

龜山島狐蝠族群的保育地位評估 (3/4)

期末報告

Conservation status of the flying fox population on the Gueishan Island

計畫編號：109 林發-09.1-保-30

計畫主持人：陳湘繁

計畫主辦人：陳湘繁、張廖年鴻

研究助理：阮仲豪

執行機關：國立臺北大學、臺北市立動物園

執行期間：109 年 1 月 1 日至 109 年 12 月 31 日

目次

目次.....	I
摘要.....	IV
Abstract	V
前言.....	1
材料與方法.....	6
1. 取樣方法.....	6
2. DNA 萃取及 PCR 引子選擇	7
3. 粒線體 DNA 分析.....	8
3.1 遺傳多樣性.....	8
3.2 遺傳分化	9
3.3 單倍型網絡圖.....	9
3.4 親緣樹重建.....	9
4. 微衛星 DNA 分析.....	10
4.1 遺傳多樣性.....	10
4.2 遺傳分化	10
4.3 族群遺傳結構.....	10
5. 個體鑑定.....	11
6. 性別鑑定.....	11
7. 親緣鑑定及譜系重建.....	13
結果.....	13
1. 粒線體 DNA 分析.....	13
1.1 遺傳多樣性.....	14
1.2 遺傳分化	14
1.3 親緣樹重建.....	15

2. 微衛星 DNA 分析.....	15
2.1 遺傳多樣性.....	15
2.2 遺傳分化	15
2.3 族群遺傳結構.....	16
3. 個體鑑定.....	16
4. 性別鑑定.....	16
5. 親子對鑑定及譜系重建.....	17
討論.....	18
表一、琉球狐蝠的粒線體遺傳多樣性	25
表二、琉球狐蝠的微衛星遺傳多樣性	25
表三、琉球狐蝠的分子變異數分析(Analysis of molecular variance, AMOVA).....	26
表四、以粒線體 DNA 分析琉球狐蝠於亞種之間的成對遺傳分化(Φ_{ST}).....	26
表五、以微衛星基因座分析琉球狐蝠於亞種之間的成對遺傳分化(F_{ST}).....	27
表六、本研究開發性別鑑定引子在四狐蝠屬物種之測試結果	27
表七、本年度鑑定個體各季出沒狀況一覽表 (2020 五月~2021 一月).....	28
圖一、琉球狐蝠地理分布圖	29
圖二、琉球狐蝠島嶼間的遺傳和地理距離之成對比較	30
圖三、琉球狐蝠的單倍型網絡圖	31
圖四、以 STRUCTURE 分析琉球狐蝠個體的遺傳結構圖.....	32
圖五、粒線體之結合序列親緣樹	33
圖六、 P_{ID} 、 P_{Sibs} 與微衛星基因座累積數量關係圖	34
圖七、本年度龜山島個體各季分布圖	34
圖八、性別鑑定之測試電泳圖	35
圖九、本年度龜山島族群之親緣鑑定	35
致謝.....	36
參考文獻.....	36
附錄一、本研究所選用之粒線體引子一覽表	56

附錄二、琉球狐蝠性別鑑定測試之引子	57
附錄三、野外調查照片	58

摘要

數量稀少且孤立之族群容易遭逢遺傳隨機事件 (stochastic events) 以及遺傳漂變 (genetic drift) 的負面影響而威脅其生存，故對受脅物種的保育而言，如何執行有效的遺傳管理是十分重要的研究議題。臺灣狐蝠 (*Pteropus dasymallus formosus*) 為琉球狐蝠五個亞種之一，為瀕臨絕種保育類野生動物，原分布於綠島，因過度獵捕及棲地破壞曾幾近消失，近幾年在龜山島和花蓮出現穩定的小族群。為進一步釐清琉球狐蝠各亞種的遺傳多樣性及族群分化的形式，我們以兩套分子標記——粒線體及微衛星 DNA 進行遺傳分析；另外針對龜山島的族群，以微衛星和性染色體基因型進行個體和性別辨識，期望能對島上的族群數量和結構有進一步的了解。成對的島嶼族群間多具有顯著的遺傳分化，其中，粒線體的單倍型呈現跨區域的混合型態，表示歷史上可能曾出現頻繁的拓殖及播遷事件；而微衛星分析的結果，則呈現「距離隔離」的分化模式 (Isolation by distance) ，並與地理上深層海峽的存在有顯著相關性。龜山島族群組成分析的部分，從 109 年度採集的樣本中成功辨識出 36 隻不同的個體 (23 雄、13 雌) ，未來將持續累積更多的樣本。總結本研究，琉球狐蝠的近期分布及亞種的遺傳多樣性，很可能受到隔離分化 (vicariance) 及長期大洋形成的基因交流屏障所形塑，然而隨著個體於鄰近島嶼間有限度的播遷，遺傳結構持續處於動態的變化。我們認為長時間隔離之下的島嶼亞群應視為獨立的保育單元，並執行具體的保育措施以減緩族群的衰減，尤其族群數量小的亞種更須嚴密監測族群的變動；而晚近才形成的龜山島族群，具有相對較高的遺傳多樣性及多來源的個體組成，未來除持續監測族群動態趨勢和組成結構，另須釐清其與臺灣本島族群及鄰近八重山亞種的交流狀況。

關鍵字：遺傳分化、島嶼生物地理學、跨洋播遷、族群結構、狐蝠科、琉球群島

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. The Formosan flying fox (*Pteropus dasymallus formosus*) is one of the five subspecies in the Ryukyu flying fox (*Pteropus dasymallus*). The population was once abundant on Lyudao (Green Island), however extensive hunting and habitat loss led to its near extinction. Small populations of the Formosan flying fox were recorded on Gueishan Island (Turtle island) and the main island of Taiwan (Hualien city) in the recent decades. To examine the genetic diversity and differentiation pattern among subspecies, we used two different types of genetic markers, mitochondrial DNA (mtDNA) and microsatellite loci, to conduct the genetic analysis. On the other hand, for the effective monitoring of the population dynamics on Gueishan Island, we established an identification procedure by polymorphic microsatellite loci and sex-linked markers. Significant genetic differentiation was detected among most island populations, with mitochondrial haplotypes showing some mixing across the regions, likely reflecting historical colonization and/or dispersal events. In contrast, microsatellite markers showed an overall pattern of isolation by distance appeared to be driven by the presence of deep ocean trenches between geographically distant populations. To date, there were 36 individuals (23 males and 13 females) recognized on Gueishan Island in 2020 by molecular identification. More samples will be collected in the future to build a more robust demography. The current distribution of *P. dasymallus* and its subspecific diversity therefore appears to have arisen through vicariance coupled with a long history of gene flow across oceanic barriers. However, with the limited dispersal

occurs through stepping stones model, the pattern of genetic structure remains to be dynamics and ongoing. We conclude that isolated island subgroups should be managed separately, with efforts directed at reducing further declines and performing an effective population monitoring, especially for subspecies with conservation concerns. In addition, for the recently colonized population on Gueishan Island, with high genetic diversity and multiple ancestral origins, it is important to keep monitoring its population demography and further examine its potential gene flow with other populations on adjacent islands.

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

前言

小規模且孤立的族群容易遭受隨機事件及遺傳漂變等壓力，這些威脅將直接減損遺傳多樣性、降低繁殖之適存值，最終導致物種滅絕(Elstrand & 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保育至關重要，特別是正處於瀕臨滅絕邊緣及生存威脅的物種。藉由分析遺傳資訊，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—如族群的數量動態變化、基因的交流等，若可善加掌握，將幫助我們了解一個物種的長期存續潛能(Allendorf *et al.*, 2010, Shafer *et al.*, 2015)。若妥善整合遺傳及非遺傳面向(如行為、生態、族群變動及環境等)的各項考量，更可有效規劃族群管理策略及提升保育行動成效(Frankham *et al.*, 2017; Hoban *et al.*, 2013, Polechová & Barton, 2015)。

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者的重要角色，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，除了可有效促進森林的復育外(Nyhagen *et al.*, 2005; Shilton & Whittaker 2009)，許多具有生態及經濟重要價值的植物(如榴槤)，也相當依賴狐蝠的授粉來繁衍(Sheherazade *et al.*, 2019)。然而，雖身為生態系服務的重要提供者，諸如棲地喪失、劣化及狩獵壓力等生存壓力近年來卻有增無減，已嚴重威脅舊世界果蝠的生存並導致族群的衰減(Cox & Elmqvist, 2000, Florens *et al.*, 2017; McConkey & Drake, 2006; Mickleburgh *et al.*, 2002)，有將近半數的果蝠物種有保育上的危急性，其中即包括 30 個狐蝠屬的物種(IUCN, 2020)。

舊世界果蝠體型大，通常被認為是強壯且擅於長距離飛行的物種。根據紅狐蝠(*P. scapulatus*)及黃果蝠(*Eidolon helvum*)的遺傳分析顯示，基因流分別橫跨澳洲大

陸及非洲，距離長達數千公里(Peel *et al.*, 2013; Sinclair *et al.*, 1996)。歸納其長距離移動的原因，可能是因為幼蝠的播遷(natal dispersal)、自然界的暴風或颱風，或者為了尋找糧食資源。以狐蝠屬的模里西斯狐蝠(*P. niger*)、太平洋狐蝠(*P. tonganus*)及馬來狐蝠(*P. vampyrus*) (Larsen *et al.*, 2014; McConkey & Drake, 2007; Tsang *et al.*, 2018)為例，遺傳分析顯示了長距離且廣泛的跨島基因交流，相鄰的島嶼族群形成一隨機交配群(panmictic)；相對而言，也有部份狐蝠物種—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; Ibouroi *et al.*, 2018; Russell *et al.*, 2016)。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管理單元；而後者，不同的島嶼族群則應視作獨立的經營管理單位(management units, MU) (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，可根據其分佈之島群作區分，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*)及八重山狐蝠(*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)。而較晚近才發現的菲律賓族群，則棲息於呂宋島北方的兩處海島群，包含巴丹群島(Batanes islands)及巴布延群島(Babuyan Islands)，目前尚未被正式命名為一亞種(Heaney *et al.*, 1998)。

琉球狐蝠近期在國際自然保育聯盟紅皮書(IUCN Red list)歸類為易危(Vulnerable)的保育等級(IUCN, 2020)，各亞種實際上的保育現況不盡相同(Vincenot

et al., 2017)。族群數量稀少並具保育迫切性的是大東、永良部及臺灣狐蝠這三個亞種，野外約僅剩 50-300 隻個體(Wu, 2010, Saitoh *et al.*, 2015)，皆已受國家層級的法律保護。其中，大東及永良部亞種被指定為日本的天然紀念物(Natural Monuments)，尤其大東亞種更被列為國家瀕危物種(National Endangered Species)；而在臺灣，臺灣狐蝠也已名列瀕臨絕種保育類野生動物。另外三個亞種—折居氏、八重山以及菲律賓狐蝠，數量相對較為豐富，並未歸類在區域性的受脅等級(Heaney *et al.*, 1998, Saitoh *et al.*, 2015)。

大東亞種在地理分布上僅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經開發為農地，最主要的威脅是颱風(Saitoh *et al.*, 2015)。永良部亞種則主要見於大隅群島(Ōsumi Islands)及圖克拉群島(Tokara Islands)，為琉球狐蝠的分布北界(Yoshiyuki, 1989)。臺灣狐蝠過去主要分布於臺灣東南方的綠島，然而該島族群卻在 1970 至 80 年代之間，遭受嚴重的狩獵及棲地喪失，數量幾近滅絕(Lin & Pei, 1999)。晚近至 2004 年，在本島東北方 9.7 km 處的龜山島首度記錄到狐蝠的出現，是目前臺灣數量最多且穩定的狐蝠族群。此外，自 2006 年以降，在臺灣本島東部及東北部也陸續有零星的通報紀錄(Wu, 2010)。目前為止，對於龜山島及臺灣本島個體的來源仍尚未有過定論。

琉球狐蝠亞種之間的親緣關係及族群分化型式仍然未知，但推測可能與琉球群島的地理及地質歷史有密切關聯。此島鏈由 150 座島嶼構成，自日本本島至臺灣跨幅近 1200 km，其中有部分島嶼在末次冰盛期(Last Glacial Maximum, LGM)曾藉陸橋相連(Ota, 1998)。過往於兩棲爬行類的遺傳研究顯示，在北、中及南琉球的族群間存在分化現象(Ota, 1998, 2000)，此三大區即使在末次冰盛期時也仍被寬廣的海

峽隔絕—分別是圖克拉海峽(Tokara Gap)及慶良間海峽(Kerama Gap)(圖一)(Nakamura *et al.*, 2013)·這些海峽形成天然的地理屏障·促進了生物族群在北、中及南琉球之間的遺傳漂變及族群分化(Lin *et al.*, 2002; Toda *et al.*, 1997)。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上·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 Islands)及巴布延群島(Babuyan Islands)·約在三百多萬年前的上新世晚期形成·相較於與呂宋島的距離(200 km)·巴丹島與臺灣南端(150 km·以巴士海峽相隔)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)·也一定程度反映了履及這些邊陲島嶼進行系統性調查之困難。

使用非侵入式的採樣方法進行珍稀、敏感或生性隱密野生動物的保育遺傳研究·已廣泛應用在各類群·包括哺乳動物·於翼手目也已應用在物種鑑定(Puechmaille & Teeling, 2014; Korstian *et al.*, 2015; Williams *et al.*, 2020)及族群調查(Puechmaille & Petit, 2007; Zarzoso-Lacoste *et al.*, 2018)·然而·如果與其他哺乳動物相比·應用實例仍不多或侷限於特定物種(Ortega & Maldonado, 2020)。本計畫於去(108)年度·已初步測試非侵入式樣本的採集與分析·確定可取得品質良好的排遺 DNA·並應用於亞種分化的研究·本年度將持續優化相關技術·並初探將之應用於族群尺度的調查。

本研究於去年度已藉由粒線體 DNA 及微衛星基因座兩種遺傳標記·初步檢驗臺灣狐蝠及其他亞種的遺傳多樣性及遺傳結構。具體目的包含—(a)量化琉球狐蝠亞種於不同島群中的遺傳多樣性；(b)評估遺傳分化是否在島群之間發生·且其型式是否與其亞種的劃分單元一致；(c)建立遺傳結構之模式·特別是釐清臺灣龜山島的新

紀錄族群(龜山島及臺灣本島)及菲律賓族群與其他亞種族群之間的關聯。

對應研究目標，至今所得的重要成果如下：(a)目前在各亞種之中，已知八重山狐蝠和臺灣狐蝠有較高的遺傳多樣性，而大東狐蝠的族群變異則相對較低；(b)不同亞種內，鄰近族群之間有明顯頻繁的基因交流，而深廣的海峽為重要的地理屏障，侷限了亞種間的基因交流，故大多數亞種之間仍可見顯著的遺傳分化，尤其折居氏、大東及菲律賓三個族群可互相視為獨立的族群單位；(c)臺灣與八重山狐蝠之間的分化並不顯著，存在多個祖先支系的潛在來源。其中，臺灣本島與綠島的族群組成相對接近，而龜山島族群除有與臺灣本島和綠島接近的來源外，亦存在一支自身的祖先支系、甚至也不乏與八重山乃至折居氏亞種的近緣個體存在。然而受限各族群的代表樣本數並不均等、所選用的遺傳標記或許無法反映完整演化歷史，臺灣狐蝠的來源，仍有必要加以檢視更多的樣本，謹慎釐清族群間的分化。

本年度的工作項目，於「亞種之間層次」之分析，目標包含在去年度研究基礎上，加入更多遺傳標記(包含粒線體、核基因，並以能夠涵蓋完整的基因片段為實驗目標)以及增加各亞種族群的代表樣本數，以能更完整重建琉球狐蝠的遺傳分化現況。

而在「族群之內的層次」，目標如下：(a)針對臺灣狐蝠最大、最穩定的族群—龜山島，進行例行採集，擴大個體資料庫，透過每季的個體標定，進行個體數量估算、性別比及譜系親緣等基礎資料的蒐集，協助評估族群的中、長期生存趨勢。(b)花蓮及綠島地區個體稀少、出沒範圍掌握不易，難以蒐集到排遺樣本，故測試以野外較易採集到的果實食渣作為 DNA 萃取來源，以提升取樣效率。

材料與方法

1. 取樣方法

於 2009~2020 年期間，我們所取得的樣本來源包括：野外捕捉的活體、屍體、救援、圈養個體以及非侵入式採樣的排遺及食渣樣本。所有的樣本皆來自八處不同的島嶼，並進一步根據其地理位置區分為五亞種(Mickleburgh *et al.* 1992) (圖一)。

樣本類型包括翼膜切片、血液、冷凍肌肉組織及排遺樣本。每次翼膜取樣約為 3mm 大小，並保存於 99.5%的酒精液體、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。

在 2020 年期間，受限於新冠肺炎疫情影響，我們未能親赴國外取得更多的琉球狐蝠樣本，故本年度採集的樣本均為臺灣的族群。為累積足夠的樣本數作為個體辨識及族群估算之用，我們分別於 5、8、10、11 月於龜山島登島進行多日調查採集，共採得了 130 件排遺及 2 件新鮮食渣樣本，並於 10 月進行捕捉，採集到 12 隻個體的翼膜組織。

綠島地區則於 12 月採得 3 件食渣樣本、花蓮市亦於同月採得 11 件食渣樣本。另於 2021 年 1 月，花蓮地區採得 3 件排遺及 5 件食渣樣本、綠島於 3 月採得 6 件樣本。就遺傳多樣性研究的部分，龜山島族群將在去年度的樣本庫基礎上，再加上本年度(2020 年)的 12 隻捕捉個體進行分析(扣除重複及親子對個體後， $n = 38$)，由於該地區的樣本數已經足夠，故本年度所採集的排遺樣本，僅應用在個體辨識及親子配對的分析，不納入遺傳多樣性之分析中；花蓮及綠島地區之樣本則相對較少，

只要通過初步品質篩選，即進行粒線體及微衛星基因座之後端遺傳分析。

2. DNA 萃取及 PCR 引子選擇

若樣本類型為翼膜、血液、冷凍肌肉組織，我們使用 DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen)進行萃取操作；若為排遺樣本，則使用 QIAamp Investigator Kit 或者 QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen)萃取。自 2020 年 10 月之後所採集的排遺及食渣樣本，均以 Labturbo Nucleic Acid Purification Kit 搭配 Labturbo 自動萃取儀(諾貝爾生物科技)萃取。

參考狐蝠屬物種之親緣地理學研究(Brown *et al.*, 2011; Tsang *et al.*, 2019b; Mohd-Yusof *et al.*, 2020)，於核基因選擇了八組基因(八組引子)、粒線體基因選擇了三組基因(五組引子)進行測試。為了解選用引子是否適用琉球狐蝠，會先以各亞種挑選 1~2 隻進行前測，若具多型性才會往下進行全體樣本的實驗。除了選用已發表引子外，本研究也以八重山亞種之粒線體序列(NC_002612.1)作為模板，設計可增幅粒線體基因(cytb, COI)全長之專一性引子，加入測試比較。引子名稱、條件及出處詳列如附錄一。

聚合酶鏈鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR)的總反應體積為 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 $^{\circ}$ C(2 分鐘)；(2).解離溫度 94 $^{\circ}$ C (30 秒)、引子專一性黏合溫度 $^{\circ}$ C (30 秒)及延長溫度 68 $^{\circ}$ C (50 秒)，此階段進行 40 次循環；(3).最終延長溫度為 68 $^{\circ}$ C (10 分鐘)。

本研究使用 ABI 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems)進行定序，層析圖以 SeqMan 及 MegAlign (DNASTAR)進行編輯及比對排列(align)。我們亦自 NCBI Genbank 上取得三筆琉球狐蝠部分控制區序列，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); 以及兩筆來自巴丹群島(Batanes Islands)的菲律賓狐蝠序列, 分別來自巴丹島(Batan Island)及沙坦島(Sabtang Island), 其 NCBI 號碼分別為 MN477630 及 MN477629 (Tsang *et al.*, 2019a, b)。

微衛星 DNA 分析的部分, 我們使用 26 個多型性的微衛星分子標誌進行(Chen *et al.*, 2021), 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).始解離溫度為 94 $^{\circ}$ C (2 分鐘); (2).離溫度 94 $^{\circ}$ C (30 秒)、黏合溫度 54 $^{\circ}$ C (30 秒) 及延長溫度 68 $^{\circ}$ C (1 分鐘), 此階段進行 40 次循環; (3).終延長溫度為 68 $^{\circ}$ 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) 及 MLrelate (Kalinowski *et al.*, 2006)進行個體和親子鑑定(方法詳述於後), 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

3.1 遺傳多樣性

根據粒線體 DNA 序列資料, 我們估算不同亞種間的單倍型數量、多型性的點位數量(P_s)、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), 上述分析以 Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010)進行。

3.2 遺傳分化

我們以分子變異數分析(analysis of molecular variance, AMOVA) · 判定亞種間的遺傳分化程度(Excoffier *et al.*, 1992) · 只有族群數大於一者方納入資料分析。總變異依其變異的貢獻來源 · 區分為「亞種內」(within subspecies)及「亞種間」(among subspecies)兩尺度加以探討 · 菲律賓族群在分析上視為一亞種 · 以與其他亞種進行分析比較。為計算亞種間的分化程度 · 我們同時估算整體族群的 Φ_{ST} 值 · 上述分析以 Arlequin 3.5.2.2 進行 · 並以 20,000 random permutation 檢驗顯著值。我們另以 $\Phi_{ST}/(1 - \Phi_{ST})$ 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)的模式。兩兩島嶼間的地理距離(geographical distances, km)是根據島嶼中心的經緯度座標 · 取直線的歐式距離(Euclidean distances)並取自然對數值。共計納入 11 座島嶼於距離隔離的分析之中 · 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、巴丹島及沙坦島 · 並以 Arlequin 3.5.2.2 進行 Mantel test · 以 20,000 個 permutation 檢視分析的顯著程度。

3.3 單倍型網絡圖

為進一步了解遺傳距離及亞種的關聯 · 我們以軟體 Popart 1.7 (Leigh & Bryant, 2015)建立 TCS 方法(Clement *et al.*, 2002)的單倍型網絡圖(haplotype network) · 以檢視琉球狐蝠的遺傳結構。

3.4 親緣樹重建

經前測後 · 我們挑選適宜基因座組合 · 進行 jModeltest2 (Darriba *et al.*, 2012)

決定親緣樹的分析模型，並以 MEGAX 以 Maximum likelihood 方法(bootstrap = 1000)重建最可信的亞種親緣關係，以馬來狐蝠(*Pteropus vampyrus*, NC_026542) 為外群。

4. 微衛星 DNA 分析

4.1 遺傳多樣性

於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，我們計算的指標包含：平均等位基因數量(N_a)、等位基因豐富度(校正各亞種樣本數而得的等位基因數, A_C)、平均 H_O 及 H_E ，並亦計算每個亞種平均的成對親緣值(RI)，以推估個體之間的親緣關係(Ritland, 1996)。以上分析均以 GenAlEx 6.51 (Peakall & Smouse, 2006, 2012)進行。

4.2 遺傳分化

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 及成對分化(pairwise differentiation)檢定，分析均以 GenAlEx 6.51 進行。我們亦檢測島嶼間的「距離隔離」(isolation by distance)的模式，分析涵蓋八個島嶼(排除欠缺微衛星資料的伊良部、巴丹島及沙坦島)，使用 Arlequin 3.5.2.2 進行 Mantel test，以 20,000 個 permutation 檢視分析的顯著性。

4.3 族群遺傳結構

為檢驗族群間的親緣關係，我們藉由貝葉氏分群方法(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 iterations、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 值皆跑 10 個獨立回合以確定結果的一致性。並藉線上軟體 Structure Harvest，根據平均值的似然值(likelihood)及變異數決定最佳的 K 值，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 產出圖形(Kopelman *et al.*, 2015)。

5. 個體鑑定

為了判斷多少微衛星基因座足以用於龜山島族群的個體鑑定，本研究以 GenAlEx 6.51 計算兩機率值— P_{ID} 及 P_{Sibs} 。 P_{ID} 代表一族群中在逢機交配的假設下，兩個無親緣個體帶有相同基因座的機率，可作為基因座解析度的極限(上限)，以值小於 0.0001 為較適當的標準； P_{Sibs} 則為族群中，兩手足個體恰帶有相同基因座之機率，可作為基因座解析度的底限(下限)，為評估基因座解析力的保守指標，以值小於 0.02 為較適當的標準(Eiken *et al.*, 2009; Lorenzini *et al.*, 2011; Mishra *et al.*, 2014)。我們檢視需要累積使用多少個基因座，以使 P_{ID} 及 P_{Sibs} 數值能夠符合適當的標準。為對野外採集樣本的品質作一有效控管，我們挑選三個成功率及多型性較佳的微衛星基因座(A206, A214, A226)，進行一次 PCR 反應，以對樣本作初步篩選，若三個基因座有任一成功，則繼續完成其餘的基因座，再以 Cervus 3.0.7 比對全數樣本的基因型，進行個體鑑定(Kalinowski *et al.*, 2007)。

6. 性別鑑定

本研究將測試包含前人已發表，適用於哺乳類或翼手目之引子(Aasen & Medrano, 1990; Sánchez *et al.*, 1996; Cathey *et al.*, 1998; Shaw *et al.*, 2003; Korstian *et*

al., 2013; McMichael *et al.*, 2017; Guan *et al.*, 2020) ; 除此之外，也嘗試以軟體 PrimerSelect (DNASTAR)自行設計適用於狐蝠屬物種的專一引子(詳見附錄二)。一般哺乳類性別鑑定引子組會包含兩組引子—正控制組和目標片段引子(Y 染色體)，以下詳述設計過程。

Y 染色體的部分，本研究以 *Sry* 基因(XM_006914921)為模板，設計兩對引子 Pd-Sry1-F/R 及 Pd-Sry2-F/R，以放大 Y 染色體部分片段，鑑別雄性個體。為確定 Y 染色體片段未被放大並非是受到樣本品質影響而呈現偽陰性，故設立正控制組之引子(無論雌、雄皆可成功放大)。本研究嘗試使用了六組引子作測試，包含以黑狐蝠(*Pteropus alecto*)位於 X 染色體之 *AML* 基因(XM_006906040)為參考模板，設計兩對引子(Pd-AML1-F/R 及 Pd-AML2-F/R)，以作為可放大 X 染色體片段之正控制組；也以另一物種馬來狐蝠(*Pteropus vampyrus*)(XM_023532279.1)之 *AML* 基因，設計另外一對引子(Pv-AML2-F/R)作測試；最後，也直接挑選兩核基因之微衛星(A1 及 A15)及一對粒線體 DNA 引子(RodmitU/L)加入比較。以上所使用引子之序列及目標片段大小，見附錄二。

聚合酶鏈鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR)由 10 μ l 的總反應體積內進行，包含 20-100 ng 的模板 DNA、0.375 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 $^{\circ}$ C (2 分鐘)；(2).解離溫度 94 $^{\circ}$ C(30 秒)、引子專一黏合溫度(以 45~60 $^{\circ}$ C 作梯度溫度確認最佳溫度) (30 秒)及延長溫度 68 $^{\circ}$ C(50 秒)，此階段進行 35~40 次循環。(3).最終延長溫度為 68 $^{\circ}$ C(10 分鐘)。

並直接以 2.0 % agarose 電泳膠於 UV 光下照射成像，檢視產物片段數量及大

小來鑑定性別(若為雄性，將有兩條產物；若為雌性，將只在正控制組有產物)。

經測試所取得的最適引子應用至非侵入式採樣(排遺及食渣)以補齊原本闕如的性別資訊。除了臺灣狐蝠外，也測試引子應用在馬來狐蝠(*Pteropus vampyrus*)、黎氏狐蝠(*Pteropus lylei*)及小狐蝠(*Pteropus hypomelanus*)等其他三種狐蝠屬物種於性別鑑定之適用性。

7. 親緣鑑定及譜系重建

為增加親緣鑑定的可信度，每個個體分析 12 個基因座，再以 Cervus 3.0.7 及 MLrelate 檢視個體之間的親緣關係。若為親子對，兩者的基因型配對需吻合，沒有任何基因座 mismatch。若為母子對、全手足或同母的半手足對，應具有相同的母系遺傳來源，故亦以引子 RodmtU/L 檢視兩個體粒線體 D-loop 片段之單倍型是否相同，並結合個體的成熟狀況和出現時序作合理的親緣關係判斷。

結果

1. 粒線體 DNA 分析

經前測結果(詳見附錄一)，僅有粒線體基因(D-loop, cytb, COI)具有多型性，並以 D-loop 片段具有最高變異性，故本節分析，將呈現兩部分結果，第一部份是 D-loop 序列，擷取 consensus 序列所得之 418 bp 結果，以最高變異性的單一片段反映六個亞種(n = 93)的分化狀況，尤其納入本年度採集的臺灣地區樣本數，探討八重山及臺灣兩亞種族群的親緣關係，並再次檢視菲律賓族群與各亞種的分化狀況；第二部分，我們以可取得 D-loop, cytb 及 COI 三段全長(3103 bp)的樣本(n = 63，涵蓋五個已命名亞種)作分析，以較多元且覆蓋範圍較長的片段，檢視五亞種的親緣關

係。

1.1 遺傳多樣性

於粒線體 DNA 控制區序列，93 個琉球狐蝠樣本共顯示了 37 個單倍型及 49 個具多型性的點位(包含 segregating site 及 indel)，在這些樣本之中，單倍型多樣性、核苷酸多樣性及成對平均差異分別為 0.944、0.011 及 4.672；而若以 63 個結合序列的樣本來觀，則共有 41 個單倍型及 67 個多型性點位，單倍型多樣性、核苷酸多樣性及成對平均差異分別為 0.968、0.002 及 6.521，其中菲律賓的族群呈現最高的多樣性；另一方面，大東亞種之多樣性則最低。在亞種層次的分析中，我們皆排除了樣本數僅為一的永良部亞種(表一)。

單倍型網絡圖中，在部分控制區的結果(圖三)菲律賓的沙坦島個體仍然明顯與其餘個體不同，而日本及臺灣個體則未有明顯的單倍型分化趨勢。在結合序列的結果(圖三)，不同單倍型與亞種則有相對較清楚的對應關係，但各單倍型的親緣關係仍十分接近。

1.2 遺傳分化

AMOVA 分析證明了五個亞種(包含臺灣、八重山、折居氏、大東及菲律賓等樣本數大於一的族群)具有遺傳上的分化。部分控制區及結合序列的 Φ_{ST} 分別為 0.155 及 0.134，顯著大於 0 ($P < 0.001$ ，表三)，這意味約有 13~16% 的粒線體 DNA 遺傳變異可由亞種間的差異所解釋。當兩兩亞種比較，除了臺灣及八重山亞種之外，其他成對族群間的遺傳距離在統計上均呈現顯著(表三)。而以 Mantel test 檢視地理距離與遺傳距離之相關性，無論是部分控制區($r^2 = 0.000$, $P = 0.550$)或結合序列($r^2 = 0.019$, $P = 0.245$)皆未達顯著(圖二)。

1.3 親緣樹重建

本研究以三段粒腺體序列(418 bp D-loop, 1140 bp *cytb*, 1545 bp COI) · 共計 3103 bp 的結合序列(concatenated sequence) · 以 HKY 模型來建立 Maximum likelihood 親緣樹(圖五) · 大多數分支的 bootstrap 值皆小於 50 · 且並未和亞種的劃分有一致趨勢。

2. 微衛星 DNA 分析

2.1 遺傳多樣性

在去年度 · 本研究已建立藉 76 個琉球狐蝠之樣本、26 個具多型性的微衛星基因型之分析結果 · 本年度再以此基礎 · 加入一品質較佳的花蓮文創園區樣本 · 增加匱乏且珍稀的臺灣本島樣本數 · 最後總計共 77 個樣本來重新分析各多樣性指標。平均異型合子率觀測值(H_o)及期望值(H_e)分別為 0.533 及 0.543 · 各亞種之中 · 遺傳多樣性最高者為臺灣及八重山亞種。而與粒線體 DNA 的資料趨勢相同 · 大東狐蝠所具有的遺傳多樣性最低(表二)。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。最後 · 除了八重山亞種 · 平均成對之親緣值(Relatedness)於四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)。

2.2 遺傳分化

AMOVA 結果顯示亞種間存在顯著的遺傳分化 · F_{ST} 值為 0.07 ($P < 0.001$, 表三)。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($r^2 = 0.231$, $P < 0.01$ · 圖二) · 顯示琉球狐蝠橫跨琉球群島至臺灣的遺傳分化符合距離隔離的模式。

2.3 族群遺傳結構

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歸類至其所屬的分群(僅有一隻折居氏個體除外)；臺灣狐蝠中的 TW2(綠島)和 TW3(臺灣本島)組成明顯接近；然而，TW1(龜山島)個體及八重山亞種則呈現了跨越遺傳分群的混合結構。而本年度新增的一隻花蓮個體，依然與其他本島個體歸屬於同樣的分群中。

3. 個體鑑定

當使用的基因座累積達 5 個以上時， P_{ID} 可降至 0.00005， P_{Sibs} 可降至 0.016，即已滿足個體辨識之底線標準(圖六)，為提升實驗的精準度，我們以 9 個基因座作為個體辨識的基礎，當使用 9 個基因座時， P_{ID} 及 P_{Sibs} 可分別降至 3.03×10^{-7} 及 0.0015。

2020 年於龜山島進行的四次調查，採得 132 件排遺或食渣樣本，其中共計 72 件通過篩選(成功率 54.55%)，加上十月份進行兩捕捉夜所得之 12 隻個體樣本，共成功鑑定出 36 隻個體(23 雄及 13 雌)(表七)，每季可鑑定出的個體數介於 7~16 隻不等(圖七)。有 6 隻個體(4 雄及 2 雌)出現兩季以上的紀錄(16.67%)、1 隻雄性個體曾出現於 2019 年 5 月。而綠島的樣本皆未成功；花蓮則有 7 個樣本通過篩選，鑑定出 2 隻個體(1 雄及 1 雌；其中一雄性個體樣本完成 26 個基因座的微衛星分析)。

4. 性別鑑定

本研究測試前人已發表的引子，若非全無成功的電泳產物、便是非專一產物過

多，而干擾了正確性別的判讀，經調整反應溫度及細項條件皆未改善，研判並不適用於琉球狐蝠。故此節將只闡述本研究自行開發之引子，測試結果詳見表六。

兩對自行設計之 Y 染色體引子皆可成功放大包含臺灣狐蝠等四種狐蝠屬物種的目標片段，而尤其以引子 P-Sry1 效率較佳、且片段大小約 150bp，並不易與電泳時易產生的小分子(<100 bp)非專一片段 primer dimer 混淆。而正控制組，兩組 X 染色體引子(P-AML2 和 Pv-AML2)都各自有一個狐蝠屬物種無法成功放大；然而，若以微衛星基因座 A1 及 A15 作為正控制組，則所有測試物種都能成功，而以後者有較明顯清晰的訊號(電泳判定圖見圖九，挑選成功結果較清晰的四對比較組合呈現)，故本研究以 P-Sry1 搭配 A15 作為性別鑑定的組合引子。性別判定的標準如下：每個樣本進行兩次重複的實驗，結果一致即判定為該樣本的性別；若兩次性別不一致，則再進行第三次判定。而此標準建立後，本年度新增的非侵入採樣樣本的性別結果可見表七。

5. 親子對鑑定及譜系重建

以今年 12 隻捕捉個體作為子代的初步結果顯示，鑑定出一對父女對，雌性個體(TW-G-45)的父親可追溯至 2011 年八月捕捉之個體(TW-G-27)，而 TW-G-45 另有一半手足 TW-G-36 於 2020 年八月已經被標定。另外，也鑑定出兩對半手足：一對同父手足是 10 月捕捉的個體(TW-G-40 及 TW-G-44)；另一對同母手足，則橫跨了九年，於本年度 8 月開始有分子標定紀錄的雌性個體(TW-G-37)，其同母姊妹可追溯至 2011 年的另一雌性個體(TW-G-15)(圖十)。

討論

自去年度開始，本研究嘗試檢視琉球狐蝠各亞種的遺傳多樣性及遺傳結構。本年度在過去基礎上，擴大對遺傳標記的選用，經前測發現琉球狐蝠在核基因層次除了微衛星基因座外多型性不高，故本年度主要工作在於開發粒線體的基因標記—除了原有的 D-loop 增加長度至 418 bp 外，也將親緣地理分析常用的 cytochrome b 及 COI 的全長基因(分別為 1140 bp 及 1545 bp)納入分析；而樣本數上，則於臺灣亞種新增了來自龜山島、花蓮及綠島的樣本。根據粒線體序列及 26 組微衛星的基因座結果顯示，島群之間存在顯著的遺傳分化(表四、五)，其中以折居氏和大東兩亞種獨特性最明顯；而台灣亞種及八重山亞種則仍然未呈現顯著的分化(圖四)。

兩種遺傳標記揭示了不同的分化模式，有助我們了解各島嶼亞種過去的族群歷史。值得注意的是，我們並未在亞種間檢測到非常大的差異，部分控制區的單倍型與島嶼之間僅顯示微弱的對應關係(圖三)，即使以 mtDNA 長達 3103 bp 所重建的親緣樹也無法依亞種單位劃分出分明的單系群(Monophyletic group)(圖五)。整體而言，這些模式顯示過去族群之間可能藉多次頻繁的基因交流、拓殖事件(colonization)及族群混合(admixture)構成了現今的遺傳特徵，而其分化明顯受到地理隔離及遺傳漂變的作用影響，也吻合某些亞種(如大東狐蝠)具有較小族群量的事實。單倍型網絡圖我們呈現了兩部分結果，一部份是較高變異的部分控制區片段、另一部分為綜合三段不同演化速率(包含第一部分的部分控制區片段和 cytb 以及 COI 之全長片段)的 mtDNA 基因，若將兩結果互相比較(圖三)，可發現一旦加入了多元但演化速率較慢的蛋白質譯碼片段(protein-coding gene)，亞種與單倍型之間，便可呈現較清晰的對應關係(不同亞種幾乎無重覆的單倍型，除了八重山與臺灣亞種

有一單倍型共享)，可能代表族群之間的變異是較晚近才出現，並透過基因交流在不同島群的亞種內累積。這樣種內呈現高單倍體多樣性，卻未能在亞種之間形成單系群的案例，也在另一飛行能力優異且廣泛分布於馬來西亞、印尼及菲律賓等地的馬來狐蝠(*P. vampyrus*)研究中可見(Tsang *et al.*, 2018)。而無論是單就高變異度的控制區片段、亦或綜合三段 mtDNA 基因的結果，位於中央的單倍型，皆主要為折居氏亞種個體(橘色標示)，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往東向大東島分布及往西進入臺灣。我們僅檢驗了兩筆 Genbank 資料庫中菲律賓個體的序列，在未能取得更多樣本之下，本年度嘗試在粒線體的部分加長增幅控制區 D-loop 片段，讓其他亞種皆可與菲律賓的兩段序列進行比較，結果與去年趨勢相仿：沙坦島的序列與其他所有個體皆有明顯差別，而另一條來自巴丹島的序列則與八重山及大東亞種相對較為接近。菲律賓的兩條序列之間則有 17 bp 的差異，推測該區族群存在著高度多樣性，未來需納入更多該區樣本以探究其多樣性與族群結構。

根據我們粒線體及微衛星分析的結果，仍與去年度的趨勢相仿，臺灣及八重山亞種擁有相對較高的遺傳多樣性，最低的則是大東亞種(表一、二)。相較其他亞種，大東亞種明顯擁有「低遺傳多樣性及高分化程度」的特徵，且不同 K 值之下，皆屬於一個相對獨立的分群(圖四，推測可以以下原因解釋：(1)地理隔離：大東群島坐落於琉球群島最東側，與其他琉球諸島有較長的地理距離(距離沖繩島約 360km 遠)；(2)缺乏「踏腳石」(stepping stones)，可供播遷者(dispersers)往來諸島。大東群島形成於 120~160 萬年前的更新世中期，為菲律賓海洋板塊抬升後的珊瑚礁島嶼(Shiroma *et al.*, 2015)，與其他琉球諸島之間存在深廣的琉球海溝(Ryukyu Trench)(圖一)，因此不若其他大陸型島嶼，在冰河期大東群島從未藉陸橋與其他大陸板塊

接續。值得注意的是，在粒線體 DNA 分析的部分，當增加了遺傳標記的長度，大東亞種的單倍型多樣性(h)並不若其他亞種明顯提升，在三段結合序列的部分甚至呈現下降，說明大東亞種在分化以後於粒線體所累積的獨有變異，高度集中在控制區片段，顯示該亞種可能是琉球狐蝠亞種之中較晚近才出現的分支。優雅角鴞(elegant scops owl, *Otus elegans*)也在大東群島及其他琉球諸島之間，呈現相似的遺傳分化型式以及有限的基因流(Hsu, 2005)。

儘管研究結果顯示亞種之間曾存在頻繁的基因流動，但遺傳分化也仍然在族群之間發生，且比較兩種遺傳標記，粒線體 DNA 分化程度更高於核基因(表三)，兩種標記所呈現的遺傳模式差異，除反映了粒線體基因組本身有較小有效族群量的事實，也透露了琉球狐蝠在島群之間，應主要以雄性作為基因交流者(雄性偏差播遷，male biased dispersal)(Chen *et al.*, 2008; Arnold & Wilkinson, 2015)。然而，當我們試圖以「距離-隔離模型」(Isolation by distance, 後文以 IBD 代稱)檢視遺傳距離與地理距離之間的相關性，卻仍然如去年度的資料僅在微衛星遺傳結果有顯著正相關(圖二)。IBD 模型為一典型「遷徙及漂變平衡」(migration-drift equilibrium)，基因交流在連續相鄰的島嶼族群間頻繁發生，形成有如「踏腳石」(stepping-stone)般循序漸進的移動模式(Kimura & Weiss, 1964)。通常 IBD 模型於較大空間尺度比較容易彰顯 (Bossart & Prowell, 1998)，本研究也可應證，各島嶼兩兩族群中較大的遺傳分化值，皆在深層海溝的兩對側發生(Hutchison & Templeton, 1999)，包括分隔北-中部琉球群島的圖克拉海峽、分隔中-南部琉球群島的慶良間海峽、琉球群島東側的琉球海溝及臺灣-菲律賓群島之間的巴士海峽。雖粒線體遺傳於本年度增加了片段長度，仍然未達顯著性，也符合過往研究顯示，粒線體基因通常不若微衛星適合探討 IBD 模型，可能是因比預期低的種內突變率、並非全然中性演化以及其基本上為

單一基因型(single locus)的特性·不若多基因型(multi-loci)的微衛星容易呈現空間上的遺傳分化所致(Teske *et al.*, 2018)。

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、臺灣東北部及南琉球「陸橋」的形成而促進交流·而確實此兩個亞種不只地理距離上最為接近·且遺傳結構的分化程度也最低。另一方面·在相距超過 200~300 km 的島嶼族群之間可觀察到明顯的分化(如折居氏相對於八重山狐蝠、大東狐蝠相對其餘亞種)·顯示這段物理距離代表基因流在族群之中所可觸及的上限。而在折居氏亞種的無線電追蹤資料(Nakamoto *et al.*, 2009, 2012)及八重山亞種於島內基因交流的研究(Taki *et al.*, 2021)·也支持了狐蝠儘管飛行能力優異·但長途的移動仍有限。儘管如此·於微衛星清楚分化的遺傳結構中·我們仍然發現有少數可能的遷移者存在—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·很可能可追溯自折居氏亞種。且方向多為東往西遷移·可能與該區冬季盛行的東北季風有關(Yang, 2007)。

本研究較出乎意料之外的發現是·臺灣的龜山島族群(TW1)呈現頗高程度的遺傳多樣性。龜山島自 1977 年起成為軍事管制區·據當時龜山島的居民訪談所述並不曾有狐蝠的目擊紀錄(Wu, 2010)·因此這一族群被認為是晚近才經由海洋播遷移入的。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顯然有更近的親緣關係·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)。我們的結果也指出龜山島族群很可能包含多個祖先起源的建立者(founders)·包括來自八重山、折居氏、TW2(綠島)、TW3(臺灣本島)甚至是菲律賓族群的個體。八重山亞種在僅有十個樣本下即呈現了高於其他亞種的多樣性、

最低的自交係數，也與近期研究所發現西表及石垣島所在的中央島區擁有高多樣性的結論一致(Taki *et al.*, 2021)，可能反映了八重山狐蝠為一擁有較長演化歷史的支系(Grant & Bowen, 1998)。值得注意的是，臺灣及折居氏都擁有偏高的自交係數(F_s)，然而臺灣亞種在其他遺傳多樣性的指標值均顯示相對較高，進一步檢視其遺傳結構，當依地理國境劃分，將龜山島、綠島及臺灣本島之狐蝠個體視為一亞種，可能取樣了多個具遺傳結構的次族群，造成「華倫得效應」(Wahlund effect)(Wahlund, 1928; Waples, 2015; Zhivotovsky, 2015)，雖整體遺傳多樣性呈現無虞，但因異型合子期望值(H_E)與觀測值(H_o)之間的落差，而呈現偏高的自交係數。這樣的類似案例也可見於中美洲的小長鼻蝠(*Leptonycteris yerbabuenae*) (Arteaga *et al.*, 2018)。然而，遺傳組成較單一的折居氏狐蝠，在亞種之中擁有最高的自交係數，應就無法以華倫得效應解釋，而可能歸因於族群有非隨機交配(non-random mating)的傾向。雖沒有任何一個亞種的自交係數在統計上達顯著標準，然而親緣值除八重山狐蝠外都顯著偏高，故未來仍需持續謹慎監測各亞種遺傳多樣性的變化。

我們試提出以下解釋，探討龜山島遺傳多樣性的起源。首先，狐蝠很可能經由季節性強勁的颱風或東北季風而帶到龜山島；再者，食物資源在島嶼之間存在季節變異，狐蝠個體有可能為了尋找資源而主動播遷(Nakamoto *et al.* 2011, 2012)；第三種可能是八重山族群主動向外擴張播遷。日本的與那國島是八重山亞種分布的西界(Kinjo & Nakamoto, 2015)，距離龜山島 110 km 之遠。根據 Nakamoto *et al.* (2011)指出，八重山狐蝠曾有跨海拓殖到約 50 km 之外的新棲地(自多良間島到宮古島)。若狐蝠在相鄰島嶼的移動並非偶見，無論是與那國島、或臺灣本島東部之零星狐蝠個體都很可能遷移至龜山島，形成一個廣泛分布且組成多樣的族群。本研究各亞種呈現的多樣遺傳結構及組成，也符合我們對於太平洋及印度洋島嶼型狐蝠的

認知，其展現了多樣且獨特的生態特性，多半以族群量小且對於環境波動具高敏感性而著稱(Jones *et al.*, 2010; Wiles & Brooke, 2010)，遺傳結構則會隨物種族群的移動能力、資源需求及演化歷史有別，並未有絕對的一致趨勢(Moussy *et al.*, 2013; Ibouroi *et al.*, 2018)；而舊世界大陸狐蝠順應季風的移動拓殖模式，亦可見於棲息於東非沿岸、印度洋零星諸島的塞島狐蝠(*P. seychellensis*)(O'Brien, 2011)，其中一支葛摩亞種(*P. s. comorensis*)棲息於非洲葛摩群島，為晚近才拓殖至不同火山島的族群，其四個島嶼族群皆尚未累積足量的獨有變異、彼此分化的程度便較低(O'Brien *et al.*, 2009; Ibouroi *et al.*, 2018)，以此對照龜山島與八重山亞種之間呈現的相似結構、個體成員亦或鑲嵌著臺灣及綠島的遺傳特徵，也同樣支持了龜山島為一尚處於成形中的新族群。

狐蝠科物種雖然以移動能力著稱，但仍普遍存在程度不等的族群量及遺傳多樣性隱憂(Okada *et al.*, 2014; Ibouroi *et al.*, 2018)，且也受限邊陲島嶼的調查履及不易，而難以掌握精確的族群資訊。琉球狐蝠現有三個亞種數量瀕危，尤其臺灣亞種近年除了龜山島之外，在臺灣本島及綠島的出現紀錄零星，不易獲得充足的分析樣本。本年度為求能擴大樣本收集的來源及效率，嘗試以狐蝠進食後所吐出的食渣進行測試，成功在新鮮食渣樣本萃取出足以辨識個體及提供足量遺傳訊息的 DNA；同時，為確知非侵入式採樣樣本的性別資訊，本年度也成功設計了適用於至少四個狐蝠屬物種的性別鑑定引子，也證實可應用於野外排遺及食渣等品質變異極大的樣本。未來應擴展於臺灣及其他琉球狐蝠分布地區的採樣，以持續探討亞種之間的親緣關係，尤其是遺傳結構明顯呈顯多來源的臺灣及八重山亞種，以及樣本數仍偏少的菲律賓族群及永良部亞種。

針對台灣境內的兩個近代新記錄的族群—龜山島及花蓮市區，本年度已分別累

積了 36 隻及 2 隻不同個體，其中龜山島性別比於各季皆明顯偏向雄性，接近 2:1。

另外，本研究嘗試以龜山島確知成熟狀況的 12 隻個體重建譜系，初步證明 2020 年出現的一隻雌性個體，可追溯至 2011 年就已存在的雄性親代；而另一雌性個體其手足更可回溯至 2011 年存在的雌性個體。保育瀕危物種除須考量各亞種遺傳結構的獨特性，還要顧及可長期存續的最小族群數(Minimum viable population)，確實掌握自然族群的族群變動以及族群分化的程度，為非常基礎且重要的工作(Nunney & Campbell, 1993)。考量本研究目標物種數量稀少，未來可持續透過非侵入式採樣方法，針對台灣狐蝠族群進行持續的動態追蹤，以利有系統的估算現今的族群量，透過「直接」的家庭譜系重建以及「間接」的遺傳結構監測，自族群動態及遺傳面向掌握臺灣狐蝠的具體族群現況，以利進行瀕危臺灣狐蝠的中、長期保育策略規劃。

表一、琉球狐蝠的粒線體遺傳多樣性

以粒線體 DNA 部分控制區(418 bp)及三段粒線體基因之結合序列(D-loop, cytb, COI 共 3103 bp)所估算。 N : 樣本數(sample size), H : 單倍型數量觀測值(number of haplotype observed), P_s : 具多型性的點位數(number of polymorphic site), 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)。永良部族群($n = 1$)不納入亞種層次的分析中。

亞種	粒線體 DNA											
	D-loop						concatenated sequence					
	N	H	P_s	h	π	k	N	H	P_s	h	π	k
臺灣	49	18	29	0.858	0.012	4.932	26	15	40	0.911	0.003	7.803
八重山	11	10	15	0.982	0.010	4.109	8	8	23	1.000	0.002	7.179
折居氏	22	10	14	0.909	0.007	2.835	22	14	21	0.948	0.001	3.775
永良部	1	1	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-
大東	8	3	7	0.679	0.007	3.000	6	4	12	0.278	0.002	5.867
菲律賓	2	2	17	1.000	0.041	17.000	-	-	-	-	-	-

*: 統計顯著 (P 值 < 0.05)

表二、琉球狐蝠的微衛星遺傳多樣性

以 26 個微衛星基因座所估算。 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($n = 1$)不納入亞種層次的分析中。

亞種	微衛星 DNA						
	N	N_a	A_c	H_o	H_e	RI	F_{is}
臺灣	37	4.962	3.597	0.574	0.600	0.004*	0.058
八重山	10	3.731	3.479	0.588	0.581	0.004	0.039
折居氏	22	3.846	3.351	0.542	0.575	0.030*	0.081
永良部	1	-	-	-	-	-	-
大東	7	2.885	2.885	0.429	0.415	0.147*	0.045

*: 統計顯著 (P 值 < 0.05)

表三、琉球狐蝠的分子變異數分析(Analysis of molecular variance, AMOVA)

部分控制區 D-loop (418 bp)之分析包含 5 個族群·分別為臺灣(Formosan)、八重山(Yaeyama)、折居氏(Orii's)、大東亞種(Daito)及菲律賓(Philippine)族群；粒線體結合序列(D-loop, cytb, COI 共 3103 bp)及微衛星 DNA (26 個基因座)之分析包含上述除菲律賓之外的 4 個族群。

變異來源	粒線體 DNA				核基因 DNA	
	D-loop		concatenated sequence		微衛星 DNA	
	variation (%)	P value	variation (%)	P value	variation (%)	P value
亞種之間	15.51	< 0.001*	13.42	< 0.001*	7.01	< 0.001*
亞種之內	84.49		86.58		92.99	

*：統計顯著

表四、以粒線體 DNA 分析琉球狐蝠於亞種之間的成對遺傳分化(Φ_{ST})

對角線上方為以部分控制區 D-loop 片段(418bp)之分析結果；對角線下方為以粒線體結合序列(D-loop, cytb, COI 共 3103 bp)之分析結果。永良部亞種(n = 1)不納入分析中。統計顯著性亦標註於表中。

亞種	臺灣	八重山	折居氏	大東	菲律賓
臺灣		0.013 ^{NS}	0.138*	0.207*	0.389*
八重山	0.020 ^{NS}		0.071*	0.160*	0.341*
折居氏	0.130*	0.113*		0.233*	0.518*
大東	0.197*	0.183*	0.284*		0.421*

NS：統計上非顯著

*：統計顯著 (P 值 < 0.05)

表五、以微衛星基因座分析琉球狐蝠於亞種之間的成對遺傳分化(F_{ST})

永良部亞種(n = 1)不納入分析中。統計顯著性亦標註於表中。

亞種	臺灣	八重山	折居氏	大東
臺灣				
八重山	0.011 ^{NS}			
折居氏	0.058*	0.035*		
大東	0.135*	0.141*	0.161*	

NS：統計非顯著

*：統計顯著 (P 值 < 0.05)

表六、本研究開發性別鑑定引子在四狐蝠屬物種之測試結果

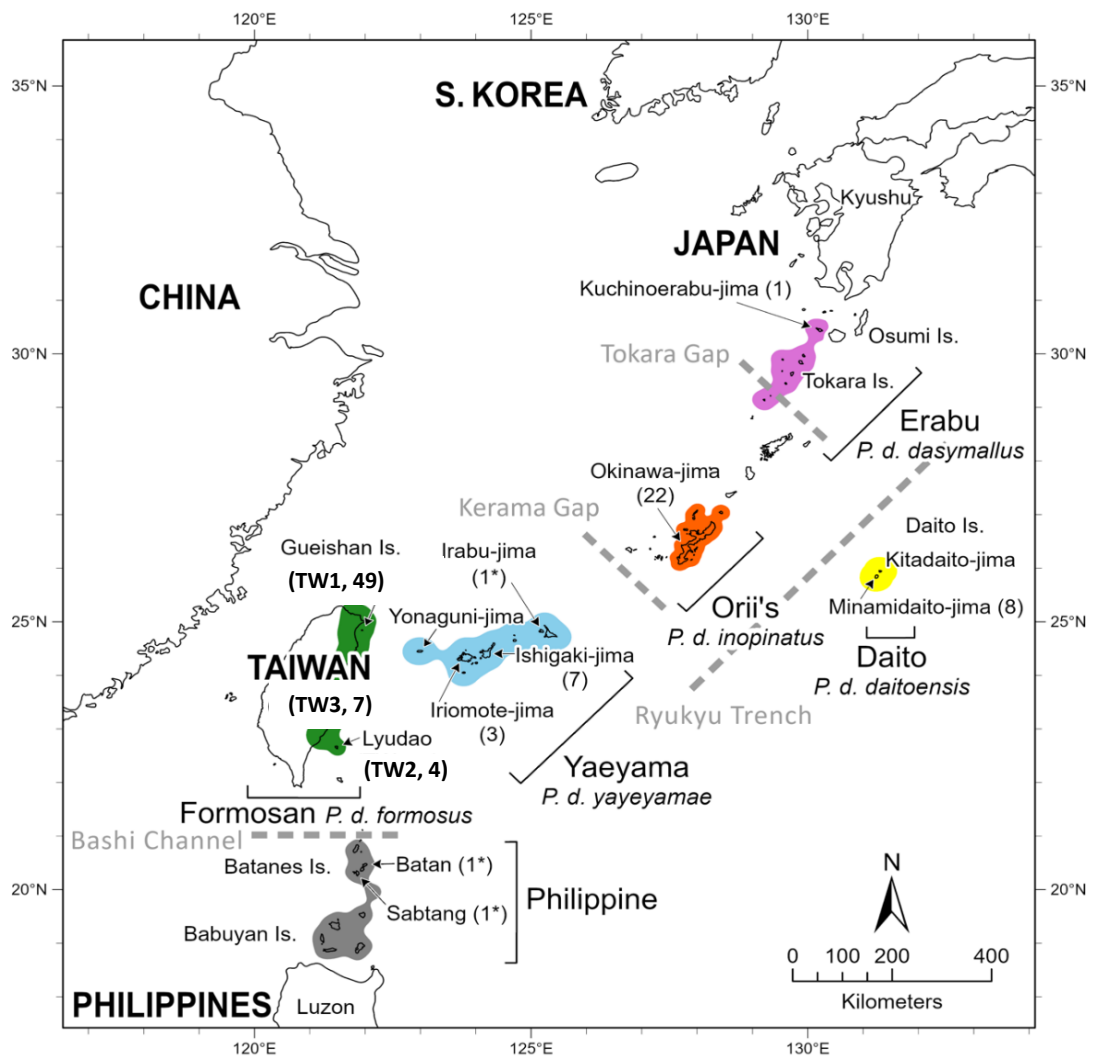
Y：成功; N：失敗。

物種	學名	Y 染色體引子		正控制組引子 (X染色體)			正控制組引子 (其他)		
		P-Sry1	P-Sry2	P-AML1	P-AML2	Pv-AML2	A1	A15	RodmitU/L
臺灣狐蝠	<i>Pteropus dasymallus formosus</i>	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
馬來狐蝠	<i>Pteropus vampyrus</i>	N	N	N	N	Y	Y	Y	N
黎氏狐蝠	<i>Pteropus lylei</i>	Y	Y	N	Y	Y	Y	Y	Y
小狐蝠	<i>Pteropus hypomelanus</i>	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y

表七、本年度鑑定個體各季出沒狀況一覽表 (2020 五月~2021 一月)

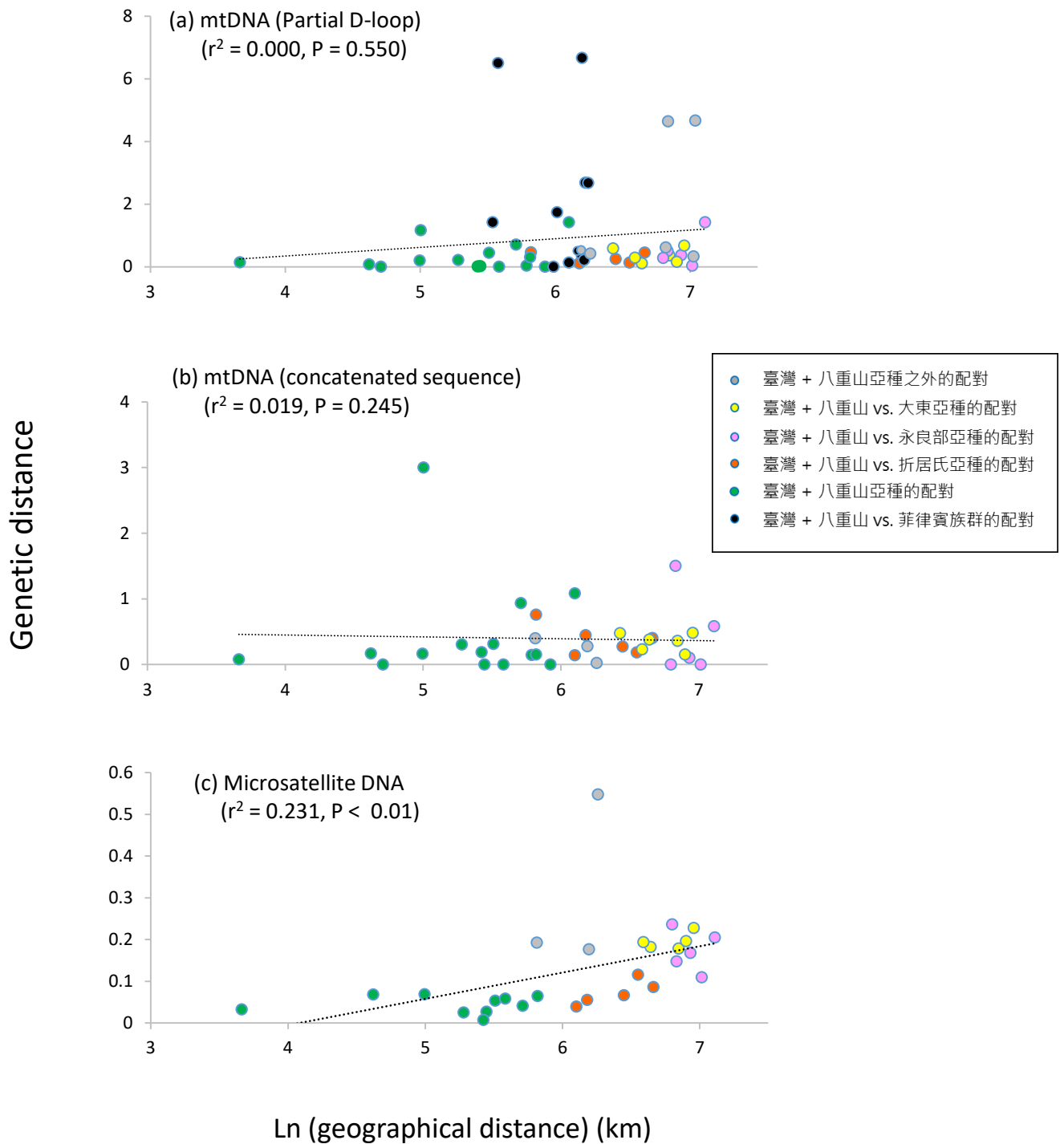
呈現各季調查結果所得的個體出沒紀錄。數字代表該個體經由分子鑑定發現的樣本數。M：雄性；F：雌性。

個體名稱	地點	性別	2020/05	2020/08	2020/10	2020/11	2021/01	備註
GSF-202001	龜山島	M	1					
GSF-202002	龜山島	F	3					
GSF-202003	龜山島	M	2					
GSF-202004	龜山島	M	1					
GSF-202005	龜山島	F	1					
GSF-202006	龜山島	F	1					
GSF-202007	龜山島	M	1					
GSF-202008	龜山島	M	1					
GSF-202009	龜山島	M	1					
GSF-202010	龜山島	M		5	2	6		
GSF-202011	龜山島	F		4				
GSF-202012	龜山島	M		6				
GSF-202013	龜山島	M		2				
GSF-202014	龜山島	M		3		3		
GSF-202015	龜山島	M			2			
GSF-202016	龜山島	M			2	1		
GSF-202017	龜山島	M			1			
GSF-202019	龜山島	F				1		
GSF-202020	龜山島	M				1		
GSF-202021	龜山島	F				1		
GSF-202023	龜山島	F				1		
GSF-202024	龜山島	M				1		
GSF-202025	龜山島	M				1		
GSF-202026	龜山島	M				1		
TW_G_34	龜山島	F			1			10月捕捉個體
TW_G_35	龜山島	F			1			10月捕捉個體
TW_G_36	龜山島	M		1	1			10月捕捉個體
TW_G_37	龜山島	F		1	1			10月捕捉個體
TW_G_38	龜山島	M			1			10月捕捉個體；2019年5月曾採集過排遺，ID為TW_G_F003
TW_G_39	龜山島	F			1			10月捕捉個體
TW_G_40	龜山島	F			1			10月捕捉個體
TW_G_41	龜山島	M			1			10月捕捉個體
TW_G_42	龜山島	M			1			10月捕捉個體
TW_G_43	龜山島	M			1			10月捕捉個體
TW_G_44	龜山島	M			1			10月捕捉個體
TW_G_45	龜山島	F			1	1		10月捕捉個體
HLF-2021001	花蓮市區	F					1	
HLF-2021002	花蓮市區	M					5	



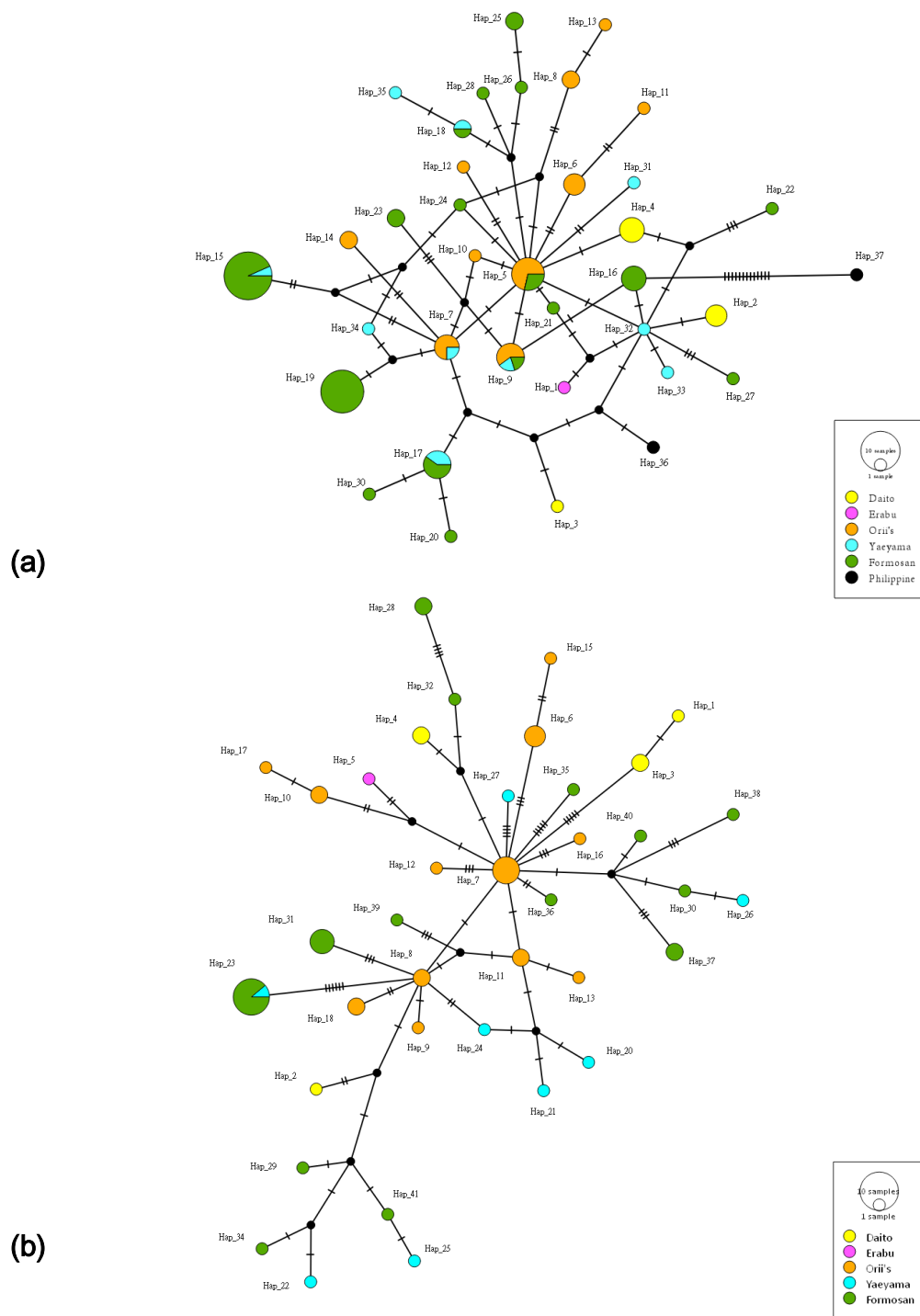
圖一、琉球狐蝠地理分布圖

本研究所使用之樣本數皆標明在該區域的括弧內。星號(*)代表 DNA 序列來自 Genbank 資料庫。



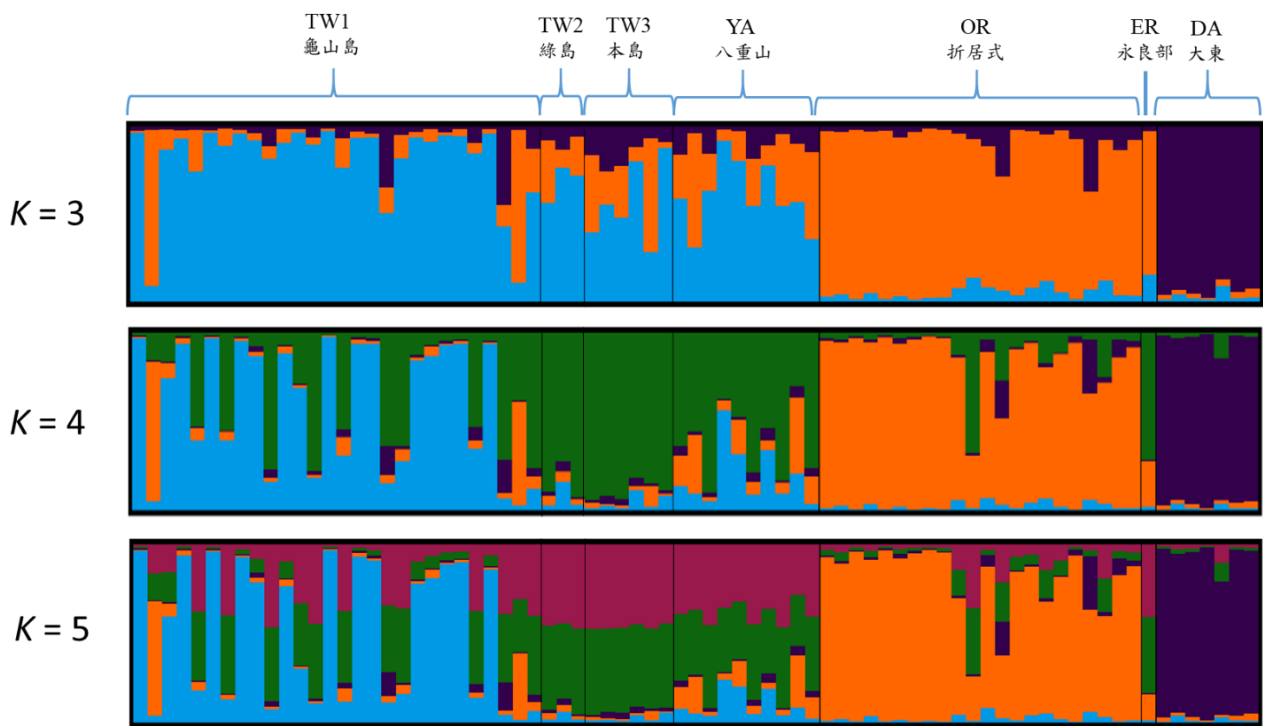
圖二、琉球狐蝠島嶼間的遺傳和地理距離之成對比較

(a) 粒線體部分控制區 (b) 粒線體結合序列 (c) 微衛星 DNA 結果。X 軸為地理距離取自然對數值、Y 軸為以 linearized Φ_{ST} (粒線體) 或者 F_{ST} (微衛星) 呈現之遺傳距離，並標上回歸趨勢線及相關性的顯著值。



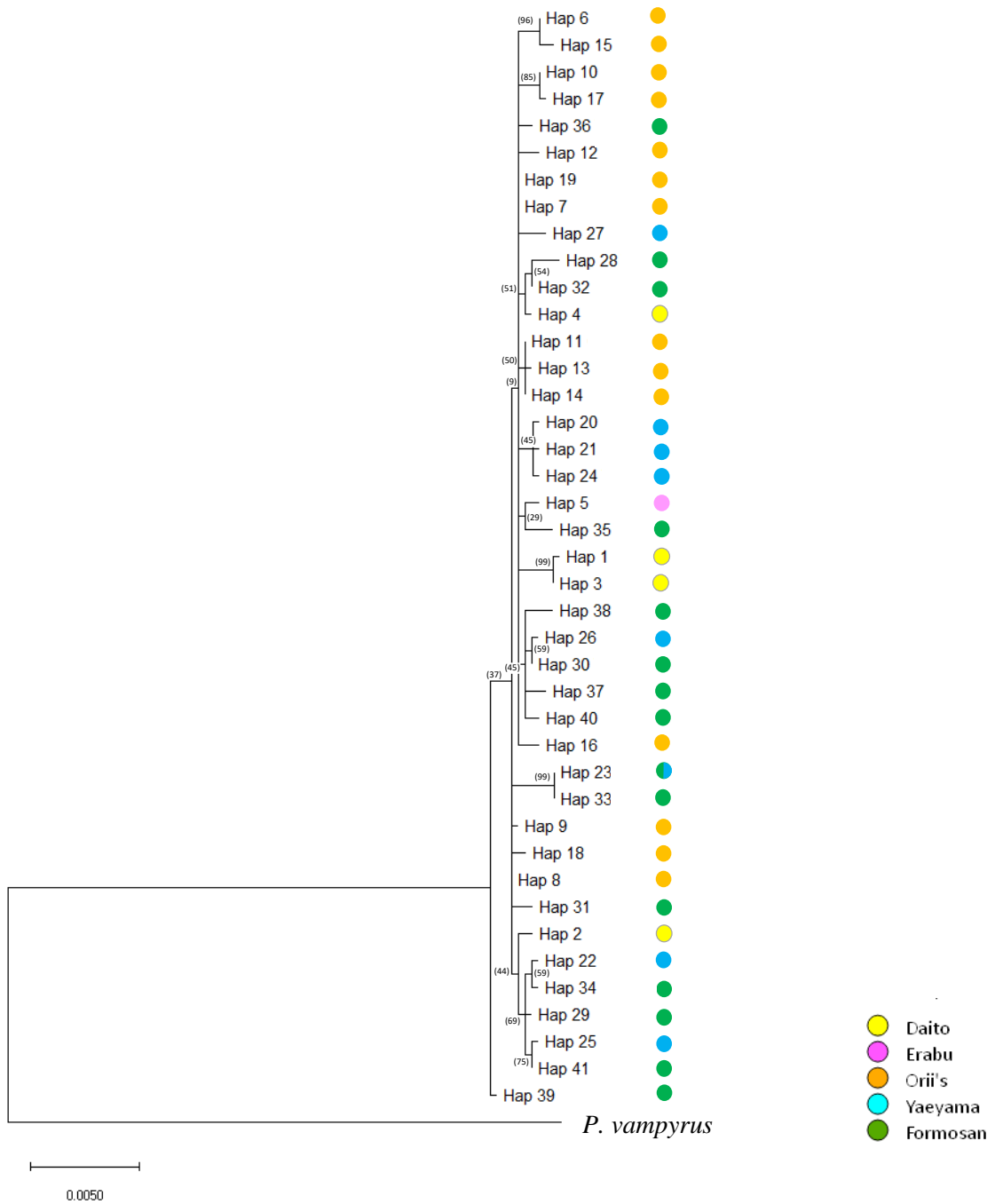
圖三、琉球狐蝠的單倍型網絡圖

(a)粒線體部分控制區 (b)粒線體結合序列。每一顏色代表一個亞種，每個圓圈的大小與單倍型的出現頻率成比例。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。



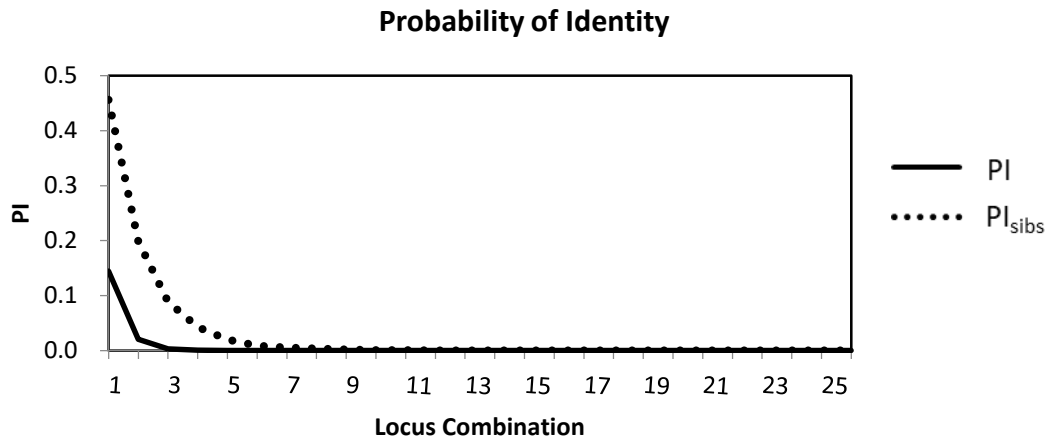
圖四、以 STRUCTURE 分析琉球狐蝠個體的遺傳結構圖

建構來自五亞種、77 隻琉球狐蝠的遺傳結構圖，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，而最可能的分群數目為 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。



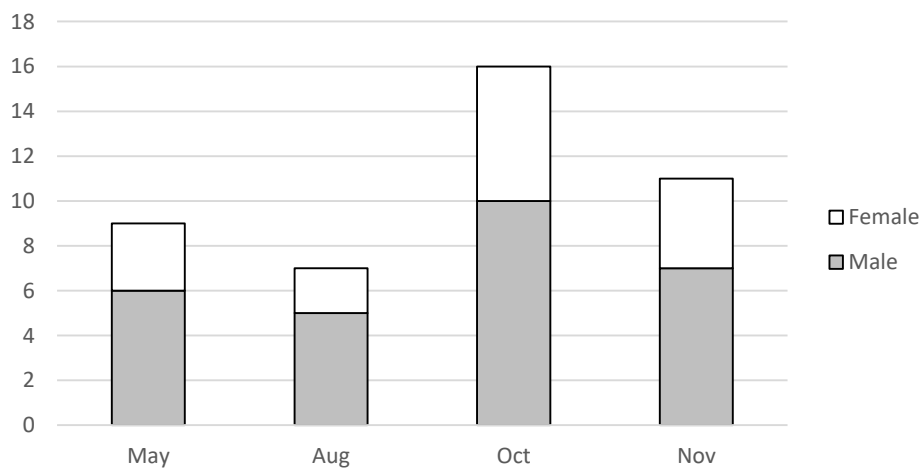
圖五、粒線體之結合序列親緣樹

以共計 3103 bp 的結合序列(concatenated sequence)、以 Maximum likelihood 方法重建。不同顏色的圓圈·代表單倍型所屬的亞種。Bootstrap 值標示於節點(node)旁·而分支的長度(branch length)則以每個點位的置換率(substitution rate)加以換算·並標示比例尺於左下方。



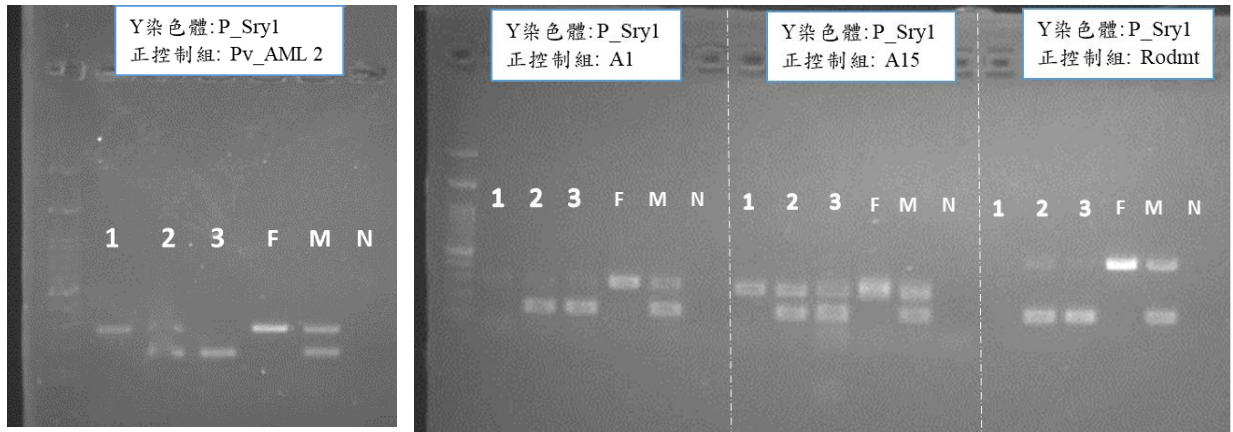
圖六、 P_{ID} 、 P_{sibs} 與微衛星基因座累積數量關係圖

P_{ID} 代表一族群中，假設隨機交配下，兩個無親緣個體帶有相同基因座的機率； P_{sibs} 則為一族群中，兩手足個體恰帶有相同基因座之機率。



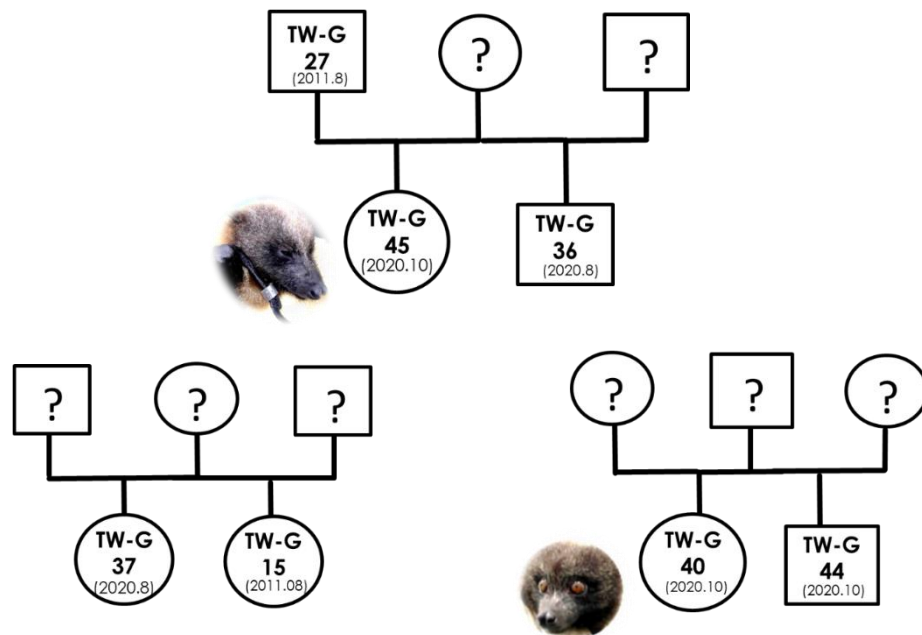
圖七、本年度龜山島個體各季分布圖

灰色與白色分別代表雄性與雌性的個體數目。



圖八、性別鑑定之測試電泳圖

1: 馬來狐蝠 (*Pteropus vampyrus*); 2: 黎氏狐蝠 (*P. lylei*); 3: 小狐蝠 (*P. hypomelanus*); F: 臺灣狐蝠 (*P. dasymallus formosus*) : 已知雌性個體(TW-G-32) , 正控制組; M: 臺灣狐蝠 : 已知雄性個體(TW-G-33) , 正控制組; N: 負控制組 , 以二次水取代 DNA template。



圖九、本年度龜山島族群之親緣鑑定

方塊與圓圈分別代表雄性與雌性個體，括弧內是首次記錄到該個體的日期。附照片者，為捕捉當下具影像紀錄者。

致謝

本研究誠摯感謝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，我們也感謝林清隆博士、黃俊嘉博士和楊茵洳協助野外工作；以及周秀綢、劉瑞秋、林大成及林祖濬等人協助監測花蓮地區的狐蝠及採集樣本。

參考文獻

- AASEN, E., & J. F. MEDRANO. (1990). Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. *Bio/technology* 8: 1279-1281.
- ALLENDORF, F. W., HOHENLOHE, P. A., & LUIKART, G. (2010). Genomics and the future of conservation genetics. *Nature Reviews Genetics* 11, 697-709.
- ARNOLD, B. D., & G. S. WILKINSON. (2015). Female natal philopatry and gene flow between divergent clades of pallid bats (*Antrozous pallidus*). *Journal of Mammalogy* 96: 531-540.
- ARTEAGA, M. C., R. A. MEDELLÍN, P. A. LUNA-ORTÍZ, P. A. HEADY, & W. F. FRICK. (2018). Genetic diversity distribution among seasonal colonies of a nectar-feeding bat (*Leptonycteris yerbabuena*) in the Baja California Peninsula. *Mammalian Biology* 92: 78-85.
- BELLWOOD, P., & DIZON, E. (2013). The Batanes Islands, Their First Observers, & 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.

CATHEY, J. C., J. W. BICKHAM, & J. C. PATTON. (1998). Introgressive hybridization and nonconcordant evolutionary history of maternal and paternal lineages in North-American deer. *Evolution* 52: 1224-1229.

CHEN, S.-F., G. JONES, & S. J. ROSSITER. (2008). Sex-biased gene flow and colonization in the Formosan lesser horseshoe bat: inference from nuclear and mitochondrial markers. *Journal of Zoology* 274: 207-215.

CHEN, S.-F., C.-H. JUAN, S. J. ROSSITER, T. KINJO, D. FUKUI, K. KAWAI, S. M. TSANG, M. J. VELUZ, H. SAKURAI, H.-C. LIN, N.-H. JANG-LIAW, K. OSAWA, W.-Y. KO, AND M. IZAWA. (2021). Population genetic structure of the insular Ryukyu flying fox *Pteropus dasymallus*. *Biotropica* 53: 548-559.

CLEMENT, M., Q. SNELL, P. WALKER, D. POSADA, & K. CRANDALL. (2002). TCS: estimating gene genealogies. *Parallel and Distributed Processing Symposium, International*, pp. 0184-0184. *IEEE Computer Society*.

- COMAS, D., PLAZA, S., WELLS, R. S., YULDASEVA, N., LAO, O., CALAFELL, F., & BERTRANPETIT, J. (2004). Admixture, migrations, & 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.
- DARRIBA, D., G. L. TABOADA, R. DOALLO, & D. POSADA. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods* 9: 772-772.
- 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.
- EIKEN, H. G., R. J. ANDREASSEN, A. KOPATZ, S. G. BJERVAMOEN, I. WARTIAINEN, C. TOBIASSEN, P. M. KNAPPSKOG, P. E. ASPHOLM, M. E. SMITH, & J. ASPI. (2009). Population data for 12 STR loci in Northern European brown bear (*Ursus arctos*) and application of DNA profiles for forensic casework. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 2: 273-274.

- 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.

FOLMER, O., M. BLACK, W. HOEH, R. LUTZ, & R. VRIJENHOEK. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3: 294-299.

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.

GRANT, W., & B. 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.

GUAN, X., E. R. BRITZKE, A. J. PIAGGIO, D. L. BERGMAN, L. VAN PELT, & R. F. LANCE. (2020). Genetic assays for guano-based identification of species and sex

- in bats of the United States and Canada. *Journal of Mammalogy* 101: 970-978.
- HASSANIN, A., & A. ROPIQUET. (2007). Resolving a zoological mystery: the kouprey is a real species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 274: 2849-2855.
- HE, K., Y.-J. LI, M. C. BRANDLEY, L.-K. LIN, Y.-X. WANG, Y.-P. ZHANG, & X.-L. JIANG. (2010). A multi-locus phylogeny of Nectogalini shrews and influences of the paleoclimate on speciation and evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56: 734-746.
- 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.
- IGEA, J., J. JUSTE, & J. CASTRESANA. (2010). Novel intron markers to study the phylogeny of closely related mammalian species. *BMC evolutionary biology* 10: 1-13.
- IRWIN, D. M., T. D. KOCHER, & A. C. WILSON. (1991). Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *Journal of molecular evolution* 32: 128-144.
- IUCN. (2020). IUCN Red List of Threatened Species. Version 2020-2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 3 September 2020.
- JANSA, S. A., S. M. GOODMAN, & P. K. TUCKER. (1999). Molecular phylogeny and biogeography of the native rodents of Madagascar (Muridae: Nesomyinae): a test of the single-origin hypothesis. *Cladistics* 15: 253-270.
- JONES, K. E., S. P. MICKLEBURGH, W. SECHREST, & A. L. WALSH. (2010). 16. Global Overview of the Conservation of Island Bats: Importance, Challenges, & Opportunities. *Island Bats*: 496-530.

- 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., A. P. WAGNER, & M. L. TAPER. (2006). ML-Relate: a computer
program for maximum likelihood estimation of relatedness and
relationship. *Molecular Ecology Notes* 6: 576-579.
- 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.
- KOCHER, T. D., W. K. THOMAS, A. MEYER, S. V. EDWARDS, S. PÄÄBO, F. X.
VILLABLANCA, & A. C. WILSON. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA
evolution in animals: amplification and sequencing with conserved
primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86: 6196-
6200.

- 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.
- KORSTIAN, J. M., A. J. SCHILDT, V. J. BENNETT, D. A. WILLIAMS, & A. M. HALE. (2015). A method for PCR-based identification of bat species from fecal samples. *Conservation Genetics Resources* 7: 803-806.
- KORSTIAN, J. M., A. M. HALE, V. J. BENNETT, & D. A. WILLIAMS. (2013). Advances in sex determination in bats and its utility in wind-wildlife studies. *Mol Ecol Resour* 13: 776-780.
- 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.
- LACK, J. B., Z. P. ROEHRS, C. E. STANLEY JR, M. RUEDI, & R. A. VAN DEN BUSSCHE. (2010). Molecular phylogenetics of *Myotis* indicate familial-level divergence for the genus *Cistugo* (Chiroptera). *Journal of Mammalogy* 91: 976-992.
- 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.
- LEIGH, J. W., & D. BRYANT. (2015). popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution* 6: 1110-1116.

- 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.
- LORENZINI, R., P. CABRAS, R. FANELLI, & G. L. CARBONI. (2011). Wildlife molecular forensics: identification of the Sardinian mouflon using STR profiling and the Bayesian assignment test. *Forensic Science International: Genetics* 5: 345-349.
- 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.
- McMICHAEL, L., D. EDSON, C. SMITH, D. MAYER, I. SMITH, S. KOPP, J. MEERS, & H. FIELD. (2017). Physiological stress and Hendra virus in flying-foxes (*Pteropus* spp.), Australia. *PloS one* 12: e0182171.
- MICKLEBURGH, S. P., HUTSON, A. M., & RACEY, P. A. (2002). A review of the global conservation status of bats. *Oryx* 36, 18-34.

- 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.
- MISHRA, S., S. K. SINGH, A. K. MUNJAL, J. ASPI, & S. P. GOYAL. (2014). Panel of polymorphic heterologous microsatellite loci to genotype critically endangered Bengal tiger: a pilot study. *SpringerPlus* 3: 1-10.
- MOHD-YUSOF, N. S., J. SENAWI, S. M. NOR, & B. M. MD-ZAIN. (2020). Haplotype and network analysis of island flying fox (*Pteropus hypomelanus*) using D-loop region of mitochondrial DNA to confirm subspecies designation. *Mammal Research* 65: 375-385.
- MOUSSY, C., D. HOSKEN, F. MATHEWS, G. SMITH, J. AEGERTER, & S. BEARHOP. (2013). Migration and dispersal patterns of bats and their influence on genetic structure. *Mammal Review* 43: 183-195.
- MURPHY, W. J., E. EIZIRIK, W. E. JOHNSON, Y. P. ZHANG, O. A. RYDER, & S. J. O'BRIEN. (2001). Molecular phylogenetics and the origins of placental mammals. *Nature* 409: 614-618.
- 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.
- NAKAMOTO, A., K. KINJO, & M. IZAWA. (2009). The role of Orii's flying-fox (*Pteropus dasymallus inopinatus*) as a pollinator and a seed disperser on Okinawa-

jima Island, the Ryukyu Archipelago, Japan. *Ecological Research* 24: 405-414.

NAKAMOTO, A., K. KINJO, & M. IZAWA. (2012). Ranging patterns and habitat use of a solitary flying fox (*Pteropus dasymallus*) on Okinawa-jima Island, Japan. *Acta Chiropterologica* 14: 387-399.

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.

NUNNEY, L., & K. A. CAMPBELL. (1993). Assessing minimum viable population size: demography meets population genetics. *Trends in Ecology & Evolution* 8: 234-239.

- 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.
- O'BRIEN, J. (2011). Bats of the western Indian Ocean islands. *Animals* 1: 259-290.
- O'BRIEN, J., C. MARIANI, L. OLSON, A. L. RUSSELL, L. SAY, A. D. YODER, & T. J. HAYDEN. (2009). Multiple colonisations of the western Indian Ocean by *Pteropus* fruit bats (Megachiroptera: Pteropodidae): the furthest islands were colonised first. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 51: 294-303.
- OKADA, A., H. SUZUKI, M. INABA, K. HORIKOSHI, & J. SHINDO. (2014). Genetic structure and cryptic genealogy of the Bonin flying fox *Pteropus pselaphon* revealed by mitochondrial DNA and microsatellite markers. *Acta Chiropterologica* 16: 15-26.
- 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.
- ORTEGA, J., & J. E. MALDONADO. (2020). *Conservation Genetics in Mammals*.
- 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). GenAEx 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.
- PUECHMAILLE, S. J., & E. C. TEELING. (2014). Non-invasive genetics can help find rare species: a case study with *Rhinolophus mehelyi* and *R. euryale* (Rhinolophidae: Chiroptera) in Western Europe. *Mammalia* 78: 251-255.

- PUECHMAILLE, S. J., & E. J. PETIT. (2007). Empirical evaluation of non-invasive capture–mark–recapture estimation of population size based on a single sampling session. *Journal of Applied Ecology* 44: 843-852.
- RITLAND, K. (1996). Estimators for pairwise relatedness and individual inbreeding coefficients. *Genetics Research* 67, 175-185.
- 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.
- SÁNCHEZ, A., M. BULLEJOS, M. BURGOS, C. HERA, R. JIMÉNEZ, & R. DIAZ DE LA GUARDIA. (1996). High sequence identity between the SRY HMG box from humans and insectivores. *Mammalian Genome* 7: 536-538.
- 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., EKBLOM, 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.
- SHAW, C. N., P. J. WILSON, & B. N. WHITE. (2003). A Reliable Molecular Method of Gender Determination for Mammals. *Journal of Mammalogy* 84: 123-128.
- 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.

- TAKI, Y., C. E. VINCENOT, Y. SATO, & M. INOUE-MURAYAMA. (2021). Genetic diversity and population structure in the Ryukyu flying fox inferred from remote sampling in the Yaeyama archipelago. *Plos one* 16: e0248672.
- TEELING, E. C., M. SCALLY, D. J. KAO, M. L. ROMAGNOLI, M. S. SPRINGER, & M. J. STANHOPE. (2000). Molecular evidence regarding the origin of echolocation and flight in bats. *Nature* 403: 188-192.
- TESKE, P. R., T. R. GOLLA, J. SANDOVAL-CASTILLO, A. EMAMI-KHOYI, C. D. VAN DER LINGEN, S. VON DER HEYDEN, B. CHIAZZARI, B. JANSEN VAN VUUREN, & L. B. BEHEREGARAY. (2018). Mitochondrial DNA is unsuitable to test for isolation by distance. *Scientific Reports* 8: 8448.
- 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.
- WAHLUND, S. (1928). Zusammensetzung von Populationen und Korrelationserscheinungen vom Standpunkt der Vererbungslehre aus betrachtet. *Hereditas* 11: 65-106.
- WAPLES, R. S. (2015). Testing for Hardy–Weinberg proportions: have we lost the plot? *Journal of heredity* 106: 1-19.
- WILES, G. J., & A. P. BROOKE. (2010). 14. *Conservation Threats to Bats in the Tropical Pacific Islands and Insular Southeast Asia*. Island Bats, pp. 405-459. University of Chicago Press.
- WILLIAMS, K. E., R. E. SHERWIN, K. K. VANDALEN, & A. J. PIAGGIO. (2020). A noninvasive genetic technique using guano for identification of

- Corynorhinus townsendii (Townsend's big-eared bat) maternity roosts. *Western North American Naturalist* 80: 476-482.
- WU, H.-W. (2010). *Preliminary Ecological Study on the Formosan Flying Foxes (Pteropus dasymallus formosus)*. (MSc thesis). National Taiwan University, Taipei, Taiwan.
- YANG, J. (2007). An oceanic current against the wind: How does Taiwan Island steer warm water into the East China Sea? *Journal of Physical Oceanography* 37: 2563-2569.
- YODER, A. D., R. VILGALYS, & M. RUVOLO. (1996). Molecular evolutionary dynamics of cytochrome b in strepsirrhine primates: the phylogenetic significance of third-position transversions. *Molecular Biology and Evolution* 13: 1339-1350.
- 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.
- ZARZOSO-LACOSTE, D., P.-L. JAN, L. LEHNEN, T. GIRARD, A.-L. BESNARD, S. J. PUECHMAILLE, & E. J. PETIT. (2018). Combining noninvasive genetics and a new mammalian sex-linked marker provides new tools to investigate

population size, structure and individual behaviour: An application to bats.

Molecular Ecology Resources 18: 217-228.

ZHIVOTOVSKY, L. A. (2015). Relationships between Wright's F_{ST} and F_{IS}

statistics in a context of Wahlund effect. *Journal of Heredity* 106: 306-309.

附錄一、本研究所選用之粒線體引子一覽表

基因名稱	引子名稱	Tm °C	F/R	序列	大小 (bp)	出處	評估
Cytochrome b (cytb)	Pd-cytb-F Pd-cytb-R	53	F R	5'-GTTCGAAATCCACACCT-3' 5'-ACTTGAGTTTCTTCCTTGAG-3'	1557	本研究設計	具多型性，可以一對引子增幅完整全長 1140 bp；亦包含部分 tRNA, D-loop 片段約 400 bp
Cytochrome c oxidase subunit I (COI)	Pd-CO1c-F Pd-CO1c-R Pd-CO1d-F Pd-CO1d-R	53	F R F R	5'-GTAAACACAGACCAAGAGC-3' 5'-TCATACGATAAAGCCGAGGAAT-3' 5'-CCGCCGGAATTACGATACTGC-3' 5'-TTTTACTAATACCTCTCCA-3'	1900	本研究設計	具多型性；兩端接合可包含完整 COI 1544 bp；同時亦包含部分 ND2, tRNA 序列約 400 bp
Displacement loop (D-loop)	RodmtU RodmtL	53	F R	5'-GCTGAGGTTCTACTTAACT-3' 5'-GAGATGTCTTATTTAAGGGG-3'	429	Brown <i>et al.</i> (2011)	具多型性

附錄二、琉球狐蝠性別鑑定測試之引子

基因片段	引子名稱	F/R	序列	片段大小	出處	結果
SRY gene	P-Sry 1	F	5'-AAC-GCA-TTC-ATA-GTG-TGG-TCT-CG-3'	150	自行設計	成功適用
		R	5'-CAA-GGC-GCG-TAG-TCT-CTG-TGC-3'			
SRY gene	P-Sry 2	F	5'-GCG-ACT-GGG-ATA-TCA-ATG-GAA-AAT-3'	60	自行設計	產物淡
		R	5'-CAA-GGC-GCG-TAG-TCT-CTG-TGC-3'			
<i>AML</i>	P-AML 1	F	5'-ATG-GGG-ACC-TGG-ATT-TTG-3'	300	自行設計	非專一產物多
		R	5'-GTA-GGG-CGT-GAT-TCG-GGG-GAT-TC-3'			
<i>AML</i>	P-AML 2	F	5'-CAG-GCT-ATG-AAT-ATT-GGC-AGG-AC-3'	500	自行設計	成功適用
		R	5'-GTA-GGG-CGT-GAT-TCG-GGG-GAT-TC-3'			
<i>AML</i>	Pv-AML 2	F	5'-TCC-GCA-ACT-TTC-AGA-GCC-AAC-T-3'	250	自行設計	成功適用
		R	5'-AGC-GGA-AAG-GGT-GTG-ACT-AT-3'			
Microsatellite	A1	F	5'-TCT-CGG-TCT-GTT-CCC-TGA-GG-3'	300	自行設計	產物淡，正控制組
		R	5'-TGA-CTA-TTT-AAG-TCA-TTT-GCC-CAT-TT-3'			
Microsatellite	A15	F	5'-TTT-GGA-AAA-ACG-ACC-CCC-TT-3'	260~300	自行設計	成功適用，正控制組
		R	5'-GCA-TCA-AAG-CAT-TAG-GGA-GGA-A-3'			
D-loop	RodmitU	F	5'-GCT-GAG-GTT-CTA-CTT-AAA-CT-3'	500	Brown <i>et al.</i> (2011),	成功適用，正控制組
	RodmitL	R	5'-GAG-ATG-TCT-TAT-TTA-AGG-GG-3'			

附錄三、野外調查照片



研究人員於龜山島架設霧網



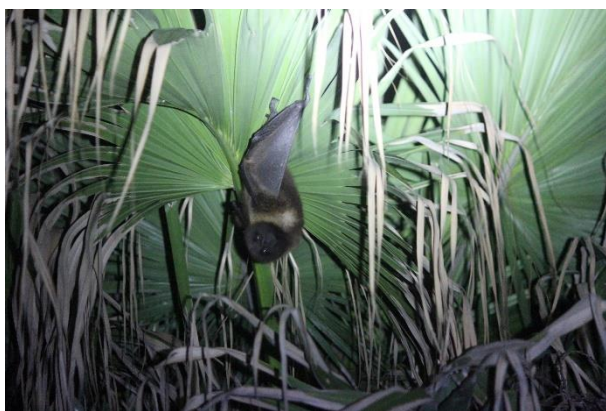
於龜山島捕捉到之雄性臺灣狐蝠



研究人員對狐蝠進行保定和測量



研究人員量測狐蝠翼長



停棲於海棗樹上的臺灣狐蝠



環湖步道稜果榕覓食中的臺灣狐蝠



401 高地步道的新鮮食渣及排遺



涼亭井口旁的新鮮排遺



龜山國小前海棗樹上 2 隻互動中的狐蝠



海棗樹上 5 隻互動中的狐蝠



蒲葵樹上的狐蝠個體



蒲葵樹上的個體理毛行為



蒲葵樹上互動中的狐蝠



狐蝠降落後在蒲葵葉上攀爬



海棗樹下的排遺



狐蝠的排遺



花蓮美崙溪出海口可記錄到狐蝠的出現



花蓮市校園的大王椰子可記錄到狐蝠的出現