

太魯閣國家公園
生態系經營指標物種遺傳物質分析計畫

執行單位：中華民國國家公園學會

研究主持人：翁慶豐

太魯閣國家公園管理處委託報告

中華民國九十九年十二月

目次

目次	I
表次	III
圖次	V
摘要	VII
英文摘要	XI
第一章 緒論	1
第一節 研究緣起	1
第二節 計畫目標	11
第二章 研究方法	13
第一節 研究物種選擇、採集地點之建立及採集方法	13
第二節 基因條碼之建立與CO I、12S 及16S 核苷酸序列之放大和選殖	17
第三章 研究結果	21
第一節 兩棲類分佈	21
第二節 兩棲爬蟲類生命條碼	25
第三節 兩棲類基因多樣性分析	41
第四章 結論與建議	53
附錄一 微衛星DNA分析	57
附錄二 專有名詞	61
附錄三 已上傳NCBI基因條碼序列	63
附錄四 會議紀錄	65
附錄五 調查工作照片	67
附錄六 生命條碼簡介	77
參考書目	87

表次

表 2-1	中橫沿線採集地點海拔分佈·····	16
表 3-1	各蛙類海拔分布表·····	22
表 3-2	不同海拔與物種調查所得之數量·····	23
表 3-3	兩棲類已定序基因條碼·····	25
表 3-4	爬蟲類已定序基因條碼·····	26

圖次

圖 1-1	中華大蟾蜍 (<i>Bufo gargarizans</i>) 粒線體之部分結構及盤古蟾蜍 控制區引子對(15971F、16582R)相對位置	10
圖 2-1	中橫沿線採集地點	15
圖 3-1	各海拔與蛙類分布調查之數量	24
圖 3-2	兩棲類分布海拔	24
圖 3-3	合歡溪上游及820林道樣點相對位置圖	41
圖 3-4	以鄰聚法分析楚南氏山椒魚粒腺體DNA 16S 序列之親緣關係樹狀圖	42
圖 3-5	以鄰聚法分析分析中國樹蟾粒腺體DNA 16S 序列之親緣關係樹狀圖	43
圖 3-6	中國樹蟾蓮花池與瑞穗兩族群點突變位置	43
圖 3-7	以鄰聚法分析分析中國樹蟾粒腺體DNA 12S 序列之親緣關係樹狀圖	44
圖 3-8	以鄰聚法分析分析梭德氏赤蛙粒線體DNA 12S 序列之親緣關係樹狀圖	45
圖 3-9	以鄰聚法分析分析梭德氏赤蛙粒線體DNA 16S 序列之親緣關係樹狀圖	45
圖 3-10	以鄰聚法建構盤古蟾蜍D-loop基因單型之親緣關係樹	48
圖 3-11	以最大簡約法建構盤古蟾蜍 D-loop 基因單型之親緣關係樹	49
圖 3-12	以鄰聚法建構高低海拔盤古蟾蜍12S 親緣關係樹狀圖	50
圖 3-13	以鄰聚法建構高低海拔盤古蟾蜍16S 親緣關係樹狀圖	51
圖 3-14	盤古蟾蜍AA群及AL群在各海拔分布比例變化	52

摘要

多樣性的基因是物種適應與演化的重要基礎，生物保育的三個層次包括生態多樣性、物種多樣性與**基因多樣性**，多樣性之研究成果，將可作為國家公園之經營管理政策擬定之基礎。已知太魯閣國家公園擁有豐富之兩棲類物種，故本計畫挑選出太魯閣國家公園內生態地位、功能重要或易受害的物種等作為生態系經營指標物種進行研究。

今年完成之**基因條碼** (DNA Barcode) 計有：莫氏樹蛙、赤尾鮎、龜殼花、菊池氏龜殼花等。此將可供國家公園管理處建立基因多樣性指標物種之用。

另本研究亦對太魯閣國家公園區合歡溪上游及 820 林道的楚南氏山椒魚，以粒線體之 16S 基因片段分析其基因多樣性，發現其核苷酸序列完全一致，顯示這兩個地點的楚南氏山椒魚應是屬於同一個族群。

根據林曜松(1991)和楊懿如(2006)之調查報告，中國樹蟾在太魯閣國家公園區之分布，呈現跳躍式分布(砂卡礑步道及蓮花池)。本計劃亦於花蓮縣瑞穗採集到另一族群之 DNA 樣本，經分析此二族群粒線體 12S 及 16S 之 DNA 序列，結果發現在 16S 部分，與 NCBI 已發表 AF315161 (Jiang and Zhou 2000, China)、蓮花池與花蓮縣瑞穗完全一致，而在 12S 部分，蓮花池與 NCBI 已發表 AF315129 (Jiang and

Zhou 2000, China)作比較，發現兩者相同，而蓮花池與瑞穗則出現一個明顯的點突變，此可將蓮花池與瑞穗之族群加以區分。

梭德氏赤蛙之調查中，在不同海拔採集到不同基因型之梭德氏赤蛙，此結果可能源自於在不同海拔、環境溫度的族群，經長時間的淘汰及生殖隔離後系群間亦逐漸產生遺傳變異。調查分布與前人的研究資料的比對，兩棲類分布可跨過 2000 公尺海拔高度的盤古蟾蜍，依其親緣關係之分析，結果發現族群內可依此海拔高度線分出兩個類群（基因多樣性）。故盤古蟾蜍將可作為兩棲類探討生態系之綜合指標生物，藉以瞭解生態環境受人為、氣候因子等影響之大小。

本研究所建立之實驗平台，完成可做為基因條碼序列之 CO1 基因部份序列解碼，並將陸續上傳至 NCBI Barcodes database，未來可繼續運用於其他物種之調查，建立更為完整之資料庫供作為太魯閣國家公園園區導覽資料，並與世界生態、生物相關資訊共享。

關鍵字：基因多樣性、基因條碼、盤古蟾蜍、梭德氏赤蛙、海拔高度

立即可行之建議

1. 珍稀物種DNA barcode資料之建立與上傳到國際基因條碼資料庫 (The Barcode of Life Data Systems, BOLD)，藉此基因條碼CO I 序列公開，藉以昭告，世界太魯閣國家公園亦從事基因多樣性建立及研究，並提昇太魯閣國家公園在國際間的知名度。

2. 太魯閣國家公園敏感性生物如兩棲類之族群分布及生態分析，進一步作為環境生態多樣性監測之用。
3. 特殊物種如中國樹蟾蓮花池單點分布，其基因多樣性可作為設特定區域之環境監測指標。
4. 利用族群分布之特性，以盤古蟾蜍作為分布升降之指標物種，監測全球氣候變遷對太魯閣國家公園生態之環境影響。
5. 並結合其它研究案，以盤古蟾蜍作為環境汙染指標物種，探討環境汙染源生物累積監控。
6. 建立太魯閣園區珍稀物種資料庫包括基因條碼CO I 序列資料，以供訪客知性之旅，相關基因多樣性與生態多樣性研究及深度解說導覽之用。

中長期性建議

- 1、針對不同海拔高度設立長期監測樣區，長期監測氣候變遷壓力下對兩棲類族群分布的影響。
- 2、將盤古蟾蜍列入長期監測及研究的重要物種，以使在有限的資源下，能更有效的長期監測環境變化，對原有自然生態造成之改變，作為維持、保育園區內的生物棲地與生物多樣性之保育政策擬定之參考。

Abstract

Genetic diversity is important issue for evolution of species and for adaption to the enviroment. The biological conservation, including ecosystem diversity, species diversity and genetic diversity, diversity of the research results serve as the management of national parks based policy making. Taroko National Park, known to have abundant amphibian species, this project was focused on species that are features important or vulnerable species, as ecosystem management indicator species to study.

The DNA barcode of the amphibians and reptiles in Taroko National Park completed in this project are: *Rhacophorus moltrecht*, *Trimeresurus stejnegeri stejnegeri*, *Trimeresurus mucrosquamatus* and *Trimeresurus gracilis*. These results could be shared to study genetic diversity and understand the biodiversity in this park.

We have studied the *Hynobius sonani* from Hehuan Creek upstream and 820 Forest Road by analysis the mitochondrial 16S gene, found that the nucleotide sequence from these two populations are identical, showing the *Hynobius sonani* from the two different locations should be the ethnic group.

The distribution of tree frogs, *Hyla chinesis* in the Taroko National Park area, show jumping distribution (Shakadang trails and Lianhua (Lotus) Pond trail). We also collected another group of *Hyla chinesis* samples from Juisue, Hualien County, and comparative analysis the mitochondrial 12S and 16S DNA sequences of these two populations, the 16S, 12S DNA sequences from NCBI published AF315161 and AF315129 (Jiang and Zhou 2000, China) as outgroup. We found that the 16S DNA sequences of these two populations and AF315161 are identical, whereas the lotus pond group and Juisui group can be separated by a SNP in mitochondria 12S nucleotide sequence.

Rana sauteri collected at different altitudes in the survey area, showing different genotypes, this result may be affected by different altitude, ambient

temperature, and the reproductive isolation among populations. Previous studies investigating the distribution of information and comparison of the distribution of amphibians can cross the 2000 m altitude, toad, according to their genetic relationship analysis, was found within populations and so separate the two group **altitude** line (genetic diversity). Therefore, the *Bufo bankorensis* can serve as the comprehensive index of biological ecosystem in order to understand the ecological environment effected by human activities and climatic factors.

Using the CO1 gene sequence decoding is performed as an experimental platform for the DNA barcode, and gradually uploaded the data to the NCBI Barcodes database. Next year this project can be extracted to other species of the investigation for establishing more complete database of Taroko National Park, sharing unique DNA barcode information on internet.

Keywords: **genetic diversity, DNA barcode, *Bufo bankorensis*, *Rana sauteri*, altitude**

第一章 緒論

第一節 研究緣起

太魯閣國家公園橫跨花蓮、臺中及南投三縣。境內地勢高聳，大致由西部的脊樑山脈向東傾斜，其間山巒起伏，二千公尺以上的山區面積約佔全境之半，以太魯閣峽谷、立霧溪、陶賽溪、大濁水南溪及三棧溪流域為主，包含：合歡山群峰、奇萊山連峰、南湖中央尖連峰、北二段群山、太魯閣大山、清水山...等山系，廣達九萬二千公頃。海拔高度從60公尺的閣口到3740公尺的南湖大山，含括林相有低中海拔的闊葉林、混生林、高海拔的針葉林、高山草原及苔原，及開墾過後的次生林。在如此複雜的地理氣候條件下，遂孕育出多樣性的生態環境與生物物種。太魯閣國家公園為花蓮最多觀光客旅遊的景點，以立霧溪穿鑿而過的大理石峽谷聞名全世界，從閣口砂卡礑溪神祕谷的海平面到海拔三千七百餘公尺的南湖大山，景觀及資源特色層層變化，成為台灣地區兼具保護與遊憩特色之高山地區國家公園，每年吸引無數的國內外觀光客到此旅遊。對國家公園的動植物造成衝擊。太魯閣國家公園雖為國家重要的生物多樣性保護區之一，由於歷史淵源所致，園區內有許多人為設施如道路、農耕地、住宅區等人類活動頻繁的地區，使得許多生物棲地之間鑲嵌非常複雜，加上過多的遊客，棲地的零碎化為園區內的生物多樣性帶來相當的衝擊。

野生動植物的研究與復育是國家公園重要的任務之一，而今全球環境變遷急劇，針對指標物種探究其生存環境壓力、生理反應及基因多樣性等，建議擬訂一套保育及復育計畫，以確保這些珍貴物種之永續存在。在國家公園有限的經費、知識與時間的限制下，保育經常要以最有效率的方式，以維持生態多樣性。談到保育，許多人直接聯想到的就是保育類物種，這也是被大家肯定，認為是重要的物種，然而沒有「保育類」這名稱光環下的其它物種，就等同失去一般大眾的注意與保護，但在這些一般類的物種中，也有一些重要程度不亞於保育類的物種，因此在進行本研究時，無論是保育類或一般類物種，都應納入研究對象。保育類物種的重要性已無庸致疑，但其重要性應不僅是《野生動物保育法》依其族群數量所定義的保育等級，也就是因珍稀而列入保育之故，也可能有其他生態地位與價值的重要性，這部分在《野生動物保育法》裡並無相關定義或說明，有鑑於此，挑選出太魯閣國家公園內生態地位、功能重要或易受害的焦點物種。讓這些重要的一般類物種能獲得更多的重視與保育，以達到生物多樣性的維持。

太魯閣國家公園全區之兩棲類物種共有山椒魚科(Hynobiidae)

3種：南湖山椒魚(*Hynobius glacialis*)、臺灣山椒魚(*Hynobius formosanus*)、楚南氏山椒魚(*Hynobius sonani*)，蟾蜍科(Bufonidae) 2

種：盤古蟾蜍(*Bufo bankorensis*)、黑眶蟾蜍(*Bufo elanostictus*)，狹口蛙科(Microhylidae) 1 種：小雨蛙(*Microhyla ornate*)，樹蟾科(Hylidae) 1 種：中國樹蟾(*Hyla chinensis*)，赤蛙科(Ranidae) 4 種：拉都希氏赤蛙(*Rana latouchii*)、澤蛙(*Rana limnocharis*)、斯文豪氏赤蛙(*Rana swinhoana*)、梭德氏赤蛙(*Rana sauteri*)，樹蛙科(Rhacophoridae) 5 種：日本樹蛙(*Buergeria japonica*)、褐樹蛙(*Buergeria robusta*)、艾氏樹蛙(*Chirixalus eiffingeri*)、白領樹蛙(*Polypedates megacephalus*)、莫氏樹蛙(*Rhacophorus moltrechti*)，計有 6 科 16 種，約佔全臺灣已知兩棲類物種之 43%。其中南湖山椒魚、臺灣山椒魚、楚南氏山椒魚、盤古蟾蜍、褐樹蛙、莫氏樹蛙等 5 種為臺灣特有種生物，臺灣山椒魚、楚南氏山椒魚、南湖山椒魚等為珍貴稀有保育類物種。

一般而言兩棲類的數量較豐富且容易監測，如蟾蜍科的盤古蟾蜍、黑眶蟾蜍，赤蛙科的斯文豪氏赤蛙、梭德氏赤蛙、澤蛙、拉都希氏赤蛙，樹蛙科的日本樹蛙、白領樹蛙、中國樹蟾、莫氏樹蛙、褐樹蛙等。兩棲類的棲息環境與水有密切的關聯，水與溼度是其重要的限制因子。兩棲類在生態環境中扮演著重要的角色，其皮膚對環境的敏感度很高，水域或陸地的環境品質的改變，對其族群分佈與數量影響大，所以常被視為監測環境的指標動物。這些特徵項目都需要針對物種進行較長時間的調查、監測與研究，才能獲得較為完整的族群動態

資料。兩棲類中山椒魚為台灣特有種，為冰河時期的子遺生物，僅分佈在2000公尺以上的高山；對陰濕環境需求度高，但限於台灣高山環境的氣候特色，山椒魚呈不連續的小族群分佈，族群數量極為稀少。山椒魚主要棲息於中高海拔原始森林之陰暗落葉層、陰濕水域及山溪附近，常棲身在近水源、小溪之腐木下或岩石下，以蚯蚓、昆蟲為主食。山椒魚為護傘種(特定棲地需求)、棲地品質指標(分佈能力受限、對壓力敏感、對干擾敏感)、易受傷害的(小族群、小範圍分佈)。研究太魯閣國家公園內的兩棲類指標物種，可提供對高山環境(山椒魚)、中低海拔(艾氏樹蛙、莫氏樹蛙、中國樹蟾)及溪流環境(褐樹蛙、斯文豪氏赤蛙)的監測，讓保育工作上，能更有效率地呈現不同生態體系下，環境監測的成效。近年因環境改變及人為破壞，兩棲類的族群數量不斷減少，已引起全球保育人士的嚴重關切，認為應建立長期監測的機制，以反應環境變遷與兩棲類族群數量的消長關係。若想瞭解造成兩棲類數量變遷的因素，則必須評估兩棲類物種的分布型態及族群動態，這需針對不同物種間和物種內、不同地點間及地點內進行長期的調查監測，才可加以評估。

梭德氏赤蛙 (*Rana sauteri*) 一般認為是台灣特有種，被歸類於林蛙類群 (brown frog complex)。廣泛分佈於台灣，在海拔100~3000公尺都可發現其身影。最早由Boulenger GA於1909年發表命名，模式

標本產地則在台南關仔嶺 (Guantzelin)。但目前為止對於梭德氏赤蛙的分類仍存在有一些爭議，高山地區的與低海拔地區的梭德氏赤蛙族群在分子層級上顯著的差異。從形態學的角度對全島的梭德氏赤蛙族群進行研究，認為可由蝌蚪的形態差異區分出兩個不同的物種，分別是分佈在低海拔 (關子嶺) 的梭德氏赤蛙和高海拔 (阿里山) 的多齒赤蛙 (*R. multidenticulata*)。研究亦提到在大禹嶺出現有3種系群 (lineages) 之梭德氏赤蛙。

太魯閣國家公園境內之梭德氏赤蛙的分佈可由低海拔直至3500公尺之合歡山，在複雜的地理氣候條件下，本實驗室在2009年以太魯閣國家公園內之梭德氏赤蛙為研究對象，採集不同海拔之樣本，將粒線體DNA中12S與16S基因選殖定序後，利用軟體分析其親緣關係，發現調查樣區內之梭德氏赤蛙可分為兩基因型，一種為廣泛分佈型 (Cluster I)，與NCBI上擷取碼 (accession number) DQ359976在高雄採集而發表之基因序列只有一個核苷酸的差異。另一基因型 (Cluster II) 的梭德氏赤蛙可能在調查樣區內為侷限性分佈，其序列與廣泛分佈型之間約有10~12%差異，故研究高山地區與低海拔地區的梭德氏赤蛙並加以比較，對於園區內兩棲類之基因多樣性能更為了解，所得之資料將對國家公園保育策略及方向基因多樣性經營管理單位有相當程度之助益。

爬蟲類在生態系中，許多種被認為是易受害物種及棲地品質指標。在太魯閣國家公園歷年的相關研究報告中，並沒有爬蟲類單一物種的研究，亦無單一只針對爬蟲類的資源普查，多只是在全面動物資源普查計畫的細項之一。因此，有關爬蟲類基礎生態及族群動態等研究資料較為缺乏。在爬蟲類的保育上應以保育類為主。目前已知太魯閣國家公園全區之爬蟲類物種共有8科36種。雪山草蜥、百步蛇、菊池氏龜殼花等台灣特有種，分佈能力受限，小族群、小範圍分佈，對棲地品質要求極高。其中百步蛇為明星物種，在原住民文化中具有崇高地位及精神文化象徵，且為民眾所熟知。菊池氏龜殼花在平衡台灣高山嚙齒類數量上扮演關鍵性的角色(杜銘章，2004)。珍貴稀有野生動物的研究與復育是國家公園重要的任務之一，而今全球環境變遷急劇，有必要針對指標物種探究其生存環境壓力、生理反應及基因多樣性是否足以因應等，然後建議擬訂一套復育計畫，以確保這些珍貴物種之永續存在。

生物多樣性保育的三個層次應包括生態多樣性、物種多樣性與基因多樣性，過去國家公園對前二者已有所認知。然而永續發展與生物多樣性的保育，一直是國家公園管理處經營管理的重點努力方向，依循此方向、過去太魯閣國家公園完成對自然與人文資源的調查與研究案，及對資源與遊憩的規劃與經營管理研究案近 200 件（吳海音，

2003)。然而回顧過去的研究報告，在生物多樣性方面的研究，重點多放在生態多樣性、物種多樣性的相關調查，在物種基因多樣性的研究卻少有著墨。物種的定義以分子生物學、遺傳演化學之觀點之下有不同詮釋。基因多樣性是研究生物多樣性最基本的項目，物種的演化與適應、族群基因庫的變異程度，基因變異在族群內的個體間和族群之間流動情形，是否出現新種等等，這些都和保育及維持物種、族群和生態系的存續息息相關。

國家公園常以海拔高度或植被林相作為研究調查與經營管理的分區，也認為大型或可移動較快速動物的分佈就是當地的動物地理分佈，而甚少考量如蝸牛或蛙類等動物之地理分區。例如海拔 2000 公尺以上的各個山頭之蝸牛種間是否已形成不同品系，被高山溪谷隔離的同種蛙類是否有不同型態等。一旦隔離機制維持的時間夠長，足以產生變異，進一步達到生殖隔離(reproductive isolation)，甚至使隔離的族群形成不同的物種，也就是異域種化(allopatric speciation)的過程。高山林立的太魯閣國家公園，具有相當適合研究這方面生態演化的條件。目前國家公園對基因多樣性之探討仍不多，僅有對於一些明星物種如珍貴稀有的保育類山椒魚、呂氏攀蜥等，曾進行過相關之研究。

演化與適應階段，基因庫裡有多少變異，變異之於個體與族群間

的流動情形。基因多樣性的價值就建立在同一物種的種間基因變異度。維持某物種的基因多樣性，則該物種對環境有較強的調適度，與其他物種的競爭性及互惠性上有較好的適應能力，因而有助於該物種的生存、繁殖與演化。某物種基因多樣性的維持可使得該物種的族群更容易維持，而生態系內其它族群的基因多樣性能更易維持，則整個生態系的群落多樣性才能維持。若物理環境沒有重大變遷，則該生態系自然發揮功能，提供適宜的生態服務。多樣性的基因是物種適應與演化的重要基礎，而該物種的生存與繁殖需要有適合的棲息環境。但是該物種在其生物群落的維繫就要靠健全的生態系。生態系的功能之一是提供維繫物種（及其基因）的多樣性存在的空間。近年以分子標記的一些方法包括 AFLP、RAPD、RFLP、Mitochondrial DNA、Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE)、Microsatellite 進行物種的族群基因多樣性之研究，已是生物多樣性研究的重要方法。微衛星序列因其具有多對偶基因(multiallelic)、共顯性遺傳(codominance)、高度多型性、高再現性、易以聚合酵素連鎖反應偵測等優點，因此近年來被廣泛應用於 DNA 指紋分析、親本與品種鑑定、分子育種、族群遺傳研究與建立高解析度的遺傳圖譜。微衛星序列標誌應用廣泛，是目前最具潛力及效用的分子標誌，藉上述此研究將現有生態多樣性與物種多樣性，溶入基因多樣性之中，以期建立完整生態系及並探討其可能變遷

之因素。

粒線體DNA(詳見附錄六)在族群遺傳的研究上，因可提供良好的解析力(Moritz *et al.*, 1987)，亦可運用在估算族群遺傳結構，及檢視同一物種之不同族群是否存在遺傳分化(Slatkin, 1985)等用途，目前已有許多物種之粒線體DNA序列和基因相對位置已被完整定序出來，如盤古蟾蜍的近緣種—中華大蟾蜍(圖1-1)，在進行這方面的研究時便有相當多的資料可參考。

選擇適當的基因作為分析比較的材料，是族群判定研究最重要的事前準備工作。先前的研究顯示，分析比較所有已定序的動物粒線體DNA，發現粒線體基因組各區段的保守性不同。一般來說，蛋白質基因、tRNA 基因與rRNA 基因比較保守，其基因的鹼基替代率最低，結構與功能也較為穩定與相似。相較而言，控制區(control region)，或稱為D-loop，是非功能性的基因，因此不受到選汰(selection)壓力的影響，在D-loop片段的演化速率大約是一般核染色體的5~10倍(Birky *et al.* , 1983; Brown *et al.*, 1979; Dawid & Blacker, 1972)，故其保守度最低，變異度最高。粒線體DNA 中各種基因長度的穩定性依次為：tRNA 基因與蛋白質基因區域 > rRNA 基因 > 控制區。由先前研究得知，cytochrome b gene 由於其長度較長、保守度高，廣泛地被應用在於「科」以上的分類階層(Avise *et al.*, 1994; Baker *et al.*,

1995)。鑑於相同之理由，12S-rRNA也被應用於生物科間、屬間的類緣關係上（Waterman *et al.*, 1992；Douzery and Catzeflis, 1995；Hannic *et al.*, 1995）。而控制區D-loop 區域，由於穩定性較低與演化速率較快，通常被應用於種間、族群分析等親緣關係遠近的研究（Sang *et al.*, 1994）。

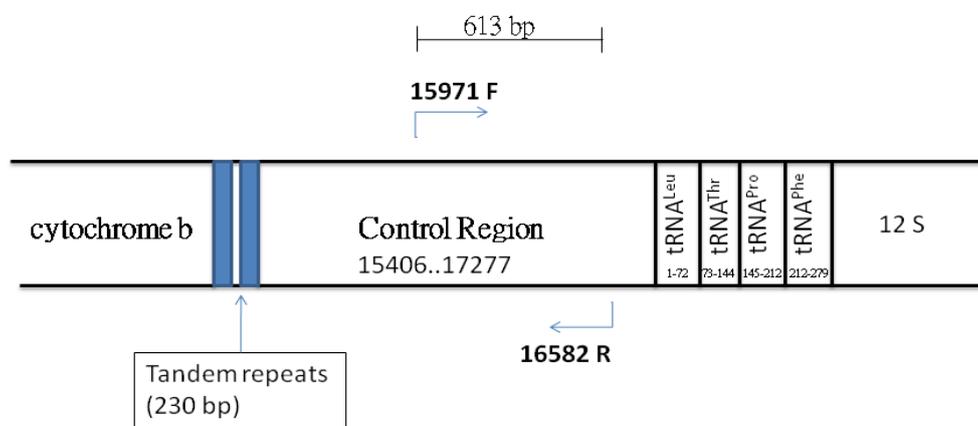


圖 1-1 中華大蟾蜍 (*Bufo gargarizans*) 粒線體之部分結構及盤古蟾蜍控制區引子對 (15971F、16582R) 相對位置。

第二節 計畫目標

物種常因為地理上或是生態上的區隔造成許多不同的族群，族群之間的基因遺傳，因為交流的機會降低而具有一定程度的差異，即使在同一族群內個體之間的變異仍然存在，稱為**基因多樣性**。利用此基因多樣性可判斷其**物種間的親緣關係**。且這個遺傳的多樣性代表著物種適應環境的潛力，自然狀態下**基因的多樣性來自基因的突變及生殖過程中基因的交換重組**，好的基因在大自然的選擇之下被穩定的保存

下來。由於瀕臨滅絕的物種其遺傳多樣性通常很貧乏，所以在進行保育工作方面，如何的保持、甚至增加物種的遺傳多樣性，以增加物種對環境變異的適應能力，就顯得非常的重要。

分子生物學提供保育生物學者鑑定生物物種的工具，由於高度的遺傳變異及敏感性，而此實作及作為未來利用需仰賴當地資料庫的建立，故本研究利用分子生物學技術分離個體內的組織 DNA 後，分析其微衛星序列基因座 (microsatellite loci)，粒線體 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 控制區 (Control region)、12S、16S 及 cytochrome b 等基因，藉以比較不同地區族群間的遺傳變異，以利未來進行太魯閣地區族群遺傳結構比較，作為後續保育及研究依據。

本研究之工作內容包括：

1. 文獻蒐集與回顧
2. 針對全球暖化及物種雌性化問題建議指標物種(兩爬類)。
3. 指標物種生存環境壓力與生理現象間關聯性探討。
4. 指標物種基因多樣性探討，物種界定、隱蔽種的發現、演化歷史的探討。
5. 相關保育計畫之研擬。

第二章 研究方法

第一節 研究物種選擇、採集地點之建立及採集方法：

本計畫擇定之研究物種考量因素包括：物種族群海拔分佈之廣度以期發現不同族群是否有基因差異者、保育類或珍稀物種且允許優先採樣者、具有其它基因條碼研究可供比對者、可供國家公園管理處建立基因多樣性指標之物種、管理處其它研究計畫所需基因資料者、並考量人力物力所能達成之數量。初步擇定之兩棲類與爬蟲類物種如下。

(一)、兩棲類

- 1.日本樹蛙 (0~1500 公尺)
- 2.褐樹蛙 (0~1500 公尺)
- 3.斯文豪氏赤蛙 (0~2500 公尺)
- 4.梭德氏赤蛙 (0~3000 公尺)
- 5.中國樹蟾 (0~1000 公尺)
- 6.盤古蟾蜍 (0~3000 公尺)
- 7.南湖山椒魚 (2100~3000 公尺)
- 8.台灣山椒魚 (2100~3000 公尺)
- 9.楚南氏山椒魚 (2600~3100 公尺)

盤古蟾蜍在太魯閣國家公園內分布廣泛，在低中高海拔均可見其蹤跡，目前本實驗室的調查中，採集到的數量最為豐富；微衛星DNA 的研究分析中，每一個樣點樣本數，一般至少需要 20~30 個樣本，故在本年度的計劃中，將以盤古蟾蜍作為兩棲類調查研究的的重點之一。

(二)、爬蟲類

- 1.呂氏攀蜥 (1000~2000 公尺)
- 2.斯文豪氏攀蜥 (0~1500 公尺)
- 3.台灣草蜥 (0~1000 公尺)
- 4.赤尾鯢 (0~1500 公尺)
- 5.龜殼花 (0~1000 公尺)
- 6.菊池氏龜殼花 (1500~2500 公尺)
- 7.紅竹蛇 (0~1000 公尺)
- 8.雪山草蜥 (1500~3000 公尺)
- 9.中國石龍子 (0~1500 公尺)
- 10.麗紋石龍子 (0~2500 公尺)
- 11.青蛇 (0~1000 公尺)

將中橫沿線區分為低中高海拔做為採集地點，設計如圖 2-1 及表 2-1：低海拔區（海拔 0~1000 公尺）：砂卡噹、布洛灣、天祥、西寶、洛韶。中海拔區(海拔 1000~2000 公尺)：台八線 148 K、新白楊、台八線 133 K、台八線 131 K、台八線 119 K。高海拔區(海拔 ≥ 2000 公尺)：關原、大禹嶺、820 林道、合歡山、小風口。以海岸山脈(1000 公尺以下)做為對照組，採集地皆以 GPS 系統定位其經緯度與實際之海拔高度。單一採集地(同一海拔)以採集同一物種五公五母為目標數量，除判斷並紀錄公母外，一併量測其體重、體長、婚姻墊之大小。

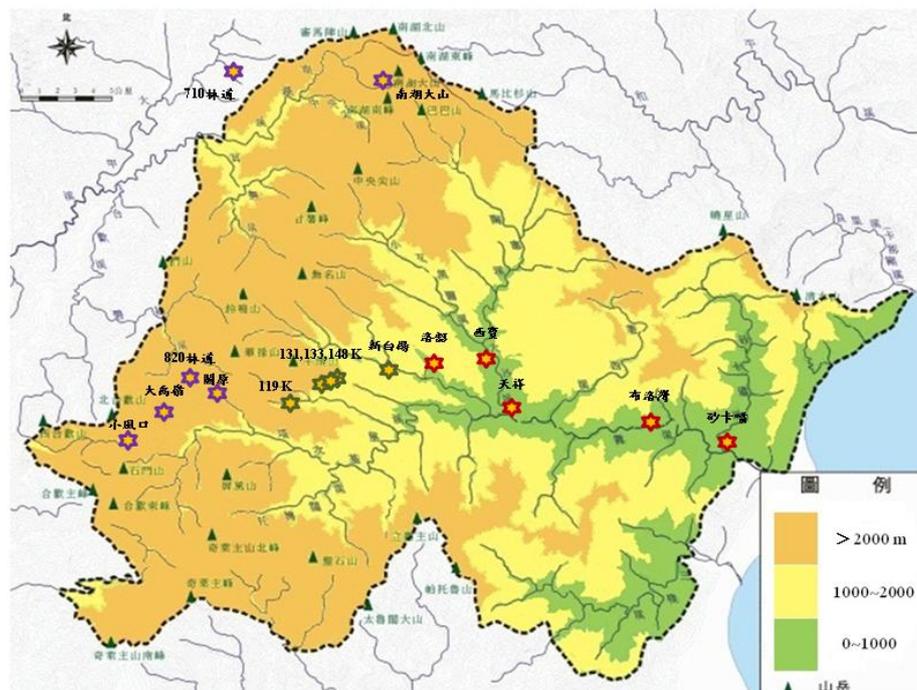


圖 2-1 中橫沿線採集地點

表 2-1 中橫沿線採集地點海拔分佈

海拔分佈 (公尺)	採集地點(實際海拔)	經緯度
0	砂卡嚕橋下、步道(<100 公尺)	24"09'42.69" 北； 121" 36'48.48" 東
500	布洛灣 (370 公尺) 天祥 (650 公尺)	24"10'06.92" 北； 121" 34'25.39" 東 24"12'39.52" 北； 121" 29'10.86" 東
1000	西寶國小後方水塘 (915 公尺) 洛韶 (1100 公尺)	24"12'25.26" 北； 121" 28'52.01" 東 24"12'28.84" 北； 121" 27'02.86" 東
1500	台八線 148k (1380 公尺) 新白楊 (1643 公尺)	24"12'21.64" 北； 121" 25'21.69" 東 24"11'52.25" 北； 121" 25'57.13" 東
2000	台八線 133k (2000 公尺) 台八線 131k (1970 公尺) 台八線 119k (2166 公尺)	24"11'35.57" 北； 121" 23'02.84" 東 24"11'21.88" 北； 121" 22'53.06" 東 24"11'16.50" 北； 121" 20'36.95" 東
2500	關原加油站 (2374 公尺) 大禹嶺 (2365 公尺)	24"11'08.21" 北； 121" 20'33.14" 東 24"10'49.94" 北； 121" 18'46.34" 東
3000	特生中心後溪床下 (3000 公尺) 合歡山區 (3200 公尺)	24"09' 43.25" 北； 121" 17' 11.42" 東 24"08' 38.33" 北； 121" 16' 48.87" 東

第二節 基因條碼之建立與 CO I、12S 及 16S 核苷酸序列之放大和選殖

2.1 節 基因之放大與選殖

DNA純化

DNA 萃取選用Epicentre公司開發的實驗用試劑組QuickExtract™ DNA Extraction Solution進行樣本萃取，其操作流程參考其使用手冊，配合實際操作經驗略做修正。操作步驟為：（1）剪下少量樣本（少於0.1 公克），若樣本保存於高濃度酒精的組織樣本，則在取出後，先浸漬於二次去離子水中10分鐘，將酒精完全溶出去除並軟化組織樣本。利用市售套組QuickExtract™抽取之後，在經由Wizard® DNA purification system純化，（2）將去酒精洗淨的組織樣本置放於1.5 mL 的微量離心管（eppendorf）中，加入200 μ L 試劑組中extraction solution，將組織樣本先以小剪刀剪成碎塊，再利用小型均質器將組織樣本研磨均質。研磨的過程必須在低溫下（冰盆中）進行。（3）均質後移至65°C的水浴槽中水浴15分鐘。水浴時要搖晃樣品兩次，以免產生沈澱導致反應不完全。（d）搖晃混合後在98°C水浴2 分鐘，再移至冰上。（e）以3000rpm轉速離心2分鐘。取出上清液並移到新的1.5 mL 的微量離心管中，即為genomic DNA。genomic DNA 可長期保存於-20°C 中或直接進行PCR 增幅。

2.2節 引子設計

CO I 萬用引子對 (Smith,2008) :

VF1-d : 5'- TTCTCAACCAACCACAARGAYATYGG -3'

VR1-d : 5'- TAGACTTCTGGGTGGCCRAARAAYCA -3'

12S 萬用引子對 (翁慶豐,2009) :

12S-F : 5'- CTTAAAACCCAAAGGACTTG -3'

12S-R : 5'- GCTGCACCTTGACCTGACG -3'

16S 萬用引子對 (翁慶豐,2009) :

16S-F : 5'- TATAAGACGAGAAGACCC -3'

16S-R : 5'- ACCCTGATCCAACATCGAG -3'

粒線體 D-loop 引子對(盤古蟾蜍) :

Bu-con-15971F : GAG CCT TCC CTT GGT TTA AGA GTA

Bu-con-16582R : CCA GGT TAA GGT CTT TAA GGT ACC AG

2.3節 CO I、12S 及 16S rRNA 之放大和選殖

萃取純化所得之樣本 genomic DNA，利用聚合酶連鎖反應 (polymerase chains reaction，簡稱 PCR) 技術進行增幅 (amplification)，以使特定片段大量複製增幅，提供選殖(clone)或定序反應足夠的反應濃度。12S及16S基因之放大利用各組引子對，進行反應總體積為25 μ L PCR反應。0.5 μ L DNA模板，0.5 μ L of 10 mM

dNTP, 0.5 μ L 之F端和R端引子, 0.5 μ L *Taq* DNA polymerase, 2.5 μ L of 10X PCR buffer, 其餘以去離子水補齊至25 μ L。條件為initial heating 94 $^{\circ}$ C, 5 min, 35循環之94 $^{\circ}$ C, 30 sec; 45 $^{\circ}$ C, 30 sec; 72 $^{\circ}$ C, 30 sec; 及final extension 72 $^{\circ}$ C, 10 min。CO I 基因之放大, 利用引子對 VF1-d/VR1-d, PCR反應總體積同為25 μ L。VF1/VR1-d條件為initial heating 94 $^{\circ}$ C, 5 min, 35循環之94 $^{\circ}$ C, 45 sec; 45 $^{\circ}$ C, 45 sec; 72 $^{\circ}$ C, 50 sec; 及final extension 72 $^{\circ}$ C, 10 min。

放大之 PCR 產物以 Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit 純化後接合至 pGEM[®]-T Vector Systems, 最終轉形至 ECOS[®] competent cell, 塗抹在含有 50 ng/mL Ampicilin, IPTG 和 X-Gal 之平板上進行 12-16 小時 37 $^{\circ}$ C 之藍白篩選, 或直接純化後送往商業公司定序。

所得之各樣本 DNA 序列後均以人工修整後, 搜尋 NCBI 資料庫 (*GeneBank*) 中已發表之珍稀及指標物種的序列, 從中比對, 以確定所得 DNA 序列之正確性。

第三節 親緣關係與基因多樣性分析：

針對基因判定親源分成由粒線體 DNA: CO I、D-loop、12S 及 16S、或由功能性基因: 色素基因(POMC)、GTH α (黃體成長素)、GTH β (卵泡刺激素)、TSH β (甲狀腺激素)、heat shock protein (70 and 90)、及 cytochrome P450 等基因設計出該物種專一的引子, 利用鏈聚

合酶反應 (PCR)、基因定序等技術建立物種間親緣關係並分析其基因多樣性。定序所得之序列，以 BioEdit 軟體(Version 7.0.1) (Hall 1999) 進行排列比對(alignment)。本研究採取二途徑，一是分析待鑑定對象與參考序列的親緣關係；二是比較待鑑定對象與參考序列的遺傳距離。本研究以鄰聚(neighbor-joining)法(Saitou and Nei, 1987) 來建構物種的親緣關係，以 Kimura's 2 parameter model (K2P) (Kimura, 1980)為分子取代(substitution) 模式，並利用 bootstrap 法(Felsenstein, 1985) 重複 1,000 次運算來求親緣關係之可信度。遺傳距離亦是以 K2P 為模式校正計算。鄰聚法、bootstrap 法及遺傳距離的計算皆是用軟體 MEGA 4.02 (Kumar *et al.*, 2004) 來執行。作為比對參考的其他粒線體細胞色素 *b* 基因序列，則從 *GeneBank* 下載，包含的序列、物種與其擷取碼(accession number)。

第三章 研究結果與討論

第一節 兩棲類分佈

兩棲類在太魯閣國家公園是相當豐富的動物，國家公園成立後針對境內曾進行詳細的生物多樣性研究調查，在呂光洋等(1983，1989)、林曜松等(1991，2005)、楊懿如(2005)及翁慶豐(2009)對太魯閣國家公園內之動物資源進行調查研究結果中顯示，太魯閣國家公園全區之兩棲類物種計有 6 科 15 種，廣泛的從低海拔一直延伸分布到高達 3000 餘公尺的合歡山區。

本計畫自 2009 年 3 月至 2010 年 10 月間進行太魯閣國家公園兩棲類的研究調查工作，考量調查人力及兩棲類的分布環境，針對太魯閣國家公園特別景觀區、一般管制區及遊憩區等人車易達地區，依不同海拔高度設置調查樣區，進行兩棲爬蟲類動物之採集工作。結果在調查樣區中紀錄到兩棲類共 5 科 8 種，將本計畫所調查記錄結果，依海拔與物種的不同加以整理，並與過去文獻記載作一比較作成表 3-1，太魯閣國家公園兩棲類之海拔分布與前人之研究大致上相符，有差異者可能是調查地點不同或努力量不同所致，較特殊的是盤古蟾蜍分布延伸至 3000 公尺，斯文豪氏從原 1000 公尺向上延伸到 2000 公尺。我們將調查結果轉成圖 3-1，由圖 3-1 可發現，在園區內之兩棲類大部分均出現於 2000 公尺海拔以下之地區，山椒魚分布在 2500 公尺以上之高冷地

區，而盤古蟾蜍、梭德氏赤蛙、斯文豪氏赤蛙之分布可從低海拔至高海拔。若進一步分析其主要的分布範圍，將調查所得之數量整理成表3-2及圖3-2，可發現3種廣泛海拔高度分布的蛙種中，梭德氏赤蛙最主要出現在2000公尺海拔、其它則是零星出現，斯文豪氏赤蛙主要分布在低於1500公尺高度之區域，僅盤古蟾蜍之分布從平地到高海拔均有一定數量之存在；故生態系經營指標物種之研究與探討兩棲類分布與海拔高度之關連性，盤古蟾蜍是相當適合之標的物種。

表 3-1 各蛙類海拔分布表

物 種 名 稱	海拔高度 (公尺)						
	0	500	1,000	1,500	2,000	2,500	3,000
山椒魚科 Hynobiidae							
楚南氏山椒魚 <i>Hynobius sonani</i>						■	■
蟾蜍科 Bufonidae							
盤古蟾蜍 <i>Bufo bankorensis</i>	■	■	■	■	■	■	■
黑眶蟾蜍 <i>Bufo melanostictus</i>	■	■					
樹蟾科 Hylidae							
中國樹蟾 <i>Hyla chinensis</i>	■		■				
赤蛙科 Ranidae							
斯文豪氏赤蛙 <i>Rana swinhoana</i>	■	■	■	■	■	■	■
梭德氏赤蛙 <i>Rana sauteri</i>	■	■	■	■	■	■	■
樹蛙科 Rhacophoridae							
日本樹蛙 <i>Buergeria japonica</i>	■	■	■				
褐樹蛙 <i>Buergeria robusta</i>	■	■	■				
莫氏樹蛙 <i>Rhacophorus moltrechti</i>	■	■	■	■	■		

■ 本次調查記錄

■ 文獻資料記載(楊懿如:2005/12 太魯閣國家公園兩棲類及水棲昆蟲調查監測計畫)

表 3-2 不同海拔與物種調查所得之數量

海拔高度 (m)	日本樹蛙	褐樹蛙	黑框蟾蜍	盤古蟾蜍	中國樹蟾	莫氏樹蛙	斯文豪氏赤蛙	梭德氏赤蛙	楚南氏山椒魚
0	116	100	2	83			57	1	
500	183	5		69		9	18	4	
1000	31			142	10		114	8	
1500				81		13	34	4	
2000				12		3	4	112	
2500				29			1		4
3000 以上								1	3
合計	330	105	2	416	10	25	228	130	7

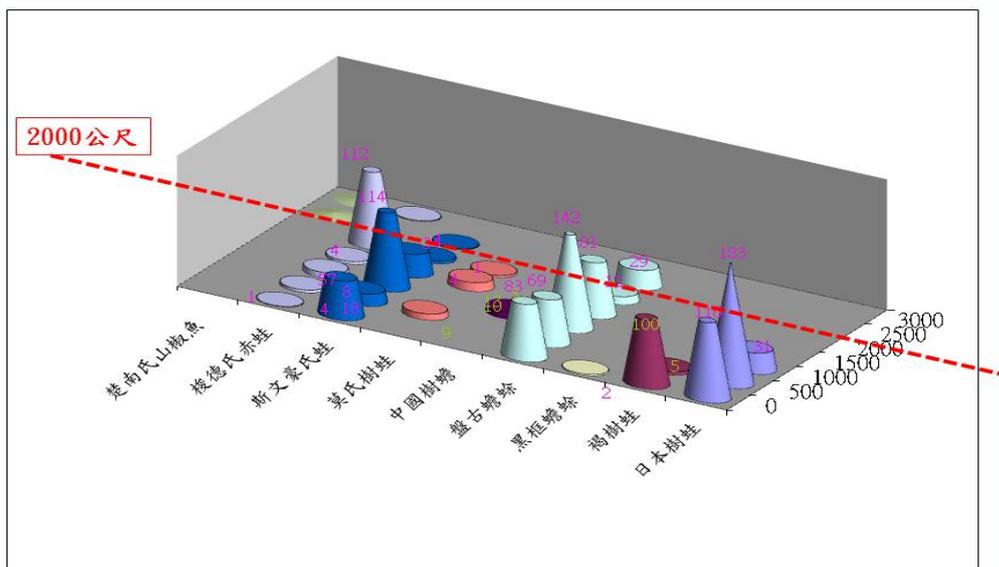


圖 3-1 各海拔與蛙類分布調查之數量

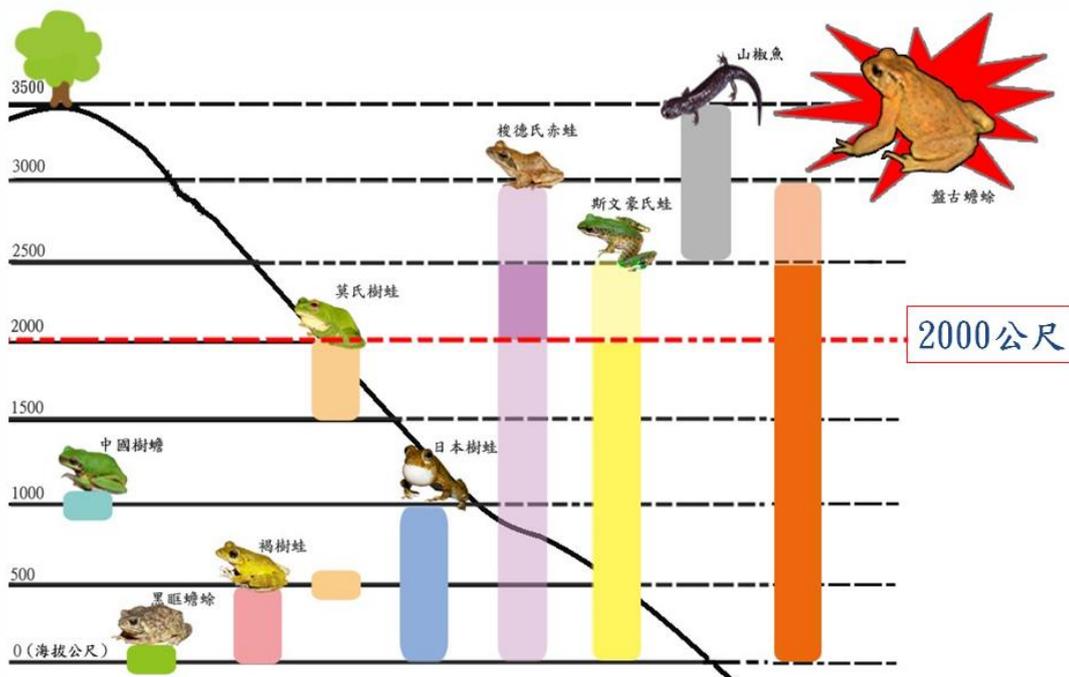


圖 3-2 兩棲類分布海拔

第二節 兩棲爬蟲類生命條碼 (Barcode)

2.1 節 生命條碼回顧及整理

自 2009 年本實驗室開始執行兩棲爬蟲類之基因多樣性及基因條碼建立計劃以來，目前已從太魯閣園區內兩棲類 6 科 16 種中，定序可作為建立基因條碼之用的部分兩棲類共計出 8 種 (表 3-3)，爬蟲類已完成 7 種 (表 3-4)；表中一併整理出目前 NCBI 資料庫有關園區內兩棲爬蟲類作為 Barcode DNA 序列。

表 3-3 兩棲類已定序基因條碼

兩棲類	NCBI 資料庫	本計劃完成
臺灣山椒魚 <i>Hynobius formosanus</i>	DQ333816.1	NA
楚南氏山椒魚 <i>Hynobius sonani</i>	NA	V
盤古蟾蜍 <i>Bufo bankorensis</i>	NA	V
黑眶蟾蜍 <i>Bufo melanostictus</i>	AY458592.1	NA
中國樹蟾 <i>Hyla chinensis</i>	AY458593.1	V
小雨蛙 <i>Microhyla ornata</i>	NA	NA
斯文豪氏赤蛙 <i>Rana swinhoana</i>	NA	V
梭德氏赤蛙 <i>Rana sauteri</i>	NA	V
澤蛙 <i>Rana limnocharis</i>	NA	NA
拉都希氏赤蛙 <i>Rana latouchii</i>	NA	NA
日本樹蛙 <i>Buergeria japonica</i>	NA	V
褐樹蛙 <i>Buergeria robusta</i>	GU244379.1	GU244379.1

艾氏樹蛙 <i>Chirixalus eiffingeri</i>	NA	NA
莫氏樹蛙 <i>Rhacophorus moltrecht</i>	NA	V
白領樹蛙 <i>Polypedates megacephalus</i>	AY458598.1	NA

NA 為無資料或尚未採得樣本

表 3-4 爬蟲類已定序基因條碼

爬蟲類	NCBI 資料庫	本計劃完成
赤尾鮎 <i>Trimeresurus stejnegeri stejnegeri</i>	NC_012146.1	V
龜殼花 <i>Trimeresurus mucrosquamatus</i>	NA	V
青蛇 <i>Cyclophiops major</i>	NA	V
雪山草蜥 <i>Takydromus hsueshanensis</i>	NA	V
呂氏攀蜥 <i>Japalura luei</i>	NA	V
斯文豪氏攀蜥 <i>Japalura swinhonis</i>	NA	NA
台灣草蜥 <i>Takydromus formosanus</i>	NA	NA
菊池氏龜殼花 <i>Trimeresurus gracilis</i>	NA	V
紅竹蛇 <i>Elaphe porphyracea nigrofasciata</i>	NA	NA
中國石龍子 <i>Eumeces chinensis</i>	NA	NA
麗紋石龍子 <i>Eumeces elegans</i>	NA	V

NA 為無資料或尚未採得樣本

2.2 節 CO I 定序完成之物種及其序列：

1. 莫氏樹蛙

學名：*Rhacophorus moitrehti*

來源：台八線 148K

CO I 基因條碼：

```
TACCCTATACTTAATTTTTGGTGCCTGAGCCGGAATAATCGGAACA  
TCTCTCAGCTTACTTATTCGAGCCGAACTTGCTCAACCCGGCACC  
CTTCTCGGCGACGACCAAATTTATAATGTAATTGTCACCGCCCATG  
CTTTTGTAATAATTTTTTTTATGGTAATGCCATTCTCATTGGAGGG  
TTTGGCAACTGATTGGTGCCATTAATAATTGGAGCACCAGATATAG  
CCTTCCCACGAATAAATAATATAAGCTTTTGATTACTCCCCCTTCA  
TTTTTCTTCTTTTAGCATCTTCAATAGTAGAAGCGGGGGTAGGGA  
CCGGATGAACAGTCTACCCACCCTTAGCTGGCAATATTGCTCACG  
CTGGACCATCTGTTGATCTAGCTATTTTTTCTTTACATCTTGCTGGT  
GTGTCTTCTATTCTAGGAGCTATTA ACTTCATCACAACAATTTTTAA  
TATAAAACCAGTATCTATAACACAATATCAAACCCCTTATTTATCT  
GGTCTGTTCTCGTAACAGCTGTTTTATTACTTCTTTCCCTTCCAGTA  
TTAGCTGCAGGAATTACTATATTGCTAACCGATCGAAACCTAAATA  
CTACCTTCTTCGATCCAGCAGGGGCGGAGACCCTGTACTATATCA  
ACATCTATTT
```



(99 年)

2. 赤尾鮎

學名：*Trimeresurus stejnegeri stejnegeri*

來源：砂卡礑步道

CO I 基因條碼：

```
AACCCTATACCTAATATTCGGTGCATGATCCGGCCTTATCGGGGCC  
TGCCTAAGCATCCTGATACGCATAGAACTAACTCAGCCTGGATCAT  
TATTCGGCAGTGACCAGATCTTTAATGTTCTAGTAACCGCTCACGC  
ATTTATCATAATCTTCTTTATAGTCATACCCATTATAATTGGAGGCTT  
CGGAAACTGACTAATCCCTCTAATAATTGGAACCCCAGACATAGC  
CTTCCCCCGAATGAACAACATGAGCTTTTGACTCCTCCCCCAGC  
ACTACTTCTACTACTATCCTCCTTACGTCGAAGCAGGCGCAGG  
AACAGGTTGAACTGTCTATCCCCCCTATCTGGAAACCTAGTACA  
CTCCGGCCCATCAGTAGACTTAGCCATTTTTTCTCTTCACTTAGCC  
GGAGCATCATCTATTCTAGGGGCAATCAACTTCATCACTACATGTA  
TTAACATAAAACCCAAATCAATACCAATATTTAACATACCACTTTT  
TGTCTGATCTGTTATAATCACCGCGATCATACTACTTCTAGCTCTAC  
CAGTACTCGCAGCAGCAATCACCATGCTCCTGACAGATCGAAACC  
TAAATACAACCTTCTTTGACCCCTGCGGAGGCGGGGACCCAGTCC  
TATTCCAACACTTGTTTC
```



(99 年)

3. 龜殼花

學名： *Trimeresurus mucrosquamatus*

來源：砂卡礑步道

CO I 基因條碼：

```
AACCCTATACTTATTATTTGGCGCATGATCAGGCCTGGTCGGGGCC  
TGCCTTAGCATCTTAATACGAATAGAATAACTCAGCCCGGGTCA  
CTACTGGGCAGTGATCAAATCTTTAATGTTCTAGTTACAGCCCACG  
CATTATTATAATTTTCTTCATGGTCATACCAATTATAATCGGCGGCT  
TTGGTAACTGATTAATCCCACTAATAATTGGAGCCCCCGATATGGC  
CTTTCACGTATAAACAACATAAGCTTCTGGCTTCTACCGCCTGCA  
CTACTTCTATTATTATCATCTCCTACGTTGAAGCAGGAGCAGGCA  
CAGGATGAACTGTATATCCACCCCTCTCGGGGAACCTGGTACACT  
CAGGACCATCAGTTGACCTAGCAATTTTCTCCCTTACCTAGCAG  
GCGCCTCCTCCATCCTGGGCGCAATCAATTTTATTACAACATGTAT  
TAACATAAAACCAAAGTCCATACCAATATTTAACATCCCCTTATTT  
GTCTGATCCGTAATAACAGCCATCATACTACTTCTAGCATTAC  
CAGTGCTGGCCGCAGCAATTACCATACTATTGACGGACCGAAACC  
TCAACACCTCTTTCTTTGACCCCTGCGGAGGGGGGGACCCGGTAC  
TATTCCAACACCTATTC
```



(99 年)

4. 菊池氏龜殼花

學名： *Trimeresurus gracilis*

來源： 台十四甲線 36K

CO I 基因條碼：

```
AACCCTATACCTTATATTTGGCGCATGATCCGGCCTCATTGGGGCCT  
GCTTAAGCATCCTAATACGCATAGAACTAACCCAGCCCGGATCCTT  
ATTCGGCAGCGACCAAATCTTTAATGTCTTAGTAACCGCCCACGCC  
TTCATCATAATCTTCTTCATGGTTATACCCATCATAATCGGGGGTTTT  
GGAAACTGACTAATCCCTTTAATAATCGGGACCCCAGACATAGCCT  
TCCCCCGAATAAACAAACATAAGTTTTTGACTCCTGCCCCCGCACT  
ACTTCTCCTACTGTCCTCCTCTTACGTGGAAGCAGGAGCAGGAAC  
AGGCTGAACTGTCTACCCGCCCCTTTCCGGAAACTTAGTCCACTC  
AGGGCCATCAGTGGACTTAGCCATCTTCTCCCTTCATCTGGCCGGA  
GCATCATCCATCCTAGGAGCAATCAACTTTATTACCACATGCATCA  
ACATAAAACCCAAATCGATACCCATGTTTAAACATTCCCCTATTTGTC  
TGATCAGTTATAATCACCGCAATTATACTACTTTTAGCCCTGCCAGT  
GCTTGCAGCAGCGATCACCATACTACTGACCGATCGAAACTTGAA  
CACAACCTTCTTTGACCCCTGCGGAGGAGGGGACCCGGTCTTA  
TTCCAACACCTGTTC
```



(99年)

5. 楚南氏山椒魚

學名：*Hynobius sonani*

來源：820 林道

CO I 基因條碼：

```
CACTTCACTTAGCAGGTATTTTCATCAATTCTTGGGGCTATTAATTTTATTACAACCTCAA  
TTAATATAAAAACCCCTATCAATATCACAATATCAAACACCCTTATTTGTCTGATCAGTAT  
TAATCACTGCTATTCTCCTCTTACTCTCATTACCAGTCCTTGCTGCAGGAATTACAATAC  
TCTTAACAGACCGAAACTTAAACACTACATTCTTTGACCCTGCAGGAGGAGGAGACCCTG  
TTCTTTACCAACACCTCTTCTGGTTTTTTGGCCATCCAGAGGTCTATATTCTTATTCTCC  
CAGGATTTGGGATAATTTCTCATATTGTTACATATTATTCGGCAAAAAAGAACCTTTTG  
GATATATAGGTATAGTATGAGCTATAATATCAATCGGATTACTAGGATTTATTGTTTGAG  
CCCACCATATATTTACAGTTGATCTTAATGTTGACACAGAGCTTATTTTACATCAGCTA  
CAATAATTATTGCTATCCCCACTGGGGTAAAAGTATTTAGCTGATTAGCAACAATACATG  
GAGGATCAATTAAATGAGATGCTGCAATATTATGAGCTTTAGGTTTTATTTTTTTATTTA  
CCGTTGGCGGATTAACCTGGCATTGTTCTTGCCAATTCATCATTAGATATTGTCCTACATG  
ATACTTATTATGTAGTGGCACATTTTCATTACGTTTTAT
```



(98 年)

6. 盤古蟾蜍

學名：*Bufo bankorensis*

來源：砂卡礑

CO I 基因條碼：

```
TACCCTATATCTTATTTTTGGGGCCTGAGCAGGGATAGTAGGAACTGCCCTT
AGCCTCCTTATCCGAGCTGAGCTGAGTCAACCCGGCTCCCTCTTGGGGCGAT
GATCAGATTTATAATGTCATTGTTACCGCCCACGCCTTCGTCATAATTTTCTT
TATGGTCATGCCCATCCTAATCGGAGGCTTCGGTAACTGACTTGTCCCCCTG
ATAATTGGGGCCCCTGACATAGCCTTCCCCCGAATGAACAACATAAGCTTTT
GATTACTCCCCCATCATTCTACTCCTCTTGGCATCCGCCGGAGTCGAAGC
AGGAGCAGGAACCGGCTGAACTGTATACCCCCCCTGGCTGGGAACCTTG
CACACGCAGGCCCATCAGTCGACTTAACCATTTTTTCCCTCCACCTTGCGG
GTGTATCATCTATCCTAGGGCGCAATTAATTTTATTACAACAACCCTAACATG
AAGCCACCATCAATGACTCAATACCAAACACCCTTATTTGTGTGATCCGTCT
TGATTACTGCTGTTTTACTCCTACTCTCCCTGCCAGTCCTCGCTGCAGGAAT
CACTATACTCCTCACTGACCGAAACCTAAACACAACATTCTTTGACCCTGCT
GGCGGAGGCGACCCCATCCTCTATCAACACCTCTTT
```



(98 年)

7. 中國樹蟾

學名：*Hyla chinensis*

來源：蓮花池

CO I 基因條碼：

```
TACTCTATACTTGGTATTTGGGGCTTGGGCTGGCATAGTAGGCACAGCCCTC
AGCCTCCTAATTCGAGCAGAATTAAGCCAGCCTGGCTCCCTTCTAGGTGAC
GATCAAATCTATAATGTCATCGTCACGGCTCACGCCTTCGTCATAATTTTCTT
TATGGTTATAACCAATCCTTATTGGGGGATTTGGAAACTGACTAGTCCCCTTAA
TAATTGGCGCACCTGATATAGCCTTCCCACGAATAACAATATAAGCTTCTG
ACTTCTTCCACCATCTTTTCTTCTTCTTAGCCTCAGCAGGTGTTGAGGCA
GGAGCAGGAACCGGATGAACTGTCTATCCACCCCTTGCCGGAAATCTAGCC
CATGCCGGCCCATCCGTAGACTTAACCATTTTTTCATTACATCTGGCAGGTG
TCTCTTCAATTTTAGGAGCTATTAATTTTATTACCACAATTCTTAACATGAAA
CCCCATCAATAACACAATACCAAACCCCGCTATTTGTTTGATCTGTTCTAAT
CACTGCTGTACTTCTACTTCTTTCTCTCCCCGTGCTAGCAGCGGGTATTACC
ATACTACTCACGGACCAGAAACCTCAACACCACATTTTTTCGACCCGGCAGGA
GGAGGGGACCCCGTACTATACCAACACTTATTC
```



(98 年)

8. 斯文豪氏赤蛙

學名：*Rana swinhoana*

來源：砂卡礑

CO I 基因條碼：

```
GACTCTATACCTAATCTTTGGCGCCTGAGCCGGGATAATCGGAACAGCCTTA  
AGCCTGCTAATTCGAGCGGAGCTCAGCCAACCAGGAACCCTGCTCGGCGA  
CGACCAAATCTATAATGTAATCGTAACCGCCACGCATTTGTAATAATCTTCT  
TTATGGTTATGCCTGTTTTGATCGGAGGCTTCGGCAACTGACTAGTCCCGTT  
AATAATCGGGGCTCCTGACATAGCCTTCCCACGAATAAATAATATAAGCTTC  
TGACTGCTTCCACCCTCCTTCTTCCTCCTATTAGCATCTTCTATGGTAGAAGC  
CGGGGCTGGCACAGGCTGAACTGTCTATCCCCCCTGGCAGGGAACCTGG  
CTCATGCCGGCCCATCCGTAGACCTAGCTATCTTCTCCCTCCACCTAGCCGG  
AATTTTCATCTATCCTCGGGGCTATTAACCTTATTACAACAATTATTAATATAAA  
GCCCCAGCCATCGCCCAATACCAAACCTCCCCTCTTTGTCTGATCCGTTTTA  
ATCACCGCCATTCTTCTACTACTTTCTCTTCCTGTTTTAGCCGCCGGAATCAC  
GATACTTCTAACTGATCGAAACCTTAATACCACCTTTTTTGACCCAGCAGGA  
GGCGGAGACCCGGTCCTGTATCAACACCTGTTC
```



(98 年)

9. 梭德氏赤蛙

學名：*Rana sauteri*

來源：台八線 133K

CO I 基因條碼：

```
TATTTGTATGATCTGTCCTAATTACTGCAGTCTTACTACTCCTTTCTCTTCCTGTCTTAG
CTGCAGGAATTACTATACTATTAACAGACCGAAATTTAAATACCTCTTTTTTTGACCCGG
CGGGAGGAGGAGACCCAATCCTTTATCAGCACTTATTCTGGTTTTTTGGTCACCCCGAGG
TATATATTCTTATTTTACCAGGCTTCGGCATAATTCACATATTGTAACTTATTATGCTG
GTAAAAGGAACCATTTCGGCTACATGGGTATAGTTTGAGCTATAATATCAATTGGGTTTT
TAGGGTTTATTGTCTGAGCTCATCATATGTTTACTGTCCGCATAGACGTCGACACTCGAG
CCTACTTTACCTCAGCTACTATAATTATTGCCATCCCAACAGGAGTTAAAGTCTTTAGTT
GACTTGCAACGCTTCACGGCGGAACAATAATGGGACGCTGCTATACTTTGAGCTCTTG
GTTTTATTTTTTTTATTTACAGTGGGGGGCCTAACAGGCATTATTTTAGCTAATTCTTCAC
TTGATATTGTCCTTCATGACACATACTACGTAGTTGCACACTTTCACTATGTATTATCAA
T
```



(98 年)

10. 日本樹蛙

學名：*Buergeria japonica*

來源：砂卡礑

CO I 基因條碼：

```
TACCTTATACTTAATTTTTGGTGCGTGGGCAGGTATAATTGGAAGTGCCTTA
GCCTTTTAATTCGAGCTGAATTAGCTCAACCTGGATCACTGCTCGGTGACG
ACCAAATTTATAATGTAATTGTTACCGCCACGCTTTTGTATAATTTTCTTTA
TAGTTATACCAATTTTAATTGGTGGATTCGGGAAGTACTTATTCCTCTAATA
ATTGGTGCCCCAGACATGGCCTTCCCTCGAATAAATAATATAAGCTTCTGAC
TTCTTCCACCCTCATTCTTCTTTTACTAGCCTCTTCTACTGTAGAAGCGGGT
GTAGGAACCGGTTGAACAGTTTACCCCCATTAGCAGGTAATCTTGCTCAT
GCAGGCCCATCAGTAGACTTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGTGTATC
ATCAATTTTAGGGGCCATCAACTTTATTACTACAATTTTAAATATAAAAACCGT
CATCAACTACACAATATCAAACCCCCCTGTTTGTGGATCTGTTCTAATTACC
GCTGTTCTTCTTCTTCTATCTCTTCCTGTTTTAGCTGCAGGAATTACCATACT
TTAACAGACCGTAATTTAAATACTACATTCTTTGACCCTGCTGGAGGAGGA
GATCCAGTTCTTTACCAACACCTTTTT
```



(98年)

11. 褐樹蛙

學名：*Buergeria robusta*

來源：砂卡礑

CO I 基因條碼：

```
CACCTTATATTTAATTTTTGGCGCATGGGCCGGAATAATCGGCACCGCACTT
AGTCTTCTAATTCGGGCTGAACTCGCTCAGCCCGGGTCCCTCCTGGGAGAC
ACCAAATTTATAATGTAATTGTCACCTGCCATGCCTTTGTTATAATTTCTTTA
TGGTCATGCCTATCCTAATCGGCGGTTTCGGAAACTGATTGGTCCCCCTAAT
AATCGGGGCTCCTGATATAGCCTTTCCCGCATAAACAACATAAGTTTCTGA
CTACTACCTCCCTCATTCTTCTACTACTAGCTTCCCTCTACAGTTGAAGCAG
GAGCTGGCACAGGGTGAAGTGTTCACCCCCCTAGCAGGAAATCTTGCTC
ACGCCGGACCCTCTGTAGACTTAGCTATTTTTCCCTTCACCTTGCAGGGAT
CTCCTCGATTCTAGGGGCTATCAACTTCATTACAACCTATTCTGAACATAAAG
CCTGCCTCAACGACACAATACCAAACACCCCTCTTTGTGTGATCTGTGCTA
ATTACAGCAGTATTACTACTTCTGTCCCTTCCAGTCTTAGCTGCGGGGATTA
CAATGCTTCTCACAGACCGCAACTTAAACACCACCTTTTTTGACCCAGCAG
GCGGAGGTGACCCAGTATTATACCAACACCTATTT
```



(98 年)

12. 青蛇

學名：*Cyclophiops major*

來源：砂卡礑

CO I 基因條碼：

```
AACCCTATACCTACTATTTCGGCGCATGATCTGGCCTAATTGGGGCCTGCCTA
AGCATTCTTATACGAATAGAATAACCCAACCAGGGTCGCTACTAGGCAGC
GACCAAATCTTTAATGTTCTAGTAACAGCCCATGCTTTCATCATAATTTTCTT
TATAGTAATACCCATTATAATCGGGGGCTTTGGAAACTGACTAATCCCCTTAA
TAATCGGAGCACCGGACATAGCCTTCCCCCGCATAAATAATATGAGTTTTTG
ACTACTTCCACCAGCACTACTCCTCCTTCTATCTTCATCTTATGTAGAAGCCG
GTGCCGGTACAGGATGAACAGTATACCCCCCCTATCAGGAAATCTAGTAC
ACTCAGGCCCATCAGTAGACCTAGCAATCTTCTCCCTACACCTAGCAGGCG
CCTCCTCCATCCTGGGAGCAATTAACTTCATTACAACATGTATCAACATAAA
ACCTAAAGCTATACCAATATTCAATATCCCCTACTATTCGTTTGATCAGTACTTA
TCACTGCCATTATACTACTACTGGCCTTGCCAGTACTAGCAGCGGCAATCAC
CATACTACTAACAGATCGAAACCTCAACACTTCTTTCTTTGACCCCTGCGGA
GGAGGGGACCCTGTACTGTTCCAACACCTGTTC
```



(98 年)

13. 雪山草蜥

學名：*Cyclophiops major*

來源：砂卡礑

CO I 基因條碼：

```
TATTTGTATGATCTGTCCTAATTACTGCAGTCTTACTACTCCTTTCTCTTCCTGTCTTAG  
CTGCAGGAATTACTATACTATTAACAGACCGAAATTTAAATACCTCTTTTTTTGACCCGG  
CGGGAGGAGGAGACCCAATCCTTTATCAGCACTTATTCTGGTTTTTTGGTCACCCCGAGG  
TATATATTCTTATTTTACCAGGCTTCGGCATAATTCACATATTGTAACCTATTATGCTG  
GTAAAAGGAACCATTTCGGCTACATGGGTATAGTTTGAGCTATAATATCAATTGGGTTTT  
TAGGGTTTTATTGTCTGAGCTCATCATATGTTTACTGTCCGCATAGACGTCGACACTCGAG  
CCTACTTTACCTCAGCTACTATAATTATTGCCATCCCAACAGGAGTTAAAGTCTTTAGTT  
GACTTGCAACGCTTCACGGCGGAACAATAAATGGGACGCTGCTATACTTTGAGCTCTTG  
GTTTTATTTTTTTTATTTACAGTGGGGGGCCTAACAGGCATTATTTTAGCTAATTCCTCAC  
TTGATATTGTCCTTCATGACACATACTACGTAGTTGCACACTTTCACTATGTATTATCAA  
T
```



(98 年)

14. 呂氏攀蜥

學名：*Japalura luei*

來源：和平林道

CO I 基因條碼：

```
CACCATGTA CTTCCCTATTTCGGGACTGCAGCTGGCCTCACTGGGTCACTGGTT  
AGCCTTCTTGTC CGTACACA ACTAATTCAGCCTGGACAAACCATCGGAGGG  
GACTCCCTGTACAATGTC TTTATCACATTCATGCCCTCGTTATAATTTCTTT  
ATAGTCATACCAATCATGATCGGGCGGATTCGAAACTGGCTGATTCCACTTA  
TACTCGGAGCCCCAGACATAGCATTCCCGGAATAAACAACATAAGCTTCT  
GACTTCTACCGCCATCATTCTTCTTTTACTTTTATCCTCTGGGTTTCGAAGCC  
GGGGTCGGCACCGGATGAACTATTTATCCGCCACTATCAAACAACACTGCC  
CACTGCGGGCCGTCCATAGATCTGGCCATCTTTTCTCTACACTTAGCAGGTG  
CCTCCTCAATTATGGCCGCCATCAACTTTATTACTACTTGTATTAACATAAGC  
CCAAATCTCACCTCACCATACAACTGGCCTTTATTTGTCTGATCCGIGTTCT  
TCACCGCCATCCTTCTGCTACTGTCACCTTCTGTGTTAGCTGCAGCAATCAC  
CATGCTTCTTACAGACCGAAATCTCAACACATCATTCTTGAGCCCTCAGGG  
GGCGGAGACCCCGTCCTATTTCAACACCTGTTC
```



(98 年)

第三節 兩棲類基因多樣性分析

3.1 節 楚南氏山椒魚(*Hynobius sonani*)

本研究在太魯閣國家公園區僅零星紀錄到少數之楚南氏山椒魚，分布於合歡山區之合歡溪上游，奇萊山區及 820 林道附近。以粒線體中的 16S 基因片段分析結果，合歡溪上游及 820 林道(圖 3-3)的楚南氏山椒魚序列完全一致，顯示這兩個地點的楚南氏山椒魚是屬於同一個系群(圖 3-4)。



圖 3-3 合歡溪上游及 820 林道樣點相對位置圖。

HM:合歡溪上游樣點； 820:820 林道樣點。

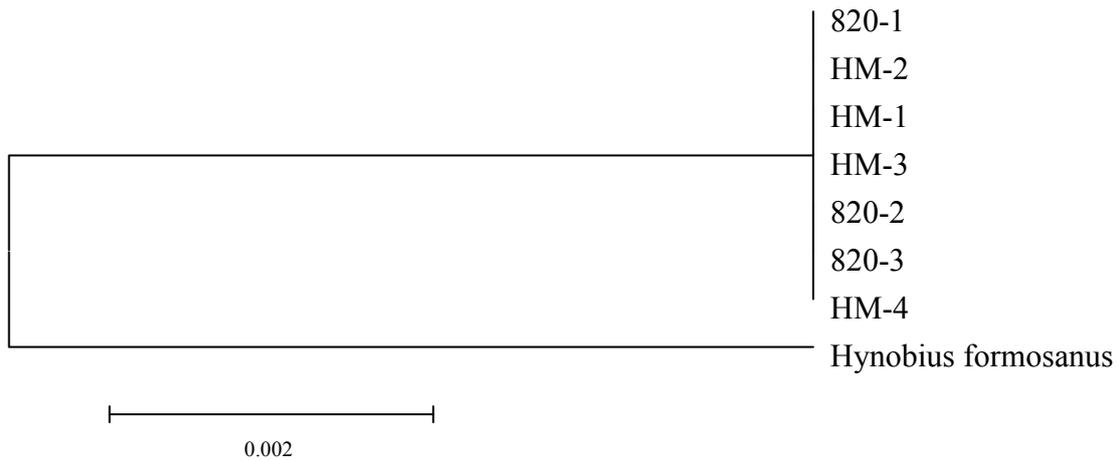


圖 3-4 以鄰聚法分析楚南氏山椒魚粒腺體 DNA 16S 序列之親緣關係樹狀圖。

HM:合歡溪上游樣本； 820:820 林道樣本；*Hynobius formosanus*: 台灣山椒魚,NCBI 資料庫 DQ333816。

3.2 節 中國樹蟾(*Hyla chinensis*)

根據林曜松(1991)和楊懿如(2006)之調查報告，中國樹蟾在太魯閣國家公園區之分布，呈現跳躍式分布(分布於 0 公尺的砂卡礑步道及 1,000 公尺之蓮花池等二個地區)，因而推論砂卡礑步道及蓮花池兩地的中國樹蟾，應是早期農業開墾等人為活動所帶入。在本研究中，目前僅在蓮花池採集到，但尚未在砂卡礑步道發現中國樹蟾。為分析探討中國樹蟾之基因多樣性及其可能之來源，本研究另於花蓮縣瑞穗採集到另一族群之 DNA 樣本，經分析此二族群粒線體 12S 及 16S 之 DNA 序列，結果發現在 16S 部分，NCBI 已發表 AF315161 (Jiang and Zhou 2000, China)、蓮花池與花蓮縣瑞穗完全一致 (圖 3-5)，而在 12S 部分，蓮花池與 NCBI 已發表 AF315129 (Jiang and

Zhou 2000, China)作比較，發現兩者相同，而蓮花池與瑞穗則出現一個明顯的點突變（圖 3-6），這可將蓮花池與瑞穗之族群區分開（圖 3-7）。

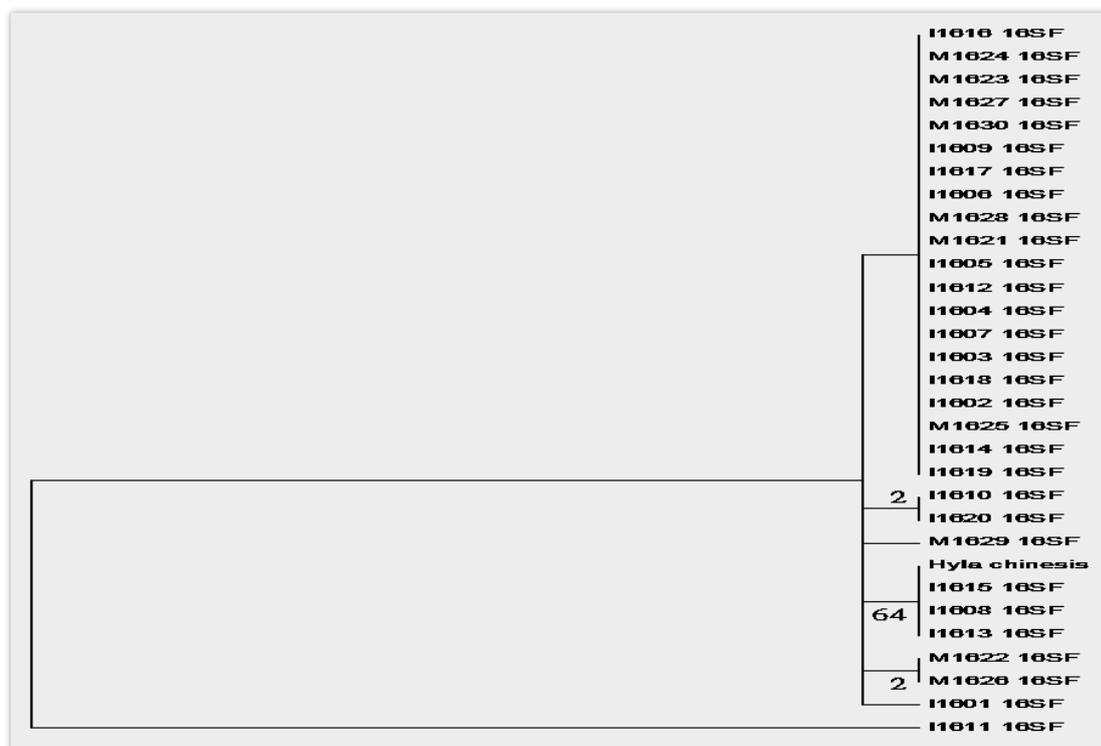


圖 3-5 以鄰聚法 (NJ) 分析分析中國樹蟾粒腺體 DNA 16S 序列之親緣關係樹狀圖。M: 蓮花池樣本；I: 花蓮縣瑞穗樣本。

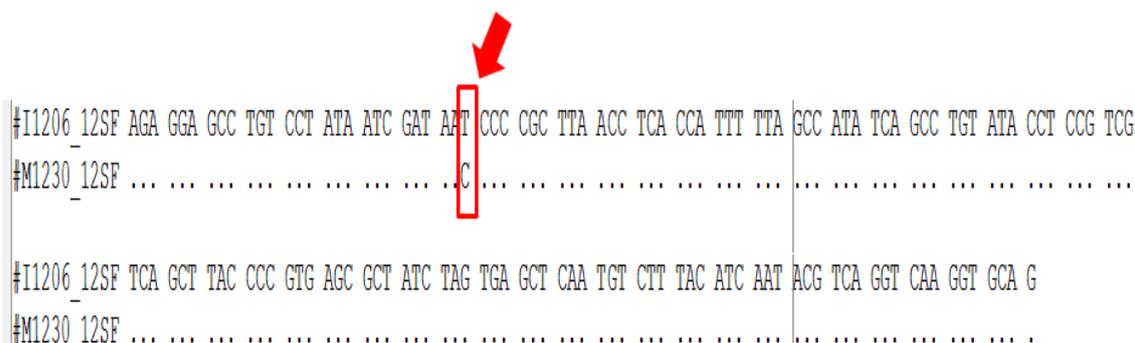


圖 3-6 中國樹蟾蓮花池與瑞穗兩族群點突變位置。箭頭所指處為兩族群核苷酸相異之位點，亦稱為單核苷酸多態性 (Single-nucleotide polymorphism, SNP)。

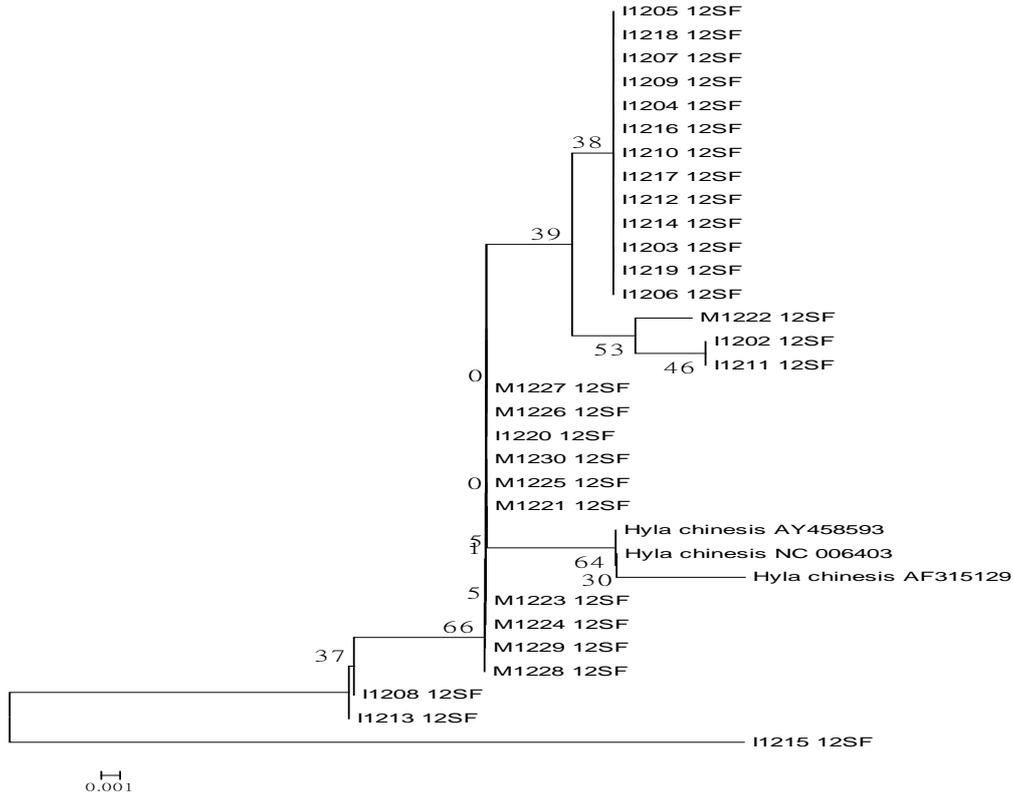


圖 3-7 以鄰聚法 (NJ) 分析分析中國樹蟾粒腺體 DNA 12S 序列之親緣關係樹狀圖。M: 蓮花池樣本；I: 花蓮縣瑞穗樣本。

3.3 節 梭德氏赤蛙(*Rana sauteri*)

本研究在太魯閣國家公園內不同海拔採集到之梭德氏赤蛙在太魯閣國家公園區之分布 (表3-2)，本研究於園區內共採集到130隻樣本，已完成粒線體12S與16S基因選殖定序部分，結果顯示園區內之梭德氏赤蛙共有10種基因單型 (haplotype)，以鄰聚法(Saitou and Nei, 1987)建構親緣關係， K2P (Kimura, 1980)為分子取代模式，並利用bootstrap法(Felsenstein, 1985)重複1,000次運算求親緣關係之可信度，計算皆是用軟體MEGA4.02執行，其親緣關係如圖 3-8(12S)、圖 3-9(16S)。

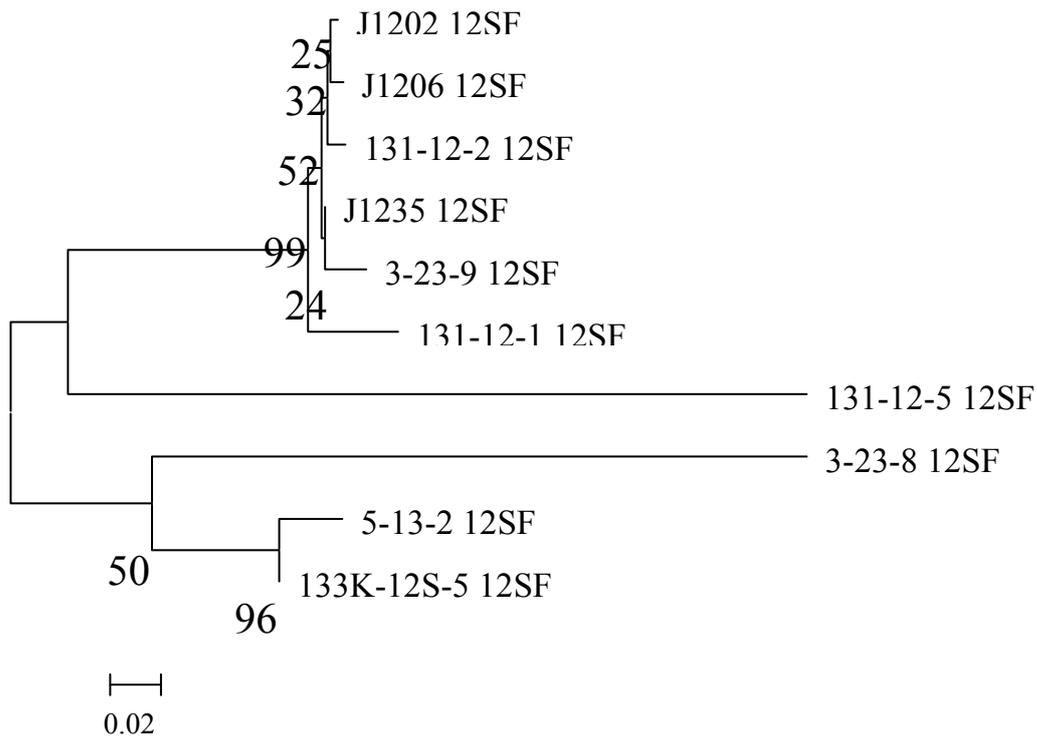


圖 3-8 以鄰聚法分析分析梭德氏赤蛙粒線體DNA 12S序列之親緣關係樹狀圖。

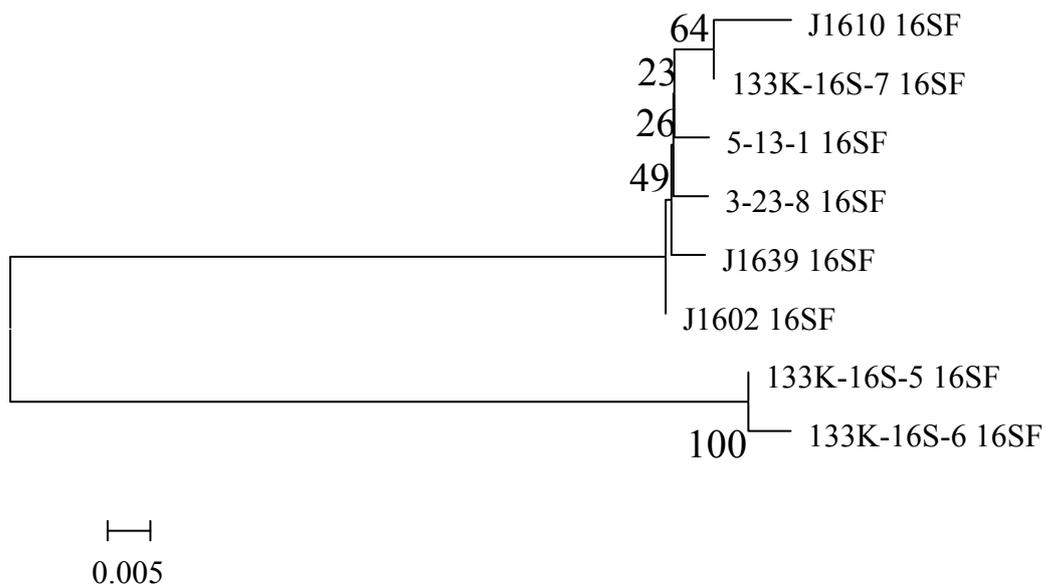


圖 3-9 以鄰聚法分析分析梭德氏赤蛙粒線體DNA 16S序列之親緣關係樹狀圖。

2009年本實驗室在執行太管處委託研究案中即發現，調查樣區內之梭德氏赤蛙可分為兩基因型，一種為廣泛分佈型(Cluster I)，與NCBI上擷取碼(accession number) DQ359976 (高雄)之基因序列只有一個核苷酸的差異。另一基因型的梭德氏赤蛙可能在調查樣區內為侷限性分佈(Cluster II)，其12S之序列與廣泛分佈型之間約有15%的差異。今年本計劃執行結果中，在砂卡礑亦發現一隻基因序列與侷限性分佈(Cluster II)相同之樣本。張廖年鴻(2007)提出梭德氏赤蛙族群為多系群組成，共分為5個支系及亞系群，而在擴散遷徙的過程中，東部是最早出現亞系群的地區，目前研究所得之侷限性分佈型或有可能為東部地區特有之亞型，此有待進一步證明。Lai *et al.* (2003) 所提出不同海拔的梭德氏赤蛙各有其不同生殖策略的結論，認為不同的環境溫度對於梭德氏赤蛙是有效的天擇作用力，經過長時間的淘汰及生殖隔離後系群間的遺傳變異逐漸產生，由此理論而言，在不同海拔進行下採集，所得到不同基因型之梭德氏赤蛙，極可能是來自於隨海拔環境溫度變化所導致的演化結果，此有待更進一步之證明。

3.4 節 盤古蟾蜍(*Bufo bankorensis*)

盤古蟾蜍在太魯閣國家公園區之分布，根據呂光洋(1983，1989)、林曜松(1991，2005)、楊懿如(2005)及翁慶豐(2009)等研究報告，從平地的太魯閣閣口到高海拔各高度分布最為廣泛的兩棲類(表 3-1)；故生態系經營指標物種之研究與探討兩棲類分布與海拔高度之關連性，盤古蟾蜍是相當適合之標的物種。

本研究採集樣點及完成之分析：

本研究針對盤古蟾蜍之分布特性，由低海拔至高海拔分別依高度，在太魯閣國家公園及海岸山脈選定共計 14 個樣點，目前共採獲 413 隻盤古蟾蜍樣本(表 3-2)。由於粒線體中之控制區演化速率較一般核染色體快、且不涉及功能性基因表達的關係，本實驗室參考其近緣種—中華大蟾蜍(*Bufo gargarizans*)之粒線體 DNA 序列(圖 1-1)，在盤古蟾蜍控制區後半段設計出一對引子，此對引子可擴增 D-loop 後半段的序列約 613 bp，定序得到之結果再以人工校正並去除引子之部分，修正後其長度為 563 bp。

從盤古蟾蜍 D-loop 序列中定序完成之樣本，可分出 23 個基因單型(haplotype)。使用 MEGA4.02 進行鄰聚法、bootstrap1000 次建構出親緣關係樹(圖 3-10)，另再以最大簡約法(maximum parsimony methods，簡稱 MP)、同樣進行 bootstrap1000 次建構出基

因單型之親緣關係樹 (圖 3-11)，兩種演算法所得之樹型大致相同。

從圖 3-6、3-7 的結果可知，在太魯閣地區的盤古蟾蜍可清楚的分為兩個系群，而進一步比對採樣資料，則發現其中一支系群廣泛地分布在各海拔間且無界限，暫時歸類為 AA 群；相較之下、另一支系群則只出現於大約 2000 公尺以下之山區，暫時歸類為 AL 群。

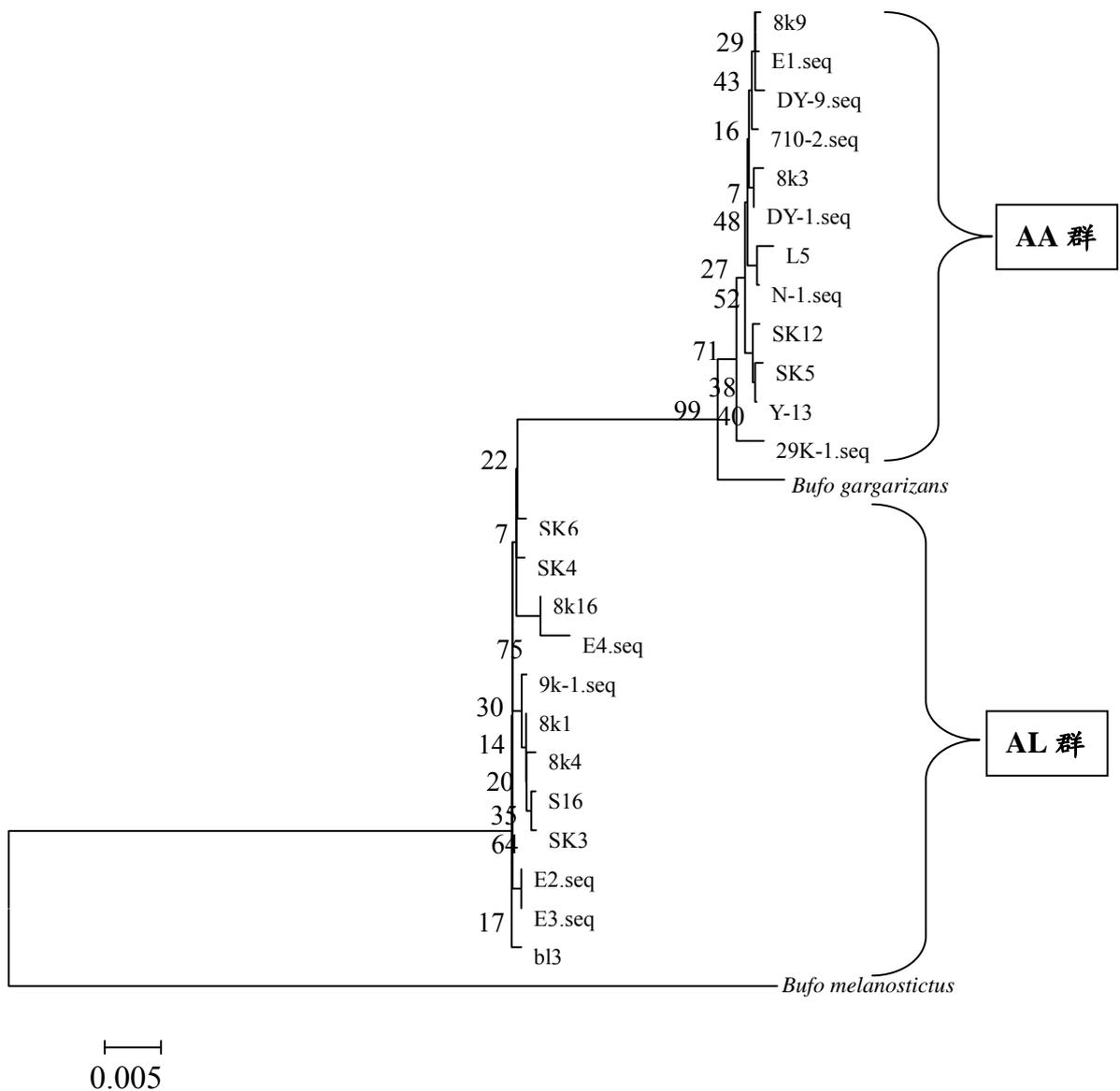


圖 3-10 以鄰聚法(NJ) 建構盤古蟾蜍 D-loop 基因單型 (haplotype) 之的親緣

關係樹。*Bufo gargarizans*：中華大蟾蜍，*Bufo melanostictus*：黑眶蟾蜍。

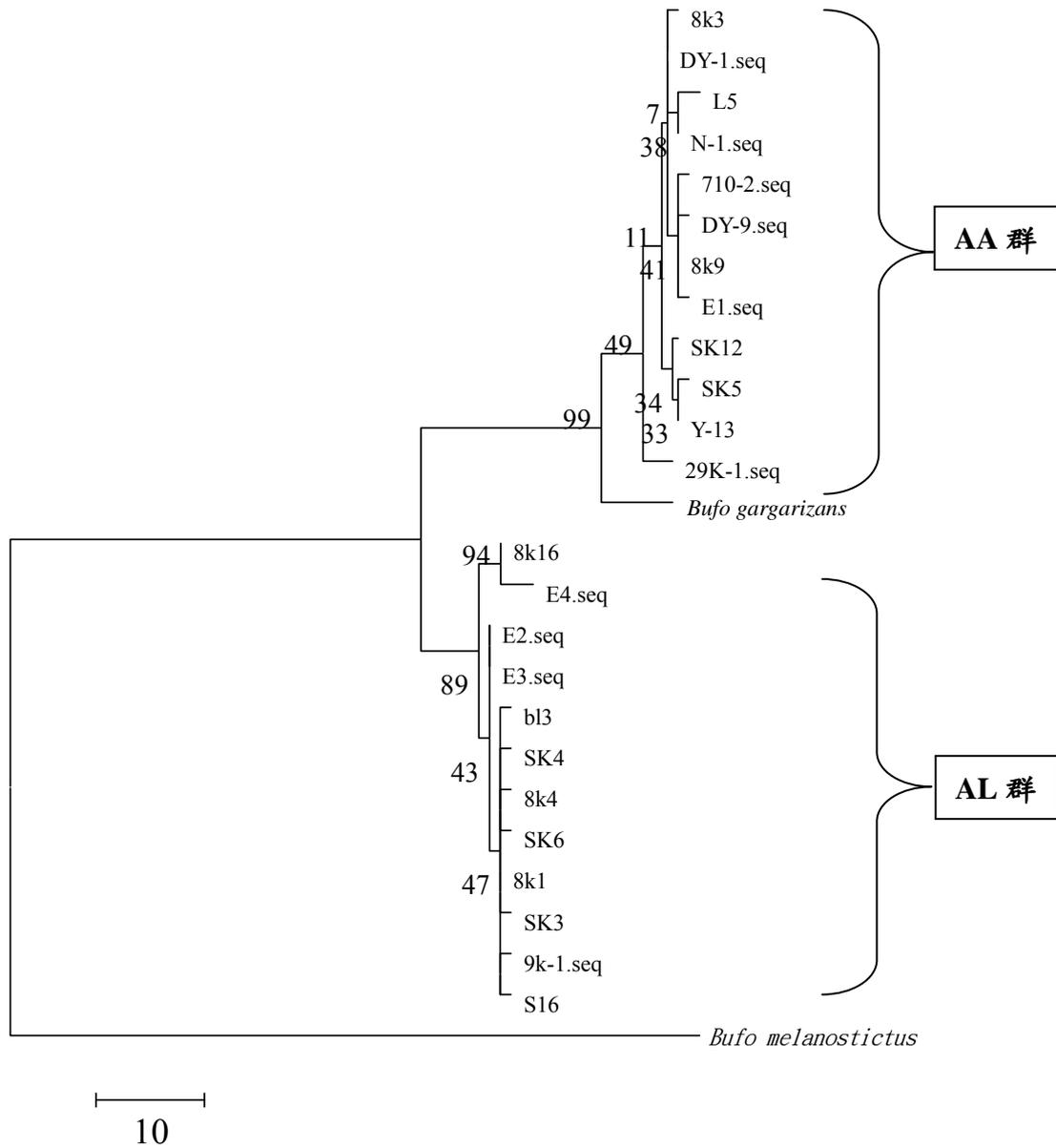


圖 3-11 以最大簡約法(MP) 建構盤古蟾蜍 D-loop 基因單型 (haplotype) 之的親緣關係樹。 *Bufo gargarizans*：中華大蟾蜍，*Bufo melanostictus*：黑眶蟾蜍。

為進一步証實高低海拔盤古蟾蜍以 D-loop 分群之結果，再進一步利用同樣是位於粒線體 DNA 上 12S 及 16S 基因作分析，得到的結果(圖 3-12、圖 3-13)與 D-loop 分群之結果一致，顯示在太魯閣國

家公園內之盤古蟾蜍的確存在著兩支系群，其分布範圍重疊，但 AL 群(低海拔)主要分布於約 2000 公尺高度以下之地區。

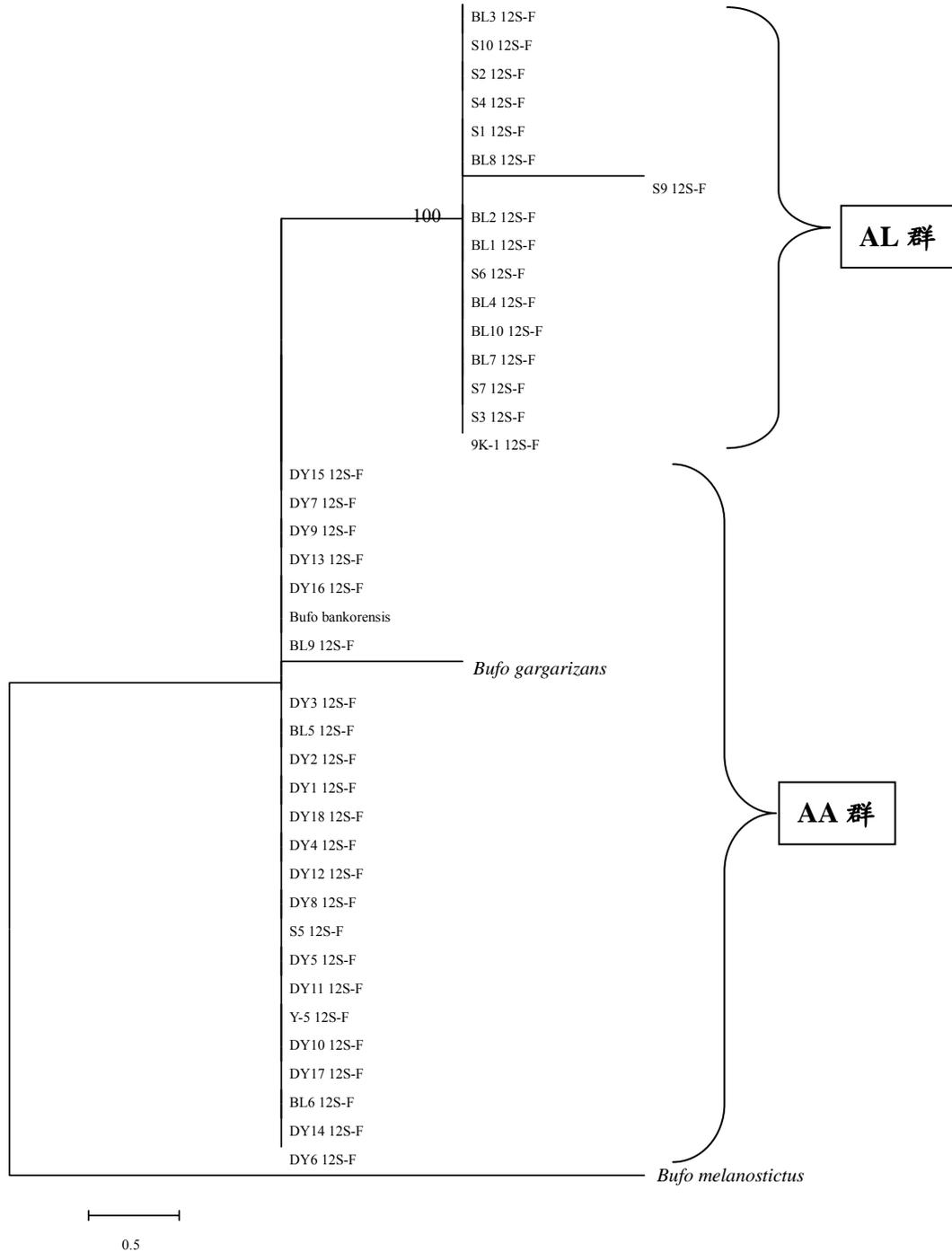


圖 3-12 以鄰聚法(NJ) 建構高低海拔盤古蟾蜍 12S 親緣關係樹狀圖。

Bufo gargarizans：中華大蟾蜍，*Bufo melanostictus*：黑眶蟾蜍。

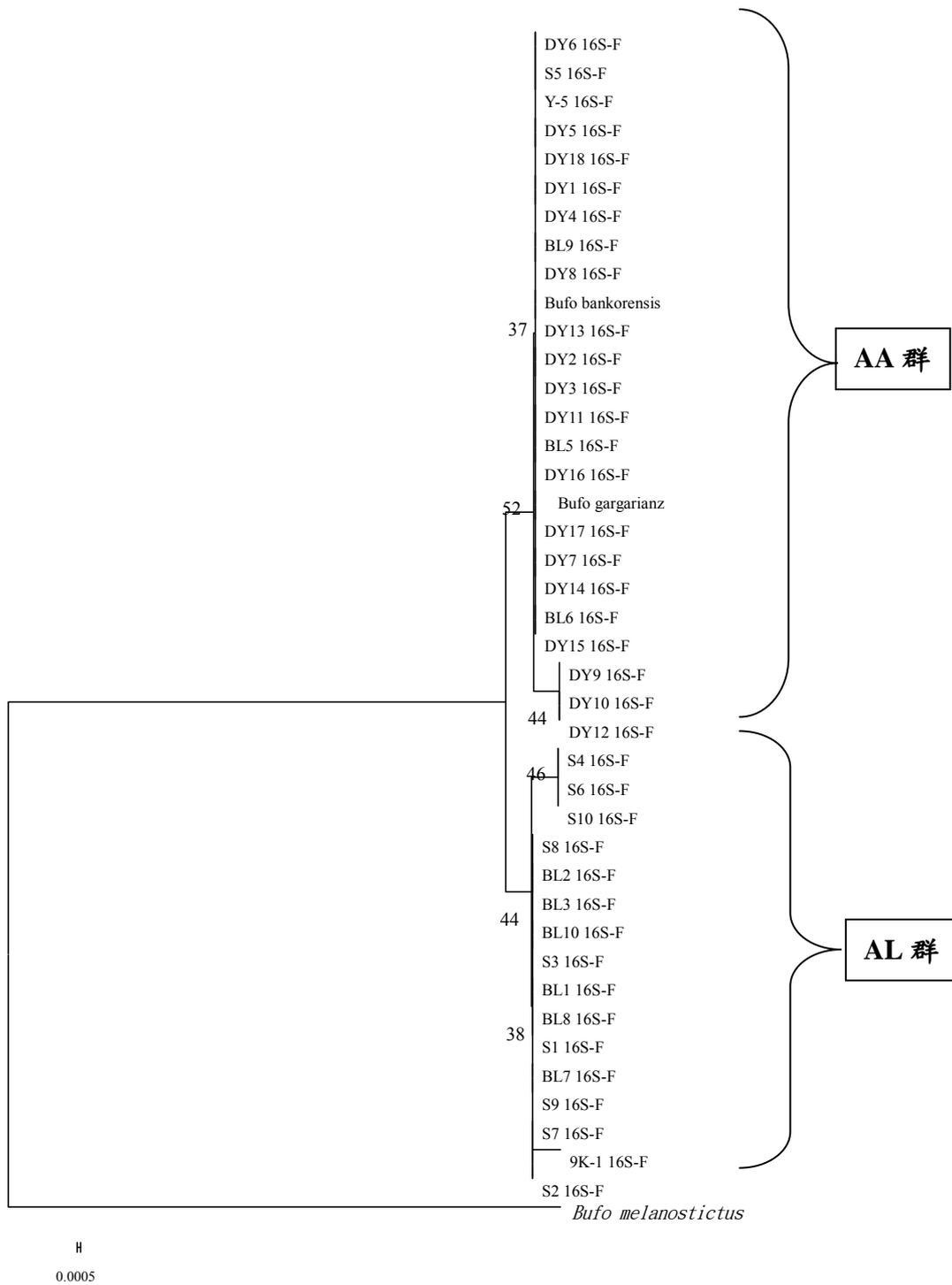


圖 3-13 以鄰聚法(NJ) 建構高低海拔盤古蟾蜍 16S 親緣關係樹狀圖。*Bufo gargarizans*：中華大蟾蜍，*Bufo melanostictus*：黑眶蟾蜍。*Bufo bankorensis*：盤古蟾蜍。

利用分析粒線體基因差異，將盤古蟾蜍分為廣海拔分布之 AA 群及低海拔分布之 AL 群，再進一步計算這兩種系群在各樣點所佔有之比例，結果如圖 3-14。從圖中可以發現，在低於海拔 1000 公尺以的環境中，AL 群具有數量上的優勢，比例接近 80%，而隨著海拔上升，AL 群比例逐漸下降，在超過 2000 公尺以上高山地區，即轉成幾乎全部都是 AA 群。

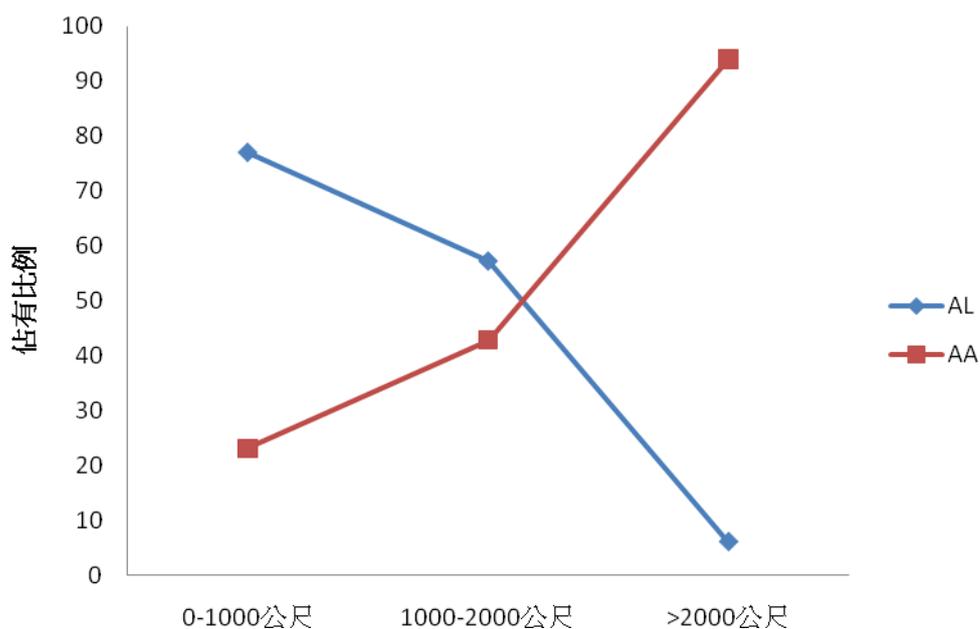


圖 3-14 盤古蟾蜍 AA 群及 AL 群在各海拔分布比例變化。

第四章 結論與建議

目前本計劃針對太魯閣國家公園內合歡溪上游及820林道採集之楚南氏山椒魚，以粒線體中的16S基因片段分析，發現其序列完全一致，顯示這兩個地點的楚南氏山椒魚是屬於同一個系群，其基因沒有分化的現象。

中國樹蟾過去曾有報告提及其分布於蓮花池和砂卡礑，在本研究中，目前僅在蓮花池採集到，尚未在砂卡礑步道發現。為分析探討中國樹蟾之基因多樣性及其可能之來源，另於花蓮縣瑞穗採集樣本，經分析此二族群粒線體12S及16S之DNA序列，結果發現在16S部分，NCBI已發表AF315161 (Jiang and Zhou 2000, China)、蓮花池與花蓮縣瑞穗之DNA序列完全一致，而在12S部分，蓮花池與NCBI已發表AF315129 (Jiang and Zhou 2000, China)作比較，發現兩者相同，而蓮花池與瑞穗則出現一個明顯的點突變，依此可將蓮花池與瑞穗之族群加以區分。

比較分析過去文獻報告之資料與本年度計劃研究所得結果，發現對於太魯閣國家公園內之兩棲類而言，2000公尺是一具有重要生態意義之分布海拔高度線。從數量分布的研究資料的比對（表3-1、3-2），此一海拔高度是山椒魚這種已適應寒冷環境的兩棲類之分布下限，或斯文豪氏赤蛙等的分布上限；若從DNA變化的微觀角度，利用分子

生物學技術進行分析發現，在資料上分布可跨過此一海拔的盤古蟾蜍，依其親緣關係之分析結果（圖3-7、3-8），族群內其實已經可依2000公尺高度線分出兩個類群，此現象可能是來自於隨海拔環境溫度變化所導致的演化結果。而另從梭德氏赤蛙親緣關係之分析結果（圖3-3、3-4），對於梭德氏赤蛙而言，在不同海拔、不同的環境溫度，經過長時間的淘汰及生殖隔離後，其系群間亦逐漸產生遺傳變異，因而亦可在不同海拔下採集到不同基因型之梭德氏赤蛙。

近年最為熱門之環境保護議題，當屬全球暖化與氣候變遷。由於兩棲類對環境條件變化十分敏感，其中分布可跨越此一海拔高度的盤古蟾蜍，將可作為兩棲類探討生態系之綜合指標生物，瞭解生態環境受人為氣候因子影響大小。

本研究所建立之實驗平台，目前已對太魯閣國家公園園區內之兩棲爬蟲類共15種，包括如楚南氏山椒魚，呂氏攀蜥及中國樹蟾等，完成可做為基因條碼序列之CO I 基因部份序列解碼，並將各別基因條碼CO I 序列陸續上傳至NCBI Barcodes database，未來可繼續運用於其他物種之調查，建立更為完整之資料庫供作為太魯閣國家公園導覽資料，與世界生態、生物相關資料分享。

立即可行之建議

1. 珍稀物種DNA barcode資料之建立與上傳到國際基因條碼資料庫 (The Barcode of Life Data Systems, BOLD)，藉此基因條碼CO I 序列公開，以昭告世界太魯閣國家公園亦從事基因多樣性建立及研究，並提昇太魯閣國家公園在國際間的知名度。
2. 太魯閣國家公園敏感性生物如兩棲類之族群分布及生態分析，進一步作為環境生態多樣性監測之用。
3. 特殊物種如中國樹蟾單點分布，可作為特殊區域如蓮花池之環境監測指標。
4. 利用族群分布之特性，以盤古蟾蜍作為指標物種，監測全球氣候變遷對太魯閣國家公園生態之環境影響。
5. 並結合其它研究案，以盤古蟾蜍作為環境汙染指標物種，探討環境汙染源生物累積監控。
6. 將建立太魯閣園區珍稀物種資料庫包括基因條碼CO I 序列資料，以供訪客知性之旅，相關基因多樣性與生態多樣性研究及深度解說導覽之用。

中長期性建議

1. 針對不同海拔高度設立監測樣區，長期監測氣候變遷壓力下對兩棲類族群的影響。
2. 將盤古蟾蜍列入長期監測及研究的重要物種，以使在有限的資源下，能更有效的長期監測環境變化，對原有自然生態造成之改變，作為維持、保育園區內的生物棲地與生物多樣性之保育政策擬定之參考。

附錄一、微衛星 DNA 分析

1. 盤古蟾蜍微衛星 DNA 篩選及引子開發：

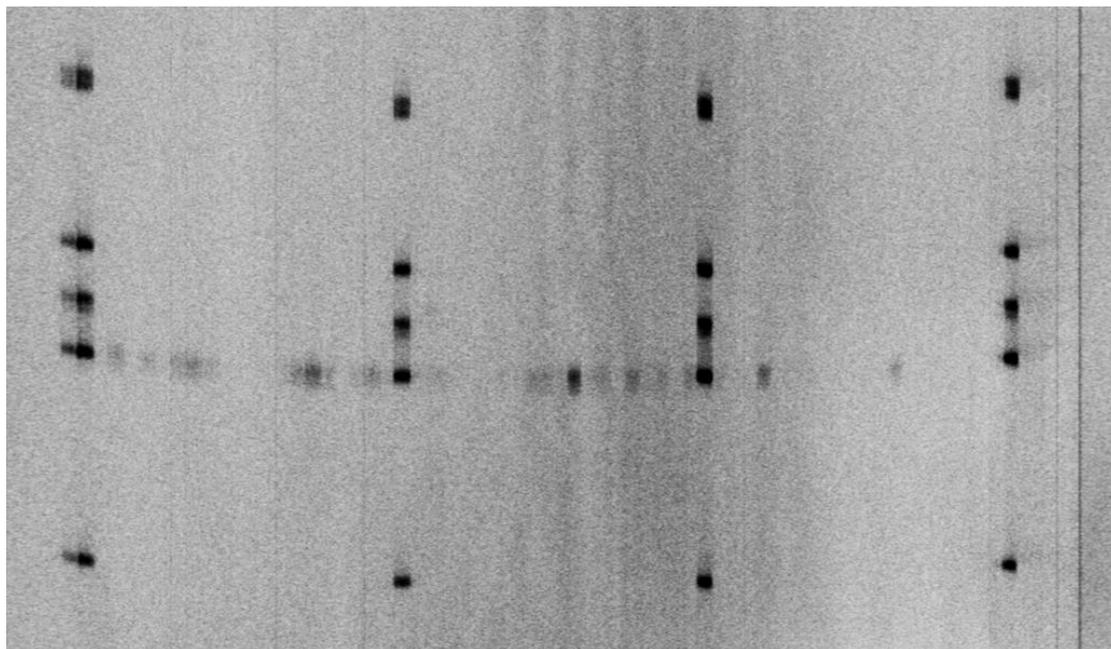
本研究定序所得之 *bankorensis* mi-1 序列：

GAATTCTCTGGAATCAGTGTCAATTCTGTAGCCAGCAGTGTGGTAAGTCAGAAAACAGTGTG
 GTGTGTGGCAGTTTCCAATGAACTGGGCCT(G/A)ATCGGTGGAGCCCTGTTACCAATACT
 GTATGTTTCAACAGAAAACCTGGGCCTATATCACAGATTTCAAAGCTCTGGGCATCCTGTAG
 GGTCCATAATCGGTGGTATTCTGTAGTTTACAGTGTAAATACATGGGAAAACCATGTCTGTGA
 GGGCAGATTCCAGCAATCTGGGCCCAAGAGAGTGTCTAGAATCTGTTGTGTTCTGTATACA
 ATGCTGAAACTACATCAGTAAGCATTGTATCGCAGATCCCAGCGC(T/C)CTGGACCCTCT
 GAATTC

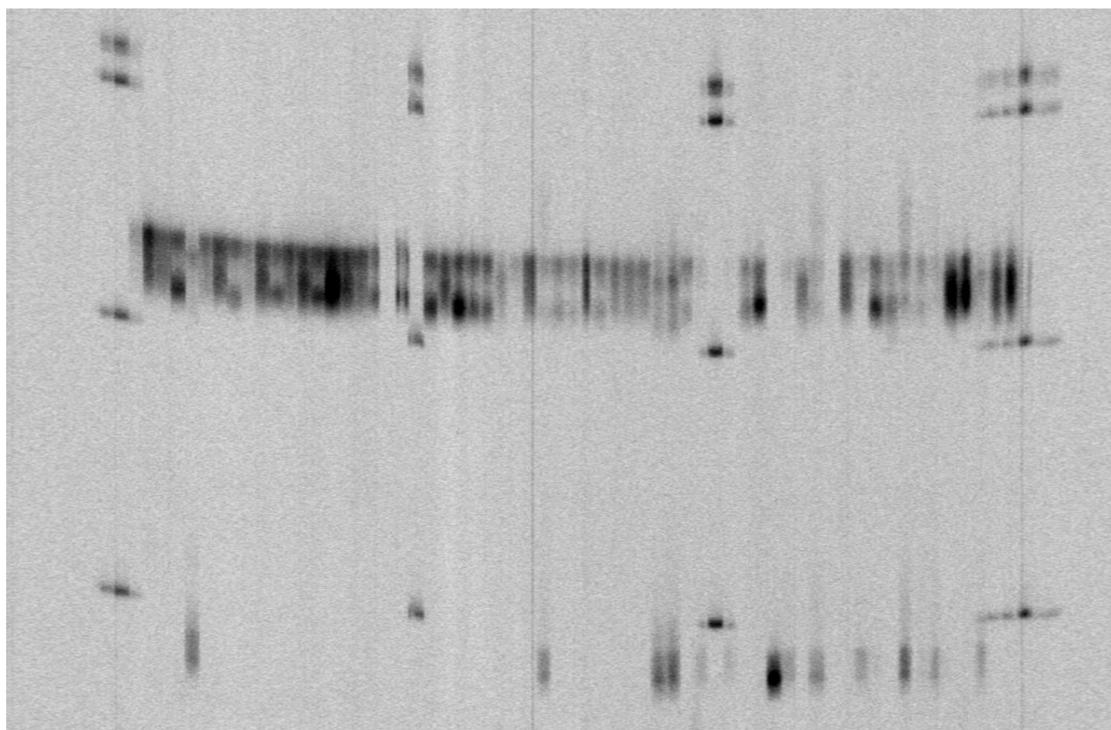
,

Brede (2001) 所發表之中華大蟾蜍 microsatellite primer:

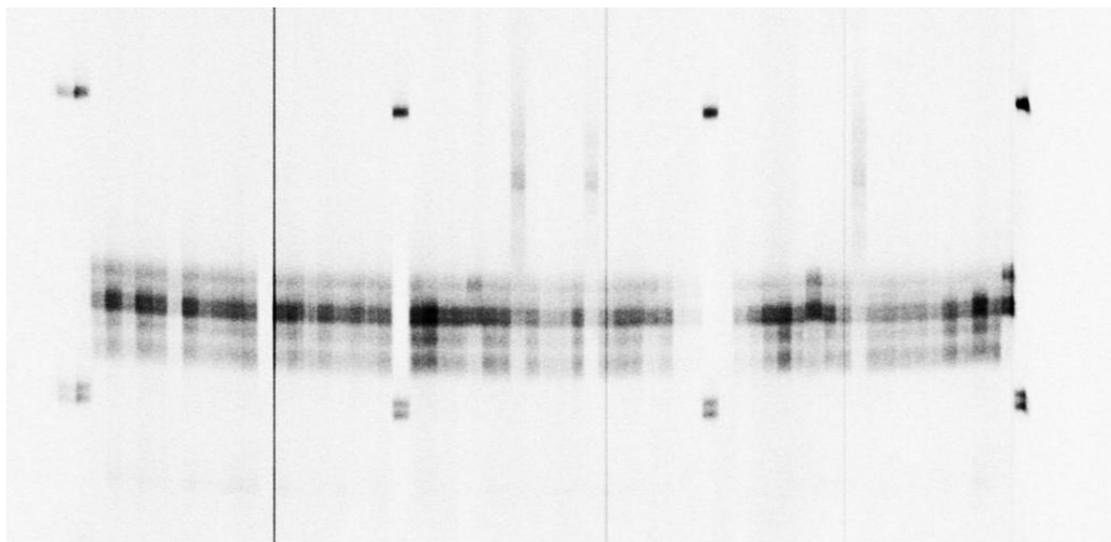
<i>Bbuf</i> _μ 13	F	AGCCTACATTGCTCAATCCGATAC
	R	GTGGCGTGGAGGGTCATAAAATC
<i>Bbuf</i> _μ 23	F	ATCGCGGTGGCTGATGG
	R	TGTGTATAATTTTGCCCGTTTAGG
<i>Bbuf</i> _μ 15	F	TCAATATAGGAGTCCCAGAATGTC
	R	AATCCCCTAGCGTACACAAGATAC
<i>Bbuf</i> _μ 16	F	GGATCTAAATGAGCATGTCTATTT
	R	GTGAACAAAATTTGAGAGTAATGG
<i>Bbuf</i> _μ 49	F	GATCTGGGCAGTGTGGATTG
	R	ATTCCGTCTGCTAAATGTCTCTTG
<i>Bbuf</i> _μ 54	F	CATTGCGCTGCTGTCAGATTACAC
	R	TTAGGGATTGCCGTCCAGTTGTC
<i>Bbuf</i> _μ 65	F	GGATCTAAGCGCTGTGAGAGTGA
	R	CGGTCCGTGTTACCACTGATGC
<i>Bbuf</i> _μ 11	F	GTCACATGGATAATAAATGAGACC
	R	TCTAATATTGATGACCAGACAACC
<i>Bbuf</i> _μ 14	F	CGTGCATGCAAGTGTACCTAACC
	R	ATGGAGAGTGAAGGGGAAAGAGTG
<i>Bbuf</i> _μ 24	F	TTTGGAGAGGGGAAAACCTCACAC
	R	CGGATTCTGTTGGGGGTGCTC



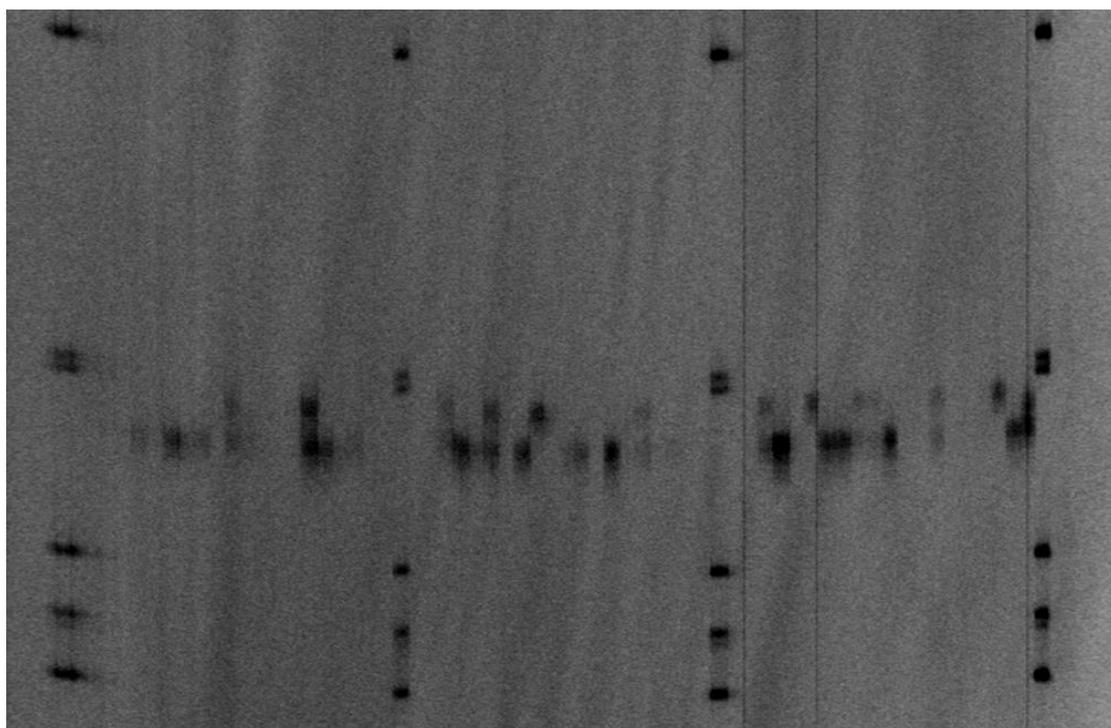
圖一、Bbufu 11 多型性電泳分析圖



圖二、Bbufu14 多型性電泳分析圖



圖三、Bbufu 24 多型性電泳分析圖



圖四、Bbufu 23 多型性電泳分析圖

附錄二、專有名詞

聚合酵素連鎖反應(Polymerase chain reaction): 是一種體外快速擴增特定基因或DNA序列的方法。它可以非常省時地從少量的DNA 複製出特定的DNA 片段。PCR 主要分成三個主要步驟：變性、黏合、延展。首先利用高溫(95°C)先將DNA 變性(denature)成單股DNA，再以所要複製基因片段其兩端所設計出的引子對(primers)與單股DNA 進行黏合(annealing)，經由DNA 聚合合成另一股互補DNA。經由多次循環，特定DNA 可以 2^n 的幾何倍數複製，而達到特定基因放大的效果。

基因多樣性: 同一種的生物生活在不同的區域，常因為地理上或是生態上的區隔造成許多不同的族群，族群之間的基因遺傳因為交流的機會降低而具有一定程度的差異，即使在同一族群內個體之間的變異仍然存在。自然狀態下基因的多樣性來自基因的突變及生殖過程中基因的交換重組，好的基因在大自然的選擇之下被穩定的保存下來。一個物種或是個體所帶有的基因好比一個基因倉庫，每一個倉庫儲藏的物品均不會完全相同，任何一個倉庫消失意味者某些東西的消失。

物種多樣性: 美麗的世界繽紛的生命，物種多樣性所呈現的面貌豐富了我們生存的環境，隨者研究者觀察的角度不同，物種的多樣性常以不同的方法去表示，生態學家多以種類繁富度及種類豐度來表示。所謂的種類繁富度，簡單的說就是定面積內生物種類數。除了生態學家急切的想了解物種的分布及其豐度之外，分類學家在觀察過無數的物種及個體之後，對物種的多樣性更能深切的了解，分類學家眼中的多樣性又多從系統發生及分類群之間的類緣關係著，從演化的角度去探討多樣性形成的原因及其未來的去向。

生態系多樣性: 多樣化的生態環境呈現不同的風貌，並提供各種不同 動植物之個別需要。生態系中生產者、消費者、分解者，有能量的流動、養分的循環，生態系是個概念，沒有一定的疆界和規模，撒哈拉沙漠是一個生態系，一條溪流也可以是一個生態系。棲息環境變了，有些生物也許可做小距離的遷移，但絕沒有辦法從一個生態系搬家到另一個生態系，因此我們可以做到最好的事，就是保障整個生態系，並維持其多樣性，破壞了的生態系，其中的物種、基因也會跟著消失。

微衛星序列: 在基因組中具有含量豐富、高多型性、共顯性及多對偶基因等特性，因此被廣泛應用在物種鑑定、族群研究、基因圖譜、連鎖群分析及親子鑑定等方面，且已廣泛應用在人類之人別鑑定上。

生殖隔離: 於生殖方面的原因，親緣關係相近的族群之間不能互相交配，或不易

交配成功的隔離機制，造成新的品種的產生，可分為兩個階段：交配前隔離機制 (pre mating isolation mechanism) 及交配後隔離機制 (post mating isolation mechanism)。

異域種化：兩個族群因地理上完全隔離(可能為板塊的移動，或陸地隆起、冰河事件等)且族群和族群之間無法交流，進而形成種化的現象。

AFLP技術：是一項新的分子標記技術，是基於PCR技術擴增基因組DNA限制性片段，基因組DNA先用限制性內切酶切割，然後將雙鏈接頭連接到DNA片段的末端，接頭序列和相鄰的限制性位點序列，作為引物結合位點。

RAPD技術：它是類型 PCR 反應，但被放大脫氧核糖核酸的段是任意的。科學家執行的RAPD創造幾任意，短的底漆(8-12核苷酸)，然後繼續進行PCR使用genomic 脫氧核糖核酸一塊大模板，希望片段將放大。通過解決發生的樣式，半獨特的外形可以從RAPD反應被搜集。

RFLP技術：一種DNA分析技術。當以核酸限制酵素(restriction endonuclease)切割二不同生物個體的DNA時,若切割碎片大小不同,則經電泳後在膠片上會出現不同形式的排列。

粒線體基因組：全長序列16,640 bp，包括12S rRNA、16S rRNA、22個tRNA、13個蛋白質基因及D環區。13個蛋白質基因包括ND1、ND2、COI、COII、ATPase8、ATPase6、COIII、ND3、ND4L、ND4、ND5、ND6及Cytb。

CO-I基因：細胞色素氧化酶基因 (cytochrome c oxidase subunit 1)。

SNP：單核苷酸多態性 (Single-nucleotide polymorphism, SNP)，DNA序列因為單一核苷酸(A、T、C或G)發生變異，而使得基因體序列亦隨之改變。例如某段DNA序列由 ACGGCTAA 改變為 ATGGCTAA，若是這裡的C在整個族群的發生率大於1%時，也就是100人中至少有一例，便是所謂的SNP。

基因條碼：動物分類利用粒線體CO-I基因，植物分類利用葉綠體基因為國際公認的生物基因條碼。

附錄三、 已上傳 NCBI 基因條碼序列

褐樹蛙：

Buergeria robusta cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial

GenBank: GU244379.1

[FASTA Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS GU244379 658 bp DNA linear VRT 01-JUL-2010

DEFINITION Buergeria robusta cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial.

ACCESSION GU244379

VERSION GU244379.1 GI:283487918

KEYWORDS .

SOURCE mitochondrion Buergeria robusta (robust Buerger's frog)

ORGANISM [Buergeria robusta](#)
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Amphibia; Batrachia; Anura; Neobatrachia; Ranoidea; Rhacophoridae; Buergeriinae; Buergeria.

REFERENCE 1 (bases 1 to 658)

AUTHORS Yu,T.-L., Chen,L.-H., Li,K.-W. and Weng,C.-F.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (16-NOV-2009) The Department of Life Science and the Institute of Biotechnology, National Dong Hwa University, 1, Sec. 2 Do Hsueh Rd., Shou-Feng, Hualien 974, Taiwan

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..658

/organism="Buergeria robusta"

/organelle="mitochondrion"

```
/mol_type="genomic DNA"  
/db_xref="taxon:39612"  
/country="Taiwan: Taroko National Park"  
/PCR_primers="fwd_name: VF1, fwd_seq:  
ttctcaaccaaccacaargayatyg, rev_name: VR1, rev_seq:  
tagacttctgggtggccraaraayca"  
gene <1..>658  
/gene="COI"  
CDS <1..>658  
/gene="COI"  
/codon_start=2  
/transl_table=2  
/product="cytochrome oxidase subunit I"  
/protein_id="ADB24654.1"  
/db_xref="GI:283487919"  
/translation="TLYLIFGAWAGMIGTALSLLIRAELAQPGLGDDQIYNVIVTA  
HAFVMIFFMVMPILIGGFGNLWVPLMIGAPDMAFPRMNMNSFWLLPPSFLLLLASSTV  
EAGAGTGWTVYPPLAGNLAHAGPSVDLAIFSLHLAGISSILGAINFITTTILNMKPAST  
TQYQTPLFVWSVLITAVLLLLSLPVLAAGITMLLTDRNLNTTFFDPAGGGDPVLYQHL  
F"
```

ORIGIN

```
1 caccttatat ttaatttttg ggcgatgggc cggataatc ggcaccgcac ttagtcttct  
61 aattcgggct gaactcgctc agcccgggct cctcctggga gacgacaaa ttataatgt  
121 aattgtcact gccatgcct ttgtataat tttctttatg gtcatgccta tctaatecgg  
181 cggtttcgga aactggttg tcccctaata atcggggct cctgatatag ctttccccg  
241 cataaacaac ataagtttct ggctactacc tccctcattt cttctactac tagcttctc  
301 tacagttgaa gcaggagctg gcacagggtg gactgtttac cccccctag caggaaatct  
361 tgctcacgcc ggaccctctg tagacttagc tttttttcc cttcaccttg cagggatctc  
421 ctgattcta ggggctatca acttcattac aactattctg aacataaage ctgcctcaac  
481 gacacaatac caaacacccc ttttgtgtg gtctgtgcta attacagcag tattactact  
541 tctgtccctt ccagtcttag ctgcgggat tacaatgctt ctacagacc gcaacttaa  
601 caccaccttt ttgaccag caggcggagg tgaccagta ttataccaac acctattt
```

附錄四、會議紀錄

期中報告會議紀錄

太魯閣國家公園管理處 99 年度委託研究計畫

「太魯閣國家公園生態系經營指標物種遺傳物質分析計畫」

期中簡報會議紀錄

- 一、時間：99 年 6 月 10 日 上午 9 時 00 分
- 二、地點：本處會議室
- 三、主持人：游處長登良 記錄：朱何宗
- 四、報告人：翁慶豐教授 翁慶豐
- 五、出席人員

張副處長登文	張副處長登文
許祕書英文	
企劃經理課	張古泥
解說教育課	黃志強
遊憩服務課	林男
環境維護課	
保育研究課	陳俊山 朱何宗 蔡佩芳
天祥管理站	
布洛灣管理站	
合歡山管理站	
蘇花管理站	
東華大學	李國清、徐培源

六、結論：

- (一) 本計劃目前已完成 5 種蛇類及 1 種蛙類之基因條碼 (DNA Barcode) 分析，未來蛙類採集將以海拔廣泛分布的種類為主，例如梭德氏赤蛙及盤谷蟾蜍，蛇類樣本也會盡量收集。在分析方面，基因條碼的部份是可以共用引子，但微衛星序列分析則需要依個別物種分別設計。
- (二) 採樣時預計採各物種五公五母，成蛙有鳴囊、性墊等特徵可供區別，但於非繁殖季或蝌蚪則無法就由外觀判定，因此需增加採集數量，再利用分子技術鑑別。
- (三) 本期中報告書面資料有許多專業性的技術細節，建議在文獻收集回顧的部分增列基本概念說明、分析流程圖、國內外案例等資料，並將調查結果轉換成解說教育素材。
- (四) 建議於期末報告時將專有名詞以註解的方式列於附錄。
- (五) 與會人員相關意見請受託單位納入參考。
- (六) 本期中簡報審查通過，准予備查。請受託單位依合約規定備妥相關資料請領第二期款。

六、討論：

- (一) 受託單位已於會議前提送期末報告書面資料 15 份，內容進度符合合約規定。
- (二) 本調查因分析物種多樣且海拔分佈廣泛，因此特別針對多種兩棲類開發出共用的引子，以增幅粒線體 16S、12S 基因片段。
- (三) 本調查共記錄兩棲類 5 科 8 種，部份種類分佈地點與先前文獻資料略有上升趨勢，估計是調查點不同及調查努力量不同所致。
- (四) 本研究有許多專業性的技術細節，建議在文獻收集回顧的部分增列基本概念說明、分析流程圖、國內外案例等資料，並將調查結果轉換成解說教育素材。

七、結論：

- (一) 與會人員相關意見，請受託單位納入參考。
- (二) 期末報告撰寫格式請依內政部委託研究作業規定辦理。
- (三) 本期末簡報審查通過，准予備查。請受託單位依會議結論修正書面報告，俟完成驗收後，依合約規定備妥相關資料請領第三期款。

附錄五、調查工作照片



砂卡嚙橋下、步道



砂卡嚙橋下、步道



砂卡嚙橋下、步道



砂卡嚙橋下、步道



砂卡嚙橋下、步道



砂卡嚙橋下、步道



砂卡嚙橋下、步道



砂卡嚙橋下、步道



布洛灣採集



布洛灣採集



布洛灣採集



布洛灣採集



布洛灣採集



布洛灣採集



布洛灣採集



布洛灣採集



天祥採集



天祥採集



天祥採集



天祥採集



西寶採集



西寶採集



西寶採集



西寶採集



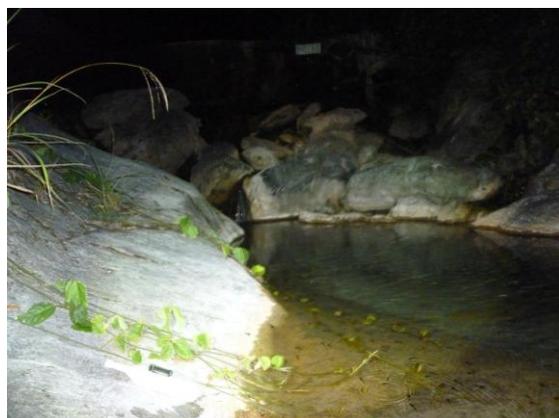
洛韶採集



洛韶採集



洛韶採集



洛韶採集



台八線 148k 採集



台八線 148k 採集



台八線 148k 採集



台八線 148k 採集



新白楊採集



新白楊採集



新白楊採集



新白楊採集



台八線 133k 採集



台八線 133k 採集



台八線 131k 採集



台八線 131k 採集



台八線 131k 採集



台八線 131k 採集



台八線 119k 採集



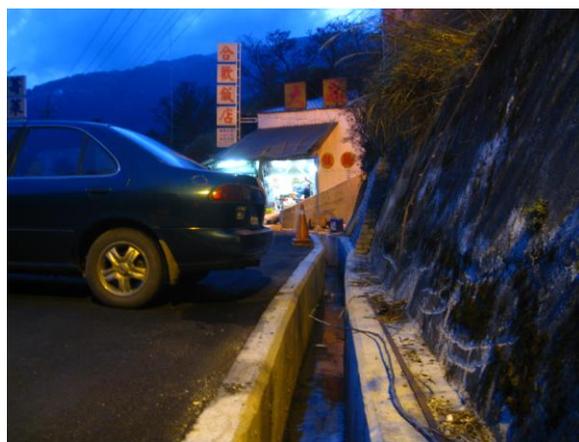
台八線 119k 採集



關原加油站採集



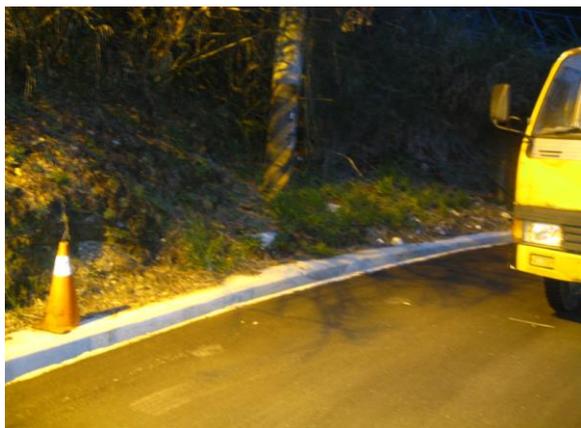
關原加油站採集



大禹嶺採集



大禹嶺採集



大禹嶺採集



大禹嶺採集



820 林道採集



820 林道採集



820 林道採集



820 林道採集

附錄六、生命條碼簡介

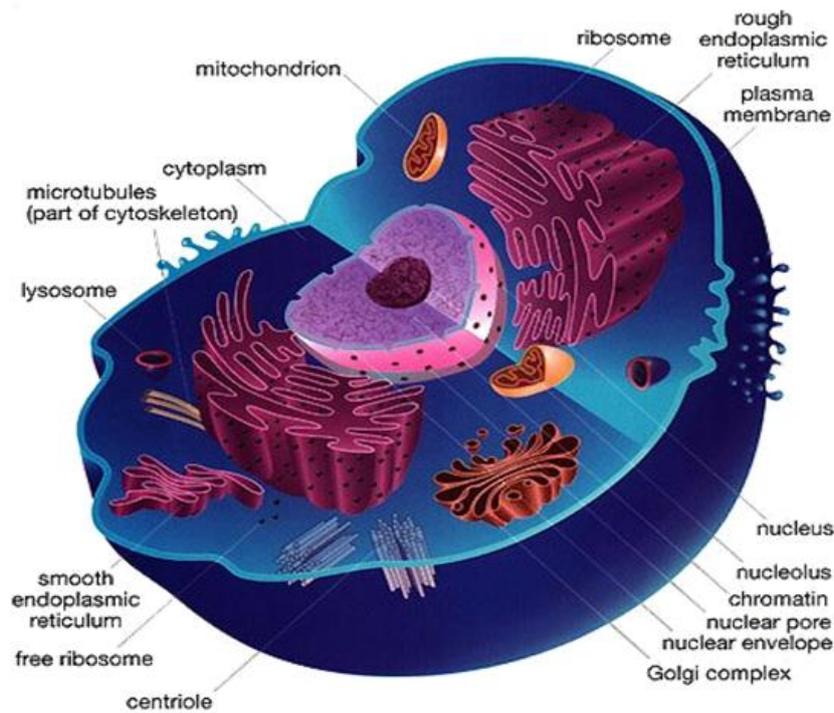
生命條碼

- 「生命條碼」「DNA條碼」(DNA barcode) 一種創新、簡便、迅速的鑑識系統：粒線體基因片段以標示物種。提供類似ISBN全球通用碼，讓世界上每個物種都有獨特的身份證。
- 「生命條碼 (Barcode of Life, 簡稱BOL)」由加拿大分子生物多樣性研究所、演化生物學家艾伯 (Paul D. N. Hebert) 於2003年提出。赫伯特：「在熱帶地區長期工作，我已經面臨多數生物學家感受到的挫折：對周遭的生命系統卻一無所知」以避開繁瑣不便的分類工作。
- 此生物辨識系統已迅速獲得「聯合國經濟合作發展組織 (OECD)」的「全球生物多樣性資訊機構 (GBIF)」重視與支援。2004年到2006年間，在多種國際期刊熱烈討論爭辯後，「生命條碼 (BOL)」議題席捲全球。
- 目前所建置的資料庫中已有二十九萬條DNA條碼，涵蓋超過四萬種生物資料。
- 也許有一天，掌上型解碼器，在野外就能進行簡單的DNA檢測，而能判定物種。

基因條碼源於粒線體

- 粒線體存在於生物的細胞之中，粒線體是一個很好的遺傳鑑定工具，因為大多數細胞中都有上百個以上的粒線體，但只有一組染色體，因此等量的樣品中，粒線體的DNA更容易被放大和使用。且粒線體DNA的演變相對於染色體DNA快，因此累積更多資訊可用為鑑定物種。
- 粒線體基因組16,640 bp 全長序列；包括12S rRNA、16S rRNA、22個tRNA、13個蛋白質基因及D環區。13個蛋白質基因包括ND1、ND2、COI、COII、ATPase8、ATPase6、COIII、ND3、ND4L、ND4、ND5、ND6及Cytb。
- 目前以CO-I基因（cytochrome c oxidase subunit 1），為國際公認的生物基因條碼。建立完成後的基因條碼更可與台灣生物多樣性資訊網（TaiBNET）結合，以提供更完整基礎科學資料，促進國際間科學與技術有關資料之標準化與相互合作交流。

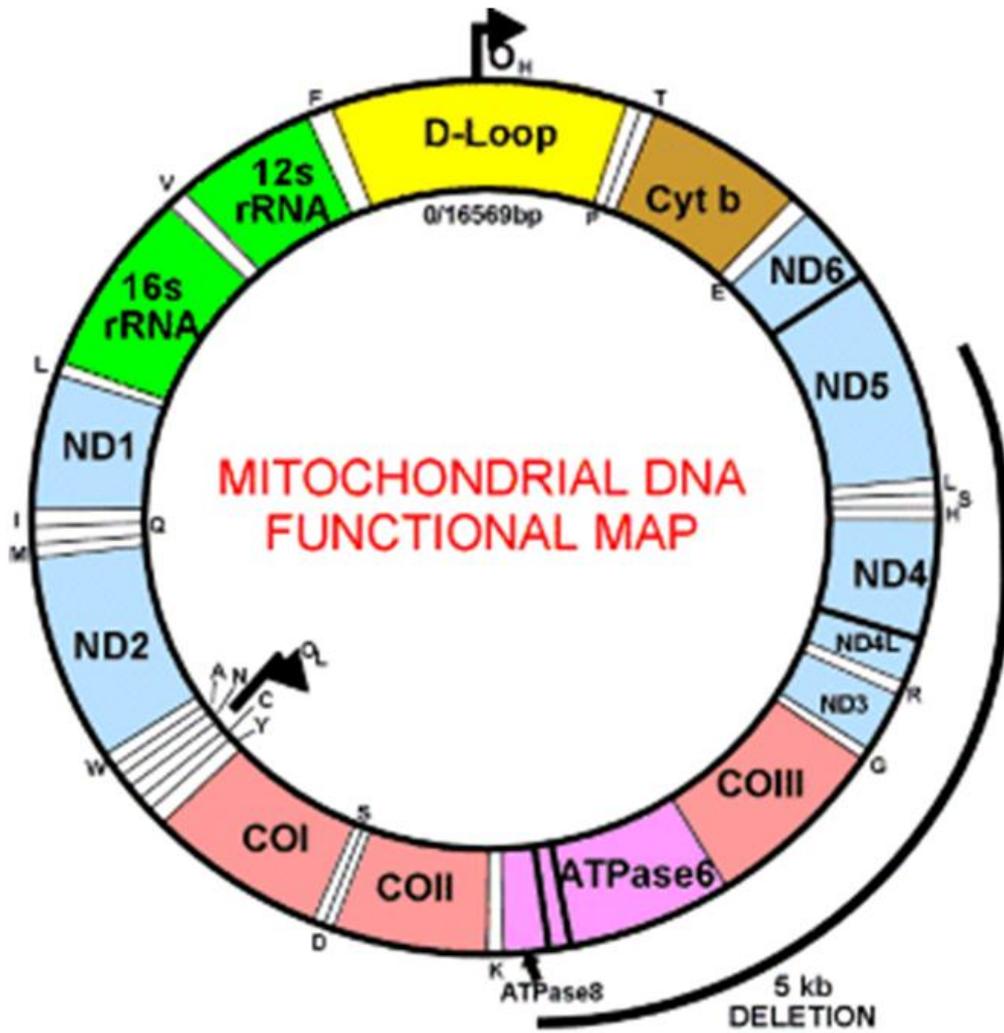
粒線體(mitochondrial DNA)



<http://larvalsubjects.files.wordpress.com/2009/02/animal-cell.jpg>

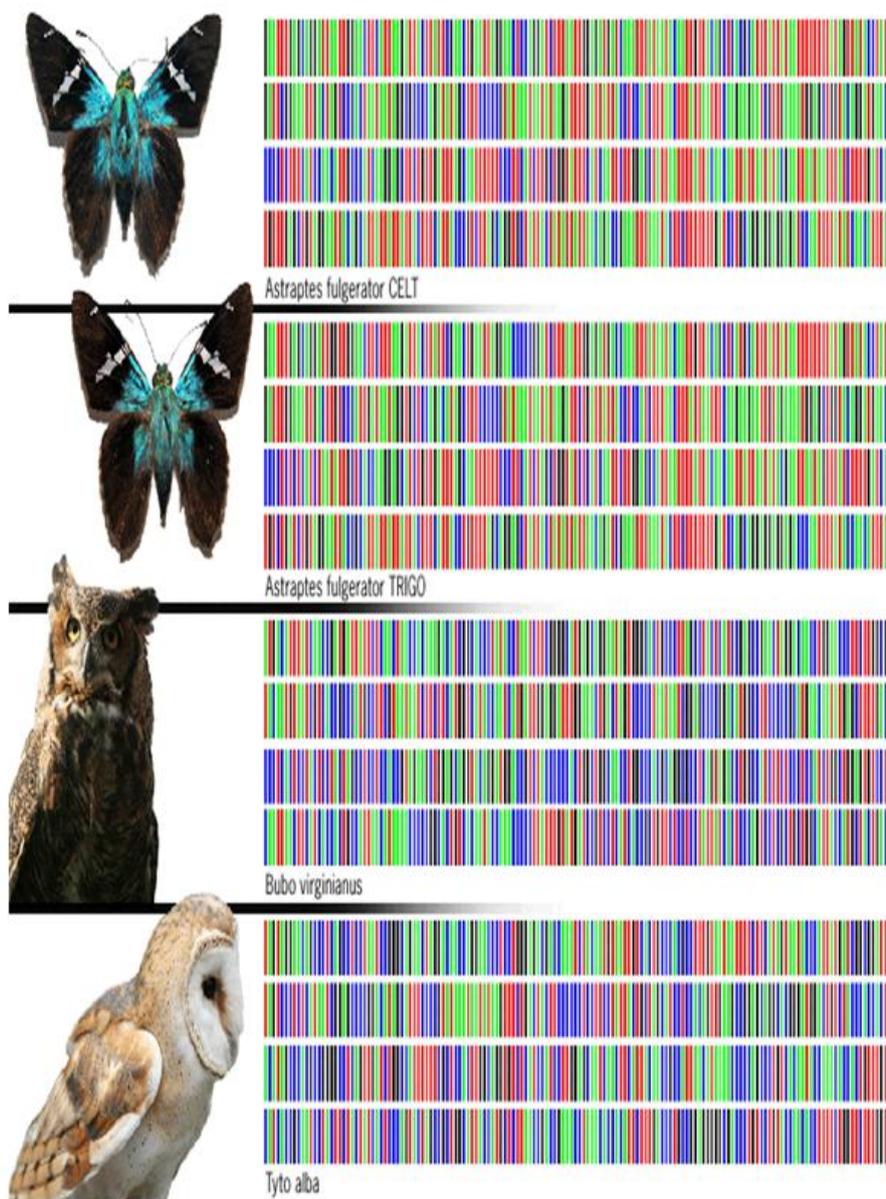
- 動物的遺傳物質可分為：細胞核DNA (nuclear DNA, nDNA) 和粒線體DNA (mitochondrial DNA, mtDNA)，而粒線體是動物細胞中唯一有獨立遺傳物質的胞器。

粒線體DNA基因圖譜



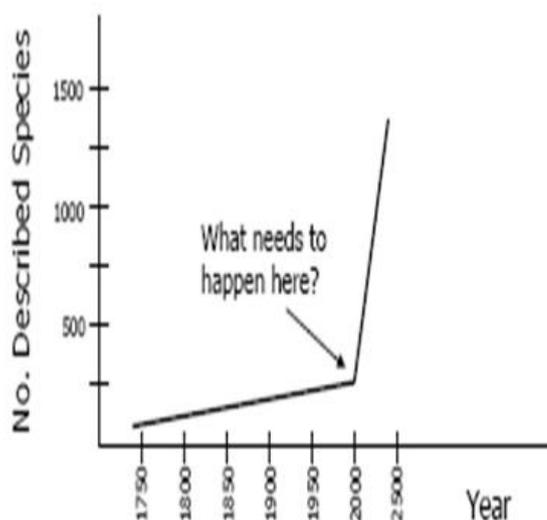
<http://mitochondriome.org/index.php/Mitomap>

DNA條碼運用於物種的鑑定



Jon R. Luoma. Jun 2008. BIODIVERSITY SCIENCE & TECHNOLOGY CENTRAL & SOUTH AMERICA

生命條碼之應用



- 藉基因鑑種（生命條碼）及生物多樣性資訊（biodiversity informatics）之助
- 例：兩棲類從1985年迄今已增加50%物種數，2005年2月後迄今增加248種（因有物種名錄及資料庫重新整理）；魚類2005~2006年增加423種（Nelson, 2006），其中鯰魚過去十年來已增加近400種（因NSF資助南美調查）；貝類、十足類等亦增加甚快。

美國阿肯色的小龍蝦案例 ——2008年



- 美國阿肯色的小龍蝦案例——2008年
- 1988年時發表新種 **Lonoke crayfish**, *Procambarus ferrugineus* 與10年前發表的 **Osage crayfish**, *Procambarus liberorum* 極為相似，但兩種相距半個州。
- 1990年後幾乎不見 **Lonoke crayfish** 的蹤影，而被列為頻危物種。
- 2003年基因學家將保存近20年的 **Lonoke crayfish** 標本，成功分離基因作分析，發現 **Lonoke crayfish** 與 **Osage crayfish** 其實是同種小龍蝦。
- 原本擔心喪失一物種，結果只是損失一部份的棲地。此可提供經營管理者正確管理方向。

美國蛙類基因研究的 案例



- 美東chorus frogs (genus *Pseudacris*)的褐色小型蛙類，長久以來分成6個種：*P. brachyphona*, *P. brimleyi*, *P. feriarum*, *P. maculata*, *P. nigrita* and *P. triseriata*。
- 直到2008年經由基因、形態及叫聲鑑定，在6種中發現另一種名為Cajun chorus frog, *Pseudacris fouquettei*。
- 進一步作基因辨識更發現Cajun chorus frog, 應可再分出*P. maculate* 及*P. feriarum* 二新種。
- 原本以為還有很大族群數量的一種，其實是三個種，若未查覺很有可能錯失保育其中一或二種。

台灣生態系對全球物種的重要性

- 台灣因擁有高山及深海等各種不同的陸域及海洋生態系，棲地多樣化造就豐富的物種多樣性。
- 粗略估計，台灣陸域生物物種數約佔全球的2.5%，而海洋則達10%，換言之，台灣單位面積的物種數比其他國家在陸域的物種數平均高100倍，而海域則為400倍。
- 特別是台灣特有種生物的比例甚高，如陸域植物有高達1/4為特有種，也因此全球任何生物多樣性資料庫的建立，例如全球物種名錄（Catalog of Life）、生命演化樹（Tree of Life）、生命大百科（Encyclopedia of Life）及生命條碼等，如缺少台灣這一塊，全球的拼圖就不完整。

國家公園於基因多樣性研究扮演之角色

- 目前國家公園保育研究多以物種名錄建立、族群分布與變遷、棲息地評估等作為經營管理之依據。
- 國家公園尚不熟悉某些物種（尤其是珍貴稀有的保育類動物如山椒魚、呂氏攀蜥等）的演化與適應階段，基因庫裡有多少變異，變異之於個體與族群間的流動情形。
- 物種基因多樣性高，族群才得以維持。族群多樣性高，生態系群落多樣性才能維持。

參考書目

- 呂光洋。1983。太魯閣國家公園動物生態資源調查。內政部營建署太魯閣國家公園管理處七十二年度研究報告。
- 呂光洋、張巍薩、林政彥。1989。太魯閣國家公園大合歡山地區山椒魚調查。自然生態保育協會。
- 杜銘章。2004。蛇類大驚奇。台北：遠流。
- 吳海音。2003。太魯閣國家公園保育研究計畫的檢討與展望。
- 林曜松、陳擎霞、盧堅富、梁輝石。1991。太魯閣國家公園動物相與海拔高度、植被之關係研究。內政部營建署太魯閣國家公園管理處八十年度研究報告。
- 林曜松。2005。太魯閣國家公園中低海拔地區動物資源動態調查研究及資料庫建立。內政部營建署太魯閣國家公園管理處九十四年度研究報告。
- 翁慶豐。2009。太魯閣國家公園珍稀及指標物種研究與復育計畫第一期兩棲爬蟲類基因條碼建立及多樣性分析。內政部營建署太魯閣國家公園管理處。
- 張慶年鴻。2007。台灣兩種赤蛙的親緣地理結構比較，國立中興大學生命科學系博士學位論文
- 楊懿如。2005。太魯閣國家公園兩棲類及水棲昆蟲調查監測計畫。內政部營建署太魯閣國家公園管理處。
- 楊懿如。2006。太魯閣國家公園兩棲類調查監測計畫。內政部營建署太魯閣國家公園管理處。
- Awise, J.C., 1994, *Molecular Markers, Natural History and Evolution*, Chapman and Hall, New York, NY. 511 pp.
- Baker, C.S., A. Perry, G.K. Chambers and P.J. Smith., 1995. Population variation in the mitochondrial cytochrome b gene of the orange roughy *Hopllostethus atlanticus* and the hoki *Macruronus novaezelandiae*. *Mar. Biol.*, **122**: 503-509
- Birky C.W. Jr, Maruyama T., Fuerst P., 1983, An approach to population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondria and chloroplasts, and some results. *Genetics*, 103, 513-527.
- Boulenger, G. A., 1909, A list of the freshwater fishes, batrachians, and reptiles obtained by Mr. J. Stanley Gardiner's expedition to the Indian Ocean. *Trans. Linn. Soc. Lond.* **12**: 291-300.
- Brede G., 2001, Polymerase chain reaction primers for microsatellite loci in the Common Toad, *Bufo bufo*. *Molecular Ecology Notes* 1 : 308-310.
- Brown W. M., M. George JR., & A. C. WILSON, 1979, Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Nation. Acad. Sci. U.S.A.*, 76: 1967-1971.
- Chou W,H,, Lin J.Y. (1997a) Geographical Variations of *Rana sauteri* (Anura: Ranidae) in Taiwan. *Zool Stud* 36: 201-221.
- Chou W,H,, Lin J.Y. (1997b) Description of a New Species, *Rana multidenticulata*

- (Anura:Ranidae), from Taiwan. *Zool Stud* 36: 222-229.
- Dawid, I. B. & Blacker, A. W., 1972, Maternal and cytoplasmic inheritance of mitochondrial DNA in *Xenopus*. *Dev. Biol.* 29, 152-161.
- Douzery, E., Catzeflis, F.M., 1995, Molecular Evolution of the Mitochondrial 12S rRNA in Ungulata (Mammalia), *Journal of molecular evolution*
- Felsenstein J., 1985, Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Hall T. A., 1999, BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hannic, C., V. Laudet, V. Barriel and F.M. Catzeflis. 1995. Evolutionary relationships of acomys and other murids (*Rodentia, Mammalia*) based on complete 12S ribosomal-RNA mitochondrial genes sequences. *Israel J. of Zool.*, **41**(2): 131-146.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- Kumar, S., Tamura, K., and Nei, M. 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5: 150-163.
- Lai SJ, YC Kam, YS Lin. 2003. Elevational variation in reproductive and life history traits of Sauter's frog *Rana sauteri* Boulenger, 1909 in Taiwan. *Zool. Stud.* 42: 193-202.
- Moritz, C., and W.M. Brown. 1987. Tandem duplications in animal mitochondrial DNAs : variation in incidence and gene content among lizards. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 7183-7187.
- Saitou, N., and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4** : 406-425.
- Sang, T.K., H.Y. Chang, C.T. Chen and C.F. Hui. 1994. Population structure of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Mol. Biol. Evol.* **11**(2): 250-260.
- Slatkin M. 1985, Gene flow in natural populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 16:393-430.
- Smith M. Alex, Poyarkov JR Nikolai A., Hebert Paul D. N. 2008. CO1 DNA barcoding amphibians: take the chance, meet the challenge. *Molecular ecology resources* 8:235-246.
- Waterman, M.S., M. Eggert, E. Lander. 1992 Parametric sequence comparisons. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **89**: 6090-6093.

『太魯閣國家公園生態系
經營指標物種遺傳物質分析計畫』
期末報告



報告人：翁慶豐 教授

提案單位：中華民國國家公園學會

研究目的

- 挑選出太魯閣國家公園內生態地位重要或易受害的物種為生態系經營指標物種。選定的物種能獲得更多的重視與保育，以達到生物多樣性的維持。
- 進行太魯閣地區族群遺傳結構比較，以建立族群親緣關係，可作為後續保育及相關研究之依據。
- 建立專屬於太魯閣國家公園地區珍稀及指標物種的國際基因條碼。

生態系經營指標物種

- 兩棲類的數量較豐富且容易監測，如蟾蜍科的盤古蟾蜍。
- 兩棲類其皮膚對環境的敏感度很高，水域或陸地的環境品質的改變，對其族群分佈與數量影響大，所以常被視為監測環境的指標動物。

主要工作內容

- 文獻蒐集與回顧
- 指標物種基因多樣性探討。
- 全球暖化問題指標物種(兩爬類)。
- 指標物種生存環境壓力探討。

完成工作項目

1. Barcode (COI)已定序兩棲類8種，爬蟲7種；其中已上傳NCBI共8種。
2. 在採集調查的部分，發現盤古蟾蜍與斯文豪氏赤蛙實際海拔分布均較文獻記載高。
3. 楚南氏山椒魚在本研究的採樣中，主要分布於合歡山區及820林道，這兩個樣點海拔高度相差600公尺，位置相距約7公里；分析其粒線體DNA 16S之部分序列結果一致，可能是屬於同一族群。
4. 分析蓮花池、花蓮瑞穗之中國樹蟾粒線體DNA 12S序列比對，發現中國樹蟾可能由於分布極為侷限，而產生地區之單一核苷酸多樣性(SNP)。
5. 梭德氏赤蛙之調查，在不同海拔採集到不同基因型之梭德氏赤蛙，此結果可能是源自於在不同海拔、環境溫度的族群，經長時間的淘汰及生殖隔離後系群間，亦逐漸產生遺傳變異。
6. 資料上兩棲類分布可跨過2000公尺海拔高度的盤古蟾蜍，依其親緣關係之分析，結果發現族群內可依此海拔高度線分出兩個類群(基因多樣性)。

1. 基因條碼(Barcode)

**Barcode (COI) 已定序兩棲類8種，爬蟲7種；
其中已上傳NCBI共8種**

台灣蜓蜥 C01 基因條碼

學名：*Sphenomorphus taiwanensis*

來源：南湖大山

5. 台灣蜓蜥 *Sphenomorphus taiwanensis*

```
CACCCTTATTTAATTTTTGGGGCCTGGGCAGGCATGGTCGGGACC  
GCTTTAAGCTTATTAATCCGAGCTGAGCTAAGTCAGCCGGGTGCC  
TTTTGGGCGACGACCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCCCACGC  
TTTCGTAATAATTTCTTCATAGTCATACCAGTTATAATCGGCGGATT  
CGGGAAGTATTAGTACCATTAATAATTGGGGCACCCGACATGGCA  
TTCCACGAATAAATAACATAAGCTTTTGACTACTTCCTCCATCATT  
CCTTTTACTCTTAGCTTCTTCTGGCGTAGAGGCCGGAGCCGGGACA  
GGTTGAACTGTATACCACCATTAGCCGGCAACTTGGCACATGCTG  
GCGCTTCCGTTGATCTAACAATCTTTTCACTGCATCTTGCCGGGGTT  
TCTTCTATTCTAGGCGCCATCAACTTTATTACAACCTGCATTAACATA  
AAACCCCGCTATAACCAATATCAAACCCCTTTATTTGTATGATC  
AGTTTTAATTACGGCCGTCCTACTGCTACTATCTTTACCTGTTCTAGC  
CGCCGGTATTACAATACTACTAACAGATCGTAATTTGAACACCTCAT  
TTTTTGACCCTGCAGGAGGGGGAGATCCTATCCTATATCAGCACTTA  
T T T
```



莫氏樹蛙 CO1基因條碼

學名：*Rhacophorus moitrechti*

來源：中橫公路148K

1. 莫氏樹蛙 *Rhacophorus moitrechti*

```
TACCCTATACTTAATTTTTGGTGCCTGAGCCGGAATAATCGGAACAT  
CTCTCAGCTTACTTATTCGAGCCGAACTTGCTCAACCCGGCACCCCT  
TCTCGGCGACGACCAAATTTATAATGTAATTGTCACCGCCCATGCTT  
TTGTAATAATTTTTTTATGGTAATGCCCATTCATTGGAGGGTTTG  
GCAACTGATTGGTGCCATTAATAATTGGAGCACCAGATATAGCCTTC  
CCACGAATAAATAATATAAGCTTTTGATTACTCCCCCTTCATTTTTT  
CTTCTTTTAGCATCTTCAATAGTAGAAGCGGGGTAGGGACCGGAT  
GAACAGTCTACCCACCCTTAGCTGGCAATATTGCTCACGCTGGACC  
ATCTGTTGATCTAGCTATTTTTCTTTACATCTTGCTGGTGTGCTTC  
TATTCTAGGAGCTATTAACCTCAACACAACAATTTTAATATAAAACC  
AGTATCTATAACACAATATCAAACCCCTTATTTAATCTGGTCTGTTCT  
CGTAACAGCTGTTTTAATTAATCTTTCCCTTCCAGTATTAGCTGCAG  
GAATACTATATTGCTAACCGATCGAAACCTAAATACTACCTTCTTC  
GATCCAGCAGGGGGCGGAGACCCTGTACTATATCAACATCTATTT
```



赤尾鮎C01基因條碼

學名：*Trimeresurus stejnegeri stejnegeri*

來源：砂卡礑步道

2. 赤尾鮎 *Trimeresurus stejnegeri stejnegeri*

```
AACCCTATACCTAATATTCGGTGCATGATCCGGCCTTATCGGGGCCT
GCCTAAGCATCCTGATACGCATAGAATACTCAGCCTGGATCATT
TTCGGCAGTGACCAGATCTTTAATGTTCTAGTAACCGCTCACGCATT
TATCATAATCTTCTTTATAGTCATACCCATTATAATTGGAGGCTTCGG
AAACTGACTAATCCCTCTAATAATTGGAACCCAGACATAGCCTTC
CCCCGAATGAACAACATGAGCTTTTGACTCCTCCCCCAGCACTAC
TTCTACTACTATCCTCCTTACGTCGAAGCAGGCGCAGGAACAGG
TTGAACTGTCTATCCCCCTATCTGGAAACCTAGTACTACTCCGGCC
CATCAGTAGACTTAGCCATTTTTTCTCTTCACTTAGCCGGAGCATCA
TCTATTCTAGGGGCAATCAACTTCATCACTACATGTATTAACATAAA
ACCCAAATCAATACCAATATTTAACATACCACTTTTTGTCTGATCTG
TTATAATCACCGCGATCATACTACTTCTAGCTCTACCAGTACTCGCA
GCAGCAATCACCATGCTCCTGACAGATCGAAACCTAAATACAACCT
TCTTTGACCCCTGCGGAGGCGGGGACCCAGTCCTATTCCAACACTT
G           T           T           C
```



龜殼花C01基因條碼

學名：*Trimeresurus mucrosquamatus*

來源：砂卡礑步道

3. 龜殼花 *Trimeresurus mucrosquamatus*

```
AACCCTATACTTATTATTTGGCGCATGATCAGGCCTGGTCGGGGCCT  
GCCTTAGCATCTTAATACGAATAGAATACTAAGCCGGGTCACT  
ACTGGGCAGTGATCAAATCTTTAATGTTCTAGTTACAGCCACGCAT  
TTATTATAATTTCTTCATGGTCATACCAATTATAATCGGCGGCTTTG  
GTAAGTGAATTAATCCACTAATAATTGGAGCCCCCGATATGGCCTTT  
CCACGTATAAACAACATAAGCTTCTGGCTTCTACCGCCTGCACTACT  
TCTATTATTATCATCCTCCTACGTTGAAGCAGGAGCAGGCACAGGAT  
GAACTGTATATCCACCCCTCTCGGGGAACCTGGTACTCAGGACC  
ATCAGTTGACCTAGCAATTTTCTCCCTTACCTAGCAGGCGCCTCCT  
CCATCCTGGGCGCAATCAATTTTATTACAACATGTATTAACATAAAA  
CCAAAGTCCATACCAATATTTAACATCCCCTTATTTGTCTGATCCGTA  
CTAATCAGCCATCATACTACTTCTAGCATTACCAGTGCTGGCCGC  
AGCAATTACCATACTATTGACGGACCGAAACCTCAACACCTCTTTC  
TTTGACCCCTGCGGAGGGGGGACCCGGTACTATTCCAACACCTAT  
T C
```

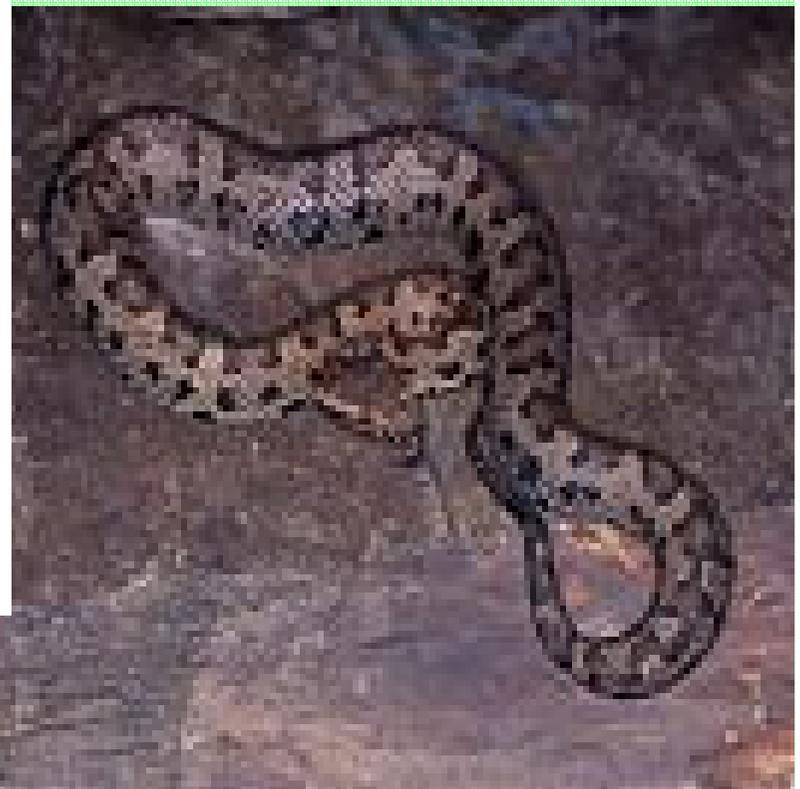


菊池氏龜殼花C01基因條碼

學名：*Trimeresurus gracilis*

來源：台十四甲36K

```
AACCCTATACCTTATATTTGGCGCATGATCCGGCCTCATCGGGGCTTGTCTTAGTATTCT  
AATACGCATAGAACTAACACAGCCTGGGACGCTATTTGGCAGCGACCAGATCTTTAACGT  
CTTAGTGACCGCCACGCATTCATCATAATCTTCTTCATAGTCATACCCATTATAATCGG  
CGGGTTCGGAAATTGACTAATTCCCCTAATAATTGGAACCCCGACATAGCCTTCCCCCG  
AATAAACACATAAGCTTTTGACTCCTACCCCGAGCACTACTTCTTACTATCCTCCTC  
TTACGTCGAAGCAGGCGCAGGAACAGGCTGAACTGTCTACCCCCCCTCTCCGGAAACTT  
AGTTCACTCAGGCCCATCAGTAGACTTAGCCATCTTCTCCCTCCATCTGGCAGGAGCGTC  
ATCCATCCTCGGAGCAATTAATTTTCATCACCACATGCATCAATATAAAACCTAAATCAAT  
ACCAATATTTAACATTCCCCTTTTTGTTTTGATCCGTTTTAATCACTGCAATTATACTACT  
TCTAGCATTACCAGTACTGGCAGCAGCAATCACTATACTTCTAACGGATCGAAACTTAAA  
CACGACCTTCTTTGACCCCTGCGGAGGGGGCGACCCAGTCCTATTCCAACACCTATTC
```



已完成之兩棲類基因條碼

兩棲類	NCBI 已知	太魯閣園區樣本
臺灣山椒魚 <i>Hynobius formosanus</i>	DQ333816.1	NA
楚南氏山椒魚 <i>Hynobius sonani</i>	NA	V
盤古蟾蜍 <i>Bufo bankorensis</i>	NA	submitted
黑眶蟾蜍 <i>Bufo melanostictus</i>	AY458592.1	NA
中國樹蟾 <i>Hyla chinensis</i>	AY458593.1	submitted
小雨蛙 <i>Microhyla ornata</i>	NA	NA
斯文豪氏赤蛙 <i>Rana swinhoana</i>	NA	submitted
梭德氏赤蛙 <i>Rana sauteri</i>	NA	V
澤蛙 <i>Rana limnocharis</i>	NA	NA
拉都希氏赤蛙 <i>Rana latouchii</i>	NA	NA
日本樹蛙 <i>Buergeria japonica</i>	NA	submitted
褐樹蛙 <i>Buergeria robusta</i>	GU244379.1	GU244379.1
艾氏樹蛙 <i>Chirixalus eiffingeri</i>	NA	NA
莫氏樹蛙 <i>Rhacophorus moltrecht</i>	NA	submitted
白領樹蛙 <i>Polypedates megacephalus</i>	AY458598.1	

已完成之爬蟲類基因條碼

爬蟲類	NCBI 已知	太魯閣園區 樣本
赤尾鮎 <i>Trimeresurus stejnegeri stejnegeri</i>	NC_012146.1	V
龜殼花 <i>Trimeresurus mucrosquamatus</i>	NA	V
青蛇 <i>Cyclophiops major</i>	NA	submitted
雪山草蜥 <i>Takydromous hsueshanensis</i>	NA	V
呂氏攀蜥 <i>Japalura luei</i>	NA	submitted
斯文豪氏攀蜥 <i>Japalura swinhonis</i>	NA	
台灣草蜥 <i>Takydromus formosanus</i>	NA	
菊池氏龜殼花 <i>Trimeresurus gracilis</i>	NA	V
紅竹蛇 <i>Elaphe porphyracea nigrofasciata</i>	NA	
中國石龍子 <i>Eumeces chinensis</i>	NA	
麗紋石龍子 <i>Eumeces elegans</i>	NA	V

2. 兩棲類分佈

在採集調查的部分，發現盤古蟾蜍與斯文豪氏赤蛙實際分布海拔高度均較文獻記載高。

太魯閣的兩棲爬蟲類現況

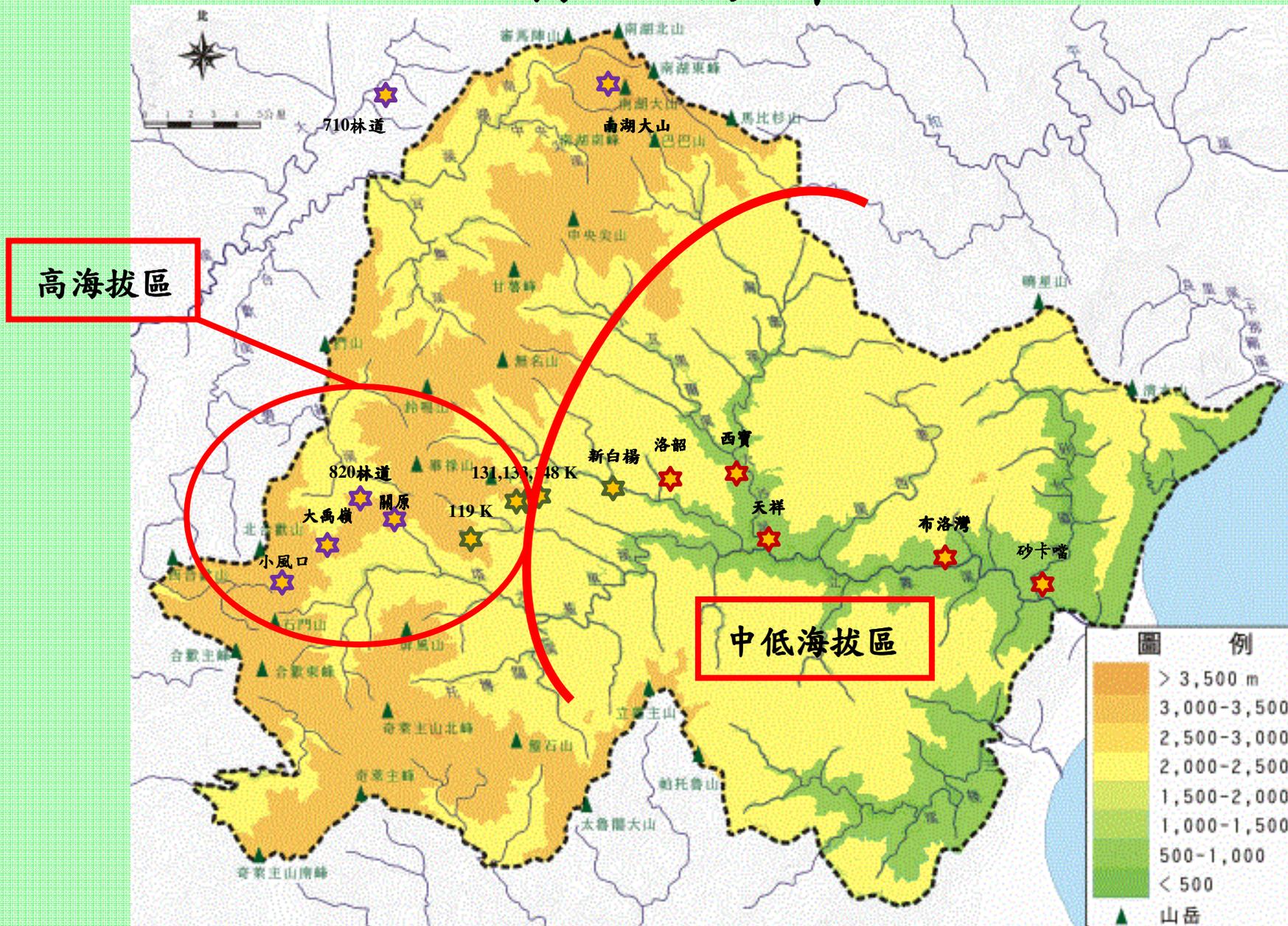
- 兩棲類物種計有6科15種，約佔全臺灣已知兩棲類物種之43%。其中臺灣山椒魚、楚南氏山椒魚、南湖山椒魚等3種為珍貴稀有保育類物種。
- 爬蟲類物種計有有鱗目蝮蛇科5種、蝙蝠蛇科2種、黃領蛇科18種、蜥蜴科1種、飛蜥科2種、蛇蜥科1種、石龍子科4種及守宮科3種。其中保育類計14種。

研究物種之擇定

- 珍稀物種
- 物種族群海拔廣泛分佈：

梭德氏赤蛙、盤古蟾蜍，在太魯閣國家公園內分布廣泛，在低中高海拔均可見其蹤跡；故在本年度的計劃中，以這兩種蛙類作為兩棲類優先調查研究之標的。

樣區分布



各蛙類海拔分布表

物種名稱	海拔高度 (公尺)						
	0-499	500-999	1,000-1,499	1,500-1,999	2,000-2,499	2,500-2,999	3,000-3,499
山椒魚科 <i>Hynobiidae</i>							
楚南氏山椒魚 <i>Hynobius souani</i>							
蟾蜍科 <i>Bufo</i>							
盤古蟾蜍 <i>Bufo bankorensis</i>							
黑眶蟾蜍 <i>Bufo melanostictus</i>							
樹蟾科 <i>Hylidae</i>							
中國樹蟾 <i>Hyla chinensis</i>							
赤蛙科 <i>Ranidae</i>							
斯文豪氏赤蛙 <i>Rana swinhoana</i>							
梭德氏赤蛙 <i>Rana sauteri</i>							
樹蛙科 <i>Rhacophoridae</i>							
日本樹蛙 <i>Buergeria japonica</i>							
褐樹蛙 <i>Buergeria robusta</i>							
莫氏樹蛙 <i>Rhacophorus moltriehti</i>							

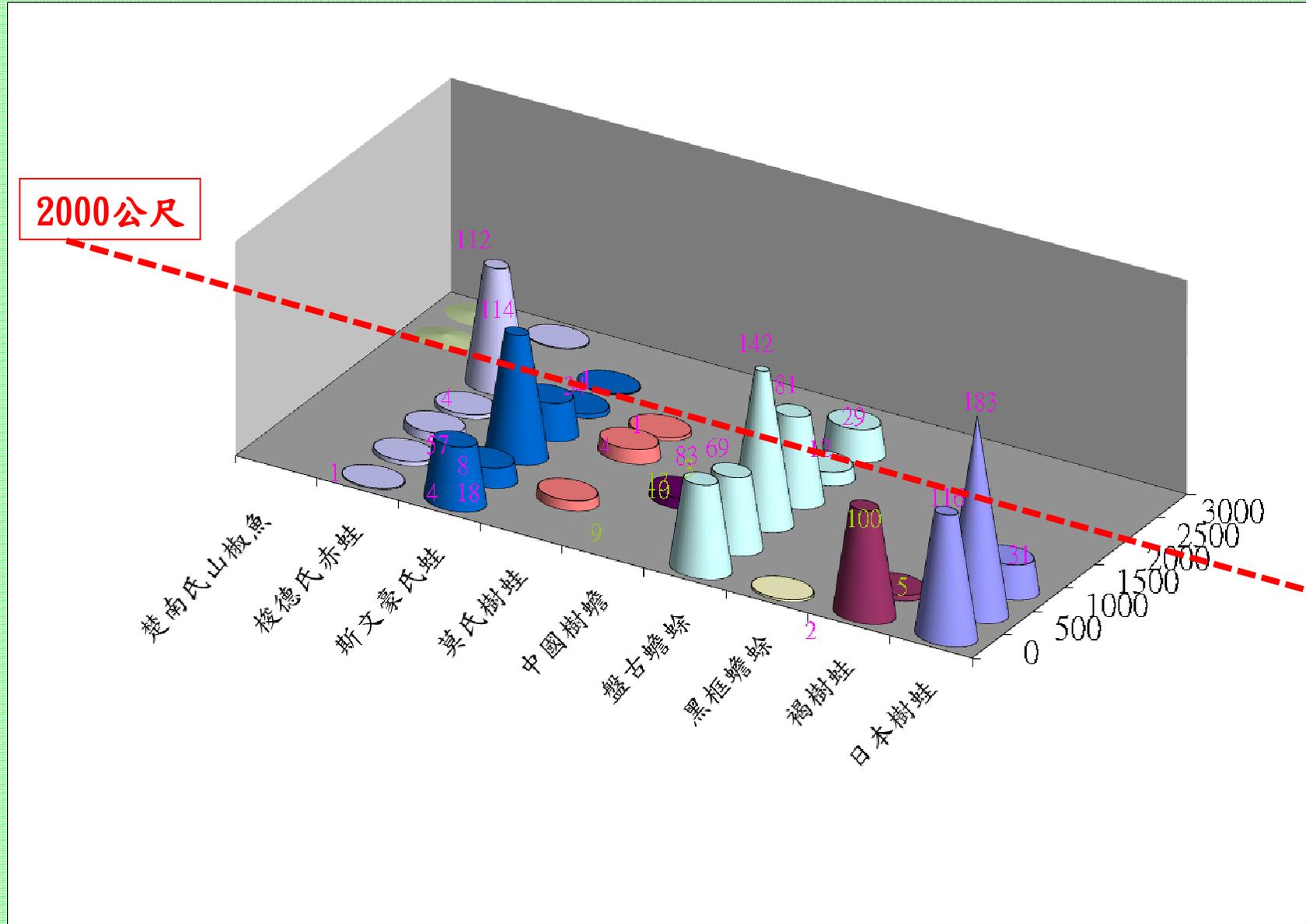
本次調查記錄

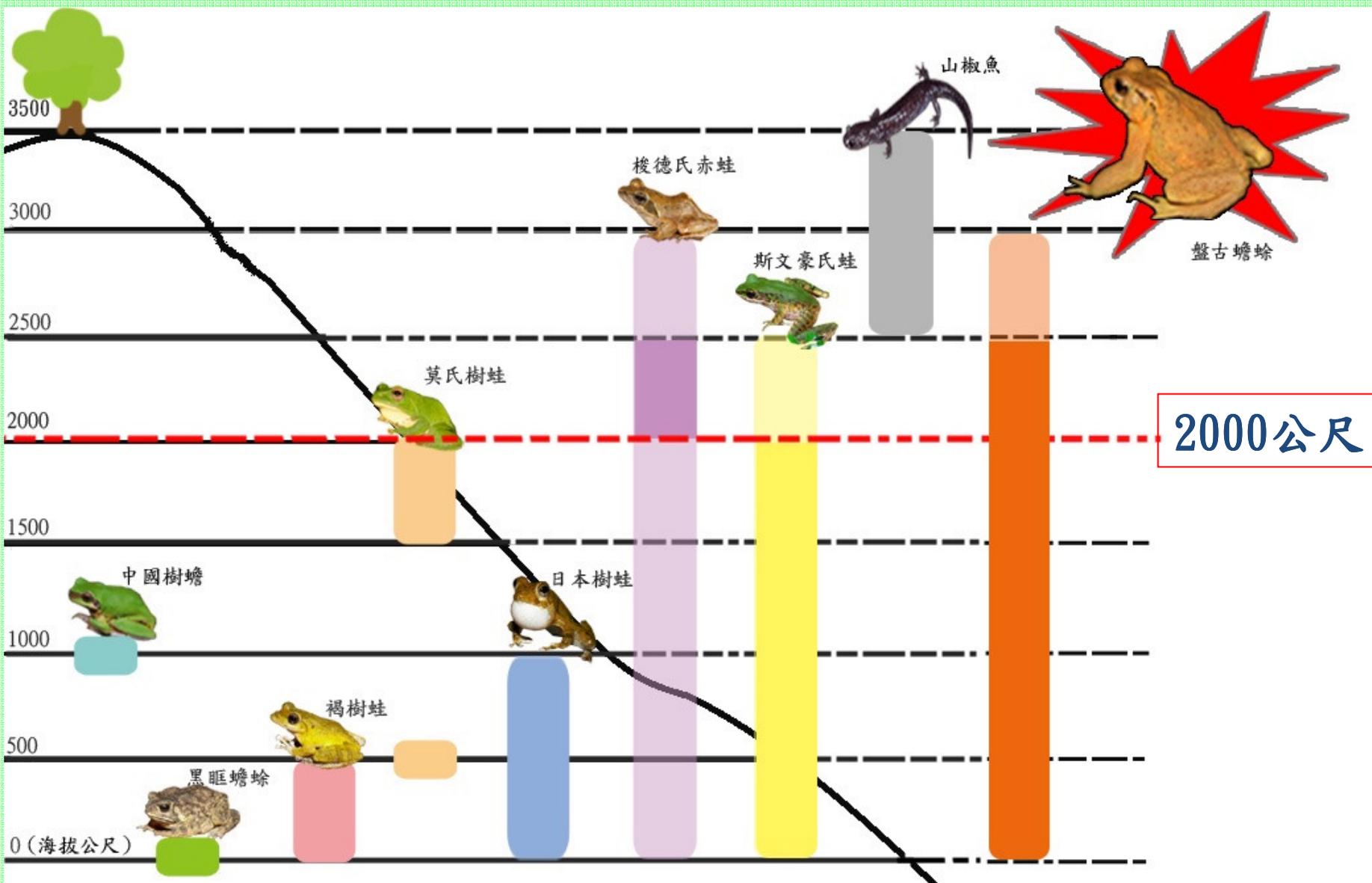
文獻資料記載(楊懿如:2005/12 太魯閣國家公園兩棲類及水棲昆蟲調查監測計畫)

各海拔與物種調查之數量

海拔高度 (公尺)	日本樹蛙	褐樹蛙	黑框蟾蜍	盤古蟾蜍	中國樹蟾	莫氏樹蛙	斯文豪氏 蛙	梭德氏赤 蛙	楚南氏山椒 魚
0~500	116	100	2	83			57	1	
500~1000	183	5		69		9	18	4	
1000~1500	31			142	10		114	8	
1500~2000				81		13	34	4	
2000~2500				12		3	4	112	
2500~3000				29			1		4
3000以上								1	3
合計	330	105	2	416	10	25	228	130	7

各海拔與物種調查之數量





2000公尺

3. 兩棲類基因多樣性分析

親緣關係與基因多樣性探討

- 設計研究物種專一引子，利用鏈聚合酶反應 (PCR)、基因定序等技術進行：
- 以粒線體DNA：CO-1、控制區(control region)、12S及16S，建立物種基因條碼並分析親緣關係及基因多樣性。
- 設計微衛星DNA引子，分析親緣關係及基因多樣性。

3.1 兩棲類基因多樣性分析

楚南氏山椒魚在本研究的採樣中，主要分布於合歡山區及820林道，這兩個樣點海拔高度相差600公尺，位置相距約7公里；分析其粒線體 DNA 中16S 之部分序列結果一致，可能屬於同一族群。

楚南氏山椒魚 (*Hynobius sonani*)



以鄰聚法分析楚南氏山椒魚粒腺體DNA中16S序列之親緣關係樹狀圖。

HM:合歡溪上游樣本；

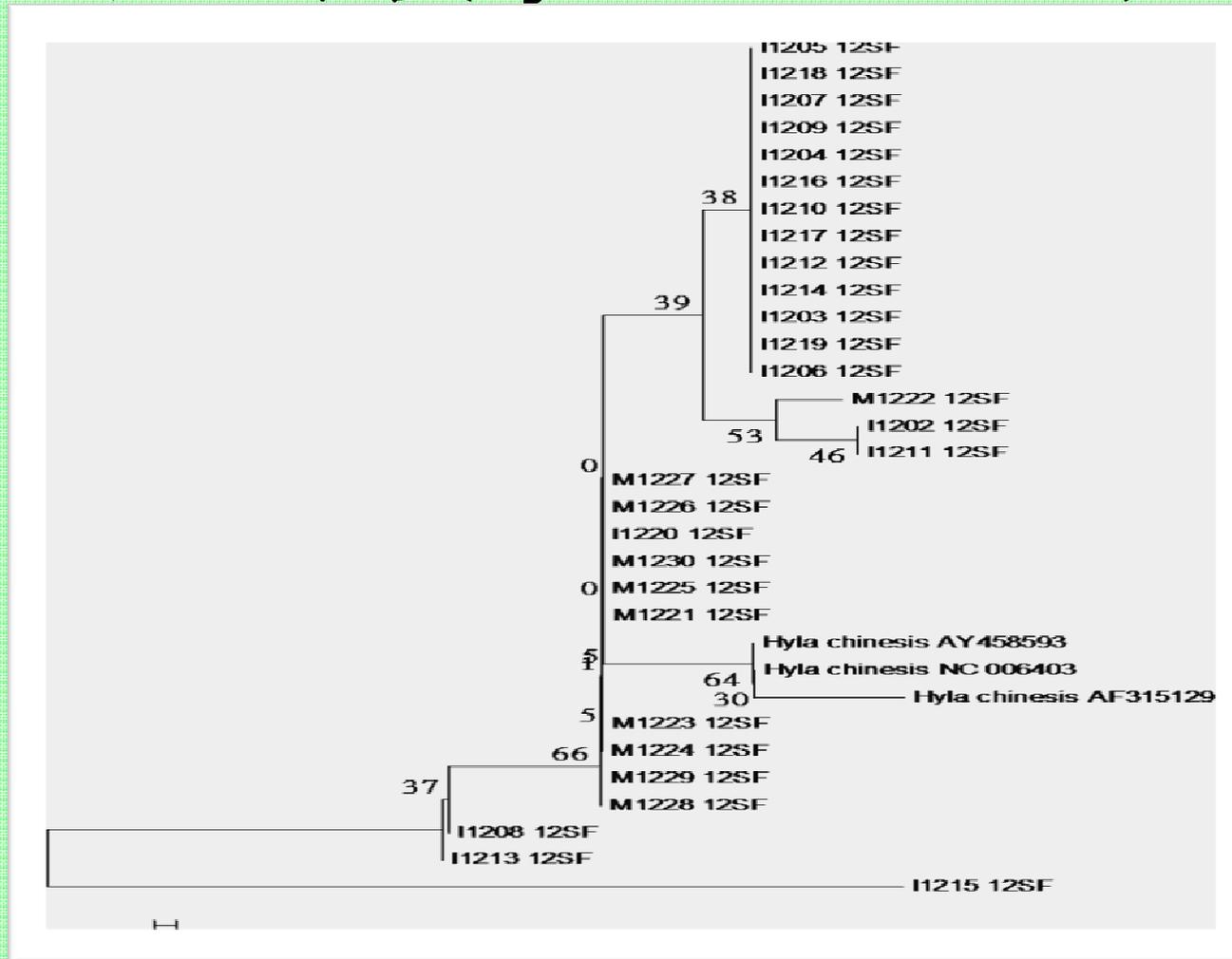
820:820林道樣本；

Hynobius formosanus: 台灣山椒魚, NCBI 資料庫DQ333816。

3.2 中國樹蟾基因多樣性分析

- 分析蓮花池、花蓮瑞穗之中國樹蟾粒線體DNA中12S及16S序列比對，發現中國樹蟾可能由於分布極為侷限，而產生地區之單一核苷酸多樣性(SNP)。

中國樹蟾 (*Hyla chinensis*)



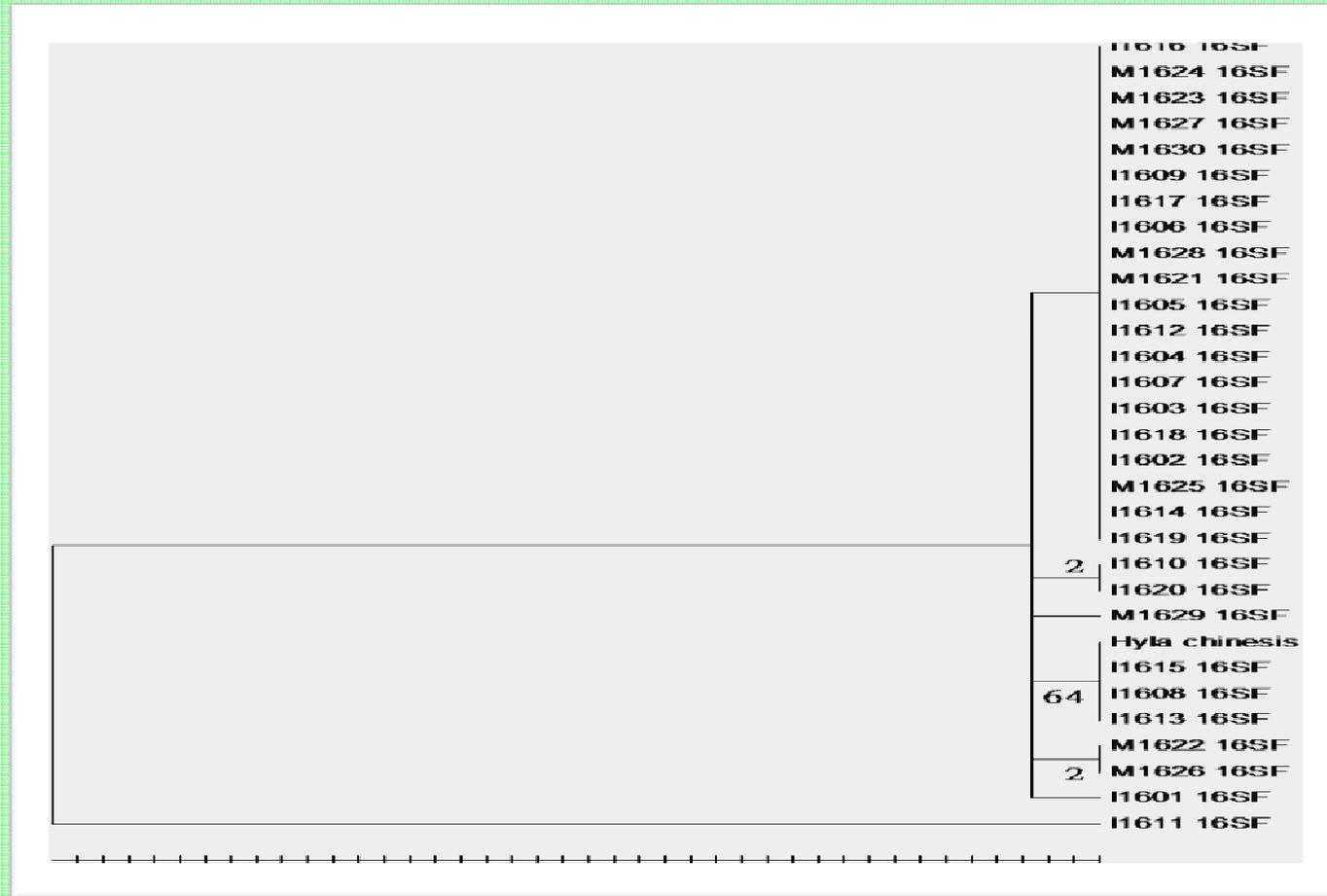
以鄰聚法 (NJ) 分析分析中國樹蟾粒腺體DNA中12S序列之親緣關係樹狀圖。

M1221~1230：蓮花池樣本；

I1201~1220：花蓮縣瑞穗樣本。

Hyla chinensis AY~AF：NCBI database

中國樹蟾 (*Hyla chinensis*)



以鄰聚法 (NJ) 分析分析中國樹蟾粒腺體DNA中16S序列之親緣關係樹狀圖。

M1221~1230：蓮花池樣本；

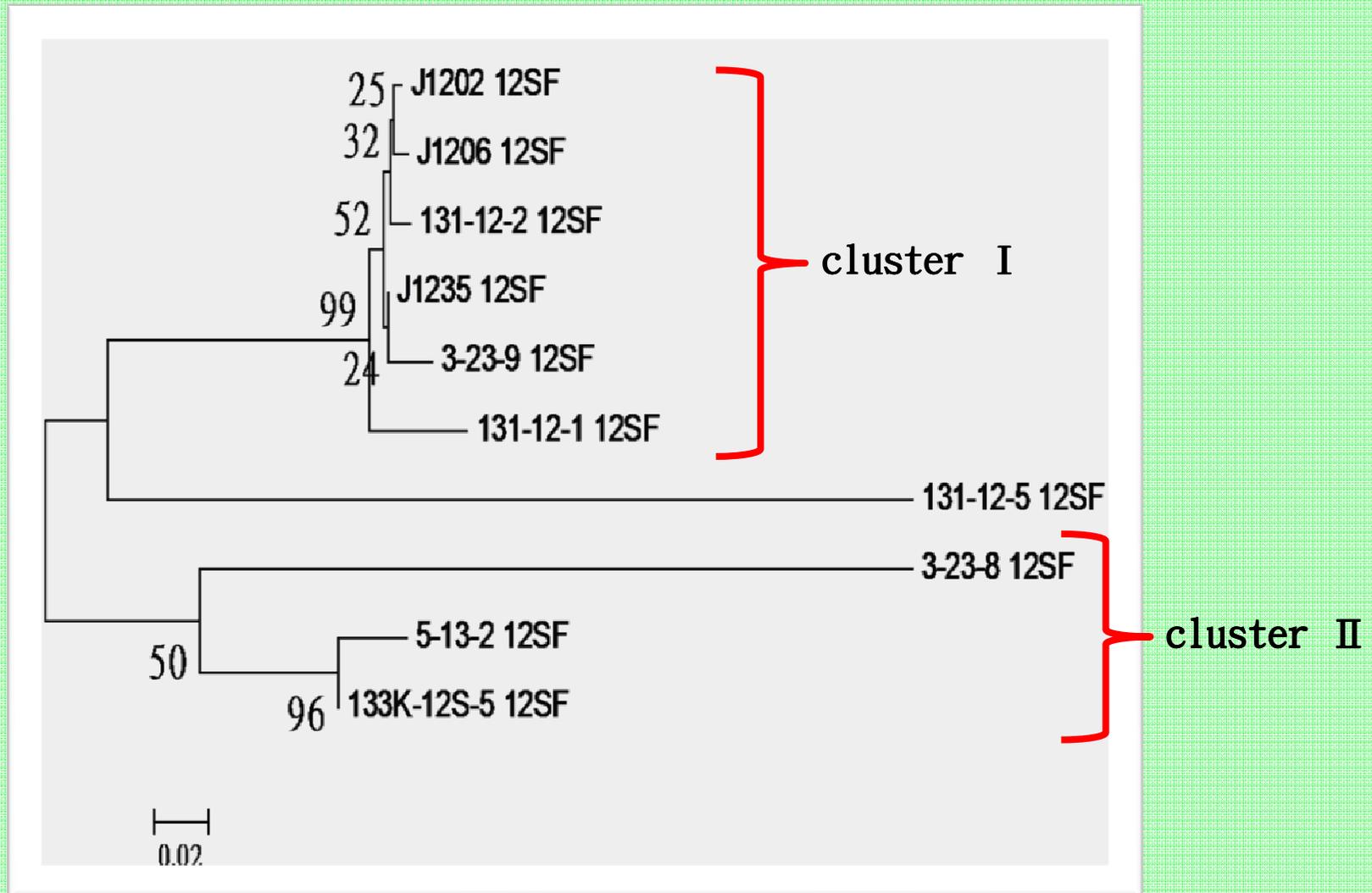
I1201~1220：花蓮縣瑞穗樣本。

Hyla chinensis：NCBI database

3.3 梭德氏赤蛙基因多樣性分析

在不同海拔採集到不同基因型之梭德氏赤蛙，此結果可能是源自於在不同海拔、環境溫度的族群，經長時間的淘汰及生殖隔離後，系群間亦逐漸產生遺傳變異。

梭德氏赤蛙 (*Rana sauteri*) -1

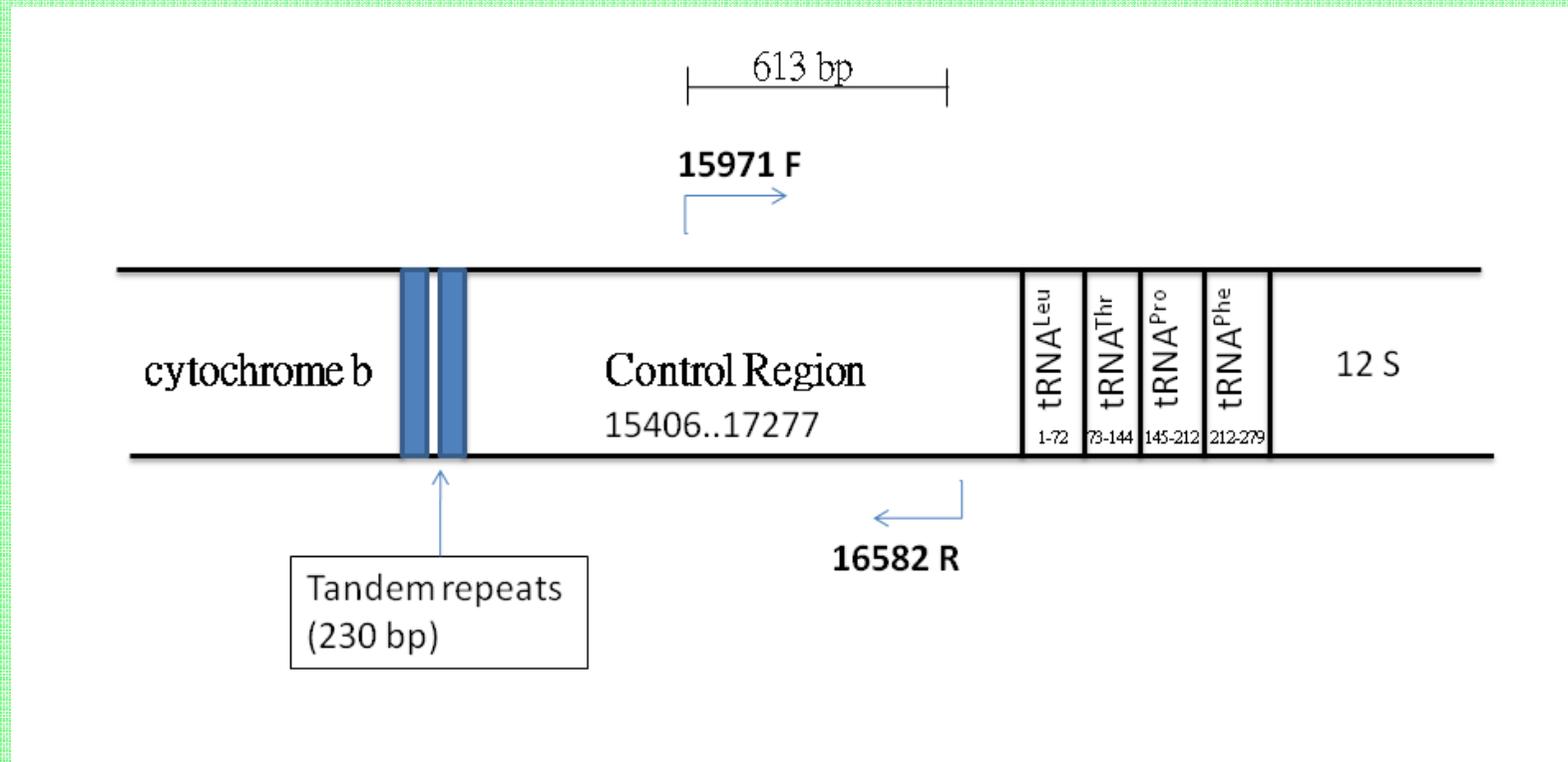


以鄰聚法分析梭德氏赤蛙粒腺體DNA中12S序列之親緣關係樹狀圖

3.4 盤古蟾蜍(*Bufo bankorensis*)基因多樣性分析

由上述資料可知兩棲類分布可跨過2000公尺海拔高度的盤古蟾蜍，依其親緣關係之分析，結果發現族群內可依此海拔高度線分出兩個類群(基因多樣性)。

中華大蟾蜍(*Bufo gargarizans*) 之粒線體結構 及盤古蟾蜍控制區引子相對位置



以鄰聚法分析分析盤古蟾蜍控制區(D loop) 單基因型的親緣關係樹

SK: 砂卡礑

BL: 布洛灣

S: 西寶

L: 洛韶

8K: 148K

Y: 新白楊

3K: 133K

29K: 129K

9K: 119K

DY: 大禹嶺

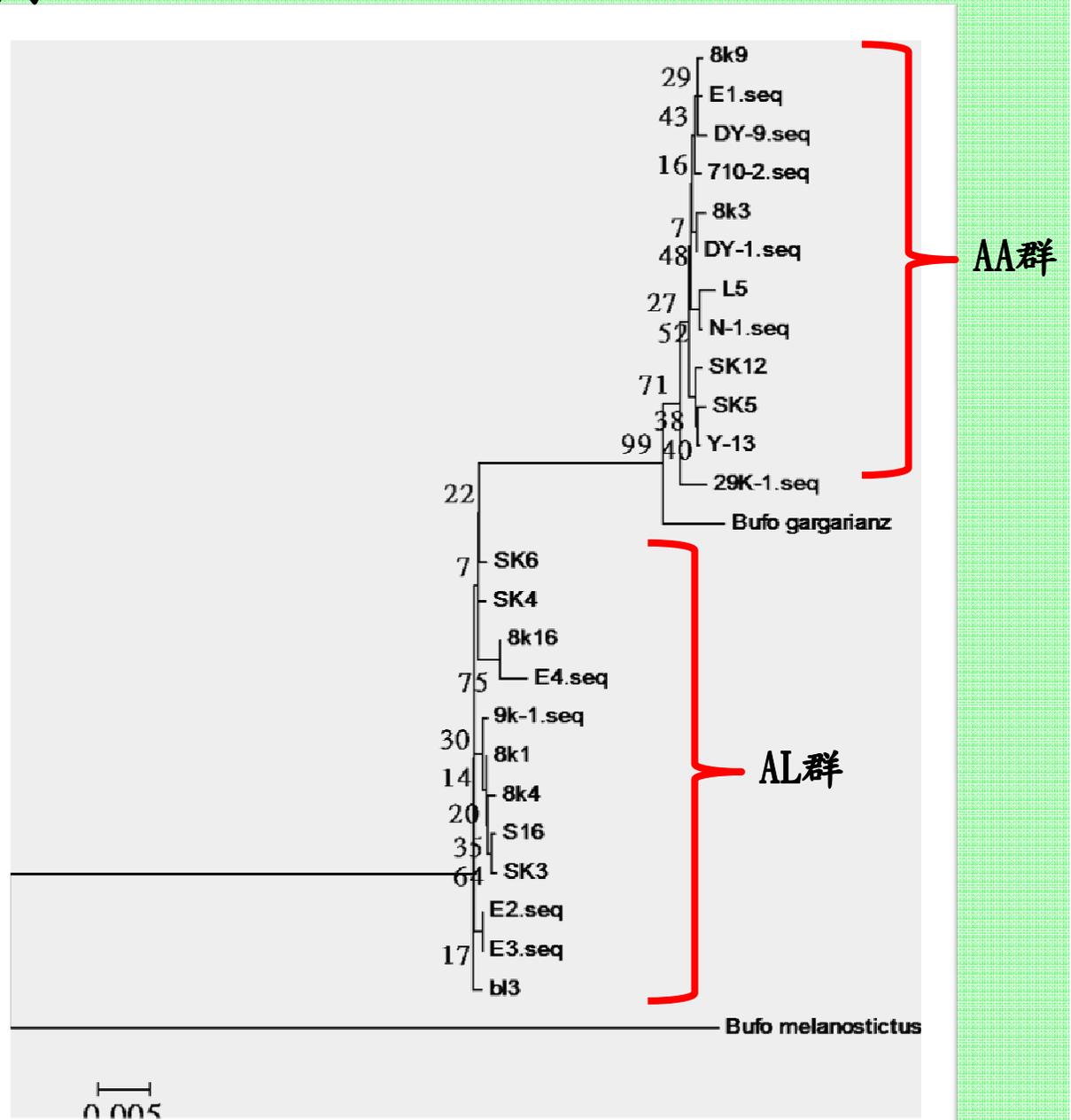
LO: 蓮花池

710: 710 林道

N: 南湖登山口

Bufo gargarizans from NCBI

Bufo melanostictus from NCBI



以最大簡約法分析分析盤古蟾蜍控制區(D loop) 單基因型之親緣關係樹

SK : 砂卡礑

BL : 布洛灣

S : 西寶

L : 洛韶

8K : 148K

Y : 新白楊

3K : 133K

29K : 129K

9K : 119K

DY: 大禹嶺

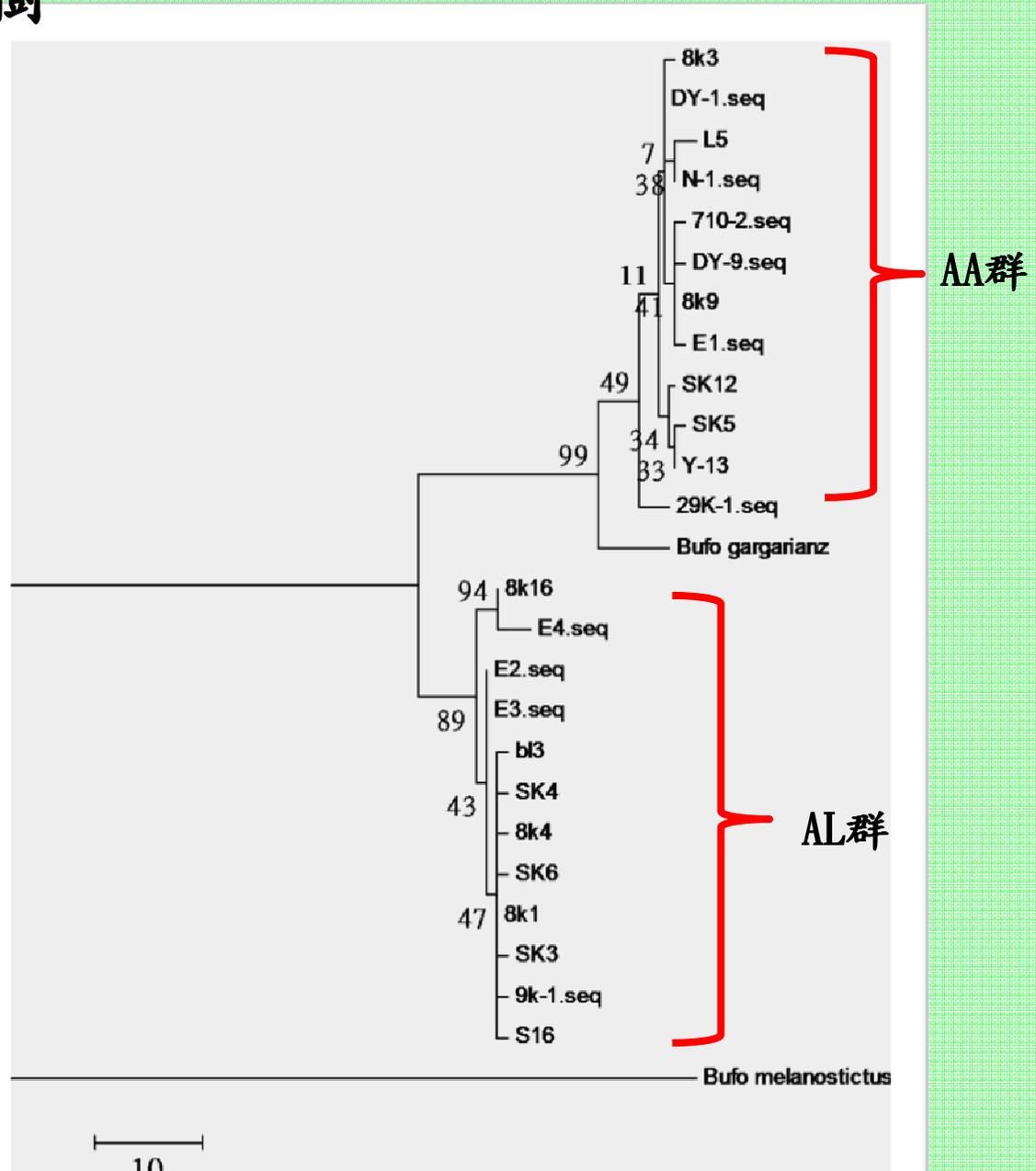
LO: 蓮花池

710: 710 林道

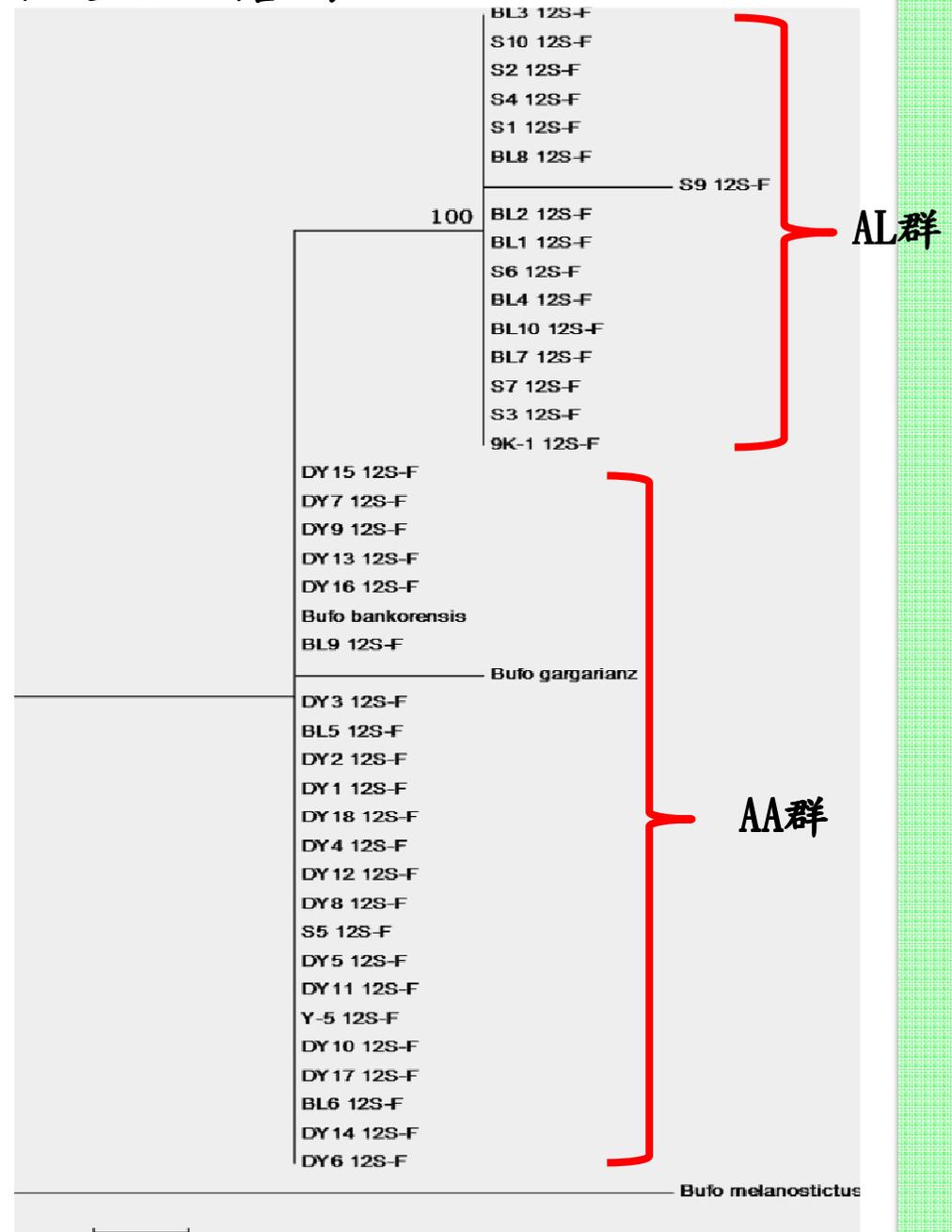
N: 南湖登山口

Bufo gargarizans from NCBI

Bufo melanostictus from NCBI



以鄰聚法分析分析高、低海拔盤古蟾蜍 12s單基因型的親緣關係樹



BL: 布洛灣

S: 西寶

Y: 新白楊

29K: 129K

9K: 119K

DY: 大禹嶺

Bufo bankorensis : from NCBI

Bufo gargarizans : from NCBI

Bufo melanostictus : from NCBI

以鄰聚法分析分析高、低海拔盤古蟾蜍 16s單基因型的親緣關係樹

BL : 布洛灣

S : 西寶

Y : 新白楊

29K : 129K

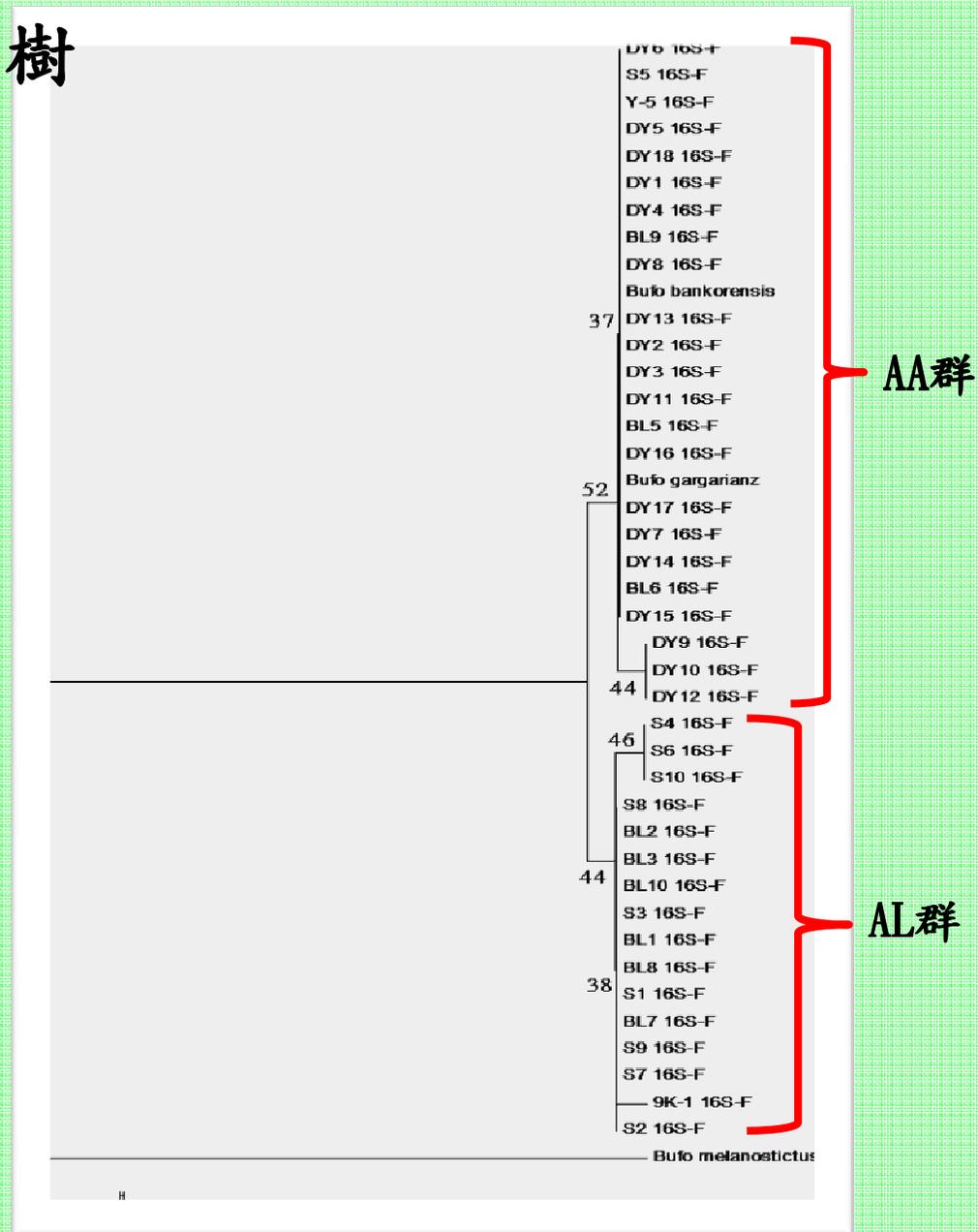
9K : 119K

DY : 大禹嶺

Bufo bankorensis : from NCBI

Bufo gargarizans : from NCBI

Bufo melanostictus : from NCBI



結論

1. Barcode (COI)已定序兩棲類8種，爬蟲7種；其中已上傳NCBI共8種。
2. 在採集調查的部分，發現盤古蟾蜍與斯文豪氏實際海拔分布均較文獻記載高，是否環境變遷影響有待證明。
3. 楚南氏山椒魚在本研究的採樣中，主要分布於合歡山區及820林道，兩個樣點海拔高度相差600公尺，位置相距約7公里；分析其粒線體DNA 16S 之部分序列結果一致，可能是屬於同一族群，並無分化現象產生。
4. 分析蓮花池、花蓮瑞穗之中國樹蟾粒線體DNA 12S，加入NCBI之序列比對，發現中國樹蟾可能由於分布極為侷限，而產生地區之單一核苷酸多樣性 (SNP)。
5. 梭德氏赤蛙之調查，在不同海拔採集到不同基因型之梭德氏赤蛙，此結果可能是源自於在不同海拔、環境溫度的族群，經過長時間的淘汰及生殖隔離後系群間亦逐漸產生遺傳變異。
6. 資料上兩棲類分布可跨過2000公尺海拔高度的盤古蟾蜍，依其親緣關係之分析，結果發現族群內可依此海拔高度線分出兩個類群(基因多樣性)。

7. 對於太魯閣國家公園園區內之兩棲類而言，發現2000公尺是一具有重要生態意義之分布海拔高度線。
8. 與數量分布的研究資料的比對，此一海拔高度是山椒魚這類已適應寒冷環境的兩棲類之分布下限，或斯文豪氏赤蛙等的分布上限；若從DNA變化的微觀角度，利用分子生物學技術進行分析，亦發現其分布界限相吻合。其中分布可跨越此一海拔高度的盤古蟾蜍，將可作為兩棲類探討生態系之綜合指標生物，瞭解生態環境受人為、氣候因子影響大小。
9. 本研究所建立之實驗平台，完成可做為基因條碼序列之CO1基因部份序列解碼，並將陸續上傳至NCBI Barcodes database，未來可繼續運用於其他物種之調查，建立更為完整之資料庫供作為太魯閣國家公園園區導覽資料，與世界生態、生物相關信息分享。

立即可行之建議

1. 珍稀物種DNA barcode資料之建立與上傳到國際基因條碼資料庫（The Barcode of Life Data Systems, BOLD），藉此基因條碼CO1序列公開，以昭告世界太魯閣國家公園亦從事基因多樣性建立及研究，並提昇太魯閣國家公園在國際間的知名度。
2. 太魯閣國家公園敏感性生物如兩棲類之族群分布及生態分析，進一步作為環境生態多樣性監測之用。
3. 特殊物種如中國樹蟾單點分布，可作為特殊區域如蓮花池之環境監測指標。
4. 利用盤古蟾蜍族群分布之特性，作為指標物種，以監測全球氣候變遷對太魯閣國家公園生態之環境影響。
5. 結合其它研究案，以盤古蟾蜍作為環境汙染指標物種，探討環境汙染源生物累積監控。
6. 將建立太魯閣園區珍稀物種資料庫中包括基因條碼CO1序列，以供作為訪客知性之旅，相關基因多樣性與生態多樣性研究及深度解說導覽之用。

中長期性建議

- 1、針對不同海拔高度設立長期監測樣區，長期監測氣候變遷壓力下對兩棲類族群的影響。
- 2、將盤古蟾蜍列入長期監測及研究的重要物種，以使在有限的資源下，能更有效的長期監測環境變化，對原有自然生態造成之改變，作為維持、保育園區內的生物棲地與生物多樣性之保育政策擬定之參考。

專有名詞

聚合酵素連鎖反應：Polymerase chain reaction, PCR，是一種體外快速擴增特定基因或DNA序列的方法。

粒線體基因組：全長序列16,640 bp，包括12S rRNA、16S rRNA、22個tRNA、13個蛋白質基因及D環區。13個蛋白質基因包括ND1、ND2、COI、COII、ATPase8、ATPase6、COIII、ND3、ND4L、ND4、ND5、ND6及Cytb。

CO-I基因：細胞色素氧化酶基因（cytochrome c oxidase subunit 1）。

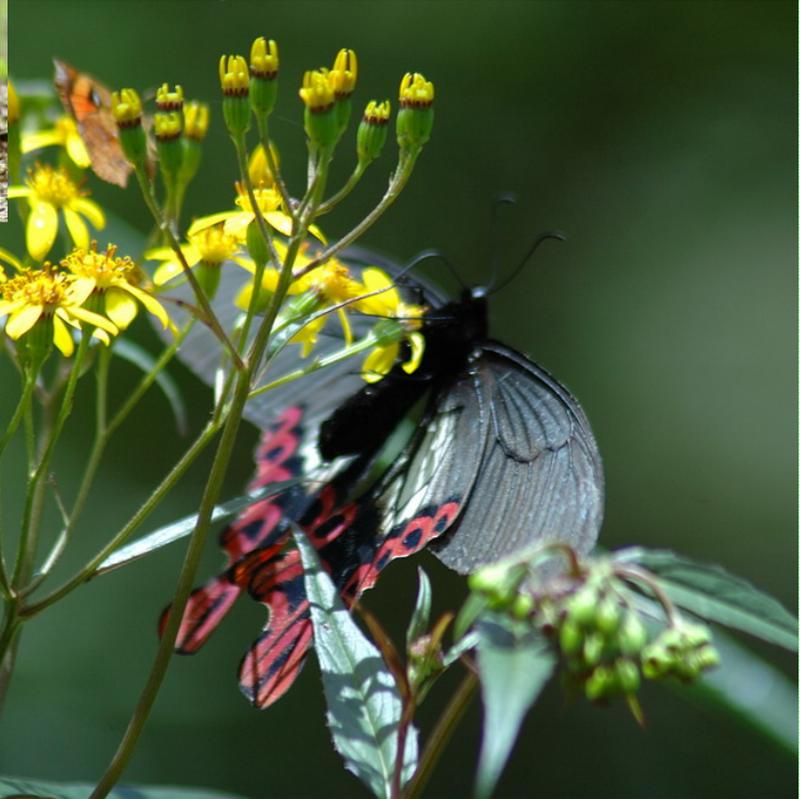
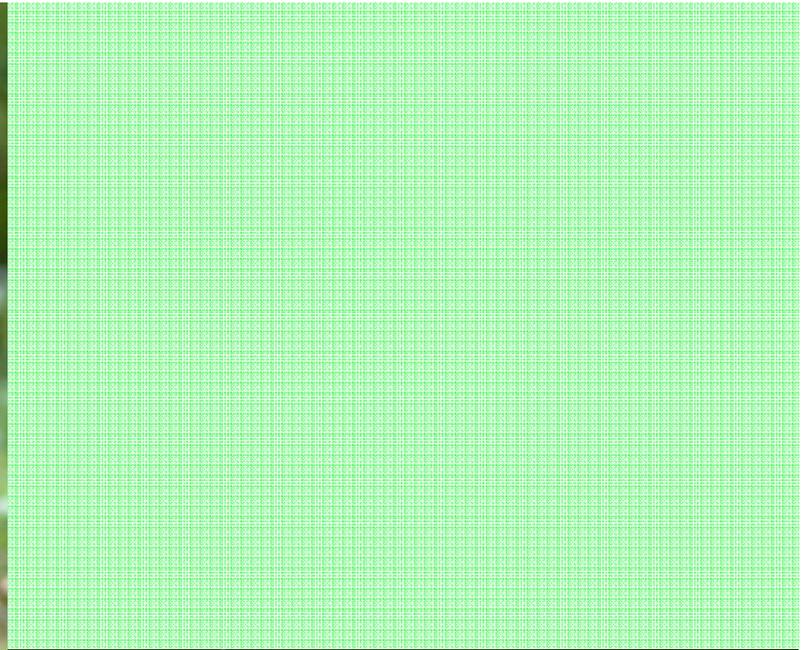
SNP：單核苷酸多態性（Single-nucleotide polymorphism, SNP），DNA序列因為單一核苷酸(A、T、C或G)發生變異，而使得基因體序列亦隨之改變。例如某段DNA序列由 ACGGCTAA 改變為 ATGGCTAA，若是這裡的C在整個族群的發生率大於1%時，也就是100人中至少有一例，便是所謂的SNP。

基因條碼：Barcode，動物分類利用CO-I基因，植物分類利用葉綠體基因為國際公認的生物基因條碼。

誌 謝

內政部營建署經費支持

太魯閣國家公園管理處同仁
協助採集樣本及照片提供



敬請指教
敬請指教

完成工作項目

1. 兩棲爬蟲類生命條碼 (Barcode)
2. 兩棲類分佈
3. 兩棲類基因多樣性分析

已完成基因條碼(Co1)

兩棲類：莫氏樹蛙。

爬蟲類：赤尾鮎、龜殼花、百步蛇、台灣蜓蜥
共計4種。

溫度對兩棲爬蟲類性別之影響

- Kettlewell, J.R., Raymond, C.S., Zarkower, D., 2000. Temperature-dependent expression of turtle Dmrt1 prior to sexual differentiation. *Genesis* 26, 174-178.
- Sakata, N., Miyazaki, K., Wakahara, M., 2006. Up-regulation of P450arom and down-regulation of Dmrt-1 genes in the temperature-dependent sex reversal from genetic males to phenotypic females in a salamander. *Dev Genes Evol* 216, 224-228.

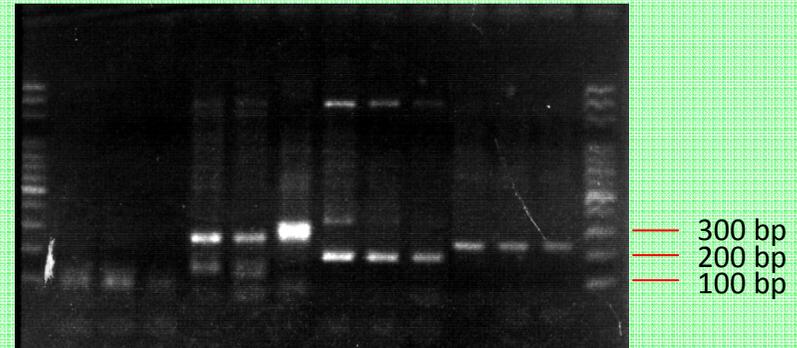
盤古蟾蜍微衛星座多型性初步探討

一、中華大蟾蜍微衛星座引子

Locus		Primer sequence (5' → 3')
<i>Bbuf</i> _μ 13	F	AGCCTACATTGCTCAATCCGATAC
	R	GTGGCGTGGAGGGTCATAAAATC
<i>Bbuf</i> _μ 23	F	ATCGCGTGGCTGATGG
	R	TGTGTATAATTTTGCCCGTTTAGG
<i>Bbuf</i> _μ 15	F	TCAATATAGGAGTCCCAGAATGTC
	R	AATCCCCTAGCGTACACAAGATAC
<i>Bbuf</i> _μ 16	F	GGATCTAAATGAGCATGTCTATTT
	R	GTGAACAAAATTTGAGAGTAATGG
<i>Bbuf</i> _μ 49	F	GATCTGGGCAGTGTGGATTG
	R	ATTCCGCTCGCTAAATGTCTCTTG
<i>Bbuf</i> _μ 54	F	CATTGCGCTGCTGCAGATTACAC
	R	TTAGGGATTGCCGTCCAGTTGTC
<i>Bbuf</i> _μ 65	F	GGATCTAAGCGCTGTGAGAGTGA
	R	CGGTCCGTGTTACCACTGATGC
<i>Bbuf</i> _μ 11	F	GTCAATGGATAATAAATGAGACC
	R	TCTAATATTGATGACCAGACAACC
<i>Bbuf</i> _μ 14	F	CGTGCAATGCAAGTGTACCTAACC
	R	ATGGAGAGTGAAGGGGAAAGAGTG
<i>Bbuf</i> _μ 24	F	TTTGGAGAGGGGAAAATTTCACAC
	R	CGGATTCTGTTGGGGTGTCTC
<i>Bbuf</i> _μ 39	F	GATCCCATCCACTGGTCA
	R	AAAAATGTCTCTTTCTCCCCTCTC
<i>Bbuf</i> _μ 46	F	GATTCCTGCCGTGAGCCCAGTG
	R	CGCCCGCCAAAACCTTCTGAAC
<i>Bbuf</i> _μ 47	F	GGATCAAGCCCTCAGACAACTC
	R	CACAGCAGCAGAAAATTTGACCAG
<i>Bbuf</i> _μ 62	F	GCACATTCCTGTGCCGTGTATAG
	R	ATTCCGAAAAACGAAAAGAAAAGAG
<i>Bbuf</i> _μ 63	F	TCCGGGCACCATCAAGTGTAC
	R	ATCATCATGGTTAGCGGCTCTTG

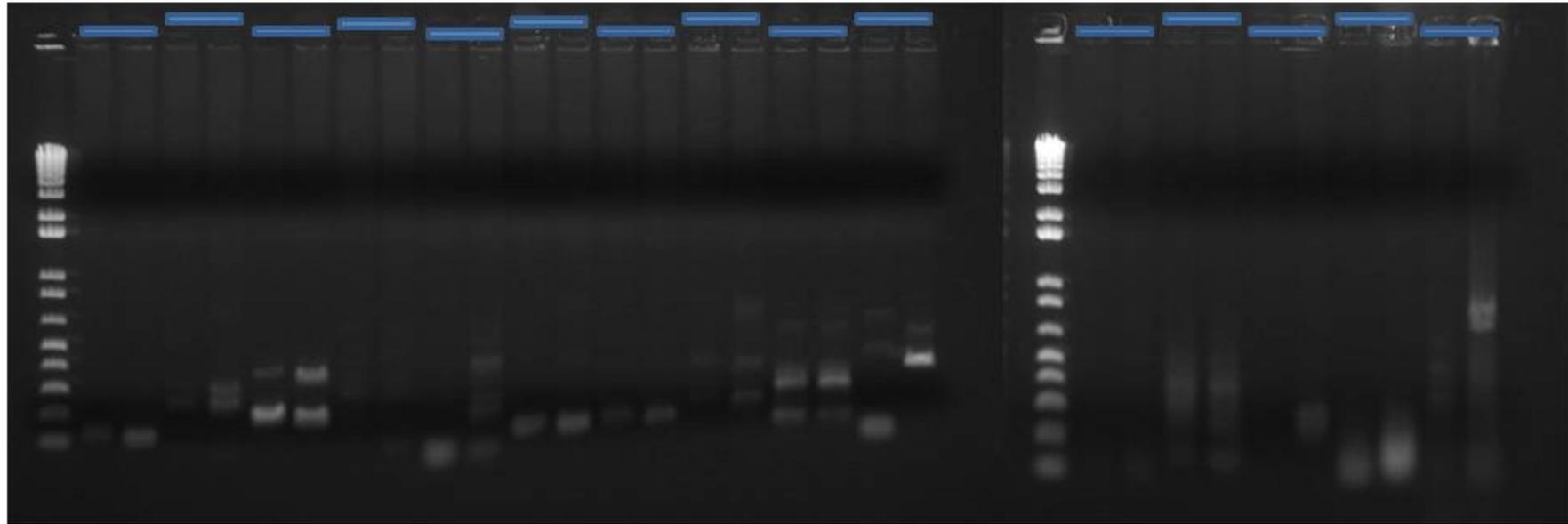
二、以PCR放大盤古蟾蜍微衛星座

*Bbuf*_μ 63 *Bbuf*_μ 46 *Bbuf*_μ 14 *Bbuf*_μ 49

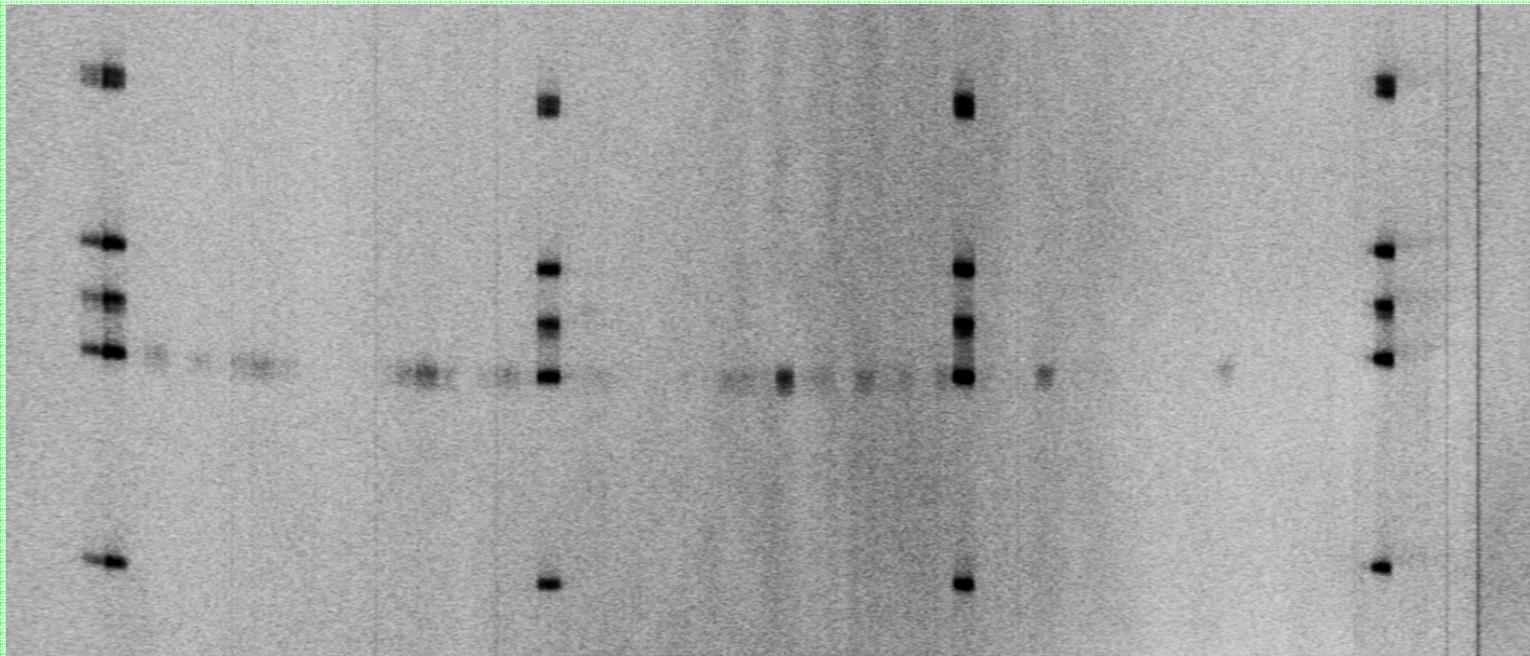


Bbafu 11 Bbafu 13 Bbafu 14 Bbafu 15 Bbafu 16 Bbafu 23 Bbafu 24 Bbafu39 Bbafu 46 Bbafu 47

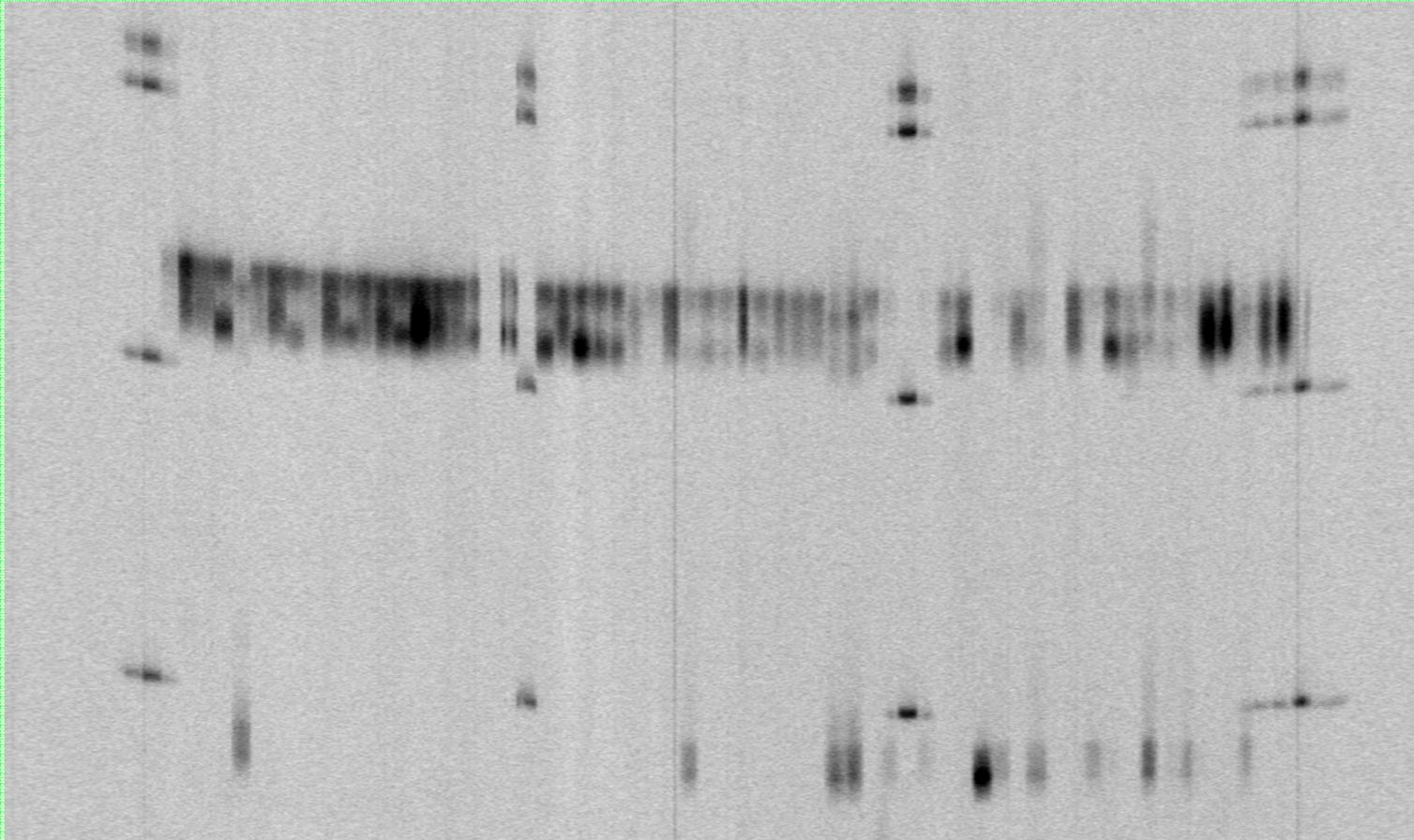
Bbafu 49 Bbafu 54 Bbafu 62 Bbafu 63 Bbafu 65



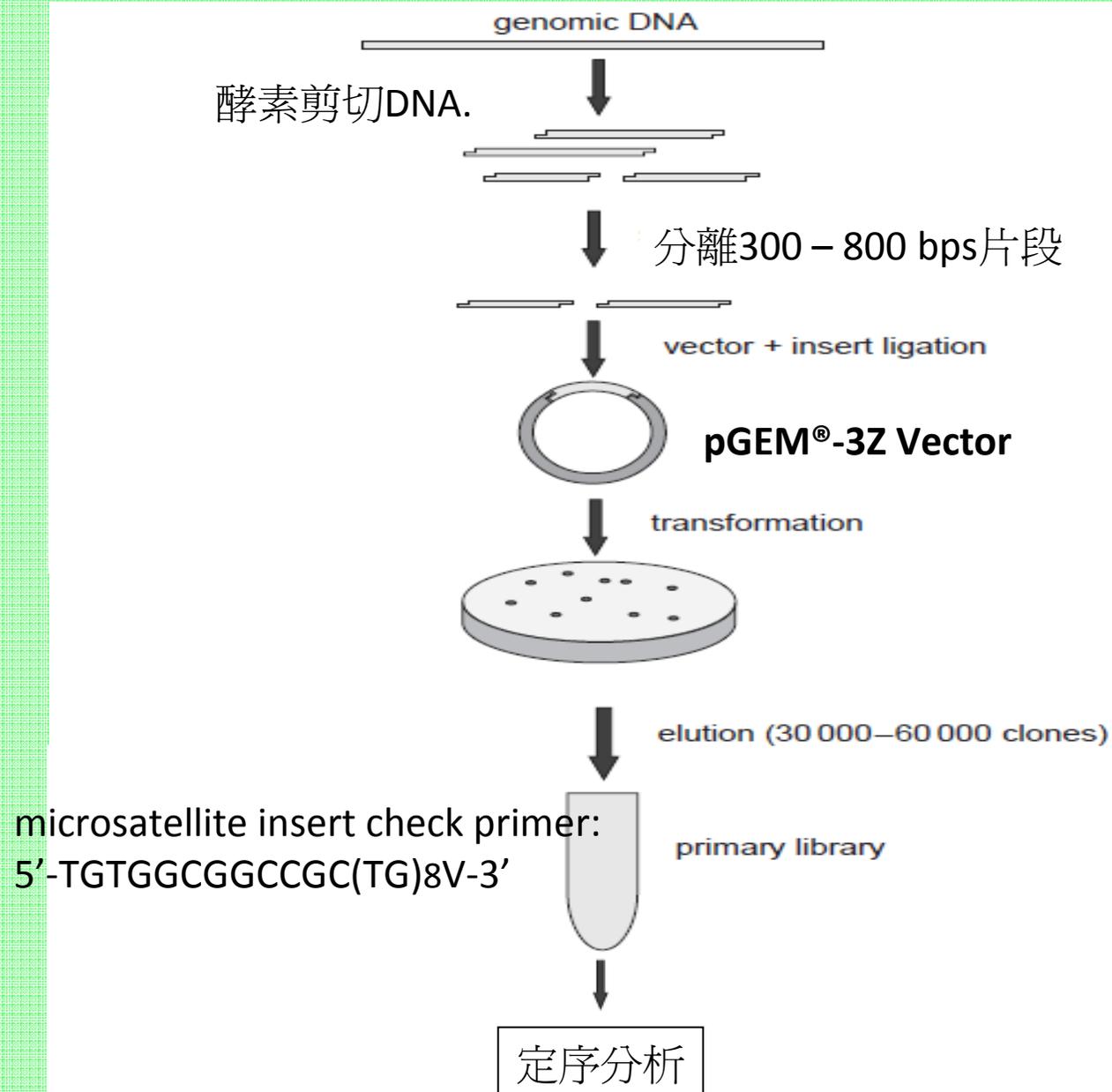
Bbufu 11多型性電泳分析圖



Bbufu 14 多型性電泳分析圖



微衛星 DNA 引子開發策略



盤古蟾蜍微衛星 DNA 篩選及引子開發：

bankorensis mi-1 序列：

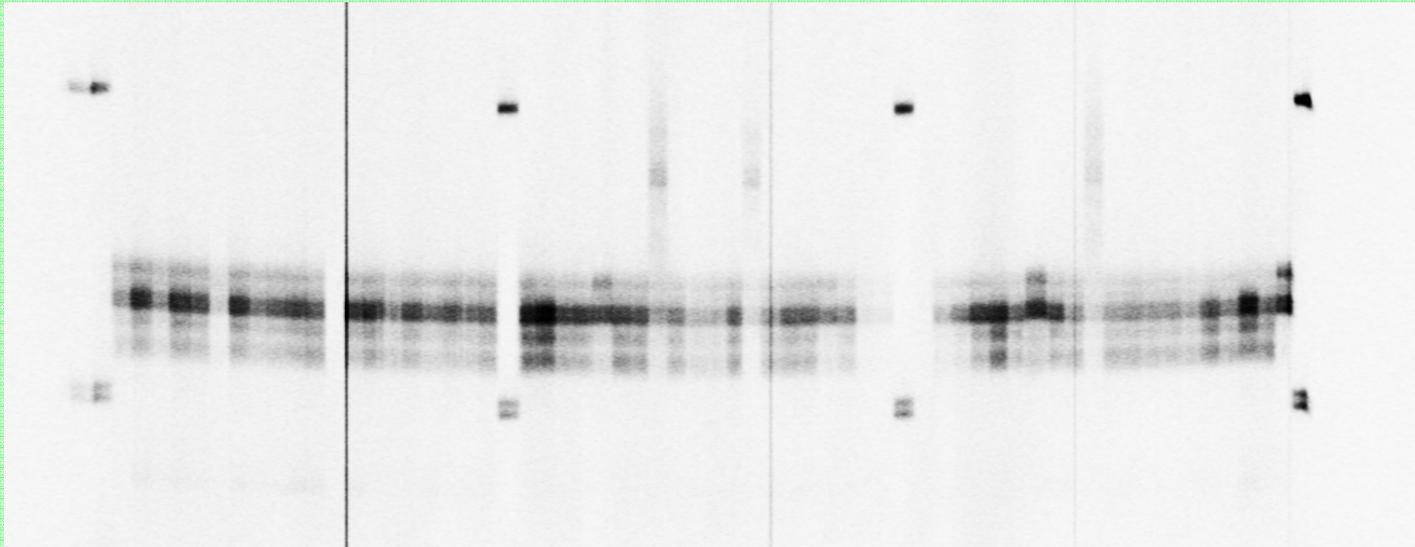
GAATTCAGAGGGTCCAGRGCGCTGGGAtCTGCGATAACAATGCTTAC
TGATGTAGTTTCAGCATTGTATACAGAACACAACAGATTCTAGACA
CTCTCTTGGGCCAGATTGCTGGAATCTGCCCTACAGACATGGTTT
TCCCATGTATTACACTGTAACTACAGAATACCACCGATTATGGACC
CTACAGGATGCCAGAGCTTTGAAATCTGTGATATAGGCCAGTTT
TCTGTTGAAACATACAGTATTGGTAACAGGGCTCCACCGATYAGGC
CCAGTTCATTGGAAACTGCCACACACCACACTGTTTTCTGACTTAC
CACACTGCTGGCTACAGAATGACACTGaTTCCAGAGAATTC

(CA)₅ repeats

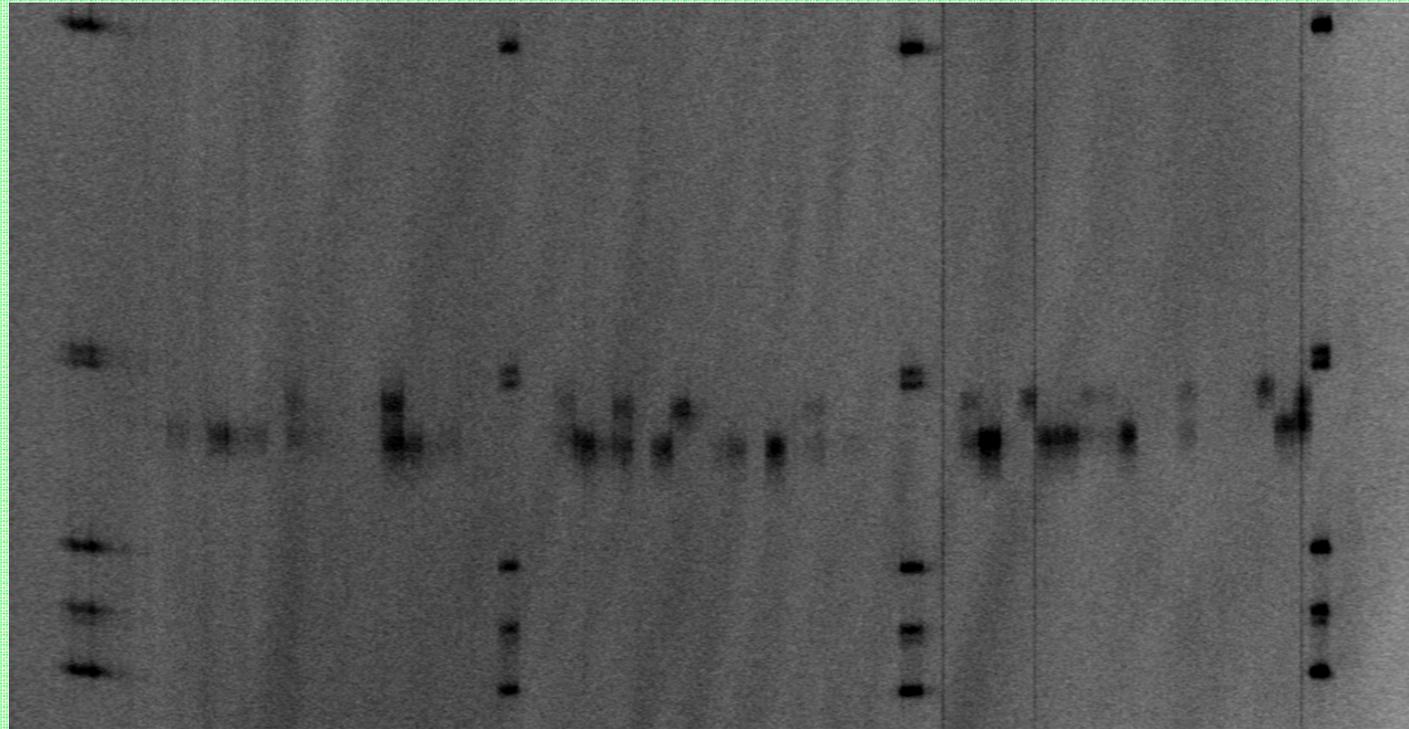
微衛星序列與基因多樣性

微衛星序列因其具有多對偶基因(multiallelic)、共顯性遺傳(codominance)、高度多型性、高再現性、易以聚合酵素連鎖反應偵測等優點，因此近年來被廣泛應用於DNA指紋分析、親本與品種鑑定、分子育種、族群遺傳研究與建立高解析度的遺傳圖譜。雖然微衛星序列標誌應用廣泛，是目前最具潛力及效用的分子標誌，藉上述此研究將現有生態多樣性與物種多樣性，溶入基因多樣性之中，以期建立完整生態系及並探討其可能變遷之因素。

Bbufu 24多型性電泳分析圖



Bbufu 23多型性電泳分析圖



以微衛星基因座分析盤古蟾蜍基因多樣性

以LICOR4300微衛星DNA分析系統進行分析工作，
基因位點（locus）只有一種基因型，不符合哈-溫平衡；
基因位點在進行DNA聚合酶連鎖反應放大時，可能同時
放大出兩個基因位點，不適用於盤古蟾蜍微衛星DNA多型性之分析。

尚待完成之工作

1. 基因條碼

2. 就擇定之物種進行物種之分子標記，分析其基因變異與基因流動範圍，擴大採集樣區。

3. 建立族群中公、母比例作為監控環境壓力引起雌性化之程度，作為國家公園是否受環境影響之指標及管理之參考，並可作為國家公園特有生物保育及復育之依據

兩棲類

- 1. 日本樹蛙(0~1500 m)
- 2. 褐樹蛙(0~1500 m)
- 3. 斯文豪氏赤蛙(0~2500 m)
- 4. 梭德氏赤蛙(0~3000 m)
- 5. 中國樹蟾(0~1000 m)
- 6. 小雨蛙(0~1500 m)
- 7. 盤古蟾蜍(0~3000 m)
- 8. 台灣山椒魚 (2100~3000 m)
- 9. 楚南氏山椒魚 (2600~3100 m)

爬蟲類

- 1. 呂氏攀蜥(1000~2000 m)
- 2. 斯文豪氏攀蜥(0~1500 m)
- 3. 台灣草蜥(0~1000 m)
- 4. 青竹絲 (0~1500 m)
- 5. 龜殼花(0~1000 m)
- 6. 菊池氏龜殼花(1500~2500 m)
- 7. 紅竹蛇(0~1000 m)
- 8. 雪山草蜥(1500~3000 m)
- 9. 中國石龍子(0~1500 m)
- 10. 麗紋石龍子(0~2500 m)
- 11. 青蛇(0~1000 m)

採集成體 (海拔、地理區域、月份、性別)

基因條碼的建立
MtDNA CO 1

基因多樣性研究 (親緣關係)
MtDNA (12S, 16S, microsatellite loci)

上傳至NCBI GeneBank

- 1. 親緣關係
neighbor-joining
- 2. 遺傳距離
Kimura's 2 parameter model

CO 1 : 細胞色素B條碼Cytochrome B
MtDNA(12S , 16S) : 粒線體DNA

誌 謝

內政部營建署經費支持

太魯閣國家公園管理處同仁
協助採集樣本及照片提供

結論與建議

比較分析過去文獻報告之資料與本年度計劃研究所得結果，我們發現對於太魯閣國家公園園區內之兩棲類而言，2000公尺是一具有重要生態意義之分布海拔高度線。從數量分布的研究資料的比對（表3-1、3-2），此一海拔高度是山椒魚這類已適應寒冷環境的兩棲類之分布下限，或是斯文豪氏赤蛙等的分布上限；若從DNA變化的微觀角度，利用現在的分子生物學技術進行分析，我們發現，在資料上分布可跨過此一海拔的盤古蟾蜍，依其親緣關係之分析結果（圖3-7、3-8），族群內其實已經可依2000公尺的高度線分出兩個類群，此現象可能是來自於隨海拔環境溫度變化所導致的演化結果。而從梭德氏赤蛙親緣關係之分析結果（圖3-3、3-4）來看，對於梭德氏赤蛙而言，在不同海拔、不同的環境溫度的是，經過長時間的淘汰及生殖隔離後系群間亦逐漸產生遺傳變異，因而我們可在不同海拔採集到不同基因型之梭德氏赤蛙。近年當最爲熱門之環境保護議題，當屬全球暖化與氣候變遷。由於兩棲類對環境條件變化十分敏感，本研究所建立之實驗平台，目前已對太魯閣國家公園園區內之兩棲爬蟲類共15種，包括如楚南氏山椒魚，呂氏攀蜥及中國樹蟾等，完成可做爲基因條碼序列之CO1基因部份序列解碼，

表 3-3 梭德氏赤蛙 12S 與 16S 之 Tajima's Method 中性假說檢定結果

	m	S	p_s	Θ	π	D
12S	29	123	0.715116	0.182095	0.137745	-0.940014
12S-133K	12	123	0.715116	0.236803	0.216702	-0.396840
16S	28	131	0.451724	0.116081	0.089409	-0.892972
16S-133K	10	141	0.470000	0.166138	0.174222	0.242059

The Tajima test statistic was estimated using MEGA4. All positions containing gaps and missing data were eliminated from the dataset (Complete deletion option). The abbreviations used are as follows: m = number of sites, S = Number of segregating sites, $p_s = S/m$, $\Theta = p/a_1$, and π = nucleotide diversity. D is the Tajima test statistic.

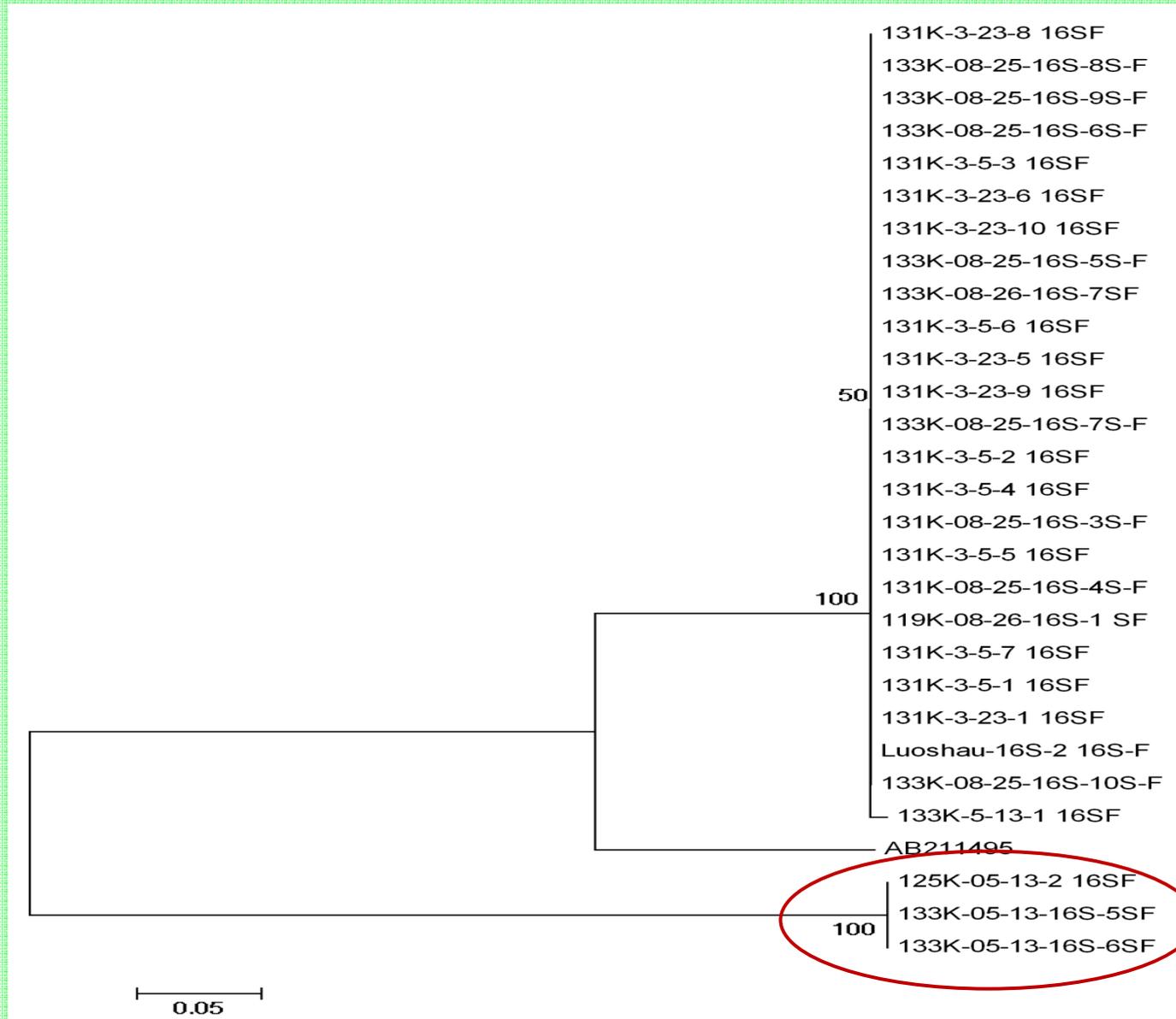
99年研究結果

報告大綱

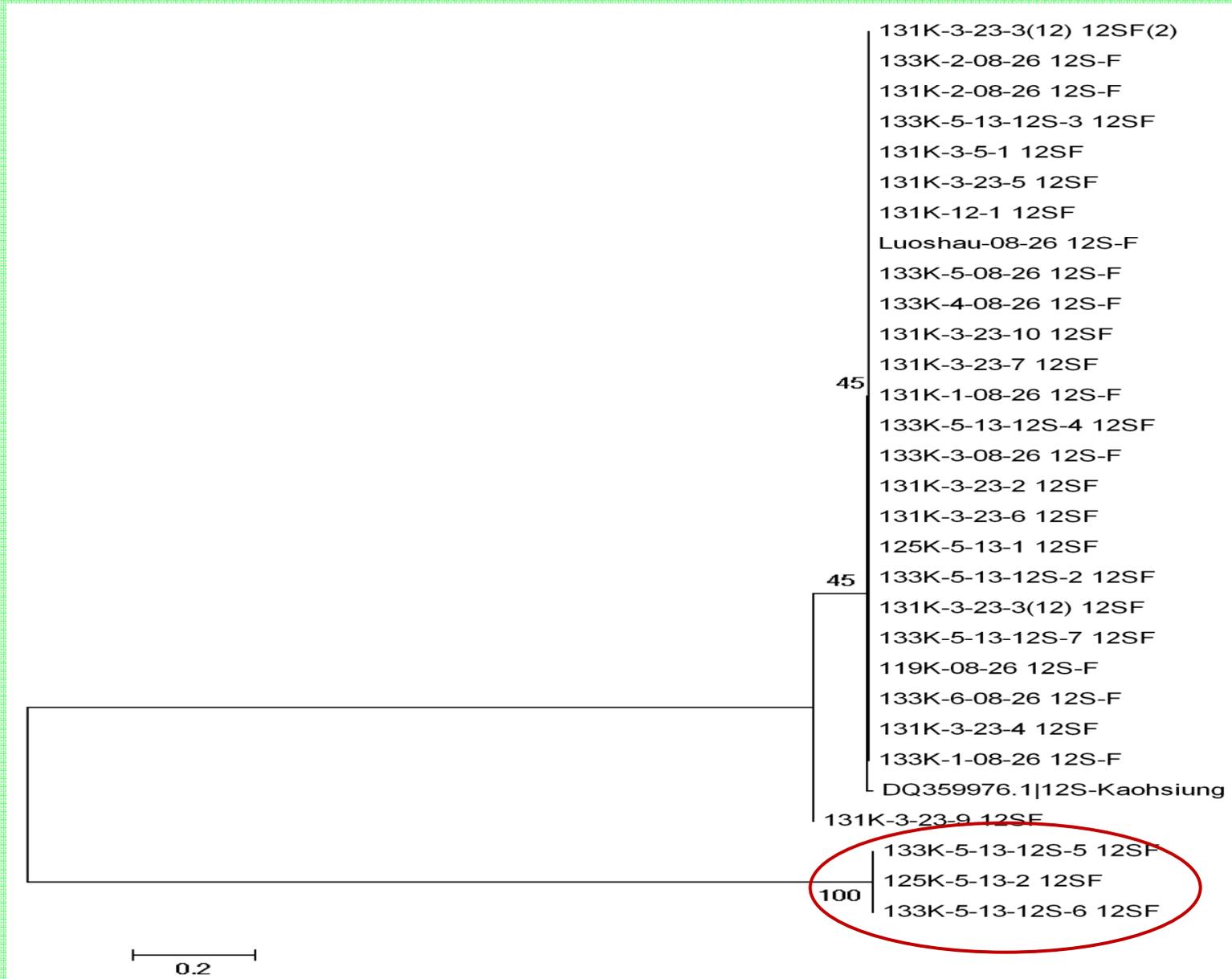
- 一、前言
- 二、98年成果
- 三、99年研究結果



以粒腺體DNA 16S序列對梭德氏赤蛙之親緣關係樹狀圖



以粒腺體DNA 12S序列對梭德氏赤蛙之親緣關係樹狀圖



尚未完成之工作

選擇定之兩棲爬蟲類物種完成分子標記，進行國家公園
行擇定物種之分子標記的比較，包括12S、16S及微衛
序列基因座 (microsatellite loci)，分析其基因
異與基因流動範圍，嘗試建立微動物地理分區。

只構國家公園生態保育之基因多樣性研究。針對此擇
物種之特殊基因或CO 1/ Mt DNA建立基因條碼，上
至NCBI基因銀行 (Genebank)、建立國家公園資料庫。

建立族群中公、母比例作為監控環境壓力引起雌性化
程度，作為國家公園是否受環境影響之指標及管理
參考，並可作為國家公園特有生物保育及復育之依據。

梭德氏赤蛙基因條碼(Co1)

學名：*Rana sauteri*

來源：中橫公路133K

```
TATTTGTATGATCTGTCCTAATTACTGCAGTCTTACTACTCCTTTTCTCTTCCTGTCTTAG
CTGCAGGAATTACTATACTATTAACAGACCGAAATTTAAATACCTCTTTTTTTGACCCGG
CGGGAGGAGGAGACCCAATCCTTTATCAGCACTTATTCTGGTTTTTTGGTCACCCCGAGG
TATATATTCTTATTTTACCAGGCTTCGGCATAATTTACATATTGTAACCTTATTATGCTG
GTAAAAGGAACCATTTCGGCTACATGGGTATAGTTTGAGCTATAATATCAATTGGGTTTT
TAGGGTTTATTGTCTGAGCTCATCATATGTTTACTGTCCGCATAGACGTCGACACTCGAG
CCTACTTTACCTCAGCTACTATAATTATTGCCATCCCAACAGGAGTTAAAGTCTTTAGTT
GACTTGCAACGCTTCACGGCGGAACAATAATGGGACGCTGCTATACTTTGAGCTCTTG
GTTTTATTTTTTTTATTTACAGTGGGGGGCCTAACAGGCATTATTTTAGCTAATTCTTCAC
TTGATATTGTCCTTCATGACACATACTACGTAGTTGCACACTTTCACTATGTATTATCAA
T
```



雪山草蜥基因條碼(Co1)

學名：*Takydromus hsuehshanensis*

來源：太魯閣合歡山

```
TATTTGTATGATCTGTCCTAATTACTGCAGTCTTACTACTCCTTTCTCTTCCTGTCTTAG  
CTGCAGGAATTACTATACTATTAACAGACCGAAATTTAAATACCTCTTTTTTTGACCCGG  
CGGGAGGAGGAGACCCAATCCTTTATCAGCACTTATTCTGGTTTTTTGGTCACCCCGAGG  
TATATATTCTTATTTTACCAGGCTTCGGCATAATTCACATATTGTAACCTATTATGCTG  
GTAAAAAGGAACCATTTCGGCTACATGGGTATAGTTTGAGCTATAATATCAATTGGGTTTT  
TAGGGTTTATTGTCTGAGCTCATCATATGTTTACTGTCGGCATAGACGTCGACACTCGAG  
CCTACTTTACCTCAGCTACTATAATTATTGCCATCCCAACAGGAGTTAAAGTCTTTAGTT  
GACTTGCAACGCTTCACGGCGGAACAATAATGGGACGCTGCTATACTTTGAGCTCTTG  
GTTTTATTTTTTTTATTTACAGTGGGGGGCCTAACAGGCATTATTTTAGCTAATTCTTAC  
TTGATATTGTCCTTCATGACACATACTACGTAGTTGCACACTTTCCTATGTATTATCAA  
T
```



楚南氏山椒魚C01基因條碼

學名：*Hynobius sonani*

來源：太魯閣 820林道

```
CACTTCACTTAGCAGGTATTTTCATCAATTCTTGGGGCTATTAATTTTATTACAACCTCAA  
TTAATATAAAACCCCTATCAATATCACAATATCAAACACCCTTATTTGTCTGATCAGTAT  
TAATCACTGCTATTCTCCTCTTACTCTCATTACCAGTCCCTTGCTGCAGGAATTACAATAC  
TCTTAACAGACCGAAACTTAAACACTACATTCTTTGACCCTGCAGGAGGAGGAGACCCTG  
TTCTTTACCAACACCTCTTCTGGTTTTTTGGCCATCCAGAGGTCTATATTCTTATTCTCC  
CAGGATTTGGGATAATTTCTCATATTGTTACATATTATTCGGCAAAAAAGAACCTTTTG  
GATATATAGGTATAGTATGAGCTATAATATCAATCGGATTACTAGGATTTATTGTTTGAG  
CCCACCATATATTTACAGTTGATCTTAATGTTGACACACGAGCTTATTTTACATCAGCTA  
CAATAATTATTGCTATCCCCACTGGGGTAAAAGTATTTAGCTGATTAGCAACAATACATG  
GAGGATCAATTAAATGAGATGCTGCAATATTATGAGCTTTAGGTTTTATTTTTTTATTTA  
CCGTTGGCGGATTAACCTGGCATTGTTCTTGCCAATTCATCATTAGATATTGTCCTACATG  
ATACTTATTATGTAGTGGCACATTTTCATTACGTTTTAT
```



盤古蟾蜍C01基因條碼

學名：*Bufo bankorensis*

來源：太魯閣砂卡礑

```
TACCCTATATCTTATTTTTGGGGCCTGAGCAGGGATAGTAGGAACTGCCCTT
AGCCTCCTTATCCGAGCTGAGCTGAGTCAACCCGGCTCCCTCTTGGGCGAT
GATCAGATTTATAATGTCATTGTTACCGCCCACGCCTTCGTCATAATTTTCTT
TATGGTCATGCCCATCCTAATCGGAGGCTTCGGTAACTGACTTGTCCCCCTG
ATAATTGGGGCCCCTGACATAGCCTTCCCCCGAATGAACAACATAAGCTTTT
GATTACTCCCCCATCATTCTACTCCTCTTGGCATCCGCCGGAGTCGAAGC
AGGAGCAGGAACCGGCTGAACTGTATACCCCCCTGGCTGGGAACCTTG
CACACGCAGGCCCATCAGTCGACTTAACCATTTTTTCCCTCCACCTTGCGG
GTGTATCATCTATCCTAGGCGCAATTAATTTTATTACAACAACCCTTAACATG
AAGCCACCATCAATGACTCAATACCAAACACCCTTATTTGTGTGATCCGTCT
TGATTACTGCTGTTTTACTCCTACTCTCCCTGCCAGTCCTCGCTGCAGGAAT
CACTATACTCCTCACTGACCGAAACCTAAACACAACATTCTTTGACCCTGCT
GGCGGAGGCGACCCCATCCTCTATCAACACCTCTTT
```



中國樹蟾C01基因條碼

學名：*Hyla chinensis*

來源：太魯閣蓮花池

```
TACTCTATACTTGGTATTTGGGGCTTGGGCTGGCATAGTAGGCACAGCCCTC  
AGCCTCCTAATTCGAGCAGAATTAAGCCAGCCTGGCTCCCTTCTAGGTGAC  
GATCAAATCTATAATGTCATCGTCACGGCTCACGCCTTCGTCATAATTTTCTT  
TATGGTTATACCAATCCTTATTGGGGGATTTGGAAACTGACTAGTCCCCTTAA  
TAATTGGCGCACCTGATATAGCCTTCCCACGAATAAACAATATAAGCTTCTG  
ACTTCTTCCACCATCTTTTCTTCTTCTTAGCCTCAGCAGGTGTTGAGGCA  
GGAGCAGGAACCGGATGAACTGTCTATCCACCCCTTGCCGGAATCTAGCC  
CATGCCGGCCCATCCGTAGACTTAACCATTTTTTCATTACATCTGGCAGGTG  
TCTCTTCAATTTTAGGAGCTATTAATTTTATTACCACAATTCTTAACATGAAA  
CCCCATCAATAACACAATACCAAACCCCGCTATTTGTTTGATCTGTTCTAAT  
CACTGCTGTACTTCTACTTCTTTCTCTCCCCGTGCTAGCAGCGGGTATTACC  
ATACTACTCACGGACCGAAACCTCAACACCACATTTTTTCGACCCGGCAGGA  
GGAGGGGACCCCGTACTATACCAACACTTATTC
```



斯文豪氏赤蛙C01基因條碼

學名：*Rana swinhoana*

來源：太魯閣砂卡礑

```
GACTCTATACCTAATCTTTGGCGCCTGAGCCGGGATAATCGGAACAGCCTTA  
AGCCTGCTAATTCGAGCGGAGCTCAGCCAACCAGGAACCCTGCTCGGCGA  
CGACCAAATCTATAATGTAATCGTAACCGCCCACGCATTTGTAATAATCTTCT  
TTATGGTTATGCCTGTTTTGATCGGAGGCTTCGGCAACTGACTAGTCCC GTT  
AATAATCGGGGCTCCTGACATAGCCTTCCCACGAATAAATAATATAAGCTTC  
TGACTGCTTCCACCCTCCTTCTTCCCTATTAGCATCTTCTATGGTAGAAGC  
CGGGGCTGGCACAGGCTGAACTGTCTATCCCCCCTGGCAGGGAACCTGG  
CTCATGCCGGCCCATCCGTAGACCTAGCTATCTTCTCCCTCCACCTAGCCGG  
AATTTCACTATCCTCGGGGCTATTAACCTTATTACAACAATTATTAATATAAA  
GCCCCAGCCATCGCCCAATACCAAACCTCCCCTCTTTGTCTGATCCGTTTAA  
ATCACC GCCATTCTTCTACTACTTTCTCTTCCCTGTTTTAGCCGCCGGAATCAC  
GATACTTCTAACTGATCGAAACCTTAATACCACCTTTTTTTGACCCAGCAGGA  
GGCGGAGACCCGGTCCTGTATCAACACCTGTTC
```

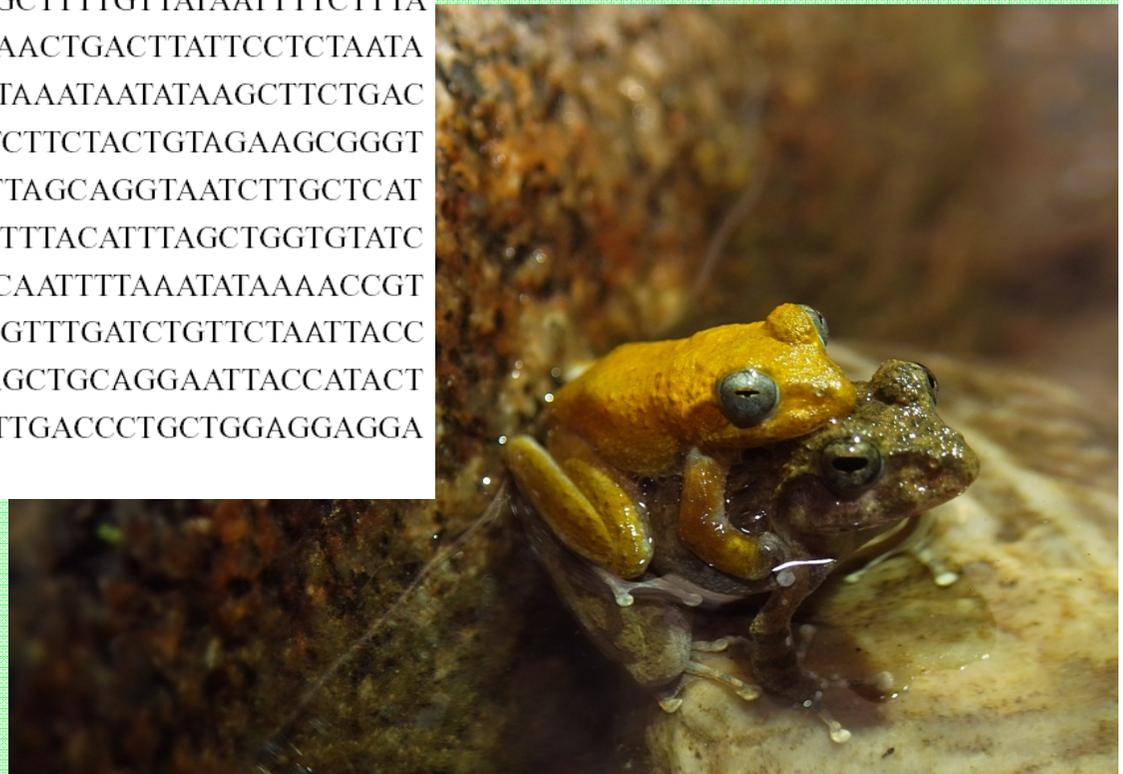


日本樹蛙C01基因條碼

學名：*Buergeria japonica*

來源：太魯閣砂卡礑

```
TACCTTATACTTAATTTTTGGTGCGTGGGCAGGTATAATTGGAAGTCCCTTA  
GCCTTTTAATTCGAGCTGAATTAGCTCAACCTGGATCACTGCTCGGTGACG  
ACCAAATTTATAATGTAATTGTTACCGCCCACGCTTTTGTATAATTTTCTTTA  
TAGTTATACCAATTTTAATTGGTGGATTTCGGGAAGTACTTATTCCTCTAATA  
ATTGGTGCCCCAGACATGGCCTTCCCTCGAATAAATAATATAAGCTTCTGAC  
TTCTTCCACCCTCATTTCTTCTTTTACTAGCCTCTTCTACTGTAGAAGCGGGT  
GTAGGAACCGGTTGAACAGTTTACCCCCATTAGCAGGTAATCTTGCTCAT  
GCAGGCCCATCAGTAGACTTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGTGTATC  
ATCAATTTTAGGGGCCATCAACTTTATTACTACAATTTTAAATATAAAAACCGT  
CATCAACTACACAATATCAAACCCCCCTGTTTGTGGATCTGTTCTAATTACC  
GCTGTTCTTCTTCTTCTATCTCTTCCCTGTTTTAGCTGCAGGAATTACCATACT  
TTAACAGACCGTAATTTAAATACTACATTCTTTGACCCTGCTGGAGGAGGA  
GATCCAGTTCTTTACCAACACCTTTTT
```



褐樹蛙C01基因條碼

學名：*Buergeria robusta*

來源：太魯閣砂卡礑

```
CACCTTATATTTAATTTTTGGCGCATGGGGCCGGAATAATCGGCACCGCACTT  
AGTCTTCTAATTCGGGCTGAACTCGCTCAGCCCGGGTCCCTCCTGGGAGAC  
ACCAAATTTATAATGTAATTGTCACTGCCCATGCCTTTGTTATAATTTTCTTTA  
TGGTCATGCCTATCCTAATCGGGCGGTTTTCGGAAACTGATTGGTCCCCCTAAT  
AATCGGGGCTCCTGATATAGCCTTTCCCCGCATAAACAACATAAGTTTCTGA  
CTACTACCTCCCTCATTTCTTCTACTACTAGCTTCCTCTACAGTTGAAGCAG  
GAGCTGGCACAGGGTGAAGTGTACCCCCCTAGCAGGAAATCTTGCTC  
ACGCCGGACCCTCTGTAGACTTAGCTATTTTTTCCCTTCACCTTGCAGGGAT  
CTCCTCGATTCTAGGGGCTATCAACTTCATTACAACCTATTCTGAACATAAAG  
CCTGCCTCAACGACACAATACCAAACACCCCTCTTTGTGTGATCTGTGCTA  
ATTACAGCAGTATTACTACTTCTGTCCCTTCCAGTCTTAGCTGCGGGGATTA  
CAATGCTTCTCACAGACCGCAACTTAAACACCACCTTTTTTGACCCAGCAG  
GCGGAGGTGACCCAGTATTATACCAACACCTATTT
```



青蛇C01基因條碼

學名：*Cyclophiops major*

來源：太魯閣砂卡礑

```
AACCCTATACCTACTATTCGGCGCATGATCTGGCCTAATTGGGGCCTGCCTA  
AGCATTCTTATACGAATAGAACTAACCCAACCAGGGTCGCTACTAGGCAGC  
GACCAAATCTTTAATGTTCTAGTAACAGCCCATGCTTTCATCATAATTTTCTT  
TATAGTAATACCCATTATAATCGGGGGCTTTGGAAACTGACTAATCCCCTTAA  
TAATCGGAGCACC GGACATAGCCTTCCCCCGCATAAATAATATGAGTTTTTG  
ACTACTTCCACCAGCACTACTCCTCCTTCTATCTTCATCTTATGTAGAAGCCG  
GTGCCGGTACAGGATGAACAGTATACCCCCCCTATCAGGAAATCTAGTAC  
ACTCAGGCCCATCAGTAGACCTAGCAATCTTCTCCCTACACCTAGCAGGCG  
CCTCCTCCATCCTGGGAGCAATTA ACTTCATTACAACATGTATCAACATAAA  
ACCTAAAGCTATACCAATATTCAATATCCC ACTATTCGTTTGATCAGTACTTA  
TCACTGCCATTATACTACTACTGGCCTTGCCAGTACTAGCAGCGGCAATCAC  
CATACTACTAACAGATCGAAACCTCAACACTTCTTTCTTTGACCCCTGCGGA  
GGAGGGGACCCTGTACTGTTCCAACACCTGTTC
```

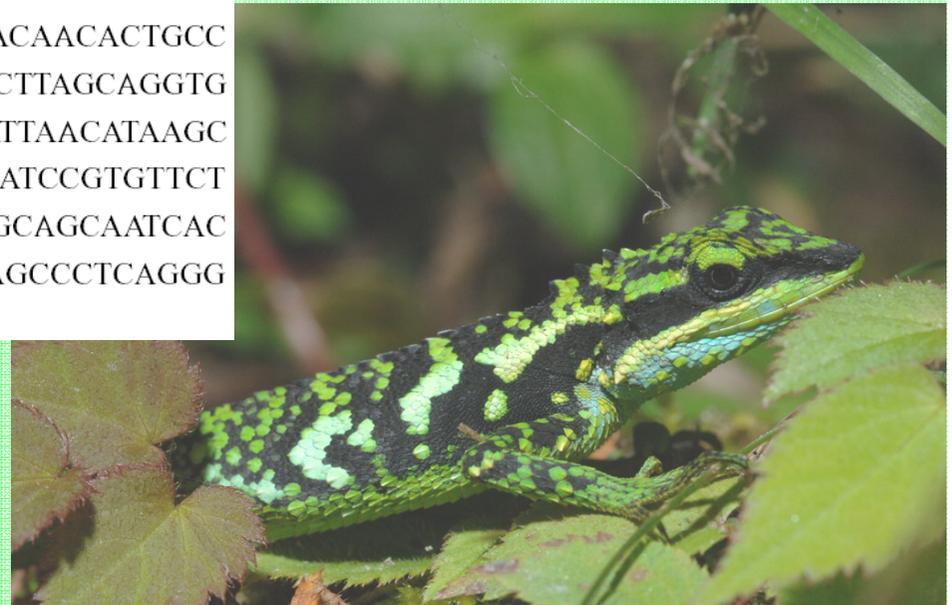


呂氏攀蜥C01基因條碼

學名：*Japalura luei*

來源：太魯閣和平林道

```
CACCATGTA CTTCC TATTCGGGACTGCAGCTGGCCTCACTGGGTC ACTGGTT  
AGCCTTCTTG TCCGTACACA ACTAATTCAGCCTGGACAA ACCATCGGAGGG  
GACTCCCTGTACA ATGTCTTTATCACATTCATGCCCTCGTTATAATTTTCTTT  
ATAGTCATA CCAATCATGATCGGCGGATTCGGAAACTGGCTGATTCCACTTA  
TACTCGGAGCCCCAGACATAGCATTCCC GCGAATAAACAACATAAGCTTCT  
GACTTCTACC GCCATCATTCTTCTTTTACTTTTATCCTCTGGGTTTCGAAGCC  
GGGGTCGGC ACCGGATGAACTATTTATCCGCCACTATCAAACAACACTGCC  
CACTGCGGGCCGTCCATAGATCTGGCCATCTTTTCTCTACACTTAGCAGGTG  
CCTCCTCAATTATGGCCGCCATCAACTTTATTACTACTTGTATTAACATAAGC  
CCAAATCTCACCTCACCATA CAACTGGCCTTTATTTGTCTGATCCGTGTTCT  
TCACCGCCATCCTTCTGCTACTGTCACTTCCTGTGTTAGCTGCAGCAATCAC  
CATGCTTCTTACAGACCGAAATCTCAACACATCATTCTTGAGCCCTCAGGG  
GGCGGAGACCCCGTCC TATTTCAACACCTGTTC
```



針對兩棲類進行焦點物種的評選工作

- 爬蟲類焦點物種分別是
 - 百步蛇(*Deinagkistrodon acutus*)
 - 雪山草蜥(*Takydromous hsueshanesis*)
 - 菊池氏龜殼花(*Trimeresurus gracilis*)
- 兩棲類焦點物種
 - 山椒魚包括台灣山椒魚(*Hynobius formosanus*)、**楚南氏山椒魚**(*Hynobius sonani*)
 - 莫氏樹蛙(*Rhacophorus moltrechti*)
 - 褐樹蛙(*Rhacophorus robustus*)
 - 中國樹蟾(*Hyla chinensis*)
 - 斯文豪氏赤蛙(*Rana swinhoana*)
 - 盤古蟾蜍(*Bufo bankorensis*)

中性理論（全稱為分子演化中性理論：
neutral theory of molecular evolution）
是日本遺傳學家木村資生（Motoo Kimura）
提出的一種演化理論（Kimura, 1968;
Kimura, 1983; Kimura, 1986）。這理論認為
在分子遺傳學的層次上，基因產生的突
變大多是中性的（neutral），對生物個體沒
有好處也沒有壞處。雖然這假說曾經造
成族群遺傳學者的誤解以及爭執（King and
Jukes, 1969; Fay and Wu, 2001），今日
這個論點已廣為接受，並且被發展成檢視基
因序列是否有受天擇作用影響的工具
（Fu and Li, 1993; Fay and Wu, 2001; Rozas *et*
al., 2003）。在討論族群遺傳變異的過
程中，如果能夠瞭解選用的基因是否來自中
性選擇，則可進一步討論其變異是否
受到外力篩選，以及推測遺傳變異資訊與地
理環境變動的關連性。

Tajima's D (Tajima 1989)及Fu's F (Fu 1997) ,
這些指數被
認為對偵測族群增加相當敏銳。此外，三個
山脈族群兩兩序列間核苷
酸數差異不相合分布(mismatch distributions)
用來評估阿里山山椒魚

- 104 -

的族群統計歷史。不相合分布若呈現單峰分
布(unimodal distribution)
表示族群在最近有族群量或者地理上的擴張
事件(expansion
event)(Excoffier 2004; Ray et al. 2003)。若是
族群在deme 數目固定時
曾進行過族群量或地理上的擴張將會有單峰
分布，而多峰分布表示一
個處於平衡狀態下的族群的隨機狀態。
Tajima's D、Fu's F 及不相合分
布皆在ARLEQUIN ver.3.11 (Excoffier et al.
2005)中計算。

PCR)，由於不同物種或是
個體間特定微衛星基因座的重複序列會因
DNA 複製時不均等的重組
(unequal crossing-over)，或是DNA 的滑動
(slipped-strand mispairing,
SSM)造成重複序列長度發生變異(Cozzolino
et al., 2003a)，而在物種
間或個體間產生高度多型性，以此作為鑑定
依據。

微衛星序列因其具有多對偶基因
(multiallelic)、共顯性遺傳
(codominance)、高度多型性、高再現性、易
以聚合酵素連鎖反應偵測
等優點，因此近年來被廣泛應用於DNA 指紋
分析、親本與品種鑑定、
分子育種、族群遺傳研究與建立高解析度的
遺傳圖譜(Ramsay et al.,
2000; Aranzana et al., 2003; Bao et al., 2003;
Cozzolino et al., 2003b;
Moriguchi et al., 2003)。Aranzana 等人(2003)
由桃(*Prunus persica* (L.)
Batsch.)中發展微衛星DNA 分子標誌，此技
術能有效鑑別出25 種栽
培種中的24 種，顯示其鑑別效力明顯高於
其他分子標誌(Aranzana et

- 「生命條碼」 「DNA條碼」 (DNA barcode) 一種創新、簡便、迅速的鑑識系統：粒線體基因片段以標示物種。提供類似ISBN全球通用碼，讓世界上每個物種都有獨特的身份證。
- 「生命條碼 (Barcode of Life, 簡稱BOL)」由加拿大分子生物多樣性研究所、演化生物學家艾伯 (Paul D. N. Hebert) 於2003年提出。赫伯特：「在熱帶地區長期工作，我已經面臨多數生物學家感受到的挫折：對周遭的生命系統卻一無所知」以避開繁瑣不便的分類工作。
- 目前所建置的資料庫中已有二十九萬條DNA條碼，涵蓋超過四萬種生物資料。
- 目前以CO-I基因 (cytochrome c oxidase subunit 1)，為國際公認的生物基因條碼。建立完成後的基因條碼更可與台灣生物多樣性資訊網 (TaiBNET) 結合，以提供更完整基礎科學資料，促進國際間科學與技術有關資料之標準化與相互合作交流。