

太魯閣國家公園兩棲爬蟲類基因條碼建立及多樣性分析

DNA barcode and Genetic diversity analysis of Amphibians and reptiles in Taroko National Park

翁慶豐* 陳立學 李國璋
國立東華大學 生物技術研究所

摘要

目前國家公園動物保育研究多以物種名錄建立、族群分佈與變遷、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，融入基因多樣性之中，以期建立完整生態系研究及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。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與區區物種之分子標記關係架構，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。

關鍵字：基因多樣性、遺傳變異、基因條碼、功能性基因、性別決定基因

基因條碼建立

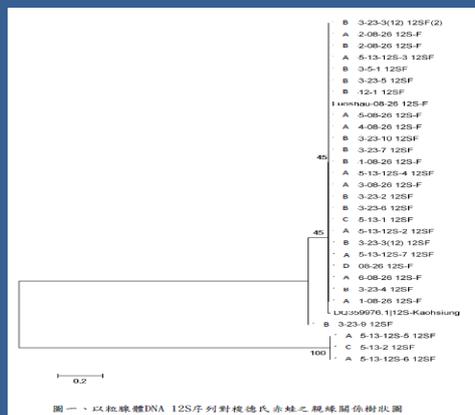
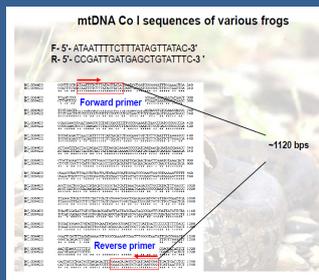
DNA條碼 (DNA barcode) 一種創新、簡便、迅速的鑑識系統：以粒線體基因的片段來標示物種。提供類似圖書出版的ISBN全球通用碼，讓世界上每個物種都有獨特的身份證。

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：楚南氏山椒魚、盤古蟾蜍、中國樹蟾、斯文豪氏赤蛙、梭德氏赤蛙、日本樹蛙、褐樹蛙、青蛇、雪山草蜥、呂氏攀蜥。

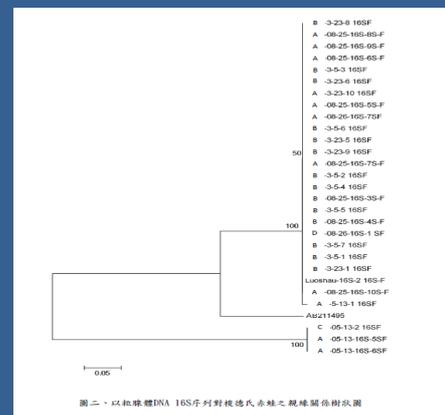
表一、梭德氏赤蛙12S與16S之Tajima's Method 中性假說檢定結果

	m	S	p_i	θ	π	D
12S	29	123	0.745116	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, $p_i = S/m$, $\theta = \pi/p_i$, and π = nucleotide diversity. D is the Tajima test statistic.



圖一、以粒線體DNA 12S序列對梭德氏赤蛙之親緣關係樹狀圖



圖二、以粒線體DNA 16S序列對梭德氏赤蛙之親緣關係樹狀圖

基因多樣性分析結果與建議

本研究以中橫沿線不同海拔高度做為採集地點。其中梭德氏赤蛙分佈的地點主要在中高海拔地區，約1500~3000公尺，如雪訓中心(海拔3000公尺)等。將其粒線體DNA中12S與16S基因選殖定序後，分別得到其親緣關係如圖一(12S)、圖二(16S)，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)，一為在調查樣區內為侷限性分佈(Cluster II)。梭德氏赤蛙之分佈型態呈現間斷分佈的型態，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佈型態兩棲類。而在本研究之基因多樣性判定的結果中(表一)，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佈，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、具有重要保育價值物種，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COI基因部分序列解碼，並將陸續上傳至NCBI Barcodes database。本研究所採用之實驗平台，未來可繼續運用於區內其他物種調查，進一步建立國家公園內之資料庫。

立即可行之建議

- 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COI / 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
- 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。
- 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，維持、保育區內的生物棲地與生物多樣性。

表一、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				
		洛部	A	B	C	
mt DNA 12S	1	12	13	2	1	29
mt DNA 16S	1	10	15	1	1	28



圖 3-1 蛙類粒線體 16S DNA 序列及引子設計圖(如框內所示)



圖 3-2 蛙類粒線體 12S DNA 序列及引子設計圖(如框內所示)

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)，一為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，