

公開

密件、不公開

執行機關(計畫)識別碼：110103e305

行政院農業委員會林務局九十五年度科技計畫研究報告

資訊庫編號：953328

計畫名稱：台灣高山地區小型哺乳類遺傳多樣性之研究：黑腹絨鼠與高山田鼠之親緣地理學研究(II) (第2年/全程4年)

(英文名稱) **Genetic diversity of small mammals in high mountain of Taiwan: Phylogeography of *Eothenomys melanogaster* and *Microtus kikuchii* (II)**

計畫編號：95農科-11.1.3-務-e3(5)

全程計畫期間：94年1月1日至97年12月31日

本年計畫期間：95年6月26日至95年12月31日

計畫主持人：林良恭

執行機關：私立東海大學

合作機關：私立亞洲大學

台灣高山地區小型哺乳類遺傳多樣性之研究：黑腹絨鼠與高山田鼠之親緣地理學研究 (II)

Genetic diversity of small mammals in high mountains of Taiwan: Phylogeography of *Eothenomys melanogaster* and *Microtus kikuchii*

林良恭 張育誠 吳榮笙 朱巧雯
東海大學生命科學系

中文摘要

台灣高山生態系是台灣地區生物多樣性最豐富的場所，不但特有比例高且是野生動物保護的重要區域。然高聳的山脈對島上的生物族群擴散形成極大的阻隔，物種可能受到不同山系間的山谷或是分布在山脈中不同的河系所形成的深蝕河谷阻礙，導致無法在各山系間進行擴散而形成被隔離的族群。因此探討高山島嶼對棲地、物種及基因的影響為當今生物多樣性保育研究的重要課題。倉鼠科 (Cricetidae) 為溫帶型小型鼠類，台灣高山地區共分佈有兩種即黑腹絨鼠 (*Eothenomys melanogaster*) 與高山田鼠 (*Microtus kikuchii*)，分布於海拔2000公尺~3500公尺山區。本研究即檢視此兩種田鼠類之細胞遺傳建立個體核型資料，及分析粒線體及核DNA分子序列差異並建立台灣高山山系區域族群之親緣地理關係，以瞭解台灣高山生態系對生物多樣性遺傳多樣性之影響。黑腹絨鼠於18個採集地點捕獲樣本83隻，高山田鼠7個採集地點共103隻。台灣黑腹絨鼠族群可分為兩核型群，差異在於X染色體的形狀，一群X染色體為acrocentric，另一群為submetametric，呈南北分群現象；DNA分子資料顯示 *cytb*、*IRBP* 及 *G6pd* 此三段不同的基因獲得的序列資訊，所建構的親緣關係樹型亦支持台灣黑腹絨鼠南北分群現象。台灣黑腹絨鼠南北群親緣關係為monophyly，起源相同自同一祖先族群分化出。高山田鼠Conventional核型於合歡山及阿里山個體並無發現任何染色體上的變異，以DNA粒線體控制區部分序列所建構出的親緣關係樹，其樹型結構上可分為南北兩群，且來自相同採集點的個體自成小群 (subclade)，顯示高山田鼠不同山頂的族群間可能受到隔離而產生遺傳分化。另外，*Microtus* 屬 *M. montebelli*、*M. oeconomus* 之11個微隨體基因座適用於台灣高山田鼠。

【關鍵字】黑腹絨鼠 (*Eothenomys melanogaster*)、高山田鼠 (*Microtus kikuchii*)、親緣地理、遺傳分化

英文摘要

High mountains have been constituted the specific ecosystems in Taiwan. It is inhibiting the higher species diversity and the important sites of biological resources. However, the high mountain range and a number of deep valleys may have interrupted the interactions among animal populations. The information of the habitats, species and genetic differentiation among the conspecific isolating populations should be necessarily studied for biodiversity conservation. Two species of Criticidae inhabit in the high mountain areas with altitudes 2000 to 3500 meter, i.e. *Eothenomys melanogaster* and *Microtus kikuchii*. It provides the best study materials for understanding the genetic structures of animals living in the mountain islands. The objectives of this study are to determine population genetic differentiation based on karyotypes, mitochondrial, and nuclear DNA sequences. Eighty-three *E. melanogaster* were captured in 18 localities and 103 *M. kikuchii* were captured in 7 localities. The population of *E. melanogaster* was divided into Southern and Northern groups due to the different karyotypes: acrocentric and submetametric X chromosome. This result was also supported by the phylogenetic trees constructed of *cytb*, *IRBP*, and *G6pd* gene. These 2 groups differentiated monophyly, derived from a common ancestor. There was no variation in conventional karyotypes of *M. kikuchii* between Hehuan Mountain and Alishan. The phylogenetic tree constructed by mitochondrial DNA control region segment showed 2 phylogroups and samples from the same localities were grouped into several subclades. It suggested that populations of *M. kikuchii* from different peak were differentiated by isolation. In addition, 11 microsatellite loci of *M. montebelli* and *M. oeconomus* in genus *Microtus* were used to genotype in *M. kikuchii*.

【Key Words】 *Eothenomys melanogaster* · *Microtus kikuchii* · Phylogeography · Genetic diversification

前言

動物族群的分布與擴散常會受到地理或生態因素的限制。地理因素的限制有山脈、河川、海洋等，而生態因素的限制有棲地的要求與選擇 (Alexandrino *et al.* 2000)。被隔離於不同地區的族群的基因交流 (gene flow) 被阻斷，將造成遺傳上的隔離 (genetic isolation)，當隔離的機制維持的時間夠長，足以產生及累積足夠的變異，可能達到生殖隔離 (reproductive isolation) 形成不同的物種，這就是異域種化 (allopatric speciation) 的過程 (Avice 2000; Ehinger *et al.* 2002)。台灣本島可分為高山及低地兩生物地理區，古北區或喜馬拉雅山區的動物多分布於台灣的高海拔山區，這些北方區系的物種應是在冰河南進時期播遷來台，當氣候變暖冰河北退後，這些物種便只能侷限分布於台灣較高海拔地區；而低海拔則多為熱帶地理區系的生物，於較近的地質年代播遷而來，最後一次冰河期約在一萬年前至六萬年前。這些播遷而來台的生物是否因海洋隔離而促成了物種的特化，形態學的比較證據常時有爭議。另外，台灣是一個多山的島嶼，海拔 1500 以上的山區就佔據了全島面積的三分之二，高聳的中央山脈對島上的生物族群擴散亦造成影響。對於低海拔物種而言，中央山脈形成了東西向基因交流的阻隔，使得東部族群與西部族群產生遺傳分化現象，例如澤蛙 (*Rana limnocharis*) (Toda *et al.* 1998)、莫氏樹蛙 (*Rhacophorus moltrechti*) (葉 1997)、斯文豪氏攀蜥 (劉 1995)。但是對於分布在中高海拔的物種而言，中央山脈所造成的影響便與低海拔物種不同了，這些物種可能受到不同山系間的山谷或是分布在中央山脈中不同的河系所形成的深蝕河谷阻礙，導致無法在各山系間進行擴散而形成被隔離的族群 (Yu 1995)，或因冰河期形成避難所的位置不同，後來交流被阻 (Yuan *et al.*, 2006)。

近年來，分子標記 (molecular marker) 被廣泛的應用在族群遺傳結構及地理親緣關係的研究上 (Avice 2000; Polly 2001)，常被使用來研究族群遺傳結構的分子標記有：同功異構酶 (allozyme)、核 DNA 及胞器 DNA (粒線體 DNA 或葉綠體 DNA) 的片段長度或序列，及微衛星體 (microsatellite) 等 (Avice 2000)，其中的粒線體 DNA (mitochondrial DNA, 簡稱 mtDNA) 廣泛用於研究相近物種間或同種內族群間之親緣關係研究 (Baker 2000)。因此本研究針對兩種生活於中高海拔的倉鼠科 (Cricetidae) 種類，即黑腹絨鼠 (*Eothenomys melanogaster*) 與高山田鼠 (*Microtus kikuchii*) 探討其遺傳結構與親緣地理，來檢視其隔離現象與物種特化的可能性。

黑腹絨鼠因為全身披覆柔軟細密似天鵝般的絨毛、又稱天鵝絨毛鼠，分布可從 1400 至 3000 公尺的中、高海拔山區，但僅侷限分佈於地表植被較縝密、土質鬆軟且潮濕的棲地環境中，故族群數量於多數地區並不高。本種在中國大陸如四川、湖南、福建等數個省份亦有分布，且亞種分化目前研究指出有 6 亞種之多。(Luo *et al.* 2004)。高山田鼠為台灣特有種，亦為廣佈於新、舊大陸的田鼠屬 (*Microtus*) 中分佈最南方的種類，主要分佈於海拔 2500 公尺以上的箭竹草原、針葉林、針闊葉混合林與灌叢。本種為箭竹草原區的優勢種，為食植性，以嫩葉、種籽或玉山箭竹的竹筍為食。

本計畫為四年期，研究內容包括（一）細胞遺傳研究建立個體核型資料，並透過已知相近似外群物種核型資料之比對，瞭解台灣二種高山鼠類染色體核型演化的關係。（二）以粒線體及核 DNA 的分子標記，建立各段基因序列資訊資料庫，進而比對台灣各高山山系區域之遺傳距離與地理關係。（三）本研究將藉由比對相關近似物種同段基因上的異同，搭配地質歷史資料，探討族群自亞洲大陸塊遷入的可能路徑，並針對不同南北基因型的黑腹絨鼠進行實驗室雜交實驗，測試物種分化的可能。（四）本研究將配合傳統型態學與分子資料，重新檢視台灣此兩種鼠類的分類地位。今日，生物多樣性的保存是保育工作的重心所在，而台灣的山地生態體系是本土物種多樣性薈聚的熱點（hot spot）。本研究將就生物多樣性的保育架構中，探討台灣高山地區小型哺乳類群的基因庫時空變化，並就人為干擾對環境影響，提出台灣高山生態系的保育對策。本報告為綜合前二項及部分第三項研究之成果。

材料方法

（一）樣本採集

以中（3x3.5x9"）或小型（2"x2.5"x6.5"）薛爾曼式活捉捕鼠器（Sherman live trap, H. B. Sherman Traps, Inc., USA），內置適度大小沾有花生醬的地瓜塊為誘餌進行全島各地捕捉，每調查地區放置 80~100 個捕鼠器，每次進行 2~4 個捕捉夜調查。本研究迄今共計捕獲台灣黑腹絨鼠樣本 84 隻，另外亦取得大陸四川黑腹絨鼠 11 隻與同屬不同種之中華絨鼠 *E. chinensis* 6 隻以及自日本取得之 *E. smithii* 1 隻（附錄 1）。高山田鼠共採集 103 隻，除野外採集捕捉高山田鼠樣本外，亦申請美國加州柏克萊大學博物館館藏台灣高山田鼠的冷凍組織樣本（樣本編號 MK033 至 MK106）（附錄 2）。另外，於南投縣仁愛鄉合歡山地區太魯閣國家公園內玉山箭竹（*Yushania nittakayamensis*）草原（北緯 24° 08 36.4 東經 121° 17 17.4）設置 1 個正方形的 4 公頃樣區（200×200 公尺），樣區呈東西走向，坡度為 45 度，海拔為 3088 公尺，進行長時間族群的研究。

（二）分子研究

1. 染色體核型分析

依 Harada and Yoshida (1978) 的細胞培養方法，以滅菌消毒過的解剖工具剪取約五分之一的耳殼、三分之一根趾頭、0.5 克內臟器官（以肺葉為主）或 0.5 公分長的尾骨，置入 75% 酒精 3~5 秒消毒，隨後移入 Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) 溶液進行細胞初期培養。初步培養的細胞隨後寄送日本大阪市立大學醫學部進行後續長期培養及傳統染色法 (Conventional staining) 染色體分析。藉由傳統染色法可觀察各對染色體含性染色體形態，並可計算其二倍體數目 (Diploid numbers, 2n) 及臂數 (fundamental numbers, FN)。各個體透過至少觀察 20 個間期 (metaphase) 細胞確定，依 Levan *et al.*, (1964) 命名各對染色體，並依其相對大小依序排列出核型。

2. DNA 萃取

以滅菌消毒過的解剖工具剪取約五分之一的耳殼或三分之一根趾頭，或肝臟、腎臟、肌肉少許組織，保存於內含 99.8%酒精的冷凍小管中，冷凍小管皆保存於-20 或-80°C 冰箱中。每個體取約 10~20 毫克 (mg) 組織，以 phenol/proteinase K/sodium dodecyl sulfate method (Sambrook *et al.*, 1989) 或以 Commercial DNA extraction kit (Tissue & Cell Genomic DNA Purification Kit, GeneMark, Co. Ltd., Taiwan) 萃取其體 DNA (genomic DNA)。

3. 分子標記選定

(1). 黑腹絨鼠

A. 粒線體 DNA 細胞色素 *b* (mitochondrial cytochrome *b*)

全段序列聚合酶鏈反應以引子組 (primer set) 進行序列增幅 (amplification)，引子序列如下所列，輕股 (light strand) Cb1 5'-GACATGAAAAATCATCGTTG-3' 和重股 (heavy strand) Cb2EM 5'-CTTTGATTGTGTAGTAGGGGTG-3'；輕股 Cb1EM 5'-GAGGAGGATTCTCAGTAGACAAAGC-3' 和重股 Cb2 5'-GTTTTTGGTTTACAAGACCAGAG-3'。以 GeneAmp® PCR System 2400 Thermal Cycler 機器 (Applied Biosystems, California, USA) 進行聚合酶鏈反應時，各個體依兩對引子組 (Cb1-Cb2EM 與 Cb2-Cb1EM) 分別進行聚合酶鍊反應，反應總體積皆為 50µl，其內包含 genomic DNA 100 ng，及一對引子組，各引子濃度為 25 pmol/L，200 µmol/L 的 dNTP，10 mmol/L Tris-HCL (pH 8.3)，50 mmol/L KCL，1.5 mmol/L MgCl₂，與 2.5 單位 (1U = 16.17 nkat) 的重組 *rTaq* DNA 聚合酶 (Takara Bio Inc., Otsu, Japan)。聚合酶反應程序設定時間第一步驟藉升溫至 94°C 反應 5 分鐘裂解 (denature) DNA 雙股螺旋結構，第二步驟以 94°C 解開 DNA 雙股螺旋 1 分鐘，降溫至 55°C 進行引子黏合 1 分鐘，再升溫至 72°C 進行 2 分鐘序列複製延伸 (extension)，重覆 35 次達成特定 DNA 片段的增幅，第三步驟最終延伸反應則以 72°C 持續 10 分鐘穩定黏合結構，PCR 反應完成產物最後皆冷藏於 4°C。為檢測 PCR 反應的效果，取各個體 PCR 產物 2.5µl，載注於 1.3% 洋菜膠 (agarose gel) 進行電泳 9~12 分鐘後，再將洋菜膠片以溴化乙炔 (Ethidium Bromide, EtBr) 染色，然後以紫外燈光源照射來判斷合成產物 DNA 片段的約略長度 (700~800 bp) 及濃度，若 PCR 產物的 DNA 片段長度與濃度符合預期與定序需求，則以純化試劑組 (PCR Clean Up-M Kit, Viogene, Taiwan) 純化 PCR 產物。定序則採用自動定序儀 (ABI PRISM™ 3730 XL DNA Analyzer, Applied Biosystems, California, USA)，以試劑組 (ABI PRISM™ BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, V3.1, Applied Biosystems, California, USA) 及兩段互補股的引子 (Cb1EM 及 Cb2EM) 來進行。PCR 產物純化與基因片段定序的步驟皆由明欣生物科技股份有限公司 (Mission Biotech Co. Ltd., Taipei, Taiwan) 執行。

B. 核基因 (Nuclear DNA)

a. 視網膜感光細胞間視黃醇類結合蛋白 (interphotoreceptor retinoid binding protein, *IRBP*) exon 1 序列

聚合酶鏈反應以下列引子組進行序列增幅，引子序列分別如下，輕股 P217

5 -ATGGCCAAGGTCCTCTTGGATAACTACTGCTT-3 和重股P1531

5 -CGCAGGTCCATGATGAGGTGCTCCGTGTCCTG-3 聚合酶鏈反應的各成分濃度與進行Cyt *b* DNA片段增幅時相同。PCR設定反應過程程序設定時間如下，第一步驟藉升溫至94°C反應5分鐘解開DNA雙股螺旋結構，第二步驟以94°C持續DNA雙股螺旋解開狀態1分鐘，降溫至70°C進行引子黏合及序列複製延伸3分鐘，重覆30次使特定DNA片段增幅，第三步驟最終延伸反應則以70°C持續10分鐘穩定黏合結構，PCR產物最後皆冷藏於4°C。所得PCR產物DNA片段約略長度(1300~1400 bp)，電泳檢測、純化與定序同Cyt *b*處理方式，惟定序時使用引子P217及P1531或引子(輕股P01F 5'-GTCCTCTTGGATAACTACTG-3'和重股P02R 5'-CAGGTCCATGATGAGGTGC-3') (張仕緯，未發表資料)進行定序反應。

b. 葡萄糖六磷酸脫氫酶 (glucose 6-phosphate dehydrogenase, G6pd)

intron 1序列

聚合酶鏈反應以 Iwasa and Suzuki (2002) 中使用的引子組進行序列增幅，引子序列為輕股 *G6pd-int1L* 5 -CAGATCTGTGAACGTGTTTGG-3 和重股 *G6pd-int1H* 5 -GGTACAACCTCTCCCTCAGG-3
G6pd 為 X 染色體連鎖基因，由於核 DNA 來自雙親，為避免此段基因上為異型合子 (Heterozygosity)，造成資料判讀上的困難，僅使用雄性個體進行聚合酶鏈反應。反應的各成分濃度與進行 Cyt *b* DNA 片段增幅時相同。設定程序同 Iwasa and Suzuki (2002)，反應時間如下，第一步驟藉升溫至 96°C 反應 5 分鐘解開 DNA 雙股螺旋結構，第二步驟以 96°C 持續 DNA 雙股螺旋解開狀態 0.5 分鐘，降溫至 56°C 進行引子黏合 0.5 分鐘，再升溫至 72°C 進行 0.5 分鐘序列複製延伸，重覆 35 次使特定 DNA 片段增幅，第三步驟最終延伸反應則以 72°C 持續 10 分鐘穩定黏合結構，PCR 產物最後皆冷藏於 4°C。合成產物基因片段約略長度(600~700bp)。電泳檢測、純化與定序同 Cyt *b* 處理方式，惟定序時僅以輕股引子 (*G6pd-int1L*) 進行定序反應。

(2) 高山田鼠

A. 粒線體 DNA

a. 細胞色素 *b* (mitochondrial cytochrome *b*)

本研究使用核酸引子: MVZ05

(5 -CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG-3) (Smith and Patton 1993) 及 VOLE14 (5 -TTTCATTACTGGTTTACAAGAC-3) (Conroy and Cook 1999) 進行聚合酶鏈反應，並以 MVZ05 及 ARVIC07

(5 -AAAGCCACCCTCACACGATT-3) (Conroy & Cook 1999) 定序。

b. 控制區域 D-loop

萃取得標本之 genomic DNA 後，利用 PCR 增幅粒線體 DNA 的控制區域片段。所使用的引子分別為：

L15933: (forward)

5 -CTCTGGTCTTGTAACCAAAAATG-3

H637: (reverse)

5 -AGGACCAAACCTTTGTGTTTATG-3

在實驗過程中爲了取得控制區域靠近 3 端的重複序列，且設計了一內切引子 (internal primer) CES1，其序列如下：5 -CGGCACATACCCCATTCAGTG-3。DNA 聚合酶鏈反應液的總體積爲 50 μ l，其中含有 0.24 μ l 的聚合酶 (Taq polymerase)，1 μ l genomic DNA 萃取液，5 μ l 的 10 倍緩衝液 (PCR buffer)，一對分別含 L15933 及 H637 引子的 25mM 溶液各 0.5 μ l，各爲 2.5mM 的 dATP、dGTP、dCTP、dTTP 的 dNTP 混合溶液 4 μ l，及滅過菌的一次蒸餾水 38.76 μ l。使用的 program 如下：Denature 94°C 1 分鐘，Annealing 54°C、1 分鐘，Extension 72°C 2 分鐘，進行 35 個循環。保存在 4°C 的冰箱中。取 PCR 增幅產物，利用 1% 洋菜膠片 (Agarose gel)，0.5× TAE buffer，以 100 伏特電壓進行電泳約 25 分鐘，再以溴化乙啶螢光染色劑 (EtBr) 染色，於紫外光燈下拍照並分析其片段長度及濃度。最後將 PCR 增幅產物以進行定序。

B. 微衛星體 DNA (Microsatellite DNA)

由於尙未有台灣高山田鼠專屬的 microsatellite DNA primer (微隨體基因引子)，但從染色體和 cytochrome-*b* 序列資料顯示 *Microtus montebelli*、*Microtus oeconomus* 和台灣高山田鼠親緣關係最相近 (Conroy & Cook 2000, Mekada *et al.* 2001)，本研究選擇從 *M. montebelli* (標本來源日本，Ishibashi *et al.* 1999) 和 *M. oeconomus* (標本來源荷蘭，Van de Zande *et al.* 2000) 所設計的微隨體基因引子，作爲解析台灣高山田鼠的分子標記。要利用爲上述 2 物種所設計微隨體基因座引子，必須測試這些引子是否可適用於台灣高山田鼠。先用 DNA purification kit (Epicentre) 來萃取台灣高山田鼠的左耳組織的 genomic DNA；再檢測這些引子從台灣高山田鼠的 DNA 增幅出片段來，然後找出小於 500 bp 的片段 (Schlötterer and Harr 2001)，切割下來後純化；接著進行 TA cloning，將特定的擴增片段接上載體 (vector, pCR[®]2.1-TOPO, Invitrogen) 放入勝任細胞 (competent cells, DH5 α) 中進行 TA cloning (Ohnishi *et al.* 1998)。挑出白色的菌落與 M13 forward 引子和 M13 reverse 引子進行聚合酶鏈反應 (polymerase chain reaction, PCR)；經過 94°C 10 分鐘後，接著 25 個循環，每個循環包含 94°C 1 分鐘、55°C 1 分鐘、72°C 1 分鐘；循環結束維持 72°C 10 分鐘然後於 4°C 保存；利用 2% agarose gel 在水平電泳槽中檢視其片段是否吻合原先切割純化的片段大小。

將片段大小吻合的質體進行定序 (ABI PRISM[™] 3730xl DNA Analyzer, Applied Biosystems, 明欣生物科技公司完成)。完整的序列則輸入 BioEdit 6.0.5 (Hall 1999) 軟體中檢視是否含有連續重複片段，並且檢驗是否微隨體基因兩端的保守片段保持著穩定不變。最後將可以使用的微隨體基因引子合成螢光引子 (FAM 和 HEX)，以便進行之後的 genotype 分析。利用以螢光標記的引子進行聚合酶鏈反應，每一樣本反應總體積爲 50 μ l，內含模版 DNA 0.6 μ l、每一 primer 各 1 μ l (25 mM)、5 μ l PCR buffer (10X)、0.6 μ l DNTP (10 mM)、0.6 μ l taq (Viogene) 和 41.2 μ l 的水。聚合酶鏈反應的產物以 ABI 310 genetic analyzer

(Applied Biosystems) 分析 (明欣生物科技公司完成)。個體的 genotype 以 Genotyper version 2.0 software (Applied Biosystems) 判定其對偶基因的大小。

結果與討論

(一) 黑腹絨鼠

1. 核型分析 (Karyotypic analysis)

總共來自 11 地點 26 隻 (雄性 13 隻; 雌性 13 隻) 的黑腹絨鼠進行核型分析。以傳統染色法獲得核型資料的發現, 其染色體對數為 28 對 ($2N=56$), 臂數為 56 ($FN=56$); 27 對體染色體形態中, 僅 1 對染色體形態為 metacentric, 其餘 26 對形態皆為 acrocentric。性染色體部分, Y 染色體形態為 acrocentric, 但 X 染色體則發現兩種不同的形態, 一為 submetacentric、另一為 acrocentric。台灣黑腹絨鼠族群內具有兩種不同形態的 X 性染色體核型群 (karyotypic races); 一為 acrocentric X 性染色體核型群、另一為 submetacentric X 性染色體核型群 (Fig. 1)。且地理分布上, 台灣北部 7 個採樣點僅發現 acrocentric X 性染色體核型群 (雄性 10 隻; 雌性 7 隻), 台灣南部 4 個採樣點僅發現 submetacentric X 性染色體核型群 (雄性 3 隻; 雌性 6 隻), 相同採樣地點未同時發現兩不同形態 X 性染色體核型群 (Fig. 2)。

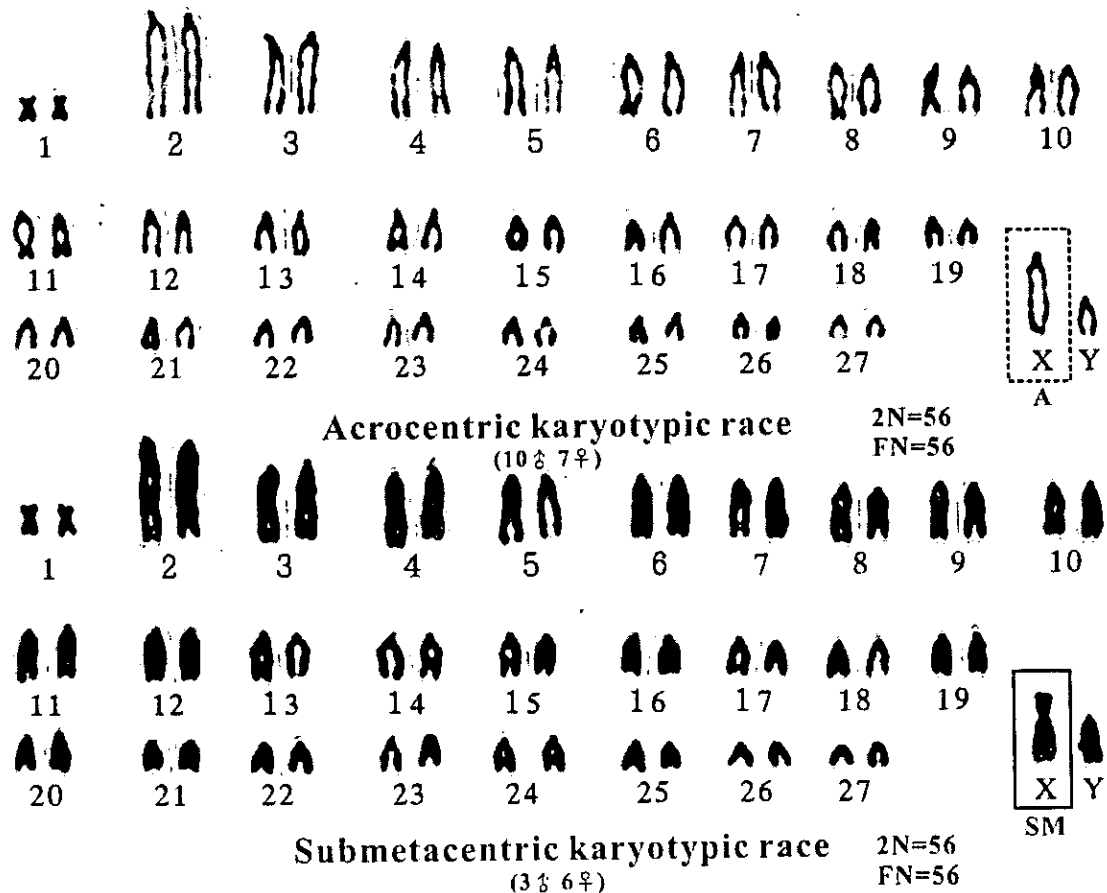


Fig. 1 台灣黑腹絨鼠 Conventional 核型。一為 acrocentric X 性染色體核型群、另一為 submetacentric X 性染色體核型群。

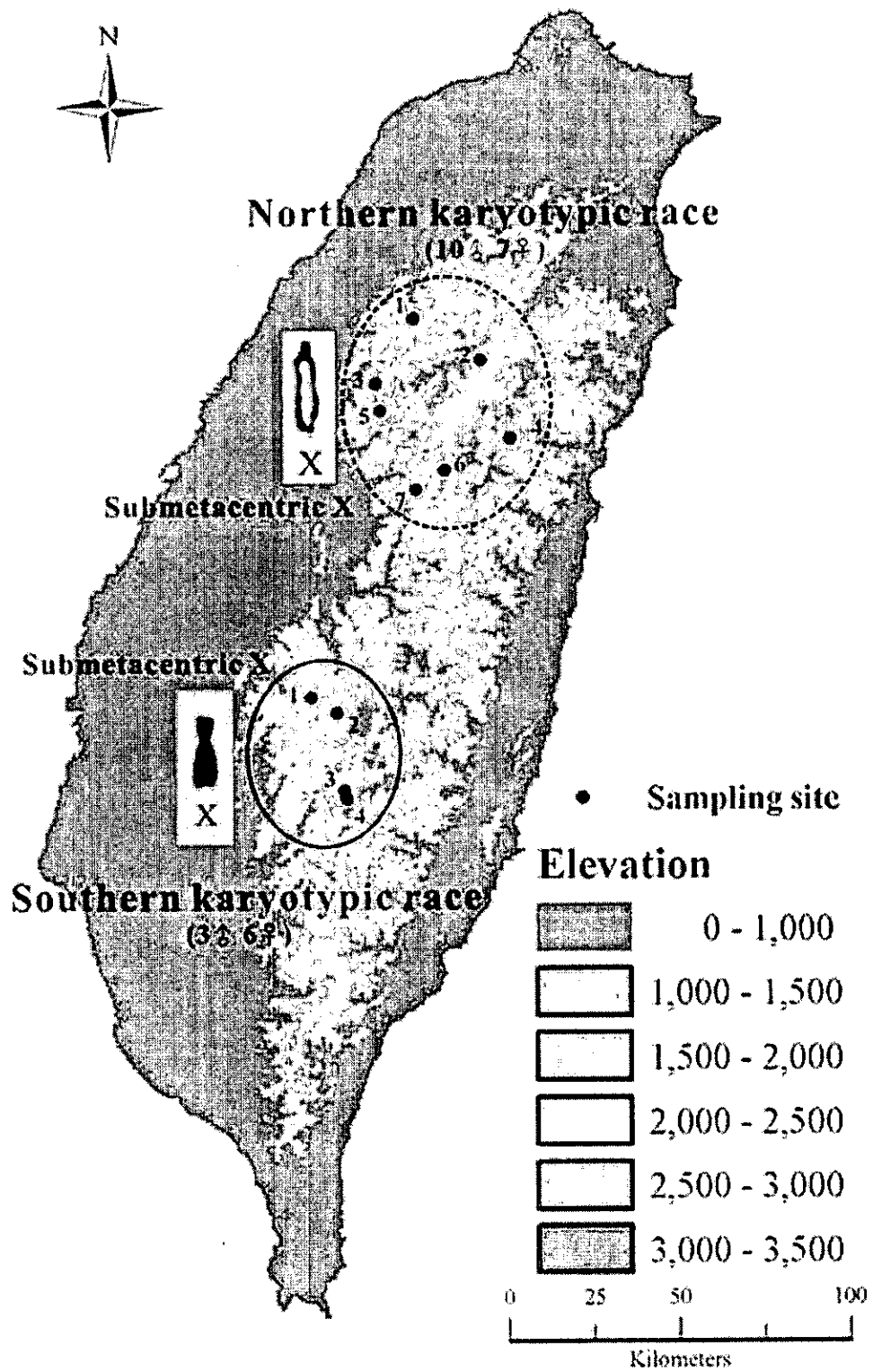


Fig. 2 黑腹絨鼠台灣北部 7 個地點皆屬於 Acrocentric X 性染色體核型，台灣南部 4 個地點個體皆屬於 submetacentric X 性染色體核型。

2. 分子資料 (Molecular data)

(1) 粒線體 DNA 細胞色素 *b* 序列 (mtDNA cyt *b* sequence)

本研究黑腹絨鼠樣本來自台灣 18 個地點與中國大陸四川 3 個地點，共完成 85 筆粒線體 DNA 細胞色素 *b* 全段序列 (1143 bp) 資料，共計發現 27 個單型 (haplotypes)，N1-N9、S1-S12、C1-C3 與 U1-U3。所有單型中總共發現 151 個變異位點 (variable sites)，其中 143 個為可區別位點 (Parsimony informative sites)。單型歧異性 (Haplotype diversity, Hd) 為 0.939，核酸差異平均數 (Average number of nucleotide differences, k , Tajima 1983) 為 35.005，核苷酸歧異性 (Nucleotide diversity, π) 為 0.03063。另外中華絨鼠 *E. chinensis* 樣本則來自中國四川峨嵋山 1 個地點，共 5 筆序列資料，共計發現 2 個單型，Ec1 與 Ec2。兩單型僅差異 2 個變異位點。單型多樣性為 0.400，核酸差異平均數為 35.005，核苷酸多樣性為 0.00070。

以 85 筆黑腹絨鼠與 5 筆中華絨鼠序列資料，另加入美國國家生物技術資訊中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 上之同屬 8 物種 17 個體序列資料，其中包含黑腹絨鼠 2 筆、滇絨鼠 *E. eleusis* 2 筆、大絨鼠 *E. miletus* 4 筆、克欽絨鼠 *E. cachinus* 1 筆、麗江絨鼠 *E. fidelis* 1 筆、西南絨鼠 *E. custos* 2 筆、昭通絨鼠 *E. olitor* 4 筆、玉龍絨鼠 *E. proditor* 1 筆。所有個體粒線體 DNA 細胞色素 *b* 全段序列資料，以最簡約法 (Maximum-Parsimony method)、鄰接法 (Neighbor-Joining method)、最大概似度法 (Maximum-Likelihood method) 和貝氏分析法 (Bayesian analysis) 建構親緣關係樹 (Fig. 3)。全部 90 個分析樣本於 4 個樹型結構 (Tree topology) 上皆可區分為 5 親緣系群 (Phylogroups)，5 親緣系群分別為台灣黑腹絨鼠南群 (單型 S1-S12，樣本數 34) 與北群 (單型 N1-N9，樣本數 40)、大陸黑腹絨鼠 (單型 C1-C3，樣本數 4)、由美國華盛頓國立自然歷史博物館 (USNM, The National Museum of Natural History) (單型 U1-U3，樣本數 7) 提供之大陸黑腹絨鼠，以及中華絨鼠 (Ec1 及 Ec2，樣本數 5)。另外，以程式 TCS 依 Statistical parsimony、95% 信賴區間內原則，進一步釐清黑腹絨鼠粒線體細胞色素 *b* 各單型間的網絡關係 (Network)。但台灣南、北群黑腹絨鼠與大陸四川黑腹絨鼠，此 3 群單型無法連結，故僅分別呈現樣本數較多的台灣黑腹絨鼠南群與北群網絡關係。台灣黑腹絨鼠南群 12 個單型 (S1-S12，樣本數 34) 網絡關係顯示 S7 為南群中的祖先型 (Ancestral form)，而 S7 與 S2 及 S8 形成迴圈 (loop)，S12 與其他單型差異較大 (Fig. 4)。台灣黑腹絨鼠北群 9 個單型 (N1-N9，樣本數 40) 網絡關係顯示 N5 為北群中的祖先型 (Ancestral form)，而 N5 與 N2、N3 及 N8 形成迴圈 (loop) (Fig. 5)。

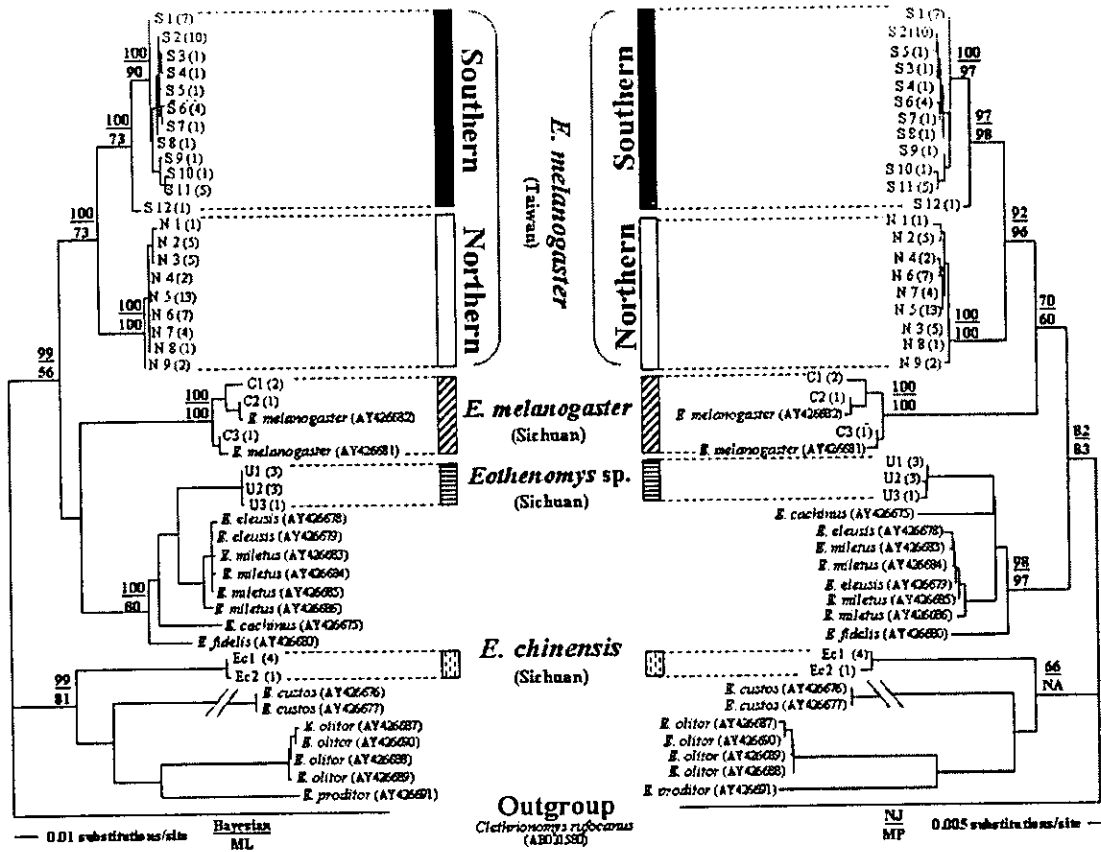


Fig. 3 依細胞色素 *b* 全段序列資訊以最簡約法、鄰接法、最大概似度法和貝氏分析法四種方法所建構之親緣關係樹型。樹型結構左邊以貝式分析法所建構之親緣關係樹，結點的數值分別代表貝式事後機率值（上值）及最大概似度法概似度值（下值）；右邊為鄰接法樹型圖，結點的數值分別代表鄰接法拔靴值（上值）及最簡約法拔靴值（下值）。S1-S12 為台灣黑腹絨鼠南群 12 個單型，N1-N9 台灣黑腹絨鼠北群 9 個單型，C1-C3 與 U1-U3 為大陸四川黑腹絨鼠 6 個單型。種名後有序號為自 NCBI 採用的資料。

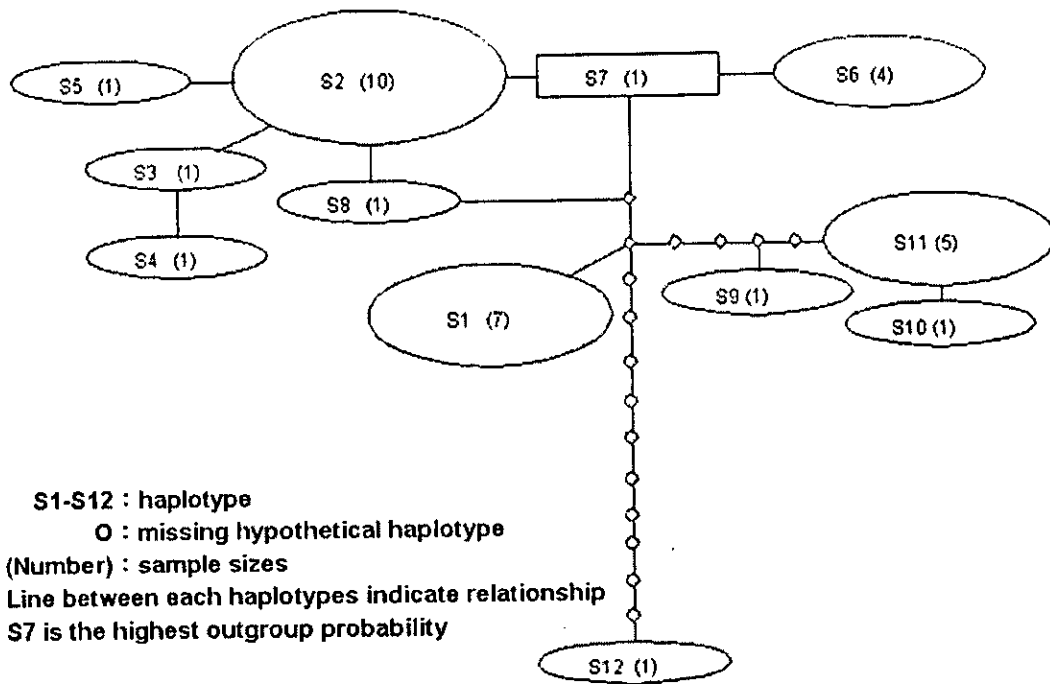


Fig. 4 台灣黑腹絨鼠南型細胞色素 *b* 所有單型 (S1-S12) 網絡關係圖 (Network)。

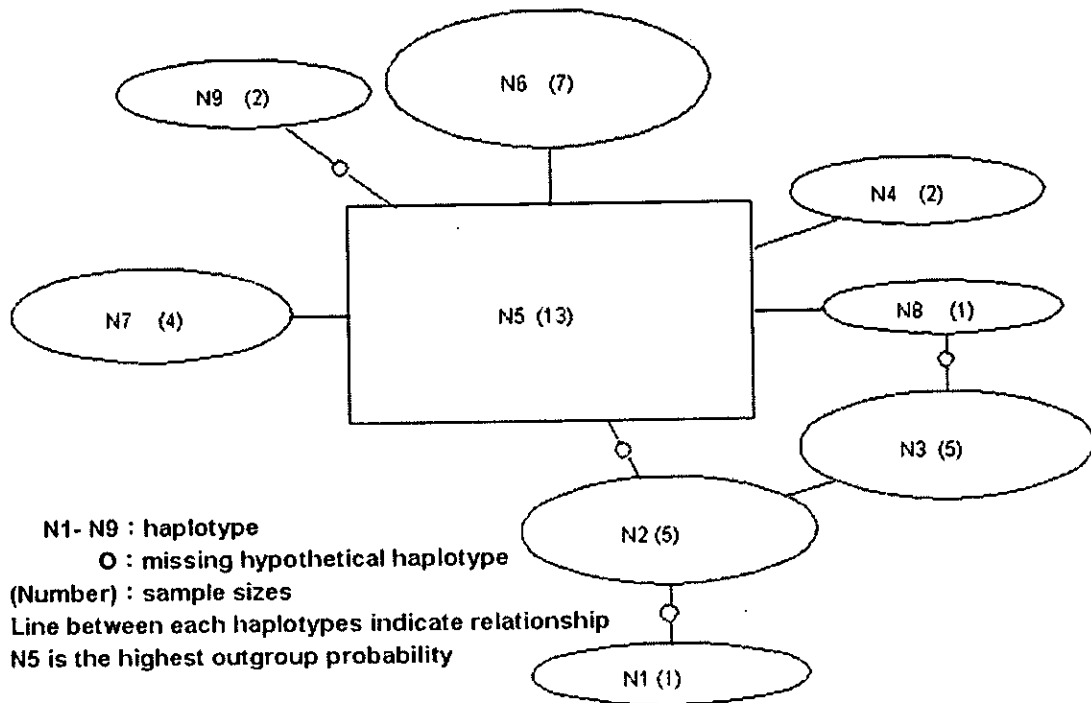


Fig. 5 台灣黑腹絨鼠北型細胞色素 *b* 所有單型 (N1-N9) 網絡關係圖 (Network)。

台灣黑腹絨鼠南、北兩群細胞色素**b**序列進行遺傳差異分析，結果顯示總變異的91.44%是由於台灣黑腹絨鼠南、北兩群的差異造成（統計值 Φ_{CT} ：0.91441， $p < 0.000001$ ），總變異的5.83%是由於南、北群內的各族群間差異造成（統計值 Φ_{SC} ：0.68059， $p < 0.000001$ ），總變異的2.73%是由於南、北族群內單型差異造成（統計值 Φ_{ST} ：0.97266， $p < 0.000001$ ）（Table 1），由此可視台灣黑腹絨鼠為明顯不同兩基因群。若加入中國大陸四川黑腹絨鼠族群與南、北兩群細胞色素**b**序列進行分析，結果顯示總變異的91.49%是由於黑腹絨鼠中國大陸四川族群與南、北群三群間的差異造成（統計值 Φ_{CT} ：0.91486， $p < 0.000001$ ），總變異的5.64%是由於三群內各族群間差異造成（統計值 Φ_{SC} ：0.66256， $p < 0.000001$ ），總變異的2.87%是由於三群族群內單型差異造成（統計值 Φ_{ST} ：0.97127， $p < 0.000001$ ），可接受將台灣黑腹絨鼠南、北群與中國大陸四川族群視為不同三群（Table 2）。

Table. 1 台灣黑腹絨鼠南、北兩群 18 個地點 74 個體之分子變異分析 (Analysis of molecular variance, AMOVA)

Group structure	Variance component	% of variation	<i>P</i>	Φ -statistics
Among Northern and Southern groups	19.72899	91.44%	< 0.000001	0.91441
Among populations within groups	1.25688	5.83%	< 0.000001	0.68059
Within populations	0.58988	2.73%	< 0.000001	0.97266

Table. 2 黑腹絨鼠大陸四川族群、台灣南與北三群 20 個地點 78 個體之分子變異分析 (Analysis of molecular variance, AMOVA)

Group structure	Variance component	% of variation	<i>P</i>	Φ -statistics
Among Sichuan, Northern, and Southern groups	21.87633	91.49%	< 0.000001	0.91486
Among populations within groups	1.34886	5.64%	< 0.000001	0.66256
Within populations	0.68697	2.87%	< 0.000001	0.97127

(2) 核 DNA, 視網膜感光細胞間視黃醇類結合蛋白 exon 1 部分序列 (nDNA *IRBP* exon 1 partial sequence)

本研究採用絨鼠屬中 3 物種的樣本，分別為黑腹絨鼠、中華絨鼠與 *E. smithii*。共完成黑腹絨鼠 63 筆視網膜感光細胞間視黃醇類結合蛋白 exon 1 部分

序列 (1260 bp) 資料，計發現 8 個單型，Ni1、Ni2、Si1、Si2、Ci1、Ci2、Ui1 與 Ui2。所有單型中總共發現 21 個變異位點，其中 19 個為可區別位點。單型歧異性 (Hd) 為 0.805，核酸差異平均數 (k, Tajima 1983) 為 5.677，核苷酸歧異性 (π) 為 0.00451。中華絨鼠樣本共完成 3 筆序列資料，僅發現 1 個單型 Eci。*E. smithii* 樣本則來自日本僅 1 筆序列資料，僅 1 單型 Eci。

63 筆黑腹絨鼠、3 筆中華絨鼠與 1 筆 *E. smithii* 序列資料，另加入美國國家生物技術資訊中心 (NCBI) 上之 2 物種，*Microtus sikimensis* 與 *Peromyscus maniculatus* 兩筆序列資料。所有個體視網膜感光細胞間視黃醇類結合蛋白 exon 1 部分序列，以最簡約法 (Maximum-Parsimony method)、鄰接法 (Neighbor-Joining method)、最大概似度法 (Maximum-Likelihood method) 和貝氏分析法 (Bayesian analysis) 建構親緣關係樹，全部 67 筆分析樣本於 4 個樹型結構 (Tree topology) 上皆可區分為 6 親緣系群 (Phylogroups)，分別為台灣黑腹絨鼠南群 (單型 Si1 與 Si2) 與北群 (單型 Ni1 與 Ni2)、大陸黑腹絨鼠 (單型 Ci1 與 Ci2)、由美國華盛頓國立自然歷史博物館 (USNM) 提供之大陸黑腹絨鼠 (單型 Ui1 與 Ui2)、中華絨鼠 (單型 Eci1) 與 *E. smithii* (單型 Esmi) (Fig. 6)。另外，以程式 TCS 依 Statistical parsimony、95% 信賴區間內原則，進一步釐清黑腹絨鼠視網膜感光細胞間視黃醇類結合蛋白 exon 1 各單型間的網絡關係 (Network) (Fig. 7)。結果顯示黑腹絨鼠所有單型可分為三個系群 (clade)，即台灣黑腹絨鼠南、北群與中國大陸四川族群。南群及北群內兩單型僅差異一個核苷酸取代，且為同義取代 (synonymous substitution)。而南群單型 Si1 與北群單型 Ni1 間則差異 6 個核苷酸取代，其中 4 個為非同義取代 (nonsynonymous substitution)，2 個同義取代 (synonymous substitution)。南群與大陸四川黑腹絨鼠族群的核苷酸差異少於北群與四川黑腹絨鼠族群的核苷酸差異。

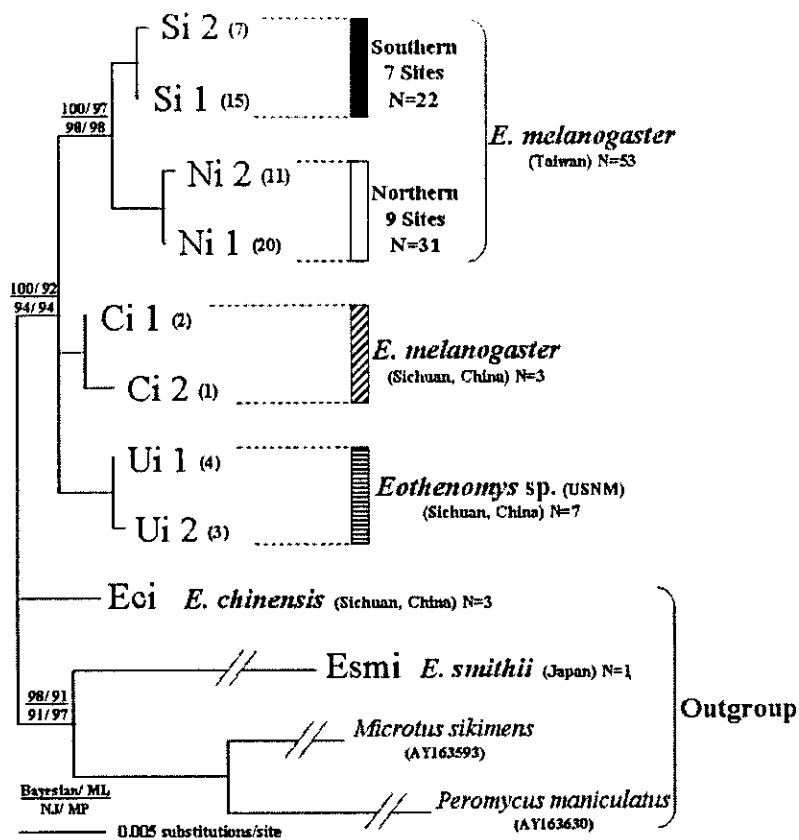


Fig. 6 依 *IRBP* exon1 部分序列資訊以最簡約法、鄰接法、最大概似度法和貝氏分析法四種方法所建構之親緣關係樹型。樹型結構以 ML 樹型呈現，結點的數值分別為貝式事後機率值（左上），最大概似度法概似度值（右上），鄰接法拔靴值（左下），最簡約法拔靴值（右下）。Si1 與 Si2 為台灣黑腹絨鼠南群單型，Ni1 與 Ni2 為台灣黑腹絨鼠北群單型，Ci1 與 Ci2 為四川黑腹絨鼠單型，Eci 為中華絨鼠單型，Esmi 為 *E. smithii* 單型。種名後有序號為自 NCBI 採用的資料。

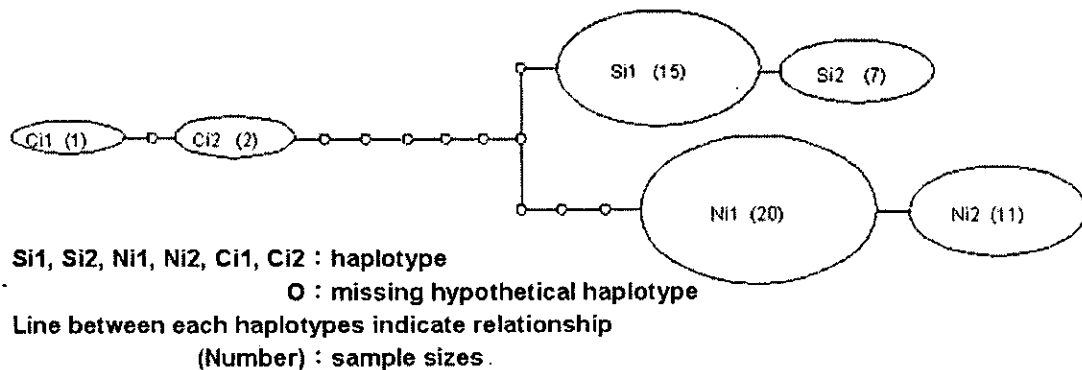


Fig. 7 黑腹絨鼠大陸四川族群（Ci1 與 Ci2）、台灣南（Si1 與 Si2）與北群（Ni1 與 Ni2）視網膜感光細胞間視黃醇類結合蛋白 exon 1 所有單型網絡關係圖（Network）。

(3) 核 DNA, X 染色體連鎖基因, 葡萄糖六磷酸脫氫酶 intron 1 部分序列 (nDNA, X-link *G6pd* intron 1 partial sequence)

本研究採用絨鼠屬中 2 物種樣本, 分別為黑腹絨鼠與中華絨鼠。共完成 49 筆葡萄糖六磷酸脫氫酶 intron 1 部分序列 (579 bp 與 574 bp) 資料, 共計發現 4 個單型, Ng、Sg、Ug (三個單型序列長度皆為 579 bp) 與 Cg (因具有 5 個 gap, 故序列長度為 574 bp)。所有單型中總共發現 4 個變異位點, 皆為可區別位點。單型歧異性 (Hd) 為 0.675, 核酸差異平均數 (k, Tajima 1983) 為 1.520, 核苷酸歧異性 (π) 為 0.00265。中華絨鼠樣本完成 2 筆序列資料, 僅發現 1 個單型 Ecg (序列長度為 560 bp)。

49 筆黑腹絨鼠與 2 筆中華絨鼠, 另加入美國國家生物技術資訊中心 (NCBI) 上絨鼠屬中 3 個物種 8 筆序列資料, 其中包含 *E. regulus* 1 筆、*E. smithii* 3 筆與 *E. andersoni* 4 筆, 鼠平屬 (Genus: *Clethrionomys*) 中 2 個物種 4 筆序列資料與田鼠屬 (Genus: *Microtus*) *Microtus montebelli* 1 筆序列資料。所有葡萄糖六磷酸脫氫酶 intron 1 部分序列資料, 以最簡約法 (Maximum-Parsimony method)、鄰接法 (Neighbor-Joining method)、最大概似度法 (Maximum-Likelihood method) 和貝氏分析法 (Bayesian analysis) 建構親緣關係樹, 全部 51 筆分析樣本於 4 個樹型結構 (Tree topology) 上皆可區分為 4 親緣系群 (Phylogroups) (Fig. 8), 4 親緣系群分別為台灣黑腹絨鼠南群與北群 (單型 Sg 與 Ng)、大陸黑腹絨鼠 (單型 Cg)、由美國華盛頓國立自然歷史博物館 (USNM) 提供之大陸黑腹絨鼠 (單型 Ug) 與中華絨鼠 (單型 Ecg)。另外, 以程式 TCS 依 Statistical parsimony、95% 信賴區間內原則, 進一步釐清黑腹絨鼠葡萄糖六磷酸脫氫酶 intron 1 部分序列各單型間的網絡關係 (Network) (Fig.9)。結果顯示台灣黑腹絨鼠南群及北群兩單型僅差異 2 個核苷酸取代, 且南群與大陸四川黑腹絨鼠族群的核苷酸差異少於北群與四川黑腹絨鼠族群的核苷酸差異。

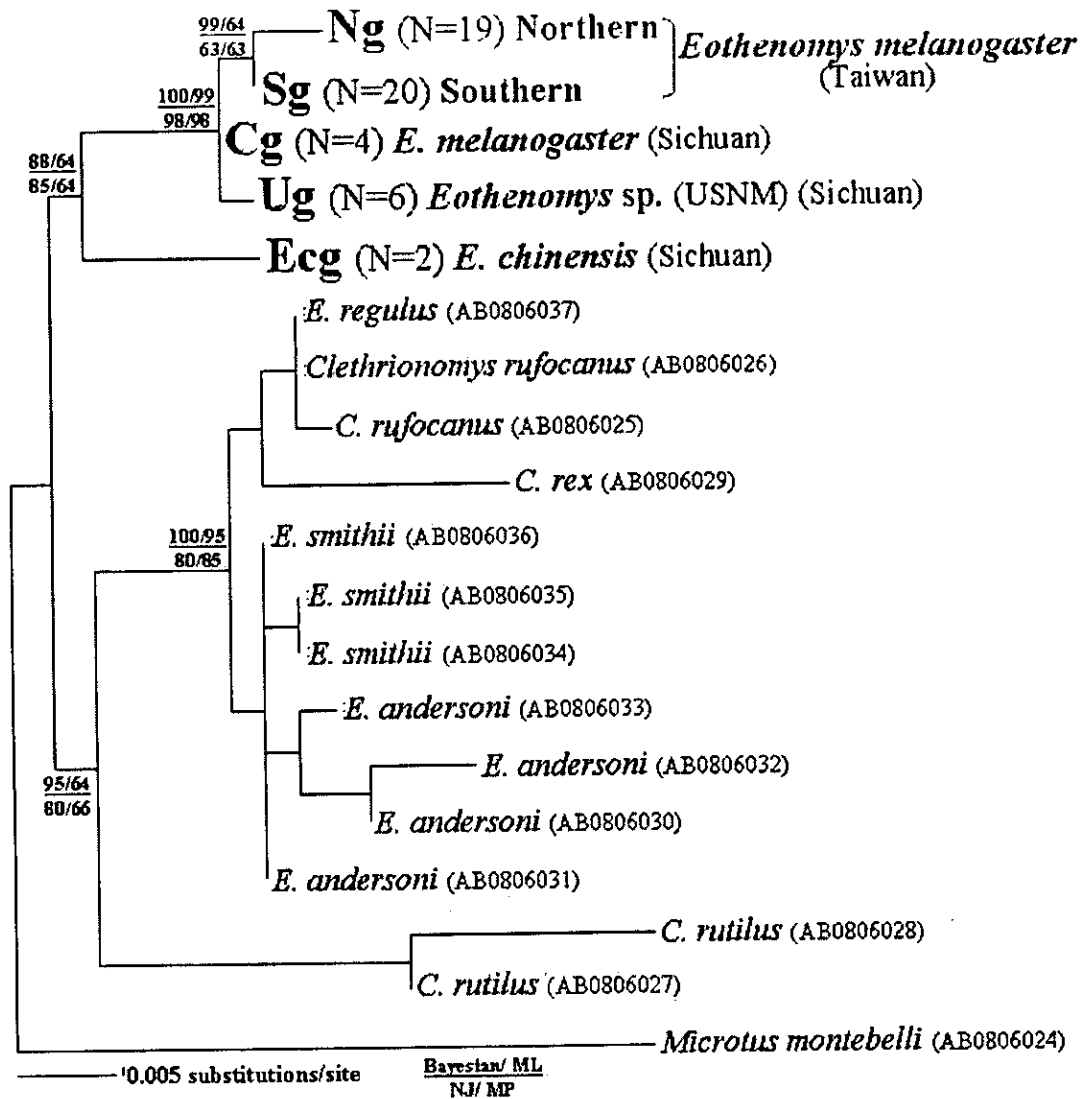
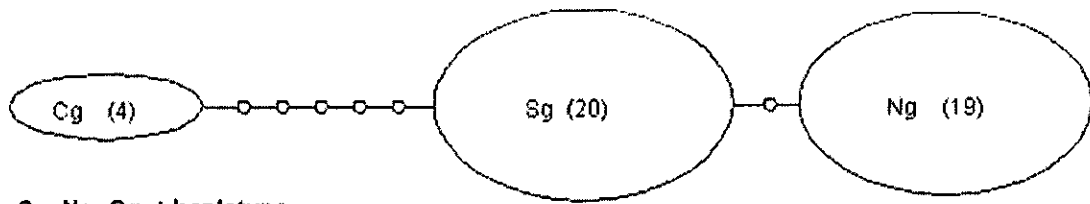


Fig. 8 *G6pd* intron1 部分序列以最簡約法、鄰接法、最大概似度法和貝氏分析法四種方法所建構之親緣關係樹型。樹型結構以 ML 樹型呈現，結點的數值分別為貝式事後機率值（左上），最大概似度法概似度值（右上），鄰接法拔靴值值（左下），最簡約法拔靴值值（右下）。Ng 為黑腹絨鼠北群單型，Sg 為黑腹絨鼠南群單型，Cg、Ug 為大陸四川黑腹絨鼠單型，Ecg 為中華絨鼠單型。種名後有序號為自 NCBI 採用的資料。



Sg, Ng, Cg : haplotype
 O : missing hypothetical haplotype
 Line between each haplotypes indicate relationship
 (Number) : sample sizes

Fig. 9 黑腹絨鼠大陸四川族群 (Cg)、台灣南 (Sg) 與北群 (Ng) 葡萄糖六磷酸脫氫酶 intron 1 部分序列各單型間的網絡關係 (Network)。

(二) 高山田鼠

1. 核型分析 (Karyotypic analysis)

高山田鼠 Conventional 核型，比對採自合歡山及阿里山個體並無發現任何染色體上的變異 (Fig. 10)。

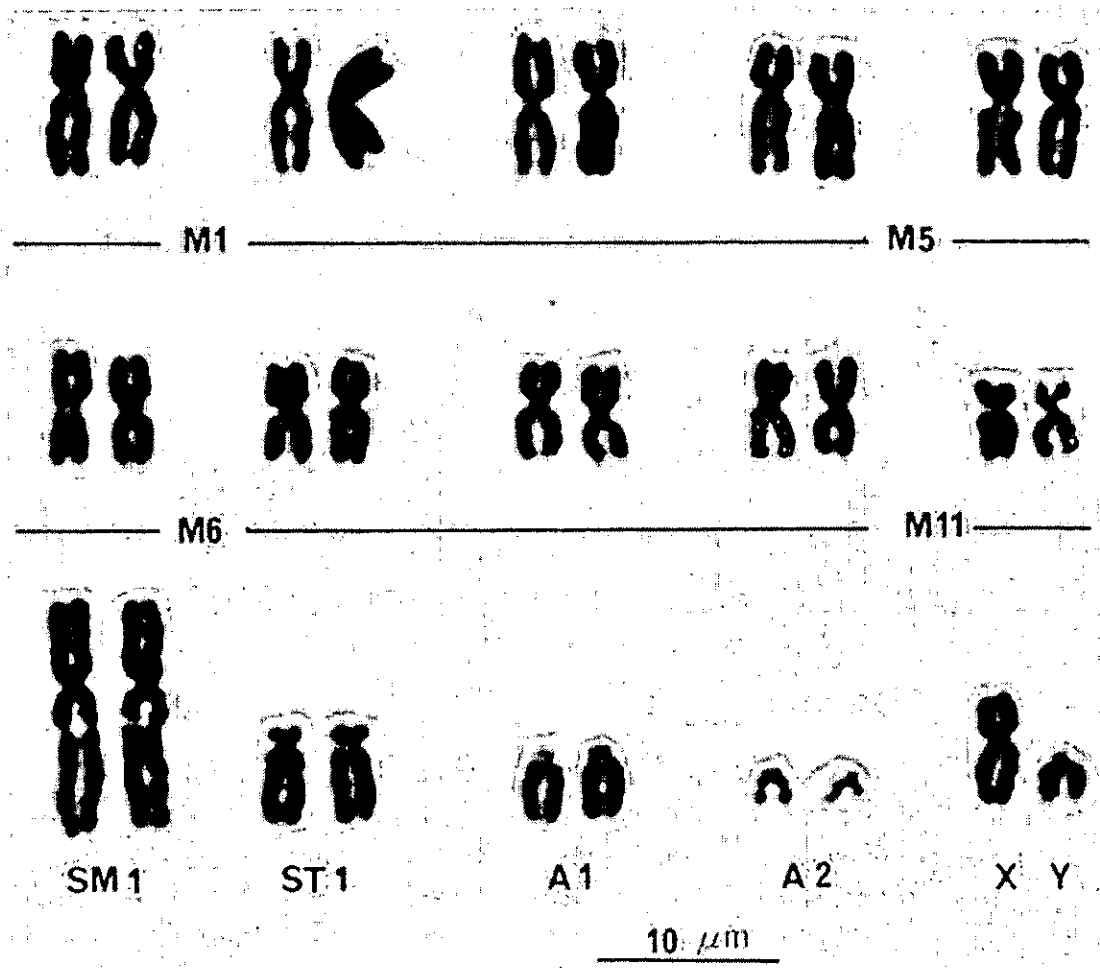


Fig. 10 高山田鼠 Conventional 核型 (合歡山：2♂4♀；阿里山：1♂)。(M 表 metacentric，SM 表 submetacentric，ST 表 subtelocentric，T 表 telocentric)

2. 分子資料 (Molecular data)

(1). 粒線體

A. 粒線體 DNA 控制區域 D-loop

高山田鼠以 DNA 粒線體控制區部分序列所建構出的親緣關係樹，其樹型結構上可分為南北兩群，且來自相同採集點的個體自成小群 (subclade) (Fig. 11)。於採集點合歡山、能高、阿里山、關山及引用自 NCBI 上一個體 (地點不明)，共 5 個採樣點 16 隻高山田鼠，在控制區域部分序列 (638 bp) 中發現 15 個單型，變異點共 46 個，包括 42 個 transitions、3 個 transversions 以及 1 個 deletion。顯示不同族群間存在著遺傳分化，也就是說這些高山田鼠族群可能受到地形、海拔或距離的隔離。在四個採集區之 DNA 序列，明顯分出四群，各群的拔靴值可信度皆高。從兩個地域的遺傳距離而言，由 2.9% 至 4.7% (Table 3)，顯示高山田鼠在各山系間已形成基因分化現象。合歡山與能高之間距離較近，形成另一群，而阿里山與關山則亦屬於另一群系，就此四區之地理距離位置而言，亦是如此。

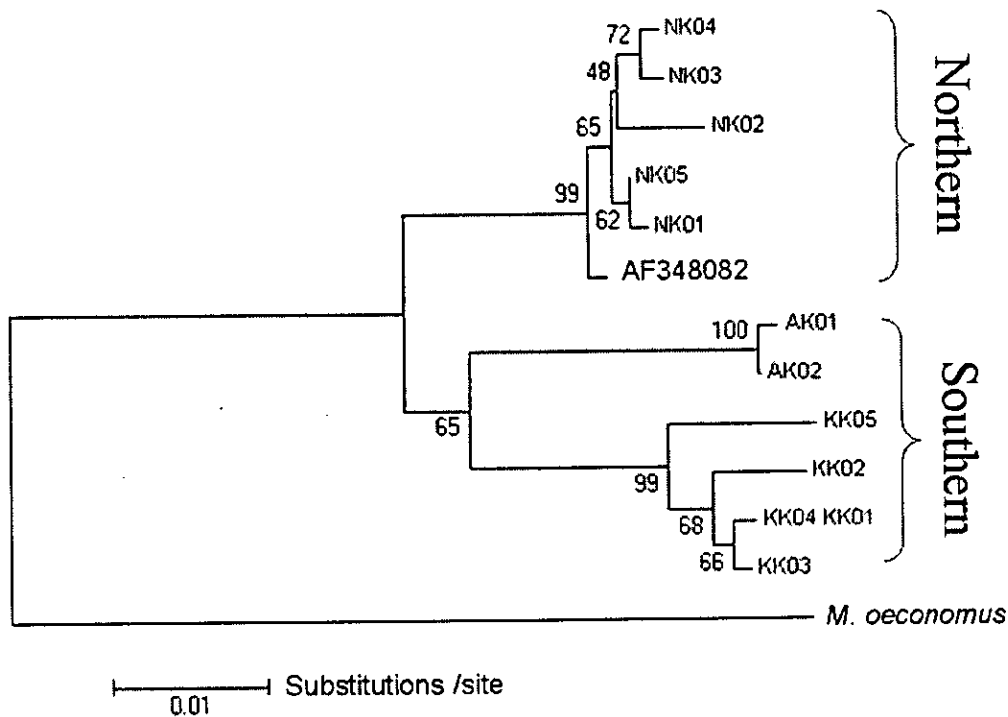


Fig. 11 高山田鼠以粒線體 DNA 控制區部分序列以鄰接法建構之親緣關係樹。樹型結構上高山田鼠呈南北分群現象。(NK、HK、AK 及 KK 後加號碼等代號表個體，相關資訊請詳見附錄二。除 KK04 與 KK01 為同一單型外，其餘個體皆為不同單型，共 15 個單型)。AF348082 及 *M. oeconomicus* 為自 NCBI 採用的資料。

Table. 3 高山田鼠 4 採樣地點個體兩兩地點粒線體 DNA 控制區部分序列平均遺傳距離 (Juke-Cantor model)

	阿里山 AK	關山 KK	能高 NK
阿里山 AK			
關山 KK	3.9 %		
能高 NK	4.0 %	4.0 %	
合歡山 HK	3.8 %	4.7 %	2.9 %

B. 粒線體 DNA 細胞色素 *b* (mitochondrial cytochrome *b*)

高山田鼠的細胞色素 *b* 片段全長 1143 bp, 共成功定序 35 個樣本, 加入 NCBI 基因資料庫中相近物種 *Microtus oeconomus* 之序列樣本 (AY220017) 為外群, 以 BioEdit 軟體將序列排列比較後, 使用 MEGA3.1 軟體進行鄰接法 (Neighbor Joining) 及最大簡約法 (Maximum Parsimony) 之分析以及計算各系群間遺傳距離。由 NJ tree 可將 35 個高山田鼠樣本分成四大群 (Fig. 12), 且與各群的採集地點有明顯關連, 以樹形中主要的兩大分支來看, 合歡山系為一大系群, 阿里山及玉山山系為另一大群; 從 MP tree 中則可推測, 由採集地編號為 4 的這一群的 haplotypes 可能為另兩群 (採集地編號 3,4 和 5,6) 的祖先型, 也就是說此兩群 (3,4 和 5,6) 可能從 4 號這一群分化衍生出來 (Fig. 13)。

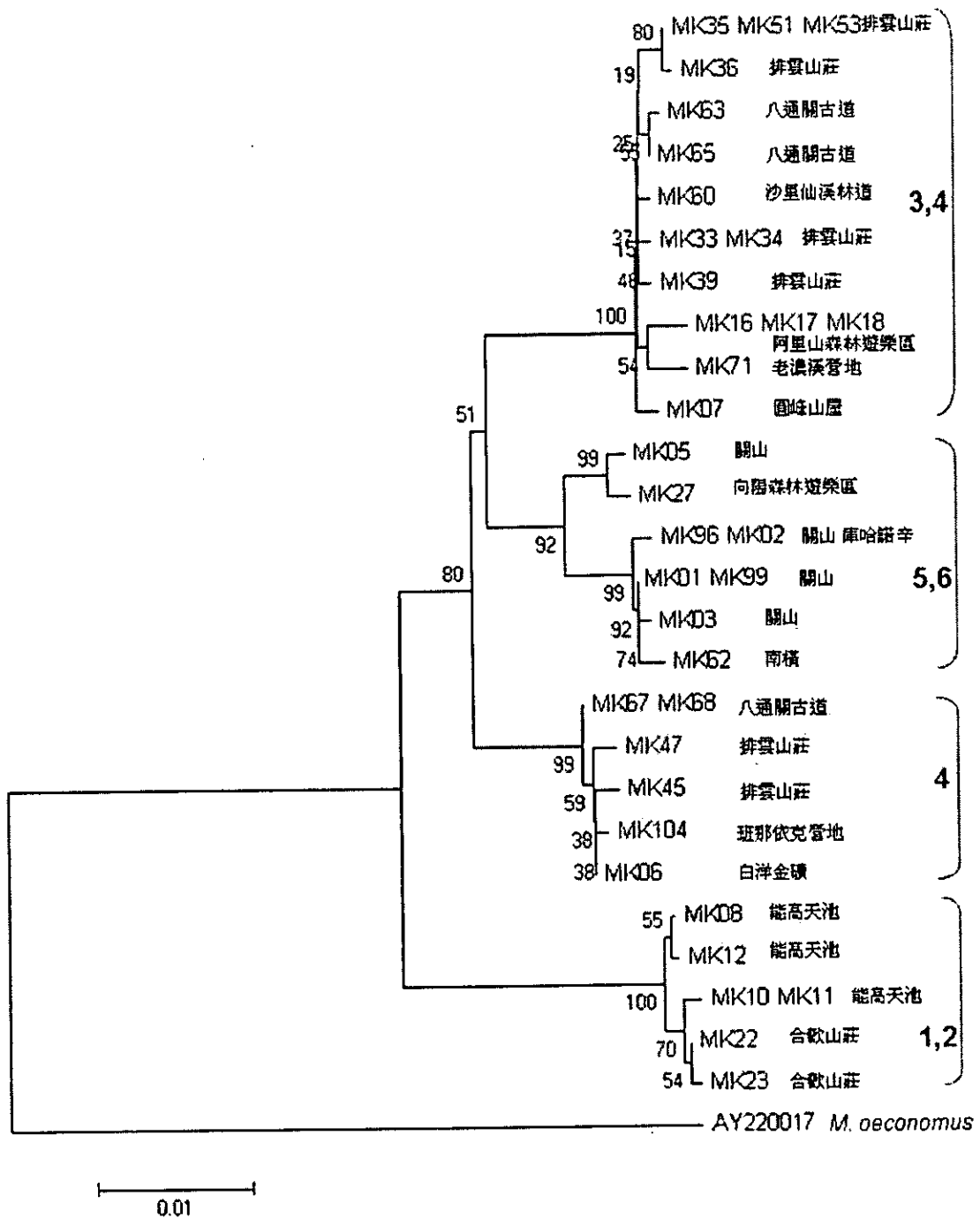


Fig. 12. 高山田鼠粒線體 DNA *cytb* 全段序列以鄰接法繪製之親緣關係樹。每一編號為一高山田鼠序列樣本，編號後為採集地點，樹型右方數字為地點編號。以近似種 *M. oeconomus* 作為外群。

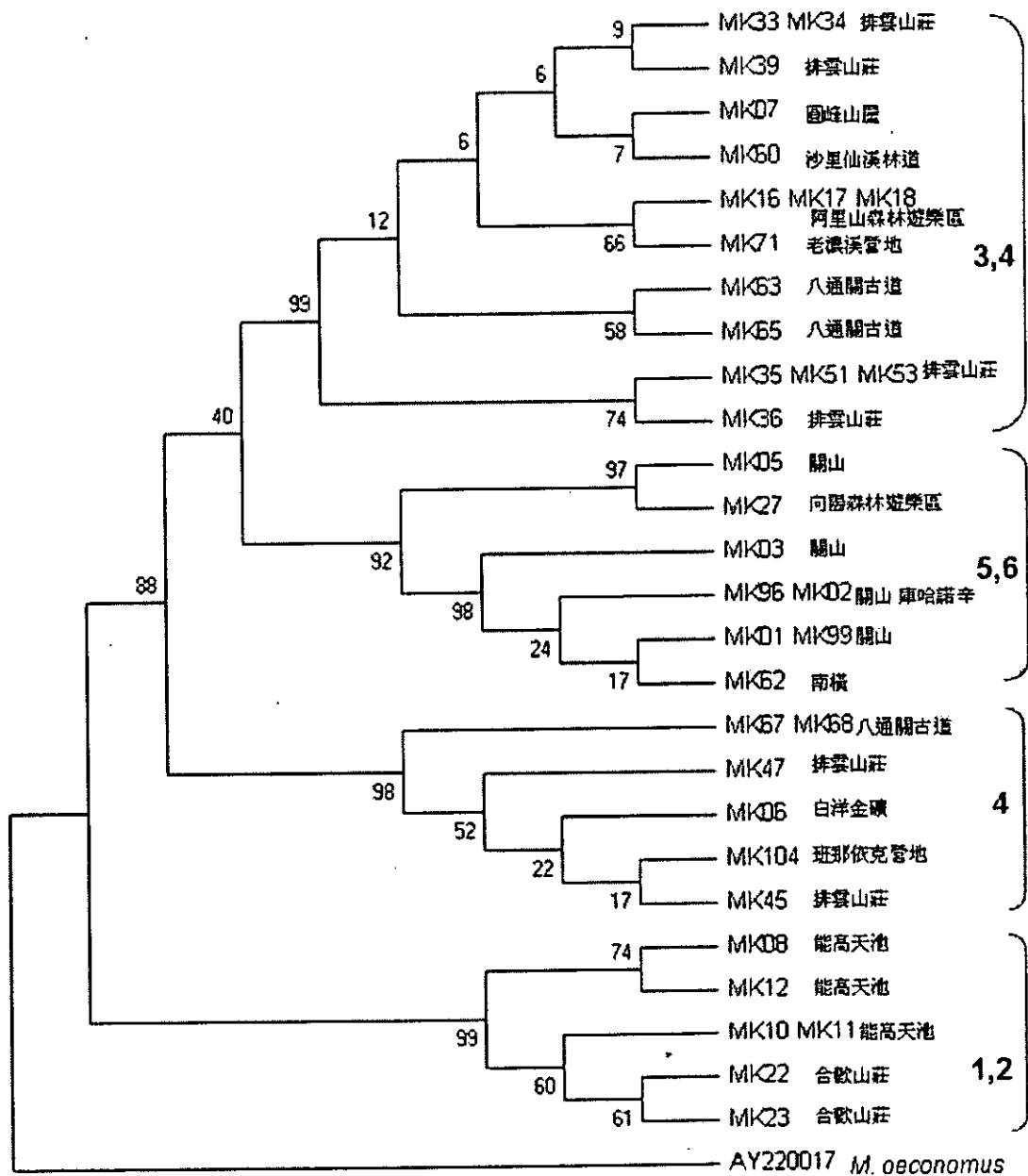


Fig. 13. 高山田鼠粒線體 DNA *cytb* 全段序列以最大簡約法繪製之親緣關係樹。每一編號為一高山田鼠序列樣本，編號後為採集地點，樹型右方數字為地點編號。以近似種 *M. oeconomus* 作為外群。

(2). 微衛星體 DNA (Microsatellite DNA)

本研究共獲得 11 個微衛星體基因座，其中 7 個基因座 (MSMM2、MSMM3、MSMM4、MSMM5、MSMM6、MSMM7 和 MSMM8) 來自於 *M. montebelli*

另外 4 個基因座 (Moe1、Moe2、Moe5 和 Moe6) 來自於 *M. oeconomus*。所有的基因座都是多型性，其對偶基因數平均值為 14.3 (範圍自 8 至 19)，除了 MSMM 7 對偶基因數為 8 之外，其餘基因座的對偶基因數都超過 10。每 1 組基因座的 H_o 值 (觀察的異型合子數) 都接近 H_e 值 (期望的異型合子數)，兩者的平均值都為 0.88；本實驗各基因座的近親交配係數值範圍由 0.049 至 -0.047，並且對於偏離零皆無達顯著差異，平均近親交配係數 F 值為 -0.002。另外，所有基因座皆無發現偏離哈溫平衡的現象，顯示本研究區域內的台灣高山田鼠族群基因庫是處於哈溫平衡的情形下。MSMM m4 與 MSMM 7 及 MSMM 4 與 Moe5 此 2 組 primers 的基因座彼此之間有連鎖不平衡的情形，因此 MSMM 4 基因座的資料並不使用在之後的分析。

討論

染色體的差異通常和種階層的分類有關，特別在嚙齒目中，核型上的分歧通常和族群分化(如種化)有關，也是探討釐清物種系統發生的演化過程重要 (Patton and Steven 1983)。染色體變異造成的些微基因組成改變有造成物種種化的可能存在 (Nachman and Searle 1995)。因此，藉由比對由染色體分析技術所染出的核型，可看出物種於染色體上發生的變異，進而探討種間或種內的差異形成的機轉，以釐清其系統演化上的關係。Searle (1993) 提到動物種內的核型上相當穩定，但小型哺乳類卻容易發生染色體的變異。小型哺乳類許多物種種內具有染色體變異；廣佈於歐洲的家鼠 (*Mus domesticus*) 由於發生羅氏易位 (Robertsonian translocation) 因而分化將近 40 個不同核型群 (Nachman and Searle 1995)。Motokawa *et al.*, (2004) 指出短尾鼯其台灣地區與大陸四川族群其染色體具有差異。此外；許多種類也有性染色體的多型性的現象 (Baverstock *et al.*, 1977；de Almeida and Yonenaga-Yassuda 1991；Ando *et al.*, 1991)。

絨鼠屬 (*Eothenomys*) 中部分物種已有核型資料，如台灣黑腹絨鼠 (Harada *et al.*, 1991)，大陸四川黑腹絨鼠與中華絨鼠 *E. chinensis* (Harada, personal communication)，大絨鼠 *E. miletus* (Chen *et al.*, 1994)，玉龍絨鼠 *E. proditor* (Yang *et al.*, 1998)，*E. smithii* (Ando *et al.*, 1991) 與 *E. regulus*。此屬的核型對數穩定，皆為 28 對染色體 ($2n=56$)，但部分物種亦發現其具有種內差異，如分布於日本的 *E. smithii*，其 X 性染色體因發生 pericentric inversion 以及 constitutive heterochromatin 的複製使的某些個體其 X 性染色體較大 (Ando *et al.*, 1991)。本研究發現台灣黑腹絨鼠具有兩種不同 X 染色體形態核型群，且此兩核型群分布上呈不重疊的南北分布現象。而台灣黑腹絨鼠與四川峨嵋山所採集到的黑腹絨鼠兩個體 (EM096 與 EM097) 的核型亦不相同，四川峨嵋山的黑腹絨鼠所有染色體含性染色體皆為 acrocentric (Harada, personal communication)，與台灣黑腹絨鼠具有一對小的 metacentric 體染色體不同。種內族群或個體間染色體的變異形成的族群分化是否確為導致物種種化的可能性，或形成生殖隔離的可能雖具有相關性，但僅依染色體核型研究作為種界定的觀點，意見仍多有分歧。

染色體的變異是否也反應其 DNA 上面， mtDNA、核基因或多基因片段的使用，將更能瞭解物種的真正演化路徑。本研究黑腹絨鼠材料從兩段核與一段粒線體 DNA 不同片段序列資訊發現，黑腹絨鼠族群三段 DNA 序列皆可發現不同數量的變異位點，而各段序列資訊依不同統計方法所建構的親緣關係樹皆支持台灣黑腹絨鼠可區分為與地理分布相關之南、北兩群。並就樹型結構來看，台灣黑腹絨鼠南、北核型群的親緣關係屬單系起源 (monophyly)，即單一起源由同一祖先群分化成南、北兩群。以 Luo *et al.*, (2004) 所計算中黑腹絨鼠屬內種間平均遺傳距離 (JC model) 為 8.9% 及範圍為 0.4%~13.0%，而台灣黑腹絨鼠南、北群遺傳距離 3.8% 以及台灣、四川黑腹絨鼠之遺傳距離 7.0%。分子時鐘與地質事件探討。以 Cytb 序列每百萬年 2% 的演化速率來估算族群分歧時間 (Avise *et al.*, 1998)。台灣黑腹絨鼠南北兩群遺傳距離約 3.8%，即 1.9Mya 分化。台灣與四川黑腹絨鼠間遺傳距離約 7.0%，即 3.5Mya 前分化。

Luo *et al.*, (2004) 運用粒線體 DNA 細胞色素 *b* 對此屬進行系統分類學之探討，由於此屬內各種外部形態如毛色等皆相當相似，故其藉由 mtDNA cytb 來釐清其屬內種的關係，確認 *Eothenomys* 內具有兩亞屬，且依傳統分類學外部形態與頭骨形質原本給定的各物種皆具有有效性，除滇絨鼠 *E. eleusis* 與大絨鼠 *E. miletus* 兩物種之有效性仍待釐清外，其餘分析物種如四川黑腹絨鼠、克欽絨鼠 *E. cachinus*、麗江絨鼠 *E. fidelis*、西南絨鼠 *E. custos*、昭通絨鼠 *E. olitor* 與玉龍絨鼠 *E. proditor* 間在遺傳上 (mtDNA cytb) 具有程度不一之遺傳分化，即分子證據支持這些物種傳統分類之種的有效性。然而本研究以黑腹絨鼠同段序列資料與之比對後，除發現台灣黑腹絨鼠具南、北兩型分化外，台灣黑腹絨鼠與四川黑腹絨鼠之遺傳差異 (7.0%) 更幾乎達到此屬內同段序列的平均遺傳距離 (8.9%)。綜合核型及 DNA 分子資料 (Table 4)，皆明顯說明台灣黑腹絨鼠南、北兩群的地理分布皆為有效被隔離的基因型，未來尋求其兩族群可能的地理雜交區域 (Hybrid zone)。

Table 4 本研究分析之黑腹絨鼠族群依分子資料可將其分為三大群，即台灣南北群（N 與 S）及大陸四川族群（C）

採樣點	核型群, n=25	MtDNA, <i>cytb</i> 單型, n=90	nDNA, <i>IRBP X, G6pd</i> , male only 單型, n=69	單型, n=51
苗栗縣泰安鄉雪霸國家公園觀霧	N (2)	N4 (1) N9 (2) N5 (4)	Ni1 (6)	Ng (3)
台中縣和平鄉雪霸國家公園	N (6)	N5 (9)	Ni2 (7)	Ng (2)
宜蘭縣大同鄉台7甲線32.5公里處	no data	N8 (1)	Ni1 (1)	Ng (1)
台中縣和平鄉雪山路210林道	N (2)	N6 (2)	Ni1 (2)	Ng (1)
台中縣和平鄉雪山路大雪山森林遊樂區	N (1)	N6 (5)	Ni1 (3)	Ng (5)
花蓮縣秀林鄉富世村慈恩	N (2)	N7 (4)	Ni2 (4)	Ng (2)
南投縣仁愛鄉翠峰	N (3)	N2 (3)	Ni1 (2)	Ng (3)
南投縣仁愛鄉梅峰	no data	N1 (1) N4 (1)	Ni1 (1)	no data
南投縣仁愛鄉北東眼山	N (1)	N3 (5) N2 (1)	Ni1 (5)	Ng (2)
南投縣仁愛鄉精英村	no data	N2 (1)	no data	no data
嘉義縣阿里山鄉香林村阿里山森林遊樂區	S (4)	S1 (7) S2 (4) S3 (1) S4 (1) S5 (1) S8 (1)	Si1 (7)	Sg (8)
南投縣信義鄉	no data	S7 (1)	Si1 (2)	Sg (1)
南投縣信義鄉玉山國家公園玉山登山口	no data	S6 (1) S2 (1)	Si1 (1)	Sg (2)
南投縣信義鄉玉山國家公園塔塔加鞍部	S (1)	S6 (3) S2 (5)	Si1 (4)	Sg (5)
高雄桃源鄉1	S (2)	S9 (1) S10 (1) S11 (3)	Si2 (5)	Sg (3)
高雄桃源鄉2	S (2)	S11 (2)	Si2 (2)	Sg (1)
高雄桃源鄉3	no data	S12 (1)	Si1 (1)	no data
中國四川省唐家河毛香壩	no data	C1 (2)	Ci1 (1)	Cg (2)
中國四川省峨嵋山	no data	C2 (1) C3 (1) Ec1 (4) Ec2 (1) (3)	Ci2 (2)	Eci Cg (2) Ecg (2)
中國大陸四川省石棉縣	no data	U1 (3) U2 (3) U3 (1)	Ui1 (4) (3)	Ui2 Ug (6)

E. melanogaster: N, S, N1-N9, S1-S12, C1-C3, Ni1, Ni2, Si1, Si2, Ci1, Ng, Sg, Cg

E. chinensis: Ec1, Ec2, Eci, Ecg

E. melanogaster from National Museum of Natural History: U1-U3, Ui1, Ui2, Ug

本研究顯示高山田鼠不同族群間存在著遺傳分化，也就是說這些高山田鼠族群可能受到地形、海拔或距離的隔離。此外比對細胞色素 b 的全段序列 (full length, 1143 個鹽基) 訊息亦發現，南北兩群群內的個體其全段序列 (1143 個鹽基) 差異僅約 3 至 5 個鹽基，但群間差異約 30 至 35 個鹽基，此結果與粒線體控制區皆支持粒線體 DNA 基因分化現象。

Yu (1995) 以 allozyme 分析玉山及關山地區的高山田鼠，六個採樣地點皆在海拔 3000 公尺以上 (包含三個樣區、每個樣區有高低二個採樣地點)，同一樣區中的高低二個採樣地點海拔差距在 300-430 公尺間，其結果顯示三個樣區族群間遺傳分化程度較高 (F_{st} 為 0.203)、基因交流較低 (N_m 為 0.308)，可能是受到隔離所致，此結果亦說明高山田鼠不同山頂的族群間可能受到隔離而產生遺傳分化。

微隨體基因是 genomic DNA 中一連串的短片段重複序列 (Hancock 1999)，且因為重複序列單元重複次數的變異，而呈現其對偶基因片段長短之差異 (Scribner *et al.* 1994)。微隨體基因被認為是快速演化的 non-coding 區域之片段，因此 cross amplification 被限制在親緣關係相近的物種之間進行 (Schlötterer *et al.* 1991, Coltman *et al.* 1996, Kayser *et al.* 1996, Valsecchi and Amos 1996)。一些研究指出為某一物種所設計的微隨體基因引子，也可以在其他種，甚至在親緣關係較遠的不同屬物種中增幅出微隨體基因的片段 (e.g., Ishibashi *et al.* 1997, Moncrief *et al.* 1997, Degnan *et al.* 1999, Kerth *et al.* 2002, Palo *et al.* 2004, Solomon *et al.* 2004, Wright *et al.* 2005)。本研究選擇為 *M. montebelli* (Ishibashi *et al.* 1999) 設計的 8 組引子和 *M. oeconomus* (Van de Zande *et al.* 2000) 設計的 8 組引子在台灣高山田鼠中增幅成功的共 11 組，並且皆是多型性。

Kondo *et al.* (1993) 發現在 153 組為 *Rattus* 所設計的引子中，有 25 組 (16.3%) 可以在 *Mus* 成功增幅出微隨體基因的片段，另外在 166 組為 *Mus* 所設計的引子中，有 20 組 (12.0%) 可以在 *Rattus* 成功增幅出微隨體基因的片段。Moncrief *et al.* (1997) 也成功地利用 52 組 *Mus* 和 5 組 *Clethrionomys* 的引子在 *Microtus pennsylvanicus* 增幅出微隨體基因的片段，分別為 15 組 (28.8%) 和 3 組 (60.0%)，但是所增幅的片段為多型性可以用來進一步分析的分別僅 5 組 (9.6%) 和 1 組 (20.0%)。Solomon *et al.* (2004) 選擇與 *M. ochrogaster* 親源關係相近物種 *M. montebelli*、*M. oeconomus*、*Clethrionomys rufocanus* 和 *Arvicola terrestris* 的 20 組引子，一共成功增幅出 5 組 (25%)。我們可以發現 cross amplification 並且其增幅出來的片段為多型性，可以用於進一步分析的成功率其實都不高，而本研究竟然從 16 組引子中成功增幅出 11 組，其可能原因為在 *Microtus* 屬中，只有 *M. montebelli*、*M. oeconomus* 與台灣高山田鼠此 3 物種具有 X-Y 染色體聯會 (synaptonemal complex between X and Y chromosomes) 的模式 (Mekada *et al.* 2001)，且彼此間的親源關係最為相近 (Conroy & Cook 2000)。

參考文獻

- 葉文珊。1997。莫氏樹蛙族群地理親緣關係之研究。國立臺灣大學動物學研究所碩士論文。
- 劉國強。1995。以粒線體核酸分析斯文豪氏攀蜥之生物地理與親緣關係。國立中山大學生命科學研究所碩士論文。
- Alexandrino, J., E. Froufe, J. W. Arntzen, and N. Ferrand. 2000. Genetic subdivision, glacial refugia and postglacial recolonization in the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela). *Molecular Ecology* 9: 771-781.
- Ando, A., M. Harada, S. Shiraishi, and T. A. Uchida. 1991. Variation of the X Chromosome in the Smith's Red-backed Vole *Eothenomys smithii*. *Journal of Mammalogical Society of Japan* 15: 83-90.
- Avise, J. C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press. Cambridge. UK.
- Avise, J. C., D. Walker, and G. C. Johns. 1998. Speciation durations and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 265: 1707-1712.
- Baker, A. J. 2000. *Molecular methods in ecology*. Blackwell Science Press. Oxford. UK.
- Baverstock, P. R., C. H. S. Watts, and J. T. Hogarth. 1977. Polymorphism of the X-Chromosome, Y-Chromosome and Autosomes in the Australian Hopping Mice, *Notomys alexis*, *N. cervinus* and *N. fuscus* (Rodentia, Muridae). *Chromosoma* 61: 243-256.
- Chen, Z., X. Jiang, and Y. Wang. 1994. Studies on the karyotype of Oriental Vole (*Eothenomys miletus*). *Cytologia* 59:289-293.
- Coltman, D. W., W. D. Bowen, and J. M. Wright. 1996. PCR primers for harbour seal (*Phoca vitulina concolour*) microsatellites amplify polymorphic loci in other pinniped species. *Molecular Ecology* 5:161-163.
- Conroy, C. J., and J. A. Cook. 2000. Molecular systematics of a Holarctic rodent (*Microtus*: Muridae). *Journal of Mammalogy* 81:344-359.
- Conroy, C. J., J. R. Demboski, and J. A. Cook. 1999. Mammalian biogeography of the Alexander Archipelago of Alaska: a north temperate nested fauna. *Journal of Biogeography* 26: 343-352.
- de almeida, E. J. C. and Y. Yoneaga-Yassuda. 1991. Pericentric inversions and sex chromosome heteromorphisms in *Oryzomys nigripes* (Rodentia, Cricetidae). *Carologia* 44: 63-73.
- Degnan, S. M., B. C. Robertson, S. M. Clegg, and C. C. Moritz. 1999. Microsatellite primers for studies of gene flow and mating systems in white-eyes (*Zosterops*). *Molecular Ecology* 8:157-168.

- Ehinger, M., P. Fontanillas, E. Petit, and N. Perrin. 2002. Mitochondrial DNA variation along an altitudinal gradient in the greater white-toothed shrew, *Crocidura russula*. *Molecular Ecology* 11: 939-945.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Research Symposium Series* 41: 95-98.
- Hancock, J. M. 1999. Microsatellite and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. *in* D. B. Goldstein and C. Schlotterer, editors. *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford. New York.
- Harada, M., A. Ando, L. K. Lin, and S. Takada. 1991. Karyotypes of the Taiwan vole *Microtus kikuchii* and the Pere David's vole *Eothenomys melanogaster* from Taiwan. *Journal of the Mammalogical Society of Japan* 16: 41-45.
- Harada, M. and T. H. Yoshida. 1978. Karyological study of four Japanese *Myotis* bats (Chiroptera, Mammalia). *Chromosoma* 65: 283-291.
- Ishibashi, Y., Y. Yoshinaga, T. Saitoh, S. Abe, H. Iida, and M. C. Yoshida. 1999. Polymorphic microsatellite DNA markers in the field vole *Microtus montebelli*. *Molecular Ecology* 8:163-164.
- Iwasa, M. A. and H. Suzuki. 2002. Evolutionary significance of chromosome change in northeastern Asiatic red-backed voles inferred with the aid of intron 1 sequences of the *G6pd* gene. *Chromosome Research* 10: 419-428.
- Kayser, M., H. Ritter, F. Bercovitch, M. Mrug, L. Roewer, and P. Nürnberg. 1996. Identification of highly polymorphic microsatellites in the rhesus macaque *Macaca mulatta* by cross-species amplification. *Molecular Ecology* 5:157-159.
- Kerth, G., F. Mayer, and E. Petit. 2002. Extreme sex-biased dispersal in the communally breeding, nonmigratory Bechstein's bat (*Myotis bechsteinii*). *Molecular Ecology* 11:1491-1498.
- Levan, A., K. Fredga, and A. A. Sandberg. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Luo, J., D. Yang, H. Suzuki, Y. Wang, W. J. Chen, K. L. Campbell, and Y. Zhang. 2004. Molecular phylogeny and biogeography of Oriental voles: genus *Eothenomys* (Muridae, Mammalia). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33: 349-362.
- Mekada, K., M. Harada, L. K. Lin, K. Koyasu, P. M. Borodin, and S. I. Oda. 2001. Pattern of X-Y chromosome pairing in the Taiwan vole, *Microtus kikuchii*. *Genome* 44:27-31.
- Moncrief, N. D., N. E. Cockett, A. D. Neff, W. L. Thomas, and R. D. Dueser. 1997. Polymorphic microsatellites in the meadow vole *Microtus pennsylvanicus*: conservation of loci across species of rodents. *Molecular Ecology* 6:299-301.

- Nachman, M. W. and J. B. Searle. 1995. Why is the house mouse karyotype so variable? Pages 397-402 in *Trends in Ecology & Evolution*.
- Ohnishi, N., Y. Ishibashi, T. Saitoh, S. Abe, and M. C. Yoshida. 1998. Polymorphic microsatellite DNA markers in the Japanese wood mouse *Apodemus argenteus*. *Molecular Ecology* 7:1431-1439.
- Osborne, M. J., J. A. Norman, L. Christidis, and N. D. Murray. 2000. Genetic distinctness of isolated populations of an endangered marsupial, the mountain pygmy-possum, *Burramys parvus*. *Molecular Ecology* 9: 609-613.
- Palo, J. U., D. Lesbarreres, D. S. Schmeller, C. R. Primmer, and M. J. 2004. Microsatellite marker data suggest sex-biased dispersal in the common frog *Rana temporaria*. *Molecular Ecology* 13:2865-2869.
- Patton, J. and S. Sherwood. 1983. Chromosome evolution in rodent. *Annual Review of Ecology and Systematics* 14: 139-158.
- Polly, P. D. 2001. On morphological clocks and paleophylogeography: towards a timescale for *Sorex* hybrid zones. *Genetica* 112: 339-357.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York.
- Scribner, K. T., J. W. Arntzen, and T. Burke. 1994. Comparative analysis of intra- and interpopulation genetic diversity in *Bufo bufo*, using allozyme, single-locus microsatellite, minisatellite, and multilocus minisatellite data. *Molecular Biology and Evolution* 11:737-748.
- Searle, J. B. 1993. in *Hybrid zones and the evolutionary process* (Harrison, R. G. ed.). pp.309~353. Oxford University Press. Oxford. UK.
- Smith, M. F. and J. L. Patton. 1993. The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the akodontine tribe. *Biological Journal of the Linnean Society* 50:149-177.
- Solomon, N. G., B. Keane, L. R. Knoch, and P. J. Hogan. 2004. Multiple paternity in socially monogamous prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Canadian Journal of Zoology* 82:1667-1671.
- Toda, M., M. Nishida, M. Matsui, K. Y. Lue, and H. Ota. 1998. Genetic variation in the Indian rice frog, *Rana limnocharis* (Amphibia: Anura) in Taiwan, as revealed by allozyme data. *Herpetologica* 54: 3-82.
- Valsecchi, E. and W. Amos. 1996. Microsatellite markers for the study of cetacean populations. *Molecular Ecology* 5:151-156.
- Van de Zande, L., R. C. van Apeldoorn, A. F. Blijdenstein, D. de Jong, W. van Schlötterer, C., and B. Harr. 2001. Microsatellite instability. in *Encyclopedia of Life Sciences*. MacMillan.

- Wright, T. F., A. M. Rodriguez, and R. C. Fleischer. 2005. Vocal dialects, sex-biased dispersal, and microsatellite population structure in the parrot *Amazona auropalliata*. *Molecular Ecology* 14:1197-1205.
- Yang D., R. Liu, Y. Zhang, Z. Chen, and Y. Wang. 1998. Chromosome study of Yulong Vole (*Eothenomys proditor*). *Cytologia* 63:435-440.
- Yu, H. T. 1995. Patterns of diversification and genetic population structure of small mammals in Taiwan. *Biological Journal of the Linnean Society* 55: 9-89.
- Yuan, S. L., L. K. Lin, and T. Oshida. 2006. Phylogeography of the mole-shrew (*Anourosorex yamashinai*) in Taiwan: implications of interglacial refugia high-elevation small mammal. *Molecular Ecology* 15: 2119-2130.

附錄一、本研究分析之絨鼠採集地點及 DNA 定序進度一覽表

編號	採集地點	TW67 X	TW67 Y	性別	核型	Cytb	IRBP	G6pd
EM001	嘉義縣阿里山鄉香林村阿里山森林遊樂區	230250	2602000	F	----	S1	Si1	----
EM002	花蓮縣秀林鄉富世村慈恩	288800	2676600	F	N	N7	Ni2	----
EM003	南投縣信義鄉玉山國家公園塔塔加鞍部	237900	2597600	M	----	S2	Si1	Sg
EM004	苗栗縣泰安鄉雲霸國家公園	260700	2711300	M	----	N5	Ni1	Ng
EM005	嘉義縣阿里山鄉香林村阿里山森林遊樂區	230250	2602000	M	----	S1	Si1	Sg
EM006	花蓮縣秀林鄉富世村慈恩	288800	2676600	M	N	N7	Ni2	Ng
EM007	嘉義縣阿里山鄉香林村阿里山森林遊樂區	230250	2602000	M	----	S2	Si1	Sg
EM008	台中縣和平鄉雲山路大雪山森林遊樂區	250217	2685402	M	----	N6	----	Ng
EM009	苗栗縣泰安鄉雲霸國家公園	260700	2711300	F	N	N9	Ni1	----
EM010	苗栗縣泰安鄉雲霸國家公園	260700	2711300	F	----	N4	Ni1	----
EM011	南投縣仁愛鄉翠峰 1	267284	2665820	F	----	N1	----	----
EM012	苗栗縣泰安鄉雲霸國家公園	260700	2711300	M	----	N5	Ni1	Ng
EM014	南投縣信義鄉玉山國家公園塔塔加鞍部	237900	2597600	F	S	S6	Si1	----
EM015	花蓮縣秀林鄉富世村慈恩	288800	2676600	F	----	N7	Ni2	----
EM016	南投縣仁愛鄉翠峰 1	267284	2665820	F	----	N4	Ni1	----
EM017	苗栗縣泰安鄉雲霸國家公園	260700	2711300	M	----	N9	----	----
EM018	嘉義縣阿里山鄉香林村阿里山森林遊樂區	230250	2602000	M	----	S1	Si1	Sg
EM019	嘉義縣阿里山鄉香林村阿里山森林遊樂區	230250	2602000	F	S	S1	Si1	----
EM020	嘉義縣阿里山鄉香林村阿里山森林遊樂區	230250	2602000	F	----	S2	----	----
EM021	嘉義縣阿里山鄉香林村阿里山森林遊樂區	230250	2602000	M	----	S2	----	Sg
EM023	苗栗縣泰安鄉雲霸國家公園	260700	2711300	M	----	N5	Ni1	Ng
EM024	嘉義縣阿里山鄉香林村阿里山森林遊樂區	230250	2602000	M	----	S8	----	Sg
EM025	嘉義縣阿里山鄉香林村阿里山森林遊樂區	230250	2602000	M	----	S1	----	Sg
EM026	嘉義縣阿里山鄉香林村阿里山森林遊樂區	230250	2602000	M	----	S2	----	Sg
EM027	苗栗縣泰安鄉雲霸國家公園	260700	2711300	F	N	N5	Ni1	----
EM028	南投縣信義鄉玉山國家公園玉山登山口	239000	2597125	M	----	S6	Si1	Sg
EM029	嘉義縣阿里山鄉香林村阿里山森林遊樂區	230250	2602000	F	----	S1	----	----
EM030	南投縣信義鄉玉山國家公園玉山登山口	239000	2597125	F	----	S2	----	Sg
EM031	南投縣信義鄉玉山國家公園塔塔加鞍部	237900	2597600	M	----	S2	Si1	Sg
EM032	南投縣信義鄉玉山國家公園塔塔加鞍部	237900	2597600	F	----	S6	Si1	----
EM033	南投縣信義鄉玉山國家公園塔塔加鞍部	237900	2597600	M	----	S2	----	Sg
EM034	嘉義縣阿里山鄉香林村阿里山森林遊樂區	230250	2602000	F	----	----	Si1	----
EM035	嘉義縣阿里山鄉香林村阿里山森林遊樂區	230250	2602000	F	----	S1	----	----
EM036	台中縣和平鄉雲山路大雪山森林遊樂區	250217	2685402	M	----	N6	Ni1	Ng
EM037	台中縣和平鄉雲山路大雪山森林遊樂區	250217	2685402	M	----	N6	Ni1	Ng
EM039	台中縣和平鄉雲霸國家公園	280285	2699290	F	----	N5	Ni2	----

EM040	台中縣和平鄉雲霸國家公園	280285	2699290	F	----	N5	Ni2	----
EM044	台中縣和平鄉雲霸國家公園	280285	2699290	F	----	N5	Ni2	----
EM045	台中縣和平鄉雲霸國家公園	280285	2699290	F	----	N5	Ni2	----
EM046	高雄縣桃源鄉 2	240034	2575050	F	S	S9	Si2	----
EM047	高雄縣桃源鄉 2	240034	2575050	M	S	S10	Si2	Sg
EM048	南投縣信義鄉玉山國家公園塔塔加鞍部	237900	2597600	M	----	S2	----	Sg
EM049	南投縣信義鄉玉山國家公園塔塔加鞍部	237900	2597600	F	----	S6	----	----
EM050	台中縣和平鄉雲山路大雪山森林遊樂區	250217	2685402	M	----	N6	----	Ng
EM051	花蓮縣秀林鄉富世村慈恩	288800	2676600	M	----	N7	Ni2	Ng
EM052	南投縣仁愛鄉翠峰 2	271500	2668000	M	N	N2	Ni1	Ng
EM053	南投縣仁愛鄉翠峰 2	271500	2668000	M	N	N2	Ni1	Ng
EM054	南投縣仁愛鄉翠峰 2	271500	2668000	M	N	N2	----	Ng
EM055	台中縣和平鄉雲霸國家公園	280285	2699290	M	N	N5	Ni2	Ng
EM056	台中縣和平鄉雲霸國家公園	280285	2699290	F	N	N5	Ni2	Ng
EM057	台中縣和平鄉雲霸國家公園	280285	2699290	F	N	N5	Ni2	Ng
EM058	台中縣和平鄉雲山路 210 林道	249500	2692380	M	N	N6	Ni1	Ng
EM059	台中縣和平鄉雲山路 210 林道	249500	2692380	F	N	N6	Ni1	----
EM060	嘉義縣阿里山鄉香林村阿里山森林遊樂區	230250	2602000	M	S	S3	----	----
EM061	嘉義縣阿里山鄉香林村阿里山森林遊樂區	230250	2602000	F	S	S4	----	----
EM062	嘉義縣阿里山鄉香林村阿里山森林遊樂區	230250	2602000	M	S	S5	Si1	Sg
EM063	高雄縣桃源鄉 2	240750	2573000	F	S	S11***	----	----
EM064	台中縣和平鄉雲山路大雪山森林遊樂區	250217	2685402	M	----	N6	Ni1	Ng
EM067	高雄縣桃源鄉 2	240750	2573000	F	S	S11	Si2	----
EM068	南投縣信義鄉玉山國家公園塔塔加鞍部	237900	2597600	M	----	S2	----	Sg
EM069	南投縣仁愛鄉北東眼山	262760	2663620	F	----	N2	----	----
EM070	台中縣和平鄉雲霸國家公園	280285	2699290	M	N	N5	----	Ng
EM071	台中縣和平鄉雲霸國家公園	280285	2699290	F	N	N5	----	----
EM072	高雄縣桃源鄉 2	240034	2575050	M	----	S11	Si2	Sg
EM073	高雄縣桃源鄉 2	240034	2575050	F	----	S11	Si2	----
EM074	南投縣仁愛鄉北東眼山	262760	2663620	F	----	N3	Ni1	----
EM075	南投縣仁愛鄉北東眼山	262760	2663620	F	----	N3	Ni1	----
EM076	南投縣仁愛鄉北東眼山	262760	2663620	F	----	N3	Ni1	----
EM077	南投縣仁愛鄉北東眼山	262760	2663620	M	----	N3	Ni1	Ng
EM078	南投縣仁愛鄉北東眼山	262760	2663620	M	N	N3	Ni1	Ng
EM079	南投縣信義鄉	241450	2602650	M	----	S7	Si1	Sg
EM080	南投縣信義鄉	241450	2602650	F	----	----	Si1	----
EM081	南投縣仁愛鄉精英村	272500	2660800	F	----	N2	----	----
EM083	高雄縣桃源鄉 1	243000	2573900	F	----	S12	Si1	----

EM084	高雄縣桃源鄉 2	240034	2575050	M	----	S11	Si2	Sg
EM085	高雄縣桃源鄉 3	240000	2572500	M	----	----	Si2	Sg
EM087	中國大陸四川省石綿縣	----	----		----	U1	Ui1	Ug
EM088	中國大陸四川省石綿縣	----	----		----	U1	Ui2	Ug
EM089	中國大陸四川省石綿縣	----	----		----	U2	Ui1	Ug
EM090	中國大陸四川省石綿縣	----	----		----	U2	Ui2	Ug
EM091	中國大陸四川省石綿縣	----	----		----	U2	Ui2	Ug
EM092	中國大陸四川省石綿縣	----	----		----	U1	Ui1	Ug
EM093	中國大陸四川省石綿縣	----	----			U3	Ui1	----
EM095	宜蘭縣大同鄉台 7 甲線 32.5 公里處 2	----	----	M	----	N8	Ni1	Ng
EM096	中國四川峨嵋山	----	----	M	----	C2	Ci2	Cg
EM097	中國四川峨嵋山	----	----	M	----	C3	Ci2	Cg
EM098	中國四川唐家河保護區	----	----	M	----	C1	Ci1	Cg
EM099	中國四川唐家河保護區	----	----	M	----	C1	----	Cg
EM100	台中縣和平鄉雲山路大霧山森林遊樂區	250217	2685402	M	N	----	----	----
EM101	宜蘭縣大同鄉太平山太平公園	----	----	F	----	----	----	----
EM103	宜蘭縣大同鄉太平山太平公園	----	----	M	----	----	----	----
EM104	宜蘭縣大同鄉太平山太平公園	----	----	M	----	----	----	----
EM132	台中縣和平鄉雲霧國家公園	----	----	M	N	----	----	----
MH3561	中國四川峨嵋山	----	----	F	----	----	Eci	----
MH3588	中國四川峨嵋山	----	----	M	----	Ec	Eci	Ecg
MH3589	中國四川峨嵋山	----	----	F	----	Ec	Eci	----
MH3590	中國四川峨嵋山	----	----	M	----	Ec	----	Ecg
MH4476	中國四川峨嵋山	----	----	M	----	Ec	----	----
MH4481	中國四川峨嵋山	----	----	M	----	Ec	----	----
HEG193	日本本州	----	----	M	----	----	Esmi	----

F: female M: male Y: 已有序列資料

附錄二、高山田鼠採集地點及 DNA 定序進度一覽表

編號	地點	性別	D-loop	Cytb	地點編號
			序列編號	完成定序	
MK001	高雄縣桃源鄉關山	M	KK01	Y	5
MK002	高雄縣桃源鄉庫哈諾辛	M	KK02	Y	5
MK003	高雄縣桃源鄉關山	M	KK03	Y	5
MK004	高雄縣桃源鄉關山	M	KK04		
MK005	高雄縣桃源鄉關山	F	KK05	Y	5
MK006	南投縣信義鄉玉山國家公園白洋金礦	M		Y	4

MK007	南投縣信義鄉玉山國家公園圓峰山屋	M		Y	4
MK008	南投縣仁愛鄉精英村能高天池	F	NK01	Y	2
MK009	南投縣仁愛鄉精英村能高天池山莊	F	NK02		
MK010	南投縣仁愛鄉精英村能高天池山莊	M	NK03	Y	2
MK011	南投縣仁愛鄉精英村能高天池山莊	M	NK04	Y	2
MK012	南投縣仁愛鄉精英村能高天池山莊	M	NK05	Y	2
MK013	南投縣仁愛鄉精英村能高天池山莊	M			
MK016	嘉義縣阿里山鄉香林村阿里山森林遊樂區	M	AK01	Y	3
MK017	嘉義縣阿里山鄉香林村阿里山森林遊樂區	F	AK02	Y	3
MK018	嘉義縣阿里山鄉香林村阿里山森林遊樂區	F		Y	3
MK019	南投縣仁愛鄉合歡山莊雪訓場附近	F	HK01		
MK020	南投縣仁愛鄉合歡山莊雪訓場附近	F	HK02		
MK021	南投縣仁愛鄉合歡山莊雪訓場附近	M	HK03		
MK022	南投縣仁愛鄉合歡山莊雪訓場附近	F		Y	1
MK023	南投縣仁愛鄉合歡山莊雪訓場附近	F		Y	1
MK025	南投縣信義鄉地利村丹大林道	M			
MK026	南投縣信義鄉地利村丹大林道沿線	M			
MK027	台東縣海端鄉向陽森林遊樂區	M		Y	6
MK028	嘉義縣阿里山鄉阿里山森林遊樂區	M			
MK029	塔塔加玉山登山口	F			
MK030	塔塔加玉山登山口	F			
MK031	嘉義縣阿里山鄉阿里山森林遊樂區姊妹潭附近鐵道旁	F			
MK032	能高天池山莊	F			
MK033	嘉義縣阿里山鄉排雲山莊往塔塔加鞍部步道2公里處	M		Y	4
MK034	嘉義縣阿里山鄉排雲山莊往塔塔加鞍部步道2公里處	F		Y	4
MK035	嘉義縣阿里山鄉排雲山莊往塔塔加鞍部步道2公里處	F		Y	4
MK036	嘉義縣阿里山鄉排雲山莊往塔塔加鞍部步道2公里處	M		Y	4
MK037	嘉義縣阿里山鄉排雲山莊往塔塔加鞍部步道2公里處	M			
MK038	嘉義縣阿里山鄉排雲山莊往塔塔加鞍部步道2公里處	M			
MK039	嘉義縣阿里山鄉排雲山莊往圓峰營地步道3公里處	F		Y	4
MK040	嘉義縣阿里山鄉排雲山莊往圓峰營地步道3公里處	F			
MK041	嘉義縣阿里山鄉排雲山莊往圓峰營地步道3公里處	M			
MK042	嘉義縣阿里山鄉排雲山莊往圓峰營地步道3公里處	F			
MK043	嘉義縣阿里山鄉排雲山莊往圓峰營地步道3公里處	F			
MK044	嘉義縣阿里山鄉排雲山莊往圓峰營地步道3公里處	F			
MK045	嘉義縣阿里山鄉排雲山莊往圓峰營地步道3公里處	M		Y	4
MK046	嘉義縣阿里山鄉排雲山莊往塔塔加鞍部步道2公里處	F			
MK047	嘉義縣阿里山鄉排雲山莊往塔塔加鞍部步道2公里處	M		Y	4

MK048	嘉義縣阿里山鄉排雲山莊往圓峰營地步道3公里處	F		
MK049	嘉義縣阿里山鄉排雲山莊往圓峰營地步道3公里處	M		
MK050	嘉義縣阿里山鄉排雲山莊往圓峰營地步道3公里處	F		
MK051	嘉義縣阿里山鄉排雲山莊往圓峰營地步道3公里處	M	Y	4
MK052	嘉義縣阿里山鄉排雲山莊往圓峰營地步道3公里處	M		
MK053	嘉義縣阿里山鄉排雲山莊往塔塔加鞍部步道2公里處	F	Y	4
MK054	嘉義縣阿里山鄉排雲山莊往圓峰營地步道3公里處	F		
MK055	嘉義縣阿里山鄉排雲山莊往圓峰營地步道3公里處	F		
MK056	嘉義縣阿里山鄉排雲山莊往塔塔加鞍部步道2公里處	M		
MK057	嘉義縣阿里山鄉排雲山莊往圓峰營地步道3公里處	F		
MK058	嘉義縣阿里山鄉排雲山莊往圓峰營地步道3公里處	F		
MK059	嘉義縣阿里山鄉排雲山莊往圓峰營地步道3公里處	M		
MK060	南投縣信義鄉沙里仙溪林道	F	Y	4
MK061	高雄縣桃源鄉南橫公路143.4公里處	F		
MK062	高雄縣桃源鄉南橫公路143.4公里處	M	Y	5
MK063	南投縣信義鄉八通關古道16公里處	F	Y	4
MK064	南投縣信義鄉八通關古道16公里處	F		
MK065	南投縣信義鄉八通關古道16公里處	F	Y	4
MK066	南投縣信義鄉八通關古道16公里處	F		
MK067	南投縣信義鄉八通關古道16公里處	F	Y	4
MK068	南投縣信義鄉八通關古道12.8公里處	F	Y	4
MK069	南投縣信義鄉老濃溪營地往上1.5公里處	M		
MK070	南投縣信義鄉老濃溪營地往下1公里處	M		
MK071	南投縣信義鄉老濃溪營地往下1公里處	M	Y	4
MK072	南投縣信義鄉老濃溪營地往下1公里處	F		
MK073	南投縣信義鄉老濃溪營地往下1公里處	F		
MK074	南投縣信義鄉老濃溪營地往上1.5公里處	M		
MK075	南投縣信義鄉老濃溪營地往下1公里處	F		
MK076	南投縣信義鄉老濃溪營地往下1公里處	M		
MK077	南投縣信義鄉老濃溪營地往下1公里處	F		
MK078	南投縣信義鄉老濃溪營地往下1公里處	F		
MK079	嘉義縣阿里山鄉排雲山莊往圓峰營地步道3公里處	F		
MK080	嘉義縣阿里山鄉排雲山莊往塔塔加鞍部步道2公里處	M		
MK081	嘉義縣阿里山鄉排雲山莊往塔塔加鞍部步道2公里處	M		
MK082	嘉義縣阿里山鄉排雲山莊往塔塔加鞍部步道2公里處	M		
MK083	嘉義縣阿里山鄉排雲山莊往塔塔加鞍部步道2公里處	F		
MK084	嘉義縣阿里山鄉排雲山莊往塔塔加鞍部步道2公里處	F		
MK085	嘉義縣阿里山鄉排雲山莊往圓峰營地步道3公里處	M		

MK086	嘉義縣阿里山鄉排雲山莊往塔塔加鞍部步道 2 公里處	M		
MK087	嘉義縣阿里山鄉排雲山莊往塔塔加鞍部步道 2 公里處	M		
MK088	嘉義縣阿里山鄉排雲山莊往塔塔加鞍部步道 2 公里處	F		
MK089	嘉義縣阿里山鄉排雲山莊往塔塔加鞍部步道 2 公里處	M		
MK090	嘉義縣阿里山鄉排雲山莊往塔塔加鞍部步道 2 公里處	M		
MK091	嘉義縣阿里山鄉排雲山莊往塔塔加鞍部步道 2 公里處	F		
MK092	嘉義縣阿里山鄉排雲山莊往塔塔加鞍部步道 2 公里處	M		
MK093	嘉義縣阿里山鄉排雲山莊往塔塔加鞍部步道 2 公里處	M		
MK094	嘉義縣阿里山鄉排雲山莊往塔塔加鞍部步道 2 公里處	M		
MK095	高雄縣桃源鄉往關山步道	M		
MK096	高雄縣桃源鄉往關山步道	F	Y	5
MK097	高雄縣桃源鄉往關山步道	F		
MK098	高雄縣桃源鄉往關山步道	M		
MK099	高雄縣桃源鄉往關山步道	M	Y	5
MK100	高雄縣桃源鄉往關山步道	F		
MK101	高雄縣桃源鄉往關山步道	F		
MK102	高雄縣桃源鄉往關山步道	F		
MK103	南投縣信義鄉老濃溪營地	F		
MK104	南投縣信義鄉班那依克營地	M	Y	4
MK105	高雄縣桃源鄉往關山步道	M		
MK106	南投縣仁愛鄉合歡山特有生物中心高海拔試驗站附近箭竹草原	F		

F: female M: male Y: 已有序列資料

MK33~MK106: 自美國柏克萊大學加州分校博物館申請標本