

## 目錄：

摘要 .....	II
Abstract .....	IV
前言 .....	1
材料與方法 .....	5
結果 .....	11
討論 .....	16
結論 .....	26
參考文獻 .....	31
附表 .....	37
附圖 .....	47



## 摘要

白領樹蛙複合種群(*Polypedates leucomystax* species complex)廣泛分佈在東亞地區，由於型態上的差異模糊不清，使得以往的研究學者在其分類地位上有許多爭議以及盲點。本研究利用台灣島內以及鄰近地區族群之粒線體 DNA 及核 DNA 的部分片段，並結合型態分析結果，以探討台灣島上白領樹蛙的分類地位與鄰近地區近似物種的地理類緣關係以及島內白領樹蛙族群遺傳結構。

以粒線體 DNA Cyt-b 序列進行台灣島內(除彰化田尾地區外)白領樹蛙的基因型分析與討論，在 minimum spanning network 中可發現台灣島內具有台灣 I 型與台灣 II 型兩基因型系群，系群內鹼基位點差異均小於五個，推論台灣島內白領樹蛙族群可能為大陸兩個不同地區的祖先族群，分別入侵台灣島，並且快速擴張造成的結果。

以 Cyt-b、Rhodopsin 兩序列片段，Maximum likelihood、Maximum parsimony、Neighbor joining 三種方法建構親緣關係樹，顯示貴州台灣島內除彰化田尾地區族群應為另一不同物種 *P. sp.*，馬祖、海南島、香港、以及彰化田尾地區族群則為 *P. megacephalus*，兩物種間 Cyt-b 序列平均遺傳距離達到 0.1736，Rhodopsin 序列平均遺傳距離達到 0.0086。

測量彰化田尾族群與台灣其他地區族群之吻肛長(SVL)、腿長(LL)、頭長(HL)、頭寬(HW)，對其進行主成分分析(PCA)與判別分析(DA)，結果顯示彰化田尾族群與台灣其他地區族群在外部形態有顯著差異，彰化田尾地區族群個體在頭部佔身體比例上，小於台灣島內其他地區族群。同時分析兩者雄性個體求偶宣告叫聲的結果也顯著不同，與分子遺傳分析的結果互相映證，顯示 *P.sp.* 與 *P. megacephalus* 在分類地位上確實為不同物種。

**關鍵字:**白領樹蛙複合種群、分類地位、Cyt-b、Rhodopsin、*P. megacephalus*、*P. sp.*、分別入侵、快速擴張、外部形態、宣告叫聲

## Abstract

Hong Kong Whipping Frog (*Polypedates megacephalus*) widely distributes in the East Asian area. Because to differentiate condition variation is difficult, there are many disputes as well as the scotoma in its classified status.

The partial sequence of mtDNA cytochrome b (Cyt-b) & nDNA Rhodopsin was used as genetic marker in this study. The length of sequenced Cyt-b gene was 615bp and Rhodopsin gene was 358bp. Totally, 191 specimens were obtained in Taiwan. This research using the Cyt-b sequence to analyze and discuss genetic structure of *Polypedates megacephalus* in the island of Taiwan (besides the Zhanghua Tianwei area). There are two haplotype (Taiwan I & Taiwan II) groups in Taiwan according as minimum spanning network. The variation of each haplotype is very small. It is the most possible that there are two mainland ancestral populations invade to Taiwan island.

Phylogenetic trees generated from the ML、NJ and MP methods showed that there are another specie frogs (*P. sp.*) in Taiwan & Guizhou. The populations of Hainan Island, Mazu, Hong Kong & Zhanghua Tianwei area are real *P. megacephalus*. We discovered the proportion size of head and the calling have the obvious difference between *P. sp.* & *P. megacephalus*.

## 前言：

現今生物族群的遺傳結構和地理分佈受物種現今生存的生態(ecology)，族群統計(demography)、擴散能力(dispersal)，及歷史地質事件(vicariance)等因素的影響(Avise,1986、2000；Harrison, 1996；Thomas et al, 2002)而種內各族群的地理結構隔離常會伴隨著某種程度的遺傳變異(Harrison, 1996；Avise, 2000)。其中一些受到長期地理隔離以致缺乏族群間基因交流(gene flow)的物種；或某些地理分布廣闊而基因交流程度較低的物種，因中間型基因的滅絕其遺傳差異呈現不連續狀且各自分布在不同的地理區域中(Avise,1986)。藉由瞭解族群遺傳結構，分析族群內與族群間的遺傳變異，可以去推論物種演化的過程(Hedrick, 1999)。生物個體可能因為棲息環境的些微不同，會產生對區域性環境的適應。這種適應過程則會促進物種的分化；另一方面，生物體在擴散、交配的過程中則會進行遺傳物質的交流，造成遺傳結構均質化(homogenization)。生物體本身的擴散能力以及族群間的距離，地理屏障的存在與否都會影響遺傳物質交流的頻率(Slatkin, 1985)。近年來由於分子生物學(Molecular Biology)以及族群遺傳學(Population genetics)技術的成熟以及理論的完善，讓我們可利用分子生物方法去探討族群遺傳結構、生物地理學上的演化歷程及物種分

類上的問題(呂, 1997)。

台灣島擁有許多高聳的山脈，海拔 1000 公尺以上的地區約佔全島面積三分之二。南北縱貫台灣島的中央山脈最高可接近海拔 4000 公尺。這樣的地形地勢可能阻隔廣泛分布於較低海拔地區物種的基因交流，使得各個族群因為基因組成的差異造成分化產生。葉(1997)的利用粒線體 DNA 研究台灣島內莫氏樹蛙(*Rhacophorus moltrechti*)的地理類緣關係，發現它們受到中央山脈阻隔的影響可劃分為而東部西部兩個分群。張及劉(1997)利用粒線體 DNA 限制酶片段長度多型性(RFLP)研究台灣斯文豪氏攀蜥(*Japalura swinhonis*)的地理類緣關係，結果顯示島內族群可分成東北部、東南部、西部、南部、太麻里五個地理分群。Toda 等人(1998)以同功異構酶(allozyme)研究台灣地區的澤蛙(*Rana limnocharis*)，發現東部族群擁有與其他族群不同的基因位址(loci)。林(2003)利用粒線體 DNA 研究台灣草蜥(*Takydromus formosanus*)，發現台灣草蜥因地理隔離，族群遺傳結構具有顯著的不同，可以分成北部、東部、西部三個單系群。方(2001)在台灣麝鼯屬的研究中，利用粒線體 DNA 發現東部花蓮、台東地區的台灣長尾麝鼯(*Crocidura tadae*)與西部族群各自為不同的單系群，顯示東部族群可能為新物種。近年來的這些研究均顯示島內廣泛分布物種族群常受到地理隔離因素造成族群分化。白領樹蛙於台灣島內低海拔廣泛分

布，個體在型態上具有差異，山岳可能阻隔其族群間基因交流造成遺傳結構上的隔離。

白領樹蛙複合種群(*Polypedates leucomystax* species complex)(Dubois, 1987)分布從尼泊爾南部、東印度的 West Bengal、Meghalaya、Assam、Arunachal Pradesh、Nagaland、Manipur、Sikkime 各省；中南半島、中國大陸南方、台灣島、菲律賓；往南到爪哇島，蘇門答臘島；琉球則也有被認為是人為引入的族群。最早這些類群全被都歸屬於 *Hyla leucomystax* Grzvenhost, 1829，後來隨著屬級分類的更改，學名有 *Rhacophorus leucomystax*、*Polypedates leucomystax* 的變動等。其中各地分佈的族群由於型態、或者行為上有所差異，陸續有許多分類觀點上的爭論。目前此複何種群內已被確認的種類有：分布於印尼爪哇島、蘇門答臘島、婆羅洲、蘇拉威西島、馬來半島南端的 *P. leucomystax*；分布於斯里蘭卡島的 *P. cruciger*；分布於馬來半島及婆羅洲的 *P. macrotis*；同樣分布於馬來半島及婆羅洲的 *P. colletti*；以及分布於中南半島，華南地區及台灣的 *P. megacephalus*。

台灣的白領樹蛙廣泛分布於全島海拔 1000 公尺以下地區，每年的三月到八月是其主要的繁殖季節。台灣島內族群原先是被認為分佈於華南，中南半島，台灣地區的 *Polypedates leucomystax*。於 1911 年

時，Vogt 將採於台灣的標本發表為新種 *P. braueri*，而後在 1925 年時，Stejneger 認為 *P. braueri* 乃是 *P. leucomystax* 的同種異名，並將其歸入 *P. leucomystax megacephalus* (模式地點在香港)，後來在 1986 年 Matsui 等人將台灣島內的白領樹蛙與爪哇島的指名亞種 *P. leucomystax leucomystax* 進行比對。結果在型態、叫聲、及染色體形狀均有所差異，故將 *P. leucomystax megacephalus* 此亞種提升為獨立種 *P. megacephalus*，但由於當時沒有取得香港、華南等地方的個體進行比較，所以台灣與中國大陸或者鄰近地區的族群可能並非同一物種。早期在台灣脊椎動物誌(陳, 1956、于, 1984)記載，島內白領樹蛙因為型態上的不同，分為分布在全島，其背上沒有條紋的 *P. leucomystax leucomystax* 以及分布在台南高雄一帶，背上具有條紋的 *P. leucomystax sexvirgata* 或者 *P. leucomystax megacephalus* 兩個亞種，因此台灣白領樹蛙的分類地位有待釐清(台灣島內白領樹蛙種名更迭見表一)。故本研究想討論台灣島內白領樹蛙是否受到山脈或者河川阻隔，造成各族群間基因結構的分化，而基因結構的分化是否會反映在個體型態不同的特徵上，以及設法釐清台灣島內白領樹蛙的分類地位。



## 材料與方法：

### 一、 樣本採集

根據前人研究及文獻，先將全島白領樹蛙區分為北部、南部及東部三群：北部群為基隆、台北、新竹、南投、雲林、宜蘭北部等濁水溪以北地區，嘉義、台南、高雄、屏東等濁水溪以南地區則歸於南部群。東部群包括中央山脈東側之宜蘭南部、花蓮、台東等地區。

2006 年三月到八月在台灣海拔 1000 公尺以下進行白領樹蛙的採集，總共會在全島均勻設置 26 個採樣點(圖一)，分別是北部：基隆、台北、桃園、新竹、台中、南投以及宜蘭北部共八個樣點，南部：雲林、嘉義、台南、高雄、屏東共九個樣點，東部：宜蘭南部、花蓮、台東、共九個樣點。盡量使每個點與點間距離相等，每個點採樣二到十隻個體。所採集到的白領樹蛙個體分別在野外或者帶回實驗室進行形質測量，並拍照紀錄其背部條紋數量及大腿內側網狀花紋，同時剪下左後肢第二趾將採集到之個體放回原採集點，將剪下的腳趾保存於 95%的酒精中以供 DNA 的萃取使用。

島外的部分預計採集香港、海南島、馬祖、及大陸地區的個體組織樣本，同樣進行粒線體 DNA 的粹取與定序，並與島內取得的樣本相比較。

## 二、分子分析

將剪下的腳趾組織切碎置於 ddH<sub>2</sub>O、Proteinase K、digestion buffer(郭, 2002)試管中, 置於 56°C 乾浴槽加熱反應, 隔夜再取出。隔天加入等體積的 LiCl 與二倍量的 Chloroform, 放入垂直轉輪中轉動 30 分鐘, 震盪均勻後進行離心, 離心機的設定值為轉速 13000RPM、10°C、15 分。取出上清液, 再加入兩倍量體積的 Chloroform, 震盪均勻後離心, 離心機的設定值為 13000 轉、10°C、10 分鐘。

取出上清液, 加入 2.5 倍體積的 100%酒精後, 將試管置入-80°C 冰箱, 進行酒精沈澱 20 分鐘。取出試管離心十分鐘, 離心機的設定值為轉速 13000RPM、10°C

、12 分鐘, 流程完畢倒掉上清液。加入等體積 70%酒精, 進行離心, 離心機的設定值為轉速 13000RPM、10°C、10 分鐘。倒掉上清液之後, 倒扣試管在通風櫥隔夜放置, 以乾燥沈澱 DNA。隔天將試管的 DNA 溶於 50µl ddH<sub>2</sub>O, 再放入-20°C 冰箱保存。取出 3µl 的 DNA, 置入已加上溴化乙定螢光染色劑 (0.5mg/ml EtBr) 的洋菜膠體, 進行 30 分鐘電泳後取出, 使用 QUANTITY ONE 膠體照相系統, 檢視 DNA 品質。

根據 GeneBank 中的相近物種 DNA 序列資料，包括 *Polypedates crusiger*、*Rhacophorus schlegelii*，利用 FPCR (fast PCR) 軟體設計寡核苷酸引子，進行增幅的片段包括細胞色素 b (Cytochrome b, cyto b) 與視紫質(Rhodopsin)部分片段。

PCR 反應流程皆相同，先進行 94°C、3 分鐘使 DNA 雙股變性解開 (denature)，接著進行 35 個循環，循環過程如下：94°C、30 秒，使 DNA 雙股變性解開；56.2°C、40 秒，使 DNA 與 Primer annealing；72°C、2 分鐘，進行 DNA 的延伸工作 (extension)。35 個循環結束後，再進行 72°C、10 分鐘，使 DNA 的延伸工作完成，反應完畢產物置於 4°C 冰箱保存。

PCR 產物進行電泳定序，使用加入溴化乙定螢光染色劑的洋菜膠體，以電壓 100 伏特進行 TBE 電泳 30 分鐘，在紫外光燈下拍照解析，確定 PCR 的產物與長度片段，最後利用 ABI377 自動定序儀 (PE Corp.) 進行雙股序列定序。

定序結果使用軟體 SEQUENCHER 4.0.5 (Gene Codes Corporation, 1999) 進行雙股的排序與合併校正，修改過的序列在 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 進行 Blast 比對，以確認序列位置，所得 haplotype 將在 Gene bank 進行 submitted。

### 三、序列分析

使用 MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, ver.4.0) (Kumar et al., 2001) 軟體計算鹼基組成百分比、鹼基對替換 (transition, 兩個嘍呤或嘍啶突變, Ts)、鹼基對顛換 (transversion, 嘍呤與嘍啶之間發生的突變, Tv) 的發生率。

在 DnaSP4.10.9 套裝軟體 (Rozas & Rozas, 1997), 將所得 DNA 序列進行中性假說測試 (Neutral mutation hypothesis) (Kimura, 1983), 使用 Tajima D test (Tajima, 1989)。

### 四、遺傳變異分析

在 DnaSP4.10.9 中進行族群間單基因型歧異度 (haplotype diversity,  $h$  值) (Nei & Tajima, 1983)、核苷酸歧異度 (nucleotide diversity,  $\pi$  值) (Nei, 1987) 的計算, 以量化族群的遺傳歧異度。以上兩者皆是族群內部的遺傳變異,  $h$  為族群內不同對偶基因的頻率與數量, 不受序列變異影響,  $\pi$  為族群中兩個對偶序列核苷酸差異平均數, 不受單基因型影響, 比較兩者的數值大小可以推測族群演化歷史 (Page & Holmes, 1998; Avise 2000; Graur & Li, 2000)。並利用軟體 Arlequin3.11 計算各系群間  $F_{st}$  值, 以及 AMOVA 分析。

## 五、遺傳距離與親緣關係樹狀圖的建立

使用軟體 Modeltest3.7 進行模式選擇的測試，再利用 PAUP4.0 軟體，利用 Maximum likelihood、Maximum parsimony、Neighbor joining 三種方法進行親緣關係樹狀圖的建立，Maximum likelihood 重複取樣 100 次(bootstrap=100)、Maximum parsimony 及 Neighbor joining 兩種方法則重複取樣 1000 次(bootstrap=1000)以增加可信度。

## 六、NCA 分析

將單基因型序列變異資料，利用 MEGA 軟體轉換成遺傳距離矩陣，再使用 MINSNET 軟體 (Excoffier & Smouse, 1994) 進行最小關聯網狀圖 (minimum spanning network, Excoffier et al., 1992; Excoffier, 1993) 分析，以探討 haplotype 之間過去族群歷史親緣關係。

## 七、外部型態分析與聲紋分析

將在野外捕捉到的個體 n=191 測量其吻肛長(SVL)、腿長(LL)、頭寬(HW)及頭長(HL)。利用統計軟體 JMP5.0.1 進行主成分分析 (PCA)，以了解是否具有顯著區別分群的現象，並同時進行判別分析

(DA)，與主成分分析的結果相驗證。

在進行野外採集同時，使用麥克風以及錄音器材(SONY MD-9HL)對彰化田尾以及嘉義蘭潭兩地區之雄性個體宣告叫聲進行錄音。錄音時麥克風與鳴叫個體距離一公尺。彰化田尾地區收錄三隻，嘉義蘭潭地區收錄兩隻，每次錄音時間為五分鐘。錄得之聲音檔案使用聲紋分析軟體 BatSound Pro3.31b 進行比對分析。

## 結果：

本研究於台灣全島、馬祖、貴州、海南島、香港 30 個地區取得之白領樹蛙組織(*P. megacephalus*)共 191 個樣本(表二、表三)，另使用 NCBI 上公布的 *P. megacephalus*、*P. crusiger*、*R. schlegelii* 之粒線體基因序列片段作為外群以供比對。

### 一、遺傳變異：

以 DnaSP4.10.9 軟體(Rozas&Rozas, 1999;Rozas et al.,2003)進行 Tajima's D test 之中性假說檢測，結果顯示所使用片段均為中性 ( $P>0.1$ )，其變異不受天擇影響。

PCR 成功增幅粒線體 DNACyt-*b* 基因，序列長度 615bps，有 3 個樣本可能是受到污染或者保存狀態不好無法進行 DNA 的粹取，共 188 個樣本。在所有序列資料中共有 20 基因型，核苷酸歧異度  $P_i=0.0668$ 、基因型歧異度  $h=0.846$  顯示均屬於高度分化的狀態。台灣島內(彰化田尾族群除外)則共有 11 個基因型， $P_i=0.0287$ 、 $h=0.777$ (表四)。核 DNA 序列長度 358bps(Rhodopsin)，發現香港與台灣兩地族群相差 3 個鹼基對，而台灣族群內並沒有發現任何差異。

遺傳分化指數( $F_{st}$ )(表五)果顯示台灣東部、北部、南部三個地區

族群的基因分化非常低( $F_{st} > 0.01$ )，而與大陸貴州地區則有 0.57 左右的分化指數，顯示為高度分化的狀態。基因交流指數( $N_m$ )(表五)則顯示台灣東部、北部、南部三的地區族群基因交流非常流暢，尤其以台灣南部與北部特別高，高達 28.7，而與貴州地區族群的基因交流指數就相對顯得非常小。PCA 分析(表六)結果也顯示台灣島內北部、南部、東部三個地區族群沒有分化，變異集中在各地區族群內的小族群。綜合  $F_{st}$ 、 $N_m$  與 AMOVA 之分析結果，顯示台灣島內白領樹蛙可視為單一族群(除彰化田尾地區外)，個體間基因交流順暢且沒有任何分化伴隨著地理結構發生。

## 二、親緣關係樹型圖與遺傳距離：

粒線體 DNA(*Cyt-b*)經軟體 Modeltest3.7 測試選用 GTR+G+I model 建構親緣關係樹型圖(圖二)，核 DNA(Rhodopsin)則選用 HKY+I model(圖三)，親緣關係樹均顯示台灣除彰化田尾地區外之白領樹蛙與模式地香港為完全不同的系群，台灣地區兩群及貴州與香港、海南島地區之平均遺傳距離(表七)高達 0.1736。在此定義基因型 Ta1~Ta6 為台灣 I 系群、Tb1~Tb5 為台灣 II 系群、G1 及 G2 為貴州系群、H1 及 H2 為香港系群、Hn、M1、M2 及 X1 與 X2 為東南沿海系群。台灣島內族群可區分為台灣 I 及台灣 II 兩群，群間遺傳距離平均為



0.058，貴州與台灣 II 遺傳平均距離為 0.061，與台灣 I 為 0.055。值得注意的是彰化田尾地區與海南島、馬祖以及香港地區最為接近，其平均遺傳距離為 0.0121，在此同樣歸屬為東南沿海系群。另在核 DNA 視紫質(Rhodopsin)的序列分析中，台灣 I 與台灣 II 並沒有差異，但與香港具有 0.0093 之遺傳距離(表八)。

### 三、各地區基因型分布：

在 20 個基因型中，Ta1~6 以及 Tb1~5 為台灣島內所擁有的獨特基因型，X1 及 X2 為彰化田尾地區之基因型，G1 及 G2 為貴州族群之基因型，Hn 為海南島族群之基因型，M1 及 M2 為馬祖地區之基因型。各地區所擁有的基因型見表九到~表十二，各基因型分布地區見表十三。在此定義基因型 Ta1~6 為系群台灣 I 型；Tb1~5 為系群台灣 II 型。台灣島內各族群基因型系群分佈及頻率見圖四。

### 四、網狀親緣關係圖：

以 minimum spanning network 方法重建白領樹蛙親緣網狀圖(圖五)，探討基因型之間親緣關係。結果顯示基因型 Tb1 及 Ta6 位於網狀圖的中央位置，在所有個體中也佔較高的比例。

## 五、外部型態分析：

收得可供測量的 196 個個體中，165 個個體為雄性，31 個個體為雌性。由於各地區雌性個體體型差異非常大，馬祖與彰化田尾兩個族群雌性個體共僅有三隻，故在分析將雌性個體予以剔除。各特徵值 (HL、HW、LL、SVL) 的平均值以及標準差見表十四、測量結果顯示在馬祖與彰化田尾地區個體之體型均較台灣其他地區個體稍大。

PCA 的結果分析顯示第一軸向量就具有 100% 的判別能力(圖六、表十五)，通常若是第一軸向量超過 75% 就可以被認為具有顯著的分群。DA 分析(表十六)顯示誤判率僅只有 11.52%，彰化田尾地區被判斷為島內其他地區之個體在 28 隻中有 2 隻，而其他地區個體被誤判為馬祖或者彰化田尾地區之個體有在 137 隻中有 17 隻。分析結果顯示島內個體可以分成兩群，彰化田尾地區之個體在外部型態顯著與島內其他地區個體不同。在 PCA 分析的結果中，第一軸向量中 HW/SVL 及 HL/SVL 有較高的特徵值，顯示青蛙頭部大小的比例在此判別分群上為主要的依據。

## 六、聲紋分析：

利用聲紋分析軟體 BatSound Pro3.31b 比對彰化田尾及嘉義蘭潭地區之白領樹蛙宣示叫聲。圖七與圖八為彰化田尾地區個體叫聲與其他地區個體之頻譜圖。彰化田尾地區個體明顯具有兩種不同宣示叫聲，每個音節大約頻率均在 0.5kHz~3kHz 間。第一種叫聲為單音，每個單音間隔大約兩秒，並且在 2~3 個重複後結束。第二種叫聲為一連串如機關槍的連續叫聲，每次大約持續 6~10 秒。與蘭潭地區之白領樹蛙之叫聲為 3~5 次串音，頻率同樣在 0.5kHz~3kHz 之間，人耳就可分辨出兩者間顯著的差異。

## 討論：

### 一、 台灣島內白領樹蛙遺傳結構

Avice(2000)等人提到，可以利用基因型歧異度 (haplotype diversity,  $h$  值) (Nei & Tajima, 1983)、與核苷酸歧異度 (nucleotide diversity,  $\pi$  值) 來推斷一個族群的變遷歷史以及族群統計 (Demography)。同樣也是 Avice(2000)等人提出在基因型歧異度與核苷酸歧異度都高的狀況下，該族群應該為一沒有受到干擾或者重大災害的長期穩定族群，突變不斷的再發生，並且不斷的累積下來。而當基因型歧異度與核苷酸歧異度都低的狀況，則代表該族群受到明顯而長期的瓶頸效應(bottleneck effect)，使得族群類的基因多樣性非常的低。當基因型歧異度高而核苷酸歧異度低時，則代表族群快速散佈，但還沒有累積足夠的變異。而基因型歧異度低，核苷酸歧異度高時則代表古老的族群可能遭遇到了短期的瓶頸效應，或者地理分隔的小族群在近期混合。

與近期台灣島分子生物研究比較：如赤腹松鼠 *Callosciurus erythraeus*(李，2003)、溪狡蛛 *Dolomedes raptor* (羅，2007)、山椒魚 (Genus: *Hynobius*)(Lai，2008)，這些研究中基因型歧異度多半在 0.8~0.9 左右，而核苷酸歧異度在 0.010 左右。與台灣島內白領樹蛙(彰

化田尾族群除外)基因型歧異度  $h=0.777$ ，而核苷酸歧異度  $\pi=0.0287$  相比，台灣島內白領樹蛙顯著基因型歧異度較低而核苷酸歧異度較高。

台灣乃一個海島，在島嶼生物地理學(Barry, et al. 2004)中提到，近期內由大陸地區遷移至島嶼上之生物，在族群結構上往往會存在著顯著的創始者效應(founder effect)，而創始者效應與瓶頸效應相同都會造成同樣的結果：僅遺傳到部分祖先的基因。這暗示台灣島內的白領樹蛙很有可能是數個古老的小族群在近期內到達台灣島內，產生創始者效應，並且擴張混合的結果。接下來將針對各個基因型分布做進一步的討論。

## 二、 台灣島內白領樹蛙基因型分布討論

從基因型分析及親緣關係樹上可發現台灣島內之白領樹蛙可區分為台灣 I 型(Ta1~Ta6，6 個基因型)及台灣 II 型(Tb1~Tb5，5 個基因型)兩個系群。而兩系群在台灣島全島均有分布(圖四)，台灣 I 型分佈於東部的宜蘭、花蓮、台東，同時也分佈於台灣北部的新竹、台中。台灣南部的嘉義、台南、高雄、屏東。而台灣 II 型則同樣在東部宜蘭、花蓮、台東三個地區，並在北部的基隆、台北、桃園、南投、南部的嘉義、台南以及屏東有分佈。由圖四可看出台灣 I 型多分布於台

灣的東南半部，而台灣 II 型則多分布於西北半部。雖然基隆、台北、桃園、南投僅分布台灣 II 型，但中間新竹、台中則存在台灣 I 型，並不能斷定基隆台北桃園地區僅存在台灣 II 型，由於這些地區採樣個體數相對較少，很有可能是採樣誤差造成的結果。此外其中在宜蘭礁溪、花蓮卓溪、台東延平、屏東內埔、台南楠西五個地點採樣的個體中就同時存在台灣 I 型與台灣 II 型，顯示台灣 I 型與台灣 II 型在台灣東西部均有分佈。由於本研究於白領樹蛙繁殖季時進行採樣，故可得知台灣 I 型與台灣 II 型應可共域並進行繁殖。故台灣島內白領樹蛙在此並沒有發現有受到任何山脈或者河流的阻隔影響，造成地區性有特異的基因型分化。

在 minimum spanning network 的分析方法(圖五)中認為，祖先族群中的古老基因型有較大的機會位於網狀樹狀圖的內部或中心區域，而因為突變新衍生的基因型則會位於邊緣位置(Crandall & Templeton, 1993)。

在台灣 I 型中，有超過一半的個體屬於基因型 Ta6；台灣 II 型中則有超過一半的個體屬於基因型 Tb1，利用白領樹蛙親緣網狀圖(圖三)發現 Ta6 與 Tb1 兩基因型分別位於台灣 I 型及台灣 II 型的中心位置，故推測 Ta6 與 Tb1 為原始族群的基因型，Ta1~Ta5 及 Tb2~Tb5 各為 Ta6 及 Tb1 突變衍生的新基因型。而從遺傳距離上來看，台灣 I

型與台灣 II 型相差大約 0.06、而貴州系群又分別與台灣 I 型及台灣 II 型相差也是僅為 0.06 左右，並沒有較大的差異，故推測台灣 I 型系群與台灣 II 型系群並非在台灣島內因長期隔離而形成。基因型 Ta6、Tb1 又與貴州系群的 G1 分別具有 33 個變異點，在此亦無法推論台灣 I 型與台灣 II 型哪個與貴州系群有較近的親緣關係。另外，台灣 I 型系群中 Ta6 與五個其他基因型僅相差 3~5 個變異點，台灣 II 型系群中 Tb1 也與其他四個基因型相差 2~3 個變異點，顯示這兩個台灣島內的系群內差異是很小的，隔離效應並不顯著。這有兩種可能：第一種為島內白領樹蛙個體雖然無法分佈或跨越到島內高聳的山脈，但中央山脈東西兩邊的族群依舊可以靠著台灣島南端或者北端地勢不高的地區進行遺傳物質交流。第二種可能則是祖先族群到達台灣島的時間不長，族群與族群之間雖然無法進行遺傳物質交流，但族群間的遺傳物質變異還來不及累積。

綜合上述討論可知道台灣島內白領樹蛙具有兩個主要的基因型系群，系群間差異大，而系群內差異小，與台灣島內拉都希氏赤蛙 (Jang-Liaw et al., 2008) 的基因型結構類似。推測有兩種可能性會造成此遺傳結構，第一種可能為兩次入侵事件：台灣島內白領樹蛙可能為大陸地區兩個不同族群在冰河時期大陸與台灣間陸橋形成時，分別不同時間遷移到台灣島上來，一次可能由台灣北部入侵、另一次從台灣

南部入侵。故有採樣時台灣 I 型系群在台灣東南部採得較多個體，而台灣 II 型系群則在台灣西北部採樣較多的現象。在拉都希氏赤蛙族群遺傳結構的研究(Jang-Liaw et al., 2008)中認為這是最是可能性較高的推論。第二種可能為只有一個入侵事件，但入侵的祖先族群中就存在兩個不同的基因型，但這種可能性兩個基因型系群應該會在島內呈現均質分布的狀況。但不論是兩次入侵或者一次入侵，祖先族群到達台灣的時間需要更多大陸沿海地區如：福建、浙江之樣本，才能作進一步的確認。而系群內個基因型差異都少於五個鹼基變異，暗示此兩系群散布到台灣的時間可能不長，島內隔離效應並不強烈，與 Fst 分析和 Nm 分析呈現類似的結果。

### 三、 台灣島內白領樹蛙分類地位

台灣島內白領樹蛙原先被歸屬於 *P. leucomystax megacephalus* (Stejneger, 1925)，後來 Matsui 等人認為台灣島內的白領樹蛙與 *P. leucomystax* 不同種(Matsui et al., 1986)，建議將 *P. leucomystax megacephalus* 提升為 *P. megacephalus*，但並未與原先 *P. leucomystax megacephalus* 之模式地香港進行比對，且主要依據外部形值資料進行分析，沒有分子遺傳方面的資料。在白領樹蛙複合種群外觀難以區分辨認的情況下，台灣島內之白領樹蛙應只能確認並非為 *P.*



*leucomystax*，但是否為 *P. megacephalus* 則有待商榷。(張，1989)

在所採得大陸地區及台灣之樣本粒線體 DNA 序列結果共可分出五個主要的單系群(圖二)，而這五個系群又可分成兩大群。第一大群包括台灣島內的台灣 I 型系群、台灣 II 型系群及貴州系群，第二大群則包括香港系群以及東南沿海系群。這兩大群之間粒線體 DNA 遺傳距離高達將近 0.20。在兩生爬行動物中，不同種間粒線體 DNA 之遺傳距離往往超過 0.10(葉，1997)(林，2003)。故台灣 I 型、台灣 II 型及貴州這三個系群應與香港及東南沿海這兩個系群為不同物種。除粒線體 DNA 序列之外，本研究中利用核 DNA 視紫質(Rhodopsin)序列來進行分析，由於核 DNA 的基因片段每個世代均會修正，兩生動物屬以下分類階級往往在核 DNA 序列上是非常微小甚至沒有任何差異的(Frost et al., 2007)。核 DNA 視紫質(Rhodopsin)序列顯示香港與台灣島也擁有將近 0.01 左右的遺傳距離(表七)。與粒線體 DNA 序列之結果相吻合。同時在親緣關係樹(圖二)上可得知，台灣島上及貴州族群與香港及東南沿海地區族群並非單系群，香港地區族群可能擁有另一產於斯里蘭卡的有效種沙漏樹蛙 *P. crusiger* 為姊妹群。顯示台灣島上的白領樹蛙族群與香港的族群並非單系群。依照演化種概念觀點，同時綜合粒線體 DNA、核 DNA 序列分析之結果均強烈支持台灣島上廣泛分佈的白領樹蛙種群並非香港的 *P. megacephalus*，應為另一完全不

同的物種 *Polypedates* sp.。翻閱文獻追溯最早的有效種名，發現 Vogt 曾經在 1911 年時採得台灣島上的標本，並發表為新種 *P. braueri*，而後在 1925 年時，Stejneger 認為其為 *P. leucomystax* 之同物異名，如今台灣島內及貴州族群可能應回復種名為 *P. braueri*，周文豪博士(2004)亦曾提出此一建議，但而後周(2008，私人通訊)指出據其本人比對位於德國洪堡大學(Universität Humboldt, Zoologisches Museum, Invalidenstrasse 43, 10115 Berlin, Germany)，當初採自台灣的 *P. braueri* 模式標本，由於年代久遠，其組織已無法粹取 DNA，而外觀又難以與白領樹蛙複合種群內其他物種區別，也無法得到其宣告叫聲，故是否應將台灣島內及貴州族群之學名變更為 *P. braueri* 則需要再尋找更多證據。而香港(*P. megacephalus* 模式標本產地)、彰化田尾地區、海南島及馬祖之族群則應明確為 *P. megacephalus*。

#### 四、彰化田尾地區族群之討論

台中郭可遇先生於 2007 年三月告知在彰化田尾地區存在一個特異族群。外觀與台灣其他地區之白領樹蛙在肉眼觀察上非常近似，而叫聲與習性似乎有所不同。前往採集後，進行分子遺傳分析，其粒線體 DNA 與核 DNA 序列經過比較後均顯示他們並非台灣其他族群的白領樹蛙，遺傳距離同樣高達將近 0.20。在粒線

體 DNA( *Cyt-b*)以及核 DNA(Rhodopsin)的親緣關係樹顯示此族群與海南島以及香港族群有相近的親緣關係，另外在基因型構成的網狀親緣關係樹狀圖(minimum spanning network)(圖五)，顯示此族群具有的兩個僅差一個鹼基變異的基因型，且此兩個基因型與馬祖以及海南島族群所具有的基因型非常接近，僅相差一個到兩個鹼基，故此族群的分類地位應該是 *P. megacephalus*。

由於可以取得完整個體，故對其進行外觀形態分析及聲紋分析。外觀型態利用主成分分析(PCA)及判別分析(DA)，結果顯示彰化田尾地區採得的個體的確與台灣其他地區之白領樹蛙族群有顯著的差異，其中所量測得到的資料中顯示彰化田尾地區族群各種型值都略大於台灣其他地區族群(表十三)。PCA 的結果中顯示，頭寬/吻肛長以及頭長/吻肛長兩數據為主要的分群依據，顯示彰化田尾地區族群與台灣其他族群，頭部佔全身比例不同，彰化田尾地區族群頭部較小( $1.025 < 1.075$ 、 $0.325 < 0.333$ )(表十三)。

雖然型態分析顯示兩者具有差異，但包括背部花紋，腿部網紋，體色等，不論是彰化田尾族群或者台灣其他地區族群都有非常多樣化的變異，有些個體背部聚有縱向條紋，有些則是 X 型斑紋，腿部網紋網目大小跟深淺也會因個體不同有很大的差異，體色則從深褐到乳白色不等。故在野外觀察時，要在不使用工具的情況

下區別兩者相當困難。

樹蛙以雄蛙發出求偶宣告叫聲吸引母蛙前來配對繁殖，雖然外部形態類似但求偶宣告叫聲不同時，如兩種綠色樹蟾 *Hyla cenerea* 與 *Hyla andersonii*，兩種不同的宣告叫聲暗示此兩種聲音的來源具有生殖隔離中的合子前隔離(Gerhardt, 1974)，經由聲紋分析的結果可得知彰化田尾族群與台灣其他地區族群具有完全不同的宣告叫聲，其差異可由人耳輕易的分辨。聲紋分析的結果也可以支持 *P. megacephalus* 與台灣島內其他族群之白領樹蛙具有生殖隔離，為兩個不同的物種。

就野外採集觀察的結果，目前已知道的分布地點有台中石岡、清水，彰化田尾，台中兩個地點的個體根據對郭可遇先生的訪談指出乃是隨著水生植物買賣流通，從彰化田尾散布過去的。而目前在彰化田尾採集之地點沒有觀察到有台灣其他地區的 *Polypedates.sp.* 分布。

## 五、 未來研究展望

目前中文名被稱為白領樹蛙的包括三個物種，包括分佈於台灣全島、貴州，正確學名尚有待釐清的 *Polypedates sp.*；已知分佈於香港、馬祖、海南島、廣西及台中彰化的 *P. megacephalus*；及分布於蘇門答

臘島以及爪哇島上的 *P. leucomystax*。為避免混淆，建議與大陸學者統一，將 *P. megacephalus* 改稱為斑腿樹蛙，白領樹蛙則專指 *P. leucomystax*。*Polypedates sp.* 在大陸地區目前僅知貴州地區有分布，而台灣與貴州之間包括湖南湖北、福建浙江等地區是否也有分布則尚待釐清。*P.sp.* 與 *P. megacephalus* 很有可能在華南或者中南半島分布區域有重疊的狀況，而是否有競爭排擠的現象或者資源分配利用的問題，可以做進一步的觀察與探討。彰化田尾地區之斑腿樹蛙(*P. megacephalus*) 是否為近期引入則需要更多個體測試其是否擁有強烈的先驅者效應(founder effect)，並密切監測其族群是否有擴散。

## 結論：

- 一、 台灣島內原先所被稱呼為白領樹蛙的類群，經由粒線體 DNA 及核 DNA 比對，結果發現並非原先認為的 *P. megacephalus*(斑腿樹蛙)，為另外一物種 *Polypedates sp.*其正確學名尚需要進一步研究。此兩種樹蛙在外觀形態非常難區分，但雄蛙求偶宣告叫聲可由人耳辨別。
- 二、 目前已知 *Polypedates sp.*分布地區不僅只在台灣島上，大陸貴州也有分布，貴州與台灣島間的地區包括四川、湖南、湖北、浙江、福建是否也有分布，則需要進一步的採樣與調查。
- 三、 馬祖及彰化田尾地區發現存在 *P. megacephalus* 族群，為新紀錄種。彰化田尾地區之 *P. megacephalus* 族群有可能為近期引進之族群。
- 四、 台灣島內 *Polypedates sp.*的兩個基因型系群沒有地理分群的現象，並且共域同時可以交配繁殖，系群內差異很小，推測祖先族群到達台灣的時間可能不長。
- 五、 台灣島內 *Polypedates sp.*族群較有可能為兩個其他地區族群各自因冰河時期海退，台灣海峽陸橋行程遷移至台灣島，產生兩次入侵事件，並迅速擴張全島之結果。

## 參考文獻；

- Avise, J. C. 1986. A note for molecular genetics in the recognition and conservation of endangered species. *Trend in Ecology and Evolution* 4: 279-281.
- Avise, J. C. 2000. *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge.
- Barber, P. H. 1999. Patterns of gene flow and population genetic structure in the canyon treefrog, *Hyla arenicolor* (Cope). *Mol. Ecol.* 8: 563-576.
- Barry C. C., P. D. Moore, 2004. *Biogeography: An ecological and evolutionary approach*. America.
- Bouzat, J. L., H. A. Lewin, and K. N. Paige. 1998. The ghost of genetic diversity past: historical DNA analysis of the Greater Prairie Chicken. *Am. Nat.*, 152: 1-6.
- Buza, L., A. Young, and P. Thrall. 2000. Genetic erosion, inbreeding and reduced fitness in fragmented populations of the endangered tetraploid pea *Swainsona recta*. *Biological Conservation* 93: 177-186.
- Caizergues, A. 2003. Population genetic structure of male black grouse (*Tetrao tetrix L*) in fragmented vs. continuous landscapes. *Mol. Ecol* 12: 2297-2306.
- Crandall, K. A., and A. R. Templeton. 1993. Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstructure. *Genetics* 134: 959-969.

- Desplanque, B., F. Viard, J. Bernard, D. Forcioli, P. Saumitou-Laprade, J. Cuguen, and H. van. Dijk. 2000. The linkage disequilibrium between chloroplast DNA and mitochondrial DNA haplotypes in *Beta vulgaris* ssp. *Maritima* (L.) : the usefulness of both genomes for population genetic studies. *Mol. Ecol.* 9: 141-154.
- Dodd, C. K. 1994. The effects of drought on population structure, activity, and orientation of toads (*Bufo quercicus* and *B. terrestris*) at a temporary pond. *Ethology, Ecology and Evolution* 6: 331-349.
- Driscoll, D. A. 1998. Genetic structure of the frogs *Geocrinia Lutea* and *Geocrinia Rosea* reflects extreme population divergence and range changes, not dispersal barriers. *Evolution* 52 (4) : 1147-1157.
- Dubois, A. 1987. *Miscellanea taxonomica batrachologica* (I). *Alytes* 5(1-2): 7-95.
- Ehrlich, P. R., and D. D. Murphy. 1987. Conservation lessons from long-term studies of checker spot butterflies. *Conservation Biology* 1: 122-131.
- Excoffier, L., and P. E. Smouse. 1994. Using allele frequencies and geographic subdivision to reconstruct gene tree within a species: Molecular variance parimony. *Genetics* 136: 343-359.
- Excoffier, L., P. E. Smouse, and J. M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Excoffier, L., P. E. Smouse, and J. M. Quattro. 1993. Analysis of Molecular Variance. Version 1.55. *Genetics and Biometry*



- Laboratory. University of Geneva.
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Mol. Ecol* 17: 368-376.
- Frost, Darrel R. 2007. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.1 (10 October, 2007). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>. American Museum of Natural History, New York, USA
- Futuyma, D. J. 1998. The geography of evolution. *In* : Evolutionary biology, 3<sup>rd</sup> ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
- Genetic similarity as a measure for connectivity between fragmented populations of the moor frog (*Rana arvalis*). *Journal of Applied Ecology* 35: 44-56.
- Gerhardt, H. C. 1974. Behavioral isolation of the tree frogs, *Hyla cinerea* and *Hyla andersonii*. *American Midland Naturalist*, Vol. 91, No 2:424-433.
- Golding, G. B. 1987. The detection of deleterious selection using ancestors inferred from a phylogenetic history. *Genet. Res.* 49: 71-82.
- Grativol, A. D., J. D. Ballou, and R. C. Fleischer. 2001. Microsatellite variation within and among recently fragmented populations of the golden lion tamarin (*Leontopithecus rosalia*). *Conservation Genetic* 2: 1-9.
- Graur, D., and W. H. Li. 2000. *Fundamentals of Molecular Evolution*, 2<sup>nd</sup> ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland.

- Haila, Y. 2002. A conceptual genealogy of fragmentation research: from island biogeography to landscape ecology. *Ecological Application* 12(2): 321-334.
- Hale, M. L., P. W. Lurz, M. D. Shirley, S. Rushton, R. M. Fuller, and K. Wolff. 2001. Impact of landscape management on the genetic structure of red squirrel population. *Science* 293: 2246-2248.
- Hans, V. D., and E. Matthysen. 1999. Habitat fragmentation and insect flight: a changing “design” in a changing landscape? *Trend in Ecology and Evolution* 14: 172-174.
- Harrison, S., and A. Hastings. 1996. Genetic and evolutionary consequences of metapopulation structure. *Trend in Ecology and Evolution II*: 180-183.
- Hedrick, P. W. 1999. Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evo.* 53 : 313-318
- Hudson, R. R. 1990. *Gene genealogies and the coalescent process.* Oxford University Press, New York.
- Jang-Liaw N. H., Lee T. H. Chou W. H. 2008. Phylogeography of *Sylvirana latouchii*(Anura, Ranidae)in Taiwan. *Zoology Science* 25: 68-79.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions trough comparative studies of nucleotide sequence. *Mol. Evol* 16: 111-120.
- Kumar, S., K. Tamura, I. B. Jakobsen, and M. Nei. 2001. *MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis.* Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.

- Lai, J.S., K. Y. Lue, 2008. Two new *Hynobius* (Caudata:Hynobiidae) salamanders from Taiwan. *Herpetologica* 64(1): 63-80
- Land, D. E., and R. C. Lacy. 2000. Introgression level achieved through Florida panther genetic restoration. *Endang. Species Updates* 17: 99-103.
- Lue, K. Y., J. S. Lai, and S. L. Chen. 1994. A new *Rhacophorus* (Anura: Rhacophoridae) from Taiwan. *Herpetology* 50(3): 303-308.
- Lynch, M., and B. Walsh. 1998. *Genetics and analysis of Quantitative Traits*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
- Matsui, M, T. Seto, and T. Utsumomiya, 1986. Acoustic and karyotypic evidence for specific separation of *Polypedates megacephalus* from *P. leucomystax*. *Journal of Herpetology*, 20(4): 483-489
- Moritz, C. 1999. Conservation units and translocations: strategies for conserving evolutionary process. *Heredity* 130: 217-228.
- Mork, J., N. Ryman, G. Staahl, F. Utter, and G. Sundnes. 1985. Genetic variation in Atlantic cod (*Gadus morhua*) throughout its range. *Can. J. Fish. Aquat. Sci* 42: 1580-1586.
- Mossman, C. A., and P. M. Waser. 2001. Effects of habitat fragmentation on population genetic structure in the white-footed mouse (*Peromyscus leucopus*) . *Canadian Journal of Zoology* 79: 285-296.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia Univ. Press. New York.
- Nei, M., and F. Tajima. 1983. Maximum likelihood estimation of the number of nucleotide substitutions from restriction sites data.

Genetics 105: 205-217.

- Page, R. D. M., and E. C. Holmes. 1998. Molecular evolution: A phylogenetic approach. Blackwell Science Inc. London.
- Paulo, O. C., W. C. Jordan, and M. W. Bruford. 2002. Using nested clade analysis to assess the history of colonization and the persistence of population of an Iberian Lizard. *Mol. Ecol.* 11: 809-819.
- Posada, D., K. A. Crandall, and A. R. Templeton. 2000. GeoDis: a program for the cladistic analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Mol. Ecol.* 9: 487-488.
- Reh, W., and A. Seitz. 1990. The influence of land use on the genetic structure of populations of the common frog *Rana temporaria*. *Biological Conservation* 54: 239-249
- Robert, A. N., and S. Tina. 2001. Microsatellite variation and fine-scale population structure in the wood frog (*Rana sylvatica*). *Mol. Ecol.* 10: 1087-1100.
- Rozas, J., and R. Rozas. 1997. DnaSP version 2.0: a novel software packed for extensive molecular population genetic s analysis. *Comut. Applic. Biosci* 13: 307-331.
- Santos, T., and J. L. Telleria. 1997. Vertebrate predation on Holm Oak, *Quercus ilex*, acorns in a fragmented habitat: effect on seedling recruitment. *Forest Ecology and Management* 98(2): 181-187.
- Schmiegelon, F. K. A., and M. Monkkonen. 2002. Habitat loss and fragmentation in dynamic landscapes: avian perspectives from the boreal forest. *Ecological Applications* 12(2): 375-389.
- Schneider, S., Roessli, D, and Excoffier, L. 2000. Arlequin: A software for population genetics data analysis. Ver. 2.0. Genetics and

- Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva.
- Slatkin, M. 1985. Gene flow in natural population. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16:393-430.
- Slatkin, M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution* 47: 264-279.
- Srikwan, S. 1998. Genetic erosion in small mammal populations following rain forest fragmentation in Thailand. PhD thesis, University of California, San Diego.
- Stow, A. D., P. Sunnucks, D. A. Briscoe, and M. G. Gardner. 2001. The impact of habitat fragmentation on dispersal of Cunningham's skink (*Egernia cunninghami*): evidence from allelic and genotypic analysis of microsatellites. *Mol. Ecol.* 10: 867-878.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- Templeton, A. R. 1998. Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Mol. Ecol.* 7: 381-397.
- 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.
- Thomas, S. 2002. Influence of habitat fragmentation on the genetic structure of *Polyommatus coridon* (Lepidoptera: Lycaenidae) : implications for conservation. *Biological Conservation* 107: 291-297.

- Toda, M., et al. ,1998. Genetic variation in the India rice frog, *Rana liamocharis* in Taiwan, as revealed by allozyme data. *Herpetologica* 54: 73-82.
- Tomas, R. 2002. So near and yet so far-habitat fragmentation and bird movement. *Trend in Ecology and Evolution* 17: 61.
- White, G. M., D. H. Boshier, and W. Powell. 2002. Increased pollen flow counteracts fragmentation in a tropical dry forest: an example from *Swietenia humilis* Zuccarini. *PANS* 99: 2038~2042.
- Whitlock, M. C., and N. H. Barton. 1997. The effective size of a subdivided population. *Genetics* 146: 427-441.
- Wright, S. 1978. *Evolution and genetics of populations*. Chicago University Press, Chicago.
- Young, A. G., A. H. D. Brown, and F. C. Zich. 1999. Genetic structure of fragmented populations of the endangered grassland daisy, *Rutidosis Leptorrhynchoides*. *Conservation biology* 13: 256-265.
- 方引平，2001。台灣麝鼯屬動物之系統分類及親緣地理學研究。國立台灣大學動物學研究所博士論文。
- 李仁凱，2003。台灣地區赤腹松鼠的地理類緣與亞種分類地位再探討。東海大學生物學系碩士論文。
- 林思民，2003。台灣及鄰近地區草蜥屬的親緣關係與親緣地理學研究（有鱗目：蜥蜴科）。國立台灣師範大學生物研究所博士論文。
- 徐瑋峰，2003。夸父瑾灰蝶的族群棲地分布特性初探。棲地零碎化、生態廊道及棲息地網研討會論文集。P64-p68。

張淑美，1989。白領樹蛙生殖行為學之研究。國立台灣大學動物學研究所碩士論文。

張學文、劉國強，1997。斯文豪氏攀蜥的生物地理與分子親緣關係。野生動物保育經營管理研討會論文集。

郭浩志，2004。台灣地區管鼻蝠屬蝙蝠的系統分類學研究。國立台灣大學生態學與演化生物學研究所碩士論文。

郭瓊華，2002。台灣蜓蜥族群遺傳結構之研究。國立台灣師範大學生物研究所碩士論文。

黃鈞漢，2002。以 mtDNA D-loop 片段探討艾氏樹蛙（溪頭地區）之族群遺傳結構。國立彰化師範大學生物研究所碩士論文。

楊懿如，1994。台北樹蛙生殖生態與族群基因組成變異。國立台灣大學動物學研究所博士論文。

葉文珊，1997。莫氏樹蛙族群地理親源關係之研究。國立台灣大學動物學研究所碩士論文。

劉怡里，2000。以 RAPD 方法分析台灣產樹蛙屬樹蛙之族群遺傳結構。國立台灣大學動物學研究所碩士論文。

蔡長益，1999。以粒線體 12S 核糖體核酸與細胞色素 b 序列分析守宮族群親緣關係。國立中山大學生命科學系碩士論文。

盧建名，2005。棲地零碎化對諸羅樹蛙族群遺傳結構影響之探討。國

立台灣師範大學生命科學系碩士論文。

謝煒智，2004。諸羅樹蛙群集展示行為研究。國立台灣師範大學生物研究所碩士論文。

羅英元，2007。台灣地區溪狡蛛之族群遺傳結構及親緣地理關係之探討。國立台灣師範大學生命科學系碩士論文。



表一、台灣島內白領樹蛙(*Polypedates megacephalus*)種名更迭。

學名	命名者	時間	模式地
<i>Polypedates leucomystax</i>	Tschudi	1838	爪哇島
<i>P. megacephalus</i>	Hallowell	1861	香港
<i>Rhacophorus braueri</i>	Vogt	1911	福爾摩沙(台灣)
<i>R. leucomystax megacephalus</i>	Stejneger	1925	
<i>P. megacephalus</i>	Matsui 等	1986	

表二、台灣島內白領樹蛙採樣地點位置及樣本數列表

區域	地點	數量	備註
北部	基隆市海大後山	5	
	坪林鄉逮魚窟	3	
	烏來鄉四崁水	7	
	大溪鎮承恩	5	
	峨眉鄉三寶寺	6	
	東勢鎮東勢林場	5	
	國姓鄉烏溪	6	
	礁溪鄉淡大後山	6	
	計		43
南部	林內鄉湖本村	5	
	嘉義市蘭潭	8	
	竹崎鄉水社寮	4	
	楠西鄉曾文水庫	5	
	東山鄉仙公廟	2	
	麻豆鎮總爺糖廠	4	
	旗山鎮中寮山	5	
	內埔鄉屏科大	5	
	滿洲鄉恆春農場	5	
	牡丹鄉壽卡	5	
計		48	
東部	南澳鄉金岳部落	4	
	吉安鄉福安里	7	
	光復鄉大馬村	8	
	玉里鎮安通溫泉	9	
	卓溪鄉卓溪部落	10	
	延平鄉鸞山村	12	
	東河鄉尚德村	11	
	金峰鄉嘉蘭部落	8	
	太麻里鄉金崙	6	
計		75	
特殊族群	田尾鄉花園公路	25	叫聲不同
台灣島內總計		191	

表三、台灣島外白領樹蛙採樣地及組織樣本數列表

區域	地點	數量	備註
福建	馬祖	2	特生提供
貴州	雷山縣西江苗寨	2	
海南島	樂東縣尖峰嶺	2	
計		6	

表四、台灣區白領樹蛙族群間粒線體 DNA Cyt-b 基因遺傳變異分析

族群位置	採樣數量	基因型數目	<b>h</b>	<b>Pi</b>
台灣北部	43	4	0.714	0.0281
台灣南部	48	8	0.741	0.0264
台灣東部	75	9	0.729	0.0285
台灣(不含彰化)	166	11	0.777	0.0287
所有個體	198	20	0.846	0.0668

**h: haplotype diversity**      **Pi: nucleotide diversity**

表五、台灣島內(不含彰化族群)與貴州地區白領樹蛙族群間遺傳分化指數(FST)以及基因交流指數(Nm)。

	台灣東部	台灣北部	台灣南部	貴州
台灣東部		13.0833	14.3443	0.2001
台灣北部	-0.0188		28.6852	0.1938
台灣南部	0.0171	-0.00864		0.1747
貴州	0.5555	0.5633	0.5887	

(右上為基因交流指數、左下為遺傳分化指數)

表六、以 AMOVA 方法分析台灣(不含彰化族群)白領樹蛙之族群遺傳結構

Source of variation	d. f.	Sum of squares	variance	Percentage of variation	$\Phi$	P
Among groups	2	15.017	-1.14413	-13.29	-0.13292	0.79765±0.01260
Among populatin	17	703.362	6.79134	78.90	0.65608	0
within groups						
Within Populations	146	293.066	2.96026	34.39	0.69643	0
Total	165	1011.445	8.60747			

表七、在 *cyt-b* 基因、以 GTR 模式估算島內外白頷樹蛙各基因型間的遺傳距離。(P. cru 為 *P. cruciger*、R. sch 為 *R. schlegelii*)

	Ta1	Ta2	Ta3	Ta4	Ta5	Ta6	Tb1	Tb2	Tb3	Tb4	Tb5	M1	M2	X1	X2	G1	G2	H2	Hn	H1	P.cruciger
Ta1																					
Ta2	0.0016																				
Ta3	0.0033	0.0016																			
Ta4	0.0016	0.0033	0.0049																		
Ta5	0.0016	0.0033	0.0049	0.0033																	
Ta6	0.0049	0.0066	0.0049	0.0066	0.0066																
Tb1	0.0595	0.0614	0.0595	0.0615	0.0615	0.0577															
Tb2	0.0612	0.0632	0.0612	0.0632	0.0632	0.0595	0.0016														
Tb3	0.0592	0.0612	0.0592	0.0612	0.0612	0.0575	0.0033	0.0016													
Tb4	0.0595	0.0615	0.0595	0.0615	0.0615	0.0578	0.0016	0.0016	0.0033												
Tb5	0.0609	0.0629	0.0609	0.0629	0.0629	0.0592	0.0049	0.0033	0.0016	0.0049											
M1	0.1768	0.1746	0.1725	0.1768	0.1747	0.1768	0.1601	0.1620	0.1641	0.1598	0.1618										
M2	0.1834	0.1811	0.1789	0.1833	0.1812	0.1834	0.1618	0.1638	0.1659	0.1616	0.1636	0.0049									
X1	0.1790	0.1768	0.1746	0.1789	0.1768	0.1790	0.1621	0.1641	0.1661	0.1619	0.1639	0.0016	0.0033								
X2	0.1812	0.1790	0.1768	0.1812	0.1790	0.1812	0.1642	0.1661	0.1682	0.1640	0.1660	0.0033	0.0049	0.0016							
G1	0.0644	0.0663	0.0644	0.0663	0.0663	0.0626	0.0585	0.0602	0.0621	0.0603	0.0639	0.1845	0.1863	0.1866	0.1887						
G2	0.0626	0.0645	0.0626	0.0646	0.0646	0.0608	0.0567	0.0584	0.0604	0.0585	0.0621	0.1869	0.1887	0.1890	0.1911	0.0016					
H2	0.1819	0.1797	0.1775	0.1817	0.1797	0.1819	0.1726	0.1746	0.1767	0.1724	0.1744	0.0708	0.0708	0.0726	0.0745	0.1936	0.1960				
Hn	0.1768	0.1746	0.1724	0.1767	0.1746	0.1768	0.1642	0.1661	0.1682	0.1640	0.1660	0.0033	0.0049	0.0016	0.0033	0.1844	0.1868	0.0726			
H1	0.1750	0.1729	0.1708	0.1749	0.1729	0.1751	0.1659	0.1679	0.1700	0.1658	0.1678	0.0652	0.0653	0.0671	0.0689	0.1866	0.1890	0.0049	0.0671		
<i>P.cruciger</i>	0.2302	0.2273	0.2271	0.2301	0.2274	0.2329	0.2263	0.2285	0.2313	0.2262	0.2312	0.2100	0.2126	0.2076	0.2101	0.2328	0.2302	0.2327	0.2077	0.2272	
<i>R.schlegelii</i>	0.3076	0.3102	0.3102	0.3050	0.3050	0.3101	0.3001	0.3024	0.3049	0.3000	0.3022	0.3087	0.3086	0.3063	0.3087	0.3043	0.3043	0.3062	0.3039	0.2981	0.3348

表八、在 Rhodopsin 基因、以 HKY 模式估算島內外白領樹蛙各基因型間的遺傳距離。

	台灣系群 I	台灣系群 II	海南島	香港	馬祖	翡翠樹蛙
台灣系群 I						
台灣系群 II	0					
海南島	0.00592	0.00592				
香港	0.00891	0.00891	0.00296			
馬祖	0.00891	0.00891	0.00296	0		
翡翠樹蛙	0.03639	0.03639	0.03332	0.03634	0.03634	

表九、台灣北部地區白領樹蛙採集地點數量及 Cyt-b 基因型分布

地點	數量	基因型
基隆市海洋大學後山	5	Tb1
台北縣坪林鄉逮魚窟	3	Tb1
台北縣烏來鄉四崁水	7	Tb3,Tb1
桃園縣大溪鎮承恩	5	Tb2
新竹縣峨眉鄉三寶寺	6	Ta6
南投縣國姓鄉烏溪	6	Tb1
台中縣東勢鎮東勢林場	5	Ta6,Tb1
宜蘭縣礁溪鄉淡大後山	6	Ta6,Tb2
總計	43	

表十、台灣南部地區白領樹蛙採集地點數量及 Cyt-b 基因型分布

地點	數量	基因型
雲林縣林內鄉湖本村	5	Tb1
嘉義市蘭潭水庫	8	Tb3,,Tb5,Tb1
嘉義縣竹崎鄉水社寮	4	Ta6,Ta2,Ta4
台南縣麻豆鎮總爺	4	Tb1
台南縣東山鄉青山	2	Tb1
台南縣楠西鄉曾文水庫	5	Ta6,Tb1
高雄縣旗山鎮中寮山	5	Ta1,Ta2
屏東縣內埔鄉屏科大	5	Ta6
屏東縣滿州鄉恆春農場	3	Ta3
屏東縣牡丹鄉壽卡	2	Ta6
總計	48	

表十一、台灣東部地區白領樹蛙採集地點數量及 Cyt-b 基因型分布

地點	數量	基因型
宜蘭縣礁溪鎮淡大後山	6	Ta6,Tb2
花蓮縣玉里鎮安通溫泉	9	Tb1
花蓮縣卓溪鄉卓溪部落	10	Ta6,Tb1
花蓮縣光復鄉大馬村	8	Tb3,Tb4
花蓮縣吉安鄉福安里	7	Tb1
台東縣太麻里鄉金崙	8	Ta6,Ta3,Ta2
台東縣金峰鄉嘉蘭部落	6	Ta3,Ta4,Tb1
台東縣延平鄉鸞山村	12	Ta2,Ta5,Tb1
台東縣東河鄉尚德村	11	Ta6,Tb1
總計	75	

表十二、其他採集地點白領樹蛙數量及特殊 Cyt-b 基因型分布

地點	數量	基因型
彰化縣田尾鄉花園公路	25	X1 ,X2
海南省樂東縣尖峰嶺	5	Hn
貴州省雷山縣西江苗寨	2	G1,G2
總計	37	

表十三、各 Cyt-b 基因型個體數及所分布位置，台灣島內主要的個體多為 Ta6 及 Tb1 兩型。其中 Ta1~Ta6 定義為台灣 I 型系群；Tb1~Tb5 定義為台灣 II 型系群；G1 及 G2 為貴州系群 H1 及 H2 定義為香港系群；M1、M2、Hn、X1 及 X2 定義為東南沿海系群。

基因型	分布地點	個體數
Ta1	高雄	1
Ta2	嘉義、高雄、台東	4
Ta3	屏東、台東	8
Ta4	嘉義、台東	2
Ta5	台東	3
Ta6	基隆台北以外全島分布	<b>55</b>
Tb1	高雄屏東以外全島分布	<b>76</b>
Tb2	桃園、宜蘭礁溪	10
Tb3	台北、嘉義、花蓮	4
Tb4	花蓮	1
Tb5	嘉義	2
G1	貴州	4
G2	貴州	1
M1	馬祖(特生提供)	1
M2	馬祖(特生提供)	1
X1	彰化田尾	3
X2	彰化田尾	22
Hn	海南島	5
H1	香港	5
H2	廣西(from ncbi)	1

表十四、白領樹蛙彰化田尾及馬祖與台灣島內其他地區雄性個體型值與比較。平均值±標準誤差；所有測量值得單位為 mm。

形值項目	島內其他地區個體	彰化田尾及馬祖個體
	n=137	n=28
吻肛長(SVL)	4.302±0.298	4.734±0.202
腿長(LL)	5.071±0.576	6.065±0.407
頭長(HL)	1.541±0.145	1.583±0.073
頭寬(HW)	1.436±0.146	1.544±0.063
頭長/吻肛長(HL/SVL)	0.358±0.019	0.335±0.017
頭長/頭寬(HL/HW)	1.075±0.057	1.025±0.041
腿長/吻肛長(LL/SVL)	1.178±0.092	1.281±0.063
頭寬/吻肛長(HW/SVL)	0.333±0.021	0.327±0.015

表十五、馬祖及台灣島內白領樹蛙雄性個體外部型態主成分分析(PCA)結果，第一軸向量就具有 100%的判別能力。

Eigenvalue	Percent	Cum Percent	Canonical Corr
0.488	<b>100.00</b>	100.000	0.573
3.564e-17	0.000	100.000	0
1.063e-19	0.000	100.000	0
-3.505e-15	0.000	100.000	0



表十六、馬祖及台灣島內白領樹蛙雄性個體各特徵向量強度值。在第一軸向量中頭寬/吻肛長(HW/SVL)以及頭長/吻肛長(HL/SVL)具有較顯著的影響。

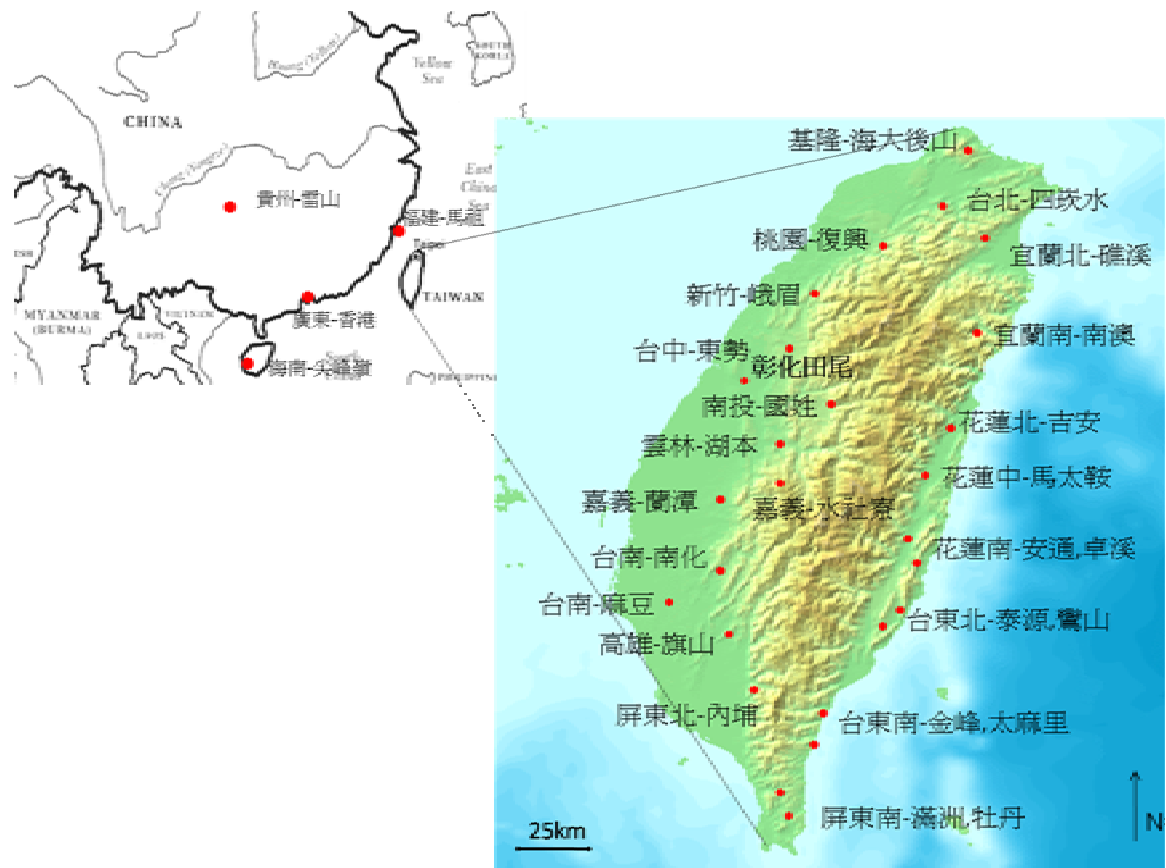
Eigenvectors	HL/SVL	LL/SVL	HL/HW	HW/SVL
Canon1	<b>-47.826</b>	-8.642	29.522	<b>95.364</b>
Canon2	16.968	3.003	-5.351	27.462
Canon3	3.191	7.777	14.376	-2.804
Canon4	-546.149	0.559	175.241	581.625

表十七、馬祖及台灣島內白領樹蛙雄性個體外部型態判別分析(DA)結果、錯分率為 15.43%。X 表示彰化田尾個體、M 為台灣其他地區個體。

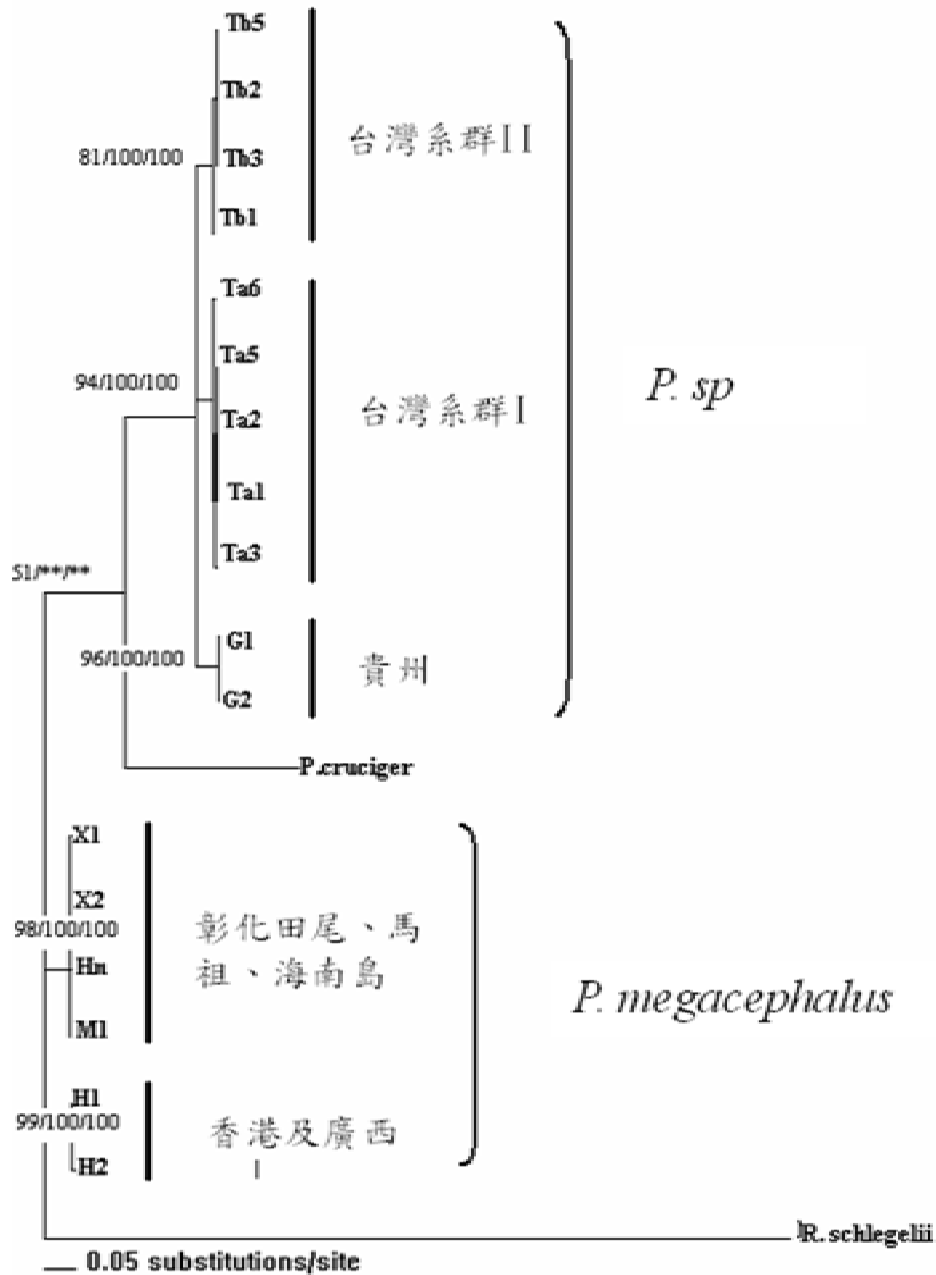
Number Misclassified	19
Percent Misclassified	<b>11.52</b>
-2LogLikelihood	55.96

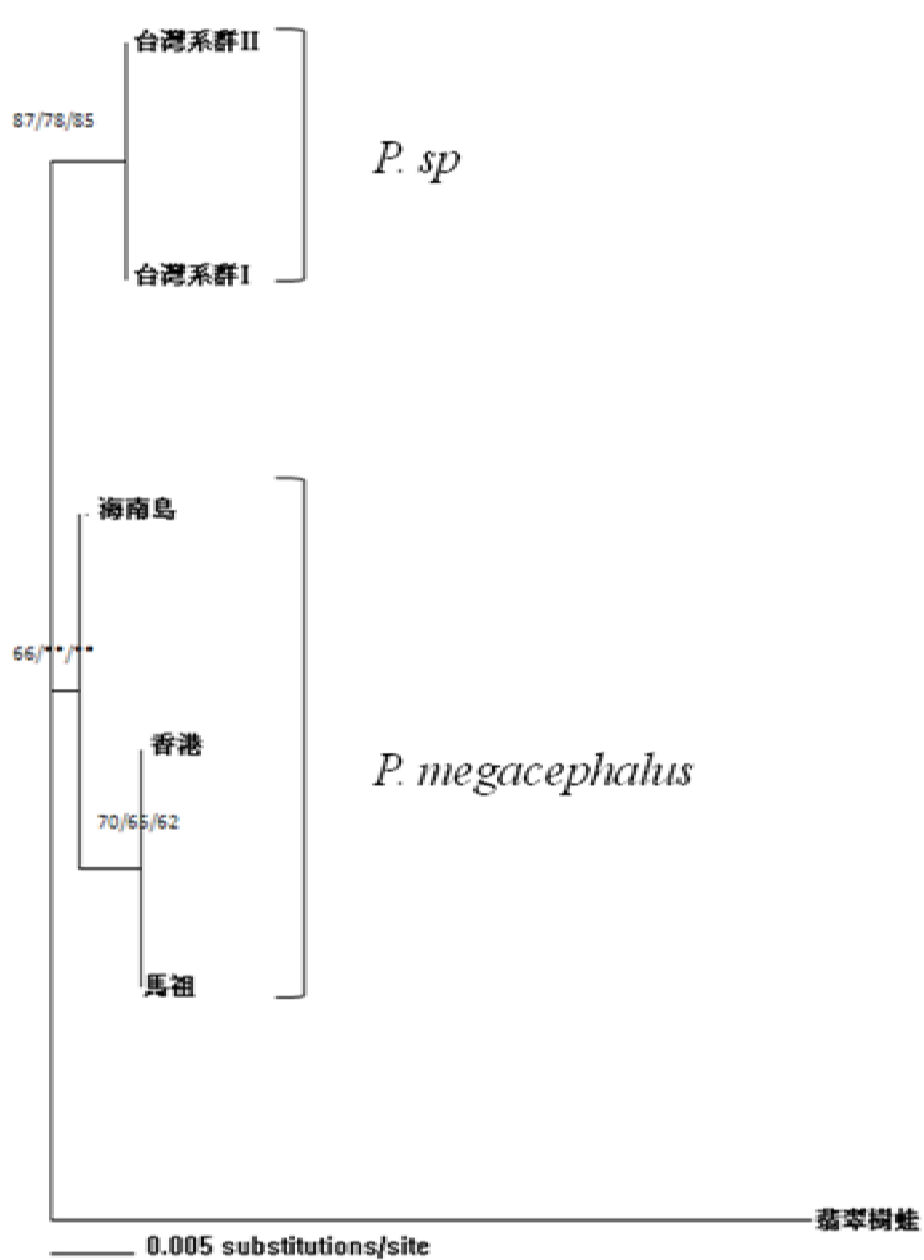
Counts: Actual Rows by Predicted Columns	M	X
M	120	<b>17</b>
X	<b>2</b>	26



圖一、白領樹蛙採集地點位置



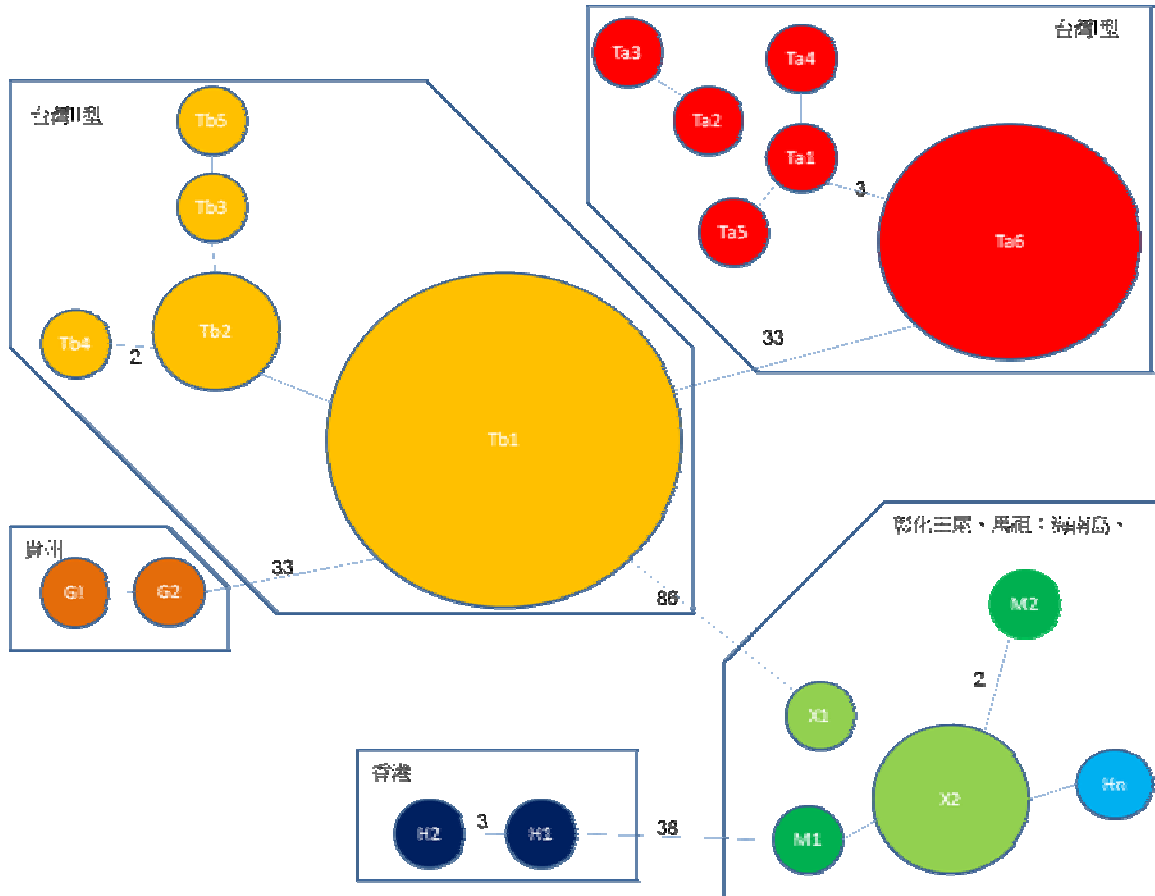
圖二、cyt-b 基因，以 GTR+G+I 模式所建構島內外白領樹蛙、沙漏樹蛙 *P. cruciger* 及薛氏樹蛙 *R. schlegelii* 之親緣關係樹。(bootstrap=100 Maximum likelihood)圖上數字分別為每個節點的支持度(Maximum likelihood method/Maximum parsimony method/Neighbor joining method)，\*\*代表不支持，Maximum likelihood 方法 bootstraps=100 其餘兩種方法 bootstraps=1000



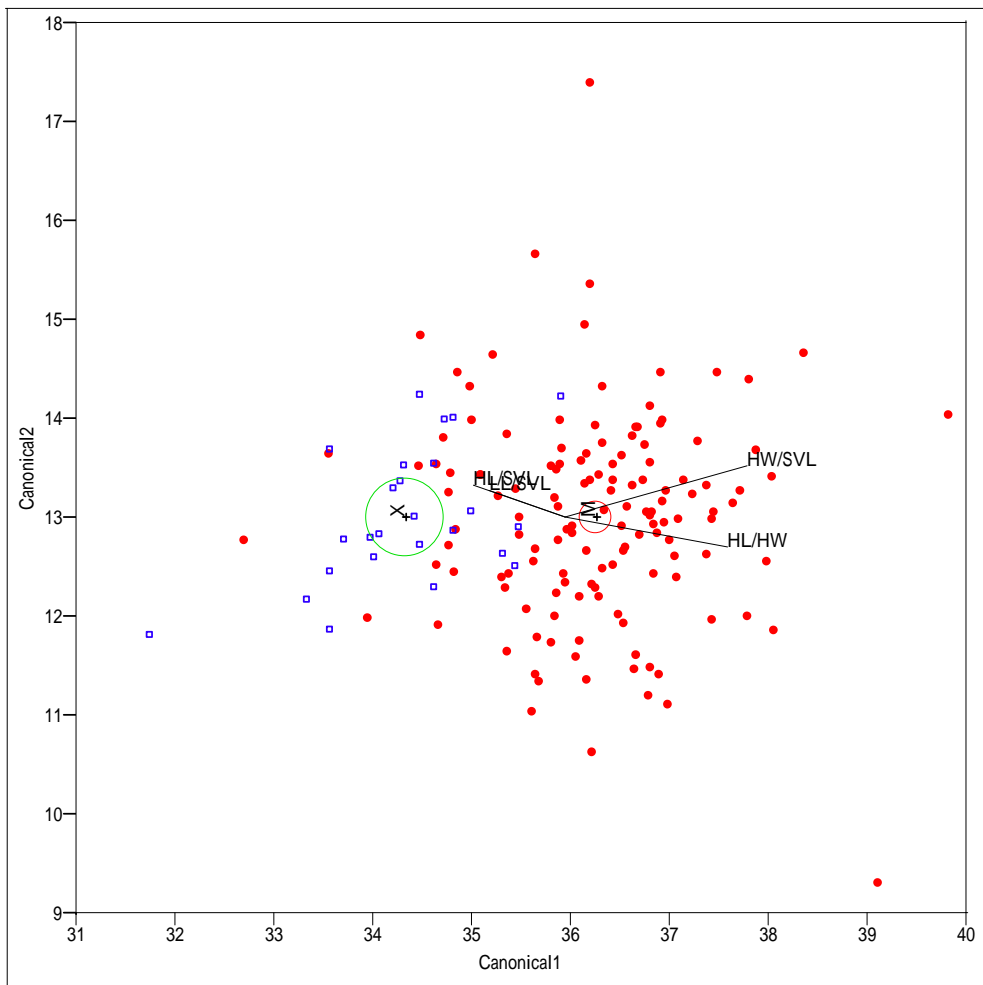
圖三、Rhodopsin 基因，以 HKY+I 模式所建構島內外白領樹蛙親緣關係樹。圖上數字分別為每個節點的支持度(Neighbor joining method /Maximum parsimony method /Maximum likelihood method) Maximum likelihood 方法 bootstraps=100 其餘兩種方法 bootstraps=1000



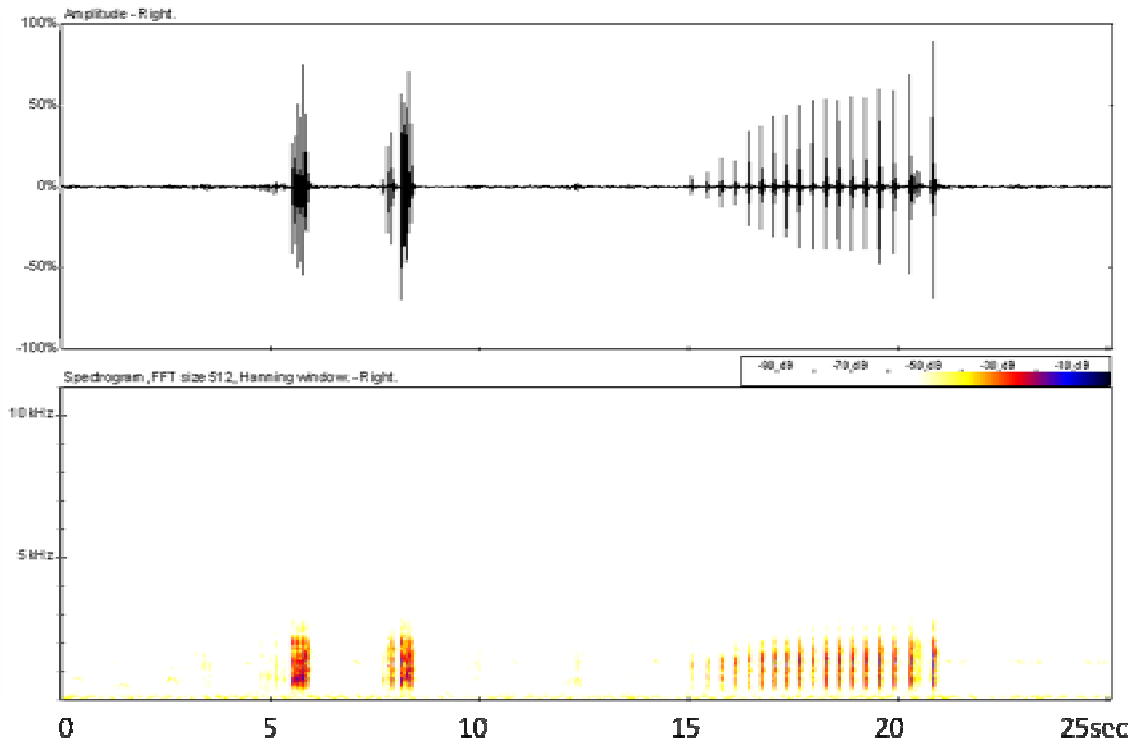
圖四、台灣島內白領樹蛙彰化田尾特殊族群(綠色)、台灣 I 型(藍色)與台灣 II 型(紅色)兩 Cyt-b 基因型系群，在各採樣地點之分布比例。



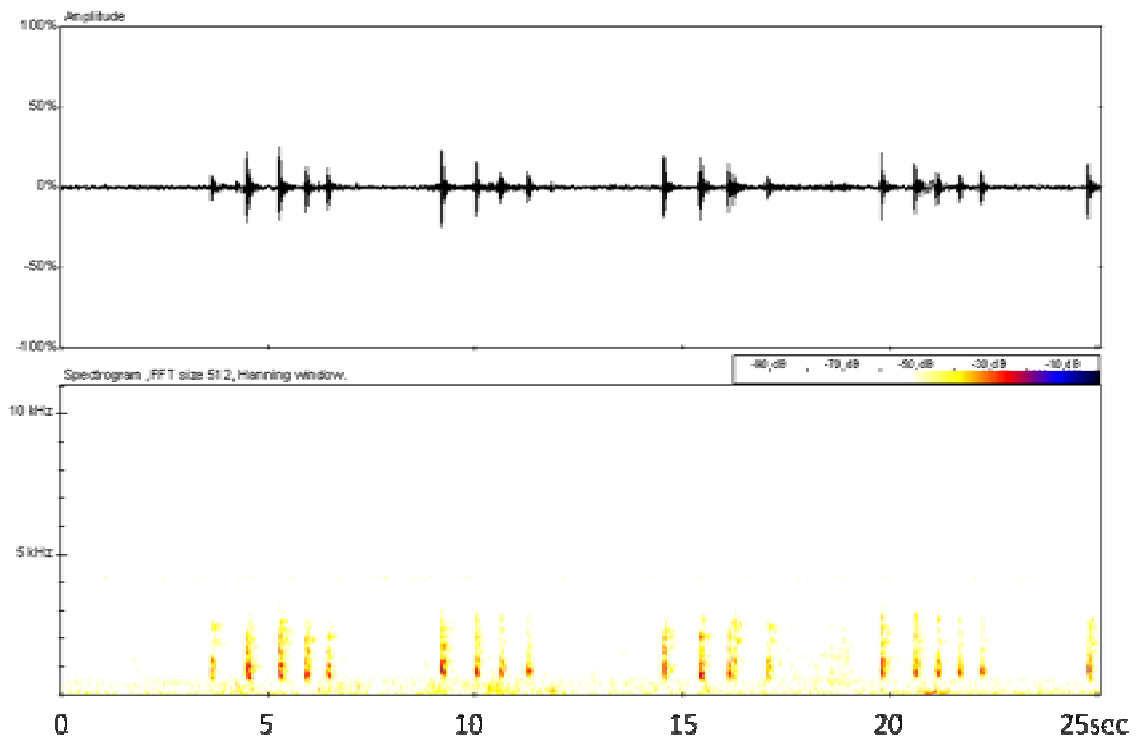
圖五、白領樹蛙粒線體基因 Cyt-b 白領樹蛙各基因型網狀親緣關係樹，數字代表鹼基對突變的數目。



圖六、馬祖及台灣島內白領樹蛙雄性個體外部型態主成分分析(PCA)結果，藍點為彰化田尾及馬祖個體、紅點為台灣其他地區個體。



圖七、聲紋分析波形圖。彰化地區個體(*P. megacephalus*)之宣告叫聲。黑色波紋表示聲音相對強度，下方彩色波紋表示頻率，顏色越深代表強度越強。橫向間隔每個間隔為5秒。其宣告叫聲有兩種，分別為響亮的單音與機關槍般連續叫聲。



圖八、聲紋分析波形圖。台灣其他地區(*P. sp.*)之宣告叫聲。黑色波紋表示聲音相對強度，下方彩色波紋表示頻率，顏色越深代表強度越強。橫向間隔每個間隔為5秒。主要多為如敲竹子般搭~搭~搭的宣告叫聲。