

龜山島狐蝠族群的保育地位評估 (2/4)

Conservation status of the flying fox population
on Gueishan Island

計畫編號：108 林發-9.1-保-30

計畫主持人：陳湘繁

計畫主辦人：陳湘繁、可文亞、張廖年鴻

研究助理：阮仲豪

執行機關：國立臺北大學、國立陽明大學、臺北市立動物園

執行期間：108 年 3 月 1 日至 108 年 12 月 31 日

中華民國 108 年 12 月 31 日

目次

目次.....	I
表次.....	II
圖次.....	III
摘要.....	IV
Abstract	V
前言.....	1
材料與方法.....	5
結果.....	9
討論.....	11
致謝.....	22
參考文獻.....	23
附錄一、本研究所使用之琉球狐蝠(<i>Pteropus dasymallus</i>)樣本數及來源對照表	33
附錄二、26組適用於琉球狐蝠(<i>Pteropus dasymallus</i>)的微衛星基因座表	34
附錄三、野外樣本採集照片	36

表次

表一、琉球狐蝠 (<i>Pteropus dasymallus</i>) 的遺傳多樣性	15
表二、琉球狐蝠的分子變異數分析(Analysis of molecular variance, AMOVA).....	16
表三、琉球狐蝠 (<i>Pteropus dasymallus</i>) 於亞種/族群之間的成對遺傳分化	17

圖次

圖一、琉球群島、臺灣及北部菲律賓群島的位置地圖.....	18
圖二、琉球狐蝠 (<i>Pteropus dasymallus</i>) 的遺傳和地理距離之島嶼間成對比較	19

摘要

數量稀少之小族群容易因遺傳隨機事件以及遺傳漂變的影響而使其生存受到威脅，故對受脅物種的保育而言，如何維持遺傳變異度是十分重要的保育議題。狐蝠為熱帶及亞熱帶生態系中，幫助植物授粉及種子傳播的基石物種，然嚴重的棲地喪失及狩獵壓力，使得許多狐蝠物種或族群正面臨險峻的存續壓力。琉球狐蝠的分布範圍從日本琉球群島、至臺灣，南達菲律賓北部小島，部分島嶼在過去幾十年族群呈現急遽衰減的趨勢。在臺灣，台灣狐蝠過去主要分布於綠島，但因過度獵捕，族群幾近消失，近年來在龜山島和花蓮出現穩定的小族群，然對其來源和分類地位，尚未有任何相關的研究。為進一步探究台灣出現之狐蝠族群與其他琉球狐蝠亞種的遺傳多樣性和族群遺傳結構，以及探討其形塑因子，我們使用兩套遺傳標記——包含粒線體及微衛星基因座，結果顯示族群之間的遺傳距離與地理距離呈正相關，符合距離隔離模式。粒線體資料顯示島嶼間有不同程度的基因交流，可能與過去歷史上出現的拓殖亦或播遷事件有關；微衛星資料則顯示海峽的分布位置可清楚對應到亞種的分群。琉球狐蝠現今的地理分布及其亞種的多樣性，可能受到地質上重大歷史事件，再加上跨越海洋地理障礙的基因流非常有限所影響。我們認為隔離的群島族群應視為獨立的保育單位管理，並應擬定具體的保育措施，以減緩其族群多樣性進一步的衰減。

關鍵字：遺傳分化、島嶼生物地理學、跨洋播遷、狐蝠科、琉球群島、地理分隔

Abstract

Small isolated populations are vulnerable to both stochastic events and the negative consequences of genetic drift. For threatened species, the genetic management of such populations has therefore become a crucial aspect of conservation. Flying foxes (*Pteropus* spp, Chiroptera) are keystone species with essential roles in pollination and seed dispersal in tropical and subtropical ecosystems. Yet many flying fox species are also of conservation concern, having experienced dramatic population declines driven by habitat loss and hunting. The insular Ryukyu flying fox (*Pteropus dasymallus*) ranges from the Ryukyu Archipelago of Japan through Taiwan to the northern Philippines, and has undergone precipitous population crashes on several islands in recent decades. In Taiwan, the Formosan flying fox was once abundant in its original main habitat on Lyudao; however, this island population experienced dramatic hunting and habitat loss in the 1970s and 1980s, leading to its near extinction. In recent years, additional small populations of the Formosan flying fox were recorded on Gueishan Island and Hualien. At the present time, nothing is known about the origin of the flying foxes on Gueishan Island and Hualien. To study the relationship between the Taiwanese flying foxes and their sister subspecies, we assessed population genetic structure and diversity in *P. dasymallus*, and its likely causes using mitochondrial and microsatellite DNA markers. Both markers showed significant genetic differentiation among most island populations with patterns of isolation by distance. However, while mitochondrial haplotypes showed some mixing across the region, likely reflecting historical colonization and/or dispersal events, microsatellites markers showed clear subdivisions corresponding to the position of deep ocean trenches. The current distribution of *P. dasymallus* and its subspecific diversity therefore appears to have arisen through vicariance coupled with a long history of restricted gene flow across oceanic barriers. We conclude that isolated island subgroups should be managed separately, with efforts directed at reducing further declines.

KEYWORDS: genetic differentiation, island biogeography, oceanic dispersal, Pteropodidae, Ryukyu Islands, vicariance

前言

小規模且孤立的族群容易受到隨機事件及遺傳漂變等壓力的影響，這些威脅將直接使其遺傳多樣性以及繁殖之適存值降低，最終甚至可能導致物種的滅絕 (Ellstrand & Elam 1993; Frankham 2010; Jordan *et al.*, 2016)。遺傳管理對於數量瀕危或破碎化之族群的生物多樣性保育至關重要，特別是對於正處於瀕臨滅絕邊緣及受到明顯生存威脅的保育物種。藉由遺傳資訊，我們可以有效地監測遺傳多樣性之逸失及精確估算各類型的族群參數——如族群量的動態變化、和基因的交流，此資訊有助我們評估一個物種長期存續的潛能 (Allendorf *et al.*, 2010, Shafer *et al.*, 2015)。若妥善整合遺傳以及非遺傳面向(如行為、生態、族群統計及環境層面等)的各項考量，更能提升保育策略的成效 (Hoban *et al.*, 2013, Polechová & Barton, 2015, Frankham *et al.*, 2017)。

舊世界果蝠(翼手目狐蝠科)於熱帶及亞熱帶生態系中扮演授粉及種子傳播的重要角色，被視為生態系中的基石物種 (Cox *et al.*, 1991; Fujita & Tuttle 1991)。狐蝠具有長距離傳播種子的能力，此生態服務可有效促進森林的復育 (Nyhagen *et al.*, 2005; Shilton & Whittaker 2009)，此外，許多具有重要經濟價值的植物(如榴槤)，也相當依賴狐蝠的授粉 (Sheherazade *et al.*, 2019)。然而，即使狐蝠如上所述，為熱帶和亞熱帶生態系服務的主要提供者之一，近年來仍面臨棲地喪失、劣化及狩獵壓力等諸多生存壓力，甚至已嚴重威脅到舊世界果蝠的生存，並導致其族群快速的衰減 (Mickleburgh *et al.*, 2002)。目前已知約 200 多個果蝠物種，將近半數被列為受威脅或瀕危等級，急需積極的保育行動，其中即包括 30 個狐蝠屬的物種 (IUCN, 2019)。

舊世界果蝠體型大，擅於長距離飛行。根據紅狐蝠 (*P. scapulatus*) 及黃果蝠 (*Eidolon helvum*) 的遺傳分析顯示，基因流可橫跨澳洲及非洲大陸數千公里的距離 (Sinclair *et al.*, 1996, Peel *et al.*, 2013)。大型舊世界果蝠會進行長距離移動，可能是因為播遷、或導因於自然界的暴風或颱風，但也可能是為了追尋短期的糧食資源。以狐蝠屬的印度狐蝠 (*P. medius*)、模里西斯狐蝠 (*P. niger*)、太平洋狐蝠 (*P. tonganus*) 及馬來狐蝠 (*P. vampyrus*) (McConkey & Drake, 2007, Larsen *et al.*, 2014, Tsang *et al.*,

2018, Olival *et al.*, 2019)為例，遺傳資料間接證明了長距離島間移動的存在，相鄰島嶼上的族群呈現隨機交配(panmictic)的型式；然而，有些狐蝠物種—例如：科莫洛狐蝠(*P. livingstonii*)、馬利安納狐蝠(*P. mariannus*)及薩摩亞狐蝠(*P. samoensis*)—群島間則呈現明顯的遺傳結構，顯示其島間的基因流非常有限(Brown *et al.*, 2011, Russell *et al.*, 2016, Ibouroi *et al.*, 2018)。因應這些不同遺傳結構型態的物種，需要不同的保育管理對策，對前者而言，群島可被視為單一的經營管理單元；而後者，島嶼之間的不同族群則應視作不同的演化顯著單元(evolutionarily significant units, ESU)，須擬定相對應、不同的管理策略(Epstein *et al.*, 2009, Oleksy *et al.*, 2019)。

琉球狐蝠 (*Pteropus dasymallus*)廣泛分布於西太平洋諸島，包含日本琉球群島、臺灣及菲律賓北部的島嶼(Kinjo & Nakamoto, 2015；圖一)。目前已知五個亞種，可根據其分布之島群做區分，包含位於日本琉球群島的四個亞種—大東狐蝠(*P. d. daitoensis*)、永良部狐蝠(*P. d. dasymallus*)、折居氏狐蝠(*P. d. inopinatus*)和八重山狐蝠(*P. d. yayeyamae*)，以及位於臺灣的第五個亞種—臺灣狐蝠(*P. d. formosus*) (Yoshiyuki, 1989, Mickleburgh *et al.*, 1992)。而較晚進才被發現的菲律賓族群，主要分布於呂宋島北方的巴丹群島(Batanes islands)及巴布延群島(Babuyan Islands)，分類地位仍待釐清，尚未被正式發表為一亞種(Heaney *et al.*, 1998)，。

琉球狐蝠在國際自然保育聯盟紅皮書(IUCN Red list)中被評估為易危(Vulnerable)的保育等級(IUCN, 2019)，實際上的保育現況各亞種不同(Vincenot *et al.*, 2017)，其中大東、永良部、和臺灣狐蝠三個亞種的族群數量都極為稀少，約僅 50-300 隻個體(Wu, 2010, Saitoh *et al.*, 2015)。目前上述亞種都已受國家層級的法律保護，大東及永良部亞種被指定為日本的天然紀念物(Natural Monuments)，其中大東亞種亦為國家瀕危物種(National Endangered Species)；而在臺灣，臺灣狐蝠也被列為瀕臨絕種保育類野生動物。相對地，其他的亞種—折居氏、八重山以及菲律賓族群，則較為普遍，尚未被歸類為區域性的受脅等級(Heaney *et al.*, 1998, Saitoh *et al.*, 2015)

大東亞種在地理分布上侷限於大東群島的兩處島嶼—南大東島(Minamidaito-jima)及北大東島(Kitadaito-jima) (圖一)，其大部分自然棲地皆已開發為農地，最主

要的生存威脅是颱風(Saitoh *et al.*, 2015)。永良部亞種分布於大隅群島(*Ōsumi Islands*)及圖克拉群島(*Tokara Islands*)，為琉球狐蝠分布的北界(Yoshiyuki, 1989)。在臺灣，臺灣狐蝠過去曾普遍分布於綠島，然而 1970 至 80 年代之間，遭受嚴重的狩獵及棲地喪失，幾近滅絕(Lin & Pei, 1999)。而於 2004 年，在龜山島首次記錄到狐蝠；此外自 2006 年，在台灣本島東部和東北部也陸續記錄到零星的個體(Wu, 2010)。目前為止，對於龜山島及臺灣本島個體的來源尚未有任何相關的研究。

琉球狐蝠亞種之間的親緣關係及族群分化型式仍未知，但有可能會與琉球群島的地理和地質歷史有關。此島鏈包含約 150 座島嶼，自日本本島至臺灣跨幅長達 1,200 公里。雖然有些相鄰的島嶼在末次冰盛期(*Last Glacial Maximum, LGM*)曾藉陸橋相連(Ota, 1998)，有些島嶼則仍維持隔離狀態。根據許多分類群的遺傳研究顯示在北、中、以及南琉球的族群間呈現分化的現象(Ota, 1998, 2000)，而這三大分區即使在末次冰盛時期也仍被寬廣的海峽隔絕——分別是圖克拉海峽(*Tokara Gap or Tokara Strait*)及慶良間海峽(*Kerama Gap or Miyako Strait*) (圖一)，這些海峽可能形成天然的地理屏障，促進了生物族群在北、中、以及南琉球之間的遺傳漂變作用及族群分化(Toda *et al.*, 1997, Lin *et al.*, 2002)。臺灣地理上最靠近南琉球(110 km)的島群，無論是物種及遺傳多樣性，臺灣與南琉球的相似程度皆大於鄰近區域的其他島嶼(>270 km) (Ota, 2000, Tominaga *et al.*, 2015)。而兩個座落南方的大洋島群——巴丹(*Batanes*)及巴布延群島(*Babuyan Islands*)，約在上新世晚期形成，直至更新世，都持續受到板塊抬升及火山作用的影響。相較於與呂宋島的距離(200 km)，巴丹島與臺灣南端(150 km, 有巴士海峽相隔)更為接近(Bellwood & Dizon, 2013)。然而，哺乳類的遺傳結構在這串島鏈中卻鮮少有研究探討(Yoshikawa *et al.*, 2016)。

本研究藉由粒線體 DNA 及微衛星基因座兩種遺傳標記，探究琉球狐蝠的遺傳多樣性及遺傳結構。目的在於：(1)量化琉球狐蝠於不同島群中的遺傳多樣性；(2)檢視島群之間是否發生遺傳分化，且其型式是否與亞種的地理區隔一致；(3)建立此物種遺傳結構之型式，同時釐清臺灣的新紀錄族群(龜山島及臺灣本島)及菲律賓族群與其他亞種之間的關聯。本研究以琉球狐蝠為例，探討島嶼之間的遺傳結構與

基因交流模式，有助未來制定適當的保育策略，決定各小族群是否應被視為獨立的保育經營管理單元。

材料與方法

1. 樣本採集

本研究之樣本採於 2009~2019 年間，來源包括：野外捕捉的活體、屍體、救傷及圈養的個體。樣本來自臺灣及琉球八處不同的島嶼，並根據其地理位置區分為五個亞種 (Mickleburgh et al. 1992)。在移除重複個體、可能的親子對組合後，共計分析 77 個樣本，各亞種的樣本數分別如下：臺灣亞種 36 個、八重山亞種 10 個、折居氏亞種 22 個、永良部亞種 1 個、以及大東亞種 8 個。臺灣的樣本進一步根據採樣地點分為三區，包含：TW1 (龜山島)、TW2 (綠島) 及 TW3 (臺灣本島)。八重山亞種的樣本來自西表島 (Iriomote-jima) 及石垣島 (Ishigaki-jima)。折居氏亞種的樣本來自沖繩島 (Okinawa-jima)、永良部亞種來自口永良部島 (Kuchinoerabu-jima)，而大東亞種的樣本來自南大東島 (Minamidaito-jima) (圖一及附錄一)。

樣本類型包括翼膜切片、血液、冷凍肌肉組織及排遺樣本。翼膜取樣約為 3mm 大小，保存於 99.5% 的酒精、Allprotect Tissue Reagent (Qiagen) 或乾燥矽膠微粒之中，直至萃取。血液樣本則是由專業獸醫採 0.5 cc 血液，保存於 EDTA 的真空採血管中。冷凍肌肉組織採自死亡屍體標本；新鮮排遺則保存於 99.5% 的酒精或 RNAlater RNA 穩定試劑 (Stabilization Reagent, Qiagen) 中。

2. DNA 萃取及目標片段放大

我們使用 DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) 萃取翼膜、血液、以及冷凍肌肉組織的全基因組 DNA；若為排遺樣本，則使用 QIAamp Investigator Kit 或 QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen) 進行萃取。

我們使用專為本研究設計的引子 BovL 14987 (5'-CGC-ATA-TGC-AAT-CCT-ACG-A-3') 及 BovR 15967 (5'-GCG-GGT-TGC-TGG-TTT-CAC-3') 放大粒線體 DNA (mt DNA) 控制區片段。聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR) 的總體積為 15 μ l，包含 20-100 ng 的模板 DNA、0.375 μ l 的 10 μ M 正反股引子及 7.5 μ l 的 Quick Taq HS DyeMix (TOYOBO)。PCR 使用下列溫度調控：

- (1) 初始解離溫度為 94 °C (2 分鐘)
- (2) 解離溫度 94 °C (30 秒)、黏合溫度 55 °C (30 秒) 及延長溫度 68 °C (50 秒) ，此階段進行 35 次循環。
- (3) 最終延長溫度為 68 °C (10 分鐘)。

本研究使用 ABI 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems)進行 PCR 產物的定序。層析圖以 SeqMan 及 MegAlign (DNASTAR)進行編輯及比對排列(align)。我們亦自 Genbank 及 Dryad 上取得三筆琉球狐蝠部分控制區的序列，包含一筆來自伊良部島(Irabu-jima)的八重山狐蝠序列(accession NC_002612.1) (Nikaido *et al.*, 2000a, b)；以及兩筆分別來自巴丹群島(Batanes Islands)的巴丹島(Batan Island)及沙坦島(Sabtang Island)的個體序列(accession MJV458 及 MJV451) (Tsang *et al.*, 2019a, b)，我們以這兩筆資料代表菲律賓之族群。

微衛星 DNA 分析的部分，我們成功設計出 26 個多型性的微衛星分子標誌(附錄二)，PCR 的總體積為 10 μ l，包含 10-50 ng 的模板 DNA、0.5 μ l 的 10 μ M 正反股引子及 5 μ l 的 Quick Taq HS DyeMix (TOYOBO)。PCR 使用下列溫度調控：

- (1) 初始解離溫度為 94 °C (2 分鐘)
- (2) 解離溫度 94 °C (30 秒)、黏合溫度 54 °C (30 秒) 及延長溫度 68 °C (1 分鐘) ，此階段進行 40 次循環。
- (3) 最終延長溫度為 68 °C (10 分鐘)。

PCR 產物亦使用 ABI 3730XL DNA Analyzer 進行分析，再以軟體 GeneMarker 4.2 (SoftGenetics)檢視每一個基因座的等位基因，使用軟體 Cervus 3.0.7 (Kalinowski *et al.*, 2007)進行個體和親子鑑定，刪除重複的個體以及親子對其中的一個樣本。

3. 粒線體 DNA 分析

根據粒線體 DNA 資料，我們計算不同亞種的單倍型數量、單倍型多樣性(h)、核苷酸多樣性(π)、平均成對差異(average number of pairwise differences for each subspecies)。我們以分子變異數分析(analysis of molecular variance, AMOVA)，來判

定亞種間的遺傳分化程度(Excoffier *et al.*, 1992)。只有族群數大於 1 者納入資料分析。總變異依變異的貢獻來源，區分為「亞種內」(within subspecies)及「亞種間」(among subspecies)兩尺度加以探討。為計算亞種間的分化程度，我們同時估算整體族群的 derived index，上述分析均使用軟體 Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010)，並以 20,000 random permutation 檢驗顯著性。

我們亦以 Φ_{ST} 值作為遺傳距離(genetic distances)的指標，檢視亞種間的分化程度(pairwise differentiation among subspecies)，以及島嶼間「距離隔離」(isolation by distance)的型式。兩兩島嶼間的地理距離(geographical distances, km)係根據島嶼中心的經緯度座標，取直線量測出的歐式距離(Euclidean distances)，距離隔離的分析共計涵蓋 11 座島嶼，分別為龜山島、綠島、臺灣本島、西表島、石垣島、伊良部島、沖繩島、口永良部島、南大東島、巴丹島以及沙坦島，使用軟體 Genepop (web version)進行 Mantel test，並以 20,000 permutation 檢驗顯著性(Raymond & Rousset, 1995, Rousset, 2008)。

我們進一步以 haplotype network 檢視琉球狐蝠的遺傳結構。首先，以 MEGA X (Kumar *et al.*, 2018)建立一個 maximum likelihood tree，並使用軟體 Haplotype Viewer (Center for Integrative Bioinformatics Vienna)繪出 haplotype network。

4. 微衛星 DNA 分析

為檢視每一基因座及亞種是否偏離哈溫平衡(Hardy-Weinberg equilibrium, HWE)，以及成對的基因座之間是否存在連鎖不平衡(Linkage disequilibrium)現象，我們使用馬可夫鏈方法(Markov Chain method)檢測(設定值為 10,000 dememorization steps, 1,000 batches 及 10,000 iterations per batch)，並以邦費羅尼校正(Bonferroni correction)作多重比較，檢測顯著性。針對每一基因座，我們記錄等位基因數量(N_A)、異型合子率觀測值(H_O)及異型合子率期望值(H_E)；而針對每一亞種，我們計算多樣性的指標則包含：平均等位基因數量(N_a)、等位基因豐富度(各亞種樣本數校正而得的等位基因數, A_C)、平均 H_O 及 H_E ，亦計算每個亞種的平均成對的親緣值(RI)，以推估個體之間的親緣關係(Ritland, 1996)。

如同粒線體 DNA，我們亦以微衛星資料進行遺傳結構分析，包含藉 F_{ST} 估算 AMOVA、成對分化(pairwise differentiation)及距離隔離(isolation by distance)。上述分析共計包括八個島嶼(排除欠缺微衛星資料的伊良部島、巴丹島及沙坦島)，以上分析以軟體 GenAlEx 6.51 (Peakall & Smouse, 2006, 2012)或 Genepop 4.7.3 進行操作。

為以微衛星檢驗族群間的親緣關係，我們藉由以 Bayesian clustering approach 為基礎的軟體 STRUCTURE 2.3.4 加以判斷遺傳分群上的顯著單位(Pritchard *et al.*, 2000, Falush *et al.*, 2003)。分析時的設定值如下：以校正後的等位基因頻率、使用 admixture ancestry model 計算，burnin period 為 100,000 iteration、Markov Chain Monte Carlo (MCMC)重複值為 1,000,000。祖先族群數(K)設定為 1~10，每個 K 值皆進行 10 個獨立回合以確定結果的一致性。並藉軟體 Structure Harvest 根據平均值的似然值(likelihood)及變異數決定最佳的 K，再以 Evanno 方法求得 ad hoc statistic ΔK (Evanno *et al.*, 2005, Earl & vonHoldt, 2012)。最終輸出的資料以 Clumpak 1.1 產出視覺化的圖形 (Kopelman *et al.*, 2015)。

結果

1. 粒線體 DNA 分析

本研究共計分析了 80 個琉球狐蝠的樣本中，涵蓋五個亞種及菲律賓族群，粒線體 DNA 的部分控制區序列共記錄到 33 個單倍型。在這些樣本中，單倍型多樣性、核苷酸多樣性及平均成對差異分別為 0.948、0.012 及 3.556。遺傳多樣性之分析結果參見表一，其中菲律賓的族群呈現最高的多樣性數值；而另一方面，大東亞種之多樣性則是最低的。在亞種層次的分析中，我們皆排除樣本數僅為一的永良部亞種。

AMOVA 分析則證明了五個分析的族群(挑選樣本數大於一的族群，包含臺灣、八重山、折居氏、大東及菲律賓等五族群)具有遺傳的分化， Φ_{ST} 為 0.140，顯著大於 0 ($P < 0.001$, 表二)，同時代表 14% 的粒線體 DNA 遺傳變異可由亞種間的差異所解釋。而粒線體 DNA 的成對分化程度則隨不同的組合有顯著的差異，臺灣及八重山之間的差異性最小；而大東及菲律賓族群與其他族群間的差異，均呈現顯著(表三)。

根據 Mantel test 的結果，我們發現在遺傳與地理距離之間存在顯著的正相關 ($r^2 = 0.115$, $P < 0.05$, 圖二)。顯示琉球狐蝠橫跨琉球群島、臺灣乃至菲律賓群島的遺傳分化符合距離隔離的模式。兩兩島嶼間的遺傳距離顯示臺灣狐蝠的 TW1 族群與來自西表島及石垣島的八重山亞種(TW1-西表島為 0.082；TW1-石垣島為 0.016) 親緣關係相近，甚至相較於同為臺灣狐蝠亞種的 TW2 以及 TW3 更為接近(TW1-TW2 為 0.252；TW1-TW3 為 0.143)。

2. 微衛星分析

以 76 個琉球狐蝠之樣本、經 26 個具多型性的微衛星基因型所得之分析結果，可見亞種之間具有一定程度的遺傳多型性。平均異型合子率觀測值(H_O)及期望值(H_E)分別為 0.536 及 0.544。5 亞種之中，遺傳多樣性最高者為臺灣及八重山亞種。而與粒線體 DNA 的資料相反，大東狐蝠所具有的遺傳多樣性是最低的(表一)。所

有族群之 F_{IS} 值皆沒有顯著性，顯示整體並未顯著偏離哈溫平衡。其中，有 4 對基因座及族群的對應組合中，顯示偏離了哈溫平衡，但在亞種與基因座上並無法看出一致趨勢。而所有基因座之間，皆未出現連鎖不平衡(Linkage disequilibrium)的顯著現象。最後，除了八重山亞種，平均成對之親緣值(Relatedness)於 4 受檢族群中皆呈現顯著，而大東亞種的親緣值則相對較高(0.147)。

AMOVA 結果則可見到亞種間存在顯著的遺傳分化趨勢。 F_{ST} 值為 0.069 ($P < 0.001$, 表二)。在成對的族群比較中，臺灣和八重山亞種為唯一不具顯著的族群組合。而「距離隔離」之模式則呈現顯著 ($r^2 = 0.298$, $P < 0.01$, 圖二)。

以軟體 STRUCTURE 分析族群遺傳結構，在地理區位及亞種單位上可觀察到明顯的次結構出現 (圖四)。根據 Evanno 方法、以最高之 ΔK 及降低變異數之平均似然值(mean likelihood value without an increase in variance)，最可能的遺傳分群為 4 ($K = 4$)。幾近全數的大東及折居氏亞種樣本皆可清楚地歸類至其所在的分群之中(僅有一隻折居氏個體除外)；而少數的個體中也可能反映了部分的祖系追溯歷史，如 TW2(綠島)、TW3(臺灣本島)及永良部個體皆有被歸類至與地理分區不同的遺傳分群。另一方面，臺灣亞種的 TW1(龜山島) 個體及八重山亞種則顯示了一明顯跨越遺傳分群、帶有完全或部分分群成員的混合結構特徵。在 $K = 3$ 的情況下，永良部及折居氏亞種被視為同一分群，而臺灣及八重山亞種則呈現混合多分群的遺傳結構；而在 $K = 5$ 時，永良部亞種呈現混合的成員組成特徵。

討論

本研究涵蓋琉球狐蝠之下 5 個亞種個體，嘗試加以檢驗其遺傳多樣性及遺傳結構，分布範圍包括日本琉球群島、臺灣及兩筆來自目前資訊較為匱乏的菲律賓巴坦群島之已發表資料。根據粒線體控制區的序列及 26 組微衛星的基因座結果顯示，在島群之間存在顯著的遺傳分化，大體上支持以地理區分的亞種分群(圖四)。

兩種不同遺傳標記揭示了不同的分化模式，並有助於我們了解各島嶼亞種族群的過去連結歷史。值得注意的是，我們並未在 5 個亞種的個體之中檢測到深度的差異，單倍型與島嶼之間僅顯示較弱的對應關係(圖三)。整體而言，這些模式顯示過去族群間可能藉多次頻繁的基因流、拓殖事件(colonization)及族群混合(admixture)構成了現今的遺傳特徵，而其可觀察到地理隔離及遺傳漂變的作用影響，也可能反映了較小族群量的事實。單倍型網絡圖(haplotype network)的中央橘色單倍型，主要多為折居氏亞種個體，顯示該亞種可能是其他琉球地區及臺灣族群的起源處，由此可見，其他亞種族群是藉由拓殖事件東向分布於大東島及西向進入臺灣。雖我們僅檢驗了兩筆來自菲律賓族群的序列，但其中沙坦島的序列與其他所有個體皆有明顯差別，可見該區族群存在著高度分化的可能性。關於該地區進一步的探討研究(包含取得來自巴布延群島的樣本)，將有助於我們釐清其截然分明的族群結構形成之原因。

根據我們的微衛星分析結果，遺傳多樣性高者可對應至臺灣及八重山亞種，最低的則是大東亞種(表一)。在所有的分類單元中，大東亞種屬於一個相對獨立的分群，在不同的 K 值設定下，並沒有觀察到混合其他來源族群的跡象。在大東亞種與其他亞種之間明顯遺傳區隔性可以下列原因加以解釋：(1). 地理隔離。大東群島坐落於最東側，該島與其他琉球諸島之間擁有較長的地理距離隔絕(大約距離沖繩島約 360 km 遠)；(2). 大東島週邊缺乏島嶼可作為播遷者(dispersers)往來不同島嶼的「踏腳石」(stepping stones)。大東群島為自約 1,200~1,600 萬年前的更新世中期，從菲律賓洋板塊抬升的珊瑚礁島(Shiroma *et al.*, 2015)，因此不若其他大陸型島嶼，位於大洋上的大東群島從未與其他大陸板塊在冰河期藉陸橋連接。而相對而

言，琉球海溝 (Ryukyu Trench) (圖一) 為一深層且廣袤的水體，阻隔大東群島與歐亞大陸的往來，成為阻擋基因流的一道顯著的地理屏障 (geographical barrier)。故我們總結，大東亞種所帶有的低遺傳多樣性及相較於其他亞種之間的高分化，可推測其是在長距離的大洋遷徙、歷經地理及生殖隔離中形成的獨特分支。相似的分化及有限的基因流 (在大東群島及其他位於歐亞板塊上的琉球諸島之間) 也可見於優雅角鴞 (elegant scops owl, *Otus elegans*) 的案例中 (Hsu, 2005)。

除了大東亞種外，根據多個基因座之資料結果，我們亦發現其他位於琉球群島的族群之間存在分化現象，尤其是永良部、折居氏及八重山亞種之間。永良部因受限於僅有單一標本數，我們並無法充分解釋其分化的狀況及成因；相對來說，位置相近的折居氏及八重山亞種間的分化令人意外，尤其是在粒線體 DNA 的資料。而在核內 DNA 的遺傳分化也與深層海峽的分佈呈現一致，包括分隔北-中部琉球群島的吐噶喇海峽及分隔中-南部琉球群島的慶良間海峽。因此，這些島群族群之間的分化，有鑑於他們在末次冰盛期從未有過陸橋連結的事實，顯然是來自島嶼彼此之間的長期隔絕。

儘管可見到明顯的遺傳分化於族群間發生，我們的研究仍顯示遺傳和地理距離之間的顯著正相關，並與臺灣及琉球群島之間的距離隔離模式呈現一致。距離隔離模型被認為是一典型「遷徙及漂變平衡」 (migration-drift equilibrium)，藉由頻繁的基因流形成「踏腳石」 (stepping-stone) 般的移動模式，因此更可能於相鄰的族群間發生 (Kimura & Weiss, 1964)。儘管如此，「距離隔離」模型的趨勢亦可能在個體向外拓殖的過程裡發生，而檢視其中對遺傳組成的影響因子，遺傳漂變則可能更甚於基因流。最後，因地理屏障在較為巨觀的距離之中才易發生，漂變及距離隔離模式很可能也於較大空間尺度才可被偵測到 (Bossart & Prowell, 1998)，而確實在本研究中也可應證，各島嶼兩兩族群中相對較大的遺傳分化，皆在深層海溝的兩側發生 (Hutchison & Templeton, 1999)。

過往研究中，曾指出狐蝠族群之間的基因流可跨越數百至數千公里之遠，而多集中在陸地及沿海岸線之移動。於本研究中，於臺灣及八重山亞種可見相似的遺傳組成，支持了兩處族群可能因末次冰盛期的陸橋連結而曾有交流，而確實此兩個

亞種不只地理距離上最為接近，且遺傳結構的程度也最低。另一方面，在 200~300 km 間的島嶼族群之間即可觀察到明顯的分化（如折居氏及八重山亞種），顯示這段物理距離代表頻繁基因流在族群之中所可觸及的上限。儘管如此，整體而言微衛星基因座的資料可見到清楚的遺傳分化，而我們的分群結果，則指出有少數的可能遷移者存在於族群之中。特別有兩個於臺灣龜山島地區(TW1)出現的個體及一個出現在八重山亞種的個體，很可能原來是來自折居氏亞種的族群。

本研究中一項較令人驚喜的發現是，在臺灣的龜山島族群(TW1)中可觀察到高程度的遺傳多樣性。1977 年代龜山島仍為軍事管制區，據當時仍居住於龜山島的居民所述並沒有目擊過狐蝠出現在島上(Wu, 2010)，因此這一族群被認為是晚近才經由海洋播遷移入的。即使此一族群相較於其他的臺灣族群(TW2, TW3)，與來自西表島的八重山個體更顯然有較近的親緣關係，其高遺傳多樣性很可能是來自多個遺傳分群混合的結果(*e.g.*, Comas *et al.*, 2004)。確實我們的結果，指出龜山島族群很可能包含多個祖先起源的建立者(founder)，包括來自八重山、TW2(綠島)、TW3(臺灣本島)亦或甚至是菲律賓族群的個體。

結合一或多項可能解釋我們可加以解釋龜山島的遺傳多樣性起源。首先，狐蝠很可能經由季節性的颱風或東北季風挾帶的勁風吹拂而抵達龜山島；再者，狐蝠個體有可能主動播遷以搜尋資源；亦或第三種可能性是八重山族群向外擴張的主動性播遷。日本的與那國島是八重山亞種的分布西界(Kinjo & Nakamoto, 2015)，距離龜山島 110 km 之遠。根據 Nakamoto *et al.* (2011)指出，八重亞種曾被假設向東播遷跨海，拓殖到約 50 km 之外的新孤立棲地(自多良間島到宮古島)。與那國島的狐蝠族群或相鄰島嶼之個體很可能藉著風向往西擴增至龜山島，形成一個廣泛分布且組成多樣的族群。

我們自粒線體及核內遺傳標記的研究發現，支持分布於琉球群島及臺灣之琉球狐蝠的近期分支。在部分島群間的次分群現象，反映了棲居其中的族群個體欠缺長期的跨洋移動，而深層海峽的存在也阻隔了末次冰盛期的陸橋形成。我們也發現近期拓殖到臺灣的個體可能涵蓋來自多個分群的建立者，綜合以上觀察，我們總結高度孤立且遺傳上顯著區別於其他分群的族群(如大東亞種)，應被視為獨立的管理

單位。另一方面，來自相鄰島嶼的狐蝠之間，則有明顯證據支持其存在晚近且頻繁的基因流，應可被視為一單獨的族群管理。而在菲律賓沙坦島及其他族群之間相對高程度的分化，則突顯了未來應持續鎖定該族群現況的研究重要性。概略而言，本研究指出了演化及生態作用力共同形塑了琉球狐蝠的遺傳結構，且仍為一動態且持續進行的過程。如琉球狐蝠這般可棲息於溫帶北方琉球群島、亞熱帶臺灣乃至熱帶南方菲律賓群島的廣布物種，其更可做為一研究島嶼生物地理學背後作用因子的理想模型。未來研究將結合新的定序技術及鎖定菲律賓族群進行更廣泛的採樣，以期更為掌握我們對於琉球狐蝠於島嶼之間親緣地理學上的認知。

表一、琉球狐蝠 (*Pteropus dasymallus*) 的遺傳多樣性，以粒線體 DNA 控制區及 26 個微衛星基因座所估算

Population	mtDNA					Microsatellite DNA						
	<i>N</i>	<i>H</i>	<i>h</i>	π	<i>k</i>	<i>N</i>	<i>N_a</i>	<i>A_C</i>	<i>H_O</i>	<i>H_E</i>	RI	<i>F_{IS}</i>
Formosan FF	36	16	0.889	0.012	3.557	36	4.885	3.599	0.574	0.601	0.004*	0.060
Yaeyama FF	11	10	0.982	0.011	3.200	10	3.731	3.480	0.596	0.584	0.005	0.031
Orii's FF	22	9	0.844	0.008	2.377	22	3.846	3.351	0.540	0.575	0.029*	0.083
Erabu FF	1	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
Daito FF	8	3	0.679	0.007	2.214	7	2.885	2.885	0.434	0.418	0.147*	0.040
Philippines	2	2	1.000	0.043	13.000	-	-	-	-	-	-	-

*: statistically significant $P < 0.05$

N: 樣本數(sample size), *H*: 可觀察到的單倍型數量(number of haplotype observed), *h*: 單倍型多樣性(haplotype diversity), π : 核苷酸多樣性(nucleotide diversity), *k*: 平均核苷酸差異數(average number of nucleotide differences), *N_a*: 每基因座平均的等位基因數(mean number of alleles per locus), *A_C*: 等位基因豐富度(allelic richness), *H_O*: 異型合子觀測值(observed heterozygosity), *H_E*: 異型合子期望值(expected heterozygosity), RI: 親緣值(relatedness), *F_{IS}*: 自交係數(inbreeding coefficient)。永良部族群因只有單一樣本，故被排除在亞種層次的分析中。縮寫: FF, 狐蝠(Flying fox)。

表二、琉球狐蝠 (*Pteropus dasymallus*) 的分子變異數分析(Analysis of molecular variance, AMOVA)

變異來源	粒線體 DNA		微衛星 DNA	
	變異數 (%)	<i>P</i> value	variation (%)	<i>P</i> value
亞種之間	13.97	< 0.001*	6.91	< 0.001*
亞種之內	86.03		93.09	

*: 統計顯著性 statistically significant

共計 5 族群加入分析，包含臺灣(Formosan)、八重山(Yaeyama)、折居氏(Orii's)、大東亞種(Daito)及菲律賓(Philippine)族群，樣本數大於一者加入粒線體 DNA 之分析，前四者進行微衛星遺傳分析。

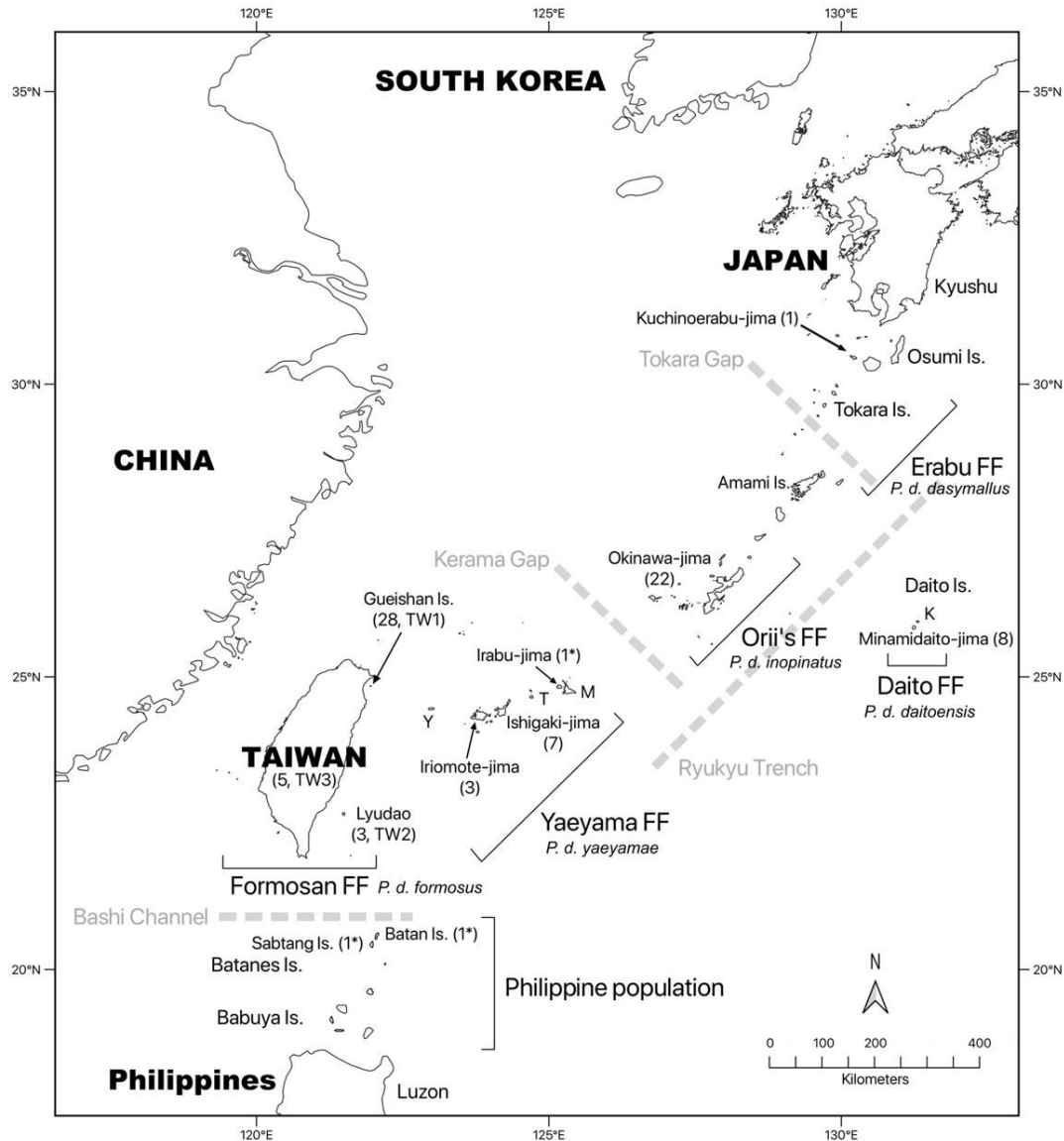
表三、琉球狐蝠 (*Pteropus dasymallus*) 於亞種/族群之間的成對遺傳分化

族群	臺灣	八重山	折居氏	大東	菲律賓
臺灣		0.000 ^{NS}	0.096*	0.166*	0.407*
八重山	0.011 ^{NS}		0.079*	0.158*	0.361*
折居氏	0.057*	0.036*		0.247*	0.519*
大東	0.132*	0.139*	0.159*		0.439*

^{NS}: nonsignificant 非顯著

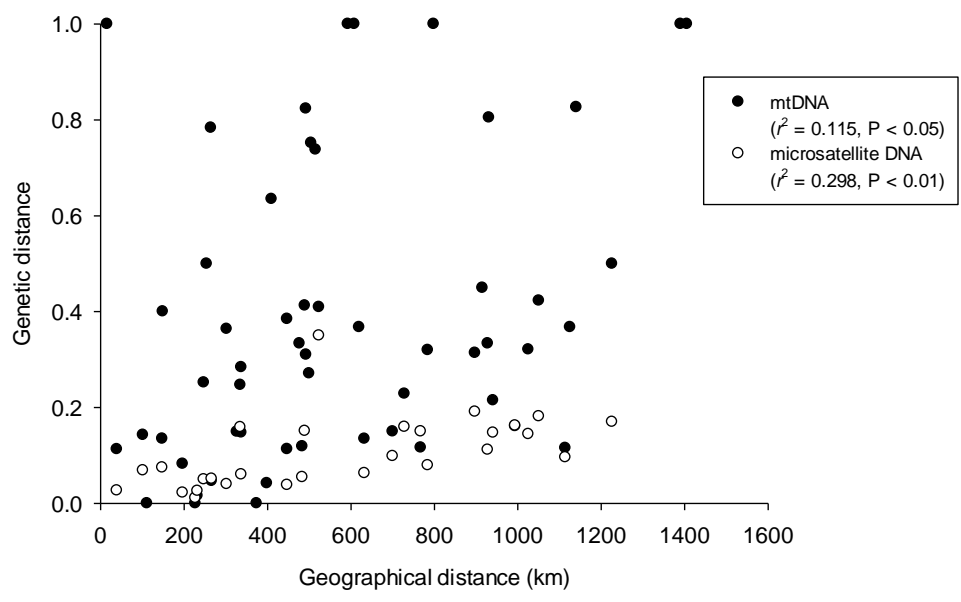
*: significant 顯著 P 值 < 0.05

F_{ST} ，在對角線之上方的粒線體分析結果； F_{ST} ，在對角線下方的微衛星分析結果。永良部亞種並未加入分析。統計顯著性亦標註於表中。

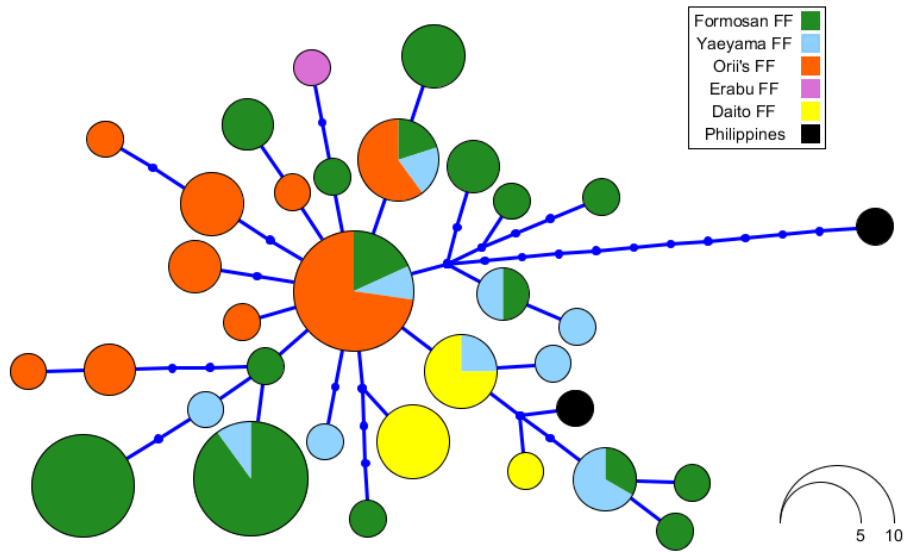


圖一、琉球群島、臺灣及北部菲律賓群島的位置地圖

本圖呈現琉球狐蝠的族群分布，每個族群來源所使用之樣本數皆標明在該區域的括弧內(另見附錄一)。星號(*)代表 DNA 序列來自 Genbank 或者 Dryad 數位資料庫。縮寫說明如下——FF: 狐蝠(Flying fox); Y: 與那國島(Yonaguni-jima); T: 多良間島(Tarama-jima); M: 宮古島(Miyako-jima); K: 北大東島(Kitadaito-jima)。

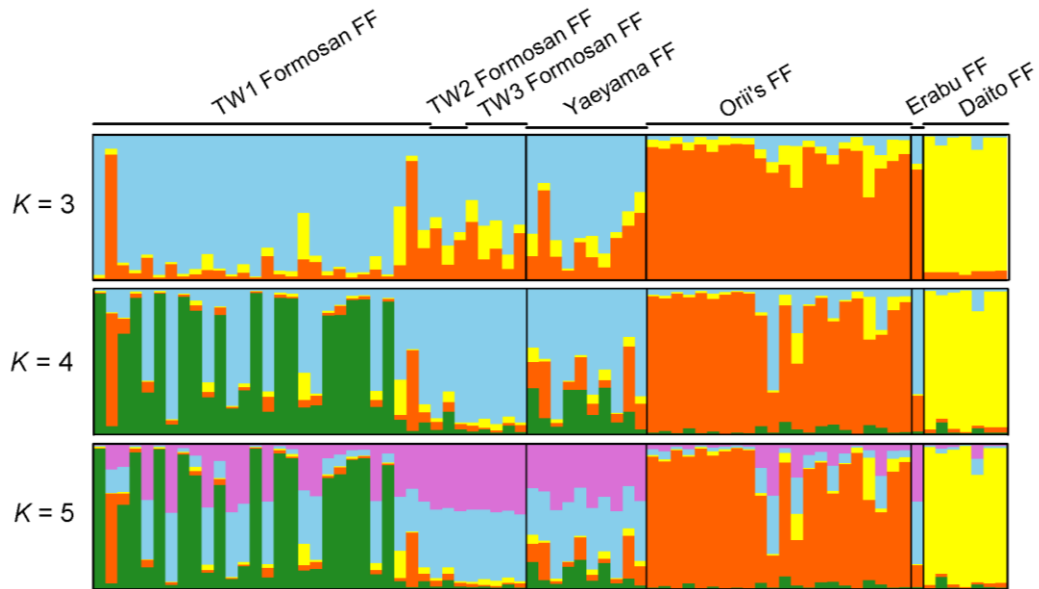


圖二、琉球狐蝠 (*Pteropus dasymallus*) 的遺傳和地理距離之島嶼間成對比較



圖三、琉球狐蝠 (*Pteropus dasymallus*) 的單倍型網絡圖

每一顏色代表一個亞種或族群，每個圓圈的尺寸大小與單倍型的頻率成比例。每一線段代表單一突變步驟；而每一小點則代表一假想的中間單倍型。縮寫說明 FF：狐蝠(Flying fox)。共計五族群加入分析，臺灣(Formosan)、八重山(Yaeyama)、折居氏(Orii's)、大東亞種(Daito)及菲律賓(Philippine)族群。縮寫: FF，狐蝠(Flying fox)。



圖四、以貝葉氏 STRUCTURE 分析，建構來自 5 亞種、76 隻琉球狐蝠 (*Pteropus dasymallus*) 個體的遺傳結構圖

每一直條代表單一個體，每一顏色代表一個遺傳分群，每種顏色的長度與該個體被歸類至某一分群之機率成正比。 K 值則代表可能的遺傳分群數，最可能的分群數目為 ΔK 最高者(為 4)。垂直黑線用以區隔不同的亞種及島嶼群；Y 軸則代表比例，範圍在 0~1 之間。縮寫: FF，狐蝠(Flying fox)。

致謝

本研究誠摯感謝林物局經費補助，以及沖繩動物園及博物館基金會、平川動物園、琉球大學及臺北動物園提供研究樣本。此外，我們也感謝李涵君、吳慧雯、林青峰、林清隆博士、Dr. Atsushi Nakamoto, Dr. Emyo Fujioka 及許多助理於野外工作的協助；以及感謝林思民博士對於草稿提供的珍貴建議及 Dr. Tetsuo Denda 對於實驗室的支持。

參考文獻

- ALLENDORF, F. W., HOHENLOHE, P. A., & LUIKART, G. (2010). Genomics and the future of conservation genetics. *Nature Reviews Genetics* 11, 697-709.
- BELLWOOD, P., & DIZON, E. (2013). The Batanes Islands, Their First Observers, and Previous Archaeology. In P. Bellwood & E. Dizon (Eds.). *4000 Years of Migration and Cultural Exchange: The Archaeology of the Batanes Islands, Northern Philippines* (pp. 1-8). Australia: ANU Press.
- BOSSART, J. L., & PROWELL, D. P. (1998). Genetic estimates of population structure and gene flow: limitations, lessons and new directions. *Trends in Ecology & Evolution* 13, 202-206.
- BROWN, V. A., BROOKE, A., FORDYCE, J. A., & MCCrackEN, G. F. (2011). Genetic analysis of populations of the threatened bat *Pteropus mariannus*. *Conservation Genetics* 12, 933-941.
- COMAS, D., PLAZA, S., WELLS, R. S., YULDASEVA, N., LAO, O., CALAFELL, F., & BERTRANPETIT, J. (2004). Admixture, migrations, and dispersals in Central Asia: evidence from maternal DNA lineages. *European Journal of Human Genetics* 12, 495-504.
- COX, P. A., & ELMQVIST, T. (2000). Pollinator extinction in the Pacific Islands. *Conservation Biology* 14, 1237-1239.
- COX, P. A., ELMQVIST, T., PIERSON, E. D., & RAINEY, W. E. (1991). Flying foxes as strong interactors in south Pacific island ecosystems: a conservation hypothesis. *Conservation Biology* 5, 448-454.

- EARL, D. A., & VONHOLDT, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4, 359-361.
- ELLSTRAND, N. C., & ELAM, D. R. (1993). Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24, 217-242.
- EPSTEIN, J. H., OLIVAL, K. J., PULLIAM, J. R. C., SMITH, C., WESTRUM, J., HUGHES, T., DOBSON, A. P., ZUBAID, A., RAHMAN, S. A., BASIR, M. M., FIELD, H. E., & DASZAK, P. (2009). *Pteropus vampyrus*, a hunted migratory species with a multinational home-range and a need for regional management. *Journal of Applied Ecology* 46, 991-1002.
- EVANNO, G., REGNAUT, S., & GOUDET, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14, 2611-2620.
- EXCOFFIER, L., & LISCHER, H. E. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10, 564-567.
- EXCOFFIER, L., SMOUSE, P. E., & 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.
- FALUSH, D., STEPHENS, M., & PRITCHARD, J. K. (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164, 1567-1587.
- FLORENS, F., BAIDER, C., MARDAY, V., MARTIN, G., ZMANAY, Z., OLEKSY, R., KRIVEK, G., VINCENOT, C., STRASBERG, D., & KINGSTON, T. (2017). Disproportionately large

- ecological role of a recently mass-culled flying fox in native forests of an oceanic island. *Journal for nature conservation* 40, 85-93.
- FRANKHAM, R. (2010). Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. *Biological Conservation* 143, 1919-1927.
- FRANKHAM, R., BALLOU, J. D., RALLS, K., ELDRIDGE, M. D. B., DUDASH, M. R., FENSTER, C. B., LACY, R. C., & SUNNUCKS, P. (2017). *Genetic Management of Fragmented Animal and Plant Populations*. Oxford University Press.
- FUJITA, M. S., & TUTTLE, M. D. (1991). Flying foxes (Chiroptera: Pteropodidae): Threatened animals of key ecological and economic importance. *Conservation Biology* 5, 455-463.
- HEANEY, L. R., DOLAR, M. L., ALCALA, A. C., DANS, A. T. L., GONZALES, P. C., INGLE, N. R., LEPITEN, M. V., OLIVER, W. L. R., ONG, P. S., RICKART, E. A., TABARANZA, J., B. R., & UTZURRUM, R. C. B. (1998). A synopsis of the mammalian fauna of the Philippine islands. *Fieldiana Zoology New Series*, No. 88, 1-61.
- HOBAN, S. M., HAUFFE, H. C., PÉREZ-ESPONA, S., ARNTZEN, J. W., BERTORELLE, G., BRYJA, J., FRITH, K., GAGGIOTTI, O. E., GALBUSERA, P., & GODOY, J. A. (2013). Bringing genetic diversity to the forefront of conservation policy and management. *Conservation Genetics Resources* 5, 593-598.
- HSU, Y.-C. (2005). *Molecular Ecology of Elegant Scops Owl (Otus elegans)*. (Doctoral dissertation). National Taiwan University, Taipei, Taiwan.
- HUTCHISON, D. W., & TEMPLETON, A. R. (1999). Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. *Evolution* 53, 1898-1914.
- IBOUROI, M. T., CHEHA, A., ARNAL, V., LAGADEC, E., TORTOSA, P., MINTER, G. L., SAID ALI OUSSENI, D., MONTGELARD, C., & BESNARD, A. (2018). The contrasting

- genetic patterns of two sympatric flying fox species from the Comoros and the implications for conservation. *Conservation Genetics* 19, 1425-1437.
- IUCN. (2019). IUCN Red List of Threatened Species. Version 2019-3. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 28 February 2020.
- JORDAN, S., GIERSCH, J. J., MUHLFELD, C. C., HOTALING, S., FANNING, L., TAPPENBECK, T. H., & LUIKART, G. (2016). Loss of genetic diversity and increased subdivision in an endemic Alpine stonefly threatened by climate change. *Plos One* 11, e0157386.
- KALINOWSKI, S. T., TAPER, M. L., & MARSHALL, T. C. (2007). Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16, 1099-1106.
- KIMURA, M., & WEISS, G. H. (1964). Stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics* 49, 561-567.
- KINJO, K., & NAKAMOTO, A. (2015). *Pteropus dasymallus*. In S. D. Ohdachi, Y. Ishibashi, M. A. Iwasa, D. Fukui & T. Saitoh (Eds.). *The Wild Mammals of Japan* (pp. 52-53). Kyoto, Japan: Shoukadoh Book Sellers.
- KOPELMAN, N. M., MAYZEL, J., JAKOBSSON, M., ROSENBERG, N. A., & MAYROSE, I. (2015). CLUMPAK: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across *K*. *Molecular Ecology Resources* 15, 1179-1191.
- KUMAR, S., STECHER, G., LI, M., KNYAZ, C., & TAMURA, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35, 1547-1549.
- LARSEN, P. A., HAYES, C. E., WILKINS, M. A., GOMARD, Y., SOOKHAREEA, R., YODER, A. D., & GOODMAN, S. M. (2014). Population genetics of the Mauritian flying fox, *Pteropus niger*. *Acta Chiropterologica* 16, 293-300.

- LIN, L.-K., & PEI, K. (1999). On the current status of field population of Formosan fruit bat (*Pteropus dasymallus formosus*). *Endemic Species Research* 1, 12-19.
- LIN, S.-M., CHEN, C. A., & LUE, K.-Y. (2002). Molecular phylogeny and biogeography of the grass lizards genus *Takydromus* (Reptilia: Lacertidae) of East Asia. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 22, 276-288.
- MCCONKEY, K. R., & DRAKE, D. R. (2006). Flying foxes cease to function as seed dispersers long before they become rare. *Ecology* 87, 271-276.
- MCCONKEY, K. R., & DRAKE, D. R. (2007). Indirect evidence that flying foxes track food resources among islands in a Pacific Archipelago. *Biotropica* 39, 436-440.
- MICKLEBURGH, S. P., HUTSON, A. M., & RACEY, P. A. (Eds.) 1992. Old World fruit bats: An action plan for their conservation. IUCN/SSC Chiroptera Specialist Group, Gland, Switzerland.
- MICKLEBURGH, S. P., HUTSON, A. M., & RACEY, P. A. (2002). A review of the global conservation status of bats. *Oryx* 36, 18-34.
- NAKAMOTO, A., ITABE, S., SATO, A., KINJO, K., & IZAWA, M. (2011). Geographical distribution pattern and interisland movements of Orii's flying fox in Okinawa Islands, the Ryukyu Archipelago, Japan. *Population Ecology* 53, 241-252.
- NAKAMURA, H., NISHINA, A., LIU, Z., TANAKA, F., WIMBUSH, M., & PARK, J.-H. (2013). Intermediate and deep water formation in the Okinawa Trough. *Journal of Geophysical Research: Oceans* 118, 6881-6893.
- NIKAIDO, M., HARADA, M., CAO, Y., HASEGAWA, M., & OKADA, N. (2000a). Data from: Monophyletic origin of the order Chiroptera and its phylogenetic position among Mammalia, as inferred from the complete sequence of the mitochondrial DNA of a Japanese megabat, the Ryukyu flying fox (*Pteropus dasymallus*). GenBank. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NC_002612.1

- NIKAIDO, M., HARADA, M., CAO, Y., HASEGAWA, M., & OKADA, N. (2000b).
Monophyletic origin of the order Chiroptera and its phylogenetic position among
Mammalia, as inferred from the complete sequence of the mitochondrial DNA of
a Japanese megabat, the Ryukyu flying fox (*Pteropus dasymallus*). *Journal of
Molecular Evolution* 51, 318-328.
- NYHAGEN, D. F., TURNBULL, S. D., OLESEN, J. M., & JONES, C. G. (2005). An
investigation into the role of the Mauritian flying fox, *Pteropus niger*, in forest
regeneration. *Biological Conservation* 122, 491-497.
- OLEKSY, R. Z., AYADY, C. L., TATAYAH, V., JONES, C., HOWEY, P. W., FROIDEVAUX, J. S.
P., RACEY, P. A., & JONES, G. (2019). The movement ecology of the Mauritian
flying fox (*Pteropus niger*): a long-term study using solar-powered GSM/GPS
tags. *Movement Ecology* 7, 12.
- OLIVAL, K. J., LATINNE, A., ISLAM, A., EPSTEIN, J. H., HERSCH, R., ENGSTRAND, R. C.,
GURLEY, E. S., AMATO, G., LUBY, S. P., & DASZAK, P. (2019). Population genetics
of fruit bat reservoir informs the dynamics, distribution and diversity of Nipah
virus. *Molecular Ecology*, <https://doi.org/10.1111/mec.15288>.
- OTA, H. (1998). Geographic patterns of endemism and speciation in amphibians and
reptiles of the Ryukyu Archipelago, Japan, with special reference to their
paleogeographical implications. *Researches on Population Ecology* 40, 189-204.
- OTA, H. (2000). The current geographic faunal pattern of reptiles and amphibians of the
Ryukyu Archipelago and adjacent regions. *Tropics* 10, 51-62.
- PEAKALL, R., & SMOUSE, P. E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel.
Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*
6, 288-295.

- PEAKALL, R., & SMOUSE, P. E. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539.
- PEEL, A. J., SARGAN, D. R., BAKER, K. S., HAYMAN, D. T. S., BARR, J. A., CRAMERI, G., SUU-IRE, R., BRODER, C. C., LEMBO, T., WANG, L.-F., FOOKS, A. R., ROSSITER, S. J., WOOD, J. L. N., & CUNNINGHAM, A. A. (2013). Continent-wide panmixia of an African fruit bat facilitates transmission of potentially zoonotic viruses. *Nature Communications* 4, 2770.
- POLECHOVÁ, J., & BARTON, N. H. (2015). Limits to adaptation along environmental gradients. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 6401-6406.
- PRITCHARD, J. K., STEPHENS, M., & DONNELLY, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945-959.
- RAYMOND, M., & ROUSSET, F. (1995). Genepop (Version-1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86, 248-249.
- RITLAND, K. (1996). Estimators for pairwise relatedness and individual inbreeding coefficients. *Genetics Research* 67, 175-185.
- ROUSSET, F. (2008). GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8, 103-106.
- RUSSELL, A. L., BROWN, V. A., UTZURRUM, R. C. B., BROOKE, A. P., WOLF, L. A., & MCCRACKEN, G. F. (2016). Comparative phylogeography of *Pteropus samoensis* and *P. tonganus* (Pteropodidae: Chiroptera) in the South Pacific. *Acta Chiropterologica* 18, 325-335.
- SAITOH, T., KAJI, K., IZAWA, M., & YAMADA, F. (2015). Conservation and management of terrestrial mammals in Japan: its organizational system and practices. *Therya* 6, 139-153.

- SHAFER, A. B. A., WOLF, J. B. W., ALVES, P. C., BERGSTRÖM, L., BRUFORD, M. W., BRÄNNSTRÖM, I., COLLING, G., L., D., DE MEESTER, L., EKBLÖM, R., FAWCETT, K. D., FIOR, S., HAJIBABAEI, M., HILL, J. A., HOEZEL, A. R., HÖGLUND, J., JENSEN, E. L., KRAUSE, J., KRISTENSEN, T. N., KRÜTZEN, M., MCKAY, J. K., NORMAN, A. J., OGDEN, R., ÖSTERLING, E. M., OUBORG, N. J., PICCOLO, J., POPOVIĆ, D., PRIMMER, C. R., REED, F. A., ROUMET, M., SALMONA, J., SCHENEKAR, T., SCHWARTZ, M. K., SEGELBACHER, G., SENN, H., THAULOW, J., VALTONEN, M., VEALE, A., VERGEER, P., VIJAY, N., VILÀ, C., WEISSENSTEINER, M., WENNERSTRÖM, L., WHEAT, C. W., & ZIELIŃSKI, P. (2015). Genomics and the challenging translation into conservation practice. *Trends in Ecology & Evolution* 30, 78-87.
- SHEHERAZADE, OBER, H. K., & TSANG, S. M. (2019). Contributions of bats to the local economy through durian pollination in Sulawesi, Indonesia. *Biotropica* 51, 913-922.
- SHILTON, L. A., & WHITTAKER, R. J. (2009). The role of pteropodid bats in reestablishing tropical forests on Krakatau. In T. H. Fleming & P. A. Racey (Eds.). *Island Bats: Evolution, Ecology & Conservation* (pp. 176-215). Chicago, USA: University of Chicago.
- SHIROMA, Y., HOSODA, M., ISHIKAWA, T., SAHOO, S. K., TOKONAMI, S., & FURUKAWA, M. (2015). Characteristics of the environmental radon and thoron in Minamidaito-jima, a comparatively high background radiation island in Japan. *Radiation emergency medicine* 4, 27-33.
- SINCLAIR, E. A., WEBB, N. J., MARCHANT, A. D., & TIDEMANN, C. R. (1996). Genetic variation in the little red flying-fox *Pteropus scapulatus* (Chiroptera: Pteropodidae): implications for management. *Biological Conservation* 76, 45-50.

- TODA, M., NISHIDA, M., MATSUI, M., WU, G.-F., & OTA, H. (1997). Allozyme variation among East Asian populations of the Indian rice frog *Rana limnocharis* (Amphibia: Anura). *Biochemical Systematics and Ecology* 25, 143-159.
- TOMINAGA, A., MATSUI, M., ETO, K., & OTA, H. (2015). Phylogeny and differentiation of wide-ranging Ryukyu Kajika Frog *Buergeria japonica* (Amphibia: Rhacophoridae): geographic genetic pattern not simply explained by vicariance through strait formation. *Zoological Science* 32, 240-248.
- TSANG, S. M., WIANTORO, S., VELUZ, M. J., SIMMONS, N. B., & LOHMAN, D. J. (2018). Low levels of population structure among geographically distant populations of *Pteropus vampyrus* (Chiroptera: Pteropodidae). *Acta Chiropterologica* 20, 59-71.
- TSANG, S. M., WIANTORO, S., VELUZ, M. J., SUGITA, N., NGUYEN, Y. L., SIMMONS, N. B., & LOHMAN, D. J. (2019a). Data from: Dispersal out of Wallacea spurs diversification of *Pteropus* flying foxes, the world's largest bats (Mammalia: Chiroptera). Dryad Digital Repository. <https://doi.org/10.5061/dryad.8892g0m>
- TSANG, S. M., WIANTORO, S., VELUZ, M. J., SUGITA, N., NGUYEN, Y. L., SIMMONS, N. B., & LOHMAN, D. J. (2019b). Dispersal out of Wallacea spurs diversification of *Pteropus* flying foxes, the world's largest bats (Mammalia: Chiroptera). *Journal of Biogeography* 47, 527-537.
- VINCENOT, C. E., COLLAZO, A. M., & RUSSO, D. (2017). The Ryukyu flying fox (*Pteropus dasymallus*)—A review of conservation threats and call for reassessment. *Mammalian Biology* 83, 71-77.
- WU, H.-W. (2010). *Preliminary Ecological Study on the Formosan Flying Foxes (Pteropus dasymallus formosus)*. (MSc thesis). National Taiwan University, Taipei, Taiwan.

YOSHIKAWA, S., MIMURA, M., WATANABE, S., LIN, L.-K., OTA, H., & MIZOGUCHI, Y.

(2016). Historical relationships among wild boar populations of the Ryukyu archipelago and other Eurasian regions, as inferred from mitochondrial cytochrome *b* gene sequences. *Zoological Science* 33, 520-527.

YOSHIYUKI, M. (1989). *A Systematic Study of the Japanese Chiroptera*. National Science Museum, Tokyo.

附錄一、本研究所使用之琉球狐蝠(*Pteropus dasymallus*)樣本數及來源

對照表

族群名稱	樣本數量	來源
<i>P. d. formosus</i> (臺灣狐蝠)		
TW1	28	龜山島
TW2	3	綠島
TW3	5	臺灣本島
<i>P. d. yayeyamae</i> (八重山狐蝠)	3 7 1 ^a	西表島 石垣島 伊良部島
<i>P. d. inopinatus</i> (折居氏狐蝠)	22	沖繩島
<i>P. d. dasymallus</i> (永良部狐蝠)	1	口永良部島
<i>P. d. daitoensis</i> (大東狐蝠)	7	南大東島
菲律賓族群	1 ^b 1 ^b	巴丹島 沙坦島
總計	80	

^a: 序列由 Genbank 取得，accession numbers 為 NC_002612.1
(Nikaido *et al.*, 2000a, b)

^b: 序列由 Dryad 數位資料庫(Dryad Digital Repository)取得，
accession numbers 分別為 MJV451 及 MJV458 (Tsang *et al.*,
2019a, b)

附錄二、26 組適用於琉球狐蝠(*Pteropus dasymallus*)的微衛星基因座表

Locus	Forward primer (5'-3')	Repeat motif	Size range (bp)	N _A	H _O	H _E
A011	F: TCTGACTTGAGCCCTAAATGCA R: CCAACTGATATCTCTCTGGGTGGT	ATCT	177-213	10	0.774	0.668
A013	F: CATCTTAGCCAAACGCCAGC R: CCTTCCCTTCTATTTTCCTGGA	ATCT	209-230	6	0.245	0.531
A206	F: CTAGTGTTAGAAATCTGGGCTATTAATGTATAC R: AAGAGATAATTGAAAGCAAAGAAAAAAGA	ATAG	231-247	5	0.590	0.558
A207	F: GCCATCGGAAATCTAATGTGC R: ACTGTCAAACACTCTCCAATAAACAA	ATCT	203-215	4	0.490	0.489
A214	F: GGAAAGAGGTCCCAATGGCT R: TTTTGAATTTCTGCATGAGAGATTTG	AGAT	182-202	6	0.539	0.531
A226	F: CTTTCAAATGCCAACTGTTGA R: TCTAGAATGTGAAACATAAGCCTCTGA	AGAT	168-185	5	0.556	0.487
B004	F: CCGACACATGCCACTTGAGT R: CCCCATGTAATATGCTGCTTTTT	GTTT	115-123	3	0.322	0.284
B007	F: TCCGTTTTTTCGCTCAGACA R: GCCCTCGCTGTTCTGATATGA	GTTT	153-157	2	0.338	0.313
C017	F: TTTGTGGGTTTCCAGCTTCC R: GGCTTATCCAGAGCAACAGGTC	TATG	179-196	5	0.475	0.417
C305	F: TGGATTTTGTAAACCAATGTCACC R: GCCGTTTCCAATTTACTTCTCTCA	CATA	143-156	4	0.250	0.471
C312	F: AGAGTGCAAGACAGGCAGGG R: TGAACACAAAATGCAGTATATGGATG	ATGT	209-235	6	0.370	0.361
A313	F: CTTTGGGATTTACGCGGCTA R: AAAAGGTTGGCCATCCTGTG	AGAT	153-173	6	0.811	0.661
A213	F: GAACTGGGTCATTGGCTGGTA R: GTGGCTCCTGGGCTACATGT	ATCT	164-185	6	0.543	0.585
D018	F: CTCCTTCAGTTTAGGCTGTGCA R: TTTTGCCAGTGAGATGCCAA	AC	154-166	7	0.378	0.400
B215	F: CTTTTGTGTGAGCGCTGGTG R: ACTCAGCCCTCTGCTGTTCCCT	GT/GTCT	174-182	5	0.559	0.503
B014	F: GCCTCAGTTTCTCCTCTGTGA R: CCTCCACTCGGTTTACCAAGA	AAAC	173-181	3	0.261	0.248
A224	F: CATGGCTCGTGCCTGTTG R: CCTCCCTCTTCTACTCTCTCTCCA	AGAT	177-197	6	0.624	0.595
C002	F: AGGGCAGTATGTCTCCTGAAGC R: TTTAATGCAATCCCTAATTGTTTTTTT	ATGT	188-196	3	0.636	0.452
A019	F: ACATGGAAACGGAGGTTGGA R: CACACGGTCACAGAAGGCTG	GAT	211-214	2	0.263	0.323
A023	F: TCTTGGA AAAATAGCTTGTGGAGA R: CCTGTACACGGGAACCTAAA	ATAG	178-227	6	0.505	0.533
A014	F: TGGCAGCATTATTCACAATAGCA R: GCACGTGTAATAATTCCTTTCTCTCT	ATAG	212-236	7	0.675	0.645
A317	F: CCTCACAATCACAGGAGCCA R: GGGCTAGCAGAGAAAGGGAAC	CAGA/ AGAT	215-251	10	0.779	0.715
C220	F: CCACTTACTTCCAATTTCTTACCAGC R: TGAGTATTTTACCCTGAGTGTGTTCCG	CATA	221-236	4	0.325	0.338
A015	F: TTTGGAAAAACGACCCCTT R: GCATCAAAGCATTAGGGAGGAA	AAC	265-286	4	0.233	0.236
A001	F: TCTCGGTCTGTTCCCTGAGG R: TGACTATTTAAGTCATTTGCCATTT	AAC	299-302	2	0.406	0.352
A222	F: GGGTTGAGAGGAGGCAGTTCT R: CCAAATAGCTTTAGGAAGGTCCCT	ATCT	338-386	11	0.801	0.656

N_A: 等位基因數(number of alleles); H_O: 異型合子觀測值(observed heterozygosity); H_E: 異型合子期望值(expected heterozygosity)

NIKAIDO, M., HARADA, M., CAO, Y., HASEGAWA, M., & OKADA, N. (2000a).

Monophyletic origin of the order Chiroptera and its phylogenetic position among Mammalia, as inferred from the complete sequence of the mitochondrial DNA of a Japanese megabat, the Ryukyu flying fox (*Pteropus dasymallus*). *Journal of Molecular Evolution* 51, 318-328.

NIKAIDO, M., HARADA, M., CAO, Y., HASEGAWA, M., & OKADA, N. (2000b). Data from:

Monophyletic origin of the order Chiroptera and its phylogenetic position among Mammalia, as inferred from the complete sequence of the mitochondrial DNA of a Japanese megabat, the Ryukyu flying fox (*Pteropus dasymallus*). GenBank.

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NC_002612.1

TSANG, S. M., WIANTORO, S., VELUZ, M. J., SUGITA, N., NGUYEN, Y. L., SIMMONS, N. B.,

& LOHMAN, D. J. (2019a). Dispersal out of Wallacea spurs diversification of *Pteropus* flying foxes, the world's largest bats (Mammalia: Chiroptera). *Journal of Biogeography* 47, 527-537.

TSANG, S. M., WIANTORO, S., VELUZ, M. J., SUGITA, N., NGUYEN, Y. L., SIMMONS, N. B.,

& LOHMAN, D. J. (2019b). Data from: Dispersal out of Wallacea spurs diversification of *Pteropus* flying foxes, the world's largest bats (Mammalia: Chiroptera). Dryad Digital Repository. <https://doi.org/10.5061/dryad.8892g0m>

附錄三、野外樣本採集照片



研究人員採集掉落在地上的新鮮排遺



龜山島 401 高地步道上的新鮮狐蝠排遺



研究人員採集掉落在樹葉上的新鮮排遺



龜山島路旁樹葉上的新鮮排遺



龜山島環湖步道



龜山島 401 高地步道