

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

中華民國九十八年十一月

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

執行單位：中華民國國家公園學會

研究主持人：翁慶豐

內政部營建署太魯閣國家公園管理處

中華民國九十八年十一月

目次

目次	I
表次	III
圖次	V
摘要	VII
第一章 緒論	1
第一節 計畫緣起	1
第二節 計畫目標	2
第二章 調查範圍與研究方法	5
第一節 調查範圍	5
第二節 研究方法	8
第三章 研究結果	15
第一節 文獻收集與回顧	15
第二節 基因條碼建立	18
第三節 基因多樣性分析	25
第四章 結論與建議	31
附錄一 太魯閣國家公園兩棲類動物名錄	33
參考書目	35

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

表次

表 2-1	土地使用分區計畫面積分配表·····	6
表 2-2	中橫沿線不同海拔採集地點·····	13
表 3-1	兩棲爬蟲類樣本採集之物種及地點分布表·····	17
表 3-2	不同海拔之梭德氏赤蛙親緣關係樣本分佈表·····	26
表 3-3	梭德氏赤蛙12S與16S之Tajima's Method 中性假說檢定結果·····	26

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

圖次

圖 2-1	太魯閣國家公園土地使用分區計畫圖·····	7
圖 2-2	蛙類粒線體 12S DNA 序列及引子設計圖·····	8
圖 2-3	蛙類粒線體 16S DNA 序列及引子設計圖·····	9
圖 2-4	蛙類粒線體 COI DNA 序列及引子設計圖·····	10
圖 3-1	820林道-楚南氏山椒魚COI基因條碼序列·····	19
圖 3-2	砂卡礑-盤古蟾蜍COI基因條碼序列·····	20
圖 3-3	蓮花池-中國樹蟾COI基因條碼序列·····	20
圖 3-4	砂卡礑-斯文豪氏赤蛙COI基因條碼序列·····	21
圖 3-5	台8線133 K-梭德氏赤蛙COI基因條碼序列·····	21
圖 3-6	砂卡礑-日本樹蛙COI基因條碼序列·····	22
圖 3-7	砂卡礑-褐樹蛙COI基因條碼序列·····	22
圖 3-8	砂卡礑-青蛇COI基因條碼序列·····	23
圖 3-9	合歡山區-雪山草蜥COI基因條碼序列·····	23
圖 3-10	和平林道-呂氏攀蜥COI基因條碼序列·····	24
圖 3-11	以粒腺體DNA 12S序列對梭德氏赤蛙之親緣關係樹狀圖·····	27
圖 3-12	以粒腺體DNA 16S序列對梭德氏赤蛙之親緣關係樹狀圖·····	28
圖 3-13	樣區內梭德氏赤蛙mtDNA 12S基因型排列比對圖·····	29
圖 3-14	樣區內梭德氏赤蛙mtDNA 16S基因(Cluster II)與高雄型排列比對圖·····	30

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

摘要

目前國家公園動物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。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，國家公園對保育研究多著重於前兩項，但對基因多樣性卻少有探討。

多樣性的基因是物種適應與演化的重要基礎，基因的多樣性為地理上或生態上的區隔所造成之結果。將現有生態多樣性與物種多樣性之研究成果，溶入基因多樣性之中，以期建立完整生態系研究及並探討其可能變遷之因素。可為國家公園之經營管理提供更有利之基礎。

太魯閣國家公園座面積達九萬二千公頃。海拔高度從 60 公尺到 3740 公尺的南湖大山。在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。全區之兩棲類物種，計有 6 科 15 種，約佔全臺灣已知兩棲類物種之 43%。其中超過半數為臺灣特有種或珍貴稀有之保育類物種。

本計畫擇定之研究物種考量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。初步擇定之兩棲類包含日本樹蛙等 9 種，與爬蟲類包括呂氏攀蜥等 11 種。採集地點沿中橫線依不同海拔高度設定樣點。

本研究計劃，就擇定之兩棲爬蟲類物種完成分子標記，建立微動物地理分區建立園區物種之分子標記親緣關係架構，國家公園生態保育之基因多樣性研究。作為國家公園是否受環境影響之指標及管理之參考，作為國家公園特有生物保育及復育之依據。

基因多樣性、遺傳變異、基因條碼、功能性基因、性別決定基因

根據本調查之研究結果，針對太魯閣國家公園境內之兩棲類海拔分布調查及長期監測調查等事項，提出下列具體建議。以下分別從立即可行及中長期性建議加以列舉：

- 1、就擇定之兩棲爬蟲類物種完成分子標記，進行國家公園個體、物種、族群和保育單位鑑定，探知物種是否有外來個體的加入，並進一步探討其在國家公園生態系之扮演角色。與已知資料作比較，並建立物種之親緣關係。
- 2、進行擇定物種之分子標記的比較，尋找其間是否有基因變異，確定基因流動範圍，嘗試建立微動物地理分區。
- 3、架構國家公園生態保育之基因多樣性研究。針對此擇定物種之特殊基因或 CO1/ Mt DNA 建立基因條碼，上傳至 NCBI 基因銀行 (Genbank) 或建立國家公園資料庫。

中長期性建議

- 1、建議可針對不同海拔高度設立長期監測樣區，長期監測不同人為開發壓力下所造成的兩棲類族群的差異。各樣區地點及環境屬性分列如下：
 - ◎0~500 公尺—砂卡礑溪(溪流、遊憩區)、布洛灣(遊憩區)。
 - ◎500~1,000 公尺—梅園竹村步道(人為開墾區)。
 - ◎1,000~1,500 公尺—蓮花池(自然環境)、洛韶(人為開墾區)。
 - ◎1,500~2,000 公尺—慈恩(人為開墾區)。
 - ◎2,000~2,500 公尺—關原(遊憩區)。
 - ◎2,500 公尺以上—合歡溪上游(自然環境)。
- 2、建議在未來的保育研究中，可針對本研究中橫公路沿線兩棲類豐度較高的地點，深入公路周圍的自然環境進行兩棲類調查，或設置捕捉陷阱，以調查分析公路邊緣與周圍自然環境間兩棲類族群的差異，作為未來設置或改善生物廊道的依據。

- 3、建議針對兩棲類進行焦點物種的評選工作，選取具有指標性物種、護傘種功能的兩棲類為焦點物種，優先列入長期監測及保育的對象，以使在有限的資源下，長期監測環境的變化，並維持、保育園區內的生物棲地與生物多樣性。

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

第一章 緒論

第一節 研究緣起

目前國家公園動物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。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，國家公園對保育研究多著重於前兩項，但對基因多樣性卻少有探討。基因多樣性的是物種適應與演化的重要基礎，基因的多樣性為地理上或是生態上的區隔所造成之結果。將現有生態多樣性與物種多樣性之研究成果，溶入基因多樣性之中，以期建立完整生態系研究及並探討其可能變遷之因素。可為國家公園之經營管理提供更有利之基礎。

太魯閣國家公園座面積達九萬二千公頃。海拔高度從 60 公尺到 3740 公尺的南湖大山。在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。兩棲類的數量豐富容易監測，而且不論在水域或陸域生態系統中，都扮演重要的角色。兩棲類由於皮膚具有通透性，及水陸兩棲的生活史特性，使牠們成為反應環境變化的良好指標生物。已知本園區之兩棲類物種，計有 6 科 15 種，約佔全臺灣已知兩棲類物種之 43%。其中超過半數為臺灣特有種或珍貴稀有之保育類物種。

以往台灣國家公園動物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。近年來物種的定義以分子生物學、遺傳演化學之觀點之下已有不同詮釋。台灣自2000年起推動的生物多樣性方案，就方案「遺傳資源收集與保存」部份，開啟遺傳演化的保育研究，探討物種因為地理空間隔離產生種化及其應用。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。例如海拔二千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。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)，甚至使隔離的族群族群形成不同的物種，也就是異域種化 (allopatric speciation) 的過程。

生物多樣性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，國家公園對前二者已有所認知，但對基因多樣性卻少有探討。目前國家公園並不熟悉某些物種（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。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。

本計畫擇定之研究物種考量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。初步擇定之兩棲類包含日本樹蛙等 9 種，與爬蟲類包括呂氏攀蜥等 11 種。採集地點以中橫沿線不同海拔高度做為採集主要地點。

第二節 計畫目標

同種的生物生活在不同的區域，常因為地理上或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，利用粒腺體 DNA (mitochondrial DNA, MtDNA) 12S、16S 及 cytochrome B 等遺傳標記，藉以比較不同地區族群間的遺傳變異，及鑑定分布於太魯閣國家公園地區珍稀及指標物種的基因條碼，以此建立專屬於太魯閣國家公園地區珍稀及指標物種的識別碼，以利未來進行太魯閣地區族群遺傳結構比較，並建構專屬於台灣本土的分子指紋資料庫，用以作為後續保育及研究依據。

本研究之目的為：

- 1.就擇定物種完成分子標記，進行個體、物種、族群和保育單位鑑定，探知物種是否有外來個體的加入，並進一步探討其在生態系之扮演角色。與已知資料作比較，並建立物種之親緣關係。
- 2.進行擇定物種之分子標記的比較，尋找其間是否有基因變異，確定基因流動範圍，建立微動物地理分區。
- 3.架構國家公園生態保育之基因多樣性研究。針對此擇定物種之特殊基因或 CO 1/ Mt DNA 建立基因條碼，上傳至 NCBI 基因銀行 (Genbank) 或建立國家公園資料庫。

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

第二章 調查範圍與研究方法

第一節 調查範圍

太魯閣國家公園座落於花蓮、臺中及南投三縣，面積達九萬二千公頃。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。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，以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。

全區依國家公園區域內資源特性與現有土地利用型態研擬分區計畫，劃分為生態保護區、特別景觀區、史蹟保存區、一般管制區、遊憩區等五種分區，以為訂定保護計畫及利用計畫之基礎(各分區位置與面積，如表2-1、圖2-1 所示)。本研究限於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，設置不同海拔高度的採集樣區，進行兩棲爬蟲類動物之採集工作。

表 2-1 土地使用分區計畫面積分配表

分 區 別		面 積 (公頃)	百 分 比 (%)	備 註
生態保護區	生(一)	8,000	8.70	清水山
	生(二)	35,390	38.46	南湖中央尖山群
	生(三)	17,850	19.40	奇萊太魯閣山群
	生(四)	1,600	1.74	砂山—二子山區
	生(五)	950	1.03	富田山—立霧主山區
	生(六)	2,450	2.67	茶岩山—捫山稜脊以東
	合 計	66,240	72.00	
特別景觀區	合計	21,640	23.53	
史蹟保存區	合計	40	0.04	
遊憩區	太魯閣遊憩帶	40	0.04	含遊憩區第一級：太魯閣台地；第三級：和仁、大清水、崇德隧道北口、砂卡礑、長春祠。
	天祥遊憩帶	100	0.11	含遊憩區第一級：天祥；第二級：布洛灣、綠水合流；第三級：文山、谷園、蓮花池、西寶、洛韶、華綠溪。
	合歡山遊憩帶	90	0.10	含遊憩區第一級：關原、合歡山；第二級：昆陽、小風口；第三級：大禹嶺、慈恩、伍橋、武嶺。
	合 計	230	0.25	
一般管制區	管(一)	1,300	1.41	
	管(二)	100	0.11	
	管(三)	2,400	2.61	
	管(四)	20	0.02	西寶松莊
	管(五)	30	0.03	富世十二鄰、崇德三鄰
	合 計	3,850	4.18	
總 計		92,000	100	

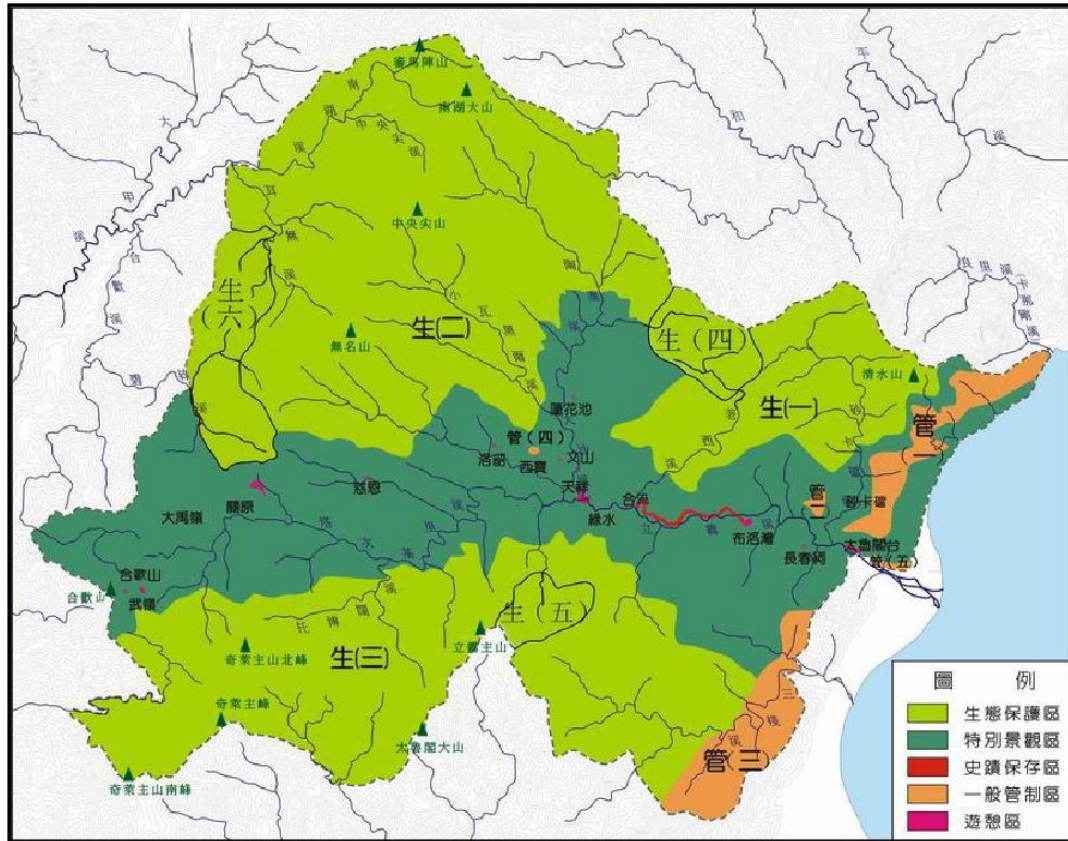


圖 2-1 太魯閣國家公園土地使用分區計畫圖

第二節 研究方法

(1) 引子的設計

廣泛搜尋前述珍稀及指標物種在 NCBI 資料庫(Genebank)中，已發表之相近物種的基因序列，從中對比並設計出該物種專一及功能性基因的引子，利用鏈聚合酶反應 (PCR)、限制酶酵素反應、基因定序等技術建立物種基因條碼。

12S引子的設計 參考NCBI基因庫(Gene Bank)資料庫中已發表的12S mtDNA 序列如下：斯文豪氏赤蛙 *Rana swinhoana* (AB200929)，梭德氏赤蛙 *Rana sauteri* (AB211472)，小雨蛙 *Microhyla ornate* (NC_009422)，中國樹蟾 *Hyla chinensis* (AY458593)，日本樹蛙 *Buergeria japonica* (AF118475)，盤古蟾蜍 *Bufo bankorensis* (AF160768)，褐樹蛙 *Buergeria robusta* (AF458125)，排列如圖 2-2，取其中保守序列約20個核苷酸的長度設計為專一性引子，其序列如下：

12S F - 5' - CTTAAACCCAAAGGACTTG -3'

12S R - 5' - GCTGCACCTTGACCTGACG -3'

```

AB200929      ACGCCAGGGAAGTACGAGCT-AGCTTAAACCCAAAGGACTTGACGGTGTCCAC--CC 492
AB211472      CCGCCAGGGAATACGAGCA-ATGCTTAAACCCAAAGGACTTGACGGTGTCCAC--CC 499
NC_009422     CCGCCCGGAATTACGAGCCAGCTTAAACCCAAAGGACTTGACGGTGTCCAC--CC 534
AY458593      TCGCCAGGGAAGTACGAGCT-AGCTTAAACCCAAAGGACTTGACGGTGTCCAC--CC 532
AF118475      ACGCTCGGTATTACGAGCT-AGCTTAAACCCAAAGGACTTGACGGTGTCCAC--CC 88
AF160768      TCGCCAGGGAAGTACGAGCT-AGCTTAAACCCAAAGGACTTGACGGTGTCCAC--CC 89
AF458125      ACGCCAGGGAATACGAGCT-AGCTTAAACCCAAAGGACTTGACGGTGTCCAC--CC 102
*****

AB200929      CCCTAGAGGAGCCTGTTCTTATAATCGATGATCCCGCTACACCCACCAACCCCTTGCTCG 552
AB211472      CACTAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGATGATCCCGCTACACCTAACCCCGCTCGCCCA 559
NC_009422     ACCTAGAGGAGCCTGTTCTGTAATCGATTCCCGGATCTACCTCACCATTCTAGCTTT 594
AY458593      ACCTAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGATAACCCCGCTTAACCTCACCATTCTTAGCA-A 591
AF118475      ACCTAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGATGATCCCGCTATACCAACCAATTTCTTGCTTA 148
AF160768      CCCTAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGATAATCCAGTTAAACCTCACCATTCTTAG-TTA 148
AF458125      ATCTAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGATAATCCAGTTATACCTTACCATTCTTAGCTTT 162
*****

AB200929      -T--CAGTCTGTATACCTCCGTCGAAAGCCTACCGTGTGAACGTT-TACAGTAGGCTC-A 607
AB211472      -T--CAGTCTGTATACCTCCGTCGAAAGCCTTACCATGTGAACGCC-CGCACTAGGCTC-A 614
NC_009422     -TTTCAGCCTGTATACCTCCGTCGTAAGCTTACCATATGAACGTTTCTCAGTCAGCTA-A 652
AY458593      -TATCAGCCTGTATACCTCCGTCGTAAGCTTACCCCGTGAGCGCTATCTAGTCAGCTC-A 649
AF118475      CTTCAGCCTGTATACCTCCGTCGTAAGCTTACCGTTGAATGTTTAAATAGTAGGTTCTA 208
AF160768      CT--CAGCCTGTATACCTCCGTCGTAAGCTTACCCCGTGAGCGCAATAGTCAGCTT-A 205
AF458125      TT--CAGCCTGTATACCTCCGTCGTAAGCTTACCGCTTGAACGCATAAAAGTGTGTCC-A 219
*****

AB200929      ATGACCTCCCGCGTTCGTCATACGTCAGGTCAAGGTGCAGCTTAAGGACCGGAAGTA 667
AB211472      GTGATTACCC-----ATCAACAGTCAGGTCAAGGTGCAGCTCAAGGAGCGGAAGTA 667
NC_009422     AAGATTTCCTC-----ATAAATAGTCAGGTCAAGGTGCAGCTCAAGGAGTGGCAAGCA 706
AY458593      ATGCTTTTAC-----ATCAATAGTCAGGTCAAGGTGCAGTAAATGAAATGGGAAGAG 702
AF118475      ATGCCCCACCC-----GTCAATAGTCAGGTCAAGGTGCAGCTTATGAAATGGGAAGCA 261
AF160768      ATGTTTATTC-----ACCAACAGTCAGGTCAAGGTGCAGCAATGAAATGGGAAGAG 258
AF458125      ATGCCACCCC-----ACCAGCAGTCAGGTCAAGGTGCAGCTCATGAAATGGGAAGCA 273
*****
```

圖 2-2 蛙類粒線體 12S DNA 序列及引子設計圖(如框內所示)

16S引子的設計 參考NCBI基因庫(Gene Bank)資料庫中已發表的16S mtDNA序列如下：褐樹蛙 *Buergeria robusta* (AF026370)，日本樹蛙 *Buergeria japonica* (AF026369)，小雨蛙 *Microhyla ornate* (NC_009422)，斯文豪氏赤蛙 *Rana swinhoana* (AB200953)，盤古蟾蜍 *Bufo bankorensis* (AF159589)，中國樹蟾 *Hyla chinensis* (AY458593)，排列如圖 2-3，取其中保守序列約20個核苷酸的長度設計為專一性引子，其序列如下：

16S F1- 5' - TATAAGACGAGAAGACCCC -3'

16S R1- 5' - ACCCTGATCCAACATCGAG -3'

AF026370	TGATCTCCCGTGAAGAAGCGGGGATATTCC	TATAAGACGAGAAGACCCC	ATGGAGCTTC	135
AF026369	TGATCTCCCGTGAAGAAGCGGGGATAATTA	TATAAGACGAGAAGACCCC	ATGGAGCTTC	135
NC_009422	TGATCTCCCGTGAAGAAGCGGGGATAAAAA	TATAAGACGAGAAGACCCC	ATGGAGCTTT	1079
AB200953	TGATCTCCCGTGAAGAAGCGGGGATTTATC	TATAAGACGAGAAGACCCC	ATGGAGCTTT	133
AB211495	TGATCTCCCGTGAAGAAGCGGGCATCAAAA	TATAAGACGAGAAGACCCC	ATGGAGCTTT	535
AB159589	TAATCTCCCGTGAAGAAGCGGGGATAAAAC	TATAAGACGAGAAGACCCC	ATGGAGCTTT	218
AY458593	TAATCTCCCGTGAAGAAGCGGGGATAAACAT	TATAAGACGAGAAGACCCC	ATGGAGCTTT	1079

AF026370	AAACTCAA-GGCAACT--CCCAGTATACAAAC-CCTCATA-T-----	TTCAAGA	179	
AF026369	AAACCTTC-AGCAACT--TTTAACTTACAAAT-CCTAATA-T-----	CTTAAAA	179	
NC_009422	AAACTCAGTACCAACT--GCCCAAATAAGAA--CCTATTA-T-----	ACTTGCA	1123	
AB200953	AAACCCAACTGACACC--CCTGACCCACACAC-CAACCTAGC-----	CCCCAAA	179	
AB211495	AAACTCACTATGCACC--TCTGTGCC-CCTAC-CA-CATAAC-----	ACAAGTA	579	
AB159589	AAACAATGCAGCATCTGCCCCATAACACTAAAATTTCCGAAT--TTAAACTC-CCTGGAC	275		
AY458593	AAACTTAATAACATTT-CCTTAAACACTCCTCTTCAGAGTACTACATTTACTTCGGC	1138		

AF026370	GTACTGCGTAACAGTTTTAGGTTGGGGTGACCGCGGAGCATAAACAAACCTCCACGACGT	239		
AF026369	GCTATGCCTACCGTTTTTGGGTTGGGGTGACCGCGGAGAAAAAATTAACCTCCATGACGA	239		
NC_009422	GCTATGGTTACTAGTTTTTCGGTTGGGGTGACCGCGGAGTAAATTAACCTCCACGATGA	1183		
AB200953	GATCTGTACGTCAAGTTTTAGGCTGGGGGGCCACGGAGTAAATTAACCTCCACAACAA	239		
AB211495	GTCTGCAATATTAGTTTTAGGTTGGGGGGACCCAGGAGTACAAATTAACCTCCACAACAA	639		
AB159589	AGTGTGACTGCAAGTTTTTGGTTGGGGTGACCGCGGAGCATAAATTAACCTCCATGCTGA	335		
AY458593	TTTCTGATTATTAGTTTTAGGTTGGGGTGACCGCGGAGCAAAAAATTAACCTCCACATTGA	1198		

AF026370	ATAGAACTAA-ACCTTTATCTAAGAGCTACTTCTCTAAGAATCAGCAAACTGACGTAAAA	298		
AF026369	ACAGAACTAA-ATCTTTATCTAAGAGCTACTACTCTAAGAATCAGTAACTGACGTAAAA	298		
NC_009422	AAGGAACATAAACCCTAACCTATGAGCTACAGCTCTAAGTATCAACAAATTGACT--AAT	1241		
AB200953	ATGGG-CTAATACCCTTATCCACGATTTTACTAATCTAAGAACCACAAAATTGATGTTTAA	298		
AB211495	ACGGG-CTAACACCCTTACCCACGAGACACAACTCTAAGAATTACTAACTAATGCTTA	697		
AB159589	A---A-GAATCTTTCTAAGCTAAGAACCAACAAATCCAAGCATCAATAAATTGACATCCAT	391		
AY458593	ATGGG-GAACTCCCTGAGACACGAGCTACAACCTTACACACCAATAAATTGACATCAAT	1257		

AF026370	TGACCCGATA-TCC-GATCATCGAACCAAGTTACCCTGGGGATAACAGCGCAATCCACTT	356		
AF026369	TGACCCGATT-ATC-GATCAACGAACCAAGTTACCCTGGGGATAACAGCGCAATCCACTT	356		
NC_009422	TGACCCAAAT-ACTTGATCAACGAACCAAGTTACCCTGGGGATAACAGCGCAATCCACTT	1300		
AB200953	TGACCCGTTA-ACTCGATCAATGAACCAAGTTACCCTGGGGATAACAGCGCAATCTACTT	357		
AB211495	CGACCCGATA--TTGATCAATGAACCAAGTTACCCTGGGGATAACAGCGCAATCTACTT	755		
AB159589	TGACCCAAATATACTTGAACAACGAACCAAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATCCACTT	451		
AY458593	TGACCCAAATATA-TTGATCAACGAACCAAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATCCGCTT	1316		

AF026370	CAAGAGCCCATATCGACAAGCGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGGT	AACCCNGTG	416	
AF026369	TGAGAGCTCATATCGACAAGTGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGGT	ATCCCGGTG	416	
NC_009422	CAAGAGCTCATATCGACAAGTGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGGT	ATCCCAAGT	1360	
AB200953	CAAGAGCCCATATCGACAAGTGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGGT	ATCCTAGTG	417	
AB211495	CAAGAGCCCATATCGACAAGTAGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGGT	ATCCTGGTG	815	
AB159589	CAAAAGCTCCTATCGACAAGTGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGGT	ATCCCAAGT	511	
AY458593	CAAGAGCTCCTATCGACAAGCGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGGT	ATCCCAAGT	1376	

圖 2-3 蛙類粒線體 16S DNA 序列及引子設計圖(如框內所示)

C01引子的設計 參考NCBI基因庫(*Gene Bank*)資料庫中已發表的C01 mtDNA
序列如下：中國樹蟾 *Hyla chinensis* (NC_006403)，小雨蛙 *Microhyla ornate*
(NC_009422)，排列如圖 2-4，取其中保守序列約20個核苷酸的長度設計為專一
性引子，其序列如下：

CO1 F - 5' - ATAATTTTCTTTATAGTTATAC -3'

C01 R - 5' - CCGATTGATGAGCTGTATTTC -3

另依據Smith(2008)等人的研究另外設計一組C01的引子如下：

VF1-d - 5' - TTCTCAACCAACCACAARGAYATYGG -3'

VR1-d - 5' - TAGACTTCTGGGTGGCCRAARAAYCA -3'

NC_006403	GCCTTGGTATAATTTTCTTTATAGTTATACCAATCTGATCGGGGATTGGAAACTGA	240
NC_009422	GCATTGTATAATTTTCTTTATAGTTATACCAATTATGATCGGGGCTTTGGTAATTGA	240
NC_006403	TTAGTCCCCTTAATAATTGGGCACTGATATAGCCTTCCCAAGAAATCAATATAAGT	300
NC_009422	CTTGTTCCACTAATAATTGGAGGCGGCGACATGGCATTCCCTGGAATAAATAACATAAGC	300
NC_006403	TTCTGACTTCTTCCACATCTTTCTTCTCTCTTAGCTCAGCAGGTGTGGAAGCAGGG	360
NC_009422	TTCTGACTTCTTCCACATCTTTCTTCTCTCTTAGCTCAGCAGGTGTGGAAGCAGGG	360
NC_006403	GCAGGAAACGGATGAAACGCTATCCACCCCTTGGGGAATCTAGCCATGCGCGGCA	420
NC_009422	GGCGGAACCTGGTTGAACAGTTTACCCCTTTAGCGGTAATCTTGCTCAGCGCGGCA	420
NC_006403	TCGTAGACTTAACCAATTTTTTCATTACATCTGGCAGGTGTCTCTCAATTTTAGGGGC	480
NC_009422	TCGTAGACTTAACCAATTTTTTCATTACATCTGGCAGGTGTCTCTCAATTTTAGGGGC	480
NC_006403	ATTAATTTTATTACCAATTTCTTAACATAAAAAACCCATCAATAACCAATAACAAAC	540
NC_009422	ATCAACTTTATTACTACTATTATTAAACATAAAAAACCCATCAATAACCAATAACAAAC	540
NC_006403	CTGTTAGGATTTATTGTTTGGGCAACATATATTCACAACTGACTTAAATGTAGACACT	900
NC_009422	CTTCTCGGCTTCATTGTATGAGGCAACATATTTACCAACAGAGCTCAAGTAGACACA	900
NC_006403	CGAGCTACTTCACTCTGCTACTATAATCATTGCCATCCCAACTGGGTAAAGTTTTT	960
NC_009422	CGAGCTATTTTAOCTCAGGCACTATAATTATTGCTATCCCAACTGGGTAAAGTTTTT	960
NC_006403	AGCTGACTGGCAACATACATGGGGGTATCATTAAATGAGAGCGCTGCCACTTTGAGGC	1020
NC_009422	AGCTGATTGGGCAACATACAGGGGGGAATTATTAATGAGAGGCGCAATGCTCTGAGGC	1020
NC_006403	TTAGGCTTCATCTTTCTATTCACTGTGGGCGGGCTCAGGCGATCGTTTAGGCAATTC	1080
NC_009422	TTAGGCTTTATCTTCTATTACTGTAGGTGGCTCAAGCGGATTTGTTCTTGTAACTCA	1080
NC_006403	TCACTGGATATTGTCTACAGATACCTTATTAAGTAGTAGCCACTTCCATTATGTTCTA	1140
NC_009422	TCTATGATATGCTCTGCAAGCACTACTATGTTGAGGACATTTCCACTATGTTCTT	1140
NC_006403	TCATGGGAGCTGTATTTGCAATTATAGCGGATTGTTGTTGATTCCCGCTTTTAACT	1200
NC_009422	TCATGGGAGGAGTATTTGCACTCATAGCAGGATTGTTGTTGATTCCCGCTTTTAACT	1200
NC_006403	GGATTCACTTTACATAAAACCTGGGCAAAATCAATTTGGGGTAATATTCAAGGAGTA	1260
NC_009422	GGGTACACACTTCATCACTCTTGAACAAAATTCACCTTGGGTAAATATTGTTGGGGTT	1260
NC_006403	AATCTAAAGTTTTTCCCTCAACATTTCTGGGTCTAGCTGGTATACCAAGAGATATTCT	1320
NC_009422	AATCTAACATTTCTTCCACAGATTTCTAGGTCTTGGGGAATGCTCAAGTTACTCT	1320
NC_006403	GACTATCTGATGCTTACACATTTGAAACACAGTCTCATCAATCGGCTCACTCATCTCC	1380
NC_009422	GATTACCTGAGGCTACACCTTTGAAATACAGTCTCATCAATCGGCTCACTCATCTCC	1380

圖 2-4 蛙類粒線體 CO1 DNA 序列及引子設計圖(如框內所示)

(2) 基因之放大與選殖

1. DNA 純化套組 QuickExtract™ DNA Extraction Solution (Epicentre, USA)
2. 轉型系統 pGEM®-T Vector Systems (Promega, USA)
3. ECOS® competent cell (Yeastern Biotech, Taiwan)
4. Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Genaid, Taiwan)

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（少於0.1 公克）蛙大腿之肌肉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1.5ml 的微量離心管(eppendorf) 中，加入200 μ l 試劑組中的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℃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℃水浴2 分鐘，再移至冰上。(f) 以3000rpm轉速離心2分鐘。取出上清液並移到新的1.5ml 的微量離心管中，即為genomic DNA。genomic DNA 可長期保存於-20℃中或直接進行PCR 增幅。

CO 1、12S 及 16S rRNA 之放大和選殖

樣本之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。利用引子對12S (F - 5' - CTAA AACCCAAAGGACTTG -3' , R - 5' - GCTGCACCTTGACCTGACG -3) ; 16S (F- 5' - TATAAGACGAGAAGACCC -3' , R-5' - ACCCTGATCCAACATCGAG -3) 放大12S 及16S rRNA。進行反應總體積為25 μ L之PCR反應。0.5 μ L之DNA模板, 0.5 μ L 10mM 之dNTP, 0.5 μ L 之F1和R1引子, 0.5 μ L *Taq* DNA polymerase, 2.5 μ L 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 1基因之放大, 對於不同物種選擇CO1 (F - 5' - ATAATTTTCTTTATAGTTATAC -3' , R - 5' - CCGATTGATGAGCTGTATTTTC -3') 或另一組CO1的引子 (VF1-d - 5' - TTCTCAACCAACCACAARGAYATYGG -3' , VR1-d - 5' - TAGACTTCTGGGTGGCCRAARAAYCA -3'), PCR反應總體積同為25 μ L。CO1 F / R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, 80 sec; 及final extension 72 $^{\circ}$ C, 10 min。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。

(3) 採集地點之建立與採集方法：

以中橫沿線不同海拔高度做為採集主要地點, 設計如表 2-2: 低海拔: 砂卡噹(海拔 0 公尺)、布洛灣(海拔 500 公尺)、天祥(海拔 500 公尺)、西寶(海拔 1000 公尺)、洛韶(海拔 1000 公尺); 中海拔: 148K(海拔 1500 公尺)、新白楊(海拔 1500 公尺)、133K(海拔 2000 公尺)、131K(海拔 2000 公尺)、125K(海拔 2000 公尺)、119K(海拔 2000 公尺); 高海拔: 關原(海拔 2500 公尺)、大禹嶺(海拔 2500 公尺)、特生中心(海拔 3000 公尺)、雪訓中心(海拔 3000 公尺)。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)以採集同一物種以 3 隻為目標數量，除判斷並紀錄公母外，一併量測其體重、肛吻長。

表 2-2 中橫沿線不同海拔採集地點

海拔分佈	採集地點(實際海拔)	經緯度
0 公尺	砂卡噹橋下、步道 (<100 公尺)	24°09' 42.69" 北; 121° 36' 48.48" 東
500 公尺	布洛灣 (370 公尺)	24°10' 06.92" 北; 121° 34' 25.39" 東
	天祥 (650 公尺)	24°12' 39.52" 北; 121° 29' 10.86" 東
1000 公尺	西寶國小後方水塘 (915 公尺)	24°12' 25.26" 北; 121° 28' 52.01" 東
	洛韶 (1100 公尺)	24°12' 28.84" 北; 121° 27' 02.86" 東
1500 公尺	台 8 線 148k (1380 公尺)	24°12' 21.64" 北; 121° 25' 21.69" 東
	新白楊 (1643 公尺)	24°11' 52.25" 北; 121° 25' 57.13" 東
2000 公尺	台 8 線 133k (2000 公尺)	24°11' 35.57" 北; 121° 23' 02.84" 東
	台 8 線 131k (1970 公尺)	24°11' 21.88" 北; 121° 22' 53.06" 東
	台 8 線 119k (2166 公尺)	24°11' 16.50" 北; 121° 20' 36.95" 東
2500 公尺	關原加油站 (2374 公尺)	24°11' 08.21" 北; 121° 20' 33.14" 東
	大禹嶺 (2365 公尺)	24°10' 49.94" 北; 121° 18' 46.34" 東
3000 公尺	特生中心後溪床下 (3000 公尺)	24°09' 43.25" 北; 121° 17' 11.42" 東
	合歡山區 (3200 公尺)	24°08' 38.33" 北; 121° 16' 48.87" 東

(4) 基因條碼的建立與基因多樣性判定

針對基因判定親源分成由粒線體 DNA：CO 1、12S 及 16S 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的遺傳變異度。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 2,000 次運算來求親緣關係之可信度，若 bootstrap 值大於 70 相當於統計上 95%的信心支持度(Hillis and Bull, 1993)。核苷

酸歧異度 (π , Nucleotide diversity)及遺傳多樣性則以 Tajima's Neutrality Test 為模式來校正計算。鄰聚法、bootstrap 法及核苷酸歧異度的計算皆是用軟體 MEGA 4 (Tamura *et al.* 2007) 來執行。作為比對參考的其他粒線體基因序列，則從 NCBI *GeneBank* 下載，包含的序列、物種與其擷取碼(accession number)。

第三章 研究結果

第一節 文獻收集與回顧

參照過去的研究資料發現，太魯閣國家公園境內的兩棲類進行詳細的生物多樣性調查，僅在呂光洋等(1983, 1989)、林曜松等(1991, 2005)及楊懿如(2005)對太魯閣國家公園內之動物資源進行調查研究結果中，呈現各調查樣點的兩棲類物種名錄(吳海音, 2003、2004)。依其研究結果顯示，統計太魯閣國家公園全區之兩棲類物種共有山椒魚科(Hynobiidae)2 種：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 melanostictus*)，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、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、楚南氏山椒魚等2種為珍貴稀有保育類物種(太魯閣國家公園境內之兩棲類名錄，如附錄一)。

梭德氏赤蛙 (*Rana sauteri*) 可能為台灣特有種，被歸類於林蛙類群 (brown frog complex)。廣泛分佈於台灣，在海拔100~3000公尺都可以發現他們的身影。最早由Boulenger GA於1909發表命名，模式標本產地在台南關仔嶺 (Guantzelin)。目前對於梭德氏赤蛙的分類仍存在有一些爭議，如Kuramoto (1984)指出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。

Chou and Lin (1997) 的研究也從形態學的角度來對全島的梭德氏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*）。張廖年鴻（2007）的研究提到在大禹嶺出現有3種系群（lineages）之梭德氏赤蛙。在楊（2006）之調查報告指出，太魯閣國家公園境內之該物種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，可合理推論其族群遺傳結構會有所變化，研究高山地區與低海拔地區的梭德氏赤蛙之後，對於園區內兩棲類之基因多樣性更為了解，所得之資料將對國家公園保育策略及方向有相當程度之助益。

表 3-1 兩棲爬蟲類樣本採集之物種及地點分布表

採集物種名稱	調查地點														
	低海拔						中海拔					高海拔			
	砂卡礑	布洛灣	天祥	西寶	洛韶	和平林道	蓮花池	台八線 148 K	新白楊	台八線 133 K	台八線 131 K	台八線 119 K	關原	大禹嶺	小風口
兩棲類															
山椒魚科 Hynobiidae															
楚南氏山椒魚 <i>Hynobius sonani</i>															V
蟾蜍科 Bufonidae															
盤古蟾蜍 <i>Bufo bankorensis</i>	V	V	V	V	V		V	V	V	V		V	V		
樹蟾科 Hylidae															
中國樹蟾 <i>Hyla chinensis</i>							V								
赤蛙科 Ranidae															
斯文豪氏赤蛙 <i>Rana swinhoana</i>	V	V	V	V	V		V	V		V		V			
梭德氏赤蛙 <i>Rana sauteri</i>					V		V		V	V	V	V		V	V
樹蛙科 Rhacophoridae															
日本樹蛙 <i>Buergeria japonica</i>	V	V	V	V	V		V								
褐樹蛙 <i>Buergeria robusta</i>	V														
莫氏樹蛙 <i>Rhacophorus moltrecht</i>									V		V				
爬蟲類															
赤尾鯢 <i>Trimeresurus stejnegeri stejnegeri</i>	V			V											
龜殼花 <i>Trimeresurus mucrosquamatus</i>	V														
青蛇 <i>Cyclophiops major</i>	V														
雪山草蜥 <i>Takydromous hsueshanensis</i>															V
呂氏攀蜥 <i>Japalura luei</i>						V									

(採集時間：98年5月至11月)

註：V表示實際採集紀錄

第二節 基因條碼建立

DNA條碼 (DNA barcode) 一種創新、簡便、迅速的鑑識系統：粒線體基因的片段來標示物種。提供類似圖書出版的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，研究人員只要帶著如影集「星艦奇航」中的掌上型解碼器，在野外就能進行簡單的DNA檢測，而能判定物種。

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。

目前已針對太魯閣國家公園樣區內兩棲爬蟲類之目標物種，完成COI基因的部份基因序列解碼如下列所示：820林道-楚南氏山椒魚(圖3-1)、砂卡礑-盤古蟾蜍(圖3-2)、蓮花池-中國樹蟾(圖3-3)、砂卡礑-斯文豪氏赤蛙(圖3-4)、台8線133

K-梭德氏赤蛙(圖3-5)、砂卡礑-日本樹蛙(圖3-6)、砂卡礑-褐樹蛙(圖3-7)、砂卡礑-青蛇(圖3-8)、合歡山區-雪山草蜥(圖3-9)、和平林道-呂氏攀蜥(圖3-10)。

在NCBI之GeneBank資料庫中，太魯閣國家公園內所採集到的目標物種皆無C01基因的序列上傳建檔，因此本研究所呈現之基因條碼序列，不僅可供國家公園自然保育與管理運用，未來亦將陸續上傳至NCBI，對於建立台灣國家公園物種之生命條碼有所貢獻。

```
CACTTCACTTAGCAGGTATTTTCATCAATTCTTGGGGCTATTAATTTTATTACAACCTCAA
TTAATATAAAACCCCTATCAATATCACAATATCAAACACCCCTATTTGTCTGATCAGTAT
TAATCACTGCTATTCTCCTCTTACTCTCATTACCAGTCCTTGCTGCAGGAATTACAATAC
TCTTAACAGACCGAAACTTAAACACTACATTCTTTGACCCTGCAGGAGGAGGAGACCCTG
TTCTTTACCAACACCTCTTCTGGTTTTTTGGCCATCCAGAGGTCTATATTCTTATTCTCC
CAGGATTTGGGATAATTTCTCATATTGTTACATATTATTCGGCAAAAAAAGAACCTTTTG
GATATATAGGTATAGTATGAGCTATAATATCAATCGGATTACTAGGATTTATTGTTTGAG
CCCACCATATATTTACAGTTGATCTTAATGTTGACACACGAGCTTATTTTACATCAGCTA
CAATAATTATTGCTATCCCCACTGGGGTAAAAGTATTTAGCTGATTAGCAACAATACATG
GAGGATCAATTAAATGAGATGCTGCAATATTATGAGCTTTAGGTTTTATTTTTTTATTTA
CCGTTGGCGGATTAACTGGCATTGTTCTTGCCAATTCATCATTAGATATTGTCCTACATG
ATACTTATTATGTAGTGGCACATTTTCATTACGTTTTAT
```

圖 3-1 820林道-楚南氏山椒魚C01基因條碼序列

TACCCTATATCTTATTTTTGGGGCCTGAGCAGGGATAGTAGGAACTGCCCTT
AGCCTCCTTATCCGAGCTGAGCTGAGTCAACCCGGCTCCCTCTTGGGCGAT
GATCAGATTTATAATGTCATTGTTACCGCCCACGCCTTCGTCATAATTTTCTT
TATGGTCATGCCATCCTAATCGGAGGCTTCGGTAACTGACTTGTCCCCCTG
ATAATTGGGGCCCCTGACATAGCCTTCCCCCGAATGAACAACATAAGCTTTT
GATTACTCCCCCATCATTTCTACTCCTCTTGGCATCCGCCGGAGTCGAAGC
AGGAGCAGGAACCGGCTGAACTGTATACCCCCCCTGGCTGGGAACCTTG
CACACGCAGGCCCATCAGTCGACTTAACCATTTTTTCCCTCCACCTTGCGG
GTGTATCATCTATCCTAGGCGCAATTAATTTTATTACAACAACCCTTAACATG
AAGCCACCATCAATGACTCAATACCAAACACCCTTATTTGTGTGATCCGTCT
TGATTACTGCTGTTTTACTCCTACTCTCCCTGCCAGTCCTCGCTGCAGGAAT
CACTATACTCCTCACTGACCGAAACCTAAACACAACATTCTTTGACCCTGCT
GGCGGAGGCGACCCCATCCTCTATCAACACCTCTTT

圖 3-2 砂卡礑-盤古蟾蜍C01基因條碼序列

TACTCTATACTTGGTATTTGGGGCTTGGGCTGGCATAGTAGGCACAGCCCTC
AGCCTCCTAATTCGAGCAGAATTAAGCCAGCCTGGCTCCCTTCTAGGTGAC
GATCAAATCTATAATGTCATCGTCACGGCTCACGCCTTCGTCATAATTTTCTT
TATGGTTATACCAATCCTTATTGGGGGATTTGGAACTGACTAGTCCCCTTAA
TAATTGGCGCACCTGATATAGCCTTCCCACGAATAAACAATATAAGCTTCTG
ACTTCTTCCACCATCTTTTCTTCTTCTTCTTAGCCTCAGCAGGTGTTGAGGCA
GGAGCAGGAACCGGATGAACTGTCTATCCACCCCTTGCCGGAAATCTAGCC
CATGCCGGGCCATCCGTAGACTTAACCATTTTTTTCATTACATCTGGCAGGTG
TCTCTTCAATTTTAGGAGCTATTAATTTTATTACCACAATTCTTAACATGAAA
CCCCCATCAATAACACAATACCAAACCCCGCTATTTGTTTGATCTGTTCTAAT
CACTGCTGTACTTCTACTTCTTTCTCTCCCCGTGCTAGCAGCGGGTATTACC
ATACTACTCACGGACCGAAACCTCAACACCACATTTTTTCGACCCGGCAGGA
GGAGGGGACCCCGTACTATACCAACACTTATTC

圖 3-3 蓮花池-中國樹蟾C01基因條碼序列

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

圖 3-4 砂卡礑-斯文豪氏赤蛙C01基因條碼序列

TATTTGTATGATCTGTCCTAATTACTGCAGTCTTACTACTCCTTTCTCTTCCTGTCTTAG
 CTGCAGGAATTACTATACTATTAACAGACCGAAATTTAAATACCTCTTTTTTTGACCCGG
 CGGGAGGAGGAGACCCAATCCTTTATCAGCACTTATTCTGGTTTTTTGGTCACCCCGAGG
 TATATATTCTTATTTTACCAGGCTTCGGCATAATTTACATATTGTAACCTATTATGCTG
 GTAAAAAGGAACCATTTCGGCTACATGGGTATAGTTTGAGCTATAATATCAATTGGGTTTT
 TAGGGTTTATTGTCTGAGCTCATCATATGTTTACTGTCCGCATAGACGTCGACACTCGAG
 CCTACTTTACCTCAGCTACTATAATTATTGCCATCCCAACAGGAGTTAAAGTCTTTAGTT
 GACTTGCAACGCTTCACGGCGGAACAATAATGGGACGCTGCTATACTTTGAGCTCTTG
 GTTTTATTTTTTTATTTACAGTGGGGGGCCTAACAGGCATTATTTTAGCTAATTCTTCAC
 TTGATATTGTCCTTCATGACACATACTACGTAGTTGCACACTTTCCTATGTATTATCAA
 T

圖 3-5 台8線133 K-梭德氏赤蛙C01基因條碼序列

TACCTTATACTTAATTTTTGGTGCGTGGGCAGGTATAATTGGAAGTGGCCCTTA
GCCTTTTAATTCGAGCTGAATTAGCTCAACCTGGATCACTGCTCGGTGACG
ACCAAATTTATAATGTAATTGTTACCGCCCACGCTTTTGTTATAATTTTCTTTA
TAGTTATACCAATTTTAATTGGTGGATTTCGGGAAGTGAATTATTCCTCTAATA
ATTGGTGCCCCAGACATGGCCTTCCCTCGAATAAATAATATAAGCTTCTGAC
TTCTTCCACCCTCATTTCTTCTTTTACTAGCCTCTTCTACTGTAGAAGCGGGT
GTAGGAACCGGTTGAACAGTTTACCCCCCATTAGCAGGTAATCTTGCTCAT
GCAGGCCCATCAGTAGACTTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGTGTATC
ATCAATTTTAGGGGCCATCAACTTTATTACTACAATTTTAAATATAAAACCGT
CATCAACTACACAATATCAAACCCCCCTGTTTGTTTGATCTGTTCTAATTACC
GCTGTTCTTCTTCTTCTATCTCTTCCTGTTTTAGCTGCAGGAATTACCATACT
TTTAACAGACCGTAATTTAAATACTACATTCTTTGACCCTGCTGGAGGAGGA
GATCCAGTTCTTTACCAACACCTTTTT

圖 3-6 砂卡礑-日本樹蛙C01基因條碼序列

CACCTTATATTTAATTTTTGGCGCATGGGCGGAATAATCGGCACCGCACTT
AGTCTTCTAATTCGGGCTGAACTCGCTCAGCCCGGGTCCCTCCTGGGAGAC
ACCAAATTTATAATGTAATTGTCAGTGGCCATGCCTTTGTTATAATTTTCTTTA
TGGTCATGCCTATCCTAATCGGCGGTTTCGGAAAGTGAATTGGTCCCCCTAAT
AATCGGGGCTCCTGATATAGCCTTTCCCCGCATAAACACATAAGTTTCTGA
CTACTACCTCCCTCATTTCTTCTACTACTAGCTTCCTCTACAGTTGAAGCAG
GAGCTGGCACAGGGTGAAGTGTTTACCCCCCCTAGCAGGAAATCTTGCTC
ACGCCGGACCCTCTGTAGACTTAGCTATTTTTTCCCTTCACCTTGCAGGGAT
CTCCTCGATTCTAGGGGCTATCAACTTCATTACAAGTATTCTGAACATAAAG
CCTGCCTCAACGACACAATACCAACACCCCTCTTTGTGTGATCTGTGCTA
ATTACAGCAGTATTACTACTTCTGTCCCTTCCAGTCTTAGCTGCGGGGATTA
CAATGCTTCTCACAGACCGCAACTTAAACACCACCTTTTTTGACCCAGCAG
GCGGAGGTGACCCAGTATTATACCAACACCTATTT

圖 3-7 砂卡礑-褐樹蛙C01基因條碼序列

AACCCTATACCTACTATTTCGGCGCATGATCTGGCCTAATTGGGGCCTGCCTA
 AGCATTCTTATACGAATAGAACTAACCCAACCAGGGTCGCTACTAGGCAGC
 GACCAAATCTTTAATGTTCTAGTAACAGCCCATGCTTTCATCATAATTTTCTT
 TATAGTAATACCCATTATAATCGGGGGGCTTTGGAAACTGACTAATCCCCTTAA
 TAATCGGAGCACCGGACATAGCCTTCCCCCGCATAAATAATATGAGTTTTTG
 ACTACTTCCACCAGCACTACTCCTCCTTCTATCTTCATCTTATGTAGAAGCCG
 GTGCCGGTACAGGATGAACAGTATACCCCCCCTATCAGGAAATCTAGTAC
 ACTCAGGCCCCATCAGTAGACCTAGCAATCTTCTCCCTACACCTAGCAGGCG
 CCTCCTCCATCCTGGGAGCAATTAACCTTCATTACAACATGTATCAACATAAA
 ACCTAAAGCTATACCAATATTCAATATCCCCTACTATTCGTTTTGATCAGTACTTA
 TCACTGCCATTATACTACTACTGGCCTTGCCAGTACTAGCAGCGGCAATCAC
 CATACTACTAACAGATCGAAACCTCAACACTTCTTTCTTTGACCCCTGCGGA
 GGAGGGGACCCTGTACTGTTCCAACACCTGTTC

圖 3-8 砂卡礑-青蛇C01基因條碼序列

TATTTGTATGATCTGTCCTAATTACTGCAGTCTTACTACTCCTTTCTCTTCCTGTCTTAG
 CTGCAGGAATTACTATACTATTAAACAGACCGAAATTTAAATACCTCTTTTTTTGACCCGG
 CGGGAGGAGGAGACCCAATCCTTTATCAGCACTTATTCTGGTTTTTTGGTCACCCCGAGG
 TATATATTCTTATTTTACCAGGCTTCGGCATAATTTACATATTGTAACCTATTATGCTG
 GTAAAAGGAACCATTCGGCTACATGGGTATAGTTTGAGCTATAATATCAATTGGGTTTT
 TAGGGTTTATTGTCTGAGCTCATCATATGTTTACTGTCCGCATAGACGTCGACACTCGAG
 CCTACTTTACCTCAGCTACTATAATTATTGCCATCCCAACAGGAGTTAAAGTCTTTAGTT
 GACTTGCAACGCTTCACGGCGGAACAATAATGGGACGCTGCTATACTTTGAGCTCTTG
 GTTTTATTTTTTTTATTTACAGTGGGGGGCCTAACAGGCATTATTTTAGCTAATTCTTCAC
 TTGATATTGTCCTTCATGACACATACTACGTAGTTGCACACTTTCCTATGTATTATCAA
 T

圖 3-9 合歡山區-雪山草蜥C01基因條碼序列

CACCATGTA CTTCCCTATTCGGGACTGCAGCTGGCCTCACTGGGTCAC TGGTT
AGCCTTCTTGTCCGTACACA ACTAATTCAGCCTGGACAA ACCATCGGAGGG
GACTCCCTGTACAATGTCTTTATCACATTTTCATGCCCTCGTTATAATTTCTTT
ATAGTCATACCAATCATGATCGGCGGATTCGGAAACTGGCTGATTCCACTTA
TACTCGGAGCCCCAGACATAGCATTC CCGCGAATAAACATAAGCTTCT
GACTTCTACCGCCATCATTCTTCTTTTACTTTTATCCTCTGGGTTCGAAGCC
GGGGTCGGCACCGGATGAACTATTTATCCGCCACTATCAAACAACACTGCC
CACTGCGGGCCGTCCATAGATCTGGCCATCTTTTCTCTACACTTAGCAGGTG
CCTCCTCAATTATGGCCGCCATCAACTTTATTACTACTTGTATTAACATAAGC
CCAAATCTCACCTCACCATAACA ACTGGCCTTTATTTGTCTGATCCGTGTTCT
TCACCGCCATCCTTCTGCTACTGTCACTTCCTGTGTTAGCTGCAGCAATCAC
CATGCTTCTTACAGACCGAAATCTCAACACATCATTCTTGAGCCCTCAGGG
GGCGGAGACCCCGTCCTATTTCAACACCTGTTC

圖 3-10 和平林道-呂氏攀蜥C01基因條碼序列

第三節 基因多樣性分析

本試驗以太魯閣國家公園內不同海拔採集到之梭德氏赤蛙為研究對象(表 3-2)，將粒線體DNA中12S與16S基因選殖定序後，分別得到其親緣關係如圖 3-11(12S)、圖 3-12(16S)。以mt DNA 12S序列所得之親緣關係樹狀圖可知：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)，並與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，推測可能是單純的點突變或定序上的誤差。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10%的差異(圖 3-13)。若以mt DNA 16S序列所得之親緣關係分析，亦可得到兩種基因型的呈現，其分佈的情形與mt DNA 12S所得相符，但Cluster II之16S與NCBI上擷取碼(accession number) AB211495在高雄採集而發表之基因序列已有12%的差異(圖 3-14)。

若以MEGA 4中Tajima's Neutrality Test分析所有太魯閣國家公園內採集之梭德氏赤蛙樣本的核苷酸歧異度 (π , Nucleotide diversity)可發現(表3-3)，整體的核苷酸歧異度分別為0.137745 (12S)與0.089409 (16S)，若進一步分析台8線133 K的樣本，顯示核苷酸歧異度分別提高為0.216702 (12S)與0.174222 (16S)，16S的中性假說檢定(Neutral hypothesis test)更呈現0.2420592的正值，可能代表該地點族群正面臨possible balancing selection或族群正在分化(population subdivision)。

表 3-2 不同海拔之梭德氏赤蛙親緣關係樣本分佈表

梭德氏赤蛙 <i>Rana sauteri</i>	調查地點					樣本 合計
	低海拔	中海拔				
	洛韶	台八線 133 K	台八線 131 K	台八線 125 K	台八線 119 K	
mt DNA 12S	1	12	13	2	1	29
mt DNA 16S	1	10	15	1	1	28

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, $p_s = S/m$, $\Theta = p_s/a_1$, and π = nucleotide diversity. D is the Tajima test statistic.

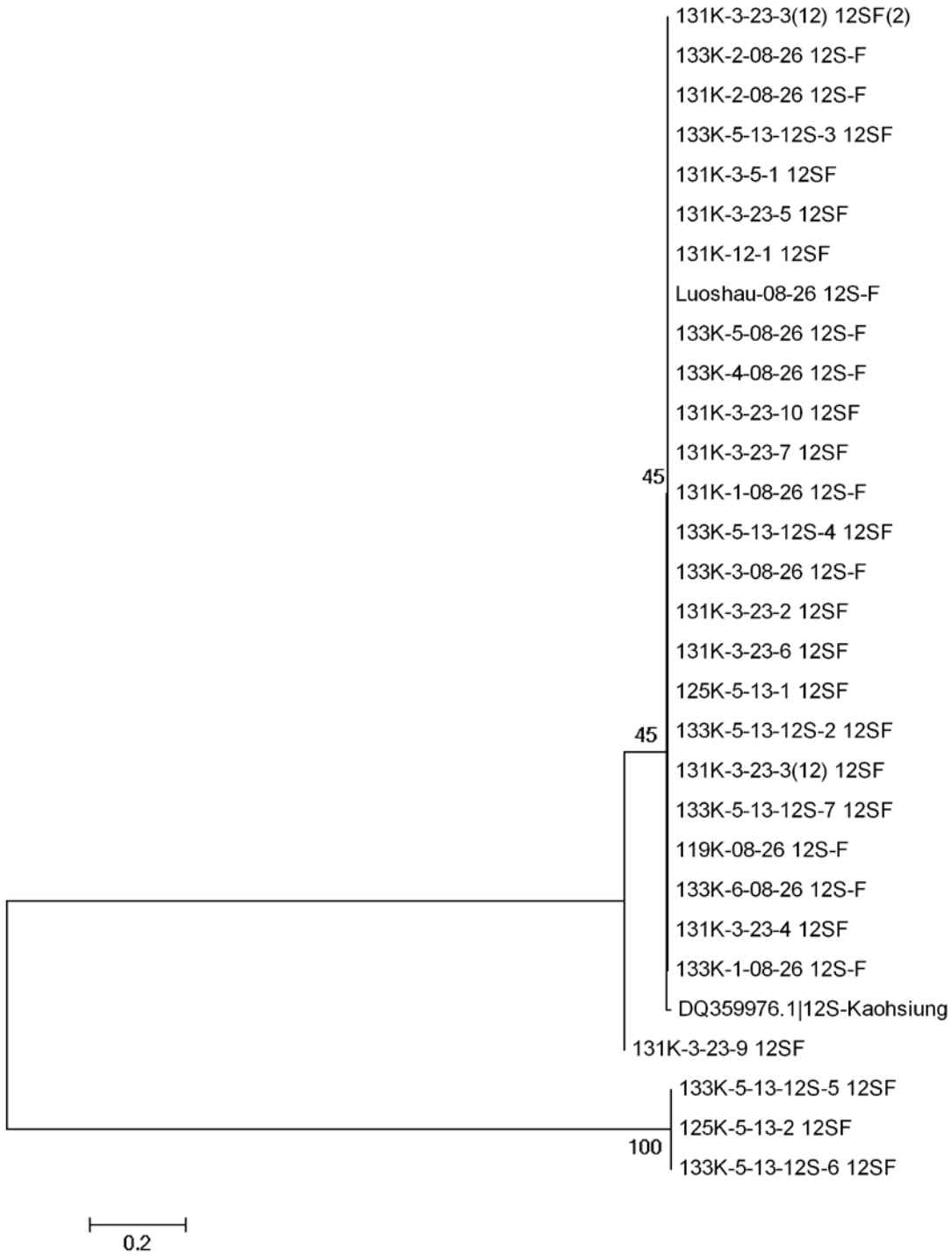


圖 3-11 以粒腺體DNA 12S序列對梭德氏赤蛙之親緣關係樹狀圖

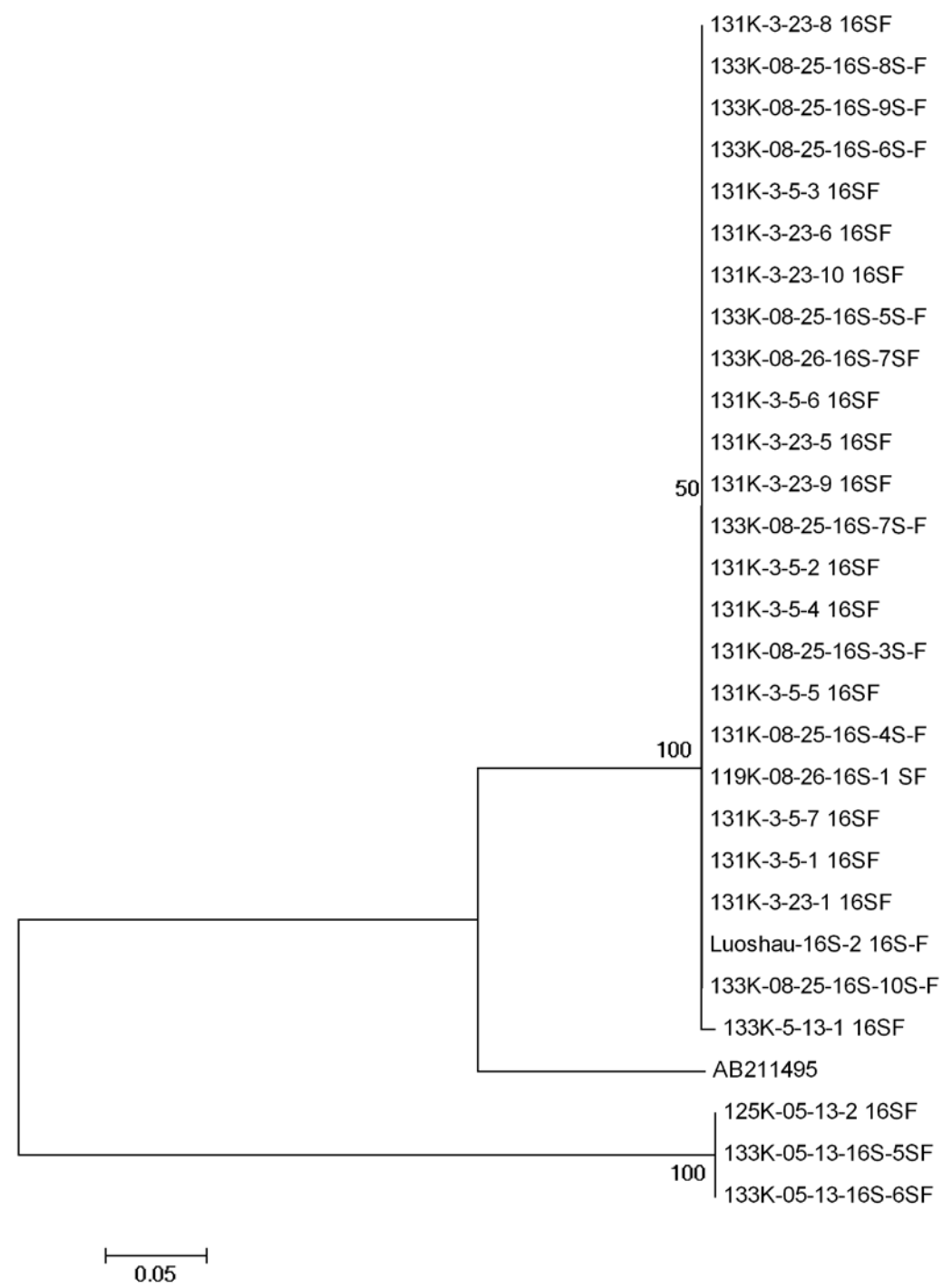


圖 3-12 以粒腺體DNA 16S序列對梭德氏赤蛙之親緣關係樹狀圖

Rana sauteri 12S seqsequence alignment within Taroko National Park

Identities = 162/189 (85%), Gaps = 5/189 (2%)

```

5-13-1_12SF      GCTGCACCTTGACCTGACGTGCTGATGGT---GAATCATTAAAGCTTACTGCGGGCGTTCA 57
5-13-2_12SF      GCTGCACCTTGACCTGACGTATTGACGAATTGGGGTCATTGAGCCTACTGTAAACATTCA 60
                  *****
                  **** *
                  * *****
                  ****
                  *****

5-13-1_12SF      CATGGTAAGCTTTTCGACGGAGGTATACAGACTGATGGGCGAGGGATGGTTAGGTGAAGCG 117
5-13-2_12SF      CACGGTAGGCTTTTCGACGGAGGTATACAGACTGATGAGCAAGGGTGGTGGGGTATAGCG 120
                  ** *****
                  ** *****
                  **** *****

5-13-1_12SF      GGGATCATCGATTATAGAACAGGCTCCTCTAGCGGGTGGGACACCGTCAAGTCCTTTGG 177
5-13-2_12SF      GGGATCATCGATTAAAGAACAGGCTCCTCTAGGGGGTGGGACACCGTCAAGTCCTTTGG 180
                  *****
                  *****
                  *****
                  *****

5-13-1_12SF      GTTTTAAGC 186
5-13-2_12SF      GTTTTAAG- 188
                  *****

```

圖 3-13 樣區內梭德氏赤蛙mtDNA 12S基因型排列比對圖

第四章 結論與建議

本研究以中橫沿線不同海拔高度做為採集地點，目前採集之結果如表 3-1 所示。其中我們發現梭德氏赤蛙分布的地點主要海拔較高的地區，如133K(海拔2000公尺)、131K(海拔2000公尺)、大禹嶺(海拔2500公尺)、雪訓中心(海拔3000公尺)等。與楊 (2006)之調查報告大致相符。梭德氏赤蛙之分布型態呈現間斷分布的型態，此一分佈型態、可能導致物種在基因交流上會較低，不若盤古蟾蜍等連續的分布型態兩棲類。而在本研究在基因多樣性判定的結果表 3-3中，顯示梭德氏赤蛙在不同樣點之間的基因交流程度偏低，此一結果顯示梭德氏赤蛙僅分佈情況不但是呈現間斷分布，其基因交流亦有可能因地形阻隔而受到限制，進一步分析樣點之核苷酸歧異度更發現，有些地點之族群正面臨possible balancing selection或族群正在分化(population subdivision)。

目前已對太魯閣國家公園園區內之兩棲爬蟲類共十種，包括目前數量相當稀少、具有重要保育價物種，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CO1基因部份序列解碼，並將陸續上傳至NCBI Barcodes database。本研究所採用之實驗平台，未來可繼續運用於園區內其他物調查，進一步建立國家公園內之資料庫。

立即可行之建議

- 1、就擇定之兩棲爬蟲類物種完成分子標記，進行國家公園個體、物種、族群和保育單位鑑定，探知物種是否有外來個體的加入，並進一步探討其在國家公園生態系之扮演角色。與已知資料作比較，並建立物種之親緣關係。
- 2、進行擇定物種之分子標記的比較，尋找其間是否有基因變異，確定基因流動範圍，嘗試建立微動物地理分區。
- 3、架構國家公園生態保育之基因多樣性研究。針對此擇定物種之特殊基因或 CO1/ Mt DNA 建立基因條碼，上傳至 NCBI 基因銀行 (Genbank) 或建立國家公園資料庫。

中長期性建議

- 1、建議可針對不同海拔高度設立長期監測樣區，長期監測不同人為開發壓力下所造成的兩棲類族群的差異。各樣區地點及環境屬性分列如下：
 - ◎0~500 公尺—砂卡礑溪(溪流、遊憩區)、布洛灣(遊憩區)。
 - ◎500~1,000 公尺—梅園竹村步道(人為開墾區)。
 - ◎1,000~1,500 公尺—蓮花池(自然環境)、洛韶(人為開墾區)。
 - ◎1,500~2,000 公尺—慈恩(人為開墾區)。
 - ◎2,000~2,500 公尺—關原(遊憩區)。
 - ◎2,500 公尺以上—合歡溪上游(自然環境)。
- 2、建議在未來的保育研究中，可針對本研究中橫公路沿線兩棲類豐度較高的地點，深入公路周圍的自然環境進行兩棲類調查，或設置捕捉陷阱，以調查分析公路邊緣與周圍自然環境間兩棲類族群的差異，作為未來設置或改善生物廊道的依據。
- 3、建議針對兩棲類進行焦點物種的評選工作，選取具有指標性物種、護傘種功能的兩棲類為焦點物種，優先列入長期監測及保育的對象，以使在有限的資源下，長期監測環境的變化，並維持、保育園區內的生物棲地與生物多樣性。

附錄一、太魯閣國家公園兩棲類動物名錄

有尾目

山椒魚科

臺灣山椒魚 *Hynobius formosanus* ◎ II #

楚南氏山椒魚 *Hynobius sonani* ◎ II #

無尾目

蟾蜍科

盤古蟾蜍 *Bufo bankorensis* ◎ #

黑眶蟾蜍 *Bufo melanostictus*

樹蟾科 中國樹蟾 *Hyla chinensis* #

狹口蛙科 小雨蛙 *Microhyla ornata* #

赤蛙科

斯文豪氏赤蛙 *Rana swinhoana* #

梭德氏赤蛙 *Rana sauteri* #

澤蛙 *Rana limnocharis*

拉都希氏赤蛙 *Rana latouchii*

樹蛙科

日本樹蛙 *Buergeria japonicus* #

褐樹蛙 *Buergeria robusta* ◎ II #

艾氏樹蛙 *Chirixalus eiffingeri*

莫氏樹蛙 *Rhacophorus moitrechti* ◎ II #

白領樹蛙 *Polypedates megacephalus*

一、◎台灣特有種 ○台灣特有亞種。

二、保育類別係參考行政院農業委員會公告指定「保育類野生動物名錄」，其中「I」瀕臨絕種野生動物；「II」珍貴稀有野生動物；「III」其他應予保育之野生動物。

三、文獻與本研究調查出現過之物種以「#」。

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。內政部營建署太魯閣國家公園管理處七十八年度研究報告。
- 吳海音。2003。太魯閣國家公園保育研究計畫的檢討與展望。內政部營建署太魯閣國家公園管理處九十二年度研究報告。
- 吳海音。2004。太魯閣國家公園高山地區動物資源基礎調查。內政部營建署太魯閣國家公園管理處九十三年度研究報告。
- 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。
- 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。
- 張廖年鴻（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
- Chou WH, Lin JY. 1997. Geographical Variations of *Rana sauteri* (Anura: Ranidae) in Taiwan. Zool Stud 36: 201-221.
- 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.
- Hillis DM, Bull JJ. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method assessing confidence in phylogenetic analysis. Systematic Biology 41: 182-192.
- 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.
- Kuramoto M, Wang CS, Yu HT. 1984. Breeding, larval morphology, and experimental hybridization of Taiwanese brown frogs, *Rana longicrus* and *R. sauteri*. Journal of Herpetology 18: 387-395.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol. 4(4):406-25.
- 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.

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

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 24(8):1596-9.

『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之研究』



報告人：翁慶豐 教授

提案單位：中華民國國家公園學會

報告大綱

- 一、前言
- 二、研究設計
- 三、研究結果
- 四、建議事項



前言

- 「生命條碼」「DNA條碼」(DNA barcode)一種創新、簡便、迅速的鑑識系統：粒線體基因的片段來標示物種。提供類似圖書出版的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，研究人員只要帶著如影集「星艦奇航」中的掌上型解碼器，在野外就能進行簡單的DNA檢測，而能判定物種。

DNA條碼

定義：

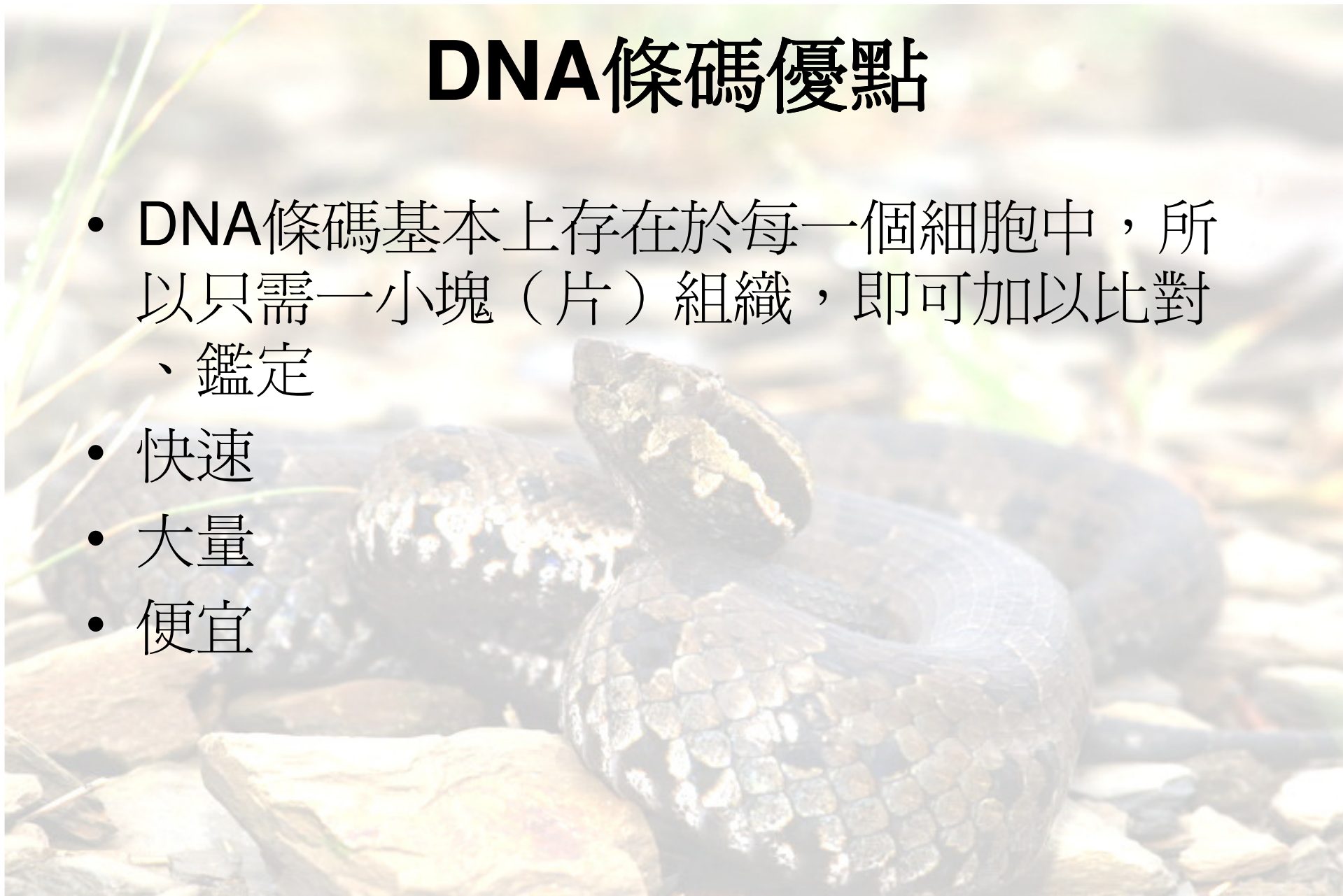
一段經標準化來自不同物種的DNA序列，經排列比較，以快速、有效率地方式，應用於物種的鑑定。

基本要件：

1. 具有足夠的物種間的變異；
2. 短的DNA片段，約400~800 bp；
3. 具有通用的PCR引子。

DNA條碼優點

- DNA條碼基本上存在於每一個細胞中，所以只需一小塊（片）組織，即可加以比對、鑑定
- 快速
- 大量
- 便宜



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。

運用於DNA條碼之基因

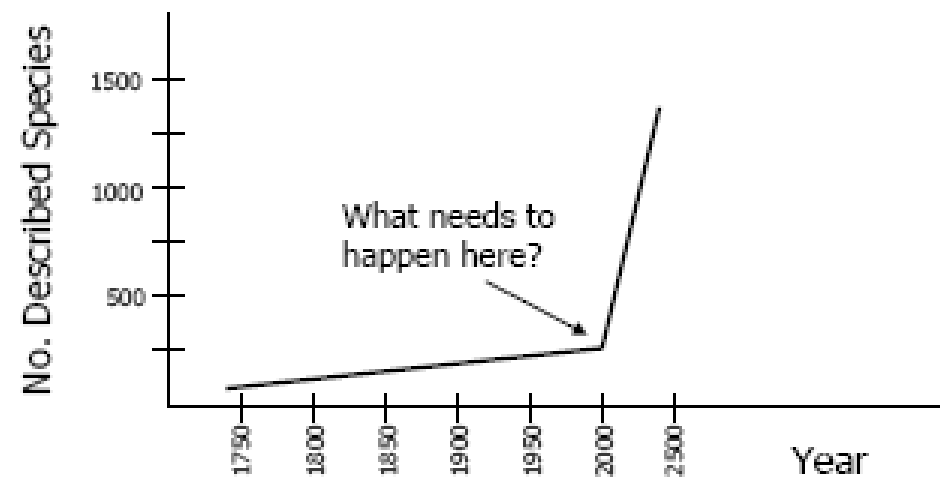
- 動物：

細胞色素c氧化次單元1 (C01)

- 植物：

核糖體內轉錄區間 (internal transcribed spacer, ITS)、
葉綠體中的rbcL和trnH-psbA

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
- 1988年時發表的新種Lonoke crayfish, *Procambarus ferrugineus* 與10年前發表的Osage crayfish, *Procambarus liberorum*極為相似，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。提供經營管理者正確方向。

DNA條碼運用於物種的鑑定

長腳赤蛙



梭德氏赤蛙



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，全球的拼圖就不會完整。

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。

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%**。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**、黃頷蛇科**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**。保育類計**14種**。

研究目的

- 鑑定分布於太魯閣國家公園地區珍稀及指標物種的基因。
- 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。
- 指標物種雌性化與功能性基因關聯性之探討。
- 進行太魯閣地區族群遺傳結構比較，建之族群親緣關係，作為後續保育及研究依據。

研究物種之擇定

- 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
- 考量人力物力所能達成之數量。

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) |
| 9. 楚南氏山椒魚 (2600~3100) | |

爬蟲類

- | | |
|---------------------|-----------------------|
| 1. 呂氏攀蜥(1000~2000m) | 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(1500~2500m) |
| 7. 紅竹蛇(0~1000 m) | 8. 雪山草蜥(1500~3000m) |
| 9. 中國石龍子(0~1500m) | 10. 麗紋石龍子(0~2500m) |
| 11. 青蛇(0~1000m) | |

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)

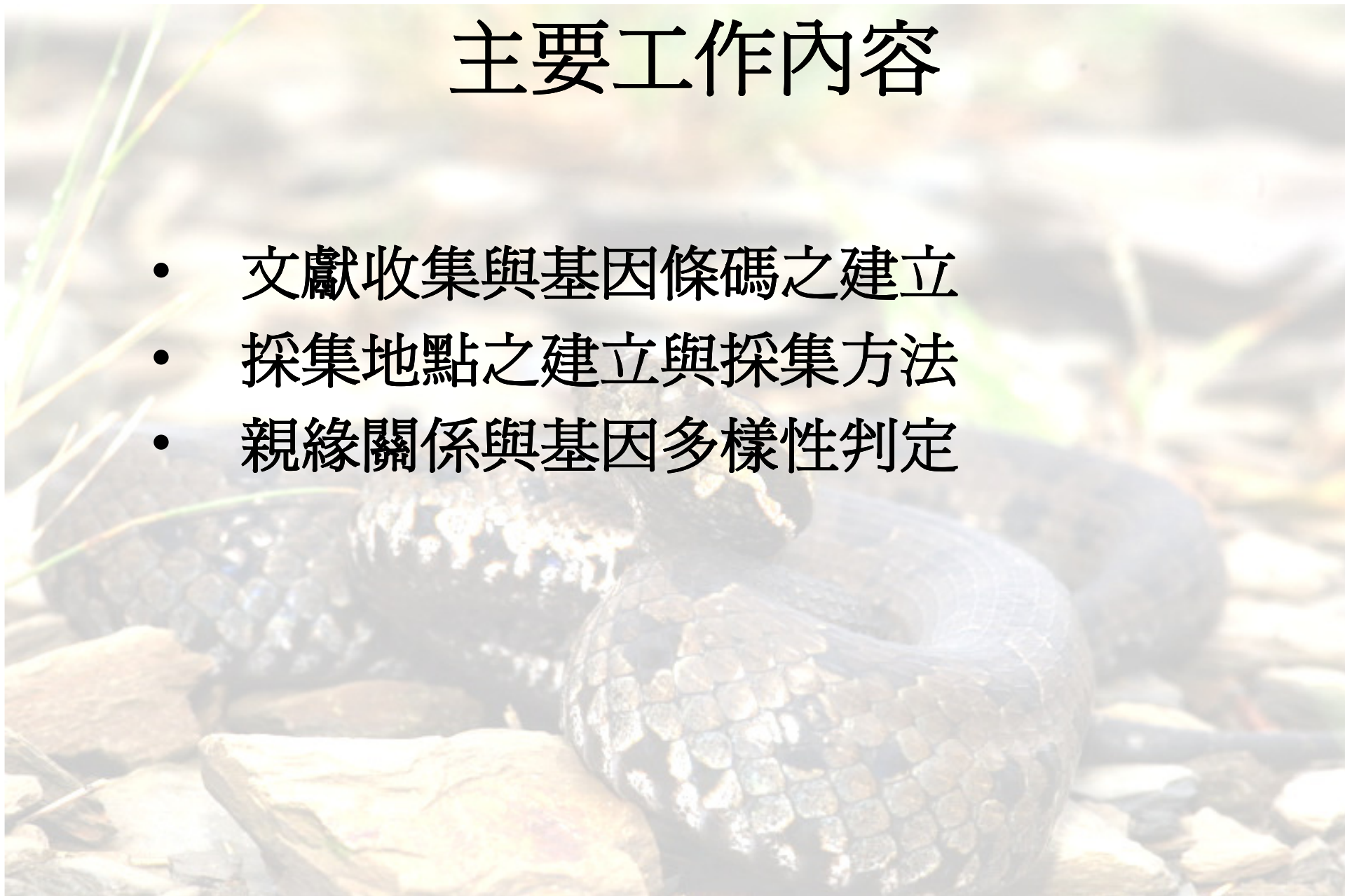
上傳至NCBI GeneBank

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
control Region
MtDNA(12S
16S)：粒線體DNA

主要工作內容

- 文獻收集與基因條碼之建立
- 採集地點之建立與採集方法
- 親緣關係與基因多樣性判定



採集工作-1



採集工作-2

特生中心



820林道



洛韶



天祥



表 3-1 兩棲爬蟲類樣本採集之物種及地點分布表

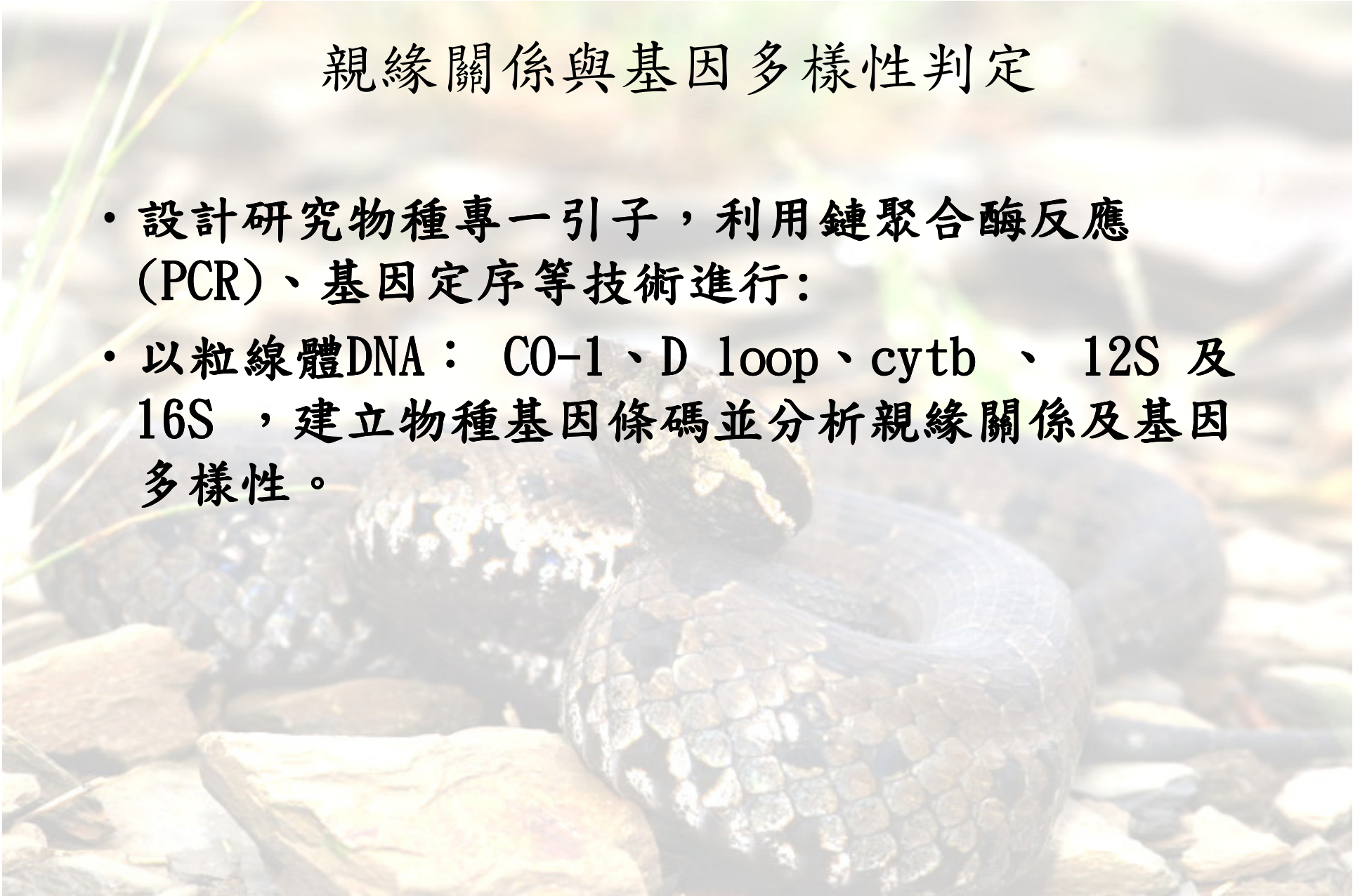
採集物種名稱	調查地點														
	低海拔						中海拔					高海拔			
	砂卡礑	布洛灣	天祥	西寶	洛韶	和平林道	蓮花池	台八線 126 km	新白楊	台八線 133 km	台八線 131 km	台八線 119 km	關原	大禹嶺	小風口
兩棲類															
山椒魚科 Hynobiidae															
楚南氏山椒魚 <i>Hynobius sonani</i>															V
蟾蜍科 Bufonidae															
盤古蟾蜍 <i>Bufo bankorensis</i>	V	V	V	V	V		V	V	V	V		V	V	V	V
樹蟾科 Hylidae															
中國樹蟾 <i>Hyla chinensis</i>							V								
赤蛙科 Ranidae															
斯文豪氏赤蛙 <i>Rana swinhoana</i>	V	V	V	V	V		V	V		V		V			
梭德氏赤蛙 <i>Rana sauteri</i>					V		V		V	V	V			V	V
樹蛙科 Rhacophoridae															
日本樹蛙 <i>Buergeria japonica</i>	V	V	V	V	V		V								
褐樹蛙 <i>Buergeria robusta</i>	V														
莫氏樹蛙 <i>Rhacophorus moltrecht</i>									V		V				
爬蟲類															
赤尾蜥 <i>Trimeresurus stejnegeri stejnegeri</i>	V			V											
龜殼花 <i>Trimeresurus mucrosquamatus</i>	V														
青蛇 <i>Cyclophiops major</i>	V														
雪山草蜥 <i>Takydromous hsueshanensis</i>															V
呂氏攀蜥 <i>Japalura luei</i>						V									

(採集時間：98年5月至11月)

註：V表示實際採集紀錄

親緣關係與基因多樣性判定

- 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、D loop、cytb 、 12S 及 16S ，建立物種基因條碼並分析親緣關係及基因多樣性。



12S mtDNA sequences of various frogs

F- 5'- CTTAAAACCCAAAGGACTTG-3'
R- 5'- GCTGCACCTTGACCTGACG-3

Forward primer

```

AB200929   ACGCCAGGGAACCTACGAGCT-ACGCTTAAAACCCAAAGGACTTGACGGTGTCCAC--CC 492
AB211472   CCGCCAGGGGATTACGAGCA-ATGCTTAAAACCCAAAGGACTTGACGGTGTCCAC--CC 499
NC_009422   CCGCCCGGAATTACGAGCCCAAGCTTAAAACCCAAAGGACTTGACGGTGTCCAC--CC 534
AY458593   TCGCCAGGGAACCTACGAGCT-ACGCTTAAAACCCAAAGGACTTGACGGTACCCACATCG 532
AF118475   ACGCCTGGGTATTACGTGCTTTAGCTTAAAACCCAAAGGACTTGACGGTATCCAC--CC 88
AF160768   TCGCCAGGGAACCTACGAGCTA-ACGCTTAAAACCCAAAGGACTTGACGGTACCCATATCC 89
AF458125   ACGCCAGGGGATTACGAGCTTTAGCTTAAAACCCAAAGGACTTGACGGTGACCCAC--CC 102
          **** * * * * * **** * * * * * * * * * * * * * * * *
  
```

```

AB200929   CCCTAGAGGAGCCTGTTCTTTAATCGATGATCCCCGCTACACCCACCACCCCTTGCTCG 552
AB211472   CACTAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGATGATCCCCGCTTACCTAACCCCCCTCGCCCA 559
NC_009422   ACCTAGAGGAGCCTGTTCTGTAATCGATTCCCCCGATCTACCTCACCACCTTCTAGCTTT 594
AY458593   ACCTAGAGGAGCCTGTCTATAATCGATAACCCCGCTTAACCTCACCATTTTTAGCA-A 591
AF118475   ACCTAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGATGATCCACGCTATACCAAACCATTTCTTGCCCTA 148
AF160768   CCCTAGAGGAGCCTGTCTATAATCGATAATCCACGTTAAACCTCACCATTTTTAG-TTA 148
AF458125   ATCTAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGATAATCCACGTTATACCTTACCATTCTAGCTTT 162
          ***** * * * * * * * * * * * * * * * *
  
```

```

AB200929   -T--CAGTCTGTATACCTCCGTCGAAAGCCTACCGTGTGAACGTT-TACAGTAGGCTC-A 607
AB211472   -T--CAGTCTGTATACCTCCGTCGAAAGCCTTACCATGTGAACGCC-CGACAGTAGGCTC-A 614
NC_009422   -TTTCAGCCTGTATACCTCCGTCGTAAGCTTACCATATGAACGTTTCTCAGTGAGCTA-A 652
AY458593   -TATCAGCCTGTATACCTCCGTCGTCAGCTTACCCCGTGAGCGCTATCTAGTGAGCTC-A 648
AF118475   CTTTCAGCCTGTATACCTCCGT                               GTTCTA 208
AF160768   CT--CAGCCTGTATACCTCCGT                               CTTT-A 205
AF458125   TT--CAGCCTGTATACCTCCGT                               GTCC-A 219
          * * * * * * * * * * * * * * * *
  
```

Reverse primer

```

AB200929   ATGACCTCCCCCGTTGTCATATCGTCAGGTCAAGGTGCAGCTTAAGGGACGGAAAGTA 667
AB211472   GTGATTCAAC-----ATCAACACGTCAGGTCAAGGTGCAGCTCAAGGGAGGGGAAGTA 667
NC_009422   AAGATTTCTTC-----ATAAATACGTCAGGTCAAGGTGCAGCTCACGAAGTGGCAAGCA 706
AY458593   ATGTCTTTAC-----ATCAATACGTCAGGTCAAGGTGCAGTAAATGAAATGGGAAGAG 702
AF118475   ATGGCCACCC-----GTCAATACGTCAGGTCAAGGTGCAGCTATGAAATGGAAAGCA 261
AF160768   ATGTTTATTC-----ACCAACACGTCAGGTCAAGGTGCAGCAATGAAGTGGAAAGAG 258
AF458125   ATGGCCACCC-----ACCAGCACGTCAGGTCAAGGTGCAGCTATGAAATGGAAAGCA 273
          * * * * * * * * * * * * * * * *
  
```

~200 bps

16S mtDNA sequences of various frogs

F- 5'- TATAAGACGAGAAGACCC-3'

R- 5'- ACCCTGATCCAACATCGAG-3'

```
AF026370      TGATCTCCCCGTGAAGAAGCGGGGATATTCCTATAAGACGAGAAGACCCCATGGAGCTTC 135
AF026369      TGATCTCCCCGTGAAGAAGCGGGGATAATTAATAAGACGAGAAGACCCCATGGAGCTTC 135
NC_009422     TGATCTCCCCGTGAAGAAGCGGGGATAAAAAATAAGACGAGAAGACCCCATGGAGCTTT 1079
AB200953      TGATCTCCCCGTGAAGAAGCGGGGATTATATATAAGACGAGAAGACCCCATGGAGCTTT 133
AB211495      TGATCTCCCCGTGAAGAAGCGGGCATCAAAAATAAGACGAGAAGACCCCATGGAGCTTT 535
AB159589      TAATCTCCCCGTGAAGAAGCGGGGATAAAATAAGACGAGAAGACCCCATGGAGCTTT 218
AY458593      TAATCTCCCCGTGAAGAAGCGGGGATAAATAAGACGAGAAGACCCCATGGAGCTTT 1079
*****
```

```
AF026370      AAACCTCAA-GGCAACT--CCCA--TTCAAGA 179
AF026369      AAACCTTC-AGCAACT--TTTA--CTTAAAA 179
NC_009422     AAACCTAGTACCAACT--GCCC--ACTTGCA 1123
AB200953      AAACCCAACGTACACC--CCTG--CCCCAAA 179
AB211495      AAACCTACTATGCACC--TCTGTGCC--CCTAC-CA-CATAAC-----ACAAGTA 579
AB159589      AAACAATGCAGCATCTGCCCCATAACATAAAATTTCGGAAT--TTAAACTC-CCTGGAC 275
AY458593      AAACCTAATAACATTT-CCTTAAACACTCACTCTTCAGAGTACTCACATTTACTTCGGC 1138
****
```

Forward primer

```
AF026370      GTACTGCGTAACAGTTTTAGGTTGGGGTGACCGCGGAGCATAAACAAACCTCCACGACGT 239
AF026369      GCTATGCCTACCGGTTTTGGGTTGGGGTGACCGCGGAGAAAAAATTAACCTCCATGACGA 239
NC_009422     GCTATGGTTACTAGTTTTTCGGTTGGGGTGACCGGAGTAAAAATTAACCTCCACGATGA 1183
AB200953      GATCTGTACGTCAGTTTTAGGCTGGGGGGGCCACGGAGTAAAAATTAACCTCCACAACAA 239
AB211495      GTCCTGCATATTAGTTTTAGGTTGGGGGACCACGGAGTACAAATTAACCTCCACAACAA 639
AB159589      AGTGTGACTGCAAGTTTTGGTTGGGGTGACCGGAGCATAATATAACCTCCATGCTGA 335
AY458593      TTTCTGATTATTAGTTTTAGGTTGGGGTGACCGCGGAGCAAAAAATAACCTCCACATTGA 1198
*****
```

~260 bps

```
AF026370      ATAGAACTAA-ACCTTTATCTAAGAGCTACTTCTCTAAGAATCAGCAAACCTGACGTAAAA 298
AF026369      ACAGAACTAA-ATCTTTATCTAAGAGCTACTTCTAAGAATCAGTAAACCTGACGTAAAA 298
NC_009422     AAGGAACTAATAACCTAACCTATGAGCTACAGCTCTAAGTATCAACAAATTGACT--AAT 1241
AB200953      ATGGG-CTAATACCCCTTATCCACGATTACTAATCTAAGAACACAAAATTGATGTTTAA 298
AB211495      ACGGG-CTAACCCCTTATCCACGAGACACAACTCTAAGAATTACTAACTAATGCTTA- 697
AB159589      A--A-GAATCTTTCTAAGCTAAGAACCAAAATCCAAGCATCAATAAATTGACATCCAT 391
AY458593      ATGGG-GAACTCCCTGAGACACGAGCTACAACCTCTACACCAATAAATTGACATCAAT 1257
*****
```

```
AF026370      TGACCCGATA-TCC-GATCATCGAACCAAGTTACCCTGGGGATAACAGCGCAATCCACTT 356
AF026369      TGACCCGATT-ATC-GATCAACGAACCAAGTTACCCTGGGGATAACAGCGCAATCCACTT 356
NC_009422     TGACCCAATT-ACTTGATCAACGAACTTACCTGGGATATACAGCGCAATCCACTT 1300
AB200953      TGACCCGTTA-ACTCGATCAATC--AATCTACTT 357
AB211495      CGACCCGATA--TTCGATCAATC--AATCTACTT 755
AB159589      TGACCCAATATACTTGAACAAC--AATCCACTT 451
AY458593      TGACCCAATATA-TTGATCAACGATCTTACCTGGGATATACAGCGCAATCCGCTT 1316
*****
```

Reverse primer

```
AF026370      CAAGAGCCCATATCGACAAGCGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGGTAACCCNGTG 416
AF026369      TGAGAGCTCATATCGACAAGTGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGGTATCCCGGTG 416
NC_009422     CAAGAGCTCATATCGACAAGTGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGGTATCCAGTG 1360
AB200953      CAAGAGCCCATATCGACAAGTGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGGTATCCTAGTG 417
AB211495      CAAGAGCCCATATCGACAAGTAGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGGTATCCTGGTG 815
AB159589      CAAAAGCTCCTATCGACAAGTGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGGTCTCCAGTG 511
AY458593      CAAGAGCTCCTATCGACAGCGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGGTATCCAGTG 1376
*****
```


梭德氏赤蛙基因條碼(Co1)

學名：*Rana sauteri*

來源：中橫公路133K

```
TATTTGTATGATCTGTCCTAATTACTGCAGTCTTACTACTCCTTTCTCTTCCTGTCTTAG
CTGCAGGAATTACTATACTATTAACAGACCGAAATTTAAATACCTCTTTTTTTGACCCGG
CGGGAGGAGGAGACCCAATCCTTTATCAGCACTTATTCTGGTTTTTTGGTCACCCCGAGG
TATATATTCTTATTTTACCAGGCTTCGGCATAATTTACATATTGTAACCTATTATGCTG
GTAAAAAGGAACCATTTCGGCTACATGGGTATAGTTTGAGCTATAATATCAATTGGGTTTT
TAGGGTTTTATTGTCTGAGCTCATCATATGTTTACTGTCCGCATAGACGTCGACACTCGAG
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  
TATATATTCTTATTTTACCAGGCTTCGGCATAATTCACATATTGTAAGTTATTATGCTG  
GTAAAAAGGAACCATTCGGCTACATGGGTATAGTTTGAGCTATAATATCAATTGGGTTTT  
TAGGGTTTATTGTCTGAGCTCATCATATGTTTACTGTCGGCATAGACGTCGACACTCGAG  
CCTACTTTACCTCAGCTACTATAATTATTGCCATCCCAACAGGAGTTAAAGTCTTTAGTT  
GACTTGCAACGCTTCACGGCGGAACAATAATGGGACGCTGCTATACTTTGAGCTCTTG  
GTTTTATTTTTTTTATTTACAGTGGGGGGCCTAACAGGCATTATTTTAGCTAATTCTTCAC  
TTGATATTGTCCTTCATGACACATACTACGTAGTTGCACACTTTCCTATGTATTATCAA  
T
```



楚南氏山椒魚CO1基因條碼序列

學名：*Hynobius sonani*

來源：太魯閣 820林道

```
CACTTCACTTAGCAGGTATTTTCATCAATTCTTGGGGCTATTAATTTTATTACAACCTCAA  
TTAATATAAAACCCCTATCAATATCACAATATCAAACACCCCTTATTTGTCTGATCAGTAT  
TAATCACTGCTATTCTCCTCTTACTCTCATTACCAGTCCCTGCTGCAGGAATTACAATAC  
TCTTAACAGACCGAAACTTAAACACTACATTCTTTGACCCTGCAGGAGGAGGAGACCCCTG  
TTCTTTACCAACACCTCTTCTGGTTTTTTTGGCCATCCAGAGGTCTATATTCTTATTCTCC  
CAGGATTTGGGATAATTTCTCATATTGTTACATATTATTCGGCAAAAAAGAACCTTTTG  
GATATATAGGTATAGTATGAGCTATAATATCAATCGGATTACTAGGATTTATTGTTTGAG  
CCCACCATATATTTACAGTTGATCTTAATGTTGACACACGAGCTTATTTTACATCAGCTA  
CAATAATTATTGCTATCCCCACTGGGGTAAAAGTATTTAGCTGATTAGCAACAATACATG  
GAGGATCAATTAAATGAGATGCTGCAATATTATGAGCTTTAGGTTTTATTTTTTTATTTA  
CCGTTGGCGGATTAACTGGCATTGTTCTTGCCAATTCATCATTAGATATTGTCCTACATG  
ATACTTATTATGTAGTGGCACATTTTCATTACGTTTTAT
```



盤古蟾蜍CO1基因條碼序列

學名：*Bufo bankorensis*

來源：太魯閣砂卡礑

```
TACCCTATATCTTATTTTTGGGGCCTGAGCAGGGATAGTAGGAACTGCCCTT
AGCCTCCTTATCCGAGCTGAGCTGAGTCAACCCGGCTCCCTCTTGGGCGAT
GATCAGATTTATAATGTCATTGTTACCGCCCACGCCTTCGTCATAATTTTCTT
TATGGTCATGCCCATCCTAATCGGAGGCTTCGGTAACTGACTTGTCCCCCTG
ATAATTGGGGCCCCTGACATAGCCTTCCCCCGAATGAACAACATAAGCTTTT
GATTACTCCCCCATCATTTCTACTCCTCTTGGCATCCGCCGGAGTCGAAGC
AGGAGCAGGAACCGGCTGAACTGTATACCCCCCCTGGCTGGGAACCTTG
CACACGCAGGCCCATCAGTCGACTTAACCATTTTTTCCCTCCACCTTGCGG
GTGTATCATCTATCCTAGGCGCAATTAATTTTATTACAACAACCCTTAACATG
AAGCCACCATCAATGACTCAATACCAAACACCCTTATTTGTGTGATCCGTCT
TGATTACTGCTGTTTTACTCCTACTCTCCCTGCCAGTCCTCGCTGCAGGAAT
CACTATACTCCTCACTGACCGAAACCTAAACACAACATTCTTTGACCCTGCT
GGCGGAGGCGACCCCATCCTCTATCAACACCTCTTT
```



中國樹蟾CO1基因條碼序列

學名：*Hyla chinensis*

來源：太魯閣蓮花池

```
TACTCTATACTTGGTATTTGGGGCTTGGGCTGGCATAGTAGGCACAGCCCTC
AGCCTCCTAATTCGAGCAGAATTAAGCCAGCCTGGCTCCCTTCTAGGTGAC
GATCAAATCTATAATGTCATCGTCACGGCTCACGCCTTCGTCATAATTTTCTT
TATGGTTATACCAATCCTTATTGGGGGATTGGAAGTACTAGTCCCCTTAA
TAATTGGCGCACCTGATATAGCCTTCCCACGAATAAACAATATAAGCTTCTG
ACTTCTTCCACCATCTTTTCTTCTTCTTAGCCTCAGCAGGTGTTGAGGCA
GGAGCAGGAACCGGATGAACTGTCTATCCACCCCTTGCCGGAATCTAGCC
CATGCCGGCCCATCCGTAGACTTAACCATTTTTTCATTACATCTGGCAGGTG
TCTCTTCAATTTTAGGAGCTATTAATTTATTACCACAATTCTTAACATGAAA
CCCCCATCAATAACACAATACCAAACCCCGCTATTTGTTTGATCTGTTCTAAT
CACTGCTGTACTTCTACTTCTTTCTCTCCCGTGCTAGCAGCGGGTATTACC
ATACTACTCACGGACCGAAACCTCAACACCACATTTTTCGACCCGGCAGGA
GGAGGGGACCCCGTACTATACCAACACTTATTC
```



斯文豪氏赤蛙CO1基因條碼序列

學名：*Rana swinhoana*

來源：太魯閣砂卡礑

```
GACTCTATACCTAATCTTTGGCGCCTGAGCCGGGATAATCGGAACAGCCTTA  
AGCCTGCTAATTCGAGCGGAGCTCAGCCAACCAGGAACCCTGCTCGGCGA  
CGACCAAATCTATAATGTAATCGTAACCGCCCCACGCATTTGTAATAATCTTCT  
TTATGGTTATGCCTGTTTTGATCGGAGGCTTCGGCAACTGACTAGTCCCGTT  
AATAATCGGGGCTCCTGACATAGCCTTCCCACGAATAAATAATATAAGCTTC  
TGACTGCTTCCACCCTCCTTCTTCCTCCTATTAGCATCTTCTATGGTAGAAGC  
CGGGGCTGGCACAGGCTGAACTGTCTATCCCCCCTGGCAGGGAACCTGG  
CTCATGCCGGCCCATCCGTAGACCTAGCTATCTTCTCCCTCCACCTAGCCGG  
AATTTCACTATCCTCGGGGCTATTAACCTTTATTACAACAATTATTAATATAAA  
GCCCCAGCCATCGCCCAATACCAAACCTCCCCTCTTTGTCTGATCCGTTTAA  
ATCACC GCCATTCTTCTACTACTTTCTTCTCCTGTTTTAGCCGCCGGAATCAC  
GATACTTCTAACTGATCGAAACCTTAATACCACCTTTTTTGACCCAGCAGGA  
GGCGGAGACCCGGTCCTGTATCAACACCTGTTC
```



日本樹蛙CO1基因條碼序列

學名：*Buergeria japonica*

來源：太魯閣砂卡礑

```
TACCTTATACTTAATTTTTGGTGCGTGGGCAGGTATAATTGGAAGTGGCCCTTA  
GCCTTTTAATTCGAGCTGAATTAGCTCAACCTGGATCACTGCTCGGTGACG  
ACCAAATTTATAATGTAATTGTTACCGCCCACGCTTTTGTTATAATTTTCTTTA  
TAGTTATACCAATTTTAATTGGTGGATTTCGGGAAGTGAAGTATTCTCTAATA  
ATTGGTGCCCCAGACATGGCCTTCCCTCGAATAAATAAATAAGCTTCTGAC  
TTCTTCCACCCTCATTCTTCTTTTACTAGCCTCTTCTACTGTAGAAGCGGGT  
GTAGGAACCGGTTGAACAGTTTACCCCCCATTAGCAGGTAATCTTGCTCAT  
GCAGGCCCATCAGTAGACTTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGTGTATC  
ATCAATTTTAGGGGCCATCAACTTTATTACTACAATTTTAAATATAAAACCGT  
CATCAACTACACAATATCAAACCCCCCTGTTTGTTTGATCTGTTCTAATTACC  
GCTGTTCTTCTTCTTCTATCTCTTCTGTTTGTAGCTGCAGGAATTACCATACT  
TTAACAGACCGTAATTTAAATACTACATTCTTTGACCCTGCTGGAGGAGGA  
GATCCAGTTCTTTACCAACACCTTTTT
```



褐樹蛙CO1基因條碼序列

學名：*Buergeria robusta*

來源：太魯閣砂卡礑

```
CACCTTATATTTAATTTTGGCGCATGGGCCGGAATAATCGGCACCGCACTT
AGTCTTCTAATTCGGGCTGAACTCGCTCAGCCCGGGTCCCTCCTGGGAGAC
ACCAAATTTATAATGTAATTGTCACTGCCCATGCCTTTGTTATAATTTTCTTTA
TGGTCATGCCTATCCTAATCGGCGGTTTTCGGAAACTGATTGGTCCCCCTAAT
AATCGGGGCTCCTGATATAGCCTTTCCCCGCATAAACAACATAAGTTTCTGA
CTACTACCTCCCTCATTTCTTCTACTACTAGCTTCCTCTACAGTTGAAGCAG
GAGCTGGCACAGGGTGAAGTGTATACCCCCCCTAGCAGGAAATCTTGCTC
ACGCCGGACCCTCTGTAGACTTAGCTATTTTTTCCCTTCACCTTGCAGGGAT
CTCCTCGATTCTAGGGGCTATCAACTTCATTACAACCTATTCTGAACATAAAG
CCTGCCTCAACGACACAATACCAAACACCCCTCTTTGTGTGATCTGTGCTA
ATTACAGCAGTATTACTACTTCTGTCCCTTCCAGTCTTAGCTGCGGGGATTA
CAATGCTTCTCACAGACCGCAACTTAAACACCACCTTTTTTGACCCAGCAG
GCGGAGGTGACCCAGTATTATACCAACACCTATTT
```



青蛇C01基因條碼序列

學名：*Cyclophiops major*

來源：太魯閣砂卡礑

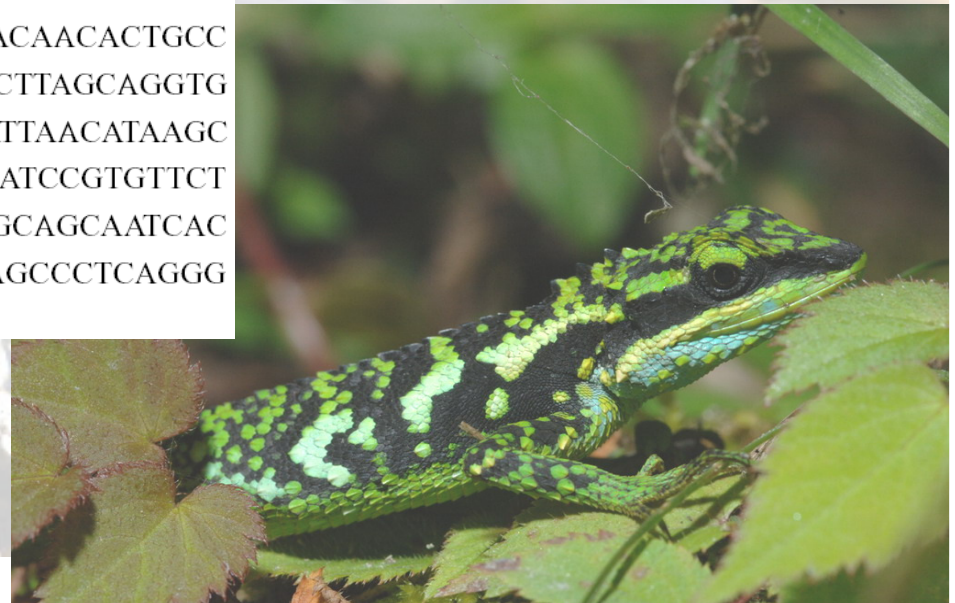
```
AACCCTATACCTACTATTTCGGCGCATGATCTGGCCTAATTGGGGCCTGCCTA
AGCATTCTTATACGAATAGAACTAACCCAACCAGGGTCGCTACTAGGCAGC
GACCAAATCTTTAATGTTCTAGTAACAGCCCATGCTTTCATCATAATTTTCTT
TATAGTAATACCCATTATAATCGGGGGGCTTTGGAAACTGACTAATCCCCTTAA
TAATCGGAGCACCGGACATAGCCTTCCCCCGCATAAATAATATGAGTTTTTG
ACTACTTCCACCAGCACTACTCCTCCTTCTATCTTCATCTTATGTAGAAGCCG
GTGCCGGTACAGGATGAACAGTATACCCCCCCTATCAGGAAATCTAGTAC
ACTCAGGCCCCATCAGTAGACCTAGCAATCTTCTCCCTACACCTAGCAGGCG
CCTCCTCCATCCTGGGAGCAATTAACCTTCATTACAACATGTATCAACATAAA
ACCTAAAGCTATACCAATATTCAATATCCCACTATTCGTTTGATCAGTACTTA
TCACTGCCATTATACTACTACTGGCCTTGCCAGTACTAGCAGCGGCAATCAC
CATACTACTAACAGATCGAAACCTCAACACTTCTTTCTTTGACCCCTGCGGA
GGAGGGGACCCTGTACTGTTCCAACACCTGTTC
```

呂氏攀蜥CO1基因條碼序列

學名：*Japalura luei*

來源：太魯閣和平林道

```
CACCATGTACTTCCTATTCGGGACTGCAGCTGGCCTCACTGGGTCCTGGTT  
AGCCTTCTTGTCGGTACACAATAATTCAGCCTGGACAAACCATCGGAGGG  
GACTCCCTGTACAATGTCTTTATCACATTTTCATGCCCTCGTTATAATTTTCTT  
ATAGTCATACCAATCATGATCGGCGGATTCGGAAACTGGCTGATTCCACTTA  
TACTCGGAGCCCCAGACATAGCATTCCCGCGAATAAACATAAGCTTCT  
GACTTCTACCGCCATCATTCTTCTTTTACTTTTATCCTCTGGGTTCTGAAGCC  
GGGGTCGGCACCGGATGAACTATTTATCCGCCACTATCAAACAACACTGCC  
CACTGCGGGCCGTCCATAGATCTGGCCATCTTTTCTCTACACTTAGCAGGTG  
CCTCCTCAATTATGGCCGCCATCAACTTTATTACTACTTGTATTAACATAAGC  
CCAAATCTCACCTCACCATACAACTGGCCTTTATTTGTCTGATCCGTGTTCT  
TCACCGCCATCCTTCTGCTACTGTCACTTCCTGTGTTAGCTGCAGCAATCAC  
CATGCTTCTTACAGACCGAAATCTCAACACATCATTCTTGAGCCCTCAGGG  
GGCGGAGACCCCGTCCTATTTCAACACCTGTTC
```



梭德氏赤蛙基因多樣性分析



圖 3-11 以粒腺體DNA 12S序列對梭德氏赤蛙之親緣關係樹狀圖

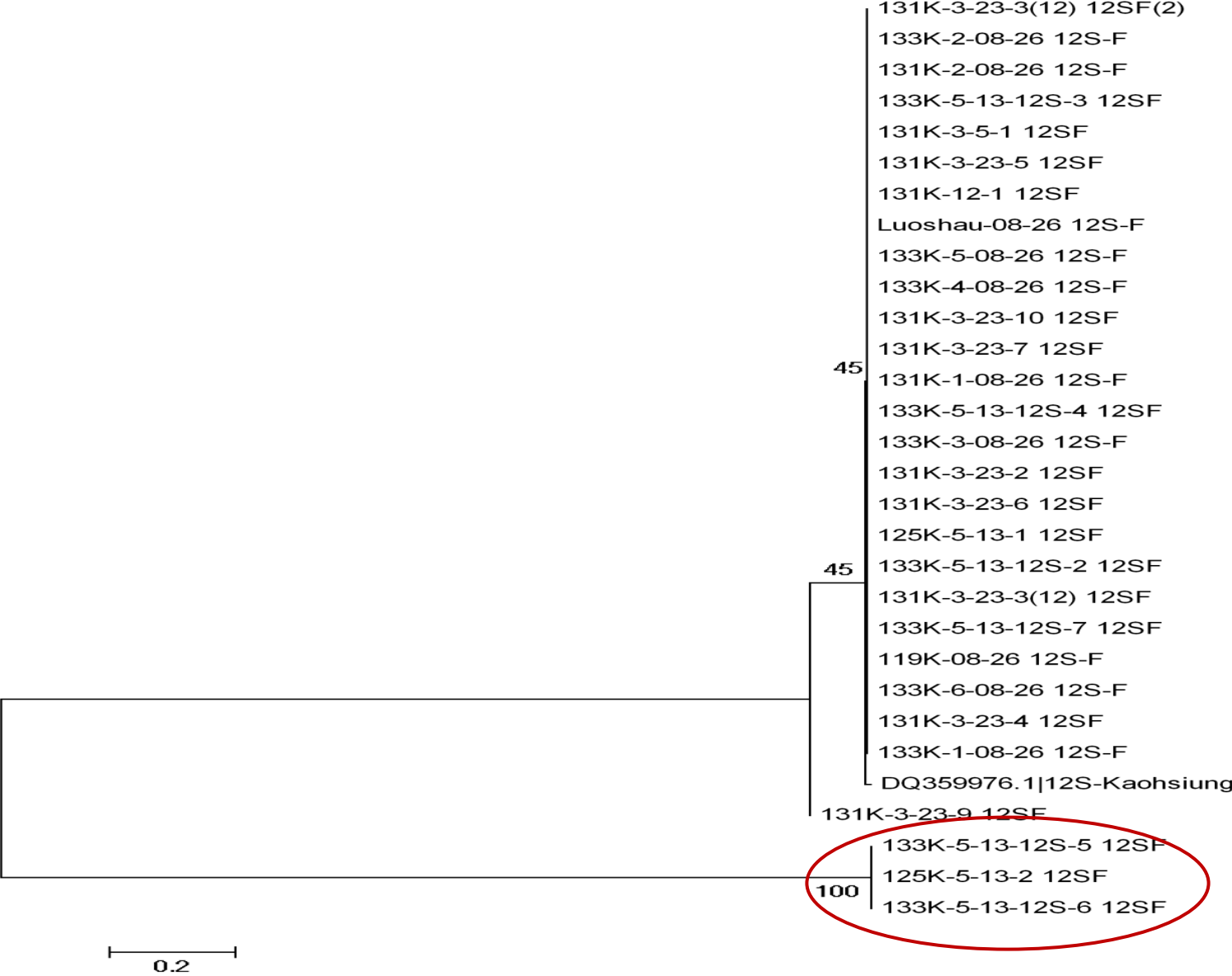


圖 3-11 以粒腺體DNA 16S序列對梭德氏赤蛙之親緣關係樹狀圖



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.

結 論

本研究以中橫沿線不同海拔高度做為採集地點，其中我們發現梭德氏赤蛙分布的地點主要海拔較高的地區，如**133K**(海拔**2000**公尺)、**131K**(海拔**2000**公尺)、大禹嶺(海拔**2500**公尺)、雪訓中心(海拔**3000**公尺)等。

在本研究在基因多樣性判定的結果中，顯示梭德氏赤蛙在不同樣點之間的基因交流程度偏低，此一結果顯示梭德氏赤蛙僅分佈情況不但是呈現間斷分布，其基因交流亦有可能因地形阻隔而受到限制，進一步分析樣點之核苷酸歧異度更發現，有些地點之族群正面臨**possible balancing selection**或族群正在分化(**population subdivision**)。

目前已對太魯閣國家公園園區內之兩棲爬蟲類共十種，包括目前數量相當稀少、具有重要保育價物種，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**CO1**基因部份序列解碼，並將陸續上傳至**NCBI Barcodes database**。本研究所採用之實驗平台，未來可繼續運用於園區內其他物調查，進一步建立國家公園內之資料庫。

立即可行之建議

1. 就擇定之兩棲爬蟲類物種完成分子標記，進行國家公園個體、物種、族群和保育單位鑑定，探知物種是否有外來個體的加入，並進一步探討其在國家公園生態系之扮演角色。與已知資料作比較，並建立物種之親緣關係。
2. 進行擇定物種之分子標記的比較，尋找其間是否有基因變異，確定基因流動範圍，嘗試建立微動物地理分區。
3. 架構國家公園生態保育之基因多樣性研究。針對此擇定物種之特殊基因或CO 1/ mt DNA建立基因條碼，上傳至NCBI基因銀行（Genbank）或建立國家公園資料庫。

感謝你聆聽
感謝心聆聽



敬請指教
敬請指教

梭德氏赤蛙基因多樣性分析

梭德氏赤蛙 <i>Rana sauteri</i>	調查地點					樣本合計
	低海拔	中海拔				
	洛韶	台八線 133 K	台八線 131 K	台八線 125 K	台八線 119 K	
mt DNA 12S	1	12	13	2	1	29
mt DNA 16S	1	10	15	1	1	28

採集工作-1



生物的分類與鑑定

- 了解地球上所有的物種為生物多樣性研究的終極目標，即使傾全世界分類學家之力量，以傳統分類的鑑定、發表程序，此目標仍相當地遙遠。近年來**DNA**序列資訊大量累積，及相關統計分析工具快速進展，已廣泛地應用於系譜學、系統分類學、族群遺傳學...等領域。**DNA**條碼順著這股趨勢，成為新的議題被提出，預期它可以成為快捷的工具，用於物種鑑定及加速發現新的物種。

中長期性建議

- 1、建議可針對不同海拔高度設立長期監測樣區，長期監測不同人爲開發壓力下所造成的兩棲類族群的差異。各樣區地點及環境屬性分列如下：
 - ◎0~500 公尺－砂卡礑溪(溪流、遊憩區)、布洛灣(遊憩區)。
 - ◎500~1,000 公尺－梅園竹村步道(人爲開墾區)。
 - ◎1,000~1,500 公尺－蓮花池(自然環境)、洛韶(人爲開墾區)。
 - ◎1,500~2,000 公尺－慈恩(人爲開墾區)。
 - ◎2,000~2,500 公尺－關原(遊憩區)。
 - ◎2,500 公尺以上－合歡溪上游(自然環境)。
- 2、建議在未來的保育研究中，可針對本研究中橫公路沿線兩棲類豐度較高的地點，深入公路周圍的自然環境進行兩棲類調查，或設置捕捉陷阱，以調查分析公路邊緣與周圍自然環境間兩棲類族群的差異，作為未來設置或改善生物廊道的依據。
- 3、建議針對兩棲類進行焦點物種的評選工作，選取具有中長期性建議指標性物種、護傘種功能的兩棲類為焦點物種，優先列入長期監測及保育的對象，以使在有限的資源下，長期監測環境的變化，並維持、保育園區內的生物棲地與生物多樣性。

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。

微衛星 DNA 引子開發

- 由於其解析度及遺傳變異較一般常用的粒線體及核基因大，微衛星 DNA 引子的開發有助於未來分子鑑定和婚配生殖系統的研究。
- 野外採集的樣本經 DNA 萃取後，以 Rsa I 和 Alu I enzyme 分解後，挑選大於 500 bps 的 DNA 片段，接上 SNX linker，然後以 PCR 反應將其這些片段放大，然後再以帶有螢光的 GATA 和 GAAA 重覆的 oligo-nucleotides 接上，用 TA cloning kit 轉殖到 vector 裡，以同位素 γ ^{32}P 標定，所得產物長度為 400–850 bps 的片段再以 PCR 和 DNA 定序確認。

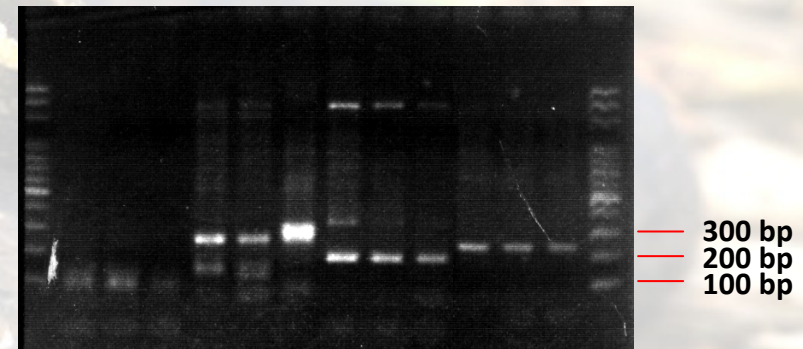
盤古蟾蜍微衛星座多型性初步探討

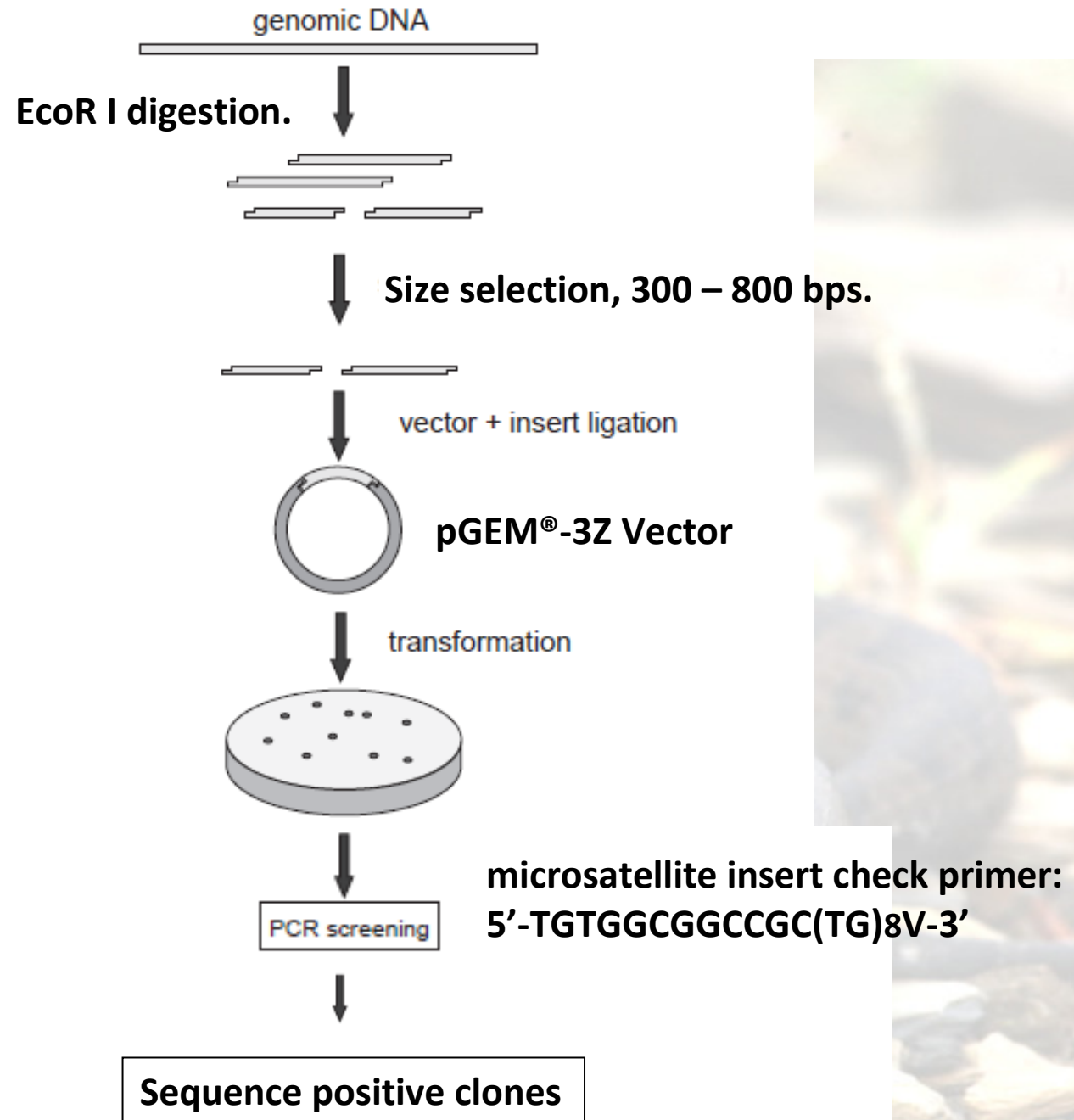
一、中華大蟾蜍微衛星座引子

Locus		Primer sequence (5' → 3')
<i>Bbuf</i> _μ 13	F	AGCCTACATTGCTCAATCCGATAC
	R	GTGGCGTGGAGGGTCATAAAATC
<i>Bbuf</i> _μ 23	F	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	CATTGCGTCTGCTGCAGATTACAC
	R	TTAGGGATTGCCGTCAGTTGTC
<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	TTGGAGAGGGGAAAACCTTCACAC
	R	CGGATTCTGTGGGGGTGCTC
<i>Bbuf</i> _μ 39	F	GATCCCCATCCACTGGTCA
	R	AAAAATGTCTCTTTCTCCCTCTC
<i>Bbuf</i> _μ 46	F	GATTTCTGCGTGAGCCAGTG
	R	CGCCCGCCAAACCTTCTGAAC
<i>Bbuf</i> _μ 47	F	GGATCAAGCCCTCAGACAATC
	R	CACAGCAGCAGAAATTTGACCAG
<i>Bbuf</i> _μ 62	F	GCACATTCTGTGTCCGTGTATAG
	R	ATTCCGAAAAACGAAAAGAAAAGAG
<i>Bbuf</i> _μ 63	F	TCGGGGCACCATCAAGTGTAC
	R	ATCATCATGTTAGCGGCTCTTG

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





Degenerate primer for prolactin receptor

1 mpqnlapttp svavtllfl ytvslnaqsl pgkpvidkr syekvtfscw wkpgsdgglp

5'-GARAARGARACNTTYACNTGYTGGTGG-3'

61 tnysllyrke ndpkiyecpd yvtsglnscf fdkahtsfwi fyhiyvnatn algsnvsdee
121 svdttyivqp ypptnvslav esghhdlilk wlppamvdvq sgwltlkyev rykeekeqew
181 eahlvgnqlk lkfgltpgg nyvvqvrckp dsghwsewst esyiqipggg kktdltlwis
241 igalsavicl tmiwtmalkr cslmsci pp vpgpki mgfd tqllksgksd ellsalgcqs

5'-TTDATYTTWGGNCCNGGNACTGGNGG-3'

301 fpptsdyddl lveflevdds kqhliasrdq sqqkqnikvc padtdndsgr gscdspfshs
361 egckelrnlq pgvdstdrgi hdhwppqntv mdgsftnfsd nksnmwpdvp stgnqiskss
421 yqdikditnl aisamtasqh ellipcndkn qlrcfktiei ideekttkps dfedlrskgv
481 eadtvhlpn dkppflparm mdyvevhkvs qnnalalipk hnensvrtdq ysvlvpnrey

Prolactin receptor protein of [*Bufo japonicus*]. GenBank: BAF75354.1

N = A,C,G or T

Y = C,T

R = A,G

性別決定基因檢測

- 純化蝌蚪與成體之genomic DNA，利用鏈聚合酶反應技術測定公母比例。

The XX/XY(♂) sex-determining system,

W_{HA}5-22A F- 5'- TTACAGCAACAGCAAATGG-3'

R- 5'- ATCAGGGACTGGGTCTGT-3'

Table 1

W_{HA} 5-22A Genotype Frequencies in 136 *Hyla arborea*
Tadpoles from Seven Swiss Ponds

	235/235 ^a	235/241 ^b	Ho ^c
Arborex	9	11	0.55
Camp Romain	12	8	0.40
Corjon	7	13	0.65
Champagne	9	11	0.55
Bomerie	8	12	0.60
Mossièrès	14	6	0.30
Plage	10	6	0.375
Total	69	67	0.493

^a Number of homozygotes 235/235.

^b Number of heterozygotes 235/241.

^c Heterozygosity.

Microsatellite markers for the European tree frog *Hyla arborea*
Arens *et al.* Mol Ecol. 2000 Nov;9(11):1944-6

Sex Identification of the Black-faced Spoonbill (*Platalea minor*)

Yeong-Hsiang Cheng¹, Tzong-Fu Kuo², Der-Nan Lee¹, and Ching-Feng Weng^{3,*}

¹Department of Animal Science, National I-Lan University, Ilan, Taiwan 260, R.O.C.

²Department of Veterinary Medicine, National Taiwan University, Taipei, Taiwan 106, R.O.C.

³Institute of Biotechnology, National Dong-Hwa University, Hualien, Taiwan 974, R.O.C.



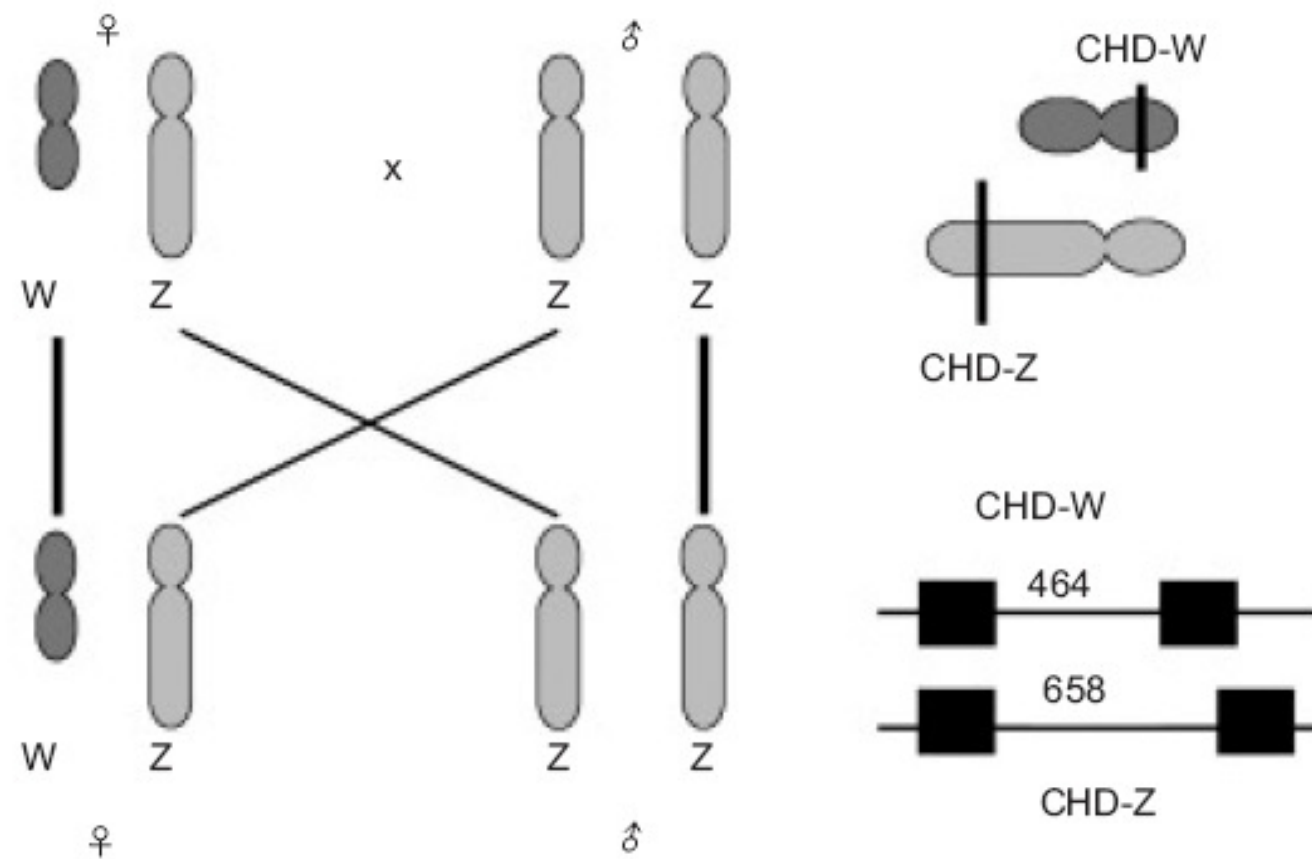


Fig. 1. Illustration of the locations of the CHD-W and -Z genes in the Black-faced Spoonbill, and lengths of the PCR products.

W ATTGAAATGATCCAGTGCTTGTTCCTCAATTCCTTTTATTGATCCATCAAGTCTCTA 60
Z ATTGAAATGATCCAGTGCTTGTTCCTCAATTCCTTTTATTGATCCATCAAGTCTCTA 60

W AAGAAATTGAATAATACAGTTAAAAAGGAA--CTCCTACTATATTCTAA-TTGGAGCAAC 117
Z AAGAGATTGAATACTACAGTTAAAAAGTAATGCTTATACTACATTCAAAATCAGAGAAGC 120

W TTGAATTCTCAATTGCCAAAACAATGGGGGGGGGGGGGGGAAATAAGAGTAATGTAA 177
Z CTGAATTCTCACCTGCTAAAACGTGTTATGGAAG-----GAAAAAAAGTAATGCAT 172

W CACTTCAT---CTTCTAATTCAATCAGTTTCATTTCAAAATACTATTACGATATAGTA 233
Z CACTTCATGTAATTTTTTAATTCACCAGTTTAATTTCAAAATACTACATAGGATATAGCG 232

W ATTGCCAGTCTTT-----TCCGTGTACAT----- 256
Z ATTGCCACTCTTTCTAGAAAAAGAACGCTTTTCTTATACCTTTTCTTAAGCAAAGTGGT 292

W ---AAAATTAAA-----TTTTCATAAATCT 278
Z AAAGAAATCAGAAAACAGTTGAAGTTGGAAGGGACCTCTGGAGGTCACTTGTACTAATC 352

W TCTTAC-----AAA-----AAGGACA-----CTTT- 299
Z CCTGTCTCAGGCAGGGGCGGCTAAAGCAGGTTGTCCAAGGTCAATGTCCAGGTGGCTTTTG 412

W -----
Z AATGTCACAGAGAATGGAGATGCAATAACCTCTGAACAACCTGTTCCAGTGCTCTGTAC 472

W -CTTGAGATAAAGCGG-----TAAAGATCAAGGCTTCTTGGCTACTACC 342
Z CCTCAGAGTAAAGAAAAGATTTTTCTTATATCCAAAAATAAAACTTCTTGGCTACTACC 532

W AGCAAAATTCCTTACCTGAAAGGGGAACTGACGATACTTCAAATACTCTGCTAGGATGTCT 402
Z ACCAAGATTCTTACCTGAAAGGGGAACTGACGATACTTCAATATCTCTGCTAGGATGTCC 592

W AGCATCCTCACCATCTGTGAGAGAAAATCAGTACTCTGTTGCCACGTTCTCGTAGACGAATC 462
Z AGCATCCTCACCATCTGTGAGAGAAAATCAGAACTCTGTTGCCACGTTCTCGTAGACGAATC 652

W AG---- 464
Z AGTAAC 658
**

(A)				
AY464013	1	g t t a c t g a t t c g t c t a c g a g a a c g t g g c a a c a g a g t t c t g a t t t t c t c a c a g a t g g t g a g	60	
AB080660	1	 t	60	
AF181828	1253	 g a	1310	
AF181825	1253	 g	1310	
AF004397	2605	 g t	2662	
AY217131	2543	 g c a	2600	
AY464013	61	g a t g c t g g a c a t c c t a g c a g a a t a t c t g a a g t a t c g t c a g t t t c c c t t t c a g g t a a g a a t	120	
AB080660	61	 c c	120	
AF181828	1311		1361	
AF181825	1311	a t	1362	
AF004397	2663	 c	2710	
AY217131	2601	 t a a	2600	
(B)				
AY464014	361	a a g g g a a a c t g a c g a t a c t t c a a a t a c t c t c g c t a g g a t g t c t a g c a t c c t c a c c a t c t g a	420	
AB080661	108	 t	149	
AF181827	1358	 t	1299	
AF181824	1358		1299	
AY217129	2879	 a	2820	
AY217130	2664	 a	2605	
AF181826	1547	. . a g . . t	1488	
AY464014	421	g a g a a a a t c a g t a c t c t g t t g c c a c g t t c t c g t a g a c g a a t c a g	464	
AB080661	48		91	
AF181827	1298		1255	
AF181824	1298	 a	1255	
AY217129	2819	 a	2776	
AY217130	2604	 a	2561	
AF181826	1487		1444	

Fig. 4. (A) Comparisons of Black-faced Spoonbill CHD-Z (120 nucleotides) with the CHD-Z of some other bird species. (see footnote in appendix)

性別決定基因檢測

The ZZ/ZW(♀) sex-determining system,

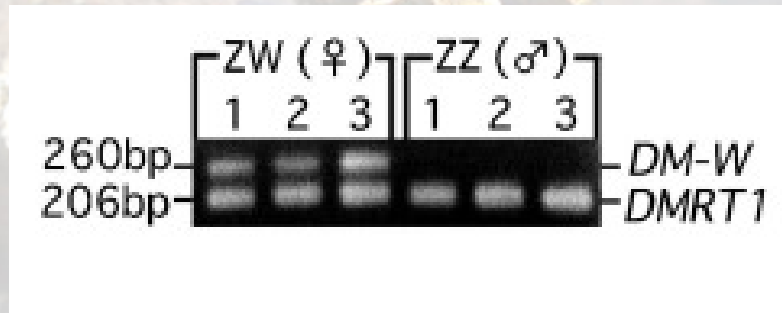
DM-W F-5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

R-5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

DMRT1 as a control

F-5' -AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

R-5' -AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'



A W-linked DM-domain gene, *DM-W*, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*

Yoshimoto *et al.* Proc Natl Acad Sci. 2008 Feb19;105(7):2469-74.

預期成果及施政之助益

- 就擇定之兩棲爬蟲類物種完成分子標記，進行國家公園個體、物種、族群和保育單位鑑定，探知物種是否有外來個體的加入，並進一步探討其在國家公園生態系之扮演角色。並與已知資料作比較，以建立物種之親緣關係。
- 進行擇定物種之分子標記的比較，尋找其間是否有基因變異，確定基因流動範圍，嘗試建立微動物地理分區。
- 架構國家公園生態保育之基因多樣性研究。針對此擇定物種之特殊基因或CO 1/ Mt DNA建立基因條碼，上傳至NCBI基因銀行（geneBank）或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。

野外採集兩棲、爬蟲類標的物種

1. 採集成體 (海拔、地理區域、月份、性別)
2. 計數蝌蚪或卵數量、採樣(性別比例)
3. 收集棲地資料(氣溫、溼度...)

基因多樣性研究

1. 性別決定基因 (含卵及蝌蚪性別比例)
2. CO 1或MtDNA(12S, 16S) (親緣關係)
3. PRL、PRLR、TH、THR、POMC
GTH α 、GTH β 、TSH β (親緣關係)

兩棲類

1. PRL、PRLR、TH、THR、POMC
GTH α 、GTH β 、TSH β (功能性基因表現量分析)
2. 蝌蚪或卵荷爾蒙干擾實驗

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

1. 生物地理
2. 物種雌性化

- **DNA條碼的序列大約有650個字母的長度，存在於粒線體之中，稱為CO -I基因（cytochrome c oxidase subunit 1）。**
- **粒線體存在於生物的細胞之中，粒線體之所以是一個很好的遺傳鑑定工具，是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。**
- **而且粒線體DNA的演變相對於染色體DNA快，因此累積更多資訊可用來鑑定物種。**
- **粒線體基因組16,640 bp 的全長序列；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。**

- 台灣生物多樣性資料的台灣物種名錄（**TaiBNET**, <http://taibnet.sinica.edu.tw>）及台灣生物多樣性資訊入口網（**TaiBIF**, <http://taibif.org.tw>）兩網站已建置完成
- 多樣性科學國際計畫（**DIVERSITAS**）、全球生物多樣性資訊機構（**GBIF**）、全球物種名錄、生命條碼、海洋生物普查計畫（**Census of Marine Life**）等各種國際組織及其合作計畫。
- 國際生命條碼倡議計畫」（**International Barcode of Life Initiative, iBOL**）全力推動，欲完成50萬種、500萬件條碼的登錄。

研究內容

- 1.文獻收集與回顧（含相關物種基因資料庫搜尋基因條碼之建立比對）。
- 2.針對全球暖化及物種雌性化問題建議指標物種。
- 3.指標物種生存環境壓力與生理現象間關聯性探討。
- 4.指標物種的基因多樣性探討
- 5.相關復育計畫研議。

cytochrome C oxidase subunit 1(Co-1)

- 選擇此段基因是由於 **Co-1 gene**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。

cytochrome C oxidase subunit 1

- 這一段被稱為DNA條碼的序列大約有650個的長度，存在於粒線體之中，稱為CO -1基因（cytochrome c oxidase subunit 1）。粒線體存在於生物的細胞之中，粒線體之所以是一個很好的遺傳鑑定工具，是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來鑑定物種。作為DNA條碼，存在於粒線體中，稱為CO-I基因（cytochrome c oxidase subunit 1）為主。

•

粒線體DNA應用

1. 探討動物親緣關係 (phylogenetic relationship) 與估計遺傳相關之研究。
2. 細胞色素b基因 (cytochrome b, *cytB*) 之演化速度適中；而核酸控制D-環區 (control region, D-loop) 具較高之序列置換率 (substitution rate)，比較兩者之序列，可廣泛應用於動物族群系統演化之研究。
3. 應用mtDNA序列置換率與歧異度 (divergence) 可估測不同物種間演化分歧時間，建構親緣關係樹狀圖 (phylogenetic tree) 與探討不同物種之演化關係。