

## 摘 要

翡翠樹蛙(*Rhacophorus prasinatus*)，為台灣特有兩棲類，目前僅侷限生活在台灣北部，桃園以北的山區，分別在天然林及耕作環境下都有發現，棲息地多為原始林邊緣或茶園等暫時性積水區，成小族群分布狀態。對於這種遷徙能力低、活動力又不強且對棲息地又有一定的忠誠度，同時分布地區又常有人為環境切割了自然地貌的物種而言，了解其野外族群的遺傳結構是有一定的重要性的。此可以提供適當的資料以利對此物種日後的研究及保育。本實驗將研究台灣特有種翡翠樹蛙的族群遺傳結構，藉由這種侷限分佈在臺灣北部的蛙類進行採集後，與其地形及水域分佈做分析比較，探討其遺傳結構概況，依水系採集了七個樣點，共 76 隻樣本。結果發現，翡翠樹蛙  $F_{st}$  為 0.0891 ~ 0.1461 之間，在南北勢溪、大漢溪間雖有中度分化，但彼此間的基因交流仍然很順暢， $N_m$  值皆大於 1； $h$  值為 0.8295、 $\pi$  值為 0.0047，顯示有高的單基因型歧異度與低的核苷酸歧異度，亦顯示翡翠樹蛙可能有少數個體組成的祖先成長而來的，且其成長時間已足夠以累積恢復基因型的變異，而各地皆共有一個相同的單基因型，亦有獨自特有的單基因型，但彼此間變異差距不大。利用 AMOVA 分析發現其變異大多產生在族群內個體間，為 89.48%。而翡翠樹蛙族群最大遺傳距離為 0.0102，在台灣目前有研究的兩棲類中僅高於諸羅樹蛙。

## Abstract

*Rhacophorus prasinatus* is an endemic species of Taiwan. Currently it is found only in northern mountain region above Taoyuan. It can be found in nature forest and plantation, such as small temporary body in tea plantation. *Rhacophorus prasinatus* has limited dispersal capabilities due to low mobility and site fidelity. It is important to know the population genetic structure of this species that can provide some useful informations for the future research of conservation. In this study, I invitegated the population genetic structure of *Rhacophorus prasinatus*, by comparing with landscape and streams. To understand what structure *Rhacophorus prasinatus* is. 76 individuals from three streams have been analysed. The result of  $F_{st}$  between 0.0891 ~ 0.1461, there are moderate differentiation between Nan-Shih Creek basin、 Pei-Shih Creek basin and Taken basin, but gene flow still can be found,  $Nm > 1$ . Haplotype diversity=0.8295, nucleotide diversity=0.0047, have high haplotype diversity and low nucleotide diversity. It shows that *Rhacophorus prasinatus* maybe come from few individuals of ancestors. There is one haplotype shared by all individuals from sample sites, however, individuals of different sample sites have their own unique haplotype, but the difference in genetic variation between haplotype is small. In AMOVA, most genetic variance (89.48%) was explained by differences within population. The maximum intra-specific genetic variance is 0.0102, among amphibian being investigated in Taiwan, *Rhacophorus prasinatus* is higher than *Rhacophorus arvalis* only.

## 前 言

生物在處於不同的棲息地下，可能會對其生存的環境產生適應，或是生物本身的遷徙能力、生態習性、年齡結構等，使得族群內、族群間產生分化，造成了族群遺傳結構 (genetic structure) (Slatkin, 1985)。Hedrick (1999) 指出，即藉由偵測種以下，族群內和族群間的遺傳變異狀態，可以瞭解物種演化的過程。生物的遺傳結構會受到許多因素的影響，包括天擇 (natural selection)、基因漂變 (genetic drift)、基因交流 (gene flow) 等，皆會對族群產生影響。藉由個體從一族群遷移至另一族群，即基因交流，使得基因互相交流，形成族群間基因均質化 (homogenization)，若族群間受到地理隔離而沒有基因交流，則容易造成分化；若族群間受到隔離而仍有基因交流，則不會造成分化。愈來愈多的學者嘗試利用分子工具來探討族群遺傳結構問題，以彌補傳統外形觀察之不足，同時可以利用其理論架構來解決或了解一些族群遺傳結構的問題。

分子生物技術發展快速，實驗發現，依照研究物種階層尺度不同而選擇合適的 DNA 序列來當作適當的標記 (markers) 進行分析，不僅在族群遺傳的研究上，可提供良好的解析力，同時也適合用來探討族群結構、基因交流、生物地理學與類緣關係。近期研究顯示，在兩棲爬蟲類的粒線體 COX1 (cytochrome oxidase c subunit 1)、cytb (cytochrome b)、D-loop (displacement loop) 基因片段是研究族群遺傳結構的適當標記 (Barber, 1999; 林, 2003)。其中 mtDNA 之 D-loop 序列因核苷酸替換率高且易產生長度變異，為 mtDNA 中演化速率最快者，這種高靈敏特性很適合用來探討種內的族群問題。中外學者皆曾使用 mtDNA 來討論兩棲類的族群問題。如楊 (1994) 研究台北樹蛙 (*Rhacophorus taipeianus*) 的 cytb 和 D-loop 片段基因，發現其可依地理位置分成北部和中部兩大族群。Wagner (2005) 利用 cytb 序列來研究 Larch Mountain salamander (*Plethodon larselli*)，發現其因地理的阻隔而造成南北兩群的遺傳分化。林 (2006) 使用 COX1、COX2、COX3、cytb 研究

台灣地區的亞洲錦蛙(*Kaloula pulchra*)發現其為單次入侵，且為單一種源的入侵種。

Reh(1990)發現，人為活動的干擾使得 *Rana temporaria* 在短至 1 km 範圍分布的族群，其遺傳距離有增加的趨勢。Driscoll(1998)利用分析澳洲的蛙類 *Geocrinia lutea*、*G. rosea* 的 allozyme，發現地理隔離使得距離 2.5~7.5 km 範圍內的族群發生分化的現象。Storfer 及 Sih (1998)利用 allozyme 檢測美國的蠵蟾 (*Ambystoma barbouri*) 不同地區族群的基因交流與族群分化的程度，得知在小於 5 km 的兩族群會發生基因交流，大於 5 km 的族群其基因交流很低。Scribner 等 (2001)研究英國的蟾蜍(*Bufo bufo*)，探討其族群大小及遺傳多樣性，發現蟾蜍族群大小與水池的密度有關。一般而言，兩棲類的活動力弱，遷移力低，且需要依賴潮濕的棲地，或沼澤通道(wetland corridor)來擴散(Rothermel and Semlitsch 2002)。因為冒著乾燥環境(desiccation)及被捕食的風險與其在陸上的遷徙有關，又其在陸上的動作又極緩慢(Rothermel and Semlitsch 2002)，因此，兩棲類個體從出生地移出是無法容易進行，其族群的範圍擴張通常是被限制的。所以，在小距離範圍內很有可能就會有遺傳結構上的差異。歐洲的樹蟾(*Hyla arborea*)，研究者分析其分子的資料後發現，這種分散且會群聚生殖的族群，在水池與水池之間有小程度的族群交流(Andersen, Fog *et al.* 2004)。此外，兩棲類對棲地有一定的忠誠度，公蛙通常在繁殖季時會在特定地點重複進出，而這種對原出生地有一定忠誠度的物種而言，也有可能造成其對於小地理範圍上的遺傳差異。*Rana temporaria* 和 *Bufo bufo* 皆為廣泛分布在英國的物種，且其生殖季時常共用同一個繁殖地，研究發現，蟾蜍的族群分化現象大於赤蛙，而赤蛙比蟾蜍的基因交流較高，顯示其族群結構的形式，即使是相近的物種，仍有很大的不同(Beebee 2005)。

台灣地形獨特，在中新世時因造山運動，中央山脈隆起，縱貫了整個台灣，

造成東西部的地理阻隔，且海拔差異大，使得台灣島的生物多樣性高。此外，水系造成山脈的切割，使的山與山之間有隔閡，形成許多不連續分布的棲地。這就有可能造成生物的分佈因為這類地形的關係而形成不連續小族群分布的現象。前人研究如彭(1997)利用 microsatellite 發現台灣的小家鼠(*Mus musculus*)在台灣各地有分化的現象產生；劉(1997)利用粒線體 DNA 限制酶片段長度多型性 (RFLP)研究台灣的斯文豪氏攀蜥(*Japalura swinhonis*)，發現其分成北台灣、西台灣、南台灣、太麻里、東台灣、東南島嶼六群；陳(2000)利用 mt DNA 的 D-loop 片段研究高身白甲魚(*Onychostoma alticorpus*)發現東西部兩族群間有分化現象產生；郭(2001)利用 mt DNA 的 COX1 及 cytb 片段來討論台灣蜓蜥的族群遺傳結構，發現雪山東峰地區的族群與其他地區的基因交流低，分化明顯；林(2003)研究 mt DNA 發現台灣草蜥(*Takydromus formosanus*)其遺傳差異可以分成北部、西部、東部族群，且北部與東部族群可提升成獨立的新種。而對於兩棲類來說，因其移動能力低，再加上這些地形的障礙，就有可能形成其基因交流不順暢。

在台灣，對於兩棲類的研究不少，例如莫氏樹蛙因台灣山勢阻隔的關係，從遺傳變異程度來看可以大致分成西部與東南部兩大群(葉，1997)。黃(2003)利用 D-loop 片段探討溪頭地區艾氏樹蛙的族群遺傳結構，發現因其對繁殖地有忠誠度和地理隔離的關係，在短距離內即有分化現象。盧(2005)提出有關棲地零碎化對諸羅樹蛙的族群遺傳結構之影響，發現由於流域間的陸域的隔離導致族群間缺乏基因交流。

翡翠樹蛙(*Rhacophorus prasinatus* Mou, Risch, & Lue, 1983)，是臺灣特有種，為於野生動物保育法中第二類珍貴稀有野生動物。翡翠樹蛙分布集中在集水區，如石門水庫、翡翠水庫附近，野外觀察顯示其分布零散，呈現小族群分布，不常看到大量的翡翠樹蛙聚集，多為少數個體，因此這種零散分布的族群是否可能造成其小族群間的遺傳差異？在生殖行為方面，前人研究發現雄蛙會在水池或

積水區附近停留數天，而且會有重覆的遷出及遷入，對其繁殖地有一定的忠誠度(陳, 1992)，其族群亦有可能會因為被山脈所阻隔而造成其基因交流不易。有關其生態及族群基本資料不多，目前只有關於其生殖行為的研究(陳, 1992)、其密度與食物量對於蝌蚪之影響(黃, 1998)、其卵泡寄生蠅之研究(林, 2000)，然而對於其族群遺傳方面的訊息卻付之闕如。

對於這種分布範圍狹小、成小族群生活、對棲地有一定忠誠度、而其移動力低，其基因交流可能會有差異，人為的干擾對於其遺傳結構可能會有所影響；而遺傳結構與地理分布的關係也不清楚。因此，希望能利用遺傳分子檢測的方法，來解決上述的問題，本實驗研究目的為：

- (1) 瞭解翡翠樹蛙的族群遺傳結構。
- (2) 翡翠樹蛙的族群是否會因不同水系間的地理阻隔而有分化現象。
- (3) 遺傳結構分化程度與地理距離間是否有相關性。

## 材料與方法

### 一、材料介紹:

翡翠樹蛙 (*Rhacophorus prasinatus* Mou, Risch, & Lue, 1983) ，為中大型蛙類。目前已知的分布地點為北部南北勢溪流域及宜蘭之低海拔山區 (陳, 1992)。

### 二、研究方法:

#### 1. 標本採集:

採集時間自 2006 年 5 月至 2008 年 4 月，將翡翠樹蛙族群依水系約略等距採七個樣點，分別是烏來、宜蘭福山植物園(南勢溪)、北宜坪林路段、台北市木柵貓空地區、石碇(北勢溪)、台北縣三峽地區、桃園縣復興鄉東眼山(大漢溪)(圖一)。每樣點採集 9 到 17 隻不等的翡翠樹蛙，個體以徒手捕捉法採集，標記方式為去趾法(toe-clipping)(Martof, 1959)，採集腳趾組織後釋放回原採集點。組織樣本共使用了 76 隻翡翠樹蛙個體，皆為雄性。分別為貓空 9 隻、福山 9 隻、坪林 11 隻、三峽 13 隻、東眼山 7 隻、石碇 10 隻、烏來 17 隻。(表一)

#### 2. 萃取 DNA 及 PCR 過程(附錄一、二)：

將先前採得的腳趾樣本切碎進行粒線體 DNA 的粹取，並且以可用的引子進行 PCR 增幅細胞色素 c 次單元一(cytochrome oxidase c subunit 1, COX1)、細胞色素 b (Cytochrome b, cytb)與控制區 (displacement loop, D-loop) 部分片段。COX1 和 cytb 引子為引用 GeneBank 中樹蛙科 *Rhacophorus schlegelii* 片段設計而成(cytb: cb20092L: 5'-GGTTAGAAGCTACAACCAACAAACC-3'、cb21081H: 5'-TAGGGCTAGTGCTGTGAGCATAATA-3'); D-loop 為使用盧在 2005 年的論文用的編號 RH7 (5'-CACATACCATCATMAACMATGTT-3')、RH8 (5'-GGGGGGAAAGGGGGGGGT-3') 引子。經過測試，找出變異較多的片段以為後續之用。並利用可用的引子，開始進行 PCR 增幅 COX1、cytb 與 D-loop 部

分片段序列來比對。利用 MegaBACE 1000 定序儀對 PCR 的產物進行雙股序列定序。

### 3. 序列分析:

DNA 定序後使用 SEQUENCHER (Gene Codes Corporation, 1999)進行雙股的排序與合併校正。並使用 MEGA(Molecular Evolutionary Genetics Analysis, ver.4.0)(Kumar *et al.*, 2001)軟體計算鹼基組合百分比、鹼基對替換(transition)、鹼基對顛換(transeversion)的發生率。

### 4. 分子資料分析

在 DnaSP4.0 套裝軟體(Rozas & Rozas, 1997)將所得 DNA 序列進行族群間單基因型歧異度(haplotype diversity,  $h$  值)(Nei & Tajima, 1983)，與核苷酸歧異度(nucleotide diversity,  $\pi$  值)(Nei, 1987)的計算，以量化族群的遺傳歧異度，可顯示族群的變異程度。各項公式分述如下:

a.  $h = (1 - \sum_{i=1}^k p_i^2)$

$n$  代表樣本數， $p_i$  是第  $i$  個單基因型的頻率， $k$  是單基因型個數(Nei, 1987)。

b.  $\pi = \frac{n}{n-1} \sum_{ij} X_i X_j d_{ij}$

$n$  代表樣本數， $X_i$  是第  $i$  個序列的頻率， $X_j$  是第  $j$  個序列的頻率，而  $d_{ij}$  則是第  $i$  個和的  $j$  個序列間的差異(Nei, 1987)。

以上兩公式皆是顯示族群內部的遺傳變異。 $D_{xy}$  為兩族群間單基因型核苷酸置換的平均數，代表族群間的 DNA 歧異度。比較  $\pi$  值及  $D_{xy}$  兩數值可得知 DNA 的遺傳變異是大多分布在族群內或族群間。測量族群間分化指數( $F_{st}$ , fixation index or genetic differentiation)(Slatkin, 1993)， $F_{st}$  為用來決定族群間遺傳分化的情形。 $F_{st}$  依數值大小可分為下列四種分化程度:  $F_{st} < 0.05$  時，代表沒有分化；



$0.05 < F_{st} < 0.15$ ，則代表中度分化； $0.15 < F_{st} < 0.25$ ，為高度分化； $F_{st} > 0.25$  為非常高度分化(Hartl & Clark, 1997)； $N_m$  基因交流指數(gene flow index)(Slatkin, 1985)，為每個世代個體在族群間遷徙的數目，用兩者看地區間的分化程度。 $N_m < 1$  時，代表族群間基因交流不順暢，在基因漂變下易造成族群分化；而  $N_m \geq 1$  時，表示族群間基因交流順暢。

本實驗以 MEGA 軟體中的 Tamura-Nei 的模式，將鹼基對替換與鹼基對顛換給予不同的比率加權來估計核苷酸取代的情形，而求得距離矩陣 (distance matrix) (Tamura & Nei, 1993)，進行族群間和族群內個體的遺傳距離計算。並用 Mantel test (Mantel, 1967) 來比較分化指數與地理距離的相關性。

使用 Arlequin 3.1(Schneider *et al.*, 2000) 進行階層性分子變異分析(analysis of molecular variance, AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992)，來檢測不同層次的族群結構。分別對區域(region)及族群(population)做檢測，可得到區域內(among groups)、族群間(among population within groups)及族群內樣本間(with population)三個不同的階層之變方成分，可以比較這三個階層的遺傳變異程度。以 Arlequin 3.1 計算並繪製各單基因型之間的親緣最小間距網狀圖(minimum spanning network, Excoffier and Smouse, 1994)，藉此了解翡翠樹蛙族群種內的遺傳演化關係，並藉此推論翡翠樹蛙單基因型間的親緣關係。

## 結 果

### 一、序列分析

76 隻翡翠樹蛙組織，經過 PCR 反應，部分成功增幅其粒線體 COX1、cyt b 與 D-loop 的部分片段，其中 COX1 為 619bp、cytb 為 779bp、D-loop 為 795bp，沒有發現缺失(deletion)與插入(insertion)的現象。各序列鹼基頻率(base frequency) 如表二所示。

以 BLAST 搜尋比對，與 Genebank locus 編號 AB202078 *Rhacophorus schlegelii* 序列相似，cyt b 部分序列相似約 86%；D-loop 部分序列相似約 88%。

### 二、遺傳變異

以下結果將會循著水系、不同水系內的地區間、三水系內所有個體進行分析。

其中因 COX1 變異度極少，在 619bp 中，只有 2bp 有差異，且差異只發生在坪林地區的其中一個樣本，其他樣本則無差異，無法當作有效序列來分析，因此在下面只討論 cyt b 與 D-loop 片段。各段序列中，各地區所出現的單基因型(haplotype)數目、單基因型歧異度(haplotype diversity)、核苷酸歧異度(nucleotide diversity) 如下：

1. 若以水系作為分群，則將貓空、石碇、坪林地區歸為北勢溪；烏來、福山地區歸為南勢溪、而三峽與東眼山地區則歸成大漢溪。cytb 部分的 h 值即基因型歧異度為 0.5183，以北勢溪最高，有 0.7425；而南勢溪最低，只有 0.2215。核苷酸歧異度即  $\pi$  值為 0.0009，最高為北勢溪，有 0.0015；最低為南勢溪，只有 0.0003。D-loop 部分 h 值為 0.6331，以南勢溪最高，有 0.8031；大漢溪最低，只有 0.2842。 $\pi$  值為 0.0047，南勢溪最高，為 0.0219；最低為大漢溪，只有 0.0006。將上述兩段序列合併分析，結果如表三所示。

基因型歧異度方面， $h$  值為 0.8295；南勢溪的  $h$  值為 0.8677，北勢溪為 0.8690，而大漢溪則相對來說較低，為 0.5158。而在核苷酸歧異度方面，為 0.0047；南北勢溪的  $\pi$  值為 0.0012，大漢溪為 0.0005。

2. 再比較同一水系不同地點的族群，*cytb* 部分， $h$  值方面，以北勢溪的三個地點較高，其中最高為貓空地區，有 0.8333；而最低為福山及東眼山地區，為 0，顯示這兩地區皆為單一基因型。 $\pi$  值方面，北勢溪三個地點較高，以貓空地區最高，為 0.0018；而福山及東眼山地區為 0。D-loop 部分， $h$  值方面，以貓空地區最高，為 0.9444；最低為東眼山地區，為 0.5238。 $\pi$  值方面，烏來地區最高，為 0.0158；東眼山地區最低，只有 0.0004。由於這兩段序列都是連結在粒線體內，因此將上述兩段序列合併進行分析，結果如表四所示。在單一基因型歧異度方面，南北勢溪的五個地點的  $h$  值較高，介於 0.7778~0.9273 之間；大漢溪的三峽與東眼山相對較低，分別只有 0.5256 和 0.5238。核苷酸歧異度方面，烏來地區最大，為 0.0158；桃園地區最小，為 0.0004；其餘五區為 0.0015~0.0006 之間。

單基因型方面，*cytb* 序列部分共有 14 組單基因型(圖二)，其中七個地點共 52 個樣本有相同基因型，顯示三水系有共用相同基因型；而坪林、貓空、石碇共 10 個樣本有相同基因型，顯示北勢溪的三個樣區有相同的基因型存在。D-loop 部分，共有 18 組基因型(圖三)，其中七個地點共 46 個樣本有相同基因型，顯示三水系皆有相同基因型存在；烏來、福山、貓空共 11 個樣本共有同一基因型，顯示南北勢溪共有一樣的基因型。在合併序列之後，發現七個地點共 30 個樣本共有同一基因型(圖四)，顯示三水系皆有同一基因型；坪林、貓空、石碇共 8 個樣本有相同基因型；烏來、貓空共 7 個樣本有相同基因型(表五)。

Dxy 與  $\pi$  值方面，*cytb* 部分，Dxy 值平均為 0.0009，以南勢溪與大漢

溪之間為最小，只有 0.0003；而  $\pi$  值平均為 0.0007，北勢溪最大，有 0.0015。D-loop 部分，Dxy 值平均 0.0086，以北勢溪與大漢溪之間最小，只有 0.0009； $\pi$  值平均為 0.0079，南勢溪最大，為 0.0219。而序列合併後(表六)發現族群間的差異為 0.001~0.0068 之間，平均為 0.0047，而族群內的差異為 0.0005~0.0112 之間，平均為 0.0043，顯示族群間差異的平均大於族群內差異的平均。其中南勢溪的族群內差異最大，為 0.0112；且南勢溪與其餘兩水系的差異最大，有 0.0068。而大漢溪的族群內差異最小，只有 0.0005。

比較同一水系不同地區，cytb 部分，北勢溪的 Dxy 值貓空與石碇最大，為 0.0016、坪林與石碇最小，為 0.0014； $\pi$  值以貓空最大，有 0.0018、坪林最小，為 0.0013。南勢溪的烏來與福山 Dxy 值為 0.0002； $\pi$  值以福山最小，為 0。大漢溪的三峽與東眼山地區，其 Dxy 值為 0.0003； $\pi$  值以東眼山地區最小，為 0。D-loop 部分，北勢溪的 Dxy 值平均為 0.0009，其中石碇與貓空最小，只有 0.0004； $\pi$  值平均為 0.0008，其中最小的為石碇地區，為 0.0003。南勢溪的烏來與福山地區的 Dxy 值為 0.0185； $\pi$  值平均為 0.0166。大漢溪的三峽與東眼山地區之 Dxy 值為 0.0007； $\pi$  值平均為 0.0039；合併序列於表七。北勢溪部分，Dxy 平均值為 0.0012，而  $\pi$  平均值為 0.0011。南勢溪部分，Dxy 值為 0.0095，而  $\pi$  平均值為 0.0085。大漢溪部分，Dxy 值為 0.0005，而  $\pi$  平均值為 0.0005。除了大漢溪地區外，南北勢溪地區的族群其族群間遺傳差異皆大於族群內。

### 三、族群間基因交流與分化

利用 Dnasp 計算族群分化指數(Fst)與基因交流指數，結果如下：

以水系分群，cytb 部分，以南北勢溪的 Fst 最大，有 0.2345；南勢溪與大漢溪的 Fst 最小，只有 0.0256。D-loop 部分，南勢溪與大漢溪的 Fst 最大，為 0.0908；最小的為北勢溪與大漢溪，為 0.0154。而序列合併後(表八)。發

現其中北勢溪與大漢溪的  $F_{st}$  最大，為 0.1461；而南北勢溪的  $F_{st}$  最小，為 0.0891；而三水系  $F_{st}$  值皆介於  $0.05 < F_{st} < 0.15$ ，為中度分化。

再比較同一水系不同地區，cytb 部分，以大漢溪的三峽與東眼山地區為最大，其  $F_{st}$  值有 0.5556；而北勢溪的坪林與貓空地區最小，為 -0.0013。D-loop 部分，坪林與貓空地區最大，為 0.1059；石碇與貓空地區最小，為 -0.06。序列合併為表九。發現屬於北勢溪的貓空對其他兩地的  $F_{st} < 0.05$ ，沒有分化；坪林與石碇呈現中度分化。南勢溪的烏來與福山為中度分化。而大漢溪的三峽與東眼山則沒有分化發生。

在  $N_m$  方面，cytb 部分，南勢溪與大漢溪間  $N_m$  值最大，有 9.5156；最小為南北勢溪間，為 0.8161。D-loop 部分，最大為北勢溪與大漢溪之間，為 15.9838；而南勢溪與大漢溪之間  $N_m$  值最小，為 2.5033。合併序列於表八。發現三水系間，其  $N_m > 1$ ，顯示其兩者間的基因交流是順暢的，其中數值最小的為北勢溪與大漢溪間，為 1.4612。

再比較同一水系不同地區，cytb 部分，坪林與貓空地區的  $N_m$  值最大，有 198.1627；三峽與東眼山地區最小，為 0.1999。D-loop 部分，三峽與東眼山最大；而坪林與貓空最小，為 2.1107。合併序列於表九。發現在北勢溪中三地區彼此之間的  $N_m$  值皆大於一，表示地區間有順暢的基因交流。南勢溪的烏來與福山有順暢的基因交流存在。屬於大漢溪的三峽與東眼山間的  $N_m$  值為 11.324，表示其間有順暢的基因交流。

#### 四、族群結構

從 AMOVA 的巢式變方分析(nested analysis)來看族群結構(表十)，組間為北勢溪、南勢溪及大漢溪，結果組間(among groups)變異僅佔所有變異的 8.56%；組內族群間(among populations within groups)變異為 1.96%；族群內(within

populations)的變異佔 89.48%，顯示絕大部分變異皆發生於族群內。而表示各階層是否有變異的  $\Phi$  值，組間  $\Phi_{CT} = 0.0856$  ( $P=0.033$ )；組內族群間  $\Phi_{SC} = 0.0215$  ( $P=0.014$ )；族群內  $\Phi_{ST} = 0.1052$  ( $P=0.006$ )。結果得知組間、組內族群間、族群內三個階層皆有顯著差異。

#### 五、建立個體及族群之親緣關係樹

將 76 隻個體與 76 隻個體所有的 32 種單基因型分別用分析軟體 MEGA 之近鄰歸群法(neighbor-joining method) 進行歸群，建構所得基因型的樹(圖五)。發現其沒有明確的分群，且 bootstrap 偏低。以 Arlequin 算出 32 種單基因型之最短距離網狀圖(minimum spanning network) (圖四)，發現 H30 翡翠樹蛙最主要的單基因型。

#### 六、地理距離與分化指數的相關性

計算 76 隻翡翠樹蛙族群分化指數與相對地理距離(表十一)之相關性。圖六為分化指數與地理距離的相關圖，所得  $r$  為 0.746， $p=0.001$ ，顯示其相對地理距離與分化指數有正相關，即距離愈遠，遺傳差異愈大。

## 討 論

### 一、分子序列變異

一般脊椎動物基因片段變異程度大小為 D-loop>cytb>COX1，而從翡翠樹蛙組織定序出來的基因片段中，變異程度亦為 D-loop>cytb>COX1，cytb 片段全長 779bp，有 12 個變異點，變異程度為 1.54%；D-loop 片段全長 795bp，有 92 個變異點，變異程度為 11.57%。Tajima's D 值是檢測族群內的基因交流是否符合隨機分佈，因此 D 值會受到族群數量變動的影響，若 D 值偏離 0，則族群被檢測的基因無法隨機分佈在族群內，造成 D 為正或負值。cytb 片段的 Tajima's 中性假說 D 值為-1.9492， $P<0.05$ ；而 D-loop 片段的 Tajima's 中性假說 D 值為-2.1465， $P<0.05$ 。兩片段皆偏離 0，顯示其分析的基因有可能不是隨機分佈在族群內。其偏離中性假說的原因非僅受到隨機基因漂變受中性突變的影響，而可能為天擇、瓶頸效應或族群拓展的影響。

而對於 COX1 片段來說，變異過少，在定出的共有 619bp 中只有 2bp 的變異，變異度僅 0.32%，且差異只發生在坪林地區的一個樣本，其餘皆無變異，有可能是因為 COX1 序列因保守特性，比較適合科、屬之間親緣關係探討，對於種內族群間的問題來說，片段會過於保守，無法給予合適的資料做分析。

### 二、族群結構

AMOVA 是目前廣泛使用分析族群結構技術，根據 Wright' 島嶼理論來解釋目前族群結構與基因交流的情形，但無法對過去的歷史事件做分析。以水系分群，經 AMOVA 的運算結果發現其變異多產生在族群內個體間，顯示翡翠樹蛙各地區內的個體遺傳變異相對的較大，可能原因有：一、因祖先族群的遺傳多態性大，使得分散到各個地區的翡翠樹蛙本身的遺傳異

質度高；二、因各個地區的地景等非生物因子並不相同，且因為所在環境多是人為環境，是不停的在變動的，使得翡翠樹蛙因為天擇而產生出其遺傳異質性。官 (2004) 用 AMOVA 分析彰化地區的澤蛙，其個體之間的變異高達 84.28%，與本實驗結果相似，顯示大多變異都在族群內個體間。

Avise(2000)將研究動物地理相與基因型之間的關聯，並探討各基因型之間差異與地理分布的關係，將其分為五個類型。第一型為遺傳差異呈現不連續，且分布與地理分布一致，他認為一些受到長期地理隔離以致於缺乏基因交流的物種；或是某些地理分佈廣，而基因交流低的物種，其中間型滅絕，因而容易造成第一類型的情形；第二型為遺傳差異呈現不連續分布，但是與地理分布不一致，各遺傳分群在相同的地理區域間，可能是原本相互隔離的族群，因地理障礙消失，使原本隔離的族群再度接融 (secondary admixture)；第三類型為基因型的分群與地理上的分布相吻合，但是基因型之間的相差不大，族群不受長期地理隔離，其基因交流程度低的物種容易形成第三類型；第四型為基因型的分布與地理上的分布不一致，基因型廣泛分布於各個地理區，且基因型彼此之間差異不大，可能為族群不受長期地理隔離，基因交流程度高的物種；第五類型為有些基因型廣泛分布於各地理區，而有些基因型僅僅侷限分布於某些地理區，呈現一個巢狀結構，為族群不受長期地理隔離，基因交流程度中等的物種會形成；後面三個類型只是在族群基因交流程度的差別。翡翠樹蛙則屬於第五類型，顯示翡翠樹蛙部分基因型廣泛分布於各地理區(H30)(圖四)；而有些基因型僅侷限分布在某些地理區。H30 可能為翡翠樹蛙的祖先基因型，在擴散到各地之後，因為樹蛙對水的依賴，因此不容易遷徙到他處，因而在當地適應產生新的突變，而有不同的基因型產生，所以才會有有的基因型僅僅侷限分布在某些地方。



一個族群具有低的  $\pi$  值及  $h$  值表示族群最近曾經歷長期或者嚴重的瓶頸效應，此族群是由少數個體組成的祖先族群快速成長而來，經歷的時間足夠由突變恢復基因型的變異，但不足以累積大量序列變異；具有低的  $\pi$  值及高的  $h$  值表示是由少數個體組成的祖先族群快速生長而來，其經歷的時間不足以累積大量的序列變異，經由突變已經恢復單基因型的變異；具有高的  $\pi$  及低的  $h$  表示來自大的、曾經歷短暫瓶頸效應的祖先族群，短暫的衝擊可以消滅許多基因型，卻不對  $\pi$  值有重大的影響，此外，也有可能是很小的、有地理上分離的亞族群所來的個體；具有高的  $\pi$  值及  $h$  值表示是一個穩定的族群，長期有大量有效的族群數量，或者混有從歷史上以分離的族群中來的個體 (Avice 2000)。就翡翠樹蛙的數據來說，是屬於第二型，具有高  $h$  值低  $\pi$  值。表示翡翠樹蛙可能有少數個體組成的祖先生長而來的，且其成長時間已足夠以累積恢復基因型的變異。相同情形也發生在彰化地區的澤蛙(官, 2004)、諸羅樹蛙(盧, 2005)、彰化地區的黑眶蟾蜍(李, 2006)。

### 三、族群分化與基因交流

以水系分群，其族群分化指數皆在 0.0891~0.1461 之間 (表八)，顯示這三水系之間有分化情形出現；且其中北勢溪與大漢溪的分化指數最大，有 0.1461(表八)；對照 Hartl & Clark 在 1997 年所提出的分化程度大小，發現此三水系間，其  $F_{st}$  值都介於 0.05 與 0.15 之間，為中度分化。相似情形亦發生在埔里華吸鰍(*Sinogastromyzon puliensis*)(廖, 1999)及香魚(*Plecoglossus altivelis*)(侯, 2001)。和水系關係密切的兩棲類中也有相似情形，如梭德氏赤蛙(*Rana sauteri*)，就分成濁水溪系的中部群與淡水河系的北部群(陳, 1993)。而本實驗結果可能原因為兩棲類的物種特性，像是低的移動力及高的繁殖地忠誠度所導致(Shaffer *et al.*, 2000)，使得族群有一定程度的分化。

翡翠樹蛙為需要依水生活的物種，或許其會到最近水域生活而不會輕易遷徙到他處，因而造成這三水域間的分化。若再細分以水系內不同地區為族群，發現只有北勢溪的坪林與石碇、南勢溪的烏來與福山部分為中度分化，可能因為採集地多為人工環境，翡翠樹蛙可能為了適應不同的環境而造成分化產生。坪林與烏來有較多獨特的單基因型，造成其與其他地區有分化的現象。北勢溪的貓空對其他兩地區為沒有分化，大漢溪的東眼山與三峽地區也呈現沒有分化的情形。Bossart (1998)認為，造成遺傳分化不明顯的可能原因有：1.族群間的分化確實不明顯，存在頻繁的基因交流；2.所選用的分子記號受到平衡性天擇 (balancing selection)的影響；3.所選用的分子標記缺乏解析度。

在基因交流數值方面，發現三水系的基因交流指數都大於一，顯示三水系的基因交流是順暢的，雖然北勢溪與大漢溪呈現中度分化，但仍有一定程度的基因交流，或許三水系的分界沒有辦法成功的造成翡翠樹蛙分布障礙。若探討水系內不同地區的族群，發現三水系內不同地區的族群間都有順暢的基因交流，顯示地區與地區之間沒有明顯的障礙，使得翡翠樹蛙仍可以在不同地區遷移。

族群間遺傳距離多為 0.001~0.0068 之間，平均為 0.0049，遺傳距離不高；而其族群內平均遺傳距離為 0.0044，相互比較發現族群內遺傳距離較族群間大。若討論水系內不同地區的族群，其族群間的遺傳距離多為 0.0005~0.095 之間，平均為 0.0028；族群內平均遺傳距離為 0.0031，顯示水系內不同地區的族群，其族群內遺傳距離會比族群間大。而三水系族群間的基因歧異度平均為 0.0047，族群內平均為 0.0043；顯示族群間稍大於族群內，但差異甚小，其中南勢溪無論族群間或族群內其基因歧異度值皆相對於其他兩水系要來的大，尤其是南勢溪的族群內基因歧異度，有 0.0112，

表是南勢溪內的個體基因差異較大。而若再細分水系內不同地區的族群，可以發現族群內基因歧異度大於族群間，尤其是南勢溪的烏來地區， $\pi$  值為 0.0158 大於其他六區約十倍，族群內歧異度甚高，有可能因為其樣本數較多，使得異質度較高。在對照於單基因型發現，若只看 cytb 部分序列，則七個地區有 14 個不同的單基因型，且差異不大。而若只單看 D-loop 部分序列，則有 18 個不同的單基因型，再對照 minimum spanning network 所建立的網狀樹狀圖，發現有三隻個體與其他個體差距甚大，而且只發生在 D-loop 的網狀樹狀圖中，造成合併序列後的網狀樹狀圖的此三個單基因型與其他單基因型差距高達 75 步。總數 76 隻有定序出部分 cytb 及 D-loop 序列的個體中，發現了 32 種不同的單基因型，其中烏來地區的單基因型就多達 10 個，且特有的基因型有 8 個，其中有三隻個體的差異相較於其他個體而言特別大，1574 bp 中最高有 93 bp 不同，且大多在於 D-loop 序列，而 D-loop 區段有可能因為變異速率過快進而影響其樣點內的變異。然而要能夠確實計算出實際的歧異度，最好能有更大量的樣本做檢測，以增加準確度。

#### 四、族群遺傳距離

(表十二) 顯示台灣地區近年所作的兩生爬蟲類的遺傳距離比較：楊 (1994) 所用 cytb、D-loop 片段研究的物種台北樹蛙，其最大遺傳距離為 0.022；而盧 (2005) 所用 COX1、cytb、D-loop 片段研究諸羅樹蛙，其最大遺傳距離為 0.004。本實驗結果顯示最大遺傳距離為 0.0102，雖小於台北樹蛙，卻大於諸羅樹蛙，可能因為翡翠樹蛙不像台北樹蛙被山系分隔成北部與中部系統，而是分佈在北部；也不像諸羅樹蛙因遭受棲地零碎化，因瓶頸效應使得變異低，且不同研究所取樣的距離也可能會影響。平均而言，翡翠樹蛙的族群內遺傳距離大於族群間遺傳距離；劉 (2000) 利用 RAPD(random amplified polymorphic DNA) 技術來探討翡翠樹蛙的族群遺傳結構，發現其族

群內的遺傳距離遠大於族群間。與本實驗結果相符。

## 五、地理距離與分化指數的相關

Wright 在 1978 年提出族群分化理論，認為在一個連續性的族群中，族群密度與散佈頻度為影響遺傳結構的重要因子，兩族群間的距離長短會影響其間個體發生交流的機率，即 isolation by distance。但從結果顯示，其分化指數與其相對地理距離間有正相關，即距離愈遠，分化愈大。原因可能為，因為翡翠樹蛙的生物習性，像是對棲地忠誠度，使得翡翠樹蛙或許比較不會作長距離的移動，導致其距離愈遠分化愈大。而也有可能因為水系、城市、山脈的切割，導致其不容易從一地長距離遷移到另一地。

## 六、個體及族群的親緣關係

以網狀樹狀圖探討親緣關係及演化歷史，依據兩項原則：1.新的單基因型是由古老的單基因型衍生而來；2.如果缺少基因交流，新的單基因型可能會被侷限在原有族群中(Templeton, 1995)由翡翠樹蛙單基因型的親緣關係樹可發現，並沒有明顯的地理分群模式，且分群並不顯著，再對照 minimum spanning network 建立的網狀樹狀圖可以發現，大多數樣本都是同一個單基因型(H30)，而其餘的獨特的單基因型皆從 H30 分枝而來。雖說 76 隻翡翠樹蛙的單基因型歧異度頗高，有可能因為所取的樣本數不夠大，使得單基因型歧異度高。但個體間的遺傳差異小，表示個體間有基因交流的現象，其中最小的在總定序長度 1574bp 中，只有 1bp 的差異，變異度為 0.06%；最大的有 93bp，變異度只有 5.9%。水系間的平均差異為 0.28%。

## 結 論

1. 分析翡翠樹蛙之 cytb 及 D-loop 片段後發現，有低的核苷酸歧異度與高的單基因型歧異度，基因型與基因型之間的差距甚小。
2. 翡翠樹蛙種內的遺傳變異程度不大，遺傳距離在國內目前僅高於諸羅樹蛙。
3. 南北勢溪與大漢溪這三水系的族群雖有中度分化情形發生，但仍維持著高度的基因交流。
4. 翡翠樹蛙的族群分化指數與其相對地理距離成正相關，顯示距離愈遠，彼此遺傳分化愈大。

## 參考文獻

- Andersen, L. W., Fog, K. and Damgaard, C. 2004. Habitat fragmentation causes bottlenecks and inbreeding in the European tree frog (*Hyla arborea*). Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences **271**: 1293-1302.
- Avise J. C., Arnold J., Ball R. M. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematic. Annual Review of Ecology and Systemics, **18**: 489-522.
- Avise J. C. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman and Hall, New York.
- Avise J. C. 2000. Phylogeography : the history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Barber, P. H. 1999. Patterns of gene flow and population genetic structure in the canyon treefrog, *Hyla arenicolor* (Cope). Molecular Ecology **8**: 563-576.
- Beebee, T. J. C. 2005. Conservation genetics of amphibians. Heredity **95**: 423-427.
- Cabe P. R., Page R. B., Hanlon T. J. , Aldrich M. E. , Connors L. and Marsh D.M. 2007. Fine-scale population differentiation and gene flow in a terrestrial salamander (*Plethodon cinereus*) living in continuous habitat. Heredity **98**: 56-60.
- Clough M. and Summers, K. 2000. Phylogenetic systematics and biogeography of the poison frogs: evidence from mitochondrial DNA sequences. Biological Journal of the Linnean Society **70**: 515-540.
- Dever J. A. 2007. Fine-scale genetic structure in the threatened Foothill Yellow-Legged Frog (*Rana boylei*). Journal of Herpetology **41**: 168-173.

- 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**: 1147-1157.
- Excoffier L., Smouse P. E. and Quattro J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes - application to human mitochondrial-DNA restriction data. *Genetics* **131**: 479-491.
- Giordano A. R., Ridenhour B. J. and Storfer A. 2007. The influence of altitude and topography on genetic structure in the long-toed salamander (*Ambystoma macrodactylum*). *Molecular Ecology* **16**: 1625-1637.
- Hartl D. L. and Clark A. G. 1997. *Principles of Population Genetics*. 3 ed. Sinauer Associates, Sunderland. Massachusetts: 542.
- Hedrick P. W. 1999. Perspective: Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution* **53**: 313-318.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequence. *Molecular Evolution* **16**: 111-120.
- Kumar S., Tamura K., Jakobsen I. B. and Nei M. 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis. Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.
- Mantel N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, **27**: 209-220.
- Measey G. J., Galbusera P., Breyne P. and Matthysen E. 2007. Gene flow in a direct-developing, leaf litter frog between isolated mountains in the Taita Hills, Kenya. *Conservation Genetics* **8**: 1177-1188.
- Moritz C., Dowling T. E. and Brown W. M. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: implications for population biology and systematics. *Annual Review of*

Ecology and Systematics. 18.

- Mou Y. P., Risch J. P. and Lue K.Y. 1983. *Rhacophorus prasinatus*, a new tree frog from Taiwan, China (*Amphibia, Anura, Rhacophoridae*). *Alytes*. **2**: 154-162.
- Mousset S., Derome N. and Veuille M. 2004. A test of neutrality and constant population size based on the mismatch distribution. *Molecular Biology and Evolution* **21**: 724-731.
- Nei M., and Tajima F. 1983. Maximum likelihood estimation of the number of nucleotide substitutions from restriction sites data. *Genetics* **105**: 205-217.
- Nei M., and Tajima F. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY.
- Reh W. and Seitz A. 1990. The Influence of Land-Use on the Genetic-Structure of Populations of the Common Frog *Rana temporaria*. *Biological Conservation* **54**: 239-249.
- Rothermel B. B. and Semlitsch R. D. 2002. An experimental investigation of landscape resistance of forest versus old-field habitats to emigrating juvenile amphibians. *Conservation Biology* **16**: 1324-1332.
- 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.
- Scribner K. T., Petersen M. R., Fields R. L., Talbot S. L., Pearce J. M. and Chesser R. K. 2001. Sex-biased gene flow in spectacled eiders (*anatidae*): Inferences from molecular markers with contrasting modes of inheritance. *Evolution* **55**: 2105-2115.
- Shaffer G., Fellers G. M., Magee A. and Voss R. 2000. The genetics of amphibian declines: population substructure and molecular differentiation in the Yosemite Toad, *Bufo canorus* (*Anura, Bufonidae*) based on single-strand conformation



- polymorphism analysis (SSCP) and mitochondrial DNA sequence data.  
*Molecular Ecology* **9**: 245-257.
- Slatkin M. 1985. Gene flow in natural population. *Annual Review of Ecology and Systematics* **16**: 393-430.
- Slatkin M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations.  
*Science* **236**: 787-792.
- Spear S. F., Peterson C. R., Matocq M. D. and Storfer A. 2005. Landscape genetics of the blotched tiger salamander (*Ambystoma tigrinum melanostictum*).  
*Molecular Ecology* **14**: 2553-2564.
- Storfer A. and Sih A. 1998. Gene flow and ineffective antipredator behavior in a stream-breeding salamander. *Evolution* **52**: 558-565.
- Wagner R. S., Miller M. P., Crisafulli C. M. and Haig S. M. 2005. Geographic variation, genetic structure, and conservation unit designation in the Larch Mountain salamander (*Plethodon larselli*). *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* **83**: 396-406.
- White P. S., Owatha L. T., Tegelatröm H. and Densmore L. D. 1998. Mitochondrial DNA isolation, separation, and detection of fragments. In: *Molecular genetic analysis of populations: a practical approach*. (Ed. Hoelzel, A. R.). . Oxford University Press, New York, : 65-101.
- Wright S. 1978. *Evolution and genetics of populations*. Chicago University Press, Chicago.
- 陳賜隆 1992. 翡翠樹蛙(*Rhacophorus smaragdinus*)生殖行為及生態學之研究。.  
國立台灣師範大學生物研究所碩士論文。.
- 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。.  
國立台灣大學動物研究所碩士論文。.

- 楊懿如 1994. 台北樹蛙(*Rhacophorus taipeianus*)生殖生態與族群基因組成差異。國立台灣大學動物研究所博士論文。
- 陳志遠 1995. 台灣綠色樹蛙屬之生物地理學與類源關係之研究。國立師範大學生物研究所碩士論文。
- 葉文珊 1997. 莫氏樹蛙族群地理親源關係之研究。國立台灣大學動物研究所碩士論文。
- 劉國強 1997. H 粒線體核酸分析斯文豪氏攀蜥之生物地理與親緣關係。國立中山大學生命科學研究所碩士論文。
- 彭優惠 1997. 台灣小家鼠的族群分化與基因交流-微隨體 DNA 之應用。國立台灣大學動物研究所碩士論文。
- 黃堅庭 1998. 密度與食物量對翡翠樹蛙(*Rhacophorus prasinatus*)蝌蚪成長變態。國立師範大學生物研究所碩士論文。林獻升 2000. 台灣地區卵泡寄生蠅之研究。國立師範大學生物研究所碩士論文。
- 廖德裕 1999. 台灣產埔里華吸鰍族群間分子親緣關係之研究。國立清華大學生命科學所碩士論文。
- 吳孟修 2000. 澎湖地區麗紋石龍子族群遺傳結構研究。國立師範大學生物研究所碩士論文。
- 陳新言 2000. 高身白甲魚(*Onychostoma alticorpus*)族群間親緣地理學之研究。國立清華大學生命科學所碩士論文。
- 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。國立台灣大學動物研究所碩士論文。
- 侯景祥 2001. 台灣香魚族群遺傳結構之研究。國立清華大學生命科學所碩士。
- 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學系碩士論文。
- 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。

林思民 2003. 臺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）。國立師範大學生物研究所博士論文。

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。

盧建名 2005. 棲地零碎化對諸羅樹蛙(*Rhacophorus arvalis*) 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。

林旻儀 2006. 台灣地區外來種亞洲錦蛙(*Kaloula pulchra*)族群遺傳結構及來源之研究。國立台灣師範大學生命科學系碩士論文。

李韻如 2006. 應用粒線體 DNA D-loop 部分片段探討彰化地區黑眶蟾蜍之族群遺傳結構。國立彰化師範大學生物學系碩士論文。

表一、翡翠樹蛙的採集地點與樣本數

水系	採集地點	樣本數	合計
北勢溪	貓空	9	30
	石碇	10	
	坪林	11	
南勢溪	烏來	17	26
	福山植物園	9	
大漢溪	東眼山	7	20
	三峽	13	
			76

表二、翡翠樹蛙 cytb 與 D-loop 序列資料。

基因片段	長度	鹼基 頻率 (百分比)			
		T	C	A	G
cytb	779	30.3	27.6	26.6	15.5
D-loop	795	28	23.5	31.7	16.8
total	1574	29.1	25.5	29.1	16.2

表三、以水系分群時，翡翠樹蛙的採集地點、樣本數、單基因型、單基因型歧異度與核苷酸歧異度數值。

地點	樣本數	$\pi$	h	Cytb haplotype number	D-loop haplotype number	Total haplotype number
北勢溪	30	0.0012	0.8690	9	6	15
南勢溪	26	0.0012	0.8677	4	11	14
大漢溪	20	0.0005	0.5158	3	4	6
total	76	0.0047	0.8295	14	18	32

表四、以地點分群時，翡翠樹蛙合併序列後，採集地點、樣本數、單基因型、單基因型歧異度與核苷酸歧異度數值。

水系	地點	樣本數	$\pi$	h	Cytb haplotype number	D-loop haplotype number	Total haplotype number
北勢溪	坪林	11	0.0015	0.9273	4	5	8
	石碇	10	0.0008	0.7778	4	2	4
	貓空	9	0.0011	0.9444	4	2	7
南勢溪	烏來	17	0.0158	0.8824	4	7	10
	福山	9	0.0012	0.8889	1	6	6
大漢溪	三峽	13	0.0006	0.5256	3	2	4
	東眼山	7	0.0004	0.5238	1	3	3
total		76	0.0047	0.8295	14	18	32

表五、翡翠樹蛙不同地區單基因型隻數表

水系	地點	單基因型(隻數)	合計單基因型數
北勢溪	坪林	H9(1) H10(1) H11(1) H12(1) H13(1) H14(1) H23(3) H30(2)	8
		石碇	H22(2) H23(3) H24(1) H30(4)
	貓空	H18(1) H19(1) H20(1) H21(1) H23(2) H30(2) H31(1)	7
南勢溪	烏來	H1(1) H2(1) H3(1) H4(1) H5(1) H6(1) H7(1) H8(1) H30(5) H31(4)	10
	福山	H27(1) H28(1) H29(1) H30(3) H31(2) H32(1)	6
大漢溪	三峽	H15(1) H16(2) H17(1) H30(9)	4
	東眼山	H25(1) H26(1) H30(5)	3
total			32

表六、以水系分群，將序列合併，估算翡翠樹蛙族群間  $D_{xy}$  值與族群內  $\pi$  值。

	北勢溪	南勢溪	大漢溪
北勢溪	0.0012		
南勢溪	0.0068	0.0112	
大漢溪	0.0010	0.0064	0.0005

表七、將序列合併，估算三水系內不同地區間的翡翠樹蛙族群  $D_{xy}$  值與族群內  $\pi$  值。

北勢溪

a.

	坪林	石碇	貓空
坪林	0.0015		
石碇	0.0012	0.0008	
貓空	0.0014	0.0010	0.0011

南勢溪

b.

	烏來	福山
烏來	0.0158	
福山	0.0095	0.0012

大漢溪

c.

	三峽	東眼山
三峽	0.0006	
東眼山	0.0005	0.0004

表八、以水系分群，合併序列後，估算翡翠樹蛙族群之間族群分化指數(Fst 值)(表格下方)及族群間基因交流數值(Nm)(表格上方)。

	北勢溪	南勢溪	大漢溪
北勢溪		2.3667	1.4612
南勢溪	0.0955		2.5558
大漢溪	0.1461	0.0891	

表九、將序列合併，估算三水系內不同地區間的翡翠樹蛙族群分化指數 (Fst) (表格下方)及族群間基因交流數值(Nm)(表格上方)。

北勢溪			
a.			
	坪林	石碇	貓空
坪林		3.7953	5.1848
石碇	0.0618		249.75
貓空	0.0460	0.0010	

南勢溪		
b.		
	烏來	福山
烏來		2.1772
福山	0.1030	

大漢溪		
c.		
	三峽	東眼山
三峽		11.3240
東眼山	0.0216	

表十、三水域區翡翠樹蛙遺傳結構(AMOVA)。

Source of variation	d.f.	Percentage of variation	$\Phi$	P
Among groups	2	8.56	0.0856	0.033
Among populations within groups	4	1.96	0.0215	0.014
Within population	75	89.48	0.1052	0.006
Total	76			

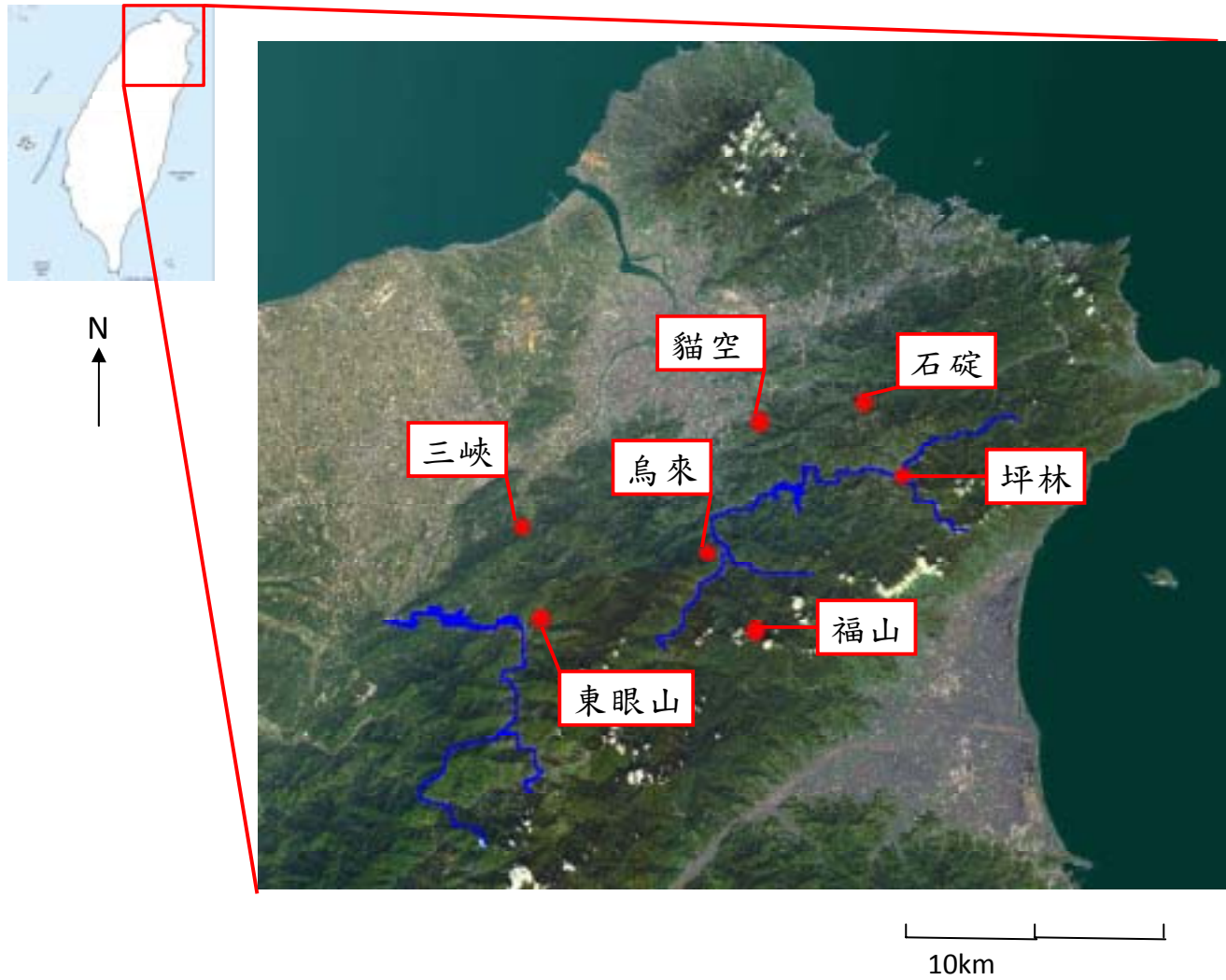
表十一、翡翠樹蛙採集點之相對地理距離(公里)

	坪林	石碇	貓空	烏來	福山	三峽
坪林						
石碇	7					
貓空	12.25	7				
烏來	17.5	19.25	14			
福山	21	24.5	21	10.5		
三峽	29.75	29.75	22.75	14	22.75	
東眼山	35	36.75	29.75	21	24.5	8.75

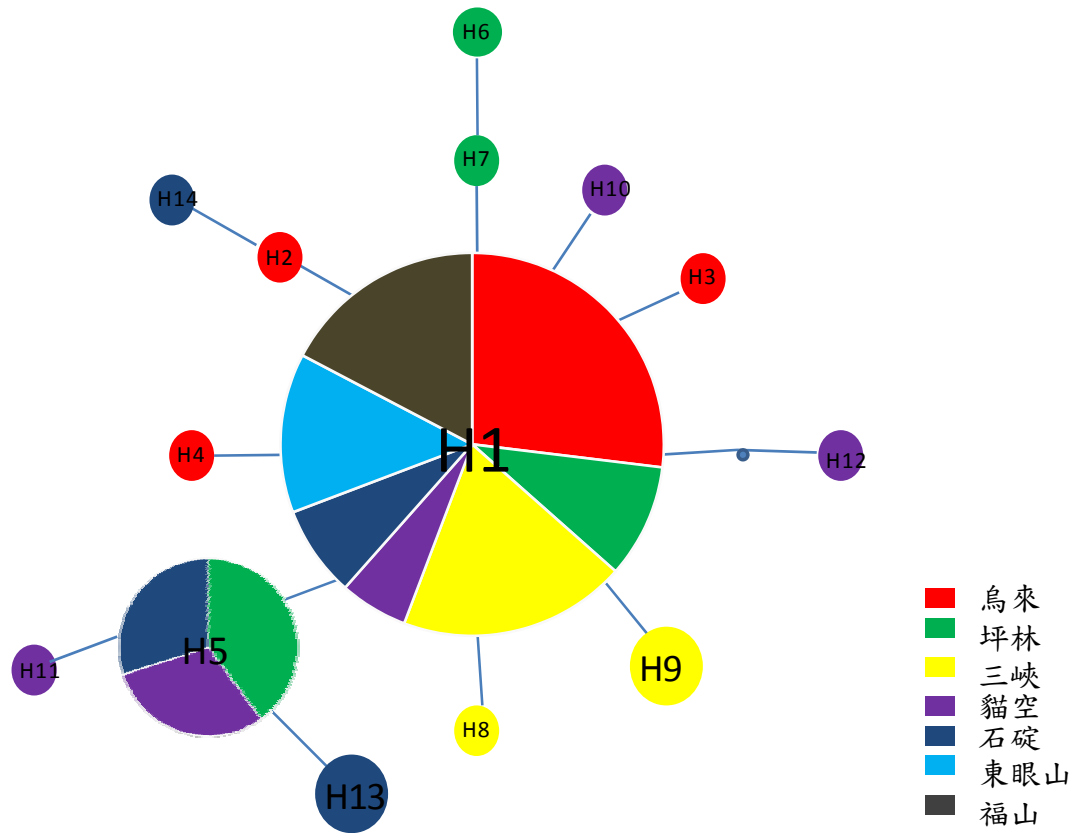


表十二、台灣區已發表兩生類物種內遺傳距離比較。

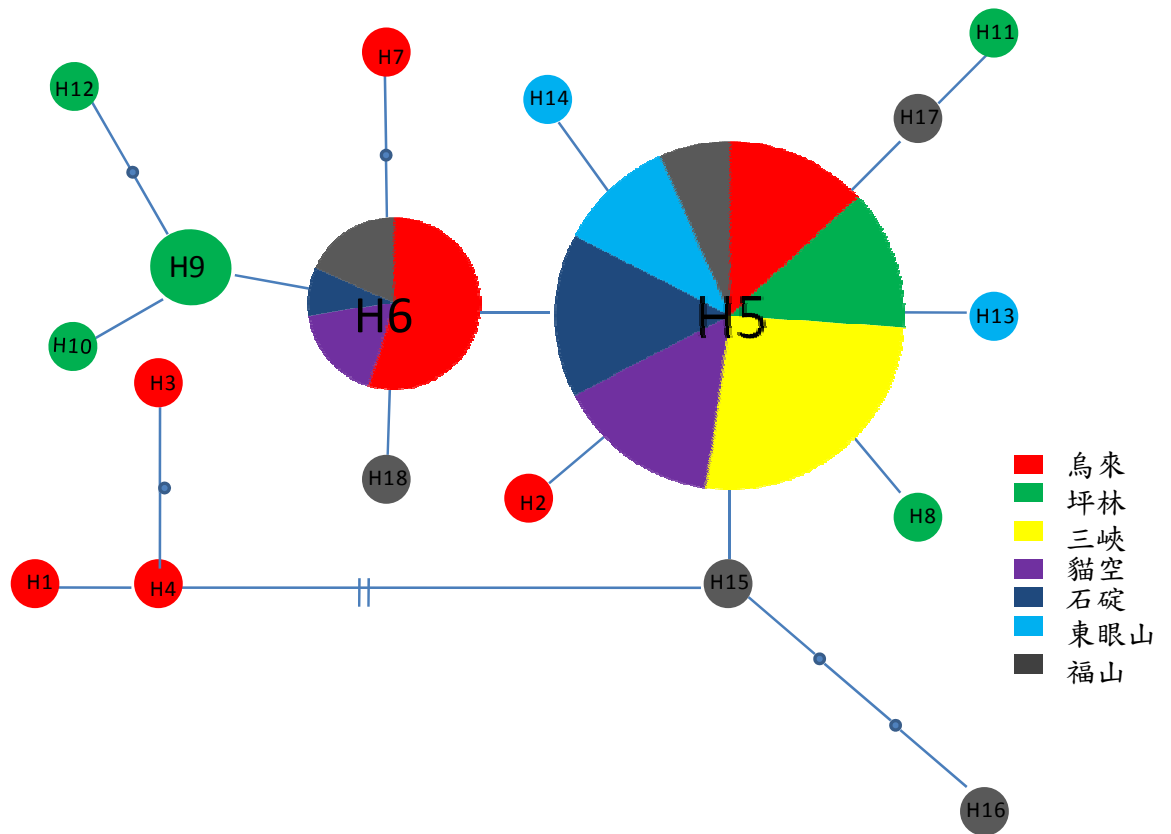
綱名	物種	基因片段	最大遺傳距離	作者
兩棲綱	<i>Rhacophorus taipeianus</i>	cytb、D-loop	0.022	楊，1994
	<i>Rhacophorus moltrechti</i>	12S、16S rRNA	0.025	葉，1997
	<i>Chirixalus eiffingeri</i>	D-loop	0.082	黃，2002
	<i>Rana limmocharis</i>	D-loop	0.019	官，2004
	<i>Rhacophorus arvalis</i>	COX1、cytb、D-loop	0.004	盧，2005
	<i>Rhacophorus prisinatus</i>	cytb、D-loop	0.014	本研究結果



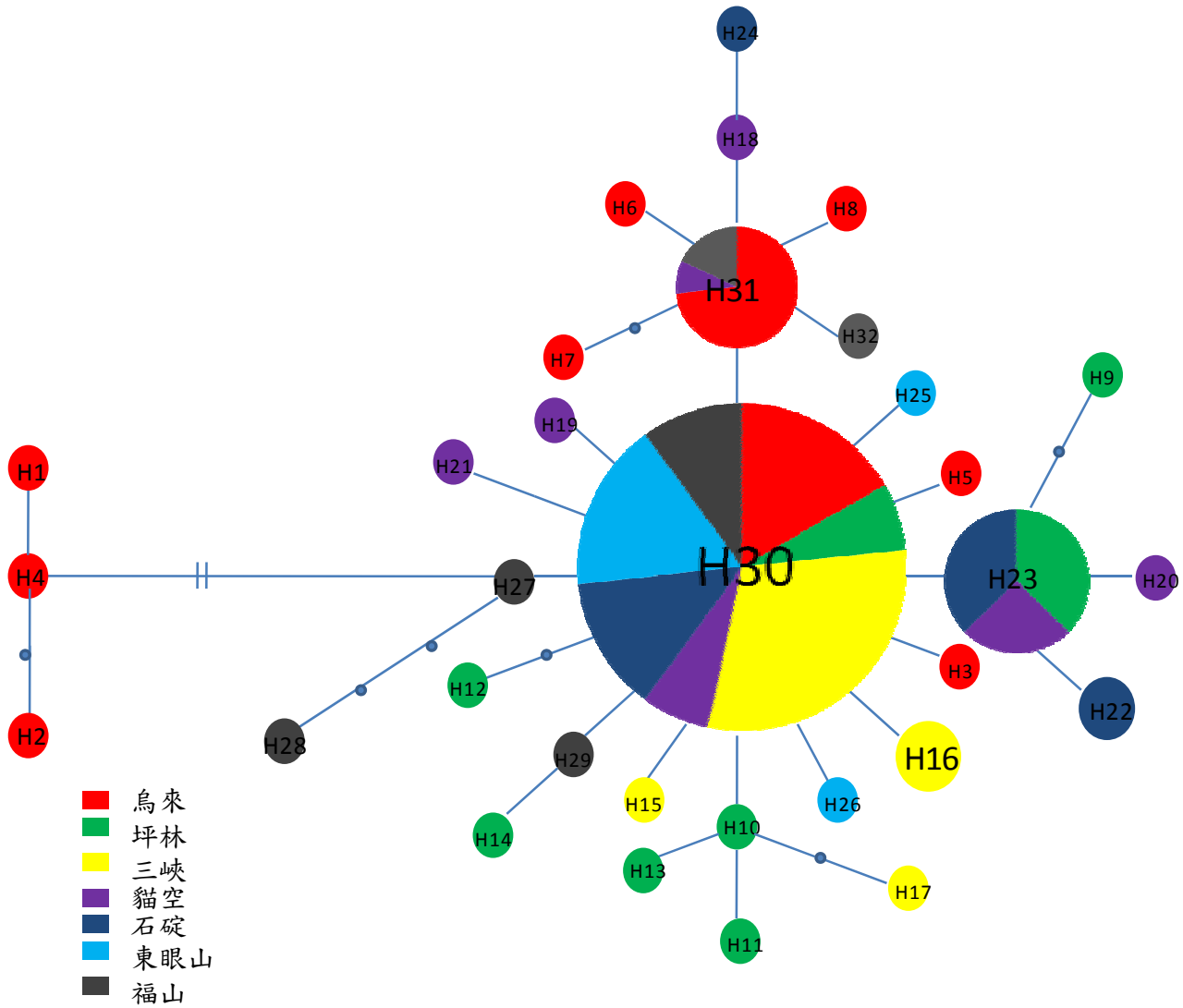
圖一、翡翠樹蛙取樣地圖點



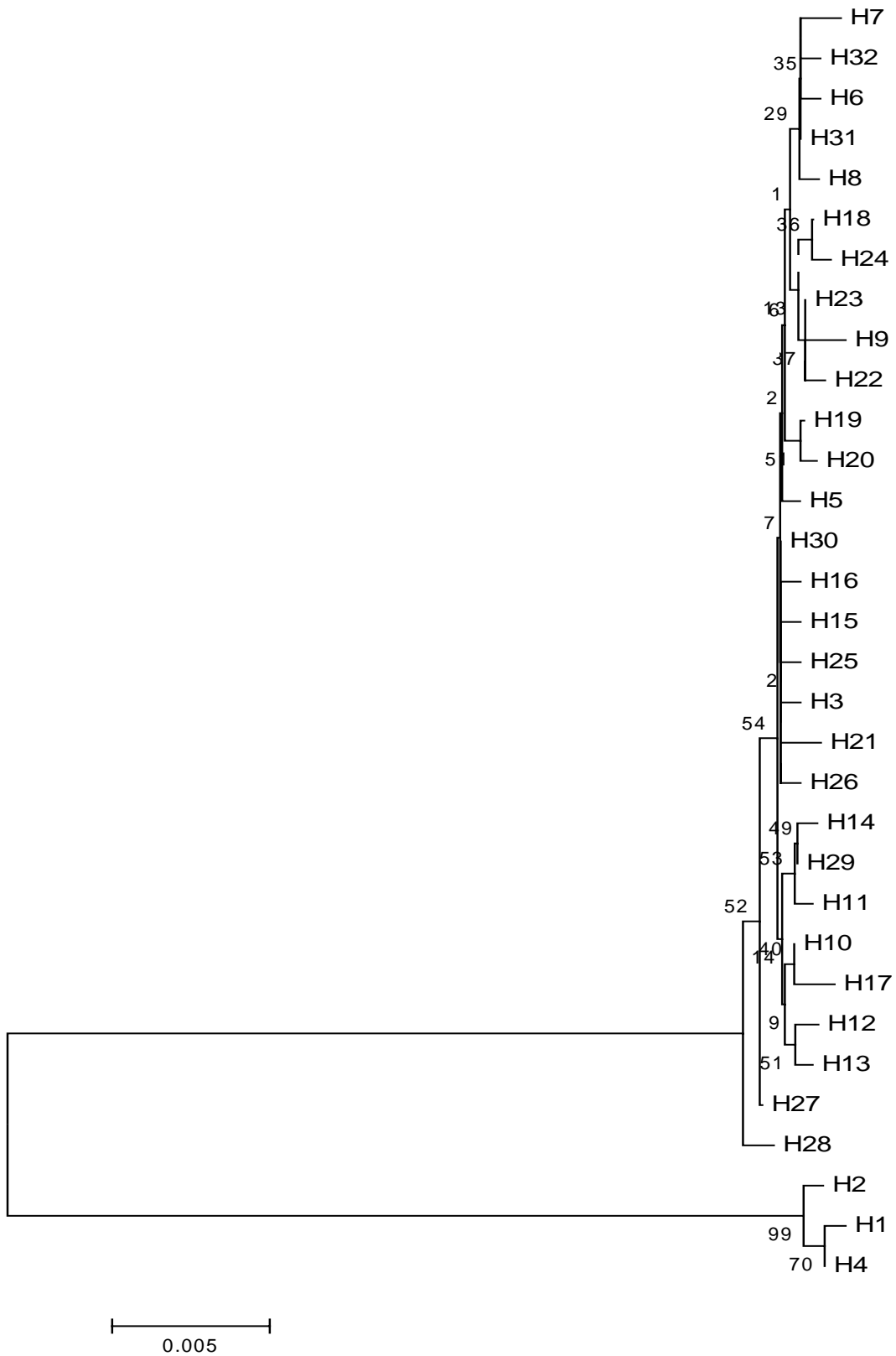
圖二、翡翠樹蛙 cyto b 單基因型的 minimum spanning network (最小關聯網狀樹狀圖)



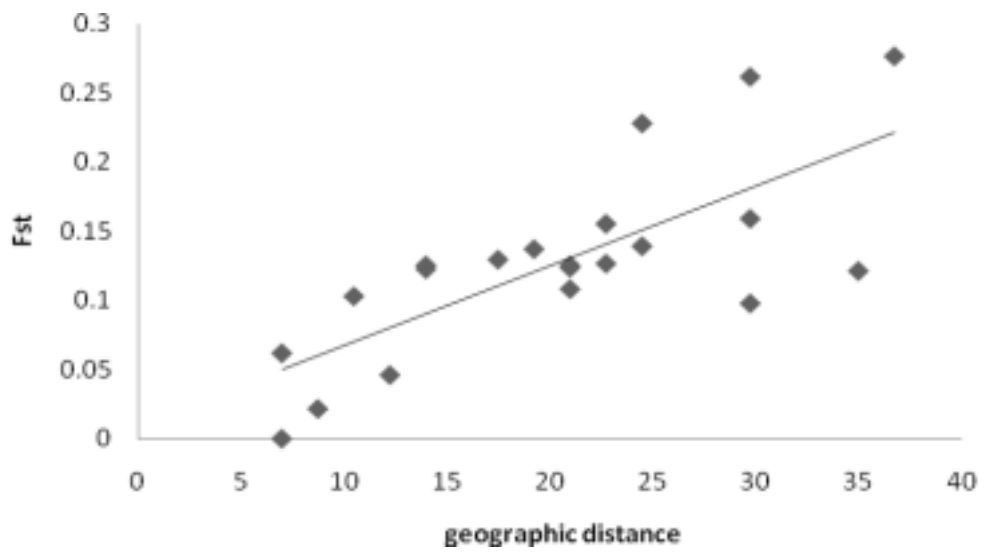
圖三、翡翠樹蛙 D-loop 單基因型的 minimum spanning network (最小關聯網狀樹狀圖)



圖四、翡翠樹蛙單基因型的 minimum spanning network (最小關聯網狀樹狀圖)



圖五、翡翠樹蛙單基因型親緣關係樹



圖六、翡翠樹蛙族群分化指數與地理距離之相關圖

## 附錄一：萃取 DNA 流程。

1. 將野外剪下的指頭組織切碎置於 ddH<sub>2</sub>O、Proteinase K、digestion buffer 試管中，置於 56°C 乾浴槽加熱反應，隔夜再取出。
2. 隔天加入等體積的 LiCl 與二倍量的 Chloroform，放入垂直轉輪中以轉速 6~7 轉動 30 分鐘，震盪均勻之後，進行離心，離心機設定為轉速 12500RPM、4°C、15 分鐘。
3. 取出上清液，再加入兩倍體積的 100%酒精，將試管輕搖後，進行離心，離心機設定為轉速 12500RPM、4°C、15 分鐘。
4. 將上清液倒掉，再加入 200μl 的 70%酒精，輕搖之後離心，離心機設定為轉速 12500RPM、4°C、3 分鐘。
5. 倒掉上清液後，倒扣試管在通風櫥放置隔夜，以乾燥沉澱 DNA。
6. 隔天將試管的 DNA 溶於 100μl ddH<sub>2</sub>O，再放入 4°C 冰箱靜置一天。
7. 隔夜取出 1.5μl 的 DNA，置入以加上溴化乙胺螢光染色劑(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。
8. 將良好品質的 DNA 放入 -20°C 冰箱保存。



## 附錄二:PCR 流程

根據 GeneBank 中的相近物種 *Rhacophorus schlegelii* 與 2005 年盧所使用的引子，利用 FPCR(fast PCR)軟體設計寡核酸引子，進行增幅的片段包括細胞色素 c 次單元一(cytochrome oxidase c subunit 1, COX1)、細胞色素 b (Cytochrome b, cyto b) 與控制區(displacement loop, D-loop) 部分片段。在這三段基因周邊選取保守區段約 25mer 的寡核酸引子。

四對引子的 PCR 反應皆相同，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，循環過程為: 94°C、30 秒，使 DNA 雙股變性解開；50°C、40 秒，使 DNA 與 primer annealing；72°C、2 分鐘，進行 DNA 的延伸工作(extension)。在 35 個循環結束之後，再進行 72°C、10 分鐘，使 DNA 的延伸工作完成。反應產物置於 4°C 冰箱保存。