

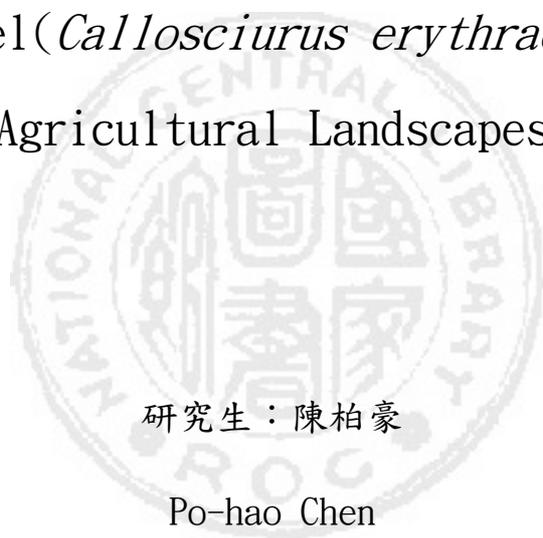
東海大學生命科學系  
碩士論文

指導教授：林良恭

Liang-kong Lin

農村地景中赤腹松鼠(*Callosciurus erythraeus*)  
的族群遺傳結構

Population Genetic Structure of Red-bellied Tree  
Squirrel(*Callosciurus erythraeus*) in  
Agricultural Landscapes



研究生：陳柏豪

Po-hao Chen

中華民國九十六年八月



# 東海大學生命科學系碩士論文

農村地景中赤腹松鼠(*Callosciurus erythraeus*)  
的族群遺傳結構

Population Genetic Structure of Red-bellied Tree  
Squirrel(*Callosciurus erythraeus*) in  
Agricultural landscapes

研究生：陳柏豪

Po-hao Chen

指導教授：林良恭

Liang-kong Lin

中華民國九十六年八月

## 誌謝

感謝家人陪伴我熬過苦痛的碩士班生涯，三生有幸能得此無私的愛，你們的關懷與叮嚀，我謹記在心。在台中的日常起居承蒙同為高雄人的佳倩與友友姐妹照應，以及感謝常常驅車到東海探望我的台大保育社同學們，你們熟悉的臉龐是種莫大的安慰。

感謝實驗室所有的成員的支持與包容，特別是王豫煌學長，野外採集、分生技術與地景資料處理均受其指導而獲益良多。感謝育誠總是兩肋插刀幫我擋掉許多災難，孟芳、惠美和宜芳耐心又有條理的幫我處理麻煩的行政流程。感謝仕緯、家鴻、守立、笈克、翰征、shock、昭龍、佑哲、坤傑、小朱、烏龍、廣霖、逸文、正慧、大俠、哈扁、屏東人等在學術討論與野外採集上的幫助，你們每個笑容都是支撐我走完碩士班的動力。

這三年間與指導教授林良恭先生相處的種種學生點滴在心頭，對論文的建議更是惠我良多。感謝口試委員台灣師範大學李壽先老師、東海大學林仲平老師、台灣大學王宏毅老師和文化大學林思民老師撥空審閱，並指出論文不足之處，讓其更完整。

最後將此論文獻給為其犧牲的赤腹松鼠們，盼其能在山林間生生不息。

## 目錄

|                     |    |
|---------------------|----|
| 中文摘要                | 1  |
| 英文摘要                | 2  |
| 前言                  | 3  |
| 材料方法                | 7  |
| 1. 研究地點             | 7  |
| 2. DNA 萃取流程         | 11 |
| 3. DNA 品質控制與濃度定量    | 11 |
| 4. 擴增片段長度多型性        | 12 |
| 5. AFLP 條帶分析        | 16 |
| 6. 遺傳資料分析           | 17 |
| 結果                  | 23 |
| 1. 野外捕捉資料           | 23 |
| 2. 樣區的地景結構          | 23 |
| 3. 遺傳資料分析結果         | 24 |
| 討論                  | 28 |
| 1. 樣區的地景結構與遺傳歧異度的關係 | 28 |
| 2. 地景障礙對族群分化的影響     | 30 |
| 3. 地景結構對赤腹松鼠擴散的影響   | 32 |

|           |    |
|-----------|----|
| 結論.....   | 36 |
| 參考文獻..... | 37 |
| 表目.....   | 43 |
| 圖目.....   | 44 |

## 摘要

近代道路的增加與都市的發展，使得台灣西部區域農村地貌具有複雜的地景結構，迄今台灣未有針對地景結構與動物遺傳結構的相關研究。本研究乃結合地景生態與分子標記，檢視台灣中部三義地區農村地景結構中赤腹松鼠(*Callosciurus erythraeus*)的族群遺傳結構。八個樣區 6098 捕捉籠夜，總共取得 183 隻赤腹松鼠個體組織，使用四種增值片段長度多型性螢光引子組合檢視族群遺傳結構，各樣區並無明顯族群遺傳歧異度差異的現象，且遺傳歧異度與六種主要地景的特徵因子並無關聯性。分子變方分析(AMOVA)結果顯示貫穿三義地區的高速公路東西兩邊的區域間與區域內族群間，有顯著但輕微的分化( $\Phi_{RT}=0.039$ ,  $\Phi_{PR}=0.085$ ,  $P<0.0001$ )，顯示高速公路為赤腹松鼠擴散的地景障礙。另分派檢定與主座標分析同樣支持東西分群，而東西兩區域內位於北邊的樣區為混合的遺傳群。Mantel test 檢驗個體間遺傳距離與直線距離的相關性，發現西邊區域的相關性最高，而東邊區域的相關性次之。本研究亦證實赤腹松鼠擴散的路徑，因受到地景障礙的影響而採用風險較低的非直線路徑。

## Abstract

Due to road construction and urban development in modern time complex forest-agriculture landscapes were formed in western Taiwan. There is lacking of studies focus on the relationships between landscape structure and animal genetic structure in Taiwan. This study is combined of landscapes and molecular marker, and to exam the effects of landscapes on the population genetic structure of the red-bellied tree squirrel (*Callosciurus erythraeus*). 183 squirrels were trapped in 6098 trapnights from eight sampling plots and examined genetic variability by four fluorescence amplified fragment length polymorphism primers. Gene diversity did not differ among eight plots and also showed no correlation with six landscape characteristics. Analysis of molecular variance results showed significance but slight differentiation between regions and within region between populations ( $\Phi_{RT}=0.039$ ,  $\Phi_{PR}=0.085$ ,  $P<0.0001$ ). Assignment test and principle coordinate analysis showed different genetic demes in west and east regions and admixed genetic demes in the northern two plots, that suggest highway is a landscape barrier for squirrel dispersal. Mantel test results showed higher correlation of genetic distance and Euclidean distance in west region than east region and landscape of west region is simpler and more continuous than east region. This study also supported squirrels' dispersal path is affected by landscape, and chose nonlinear dispersal path which is less risk.

## 前言

自然環境的人為開發是野生動物棲息地破碎的主要原因，隨著棲息地的面積縮減與被隔離，族群量變少而呈劇烈波動，增加滅絕的危機 (Calson and Edenhamn 2000)，近親交配與基因漂變也會伴隨著小族群而來，造成族群內部喪失遺傳歧異度，減低處理外在環境變動的適應力，面臨較高的族群滅絕的風險 (Saccheri *et al.* 1998)。棲地破碎化也阻礙了族群間的基因流動，加深被隔離的族群間族群分化的程度 (Hirota *et al.* 2004)。

棲地破碎化使棲地連結度下降，棲地連結度的定義為棲地間彼此往來的便利或阻礙程度 (Baudry and Burel 1998)，均質地景因干擾後產生不同的地景類型而異質化。一旦新的地景類型無法提供動物躲避掠食者的遮蔽，或棲地間的距離大於動物嘗試穿越時移動的極限，則該地景類型成為動物在棲地間移動時的障礙 (Arnold *et al.* 1993)。地景障礙 (landscape barrier) 使動物擴散的個體數減少，且擴散的距離增加 (Diffendorfer *et al.* 1995)，擴散是動物個體從其出生地或群體，移動到其交配地或群體的行為 (Shields 1987)，擴散對族群的表現有極大影響，決定動物的分佈模式，影響族群的調節與穩定，也控制了基因流動的模式 (Dieckmann *et al.* 1999)。Bakker and Vuren (2004) 指出紅松鼠 (*Tamiasciurus hudsonicus*) 在森林皆伐

地景中擴散，必須在穿越或是繞開皆伐地兩種路徑中選擇，因繞開必須花費較多的能量，而直接穿越則面臨較高的風險，因此皆伐地所形成的地景障礙影響動物擴散的路徑選擇。

儘管擴散如此重要，且受棲地破碎化的影響，但因大規模的野外實驗不易進行，無法長時間對大量的個體進行捕捉與追蹤其擴散的行為，故仍對其瞭解仍然有限(Wiens 2001)。透過小尺度的遺傳分化資料，可以估算動物族群的擴散表現，特別適合用來研究地景結構對擴散的影響(Vos *et al.* 2001)，如東京郊區大林姬鼠(*Apodemus speciosus*)的族群被都市地景隔離，動物雖無法直接穿越都市進行擴散，但可經由河川兩邊的森林擴散到其他族群進行基因交流，降低遺傳分化的程度與維持遺傳歧異度(Hirota *et al.* 2004)。

動物在均質地景中個體間的遺傳距離會隨著地理距離增加，此稱為地理距離隔離理論(isolation by distance) (Wright 1943)，因動物距離相近的個體間，交配的機率大於相距遠的個體間，這現象會受到棲地破碎化的影響，因距離相近的個體，無法穿越阻隔兩者間的地景，而造成其基因流動減少，故遺傳距離增加。利用地理資訊系統(geographic information system)的功能，能夠了解動物在破碎化地景中，所採用遭遇風險最低且耗費能量最少的擴散路徑，即為最少代價距離(least cost distance) (Verbeulen *et al.* 2003,

Adriaensen *et al.* 2003)，例如狍(*Capreolus capreolus*)其棲息的森林被轉變為農地與建築物，僅有少數森林彼此連接，其個體間的遺傳距離與最小花費距離呈正相關，而與直線距離無相關，表示該物種依賴森林作為擴散的通道，並且會避開農地與建築物(Coulon *et al.* 2004)。地景結構對美洲貂(*Martes americana*)的研究顯示，在破碎地景中的個體間，遺傳距離與直線距離的相關性值低於遺傳距離與最少代價距離的相關性，但在完整森林中，前述兩項的相關質性差異降低(Broquet *et al.* 2006)。

隨著都市化蓬勃發展，道路的興建亦伴隨著棲地破碎化(Meffe and Carroll 1994)，由於網狀道路系統造成野生動植物族群間的棲地連結度下降(Epps *et al.* 2005)，已有許多研究指出道路造成野生動物族群間的基因交流降低，如甲蟲(Keller and Largiadèr 2003)、兩棲類(Reh and Seitz 1990)、山貓和郊狼(Riley *et al.* 2006, Strasburg 2006)等。

從 1970 年代至今，台灣整個西部農村地區因經濟成長，自然環境受到都市化擴展與道路系統的開發，加上 1978 年所興建完成的中山高速公路，更沿著台灣西部低海拔區域由北向南穿越中部地帶的丘陵地，讓分佈於低海拔區域的物種面臨嚴重的棲地破碎化影響，如環頸雉(*Phasianus colchicus*)(陳等 2004)與諸羅樹蛙(*Rhacophorus*

*arvalis*) (盧 2004)，但現今並無於農村地景中，針對道路與人為開發所形成的地景類型，尤其是道路影響低海拔哺乳動物的棲息相關研究。

赤腹松鼠(*Callosciurus erythraeus*)為台灣低海拔林地常見的哺乳動物，親源地理的研究顯示其受到中央山脈、濁水溪與蘭陽溪的阻隔，形成基因分化的界線(Oshida *et al.* 2006)，過去之分類研究亦有區域性分佈的四種亞種類型(于 1984)。台灣中部三義地區為典型的農林地，人為活動頻繁，近代道路的增加與都市的發展，造成鑲嵌飾式的地景，森林面積減少，由於樹棲的特性使赤腹松鼠的分佈易受林地有無影響(劉 2002)。AFLP 是透過 PCR 反應增殖特定的限制片段提供快速檢視遺傳多樣性的方法，具有高解析度、可重複性並節省時間與花費等優點(Muller 1999)，結合景觀生態與分子生態的工具，將能有效的檢視台灣中部三義地區的地景結構，對赤腹松鼠族群遺傳的影響，本研究目的欲回答以下問題：

- 1)地景結構與赤腹松鼠族群遺傳歧異度的關係為何?
- 2)地景障礙是否造成三義地區赤腹松鼠族群的遺傳分化?
- 3)透過地景遺傳研究，檢視地景結構如何影響赤腹松鼠的擴散?

## 材料與方法

### 一、研究地點

研究地區在台灣西北部的苗栗縣三義鄉(東經 120.46 度，北緯 24.24 度)，南邊為大安溪的溪床，與后里接鄰；西邊以火炎山脈為界與通宵鎮跟苑裡鎮相接；東邊為關刀山與大湖鄉跟卓蘭鎮相接；北邊接臨著銅鑼鄉。全區主要為丘陵地形，面積僅有十分之一為平原，海拔高度為 300 到 900 公尺，平均高度為 400 公尺，一月平均溫度為 15°C，七月平均溫度為 28°C，年降雨量為 1500 到 2000 公厘 (<http://www.sanyi.gov.tw>)。森林為主要的地景類型，多為油桐與相思樹的次生林，明顯的道路切割主要為國道與省道南北向貫穿，以及縣道與鄉道東西向切割，建築物、農田、果園、茶園、墓地和荒地等人為地景隨著道路兩邊散佈。

#### 1. 地景類型分類

全區地景圖層以 Arc Map (version 8.0, ESRI, California) 進行地景分析研究，利用 2001 年農林航空測量所拍攝的 1/25000 正攝影像做為地景判斷依據，在 Arc Map 程式下建立空白的圖層，將空白圖層與正攝影像堆疊之後，進行地景類型的判斷辨識，以 1/1500 的比例在空白圖層上沿著地景類型的邊界，將邊界數化描繪至空白的圖層上，共將三義分為 20 種地景類型(王豫煌 未發表資料)。依野外

觀察赤腹松鼠的經驗，將影響其擴散程度相似的地景合併，既有地景分類中的荒地與墓園合併為灌叢，旱地、田地、茶園和草地合併為農地，鐵道、三等道路、小路與一般道路合併為小路，礫地和岩壁合併為裸露地，溪流與池塘合併為水體，總共為 11 種地景類型（表一、圖一）。以林冠的大小與密度分辨森林、果園與竹林地景，森林的林冠與密度最大，果園的林冠與密度較小，竹林的林冠密度高但小。灌叢地景的特徵為沒有喬木的樹冠，長著稀疏的長草與灌木，有時可見到地表。農地地景的特徵為地表裸露較多，有整齊且清楚的農作物栽種；建築地景為樓房與其周邊的水泥地跟小於五公尺的道路。高速公路為國道一號與省道。路寬小於五公尺的道路設為小路。裸露地的特徵為地表裸露，沒有植被覆蓋。水體則為溪流與池塘。依照該地景類型對赤腹松鼠棲息及移動時的影響分為四大類(圖二)，森林與果園為棲地 (habitat)；竹林、灌叢地和農地為移遷廊道 (corridor)；小路、縣道和裸露地為輕微地景障礙 (incomplete barrier)；國道、省道、建築物與水體為完全阻隔的地景障礙 (complete barrier)。

森林與果園為赤腹松鼠的棲地，各佔總面積的 60.6%與 10.3%，總和為 70.9%，面積為 7090 公頃。可作為赤腹松鼠移遷廊道的竹林、灌叢地與農地佔總面積的 20.5%。對赤腹松鼠擴散造成不完全障礙的縣道、小路和裸露地，佔總面積的 2.2%。赤腹松鼠無法穿越，為完

全地景障礙的建築物、高速公路與水體則佔總面積的 6.4%。

## 2. 捕捉樣區位置的選擇方式

因赤腹松鼠的棲地為森林，故參考正攝影像的森林分布，挑選森林覆蓋度高的區域進行捕捉，為檢視高速公路對族群遺傳結構的影響，在其東西兩邊設置三組位置對應的樣區，西邊為 W2~W4，東邊為 E1~E3，並使兩樣區間的距離盡量一致，以方便後續的分析，為了檢測東西區域內樣區間的地景結構對赤腹松鼠族群遺傳結構的影響，在 W1 與 E4 設兩樣區，增加區域的範圍。W1 與 W2 的距離最近，相距 1078 公尺，相距最遠的兩樣區為 W1 與 E4，距離為 7889 公尺。

## 3. 樣區內的地景結構

利用 Arc GIS (version 3.3, ESRI, California) 標出每個樣區中曾經捕捉到赤腹松鼠的籠位並計算其重心，以重心為圓心，使用 Arc Map (version 8.0, ESRI, California) 製造半徑為 1500 公尺的圓型緩衝圖層(buffer zone)，並將緩衝圖層與地景分類圖層套疊，即得到每個樣區周遭的地景分類圖層，因為 W3 與 W4 的捕捉籠位重心離三義全區的地景分類圖層的邊緣較近，因此該樣區的圓形緩衝圖層超出邊界，而使代表樣區周遭的地景分類圖層不是完整的圓形。將該圖層由多邊型(polygon)轉換為方格(grid)以利 FRAGSTATS 3.3 (McGarigal *et al.* 2002)分析，FRAGSTATS 3.3 參數設定中，使用

標準分析模式，patch neighbors 設定為 8 cell rule，以此設定計算各樣區周遭森林的地景特徵，總共運算 14 種地景特徵，其為 Forest percentage、Patch density、Largest patch index、Edge density、Landscape shape index、Perimeter-area fractal dimension、Clumpiness index、Like adjacencies percentage、Interspersion and juxtaposition index、Conectance index、Patch cohesion index、Landscape division index、Splitting index 和 Aggregation index，以地景特徵為樣區間的地景變異，透過主成分分析(principle component analysis, PCA)檢視樣區間的地景結構差異。

#### 4. 捕捉方法與組織取樣

每個樣區進行 1 到 2 次的捕捉，調查時間約 7 個捕捉夜，以穿越線的方式進行佈籠，籠位間距 10 到 20 公尺，香蕉為誘餌放入台灣製老鼠籠進行捕捉，每日上午 8 點到上午 12 點查籠，捕捉到的赤腹松鼠以 Forane (isoflurane) 進行麻醉，使用滅菌消毒過的解剖用具進行剪指法標記，取下的組織放入裝有無水酒精的冷凍小管中，紀錄捕捉日期、籠位、個體編號和性別，依據雌性是否乳頭明顯、陰道口開啟，雄性則以睪丸膨大與否作為生殖狀態的判斷依據，完成組織採樣與資料紀錄後，帶回原捕捉籠位釋放，回到實驗室後，將組織置入  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。

## 二、DNA 粹取流程

使用 DNA 萃取套裝組(DNA extraction kit)取其 DNA(genomic DNA)，步驟如下：

- 1)將小塊的松鼠組織切碎後放入加有 300  $\mu$ l 的組織與細胞溶解液 (tissue and cell lysis solution)的冷凍小管中。
- 2) 加入 1  $\mu$ l 的蛋白質分解酶 K (proteinase K)，加溫至 65°C 維持 15 分鐘，並每隔五分鐘搖晃均勻，隨後降溫至 37°C。
- 3)加入核糖核酸分解酶(RNase A)保持溫度於 37°C，維持 30 分鐘，隨後置於冰上五分鐘。
- 4)接著加入 175  $\mu$ l MPC 蛋白質沈澱反應劑(MPC protein precipitation reagent)用力搖晃 10 秒鐘，放置入離心機以每分 15000 轉離心 10 分鐘，取出上清液置入新的冷凍小管中。
- 5)加入 500  $\mu$ l 的異丙醇(isopropanol)，隨後上下顛倒冷凍小管 40 次，以 4°C 每分 13000 轉離心 10 分鐘，將異丙醇 (isopropanol) 取出，以 75%的酒精清洗兩次。
- 6)加入 20  $\mu$ l 的 TE 緩衝液溶解 DNA，產物放入 4°C 冰箱待其溶解。

## 三、DNA 品質控制與濃度定量

使用微量分光光度計測量濃度，以滅菌過的二次水稀釋濃度，控制每隻個體的 DNA 濃度均在 40-60ng/ $\mu$ l 之間，並量測溶液對 260nm

與 280nm 的吸光值，確定所有個體的 DNA 溶液的  $OD_{260}/OD_{280}$  值均在 1.8 以上，最後將濃度與品質一致的 DNA 儲存於 4°C 冰箱。

#### 四、擴增片段長度多型性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP)

依照 Vos *et al.* (1995) 的作法及接合子序列(adaptor)進行 AFLP 操作，分三部分，1)利用兩種限制酶(restriction enzyme)切割 DNA，隨後在這些片段兩端接上接合子，接合子序列包含核心序列(core sequence)，以及限制酶專一序列(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 1 到 3 個可任意變換的含氮鹼基，此步驟需 2 次聚合酶鍊反應，分別為前擴增反應 (pre-selective amplification) 和選擇性擴增反應 (selective amplification)，PCR 反應會透過引子的引導，增殖具有與引子對應的接合子的 DNA 片段，選擇性擴增反應的引子其 5' 端具有螢光染劑標定，3)將被擴增的特定片段變性處理 (denature) 為單股狀態後，進行電泳分析擴增片段的長度。

## 1. 限制酶切割(restriction)

使用兩組限制酶 *EcoRI*/*Taq*<sup>α</sup>*I* 和 *EcoRI*/*MseI* 切割 DNA，因 *EcoRI* 與 *Taq*<sup>α</sup>*I* 兩種限制酶的反應溫度不同，因此切割過程分兩階段，而 *EcoRI*/*Taq*<sup>α</sup>*I* 則可以一起作用。

### 1.1 *EcoRI*/*Taq*<sup>α</sup>*I* 限制酶切割

*EcoRI* 限制酵素先作用，總反應體積為 5  $\mu$ l，其內有 2.25  $\mu$ l 的滅菌水、0.25  $\mu$ l 的 *EcoRI* 限制酶(20 U/ $\mu$ l)、0.5  $\mu$ l 的 10X NEB Buffer 3 和 2  $\mu$ l 的 DNA (100ng)，混合均勻後，保持溫度在 37°C 維持三小時，讓 *EcoRI* 限制酶切割 DNA，之後升溫至 65°C，維持 10 分鐘，讓 *EcoRI* 停止反應，接著是 *Taq*<sup>α</sup>*I* 限制酶作用，總反應體積為 10  $\mu$ l，其內有 4.15  $\mu$ l 的滅菌水、0.25  $\mu$ l 的 *Taq*<sup>α</sup>*I*、0.5  $\mu$ l 的 10X NEB Buffer 3、0.1  $\mu$ l 的 100X BSA 和 5  $\mu$ l 的 *Taq*<sup>α</sup>*I* 酵素反應後的預混合液(premix)，保持在 65°C 維持 3 小時，之後升溫至 80°C 讓 *Taq*<sup>α</sup>*I* 停止反應。

### 1.2 *EcoRI*/*MseI* 限制酶切割

*EcoRI*/*MseI* 限制酶的反應溫度相同，可同時作用，總反應體積為 10  $\mu$ l，其內有 6.25  $\mu$ l 的 ddH<sub>2</sub>O、0.25  $\mu$ l 的 *EcoRI*(20 U/ $\mu$ l)、0.5  $\mu$ l 的 *MseI*(10 U/ $\mu$ l)、1  $\mu$ l 的 10X NEB Buffer 2 和 2  $\mu$ l 的 DNA(100ng)，混合均勻後，保持溫度在 37°C 維持三小時，之後升溫

至 65°C，維持 10 分鐘，讓限制酶停止反應。

## 2. 接合子黏合 (ligation)

*EcoRI*/*Taq*<sup>α</sup>*I* 與 *EcoRI*/*MseI* 的接合子黏合的反應條件相同，因此流程合併說明，總反應體積為 20 μl，其內有 6.75 μl 的 ddH<sub>2</sub>O、0.5 μl 的 T4 DNA 接合酶 (ligase)、2 μl 的 10X T4 ligase buffer、0.375 μl 的 *EcoRI* 接合子 (100 pmole/μl)、0.375 μl 的 *Taq*<sup>α</sup>*I* 接合子 (100 pmole/μl) 或 *MseI* 接合子 (100 pmole/μl)，和 10 μl 的 *EcoRI*/*Taq*<sup>α</sup>*I* 限制酶切割後的產物，保持在 16°C 維持 12 小時，之後取 10 μl 產物，以 40 μl 的 Tris 溶液 (10Mm, PH=8.5) 稀釋，儲存在 4°C 冰箱。

## 3. AFLP 聚合酶鍊反應 (polymerase chain reaction, PCR)

### 3.1 前擴增反應 (pre-selective amplification)

*EcoRI*/*Taq*<sup>α</sup>*I* 與 *EcoRI*/*MseI* 的前擴增反應流程相同，因此合併描述，總反應體積為 25 μl，其內含 5 μl 的 *EcoRI*/*Taq*<sup>α</sup>*I* 或 *EcoRI*/*MseI* 限制酶切割後經過接合子黏合後的產物、16 μl 的滅菌水、2.5 μl 的 10 倍 PCR 緩衝液(MgSO<sub>4</sub>, 20mM)、0.5 μl 的 dNTP(10mM)、0.375 μl 的 *EcoRI* 前擴增反應引子(20pmole/μl)、0.375 μl 的 *Taq*<sup>α</sup>*I* 前擴增反應引子 (20pmole/μl) 或 *MseI* 前擴增反應引子 (20pmole/μl)，以及 0.25 μl 的 *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/μl)。以熱

循環反應機進行 PCR 反應，反應條件為先 72°C 60 秒，接著 94°C 50 秒，56°C 60 秒，72°C 120 秒，20 個循環，停止反應。96 管反應取前 8 管進行電泳分析確定產物品質，取 5  $\mu$ l 的產物以 90  $\mu$ l Tris 溶液 (10mM, PH=8.5) 稀釋，保存在 4°C。

### 3.2 選擇性擴增反應 (selective amplification)

使用四種引子組合: E-AAA/T-GAA、E-AAG/T-GAG、E-AGA/T-GAA、E-AGA/T-GAG 進行選擇性擴增反應，*EcoRI*/*Taq<sup>α</sup>I* 與 *EcoRI*/*MseI* 的選擇性擴增反應溶液相同，因此合併描述，不過兩者 PCR 反應的條件設定不同，在後面分開描述。

總反應體積為 25  $\mu$ l，5  $\mu$ l 的前擴增反應稀釋後的產物、15.35  $\mu$ l 的滅菌水、2.5  $\mu$ l 的 10 倍 PCR 緩衝液 (MgSO<sub>4</sub>, 20mM)、1  $\mu$ l 的 dNTP(10mM)、0.25  $\mu$ l 的 *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ $\mu$ l)、0.15  $\mu$ l 的螢光 *EcoRI* 選擇性擴增反應引子 (20pmole/ $\mu$ l) 和 0.75  $\mu$ l 的 *Taq<sup>α</sup>I* 選擇性擴增反應引子 (20pmole/ $\mu$ l) 或 *MseI* 選擇性擴增反應引子 (20pmole/ $\mu$ l)。

以熱循環反應機進行 PCR 反應，*EcoRI*/*Taq<sup>α</sup>I* 的反應條件為先 94°C 50 秒，接著 94°C 50 秒，\*65°C 1 分鐘，72°C 2 分鐘，10 個循環(\*每循環一次下降 1°C)，接著 94°C 50 秒，56°C 1 分鐘，72°C 2 分鐘，20 個循環，接著 72°C 10 分鐘，停止反應，保存在 4°C。

*EcoRI/MseI* 反應條件為先 94°C 50 秒，接著 94°C 50 秒，\*63°C 1 分鐘，72°C 2 分鐘，10 個循環(\*每循環一次下降 1°C)，接著 94°C 50 秒，54°C 1 分鐘，72°C 2 分鐘，20 個循環，接著 72°C 10 分鐘，停止反應，保存在 4°C。

#### 4. 毛細管電泳

將完成選擇性擴增反應的 DNA 樣本以 ABI 3100 Automated capillary DNA sequencer(ABI, California, USA)進行核酸電泳分析，分子量校正的標準品為 Rox-500，使用 Genescan (version 2, ABI, California)軟體紀錄螢光訊號。

#### 五、AFLP 條帶分析

使用 Gelcompar(version 2, Biosystematica, Wales)解析 AFLP 螢光訊號的紀錄檔案，將影像檔匯入軟體中，影像亮度調至最亮，標準品校正後，透過背景雜訊強度與條帶訊號強度的比較，挑選 50bp 到 500bp 之間具有多型性的條帶。若基因座(locus)有個體訊號不清楚的條帶，則設為遺失資料，若單一個體或基因座有過多遺失資料，則剔除該資料，將條帶影像資料轉換為方格資料，有其條帶記錄為 1，若無則為 0，遺失資料設為 9，輸出資料為文字檔，提供後續軟體分析。

## 六、遺傳資料分析

### 1. 族群遺傳歧異度 (Genetic diversity)

利用 AFLP-SURV 1.0 (Vekemans *et al.* 2002) 計算 Nei' s heterozygosity (Nei 1975), 簡稱  $H_j$ , 因 AFLP 為顯性標誌 (dominant marker), 無法直接估算對偶基因的頻率, 因此假設每個條帶為一基因座 (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型, 沒有條帶表示為隱性基因型, 根據 Lynch and Milligan (1994) 提出的方式能夠估算出避免偏差的對偶基因頻率。

各族群間分子標記 (marker) 歧異度的計算公式為: 
$$h_i = \frac{n(1 - \sum_i P_i^2)}{n-1},$$

$h_i$  為第  $i$  個基因座的歧異度,  $P_i$  為第  $i$  個基因座在族群裡的頻率,  $n$  為個體數量, 各族群遺傳歧異度計算公式為  $H_j = \frac{\sum h_i}{r}$ ,  $H_j$  為族群遺傳歧異度,  $r$  為每個引子組合的基因座數量。

在 AFLP-SRUV 的設定中, 將所有個體依其被捕捉樣區分群, 分析捕捉點的族群遺傳歧異度 ( $H_j$ ), 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值優先分佈貝式方法 (bayesian method with non-uniform prior distribution) 計算基因位點頻率 (allelic frequency), 近親交配係數為零 ( $F_{is}=0$ ), 捕捉樣區內的遺傳歧異度性 ( $H_j$ ) 與東西兩邊族群

總遺傳歧異度 (Ht)，排列更換次數 (Ppermutation) 為 999 次，以上計算均為無偏估計，最後以線性迴歸檢驗各樣區的地景特性與遺傳歧異度之間是否具有關聯性。

## 2. 樣區間遺傳距離(genetic distance)

使用 GeneAlex 6 (Peakall and Smouse 2005) 計算成對樣區間的遺傳距離 ( $\Phi PT$ )， $\Phi PT$  意義相當於  $F_{st}$ ，
$$\Phi PT = \frac{V_{AR} + V_{AP}}{V_{AR} + V_{AP} + V_{WP}}$$
， $V_{AP}$  為樣區間的遺傳變異， $V_{AR}$  為高速公路東西兩邊的區域間的遺傳變異， $V_{WP}$  為樣區內部的遺傳變異。並計算其  $P$ -value，排列更換次數為 9999 次，並以求得的樣區間遺傳距離利用 Phylip 3.62 (Felsenstein 1995) 繪出 UPGMA consensus 樹型圖。

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

分子變方分析是以 Excoffier 等人 (1992) 提出的歐幾里德偏距矩陣 (euclidean distance matrix)， $E = \left\{ \mathcal{E}_{xy}^2 \right\} = n \left[ 1 - \frac{2n_{xy}}{2n} \right]$ ， $n$  為多型性基因座的數量， $x$ 、 $y$  代表兩兩不同的樣本個體， $n_{xy}$  表示兩個體共同擁有的多型性基因座數量，可得個體間遺傳距離矩陣。

0/1 資料整理為 GeneA1Ex6 (Peakall and Smouse 2005) 的格式，將 183 個體依其捕捉點分為八群，以高速公路為界分為兩區域，運算設定為輸入原始資料 (raw data)、二元 (binary) 距離計算並且變

更遺失資料 (interpolate missing data)，排列更換次數為 9999 次，求其變異成分估值 (estimate variance) 和各成分佔總變異之比例與隨機運算得到極端值的機率 ( $P$ -value)。

#### 4. 分派檢定(assignment test)

將有遺失資料的個體剔除後，以 171 隻個體的遺傳資料，利用 Structure 2.1 (Pritchard *et. al* 2000) 進行分派檢定，設定如下，Length of burnin period 為 50000，Number of MCMC Reps after Burnin 為 500000，Ancestry info 為 admixture model，Frequency model 為 allele frequencies correlate among populations，假設族群  $k$  為 1 到 8，進行 3 次重複，分派檢驗的結果以軟體 R (<http://www.r-project.org>) 中的 structure-sum (Ehrich 2006) 以四步驟檢驗  $\Delta K$  的變化推估分派檢定的結果 (Evanno *et al.* 2005)，以瞭解所有的個體可被分為幾個地理遺傳群 (geographical genetic demes)，以及其分配到該地理遺傳群的機率。

#### 5. 主座標分析(principle coordinate analysis, PCoA)

以先前運算得知的個體間遺傳距離三角矩陣為資料，利用 GeneALEx6 (Peakall and Smouse 2005) 的功能進行主座標分析，探求所有個體間分群的狀態，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 PCoA 的方法，可

得對變異的解釋度前三強的座標軸的能解釋比例。

## 6. Mantel test

以 GeneA1Ex6 (Peakall and Smouse 2005) 運算個體間遺傳距離的三角矩陣 (triangular matrices) 與直線距離的三角矩陣，最少代價距離 (least cost distance) 則由 Arc GIS (version 3.3, ESRI, California) 的擴充程式 Pathmatrix (Ray 2005) 運算得知，以 Mantel test 檢視直線距離與遺傳距離之間的相關性，以及最少代價距離與遺傳距離之間的相關性，檢測不同地景類型對赤腹松鼠遺傳距離與地理距離相關性的影響。

## 7. 障礙參數組 (resistance set) 設計方法

若要產生最少代價距離需有兩種資料，分別為個體捕捉點位的座標和地景障礙圖層 (resistance layer)，地景障礙圖層則需地景分類圖層與各地景類型的障礙參數 (resistance value)，依照物種特性、野外觀察的經驗和相關研究 (Verbeylen *et al.* 2003) 給予地景類型不同的障礙參數。本研究將 11 種地景類型區分為棲地、移遷廊道、不完全地景障礙和完全地景障礙，各地景類型設定不同的障礙參數，並以此設定的障礙參數組計算最少代價距離。總共設置 35 組障礙參數組 (resistance set)，每組有 11 種地景類型 (表二)。障礙參數代表赤腹松鼠穿越該地景花費的能量與面對的風險，例如森林的障礙參數

為 1 表示松鼠能夠輕易的跨越該地景類型，水體的參數 10000，則表示松鼠穿越水體的能量花費與風險為森林 10000 倍。透過變動不同地景類型的障礙參數，可找到最能解釋野外資料的一組障礙參數組，設計了以下 35 組：

R0: 所有地景類型的障礙參數均為 1，移除地景的影響，僅直線距離影響個體間遺傳距離。

R1-R5: 兩個的障礙參數等級，有植被地景的障礙參數為 1，無植被地景的障礙參數為 10、100、1000、10000 和 100000。

R6-R13: 三個障礙參數等級，讓森林與果園跟其他有植被的地景類型區分開來，取 R1-R5 裡最佳的障礙參數組，在該組中加入新的障礙等級，設農地、灌叢地與竹林的障礙參數為 5、10、20、50、100、500、1000 和 2500。

R14-R22: 四個障礙參數等級，讓水體、高速公路與建築物和其他無植被的地景類型區分開，取 R6-R13 裡最佳的障礙參數組，在該組中加入新的障礙等級，設裸露地、鄉道和小路的障礙參數為 100、250、500、1000、2000、3000、4000 和 5000。

R23-R27: 五個地景障礙參數等級，讓水體與其他地景障礙區分，取 R14-R22 裡最佳的障礙參數組，在該組中加入新的障礙等級，設高速公路與建築物的障礙參數為 9000、8000、7000、6000 和 5000。

R28-R30:五個地景障礙參數等級，讓建築物與其他地景障礙區分，取

R23-R27 裡最佳的障礙參數組，在該組中加入新的障礙等級參數，

設建築物的障礙參數為 7500、6000 和 5000。

R31-34:九個地景障礙參數等級，取 R28-30 裡最佳的障礙參數等級，

微調地景中縣道、小路、灌叢地與竹林的障礙參數。

## 結果

### 一、野外捕捉資料

實驗捕捉時間自 2005 年 3 月至 2006 年 2 月，於八個樣區 6098 個捕捉籠夜，共捕捉標記 183 隻赤腹松鼠個體，其中雄性 96 隻，雌性 82 隻，5 隻個體因逃逸而無法辨別性別，但仍有取到組織以供遺傳研究。除了 E3 有性別偏差( $X^2$  test,  $P < 0.001$ )外，全部樣區的個體雄雌性別比為 1.17，無性別偏差( $X^2$  test,  $P > 0.5$ )(表三)。

### 二、樣區的地景結構

主成分分析依照 14 種地景特徵的變異(表四)，以第一主成分軸(62.8%)與第二主成分軸(22.3%)將八個樣區分為四群(圖三)，可解釋 85.1%的變異。第一成分軸的主要變異為 largest patch index、like adjacencies percentage、splitting index、aggregation index、landscape division index 和 patch cohesion index，亦即森林區塊(forest patch)的面積及叢集(aggregation)的程度為主要因子，第二成份軸的主要變異為 perimeter-area fractal dimension 和 clumpiness Index，即森林區塊形狀的複雜度(shape complexity)與叢集的程度為主要因子。八個樣區可被第一與第二主成份軸區分為四群，W4 與 E1 兩樣區為一群，W1、W3 與 E4 為一群，而 W2 與 E3 為一群，E4 則單獨與其他樣區分開。

### 三、遺傳資料分析結果

#### 1. 擴增片段長度多型性引子篩選及使用

四組引子組合產生具多型性的有效條帶數分別為 24、20、27 和 18，共 89 個有效條帶（表五），平均每對引子可獲得 22.25 個有效條帶，片段長度介於 56bp 到 492bp。

#### 2. 族群遺傳歧異度(Hj)以及其與地景特徵的關聯性

八個樣區的族群遺傳歧異度最高為 W2(0.42)，最低為 E3 與 E4 (0.35)(表六)。各樣區遺傳歧異度與 PCA 所分析的地景結構中，屬於第一主成份軸的六個主要地景特徵，並無線性迴歸的關係(圖四)，顯示遺傳歧異度與地景特徵並無明顯關聯。

#### 3. 地景障礙對族群遺傳分化的影響

假設高速公路等地景障礙可能會影響赤腹松鼠的擴散，檢驗遺傳變異分布的狀況，分子變方分析(AMOVA)結果顯示三義地區赤腹松鼠的族群遺傳結構的變異中，4.0%屬於高速公路東西兩邊的變異，8.4%為區域內部樣區間的變異，87.6%為樣區內部的變異(表七)，三義地區赤腹松鼠主要的變異是在樣區內，東西兩區域間與區域內各樣區間的變異並不大，但均達顯著水準( $P < 0.0001$ )，顯示三義地區的赤腹松鼠在東西兩區域間和區域內各樣區間，已有輕微的遺傳分化。

以 STRUCTURE (Pritchard *et. al* 2000)進行分派檢定

(assignment test)，設計  $K=1\sim 8$ ， $K$  為地理遺傳群(geographic genetic deme)的數量，運用貝式(bayesian)的分群方式找出最佳的模式組為  $K=3$ 。本結果為利用 structure-sum (Ehrich 2006)提供的方法，檢驗  $K=1\sim 8$  中最佳的  $K$  值(圖五)，平均  $L(K)$  的曲線斜率最大的為  $K=1\sim 2$ 、 $K=2\sim 3$  與  $K=7\sim 8$  之間的區段， $L'(K)$  在  $K=2$ 、 $3$  與  $7$  時有較大值， $L''(K)$  最大的為  $K=3$  與  $K=7$ ， $\Delta K$  最大的在  $K=3$ 。四步驟挑選的結果顯示三義地區所有赤腹松鼠的個體就分派檢定的分群，可歸屬於三個遺傳群(圖六)。E2、E3 與 E4 屬於高速公路東邊的族群，分到單一遺傳群機率約大於 65%；W2、W3 與 W4 為在高速公路西邊的族群，分派到另外兩個遺傳群的機率總和約高於 75%；W1 與 E1 其分派到任一遺傳群的機率均低於 60%，因此 W2、W3 與 W4 的族群遺傳結構異於 E2、E3 與 E4，而 W1 與 E1 的族群遺傳結構則同時具有東西兩區的表現。

主座標分析(principle coordinate analysis)前三座標軸的解釋力分別為 24.61%、21.75%和 14.18%，總和為 60.54%，第一與第二為座標軸，以及第二與第三為座標軸繪製而成的圖均有 W2~W4 與 E2~E4 為明顯的東西分群，而 E1 與 W1 則無分群的現象(圖七)，此與分派檢驗的結果相符。UPGMA consensus 樹型圖可見八個樣區的分群現象(圖八)，西邊群為 W2~W4，東邊群為 E2~E4，中間混合群則為 W1

與 E1，與上述兩項的分析結果相符。

#### 4. 地景結構對赤腹松鼠擴散行為的影響

就樣區間的地理距離跟遺傳距離的關係，圖九顯示就高速公路為界，東西兩區域間的樣區遺傳距離高於區域內的樣區遺傳距離，代表區域間的基因交流小於區域內的基因交流。只以近高速公路的六個樣區 (W2-W4, E1-E3) 之間的遺傳距離而言，東西區域內部距離相等的樣區間(W2W3、W3W4、E1E2 和 E2E3)的遺傳距離平均為 0.068，東西區域間距離相等的樣區間(W2E1、W3E2 和 W4E3)的遺傳距離平均為 0.128，顯示有高速公路阻隔的樣區間，遺傳距離增加。

以 Mantel test 檢測個體間的遺傳距離與地理直線距離的相關性，西邊個體(W1~W4)、東邊個體(E1~E4)與所有個體的遺傳距離與直線距離均顯著正相關，但相關係數值( $r_{xy}$ )不同(表八)。西邊區域內個體間的遺傳距離與地理距離的相關性( $r_{xy}=0.299$ )高於東邊區域內與所有個體的相關性( $r_{xy}=0.118$ )，而所有個體的遺傳距離與直線距離的相關性最低( $r_{xy}=0.115$ )。

為了檢測地景結構對赤腹松鼠擴散的影響，給予各地景類型不同的障礙參數，35 組障礙參數組產生的最少代價距離與遺傳距離均為正相關且顯著(表九)，其中 R0 的相關係數為 0.1147，兩個障礙等級 (R1-R5)的 R4 相關係數最高(0.1482)，三個障礙等級(R6-R13)的 R7

相關係數最高(0.1494)，四個障礙等級(R14-R22)的 R16 相關係數最高(0.1495)，五個障礙等級(R23-R30)的 R28 相關係數最高(0.1495)，九個障礙等級(R31-R34)的 R31 相關係數最高(0.1496)。

相關係數隨著障礙等級數量增加，增加幅度最大為由一個障礙等級到兩個障礙等級，相關係數增加最多( $r_{xy}=0.1147\sim 0.1482$ )，由兩個障礙等級到九個障礙等級的相關性並無明顯增加( $r_{xy}=0.1482\sim 0.1496$ )，R31 為 35 組障礙等級參數中相關性最高的一組。以相關性最高的地景障礙參數組(R31)預測赤腹松鼠在三義地景中的擴散路徑，結果顯示高速公路東西兩邊區域內的松鼠，在三義地區的南邊有風險的擴散路徑(見圖十)，即表示赤腹松鼠由南邊進行東西區域間擴散的風險較低。

## 討論

### 一、樣區的地景結構與遺傳歧異度的關係

地景結構中棲地破碎化對生態現象影響的研究，大部分破碎化程度僅依賴少數的地景特徵作為依據，如面積和距離(Honnay *et al.* 2006, Dodd *et al.* 2006, Rodriguez and Andrén 1999 )，換句話說面積的大小與樣區間距離的遠近，代表破碎化程度的高低，但以少數的地景特徵來解釋複雜地景結構稍嫌薄弱(Riitters *et al.* 1995)。

由於赤腹松鼠為典型樹棲型的物種，本實驗乃依森林區塊的地景資料，針對 14 種的地景特徵，以主成份分析將三義地區的八個樣區區分為四群，整體而言，此四群反應出森林面積的大小、森林區塊叢集的程度與區塊形狀的複雜度。位於東北方三角山的 E1 與靠近西南方火焰山脈的 W4，兩樣區的森林區塊面積大、叢集程度高與形狀完整；西邊火焰山脈的 W1 與 W3，以及東南方關刀山的 E4，此三樣區的森林區塊面積亦大、叢集程度高但形狀不完整；因靠近城鎮而開發程度較高的西邊慈濟山樣區 W2 與東邊西湖樣區 E3 的森林面積較小、叢集程度中等、不過形狀完整，同是西湖的 E2，其森林面積小、叢集程度低和形狀破碎。以面積大小與叢集程度為破碎化程度的依據，則 W1、W3、W4、E1 與 E4 為較完整的樣區，W2、E2 和 E3 為相對較破碎的樣區。

本實驗結果顯示較完整樣區(W1、W3、W4、E1 和 E4)的赤腹松鼠遺傳歧異度為 0.35~0.39，並沒有高於較破碎樣區(W2、E2 和 E3)的遺傳歧異度(0.35~0.42)，一般而言，在郊區地景中的隔離棲地，動物的遺傳歧異度呈現下降的現象(Hirota *et al.* 2004, Takami *et al.* 2004, Noël *et al.* 2007)。由於本研究缺乏大面積原生棲地的赤腹松鼠的遺傳資料來作為比對，所以無法說明目前三義地區所有樣區內赤腹松鼠的族群遺傳歧異度是否已受破碎化的影響，不論是地景分類屬於較完整的棲地或是較破碎的樣區。

另本實驗結果亦呈現地景特徵與族群遺傳歧異度並無關聯(見圖四)，樣區間雖有破碎化程度的差異，但遺傳歧異度卻無明顯差異。已知物種特性會影響動物對破碎化棲地的反應，如棲地需求程度和移動能力 (Goheen *et al.* 2003)，因此地景是否破碎化應仍取決於該物種的特性。美國纓耳松鼠(*Sciurus aberti*)的族群動態的研究中，發現森林面積低於 42%時，會造成族群密度顯著下降(Dodd *et al.* 2006)。針對瑞士歐亞松鼠(*Sciurus vulgaris*)的研究，當森林區塊面積大於 6 公頃，且區塊間的距離小於 600 公尺時，松鼠存活的機率顯著增加(Rodríguez *et al.* 1999)。上述研究顯示地景對松鼠的族群特性造成影響，需達棲地變化量的閾值，或許造成遺傳歧異度的變化亦應有其類似閾值的關係。三義全區有 60.6%的面積為森林地

景，保有較大的森林面積，森林區塊間的連結度亦高，如此地景結構可能尚未達到影響赤腹松鼠遺傳歧異度變化的閾值，因此八個樣區的破碎化程度雖有所不同，但赤腹松鼠族群遺傳歧異度相近。

根據 1904 年的台灣堡圖（遠流出版社 1996）與 1986 年的航照圖（由農林航空測量所購得）得知，過去的開發歷程中，本研究所調查的樣區地景明顯存在不同程度的人為干擾（王豫煌 個人通訊）。其中 W1、E1 和 E4 自 1904 年以來受到較少的人為干擾，因此樣區內仍然保有較完整的林相。W3 與 W4 過去屬於農墾地與荒地居多，晚近 30 年間逐漸演替成為較完整的次生林。W2、E2 與 E3 過去同樣是農墾地與荒地居多，雖森林已漸漸回復，但多屬於人為干擾的地景類型，如果園與竹林佔多數，亦造成森林區塊較其他樣區破碎，不過對樹棲型的赤腹松鼠而言，W2、E2 與 E3 的地景結構仍為適合其生存的棲地。Curtis *et al.* (2003) 指出，過去屬於非森林地帶的樣區，隨著時間變化，本來為干擾地的地景，森林逐漸回復後，或因此動物的族群量增加與周圍新個體的移入，也造成基因相互交流之結果。本研究各樣區的族群遺傳歧異度並無明顯差異，或許是因為森林回復後，赤腹松鼠的族群量也隨之增加，減少過去土地利用對松鼠族群遺傳歧異度的影響。

## 二、地景障礙對族群分化的影響

分子變方分析結果顯示東西兩區域間，以及區域內樣區間均有遺傳分化的現象，雖分別僅有 4%與 8%的變異，但赤腹松鼠在三義地區區域性族群有顯著分化，代表其族群遺傳結構已受到地景結構變化的影響。許多研究均指出地景障礙阻隔了基因交流，而造成遺傳分化，如道路或建築物 (Hirota *et al.* 2004, Epps *et al.* 2005)，因此本實驗亦証實高速公路可視為赤腹松鼠東西向擴散的地景障礙。

分派檢定可用以檢視短時間所發生的遺傳事件，如遺傳群 (genetic demes) 的數量與動物擴散的現象 (Manel *et al.* 2005)，三義全區的赤腹松鼠有三個的遺傳群，W2~W4 與 E2~E4 各有其遺傳群，W1 與 E1 混合上述東西兩區的遺傳群，主成分分析的結果也相同 (見圖七)，UPGMA consensus 樹型圖可見同樣分群的現象 (圖八)。Zamudio *et al.* (2007) 提到造成混合遺傳群的原因，可能為其他遺傳群的個體，由別的樣區擴散而來所造成。可見 W1 與 E1 之間有個體擴散的行為產生，即表示赤腹松鼠可穿越屬於三義北邊 W1 與 E1 樣區間的地景障礙，現地的觀察可見到北邊的高速公路為高架的路段較多，高架路段下方為有行道樹的穿越隧道與崩塌的溪床，可供赤腹松鼠通過。而南邊的高速公路為高架的較少，並且高架路段的下方均是 20 公尺寬的省道，咸信赤腹松鼠在此穿越的風險應較北邊為高。

由於本研究進行分派檢定的前提設定是個體的祖先來源可以為混合型，現今所有樣區的主要地景類型為森林地景(53%~78%)，且 W1、E1 和 E4 一直以來受到較少的人為干擾，保有較完整的森林區塊，推論在 W1、E1 與 E4 樣區中，因赤腹松鼠的族群較少受到干擾，而能夠保留完整的基因型，加上 W1 與 E1 為兩地理位置相近的樣區，即使晚近的高速公路興築造成兩樣區間松鼠擴散的阻隔，也仍讓兩樣區擁有相同的混合祖先遺傳群。E4 為最東邊的樣區，故呈現東邊區域的祖先遺傳群。W2~W4 與 E2~E3 的赤腹松鼠族群隨著森林回復才恢復，因此以上樣區的松鼠族群擁有不同的祖先來源，W1~W4 的松鼠祖先來源為三義西部的火焰山山脈，E2~E3 的松鼠祖先來源為三義東部的關刀山山脈，但因東西兩區域間的松鼠受現今人為開發形成的地景障礙而無法進行基因交流，呈現出現今三義赤腹松鼠的族群遺傳結構。

### 三、地景結構對赤腹松鼠擴散行為的影響

本研究區域內的高速公路降低赤腹松鼠東西區域間的基因交流，且增加樣區間的遺傳距離(見圖九)，即被隔離的兩棲地間的遺傳距離，大於沒有被隔離的遺傳距離(Hirota *et al.* 2004, Banks *et al.* 2005)。Mantel test 的結果顯示個體遺傳距離與直線距離相關性最強的是西邊區域的赤腹松鼠族群( $r_{xy}=0.299$ ) (見表八)，東邊區域赤腹松鼠族群的遺傳距離與直線距離相關性( $r_{xy}=0.118$ )次之，而全區的

遺傳距離與直線距離相關性( $r_{xy}=0.115$ )最低。在均質地景中，動物擴散的方向是隨機的，即當地景影響對動物的擴散產生影響時，遺傳距離與地理距離的相關性會下降(Coulon *et al.* 2004)。西邊相關性高於東邊的原因，為西邊區域較東邊區域的地景組成單純且森林連續(見圖一)，而高速公路則為影響全區的相關性降低的地景障礙。

在異質地景中，估算地理距離已非直線式，需將地景結構納入考量(Coulon *et al.* 2004)，因動物將選擇地景中風險最少的途徑，不惜繞道來擴散進行擴散，亦即為最少代價距離(least cost distance)。三義地區赤腹松鼠的遺傳距離與最少代價距離的相關性( $r_{xy}=0.1496$ )，高於與直線距離的相關性( $r_{xy}=0.1147$ )，顯示地景結構對松鼠擴散的路徑造成影響。劉(2002)指出赤腹松鼠偏好樹冠覆蓋度高的棲地，擴散的路徑應受到植被有無的影響，本研究所使用最少代價距離的主觀設定參數組中，R4 提升沒有植被地景類型的障礙參數，在參數為 10000 時，為相關性最高參數組，代表沒有植被的地景類型，對遺傳距離與最少代價距離相關性的影響很大，。R7 為提升非典型有植被地景類型的障礙參數，如農地、灌叢地與竹林，當障礙參數由 1 提升至 10 時，可得到較高的相關性，代表該地景類型對赤腹松鼠的擴散行為的障礙影響略大於森林的影響，但仍屬於松鼠擴散時可利用的地景類型，與赤腹松鼠同是依賴森林的紅松鼠

(*Tamiasciurus hudsonicus*)無線電追蹤研究，發現紅松鼠能夠穿越灌叢地以達到擴散的目的(Bakker and Vuren 2004)，與本研究給予非典型有植被地景類型的障礙參數結果相符。在 R16 的參數組中，當降低縣道、小路和裸露地的障礙參數至 500 時， $r_{xy}$  值相關性較高，代表該地景類型對物種擴散的影響遠小於水體、高速公路與建築物的阻隔，換句話說，屬於風險較小赤腹松鼠可穿越的地景，驗證林 (2002) 的研究中提到即便有車輛穿越之道路，仍有赤腹松鼠穿越的可能。R23 到 R27 為降低高速公路與建築物的障礙參數組，由 9000 降至 5000，相關性均沒有提升，反而下降，表示高速公路對松鼠擴散的影響與水體的影響相當。R28 為降低建築物的障礙參數組，參數為 7500 時，有較高的相關性，表示建築物對擴散的阻礙影響低於高速公路，筆者野外觀察到若建築物的高度與周邊樹冠接近時，赤腹松鼠可透過建築物的屋頂移動。R31 為九個障礙參數等級的參數組以細微調整棲地、移遷廊道、不完全地景障礙與完全地景障礙等不同地景類型的障礙參數值，此組的  $r_{xy}$  值相關性高於本研究所設定的 34 組障礙參數組，因此 R31 或可代表三義地區各地景類型影響赤腹松鼠擴散的相對阻礙強度。

利用 R31 組估算赤腹松鼠個體間的最少代價路徑(least cost path)結果顯示，東西區域間個體的擴散路徑均為從三義的最南邊跨

越地景障礙到另一邊區域(見圖十)。換句話說，東西區域間的基因交流應該是南邊較北邊頻繁，此與分派檢定的結果不符，即遺傳資料呈現東西向的擴散通道應在三義地區的北邊而非在南邊。此現象可能原因為決定赤腹松鼠擴散的關鍵性地景類型沒有呈現在地景分類中，如由高速公路下方穿越的鄉道、縣道與溪床，該鄉道與縣道寬約五到十公尺，並且有行道樹，由於這些的關鍵性的地景類型均位於高速公路下方，無法透過航空拍攝的正攝影像得知，而難以將此關鍵的地景忠實呈現於地景結構中，咸信此為造成本研究所呈現松鼠的最少代價距離途徑與分派檢定之基因交流位置不一致。比利時歐亞松鼠(*Sciurus vulgaris*)的研究亦顯示，若將行道樹考量入地景類型中，可增加最少代價距離與該物種分佈的相關性(Verbeylen *et al.* 2003)，表示地景類型分類的依據，或需仔細的考量物種的特性，才能提升最少代價距離的預測準確率。三義地區南邊緊鄰大安溪溪床，溪床的主要地景為農地，R31 組預測赤腹松鼠的最少擴散路徑為穿越省道至大安溪溪床，再由溪床上的農地穿越高速公路進行東西兩區域的擴散。該最少代價路徑需要行經長距離無林地遮蔽的農地與穿越省道與高速公路，此對樹棲的赤腹松鼠而言，應會降低其擴散的意願以及成功率。

## 結論

本研究顯示台灣中部三義地區的赤腹松鼠族群遺傳結構受到地景結構的影響，高速公路等地景障礙造成東西區域間以及區域內樣區間的遺傳分化，透過檢視遺傳距離與地理距離的相關性，也發現地景結構影響赤腹松鼠的擴散。

## 參考文獻

- 于名振。1984。台灣脊椎動物誌。477-478 頁。台灣商業印書館。台北。
- 遠流出版社。1996。台灣堡圖。102-103 頁。遠流出版社。台北。
- 林沛毅。2002。以景觀生態學觀點探討棲地模擬模型---以台中市大坑地區為例。私立東海大學生命科學系碩士論文。台中。
- 劉彥芳。2002。南仁山地區赤腹松鼠(*Callosciurus erythraeus*)族群和棲地利用之研究。國立屏東大學野生動物保育所碩士論文。屏東。
- 陳美惠、袁孝維、林耀松。2004。台灣地區環頸雉遺傳組成多樣性和族群遺傳結構。臺大實驗林研究報告。18:65-75。
- 盧建名。2004。棲地零碎化對諸羅樹蛙族群遺傳結構影響之探討。國立臺灣師範大學生命科學所碩士論文。台北。
- Adriaensen, F., J. P. Chardon, G. E. Blust, E. Swinnen, S. Villalba, H. Gulinck, and E. Matthysen. 2003. The application of 'least-cost' modeling as a functional landscape model. *Landscape and Urban Planning* **64**: 233-247.
- Arnold, G., D. Steven, and J. Weeldenburg. 1993. Influences of remnant size, spacing pattern and connectivity on population boundaries and demography in euros *Macropus robutus* living in a fragmented landscape. *Biological Conservation* **64**: 219-230.
- Bakker, V. J., and D. H. V. Vuren. 2004. Gap-crossing decisions by the red squirrel, a forest-dependent small mammal. *Conservation Biology* **18**: 689-697.
- Banks, S. C., D. B. Lindenmayer, S. J. Ward, and A. C. Taylor. 2005. The effects of habitat fragmentation via forestry plantation establishment on spatial genotypic structure in the small marsupial carnivore, *Antechinus agilis*. *Molecular Ecology* **14**: 1667-1680.

- Baudry, J., and F. Burel. 1998. Dispersal, movement, connectivity and land use processes. Pages 323-329. International association for landscape ecology press, Preston, UK.
- Broquet, T., N. Ray, E. Petit, J. M. Fryxell, and F. Burel. 2006. Genetic isolation by distance and landscape connectivity in the American marten (*Martes americana*). *Landscape ecology* **21**: 877-889.
- Carlson, A., and P. Edenhamn. 2000. Extinction dynamics and the regional persistence of a tree frog metapopulation. *Proceedings of the Royal Society* **267**: 1311-1313.
- Coulon, A., J. F. Cosson, J. M. Angibault, B. Cargnelutti, M. Galan, N. Morellet, E. Petit, S. Aulagnier, and A. J. M. Hewison. 2004. Landscape connectivity influences gene flow in a roe deer population inhabiting a fragmented landscape: an individual-based approach. *Molecular Ecology* **13**: 2841-2850.
- Curtis, J. M. R., and E. B. Taylor. 2003. The genetic structure of coastal giant salamanders (*Dicamptodon tenebrosus*) in a managed forest. *Biological Conservation* **115**: 45-54.
- Dieckmann, U., B. O'Hara, and W. Weisser. 1999. The evolutionary ecology of dispersal. *Trends in Ecology and Evolution* **14**: 88-90.
- Diffendorfer, J., M. Gaines, and R. Holt. 1995. Habitat fragmentation and movements of three small mammals (*Sigmodon*, *Microtus* and *Peromyscus*). *Ecology* **76**: 827-839.
- Dodd, N. L., R. E. Schweinsburg, and S. Boe. 2006. Landscape-scale forest habitat relationship to tassel-eared squirrel populations: implications for ponderosa pine forest restoration. *Restoration Ecology* **14**: 537-547.
- Ehrich, D. 2006. AFLPDAT: a collection of R functions for convenient handling of AFLP data. *Molecular Ecology Note* **6**: 603-604.

- Epps, C. W., P. J. Palsbøll, J.D. Wehausen, G. K. Roderick, R. R. Ramey II and D. R. McCullough. 2005. Highways block gene flow and cause a rapid decline in genetic diversity of desert bighorn sheep. *Ecology Letters* **8**: 1029-1038.
- 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. *Genetics* **131**: 479-491.
- 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.
- Felsenstein, J. 1995. *PHYLIP*(Phylogeny Inference Package), Version 3.62. Department of Genetics. University of Washington, Seattle, USA.
- Goheen, J.R., R.K. Swihart, T.M. Gehring, and M.S. Miller. 2003. Forces structuring tree squirrel communities in landscapes fragmented by agriculture: species differences in perceptions of forest connectivity and carrying capacity. *Oikos* **102**:95-103.
- Hirota, T., H. Tetsuo, H. Mashima, T. Satoh, and Y. Obara. 2004. Population structure of the large Japanese field mouse, *Apodemus speciosus* (Rodentia: Muridae), in suburban landscape, based on mitochondrial D-loop sequences. *Molecular Ecology* **13**: 3275-3282.
- Honnay, O., E. Coart, J. Butaye, D. Adriaens, S. V. Glabeke, and I. Roldán-Ruiz. 2006. Low impact of present and historical landscape configuration on the genetic of fragmented *Anthyllis vulneraria* populations. *Biological Conservation* **127**: 411-419.
- Keller I.,and C. R. Largiadèr. 2003. Five microsatellite DNA markers for the ground beetle *Abax parallelepipedus* (Coleoptera, Carabidae). *Molecular Ecology* **3**: 113-114.
- Lynch, M., and B. G. Milligan. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* **3**: 91-99.

- Manel, S., O. E. Gaggiotti, and R. S. Waples. 2005. Assignment methods: matching biological questions with appropriate techniques. *Trends in Ecology and Evolution* **20**:136-142.
- McGarigal, K., S. A. Cushman, M. C. Neel, and E. Ene. 2002. FRAGSTATS: Spatial pattern analysis program for categorical maps. Computer software program produced by the authors at the University of Massachusetts, Amherst.US.  
<http://www.umass.edu/landeco/research/fragstats/fragstats.html>
- Meffe, K. G., and C. R. Carroll. 1994. Principles of conservation biology. Pages 248. Sinauer associates press, Massachusetts, Us.
- Nei, M. 1975. Molecular population genetics and evolution. Pages 149-156. North Holland press, Amsterdam, Holland.
- Noël, S., M. Ouellet, and P. Galois. 2007. Impact of urban fragmentation on the genetic structure of the eastern red-backed salamander. *Conservation Genetics* **8**: 599-606.
- Oshida, T., J. K. Lee, L. K. Lin, and Y. J. Chen. 2006. Phylogeography of pallas's squirrel in Taiwan: Geographical isolation in an arboreal small mammal. *Journal of Mammalogy* **87**: 247-254.
- Peakall, R., and P. E. Smouse. 2005. GenALEx 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Australian National University, Canberra, Australia.  
<http://www.anu.edu.au/BoZo/GenALEx/>
- Pritchards, J. K., M. Stephens, and P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**: 945-959.
- Ray, N. 2005. PATHMATRIX: a geographical information system tool to compute effective distance among samples. *Molecular Ecology Note* **5**: 177-180.

- Reh, W., and A. Seitz. 1990. The influence of land use on the genetic structure of populations of the commonfrog *Rana temporaria*. *Biological Conservation* **54**: 239-249.
- Riitters, K. H., R. V. O'Neill, C. T. Hunsaker, J.D. Wickham, D.H. Yankee, S.P. Timmins, K. B. Jones, and B.L. Jackson. 1995. A factor analysis of landscape pattern and structure metrics. *Landscape Ecology* **10**: 23-39.
- Riley, S. P. D., J. P. Pollinger, R. M. Sauvajot, E. C. York, C. Bromley, T. K. Fuller, and R. K. Wayne. 2006. A southern California freeway is a physical and social barrier to gene flow in carnivores. *Molecular Ecology* **15**: 1733-1741.
- Rodríguez, A., and H. Andrén. 1999. A comparison of Eurasian red squirrel distribution in different fragmented landscapes. *Journal of Applied Ecology* **36**: 649-662.
- Saccheri, I., M. Kuussaari, M. Kankare, P. Vikman, W. Fortelius, and I. Hanski. 1998. Inbreeding and extinction in a butterfly fragmentation. *Nature* **392**: 491-494.
- Shields, W. 1987. *Dispersal and mating systems: investigating their casual connections*. Pages 3-24. University of Chicago Press. Chicago. US.
- Strasburg, J. L. 2006. Roads and genetic connectivity. *Nature*. **440**: 875-876.
- Takami, Y., C. Koshio, M. Ishii, H. Fujii, T. Hidaka, and I. Shimizu. 2004. Genetic diversity and structure of urban populations of *Pieris* butterflies assessed using amplified fragment length polymorphism. *Molecular Ecology* **13**: 245-258.
- Vekemans X., T. Beauwens, M. Lemaire, and I. Roldan-Ruiz. 2002. Data from amplified fragmented length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. *Molecular Ecology* **11**: 139-151.

- Verbeylen, G., L. D. Bruyn, F. Adriaensen, and E. Matthysen. 2003. Does matrix resistance influence Red squirrel (*Sciurus vulgaris* L. 1758) distribution in an urban landscape? *Landscape Ecology* **18**: 791-805.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. V. D. Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**: 4407-4414.
- Vos, C., A. A. Jong, P. Goedharts, and M. Smulders. 2001. Genetic similarity as a measure for connectivity between fragmented population of the moor frog (*Rana arvalis*). *Heredity* **86**: 598-608.
- Wiens, J. 2001. The landscape context of dispersal. Pages 96-109. Oxford University Press. New York. US.
- Wright, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics* **28**: 114-138.
- Zamudio, K. R., and A. M. Wieczorek. 2007. Fine-scale spatial genetic structure and dispersal among spotted salamander (*Ambystoma maculatum*) breeding populations. *Molecular Ecology* **16**: 257-274.

## 表目

|    |  |    |
|----|--|----|
| 表一 | 台灣苗栗三義地區的地景類型劃分與各地景類型的面積以及佔全區面積的百分比.....       | 45 |
| 表二 | 用以預測台灣苗栗三義地區赤腹松鼠的擴散路徑 35 組障礙參數組.....           | 46 |
| 表三 | 台灣苗栗三義地區的赤腹松鼠捕捉資料.....                         | 47 |
| 表四 | 台灣苗栗三義地區樣區的地景特徵主成分分析結果.....                    | 48 |
| 表五 | 用於分析台灣苗栗三義地區赤腹松鼠的族群遺傳結構的四組增值片段長度多型性引子組合.....   | 49 |
| 表六 | 台灣苗栗三義地區八個樣區的赤腹松鼠族群遺傳歧異度...                    | 50 |
| 表七 | 台灣苗栗三義地區八個樣區的赤腹松鼠族群的分子辯方分析結果.....              | 51 |
| 表八 | 台灣苗栗三義地區赤腹松鼠遺傳距離與地理直線距離的相關性.....               | 52 |
| 表九 | 由 35 組障礙參數組預測台灣苗栗三義地區赤腹松鼠的最少花費距離與遺傳距離的相關性..... | 53 |

## 圖目

- 圖一 台灣苗栗三義地區的地景分類圖與樣區位置…………… 54
- 圖二 台灣苗栗三義地區的地景分類圖，分為 4 種地景類型……………55
- 圖三 台灣苗栗三義地區八個樣區地景特徵的主成分分析結果… 56
- 圖四 台灣苗栗三義地區八個樣區的六種地景特徵與遺傳歧異度( $H_j$ )  
線性迴歸關圖…………… 57
- 圖五 以圖像檢驗最恰當的台灣苗栗三義地區赤腹松鼠族群遺傳結  
構的分派檢定結果…………… 58
- 圖六 台灣苗栗三義地區赤腹松鼠分派檢定(assignment test)的結  
果…………… 59
- 圖七 台灣苗栗三義地區赤腹松鼠個體間遺傳關係的主座標軸分析  
結果…………… 60
- 圖八 台灣苗栗三義地區八個樣區的赤腹松鼠，成對樣區間遺傳距離  
( $\Phi_{PT}$ )的 UPGMA consensus 樹型圖…………… 61
- 圖九 台灣苗栗三義地區赤腹松鼠成對樣區間的遺傳距離( $\Phi_{PT}$ )與  
地理直線距離關係圖…………… 62
- 圖十 以 R31 地景參數組預測台灣苗栗三義地區赤腹松鼠之間的最  
少代價距離的路徑…………… 63

表一 台灣苗栗三義地區的地景類型劃分與各地景類型的面積以及佔全區面積的百分比，其中將森林與果園視為赤腹松鼠的棲地，竹林、灌叢地和農地為移棲廊道，縣道、裸露地與小路為赤腹松鼠擴散時的不完全地景障礙，建築物、高速公路和水體為完全地景障礙，小路為路寬小於五公尺的道路，高速公路包含省道，水體為溪流、河川與池塘。

**Table 1** Landcover types in Sanyi, Miaoli County, Taiwan. Forest and orchard are classified as *Callosciurus erythraeus* habitat. Bamboo plantation, shrub, and farm land are corridors. County and small roads and bare land are incomplete barriers. Buildings, highways, and water bodies are complete barriers. Small roads are <5 meters wide. Highways include provincial roads. Water bodies include streams, rivers, and ponds.

| Landcover type                | Area (ha) | Area(%) |
|-------------------------------|-----------|---------|
| Forest                        | 6060      | 60.6    |
| Orchard                       | 1030      | 10.3    |
| Subtotal (habitat)            | 7090      | 70.9    |
| Bamboo plantation             | 750       | 7.5     |
| Shrub                         | 660       | 6.6     |
| Farm land                     | 640       | 6.4     |
| Subtotal (corridor)           | 2050      | 20.5    |
| County road                   | 30        | 0.3     |
| Small road                    | 90        | 0.9     |
| Bare land                     | 100       | 1       |
| Subtotal (incomplete barrier) | 220       | 2.2     |
| Building                      | 430       | 4.3     |
| Highway                       | 60        | 0.6     |
| Water body                    | 150       | 1.5     |
| Subtotal (Complete barrier)   | 640       | 6.4     |

表二 35組障礙參數組(resistance set)預測台灣苗栗三義地區赤腹松鼠的擴散路徑，每組均有11種地景類型及地景的障礙參數。

**Table 2** The 35 resistance sets with the assigned resistance values for 11 land cover types in Sanyi, Miaoli county, Taiwan.

| Land cover type | 1<br>Water bodies | 2<br>Highway | 3<br>Buildings | 4<br>Bare land | 5<br>County road | 6<br>Small road | 7<br>Agricultural land | 8<br>Shrubs | 9<br>Bamboo plantation | 10<br>Orchard | 11<br>Forest |
|-----------------|-------------------|--------------|----------------|----------------|------------------|-----------------|------------------------|-------------|------------------------|---------------|--------------|
| R0              | 1                 | 1            | 1              | 1              | 1                | 1               | 1                      | 1           | 1                      | 1             | 1            |
| R1              | 10                | 10           | 10             | 10             | 10               | 10              | 1                      | 1           | 1                      | 1             | 1            |
| R2              | 100               | 100          | 100            | 100            | 100              | 100             | 1                      | 1           | 1                      | 1             | 1            |
| R3              | 1000              | 1000         | 1000           | 1000           | 1000             | 1000            | 1                      | 1           | 1                      | 1             | 1            |
| R4              | 10000             | 10000        | 10000          | 10000          | 10000            | 10000           | 1                      | 1           | 1                      | 1             | 1            |
| R5              | 100000            | 100000       | 100000         | 100000         | 100000           | 100000          | 1                      | 1           | 1                      | 1             | 1            |
| R6              | 10000             | 10000        | 10000          | 10000          | 10000            | 10000           | 5                      | 5           | 5                      | 1             | 1            |
| R7              | 10000             | 10000        | 10000          | 10000          | 10000            | 10000           | 10                     | 10          | 10                     | 1             | 1            |
| R8              | 10000             | 10000        | 10000          | 10000          | 10000            | 10000           | 20                     | 20          | 20                     | 1             | 1            |
| R9              | 10000             | 10000        | 10000          | 10000          | 10000            | 10000           | 50                     | 50          | 50                     | 1             | 1            |
| R10             | 10000             | 10000        | 10000          | 10000          | 10000            | 10000           | 100                    | 100         | 100                    | 1             | 1            |
| R11             | 10000             | 10000        | 10000          | 10000          | 10000            | 10000           | 500                    | 500         | 500                    | 1             | 1            |
| R12             | 10000             | 10000        | 10000          | 10000          | 10000            | 10000           | 1000                   | 1000        | 1000                   | 1             | 1            |
| R13             | 10000             | 10000        | 10000          | 10000          | 10000            | 10000           | 2500                   | 2500        | 2500                   | 1             | 1            |
| R14             | 10000             | 10000        | 10000          | 100            | 100              | 100             | 10                     | 10          | 10                     | 1             | 1            |
| R15             | 10000             | 10000        | 10000          | 250            | 250              | 250             | 10                     | 10          | 10                     | 1             | 1            |
| R16             | 10000             | 10000        | 10000          | 500            | 500              | 500             | 10                     | 10          | 10                     | 1             | 1            |
| R17             | 10000             | 10000        | 10000          | 500            | 500              | 500             | 20                     | 20          | 20                     | 1             | 1            |
| R18             | 10000             | 10000        | 10000          | 1000           | 1000             | 1000            | 20                     | 20          | 20                     | 1             | 1            |
| R19             | 10000             | 10000        | 10000          | 2000           | 2000             | 2000            | 20                     | 20          | 20                     | 1             | 1            |
| R20             | 10000             | 10000        | 10000          | 3000           | 3000             | 3000            | 20                     | 20          | 20                     | 1             | 1            |
| R21             | 10000             | 10000        | 10000          | 4000           | 4000             | 4000            | 20                     | 20          | 20                     | 1             | 1            |
| R22             | 10000             | 10000        | 10000          | 5000           | 5000             | 5000            | 20                     | 20          | 20                     | 1             | 1            |
| R23             | 10000             | 9000         | 9000           | 500            | 500              | 500             | 20                     | 20          | 20                     | 1             | 1            |
| R24             | 10000             | 8000         | 8000           | 500            | 500              | 500             | 20                     | 20          | 20                     | 1             | 1            |
| R25             | 10000             | 7000         | 7000           | 500            | 500              | 500             | 20                     | 20          | 20                     | 1             | 1            |
| R26             | 10000             | 6000         | 6000           | 500            | 500              | 500             | 20                     | 20          | 20                     | 1             | 1            |
| R27             | 10000             | 5000         | 5000           | 500            | 500              | 500             | 20                     | 20          | 20                     | 1             | 1            |
| R28             | 10000             | 10000        | 7500           | 500            | 500              | 500             | 10                     | 10          | 10                     | 1             | 1            |
| R29             | 10000             | 10000        | 6000           | 500            | 500              | 500             | 10                     | 10          | 10                     | 1             | 1            |
| R30             | 10000             | 10000        | 5000           | 500            | 500              | 500             | 10                     | 10          | 10                     | 1             | 1            |
| R31             | 10000             | 10000        | 7500           | 500            | 300              | 100             | 10                     | 5           | 2                      | 1             | 1            |
| R32             | 10000             | 10000        | 7500           | 500            | 450              | 200             | 10                     | 9           | 8                      | 1             | 1            |
| R33             | 10000             | 10000        | 7500           | 500            | 400              | 150             | 10                     | 6           | 5                      | 1             | 1            |
| R34             | 10000             | 10000        | 7500           | 500            | 250              | 100             | 10                     | 8           | 7                      | 1             | 1            |

表三 台灣苗栗三義地區的赤腹松鼠捕捉資料，包含西邊樣區(W1-W4)與東邊樣區(E1-E4)的籠數、捕捉籠夜、雌雄個體數與性別比例(雄性/雌性)。

**Table 3** Western trapsites (W1-W4) and eastern trap sites (E1-E4) in Sanyi, Miaoli County, Taiwan: trapping effort and success in capturing *Callosciurus erythraeus*.

| Trap site | Traps | Total trap Nights | Trapped individuals (N) |        |       | Sex ratio (male: female) |
|-----------|-------|-------------------|-------------------------|--------|-------|--------------------------|
|           |       |                   | Male                    | Female | Total |                          |
| W1        | 170   | 1010              | 12                      | 11     | 23    | 1.09                     |
| W2        | 90    | 560               | 10                      | 8      | 18    | 1.25                     |
| W3        | 80    | 490               | 14                      | 14     | 28    | 1                        |
| W4        | 120   | 560               | 12                      | 15     | 27    | 0.8                      |
| E1        | 68    | 408               | 8                       | 10     | 18    | 0.8                      |
| E2        | 70    | 490               | 13                      | 10     | 23    | 1.30                     |
| E3        | 80    | 560               | 22                      | 6      | 28    | 3.63                     |
| E4        | 80    | 560               | 5                       | 8      | 13    | 0.63                     |
| Total     | 758   | 6098              | 96                      | 82     | 178   | 1.17                     |

表四 以14種地景特徵為變數進行主成分分析台灣苗栗三義地區的八個樣區。

**Table 4** Principle component analysis (PCA) of eight trapsites landscape structure in Sanyi, Miaoli county, Taiwan, by using 14 landscape characteristics as variable.

| Landscape characteristics             | PC1    | PC2    | PC3    |
|---------------------------------------|--------|--------|--------|
| Forest percentage                     | 0.816  | 0.464  | 0.030  |
| Patch density                         | -0.860 | -0.194 | -0.105 |
| Largest patch index                   | 0.958  | 0.196  | -0.039 |
| Edge density                          | -0.771 | 0.632  | -0.048 |
| Landscape shape index                 | -0.875 | 0.459  | 0.032  |
| Perimeter-area fractal dimension      | -0.082 | 0.915  | -0.053 |
| Clumpiness Index                      | 0.230  | -0.913 | -0.063 |
| Like adjacencies percentage           | 0.970  | -0.214 | 0.082  |
| Interspersion and juxtaposition index | -0.036 | 0.209  | 0.968  |
| Connectance index                     | 0.764  | 0.485  | -0.343 |
| Patch cohesion index                  | 0.921  | 0.229  | 0.065  |
| Landscape division index              | -0.900 | -0.348 | 0.106  |
| Splitting index                       | -0.970 | 0.002  | -0.118 |
| Aggregation index                     | 0.963  | -0.246 | 0.064  |
| Eigenvalue                            | 8.73   | 3.13   | 1.11   |
| % variance explained                  | 62.8   | 22.3   | 7.9    |

**表五** 由四組增值片段長度多型性引子組合，挑選出共89個具有多型性的基因座，用於分析台灣苗栗三義地區赤腹松鼠的族群遺傳結構。

**Table 5** Polymorphic loci scored from four amplified fragment length polymorphism (AFLP) primer combinations to analyze the population genetic structure of 183 *Callosciurus erythraeus* sampled in Sanyi, Miaoli County, Taiwan.

| Primer combination | Fluorophore label | Polymorphic loci (N) |
|--------------------|-------------------|----------------------|
| E-AAA/T-GAA        | 6-FAM             | 24                   |
| E-AAG/T-GAG        | 6-FAM             | 20                   |
| E-AGA/T-GAA        | NED               | 27                   |
| E-AGA/T-GAG        | NED               | 18                   |
| Total              |                   | 89                   |

表六 台灣苗栗三義地區八個樣區W1-W4與E1-E4的赤腹松鼠族群遺傳歧異度。

**Table 6** Genetic diversity of *Callosciurus erythraeus* sampled in Sanyi, Miaoli County, Taiwan, from the western and eastern region.

| Trap site | n  | Hj   | S.E.  |
|-----------|----|------|-------|
| W1        | 22 | 0.39 | 0.014 |
| W2        | 21 | 0.42 | 0.011 |
| W3        | 28 | 0.39 | 0.014 |
| W4        | 25 | 0.38 | 0.014 |
| E1        | 19 | 0.37 | 0.016 |
| E2        | 22 | 0.39 | 0.015 |
| E3        | 27 | 0.35 | 0.016 |
| E4        | 12 | 0.35 | 0.015 |

Hj: Expected heterozygosity of genetic diversity

表七 89個增殖片段長度多型性基因座進行分子變方分析，檢視台灣苗栗三義地區八個樣區的赤腹松鼠族群遺傳結構，以高速公路東西為兩區域，每個樣區為族群，*P*值透過排列運算9,999次得知。

**Table 7** Analysis of molecular variance (AMOVA) of 89 amplified fragment length polymorphism (AFLP) loci of *Callosciurus erythraeus* trapped from eight sites in Sanyi, Miaoli County, Taiwan. Hierarchical compare genetic variance between two regions separate by highway (west and east), and populations according to their trap sites. The *P*-values were calculated based on 9,999 permutations.

| Source of variance               | d.f. | E.V. | %    |    | Value | <i>P</i> |
|----------------------------------|------|------|------|----|-------|----------|
| Among Regions                    | 1    | 0.7  | 4    | RT | 0.039 | <0.0001  |
| Among Populations within Regions | 6    | 1.5  | 8.4  | PR | 0.085 | <0.0001  |
| Within Populations               | 175  | 15.8 | 87.6 | PT | 0.120 | <0.0001  |

RT: The correlation within a region, relative to the total .

PR: The correlation among individuals within a population, relative to individuals from the same region.

PT: The correlation among individuals within a population, relative to the total.

d.f.: Degree of freedom.

E.V.: Estimated variance.

表八 台灣苗栗三義地區赤腹松鼠的Mantel test，檢驗西邊區域、東邊區域與全區的個體，其遺傳距離與地理直線距離的相關性，*P*值為透過排列運算9,999次得知。

**Table 8** Mantel test for correlation between pairwise genetic and geographic distances among *Callosciurus erythraeus* individuals from Sanyi and western and eastern regions in Sanyi, Miaoli County, Taiwan. The *P*-values were calculated based on 9,999 permutations.

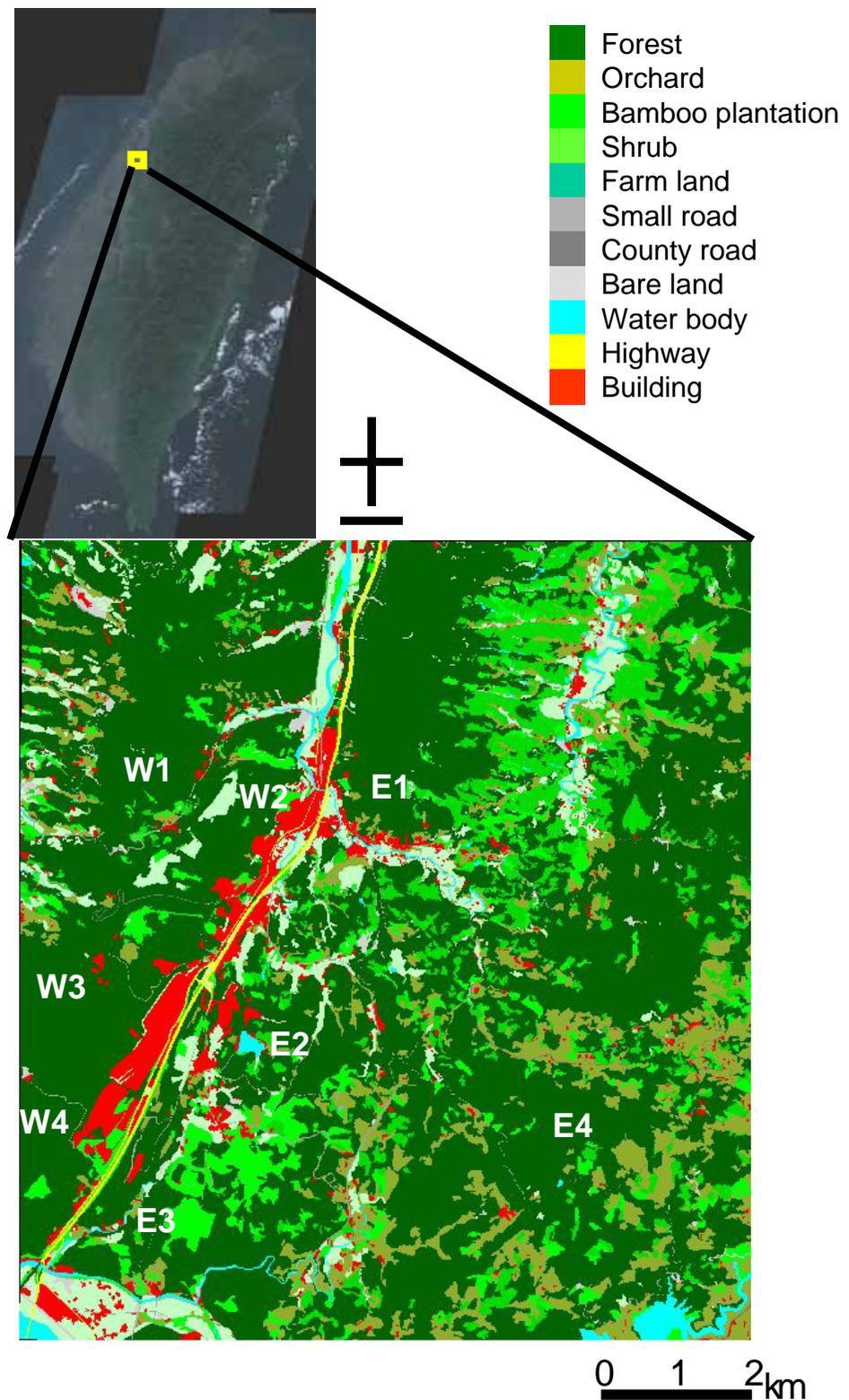
| Population | $r_{xy}$ | <i>P</i> |
|------------|----------|----------|
| West       | 0.299    | 0.001    |
| East       | 0.118    | 0.001    |
| Total      | 0.115    | 0.001    |

$r_{xy}$ : Mantel correlation coefficient

**表九** 32組障礙參數組(resistance set)預測台灣苗栗三義地區赤腹松鼠的擴散路徑，並以mantel test檢驗由障礙參數組運算而得的最少花費距離(least cost distance)與遺傳距離的相關性， $r_{xy}$ 為mantel相關係數， $P$ 值為透過排列運算9,999次得知，粗體表示相關性最高的障礙參數組。

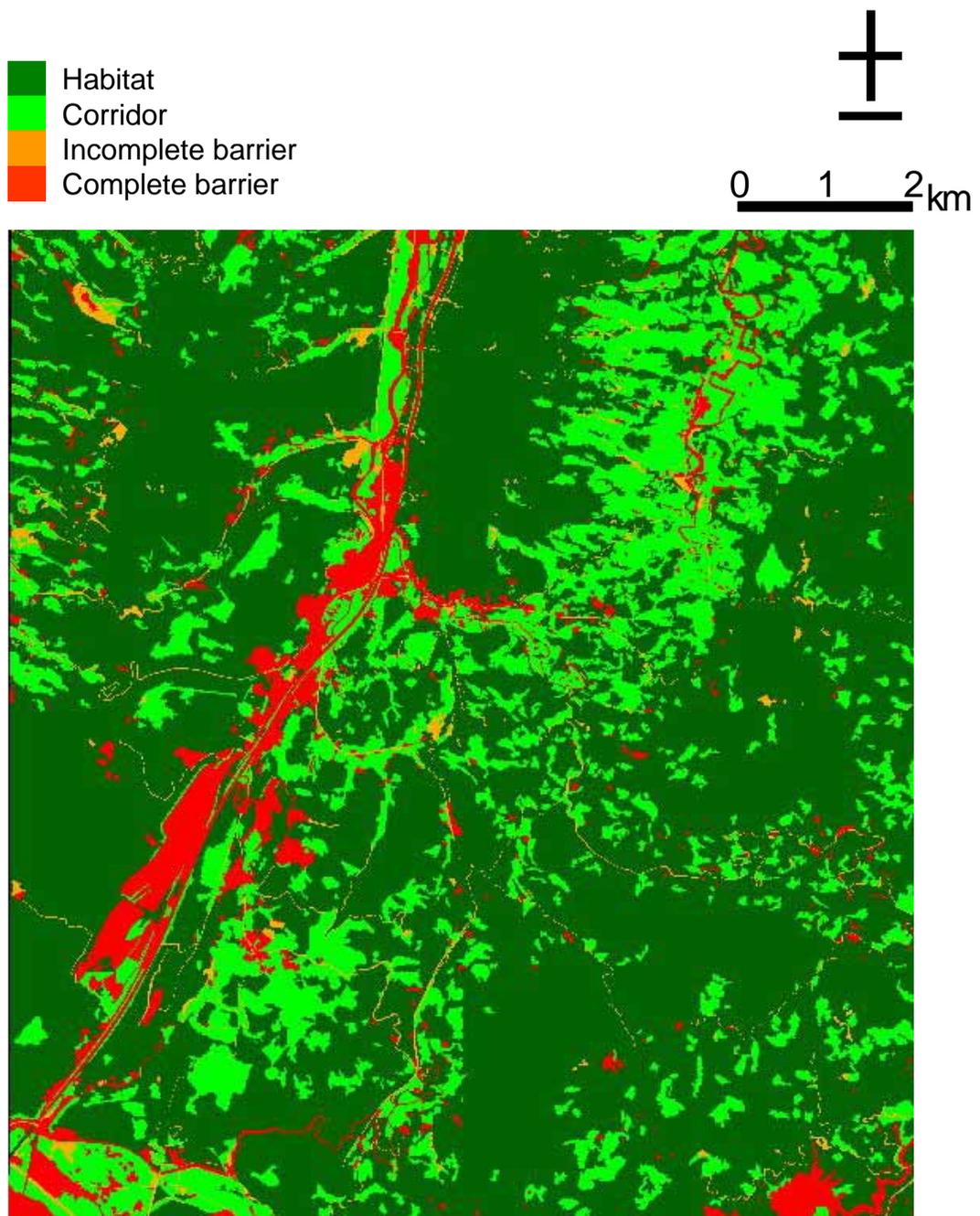
**Table 9** Relation of least cost distance and genetic distance tested of 32 resistance sets by mantel test in Sanyi, Miaoli county, Taiwan.  $r_{xy}$  represents mantel correlation coefficient The  $P$ -values were calculated based on 9,999 permutations. The best sets are given in bolds.

| Resistance set |  | $r_{xy}$      | $P$ -vaule    |
|----------------|--|---------------|---------------|
| R0             | 1 class: 1                                       | 0.1147        | 0.0001        |
| R1             | 2 classes:10-1                                   | 0.1272        | 0.0001        |
| R2             | 2 classes:100-1                                  | 0.1473        | 0.0001        |
| R3             | 2 classes:1000-1                                 | 0.1413        | 0.0001        |
| <b>R4</b>      | <b>2 classes:10000-1</b>                         | <b>0.1482</b> | <b>0.0001</b> |
| R5             | 2 classes:100000-1                               | 0.1476        | 0.0001        |
| R6             | 3 classes:10000-5-1                              | 0.1493        | 0.0001        |
| <b>R7</b>      | <b>3 classes:10000-10-1</b>                      | <b>0.1494</b> | <b>0.0001</b> |
| R8             | 3 classes:10000-20-1                             | 0.1483        | 0.0001        |
| R9             | 3 classes:10000-50-1                             | 0.1459        | 0.0001        |
| R10            | 3 classes:10000-100-1                            | 0.1434        | 0.0001        |
| R11            | 3 classes:10000-500-1                            | 0.1381        | 0.0001        |
| R12            | 3 classes:10000-1000-1                           | 0.1330        | 0.0001        |
| R13            | 3 classes:10000-2500-1                           | 0.1308        | 0.0001        |
| R14            | 4 classes:10000-100-10-1                         | 0.1495        | 0.0001        |
| R15            | 4 classes:10000-250-10-1                         | 0.1493        | 0.0001        |
| <b>R16</b>     | <b>4 classes:10000-500-10-1</b>                  | <b>0.1495</b> | <b>0.0001</b> |
| R17            | 4 classes:10000-500-20-1                         | 0.1494        | 0.0001        |
| R18            | 4 classes:10000-1000-20-1                        | 0.1491        | 0.0001        |
| R19            | 4 classes:10000-2000-20-1                        | 0.1489        | 0.0001        |
| R20            | 4 classes:10000-3000-20-1                        | 0.1487        | 0.0001        |
| R21            | 4 classes:10000-4000-20-1                        | 0.1486        | 0.0001        |
| R22            | 4 classes:10000-5000-20-1                        | 0.1483        | 0.0001        |
| R23            | 5 classes:10000-9000-500-20-1                    | 0.1492        | 0.0001        |
| R24            | 5 classes:10000-8000-500-20-1                    | 0.1491        | 0.0001        |
| R25            | 5 classes:10000-7000-500-20-1                    | 0.1488        | 0.0001        |
| R26            | 5 classes:10000-6000-500-20-1                    | 0.1483        | 0.0001        |
| R27            | 5 classes:10000-5000-500-20-1                    | 0.1481        | 0.0001        |
| <b>R28</b>     | <b>5 classes:10000-7500-500-20-1</b>             | <b>0.1495</b> | <b>0.0001</b> |
| R29            | 5 classes:10000-6000-500-20-1                    | 0.1494        | 0.0001        |
| R30            | 5 classes:10000-5000-500-20-1                    | 0.1493        | 0.0001        |
| <b>R31</b>     | <b>9 classes:10000-7500-500-300-100-10-5-2-1</b> | <b>0.1496</b> | <b>0.0001</b> |
| R32            | 9 classes:10000-7500-500-450-200-10-9-8-1        | 0.1494        | 0.0001        |
| R33            | 9 classes:10000-7500-500-400-150-10-6-5-1        | 0.1495        | 0.0001        |
| R34            | 9 classes:10000-7500-500-350-100-10-3-2-1        | 0.1495        | 0.0001        |



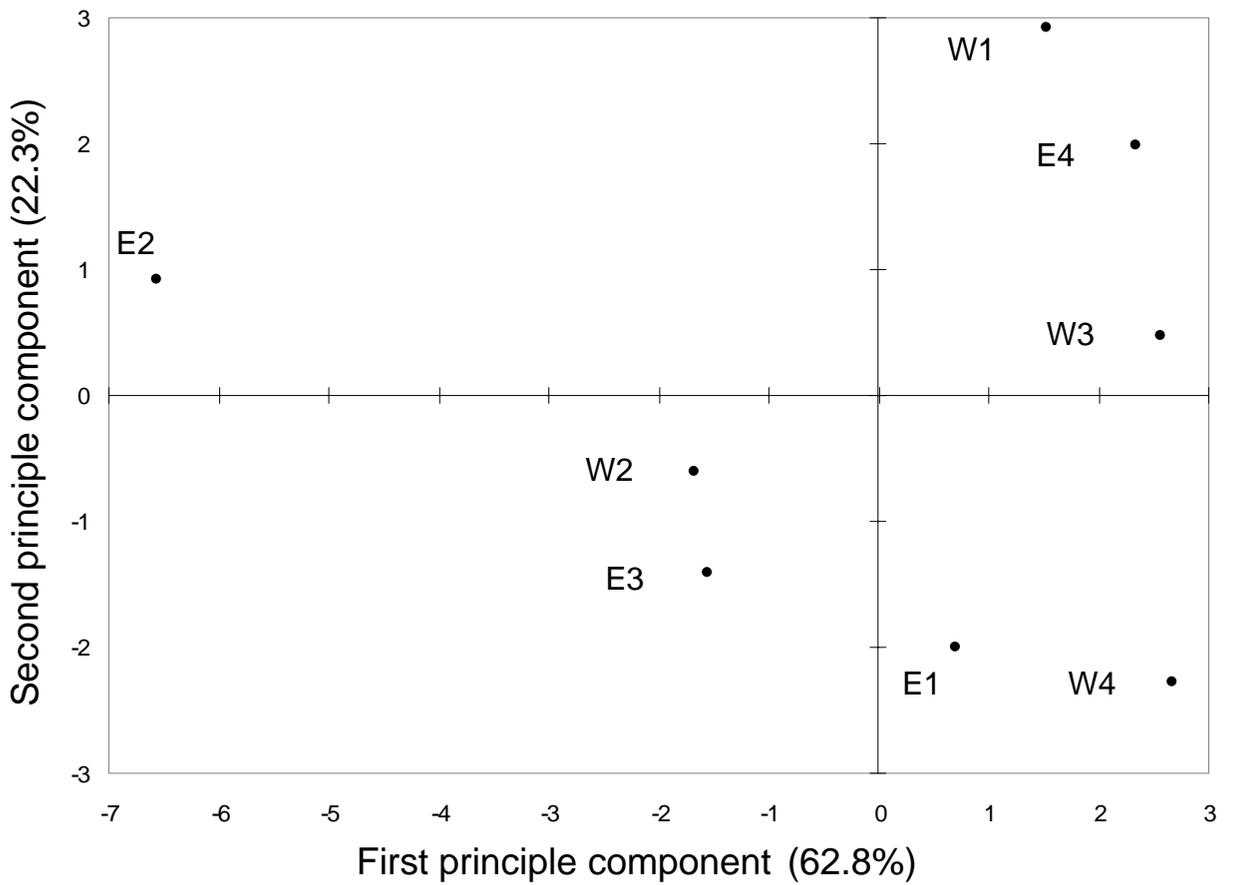
圖一 台灣苗栗三義地區赤腹松鼠的八個捕捉樣區位置，以及地景分類圖，西邊為W1~W4，東邊為E1~E4。

**Figure 1** Landuse and location of the eight trapsites of *Callosciurus erythraeus* in Sanyi, Miaoli County, Taiwan. Western trap sites are W1-W4 and eastern trap sites are E1-E4.



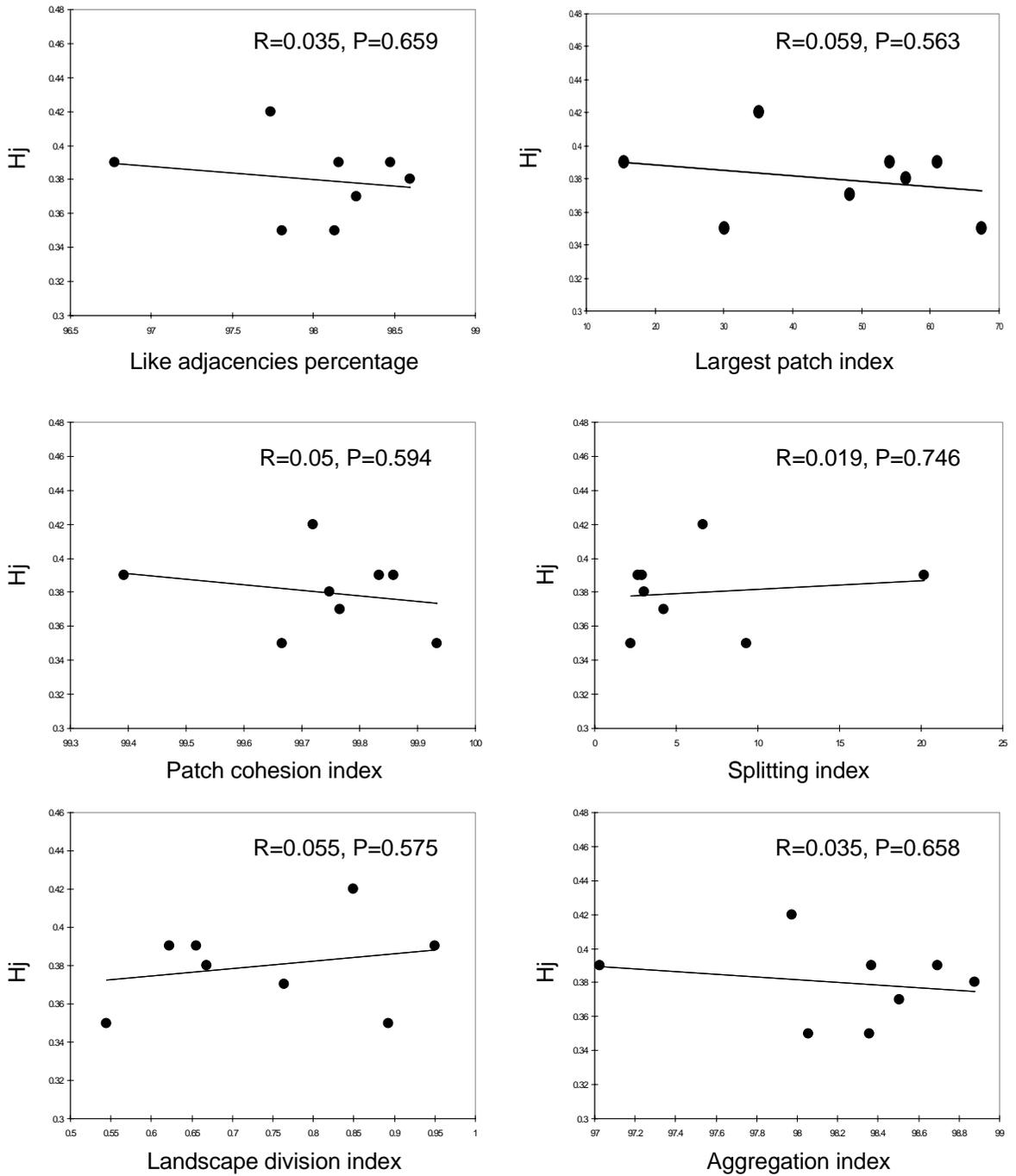
圖二 台灣苗栗三義地區的地景分類圖，依照不同地景類型對赤腹松鼠穿越時的影響，將十一種地景類型分為四類，棲地、廊道、不完全地景障礙和完全地景障礙。

**Figure 2** Land use in Sanyi, Miaoli County, Taiwan, classified according to the effect on *Callosciurus erythraeus* dispersal: habitat, corridor, incomplete barriers and complete barriers.



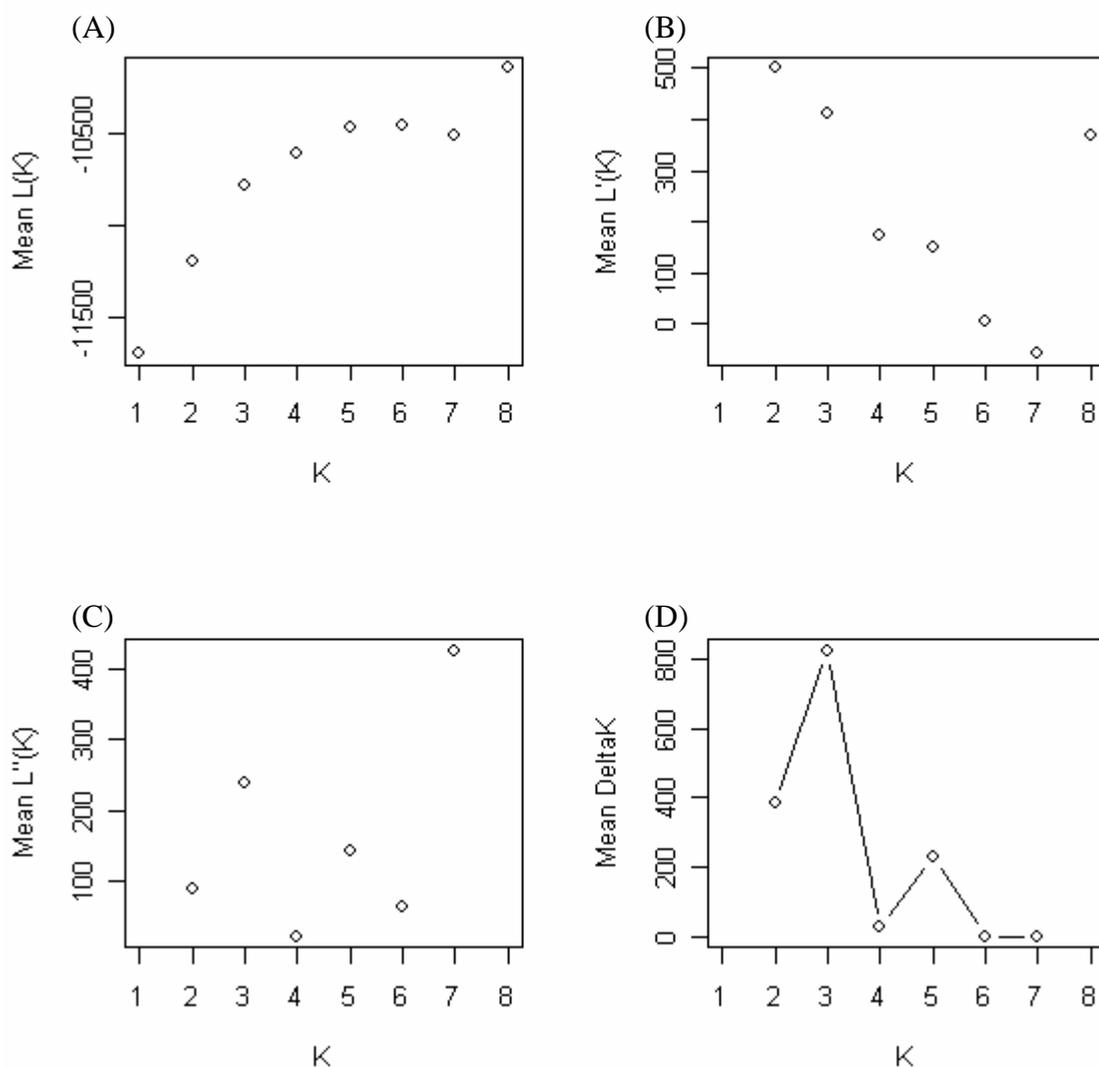
圖三 根據14種地景特徵對台灣苗栗三義地區八個樣區的主成分分析。

**Figure 3** Principal component analysis of eight trapsite in Sanyi, Miaoli County, Taiwan, based on 16 landscape characteristics.



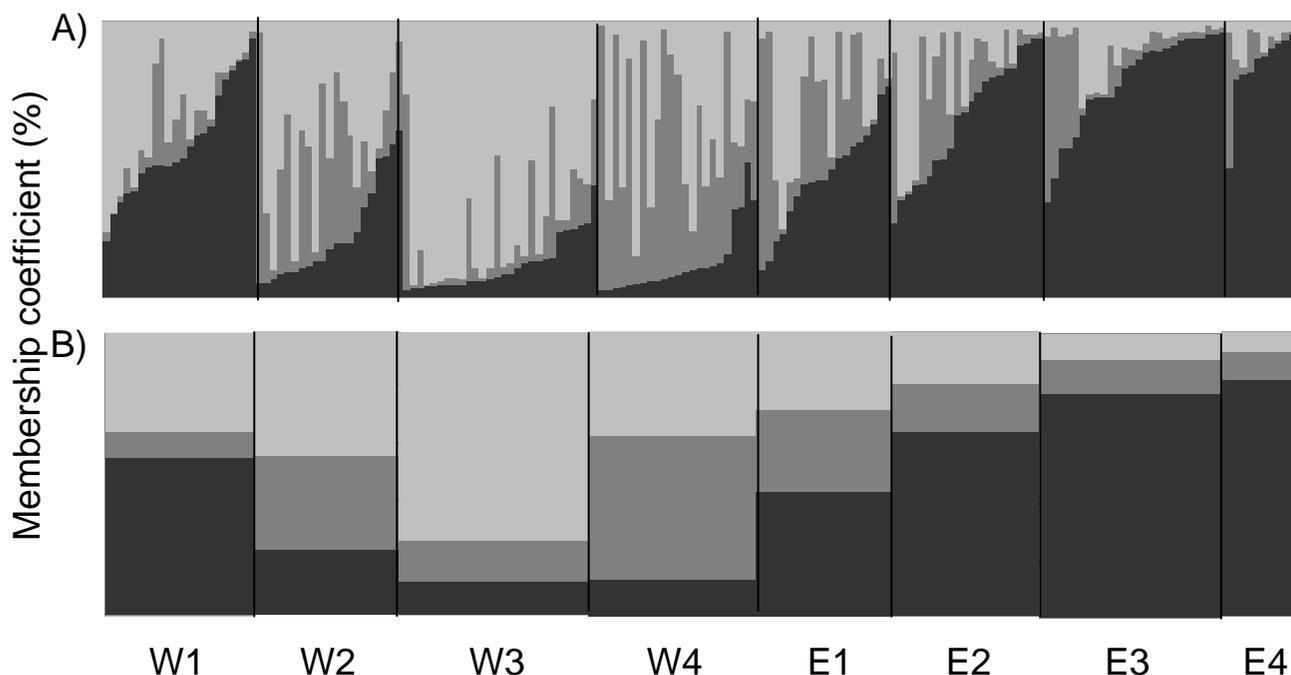
圖四 台灣苗栗三義地區八個樣區的六種地景特徵與遺傳歧異度( $H_j$ )的線性迴歸關係圖。

**Figure 4** Linear regression of *Callosciurus erythraeus* genetic diversity ( $H_j$ ) and six landscape characteristics from eight trapsites in Taiwan, Miaoli county, Sanyi.



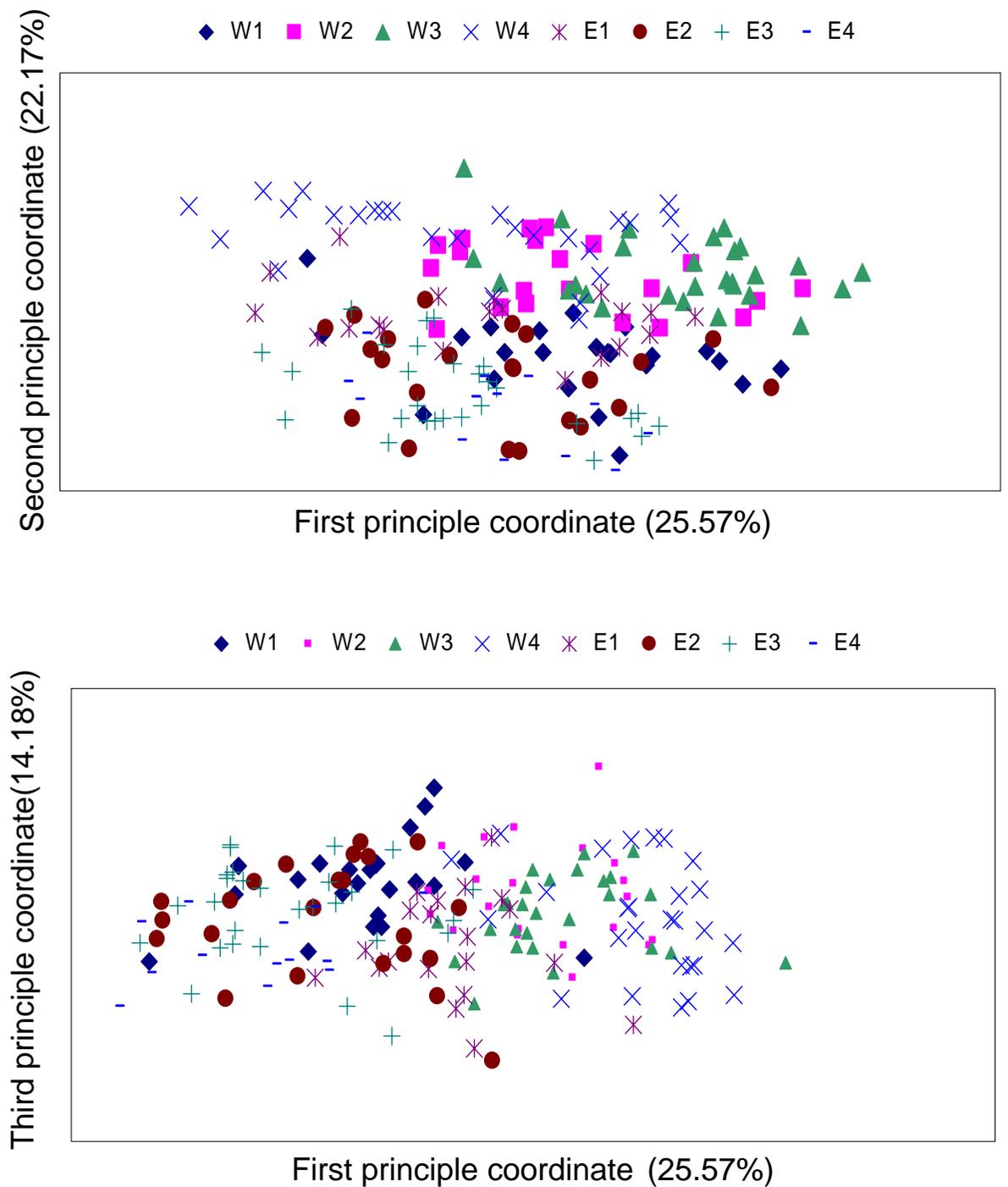
**圖五** 以圖像檢驗最恰當的K值，四步驟檢視台灣苗栗三義地區赤腹松鼠族群遺傳結構的分派檢定結果，A)平均L(K)，B)L(K)變化的速度， $L'(K)=L(K)-L(K-1)$ ，C)  $L''(K)$ ，D) $\Delta K=m|L''(K)|/s [L(K)]$

**Figure 5** Description of four steps to estimate the best K for the assignment test of *Callosciurus erythraeus* in Sanyi, Miaoli County, Taiwan. A) Mean L(K), B) Rate of L(K) change,  $L'(K)=L(K)-L(K-1)$ , C)  $L''(K)$ , D) $\Delta K=m|L''(K)|/s [L(K)]$



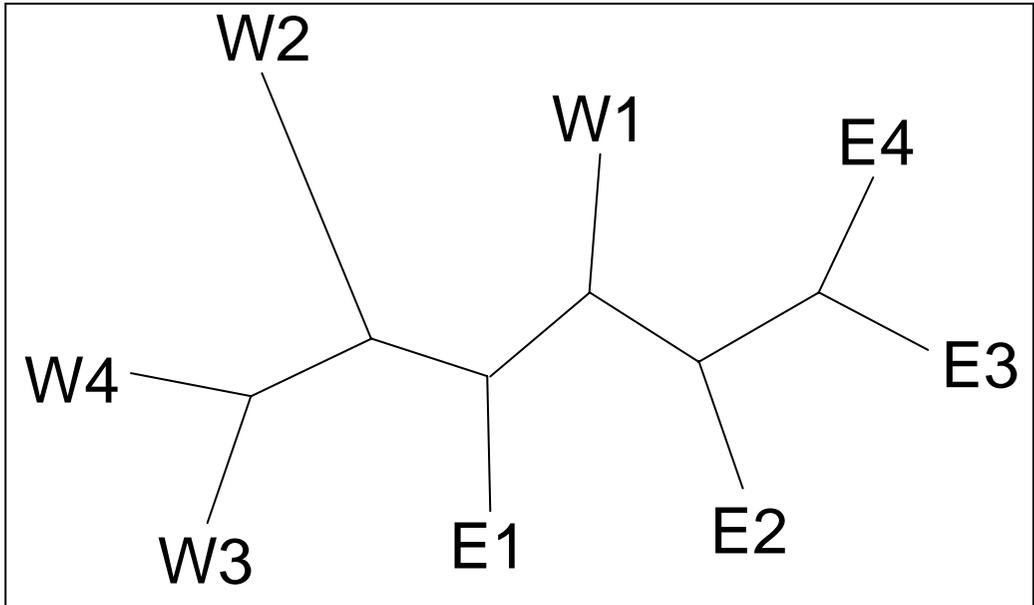
**圖六** 台灣苗栗三義地區赤腹松鼠分派檢定(assignment test)的結果，共三個遺傳群，黑色、灰色和淺灰，每個群集代表一個樣區，西邊樣區為W1-W4，東邊樣區為E1-E4，上圖為每個個體分派到各基因群的機率，A)個體分派到各遺傳群的機率，B)樣區內所有個體分派到各遺傳群的平均機率，W2-W4分派到灰與淺灰的基因群的機率超過七成，E2-E4分派到黑色基因群的機率約超過七成，W1與E1分派到三群的機率約均等，表示該區混合了來自東西兩區域的赤腹松鼠。

**Figure 6** Population structure as inferred by assignment test of *Callosciurus erythraeus* sampled in Sanyi, Miaoli County, Taiwan. The three genetic groups are represented by black, grey, and light grey. Each block represent a trap site in the western region(W1-W4) and eastern region(E1-E4). A) Individual membership coefficient in the three genetic groups. B) Mean membership coefficient of each trap site. Probability of W2-W4 assigned to grey and light grey is >70%. Probability of E2-E4 assigned to black is about 70%. Probability of W1 and E1 assigned to the three genetic groups is about equal, indicating the squirrels trapped in W1 and E1 are a mixture of eastern and western populations.



圖七 台灣苗栗三義地區赤腹松鼠個體間遺傳關係的主座標軸分析(PCoA)前三座標軸的結果(25.57%, 22.17%, 14.18%)。

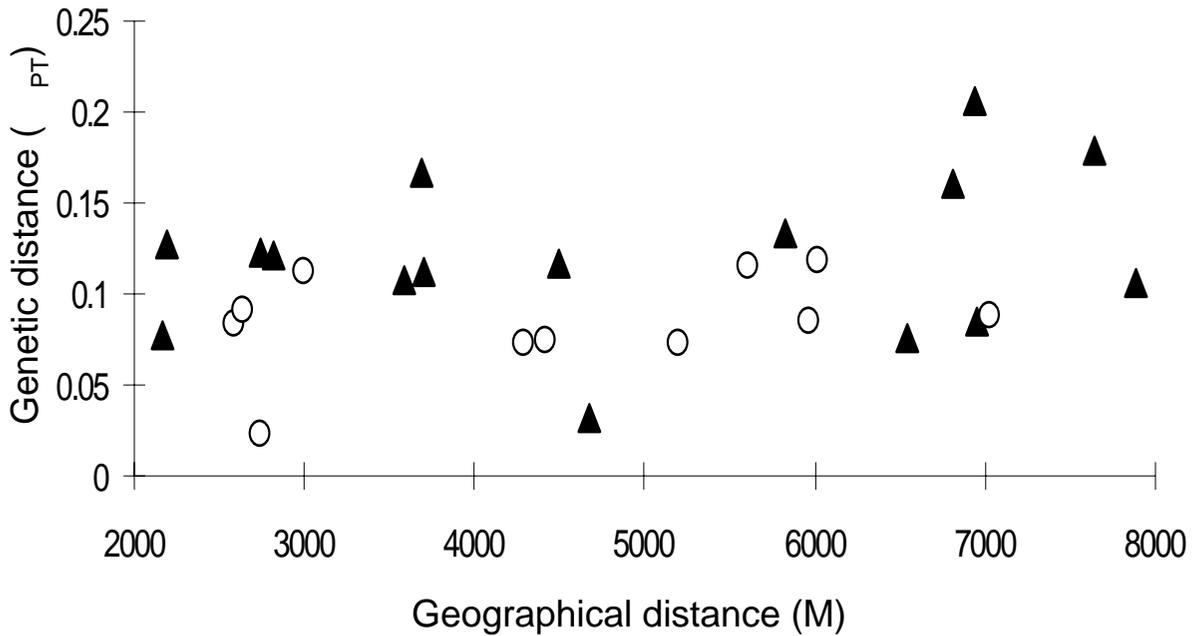
**Figure 7** The first three principle coordinates showing the genetic relationships of *Callosciurus erythreus* individuals sampled from Sanyi, Miaoli County, Taiwan. These principle coordinates accounted for 25.57%, 22.17%, and 14.18% of explanation.



圖八 台灣苗栗三義地區八個樣區的赤腹松鼠，成對樣區間遺傳距離 ( $\Phi_{PT}$ )的UPGMA consensus 樹型圖。

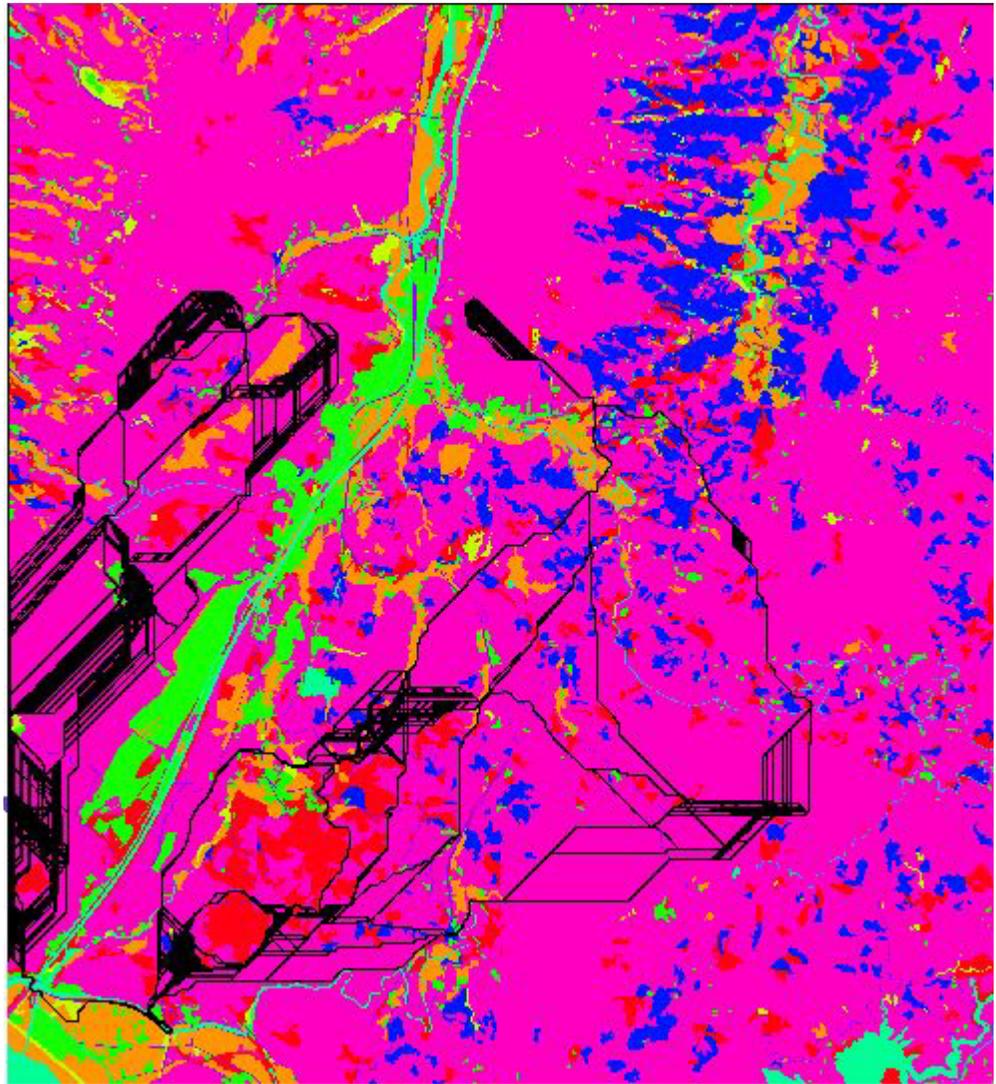
**Figure 8** UPGMA consensus tree of pairwise genetic distance ( $\Phi_{PT}$ ) from eight trap sites in Sanyi, Miaoli county, Taiwan.





圖九 台灣苗栗三義地區赤腹松鼠成對樣區間的遺傳距離( $\Phi_{PT}$ )與地理直線距離關係圖，三角形代表東西區域間的成對樣區，即受高速公路相隔，圓形為東西區域內部的成對樣區，即無高速公路相隔。

**Figure 9** Correlation of pairwise genetic distance ( $\Phi_{PT}$ ) and geographical distance among *Callosciurus erythreus* population in Sanyi, Miaoli County, Taiwan. Triangles represent the correlation among populations separated by highways. Circles represent the correlation among populations within the same region.



圖十 以R31地景參數組預測台灣苗栗三義地區赤腹松鼠之間的最少代價路徑(least cost path)圖。

**Figure 10** The least cost path between *Callosciurus erythraeus* in Sanyi, Miaoli County, Taiwan, eximated by R31.

## 作者個人資料

姓名：陳柏豪

籍貫：高雄市

出生日期：71年7月6日

學經歷：國立台灣大學生命科學系

通訊地址：802 高雄市苓雅區武漢街115巷21號