

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

台灣南部動物地理區之淡水魚起源：條紋二鬚魚巴親緣地
理與族群遺傳結構之研究

研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型

計畫編號：NSC 96-2621-B-041-002-

執行期間：96年08月01日至97年07月31日

執行單位：嘉南藥理科技大學環境資源管理系

計畫主持人：鄭蕙玲

計畫參與人員：大學生-兼任助理：邱思婷、朱立曜

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 97年10月31日

96 年度成果報告

計畫名稱：台灣南部動物地理區之淡水魚起源—條紋二鬚鮑親緣
地理與族群遺傳結構之研究

計畫編號：NSC 96-2621-B-041-002-

執行機構：嘉南藥理科技大學

主持人：鄭蕙玲

前言

親緣地理(phylogeography)研究的是歷史與空間事件對於物種族群與地理事件之間的關係(Avise, 2000)，親緣地理除了用來檢視族群枝序分歧的歷史及空間內容之外，也常用於解釋相近緣族群之間的演化動態(Gifford *et al.*, 2004)。透過結合過去跟現代的生物地理學資訊以及分子訊息，親緣系統方法可以用來測試種內變異關係、演化模式及其過程的假說(e.g., Avise, 2000; Avise *et al.*, 1987; Emerson, 2002; Schneider *et al.*, 1998; Gifford *et al.*, 2004)。為族群遺傳學、演化生物學以及生態學提供了一個重要的前瞻性(Salzburger *et al.*, 2003)。初級性淡水魚類終生不下海，在地理分佈上，必須依賴水系的相連才可擴遷，故初級性淡水魚類在分佈上就具有『島嶼』的擴遷模式(Salzburger *et al.*, 2003)，因此其演化及分佈模式，常會反應出一個地區在古地質生物學上的複雜性，尤其是水系的發展、分離還有相連結的過程(Bermingham and Martin, 1998; Durand *et al.*, 1999)。由於此特性，初級性淡水魚類在地理分布上經常出現顯著的動物地理區(Meffe and Vrijenhoek, 1988)，因此藉著瞭解初級性淡水魚類的親緣地理，可以幫助我們瞭解此地區水系過去所經歷的歷史與演化事件。

條紋二鬚鯮 (*Puntius semifasciolatus*)，在分類上屬於鯉形目 (Cypriniformes)、鯉科 (Cyprinidae)、鯮亞科 (Barbinae) 的魚類，小鯮屬 (*Puntius*) 是典型的熱帶和亞熱帶魚類類群，主要生活在山澗溪流及敞水環境，本屬魚類主要分佈於青藏高原以南各水系，此屬在台灣有兩個種，一為史尼氏小鯮 (*Puntius snyderi*)，本種在 1919 年由大島正滿氏 (Oshima) 發表，為台灣特有種，主要分佈於台灣中部地區，另一種為條紋二鬚鯮 (*Puntius semifasciolatus*)，本種非特有種，主要分佈於中南半島及中國南部，在中國主要分佈於福建九龍江以南至海南島各水系，台灣則分佈於中央山脈以西，濁水溪以南各水系。條紋二鬚鯮在台灣分佈於濁水溪以南水系，在中國則分佈於九龍江以南各水系，若由地理上來看，此物種在分佈是沿著南嶺以南分佈，在台灣上可能亦因受限於北港高地而未往北分佈，屬於典型南水系起源物種，而僅分佈於台灣南部動物地理區的淡水魚，亦僅有此種非屬特有種，其他如何氏棘鯈 (*Spinibarbus hollandi*) 與高身鏟領魚 (*Varicorhinus alticorpus*) 均屬於特有種，並不適合作為起源路徑研究探討，因此，本研究將藉由條紋二鬚鯮族群間親緣關係，探討台灣南部魚類起源與中國水系之關係。

台灣由於板塊運動和冰河期影響的關係，初級性淡水魚類呈現極明顯的動物地理區系，台灣淡水魚類的動物地理區系最早是由大島正滿（Oshima, 1923）提出，他主張台灣的淡水魚類北部地區與中國舊北帶魚類魚類相似，南部地區則與珠江東洋區系相似，中間則為過渡地帶，Tzeng (1986) 則根據台灣淡水魚類的分布，將之區分為東部、南部和北、中部等三個動物地理區。根據過去的地質歷史，台灣和中國大陸因冰河時期來臨造成海平面下降，而有過數次的相連，初級性淡水魚類藉水系相連時期，分布到台灣島上，條紋二鬚鯮屬於台灣特有種，並分佈於台灣中部的過渡帶，推測此物種應屬於台灣獨立異域種化的物種。

粒線體 DNA 由於具有母系遺傳、不重組、演化速率較核 DNA 快約 5-10 倍等特性 (Futuyma, 1998)，常被應用於族群遺傳或親緣地理的研究，本研究利用粒線體 DNA 細胞色素 b 片段，研究台灣地區之條紋二鬚鯮族群，瞭解此瀕危物種族群間的關係與遺傳結構，並利用 Nested clade analysis 分析地理區間隔離與條紋二鬚鯮族群遺傳結構的關係，藉以評估並訂定正確的保育策略。

材料與方法

本研究在條紋二鬚鯮分佈之中國大陸福建省九龍江河系及台灣東港溪等七河系，共選取 11 個族群共 68 個個體，進行分析研究，詳細資料及各河系代號如表一。

野外採集樣本以 95% 酒精保存，攜回實驗室後，取部分肌肉組織，加入 DNA Extraction Kit 進行 DNA 萃取。我們以 L14724 (5'-GACTTGAAAAACCACCGTTG-3') 和 H15915 (5'-CTCCGATCTCCGGATTACAAGAC-3') (Xiao *et al.* 2001). 作為引子，進行 PCR 反應增幅粒線體 DNA 序列。每 $100\mu\text{L}$ PCR 反應中，包括 10 ng 的樣本 DNA、 $10\mu\text{L}$ 10 倍反應緩衝液、 $10\mu\text{L}$ 之 dNTP(8mM)、 $10\mu\text{L}$ 之氯化鎂 (25mM) 、10 pmole 之 L14724 與 H15915 引物與 4U of DNA 聚合酵素 (*Taq* polymerase, Promega, Madison, WI, USA)，以 MJ Thermal Cycler 進行 PCR 反應，反應步驟如下：以 95°C 進行 4 分鐘變性反應，再以 94°C 變性 45 秒、 46°C 進行黏合反應 1 分 15 秒， 72°C 進行延長反應 1 分 30 秒，此循環反應進行 30 個循環，最後進行十分鐘 72°C 延長反應，以 4°C 保存 PCR 產

物，所得產物以 1.0% 洋菜膠於 1×TAE 緩衝液進行電泳，最後以 gel purification kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) 進行純化，所得產物以 ABI 377XL automated sequencer (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) 進行序列定序。

DNA 分子序列以 CLUSTAL X 1.81 (Thompson *et al.*, 1997) 進行排序比對 (alignment)，所得結果再進行人為調整。neighbor-joining (NJ) tree 使用 Kimura 2-parameter distance 法為參數 (Kimura, 1980)，以 MEGA 2 (Kumar *et al.*, 2001) 套裝軟體進行親緣關係樹重建，再以 bootstrap 法進行 1000 次重排，以測驗親緣關係之可信度 (Felsenstein, 1985)。網狀親緣關係 (network) 以 MINSPNET (Excoffier and Smouse, 1994) 建立，以 Templeton *et al.* (1987) 與 Templeton and Sing (1993) 所提觀念進行 Nested claded analysis，最後以 GeoDis 2.0 (Posada *et al.*, 2000) 進行各 clade 與地理關係分析，所得結果依據 Templeton *et al.* (2004) 所提之檢索，進行各 Clade 經歷歷史事件描述。

各族群序列多型性變異利用 DnaSP vs. 3.95 (Rozas and Rozas, 1999) 套裝軟體進行分析，以核苷酸變異值 (nucleotide diversity (θ) (Jukes and Cantor, 1969), nucleotide diversity (π) (Nei, 1987)) 與單型多樣性 (haplotype diversity (h) (Nei and Tajima, 1983)) 描述，族群間基因交流值 (F_{ST}) 亦利用 DnaSP vs. 3.95 (Rozas and Rozas, 1999) 進行分析，測試族群間與地理區間遺傳變異程度，則利用 Arlequin Ver. 2000 (Excoffier *et al.*, 2000) 套裝軟體以 AMOVA 方式分析，其中 ψ_{CT} 為地理區間的分化程度， ψ_{ST} 為族群間的分化程度， ψ_{SC} 為地理區內族群間的分化程度。為了解條紋二鬚鮑族群在過去歷史中，是否經歷族群波動，本研究利用 DnaSP vs. 3.95 軟體，進行 Tajima's *D* 測驗與 mismatch distribution (Rogers and Harpending, 1992) 分析。

結果

本研究利用 PCR 增幅粒線體 DNA 完整細胞色素 b (cytochrome b) 片段，我們所得長度為 1140bp，在序列鹼基對比例方面，A 所佔比例為 31.1%，T 佔約 29.8%，C 佔約 24.9%，G 佔約 14.3%，呈現 A-T rich，此特徵在其他魚類亦有報導 (Wang *et al.*, 2000; Perdices *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004)。

我們在條紋二鬚鮑 68 個個體中得到了 31 個單型 (haplotype) , 平均單型多樣性 (h) 為 0.960 , 顯示條紋二鬚鮑族群依然維持較高的遺傳多樣性 , 核苷酸歧異值 (θ , π) 以北江的陽山族群 (YS) 為最低 ($\theta=0.0007$, $\pi=0.0005$) , 九龍江的白沙族群 (BA) 為最高 ($\theta=0.0158$, $\pi=0.0158$) , 各族群 θ 與 π 的平均值分別為 0.0132 與 0.0110 (表一) 。利用 DNAsp 估算族群間分化指數 (F_{ST}) , 條紋二鬚鮑以北江的韶關族群與其他河系族群之分化指數較高 (0.16-0.90) , 韓江的大埔族群與其他河系之族群分化相對較低 (0.00-0.45) , 族群間分化指數平均值為 0.538 , 顯示族群間具高度分化 (表二) 。

利用 MEGA4 以 Neighbor-joining 法重建條紋二鬚鮑親緣關係圖 (圖一) , 圖中可以清楚分為四群 , 分別為 A 群 : 東港溪的五溝水族群 (WG) ; B 群包括榕江的豐順族群 (FZ) 、韓江的大埔族群 (DP) 與九龍江的連城族群 (LC) 部分個體 ; C 群 : 漠陽江的韶安族群 (SN) 、九龍江的連城族群 (LC) 部分個體與東江的惠州族群 (HG) 部分個體 ; 以及 D 群 : 九龍江的白沙族群 (BA) 部分個體、東江的惠州族群 (HG) 部分個體、東江的龍川族群 (LS) 與北江的韶關族群 (SU) 。

族群擴張歷史測驗上 , 利用 Tajima's D test 檢測 , 結果顯示族群的 D 值呈現負值的有九龍江等六個族群 , 顯示條紋二鬚鮑在過去經歷過族群擴張現象 (表四) , mismatch distribution 分析上 , 將所有個體併入進算 , 條紋二鬚鮑族群呈現多高峰型 , 顯示此物种過去至少發生過一次的族群擴張 (圖二、三) 。

討論

以 Neighbor-joining 法所建構的親緣樹中發現 , 條紋二鬚鮑族群可區分為四個 monophyletic group , 其中東港溪的五溝水族群 (WG) (A 群) 形成單系群 , 顯示這個族群與其他族群具有較長的隔離歷史 , 與其他族群已經分化。

在族群遺傳結構分析上 , 條紋二鬚鮑族群在平均單型多樣性 (h) 為 0.96 , 顯示條紋二鬚鮑族群具有極高的遺傳多樣性 , 此特徵與台灣鏟領魚 (*Varicorhinus barbatulus*, $h=1.0 - 0.70$, Wang *et al.*, 2004) 類似 , 但在核苷酸歧異值 (θ 與 π 值) 上 , 其平均值分別為

0.013與0.011（表一），此值與其他鯉科魚類相比是較低的，例如：*Leuciscus souffia* ($\theta = 0.056$) (Salzburger *et al.*, 2003)，但是若與台灣其他魚類相比，則此值是相近的，如台灣石賓*Acrossocheilus paradoxus* ($\theta = 0.0103$) (Wang *et al.*, 2000)與*Varicorhinus barbatulus* ($\theta = 0.01033$) (Wang *et al.*, 2004)。在各族群的核苷酸歧異值上，我們發現以白沙族群為最高 ($\theta = 0.0158$)，此結果可能是因為大甲溪族群，因具有較穩定族群量，所以可以累積較多的變異，而核苷酸歧異值最低的族群為陽山群 ($\theta = 0.0005$)，該族群零散存在於數處小水池中，族群量極小，有滅絕之虞，條紋二鬚鮑族群核苷酸歧異值較低，可能是過去曾經受到瓶頸效應 (bottleneck) (Frank *et al.*, 1998)，或是棲地破碎化 (habitat fragment) 的影響，單型多樣性(h) 和核苷酸歧異值(π)的變異模式，可以用來推斷族群過去所經歷之歷史事件，若根據Grant and Bowen (1998)所提出之意見，當族群具有高的 h 和低的 π (i.e., $h > 0.5$, $\pi < 0.5\%$)，可以推測此族群過去可能經歷過瓶頸效應，之後伴隨著快速族群增長的歷史事件。

利用DNAsp估算族群間分化指數 (F_{ST}) 可推論條紋二鬚鮑的遺傳分化程度，我們發現條紋二鬚鮑族群間分化指數平均值為0.538，各族群間的分化指數以韓江大埔族群 (DP) 與九龍江連城族群 (LC) 相對較低 ($F_{ST} = 0.000$)，以北江陽山族群 (YS) 與北江韶關族群 (SU) 相對較高 ($F_{ST} = 0.90$)，顯示條紋二鬚鮑各族群間具高度分化 (表二)，一般而言，初級性淡水魚類因為河系的阻隔，通常會具有較高的遺傳分化 (Ward *et al.*, 1994)，條紋二鬚鮑的分化指數 (F_{ST}) 高於其他淡水魚類平均值 ($F_{ST} = 0.22$; Ward *et al.*, 1994)，但與台灣其他淡水魚類 (*Varicorhinus barbatulus*, $F_{ST} = 0.791$, Wang *et al.*, 2004) 相比，此值是相當的，顯示條紋二鬚鮑因為長期的水系隔離，各族群間具有高度明顯的分化。

Tajima's *D*測驗與mismatch analysis可以幫助我們瞭解族群間是否經歷過族群擴張事件 (population expansion)，Tajima's *D*值在非轉譯序列上，若呈現負值且顯著時，顯示此族群曾經經歷過族群擴張，而mismatch analysis上，若在核甘酸變異分析上呈現多峰型，亦顯示這個物種曾經經歷過族群擴張，條紋二鬚鮑在各族群內的Tajima's *D*均呈現負值且顯著 (表四)，在mismatch analysis上，亦呈現多峰型 (圖三)，顯示條紋二鬚

鰈族群過去呈現族群擴張的情形，這個結果和台灣另二種初級性淡水魚類是類似的（*Acrossocheilus paradoxus*, Wang et al., 2000; *Varicorhinus barbatulus*, Wang et al., 2004），台灣河川大部分屬於荒溪型態，冬季枯水期與夏季的洪水，可能是造成淡水魚類族群呈現週期性變化的原因。



參考文獻

- Avise JC. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Avise JC, Arnold J, Ball JR, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA and Saunders NC. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18: 489–522.
- Bermingham E and Martin AP. 1998. Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fish: testing shared history of infer the evolutionary landscape of lower Central America. *Mol. Ecol.* 7, 499-517
- Blin N and Stafford DW. 1976. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucl. Acids Res.* 3: 2303-2308.
- Durand JD, Persat H and Bouvet Y. 1999. Phylogeography and postglacial dispersion of the chub (*Leuciscus cephalus*) in Europe. *Mol. Eco.* 8: 989-998.
- Emerson BC. 2002. Evolution on oceanic islands: molecular phylogenetic approaches to understanding pattern and process. *Mol. Ecol.* 11: 951–966.
- Excoffier L. and Smouse PE. 1994. Using allele frequencies and geographic subdivision to reconstruct gene trees within a species: molecular variance parsimony. *Genetics* 136: 343-359.
- Excoffier L, Smouse PE and Quattro JM. 2000. Analysis if molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 136: 343 – 359.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Franck P, Garnery L, Solignac M and Cornuet JM. 1998. The origin of West European subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): new insights from microsatellite and mitochondrial data. *Evolution* 52: 1119–1134.

- Futuyma DJ. 1998. Evolutionary Biology, 3rd edn. Sinauer, Sunderland, MA.
- Gifford ME, Powell R, Larson A and Ronald LG. 2004. Population structure and history of a phenotypically variable teiid lizard (*Ameiva chrysolaema*) from Hispaniola: the influence of a geologically complex island Mol. Phylogenetic Evol. 32: 735-748.
- Grant W and Bowen BW. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. J. Hered. 89: 415 - 426.
- Jukes TH and Cantor CR. 1969. Evolution of protein molecules. In: Mammalian Protein Metabolism (ed. Munroled HN). Academic Press, New York, Pp. 31–132.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Mol. Ecol. 16:111-120
- Tamura K, Dudley J, Nei M and Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 10.1093/molbev/msm092.
- Meffe GK and Vrijenhoek RC. 1988. Conservation genetics in the management of desert fishes. Conserv. Biol. 2: 157 – 169.
- Nei M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York.
- Nei M and Tajima F. 1983. Maximum likelihood estimation of the number of nucleotide substitutions from restriction sites data. Genetics 105: 207-217.
- Oshima M. 1923. Studies on the distribution of freshwater fishes of Taiwan and discuss the geographical relationship of the Taiwan island and the adjacent area. Zool. Mag. 35: 1-49.
- Perdices A, Cunha C and Coelho MM. 2004. Phylogenetic structure of *Zacco platypus* (Teleostei, Cyprinidae) populations on the upper and middle Chang Jiang (= Yangtze) drainage inferred from cytochrome b sequences. Mol. Phylogenetic Evol. 31: 192–203.
- Posada D, Crandall KA and Templeton AR. 2000. GeoDis: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. Mol. Ecol. 9: 487–488.

- Rogers, A.R., Harpending, H., 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.* 9, 552-569.
- Rozas J and Rozas R. 1999. DnaSP version 3.0: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics* 15: 174-175.
- Salzburger W, Brandstatter A, Gilles A, Parson W, Hempel M, Sturmbauer C and Meyer A. 2003. Phylogeography of the vairone (*Leuciscus souffia*, Risso 1826) in Central Europe. *Mol. Ecol.* 12: 2371-2386
- Schneider CJ, Cunningham M and Moritz C. 1998. Comparative phylogeography and the history of endemic vertebrates in the wet tropical rainforests of Australia. *Mol. Ecol.* 7: 487-498.
- Templeton AR, Boerwinkle E and Sing CF. 1987. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I. Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. *Genetics* 117: 343-351.
- Templeton AR and Sing CF. 1993. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. IV. Nested analyses with cladogram uncertainty and recombination. *Genetics* 134: 659-669.
- Templeton AR. 2004. Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. *Mol. Ecol.* 13: 789-809.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F and Higgins DG. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acid Res.* 24: 4876-4882.
- Tzeng CS. 1986. Distribution of the freshwater fishes of Taiwan. *J. Taiwan Mus.* 39: 127-146.
- Wang JP, Hsu KC and Chiang TY. 2000. Mitochondrial DNA phylogeography of *Acrossocheilus paradoxus* (Cyprinidae) in Taiwan. *Mol. Ecol.* 9: 1483-1494

Wang JP, Lin HD, Huang S, Pan CH, Chen XL and Chiang TY. 2004. Phylogeography of Varicorhinus barbatulus (Cyprinidae) in Taiwan based on nucleotide variation of mtDNA and allozymes. Mol. Phylogenet. Evol. 31: 1143 – 1156.

Ward, R.D., Woodwark, M., Skibinski, D.O.F., 1994. A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes. J. Fish Biol. 44, 213-232.

Xiao W, Zhang Y, Liu H (2001) Molecular systematics of Xenocyprinae (Teleostei: Cyprinidae): taxonomy, biogeography, and coevolution of a special group restricted in East Asia. *Molecular Phylogenetics Evolution*, 18, 163–173.



Table 1. Materials of *Puntius semifasciolatus* used for mtDNA analyses and nucleotide and haplotype diversities in each population.

Region subregion	Populations (Abbreviation)	Sample size	Haplotype numbers	Haplotype Diversity (<i>h</i>)	Nucleotide diversity (π)	Nucleotide diversity (θ)
Mainland China		49	28	0.963	0.01149	0.01282
JiuLong River		7	5	0.905	0.00995	0.01111
	LianCheng (LC)	4	2	0.667	0.00351	0.00287
	BaiSha (BA)	3	3	1.000	0.01580	0.01580
Han River						
	DaPu (DP)	3	2	0.667	0.01462	0.01462
MoYang River		4	4	1.000	0.00366	0.00383
	ShaoAn (SN)	3	3	1.000	0.00293	0.00293
	ChihShih (ZS)	1	--	--	--	--
Rong River	FongShun (FZ)	11	6	0.836	0.00278	0.00479
Pearl River		24	14	0.931	0.01302	0.01010
Dong River		12	8	0.894	0.01259	0.00959
	HuiZhou (HG)	7	4	0.810	0.01337	0.01038
	LongChuan (LS)	5	5	1.000	0.01088	0.01053
Bei River		12	7	0.833	0.01295	0.00988
	YangShan (YS)	7	3	0.524	0.00050	0.00072
	ShaoGuan (SU)	5	4	0.900	0.00368	0.00379
Taiwan						
DongGang River						
	WuGouShui (WG)	7	4	0.810	0.00267	0.00215
Total		68	31	0.960	0.01102	0.01321

Table 2. Matrix of pairwise nucleotide diversity (%) ; above diagonal) and F_{ST} (below diagonal) between 9 populations of *Puntius semifasciolatus* based on mtDNA.

	LC	BA	DP	SN	FZ	HG	LS	YS	SU
BA	0.17								
DP	0.00	0.22							
SN	0.003	0.14	0.009						
FZ	0.34	0.21	0.05	0.47					
HG	0.28	0.10	0.12	0.26	0.38				
LS	0.56	0.01	0.01	0.58	0.56	0.03			
YS	0.56	0.01	0.16	0.67	0.36	0.45	0.63		
SU	0.84	0.43	0.45	0.85	0.85	0.42	0.16	0.90	
WG	0.48	0.28	0.14	0.58	0.34	0.43	0.59	0.25	0.86

Table 3. *Puntius semifasciolatus*. Point estimates and 95% confidence intervals for joint estimates of Θ and migration (Nm) in lingcod from MIGRATE.

Population	Θ	M (m/mu) [+receiving population]							
		n [x] [x Ne mu]	1,+ 003	2,+ 014	3,+ 014	4,+ 014	5,+ 014	6,+ 014	7,+ 014
JR	0.0156	- 003	1.04e+ 003	9.36e- 014	9.36e- 014	9.36e- 014	9.36e- 014	9.36e- 014	9.36e- 014
DP	0.0021	7.83e- 013	- 003	1.72e+ 013	7.83e- 013	7.83e- 013	7.83e- 013	7.83e- 013	7.83e- 013
MR	0.0094	9.62e- 014	9.62e- 014	- 014	9.62e- 014	9.62e- 014	2.46e- 013	9.62e- 014	
FZ	1.07e+013	9.93e- 013	9.93e- 013	1.92e+ 003	- 003	9.93e- 013	9.93e- 013	9.93e- 013	9.93e- 013
ER	3.03e+011	1.07e- 013	1.07e- 013	3.47e+ 003	1.07e- 013	- 013	1.07e- 013	1.07e- 013	1.07e- 013
NR	2.78e+008	1.35e+ 003	3.04e- 010	4.05e+ 003	3.04e- 010	3.04e- 010	- 010	3.04e- 010	
WG	0.0033	1.08e- 013	1.08e- 013	1.08e- 013	1.08e- 013	670.67	1.08e- 013	- 013	

Table 4. Tests of neutrality statistics in 11 populations of *Puntius semifasciolatus* in Taiwan.

Area	Population	Tajima's D	Fu and Li's D	Fu and Li's F	Fu's Fs
Mainland		-0.36410	-1.78974	-1.51205	-4.045*
China					
JiuLong River		-0.59571	-0.47489	-0.55470	1.928
	LianCheng (LC)	2.15629	2.15629*	2.07262	3.526*
	BaiSha (BA)	-----	-----	-----	-----
Han River					
	DaPu (DP)	-----	-----	-----	-----
MoYang River		-0.44637	-0.44637	-0.43935	-0.769
	ShaoAn (SN)	-----	-----	-----	-----
	ChihShih (ZS)	-----	-----	-----	-----
Rong River	FongShun (FZ)	-1.87589*	-2.27768*	-2.46367*	-0.403*
Pearl River					
Dong River		1.41463	0.66298	0.97998	1.699
	HuiZhou (HG)	1.63764	1.17229	1.41033	4.638*
	LongChuan (LS)	0.24809	0.24809	0.26673	-0.060
Bei River		1.40617	0.69185	1.00183	3.080
	YangShan (YS)	-1.23716	-1.29591	-1.37408	-0.922
	ShaoGuan (SU)	-0.19740	-0.19740	-0.20752	0.212
Taiwan					
DongGang River		-----	-----	-----	-----
	WuGouShui (WG)	1.24188	0.95066	1.10677	0.690
Total		-0.57406	-1.87362	-1.65461	-5.385*

*P < 0.05, ** P < 0.01, ***P < 0.001

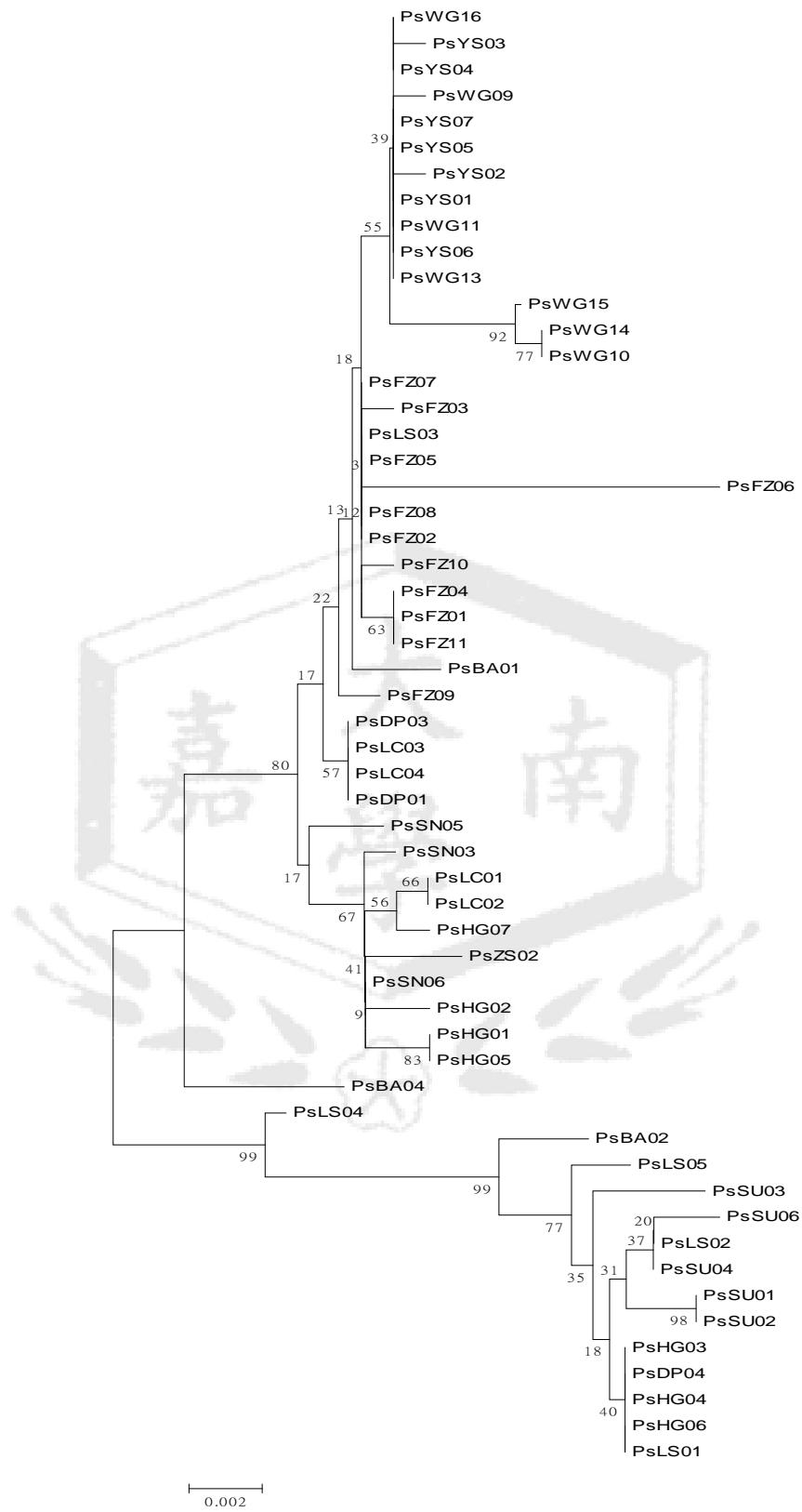


Fig. 1. Neighbor-Joining tree based on mtDNA Cyt-b gene in *Puntius semifasciolatus*. Numbers at the nodes indicate bootstrap values (expressed as percentage) with 1,000 replicates

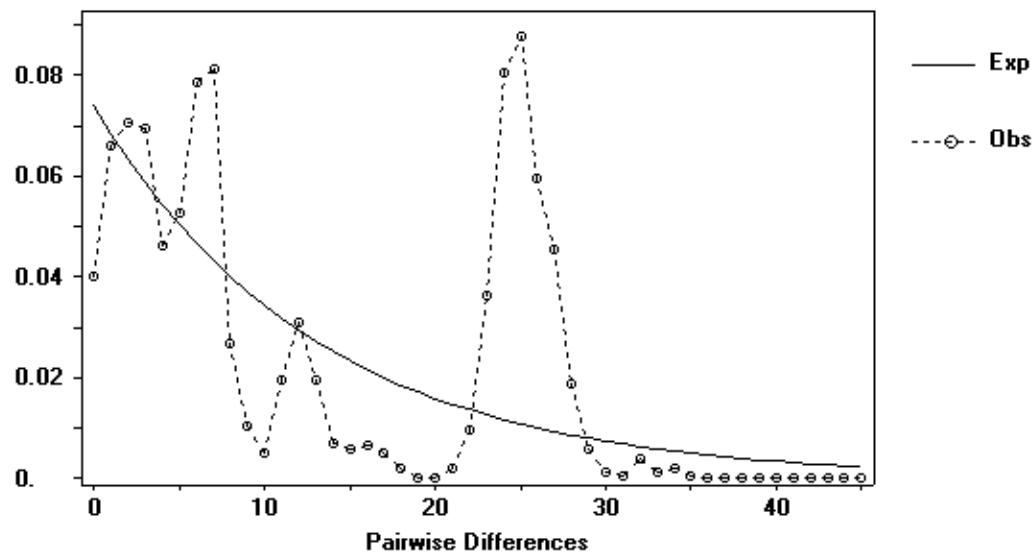


Fig. 2. Mismatch-distribution analysis of *Puntius semifasciolatus* mtDNA haplotype sequences from Taiwan and Mainland China. A simulated Poisson distribution is indicated by a dotted line.

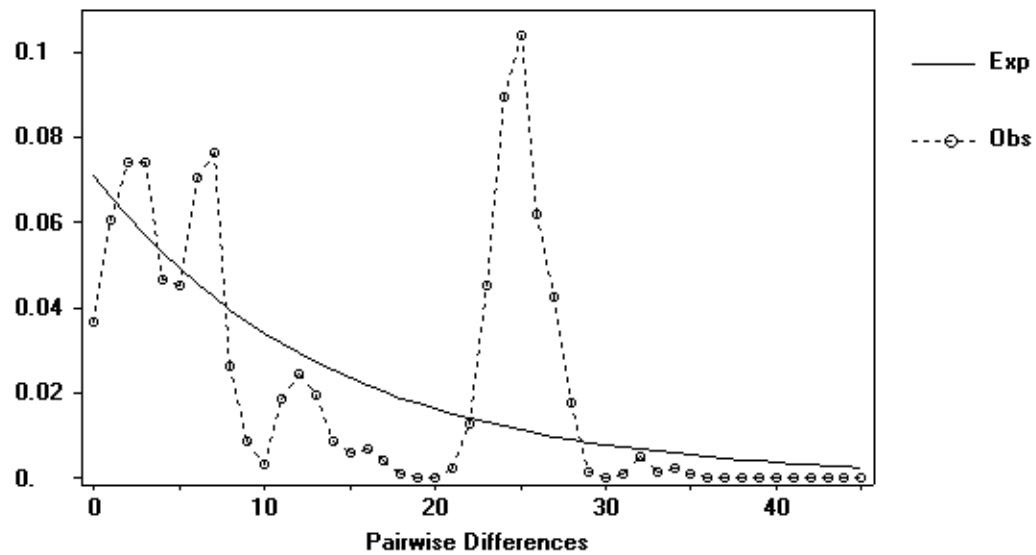


Fig. 3. Mismatch-distribution analysis of *Puntius semifasciolatus* mtDNA haplotype sequences from Mainland China. A simulated Poisson distribution is indicated by a dotted line.

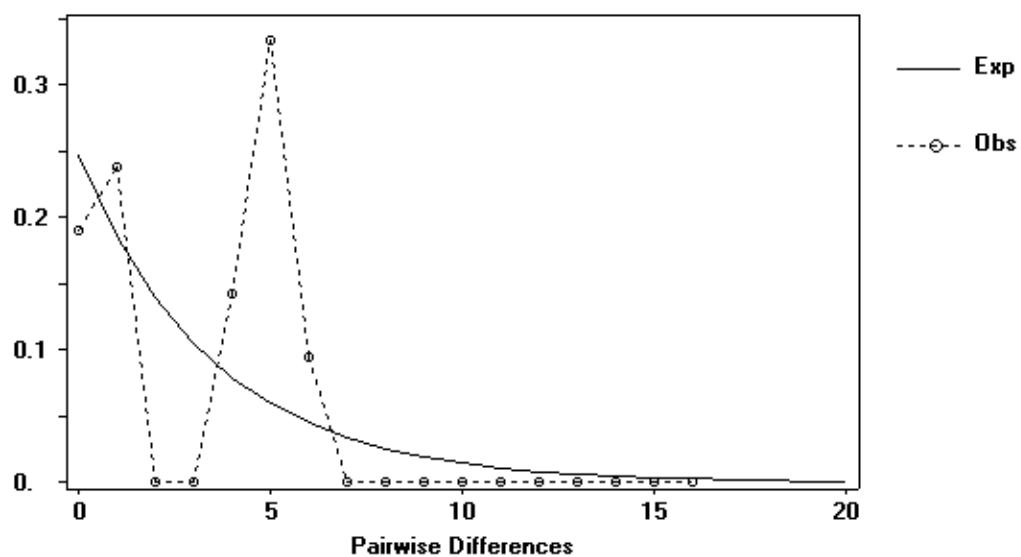


Fig. 4. Mismatch-distribution analysis of *Puntius semifasciolatus* mtDNA haplotype sequences from Taiwan. A simulated Poisson distribution is indicated by a dotted line.