

東海大學生命科學系

碩士論文

指導教授：林惠真 博士

Dr. Hui-Chen Lin

台灣西部沿海台灣招潮蟹族群的遺傳與形態變異

Genetic and morphological variability in the populations of

***Uca formosensis* in the west coast of Taiwan**

研究生：洪昆璿

Kun-Chin Hung

中華民國一百零四年七月三十日

東海大學生命科學系
碩士論文學位考試審定書

生命科學系碩士班研究生 洪昆璿 君所撰寫之論文

(中文)

探討在台灣西部沿海台灣招潮蟹族群的遺傳與型態變異

(英文)

Genetic and morphological variability of *Uca formosensis* populations in
Taiwan west coast

經本委員會審定通過，特此證明。

學位考試委員會

召集人

張學文

(簽名)

委員

曾文治

祝智德

劉靜榆

林惠真

中華民國 104 年 6 月 26 日

致 謝

很多人說好的開始就是成功的一半，但是一件事情最難著手的就是怎麼開始，。以前總是只知道有這麼一句話，直到上了大學才略懂得這感受，一直到了現在終於能深刻體會。

其實在大學時期，我研讀的方向以較偏向生物醫學領域，關於蛋白質體的部分。到了研究所轉換跑來了生態領域，人家說隔行如隔山，但同在生物領域，只是從生物醫學轉到生物生態，我就已經深覺隔海了。從一開始的挫折痛苦，到後來的扎實成就感，這些都是非常珍貴。雖然中途一度有想放棄的念頭，源自於無法突破的障礙與瓶頸，但是有時候轉個念頭或者試試其他方法或者傾聽他人建議，都會是柳暗花明又一村。這過程中很感謝林惠真老師願意讓我從零開始，一步一步的讓我學習很多事情，不厭其煩的教我怎麼成為一個科學家。也感謝口試委員張學文老師、施習德老師、劉靜榆老師、曾令銘老師，在口試上給予我很多建議跟修改，讓我的論文更加完善。也很感謝在實驗上引領我方向和提供我方法的學長-蘇詠超學長，學長在我的整個實驗生涯中扮演著明燈與啟蒙的重要角色。也感謝在這一路上，在不同時期黑暗中出現的燈塔-鵬如學姊、劉少倫老師、佳蓉、昀潔、雅君、俊諺、廣瑜、學曦、冠達、利文、巧倫、靖涵、猷威、家郡等在不管實驗方法或者邏輯上給予我很多幫助。還有一路上陪著我上山下海採樣的大家-韻婷、安均、崇鑫、韋齊、昱玄、昀暉、郁琪、乙玄、宗洋、筱芸、嘉珊等不僅提供交通工具，也無條件的給予幫助讓我得以順利採樣完成。也謝謝這期間所有曾經支援我實驗、借我實驗工具的每一位老師、學長姐和同學。也謝謝為了的論文受傷或者奉獻生命的台灣招潮蟹們，有了你們才有這珍貴的數據，也希望能對台灣招潮蟹的族群，在未來能有一些貢獻。

最後，「越困難的事情，越值得你去挑戰」、「在科學的路上，很多冤枉路是必需的，因為要走過才知道正確的路在哪」、「放棄很容易，堅持很困難，但是成功往往是屬於是堅持到最後的人」，以上幾句話是支撐我度過非常挫折時期的金玉良言，希望能對於看到這篇論文的人有所幫助。

洪昆璿 謹誌
2015.07

目錄

中文摘要.....	5
英文摘要.....	7
前言.....	9
材料與方法.....	15
一、 研究地點.....	15
二、 採樣時間與方法.....	15
四、 DNA 萃取流程.....	16
五、 DNA 品質與濃度測定.....	17
六、 三限制酶擴增片段長度多型性.....	17
七、 遺傳資料分析.....	20
1. 族群基因多樣性.....	20
2. 單套基因多樣性分析.....	21
3. 各族群之間的遺傳距離與基因交流.....	21
4. 分子變方分析.....	22
5. 分派檢定.....	22
6. 主座標軸分析.....	23

7. Mantel test.....	23
結果.....	25
一、 野外捕捉資料.....	25
二、 族群估量與族群密度.....	25
三、 台灣招潮蟹形態資料.....	25
四、 遺傳資料分析結果.....	27
1. 族群遺傳分化指數與基因交流程度	27
2. 台灣招潮蟹四個族群的遺傳多樣性與族群結構	27
3. 遺傳距離指數、形態分化距離指數和地理距離的相關性	29
討論.....	31
一、 台灣招潮蟹形態與遺傳變異.....	31
二、 台灣招潮蟹的高基因交流與低遺傳分化	32
三、 台灣招潮蟹的基因多樣性.....	33
四、 1984 年、1999 年的等位酶研究與 2014 TE-AFLP 法	35
五、 台灣招潮蟹的族群保育策略.....	35
參考文獻.....	38

中文摘要

台灣招潮蟹 (*Uca formosensis*) 為台灣特有種。十幾年前，分別在曾文溪口、大肚溪口以及香山濕地有比較大的族群存在。因為環境壓力日益嚴重，許多原來記載存在的台灣招潮蟹棲地，經由追蹤調查發現其族群數量與棲地面積均大幅減少。最近陸續有相關計畫與復育規劃得以讓台灣招潮蟹繼續生存。然而，過去相關研究多以台灣招潮蟹的行為模式、棲地形態、外觀與覓食等居多，少有分子證據來進行族群遺傳的研究與分析。只有較早的等位酶的位點分析台灣招潮蟹的遺傳結構與變異，而過去的研究亦發現台灣招潮蟹的螯形存在變異。得待進一步確認台灣招潮蟹的螯形變異是否與遺傳距離之間呈現相關性。本研究的目的是在台灣西部沿岸四個濕地（香山、線西、麥寮、七股）採樣 200 隻台灣招潮蟹，藉由 DNA 指紋分析法 TE-AFLP 探討台灣招潮蟹族群的遺傳變異，以及族群之間的基因多樣性與遺傳結構。也將利用所得到的遺傳資訊，來探討形態差異與遺傳距離之相關性。形態與分子資料結果顯示，形態分化距離與遺傳距離無顯著相關性存在。遺傳多樣性資料則顯示，台灣招潮蟹族群中的線西族群除了與麥寮族群有較高的基因交流外，線西與其他族群（香山、七股）的基因交流程度相對較低；而且線

西族群的基因多樣性也相對於其他族群低。遺傳變異資料也顯示有99%的遺傳變異存在於族群內。遺傳結構分析結果顯示，各族群之間約分為兩個遺傳群，各族群所分配到遺傳群的機率大致相同，遺傳結構也沒有太大的差異。也就是說，雖然台灣招潮蟹族群數量急遽下降，本研究結果顯示目前仍保有較高的遺傳變異與基因交流，這也暗示只要營造與保留適合的棲地，台灣招潮蟹的族群也許有恢復的機會。

Abstract

The fiddler crab *Uca formosensis* is an endemic species of Taiwan. More than a decade ago, large populations were reported in the wetlands of Tzenwen estuary, Shankang, and Shianshan mudflats. However, due to the decrease in natural habitat for human use, the population of *U. formosensis* gradually decreased. Until recently, there is a growing consensus to protect its habitat. However, studies on *U. formosensis* were mostly descriptive, focusing on the morphology, the foraging and social behavior, and the habitats. There is no report on the population genetic analysis of *U. formosensis*, except two studies using allozyme analysis in 1984 and 1999. These two early allozyme reported that *U. formosensis* has variations in the shapes of major chela. Therefore, it is necessary to determine whether there is a correlation between morphological variations in the major chela and the genetic structure in the population of *U. formosensis*. The goal of my study was to understand population genetic structure of *U. formosensis* from new molecular evidences. Thus far, I have collected 200 samples from four wetland habitats located along the west coast of Taiwan. I examined the genetic variability of *U. formosensis* through TE-AFLP with the aim to identify the genetic

diversity of *U. formosensis* populations. Using the information on the genetic variations, I investigated the relationship between the morphology of the major chela and the genetic information. The result of relationship between morphology of the major chela and the genetic distance did not differ significantly. The genetic result indicated that the population of *U. formosensis* had high gene flow value between Sainsi and Mailiao, but the degree of gene flow between Sainsi and the other two populations (Siangshan, Chiku) is relatively low. And the gene diversity of Sainsi population ($H_j = 0.083$) was also lower than those of the three populations. *U. formosensis* have 99% genetic variation within population. The results of either population structure or PCoA analyses did not differ significantly among populations. In summary, with the high genetic variation and gene flow, there is still a chance to recover the population of *U. formosensis* if there is a better plan for habitat restoration.

前 言

台灣招潮蟹 (*Uca formosensis*) 為台灣特有種。因紅樹林的大量移植以及棲地的大量開發與破壞，導致台灣招潮蟹的棲息地日漸消逝。十幾年前，分別在曾文溪口、大肚溪口以及香山濕地有比較大的族群存在 (施, 1997)。以彰化縣伸港為例，號稱為「台灣招潮蟹的故鄉」並且擁有較大族群量的台灣招潮蟹族群 (李, 1991)，由於環境壓力日益嚴重，許多原來記載存在的台灣招潮蟹棲地，經由追蹤調查發現其族群數量與棲地面積均大幅減少，甚至讓台灣招潮蟹面臨消失的危機 (Shih *et al*, 1999; Shih *et al*, 2008; Chen *et al*, 2008; Liu, 2012)。在1995年彰化縣政府在伸港鄉設立了「台灣招潮蟹的故鄉」相關立牌與設施，但卻因為規劃與施做不當，導致該棲地成為弧邊招潮蟹 (*Uca arcuata*) 與清白招潮蟹 (*Uca lactea*) 為優勢種的棲息地，而台灣招潮蟹族群在20年間數量減少 (劉等, 2010)。台南市的曾文溪口也有相同例子，在1992年的調查中，台灣招潮蟹的群居性強，常常呈現大面積的單一優勢景象 (劉等, 1993)，但因為當地魚塭的急遽擴張造成原棲地破壞，導致現今只剩下台南河口3處較為穩定的台灣招潮蟹族群可供採取研究樣本 (劉, 2012)。再以北台灣最大潮間帶濕地-香山濕地為例，在香山濕地中的新竹客雅溪口與大庄里海岸，原為台灣招潮蟹的棲

地，但是在2006年新竹客雅水資回收中心興建之初，因為人為工程關係導致台灣招潮蟹族群消失殆盡（楊，2012）。許多文獻報告也指出因為紅樹林的移植不當，造成台灣招潮蟹族群量逐年遞減甚至消失（楊，2012；Shih *et al*, 2008）。一直到了最近，陸續有相關計畫與保育進行，得以讓台灣招潮蟹繼續生存。例如，新竹市政府在香山濕地有一系列台灣招潮的復育研究計畫，在2012年的香山濕地復育調查計畫中，發現將紅樹林清除以及棲息地復育之後，目前台灣招潮蟹族群數量估計達35000隻/公頃（楊，2012；劉，2012），這結果顯示當紅樹林移除之後，台灣招潮蟹族群量有逐年回升的趨勢。

過度開發與不適當的利用，不僅會造成野生族群量的驟減與棲息地的破壞，也會導致該族群遺傳多樣性下降，造成遺傳漂變、近親交配或族群滅絕的風險（Marianna *et al*, 2010；Haag *et al*, 2009）。世界保育聯盟（The World Conservation Union, IUCN）的規範中，將遺傳多樣性、棲地多樣性與物種多樣性並列為生物多樣性保育的三大層級，可見族群遺傳多樣性對於物種的保育來說相當的重要。尤其以物種保育的層級而言，以族群間及族群內的遺傳變異、不同地理族群間的遺傳分化、族群間基因交流的強度皆是研究及規劃欲保

育之焦點物種的重要指標數據 (Frankel, 1974; Araujo and Ramos, 2000; Geist, 2010)。族群遺傳多樣性的調查，是評估焦點物種及其不同的地理族群是否能在環境中存活及適應的直接方法。因此，藉由不同地理族群的遺傳結構與遺傳多樣性的研究，可以清楚界定保育的單元，藉此提高保育工作的效率。然而，目前以台灣招潮蟹的研究來說，多以行為模式、棲地形態、外觀、洞穴形態與覓食等研究居多，少有分子證據來進行族群遺傳的分析與研究，只有 1984 年與 1999 年等位酶進行的位點分析，因此對於台灣招潮蟹族群的遺傳結構現況的了解是必須的。

DNA 指紋分析法是近年來伴隨分子生物學的精進所迅速發展的族群遺傳分析技術。無論是微衛星標定 (microsatellite-anchored fragment length polymorphisms)、隨機增幅多型性 DNA (random amplification of polymorphic DNA, RAPD)、限制性片段長度多型性法 (restriction fragment length polymorphism, RFLP)、增幅片段長度多型性法 (amplified fragment length polymorphism, AFLP)、三內切酶增幅片段長度多型性法 (three endonuclease - amplified fragment length polymorphism, TE-AFLP) 等，這些方法都可短時間內產生大量的族群遺傳結構數據，使研究者可以提高效率及更精確分析欲保

育物種的遺傳多樣性資料，進而對物種的保育提出較準確的建議。

目前 DNA 指紋法在甲殼類中的應用大致分為兩大類：1) 為水產養殖經濟物種的來源鑑定 (Tang *et al*, 2003)；2) 學術方面主要應用於與族群結構的研究 (Fratini and Vannini, 2002；Herborg *et al*, 2007)。

這些研究多採用微衛星標定法，微衛星標定法的侷限在於發展特定類群的引子組合，所花費的時間及經費相對較高。以蟹類而言，已發展的微衛星標定法大多是應用於水產養殖的物種，例如大閘蟹 (*Eriocheir sinensis*) 及梭子蟹等經濟物種 (Seeb *et al*, 2002；Hänfling and Weetman 2003；Steven *et al*, 2005)。少部分是應用在潮間帶蟹類浮游幼生傳播模式的研究 (Tanano and Barinova, 2005)。

目前微衛星標定法尚未被應用於台灣招潮蟹的族群遺傳結構的研究，因此本計畫採用較為經濟的 TE-AFLP 法，對台灣招潮蟹現有地理族群進行族群遺傳結構的分析。TE-AFLP 法的基本原理和 AFLP 相似，與 AFLP 不同的是，萃取出來的 DNA 同時用 2 種低頻率切點的限制酶和 1 種高頻率切點限制酶來進行混合酶切。DNA 則會被這 3 種識別不同位點的限制內切酶混合切斷，產生不同末端序列的 DNA 片段，然後再加入只會識別低頻率限制酶所切出來片段的轉接子 (adapter) 來黏合上去，黏合之後末端序列和轉接子序列則是作為 PCR 反應的引物 (primer) 接合點，最後則是再透過 PCR 反應來呈

現結果。此 DNA 指紋分析法的最大優點在於其研究所需花費相對低於其他的 DNA 指紋分析法，但是仍然可以提供高解析度的族群遺傳多樣性數據。換言之，運用此方法分析台灣招潮蟹的遺傳多樣性是較為經濟且準確的方法。

野外觀察發現與標本比對時發現背甲與大螯都至少有兩種形態的存在（張，1984；Shih, 1999）。在1984年台灣招潮蟹的等位酶與形態上的研究發現弧邊招潮蟹、凹指招潮蟹、清白招潮蟹的形態資料與遺傳資料之間並沒有相關性，作者推測有可能是因為招潮蟹本身存在螯形多形性。在1999年的台灣招潮文獻中也提及台灣招潮蟹的大螯形態可分為兩種，一種為平整短螯（brachychelous），另一種則是細螯（leptochelous），作者推測細螯螯形的個體，有可能是再生螯（施，1999）。但是在其他水生物種上亦有形態與遺傳分化相關的例子，例如櫻花蝦（*Sergia lucens*）、日本與台灣文蛤（*Meretrix spp.*）、藤壺（*Tetraclita squamosa*）等，在不同地理位置的族群，形態分化距離與遺傳距離上都有顯著相關性存在（Chan *et al*, 2006；Imai *et al*, 2013；Yamakawa and Imai, 2013），在其他物種上也有相同例子，例如希臘陸龜（*Testudo graeca*）在遺傳分化與形態、族群分佈的地理位置都出現顯著相關性（Ives *et al*, 2008）。但是，在台灣招

潮蟹的形態距離與遺傳距離是否呈現相關性尚未得知，本研究將會比對各族群之間的形態變異與遺傳資訊，檢視是否呈現相關性。

本研究在台灣西部沿岸四個濕地採樣總共約 200 隻台灣招潮蟹，記錄個體的背甲與大螯螯形，再藉由 DNA 指紋分析 (TE-AFLP) 探討台灣招潮蟹族群遺傳結構。目的是：1) 探討遺傳距離是否與形態分化距離呈現相關性；2) 以及研究整個族群是否因為族群量下降而影響遺傳變異與限制了族群間的基因交流。如果我們能藉由比較新的 DNA 指紋分析技術來更了解台灣招潮蟹的族群的遺傳結構，或許我們能提供更完善的保育方法來避免台灣招潮蟹的消失。

材料與方法

一、 研究地點

研究樣本來自台灣西部沿海濕地，地點選擇為北部新竹西濱沿海香山濕地 (N 24° 48' 01.80", E 120° 54' 52.05")、中部彰化線線西鄉彰濱工業區旁濕地 (N 24° 07' 30.67", E 120° 25' 29.03")、中部雲林縣麥寮鄉六輕工業區旁濕地 (N 23° 49' 33.75", E 120° 14' 23.46") 以及南部台南七股沿海海堤外廢棄魚塢 (N 23° 03' 18.51", E 120° 03' 37.45")。

二、 採樣時間與方法

採樣日期為 2014 年 6 月到 9 月。採樣時間為大潮三天後的退潮期間進入濕地採樣，四個採樣地點均隨機捕捉視野內所見約 50 隻台灣招潮蟹，並記錄每隻個體背甲寬、大螯形態、背甲形態。再使其自割一對步足後原地放回，將步足外殼輕壓碎，再使用 95% 酒精將其保存於試管中，完成組織採樣與資料記錄後，原地將個體放回。步足肌肉組織則當日帶回實驗室冰入 -20 以便後續 DNA 提取作業。

三、 族群估量方法

台灣招潮蟹各族群的族群密度估算方法，是以步行方式利用 GPS 先劃定四個採樣地區的面積，再以隨機 5 個 9 m² 的樣區估計期族群密度，最後以分佈總面積除以 9 m² 的族群密度，得到該採樣區的族群估量。

四、 DNA 萃取流程

使用 DNA 萃取套裝 (DNA extraction Kit) 取其 DNA (genomic DNA)，步驟如下：1) 將樣本從 -20°C 冰箱中取出，再取出 0.05g 肌肉組織放進 1.5 ml 的試管中。2) 加入 300 µl 組織與細胞溶解液 (tissue and cell lysis solution) 與 1 µl 的蛋白質分解酶 (proteinase A)，將其磨勻後，65°C 水浴 30 分鐘。3) 靜置 10 分鐘，加入核糖核酸分解酶 (RNase) 1 µl，37°C 放置 30 分鐘。4) 放置冰上 5 分鐘，加入蛋白質沉澱反應劑 (MPC protein precipitation reagent) 200 µl，vortex 10 秒之後進行離心 4°C 10 分鐘 11000g。5) 保留上清液至新的 1.5 ml 試管中，再於新試管加入異丙醇 (Isopropanol)，上下輕搖 40 下左右後，進行 4°C 15 分鐘 11000g 離心。6) 倒掉異丙醇 (Isopropanol)，保留白色沉澱物 (pellet)，使用 95% 酒精清洗三次，最後靜置等

酒精揮發，加入 35 μl TE buffer，放入 -20°C 保存。

五、 DNA 品質與濃度測定

使用微量分光光度計測量濃度，量測溶液對 260 nm 與 280nm 的吸光值，確定所有個體的 DNA 溶液的 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 值均在 1.7 以上 2.0 以下，濃度在 50~90 $\text{ng}/\mu\text{l}$ ，最後將濃度與品質符合標準的 DNA 樣本存放於 -20°C 冰箱中保存。

六、 三限制酶擴增片段長度多型性 (Three endonuclease amplified fragment length polymorphism, TE-AFLP)

依照 van der Wurff 的做法以及接合子 (adaptor) 進行 TE-AFLP 的操作 (van der Wurff *et al*, 2000)，分成三部分，1)用三種限制酶 (restriction enzyme) 切割 DNA，隨後在這些片段的兩端接上有限制酶專一序列的接合子 (enzyme-specific sequence)。2)利用與接合子對應的引子 (primer)，進行選擇性擴增限制片段 (selective amplification)，引子包含一段核心序列，一段限制酶專一序列與具選擇性的延伸序列 (selective extension)，延伸序列為 2 個可任意變換的含氮鹼基。PCR 反應會透過引子的引導，增值具有引子對應接合的 DNA 片段，選擇

性擴增反應的引子其 5'端具有螢光標定。3)將被擴增的特定片段變性處理後，進行電泳分析擴增片段的長度，最後得到我們所需要的遺傳資訊。

1. 限制酶切割 (restriction) 與接合子黏合 (ligation)

實驗中使用了 *XbaI*、*BamHI* 和 *RsaI* 三種內切限制酶，來進行 TE-AFLP 的實驗。最後則會使用 *XbaI*、*BamHI* 兩個轉接子，來接合被限制酶切割下來的 DNA 片段。每一組反應 (限制酶切割與接合子黏合) 包含了 100ng 樣本萃取出來的 DNA、2 μ l 10X Ligase buffer、2.0 μ l 500 mM NaCl、7.5 U ligase (NEB, USA)、1.25 U *XbaI* (Promega, USA)、4.0 μ l *BamHI* 轉接子 (1 picoM/ μ l)、4.0 μ l *XbaI* 轉接子 (1 picoM/ μ l)，最後補足夠的滅菌過 d.d.H₂O 至總體積 20 μ l。

2. TE-AFLP 聚合酶鍊反應 (polymerase chain reaction, PCR)

在PCR的反應過程中我使用的引子為 *XbaI*-CC and *BamHI*-C (van der Wurff *et al*, 2000)。每一個12.75 μ l PCR反應包含了0.5 μ l經過酶切黏合的DNA樣本，2.5 μ l 的 5 \times PCR buffer，0.25 μ l 的 *BamHI*-C 引子 (10pmol/ μ l)，0.25 μ l 的 *XbaI*-CC 引子 (10pmol/ μ l)，0.125 μ l 的 Taq polymerase

(Gotaq, Promega, USA), 與 0.25 μ l 的 10 mM dNTPs。以熱循環反應機進行PCR反應，反應條件為 denaturation 95 °C 3分鐘，接著 95 °C 30秒，70 °C 30秒，72 °C 60秒，進行10個循環；接下來95 °C 30秒，60 °C 30秒，72 °C 60秒，進行40個循環；在末進行72 °C 20分鐘，最後於 4°C 終止反應。最後產物則是保存在-20°C保存，最後將PCR產物跑膠之後，再將其膠圖經由GeneMapper軟體轉成0, 1的資料矩陣，以便日後進行遺傳資料的分析。

七、 遺傳資料分析

1. 族群基因多樣性 (Gene diversity)

利用 AFLP-SURV 1.0 (Vekemans *et al.* 2002) Nie's heterozygosity (Nei, 1975), 簡稱 H_j , 又因為 AFLP 為顯性標誌, 所以無法直接估算對偶基因的頻率, 因此假設每個條帶代表一個一基因座 (Locus), 每個基因座上只有兩個對偶基因 (Alleles), 擁有條帶表示為顯性基因, 沒有條帶表示為隱性基因, 根據 Lynch and Milligan (1994) 所提出的方式能夠估算出避免偏差得對偶基因頻率。在 AFLP-surv 1.0 的設定當中, 將所有個體依照其被採樣的樣區分群, 分析採樣點得遺傳多樣性 (H_j), 假設樣本符合哈溫平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium), 採用系統設定的運算方式, 非均質優先分佈貝氏法 (bayesian method with non-uniform prior distribution) 計算基因位點頻率 (allelic frequency), 近親交配系數為零 ($F_{is}=0$), 捕捉樣區內的遺傳多樣性 (H_j) 與總遺傳多樣性指數 (H_t), 排列更換次數 (Permutation) 設定為 999 次, 以上計算均為不偏估計。

2. 單套基因多樣性 (Haplotype diversity) 分析使用

GeneAlex 6.501 (Peakall and Smouse, 2005) 計算成對樣區間的單套基因多樣性，單套基因多樣性代表的是不同等位基因 (alleles) 的數量和頻率，不受序列上的變異影響，其計算方式為則是利用 H 代表單套基因多樣性， $H = 1 - (p^2 + q^2)$ ， p 為個體的條帶出現頻率， q 則是個體本身單套基因出現的頻率。最高值是 1，代表某族群內的單套基因型完全不同。

3. 各族群之間的遺傳距離 (Genetic distance) 與基因交流 (Gene flow)

使用 GeneAlex 6.501 (Peakall and Smouse, 2005) 計算成對樣區間的遺傳距離 (Φ_{PT})， Φ_{PT} 的意義相當於 F_{st} ， $\Phi_{PT} = \frac{V_{AP}}{V_{AP} + V_{WP}}$ ， V_{AP} 為樣區間的遺傳變異， V_{WP} 為樣區內部的遺傳變異，並計算 P -Value。排列更換次數設定為 999 次，藉此求得樣區間遺傳距離，再利用 Phylip 3.6 (Felesentein, 1995) 繪出 UPGMA consensus 的親緣關係樹。

4. 分子變方分析 (analysis of molecular variance, AMOVA)

分子變方分析 (Excoffier, 1992) 是利用歐幾里得所得距離矩陣 (Euclidean distance matrix) 來計算的, $E = \{\epsilon_{xy}^2\} = n [1 - \frac{2n_{xy}}{2n}]$, n 為多型性基因座的數量, x 、 y 代表的是兩兩不同的樣本個體, n_{xy} 表示兩個共同擁有多型性基因座數量, 可得到個體之間的遺傳距離矩陣。再將 0,1 資料整理為 GeneAlex 6.501 (Peakall and Smouse, 2005) 的格式, 將 170 隻個體依照採樣地點分為四群, 運算設定為輸入原始資料 (raw data)、二元 (binary) 距離計算並且更新遺失資料 (interpolate missing data), 排列更換次數設定 9999 次, 求得變異成份估計值 (estimate variance), 和各成分佔總變異比例與隨機運算得到極端值的機率 (P -value)。

5. 分派檢定 (assignment test)

以 170 隻個體的遺傳資料利用 STRUCTURE 2.3.4

(Pritchard *et al*, 2000) 進行分派檢定, 設定如下, Length of burnin period 為 30000, Number of MCMC reps after burnin 為 30000, Ancestry info 為 admixture model, Frequency model 設

定為allele frequencies correlate among population，假設族群K為1~4，每個K值都進行3重複測定得到K=1~4的所有結果，再檢測 ΔK 的變化來推估最適合的分派檢定結果（Evanno, 2005），以了解所有的個體可被分為幾個遺傳群（Genetic demes），以及各族群被分到該遺傳群的機率。

6. 主座標軸分析（Principal coordinate analysis, PCoA）

利用先前運算得知的個體之間的遺傳距離三角矩陣，使用GeneAlex 6.501（Peakall and Smouse, 2005）的主座標軸分析功能進行分析，檢視所有個體之間分群的狀況，運算設定為三角矩陣為輸入的資料格式，以及選擇距離標準化（distance-standardized）為分析的條件，最後可得到對變異的解釋度前三強的座標軸能解釋的比例。

7. Mantel test

利用GeneAlex 6.501（Peakall and Smouse, 2005）先運算各族群個體間的遺傳距離的三角矩陣（triangular matrices）與地理直線距離的三角矩陣，再使用 Past 3.0 運算個體之間的形態分化距離指數，這裡以歐式距離（Euclidean

distance) 來代表，歐式距離公式為 $d_{ij} = \sqrt{(x_i - x_j)^2 + (y_i - y_j)^2}$ ，來計算個體之間的形態變異距離。最後以 Mantel test 檢視地理直線距離與遺傳距離之間的相關性，以及地理直線距離與形態分化距離之間的相關性。最後則是固定地理距離，比對遺傳距離與形態距離之間的相關性。

結果

一、 野外捕捉資料：

實驗採樣時間為 2013 年 6 月至 9 月與 2014 年 6 月至 9 月，於四個樣區（新竹香山、彰化線西、雲林麥寮、台南七股）採樣紀錄總共 211 隻雄性台灣招潮蟹（圖 1）。

二、 族群估量與族群密度：

各族群密度結果（表 1）顯示麥寮族群密度最高（4 隻/m²），其次是香山（1.8 隻/m²），線西（1.2 隻/m²），最低則是台南採樣區（0.6 隻/m²）。

三、 台灣招潮蟹形態資料：

四個樣區（新竹香山、彰化線西、雲林麥寮、台南七股）捕捉共 211 隻台灣招潮蟹，採樣到細螯形、平整螯形、白點背甲、黑紫色背甲之個體（圖 2），白點背甲細螯形個體共 15 隻、白點背甲平整螯形 17 隻、黑色背甲細螯形 50 隻、黑色背甲平整螯 113 隻。細螯形所占比例從北到南依序為 46%、25%、22%、20%；平整螯形比例從北到南依序為 54%、75%、78%、

80%，北部樣區的細螯形所占比例較多（表 2），其他採樣區則是平整螯形佔大多數，將螯形進行卡方檢定分析，結果呈現顯著差異（ $\chi^2 = 11.99$, $df = 3$, $P < 0.01$ ）。然而，在背甲形態方面四個樣區的台灣招潮蟹樣本則無明顯趨勢，唯獨麥寮樣區未採到白點背甲個體。歐式距離計算結果也顯示新竹採樣點的大螯形態與其他三個採樣點的大螯形態相差較遠（Euclidean distance values = 0.76~0.66），其他樣區大螯形態分化距離相差較近（Euclidean distance values = 0.59~0.37）。我們也利用 U-test 分析了白點出現在小個體與大個體上的差異（圖 3），結果並無顯著（ $df=1$, $P=0.175$ ），也就是說白點會隨機出現在任何大小的背甲上。另外也利用卡方檢定來檢視每個固定的背甲寬範圍之下，是否某個螯形所佔的比例會比較多，結果顯示並無差異（圖 4），也就是說每個背甲寬範圍內的螯形比例是接近的（ $df=3$, $P=0.645$ ），但是發現在比較的大背甲寬個體上，細螯所佔的比例會多一些。

四、 遺傳資料分析結果：

1. 族群遺傳分化指數與基因交流程度

AMOVA 結果顯示有 99% 的變異存在於族群內 (表 3)，並且，四個台灣招潮蟹族群 (香山、線西、麥寮、七股) 之間的遺傳分化程度 (Φ_{PT} value) 都很低 (最高：0.047；最低：0.002)，線西族群與麥寮族群之間最低，新竹則與其他族群分化指數較高 (表 4)。各族群之間也存在相當高程度的基因交流，尤其是麥寮與各族群間的基因交流都很高。然而，也利用 AMOVA 計算出來的遺傳距離 (Φ_{PT} value)，再使用 PHYLIP 3.6 software 軟體透過 UPGMA 來繪製親緣關係樹 (圖 5)，結果顯示麥寮和線西族群最先被劃為一群，最遠的則是香山的族群，七股族群則是介於麥寮線西與香山之間。

2. 台灣招潮蟹四個族群的遺傳多樣性與族群結構

族群多樣性則以 Nei's gene diversity (H_j)，來代表台灣招潮蟹四個族群的基因多樣性 (表 5)，四個族群中基因多樣性較高的是麥寮 ($H_j=0.137$)，最低的則是線西族群 ($H_j=0.08$)。單套基因多樣性 (haplotype diversity) 則以 H

來代表 (表 6)，最高的是麥寮族群 ($H=0.230$)，其次則是台南族群 ($H=0.214$)，最低的是線西族群 ($H=0.137$)，平均值為 $H=0.194$ 。

以 STRUCTURE (Pritchard *et al*, 2000) 軟體進行分派檢定 (assignment test)，設定 $K=1\sim 4$ ， K 假設為遺傳群的數量 (genetic deme)，運用貝式 (Bayesian) 的分群方法找出最佳模式為 $K=2$ 。本結果則是利用檢驗 $K=1\sim 4$ 之中最佳的 K 值 (圖 6)，以及平均 $L(K)$ 的曲線斜率最大的為 $K=1\sim 2$ 之間 (圖 6A)， $L'(K)$ 則是在 $K=2$ 的時候有較大值 (圖 6B)， $L''(K)$ 最大為 $K=2$ (圖 6C)，在 ΔK 的部份則是最大值 $K=2$ 的時候出現 (圖 6D)。四步驟挑選結果顯示台灣西部沿海濕地四個族群的所有個體分派檢定的分群結果，大致可以分為兩個遺傳群 (圖 7)。香山、麥寮、七股三個族群被分配到單一遺傳群的機率分別為 78.3%、71.6%、72.8%，線西族群被分配到單一遺傳群的機率則為 89.5%，除了線西族群被分配到單一遺傳群的機率較高以外，其餘三個族群被分配到的機率並無差異，也就是說台灣招潮蟹西部沿海四個族群在遺傳結構上，並無太大差異存在，沒有分群的現象。

主座標軸分析 (Principal coordinate analysis, PCoA) 的前三解釋力分別為 22.68%、28.99%、33.96%，總合為 85.63%。不管是第一與第二座標軸，或者是第一與第三座標軸所顯示的結果都是無明顯的分群現象 (圖 8)，所有個體幾乎聚在一起，並無明顯的分群趨勢存在。只有線西族群的所有個體幾乎包含在麥寮族群裡面，其次是七股族群個體，香山的族群個體稍微分開。PCoA 分析的結果與分派檢定相呼應，在 UPGMA 的親緣關係樹 (圖 5) 也與 PCoA 分析呈現類似的結果。

3. 遺傳距離指數、形態分化距離指數和地理距離的相關性

在形態結果顯示香山族群形態與其他族群形態有顯著差異 ($\chi^2 = 11.99, P < 0.01$)，在親緣關係樹上香山族群也被劃在最外面一群，因此將形態距離指數 (Euclidean distance) 先與地理直線距離 (Geographic distance) 進行 Mantel test 檢定 (圖 9A)，得到結果並不顯著 ($R^2 = 0.6503, P = 0.076$) 但是有一些趨勢存在。因此，我們再將遺傳距離 (Genetic distance, Φ_{PT}) 與地理直線距離 (Geographic distance) 進行 Mantel test 檢定 (圖 9B)，結果也無顯著差異 ($R^2 = 0.075, P$

= 0.3)。接下來固定地理直線距離來檢測遺傳距離與形態距離是否呈現相關性（圖 9C），結果顯示遺傳距離與形態距離並無任何相關性（ $R^2 = 0.0261$, $P = 0.48$ ）。

討論

一、 台灣招潮蟹形態與遺傳變異

結果顯示台灣招潮蟹的形態距離與遺傳距離並無相關性 ($R^2 = 0.0261, P = 0.48$)。在形態距離與地理直線距離雖無顯著性差異 ($R^2 = 0.6503, P = 0.076$)，但是有呈現一定的趨勢 (圖 6)，換句話說北部族群擁有細螯形的個體較多，有逐次往南遞減的趨勢。而在過去等位酶與形態搭配的研究中，因為分子資料與形態距離數據沒有相關性，因此推測招潮蟹有可能存在著螯形多型性，不管是在凹指招潮蟹 (*Uca vocans*)、清白招潮蟹 (*Uca lactea*)、弧邊招潮蟹 (*Uca arcuata*) 等 (張, 1984) 都有相似的情況。且在過去文獻中對於招潮蟹形態的描述，提及大螯形態中的細螯形 (leptochelous chela) 可能為再生螯形 (Von Hagen, 1962; Crane, 1975; Yamaguchi, 1994)，很有可能是因為打鬥或者被捕食者攻擊後，大螯斷掉之後再重生之後的大螯 (Yamaguchi, 1994; Shih *et al*, 1999)。在其他招潮蟹也有相同的例子，關於再生大螯的肌肉比例、重量、幾丁質比例都少於原生大螯 (Patricia *et al*, 2000)。但是因礙於台灣招潮目前族群數量驟減的情況下，大螯又對招潮蟹來說是極為重要生存工具，

因此本研究中並未對台灣招潮蟹的大螯做進一步檢測。

二、 台灣招潮蟹的高基因交流與低遺傳分化

台灣招潮蟹族群數量減少 (Li, 1991 in Chinese ; Chen *et al.*, 2008 ; Lee, 2008)，卻能仍然保持高遺傳變異與較高的基因交流 (表 3)，有可能與兩個因子相關，1) 生物因子，招潮蟹擁有著獨特的潮間帶生活史，繁殖季節會釋幼回大海之中，經過一段時間後再上岸展開另一段生活史，又因為招潮蟹成體並無遷移行為 (施, 1999)，所以招潮蟹族群間如果想維持基因交流，只能依靠其幼生時期的散佈能力 (Silva *et al.*, 2010)。然而，在其他物種也有相似例子，例如許多梭子蟹與環紋招潮蟹 (*Uca annulipes*) 等，在兩個地理位置相差甚遠的族群，都還有很高基因交流存在 (Silva *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2012; Ituarte *et al.*, 2012)，可見幼生時期在招潮蟹的生活史中扮演著相當重要的角色。2) 環境因子，縱使招潮蟹會在固定時間大量釋幼回大海之中，還是需要藉由海洋環境因子的幫助，才能達到進行基因交流的目的。又因為海洋環境相對於陸地環境來說地理屏障較小，讓許多潮間帶招潮蟹藉由海洋的表面洋流幫助，來進行族群間的基因交流。台灣招潮蟹也不例外，在 3~10 月為台灣招潮

蟹繁殖季節（施，1999），此時台灣招潮蟹會釋幼，藉由台灣海峽的表層洋流來達到台灣西部沿海各族群的基因交流與維持基因多樣性的目的。這或許就是台灣招潮蟹近年來雖然族群量驟減，但仍然維持高基因多樣性與高基因交流的原因所在。

三、 台灣招潮蟹的基因多樣性

台灣招潮蟹的平均基因多樣性 (H_j) 平均值為 0.116 (表)，單套基因多樣性 (H) 平均值為 0.194。然而，台灣招潮蟹的基因多樣性 (H_j) 比一些已知的遠洋蟹類及招潮蟹還高，例如細點圓趾蟹 (*Ovalipes punctatus*) $H_j=0.022\sim0.063$ ，以及海栖招潮蟹 (*Uca maracoani*) $H_j=0.062$ (Yu *et al*, 2010; Wieman *et al*, 2014)。由於物種的預期雜合度 (H_j) 能反應族群中等位基因的豐富度和均勻程度，在 Nei (1973) 文獻中也稱物種的預期雜合度為基因多樣性指數 (index of gene diversity)。因此，台灣招潮蟹不管在遺傳變異或者遺傳多樣性都是很高的物種，這也代表台灣招潮蟹更能適應多變的環境 (施，1999)。然而，在單套基因多樣性上的數值都偏低，代表著在台灣西部沿海岸的台灣招潮蟹族群，單套基因型都很相似。換句話說，會有單套基因多樣性偏低的現象出現，很有可能是因為台灣招潮蟹的獨特生活

史所造成，在繁殖季節釋幼回大海中，來達到高基因交流的目的，共享族群間的單套基因型，來減少族群之間的分化程度（Silva *et al*, 2010）。

在各個採樣區中，線西樣區中植被與紅樹林占了大部分面積，非開闊泥灘地。香山採樣區則是位於垃圾掩埋場與水資源回收中心之間，在過去因為人為大量移植紅樹林與人為開發導致族群量驟減，但近年來已完成部分紅樹林移除作業，台灣招潮蟹族群量也有明顯的回升趨勢（楊等，2012）。由表 4 中可看出在各族群的基因多樣性中，線西族群的基因多樣性最低

（ $H_j=0.08$ ），最高的是麥寮（ $H_j=0.137$ ）其次分別是七股、香山族群。會造成線西族群多樣性低於其他族群的原因，有可能是該族群正經歷環境因子的選擇作用、創始者效應或瓶頸效性所導致（Silva *et al*, 2010）。在過去文獻顯示，紅樹林與大量植被的棲地，會經由影響基質、食物來源、其他優勢物種等競爭，造成台灣招潮蟹的生存壓力上升，導致遺傳多樣性降低（施，1999）。另一個可能原因，是線西樣區緊鄰線西工業區旁，線西工業區於西元 2001 年完工，占地 3643 約公頃，距今約 14 年左右。因此，推測該族群也有可能是被創始者效應影響，導致該

族群基因多樣性低於其他族群。

四、 1984 年、1999 年的等位酶研究與 2014 TE-AFLP 法

台灣招潮蟹在 1999 等位酶研究中，結果顯示有 97% 遺傳變異存在於各族群之間，也就是說台灣招潮蟹是個適應力很強的物種（施，1999）。在 DNA 指紋分析法中的分子變方分析結果也顯示，目前台灣招潮蟹的族群擁有 99% 遺傳變異存在於各族群之間。而過去許多在甲殼類的研究中，AFLP (TE-AFLP) 指紋分析法比等位酶分析更能真實反應出遺傳變異、基因交流程度與遺傳多樣性等（Harding *et al*, 1997），而且對於依賴海洋環境、又擁有高基因交流的族群，更適合利用 AFLP 這種 DNA 指紋分析法來研究（Gomez-Uchida *et al*, 2003）。而且 AFLP 中的 TE-AFLP 法對於族群研究也可以短時間內產出大量數據，來提供資料研究該物種族群結構。

五、 台灣招潮蟹的族群保育策略

台灣招潮蟹族群量驟減卻仍然保持高基因多樣性，這結果暗示保留或維護適當的棲息地給台灣招潮蟹，或許族群就有恢復的機會。但這也並不代表目前台灣招潮蟹族群就不會遭受滅

絕的危機。就像與台灣招潮蟹共域的弧邊招潮蟹，是一種相當常見的招潮蟹，不論是遺傳變異或者遺傳多樣性都很高（Aoki *et al*, 2008），但位於日本沖繩群島的弧邊招潮蟹族群相對於其他族群來說，不僅族群量小，基因多樣性與核酸多樣性也都低於其他族群，又因為周邊的海灣填海工程正在進行，很有可能會限制該族群基因交流的機會，因此應給予該族群適當的保育措施（Aoki *et al*, 2008）。而在西太平洋地區的粗腿招潮蟹（*Uca crassipes*）採樣的族群中，因為混雜了其他相似種，而造成遺傳多樣性與遺傳變異都相當高，可是有些族群相對的較小，其中幾個族群最多大約只有 500 隻個體左右，滅絕的風險相對於其他族群高出許多，為了不讓其可進行基因交流的族群減少，保護小族群也是我們該考慮的保育策略之一（Aoki and Wada, 2013）。前人研究也指出，一個野生族群如果持續受到環境壓力影響，導致族群量驟減，最後則會讓該族群的基因多樣性與基因交流程度都下降，進而提高族群的滅絕風險（Hoffmann and Willi, 2008）。如果我們任由台灣招潮蟹的族群量繼續驟減，即使台灣招潮蟹擁有再高的遺傳變異與遺傳多樣性，遲早會像沖繩島上的網紋招潮蟹一樣面臨族群滅絕的危機。再以台灣招潮蟹的台南棲息地為例，在 1993 年台南七股的灘地上，台灣招潮

蟹常呈現單一優勢的景象（劉，2012）。但經由近年來採樣與觀察記錄下，發現並無呈現單一優勢的現象（個人觀察）。

雖然在過去的文獻中提到，許多台灣招潮蟹的族群正在逐一消失，例如：曾經記錄過台灣招潮蟹的基隆、高雄永安、宜蘭等（施，1999），但是目前也有許多新的台灣招潮蟹族群陸續被發現，例如台北關渡（施習德老師口述）與屏東大鵬灣（中國時報電子報專頁，<http://www.chinatimes.com/realtimenews/>），以及在台南七股除了本研究採樣點之外，還另有更大的台灣招潮蟹族群存在，但因為不易到達進行採樣與觀察，所以除了一些論文與書籍中提到外，尚未有正式的學術報告（劉，2012）。台灣招潮蟹的遺傳研究中，幼生時期在生活史中也扮演相當重要的角色，所以對於其幼生的生活模式的了解與研究相當重要；對於生活史的了解，或許能更幫助其族群的恢復，例如利用解析度更高的 DNA 分子標記（微衛星標定等）來建立台灣招潮蟹的散佈能力與模式，這對於台灣招潮蟹的復育策略來說，是不可或缺的一部分。總之，如果積極保留適合的棲地與環境，或許目前台灣招潮蟹的族群量就有恢復的可能。

References

- 張寶連。1984。臺灣產提琴手蟹在生化上的比較研究。國立台灣師範大學生物研究所碩士論文。
- 李曉易。1990。台灣招潮蟹 (*Uca formoseensis*) 的生態與行為研究。國立中山大學海洋生物研究所碩士論文。
- 施習德。1999。以形態、遺傳及生態研究台灣特有種台灣招潮蟹之分類系統。國立中山大學海洋生物研究所博士論文。
- 施習德。2002。甲殼類分子生態學。科學月刊。388：307-314。
- 陳曉怡。2008。台灣招潮蟹棲地保育之底質特徵探討：以麥寮為例。國立台灣大學漁業科學研究所碩士論文。
- 盧怡萍、吳盈螢、史金燾、黃生。1997。臺灣河口的北方呼喚招潮蟹之族群遺傳結構。師大生物學報。32：25-32。

劉靜榆、賴國祥、曾彥學、林旭宏、侯安璟。1993。台灣西南沿海

生物資源調查 I：曾文溪口生物資源調查。台灣省特有生物研

究保育中心82年度試驗研究計畫執行成果。71-121。

劉靜榆。2010。走訪台灣西海岸（II）-中彰雲段沿海生態介紹。自

然保育季刊。71:65-67。

劉靜榆。2012。曾文溪口台灣招潮棲地特性研究。台灣生物多樣性

研究期刊。14:1-25。

楊樹森。2012。101年香山濕地棲地復育調查計劃成果報告書。國

立新竹教育大學應用科學系。

Aoki M., T. Naruse, J. Cheng, Y. Suzuki and H. Imai. 2008. Low genetic

variability in an endangered population of fiddler crab *Uca arcuata*

on Okinawajima Island: analysis of mitochondrial DNA. Fisheries

Science. 74:330-340.

- Aoki M. and K. Wada. 2013. Genetic structure of the wide-ranging fiddler crab *Uca crassipes* in the west Pacific region. Marine Biological Association of the United Kingdom. **93**:789-795.
- Araujo R. and M.A. Ramos. 2000. Status and conservation of the giant European freshwater pearl mussel (*Margaritifera auricularia*) (Spengler, 1793) (Bivalvia: Unionoidea). Biological conservation. **96**:233-239.
- Backwell P. R. Y., H. C. John, R. T. Steven, D. J. Michael and I. P. Neville. 2000. Dishonest signaling in a fiddler crab. The Royal Society. **267**:719-724.
- Bazin E., Glémin S. and Galtier N. 2006. Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals. Science. **312**:570.
- Bensch S. and M. Akesson. 2005. Ten years of AFLP in ecology and evolution: why so few animals. Molecular Ecology. **14**:2899-2914.

Chen P. H. and Y.-H. D. Lee. 2008. Being extinguished *Uca formosensis* study. *Journal of soil and water conservation*. **40**:235-256.

Crane J. 1975. Fiddler crabs of the world (*Ocypodidae*: genus *Uca*).
Princeton, New Jersey: Princeton University Press.

Chan B. K. K., L. M. Tsang and K. H. Chu. 2007. Morphological and genetic differentiation of the acorn barnacle *Tetraclita squamosal* (Crustacea, Cirripedia) in East Asia and description of a new species of *Tetraclita*. *The Norwegian academy of science and letters*. **36**:79-91.

Excoffier L. P. Smouse and J. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction sites. *Genetic*. **131**:479-491.

Frankel O. H. 1974. Genetic conservation: our evolutionary responsibility. *Symposium on Genetic and Society*. **78**:53-65.

- Fratini S. and M. Vannini. 2002. Genetic differentiation in the mud crab *Scylla serrata* (Decapoda: Portunidae) within the Indian Ocean. *Experimental marine biology and ecology*. **272**:103-116.
- Geist J. 2010. Strategies for the conservation of endangered freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera* L.): a synthesis of Conservation Genetics and Ecology. *Hydrobiology*. 644:69-88.
- Gomez-Uchida D., W. David, L. Hauser, R. Galleguillos and M. Retamal. 2003. Allozyme and ALFP analysis of genetic population structure in the hairy edible crab *Cancer Setosus* from the Chilean coast. *Journal of crustacean biology*. **23**:486-494.
- Hääg T., A. S. Santos, D. A. Sana, R. G. morato, L. Cullen Jr., P. G. Craeshaw Jr., C. Deangelo, M. S. Dibitetti, F. M. Salzano and E. Eizirik. 2010. The effect of habitat fragmentation on the genetic structure of a top predator: loss of diversity and high differentiation among remnant populations of Atlantic forest jaguars (*Panthera onca*). *Molecular Ecology*. **19**:4906-4921.

Hänfling B. and D. Weetman. 2003. Characterization of microsatellite loci for the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Molecular Ecology Notes*. **3**:15-17

Harding G.C., E. L. Kenchington, C. J. Bird, D. S. Pezzack and D. C. Landry. 1997. Genetic relationships among subpopulations of the American lobster (*Homarus americanus*) as revealed by random amplified polymorphic DNA. *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences*. **54**:1762-1771

Herborg L.M., D. Weetman, C. V. Oosterhout and B. Hanfling. 2007. Blackwell Publishing Ltd Genetic population structure and contemporary dispersal patterns of a recent European invader, the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Molecular Ecology*. **16**:231-242.

Hoffmann A. A. and Y. Willi. 2008. Detecting genetic responses to environmental change. *Nature*. **9**:421-432.

Hung J. P. and C. P. Lin. 2010. Diversification in subtropical mountains: phytogeography, pleistocene demographic expansion, and evolution of polyphonic mandibles in Taiwanese stag beetle, *Lucanus formosanus*. *Molecular Phylogenetic and Evolution*. **57**:1149-1161.

Ives I., Q. S. Phillip and B. S. Howard. 2008. Morphological and genetic variation in the endangered Sulawesi tortoise *Indotestudo forstenii*: evidence of distinct lineages. *Conservation genetic*. **9**:709-713.

Imai H., Y. Hanamura and J. H. Cheng. 2013. Genetic and morphological differentiation in the Sakura shrimp (*Sergia lucens*) between Japanese and Taiwanese populations. *Contributions to Zoology*. **82**:123-130.

Ituarte R. B., A. D. Anatro, T. A. Luppi, P. D. Ribeiro, E. D. Spivak, O. O. Iribarne and E. P. Lessa. 2012. Population structure of the SW Atlantic estuarine crab *Neohelice granulata* throughout its range: a genetic and morphometric study. *Estuaries and Coasts*. **35**:1249-1260.

- Lynch M. and B. G. Milligan. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD marker. *Molecular Ecology*. **3**:91-99.
- Marianna D., P. M. Jean, S. M. Joao and R. Z. Kelly. 2010. Habitat fragmentation reduces genetic diversity and connectivity among toad populations in the Brazilian Atlantic coastal forest. *Biological Conservation*. **142**:1560-1569.
- Ma H., H. Cui, C. Ma and L. Ma. 2012. High genetic diversity and low differentiation in mud crab (*Scylla paramamosain*) along the southeastern coast of China revealed by microsatellite markers. *Experimental Biology*. **215**:3120-3125.
- Nei M. 1975. *Molecular population genetic and evolution*. North Holland press, Amsterdam, Hoand. Pages 149-156.
- Pritchards J. K., M. Stephens and P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using mutinous genotype data. *Genetic*. **155**:945-959.

Shih H. T., J. H. Lee and J. Y. Shy. 2008. Three freshwater and coastal crabs (Crustacea: Decapoda: Brachyura) new to Penghu, Taiwan, with notes on their biogeographical implications. *College and Research*. **21**:39-44.

Shih H. T., H. K. Mok, H. W. Chang and S. C. Lee. 1999. Morphology of *Uca formosensis* Rathbun, 1921 (Crustacea: Decapoda: Ocypodidae), an endemic fiddler crab from Taiwan, with notes on its ecology. *Zoological*. **38**:164-177.

Shih H. T., H. K. Mok and H. W. Chang. 2005. Chimney building by male *Uca formosensis* Rathbun, 1921 (Crustacea: Decapoda: Ocypodidae) after pairing: a new hypothesis for chimney function. *Zoological Studies*. **44**:242-251.

Silva C. I., N. Mesquita and J. Paula. 2010. Lack of population structure in the fiddler crab *Uca annulipes* along an East African latitudinal gradient: genetic and morphometric evidence. *Marine Biology*. **157**:1113-1126.

- Sui L., F. Zhang, X. Wang, P. Bossier, P. Sorgeloos and B. HänXing.
2009. Genetic diversity and population structure of the Chinese
mitten crab *Eriocheir sinensis* in its native range. *Marine biology*.
156:1573-1583.
- Supmee V., L. Ngernsiri, A. Sriboonlert, P. Wonnapijitj and P. Sangthong.
2012. Population genetics of the violet vinegar crab (*Episesarma*
versicolor) along the Andaman sea coast of Thailand. *Zoological*
Studies. **51**:1040-1050.
- Takahasi, S. 1935. Ecology notes on the ocypodian crabs (*Ocypodidae*) in
Formosa, Japan. The Zoological Society of Japan. **15**:78-87.
- Tang B., K. Zhou, D. Song, G. Yang and A. Dai. 2003. Molecular
systematics of the Asian mitten crabs, genus *Eriocheir* (Crustacea:
Brachyura). *Molecular phylogenetic and evolution*. **29**:309-316.
- Von Hagen H. O. 1962. Freilandstudien zur Sexual- und Fortpflanzungs-
Biologie von *Uca tangeri* in Andalusien. *Z. Morph. Ökol. Tiere* **51**:

611-725.

Vekemans X., T. Beauwens, M. Lemaire and I. Roldan-Ruiz. 2002. Data from amplified fragmented length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplays and of a relationship between degree of homoplays and fragment size. *Molecular Ecology*. 11:139-151.

Van der Wurff, A.W.G., Y. L. Chen, N. M. Straalen and J. Schouten. 2000. TE-AFLP combining rapidity and robustness in DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, **28**:5005-5009.

Yamaguchi T. 1994. Fiddler crabs of the genus *Uca* in the collections of three natural history museums in Europe. 1. The specimens held by the Nationaal Natuurhistorisch Museum, Leiden and the Natural History Museum. **11**:151-189.

Yamakawa A. Y. and H. Imai. 2013. PCR-RFLP typing reveals a new invasion of Taiwanese *Meretrix* (*Bivalvia*: *Veneridae*) to Japan.

Aquatic invasions. **4**:417-415.

Yu C. G., Z. Q. Han, J. Zheng, L. J. Xue and T. X. Gao. 2010. Genetic population structure of *Ovalipes punctatus* revealed by AFLP markers. Scientific Research and Essays. **5**: 1649-1654.

Wieman A. C., P. B. Berendzen, K. R. Hampton, J. Jang, M. J. Hopkins, J. Jurgenson, J. C. McNamara and C. L. Thurman. 2014. A panmictic fiddler crab from the coast of Brazil? Impact of divergent ocean currents and larval dispersal potential on genetic and morphological variation in *Uca maracoani*. Journal of Marine Biology. **161**: 173-185.

表 1、台灣招潮蟹各族群的族群密度。以步行的方式用 GPS 劃定四個採樣地區的面積，再以隨機 5 個 9 m² 的樣區估計期族群密度，最後以分佈總面積/9 m² 的族群密度，得到該採樣區的族群估量。

Trap sites	Populations density (N/m²)
Siangshan	1.8
Siansi	1.2
Mailiao	4
Chiku	0.6

表 2、台灣招潮蟹平整螯與細螯在各族群的比例。利用卡方檢定，
 檢視台灣西部沿海濕地四個採樣地區台灣招潮蟹螯形比例差異。

	brachychelous chela (%)	leptochelous chela (%)	<i>n</i>	χ^2	<i>P</i> value
Siangshan	46	54	54		
Siansi	75	25	49	11.99	< 0.01
Mailiao	78	22	52		
Chiku	80	20	41		

表 3、總共使用 130 個增值片段長度多型性基因座進行分子變方分析，檢視台灣西部沿海岸四個樣區的台灣招潮蟹的族群遺傳變異。 P 值透過排列運算 999 次得知。

Source	df	%	<i>p</i>
Among population	3	1	<0.001
Within population	135	99	<0.001

df : Degree of freedom

E.V. : Estimated variance

表 4、各族群之間的遺傳分化指數 (Phi'PT values) 與基因交流指數 (N_m values)。

	Siangshan	Siansi	Mailiao	Chiku
Siangshan	-	39.040	115.528	44.630
Siansi	0.015	-	282.040	12.718
Mailiao	0.006	0.002	-	126.375
Chiku	0.014	0.047	0.005	-

Above diagonal: N_m values ; Below diagonal: Phi'PT values

表 5、台灣西部沿海岸四個樣區的台灣招潮蟹的遺傳多樣性指數。

Sampling site	N	H_j	S.E.
Siangshan	39	0.11732	0.00568
Siansi	30	0.08277	0.00587
Mailiao	38	0.13698	0.00436
Chiku	38	0.12883	0.00549

H_j: Expected heterozygosity of genetic diversity

表 6、台灣西部沿海岸四個樣區的台灣招潮蟹的單套基因多樣性。

Sampling site	N	H	S.E.
Siangshan	39	0.196	0.010
Siansi	30	0.137	0.011
Mailiao	38	0.230	0.009
Chiku	38	0.214	0.010

H: haplotype diversity

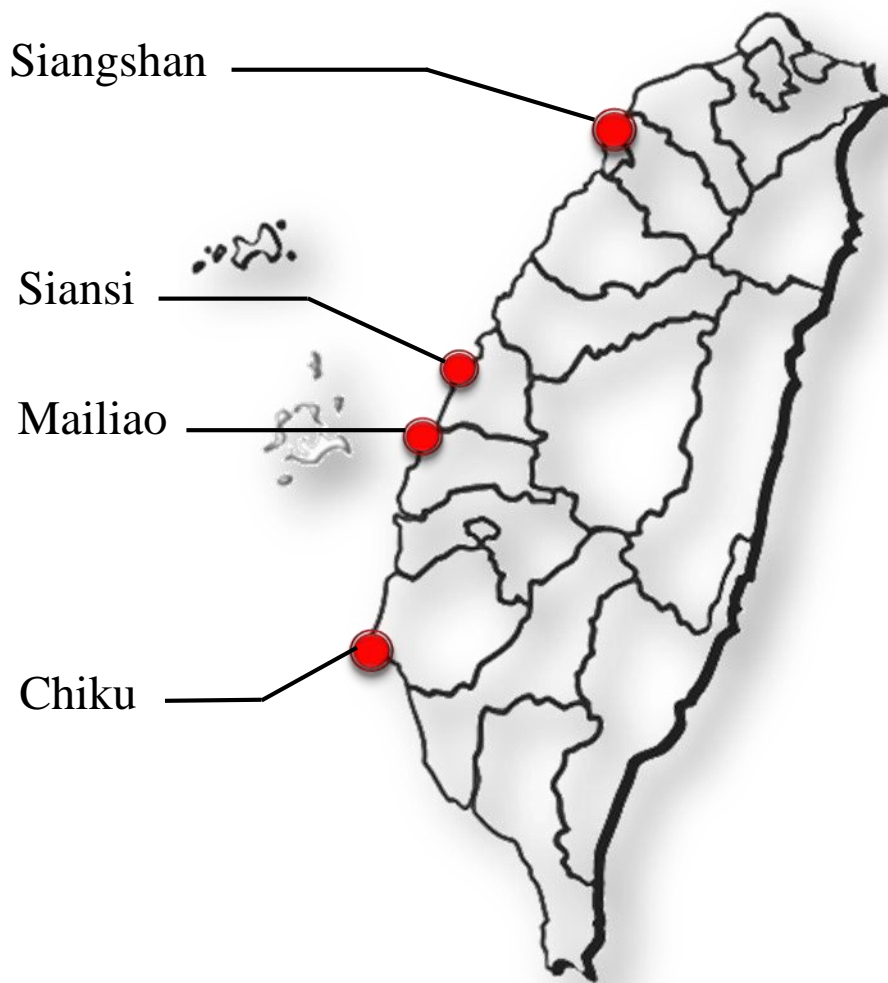


圖 1、台灣西部沿海岸四個台灣招潮蟹樣區（新竹香山= Siangshan、彰化線西= Siansi、雲林麥寮= Mailiao、台南七股= Chiku）。

(A)



(B)



(C)



(D)



圖 2、台灣招潮蟹大螯形態與背甲形態描述，A) 為台灣招潮蟹的細螯螯形的個體，B) 為台灣招潮蟹的平整螯螯形個體，C) 為台灣招潮蟹的白點背甲個體，D) 為台灣招潮蟹的黑紫色背甲個體。

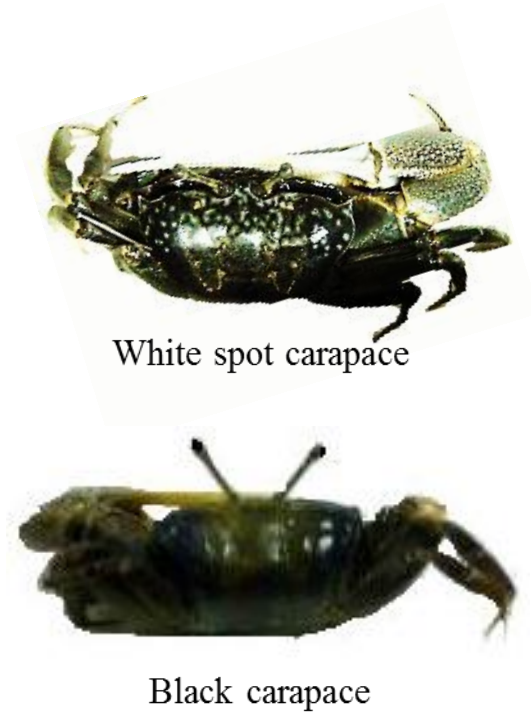
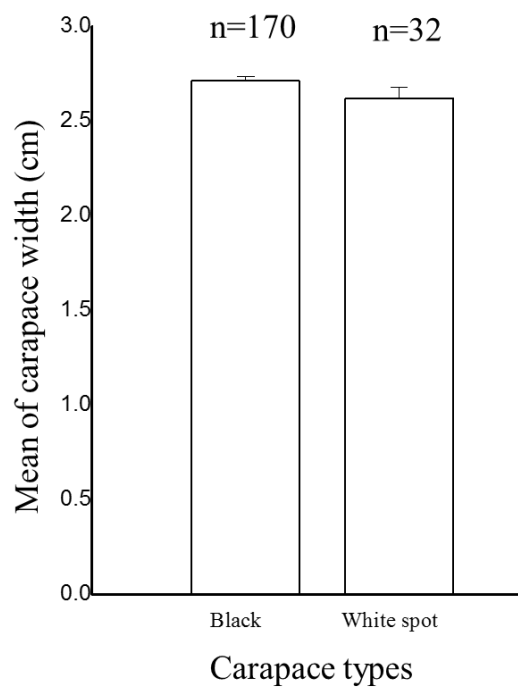


圖 3、台灣招潮蟹的白點背甲的個體，與黑色被甲的個體的背甲寬是否有差異存在，經由 Mann-Whitney U Test 檢定的結果 ($W=31.31$, $df=1$, $P=0.175$) 並無顯著差異。

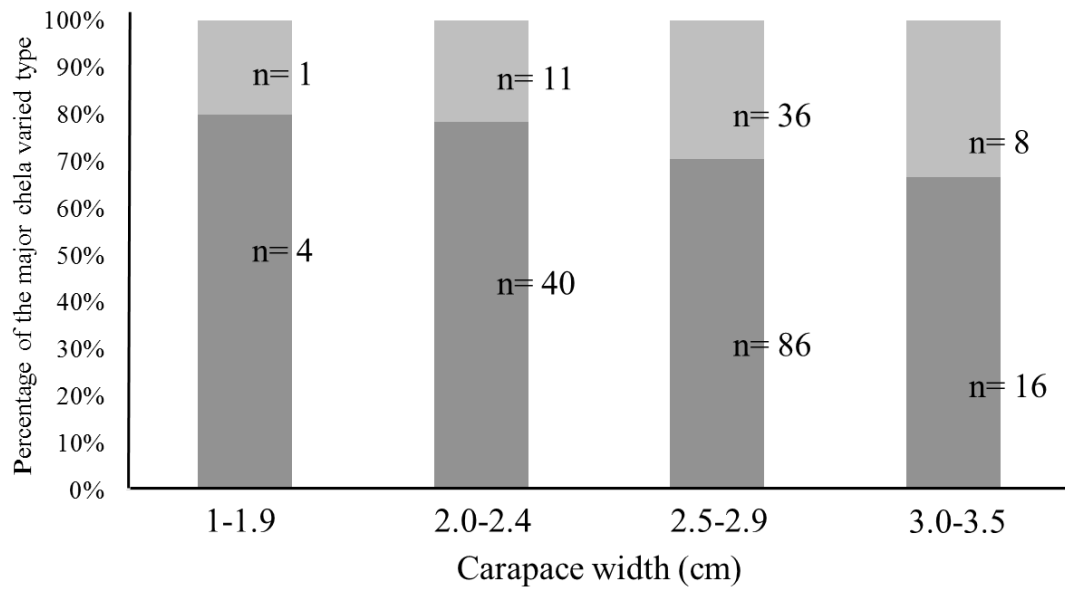


圖 4、特定背甲寬的範圍之下，螯形態所佔比例是否有差異存在。

利用卡方檢定結果 ($\chi^2 = 1.684, df = 3, P = 0.6405$) 並無顯著差異。但

越大背甲的個體中細螯形比例比較多。

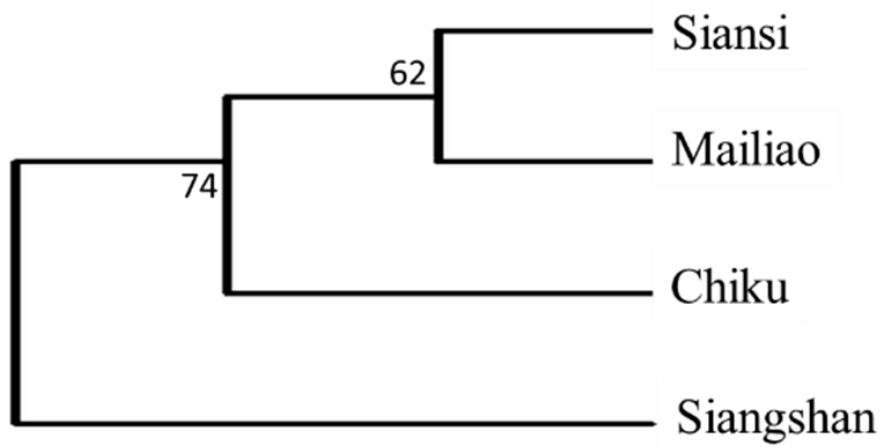


圖 5、台灣西部沿海岸四個樣區的台灣招潮蟹族群，樣區間遺傳距離的 UPGMA Consensus 親緣關係樹。

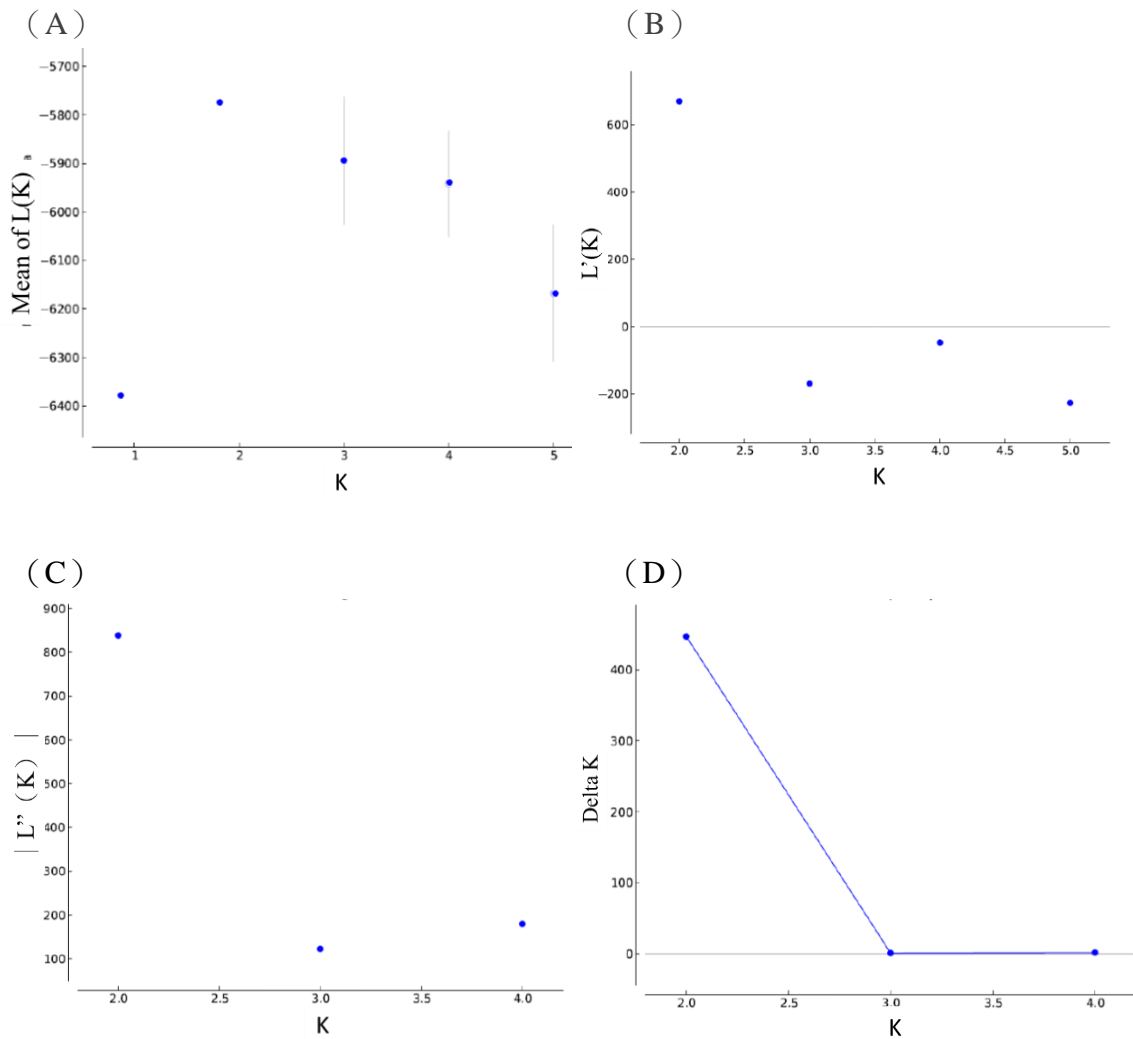
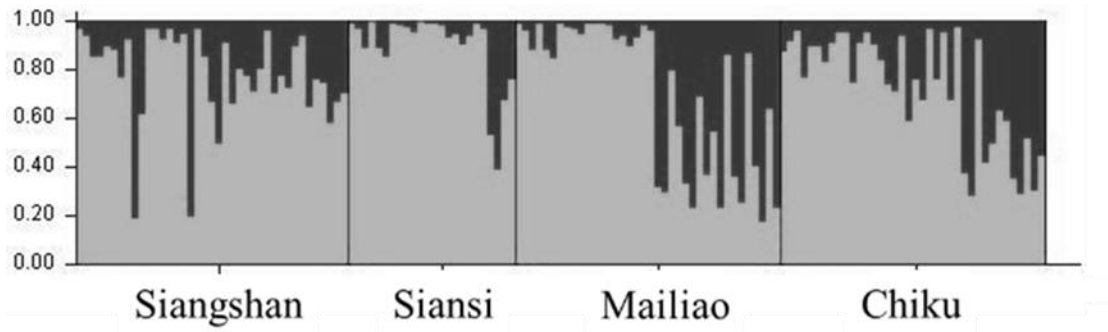


圖 6、以圖像檢驗最恰當的 K 值，四步驟檢視台灣西部沿海岸台灣招潮蟹族群遺傳結構的分派檢定結果，設定 $K=1\sim 4$ ，K 假設為遺傳群的數量 (genetic deme) 運用貝式 (Bayesian) 的分群方法找出最佳模式的 K 值。本結果則是利用檢驗 $K=1\sim 4$ 之中最佳的 K 值，以及平均 $L(K)$ 的曲線斜率最大的為 $K=1\sim 2$ 之間 (圖 A)， $L'(K)$ 則是在 $K=2$ 的時候有較大值 (圖 B， $L'(K) = L(K) - L(K-1)$)， $|L''(K)|$ 最大為 $K=2$ (圖 C)，在 ΔK 的部份則是最大值 $K=2$ 的時候出現 (圖 D， $\Delta K = |mL''(K)| / [L(K)]$)。

(A)



(B)

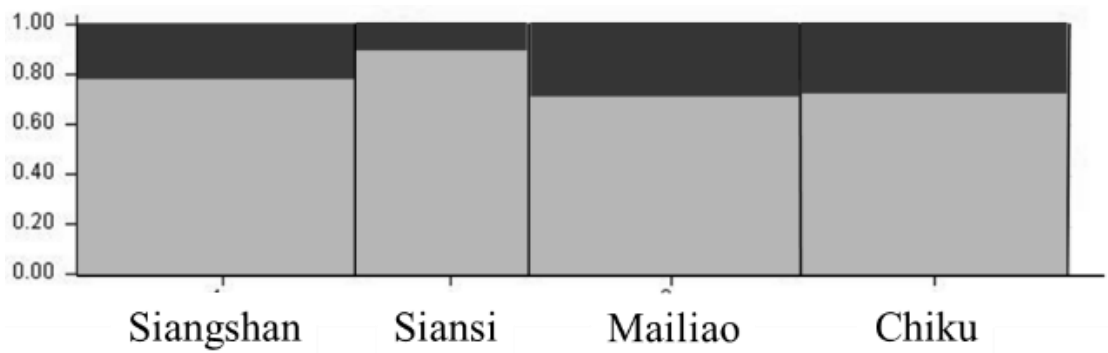


圖 7、台灣西部沿海岸四個族群的分派檢定 (assignment test) 的結果，共兩個遺傳群，分別用黑色與灰色代表，每個群集代表一個樣區，上圖為每個個體分派到個遺傳群的機率。A) 個體分派到各遺傳群的機率，B) 樣區內所有個體分派到個遺傳群的平均機率，結果顯示各區並無太大差異。

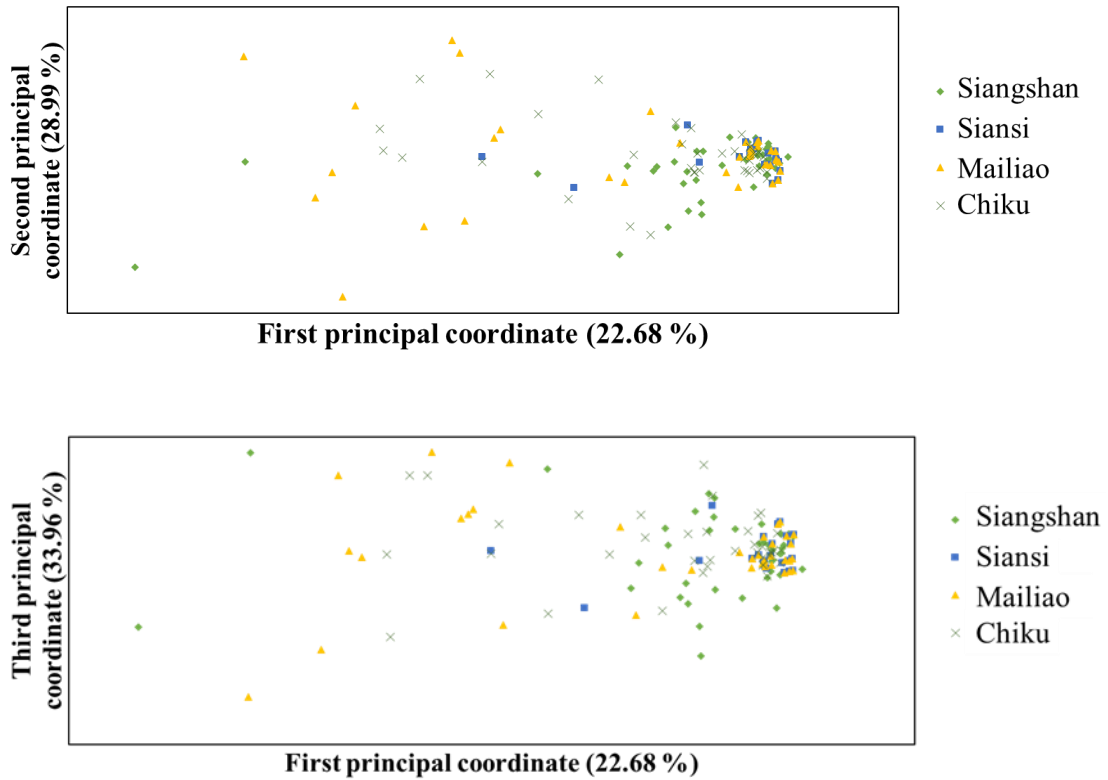


圖 8、台灣西部沿海岸濕地，四個台灣招潮蟹族群個體間遺傳關係的主座標軸分析 (PCoA)，前三座標軸的結果 (22.68%、28.99%、33.96%)，顯示台灣招潮蟹並沒有明顯分群現象，而且麥寮與線西族群幾乎相重疊。

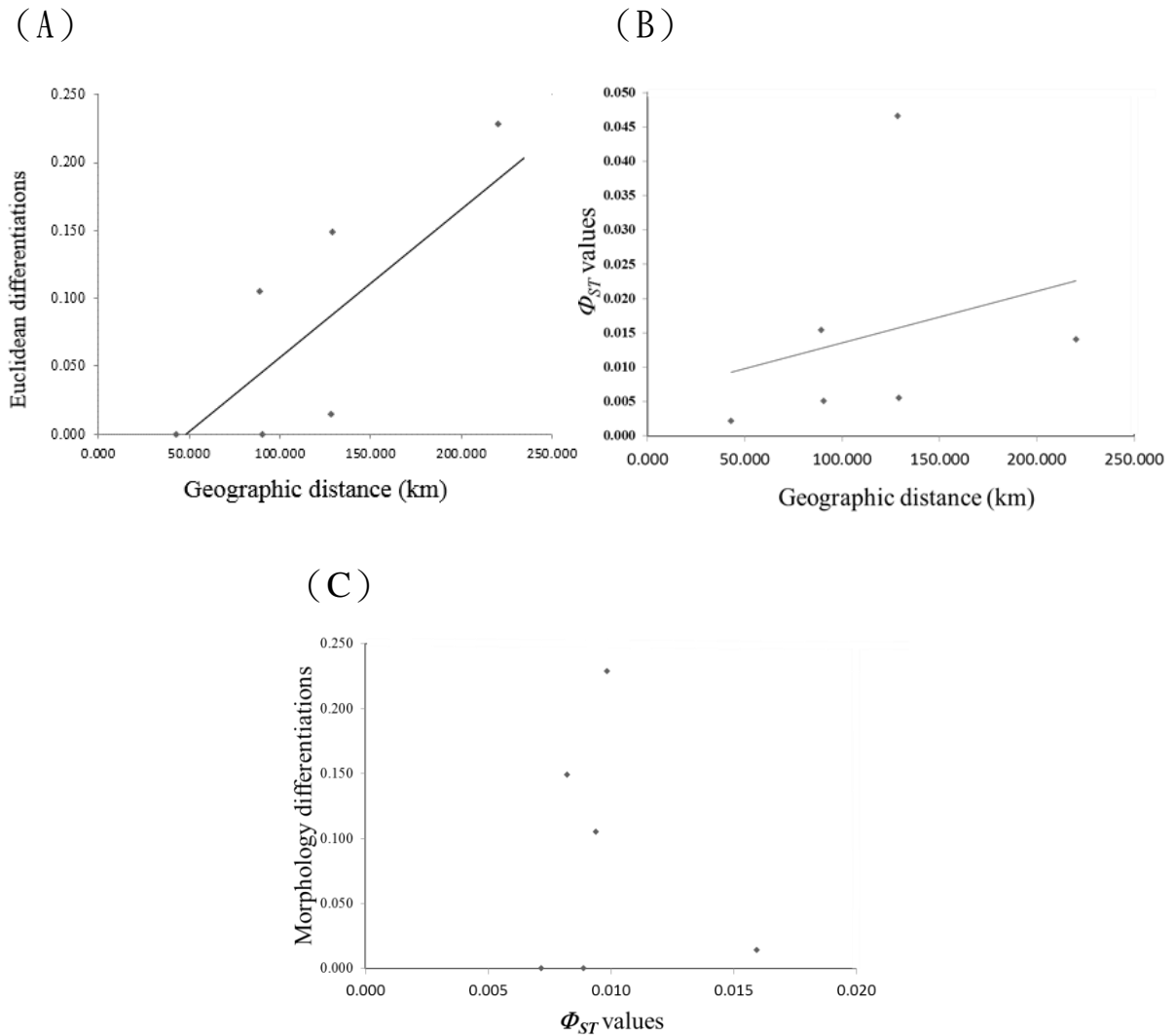


圖 9、台灣招潮蟹族群四個族群的遺傳距離、形態距離、地理距離之間的相關性，A) 形態距離指數 (Euclidean distance) 先與地理直線 (Geographic distance) 距離進行 Mantel test 檢定，結果並不顯著 ($R^2 = 0.6503$, $P = 0.076$)，B) 遺傳距離 (Genetic distance, Φ_{PT}) 與地理直線距離進行 Mantel test 檢定，結果也無顯著差異 ($R^2 = 0.075$, $P = 0.3$)，C) 固定地理直線距離來檢測遺傳距離與形態距離使否呈現相關性，結果顯示遺傳距離與形態距離並無任何相關性 ($R^2 = 0.0261$, $P = 0.48$)。

個人經歷

姓名：洪昆璿 Kun, -Chin Hung

連絡信箱：x12127802@hotmail.com

學歷

2012.09-2015.07 東海大學 生命科學系 碩士班

2008.09-2011.06 長榮大學 生物科技學系 學士班

經歷

長榮大學 物科技學系 普通生物學 實驗助教

東海大學 生命科學系 普通生物學、遺傳學、生態學實驗助教

2012 年 清淨彰化海岸線-彰化西濱海岸淨灘活動 兼任助理

2015 年 動物行為暨生態學研討會口頭論文發表 嘉義 嘉義大學

2015 年 台灣濕地生態學研討會口頭論文發表 台南 台南大學

2015 年 生命科學的跨領域整合語應用研討會 三分鐘演講 決賽