

太魯閣國家公園珍稀及指標物種  
研究與復育計畫第一期  
兩棲爬蟲類基因條碼建立及多樣性分析

內政部營建署太魯閣國家公園管理處

中華民國九十八年十一月



太魯閣國家公園珍稀及指標物種  
研究與復育計畫第一期  
兩棲爬蟲類基因條碼建立及多樣性分析

執行單位：中華民國國家公園學會

研究主持人：翁慶豐

內政部營建署太魯閣國家公園管理處

中華民國九十八年十一月



## 目次

|                    |     |
|--------------------|-----|
| 目次                 | I   |
| 表次                 | III |
| 圖次                 | V   |
| 摘要                 | VII |
| 第一章 緒論             | 1   |
| 第一節 計畫緣起           | 1   |
| 第二節 計畫目標           | 2   |
| 第二章 調查範圍與研究方法      | 5   |
| 第一節 調查範圍           | 5   |
| 第二節 研究方法           | 8   |
| 第三章 研究結果           | 15  |
| 第一節 文獻收集與回顧        | 15  |
| 第二節 基因條碼建立         | 18  |
| 第三節 基因多樣性分析        | 25  |
| 第四章 結論與建議          | 31  |
| 附錄一 太魯閣國家公園兩棲類動物名錄 | 33  |
| 參考書目               | 35  |

太魯閣國家公園珍稀及指標物種研究與復育計畫第一期－  
兩棲爬蟲類基因條碼建立及多樣性分析

## 表次

|       |                                            |    |
|-------|--------------------------------------------|----|
| 表 2-1 | 土地使用分區計畫面積分配表·····                         | 6  |
| 表 2-2 | 中橫沿線不同海拔採集地點·····                          | 13 |
| 表 3-1 | 兩棲爬蟲類樣本採集之物種及地點分布表·····                    | 17 |
| 表 3-2 | 不同海拔之梭德氏赤蛙親緣關係樣本分佈表·····                   | 26 |
| 表 3-3 | 梭德氏赤蛙12S與16S之Tajima's Method 中性假說檢定結果····· | 26 |

太魯閣國家公園珍稀及指標物種研究與復育計畫第一期  
兩棲爬蟲類基因條碼建立及多樣性分析

## 圖次

|        |                                          |    |
|--------|------------------------------------------|----|
| 圖 2-1  | 太魯閣國家公園土地使用分區計畫圖                         | 7  |
| 圖 2-2  | 蛙類粒線體 12S DNA 序列及引子設計圖                   | 8  |
| 圖 2-3  | 蛙類粒線體 16S DNA 序列及引子設計圖                   | 9  |
| 圖 2-4  | 蛙類粒線體 CO1 DNA 序列及引子設計圖                   | 10 |
| 圖 3-1  | 820林道-楚南氏山椒魚CO1基因條碼序列                    | 19 |
| 圖 3-2  | 砂卡礑-盤古蟾蜍CO1基因條碼序列                        | 20 |
| 圖 3-3  | 蓮花池-中國樹蟾CO1基因條碼序列                        | 20 |
| 圖 3-4  | 砂卡礑-斯文豪氏赤蛙CO1基因條碼序列                      | 21 |
| 圖 3-5  | 台8線133 K-梭德氏赤蛙CO1基因條碼序列                  | 21 |
| 圖 3-6  | 砂卡礑-日本樹蛙CO1基因條碼序列                        | 22 |
| 圖 3-7  | 砂卡礑-褐樹蛙CO1基因條碼序列                         | 22 |
| 圖 3-8  | 砂卡礑-青蛇CO1基因條碼序列                          | 23 |
| 圖 3-9  | 合歡山區-雪山草蜥CO1基因條碼序列                       | 23 |
| 圖 3-10 | 和平林道-呂氏攀蜥CO1基因條碼序列                       | 24 |
| 圖 3-11 | 以粒腺體DNA 12S序列對梭德氏赤蛙之親緣關係樹狀圖              | 27 |
| 圖 3-12 | 以粒腺體DNA 16S序列對梭德氏赤蛙之親緣關係樹狀圖              | 28 |
| 圖 3-13 | 樣區內梭德氏赤蛙mtDNA 12S基因型排列比對圖                | 29 |
| 圖 3-14 | 樣區內梭德氏赤蛙mtDNA 16S基因(Cluster II)與高雄型排列比對圖 | 30 |

太魯閣國家公園珍稀及指標物種研究與復育計畫第一期  
兩棲爬蟲類基因條碼建立及多樣性分析

## 摘要

目前國家公園動物保育研究多以物種名錄建立、族群分布與變遷、棲息地評估等作為經營管理之依據。生物保育的三個層次包括生態多樣性、物種多樣性與基因多樣性，國家公園對保育研究多著重於前兩項，但對基因多樣性卻少有探討。

多樣性的基因是物種適應與演化的重要基礎，基因的多樣性為地理上或生態上的區隔所造成之結果。將現有生態多樣性與物種多樣性之研究成果，溶入基因多樣性之中，以期建立完整生態系研究及並探討其可能變遷之因素。可為國家公園之經營管理提供更有利之基礎。

太魯閣國家公園座面積達九萬二千公頃。海拔高度從 60 公尺到 3740 公尺的南湖大山。在複雜的地理氣候條件下，遂孕育出多樣性的生態環境與生物物種。全區之兩棲類物種，計有 6 科 15 種，約佔全臺灣已知兩棲類物種之 43%。其中超過半數為臺灣特有種或珍貴稀有之保育類物種。

本計畫擇定之研究物種考量物種族群海拔分佈之廣度，以期發現不同族群是否有基因差異者、保育類或珍稀物種且允許優先採樣者、具有其它基因條碼研究可供比對者、可供國家公園管理處建立基因多樣性指標之物種、管理處其它研究計畫所需基因資料者。初步擇定之兩棲類包含日本樹蛙等 9 種，與爬蟲類包括呂氏攀蜥等 11 種。採集地點沿中橫線依不同海拔高度設定樣點。

本研究計劃，就擇定之兩棲爬蟲類物種完成分子標記，建立微動物地理分區建立園區物種之分子標記親緣關係架構，國家公園生態保育之基因多樣性研究。作為國家公園是否受環境影響之指標及管理之參考，作為國家公園特有生物保育及復育之依據。

**基因多樣性、遺傳變異、基因條碼、功能性基因、性別決定基因**

根據本調查之研究結果，針對太魯閣國家公園境內之兩棲類海拔分布調查及長期監測調查等事項，提出下列具體建議。以下分別從立即可行及中長期性建議加以列舉：

- 1、就擇定之兩棲爬蟲類物種完成分子標記，進行國家公園個體、物種、族群和保育單位鑑定，探知物種是否有外來個體的加入，並進一步探討其在國家公園生態系之扮演角色。與已知資料作比較，並建立物種之親緣關係。
- 2、進行擇定物種之分子標記的比較，尋找其間是否有基因變異，確定基因流動範圍，嘗試建立微動物地理分區。
- 3、架構國家公園生態保育之基因多樣性研究。針對此擇定物種之特殊基因或 CO1/ Mt DNA 建立基因條碼，上傳至 NCBI 基因銀行 (Genbank) 或建立國家公園資料庫。

### 中長期性建議

- 1、建議可針對不同海拔高度設立長期監測樣區，長期監測不同人為開發壓力下所造成的兩棲類族群的差異。各樣區地點及環境屬性分列如下：
  - ◎0~500 公尺—砂卡礑溪(溪流、遊憩區)、布洛灣(遊憩區)。
  - ◎500~1,000 公尺—梅園竹村步道(人為開墾區)。
  - ◎1,000~1,500 公尺—蓮花池(自然環境)、洛韶(人為開墾區)。
  - ◎1,500~2,000 公尺—慈恩(人為開墾區)。
  - ◎2,000~2,500 公尺—關原(遊憩區)。
  - ◎2,500 公尺以上—合歡溪上游(自然環境)。
- 2、建議在未來的保育研究中，可針對本研究中橫公路沿線兩棲類豐度較高的地點，深入公路周圍的自然環境進行兩棲類調查，或設置捕捉陷阱，以調查分析公路邊緣與周圍自然環境間兩棲類族群的差異，作為未來設置或改善生物廊道的依據。

- 3、建議針對兩棲類進行焦點物種的評選工作，選取具有指標性物種、護傘種功能的兩棲類為焦點物種，優先列入長期監測及保育的對象，以使在有限的資源下，長期監測環境的變化，並維持、保育園區內的生物棲地與生物多樣性。

太魯閣國家公園珍稀及指標物種研究與復育計畫第一期  
兩棲爬蟲類基因條碼建立及多樣性分析

## 第一章 緒論

### 第一節 研究緣起

目前國家公園動物保育研究多以物種名錄建立、族群分布與變遷、棲息地評估等作為經營管理之依據。生物保育的三個層次包括生態多樣性、物種多樣性與基因多樣性，國家公園對保育研究多著重於前兩項，但對基因多樣性卻少有探討。基因多樣性的是物種適應與演化的重要基礎，基因的多樣性為地理上或是生態上的區隔所造成之結果。將現有生態多樣性與物種多樣性之研究成果，溶入基因多樣性之中，以期建立完整生態系研究及並探討其可能變遷之因素。可為國家公園之經營管理提供更有利之基礎。

太魯閣國家公園座面積達九萬二千公頃。海拔高度從 60 公尺到 3740 公尺的南湖大山。在複雜的地理氣候條件下，遂孕育出多樣性的生態環境與生物物種。兩棲類的數量豐富容易監測，而且不論在水域或陸域生態系統中，都扮演重要的角色。兩棲類由於皮膚具有通透性，及水陸兩棲的生活史特性，使牠們成為反應環境變化的良好指標生物。已知本園區之兩棲類物種，計有 6 科 15 種，約佔全臺灣已知兩棲類物種之 43%。其中超過半數為臺灣特有種或珍貴稀有之保育類物種。

以往台灣國家公園動物保育研究多以物種名錄建立、族群分布與變遷、棲息地評估等作為經營管理之依據。近年來物種的定義以分子生物學、遺傳演化學之觀點之下已有不同詮釋。台灣自 2000 年起推動的生物多樣性方案，就方案「遺傳資源收集與保存」部份，開啟遺傳演化的保育研究，探討物種因為地理空間隔離產生種化及其應用。國家公園常以海拔高度或植被林相作為研究調查與經營管理的分區，也認為大型或可移動較快速動物的分佈就是當地的動物地理分佈，而甚少考量如蝸牛或蛙類等動物之地理分區。例如海拔二千公尺以上的各個山頭之蝸牛種間是否已形成不同品系，被高山溪谷隔離的同種蛙類是否有不同型態等。隔離機制維持的時間夠長，足以產生變異，進一步達到生殖隔離(reproductive

isolation)，甚至使隔離的族群族群形成不同的物種，也就是異域種化 (allopatric speciation) 的過程。

生物多樣性保育的三個層次包括生態多樣性、物種多樣性與基因多樣性，國家公園對前二者已有所認知，但對基因多樣性卻少有探討。目前國家公園並不熟悉某些物種（尤其是珍貴稀有的保育類動物如山椒魚、呂氏攀蜥等）的演化與適應階段，基因庫裡有多少變異，變異之於個體與族群間的流動情形。基因多樣性的價值就建立在同一物種的種間基因變異度。維持某物種的基因多樣性，則該物種對環境有較強的調適度，與其他物種的競爭性及互惠性上有較好的適應能力，因而有助於該物種的生存、繁殖與演化。某物種基因多樣性的維持可使得該物種的族群更容易維持，而生態系內其它族群的基因多樣性能更易維持，則整個生態系的群落多樣性才能維持。若物理環境沒有重大變遷，則該生態系自然發揮功能，提供適宜的生態服務。

本計畫擇定之研究物種考量物種族群海拔分佈之廣度，以期發現不同族群是否有基因差異者、保育類或珍稀物種且允許優先採樣者、具有其它基因條碼研究可供比對者、可供國家公園管理處建立基因多樣性指標之物種、管理處其它研究計畫所需基因資料者。初步擇定之兩棲類包含日本樹蛙等 9 種，與爬蟲類包括呂氏攀蜥等 11 種。採集地點以中橫沿線不同海拔高度做為採集主要地點。

## 第二節 計畫目標

同種的生物生活在不同的區域，常因為地理上或生態上的區隔造成許多不同的族群，族群之間的基因遺傳因為交流的機會降低而具有一定程度的差異，即使在同一族群內，個體之間的變異仍然存在，稱為基因多樣性。利用此基因多樣性可判斷其物種間親緣關係。且這個遺傳的多樣性代表著物種適應環境的潛力，自然狀態下基因的多樣性來自基因的突變，及生殖過程中基因的交換重組，好的基因在大自然的選擇之下被穩定的保存下來。由於瀕臨滅絕的物種，其遺傳多樣性

通常很貧乏，所以在進行保育工作方面，如何的保持、甚至增加物種的遺傳多樣性，以增加物種對環境變異的適應能力，就顯得非常的重要。

分子生物學提供保育生物學者鑑定生物物種的工具，由於高度的遺傳變異及敏感性，而此實作及作為未來利用需仰賴當地資料庫的建立，故本研究利用分子生物學技術分離個體內的組織 DNA 後，利用粒腺體 DNA (mitochondrial DNA, MtDNA) 12S、16S 及 cytochrome B 等遺傳標記，藉以比較不同地區族群間的遺傳變異，及鑑定分布於太魯閣國家公園地區珍稀及指標物種的基因條碼，以此建立專屬於太魯閣國家公園地區珍稀及指標物種的識別碼，以利未來進行太魯閣地區族群遺傳結構比較，並建構專屬於台灣本土的分子指紋資料庫，用以作為後續保育及研究依據。

本研究之目的為：

1. 就擇定物種完成分子標記，進行個體、物種、族群和保育單位鑑定，探知物種是否有外來個體的加入，並進一步探討其在生態系之扮演角色。與已知資料作比較，並建立物種之親緣關係。
2. 進行擇定物種之分子標記的比較，尋找其間是否有基因變異，確定基因流動範圍，建立微動物地理分區。
3. 架構國家公園生態保育之基因多樣性研究。針對此擇定物種之特殊基因或 CO 1/ Mt DNA 建立基因條碼，上傳至 NCBI 基因銀行 (Genebank) 或建立國家公園資料庫。

太魯閣國家公園珍稀及指標物種研究與復育計畫第一期－  
兩棲爬蟲類基因條碼建立及多樣性分析

## 第二章 調查範圍與研究方法

### 第一節 調查範圍

太魯閣國家公園座落於花蓮、臺中及南投三縣，面積達九萬二千公頃。境內地勢高聳，大致由西部的脊樑山脈向東傾斜，其間山巒起伏，二千公尺以上的山區面積約佔全境之半，以太魯閣峽谷、立霧溪、陶賽溪、大濁水南溪及三棧溪流域為主，包含：合歡山群峰、奇萊山連峰、南湖中央尖連峰、北二段群山、太魯閣大山、清水山...等山系。海拔高度從 60 公尺的閣口到 3740 公尺的南湖大山，含括林相有低中海拔的闊葉林、混生林、高海拔的針葉林、高山草原及苔原，以及開墾過後的次生林。在如此複雜的地理氣候條件下，遂孕育出多樣性的生態環境與生物物種。

全區依國家公園區域內資源特性與現有土地利用型態研擬分區計畫，劃分為生態保護區、特別景觀區、史蹟保存區、一般管制區、遊憩區等五種分區，以為訂定保護計畫及利用計畫之基礎(各分區位置與面積，如表2-1、圖2-1 所示)。本研究限於調查人力及兩棲類的分布環境，針對太魯閣國家公園特別景觀區、一般管制區及遊憩區等人車易達地區，設置不同海拔高度的採集樣區，進行兩棲爬蟲類動物之採集工作。

表 2-1 土地使用分區計畫面積分配表

| 分 區 別     |        | 面 積<br>(公頃) | 百 分 比<br>( % ) | 備 註                                              |
|-----------|--------|-------------|----------------|--------------------------------------------------|
| 生態保護區     | 生(一)   | 8,000       | 8.70           | 清水山                                              |
|           | 生(二)   | 35,390      | 38.46          | 南湖中央尖山群                                          |
|           | 生(三)   | 17,850      | 19.40          | 奇萊太魯閣山群                                          |
|           | 生(四)   | 1,600       | 1.74           | 砂山—二子山區                                          |
|           | 生(五)   | 950         | 1.03           | 富田山—立霧主山區                                        |
|           | 生(六)   | 2,450       | 2.67           | 茶岩山—捫山稜脊以東                                       |
| 合 計       |        | 66,240      | 72.00          |                                                  |
| 特別景觀區     | 合計     | 21,640      | 23.53          |                                                  |
| 史蹟保存區     | 合計     | 40          | 0.04           |                                                  |
| 遊 憩 區     | 太魯閣遊憩帶 | 40          | 0.04           | 含遊憩區第一級：太魯閣台地；第三級：和仁、大清水、崇德隧道北口、砂卡礑、長春祠。         |
|           | 天祥遊憩帶  | 100         | 0.11           | 含遊憩區第一級：天祥；第二級：布洛灣、綠水合流；第三級：文山、谷園、蓮花池、西寶、洛韶、華綠溪。 |
|           | 合歡山遊憩帶 | 90          | 0.10           | 含遊憩區第一級：關原、合歡山；第二級：昆陽、小風口；第三級：大禹嶺、慈恩、伍橋、武嶺。      |
|           | 合 計    | 230         | 0.25           |                                                  |
| 一 般 管 制 區 | 管(一)   | 1,300       | 1.41           |                                                  |
|           | 管(二)   | 100         | 0.11           |                                                  |
|           | 管(三)   | 2,400       | 2.61           |                                                  |
|           | 管(四)   | 20          | 0.02           | 西寶松莊                                             |
|           | 管(五)   | 30          | 0.03           | 富世十二鄰、崇德三鄰                                       |
| 合 計       |        | 3,850       | 4.18           |                                                  |
| 總 計       |        | 92,000      | 100            |                                                  |

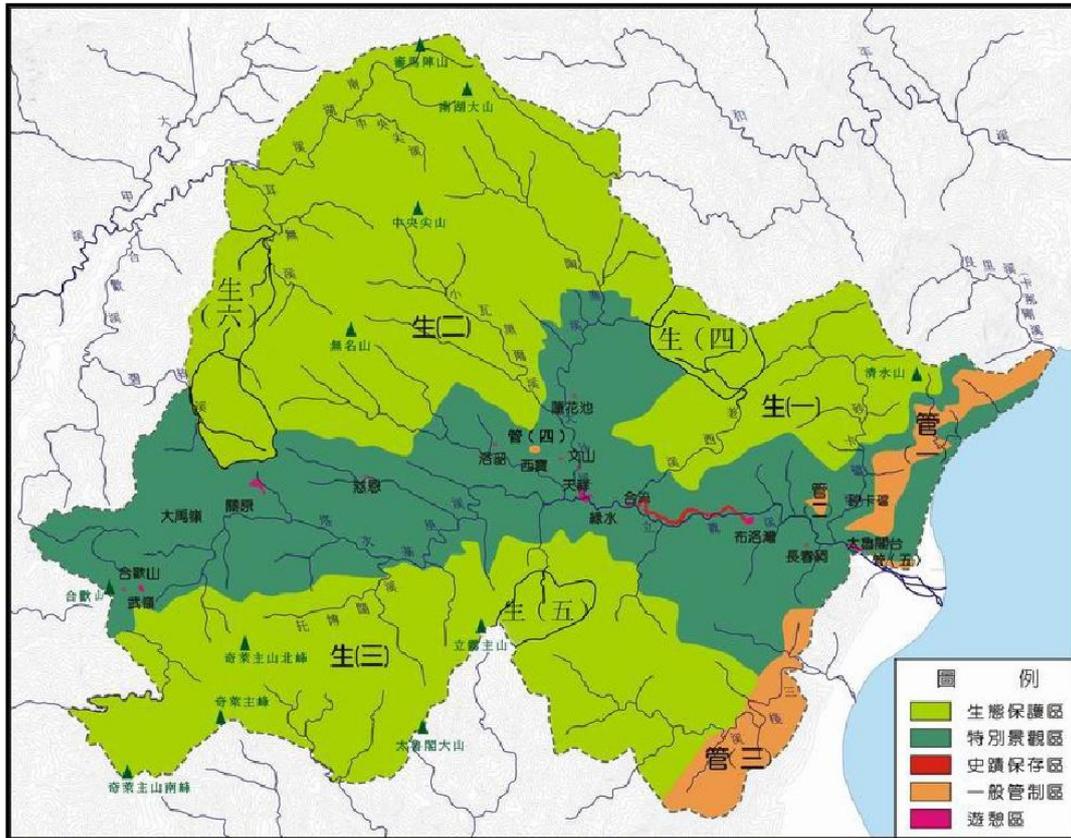


圖 2-1 太魯閣國家公園土地使用分區計畫圖



16S引子的設計 參考NCBI基因庫(Gene Bank)資料庫中已發表的16S mtDNA 序列如下：褐樹蛙 *Buergeria robusta* (AF026370)，日本樹蛙 *Buergeria japonica* (AF026369)，小雨蛙 *Microhyla ornate* (NC\_009422)，斯文豪氏赤蛙 *Rana swinhoana* (AB200953)，盤古蟾蜍 *Bufo bankorensis* (AF159589)，中國樹蟾 *Hyla chinensis* (AY458593)，排列如圖 2-3，取其中保守序列約20個核苷酸的長度設計為專一性引子，其序列如下：

16S F1- 5' - TATAAGACGAGAAGACCC -3'

16S R1- 5' - ACCCTGATCCAACATCGAG -3'

|           |                                                                     |                      |            |      |
|-----------|---------------------------------------------------------------------|----------------------|------------|------|
| AF026370  | TGATCTCCCGTGAAGAAGCGGGGATATTCC                                      | TATAAGACGAGAAGACCC   | ATGGAGCTTC | 135  |
| AF026369  | TGATCTCCCGTGAAGAAGCGGGGATAATTA                                      | TATAAGACGAGAAGACCC   | ATGGAGCTTC | 135  |
| NC_009422 | TGATCTCCCGTGAAGAAGCGGGGATAAAAA                                      | TATAAGACGAGAAGACCC   | ATGGAGCTTT | 1079 |
| AB200953  | TGATCTCCCGTGAAGAAGCGGGGATTTATC                                      | TATAAGACGAGAAGACCC   | ATGGAGCTTT | 133  |
| AB211495  | TGATCTCCCGTGAAGAAGCGGGCATCAAAA                                      | TATAAGACGAGAAGACCC   | ATGGAGCTTT | 535  |
| AB159589  | TAATCTCCCGTGAAGAAGCGGGGATAAAAC                                      | TATAAGACGAGAAGACCC   | ATGGAGCTTT | 218  |
| AY458593  | TAATCTCCCGTGAAGAAGCGGGGATAAACAT                                     | TATAAGACGAGAAGACCC   | ATGGAGCTTT | 1079 |
|           | * * * * *                                                           | * * * * *            | * * * * *  |      |
| AF026370  | AAACTCAA - GGCAACT - - CCCAGTATACAAAC - CCTCATA - T - - - - -       | TTCAAGA              |            | 179  |
| AF026369  | AAACCTTC - AGCAACT - - TTAACTTACAAAT - CCTAATA - T - - - - -        | CTTAAAA              |            | 179  |
| NC_009422 | AAACTCAGTACCAACT - - GCCCAAATAAGAA - - CCTATTA - T - - - - -        | ACTTGCA              |            | 1123 |
| AB200953  | AAACCCAACTACACC - - CTGACCCACACAC - CAACCTAGC - - - - -             | CCCCAAA              |            | 179  |
| AB211495  | AAACTCACTATGCACC - - TCTGTGCC - CCTAC - CA - CATAAC - - - - -       | ACAAGTA              |            | 579  |
| AB159589  | AAACAATGCAGCATCTGCCCCATAACACTAAAATTTCCGAAT - - TTAAGTC - CCTGGAC    |                      |            | 275  |
| AY458593  | AAACTTAATAACATTT - CCTTAAACACTCCTTTCAGAGTACTACATTTACTTCGGC          |                      |            | 1138 |
|           | ***                                                                 | *                    | *          |      |
| AF026370  | GTACTGCGTAACAGTTTTAGGTTGGGGTGACCGGAGCATAAAACAACTCCACGACGT           |                      |            | 239  |
| AF026369  | GCTATGCCCTACCGTTTTGGGTTGGGGTGACCGGAGAAAAATTAACCTCCATGACGA           |                      |            | 239  |
| NC_009422 | GCTATGGTTACTAGTTTTTCGGTTGGGGTGACCGGAGTAAAATTAACCTCCACGATGA          |                      |            | 1183 |
| AB200953  | GATCTGTACGTCAGTTTTAGGCTGGGGGGCCACGGAGTAAAATTAACCTCCACAACAA          |                      |            | 239  |
| AB211495  | GTCTGCAATATTAGTTTTAGGTTGGGGGGACCCAGGAGTACAAATTAACCTCCACAACAA        |                      |            | 639  |
| AB159589  | AGTGTGACTGCAAGTTTTTGGTTGGGGTGACCCAGGAGCATAATATAACCTCCATGCTGA        |                      |            | 335  |
| AY458593  | TTTCTGATTATTAGTTTTAGGTTGGGGTGACCGGAGCAAAAAATTAACCTCCACATTGA         |                      |            | 1198 |
|           | ***                                                                 | ***                  | ***        |      |
| AF026370  | ATAGAACTAA - ACCTTTATCTAAGAGCTACTTCTCTAAGAATCAGCAAACCTGACGTAAAA     |                      |            | 298  |
| AF026369  | ACAGAACTAA - ATCTTTATCTAAGAGCTACTACTCTAAGAATCAGTAAACCTGACGTAAAA     |                      |            | 298  |
| NC_009422 | AAGGAACTAATAACCTAACCTATGAGCTACAGCTCTAAGTATCAACAAATGACT - - AAT      |                      |            | 1241 |
| AB200953  | ATGGG - CTAATACCCTTATCCACGATTTACTAATCTAAGAACCACAAAATTTGATGTTAA      |                      |            | 298  |
| AB211495  | ACGGG - CTAACACCCTTACCACGAGACACAACTCTAAGAATTTACTAAACTAATGCTTA -     |                      |            | 697  |
| AB159589  | A - - - A - GAATCTTTCTAAGCTAAGAACCACAAATCCAAGCATCAATAAATTTGACATCCAT |                      |            | 391  |
| AY458593  | ATGGG - GAACCTCCCCTGAGACCGACTCAACTCTACACCAATAAATTTGACATCAAT         |                      |            | 1257 |
|           | * * * * *                                                           | * * * * *            | * * * * *  |      |
| AF026370  | TGACCCGATA - TCC - GATCATCGAACCAAGTTACCCTGGGGATAACAGCGCAATCCACTT    |                      |            | 356  |
| AF026369  | TGACCCGATT - ATC - GATCAACGAACCAAGTTACCCTGGGGATAACAGCGCAATCCACTT    |                      |            | 356  |
| NC_009422 | TGACCCAATT - ACTTGATCAACGAACCAAGTTACCCTGGGGATAACAGCGCAATCCACTT      |                      |            | 1300 |
| AB200953  | TGACCCGTTA - ACTCGATCAATGAACCAAGTTACCCTGGGGATAACAGCGCAATCCACTT      |                      |            | 357  |
| AB211495  | CGACCCGATA - - TTCGATCAATGAACCAAGTTACCCTGGGGATAACAGCGCAATCCACTT     |                      |            | 755  |
| AB159589  | TGACCCAATATACTTGAACAACGAACCAAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATCCACTT        |                      |            | 451  |
| AY458593  | TGACCCAATATA - TTGATCAACGAACCAAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATCCGCTT      |                      |            | 1316 |
|           | *****                                                               | *****                | *****      |      |
| AF026370  | CAAGAGCCCATATCGACAAGCGGGTTTACGA                                     | CCTCGATGTTGGATCAGGGT | AACCCNGTG  | 416  |
| AF026369  | TGAGAGCTCATATCGACAAGTGGGTTTACGA                                     | CCTCGATGTTGGATCAGGGT | ATCCCGGTG  | 416  |
| NC_009422 | CAAGAGCTCATATCGACAAGTGGGTTTACGA                                     | CCTCGATGTTGGATCAGGGT | ATCCCAAGT  | 1360 |
| AB200953  | CAAGAGCCCATATCGACAAGTGGGTTTACGA                                     | CCTCGATGTTGGATCAGGGT | ATCCTAGTG  | 417  |
| AB211495  | CAAGAGCCCATATCGACAAGTGGGTTTACGA                                     | CCTCGATGTTGGATCAGGGT | ATCCCTGGT  | 815  |
| AB159589  | CAAAAAGCTCATATCGACAAGTGGGTTTACGA                                    | CCTCGATGTTGGATCAGGGT | ATCCCAAGT  | 511  |
| AY458593  | CAAGAGCTCATATCGACAAGCGGGTTTACGA                                     | CCTCGATGTTGGATCAGGGT | ATCCCAAGT  | 1376 |
|           | * * * * *                                                           | * * * * *            | * * * * *  |      |

圖 2-3 蛙類粒線體 16S DNA 序列及引子設計圖(如框內所示)

CO1引子的設計 參考NCBI基因庫(*Gene Bank*)資料庫中已發表的CO1 mtDNA  
序列如下：中國樹蟾 *Hyla chinensis* (NC\_006403)，小雨蛙 *Microhyla ornate*  
(NC\_009422)，排列如圖 2-4，取其中保守序列約20個核苷酸的長度設計為專一  
性引子，其序列如下：

CO1 F - 5' - ATAATTTTCTTTATAGTTATAC -3'

CO1 R - 5' - CCGATTGATGAGCTGTATTTTC -3

另依據Smith(2008)等人的研究另外設計一組CO1的引子如下：

VF1-d - 5' - TTCTCAACCAACCACAARGAYATYGG -3'

VR1-d - 5' - TAGACTTCTGGGTGGCCRAARAAYCA -3'

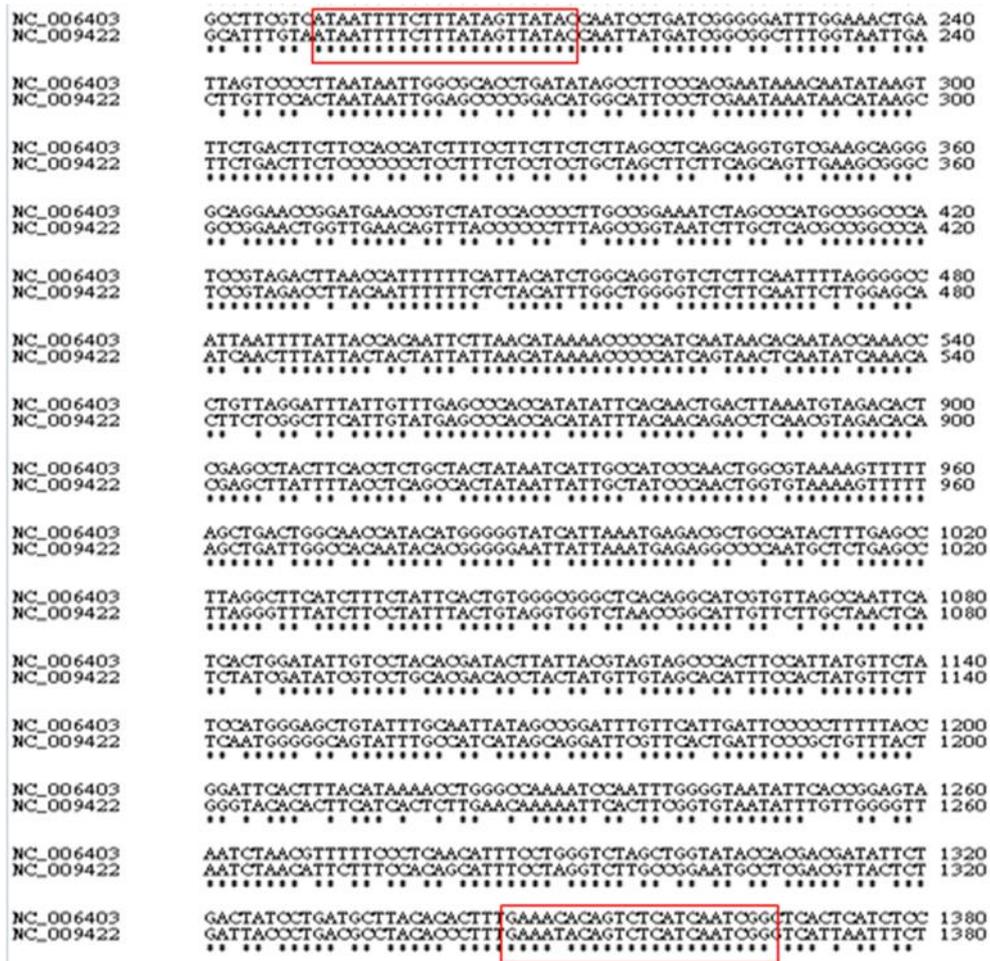


圖 2-4 蛙類粒線體 CO1 DNA 序列及引子設計圖(如框內所示)

## (2) 基因之放大與選殖

1. DNA 純化套組 QuickExtract™ DNA Extraction Solution (Epicentre, USA)
2. 轉型系統 pGEM®-T Vector Systems (Promega, USA)
3. ECOS® competent cell (Yeastern Biotech, Taiwan)
4. Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Genaid, Taiwan)

### DNA純化

DNA 萃取選用Epicentre公司開發的實驗用試劑組QuickExtract™ DNA Extraction Solution進行樣本萃取，其操作流程參考其使用手冊，配合實際操作經驗略做修正。操作步驟為：(1) 剪下少量（少於0.1 公克）蛙大腿之肌肉若樣本保存於高濃度酒精的組織樣本，則在取出後，先浸漬於二次去離子水中10分鐘，將酒精完全溶出去除並軟化組織樣本。利用市售套組QuickExtract™抽取之後，在經由Wizard® DNA purification system純化，(2) 將去酒精洗淨的組織樣本置放於1.5ml 的微量離心管（eppendorf）中，加入200  $\mu$ l 試劑組中的extraction solution，將組織樣本先以小剪刀剪成碎塊，再利用小型均質器將組織樣本研磨均質。研磨的過程必須在低溫下（冰盆中）進行。(3) 均質後移至65°C的水浴槽中水浴15分鐘。水浴時要搖晃樣品兩次，以免產生沈澱導致反應不完全。(d) 搖晃混合後在98°C水浴2 分鐘，再移至冰上。(f) 以3000rpm轉速離心2分鐘。取出上清液並移到新的1.5ml 的微量離心管中，即為genomic DNA。genomic DNA 可長期保存於-20°C中或直接進行PCR 增幅。

### CO 1、12S 及 16S rRNA 之放大和選殖

樣本之genomic DNA，利用聚合酶連鎖反應（polymerase chains reaction，簡稱PCR）技術進行增幅（amplification），以使特定片段大量複製增幅，提供

選殖(clone)或定序反應足夠的反應濃度。利用引子對12S (F - 5' - CTAA AACCCAAAGGACTTG -3' , R - 5' - GCTGCACCTTGACCTGACG -3) ; 16S (F- 5' - TATAAGACGAGAAGACCC -3' , R-5' - ACCCTGATCCAACATCGAG -3) 放大12S 及16S rRNA。進行反應總體積為25  $\mu$ L之PCR反應。0.5  $\mu$ L之DNA模板, 0.5  $\mu$ L 10mM之dNTP, 0.5  $\mu$ L 之F1和R1引子, 0.5  $\mu$ L *Taq* DNA polymerase, 2.5  $\mu$ L 10X PCR buffer, 其餘以去離子水補齊至25  $\mu$ L。條件為initial heating 94  $^{\circ}$ C, 5 min, 35循環之94  $^{\circ}$ C, 30 sec; 45  $^{\circ}$ C, 30 sec; 72  $^{\circ}$ C, 30 sec; 及final extension 72  $^{\circ}$ C, 10 min。CO 1基因之放大, 對於不同物種選擇CO1 (F - 5' - ATAATTTTCTTTATAGTTATAC -3' , R - 5' - CCGATTGATGAGCTGTATTTTC -3' ) 或另一組CO1的引子 (VF1-d - 5' - TTCTCAACCAACCACAARGAYATYGG -3' , VR1-d - 5' - TAGACTTCTGGGTGGCCRAARAAYCA -3' ) , PCR反應總體積同為25  $\mu$ L。CO1 F / R條件為initial heating 94  $^{\circ}$ C, 5 min, 35循環之94  $^{\circ}$ C, 45 sec; 45  $^{\circ}$ C, 45 sec; 72  $^{\circ}$ C, 80 sec; 及final extension 72  $^{\circ}$ C, 10 min。VF1 / VR1-d條件為initial heating 94  $^{\circ}$ C, 5 min, 35循環之94  $^{\circ}$ C, 45 sec; 45  $^{\circ}$ C, 45 sec; 72  $^{\circ}$ C, 50 sec; 及final extension 72  $^{\circ}$ C, 10 min。

放大之 PCR 產物以 Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit 純化後接合至 pGEM<sup>®</sup>-T Vector Systems, 最終轉形至 ECOS<sup>®</sup> competent cell, 塗抹在含有 50 ng/mL Ampicilin, IPTG 和 X-Gal 之平板上進行 12-16 小時 37  $^{\circ}$ C 之藍白篩選。

### (3) 採集地點之建立與採集方法：

以中橫沿線不同海拔高度做為採集主要地點, 設計如表 2-2: 低海拔: 砂卡噹(海拔 0 公尺)、布洛灣(海拔 500 公尺)、天祥(海拔 500 公尺)、西寶(海拔 1000 公尺)、洛韶(海拔 1000 公尺); 中海拔: 148K(海拔 1500 公尺)、新白楊(海拔 1500 公尺)、133K(海拔 2000 公尺)、131K(海拔 2000 公尺)、125K(海拔 2000 公尺)、119K(海拔 2000 公尺); 高海拔: 關原(海拔 2500 公尺)、大禹嶺(海拔 2500 公尺)、特生中心(海拔 3000 公尺)、雪訓中心(海拔 3000 公尺)。採集地皆以 GPS 系統定位其經

緯度與實際之海拔高度。單一採集地(同一海拔)以採集同一物種以 3 隻為目標數量，除判斷並紀錄公母外，一併量測其體重、肛吻長。

表 2-2 中橫沿線不同海拔採集地點

| 海拔分佈    | 採集地點(實際海拔)           | 經緯度                                |
|---------|----------------------|------------------------------------|
| 0 公尺    | 砂卡噹橋下、步道 (<100 公尺)   | 24°09' 42.69" 北; 121° 36' 48.48" 東 |
| 500 公尺  | 布洛灣 (370 公尺)         | 24°10' 06.92" 北; 121° 34' 25.39" 東 |
|         | 天祥 (650 公尺)          | 24°12' 39.52" 北; 121° 29' 10.86" 東 |
| 1000 公尺 | 西寶國小後方水塘 (915 公尺)    | 24°12' 25.26" 北; 121° 28' 52.01" 東 |
|         | 洛韶 (1100 公尺)         | 24°12' 28.84" 北; 121° 27' 02.86" 東 |
| 1500 公尺 | 台 8 線 148k (1380 公尺) | 24°12' 21.64" 北; 121° 25' 21.69" 東 |
|         | 新白楊 (1643 公尺)        | 24°11' 52.25" 北; 121° 25' 57.13" 東 |
| 2000 公尺 | 台 8 線 133k (2000 公尺) | 24°11' 35.57" 北; 121° 23' 02.84" 東 |
|         | 台 8 線 131k (1970 公尺) | 24°11' 21.88" 北; 121° 22' 53.06" 東 |
|         | 台 8 線 119k (2166 公尺) | 24°11' 16.50" 北; 121° 20' 36.95" 東 |
| 2500 公尺 | 關原加油站 (2374 公尺)      | 24°11' 08.21" 北; 121° 20' 33.14" 東 |
|         | 大禹嶺 (2365 公尺)        | 24°10' 49.94" 北; 121° 18' 46.34" 東 |
| 3000 公尺 | 特生中心後溪床下 (3000 公尺)   | 24°09' 43.25" 北; 121° 17' 11.42" 東 |
|         | 合歡山區 (3200 公尺)       | 24°08' 38.33" 北; 121° 16' 48.87" 東 |

#### (4) 基因條碼的建立與基因多樣性判定

針對基因判定親源分成由粒線體 DNA：CO 1、12S 及 16S 等基因設計出該物種專一的引子，利用鏈聚合酶反應 (PCR)、基因定序等技術建立物種間親緣關係並分析其基因多樣性。定序所得之序列，以 BioEdit 軟體(Version 7.0.1) (Hall 1999) 進行排列比對(alignment)。本研究採取二途徑，一是分析待鑑定對象與參考序列的親緣關係；二是比較待鑑定對象的遺傳變異度。本研究以鄰聚 (neighbor-joining)法(Saitou and Nei 1987) 來建構物種的親緣關係，以 Kimura's 2 parameter model (K2P) (Kimura 1980)為分子取代(substitution) 模式，並利用 bootstrap 法(Felsenstein 1985)重複 2,000 次運算來求親緣關係之可信度，若 bootstrap 值大於 70 相當於統計上 95%的信心支持度(Hillis and Bull, 1993)。核苷

酸歧異度 ( $\pi$ , Nucleotide diversity)及遺傳多樣性則以 Tajima's Neutrality Test 為模式來校正計算。鄰聚法、bootstrap 法及核苷酸歧異度的計算皆是用軟體 MEGA 4 (Tamura *et al.* 2007) 來執行。作為比對參考的其他粒線體基因序列，則從 NCBI *GeneBank* 下載，包含的序列、物種與其擷取碼(accession number)。

## 第三章 研究結果

### 第一節 文獻收集與回顧

參照過去的研究資料發現，太魯閣國家公園境內的兩棲類進行詳細的生物多樣性調查，僅在呂光洋等(1983, 1989)、林曜松等(1991, 2005)及楊懿如(2005)對太魯閣國家公園內之動物資源進行調查研究結果中，呈現各調查樣點的兩棲類物種名錄(吳海音, 2003、2004)。依其研究結果顯示，統計太魯閣國家公園全區之兩棲類物種共有山椒魚科(Hynobiidae)2種：臺灣山椒魚(*Hynobius formosanus*)、楚南氏山椒魚(*Hynobius sonani*)，蟾蜍科(Bufonidae)2種：盤古蟾蜍(*Bufo bankorensis*)、黑眶蟾蜍(*Bufo melanostictus*)，狹口蛙科(Microhylidae)1種：小雨蛙(*Microhyla ornate*)，樹蟾科(Hylidae)1種：中國樹蟾(*Hyla chinensis*)，赤蛙科(Ranidae)4種：拉都希氏赤蛙(*Rana latouchii*)、澤蛙(*Rana limnocharis*)、斯文豪氏赤蛙(*Rana swinhoana*)、梭德氏赤蛙(*Rana sauteri*)，樹蛙科(Rhacophoridae)5種：日本樹蛙(*Buergeria japonica*)、褐樹蛙(*Buergeria robusta*)、艾氏樹蛙(*Chirixalus eiffingeri*)、白領樹蛙(*Polypedates megacephalus*)、莫氏樹蛙(*Rhacophorus moltrechti*)，計有6科15種，約佔全臺灣已知兩棲類物種之43%。其中，臺灣山椒魚、楚南氏山椒魚、盤古蟾蜍、褐樹蛙、莫氏樹蛙等5種為臺灣特有種生物，臺灣山椒魚、楚南氏山椒魚等2種為珍貴稀有保育類物種(太魯閣國家公園境內之兩棲類名錄，如附錄一)。

梭德氏赤蛙(*Rana sauteri*)可能為台灣特有種，被歸類於林蛙類群(brown frog complex)。廣泛分佈於台灣，在海拔100~3000公尺都可以發現他們的身影。最早由Boulenger GA於1909發表命名，模式標本產地在台南關仔嶺(Guantzelin)。目前對於梭德氏赤蛙的分類仍存在有一些爭議，如Kuramoto(1984)指出高山地區的與低海拔地區的梭德氏赤蛙族群在分子層級上顯著的差異。

Chou and Lin (1997) 的研究也從形態學的角度來對全島的梭德氏赤蛙族群進行研究，認為可由蝌蚪的形態差異區分出兩個不同的物種，分別是分佈在低海拔（關子嶺）的梭德氏赤蛙和高海拔（阿里山）的多齒赤蛙（*R. multidenticulata*）。張廖年鴻（2007）的研究提到在大禹嶺出現有3種系群（lineages）之梭德氏赤蛙。在楊（2006）之調查報告指出，太魯閣國家公園境內之該物種的分佈可由低海拔直至3500公尺之合歡山，在複雜的地理氣候條件下，可合理推論其族群遺傳結構會有所變化，研究高山地區與低海拔地區的梭德氏赤蛙之後，對於園區內兩棲類之基因多樣性更為了解，所得之資料將對國家公園保育策略及方向有相當程度之助益。

表 3-1 兩棲爬蟲類樣本採集之物種及地點分布表

| 採集物種名稱                                        | 調查地點 |     |    |    |    |      |     |           |     |           |           |           |    |     |     |      |        |      |
|-----------------------------------------------|------|-----|----|----|----|------|-----|-----------|-----|-----------|-----------|-----------|----|-----|-----|------|--------|------|
|                                               | 低海拔  |     |    |    |    | 中海拔  |     |           |     |           | 高海拔       |           |    |     |     |      |        |      |
|                                               | 砂卡礑  | 布洛灣 | 天祥 | 西寶 | 洛韶 | 和平林道 | 蓮花池 | 台八線 148 K | 新白楊 | 台八線 133 K | 台八線 131 K | 台八線 119 K | 關原 | 大禹嶺 | 小風口 | 合歡山區 | 820 林道 | 奇萊山區 |
| 兩棲類                                           |      |     |    |    |    |      |     |           |     |           |           |           |    |     |     |      |        |      |
| 山椒魚科 <i>Hynobiidae</i>                        |      |     |    |    |    |      |     |           |     |           |           |           |    |     |     |      |        |      |
| 楚南氏山椒魚 <i>Hynobius sonani</i>                 |      |     |    |    |    |      |     |           |     |           |           |           |    |     | V   | V    | V      | V    |
| 蟾蜍科 <i>Bufo</i>                               |      |     |    |    |    |      |     |           |     |           |           |           |    |     |     |      |        |      |
| 盤古蟾蜍 <i>Bufo bankorensis</i>                  | V    | V   | V  | V  | V  |      | V   | V         | V   |           | V         | V         | V  |     |     |      |        |      |
| 樹蟾科 <i>Hylidae</i>                            |      |     |    |    |    |      |     |           |     |           |           |           |    |     |     |      |        |      |
| 中國樹蟾 <i>Hyla chinensis</i>                    |      |     |    |    |    |      | V   |           |     |           |           |           |    |     |     |      |        |      |
| 赤蛙科 <i>Ranidae</i>                            |      |     |    |    |    |      |     |           |     |           |           |           |    |     |     |      |        |      |
| 斯文豪氏赤蛙 <i>Rana swinhoana</i>                  | V    | V   | V  | V  | V  |      | V   |           | V   |           | V         |           |    |     |     |      |        |      |
| 梭德氏赤蛙 <i>Rana sauteri</i>                     |      |     |    |    | V  |      | V   | V         | V   | V         | V         |           | V  |     | V   | V    | V      |      |
| 樹蛙科 <i>Rhacophoridae</i>                      |      |     |    |    |    |      |     |           |     |           |           |           |    |     |     |      |        |      |
| 日本樹蛙 <i>Buergeria japonica</i>                | V    | V   | V  | V  | V  |      | V   |           |     |           |           |           |    |     |     |      |        |      |
| 褐樹蛙 <i>Buergeria robusta</i>                  | V    |     |    |    |    |      |     |           |     |           |           |           |    |     |     |      |        |      |
| 莫氏樹蛙 <i>Rhacophorus moltrecht</i>             |      |     |    |    |    |      |     | V         |     | V         |           |           |    |     |     |      |        |      |
| 爬蟲類                                           |      |     |    |    |    |      |     |           |     |           |           |           |    |     |     |      |        |      |
| 赤尾鮎 <i>Trimeresurus stejnegeri stejnegeri</i> | V    |     |    | V  |    |      |     |           |     |           |           |           |    |     |     |      |        |      |
| 龜殼花 <i>Trimeresurus mucrosquamatus</i>        | V    |     |    |    |    |      |     |           |     |           |           |           |    |     |     |      |        |      |
| 青蛇 <i>Cyclophiops major</i>                   | V    |     |    |    |    |      |     |           |     |           |           |           |    |     |     |      |        |      |
| 雪山草蜥 <i>Takydromous hsueshanensis</i>         |      |     |    |    |    |      |     |           |     |           |           |           |    |     |     | V    |        |      |
| 呂氏攀蜥 <i>Japalura luei</i>                     |      |     |    |    |    | V    |     |           |     |           |           |           |    |     |     |      |        |      |

(採集時間：98年5月至11月)

註：V表示實際採集紀錄

## 第二節 基因條碼建立

DNA條碼 (DNA barcode) 一種創新、簡便、迅速的鑑識系統：粒線體基因的片段來標示物種。提供類似圖書出版的ISBN全球通用碼，讓世界上每個物種都有獨特的身份證。生命條碼 (Barcode of Life, 簡稱BOL) 由加拿大分子生物多樣性研究所、演化生物學家艾伯 (Paul D. N. Hebert) 於2003年提出。赫伯特：「在熱帶地區長期工作，我已經面臨多數生物學家感受到的挫折：對周遭的生命系統卻一無所知。」以避開繁瑣不便的分類工作。此生物辨識系統已迅速獲得「聯合國經濟合作發展組織 (OECD)」的「全球生物多樣性資訊機構 (GBIF)」重視與支援。2004年到2006年間，在多種國際期刊熱烈討論爭辯後，「生命條碼 (BOL)」議題席捲全球。目前所建置的資料庫中已有二十九萬條DNA條碼，涵蓋超過四萬種生物資料。也許有一天，研究人員只要帶著如影集「星艦奇航」中的掌上型解碼器，在野外就能進行簡單的DNA檢測，而能判定物種。

粒線體存在於生物的細胞之中，粒線體是一個很好的遺傳鑑定工具，因為大多數細胞中都有上百個以上的粒線體，但只有一組染色體，因此等量的樣品中，粒線體的DNA更容易被放大和使用。且粒線體DNA的演變相對於染色體DNA快，因此累積更多資訊可用為鑑定物種。粒線體基因組包括12S rRNA、16S rRNA、22個tRNA、13個蛋白質基因及D環區。13個蛋白質基因包括ND1、ND2、COI、COII、ATPase8、ATPase6、COIII、ND3、ND4L、ND4、ND5、ND6及Cytb。目前以CO-I基因 (cytochrome c oxidase subunit 1)，為國際公認的生物基因條碼。建立完成後的基因條碼更可與台灣生物多樣性資訊網 (TaiBNET) 結合，以提供更完整基礎科學資料，促進國際間科學與技術有關資料之標準化與相互合作交流。

目前已針對太魯閣國家公園樣區內兩棲爬蟲類之目標物種，完成COI基因的部份基因序列解碼如下列所示：820林道-楚南氏山椒魚(圖3-1)、砂卡礑-盤古蟾蜍(圖3-2)、蓮花池-中國樹蟾(圖3-3)、砂卡礑-斯文豪氏赤蛙(圖3-4)、台8線133

K-梭德氏赤蛙(圖3-5)、砂卡礑-日本樹蛙(圖3-6)、砂卡礑-褐樹蛙(圖3-7)、砂卡礑-青蛇(圖3-8)、合歡山區-雪山草蜥(圖3-9)、和平林道-呂氏攀蜥(圖3-10)。

在NCBI之GeneBank資料庫中，太魯閣國家公園內所採集到的目標物種皆無COI基因的序列上傳建檔，因此本研究所呈現之基因條碼序列，不僅可供國家公園自然保育與管理運用，未來亦將陸續上傳至NCBI，對於建立台灣國家公園物種之生命條碼有所貢獻。

```

CACTTCACTTAGCAGGTATTTTCATCAATTCTTGGGGCTATTAATTTTATTACAACCTCAA
TTAATATAAAAACCCCTATCAATATCACAATATCAAACACCCCTATTTGTCTGATCAGTAT
TAATCACTGCTATTCTCCTCTTACTCTCATTACCAGTCCTTGCTGCAGGAATTACAATAC
TCTTAACAGACCGAAACTTAAACACTACATTCTTTGACCCTGCAGGAGGAGGAGACCCTG
TTCTTTACCAACACCTCTTCTGGTTTTTTGGCCATCCAGAGGTCTATATTCTTATTCTCC
CAGGATTTGGGATAATTTCTCATATTGTTACATATTATTCGGCAAAAAAAGAACCCTTTG
GATATATAGGTATAGTATGAGCTATAATATCAATCGGATTACTAGGATTTATTGTTTGAG
CCCACCATATATTTACAGTTGATCTTAATGTTGACACACGAGCTTATTTTACATCAGCTA
CAATAATTATTGCTATCCCCACTGGGGTAAAAGTATTTAGCTGATTAGCAACAATACATG
GAGGATCAATTAAATGAGATGCTGCAATATTATGAGCTTTAGGTTTTATTTTTTTATTTA
CCGTTGGCGGATTAACGGCATTGTTCTTGCCAATTCATCATTAGATATTGTCCTACATG
ATACTTATTATGTAGTGGCACATTTTCATTACGTTTTAT

```

圖 3-1 820林道-楚南氏山椒魚COI基因條碼序列

TACCCTATATCTTATTTTTGGGGCCTGAGCAGGGATAGTAGGAACTGCCCTT  
AGCCTCCTTATCCGAGCTGAGCTGAGTCAACCCGGCTCCCTCTTGGGCGAT  
GATCAGATTTATAATGTCATTGTTACCGCCCACGCCTTCGTCATAATTTTCTT  
TATGGTCATGCCATCCTAATCGGAGGCTTCGGTAACTGACTTGTCCCCCTG  
ATAATTGGGGCCCCTGACATAGCCTTCCCCCGAATGAACAACATAAGCTTTT  
GATTACTCCCCCATCATTCTACTCCTCTTGGCATCCGCCGGAGTCGAAGC  
AGGAGCAGGAACCGGCTGAACTGTATACCCCCCCTGGCTGGGAACCTTG  
CACACGCAGGCCATCAGTCGACTTAACCATTTTTTCCCTCCACCTTGCGG  
GTGTATCATCTATCCTAGGCGCAATTAATTTTATTACAACAACCCTAACATG  
AAGCCACCATCAATGACTCAATACCAAACACCCTTATTTGTGTGATCCGTCT  
TGATTACTGCTGTTTTACTCCTACTCTCCCTGCCAGTCCTCGCTGCAGGAAT  
CACTATACTCCTCACTGACCGAAACCTAAACACAACATTCTTTGACCCTGCT  
GGCGGAGGCGACCCCATCCTCTATCAACACCTCTTT

圖 3-2 砂卡礑-盤古蟾蜍C01基因條碼序列

TACTCTATACTTGGTATTTGGGGCTTGGGCTGGCATAGTAGGCACAGCCCTC  
AGCCTCCTAATTCGAGCAGAATTAAGCCAGCCTGGCTCCCTTCTAGGTGAC  
GATCAAATCTATAATGTCATCGTCACGGCTCACGCCTTCGTCATAATTTTCTT  
TATGGTTATACCAATCCTTATTGGGGGATTTGGAACTGACTAGTCCCCTTAA  
TAATTGGCGCACCTGATATAGCCTTCCCACGAATAAACAATATAAGCTTCTG  
ACTTCTTCCACCATCTTTTCTTCTTCTTAGCCTCAGCAGGTGTTGAGGCA  
GGAGCAGGAACCGGATGAACTGTCTATCCACCCCTTGCCGGAAATCTAGCC  
CATGCCGGCCCATCCGTAGACTTAACCATTTTTTTCATTACATCTGGCAGGTG  
TCTCTTCAATTTTAGGAGCTATTAATTTTATTACCACAATTCTTAACATGAAA  
CCCCATCAATAACACAATACCAAACCCCGCTATTTGTTTGATCTGTTCTAAT  
CACTGCTGTACTTCTACTTCTTTCTCTCCCCGTGCTAGCAGCGGGTATTACC  
ATACTACTCACGGACCGAAACCTCAACACCACATTTTTTCGACCCGGCAGGA  
GGAGGGGACCCCGTACTATACCAACACTTATTC

圖 3-3 蓮花池-中國樹蟾C01基因條碼序列

GACTCTATACCTAATCTTTGGCGCCTGAGCCGGGATAATCGGAACAGCCTTA  
 AGCCTGCTAATTCGAGCGGAGCTCAGCCAACCAGGAACCCTGCTCGGCGA  
 CGACCAAATCTATAATGTAATCGTAACCGCCACGCATTTGTAATAATCTTCT  
 TTATGGTTATGCCTGTTTTGATCGGAGGCTTCGGCAACTGACTAGTCCCCTT  
 AATAATCGGGGCTCCTGACATAGCCTTCCCACGAATAAATAATATAAGCTTC  
 TGACTGCTTCCACCCTCCTTCTTCTCCTATTAGCATCTTCTATGGTAGAAGC  
 CGGGGCTGGCACAGGCTGAACTGTCTATCCCCCCTGGCAGGGAACCTGG  
 CTCATGCCGGCCCATCCGTAGACCTAGCTATCTTCTCCCTCCACCTAGCCGG  
 AATTCATCTATCCTCGGGGCTATTAACCTTTATTACAACAATTATTAATATAAA  
 GCCCCAGCCATCGCCCAATACCAAACCTCCCCTCTTTGTCTGATCCGTTTTA  
 ATCACCGCCATTCTTCTACTACTTTCTCTTCTCCTGTTTTAGCCGCCGGAATCAC  
 GATACTTCTAACTGATCGAAACCTTAATACCACCTTTTTTTGACCCAGCAGGA  
 GGCGGAGACCCGGTCCTGTATCAACACCTGTTC

圖 3-4 砂卡礑-斯文豪氏赤蛙C01基因條碼序列

TATTTGTATGATCTGTCCTAATTACTGCAGTCTTACTACTCCTTTCTCTTCTCCTGCTTAG  
 CTGCAGGAATTACTATACTATTAACAGACCGAAATTTAAATACCTCTTTTTTTGACCCGG  
 CGGGAGGAGGAGACCCAATCCTTTATCAGCACTTATTCTGGTTTTTTGGTCACCCCGAGG  
 TATATATTCTTATTTTACCAGGCTTCGGCATAATTTACATATTGTAACCTTATTATGCTG  
 GTAAAAAGGAACCATTTCGGCTACATGGGTATAGTTGAGCTATAATATCAATTGGGTTTT  
 TAGGGTTTATTGTCTGAGCTCATCATATGTTTACTGTCCGCATAGACGTCGACACTCGAG  
 CCTACTTTACCTCAGCTACTATAATTATTGCCATCCCAACAGGAGTTAAAGTCTTTAGTT  
 GACTTGCAACGCTTCACGGCGGAACAACCTAAATGGGACGCTGCTATACTTTGAGCTCTTG  
 GTTTTATTTTTTTATTTACAGTGGGGGGCCTAACAGGCATTATTTTAGCTAATTCCTCAC  
 TTGATATTGTCCTTCATGACACATACTACGTAGTTGCACACTTTCCTATGTATTATCAA  
 T

圖 3-5 台8線133 K-梭德氏赤蛙C01基因條碼序列

TACCTTATACTTAATTTTTGGTGCGTGGGCAGGTATAATTGGAAGTGCCCTTA  
GCCTTTTAATTCGAGCTGAATTAGCTCAACCTGGATCACTGCTCGGTGACG  
ACCAAATTTATAATGTAATTGTTACCGCCCACGCTTTTGTATAATTTTCTTTA  
TAGTTATACCAATTTTAATTGGTGGATTCGGGAAGTACTTATTCTCTAATA  
ATTGGTGCCCCAGACATGGCCTTCCCTCGAATAAATAATATAAGCTTCTGAC  
TTCTTCCACCCTCATTTCTTCTTTTACTAGCCTCTTCTACTGTAGAAGCGGGT  
GTAGGAACCGGTTGAACAGTTTACCCCCATTAGCAGGTAATCTTGCTCAT  
GCAGGCCCATCAGTAGACTTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGTGTATC  
ATCAATTTTAGGGGCCATCAACTTTATTACTACAATTTTAAATATAAAACCGT  
CATCAACTACACAATATCAAACCCCCCTGTTTGTGGATCTGTTCTAATTACC  
GCTGTTCTTCTTCTTCTATCTCTTCTGTTTGTAGCTGCAGGAATTACCATACT  
TTAACAGACCGTAATTTAAATACTACATTCTTTGACCCTGCTGGAGGAGGA  
GATCCAGTTCTTTACCAACACCTTTTT

圖 3-6 砂卡礑-日本樹蛙C01基因條碼序列

CACCTTATATTTAATTTTTGGCGCATGGGCCGGAATAATCGGCACCGCACTT  
AGTCTTCTAATTCGGGCTGAACTCGCTCAGCCCGGGTCCCTCCTGGGAGAC  
ACCAAATTTATAATGTAATTGTCACTGCCATGCCTTTGTATAATTTTCTTTA  
TGGTCATGCCTATCCTAATCGGCGGTTTCGGAAACTGATTGGTCCCCCTAAT  
AATCGGGGCTCCTGATATAGCCTTTCCCCGCATAAACAACATAAGTTTCTGA  
CTACTACCTCCCTCATTTCTTCTACTACTAGCTTCCCTCTACAGTTGAAGCAG  
GAGCTGGCACAGGGTGAAGTGTTTACCCCCCCTAGCAGGAAATCTTGCTC  
ACGCCGGACCCTCTGTAGACTTAGCTATTTTTTCCCTTCACCTTGCAGGGAT  
CTCCTCGATTCTAGGGGCTATCAACTTCATTACAACCTATTCTGAACATAAAG  
CCTGCCTCAACGACACAATACCAAACACCCCTCTTTGTGTGATCTGTGCTA  
ATTACAGCAGTATTACTACTTCTGTCCCTTCCAGTCTTAGCTGCGGGGATTA  
CAATGCTTCTCACAGACCGCAACTTAAACACCACCTTTTTTGACCCAGCAG  
GCGGAGGTGACCCAGTATTATACCAACACCTATTT

圖 3-7 砂卡礑-褐樹蛙C01基因條碼序列

AACCCTATACCTACTATTCGGGCGCATGATCTGGCCTAATTGGGGCCTGCCTA  
 AGCATTCTTATACGAATAGA ACTAACCCAACCAGGGTCGCTACTAGGCAGC  
 GACCAAATCTTTAATGTTCTAGTAACAGCCCATGCTTTCATCATAATTTTCTT  
 TATAGTAATACCCATTATAATCGGGGGCTTTGGAAACTGACTAATCCCCTTAA  
 TAATCGGAGCACCGGACATAGCCTTCCCCCGCATAAATAATATGAGTTTTTG  
 ACTACTTCCACCAGCACTACTCCTCCTTCTATCTTCATCTTATGTAGAAGCCG  
 GTGCCGGTACAGGATGAACAGTATACCCCCCCTATCAGGAAATCTAGTAC  
 ACTCAGGCCCATCAGTAGACCTAGCAATCTTCTCCCTACACCTAGCAGGCG  
 CCTCCTCCATCCTGGGAGCAATTA ACTTCATTACAACATGTATCAACATAAA  
 ACCTAAAGCTATACCAATATTCAATATCCC ACTATTCGTTTTGATCAGTACTTA  
 TCACTGCCATTATACTACTACTGGCCTTGCCAGTACTAGCAGCGGCAATCAC  
 CATACTACTAACAGATCGAAACCTCAACACTTCTTTCTTTGACCCCTGCGGA  
 GGAGGGGACCCTGTACTGTTCCAACACCTGTTC

圖 3-8 砂卡礑-青蛇C01基因條碼序列

TATTTGTATGATCTGTCC TAATTACTGCAGTCTTACTACTCCTTTCTCTTCCTGTCTTAG  
 CTGCAGGAATTACTATACTATTAACAGACCGAAATTTAAATACCTCTTTTTTTGACCCGG  
 CGGGAGGAGGAGACCCAATCCTTTATCAGCACTTATTCTGGTTTTTTGGTCACCCCGAGG  
 TATATATTCTTATTTTACCAGGCTTCGGCATAATTTACATATTGTA ACTTATTATGCTG  
 GTAAAAGGAACCATTTCGGCTACATGGGTATAGTTTGAGCTATAATATCAATTGGGTTTT  
 TAGGGTTTATTGTCTGAGCTCATCATATGTTTACTGTCCGCATAGACGTCGACACTCGAG  
 CCTACTTTACCTCAGCTACTATAATTATTGCCATCCCAACAGGAGTTAAAGTCTTTAGTT  
 GACTTGCAACGCTTCACGGCGGAACA ACTAAATGGGACGCTGCTATACTTTGAGCTCTTG  
 GTTTTATTTTTTTTATTTACAGTGGGGGGCCTAACAGGCATTATTTTAGCTAATTC TTCAC  
 TTGATATTGTCCTTCATGACACATACTACGTAGTTGCACACTTTC ACTATGTATTATCAA  
 T

圖 3-9 合歡山區-雪山草蜥C01基因條碼序列

CACCATGTA CTTCCCTATTCGGGACTGCAGCTGGCCTCACTGGGTC ACTGGTT  
AGCCTTCTTGTCCGTACACA ACTAATTCAGCCTGGACAA ACCATCGGAGGG  
GACTCCCTGTACAATGTCTTTATCACATTTTCATGCCCTCGTTATAATTTTCTTT  
ATAGTCATACCAATCATGATCGGCGGATTCGGAAACTGGCTGATTCCACTTA  
TACTCGGAGCCCCAGACATAGCATTC CCGCGAATAAACAACATAAGCTTCT  
GACTTCTACCGCCATCATTCTTCTTTTACTTTTATCCTCTGGGTT CGAAGCC  
GGGGTCGGCACCGGATGAACTATTTATCCGCCACTATCAAACAACACTGCC  
CACTGCGGGCCGTCCATAGATCTGGCCATCTTTTCTCTACACTTAGCAGGTG  
CCTCCTCAATTATGGCCGCCATCAACTTTATTACTACTTGTATTAACATAAGC  
CCAAATCTCACCTCACCATACAACTGGCCTTTATTTGTCTGATCCGTGTTCT  
TCACCGCCATCCTTCTGCTACTGTCACTTCCTGTGTTAGCTGCAGCAATCAC  
CATGCTTCTTACAGACCGAAATCTCAACACATCATTCTTGAGCCCTCAGGG  
GGCGGAGACCCCGTCCTATTTCAACACCTGTTC

圖 3-10 和平林道-呂氏攀蜥C01基因條碼序列

### 第三節 基因多樣性分析

本試驗以太魯閣國家公園內不同海拔採集到之梭德氏赤蛙為研究對象(表 3-2)，將粒線體DNA中12S與16S基因選殖定序後，分別得到其親緣關係如圖 3-11(12S)、圖 3-12(16S)。以mt DNA 12S序列所得之親緣關係樹狀圖可知：調查樣區內之梭德氏赤蛙可分為兩基因型，一種為廣泛分佈型(Cluster I)，並與NCBI上擷取碼(accession number) DQ359976在高雄採集而發表之基因序列只有一個核苷酸的差異，推測可能是單純的點突變或定序上的誤差。另一基因型的梭德氏赤蛙可能在調查樣區內為侷限性分佈(Cluster II)，其12S之序列與廣泛分佈型之間約有10%的差異(圖 3-13)。若以mt DNA 16S序列所得之親緣關係分析，亦可得到兩種基因型的呈現，其分佈的情形與mt DNA 12S所得相符，但Cluster II之16S與NCBI上擷取碼(accession number) AB211495在高雄採集而發表之基因序列已有12%的差異(圖 3-14)。

若以MEGA 4中Tajima's Neutrality Test分析所有太魯閣國家公園內採集之梭德氏赤蛙樣本的核苷酸歧異度 ( $\pi$ , Nucleotide diversity)可發現(表3-3)，整體的核苷酸歧異度分別為0.137745 (12S)與0.089409 (16S)，若進一步分析台8線133 K的樣本，顯示核苷酸歧異度分別提高為0.216702 (12S)與0.174222 (16S)，16S的中性假說檢定(Neutral hypothesis test)更呈現0.2420592的正值，可能代表該地點族群正面臨possible balancing selection或族群正在分化(population subdivision)。

表 3-2 不同海拔之梭德氏赤蛙親緣關係樣本分佈表

| 梭德氏赤蛙 <i>Rana sauteri</i> | 調查地點 |              |              |              |              | 樣本<br>合計 |
|---------------------------|------|--------------|--------------|--------------|--------------|----------|
|                           | 低海拔  | 中海拔          |              |              |              |          |
|                           | 洛韶   | 台八線<br>133 K | 台八線<br>131 K | 台八線<br>125 K | 台八線<br>119 K |          |
| mt DNA 12S                | 1    | 12           | 13           | 2            | 1            | 29       |
| mt DNA 16S                | 1    | 10           | 15           | 1            | 1            | 28       |

表 3-3 梭德氏赤蛙 12S 與 16S 之 Tajima's Method 中性假說檢定結果

|          | m  | S   | $p_s$    | $\Theta$ | $\pi$    | D         |
|----------|----|-----|----------|----------|----------|-----------|
| 12S      | 29 | 123 | 0.715116 | 0.182095 | 0.137745 | -0.940014 |
| 12S-133K | 12 | 123 | 0.715116 | 0.236803 | 0.216702 | -0.396840 |
| 16S      | 28 | 131 | 0.451724 | 0.116081 | 0.089409 | -0.892972 |
| 16S-133K | 10 | 141 | 0.470000 | 0.166138 | 0.174222 | 0.242059  |

The Tajima test statistic was estimated using MEGA4. All positions containing gaps and missing data were eliminated from the dataset (Complete deletion option). The abbreviations used are as follows: m = number of sites, S = Number of segregating sites,  $p_s = S/m$ ,  $\Theta = p_s/a_i$ , and  $\pi$  = nucleotide diversity. D is the Tajima test statistic.

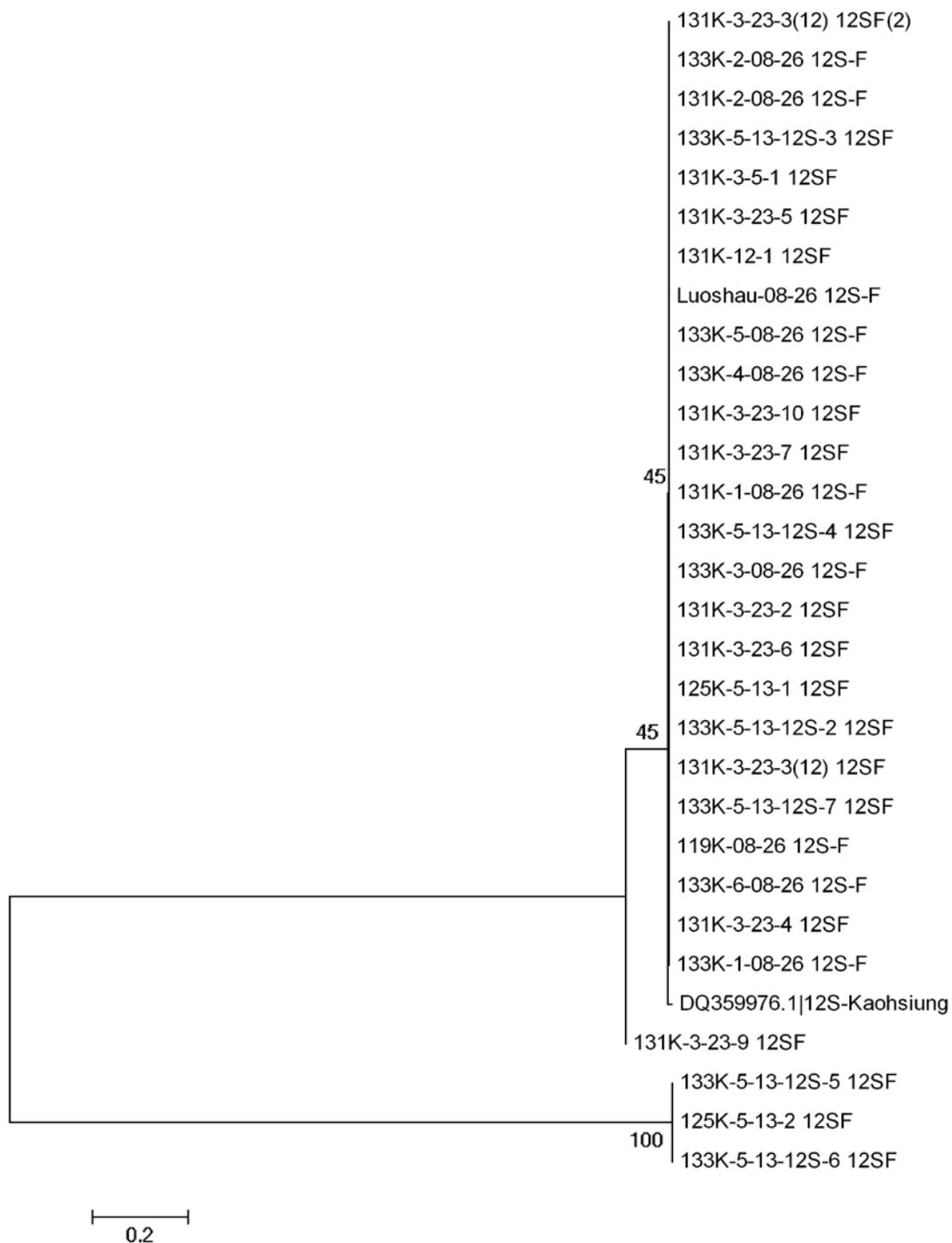


圖 3-11 以粒腺體DNA 12S序列對梭德氏赤蛙之親緣關係樹狀圖

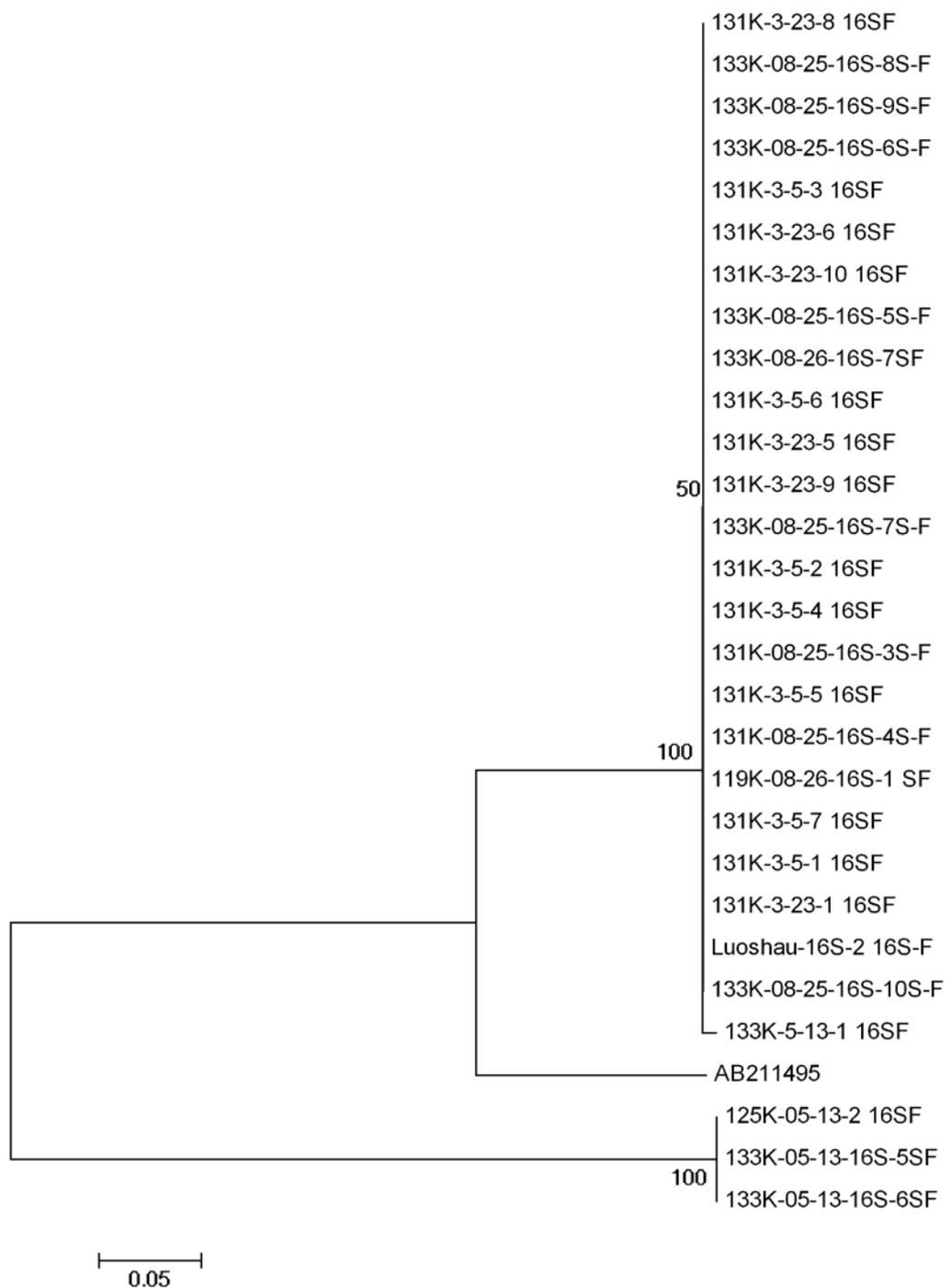


圖 3-12 以粒腺體DNA 16S序列對梭德氏赤蛙之親緣關係樹狀圖

Rana sauteri 12S seqsequence alignment within Taroko National Park

Identities = 162/189 (85%), Gaps = 5/189 (2%)

```

5-13-1_12SF      GCTGCACCTTGACCTGACGTGCTGATGGT---GAATCATTAAAGCTTACTGCGGGCGTTCA 57
5-13-2_12SF      GCTGCACCTTGACCTGACGTATTGACGAATTGGGGTCATTGAGCCTACTGTAAACATTCA 60
*****
                    *** *      * ***** ** ***** * *****

5-13-1_12SF      CATGGTAAGCTTTCGACGGAGGTATACAGACTGATGGGCGAGGGATGGTTAGGTGAAGCG 117
5-13-2_12SF      CACGGTAGGCTTTCGACGGAGGTATACAGACTGATGAGCAAGGGTGGTGGGGTATAGCG 120
** *****

5-13-1_12SF      GGGATCATCGATTATAGAACAGGCTCCTCTAGCGGGTGGGACACCGTCAAGTCCTTTGG 177
5-13-2_12SF      GGGATCATCGATTAAAGAACAGGCTCCTCTAGGGGGTGGGACACCGTCAAGTCCTTTGG 180
*****

5-13-1_12SF      GTTTTAAGC 186
5-13-2_12SF      GTTTTAAG- 188
*****

```

圖 3-13 樣區內梭德氏赤蛙mtDNA 12S基因型排列比對圖



## 第四章 結論與建議

本研究以中橫沿線不同海拔高度做為採集地點，目前採集之結果如表 3-1 所示。其中我們發現梭德氏赤蛙分布的地點主要海拔較高的地區，如133K(海拔2000公尺)、131K(海拔2000公尺)、大禹嶺(海拔2500公尺)、雪訓中心(海拔3000公尺)等。與楊 (2006)之調查報告大致相符。梭德氏赤蛙之分布型態呈現間斷分布的型態，此一分佈型態、可能導致物種在基因交流上會較低，不若盤古蟾蜍等連續的分布型態兩棲類。而在本研究在基因多樣性判定的結果表 3-3中，顯示梭德氏赤蛙在不同樣點之間的基因交流程度偏低，此一結果顯示梭德氏赤蛙僅分佈情況不但是呈現間斷分布，其基因交流亦有可能因地形阻隔而受到限制，進一步分析樣點之核苷酸歧異度更發現，有些地點之族群正面臨possible balancing selection或族群正在分化(population subdivision)。

目前已對太魯閣國家公園園區內之兩棲爬蟲類共十種，包括目前數量相當稀少、具有重要保育價物種，如楚南氏山椒魚，呂氏攀蜥及中國樹蟾等，完成可做為基因條碼序列之CO1基因部份序列解碼，並將陸續上傳至NCBI Barcodes database。本研究所採用之實驗平台，未來可繼續運用於園區內其他物調查，進一步建立國家公園內之資料庫。

### 立即可行之建議

- 1、就擇定之兩棲爬蟲類物種完成分子標記，進行國家公園個體、物種、族群和保育單位鑑定，探知物種是否有外來個體的加入，並進一步探討其在國家公園生態系之扮演角色。與已知資料作比較，並建立物種之親緣關係。
- 2、進行擇定物種之分子標記的比較，尋找其間是否有基因變異，確定基因流動範圍，嘗試建立微動物地理分區。
- 3、架構國家公園生態保育之基因多樣性研究。針對此擇定物種之特殊基因或 CO1/ Mt DNA 建立基因條碼，上傳至 NCBI 基因銀行 (Genbank) 或建立國家公園資料庫。

### 中長期性建議

- 1、建議可針對不同海拔高度設立長期監測樣區，長期監測不同人為開發壓力下所造成的兩棲類族群的差異。各樣區地點及環境屬性分列如下：
  - ◎0~500 公尺—砂卡礑溪(溪流、遊憩區)、布洛灣(遊憩區)。
  - ◎500~1,000 公尺—梅園竹村步道(人為開墾區)。
  - ◎1,000~1,500 公尺—蓮花池(自然環境)、洛韶(人為開墾區)。
  - ◎1,500~2,000 公尺—慈恩(人為開墾區)。
  - ◎2,000~2,500 公尺—關原(遊憩區)。
  - ◎2,500 公尺以上—合歡溪上游(自然環境)。
- 2、建議在未來的保育研究中，可針對本研究中橫公路沿線兩棲類豐度較高的地點，深入公路周圍的自然環境進行兩棲類調查，或設置捕捉陷阱，以調查分析公路邊緣與周圍自然環境間兩棲類族群的差異，作為未來設置或改善生物廊道的依據。
- 3、建議針對兩棲類進行焦點物種的評選工作，選取具有指標性物種、護傘種功能的兩棲類為焦點物種，優先列入長期監測及保育的對象，以使在有限的資源下，長期監測環境的變化，並維持、保育園區內的生物棲地與生物多樣性。

附錄一、太魯閣國家公園兩棲類動物名錄

有尾目

山椒魚科

臺灣山椒魚 *Hynobius formosanus* ◎ II #

楚南氏山椒魚 *Hynobius sonani* ◎ II #

無尾目

蟾蜍科

盤古蟾蜍 *Bufo bankorensis* ◎ #

黑眶蟾蜍 *Bufo melanostictus*

樹蟾科 中國樹蟾 *Hyla chinensis* #

狹口蛙科 小雨蛙 *Microhyla ornata* #

赤蛙科

斯文豪氏赤蛙 *Rana swinhoana* #

梭德氏赤蛙 *Rana sauteri* #

澤蛙 *Rana limnocharis*

拉都希氏赤蛙 *Rana latouchii*

樹蛙科

日本樹蛙 *Buergeria japonicus* #

褐樹蛙 *Buergeria robusta* ◎ II #

艾氏樹蛙 *Chirixalus eiffingeri*

莫氏樹蛙 *Rhacophorus moitrehti* ◎ II #

白領樹蛙 *Polypedates megacephalus*

一、◎台灣特有種 ○台灣特有亞種。

二、保育類別係參考行政院農業委員會公告指定「保育類野生動物名錄」，其中「I」瀕臨絕種野生動物；「II」珍貴稀有野生動物；「III」其他應予保育之野生動物。

三、文獻與本研究調查出現過之物種以「#」。

太魯閣國家公園珍稀及指標物種研究與復育計畫第一期  
兩棲爬蟲類基因條碼建立及多樣性分析

## 參考書目

- 呂光洋。1983。太魯閣國家公園動物生態資源調查。內政部營建署太魯閣國家公園管理處七十二年度研究報告。
- 呂光洋、張巍薩、林政彥。1989。太魯閣國家公園大合歡山地區山椒魚調查。內政部營建署太魯閣國家公園管理處七十八年度研究報告。
- 吳海音。2003。太魯閣國家公園保育研究計畫的檢討與展望。內政部營建署太魯閣國家公園管理處九十二年度研究報告。
- 吳海音。2004。太魯閣國家公園高山地區動物資源基礎調查。內政部營建署太魯閣國家公園管理處九十三年度研究報告。
- 林曜松、陳擎霞、盧堅富、梁輝石。1991。太魯閣國家公園動物相與海拔高度、植被之關係研究。內政部營建署太魯閣國家公園管理處八十年度研究報告。
- 林曜松。2005。太魯閣國家公園中低海拔地區動物資源動態調查研究及資料庫建立。內政部營建署太魯閣國家公園管理處九十四年度研究報告。
- 楊懿如。2005。太魯閣國家公園兩棲類及水棲昆蟲調查監測計畫。內政部營建署太魯閣國家公園管理處。
- 張慶年鴻 (2007) , 台灣兩種赤蛙的親緣地理結構比較, 國立中興大學生命科學系博士學位論文
- Chou WH, Lin JY. 1997. Geographical Variations of *Rana sauteri* (Anura: Ranidae) in Taiwan. Zool Stud 36: 201-221.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39: 783-791.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41: 95-98.
- Hillis DM, Bull JJ. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method assessing confidence in phylogenetic analysis. Systematic Biology 41: 182-192.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution 16: 111-120.
- Kuramoto M, Wang CS, Yu HT. 1984. Breeding, larval morphology, and experimental hybridization of Taiwanese brown frogs, *Rana longicrus* and *R. sauteri*. Journal of Herpetology 18: 387-395.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol. 4(4):406-25.
- Smith M. Alex, Poyarkov JR Nikolai A., Hebert Paul D. N. 2008. CO1 DNA barcoding amphibians: take the chance, meet the challenge. Molecular ecology resources 8:235-246.

太魯閣國家公園珍稀及指標物種研究與復育計畫第一期  
兩棲爬蟲類基因條碼建立及多樣性分析

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 24(8):1596-9.