

臺灣狐蝠的族群動態及遺傳結構 (1/4)
期末報告

Population dynamics and genetic structure of the
Formosan flying fox (*Pteropus dasymallus formosus*)

計畫編號：111H411207

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：111年1月1日至111年12月31日

目次

目次.....	I
摘要.....	III
前言.....	1
材料與方法.....	3
1. 調查及取樣方法.....	3
2. DNA 萃取及 PCR.....	4
3. 遺傳多樣性.....	5
4. 遺傳結構及移入者檢定.....	6
5. 族群量估算及性別比.....	6
6. 親緣關係重建.....	7
結果.....	8
1. 遺傳多樣性及分化.....	8
2. 個體鑑定、性別比及族群數估算.....	8
3. 遺傳結構及移入者檢定.....	9
4. 親緣關係重建.....	10
5. 標本典藏初探.....	11
討論.....	11
表一、本研究所選用之微衛星引子組合一覽表.....	15
表二、本研究設計之琉球狐蝠性別鑑定引子.....	16
表三、琉球狐蝠的遺傳多樣性.....	17
表四、琉球狐蝠的成對 F_{st}	17
表五、琉球狐蝠的分子變異數分析.....	17
表六、臺灣狐蝠於綠島、龜山島及花蓮市的族群估算值及 95% 信賴區間.....	18
表七、琉球狐蝠各族群之第一世代(F0)移入者數量及比例.....	19
表八、琉球狐蝠各族群之第一世代(F0)移入者數量及比例(將臺灣區分為三族群).....	19
表九、臺灣狐蝠親緣關係重建表(標明親子關係).....	20
表十、臺灣狐蝠親緣關係重建表(僅列出配對, 不標明親代).....	21
表十一、臺灣狐蝠現存標本典藏.....	22
圖一、臺灣狐蝠出現紀錄之分布圖.....	23
圖二、臺灣狐蝠的性別鑑定電泳膠圖.....	24
圖三、以 STRUCTURE 分析琉球狐蝠個體的遺傳結構.....	25

圖四、龜山島及花蓮市近年已鑑定個體之性別比變化	26
圖五、臺灣狐蝠的親緣譜系重建結果	27
致謝	28
參考文獻	28
附錄、野外調查照片	33

摘要

數量稀少且孤立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*)為琉球狐蝠的臺灣特有亞種，依野生動物保育法公告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。本研究針對臺灣狐蝠的三處穩定居留族群(龜山島、花蓮市及綠島)，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、結構及交流狀況有進一步的了解。此外，本年度亦延續過往研究，納入近年樣本以持續監測琉球狐蝠各亞種的遺傳結構及分化形式。歸納 2019~2022 年間採集的樣本，共可成功辨識出 108 隻不同的臺灣狐蝠個體(62 隻雄性、34 隻雌性、12 隻性別不詳)，估計族群數約為 263 隻，以雄性居多。檢視三處居留族群交流的狀況，龜山島、花蓮市及綠島之間雖無直接鑑定出跨地域的移動者，然而透過親子配對分析顯示一隻龜山島個體可能與來自花蓮市的個體具有親子關係。遺傳結構的結果顯示亞種之間存在遺傳分化，並以臺灣及最為鄰近的八重山亞種具有相對高的遺傳多樣性且相似的結構；若進一步檢視其族群組成，兩亞種亦皆含有一定比例的外來移入者且多為雄性。歸納臺灣狐蝠的族群動態，數量有回升的趨勢，綜合遺傳及親緣譜系之分析結果，多數個體可能終年居留於同一棲所並進行繁殖；然而相鄰的島嶼族群仍可能發生頻繁的跨洋播遷及拓殖，尤其以雄性為主要的基因交流者。本研究以分子生物學的研究方法監測臺灣狐蝠野外族群，分析臺灣狐蝠現今的族群數、性別比及遺傳多樣性等基礎生物學資料，提供評估此一島嶼易危物種現況及擬定保育策略之參考。由於本物種分布廣泛且可能存在島嶼間的交流，因此除了應以較大的時空尺度(跨地域、跨國境)進行長期監測及管理外，也應考量臺灣三處族群相異的族群趨勢及該物種對於棲地的忠誠性，擬定因地制宜的保育行動。

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、親子配對、狐蝠科、琉球狐蝠

前言

野生動物的監測對於有效的保育經營管理十分重要(McMahon *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2013), 除了族群數量的動態外, 也應包含遺傳多樣性之評估(Frankham 2005)。處於瀕臨滅絕邊緣的保育類物種, 因數量稀少及欠缺族群交流, 易受隨機事件(stochastic event)及遺傳漂變(genetic drift)等影響, 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(Ellstrand & Elam 1993; Frankham 2010; Jordan *et al.*, 2016)。倘若僅評估「實際族群數量」(N_c , population census size), 可能無法忠實反映族群的演化適應潛能, 甚至低估了物種滅絕的風險(Kalinowski & Waples 2002); 將可代表遺傳多樣性逸失速率(遺傳漂變)及演化歷史動態的「有效族群數」(N_e , effective population size)納入考量(Frankham 2005), 則可更為完整地了解一保育物種過去的族群變動歷史(Miller & Waits 2003; Stoffel *et al.*, 2018; Zarzoso-Lacoste *et al.*, 2018), 並有助評估未來的生存趨勢(Dussex & Robertson 2018)。

過往保育類物種受限於取樣不易, 族群監測難度高, 然而近年來非侵入式取樣(non-invasive sampling)技術的進展, 大幅提高樣本的來源及品質, 其遺傳資訊除可進行個體辨識之外, 更可廣泛應用於族群遺傳甚至於基因體層次之分析(Norman & Spong 2015; Carroll *et al.*, 2018; Natesh *et al.*, 2019)。故若能檢視並妥善整合「遺傳」或者「非遺傳」(如行為、生態、生活史、族群統計及環境等)各層面的資訊, 將更有助於提升保育管理計畫及族群管理策略的效能(Hoban *et al.*, 2013; Polechová & Barton 2015; Frankham *et al.*, 2017; Zarzoso-Lacoste *et al.*, 2018)。

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、臺灣及北部菲律賓群島(Kinjo & Nakamoto 2015)。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—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 2022), 然而各亞種的保育現況不盡相同(Vincenot *et al.*, 2017)。大東、

永良部及臺灣狐蝠這三個亞種族群數量稀少，野外僅剩約 50-300 隻個體，具保育的迫切性(Saitoh *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2022)，皆受到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)，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 *et al.*, 2022)。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。

目前在各亞種之中，已知八重山狐蝠和臺灣狐蝠具有較高的遺傳多樣性，而大東狐蝠的族群變異則相對較低；大部分的亞種間存在顯著的遺傳分化，尤其折居氏、大東及菲律賓應可視為獨立的族群單位管理，然而臺灣與八重山亞種之間的分化並不顯著；而臺灣狐蝠本身存在多個祖先支系的可能來源，尤其以龜山島族群變異最高，遺傳結構顯示其有一支自身的獨立祖先支系、也有另一支與臺灣本島和綠島接近的來源，甚至有與八重山和折居氏亞種接近的個體存在(Chen *et al.*, 2021)。

本年度針對臺灣狐蝠已執行例行調查多年的三處族群—龜山島、花蓮市區及綠島進行採集，期盼能擴大個體資料庫，透過每季之間的個體基因型標定資料為基礎，進行族群數(N_c , population census size)估算、性別比及譜系親緣之重建，以評估臺灣狐蝠族群未來的中、長期生存趨勢。而過往於日治時代，臺灣狐蝠曾於臺灣本島多處有零星紀錄，也有少數標本散落各地典藏機構，本研究亦將計畫逐一檢視，評估樣本用於族群遺傳分析之可行性。

1. 全程目標：

持續累積臺灣狐蝠的個體及遺傳資訊，於過去計畫建立之平臺基礎上，持續優化臺灣狐蝠的族群動態及遺傳結構監測之技術，目標除了釐清過去與現今族群的親緣關聯及交流歷史，也將持續在族群數及遺傳多樣性的面向上，監測現生族群於短、中、長程之變化趨勢，以利制定適當的保育管理政策。

2. 本年度目標：

1. 累積樣本及個體資料庫：針對臺灣狐蝠三處族群——龜山島、臺灣本島(花蓮為主)及綠島，持續藉由現地調查或與在地志工合作，蒐集各類型樣本，進行個體及性別鑑定，以累積臺灣狐蝠之個體資料庫，並估算族群性別比，進一步應用於後續的族群數估算、親緣分析，以及族群存續之經營管理。
2. 近期族群的動態評估：於龜山島、花蓮地區及綠島進行每季採樣，延續過去2019~2021年期間建立的實際族群(N_c , population census size)估算資料，以持續監測臺灣狐蝠近年族群的成長狀況，並透過直接的親子譜系重建或間接的遺傳結構分析，檢視臺灣境內族群是否存在交流。
3. 古標本樣本及歷史族群的分析技術評估：尋訪臺灣現存的臺灣狐蝠標本，嘗試萃取DNA進行遺傳分析。
4. 持續分析琉球狐蝠之遺傳結構：本團隊過去已藉跨國合作，對琉球狐蝠各亞種的遺傳分化進行探討，得知琉球狐蝠的遺傳交流呈現「距離-隔離模式」(Isolation by distance)，鄰島族群仍存在交流，呈現動態變化的遺傳結構形式。本年度試圖取得更多目前較缺乏的臺灣本島及綠島樣本，納入過去分析的資料組，持續探討臺灣狐蝠之族群來源以及與其他亞種之關聯性。

材料與方法

1. 調查及取樣方法

本研究分析的樣本跨幅2009~2022年，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、食渣和食餘樣本。涵蓋琉球狐蝠的分布地，包含臺灣(圖一)和琉球群島八處不同的島嶼(Chen *et al.*, 2021)。樣本類型則包括翼膜切片、血液、肌肉組織、排遺、食渣和食餘樣本。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；肌肉組織採自死亡屍體或標本；新鮮排遺、食渣和食餘則保存於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，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。於龜山島及花蓮，以架設霧網的方式進行野外個體的捕捉，共採集到 19 份翼膜樣本，另取得一隻救傷拾獲個體的翼膜樣本。非侵入式樣本(排遺、食渣和食餘)的採集則於龜山島、綠島和花蓮三個地區皆有進行，涵蓋多個不同的月份、日期和地點，於龜山島共採得 99 件新鮮樣本，綠島地區採得 8 件樣本。花蓮市則透過迴瀾風生態有限公司和荒野保護協會花蓮分會的協助，共採得 617 件排遺或食渣樣本。

此外，除了持續蒐集及監測臺灣狐蝠的現今野外族群外，本團隊也聯繫博物館、大學等學術教育典藏單位，尋訪過去的臺灣狐蝠標本紀錄，評估將歷史標本納入遺傳分析的可行性。

2. DNA 萃取及 PCR

若樣本類型為翼膜、血液或肌肉組織，我們使用 DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen)進行萃取操作；2019 至 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，自去年度(2021 年)起以多引子的組合(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 20 μ l，包含 10-50 ng 的模板 DNA、0.3 μ l 的 10 μ M 正反股引子(各三對)及 10 μ l 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 μ l，包含 20-100 ng 的模板 DNA、0.25 μ l 的 10 μ M 正反股引子及 5 μ l 的 Quick Taq HS DyeMix (TOYOBO)。PCR 的溫度調控如下：

- (1) 初始解離溫度為 94 $^{\circ}$ C (2 分鐘)；
- (2) 解離溫度 94 $^{\circ}$ C (30 秒)、黏合溫度 53 $^{\circ}$ C (30 秒) 及延長溫度 68 $^{\circ}$ C (60 秒)，此階段進行 40 次循環；
- (3) 最終延長溫度為 68 $^{\circ}$ 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，詳如圖二。

3. 遺傳多樣性

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，我們計算的指標則包含：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 ，亦計算每個亞種的平均成對之親緣值 (RI, average pairwise relatedness)，以推估個體之間的親緣關係 (Ritland 1996)。我們另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)。以上分析係以 GenAlEx 6.51 (Peakall & Smouse, 2006, 2012) 進行，樣本涵蓋琉球群島和臺灣地區共計八個島嶼，包括口永良部島、南大東島、沖繩、石垣島、西表島、龜山島、綠島和臺灣本島。此外，隨臺灣地區的採樣期間跨幅增加，我們進一步依調查時間將臺灣的樣本分成前期和近期二組 (2005~2013 及 2019~2022) 進行遺傳多樣性之分析，以探討遺傳多樣性隨時間推

移，是否產生變化。

4. 遺傳結構及移入者檢定

為檢驗族群之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 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)。臺灣狐蝠的穩定居留族群中，龜山島和臺灣本島(花蓮市)的個體數量相對較多、並跨幅多個世代，為了解較長時間尺度下遺傳結構的變化情形，特別將這兩處族群個體，以採集時序(年分及季節)排列呈現。

另外，為了解琉球狐蝠各族群的潛在遷移狀況，我們亦根據個體遺傳特徵，以 Monte Carlo resampling methods 為基礎的軟體 GeneClass2 (Piry *et al.*, 2004)，選用 Bayesian assignment (Rannala & Mountain 1997)來鑑定族群中潛在的「第一世代移入者」(the first generation migrants, F0 migrant)數量，了解各族群中有多少比例的個體，為可能的外來個體。

5. 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「捕捉、標記、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 2022 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指環，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 2022 年十二月期間，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、食渣及食餘，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 $\hat{S}_{Chao2} = S_{obs} + \left(\frac{m-1}{m}\right) \frac{q_1(q_1-1)}{2}$ 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， $\text{var}(\hat{S}_{Chao2}) = \left(\frac{m-1}{m}\right) \frac{q_1(q_1-1)}{2} + \left(\frac{m-1}{m}\right)^2 \frac{q_1(2q_1-1)^2}{4} - \left(\frac{m-1}{m}\right)^2 \frac{q_1^4}{4\hat{S}_{Chao2}}$ 。

除了實際族群數外，本研究亦透過微衛星的遺傳資料，以軟體 NeEstimator v.2.0 (Do *et al.*, 2014) 的連鎖不平衡方法 (Linkage disequilibrium method) (Waples & Do 2008) 估算臺灣狐蝠的「有效族群數」，了解實際能反映遺傳多樣性現況的族群數值為何，分析設定為隨機交配，並僅使用頻率大於 0.05 的基因進行分析，以避免罕見等位基因 (rare allele) 對數值估算造成偏差。此外，也將計算有效族群數與實際族群數的比值 (Ne/Nc)，以評估目前臺灣狐蝠在遺傳多樣性保育的危急程度。

6. 親緣關係重建

我們以軟體 Colony v.2.0.6.9 (Jones & Wang 2010) full likelihood method 分析個體的微衛星基因型資料，並考量個體出現的時序及成熟狀況 (架網捕捉或者救傷拾獲之個體) 等資訊，重建個體之間的最可能親子及手足關係，並使用 pedigree viewer v6.5f (Kinghorn 2011) 呈現最後重建的譜系結果。設定上我們使用多配制 (polygamous mating system)，並允許至多一個基因座的容錯率發生 (mismatch loci = 1)。若基因型為異型合子，PCR 的增幅過程，有可能會因模板 DNA 降解、等位基因的複製效率不同等因素，最後僅成功增幅了其中一個等位基因、導致我們誤判為同型合子，此

現象稱之為「等位基因遺漏」(allelic drop out)。我們容許親代和子代之間的配對，有一基因座的容錯率，但必須符合是等位基因遺漏的情況。

針對母子對及全手足的個體，由於其間應具有相同的母系遺傳，在以 Colony 初步判斷其親緣關係後，我們會再檢視其粒線體 d-loop 的單倍型是否完全吻合，確認相同後，才會視為一筆正式的有效結果。

結果

1. 遺傳多樣性及分化

本年度以 Chen *et al.*, (2021) 的研究樣本為基礎，另增加龜山島近年的個體(3 隻)，以及加入匱乏且珍稀的綠島(1 隻)及臺灣本島樣本(6 隻)，提升臺灣地區樣本的代表性，最後連同其他亞種，總計以 86 個樣本來重新分析各指標，探討琉球狐蝠的遺傳多樣性現況。就遺傳多樣性的各指標而言，多數亞種皆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 0.533 及 0.544。各亞種遺傳多樣性的趨勢顯示臺灣及八重山亞種的遺傳多樣性最高，大東狐蝠則是最低的(表三)。所有族群之 F_{IS} 值皆沒有顯著性偏低，顯示琉球狐蝠整體族群並未顯著偏離哈溫平衡。最後，除了八重山亞種，其餘四個受檢亞種皆呈現顯著的平均成對之親緣值(RI)，尤其以大東亞種的親緣值相對較高(0.146)。而臺灣狐蝠於前後兩個調查時期，皆呈現了不低的遺傳多樣性，其中近期(2019~2022 年)在各指標上皆略佳於前期(2005~2013 年)。AMOVA 結果則可觀察到亞種間存在顯著的遺傳分化， F_{ST} 值為 0.065 ($P < 0.001$ ，表五)。在成對的族群比較中，臺灣和八重山亞種為唯一不具顯著遺傳分化的族群組合。

2. 個體鑑定、性別比及族群數估算

研究資料分兩時期呈現，詳見表六。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 2019~2022 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 85 隻個體，大多數個體僅出現一次(66 隻，77.6%)，便未曾再發現；而 19 隻個體有重複標定的紀錄(22.4%)，其中 14 隻個體有兩次標定的紀錄，5 隻個體有三次以上標定的紀錄，估計族群數量約為 229 隻個體。整體而

言，性別比為 1.79:1 (雄: 雌)，顯著偏離 1:1 (二項式檢定: $P < 0.01$)。而若單獨檢視近年的性別比變化(圖四)，2019 年(性別比: 2.4:1)和 2020 年(性別比: 1.92:1)皆仍顯著偏離 1:1 ($P < 0.01$)，而 2021 年(性別比: 1:1)及 2022 年(性別比: 1.4:1)，兩性比例則已經無顯著差異(P 值分別為 0.223 及 0.117)。

於花蓮市區，我們則是自 2019 年開始採集該地的排遺、食渣及拾獲個體等不同來源之樣本，進行個體辨識，共計鑑定出 20 隻不同的個體，估計族群數量約為 28 隻，性別比之觀測值為 1.83:1，雄性居多，但在統計上並未呈現顯著差異(二項式檢定: $P = 0.094$)。至於綠島，在 2005~2008 年及 2019~2022 年期間，僅分別成功鑑定出 4 隻及 3 隻個體，估計族群數分別為 5 隻及 6 隻。總結以上分析，若將三處居留族群之數量加總作為臺灣族群之估算數值，前期調查期間(2005~2013 年)族群量約為 119 隻，而近期調查期間(2019~2022 年)則為 263 隻。

至於有效族群數(N_e)的估算值(表六)，由於綠島及花蓮市的樣本數過小不適合獨立計算，故我們僅呈現合併三處臺灣族群的數值，結果顯示臺灣狐蝠於前期調查期間(2005~2013 年)的有效族群數為 46 隻($CI = 31\sim 84$)，有效族群數與實際族群數的比值(N_e/N_c)為 0.39；而近期調查期間(2019~2022 年)則為 49 隻($CI = 32\sim 89$)，有效族群數與實際族群數的比值為 0.18。

3. 遺傳結構及移入者檢定

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(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明確歸類至其所屬的分群(僅一隻折居氏個體除外)；然而，龜山島(TW1)個體及八重山亞種則呈現了跨越遺傳分群的混合結構，綠島(TW2)的個體組成則相對單純，而採自臺灣本島(TW3)的個體則介於綠島及龜山島之間。龜山島族群穩定，樣本採集的期程最長，樣本數最多，由圖三(a)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，各記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)。如將龜山島及臺灣本島的個體依樣本採集到的年份先後順序排列(圖三 b)，探討時間對遺傳結構的影響，結果顯示龜山島自 2009 年開始監測以來，每一年度都存在多個來源

的個體，並非只集中在特定年份，也未觀察到結構變化的趨勢；臺灣本島族群遺傳結構的部分，年間的變化亦不大。

以軟體 GeneClass2 檢視族群內的移入者比例，發現臺灣及八重山狐蝠都有近兩成的比例為具外來遺傳特徵的移入者(表七)，若檢視跨亞種共 10 隻可能外來者的性別，雄性占 60%，雌性及未知性別者則分別各占 20%。為進一步探究臺灣境內外來者的分布是否有區域差異，我們將臺灣狐蝠的居留族群分成三組族群(龜山島、綠島及臺灣本島)，與其他亞種視為平行的單位進行分析，結果亦顯示臺灣各處族群都存在一定比例的外來者，並非僅集中於特定區域(表八)；其中臺灣本島及八重山族群在此分析架構下，外來移入者比例提高到近四成，性別亦以雄性居多(57%)，雌性及未知性別相等(21%)。而折居氏及大東族群則如前述遺傳結構的結果，組成相對單一，無論臺灣族群的單位如何劃分，皆未受影響，沒有偵測到任何外來個體。

4. 親緣關係重建

本年度分析納入了過往資料庫中所有曾經鑑定出基因型的個體，重建自 2009 年長期監測以來，臺灣狐蝠個體之間最可能的親緣關係，結果詳列於表九及表十。依據譜系關係和年紀推論個體係屬親代或子代，無法判斷者，如採集年份間隔 5 年以上，則以樣本採集年份早者定為親代，晚者定為子代(表九)；如年份間隔 5 年內，則不判定何者為親代或子代(表十)。本研究共鑑定了 6 組母子對(來自 5 隻雌性親代)、8 組父子對(來自 4 隻雄性親代)及 10 組無法判定成幼順序的親子對，並未有任一子代的雙親能同時都被鑑別到(圖五)。母子對的部分，在 5 隻鑑定出的雌性親代中，有 4 隻僅鑑定出單一子代，另 1 隻則鑑定出 2 個子代，且是和不同雄性所配對產出，半手足首次被採集到的年份不同。父子對的部分，在 4 隻鑑定出的雄性親代中，有 2 隻個體各有一隻子代，而另外 2 隻個體則皆鑑定出 3 個有效子代，且都是和不同雌性個體配對的結果。

而若以配對所屬的地域來檢視譜系結果(圖五)，於龜山島共鑑定到 18 組親子對(包括父或母子對以及無法確定成幼的配對)，多數配對的親代與子代首次發現時間間隔是在三年內，但亦有少數親子對有較長時間的跨幅，包括了三對跨越近 8 年及兩對近 10 年的親子配對；以及一組於三代之間、跨越近 8 年(2012~2020)的祖孫配對，此橫跨三代的案例最早是追溯到一隻 2012 年八月出現已為成熟狀態的雄性個

體(TW_G_27), 並且於 2020~2022 年鑑定到 5 隻直系子代, 包括三隻透過排遺或捕捉採集鑑定為父女關係之雌性個體, 以及為祖孫關係的兩隻雄性個體。

若檢視臺灣本島的樣本, 有效親子配對均來自花蓮市, 由於花蓮於 2020 年底才開始有穩定的遺傳監測資料, 故配對跨幅年代都在 2 年內, 包括一對同一晚被捕捉到的母女對以及 6 組親子對。而無論龜山島或花蓮市, 親子配對絕大都在相同地域內發現, 僅有一對親子對出現跨地域的現象, 一隻以排遺鑑定之雄性龜山島個體(編號 TW_G_F030), 其可能與另一隻花蓮市的雄性個體(TW_TW_07)具有親子關係。而根據移入者分析, 無論將臺灣族群合併或分成三處族群的檢視基礎下, 個體 TW_TW_07 和現有的臺灣個體均不相似, 屬於外來移入個體。

5. 標本典藏初探

本研究透過訪查及文獻搜尋, 目前共蒐集到五件臺灣狐蝠的標本典藏紀錄(表十一), 其中一筆是典藏於動物園、年代確知的近代標本紀錄, 本研究已經取得該樣本, 分析基因型, 確定其族群來源屬於臺灣狐蝠; 而年代及發現地不詳的另四筆紀錄, 因屬於數十年以上的陳年標本, 經詢問館藏人員樣本可能是以砒霜、福馬林等對遺傳分子具破壞性的化學藥品鞣製, 可能不適用一般的樣本萃取流程。為盡可能提高實驗效率、減少對珍貴標本不必要的侵入式影響, 暫以其它小獸類的標本進行分析古標本的實驗條件測試, 待方法學穩定後再行分析早期之狐蝠樣本, 目前尚在測試階段。

討論

臺灣狐蝠的族群歷經長時期僅有零星的紀錄, 近年研究調查顯示族群量已出現回升的趨勢(表六), 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), 並不時於東部沿海有發現紀錄和通報。本年度延續過去幾個年度(2019~2021 年)的資料基礎(Wu *et al.*, 2022), 持續估算及修正近年臺灣狐蝠族群數為 263 隻個體, 整體族群不僅與過往族群(2005~2013 年為 114 隻)相比有上升趨勢, 也較去年度所估算的族群數(239 隻)略微增加。其中綠島族群數仍然稀少, 由於該地樣本取得受限, 導致族群數被低估。晚近發現的龜山島族群數量最多(229 隻), 佔了總族群量的 87% 之多。花蓮市的估算值(28 隻)較去年

度(60 隻)下降，然而信賴區間(CI = 22~54)相較去年度(CI = 27~162)有明顯變小的趨勢，可見估算值已隨在地單位協助提升調查努力量以及實驗分析方法越趨穩定，使得分析結果更趨近於族群真實現狀。

根據過去在各地所進行的臺灣狐蝠族群監測和捕捉標記，尚無直接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固定棲息於一地區。然而，透過個體親緣關係之重建(詳見後文)，我們首次觀察到一隻龜山島的雄性個體與另一隻主要活動於花蓮市區(文創園區及國風國中)的雄性個體具有親子關係，顯示臺灣境內不同地區間確實發生跨區交流，然頻率甚低，此結果可以呼應本研究進行的移入者分析結果(性別以雄性居多)，以及過往本團隊比較母系遺傳及核基因遺傳的分析結論(Chen *et al.*, 2021)，雄性個體為族群之間主要的跨洋交流者。

臺灣狐蝠的性別比若綜合過去四年趨勢，無論將三處族群合併計算、亦或單獨檢視穩定監測的龜山島或花蓮族群，比例皆以雄性居多。過去我們鑒於龜山島及花蓮市之狐蝠個體皆是近期建立的繁殖族群，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綜合結果，尤其以龜山島不但遺傳結構多元且維持變動，於族群初始發現以來，無論前期(2005~2013 年)及近期(2019~2022 年)兩時期，都一致反映雄性為多數的性別比。然而，若細看年間的變化(圖四)，則可以發現龜山島自 2021 年以來，雌雄比例已未再顯著偏離 1:1，是否因族群結構已漸趨於穩定，以及性別比變化對於遺傳多樣性的影響，均有待未來持續的監測。花蓮市的族群則因樣本數過少，即使亦以雄性占多數，然性別比在統計上並未呈現顯著偏離。對於小族群而言，顯著不均等的性別比可能會帶來諸多的負面效應，自族群遺傳學的角度，族群會有較小的有效族群數(*effective population size*)，並且可能會面臨拓荒者效應(*founder effect*)和瓶頸效應(*bottleneck effect*)等生存危機 (Charlesworth 2009)。以本研究我們估算出的有效族群數(表六)以及各遺傳多樣性指標參數來看(表三)，臺灣狐蝠相較其他亞種仍保有一定程度的遺傳多樣性，若僅以臺灣狐蝠長期調查的前後兩時期作比較，也並未有明顯落差。一般野生動物物種的有效族群數及實際族群數的比值(N_e/N_c)落在 0.10~0.11 之間(Frankham 1995)，若以臺灣狐蝠的比值於 2005~2013 年為 0.39 及 2019~2022 年為 0.18 來看，應無近期危機。然而，無論前後時期，臺灣狐蝠的有效族群數皆不到 50，仍小於過往於保育遺傳學研究指出的「50/500 定律」，即小族群數量應大於 50 才能免於近交衰退，但必須至少 500 以上才能保持長期演化上足以適應環境變遷的潛力(Franklin 1980;

Soule 1980), 根據近年研究, 此標準甚至更上修至 100/1000 (Frankham *et al.*, 2014)。無論是以何種標準, 皆應致力使臺灣狐蝠的有效族群數持續維持成長, 以免於潛在的族群生存危機。

本研究在龜山島和花蓮市均偵測到多組親子對(表九、圖五), 多數親子對成員出現在相同的族群內, 僅一組例外, 推測多數個體選擇留在原地尋求繁殖機會, 亦呼應了以分子標定臺灣狐蝠個體的結果—未偵測到任何個體重複出現在不同地區, 沒有島嶼間的移動。以累積長期監測資料的龜山島來看, 雖然沒有個體在前後兩段密集監測的時期皆被捕獲或標定, 我們無法追蹤個體的去向, 但無論是雌性或雄性, 都有與不同配偶配對的紀錄, 此外, 親子對成員首次被標定的年份間隔可跨越長達 8~10 年以上(圖五), 顯示狐蝠在龜山島, 個體穩定繁衍, 持續產生子代。

雖欠缺直接的移動者紀錄, 但我們仍透過親子配對, 找到了臺灣境內族群交流的證明, 一隻花蓮市區的雄性個體(TW_TW_07)與另一隻龜山島的雄性個體(TW_G_F030)為親子關係。本研究於 2021 年首次標定到該花蓮個體, 檢視其活動範圍, 橫跨不同季節(一、二、八及九月)均集中在花蓮市區一帶, 從未在其他樣點被記錄到, 其龜山島的親子對成員則是於 2020 年 11 月首次被標定, 惟此兩個體均是透過分析排遺所鑑定到的, 因此無法得知成熟狀態及辨識係屬親代還是子代; 本研究於 2021 年在花蓮另鑑定出兩個 TW_TW_07 的親子對成員。雖然我們無法確知 TW_TW_07 是否長年棲息於花蓮市, 但根據其遺傳特徵, 推測該個體並非屬於花蓮或龜山島的分群, 可能是一隻琉球狐蝠的雄性播遷者, 近年融入花蓮此新拓殖的族群。未來需要增加綠島及八重山亞種的樣本, 累積更多長期監測以及行為觀察, 方得以判斷移入個體潛在的來源, 進一步了解族群乃至亞種之間的交流歷史, 以對臺灣狐蝠的生活史、婚配及播遷行為有更完整的了解。

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(Nakamoto *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2021; Taki *et al.*, 2021)。本研究的遺傳監測結果顯示, 臺灣及八重山族群是琉球狐蝠亞種之中, 唯一無法顯著區分彼此的組合。而細究遺傳結構的歷年變化, 龜山島及八重山呈現了多個來源的混合結構, 綠島較龜山島組成單純, 臺灣本島(多為花蓮市個體)則介於其間; 然而若將臺灣依地區分成不同族群單位—龜山島、綠島和臺灣本島, 每一族群都存在潛在移入者。龜山島以及臺灣本島的地理位置與日本八重山群島相鄰, 可作為琉球狐蝠南來北往的中繼站, 蘊含的高遺傳多樣性也說明了其多元的祖系來源(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，族群數量的增加可能會促使個體向外播遷，隨臺灣族群持續成長，未來族群是否將漸趨飽和、達到族群最大承載量(Carrying capacity)、甚至是否進而拓殖至其他島嶼，將是未來需要密切觀察的重點。

檢視目前三處臺灣族群的現況，龜山島由於僅於日間開放遊客登島觀光，並具有冬季封島期，對於夜行性的狐蝠而言，尚不致受到太多人為的干擾，因此該處維持了良好的棲地環境供狐蝠及野生動物利用；本年度東北角暨宜蘭海岸國家風景區管理處於環湖步道種植了多棵蒲葵及稜果榕，營造適於狐蝠利用的覓食棲地及停棲樹木，未來亦可提供遊客於日間遮陽休憩。花蓮市的狐蝠生活範圍與人類高度重疊，並會利用當地居民種植的經濟作物或公園果樹，高度依賴特定的覓食棲地及停棲樹木，若狐蝠族群量持續上升，並在都市擴張活動範圍，諸多潛在衝突，例如過度修剪狐蝠重要棲地的樹木、不當的人為活動干擾及潛在野生動物疾病等疑慮，均需透過大眾教育進行妥善的宣導與溝通(Currey *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2022)。至於過去臺灣狐蝠主要的原棲息地綠島，其狐蝠數量仍然未有回升趨勢，且因個體數過少，已不足於當地生態系中扮演關鍵物種的角色(McConkey & Drake 2006)，為復育綠島狐蝠族群，更為積極的棲地營造(種植原生林)和外來種(赤腹松鼠)移除，以及透過教育使在地社群認識並重視狐蝠及自然資源的保育，為現階段迫切應採取的保育行動。

本研究長期以分子生物學的研究方法監測臺灣狐蝠野外族群，涵蓋龜山島、花蓮市和綠島三處穩定的居留族群，分析臺灣狐蝠現今的族群數、性別比及遺傳多樣性等重要基礎生物學資料，提供評估此一島嶼易危物種現況及擬定保育策略之參考。此外，藉由強化與在地保育單位及團體的橫向合作，有效地提高調查努力量，取得更多原本匱乏的本島及綠島樣本，使得分析結果能更趨近族群真實的狀況。由於本物種分布廣泛且可能存在島嶼間的交流，因此除了應以較大的時空尺度及跨越地理疆界的思維進行長期監測及管理外，也應考量臺灣三處族群相異的族群趨勢及該物種對於棲地的忠誠性，擬定兼具棲地管理、因地制宜及大眾教育的保育行動。

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 R: CCAACTGATATCTCTCTGGGTGGT	ATCT	177-213	10	0.724	0.759	A11
	A207	F: GCCATCGGAAATCTAATGTGC R: ACTGTCAAAACACTCTCCAATAAACA	ATCT	203-215	4	0.671	0.654	FAM
	B007	F: TCCGTTTTTTGCGTCAGACA R: GCCCTCGCTGTTCTGATATGA	GTTT	153-157	2	0.434	0.427	TAMRA
2	C017	F: TTTGTGGGTTTCCAGCTTCC R: GGCTTATCCAGAGCAACAGGTC	TATG	179-196	5	0.632	0.608	HEX
	C305	F: TGGATTTTGTTAACCAATGTCACC R: GCCGTTTCCAATTTACTTCTCTCA	CATA	143-156	4	0.224	0.578	TAMRA
	A317	F: CCTCACAATCACAGGAGCCA R: GGGCTAGCAGAGAAAGGGAAC	CAGA/ AGAT	215-251	10	0.816	0.841	FAM
3	C220	F: CCACTTACTTCCAATTCTTACCAGC R: TGAGTATTTTACCACTGAGTGTGTTTCG	CATA	221-236	4	0.434	0.538	FAM
	A224	F: CATGGCTCGTGCCTGTTG R: CCTCCCTCTTCTACTCTCTCTCCA	AGAT	177-197	6	0.697	0.727	HEX
	A313	F: CTTTGGGATTTACGGGCTA R: AAAAGGTTGGCCATCCTGTG	AGAT	153-173	6	0.776	0.798	TAMRA
4	A206	F: CTAGTGTTAGAAATCTGGGCTATTAATGTATAC R: AAGAGATAATTGAAAGCAAAGAAAAAAGA	ATAG	231-247	5	0.579	0.705	FAM
	A214	F: GGAAAGAGGTCCCAATGGCT R: TTTTGAATTCTGCATGAGAGATTTG	AGAT	182-202	6	0.684	0.697	HEX

A226	F: CTTTCCAAATGCCAACTGTTGA R: TCTAGAATGTGAAACATAAGCCTCTGA	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、琉球狐蝠的遺傳多樣性

以 26 個微衛星基因座所估算。N: 樣本數, Na: 每基因座平均的等位基因數(mean number of alleles per locus), Ac: 等位基因豐富度(allelic richness), Ho: 異型合子觀測值(observed heterozygosity), He: 異型合子期望值(expected heterozygosity), RI: 親緣值(relatedness), Fis: 自交係數(inbreeding coefficient)。永良部族群因僅有單一有效樣本, 故不計入亞種層次的分析中。

亞種/族群	微衛星 DNA						
	N	Na	Ac	Ho	He	RI	Fis
臺灣	46	5.154	3.645	0.574	0.606	0.001*	0.051
八重山	10	3.731	3.479	0.588	0.581	0.002	0.039
折居氏	22	3.846	3.351	0.542	0.575	0.035*	0.081
永良部	1	-	-	-	-	-	-
大東	7	2.885	2.885	0.429	0.415	0.146*	0.045
臺灣 (2005-13)	23	4.346	4.261	0.567	0.585	0.028*	0.025
臺灣 (2019-22)	22	4.846	4.767	0.586	0.607	0.002*	0.038

*: 統計顯著 (P 值 < 0.05)

表四、琉球狐蝠的成對 Fst

亞種	臺灣	八重山	折居氏	大東
臺灣				
八重山	0.007 ^{NS}			
折居氏	0.056*	0.035*		
大東	0.125*	0.141*	0.161*	

NS: 統計非顯著

*: 統計顯著 (P 值 < 0.05)

表五、琉球狐蝠的分子變異數分析

	核基因 DNA	
	微衛星 DNA	
	variation (%)	P value
亞種之間	6.54	< 0.001*
亞種之內	93.46	

*: 統計顯著 (P 值 < 0.05)

表六、臺灣狐蝠於綠島、龜山島及花蓮市的族群估算值及 95%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。族群數欄位內的括弧為 95%信賴區間的上下界估算數值。

地點 年分\性別	綠島			龜山島			花蓮市			總計
	雄	雌	未知	雄	雌	未知	雄	雌	未知	
2005-2013	1	1	2	14	8	0	-	-	-	26
估計族群數(Nc)	5 (4~17)			114 (44~407)			-			119
有效族群數(Ne)	-			-			-			46 (31~84)
Ne/Nc										0.39
2019-2022	1	0	2	50	28	7	11	6	3	108
估計族群數(Nc)	6 (3~25)			229 (156~378)			28 (22~54)			263
有效族群數(Ne)	-			-			-			49 (32~89)
Ne/Nc										0.18

表七、琉球狐蝠各族群之第一代(F0)移入者數量及比例

臺灣族群包含綠島、龜山島及花蓮三處的個體，合併進行分析。

族群	F0 移入者數量	族群數量	F0 移入者比例
臺灣	8	46	17.39%
八重山	2	10	20%
折居氏	0	22	0%
大東	0	7	0%

表八、琉球狐蝠各族群之第一代(F0)移入者數量及比例(將臺灣區分為三族群)

將綠島、龜山島及花蓮三處臺灣族群個體視為不同族群進行分析。

族群	F0 移入者數量	族群數量	F0 移入者比例
龜山島	5	31	16.13%
綠島	1	4	25%
臺灣本島	4	11	36.36%
八重山	4	10	40%
折居氏	0	22	0%
大東	0	7	0%

表九、臺灣狐蝠親緣關係重建表(標明親子關係)

代號以「TW_G」開頭為龜山島個體，代號以「TW_TW」開頭為臺灣本島(花蓮市)個體。若無法確認任一父系或母系親代，將另以數字代稱個體號。性別代號 M 為雄性，F 為雌性。採集跨幅年份為「親代首次發現時間」與「子代首次發現時間」的間隔年份，未滿一年的部分，若未滿六個月以 0 年計，六個月以上以 1 年計。若為捕捉個體，則標註首次發現時的成熟狀況。

子代編號	性別	子代成熟狀況	子代首次發現時間	父親編號	母親編號	已知親代成熟狀況	親代首次發現時間	採集跨幅年份
TW_G_41	M	成體	2020/10	*38	TW_G_60	成體	2022/10	2
TW_G_55	F	成體	2021/10	*29	TW_G_14	成體	2011/08	10
TW_G_20	M	幼體	2012/08	*23	TW_G_14	成體	2011/08	1
TW_G_44	M	幼體	2020/10	*22	TW_G_23	幼體	2012/08	8
TW_G_36	M	亞成	2020/08	*29	TW_G_45	成體	2020/10	0
TW_TW_17	F	亞成	2022/07	*7	TW_TW_16	成體	2022/07	0
TW_G_15	F	幼體	2011/08	TW_G_12	#15	成體	2009/09	2
TW_G_16	F	幼體	2011/09	TW_G_12	#13	成體	2009/09	2
TW_G_19	F	幼體	2012/08	TW_G_12	#16	成體	2009/09	3
TW_G_60	F	成體	2022/10	TW_G_27	#28	成體	2012/08	10
TW_G_45	F	成體	2020/10	TW_G_27	#20	成體	2012/08	8
TW_G_F019	F	-	2020/08	TW_G_27	#22	成體	2012/08	8
TW_G_23	F	幼體	2012/08	TW_G_18	#44	幼體	2011/09	1
TW_G_40	F	亞成	2020/10	TW_G_F041	#12	-	2019/08	1

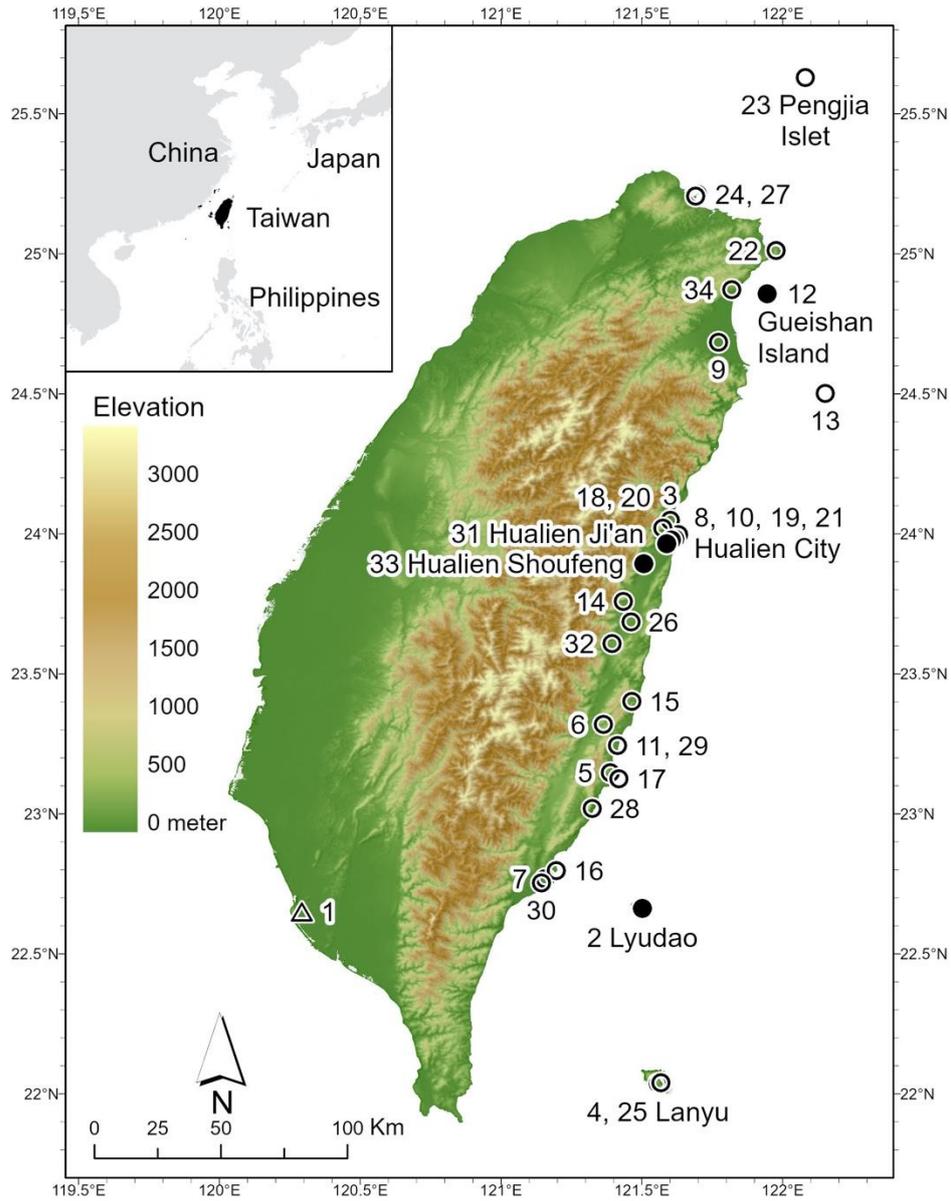
表十、臺灣狐蝠親緣關係重建表(僅列出配對，不標明親代)

代號以「TW_G」開頭為龜山島個體，代號以「TW_TW」開頭為臺灣本島(花蓮市)個體。性別代號 M 為雄性，F 為雌性，N 則為性別未知。採集跨幅年份為「親代首次發現時間」與「子代首次發現時間」的間隔年份，未滿一年的部分，若未滿六個月以 0 年計，六個月以上以 1 年計。若為捕捉個體，則標註首次發現時的成熟狀況。

成員 A 編號	成員 A 性別	成員 A 成熟狀況	成員 A 首次發現時間	成員 B 編號	成員 B 性別	成員 B 成熟狀況	成員 B 首次發現時間	採集跨幅年份
TW_G_F001	M	-	2019/05	TW_G_F018	M	-	2020/08	1
TW_G_F017	M	-	2020/05	TW_G_F018	M	-	2020/08	0
TW_G_F020	M	-	2020/08	TW_G_F018	M	-	2020/08	0
TW_G_F042	F	-	2019/08	TW_G_F041	M	-	2019/08	0
TW_G_F030	M	-	2020/11	TW_TW_07	M	-	2021/01	0
TW_TW_12	M	-	2021/08	TW_TW_07	M	-	2021/01	1
TW_TW_19	M	-	2021/12	TW_TW_07	M	-	2021/01	1
TW_TW_01	n	-	2019/05	TW_TW_13	M	-	2021/08	2
TW_TW_15	M	成體	2022/04	TW_TW_13	M	-	2021/08	1
TW_TW_21	M	-	2022/08	TW_TW_13	M	-	2021/08	1

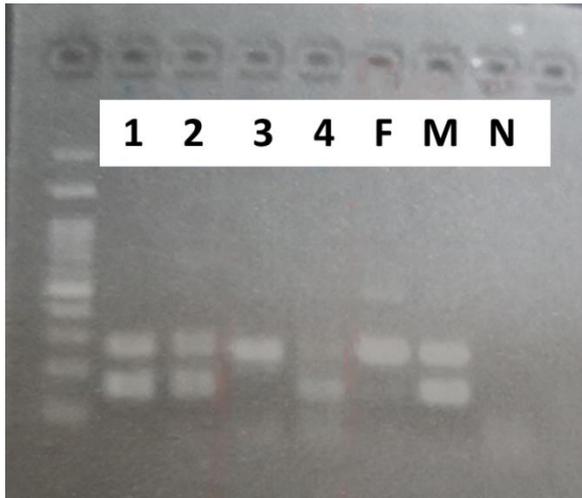
表十一、臺灣狐蝠現存標本典藏

年代	典藏縣市	館藏處	性別	皮毛標本 (件)	浸液標本 (件)	備註
不詳	臺北市	國立臺灣博物館	-	1		館藏編號 TMMA.0035
不詳	臺北市	國立臺灣博物館	-	1		館藏編號 TMMA.0165
不詳	臺北市	國立臺灣博物館	-		1	館藏編號 TMMA.0380
不詳	臺北市	國立臺灣大學	雄	1		生命科學系 乾標室 棍棒標本
2007	臺北市	臺北市立動物園	雌	1		解說導覽人員展示標本



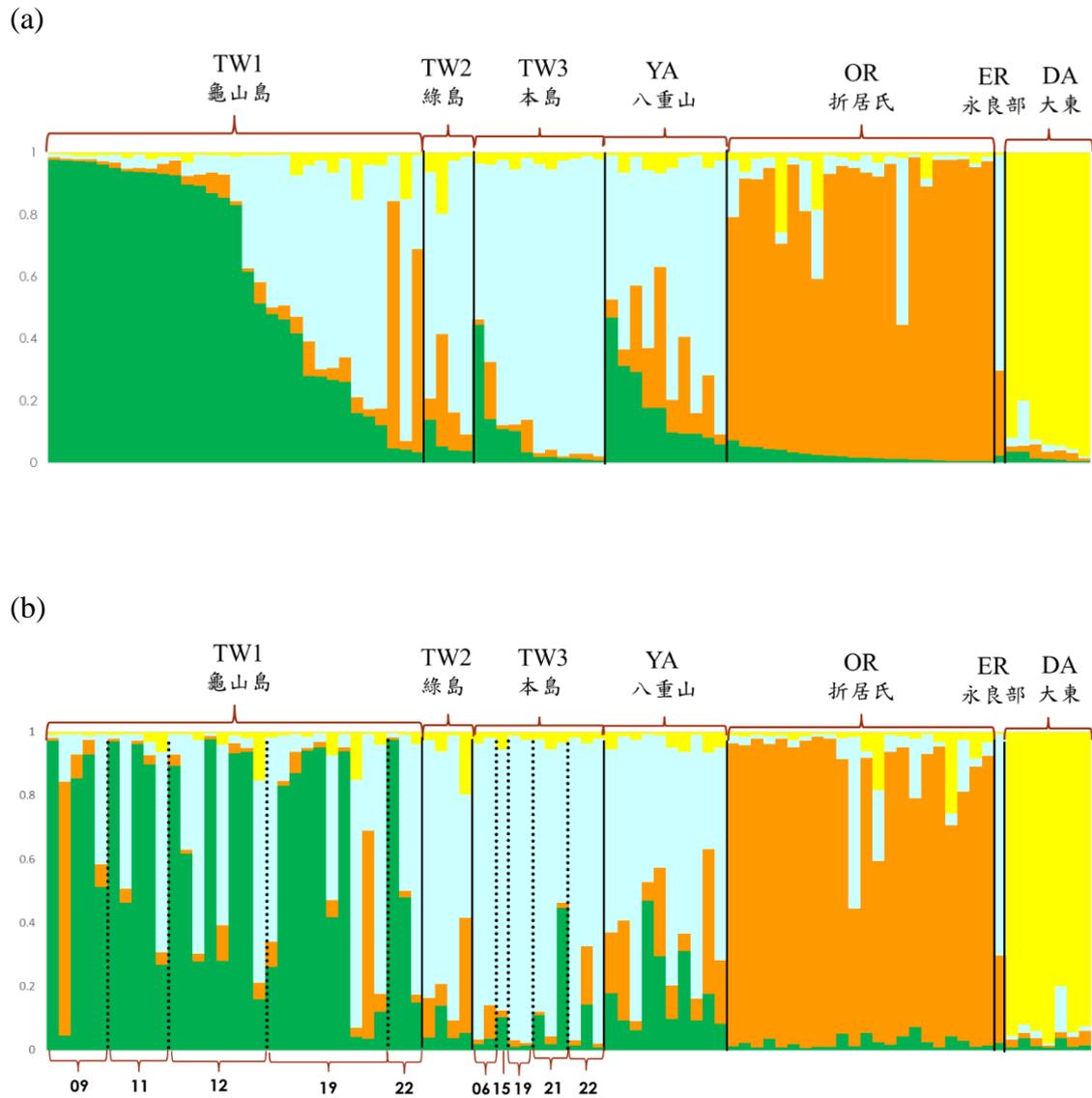
圖一、臺灣狐蝠出現紀錄之分布圖

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。



圖二、臺灣狐蝠的性別鑑定電泳膠圖

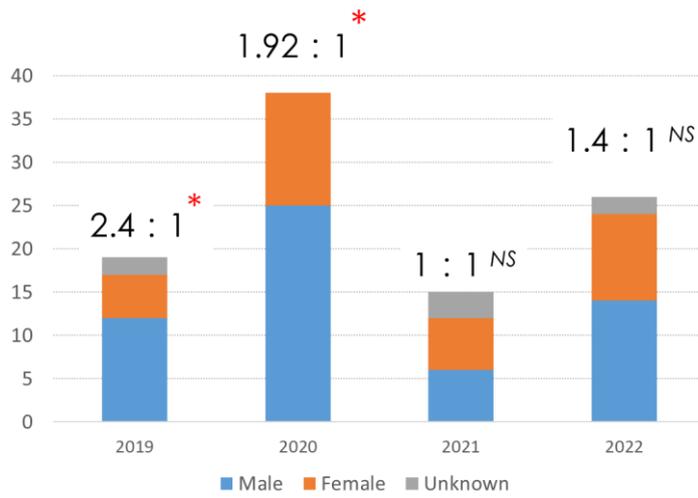
1-4 號為受測試之樣本；F：正控制組，雌性；M：正控制組，雄性；N：負控制組，以二次水取代 DNA template。將受測試樣本與正控制組比對後，鑑定性別如下：1 和 2 為雄性，3 為雌性，4 的條帶模糊且微弱，將視為無效。



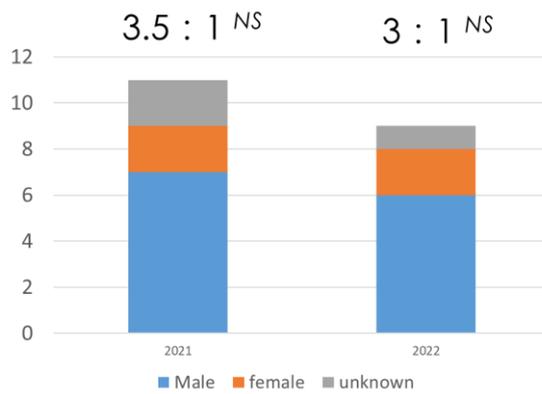
圖三、以 STRUCTURE 分析琉球狐蝠個體的遺傳結構

建構來自五亞種、86 隻琉球狐蝠的遺傳結構圖，每一垂直條代表單一個體，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。分析結果顯示最可能的遺傳分群數目為 4。Y 軸代表比例，範圍在 0~1 之間。(a) 以同分群做為排列依據；(b) 以樣本採集時序作為排列順序。黑色垂直實線用以區隔不同的亞種及島嶼群；另以黑色虛線區隔長期監測的兩處居留族群——龜山島及臺灣本島個體之採集年份。

(a)



(b)



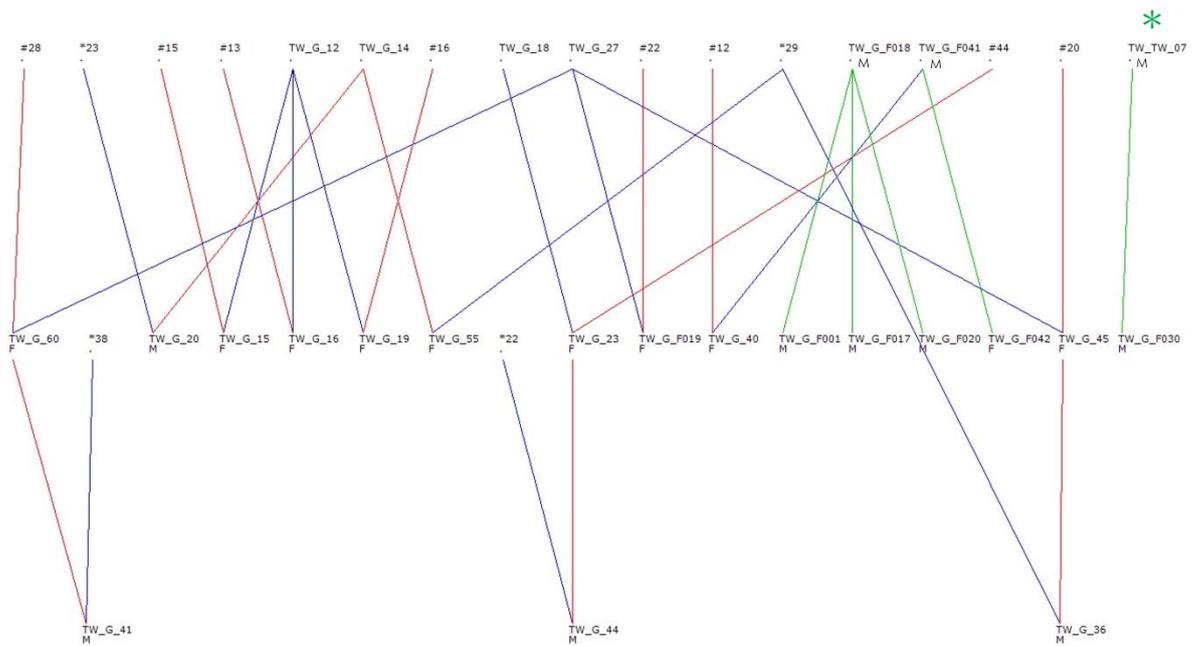
圖四、龜山島及花蓮市近年已鑑定個體之性別比變化

(a) 龜山島(2019~2022), (b)花蓮市(2021~2022)。縱軸代表個體數, 橫軸代表年份(花蓮僅納入 2021~2022 年實驗方法穩定後的個體監測紀錄)。直條圖藍色部分代表雄性, 橘色代表雌性, 灰色部分代表性別未知個體, 上方數字代表雄性與雌性的比例。

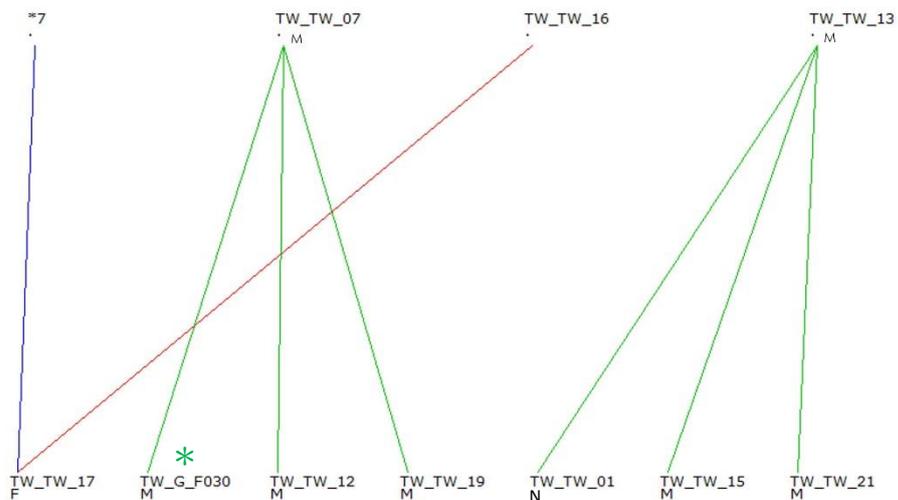
NS: 統計非顯著

*: 統計顯著 (P 值 < 0.05)

(a)



(b)



圖五、臺灣狐蝠的親緣譜系重建結果

(a) 龜山島; (b) 花蓮市。藍色線代表確定的父子對、紅色線代表母子對、綠色線代表兩個體有親子關係，但無法確定何者為親代。子代之性別則以 M (雄), F(雌)或 N(未知)標示在下方。代號以「TW_G」開頭為龜山島個體，代號以「TW_TW」開頭為臺灣本島個體。若無法確認任一父系或母系親代，將另以數字代稱個體號。
*代表為跨地域者，意指和配對個體地域並不相同的個體。

致謝

誠摯感謝林務局對本研究的經費支持和行政協助，沖繩動物園及博物館基金會、平川動物園、琉球大學及臺北市立動物園提供研究樣本，以及東北角暨宜蘭海岸國家風景區、東部海岸國家風景區、頭城漁會、海巡署對於龜山島和綠島野外調查工作的支援。此外，特別感謝臺灣蝙蝠學會林清隆博士、林融以及特有生物中心鄭錫奇博士、張簡琳玟、張義榮、陳宏彰、劉嘉顯、許家維協助野外工作及經驗交流；以及朱何宗、吳昌鴻、簡任廷、范力仁、周秀綢、林祖濬及吳宓思協助監測花蓮地區的狐蝠現況、樣本採集及出差期間的諸多照應。

參考文獻

- CARROLL, E. L., M. W. BRUFORD, J. A. DEWOODY, G. LEROY, A. STRAND, L. WAITS, AND J. WANG. 2018. Genetic and genomic monitoring with minimally invasive sampling methods. *Evolutionary Applications* 11: 1094-1119.
- 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., 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.
- CURREY, K., D. KENDAL, R. VAN DER REE, AND P. E. LENTINI. 2018. Land manager perspectives on conflict mitigation strategies for urban flying-fox camps. *Diversity* 10: 39.
- DO, C., R. S. WAPLES, D. PEEL, G. MACBETH, B. J. TILLET, AND J. R. OVENDEN. 2014. NeEstimator v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. *Molecular Ecology Resources* 14: 209-214.

- DUSSEX, N., AND B. ROBERTSON. 2018. Contemporary effective population size and predicted maintenance of genetic diversity in the endangered kea (*Nestor notabilis*). *New Zealand Journal of Zoology* 45: 13-28.
- 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.
- ELLSTRAND, N. C., AND D. R. ELAM. 1993. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24: 217-242.
- 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.
- FRANKHAM, R. 1995. Effective population size/adult population size ratios in wildlife: a review. *Genetics Research* 66: 95-107.
- FRANKHAM, R. 2005. Genetics and extinction. *Biological Conservation* 126: 131-140.
- FRANKHAM, R. 2010. Where are we in conservation genetics and where do we need to go? *Conservation Genetics* 11: 661-663.
- FRANKHAM, R., J. D. BALLOU, K. RALLS, M. ELDRIDGE, M. R. DUDASH, C. B. FENSTER, R. C. LACY, AND P. SUNNUCKS. 2017. Genetic management of fragmented animal and plant populations. Oxford University Press.
- FRANKHAM, R., C. J. BRADSHAW, AND B. W. BROOK. 2014. Genetics in conservation management: revised recommendations for the 50/500 rules, Red List criteria and population viability analyses. *Biological Conservation* 170: 56-63.
- FRANKLIN, I. R. 1980. Evolutionary change in small populations. *Conservation Biology - An evolutionary-ecological perspective*. Sinauer Associates, U.S.A., Sunderland, Massachusetts.
- HEANEY, L., D. BALETE, L. DOLAR, AND P. ONG. 1998. A Synopsis of the Mammalian Fauna of the Philippine Islands. *Fieldiana Zoology* 88: 1-61.
- HOBAN, S. M., H. C. HAUFFE, S. PÉREZ-ESPONA, J. W. ARNTZEN, G. BERTORELLE, J. BRYJA, K. FRITH, O. E. GAGGIOTTI, P. GALBUSERA, AND J. A. GODOY. 2013.

- Bringing genetic diversity to the forefront of conservation policy and management. *Conservation Genetics Resources* 5: 593-598.
- IUCN. 2022. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2022-2. <https://www.iucnredlist.org>. Accessed on 3 March 2023.
- JONES, O. R., AND J. WANG. 2010. COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Molecular ecology resources* 10: 551-555.
- JORDAN, S., J. J. GIERSCH, C. C. MUHLFELD, S. HOTALING, L. FANNING, T. H. TAPPENBECK, AND G. LUIKART. 2016. Loss of genetic diversity and increased subdivision in an endemic alpine stonefly threatened by climate change. *PloS one* 11: e0157386.
- 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.
- KALINOWSKI, S. T., AND R. S. WAPLES. 2002. Relationship of effective to census size in fluctuating populations. *Conservation Biology* 16: 129-136.
- KINGHORN, B. P. 2011. An algorithm for efficient constrained mate selection. *Genetics Selection Evolution* 43: 1-9.
- KINJO, K., AND A. NAKAMOTO. 2015. The wild mammals of Japan. Shoukadoh Book Sellers.
- 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. *Molecular Ecology Resources* 15: 1179-1191.
- LIN, L. K., AND K. J.-C. PEI. 1999. On the current status of field population of Formosan flying fox (*Pteropus dasymallus formosus*). *Endemic Species Research* 1: 12-19.
- MCCONKEY, K. R., AND D. R. DRAKE. 2006. Flying foxes cease to function as seed dispersers long before they become rare. *Ecology* 87: 271-276.
- MCMAHON, S. M., S. P. HARRISON, W. S. ARMBRUSTER, P. J. BARTLEIN, C. M. BEALE, M. E. EDWARDS, J. KATTGE, G. MIDGLEY, X. MORIN, AND I. C. PRENTICE. 2011. Improving assessment and modelling of climate change impacts on global terrestrial biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution* 26: 249-259.

- MICKLEBURGH, S. P., A. M. HUTSON, AND P. A. RACEY. 1992. Old World fruit bats. An action plan for their conservation. Gland, Switzerland: IUCN 263.
- MILLER, C. R., AND L. P. WAITS. 2003. The history of effective population size and genetic diversity in the Yellowstone grizzly (*Ursus arctos*): implications for conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 4334-4339.
- 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.
- NATESH, M., R. W. TAYLOR, N. K. TRUELOVE, E. A. HADLY, S. R. PALUMBI, D. A. PETROV, AND U. RAMAKRISHNAN. 2019. Empowering conservation practice with efficient and economical genotyping from poor quality samples. *Methods in Ecology and Evolution* 10: 853-859.
- NORMAN, A. J., AND G. SPONG. 2015. Single nucleotide polymorphism-based dispersal estimates using noninvasive sampling. *Ecology and Evolution* 5: 3056-3065.
- PEREIRA, H. M., S. FERRIER, M. WALTERS, G. N. GELLER, R. JONGMAN, R. J. SCHOLES, M. W. BRUFORD, N. BRUMMITT, S. BUTCHART, AND A. CARDOSO. 2013. Essential biodiversity variables. *Science* 339: 277-278.
- PIRY, S., A. ALAPETITE, J.-M. CORNUET, D. PAETKAU, L. BAUDOUIN, AND A. ESTOUP. 2004. GENECLASS2: a software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity* 95: 536-539.
- POLECHOVÁ, J., AND N. H. BARTON. 2015. Limits to adaptation along environmental gradients. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112: 6401-6406.
- PRITCHARD, J. K., M. STEPHENS, AND P. DONNELLY. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- RANNALA, B., AND J. L. MOUNTAIN. 1997. Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94: 9197-9201.
- RITLAND, K. 1996. Estimators for pairwise relatedness and individual inbreeding coefficients. *Genetics Research* 67: 175-185.
- SAITOH, 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.

- SOULÉ, M. 1980. Thresholds for survival: maintaining fitness and evolutionary potential. In: SOULÉ, M., AND WILCOX B. (eds.), Conservation biology: an evolutionary-ecological perspective (pp. 151-169). Oxford University Press.
- STOFFEL, M., E. HUMBLE, A. PAIJMANS, K. ACEVEDO-WHITEHOUSE, B. L. CHILVERS, B. DICKERSON, F. GALIMBERTI, N. J. GEMMELL, S. GOLDSWORTHY, AND H. NICHOLS. 2018. Demographic histories and genetic diversity across pinnipeds are shaped by human exploitation, ecology and life-history. *Nature Communications* 9: 1-12.
- 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.
- VINCENOT, C. E., A. M. COLLAZO, AND D. RUSSO. 2017. The Ryukyu flying fox (*Pteropus dasymallus*)—A review of conservation threats and call for reassessment. *Mammalian Biology* 83: 71-77.
- WAPLES, R. S., AND C. DO. 2008. LDNE: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Resources* 8: 753-756.
- WU, H.-W., D.-J. LU, C.-L. LIN, H.-C. CHENG, C.-H. JUAN, T.-J. SHEN, H.-C. LIN, AND S.-F. CHEN. 2022. Population and conservation status of the flying fox *Pteropus dasymallus* in Taiwan. *Zoological Studies* 61.
- YOSHIYUKI, M. 1989. A systematic study of the Japanese Chiroptera. National Science Museum Monographs 7: 1-242.
- ZARZOSO-LACOSTE, D., P.-L. JAN, L. LEHNEN, T. GIRARD, A.-L. BESNARD, S. J. PUECHMAILLE, AND 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.

附錄、野外調查照片



龜山島環湖步道採樣地點周遭環境



五月份日間於 401 步道觀察到一隻吊掛在樹上的狐蝠個體



環湖步道的新鮮狐蝠排遺



採集狐蝠的食渣，挑選未被雨淋濕及咀嚼程度較高的採集



於毛柿步道採集食渣



於環湖步道涼亭周邊採集到的食渣



於毛柿步道入口架設霧網捕捉狐蝠



於毛柿步道入口架設霧網捕捉狐蝠



於龜山國小前架設網具



研究人員架設霧網捕捉狐蝠，將網具固定在周圍樹幹



捕捉到一隻亞成個體，將其繫上指環，編號 BATTW000014，並貼上綠螢光標籤



亞成體的陰莖及睪丸



調查人員將中網的狐蝠解下



捕捉到一隻右眼疑似失明、無法全開的狐蝠，為去（2021）年八月曾捕捉過的雄性個體(TW_G_46)



雌性個體腹面照



今年曾育幼之雌蝠，乳頭偏黑且週邊毛髮稀疏



研究人員將測量後的狐蝠個體一一放在樹上，待其自行飛離



已完成測量標記，懸掛於蒲葵樹上，待其自行飛離的個體