

翁慶豐* 陳立學 李國璋 徐培源
國立東華大學 生物技術研究所

摘要

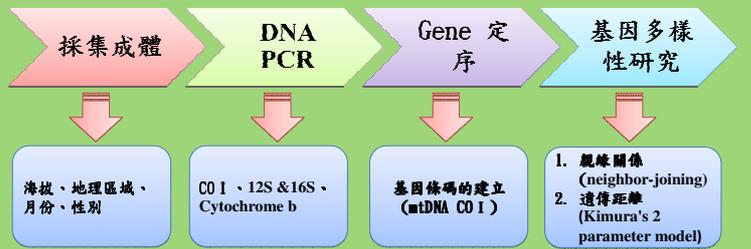
多樣性的基因是物種適應與演化的重要基礎，生物保育的三個層次包括生態多樣性、物種多樣性與基因多樣性，多樣性之研究成果，將可作為國家公園之經營管理政策擬定之基礎。故本計畫挑選出太魯閣國家公園內生態地位、功能重要或易受害的物種等作為生態系經營指標物種進行研究。

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。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。中國樹蟾粒線體16S DNA序列，結果發現與NCBI已發表AF315161、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。

本研究建立之實驗平台，完成可做為基因條碼序列之CO I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

材料與方法



兩棲類本種類	爬蟲類本種類	海拔分布	採集地點(實際海拔)
1. 日本樹蛙 (0-1500 m)	1. 呂氏攀樹 (1000-2000 m)	0 m	分亨喀橋下、步道 (<100 m) 五管處周圍 (100 m)
2. 潤樹蛙 (0-1500 m)	2. 謝文義氏攀樹 (0-1500 m)	500 m	菁寮潭 (570 m) 天祥 (650 m)
3. 謝文義氏赤蛙 (0-2500 m)	3. 台灣攀樹 (0-1000 m)	1500 m	高寶園小徑水塔 (915 m) 塔則 (1100 m)
4. 梭德氏赤蛙 (0-3000 m)	4. 身背屬 (0-1500 m)	2000 m	148水溝 (1380 m) 新白蘭 (1645 m)
5. 中國樹蟾 (0-1000 m)	5. 龜殼花 (0-1000 m)	2500 m	133K橋下 (2000 m) 131K岩壁下 (1970 m) 119K圓橋橋下 (2166 m)
6. 小鳴蛙 (0-1500 m)	6. 菊池氏龜殼花 (1500-2500 m)	3000 m	關島加地地 (2374 m) 115.5K (2365 m) 大烏龜 (2365 m)
7. 盤古蟾蜍 (0-3000 m)	7. 紅竹蟾 (0-1000 m)		特在中心橋潭下 (3000 m) 雲洞中 (3200 m)
8. 台灣山椒魚 (2100-3000 m)	8. 雲山翠蜥 (1500-3000 m)		
9. 楚南氏山椒魚 (2600-3100 m)	9. 中國石龜子 (0-1500 m)		
10. 麗紋石龜子 (0-2500 m)	10. 麗紋石龜子 (0-2500 m)		
11. 赤尾鮎 (0-1000 m)	11. 赤尾鮎 (0-1000 m)		

基因多樣性分析討論與建議

本研究以中橫沿線不同海拔高度做為採集地點。其中梭德氏赤蛙分布的地點主要在中高海拔地區，約1500~3000公尺，如雲洞中心(海拔3000公尺)等。將其粒線體DNA中12S與16S基因選定序後，分別得到其親緣關係如圖三(12S)、圖四(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)。梭德氏赤蛙之分布型態呈現間斷分布的型態，此一分布型態，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中，表一，顯示梭德氏赤蛙在不同採集地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，進一步分析採集地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、呂氏攀樹及中國樹蟾等，完成可為基因條碼序列之COI基因部份序列解碼，並將陸續上傳至NCBI Barcodes database，本研究採用之實驗平台，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

- 進行採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。針對此採定物種之特殊基因或CO I/ 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。(感謝內政部營建署經費補助)

◆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。(感謝太魯閣國家公園同仁計劃執行上協助)

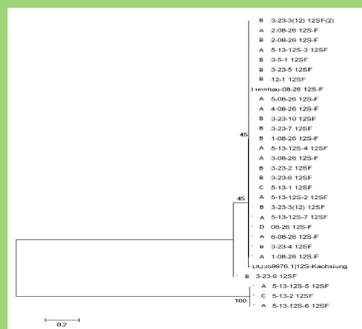
結果

表一、兩棲類已定序基因條碼

物種名稱	NCBI 序列號	本計劃代號
臺灣山椒魚 <i>Rhinophrynus formosanus</i>	HQ323816.1	NA
楚南氏山椒魚 <i>Rhinophrynus sennoi</i>	NA	Y
盤古蟾蜍 <i>Bufo hankarensis</i>	NA	HQ050552
黑腹蟾蜍 <i>Bufo melanostictus</i>	AY458502.1	NA
中國樹蟾 <i>Alya chinensis</i>	AY458503.1	HQ050556
小鳴蛙 <i>Microlis carina</i>	NA	Y
謝文義氏赤蛙 <i>Rana sinobana</i>	NA	HQ050553
梭德氏赤蛙 <i>Rana suteri</i>	NA	Y
澤蛙 <i>Rana limochalis</i>	NA	NA
楚南氏赤蛙 <i>Rana latouchii</i>	NA	NA
日本樹蛙 <i>Buergeria japonica</i>	NA	HQ050554
福壽蛙 <i>Buergeria robusta</i>	GU244379.1	CH244379.1
望天蛙 <i>Chirixalus effinieri</i>	NA	NA
莫氏樹蛙 <i>Discophorus molletrui</i>	NA	HQ050555
白喉樹蛙 <i>Polypedates megacephalus</i>	AY458508.1	NA



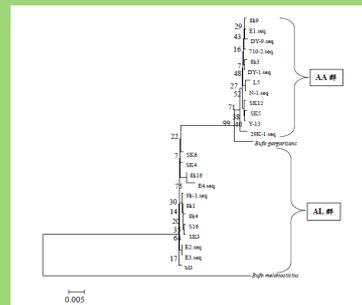
圖一、楚南氏山椒魚CO I 基因條碼序列



圖三、以粒線體DNA 12S序列對梭德氏赤蛙之親緣關係

表三、不同海拔之梭德氏赤蛙親緣關係樣本分布

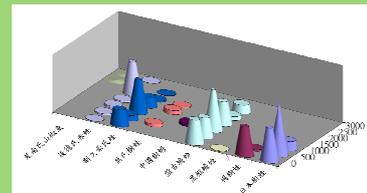
採集地點	調查地點				樣本合計
	低海拔	A	B	中海海拔	
梭德氏赤蛙 <i>Rana suteri</i>	1	12	13	2	28
mt DNA 12S	1	12	13	2	29
mt DNA 16S	1	10	15	1	28



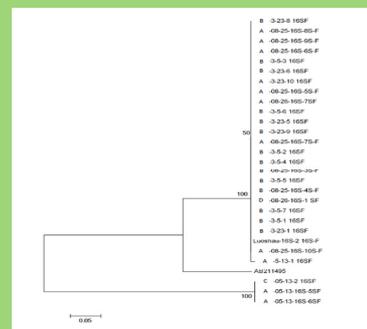
圖五、高低海拔盤古蟾蜍16S 親緣關係

表二、爬蟲類已定序基因條碼

物種名稱	NCBI 序列號	本計劃代號
赤尾鮎 <i>Trimeresurus sibiricus</i>	NC_012148.1	Y
龜殼花 <i>Trimeresurus macrotarsus</i>	NA	Y
奇蛙 <i>Cyclophaps minor</i>	NA	HQ050558
雲山翠蜥 <i>Takydromus leucostriatus</i>	NA	Y
呂氏攀樹 <i>Japalura luei</i>	NA	HQ050557
謝文義氏攀樹 <i>Japalura sinobana</i>	NA	NA
台灣攀樹 <i>Takydromus formosanus</i>	NA	NA
梭德氏龜殼花 <i>Trimeresurus gracilis</i>	NA	Y
紅竹蟾 <i>Elaphe parphyraea nigrofasciata</i>	NA	NA
中國石龜子 <i>Dumosa chinensis</i>	NA	Y
麗紋石龜子 <i>Dumosa elegans</i>	NA	Y



圖二、各海拔與物種調查之數量

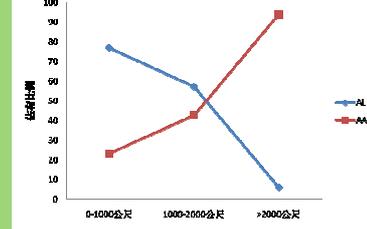


圖四、以粒線體DNA 16S序列對梭德氏赤蛙之親緣關係

表四、梭德氏赤蛙12S與16S之中性假說檢定結果

	m	S	A	B	π	D
12S	29	123	0.751516	0.183895	0.137745	-0.940034
12S-133K	12	123	0.751516	0.256803	0.216702	-0.396840
16S	28	131	0.457174	0.116881	0.094949	-0.929272
16S-133K	30	141	0.470000	0.106338	0.171222	-0.242359

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, π = S/m, θ = π * m, and π = nucleotide diversity, D is the Tajima test statistic.



圖六、盤古蟾蜍AL群及AL#群在各海拔分布比例變化