

太魯閣國家公園兩棲類之族群遺傳結構探討 -以盤古蟾蜍為例

曾登裕、林弘都*、吳健毓、楊晴安、鍾維軒、黃蓉圓、傅家翎、曾品慈、孫少紘

*E-mail : varicorhinus@hotmail.com

國立臺南大學生物科技學系



前言

二次接觸 (Secondary contact) 指的是兩個因地理隔離或其他因素分化極大的系群，重新接觸而產生雜交個體的情況，這個帶有兩個間斷特徵的系群重疊分布的區域稱雜交帶 (hybrid zone)，雜交帶通常有較高的遺傳分化和多樣性，雜交個體的基因型和表型特徵在兩個親本的類型之間呈漸變式變化，因此適合作為檢測物種之間親緣關係、系群間基因流和雜交適應性的研究。

盤古蟾蜍為台灣特有種兩生類，過去的研究顯示，台灣的盤古蟾蜍族群，在親緣關係上以中央山脈為界，大致可分為東部群 (E型) 與西部群 (W群) 兩個系群，兩個系群的起源並不相同，太魯閣國家公園低海拔地區可以發現東部群與西部群個體混雜，盤古蟾蜍是少數分布可以超過3000公尺的兩生類物種，過去盤古蟾蜍生理學研究顯示，西部群 (W群) 較東部群 (E型) 在生理學上更為耐寒，中央山脈是否因盤古蟾蜍的特殊生態習性，使得其阻隔效應降低，兩系群因此發生二次接觸，為族群遺傳學上有趣的議題。

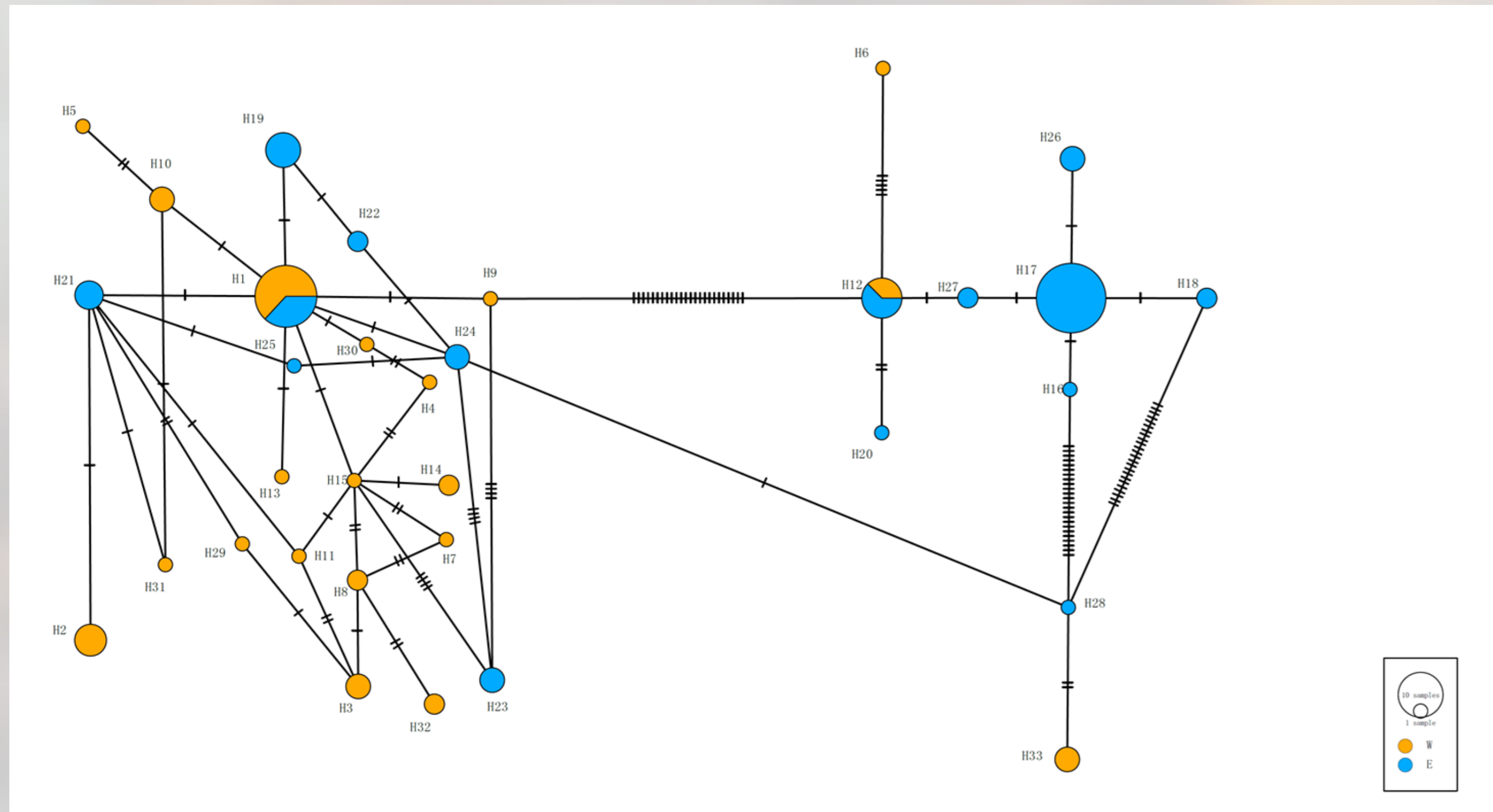


Figure 1. The haplotype network inferred from mitochondrial D-loop gene of *Bufo bankorensis* from twelve geographic samples in Taroko National Park. Each circle indicated each haplotype and the size of each circle is related to its haplotype distribution frequency. Each color in haplotype network circles represents each geographic samples.

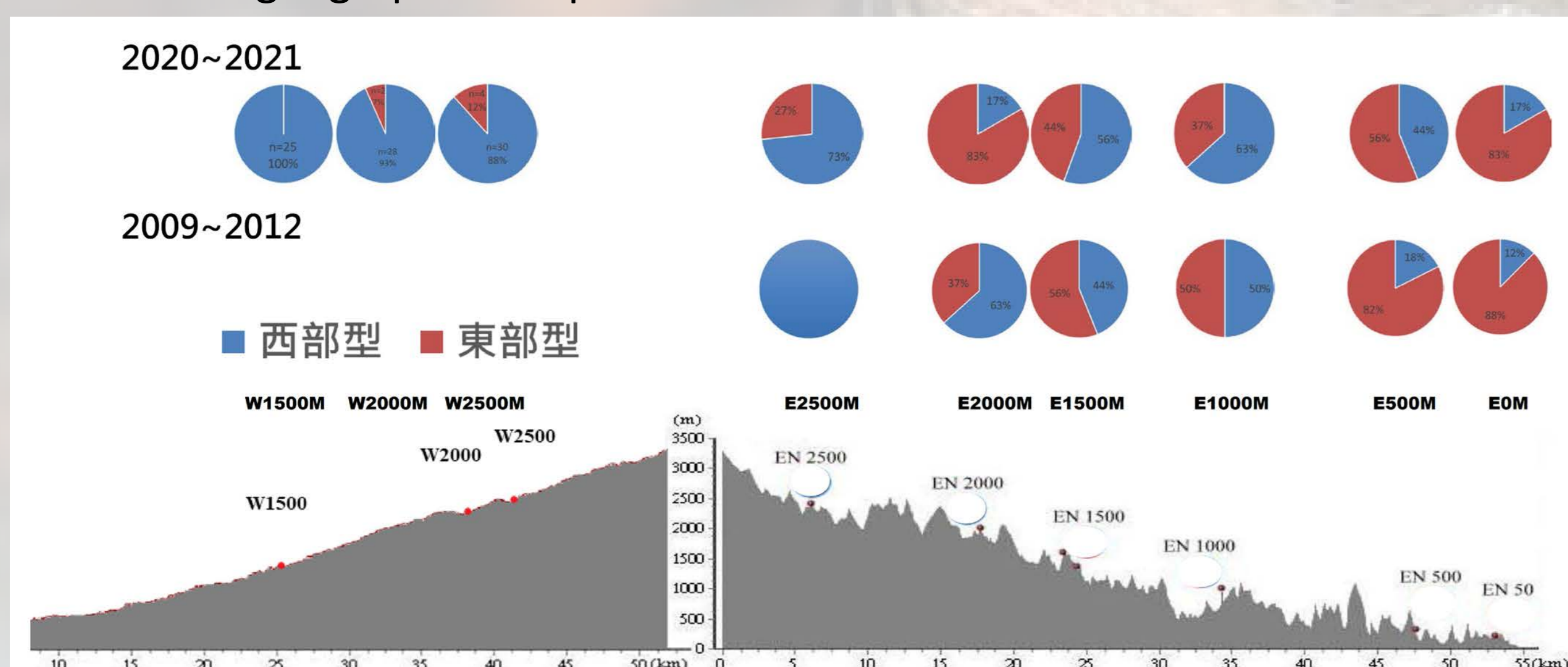


Figure 2. The haplotype frequency inferred from mitochondrial D-loop gene of *Bufo bankorensis* between 2010 and 2020.

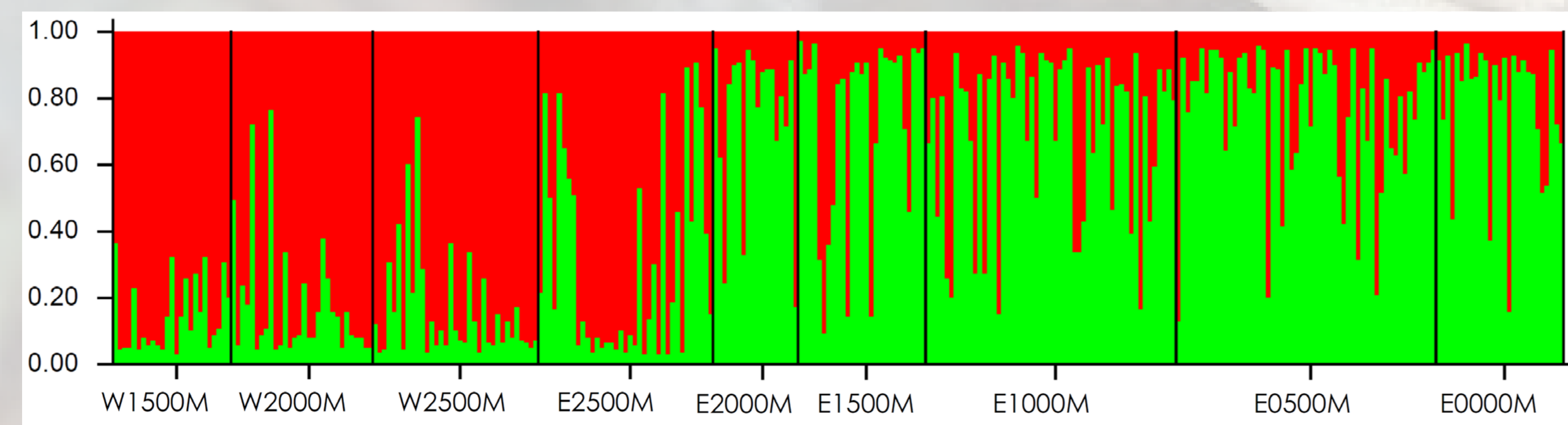


Figure 3. Clustering of individuals by structure at K=2. Individuals are represented by vertical bars. Each vertical column represents one individual, and the separation of the column into two colors represents the estimated probability of belonging to one population or the other. Different colors in the same individual indicate the percentage of the genome shared with each cluster according to the admixture proportions. The y-axis represents the probability to belong to a certain cluster, while on the x-axis is reported each population delimited by a black solid vertical line.

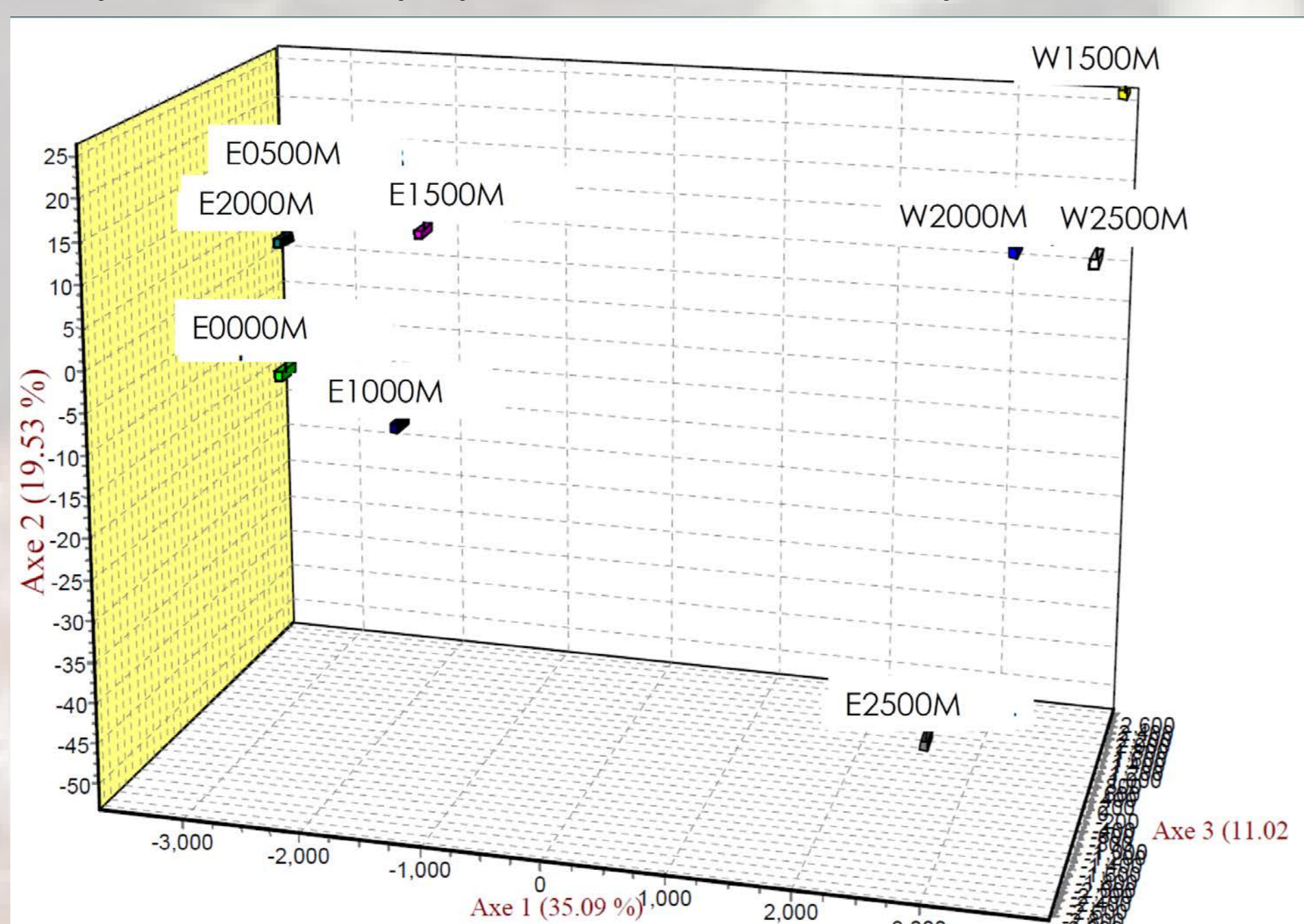


Figure 4. Plot of principal coordinate (PCA) axes for nine populations of *Bufo bankorensis* based on population genetic distance. Percentage values represent variation justified by each axis.

Table 1. Characterization of 12 polymorphic microsatellite loci in toad species *Bufo bankorensis* (Barbour, 1908)

Locus	Primer sequence (5'-3')	Repeat unit	Size range(bp)	Total no. of alleles	Tm C	Special allele no. of western clades	Special allele no. of eastern clades
B192	F: GGATAGCTTGTAAATTCGGAC R: GCTTAGAAGAGGACGAGG	(TG) ₁₀	141-159	3	56	1	
F14	F: CGTGCATGCAAGTGTACCTAACC R: ATGGAGAGTGAAGGGAAAGAGTG	(TG) ₅ G(GT) ₁₂	163-207	4	62		
B123	F: ATTGCTCCTTGGTGACT R: CTTCCCTCATTGTTGTG	(GT) ₁₅	234-256	4	56		
F23	F: ATCGCGTGGCTGATGG R: TGTGTATAATTTTGCCGTTTAGG	(AC) ₁₉	138-142	3	56		
F46	F: GATTTCCTGCGGTGAGCCAGTG R: CGCCCGCAAACCTTCTGAAC	(TG) ₁₅	150-180	15	63	5	
B447	F: TGTATCTACAGCTGGG R: GATGTAATTCACACAGCA	(AG) ₁₀	191-199	4	63	1	
F24	F: TTGGAGAGGGGAAAACCTCACAC R: CGGATTCGTGGGGGTGCTC	(CA) ₁₃	150-162	3	65		
B465	F: CCCTGCATCTCAAGGCTTA R: TTTGTCTCATCTGGACTC	(AC) ₁₆	258-282	14	62	5	2
A21	F: AGGGCAAGTCTGATCAACG R: GATACGTCGTGAATGAGGC	(TA) ₁₁	266-294	6	65		
A35	F: CATGGCTGCAGTATCAGTG R: CATTACTGCTCCCTGCT	(TG) ₁₀	185-193	5	60.9		
A14	F: CTTTCGTTATGGCCCTTCC R: GTGTGAGGATCCAGGCTGAC	(GA) ₁₀	369-411	18	63	4	1
A31	F: CAAACAATGCTTCCCGTTT R: TAACGGTTCATGAATTGGC	(AG) ₁₁	322-344	12	60.9	1	

材料與方法

本研究利用粒線體DNA之D-loop片段與12組微衛星DNA基因座為遺傳標示物，以海拔500公尺單位，選取中央山脈東側太魯閣國家公園內台八線與中央山脈西側台14甲線共九個盤古蟾蜍族群，進行族群遺傳結構與系群交會帶研究。

結果與討論

在粒線體DNA上，111個個體中得到了33個單倍型 (haplotype)，平均單倍型多樣性 (h) 為0.913，平均核苷酸多樣性 (π) 為0.024。網狀親緣關係樹上顯示，盤古蟾蜍族群形成兩個系群 (W與E型) (圖一)，在地理分佈上，中央山脈西側族群以W群為主，中央山脈東側則出現W與E兩群混雜狀況，2010年樣本顯示中央山脈東側2500公尺關原族群以W型個體為主，但2020年樣本則發現此族群出現E型個體，顯示E型個體有往高海拔擴張趨勢 (圖二)。

在微衛星DNA上，分析了12個微衛星基因座 (表一)，在307個個體中得到了92個等位基因，其中，平均等位基因數為7.66，平均異型合子觀測值 (H_o) 為0.44，平均異型期望值 (H_e) 為0.50 (表二)。

若以中央山脈為界，將盤古蟾蜍分為兩群，以AMOVA分析地理區間的變異，結果顯示在粒線體DNA上，變異出現在群間的比例為35.58%，但在微衛星DNA上，群間的變異比例降為4.30%，粒線體DNA為母系遺傳標示物，顯示盤古蟾蜍受到中央山脈隔離效應的影響，因隔離所產生的E和W系群，分別分布於中央山脈東西兩側，但微衛星DNA為核基因遺傳標示物，群間變異只有4.30%，顯示部分越過中央山脈的E或W群個體，在族群發生雜交，使得中央山脈在微衛星DNA標示物上的隔離效應降低 (表三)。

以STRUCTURE與GENETIX軟體分析，顯示盤古蟾蜍族群在遺傳結構上可分為三大群，分別是中央山脈西側族群、中央山脈東側2500公尺以下族群與中央山脈2500公尺關原族群 (圖三、圖四)。

結論

太魯閣國家公園2500公尺以上關原地區應為盤古蟾蜍系群二次接觸之交會帶。由微衛星DNA等位基因結構發現兩系群個體會雜交並出現雜交個體，顯示台灣盤古蟾蜍兩系群在分類上應屬同一物種。

Table 2 Characteristics and genetic diversity indices for twelve microsatellite loci in *Bufo bankorensis*

Locus	N_a^a	A_r^b	H_o^c	H_e^d	F_{ST}	R_{ST}	F_{IS}
B192	3	2.281	0.095	0.094	0.037	0.042	-0.012
F14	4	3.094	0.344	0.362	0.074	0.083	0.051
B123	4	2.250	0.121	0.189	0.022	0.025	0.358
F23	3	2.960	0.205	0.424	0.112	0.124	0.517
F46	16	11.506	0.760	0.886	0.023	0.026	0.142
B447	4	3.342	0.392	0.398	0.064	0.071	0.015
F24	3	2.051	0.106	0.101	0.002	0.003	-0.049
B465	14	9.964	0.796	0.818	0.015	0.017	0.027
A21	6	3.337	0.545	0.57	0.044	0.049	0.044
A35	5	3.854	0.555	0.551	0.049	0.054	-0.007
A14	18	10.969	0.813	0.858	0.043	0.049	0.052
A31	12	7.905	0.553	0.762	0.033	0.037	0.274
Mean	7.666	5.293	0.441	0.501	0.043	0.048	0.117

Table 3 Analysis of molecular variance (AMOVA) for *Bufo bankorensis* populations based on mitochondrial D-loop gene and microsatellite DNA.

Scheme	Category description	% Var.	Statistic	p
Two geographical groups (East)(West)(mtDNA)				
Among groups		35.58	$F_{CT}=0.355$	0.010
Among populations within groups		2.27	$F_{SC}=0.035$	< 0.000
Within populations		62.15	$F_{ST}=0.378$	< 0.000
Two geographical groups (East)(West)(microsatellite)				
Among groups		4.30	$F_{CT}=0.043$	0.007
Among populations within groups		2.79	$F_{SC}=0.029$	< 0.000
Within populations		92.91	$F_{ST}=0.070$	< 0.000