

臺灣狐蝠的族群動態及遺傳結構評估 (4/4)

成果報告

Population dynamics and genetic structure of the
Formosan flying fox



國土生態綠網

計畫編號：114 林發-09.3-保-13

計畫主持人：陳湘繁

計畫主辦人：陳湘繁、張廖年鴻

研究助理：阮仲豪

執行機關：國立臺北大學、臺北市立動物園

執行期間：114 年 1 月 1 日至 114 年 12 月 31 日

目次

目次.....	I
摘要.....	III
前言.....	1
材料與方法.....	4
1. 樣本採集.....	4
2. DNA 萃取及 PCR.....	4
3. 簡化基因組建庫及定序.....	6
4. 遺傳多樣性.....	6
5. 遺傳結構.....	7
6. 單倍型網絡圖.....	8
7. 遷移率分析.....	8
8. 性別比及族群數估算.....	8
9. 瓶頸效應.....	9
結果.....	10
1. 遺傳多樣性及分化.....	10
2. 遺傳結構.....	11
3. 單倍型網絡圖.....	12
4. 個體鑑定及遷移率分析.....	12
5. 性別比及族群數估算.....	13
6. 瓶頸效應.....	13
討論.....	14
遺傳多樣性及遺傳結構.....	14
族群量、性別比及族群動態變化.....	15
結論.....	16
致謝.....	16
參考文獻.....	17
表一、本研究所選用之微衛星引子組合一覽表.....	24
表二、本研究設計之琉球狐蝠性別鑑定引子.....	26
表三、琉球狐蝠的遺傳多樣性.....	27
表四、琉球狐蝠的分子變異數分析.....	29
表五、琉球狐蝠成對亞種/族群間之遺傳分化指數 (Φ_{ST}/F_{ST}).....	30

表六、臺灣狐蝠於各島嶼的遷移率分析.....	33
表七、臺灣狐蝠於綠島、龜山島及花蓮市的族群估算值及 95%信賴區間	34
圖一、琉球狐蝠之地理分布圖	35
圖二、臺灣狐蝠的性別鑑定電泳膠圖	36
圖三、以 STRUCTURE 分析琉球狐蝠的遺傳結構	37
圖四、琉球狐蝠的主成分分析(Principal Component Analysis, PCA)	38
圖五、琉球狐蝠的單倍型網絡圖	41
圖六、臺灣狐蝠近年之性別比變化.....	42
圖七、臺灣狐蝠近年累積族群數之變化.....	43
附錄一、以 STRUCTURE 分析琉球狐蝠各大分群內的遺傳次結構	44
附錄二、野外調查照片	47

摘要

數量稀少且孤立之族群容易遭逢遺傳隨機事件以及遺傳漂變的影響而威脅其生存，故對受威脅物種的保育而言，如何有效地進行監測並維護遺傳多樣性及族群數是十分重要的保育研究議題，尤其是資源有限且環境變動劇烈的島嶼族群。臺灣狐蝠 (*Pteropus dasymallus formosus*) 為琉球狐蝠的臺灣特有亞種，依野生動物保育法公告為瀕臨絕種保育類野生動物，原分布於綠島，曾因過度獵捕及棲地破壞而幾近消失，近年來在龜山島和花蓮市出現穩定的族群。本研究運用分子生物學的方法，以微衛星和性染色體基因型進行個體和性別辨識，並輔以粒線體及次世代的簡化基因組定序技術探討遺傳多樣性，以檢視琉球狐蝠的遺傳結構，並進一步分析臺灣狐蝠現今三處居留族群 (龜山島、花蓮市及綠島) 的族群數量和性別比，建立該瀕危物種的基礎生物學資料。本研究自 2006 年以降累積琉球狐蝠個體資料庫，至本年度為止共成功鑑定包含 5 亞種、317 隻個體 (含 169 隻雄性、114 隻雌性及 34 隻性別不詳)，其中包含 210 隻臺灣狐蝠個體 (112 隻雄性、73 隻雌性及 25 隻性別不詳)，估計臺灣狐蝠族群數約為 580 隻，族群穩定成長，性別組成以雄性居多；檢視交流狀況並無觀察到臺灣三處族群存在移動個體，然而以石垣島為中心、主要方向由東往西挹注的基因流，可能為臺灣境內重要的個體移入來源。遺傳分析結果顯示，琉球狐蝠具有三大分群的族群結構，其中以八重山群島的與那國島個體組成最為獨立且同質性高、臺灣狐蝠與八重山群島之西表及石垣島有密切的交流歷史，而北琉球的折居氏和大東則自成一支系。未來將持續提升各島嶼的樣本數，以更深入探討琉球狐蝠，尤其是臺灣族群以及與臺灣最為鄰近的八重山族群之間的族群結構，並持續監測臺灣狐蝠的族群數及遺傳多樣性之變動，以釐清該物種適宜的保育單元。

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

前言

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

過往保育類物種受限於取樣不易, 族群監測難度高, 然而近年來非侵入式取樣 (Non-invasive sampling) 的技術進展, 大幅提高樣本來源及品質, 其遺傳資訊除可進行個體辨識之外, 更可廣泛應用於族群遺傳甚至於基因體層次之分析 (Norman & Spong, 2015; Carroll *et al.*, 2018; Natesh *et al.*, 2019)。故若妥善整合「遺傳」或者「非遺傳面向」(如行為、生態、生活史、族群統計及環境層面等) 的各層考量, 將更有助於制定高效能的保育管理計畫及族群管理策略 (Hoban *et al.*, 2013; Polechová & Barton, 2015; Frankham *et al.*, 2017; Zarzoso-Lacoste *et al.*, 2018)。

琉球狐蝠 (*Pteropus dasymallus*), 廣泛分布於西太平洋諸島, 包含日本琉球群島、臺灣及北部菲律賓群島 (Kinjo & Nakamoto, 2015)。目前已知五個亞種, 可根據其分佈之島群作區分, 包含位於日本琉球群島的四個亞種—大東狐蝠 (*P. d. daitoensis*)、永良部狐蝠 (*P. d. dasymallus*)、折居氏狐蝠 (*P. d. inopinatus*) 及八重山狐蝠 (*P. d. yayeyamae*), 以及位於臺灣的第五個亞種—臺灣狐蝠 (*P. d. formosus*) (Mickleburgh *et al.*, 1992; Yoshiyuki, 1989)。而較晚近才發現的菲律賓族群, 則棲息於呂宋島北方的兩處海島群, 包含巴丹群島 (Batanes islands) 及巴布延群島 (Babuyan Islands), 目前尚未被正式命名為一亞種 (Heaney *et al.*, 1998)。

琉球狐蝠近期在國際自然保育聯盟紅皮書 (IUCN Red list) 歸類為易危 (Vulnerable) 的保育等級 (IUCN, 2025), 各亞種實際上的保育現況不盡相同

(Vincenot *et al.*, 2017)。族群數量稀少並具保育迫切性的是大東、永良部及臺灣狐蝠這三個亞種，野外約僅剩 50–300 隻個體 (吳慧雯, 2010; Saitoh *et al.*, 2015)，皆已受國家層級的法律保護。其中，大東及永良部亞種被指定為日本的天然紀念物(Natural Monuments)，尤其大東亞種更被列為國家瀕危物種 (National Endangered Species)；而在臺灣，臺灣狐蝠也已名列瀕臨絕種保育類野生動物。另外三個亞種—折居氏、八重山以及菲律賓族群，數量相對較為豐富，並未歸類在區域性的受脅等級(Heaney *et al.*, 1998; Saitoh *et al.*, 2015)。

大東亞種在地理分布上僅侷限於大東群島的兩處島嶼—南大東島(Minamidaito-jima) 及北大東島 (Kitadaito-jima)，其大部分自然棲地皆已經開發為農地，最主要的威脅是颱風 (Saitoh *et al.*, 2015)。永良部亞種則主要見於大隅群島 (Ōsumi Islands) 及圖克拉群島 (Tokara Islands)，為琉球狐蝠的分布北界 (Yoshiyuki, 1989)。臺灣狐蝠過去主要分布於臺灣東南方的綠島，然而該島族群卻在 1970 至 80 年代之間，遭受嚴重的狩獵及棲地喪失，數量幾近滅絕 (林良恭、裴家騏, 1999)。晚近至 2004 年，在本島東北方 9.7 公里處的龜山島首度記錄到狐蝠的出現，是目前臺灣數量最多且穩定的狐蝠族群。此外，自 2006 年以降，在臺灣本島東部及東北部也陸續有零星的通報紀錄，甚至在花蓮，2009 年以後亦記錄到穩定的居留族群 (吳慧雯, 2010)。

各亞種之中，已知八重山狐蝠和臺灣狐蝠具有較高的遺傳多樣性，而大東狐蝠的族群變異則相對較低；遺傳的顯著分化確實存在於大多數亞種族群之間，尤其折居氏、大東及菲律賓應可視為獨立的族群單位管理，然而臺灣與八重山亞種之間的分化並不顯著；而臺灣狐蝠本身存在多個祖先支系的可能來源，其中臺灣本島與綠島的族群相對接近，而龜山島族群則有一支自身的獨立祖先支系、也有另一支與臺灣本島和綠島接近的來源，甚至也有與八重山與折居氏亞種接近的個體存在 (Chen *et al.*, 2021; Taki *et al.*, 2021)。根據臺灣狐蝠族群近年的監測結果，整體而言，族群數量呈現增加的趨勢，龜山島個體佔有近七成的臺灣族群數量，而花蓮市區的個體除發現紀錄逐年增加外，也觀察到適應都會環境的現象、甚至可於市鎮內的綠地公園便發現日棲所，近年於育幼季也不乏母子蝠的觀察紀錄。原本個體數量豐富的綠島，經歷大規模商業狩獵後，如今個體數十分稀少，近年僅有零星紀錄 (Wu *et al.*, 2022)。

本年度，將針對臺灣狐蝠已執行例行調查多年的三處族群—龜山島、花蓮市區及綠島進行採集，期盼能擴大個體資料庫，透過個體基因型標定資料為基礎，持續

監測實際族群數 (Nc, census population size)、性別比、以及評估臺灣狐蝠族群的交流狀況。另預計透過海外採集或以國際交流等方式擴大採樣，取得更多不同島嶼群的琉球狐蝠亞種樣本。除了傳統分子工具之外，本年度將進行基因體尺度的次世代定序技術，以大量具多型性的分子標記探討該物種的遺傳結構及亞種之間的親緣關係，釐清臺灣狐蝠的族群起源以及琉球狐蝠各亞種的演化歷史，以利界定該物種更為精確的保育管理單元。本計畫將結合多項族群動態 (族群數及性別比等) 及多樣性指標，期盼能更深入了解臺灣狐蝠的近期族群動態及遺傳多樣性之間的關聯，作為規劃保育管理的基礎參考資料。

1. 全程目標：

累積臺灣狐蝠的個體及遺傳資訊，優化臺灣狐蝠族群動態及遺傳結構監測之技術，目標除了釐清琉球狐蝠各亞種或島嶼的親緣關聯及交流歷史，也將持續監測族群數及遺傳多樣性之變化趨勢，以利制定適當的保育管理政策。

2. 本年度目標：

- (1) 累積樣本及個體資料庫：將針對臺灣狐蝠已知穩定出沒之地區或離島，持續藉由現地調查或與在地志工合作，蒐集各類型樣本、鑑定個體並累積臺灣狐蝠之個體資料庫、性別比及族群成長趨勢，以作為族群存續經營管理之參考。
- (2) 臺灣狐蝠族群動態評估：本團隊預期進行每季定點採樣，藉由已建立的分子生物學方法取得遺傳資料，透過直接的親子譜系重建或間接的遺傳結構分析，檢視臺灣境內族群是否存在交流，並監測遺傳多樣性的變化。
- (3) 琉球狐蝠之親緣關係與遺傳結構：針對琉球狐蝠各亞種的親緣關係，除了粒線體及微衛星基因座分析外，本年度將進一步使用次世代分析的簡化基因組技術—限制酶切位連結核酸定序 (restriction-site associated DNA sequencing, RADseq)，取得大量的單一核苷酸多型性分子標記 (Single nucleotide polymorphism, SNP)，並透過國際交流嘗試取得其他亞種之樣本，持續探索臺灣狐蝠族群與其他亞種之關聯性，並進一步釐清亞種之間的演化歷史。

材料與方法

1. 樣本採集

本研究分析的樣本跨幅 2006~2025 年，樣本來源包括：野外捕捉的活體、屍體、救傷個體、圈養個體和野外採集之非侵入式樣本 (附錄二)。涵蓋琉球狐蝠的分布地，包含臺灣和琉球群島等七處不同的島嶼 (圖一) (Chen *et al.*, 2021)。樣本類型則包括翼膜切片、血液、肌肉組織、以及非侵入式採樣的排遺、食渣和食餘。翼膜樣本為以 3mm 組織採樣器採樣之翼膜組織，保存於 95% 的酒精、Allprotect Tissue Reagent (Qiagen) 或乾燥矽膠微粒之中，直至萃取；血液樣本則是採集 0.25 cc 的血液，保存於 EDTA 採血管中；肌肉組織採自死亡屍體或標本；新鮮排遺、食渣和食餘則保存於 99.5% 的酒精或 RNAlater 試劑 (Stabilization Reagent, Qiagen) 中。

2. DNA 萃取及 PCR

若樣本類型為翼膜、血液或肌肉組織，我們使用 DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) 進行萃取操作；2019 至 2020 年 10 月所採集的排遺樣本，則使用 QIAamp Investigator Kit 或者 QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen) 萃取；自 2020 年 11 月以後至 2023 年所採集的排遺及食渣樣本，主要以 Nucleic Acid Purification Kit (Labturbo) 搭配專屬自動萃取儀器萃取。而自 2024 年起，非侵入式樣本則一律以 Genomic DNA mini kit (Geneaid) 進行萃取，並修改程序如下：吸取採樣管中 1400 μ l 酒精固定液，並挑取 300 μ l 的檢體量，一併置於新的 2.0 ml 離心管，於自動震盪機中以低轉速 (80 rpm) 震盪 2 小時，結束後再以高速離心機、以 13500 rpm 離心 5 分鐘，倒去上清液。隨後，將帶有沉澱物的空管置於乾浴槽 70 $^{\circ}$ C 揮發樣本的殘餘酒精，再加入 GT Buffer、Proteinase K 等試劑置於 60 $^{\circ}$ C 乾浴槽至少 12 小時，再依試劑所附之萃取流程完成剩餘操作。

本研究針對不同目的，挑選不同的遺傳基因標記進行實驗分析之用，包含了粒線體、核基因微衛星基因座及性染色體基因。針對粒線體遺傳片段的分析，參考狐蝠屬物種之親緣地理學研究 (Brown *et al.*, 2011)，選用變異性高的 d-loop 片段，聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR) 的總反應體積為 15 μ l，包含 20-100 ng 的模板 DNA、0.375 μ l 的 10 μ M 正反股引子及 7.5 μ l 的 Quick Taq HS DyeMix

(TOYOBO)。PCR 使用下列溫度調控：(1) 初始解離溫度為 94 °C (2 分鐘)；(2) 解離溫度 94 °C (30 秒)、黏合溫度 53°C (30 秒) (若為非侵入樣本則為 1 分鐘) 及延長溫度 68 °C (60 秒)，此階段進行 40 次循環；(3) 最終延長溫度為 68 °C (10 分鐘)。

本研究使用 ABI 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems) 進行定序，層析圖以 SeqMan 及 MegAlign (DNASTAR) 進行編輯及比對排列 (align)。我們亦自 NCBI Genbank 上取得三筆琉球狐蝠部分控制區序列，包含一筆來自伊良部島 (Irabu-jima) 的八重山狐蝠序列 (accession NC_002612.1) (Nikaido *et al.*, 2000a, b)；以及兩筆來自巴丹群島 (Batanes Islands) 的菲律賓狐蝠序列，分別來自巴丹島 (Batan Island) 及沙坦島 (Sabtang Island)，其 NCBI 編號分別為 MN477630 及 MN477629 (Tsang *et al.*, 2019a, b)。

核基因的部分，本研究使用 12 個多型性的微衛星分子標誌進行個體鑑定，並以至多 26 個基因座進行族群遺傳多樣性及結構之分析 (Chen *et al.*, 2021)，由於野外採集到的排遺和食渣樣本數量龐大，為增加實驗效率，自 110 年度 (2021 年) 起以多引子的組合 (multiplex PCR) 進行增幅反應，並進行實驗條件之優化，引子的配對組合及接合螢光色詳見表一。每一 PCR 的總體積為 20 μ l，包含 10-50 ng 的模板 DNA、0.3 μ l 的 10 μ M 正反股引子 (各三對) 及 10 μ l 的 Quick Taq HS DyeMix (TOYOBO)。PCR 的溫度調控如下：(1) 初始解離溫度為 94 °C (2 分鐘)；(2) 解離溫度 94°C (50 秒)、黏合溫度 54°C (2 分鐘) 及延長溫度 68°C (1 分鐘)，此階段進行 40 次循環；(3) 最終延長溫度為 68°C (10 分鐘)。

PCR 產物使用 ABI 3730XL DNA Analyzer 進行分析，再以軟體 GeneMarker 4.2 (SoftGenetics) 檢視每一個基因座的等位基因，使用軟體 Cervus 3.0.7 (Kalinowski *et al.*, 2007) 比對全數樣本的基因型，進行個體鑑定，並刪除重複的個體。為有效控管野外採集樣本的品質，我們以成功率及多型性較佳的三個微衛星基因座—A207、A11 和 B7)，先對每一件樣本進行一次 PCR 反應，若三個基因座中有任一成功，則繼續完成其餘的基因座。

本研究以自行設計的 P-Sry1 (位於 Y 染色體) 搭配 A15 (位於體染色體) 作為樣本性別鑑定的組合引子 (表二)。性別判定的標準如下：每個樣本進行兩次重複的實驗，結果一致即判定為該樣本的性別；若兩次結果不一致，則再進行第三次判定。

PCR 的總反應體積為 10 μ l，包含 20-100 ng 的模板 DNA、0.25 μ l 的 10 μ M 正反股引子及 5 μ l 的 Quick Taq HS DyeMix (TOYOBO)。PCR 的溫度調控如下：(1)初

始解離溫度為 94 °C (2 分鐘); (2) 解離溫度 94 °C (30 秒)、黏合溫度 55°C (30 秒)及延長溫度 68 °C (60 秒), 此階段進行 40 次循環; (3) 最終延長溫度為 68 °C (10 分鐘)。

PCR 完成後, 直接以 2.0% agarose 電泳膠於 UV 光下照射成像, 依據產物片段數量及大小鑑定性別, 若為雄性, P-Sry1 和 A15 皆可成功增幅, 呈現出兩條產物; 若為雌性, 將僅在正控制組 (A15) 呈現一條產物。電泳膠體的判斷示意圖, 詳如圖二。

3. 簡化基因組建庫及定序

本研究使用雙限制酶切位點定序法 (double-digest restriction site-associated DNA sequencing; ddRAD-seq) (Peterson *et al.*, 2012), 進行簡化基因組的遺傳分析。先以核酸螢光定量儀(Qubit)及膠泳電泳檢測中, 於各亞種及島嶼族群中挑選 DNA 質量均佳的 48 份樣本(總量大於 100 ng, DNA 於電泳中無呈現破碎片段), 再委以國立臺灣大學生命科學院科技共同空間(TechComm), 以雙酵素組合(*Sbf*I 和 *Msp*I)進行酶切建庫, 取得平均 418 bp 長度的片段, 再經包括 Qubit, qPCR 進行核酸定量及 BioAnalyzer 進行 size distribution 等流程確認建庫品質後, 送交生技公司(基龍米克斯)以 Illumina NovaSeq X plus 平台、以每樣本預計 2 GBases 的定序量, 進行 150 bp paired-end 之定序。定序結果將以 ipyrad v 0.9.93 (Eaton & Overcast 2020) 進行組裝 (assemble), 參考基因組(reference genome)為同屬的近緣物種, 小笠原狐蝠(*Pteropus pselaphon*, GenBank assembly accession: GCA_014363405.1)。

4. 遺傳多樣性

遺傳多樣性的分析分成粒線體、微衛星基因及簡化基因組 ddRADseq 定序分析等三部分說明。粒線體的部分, 針對每一亞種我們計算以下指標: 單倍型數量 (H , number of haplotype observed), 該族群特有的單倍型數量 (P_H , private haplotype), 單倍型多樣性 (h , haplotype diversity), 核苷酸多樣性 (π , nucleotide diversity) 及平均核苷酸差異數 (k , average number of nucleotide differences), 以上分析以 Arlequin 3.5.2.2 進行 (Excoffier & Lischer 2010)。微衛星的部分, 我們計算的指標則包含: 平均等位基因數量 (N_a), 等位基因豐富度 (A_R , 校正各亞種樣本數而得的等位基因數), 異型

合子率觀測值 (H_0)、異型合子率期望值 (H_E)、近親交配指數 (F_{IS} , Inbreeding coefficient)、以及該族群特有之平均等位基因數 (P_A , Private allele, 計算方式為該族群的特有等位基因數量除以使用的基因座總數), 亦計算每個亞種的平均成對之親緣值 (RI, average pairwise relatedness), 以推估個體之間的親緣關係 (Ritland 1996)。為了解琉球狐蝠各族群的親緣關係, 我們亦藉 F_{ST} (Φ_{ST}) 估算 AMOVA 及族群成對分化 (pairwise differentiation)。以上 N_a 、 H_0 、 H_E 、 P_A 和 RI 之分析係以 GenAlEx 6.51 (Peakall & Smouse 2006; Smouse & Peakall 2012) 進行, 而 A_C 和 F_{IS} 則是以 Fstat 2.9.4 (Goudet 2003) 計算。ddRADseq 的部分, 則包括平均等位基因數量 (N_a)、異型合子率觀測值 (H_0)、異型合子率期望值 (H_E)、近親交配指數 (F_{IS} , Inbreeding coefficient) 等四項指標, 以 GenoDive v3.05 (Meirmans 2020) 進行計算。

分析樣本涵蓋琉球群島、臺灣及菲律賓北部地區, 包括口永良部島、南大東島、沖繩島、伊良部島、石垣島、西表島、與那國島、龜山島、綠島、臺灣本島、巴丹島及沙坦島共 12 處島嶼。為進一步了解琉球狐蝠在這些島嶼群的遺傳多樣性現況, 並評估族群間的親緣距離, 此分析以兩種分群方式界定族群, 一為地理上的亞種疆界, 另一為樣本的來源島嶼。

5. 遺傳結構

為檢驗族群之間的親緣關係及探討族群中是否存在潛在移入者, 我們藉由以 Bayesian clustering approach 為基礎的軟體 STRUCTURE 2.3.4 加以判斷遺傳分群上的顯著單位 (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2003), 以兩種遺傳標記——微衛星基因座及 ddRADseq 皆分別進行。分析時的設定值如下: 以校正後的等位基因頻率、使用 admixture ancestry model 進行計算, burn-in period 為 100,000 iterations、Markov Chain Monte Carlo (MCMC) 重複值為 1,000,000。祖先族群數 (K) 設定為 1~10, 每個 K 值皆跑 10 個獨立回合以確定結果的一致性。並使用網頁版之 StructureSelector (Li & Liu 2018; Kopelman *et al.*, 2015), 以 Evanno 方法求得 ad hoc statistic ΔK 決定最佳的 K 值並產出圖形 (Evanno *et al.*, 2005), ddRADseq 的分析結果, 亦加以 R package POPHELPER v2.3.1 (Francis 2017) 進行圖形優化。為忠實呈現族群的分群狀況、不受固有亞種或島嶼單元限制, 首次分析時, 先不針對族群預設任何分群單位, 所有個體視為同一族群進行分析; 當進一步分析時, 再依初次的分群結果劃定單元,

逐一獨立進行結構分析，以釐清族群中的次結構及細緻的島嶼基因交流狀況。

除此之外，於 ddRADseq 的資料結果，我們亦使用主成分分析(Principal Component Analysis, PCA)，以不預設任何模型的情況下、根據最高的兩項特徵值(eigenvalues)之主成分所反映的最大變異比例，檢視分群狀況，與以 Bayesian clustering 為方法基礎的 STRUCTURE 互作比較，了解琉球狐蝠的族群結構。PCA 的分析以 R v 4.3.2 (Team, 2013)進行操作，執行以下 packages: adegenet (Jombart 2008), ape (Paradis & Schliep 2019) 以及 pegas (Paradis 2010)，並以 ggplot2 (Wickham 2016)進行配色視覺優化。

6. 單倍型網絡圖

本研究利用個體的粒線體資訊，以軟體 Popart 1.7 (Leigh & Bryant 2015) 應用 TCS 方法 (Clement *et al.*, 2002) 建立單倍型網絡圖 (haplotype network)，從亞種、次族群乃至個體等多個層次，探討母系遺傳單倍型的分布與變動，了解各族群交流的狀況。為能全面探討個體之間的母系遺傳關係，網絡圖的分析納入所有可成功取得序列的個體。

7. 遷移率分析

遷移率(m)定義為每一世代中，來自來源族群的個體數量在移入族群中所佔有之比例，以軟體 BayesAss v 3.0.5 估算 (Wilson & Rannala 2003)。若 m 大於 0.1，代表族群之間基因交流頻繁；反之，若小於 0.1，族群之間則傾向視為獨立族群 (Hastings 1993)。

8. 性別比及族群數估算

本研究藉由直接捕捉、觀察及非侵入式遺傳取樣等方式獲取個體資訊，根據個體資訊，我們得以推估族群的性別比，亦可依據個體鑑定資料以及重複被記錄到的頻度估算族群數量。2009 年三月至 2012 年九月期間及 2019 年十月至 2024 年十月期間，於龜山島進行動物的捕捉，研究人員於日落前於狐蝠的飛行路徑架設霧網，並在旁守候，約於午夜前收網。會於捕捉到的個體肩胛骨之間植入皮下晶片或於前肢大拇指繫上刻有英文及數字標記的金屬指環，以進行個體標示，亦會採集每隻個

體的翼膜，進行基因型辨識及建檔。所有捕捉到的個體經形質測量、性別檢視、採樣及標記後，於原捕捉地釋放。2005年八月至2008年四月期間，綠島的個體稀少，但出沒規律、地點固定，故該地族群是以直接目擊，根據個體的毛色、體型及性別特徵來辨別個體。自2019年五月至2024年期間，於龜山島、綠島及花蓮市三地區，另以非侵入式遺傳取樣方法，採集新鮮排遺、食渣及食餘，進行DNA萃取及遺傳分析，以基因型辨識個體，而性別比的差異則以二項式檢定進行統計檢驗。

本研究應用 Chao2 estimator (replicated incidence data) 估算物種豐富度的原理估算族群數量 (Chao 1987; Chao & Chiu 2016)，以此方法建立後續監測族群趨勢的基礎。Chao2 estimator 的計算公式如下：當 $q_2 > 0$ 時， $\hat{S}_{Chao2} = S_{obs} + \left(\frac{m-1}{m}\right) \frac{q_1^2}{2q_2}$ ；當 $q_2 = 0$ 時， $\hat{S}_{Chao2} = S_{obs} + \left(\frac{m-1}{m}\right) \frac{q_1(q_1-1)}{2}$ 。 \hat{S}_{Chao2} 即為估算出之族群數量， S_{obs} 為樣區內可辨識到的不同個體總數， q_1 及 q_2 則分別為觀察到一次及兩次出現紀錄的個體數，而 m 則為進行調查的次數。經對數轉換後的 95% 信賴區間之計算公式為 $\left[S_{obs} + \frac{(\hat{S}_{Chao2} - S_{obs})}{C}, S_{obs} + (\hat{S}_{Chao2} - S_{obs})C \right]$ ，其中 $C = \exp \left\{ 1.96 \left[\log \left(1 + \frac{\text{vâr}(\hat{S}_{Chao2})}{(\hat{S}_{Chao2} - S_{obs})^2} \right)^{\frac{1}{2}} \right] \right\}$ ，當 $q_2 > 0$ 時， $\text{vâr}(\hat{S}_{Chao2}) = q_2 \left[\frac{1}{2} \left(\frac{m-1}{m} \right) \left(\frac{q_1}{q_2} \right)^2 + \left(\frac{m-1}{m} \right)^2 \left(\frac{q_1}{q_2} \right)^3 + \frac{1}{4} \left(\frac{m-1}{m} \right)^2 \left(\frac{q_1}{q_2} \right)^4 \right]$ ；當 $q_2 = 0$ 時， $\text{vâr}(\hat{S}_{Chao2}) = \left(\frac{m-1}{m} \right) \frac{q_1(q_1-1)}{2} + \left(\frac{m-1}{m} \right)^2 \frac{q_1(2q_1-1)^2}{4} - \left(\frac{m-1}{m} \right)^2 \frac{q_1^4}{4\hat{S}_{Chao2}}$ 。

9. 瓶頸效應

為了解臺灣狐蝠族群的近代族群變動狀況，我們亦以軟體 BOTTLENECK v1.2.0.2 (Piry *et al.*, 1999) 帶入微衛星資料，進行兩項檢定—(1) heterozygosity excess tests (使用 TPM 模型，設定為 95% stepwise mutations, 12% variance 及 10,000 simulation iterations) (Rienzo *et al.*, 1994; Cornuet & Luikart 1996) 和 (2) mode-shift test (Luikart *et al.*, 1998; Luikart & Cornuet 1998)，檢視族群是否存在瓶頸效應 (bottleneck effect)。而其中第一項 heterozygosity excess tests，又包含兩項統計檢定：sign test 及 one-tailed Wilcoxon signed-rank test (Cornuet & Luikart 1996; Luikart & Cornuet 1998)。因原始文獻建議，族群數需大於 30 隻個體才具有足夠統計解析力

(Cornuet & Luikart 1996), 故亞種層級中我們只比較樣本數滿足標準的臺灣及八重山兩支亞種; 而於島嶼層次中, 我們僅納入臺灣及八重山亞種中的龜山島及石垣島進入計算。

結果

1. 遺傳多樣性及分化

遺傳多樣性的分析除了納入 402 bp 的粒線體控制區片段、26 個微衛星基因座外, 亦挑選樣本使用了簡化基因組的 ddRADseq 進行分析, 48 個樣本共取得了 125.87 Gbases, 平均每個樣本有 2.62 Gbases 的定序量, 扣除兩個 loci 缺失較多的樣本, 總計於 46 個樣本中共取得了 13,915 個基因座 (loci) 數量, 具有多型性的總 SNP 數量為 20,335 個。

當以亞種作為分析的族群單元時, 菲律賓族群展現了最高的粒線體多樣性; 而無論是在粒線體、微衛星標記或 ddRADseq 的分析結果中, 臺灣及八重山族群於多數指標皆有頗佳的遺傳變異, 大東狐蝠則是所有分析族群中最低的。所有族群之 F_{IS} 值皆沒有顯著性偏低, 然而親緣值 (RI) 在所有亞種皆顯著性地偏高, 而尤其以大東狐蝠最為明顯 (表三 a)。

若以島嶼作為分析的族群單元時 (表三 b), 臺灣及八重山亞種下的各島嶼族群有高低程度不一的表現差異, 臺灣境內的龜山島及本島、八重山群島的西表及石垣島皆有頗高的多樣性, 尤其西表島雖樣本數偏少, 限制了等位基因 (N_A) 的數量, 但在其餘各指標的比較上, 皆不遜於其他的島嶼, 甚至是唯一一個親緣值未顯著偏高的族群; 而台灣的綠島、八重山群島中的與那國島則與大東島族群一樣, 遺傳多樣性明顯屬於相對偏低的族群。無論是以何種族群單元分析, 各個不同亞種或島嶼內的族群大多都擁有獨特、未見於他處的等位基因 (P_A) 存在, 在亞種分析單元下, 尤其以臺灣族群最為可觀 ($P_A=0.114$), 而於島嶼分析單元中, 則以龜山島擁有較高比例的特有等位基因 ($P_A=0.308$); 而粒線體的分析中, 除了宮古島之外, 其餘島嶼也都有其獨特的單倍型 (P_H) (表三 b)。ddRADseq 雖在樣本拆解至島嶼層次後, 單一族群的樣本數變少, 但呈現的趨勢仍然大至和另兩種遺傳標記一致, 若以樣本數大於 5 的島嶼來比較, 仍以龜山島、臺灣本島及石垣島遺傳多樣性較高, 與那國島相對

較低。

AMOVA 在兩種遺傳標記的分析結果，無論是以亞種或者島嶼作為族群單元，皆呈現顯著的遺傳分化 (表四)，而成對亞種間的遺傳分化指數 (Φ_{ST} 及 F_{ST}) 亦可看到顯著差異 (表五)，惟臺灣與八重山亞種間的數值仍是最小的，代表這兩個相鄰族群是遺傳距離上最接近的亞種；雖菲律賓樣本數少，但也可見顯著和其他亞種的遺傳差距。而若以島嶼族群作成對比較，八重山群島中地理位置相鄰的西表島和石垣島無論於粒線體和微衛星標記的成對比較，皆呈現密切的親緣關聯，然而其他諸島則顯現了若干不同於地理亞種的分析結果—於兩種遺傳標記的成對比較中，大多數的族群之間都存在顯著分化，在樣本數大於 5 的成對組合中，尤其以龜山島、沖繩島及南大東島與其他島嶼族群都有顯著的不同。而有些組合則在兩種標記中有不一致的趨勢，如臺灣本島於粒線體和西表、石垣島無顯著差異，但微衛星則可見差異；而與那國島雖和西表島於粒線體遺傳上接近，但在無論粒線體或微衛星標記則和所有其他島嶼皆具頗高的顯著分化。

2. 遺傳結構

以軟體 STRUCTURE 分析族群遺傳結構，不論是微衛星或 ddRADseq 之分析結果，皆可觀察到明顯的次結構 (圖三)。根據 Evanno 方法、以最高之 ΔK 及降低變異數之平均似然值 (mean likelihood value without an increase in variance)，兩種遺傳標記皆指出最可能的遺傳分群為 2 (微衛星 $\Delta K = 26.93$, ddRADseq $\Delta K = 92.96$)，且皆以與那國島為組成最為獨特單一的分群。惟當微衛星標記於 $K = 3$ 時，亦可看出琉球狐蝠可分出另外兩群，包含一支臺灣三處島嶼族群及除了與那國島外的八重山諸島 (西表島、石垣島)，以及北方兩亞種所座落的沖繩島、南大東島；而 $K = 4$ 及 5 時，北方兩亞種的組成又可見明顯差異，臺灣境內的三處族群，也逐漸彰顯細微的結構不同，以龜山島包含最多樣的個體來源，除了與鄰近島嶼結構高度相似外，尚包含了來自沖繩島及與那國島的移入者，甚至於 $K = 5$ 可見一支自身獨有的支系。而 ddRADseq 趨勢則大致和微衛星相似，於 $K = 3$ 時，可見到琉球狐蝠形成三大分群的趨勢，惟於 $K = 4, 5$ 時，北方琉球狐蝠的兩亞種仍並未如微衛星的結果一樣分化。

為進一步檢視琉球狐蝠之下，各大分群內部的島嶼交流狀況，我們亦針對三大分群進行獨立的結構分析 (附錄一)。第一分群(臺灣地區及西表島、石垣島)中，於

微衛星仍可見到龜山島具有多樣性的個體來源，不僅與鄰近地區皆有相似個體，也更確定自身的獨特支系的存在，而臺灣本島則與西表島、石垣島結構相似 (附錄一 a)；然而 ddRADseq 的結果，各島嶼的差異尚並不明顯 (附錄一 d)。第二分群(與那國島)，於兩種遺傳標記的各分群結果，都更確定了其組成的獨立性，數項 K 值都呈現一致同質性高的結果 (附錄一 b, e)。至於第三分群 (沖繩島及南大東島)，也可觀察到該區顯然存在兩大分群、可對應於地理亞種的結構差異，其中又以大東亞種的遺傳組成同質性較高 (附錄一 c, f)。

以 ddRADseq 進行的 PCA 結果中，前兩項最高特徵值的 PC1 和 PC2 分別為 9.54% 和 7.05%。與 STRUCTURE 相仿，可見琉球狐蝠呈現三大分群，首先 PC1 即可見到與那國島個體與其他島嶼族群的顯著獨立性，而 PC2 又更進一步，將剩下島嶼分成兩大南北族群，包含北方的沖繩島及南大東島，以及南方的龜山島、臺灣本島及西表島、石垣島。

3. 單倍型網絡圖

共計有 60 個單倍型於 339 隻個體中被鑑定出來，而多數單倍型親緣距離皆十分接近，僅有 1-2 個點突變的差異(圖五)。位於中央的單倍型為 hap_6，由龜山島、石垣島、與那國島、宮古島、小濱島及沖繩島所共享，代表該物種的共同祖系單倍型。於亞種尺度中 (圖五 a)，可觀察到臺灣及八重山明顯擁有許多共享的單倍型，而大東和菲律賓的單倍型則皆十分獨特，不見於其他地區，尤其菲律賓沙坦島的 hap_12，明顯與所有其他族群的單倍型不同，存在較明顯的遺傳分化。若進一步觀察，於島嶼尺度 (圖五 b) 之下，尤其可觀察到「臺灣—八重山島群」中，臺灣本島是唯一和所有主要島嶼(除了竹富島)都具有共享單倍型的族群。

若觀察單倍型於島嶼族群中的多樣性分布狀況 (圖五 b)，可發現包含龜山島、與那國島及宮古島等三處島嶼明顯由少數的優勢單倍型組成。如龜山島僅由兩個主要單倍型(hap_23 和 25)構成將近 44.3%的個體；而與那國島及宮古島則分別由一主要的單倍型(hap_6 和 hap_8)便代表了族群中半數以上的粒線體多樣性。

4. 個體鑑定及遷移率分析

本研究自 2006 以降開始累積琉球狐蝠個體資料庫，至 2025 年 為止，共成功鑑

定 317 隻個體 (含 169 隻雄性、114 隻雌性及 34 隻性別不詳), 其中包括 210 隻臺灣狐蝠個體 (含 112 隻雄性、73 隻雌性及 25 隻性別不詳)。若僅以 2021-2025 年的個體資料來看, 全臺累積鑑定出 136 隻個體(61 隻雄性、49 隻雌性及 26 隻性別不詳), 並無重複個體於三處被標定。

檢視島嶼交流狀況, 大多數成對族群之間, 遷移率皆小於 0.1 (表六), 顯示無明顯的基因交流, 唯獨包含龜山島、綠島、臺灣本島及西表島等四處族群, 有明顯來自石垣島移入的基因流, 遷移率皆大於 0.1。其中, 以臺灣本島(0.248)明顯較高於另外三處族群(範圍在 0.108~0.120 之間), 將近有兩倍之多。

5. 性別比及族群數估算

臺灣狐蝠全境近年(2021-2025)年的性別比為 1.31: 1, 以雄性顯著較多($P < 0.05$), 若各別看區域族群, 龜山島近年來性別比數值略有起伏, 但累積至 2025 年, 趨勢仍以雄性顯著居多 (1.71: 1, $P < 0.05$), 而花蓮市則兩性皆無顯著差異 (0.82: 1, $P = 0.103$) (圖六)。

族群數估算的樣本來源包含 2005~2013 年間研究初期的紀錄以及自 2021 年團隊調查努力量提升後的近 5 年監測, 以三處族群的各別及加總結果來呈現族群估算值的變化趨勢, 詳見表七、圖七。除綠島無論早期(2005-13)及近年(2021-2025)族群數皆持續稀少外, 龜山島及花蓮則穩定監測以來, 皆呈現成長的曲線趨勢, 族群數總計估計已達 580 隻個體。

6. 瓶頸效應

於亞種層級, 臺灣狐蝠並未檢測到瓶頸效應的跡象 (sign test: $P = 0.451$; Wilcoxon signed-rank test: $P = 0.470$; mode shift test: normal L-shaped distribution); 而八重山亦然, 除了其中一項 Wilcoxon signed-rank test 外 ($P < 0.05$), 於大多數統計檢定皆無顯著。於島嶼層級中, 龜山島 (sign test: $P = 0.44$; Wilcoxon signed rank test: $P = 0.45$; mode shift test: normal L-shaped distribution) 和石垣島 (sign test: $P = 0.522$; Wilcoxon signed rank test: $P = 0.09$; mode shift test: normal L-shaped distribution) 於各檢定都無顯著瓶頸效應的跡象。

討論

本計畫延續歷年研究基礎，結合非侵入式遺傳鑑定或捕捉標放等調查方法，持續檢視近年臺灣狐蝠族群數及遺傳結構動態，並評估族群間交流狀況及成長趨勢，除了過往應用的粒線體及微衛星遺傳標記外，並首度以 ddRADseq 技術，挑選部分品質佳的樣本進行基因體層次的初步分析，期盼能以大量具多型性的遺傳標記進一步釐清琉球狐蝠的遺傳結構及島嶼之間的交流狀況。

遺傳多樣性及遺傳結構

遺傳多樣性的部分，ddRADseq 和粒線體、微衛星基因座呈現的趨勢相近，亞種中以臺灣及八重山數值皆高；島嶼層次則以臺灣的龜山島及本島；八重山群島的西表及石垣島有較高的多樣性。而比較亞種及島嶼層次的 AMOVA 結果，也可發現，以島嶼單元可觀察到的遺傳變異，更高於亞種單元，說明可能傳統的地理亞種界線，並不能完全解釋我們所觀測到的族群遺傳分化差異。

為進一步探討琉球狐蝠的遺傳分化狀況，本計畫亦首度納入了次世代定序的 ddRADseq 技術以取得大量的 SNPs 進行分析，雖樣本數尚相對有限，但於遺傳結構 (圖三、附錄一)、PCA (圖四) 和微衛星基因座分析結果尚且一致，皆清楚呈現三大分群的族群結構，北琉球群島包含折居氏狐蝠與大東狐蝠兩亞種，兩者相較於其他族群親緣關係較為接近，但仍呈現一定程度的分化；而南琉球則可進一步區分為兩支系，其一為遺傳組成最為獨立且同質性最高的與那國島族群，其二則為交流較為密切的島嶼群，包括臺灣三處居留族群，以及八重山群島的西表島與石垣島。而微衛星基因座，因為涵蓋歷年累積樣本數，甚至亦包含非侵入式的樣本來源，故於龜山島觀察到兩隻來自與那國島及一隻帶有折居氏亞種遺傳特徵的外來個體。以上族群結構的初步分析結果中，我們可觀察及比較亞種及島嶼間的分化程度，而單倍型網絡圖的重建，則可幫助我們推演及重建島嶼過去的交流歷史，如圖六中，我們可發現臺灣和八重山島嶼群存在密切交流，即使是遺傳結構與眾不同的與那國島，相比北方的亞種 (折居氏和大東)，其代表的單倍型仍然更為接近其他南琉球的島嶼族群，並且主要由少數的優勢單倍型所構成 (亦見於其他臺灣及八重山島嶼，並非與那國島所特有)。此結果顯示，這些個體可能於近代自其他八重山群島族群移入，並在與

鄰近島嶼基因流受限及小族群中較為顯著的遺傳漂變作用下，逐漸形成該島嶼高度同質化的遺傳結構。這般雖地理距離和鄰近島嶼接近，卻出現高度分化的結構，亦與先前八重山狐蝠的研究發現相符 (Taki *et al.*, 2021)，並且也見於該區域另一個翼手目的保育類物種——*Hipposideros turpis turpis* (Echenique-Díaz *et al.*, 2009)。而值得注意的是，同樣面積不大、和與那國島地理位置接近(約 110 公里)的龜山島，無論於粒線體單倍型和微衛星的遺傳結構，卻顯示了多來源的豐富多樣性，反映了其存在與鄰近島嶼密切交流的事實，然而同時又具有本身獨特的基因型。未來仍須納入更多鄰近八重山島嶼地區的樣本，以釐清龜山島本身的遺傳獨特性是來自近代奠基者(founder effect)的遺傳漂變，亦或實則存在長時間獨立的演化歷史。而綠島，因樣本數稀少，限制了我們對於多數分析統計值的解釋能力，但仍可自遺傳結構、單倍型網絡圖，看到其與花蓮、西表島及石垣島存在密切關聯。

族群量、性別比及族群動態變化

族群數的監測上，臺灣的兩處居留族群——龜山島及花蓮市呈現穩定上升，目前估算出的臺灣狐蝠族群數量已達 580 隻，性別比整體而言仍以雄性偏多。本研究記錄到多隻個體跨年度重複出沒，顯示個體會持續利用固定的棲地，目前並未觀察到明顯的遷徙行為。根據遺傳分析相關結果，臺灣族群組成具高多樣性、也並未呈現任何瓶頸效應的跡象，且根據遷移率分析，顯示了該區域存在一明顯由東往西的不對稱基因流(asymmetric gene flow)—尤其是以石垣島為中心—構成臺灣三處族群移入者的重要來源(表六)，很可能現今我們所觀測到的臺灣狐蝠，並非成長自一個歷史數量大量縮減的族群，而有一定程度的成員與鄰近島嶼的關聯族群(metapopulation)存在密切的親緣關係。過往本團隊分析母系遺傳及核基因遺傳，支持琉球狐蝠存在雄性偏差播遷現象 (Chen *et al.*, 2021)，而龜山島的族群性別比近年皆以雄性居多，且遺傳結構也呈現最多元的樣貌，是否代表其族群穩定成長同時，仍持續有以雄性偏多的外來個體挹注，而導致失衡的性別比，值得持續觀察；而臺灣本島的花蓮個體，於遺傳組成上與西表島、石垣島相對接近，甚至遺傳距離上與該兩島的交流，比起與龜山島而言更為密切(表五、表六及圖三)。根據 Nakamoto (2017) 的研究，琉球狐蝠於新島嶼建立族群的時間大約為 20 年，也恰好與花蓮首次有個體紀錄(1992)乃至族群已經進入穩定居留狀態 (2009) 的時間區間 (17 年) 大約相符 (Wu *et al.*,

2022)。很可能花蓮族群曾處於琉球狐蝠於島嶼間播遷擴散的動態過程，最初由少數來自八重山群島的拓殖個體定居、繁衍，成長至漸有規模的新拓殖族群；而性別比雖並未有顯著差異，但近年(圖六)數值也逐漸由雄性居多轉變為均等的比例。雖目前其族群結構相對單純，但因族群數仍持續上升，以花蓮市區有限的可利用棲地，不排除族群穩定居留繁殖的同時，也可能有少數個體主動向外擴散，故未來仍須持續追蹤其遺傳多樣性的變動趨勢以及與鄰近族群交流動態。綠島近年僅有零星個體紀錄，無法評估明確的族群動態，於遷移率分析中，雖亦有明顯來自石垣島的基因流補充，但也是三處居留族群中最低的($m = 0.108$)，在島內缺少穩定繁殖的個體、又欠缺外來個體補充之下，可能是三處臺灣族群中最可能面臨滅絕風險的族群。

結論

本次計畫納入基因體尺度的遺傳分析標記，雖樣本數尚少，但與目前透過粒線體及微衛星標記所得到的初步結論趨勢一致，琉球狐蝠應存在至少三大分群，首先以八重山群島中的與那國島族群，具有最為顯著的遺傳獨立性；臺灣狐蝠與除了與那國島以外的八重山狐蝠族群(西表島、石垣島)關係密切；而北方兩支亞種——折居氏和大東——雖比其他南方亞種較為相似，但實則同中有異，存在長時間的演化隔離。臺灣三處居留族群可能正好反映琉球狐蝠在此島鏈中不同動態平衡的狀態，龜山島與臺灣本島花蓮地區族群，可能處於穩定繁殖並持續接受基因流補充的成長階段；相較之下，綠島位於臺灣狐蝠的地理分布邊界，由於欠缺足量的居留個體、外來基因流不足，其族群的規模及存續可能正接近該亞種的局域滅絕(local extinction)邊緣。基因體尺度的 ddRADseq 透過大量遺傳標記，可增加對於遺傳分析的說服力及解析度，然而傳統粒線體及微衛星基因座的遺傳工具，仍有提供大量樣本數及成本低廉的優勢，未來本計畫應可在不同分子工具特性互補之下，持續擴大不同亞種、島嶼的樣本數量，以幫助我們解析更為細緻的族群間與島嶼間的移動及演化歷史。

致謝

誠摯感謝林業及自然保育署對本研究的經費支持，沖繩動物園及博物館基金會、

平川動物園、琉球大學及臺北市立動物園提供研究樣本，以及東北角暨宜蘭海岸國家風景區、東部海岸國家風景區和海巡署對於龜山島和綠島野外調查工作的支援。感謝日本東海大學河合久仁子博士和岡山理科學大學中本敦博士等研究者，協助日本之採集工作。此外，特別感謝農業部生物多樣性研究所鄭錫奇主秘及其團隊、社團法人臺灣蝙蝠學會林清隆博士、林業及自然保育署花蓮分署、洄瀾風生態有限公司、林業及自然保育署花蓮分署志工巡守隊隊長鍾秀綢、花蓮縣立國風國民中學林祖濬及所有曾經協助我們樣本採集、動物捕捉和熱心提供寶貴資訊、研究諮詢的人士。

參考文獻

- 呂光洋、鄭錫奇、許再文、林清隆、林融、劉嘉顯、黃光隆、陳宏彰、許家維、張義榮、葉大詮、張簡琳玟。2022。綠島地區臺灣狐蝠分布、數量調查及其重要棲地研究(2/2)。行政院農業委員會林務局臺東林區管理處。105 頁。
- 林良恭、裴家騏。1999。臺灣狐蝠的野外族群現況。特有生物研究。1(1): 12-19。
- 吳慧雯。2010。臺灣狐蝠生態研究之初探。國立臺灣大學森林環境暨資源學系碩士論文。88 頁。
- BROWN, V. A., A. BROOKE, J. A. FORDYCE, AND G. F. MCCrackEN. 2011. Genetic analysis of populations of the threatened bat *Pteropus mariannus*. *Conservation Genetics* 12: 933-941.
- CARROLL, E. L., M. W. BRUFORD, J. A. DEWOODY, G. LEROY, A. STRAND, L. WAITS, AND J. WANG. 2018. Genetic and genomic monitoring with minimally invasive sampling methods. *Evolutionary Applications* 11: 1094-1119.
- CHAO, A. 1987. Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability. *Biometrics*: 783-791.
- CHAO, A., AND C.-H. CHIU. 2016. Species richness: estimation and comparison. *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online* 1: 26.
- CHEN, S.-F., C.-H. JUAN, S. J. ROSSITER, T. KINJO, D. FUKUI, K. KAWAI, S. M. TSANG, M. J. VELUZ, H. SAKURAI, H.-C. LIN, N.-H. JANG-LIAW, K. OSAWA, W.-Y. KO, AND M. IZAWA. 2021. Population genetic structure of the insular Ryukyu flying fox *Pteropus dasymallus*. *Biotropica* 53: 548-559.

- CLEMENT, M., Q. SNELL, P. WALKER, D. POSADA, AND K. CRANDALL. 2002. TCS: estimating gene genealogies. *Parallel and Distributed Processing Symposium, International*, pp. 0184-0184. IEEE Computer Society.
- CORNUET, J. M., AND G. LUIKART. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144: 2001-2014.
- EARL, D. A. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4: 359-361.
- EATON, D. A., AND I. OVERCAST. 2020. ipyrad: Interactive assembly and analysis of RADseq datasets. *Bioinformatics* 36: 2592-2594.
- ECHENIQUE-DÍAZ, L. M., J. YOKOYAMA, O. TAKAHASHI, AND M. KAWATA. 2009. Genetic structure of island populations of the endangered bat *Hipposideros turpis turpis*: implications for conservation. *Population ecology* 51: 153-160.
- ELLSTRAND, N. C., AND D. R. ELAM. 1993. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24: 217-242.
- EVANNO, G., S. REGNAUT, AND J. GOUDET. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611-2620.
- EXCOFFIER, L., AND H. E. LISCHER. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564-567.
- FALUSH, D., M. STEPHENS, AND J. K. PRITCHARD. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164: 1567-1587.
- FRANCIS, R. 2017. pophelper: an R package and web app to analyse and visualize population structure. *Molecular ecology resources* 17: 27-32.
- FRANKHAM, R., J. D. BALLOU, K. RALLS, M. ELDRIDGE, M. R. DUDASH, C. B. FENSTER, R. C. LACY, AND P. SUNNUCKS. 2017. Genetic management of fragmented animal and plant populations. Oxford University Press.

- GERLACH, G., A. JUETERBOCK, P. KRAEMER, J. DEPPERMAN, AND P. HARMAND. 2010. Calculations of population differentiation based on GST and D: forget GST but not all of statistics! Wiley Online Library.
- GOUDET J. 2003. FSTAT (ver. 2.9.4), a program to estimate and test population genetics parameters. Retrieved from <https://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>
- HASTINGS, A. 1993. Complex interactions between dispersal and dynamics: lessons from coupled logistic equations. *Ecology* 74: 1362-1372.
- HEANEY, L., D. BALETE, L. DOLAR, AND P. ONG. 1998. A Synopsis of the Mammalian Fauna of the Philippine Islands. *Fieldiana Zoology* 88: 1-61.
- HOBAN, S. M., H. C. HAUFFE, S. PÉREZ-ESPONA, J. W. ARNTZEN, G. BERTORELLE, J. BRYJA, K. FRITH, O. E. GAGGIOTTI, P. GALBUSERA, AND J. A. GODOY. 2013. Bringing genetic diversity to the forefront of conservation policy and management. *Conservation Genetics Resources* 5: 593-598.
- IUCN. 2025. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2025-2. <https://www.iucnredlist.org>. Accessed on February 2025.
- JOMBART, T. 2008. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 24: 1403-1405.
- JONES, K. E., S. P. MICKLEBURGH, W. SECHREST, A. L. WALSH, T. FLEMING, AND P. RACEY. 2009. Global overview of the conservation of island bats: importance, challenges and opportunities. In T. H. Fleming AND P. A. Racey (Eds.), *Island Bats: Evolution, Ecology, and Conservation* (pp. 496-530). University of Chicago Press.
- JORDAN, S., J. J. GIERSCH, C. C. MUHLFELD, S. HOTALING, L. FANNING, T. H. TAPPENBECK, AND G. LUIKART. 2016. Loss of genetic diversity and increased subdivision in an endemic alpine stonefly threatened by climate change. *PLoS ONE* 11: e0157386.
- KALINOWSKI, S. T., M. L. TAPER, AND T. C. MARSHALL. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16: 1099-1106.
- KINGSTON, T., F. V. FLORENS, AND C. E. VINCENOT. 2023. Large Old World Fruit Bats on the Brink of Extinction: Causes and Consequences. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 54: 237-257.
- KINJO, K., AND A. NAKAMOTO. 2015. *The wild mammals of Japan*. Shoukadoh Book Sellers.

- KOPELMAN, N. M., J. MAYZEL, M. JAKOBSSON, N. A. ROSENBERG, AND I. MAYROSE. 2015. Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular Ecology Resources* 15: 1179-1191.
- LEE, Y.-F., T. TAKASO, T.-Y. CHIANG, Y.-M. KUO, N. NAKANISHI, H.-Y. TZENG, AND K. YASUDA. 2009. Variation in the nocturnal foraging distribution of and resource use by endangered Ryukyu flying foxes (*Pteropus dasymallus*) on Iriomotejima Island, Japan. *Contributions to Zoology* 78: 51-64.
- LEIGH, J. W., AND D. BRYANT. 2015. popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution* 6: 1110-1116.
- LI, Y. L., AND J. X. LIU. 2018. StructureSelector: A web-based software to select and visualize the optimal number of clusters using multiple methods. *Molecular Ecology Resources* 18: 176-177.
- LUIKART, G., AND J.-M. CORNUET. 1998. Empirical Evaluation of a Test for Identifying Recently Bottlenecked Populations from Allele Frequency Data. *Conservation Biology* 12: 228-237.
- LUIKART, G., F. ALLENDORF, J. CORNUET, AND W. SHERWIN. 1998. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *Journal of heredity* 89: 238-247.
- MCCMAHON, S. M., S. P. HARRISON, W. S. ARMBRUSTER, P. J. BARTLEIN, C. M. BEALE, M. E. EDWARDS, J. KATTGE, G. MIDGLEY, X. MORIN, AND I. C. PRENTICE. 2011. Improving assessment and modelling of climate change impacts on global terrestrial biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution* 26: 249-259.
- MEIRMANS, P. G. 2020. Genodive version 3.0: Easy-to-use software for the analysis of genetic data of diploids and polyploids. *Molecular Ecology Resources* 20: 1126-1131.
- MICKLEBURGH, S. P., A. M. HUTSON, AND P. A. RACEY. 1992. Old World fruit bats. An action plan for their conservation. Gland, Switzerland: IUCN 263.
- NAKAMOTO, A. 2017. Temporal changes in distributional range of the Ryukyu flying fox in the Ryukyu Archipelago, Japan. *哺乳類科学* 57: 267-284.
- NAKAMOTO, A., K. KINJO, AND M. IZAWA. 2012. Ranging patterns and habitat use of a solitary flying fox (*Pteropus dasymallus*) on Okinawa-jima Island, Japan. *Acta Chiropterologica* 14: 387-399.

- NAKAMOTO, A., S. ITABE, A. SATO, K. KINJO, AND M. IZAWA. 2011. Geographical distribution pattern and interisland movements of Orii's flying fox in Okinawa Islands, the Ryukyu Archipelago, Japan. *Population Ecology* 53: 241-252.
- NATESH, M., R. W. TAYLOR, N. K. TRUELOVE, E. A. HADLY, S. R. PALUMBI, D. A. PETROV, AND U. RAMAKRISHNAN. 2019. Empowering conservation practice with efficient and economical genotyping from poor quality samples. *Methods in Ecology and Evolution* 10: 853-859.
- NIKAIDO, M., HARADA, M., CAO, Y., HASEGAWA, M., & OKADA, N. 2000a. Data from: Monophyletic origin of the order Chiroptera and its phylogenetic position among Mammalia, as inferred from the complete sequence of the mitochondrial DNA of a Japanese megabat, the Ryukyu flying fox (*Pteropus dasymallus*). GenBank. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NC_002612.1
- NIKAIDO, M., HARADA, M., CAO, Y., HASEGAWA, M., & OKADA, N. 2000b. Monophyletic origin of the order Chiroptera and its phylogenetic position among Mammalia, as inferred from the complete sequence of the mitochondrial DNA of a Japanese megabat, the Ryukyu flying fox (*Pteropus dasymallus*). *Journal of Molecular Evolution* 51, 318-328.
- NORMAN, A. J., AND G. SPONG. 2015. Single nucleotide polymorphism-based dispersal estimates using noninvasive sampling. *Ecology and Evolution* 5: 3056-3065.
- PARADIS, E. 2010. pegas: an R package for population genetics with an integrated-modular approach. *Bioinformatics* 26: 419-420.
- PARADIS, E., AND K. SCHLIEP. 2019. ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics* 35: 526-528.
- PEAKALL, R., AND P. E. SMOUSE. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. *Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- PEREIRA, H. M., S. FERRIER, M. WALTERS, G. N. GELLER, R. JONGMAN, R. J. SCHOLES, M. W. BRUFORD, N. BRUMMITT, S. BUTCHART, AND A. CARDOSO. 2013. Essential biodiversity variables. *Science* 339: 277-278.
- PETERSON, B. K., J. N. WEBER, E. H. KAY, H. S. FISHER, AND H. E. HOEKSTRA. 2012. Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PloS one* 7: e37135.

- PIRY, S., G. LUIKART, AND J. M. CORNUET. 1999. Computer note. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective size using allele frequency data. *Journal of heredity* 90: 502-503.
- POLECHOVÁ, J., AND N. H. BARTON. 2015. Limits to adaptation along environmental gradients. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112: 6401-6406.
- PRITCHARD, J. K., M. STEPHENS, AND P. DONNELLY. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- RIENZO, A. D., A. C. PETERSON, J. C. GARZA, A. M. VALDES, M. SLATKIN, AND N. B. FREIMER. 1994. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91: 3166-3170.
- RITLAND, K. 1996. Estimators for pairwise relatedness and individual inbreeding coefficients. *Genetics Research* 67: 175-185.
- SAITOH, T., K. KAJI, M. IZAWA, AND F. YAMADA. 2015. Conservation and management of terrestrial mammals in Japan: its organizational system and practices. *Therya* 6: 139-153.
- SMOUSE, R. P. P., AND R. PEAKALL. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539.
- TAKI, Y., C. E. VINCENOT, Y. SATO, AND M. INOUE-MURAYAMA. 2021. Genetic diversity and population structure in the Ryukyu flying fox inferred from remote sampling in the Yaeyama archipelago. *PLoS ONE* 16: e0248672.
- TAKI, Y., C. E. VINCENOT, Y. SATO, AND M. INOUE-MURAYAMA. 2021. Genetic diversity and population structure in the Ryukyu flying fox inferred from remote sampling in the Yaeyama archipelago. *Plos one* 16: e0248672.
- TEAM, R. C. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.
- TSANG, S. M., Wiantoro, S., VELUZ, M. J., SUGITA, N., NGUYEN, Y. L., SIMMONS, N. B., & LOHMAN, D. J. 2019a. Data from: Dispersal out of Wallacea spurs diversification of *Pteropus* flying foxes, the world's largest bats (Mammalia: Chiroptera). Dryad Digital Repository. <https://doi.org/10.5061/dryad.8892g0m>
- TSANG, S. M., Wiantoro, S., VELUZ, M. J., SUGITA, N., NGUYEN, Y. L., SIMMONS, N. B., & LOHMAN, D. J. 2019b. Dispersal out of Wallacea spurs diversification of

- Pteropus* flying foxes, the world's largest bats (Mammalia: Chiroptera). *Journal of Biogeography* 47, 527-537.
- VINCENOT, C. E., A. M. COLLAZO, AND D. RUSSO. 2017. The Ryukyu flying fox (*Pteropus dasymallus*)—A review of conservation threats and call for reassessment. *Mammalian Biology* 83: 71-77.
- WICKHAM, H. 2016. *Elegant graphics for data analysis*. Springer.
- WILSON, G. A., AND B. RANNALA. 2003. Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics* 163: 1177-1191.
- WU, H.-W., D.-J. LU, C.-L. LIN, H.-C. CHENG, C.-H. JUAN, T.-J. SHEN, H.-C. LIN, AND S.-F. CHEN. 2022. Population and conservation status of the flying fox *Pteropus dasymallus* in Taiwan. *Zoological Studies* 61.
- YOSHIYUKI, M. 1989. *A systematic study of the Japanese Chiroptera*. National Science Museum Monographs 7: 1-242.

表一、本研究所選用之微衛星引子組合一覽表

組合	Locus	Primer sequences (5'-3')	Repeat motif	Size range (bp)	N _A	H _o	H _E	螢光
1	A011	F: TCTGACTTGAGCCCTAAATGCA R: CCAACTGATATCTCTCTGGGTGGT	ATCT	177-213	10	0.714	0.762	HEX
	A207	F: GCCATCGGAAATCTAATGTGC R: ACTGTCAAAACACTCTCCAATAAACAA	ATCT	203-215	4	0.685	0.656	FAM
	B007	F: TCCGTTTTTTGCGTCAGACA R: GCCCTCGCTGTTCTGATATGA	GTTT	153-157	2	0.424	0.428	TAMRA
2	C017	F: TTTGTGGGTTTCCAGCTTCC R: GGCTTATCCAGAGCAACAGGTC	TATG	179-196	5	0.62	0.601	HEX
	C305	F: TGGATTTTGTTAACCAATGTCACC R: GCCGTTTCCAATTTACTTCTCTCA	CATA	143-156	4	0.228	0.572	TAMRA
	A317	F: CCTCACAATCACAGGAGCCA R: GGGCTAGCAGAGAAAGGGAAC	CAGA/ AGAT	215-251	10	0.815	0.836	FAM
3	C220	F: CCACTTACTTCCAATTCTTACCAGC R: TGAGTATTTTACCACTGAGTGTGTTCCG	CATA	221-236	4	0.446	0.544	FAM
	A224	F: CATGGCTCGTGCCTGTTG R: CCTCCCTCTTCTACTCTCTCTCCA	AGAT	177-197	6	0.696	0.728	HEX
	A313	F: CTTTGGGATTTACGGGCTA R: AAAAGGTTGGCCATCCTGTG	AGAT	153-173	6	0.772	0.798	TAMRA
4	A206	F: CTAGTGTTAGAAATCTGGGCTATTAATGTATAC R: AAGAGATAATTGAAAGCAAAGAAAAAGA	ATAG	231-251	6	0.567	0.707	FAM
	A214	F: GGAAAGAGGTCCCAATGGCT	AGAT	182-206	7	0.685	0.709	HEX

	A226	R: TTTGAATTCTGCATGAGAGATTG F: CTTTCCAAATGCCAACTGTTGA R: TCTAGAATGTGAAACATAAGCCTCTGA	AGAT	166-185	6	0.663	0.683	TAMRA
5	A13	F: CATCTTAGCCAAACGCCAGC R: CCTTCCCTTCTATTTTCCTGGA	ATCT	209-230	6	0.286	0.71	FAM
	B14	F: GCCTCAGTTTCCTCCTCTGTGA R: CCTCCACTTCGGTTTACCAAGA	AAAC	173-181	3	0.338	0.367	HEX
6	C312	F: AGAGTGCAAGACAGGCAGGG R: TGAACACAAAATGCAGTATATGGATG	ATGT	209-235	6	0.494	0.602	FAM
	C2	F: AGGGCAGTATGTCTCCTGAAAGC R: TTTAATGCAATCCCTAATTGTTTTTTT	ATGT	188-196	3	0.468	0.41	HEX
	A213	F: GAACTGGGTCATTGGCTGGTA R: GTGGCTCCTGGGCTACATGT	ATCT	164-185	6	0.714	0.773	TAMRA
7	A1	F: TCTCGGTCTGTTCCCTGAGG R: TGACTATTTAAGTCATTTGCCCATTT	AAC	299-302	2	0.416	0.463	FAM
	A19	F: ACATGGAAACGGAGGTTGGA R: CACACGGTCACAGAAGGCTG	GAT	211-214	2	0.416	0.455	HEX
	B215	F: CTTTTGTGTGAGCGCTGGTG R: ACTCAGCCCTCTGCTGTTTCCT	GT/GTCT	174-182	5	0.338	0.367	TAMRA
8	A15	F: TTTGGAAAAACGACCCCTT R: GCATCAAAGCATTAGGGAGGAA	AAC	265-286	4	0.364	0.425	FAM
	A23	F: TCTTGGAAAAATAGCTTGTGGAGA R: CCTGTCACACGGGAACCTAAA	ATAG	178-227	6	0.737	0.747	HEX
	D18	F: CTCCTTCAGTTTAGGCTGTGCA R: TTTTGCCAGTGAGATGCCAA	AC	154-166	7	0.429	0.518	TAMRA
9	A222	F: GGGTTGAGAGGAGGCAGTTCT	ATCT	341-386	10	0.766	0.773	FAM

A14	R: CCAAATAGCTTTAGGAAGGTCCT F: TGGCAGCATTATTCACAATAGCA	ATAG	212-236	7	0.636	0.754	HEX
B4	R: GCACGTGTAATAATTCCTTTCCTCTT F: CCGACACATGCCACTTGAGT R: CCCCATGTAATATGCTGCTTTTT	GTTT	115-123	3	0.39	0.394	TAMRA

表二、本研究設計之琉球狐蝠性別鑑定引子

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

表三、琉球狐蝠的遺傳多樣性

分別以 402 bp 的粒線體控制區片段、26 個微衛星基因座及次世代 ddRADseq 序列進行分析，呈現琉球狐蝠各亞種/族群之遺傳多樣性。
 N : 樣本數, H : 可觀察到的單倍型數量 (number of haplotype observed), P_H : 該族群特有的單倍型數量 (private haplotype), h : 單倍型多樣性 (haplotype diversity), π : 核苷酸多樣性 (nucleotide diversity), k : 平均核苷酸差異數 (average number of nucleotide differences), N_a : 每基因座平均的等位基因數 (mean number of alleles per locus), A_R : 等位基因豐富度 (allelic richness), P_A : 該族群特有之平均等位基因數 (private allele), H_O : 異型合子觀測值 (observed heterozygosity), H_E : 異型合子期望值 (expected heterozygosity), RI : 親緣值 (relatedness), F_{IS} : 近親交配指數 (inbreeding coefficient)。若族群僅有單一有效樣本，則不計入亞種/族群層次的分析中

(a) 以地理上的亞種界線為分析單元

亞種	粒線體 DNA						微衛星 DNA							ddRADseq					
	N	H	P_H	h	π	k	N	N_a	A_R	P_A	H_O	H_E	RI	F_{IS}	N	N_a	H_O	H_E	F_{IS}
臺灣	68	22	12	0.912	0.013	5.089	72	5.154	3.650	0.114	0.570	0.611	0.004*	0.073	16	1.388	0.25	0.084	-1.977
八重山	191	42	25	0.953	0.009	3.531	56	5.077	3.657	0.101	0.565	0.627	0.004*	0.105	20	1.385	0.218	0.08	-1.735
折居氏	22	10	7	0.909	0.007	2.835	22	3.846	3.351	0.064	0.542	0.575	0.054*	0.083	6	1.247	0.185	0.067	-1.766
永良部	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
大東	8	3	3	0.679	0.007	3	7	2.885	2.885	0.038	0.429	0.415	0.159*	0.022	3	1.177	0.15	0.056	-1.691
菲律賓	2	2	2	1	0.042	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*: 統計顯著 ($P < 0.05$)

(b) 以島嶼族群作為分析單元

亞種	族群	粒線體 DNA						微衛星 DNA							ddRADseq					
		N	H	P_H	h	π	k	N	N_a	A_R	P_A	H_O	H_E	RI	F_{IS}	N	N_a	H_O	H_E	F_{IS}
臺灣	綠島	5	3	1	0.8	0.005	1.8	4	2.654	2.475	0.038	0.535	0.468	0.105*	-0.003	-	-	-	-	-
	臺灣本島	19	11	3	0.930	0.015	5.836	23	4.423	2.815	0.077	0.584	0.609	0.031*	0.065	6	1.279	0.212	0.075	-1.815
八重山	龜山島	44	12	1	0.814	0.011	4.446	45	4.846	2.677	0.308	0.566	0.581	0.019*	0.04	10	1.328	0.235	0.078	-1.997
	與那國島	41	8	1	0.598	0.006	2.278	16	3.6154	2.454	0.038	0.51	0.524	0.106*	0.078	8	1.234	0.168	0.057	-1.949
	西表島	15	14	4	0.99	0.012	4.724	3	2.808	2.808	0	0.615	0.504	-0.009	-0.058	2	1.181	0.174	0.059	-1.935
	石垣島	61	24	9	0.944	0.010	4.170	37	4.9231	2.814	0.154	0.585	0.619	0.011*	0.061	10	1.321	0.216	0.079	-1.726
	伊良部島	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
折居氏	宮古島	63	12	0	0.692	0.007	2.730	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	沖繩	22	10	7	0.909	0.007	2.835	22	3.846	2.689	0.115	0.542	0.575	0.054*	0.083	6	1.247	0.185	0.067	-1.766
永良部	口永良部島	1	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
大東	大東島	8	3	3	0.679	0.007	3.000	7	2.885	2.251	0.038	0.429	0.415	0.159*	0.022	3	1.177	0.15	0.056	-1.691
菲律賓	沙坦島	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	巴丹島	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*: 統計顯著 ($P < 0.05$)

表四、琉球狐蝠的分子變異數分析

(a) 以地理上的亞種界線為分析單元

變異來源	粒線體 DNA		微衛星 DNA	
	variation (%)	<i>P</i> value	variation (%)	<i>P</i> value
亞種之間	9.55	< 0.001*	4.72	< 0.001*
亞種之內	90.45		95.27	

*: 統計顯著 ($P < 0.05$)

(b) 以島嶼族群作為分析單元

變異來源	粒線體 DNA		微衛星 DNA	
	variation (%)	<i>P</i> value	variation (%)	<i>P</i> value
族群之間	11.87	< 0.001*	7.46	< 0.001*
族群之內	88.13		92.54	

*: 統計顯著 ($P < 0.05$)

表五、琉球狐蝠成對亞種/族群間之遺傳分化指數 (Φ_{ST}/ F_{ST})

表格中以對角線區隔兩種遺傳標記的資料來源：上方為粒線體控制區片段 (Φ_{ST})、下方為核基因之微衛星分析結果 (F_{ST})。欄位內數值低到高，對應於色階黃至深藍。

(a) 以地理上的亞種界線為分析單元

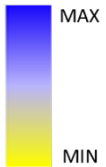
亞種	N	臺灣	八重山	折居氏	大東	菲律賓
		68	191	22	8	2
臺灣	72	-	0.056*	0.108*	0.17*	0.366*
八重山	56	0.018*	-	0.07*	0.179*	0.489*
折居氏	22	0.062*	0.046*	-	0.233*	0.518*
大東	7	0.122*	0.137*	0.161*	-	0.421*

(b) 以島嶼族群作為分析單元 (粒線體 DNA)

亞種		臺灣	八重山					折居氏	大東					
亞種	族群	N	龜山島	綠島	臺灣本島	西表島	石垣島	與那國島	宮古島	波照間島	小濱島	黑島	沖繩島	南大東島
臺灣	龜山島	44	-											
	綠島	5	0.32*	-										
	臺灣本島	19	0.093*	0.178*	-									
八重山	西表島	15	0.102*	0.218*	0.017	-								
	石垣島	61	0.093*	0.213*	0.019	0.026	-							
	與那國島	41	0.176*	0.41*	0.09*	0.031	0.048*	-						
	宮古島	63	0.158*	0.328*	0.131*	0.087*	0.067*	0.128*	-					
	波照間島	4	0.214*	0.464*	0.105	0.027	0.148*	0.236*	0.232*	-				
	小濱島	3	0.002	0.339*	-0.015	0.007	0.073	0.287*	0.215	0.141	-			
	黑島	2	-0.01	0.523*	-0.011	0.034	0.083	0.337*	0.187	0.344*	-0.167	-		
折居氏	沖繩島	22	0.171*	0.338*	0.13*	0.07*	0.085*	0.103*	0.139*	0.169*	0.192*	0.284*	-	
大東	南大東島	8	0.244*	0.438*	0.141*	0.092*	0.172*	0.268*	0.278*	0.253*	0.182	0.304	0.233*	-

(c) 以島嶼族群作為分析單元 (微衛星 DNA)

亞種			臺灣			八重山		折居氏		大東
亞種	族群	N	龜山島	綠島	臺灣本島	西表島	石垣島	與那國島	沖繩島	南大東島
臺灣	龜山島	45	-							
	綠島	4	0.076*	-						
	臺灣本島	23	0.052*	0.068*	-					
八重山	西表島	3	0.034	0.062	0.012	-				
	石垣島	37	0.027*	0.068*	0.033*	0.022	-			
	與那國島	16	0.109*	0.120*	0.121*	0.104*	0.104*	-		
折居氏	沖繩島	22	0.076*	0.077*	0.079*	0.052*	0.048*	0.124*	-	
大東	南大東島	7	0.149*	0.164*	0.127*	0.154*	0.13*	0.214*	0.161*	-



NS: 統計非顯著

*: 統計顯著 ($P < 0.05$)

表六、臺灣狐蝠於各島嶼的遷移率分析

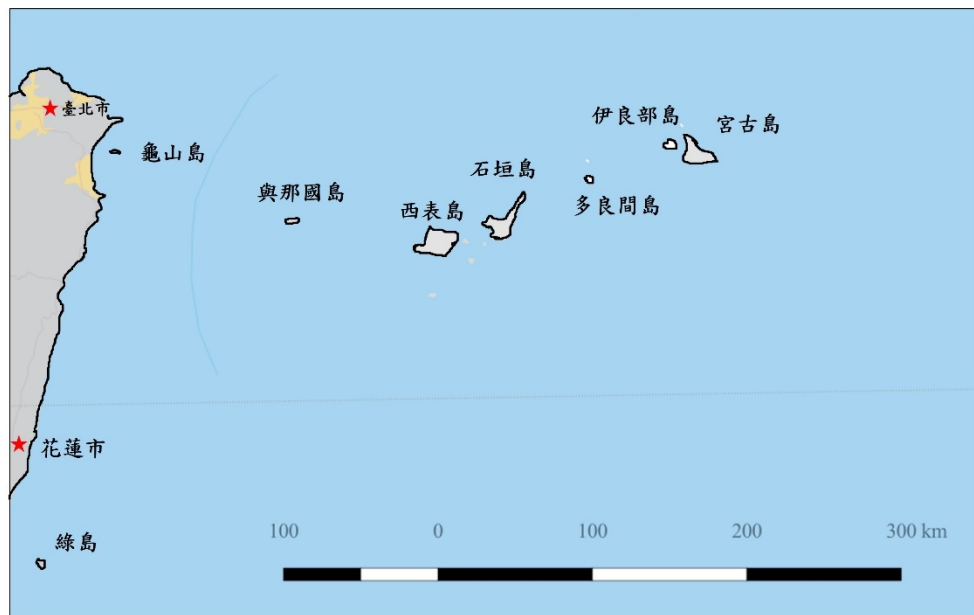
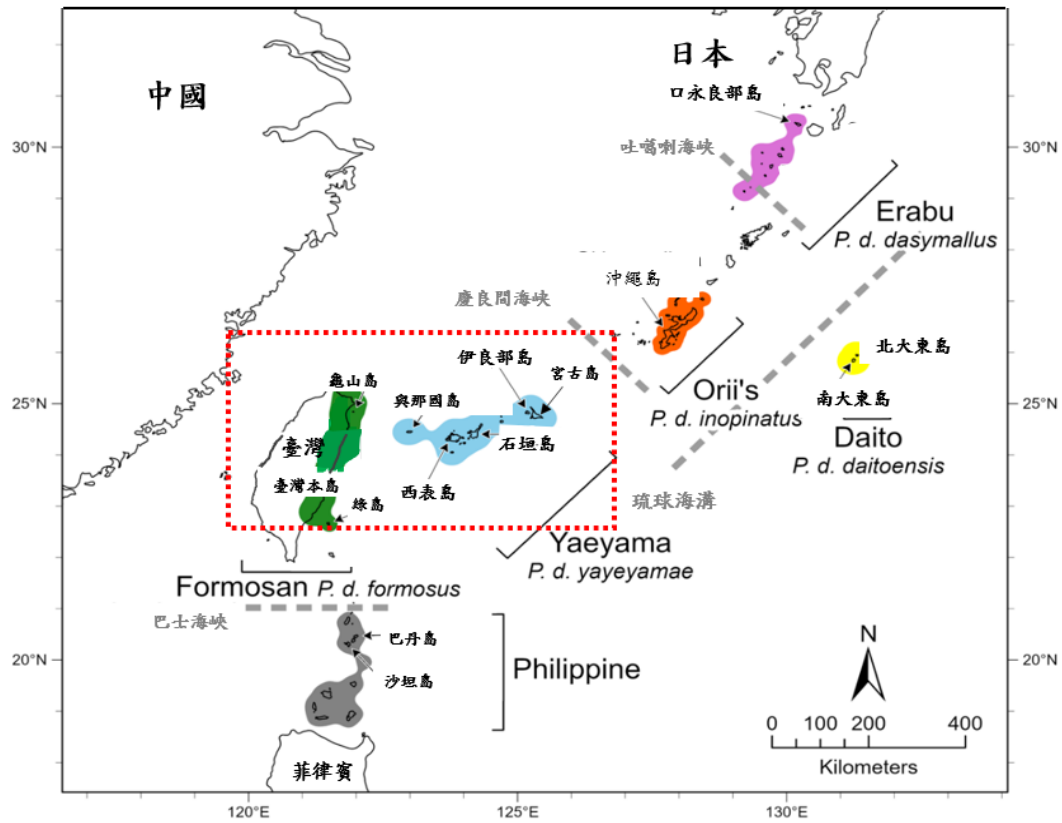
遷移率(m)定義為每一世代中，來自來源族群的個體數量在移入族群中所佔有之比例。若大於 0.1，代表族群中有頻繁的基因交流，表格中以粗體表示。對角線中的灰底則代表每一族群中非遷移者(non-migrants)的比例。

		來源族群							
		龜山島	綠島	臺灣本島	西表島	石垣島	與那國島	沖繩島	南大東島
移入族群	龜山島	0.823	0.006	0.006	0.006	0.116	0.024	0.012	0.007
	綠島	0.030	0.695	0.028	0.028	0.108	0.028	0.055	0.029
	臺灣本島	0.018	0.011	0.678	0.011	0.248	0.012	0.012	0.011
	西表島	0.031	0.030	0.030	0.697	0.120	0.031	0.031	0.030
	石垣島	0.015	0.008	0.008	0.009	0.930	0.009	0.012	0.009
	與那國島	0.014	0.014	0.014	0.014	0.021	0.889	0.014	0.019
	沖繩島	0.018	0.011	0.011	0.011	0.031	0.011	0.893	0.013
	南大東島	0.029	0.022	0.022	0.022	0.058	0.022	0.023	0.801

表七、臺灣狐蝠於綠島、龜山島及花蓮市的族群估算值及 95%信賴區間

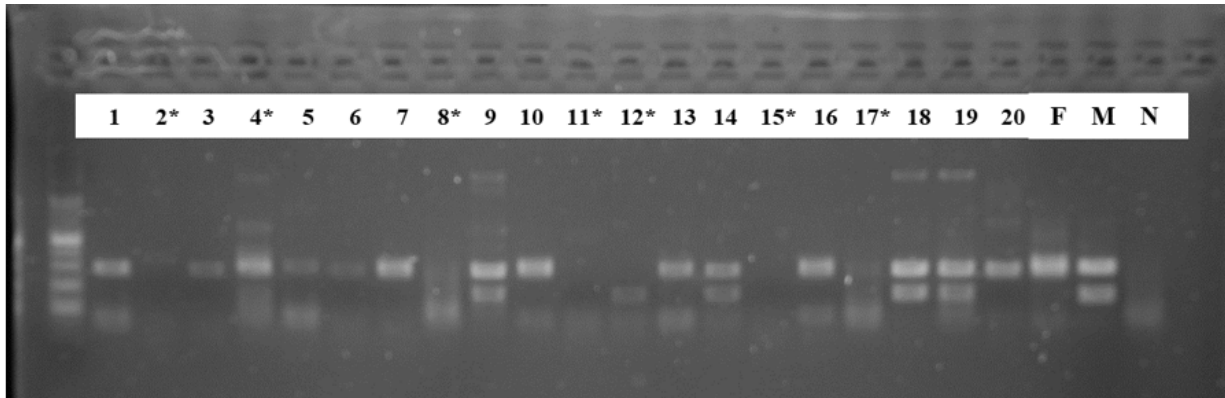
個體鑑定使用之方法包括：直接目測觀察、捕捉法及非侵入採樣之遺傳基因型鑑定，詳述於內文。族群數欄位內的括弧為 95%信賴區間的上下界估算數值。

年分	地點				族群數總和
	綠島	龜山島	花蓮市		
2005-13	5 (4~17)	114 (44~407)	-		119
2021	5 (3~20)	102 (31~518)	30 (15~106)		135
2022	4 (3~14)	151 (75~383)	44 (26~117)		201
2023	4 (3~14)	213 (116~464)	56 (31~150)		275
2024	4 (3~14)	339 (186~697)	162 (77~452)		507
2025	4 (3~14)	390 (220~769)	186 (89~517)		580



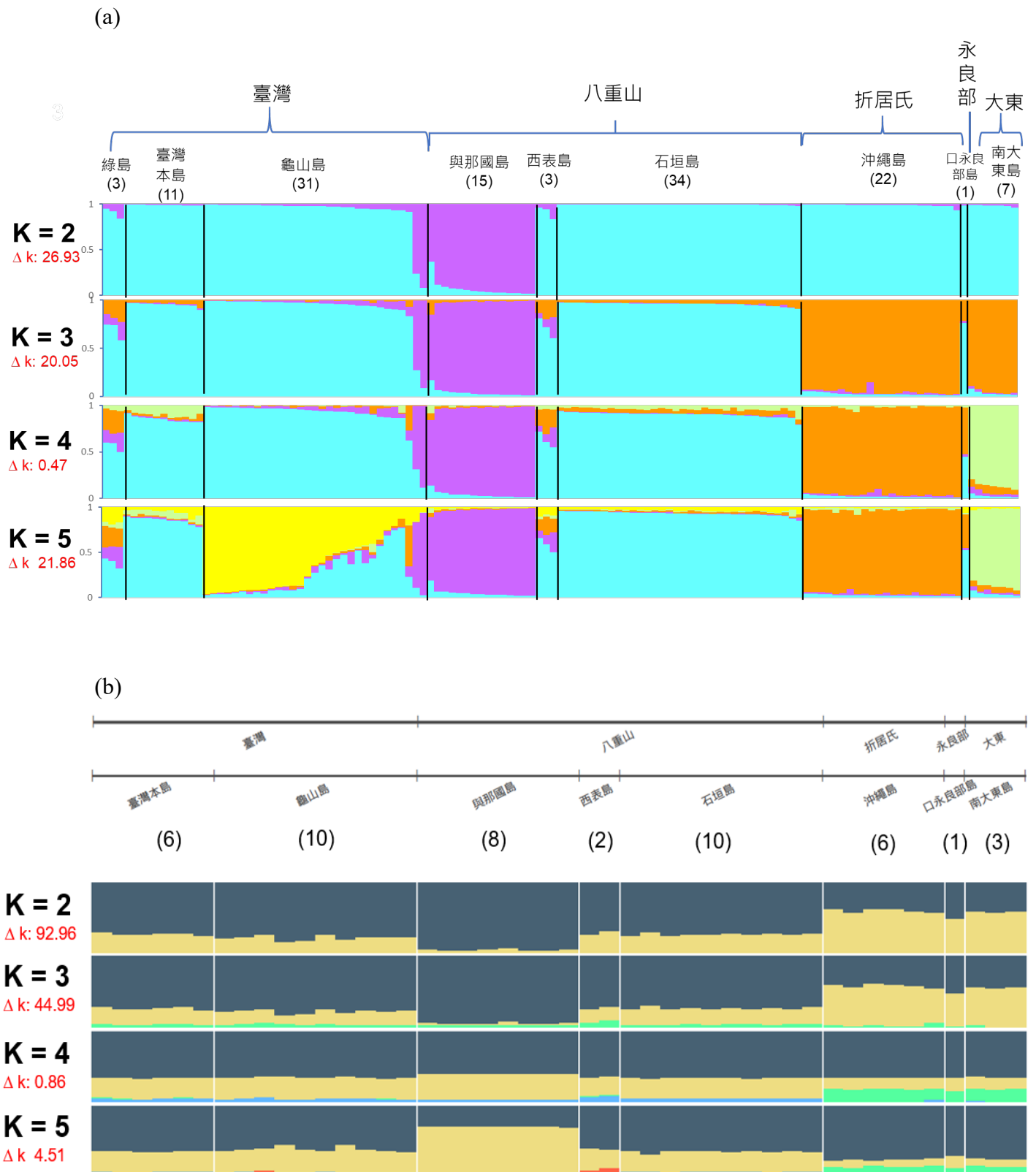
圖一、琉球狐蝠之地理分布圖

本圖呈現琉球狐蝠於各島嶼的族群分布，以不同底色區分不同的亞種族群。另外，將臺灣及八重山族群分布的島嶼群 (上圖紅框處) 以較大比例尺呈現相對地理位置 (下圖)。



圖二、臺灣狐蝠的性別鑑定電泳膠圖

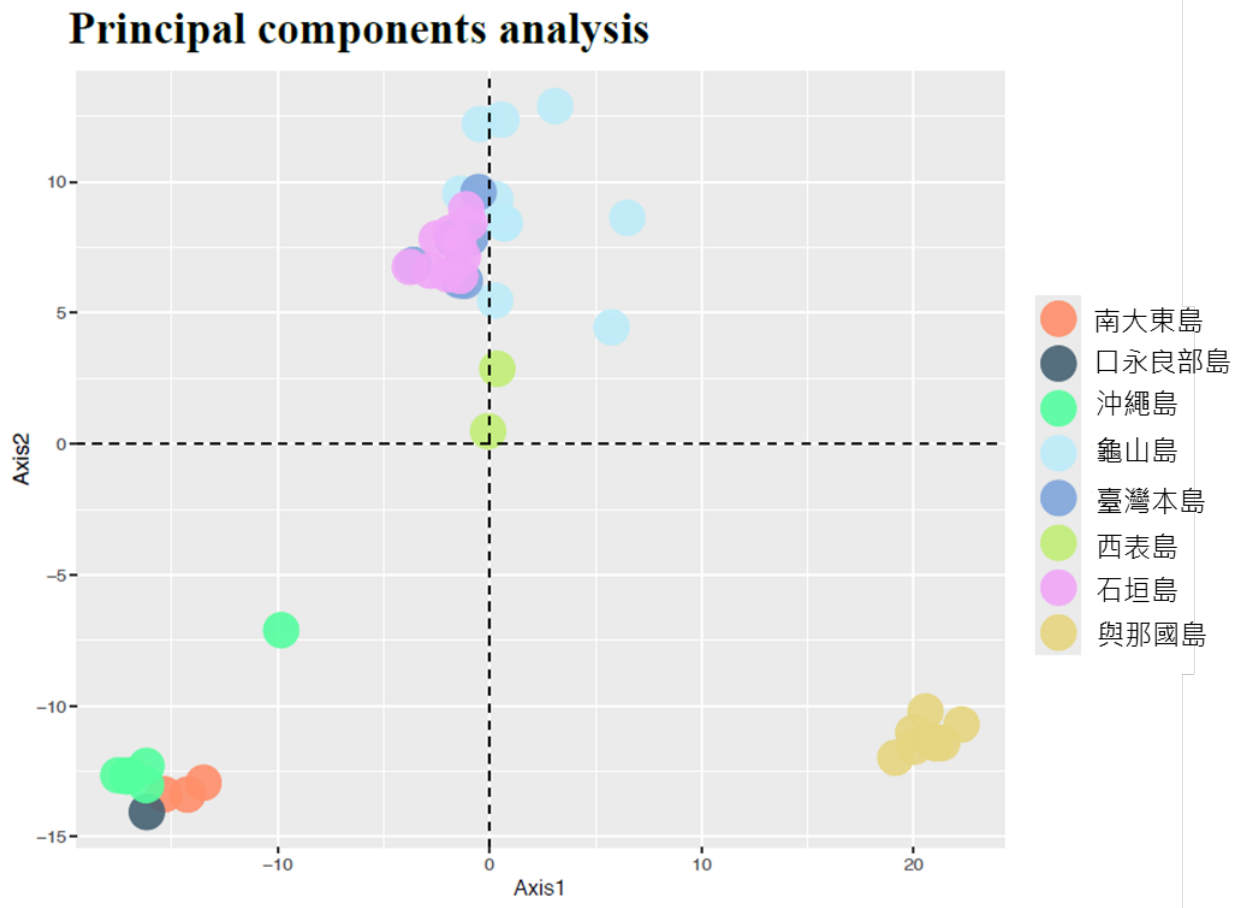
1-20 號為受測試之樣本；F：正控制組，雌性；M：正控制組，雄性；N：負控制組，以二次水取代 DNA template。將受測試樣本與正控制組比對後，鑑定性別如下：1, 3, 5, 6, 7, 10, 16 及 20 為雌性；9, 14, 18 及 19 為雄性。而 2, 4, 8, 11, 12, 15, 17 的條帶模糊微弱或無任何結果，視為無效。



圖三、以 STRUCTURE 分析琉球狐蝠的遺傳結構

以 (a) 微衛星基因座 及 (b) ddRADseq 建構來自 5 亞種、9 座島嶼琉球狐蝠的遺傳

結構圖，括弧內為樣本數，垂直實線則用以區隔不同的獨立島嶼。每一直條代表單一個體，每一顏色代表一個遺傳分群，每種顏色的長度與該個體被歸類至某一分群之機率成正比。Y 軸代表比例，範圍在 0~1 之間，並列出分群 K=2~5 作為參考。

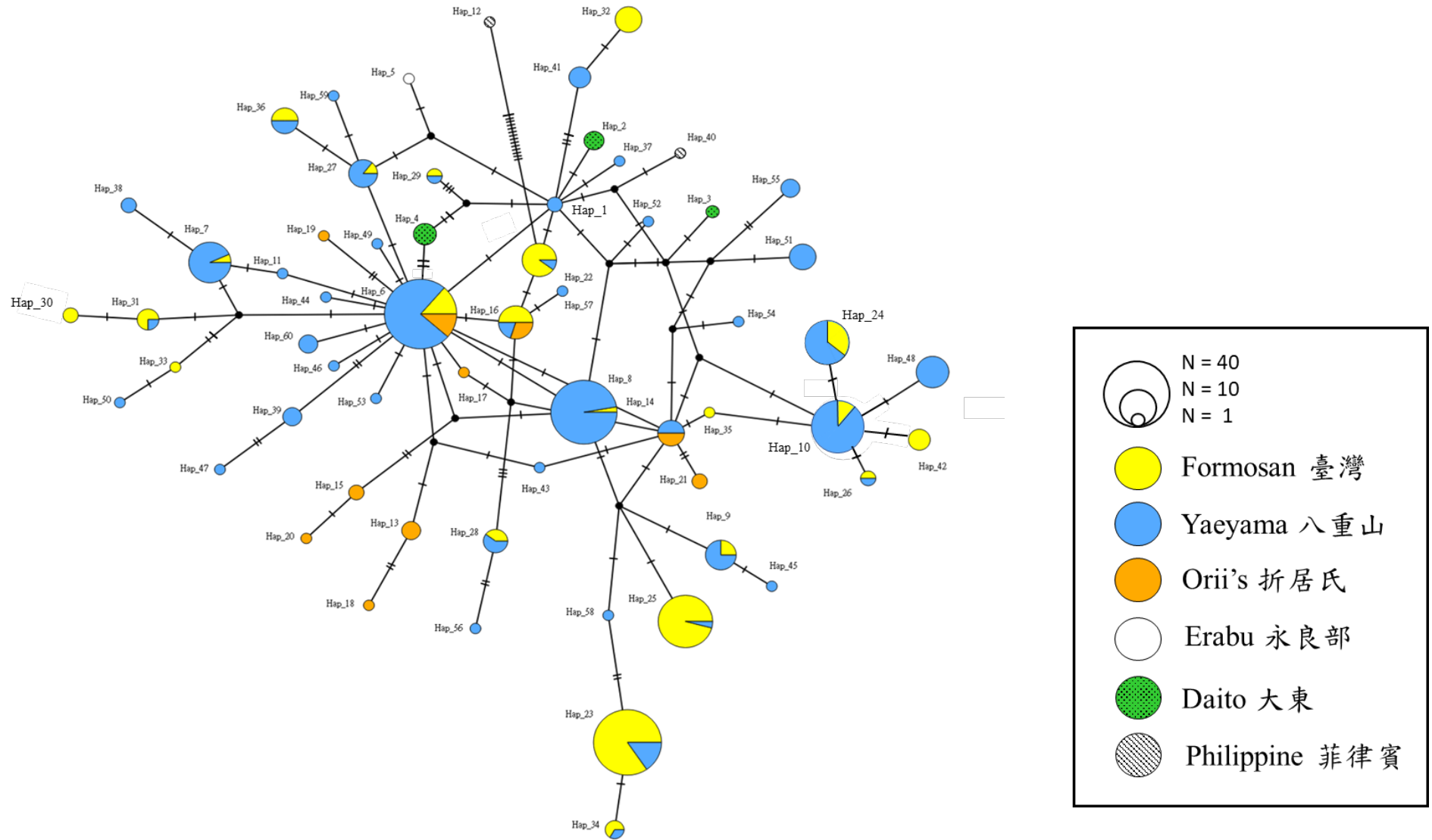


圖四、琉球狐蝠的主成分分析(Principal Component Analysis, PCA)

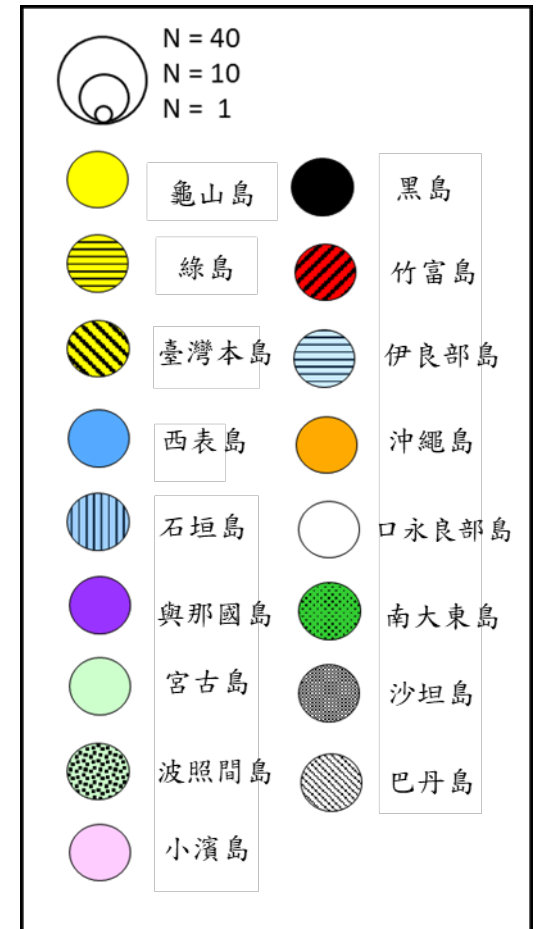
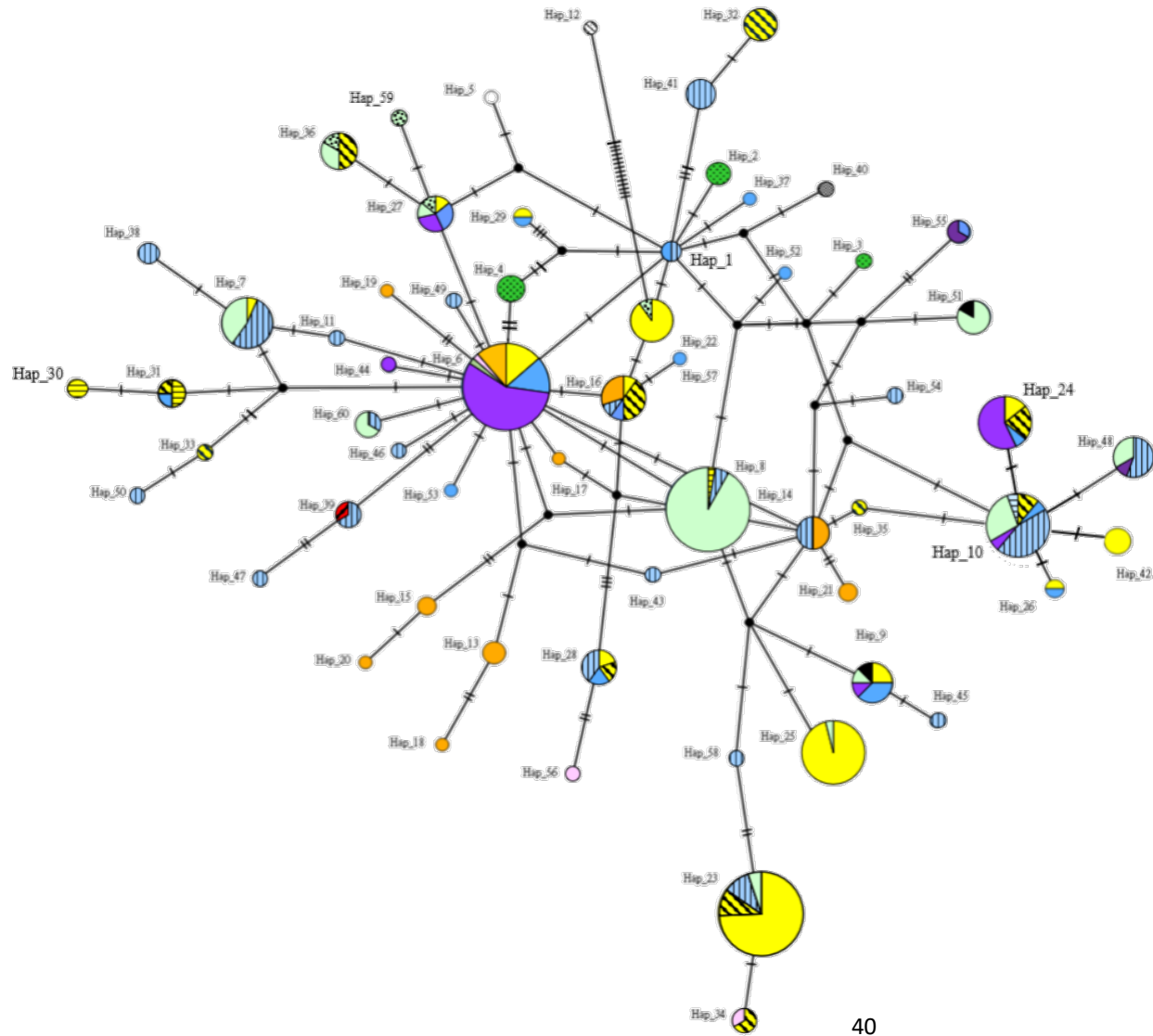
以 ddRADseq 資料進行 46 隻涵蓋 5 支亞種、8 座島嶼的琉球狐蝠個體的主成分分析，「島嶼」族群及代表顏色標示於右側。

*

(a) 地理亞種單元

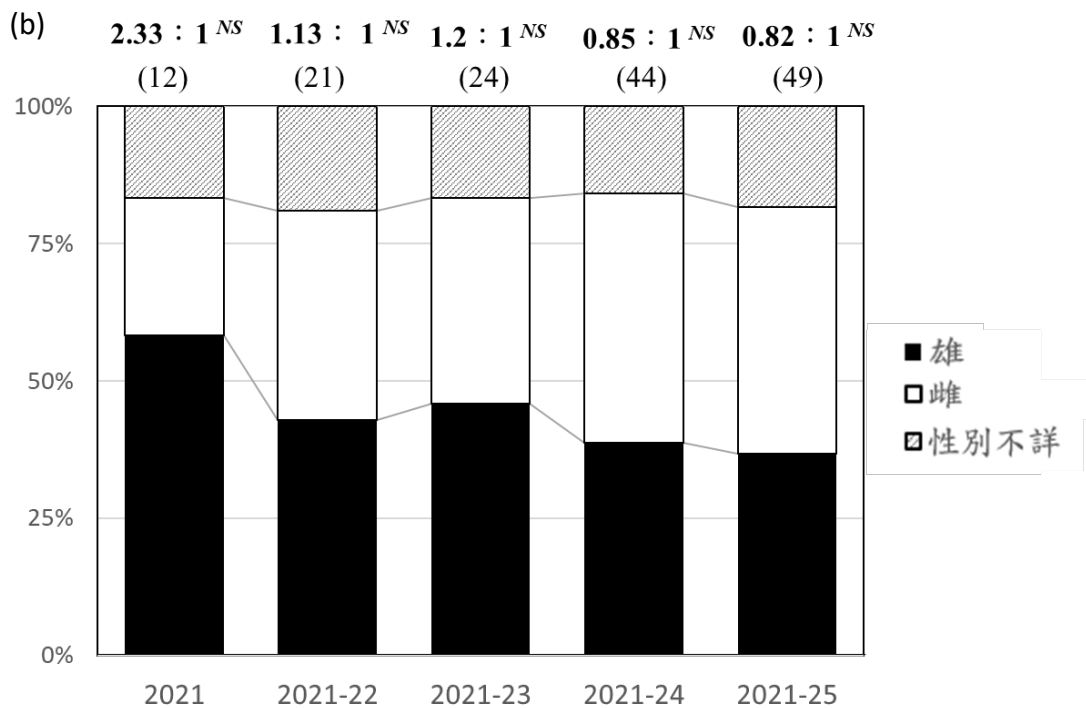
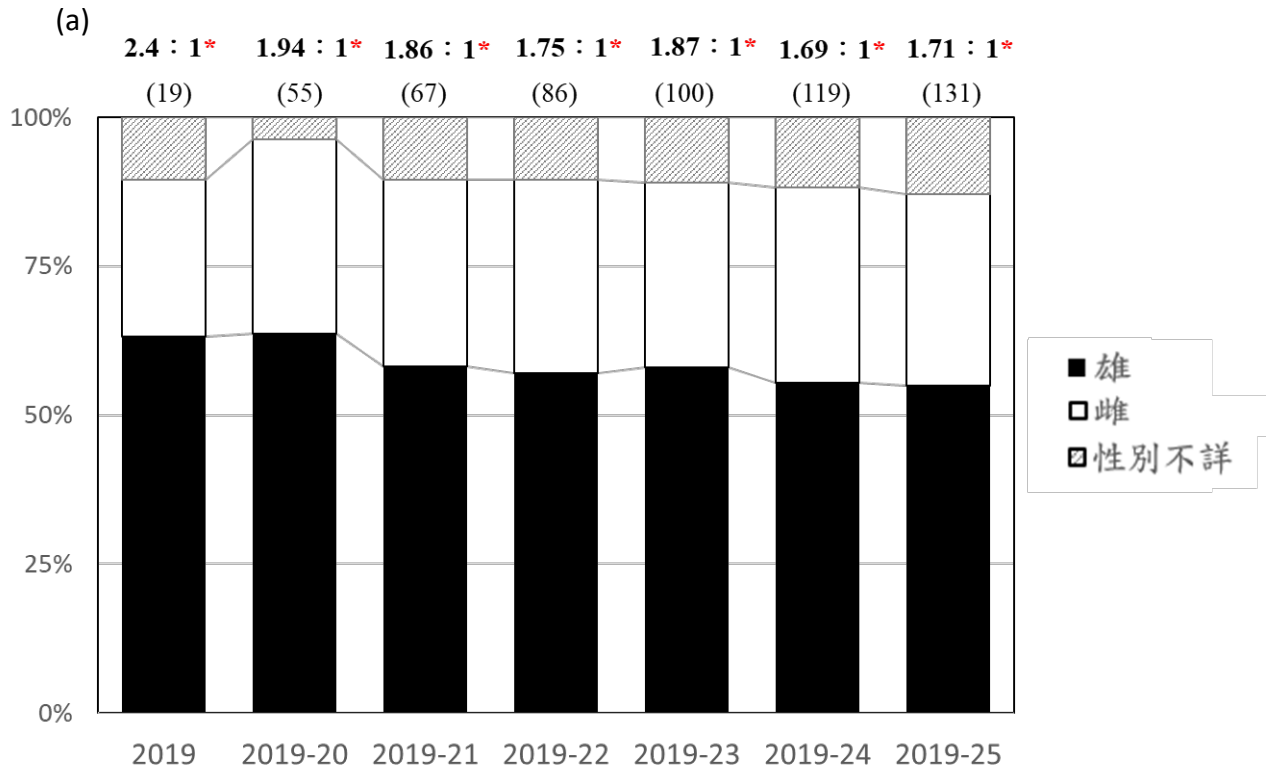


(b) 島嶼單元



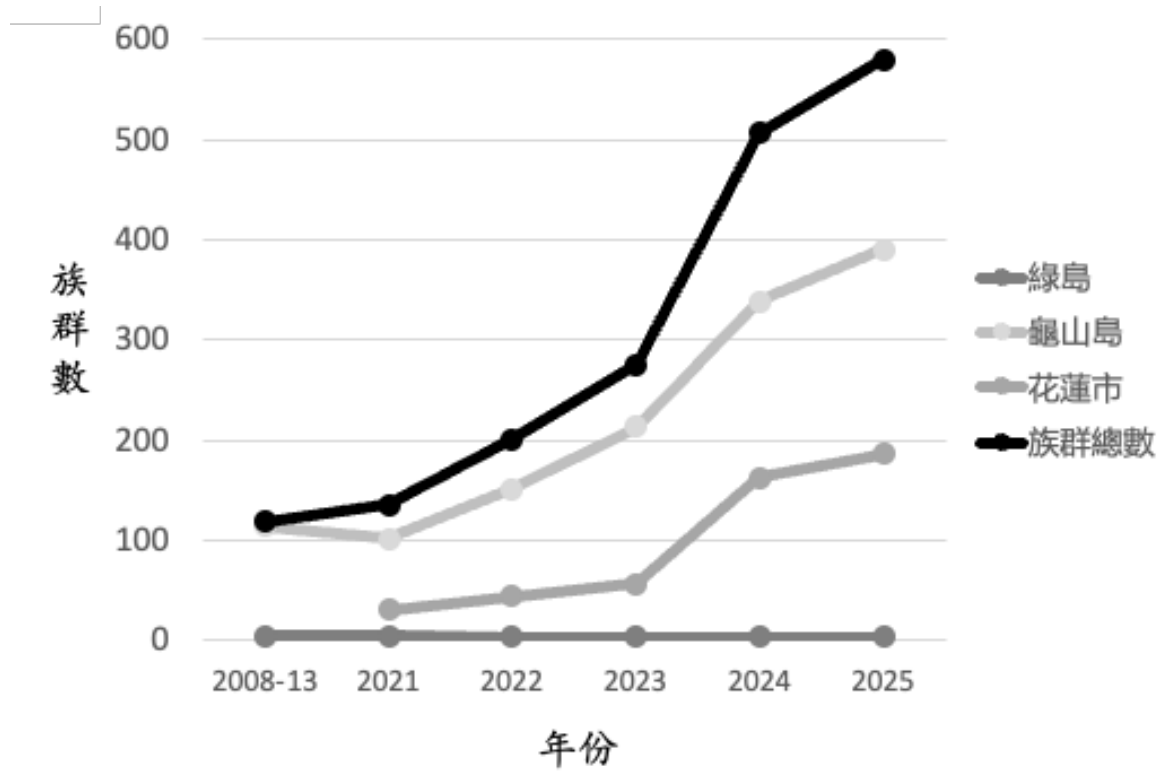
圖五、琉球狐蝠的單倍型網絡圖

以 (a)地理亞種 及 (b)島嶼單元呈現的琉球狐蝠單倍型網絡圖，共計鑑定出 60 個粒線體單倍型。每一顏色代表來自一個獨立的亞種或島嶼的族群，標註在右方註釋欄。每個單倍型的尺寸大小與出現頻率成比例。每一線段代表單一點突變，而每一節點則代表一假想的中間單倍型。



圖六、臺灣狐蝠近年之性別比變化

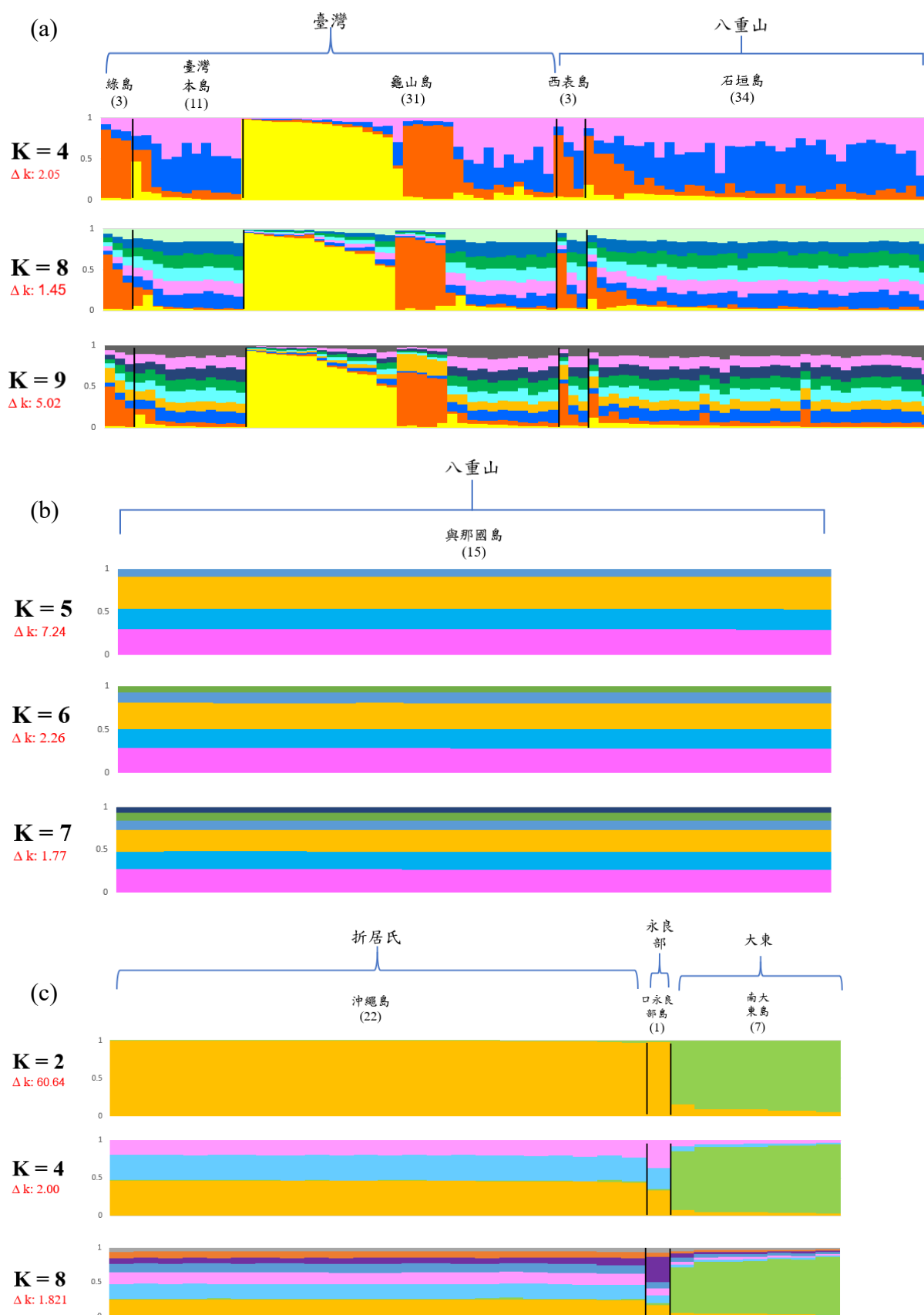
(a) 龜山島 (2019~2025); (b) 花蓮市 (2021~2025)。縱軸代表個體數佔的百分比，橫軸代表年分 (花蓮僅納入 2021 年後採樣及實驗方法穩定後的個體監測紀錄)。直條圖黑色部分代表雄性，白色代表雌性，斜紋部分代表性別不詳的個體，性別比例及樣本數分別標示在每一對應年分上方。^{NS}: 統計非顯著; *: 統計顯著 ($P < 0.05$)

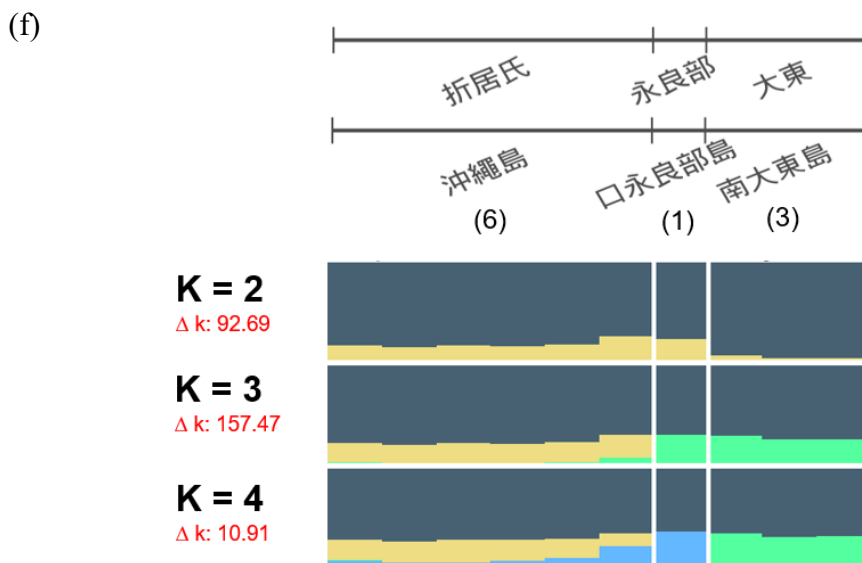
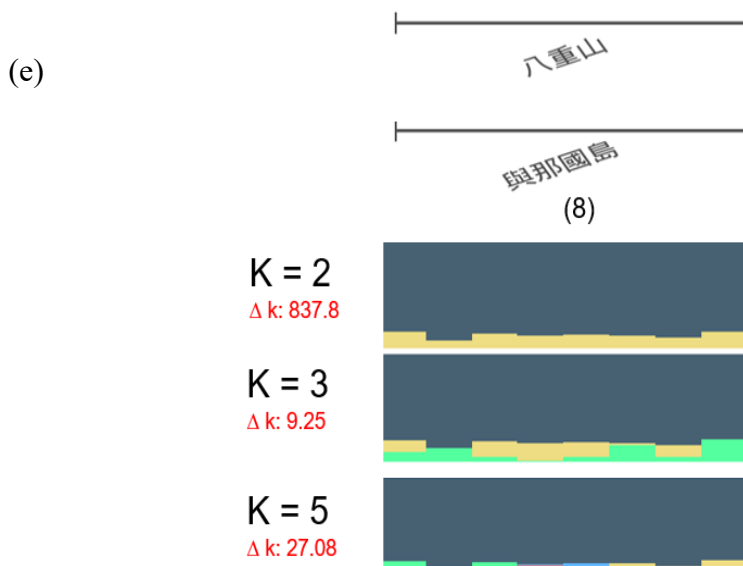
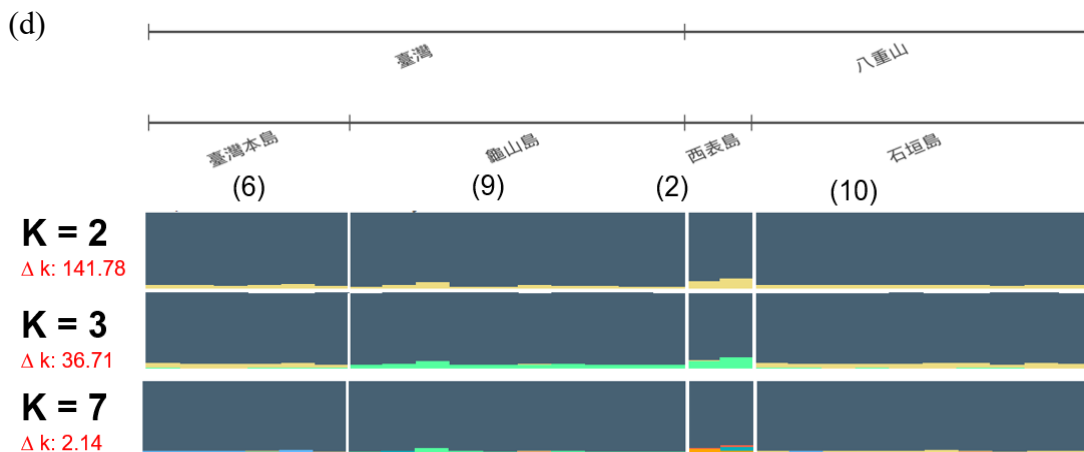


圖七、臺灣狐蝠近年累積族群數之變化

以不同顏色標示綠島、龜山島和花蓮三處居留族群歷年的族群估算值以及加總的族群數量。早期 2008~2013 年的資料整合成一筆估算值呈現，自 2021 年起則逐年累計監測之族群數。

附錄一、以 STRUCTURE 分析琉球狐蝠各大分群內的遺傳次結構





(a)-(c)為使用微衛星基因座、(d)-(f)則為使用簡化基因組 ddRADseq 資料，分別在「臺灣本島-龜山島-西表島-石垣島」、「與那國島」及「沖繩-口永良部島-南大東島」等三大群獨立進行的遺傳結構分析結果。垂直實線用以區隔不同的獨立島嶼。每一直條代表單一個體，每一顏色代表一個遺傳分群，每種顏色的長度與該個體被歸類至某一分群之機率成正比。Y 軸代表比例，範圍在 0~1 之間，每一分群中，皆列出前三高 ΔK 值，作為可能的分群參考。

附錄二、野外調查照片



龜山島的新鮮狐蝠排遺



龜山島狐蝠的新鮮食渣(三葉香山圓)



龜山島本年度發現罕見的葉片食渣



果實食渣(稜果榕)仍是龜山島上最常見的樣本類型



欖仁果實食渣和食餘為花蓮冬季常見的樣本類型



於美崙山公園之樣點架設霧網



研究人員於龜山島環湖步道採集樣本



研究人員於龜山島401步道搜尋樣本



研究夥伴協力架設霧網捕捉狐蝠



捕捉個體皆會進行形質測量



協助中網個體解網



捕捉個體待補充養分、觀察狀況無虞後，當夜即放飛原處