

龜山島狐蝠族群的保育地位評估（4/4） 期末報告

Conservation status of the flying fox
population on the Gueishan Island

計畫編號：110 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：110 年 1 月 1 日至 110 年 12 月 31 日

目次

目次	1
摘要	II
前言	1
材料與方法	2
1. 調查及取樣方法	2
2. DNA 萃取及 PCR	2
3. 遺傳結構	4
4. 族群量估算及性別比	4
結果	5
1. 個體鑑定及族群數估算	5
2. 遺傳結構	5
討論	6
表一、本研究所選用之微衛星引子組合一覽表	9
表二、本研究設計之琉球狐蝠性別鑑定引子	11
表三、臺灣狐蝠於綠島、龜山島及花蓮市的族群估算值及 95%之信賴區間	12
圖一、臺灣狐蝠的性別鑑定電泳膠圖	13
圖二、臺灣狐蝠的出沒紀錄分布圖	14
圖三、以 STRUCTURE 分析琉球狐蝠個體的遺傳結構圖	15
致謝	16
參考文獻	16
附錄、野外調查照片	20

摘要

數量稀少且隔離之族群容易遭逢遺傳隨機事件以及遺傳漂變的影響而威脅其生存，故對受威脅物種的保育而言，如何有效地進行監測並維護遺傳多樣性及族群數是十分重要的保育研究議題。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，曾因過度獵捕及棲地破壞而幾近消失，近幾年在龜山島和花蓮市出現穩定的小族群。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，我們以微衛星 DNA 進行遺傳分析；另外針對臺灣狐蝠的三處穩定居留族群(龜山島、花蓮市及綠島)，亦以微衛星和性染色體基因型進行個體和性別辨識，期望能對族群數量和結構有進一步的了解。遺傳結構上，成對的島嶼族群間存在遺傳分化，其中龜山島及八重山的族群具有相對高的遺傳多樣性且相似的結構。臺灣狐蝠族群組成的部分，從 108-110 年度採集的樣本中成功辨識出 74 隻不同的個體(46 隻雄性、21 隻雌性、7 隻性別不詳)，估計族群數約為 240 隻，以雄性居多，龜山島、花蓮市及綠島三個族群之間並無鑑定出跨地域的移動者。臺灣狐蝠的族群數量有回升的趨勢，多數個體可能終年棲息於同一島嶼並進行繁殖；然而遺傳分析顯示相鄰的島嶼族群可能會發生跨洋播遷及拓殖。本研究建立了臺灣狐蝠的族群數、性別比及遺傳多樣性等生物學基礎資料，以作為保育此一島嶼易危物種的參考，由於本物種分布廣泛且可能存在島嶼間的交流，因此應以生物地理學、較大的空間尺度(跨地域、跨國境)進行長期監測及保育管理。

關鍵字：遺傳分化、島嶼生物地理學、跨洋播遷、族群結構、族群估算、狐蝠科、琉球狐蝠

前言

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; Aziz *et al.*, 2021)。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，其近年來所面臨的生存壓力，諸如棲地喪失、劣化及狩獵等卻有增無減，已嚴重威脅舊世界果蝠的生存並導致族群的衰減(Cox & Elmquist, 2000; Mickleburgh *et al.*, 2002; McConkey & Drake, 2006; Florens *et al.*, 2017)，在島嶼生態系中，這些威脅更顯得嚴峻並可能加速物種的滅絕(Frick *et al.*, 2020; Kingston *et al.*, 2021)，目前已有近半數的狐蝠屬物種被列為受威脅物種(IUCN, 2021)，狐蝠於生態、演化及經濟面向所提供的生態系服務也因而受到衝擊(Cox & Elmquist, 2000; McConkey & Drake, 2006; Florens *et al.*, 2017)。有鑑於島嶼生態系的脆弱及特有性，監測島嶼的狐蝠族群，是重要的島嶼生態保育與經營管理的議題。

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。目前已知五個亞種，可根據其分布之島群作區分，包含位於日本琉球群島的四個亞種一大東狐蝠(*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)。雖亞種之間外型十分相似，但除了臺灣狐蝠及八重山狐蝠之外，在多數亞種族群之間仍有顯著的遺傳分化存在，其亞種之間的界限與跨洋的長距離深層海峽可互相對應(Chen *et al.*, 2021)。

臺灣狐蝠過去主要分布於臺灣東南方的綠島，並曾在台灣的東海岸及蘭嶼有零星紀錄(Mickleburgh *et al.*, 1992)。早年棲息於綠島的族群推估約有 2000 隻，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)，於 1989 年被列為瀕臨絕種保育類野生動物。於 2005 年綠島再度正式記錄到狐蝠的蹤跡(Chen *et al.*, 2009)，近年來，臺灣本島東部及東北部也陸續有零星的通報紀錄，本

島東北方 9.7 km 處的龜山島則於 2004 年首度記錄到狐蝠的出現，也成為目前臺灣數量最多且穩定的狐蝠族群。故臺灣狐蝠於臺灣本島的分布現況及族群結構，已有必要再度全面的審慎檢視，以利適當的保育管理。

本年度研究，我們結合田野調查以及遺傳研究分析，建立狐蝠個體資料庫，並進一步估算臺灣狐蝠的族群數量，以了解臺灣狐蝠現階段族群變遷的趨勢並提出適當的保育策略。

材料與方法

1. 調查及取樣方法

本研究分析的樣本來自 2009~2021 年期間，樣本來源包括：野外捕捉的活體、屍體、救傷、圈養個體以及非侵入式採樣的排遺及食渣樣本。樣本來自臺灣和琉球群島八處不同的島嶼，並進一步根據其地理位置區分為五亞種(Mickleburgh *et al.*, 1992)。

樣本類型包括翼膜切片、血液、冷凍肌肉組織及排遺樣本。翼膜樣本約為 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；血液樣本則是採集 0.5 cc 的血液，保存於 EDTA 採血管中；冷凍肌肉組織採自死亡屍體標本；新鮮排遺和食渣則保存於 99.5% 的酒精或 RNAlater 試劑(Stabilization Reagent, Qiagen) 中。

本年度受限於新冠肺炎疫情影響，我們未能赴日本取得更多的琉球狐蝠樣本供分析使用，故本年度樣本的採集聚焦於臺灣的族群。為累積足夠的樣本數作為族群估算之用，我們分別於 8 月及 10 月於龜山島進行多日採集，共採得 150 件新鮮排遺或食渣樣本，並捕捉到 4 隻個體，採集其翼膜組織。綠島地區共採得 37 件排遺或食渣樣本、花蓮市採得 263 件排遺或食渣樣本。

2. DNA 萃取及 PCR

若樣本類型為翼膜、血液或冷凍肌肉組織，我們使用 DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) 進行萃取操作；2019~2020 年 10 月所採集的排遺樣本，則使用 QIAamp Investigator Kit 或者 QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen) 萃取。自 2020 年 10 月後至今年度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。

本研究使用 12 個多型性的微衛星分子標誌進行分析(Chen *et al.*, 2021)，由於野外採集到的排遺和食渣樣本數量龐大，為增加實驗效率，本年度以多引子的組合(multiplex PCR)進行增幅反應，並進行實驗條件之優化，引子的配對組合及接合螢光色詳見表一。每一 PCR 的總體積為 25 μl ，包含 10-50 ng 的模板 DNA、0.375 μl 的 10 μM 正反股引子(各三對)及 12.5 μl 的 Quick Taq HS DyeMix (TOYOBO)。PCR 的溫度調控如下：

- (1) 初始解離溫度為 94 °C (2 分鐘);
- (2) 解離溫度 94°C (50 秒)、黏合溫度 54°C (50 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)比對全數樣本的基因型，進行個體鑑定，並刪除重複的個體。

為有效控管野外採集樣本的品質，我們以成功率及多型性較佳的微衛星基因座(A207, A11, B7)，先對每一件樣本進行一次 PCR 反應，若三個基因座中有任一成功，則繼續完成其餘的基因座。

本研究以自行設計的 P-Sry1 (位於 Y 染色體) 搭配 A15 (位於體染色體) 作為樣本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；若兩次結果不一致，則再進行第三次判定。以上所使用引子之序列及目標片段大小，詳如表二。

PCR 的總反應體積為 10 μl ，包含 20-100 ng 的模板 DNA、0.25 μl 的 10 μM 正反股引子及 5 μl 的 Quick Taq HS DyeMix (TOYOBO)。PCR 的溫度調控如下：

- (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 53°C (30 秒)及延長溫度 68 °C(60 秒)，此階段進行 40 次循環；
- (3) 最終延長溫度為 68 °C(10 分鐘)。

PCR 完成後，直接以 2.0 % agarose 電泳膠於 UV 光下照射成像，依據產物片段數量及大小鑑定性別，若為雄性，P-Sry1 和 A15 皆可成功增幅，呈現出兩條產物；若為雌性，將僅在正控制組(A15)呈現一條產物。電泳膠體的判斷示意圖，詳如圖一。

3. 遺傳結構

為檢驗族群間的親緣關係及探討族群中是否存在潛在移入者，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。並使用 Structure Harvest 軟體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, 2012)。最終輸出的資料，以 Clumpak 1.1 產出圖形(Kopelman *et al.*, 2015)。因於龜山島過去數年累積下來採集到的樣本數量和鑑定出的個體數量最多，且多數個體有明確的採集資訊，故另將龜山島的個體資料，以採集時序(年分及季節)排列呈現。

4. 族群量估算及性別比

本研究藉由直接捕捉、觀察及非侵入式遺傳取樣等方式獲取個體資訊，根據個體資訊，我們得以推估族群的性別比，並可以「標示再捕捉法」(capture-mark-recapture method)估算族群數量。2009 年三月至 2012 年九月期間及 2019 年十月至 2021 年十月期間，於龜山島進行動物的捕捉，研究人員於日落前於狐蝠的飛行路徑架設霧網，並在旁守候，約於午夜前收網。捕捉到的個體會於肩胛骨之間植入皮下晶片或於大拇指繫上刻有數字標記的金屬翼環，以進行個體標示，每隻個體亦會採集翼膜(流程如前所述)進行基因型辨識及建檔。於測量、檢視性別、採樣及標記後，所有個體將於原捕捉地釋放回野外。2005 年八月至 2008 年四月期間，綠島的個體稀少，但出沒規律、地點固定，故該地族群是以直接目擊，根據個體的毛色、體型及性別特徵來辨別個體。自 2019 年五月至 2021 年十月期間，於龜山島、綠島及花蓮市三地區，另以非侵入式遺傳取樣方法，採集新鮮排遺及食渣，進行 DNA 萃取及遺傳分析，以基因型辨識個體。

本研究以 Chao2 estimator (replicated incidence data) 估算族群數量(Chao, 1987; Chao & Chiu, 2016)，計算公式如下： $\hat{S}_{Chao2} = S_{obs} + \left(\frac{m-1}{m}\right) \frac{q_1^2}{2q_2}$ for $q_2 > 0$ and $\hat{S}_{Chao2} = S_{obs}$ for $q_2 \leq 0$ 。

$S_{obs} + \left(\frac{m-1}{m}\right) \frac{q_1(q_1-1)}{2}$ for $q_2 = 0$, S_{obs} 為樣地內可辨識到的不同個體總數, q_1 及 q_2 則分別為觀察到一次及兩次出現紀錄的個體數, 而 m 則為進行調查的次數。經對數轉換後的 95% 信賴區間之計算公式為 $\left[S_{obs} + \frac{(\hat{S}_{Chao2} - S_{obs})}{C}, S_{obs} + (\hat{S}_{Chao2} - S_{obs})C \right]$, 其中 $C = \exp \left\{ 1.96 \left[\log \left(1 + \frac{\text{var}(\hat{S}_{Chao2})}{(\hat{S}_{Chao2} - S_{obs})^2} \right) \right]^{\frac{1}{2}} \right\}$, 當 $q_2 > 0$ 時, $\text{var}(\hat{S}_{Chao2}) = q_2 \left[\frac{1}{2} \left(\frac{m-1}{m} \right) \left(\frac{q_1}{q_2} \right)^2 + \left(\frac{m-1}{m} \right)^2 \left(\frac{q_1}{q_2} \right)^3 + \frac{1}{4} \left(\frac{m-1}{m} \right)^2 \left(\frac{q_1}{q_2} \right)^4 \right]$; 當 $q_2 = 0$ 時, $\text{var}(\hat{S}_{Chao2}) = \left(\frac{m-1}{m} \right)^2 \frac{q_1(q_1-1)}{2} + \left(\frac{m-1}{m} \right)^2 \frac{q_1(2q_1-1)^2}{4} - \left(\frac{m-1}{m} \right)^2 \frac{q_1^4}{4\hat{S}_{Chao2}}$ 。

結果

1. 個體鑑定及族群數估算

研究資料分兩時期呈現，首先於 2009-2012 年間，於龜山島共計捕捉了 22 隻不同的個體，其中有兩隻個體於研究期間被重複捕捉，族群數之估算值為 114 隻個體；另於 2019-2021 年間，以直接捕捉及非侵入式採樣，分析遺傳基因型，並進行個體辨識，共計鑑定出 60 隻個體，其中有 12 隻曾重複標定，估計族群數量約為 176 隻個體。整體而言，性別比為 1.96:1 (雄: 雌)，顯著偏離 1:1 (二項式檢定 $P < 0.01$)。

於花蓮市區取得排遺、食渣及拾獲個體等不同來源之樣本，經分析遺傳基因型，並進行個體辨識，共計鑑定出 12 隻不同的個體，估計族群數量約為 60 隻個體，性別比之觀測值為 3.5:1 (二項式檢定: $P = 0.180$)。至於綠島，於 2005-2008 年及 2019-2021 年期間，僅分別成功鑑定出 4 隻及 2 隻個體，估計族群數分別為 5 隻及 3 隻個體 (個體鑑定數及族群數量估算值，詳見表三)。

2. 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(圖三)。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)組成明顯較為接近；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。龜山島族群穩定，樣本採集的期程最長，樣本數最多，由圖三可看出約有將近一半的個體並非來自所屬的主要分群，並且於 2009 年及 2019 年的夏季，各紀錄到一隻遺傳上明顯較接近折居氏亞種的個體(一隻雄性及一隻未知性別)。

討論

臺灣狐蝠的族群歷經長時期僅有零星的紀錄，近年已開始出現族群量回升的趨勢，而相鄰的族群之間可能仍持續發生跨洋的播遷及拓殖。近數十年間，除了原本的主要棲息地綠島，臺灣狐蝠亦向外拓殖至龜山島及花蓮(包括市區、吉安及壽豐等地)。然而，於近三年間(2019-2021)，經再捕捉及遺傳分子鑑定等調查方式，尚無發現跨季節或跨島嶼的個體遷移行為，推測臺灣狐蝠個體大多終年棲息於同一島嶼，並進行繁殖。經本研究估算的臺灣狐蝠族群數約為 240 隻個體，其中晚近發現的龜山島族群數量最多，佔了總族群量的 73.64%之多。

綠島的臺灣狐蝠在短短二十年間，因人為因素導致族群幾乎滅絕，島上現今雖仍有殘存的族群，但因個體數過少，已不足於當地生態系中扮演關鍵物種的角色(McConkey & Drake, 2006)，但卻可視為一值得關注的保育案例，警示我們應高度留意島嶼物種於生態系中的特有及易危性，以作為島嶼生態經營管理的借鏡。

遺傳技術的進展大幅提升了鑑別個體的數量及提高估算現生族群數的準確度，進而使我們可推估許多重要的族群參數，例如性別比。本研究所使用的樣本除了來源多元(捕捉、排遺及食渣)外，採集工作亦涵蓋多個樣點步道、跨越多個年份及季節，應可反映接近真實的性別比，而不是因性別因素影響而導致的取樣偏差(例如：雌、雄不同性別可能對於覓食棲地的偏好不同，或是對於捕捉用網的迴避能力存在差異)。其中，在鑑定出最多個體數量和調查時程最長的龜山島，觀測到的性別比為 1.96:1，雄性明顯地居多；花蓮市的狐蝠族群性別比為 3.5:1，然在統計上並未顯著偏離 1:1，可能是樣本數偏小的結果。狐蝠屬之性別比依物種有所差異，甚至可能存在地區變異(Clark *et al.*, 1997; Divljan *et al.*, 2011)，食性亦可能影響發育中胚胎的性別(Parry-Jones, 2011)。因欠缺其他地區的琉球狐蝠族群資料可供比較，我們無法推斷本研究以雄性偏多的性別比是否為此物種普遍的族群特徵。然而，鑑於龜山島及花蓮市之個體皆是晚近才建立的新族群，高度偏向雄性個體的性別比很可能是性別

偏差播遷(sexually biased dispersal)或族群結構尚不穩定之結果。

於小族群中，顯著不均等的性別比很可能代表其「有效族群數」(effective population size)將遠小於「現生族群數」(census population size)，從族群遺傳的角度來看，意味族群很可能會出現如「建立者效應」(founder effects)或者「瓶頸效應」(bottleneck effect)等的生存危機(Charlesworth, 2009)，族群及環境的隨機性(Demographic and environmental stochasticity)、遺傳變異的逸失及族群密度依變的「阿利效應」(density-dependent Allee effect)皆可能對於小族群之長期生存及繁殖，造成不利的影響(Newman & Pilson, 1997; Stephens & Sutherland, 1999)。因此，未來有必要持續監測明顯偏低的雌性成體組成對於整體族群動態趨勢及族群結構所造成的影响。

根據文獻回顧及本研究結果，狐蝠多零星見於臺灣東岸及東北岸區域，詳見圖二。然而，除了原棲地綠島之外，近幾年新記錄到的穩定居留族群則僅見於龜山島及花蓮。從累積的出現紀錄得知，新棲地出現播遷者是一發生頻率極低的偶發事件，發生的時間點並非呈規律分佈，高度集中於1995年、2006-2010年及2015年以降。僅有一單獨播遷的個體並無法成功拓殖建立族群，基於該物種的高壽命期望值及優異的移動能力，若有多隻個體同時群集、向外播遷，或在相近的時間抵達同一棲息地，應有機會於新棲地成功建立一新的族群。龜山島族群的高遺傳多樣性可能即源自其多祖系的來源，也支持了狐蝠個體於相鄰島群之間，近代發生多次播遷、基因交流的假說(Chen *et al.*, 2021)。

播遷事件(dispersal)受到不同外在及內在因子及其交互作用所影響，其中，島嶼食物之可獲得性(food availability)顯然為一重要的限制因子。季節性的颱風及東北季風帶來的勁風及豪雨，在島嶼有限的棲地下，可能加劇了食物的匱乏及生存威脅，並迫使狐蝠主動向外播遷，尋覓食物資源。東北季風的影響由每年的九月持續至翌年四月，很可能促進了季節性的性別偏差播遷，遺傳結構中，各季的性別比也多以雄性個體居多；而回顧出沒紀錄，臺灣境內的零星狐蝠發現紀錄多半見於九月及十月之間，也呼應了東北季風對於促進個體播遷可能扮演的角色。除此之外，大多數的目擊樣點座落於本島東部及東北部的海岸地帶，若南琉球群島的八重山狐蝠確實有因應季風的西向活動，這些地區很可能即為首要登陸的範圍。

極端氣候的頻度增加，可能影響野生動物播遷的時機、方向及速率，進而影響族群的動態及分布範圍(Lea *et al.*, 2009; Knutson *et al.*, 2010; Kuussaari *et al.*, 2016)。對許多季節性遷移的動物而言，龜山島為一於太平洋西緣重要的中繼站，我們於當地進行冬季調

查的過程中，即觀察到許多過境鳥及迷鳥，其中不乏呈現飢餓、虛弱甚至死亡的個體，此現象在嚴峻的氣候期間更加顯著。對於狐蝠而言，極端氣候也可能是增加其生存壓力，並導致主動播遷的因素。

族群的增加可能促使分布範圍擴張，與臺灣狐蝠鄰域的兩個狐蝠族群——八重山及菲律賓族群，目前數量穩定(Heaney *et al.*, 1998; Saitoh *et al.*, 2015)。雖與其他狐蝠物種相比，琉球狐蝠的活動範圍相對較為侷限，但仍存在跨洋播遷及拓殖事件，例如宮古群島曾出現45km的跨島移動，並建立新族群，這些相鄰島嶼的移動可由直接的族群調查及間接的遺傳監測獲得證實(Nakamoto *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2021; Taki *et al.*, 2021)。於2006年，曾有一隻雄性亞成體於蘇澳外海被漁船救援的紀錄，該地點與臺灣及琉球群島之最近距離，分別為40 km及70 km。亦曾有綠島的在地居民，於受訪時表示目擊過狐蝠自開放海域飛往綠島。故針對琉球狐蝠或臺灣狐蝠亞種的調查、監測及保育，均應以生物地理學、較大的空間尺度(跨地域、跨國境)進行規劃和經營管理。

表一、本研究所選用之微衛星引子組合一覽表

組合	Locus	Primer sequences (5'-3')	Repeat motif	Size range (bp)	N _A	H _O	H _E	螢光
1	A011	F: TCTGACTTGAGCCCTAAATGCA	ATCT	177-213	10	0.724	0.759	A11
		R: CCAACTGATATCTCTGGGTGGT						
	A207	F: GCCATCGGAAATCTAATGTGC	ATCT	203-215	4	0.671	0.654	FAM
		R: ACTGTCAAAACACTCTCCAATAACAA						
2	B007	F: TCCGTTTTTGCAGACA	GTTC	153-157	2	0.434	0.427	TAMRA
		R: GCCCTCGCTGTTCTGATATGA						
	C017	F: TTTGTGGGTTTCCAGCTTCC	TATG	179-196	5	0.632	0.608	HEX
		R: GGCTTATCCAGAGCAACAGGTC						
3	C305	F: TGGATTTGTTAACCAATGTCACC	CATA	143-156	4	0.224	0.578	TAMRA
		R: GCGGTTCCAATTACTCTCTCA						
	A317	F: CCTCACAAATCACAGGAGCCA	CAGA/ AGAT	215-251	10	0.816	0.841	FAM
		R: GGGCTAGCAGAGAAAGGGAAC						
4	C220	F: CCACTTACTTCCAATTCTTACAGC	CATA	221-236	4	0.434	0.538	FAM
		R: TGAGTATTTACCACTGAGTGTTCG						
	A224	F: CATGGCTCGTGCCTGTTG	AGAT	177-197	6	0.697	0.727	HEX
		R: CCTCCCTCTACTCTCTCCA						
5	A313	F: CTTGGGATTCACGGGCTA	AGAT	153-173	6	0.776	0.798	TAMRA
		R: AAAAGGTTGCCATCCTGTG						
	A206	F: CTAGTGTAGAAATCTGGCTATTAATGTATAC	ATAG	231-247	5	0.579	0.705	FAM
		R: AAGAGATAATTGAAAGCAAAGAAAAAGA						
	A214	F: GGAAAGAGGTCCAATGGCT	AGAT	182-202	6	0.684	0.697	HEX
		R: TTTGAAATTCTGCATGAGAGATTG						

A226

F: CTTTCCAATGCCAACTGTTGA

R: TCTAGAACATAAGCCTCTGA

AGAT

168-185

5

0.671

0.675

TAMRA

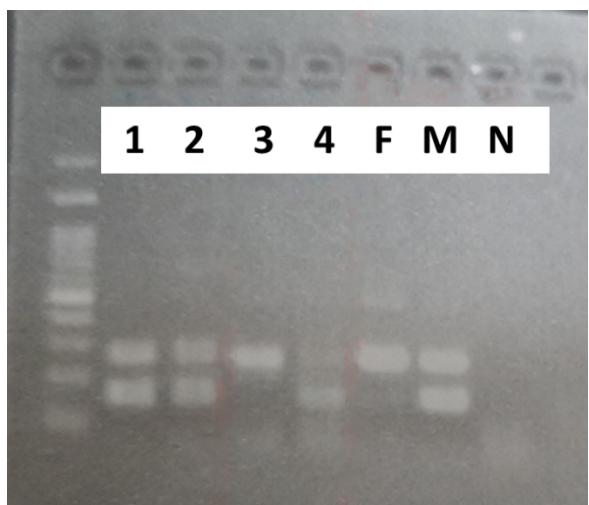
表二、本研究設計之琉球狐蝠性別鑑定引子

基因片段	引子名稱	F/R	序列	片段大小
SRY gene	P-Sry 1	F	5'-AAC-GCA-TTC-ATA-GTG-TGG-TCT-CG-3'	150
		R	5'-CAA-GGC-GCG-TAG-TCT-CTG-TGC-3'	
Microsatellite	A15	F	5'-TTT-GGA-AAA-ACG-ACC-CCC-TT-3'	260~300
		R	5'-GCA-TCA-AAG-CAT-TAG-GGA-GGA-A-3'	

表三、臺灣狐蝠於綠島、龜山島及花蓮市的族群估算值及 95%之信賴區間

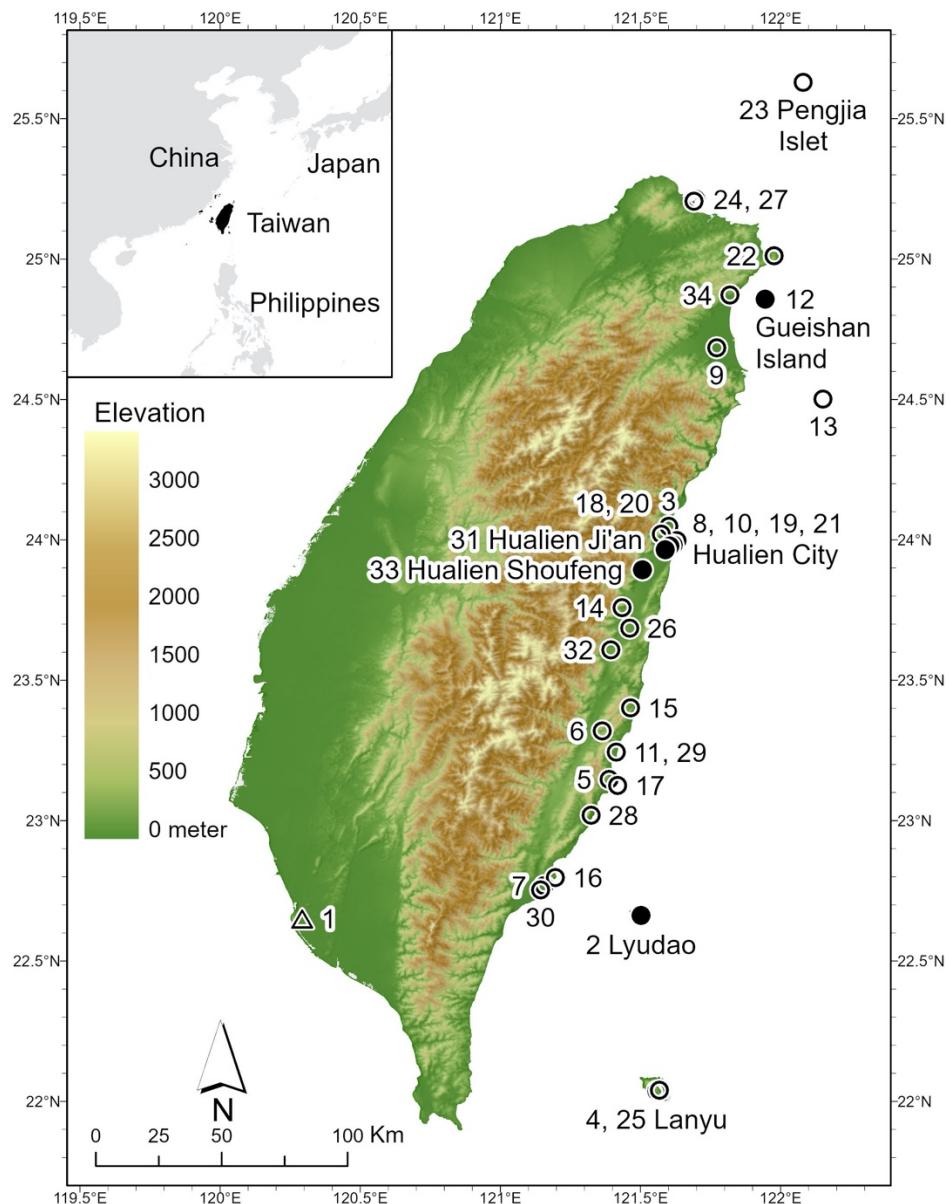
個體鑑定使用之方法包括：直接目測觀察、捕捉法及非侵入採樣之遺傳基因型鑑定，詳述於內文。

樣點 年分\性別	綠島			龜山島			花蓮市		
	雄	雌	未知	雄	雌	未知	雄	雌	未知
2005-2013	1	1	2	14	8	0	-	-	-
估計族群數		5 (CI = 4~17)		114 (CI = 44~407)			-		
2019-2021	0	0	2	39	19	2	7	2	3
估計族群數		3 (CI = 2~12)		176 (CI = 110~330)			60 (CI = 27~162)		



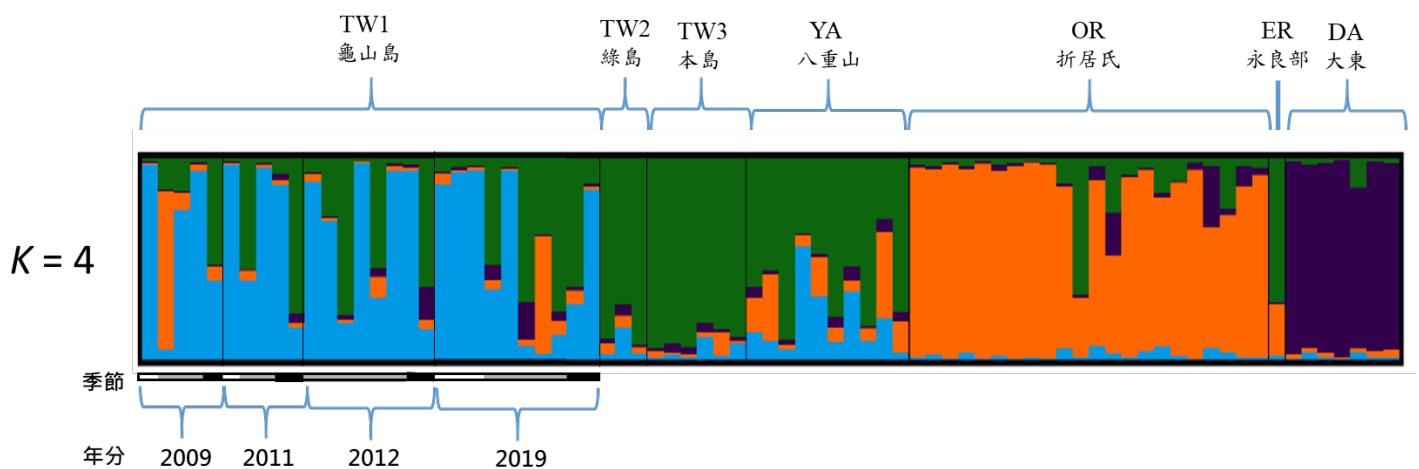
圖一、臺灣狐蝠的性別鑑定電泳膠圖

1-4 號為受測試之樣本；F：正控制組，雌性；M：正控制組，雄性；N：負控制組，以二次水取代 DNA template。將受測試樣本與正控制組比對後，鑑定性別如下：1 和 2 為雄性，3 為雌性，4 的條帶模糊且微弱，將視為無效。



圖二、臺灣狐蝠的出沒紀錄分布圖

實心圓代表定居族群，空心圓代表偶發之出沒紀錄，空心三角形為存疑之文獻紀錄。



圖三、以 STRUCTURE 分析琉球狐蝠個體的遺傳結構

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，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。龜山島的個體另以年分及季節之先後排序，標明初次發現的時間點。白、灰及黑色線段，分別代表春(3-5 月)、夏(6-8 月)及秋季(9-11 月)發現的個體。

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，頭城漁會、海巡署及臺大森林系野生動物研究室對於龜山島野外出差工作的支援及照應。此外，我們也特別感謝林清隆博士、陳宏彰、林融、許家維及尤宣雅協助野外工作；以及周秀綱、林祖濬、吳昌鴻、簡任廷、范力仁、劉瑞秋及林大成等人協助監測花蓮地區的狐蝠及採集樣本。

參考文獻

- AZIZ, S. A., K. R. McCONKEY, K. TANALGO, T. SRITONGCHUAY, M.-R. LOW, J. Y. YONG, T. L. MILDENSTEIN, C. E. NUEVO-DIEGO, V.-C. LIM, AND P. A. RACEY. (2021). The critical importance of Old World fruit bats for healthy ecosystems and economies. *Frontiers in Ecology and Evolution* 9: 641411.
- CHAO, A. (1987). Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability. *Biometrics*: 783-791.
- CHAO, A., AND C.-H. CHIU. (2016). Species richness: estimation and comparison. *Wiley StatsRef: statistics reference online* 1: 26.
- CHARLESWORTH, B. (2009). Effective population size and patterns of molecular evolution and variation. *Nature Reviews Genetics* 10: 195-205.
- CHEN, S.-F., S.-L. CHEN, Z.-L. LI, W.-C. LIN, AND M.-H. CHANG. (2009). A survey of terrestrial vertebrates on Green Island. *Journal of National Park* 19: 1-22.
- CHEN, S.-F., C.-H. JUAN, S. ROSSITER, T. KINJO, D. FUKUI, K. KAWAI, S. M. TSANG, M. J. VELUZ, N.-H. JANG-LIAW, AND K. OSAWA. (2021). Population genetic structure of the insular Ryukyu flying fox, *Pteropus dasymallus*. *Biotropica* 53: 548-559.
- CLARK, K., J. B. CARROLL, M. CLARK, S. GARRETT, S. PINKUS, AND R. SAW. (1997). Capture and survey of Livingstone's fruit bats *Pteropus livingstonii* in the Comoros Islands: the 1995 expedition. *Dodo* 33: 20-35.
- COX, P. A., AND T. ELMQVIST. (2000). Pollinator extinction in the Pacific Islands. *Conservation Biology* 14: 1237-1239.

- COX, P. A., T. ELMQVIST, E. D. PIERSON, AND W. E. RAINY. (1991). Flying foxes as strong interactors in south Pacific island ecosystems: a conservation hypothesis. *Conservation Biology* 5: 448-454.
- DIVLJAN, A., K. PARRY-JONES, AND P. EBY. (2011). Deaths and injuries to Grey-headed Flying-foxes, *Pteropus poliocephalus* shot at an orchard near Sydney, New South Wales. *Australian Zoologist* 35: 698-710.
- EARL, D. A. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation genetics resources* 4: 359-361.
- EVANNO, G., S. REGNAUT, AND J. GOUDET. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology* 14: 2611-2620.
- FALUSH, D., M. STEPHENS, AND J. K. PRITCHARD. (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164: 1567-1587.
- FLORENS, F., C. BAIDER, V. MARDAY, G. MARTIN, Z. ZMANAY, R. OLEKSY, G. KRIVEK, C. VINCENOT, D. STRASBERG, AND T. KINGSTON. (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.
- FRICK, W. F., T. KINGSTON, AND J. FLANDERS. (2020). A review of the major threats and challenges to global bat conservation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1469: 5-25.
- HEANEY, L. R., M. L. DOLAR, A. C. ALCALA, A. T. L. DANS, P. C. GONZALES, N. R. INGLE, M. V. LEPILEN, W. L. R. OLIVER, P. S. ONG, E. A. RICKART, J. TABARANZA, B. R., AND R. C. B. UTZURRUM. (1998). A synopsis of the mammalian fauna of the Philippine islands. *Fieldiana Zoology* New Series, No. 88: 1-61.
- IUCN. (2021). IUCN red list of threatened species. Version 2021-3.
- KALINOWSKI, S. T., M. L. TAPER, AND T. C. MARSHALL. (2007). Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16: 1099-1106.
- KINGSTON, T., F. V. FLORENS, AND C. E. VINCENOT. (2021). Crumbling island keystones: threat diversity and intensification on islands push large island fruit bats to the brink. *EcoEvoRxiv* July 29: doi:10.32942/osf.io/ehjcn.

- KNUTSON, T. R., J. L. MCBRIDE, J. CHAN, K. EMANUEL, G. HOLLAND, C. LANDSEA, I. HELD, J. P. KOSSIN, A. SRIVASTAVA, AND M. SUGI. (2010). Tropical cyclones and climate change. *Nature Geoscience* 3: 157-163.
- KOPELMAN, N. M., J. MAYZEL, M. JAKOBSSON, N. A. ROSENBERG, AND I. MAYROSE. (2015). Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Mol Ecol Resour* 15: 1179-1191.
- KUUSSAARI, M., S. RYTTERI, R. K. HEIKKINEN, J. HELIÖLÄ, AND P. VON BAGH. (2016). Weather explains high annual variation in butterfly dispersal. *Proc. R. Soc. Lond. B* 283: 20160413.
- LEA, M.-A., D. JOHNSON, R. REAM, J. STERLING, S. MELIN, AND T. GELATT. (2009). Extreme weather events influence dispersal of naive northern fur seals. *Biology Letters* 5: 252-257.
- LIN, L.-K., AND K. PEI. (1999). On the current status of field population of Formosan fruit bat (*Pteropus dasymallus formosus*). *Endemic Species Research* 1: 12-19.
- MC CONKEY, K. R., AND D. R. DRAKE. (2006). Flying foxes cease to function as seed dispersers long before they become rare. *Ecology* 87: 271-276.
- MICKLEBURGH, S. P., A. M. HUTSON, AND P. A. RACEY. (1992). *Old World fruit bats: an action plan for their conservation*. IUCN/SSC Chiroptera Specialist Group, Gland, Switzerland.
- MICKLEBURGH, S. P., A. M. HUTSON, AND P. A. RACEY. (2002). A review of the global conservation status of bats. *Oryx* 36: 18-34.
- NAKAMOTO, A., S. ITABE, A. SATO, K. KINJO, AND M. IZAWA. (2011). Geographical distribution pattern and interisland movements of Orii's flying fox in Okinawa Islands, the Ryukyu Archipelago, Japan. *Population Ecology* 53: 241-252.
- NEWMAN, D., AND D. PILSON. (1997). Increased probability of extinction due to decreased genetic effective population size: experimental populations of *Clarkia pulchella*. *Evolution* 51: 354-362.
- NYHAGEN, D. F., S. D. TURNBULL, J. M. OLESEN, AND C. G. JONES. (2005). An investigation into the role of the Mauritian flying fox, *Pteropus niger*, in forest regeneration. *Biological Conservation* 122: 491-497.
- PARRY-JONES, K. (2011). "Diverse weights and diverse measures": factors affecting the post-natal growth of the Grey-headed Flying-fox *Pteropus poliocephalus* and implications for ageing juvenile flying-foxes. *The Biology and Conservation of*

Australasian Bats, 1st ed. Mosman: Royal Zoological Society of NSW, Australia:
175-184.

- PRITCHARD, J. K., M. STEPHENS, AND P. DONNELLY. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- SAITO, T., K. KAJI, M. IZAWA, AND F. YAMADA. (2015). Conservation and management of terrestrial mammals in Japan: its organizational system and practices. *Therya* 6: 139-153.
- SHEHERAZADE, H. K. OBER, AND S. M. TSANG. (2019). Contributions of bats to the local economy through durian pollination in Sulawesi, Indonesia. *Biotropica* 51: 913-922.
- SHILTON, L. A., AND R. WHITTAKER. (2009). The role of pteropodid bats in re-establishing tropical forests on Krakatau. *Island Bats: Evolution, Ecology, and Conservation.*: 176-215.
- STEPHENS, P. A., AND W. J. SUTHERLAND. (1999). Consequences of the Allee effect for behaviour, ecology and conservation. *Trends in ecology & evolution* 14: 401-405.
- TAKI, Y., C. E. VINCENOT, Y. SATO, AND 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.
- YOSHIYUKI, M. (1989). *A systematic study of the Japanese chiroptera*. National Science Museum, Tokyo.

附錄、野外調查照片



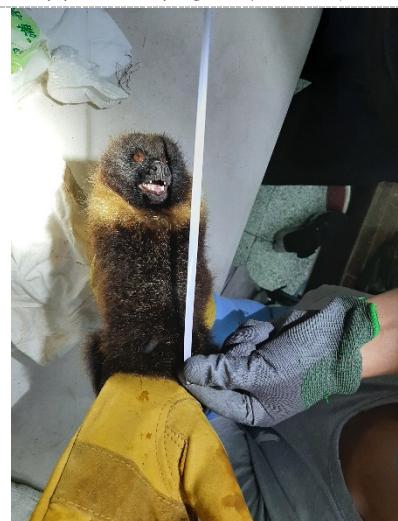
研究人員於龜山島架設霧網



研究人員檢視捕獲之雌性個體的性徵



研究人員對狐蝠進行保定和測量



於龜山島捕捉到的雄性臺灣狐蝠



新鮮的臺灣狐蝠排遺



龜山島的稜果榕食渣



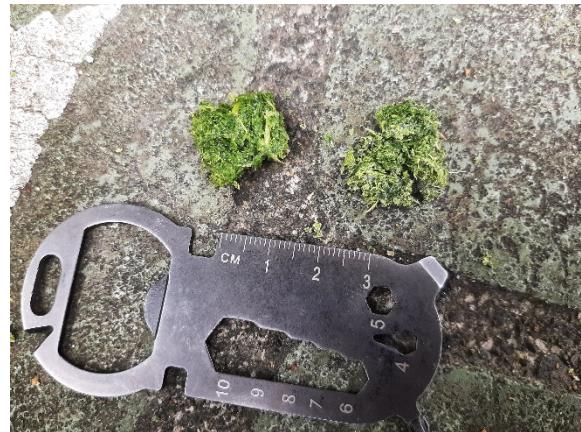
研究人員沿調查線搜尋狐蝠的食渣或排遺，
(圖攝於花蓮市區美崙溪河濱一帶)



花蓮市區狐蝠與人類生活環境緊鄰
(圖為北濱公園停棲於大葉山欖的狐蝠)



花蓮市發現的新鮮食渣



花蓮市發現的島榕葉片食渣



狐蝠嚼食過的福木果實，可見明顯齒痕



與花蓮志工交流狐蝠生態觀察經驗



於綠島背山面海的邊坡樹林，入夜後可能出現狐蝠停棲



研究人員下切無人溪谷搜尋狐蝠可能出沒的地點



研究人員於綠島架設霧網



於綠島發現的狐蝠舊排遺



於綠島發現的狐蝠舊食渣



於綠島發現的狐蝠福木果渣