

## 參、結果

### (一) 野外樣本的採集

於台灣的地理區中，總共採集了 13 個樣點，另有 3 個台灣的樣點與 2 個海外的樣點的樣本。除了大部分自行採集的樣本，少部分的樣本則是由海洋大學何平合老師與特有生物中心的陳榮宗先生所提供，共計 18 個樣點。採集地點與完成定序的樣本編號如〈表一〉所示，共定序了 61 條序列。

各地理區樣本蒐集的狀況，西部地區所蒐集樣本，各別是烏溪 (W) 1 隻、大甲溪 (DJ) 3 隻、後龍溪 (HL) 3 隻、頭前溪 (TC) 4 隻，共計 4 條河川，11 個樣本。北部地區則是嘉寶溪 (JB) 1 隻、荖荖坑溪 (LCK) 4 隻、八連溪 (BL) 1 隻、老梅溪 (LM) 2 隻、石門坑溪 (SMK) 4 隻、圓潭溪 (YT) 4 隻、瑪鋉溪 (MS) 4 隻、雙溪 (SS) 2 隻，共計 8 條河川，22 個樣本。東北部則有大溪川 (DSC) 4 隻、梗枋溪 (KF) 4 隻、新城溪 (SC) 4 隻、白米溪 (BM) 4 隻，共計 4 條河川 16 個樣本。海外的樣本分別是琉球沖繩 (Oki) 10 隻與中國大陸珠江流域 (JJ) 2 隻個體。其結果如〈表四〉所示。

野外的採集狀況，西部地區因河川流域面積較廣，長度較長，絨螯蟹的族群不易集中；加上污染的程度較為北部與東北部地區的河川嚴重，因此也最不易採集。北部地區的河川流短，水量與長度也較西部河川小，但污染的程度較西部輕微，因此絨螯蟹的捕獲狀況也較佳。東北部地區除了蘭陽溪擁有較大的流域面積外，其餘的河川皆流短，污染的

程度也較小，絨螯蟹族群易集中，也因此捕獲率較高。

台灣地區現存的兩種絨螯，日本絨螯蟹 (*E. japonica*) 與台灣扁絨螯蟹 (*P. formosa*)，恰巧大致上以中央山脈為界東邊是台灣扁絨螯蟹 (*P. formosa*) 的棲地，西邊則是日本絨螯蟹 (*E. japonica*) 的分布區。採集的過程中，東北地區四條採集河川中，有三條皆有發現兩物種共域 (Sympatric) 的現象，分別是大溪川 (DSC)、梗枋溪 (KF)、新城溪 (SC)。但就採集結果，雖為共域的三條溪，但大多數的絨螯蟹組成還是以日本絨螯蟹為主，台灣扁絨螯蟹則是佔少數 (比例為捕獲十隻的絨螯蟹中約有一隻為台灣扁絨螯蟹)。

海外樣本的部份，蒐集了日本琉球沖繩群島 (Okinawa, Oki) 以及中國大陸珠江流域 (Ju-Jiang, JJ) 兩的部份。樣本的數量也分別為 10 隻與 2 隻，雖嫌數量少了點，但除了可探討台灣本島中日本絨螯蟹的族群結構外，亦可加入此二地區的樣本，對於東亞地區日本絨螯蟹的族群結構做一初探。

資料庫序列蒐集方面，利用網路於 NCBI 中之 GenBank 蒐集了絨螯蟹屬 (*Eriocheir*) 中的中華絨螯蟹、合浦絨螯蟹 (*E. hepuensis*) 與日本絨螯蟹；扁絨螯蟹屬 (*Platyeriocheir*) 的台灣扁絨螯蟹；新絨螯蟹屬 (*Neoeriocheir*) 的狹額新絨螯蟹，以及當做外群的字紋弓蟹 (*Varuna litterata*) 與白紋方蟹 (*Grapsus albolineatus*) 的 COI 序列，共計 34 個樣本。大部分的序列沒有明確採集地點的紀錄，僅中華絨螯蟹 (*E. sinensis*) 的 Es09 採集地為中國大陸長江、合浦絨螯蟹 (*E. hepuensis*) Eh03 採集地為中國大陸廣西合浦、台灣扁絨螯蟹 (*P. formosa*) Pf01、Pf02 與 Pf03 採集地為台灣與日本絨螯蟹 (*E. japonica*) 有 4 隻樣本

標明採集的地點，分別是 Ej10 、 Ej11 、 Ej12 與 Ej13 ，其地點分別是琉球沖繩（Okinawa）、大阪（Osaka）、德島縣（Tokushima）與下關（Shimonoseki）。其結果如〈表二〉與〈表三〉所示。

## （二）日本絨螯蟹（*E. japonica*）COI 基因之序列變異及多態性分析

分析各地所蒐集與 GenBank 上所下載的日本絨螯蟹樣本共 65 個樣本，定序了粒線體 DNA（Mitochondrial DNA, mtDNA）中 COI 基因 555 bp，發現有 44 個變異位置，佔序列的 7.9%，23 個基因型（Haplotype），分別是 H1~H23 如〈表五〉所示。

所得到的 23 個基因型中，台灣（Taiwan）共計有 15 個基因型，分別為 H6~H10 與 H12~H21；台灣島內西部地區（West）、北部地區（North）與東北部地區（NorthEast）共享 H7、H8 與 H19 之基因型。中國大陸珠江（China, Ju-Jiang）的樣本有 2 個基因型，分別為 H11 與 H19。日本地區（Japan Total）則共有 7 個基因型，為 H1~H5 與 H22~H23；日本琉球的沖繩（Okinawa）佔 5 個基因型，為 H1~H5；日本（Japan）有 2 個基因型，為 H22 與 H23。其中中國大陸與台灣共享 H19 的基因型；台灣地區（Taiwan Total）與中國大陸珠江（China, Ju-Jiang）相對照於日本地區（Japan Total）則可發現日本地區（Japan Total）有 7 個專屬的基因型，未與其他地區共享，如〈表六〉所示。

基因型多態性分析方面，23 個基因型的基因型歧異度（Haplotype diversity）為 0.904，台灣地區（Taiwan Total）基因型歧異度為 0.859，於台灣地區三個劃分的地理區中，基因型歧異度的最大值為東北

地區 ( NorthEast ) 其值為 0.892 ，最低為北部地區 ( North ) ，其值為 0.827 。海外方面，日本地區 ( Japan Total ) 之基因型歧異度為 0.758 ；日本地區境內，日本 ( Japan ) 的基因型歧異度 0.667 比琉球的沖繩地區 ( Okinawa ) 的基因型歧異度 0.533 之值來得大。中國大陸珠江地區 ( China, Ju-Jiang ) 所蒐集到的樣本最少，故基因型歧異度也是所有地區中最高的，其值為 1.000 。如〈表七〉所示。

核酸多態性分析了兩個指數，一為  $\pi$  值，一為  $\theta$  值，此二值皆稱為核酸歧異度 ( Nucleotide diversity ) 。三個主要的大地理區中以日本地區 ( Japan Total ) 的核酸歧異度為最高，其值  $\pi$  為 0.01443 ，  $\theta(\pi)$  為 0.01472 ，  $\theta(s)$  為 0.01458 ；其次中國大陸珠江 ( China, Ju-Jiang ) 是其值  $\pi$  為 0.00541 ，  $\theta(\pi)$  為 0.00544 ，  $\theta(s)$  為 0.00544 ；核酸歧異度最低的是，台灣地區 ( Taiwan Total ) 其值  $\pi$  為 0.00260 ，  $\theta(\pi)$  為 0.00261 ，  $\theta(s)$  為 0.00574 。台灣地區內的三個小地理區，東北地區 ( NorthEast ) 之核酸歧異度為最高，其值  $\pi$  為 0.00290 ，  $\theta(\pi)$  為 0.00291 ，  $\theta(s)$  為 0.00438 ；最低為西部地區 ( West ) ，其值  $\pi$  為 0.00216 ，  $\theta(\pi)$  為 0.00217 ，  $\theta(s)$  為 0.00309 。日本地區中，琉球的沖繩地區 ( Okinawa ) 之核酸歧異度  $\pi$  為 0.00180 ，  $\theta(\pi)$  為 0.00261 ，  $\theta(s)$  為 0.00574 又比日本 ( Japan ) 之核酸歧異度  $\pi$  為 0.00120 ，  $\theta(\pi)$  為 0.00120 ，  $\theta(s)$  為 0.00120 來得高。就東亞整體的核酸歧異度，其值  $\pi$  為 0.01455 ，  $\theta(\pi)$  為 0.01483 ，  $\theta(s)$  為 0.01749 。如〈表七〉所示。

### (三) 利用 Tajima's D test 和 Fu and Li's D test 中性檢定的結果

中性檢定的部份，利用兩種不同的檢定方式，分別是 Tajima's D test 與 Fu and Li's D test 。於 Tajima's D test 的檢定中，僅琉球沖繩 (Okinawa) 地區的族群 Tajima's D 值有顯著的偏離 0 ( $P < 0.05$ )，其於地區皆無顯著的偏離 0。三個主要的大地理區中，以日本地區 (Japan Total) 的 Tajima's D 值為最高，其值為 -0.086；其次是台灣 (Taiwan Total) 地區，其值為 -1.645；中國大陸珠江 (China, Ju-Jiang) 因其樣本數未達到 4 隻以上，故無法進行 Tajima's D test 的運算。台灣地區內的三個小地理區中，以東北地區 (NorthEast) 之 Tajima's D 值最低，其值為 -1.200；Tajima's D 值最高則是在西部地區 (West)，其值為 -1.138。日本地區中，琉球沖繩 (Okinawa) 的 Tajima's D 值為 -1.741 無顯著偏離 0；日本 (Japan) 的樣本只有 3 隻，無法進行 Tajima's D 值的估算。整體東亞之 Tajima's D 值為 -0.728，亦無顯著偏離 0。如〈表八〉所示。



Fu and Li's D test 的檢定中，僅台灣地區 (Taiwan Total) 之族群 Fu and Li's D 值有顯著偏離 0 ( $P < 0.05$ )，其於地區皆無顯著偏離 0。三個主要的大地理區中，台灣地區 (Taiwan Total) 之 Fu and Li's D 值最低，為 -3.269；日本地區 (Japan Total) 最高，其值為 0.326；中國大陸珠江 (China, Ju-Jiang) 樣本數未達到 4 隻以上，亦無法進行 Fu and Li's D test 的運算。台灣地區內的三個小地理區中，以東北地區 (NorthEast) 之 Fu and Li's D 值最低，為 -1.808；西部地區之 Fu and Li's D 值則是最高，為 -0.764。日本地區中，琉球沖繩 (Okinawa) 的 Fu and Li's D 值為 -2.010；日本 (Japan) 的樣本數不足 4 隻，無法進行 Fu and Li's D 之運算。整體東亞之 Fu and Li's D 值為 -1.076，無顯著偏離 0。如〈表八〉所示。

#### (四) 日本絨螯蟹 (*E. japonica*) 各族群間之遺傳歧異度

各族群間的 DNA 歧異度  $D_{xy}$  及 DNA 淨歧異度  $D_A$  如〈表九〉所示。大地理區的 DNA 歧異度  $D_{xy}$ ，以日本地區 (Japan Total) 與中國大陸珠江 (China, Ju-Jiang) 所得之值為最高，為 0.03629；其次是日本地區 (Japan Total) 與台灣地區 (Taiwan Total) 所得之值 0.03578；以台灣地區 (Taiwan Total) 與中國大陸珠江 (China, Ju-Jiang) 值為最低，為 0.00336。台灣島內的三個小地理分區中，以東北部 (NorthEast) 與北部 (North) 所得之值為最高，為 0.00275；其次是東北部 (NorthEast) 與西部 (West) 所得之值，為 0.00251；以北部 (North) 與西部 (West) 值最低，為 0.00242。日本地區內，琉球沖繩 (Okinawa) 與日本 (Japan) 所得之值為 0.03533。比較所有的小地理區之 DNA 歧異度  $D_{xy}$  值，以日本 (Japan) 與台灣東北部 (NorthEast) 所得之值 0.04403 為最高；以台灣島內北部 (North) 與西部 (West) 所得之值 0.00242 為最低。

DNA 淨歧異度  $D_A$  方面。主要大地理區中以日本地區 (Japan Total) 與台灣地區 (Taiwan Total) 所得之值 0.02723 為最高；其次是日本地區 (Japan Total) 與中國大陸珠江 (China, Ju-Jiang) 所得之值 0.02637；台灣地區 (Taiwan Total) 與中國大陸珠江 (China, Ju-Jiang) 所得之值 0.00064 為最低。台灣島內的三個小地理區中，以北部 (North) 與西部 (West) 的值最高，為 0.00005；其次是東北部 (NorthEast) 與西部 (West) 之值，為 0.00002；東北部 (NorthEast) 與北部 (North) 所得之值最低，為 0.00001。日本地區內，日本 (Japan) 與琉球沖繩 (Okinawa) 所得之值為 0.03342。比較所有的小地理區之 DNA 淨歧異

度  $D_A$  值，以日本 (Japan) 與台灣東北部 (NorthEast) 所得之值最高，為 0.04198；台灣東北部 (NorthEast) 與台灣北部 (North) 之值為最低，為 0.00001。

#### (五) 日本絨螯蟹 (*E. japonica*) 各族群間之遺傳分化

各族群間遺傳分化以兩個數值表示，分別是  $N_{st}$  值與  $F_{st}$  值。於三個主要的大地理區中，以日本地區 (Japan Total) 與台灣地區 (Taiwan Total) 之遺傳分化值最高， $N_{st}$  值為 0.76252， $F_{st}$  值為 0.76109；其次是日本地區 (Japan Total) 與中國大陸珠江 (China, Ju-Jiang)， $N_{st}$  值為 0.72895， $F_{st}$  值為 0.72668；台灣地區 (Taiwan Total) 與中國大陸 (China, Ju-Jiang) 之遺傳分化值為最低， $N_{st}$  值為 0.19021， $F_{st}$  值為 0.18989。台灣島內的三個小地理，以北部 (North) 與西部 (West) 之遺傳分化值為最高， $N_{st}$  值為 0.01971， $F_{st}$  值為 0.01975；其次是東北部 (NorthEast) 與西部 (West)， $N_{st}$  值為 0.00868， $F_{st}$  值為 0.00871；東北部 (NorthEast) 與北部 (North) 遺傳分化值則是最低， $N_{st}$  值為 0.00508， $F_{st}$  值為 0.00501。日本地區內，日本 (Japan) 與琉球沖繩 (Okinawa) 之遺傳分化程度， $N_{st}$  值為 0.94704， $F_{st}$  值為 0.94590。從所有的小地理區來看，以日本 (Japan) 與台灣西部 (West) 之遺傳分化程度最大， $N_{st}$  值為 0.96262， $F_{st}$  值為 0.96155；以台灣東北部 (NorthEast) 與台灣北部 (North) 之遺傳分化程度最小， $N_{st}$  值為 0.00508， $F_{st}$  值為 0.00501 (表十)。

基因交流程度方面以  $N_m$  值表示，有兩個  $N_m$  值，分別是  $N_m$

( $N_{st}$ ) 與  $N_m$  ( $F_{st}$ )。三個主要的大地理區中，以台灣地區 (Taiwan Total) 與中國大陸珠江 (China, Ju-Jiang) 之基因交流度最高， $N_m$  ( $N_{st}$ ) 值為 1.56， $N_m$  ( $F_{st}$ ) 值為 1.57；其次是日本地區 (Japan Total) 與中國大陸珠江 (China, Ju-Jiang)， $N_m$  ( $N_{st}$ ) 值為 0.09， $N_m$  ( $F_{st}$ ) 值為 0.09；以日本地區 (Japan Total) 與台灣地區 (Taiwan Total) 之基因交流度最低， $N_m$  ( $N_{st}$ ) 值為 0.08， $N_m$  ( $F_{st}$ ) 值為 0.08。

台灣的三個小地理區中，以東北部 (NorthEast) 與北部 (North) 之基因交流度最高  $N_m$  ( $N_{st}$ ) 值為 49.00， $N_m$  ( $F_{st}$ ) 值為 48.79；其次是東北部 (NorthEast) 與西部 (West)， $N_m$  ( $N_{st}$ ) 值為 29.06， $N_m$  ( $F_{st}$ ) 值為 28.96；北部 (North) 與西部 (West) 之基因交流度最低， $N_m$  ( $N_{st}$ ) 值為 12.43， $N_m$  ( $F_{st}$ ) 值為 12.41。日本地區中，日本 (Japan) 與琉球沖繩 (Okinawa) 的基因交流度為  $N_m$  ( $N_{st}$ ) 值為 0.01， $N_m$  ( $F_{st}$ ) 值為 0.01。從所有的小地理區來看，台灣東北部 (NorthEast) 與北部 (North) 地區之基因交流的程度最高， $N_m$  ( $N_{st}$ ) 值為 49.00， $N_m$  ( $F_{st}$ ) 值為 48.79；日本 (Japan) 與琉球沖繩 (Okinawa)、台灣東北部 (NorthEast)、台灣北部 (North) 與台灣西部 (West) 四個小地理區之基因交流的程度最低，其  $N_m$  ( $N_{st}$ ) 值皆為 0.01， $N_m$  ( $F_{st}$ ) 值皆為 0.01 〈表十〉。

#### (六) 日本絨螯蟹 (*E. japonica*) 親緣關係樹之重建

利用 MEGA 3.1 之軟體，將自行定序的序列以及 NCBI 之 GenBank 所蒐集的序列 541 bp 以 Neighbor-Joining Tree (NJ Tree) 繪製出絨螯蟹各屬與屬內種間之親緣關係樹。〈圖四〉中顯示絨螯蟹屬 (*Eriocheir*) 日本絨螯蟹、中華絨螯蟹、合浦絨螯蟹與扁絨螯蟹屬

( *Platyriocheir* ) 台灣扁絨螯蟹與新絨螯蟹屬 ( *Neoeriocheir* ) 狹額新絨螯蟹之親緣關係樹。其中日本絨螯蟹與合浦絨螯蟹 ( *E. hepuensis* & *E. okinawansis* ) 分支包含了台灣、中國大陸 ( H6 ~ H21 ) 日本絨螯蟹、合浦絨螯蟹與琉球沖繩 ( H1 ~ H5 ) 日本絨螯蟹兩個類群；日本之日本絨螯蟹 ( *E. japonica* ) 的分枝與 中華絨螯蟹 ( *E. sinensis* ) 被歸類為同一個群聚 ( Group ) 。台灣扁絨螯蟹 ( *P. formosa* ) 獨立成一群與日本絨螯蟹 ( *E. japonica* & *E. okinawansis* ) 、合浦絨螯蟹 ( *E. hepuensis* ) 與中華絨螯蟹 ( *E. sinensis* ) 分開。狹額新絨螯蟹 ( *N. leptognathus* ) 與其他三種絨螯蟹的關係最遠，其分支也是絨螯蟹屬中最基礎的一支。

利用 MEGA 3.1 之軟體再進一步的分析，繪出日本絨螯蟹所有有明確採集地點樣本的 Neighbor – Joining Tree ( NJ Tree ) 親緣關係樹如〈圖五〉所示。並將此結果與所劃分的地理區〈圖三〉相比較。發現日本 ( Japan ) 的 3 個樣本 ( Ej19, Ej20, Ej21 ) 被歸類為同一個群聚， Bootstrap 值高達 100，可信度相當高。琉球沖繩群島 ( Okinawa ) 之 11 個樣本 ( Oki01, Oki02, Oki03, Oki04, Oki05, Oki06, Oki07, Oki08, Oki09, Oki10, Ej10 ) 也被歸類為同一群， Bootstrap 值為 97，也相當可信。台灣 ( Taiwan ) 的族群與中國大陸 ( China ) 的族群被混合在一起形成一個群聚 ( Taiwan, China )， Bootstrap 值為 100，顯示此一群聚的可信。台灣島內之族群亦無法再加以細分，其 Bootstrap 值皆在 70 以下。

將 65 條日本絨螯蟹 ( *E. japonica* ) 之 COI 序列繪製成 Minimum Spanning NetWorks 之圖，如〈圖六〉。由圖中整體從東亞 ( East Asian ) 大類群在細分成日本 ( Japan Mainisland ) 琉球沖繩 ( Japan Okinawa ) 與台灣、中國大陸 ( Taiwan, China ) 之 3 個亞類群，每個亞類群中又是由不同的基因型組成。各基因型越位居 NetWorks 圖譜中央，將被推測為

越古老的類群；越位於圖譜末端表示是越晚才分化出來的類群。於目前的圖譜結果發現，推測台灣、中國 (Taiwan, China) 中 H8 之基因型應屬於最古老的類群。在日本 (Japan) 的各基因型皆與 H8 基因型相距了至少 18 個位階以上。

利用 AMOVA 進行族群結構變異的估算，發現於地理區間的變異最高，其值為 76.01 %，地理區內族群間的變異次之，為 15.01 %，族群之內則是最少，其值為 8.99 % 〈表十一〉。由此可知其變異是產生於地理區間內，並非地理區內族群之間或是族群之內。印證了 NJ Tree 〈圖五〉的正確性。

#### (七) 台灣島內日本絨螯蟹 (*E. japonica*) 的遷移

利用 IM 的運算，估算台灣島內三個小地理區的絨螯蟹遷移情形，發現西部地區 (West)、北部地區 (North) 與東北地區 (NorthEast) 各地區間的交流相當頻繁。由〈表十二〉可以看出西部地區 (West) 往北部地區 (North) 遷移的頻率較北部地區 (North) 往西部地區 (West) 遷移的頻率還高，其值分別為  $6.235 > 5.505$ 。比較北部地區 (North) 與東北地區 (NorthEast) 發現北部地區 (North) 往東北地區 (NorthEast) 遷移的頻率較東北地區 (NorthEast) 往北部地區 (North) 遷移的頻率低，其值分別為  $4.795 < 5.725$ 。由估算的值可發現，台灣島內絨螯蟹遷移交流，其方向大致以西部地區 (West) 往北部地區 (North)，以及東北地區 (NorthEast) 往北部地區 (North) 為主。

#### (八) 日本絨螯蟹 (*E. japonica*) Coalescent 分隔時間點的估算

本研究中以台灣地區西部 ( West ) 、北部 ( North ) 與東北部 ( NorthEast ) 的日本絨螯蟹與 GenBank 上所蒐集到其他絨螯蟹的 COI 序列進行遺傳距離的估算，並根據 Schubart ( 1998 ) 所提到陸域相手蟹 COI 基因每 Base pair 每百萬年的變異為速度為 1.66 % 與海域相手蟹 COI 基因每 Base pair 每百萬年的變異速度為 2.33 % 的變異速率，利用 IM 進行絨螯蟹屬與日本絨螯蟹種內遺傳分隔時間點的估算。估算結果如〈表十三〉所示，絨螯蟹屬內日本絨螯蟹與台灣絨螯蟹分離的時間點約為 7.01 ~ 7.60 百萬年前，日本絨螯蟹與中華絨螯蟹分離的時間約為 6.67 ~ 7.96 百萬年前。日本絨螯蟹屬內，其各大地理區分離的時間點以台灣、中國大陸地區 ( Taiwan & China ) 與日本本島 ( Japan Main Island ) 分離的時間點最久約為 7.47 百萬年前，其次為台灣、中國大陸地區 ( Taiwan & China ) 與日本琉球沖繩群島 ( Japan Okinawa ) 約為 6.38 百萬年。狹額絨螯蟹與其他三種絨螯蟹的分隔時間點的估算結果於此文章中則僅列出供參考，因為所蒐集到的序列資料僅為一條，所能提供的遺傳變異資訊恐有不足，故不將運算出的分子鐘結果於本文中討論。