

國立臺灣師範大學生命科學系碩士論文

以粒線體中細胞色素氧化酶 I
部分基因片段探討台灣產溝渠豹蛛
之族群遺傳結構及親緣地理關係

**Study on population genetic structure and
Phylogeography of *Pardosa laura*
(Araneae: Lycosidae) in Taiwan
based on COI of Mitochondrial DNA**

研究生：林雅惠

Ya-Hui Lin

指導教授：陳世煌 博士

Shyh-Hwang Chen

中華民國九十八年一月



目 錄

附表目次.....	II
附圖目次.....	III
摘要.....	IV
英文摘要.....	V
前言.....	1
材料與方法.....	10
結果.....	17
討論.....	23
結論.....	29
參考文獻.....	30
附錄一：溝渠豹蛛 (<i>Pardosa laura</i>)基因型 A 之部分 mtDNA <i>COI</i> 基因序列.....	50
附錄二：台灣地區溝渠豹蛛 (<i>Pardosa laura</i>)之基因型 A 和中國地 區溝渠豹蛛，以及星豹蛛 (<i>P. astrigera</i>)與同科脈蝟蛛 (<i>Wadicosa fidelis</i>)之部分 <i>COI</i> 序列比較.....	51

附表目次

表一、台灣地區溝渠豹蛛的採集樣點代號、位置和樣本數.....	38
表二、台灣地區溝渠豹蛛之 <i>COI</i> 部分序列資料.....	39
表三、台灣地區溝渠豹蛛各樣點之基因型數、核苷酸歧異度和基因型歧異度...	40
表四、溝渠豹蛛各分群之基因型數量、核苷酸歧異度和基因型歧異度.....	41
表五、台灣地區溝渠豹蛛各樣點之基因型種類、數目和基因型頻率.....	42
表六、溝渠豹蛛各群間之遺傳分化指數 F_{ST} 和基因交流指數 Nm	43

附 圖 目 次

圖一、台灣地區溝渠豹蛛各樣點之位置圖.....	44
圖二、台灣地區溝渠豹蛛各樣點基因型之頻率分布.....	45
圖三、以 maximum parsimony 方法重建台灣地區溝渠豹蛛之親緣關係樹型圖....	46
圖四、以 neighbor-joining 方法重建台灣地區溝渠豹蛛之親緣關係樹型圖.....	47
圖五、台灣地區溝渠豹蛛基因型之 minimum spanning network.....	48
圖六、台灣地區溝渠豹蛛各分群之頻度分布圖 (frequency spectrum)	49

摘要

台灣陸域動物親緣關係之分化模式，受於物種行為能力、氣候變遷、板塊活動及人為活動所影響，但是在眾多研究之中，尚未有針對廣泛分布的無脊椎動物的族群遺傳結構作探討。台灣地區溝渠豹蛛 (*Pardosa laura* Karsch, 1879) 分布範圍從平地到海拔 3200 公尺以上，適合作為探討廣泛分布種之分群情形。本研究由 34 個樣點、150 隻溝渠豹蛛，利用 689bp 粒線體 DNA 之色素氧化酶 I (*CO I*) 基因片段當作分子遺傳標誌，並輔以中國地區溝渠豹蛛、星豹蛛 (*P. astrigera*) 和同科脈媧蛛 (*Wadicosa fidelis*) 為外群，來建立台灣地區溝渠豹蛛的族群結構，推估其演化上經歷的歷史事件，評估是否有隱藏種存在的可能性。結果在 24 種基因型 (haplotype) 所建構的最儉約法則 (Maximum parsimony criterion)、鄰聚法 (Neighbor joining method) 及網狀親緣圖 (minimum spanning network) 之親緣關係分析法，皆將本島本種分為兩大系群，其中系群 I 可再分成三個小單群，包括台灣島內 IA 亞群、IB 亞群和中國亞群，顯示台灣地區溝渠豹蛛為多系群 (polyphyletic group)，且族群結構呈現出垂直分層分化的地理分布類型 (altitudinal patterns or stratum patterns)，與過去研究所認知的陸域動物地理分化模式不相同。而其偏高的核苷酸歧異度 (π) 和基因型歧異度 (h) 數值指出族群結構為不同系群再次接觸所形成，因而推估溝渠豹蛛的族群結構可能受多次入侵 (mutli- incursion) 作用而形成兩大系群。然而再重新檢測台灣地區溝渠豹蛛的形態特徵，卻未能從生殖器上有相對應其遺傳結構變異的形態，僅有 B 群的胸板有穩定的全黑斑紋，因此建議未來研究者能夠加強台灣地區三個分群間的交配行為探討和微棲地調查。

Abstract

Geographic barriers for inland animals would affect their phylogeography in Taiwan. The phylogeographic differentiation pattern could be limited by the behavior of the species, ancient climate change, plate movement of Taiwan or human activities. However, the study of population structure is seldom focus on the widely distributed invertebrate species in Taiwan. The distribution of *Pardosa laura* (Araneae: Lycosidae) ranges from low to high elevation that can be served as a model species to investigate the genetic differentiation pattern on the widely distributed species. Totally, 150 specimens were obtained from 34 localities in Taiwan. The 689bp of partial sequence of mtDNA cytochrome oxidase subunit I (*COI*) were used as a genetic marker in order to understand the population structure, the history of *P. laura* and the possibility of cryptic species in Taiwan. Using *P. astrigers* and *Wadicosa fodelis* as outgroups, the phylogenetic relationship among 24 haplotypes of *P. laura* from Taiwan all can be grouped into two major clades based on Maximum parsimony criterion or Neighbor joining method or minimum spanning network. The clade I can be subdivided into subclade IA, subclade IB and subclade China. The genetic differentiation of *P. laura* in Taiwan belongs to the altitudinal pattern which is different from those of previously reports and is a polyphyletic group. Higher values of both the nucleotide diversity (π) and the haplotype diversity (h) indicate that the genetic structure of *P. laura* is composed of different major groups and might be affected by the muti-incursion. However, the morphology of genital structures cannot be recognized for each group, only individuals of subclade IB all have the dark-marked sternum. A mating behavior investigation or microhabitat comparisons among three major groups of *P. laura* in Taiwan are strongly suggested in the future study.

前 言

台灣位於北緯 22-25 度和東經 120-122 度之間，被北迴歸線所橫跨，面積僅約 3.6 萬平方公里，係典型板塊碰撞而拱起之大陸性島嶼，處於歐亞大陸板塊和菲律賓板塊之交界帶，生物主要由舊北區 (Palearctic region)和東洋區 (Oriental region)之物種所組成 (Liu *et al.*, 2000)。另外，本島聳峙 258 座三千公尺以上的高山，依據海拔可區分為熱帶、溫帶和寒帶氣候區，營造多樣的植群棲息地，進而容納四次更新世 (Pleistocene)冰期的孑遺物種，導致台灣部份中高海拔之陸域動物與亞洲大陸北方及喜馬拉雅山東麓的生物為近緣種 (Emery *et al.*, 1971)。因而從地緣、地勢及地質歷史事件著眼，才能全面瞭解造成台灣島具有較高生物多樣性及龐雜物種的原因。

自從親緣地理學 (phylogeography)的提倡 (Avice *et al.*, 1987)和分子技術的進展，國內學者大量投入研究種內族群變異與地理結構間關聯性，藉以了解台灣陸域動物族群遺傳結構 (genetic structure)，結果顯示族群遺傳結構會受到物種的行為能力、冰河期或間冰期的氣候變遷、台灣島板塊運動以及人為活動所影響。

首先，物種的行為能力可從兩個觀點來看：(1)棲地依賴型 (habit-dependent)：若物種對潮濕環境有高度忠誠度 (site fidelity)，終生無法遠離水域生存，除非發生河川襲奪 (stream capture)事件，否則各水系族群間基因交流困難，最終依據水系分化，如台北樹蛙 (*Rhacophorus taipeianus*) (楊,1996)分成北部和中部水系系群。(2)物種有強大遷徙能力 (migration rate)：物種能進行長距

離的移動能力，使得在南北長為 240 公里、東西寬為 45 公里的台灣，族群間仍然保持基因交流頻繁、不分化，使得全島基因呈現單一形態，如青斑蝶 (*Parantica sita nipponica*) 在台灣與鄰近島嶼有季節性之遷徙行為 (林, 2002)、緣點白粉蝶 (*Pieris canidia*) 能作長距離的移動 (250-600m/day) (李, 2004)，因而台灣族群結構不分化。

其二，冰河期或間冰期的氣候變遷從三個角度來看：(1) 島嶼效應 (island effect)，隔離山頭猶如孤獨島嶼，低地高溫環境譬喻為海洋，當冰河期時中高海拔物種遷降於平地，自由移動於山脈間，但間冰期時物種受限於對溫度的耐受性，而無法穿越各山脈間深谷或溪流，逐漸依不同山脈分群，如短尾鼯 (*Anourosorex squamipes yamashinai*) 的北和南系群，及標蛇 (*Achalinus niger*) 的雪山山脈和中南部山區系群皆因無法跨越兩山脈間的低地而分化 (袁, 2003；謝, 2005)。(2) 避難所效應 (refugia effect)：認為台灣冰河事件促使族群遽減，殘留個體於避難所中，受到不同避難所環境所選擇，使得各族群趨向分化，如台灣蜓蜥 (*Sphenomorphus taiwanensis*)、藪鳥 (*Liocohla steerii*)、短肢攀蜥 (*Japalura brevipes*) 和金翼白眉 (*Garrulax morrisonianus*) 曾於中部形成多個避難所，各避難所族群演化上能累積獨特遺傳變異，而各自形成單系群 (郭, 2002；彭, 2005；周, 2006；劉, 2008)。(3) 多次入侵 (muti-incursion) 假說：認為多次冰期造成海平面下降，所形成陸橋允許不同祖先族群入侵至台灣島，得以讓物種有多系群，如大扁頭蟋蟀 (*Loxoblemmus appendicularis*)、台灣葉鼻蝠 (*Hipposideros terasensis*)、短腹幽螳

(*Euphaea formosa*)和白領樹蛙 (*Polypedates leucomystax*)等，皆因兩次入侵而造成台灣區有兩不同系群 (Yeh *e. al.*, 2004；朱, 2006；黃, 2008；張, 2008)。

其三，台灣島板塊運動 (plate movement theory)分為兩個方面來看：(1)隔離假說 (vicariance)：認為台灣造山運動使原本廣泛分布物種，受山脈隆起或支流形成，阻隔兩邊族群間的基因交流，遂而分成兩大系群，物種呈現地理區分化情況，如 *Metaphire yuhsii* (腔環蚓屬)在淡水河形成時 (2.5 百萬年前)被分隔為南、北兩系群 (張, 2005)、阿里山山椒魚 (*Hynobius arisanensis*)因玉山和阿里山山脈間的水平斷層 (40 萬年前)而被分為兩山脈系群 (賴, 2008)。(2)擴散 (dispersal)假說：認為單一起源的物種族群擴張後，受到距離隔離作用 (isolation by distance)，使分布兩端的族群基因交流不易，再加上中間型基因滅絕，使得族群結構呈現間斷地理分佈，如溪狡蛛 (*Dolomedes raptor*)的祖先族群遷移至台灣時，從中央山脈以北的平地，向東、西兩不同路徑擴散，而形成北、東和南部系群 (羅, 2007)。

最後，人為活動分為兩種觀點來看：(1)人為干擾性棲地破碎化 (habitat fragmentation)：認為人為建設所產生干擾效應，如縮減棲地面積的面積效應 (area effect)、阻礙個體移動的隔離效應 (isolation effect)，和切劃各棲地為核心區和邊緣區的邊際效應 (edge effect)，會影響族群間基因交流進，而促使分群，如彰化地區的澤蛙 (*Rana limnocharis*)受道路路基和矮牆等水泥阻隔 (官, 2004)、三義地區的赤腹松鼠 (*Callosciurus erythraeus*)受高速公路阻隔而分成兩系群 (陳,

2007)。(2)人為活動移除種化初期的隔離機制：當人為活動促使親緣相近的兩群再次接觸，產生基因滲入 (introgression)，呈現形態與遺傳不相對應現象，如烏頭翁 (*Pycnonotus taivanus*)和白頭翁 (*P. sinensis*)雖然有顯著羽冠的形態差異，然而因道路交通開發或放生活動，遂使特有種烏頭翁的獨特基因消失，兩物種間在粒線體控制區 (mitochondrial DNA control-region sequences)遺傳不分化 (許, 1998)。

然而眾多台灣陸域動物之族群遺傳結構的研究資料中，多以低海拔動物或中高海拔動物作探索，鮮少有針對台灣廣海拔分布的物種探討。究竟泛島性分布的物種之族群結構是否會分化嗎？而影響分化的模式又如何呢？僅能從梭德氏赤蛙 (*Rana sauteri*)、麗紋石龍子 (*Eumeces elegans*)、小家鼠 (*Mus musculus*)、台灣彌猴 (*Macaca cyclopis*)的遺傳變異文獻中略窺一視。陳 (1993)指出梭德氏赤蛙分為兩大水系，以淡水河和蘭陽溪族群為一群，以及濁水溪族群為另一群；孫 (1997)分析麗紋石龍子含有東、西兩系群；楊 (1997)認為小家鼠有東北、西北、中、西南和東部五大系群；儲 (2004)發現台灣彌猴的遺傳結構分為有東北、北、中、南和東部五大系群。這四篇文獻皆顯示族群結構有分化的情況，但是造成物種分化模式不盡相同。研究顯示梭德氏赤蛙因對潮濕環境的棲地偏好，而導致族群依據水系分化。麗紋石龍子因採樣設計錯誤，使得樣點不充足，而無法探討族群分化的機制。小家鼠以南部族群的遺傳多樣性指數最高，並依次向南、向北族群遞減，因而推估小家鼠在自然或人為活動下，由南部地區分別向南、向北擴散出去；

此外台灣和金門的小家鼠普遍具有 *cas-S4* 基因，而 *dom-TW* 基因僅為屏東族群與金門族群獨有，所以台灣地區小家鼠族群可能有涉及多次入侵所建構。由於台灣彌猴在近親系群的地理分布上呈現不連續性，所以台灣彌猴可能受避難所效應而異域分化出各系群。因此泛島性分布的物種之族群結構可能與物種本身的行為特質有相關連（梭德氏赤蛙），或受氣候變遷所導致（台灣彌猴），甚至有機會受到人為活動所影響（小家鼠）。但是以上結論是從這四個脊椎動物所推估，而廣泛分布的台灣無脊椎動物之族群分化模式如何呢？與脊椎動物相比，無脊椎動物的遷徙能力較差，族群結構分化模式是否更為顯著呢？因此選取無脊椎動物探討泛島性物種的族群結構分化模式是有其必要性。

目前全世界狼蛛科 (Lycosidae) 約有 110 屬 2339 種 (Platnick, 2009)，台灣共發現 8 屬 24 種 (魏, 2004)，包括豹蛛屬 (*Pardosa*) 8 種，其中溝渠豹蛛 (*Pardosa laura* Karsch, 1879) 能適應各種熱帶、溫帶和寒帶的氣候類型，分布於台灣之平地和中高海拔山區，為泛島性分布的物種，較偏好受人類輕度干擾的環境，常棲息於陽光直射、開闊地邊緣的陰暗草生地或落葉堆，如公園大樹下、森林小徑兩側或山路兩側峭壁上，通常為環境中的優勢種，唯冬季在中高海拔之結霜或積雪地上不易見到。

溝渠豹蛛成蛛體長約 5-7 mm，頭胸部的背甲底色呈褐色、具黃褐色中央縱帶、兩側有不規則黑色縱帶，胸板呈心型，且中央具有斑紋；而身體腹部背面呈灰褐色，前段中央具有一黃褐色縱斑，且最前端兩側各具有黑色斑，後段具有約

6 對黑褐色橫斑。雌蛛外雌器中隔呈倒 T 字型，交配孔明顯，垂兜一對隱約可見。雄蛛觸肢脛節至杯葉前端黑色，杯葉末端具有 1 對爪，中突腹面觀呈三角形，遠端突起稍圓鈍，近端突起向後腹側彎折，頂端發達成劍狀，其體型較雌蛛小，體色較雌蛛鮮明 (魏, 2004)。

溝渠豹蛛之生活史或行為的相關資料仍很缺乏的，僅能從親緣相近的他種豹蛛 (*Pardosa*) 來推估。根據他種的行為研究，得知豹蛛每小時的活動時間約為二十秒至六分鐘 (Ford, 1978; Walker *et al.*, 1999; Samu *et al.*, 2003)、每日位移 3-8 公尺 (Bonte *et al.* 2003; Bonte *et al.* 2006)、一生大多生活在出生地附近，且多與有親緣關係的個體交配 (Richardson *et al.*, 1986)。此外，雖 Richter (1970) 和 Weyman (1993) 認為幼小狼蛛具有牽絲進行空飄的能力，但是從以下兩點評估，揣測空飄在溝渠豹蛛上應該為很罕見的遷移方式：其一，溝渠豹蛛若蛛孵出後會在雌蛛腹部背面上共居一星期左右，其移動能力深受母蛛限制 (陳, 2001)；其二，本種僅於地表遊走，未曾被發現站在樹叢高處或懸掛在樹枝間而進行空飄。因而溝渠豹蛛活動力不高、擴散能力差和侷限基因交流，有利於族群分化。

近年分子生物學的技術應用在蛛形綱親緣地理學 (phylogeography)，學者藉由分析族群基因結構，了解族群遺傳變異在空間分布 (Boulton *et al.*, 1998; Bond *et al.*, 2001; Evans & Goodisman, 2002; Ayoub & Riechert, 2004; Chang *et al.*, 2007; Su *et al.*, 2007)，和明確判斷隱藏種存在與否 (Croucher *et al.*, 2004; Ramirez & Chi, 2004; Muster & Berendonk, 2006; Opell, 2006; Hendrixson & Bond,

2005ab ; Starrett & Hedin, 2007) , 得以重建物種過往歷史事件。

當分子技術以動物為目標時，常用粒線體 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 來當作遺傳標記，其結構為簡單之雙股封閉環形分子，總長度約 15MB~17MB，僅約核 DNA 的萬分之一，包含了 37 個功能基因以及一個含有複製和轉錄起點的控制區域 (D-loop)，基因分別為 22 個 tRNA 基因 (transfer RNA gene)、2 個 rRNA 基因 (ribosomal RNA gene)、和 13 個蛋白質基因 (protein coding gene) (Graur & Li, 2000)。由於粒線體 DNA 僅為母系遺傳，無基因重組的現象，且因缺乏修補系統，而具有比細胞核高出 5~10 倍的突變率，因此演化速度較快，可提供大量的種內基因多型性分析，適合探討地理親緣的主題。近年來進行族群遺傳結構的研究，以其內 12S rRNA、16S rRNA、細胞色素 b (cytochrome b) 和色素氧化酶 I (cytochrome oxidase I, *COI*) 的基因片段來探討遺傳變異。12S rRNA 和 16S rRNA 基因在種間是相當保守，適用在科以上的高階分類。細胞色素 b 和色素氧化酶 I 的基因在種內有較多的變異，適合用來做種內不同族群間的區別。其中色素氧化酶 I 片段為負責產生電子傳遞鏈反應中所需要的酵素之一，在無脊椎動物中具有相當保守的引子，且鹼基轉換 (transition) 尚未飽和，演化速度快及具有高度變異，為族群遺傳研究上很適合的分子標誌，因此許多有關於探討蜘蛛類的族群遺傳、親緣地理、及複合群分化等問題上被大量使用 (Colgan *et al.*, 2002 ; Hedin & Wood, 2002 ; Ayoub & Riechert, 2004 ; Croucher *et al.*, 2004 ; Hendrixson & Bond, 2005a ; Chang *et al.*, 2007 ; Starrett & Hedin, 2007 ; Su *et al.*, 2007) ，提供

蜘蛛類種內變異研究上足夠解析力。

台灣學者亦曾針對襍網蜘蛛 (*Psecchrus* sp.)、人面蜘蛛 (*Nephila pilipes*)和溪狡蛛 (*Dolomedes raptor*)的族群遺傳結構做研究。分布於低海拔的人面蜘蛛具空飄行為 (ballooning)，使得族群間基因交流順暢，族群遺傳結構不受中央山脈地理隔離 (李, 2001)；相對的，溪狡蛛依賴流水生活，一生都不離開水邊，導致個體無法跨越水系，族群間缺乏基因交流，而明顯分化 (羅, 2007)；襍網蜘蛛之遺傳結構分為北部、中部族群和南部、東部族群兩大群 (林等, 1999)，但後來進一步鑑定後，發現其包含不只一種的襍網蜘蛛 (陳, 未發表)，不列入考慮。以上研究顯示蜘蛛的擴散能力和對棲地的專一性為決定族群分化的關鍵因素。人面蜘蛛屬於具空飄能力的圓網型蜘蛛 (orb weaver)，無明顯分群的現象，而溪跑蛛為對水域棲地依賴的遊走型蜘蛛 (wandering)，依水系而分成北、中南和東部系群，但是活動力介於兩者之間的遊走型溝渠豹蛛，其族群結構是否會分化嗎？影響分化的機制與溪跑蛛一樣是受山系或流域隔離嗎？這些問題有待探討。

本研究以粒線體 DNA 之 *COI* 部分基因序列作為分子遺傳標誌，探討族群遺傳與親緣地理關係，藉以了解台灣地理對地表遊走型蜘蛛或泛島性無脊椎動物的影響，研究主題包括下列三個主題：

- (1) 建立台灣地區溝渠豹蛛的族群結構，檢驗各族群間基因交流之順暢度，及其族群分化情況，了解台灣地理地勢對分化的影響度。
- (2) 推估台灣地區溝渠豹蛛可能經歷的歷史事件，其族群結構分化的模式符合文

獻探討的哪一種機制，進而提供影響廣分布的無脊椎動物之族群結構分化機制。

(3) 評估台灣的溝渠豹蛛是否有隱藏種存在。

材料與方法

一、樣本採集

自 2006 年 9 月至 2008 年 7 月，根據台灣北、中、南和東部的四個地理區劃分，於各區域內廣泛由低至高海拔選取 6-13 個地點進行日間目視法樣本採集，總共達 34 個族群 (圖一、表一)。各樣點如下所示：

北部：台北文山師大公館校區、台北樹林山佳、台北北投大屯山、新竹竹東光棟國小、宜蘭大同棲蘭、宜蘭大同思源啞口。

中部：苗栗大湖後龍溪、台中和平雪霸、南投草屯九九峰、南投仁愛霧社、南投仁愛合歡山、南投仁愛雲海、南投仁愛天池、南投仁愛光被八表。

南部：嘉義梅山太平山、台南白河關子嶺、高雄甲仙紫霞山、高雄桃源藤枝、高雄杉林德旺、屏東獅子雙流、屏東三地小鬼湖。

東部：花蓮秀林新城、花蓮秀林鯉魚潭、台東卑南知本、台東卑南利嘉、台東卑南初鹿、台東關山、台東富里六十石、花蓮萬榮清水溪橋、花蓮秀林布洛農、花蓮秀林西寶、花蓮秀林陽明橋、花蓮秀林小風口、花蓮秀林能高奇萊口。

二、分子技術方法

將取得樣本帶回實驗室，提供分子技術利用，而其餘部分置於 70%酒精內浸泡，保存在-20°C 冰櫃內，收藏於國立台灣師範大學生命科學系作為存證標本。

(一)DNA 萃取

利用修飾的 LiCl 之萃取 DNA 方法 (Gemmel & Akiyama, 1996), 其流程如下所示:

1. 取下的蜘蛛步足, 加入 195 μ l ddH₂O、30 μ l 之 10X digestion buffer 和 30 μ l DTT (10mg/ml), 緊接將步足剪碎, 而後再加入 45 μ l 之 protein K (0.5mg/ml), 達到總體積 300 μ l, 將之置於 56°C 乾浴槽反應 16 小時。
2. 續加 300 μ l 5M LiCl 與 600 μ l 氯仿 (Chloroform) 後, 置於垂直轉輪轉速在 6~7 之間, 旋轉 30 分鐘充分混勻。
3. 以 12500rpm 轉速、4°C 離心 15 分鐘後, 取出上清液 500 μ l 至新的離心管, 並加入 1000 μ l 99.5% 冰酒精, 輕搖搖晃 45 下, 可見析出絲綢狀的 DNA。
4. 以 12500rpm 轉速、4°C 離心 15 分鐘後, 倒出酒精, 加入 200 μ l 70% 酒精清洗。
5. 以 12500rpm 轉速、4°C 離心 3 分鐘後, 倒出酒精, 置於通風處晾乾一天。
6. 晾乾後加入 30 μ l ddH₂O, 置於 -20°C 冰箱中保存。
7. 利用紫外分光光度計測量 DNA 濃度, 確保萃取的 DNA 品質達到 50-70ng/ μ l。

(二) 聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR)

1. PCR 引子設計: 以修飾 Chang *et al.* (2007) 的引子 (primer) 序列來增幅 *CO I* 之 1718-2572bp 和 1718-2621bp 的基因片段 (數據 1718、2572、2612 代表 *P. astrigera* 粒線體基因庫中鹼基位置), 引子序列如下:

CO I-J-1718 : 5'-CCA GAT ATA TCA TTT CCT CGA ATG-3' (24bp)

CO I-N-2572 : 5'-TCT TAA TAC ATA ATG AAA ATG AGC-3' (24bp)

CO I-N-2621 : 5'-GGA AAT CAA TAA GTT ATA CCA GC-3' (23bp)

2.PCR 反應內容物：1.25 μ l 之 10X 之 PCR buffer、0.3125 μ l dNTP (25mM)、0.25 μ l 之 *CO I*-J primer (10pm/ μ l)、0.25 μ l 之 *CO I*-N primer (10pm/ μ l)、0.3125 μ l Taq、50-70ng 之 Sample DNA、而後以 ddH₂O 加至總容量 12.5 μ l。

3.PCR 程序設定：利用熱循環儀進行反應，進行 38 個增幅循環，設定如下：

(a) Predenature : 94°C、2 分鐘，使雙股 DNA 變性解開。

(b) Denature : 94°C、1 分鐘，使雙股 DNA 變性解開；

(c) Annealing : 53°C、45 秒，使 DNA 與引子鍊合；

(d) Extension : 72°C、1 分鐘，進行 DNA 延長。

(e) Final extension : 72°C、10 分鐘，使 DNA 延長完全。

1 μ l PCR 產物經由溴化乙錠螢光染劑 (0.5mg/ml EtBr) 處理後，於 1.2%瓊脂膠片、100V、電泳 30 分鐘後，在紫外光燈下拍照，檢測 PCR 反應增幅的 DNA 片段長度和品質，PCR 產物確定無誤後而在 ABI 377 自動定序分析儀 (PE Corp.) 進行 DNA 定序。

三、統計分析

(一)核苷酸定序和序列排列 (sequence alignment)

將 PCR 產物進行序列定序，所得之序列與自動定序儀之波形序列圖以 Sequencher*4.7 (Gene Codes, Corp., Ann Arbor, MI, US)進行序列合併、校正和排序 (alignment)的工作，再經由人為調整，緊接將序列轉成後續分析程式所需的檔案格式 (*fas.)。並在 National Center for Biotechnology Information (NCBI)進行序列比對 (Blast)，確定序列為本研究之物種序列。

(二)遺傳變異分析和基因交流與分化

以 Dnasp *4.10.9 (Rozas et al.,2003)分析序列之遺傳訊息，包括計算基因型 (haplotype)、族群間核苷酸歧異度 (nucleotide diversity, θ)、族群內核苷酸歧異度 (nucleotide diversity, π) (Nei, 1987)和基因型歧異度 (haplotype diversity, h) (Nei & Tajima, 1983)、測試 Tajima's D test 之中性假說 (Neutral hypothesis) (Tajima, 1989)，以及遺傳距離 ("p" distance)，且計算頻率分布 (frequency spectrum)來檢測族群數量隨時間變動情況，並估算分化指數 (F_{ST} , fixation index) (Hudson et al., 1992)和轉換計算基因交流指數 (N_m , gene flow index) (Slatkin, 1987)。

測試中性假說為檢測存在於族群的變異是否只受到隨機基因漂變的影響，而不受天澤選汰決定，核苷酸的置換率僅受突變率影響 (Kimura, 1983)。Tajima's D test使用之統計D值為 β 分布的假設下，平均為0，變方為1，公式為Tajima's test (D) = $\pi - \theta / \sqrt{V(\pi - \theta)}$ ， θ 是核苷酸變異位置的數量， π 是每個核苷酸變異出現的頻率。依據Hedrick (2000)的解讀：(1) $\pi = \theta$ ，D值為0，當核苷酸變異是不受天澤選汰、逢

機交配前提下達到平衡，符合中性假說的預測；(2) $D < 0$ ，可能為族群遭受瓶頸效應或族群擴張，導致序列受搭載 (hitchhiking) 或掃蕩 (selective sweep) 而被選擇所造成；(3) $D > 0$ ，為族群受天擇作用，導致序列受平衡選擇 (balancing selection) 而造成 $\pi > \theta$ 。D 值可計算信賴區間 (confidence intervals)，決定以上正、負值是否有無顯著差異的支持性。

核苷酸歧異度 (π) 和基因型歧異度 (h) 皆為族群內部的遺傳變異，但是兩數值計算過程互無關聯，比較兩數值可推測族群演化所遭遇的事件。 π 為族群內任取兩個基因型，兩兩比較核苷酸差異的平均數，顯示族群內不同個體間的 DNA 序列差異程度，公式為 $\pi = n \sum f_i f_j \pi_{ij} / (n-1)$ ， n 為取樣的 DNA 序列數量， f_i 為族群內單套型 i 的頻率， f_j 為族群內單套型 j 的頻率， π_{ij} 是第 i 個基因型與第 j 個基因型之核苷酸的差異； h 為族群內不同基因型的頻率及數量，公式為 $h = n (1 - \sum f_i^2) / (n-1)$ ， n 為取樣的個體數， f_i 為第 i 的基因型頻率。依據 Grant & Bowen (1998) 的解讀，(1) 若 π 值、 h 值皆低，表示族群近期遭遇過瓶頸效應或創造者效應；(2) 僅有 π 值低而 h 值高，表示族群受快速擴張而遭遇瓶頸效應且累積足多突變；(3) 而 π 值高而 h 值低，表示受地理隔離而族群分化；(4) 如 π 值、 h 值皆高，表示受長時間演化歷史而形成夠大穩定的族群或兩族群間因故而再次接觸。

F_{ST} 表示族群間分化的程度，公式為 $F_{ST} = 1 - H_w / H_b$ ， H_w 與 H_b 分別表示族群內及族群間兩兩序列的平均核苷酸差異。依據 Wright (1978) 的解讀，(1) 當 $F_{ST} > 0.25$ 時表示族群間有非常高度的分化；(2) $0.15 < F_{ST} < 0.25$ 時表示高度分化；

(3) $F_{ST} < 0.15$ 時表示沒有分化的現象。

N_m 表示每個世代個體在族群間遷徙的數目，由 F_{ST} 所推估計算出的，公式為 $N_m = ((1 / F_{ST}) - 1) / 2$ ， N 代表族群大小， m 為每一代移入的對偶基因比例（每世代個體在族群間的遷徙數目）， N_m 即為每一代移入的基因數（母系遷徙速度）。依據 Slatkin (1987) 的解讀，(1) 當 N_m 值 ≥ 1 時，表示每世代至少有一個個體在族群間進行基因交流，得以讓族群間基因交流順暢；(2) 當 N_m 值 < 1 時，表示族群間基因交流不順暢，易造成族群的分化。

以 Kimura 雙參數模式 (Kimura-2-parameter model) (Kimura, 1980)，進行族群間的遺傳距離 (“p” distance) 計算。分子鐘則以 Ayoub & Riechert (2004) 認為節肢動物 *COI* 基因大約每百萬年平均有 2-2.3% 的變異量，來估算台灣地區溝渠豹蛛族群分化時間。

頻率分布圖 (frequency spectrum) 以變異位點 (segregating site) 的分布情況來檢測族群成長穩定性，若穩定成長的族群之變異位點的分布曲線會呈現幾何分布 (geometric distribution)，而當族群數量有發生動盪過，族群數量有遽增或縮減，則分布曲線會呈現多峰狀態，其中族群數目增加時，單一突變位點 (singleton) 數目會特別多，而族群數目減少時，單一突變位點數目會減少。

(三) 親緣關係樹分析

選取本島溝渠豹蛛各基因型，與 NCBI 二個中國地區溝渠豹蛛之 *COI* 部分序

列 (accession numbers AY836141、AY836215，兩者序列相同，只有一種基因型) 作為內群，並以星豹蛛 (*P. astrigera*) (accession numbers AY836012、AY836058) 和同科脈蝟蛛 (*Wadicosa fidelis*) (accession number AY836142) 作為外群 (羅, 2004)，利用 MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 3.1 軟體 (Kimura, et al., 2001) 建立最大檢約法 (Maximum parsimony, MP) 和聚類分析法 (Neighbor-Joining, NJ) 之親緣關係樹形圖，兩者樹型圖皆以重複 1000 次重排 (bootstrap) 估算其各分支的支持度 (Felsenstein, 1985)。

(四) 網狀親緣關係分析

將各基因型序列資料整合，利用 Arlequin 3.11 軟體 (Schneider *et al.*, 2000) 以最儉約方法估算而進行最小關聯網狀親緣關係圖分析 (minimum spanning network, MSN) (Excoffier *et al.*, 1992; Excoffier & Smouse 1994)，以探討各基因型之間的親緣關係以及族群的過去歷史。在網狀親緣圖的分析方法中認為，祖先族群中的古老基因經由突變或重組而衍生出新的基因型，使古老的基因型有較大的機會位於網狀樹狀圖內部 (interior)，而新衍生出的基因型則會位於網狀樹狀圖的邊緣 (tip) (Templeton *et al.*, 1995)，且古老基因型也通常分布較廣泛，在族群中所佔的比例較高。

結 果

本研究於台灣 34 個族群中，取得 150 個溝渠豹蛛所增幅部分粒線體 *COI* 基因 689bp 之片段（表一），所有樣本序列內沒有插入 (insertion) 或缺失 (deletion)，既沒有任何序列長度有所差異。所分析 *COI* 序列平均鹼基頻率 (base frequency)，以 AT 所佔比例較高 (69.6%)，符合典型節肢動物序列的特性 (Simon et al., 1994)。

一、變異位點 (segregating site) 與基因型 (haplotype) 分析

由表二可知，所分析台灣地區溝渠豹蛛 *COI* 序列，總共包含 39 個變異位點 (5.7%)、24 個基因型。在變異位點中，有 34 個為儉約訊息 (parsimony informative sites)，其餘五個為單一突變位點 (singleton variable sites)，但沒有任何變異位點造成胺基酸改變。而在基因型中，無任一基因型為全部族群所共有，大部分基因型都侷限分布於一個特定區域，其中 16 個基因型只包含一個樣本，21 個基因型僅單一族群所特有，而基因型 G 為 2 個族群所共有、基因型 D 為 8 個族群所共有、基因型 A 為 22 個族群所共有，且這三種基因型 (G、D 和 A) 佔所有樣本數量高達 80.6%。各族群基因型的出現頻率與分布情況如圖二所示，顯示各基因型不是呈現地理區的分群現象，所以山脈和水系並非阻礙台灣溝渠豹蛛各族群間基因交流的屏障。

二、各族群之遺傳變異分析

在 34 個族群中，各族群的基因型數量 (haplotype) 介於 1-4 個之間，核苷酸歧異度 (nucleotide diversity, π) 介於 0-0.0061 之間 (平均值 = 0.00076)，基因型歧異度 (haplotype diversity, h) 介於 0-1 之間 (平均值 = 0.26)，有 11 個族群僅只有一種基因型，但有兩個族群僅有一個個體，無法計算 π 和 h 值 (表三)，從基因型數、 π 和 h 之三種數值相互對照，發現多數族群有遺傳均質化 (homogeneity)，而少數族群才具有遺傳異質化 (heterogeneity)。

三、台灣地區溝渠豹蛛之親緣關係分析

以台灣地區溝渠豹蛛的 24 個基因型，並輔以中國地區溝渠豹蛛的遺傳序列，來建立最儉約法樹形圖 (MP tree)、鄰近法樹形圖 (NJ tree) 和最小關聯網狀親緣關係圖 (MSN)，重建台灣地區溝渠豹蛛之親緣關係。MP tree 和 NJ tree 皆顯示溝渠豹蛛為單系群 (monophyletic group)，可被分為系群 I 和系群 II 兩大群。系群 I 可再分成 IA 亞群、IB 亞群和中國亞群的三個亞群 (subclade)。IA 亞群包括台灣地區中 22 個族群、97 個樣本、3 個基因型，其分布在海拔高度 38-1021 公尺；和 IB 亞群包括台灣地區中 4 個族群、17 個樣本、10 個基因型，其分布在海拔高度 2800- 3217 公尺；而中國亞群僅包括 NCBI 的兩個中國個體 (單一基因型)。系群 II 則包括 8 個族群、36 個樣本、11 個基因型，其分布在海拔高度 1451-2340 公尺。因而台灣地區溝渠豹蛛為多系群 (polyphyletic group)，被分為

IA 亞群、IB 亞群和系群 II 之三群，其中每一族群的所有基因型隸屬同群，顯示各群間有明顯遺傳差異。擁有多種基因型的族群，僅有南投仁愛光被八表族群可獨自形成一小支單系群，其造成的原因將於討論中探討。台灣島內三大分群彼此間無垂直重疊的區域，表示台灣地區溝渠豹蛛之族群結構呈現垂直分布 (altitudinal or stratum patterns)，不受地理區所分群。此外，MP tree 顯示中國地區溝渠豹蛛與臺灣地區的 IA+IB 亞群有共祖，而 NJ tree 呈現中國亞群的溝渠豹蛛僅與 IB 亞群有共祖 (圖三、圖四、圖五)。

在最小關聯網狀親緣關係圖中，IB 亞群位於中間，IA 亞群、中國亞群和系群 II 位於外圍，而 IB 亞群和 IA 亞群遺傳上相差 13 步，IB 亞群和系群 II 遺傳上約相差 10 步，IB 亞群與中國亞群相差 10 步遠。網狀親緣關係圖中央係以單一樣本、海拔分布較高的基因型 Q 向外延伸，而所佔樣本數較多、海拔分布偏低的基因型 A 或基因型 D 則位於網狀親緣關係圖外圍，此親緣分布情況不符合 Templeton *et al.* (1995) 的兩種假設：(1) 網狀親緣關係圖中央的基因型為分布較廣泛的祖先型基因，或 (2) 網狀親緣關係圖中央的基因型為分群間的地理過渡區的族群所擁有。此外，圖中中國亞群由 IB 亞群中基因型 Q 向外延伸，且中國樣本並非與台灣地區常見的基因型 A 或基因型 D 有較近的親緣關係，這特殊情況將於討論中探討。另外，系群 II 的網狀親緣關係圖由基因型 D 向外輻射衍生出多種基因型，有明顯族群擴張的趨勢；IB 亞群的網狀親緣關係圖可分為光被八表和其他三個樣點的兩群，與親緣關係樹中光被八表形成單支相吻合。

四、台灣分群內族群間和分群間遺傳變異與分群間基因交流與分化的分析

遺傳變異分析結果顯示台灣島內 IA 亞群、IB 亞群與中國亞群所組成系群 I 之核苷酸歧異度 (π) 為 0.00691、基因型歧異度 (h) 為 0.32804，而系群 II 的 $\pi = 0.00258$ 、 $h = 0.59365$ ；然而台灣島內的 IA 亞群為 $\pi = 0.00060$ 和 $h = 0.06121$ ，IB 亞群為 $\pi = 0.00868$ 、 $h = 0.88235$ (表四)。Grant & Bowen (1998) 認為核苷酸歧異度 (π) 和基因型歧異度 (h) 數值高低，可推測族群演化所遭遇的事件。IA 亞群為 π 低 (0.00060) 和 h 低 (0.06121) 的類型，而系群 II 和 IB 亞群均呈現的 π 高 (0.00258 和 0.00868) 和 h 高 (0.59365 和 0.88235) 的類型，據此可推測 IA 亞群可能近期曾受瓶頸效應或創始者效應作用，導致遺傳變異低，而系群 II 和 IB 亞群為穩定族群或不同類群再次接觸所造成，使得遺傳變異偏高。

基因交流指數 (Nm) 與遺傳分化指數 (F_{ST}) 分析結果顯示系群 I 與系群 II 基因交流指數為 0.14933、遺傳分化指數為 0.77003，依據 Wright (1978)， Nm 遠小於 1，顯示兩系群間基因交流皆不順暢， F_{ST} 遠大於 0.25 表示兩系群間有高度分化的現象 (表六)。此外，系群 I 內的 IA 亞群、IB 亞群和中國亞群的基因交流指數介於 0.00069-0.14937 之間、遺傳分化指數介於 0.76998-0.99863 之間，這三個亞群間亦有高度分化程度。

五、台灣地區溝渠豹蛛之變動歷史 (Demographic history)

從頻率分布圖 (frequency spectrum) 亦能推測族群演化所遭遇的事件。結果顯示台灣地區溝渠豹蛛的所有樣本頻率分布圖呈現四個高峰，IA 亞群則呈現單一平滑分布，系群 II 有一個高峰，IB 亞群有兩個高峰，因此台灣地區溝渠豹蛛在演化上並非屬於一個穩定族群，而之曾經歷過讓族群數量縮減和擴張的歷史事件，促使分布圖呈現多峰狀態；同樣為單峰的 IA 亞群和系群 II，在輔以 π 值和 h 值的高低，可分別認定 IA 亞群是由於族群快速擴張而形成 (π 值和 h 值皆偏低)，系群 II 在演化上為一穩定族群 (π 值和 h 值皆偏高)；IB 亞群有兩高峰，顯示族群間存有一定變異，演化上非一穩定族群 (圖六)。

Tajima's D test 之中性假說可檢測在統計上族群的變異是否只受到隨機基因漂變或天擇作用的影響。結果顯示本研究中所有台灣樣本、IA 亞群、IB 亞群和系群 II 的 Tajima's D 值分別是 0.44、-2.60、1.65 和 -1.97。Hedrick (2000) 認為所有台灣樣本和 IB 亞群之 D 值為正值，表示台灣地區溝渠豹蛛正值分化 (population subdivision) 而產生三個分群，IB 亞群也正值分化而呈現兩類群，但兩者在統計上皆不顯著 ($P > 0.1$, $P > 0.10$)，而 IA 亞群和系群 II 之 D 值皆為負值，輔以各分群 π 和 h 數值高低，分別表示 IA 亞群顯著受基因漂流作用 (genetic drift) ($P < 0.001$) 的影響，使得 IA 亞群內遺傳變異極低，而系群 II 則顯著遭受族群擴張 ($P < 0.05$)，使得系群 II 內遺傳變異高，此與網狀親緣關係圖呈現的輻射分布相符合。

六、分子鐘計算

從親緣關係樹中，顯示系群 I 和系群 II 為姊妹群。而以 Kimura 雙參數模式計算出系群 I 與系群 II 之遺傳距離為 1.27%，依據 Ayoub & Riechert (2004) 推估節肢動物每百萬年有 2-2.3% 的遺傳距離作為分子鐘基準，估計系群 I 和系群 II 共祖時間為 28 萬年前，正值古薩-民德間冰期 (Gunz-Midel) (林, 1963)。

討 論

一、台灣島內各分群之遺傳變異和族群變動

IA 亞群僅擁有三種基因型，其中基因型 A 為 IA 亞群內所有族群所共有，而基因型 B、C 僅各只有一個樣本，兩者分別與基因型 A 之序列只相差一個鹼基變異。其遺傳變異指數有 20 個族群之基因型歧異度 (h) 與核苷酸歧異度 (d) 均為 0，如此低之 h 值 (0.06121) 和 d 值 (0.00060)，顯示 IA 亞群有高度基因均質化 (genetic homogeneity) 現象，可能是由 IA 亞群的繁殖能力、行為或歷史事件所造成。在行為上，豹蛛不易離開出生地，成體會與有親緣關係的個體交配，近親交配促成族群內的遺傳變異低 (Richardson *et al.*, 1986)，另外，族群內可能有同類相殘行為 (cannibalism) (Anthony, 2003; Rickers & Scheu, 2005)，促使個體往鄰近地區擴散，造成族群間的基因交流頻繁，族群間遺傳變異偏低。在繁殖能力上，根據本人採集經驗在樣區 10*10 公尺內有上百隻母蛛個體，若一隻母蛛可生產 20 隻若蛛 (個人觀察)，再加上本種為一年多世代 (個人觀察)，其族群量則相當可觀，因此即便光靠步足遊走族群間，亦使 IA 亞群族群間之基因交流流暢。在歷史事件上，Grant & Bowen (1998) 認為 h 值和 d 值偏低，為族群最近曾受到基因漂流 (genetic drift) 作用，導致遺傳變異偏低，此與中性假說之 D 值顯著為負值 ($D = -2.60, P < 0.001$) 有相同結果，推測 IA 亞群曾於演化上遭受瓶頸效應或創造者效應，隨之快速擴張，可與頻率分布圖呈現單一平滑分布相對應。由於行為和繁殖能力在各分群大致相同，然而系群 II 和 IB 亞群能夠維持著一定程度的

遺傳變異，IA 亞群卻具有低遺傳變異，所以歷史事件應是造成 IA 亞群的族群間和族群內遺傳變異呈現單態情況的最主要因素。相對下，人面蜘蛛因空飄能力強，族群間基因交流頻繁造成全島各族群基因均質化 (李, 2001)，此現象與造成溝渠豹蛛 IA 亞群受基因漂流呈現單態基因型分布的機制有所不同。

系群 II 為台灣地區內三分群間擁有最多基因型者，族群間皆有共同基因型 D，而部分族群擁有獨特基因型，其 h 值和 D 值顯著為正值、頻率分布圖呈現單峰，皆顯示系群 II 在演化上為一個維持長久穩定大族群。

IB 亞群被分成光被八表和其他族群的兩部分。由於 Boulton (1998) 認為五個蜘蛛個體在遺傳分析上具有族群代表性，因此光被八表族群 ($n = 7$) 呈現單支現象值得重視，推測造成單支的原因可能為島嶼效應或特殊地理位置造成，而後者較有可能為主因。首先，山谷和溪流雖然可能隔絕高海拔族群間的基因交流，營造出光被八表族群為孤獨島嶼，但是與地理距離僅相距 3 公里的天池族群，彼此間並無明顯的地理屏障分隔，卻在關聯網狀親緣關係圖上相差 10 步以上，反倒是天池族群與合歡山族群之基因型呈現鑲嵌分布，因此排除島嶼效應造成光被八表呈現單支的可能性。較有可能的解釋為光被八表位於南投和花蓮的縣界中央山脈的稜脊上，高山風寒嚴酷環境可能促成族群方向性選擇 (direction selection) 來適應特殊的微棲地環境，或者光被八表曾於冰河期被當作一避難所，許多研究已指出中部地區為中高海拔物種的冰河時期避難所 (郭, 2002; 彭, 2005; 周, 2006; 劉, 2008)，如梅峰、合歡山、望鄉曾為冰河避難所，使得目前在此地的族群演化

上呈現單群，由於光被八表從未被其他研究員作為親緣關係研究之樣區，因而光被八表在冰河期所扮演的角色才未被提及到。

二、台灣地區分群間之遺傳關係

親緣關係樹型圖顯示溝渠豹蛛可分為系群 I 和系群 II 之兩大系群，其中台灣島內的 IA 亞群、IB 亞群與中國亞群共同組成系群 I。在 34 個族群中，基因型 A 為 IA 亞群之 22 個族群所共有基因型，基因型 D 為系群 II 之 8 個族群所共有基因型，然而三大分群間沒有任何共有的基因型，且在海拔高度的分布上不相重疊，符合 Avise (2000) 提及動物地理與基因型之間關聯的第一種類型，認為遺傳變異呈現不連續的分布並與地理分布一致，表示台灣地區溝渠豹蛛各分群曾經歷過長期的隔離，彼此間基因交流不順暢，而各自有獨立演化過程，因而各群分布於不同區域的現況。

由採樣地點得知 IA 亞群和系群 II 廣布於台灣，未受到山脈或水系所侷限，且二群分布在不重疊的海拔高度，顯示兩群間有生態環境分化 (ecological differentiation)、偏好不同微棲地 (microhabit) 的現象。由於地理鄰域的 IA 亞群和系群 II 在遺傳上未有基因滲透 (genetic introgression) 的現象，顯示有某種機制存在，使得族群無法向其他環境擴張，導致 IA 亞群與系群 II 間基因交流 ($Nm < 1$) 困難，兩群間呈現高度分化 ($F_{ST} > 0.25$)，然而使得兩群間產生生殖隔離的機制將於下面探討。此外，雖然 IB 亞群的樣點侷限於在花蓮和南投地區，但是其自

成一單支並非受到採樣偏差所導致，從親緣關係中得知 IB 亞群與地理鄰域的系群 II 為較遠親緣關係，且與地理不連續的 IA 亞群有較近親緣關係，顯然的，IB 亞群不是由台灣島內單一祖先族群擴張而隔離產生，而是藉由下面敘述的機制所形成。

三、推估族群結構之分化模式的因素

台灣溝渠豹蛛之族群遺傳結構呈現垂直分層的地理分布，相較於其他台灣陸生動物的族群結構的分化迥然不同。在 MP tree 或 NJ tree 皆呈現台灣地區三分群 (IA 亞群、IB 亞群和系群 II) 和中國亞群分別各自形成單支，而 MSN 圖顯示這四支分群彼此間無過渡基因型，因而三種親緣關係圖表達四分群為獨自演化形成。溝渠豹蛛現況在東亞區域為廣緯度分布 (魏, 2004)，因而若有兩種以上對溫度適應不同的祖先族群在冰河期入侵到台灣，則有機會促使台灣溝渠豹蛛的族群結構呈現垂直分布。在系群 I 的親緣關係圖中，顯示台灣島內 IA 亞群 (NJ tree) 或 IA+IB 亞群 (MP tree) 與中國有共祖，而系群 II 祖先族群不明，這凸顯台灣島內的系群 II 和 IA +IB 亞群不具有共同祖先。此外，Grant & Bowen (1998) 對 d 和 h 值偏高，認為族群結構受不同類群再次接觸所建立，所以台灣族群合理推測為受到多次入侵作用，而導致台灣地區溝渠豹蛛由三個不同海拔高度的分群所建成多系群 (polyphyletic groups)。從 Ayoub & Riechert (2004) 的分子鐘計算結果，推測系群 I 和系群 II 的共祖時間為 28 萬年前 (民德-里斯間冰期)、系群 I 的共祖時

間為渥姆冰期 (林, 1963)，所以第一批祖先族群可能在民德冰期入侵到台灣島，而先形成系群 II。接著第二批祖先族群再由渥姆冰期入侵到台灣島，產生系群 I 內的台灣族群。因而網狀親緣關係圖中央以罕見的基因型 Q 向外連結，而分布廣泛的基因型 A 或地理區過渡的的基因 D 位於外圍，僅是台灣地區三分群為獨自演化的族群。

四、台灣島內三分群是否為三個有效種

日本學者曾利用形態特徵和行為來探討六種日本產溝渠豹蛛複合群的關係，相對下，本研究以分子角度來看待台灣地區溝渠豹蛛的親緣關係，兩者因類群問題尺度不同而分別採用不同方法來作探討，比對彼此成果將能夠了解台灣島內溝渠豹蛛的分化程度。

Tanaka 和 (1976)和 Suwa (1984)由雄蛛觸肢 (palp)上白毛的裝飾面積和排列部位的形態，將日本產溝渠豹蛛分成 I、II、III、IV、Iki 和 Nansei 等六個類型，合稱為溝渠豹蛛複合群 (*Pardosa laura* complex)。再進一步觀察求偶過程中，發現各類型的雄蛛能夠展示獨特的觸肢擺動姿勢，並且雌蛛也具有辨識同型雄蛛的能力 (Suwa, 1980；Tanaka, 1985；Tanaka & Suwa, 1986)。Eberhard's hypothesis 指出藉由雌性的性擇可加速物種生殖構造演化和物種分化 (Eberhard, 1985)，因此日本各類型的溝渠豹蛛雖然僅有觸肢的裝飾和體表的顏色有稍微差異，但仍導致種化的產生。

台灣溝渠豹蛛之粒線體 *COI* 基因序列的親緣關係分析，顯示有三個明顯的分群，這些分群是否可以視為不同的種呢？在節肢動物中，種化通常伴隨著生殖器形態的改變，機械式生殖隔離能有效地阻隔親緣相近物種的交配，蜘蛛目 (Araneae) 的新種發表著重於生殖器內、外部形態差異 (Eberhard, 1985)。本人檢測台灣地區溝渠豹蛛三個分群的形態特徵，嘗試找出能夠區隔三分群的有效形態特徵，但是很遺憾的，三分群觸肢皆屬於 Tanaka & Suwa 描述的類型 II，雌蛛外雌器皆未有群間差異，僅有 IB 亞群每一個體之胸板的斑紋與 IA 亞群和系群 II 有明顯差異，IB 亞群個體胸板呈現全黑斑紋，而 IA 亞群和系群 II 各族群內胸板有大 V 型、V 型、心型等多種變異 (魏, 2004)，尚未能從形態上區別各分群間之不同。

生物種的概念 (Biological Species Concept, BSC) 強調不同種之間有生殖隔離，本研究藉由分子方法發現溝渠豹蛛群間的基因交流相當低，即使鄰域群間也無基因滲透的情況發生，群間的基因交流有阻礙，但是群間之遺傳距離小於 5% ($p = 1\% - 0.6\%$)，屬於種內變異範圍，再加上缺乏形態差異，有鑒於本種研究文獻不多，且僅從約 700bp 的分子結果，不宜斷然下定論。建議未來研究者能夠加強群間交配行為探討和微棲地調查。

結 論

1. 台灣地區溝渠豹蛛之遺傳結構明顯分成三大分群，各分群垂直分布於不同海拔高度內，與文獻中其他陸域動物的基因型係明顯地理區分化的情況是迥然不同。
2. 台灣地區溝渠豹蛛的群間基因交流不順暢、分化程度高，各群未發現有共域現象，顯示群間對棲地海拔高度有偏好差異。
3. 由於三系群間的基因交流指數相當低，且地理上未有重疊的分布，再加上系群 I 內包括中國亞群，而系群 II 獨立為單系群，因而推測造成目前台灣地區溝渠豹蛛的族群結構的主要原因為多次入侵所影響。
4. 雖然台灣地區溝渠豹蛛之遺傳結構明顯分成三大分群，但是仍缺乏可供鑑別的形態差異，且各分群間遺傳距離小於 5%，故三分群仍在種內變異的範圍。

參 考 文 獻

- 朱巧雯。2005。台灣地區兩種葉鼻蝠科蝙蝠之遺傳變異。私立東海大學生物學系碩士論文。
- 李峻瑋。2001。以粒線體之細胞色素氧化酶 I 部分序列探討臺灣地區人面蜘蛛 (*Nephila maculata*) 之族群遺傳結構。私立東海大學生物學系碩士論文。
- 李宜欣。2004。臺灣島內緣點白粉蝶與白粉蝶粒線體 DNA 變異研究。國立臺灣師範大學生命科學系碩士論文。
- 林朝榮。1963。台灣之第四紀。臺灣文獻。14: 1-53。
- 林俊宏、李錦年、楊智傑、呂柏緯、陳世煌、呂光洋、方剛。1999。台灣產襖網蜘蛛分子遺傳結構之分析。生物學報。34: 95-104。
- 林唯穎。2002。青斑蝶族群遺傳結構之研究。國立台灣大學昆蟲學研究所碩士論文。
- 官淑蕙。2004。應用粒線體 DNA D-loop 片段探討彰化地區澤蛙之族群遺傳結構。國立彰化師範大學生物學系碩士論文。
- 周常恩。2006。以細胞色素 b 序列和外部形態分析台灣特有種短肢攀蜥之親緣地理。國立中山大學生物科學系博士論文。
- 許譽騰。1998。由族群遺傳結構探討白頭翁與烏頭翁之演化關係。國立台灣大學動物學研究所碩士論文。
- 孫承拒。1997。台灣地區石龍子類生物地理類源關係之初探。國立台灣師範大學生物學系碩士論文。
- 袁守立。2003。以粒線體細胞色素 b 區域序列探討臺灣地區短尾鮑族群的地理親緣變異。私立東海大學生物學系碩士論文。
- 黃仁磐。2008。台灣特有種短腹幽螳的多次入侵暨更新世晚期族群擴張事件。私立東海大學生物學系碩士論文。
- 郭瓊華。2002。臺灣蜓蜥族群遺傳結構之研究。國立臺灣師範大學生物研究所碩

- 士論文。國立台灣師範大學生物學系碩士論文。
- 陳惠琦。1993。梭德氏蛙 (*Rana sauteri*)的粒線體DNA序列與族群變異之初探。
國立台灣大學動物學研究所碩士論文。
- 陳世煌。2001。台灣常見蜘蛛圖鑑。行政院農業委員會。台北。
- 陳柏豪。2006。農村地景中赤腹松鼠 (*Callosciurus erythraeus*)的族群遺傳結構。
私立東海大學生物學系碩士論文。
- 張智涵。2005。利用形態特徵與粒線體DNA探討*Metaphire formosae*種群蚯蚓的
系統分類、生物地理與演化。國立台灣大學動物學研究所碩士論文。
- 張天祐。2008。台灣區白領樹蛙複合種群 (*Polypedates leucomystax species*
complex)族群遺傳結構與分類地位之探討。國立台灣師範大學生命科學系碩
士論文。
- 彭鈺雯。2005。台灣藪鳥族群遺傳結構。國立臺灣大學森林環境暨資源學系碩士
論文。
- 楊懿如。1993。台北樹蛙生殖生態與族群基因組成差異。國立台灣大學動物學研
究所碩士論文。
- 楊尚達。1997。台灣地區小家鼠粒線體 DNA 控制區序列變異及族群遺傳之研究。
國立台灣大學動物學研究所碩士論文。
- 劉秀晶。2007。台灣特有種鳥類金亦白梅之微衛星序列選殖及族群遺傳結構探討。
國立成功大學生物多樣性研究所碩士論文。
- 賴俊祥。2008。台灣產山椒魚的分類與阿里山山椒魚生態與族群遺傳研究。國立
台灣師範大學生命科學系博士論文。
- 儲瑞華。2004。台灣獼猴的親緣地理與族群遺傳學研究。台灣大學動物學研究博
士論文。
- 謝佳蓉。2005。台灣產標蛇屬之親緣地理。國立中山大學生物科學系碩士論文。
- 魏宏仁。2004。台灣產狼蛛科分類研究。國立台灣師範大學生命科學系碩士論文。
- 羅育發。2004。中國狼蛛科 (*Lycosidae*)主要類群的遺傳多樣性及分子系統發育

- 研究。湖南師範大學碩士學位論文。
- 羅英元。2007。台灣產溪狡蛛 (*Dolomedes raptor*)地理親緣關係之研究。國立臺灣師範大學生命科學系碩士論文。
- Avise, J. C.. 2000. Phylogeography: The history and formation of species. *Harvard College Press*, Cambridge.
- Avise, J. C., J. Arnold, R. M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J. E. Neigel, C. A. Reeb, and N. C. Saunders. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 18: 489-522.
- Ayoub, N. A., and S. E. Riechert. 2004. Molecular evidence for Pleistocene glacial cycles driving diversification of a North American desert spider, *Agelenopsis aperta*. *Molecular Ecology*. 13: 3453-3465.
- Bond, J. E., M. C. Hedin, M. G. Ramirez, and B. D. Opell. 2001. Deep molecular divergence in the absence of morphological and ecological change in the Californian coastal dune endemic trapdoor spider *Aptostichus simus*. *Molecular Ecology*. 10: 899-910.
- Bonte, D., L. Lens, J. P. Maelfait, M. Hoffmann, and E. Kuijken. 2003. Patch quality and connectivity influence spatial dynamics in a dune wolfspider. *Oecologia*. 135: 227-233
- Bonte, D., J. V. Borre, L. Lens, and E. P. Maelfait. 2006. Geographical variation in wolf spider dispersal behaviour is related to landscape structure. *Animal Behaviour*. 72: 655-662.
- Boulton, A. M., M. G. Ramirez, and C. P. Blair. 1998. Genetic structure in a coastal dune spider (*Geolycosa pikei*) on Long Island, New York barrier islands. *Biological Journal of the Linnean Society*. 64: 69-82.
- Chang, J., D. Song, and K. Zhou. 2007. Incongruous nuclear and mitochondrial

- phylogeographic patterns in two sympatric lineages of the wolf spider *Pardosa astrigera* (Araneae: Lycosidae) from China. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 42: 104–121.
- Colgan, D. J., S. Brown, R. E. Major, F. Christie, M. R. Gray, and G. Cassis. 2002. Population genetics of wolf spiders of fragmented habit in the wheat belt of New South Wales. *Molecular Ecology*. 11: 2295-2305.
- Croucher, P. J. P., G. S. Oxford, and J. B. Searle. 2004. Mitochondrial differentiation, introgression and phylogeny of species in the *Tegenaria atrica* group (Araneae: Agelenidae). *Biological Journal of the Linnean Society*. 81: 79–89.
- Eberhard, W. G.. 1985. Sexual selection and animal genitalia. *Harvard university press*, Cambridge.
- Emery, K. O., H. Nino, and B. Sullivan. 1971. Post-Pleistocene levels of the east China sea. *Woods Hole Oceanographic Institute Press*, Woods Hole, MA.
- Excoffier, L., and P. E. Smouse. 1994. Using allele frequencies and geographic subdivision to reconstruct gene trees within a species: molecular variance parsimony. *Genetics*. 136: 343-359.
- Excoffier, L., P. E. Smouse, and J. M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotype: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 131: 479-491.
- Evans, T., and M. A. D. Goodisman. 2002. Nestmate relatedness and population genetic structure of the Australian social crab spider *Diaea ergandros* (Araneae: Thomisidae). *Molecular Ecology*. 11: 2307-2316.
- Felsenstein, J.. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 39: 783-791.
- Ford, M. J.. 1978. Locomotory activity and the predation strategy of the wolf spider *Pardosa amentata* (Clerck) (Lycosidae). *Animal Behaviour*. 26: 31-35.

- Grant, W. S., and B. W. Bowen. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from the sardines and anchovies and lessons for conservation. *The American Genetic Association*. 89: 415-426.
- Graur, D., and W. H. Li. 2000. Fundamentals of molecular evolution. *Sinauer Associates, Inc. USA*.
- Hedin, M., and D. A. Wood. 2002. Genealogical exclusivity in geographically proximate populations of *Hypochilus thorelli* Marx (Araneae, Hypochilidae) on the Cumberland Plateau of North America. *Molecular Ecology*. 11: 1975 - 1988.
- Hedrick, P. W. 2000. Genetics of Populations. 2nd ed. pp. 374. *Jones and Bartlett Publishers, Inc. Sudbury Massachusetts*.
- Hendrixson, B. E., and J. E. Bond. 2005a. Testing species boundaries in the *Antrodiaetus unicolor* species complex (Araneae: Mygalomorphae: Antrodiaetidae): "Paraphyly" and cryptic diversity. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 36: 405-416.
- Hendrixson, B. E., and J. E. Bond. 2005b. Two sympatric species of *Antrodiaetus* from southwestern North Carolina (Araneae, Mygalomorphae, Antrodiaetidae). *Zootaxa*. 872: 1-19.
- Hudson, R. R., M. Slatkin, and W. P. Waddison. 1992. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics*. 132: 583-589.
- Karsch, F. 1879. Baustoffe zu eniner Spinnenfauna von Japan. *Verh. Naturh. Ver. Preuss, Rheinl Westfal*. 36: 102-103, fig. 21.
- Kimura, M.. 1980. A simple method of estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequence. *Journal of Molecular evolution*. 16: 111-120.
- Kimura, M. 1983. Rare variant alleles in the light of the neutral theory. *Molecular*

- and Biological Evolution*. 1: 84-93.
- Kimura, S., K. Tamura, I. B. Jakobsen, and M. Nei. 2001. Molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics*. 17: 1244-1245.
- Liu, T. K., Y. G. Chen, W. S. Chen., and S. H. Jing. 2000. Rates of cooling and denudation of early Pengli Orogeny, Taiwan, as assessed by fission-track constraints. *Tectonophysics*. 320:69-82.
- Muster, C. T., and T.U. Berendonk 2006. Divergence and diversity: lessons from an arctic-alpine distribution group (*Pardosa saltuaria*, Lycosidae). *Molecular Ecology*. 5: 2921-2953.
- Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. *Columbia University Press*, New York.
- Nei, M., and F. Tajima. 1983. Maximum likelihood estimation of the number of nucleotide substitutions from restriction sites data. *Genetics* 105: 2007-217.
- Opell, B.D. 2006. Molecular phylogenetic evidence for the parallel evolution of rock ecomorphs in the New Zealand orb-weaving spider *Waitkera waitakerenesis* (Family Uloboridae). *Journal of Arachnology*. 34: 467–475.
- Platnick, N. I. 2009. The world spider catalog, version 9.5. *American Museum of Natural History*, online at <http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/COUNTS.html>. .
- Ramirez, M. G., and B. Chi. 2004. Cryptic speciation, genetic diversity and gene flow in the California turret spider *Atypoides riversi* (Araneae: Antrodiaetidae). *Biological Journal of the Linnean Society*. 82: 27–37.
- Richardson, B. J., P. R. Baverstock , and M. Adams. 1986. Allozyme electrophoresis: a handbook for animal systematic and population studies. *Academic Press*, New York.
- Richter, C. J. J. 1970 Aerial dispersal in relation to habitat in eight wolf spider species

- (*Pardosa*, Araneae, Lycosidae). *Oecologia*. 5: 200-214.
- Rickers, S., and S. Scheu. 2005. Cannibalism in *Pardosa palustris* (Araneae, Lycosidae): effects of alternative prey, habitat structure, and density. *Basic and Applied Ecology*. 6: 471-478
- Rozas, J., J. C. Sanchez-DelBarrio, X. Messeguer, and R. Rozas. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analysis by the coalescent and other methods. *Molecular Biology and Evolution*. 19: 2496-2497.
- Samu, F., A. Sziranyi, and B. Kiss. 2003. Foraging in agricultural fields: local 'sit-and-move' strategy scales up to risk-averse habitat use in a wolf spider. *Animal Behaviour*. 66: 939-947.
- Schneider, S., D. Roessli, and L. Excoffier. 2000. ARLEQUIN 2.0: A software for population genetic data analysis. *Genetics and Biometry Laboratory*, University of Geneva, Switzerland.
- Simon, C., F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu, and P. Flook. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*. 87: 651-701
- Slatkin, M.. 1987. Gene flow and geographic structure of nature population. *Science*. 239: 787-792.
- Starrett, J., and M. Hedin. 2007. Multilocus genealogies reveal multiple cryptic species and biogeographical complexity in the California turret spider *Antrodiaetus riversi* (Mygalomorphae, Antrodiaetidae). *Molecular Ecology*. 16: 583-604.
- Su, Y. C., Y. H. Chang, S. C. Lee, and I. M. Tso. 2007. Phylogeography of the giant wood spider (*Nephila pilipes*, Araneae) from Asian- Australian regions. *Journal of Biogeography*. 34: 177-191.
- Suwa, M.. 1980. Courtship behavior of the wolf spider *Pardosa laura* complex.

- Japanese Journal of Ecology*. 30: 63-74.
- Suwa, M.. 1984. Courtship behavior of 3 new forms in the wolf spider *Pardosa laura* complex. *Japanese Journal of Ecology*. 2: 99-107.
- Tajima, F.. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 123: 585-595.
- Tanaka, H.. 1976. Three forms distinguished in *Pardosa laura*. *Atypus*. 66:52.
- Tanaka, H.. 1985. Descriptions of new species of Lycosidae (Araneae) from Japan. *Acta Arachnologica*. 33: 51–87.
- Tanaka, H., and M. Suwa. 1986. Descriptions of three new spiders of the *Pardosa laura* complex (Araneae: Lycosidae) based on their morphology and ecology. *Acta Arachnologica*. 34: 49–60.
- Templeton, A. R., E. Routman and C. A. Phillips. 1995. Separating population structure from population history: A cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the Tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics*. 140: 767-782.
- Walker, S. E., S. D. Marshall, A. L. Rypstra and D. H. Taylor. 1999. The effects of hunger on locomotors behaviour in two species of wolf spider (Araneae, Lycosidae). *Animal Behaviour*. 58: 515–520.
- Weyman, G. S. 1993. A review of the possible causative factors and significance of ballooning in spiders. *Ethology Ecology and Evolution*. 5: 279-291.
- Wright, S.. 1978. Evolution and genetics of populations. *Chicago University Press*, Chicago.
- Yeh, W. B., Y. L. Chang, J. S. Lin, F. S. Wu and J. T. Yang. 2004. Genetic differentiation of *Loxoblemmus appendicularis* complex (Orthoptera: Gryllidae): speciation via vicariant and glaciation events. *Annals of the Entomological Society of America*. 97: 613-623.

表一、台灣地區溝渠豹蛛的採集樣點代號、位置和樣本數

採集樣點	代號	經度_97	緯度_97	海拔高度(m)	樣本數
1.台北文山師大公館校區	NTNU-KK	303192	2766882	38	7
2.花蓮秀林新城	SC	314354	2670789	39	4
3.台北樹林山佳	SJ	288845	2763680	40	7
4.花蓮秀林鯉魚潭	LYT	301664	2645029	111	6
5.高雄杉林德旺	TW	206494	2537847	120	2
6.花蓮萬榮清水溪	CSC	296772	2631239	121	6
7.台東卑南知本	CP	250524	2510250	133	7
8.屏東獅子雙流	SL	229299	2457623	174	7
9.新竹竹東光棟國小	KT	259110	2732640	186	6
10.花蓮秀林布洛灣	PLN	308665	2674254	213	5
11.台東富里六十石山	LST	278954	2568505	231	5
12.高雄甲仙紫霞山	THS	203632	2552206	260	2
13.台東卑南利嘉	LC	255455	2520135	285	2
14.台東關山	KS	265846	2549643	288	2
15.台南白河關子嶺	KTL	188201	2583278	311	2
16.台東卑南初鹿	CL	261121	2529666	398	3
17.宜蘭大同棲蘭	CIL	299610	2719380	427	4
18.南投草屯九九峰	CCF-KS	227715	2655100	453	1
19.台北北投大屯山	TTS	301798	2786738	800	7
20.嘉義梅山太平山	TPS	208700	2606724	886	3
21.花蓮秀林西寶	HP	299292	2677283	911	4
22.南投仁愛霧社	WS	262471	2656632	1021	5
23.屏東三地小鬼湖	HKH	227710	2514280	1451	2
24.高雄桃源藤枝	TC	224779	2551778	1566	5
25.苗栗大湖後龍溪	HL	250463	2699815	1709	3
26.花蓮秀林陽明橋	YMC	292315	2675692	1806	5
27.花蓮秀林能高奇萊口	CLK	282788	2658135	1900	3
28.宜蘭大同思源啞口	SYK	284999	2698854	2031	6
29.台中和平雪霸	HYP	280375	2695905	2300	6
30.南投仁愛雲海	YH	273158	2660416	2340	6
31.南投仁愛天池	TIC	277485	2660136	2800	7
32.南投仁愛光被八表	KPPP	277924	2659067	2927	7
33.花蓮秀林小風口	HFk	279209	2672993	2975	1
34.南投仁愛合歡山	HHS	278030	2670986	3217	2
總計					150

表二、台灣地區溝渠豹蛛之 *COI* 部分序列資料 (每個點表示位置上的核苷酸和基因型 A 相同,“-”為與 hapA 相同鹼基)

基因型	變異位點																																								
	27	51	60	65	72	77	129	141	153	192	204	228	234	243	264	279	314	330	357	360	363	402	408	417	441	455	471	497	501	519	555	573	596	644	654	669	674	680	684		
hapA	C	A	C	A	A	C	T	T	G	A	T	T	A	T	A	C	G	C	T	G	A	C	C	G	T	G	T	A	C	T	C	A	C	C	C	A	C	A	T		
hapB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-
hapC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
hapD	-	-	-	T	-	T	-	-	A	-	C	A	-	-	C	T		T	-	-	G	T	A	A	-	A	-	-	-	C	T	-	-	-	T	-	-	-	-	-	
hapE	-	-	-	T	-	T	-	-	A	-	C	A	-	-	C	T	T	T	-	-	G	T	A	A	-	A	-	-	-	C	T	-	-	-	T	-	-	-	-	-	
hapF	-	-	-	T	-	T	-	-	A	-	C	A	-	-	C	T	-	T	-	-	G	T	A	A	-	A	-	-	-	C	T	-	-	T	T	-	-	-	-	-	
hapG	-	-	-	T	-	T	-	-	A	-	C	A	-	-	C	T	-	T	-	-	-	T	A	A	-	A	-	-	-	C	T	-	-	-	T	-	-	-	-	-	
hapH	-	-	-	T	-	T	-	-	A	-	C	A	-	-	C	T	-	T	-	-	G	T	A	A	-	A	-	-	-	C	T	-	-	-	T	-	T	-	-	-	
hapI	-	-	-	T	-	T	-	-	A	-	C	A	-	-	C	T	-	T	-	-	G	T	A	A	-	A	-	-	-	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	
hapJ	-	-	-	T	-	T	-	-	A	T	C	A	-	-	C	T	-	T	-	-	G	T	A	A	-	A	-	-	-	C	T	-	-	-	T	-	-	-	-	-	
hapK	-	-	-	T	-	T	-	-	A	-	C	A	-	-	T	T	-	T	-	A	G	-	A	-	-	A	-	-	T	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-	C	
hapL	T	-	-	T	-	T	-	-	A	-	C	A	T	-	C	T	-	-	-	-	G	T	A	A	-	A	C	-	T	C	T	-	-	-	T	-	-	-	-	-	
hapM	-	-	-	T	-	T	-	-	A	-	C	A	-	C	C	T	-	T	-	-	-	T	A	A	-	A	-	-	-	C	T	-	-	-	T	-	-	-	-	-	
hapN	-	-	-	T	-	T	-	-	A	-	C	A	-	-	T	T	-	T	-	A	G	-	A	A	-	A	-	-	-	C	-	-	T	-	T	-	-	-	-	C	
hapO	T	T	-	T	-	T	C	C	A	-	-	-	-	-	-	T	-	T		A	-	-	A	-	A	A	-	G	-	-	T	T	-	-	A	T	-	-	C		
hapP	T	T	-	T	-	T	C	C	A	-	-	-	-	-	-	T	-	T		A	-	-	A	-	A	A	-	G	-	-	T	T	-	-	A	T	-	-	-		
hapQ	T	-	-	T	T	T	-	-	A	-	-	-	-	-	-	T	-	T		A	-	-	A	-	-	A	-	-	-	T	T	-	-	-	-	-	-	-	-	C	
hapR	T	T	-	T	-	T	-	C	A	-	-	-	-	-	-	T	-	T		A	-	-	A	-	A	A	-	G	-	-	T	T	-	-	A	T	-	-	-	C	
hapS	-	-	T	T	T	T	-	-	A	-	-	C	-	C	-	T	-	T	C	A	-	-	A	-	-	A	-	G	-	-	T	T	-	-	A	-	-	-	-	-	
hapT	T	T	-	T	-	T	C	C	A	-	-	-	-	-	-	T	-	T		A	-	-	A	-	A	A	-	G	-	-	T	T	-	-	-	T	-	-	-	C	
hapU	T	-	T	T	T	T	-	-	A	-	-	-	-	C	-	T	-	T	C	A	-	-	A	-	-	A	-	G	-	-	T	T	-	-	-	-	-	-	-	-	
hapV	T	-	-	T	T	T	-	-	A	-	-	-	-	C	-	T	-	T	C	A	-	-	A	-	-	A	-	G	-	-	T	T	-	-	-	-	-	-	-	-	
hapW	T	-	-	T	T	T	-	-	A	-	-	-	-	C	-	T	-	T	C	A	-	-	A	-	-	A	-	G	-	-	T	T	-	-	A	-	-	-	-	-	
hapX	T	-	-	T	T	T	-	-	A	-	-	-	-	C	-	T	-	T	C	A	-	-	A	-	-	A	-	-	-	T	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

表三、台灣地區溝渠豹蛛各樣點之基因型數、核苷酸歧異度和基因型歧異度

採集樣點	樣本數	變異位點	基因型數	核苷酸歧異度	基因型歧異度
1.台北文山師大公館校區	7	0	1	0	0
2.花蓮秀林新城	4	0	1	0	0
3.台北樹林山佳	7	0	1	0	0
4.花蓮秀林鯉魚潭	6	0	1	0	0
5.高雄杉林德旺	2	0	1	0	0
6.花蓮萬榮清水溪橋	6	0	1	0	0
7.台東卑南知本	7	0	1	0	0
8.屏東獅子雙流	7	0	1	0	0
9.新竹竹東光棟國小	6	0	1	0	0
10.花蓮秀林布洛農	5	0	1	0	0
11.台東富里六十石山	5	0	1	0	0
12.高雄甲仙紫霞山	2	0	1	0	0
13.台東卑南利嘉	2	0	1	0	0
14.台東關山	2	0	1	0	0
15.台南白河關子嶺	2	1	2	0.00145	1.00000
16.台東卑南初鹿	3	0	1	0	0
17.宜蘭大同棲蘭	4	0	1	0	0
18.南投草屯九九峰	1	-	1	--	--
19.台北北投大屯山	7	0	1	0	0
20.嘉義梅山太平山	3	1	2	0.00097	0.66667
21.花蓮秀林西寶	4	0	1	0	0
22.南投仁愛霧社	5	0	1	0	0
23.屏東三地小鬼湖	2	0	1	0	0
24.高雄桃源藤枝	5	0	1	0	0
25.苗栗大湖後龍溪	3	2	3	0.00194	1.00000
26.花蓮秀林陽明橋	5	8	3	0.00613	0.7
27.花蓮秀林能高奇萊口	3	1	2	0.00097	0.66667
28.宜蘭大同思源啞口	6	2	3	0.00097	0.6
29.台中和平雪霸	6	6	3	0.00435	0.73333
30.南投仁愛雲海	6	2	3	0.00126	0.73333
31.南投仁愛天池	7	4	3	0.00166	0.52381
32.南投仁愛光被八表	7	3	4	0.00166	0.71429
33.花蓮秀林小風口	1	-	1	--	--
34.南投仁愛合歡山	2	2	2	0.0029	1.00000
總計	150	39	24	0.0125	0.57610

表四、溝渠豹蛛各分群之基因型數量、核苷酸歧異度和基因型歧異度

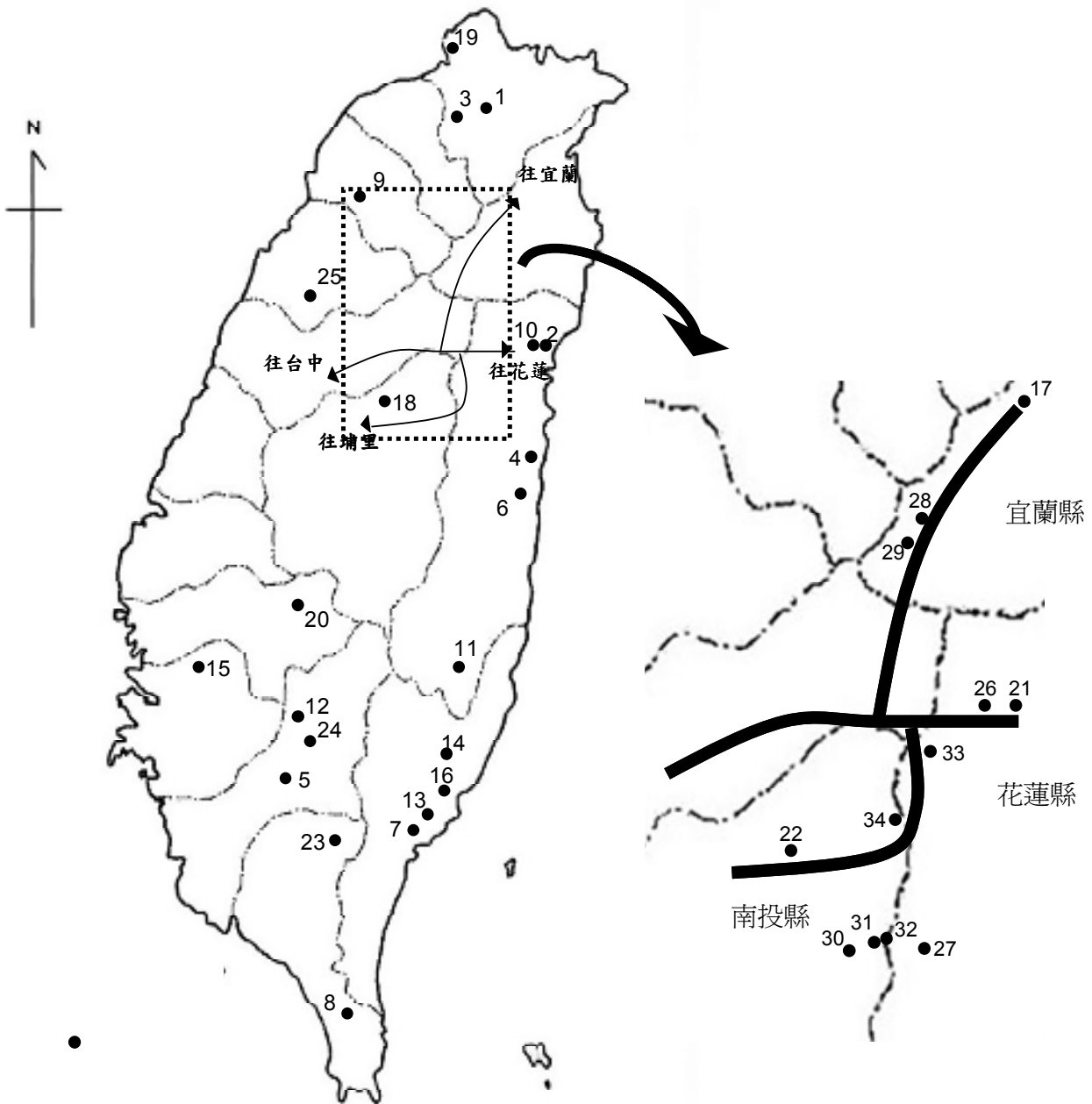
分群	個體數	變異位點	基因型數	核苷酸歧異度	基因型歧異度
IA 亞群	97	2	3	0.00060	0.06121
IB 亞群	17	14	10	0.00868	0.88235
中國	2	0	1	0	0
系群 I	116	31	1	0.00691	0.32804
系群 II	36	18	11	0.00258	0.59365

表五、台灣地區溝渠豹蛛各樣點之基因型種類、數目和基因型頻率 (A-X 英文代號代表基因型，樣點代號同表一，數字代表隻數)

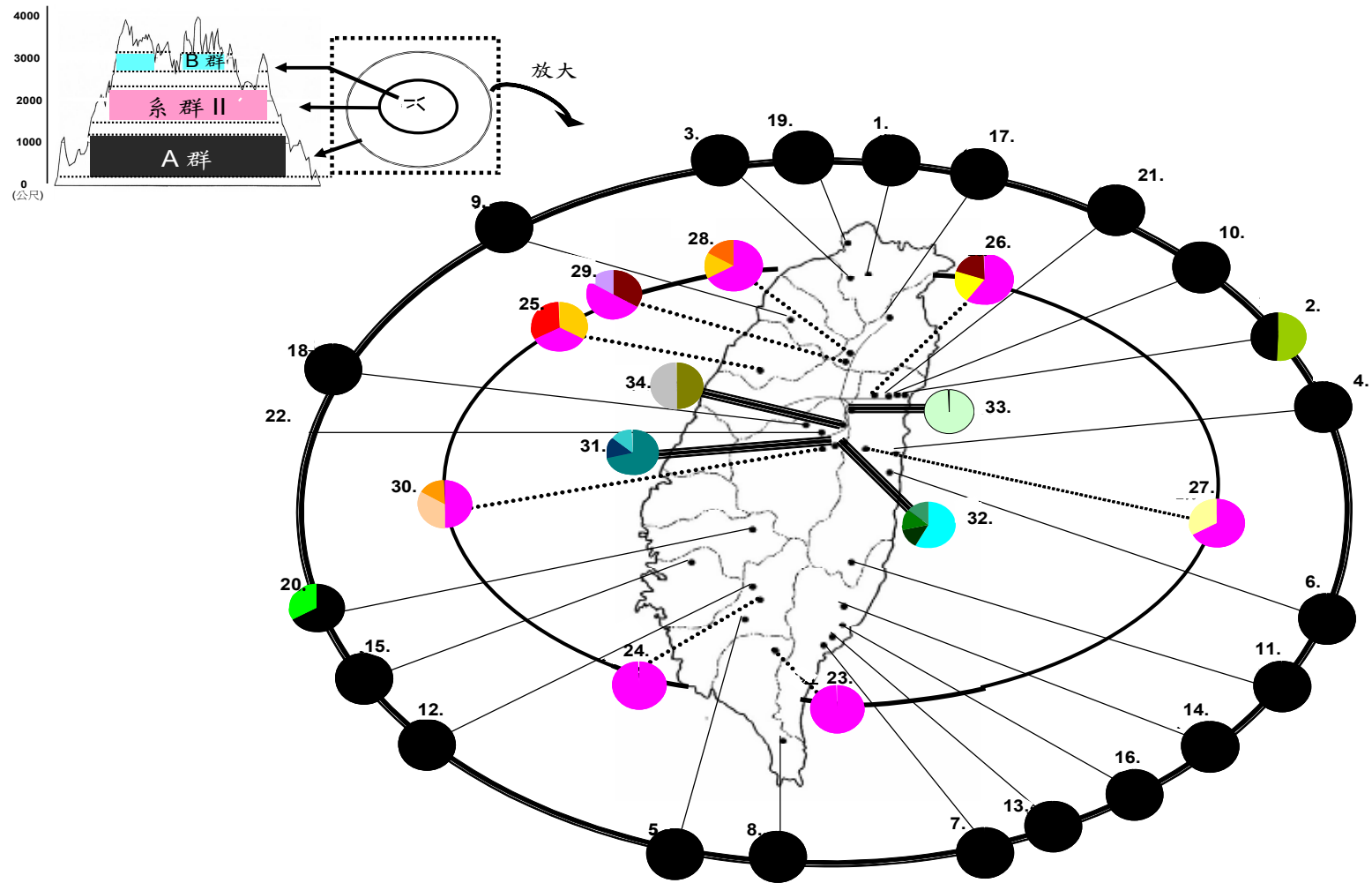
樣點	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	總計	
NTNU-KK	7																								7	
SC	4																									4
SJ	7																									7
LYT	6																									6
TW	2																									2
CSC	6																									6
CP	7																									7
SL	7																									7
KT	6																									6
PLN	5																									5
LST	5																									5
THS	2																									2
LC	2																									2
KS	2																									2
KTL	1	1																								2
CL	3																									3
CIL	4																									4
CCF-KS	1																									1
TTS	7																									7
TPS	2		1																							3
HP	4																									4
WS	5																									5
HKH				2																						2
TC				5																						5
HL				1			1						1													3
YMC				3								1			1											5
CLK				2				1																		3
SYYK				4			1			1																6
HYP				3	1							2														6
YH				3		2			1																	6
TIC																			1		5	1				7
KPPP															1	1		4		1						7
HFK																	1									1
HHS																								1	1	2
總計	95	1	1	24	2	2	2	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	4	1	1	5	1	1	1	1	150

表六、溝渠豹蛛各群間之遺傳分化指數 F_{ST} 和基因交流指數 Nm (對角線以上的數值為遺傳分化指數 F_{ST} ，對角線以下的數值為基因交流指數)

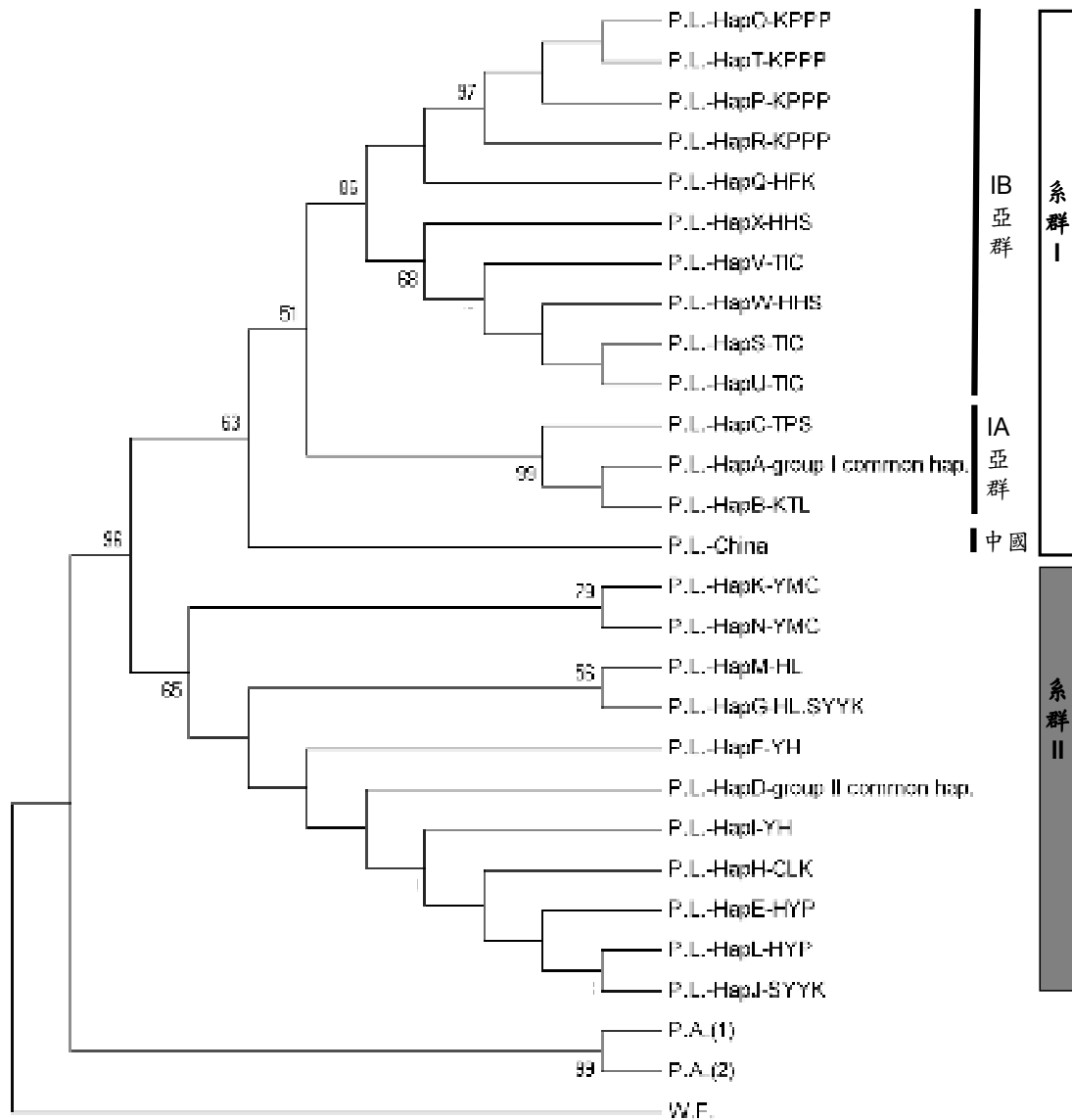
	IA 亞群	IB 亞群	中國亞群	系群 I	系群 II
IA 亞群		0.10950	0.00069	--	0.03405
IB 亞群	0.82035		0.14937	--	0.18437
中國亞群	0.99863	0.76998		--	0.04262
系群 I	--	--	--		0.14933
系群 II	0.93624	0.73060	0.92145	0.77003	



圖一、台灣地區溝渠豹蛛各樣點之位置圖 (樣點編號同表三，左圖圖內曲線為中橫和北橫道路，而右圖為宜蘭縣、花蓮縣和南投縣交界面的放大圖，其粗線為中橫和北橫道路)



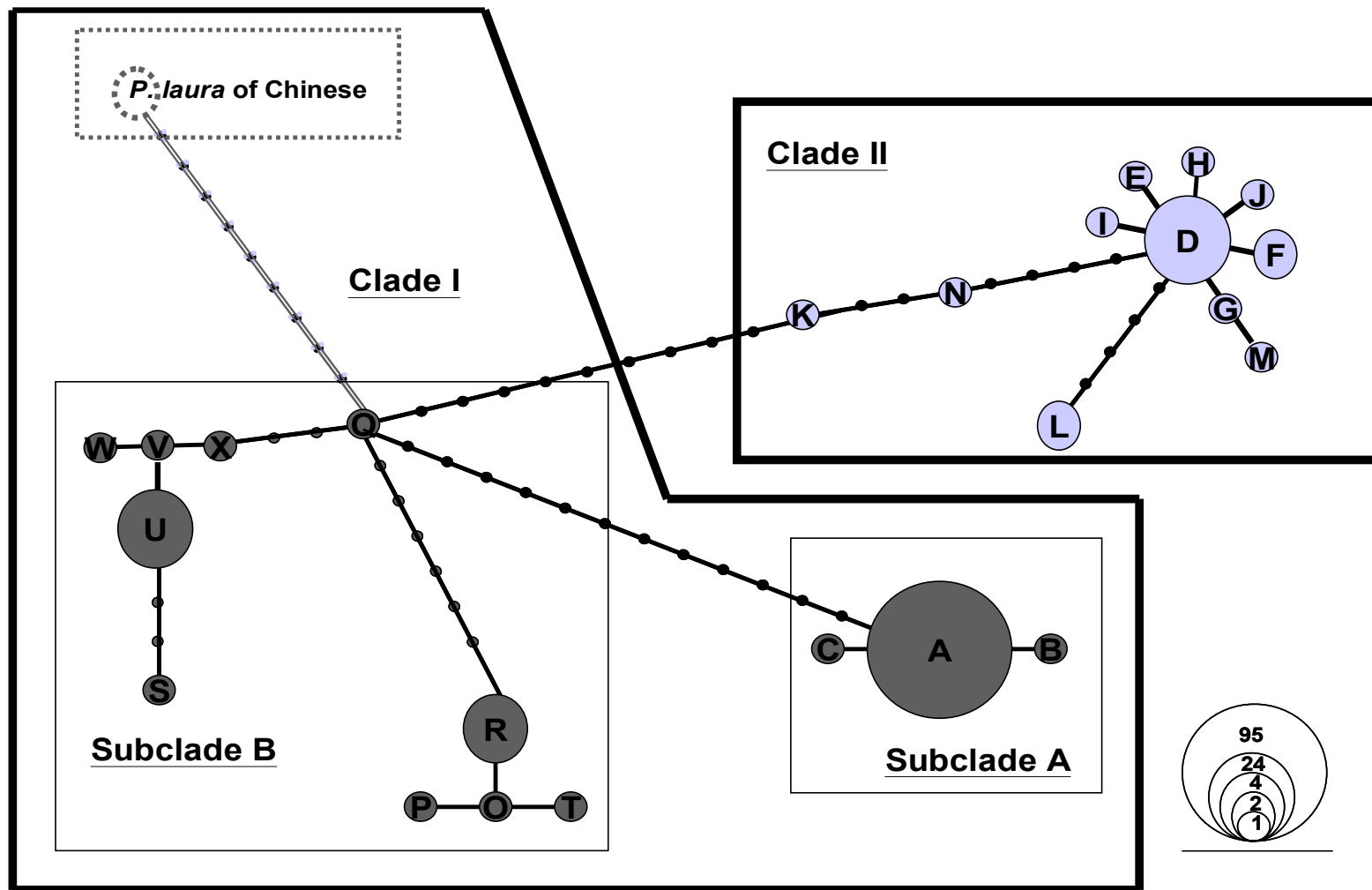
圖二、台灣地區溝渠豹蛛各樣點基因型之頻率分布 (樣點編號與表一同，左上圖顯示系群 I 之 IA 亞群、IB 亞群和系群 II 於各海拔高度的分布；而右圖外圓上的小圓代表 IA 亞群內族群、內圓上的小圓代表系群 II 內族群，而 IB 亞群內族群以粗直連接小圓代表)



圖三、以 maximum parsimony 方法重建台灣地區溝渠豹蛛之親緣關係樹型圖

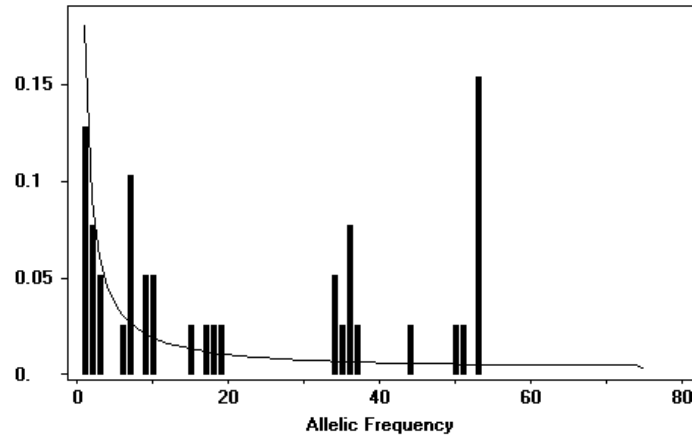


圖四、以 neighbor-joining 方法重建台灣地區溝渠豹蛛之親緣關係樹型圖

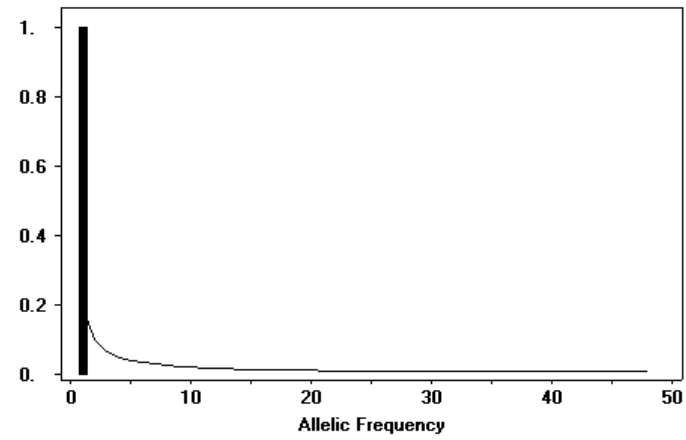


圖五、台灣地區溝渠豹蛛基因型之 minimum spanning network (基因型代號同表二)

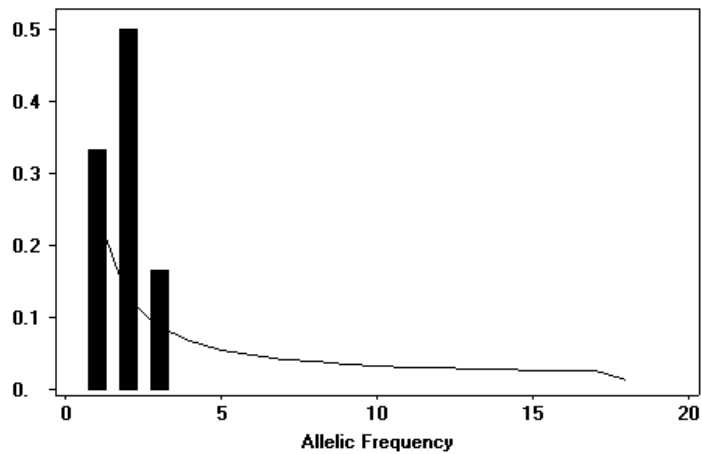
1. 台灣地區之所有樣本



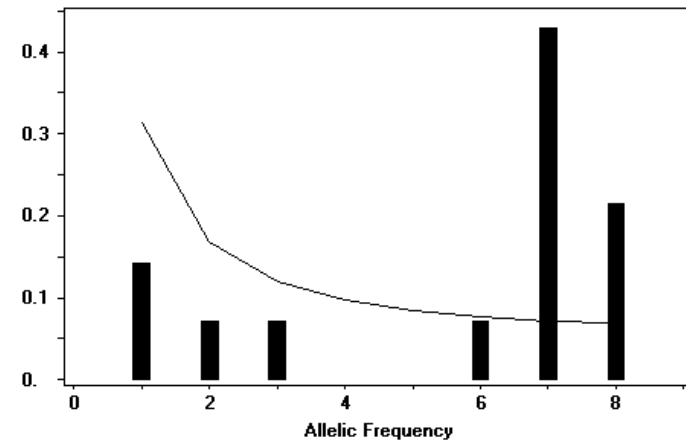
2. IA 亞群



3. 系群 II



4. IB 亞群



圖六、台灣地區溝渠豹蛛各分群之頻度分布圖 (frequency spectrum) (“-”為預測值, ”■”

附錄一：溝渠豹蛛 (*Pardosa laura*) 基因型 A 之部分 mtDNA COI 基因序列

0-40	CCTTTAGCAT	CTACAGTTGG	TCATATAGGA	AGTTCGATAG
41-80	ATTTTGCTAT	TTTTTCTCTT	CATTTAGCTG	GAGCTTCTTC
81-120	TATTATAGGT	GCTGTAAATT	TTATTTCTAC	TATTATTAAT
121-160	ATACGAATAT	TAGGGATATC	TATAGAAAAA	GTACCTCTTT
161-200	TTGTTTGATC	AGTTTTAATT	ACAGCAGTGT	TATTATTACT
201-240	TTCTTTACCT	GTTTTAGCAG	GTGCTATTAC	TATACTATTA
241-280	ACAGATCGAA	ATTTTAATAC	TTCTTTTTTT	GACCCTGCTG
281-320	GGGGAGGGGA	TCCTATTTTA	TTTCAACATT	TGTTTTGATT
321-360	TTTTGGTCAC	CCAGAGGTTT	ATATTTTAAT	TCTTCCAGGG
361-400	TTTGAATIG	TATCTCATGT	TATTAGTTCT	TCGGTAGGTA
401-440	AGCGAGAACC	GTTTGGAAGA	TTAGGTATAA	TTTATGCTAT
441-480	AGTAGGAATT	GGTGGTATAG	GATTTGTAGT	TTGGGCTCAT
481-520	CATATATTTT	CTGTAGGTAT	AGATGTTGAT	ACTCGTGCAT
521-560	ATTTTACTGC	TGCTACCATA	ATTATTGCAG	TTCTACTGG
561-600	AATTAAGGTT	TTAGATGAA	TAGCTACAAT	TCATGGTTCT
601-640	TATTTTAAAA	TAGATACTCC	ATTATTATGG	AGTATTGGTT
641-680	TTGTATTTTT	ATTTACTTTA	GGGGGAATTA	CAGGGGTTGT
681-689	ATTATCTAA			

附錄二：台灣地區溝渠豹蛛 (*Pardosa laura*)之基因型 A 和中國地區溝渠豹蛛，以及星豹蛛 (*P. astrigera*)與同科脈媽蛛 (*Wadicosa fidelis*)之部分 COI 序列比較 (中國地區溝渠豹蛛從 NCBI 的 AY836141、AY836215 所獲取，兩者序列相同；星豹蛛為 AY836012、AY836058；脈媽蛛為 AY836142)

0-60	<i>P. laura</i> hapA	CCTTTAGCAT	CTACAGTTGG	TCATATAGGA	AGTTCGATAG	ATTTTGCTAT	TTTTTCTCTT
	<i>P. laura</i> China	CCTTTAGCAT	CTACAGTTGG	TCATATAGGA	AGTTCGATAG	ATTTTGCTAT	TTTTTCTCTT
	<i>P. astrigera</i> (1)	CCTTTAGCGT	CTACAGTTGG	TCATATAGGA	AGCTCAATAG	ATTTTGCTAT	TTTTTCTCTT
	<i>P. astrigera</i> (2)	CCTTTAGCGT	CTACAGTTGG	TCATATAGGA	AGCTCAATAG	ATTTTGCTAT	TTTTTCTCTT
	<i>Wadicosa fidelis</i>	CCCTTAGCAT	CAACGGTTGG	TCATATAGGA	AGTTCTATAG	ATTTTGCTAT	TTTTTCTTTA
61-120	<i>P. laura</i> hapA	CATTTAGCTG	GAGCTTCTTC	TATTATAGGT	GCTGTAAATT	TTATTCTAC	TATTATTAAT
	<i>P. laura</i> China	CATTTAGCTG	GAGCTTCTTC	TATTATAGGT	GCTGTAAATT	TTATTCTAC	TATTATTAAT
	<i>P. astrigera</i> (1)	CATTTAGCTG	GGGCTTCTTC	TATTATAGGA	GCTGTAAATT	TTATTCTAC	TATTATTAAT
	<i>P. astrigera</i> (2)	CATTTAGCTG	GGGCTTCTTC	TATTATAGGA	GCTGTAAATT	TTATTCTAC	TATTATTAAT
	<i>Wadicosa fidelis</i>	CATTTAGCTG	GAGCTTCTTC	TATTATAGGA	GCTGTAAATT	TTATTCTAC	TATTATTAAT
121-180	<i>P. laura</i> hapA	ATACGAATAT	TAGGGATATC	TATAGAAAAA	GTACCTCTTT	TTGTTTGATC	AGTTTTAATT
	<i>P. laura</i> China	ATACGAATAT	TGGGAATATC	TATAGAAAAA	GTACCTCTTT	TTGTTTGATC	AGTTTTAATT
	<i>P. astrigera</i> (1)	ATACGAATAT	TAGGAATGTC	TATAGAAAAA	GTTCTCTTT	TTGTTTGATC	AGTTTTAATT
	<i>P. astrigera</i> (2)	ATGCGAATAT	TAGGGATATC	TATAGAAAAA	GTTCTCTTT	TTGTTTGATC	AGTTTTAATT
	<i>Wadicosa fidelis</i>	ATACGAGTGG	TAGGAATATC	TATAGAAAAG	GTTCTCTTT	TTGTTTGATC	AGTTTTGATT
181-240	<i>P. laura</i> hapA	ACAGCAGTGT	TATTATTACT	TTCTTTACCT	GTTTTAGCAG	GTGCTATTAC	TATACTATTA
	<i>P. laura</i> China	ACAGCAGTAT	TATTATTACT	TTCTTTACCT	GTTTTAGCAG	GTGCTATTAC	TATATTATTA
	<i>P. astrigera</i> (1)	ACAGCTGTAT	TATTATTACT	TTCTTTACCT	GTTTTAGCAG	GTGCTATTAC	TATATTATTA
	<i>P. astrigera</i> (2)	ACAGCTGTAT	TATTATTACT	TTCTTTACCT	GTTTTAGCGG	GTGCTATTAC	TATATTATTA
	<i>Wadicosa fidelis</i>	ACAGCAGTTT	TATTATTACT	TTCTTTACCT	GTATTAGCAG	GTGCTATTAC	TATATTATTA
241-300	<i>P. laura</i> hapA	ACAGATCGAA	ATTTTAATAC	TTCTTTTTTT	GACCCTGCTG	GGGGAGGGGA	TCCTATTTTA
	<i>P. laura</i> China	ACAGATCGAA	ATTTTAATAC	TTCTTTTTTT	GATCCTGCTG	GTGGAGGGGA	TCCTATTTTA
	<i>P. astrigera</i> (1)	ACGGATCGAA	ATTTTAATAC	TTCTTTTTTT	GATCCTGCTG	GTGGAGGGGA	TCCTATTTTG
	<i>P. astrigera</i> (2)	ACGGATCGAA	ATTTTAATAC	TTCTTTTTTT	GATCCTGCTG	GTGGAGGGGA	TCCTATTTTG
	<i>Wadicosa fidelis</i>	ACCGATCGTA	ATTTTAATAC	TTCTTTTTTT	GACCCTGCGG	GAGGTGGAGA	TCCTATTTTA
301-360	<i>P. laura</i> hapA	TTTCAACATT	TGTTTTGATT	TTTTGGTCAC	CCAGAGGTTT	ATATTTTAAT	TCTTCCAGGG
	<i>P. laura</i> China	TTTCAACATT	TGTTTTGATT	TTTTGGTCAT	CCAGAGGTTT	ATATTTTAAT	TCTTCCAGGA
	<i>P. astrigera</i> (1)	TTTCAACATT	TATTTTGATT	TTTTGGACAT	CCAGAAGTTT	ATATTTTAAT	TCTTCCAGGA
	<i>P. astrigera</i> (2)	TTTCAACATT	TATTTTGATT	TTTTGGACAT	CCAGAAGTTT	ATATTTTAAT	TCTTCCAGGA
	<i>Wadicosa fidelis</i>	TTTCAACATT	TATTTTGATT	TTTTGGACAC	CCAGAAGTTT	ATATTTTAAT	TTTACCAGGA
361-420	<i>P. laura</i> hapA	TTTGGAATTG	TATCTCATGT	TATTAGTTCT	TCGGTAGGTA	AGCGAGAACC	GTTTGGAAGA
	<i>P. laura</i> China	TTTGGAATTG	TATCTCATGT	TATTAGTTCT	TCGGTAGGTA	AACGAGAACC	ATTTGGAAGA
	<i>P. astrigera</i> (1)	TTTGGAATTG	TATCTCATAT	TATTAGTTCT	TCGATAGGAA	AACGGGAACC	ATTTGGAAGA

附錄二(續)：台灣地區溝渠豹蛛 (*Pardosa laura*)之基因型 A 和中國地區溝渠豹蛛，以及星豹蛛 (*P. astrigera*)與同科脈蝟蛛 (*Wadicosa fidelis*)之部分 COI 序列比較 (中國地區溝渠豹蛛從 NCBI 的 AY836141、AY836215 所獲取，兩者序列相同；星豹蛛為 AY836012、AY836058；脈蝟蛛為 AY836142)

	<i>P. astrigera</i> (2)	TTTGGAATTG	TATCTCATAT	TATTAGTTCT	TCGATAGGAA	AACGGGAACC	ATTTGGAAGA
	<i>Wadicosa fidelis</i>	TTTGGAATTG	TTTCTCATGT	TATTAGTTCT	TCAGTAGGTA	AGCGAGAGCC	TTTTGGTAGA
421-480	<i>P. laura</i> hapA	TTAGGTATAA	TTTATGCTAT	AGTAGGAATT	GGTGGTATAG	GATTTGTAGT	TTGGGCTCAT
	<i>P. laura</i> China	TTAGGTATAA	TTTATGCTAT	AGTAGGAATT	GGTGGTATAG	GATTTGTAGT	TTGGGCTCAT
	<i>P. astrigera</i> (1)	TTAGGGATGA	TTTATGCTAT	GGTTGGGATT	GGAGGAATAG	GATTTGTAGT	TTGGGCACAT
	<i>P. astrigera</i> (2)	TTAGGAATGA	TTTATGCTAT	GGTTGGGATT	GGAGGAATAA	GATTTGTAGT	TTGGGCACAT
	<i>Wadicosa fidelis</i>	TTAGGAATAA	TTTATGCTAT	ATTGGGAATT	GGAGGAATGG	GATTTGTAGT	TTGGGCTCAT
481-540	<i>P. laura</i> hapA	CATATATTTT	CTGTAGGTAT	AGATGTTGAT	ACTCGTGCAT	ATTTTACTGC	TGCTACCATA
	<i>P. laura</i> China	CATATATTTT	CTGTAGGTAT	AGATGTTGAT	ACTCGTGCAT	ATTTTACTGC	TGCTACTATA
	<i>P. astrigera</i> (1)	CATATGTTTT	CTGTGGGAAT	AGATGTGGAT	ACTCGTGCAT	ATTTTACTGC	TGCTACTATA
	<i>P. astrigera</i> (2)	CATATGTTTT	CTGTGGGAAT	AGATGTGGAT	ACTCGTGCAT	ATTTTACTGC	TGCTACTATA
	<i>Wadicosa fidelis</i>	CATATATTTT	CTGTGGGAAT	AGATGTTGAT	ACTCGTGCAT	ATTTTACTGC	TGCTACTATA
541-600	<i>P. laura</i> hapA	ATTATTGCAG	TTCCTACTGG	AATTAAGGTT	TTTAGATGAA	TAGCTACAAT	TCATGGTTCT
	<i>P. laura</i> China	ATTATTGCAG	TTCCTACTGG	AATTAAGGTT	TTTAGATGAA	TAGCTACAAT	TCATGGTTCT
	<i>P. astrigera</i> (1)	ATTATTGCAA	TTCCTACTGG	AATTAAGGTT	TTTAGTTGGA	TAGCTACAAT	TCATGGATCT
	<i>P. astrigera</i> (2)	ATTATTGCAA	TTCCTACTGG	AATTAAGGTT	TTTAGTTGGA	TAGCTACAAT	TCATGGGTCT
	<i>Wadicosa fidelis</i>	ATTATTGCAA	TTCCTCCTGG	AATTAAGGTT	TTTAGATGAA	TAGCTACTAT	TCATGGTTCC
601-660	<i>P. laura</i> hapA	TATTTTAAAA	TAGATACTCC	ATTATTATGG	AGTATTGGTT	TTGTATTTTT	ATTTACTTTA
	<i>P. laura</i> China	TATTTTAAAA	TAAATACTCC	ATTAATATGA	AGAATTGGTT	TTGTATTTTT	ATTTACTTTA
	<i>P. astrigera</i> (1)	TATTTTAAAA	TAAATACTCC	ATTTATATGG	AGAATTGGAT	TTGTATTTTT	ATTTACTTTA
	<i>P. astrigera</i> (2)	TATTTTAAAA	TAAATACTCC	ATTTATATGG	AGAATTGGAT	TTGTATTTTT	ATTTACTTTG
	<i>Wadicosa fidelis</i>	TATTTTAAGA	TAAATACTCC	TTTGATATGA	AGTATTGGTT	TTGTGTTTTT	ATTTACTTTA
661-689	<i>P. laura</i> hapA	GGGGGAATTA	CAGGGGTTGT	ATTATCTAA			
	<i>P. laura</i> China	GGGGGAATTA	CAGGGGTTGT	ATTATCTAA			
	<i>P. astrigera</i> (1)	GGGGGGATTA	CAGGAGTTGT	GTTGTCTAA			
	<i>P. astrigera</i> (2)	GGAGGGATTA	CAGGAGTTGT	ATTGTCTAA			
	<i>Wadicosa fidelis</i>	GGGGGAATTA	CGGGAGTTGT	ATTATCTAA			