

臺灣產黑蒙西氏小雨蛙
(*Microhyla heymonsi*) 族群遺傳結構與親
緣地理學研究
Population genetic structure and phylogeographic study
of *Microhyla heymonsi* in Taiwan

林彥博^{1,2,*} 呂光洋³

Yen-Po Lin^{1,2,*} and Kuang-Yang Lue³

¹ 農業部生物多樣性研究所 552 南投縣集集鎮民生東路 1 號

² 國立中興大學生命科學系 402 台中市南區興大路 145 號

³ 國立臺灣師範大學生命科學專業學院 106 臺北市大安區和平東路一段 162 號

¹Taiwan Biodiversity Research Institute, 1, Ming-shen East Road, Jiji, Nantou
County 552, Taiwan

²Department of Life Sciences, National Chung Hsing University, 145, Xingda Road,
South District, Taichung City 402, Taiwan

³School of Life Science, National Taiwan Normal University, 162, Section 1, Heping
East Road, Taipei City 106, Taiwan

* 通訊作者：yplin@tbri.gov.tw

* Corresponding author: yplin@tbri.gov.tw

摘要

臺灣在地形結構上相當多樣且與鄰近地區的地理關係相當密切，因此臺灣島上生物的族群結構易受到地形及環境氣候而影響。兩棲類動物一般被認為是遷移能力較差的脊椎動物類群，更容易受到地形及環境變遷影響其族群結構。黑蒙西氏小雨蛙 (*Microhyla heymonsi*) 分布於南亞及東南亞地區，在臺灣的分布則是中、南部的中低海拔地區，適合以此為材料來探討臺灣高度的地形歧異度以及歷史上豐富的地質事件，是否會對黑蒙西氏小雨蛙的族群遺傳結果造成影響。本研究利用粒線體中的 cytochrome oxidase I (COI) 部份序列來進行族群遺傳結構的探討。結果顯示臺灣黑蒙西氏小雨蛙族群可分成兩個主要的系群，分別對應中央山脈以東及以西的族群，顯示中央山脈的確是會造成東、西部族群因地理隔離的效應而產生遺傳分化的情形。以中性演化理論檢測、Mismatch distribution、以及貝氏天際線點圖的結果顯示，在更新世時期，臺灣黑蒙西氏小雨蛙族群經過了快速擴張的事件，提供了一個生活在亞熱帶及熱帶地區的生物，受到更新世氣候變遷影響的例子。

關鍵詞：親緣地理學、族群遺傳結構、黑蒙西氏小雨蛙、更新世

Abstract

In this study, we used *Microhyla heymonsi* (Anura: Microhylidae), a low to mid-altitude distributed narrow-mouth frog in Taiwan, to investigate the pattern of phylogeography based on its mitochondrial cytochrome oxidase I (COI) gene. The results of its phylogenetic tree indicated two major haplotype clades in Taiwan. The variation in population genetics of these two clades corresponded to the Central Mountain Range's eastern and western geographical features, respectively. The Central Mountain Range is a geographic barrier that runs from the north to the south of Taiwan

Island and disrupts the gene flow between eastern and western populations. Both major clades showed a significant isolation by distance effect. Historical population demography analyzed using neutrality tests, mismatch distribution, and Bayesian skyline plot analyses showed that populations of *M. heymonsi* in Taiwan underwent an expansion event during the Pleistocene Epoch.

Keywords: phylogeography, population genetic structure, *Microhyla heymonsi*, Pleistocene

收件日期：2023 年 09 月 18 日

接受日期：2024 年 03 月 06 日

Received: September 18, 2023

Accepted: March 6, 2024

緒言

親緣地理學 (phylogeography) 是利用遺傳訊息來研究主要是種內生物族群譜系的地理分布以及瞭解造成背後的生物及非生物因子的影響機制，進而討論造成不同地理分布的原因。因此瞭解空間及時間因子對於物種的遺傳結構的影響，以及闡述生態因子和生物特性的影響對親緣地理學研究是非常重要的 (Kumar and Kumar 2018)。例如 Kuchta and Tan (2005) 研究美國的粗皮蟾蜍 (*Taricha granulosa*) 的族群遺傳結構，結果顯示族群遺傳

結構與過去的氣候變遷及族群量變動有緊密的關係。在更新世期，美洲歷經多次的冰河期，當冰河期來臨時粗皮蟾蜍族群往南擴散遷移至較溫暖的地區，當冰河期結束粗皮蟾蜍族群往北拓殖，使得北部族群的遺傳多樣性明顯的低於南部的族群。另外不同生態習性及生物特性也會影響親緣地理類型，例如 Barrow 等人 (2017) 研究美國東、南部 4 種蛙類的比較親緣地理學來檢測避難所假說，其結果顯示這 4 種蛙類對於過去的氣候變遷反應並不相同，間冰期時從避難所遷移出

的遷移率在 4 種蛙類中有所差異，原因與這 4 種蛙類具有不同的自然史特徵及生態習性有關，具有較廣適應性及較短繁殖期的蛙類有較多合適的棲位以及較低程度的遺傳結構。親緣地理學也可以協助找出物種分布的熱點及保育工作的優先順序，例如 Rosauer 等人 (2016) 研究澳洲石龍子科及壁虎科物種的比較親緣地理學，利用分布區域內的親緣特有性 (phylogenetic endemism) 來得知這些蜥蜴物種的分布熱點以及指認保育優先區域。因此可知現今生物的族群遺傳結構，主要受到各物種間的生物學 (biology)、擴散能力 (dispersal)、族群變動 (population demography) 以及地區的歷史地質隔離事件 (historical vicariance) 等因素所影響 (Avise 2000)，形成我們現今看到的生物族群結構的樣貌。因此瞭解物種的族群遺傳結構及親緣地理的類型為何，對於演化歷史、保育的議題或者解決分類問題來說是相當重要的。

臺灣位於歐亞大陸板塊與菲律賓海洋板塊的交界處，長期歷經板塊的

運動、碰撞和擠壓，導致臺灣島的海拔高度呈現近 4,000 公尺的落差。這使得臺灣在地形和氣候方面呈現出更豐富的多樣性。臺灣島不僅位處古北區 (Palearctic) 和東洋區 (Oriental) 的交界，還位於東亞島弧的中心地帶，這使得臺灣的生物相組成相當豐富多樣，同時與歐亞大陸、東亞島嶼等相鄰地區關係密切 (Lin *et al.* 2002)。在更新世的多次冰河時期，臺灣島與鄰近地區形成過多次陸橋，使生物可以透過這些陸橋進行遷徙，影響了臺灣物種分布和種內族群的基因結構。因此臺灣的地理位置和地質特徵使其成為研究生物相地理分布和生物演化歷史變遷的理想環境 (Creer *et al.* 2001)。例如 Lin 等人 (2012) 研究臺灣褐樹蛙 (*Buergeria robusta*) 這種溪流型蛙類的地景遺傳學發現褐樹蛙的遺傳結構與臺灣島內的地理結構呈現高度的一致性，中央山脈具有高度的隔離效應使得褐樹蛙族群被分成東部及西部系群，此外在較小的地理尺度中，溪流在族群遺傳分化中也有著重要的隔離效應。Wang 等人 (2017) 研究臺

灣及琉球群島的日本樹蛙複合種群 (*Buergeria japonica* species complex) 發現臺灣西北部的族群與琉球石垣、西表島的族群在遺傳上更為接近，且與臺灣其他族群呈現高度的遺傳分化情形，在遺傳、形態及行為表現上皆有差異已達不同物種的層級。原因除了臺灣島內的地理隔離外，過去臺灣與琉球群島豐富且關係密切的地質歷史關係也是可能的原因之一。

黑蒙西氏小雨蛙 (*Microhyla heymonsi*) 屬於狹口蛙科 (Microhylidae)、姬蛙屬 (*Microhyla*) 的兩生類，是德國學者 Theodor Vogt 於 1911 年根據採集自臺灣 (但確切地點不詳) 的標本所命名的 (Vogt 1911)。其為小型蛙類，具背中線且中央具一或兩個的黑色小括弧“()”狀花紋，故又稱小弧斑姬蛙。在全世界的分布上，黑蒙西氏小雨蛙廣泛分布於南亞及東南亞地區，包括大陸東南方、印度、印尼、中南半島以及馬來半島等地均有分布 (Frost 2023)。黑蒙西氏小雨蛙常見於臺灣中南部及東南部 1,500 m 以下地區，大部份在接近山區竹林、開墾地水域、闊葉

林底層及草澤地活動。由於棲地與人類活動地區易重疊容易遭受破壞，故族群呈不連續狀分布 (呂等，1999)。

本研究將利用臺灣島內各地黑蒙西氏小雨蛙族群分子資料的比對，探討地理隔離與物種遷移能力會對臺灣黑蒙西氏小雨蛙的族群遺傳結構造成什麼樣的影響，預期達成下列目標：一、臺灣黑蒙西氏小雨蛙族群是否存在明顯的遺傳結構差異？二、瞭解黑蒙西氏小雨蛙族群間的基因交流程度。三、探討臺灣黑蒙西氏小雨蛙的族群變動歷史。

材料與方法

一、樣本取樣：

本研究在臺灣全島共 25 個採樣點，採得 181 隻黑蒙西氏小雨蛙樣本 (表 1、圖 1)。每個採樣點採集至少 5 隻樣本，採集整隻樣本或以剪趾法 (toe-clipping) 取得腳趾樣本以供萃取粒腺體 DNA 之用。採集成體或蝌蚪。成蛙取下其肌肉組織或腳趾組織，保存於 95% 酒精中，其餘部份以 10% 福馬林製成浸液標本保存。蝌蚪樣本

則整隻保存於 95% 酒精中。。

在外群的選擇是以狹口蛙科中與黑蒙西氏小雨蛙同屬的物種 (Genus *Microhyla*) 以及不同屬的物種 (Genus *Kaloula*, *Caluella*)，以及 Brevicipitidae 中的 *Breviceps fuscus* (accession number: EF396040)，作為外群比對。

二、萃取粒腺體 DNA、增幅與定序：

(一) 粒腺體 DNA 萃取：

粒腺體 DNA 萃取方式從酒精保存的肌肉組織中抽取 total genomic DNA 利用 Proteinase K 分解及氯仿 - 酒精抽取法 (Hillis *et al.* 1996)，步驟如下：1. 將肌肉組織或腳趾組織切碎置於含有 ddH₂O、digestion buffer 及 Proteinase K 的試管中，置於 56°C 乾浴槽中加熱反應，隔夜取出。2. 加入等體積的 5M LiCl 與兩倍量的 Chloroform，放入垂直轉輪中轉動 30 分鐘。3. 以 13000 rpm 轉速、4°C 的條件下離心 15 分鐘。4. 取出上清液後，加入兩倍量的 100% 冰酒精，並輕輕搖晃。5. 再以 13000 rpm 轉速、4°C 的條件下離心 15 分鐘。6. 直接倒出酒精後，加入 200 μ l

的 70% 酒精。7. 以 13000 rpm 轉速、4°C 的條件下離心 3 分鐘。8. 倒出酒精，置於通風櫃中晾乾，隔日加入 50 μ l 的 ddH₂O，9. 於 1.2% 洋菜膠片上，以 100 伏特的電壓進行 TBE 電泳 30 分鐘，檢視 DNA 品質。10. 放入 -20°C 冰箱中保存，以供後續實驗使用。

(二) PCR (Polymerase Chain Reaction) 反應與定序：

欲增幅的 CO I (Cytochrome Oxidase subunit I) 基因片段所採用的引子 (primer) 是修飾 Vences *et al.* (2005) 所發表用於增幅 CO I 基因片段的引子，引子序列為：

LCO020：5' TTT CAA CCA ACC ACA AAG ACA TCG G 3'；

HCO710：5' TAT ACT TCA GGG TGG CCA AAR AAT CA 3'。

PCR 反應流程為：Predenature：94°C、3 分鐘；接著進行 35 個循環，循環過程為：Denature：94°C、30 秒；Annealing：50°C、40 秒；Extension：72 °C、1 分鐘；Final-extension：72°C、10 分鐘。最後於 1.2% 洋菜膠片上，以 100 伏特的電壓進行 TBE 電

泳 30 分鐘，以檢測所增幅片段的品質與片段長度。以 ABI377 自動定序儀 (PE Corp.) 完成定序工作。所得序列利用 SEQUENCHER 4.0.5 (Gene Codes Corporation 1999) 進行雙股序列的排序與合併校對並輔以肉眼校正以確認電腦判斷正確無誤。完全相同之序列判別為同一基因型 (haplotype)。

三、分子親緣關係分析：

進行分子親緣關係分析的操作單元 (OTUs) 為歸納所得的基因型 (haplotype)。使用 PAUP* (version 4.0b10, Swofford 2001) 軟體進行 Neighbor Joining (NJ)、Maximum Parsimony (MP) 及 Maximum likelihood (ML) 等分析。另使用 MrBayes (version 3.1; Huelsenbeck and Ronquist 2001) 進行 Bayesian Inference (BI) 分析。Maximum Parsimony (MP) 分析使用 heuristic search，條件如下：最初的樹以 10 次隨機序列加入 (random sequence addition)，再進行 1000 次重覆的 Tree-bisection-reconnection (TBR) branch swapping，所有特徵等同加權。

Maximum Parsimony (MP) 所得結果的強度以 non-parametric bootstrapping analyses (Felsenstein 1985) 進行 1000 次重覆。進行 Neighbor Joining (NJ)、Maximum Likelihood (ML) 及 Bayesian Inference (BI) 分析中所需要的最適合的序列演化模型與其他參數使用 MODELTEST 3.7 (Posada and Crandall 1998) 中的 Akaike information criterion (AIC) 來選擇最適模型與序列參數。Neighbor Joining (NJ) 與 Maximum Likelihood (ML) 在 PAUP* 軟體中完成，親緣關係樹的支持強度均是進行 non-parametric bootstrapping analyses 來輔證，Neighbor Joining (NJ)、Maximum Likelihood (ML) 分析均進行 1000 次重覆。Bayesian Inference (BI) 在 MrBayes 3.2.7 軟體中完成。同時進行 2 次，以 4 條 Markov chains 搜尋較佳機率值的樹型圖。以 5×10^6 個 generations 進行 Markov Chain Monte Carlo (MCMC) 搜尋，每 100 個 generations 取樣一次，四分之一的取樣樹當作 burn-in 棄卻。棄卻 burn-in 後的樣本用於產生 50%

majority consensus tree，分支的支持強度則以 Bayesian posterior probabilities 來輔證。

四、族群遺傳變異分析：

以 DnaSP ver. 4.0 軟體 (Rozas and Rozas 1999; Rozas *et al.* 2003) 計算基因型多樣性 (haplotype diversity)、核苷酸多樣性 (nucleotide diversity)，比較兩者的數值大小可以推論族群演化的歷史。以及族群間的遺傳分化指數 (F_{ST})，以及族群間基因交流指數 (N_m)。並將族群間的 F_{ST} 與採樣點間的地理距離 (pairwise geographic distance) 點對點作圖，進行 Mantel test (1967) 檢測是否存在隔離分化的效應，Mantel test 則是在 R 軟體中進行。以 ARLEQUIN ver. 3.01 (Excoffier *et al.* 2005) 進行 Analysis of Molecular Variance (AMOVA) 計算基因分化 (genetic differentiation) 的程度與檢測族群間或地理區間是否具有遺傳上的結構存在，而 AMOVA 檢測時，進行 1000 次的 permutation。均會計算族群內 (Φ_{ST})、同地理區內不同族群間

(Φ_{SC}) 及不同地理區間 (Φ_{CT})，三個不同層級的分化指數。以 ARLEQUIN ver. 3.01 進行 1000 次的 permutation 計算 Tajima's D (Tajima 1989) 以及 Fu's F 值 (Fu 1997) 檢測存在於族群間的變異是否只受到隨機基因漂變的影響，而不受天擇選汰的影響。

五、族群變動歷史與分子鐘估算：

臺灣黑蒙西氏小雨蛙族群的族群變動歷史 (demographic history) 是以 Mismatch distribution 方法分析。使用 DnaSP 軟體，以 constant population size model 進行 Mismatch distribution 的分析。若 Mismatch distribution 結果呈現單峰分布 (unimodal distribution)，則代表族群最近經過族群量或地理上的擴張事件 (range expansion events)。反之，若呈多峰分布 (multimodal distribution) 則代表族群呈現穩定平衡的隨機狀態。以 Bayesian coalescence-based framework (Drummond *et al.* 2005) 來分析族群變動歷史與樹狀圖分支間的分歧時間 (divergence time)。以 Bayesian Evolutionary

Analysis Sampling Trees (BEAST ver. 1. X; Drummond and Rambaut 2007) 軟體估算有效族群量 (Effective population size; $N_e \tau$) 與分支間的最近共祖時間 (Time to the Most Recent Common Ancestor; T_{MRC})。Markov Chain Monte Carlo (MCMC) 的運算是進行 1×10^7 代的取樣，每 1000 代取樣一次，取樣的前 10% 當作 burn-in 棄卻。序列演化模型與事先的分析參數是進行 MODELTEST 後所得到的結果。本研究應用於無尾類粒腺體基因的演化速度，為每百萬年 0.5~1% 的核苷酸置換速率 (0.5~1% substitution per million years) (Austin *et al.* 2004)，為了求得較精確的分子定年的時間範圍，我分別使用 0.5% 以及 1% 兩個不同層級的演化速率進行分歧時間的估算。Effective Sample Sizes (ESS) 的估算是 TRACER ver. 1.4 (Drummond and Rambaut 2007) 中進行。

結果

一、序列變異分析：

本研究在臺灣共 25 個採樣點採得

181 隻樣本 (表 1、圖 1)。並成功定序 181 條粒線體 CO I 基因部份序列，總長為 625 bp (base pairs)，沒有插入 (insertions)、缺失 (deletions) 或停止碼 (stop codons)。在 625 bp 序列中，有 75 個多態位點 (polymorphic sites)。在總共 181 條序列中，可整理出 48 條基因型 (haplotypes)，臺灣黑蒙西氏小雨蛙之基因型多樣性 (h) 為 0.9328，核苷酸多樣性 (π) 為 0.0160。基因型序列間的遺傳距離範圍為 0.14%-6.34%。在臺灣黑蒙西氏小雨蛙全部族群中以 hap01、hap11 以及 hap27 三組基因型擁有較高頻率，分別有四個族群 19 個個體、六個族群 26 個體以及九個族群 30 個個體共有。

二、黑蒙西氏小雨蛙族群間親緣關係分析：

以 MODELTEST 軟體進行最適合臺灣族群的 CO I 基因序列演化模型選擇，所得到的結果為 HKY+ Γ +I model (Hasegawa-Kishino-Yano model with a gamma-shape parameter, and a proportion of invariable sites; transition/

transversion= 3.9466; gamma-shape parameter= 1.0146; proportion of invariable sites= 0.5312) 為最適合的序列演化模式。以 Neighbor Joining (NJ)、Maximum Likelihood (ML)、Maximum Parsimony (MP) 以及 Bayesian Inference (BI) 四種演算法，以狹口蛙科中的小雨蛙 (*Microhyla fissipes*)、花狹口蛙 (*Kaloula pulchra*) 以及 Brevicipitidae 中的 *Breviceps fuscus* 為外群，最後所得到的樹狀圖結構均是相似的，在此以 Maximum Likelihood 方法所建構的親緣關係樹為參考樹型，並將其他方法支持度標記在此樹型結點上 (圖 2)。臺灣黑蒙西氏小雨蛙族群的親緣關係樹中顯示可分成與地理位置相關的兩個主要系群，恰可以中央山脈為界，分別為西部系群 (W) 以及東部系群 (E)。而西部系群尚可分出三個亞支，分別是中部亞支 (C)、中、西部亞支 (C+W) 以及西部亞支 (W)，形成三叉的樹型結構，但支持度均不高，三者間的關係並不清楚，因此在這裡視為同一系群 (圖 2)。在親緣關係樹的結果中可得知，

中央山脈對於黑蒙西氏小雨蛙具有地理隔離的效應，使得東部及西部族群擁有各自的系群 (圖 3)。兩個主要系群間的平均遺傳距離 (p -distance) 為 0.027 ± 0.006 (平均值 $\pm$ 標準差 standard deviation)，東部系群內平均遺傳距離為 0.004 ± 0.001 ，西部系群內平均遺傳距離為 0.007 ± 0.001 (表 2)。

三、族群遺傳變異分析：

以 DnaSP 軟體計算所有臺灣黑蒙西氏小雨蛙族群的基因型多樣性 (haplotype diversity; h) 及核苷酸多樣性 (nucleotide diversity; π)，所有族群的基因型多樣性介於 0 到 0.8939 之間，而核苷酸多樣性則介於 0 到 0.0173 之間。核苷酸多樣性較高的四個族群皆位於臺灣東南部，為屏東社頂、屏東牡丹、臺東達仁以及臺東太麻里， π 值為 0.0122 到 0.0173 之間 (表 1)。將臺灣黑蒙西氏小雨蛙族群歸於西部地理群 (W) (採樣點編號 1-15) 以及東部地理群 (E) (採樣點編號 20-25)，計算這兩個地理分群之間的遺傳分化指數 (F_{ST}) 與基因交流指數 (N_m)。為了較清楚

檢視東、西部族群是否具有遺傳分化的情形，而不受到採樣點 16~19 同時具有東、西部系群的遺傳成份影響結果，因此不將這四個族群併入分析。結果顯示西部群 (W) 與東部群 (E) 的 F_{ST} 為 0.622。而基因交流指數 (Nm) 的計算方法以 $F_{ST}=1/(1+2Nm)$ 公式計算，西部群 (W) 與東部群 (E) 的 Nm 為 0.304。由 F_{ST} 與 Nm 值來看，在這兩個地理區間，遺傳分化的情形是很明顯的，顯示地理的屏障的確會造成臺灣黑蒙西氏小雨蛙族群間的遺傳分化。並分別計算兩個主要系群內族群的 F_{ST} 與 Nm，西部系群內族群間平均 F_{ST} 值為 0.536，平均 Nm 值為 1.143。東部系群內族群間平均 F_{ST} 值為 0.267，平均 Nm 值為 1.885。以臺灣所有族群間的 F_{ST} 與地理位置距離，進行 Mantel test 檢測是否有隔離分化 (isolation by distance) 的效應存在。結果顯示臺灣所有的黑蒙西氏小雨蛙族群間的遺傳分化的情形隨著地理距離增加而顯著增加 (matrix correlation $r=0.24102$, Mantel test $t=3.3428$, $p=0.003$)，也就是存在著隔離分化的效

應 (圖 4)。西部系群族群間的遺傳分化情形也隨著地理距離增加而顯著增加 (matrix correlation $r=0.28793$, Mantel test $t=3.3487$, $p=0.007$) (圖 5)。而東部系群族群間的隔離分化效應同樣是顯著的 (matrix correlation $r=0.32689$, Mantel test $t=1.7509$, $p=0.003$) (圖 6)。將臺灣黑蒙西氏小雨蛙族群歸於兩個地理區內 (西部族群 W：採樣點編號 1~15 以及東部族群 E：採樣點編號 20~25)，以 Analysis of Molecular Variance (AMOVA) 方法檢測不同階層的遺傳分化程度。結果顯示在兩個不同地理區間 ($\Phi_{CT} = 0.6129$; $p<0.0001$)、同地理區內不同族群間 ($\Phi_{SC} = 0.4916$; $p<0.0001$) 以及族群內 ($\Phi_{ST} = 0.8032$; $p<0.0001$) 的遺傳分化均呈現顯著的情形。兩個不同地理區間變異佔所有變異的 61.3%，同地理區內不同族群間的變異佔所有變異的 19.03%，族群內變異佔所有變異的 19.67%，大部份的變異是存在於兩個不同地理區間，表示臺灣黑蒙西氏小雨蛙族群具有明顯東、西部分群的遺傳結構 (表 3)。以 ARLEQUIN 軟

體以 1000 次 permutation 計算臺灣所有的黑蒙西氏小雨蛙族群以及兩個主要系群的 Tajima's D 以及 Fu's F 值。結果顯示臺灣所有的黑蒙西氏小雨蛙族群的遺傳變異均符合中性演化假說 (Tajima's $D=-0.71313$, $p=0.268$; Fu's $F=-9.11765$, $p=0.054$)。進一步計算兩個主要系群的 Tajima's D 以及 Fu's F 值，西部系群 (W) 的 Tajima's $D=-0.90427$ ($p=0.199$)，Fu's $F=-9.03033$ ($p=0.008$)，西部系群的 Fu's F 值顯著的偏離 0。東部系群 (E) 的 Tajima's $D=-2.25174$ ($p=0$)，Fu's $F=-8.17999$ ($p=0.002$)，東部系群不論是 Tajima's D 或 Fu's F 值均顯著偏離 0 (表 4)。這樣顯著偏離 0 的結果有可能並不是單純地受天擇汰選所造成的，而是受到族群變動歷史所影響，尤其 Fu's F 值對於族群擴張的情形的檢測是相當敏銳的 (Fu 1997)，這樣 Tajima's D 與 Fu's F 值明顯偏離 0 的情形，可能代表著西部系群與東部系群的族群曾有族群擴張的情形。

四、親緣地理關係網狀圖：

以 TCS 軟體建構親緣地理網狀圖，結果可以從圖中看出兩個主要的系群，這與親緣關係樹上所呈現的結果是一致的，同樣也可區分出西部系群 (W) 以及東部系群 (E)。基因型 hap01、hap11 以及 hap27 三組基因型在族群中所佔的比例較高，也相對的位於親緣地理網狀圖的較中央的位置，顯示這三組基因型應是較老的基因型，而後衍生出較新的基因型則位於網狀圖的末端 (圖 7)。

五、族群變動歷史：

以 DnaSP ver. 4.0 軟體分析臺灣黑蒙西氏小雨蛙的族群變動歷史，分別以兩個主要系群來進行各系群黑蒙西氏小雨蛙族群的 Mismatch distribution 分析，東部系群 (E) 的分布圖呈現單峰分布 ($SSD=0.00187289$; $p=0.833$; Harpending's Raggedness index $r=0.01615329$; $p=0.99$)，而西部系群 (W) 則是呈現雙峰分布 ($SSD=0.01335955$; $p=0.278$; Harpending's Raggedness index $r=0.0200731$; $p=0.5$) 表示東部系群的黑蒙西氏小雨蛙族

群最近經過族群量或地理上的擴張事件。而西部系群則是處於相對族群量穩定或具有明顯結構性的狀態，此 Mismatch distribution 的結果和 Tajima's D 與 Fu's F 值大致吻合。除了西部系群的 Fu's F 值顯著的偏離 0 (Fu's $F=-9.03033$; $p=0.008$)。以 Bayesian skyline plot (BSP) 推估臺灣黑蒙西氏小雨蛙族群的族群變動歷史，結果顯示東部系群 (E) 約在十五萬年~二十五萬年前間有一族群擴張事件 (圖 8)，西部系群 (W) 也約在十五萬年~三十萬年前間有一族群擴張事件 (圖 9)，而，此時間點對應了更新世時期 (Pleistocene Epoch)。

六、分子鐘估算

以 Bayesian coalescent approach 計算系群間的到最近共祖的時間，可略估系群間的分歧時間。結果顯示東、西部系群分歧時間約在一百八十萬年到三百五十萬年前之間 (1.806~3.588 Mya)。而東部系群的最近共祖時間為一百四十萬年到兩百八十萬年前之間 (1.402~2.80 Mya)，西部系群的最近共

祖時間為七十八萬年到一百五十四萬年前之間 (0.781~1.542 Mya)。

討論

一、臺灣產黑蒙西氏小雨蛙之族群結構與地理親緣關係：

以臺灣黑蒙西氏小雨蛙的親緣關係樹所顯示的結果來看 (圖 2)，臺灣所有的族群可分成兩個主要的系群，分別對應了中央山脈東側及西側族群，且中央山脈東側及西側族群並無共有同樣的基因型。推估東、西系群的分歧時間為一百八十萬年到三百五十萬年前之間 (1.806~3.588 Mya)。中央山脈的確可以形成地理上的屏障，造成臺灣黑蒙西氏小雨蛙的東、西部族群之遺傳分化情形。

許多研究臺灣本土生物的親緣地理研究均指出臺灣的地形結構所造成的地理屏障，可能會造成生物族群間基因交流不易而產生遺傳分化的情形，特別是分布於中、低海拔的物種。如拉都希氏赤蛙 (*Sylvirana latouchii*; Jang-Liaw et al. 2008)、澤蛙 (*Fejervarya limnocharis*; Toda et

al. 1998)、褐樹蛙 (*Buegeria robusta*; Lin *et al.* 2012)、小雨蛙 (*Microhyla fissipes*; Lee *et al.* 2016)、日本樹蛙複合種群 (*Buegeria japonica* species complex; Wang *et al.* 2017) 等臺灣本土生物物種的親緣地理類型，顯示中央山脈具有強烈的隔離效應使中央山脈東、西兩側族群間產生遺傳分化情形，而與本研究呈現臺灣黑蒙西氏小雨蛙族群可分為東、西部兩大系群的結果相似，表示中央山脈所造成的隔離效應可能在其族群遺傳結構與分化上扮演一個重要的角色。

在臺灣東南部的屏東社頂 (採樣點 16)、屏東牡丹 (採樣點 17)、臺東達仁 (採樣點 18) 以及台東太麻里 (採樣點 19) 四個族群中，同時參雜了東部及西部系群的遺傳成份，可能因為兩系群在臺灣東南部有再次接觸 (secondary contact) 的現象，又或者恆春半島在過去的歷史中可能是一個冰河時間的避難所，使得這四個族群具有較高的核苷酸多樣性 (表 1)。較特別的是在這四個族群所含西部系群的遺傳成份，是西部系群在臺灣東

南部有一分化的亞支所組合，其分界點在屏東春日 (採樣點 15) 與屏東社頂 (採樣點 16) 之間，這四個族群中具有分化的東南亞支，可能是因為恆春半島是在中新世至更新世 (Pliocene-Pleistocene) 時期，因板塊碰撞所形成的 (Yu and Lu 1995)，造成臺灣東南部的地區具有許多地質歷史上相對年輕且陡峭的山脈與峭壁，如在屏東枋山鄉的地形結構上具有許多斷崖峭壁，可能會形成地理屏障，阻礙了彼此間的基因交流。而臺東知本以南具有大武斷層，因此臺東太麻里以北等族群，就沒有發現帶有西部系群遺傳成份的個體，由此看來大武斷層也是個阻礙東南部族群個體往北遷移的障礙，在恆春半島地區具有獨特的系群的情形與拉都希氏赤蛙 (*Sylvirana latouchii*; Jang-Liaw *et al.* 2008)、赤腹松鼠 (*Callosciurus erythraeus*; Oshida *et al.* 2006)、小雨蛙 (*Microhyla fissipes*; Lee *et al.* 2016) 族群皆在枋山至大武斷層以南的恆春半島區具有遺傳上獨特的系群的情形相似。但值得一提的是，儘管大武斷層似乎會是東南部族群往

北遷移的隔離因子，但在東南部四個族群內所含東部系群的遺傳成份，並無與其他東部族群具有遺傳分化的情形（圖 3），造成這樣的原因可能是因為隔離的年代尚不夠久，所以無法看到有遺傳分化的情形，也可能是大武壠層雖然可能構成地理屏障，但可能無法形成完全的隔離，仍然有部份個體能夠越過這些斷崖進行基因交流。總結以上，臺灣黑蒙西氏小雨蛙族群結構受到臺灣的地形結構影響甚深，中央山脈東、西兩側的族群已產生遺傳分化的現象，兩個主要系群各自擁有獨特的基因型。

二、臺灣黑蒙西氏小雨蛙族群間基因交流情形：

臺灣黑蒙西氏小雨蛙東、西部族群間 F_{ST} 值為 0.622，顯示以中央山脈為界，東、西部族群間遺傳分化情形相當明顯。分別計算臺灣所有族群、東部系群以及西部系群的 F_{ST} 值與 Nm 值，瞭解所有族群間、東部系群內以及西部系群內族群間的基因交流情形。 Nm 的公式概念是來自於 Wright's

(1951) island model of gene flow， N 代表在一個族群雌性個體的有效族群量，而 m 代表平均的遷移速率，因此 Nm 值可當成族群間基因交流程度的指標 (Hudson *et al.* 1992)。若平均 Nm 值 ≥ 1 時，被認為可以足夠對抗遺傳漂變 (genetic drift) 的效應，避免族群間遺傳分化的情形。計算臺灣所有黑蒙西氏小雨蛙族群間的平均 F_{ST} 值為 0.614，平均 Nm 值為 1.077，再各別討論東、西部系群內族群間的基因交流程度。東部系群族群間的 F_{ST} 為 0.267，平均 Nm 值為 1.885，具有較頻繁的基因交流現象，而西部系群族群間的 F_{ST} 為 0.536，平均 Nm 值為 1.143， Nm 值也略大於 1，呈現些微程度的基因交流的現象。雖然在臺灣所有族群間的 Nm 值為 1.077，顯示黑蒙西氏小雨蛙可能具一定的擴散能力，在東部的地形上是以花東縱谷為主，且無太高聳的高山地形，這樣較為平坦的花東縱谷地形，對於東部黑蒙西氏小雨蛙來說，在基因交流上並不會形成太大的障礙。而臺灣西部的地形上大多為平原地形，對於西部黑

蒙西氏小雨蛙族群間的交流也可能並不會造成太大的障礙。雖然在前人對於臺灣兩生類的親緣地理學發現，如拉都希氏赤蛙 (*Sylvirana latouchii*) 的研究中 (Jang-Liaw *et al.* 2008) 顯示在平坦的西部平原中，水文系統的地理隔離，如濁水溪，也會是個隔離的因子，但並不是完全的隔離。而在西部黑蒙西氏小雨蛙的親緣地理結構上雖然呈現某些程度上的受到濁水溪的隔離，但從系群的地理分布圖 (圖 3) 來看，黑蒙西氏小雨蛙個體還是能夠往返河川的兩岸進行交流，並無明顯的受到河川的隔離的效應。在 Lee 等人 (2016) 的小雨蛙 (*Microhyla fissipes*) 族群遺傳研究中，臺灣小雨蛙族群可分為北部群、西部群、東部群及南部群 4 個系群，其結果顯示在西部群中河川水系也並未對小雨蛙族群有明顯的隔離效應。因此，水文系統的地理結構所形成的障礙可能無法完全阻隔一些兩生類的交流。總和以上的結果推論，雖然黑蒙西氏小雨蛙具有一定的擴散能力，但從隔離分化效應的檢測來看 (圖 5、圖 6)，東、西部系群均具

有隔離分化的效應，這表示距離較近的族群間基因交流較為頻繁，而距離越遠的族群間的基因交流程度就越低。

黑蒙西氏小雨蛙在臺灣的分布為臺中市以南，南至恆春半島，東部北界為花蓮縣。以東、西族群的 Nm 值來看，雖然東、西部系群內族群間具有一定能力的擴散能力，但是黑蒙西氏小雨蛙在臺灣北部地區並無分布，可能是因為遇到難以跨越的地理障礙或是生理條件上的限制。清水斷崖位於臺灣東部花蓮與宜蘭交界，阻斷了蘭陽平原與花東縱谷兩個地理區，而一些大斷崖的海拔高度可達一千公尺，在過去一些研究指出清水斷崖是北部群與東部群產生分化的重要地理因素，如臺灣草蜥種群 (*Takydromus formosanus species complex*) 在清水斷崖兩側具有已分化的兩系群，且已達種的層級 (Tseng *et al.* 2014)。相信這樣的地理障礙對於棲息於中、低海拔的黑蒙西氏小雨蛙會是個有效的地理屏障，使得東部族群難以往北散播過去。位於臺灣西部臺中縣與苗栗縣交界的苗栗台地，苗栗台地的兩側在

氣候與生物相上具有明顯的差異，可能是西部黑蒙西氏小雨蛙族群無法往北播遷的一個地理障礙。除了這些地理結構的原因之外，生態上的限制也可能是個重要的因子。一般認為狹口蛙是熱帶起源的兩生類群，現狹口蛙在世界上的分布多位於熱帶地區，只有少數能拓展至溫帶地區 (Parker 1934)。而臺灣是全世界黑蒙西氏小雨蛙分布的最東界。在這樣一個熱帶起源的物種而言，在生態條件上應該喜歡較溫暖、潮溼的生態環境，或許是因為生理上的限制，使得黑蒙西氏小雨蛙無法成功渡過臺灣北部的冬天，進而成功建立族群。但是同樣為狹口蛙科物種的小雨蛙 (*Microhyla fissipes*)，卻能夠在臺灣全島皆有分布，而在 Lee 等人 (2016) 的小雨蛙族群遺傳結構研究結果顯示北部群與臺灣其他地區的遺傳組成具有差異，可能具有明顯的隔離效應將北部族群區隔。因此，造成黑蒙西氏小雨蛙無法在北部建立族群可能的原因為地理上所造成的屏障或者是因為生態、生理條件上的限制，也可能是本來北部具

有黑蒙西氏小雨蛙但經歷了不知原因的滅絕事件，造成北部地區並無黑蒙西氏小雨蛙的分布。這可能需要進行更多研究才能解答這樣的現象。總結以上，臺灣黑蒙西氏小雨蛙在東部系群內族群間的基因交流程度較西部系群內族群間佳，但由隔離分化的分析結果顯示整體的擴散能力並不佳，距離越遠的族群間基因交流程度越低。

三、臺灣黑蒙西氏小雨蛙族群的變動歷史：

在過去幾百萬年來氣候的變動，會對現存物種的族群變動歷史以及遺傳多樣性造成顯著的影響。當冰河期來臨時，氣溫下降，生物族群被迫使向南遷移進入避難所 (refugium)，等到間冰期時，族群會從避難所向外擴張，因此隨著氣候的變遷，生物族群量的變動歷史也隨著緊縮、擴張，因此會影響現今生物族群的遺傳多樣性與基因組成 (Hewitt 1996, 2000; Excoffier 2004; Soltis *et al.* 2006)。氣候變遷對於生物族群變動歷史的研究，在歐洲及北美洲的溫帶動物的研究著墨較多

(Green *et al.* 1996; Austin *et al.* 2002; Kuchta and Tan 2005)，對於生活在亞熱帶或熱帶地區的生物族群，此類的研究較少。

本次研究的結果清楚的顯示臺灣黑蒙西氏小雨蛙族群變動歷史與更新世的氣候變遷有相當密切的關係。先討論東部系群內族群的變動歷史，以 Tajima's D 及 Fu's F 值皆為負值且顯著偏離 0 (表 4)，Mismatch distribution 為單峰分布 (unimodal distribution)，以上的結果皆顯示東部系群的族群經過了一族群擴張的事件。而 Bayesian skyline plot (BSP) 的結果顯示在十五萬到二十五萬年前有一族群擴張事件，其時間點落於更新世時期 (圖 8)。而西部系群內族群的變動歷史，雖然 Tajima's D 值為負值，但並不顯著偏離 0，而 Fu's F 值為負值且顯著偏離 0 (表 4)，Mismatch distribution 為雙峰分布 (bimodal distribution)，顯示西部系群呈現相對穩定的族群結構，儘管 Tajima's D 檢測與 Mismatch distribution 不能顯示西部系群的族群有族群擴張事件，但

從 Bayesian skyline plot 的結果顯示在十五萬到三十萬年前有一族群擴張事件，其時間點同樣也落於更新世時期 (圖 9)。

Grant and Bowen (1998) 提出可以利用比較核苷酸多樣性 (π) 以及基因型多樣性 (h)，來推斷族群的變遷歷史以及族群變動統計。可以分成四種類型：(1) $h < 0.5$ 且 $\pi < 0.5\%$ ，表示這族群受到持續的瓶頸效應。(2) $h > 0.5$ 而 $\pi < 0.5\%$ ，表示族群是由少數祖先族群快速擴張而來的。(3) $h < 0.5$ 而 $\pi > 0.5\%$ ，表示族群遭受到短期的瓶頸效應。(4) $h > 0.5$ 且 $\pi > 0.5\%$ ，表示族群在歷史上具有穩定且大的有效族群量，或是分化的系群再次接觸。分別以兩個主要的系群來看，東部系群的基因型多樣性 (h) 為 0.7858，核苷酸多樣性 (π) 為 0.416%。西部系群的基因型多樣性 (h) 為 0.9041，核苷酸多樣性 (π) 為 0.743%。東部系群的 $h=0.7858 > 0.5$ ， $\pi=0.416\% < 0.5\%$ ，顯示東部系群為少數的祖先族群快速擴張而來，而從 minimum spanning network 與東部族群的遺傳多樣性推測

東部系群在冰河時期的避難所可能在臺東東河一帶，因為臺東東河的個體所帶的基因型 (hap37、hap27) 位於東部系群網狀圖的中央位置 (圖 7)，且核苷酸多樣性 (π) 較其他族群來得高 (表 1)。而西部系群的 $h=0.9041>0.5$ ， $\pi=0.743\%>0.5\%$ ，顯示西部系群的族群可能擁有穩定且大的有效族群。由以上結果可推論，更新世的氣候變遷會造成臺灣黑蒙西氏小雨蛙族群量及範圍的變動，提供了一個生活在亞熱帶及熱帶地區的生物受到更新世氣候變遷影響的例子。

引用文獻

- 呂光洋、杜銘章、向高世。1999。臺灣兩棲爬行動物圖鑑 (初版)。中華民國自然生態保育協會。大自然雜誌社，臺北。
- Austin, J. D., S. C. Louheed, L. Neidrauer, A. A. Chek, and P. T. Boag. 2002. Cryptic lineages in a small frog: the post-glacial history of the spring peeper, *Pseudacris crucifer* (Anura: Hylidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 25: 316–329.
- Avice, J. C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Barrow, L. N., J. A. Soto-Centeno, A. R. Warwick, A. R. Lemmon, and E. Moriarty Lemmon. 2017. Evaluating hypotheses of expansion from refugia through comparative phylogeography of south-eastern Coastal Plain amphibians. *Journal of Biogeography* 44: 2692–2705.
- Creer, S., A. Malhotra, R. S. Thorpe, and W. H. Chou. 2001. Multiple causation of phylogeographical pattern as revealed by nested clade analysis of the bamboo viper (*Trimeresurus stejnegeri*) within Taiwan. *Molecular Ecology* 10: 1967–1981.
- Drummond, A. J., A. Rambaut, B. Shapiro, and O. G. Pybus. 2005. Bayesian coalescent inference of

- past population dynamics from molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution* 22: 1185-1192.
- Drummond, A. J. and A. Rambaut. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7: 214.
- Excoffier, L. 2004. Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model. *Molecular Ecology* 13: 853–864.
- Excoffier, L., G. Laval, and S. Schneider. 2005. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics* 1: 47–50.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.
- Frost, D. R. 2023. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.2 (Date of access). Electronic Database accessible at <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>. American Museum of Natural History, New York, USA. <https://doi.org/10.5531/db.vz.0001>.
- Fu, Y. X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915–925.
- Grant, W. S. and B. W. Bowen. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity* 89: 415–426.
- Green, D. M., T. F. Sharbel, J. Kearsley, and H. Kaiser. 1996. Postglacial range fluctuations, genetic subdivision and speciation in the western North American spotted frog complex, *Rana pretiosa*.

- Evolution 50: 374–390.
- Hewitt, G. M. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* 58: 247–276.
- Hillis, D. M. Mable, B. K. Larson, A. Davis, S. K., and E. A. Zimmer. 1996. Nucleic acids. IV. Sequencing and cloning. *In*: D. M., Hillis C. Moritz, and B. K. Mable (eds.). *Molecular Systematics, Second Edition*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, U.S.A.
- Hudson, R. R., M. Slatkin, and W. P. Maddison. 1992. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics* 132: 583–589.
- Huelsenbeck, J. P. and F. Ronquist. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754–755.
- Jang-Liaw, N. H., T. H. Lee, and W. H. Chou. 2008. Phylogeography of *Sylvirana latouchii* (Anura, Ranidae) in Taiwan. *Zoological Science* 25: 68–79.
- Kuchta, S. R. and A. M. Tan. 2005. Isolation by distance and post-glacial range expansion in the rough-skinned newt, *Taricha granulosa*. *Molecular Ecology* 14: 225–244.
- Kumar, R. and V. Kumar. 2018. A review of phylogeography: biotic and abiotic factors. *Geology, Ecology, and Landscapes* 2(4): 268–274.
- Lee, K. H., P. J. L. Shaner, Y. P. Lin, S. M. Lin. 2016. Geographic variation in advertisement calls of a Microhylid frog – testing the role of drift and ecology. *Ecology and Evolution* 6(10): 3289–3298.
- Lin, H. D., Y. R. Chen, and S. M. Lin. 2012. Strict consistency between genetic and topographic landscapes of the brown tree frog (*Buergeria robusta*) in Taiwan. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62(1):

- 251–262.
- Lin, S. M., C. A. Chen, and K. Y. Lue. 2002. Molecular phylogeny and biogeography of the grass lizards genus *Takydromus* (Reptile: Lacertidae) of East Asia. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 22: 276–288.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209–220.
- Oshida, T., J. K. Lee, L. K. Lin, and Y. J. Chen. 2006. Phylogeography of Palla's squirrel in Taiwan: geographical isolation in an arboreal small mammal. *Journal of Mammalogy* 87: 247–254.
- Parker, H. W. 1934. A monograph of the frogs of the family Microhylidae. The British Museum, London.
- Posada, D. and K. A. Crandall. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817–818.
- Rosauer, D.F., M. P. K. Blom, G. Bourke, S. Catalano, S. Donnellan, G. Gillespie, E. Mulder, P. M. Oliver, S. Potter, R. C. Pratt, D. L. Rabosky, P. L. Skipwith, and C. Moritz. 2016. Phylogeography, hotspots and conservation priorities: an example from the Top End of Australia. *Biological Conservation* 204: 83–93.
- Rozas, J. and R. Rozas. 1999. DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics* 15: 174–175.
- Rozas, J., J. C. Sánchez-DelBarrio, X. Messeguer, and R. Rozas. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496–2497.
- Soltis, D. E., A. B. Morris, J. S. McLachlan, P. S. Manos, and P. S. Soltis. 2006. Comparative phylogeography of unglaciated eastern North America. *Molecular*

- Ecology 15: 4261–4293.
- Swofford, D. L. 2001. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other methods), version 4 beta10. Sunderland, MA.
- Toda, M., M. Nishida, M. Matsui, K. Y. Lue, and H. Ota. 1998. Genetic variation in the Indian rice frog, *Rana limnocharis* (Amphibia: Anura), in Taiwan, as revealed by allozyme data. Herpetologica 54: 73–82.
- Tseng, S. P., S. H. Li, C. H. Hsieh, H. Y. Wang, and S. M. Lin. 2014. Influence of gene flow on divergence dating –implications for the speciation history of *Takydromus* grass lizards. Molecular Ecology 23: 4770–4784.
- Vences, M., M. Thomas, A. van der Meijden, Y. Chiari, and D. R. Vieites. 2005. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. Frontiers in Zoology 2: 5.
- Vogt, T. 1911. Reptilien und Amphibien aus Kaiser-Wilhelmsland. Sitzungsberichte der Gesellschaft Naturforschender Freunde zu Berlin: 181.
- Wang, Y. H., Y. W. Hsiao, K. W. Lee, H. Y. Tseng, Y. P. Lin, S. Komaki, and S. M. Lin. 2017. Acoustic differentiation and behavioral response reveals cryptic speciation within *Buergeria* treefrogs (Anura, Rhacophoridae) from Taiwan. PLoS ONE 12(9): e0184005.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. Annals of Eugenics 15: 323–354.
- Yu, H. S., and J. C. Lu. 1995. Development of the shale diaper-controlled Fangliao Canyon on the continental slope off southwestern Taiwan. Journal of Southeast Asian Earth Sciences 11: 265–276.

表 1 臺灣黑蒙西氏小雨蛙 (*Microhyla heymonsi*) 採樣地點、個體數 (N)、基因型數量 (H)、各族群基因型多樣性 (haplotype diversity; h) 以及核苷酸多樣性 (nucleotide diversity; π)

Table 1 List of sampling localities, sample size, number of haplotypes, haplotype diversities, and nucleotide diversities of *Microhyla heymonsi* in Taiwan.

Sampling localities	N	H	h	π
1. Taichung Dakeng	7	2	0.2857	0.0009
2. Changhua Shetou	5	1	0	0
3. Nantou Guoxing	8	4	0.6429	0.0012
4. Nantou Yuchi	10	4	0.7778	0.0017
5. Nantou Jiji	5	1	0	0
6. Nantou Lugu	8	4	0.7500	0.0047
7. Yunlin Huben	5	2	0.6000	0.0067
8. Chiayi Chukou	6	2	0.5333	0.0017
9. Tainan Donshan	10	3	0.5111	0.0009
10. Tainan Nanhua	7	3	0.5238	0.0059
11. Kaohsiung Maolin	7	2	0.2857	0.0009
12. Kaohsiung Zhongliaoshan	5	2	0.4000	0.0051
13. Kaohsiung Fengshan	5	3	0.7000	0.0019
14. Pingtung Neipu	8	3	0.4643	0.0008
15. Pingtung Chunri	5	1	0	0
16. Pingtung Sheding	9	4	0.6944	0.0143
17. Pingtung Mudan	8	5	0.8571	0.0162
18. Taitung Daren	5	2	0.6000	0.0173
19. Taitung Taimali	5	3	0.7000	0.0122
20. Taitung Lijia	7	2	0.5714	0.0009
21. Taitung Yanping	12	7	0.8939	0.0051
22. Taitung Donghe	9	5	0.7222	0.0103
23. Hualien Fuli	10	6	0.8889	0.0038
24. Hualien Ruisui	8	4	0.7857	0.0017
25. Hualien Shoufeng	7	1	0	0
Total	181	48		
Total populations			0.9328	0.0160

表 2 東西兩個主要系群間、系群內 (粗體字) 平均遺傳距離 (p -distance)

Table 2 The mean genetic distance between/within (**bold**) two major clades from eastern and western regions of Taiwan, respectively.

	Eastern lineage	Western lineage
Eastern lineage	0.004	-
Western lineage	0.027	0.007

表 3 臺灣黑蒙西氏小雨蛙 (*Microhyla heymonsi*) 之分子變方分析 (Analysis of Molecular Variance; AMOVA), 以中央山脈為界, 將東、西部族群分群作檢測

Table 3 Analysis of the Molecular Variance (AMOVA) table statistic of eastern and western populations of *Microhyla heymonsi*.

Source of variation	df	% of variance	Φ	P
East/West regions	1	61.30%	0.61299	<0.0001
Among population within regions	23	19.03%	0.49167	<0.0001
Within population	156	19.67%	0.80327	<0.0001

表 4 臺灣所有黑蒙西氏小雨蛙 (*Microhyla heymonsi*) 族群個體以及兩個主要系群族群個體的中性檢測 (Tajima's D and Fu's F test)。** 表示 $P<0.01$, *** 表示 $P<0.001$

Table 4 The neutrality tests of *Microhyla heymonsi* populations. ** represents $P<0.01$; ***represents $P<0.001$

	Tajima's D	Fu's F
All populations	-0.71313	-9.11765
Western lineage	-0.90427	-9.03033**
Eastern lineage	-2.25174***	-8.17999**

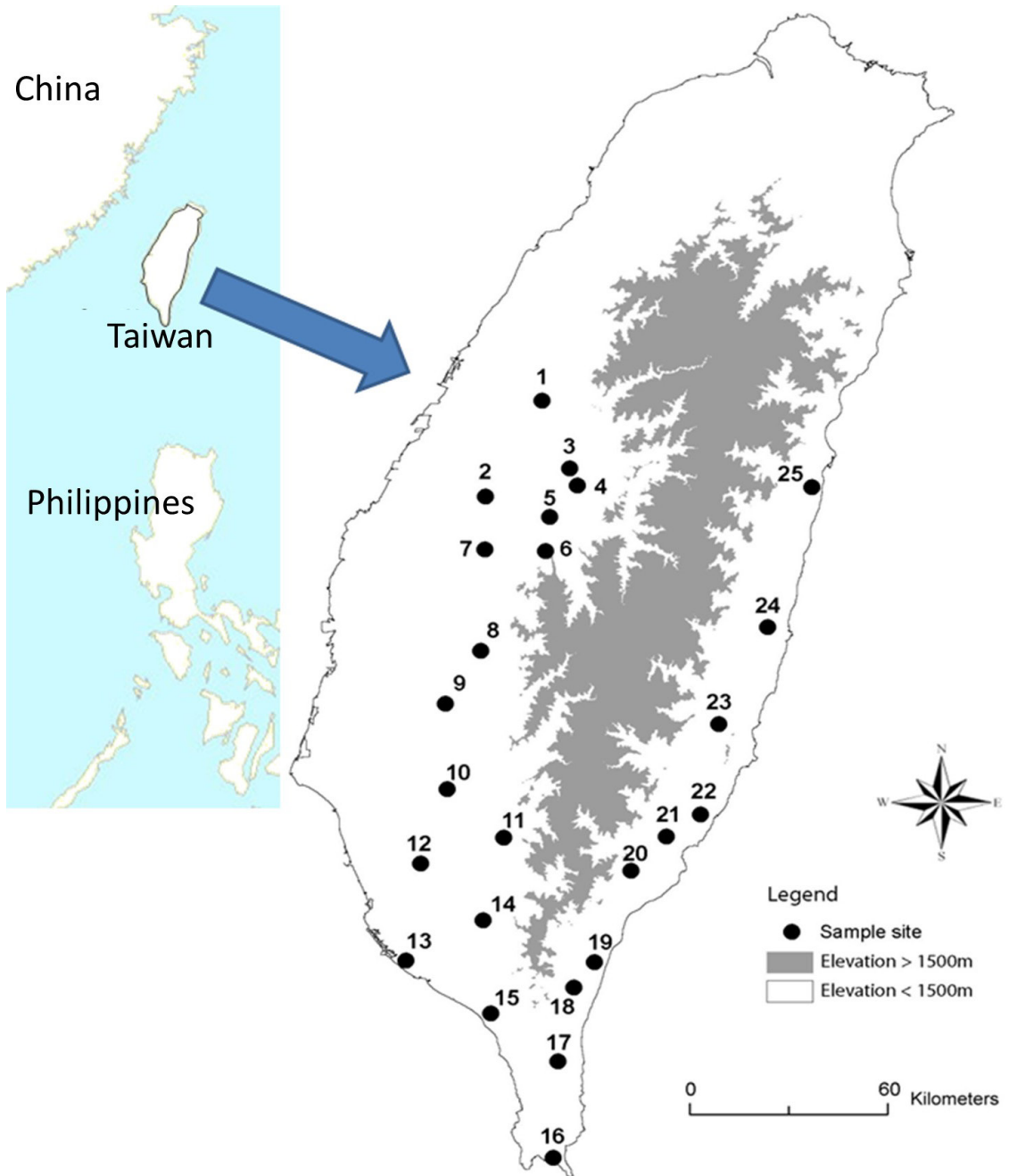


圖 1 本研究所使用之黑蒙西氏小雨蛙 (*Microhyla heymonsi*) 樣本的採樣地點。

Fig. 1 The sampling localities of *Microhyla heymonsi* in this study.

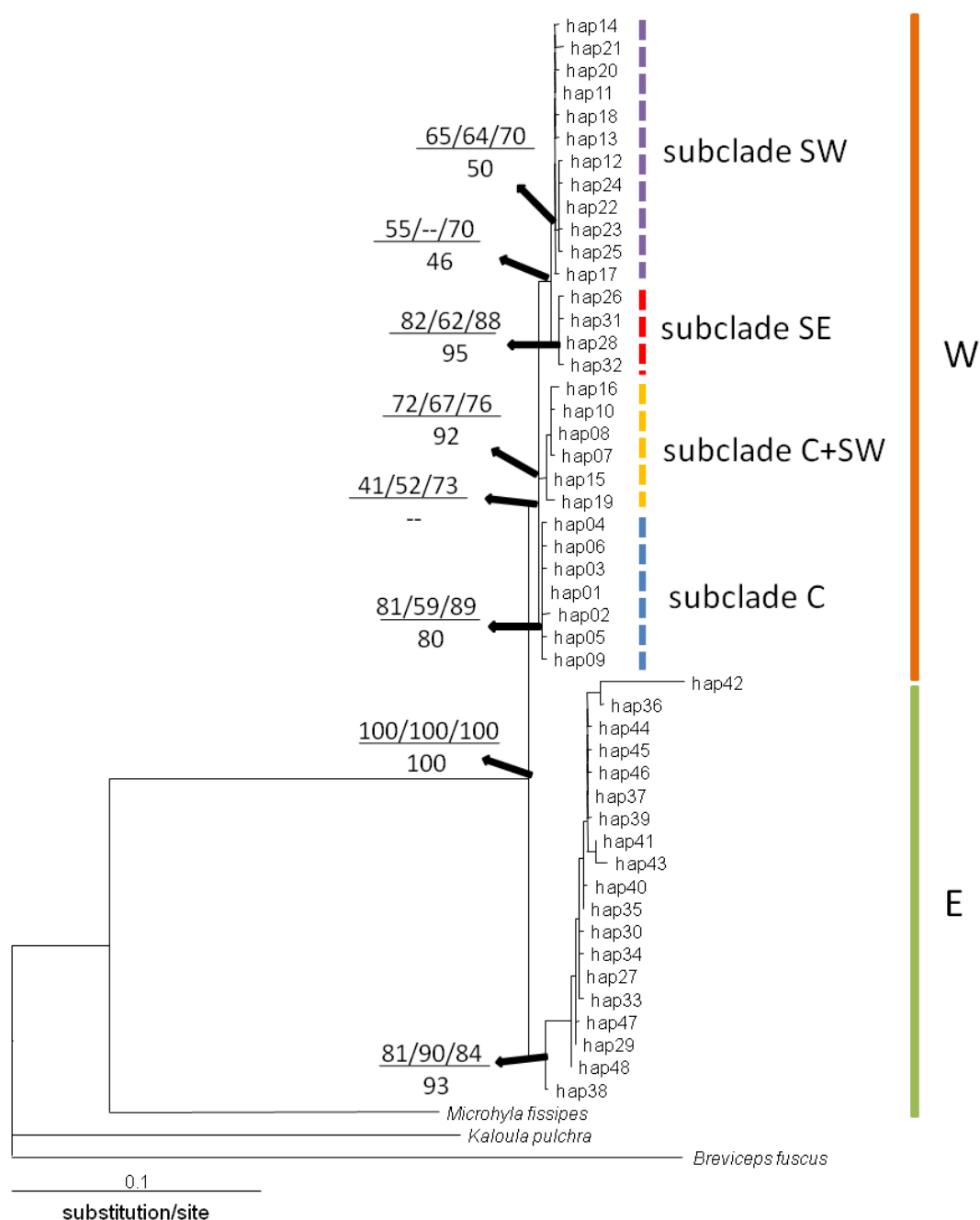


圖 2 以 Maximum Likelihood 方法重建臺灣黑蒙西氏小雨蛙 (*Microhyla heymonsi*) 族群的親緣關係樹。分支上上層數字分別為 ML、MP、NJ 的 bootstrap value，下層數字為 BI 的 posterior probability。

Fig. 2 The maximum likelihood tree of (*Microhyla heymonsi*'s) CO1 sequence. The numbers above the nodes indicate the bootstrap values of ML, MP, and NJ, respectively. The numbers below the nodes indicate the posterior probability of Bayesian Inference.

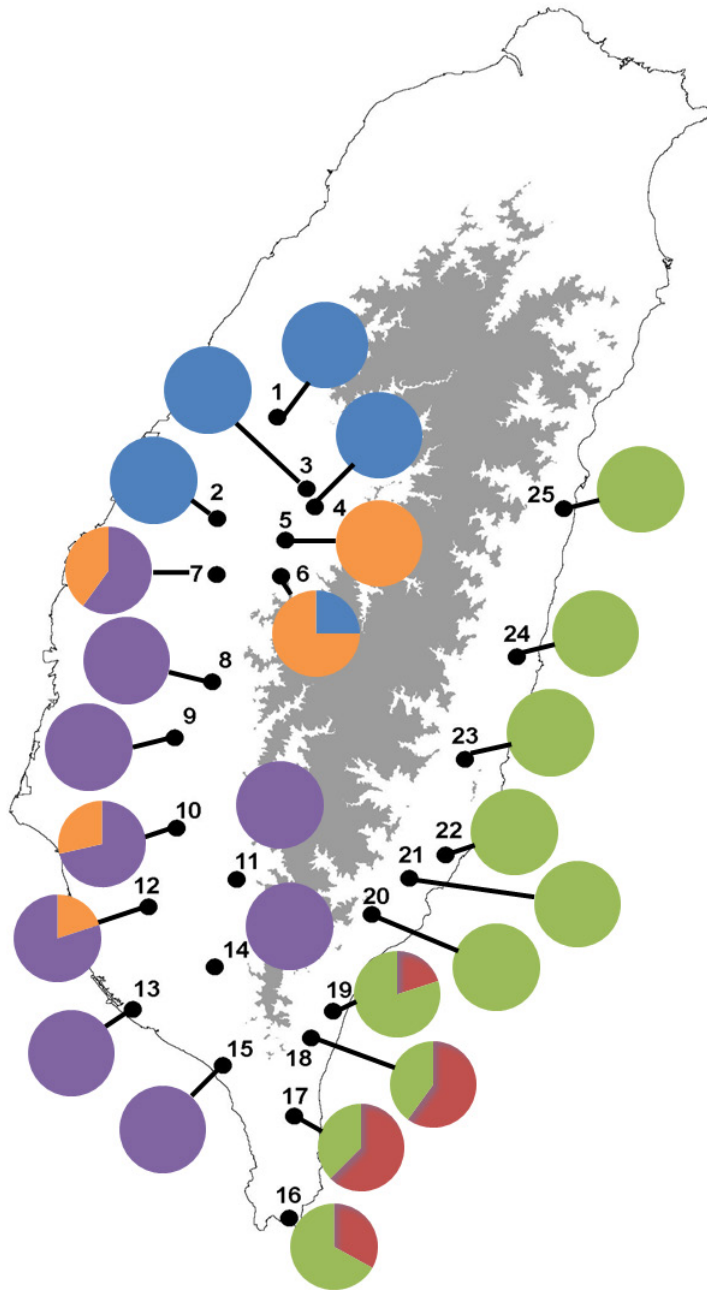


圖 3 臺灣黑蒙西氏小雨蛙 (*Microhyla heymonsi*) 各族群所含兩個主要系群的比例分布圖。藍色代表中部亞支 (C)，黃色代表中、西部亞支 (C+W)，紫色代表西南部亞支 (SW)，紅色代表在西部系群中的東南部亞支 (SE)，綠色代表東部系群 (E)。

Fig. 3 The distribution of the haplotypes of the eastern and western major clades *Microhyla heymonsi*. The color blue represents the central subclade (C); the color yellow represents the central+west subclade (C+W); the color purple represents the southwest subclade (SW); the color red represents the southeast subclade (SE); and the color green represents the eastern major clade (E).

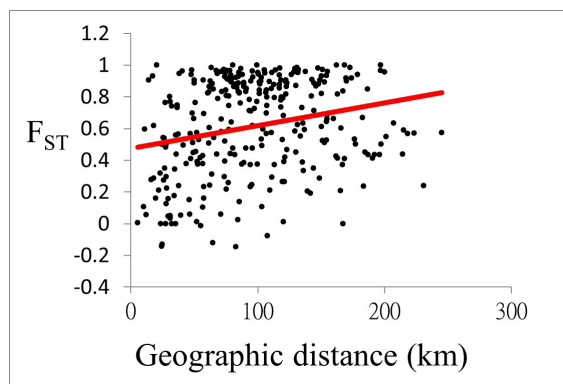


圖 4 臺灣黑蒙西氏小雨蛙 (*Microhyla heymonsi*) 所有族群間，兩兩比較 F_{ST} 值對兩兩地理距離作圖。
Mantel test $t=3.3428$, $P=0.003$ 。

Fig. 4 Mantel test between pairwise F_{ST} and geographic distances for all populations.

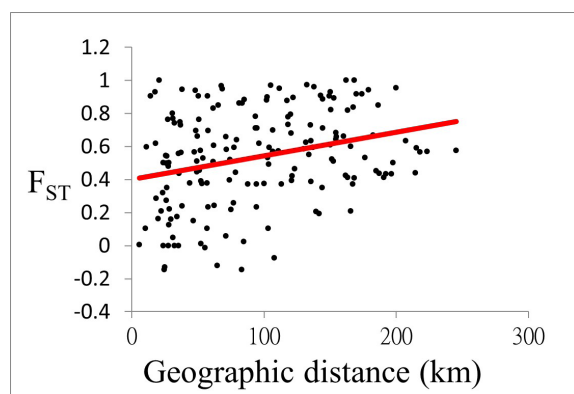


圖 5 臺灣黑蒙西氏小雨蛙 (*Microhyla heymonsi*) 西部系群族群間，兩兩比較 F_{ST} 值對兩兩地理距離作圖。Mantel test $t=3.3487$, $P=0.007$ 。

Fig. 5 Mantel test between pairwise F_{ST} and geographic distances for the western populations.

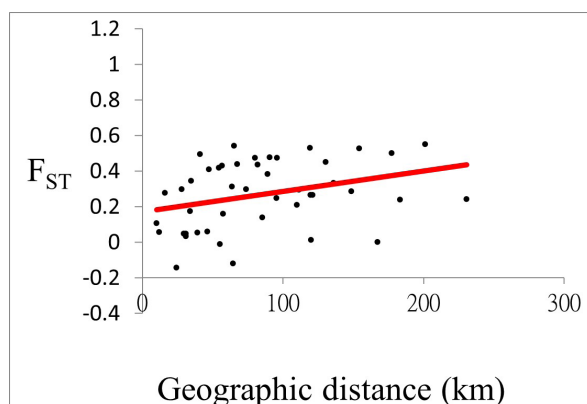


圖 6 臺灣黑蒙西氏小雨蛙 (*Microhyla heymonsi*) 東部系群族群間，兩兩比較 F_{ST} 值對兩兩地理距離作圖。Mantel test $t=1.7509$, $P=0.003$ 。

Fig. 6 Mantel test between pairwise F_{ST} and geographic distances for the eastern populations.

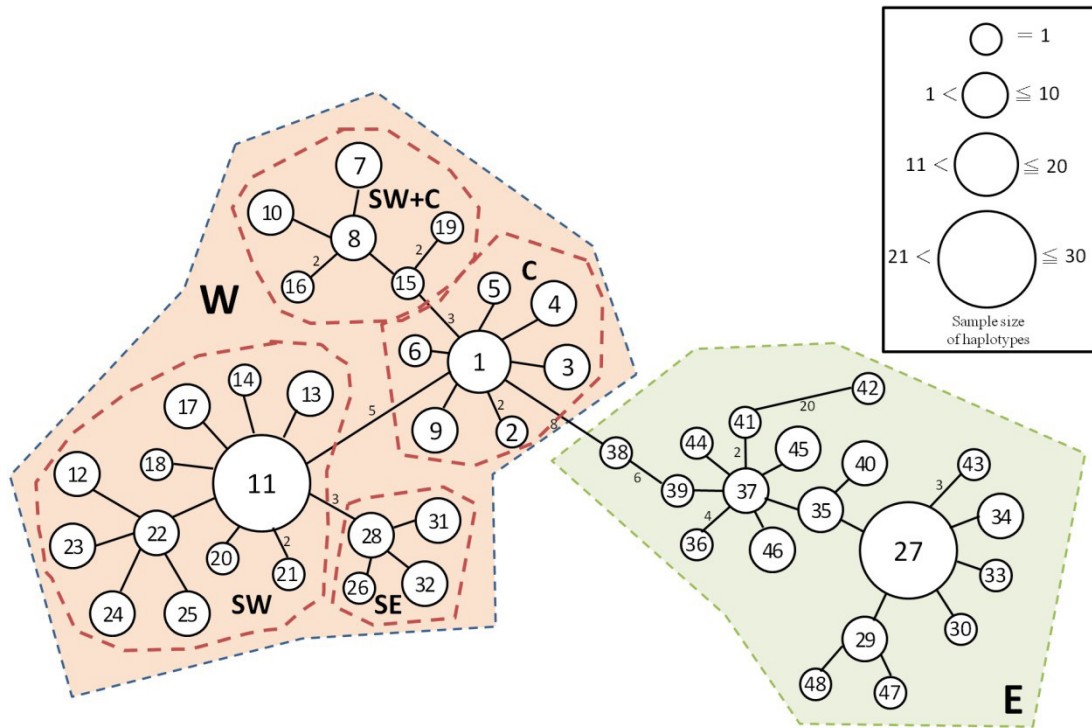


圖 7 臺灣黑蒙西氏小雨蛙 (*Microhyla heymonsi*) 48 條基因型 (haplotype) 的最小關聯網狀圖 (minimum spanning network)。

Fig. 7 The minimum spanning network of 48 haplotypes recognized in Taiwan *Microhyla heymonsi* populations.

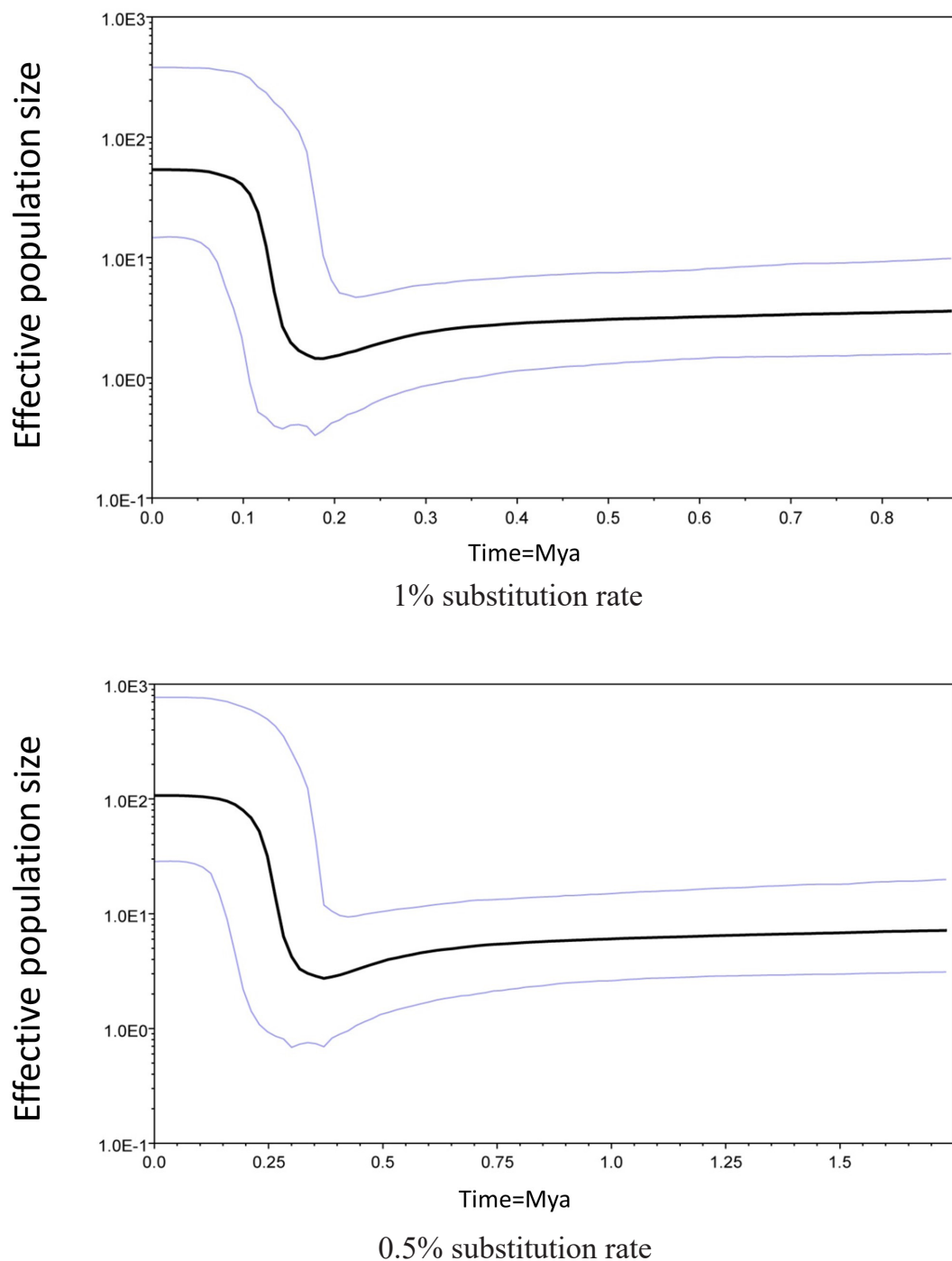
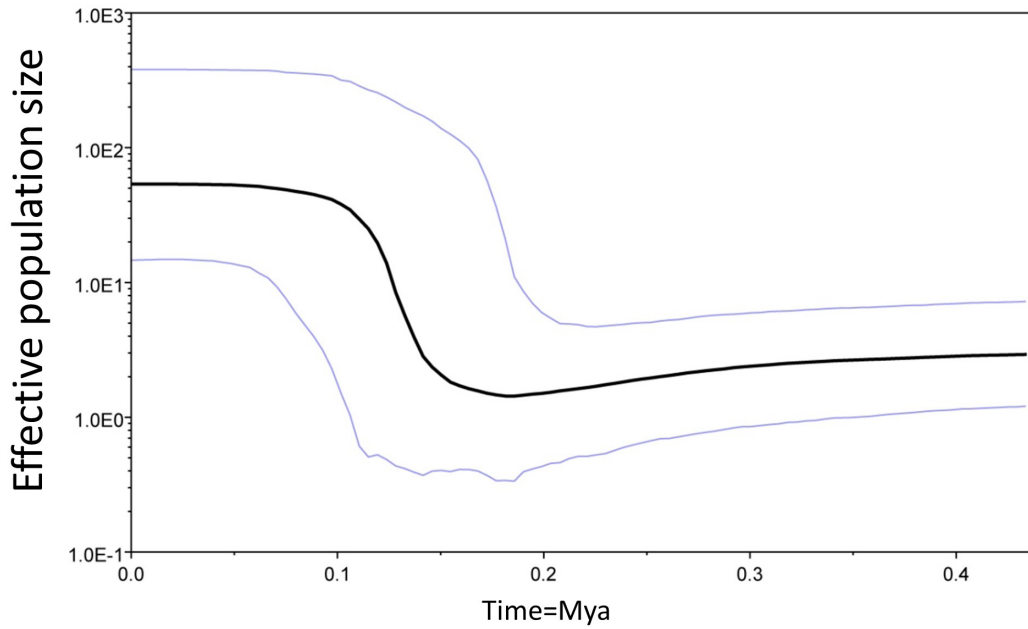
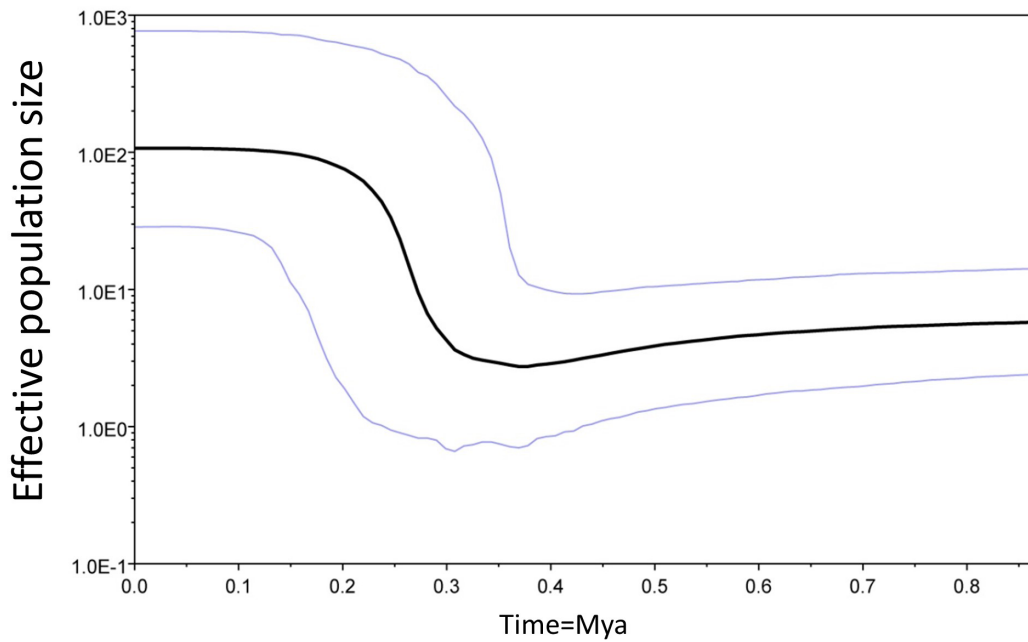


圖 8 分別以 1% 及 0.5% 的核苷酸置換率進行 Bayesian skyline plot 分析，回溯臺灣黑蒙西氏小雨蛙 (*Microhyla heymonsi*) 東部系群的族群量變動歷史。

Fig. 8 The Bayesian skyline plot of the eastern major clade indicates a population growth beginning near 0.25~0.15 Mya (0.5% and 1% substitution rate, respectively) of the Pleistocene Epoch.



1% substitution rate



0.5% substitution rate

圖 9 分別以 1% 及 0.5% 的核苷酸置換率進行 Bayesian skyline plot 分析，回溯臺灣黑蒙西氏小雨蛙 (*Microhyla heymonsi*) 西部系群的族群量變動歷史。

Fig. 9 The Bayesian skyline plot of the western major clade indicates a population growth beginning near 0.3~0.15 Mya (0.5% and 1% substitution rate, respectively) of the Pleistocene Epoch.