

# 太魯閣國家公園山椒魚棲地調查與族群遺傳結構研究

受委託單位：國立臺灣大學

研究主持人：朱有田

太魯閣國家公園委託辦理報告

中華民國108年12月

(本報告內容及建議，純屬研究小組意見，不代表本機關意見)



# 太魯閣國家公園山椒魚棲地調查與族群遺傳結構研究

受委託單位：國立臺灣大學

研究主持人：朱有田

研究期程：中華民國 107 年 3 月至 108 年 12 月

研究經費：新臺幣 178.8 萬元

研究員：鄭勝文、林祐竹、游佩儒、孫沛煒、伍思聰、

陳以琳、彭筠文、康主霖、張芳綸、賴薇因

太魯閣國家公園委託辦理報告

中華民國108年12月

(本報告內容及建議，純屬研究小組意見，不代表本機關意見)



## 目錄

圖次	III
表次	V
摘要	VII
第一章 前言	1
第二章 材料與方法	11
第一節 研究地區	11
第二節 研究方法	11
第三章 結果與討論	17
一、太魯閣國家公園內山椒魚調查、粒線體遺傳結構分析與分析過去歷史族群動態變化	17
二、收集與分析太魯閣國家公園內臺灣、楚南氏與南湖山椒魚棲地溫度濕度光照與水質等環境因子資料與偏好	34
三、建立臺灣、楚南氏與南湖山椒魚生理資料	57
四、分析太魯閣國家公園內山椒魚是否有蛙壺菌感染	60
五、分析臺灣、楚南氏與南湖山椒魚骨骼型態資料	66
六、估算出合歡山、南湖山區山椒魚數量	73
第四章 結論	79
第五章 建議事項	81
附件一 臺灣山椒魚棲地微環境（水質與土壤）資料的收集與檢測流程	83
附件二 山椒魚生理監測標準流程	87
附件三 山椒魚微電腦斷層掃描造影標準流程	91
附件四 山椒魚全身骨骼	95
附件五 解剖學名詞縮寫與全名	99
附件六 細部計畫書通過通知函	101
附件七 評選會議紀錄	103
附件八 第 2 次審查會議紀錄	109
附件九 第 2 次審查意見回覆	117
附件十 第 3 次審查會議紀錄	121
附件十一 第 3 次審查意見回覆	129
附件十二 第 4 次審查會議紀錄	133
附件十三 第 4 次審查意見回覆	141
附件十四 第 5 次審查會議紀錄	145

附件十五	第 5 次審查意見回覆	153
附件十六	SWAB 樣本委送家畜衛生試驗所檢測結果	156
參考文獻		158

## 圖次

圖一、臺灣產山椒魚的分布	5
圖二、園區兩個不同種山椒魚棲地鄰域分布的區域	5
圖三、臺灣產山椒魚最大似然法 (Maximum Likelihood) 親緣關係樹	7
圖四、太魯閣國家公園境內山椒魚族群分布	21
圖五、白姑大山的個體、南湖山區南湖山椒魚、臺灣山椒魚與楚南氏山椒魚比較 吻肛長 (前 30% 個體)	22
圖六、合歡山 820 林道的山椒魚	22
圖七、臺灣產山椒魚之粒線體細胞色素 <i>b</i> 基因核苷酸全長序列 (1,141 bps) 親緣 關係樹	27
圖八、南湖山椒魚、臺灣山椒魚與楚南氏山椒魚粒線體 <i>Cytochrome b</i> 序列之貝葉 氏天際線圖 (Bayesian skyline plot)	29
圖九、以粒線體 <i>cytochrome b</i> 序列估算楚南氏山椒魚、南湖山椒魚及臺灣山椒魚 演化分歧時間	33
圖十、以粒線體 <i>cytochrome b</i> 序列估算楚南氏山椒魚、南湖山椒魚及臺灣山椒魚 演化分歧時間 (95% 信賴區間)	33
圖十一、中央尖溪源頭、支流、香菇寮與南湖圈谷 HOBO 記錄器樣點分布與山 椒魚分布套疊圖	36
圖十二、武嶺 HOBO 記錄器樣點與山椒魚分布套疊圖	36
圖十三、合歡山 HOBO 記錄器樣點分布與山椒魚分布套疊圖	37
圖十四、中央尖溪源頭樣點每月均溫、最高溫與最低溫折線圖	39
圖十五、中央尖溪源頭樣點每月相對濕度、光照強度變化折線圖	39
圖十六、中央尖溪支流樣點月均溫、最高及最低溫折線圖	40
圖十七、中央尖溪支流樣點每月相對濕度變化折線圖	41
圖十八、香菇寮樣點月均溫、月最高溫、月最低溫及光照強度變化折線圖	41

圖十九、香菇寮樣點相對濕度及光照強度變化折線圖	42
圖二十、南湖圈谷樣點月均溫、最高及最低溫折線圖	43
圖二十一、南湖圈谷樣點相對濕度、光照強度折線圖	43
圖二十二、武嶺樣點溫度折線圖	44
圖二十三、武嶺樣點相對濕度、光照強度折線圖	44
圖二十四、820 林道山椒魚發現頻度高熱點、發現頻度低非熱點月溫變化（2018 年 3 月至 2019 年 4 月）、山椒魚調查量與降雨量	49
圖二十五、820 林道山椒魚分布熱點與非熱點相對濕度折線圖	50
圖二十六、820 林道山椒魚發現頻度高（實心圓形）與低（白色圓形）的點位月平均光照強度折線圖	51
圖二十七、南湖山屋周圍土壤樣本採集地點	56
圖二十八、不同複本數 (copy number) 的正控制組 DNA 經 Bd18SF1 與 Bd28SR1 引子擴增後之瓊脂電泳膠圖	63
圖二十九、以 Bd18SF1、Bd28SR1 擴增蛙壺菌 18S、5.8S 與 28S 核糖體 RNA 基因序列片段	64
圖三十、以引子 Bd1a 及 Bd2a 擴增蛙壺菌 5.8S 核糖體 RNA 基因序列	64
圖三十一、經巢式 PCR 反應後的擴增片段定序結果	65
圖三十二、三種山椒魚的頭骨型態	71
圖三十三、觀霧山椒魚的中軸骨側面圖	71
圖三十四、山椒魚的右前肢 (in dorsal view)	72
圖三十五、不同山椒魚的左後肢 dorsal view	72
圖三十六、820 林道山椒魚標放情形	75

## 表次

表一、太魯閣地區山椒魚分布、族群與生態調查	19
表二、山椒魚遺傳樣本採集地與河川流域對照表	23
表三、四個臺灣產山椒魚類群中性檢測	31
表四、四個臺灣產山椒魚類群單倍型多樣性 (Hd) 及核苷酸多樣性 ( $\pi$ )	31
表五、HOBO 記錄器設置地點與分布的山椒魚種類對照	35
表六、820 林道山椒魚發現頻度高的熱點與發現頻度低的點位相對濕度、光照強度比較	47
表七、820 林道山椒魚發現頻度高的熱點與發現頻度低的點位溫度比較	48
表八、熱點/非熱點為應變量，環境因子為自變量的多變量線性迴歸結果	48
表九、熱點/非熱點為應變量，光照強度為自變量的線性迴歸結果	48
表十、南湖中央尖山區水體成分檢測	54
表十一、南湖山屋周圍土壤樣本成分檢測	55
表十二、體表溫度與心跳頻率等生理資料平均值	59
表十三、麻醉前體表溫度與麻醉前心跳頻率的線性迴歸結果	59
表十四、山椒魚麻醉後體表溫度與麻醉後心跳頻率之線性迴歸分析結果	59
表十五、太魯閣國家公園區內山椒魚表皮拭子蛙壺菌 DNA 檢測情形(物種別)	62
表十六、太魯閣國家公園區內山椒魚表皮拭子蛙壺菌 DNA 檢測情形(地區別)	62
表十七、臺灣五種山椒魚的中軸骨數量差異	70
表十八、臺灣五種山椒魚的前肢掌骨數量以及指式差異	70
表十九、五種山椒魚的 mesopodial elements number 以及後腳趾式 (hind phalangeal formula) 差異	70
表二十、使用 MARK 考慮不同參數模型之族群估算式選擇結果 (820 林道)	76
表二十一、以 Jolly-Seber model 估算 106 至 108 年 820 林道樣線的山椒魚數量	76
表二十二、使用 MARK 考慮不同參數模型族群估算式選擇結果 (南湖山區)	77

表二十三、以 Jolly-Seber model 估算 106 至 108 年 8 個調查季南湖山區的山椒魚  
族群大小 . . . . . 77

## 摘要

臺灣冰河孑遺山椒魚，對於氣候動盪極為敏感，因其活動範圍小，是適合作為研究氣候動盪、親緣地理與物種演化的極佳模式。太魯閣國家公園屬於高山型國家公園，分布有臺灣山椒魚、南湖山椒魚與楚南氏山椒魚，是山椒魚種類多樣性最高的國家公園。研究太魯閣國家公園的山椒魚遺傳結構與棲地分布間的關係可以提供臺灣的山椒魚如何適應過去的氣候動盪與陡峭地形之資訊。因此有必要對太魯閣國家公園內山椒魚棲地與物種分布做更廣泛的調查，深入收集與分析。過去研究尚無針對太魯閣國家公園內的山椒魚進行親緣地理的遺傳分析與不同種山椒魚的骨骼形質分析，亦無山椒魚棲地的水質、溫度、濕度與光照數據、山椒魚呼吸與心跳頻律等與緊迫相關生理資料。本研究的目的是完成上述問題的調查研究，亦進行危害兩棲生物甚巨的蛙壺菌 (*Batrachochytrium dendrobatidis*) 保育醫學監測。其中 820 林道為台灣少有之三種山椒魚鄰域分布之棲地，因此建議沿線欲施作工程前需先經過長期調查及評估，以保存棲地及監測山椒魚族群狀況。本研究計畫：(一) 完成大甲溪、大肚溪、濁水溪、南湖溪及木瓜溪等溪流上游的山椒魚棲地與分布調查。於畢祿山 820 林道調查到與南湖中央尖山的南湖山椒魚同一細胞色素 *b* (*cytochrome b*) DNA 單套型類群的南湖山椒魚。顯示合歡山地區 820 林道同時分布三種特有種山椒魚。分析過去歷史族群動態變化，南湖山椒魚約在距今 10,000 年前開始歷經族群擴張，到近代族群成長趨緩、縮減，有效族群量較臺灣山椒魚與楚南氏山椒魚低。臺灣山椒魚與楚南氏山椒魚過去的有效族群呈現穩定的狀態，距今 25,000 年有效族群大小呈現下降趨勢。園區內南湖山椒魚、楚南氏山椒魚與臺灣山椒魚的粒線體 *cytochrome b* 還擁有高的單倍型多樣性 ( $> 0.5$ )。這三種山椒魚只有南湖山椒魚核苷酸多樣性偏低 ( $< 0.5\%$ )。以 *cytochrome b* 遺傳距離估分歧時間，臺灣山椒魚與其他的遺傳類群約在 367.5 萬年前分歧 (95%信賴區間：117 萬年前至 702 萬年前)；南湖山椒魚與楚南氏、阿里山類群的分歧時間約在距今 276.8 萬年前 (95%信賴區間：35 萬年前至 607 萬年

前)；楚南氏山椒魚約在距今 106 萬年前與阿里山山椒魚分歧 (95%信賴區間：現今至 277.6 萬年前)。(二) 收集與分析太魯閣國家公園內臺灣、楚南氏與南湖山椒魚棲地溫度、濕度、光照與水質等環境因子資料與偏好，累計紀錄期間 2018 年 3 月至 2019 年 3 月。依目前研究數據，合歡山 820 林道調查到山椒魚個體數高峰約在約 5~9 月，亦即融雪後溫度上升後至溫度變動幅度趨緩的 7~8 月，9 月後氣溫下降，被調查到的山椒魚數量也接著下降。經由微棲地的地表大氣溫度、濕度與光照強度差異以多變量迴歸分析，結果顯示 820 樣線內山椒魚較活躍與較不活躍樣點的差異，與溫度、濕度與光照強度關聯性較小。猜測微棲地的地表大氣溫度、濕度與光照強度並不是決定山椒魚在地表被調查到的主要因素。另棲地土壤與水質亦符合標準。(三) 分析楚南氏山椒魚、臺灣山椒魚及南湖山椒魚的體溫及心跳資料。結果顯示，自然環境下南湖山椒魚的體溫為  $11.5 \pm 1.30^{\circ}\text{C}$ ；臺灣山椒魚為  $8.99 \pm 2.63^{\circ}\text{C}$ ；楚南氏山椒魚為  $8.20 \pm 1.97^{\circ}\text{C}$ 。南湖山椒魚麻醉前心跳  $63.43 \pm 12.42$  次/分；臺灣山椒魚麻醉前心跳  $56.63 \pm 6.92$  次/分；楚南氏山椒魚麻醉前心跳  $54.67 \pm 8.19$  次/分。t-test 分析顯示南湖山椒魚與楚南氏山椒魚在麻醉前後的體溫有顯著差異。三種山椒魚麻醉前後的心跳頻率皆有下降趨勢，但僅臺灣山椒魚有顯著差異。南湖山椒魚麻醉後的溫度與心跳，皆較楚南氏山椒魚與臺灣山椒魚為高。(四)完成太魯閣國家公園園區內野生山椒魚皮膚拭子樣本分析，共 105 份樣本進行蛙壺菌 18S、28S 核糖體 RNA 的 DNA 片段 PCR 檢測，結果皆呈現陰性。判斷園區內的野生山椒魚並未受蛙壺菌感染。(五) 完成活體山椒魚的電腦斷層掃描，分析臺灣、楚南氏與南湖山椒魚骨骼形態資料，楚南氏山椒魚與南湖山椒魚頭部皆具型態相似的犁骨 (vomer bones) 形態，但腮骨 (branchial skeleton) 型態不同。並對不同種山椒魚的硬骨型態及頭骨骨骼之間的開孔程度差異進行了初步描述，三種山椒魚間在中軸骨數目與後腳趾式 (hind phalangeal formula) 亦有差異。(六) 估算合歡山 820 林道、南湖中央尖山區山椒魚數量，2017 年至 2019 年 4 月在合歡山 820 林道共標放 199 隻山椒魚；南湖中央尖山區標放 97 隻山椒魚。利用 MARK 軟體估計 107 年 820 林道兩旁 (寬 2-5 公尺，長

約 7.3 公里) 族群約為 385 隻 (95% 信賴區間約為 276 至 537 隻), 南湖山區 (包含南湖圈谷及中央尖溪) 約 180 隻山椒魚 (95% 信賴區間約為 88 至 368 隻)。本調查研究案, 提供太魯閣國家公園園區內較完整的山椒魚的分布、遺傳地理分群概況與族群數量估算。研究亦發現南湖山椒魚的分布範圍可能涵蓋南湖中央尖、無明山、鈴鳴山與碧祿山。在遺傳分析上, 更發現白姑大山有一獨特的山椒魚族群與南湖中央尖的山湖山椒魚親緣關係最近, 但分類地位尚待更多資料確定。本調查研究亦建立臺灣山椒魚、楚南氏山椒魚與南湖山椒魚的骨骼形態、麻醉前後心跳與體溫的基礎生理資料與蛙壺菌監測方法。唯, 影響太魯閣國家公園內山椒魚被調查到頻度之微棲地因子尚需進一步研究。

關鍵字：臺灣山椒魚、楚南氏山椒魚、南湖山椒魚、太魯閣國家公園



## 第一章 前言

### 一、臺灣是研究氣候動盪與地形交互作用形塑生物遺傳結構良好地點

面對氣候動盪 (climate oscillation) 時，物種會遷徙至適合棲地，這樣的動態遷徙特別明顯地發生在棲息於地形陡峭 (steep elevation gradient) 的高海拔物種。面對氣候暖化或間冰期時，退居隔離在高海拔山區產生遺傳分化，而後在再次的冰期，這些高海拔物種擴展至低海拔再次與其他物種接觸，甚至雜交，這樣的例子普遍發生在高山植物或高山動物 (Morueta-Holme *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2016; Stewart *et al.*, 2016)。臺灣雖身處亞熱帶，但屬高山島嶼，海拔 3,000 公尺以上的高山更達 268 座以上，垂直的海拔造就不同氣候帶，孕育多樣的植群與動物相。在動物地理學 (zoogeography)，陡峭山脈往往形成族群遺傳交流的障礙，進而產生動物遺傳分化，因此臺灣適合探討生物的遺傳結構如何受到山脈地形與氣候動盪的交互影響。反過來，研究特定動物的親緣地理、遺傳結構、族群變動歷史與基因交流，可以追溯過去的氣候動盪與地形的交互作用。

在 1960 年代後，當 DNA 與蛋白質序列的多態性被作為研究遺傳演化應用的分子標記後，物種的遺傳結構研究數量大為增加 (Avice, 1974; Aris-Brosou and Rodrigue, 2019)。後來地理資訊的數位化與設備精進，科學家將遺傳親緣研究資料與其地理分布資訊套疊，分析遺傳分歧形式與地理分布的關係 (Hare, 2001; Zhang and Hewitt, 2003)。大量數據運算的進步與比較分析軟體開發，開啟了比較親緣地理學 (comparative phylogeography) (Bermingham and Moritz, 1998; Avice, 2000)。近年來，結合比較親緣地理學、共祖理論推論過去族群歷史數量變動與分子時鐘運算軟體的推論，可獲得冰河時期避難所 (refugium) 的位置，以及回暖期時可能的再拓殖 (recolonization) 路徑等等演化歷史 (evolutionary history) 資訊 (Schneider *et al.*, 1998; Riddle *et al.*, 2001)。過去十年來對於臺灣生物的親緣地理學研究數量增加很多，以脊椎動物為例，有哺乳類的赤腹松鼠 (*Callosciurus erythraeus*) (Oshida *et al.*, 2006)；兩生類的梭德氏蛙 (*Rana sauteri*) (陳, 1994)、

莫氏樹蛙 (*Rhacophorus moletrechti*) (葉, 1997)、澤蛙 (*Rana limnocharis*) (Toda *et al.*, 1998) 及拉都希氏蛙 (*Sylvirana latouchii*) (Jang-Liaw *et al.*, 2008)、褐樹蛙 (*Buergeria robusta*) (Lin *et al.*, 2012)；爬蟲類的斯文豪氏攀蜥 (*Japalura swinhonis*) (劉, 1994)、淡水魚類的高體鱒魚 (*Rhodeus ocellatus*)、革條副鱒 (*Tanakia himantegus*)、羅漢魚 (*Pseudorasbora parva*)、菊池氏細鯽 (*Aphyocypris kikuchii*) (Lin *et al.*, 2008)、何氏棘魮 (*Spinibarbus hollandi*) 與臺灣白甲魚 (*Onychostoma barbatulus*) (繁, 2001)。這些研究多以廣泛分布於臺灣全島的物種作為模式生物，探討中央山脈如何造成生物在臺灣東西部的分化。

至於臺灣高海拔的生物，尤其是動物如何受到氣候與山脈阻隔而影響遺傳結構的研究仍是相當缺乏，如脊椎動物中臺灣蜓蜥 (*Sphenomorphus taiwanensis*) (郭, 2002) 及短尾鮑 (*Anourosorex squamipes*) (袁, 2003)。但這些物種只在臺灣只有到亞種分群，不似臺灣產山椒魚在臺灣就有五個特有種。

## 二、冰河子遺生物—山椒魚適合作為研究氣候動盪與高山地形交互作用影響遺傳結構的物種

有尾兩棲類 (Caudata) 提供了檢測生物地理障礙對生物的影響一個很好的系統，其理由如下：(1) 為古老的類群，例如在北美洲已經存在了 4,000 萬年；(2) 他們定棲性很強，其活動範圍是脊椎動物中已知最小的 (小於 10 m)；(3) 某些種類分布非常侷限，對於找出特有性區域是非常有價值；而一些種類的地理分布則非常廣，提供檢驗大範圍地理區域的生物地理親緣故事。如 Martinez-Solano *et al.* (2007) 以蜥尾螈 (*Batrachoseps attenuates*) 來探討北美洲西部生物分布的主要障礙。

2016 年，Matsunami *et al.* 團隊提出小鮭屬山椒魚 (*Hynobius*) 符合上述條件，因為其擴散速度緩慢，限制基因交流能力。Pereira *et al.* (2016) 利用能適應歐洲高緯度的 fire salamander 作為動物模式，探討冰期與間冰期氣候變遷與陡峭高山造就間冰期不同 fire salamander 族群被隔離在高海拔山頂而遺傳分化，而在間

冰期期間不同族群再次擴張接觸、進而雜交增加基因多樣性與環境適應力，成為演化適應一個特殊的例子。至於，臺灣產山椒魚是否也會採類似的演化模式去適應高山地形與氣候，值得研究探討。

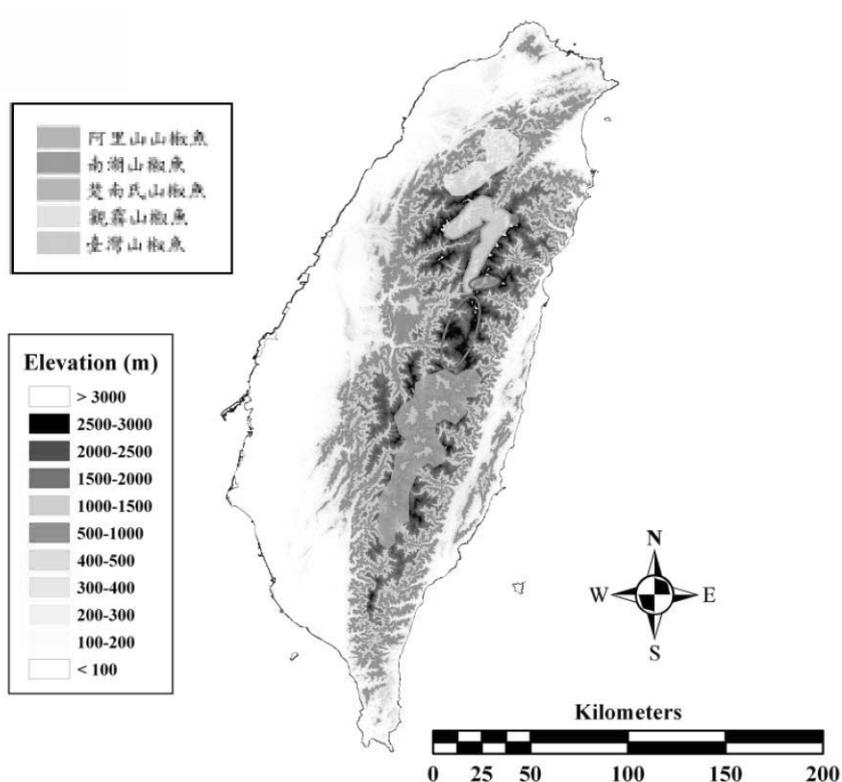
臺灣的山椒魚分布在較高海拔山區，受到其本身對低溫與潮溼森林環境的需求，加以其有限的行動能力，往往山脈之間較低海拔的地區成其分布的障礙。臺灣的山椒魚大致符合前段的特徵，特別是悠久演化歷史及極度的低活動性（賴和呂，2007），預期山椒魚的粒線體 DNA 與核 DNA 變異的形式可以反應他們居住地理區域的複雜氣候動盪與高山地形交互作用事件。藉由對臺灣不同的山椒魚族群遺傳結構的瞭解有助於解析此種現象。

### 三、臺灣產山椒魚的遺傳分類、分布與棲地界限

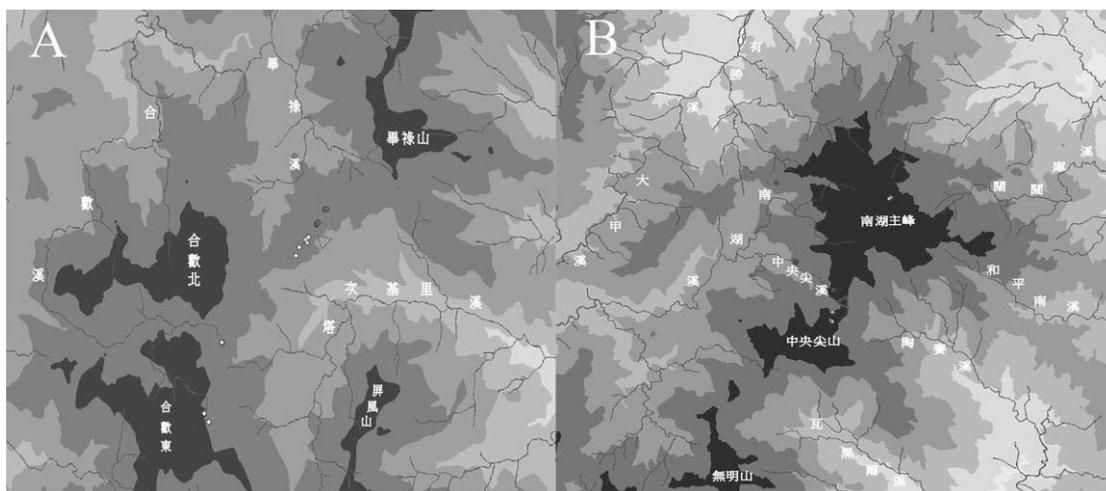
山椒魚又稱為小鯢，為兩生綱(Amphibia)有尾目(Caudata)小鯢科(Hynobiidae)中的小鯢屬。這個屬目前有 31 種山椒魚，在世界上的分布包括中國中部（貴州、湖南、福建、浙江等省）、東北亞（中國東北、韓國及日本）及臺灣，臺灣是其分布的最南界。山椒魚在生理上無法適應較高的溫度，其繁殖季介於冬天與春天之際；利用雪融的積水當繁殖的場所，因此小鯢屬大部分分布在溫帶地區，而亞熱帶的臺灣是牠分布的最南界。推測臺灣的山椒魚於某個冰河期時播遷到臺灣，當冰河退卻後，因為臺灣高山的溫帶氣候將牠們保留下來。而關於牠們的種類多樣性，Lai and Lue（2008）的研究中已確認臺灣共有 5 種山椒魚，分別是觀霧山椒魚(*Hynobius fuca*)、臺灣山椒魚(*H. formosanus*)、楚南氏山椒魚(*H. sonani*)、南湖山椒魚(*H. glacialis*)與阿里山山椒魚(*H. arisanensis*)。觀霧山椒魚棲地分布在雪山山脈的西北地區至北橫，其分布海拔在 1,300 至 2,300 公尺(呂與賴,2010)；預備研究顯示臺灣山椒魚在臺灣的分布較廣，包括了中央山脈能高安東軍以北至南湖中央尖及雪山山脈，然而每個地點的族群量不多，且族群之間在體色與斑紋上呈現極大的變異，其分布海拔在 2,300 至 2,900 公尺(李等,2016)。楚南氏山椒魚僅分布在合歡山、奇萊山、奇萊東稜與能高北部南華山一帶，其分布海拔在

2,600 至 3,100 公尺。而南湖山椒魚僅在南湖大山與中央尖山發現，其分布海拔在 3,200 至 3,400 公尺（李等，2016）。阿里山山椒魚則分布在中央山脈丹大山以南海拔 1,800 公尺至 3,600 公尺的山區（李等，2016）。結合呂光洋老師與賴俊祥老師與我們過去的研究，臺灣五種的山椒魚分布如圖一。

團隊在 2016 年執行太魯閣國家公園委託案「**太魯閣國家公園保育類物種監測調查計畫**」發現，在畢祿大禹嶺調查到楚南氏山椒魚與臺灣山椒魚兩種，其中楚南氏山椒魚分布在較高海拔，臺灣山椒魚則分布在相對較低海拔。在畢祿大禹嶺（合歡溪水系上游支流）中兩種山椒魚有鄰域的現象，是否有共域情形需要更進一步的研究（圖二 A）。另外，臺灣山椒魚分布在中央尖溪海拔 2,500 公尺以下的地點，如舊雲稜山莊水源、中央尖溪及香菇寮，而海拔 2,700 公尺以上的地點則只觀察到南湖山椒魚。這結果顯示臺灣山椒魚與南湖山椒魚為鄰域分布，棲地分別位於中央尖溪較低海拔與較高海拔的流域（圖二 B）。



圖一、2018 年之前調查到的臺灣不同種山椒魚的分布。淺黃綠色區塊為觀霧山椒魚、粉紅色區塊為臺灣山椒魚、紅色區塊為南湖山椒魚、淺紫色區塊為楚南氏山椒魚、咖啡色區塊為阿里山山椒魚、紅色空心橢圓表示還未調查地區。



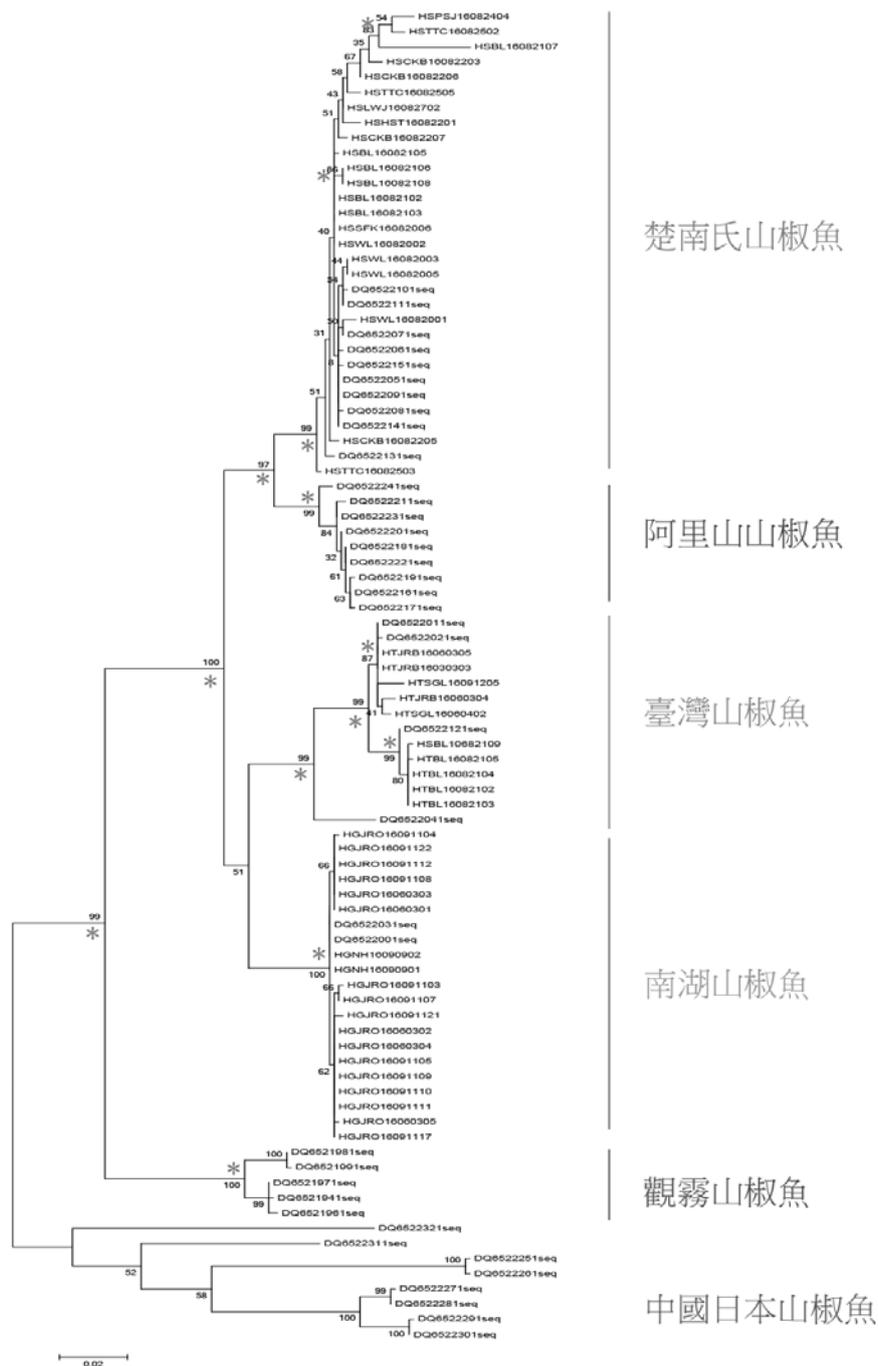
圖二、園區不同種山椒魚棲地鄰域分布的區域。A、合歡山與大禹嶺樣區山椒魚分布狀況。藍色線表溪流；黃色圓點表示調查到之楚南氏山椒魚點位；紅色圓點表示調查到之臺灣山椒魚點位。B、南湖中央尖山椒魚分布狀況。藍色線表溪流；綠色圓點表示調查到之南湖山椒魚點位；紅色圓點表示調查到之臺灣山椒魚點位。綠色三角形符號為兩種不同山椒魚棲地鄰域的地帶。

#### 四、臺灣產山椒魚的分子遺傳學研究現況

預備試驗共獲得 22 隻楚南氏山椒魚的全長 *cytochrome b* 粒線體序列 (1141 bp)、10 隻臺灣山椒魚的全長 *cytochrome b* 粒線體序列與 19 隻南湖山椒魚的全長 *cytochrome b* 粒線體序列。再從 NCBI 網站下載賴俊祥老師 2008 年所發表的山椒魚 *cytochrome b* 部分序列 (784 bp)，包括觀霧山椒魚序列 5 條、南湖山椒魚序列 2 條、臺灣山椒魚序列 4 條、楚南氏山椒魚序列 10 條與阿里山山椒魚序列 9 條。另外亦下載東北小鯢 (*hynobius leechii*)、中國小鯢 (*hynobius chinensis*)、*hynobius nebulosus* 與安吉小鯢 (*hynobius amjiensis*) 的 *cytochrome b* 部分序列 (784 bp) 作為外群。經過軟體裁切成 784 bp 後，進行最大似然法 (Maximum Likelihood) 親緣關係樹分析 (圖三)。結果顯示臺灣產山椒魚可明顯被分成五群，分別為觀霧山椒魚、楚南氏山椒魚、阿里山山椒魚、臺灣山椒魚與南湖山椒魚。其中，觀霧山椒魚被獨立分成一獨立類群，而楚南氏山椒魚、阿里山山椒魚、臺灣山椒魚與南湖山椒魚則被分在另一大類群。這一大類群而後又被分成臺灣山椒魚及南湖山椒魚，與楚南氏山椒魚及阿里山山椒魚兩大次類群。在臺灣山椒魚的類群，又可分成大禹嶺畢祿的臺灣山椒魚與中央尖溪兩個次類群，其 bootstrap 值分別為 99% 與 87%。很有趣的，中央尖溪與南湖山屋的南湖山椒魚也明顯地分成兩群，顯示這兩樣區間的基因交流並不順暢。

#### 五、臺灣的山椒魚棲地與生理適應

建立山椒魚的生理資料，如與緊迫 (stress) 與健康有關的心跳與呼吸數據，有助於未來山椒魚的健康監測與未來生物學研究。另外，微棲地的光照、溫度與濕度的差異，顯著影響有尾兩棲動物的生理、生長、發育與繁殖 (Kukita *et al.*, 2015)。研究山椒魚棲地的環境因子與山椒魚的生理資料的交互作用，可以瞭解山椒魚在不同季節、不同發育時期與繁殖需求時的合適棲地條件 (Peterman and Semlitsch, 2013)。而不同棲地因子，如溫度與光照會直接影響有尾兩棲動物的心跳、體溫等等生理條件 (Catenazzi, 2016)。過去未曾對臺灣的山椒魚進行生理形質測量與記錄。



圖三、臺灣產山椒魚最大似然法(Maximum Likelihood)親緣關係樹。\*表 bootstrap 值高於 90%。

## 六、疾病監測

蛙壺菌病 (chytridiomycosis) 是由蛙壺菌 (*Batrachochytrium dendrobatidis*, 簡稱 Bd) 所感染而導致的疾病。這疾病是在 1997 被發現, 但 2015 年已有 42% 的兩棲類物種被發現有感染, 嚴重影響兩棲物動物的生存 (Zhu *et al.*, 2014)。蛙壺菌屬真菌 (fungus), 被寄生的兩棲類動物的腹部、後腿兩側皮膚會潮紅、腹部膨大。蛙壺菌對變態後敏感 (postmetamorphic susceptible) 兩棲類動物, 蛙壺菌首先感染上皮細胞, 造成角質化過度、電解質與滲透壓不平衡 (hyperkeratosis, electrolyte and osmotic imbalances), 導致死亡 (Zhu *et al.*, 2014)。溫度是影響蛙壺菌的重要因子, 它生活的最適溫度為 4- 25°C, 溫度高於 30°C 或低於 4°C 皆可導致蛙壺菌死亡 (Bradley *et al.*, 2017)。臺灣的山椒魚棲地適合蛙壺菌生存。根據特生中心林春富研究員的標本檢測, 1994 年及 2003 年的臺灣山椒魚 (*Hynobius formosanus*) 標本, 以及 2001 年的阿里山山椒魚 (*Hynobius arisanensis*) 標本皆有檢測出蛙壺菌。但過去至今, 並沒有對臺灣的野外山椒魚進行過蛙壺菌的監測。因此, 野外山椒魚的蛙壺菌檢測實有必要。

## 七、計畫工作項目

本研究計畫第一年目標：

- 一、分析合歡溪、南湖溪、濁水溪、大肚溪與塔次基里溪山椒魚的粒線體 *cytochrome b* 基因序列
- 二、收集太魯閣國家公園內臺灣、楚南氏與南湖山椒魚棲地溫度、濕度、光照與水質等環境因子資料
- 三、建立山椒魚生理監測方法
- 四、建立蛙壺菌檢測方法
- 五、建立山椒魚微電腦斷層掃描造影標準流程
- 六、進行合歡山區與南湖山區山椒魚的螢光標記標放

第二年目標：

- 一、太魯閣國家公園內山椒魚粒線體遺傳結構與分析過去族群動態變化
- 二、收集與分析太魯閣國家公園內臺灣、楚南氏與南湖山椒魚棲地溫度、濕度、光照與水質等環境因子資料與偏好
- 三、建立臺灣、楚南氏與南湖山椒魚生理資料
- 四、分析太魯閣國家公園內山椒魚是否有蛙壺菌感染
- 五、分析臺灣、楚南氏與南湖山椒魚骨骼形態資料
- 六、估算出合歡山、南湖山區山椒魚數量



## 第二章 材料與方法

### 第一節 研究地區

太魯閣國家公園位於花蓮、臺中及南投三縣市境內，其範圍以立霧河流域、中部東西橫貫公路沿線及其外圍山區為主，面積共約 92,000 公頃。高海拔地區植物相以高山針葉林、玉山箭竹矮灌叢等類群為主，林線以上具有大面積的高山草原，中海拔地區植物相極為豐富，以闊葉林及針闊葉混淆林為主（楊遠波及徐國士 2004）。本計畫的目的之一是調查與分析合歡溪、南湖溪、濁水溪、大肚溪與塔次基里溪山椒魚的分布與利用粒線體 *cytochrome b* 基因序列進行遺傳親緣關係分析，最後分析不同山椒魚的地理分布與遺傳分化的關係。研究範圍包括南湖山區、合歡山區河流源頭與中海拔山區、能高山以北之山椒魚。南湖山區位於中央山脈主稜，年均溫為 7.7 °C，冬季一、二月間溫度常在 0 °C 以下，年雨量在 2,000 mm 以上，夏季多雨，冬季較乾，可能積雪。

### 第二節 研究方法

#### 一、太魯閣國家公園合歡山區與南湖山區山椒魚的螢光標放

1. 進行南湖中央尖溪與820林道兩個樣區山椒魚的可見螢光埋植彈性標記（visible implant elastomer tags, VIE）標識。尋獲山椒魚時先以pH 7.0之MS-222（Tricaine Methanesulfonate）麻醉，MS-222可以維持30分鐘無痛覺反射。劑量為0.2-0.5 g/L於幼期（larvae stage），0.8-1 g/L於成體，麻醉誘導時間低於5分鐘，成體依照前述劑量可維持麻醉時間持續約25至45分鐘無翻正反射（righting-reflex）。麻醉期間進行體型量測、拍照記錄、採集表皮檢體SWAB與螢光彈性標記標識。監測頻度為每兩個月一次。
2. 監測方式如下：在樣區內以徒手方式翻開石頭或倒木，找尋山椒魚。山椒魚的體型量測包括：座標、體長、尾長、頭長、頭寬等形值，拍照記錄個體的外觀。並進行 VIE-tag 標記（mark）後釋放，記錄往後調查的再捕捉（recapture）個體，並對新捕捉到的個體進行 VIE-tag 標記。記錄的體型量

測值取南湖山區南湖山椒魚、臺灣山椒魚與楚南氏山椒魚前 30%的吻肛長進行 ANOVA 分析，比較不同山椒魚的體型差異。

3. 族群估算乃利用捉放法估算。以 MARK 軟體估算(一)合歡山 820 林道及(二)南湖山區兩地區山椒魚族群動態，採用 Jolly-Seber model (*POPAN* formulation)，比較不同參數(parameter)條件包含生存率(survival probabilities,  $\Phi$ ,  $\phi$ )、捕捉機率(probability of capture,  $p$ )，選擇最低 AICc 值的 model 估算族群大小 ( $N$ )。

## 二、收集太魯閣國家公園內臺灣、楚南氏與南湖山椒魚棲地溫度、濕度、光照與水質等環境因子資料

山椒魚棲地的溫度、濕度與光照則採用 HOBO 溫溼度記錄器與 HOBO 溫度照度記錄器記錄 (Onset®)。每 3 個小時記錄一次，每天記錄 8 個不同時間點之環境因子。計算微環境的月均溫、月最高溫與月最低溫；相對濕度的月平均值、月最高值與月最低值；月平均光照強度等環境因子。並比較合歡山 820 林道山椒魚分布熱點與非分布熱點為環境因子差異，並計算其相關性。南湖山椒魚是臺灣所有的山椒魚棲地分布範圍最小，調查到的數量亦最少。2016 年的山椒魚調查亦顯示南湖圈谷山椒魚數量比過去記錄的少。由於南湖山屋的登山遊客數量多，是否造成水質、土壤性質改變，間接影響南湖山椒魚在南湖圈谷的分布，因過去研究缺乏對南湖圈谷水質土壤化學性質的長期記錄，因此本研究進行南湖圈谷土壤與水質的化學性質檢測，建立可供未來長期追蹤環境變化的基礎資料。棲地水質利用攜帶型四合一水質檢測計 pH 值、導電度 (EC)、氧化還原度 (ORP)；濁度計 (Turbidimeter, Thermo Scientific) 分析濁度；以水中生化需氧量檢測方法檢測生化需氧量 (BOD)。土壤檢測範圍主要為南湖山屋包含鄰近公廁及水源地的土壤。將土壤樣本放入封口袋中封好保存，攜回研究室檢測項目包括：以攜帶型四合一水質檢測計 (TSI professional pH/ORP/EC) 檢測 pH；以總有機碳分析儀 (Aurora Model 1030, OI Analytical) 測總有機碳 (total organic carbon, TOC)；以離子層析儀 (DIONEX AQUION, Thermo Scientific) 分析陰離子；電感耦合電漿體光學發射光譜 (5110 ICP-OES, Agilent Technologies) 分析重金屬。

### 三、建立山椒魚生理監測標準流程

山椒魚的心跳是以都卜勒儀監測進行量測(ES-100VX MiniDoppler® Vascular Ultrasound Doppler)。山椒魚的體溫則以攜帶式的紅外線熱像儀來量測 (Testo 885-1 Thermal Imager, Testo SE & Co. KGaA)，呼吸速度則以目視量測。本研究目的在建立野外山椒魚生理基礎資料與監測標準流程，作為未來山椒魚保育的生理指標依據。

### 四、建立蛙壺菌檢測方法

山椒魚是否受到蛙壺菌的感染，我們利用巢式 PCR 反應 (nested PCR assay) (Goka *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2014)，進行蛙壺菌 18S、5.8S 與 28S ribosomal RNA 基因的 PCR 擴增。根據發表在 NCBI 資料庫之蛙壺菌菌株 JECL197 之全基因組基因序列，設計位在 18S 核糖體的順向引子 Bd18SF1 (5'-TTTGTACACACCGCC CGTCGC-3') 與位在 28S 核糖體反向引子 Bd28SR1 (5'-ATATGCTTAAGTTCAG CGGG-3')，作為巢式 PCR 反應的外圍引子 (outer pair)。而後進行 PCR 將蛙壺菌的 28S、5.8S 與 18S 核糖體的 DNA 基因序列擴增出來。利用在 ITS1 與 ITS2 序列上的第二次 PCR 擴增引子 (second pair of primers) Bd1a (5'-CAGTGTGCCAT ATGTCACG-3') 與 Bd2a (5'-CATGGTTCATATCTGTCCAG-3') 進行蛙壺菌的 5.8S 核糖體 DNA 的擴增。經 PCR 將蛙壺菌的 5.8S 核糖體的 DNA 基因序列擴增出來與否判斷感染與否。若有蛙壺菌感染，結果可在瓊脂膠體 (agarose) 電泳檢測到 PCR 的產物。

### 五、建立山椒魚微電腦斷層掃描造影標準流程

建立山椒魚微電腦斷層掃描造影標準流程所用方法，參考 Hess *et al.* (2016) 所發表的文獻。山椒魚個體採集自兩個樣區，分別是(1) 合歡山區之楚南氏山椒魚與臺灣山椒魚；(2) 南湖山區之南湖山椒魚。採集後利用 4°C 冰盒將山椒魚自棲地移至研究室低溫冰箱飼養，冰箱控制在 16°C 以下，並給予光照調控晝夜循環。掃描當日，動物以低溫保存運輸，送至「國家實驗動物中心」後(路程約 30 分鐘)，以 MS-222(0.8 mg/1L 水溶液)將山椒魚麻醉後，浸於麻醉維持液 (0.4 mg/1L MS-222 水溶液) 保持體表濕潤，維持鼻孔朝上高出水面，放到小動物電腦斷層

掃描儀 (micro-computed tomography, SKYSCAN 1076 micro-CT) 進行骨骼造影。3D 影像重建則利用軟體 CTVOX (BRUKER) 進行重建。影像建檔後，將山椒魚送回原棲地釋放。

## 六、DNA 的萃取與親緣關係樹的建立

### (一) 基因組 DNA 萃取

本計畫 107 年與 108 年所採集的尾部組織保存於 95% 酒精中，以 Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA) 套組萃取基因組 DNA，步驟如下：取 10-20 毫克組織切碎後以 500  $\mu$ L Nuclei Lysis Solution、120  $\mu$ L 0.5M EDTA (pH 8.0) (Sigma-Aldrich, USA)、17.5  $\mu$ L Proteinase K (20mg/ml) (Sigma-Aldrich, USA) 混和液於 55-60°C 作用 12-14 小時。再加入 3  $\mu$ L RNase A (4 mg/ml)，37°C 水浴作用 20 分鐘，加入 200  $\mu$ L Protein Precipitation Solution，震盪混勻後於冰上靜置 15 分鐘，以 14,000 rpm，4°C 下離心 10 分鐘。收集上清液以 Isopropanol 析出 DNA，70% 酒精清洗析出的 DNA 沉澱後晾乾，以 DNA Rehydration solution 或去離子水回溶，全波長光譜分析儀 (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific™, USA) 檢測 DNA 濃度。

### (二) 聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR) 擴增粒線體 DNA 片段

擴增山椒魚粒線體細胞色素 *b* (cytochrome *b*, CYTB) 全長序列，參考 NCBI 發表之臺灣山椒魚粒線體全長序列 (NC008084.1) 於 ND6 區域設計順向引子 HT cytb L 14014 (5'-ACAAACAGCCGCCAACACTAA-3')，tRNA-Thr 至 tRNA-Pro 區域設計反向引子 HT cytb H 15444 (5'-GAGAGGCCTGGAAGAAATGGA-3')，擴增產物長度約 1,400~1,500 bp。PCR 反應條件依 Advantage® 2 Polymerase Mix (Takara Bio, Japan) 說明書建議，以 25  $\mu$ L 反應體積，10mM Tris-HCl (pH 8.5)、50 mM KCl、2mM MgCl<sub>2</sub>、0.2  $\mu$ M dNTP、0.4 $\mu$ M 引子、DNA 模板以及 1/50 反應體積的 50X Advantage 2 Polymerase Mix 進行 PCR 反應。溫度作用條件：94°C 反應 4 分鐘，接續 94°C 反應 45 秒，61°C 反應 45 秒，68°C 反應 1 分 40 秒，重複共 32 循環，最後以 68°C 反應 10 分鐘後結束 PCR 作用。在 1.2% 瓊脂膠體/0.5X TBE

下分析反應產物。

### (三) 粒線體細胞色素 *b* 全長序列分析

反應完成的 PCR 產物利用 GenepHlow™ Gel/PCR Kit (Geneaid, Taiwan) 依照產品說明書建議步驟進行純化, 以 3730xl DNA 定序儀 (Applied Biosystems™, USA) 進行定序, 獲得的 DNA 序列經 EditSeq 軟體 (DNASTAR Inc.) 編輯, 合併重疊的序列獲得粒線體細胞色素 *b* 全長序列。編輯完成的序列使用軟體 MegAlign 7.1.0 軟體 (DNASTAR Inc.) 利用 Clustal V method 進行排序、比對, 尋找核苷酸替代位點判定單套型。

### (四) 親緣關係樹繪製

依照今年及過去所獲得的山椒魚粒線體 *cytochrome b* 全長序列 (1,141 bp), 結合過去所得阿里山山椒魚序列作為參考序列, 另以 NCBI 網站公布之東北小鮡 (*hynobius leechii*)、中國小鮡 (*hynobius chinensis*)、安吉小鮡 (*hynobius amjiensis*)、*Hynobius tokyoensis* 與 *Hynobius nebulosus* 等東亞地區及日本等地的山椒魚 *cytochrome b* 序列做為外群, 以演化分析軟體 MEGA 10.0.5 (molecular evolution genetics analysis), 選擇 General Time Reversible 核苷酸替代模型, 建構 Maximum Likelihood 法親緣關係樹。同時進行 1000 次靴帶式 (Bootstrap) 重複計算樹圖上各分支可信度 (Bootstrap value)。

### (五) 歷史族群動態

粒線體 *cytochrome b* 全長序列, 以 jModeltest 選擇最低 Akaike information criterion (AIC) value 的 HKY+G+I model 做為序列演化模型, BEAST 2.5 軟體進行 MCMC 運算, 核苷酸置換速率則參考 Weirsrock et al. (2001) 對小鮡科的估算, 設為每百萬年 1.28 % (0.0128 mutations/site/Myr), 設定  $1 \times 10^7$  世代取樣, 每 1,000 世代取樣一次, 捨棄前 10% 的取樣後, 以 TRACER 軟體繪製貝葉氏天際線點圖, 分析南湖山椒魚、楚南氏山椒魚與臺灣山椒魚的族群歷史動態。

### (六) 中性檢測與遺傳歧異度

為了解臺灣的山椒魚各類群的遺傳歧異度, 評估其是否遭受選汰或歷經族群

的擴張或縮減，首先使用 MegAlign 整理各類群的 DNA 序列資料，分別以 DnaSP 6.12.03 與 Arlequin 3.5.2.2 軟體利用 Tajima's D test 和 Fu's FS test 進行中性檢測。遺傳歧異度分析則使用 DnaSP 6.12.03 軟體計算單倍型多樣性 (Hd) 及核苷酸多樣性 ( $\pi$ ) 評估類群中的遺傳多樣性。

#### (七) 分歧時間估算

使用 MEGA 10.0.5 軟體，以 (四) 親緣關係樹繪製建構出的 Maximum Likelihood 法親緣關係樹做為原始樹圖，指定東北小鮎 (*Hynobius leechii*)、中國小鮎 (*Hynobius chinensis*)、安吉小鮎 (*hynobius amjiensis*) 與 *Hynobius nebulosus* 為外群，並參考 Chen 等以 29 個核基因估算之小鮎屬分歧時間，以 *Hynobius tokyoensis* 與其他小鮎屬成員分歧的時間 8.6 – 12.6 Myr (Chen *et al.*, 2015) 校正分子鐘。設置 Maximum Relative Rate Ratio 為 20，以 Reltime-ML method 依據親緣關係樹各分支的長度(遺傳距離)估算各遺傳類群在演化上出現分歧的可能時間。

### 第三章 結果與討論

#### 一、太魯閣國家公園內山椒魚調查、粒線體遺傳結構分析與分析過去歷史族群動態變化

##### (一)、太魯閣國家公園園區山椒魚分布、族群與生態調查

107 年度本計畫對園區內南湖中央尖山區、武嶺合歡山、820 林道等地持續進行山椒魚舊有樣區的族群調查。棲地調查更擴及到到大禹嶺、730 林道、中央尖溪支流等新的山椒魚棲地。另外，為研究臺灣山椒魚與楚南氏山椒魚的分布與親緣演化，本計畫也進行奇萊南華、能高越嶺與白姑大山舊有樣區的族群調查及新樣區尋找（表一）。在舊有樣區的族群調查，107 及 108 年度在舊雲稜山莊水源皆有調查到臺灣山椒魚，此棲地於 105 年 5 月亦曾調查到山椒魚，但 105 年 9 月則無。而在能高越嶺、大禹嶺、塔次基里溪及 730 林道亦有調查到臺灣山椒魚分布。另在 820 林道、中央尖溪支流、香菇寮在 107 及 108 年皆有調查到臺灣山椒魚。

中央尖溪源頭的南湖山椒魚新發現的棲地，於 105 年與 107 年皆有調查到南湖山椒魚分布；107 年並在中央尖溪支流找到新的南湖山椒魚樣區。結合過去的資料，中央尖溪支流，在較低海拔棲地為臺灣山椒魚，較高海拔的溪流源頭為南湖山椒魚棲地。而審馬陣草原 107、108 年依舊無調查到任何山椒魚。107 年 5 月與 9 月、108 年在白姑大山調查到共 6 隻山椒魚個體。外觀上，其後肢腳趾為 5 趾，與雪山山脈臺灣山椒魚不同。吻肛長與南湖山椒魚、楚南氏山椒魚有顯著差異（圖五）。萃取 DNA 後獲得粒線體 *cytochrome b* 基因序列，經親緣關係分析發現這些個體與太魯閣國家公園內南湖山椒魚被編派在同一類群，但基因序列有很大差異（平均 100 核苷酸有 2 個以上的差異），bootstrap 值為 99%，顯示白姑大山的山椒魚與南湖中央尖的山椒魚有顯著的遺傳分化。將其與臺灣山椒魚、楚南氏山椒魚與南湖山區南湖山椒魚取前 30% 個體的吻肛長進行 ANOVA 分析，

結果顯示此地區山椒魚的吻肛長與楚南氏山椒魚、南湖山區南湖山椒魚有顯著差異 ( $P < 0.05$ )，與臺灣山椒魚的前 30% 個體吻肛長無顯著差異。遺傳分析和形值比較的初步結果發現此類山椒魚與目前發現的幾種山椒魚有所不同，唯目前統計數量偏低，需分析更多的白姑大山山椒魚個體才能判斷是否為一新種。本計畫先以南湖賴氏山椒魚命名。

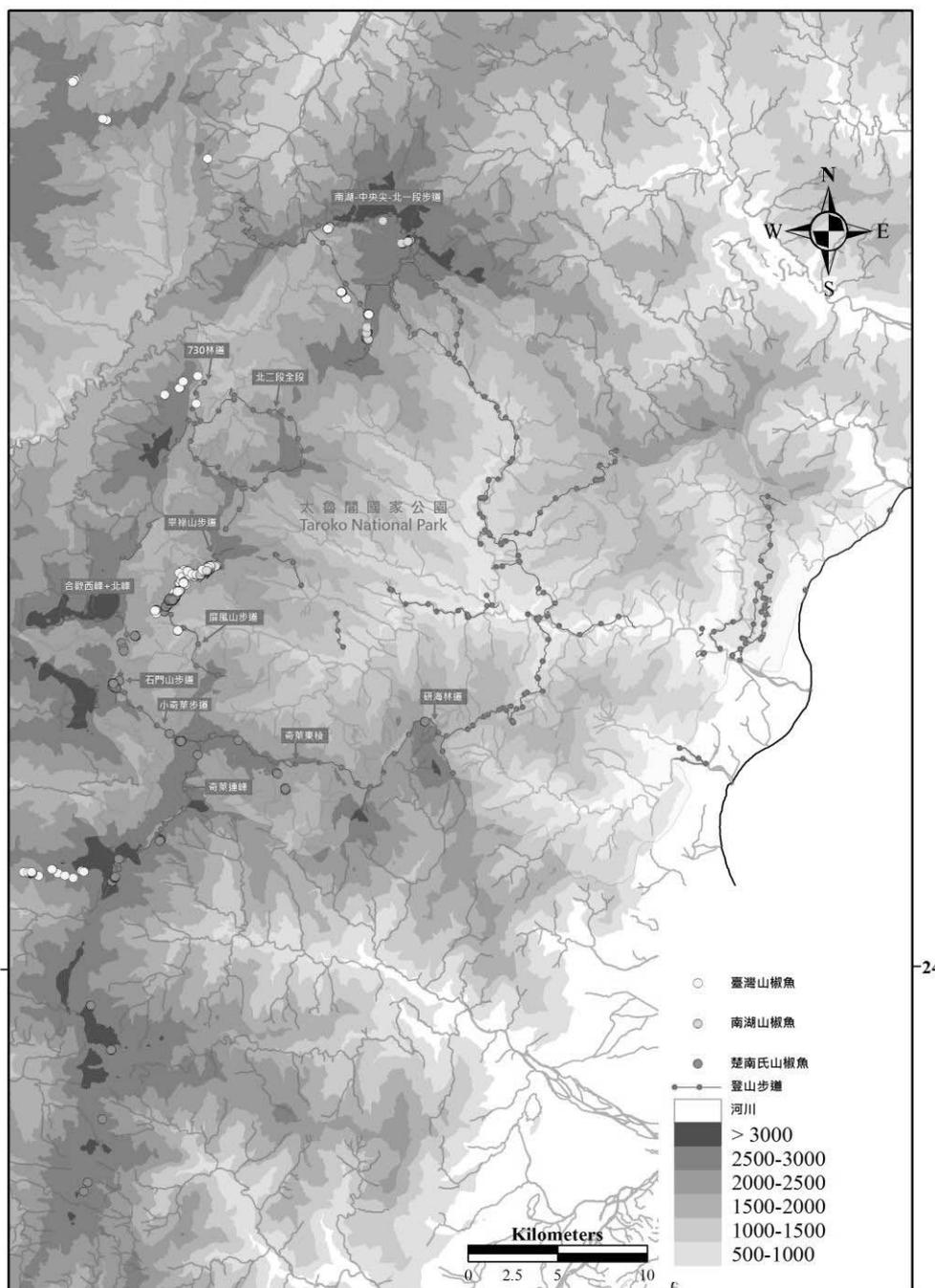
107 年度，楚南氏山椒魚的調查，結果在能高越嶺 4~10K、奇萊裡山東側的木瓜溪源頭皆調查到楚南氏山椒魚的分布。在木瓜溪源頭調查到楚南氏山椒魚，顯示楚南氏山椒魚是有能力翻越稜線，撥遷至往東出海的溪流源頭。最後，於 107 年，本研究團隊完成過去自奇萊裡山以南至能高山的山椒魚分布調查。

108 年著重在舊有樣區的持續族群監控，包含合歡山 820 林道、奇萊南華、南湖中央尖山等地區，主要集中大甲溪、大肚溪與濁水河流域。和 107 年 10 月之調查相似，108 年 3 月團隊再次於 820 林道後段調查到外表型不為典型臺灣山椒魚或楚南氏山椒魚的個體，共 8 隻（圖六）。這些個體吻肛長 6.7 公分（頭長 1.5 公分），尾長 5.3 公分，約與體長相等。體色呈現為土黃體色綴有深棕色細斑，斑紋型態似臺灣山椒魚，然其後肢皆為 5 趾符合楚南氏山椒魚的特徵，顯示這些個體不具有臺灣山椒魚與楚南氏山椒魚的典型外型特徵，僅依賴外表特徵與體型難以鑑定其物種，因此我們亦對此類山椒魚個體採集遺傳樣本進行粒線體細胞色素 *b* 基因序列的分析，敘述結果於後面章節。

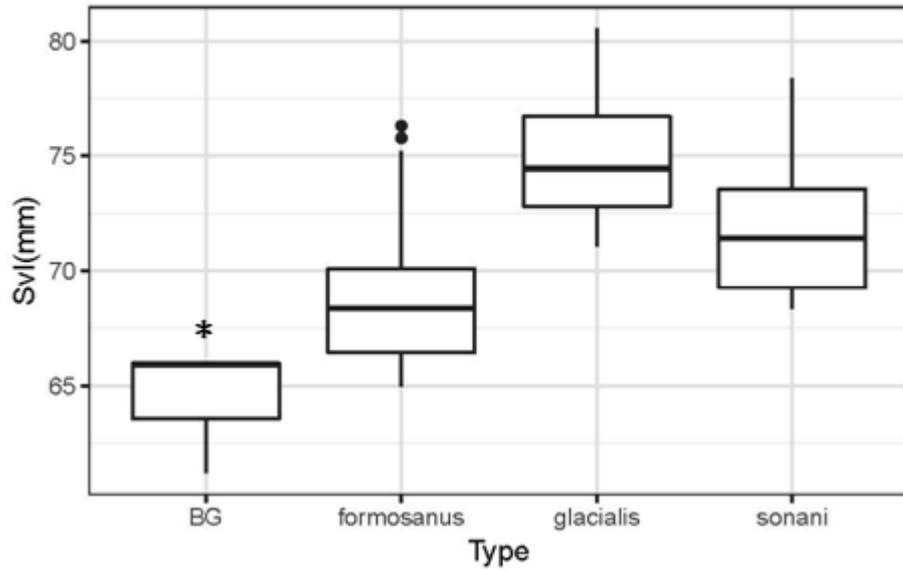
表一、太魯閣地區山椒魚分布、族群與生態調查

調查日期	調查地點	記錄、VIE-tag 標記與操作
2018/3/6 - 2018/3/7	武嶺營區 820 林道	山椒魚族群調查 (9 隻) 微棲地記錄 VIE-tag 標記 (9 隻) 溫度光度計設置
2018/4/12 - 2018/4/15	武嶺營區 820 林道 大禹嶺隧道後臺 8 線溪溝	山椒魚族群調查 (13 隻) 卵串調查 (1 個) 微棲地記錄 VIE-tag 標記 (12 隻) 溫度光度計設置
2018/4/21 - 2018/4/24	730 林道 13~19K	山椒魚族群調查 (5 隻) 微棲地記錄 VIE-tag 標記 (5 隻)
2018/5/14 - 2018/5/16	能高越嶺 4~10 K 奇萊裡山往東木瓜溪源頭	山椒魚族群調查 (21 隻) 微棲地記錄 VIE-tag 標記 (21 隻)
2018/5/31 - 2018/6/1	谷關紅香	山椒魚族群調查 (5 隻) 微棲地記錄
2018/6/8 - 2018/6/9	武嶺營區 820 林道	山椒魚族群調查 (57 隻) 微棲地記錄
2018/7/21 - 2018/7/26	舊雲稜水源 南湖山屋、南湖溪源頭 中央尖溪源頭 中央尖溪支流 香菇寮	山椒魚族群調查 (共 26 隻, 1 隻回收) VIE-tag 標記 (24 隻)
2018/8/3 - 2018/8/5	武嶺營區 820 林道	山椒魚族群調查 (共 22 隻, 3 隻回收) VIE-tag 標記 (19 隻)
2018/8/11 - 2018/8/17	審馬陣草原 南湖溪源頭 南湖圈谷下方 中央尖溪源頭、支流 香菇寮 (中央尖溪)	山椒魚族群調查 (共 16 隻, 1 隻回收) VIE-tag 標記 (15 隻) 水質、土壤測定及樣本採集 (8 個樣點)
2018/9/1 - 2018/9/4	谷關紅香	山椒魚族群調查 (共 1 隻, 1 隻回收) 水質測定及樣本採集 (2 個樣本)
2018/9/25 - 2018/9/28	谷關紅香	山椒魚族群調查 (2 隻) 水質測定 (1 個樣本)
2018/10/22 - 2018/10/25	武嶺營區 820 林道	山椒魚族群調查 (18 隻, 2 隻回收) VIE-tag 標記 (16 隻) 遺傳樣本採集 (1 個) 微環境因子資料收集

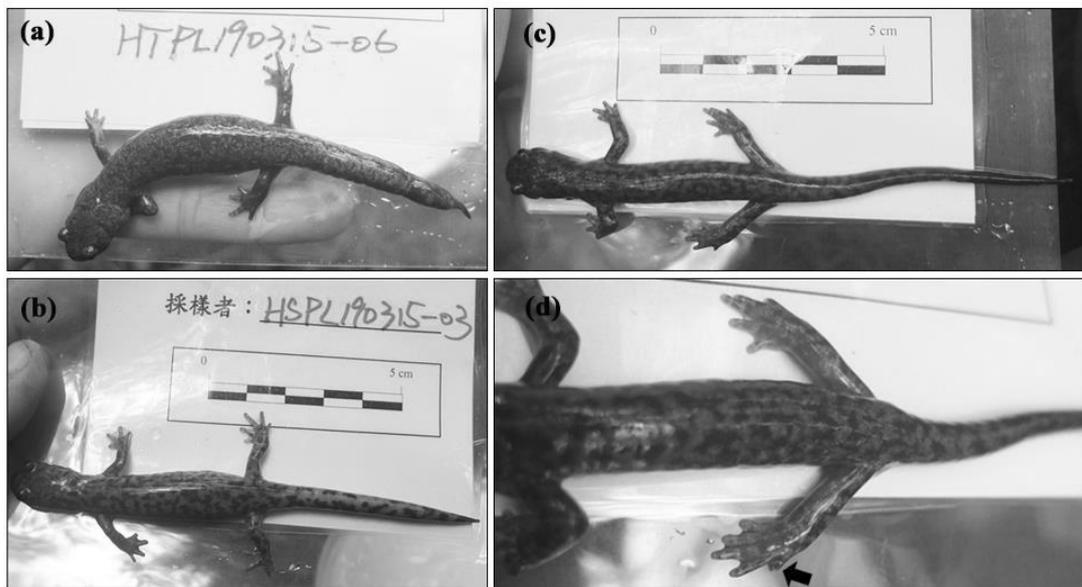
調查日期	調查地點	記錄、VIE-tag 標記與操作
2018/12/4 - 2018/12/6	武嶺營區 820 林道	山椒魚族群調查 (1 隻) 微棲地記錄 VIE-tag 標記 (1 隻) 遺傳樣本收集 微環境因子資料收集
2019/2/13 - 2019/2/16	雲海保線所 松原駐在所遺址 奇萊南峰	山椒魚族群調查 (3 隻) 微棲地記錄 VIE-tag 標記 (3 隻) 遺傳樣本收集
2019/3/14 - 2019/3/17	武嶺營區 820 林道	山椒魚族群調查 (17 隻) 微棲地記錄 VIE-tag 標記 (15 隻) 遺傳樣本收集 微環境因子資料收集
2019/4/30 - 2019/5/3	武嶺營區 820 林道	山椒魚族群調查 (45 隻) 微棲地記錄 VIE-tag 標記 微環境因子資料收集
2019/6/3 - 2019/6/5	武嶺營區 820 林道	山椒魚族群調查 (28 隻) 微棲地記錄 VIE-tag 標記 (16 隻) 遺傳樣本收集
2019/6/18 - 2019/6/20	武嶺營區 820 林道	山椒魚族群調查 (29 隻) 微棲地記錄 VIE-tag 標記 (11 隻) 遺傳樣本收集
2019/7/1 - 2019/7/7	南湖溪 南湖圈谷 中央尖溪源頭、支流 香菇寮 (中央尖溪)	山椒魚族群調查 (22 隻) 微棲地記錄 VIE-tag 標記 (21 隻) 遺傳樣本收集 微環境因子資料收集
2019/7/22 - 2019/7/26	武嶺營區 820 林道	山椒魚族群調查 (16 隻) 微棲地記錄 VIE-tag 標記 (14 隻)
2019/8/26 - 2019/8/29	谷關紅香	山椒魚族群調查 (2 隻) 微棲地記錄 VIE-tag 標記 (2 隻)
2019/9/9 - 2019/9/16	南湖溪 南湖圈谷 中央尖溪源頭、支流 香菇寮 (中央尖溪)	山椒魚族群調查 (28 隻) 微棲地記錄 VIE-tag 標記 (25 隻) 水質分析樣本採集 微環境因子資料收集
2019/10/3 - 2019/10/5	武嶺營區 820 林道	山椒魚族群調查 (18 隻, 3 隻回收) 微棲地記錄 VIE-tag 標記 (15 隻)



圖四、太魯閣國家公園境內山椒魚族群分布，圖中黃色圓點代表臺灣山椒魚，綠色代表南湖山椒魚，紅色圓點代表楚南氏山椒魚。



圖五、白姑大山南湖賴氏山椒魚、南湖山區南湖山椒魚、臺灣山椒魚與楚南氏山椒魚的吻肛長比較（前 30%個體）。以 ANOVA 分析  $P < 0.05$ （以\*表示）。BG：白姑大山南湖賴氏山椒魚，*formosanus*：臺灣山椒魚，*glacialis*：南湖山區南湖山椒魚，*sononi*：楚南氏山椒魚。



圖六、合歡山 820 林道的山椒魚。(a) 臺灣山椒魚，後肢為 4 趾，細小黃斑斑點分布均勻，以此個體為例，體長約 4.8 公分，尾長 3.3 公分，尾長短於體長；(b) 楚南氏山椒魚，其體色淺藕色，斑紋密集均勻分布，後肢為 5 趾。以此個體為例，體長約 5 公分，尾長 4.7 公分，約與體長相等；(c) 與 (d) 外表型不似典型臺灣山椒魚及典型楚南氏山椒魚的個體，其粒線體序列被編派(assign)與南湖中央尖山的南湖山椒魚為同一類群。箭頭標示處為其後肢第 5 趾。

## (二)、遺傳樣本收集

為了釐清臺灣山椒魚、南湖山椒魚與楚南氏山椒魚的族群遺傳結構與演化歷史研究，本研究結合賴俊祥老師收集的山椒魚遺傳樣本，更擴大到太魯閣國家公園以外地區進行山椒魚的調查研究，包括大肚溪上游（北港溪流域、關谷紅香）的山椒魚族群調查；大甲溪、濁水溪、南湖溪及木瓜溪等溪流上游的山椒魚棲地調查。所有的樣本，經 DNA 分析發現臺灣山椒魚有 26 個 *cytochrome b* 單套型 (haplotype)；南湖山椒魚 10 個單套型；楚南氏山椒魚共 30 個單套型。

表二、山椒魚遺傳樣本採集樣區與河川流域對照表

種類	調查樣線/樣區	河川	流域	調查隻次
臺灣山椒魚	大禹嶺隧道後臺 8 線溪溝	合歡溪	大甲溪	6
	730 林道 13K ~ 19K	耳無溪	大甲溪	5
	谷關紅香	北港溪	大肚溪	1
	舊雲稜水源	南湖溪	大甲溪	2
	香菇寮	南湖溪	大甲溪	27
	820 林道	合歡溪	大甲溪	120
	能高越 4K ~ 10K	塔羅灣溪	濁水溪	12
	雲海保線所	塔羅灣溪	濁水溪	1
	楚南氏山椒魚	能高越 9.8K	塔羅灣溪	濁水溪
奇萊裡山往東溪溝		木瓜溪	花蓮溪	8
奇萊南峰		木瓜溪	花蓮溪	1
谷關紅香		北港溪	大甲溪	9
820 林道		合歡溪	大甲溪	91
武嶺營區		合歡溪	大甲溪	16
南湖山椒魚	中央尖溪源頭	中央尖溪	大甲溪	27
	中央尖溪支流	中央尖溪	大甲溪	4
	南湖圈谷	南湖溪	大甲溪	25

## (三)、粒線體 *cytochrome b* 親緣關係樹

依照今年及過去所獲得的山椒魚粒線體 *cytochrome b* 全長序列 (1,141 bp)

共 74 個單套型，結合過去所得阿里山山椒魚序列，另以 NCBI 網站公布之東北小鮭 (*Hynobius leechii*)、中國小鮭 (*Hynobius chinensis*)、安吉小鮭 (*Hynobius amjiensis*)、*Hynobius tokyoensis* 與 *Hynobius nebulosus* 等東亞地區及日本等地的山椒魚 *cytochrome b* 序列做為外群，以最大似然法建構親緣關係樹。觀霧山椒魚因缺乏 *cytochrome b* 全長序列資料，故未納入本次親緣關係樹的建構。

臺灣的山椒魚的遺傳親緣關係分析 (不包含觀霧山椒魚) 顯示，可分為 5 個大類群 (Clade) (圖七)：由上至下分別為楚南氏山椒魚 (紅色分支)、阿里山山椒魚 (淺綠色分支)、白姑大山南湖賴氏族群 (紫色分支)、南湖山椒魚 (橘色分支) 及臺灣山椒魚 (藍色分支)。臺灣山椒魚可以再分出 (1) 南湖大山族群 (南湖溪、中央尖溪) (圖七 F-I)；(2) 雪霸國家公園族群 (志樂溪、大安溪及淡水河) (圖七 F-II)；(3) 730 林道耳無溪族群 (圖七 F-III)；與 (4) 合歡山碧綠溪、能高族群 (合歡溪、大肚溪、濁水溪) (圖七 F-IV) 等 4 種次類群。以地理位置來看，大甲溪不同支流的臺灣山椒魚被分派在不同的次類群之中。位於大甲溪上游的南湖流域臺灣山椒魚又分為兩大群 (bootstrap 值 99%)，一為耳無溪族群，另一為南湖溪與中央尖溪族群，在 108 年的研究中，團隊於中央尖溪支流的樣點採集到 1 隻其 *cytochrome b* 單套型為耳無溪族群單套型的臺灣山椒魚，因此中央尖溪支流及耳無溪兩地的臺灣山椒魚彼此間可能存在基因交流。根據本研究的調查結果，臺灣山椒魚最北分布於雪山山脈的鎮西堡的塔克金溪與薩克亞金溪上游；最西側在小雪山、最東側在於南湖中央尖山與畢祿山；分布最南側為能高越嶺的塔羅灣溪源頭。

楚南氏山椒魚遺傳親緣關係分析顯示亦分成兩個主要類群，統計上呈顯著支持 (bootstrap value = 81%)。分布在能高山以南的 (臺灣池、萬大溪) 楚南氏山椒魚的 *cytochrome b* 單套型 (HSN20-24；圖七 S-II) 與其他的楚南氏山椒魚顯著分群。這群楚南氏山椒魚皆分布在濁水溪溪流源頭。但有一部分來自能高越嶺，濁水溪溪流源頭最北側另一支流的山椒魚卻與另一主要類群 (包含合歡山、奇萊東稜等地區) 的楚南氏山椒魚分派在同一大類群中，主要分布在大肚溪。結合過

去文獻日本學者富田芳郎誠提出現今濁水溪最北側支流的溪流源頭曾經是大肚溪的溪流源頭，但後來可能發生河川襲奪，變成是現今的濁水溪溪流源頭北側支流（葉志杰、楊貴三，2017）。因此，由楚南氏山椒魚遺傳親緣的研究，也可提供過去河川襲奪的一個重要佐證。本研究的資料顯示，楚南氏山椒魚分布的最北側在 820 林道、最東側在立霧主山、最西側在合歡山、最南側在安東軍山。

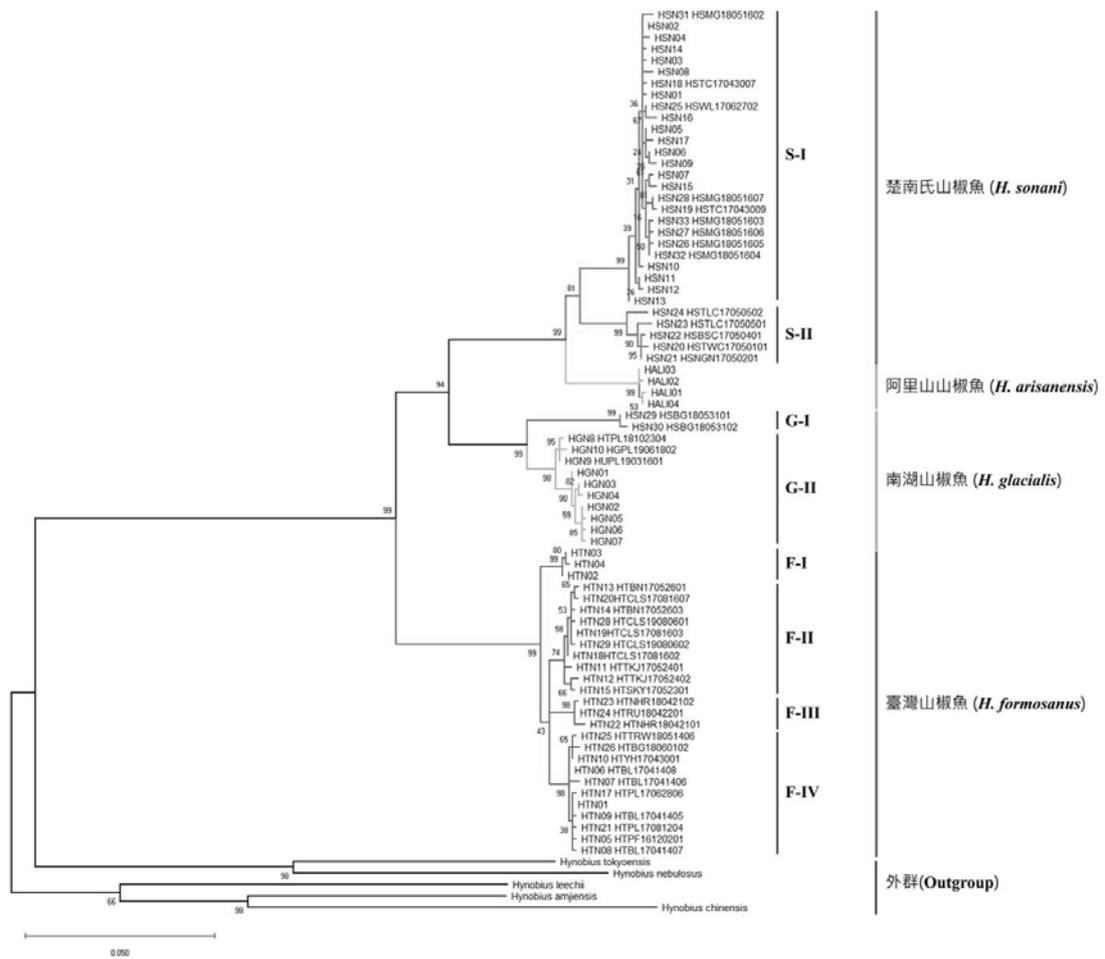
過去的研究認為南湖山椒魚僅分布於南湖溪及中央尖山地區，及南湖溪與中央尖溪。以中央尖溪源頭發現的單套型數目較多（6 種），南湖圈谷 3 種單套型。南湖山椒魚不論在單套型數目或發現個體數皆少於太魯閣國家公園境內的另外兩種山椒魚。107 年 5 月、9 月及 108 年分別在白姑大山紅香調查到 6 隻山椒魚，後肢具有 5 個腳趾，外形與臺灣山椒魚明顯不同。經 *cytochrome b* 基因序列分析，發現這些山椒魚與南湖圈谷、中央尖山的南湖山椒魚被編派在同一大類群中。但白姑大山的山椒魚與南湖圈谷、中央尖山的南湖山椒魚還是有顯著的遺傳分群（bootstrap value = 98%）。由於體型形態、吻肛長與遺傳特徵皆與南湖山大山的南湖山椒魚不同，故我們先稱牠們為南湖賴氏山椒魚或是賴氏山椒魚（圖七 G-I）。

107 年 10 月與 108 年在 820 林道 6.1K 後段採集到體色接近臺灣山椒魚，但後肢具 5 個腳趾，外表型不似典型臺灣山椒魚亦非楚南氏山椒魚的特殊山椒魚。經粒線體 DNA 分析後，其 *cytochrome b* 基因序列被分配到了南湖圈谷、中央尖山的南湖山椒魚的類群中，但自成一個統計上顯著支持的次類群（bootstrap value = 95%）（圖七 HGN8-HGN10）。

本計畫顯示南湖山椒魚的分布除在南湖大山與中央尖山外，畢祿山亦有分布。依太魯閣國家公園的地景，推測南湖山椒魚的分布應該從南湖大山、中央尖山、甘藷峰、無明山、鈴鳴山一直到畢祿山皆有分布。

經由本研究的遺傳分析，分布在太魯閣國家公園 820 林道的山椒魚種類為楚南氏山椒魚、臺灣山椒魚與南湖山椒魚三種棲息。三種山椒魚同時棲息的樣區，在國內目前的研究屬於少見。而當地的三種山椒魚是否有雜交情形，需要進一步

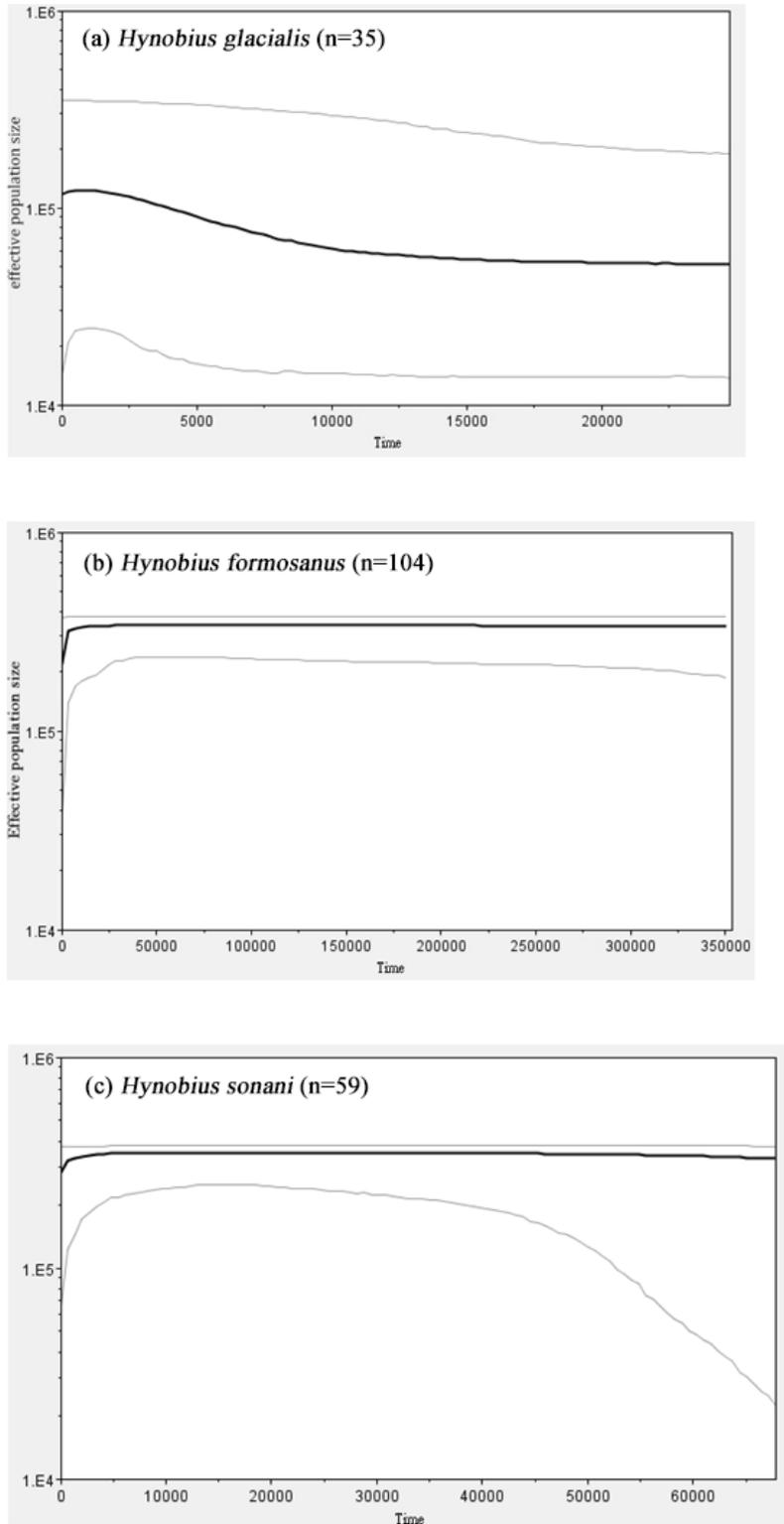
研究。



圖七、臺灣產山椒魚之粒線體細胞色素 *b* 基因核苷酸全長序列 (1,141 bps) 親緣關係樹。透過演化分析軟體 MEGA 10.0.5, 以 Maximum Likelihood 法基於 General Time Reversible 核苷酸替代模型推演有最高 log likelihood 的演化樹所建構。

#### (四)、歷史族群動態

為了解臺灣山椒魚、楚南氏山椒魚與南湖山椒魚過去的歷史族群動態變化，我們以粒線體 *cytochrome b* 全長序列建構貝葉氏天際線分析南湖山椒魚、楚南氏山椒魚與臺灣山椒魚的族群歷史動態。(圖八) 結果顯示南湖山椒魚約在距今 10,000 年前開始歷經族群擴張，到近代族群成長趨緩、縮減，有效族群量較低。臺灣山椒魚與楚南氏山椒魚過去的有效族群呈現穩定的狀態，距今 25,000 年臺灣山椒魚與楚南氏山椒魚的有效族群大小呈現下降趨勢。



圖八、南湖山椒魚、臺灣山椒魚與楚南氏山椒魚粒線體 *cytochrome b* 序列之貝葉氏天際線圖 (Bayesian skyline plot)。橫軸表示以年為單位的時間軸，縱軸為有效族群數量 (logarithmic scale)，黑色實線表示貝葉氏天際線的估計值，上下兩條淡色線為 95% 信賴區間。(a) 南湖山椒魚；(b) 臺灣山椒魚；(c) 楚南氏山椒魚。

### (五)、中性檢測與遺傳歧異度

為了解臺灣的山椒魚各類群的遺傳歧異度，評估其是否遭受選汰或歷經族群的擴張或縮減，我們依據圖七的親緣關係樹對單套型的分派，將分析的山椒魚序列分為臺灣山椒魚、白姑大山、楚南氏山椒魚及南湖山椒魚四類群，進行中性檢測 (Tajima's D test、Fu's FS test)、單倍型多樣性 (Hd) 及核苷酸多樣性 ( $\pi$ ) 的分析 (表三、表四)。

在中性檢測的結果，臺灣山椒魚、白姑大山南湖賴氏山椒魚及南湖山椒魚皆無顯著偏離中性。但楚南氏山椒魚的 Tajima's D 及 Fu's FS 皆為顯著的負值 (-1.33617, -7.21706)，顯示楚南氏山椒魚的族群可能受到天擇影響、經歷瓶頸效應或定向天擇 (directional selection)。在親緣關係樹分析上，楚南氏山椒魚呈現兩個遺傳分化的類群，顯示其族群演化上有受到選拔淘汰的影響。

粒線體遺傳歧異度分析方面，臺灣山椒魚、白姑大山南湖賴氏山椒魚及南湖山椒魚的單倍型多樣性 (Hd) 高於 0.5，顯示這些族群還擁有高的單倍型多樣性。其中，楚南氏山椒魚與臺灣山椒魚擁有較高的單倍型多樣性 ( $Hd > 0.5$ ) 及核苷酸多樣性 ( $\pi > 0.05\%$ ) (Avisé, 2000)，但本研究南湖山椒魚的樣本數與白姑大山南湖賴氏山椒魚的樣本數比楚南氏與臺灣山椒魚少，上述族群間的粒線體遺傳歧異度的差異，尚需累積更多的白姑大山南湖賴氏山椒魚及南湖山椒魚粒線體序列資料，才能進行更客觀的評估。

表三、四個臺灣產山椒魚類群中性檢測

檢測項目	白姑大山	南湖賴氏山椒魚	南湖山椒魚	楚南氏山椒魚	臺灣山椒魚
Sample size	6		40	66	104
Tajima's D test					
Tajima's D	1.03194		-0.15256	-1.33617	-0.58432
P-value	0.858		0.493	0.066*	0.302
Fu's FS test					
Fu's FS	1.7231		-0.34589	-7.21706	-0.8157
P-value	0.774		0.479	0.034*	0.479

\*p&lt;0.05

表四、四個臺灣產山椒魚類群單倍型多樣性 (Hd) 及核苷酸多樣性 ( $\pi$ )

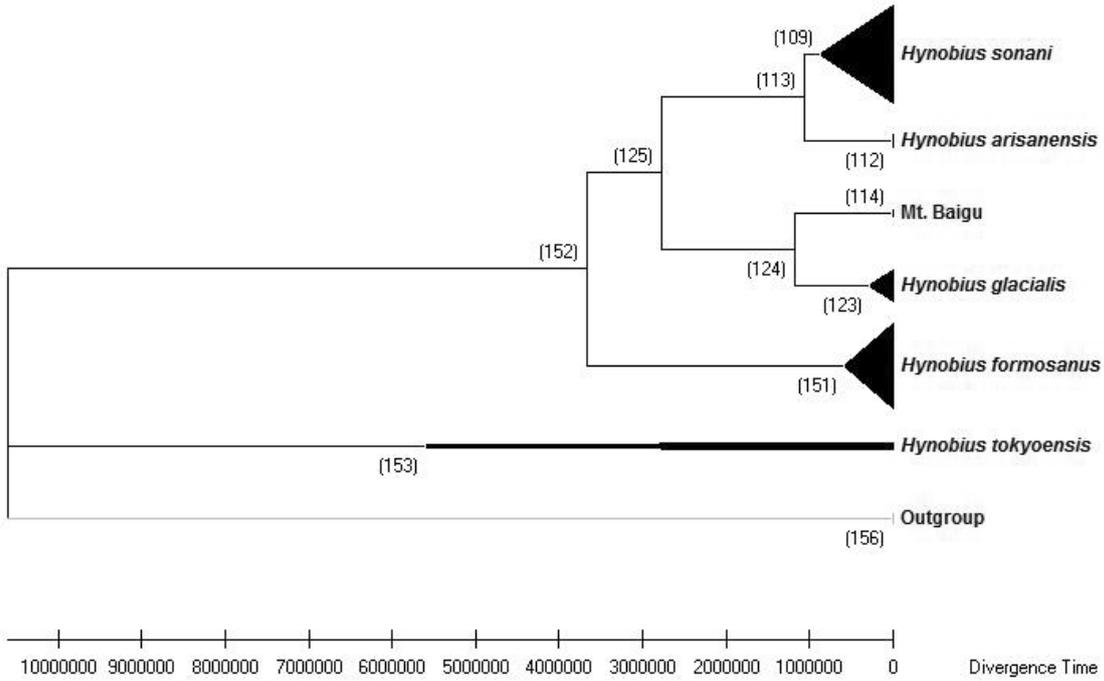
族群	樣本數	單倍型數	單倍型多樣性 (Hd)		核苷酸多樣性 ( $\pi$ )	
白姑大山	6	2	0.533	± 0.172	0.00094	± 0.0003
南湖賴氏山椒魚						
南湖山椒魚	40	10	0.79	± 0.045	0.00295	± 0.00043
楚南氏山椒魚	66	30	0.897	± 0.026	0.00734	± 0.00153
臺灣山椒魚	104	26	0.838	± 0.027	0.00817	± 0.00052

## (六)、分歧時間估算

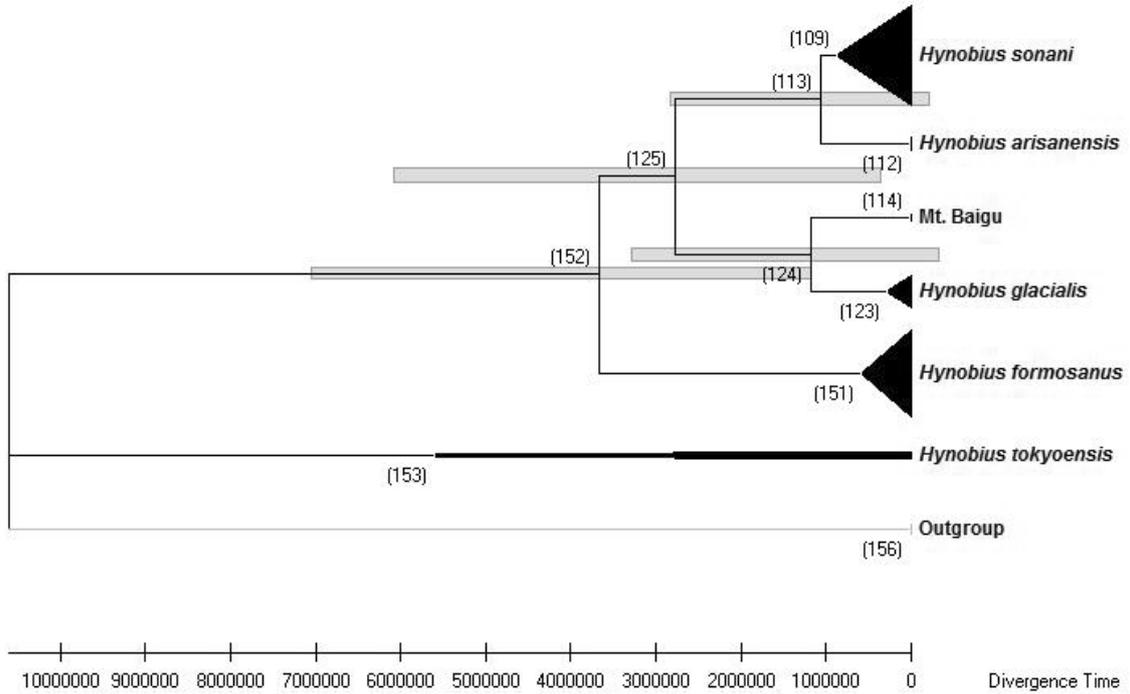
因目前尚無可靠的小鯢屬化石被出土，因此無法以化石鑑定的年代校正分子鐘。因此參考 Chen (2015) 等以 29 個核基因估算之小鯢屬分歧時間，以 *Hynobius tokyoensis* 與其他小鯢屬成員分歧的時間 8.6 – 12.6 Myr (Chen *et al*, 2015) 校正分子鐘，使用分析軟體 MEGA 10.0.5 以 Reltime method 估算各遺傳類群可能的分歧時間 (圖九)。

估算的結果，臺灣山椒魚 (節點 152) 與其他的遺傳類群約在 367.5 萬年前分歧 (95%信賴區間：117 萬年前至 702 萬年前)；南湖山椒魚與楚南氏、阿里山類群的分歧時間約在距今 276.8 萬年前 (節點 125；95%信賴區間：35 萬年前至 607 萬年前)；楚南氏山椒魚約在距今 106 萬年前與阿里山山椒魚分歧 (節點 113；95%信賴區間：現今至 277.6 萬年前)。白姑大山南湖賴氏山椒魚與南湖中央尖山山椒魚分歧的時間亦在距今 100 萬年前 (節點 124；95%信賴區間：現今至 323.7 萬年前)

因遺傳樣本缺乏，未能將觀霧山椒魚的全長序列納入本次的分析。若未來能納入觀霧山椒魚的 *cytochrome b* 全長序列，期望可得較準確之分歧時間。



圖九、以粒線體 *cytochrome b* 序列估算楚南氏山椒魚、南湖山椒魚及臺灣山椒魚演化分歧時間。括弧內數字為節點編號。



圖十、以粒線體 *cytochrome b* 序列估算楚南氏山椒魚、南湖山椒魚及臺灣山椒魚演化分歧時間（95%信賴區間）。括弧內數字為節點編號。灰色長方形為節點（分歧時間）的 95%信賴區間。

## 二、收集與分析太魯閣國家公園內臺灣、楚南氏與南湖山椒魚棲地溫度濕度光照與水質等環境因子資料與偏好

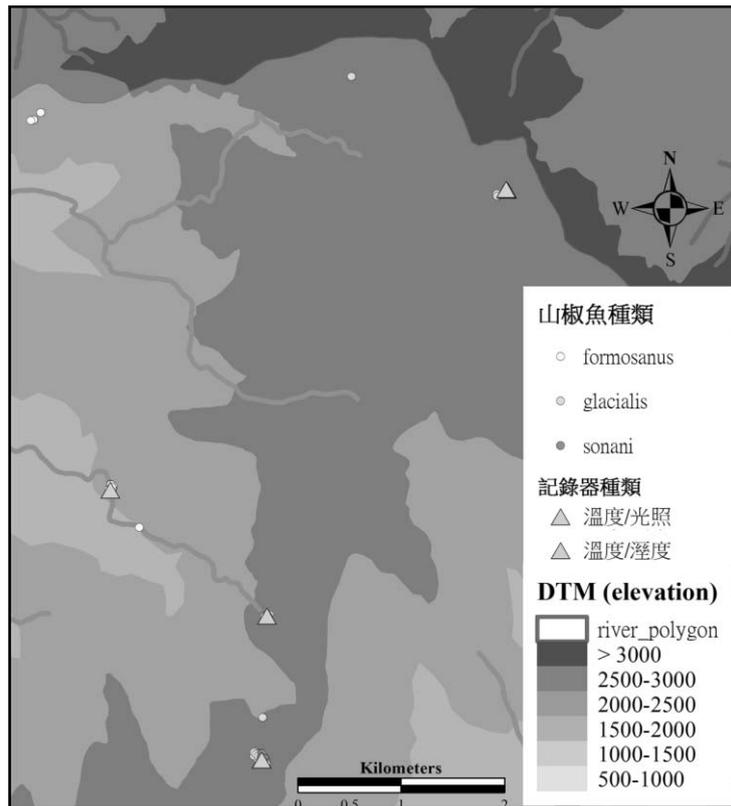
### (一)、棲地溫度、濕度、光照

為了收集太魯閣國家公園內臺灣、楚南氏與南湖山椒魚棲地溫度、濕度、光照等資料，我們依據 105 年團隊執行委託研究計劃「太魯閣國家公園保育類物種監測調查計畫」所調查到的臺灣的山椒魚分布點位，於中央尖溪源頭及支流、南湖圈谷及武嶺合歡山區域設置 HOBO 記錄器，各設置地點與對應的山椒魚種類分布如表五所示，涵蓋臺灣、南湖及楚南氏三種山椒魚的棲地。設定記錄頻率每 3 小時記錄一次，每天記錄 8 個不同時間點。另依據 105 年與 106 之調查記錄，對照出 820 林道山椒魚分布熱點與無山椒魚分布點位，於這些點位設置 HOBO 記錄器。各地點 HOBO 記錄器設置位置地圖如圖十一、圖十二及圖十三所示。

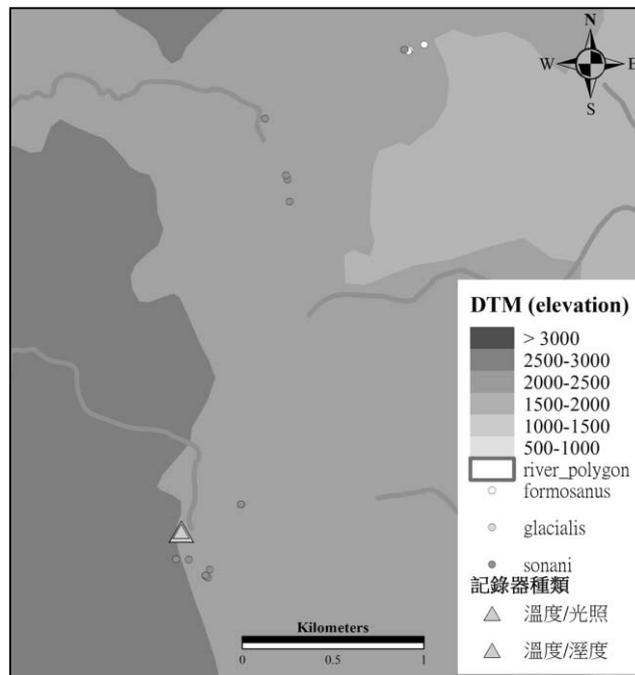
表五、HOBO 記錄器設置地點與分布的山椒魚種類對照。

地點	代號	分布山椒魚種類	記錄器類型	收集資料類型	設置樣點
中央尖溪源頭	JRO	南湖山椒魚	MX2301	溫度、相對濕度	1
			UA-002-64	溫度、光照強度	1
中央尖溪支流	JRB	臺灣山椒魚	MX2301	溫度、相對濕度	1
		南湖山椒魚			
香菇寮	SGL	臺灣山椒魚	UA-002-64	溫度、光照強度	1
南湖園谷	NH	南湖山椒魚	MX2301	溫度、相對濕度	1
			UA-002-64	溫度、光照強度	1
合歡山	HH	臺灣山椒魚	UA-002-64	溫度、光照強度	6 *
		楚南氏山椒魚	MX2301	溫度、相對濕度	4
			MX2301	溫度、相對濕度	1
武嶺	WL	楚南氏山椒魚	UA-002-64	溫度、光照強度	1

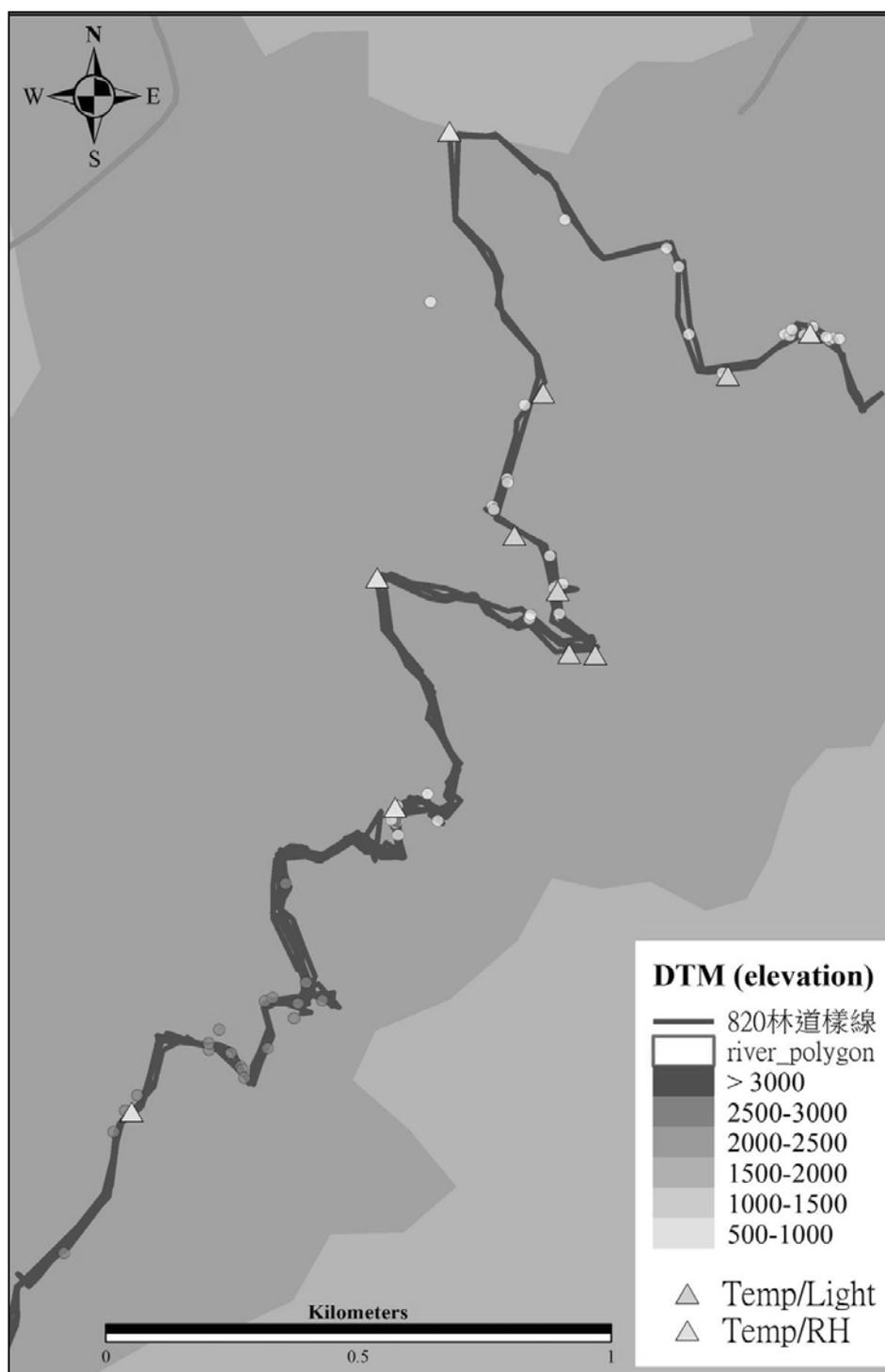
\* 合歡山共設置 UA-002-64 型記錄器 6 臺，回收 4 臺記錄器之資料。



圖十一、中央尖溪源頭、支流、香菇寮與南湖圈谷 HOBO 記錄器樣點分布 (n=5) 與山椒魚分布套疊圖。圖中粉紅色三角形為溫度/光照強度記錄器；藍色三角形為溫度/相對濕度記錄器。黃色圓點代表臺灣山椒魚，綠色圓點代表南湖山椒魚。



圖十二、武嶺 HOBO 記錄器樣點 (n=2) 與山椒魚分布套疊圖。圖中粉紅色三角形為溫度/光照強度記錄器；藍色三角形為溫度/相對濕度記錄器。黃色圓點代表臺灣山椒魚，紅色圓點代表楚南氏山椒魚。



圖十三、合歡山 HOBO 記錄器樣點分布 (n=10) 與山椒魚分布套疊圖。合歡山樣區的 HOBO 記錄器沿 820 林道設置，圖中粉紅色三角形為溫度/光照強度記錄器；藍色三角形為溫度/相對濕度記錄器。黃色圓點代表臺灣山椒魚，紅色圓點代表楚南氏山椒魚。溫度/相對濕度記錄器共設置 4 個，分別各設置 2 個位於山椒魚活動較活躍的 0.6 K、1.3K 與山椒魚活動較不活躍的 4.4K、2.7K。溫度/光照強度記錄器共設置 6 個，成功回收 4 個記錄器資料。

## 1. 中央尖溪源頭溫度、濕度、光照強度

### 溫度

中央尖溪源頭中央尖溪源頭設置之兩台記錄器自 2017 年 11 月至 2019 年 9 月共收集 23 個月的氣溫、濕度資料。記錄期間內，溫度變動在  $-5.45 \sim 34.25^{\circ}\text{C}$  之間，月均溫介於  $2.89 \sim 13.16^{\circ}\text{C}$ 。於 2018 年 1 月記錄到最低溫  $-5.45^{\circ}\text{C}$ ，最高溫  $34.25^{\circ}\text{C}$  於 2019 年 7 月。

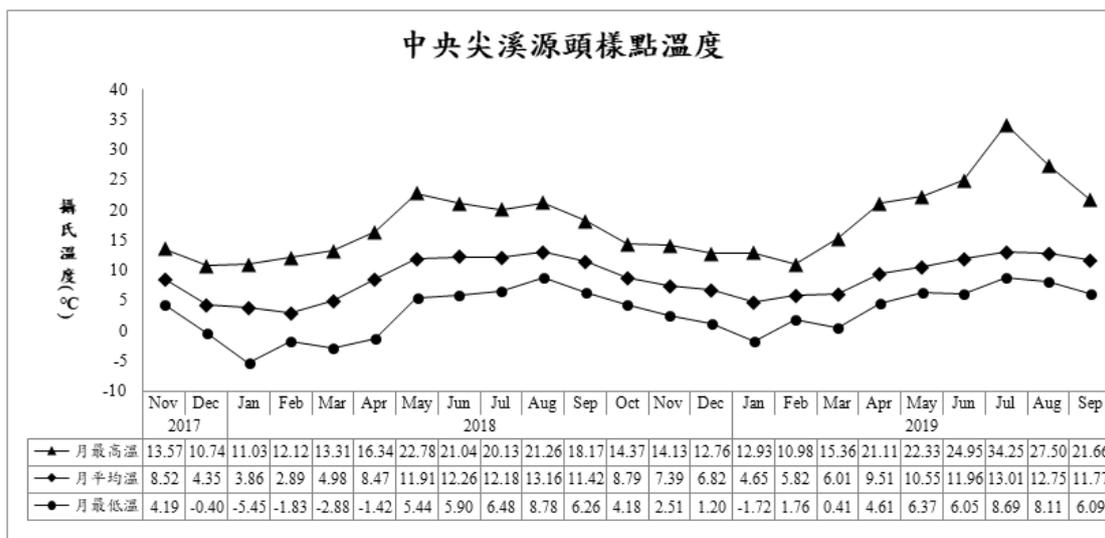
### 相對濕度

每月最高 RH% 在記錄期間維持 99.98%；月最低 RH% 則變動較大，於 2018 年 3 月有最低相對溼度 30.40 %。而整體月平均相對溼度 (RH%) 介於 79.58 ~ 98.21 %。

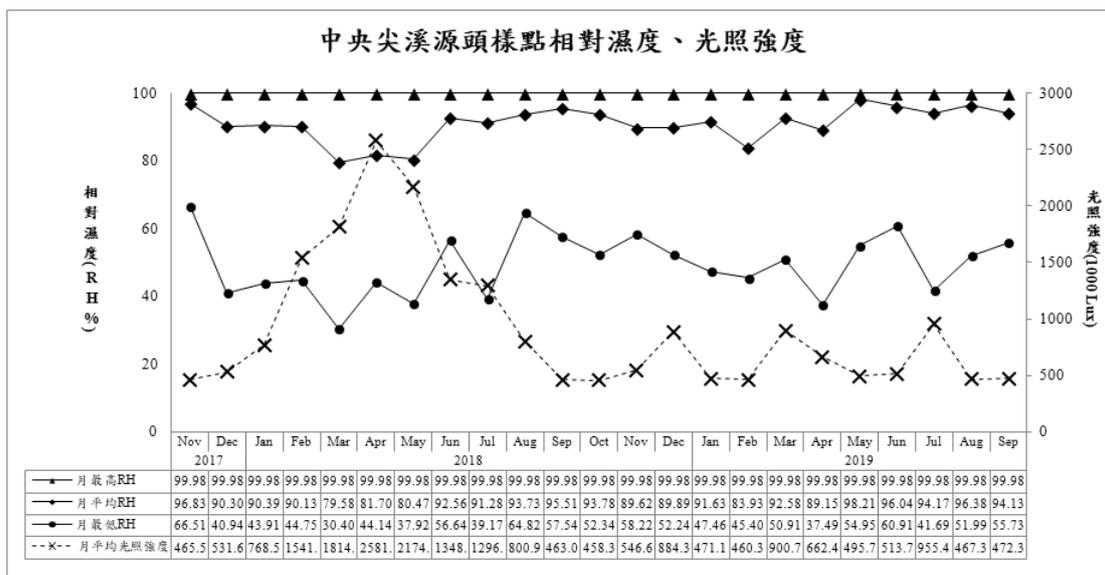
### 光照強度

月平均光強度的變化可自 458.3 勒克斯 ( Lux ) 高至 2581.5 勒克斯，最高月平均光照強度出現於 2018 年 4 月，最低出現在 2018 年 10 月。其中，中央尖溪源頭最低與最高月平均光強度出現月份，彼此的最高 RH% 並無差異，而最低月平均光強度的月份其最低 RH% 同樣低於最高月平均光照強度出現的月份。大致呈現較低光照強度月份的平均 RH% 及最低 RH% 亦低於較高光照強度的月份。

比較兩張圖表，可見中央尖溪源頭月平均最高溫與月平均最低 RH% 的出現月份並不相同，分別在 5-8 月及 3-5 月，顯示該山椒魚棲地之濕度的高低受當地氣溫影響較小。而月平均光照較高的月份，其棲地 RH% 也較低。



圖十四、中央尖溪源頭樣點每月均溫、最高溫與最低溫折線圖。(n = 2, 2017 年 11 月至 2019 年 9 月)



圖十五、中央尖溪源頭樣點每月相對濕度、光照強度變化折線圖。(n = 1, 2017 年 11 月至 2019 年 9 月)

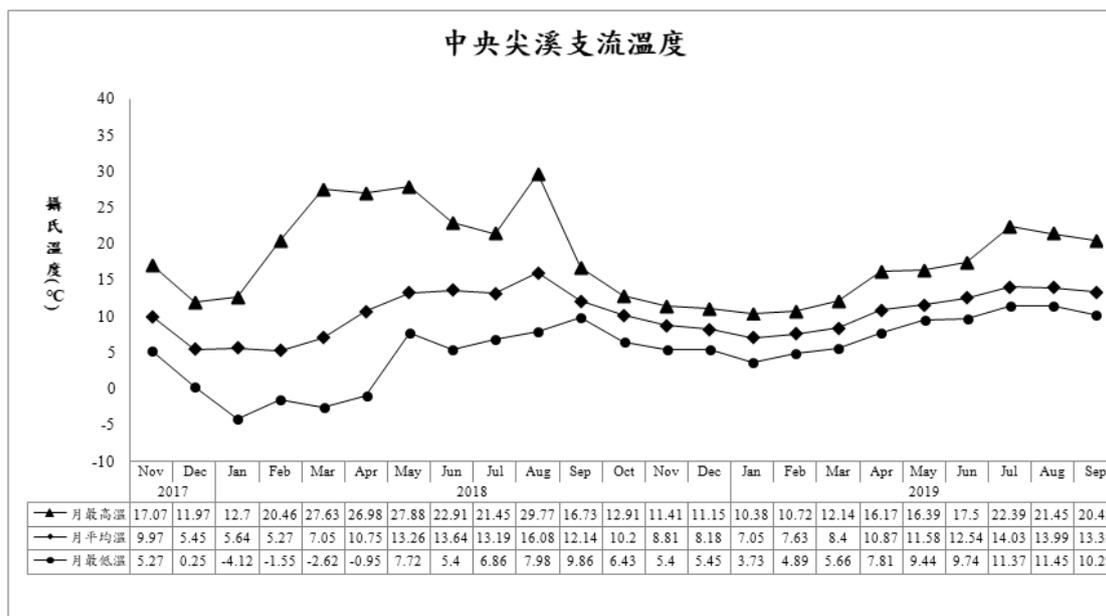
## 2. 中央尖溪支流溫度、濕度

### 溫度

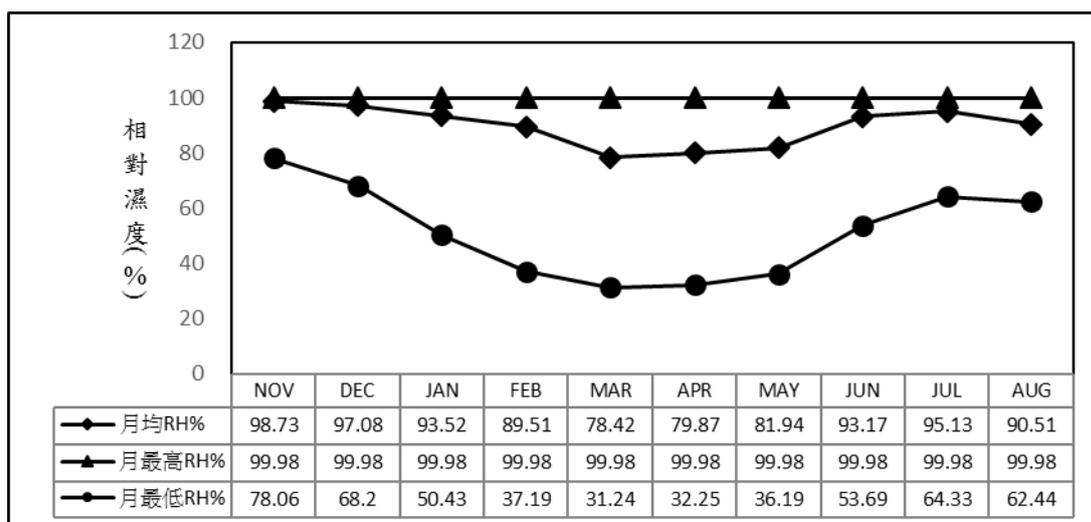
中央尖溪支流於 2017 年 11 月至 2019 年 9 月的記錄期間內，溫度變化在歷經冬季低溫後，自 2018 年 1 月起溫度逐漸回升而在 3 月 5 月擁有較高的月最高溫。全期月均溫約在  $10.39 \pm 0.66^{\circ}\text{C}$ ，但月份與月份間的差異大，主要表現在月最高溫的差距上。相較於中央尖溪支流的月最低溫其月份間差距  $15.57^{\circ}\text{C}$ ，月最高溫的月份間差距最高為  $19.39^{\circ}\text{C}$ 。2019 年的變化趨勢合 2018 年相同，但月最高溫與月最低溫的差距較 2018 年緩。

### 濕度

中央尖溪支流樣點 2017 年 11 月至 2018 年 8 月的記錄期間內，記錄到平均相對濕度介於 78.42 ~ 98.73 %，月最高相對濕度雖維持 99.98%，但由月最低 RH% 變化可見該棲地可能於春季（2~5 月）經歷較為劇烈的 RH% 變化、較為乾燥，亦可見 2018 年 2~5 月該地的溫度變化呈現較劇烈的變化，月最高溫與月最低溫的差距較大（圖十六）。



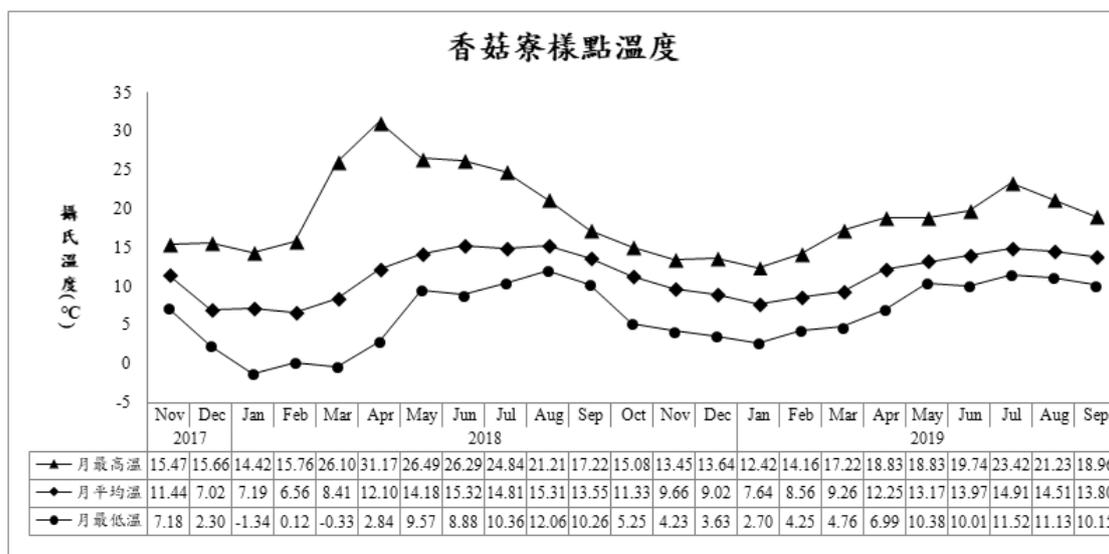
圖十六、中央尖溪支流樣點月均溫、最高及最低溫折線圖。(n = 1, 2017 年 11 月至 2019 年 9 月)



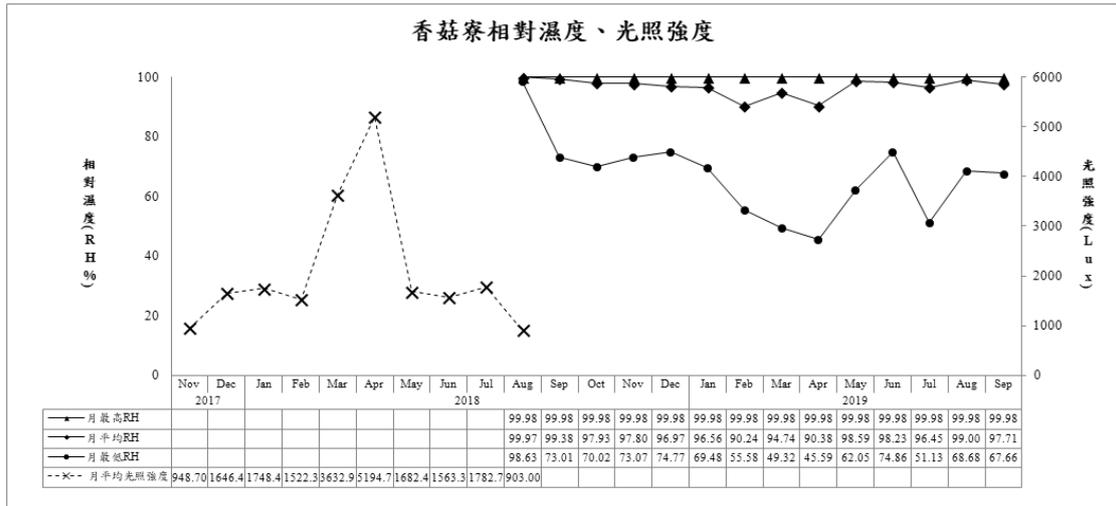
圖十七、中央尖溪支流樣點每月相對濕度變化折線圖。( n = 1, 2017 年 11 月至 2018 年 8 月 )

### 3. 香菇寮溫度、光照強度

香菇寮同樣位於南湖大山中央尖溪流域，分布有臺灣山椒魚而無南湖山椒魚。該棲地於記錄期間 2017 年 11 月至 2019 年 9 月，月均溫介於 6.56~15.32°C，最高溫出現於 2018 年 4 月 31.17°C；最低溫於 2018 年 1 月被記錄，為 -1.34°C。平均光照強度的月份變化，最高平均光照強度與最高溫皆於 2018 年 4 月被記錄，為 5194.7 勒克斯。全記錄期間的平均光照強度 2062.48 勒克斯。



圖十八、香菇寮樣點月均溫、月最高溫、月最低溫及光照強度變化折線圖。( n = 2, 2017 年 11 月至 2019 年 9 月 )



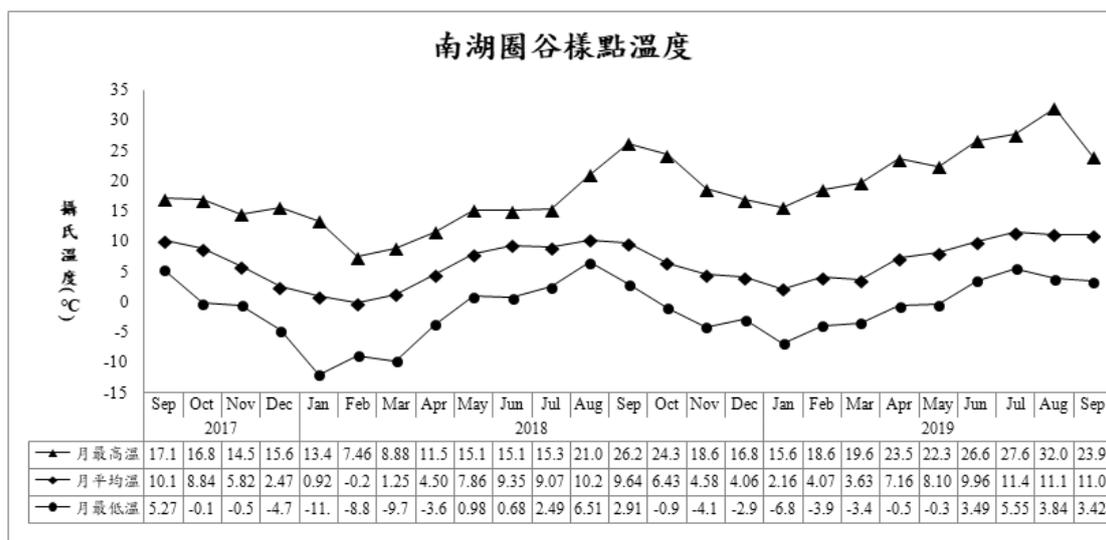
圖十九、香菇寮樣點相對濕度及光照強度變化折線圖。(n = 1)

#### 4. 南湖圈谷溫度、濕度、光照強度

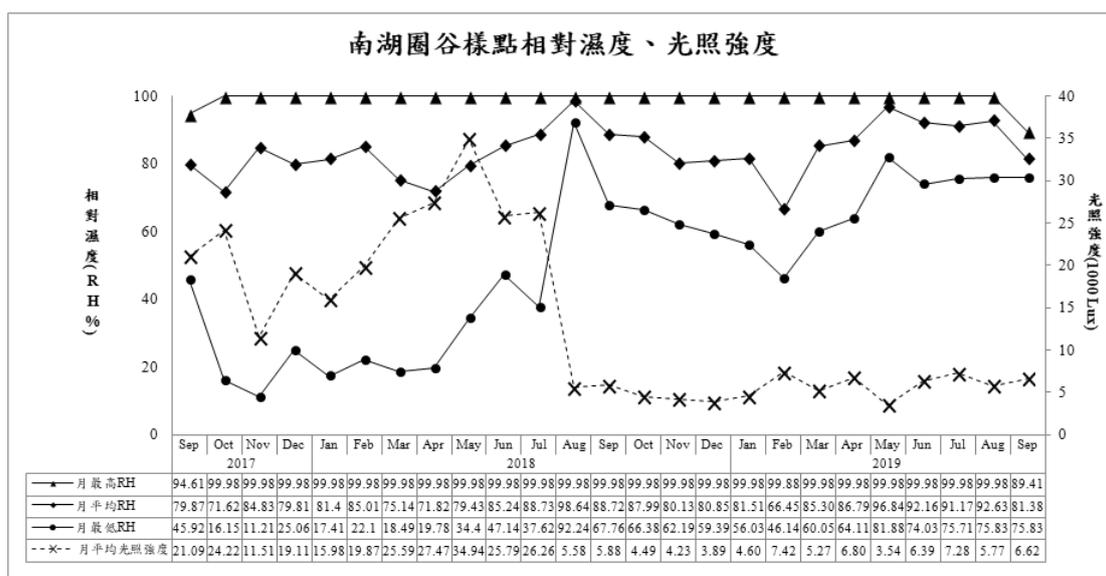
圖二十至圖二十一為南湖圈谷溫度、濕度及光照強度月份變化之折線圖。記錄期間自 2017 年 9 月至 2019 年 9 月，共 25 個月份之氣溫資料。記錄期間的月均溫介於 2.16~17.11 °C，月最高溫出現於 2019 年 8 月，為 32.0°C；最低溫 -11.51°C 出現於 2018 年 1 月。此樣區的月均溫變化趨勢，自 9 月起溫度逐漸下降，在 1、2 月到達最低溫後逐漸回升。

每月的最高相對濕度，除 2017 年 9 月及 2019 年 9 月偏低外，最高相對濕度維持 99.98 %。月均 RH % 為 70.39 ± 13.91 %。最低 RH % 在觀察期間以 2018 年 8 月為分界，出現兩個最低 RH % 明顯不同的時期，在 2018 年 8 月以前，南湖圈谷樣區的最底 RH % 介於 20% - 40%，8 月之後，最低 RH % 提升至 40% - 60%。

綜合光照、溫度與濕度的資料，南湖圈谷樣區最高的月最高溫及月均溫約在 8 月與 9 月，同一月份內的最高溫與最低溫之間的差距也增大。資料也顯示，較高光照的月份，棲地的最低相對濕度也較低。另外 2018 年的 2 月至 7 月的平均光照高於 2019 年 2 月至 7 月的平均光照。



圖二十、南湖圈谷樣點月均溫、最高及最低溫折線圖。(n=2, 2017年9月至2019年9月)



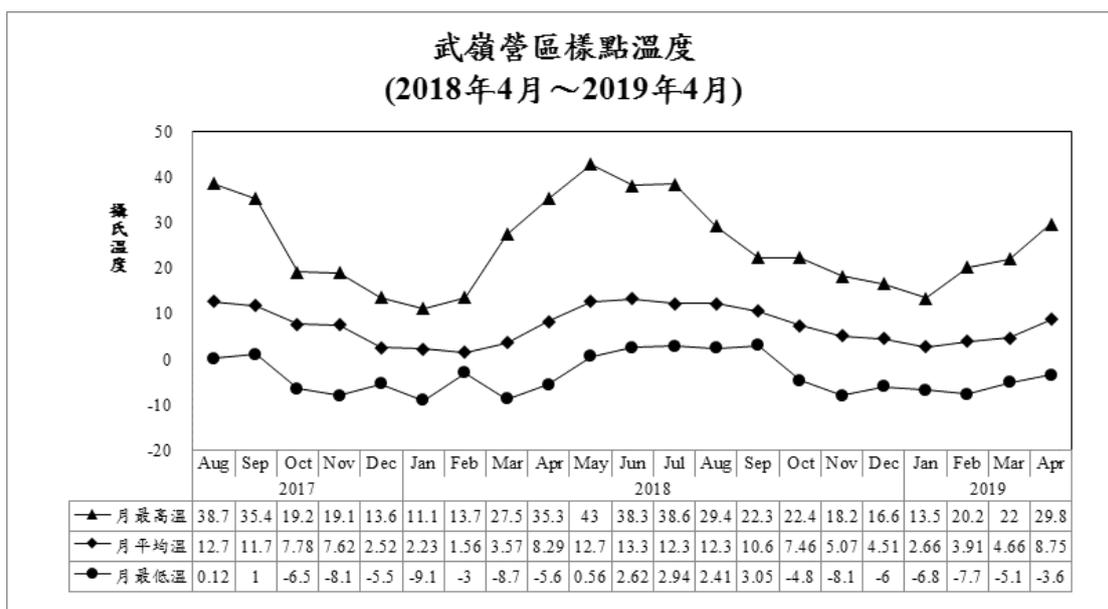
圖二十一、南湖圈谷樣點相對濕度、光照強度折線圖。(n=2, 2017年9月至2019年9月)

#### 4. 武嶺溫度、濕度、光照強度

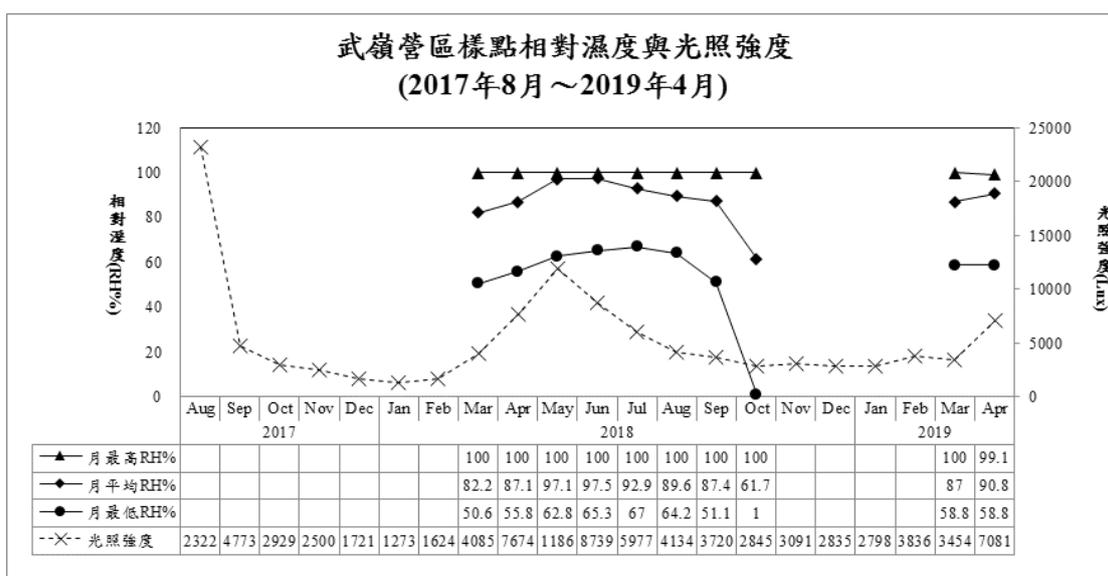
武嶺的樣點在2017年8月後快速下降後維持低於15,000勒克斯的光照強度，隔年3月開始逐漸回升，但在2018年5月後又開始下降至10,000勒克斯以下。因2019年的4月份又開始能觀察到光照強度增加，且數次調查中並未觀察到此

臺記錄器 (UA-002-64 型) 被翻動的情況，推測當初設置地點考量過去翻找到山椒魚的地點，山椒魚偏好棲息箭竹叢下等陰暗處，因此記錄器設置在箭竹叢下，而 2017 年 8 月後該叢箭竹逐漸生長至足以遮蓋記錄器的茂密程度，而使記錄光照強度減低。

與其他區域相比，武嶺營區的樣點在 3 月至 8 月的月最高溫明顯升高 (甚至可達 30-40 °C)，其餘期間則和其他區域類似在 10-20°C。相對濕度約在 40-60 %。



圖二十二、武嶺樣點溫度折線圖。(n=1, 2017年8月至2019年4月)



圖二十三、武嶺樣點相對濕度、光照強度折線圖。(n=1)

## 5.發現頻度高的熱點與發現頻度低的點位之氣溫、相對濕度與光照強度相關性研究

合歡山設置 HOBO 記錄器的樣點位於 820 林道，林道沿線皆有山椒魚活動的可能，因此藉由 ArcGIS 地理資訊系統，將過去團隊於 820 林道發現山椒魚的位點與林道樣線地圖進行套疊，根據圖上位點分布的密集程度，選出山椒魚發現頻度高的分布熱點與發現頻度低的非分布熱點各設置 5 臺 HOBO 記錄器（3 臺 UA-002-64 型，2 臺 MX2301 型），共 10 臺記錄器。目的是比較山椒魚分布熱點與非分布熱點其溫度、相對濕度、光照強度是否有差異。

設置的 10 臺記錄器，其中 2 個記錄器於往後的調查期間未取得可判讀的數據，故不納入此 2 臺記錄器的資料。另外 8 臺（4 臺 UA-002-64 型，4 臺 MX2301 型），包含 5 個山椒魚發現頻度低的非分布熱點（林道 4.4K、2.7K），3 個山椒魚發現頻度高的分布熱點（林道 0.6 K、1.3K）的氣溫、濕度或光照強度資料。各項目比較結果如表六及表七。

對照合歡山 820 林道樣點的溫度變化（表七、圖二十四），可見除 2018 年 7 月、2019 年 2 月及 3 月以外，調查熱點的月最高溫、月均溫及月最低溫略低於非熱點。相對濕度的變化趨勢，分布熱點與非分布熱點皆為最高濕度年間大致相似，維持在 99% 以上，最低相對溼度的高峰出現在 6 月至 9 月的變化趨勢。且 6 月後山椒魚分布熱點比非分布熱點其最低相對溼度有較高的趨勢。（圖二十五）

對照合歡山 820 林道樣點的溫度變化與山椒魚調查量（表七、圖二十四），調查數量在 3、4 月份融雪後，月溫持續上升，尤其月最低溫自 3 月份冰點以下上升至約攝氏 10 度，在 5 月上升趨緩後維持，於 6 月份有一次山椒魚調查量的高峰，在 8 月份以後月最高溫及月均溫開始下降，月最低溫大幅下滑至攝氏 7 度，期間山椒魚調查到的數量亦呈現下降趨勢。2019 年 3、4 月份溫度較 2018 年為高，月最低溫在 3 月時已明顯上升至冰點以上（2018 年的月最低溫則是在 5 月份明顯上升），同時也可觀察到山椒魚的調查量較 2018 年同時期為多，推測山椒魚在 820 林道地表整體被調查到的程度可能受月最低溫是否突破冰點影響。

### 山椒魚發現頻率與微環境因子相關性分析

為了解山椒魚在 820 林道分布熱點和非分布熱點與溫度、濕度或光照強度的關聯強弱，我們使用在 820 林道六個地點設置的八臺 HOBO 記錄器於 2018-2019 年間取得的溫度、濕度、光照等資料進行分析。分析方式則是使用多變量線性迴歸 (multiple linear regression model) 來分析熱點與非熱點的環境因子差異以及其相關性。

我們在山椒魚分布熱點與非熱點設置的 HOBO 記錄器中，有 4 臺完整記錄 2018 年 3 月到 2019 年 4 月共 14 個月的月均溫、月最高溫、月最低溫、月均濕度、月最高濕度、月最低溼度等六種變量，以此 4 臺記錄的資料納入分析以熱點／非熱點作為應變量，上述六種環境因子作為自變量，使用多變量線性迴歸來分析六種環境因子對各地點的山椒魚出現頻率的影響。依照表八的結果顯示六種環境因子對於山椒魚的出現頻率皆沒有顯著影響。(p>0.05)

光照強度使用了四臺分別設置在熱點與非熱點區域並且記錄了 2017 年 7 月到 2019 年 4 月共 22 個月的資料來進行分析。將熱點/非熱點作為應變量，光照度作為自變量，跑線性迴歸 (linear regression model) 的結果顯示月平均光照強度 (lux) 對山椒魚的出現頻率有統計上的顯著影響 (p=0.006)，但是修正過後的 R 值平方只有 0.09 (表九)。代表光照強度對於山椒魚出現頻率的解釋程度只有 9%，因此這個結果並不足以推論光照強度能有效地影響山椒魚的出現頻率。

依照目前所得數據來看，820 林道整體的山椒魚活動可能受月最低溫影響，但溫度、濕度與光照強度的差異無法很好地解釋合歡山 820 林道樣線內山椒魚出現熱點與非出現熱點的環境因素差異。

表六、820 林道山椒魚發現頻度高的熱點與發現頻度低的點位相對濕度、光照強度比較。

山椒魚分布 設置數量 (n)	月最高 RH %		月最低 RH %		月平均 RH %		月平均光照強度 (Lux)		
	較多	較少	較多	較少	較多	較少	較多	較少	
	2	2	2	2	2	2	1	3	
2017 年	七月	-	-	-	-	-	-	1153.65	
	八月	-	-	-	-	-	1584.90	701.27	
	九月	-	-	-	-	-	1263.30	595.93	
	十月	-	-	-	-	-	674.90	326.33	
	十一月	-	-	-	-	-	567.70	189.70	
	十二月	-	-	-	-	-	332.80	223.33	
2018 年	一月	-	-	-	-	-	424.60	404.83	
	二月	-	-	-	-	-	817.20	768.47	
	三月	97.84	98.75	37.61	38.50	77.34	77.38	1609.60	1339.50
	四月	99.44	99.98	50.78	51.32	84.79	83.42	1511.90	1061.47
	五月	99.98	99.98	43.65	46.93	85.05	84.13	1558.20	961.67
	六月	99.98	99.98	81.81	78.28	97.52	96.60	1188.30	664.40
	七月	99.98	99.98	78.80	76.97	98.41	97.81	1309.10	640.07
	八月	99.98	99.98	81.03	81.15	97.98	97.85	1065.20	552.67
	九月	99.98	99.98	83.68	76.71	98.77	98.09	1052.70	524.40
	十月	99.98	99.98	52.09	45.81	87.12	88.59	1111.80	419.60
	十一月	99.98	99.98	67.56	62.72	94.26	94.15	553.00	264.57
	十二月	99.98	99.98	54.45	46.87	89.92	88.38	402.50	578.30
2019 年	一月	99.98	99.98	43.10	38.52	94.07	93.80	475.10	800.50
	二月	99.55	99.73	38.13	41.88	84.04	83.33	2145.50	2581.90
	三月	99.98	99.98	43.62	47.97	89.20	89.79	2314.90	2239.90
	四月	99.98	99.98	49.59	48.98	87.68	87.33	2564.30	2082.60

“-“表示無資料。

表七、820 林道山椒魚發現頻度高的熱點與發現頻度低的點位溫度比較

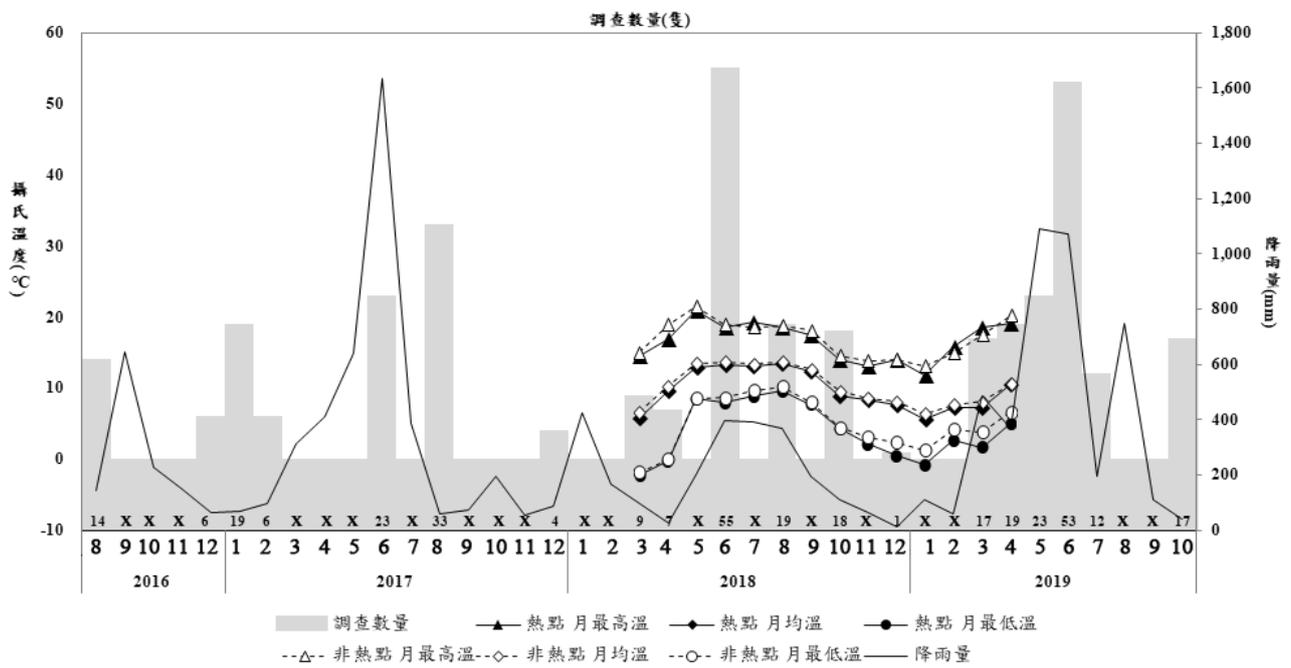
山椒魚分布 設置數量 (n)	月均溫 (°C)		月最高溫 (°C)		月最低溫 (°C)			
	較多	較少	較多	較少	較多	較少		
	3	5	3	5	3	5		
2018 年	三月	5.82	6.61	14.55	15.01	-2.21	-1.85	
	四月	9.64	10.28	16.96	18.86	-0.32	0.02	
	五月	12.85	13.49	20.91	21.50	8.43	8.60	
	六月	13.30	13.62	18.63	18.91	7.90	8.62	
	七月	13.15	13.36	19.36	18.60	8.80	9.63	
	八月	13.44	13.71	18.55	18.74	9.55	10.20	
	九月	12.32	12.66	17.49	18.10	7.68	8.04	
	十月	8.97	9.56	14.05	14.53	4.35	4.45	
	十一月	8.28	8.56	13.10	13.83	2.07	3.08	
	十二月	7.57	8.09	14.01	14.05	0.48	2.36	
	2019 年	一月	5.54	6.35	11.71	13.16	-0.82	1.31
		二月	7.18	7.68	15.81	14.92	2.62	4.13
三月		7.32	8.10	18.52	17.54	1.64	3.76	
四月		10.58	10.56	19.16	20.14	4.98	6.62	

表八、熱點/非熱點為應變量，六個環境因子為自變量的多變量線性迴歸結果。

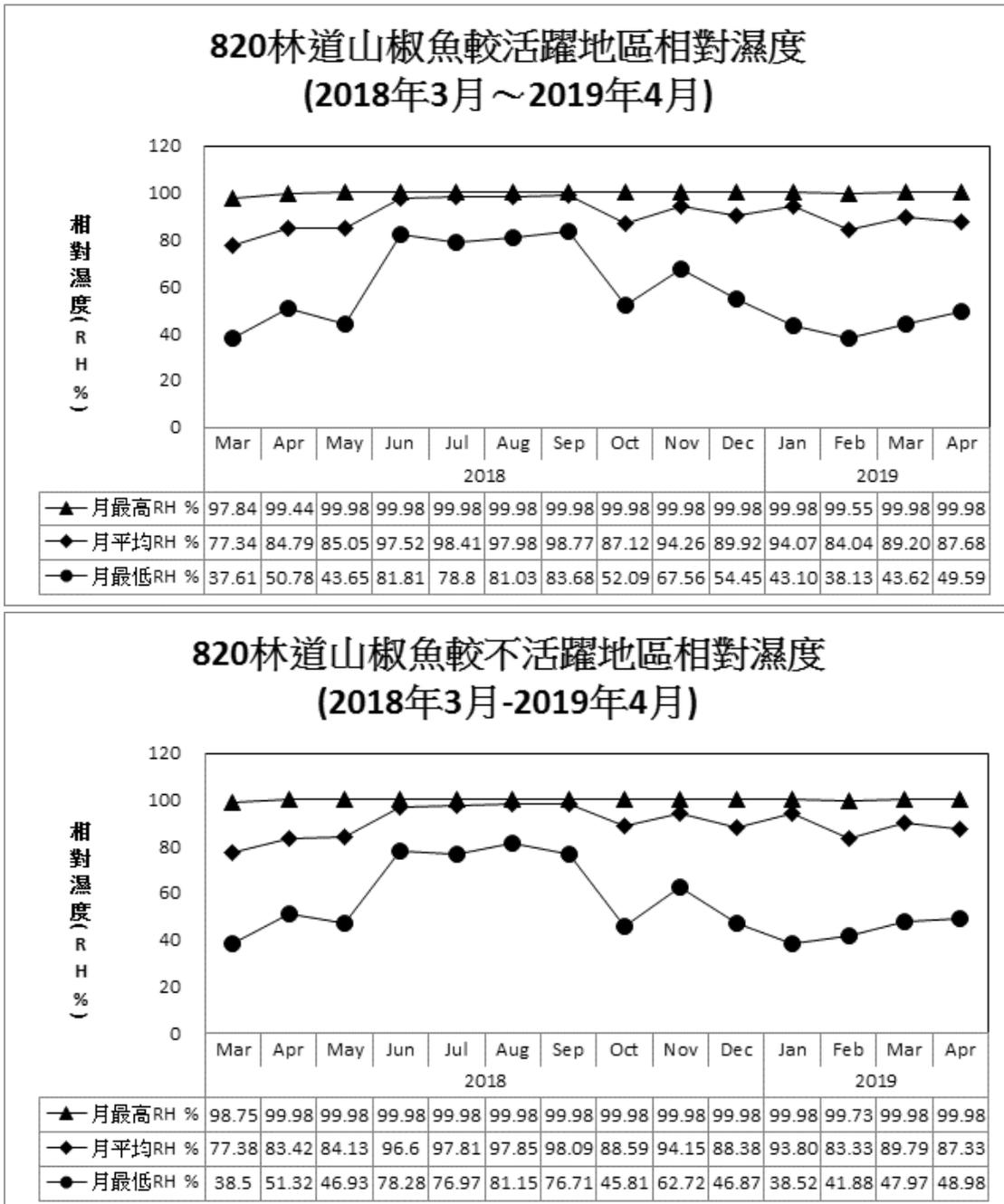
項目	統計值	標準誤	z value	P 值
	Estimate	Std. Error	Eestimate/ Std. Error	Pr (> z )
(Intercept)	51.162937	83.337291	0.614	0.539
月均溫	0.027784	0.401442	0.069	0.945
月最高溫	-0.22251	0.184474	-1.206	0.228
月最低溫	0.053758	0.204271	0.263	0.792
月均濕度	-0.011191	0.10842	-0.103	0.918
月最高濕度	-0.476129	0.889807	-0.535	0.593
月最低溼度	0.008884	0.043851	0.203	0.839

表九、熱點/非熱點為應變量，光照強度為自變量的線性迴歸結果。

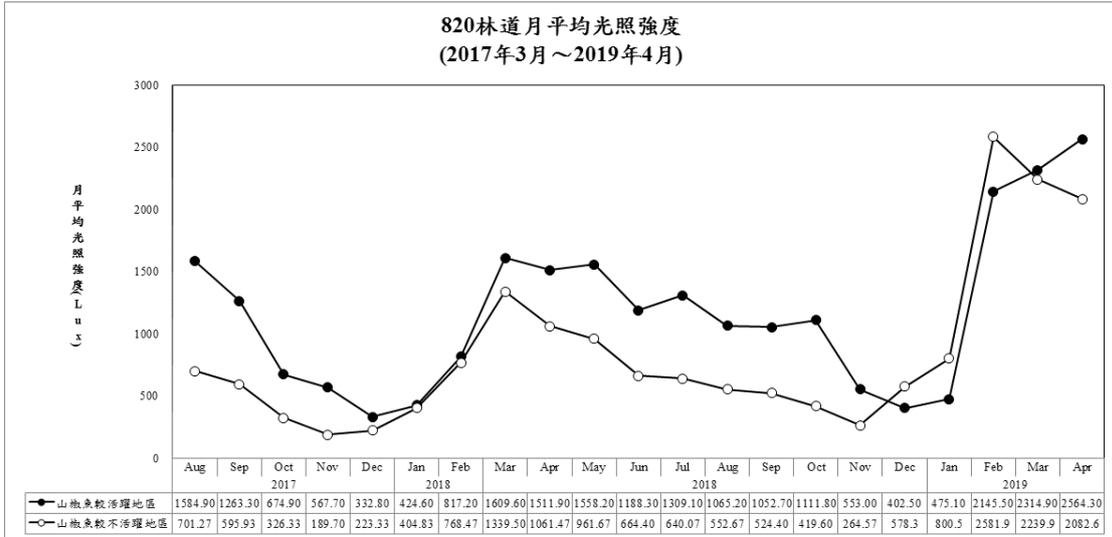
項目	統計值	標準誤	t value	P 值
	Estimate	Std. Error	Eestimate/ Std. Error	Pr (> z )
(Intercept)	9.75E-02	7.86E-02	1.240	0.21891
光照強度	2.11E-04	7.41E-05	2.844	0.00573 **



圖二十四、820 林道山椒魚發現頻度高熱點 (n=3)、發現頻度低非熱點 (n=5) 月溫變化 (2018 年 3 月至 2019 年 4 月)、山椒魚調查量與降雨量，調查量 x 表示未進行調查的月份。



圖二十五、820 林道山椒魚分布熱點(上)與非熱點(下)相對濕度折線圖。(2018年3月至2018年10月)



圖二十六、820 林道山椒魚發現頻度高（實心圓形）與低（白色圓形）的點位月平均光照強度折線圖。

## (二) 水質

為了解棲地品質，利用水質檢驗器記錄 pH 值、導電度、濁度、氧化還原度 (ORP)、生化需氧量 (BOD)。水體取自南湖圈谷下方、南湖山屋旁、審馬陣山屋水池、南湖南峰水源、舊雲稜、中央尖溪源、香菇寮、木杆鞍部下溝、南湖溪源頭、圈谷下方溪溝與南湖山屋最近溪段 (表十)。

依行政院環保屬河川水質之水質指標，定義生化需氧量 (BOD) 小於 3.0 mg/L 即定義為未 (稍) 受污染， $3.0 < \text{BOD} \leq 4.9$  即定義為輕度污染。本研究在南湖山屋旁與南湖南峰水源測得的 BOD 為 3.6 mg/L。顯示這兩個地方水源受到有機質的輕度污染。一般淡水魚適合水質 pH 值標準介於 6.5-8.5 間，當 pH 值低於 6.5 時，可能影響魚類之繁殖性能 (Mount, 1973)。另外，歐盟及臺灣建議淡水魚之水質 pH 應介於 6-9 之間。過去雪霸國家公園監測櫻花鉤吻鮭七家灣溪流 pH 值介於 6.2-8.5 之間。本研究樣區水體 pH 介於 6.01-7.88 間，應屬正常範圍。導電度可以顯示水中離子含量多寡，在導電度的標準規範，環保屬環境水質規定甲類陸域地面水體之導電度標準在 750  $\mu\text{s}/\text{cm}$  以下，屬於戊類環境保育陸域地面水體則沒有規範。文獻指出鮭魚最適水質導電度介在 120-450  $\mu\text{s}/\text{cm}$  之間。七家灣溪導電度介於 130-280  $\mu\text{mho}/\text{cm}$  間，本研究樣區水體導電度介於 5.11-157.7  $\mu\text{s}/\text{cm}$  間。本研究各樣區水體濁度介於 0.2-1.0 間，濁度比七家灣溪濁度 2.44 NTU 低。水中硝酸鹽含量為水質優養化的重要指標之一，若大於 10 ppm 會加速水中藻類繁殖，並使得溶氧減少。本研究水體中硝酸鹽含量介於 0.147-1.966 ppm 間。七家灣溪流域硝酸鹽濃度介於 0.1~2.6 ppm 之間。

土壤檢測以南湖山屋附近土壤為檢測對象 (圖二十七)，南湖山屋周邊及上游溪流為南湖山椒魚的棲地之一，藉檢測山屋周圍的土壤成分評估當地的登山活動對山椒魚棲地造成的影響。檢測的結果顯示 (表十一) 四個地點的土壤 pH 值介於 4.77-5.74，總有機碳 (TOC) 及有機質含量以南湖山屋棲地 (樣本編號 465) 最高，分別為 7.271% 及 12.537%。其次依序為南湖山屋旁 (紮營處 A)、紮營處

B、廁所。本研究未有持續性的監測土壤成分，登山活動長期下來對土壤及圈谷的山椒魚族群的影響，需仰賴長期收集資料，讓研究成果更有代表性。

重金屬檢測結果，四份土壤樣本皆檢測出銅及鉛，南湖山屋旁(樣本編號 464)除銅及鉛外，尚檢測出鋅 0.806 mg/kg。行政院環境保護署之土壤汙染管制標準規定銅的管制標準值為 400 mg/kg (食用作物農地之管制標準值為 200 mg/kg)，鉛的管制標準值 2000 mg/kg (食用作物農地之管制標準值為 600 mg/kg)，鋅的管制標準值 2000 mg/kg (食用作物農地之管制標準值為 600 mg/kg)。本研究檢測的土壤樣本，銅含量介於 39.296-223.5 mg/kg，鉛介於 0.403-3.224 mg/kg。

表十、南湖中央尖山區水體成分檢測。

基礎檢測												
採樣地點	圖谷下方	南湖山屋旁	審馬陣水池	南湖南峰水源	舊雲稜山莊	中央尖溪源頭	香菇寮	木杆鞍部下溝	南湖溪源頭	圖谷下方溪溝	南湖山屋最近溪段	
採樣日期	2018/8/13	2018/8/13	2018/8/14	2018/8/14	2018/8/15	2018/8/15	2018/8/16	2018/8/17	2019/9/11	2019/9/11	2019/9/11	
項目	單位											
濁度	NTU	0.46	0.29	1.07	0.16	0.54	0.21	1	0.4	0.06	0.2	0.23
pH	-	6.2	6.6	7.41	6.39	6.41	6.56	6.01	6.49	7.88	7.8	7.78
ORP	mV	162	173	182	175	165	181	182	187	186.3	183.4	183.3
EC	us/cm	123.4	118.6	5.11	188	74	157.7	115.6	205	124.8	87.4	124.1
TOC	ppm	1.238	0.794	2.697	0.92	1.367	1.077	1.583	1.688	1.046	0.997	0.958
TIC	ppm	12.062	12.77	0.699	20.394	5.059	15.209	9.673	18.125	15.722	11.194	15.714
TC	ppm	13.3	13.564	3.396	21.314	6.426	16.286	11.256	19.813	16.768	12.191	16.672
BOD	ppm	1.2	3.6	1.2	3.6	2.4	1.2	1.2	2.4	0.32	0.31	0.37
重金屬檢測												
採樣地點	圖谷下方	南湖山屋旁	審馬陣水池	南湖南峰水源	舊雲稜山莊	中央尖溪源頭	香菇寮	木杆鞍部下溝	南湖溪源頭	圖谷下方溪溝	南湖山屋最近溪段	
採樣日期	2018/8/13	2018/8/13	2018/8/14	2018/8/14	2018/8/15	2018/8/15	2018/8/16	2018/8/17	2019/9/11	2019/9/11	2019/9/11	
項目	單位											
鎘	mg/L	N.D*	N.D.	N.D.								
銅	mg/L	N.D.	N.D.									
鋅	mg/L	N.D.	N.D.									
鉛	mg/L	N.D.	N.D.									
鎳	mg/L	N.D.	N.D.									
鉻	mg/L	N.D.	N.D.									
水中各項陰離子檢測												
採樣地點	圖谷下方	南湖山屋旁	審馬陣水池	南湖南峰水源	舊雲稜山莊	中央尖溪源頭	香菇寮	木杆鞍部下溝	南湖溪源頭	圖谷下方溪溝	南湖山屋最近溪段	
採樣日期	2018/8/13	2018/8/13	2018/8/14	2018/8/14	2018/8/15	2018/8/15	2018/8/16	2018/8/17	2019/9/11	2019/9/11	2019/9/11	
項目	單位											
F <sup>-</sup>	ppm	0.39	0.387	0.393	0.391	0.439	0.379	0.424	0.438	0.248	0.247	0.83
Cl <sup>-</sup>	ppm	0.377	0.339	0.576	0.329	0.59	0.371	0.486	0.554	0.226	0.127	0.132
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	ppm	n.a.	0.537	0.494	1.525							
Br <sup>-</sup>	ppm	n.a.	1.209	1.228	1.657							
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	ppm	0.342	0.396	0.172	0.357	0.478	1.198	0.147	1.966	n.a.	0.185	n.a.
PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	ppm	n.a.	0.124	n.a.	n.a.							
SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	ppm	6.403	4.197	0.517	4.855	11.708	7.403	12.13	23.212	5.91	5.209	6.5

\*偵測極限 N.D.(mg/L)：鎘 < 0.000007、銅 < 0.000016、鋅 < 0.000020、鉛 < 0.000003、鎳 < 0.000011、鉻 < 0.000007。

表十一、南湖山屋周圍土壤樣本成分檢測。

土壤樣本		464	465	466	467
地點		南湖山屋旁 (紮營處 A)	南湖山屋樓地	紮營處 B	廁所
採樣日期		2019/7/10	2019/7/10	2019/7/10	2019/7/10
<b>基礎檢測</b>					
項目	單位				
pH	-	4.77	5.48	5.74	5.73
EC	us/cm	449.4	145.7	45.43	33.37
TOC	%	5.507	7.271	1.152	0.935
有機質含量	%	9.495	12.537	1.987	1.612
含水量	%	0.76	0.77	0.22	0.21
<b>重金屬</b>					
項目	單位				
鎘	mg/kg	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
銅	mg/kg	39.296	98.555	223.5	47.901
鋅	mg/kg	0.806	N.D.	N.D.	N.D.
鉛	mg/kg	3.224	0.403	1.403	1.002
鎳	mg/kg	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
鉻	mg/kg	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

\*偵測極限 N.D.(mg/kg)：鎘 < 0.000007、銅 < 0.000016、鋅 < 0.000020、鉛 < 0.000003、鎳 < 0.000011、鉻 < 0.000007。



圖二十七、南湖山屋周圍土壤樣本採集地點。圖中黃色圖示標示處為土壤樣本採集地點，綠色房屋圖示為南湖山屋所在地，綠色人像圖示為山屋廁所。

### 三、建立臺灣、楚南氏與南湖山椒魚生理資料

為收集臺灣的山椒魚於野外棲地的正常生理值，以利於未來於實驗室的微電腦斷層時山椒魚健康與緊迫的生理監測。首先使用東方蝾螈 (*Cynops orientalis*) 建立心跳監測流程，以此流程為基礎建立山椒魚生理監測標準流程，詳述於附件二。預備實驗顯示麻醉深度會影響東方蝾螈的心跳，因此在正式的調查中，我們在山椒魚進行麻醉前後皆量測一次他們的呼吸與心跳，記錄一般與麻醉情況下山椒魚的體溫與心跳，包括 16 隻臺灣山椒魚、9 隻楚南氏山椒魚及 7 隻南湖山椒魚的心跳及體溫資料。

以 testo 885-1 DV 式高階熱像儀偵測 820 林道、南湖大山等地的臺灣山椒魚 (n=16)、楚南氏山椒魚 (n=9)、以及南湖山椒魚 (n=7) 的體表溫度、攜帶式都卜勒儀 (ES-100VX MiniDoppler) 量測心跳，收集其生理資料。記錄 (a) 發現於原始棲地的體表溫度、(b) 捉離原棲地麻醉前的體表溫度、(c) 麻醉完成後的體表溫度、(d) 捉離原棲地麻醉前的心跳頻率、(e) 麻醉完成後的心跳頻率 (表十二)。

分析方式使用 t-test 分析不同處置之下的體表溫度以及心跳頻率差異，以及使用線性迴歸模型分析麻醉前後的體表溫度與呼吸頻率之間的相關性 (表十三、表十四)。

本研究顯示，臺灣山椒魚、楚南氏山椒魚與南湖山椒魚於原棲地時體表溫度分別為  $8.99^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 2.63$ )、 $8.2^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 1.97$ ) 與  $11.5^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 1.30$ )。麻醉後臺灣山椒魚、楚南氏山椒魚與南湖山椒魚體溫分別為  $12.93^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 2.64$ )、 $13.99^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 0.98$ ) 與  $15.10^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 0.81$ )。顯示在原棲地時的南湖山椒魚體溫高於臺灣山椒魚與楚南氏山椒魚。而這三種山椒魚麻醉後的體溫皆高於原棲地剛發現時的體溫。麻醉後的體溫也是以南湖山椒魚最高。麻醉前後的心跳頻率，南湖山椒魚高於臺灣山椒魚與楚南氏山椒魚。

以成對 t-test 分析同種山椒魚內麻醉前後生理資料平均值，在三種山椒魚種內剛發現體溫和麻醉後體溫皆有統計差異。而麻醉前後心跳，僅臺灣山椒魚的麻醉前後心跳次數有統計差異 (P 值  $0.001037 < 0.05$ )。

以 t-test 分析，比較不同種山椒魚種間上述生理資料的平均數差，在 (a) 剛發現於原始棲地的體表溫度，南湖山椒魚高於臺灣山椒魚及楚南氏山椒魚。(P 值分別為  $0.011044$  和  $0.000723 < 0.05$ )；(b) 捉離原棲地麻醉前的體表溫度，楚南氏山椒魚高於臺灣山椒魚 (P 值  $0.01116 < 0.05$ )；(c) 麻醉後體表溫度，南湖山椒魚高於楚南氏山椒魚及臺灣山椒魚、(P 值分別為  $0.007429$  和  $P=0.029282 < 0.05$ )；(d) 麻醉前的心跳，三種山椒魚之間沒有種間差異 ( $P > 0.05$ )；(e) 麻醉後的心跳，南湖山椒魚高於楚南氏山椒魚和臺灣山椒魚 (P 值  $0.000936$  和  $0.000018 < 0.05$ )。

分析 (a) 麻醉前的體表溫度以及麻醉前的心跳頻率相關性及 (b) 麻醉後的體表溫度與麻醉後的心跳頻率相關性，在此三種山椒魚，麻醉前的體表溫度以及麻醉前的心跳頻率相關性不顯著 ( $P=0.232 > 0.05$ ) (表十三)。麻醉後的體表溫度與麻醉後的心跳頻率雖統計上呈現顯著相關 (表十四)，但修正後的  $R^2$  只有  $0.01501$ ，只能夠解釋 2% 的結果。

表十二、體表溫度與心跳頻率等生理資料平均值 ( $\pm$  標準差)。

山椒魚種類	臺灣山椒魚	楚南氏山椒魚	南湖山椒魚
樣本數	16	9	7
原棲地時的體表溫度 ( $^{\circ}\text{C}$ )	$8.99 \pm 2.63$	$8.20 \pm 1.97$	$11.50 \pm 1.30$
麻醉前體表溫度 ( $^{\circ}\text{C}$ )	$13.76 \pm 1.86$	$15.20 \pm 0.70$	$14.54 \pm 1.60$
麻醉後體表溫度 ( $^{\circ}\text{C}$ )	$12.93 \pm 2.64$	$13.99 \pm 0.98$	$15.10 \pm 0.81$
麻醉前心跳頻率 (次/分鐘)	$56.63 \pm 6.92$	$54.67 \pm 8.19$	$63.43 \pm 12.42$
麻醉後心跳頻率 (次/分鐘)	$48.56 \pm 7.45^{\text{ab}}$	$48.67 \pm 3.60^{\text{b}}$	$60.00 \pm 3.46^{\text{a}}$

\*sd: 標準差

表十三、麻醉前體表溫度與麻醉前心跳頻率的線性迴歸結果。

項目	Estimate	Std. Error	t value	Pr ( $> t $ )
(Intercept)	12.62264	1.47485	8.559	1.15E-09
麻醉前心跳頻率 (次/分鐘)	0.03006	0.02464	1.22	<b>0.232</b>

表十四、山椒魚麻醉後體表溫度與麻醉後心跳頻率之線性迴歸分析結果。

項目	Estimate	Std. Error	t value	Pr ( $> t $ )
(Intercept)	3.1216	1.8233	1.712	0.0969 .
麻醉後心跳頻率 (次/分鐘)	0.2069	0.0354	5.846	<b>1.9e-06 ***</b>

Multiple R-squared: 0.04579 Adjusted R-squared: 0.01501

#### 四、分析太魯閣國家公園內山椒魚是否有蛙壺菌感染

##### 蛙壺菌 5.8S 核糖體 DNA 正控制組建立

為了建立監測蛙壺菌感染實驗的聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 正控制組，我們參照 O'Hanlon *et al.* (2018) 與 Goka *et al.* (2009) 所發表的文獻，委請生技公司合成 500bp 之蛙壺菌核糖體 DNA，做為正控制組。為了建立檢測蛙壺菌 DNA 的標準步驟與增加正確率與專一性，利用巢式 PCR (nested PCR) 反應擴增蛙壺菌 18S、5.8S 與 28S ribosomal RNA 基因序列。第一次 PCR 所用的引子為順向引子 Bd18SF1 與反向引子 Bd28SR1，再利用 PCR 擴增將蛙壺菌正控制組的 DNA (包含 28S、5.8S 與 18S 核糖體的 DNA 基因序列)，而後選殖入 pUC57 質體中。再利用巢式引子 (nested primer) 對 Bd1a 與 Bd2a，經 PCR 將蛙壺菌的 5.8S 核糖體 DNA 基因序列 (300 bp) 擴增出來，並利用瓊脂膠體電泳分析，同時也進行 DNA 序列分析。

為確定我們使用的 Taq 與 PCR 條件所能成功擴增蛙壺菌 5.8S 核糖體正控制組 DNA 的最低複本數 (copy 數)。我們進行  $10^8$ 、 $10^6$ 、 $10^4$ 、 $10^2$ 、10、1 copy 的正控制組 DNA 進行目標片段的擴增，結果如圖二十八，此方法在複本數接近 1 的正控制組 DNA 下依然能增幅出目標片段 (~700 bp)。

##### 巢式 PCR 反應檢測表皮拭子 (SWAB) 萃取之 DNA 是否帶蛙壺菌 DNA

參考 Goka *et al.* (2009) 發表資訊，以 NP-40 Lysis buffer (NP-40/Proteinase k/NaCl/EDTA/Tris-HCl) 自野生山椒魚採集之表皮拭子 (SWAB) 萃取 DNA，保存於 1X TB buffer。萃取純化之 DNA 以引子對 Bd18SF1 與 Bd28SR1 擴增蛙壺菌 18S、5.8S 與 28S 核糖體 RNA 基因序列片段，擴增產物長度約 700 bp。第一次 PCR 的反應產物在 1.2% 瓊脂膠體下分析結果，同時作為第二次 PCR 反應的模板 DNA。第二次 PCR 以引子 Bd1a 及 Bd2a，擴增蛙壺菌 5.8S 核糖體 RNA 的基因序列以增加 PCR 反應檢測蛙壺菌 DNA 的專一性，擴增產物長度約 300 bp。於 1.5% 瓊脂膠體下分析 PCR 結果。

本研究完成 105 份太魯閣國家公園園區內野生山椒魚的皮膚拭子樣本的 DNA 萃取及 PCR 分析，臺灣山椒魚 45 份、楚南氏山椒魚 34 份、南湖山椒魚 26 份（表十五、表十六）。共 9 個樣本在 1<sup>st</sup> PCR 反應擴增出 DNA 片段，其中 1 個樣本在 2<sup>nd</sup> PCR 亦增幅出擴增產物，推測 1<sup>st</sup> PCR 擴增出 DNA 應為非專一性擴增。擴增出 DNA 片段的樣本中，1 份採自武嶺營區，其餘為在 820 林道採集的樣本。南湖山區目前所採集到之皮膚拭子樣本進行 DNA 粗萃取後，1<sup>st</sup> PCR 並無擴增出蛙壺菌 18S、28S 核糖體 RNA 的 DNA 片段。第二次 PCR 擴增出約 300 bp 之目標片段的樣本，以引子 Bd1a 及 Bd2a 對此 300 bp 之片段，經 3730XL DNA 序列分析儀（ABI）分析其核苷酸序列，其 296 bp 序列與建置的正控制組序列完全相同（圖三十一）。

對應此情況，我們挑選在 1<sup>st</sup> PCR 擴增出 DNA 片段的數個 DNA 粗萃樣本，搭配數支 PCR 結果為陰性的樣本，委送家畜衛生試驗所依照 OIE 水生動物診斷方法手冊方法操作，以釐清是否為正控制組 DNA 污染 PCR 反應試劑所致，測試的結果為陰性（附件十六），未檢測出蛙壺菌核糖體 5.8S DNA 片段。

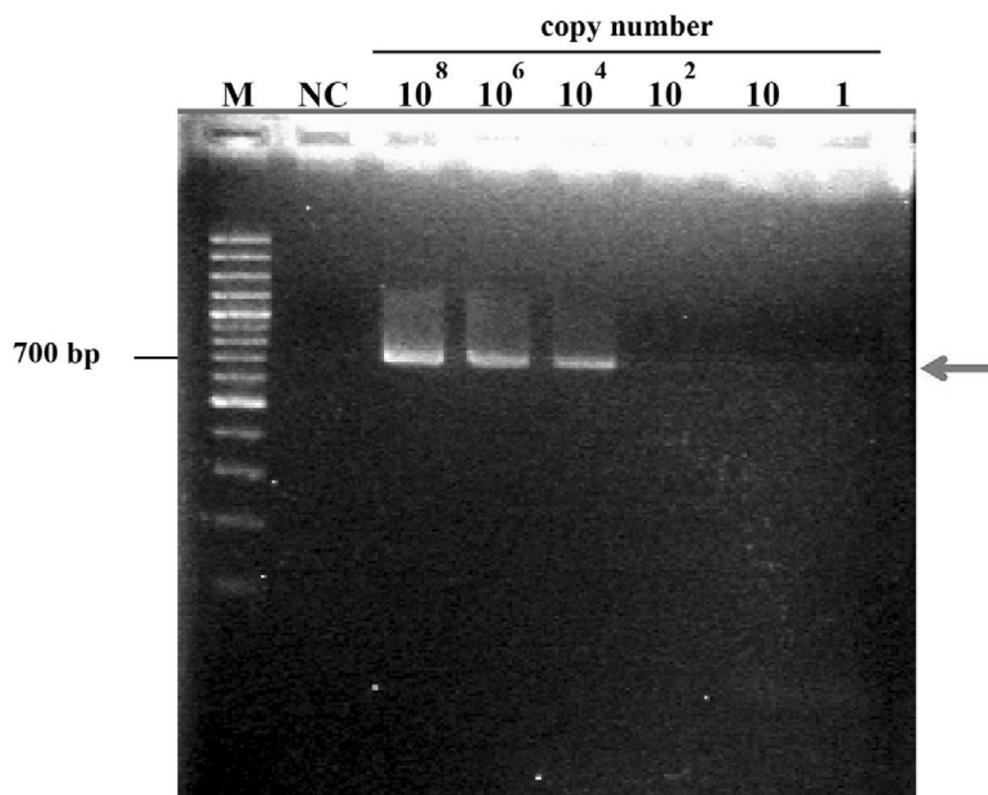
本實驗結果推測目前太魯閣國家公園區內的山椒魚族群並未受蛙壺菌感染或影響。

表十五、太魯閣國家公園區內山椒魚表皮拭子蛙壺菌 DNA 檢測情形。(物種別)

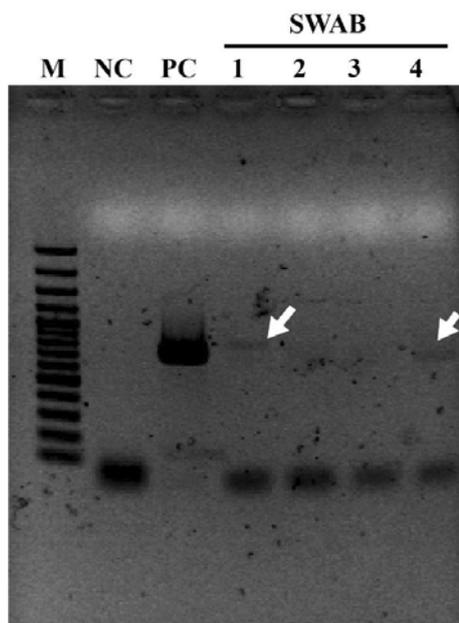
種類	分析樣本數	2nd PCR 陽性檢出數
臺灣山椒魚	45	1
楚南氏山椒魚	34	0
南湖山椒魚	26	0
合計	105	1

表十六、太魯閣國家公園區內山椒魚表皮拭子蛙壺菌 DNA 檢測情形。(地區別)

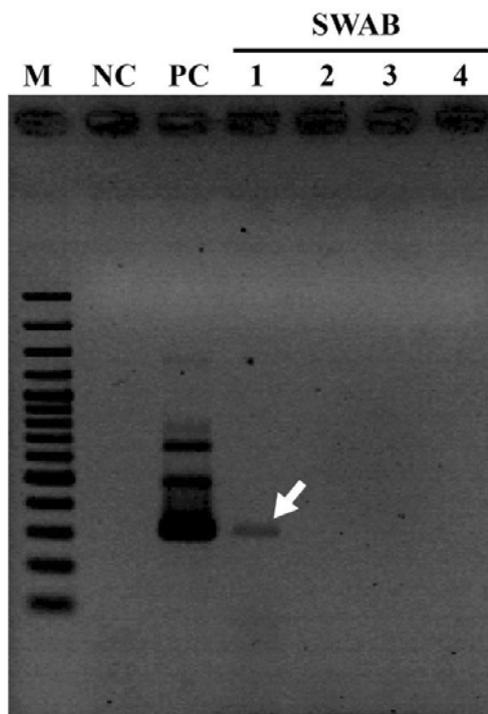
地區	分析樣本數	2nd PCR 陽性檢出數
武嶺營區	4	0
820 林道	68	1
南湖山屋	7	0
中央尖溪源頭	10	0
中央尖溪支流	16	0
合計	105	1



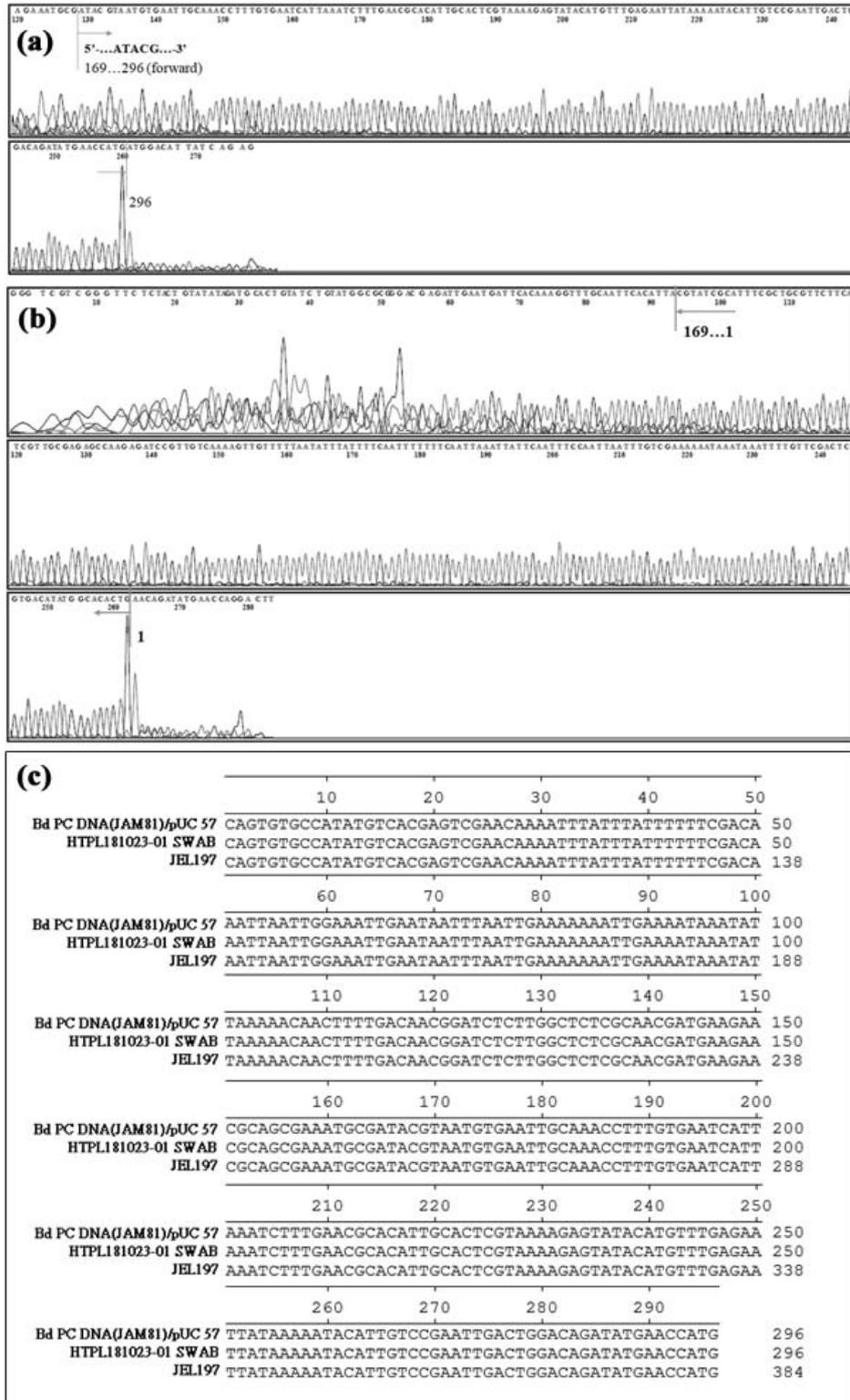
圖二十八、不同複本數 (copy number) 的正控制組 DNA 經 Bd18SF1 與 Bd28SR1 引子擴增後之瓊脂電泳膠圖。紅色箭頭為增幅出之目標片段 (約 700 bp)。M : DNA 標準品 (100 bp DNA ladder ; 100 ng/uL) ; NC : 負控制組。Copy number 為正控制組 DNA 的副本數。



圖二十九、以 Bd18SF1、Bd28SR1 擴增蛙壺菌 18S、5.8S 與 28S 核糖體 RNA 基因序列片段。M：DNA 標準品（100 bp DNA ladder（100 ng/uL））；NC：負控制組；PC：正控制組（擴增產物 700 bp）；SWAB1：HTPL181023-01（800 bp）；SWAB2：HTPL181023-02；SWAB3：HTPL181023-03；SWAB4：HTPL181023-04（700 bp）。白色箭頭表樣本擴增後的 PCR 產物。



圖三十、以引子 Bd1a 及 Bd2a，維持與第一次 PCR 相同反應條件，擴增蛙壺菌 5.8S 核糖體 RNA 基因序列，SWAB1 樣本擴增出長度約 300 bp 的產物(白色箭頭)。M：DNA 標準品（100 bp DNA ladder（100 ng/uL））；NC：負控制組；PC：正控制組（擴增產物 296 bp）；SWAB1：HTPL181023-01（300 bp）；SWAB2：HTPL181023-02；SWAB3：HTPL181023-03；SWAB4：HTPL181023-04。



圖三十一、SWAB 1 (HTPL181023-01) 經巢式 PCR 反應後的擴增片段定序結果，(a) 順向引子 Bd1a 定序波形，(b) 反向引子 Bd2a 定序波形，將兩者所得序列合併，比對正控制組 (Bd PC DNA (JAM81) /pUC57) 及 NCBI 資料庫比對出與其相似之蛙壺菌品系 JEL197，三者在此 296 bp 核苷酸序列完全相同。

## 五、分析臺灣、楚南氏與南湖山椒魚骨骼型態資料

### 建立山椒魚微電腦斷層掃描造影標準流程

骨骼形態是重要的動物分類依據，為了建立臺灣的骨骼形態資料，107 年 5 月 16 日，我們以火蠓蠟模擬山椒魚，進行微電腦斷層掃描造影，建立實驗流程。7 月 30 日、8 月 8 日、9 月 19 日完成以楚南氏山椒魚 1 隻、南湖山椒魚 1 隻、臺灣山椒魚 1 隻，建立微電腦斷層掃描造影標準流程。詳細流程述於附件三。

### 臺灣、楚南氏與南湖山椒魚骨骼型態

#### 1. 頭部骨骼 (skull)：

有尾目的頭骨由內部的軟骨組織 endochondral bones 以及外部的硬骨 dermal bones 所組成 (Duellman and Trueb, 1986)，因為 micro CT 只有辦法區別出軟骨，此處只就 Dermal bones 的部分討論。以下將頭骨分成四個部分分別描述以及討論。

#### Dermal skull roof

從顱骨的背面 (dorsal) 來看，不同個體以及種類山椒魚在 premaxilla 延伸到 nasal 接合處的形狀有很大的差異。南湖山椒魚有 anterodorsal fenestra，nasal 和 frontal 之間也有圍繞出孔洞，楚南氏山椒魚缺乏 anterodorsal fenestra，反而是在 nasals 之間圍繞出孔洞，臺灣山椒魚有 anterodorsal fenestra，兩片 nasals 之間也有圍繞出長條形的孔洞。

#### 懸垂骨 (suspensorium)

依照 micro CT 的結果，三種山椒魚 (南湖、楚南氏、臺灣) 的 Suspensorium 在不少骨骼都有型態差異，差異最大的是 prootic 以及 squamosal 之間的相對大小。從背面來看，南湖山椒魚與臺灣山椒魚的 squamosal 比 prootic 大許多，但是臺灣山椒魚的 squamosal 長度又更長，而楚南氏山椒魚的 squamosal 和 prootic 比例則較為接近。另外三種山椒魚的 pterygoid anterolateral process 長度與形狀也有差異，其中以楚南氏山椒魚的 pterygoid anterolateral process 相對長度最長。

## 上顎 (palate)

山椒魚的 vomerine teeth 不只在同個個體生活史之間會產生變化(Xiong *et al.*, 2014), 不同個體之間也會有差異, 在過去的研究中 vomerine teeth 也是一個分析時常用的衍徵 (Zhang *et al.*, 2006), 但是臺灣過去的研究顯示 vomerine teeth 的型態以及齒數在更小的分類單元(taxon)分類上並不是一個穩定的特徵(賴, 2008), 是否能依照 vomerine teeth 的型態來進行種或是族群尺度的分類還需要更多資料才能進行下一步推論。

## 下顎 (Mandible)

整個 Mandible 由四種硬骨組成, 分別是 dentary, prearticular, angular, 還有 articular。Dentary 是整個 Mandible 最大的骨頭, 兩塊 Dentaries 形成向內的弧度, 並且在前端組成 mandibular symphysis。臺灣五種山椒魚的 Mandible 形態上都有些許差異, 依照其他研究 (Zelditch *et al.*, 2017) 顯示, 下顎的大小或是形狀在特定情況下會與食性以及適應演化相關, 但是臺灣的山椒魚的下顎是否有適應性演化的作用則需要更加精細的測量與分析才能得知更多資訊。

## 2. 中軸骨 (Axial skeleton) :

小鮠科的中軸骨大約分成五個部分, 由前開始是單節的 atlas, 15 - 19 節的 trunks, 連接 ilium 的單節 sacrum, 2 - 4 節的 caudosacrals, 以及 15 - 20 節的 caudal vertebrae (見圖三十三)。臺灣過去的相關研究測量了臺灣五種山椒魚的中軸骨數量差異 (陳及呂, 1987; 賴, 2008), 顯示出不管是種間或是種內, 中軸骨的數量都可能有變異, 但需要累積更多的資料。依照這一次的 micro CT 結果, 除了 atlas 以及 sacral 的數量在不同山椒魚都是 1 節, 其他部分的中軸骨數量都有差異, 其中 caudal 的差異最大 (見表十七), 推估 caudal 節數的差異特別大可能與體型差異或是有無斷尾有關。不同種山椒魚的完整全身骨骼請參閱附件四。

## 3. 附肢骨 (Appendicular skeleton) :

## 胸帶 (Pectoral girdle) 與前肢 (forelimbs)

胸帶只有由 procoracoid 和 coracoid 融合形成的單一 scapulocoracoid 有骨化，其他部分都維持軟骨，scapulocoracoid 有一凹窩連接 humerus，humerus 的遠端分別連接 radius 以及 ulna，radius 的型態近端維持圓筒狀，遠端則變成寬大的扁平狀，而 ulna 則相反，是近端呈扁平狀（見圖三十四）。radius 以及 ulna 遠端連接的是一組骨化的 mesopodium，大約包含 6-7 個小骨頭，在不同物種以及生活史之間骨化程度會有差異。

臺灣五種山椒魚的 mesopodium 可能在生活階段以及種類之間皆有差異，比較的結果顯示臺灣的五種山椒魚基本的 mesopodial elements 塊數是 7 塊（見表十八）。除觀霧山椒魚外的四種山椒魚外側的 ulnare 與 intermedium 融合為一塊，在近端與 radius 以及 ulna 相接，遠端與 centrale 相接，唯觀霧山椒魚的 ulnare 與 intermedium 的硬骨是分離的，彼此之間只以軟骨連接。在 mesopodium 的遠端有 basale commune 於遠端連接 metacarpal 1 與 2，distal carpal 3 與 4 則於遠端分別連接 metacarpal 3 與 4。除觀霧山椒魚外的四種山椒魚在 metacarpal 1 的近端有兩塊骨頭，分別是 prepolles 與 radiale，radiale 在近端與 radius 相接。臺灣五種山椒魚的前肢 metacarpal 數量皆是四支，與外表所見的四根前指對應，指式 (phalangeal formula) 在種間與種內都存在變異，這次的結果顯示楚南氏山椒魚的指式為 2-2-2-2，觀霧山椒魚的指式為 1-1-2-1，南湖山椒魚的指式為 2-2-2-2，臺灣山椒魚的指式為 2-2-2-2，但指骨的節數可能會受再生階段與畸形影響。

## 腰帶 (Pelvic girdle) 與後肢 (hind limbs)

山椒魚的後肢構造與前肢相似，femur 的近端與 acetabulum 連接，femur 的長度與 humerus 相當，近端較為接近圓柱，遠端則變為扁平狀，在靠近近端有一鉤狀突起 trochanter（見圖三十五）。Femur 的遠端則連接 fibia 以及 tibia，fibia 以及 tibia 的兩端為扁平狀，遠端共同與 mesopodial elements 連接。有尾目的基本 mesopodial elements 形式為 9 塊，與前肢一樣，數量以及骨化程度有個體差異。fibia 以及 tibia 的遠端連接 intermedium、tibiale、以及 fibulare，intermedium 的遠端以

及 fibulare 共同連接 centrale，tibiale 的遠端連接 prehallux。五種山椒魚之中觀霧山椒魚的 mesopodial elements 與其他種差異最大，只有 6 塊硬骨，與典型的 9 塊 mesopodial elements 比較，除了缺乏 distal tarsal 5 之外，tibiale 以及 prehallux 也沒有完成骨化。

mesopodim 的遠端有一塊 basale commune 與數塊 distal tarsal，basale commune 連接於 metatarsal 1 與 2，外觀有五隻腳趾的山椒魚有五根 metatarsals，distal tarsal 的數量為 3，而外觀有四隻腳趾的山椒魚只有四根 metatarsals，distal tarsal 的數量為 2，metatarsal 與 distal tarsal 的對應方式與前肢相似（見表十九）。觀霧山椒魚以及臺灣山椒魚的後腳趾外觀數量為 4，趾式方面分別是觀霧山椒魚 2-2-3-2，臺灣山椒魚 2-2-3-2，而在後趾外觀為 5 趾的山椒魚之中，楚南氏山椒魚的趾式為 2-2-3-3-1，南湖山椒魚為 2-2-3-2-0（代表第五趾只有掌骨沒有趾骨），阿里山山椒魚為 2-2-2-3-2。

本研究初步地描述臺灣五種山椒魚的硬骨差異，單純由使用的樣本來看，觀霧山椒魚的前後肢腕骨的骨化程度與其他四種山椒魚差異最大，骨化腕骨的數量少於其他種類，尾骨的數量也較其他種類少，另外五種山椒魚在頭骨骨骼之間的開孔程度也有許多差異存在。本研究分析用的樣本在五種山椒魚的數量都是各一隻，無法明確比較同一族群或是不同族群在骨骼解剖構造上是否有差異存在，這需要更多樣本才能做出更加完整的描述，另外本研究的分析只有使用初步的型態描述，如果需要細緻地比較骨骼的形狀以及大小，則需要用其他軟體以及測量方式才能達成，未來如果有其他需求將可以往這個方向進行。

表十七、臺灣五種山椒魚的中軸骨數量差異。

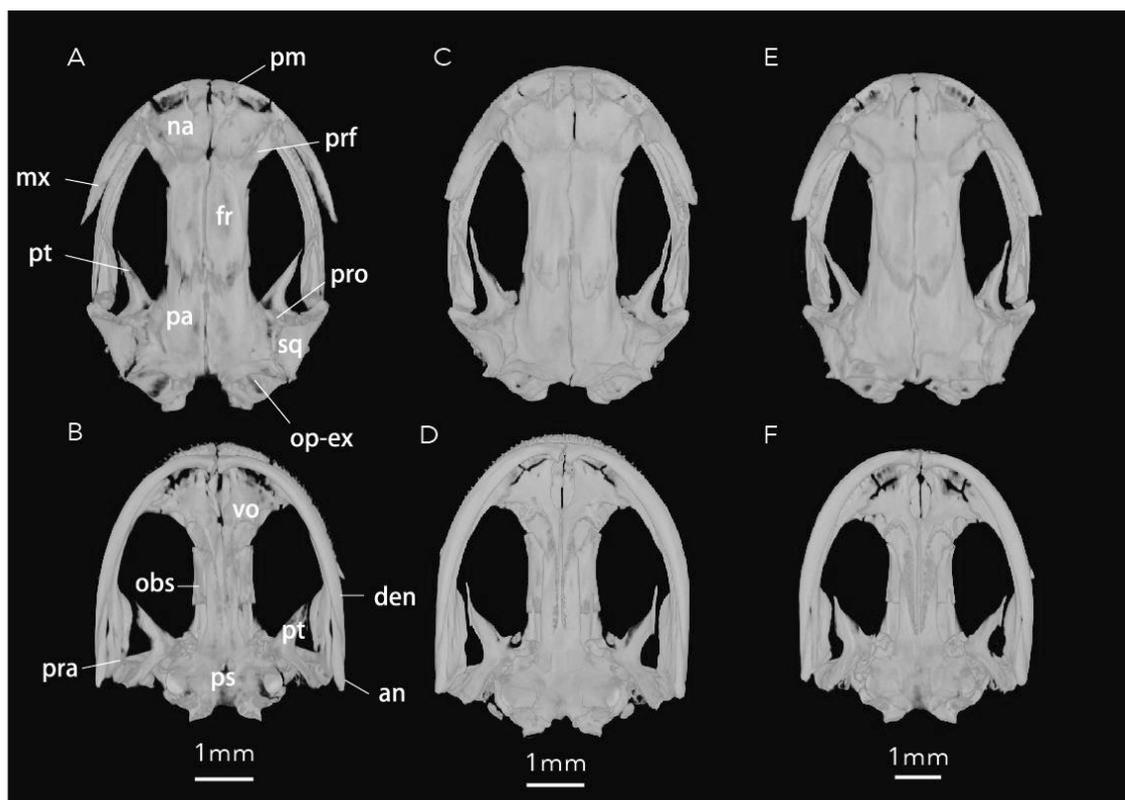
Skeleton type	<i>H. fuca</i>	<i>H. formosanus</i>	<i>H. sonani</i>	<i>H. glacialis</i>	<i>H. arisanensis</i>
Atlas number	1	1	1	1	1
Trunk number	15	15	16	16	16
Sacrum number	1	1	1	1	1
Caudosacral number	2	2	2	2	2
Caudal number	16	18	19	21	19

表十八、臺灣五種山椒魚的前肢掌骨數量以及指式差異。

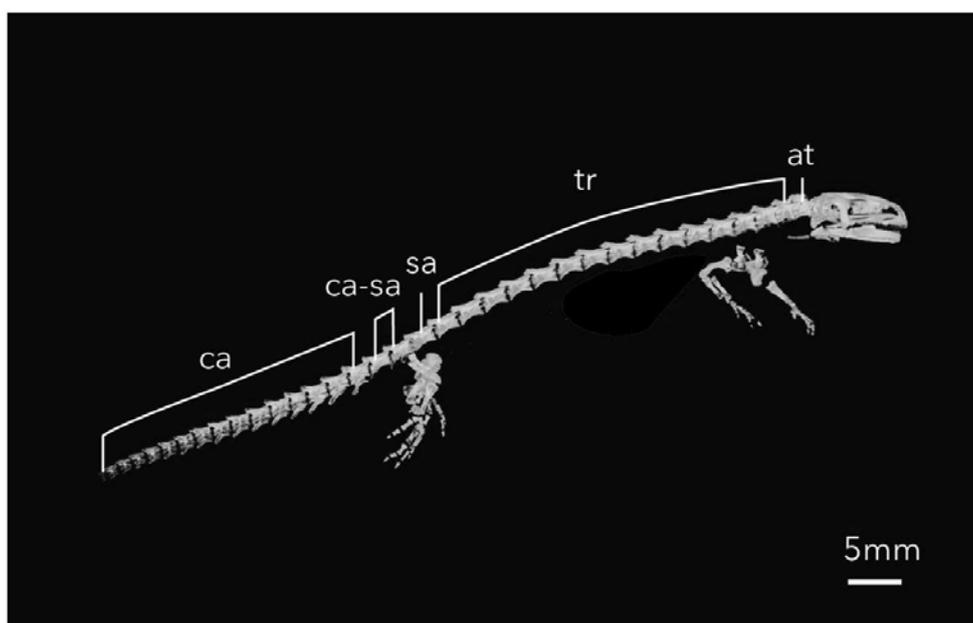
Skeleton type	<i>H. fuca</i>	<i>H. formosanus</i>	<i>H. sonani</i>	<i>H. glacialis</i>	<i>H. arisanensis</i>
Mesopodial elements number	6	7	7	6	6
Fore phalangeal formula	1-1-2-1	2-2-2-2	2-2-2-2	2-2-2-2	2-2-2-2

表十九、五種山椒魚的 mesopodial elements number 以及後腳趾式 (hind phalangeal formula) 差異。

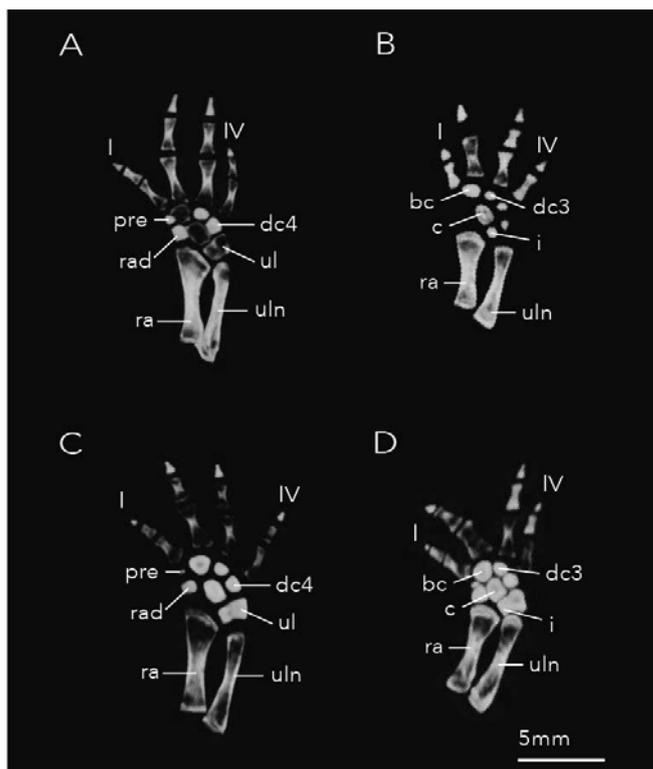
Skeleton type	<i>H. fuca</i>	<i>H. formosanus</i>	<i>H. sonani</i>	<i>H. glacialis</i>	<i>H. arisanensis</i>
Mesopodial elements number	6	8	9	9	9
Hind phalangeal formula	2-2-3-2	2-2-3-2	2-2-3-3-1	2-2-3-2-0	2-2-2-3-2



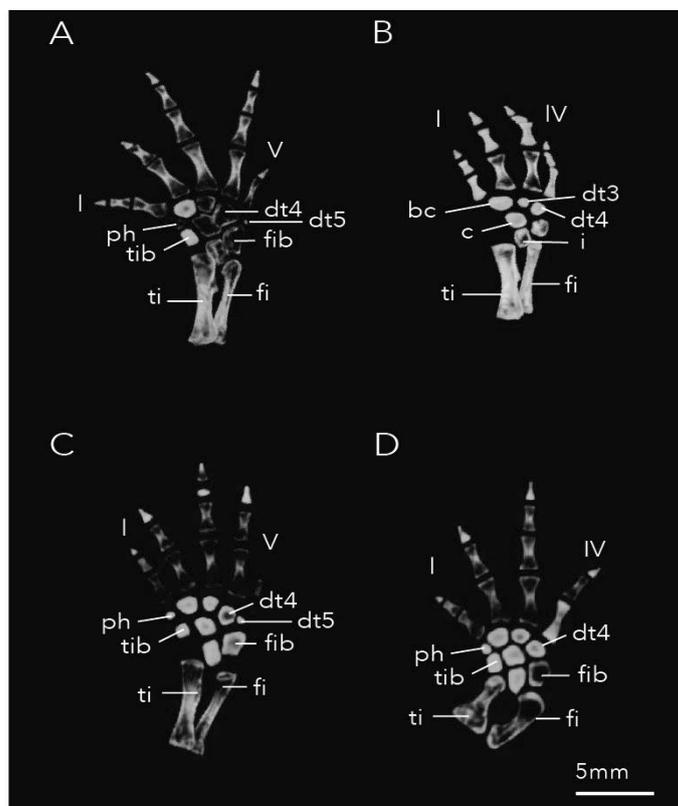
圖三十二、三種山椒魚的頭骨型態，分別是 (A) *Hynobius glacialis* in dorsal view, (B) *Hynobius glacialis* in ventral view, (C) *Hynobius sonani* in dorsal view, (D) *Hynobius sonani* in ventral view, (E) *Hynobius formosanus* in dorsal view, (F) *Hynobius formosanus* in ventral view。



圖三十三、觀霧山椒魚的中軸骨側面圖。



圖三十四、山椒魚的右前肢 (in dorsal view)，分別是 (A) *Hynobius sonani*, (B) *Hynobius fuca*, (C) *Hynobius glacialis*, (D) *Hynobius formosanus*。



圖三十五、不同山椒魚的左後肢 dorsal view。(A) *Hynobius sonani*, (B) *Hynobius fuca*, (C) *Hynobius glacialis*, (D) *Hynobius formosanus*

## 六、估算出合歡山 820 林道、南湖山區山椒魚數量估算

自標放調查期間 106 年至 108 年 9 月，於合歡山 820 林道及南湖山區兩大區域進行山椒魚 VIE-tag 標放。每次調查對捕捉到的山椒魚進行 VIE-tag 標記(MARK)後釋放，記錄之後調查之再捕捉 (mark-recapture) 個體，並對新捕捉到的個體進行 VIE-tag 標記。

以 MARK 軟體進行 (一) 合歡山 820 林道及 (二) 南湖山區兩地區山椒魚族群大小估算，採用 Jolly-Seber model，比較不同參數條件的 model 選擇最低 AICc 值的 model 估算族群大小 ( $N$ )。評估的參數 (parameter) 包含生存率 (survival probabilities,  $\Phi, \phi$ )、捕捉機率 (probability of capture,  $p$ )。

### (一)、合歡山 820 林道樣線路面山椒魚估算

820 林道樣線寬約 2-5 公尺，長約 7 公里。調查期間完成 199 隻山椒魚的軟性螢光標放，有重複捕捉 (recapture) 28 隻次 (圖三十六)。以 MARK 估算族群大小，依 AICc 值挑選  $\{\phi(t), p(t)\}$  (生存率與捕捉機率隨時間改變) 模式 (表二十)。估算結果，820 林道樣線上的山椒魚數量，106 年為 147 隻，107 年 237 隻，108 年 237 隻 (表二十一)，研究全期數量估計平均為 222 隻。而 107 年 8 月至 108 年 4 月，山椒魚數量估計平均為 385 隻，估算最高隻數為 536 隻。

### (二)、南湖山區

南湖山區包含樣區舊雲稜山莊、中央尖溪、香菇寮、南湖圈谷等區，期間共進行軟性螢光標記標放 97 隻山椒魚，重複捕捉 5 隻次。

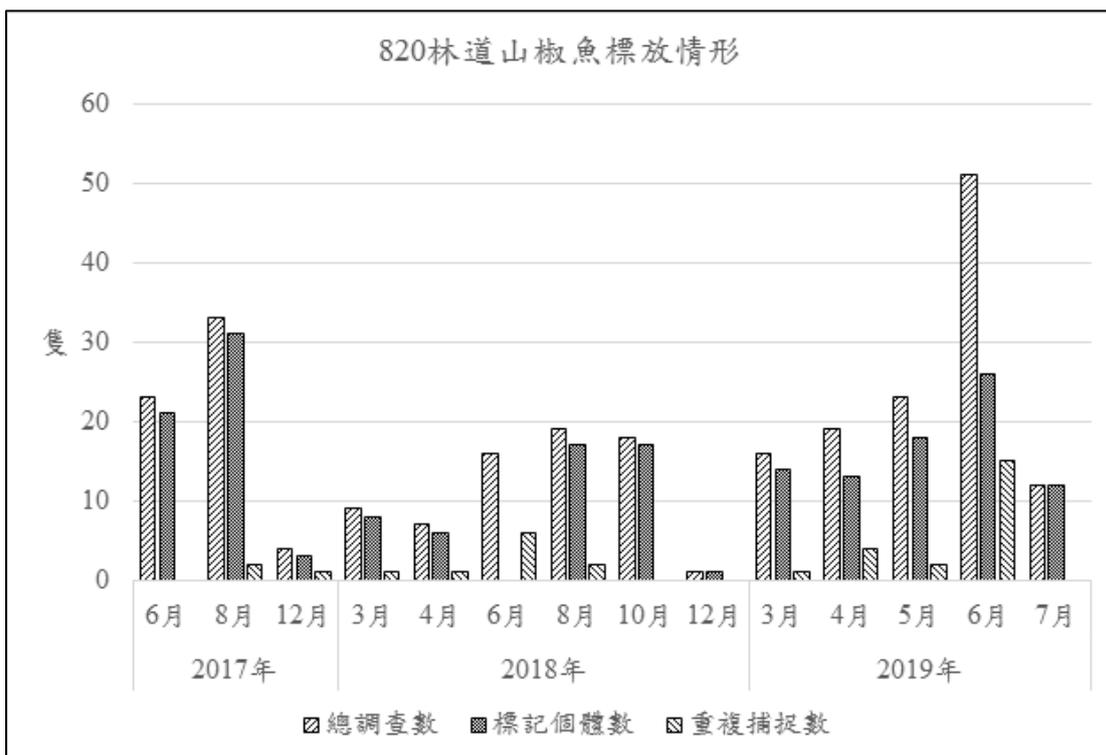
不同變因組合的模式挑選 AICc 最低的  $\{\phi(\cdot), p(\cdot)\}$  (生存率一致、捕捉機率一致) 與次低之  $\{\phi(t), p(\cdot)\}$  (生存率隨時間改變，捕捉機率一致) 模式，比較  $\Delta AICc$  大於 0-2，因此選擇之最適合模型為  $\{\phi(\cdot), p(\cdot)\}$ 。(表二十二)

估算的存活率  $\Phi$  估計值 0.9236773 (SE=0.0392654)，95% 信賴區間為 [0.8024566, 0.9730136]；捕捉機率  $p$  估計值 0.1372215 (SE=0.0541787)，95% 信

賴區間為[0.0609108, 0.2805728]。族群大小的估計如表二十三所示。南湖山區的山椒魚 107 年至 108 年三個調查季的族群數量估計值分別為 181 隻、167 隻及 173 隻，平均約 174 隻。而 107 年 7、8 兩月至 108 年 7、9 兩月，山椒魚數量估計平均為 185 隻，估算最高隻數為 358 至 481 隻。

可以觀察到，團隊在 820 林道總共進行 199 隻山椒魚的標記，此數量很接近該樣區全期的平均估計值（222 隻），再捕捉率低（820 林道 14%）。調查期間曾調查到已標記的山椒魚會躲藏於土中，而目前調查所使用的翻找方法僅能捕捉到在林道地面活動的山椒魚，推測其為造成較低的再捕捉率的原因。考量此現象，本研究所估算出的山椒魚數量，可能低估 820 林道實際山椒魚族群大小，而接近活動於樣線沿線地表的的山椒魚數量，有一定比例的山椒魚可能於被標記釋放即鑽入土中、躲藏於陡坡或往河谷移動。

南湖山區包含舊雲稜山莊、中央尖溪、香菇寮、南湖圈谷等南湖溪上游區域，包含的地理範圍較大，實際上 820 林道的山椒魚數目可能會較南湖大山更多。瞭解特定棲地山椒魚族群的數量與密度，對於動物保育極其重要。利用捕捉、標定、再捕捉的方法去估算族群，其準確率依賴於對所研究物種的基礎資料的收集。包括活動範圍、存活率、繁殖季節等等。目前，臺灣的五種山椒魚的上述資料尚未備有系統研究。未來，收集上述資料應為研究上的重要項目。



圖三十六、820 林道山椒魚標放情形。數列左至右為總調查數、標記個體數、重複捕捉數。

表二十、使用 MARK 考慮不同參數模型之族群估算式選擇結果 (820 林道)。

Model*	AICc	$\Delta$ AICc	AICc Weights	Number of Parameter
{ $\phi(t), p(t)$ }	552.5802	0	0.98015	31
{ $\phi(\cdot), p(t)$ }	560.3906	7.8104	0.01974	26
{ $\phi(t), p(\cdot)$ }	605.3799	52.7997	0	21
{ $\phi(\cdot), p(\cdot)$ }	627.2208	74.6406	0	8

\* $\Phi$ ：生存率，p：捕捉機率，t：參數隨時間變化，.：參數不變。

表二十一、以 Jolly-Seber model 估算 106 至 108 年 820 林道樣線的山椒魚數量。

年份	月份	調查次序	估計值*	標準誤	95% 信賴區間	
					下限	上限
106	六	1	23.00	4.689	15.49	34.16
	七	2	147.09	33.562	94.58	228.74
	十二	3	147.09	33.562	94.58	228.74
107	三	4	147.09	33.561	94.58	228.74
	四	5	130.21	83.800	41.07	412.81
	六	6	54.13	25.780	22.31	131.31
	八	7	321.03	232.579	89.88	1146.70
	十	8	385.02	65.660	276.29	536.55
	十二	9	385.02	65.660	276.29	536.55
108	三	10	385.02	65.660	276.29	536.55
	四	11	385.02	65.660	276.29	536.55
	五	12	123.75	25.457	83.03	184.43
	六	13	55.00	43.229	14.13	214.16
	七	14	12.00	3.428	6.93	20.78

\*估算結果以第 2 至 13 調次次序 (灰底欄位) 的估算值為較可信賴之族群大小。

表二十二、使用 MARK 考慮不同參數模型之族群估算式選擇結果（南湖山區）。

Model*	AICc	$\Delta$ AICc	AICc Weights	Number of Parameter
{ $\phi(\cdot), p(\cdot)$ }	122.6656	0	0.93399	6
{ $\phi(t), p(\cdot)$ }	128.5456	5.88	0.04938	10
{ $\phi(\cdot), p(t)$ }	130.8355	8.1699	0.01571	11
{ $\phi(t), p(t)$ }	136.5005	13.8349	0.00092	14

\* $\Phi$ ：生存率，p：捕捉機率，t：參數隨時間變化，.：參數不變。

表二十三、以 Jolly-Seber model 估算 106 至 108 年 8 個調查季南湖山區的山椒魚族群大小。

年份	月份	調查次序	估計值*	標準誤	95% 信賴區間	
					下限	上限
106	十一	1	87.340182	42.533916	35.361283	215.72485
107	七月	2	180.59764	68.001051	88.46339	368.68934
	八月	3	166.81407	67.606939	77.674552	358.25032
108	七月	4	172.60549	75.554706	75.972432	392.15087
	九月	5	223.62562	90.822349	103.97287	480.97564

\*估算結果以第 2 至 4 季（灰底欄位）的估算值為較可信賴之族群大小。



## 第四章 結論

本調查研究完成大肚溪上游（北港河流域、白姑大山）的山椒魚族群調查；大甲溪、濁水溪、南湖溪及木瓜溪等溪流上游的山椒魚棲地調查。研究發現南湖山椒魚的分布範圍可能涵蓋南湖中央尖、無明山、鈴鳴山與畢祿山。在白姑大山有一獨特的山椒魚族群與南湖中央尖的山湖山椒魚親緣關係最近，但分類地位尚待確定。楚南氏山椒魚分布的最北側在 820 林道、最東側在立霧主山、最西側在合歡山、最南側在安東軍山。臺灣山椒魚最北分布於雪山山脈的鎮西堡的塔克金溪與薩克亞金溪上游；最西側在小雪山、最東側在於南湖中央尖山與畢祿山；分布最南側為能高越嶺的塔羅灣溪源頭。結合賴俊祥老師收集的山椒魚遺傳樣本，經 DNA 分析發現臺灣山椒魚有 26 個 *cytochrome b* 單套型 (haplotype)；南湖山椒魚 10 個單套型；楚南氏山椒魚共 30 個單套型。園區內南湖山椒魚、楚南氏山椒魚與臺灣山椒魚的粒線體 *cytochrome b* 還擁有高的單倍型多樣性 ( $> 0.5$ )。這三種山椒魚只有南湖山椒魚核苷酸多樣性偏低 ( $< 0.5\%$ )。並以 *cytochrome b* 的遺傳距離估算分歧時間。收集與分析太魯閣國家公園內臺灣、楚南氏與南湖山椒魚棲地溫度、濕度、光照與水質等環境因子資料，累計記錄期間 2018 年 3 月至 2019 年 3 月。依目前所得數據，合歡山 820 林道整體的山椒魚在林道上被調查到的頻度可能受月最低溫與降雨量的影響。微環境溫度、濕度與光照強度的差異以多變量迴歸分析結果顯示樣線內山椒魚較活躍與較不活躍樣點的溫度、濕度與光照強度無顯著差異。檢測南湖中央尖山區水體成分，南湖山屋旁與南湖南峰水源測得的生化需氧量 (BOD) 為 3.6 mg/L，顯示這兩個地方水源受到有機質的輕度污染。檢測南湖山屋周圍土壤成分，其 pH 值介於 4.77-5.74，總有機碳及有機質含量依序為南湖山屋棲地、南湖山屋旁（紮營處 A）、紮營處 B 及廁所。本研究調查亦完成分析楚南氏山椒魚、臺灣山椒魚及南湖山椒魚的體溫及心跳，建立三種山椒魚基礎生理資料。t-test 分析顯示南湖山椒魚與楚南氏山椒魚在麻醉前後的體溫有顯著差異，同種山椒魚麻醉前後的心跳頻率僅臺灣山椒魚有顯著差異，其

中南湖山椒魚麻醉後的體表溫度與心跳，皆較楚南氏山椒魚與臺灣山椒魚為高。完成 105 份太魯閣國家公園園區內野生山椒魚皮膚拭子樣本分析，目前所採集到之樣本並無陽性案例，推測目前太魯閣國家公園區內的山椒魚族群並未受蛙壺菌感染。完成活體楚南氏山椒魚、南湖山椒魚與臺灣山椒魚的電腦斷層掃描造影，分析臺灣、楚南氏與南湖山椒魚骨骼形態資料，楚南氏山椒魚與南湖山椒魚頭部皆具型態相似的犁骨形態，但腮骨型態不同。三種山椒魚間在中軸骨數目與後腳趾式亦有差異。2017 年至 2019 年在合歡山 820 林道共標放 199 隻山椒魚，且此棲地三種山椒魚有鄰域現象。南湖山區標放 97 隻山椒魚，調查期間兩地皆有重複捕捉個體。由捕捉標放資料估算，107 年 820 林道兩旁（寬 2-5 公尺，長約 7.3 公里）族群族群約為 385 隻（95%信賴區間約為 276 至 537 隻），南湖山區（包含南湖圈谷及中央尖溪）約為 180 隻（95%信賴區間約為 88 至 368 隻）。

## 第五章 建議事項

### 事由一：

政府推動「山林解禁」的同時，為服務登山客與安全性考量，所進行之人工設施施作、動線與山屋設置，應考慮瀕臨絕種特有生物的保育與長期研究監測。

### 說明：

南湖山椒魚被行政院農業委原會野生動物保護法列於一級保育類動物（瀕臨絕種動物）。本研究顯示南湖山椒魚的族群數量與棲地分布相較於其他山椒魚少且皆位於遊客量較多的步道或山屋旁，例如南湖山屋與大禹嶺 820 林道。至今南湖山椒魚只有在南湖中央尖山區與 820 林道 6.1K 之後被調查到。2018 年至 2019 年的研究，緊鄰南湖山屋的後方（北側）就調查到 18 隻南湖山椒魚。若未來山屋維修、整建與遊客活動動線規劃不當，將會影響山椒魚族群的永續存活。

### 建議：

未來，山屋旁的山椒魚族群是否會受南湖山屋整修影響，管理處需要結合研究團隊的調查研究結果、意見與進行長期山椒魚族群監測。在山屋整建後，亦須評估遊客活動對於山椒魚族群的影響。

### 事由二：

新設置的山屋與步道整修，須先進行生態調查、生態衝擊評估與山椒魚族群長期評估。

### 說明：

政府推動「山林解禁」，未來四年內投入 7 億元經費，整建現有山屋設備、步道及告示牌。今年底將先完成 20 座山屋及 45 條步道的整建...。其中，太魯閣國家公園預計今年發包新增 820 林道山屋與屏風山山屋。根據本團隊 2016 年至 2018 年的調查研究，顯示顯示 820 林道同時分布三種特有種山椒魚，包括南湖山椒魚、楚南氏山椒魚與臺灣山椒魚。820 林道是目前全臺灣被監測到同時擁有三種山椒魚唯一的林道。這三種山椒魚皆被行政院農業委原會野生動物保護法列為一級保育類動物。過去的山椒魚分布調查因人力與經費的問題只調查到 820 林道 7.3K 的位置，步道沿線皆是山椒魚的重要棲地。另林道 7.3K 後，雖然不曾進行山椒魚分布調查，根據棲地類型，預測也是臺灣山椒魚與南湖山椒魚的重要棲地。

### 建議：

若必須於大禹嶺 820 林道 7.3K 之後設置山屋，設置之前與之後必須經過詳細的生態評估，包括建材運補時對於林道沿線山椒魚棲地、水系之影響，不宜貿然設置山屋。工程進行前、進行中與進行後，必須比較設置山屋前與設置後物種與

步道沿線生態環境的影響研究。在山屋開放後，亦須評估遊客活動對於山椒魚族群的影響。相同的建議，等同於屏風山山屋的設置。

附件一 臺灣山椒魚棲地微環境（水質與土壤）資料的收集與檢測流程

**臺灣山椒魚棲地微環境（水質與土壤）資料的收集與檢測流程**

檢測地點：臺大生物環境系統工程學系或現地

檢測項目

1.1 水質：酸鹼度（pH）、電導度（EC）、陰離子、重金屬、水溫、DO 溶氧、濁度、氧化還原度（ORP）、生化需氧量（BOD）。

1.2 土壤：酸鹼度（pH）、酸鹼度（pH）、陰離子、重金屬、總有機碳（TOC）。

2. 採樣時間：

於 6 至 9 月進行採樣，每月採樣 1 次，每次收集 10 個樣本。

3. 採樣地點：

3.1 發現山椒魚個體後，沿樣區最上游、最下游、中間處有發現山椒魚的地點，分別收集水流與土壤樣本進行分析，項目參照 1. 檢測項目。

3.2 對樣區中無山椒魚棲息的地點收集土壤、水質樣本分析。

4. 水質檢測方法

4.1 pH、EC、水溫、DO 溶氧：

4.1.1 採樣

a. 於樣點現場檢測，不額外採樣。

4.1.2 檢驗

a. 以水質檢測儀（YSI PRODSS 攜帶式水質儀）直接檢測樣點水體 pH、EC、水溫、DO 溶氧。

## 4.2 氧化還原值 (ORP) :

### 4.2.1 採樣

- a. 於樣點現場檢測，不額外採樣。

### 4.2.2 檢驗

- a. 以氧化還原計測定 ORP 值。

## 4.3 濁度 :

### 4.3.1 採樣

- a. 每一點位以塑膠或玻璃製採樣瓶盛取 500 ml 水樣。

### 4.3.2 檢驗

- a. 保存水樣送至國立臺灣大學生物環境系統工程學系，以濁度計進行濁度測定。

## 4.4 生物需氧量 (BOD)

### 4.4.1 採樣

- a. 每一樣點以塑膠或玻璃製採樣瓶、或 BOD 瓶，盛裝 500ml 水樣。
- b. 樣品採集後需避光並低溫保存 (4°C)，保存期限 48 小時。

### 4.4.2 檢驗

- a. 採集的水體樣本送至國立臺灣大學生物環境系統工程學系，進行生物需氧量檢測。

## 4.5 陰離子 F<sup>-</sup>、Cl<sup>-</sup>、Br<sup>-</sup> : IC 離子層析儀 (實驗室)

### 4.5.1 採樣

- a. 每一點位以塑膠或玻璃製採樣瓶盛取 500 ml 水樣。分析 ClO<sub>2</sub><sup>-</sup>須使用不透光採樣瓶。
- b. 樣本保存期限 28 日。

### 4.5.2 檢驗

- a. 樣本送至國立臺灣大學生物環境系統工程學系，以 IC 離子層析儀分析陰離子。

#### 4.6 重金屬：ICP（實驗室）

##### 4.6.1 採樣

- a. 每一樣點以玻璃製採樣瓶盛裝 500ml 水樣。
- b. 現場添加 1.5–2 ml 硝酸保存水樣。

##### 4.6.2 檢驗

- a. 樣本送至國立臺灣大學生物環境系統工程學系，以感應耦合電漿（ICP）分析法分析重金屬含量。

#### 4.7 現場採樣總量：

- 4.7.1 欲分析 4.1~4.6 全部檢測項目，每個樣點須採集 2000 ml 水體樣本，細分如下：

- a. 塑膠或玻璃製避光採樣瓶 2 瓶，每瓶 500 ml 樣點水體。
- b. 塑膠或玻璃製採樣瓶 1 瓶，每瓶 500 ml 樣點水體。
- c. 塑膠製採樣瓶 1 瓶，每瓶 500 ml 樣點水體，並加入 1.5 至 2 ml 硝酸。

- 4.7.2 採集後的樣本盡可能保持低溫，避免干擾檢測結果。

#### 5. 土壤檢測方法：

- 5.1 土壤檢測的所有項目如 1.2，皆於採樣後送至國立臺灣大學生物環境系統工程學系進行分析，無樣點現場檢測項目。

##### 5.2 採樣方法：

- 5.2.1 每個分析樣本，以鏟子產取樣點土壤裝滿 8 號塑膠封口袋（尺寸 17cm \* 24cm \* 0.04 mm），封緊袋口。

- 5.2.2 裝滿的封口袋外面多套一層封口袋，避免袋子破裂樣本灑出。

5.3 採樣後的土壤樣本送至國立臺灣大學生物環境系統工程學系進行 pH、EC、TOC、陰離子及重金屬分析。使用的分析方法或儀器簡列如下：

檢測項目	pH、EC	TOC	陰離子	重金屬
分析方法/儀器	土壤酸鹼度計、土壤電導度計	濕式氧化法	IC 離子層析儀	感應耦合電漿 (ICP) 分析

附件二

## 山椒魚生理監測標準流程

1. 目的：建立於山椒魚原棲息地量測山椒魚體溫、心跳的方法。以了解在原棲地中山椒於正常狀態下的心跳體溫基礎值。

### 2. 器材：

1. 隔夜曝氣水或山椒魚原棲地水體。
2. 攜帶電子秤、秤紙。
3. 攪拌棒
4. 小蘇打粉
5. 筆型 pH 計
6. pH 標準液 ( pH= 4.0 , 10.0, 7.0 )
7. 麻醉劑 (MS222)：可以攜帶電子秤現秤或先分裝成 80 mg 為一單位在 1.5 ml 的微量離心管內。
8. 都普勒儀 ( ES-100VX MiniDoppler® Vascular Ultrasound Doppler )
9. 紅外線熱像儀 ( testo 885-1 DV 式高階熱像儀 )

### 3. 操作步驟：

#### 3.1 剛發現體溫

- 3.1.1 人員在山椒魚原棲地進行族群調查，於石頭或樹木等遮蔽物下翻到山椒魚時，先不抓取 ( 避免驚動造成山椒魚警戒逃走 )，以紅外線熱像儀偵測此時山椒魚的體溫，記錄「剛發現體溫」。

#### 3.2 麻醉前心跳

- 3.2.1 記錄完剛發現體溫後，即可輕輕抓起山椒魚，如圖所示方式將攜帶

式都卜勒儀緊貼山椒魚腹側前肢交會處（無塗膠在肚子與都卜勒儀的探頭間），若探頭擺放位置正確，可經都卜勒儀的擴聲器聽到規律的簌簌聲，為山椒魚的心臟血流。



圖、都卜勒儀與經 MS222 麻醉的東方蝾螈 (*Cynops orientalis*)，都卜勒儀貼近蝾螈腹側近心臟處可測得心跳。

3.2.2 沒有麻醉的情況下，山椒魚會試圖逃避人員抓拿，因此人員可記錄 15 秒內心跳次數，計算每分鐘心跳數，記錄「麻醉前心跳」

### 3.3 麻醉前體溫

3.3.1 在正式將山椒魚麻醉前，人員以 TESTO 紅外線熱像儀偵測並記錄山椒魚的體溫，記錄「麻醉前體溫」。



圖、楚南氏山椒魚經紅外線熱像儀偵測體溫約為攝氏 10 度。

### 3.4 麻醉

- 3.4.1 以容器盛裝 100 ml 曝氣水或山椒魚原棲地水體，加入 MS222 水溶液 80 mg 溶解為水溶液。
- 3.4.2 單純的 MS222 溶液配置後是酸性，以小蘇打粉校正 pH 值至約 7.0。
- 3.4.3 將山椒魚放至配置好的 MS222 水溶液（80 mg / 100 ml），計時 30 秒至 2 分鐘，觀察山椒魚是否進入麻醉狀態。
- 3.4.4 藉由麻醉過程，將山椒魚腹部翻面朝上，如其將腹部翻回底面，表示尚未完全進入麻醉，需間隔 30 秒後再嘗試一次將山椒魚腹部朝上，藉以觀察其麻醉反應狀況。
- 3.4.5 至山椒魚無翻正反射（Righting reflex），經獸醫確認麻醉後，可將山椒魚移出 MS222 麻醉水溶液進行後續操作，如測量麻醉後體溫、麻醉後心跳。
- 3.4.6 麻醉可維持山椒魚約 30 分鐘無翻正反射。期間山椒魚會失去自主呼吸，但因其兩棲類特性仍可藉皮膚進行氣體交換，因此需以曝氣水或原棲地水體定期濕潤山椒魚的體表，確保氣體交換。

### 3.5 麻醉後體溫

人員以紅外線熱像儀偵測並記錄山椒魚的體溫，記錄「麻醉前體溫」。

### 3.6 麻醉後心跳

以都卜勒儀 (ES-100VX MiniDoppler® Vascular Ultrasound Doppler) 檢測山椒魚心跳、血流情形，記錄「麻醉後心跳 (次/分)」。

3.7 所有操作結束後，保持定期濕潤山椒魚體表，等待山椒魚甦醒後釋回原棲地，完成山椒魚生理監測。

(流程結束)

附件三 山椒魚微電腦斷層掃描造影標準流程

**山椒魚微電腦斷層掃描造影標準流程**

1. 目的：建立山椒魚微電腦斷層掃描（micro CT）造影。
2. 器材：
  1. 隔夜曝氣水 2 - 5 公升
  2. 攜帶電子秤、秤紙
  3. 攪拌棒
  4. 小蘇打粉
  5. 筆型 pH 計
  6. pH 標準液（pH= 4.0, 10.0, 7.0）
  7. 麻醉劑（MS222, Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate）
  8. 水族用打氣裝置：風管及發泡金剛石以一次使用只給一隻山椒魚避免可能的交叉污染，若給不同個體使用，先以稀釋漂白水及清水清洗風乾。
  9. 都卜勒儀（ES-100VX MiniDoppler® Vascular Ultrasound Doppler）
  10. 保麗龍盒：外徑高  $\leq 4$  cm、寬  $\leq 5.5$  公分；內徑長寬依山椒魚個體長度製作。
  11. 小動物電腦斷層掃描儀（SKYSCAN1076 micro-CT）
3. 操作步驟：
  - 3.1 微電腦斷層掃描的山椒魚來自合歡山、南湖大山...等在臺灣的原棲地，自原棲地捕捉山椒魚後，記錄捕獲地的 GPS 位點。
  - 3.2 用容器攜帶山椒魚，不同個體以一隻一盒/袋為原則獨立攜帶，並以棲地水體或冰塊保持低溫（約攝氏 0 - 15 度，接近山椒魚原棲地溫度為佳）
  - 3.3 山椒魚離開原棲地至 micro CT 造影前於 4~7°C 冷藏箱待至少一晚避免光照，以適應環境、降低緊迫。

3.4 micro CT 造影操作地點在臺北南港 國家動物研究中心。儀器使用申請與規範參照中心公告為準。

### 3.5 麻醉

3.5.1 以容器盛裝 100 ml 曝氣水，加入 MS222 水溶液 80 mg 溶解為水溶液，為麻醉導入液。

3.5.2 單純的 MS222 溶液配置後是酸性，以小蘇打粉校正至 pH 7.0。

3.5.3 將山椒魚放至配置好的 MS222 麻醉導入液（80 mg / 100 ml），計時 30 秒至 2 分鐘，觀察山椒魚是否進入麻醉狀態。

3.5.4 藉由麻醉過程，將山椒魚腹部翻面朝上，如其將腹部翻回底面，表示尚未完全進入麻醉，需間隔 30 秒後再嘗試一次將山椒魚腹部朝上，藉以觀察其麻醉反應狀況。

3.5.5 至山椒魚無翻正反射（Righting reflex），經獸醫確認麻醉後，將山椒魚移出麻醉導入液，以都卜勒儀器先監視其心跳、血流狀況。

3.5.6 順利進入麻醉的山椒魚可放入含麻醉維持液（40 mg MS222 / 100 ml 曝氣水）的保麗龍盒內，調整液體量使山椒魚體表濕潤但不浮起。

3.5.7 有麻醉維持液的情況下，可維持山椒魚約 40 - 60 分鐘無翻正反射。期間可進行 3.6 micro CT 造影。

3.5.8 山椒魚會失去自主呼吸，但因山椒魚為兩棲類，仍可藉麻醉維持液經皮膚行氣體交換。

### 3.6 微電腦斷層造影

3.6.1 將山椒魚和保麗龍盒一起移入 Micro-CT 中掃描。

3.6.2 根據掃描的切片厚度不同有不同的掃描時間。厚度及所需掃描時間如下：

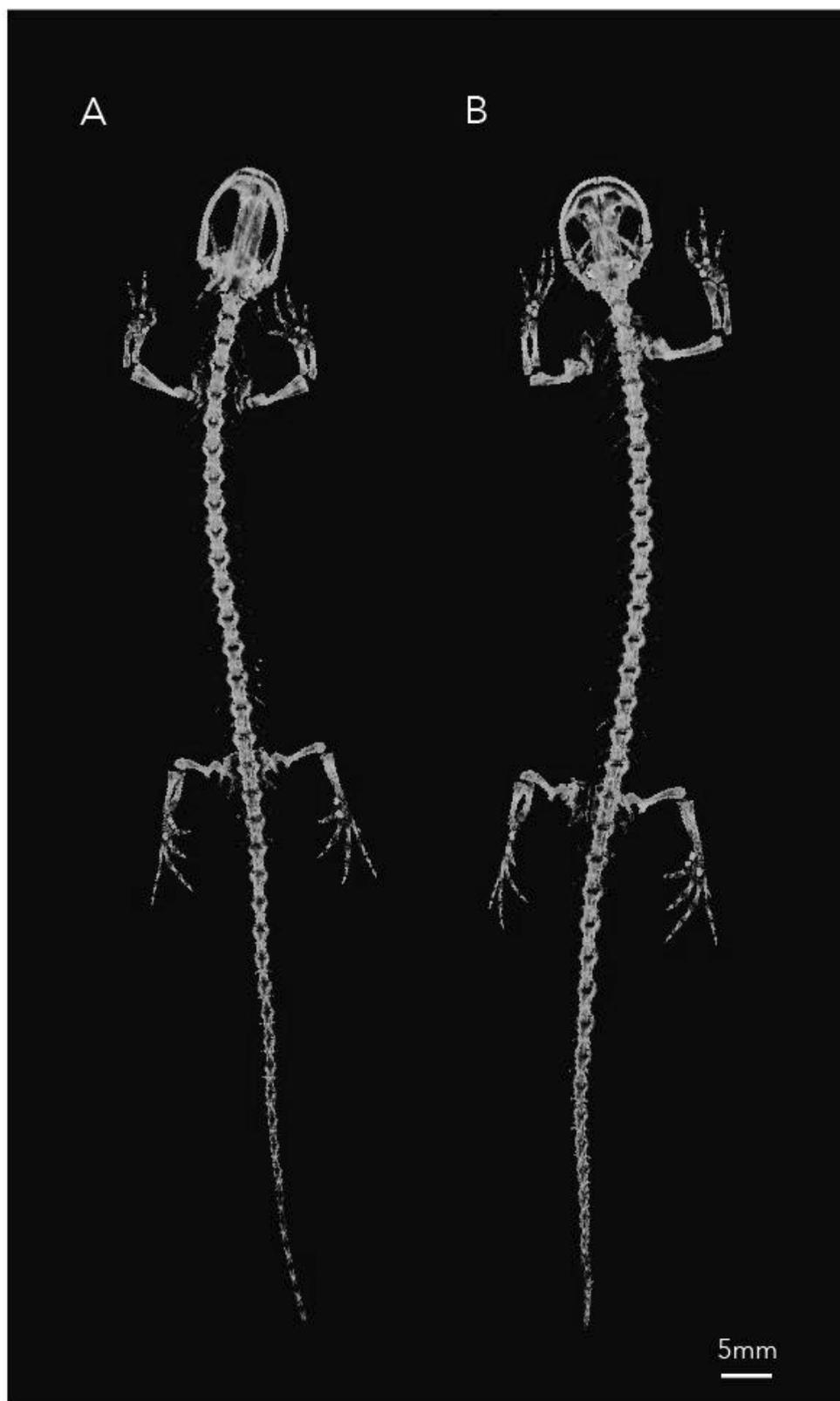
(a) 35 um : 15 分鐘

(b) 17um : 30 分鐘

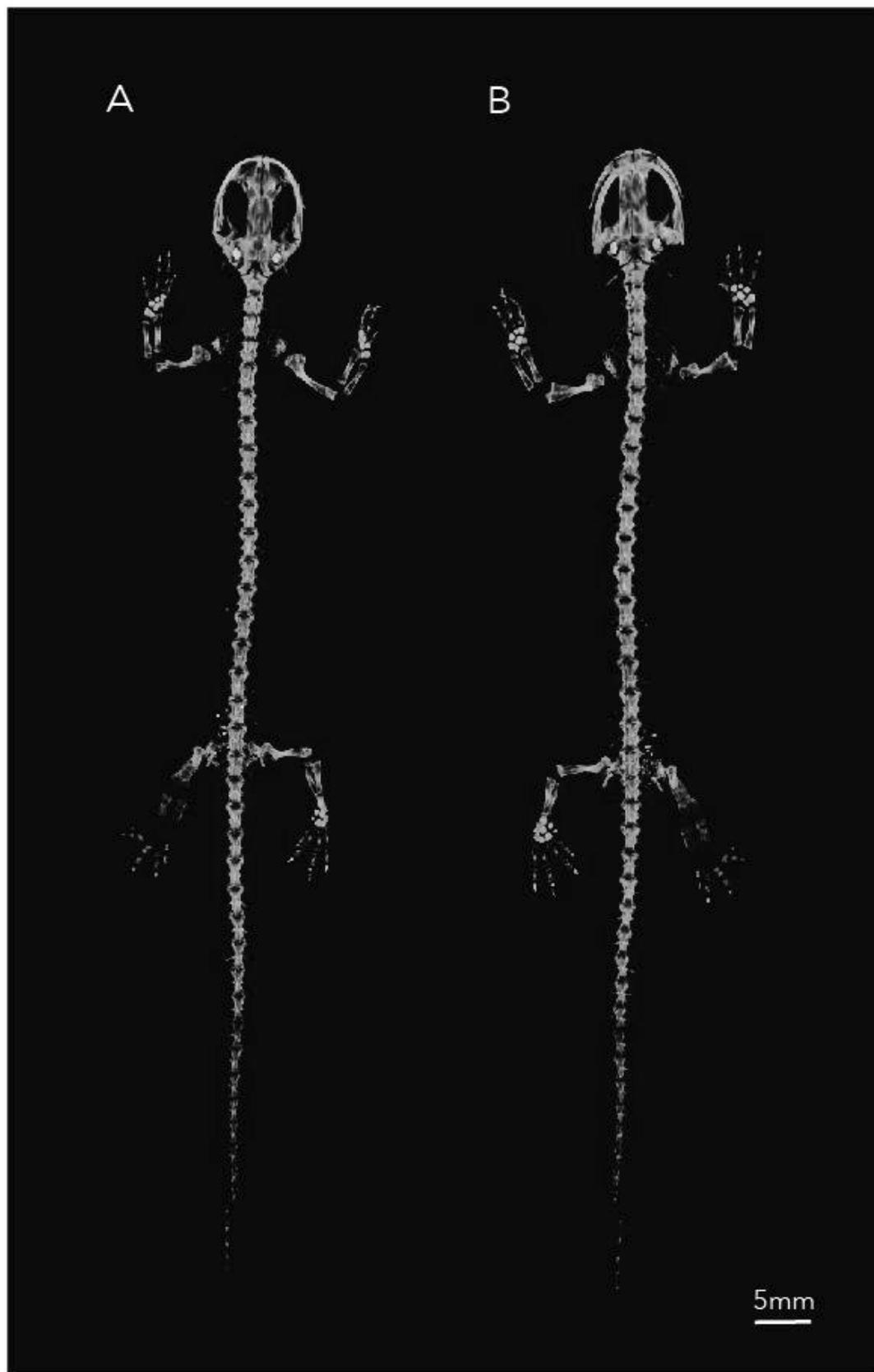
- 3.7 掃描完成後，儘速將山椒魚放回打氣水中，將其甦醒。甦醒後的山椒魚飼養在 4~7°C 低溫冷藏箱，根據捕捉時的 GPS 點位在原棲地釋回。
- 3.8 掃描完成以 SKYSCAN 1076 Micro-CT workstation software 建構 3D 影像。



附件四 山椒魚全身骨骼



楚南氏山椒魚 (*Hynobius sonani*) 全身骨骼  
(A) dorsal view、(B) ventral view。



南湖山椒魚 (*Hynobius glacialis*) 全身骨骼  
(A) dorsal view, (B) ventral view。



臺灣山椒魚 (*Hynobius formosanus*) 全身骨骼  
(A) dorsal view, (B) ventral view。



## 附件五、解剖學名詞縮寫與全名

縮寫	全名	縮寫	全名
act	acetabulum	glf	glenoid fossa
adf	anterodorsal fenestra	hb	hypobranchial
amf	anteromedial fenestra	hu	humerus
an	angular	i	intermedium
ar	articular	icf	internal carotid foramen
at	atlas	il	ilium
bb	basibranchial	isc	ischium
bc	basale commune	lac	lacrimal
c	centrale	lacf	lacrimal foramen
cb	ceratobranchial	mx	maxilla
ch	ceratohyal	na	nasal
cor	coracoid	obf	obturator foramen
corn	cornua	obs	orbitosphenoid
crd	crista dorsalis	op-ex	opisthotic–exoccipital complex
crv	crista ventralis	pa	parietal
dc	distal carpal	pcor	procoracoid
den	dentary	ph	prehallux
dt	distal tarsal	pm	premaxilla
etr	external trochanter	po	postminimus
fe	femur	pra	prearticular
fir	femoral trochanter	prf	prefrontal
fi	fibula	pro	prootic
fib	fibulare	ps	parasphenoid
fr	frontal	pt	pterygoid
pub	pubis		

縮寫	全名	縮寫	全名
qu	quadrate	st	stapes
ra	radius	stf	stapedial foramen
rad	radiale	ti	tibia
rl	radial loop	tib	tibiale
sca	scapulocoracoid	ul	ulna
scof	supracoracoid foramen	uln	ulnare
sm	septomaxilla	vo	vomer
sq	squamosal	yps	ypsiloid

附件六 細部計畫書通過通知函

太魯閣國家公園管理處 函

地址：97253花蓮縣秀林鄉富世村富世291號  
聯絡人：張玉蓮  
電話：8621100分機702  
傳真：8621435  
電子郵件：lillian@taroko.gov.tw

受文者：如正副本行文單位

發文日期：中華民國107年3月30日  
發文字號：太保字第1070001674號  
速別：普通件  
密等及解密條件或保密期限：  
附件：

主旨：貴校函送本處「太魯閣國家公園山椒魚棲地調查與族群遺傳結構研究」委託辦理案細部工作計畫書1案，復請查照。

說明：

- 一、復貴校107年03月28日校生農字第1070023719號函。
- 二、貴校依契約書第七條第一項第一款規定函送細部工作計畫書，經本處審查符合本處需求，同意備查。
- 三、請依契約書第五條第一項第一款規定，憑收據或發票請撥契約價金10%。

正本：國立臺灣大學

副本：國立臺灣大學朱有田老師、本處主計機構、保育研究課

處長 楊 模 麟



附件七 評選會議紀錄

「太魯閣國家公園山椒魚棲地調查與族群遺傳結構研究」案

評選會議紀錄

壹、會議時間：107年2月23日下午2時整

貳、會議地點：本處大會議室

參、主持人：張召集人登文

記錄：張玉蓮

肆、評選組成：設置委員7人，其中外聘委員4人(外聘專家、學者人數不得少於三分之一)，內聘委員3人。

伍、出席委員：張召集人登文、謝委員蕙蓮、涂委員堅、黃委員朝慶、李委員訓煌、孫委員麗珠

陸、請假委員：林副召集人忠杉

柒、列席人員(工作小組成員)：劉文池、陳綺鄉、張玉蓮

捌、評選方式：採序位法評選優勝之廠商

玖、投標廠商家數及名稱：投標廠商1家，且資格及相關資料經審查合格，廠商名稱為：國立臺灣大學。

壹拾、召集人致詞(略)

壹拾壹、報告事項

一、主辦單位就本案需求內容及廠商評選事宜報告。

(一)本案依政府採購法第22條第1項第九款，辦理限制性招標，經公開評選優勝廠商辦理議價。

(二)本案於107年2月6日上網公告，107年02月13日早上10時整假本處會議室辦理第一階段資格審查，計有：國立臺灣大學1

家廠商投標。審查結果：國立臺灣大學 1 家廠商符合招標文件規定為合格廠商。

(三) 本採購案經本案工作小組於 107 年 02 月 13 日早上 11 時審查投標廠商服務建議書就其建議書之內容、相關實務經驗與執行本案之能力及經費編列合理性等項目符合本處招標文件規定，並完成工作小組初審意見。業經徵詢各評選委員對於開會時間之意見，乃擇本日(107)年 2 月 23 日下午 2 時整辦理公開評選。

(四) 本案評選委員由 7 名委員組成，本次評選會議出席委員人數 6 名，(外聘委員 4 人，內聘委員 2 人)，符合出席委員達委員總人數不得少於二分之一以上且外聘學者、專家人數達出席委員人數三分之一以上之召開評選會議規定，遂繼續本評選會議議程。

(五) 重申「採購評選委員會委員須知及評審委員迴避條款」：委員及廠商無異議。(工程會 107 年 1 月 26 日工程企字第 10700028550 號函修正)

(六) 評選結果於簽報機關首長或其授權人員核定後，辦理議價作業。

(七) 本案經詢問評選委員及參標廠商對於本案相關評審規定及程序均表示無意見。

## 二、工作小組初審意見報告：

(一) 工作小組初審意見，委員均無異議。

(二) 依據採購法第 56 條定，未列入項目不得作為評選之參考。依據最有利標評選辦法第 10 條規定，廠商簡報及現場詢答，應與評選項目有關。簡報不得更改廠商投標文件內容。廠商另外提出變更或補充資料者，該資料不納入評選。

壹拾貳、廠商詢答事項(略)

壹拾參、評選結果：

- 一、經本委員會就各評選項目、受評廠商資料及工作小組初審意見逐項討論後，綜合評審結果詳評選總表。評選結果應簽報機關首長或其授權人核定。
- 二、經各委員依據本採購案評分表評定參與評選廠商分數（序位），並將各委員評分結果填列於評選總表，「國立臺灣大學」總評分為 500 分，平均總評分 83.33 分，序位和(序位合計)6，序位名次 1。
- 三、經召集人詢問各出席委員，均認為不同委員之評選結果無明顯差異情形，且經召集人就各別委員評選序位、內容與評選結果再次徵詢與會委員，全體委員一致同意本次評選結果。
- 四、決議：

1 家參與評選廠商之平均總評分達 75 分以上，且標價合理，經出席委員全數決議：序位第 1 之「國立臺灣大學」為第一優勝廠商，評選結果將由業務單位依程序簽報處長（或其授權人）核定後，再辦理後續行政作業。

壹拾肆、委員意見及廠商答詢：詳後附

壹拾伍、散會(17 時 00 分)

**評審委員意見：**

**謝委員蕙蓮**

1. 本研究環境因子包括水文、水量及微棲地地質構造，請補充說明如何定量微棲地的物理性結構。

**李委員訓煌**

1. 有關本研究棲地環境因子的調查所規劃的樣區請補充說明？
2. 本研究遺傳標記合歡山與南湖大山選取標本數量為何不同？

**黃委員朝慶**

1. 山椒魚是特有種，目前已受到人為的干擾，對於本研究所收集到的第 1 手資料，建議立即提供給管理處。
2. 本研究提到蛙壺菌作為山椒魚監測健康，請說明蛙壺菌病原來自何處？
3. 山椒魚是否可以成為全球氣候變遷的環境指標？
4. 有關山椒魚源自日本或大陸很值得進一步探討。
5. 有關山椒魚生理形質之研究只取 3 種其代表性為何？
6. 對於山椒魚的螢光標記反應可維持多久？
7. 山椒魚分布範圍包括南湖與中央尖山，其族群分布與演化是否與水系有關很值得進一步探討。

**涂委員堅**

1. 本研究服務建議書有多處筆誤，請受託單位再審視並修正。
2. 蛙壺菌最早被引用的是 2014 年大陸學者，目前台灣尚未確定是否有該疾病。

3. 還有山椒魚親緣性分析除了粒線體 cytochrome b 基因外，建議還可利用其他特異 marker 加以細分，另外 2013 年比利時學者發表在荷蘭山椒魚發現新型病原 *Batrachochytrium salamandrivorans* 會造成山椒魚大量死亡，建議一併加以篩選。

#### 孫委員麗珠

1. 中央氣象局已完成南湖與奇萊地區氣象站架設，可以提供本研究需要的一些環境資料，但為了解全球氣候變遷對山椒魚棲地的影響，值得進一步收集更多有關的生態改變因子資料。
2. 近幾年登山客逐漸增加，且發現有不當行為，為協助本處進行棲地保育及教育山友共同守護珍稀物種，請受託單位於本研究提出相關建議供本處經營管理參考。

#### 廠商回覆（國立臺灣大學）

1. 有關山椒魚棲地物理性在本計畫並未特別說明，主在是過去本研究團隊已有收集到山椒魚林相、遮蔽物與底質等相關資料，為加深本研究調查的深度，未來將增加水文等微棲地的環境因子，對於山椒魚微棲地環境因子氣象局架設氣象站則無法監測到。
2. 有關取樣數不同主要是南湖山椒魚數量少。
3. 本研究每個樣線會設置 3 個以上監測器及 6 個樣點。
4. 台灣 5 種山椒魚屬於同一種源，至於種源來自日本或大陸仍需收集更多資料來證明。
5. 本研究未來會增加更多的遺傳標記，並以體細胞進行遺傳分析。

6. 對於電腦斷層只取 3 隻主要是申請樣本數量最多只能 3 隻。
7. 有關蛙壺菌 SSRN 遺傳序列並參考國外研究，將進一步瞭解後，如果可以取得相關資料將與國外研究進行比較。
8. 有關本研究完成相關影像將提供管理處作為保育與環境教育之用。
9. 有關服務建議書內容筆誤部分將一併修正。

附件八 第2次審查會議紀錄

太魯閣國家公園管理處 函

地址：97253花蓮縣秀林鄉富世村富世291號  
聯絡人：陳敬儒  
電話：038621100分機701  
傳真：038621435  
電子郵件：passion125x@taroko.gov.tw

受文者：如正副本行文單位

發文日期：中華民國107年8月1日  
發文字號：太保字第1071002370號  
速別：普通件  
密等及解密條件或保密期限：  
附件：第2次報告審查會議紀錄1份

主旨：檢送本處107-108年度「太魯閣國家公園山椒魚棲地調查與族群遺傳結構研究」第2次報告審查會議紀錄1份，請查照。

說明：依據本處107年6月22日太保字第1070003478號開會通知單辦理。

正本：呂光洋委員、涂堅委員、國立臺灣大學、國立臺灣大學朱有田教授、本處張副處長登文、林秘書兼室主任忠杉、企劃經理課、環境維護課、遊憩服務課、解說教育課、布洛灣管理站、天祥管理站、蘇花管理站、合歡山管理站  
副本：本處保育研究課（含附件）

處長 楊 模 麟

「太魯閣國家公園山椒魚棲地調查與族群遺傳結構研究」委託辦理案

第 2 次報告審查會議紀錄

- 壹、開會時間：107 年 07 月 26 日（星期四）上午 10 時 30 分
- 貳、開會地點：本處大會議室
- 參、主持人：張副處長登文  
記錄：陳敬儒
- 肆、出席單位及人員：如簽到簿
- 伍、主席致詞（略）
- 陸、業務單位說明（略）
- 柒、受託單位報告：國立臺灣大學
- 捌、討論（委員/出席者意見摘要）

呂光洋委員

- （一）由報告的內容顯示不出研究計畫的重點，委託工作的項目實在太多，因為多，所以報告就顯得有點凌亂。
- （二）既然標題是「棲地調查與族群遺傳結構的研究」，故報告應聚焦在這兩項。有關山椒魚的生理及健康的資料收集及監測，非野外調查工作能輕易執行。另外，骨骼形態資料的收集目的為何？
- （三）委託單位應仔細思考野外調查工作之辛苦及能否收集到長期及有意義的科學資訊。
- （四）報告中所列的研究方法，有些不必詳述，僅列引用的文獻即可。
- （五）可提供一些動物體的照片，分布區的圖可放大。
- （六）要做族群(population)的估算，必須要有一定的範圍，本案調查採用線狀調查，這個數據僅能供作參考使用。

涂堅委員

- （一）親緣性分析可否使用粒線體 Cytochrome b 全長來做，看是否跟 784bp 作

出的親緣關係相同。

- (二) 期中報告第 18 頁，檢測項目 1.2 土壤之項目，似乎酸鹼度(pH)重複 2 次，請確認。
- (三) 生理資料、棲地水質、土壤資料是山椒魚的保育及動物福祉的重要評估指標，對於國家公園營運及保育也很重要，請繼續調查這些重要基礎資料。
- (四) 3D 電腦斷層掃描造影也很重要，請繼續進行作為分類的基礎資料。
- (五) 感謝朱老師團隊無私的付出，對台灣特有保育動物貢獻值得鼓勵，應繼續執行這項計畫。
- (六) 蛙壺菌調查攸關本國本病原的分布及出現時間，本病原為世界動物衛生組織表列疾病，全球均應即時報告該組織此病原存在情形，以保護全球的兩棲類族群，應繼續調查此項基礎資料。

#### **天祥管理站 高主任伙**

- (一) 山椒魚因屬重要冰河時期孑餘物種，是本處重要的生態資源，受託單位能否給予更多資源保育上的建議。

#### **蘇花管理站 陳主任顧淋**

- (一) 親緣性分析如果使用粒線體 Cytochrome b 全長進行分析，是否可以確定是島內分化還是島外分化？
- (二) 簡報檔案中有關武嶺 6 月 8 日採樣 57 隻部分，是否有已標記重複捕捉 (recapture) 的紀錄，請老師再補充說明。
- (三) 南湖山椒魚有另外兩個檢體在親緣關係樹上是歸類於另外一群，未來有沒有可能是另外的亞種或新種？是否有需要再增加採集的數量？
- (四) 有關架設標語牌的部分，是否請受託單位再跟保育研究課聯繫。

#### **保育研究課 孫課長麗珠**

- (一) 再次感謝朱老師的團隊，野外的調查工作很辛苦。
- (二) 報告書中請老師把評選會議的委員建議事項納入。簡報檔案有更新的部分，請提供新的版本給本處。

- (三) 本案成果與本處後續經營管理有其相關性，因為奇萊與南湖山區登山活動很頻繁，本處對於山上的遊憩乘載量，過去是以設施能提供的使用額度來訂定，未來希望可以有更多的生態資料佐證，以提供本處檢討遊憩乘載量，並作為經營管理上的參考。

#### 保育研究課 張約僱人員玉蓮

- (一) 有聽聞山友說有商業團會以找尋山椒魚給消費者看為賣點進行攬客，於山區的現場亦有山友說有商業團會去亂翻石塊。這部分老師有何建議？

#### 張副處長登文

- (一) 受託單位所提建議事項(設置標語牌部分)，請保育研究課進行協助。  
(二) 有關簡報第 20 頁在能高越嶺調查數量較多？是因為族群數量較多嗎？  
(三) 請保育研究課確認契約書履約標的工作事項(二)蛙壺菌調查部分，語意不清，是要達成何工作事項，請再確認。

#### 玖、受託單位(國立臺灣大學)回應內容

- (一) 有關山椒魚的生理及健康的資料收集及監測部分，因為必須要把山椒魚的個體帶下山做 Micro CT，必須要有各項血氧含量、心跳數、呼吸等數據，以判斷山椒魚是否感到緊迫。另外就是關於山椒魚的習性(例如：進食行為、棲地偏好)也需要一些基礎資料支持。  
(二) 野外調查所得山椒魚分布的地點及環境屬性資料將於期末報告中提供，可供作環境解說教育使用。  
(三) 親緣性分析可否使用粒線體 Cytochrome b 全長作為基因組比對部分，因人力不足目前尚未開始進行；另本研究團隊針對臺灣山椒魚、楚南氏山椒魚、南湖山椒魚目前都是做到 1140bp 左右，暑假期間將針對觀霧山椒魚、阿里山山椒魚僅做到 784bp 的部分做到 1140bp，並將健康個體各選取 3 隻進行比對，其結果就會更客觀。  
(四) 報告書中有筆誤部分將進行修正；簡報檔案有更新部分將再提供給管理處。  
(五) 蛙壺菌調查部分若有疑問會與涂老師進行討論。

- (六)有關能高越嶺族群調查數量較高部分，是因為山椒魚冬天會躲藏於泥土中，4~9月較能找尋到，至於調查數量比較高是因為氣溫比較高。
- (七)山椒魚族群(population)的估算，因為受限調查場域為開放式，可能要改變調查頻率或調查方法，才能得到近似於實際值的數據。
- (八)有關在報告書內補充未來管理處的重要生態資源保育上的建議部分，會進行論述。
- (九)有關如果使用粒線體 Cytochrome b 全長進行分析，是否可以確定是島內分化還是島外分化？此部分目前無法回答。
- (十)南湖山椒魚涉另外一群的部分，將於期末報告中再進行說明。
- (十一) 標語牌的部分會先設計完成後再與管理處進行討論。

#### **拾、決議**

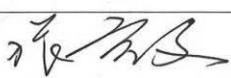
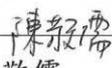
本案第 2 次報告經承辦課確認符合預定進度及工作內容，本次報告原則通過，相關專家學者及與會代表建議請納入計畫後續執行參考。

**拾壹、散會時間：上午 12 時 35 分。**

「太魯閣國家公園山椒魚棲地調查與族群遺傳結構研究」委託辦理

案

第 2 次報告審查會議 簽到簿

時 間：107 年 7 月 26 日(星期四)上午 10 時 30 分	
地 點：本處大會議室	
主持人：張副處長登文  紀錄：陳敬儒 	
報告人：國立臺灣大學	
出席	簽 到 處
呂委員光洋	呂 光 洋
涂委員堅	涂 堅
國立臺灣大學	朱 育 田 游佩儒
林秘書忠杉	林 忠 杉
企劃經理課	
環境維護課	
解說教育課	鄒月娥
保育研究課	孫昭珠
遊憩服務課	
合歡山管理站	





## 附件九 第2次審查意見回覆

委員或單位	審查意見	廠商處理方式
呂光洋委員	1. 由報告的內容顯示不出研究計畫的重點，委託工作的項目實在太多，因為多，所以報告就顯得有點凌亂。	謝謝委員提醒，已對報告內容各項委託工作項目進行整理。
	2. 既然標題是「棲地調查與族群遺傳結構的研究」，故報告應聚焦在這兩項。有關山椒魚的生理及健康的資料收集及監測，非野外調查工作能輕易執行。另外，骨骼形態資料的收集目的為何？	研究成果報告會多加詳述棲地、棲地環境調查與族群遺傳結構的部分。  有關山椒魚的生理及健康的資料收集及監測部分，因必須把山椒魚個體帶至研究室進行 micro CT。必須要收集山椒魚心跳、呼吸與體溫等數據。以判斷山椒魚在進行 micro CT 過程是否有緊迫。  未來計畫藉由比較骨骼形態差異輔助臺灣的山椒魚的分類。過去的作法是直接犧牲動物進行骨骼形態比較。因臺灣五種山椒魚皆屬保育類動物，因此採用活體 Micro CT 造影的方式取得骨骼形值資料。
	3. 報告中所列的研究方法，有些不必詳述，僅列引用的文獻即可。	謝謝委員的建議，會再精簡研究方法的敘述。
	4. 可提供一些動物體的照片，分布區的圖可放大。	野外調查所得山椒魚分布的地點及環境屬性資料將於研究成果報告中提供，可供作環境解說教育使用。

委員或單位	審查意見	廠商處理方式
	<p>5. 要做族群的估算，必須要有一定的範圍，本案調查採用線狀調查，這個數據僅能供作參考使用。</p>	<p>山椒魚族群 (population) 的估算，因受限調查場域為開放的步道樣線。因此所得數據的確不可能太精確。我們會努力改變調查頻率或調查方法，希望能得到近似於實際值的數據。</p>
<p>涂堅委員</p>	<p>1. 親緣性分析可否使用粒線體 <i>Cytochrome b</i> 全長來做，看是否跟 784bp 作出的親緣關係相同。</p>	<p>本研究團隊對臺灣山椒魚、楚南氏山椒魚、南湖山椒魚皆分析獲得 <i>Cytochrome b</i> 全長 1140bp。與預備實驗以 784bp 建構的親緣關係相似，但 1140bp 的解析度較好。未來計畫將對觀霧山椒魚、阿里山山椒魚僅做到 784bp 的部分做到 1140bp，其結果就會更客觀。</p>
	<p>2. 期中報告第 18 頁，檢測項目 1.2 土壤之項目，似乎酸鹼度(pH)重複 2 次，請確認。</p>	<p>報告書中有筆誤部分將進行修正；簡報檔案有更新部分將再提供給管理處。</p>
	<p>3. 生理資料、棲地水質、土壤資料是山椒魚的保育及動物福祉的重要評估指標，對於國家公園營運及保育也很重要，請繼續調查這些重要基礎資料。</p>	<p>謝謝委員的鼓勵，將持續對基礎資料進行調查收集。期望未來研究成果能對山椒魚的保育有正面效益。</p>
	<p>4. 3D 電腦斷層掃描造影也很重要，請繼續進行作為分類的基礎資料。</p>	
	<p>5. 感謝朱老師團隊無私的付出，對台灣特有保育動物貢獻值得鼓勵，應繼續執行這項計畫。</p>	<p>蛙壺菌調查部分若有疑問會與涂老師進行討論。</p>
<p>6. 蛙壺菌調查攸關本國本病原的分布及出現時間，本病原為世界動物衛生組織表列疾病，全球</p>		

委員或單位	審查意見	廠商處理方式
	均應即時報告該組織此病原存在情形，以保護全球的兩棲類族群，應繼續調查此項基礎資料。	
天祥管理站 高主任依	山椒魚因屬重要冰河時期孑遺物種，是本處重要的生態資源，受託單位能否給予更多資源保育上的建議。	目前計畫尚處資料收集階段，關於山椒魚資源保育上的建議將於研究成果報告提出。
蘇花管理站 陳主任顧淋	1. 親緣性分析如果使用粒線體 <i>Cytochrome b</i> 全長進行分析，是否可以確定是島內分化還是島外分化？	確定山椒魚是島分化還是島外分化需要更有系統的收集與分析臺灣個河系與山脈的山椒魚遺傳資訊，再經由親緣網絡分析、親緣地理分析等等研究才有辦法確定臺灣的山椒魚是島分化還是島外分化。
	2. 簡報檔案中有關武嶺 6 月 8 日採樣 57 隻部分，是否有已標記重複捕捉(recapture)的記錄，請老師再補充說明。	6 月 8 日採樣 57 隻，其中 2 隻在武嶺營區，另外 55 隻為 820 林道的個體。確實 6 月 8 日在武嶺捕捉的 2 隻個體中，有 1 隻為重複捕捉。為 2017 年標放的個體。
	3. 南湖山椒魚有另外兩個檢體在親緣關係樹上是歸類於另外一群，未來有沒有可能是另外的亞種或新種？是否有需要再增加採集的數量？	南湖山椒魚涉另外一群的部分，將於期末報告中再進行說明。
	4. 有關架設標語牌的部分，是否請受託單位再跟保育研究課聯繫。	標語牌的部分會先設計完成後再與管理處進行討論
保育研究課 孫課長麗珠	1. 再次感謝朱老師的團隊，野外的調查工作很辛苦。	感謝課長鼓勵，團隊將持續進行野外調查工作。

委員或單位	審查意見	廠商處理方式
	<p>2. 報告書中請老師把評選會議的委員建議事項納入。簡報檔案有更新的部分，請提供新的版本給本處。</p>	<p>報告書比照建議進行辦理。簡報檔案有更新部分將再提供給管理處。</p>
	<p>3. 本案成果與本處後續經營管理有其相關性，因為奇萊與南湖山區登山活動很頻繁，本處對於山上的遊憩乘載量，過去是以設施能提供的使用額度來訂定，未來希望可以有更多的生態資料佐證，以提供本處檢討遊憩乘載量，並作為經營管理上的參考。</p>	<p>有關在報告書內補充未來管理處的重要生態資源保育上的建議部分，會進行論述。</p>
<p>保育研究課 張約僱人員 玉蓮</p>	<p>1. 聽聞山友說有商業團會以找尋山椒魚給消費者看為賣點進行攬客，於山區的現場亦有山友說有商業團會去亂翻石塊。這部分老師有何建議？</p>	<p>除可考慮放置告示牌及積極宣導教育遊客。針對商業團亦可放置紅外線自動相機記錄違規行為並據實開罰，兼具嚇阻作用。</p>
<p>張副處長 登文</p>	<p>1. 有關簡報第 20 頁在能高越嶺調查數量較多？是因為族群數量較多嗎？</p>	<p>有關能高越嶺族群調查數量較高部分，是因為山椒魚冬天會躲藏於泥土中，4~9 月較能找尋到，至於調查數量比較高是因為氣溫比較高。</p>

附件十 第3次審查會議紀錄

太魯閣國家公園管理處 函

地址：97253花蓮縣秀林鄉富世村富世291號  
聯絡人：陳敬儒  
電話：038621100分機701  
傳真：038621435  
電子郵件：passion125x@taroko.gov.tw

受文者：如正副本行文單位

發文日期：中華民國107年12月5日

發文字號：太保字第1071003742號

速別：普通件

密等及解密條件或保密期限：

附件：山椒魚第3次審查會議紀錄1份

主旨：檢送本處「太魯閣國家公園山椒魚棲地調查與族群遺傳結構研究」第3次報告審查會議紀錄1份，請查照。

說明：依據本處107年11月22日太保字第1070006762號開會通知單辦理。

正本：呂光洋委員、涂堅委員、國立臺灣大學、國立臺灣大學朱有田教授、本處張副處長登文、林秘書兼室主任忠杉、企劃經理課、環境維護課、遊憩服務課、解說教育課、布洛灣管理站、天祥管理站、蘇花管理站、合歡山管理站

副本：本處保育研究課（含附件）

處長 楊 模 麟

「太魯閣國家公園山椒魚棲地調查與族群遺傳結構研究」委託辦理案

第 3 次報告審查會議紀錄

- 壹、開會時間：107 年 11 月 29 日（星期四）下午 2 時
- 貳、開會地點：本處大會議室
- 參、主持人：張副處長登文  
記錄：陳敬儒
- 肆、出席單位及人員：如簽到簿
- 伍、主席致詞（略）
- 陸、業務單位說明(略)
- 柒、受託單位報告：國立臺灣大學
- 捌、討論(委員/出席者意見摘要)

涂堅委員

- (一)有關明年調查山椒魚出現頻度時，除考量土壤濕度、降雨量外，是否考慮棲息地的攝食生物種類也可能影響？
- (二)摘要建議是否縮短至 A4 一頁，並依據評估指標成果撰寫，讀者較容易掌握重點。另外，關鍵字是否順便撰寫在報告。
- (三)報告書第 22 頁圖 6，建議標示賴氏山椒魚分類位置。
- (四)報告書第 51 頁建議應贊助研究登山客承載對棲息地的壓力是否造成山椒魚生態的影響。
- (五)報告書第 72 頁及第 45 頁參考文獻作者的姓名及排列請再確認。
- (六)報告書第 45 頁圖 25 之敏感度最低稀釋倍數檢出請再確認。

蘇花管理站高琇瑩

- (一)之前看到山椒魚的報告是在雪山山脈，看起來分布狀況是 1300~2300 公尺海拔，覺得很好奇山椒魚的分布怎麼都是跟西側的河系有關(大肚溪、大甲溪、濁水溪等)，東側這邊同樣的海拔高度的區域例如大禹嶺或碧綠

神木等區域，不曉得有沒有山椒魚？

**蘇花管理站 陳主任顧淋**

- (一)有關南湖山椒魚的分化年份可以知道嗎？此結果支持島內分布？
- (二)有關判定山椒魚個體年齡的方法，可以使用骨骼密度嗎？
- (三)舌骨消失是否是個體長幼年齡所致？
- (四)820 林道的捕捉量標記了 107 隻再重複捕捉之後才推估出總量只有 300 隻？
- (五)雨季發現山椒魚的頻率較多，有成體幼體的差別嗎？有透過催吐進行食性分析？

**解說教育課 黃課長志強**

- (一)在 820 林道標放 107 隻，推估出 204~300 隻，那代表是數量很少嗎？有關南湖山椒魚的分化年份可以知道嗎？此結果支持島內分布？
- (二)觀霧、臺灣、楚南氏山椒魚有無可能是島外分化，然後到島內之後再分化？

**保育研究課 孫課長麗珠**

- (一)蛙弧菌可能導致山椒魚消失，國外是否針對環境之監測提供預防性管理之參考。
- (二)南湖山椒魚數量少，且分布棲地侷限於南湖地區，其遺傳的多樣性是否較單一？
- (三)南湖山屋及公廁遊客量多，委託單位建議設置集水桶以避免遊客清洗菜餚而干擾山椒魚，請委託單位提供設置區位供本處參考。
- (四)本簡報書面資料有更動，請檢附最新資料供建檔使用。

**保育研究課 張約僱人員玉蓮**

- (一)有聽聞山椒魚從冰河時期活到現在，應該沒那麼容易滅絕，想聽聽看老師的意見。

**保育研究課 陳技士敬儒**

- (一) 本案報告書中第 22 頁親緣關係樹中針對分枝後同一類群中有關有些有直線條、有些無直線條的意涵為何？
- (二) 針對第 43 頁圖 23、圖 24 中麻醉前後體溫的資料，請說明山椒魚為外溫動物，對於測定麻醉前後的室內溫度，或者是山椒魚保管箱的溫度，有無控制在同樣的溫度中？
- (三) 針對摘要第二點第 12 行所述，發現山椒魚頻率較高熱點與發現山椒魚頻率較低點位間之溫溼度差異沒有明顯相關。此段文字是否應該加註說明為「目前」尚未發現明顯相關？因為本案目前仍為第一年調查，是否應該累積更長期資料比較有其依據。

#### 玖、受託單位(國立臺灣大學)回應內容

- (一) 報告書中有缺漏、摘要濃縮或筆誤部分將再整理。
- (二) 有關 copy 數的部份，理論上 PCR 不會從 10 的 4 次方一下子掉下來，所以本案將會再去重做試驗，重作三次之後去把 10 的 4 次方跟 1 中間拉稀一點，產生更多的 condition，等新的結果產生之後會把圖更正。
- (三) 本研究延續之前賴老師的研究，大部分山椒魚發現的地區的河流都是往西，沒有往東流的河流，所以後續研究山椒魚是否能夠跨過中央山脈這個地理屏障時，本研究團隊就跨過奇萊，在奇萊東邊的木瓜溪的上游，一直到立霧主山都有楚南氏山椒魚被發現，所以往東流的河流是有機會發現山椒魚的，但是在南湖大山往東到和平的方向曾經調查過都沒有發現，至於碧綠神木附近調查的成果是沒有發現山椒魚，但是不代表這些區域沒有山椒魚，只是目前研究團隊受限於山椒魚的活動範圍很小、有些區域無法到達以及查找山椒魚需人工翻動石頭等條件限制所以沒有發現。
- (四) 白姑大山目前的山椒魚的數量還不夠多，遺傳距離也可以計算得知，但是演化速度需要考古遺址化石的碳 14 定年資料，所以島內島外分化的論點可能還需要累積更多的資料。
- (五) 針對小鮡屬小鮡科的相關研究很少，所以關於骨骼密度缺乏相關的研究資料，如果真的要作年齡與骨骼的關係，是需要圈養的山椒魚才有辦法掌控產生正確的資訊，本研究團隊有在構思未來圈養山椒魚的想法。

- (六) 本案捕捉回收率不高，除了開放性的場域數據較不精準之外，山椒魚被干擾的頻率提高也會產生影響。
- (七) 目前食性分析有查到林春富教授研究的楚南氏山椒魚及呂光洋教授研究的相關資料，另外參考高山的昆蟲種類調查去參考。
- (八) 蛙弧菌的預防及風險管理上可能要針對登山客的教育會比較重要，如果家裡有養動物要多注意，另外如果南湖山屋附近的山椒魚常被遊客干擾的話，族群應該也會很快受到影響。
- (九) 南湖山椒魚的資料中，基因型只剩下 2 種不一樣的單套型，在遺傳多樣性上非常低，幸好另外在中央尖山有 30 隻個體分析出來有 6 種單套型，遺傳多樣性比較高。
- (十) 至於南湖山屋部分，遊客取水及洗廚具的水源有山椒魚的棲地，建議可以在山屋附近架設雨水集水裝置，以減少遊客對山椒魚的影響；明年會在遊客活動的範圍多做一些山椒魚及環境因子的調查。
- (十一) 親緣樹後面的不同基因型前後有線條，是表示不同基因型間在核甘酸裡面有多少長度的差異。
- (十二) 麻醉前後的室溫如果是現場，會有 HOBO 的溫度資料，如果是研究室室內則沒有資料。
- (十三) 溫溼度計的資料會蒐集 3 年。

## 拾、決議

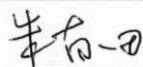
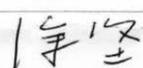
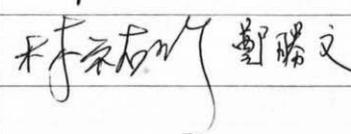
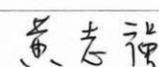
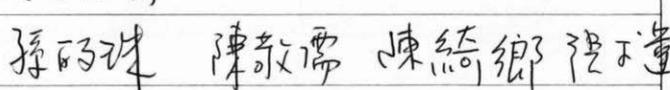
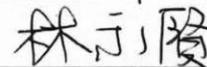
本案第 3 次報告經承辦課確認符合預定進度及工作內容，本次報告原則通過，相關專家學者及與會代表建議請納入計畫後續執行參考。

拾壹、散會時間：下午 16 時 20 分。

「太魯閣國家公園山椒魚棲地調查與族群遺傳結構研究」委託辦理

案

第3次報告審查會議 簽到簿

時 間：107年11月29日(星期四)下午2時	
地 點：本處大會議室	
主持人：張副處長登文  紀錄：陳敬儒	
報告人：國立臺灣大學 	
出席	簽 到 處
呂委員光洋	請假
涂委員堅	
國立臺灣大學	
林秘書忠杉	
企劃經理課	
環境維護課	
解說教育課	
保育研究課	
遊憩服務課	
合歡山管理站	





## 附件十一 第3次審查意見回覆

委員或單位	審查意見	廠商處理方式
涂堅委員	1. 有關明年調查山椒魚出現頻度時，除考量土壤濕度、降雨量外，是否考慮棲息地的攝食生物種類也可能影響？	目前食性分析有查到林春富教授研究的楚南氏山椒魚及呂光洋教授研究的相關資料，另外參考高山的昆蟲種類調查去參考。土壤濕度及降雨量亦會影響棲息地獵物數量。
	2. 摘要建議是否縮短 4 頁並依據評估指標成果撰寫，讀者較容易掌握重點。另外，關鍵字是否順便撰寫在報告。	依照委員建議會將摘要縮短至 4 頁並依據評估指標成果撰寫研究進度。
	3. 報告書第 22 頁圖 6，建議標示賴氏山椒魚分類位置。	將於後續報告中加上。
	4. 報告書第 51 頁建議應贊助研究登山客承載對棲息地的壓力是否造成山椒魚生態的影響。	土壤品質監控受到採樣樣點的限制，需針對南湖圈谷山屋附近進行放射狀系統土壤採樣與分析，才能顯現出登山客承載與土壤品質間的相關性，目前人力與研究經費尚無法進行。
	5. 報告書第 72 頁及第 45 頁參考文獻作者的姓名及排列請再確認。	報告書中有缺漏、摘要濃縮或筆誤部分將再整理。
	6. 報告書第 45 頁圖 25 之敏感度最低稀釋倍數檢出請再確認。	有關 copy 數的部份，理論上不會從 10 的 4 次方一下子掉下來，所以本案將會再去重做試驗，重作三次之後去把 10 的 4 次方跟 1 中間拉稀一點，產生更多的 condition，等新的結果產生之後會將圖更正。
蘇花管理站陳主任顧淋	1. 有關南湖山椒魚的分化年份可以知道嗎？此結果支持島內分布？	白姑大山目前的山椒魚的數量還不夠多，遺傳距離也可以計算得知，但是演化速度需要考古遺址化石的碳 14 定年資料，所以島內島外分化的論點可能還需要累積更多的資料。

委員或單位	審查意見	廠商處理方式
	2. 有關判定山椒魚個體年齡的方法，可以使用骨骼密度嗎？	針對小鯢屬小鯢科的相關研究很少，所以關於骨骼、骨骼密度缺乏相關的研究資料，如果真的要與年齡的關係，是需要圈養的山椒魚才有辦法掌握產生正確的資訊，本研究團隊有在構思未來圈養山椒魚的想法。
	3. 舌骨消失是否是個體長幼年齡所致？	本案捕捉回收率不高，除了開放性的場域數據較不精準之外，山椒魚被干擾的頻率提高也會產生影響。
	4. 820 林道的捕捉量標記了 107 隻再重複捕捉之後才推估出總量只有 300 隻？	雨季的調查能觀察到較多幼體。目前食性分析有查到林春富教授研究的楚南氏山椒魚及呂光洋教授研究的相關資料，另外參考高山的昆蟲種類調查去參考。本案未催吐進行食性分析。
	5. 雨季發現山椒魚的頻率較多，有成體幼體的差別嗎？有透過催吐進行食性分析？	本研究延續之前賴老師的研究，大部分山椒魚發現的地區的河流都是往西，沒有往東流的河流，所以後續研究山椒魚是否能夠跨過中央山脈這個地理屏障時，本研究團隊就跨過奇萊，在奇萊東邊的木瓜溪的上游，一直到立霧主山都有楚南氏山椒魚被發現，所以往東流的河流是有機會發現山椒魚的，但是在南湖大山往東到和平的方向曾經調查過都沒有發現，至於碧綠神木附近調查的成果是沒有發現山椒魚，但是不代表這些區域沒有山椒魚，只是目前研究團隊受限於山椒魚的活動範圍很小、有些區域無法到達以及查找山椒魚需人工翻動石頭等條件限制所以沒有發現。
蘇花管理站 高琇瑩	1. 之前看到山椒魚的報告是在雪山山脈，看起來分布狀況是 1300~2300 公尺海拔，覺得很好奇山椒魚的分布怎麼都是跟西側的河系有關（大肚溪、大甲溪、濁水溪等），東側這邊同樣的海拔高度的區域例如大禹嶺或碧綠神木等區域，不曉得有沒有山椒魚？	

委員或單位	審查意見	廠商處理方式
解說教育課黃 課長志強	1. 在 820 林道標放 107 隻，推估出 204~300 隻，那代表是數量很少嗎？	本案捕捉回收率不高，除了開放性的場域數據較不精準之外，山椒魚被干擾的頻率提高也會產生影響。
	2. 有關南湖山椒魚的分化年份可以知道嗎？此結果支持島內分布？	演化速度需要考古遺址化石的碳 14 定年資料，所以島內島外分化的論點可能還需要累積更多的資料。
	3. 觀霧、臺灣、楚南氏山椒魚有無可能是島外分化，然後到島內之後再分化	
保育研究課孫 課長麗珠	1. 蛙弧菌可能導致山椒魚消失，國外是否針對環境之監測提供預防性管理之參考。	蛙壺菌的預防及風險管理，國家公園可能針對登山客的教育會比較重要，如果家裡有養動物要多注意，另外如果南湖山屋附近的山椒魚常被遊客干擾的話，族群應該也會很快受到影響。
	2. 南湖山椒魚數量少，且分布棲地侷限於南湖地區，其遺傳的多樣性是否較單一？	南湖山椒魚的資料中，基因型只剩下 2 種不一樣的單套型，在遺傳多樣性上非常低，幸好另外在中央尖山有 30 隻個體分析出來有 6 種單套型，遺傳多樣性比較高。
	3. 南湖山屋及公廁遊客量多，委託單位建議設置集水桶以避免遊客清洗菜餚而干擾山椒魚，請委託單位提供設置區位供本處參考。	南湖山屋部分，遊客取水及洗廚具的水源有山椒魚的棲地，建議可以在山屋附近架設雨水集水裝置，以減少遊客對山椒魚的影響；明年會在遊客活動的範圍做一些山椒魚及環境因子的調查。
	4. 本簡報書面資料有更動，請檢附最新資料供建檔使用。	將提供更新後資料。
保育研究課張 約催人員玉蓮	1. 有聽聞山椒魚從冰河時期活到現在，應該沒那麼容易滅絕，想聽聽看老師的意見	冰河時期與間冰期溫度變化的時間幅度較大。若山椒魚適應演化的速度趕不上氣候改變，族群還是會受到影響。

委員或單位	審查意見	廠商處理方式
<p>保育研究課陳 技士敬儒</p>	<p>1. 本案報告書中第 22 頁親緣關係樹中針對分枝後同一類群中有些有直線條、有些無直線條的意涵為何？</p>	<p>親緣樹後面的不同基因型前後有線條，是表示不同基因型間在核苷酸裡面有多少的差異。</p>
	<p>2. 針對第 43 頁圖 23、圖 24 中麻醉前後體溫的資料，請說明山椒魚為外溫動物，對於測定麻醉前後的室內溫度，或者是山椒魚保管箱的溫度，有無控制在同樣的溫度中？</p>	<p>麻醉前後的室溫如果是現場，會有當日的溫度資料，如果是研究室，室內則沒有資料。</p>
	<p>3. 針對摘要第二點第 12 行所述，發現山椒魚頻率較高熱點與發現山椒魚頻率較低點位間之溫溼度差異沒有明顯相關。此段文字是否應該加註說明為「目前」尚未發現明顯相關？因為本案目前仍為第一年調查，是否應該累積更長期資料比較有其依據。</p>	<p>溫溼度計的資料會蒐集 3 年</p>

附件十二 第4次審查會議紀錄

太魯閣國家公園管理處 函

地址：97253花蓮縣秀林鄉富世村富世291號  
聯絡人：陳敬儒  
電話：038621100分機701  
傳真：038621435  
電子郵件：passion125x@taroko.gov.tw

10617  
臺北市羅斯福路4段1號

受文者：國立臺灣大學朱有田教授

發文日期：中華民國108年6月21日  
發文字號：太保字第1081001776號  
速別：普通件  
密等及解密條件或保密期限：  
附件：第4次報告審查會議紀錄

主旨：檢送本處「太魯閣國家公園山椒魚棲地調查與族群遺傳結構研究」第4次報告審查會議紀錄1份，請查照。

說明：依據本處108年5月23日太保字第1080002793號開會通知單辦理。

正本：巫奇勳委員、涂堅委員、國立臺灣大學、國立臺灣大學朱有田教授、本處處長室、張副處長登文、林秘書兼室主任忠杉、企劃經理課、環境維護課、遊憩服務課、解說教育課、布洛灣管理站、天祥管理站、蘇花管理站、合歡山管理站  
副本：本處保育研究課（含附件）

處長 游登良

「太魯閣國家公園山椒魚棲地調查與族群遺傳結構研究」委託辦理案

第 4 次報告審查會議紀錄

壹、開會時間：108 年 6 月 13 日（星期四）下午 2 時

貳、開會地點：本處大會議室

參、主持人：游處長登良

記錄：陳敬儒

肆、出席單位及人員：如簽到簿

伍、主席致詞（略）

陸、業務單位說明（略）

柒、受託單位報告：國立臺灣大學

捌、討論（委員/出席者意見摘要）

涂堅委員

- (一) 白姑大山及 820 林道新發現山椒魚與現有山椒魚外表型及基因型顯著不同，需加做其他的任何實驗來證實為新種嗎？
- (二) 山椒魚發現頻度高低與溫度、相對濕度、光照強度並不相關，請問除石頭底溫度、濕度因子外，還有其他可能因子嗎？
- (三) 蛙弧菌在一個樣品中發現，懷疑是汙染，是否將陽性核酸交由家衛所國家實驗室確認，瞭解是否為真正汙染或為實際感染（但並沒發病）？
- (四) 報告書第 32 頁第 2 段「可見中央尖源頭最高溫與最低 RH%...」是否應寫為「...月平均溫最高溫與月均 RH%最低 RH%...」？請再確認。

巫奇勳委員

- (一) 為何需要蒐集麻醉前後的體溫及心跳等生理資料，收集這些生理資料最想回答的問題是甚麼？種間比較的意義又是甚麼？測山椒魚體溫時，當下的氣溫有無測量？若有要敘述。
- (二) 預備實驗使用東方蝾螈做麻醉測試，為何不直接用山椒魚做前測就好？

- (三)麻醉劑的濃度如何訂？有參考文獻？濃度似乎稍高(幼體：0.5g/L，成體 1-2g/L)(以觀霧山椒魚為例：0.5g/L)
- (四)第 13 頁所提到山椒魚如何飼養？飼養溫度？飼養多久放回？這需要提供資料，學校實驗動物小組應該也會關心這個問題。
- (五)第 39 頁有提到山椒魚活躍與不活躍地區間的環境因子沒有差異，指的是哪些環境因子？會不會因為測的是氣溫所以無法看出差異？有差異的是為棲地的溫度變化？
- (六)第 65 頁能否估算族群量，再捕捉率很重要，如何在這個計畫中克服？
- (七)材料與方法中沒有提到分生實驗的流程方法。
- (八)第 39 頁提到有一些紀錄器沒有成功讀取，是否有其他因為？
- (九)第圖 24、圖 25 是否與圖 23 有重複。

**蘇花管理站 陳主任願淋**

- (一)白姑山與 820 的特殊山椒魚有去照 CT scan 嗎？還需要做哪些研究才能知道是不是新種？
- (二)重複捕捉能否知道與之前釋放地點相隔多少距離？能知道山椒魚個體成熟之後會離開原棲地多遠距離？

**保育研究課 陳技士敬儒**

- (一)本案報告書中第 22 頁親緣關係樹中針對分枝後同一類群中有關有些有直線條、有些無直線條的意涵為何？
- (二)針對第 43 頁圖 23、圖 24 中麻醉前後體溫的資料，請說明山椒魚為外溫動物，對於測定麻醉前後的室內溫度，或者是山椒魚保管箱的溫度，有無控制在同樣的溫度中？
- (三)針對摘要第二點第 12 行所述，發現山椒魚頻率較高熱點與發現山椒魚頻率較低點位間之溫溼度差異沒有明顯相關。此段文字是否應該加註說明為「目前」尚未發現明顯相關？因為本案目前仍為第一年調查，是否應該累積更長期資料比較有其依據。

**玖、受託單位(國立臺灣大學)回應內容**

- (一) 報告書中有缺漏、摘要濃縮或筆誤部分將再整理。
- (二) 野生動物的醫學保健及後續人工繁殖方面需要，要瞭解動物是否受緊迫，需要蒐集生理資料作為參考。
- (三) 在野外量測捕捉的山椒魚體溫時都有記錄當下的時間及溫度計及熱像儀的數據。
- (四) 因為做 CT scan 是在國家動物研究院進行測試，CT 在掃描的時候會發熱，這是預先以東方蠵龜進行測試才發現的。
- (五) 麻醉的濃度是有先參考過前人研究，還有實際操作捕捉後再野放，目前尚無發現其他問題。
- (六) 再捕捉率提升的問題去年就有遇到，今年度希望可以在不影響山椒魚的情況下提高調查次數。
- (七) 本研究在微棲地的量測上，目前尚在嘗試中。
- (八) 微棲地的數據與日本學者討論非常難，日本學者覺得台灣的山椒魚是在地下伏流活動。
- (九) 本案檢測的蛙弧菌 KEL197 及 JAM81 這兩個序列都是國際上公告的標準序列，台灣學者也有公告台灣的序列，會覺得是污染是因為在正控制組的旁邊，本計畫將要求助理要做重複 3 組。
- (十) 目前看白姑的個體是 100 個核苷酸裡面有 5 個不一樣，以此類推 1000 個核苷酸就有 50 個不一樣，但是目前只有拿一個基因序列來做檢測，還需要參考國際上的研究數據，將核染色體裡面的某些特定的片段加入、單點核苷酸的突變資料；另外 CT scan 也可以提供作參考使用，加入年齡、性別的數據之後，從骨骼上比較之後，比較有數據能去證實跟其他的山椒魚有形態上的差異，才有辦法去判斷是否是新種或隱藏種。
- (十一) 重複捕捉的山椒魚的移動距離沒有量測。
- (十二) 分生實驗的研究流程方法將在期末報告時補充。
- (十三) 濕度的記錄器好像是高海拔的低溫電池問題導致。

#### 拾、決議

本案第 4 次報告經承辦課確認符合預定進度及工作內容，本次報告原則通過，相關專家學者及與會代表建議請納入計畫後續執行參考。

拾壹、散會時間：下午 16 時 00 分。

「太魯閣國家公園山椒魚棲地調查與族群遺傳結構研究」委託辦理

案

第 4 次報告審查會議 簽到簿

時 間：108 年 06 月 13 日(星期四)下午 2 時	
地 點：本處大會議室	
主持人：游處長登良 紀錄：陳敬儒	
報告人：國立臺灣大學	
出席	簽 到 處
巫委員奇勳	巫奇勳
涂委員堅	涂堅
國立臺灣大學	朱育田
內政部營建署	請假
林秘書忠杉	林忠杉
企劃經理課	
環境維護課	
解說教育課	
保育研究課	游明珠 陳敬儒 高傑
遊憩服務課	蔡鳳屏





## 附件十三 第 4 次審查意見回覆

委員或單位	審查意見	廠商處理方式
涂堅委員	<p>(一) 白姑大山及 820 林道新發現山椒魚與現有山椒魚外表型及基因型顯著不同，需加做其他的任何實驗來證實為新種嗎？</p>	<p>目前看白姑的個體是 100 個核甘酸裡面有 5 個不一樣，以此類推 1000 個核甘酸就有 50 個不一樣，但是目前只有拿一個基因序列來做檢測，還需要參考國際上的研究數據，將核染色體裡面的某些特定的片段加入、單點核甘酸的突變資料；另外 CT scan 也可以提供作參考使用，加入年齡、性別的數據之後，從骨骼上比較之後，比較有數據能去證實跟其他的山椒魚有形態上的差異，才有辦法去判斷是否是新種或隱藏種。</p>
	<p>(二) 山椒魚發現頻度高低與溫度、相對濕度、光照強度並不相關，請問除石頭底溫度、濕度因子外，還有其他可能因子嗎？</p>	<p>將更多徵棲地的數據納入分析這點，與日本學者討論非常難，日本學者覺得臺灣的山椒魚是在地下伏流活動。</p>
	<p>(三) 蛙壺菌在一個樣品中發現，懷疑是汙染，是否將陽性核酸交由家衛所國家實驗室確認，瞭解是否為真正汙染或為實際感染（但並沒發病）？</p>	<p>本案檢測的蛙弧菌 KEL197 及 JAM81 這兩個序列都是國際上公告的標準序列，臺灣學者也有公告臺灣的序列，會覺得是汙染是因為為在正控制組的旁邊，本計畫將要求助理要做重複 3 組。</p> <p>陽性樣本已委託家畜衛生試驗所進行檢測。</p>
	<p>(四) 報告書第 32 頁第 2 段「可見中央尖源頭最高溫與最低 RH%...」是否應寫為「月平均溫最高溫與月均 RH%最低 RH%...」？請再確認。</p>	<p>報告書中有缺漏或筆誤部分將再整理。</p>

<p><b>巫奇勳委員</b></p>	<p>(一) 為何需要蒐集麻醉前後的體溫及心跳等生理資料，收集這些生理資料最想回答的問題是甚麼？種間比較的意義又是甚麼？測山椒魚體溫時，當下的氣溫有無測量？若有要敘述。</p>	<p>野生動物的醫學保健及後續人工繁殖方面需要，要瞭解動物是否受緊迫，需要蒐集生理資料作為參考。</p> <p>在野外量測捕捉的山椒魚體溫時都有記錄當下的時間及溫度計及熱像儀的數據</p>
	<p>(二) 預備實驗使用東方蝾螈做麻醉測試，為何不直接用山椒魚做前測就好？</p>	<p>因為做 CT scan 是在國家動物研究院進行測試，CT 在掃描的時候會發熱及造成皮膚乾燥，這是預先以東方蝾螈進行測試才發現的。直接使用山椒魚進行前測有風險。</p>
	<p>(三) 麻醉劑的濃度如何訂？有參考文獻？濃度似乎稍高(幼體：0.5/L，成體 1-2g/L)(以觀霧山椒魚為例：0.5g/L)</p>	<p>麻醉的濃度是有先參考過前人研究，還有實際操作捕捉後再野放，目前尚無發現其他問題</p>
	<p>(四) 第 13 頁所提到山椒魚如何飼養？飼養溫度？飼養多久放回？這需要提供資料，學校實驗動物小組應該也會關心這個問題。</p>	<p>山椒魚飼養於低溫環境給予蚯蚓及節肢動物等餌料。掃描完 CT scan 後盡速放回原棲地，飼養期間最長不超過 3 個月。另本研究已有申請並通過學校之 IACUC 實質審查。</p>
	<p>(五) 第 39 頁有提到山椒魚活躍與不活躍地區間的環境因子沒有差異，指的是哪些環境因子？會不會因為測的是氣溫所以無法看出差異？有差異的是為棲地的溫度變化？</p>	<p>就記錄器所收集的溫度、光照強度及濕度為微環境因子。本研究在微棲地的量測上，目前尚在嘗試中。</p>
	<p>(六) 第 65 頁能否估算族群量，再捕捉率很重要，如何在這個計畫中克服？</p>	<p>再捕捉率提升的問題去年就有遇到，今年度希望可以在不影響山椒魚的情況下提高調查次數。</p>
	<p>(七) 材料與方法中沒有提到分生實驗的流程方法。</p>	<p>分生實驗的研究流程方法將在期末報告時補充。</p>

	<p>(八) 第 39 頁提到有一些記錄器沒有成功讀取，是否有其他因為？</p>	<p>濕度的記錄器好像是高海拔的低溫電池耗電過快問題導致，以目前人力無法克服。820 林道的記錄器設置時有以繩子或束帶固定，但颱風、遊客行為、野生動物活動等皆可能造成記錄器損毀或遺失。</p>
	<p>(九) 第圖 24、圖 25 是否與圖 23 有重複。</p>	<p>報告書中有缺漏或筆誤部分將再整理。</p>
<p>蘇花管理站 陳主任顧淋</p>	<p>(一) 白姑山與 820 的特殊山椒魚有去照 CT scan 嗎？還需要做哪些研究才能知道是不是新種？</p>	<p>以進行 CT scan 提供作參考使用，加入年齡、性別的數據之後，從骨骼上比較之後，比較有數據能去證實跟其他的山椒魚有形態上的差異，還需要參考國際上的研究數據，將核染色體裡面的某些特定的片段加入、單點核甘酸的突變資料分析才有辦法去判斷是否是新種或隱藏種。</p>
	<p>(二) 重複捕捉能否知道與之前釋放地點相隔多少距離？能知道山椒魚個體成熟之後會離開原棲地多遠距離？</p>	<p>重複捕捉的山椒魚的移動距離沒有量測。</p>
<p>保育研究課 陳技士敬儒</p>	<p>(一) 本案報告書中第 22 頁親緣關係樹中針對分枝後同一類群中有關有些有直線條、有些無直線條的意涵為何？</p>	<p>直線長度為各分枝的遺傳距離，遺傳距離非常小的分枝於圖像呈現上會被忽略。</p>
	<p>(二) 針對第 43 頁圖 23、圖 24 中麻醉前後體溫的資料，請說明山椒魚為外溫動物，對於測定麻醉前後的室內溫度，或者是山椒魚保管箱的溫度，有無控制在同樣的溫度中？</p>	<p>麻醉前後的體溫資料是在野外量測，捕捉的山椒魚體溫都有記錄當下的時間及溫度計及熱像儀的數據。</p>

	<p>(三) 針對摘要第二點第 12 行所述，發現山椒魚頻率較高熱點與發現山椒魚頻率較低點位間之溫歷度差異沒有明顯相關。此段文字是否應該加註說明為「目前」尚未發現明顯相關？因為本案目前仍為第一年調查，是否應該累積更長期資料比較有其依據。</p>	<p>報告書中有缺漏或筆誤部分將再整理。因記錄期間僅 1 至 2 年，期末報告將採較保守撰寫。</p>
--	--	---

附件十四 第5次審查會議紀錄

太魯閣國家公園管理處 函

地址：97253花蓮縣秀林鄉富世村富世291號  
聯絡人：陳敬儒  
電話：038621100分機701  
傳真：038621435  
電子郵件：passion125x@taroko.gov.tw

受文者：如正副本行文單位

發文日期：中華民國108年11月28日  
發文字號：太保字第1081003551號  
速別：普通件  
密等及解密條件或保密期限：  
附件：會議紀錄1份

主旨：檢送本處「太魯閣國家公園山椒魚棲地調查與族群遺傳結構研究」第5次報告審查會議紀錄1份，請查照。

說明：依據本處108年10月30日太保字第1081003161號開會通知單辦理。

正本：涂堅委員、國立臺灣大學、國立臺灣大學朱有田教授、本處處長室、張副處長登文、林秘書兼室主任忠杉、企劃經理課、環境維護課、遊憩服務課、解說教育課、布洛灣管理站、天祥管理站、蘇花管理站、合歡山管理站  
副本：本處保育研究課（含附件）

虞長游登良

「太魯閣國家公園山椒魚棲地調查與族群遺傳結構研究」委託辦理案

第 5 次報告審查會議紀錄

壹、開會時間：108 年 11 月 25 日（星期一）下午 2 時

貳、開會地點：本處大會議室

參、主持人：游處長登良

記錄：陳敬儒

肆、出席單位及人員：如簽到簿

伍、主席致詞（略）

陸、業務單位說明（略）

柒、受託單位報告：國立臺灣大學

捌、討論（委員/出席者意見摘要）

涂堅委員

- (一)圖五，白姑大山的個體與其他山椒魚比較吻肛長中有顯著差異，建議圖中加以星號標示。
- (二)圖七，白姑大山及 820 林道採集之山椒魚均屬於南湖山椒魚類群，彼此間是否有演化關係，如何進一步研究。
- (三)圖九、圖十，分歧時間估算為何 300-100 萬年前是屬於島內分化，請解釋一下。
- (四)白姑大山及 820 林道之山椒魚骨骼型態，可否用來分類？
- (五)參考文獻中作者姓名排列請一致化，另專有名詞請斜體化。

遊憩服務課 蔡技士佩芳

- (一)本案報告書中第 51 頁有提到藉由檢測南湖山屋周圍的土壤成分評估當地的登山活動是否對山椒魚棲地造成影響，此言論搭配老師的土壤調查成果是否會讓一般民眾誤以為高山活動對山椒魚沒有影響？是否應該再修飾文句。

- (二)土壤採集的日期是108年7月10日，雖然這是登山活動比較旺盛的日期，但是否應該考量在登山活動季節過後再去採集，比較能看出差異？

**蘇花管理站 黃主任瑞諒**

- (一)本案針對山椒魚熱點非熱點間的雨量及溫溼度進行分析，卻都沒有顯著差異，是不是有其他原因？
- (二)針對演化的路線，委託團隊自己的推論為何？
- (三)820林道有些地方有山椒魚，有些地方沒有山椒魚，在老師的報告書中是說受到低溫的影響，是不是有其他原因？

**保育研究課 陳技士敬儒**

- (一)本案報告書中說820林道同時有調查出三種山椒魚，請問在這三種山椒魚交界的地方是否有雜交種出現？針對這個區域，是否有一些經營管理上的建議？

**環境維護課 鄭技士凱文**

- (一)本案委託團隊有在820林道7.3K前進行山椒魚調查，之後還有一條溪，應該是會有山椒魚，為何取樣的距離只到7.3K？

**玖、受託單位(國立臺灣大學)回應內容**

- (一)針對白姑大山的個體跟其他山椒魚的吻肛長比較，因為目前台灣各種山椒魚缺少性別、年齡及性成熟的基準，在這個前提之下的各種比較值比較缺乏代表性，如果後續還有計畫進行，公母的區別想要利用MRI去調查(兩棲類的染色體Y是一樣的)，報告書中圖五的星號標示將修正。
- (二)白姑大山山椒魚及南湖山椒魚的演化關係目前的研究還沒辦法針對演化關係作解釋，但是目前比較確定是白姑大山山椒魚是從大甲溪溯源而上，另外島內分化的內容於修正版本中已經刪去。
- (三)白姑大山山椒魚的型態目前沒有進行CT掃描。
- (四)參考文獻的格式將再修正。
- (五)本案是先假設遊客的乘載量增加會造成山椒魚的數量減少，所以才有本

案的針對南湖山屋附近的土質及水質進行調查，本來以為遊客增加土壤中的有機質會造成山椒魚數量減少，但結果卻不如預期的假設，所以結論會再修正；但本案沒有持續性的監測，而找委託團隊上山進行長期監測及土壤水質分析也需要額外費用，所以在結論與建議中才會建議管理處可以委託志工進行採樣，如此一來就可以長期收集資料，讓研究成果更有代表性。

- (六) 本案因為目前為止對於山椒魚的生活史還不清楚，所以一開始的研究方向比較發散，但是陸續有部分成果之後，研究的方向會逐漸收斂，像是土壤水份及土壤有機質的調查。
- (七) 有關濕度、光照及濕度對山椒魚熱點與非熱點間沒有顯著差異，這部分本研究團隊還在考量其他變因，以青蛙來說還有求偶跟食性的影響，所以這部分可以給未來研究提供其他方向。
- (八) 台灣各種山椒魚的狀況，應該是在島外分化之後才進來台灣，因為分子中上面的演化分歧，比台灣島嶼的成因時間還早；至於某些山椒魚可能是還有在島內進行分化，這部分還需要更多的試驗。
- (九) 因為溫度低於零度之後，在地表發現山椒魚的機率比較高，未來將在發現山椒魚地點附近的底下埋設溫度計，測試地表上下之間的溫度差異。
- (十) 目前在 820 林道在 0~1.7K 是楚南式山椒魚，1.7K~6K 是南湖山椒魚，6K~7.3K 是台灣山椒魚，幾乎不會發現有其他種的山椒魚混入相異的山椒魚領域，目前沒有在 820 林道發現棲地重疊及雜交。
- (十一) 只選擇採樣到 7.3K 是考量本研究主要是針對山椒魚的出現及活動範圍進行採樣，7.3K 之後有進行過調查，但是數量比較少，所以在考量取樣區域及考量研究時間時就只設定取樣到 7.3K。另外本研究有在中央尖及畢祿 820 林道發現南湖山椒魚，推測在中間的北二段也有南湖山椒魚，未來的研究方向將會去北二段進行調查。

## 拾、決議

本案第 5 次報告符合預定進度及工作內容原則通過，請委託單位依據內政部規定格式於 108 年 12 月 10 日前繳交成果報告書；並將相關專家學者及與會代表建議納入成果報告書，並請依契約規定辦理後續相關事宜。

拾壹、散會時間：下午 16 時 00 分。

「太魯閣國家公園山椒魚棲地調查與族群遺傳結構研究」委託辦理

案

第 5 次報告審查會議 簽到簿

時 間：108 年 11 月 25 日(星期一)下午 2 時	
地 點：本處大會議室	
主持人：游處長登良 紀錄：陳敬儒	
報告人：國立臺灣大學 朱有田	
出席	簽 到 處
巫委員奇勳	請假
涂委員堅	涂堅
國立臺灣大學	林祐均 鄧聯文
內政部營建署	請假
林秘書忠杉	
企劃經理課	
環境維護課	
解說教育課	陳顯明
保育研究課	孫明珠 陳敬儒
遊憩服務課	蔡凡平 顏連榆





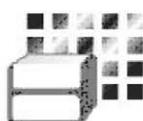
## 附件十五 第 5 次審查意見回覆

委員或單位	審查意見	廠商處理方式
涂堅委員	1. 圖五，白姑大山的個體與其他山椒魚比較吻肛長中有顯著差異，建議圖中加以星號標示。	報告書中圖五的星號標示將修正。針對白姑大山的個體跟其他山椒魚的吻肛長比較，因為目前臺灣的各種山椒魚缺少性別、年齡及性成熟的基準，在這個前提之下的各種比較值比較缺乏代表性，如果後續還有計畫進行，公母的區別想要利用 MRI 去調查(兩棲類的染色體 Y 是一樣的)，
	2. 圖七，白姑大山及 820 林道採集之山椒魚均屬於南湖山椒魚類群，彼此間是否有演化關係，如何進一步研究。	白姑大山山椒魚及南湖山椒魚的演化關係目前的研究還沒辦法針對演化關係作解釋，但是目前比較確定是白姑大山山椒魚是從大甲溪溯源而上。
	3. 圖九、圖十，分歧時間估算為何 300-100 萬年前是屬於島內分化，請解釋一下。	島內分化的內容於修正版本中已經刪去。
	4. 白姑大山及 820 林道之山椒魚骨骼型態，可否用來分類？	白姑大山山椒魚的型態目前沒有進行 CT 掃描。
	5. 參考文獻中作者姓名排列請一致化，另專有名詞請斜體化	參考文獻的格式將再修正。
遊憩服務課 蔡技士佩芳	1. 本案報告書中第 51 頁有提到藉由檢測南湖山屋周圍的土壤成分評估當地的登山活動是否對山椒魚棲地造成影響，此言論搭配老師的土壤調查成果是否會讓一般民眾誤以為高山活動對山椒魚沒有影響？是否應該再修飾文句	本案是先假設遊客的乘載量增加會造成山椒魚的數量減少，所以才會有本案的針對南湖山屋附近的土質及水質進行調查，本來以為遊客增加土壤中的有機質會造成山椒魚數量減少，但結果卻不如預期的假設，所以結論會再修正；但本案沒有持續性的監測，而找委託團隊上山進行長期監測及土壤水質分析也需要額外費用，所以在結論與建議中才會建議管理處可以委託志工進行採樣，如此一來就可以長期收集資料，讓研究成果更有代表性。
	2. 土壤採集的日期是 108 年 7 月 10 日，雖然這是登山活動比較旺盛的日期，但是否應該考量在登山活動季節過後再去採集，比較能看出差異？	

委員或單位	審查意見	廠商處理方式
<p>蘇花管理站 黃主任瑞諒</p>	<p>1. 本案針對山椒魚熱點非熱點間的雨量及溫溼度進行分析，卻都沒有顯著差異，是不是有其他原因？</p>	<p>有關濕度、光照及濕度對山椒魚熱點與非熱點間沒有顯著差異，這部分 本研究團隊還在考量其他變因，以青蛙來說還有求偶跟食性的影響，所以這部分可以給未來研究提供其他方向。</p>
	<p>2. 針對演化的路線，委託團隊自己的推論為何？</p>	<p>臺灣各種山椒魚的狀況，應該是在島外分化之後才進來臺灣，因為分子鐘上面的演化分歧，比臺灣島嶼的成因時間還早；至於某些山椒魚可能是還有在島內進行分化，這部分還需要更多的試驗。</p>
	<p>3. 820 林道有些地方有山椒魚，有些地方沒有山椒魚，在老師的報告書中是說受到低溫的影響，是不是有其他原因</p>	<p>因為溫度高於零度之後，在地表發現山椒魚的機率比較高，未來將在發現山椒魚地點附近的底下埋設溫度計，測試地表上下之間的溫度差異。</p>
<p>保育研究課 陳技士敬儒</p>	<p>1. 本案報告書中說 820 林道同時有調查出三種山椒魚，請問在這三種山椒魚交界的地方是否有雜交種出現？針對這個區域，是否有一些經營管理上的建議</p>	<p>目前在 820 林道在 0~1.7K 是楚南氏山椒魚，1.7K~6K 是臺灣山椒魚，6K~7K 是南湖山椒魚，幾乎不會發現楚南氏山椒魚混入臺灣山椒魚，或是臺灣山椒魚混入楚南氏山椒魚領域。臺灣山椒魚和南湖山椒魚的領域有部分重疊，目前沒有在 820 林道發現雜交。</p>
<p>環境維護課 鄭技士凱文</p>	<p>1. 本案委託團隊有在 820 林道 7.3K 前進行山椒魚調查，之後還有一條溪，應該是會有山椒魚，為何取樣的距離只到 7.3K？</p>	<p>只選擇採樣到 7.3K 是考量本研究主要是針對山椒魚的出現及活動範圍進行採樣。7.3K 之後有進行過調查，但發現的數量比較少，所以在考量人力、取樣區域及研究時間，就只設定取樣到 7.3K，並不代表 7.3K 以後沒有山椒魚。另外本研究有在中央尖及畢祿 820 林道發現南湖山椒魚，推測在中間的北二段也有南湖山椒魚，未來的研究方向將會去北二段進行調查。</p>



附件十六 SWAB 樣本委送家畜衛生試驗所檢測結果



LightCycler® 480 Software

Report



20191114 BD Taiwan YH

Experiment

Creation Date	11/14/2019 5:32:02 PM	Last Modified Date	11/14/2019 7:12:15 PM
Operator	System Admin	Owner	System Admin
Start Time	11/14/2019 5:35:24 PM	End Time	11/14/2019 7:03:32 PM
Run State	Completed	Software Version	LCS480 1.5.0.39
Macro		Macro Owner	
Macro Status			
Templates	Bd Run Protocol	Plate ID	
Test ID		Lot ID	
Color Comp ID			
Run Notes			

Programs

Program Name pre-incubation							
Cycles	1	Analysis Mode	None				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
50	None	00:02:00	4.40		0	0	0
95	None	00:10:00	4.40		0	0	0
Program Name amplification							
Cycles	40	Analysis Mode	Quantification				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:15	4.40		0	0	0
60	Single	00:01:00	2.20		0	0	0
Program Name cooling							
Cycles	1	Analysis Mode	None				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
40	None	00:00:30	1.50		0	0	0

Abs Quant/2nd Derivative Max for 20191114 BD (2) (Abs Quant/2nd Derivative Max)

Results

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard	Status
<input checked="" type="checkbox"/>	A1	HTPL181023-01	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	A2	HTPL181023-02	Unknown				

< - Early Cp call (first five cycles) has higher uncertainty

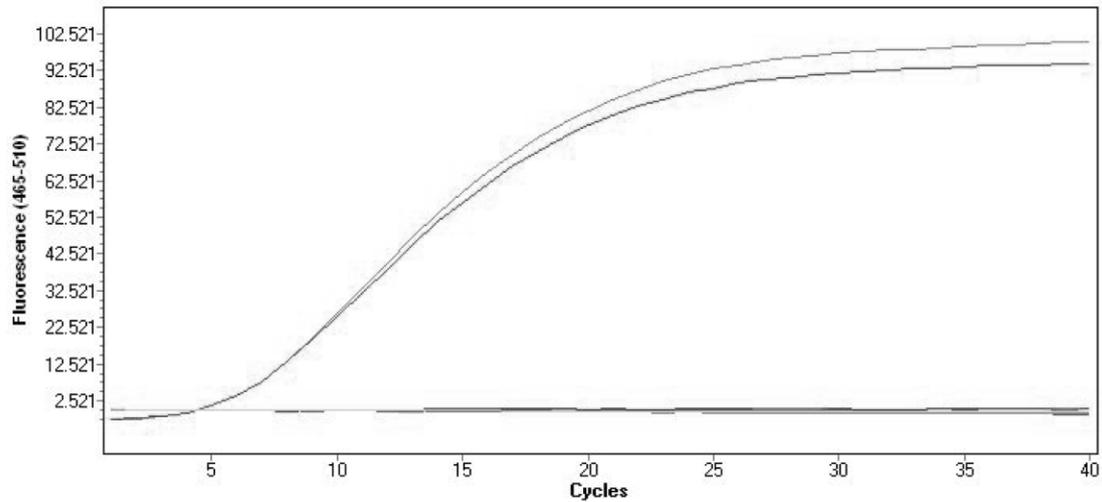
**Results**

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard	Status
<input checked="" type="checkbox"/>	A3	HTPL181023-03	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	A4	HTPL181023-04	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	A5	HTPL190315-01	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	A6	HTPL190315-03	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	A7	HTPL190316-01	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	A8	HTPL190316-04	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	B1	HGPL190604-05	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	B2	HTJRB190705-01	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	B3	BD C+	Positive Control/Calibrator	6.00			
<input checked="" type="checkbox"/>	B4	BD C+	Positive Control/Calibrator	5.00			<
<input checked="" type="checkbox"/>	B5	DDW	Negative Control				
<input checked="" type="checkbox"/>	B6	DDW	Negative Control				

< - Early Cp call (first five cycles) has higher uncertainty

**Amplification Curves**

— A1: HTPL181023-01	— A2: HTPL181023-02	— A3: HTPL181023-03	— A4: HTPL181023-04
— A5: HTPL190315-01	— A6: HTPL190315-03	— A7: HTPL190316-01	— A8: HTPL190316-04
— B1: HGPL190604-05	— B2: HTJRB190705-01	— B3: BD C+	— B4: BD C+
— B5: DDW	— B6: DDW		



## 參考文獻

- 呂光洋、賴俊祥。2010。觀霧山椒魚(*Hynobius fuca*)之分布及棲息地的調查。國立臺灣師範大學。
- 李心予、賴俊祥、蔡孟勳、朱有田。2016。太魯閣國家公園保育類物種監測調查計畫。太魯閣國家公園委託報告。
- 袁守立。2003。以粒線體細胞色素 *b* 區域序列探討臺灣地區短尾鮑族群的地理親緣變異。私立東海大學生物學系碩士論文。
- 郭瓊華。2002。臺灣蜓蜥族群遺傳結構之研究，第 79 頁。國立臺灣師範大學生物學系碩士論文。
- 陳世煌、呂光洋。1987。臺灣產山椒魚之研究（一）—研究歷史、分布和形態學之初步研究。野生動物保育研討會專集（一）國家公園和自然保留區之野生動物：79-104。林曜松編。
- 陳惠琦。1994。梭德氏蛙粒線體 DNA 序列與族群變異之初探。國立臺灣大學動物學研究所碩士論文。
- 葉文珊。1997。莫氏樹蛙族群地理親緣關係之研究，第 96 頁。國立臺灣大學動物研究所碩士論文。
- 劉國強。1994。H 粒線體核酸分析斯文豪氏攀析之生物地理與親緣關係，第 62 頁。國立中山大學生命科學研究所碩士論文。
- 賴俊祥、呂光洋。2007。阿里山地區阿里山山椒魚的分布與族群監測。BioFormosa 42 (2) : 105-117。
- 賴俊祥。2008。臺灣產山椒魚的分類與阿里山山椒魚族群生態與族群遺傳研究。國立臺灣師範大學生命科學系博士論文。

- 繁玉萍。2001。臺灣島形成過程對臺灣淡水魚族群遺傳結構影響之研究，第 53 頁。國立清華大學生命科學系碩士論文。
- Aris-Brosou, S., and N. Rodrigue. 2019. A Not-So-Long Introduction to Computational Molecular Evolution. *Methods Mol. Biol.* 1910: 71-117. doi: 10.1007/978-1-4939-9074-0\_3.
- Avise, J. C. 1974. Systematic value of electrophoretic data. *Syst. Zool.* 23: 465–481.
- Avise, J. C. 2000. *Phylogeography*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Bermingham, E., and C. Moritz. 1998. Comparative phylogeography: concepts and applications. *Mol. Ecol.* 7: 367–369.
- Bradley, P. W., M. D. Brawner, T. R. Raffel, J. R. Rohr, D. H. Olson, and A. R. Blaustein. 2017. Shifts in temperature influence how *Batrachochytrium dendrobatidis* infects amphibian larvae. bioRxiv 165985; doi: <https://doi.org/10.1101/165985>.
- Catenazzi, A. 2016. Ecological implications of metabolic compensation at low temperatures in salamanders. *PeerJ.* 4:e2072. doi: 10.7717/peerj.2072.
- Chen, M. Y., R. L. Mao, D. Liang, M. Kuro-o, X. M. Zeng, and P. Zhang. 2015. A reinvestigation of phylogeny and divergence times of Hynobiidae (Amphibia, Caudata) based on 29 nuclear genes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 83: 1-6. doi: 10.1016/j.ympev.2014.10.010.
- Duellman, W. E., and L. Trueb. 1986. *Biology of Amphibians*. McGraw Hill. p.289-365
- Goka, K., J. Yokoyama, Y. Une, T. Kuroki, K. Suzuki, M. Nakahara, A. Kobayashi, S. Inaba, T. Mizutani, and A. D. Hyatt. 2009. Amphibian chytridiomycosis in Japan:

- distribution, haplotypes and possible route of entry into Japan. *Mol. Ecol.* 18(23): 4757-4774. doi: 10.1111/j.1365-294X.2009.04384.x.
- Hare, M. P. 2001. Prospects for nuclear gene phylogeography. *Trends Ecol. Evol.* 16: 700-706.
- Heiss, E., S. Handschuh, P. Aerts, and S. Van Wassenbergh. 2016. Musculoskeletal architecture of the prey capture apparatus in salamandrid newts with multiphasic lifestyle: does anatomy change during the seasonal habitat switches? *J Anat.* 228(5): 757-770. doi: 10.1111/joa.12445.
- Holdsworth, D. W., and M. M. Thornton. 2002. Micro-CT in small animal and specimen imaging. *Trends Biotechnol.* 20 (8):S34-S39.
- Jang-Liaw, N. H., T. H. Lee, and W. H. Chou. 2008. Phylogeography of *Sylvirana latouchii* (Anura, Ranidae) in Taiwan. *Zoolog. Sci.* 25(1): 68-79.
- Jia, J., J. P. Jiang, M. H. Zhang, and K. Q. Gao. 2019. Osteology of *Batrachuperus yenyuanensis* (Urodela, Hynobiidae), a high-altitude mountain stream salamander from western China. *PLoS. One* 14(1): e0211069.
- Jiang, J. P., J. Jia, M. Zhang, and K. Q. Gao. 2018. Osteology of *Batrachuperus londongensis* (Urodela, Hynobiidae): study of bony anatomy of a facultatively neotenic salamander from Mount Emei, Sichuan Province, China. *PeerJ.* 6: e4517. doi: 10.7717/peerj.4517.
- Kukita, S., M. Gouda, S. Ikeda, S. Ishibashi, T. Furuya, and K. Nakamura. 2015. Effects of Photoperiod and Temperature on Growth and Development in Clouded Salamander (*Hynobius nebulosus*) Larvae. *Zoolog. Sci.* 32(3): 266-271. doi: 10.2108/zs140220.

- Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, and K. Tamura. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35(6): 1547-1549. doi: 10.1093/molbev/msy096.
- Lai, J. S., and K. Y. Lue. 2008. Two new *Hynobius* (Caudata : Hynobiidae) salamanders from Taiwan. *Herpetologica* 64(1):63-80. doi: 10.1655/06-065.1.
- Lai, J. S., and K. Y. Lue. 2013. Microhabitat Preference of the Alishan Salamander (*Hynobius arisanensis*). *Curr. Herpetol.* 32(2):125-134. doi: 10.5358/hsj.32.125.
- Lin, H. D., K. C. Hsu, K. T. Shao, Y. C. Chang, J. P. Wang, C. J. Lin, and T. Y. Chiang. 2008. Population structure and phylogeography of *Aphyocypris kikuchii* (Oshima) based on mitochondrial DNA variation. *J. Fish. Biol.* 72(8):2011 - 2025. doi: 10.1111/j.1095-8649.2008.01836.x.
- Lin, H. D., Y. R. Chen, and S. M. Lin. 2012. Strict consistency between genetic and topographic landscapes of the brown tree frog (*Buergeria robusta*) in Taiwan. *Mol. Phylogenet. Evol.* 62(1):251-62. doi: 10.1016/j.ympev.2011.09.022
- Martinez-Solano, I., E. L. Jockusch, and D. B. Wake. 2007. Extreme population subdivision throughout a continuous range: phylogeography of *Batrachoseps attenuatus* (Caudata: Plethodontidae) in western North America. *Mol. Ecol.* 16(20): 4335-4355. doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03527.x.
- Matsunami, M., T. Igawa, H. Michimae, T. Miura, and K. Nishimura. 2016. Population Structure and Evolution after Speciation of the Hokkaido Salamander (*Hynobius retardatus*). *PLoS. One* 11(6): e0156815. doi: 10.1371/journal.pone.0156815.
- Morueta-Holme, N., K. Engemann, P. Sandoval-Acuna, J. D. Jonas, R. M. Segnitz, and J. C. Svenning. 2015. Reply to Feeley and Rehm: Land-use intensification

- increases risk of species losses from climate change. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112(45): E6085. doi: 10.1073/pnas.1518956112.
- Mount, D. 1973. Chronic effect of low pH on fathead minnow survival, growth and reproduction. *Water Res.* 7(7):987-993. doi: 10.1016/0043-1354(73)90180-2.
- O'Hanlon, S. J., A. Rieux, and R. A. Farrer et al. 2018. Recent Asian origin of chytrid fungi causing global amphibian declines. *Science* 360(6389): 621-627. doi: 10.1126/science.aar1965.
- Oshida, T., J. K. Lee, L. K. Lin, and Y. J. Chen. 2006. Phylogeography of Pallas's squirrel in Taiwan: Geographical isolation in an arboreal small mammal. *J. Mammal* 87:247-254. doi: 10.1644/05-MAMM-A-123R1.1.
- Pereira, R. J., I. Martinez-Solano, and D. Buckley. 2016. Hybridization during altitudinal range shifts: nuclear introgression leads to extensive cyto-nuclear discordance in the fire salamander. *Mol. Ecol.* 25(7): 1551-1565. doi: 10.1111/mec.13575.
- Peterman, W., and R. Semlitsch. 2013. Fine-scale habitat associations of a terrestrial salamander: the role of environmental gradients and implications for population dynamics. *PLoS. ONE* 8(5):e62184. doi: 10.1371/journal.pone.0062184.
- Riddle, B., D. Hafner, L. Alexander, and J. R. Jaeger. 2001. Cryptic vicariance in the historical assembly of a Baja California Peninsular Desert Biota. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97(26):14438-43. doi: 10.1073/pnas.250413397.
- Schneider, C. J., M. Cunningham, and C. Moritz. 1998. Comparative phylogeography and the history of endemic vertebrates in the Wet Tropics rainforests of Australia. *Mol. Ecol.* 7(4): 487-498.

- Stewart, K. A., J. D. Austin, K. R. Zamudio, and S. C. Loughheed. 2016. Contact zone dynamics during early stages of speciation in a chorus frog (*Pseudacris crucifer*). *Heredity* (Edinb) 116(2): 239-247. doi: 10.1038/hdy.2015.96.
- Tamura, K., F. U. Battistuzzi, P. Billing-Ross, O. Murillo, A. Filipski, and S. Kumar. 2012. Estimating divergence times in large molecular phylogenies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109(47): 19333-19338. doi: 10.1073/pnas.1213199109.
- Tamura, K., Q. Tao, and S. Kumar. 2018. Theoretical foundation of the reltime method for estimating divergence times from variable evolutionary rates. *Mol. Biol. Evol.* 35(7): 1770-1782. doi: 10.1093/molbev/msy044.
- Toda, M., M. Matsui, M. Nishida, and H. Ota. 1998. Genetic divergence among southeast and east Asian populations of *Rana limnocharis* (Amphibia: Anura), with special reference to sympatric Cryptic species in Java. *Zool. Sci.* 15(4):607-613. doi: 10.2108/zsj.15.607.
- Vassilieva, A., J. S. Lai, S. F. Yang, Y. Hao. Chang, and P. Nikolay. 2015. Development of the bony skeleton in the Taiwan salamander, *Hynobius formosanus* MAKI, 1922 (Caudata: Hynobiidae): Heterochronies and reductions. *Vertebr. Zool.* 65 (1):117-130.
- Weisrock, D.W., J. R. Macey, I. H. Ugurtas, A. Larson, and T. J. Papenfuss. 2001. Molecular phylogenetics and historical biogeography among salamandrids of the "true" salamander clade: rapid branching of numerous highly divergent lineages in *Mertensiella luschani* associated with the rise of Anatolia. *Mol. Phylogenet. Evol.* 18(3):434-448. doi: doi.org/10.1006/mpev.2000.0905.

- Xiong, J., X. Liu, L. Qing, and X. Zeng. 2014. Comparison of vomerine tooth rows in juvenile and adult *Hynobius guabangshanensis* (Urodela: Hynobiidae). *Vertebr. Zool.* 64(2):215-220.
- Zelditch, M. L., J. Ye, J. S. Mitchell, and D. L. Swiderski. 2017. Rare ecomorphological convergence on a complex adaptive landscape: Body size and diet mediate evolution of jaw shape in squirrels (Sciuridae). *Evolution* 71(3): 633-649. doi: 10.1111/evo.13168.
- Zhang, D. X., and G. M. Hewitt. 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Mol. Ecol.* 12(3): 563-584.
- Zhang, P., Y. Q. Chen, H. Zhou, Y. F. Liu, X. L. Wang, T. J. Papenfuss, D. B. Wake, and L. H. Qu. 2006. Phylogeny, evolution, and biogeography of Asiatic Salamanders (Hynobiidae). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103(19): 7360-7365. doi: 10.1073/pnas.0602325103.
- Zhu, W., C. Bai, S. Wang, C. Soto-Azat, X. Li, X. Liu, and Y. Li. 2014. Retrospective survey of museum specimens reveals historically widespread presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in China. *Ecohealth.* 11(2): 241-250.