

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

台灣水鼯 (*Chimmarogale himalayica*) 之族群生物學研究
並釐定亞洲水鼯屬之系統分類

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2621-B-029-003-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：東海大學生命科學系

計畫主持人：林良恭

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 10 月 28 日

摘要

亞洲水鼯 (Asiatic water shrew), *Chimarrogale*, 是一群半水棲生活的食蟲目動物。目前本屬中共有 6 個種, 過去對此類動物的分類研究建立於外部特徵以及頭骨形值分析, 但本屬種間特徵差異不明顯故容易混淆, 且檢視之樣本數偏低。本研究使用分子標記以及形態特徵來重新檢視 *Chimarrogale* 屬內各種間的親緣關係與分類地位。此外, 亦檢視台灣島內水鼯族群的親緣地理關係, 並分析是否與台灣獨特的水系環境有所關連。結果顯示, 在最大近似以及最大簡約法的分析中均支持台灣、日本及婆羅洲之水鼯應分屬於三個不同的種。此三種間的平均遺傳距離(Kimura's two parameter)達到 10.7%。而台灣的水鼯族群的粒線體 DNA 單型在親緣關係樹可分成二個主要的族群, 此二群在北台灣及中台灣之分佈重疊, 顯示此區域族群間有高度的基因交流現象。

關鍵詞：亞洲水鼯、粒線體 DNA、控制區、細胞色素 *b*、親緣地理、分子系統分類，水系，族群分化

Abstract

The species of genus *Chimarrogale* (Insectivora: Soricidae) are commonly called Asiatic water shrews. They are adapted to semi-aquatic life. Six species are recognized in this genus. Previous taxonomic studies are based on morphological and cranial characters, but these characters are obscure and the sample sizes are usually small. In present study, we used molecular marker to examine the phylogenetic and taxonomic status of *Chimarrogale*. We also used mitochondrial DNA marker to examine whether the phylogeographic relationship of water shrews was concordant with the complex drainage systems of Taiwan.

The results showed that in both maximum likelihood and maximum parsimony trees, of complete mitochondrial DNA cytochrome *b* gene sequences revealed that the *Chimarrogale* of Taiwan, Japan, and Borneo were distinct species. The mean genetic distance (Kimura's two parameter) among these three species was greater than 10.7%. Both neighbor-joining and maximum parsimony methods identified two populations among haplotypes of Taiwan populations. These haplotypes were broadly sympatric in central and northern Taiwan, suggesting high levels of gene flow between the two populations.

Keywords: Asiatic water shrew, *Chimarrogale*, mitochondrial DNA, control region, d-loop, cytochrome *b*, phylogeography, molecular systematic, drainage system, population divergence

緣由與目的

亞洲水鼩 (Asiatic water shrew) 為 *Chimarrogale* 屬的動物，分類上屬於哺乳綱 (Mammalia)，食蟲目 (Insectivora)，尖鼠科 (Soricidae)，尖鼠亞科 (Soricinae)，是一群生活習性特殊的小型哺乳類。其食物來源完全依靠淡水河流。Dunstone and Gorman (1998) 定義此類動物為半水棲哺乳類 (semi-aquatic mammals)，其中成員除水鼩外，尚有水獺以及少數習性特殊之蝙蝠。水鼩的體型小，顏色從灰色到灰黑色，與水底岩石顏色接近；沒有背腹顏色界線；吻端較為扁平；腦腔容積較其他鼩鼯類大；耳殼小，游泳時能閉鎖以防水；四肢趾端有白色硬毛 (stiff hair)，游泳時能增加與水接觸的面積；毛髮綿密，末端扁平，推測能增加抗水性並保暖，且全身毛髮間夾雜較長的白色之保護毛 (guard hair)，此為水鼩類的獨有特徵 (Corbet and Harris 1991, Dunstone and Gorman 1998)。

根據 Corbet and Hill (1992) 與 Wilson and Reeder (1993) 之回顧與分析，目前 *Chimarrogale* 屬之動物一共有六種，分別是：*C. himalayica* (Gray 1963)，主要分佈於東南亞到南亞之大陸地區 (中國南部，台灣，緬甸，越北，尼泊爾至北印度等地)。*C. styani* (De Winton 1899)，於中國中部，中國西南部有零星紀錄。*C. phaeura* (Thomas 1898)，分佈於印尼蘇門答臘地區以及馬來西亞半島。*C. platycephala* (Temminck 1842)，目前僅分佈於日本島，為日本特有種。*C. hantu* (Harrison 1958)，僅分佈於馬來西亞半島。*C. sumatrana* (Thomas 1921)，僅分佈於印尼的蘇門答臘島。由於水鼩在外型上缺乏顯而易見的明顯差別，亞洲水鼩的分類一直存有爭議：例如毛皮都是黑色到黑灰色且無明顯界線，都具有白色的保護毛 (guard hair)，毛皮顏色與保護毛長短都會呈現個體差異，不能做為物種鑑識之依據；尾部毛髮形式與長度亦與物種辨識沒有明顯相關。目前能用於分類的外部形值，僅有 *C. himalayica* 與 *C. phaeura* 的上門齒尖端形狀不同，然亦非完全可靠。物種的分佈範圍亦重疊，例如：*C. phaeura* 與 *C. hantu* 都分佈在馬來西亞半島，*C. himalayica* 與 *C. styani* 於中國西南部都有採集紀錄，其中一種被認為可能只是族群內的變異型。據此，Ellerman and Morrison-Scott (1966) 便認定所有古北區與南亞區的水鼩事實上應該只有一種，即 *C. platycephala*，然而，其檢視的標本並未包括 *C. hantu*，*C. phaeura* 與 *C. sumatrana* 之分佈範圍，明顯地有所偏差。Harrison (1958) 雖然承認 *C. hantu* 是一獨立物種，且將過去認知的亞種均提升為獨立種，包括重新認定 *C. sumatrana* 為一獨立種，但仍認為水鼩屬的所有物種均沒有足夠的樣本數來支持其分類地位。Medway (1965, 1977) 則將 *C. hantu* 以及 *C. phaeura* 合併到 *C. himalayica* 之下，成為 *C. himalayica* 的二個亞種；而後在 Jones and Mumford (1971) 之研究中，則再次認定此二種應為獨立存在之物種。Corbet and Hill (1992) 與 Wilson and Reeder (1993) 綜合以上的說法，認定日本特有種 *C. platycephala* 是有效的，但 *C. platycephala* 與 *C. himalayica* 染色體核型極為相似，僅在第一對染色體大小有變異 (Obara and Tada 1985, Obara

et al. 1996, Satoh and Obara 1995)，部分日本學者認為對此一物種之描述不足，相信日本族群仍應為 *C. himalayica* 的一支 (Abe 1994)。因此，關於水鼯屬之分類，實有重新檢測之必要，尤其是分佈範圍重疊的物種。

台灣的水鼯描述始於 1971 年之採集與基礎分類學的研究 (Jones and Mumford 1969, 1971)。經過與中國大陸四份 *C. himalayica* 頭骨標本加上二份 *C. styani* 頭骨標本以及取自日本的 *C. himalayica* 三份頭骨標本 (目前已修正為 *C. platycephala*) 做比對後，Jones 等認為台灣發現的水鼯應為 *C. himalayica*。然而，台灣之標本比大陸的 *C. himalayica* 體型略小，幾乎所有的頭骨測值也略小於大陸及日本之標本，極可能是一獨立亞種，但比對的標本數不足，無法做此一定論。

過去針對亞洲水鼯屬動物所進行的相關研究僅止於分類學的描述，最近，日本學者開始對日本境內所分佈之日本水鼯 *Chimarrogale platycephala* 進行棲息地的調查與親緣地理等研究。結果顯示日本水鼯多分佈在海拔 200~1400 公尺的範圍內，偏好多石頭、岩塊、倒木且遮蔽良好、水中無脊椎動物豐富的乾淨溪流。此外，水鼯的族群量比其他的陸域小型哺乳類來得低，且很容易因人類的工事活動而消失 (阿部等 2002, Abe 2003)。在親緣地理的研究方面，利用粒線體 DNA 分析之結果顯示日本水鼯可分成二大群，分屬於東北與西南區域，但二群間的遺傳差異不大，且於日本中部區域混合出現。推測日本水鼯族群於中更新世時曾大幅衰減，而於第四紀晚期族群再度往東北與西南拓殖 (Iwasa 2005, in press)。在針對歐亞水鼯 *Neomys fodiens* 的研究中則指出水鼯只能生存於乾淨、無污染且無脊椎動物豐富的溪流，個體間的領域重疊性極低，族群數量也較一般的陸生鼯類小。日活動範圍約在 10~60 公尺，最大亦只有 150~200 公尺，顯示水鼯的移動能力相當低。此物種壽命約不到 2 年，冬季時成體會大量死亡，族群內成員替換速度相當快，幾乎每年更新一次 (Corbet and Harris 1991)。此外，*Neomys fodiens* 的食物來源有 80% 是水中生物，對溪流的依賴性極高，水中食物的豐富度直接影響水鼯的族群量 (DuPasquier and Cantoni 1992)。由此推知，由於採用特殊的生態棲位，相比之下，水鼯的族群數量遠較其他陸域小型哺乳類來得低，對溪流品質有高度的依賴性，活動範圍較小，對環境變動或人為干擾等因素十分敏感，且個體壽命短，容易因外在壓力致使族群被分割或消失。綜合這些特性，推測台灣島內的水鼯族群將無法突破陡峭地形以及溪流所產生的天然 (例如瀑布、深谷) 或人工 (例如攔砂壩、水壩) 障礙，並受到第四紀晚期冰河期之影響，族群遺傳結構因山脈與水系隔離而有分割的現象。因此，本研究的主要目標有二：1. 利用分子標記重新釐定 *Chimarrogale* 屬之系統分類關係。2. 以粒線體 DNA 片段作為分子標記，探討台灣地區各溪流，山脈間與溪流內上下游間水鼯族群之是否因地形或人工建物的阻隔產生遺傳分化現象。

研究方法

(1.) 標本採集

選定台灣島內各地區海拔在 500~2000 公尺左右適合水鼩生存的乾淨溪流，設置薛爾曼氏 (Sherman) 捕鼠器或捕鼠夾進行全島廣泛性水鼩個體捕捉。

(2.) 樣本 DNA 之粹取與 PCR 增幅

所採得之組織標本以 phenol/ chloroform/ isoamylalcohol 法或 DNA extraction kit 進行 genomic DNA 粹取，所得之 DNA 保存在 1X TE buffer 之中，並存於 4°C 之下，再利用 PCR 方式增幅所需之粒線體 DNA d-loop 與 cytochrome *b* 片段。PCR 之增幅溫度操作如下：94°C 處理 1 分鐘使 DNA 變性，再以 52°C 處理 1 分鐘進行引子與樣本 DNA 黏合，最後以 72°C 進行延長增幅 2 分鐘；此一循環共進行 35 次，最後的 DNA 增幅產物保存在 4°C 之下。所使用的 PCR 引子設計如下：d-loop 部分參考 NCBI GenBank 中鼩鼯類之 d-loop 序列，於 L-strand 的 cytochrome *b* 區域以及 H-strand 的 d-loop 區域中央區 (central domain) 分別設計正向與反向之引子以進行增幅 (pr1:

5'-ATGCCAATCACAAGTCTACT-3', pr2:

5'-CATCGAGATGTCTTATTTAAGAGG-3'); cytochrome *b* 部分則參考

Yuan et al. 2005 (in press) 所設計的引子組進行增幅。所得之 PCR 產物經電泳確認之後，交由生物科技公司進行定序。所有樣本均定序二次以上，以確認序列之正確性。

(3.) 系統分類、親緣地理之分析方法

所得之序列利用電腦軟體 ClusterW 進行多重序列排序，再由人工方式檢驗確認。排序完成的序列輸入電腦軟體 Modeltest 中，尋找最適當的演化模型，所得之參數代入電腦軟體 PAUP 內，以最大近似法 (maximum likelihood) 與最大檢約法 (maximum parsimony) 建構各序列間之親緣關係。此外將利用電腦軟體 MEGA 計算各序列之間之遺傳距離，以鄰接法

(neighbor-joining) 建構其親緣關係樹。在研究台灣島內水鼩族群的親緣地理時，除上述方法外，同時採用 Templeton 氏所發表之 nested clade analysis (Templeton et al. 1992, 1995) 建構台灣島內水鼩樣本 d-loop 序列間之最檢約網狀圖 (network)，以釐清島內族群是否有地理區域間分化之現象。

結果與討論

(1.) 以分子資料重新檢視亞洲水鼩屬 (*Chimarrogale*) 之系統分類地位

本研究共取得亞洲水鼩屬三物種之樣本：*Chimarrogale himalayica* 11 隻 (台灣)，*Chimarrogale platycephala* 3 隻 (日本) 以及 *Chimarrogale phaeura* 1 隻 (婆羅洲)。經由 PCR 及定序後，成功取得各樣本的粒線體 DNA cytochrome *b* 區域完整序列 1140 bp。其中來自台灣的 *C. himalayica* 樣本共有 7 種 haplotype，*C. platycephala* 中有 3 種 haplotype，*C. phaeura* 則有 1 種 haplotype。建立進行親緣關係樹時，加入台灣的短尾鼩 (*Anourosorex yamashinai*) cytochrome *b* 序列資料作為外群，利用 Modeltest 所得到最佳 model 為 TrN+G 模型，依此建立之最大近似關係樹如圖一所示，並以 1000 次 bootstrap 重複取樣檢驗各分枝的可信度。使用最大檢約法所得之親緣關係樹與最大近似法所得之結果相同，其中各分枝的 bootstrap 的支持度同樣標示於圖一。以 MEGA 軟體計算三物種之間的 K2P 與 TrN+G 之平均遺傳距離則列於表一之中。

由圖一的結果，可看出本研究中所檢驗的三種亞洲水鼩分屬於三個不同的獨立群，不論是最大近似法或最大檢約法，所得到的分群關係均一致且有極高的 bootstrap 支持度 (100%)，此一結果支持三物種應具有其獨立之分類地位。表一中所呈現的種間遺傳距離亦支持此一結論：*C. platycephala* 與 *C. himalayica* 間的 K2P 遺傳距離為 10.73%，參考前人對於小型哺乳類間遺傳距離之歸納統計 (Bradley and Baker 2001)，此一差異應已達到種間的程度，*C. phaeura* 與其他二種間的遺傳距離更達到 16% 以上。上述結果支持日本所產的 *C. platycephala* 應不屬於 *C. himalayica* 中的一支，而為獨立種，與 Corbet and Hill (1992) 與 Wilson and Reeder (1993) 歸納之結果相符。然而，近期亦有學者指出台灣所產的 *C. himalayica* 與越南所產的 *C. himalayica* 在 cytochrome *b* 基因序列上有相當之差異 (Odachi, personal communication)，因此還需要比對中國大陸樣本後才能確定台灣，日本，越南各亞洲水鼩物種間確實之分類地位。

(2.) 台灣島內水鼩族群之親緣地理關係

本研究中共分析採自台灣 5 個地點共 11 隻 *Chimarrogale himalayica* 樣本 (圖二)。以 PCR 增幅其粒線體 DNA d-loop 片段後進行定序，共得到 d-loop 區域中 650 bp 之部分序列。11 個樣本內共發現 9 種 haplotype，有 15 個變異位點 (polymorphic site)。經軟體 Modeltest 篩選後，使用 HKY 模型來建立序列間親緣關係，以鄰接法與最大檢約法所建構的親緣關係樹結論大致相同 (圖三)，台灣的水鼩 haplotype 間可分成明顯 A、B 二個 phylogroup，有高的 bootstrap 支持度 (80% 以上)。若以地理位置來分析

此二群，則可發現大致以中部為分界，可分為北部以及西南部群。而在眉溪與拉拉溪此二採樣點中，A、B phylogroup 各佔有 1/2 的比率，顯示水鼩族群在中西部地區有頻繁的基因交流。Nested clade 分析亦支持此一結果（圖四），A、B phylogroup 之間有 4 個取代（substitution）差異。若和 Yuan et al. 2005 (in press)所做之台灣島內短尾鼩之親緣地理研究相比，水鼩在 d-loop 區域之變異量相當少，推測可能是最近一次冰河期才由大陸遷移來台，於台灣中西部河流登陸，而後沿河流域往台灣南、北拓殖。由於水鼩需要溪流環境供其遷移，目前台灣東部以及南部高雄，屏東等地尚未能發現其蹤跡，可證明其仍處於早期拓殖階段。

參考文獻

- 阿部永、石井信夫、金子之史、前田喜四雄、三浦慎悟、米田政明。2002。日本の哺乳類。東海大學出版會。日本。(in Japanese)
- Abe H. 1994. A pictorial guide to the mammals of Japan. Tokai University Press, Tokyo. (in Japanese)
- Abe, H. 2003. Trapping, habitat, and activity of the Japanese water shrew, *Chimarrogale platycephala*. Mammalian Science. **43**: 51-65. (in Japanese)
- Bradley, R. D., and R. J. Baker. 2001. A test of the genetic species concept: cytochrome-*b* sequences and mammals. Journal of Mammalogy **82**: 960-973.
- Corbet, G. B., and J. E. Hill. 1992. The mammals of the indomalayan region: a systematic review. Oxford University, USA.
- Corbet, G. B., and S. Harris. 1991. The handbook of British mammals. Blackwell Scientific Publications, London, UK.
- Dunstone N., and M. L. Gorman. 1998. Behaviour and ecology of riparian mammals. Cambridge University, UK.
- DuPasquier, A., and D. Cantoni. 1992. Shift in benthic macroinvertebrate community and food habits of the water shrew, *Neomys fodiens* (Soricidae, Insectivora). Acta Ecologica **13**: 81-99.
- Iwasa, M. A. 2005. Colonization history of the Japanese water shrew, *Chimarrogale platycephala*, in the Japanese Islands. (in press)
- Jones, G. S., and R. E. Mumford. 1971. *Chimarrogale* from Taiwan. Journal of Mammalogy **52**: 228-232.
- Jones, G. S., F. L. Huang, and T. Y. Chang. 1969. A checklist and the vernacular names of Taiwan mammals (excluding Sirenia, Pinipedia, and Cetacea): a review of the literature. Chinese Journal of Microbiology **2**: 47-65.

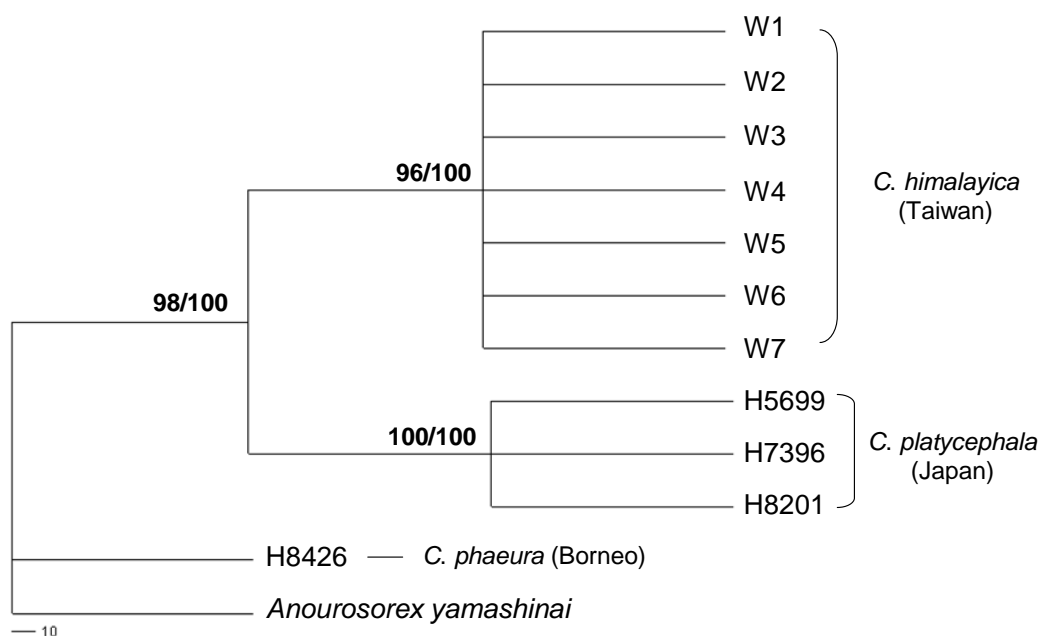
- Obara Y., and T. Tada. 1985. Karyotypes and chromosome banding patterns of the Japanese water shrew, *Chimarrogale himalayica platycephala*. Proceedings of Japan Academy **61 series B**: 20-23.
- Obara Y., J. Izumi, T. Tanaka, and J. Koseki. 1996. Heteromorphism of the No.1 homologue in the Japanese water shrew, *Chimarrogale himalayica platycephala*. Chromosome Information Service **61**: 20-22.
- Templeton, A. R., E. Routman, and C. A. Phillips. 1995. Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. Genetics **140**: 767-782.
- Templeton, A. R., K. A. Crandall, and C. F. Sing. 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction site endonuclease mapping and DNA sequence data. (III) Cladogram estimation. Genetics **132**: 619-633.
- Wilson, D. E., and D. M. Reeder. 1992. Mammal species of the world. Smithsonian Institution, USA.
- Yuan, S. L., L. K. Lin, and T. Oshida. 2005. Phylogeography of the mole-shrew (*Anourosorex yamashinai*) in Taiwan: implications of interglacial refugia in a high elevation small mammal. (in press)

表一、本研究中 *Chimarrogale* 屬三物種間的平均遺傳距離

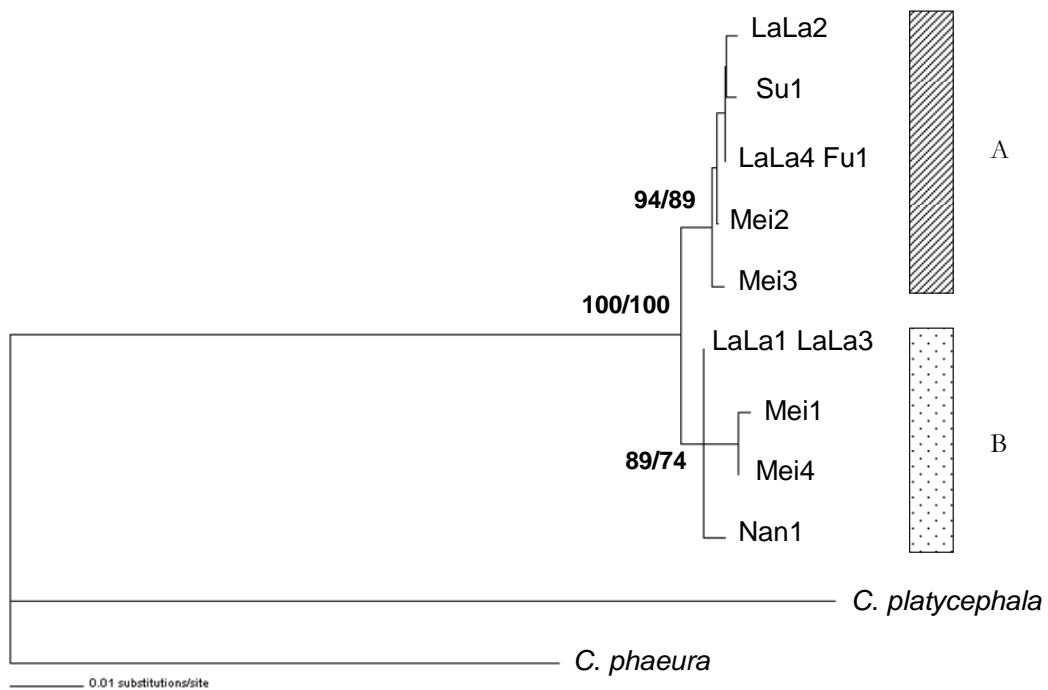
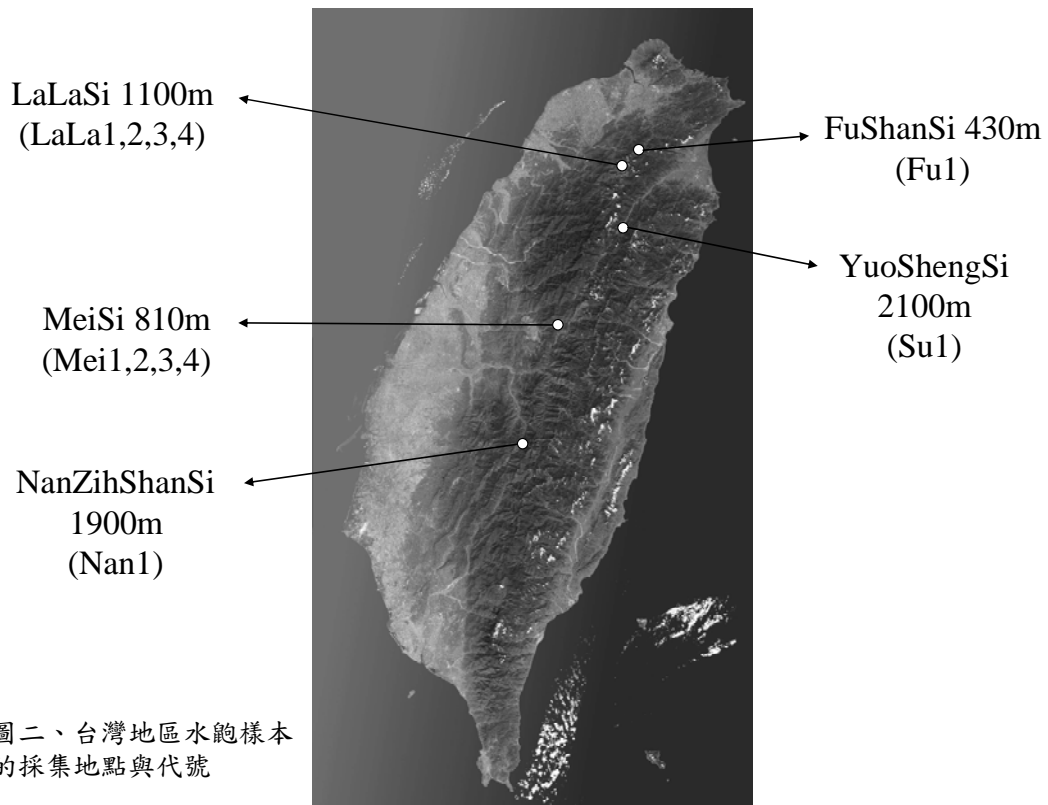
| | 1 | 2 | 3 |
|-----------------------------------|--------|--------|-------|
| 1. <i>C. himalayica</i> (Taiwan) | - | 0.156 | 0.298 |
| 2. <i>C. platycephala</i> (Japan) | 0.1073 | - | 0.297 |
| 3. <i>C. phaeura</i> (Borneo) | 0.1631 | 0.1638 | - |

左下：K2P distance

右上：TrN+G distance



圖一、以最大近似法分析三種亞洲水鼯 (*Chimarrogale*) 之 cytochrome *b* 序列所得之親緣關係圖 (1000次bootstrap支持度標示於各分支：ML/MP)



圖三、以鄰接法分析台灣之 *Chimarrogale himalayica* d-loop 序列所得之親緣關係圖 (1000次bootstrap檢定支持度標示於各分支：NJ/MP)

圖四、以nested clade法分析台灣之*Chimarrogale himalayica* d-loop序列所得之網狀關係圖

