

國立屏東科技大學野生動物保育研究所

碩士學位論文

玉山國家公園大分地區臺灣黑熊遺傳多樣性之初探

Preliminary Study of Genetic Diversity of Formosan black  
bears(*Ursus thibetanus formosanus*) in Dafen of  
Yushan National Park

指導教授：黃美秀 博士

翁國精 博士

研究生：何冠助

中華民國 101 年 7 月 29 日

## 摘要

學號：M9717012

論文題目：玉山國家公園大分地區臺灣黑熊遺傳多樣性之初探

總頁數：85

學校名稱：國立屏東科技大學 系（所）別：野生動物保育研究所

畢業時間及摘要別：100 學年度第 2 學期碩士學位論文摘要

研究生：何冠助

指導教授：黃美秀 博士

翁國精 博士

論文摘要內容：

過去針對臺灣黑熊的遺傳研究，都是著重於亞種的分類，並沒有針對臺灣黑熊族群進行評估其遺傳多樣性，本實驗採用非侵入性採集法 (Non-invasive sampling method)，去收集黑熊樣本供實驗需要，此方法已被廣泛用來評估密度較低或活動範圍較大的物種。

本研究從 2008 年 2 月至 2009 年 1 月間，於玉山國家公園大分地區利用毛髮陷阱(Hair trap)收集臺灣黑熊之毛髮樣本，利用穿越線收集排遺樣本，利用擴增 6 組微衛星基因座來辨識黑熊個體，利用性別引子確認個體性別。

我們分析熊毛髮 (n=112) 及排遺樣本 (n=290)，6 個基因座的 PCR 擴增成功率分別為 47% 及 34%，且分別檢定出 30 及 48 個體，兩種樣本重複判定出 13 隻個體，共辨識出 65 隻不同的個體，其中 27 隻雌性、33 隻雄性、5 隻為未知性別，未達顯著偏離性別平衡。6 個微衛星基因座之等位基因的數目為 4-8 個 ( $6.33 \pm 0.151$ )，個體鑑別率為  $1.381E-06$ ；觀測異質度為 0.754，與理論值接近 (0.744)，多態信息量 (Polymorphism Information Content, PIC) 皆大於 0.5；結果顯示本研究採用雖然整體族群經哈溫定律平衡測試，顯著偏離哈溫平衡 ( $p < 0.05$ )，但  $F_{IS}$  值 (近親交配指數, Inbreeding coefficient) 為極小的 0.013，此數值極小應可忽略的，

大分地區的黑熊應為隨機交配。有 90%(59/65)的黑熊個體在青剛櫟結果季(10 月至隔年一月)出現在大分地區，其相對變化量與同時期的自動相機資料相符。

與 21 個北美洲的美洲黑熊與棕熊的遺傳多樣性相較，大分地區黑熊能處於一個高遺傳多樣性的狀況。本研究發現族群偏離哈溫定律平衡(Hardy-Weinberg equilibrium, HWE)，但由於缺乏了長期追蹤個體的資料，與大分地區以外的樣本佐證，難以確實推測其原因。

關鍵詞：非侵入性採樣法、微衛星基因座、毛髮陷阱、排遺、青剛櫟結果季

## Abstract

Student ID: M9717012

Title of Thesis: Preliminary Study of Genetic Diversity of Formosa black bears (*Ursus thibetanus formosanus*) in Dafen of Yushan National Park

Total Page: 85

Name of Institute: Institute of Wildlife Conservation, National Pingtung University of Science and Technology

Graduate Date: July, 2012

Degree Conferred: Master

Name of Student: Guan-Zhu He

Adviser: Dr. Mei-Hsiu Hwang

Dr. Guo-Jing Weng

The Contents of Abstract in This Thesis :

Over the past decade, genetic studies of the Formosan black bear were forces on classification of the subspecies. There is no study of assess genetic diversity of Formosan black bear populations. Noninvasive sampling methods have been widely used to estimate elusiveness or abundance of animals. The Formosan black bear (*Ursus thibetanus formosanus*), an endemic subspecies of Asiatic black bear (*U. thibetanus*) inhabiting Taiwan, has been listed as a locally endangered species during past decades. Although intensive ecological research programs have been conducted in Yushan National Park (YNP) since 1998, there have not been attempts to estimate the bear abundance. It is difficult to collect data from range-free and small populations in remote and rugged terrain like our study area.

The area in study was searched for Formosan Black bear feces and sampled hair snared from baited traps from February 2008 to January 2009, in a monthly basis. For every sample was amplified using 6 microsatellite locus.

We analyzed 112 hair and 290 fecal samples, which yielded 47% and 34% of the successful DNA amplification rates, respectively. The genotyping based on 5 microsatellite loci for individual identification indicated the presence of 30 and 48 individuals, from hair and fecal samples, respectively. As a result, a total of 65 different individuals were identified and the population estimation was further conducted and discussed. The average number of alleles per locus was  $6.33 \pm 1.51$ , ranging from 4 to 8. The overall observed heterozygosity was 0.754, which was close to the expected heterozygosity (0.744). The overall  $F_{IS}$  value was 0.013. The result revealed an acceptable level of genetic diversity of the YNP population. Almost 90% were detected in the acorn season (October up to next January).

The masting season of *Cyclobalanopsis glauca* in 2008 likely attracted a highly dense congregation of bears. Considering the bear movement pattern for seeking food and the fact that all our effective samples collected in non-acorn season were hair samples, we suggest that hair traps should be technically feasible and suitable for areas with sparsely distributed populations.

Key words: Non-invasive sampling method, Microsatellite loci, Fecal, Hair trap, Acorn season

## 謝誌

從大四讀到碩四，四年光陰如梭，從碩士到碩四。研究所去了不少地方，學了不少東西，對人對事都有全新的看法，看盡人心不古，有事情能推就推，人前人後一個樣，到處說人事非；有人則是古道熱腸，保持著我為人人，人人位我的精神。這條求學路上，有許多的顛簸，但貴人何其多，讓我完成了了這一本論文，以下感謝他們出現在我的生命中，也謝謝他們讓我胡亂撒野。

在這四年，感謝我的指導教授，黃美秀老師，雖然我老是跌跌撞撞，但是你的堅持與熱誠，讓我體會到做科學，不是辦家家酒。並熱情贊助我許多物質及精神上的支持，讓我可以支持到現在。

感謝我的共同指導，翁國精老師，我真的很皮，你卻苦口婆心的指導我，跟使我在這條路上，雖然走的不是如意，但也是平安的走過。野保所的感情，在各大專院校的研究所排行榜，應該是一等一，每個老師熱心教學，同輩間的交流等，都讓我精進不少。

遙想當年，第一次上大分，我還是什麼都不懂的菜鳥，阿輝（林廷輝）與林大哥（林淵源）帶我走到了大分，中途我還中暑、走到一半滑到步道下面，因為穿硬底登山鞋，而滑倒近百次，後來登山鞋就被束之高閣，之後就被雨鞋所取代，但對臺灣這一片自然生態有更進一分的認識，讓我知道野外研究的辛苦、大自然與在下的脫節，種下了不解之緣(可能是屁股跟大地之母親接觸百次，產生了一種情愫)。

這四年來，有許多的過客與朋友。以下列舉出在四年的朋友：郭熊（彥仁），這小子找我總是沒好事，舉凡車壞掉，找論文等，對於他給我的一句話就是：沒新聞就是好新聞，兩個大男人，在查查牙賴山上，因為下著大雨，打著赤膊收著自動相機資料，睡在兩人帳中(真的很擠)，走在原本可以開車到達的林道上兩天(原本開車幾個鐘頭就到，因為道路坍塌，只能用步行)，還有平常跟我喇賽，消除壓力，與賴均銘（Jimmy）一樣都是打球打屁聊天、分享見聞的好夥伴。

一起去大分的朋友：王育慧、阿德（張書德）、俞佑、菜圃（俊傑）、冠甫、小八（匡洵）、嘉孜、郁葶、菜鴨、秀芬。

在實驗室實驗部份，感謝臺北市立動物園動物組長石芝菁，與助理

侯宣伊與謝育錚提供技術與實驗場地，臺灣師範大學李壽先老師與助理夜佳芬協助分析樣本。在破萬個 PCR 實驗中，PCR 小管、Pipetman，真是我的好朋友，日復一日與他相處，實驗期間，有一度右手大拇指肌腱發炎。

還有許多朋友沒被提到，我也懶得打字了表揚你的功績？在下面感謝你讓我在你生命中的小角落胡鬧，以下：蔡佳容(渣)、翁偉雄(no尾)、梁書愉(豬皮)、曾心怡(胖胖)、李逸昕、李濠汎、王笠、王彤、郭亦穎、與蘭嶼的無餓不坐。特別感謝餅乾小姐的讓座，讓我的人生中又有另一番田地，遇到錢曉薇跟他寶貝狗女兒 Sunday。

最終感謝山神、土地公與嘉義新港鄉奉天宮媽祖的保佑，讓我在山上亂跑，都可以平安的回家，賜給我如此多的樣本與經驗，希望山裡的萬物神靈，可以永續長存。

冠助 2012/8/13

## 目錄

摘要.....	I
Abstract .....	III
謝誌.....	V
目錄.....	VII
圖表目錄.....	IX
壹、前言.....	1
一、臺灣黑熊之遺傳研究現況.....	1
二、非侵入性採樣法與應用.....	3
三、分子生物技術運用在野生動物的保育遺傳管理.....	3
四、台灣黑熊與櫟實之關係.....	6
五、研究目標.....	7
貳、方法.....	8
一、研究樣區.....	8
二、樣本採集.....	8
(一) 毛髮採集.....	8
(二) 排遺採集.....	9
三、實驗室分析.....	10
(一) 樣本篩選與 DNA 萃取.....	10
(二) PCR 擴增微衛星 DNA 片段.....	12
(三) 基因型的判定.....	13
(四) 性別鑑定(Sex determine).....	15
四、資料分析.....	16
參、結果.....	18
一、樣本採集與實驗室分析.....	18
(一) 毛髮樣本採集、篩選與 DNA 萃取.....	18
(二) 排遺樣本採集、篩選與 DNA 萃取.....	18
(三) 排遺樣本新鮮程度與微衛星擴增成功率.....	19
(四) 個體判定.....	19
(五) 個體與樣本數量頻度分析.....	20

二、個體之性別鑑定 .....	21
(一) 毛髮樣本 .....	21
(二) 排遺樣本 .....	21
(三) 毛髮與排遺樣本合併分析 .....	21
三、遺傳多樣性 .....	22
(一) 毛髮樣本 .....	22
(二) 排遺資料 .....	22
(三) 毛髮與排遺樣本合併分析 .....	22
肆、討論 .....	24
一、非侵入性採樣法之討論 .....	24
(一) 毛髮樣本 .....	24
(二) 排遺樣本 .....	25
(三) 基因型判斷錯誤(Genotyping error)之影響 .....	27
二、大分地區臺灣黑熊遺傳多樣性 .....	27
(一) 6個基因座探討 .....	27
(二) 大分地區之黑熊遺傳多樣性 .....	28
三、黑熊在大分地區的族群結構與月份之關係 .....	30
伍、結論 .....	33
參考文獻 .....	34
附錄 1、2008 年 3 月至 2009 年 2 月，大分地區所有毛髮陷阱位點資料 .....	52
附錄 2、排遺新鮮度說明 .....	53
附錄 3、10 組微衛星基因座引子序列及 PCR 擴增時的黏合溫度 .....	55
附錄 4、6 個基因座在 MEGABASE 上判斷的波形圖 .....	56
附錄 5、毛髮陷阱採樣流程 .....	59
附錄 6、排遺採樣流程 .....	64
附錄 7、本實驗 6 個微衛星基因座波形圖與動物園石芝菁等人實驗比較圖 .....	67
作者簡介 .....	85

## 圖表目錄

圖 1、大分研究樣區長期調查樣線及樣點的分布.....	42
圖 2、臺灣黑熊排遺樣本進行性別鑑定之電泳膠圖.....	43
圖 3、臺灣黑熊排遺樣本在 6 組微衛星基因座擴增成功率與排遺樣本新鮮程度之關係圖.....	44
圖 4、毛髮及排遺樣本以非侵入性採樣法採集樣本之頻度與個體關係圖.....	45
圖 5、2008 年 2 月至隔年 1 月大分地區利用毛髮及排遺樣本判定出臺灣黑熊個體及性別的各月變化圖.....	46
表 1、表 1、2008 年 2 月至 2009 年 1 月各月所採集的毛髮與排遺樣本數、進行初步篩選樣本數、擴增成功樣本數及辨識個體數.....	47
表 2、2008 年 2 月至 2009 年 1 月，大分地區每月臺灣黑熊毛髮及排遺樣本所辨識出個體與性別表。.....	48
表 3、2008 年 2 月至 2009 年 1 月，大分地區臺灣黑熊毛髮樣本之 6 個微衛星基因多樣性表 (n=30).....	49
表 4、2008 年 2 月至 2009 年 1 月，大分地區臺灣黑熊毛髮樣本之 6 個微衛星基因多樣性表 (n=48).....	50
表 5、2008 年 2 月至 2009 年 1 月，大分地區臺灣黑熊毛髮及排遺樣本之 6 個微衛星基因多樣性表 (n=65).....	51

## 壹、前言

臺灣黑熊 (*Ursus thibetanus formosanus* Swinhoe, 1864) 為臺灣體型最大的食肉目動物，曾經廣泛地分布於臺灣低至高海拔的森林地帶 (王穎與陳添喜 1991; 王穎等 1992)，但近年來由於人為開發活動的壓力、棲地破壞及狩獵等壓力，臺灣黑熊的生存備受威脅，不僅野外族群減少，而且分布範圍也大為縮小 (Hwang and Wang 2006)，目前黑熊多侷限於地形較崎嶇陡峭、高海拔或人為活動較少的山區，其族群也處於受威脅的狀態 (Wang 1999, Hwang and Wang 2006)，因此已於 1989 年依野生動物保育法被公告為瀕臨絕種的動物。

### 一、臺灣黑熊之遺傳研究現況

臺灣黑熊為亞洲黑熊 (*U. t.* Cuvier, 1823) 的七個亞種之一，亞洲黑熊主要分布於亞洲大陸與其鄰近島嶼，包含中國大陸、俄羅斯、朝鮮半島、日本、中南半島、東南亞、海南島、臺灣、喜馬拉雅山脈附近及巴基斯坦等地 (Garshelis 2009)，毛色黑其胸部上白色月牙型的斑紋，為最明顯的特徵。七個亞種分別為分布於尼泊爾東北部、印度、不丹、孟加拉國、緬甸、老撾、泰國、柬埔寨、越南的西藏黑熊 (*U. t. thibetanus* Cuvier, 1823)；分布於臺灣的臺灣黑熊 (*U. t. formosanus* Swinhoe, 1864)；分布於伊朗東南部，巴基斯坦中南部的巴基斯坦黑熊 (*U. t. gedrosianus* Blanford, 1877)；分布於日本的日本黑熊 (*U. t. japonicus* Schlegel, 1857)；分布於喜馬拉雅山脈，從阿富汗到印度北部 (查謨和克什米爾、喜馬偕爾邦與烏塔拉卡漢德) 的長毛黑熊 (*U. t. laniger* Pocock, 1932)；分布於中國中南部的西南黑熊 (*U. t. mupinensis* Heude, 1901)；分布於俄羅斯遠東地區，中國東北，朝鮮半島的東北黑熊 (*U. t. ussuricus* Heude, 1901) (Garshelis 2009)。

由於亞洲黑熊分布範圍極大，在不同緯度及氣候下型態及外型有很大的變異 (Garshelis 2009)。在形態特徵無法區別的狀況下，利用遺傳標記 (Genetic marker) 區別不同地理區黑熊之遺傳變異來鑑別種內的亞種，是另一可行之方法。目前在臺灣黑熊研究分類研究方面，儲瑞華等人 (2000) 初步探討了在台北市立動物園的圈養 11 隻不確定種源的亞洲

黑熊與 4 隻玉山國家公園的野生黑熊，體內的粒線體 DNA (Mitochondrion DNA) 中控制區 (Control region) 片段序列中，共 532 個鹼基對 (Base pair; bp)，發現 11 種基因型 (Haplotype) 有著較高的變異性並辨別部份粒線體個體為臺灣黑熊粒線體，部份個體可能非臺灣之亞種。之後在陳元龍與楊吉宗 (2002) 進行臺灣黑熊與亞洲黑熊之粒線體 DNA 的 12S rRNA 與 16S rRNA 的遺傳變異探討，但發現變異比例僅有 0.77% 及 0.71%，無法做為亞種分類的依據。在 Shih et al. (2009a) 分析 79 個黑熊樣本 (其中 56 個確定為臺灣野生黑熊樣本、8 個越南的亞洲黑熊的樣本、1 個泰國亞洲黑熊樣本、8 個中國大陸 (西南)、1 個中國大陸 (東北) 亞洲黑熊樣本與 5 個俄羅斯亞洲黑熊樣本)，在粒線體 DNA 上的控制區差異，結果發現臺灣黑熊只有 4 個基因單型 (Haplotype)，在親緣分析方面，臺灣黑熊樣本自成一個單系群 (Monophyletic group)，初步已可以看出臺灣黑熊與亞洲黑熊各地理區遺傳變異與遺傳分化的程度。在石芝菁等人 (2012) 分析 77 個確定來源亞洲黑熊樣本 (46 個臺灣黑熊、9 個西藏黑熊、17 個西南黑熊、8 個東北黑熊)，在定序出粒線體的控制區 700 個鹼基對，發現所有臺灣黑樣本形成單系群，遺傳特徵明顯與其他亞洲黑熊不同，另外在 46 個臺灣黑樣本僅分析出 5 個基因單型；此外，在玉山國家公園中採集到的 30 個樣本，結果僅有 2 個基因單型，此實驗還有利用 10 個微衛星基因座 (Microsatellite loci) 分析同樣的 77 個確定來源樣本，利用分派檢定 (Assignment test) 的結果，支持臺灣黑熊族群與其他地區亞洲黑熊分群。

Hwang et al. (2008) 的研究，利用定序 (Sequencing) 在三個不同亞種 (分別為東北、四川、臺灣) 完整亞洲黑熊的粒線體 DNA，約 17,000 鹼基對，在黑熊粒線體 DNA 中發現，控制區有許多的串聯重複 (Tandem repeat)，每個亞種有不同的形式的序列 (Sequence)，可提供各亞種在辨別分類的依據。在臺灣黑熊的研究上，以 Tsai et al. (2009) 研究較詳細，結果顯示臺灣黑熊 (*U. t. formosanus*) 與西藏黑熊 (*U. t. thibetanus*) 較相近，在粒線體 DNA 相似度達 98.7%；更在 Choi et al. (2010) 的文獻中也具有同似結果，此篇文獻中更提到，在粒線體的控制區中可以利用串聯重複辨識出亞洲黑熊亞種間的差異，其中臺灣黑熊的串聯重複為 5'-

ACGCACGTGT-3' 重複 56 次；西藏黑熊為 5'- ACGCACGTGT-3' 重複 55 次，但較臺灣黑熊多一種重複序列為 5'-ACATGCGTGC-3' 重複 3 次。可利用此點差異辨識出亞種。

## 二、非侵入性採樣法與應用

藉由採集動物的排遺、毛髮、蛻皮等樣本獲得到基因資訊來分辨個體，無需捕捉處理動物，屬於非侵入性的採樣法（Noninvasive genetic sampling, Pearse et al. 2001）。在野生動物研究上鼓勵使用替代辦法，因為對於有些目標物種，捕捉和處理程序有時可能具破壞性，或者在某些情況下並不適當，或是不被允許（Chu et al. 2006）。非侵入性採樣方式之最大優點為不需直接接觸目標動物，減少了取樣上的限制，並降低對動物的可能干擾，採樣時也無採樣數量（e.g.政府機關允許捕捉的個體數量）的顧慮，在需要保育之物種研究上提供相當大的幫助（Chu et al. 2006）。在傳統的樣本採樣上，由於臺灣黑熊野外數量稀少、以及習性隱蔽且機警之外，臺灣山林林相複雜、遮蔽度高、地形崎嶇與交通不便，皆使野外研究黑熊的族群及生態習性的作業十分困難，相對使用非侵入性的採樣法，應較容易取得黑熊樣本。

## 三、分子生物技術運用在野生動物的保育遺傳管理

成功的監測及管理瀕危物種時，取決於取得正確的族群結構及數量資訊（Sloane et al. 2000）。在近年來分子技術發展快速，利用 PCR（Polymerase chain reaction，聚合酶連鎖反應）的技術廣為利用，出現了許多以 PCR 為基礎的 DNA 遺傳標記技術，DNA 和蛋白質相比，具有易於保存，不易分解之優勢，同時亦為記錄遺傳訊息的最基本物質，故廣為運用在遺傳分析上。以下介紹目前常被使用，以 DNA 為基礎的遺傳標記：

（一）限制片段長度多態性（Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP）

限制片段長度多態性其基本原理為利用限制酶可截切 DNA 序列內特定序列位點之特性辨識序列上之點突變，早期試驗方法為利用限制酶切割 DNA 後進行洋菜膠體電泳，將電泳產物以南方點墨法轉印之後，以放射性探針顯像，對轉印所得之條帶(Band) 進行基因型判讀(Kan and Dozy 1978)。

(二) 隨機增殖 DNA 多態性 (Random Amplified Polymorphism DNA, RAPD)

隨機增殖 DNA 多態性其原理為利用較短片段的隨機引子 (通常為 10 個鹼基對)，利用 PCR 技術進行對基因體上不特定序列增殖出具多態性之片段，並將產物進行洋菜膠體或聚丙烯醯胺膠體電泳分析，而後對電泳所得之條帶進行分析 (Williams et al. 1990)。

(三) 增殖片段長度多態性 (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP)

增殖片段長度多態性其原理為利用限制酶切割基因組 DNA (Genomic DNA)，形成分子量大小不等的多態性片段，再於切割產物切點上黏接一段短片端承接子 (Adaptor)，之後利用對應承接子的核酸引子進行 PCR，增殖出具多態性的片段並進行洋菜膠體或聚丙烯醯胺膠體電泳，而後對電泳所得之多態性條帶進行分析 (Vos et al. 1995)

(四) 微衛星 (Microsatellite)

1960 年代早期，科學家在研究基因體結構時，發現在真核生物基因體中，有一些被稱為衛星 (satellite) DNA 的片段會妨礙細胞選殖。此些衛星 DNA 在進行抽取時，當利用氯化鈯 (CsCl) 梯度高速離心分離 DNA 時，會形成許多細小環帶分布於由大多數 DNA 所構成的主要環帶旁，狀似行星旁邊的衛星，故此得名，Southern (1970) 採用限制酶切割的方法，發現經切割後的衛星 DNA 在電泳後會出現梯狀條帶而證明其具有重要特徵-串聯重複。於 1985 年，DNA 指紋首次被用於親子鑑定上並且獲得成功 (Jeffery et al. 1985)。而隨後於 1980 年代晚期，更發現了 1~6 個鹼基所組成之串聯重複片段，被稱為微衛星 (Tautz 1989)。

無論是那類串聯重複片段 DNA 用於親子及個體鑑定或犯罪偵測等的鑑識科學領域（李俊億與謝幸媚 2008）上都有下列優點：

1. 廣泛存在於真核生物體中。
2. 多型性（Polymorphism）：微衛星基因座有高度的遺傳變異，有些基因座可能包含了十多種等位基因（allele）（O'Connell et al. 1998）。
3. 共顯性遺傳（Co-dominant）：父、母系的微衛星基因座可以在子代同時被表現，此為共顯性遺傳，遵循孟得爾遺傳定律。
4. 中性遺傳（Neutral genetic）：重複片段的 DNA 不會被轉錄或轉譯，不影響生物的表現型，故不受天擇或人擇的影響，所有保留了所有突變的記錄，因其演化速度較快，相對短的時間內就產生了個體差異，遂可當做辨識個體的標記，通常使用於族群層次及個體辨識之研究。（Woodruff 1993）。

以上幾種 DNA 遺傳標記，其中又以微衛星為目前在保育遺傳學上應用最廣泛應用的技術（Ouborg et al. 2010）。

微衛星 DNA 技術是用螢光物質標記在核酸引子，利用標記過的引子進行 PCR 擴增 DNA 樣品特定的微衛星基因座片段，之後以毛細管電泳或是其他方式偵測帶有螢光的 PCR 產物以判定其片段大小與鑑定其基因型（李俊億與謝幸媚 2008）。此技術因所需 DNA 樣本較少，再現性高，容易判定基因型、多態性高、片段短容易複製（Goodwin et al. 2007）而成為鑑識科學於個體及親子鑑定與微量證據的舉證之最主要工具。因為所需要的 DNA 量不需要很高，因此可以利用個體的毛髮或排遺等低含量的 DNA 樣本，萃取出實驗所需的 DNA 量。

利用排遺進行研究分析的優點為（1）可從 DNA 中，可得知此物種的數量，分布和性別比例。（2）萃取出 DNA 量較高（與毛髮比較）。（3）可以提供食性、內分泌、內寄生蟲等資料（Wasser et al. 2004）。然而，對於稀有或移動性大的動物，或在溫暖潮濕的環境下，排遺的收集不易，排遺的偵測還會受到環境狀況及研究者影響，而且排遺新鮮度

也會直接影響 DNA 的品質。

臺灣黑熊在野外所需的活動範圍十分廣大，可超過 100 km<sup>2</sup> (Hwang et al. 2010)，若採用個體捕捉繫放的方法需要耗費大量的人力、時間與金錢。相較之下，毛髮與排遺樣本的取得容易且成本較低，對動物個體本身的影響也較小。黑熊的棲息地都在地形崎嶇、植被茂密的山區，加上族群稀少、生性機警且活動隱密，野外研究或採集都是十分困難，因此有必要應用非侵入式的毛髮與排遺樣本採集法。加上黑熊個體的活動領域很容易受人為開發造成的棲地破碎化所阻隔，使族群間的基因交流降低或是完全隔離，造成小族群自交、基因同質化等問題。這對現有族群數量已經稀有的臺灣黑熊而言，可能會造成更嚴重的威脅。目前野外威脅臺灣黑熊的因素持續存在之餘，黑熊於全島各地族群的遺傳多樣性、族群結構究竟為何，則成為擬定有效的保育策略的重要議題。目前分子資訊已被廣泛運用在界定疑難分類群，以及釐清族群遺傳結構與保育研究上。

#### 四、台灣黑熊與櫟實之關係

玉山國家公園東側的重要黑熊棲息地一大分地區，主要的殼斗科植物為青剛櫟，其果實是許多動物的食物來源，包括鳥類、齧齒類、大型草食動物和黑熊等 (Hwang 2003、林冠甫 2009)。殼斗科 (Fagaceae) 植物的堅果 (或稱櫟實，acorn) 為熊類以及許多其他野生動物在秋冬季或入冬前的重要食物來源。不同物種對青剛櫟果實的利用方式和程度有雖所差異，櫟樹在森林中的組成和數量，以及季節性的結果和其果實產量的差異，會造成食物資源的可得性和豐富度變動，而影響野生動物群落的組成 (McShea et al. 2007) 和族群動態 (Greenberg and Parresol 2002)。

櫟實是營養豐富的食物資源，擁有高含量的脂質和碳水化合物，加上容易消化和高代謝能的特性，櫟實可視為高度濃縮形式的食物能源 (Kirkpatrick and Pekins 2002，陳亞萱 2009)。因此，櫟實的生產和動物的覓食行為對大型哺乳動物的許多生態層面都有直接或間接的重要影響，包括繁殖、生存、活動和生長 (Vaughan 2002)。在北美洲地區，許多研究也發現發現，美洲黑熊 (*U. americanus*) 的分布狀況、族群動態、活

動範圍、移動距離、活動模式、繁殖速率、繁殖成功率、食性、棲地利用和冬眠等行為皆會受櫟實生產影響 (Vaughan 2002, Garshelis et al. 2008)。

在許多有殼斗科植物分布的地理區，森林性的熊類（如美洲黑熊及亞洲黑熊）與殼斗科森林之間，有密不可分的關係 (Hwang et al. 2002, Vaughan 2002, Garshelis et al. 2008)。這些地區的黑熊，包括台灣黑熊，於秋冬季值堅果大量結果時，會出現集中於櫟林中且大量覓食堅果的現象 (Hwang et al. 2002)。

青剛櫟為該大分地區非常優勢的喬木層組成樹種，出現頻度和出現密度皆最高，分別為 67% 和 24.7 棵/100 m<sup>2</sup>；優勢度則是臺灣二葉松 (33.5 cm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup>) 和青剛櫟 (22.7 cm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup>) 最高。喬木樹種的相對重要值 (important value index, IVI) 以青剛櫟最高 (27.5%)，臺灣二葉松次之 (20%)，其餘樹種皆小於 11% (黃美秀等 2009b)，過去研究者於玉山國家公園東側園區的長期野外調查 (Hwang 2003, 林冠甫 2009) 發現，大分地區為台灣黑熊於秋冬季出沒較頻繁的地區，且青剛櫟結果量的變動對於台灣黑熊的活動有決定性的影響，不同種類的殼斗科櫟實於秋冬季的結果量有逐年波動的現象，且黑熊於此季節的食性和活動模式也隨之變動。2006-2009 年於大分地區進行台灣黑熊族群相對豐富度和青剛櫟果實產量的監測，透過自動照相機和痕跡調查的資料皆發現，台灣黑熊的相對豐富度於各年之青剛櫟結果季 (10 月至隔年 1 月) 皆顯著大於非青剛櫟結果季 (2 月至 9 月)，且青剛櫟結果季時，黑熊會增加夜間活動的頻度 (黃美秀等 2006、2007、2008、2009a)。

## 五、研究目標

本實驗目的為：(1) 估計玉山國家公園大分地區臺灣黑熊的遺傳多樣性；(2) 應用毛髮及排遺樣本檢視臺灣黑熊之微衛星基因座分析的可行性；(3) 並比較毛髮及排遺樣本之分析成效；(4) 建立臺灣黑熊之非侵入性樣本採集與分析方法之標準作業程序。

## 貳、方法

### 一、研究樣區

採樣地區位於花蓮縣卓溪鄉拉庫拉庫溪流域的大分地區(北緯 23°22' 25" 47，東經 121°05' 21" 49；圖 1)，地處中央山脈，屬於玉山國家公園東側園區，該區海拔約由闊闊斯溪溪床 1,100 公尺至大分山 2,000 公尺。由花蓮縣南安管理站附近的山風登山口入山，單程需步行 40 km，耗時 3 日。

### 二、樣本採集

#### (一) 毛髮採集

利用倒勾鐵絲網圍成的熊毛陷阱，依 Woods 等人 (1999) 研發之方式架設，在多邊形倒勾鐵絲圍籬中央懸掛誘餌，誘餌由底片盒與氣味劑及棉球組成，誘餌吊至多邊形中間黑熊構不到的位置，高度至少 2.2 公尺，其目的為吸引黑熊穿過鐵絲網，將熊毛留在鐵絲網上。氣味劑的選擇有肉類與水果混合搭配使用。採集時間於 2008 年 3 月至 2009 年 2 月間，固定每月檢視一次熊毛陷阱毛髮陷阱，毛髮陷阱的總數 21 座 (圖 1；其詳細資料與 GPS 點位於附錄 1)。工作內容有：收集熊毛樣本，更新氣味劑並紀錄。熊毛樣本保存於 4 或 5 號夾鍊袋中。在夾鍊袋寫上採集日期、採集人、採集陷阱名稱、毛髮所在的鐵絲編號、物種以及毛髮量的多寡為劃分 3 個等級：(1): 1 根毛髮；(2): 2~4 根毛髮；(3): 5 根毛髮以上。以上資料均紀錄，樣本帶回實驗室樣本以 -20°C 保存等待分析。

## (二) 排遺採集

目視採集法，在穿越線旁 1-5 公尺搜尋 (圖 1)，及穿越線與穿越線之間，行走時以目視找尋黑熊排遺，發現後紀錄其相對位置，以相機拍照，以全球定位系統 (Global Positioning system, GPS; 機型: GPSmap 60CSx) 定位。並編號紀錄其點位、內容物、新舊程度與採集日期；其中新舊程度依照排遺採集當時的色澤、軟硬、濕度來判斷新舊黑熊排放排遺到採樣時的天數，分為 5 級 (附錄 2): (1). 新鮮 (0~2 天); 2. 3~7 天; 3. 1-2 周; 4. 3-4 周; 5. 1 個月以上。帶回實驗室時，採樣一份排遺採樣 A 與 B 兩管。A 管以 15 mL 離心管，內含物包含 10 mL 酒精，以棉棒刮取排遺表面體積約 1 mL 的量，此管存放在  $-20^{\circ}\text{C}$  之環境待做實驗。B 管以 5 mL 的抗凍管，內含物以 3 mL 的酒精，與以棉棒刮取排遺表面體積約 1 mL 的量，此管存放於  $-80^{\circ}\text{C}$  之冰箱，作為備份。

### 三、實驗室分析

#### (一) 樣本篩選與 DNA 萃取

##### 1. 毛髮樣本篩選與 DNA 萃取

###### (1) 毛髮樣本初步篩選

毛髮樣本選取等級 2 與 3 的樣本，確認毛髮樣本有毛囊後，由以下的篩選方法篩選樣本：1.比較毛髮所在的鐵絲編號，將相鄰的 2 個毛髮樣本，取鐵絲編號較少的樣本；2.鐵絲編號相近的上下兩條鐵絲的兩樣本，取上方鐵絲的樣本；3.如果鐵絲上連續出現 3 個或以上樣本時，取鐵絲編號較少的樣本。

###### (2) 毛髮樣本 DNA 萃取

毛髮樣本選取等級 2 與 3 的樣本，剪取含毛囊端，採用 Proteinase K/ Phenol/ Chloroform 方法萃取 DNA (Kocher et al. 1989)。以滅菌過的無菌水 (dd H<sub>2</sub>O) 沖洗去除表面雜質，取 1 至 5 根帶有毛囊的黑熊毛髮，剩餘熊毛放回封口袋放回 -20°C 以保存。以剪刀取離毛根 0.5 cm 之毛髮，500 μL reaction buffer 及 15 μL 的 25 mg/mL Proteinase K，56°C 下震盪一天。加入 500 μL 之 PCI (Phenol:Chloroform:Isoamyl alcohol = 25:24:1) 高速震盪 5-10 秒，再以 12500 rpm 離心 10 分鐘。此時上清液中含有 DNA 物質，取 350 至 400 μL 上清液至另一 1.5 mL 離心管中，再加入上清液之 1/10 體積 3 M 的 Ammonium acetate (pH=5.2)，與兩倍量 100% Cold ethanol。上下輕晃數次，放入 -20°C 冰箱存放 10~20 分鐘或隔夜。以 4°C，12500 rpm、離心 10 分鐘。以酒精沈澱後，抽去酒精，再以 70% Ethanol 清洗一次，加 50 μL 的無菌水，至 55°C 的乾浴機上溶解，再以分光光度計 (NanoVue Spectrophotometer, GE Healthcare)，測量其中 DNA 濃度後保存於 -20°C 環境中。

## 2.排遺樣本篩選與 DNA 萃取

### (1) 排遺樣本初步篩選

在收集到排遺樣本後，但由於排遺樣本本身可能因天氣狀況或是上 1 個月未採集到，其質地因水分蒸散而硬化，此難以刮取到排遺至離心管中，故不採集此類樣本。

### (2) 排遺樣本 DNA 萃取

排遺樣本則依據 (Hung et al. 2004) 的方法進行排遺 DNA 萃取。去除排遺樣本中大顆粒物質與食物殘渣，以酒精離心 7 分鐘，倒去酒精，刮取最上層排遺泥質至另一 2 mL 離心管。加入 1.8 mL 的兩倍 CTAB buffer (2% Hexadecyltrimethylammonium bromide, 1.4M NaCl, 20mM EDTA, 100mM Tris-HCl, Parsons et al. 1999) 入 2 mL 的離心管中，搖晃 60 分鐘。之後取 1.5 mL 上清液至另一離心管，加 0.5 mL 氯仿(Chloroform)，均勻搖晃後離心 5 分鐘。重複以上步驟，但改取上清液 1.3 mL。至另一離心管，加 0.6 mL 異丙醇。置-20°C，10 分鐘。以 150 rpm 搖晃 30 分鐘，20°C 下 13,000 rmp 離心 5 分鐘。倒去液體，加 1mL 70%酒精，20°C 下 13,000 rmp 離心 4 分鐘。吸取殘存酒精。至 55°C 加熱 30 分鐘，蒸乾其中之酒精。再以 QIAGEN DNeasy® Tissue kit，依照此產品說明書進行 DNA 純化 (Purification) 再以 AE buffer (QIAGEN) 溶解，存放於-20°C 環境中。

## (二) PCR 擴增微衛星 DNA 片段

本研究利用 Shih 等人 (2009b)，針對臺灣黑熊所篩選之 10 組微衛星基因座引子 (UT1、UT3、UT4、UT23、UT25、UT29、UT31、UT35、UT36、UT38；附錄 3) 進行實驗，基於節省經費的考量，採用在 forward 方向引子的 5'端加上 M13-tail (5-GGAAACAGCTATGACCAT-3') 或 CAG-tail(5'-CAGTCGGGCGTCATCA-3') 的引子設計 (Schuelke 2000)。

在進行 PCR 時，反應總體積為 10  $\mu$ L，內含 1 倍的 PCR 緩衝液 (Buffer, Cat No.: JMR-420, Bertec)，0.05  $\mu$ M 引子 (Forward 端)，0.12  $\mu$ M 引子 (Reversed 端)，0.18  $\mu$ M 螢光物質 (M13 或 CAG-tag with FAM, HEX 或 TAMRA)，0.1 mM dNTP，2.5mM MgCl<sub>2</sub>，0.125 unit DNA polymerase (Cat No.: JMR-801, Bertec) 混合 0.25  $\mu$ L TaqStart™ Antibody (Clontech)，與排遺萃取出 DNA 物質 0.5  $\mu$ L。

在溫度循環控制儀 (Thermo cycler, ASTEC PC-818) 進行 40 次的 PCR，循環條件如以下所示：

- (1) 94°C 30 秒，使雙股 DNA 變性打開 (Denaturing)。
- (2) Ta°C 30 秒，使打開的雙股片段與引子煉合 (Annealing)。(Ta：黏合溫度 (不同引子，有著不同的黏合溫度本實驗分別有 64、62、56°C，3 種溫度，附錄 3))
- (3) 72°C 20 秒，此時 PCR 進行延伸聚合反應 (Extension)。
- (4) 最後在 72°C 7 分鐘，讓反應不全的片段繼續反應完成。

### (三) 基因型的判定

將 PCR 的產物置於 96 孔盤中，以 ET400 (Amersham Bioscience) 作為校正標準 (Size standard)，並以自動定序儀進行 (Megabase 1000, Amersham Bioscience) 毛細管膠體電泳分析及 Genetic profiler Version 1.5 軟體進行基因型 (Genotype) 判讀。

為了避免等位基因擴增丟失 (Allelic dropout) 及假性等位基因 (False Allele) 造成誤判基因型及假性個體的機會，我們以重複多次 PCR 的方式減少假性等位基因出現 (Taberlet et al. 1996)。每組基因座進行最少二次重複且獨立的 PCR，最多可達四次。每個基因座判斷基因型依據如下 (黃傳景 2005, Creel et al. 2003, Hung et al. 2004)：

- (1) 每個樣本皆利用 10 個微衛星基因座進行第 1 次 PCR。
- (2) 每個樣本在第 1 次 PCR 之後，出現 4 個以上的基因座擴增失敗，此樣本即不予繼續分析。
- (3) 在第 1 次 PCR 中通過的樣本，再經過數次獨立 PCR，每個基因座可能是異型合子 (Heterozygous, 附錄 4) 或是同型合子 (Homozygous, 附錄 4)。異型合子表示了的分析中具有明顯的兩波峰，代表了兩個等位基因。同型合子表示了在分析中具有明顯的單一波峰，但可能是另一個等位基因在 PCR 失敗造成等位基因擴增丟失的現象。
- (4) 成功判定資料後，呈現 2 次相同異型合子 AB，**判定基因型為 AB。**
- (5) 呈現 3 次相同的同型合子 AA，**判定基因型為 AA**
- (6) 資料出現異型合子 AB 一次，同型合子 AA 與 BB 最少皆出現一次，**判定基因型為 AB。**
- (7) 資料出現同型合子 AA 及 BB 各兩次，**判定基因型為 AB。**

當經過四次 PCR 後，未達上述條件，則做以下判定：

- (1) 只出現 2 次相同之同型合子 AA，判定基因型為 A0，其中 0 為等位基因擴增丟失。
- (2) 出現 2 次相同之同型合子 AA，與一次同型合子 BB，判定基因型為 A0，其中 0 為等位基因擴增丟失。
- (3) 出現 1 次異型合子 AB，與 1 次同型合子 AA，判定基因型為 A0，其中 0 為等位基因擴增丟失。
- (4) 當樣本經過各基因座皆四次 PCR 後，還有未確認基因座達四個以上。此樣本不進行後續分析。

經初步分析後發現，10 組皆有產物，但其中 UT23 與 UT31 兩組基因座有多個片段(Multiple bands)容易造成基因型的誤判，及 UT3 與 UT36 擴增成功率較差，這 4 組基因座可能對後續之個體分析可能有影響 (Pompanon et al. 2005)，後續分析刪除此 4 組資料留下 UT1、UT4、UT25、UT29、UT35、UT38 這 6 組資料作為個體辨識。

在個體判定的部份依照方法對個體判定：(1) 在 6 個基因座中，有 2 個以上等位基因擴增丟失，此樣本不進行後需分析；(2) 在兩樣本有不同判讀結果符合等位基因擴增丟失造成影響時，將兩樣本判定為同一個體(黃傳景 2005)。(3) 兩樣本只有一個基因座上的一個等位基因有差異，判斷為同一個體 (Bellemain et al. 2005)。

#### (四) 性別鑑定 (Sex determine)

此實驗之引子 (Primer) 與技術採用 Pagès et al. (2009) 專門為熊科 (Ursidae) 動物所設計的兩組性別鑑定引子分別為：

MP-SRY-Ursus (5'-TGGTCTCGTGATCAAAGGCGC-3')

MP-SRY-1R-Ursus (5'-GCCATTTTTTCGGCTTCCGTAAG-3')

MP-ZF-F (5'-GACAGCTGAACAAGGGTTG-3')

MP-ZF-R (5'-GCTTCTCGCCGGTATGGATG-3')

因具有專一性，可避免黑熊因取食其他物種的組織時，使排遺含有其他物種的 DNA，在進行 PCR 時如果以非專一性引子，就可能擴增到非黑熊的 DNA (Murphy et al. 2003)，造成結果錯誤。採用專一性引子可以把錯誤率減至為零。以 Pagès et al. (2009) 的 MP-ZF 引子的擴增之長度為 144 鹼基對；MP-SRY 引子擴增之長度為 115 鹼基對。

在此實驗中，以多引子 PCR (Multiplex PCR) 原理進行，在實驗中同時放入兩組引子擴增兩個目標片段。PCR 條件如下：產物總體積共 25 $\mu$ l，包含 1 倍 EmeraldAmp® GT PCR Master Mix (Cat. No.: RR310, TaKaRa)、0.2 $\mu$ M 的引子、3 $\mu$ l 的 DNA template，以 ddH<sub>2</sub>O 補至體積 25 $\mu$ l。

進行 PCR，反應在溫度循環機進行，條件如下所示：(a) 98 $^{\circ}$ C，10 秒使模板 DNA 變性；(b) 58 $^{\circ}$ C，30 秒，以實驗出兩組引子皆適合的黏合溫度；(c) 72 $^{\circ}$ C，30 秒：使聚合酶進行延伸反應，共進行 35 次循環。反應完畢，DNA 分子量標準液 (100 bp marker) 加入最左邊的孔，取 PCR 產物 5 $\mu$ l，以 1 倍 TBE 緩衝液 (0.09M Tris-base、0.09M Boric acid、2mM Na<sub>2</sub>EDTA，pH=8.3) 進行 2.5% 的瓊脂糖凝膠電泳 (Agarose gel electrophoresis)，以電壓 100 伏特、時間 45 分鐘後，檢視結果，以上反應條件適用在排遺 DNA 樣本，如果要使用在毛髮樣本上，PCR 增至 40 次。

在實驗中，使用的正控制組 (Positive control) 為已知性別之圈養黑熊個體的血液樣本 (黑皮，雄性；來源自屏東科技大學野生動物收容中

心)。與一個負控制組 (Negative control) 以 ddH<sub>2</sub>O 替代 DNA template，確保實驗無污染的疑慮 (圖 2)。且進行三次獨立之 PCR 實驗，在兩次成功鑑定性別的 PCR 中，兩次判讀為雄性的判定為雄性，兩次判讀為雌性的判定為雌性。

#### 四、資料分析

排遺樣本的微衛星基因座擴增的成功率與採集樣本時的新舊狀態，與後續的實驗室分析在微衛星引子擴增成功率的關係密切，為建立後續採樣時的標準流程，我們將分析排遺新舊程度與成功擴增率之間，採用 Spearman's Rho 檢定其中的相關關係，其中微衛星基因座擴增成功計算方式為：微衛星基因座擴增成功樣本數除此級排遺新鮮度總樣本數 (微衛星基因座擴增成功定義：在 6 個基因座中，少於 2 個等位基因擴增丢失)。

經過毛細管電泳所得到的基因型，擬使用 GENECAP 軟體 (Wilberg and Dreher 2004) 判讀計算個體鑑別率 (Probability of identity: P<sub>(ID)</sub>)，P<sub>(ID)</sub> 的定義為「族群內兩不同個體進基因座基因分型時，具有同樣的基因型的機率」，數值必需小於 0.01 (Miller et al. 2002) 此實驗才具有鑑別力。在共顯性遺傳的分子標記上，單一基因座之 P<sub>(ID)</sub> 計算方式如下 (Waits et al. 2001)：

$$P_{(ID)} = \sum_{i=1}^n p_i^4 + 4 \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^{n-1} p_i^2 p_j^2$$

其中的  $p_i$  與  $p_j$ ，分別為基因座上第  $i, j$  個交替基因頻率。

在檢視完每個樣本的基因型後，可看出每個基因型在此樣區的每月出現情形，是否有個體在這邊長住及樣區內雌雄比的變化，並以卡方分配 (Chi-square distribution) 檢視雌雄比是否偏離性別平衡 1:1。

將判讀出之遺傳訊息辨別出個體數，出現的頻率。將擬使用軟體 CERVUS (Kalinowski et al. 2007) 計算每個基因座的多態信息量 (Polymorphism information content, PIC)，是用來估計基因座的多態性，PIC 值越高表示基因座的多態性也較高，值介於 0-1 間，假使值大於 0.5，

表示此基因座為具多型性的分子標記，其計算公式為（Bostein et al. 1980）：

$$PIC=1-\sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

$p_i, p_j$  分別為基因座上第  $i, j$  個交替基因之頻率

觀測異質度（Observed heterozygosity,  $H_O$ ）與理論異質度（Expected heterozygosity,  $H_E$ ）。； $H_E$  常被用為做為族群內遺傳變異分析的依據，一般來說，較高的  $H_E$  值代表的是族群有較高的遺傳歧異度。Genepop 4.0（Rousset 2008）分析這些基因座的等位基因是否符合哈溫平衡（Hardy-Weinberg equilibrium, HWE），採用費氏精確測驗法（Fisher's exact test）來評估族群內各基因型的比例有無偏離哈溫平衡，並利用馬可夫鏈法（Markov chain method）模擬計算每個基因座的哈溫平衡之 P 值，計算的參數設定如同程式的預設值（Dememorization number=1000; Number of batches=100; Number of iterations per batch=1000）。另外以 FSTAT 軟體計算  $F_{IS}$ （近親交配指數，Inbreeding coefficient）（Goudet 1995）， $F_{IS}$  值的意義用來評估族群是否偏離 HWE，當  $F_{IS}>0$  時，表示族群可能有近親交配的現象，反之  $F_{IS}<0$  時，則表示可能有遠親交配的情況產生。 $F_{IS}$  的計算定義如下（Wright 1978）：

$$F_{IS}=1-\frac{H_o}{H_E}$$

## 參、結果

結果部份把月份往前移 1 個月，因為在每次採樣時間為每月月初，故為上 1 個月所累積的樣本於這個月所採集(e.g. 11 月初所採集的樣本，事實上是 10 月份所累積，在以下結果以 10 月呈現)。所以採樣時間 2008 年 3 月至 2009 年 2 月，在結果呈現部份會變成 2008 年 2 月至 2009 年 1 月。

### 一、樣本採集與實驗室分析

#### (一) 毛髮樣本採集、篩選與 DNA 萃取

##### 1. 毛髮樣本採集與初步篩選

自 2008 年 3 月至 2009 年 2 月利用毛髮陷阱收集到 228 個黑熊毛髮樣本，除了 2、7、8 月沒有收集到任何樣本之外，各月為 1-68 撮毛不等，尤以 11 月和 12 月最高，皆大於 60，其次為 1 月(n=47)及 10 月(n=20)，非青剛櫟結果季的集毛結果明顯低於結果季，除 5 月較高(n=13)之外，其他各月皆不及 10 撮(表 1)。

經過初步篩選，於 228 個毛髮樣本中篩選出 112 個樣本去進行萃取及 PCR 進行微衛星基因座擴增。

##### 2. 毛髮樣本實驗室分析

篩選出 112 樣本進行 6 個微衛星基因座引子之 PCR 擴增，其中 53 個樣本經六組基因座擴增後，等位基因擴增丟失少於 2 個，可進行後續資料分析，其擴增成功率為 47% (53/112)。

#### (二) 排遺樣本採集、篩選與 DNA 萃取

##### 1. 排遺樣本採集與初步篩選

自 2008 年 3 月至 2009 年 2 月採集自大分地區較新鮮臺灣黑熊排遺樣本共 321 個，其中 99% 是在青剛櫟結果季(10 月至隔年 1 月)所採集，其中 11 月樣本數高達總採集量的 42% (n=137)，其次為 1 月 (n=103)，非青剛櫟結果季所採集到的樣本只有 2 個(表 1)。

經初步篩選，選出 290 個排遺樣本（表 1），有 31 個排遺樣本質地過硬，不適合進行 DNA 萃取，所以以 290 個排遺樣本進行 DNA 萃取及 6 組微衛星基因座擴增。

## 2. 排遺樣本實驗室分析

排遺樣本經 DNA 萃取與 6 個微衛星基因座引子之 PCR 擴增，其中 101 個樣本之等位基因擴增丟失少於 2 個，可以進行後續資料分析，即擴增成功率為 34%（101/290）。

### （三）排遺樣本新鮮程度與微衛星擴增成功率

利用 2008 年 3 月 2009 年 2 月所收集的排遺樣本進行分析。因在 2009 年 1 月有更換助理，加上排遺新鮮等級的判斷有時有因個人或經驗而異的情況，所以把 2009 年後的樣本刪減，列入分析的樣本為 154 個，PCR 之後擴增成功之樣本數為 46 個。結果顯示樣本微衛星基因座擴增成功率隨著排遺新鮮程度減少而遞減，二者呈現顯著負相關（Spearman's rho,  $r = -0.234$ ,  $p = 0.002$ ,  $n = 154$ ）。其中排遺新鮮度在 0 至 2 天的 PCR 擴增成功率為 50%，1 周內為 38%，1-2 周者則為 27%，但 3 周以上的排遺樣本的成功率則降至 20% 以下（0%-20%）（圖 3）

### （四）個體判定

53 個毛髮樣本進行後續分析後，各月檢定出的個體數最多為 10 個（11 月），其次為 9 個（12 月）總共辨識出 30 隻個體（表 1）。

101 個排遺樣本進行後續分析，其中排遺樣本各月檢定出的個體數最高為 23 個（11 月），其次為 19 個（12 月），共辨識出 48 隻個體（表 1）。

在排遺樣本與毛髮樣本所檢視出個體中發現，針對成功擴增 6 個微衛星基因座，可以進行後續分析之樣本（ $n = 154$  個成功擴增樣本），經 GENECAP 軟體分析出 65 隻個體，整體判讀顯示 11 月個體數是最高為 30 隻，12 月為其次（ $n = 25$ ）。重複檢視出 13 隻個體，兩種樣本共鑑定出 65 隻個體（表 2）。

#### (五) 個體與樣本數量頻度分析

在排遺樣本所檢視出 48 隻個體，其中有 24 隻個體只出現於 1 個樣本中，出現在 2 個樣本的個體有 10 隻，出現在 3 至 5 個樣本的個體數依序為 6、4、1 隻。出現次數最高為 6 次，共有 3 隻個體（圖 4）。

在毛髮樣本所檢視出 30 隻個體，其中有 20 隻個體僅出現於 1 個樣本中，出現在 2 個樣本的個體有 5 隻，出現於 3、4、5、6、7 個樣本的個體數依序為 2、1、1、0、0 隻。出現次數最高為 8 次，僅有 1 隻個體（圖 3）。

綜合分析毛髮與排遺樣本中，共檢測出的 65 隻個體，出現於 1 個樣本中的個體有 35 隻，10 隻出現在 2 個樣本中，出現於 3、4、5、6、8、9 個樣本的個體數依序為 6、3、4、4、2、1 隻。其中出現在兩個樣本以上，共 30 隻。

## 二、個體之性別鑑定

### (一) 毛髮樣本

在毛髮樣本判別出的 30 隻個體中，16 隻為雌性、11 隻為雄性、3 隻為未知性別（表 3），無顯著偏離性別平衡 1:1 ( $\chi^2=0.923, p = 0.336$ )；在青剛櫟結果季節（10 月-隔年 1 月）間，出現的 14 隻雌性、7 隻雄性、1 隻為未知性別，發現無顯著偏離性別平衡 ( $\chi^2=3.2, p = 0.074$ )；在非青剛櫟結果季（2 月至 9 月），有 3 隻雌性、4 隻雄性、2 隻為未知性別，分析結果未達顯著 ( $\chi^2=0.143, p = 0.705$ )。

### (二) 排遺樣本

排遺樣本的 48 隻個體中，判別出 18 隻雌性、28 隻雄性、2 隻為未知性別（表 3），經分析無偏離性別平衡 ( $\chi^2=2.174, p = 0.14$ )，由於所有個體皆出現於青剛櫟結果季，所以不另行分析非青剛櫟結果季之資料。

### (三) 毛髮與排遺樣本合併分析

在毛髮及排遺兩種樣本中總共檢視出 65 隻，其中 27 隻為雌性、33 隻為雄性，5 隻為未知性別（表 3，圖 5），並無顯著偏離 1:1 ( $\chi^2=0.439, p = 0.916$ ；圖 4)。在 2008 年 2 月至隔年 1 月，針對個體大於 5 的月份進行測試，各月出現的性別比，皆無顯著偏離性別平衡 1:1（10 月： $\chi^2=3.6, p = 0.317$ ；11 月： $\chi^2=0.133, p = 0.715$ ；12 月： $\chi^2=1.5, p = 0.221$ ；隔年 1 月： $\chi^2=0.889, p = 0.346$ ）。

在青剛櫟結果季節，出現的的總個體為 58 隻個體，佔全年所出現的 89%，其中 25 隻為雌性、30 隻為雄性，3 隻為未知性別（表 3），並無顯著偏差 ( $\chi^2=0.455, p = 0.5$ )。在非青剛櫟結果季節（2 隻為雌性、3 隻為雄性，2 隻為未知性別），性別比亦未達顯著偏離性別平衡 ( $\chi^2=1.286, p = 0.257$ )。

### 三、遺傳多樣性

#### (一) 毛髮樣本

在毛髮樣本中辨識出 30 隻個體的 6 組微衛星基因座，等位基因數為 4-8 個，平均為  $5.83 \pm 1.46$  (表 3)；個體鑑別率 (Probability of identity,  $P_{(ID)}$ ) 為 0.055-0.168，整體為  $9.76E-07$ ；PIC 值為 0.613-0.78；平均觀測異質度 ( $H_O$ ) 為 0.784 (範圍：0.536-0.88)，略大於平均理論異質度 ( $H_E$ ) 為 0.757 (範圍：0.679-0.832)。

其中 UT1、UT25 這 2 組的觀測異質度小於理論異質度， $F_{IS}$  值大於 0，其餘 4 組皆小於 0；在哈溫平衡檢測方面，UT1、UT4、UT38 達顯著偏哈溫平衡 ( $p < 0.05$ ，表 3)，其餘 3 組未達顯著；整體達顯著差異水準 ( $p < 0.05$ )。

#### (二) 排遺資料

在排遺樣本中辨識出 48 隻個體的 6 組微衛星基因座，等位基因數為 4-8 個，平均為  $6.33 \pm 1.37$  (表 4)；個體鑑別率為 0.095-0.232，整體為  $2.87E-06$ ；PIC 值為 0.532-0.772；平均觀測異質度 ( $H_O$ ) 為 0.759 (範圍：0.591-0.892)，略小於平均理論異質度 ( $H_E$ ) 為 0.727 (範圍：0.611-0.892)。

其中 UT1、UT25、UT35 這 3 組的觀測異質度小於理論異質度， $F_{IS}$  值大於 0，其餘 3 組皆小於 0；在哈溫平衡檢測方面，UT1、UT4、UT35 達顯著偏哈溫平衡 ( $p < 0.05$ ，表 4)，其餘 3 組未達顯著；整體達顯著差異水準 ( $p < 0.05$ )。

#### (三) 毛髮與排遺樣本合併分析

綜合所有於 2008 年 2 月至 2009 年 1 月，12 個月的黑熊遺傳物質分析結果，在 6 組微衛星基因座中，每個基因座的等位基因數為 4-8 個，平均等位基因數目為  $6.33 \pm 1.51$ ；個體鑑別率為 0.063-0.188，整體為  $1.381E-06$ ，合乎估算族群數量遺傳標記的  $P_{(ID)}$  必須小於 0.01 的標準。以 UT38 微衛星基因座具有最多的等位基因數；反之，UT1 基因座則有最少的等位基因數 ( $n=4$ )。此外，UT25 擴增成功數最高 ( $n=64$ )，則 UT38 判別成功數最

少 ( $n=50$ ; 表2)。在PIC為0.589-0.785，平均為 $0.697\pm 0.078$ ，6個基因座皆大於0.5 (表2)。

利用軟體Genepop測試，結果顯示6個基因座，除了UT25，其餘5個基因座皆偏離哈溫平衡( $p < 0.05$ , 表2)，整體達顯著差異水準( $p < 0.05$ )，顯示此樣本族群偏離哈溫平衡。平均觀測異質度 ( $H_o$ ) 為0.754 (範圍: 0.567-0.88)，略大於平均理論異質度 ( $H_E$ ) 為0.744 (範圍: 0.663-0.816)，其中UT1、UT25、UT35這三組的觀測異質度小於理論異質度。整體值為-0.013 (表2)，但6組基因座的 $F_{IS}$ 值正負並不一致，UT1、UT25、UT35大於0；UT4、UT29、UT38小於0。

## 肆、討論

### 一、非侵入性採樣法之討論

#### (一) 毛髮樣本

本研究的毛髮樣本的 PCR 擴增成功率為 47%，低於 Kendall et al. (2009) 分析 7 個基因座的 PCR 成功率 70%。在取樣上皆是採用毛髮陷阱，除了研究環境上氣候條件的差異可能影響 PCR 擴增成功率的結果之外，我們比較兩者於方法學上的差異，推論應該亦與毛髮陷阱的取樣間隔時間，以及萃取時所使用的毛髮數量有關。Kendall et al. (2009) 的取樣時間為 14 天，本研究中毛髮陷阱取樣間隔較久，約為 1 個月，故毛髮自臺灣黑熊身上脫落之後，游離暴露在外的時間短則 1 天，長則達 1 個月之久，故 DNA 降解的情況相對地也較嚴重。此外，在野外研究中，保存樣本是一件重要的事，Roon et al (2003) 建議加入二氧化矽（俗稱水玻璃）乾燥劑，可以讓毛髮樣本常溫保存 6 個月後，進行 1000 鹼基對的粒線體 DNA 目標片段之 PCR 擴大實驗，成功率約 6 成，僅略低保存在  $-20^{\circ}\text{C}$  的樣本。

在使用於萃取時的熊毛髮數量上，Kendall et al. (2009) 採用 10 根毛髮進行萃取，本研究萃取的毛髮數為 2-5 根，故在 DNA 模板的量比其研究少。此差異對於 PCR 的成功率亦應有重要的影響 (Goossens et al. 1998)。話雖如此，考量在臺灣黑熊的野外樣本難以取得的情形下，本研究顯示即使少量毛髮數 ( $\leq 5$  根) 的樣本，亦能獲得相當高的 PCR 成功率，故仍具重要的研究價值。

在臺灣，石芝菁等人 (2007) 針對亞洲黑熊的研究也指出，毛髮暴露在室外 30 天之後，長度 450 鹼基對的粒線體 DNA 目標片段之 PCR 擴增成功率為 86.7%，但到了 60 天後，則僅降低至 53.3%。然該研究使用的目標片段為粒線體 DNA 控制區上的片段，但本研究的目標片段則屬細胞核內 DNA (Nuclear DNA; nDNA)。由於特定片段於核 DNA 複本數 (Copy number) 比粒線體 DNA 為少，故若就同樣長度的 PCR 片段而言，本研究所使用的核內 DNA 的目標片段的 PCR 擴增成功率自然可能會比

在粒線體 DNA 者為低。

## (二) 排遺樣本

本研究利用黑熊排遺樣本之 PCR 擴增成功率為 34%，是已事先經過挑選較新鮮、濕潤、質地軟的樣本進行分析的結果。相較於本研究所沿用的萃取排遺 DNA 技術之研究 Hung et al. (2004)，金門地區歐亞水獺 (*Lutra lutra*) 之排遺 PCR 擴增率成功率為 65%，較本研究為高。此差異可能與該研究的樣本為每天收集的新鮮排遺有關。反之，Wasser et al. (2004) 研究美國黃石公園的棕熊和美洲黑熊發現，排遺 PCR 擴增成功率僅為 40%，與本研究結果相差不大。

此外，排遺的新鮮程度會影響其內 DNA 樣本之品質，其中排遺排放的環境是影響內含遺傳物質的保存狀況的原因之一，比如日曬、溫度及微生物分解程度，從而影響到擴增成功率。Bellemain et al. (2007) 在巴基斯坦，利用棕熊排遺監測族群指出，新鮮度在 1 至 7 天的排遺樣本的擴增成功率小於 40%，故建議減少收集大於一週。相較之下，與本研究之樣本的擴增成功率相似，新鮮度在 1 周以內的排遺樣本的擴增成功率為 38% (圖 3)，故若考量增加樣本數的情況下，則建議黑熊排遺新鮮程度在 1 周內的樣本都應該列入採集目標之內，以建構 DNA 樣本資料庫；同時建議未來研究可以進一步利用圈養的黑熊個體之排遺，搭配戶外環境狀況，檢視切確的排遺新鮮程度與擴增成功率的關係，以提供更明確的採樣依據。

我們收集排遺樣本大都集中於青剛櫟結果季，排遺內含物大多為植物，可能是因為排遺樣本中含有植物的次級化合物 (Secondary compound) 干擾 PCR 實驗進行，降低成功率 (Huber et al. 2002)。此外，在 Rutledge et al (2009) 的研究中發現，收集排遺時把排遺先用夾鍊袋包裝後，回到實驗室再移入試管中保存，此步驟會使腸道細胞附著於夾鍊袋上，使刮取到的細胞變少，得到的 DNA 含量減少，導致之後的 PCR 實驗成功率降低，建議於野外採樣時，直接將排遺刮取進試管中保存，提高後續實驗的成功率。

在臺灣山野地區由於地形崎嶇，大型哺乳類生性隱密活動範圍大，要進入動物相對高的地方，皆需徒步多日，且需攜帶食物及個人用品，相形之下野外研究較北美及其他地區困難。排遺與毛髮樣本兩種不同性質的非侵入性採樣法的樣本，所需條件與準備材料皆不相同，例如毛髮的取得需要先架設毛髮陷阱，排遺則不需要事前準備，但架設完成毛髮陷阱之後，後續工作則比排遺來的容易，排遺樣本需要酒精及 15mL 離心管的保存，毛髮樣本需要夾鍊袋及二氧化矽做保存，兩者採樣到的樣本比較體積與重量，等數量毛髮樣本比排遺樣本輕小許多。

在擴增成功率上毛髮高於排遺，雖然此研究發現在新鮮程度 1 周內的排遺樣本有 38% 成功率，但在操作面上，由於地形崎嶇且路途遙遠，只能 1 個月採集 1 次，比較之下毛髮樣本則比較沒有此問題，在石芝菁等人 (2007) 研究，模擬野外實驗，將毛髮與排遺擺放至室外，14 天後，進行 DNA 萃取與 PCR 擴增粒線體 DNA 之控制區的 450 鹼基對，排遺樣本成功率僅 30%，毛髮樣本則有 100% 的成功率，顯示毛髮 DNA 在自然環境下比排遺 DNA 保存良好。

此兩種樣本在不同季節所呈現的調查效能不一，推測應該與黑熊的行為模式有關。在非青剛櫟結果季期間，大分地區除 5 月有零星區塊分布的山櫻花 (*Prunus camjpanulata*) 果實可能吸引少數的黑熊前來此區覓食 (黃美秀等 2009a)，但由於食物資源分散且有限，黑熊停留此區的時間應該相對性的短暫。此外，夏季為臺灣黑熊的繁殖季節，此時黑熊移動範圍較大，較長時間停留大分的機會較低。當黑熊停留一地區的時間變少時，該地可以發現黑熊的排遺量則降低，再加上春、夏季山區的氣候溫暖且多雨，也會加速排遺分解率，導致不易發現黑熊排遺。由於毛髮陷阱的設置有氣味劑，可誘引於附近活動的個體前來，因此我們推測一旦有黑熊路過附近，則有很高的機率會被陷阱”捕獲”，但卻不一定會被人發現排遺。故在地形崎嶇且目標物種排遺分布稀疏的情況下，除非縮短排遺取樣的間隔，從 1 個月縮減為 0.5 個月，否則難以收集新鮮的排遺，但這對於偏遠的研究樣區而言恐怕難以執行。

### （三）基因型鑑定錯誤（Genotyping error）之影響

在非侵入性的採樣法中，遇到的問題常常是 DNA 品質差，造成 PCR 增幅後，有假性等位基因及等位基因擴增丟失等問題而造成，假個體的出現，使個體數量高估（Paetkau 2003，Pompanon et al. 2005）等問題。

在本實驗中，以多次 PCR 擴增的方式（Taberlet et al. 1996）將假性等位基因及等位基因擴增丟失出現率降到最低。也刪除掉 2 個失敗率高（UT3、UT36），2 個具有多片段容易誤判基因型的微衛星基因座（UT23、UT31），也加入規則在判定每個基因座的基因型（第 2 章第 2 節第 3 小節），增加每個樣本比較時基因座時，每個樣本可比較的數量，有助於減少假性個體的發生；但在使用規則的時候，容易使得差一點到達門檻的樣本遭刪除，使可用來後續資料分析的樣本減少，此作法避免假個體出現，避免高估族群量，但推測可能會導致族群量被低估。

此研究與黃美秀等人（2010）為同一實驗，但結果並不同。因本實驗使用 6 個微衛星基因座的資料加上本實驗將數據重新整理，利用新訂定的規則檢視每個基因座，新規則較黃美秀等人（2010）的實驗嚴謹，讓結果大不相同，但為確保本實驗的波形圖判定正確，將資料與開發本實驗所使用的微衛星基因座的臺北市立動物園動物組組長石芝菁小姐，進行波形圖及判定比對（附錄 7），避免判定上的人為錯誤，所以在結果可信度上較黃美秀等人（2010）的研究高。

## 二、大分地區臺灣黑熊遺傳多樣性

### （一）6 個基因座探討

此實驗是第一次利用六組衛星基因座（UT1、UT4、UT25、UT29、UT35、UT38）及非侵入性樣本去辨識野外臺灣黑熊個體。在毛髮與排遺樣本各別分析中，發現在 2 種樣本的 UT35 與 UT38，此 2 個基因座在多樣性檢測及哈溫平衡測試結果出現不一致的現象，推測可能是因為排遺樣本在 UT38 基因座中所辨識出個體為 37 隻（表 4），則整體排遺樣本辨識出 48 個體，其中 11 個體的 UT38 這個基因座有等位基因擴增丟失，造成等位基因頻率出現了改變。在 UT35 中，毛髮樣本等位基因個數 6 個，

排遺樣本則為 7 個，推測在這兩種樣本之等位基因個數造成其中等位基因頻率出現了改變，讓結果出現了不一致的情形，但在兩種樣本的整體哈溫平衡檢測中，結果皆為顯著偏離，表示雖然在毛髮與排遺樣本有 2 個基因座有些許差異，但毛髮與排遺樣本個別分析結果與整體結果來看並無差別，所以在以下討論中將以整體樣本結果 (n=65) 作為討論。

在毛髮及排遺樣本整體分析 65 隻個體的 6 組微衛星基因座在多態型信息量 (PIC) 的結果均大於 0.5，表示此六組為有效的遺傳多型性分析工具。此外，加上整體的個體鑑別率達到 1.381E-06，合乎估算族群數量遺傳標記的  $P_{(ID)}$  必須小於 0.01 (Miller et al. 2002) 的標準，都顯示這些基因座的多型性適用於辨識個體上。但在 6 個基因座中，理論異質度與觀測異質度上出現大小不一之情形，造成  $F_{IS}$  值不一致，都指出微衛星基因座旁的某些基因可能受到天擇或其他汰擇壓力受到影響，如果用於檢測族群遺傳變異上，可能會發生結果不一致之情形，可能會導致偏離哈溫平衡等。

## (二) 大分地區之黑熊遺傳多樣性

本研究紀錄的臺灣黑熊族群之平均理論異質度 ( $H_E$ ) 為 0.744，相較於 Paetkau (2003) 使用非侵入性法以 5-7 個基因座分析 21 個 3 種熊類 (即棕熊、美洲黑熊及懶熊, *Melursus ursinus*) 的族群遺傳資訊，理論異質度為  $0.7 < H_E < 0.8$ ，則本研究的值介於此範圍值內。就大而連續的族群來看，北美洲黑熊和棕熊的 6 基因座理論異質度為 0.799 及 0.758 (Paetkau et al. 1998)；另在日本不同地區的亞洲黑熊族群，使用 6 基因座檢測所得之理論異質度為 0.66 (Iwate, 本州岩手縣, Saito et al. 2008)，以及 0.702 (Kinki, 近畿) 和 0.737 (Honshu, 本州中部, Ohnishi et al. 2007)。然而，就破碎化的小族群來看，在日本四國 (Chugoku) 西部的 3 個地理隔離的黑熊族群，其 6 基因座的理論異質度則僅為 0.229-0.311 (Saitoh et al. 2001) 或 0.545-0.630 (Ohnishi et al. 2007)。因此，由上述與區域族群屬健全的日本亞洲黑熊或其他地區的熊類族群的基因多樣性的初步比較來看，本研究所紀錄的理論異質度數值相近於這些連續的不同熊類族群，並皆大於日本不同地區的黑熊族群 (Ohnishi et al. 2007)，顯示臺灣黑熊

應該仍維持著某種高程度的多樣性。

活動於大分地區的黑熊個體的遺傳異質度分析顯示 $H_O$ 與 $H_E$ 值相近， $F_{IS}$ 值為-0.013，較在日本小而破碎化的亞洲黑熊族群的 $F_{IS}$ 值低(Ohnishi et al. 2007)。負值表示族群無近親交配的傾向，然因 $F_{IS}$ 十分趨近於0，因此我們認為近親交配的效應應該可以忽略。

然而在評估哈溫平衡(Hardy-Weinberg equilibrium)的整體P值顯示族群偏離哈溫平衡。哈溫平衡是描述一個族群的遺傳平衡狀態，其前提為在一個隨機交配的夠大族群中，可以忽略突變等隨機因素，無天擇及其他汰擇，等位基因的出現頻率將維持一常數，且不同基因間的頻度比例也是固定。因此，任何違反上述假定的情況皆可能導致偏離哈溫平衡的情況。

對此我們推論可能原因，本研究所偵測到的黑熊個體大部分集中於青剛櫟季節在大分地區活動，並在青剛櫟結果季結束或該區堅果可得度降低之後，黑熊便陸續離開此區域；事實上，大部分的這些黑熊個體一年的大部分時間都分散在其他地區(Hwang et al. 2010)。此外，有學者指出臺灣黑熊繁殖期為2-7月(楊吉宗等 2006)，然在這段時間，原本可能季節性聚集於大分地區的黑熊則已返回其一般的活動範圍(Hwang et al. 2010)。從而偏離哈溫平衡。雖然早期的無線電追蹤資料顯示熊個體離開大分之後，亦有四散分別往東或往西的趨勢，此二區域的個體活動範圍除大分地區之外並無重疊(Hwang et al. 2010)，故繁殖季恐鮮有接觸的機會。若是如此，可能違反哈溫平衡之隨機交配假定。然而，本研究結果的 $F_{IS}$ 值為-0.013，此值甚小可忽略，支持大分族群仍然維持隨機交配，推測由於黑熊廣泛的活動範圍、移動能力強，以及無線電追蹤技術在時空上的應用限制和取樣偏差，加上樣區並無天然或人為阻隔效應，非隨機交配存在的可能性應該極低。

在石芝菁等人(2012)的研究，利用46個已知來源的臺灣黑樣本擴增其粒線體DNA之控制區700個鹼基對，定序後發現了5個單套型，其中玉山國家公園及周遭的地區30個樣本僅發現2個單套型，雪霸國家公園及拉拉山地區各發現一個單套型。在過去無線追蹤資料(Hwang et al. 2010)

發現在大分捕捉後，追蹤個體離開大分後，分別往東至拉庫拉庫河流域、往西至荖濃溪下游的區域活動，但並沒有個體向北橫跨玉山-馬博橫斷的記錄，推測目前大分地區臺灣黑熊具有存在地理或其他因素造成的生殖隔離，可能造成小族群的現象，而有造成遺傳漂變（Genetic drift）的現象，或是過去有經歷過曾經受到瓶頸效應（Bottleneck effect），但以本實驗資料看起來，目前的大分的黑熊族群，仍處於一個健康的狀態，但對於之後的族群監測，勢必需要長期監測，才能瞭解整個族群的趨勢。此外，目前由於國內目前缺乏多年長期追蹤黑熊個體的資料，個體跨年度的移動資訊不足，因此除非增進此方面資訊的收集，同時增加建構否則與大分以外區域的黑熊遺傳資訊，目前臺灣黑熊仍缺乏詳細的資料可提供切確佐證。

### 三、黑熊在大分地區的族群結構與月份之關係

在大分地區青剛櫟結果季，臺灣黑熊個體活動於大分地區的情況與活動此區的個體數量及其停留時間有密切關係，此則與大分地區青剛櫟結果量及玉山國家公園園區其他地區的果實相對豐富程度有關（Hwang 2003, Hwang et al. 2010）。黑熊於青剛櫟結果季前（9月）就有少部份來到大分地區，在11月達到最高峰，在12月之後陸續離開。此外，與同時期自動照相機的紀錄結果相較，與檢測個體數的相對變化量一致（林冠甫 2009）。

Garshelis (2009) 之研究指出每當熊聚集在一起時，雖偶有因爭奪食物而起的小爭執，但熊群通常會保持和諧的關係；一般減少紛爭主要透過承認彼此的位階關係，即體型碩大並掌握優勢的雄性成熊通常會擁有最優渥的覓食地點和最好的覓食時段，並且排除雌性個體，雌性個體會明顯的遠離或躲避雄性集中的覓食地點，導致雌雄會有些隔離（Sexual segregation, 目前已有五種熊的記錄）的情形；在研究者早期在大分地區捕捉繫放和無線電追蹤黑熊發現，雌性或亞成體在時間上和空間上有與成體雄性區隔的情況，這樣有助於避免在有限的資源地區產生衝突（Hwang et al. 2010）。

但在2008年結果季時，卻沒有發生性別失衡之情形，我們推測與採

集樣本區域位置有關，目前沒有青剛櫟結果時黑熊活動模式的詳細資料，無法確定雄性覓食的核心區位置，由於本實驗採集樣本位置涵蓋所有大分地區（圖一），如果雄性聚集在青剛櫟結果最好的地區，雌性及亞成體在周圍活動，但採集樣本時又無法區隔，這樣可能把所有個體一同分析，讓結果看起來沒有性別失衡的現象。

在 Hwang et al. (2010) 無線電追蹤資料發現，雖然在青剛櫟結果季大分地區捕獲黑熊個體，但並不是每隻個體都會在大分地區停留，其中有些個體在被捕獲之後，便離開大分，表示本實驗所辨識出的個體並不是所有個體都在青剛櫟結果季時留在大分，所以我們假設我們所採樣到所有樣本中，個體出現在 2 個樣本中，我們認為他在大分地區有停留。本研究樣區範圍不及  $10\text{km}^2$ ，以  $10\text{km}^2$  計算，相較於臺灣黑熊活動範圍可謂甚小，加上在青剛櫟結果季時 90% (59/65) 的熊出現大分地區，算出 2008 青剛櫟結果季時，有 3 隻/ $\text{km}^2$  (30/10) 相較於在美國的路易斯安那州的美洲黑熊 0.365 隻/ $\text{km}^2$  (Boersen et al. 2003) 來的高。

2008 年青剛櫟結果季為 2006-2009 年監測結果量以來的最高峰（黃美秀等 2010），聚集的黑熊眾多；在 Garshelis (2009) 研究指出食物量相較豐富但食物豐富度高且族群密度大時，美洲黑熊 (*Ursus americanus*) 活動領域的重疊度會增高，但在大多數的族群中，卻沒有證據顯示領域行為；在高密度的地方，大部分的熊就算彼此活動範圍很接近，但也能避免在相同時間使用相同重覆的活動地區。較有名的案例諸如棕熊及美洲黑熊會有大量群聚在鮭魚產卵季 (Salmon stream) 的溪流中捕捉鮭魚 (Egbert et al. 1976)，或是在野果豐富或玉米成熟期的地區，也都會吸引熊群聚集覓食。因此，每當地區的食物資源豐富度提高，總會吸引熊群集中覓食，儘管其間總會有一段長期時間不被使用，大分地區之於臺灣黑熊的情況也是如此。

雖然本研究無法得知季節性活動於大分地區的黑熊源自何處，然而無線電追蹤的資料顯示，在青剛櫟季於大分被捕獲並繫掛無線電追蹤發報器的個體於離開大分後，通常是青剛櫟果實的可得性變低時，並沒有任一個體繼續長期居留於大分地區，顯示此區域僅為這些黑熊活動範圍

的一部份，無線電追蹤期間也未發現這些個體在青剛櫟季以外的時間密集在利用大分地區的情況 (Hwang et al. 2010)。這些密集無線電追蹤的 8 隻個體有一半會移動至玉山國家公園以外的範圍，最遠移動至國家公園疆界以外 6 km 處。牠們後續並居留該區數月或超過一年以上的時間。在青剛櫟結果豐碩的時候，熊會聚集在大分地區，但遇到青剛櫟可得性較低時候，則不會留在大分地區 (Hwang et al. 2010)，此時黑熊可能擴增活動範圍到國家公園外，到達人類所活動的地區取食。最後提供毛髮及排遺標準作業程序，提供未來想利用非侵入性採樣法所採集到的樣本進行研究的人一些參考 (附錄 5、6)。

## 伍、結論

本研究以六組微衛星基因座應用於兩種非侵入性採樣法所採集的樣本，實驗證實，可應用於野外樣本，具有高度的個體鑑別度。毛髮較排遺樣本的擴增成功率為高。如果要提高排遺樣本擴增成功率，可採集排遺時，儘量採集 1 周內的新鮮排遺，避免將樣本裝入夾鍊袋中，直接裝入離心管中，去進行實驗室分析。採集毛髮樣本時可加入二氧化矽（乾燥劑），減少 DNA 降解，提高大成功率。

2008 年 2 月至 2009 年 1 月的毛髮與排遺樣本的微衛星基因座鑑定結果顯示，黑熊出現於大分的區的頻度隨季節而有很大波動，2008 年青剛櫟結果為過去 4 年中產量最高者，吸引大量黑熊聚集，活動於青剛櫟結果季的個體數為非青剛櫟結果季的 10 倍，個體數量變化與同時間大分地區自動相機相對量一致。

在辨識出 65 隻個體中，其遺傳多樣性與熊類經營管理尚屬健全的日本亞洲黑熊或北美洲之美洲黑熊多樣性相較，大分地區臺灣黑熊族群之理論異質度為 0.744，顯示臺灣黑熊尚維持著較高的遺傳多樣性。

由於目前缺乏長期追蹤黑熊個體資料及個體跨年度資訊，難以去正確推斷族群偏離哈溫平衡定律的因素，與性別間活動模式差異。此地區的臺灣黑熊可能有著潛在的生殖隔離等現象，需要更多大分以外的黑熊樣本進行遺傳研究，及更多活動模式資料去了解大分族群現況。

## 參考文獻

- 王穎、陳添喜。1991。台灣黑熊之生態學研究及其經營管理策略(II)。行政院農委會。行政院農業委員會生態研究第 014 號。
- 王穎、陳輝勝、黃美秀、高美芳。1992。台灣黑熊之生態學研究及其經營管理策略(III)。行政院農業委員會生態研究第 0130 號。
- 石芝菁、陳慧倫、賴靜怡。2007。臺灣黑熊親緣關係建立與保育遺傳應用。臺北市立動物園。13 頁。
- 石芝菁、黃美秀、李壽先、李玲玲。2012。台灣黑熊之親緣探究及遺傳多樣性。台灣黑熊保育回顧與展望研討會，台灣黑熊保育協會主辦。臺北市，市立動物園貓熊館。
- 林冠甫。2009。玉山國家公園大分地區櫟實結果對於大型哺乳動物豐富度之影響，國立屏東科技大學碩士論文。115 頁。
- 李俊億、謝幸媚。2008。親子鑑定的演算邏輯。臺大出版中心，臺北市。209 頁。
- 陳元龍、楊吉宗。2002。台灣地區野生及圈飼黑熊遺傳變異之初探。特有生物研究。4：73-77。
- 陳亞萱。2009。亞洲黑熊之表面消化率及校正係數。國立屏東科技大學碩士論文。75 頁。
- 楊吉宗、毛嘉洪、張耿瑞、何東輯、詹芳澤。2006。利用糞類固醇激素監測圈養台灣黑熊的繁殖狀態。特有生物研究 8(1):1-11。
- 黃傳景。2005。利用排遺 DNA 標定法探討金門地區水獺之族群遺傳結構與雌雄播遷模式之差異。國立台灣大學碩士論文。49 頁。
- 黃美秀、林冠甫、何冠助。2010。玉山國家公園台灣黑熊族群生態及遺傳狀況評估研究(1/4)。內政部營建署玉山國公園管理處。94 頁。
- 黃美秀、林冠甫、張書德、何冠助、葉炯章。2009a。玉山國家公園台灣黑熊族群生態學及保育研究(4/4)。內政部營建署玉山國公園管理處。133 頁。
- 黃美秀、林冠甫、賴秀芬。2008。玉山國家公園台灣黑熊族群生態學及保育研究(3/4)。內政部營建署玉山國家公園管理處。75 頁。
- 黃美秀、林冠甫。2007。玉山國家公園台灣黑熊族群生態學及保育研究

- (2/4)。內政部營建署玉山國家公園管理處。48 頁。
- 黃美秀、祈偉廉、吳尹仁。2006。玉山國家公園台灣黑熊族群生態學及保育研究 (1/4)。內政部營建署玉山國家公園管理處。53 頁。
- 黃美秀、賴秀芬、林冠甫、葉慶龍。2009b。玉山國家公園台灣黑熊重要棲息地-大分地區之植群生態及森林更新。國家公園學報，19:62-82。
- 儲瑞華、吳海音、林曜松。2000。台灣黑熊 (*Selenarctos thibetanus formosanus*) 的 DNA 鑑定初探。動物園學報 12:25-34。
- Bellemain, E., M. Nawaz, A. Valentini, J. Swenson, and P. Taberlet. 2007. Genetic tracking of the brown bear in northern Pakistan and implications for conservation. *Biological Conservation* 134:537-547.
- Bellemain, E., J. Swenson, D. Tallmon, S. Brunberg, and P. Taberlet. 2005. Estimating population size of elusive animals with DNA from hunter-collected feces: four methods for brown bears. *Conservation Biology* 19:150-161.
- Boersen, M. R., J. D. Clark, and T. L. King. 2003. Estimating black bear population density and genetic diversity at Tensas River, Louisiana using microsatellite DNA markers. *Wildlife Society Bulletin*:197-207.
- Bostein, D., R. L. White, M. Skolnick, and R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331.
- Choi, E. H., S. K. Kim, S. H. Ryu, K. H. Jang, and U. W. Hwang. 2010. Mitochondrial genome phylogeny among Asiatic black bear *Ursus thibetanus* subspecies and comprehensive analysis of their control regions. *Mitochondrial DNA* 21:105-114.
- Chu, J.-H., Y.-S. Lin, and H.-Y. Wu. 2006. Applicability of Non-Invasive Sampling in Population Genetic Study of Taiwanese Macaques (*Macaca cyclopis*). *Taiwania* 51:258-265.
- Creel, S., G. Spong, J. L. Sands, J. Rotella, J. Zeigle, L. Joe, K. M. Murphy, and D. Smith. 2003. Population size estimation in Yellowstone wolves

- with error-prone noninvasive microsatellite genotypes. *Molecular Ecology* 12:2003-2009.
- Egbert, A. L., A. W. Stokes, and A. L. Egbert. 1976. The Social Behaviour of Brown Bears on an Alaskan Salmon Stream. *Bears: Their Biology and Management* 3:41-56.
- Garshelis, D. L. 2009. Family Ursidae (bears). Pages 448-497 in D. E. Wilson, and R. A. Mittermeier, eds. *Handbook of the Mammals of the World*. Lynx Edicions, Barcelona, Spain.
- Garshelis, D. L., H. Wang, D. J. Wang, X. J. Zhu, S. Li, and W. J. McShea. 2008. Do revised giant panda population estimates aid in their conservation? *Ursus* 19:168-176.
- Goodwin, W., A. Linacre, and S. Hadi. 2007. *An introduction to forensic genetics*. Wiley.
- Goossens, B., L. Waits, and P. Taberlet. 1998. Plucked hair samples as a source of DNA: reliability of dinucleotide microsatellite genotyping. *Molecular Ecology* 7:1237-1241.
- Goudet, J. 1995. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* 86:485-486.
- Greenberg, C. H., and B. R. Parresol. 2002. Dynamics of acorn production by five species of Southern Appalachian oaks. Pages 149-172 in W. J. McShea, and W. M. Healy, eds. *Oak forest ecosystems: ecology and management for wildlife*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.
- Huber, S., U. Bruns, and W. Arnold. 2002. Sex determination of red deer using polymerase chain reaction of DNA from feces. *Wildlife Society Bulletin*:208-212.
- Hung, C. M., S. H. Li, and L. L. Lee. 2004. Faecal DNA typing to determine the abundance and spatial organisation of otters (*Lutra lutra*) along two stream systems in Kinmen. *Animal Conservation* 7:301-311.
- Hwang, D.-S., J.-S. Ki, D.-H. Jeong, B.-H. Kim, B.-K. Lee, S.-H. Han, and

- J.-S. Lee. 2008. A comprehensive analysis of three Asiatic black bear mitochondrial genomes (subspecies *ussuricus*, *formosanus* and *mupinensis*), with emphasis on the complete mtDNA sequence of *Ursus thibetanus ussuricus* (Ursidae). *Mitochondrial DNA* 19:418-429.
- Hwang, M.-H. 2003. Ecology of Asiatic black bears (*Ursus thibetanus formosanus*) and people-bear interactions in Yushan National Park, Taiwan. University of Minnesota, Twin Cities, Minnesota, USA.
- Hwang, M.-H., D. L. Garshelis, Y.-H. Wu, and Y. Wang. 2010. Home ranges of Asiatic black bears in the Central Mountains of Taiwan: Gauging whether a reserve is big enough. *Ursus* 21:81-96.
- Hwang, M.-H., and Y. Wang. 2006. The status and management of Asiatic black bears in Taiwan. Pages 107-110 in T. Oi, (ed.) *Understanding Asian Bears to Secure Their Future*. Japan Bear Network Press, Japan.
- Hwang, M. H., D. L. Garshelis, and Y. Wang. 2002. Diets of Asiatic black bears in Taiwan, with methodological and geographical comparisons. *Ursus* 13:111-125.
- Jeffreys, A. J., V. Wilson, and S. L. Thein. 1985. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature* 316: 76-79
- 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.
- Kan, Y. W., and A. M. Dozy. 1978. Polymorphism of DNA sequence adjacent to human beta-globin structural gene: relationship to sickle mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 75:5631-5635.
- Kendall, K. C., J. B. Stetz, J. Boulanger, A. C. Macleod, D. Paetkau, and G. C. White. 2009. Demography and Genetic Structure of a Recovering Grizzly Bear Population. *Journal of Wildlife Management* 73:3-17.
- Kirkpatrick, R. L., and P. J. Pekins. 2002. Nutritional value of acorns for wildlife. Pages 173-181 in W. J. McShea, and W. M. Healy, (eds.) *Oak*

- forest ecosystems: ecology and management for wildlife. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.
- Kocher, T. D., W. K. Thomas, A. Meyer, S. V. Edwards, S. Pääbo, F. X. Villablanca, and A. C. Wilson. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86:6196-6220.
- McShea, W. J., W. M. Healy, P. Devers, T. Fearer, F. H. Koch, D. Stauffer, and J. Waldon. 2007. Forestry matters: Decline of oaks will impact wildlife in hardwood forests. *Journal of Wildlife Management* 71:1717-1728.
- Miller, C. R., P. Joyce, and L. P. Waits. 2002. Assessing allelic dropout and genotype reliability using maximum likelihood. *Genetics* 160:357-366.
- Murphy, M. A., L. P. Waits, and K. C. Kendall. 2003. The influence of diet on faecal DNA amplification and sex identification in brown bears (*Ursus arctos*). *Molecular Ecology* 12:2261-2265.
- O'Connell, M., M. Dillon, and J. Wright. 1998. Development of primers for polymorphic microsatellite loci in the Pacific herring (*Clupea harengus pallasii*). *Molecular Ecology* 7:358-360.
- Ohnishi, N., T. Saitoh, Y. Ishibashi, and T. Oi. 2007. Low genetic diversities in isolated populations of the Asian black bear (*Ursus thibetanus*) in Japan, in comparison with large stable populations. *Conservation Genetics* 8:1331-1337.
- Ouborg, N. J., C. Pertoldi, V. Loeschcke, R. K. Bijlsma, and P. W. Hedrick. 2010. Conservation genetics in transition to conservation genomics. *Trends in Genetics* 26:177-187.
- Paetkau, D. 2003. An empirical exploration of data quality in DNA-based population inventories. *Molecular Ecology* 12:1375-1387.
- Paetkau, D., L. P. Waits, P. L. Clarkson, L. Craighead, E. Vyse, R. Ward, and C. Strobeck. 1998. Variation in genetic diversity across the range of

- North American brown bears. *Conservation Biology* 12:418-429.
- Pagès, M., C. Maudet, E. Bellemain, P. Taberlet, S. Hughes, and C. Hänni. 2009. A system for sex determination from degraded DNA: a useful tool for palaeogenetics and conservation genetics of ursids. *Conservation Genetics* 10:897-907.
- Parsons, K. M., J. F. Dallas, D. E. Claridge, J. W. Durban, K. C. Balcomb Iii, P. M. Thompson, and L. R. Noble. 1999. Amplifying dolphin mitochondrial DNA from faecal plumes. *Molecular Ecology* 8:1766-1768.
- Pearse, D. E., C. M. Eckerman, F. J. Janzen, and J. C. Avise. 2001. A genetic analogue of 'mark-recapture' methods for estimating population size: an approach based on molecular parentage assessments. *Molecular Ecology* 10:2711-2718.
- Pompanon, F., A. Bonin, E. Bellemain, and P. Taberlet. 2005. Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics* 6:847-846.
- Roon, D., L. Waits, and K. Kendall. 2003. A quantitative evaluation of two methods for preserving hair samples. *Molecular Ecology Notes* 3:163-166.
- Rousset, F. 2008. genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8:103-106.
- Rutledge, L. Y., J. J. Holloway, B. R. Patterson, and B. N. White. 2009. An improved field method to obtain DNA for individual identification from wolf scat. *Journal of Wildlife Management* 73:1430-1435.
- Saitoh, T., Y. Ishibashi, H. Kanamori, and E. Kitahara. 2001. Genetic status of fragmented populations of the Asian black bear *Ursus thibetanus* in western Japan. *Population Ecology* 43:221-227.
- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18:233-234.

- Shih, C.-C., M.-H. Hwang, S.-H. Li, h.-Y. hou, J. Gong, H. J. Bacon, and L.-L. Lee. 2009a. Phylogenetic comparisons of Formosan black bear (*Ursus thibetanus formosanus*) and Asiatic black bear in Adjacent areas. (台灣黑熊與鄰近地區亞洲黑熊之遺傳變異與分子親源分析). International Symposium on Conservation of the Asiatic Black Bear (2009 亞洲黑熊保育國際研討會). p52-53 (Oral 4-2).
- Shih, C.-C., S.-H. Li, M.-H. Hwang, and L.-L. Lee. 2009b. Ten novel tetranucleotide microsatellite DNA markers from Asiatic black bear, *Ursus thibetanus*. Conservation Genetics:1-3.
- Sloane, M., P. Sunnucks, D. Alpers, L. Beheregaray, and A. Taylor. 2000. Highly reliable genetic identification of individual northern hairy-nosed wombats from single remotely collected hairs: a feasible censusing method. Molecular Ecology 9:1233-1240.
- Southern, E. M. 1970. Base sequence and evolution of guinea-pig alpha-satellite DNA. Nature 227: 794-798.
- Taberlet, P., S. Griffin, B. Goossens, S. Questiau, V. Manceau, N. Escaravage, L. P. Waits, and J. Bouvet. 1996. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. Nucleic Acids Research 24:3189-3194.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Res. 17: 6463-6471.
- Tsai, C.-L., Y.-C. Chou, C.-C. Shih, H.-C. Cheng, C.-C. Yang, and H.-W. Kao. 2009. The complete mitochondrial genome of the Formosan black bear (*Ursus thibetanus formosanus*). Zootaxa 1971:50-58.
- Vaughan, M. R. 2002. Oak trees, acorns, and bears. Pages 224-240 in W. J. McShea, and W. M. Healy, eds. Oak forest ecosystems: ecology and management for wildlife. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland, USA.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. v. d. Lee, M. Hornes, A. Friters, J. Pot, J. Paleman, M. Kuiper, and M. Zabeau. 1995. AFLP: a

- new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23:4407-4414.
- Waits, L. P., G. Luikart, and P. Taberlet. 2001. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Molecular Ecology* 10:249-256.
- Wang, Y. 1999. Status and management of the Asiatic black bear in Taiwan. Pages 213-215 in C. Servheen, C. Herrero, and B. Peyton, eds. *Bears: status survey and conservation action plan*, IUCN, Gland, Switzerland.
- Wasser, S. K., B. Davenport, E. R. Ramage, K. E. Hunt, M. Parker, C. Clarke, and G. Stenhouse. 2004. Scat detection dogs in wildlife research and management: application to grizzly and black bears in the Yellowhead Ecosystem, Alberta, Canada. *Canadian Journal of Zoology* 82:475-492.
- Wilberg, M. J., and B. P. Dreher. 2004. GENECAP: a program for analysis of multilocus genotype data for non-invasive sampling and capture-recapture population estimation. *Molecular Ecology Notes* 4:783-785.
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18:6531-6535.
- Woodruff, D. 1993. Non-invasive genotyping of primates. *Primates* 34:333-346.
- Woods, J., D. Paetkau, D. Lewis, B. McLellan, M. Proctor, and C. Strobeck. 1999. Genetic tagging of free-ranging black and brown bears. *Wildlife Society Bulletin* 27:616-627.
- Wright, S. 1978. *Evolution and the Genetics of Populations*. vol. 4. *Variability Within and Among Natural Populations*. University of Chicago Press, Chicago.

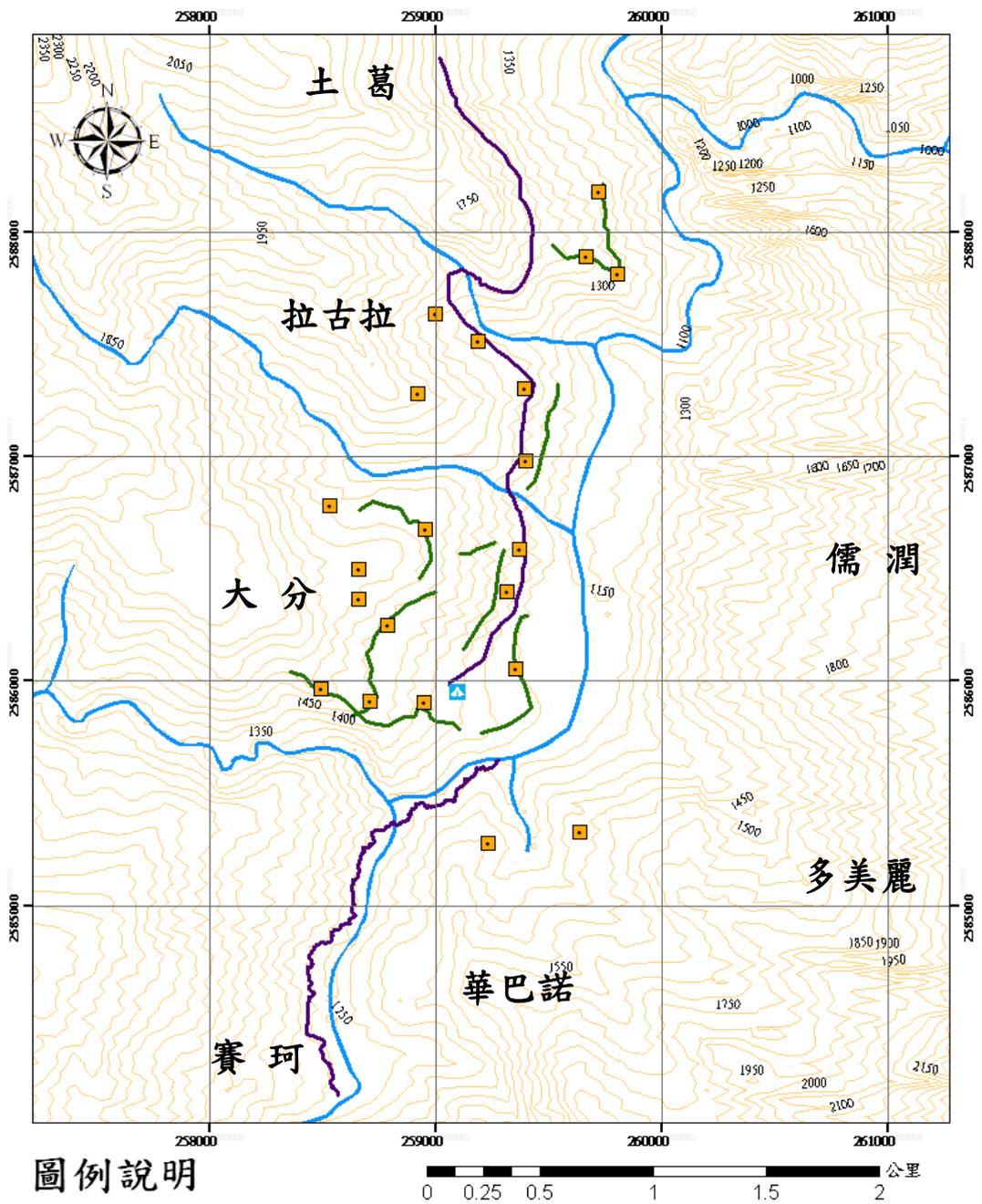


圖 1、大分研究樣區長期調查樣線及樣點的分布。包括排遺調查樣線、年度熊痕跡調查樣線和熊毛陷阱（座標系統為 TWD-67）。

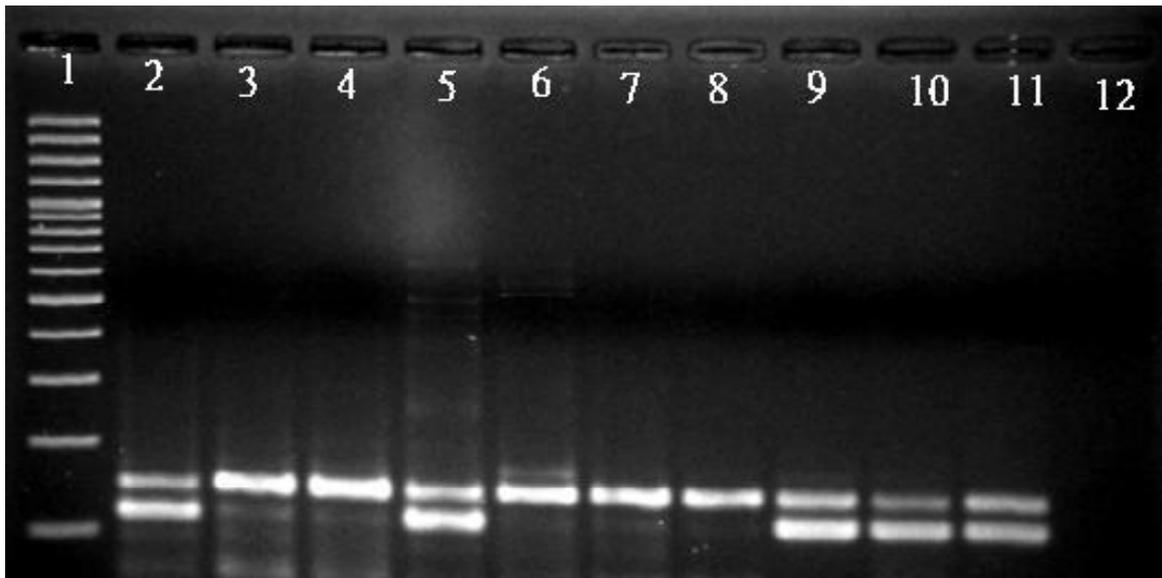


圖 2、臺灣黑熊排遺樣本進行性別鑑定之電泳膠圖。Lane 2, 5, 9,10 鑑別為雄性；Lane 3, 4, 6, 7, 8 鑑別為雌性；Lane 1 為 DNA 分子量標準液(100 bp marker)；Lane 11 為正控制組；Lane 12 為負控制組。

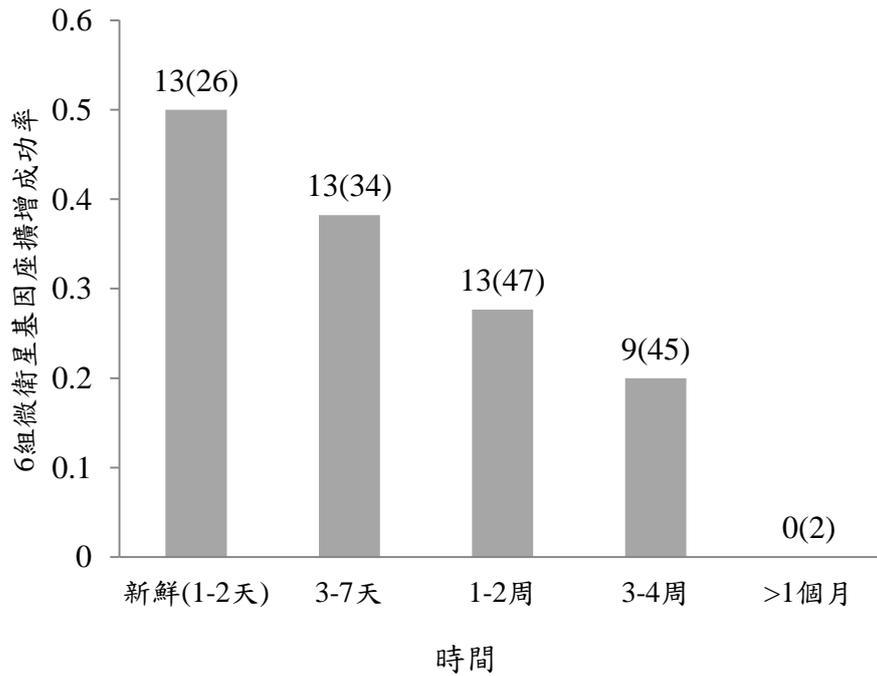


圖 3、臺灣黑熊排遺樣本在 6 組微衛星基因座擴增成功率與排遺樣本新鮮程度之關係圖。長條圖頂端數字：e.g.13(26)，13：成功擴增樣本數；26：實驗所用樣本數（Spearman's rho,  $r = -0.234$ ,  $p = 0.002$ ,  $n = 154$ ）。

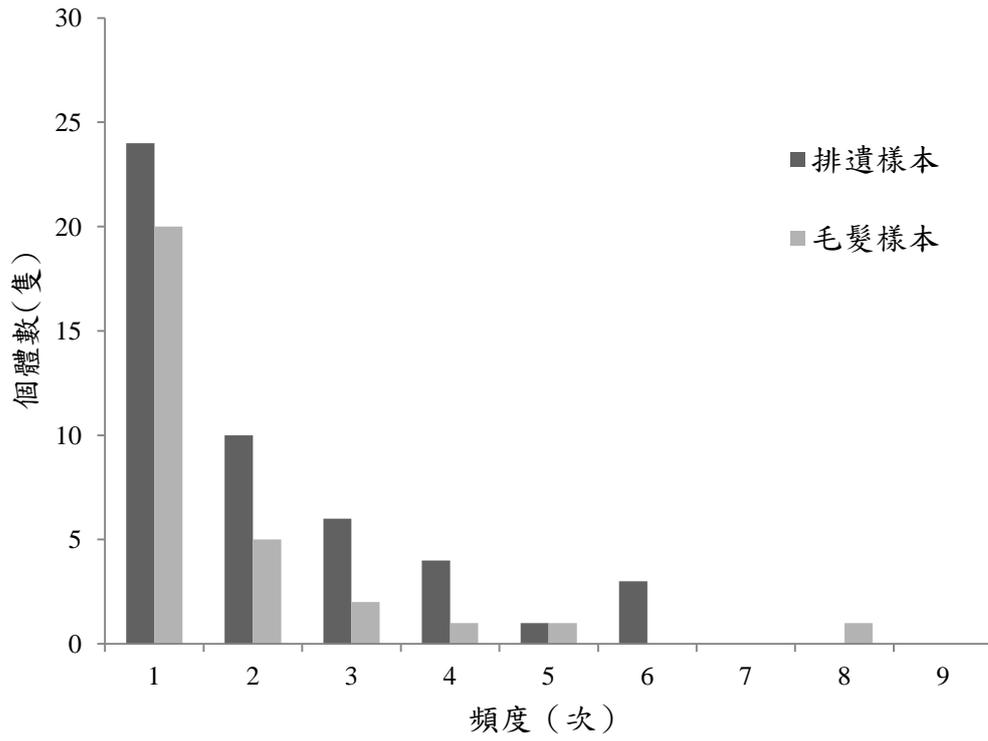


圖 4、毛髮及排遺樣本以非侵入性採樣法採集樣本之頻度與個體關係圖，其中深灰色及淺灰色長條圖分別代表排遺與毛髮樣本。

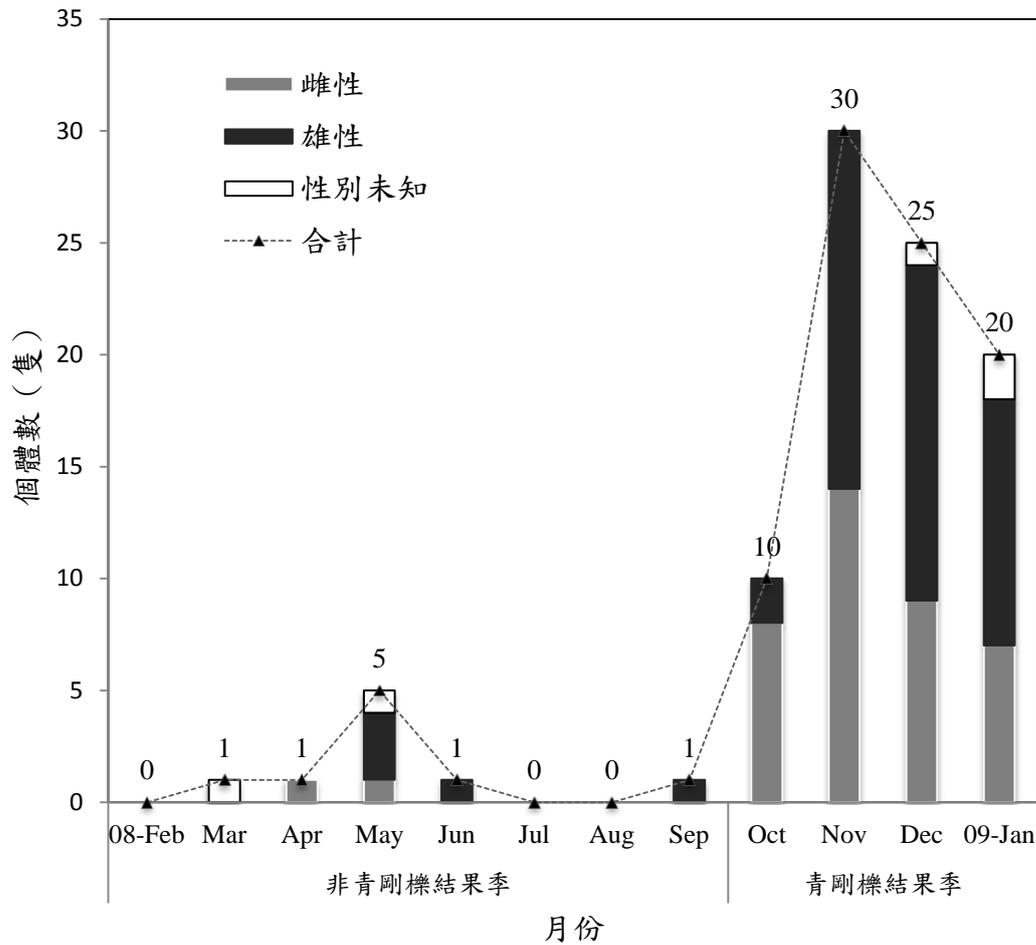


圖 5、2008 年 2 月至隔年 1 月大分地區利用毛髮及排遺樣本判定出臺灣黑熊個體及性別的各月變化圖。非青剛櫟結果季：2 月至 9 月；青剛櫟結果季：10 月至隔年 1 月。折線圖：每月記錄個體總數；灰色長條圖：每月出現雌性個體數；黑色長條圖：每月出現雄性個體數；白色長條圖：每月出現性別未知個體數。三角形上的數字為該月紀錄之個體總數。

表 1、2008 年 2 月至 2009 年 1 月各月所採集的毛髮與排遺樣本數、進行初步篩選樣本數、擴增成功樣本數及辨識個體數。

	非青剛櫟結果季								青剛櫟結果季			合 計	
	08- Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec		09- Jan
<b>毛髮樣本：</b>													
採集樣本數	1	1	3	13	3	0	0	8	20	68	64	47	<b>228</b>
初步篩選樣本數	1	1	1	6	3	0	0	4	9	32	29	26	<b>112</b>
擴增成功樣本數 <sup>a</sup>	0	1	1	5	1	0	0	1	7	11	16	10	<b>53</b>
個體數	0	1	1	5	1	0	0	1	6	10	9	8	<b>30</b>
<b>排遺樣本：</b>													
採集樣本數	0	0	1	0	0	0	0	1	17	137	62	103	<b>321</b>
初步篩選樣本數	0	0	1	0	0	0	0	0	17	137	62	73	<b>290</b>
擴增成功樣本數 <sup>a</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	11	35	28	27	<b>101</b>
個體數	0	0	0	0	0	0	0	0	5	23	19	14	<b>48</b>

<sup>a</sup>:成功擴增 6 組微衛星基因座，等位基因擴增丟失少於 2 個以上之樣本。

表 2、2008 年 2 月至 2009 年 1 月，大分地區每月臺灣黑熊毛髮及排遺樣本所辨識出個體與性別表。

樣本數	非青剛櫟結果季								青剛櫟結果季				合計
	08-Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec	09-Jan	
<b>毛髮樣本：</b>													
雄性	0	0	0	3	1	0	0	1	1	3	3	3	<b>11</b>
雌性	0	0	1	1	0	0	0	0	5	7	6	4	<b>16</b>
未知性別	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	<b>3</b>
小計	0	1	1	5	1	0	0	1	6	10	9	8	<b>30</b>
<b>排遺樣本：</b>													
雄性	0	0	0	0	0	0	0	0	1	14	13	9	<b>28</b>
雌性	0	0	0	0	0	0	0	0	4	9	5	4	<b>18</b>
未知性別	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	<b>2</b>
小計	0	0	0	0	0	0	0	0	5	23	19	14	<b>48</b>
<b>合計</b>													
雄性	0	0	0	3	1	0	0	1	2	16	15	11	<b>33</b>
雌性	0	0	1	1	0	0	0	0	8	14	9	7	<b>27</b>
未知性別	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	2	<b>5</b>
總個體數	0	1	1	5	1	0	0	1	10	30	25	20	<b>65</b>

表 3、2008 年 2 月至 2009 年 1 月，大分地區臺灣黑熊毛髮樣本之 6 個微衛星基因多樣性表 (n=30)。(k：等位基因數目；H<sub>O</sub>：觀測異質度；H<sub>E</sub>：理論異質度；PIC:多態信息量；P-value：利用費氏精確測驗法估算有無偏離哈溫平衡；P<sub>(ID)</sub>:個體鑑別率；N：個體數；S.D.：標準差 (Standard Deviation)。

Locus	k	H <sub>O</sub>	H <sub>E</sub>	PIC	P-value	F <sub>IS</sub>	P <sub>(ID)</sub>	N
UT1	4	0.536	0.699	0.621	0.002	0.233	0.163	28
UT4	6	0.897	0.679	0.613	0.0015	-0.321	0.168	29
UT25	4	0.633	0.688	0.624	0.3013	0.080	0.157	30
UT29	7	0.893	0.832	0.795	0.0602	-0.073	0.055	28
UT35	6	0.867	0.825	0.785	0.0904	-0.051	0.062	30
UT38	8	0.88	0.824	0.78	0.0045	-0.068	0.067	25
mean	5.83	0.784	0.757	0.703	-	-	-	28.33
S.D.	1.46	0.144	0.069	-	-	-	-	1.70
overall	-	-	-	-	*	-0.035	9.76E-07	-

\* :  $p < 0.05$

表 4、2008 年 2 月至 2009 年 1 月，大分地區臺灣黑熊毛髮樣本之 6 個微衛星基因多樣性表 (n=48)。(k: 等位基因數目;  $H_O$ : 觀測異質度;  $H_E$ : 理論異質度; PIC: 多態信息量; P-value: 利用費氏精確測驗法估算有無偏離哈溫平衡;  $P_{(ID)}$ : 個體鑑別率; N: 個體數; S.D.: 標準差 (Standard Deviation)。

Locus	k	$H_O$	$H_E$	PIC	P-value	$F_{IS}$	$P_{(ID)}$	N
UT1	4	0.591	0.611	0.532	<0.0001	0.033	0.232	44
UT4	7	0.837	0.7	0.647	0.0139	-0.196	0.142	43
UT25	5	0.66	0.685	0.627	0.1417	0.036	0.155	47
UT29	7	0.822	0.778	0.737	0.1183	-0.057	0.087	45
UT35	7	0.756	0.81	0.772	0.0001	0.067	0.069	45
UT38	8	0.892	0.78	0.735	0.6759	-0.144	0.095	37
mean	6.33	0.75	0.727	0.675	-	-	-	43.5
S.D.	1.37	0.105	0.069	-	-	-	-	3.1
overall	-	-	-	-	*	-0.045	2.87E-06	-

\* :  $p < 0.05$

表 5、2008 年 2 月至 2009 年 1 月，大分地區臺灣黑熊毛髮及排遺樣本之 6 個微衛星基因多樣性表 (n=65)。k：等位基因數目；H<sub>O</sub>：觀測異質度；H<sub>E</sub>：理論異質度；PIC：多態信息量；P-value：利用費氏精確測驗法估算有無偏離哈溫平衡；P<sub>(ID)</sub>：個體鑑別率；N：個體數；S.D.：標準差 (Standard Deviation)。

Locus	k	H <sub>O</sub>	H <sub>E</sub>	PIC	P-value	F <sub>IS</sub>	P (ID)	N
UT1	4	0.567	0.663	0.589	<0.0001	0.144	0.188	60
UT4	7	0.831	0.694	0.642	0.0005	-0.197	0.145	59
UT25	5	0.656	0.688	0.630	0.1941	0.0465	0.152	64
UT29	7	0.820	0.800	0.767	0.0214	-0.025	0.069	61
UT35	7	0.774	0.816	0.782	<0.0001	0.051	0.063	62
UT38	8	0.88	0.807	0.771	0.0292	-0.090	0.074	50
Mean	6.33	0.754	0.744	0.697	-	-	-	59.3
S.D.	1.51	0.022	0.028	0.078	-	-	-	4.4
Overall	-	-	-	-	*	-0.013	1.381E-06	-

\* :  $p < 0.05$

附錄 1、2008 年 3 月至 2009 年 2 月，大分地區所有毛髮陷阱位點資料。(座標系統為 TWD-67)

陷阱名稱	東距 (X 座標)	北距 (Y 座標)	海拔(公尺)
HT-SAKULA-01	259397	2587300	1390
HT-SAKULA-02	259185	2587511	1412
HT-DFFALL	259399	2586983	1338
HT-LAGULA	259000	2587615	1465
HT-T4-01	259630	2587898	1457
HT-T4-02	259800	2587822	1386
HT-T4-03	259730	2588220	1310
HT-T5-02	258789	2586246	1500
HT-T5-03	258713	2585906	1490
HT-T6-01	259497	2585957	1612
HT-T6-02	259033	2585839	1360
HT-T7-01	259357	2586050	1280
HT-T8-01	258968	2586490	1537
HT-SARVI	258662	2586495	1653
HT-DIMU	258660	2586363	1624
HT-DN-01	259316	2586406	1312
HT-DN-02	259375	2586590	1300
Dafall Up	258921	2587277	1679
Gagadu Hair	258526	2586773	1576
Wabano Ht	259234	2585273	1451
Wabano 2 Ht	259640	2585324	1456

附錄 2、排遺新鮮度說明

排遺新鮮度分級	圖片	說明
1. 新鮮 (0~2 天)		<p>色澤鮮艷，依食物類型不同有不同的顏色，排遺表面帶有黏液的光澤。</p>
2. 3~7 天		<p>排遺邊緣暗化，表面失去光澤，但還可以看到排遺原本的顏色。</p>
3. 1-2 周		<p>原本條狀的排遺，會往下塌陷，顏色會轉變成深色。如果本身非條狀排遺會變得更扁，外表開始變硬。</p>

附錄 2 (續)、排遺新鮮度說明

排遺新鮮度分級	圖片	說明
4. 3-4 周		<p>外觀變成深色或黑色，質地變硬，需用力才能撥開，排遺核心部份，還是較軟有彈性。</p>
5. 1 個月以上		<p>外觀變成深色或黑色，質地變硬，排遺硬化，需用硬物才能使其分開，內部硬化。有些排遺可能表面會有黴菌滋生。</p>

附錄 3、10 組微衛星基因座引子序列及 PCR 擴增時的黏合溫度(Shih et al. 2009b)。F：Forward；R: Reverse。

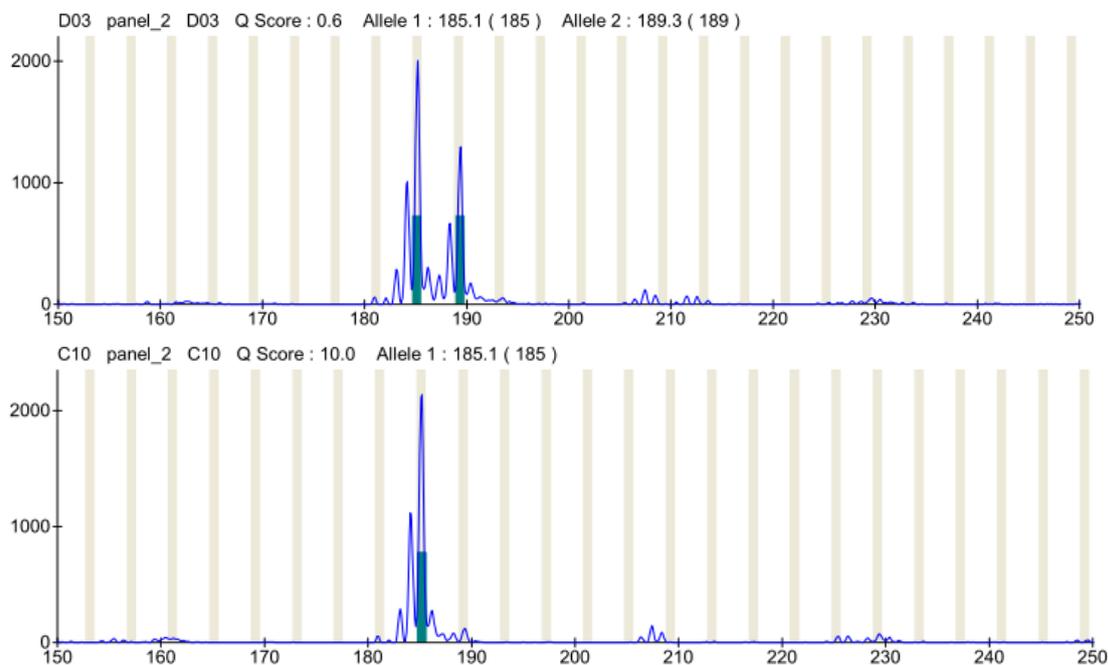
基因座	引子序列(5'-3')	黏合溫度(°C)
*UT1	F: <u>CAG</u> -AGCAACTCTTCTCAGATGTTACAAA R: CCCAGGTCAGCACTTGGCATAC	64
UT3	F: <u>CAG</u> -AAGACATACAGAAGCCAAGACTAG R: TACTCAATTACAAAGGATAACTATA	56
*UT4	F: <u>M13</u> -GAGTTATTGGCACTAAAATCTAATG R: CTGCAAATCCCTGCTCAACTTTC	56
UT23	F: <u>M13</u> -GCTGGATACATCATCCTGGCTC R: GGAATCAAGTTCGGCATCGGG	62
*UT25	F: <u>M13</u> -GCTCAGGGCGTGATCCCAGAG R: GGCTCCCCTGCACTAGAGATTTAAC	62
*UT29	F: <u>CAG</u> -GACATTGCCTTTTACAGAGCAG R: GGCAGATCTCAACCACCATAAGC	64
UT31	F: <u>CAG</u> -AATAAACTGATGCAGCCATACTAG R: CTGCCACTGAATCTTCTGATCTTAG	64
*UT35	F: <u>CAG</u> -ACTCCCTAGTAAGTAGAAAGCACAC R: CCCACAGGATGGGCTCAAGAA	64
UT36	F: <u>CAG</u> -AGACTCAGGAAGTCTGGAGTGGGA R: CTTTCGGCTCAGGGATCGAGC	62
*UT38	F: <u>M13</u> -ATTATTGATGAGCAGGGACAG R: CTAAAGCAACAACATGTGAATG	56

\*為實驗後續結果分析，所採用的 6 組基因座。

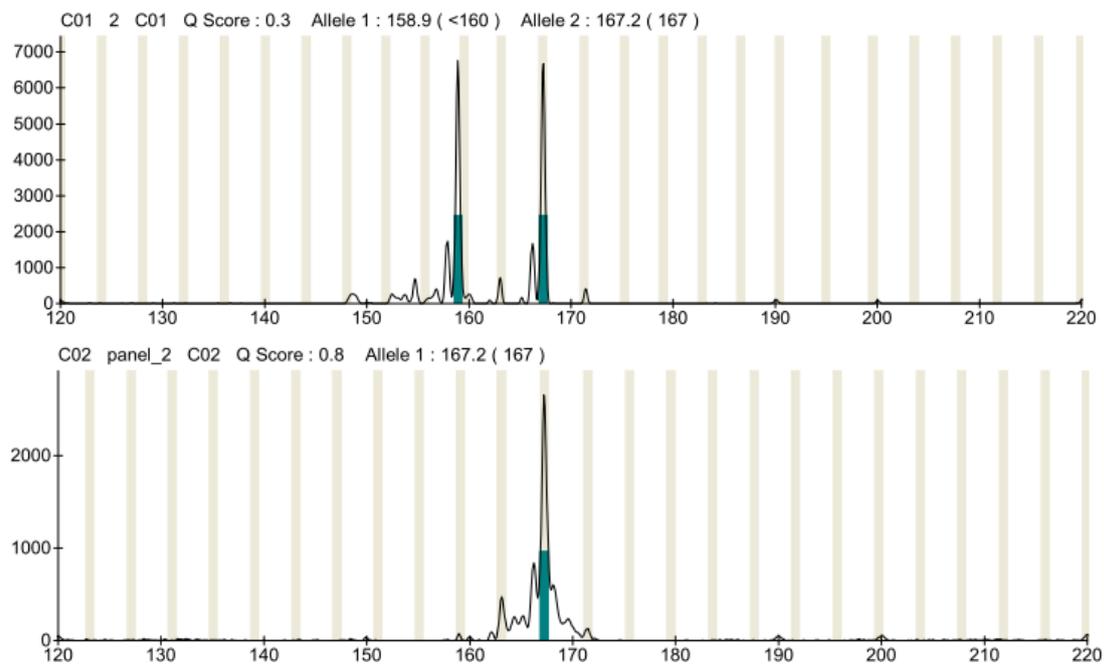
附錄 4、6 個基因座在 MEGABASE 上判斷的波形圖。

每個基因座上圖為異型合子，下圖為同型合子；X 軸：鹼基對長度，Y 軸：訊號強度(RFU)。

### UT1

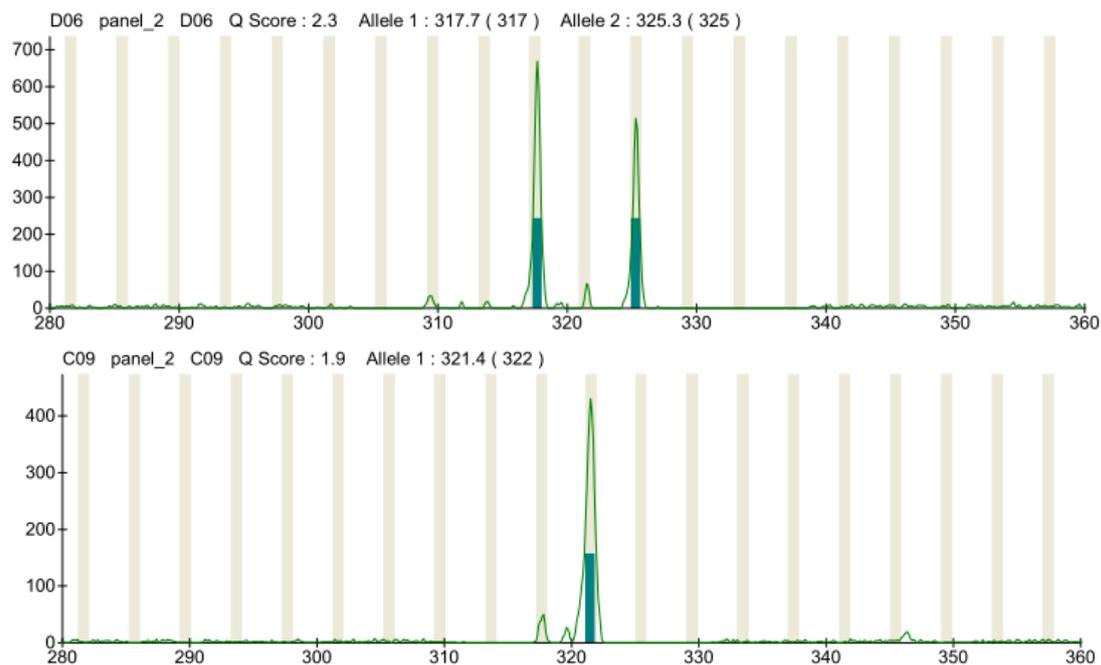


### UT4

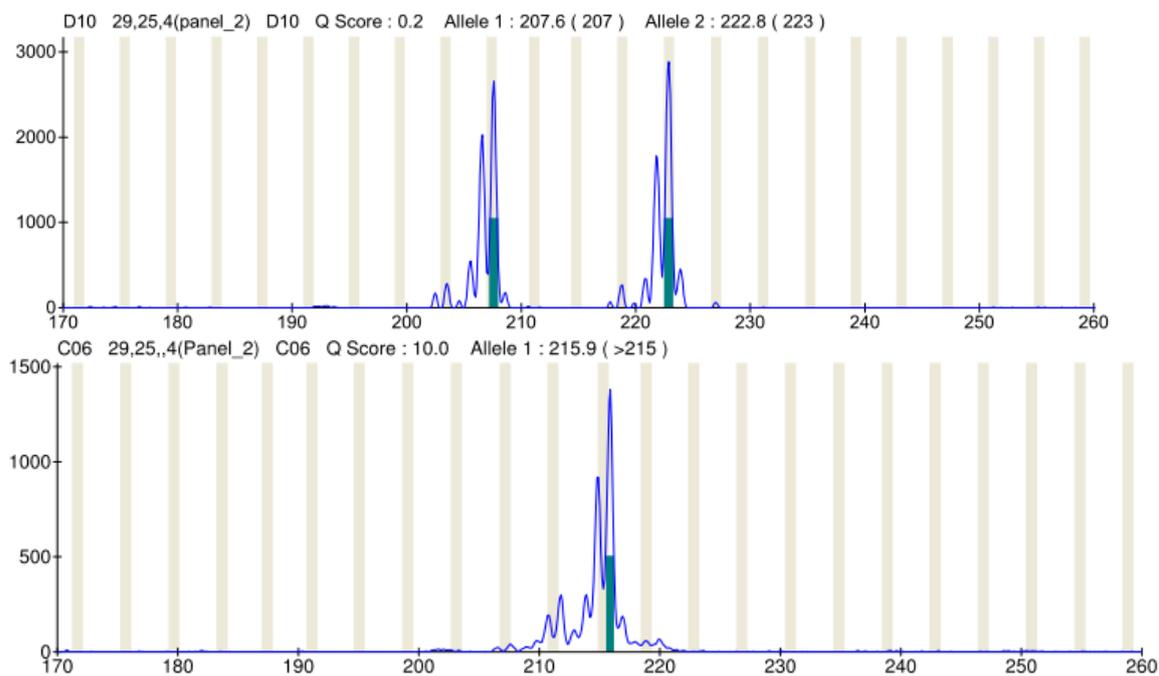


附錄 4 (續)、6 個基因座在 MEGABASE 上判斷的波形圖。

### UT25

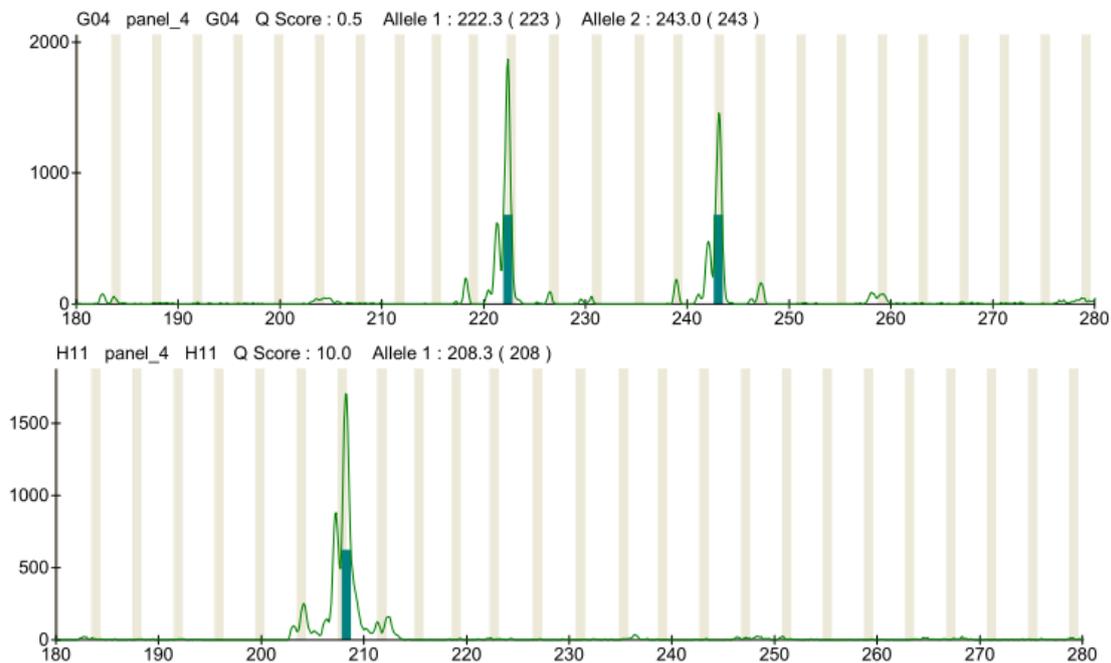


### UT29

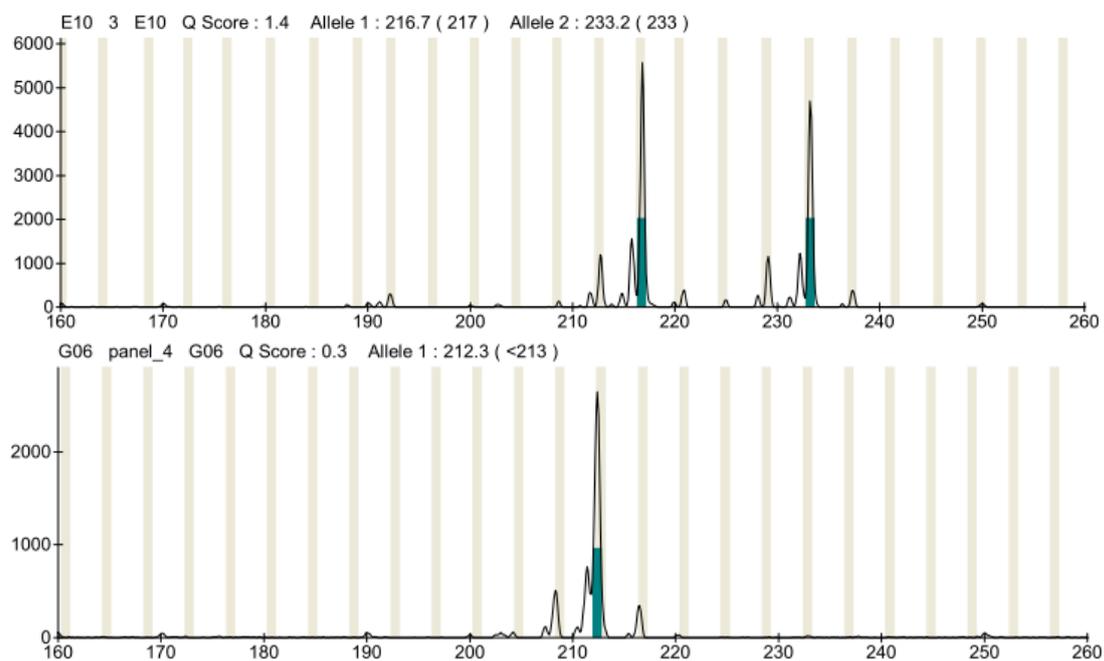


附錄 4 (續)、6 個基因座在 MEGABASE 上判斷的波形圖。

### UT35



### UT38



## 附錄 5、毛髮陷阱採樣流程

### 一、 器材準備

1. 小型紙質信封袋\*30
2. 奇異筆\*2
3. 鑷子\*2
4. 打火機\*2
5. 白紙\*2
6. 10 號夾鍊袋\*1
7. 鐵鎚\*1
8. 三吋釘子\*10
9. 棉球\*5
10. 底片盒\*2
11. 氣味劑(20 mL)
12. 細繩(3 公尺)
13. 二氧化矽(水玻璃;50 公克)
14. 軟鐵絲 (15 公分) \*5

### 二、 採集現場

1. 在巡視毛髮陷阱時，以白紙作為底，較好發現鐵刺絲上的毛髮(圖 1)。
2. 發現毛髮時，書寫於信封代上依序為紀錄其採集時間、陷阱名稱、所在鐵絲編號、物種名稱與採集人(見圖 2)。其中的所在鐵絲編號，以 T1-U+12 為例，分成三個部份解釋：
  - i. T1：為樹的編號，以最靠北邊的樹為 T1 以順時針方向依序為 T2、T3 等(見圖三)。
  - ii. U：因毛髮陷阱分成上下兩條鐵刺絲所以上方鐵絲給代號為 U 表示 up 之意，下方鐵絲為 D，表示 down 之意。
  - iii. +12：+為順時鐘方向； 12 為此鐵絲上離 T1 第 12 個鐵絲勾。若為逆時鐘方向則用“-”代表。

### 附錄 5 (續)、毛髮陷阱採樣流程

3. 利用鑷子取下毛髮裝入信封袋中後，袋口密封，再利用打火機把鐵絲勾上難以取下的毛髮燒盡，此時要注意鐵絲勾上不能有毛髮留下。
4. 注意鐵絲鬆緊度，如果太鬆可能會造成動物通過時，毛髮難以勾在鐵絲上，利用鐵釘及鐵鎚做調整。
5. 更換氣味劑，把棉球利用軟鐵絲綁緊，浸入氣味劑中，使棉球上沾滿氣味劑，掛於繩上。

### 三、 回到山屋

1. 確認每個陷阱所採集到的毛髮數量及物種數。
2. 將熊的毛髮與其他動物毛髮分成兩堆後，裝入內有二氧化矽的 10 號夾鍊袋中保存（注意二氧化矽的顏色，由藍色變成紫色後需處理過方可使用）。
3. 在回到實驗室前，必須注意樣本避免放置在陽光直射及高溫處保存。

### 四、 回實驗室後

1. 每 1 個樣本建檔保存，內容有採集時間、陷阱名稱、所在鐵絲編號、物種名稱與採集人。
2. 放入-20°C 冰箱中，等待分析。

附錄 5 (續)、毛髮陷阱採樣流程



圖 1、巡視毛髮陷阱時的樣子，右下小圖為鐵刺絲勾取到熊毛的樣子。

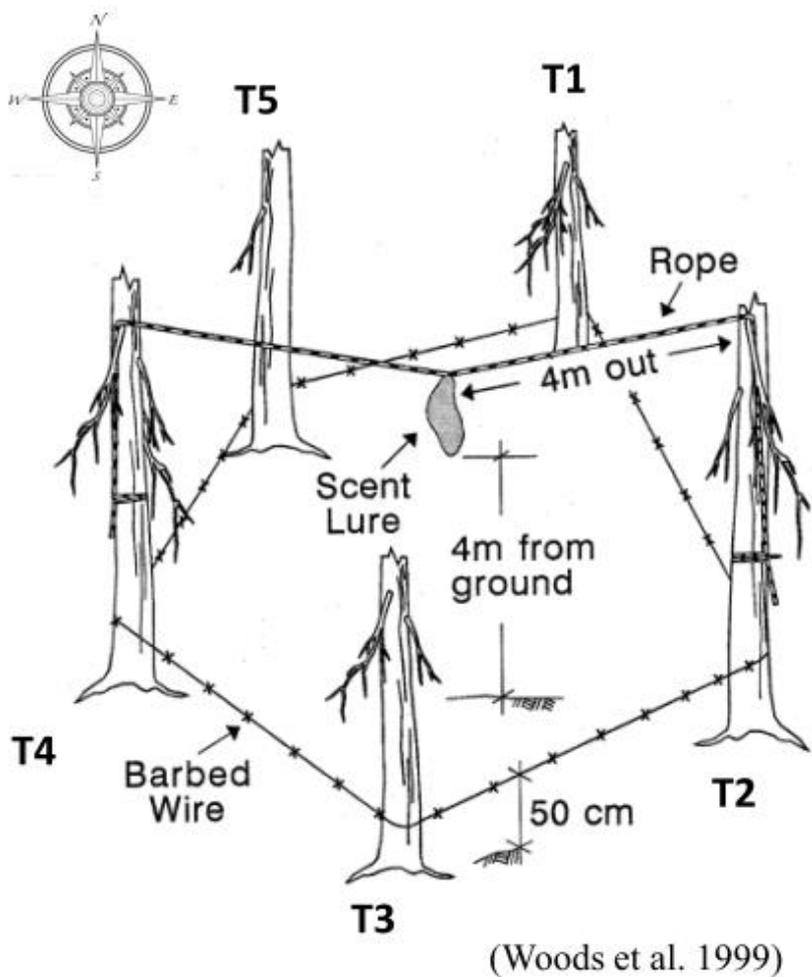
附錄 5 (續)、毛髮陷阱採樣流程

The image shows a sample collection label with a header and five rows of text. The header is a trapezoidal shape with a slanted top. The text is as follows:

<b>2008.12.05</b>	.....	採集時間
<b>HT-Sakula-01</b>	.....	陷阱名稱
<b>T1-U+12</b>	.....	所在鐵絲編號
<b>Bear</b>	.....	物種名稱
<b>何冠助</b>	.....	採集人

圖 2、信封袋書寫項目，虛線後方為書寫項目名稱。

附錄 5 (續)、毛髮陷阱採樣流程



圖三、毛髮陷阱樹編號示意圖。

## 附錄 6、排遺採樣流程

### 一、 器材準備

1. 95%酒精\*500 mL
2. 15mL 離心管 (25~50 管)
3. 咖啡匙或滅菌過竹籤\*150
4. 石蠟膜 (剪成 4cm \*2cm 的條狀) \*200
5. 8 號夾鍊袋\*100
6. 樣本登記表格\*2
7. 防酒精筆 (寫離心管) \* 2
8. 白板筆 (寫護貝表格)\*2
9. 鉛筆(樣本登記表格寫用)\*2
10. GPS 定位儀器 \*1
11. 尺標照相用表格 (需護貝)

### 二、 事前準備

1. 將咖啡匙修剪成圖 1 所示，或將竹籤滅菌消毒。
2. 將 95%酒精裝入離心管中約 8-10mL。

### 三、 採集現場

1. 發現排遺後，首先進行 GPS 座標定位 (採 TWD-67 系統) 與樣本編號，同時記錄於樣本登記表格&照相記錄用含尺標表格&夾鍊袋。
2. 填寫於記錄用表格&照相用表格&夾鍊袋。書寫順序按：樣本編號、GPS 坐標、物種、日期 (西元年、月、日) 與採集者順序書寫。

## 附錄 6(續)、排遺採樣流程

3. 夾鍊袋與離心管上需用防酒精筆書寫。夾鍊袋需書寫兩面。
4. 將記錄用含尺標表格置於排遺旁，執行照相記錄排遺原始外形與保存狀態如下：
  - i. 尺標照相用表格(第 1 張)
  - ii. 對焦於排遺 (有比例尺；第 2 張)
  - iii. 同時聚焦於排遺樣本與含尺標照相用表格 (第 3 張)
5. 取咖啡匙挖取排遺，約挖 1 mL 的排遺，加入離心管中，輕輕慢慢的上下搖晃使排遺均勻溶於酒精。
6. 1 份樣本可在排遺的表面及內部各取 1 部份；如果發現該排遺已遭受直接日曬或雨淋，就盡量採集排遺內部未直接暴露在外的部份。同時，採集的部份盡量是大便泥質物，非食物殘餘物。
7. 確保管口潔淨後，在管口封上石蠟膜後蓋上
8. 裝有樣本的離心管要盡量保持在陰影下，不可照太陽且保持低溫。

## 四、 回到營地

1. 注意！避免樣本直射太陽，需放置在陰影且低溫的處。

## 五、 回實驗室

1. 清點樣本數量與紀錄的正確性
2. 離心管移至-20°C 冰箱保存。

附錄 6(續)、排遺採樣流程

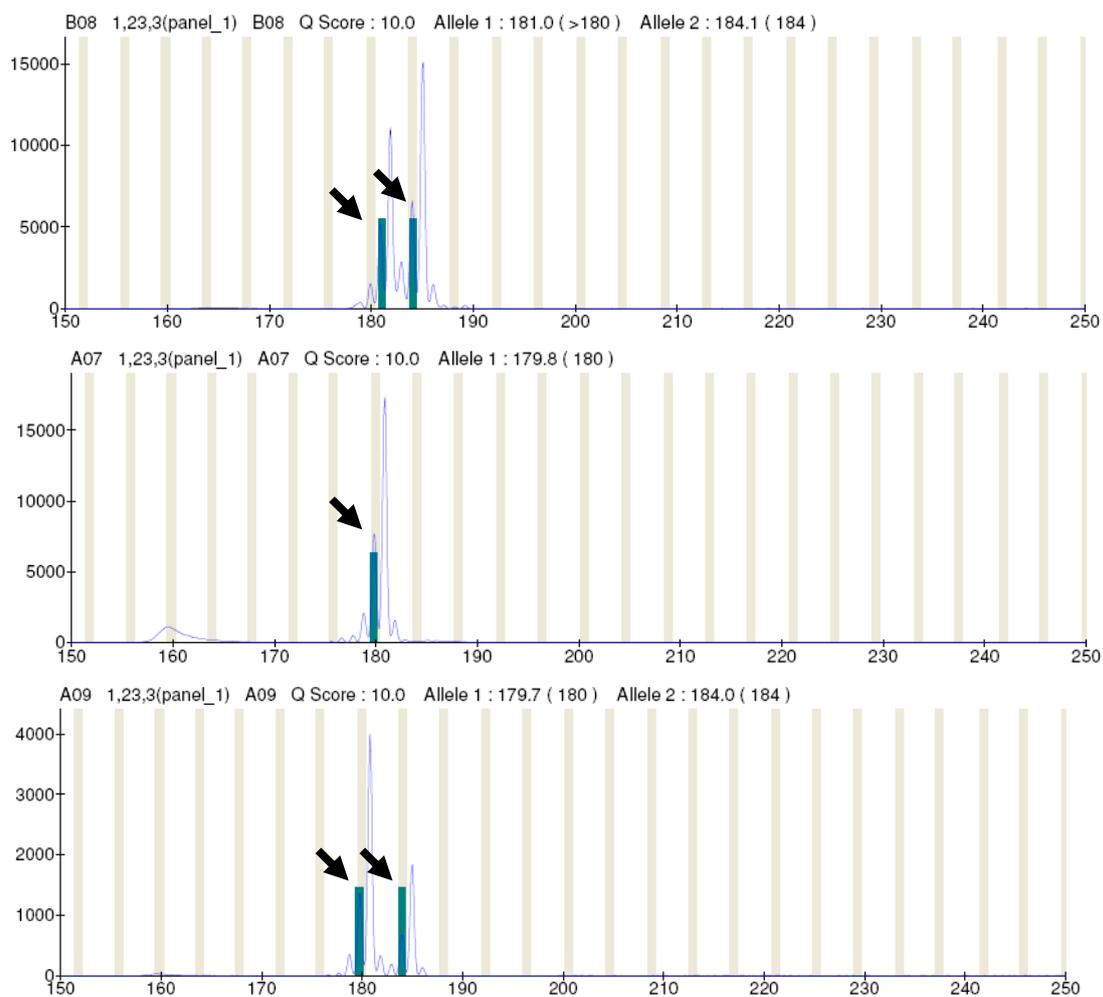


圖 1、咖啡匙所裁剪的方式

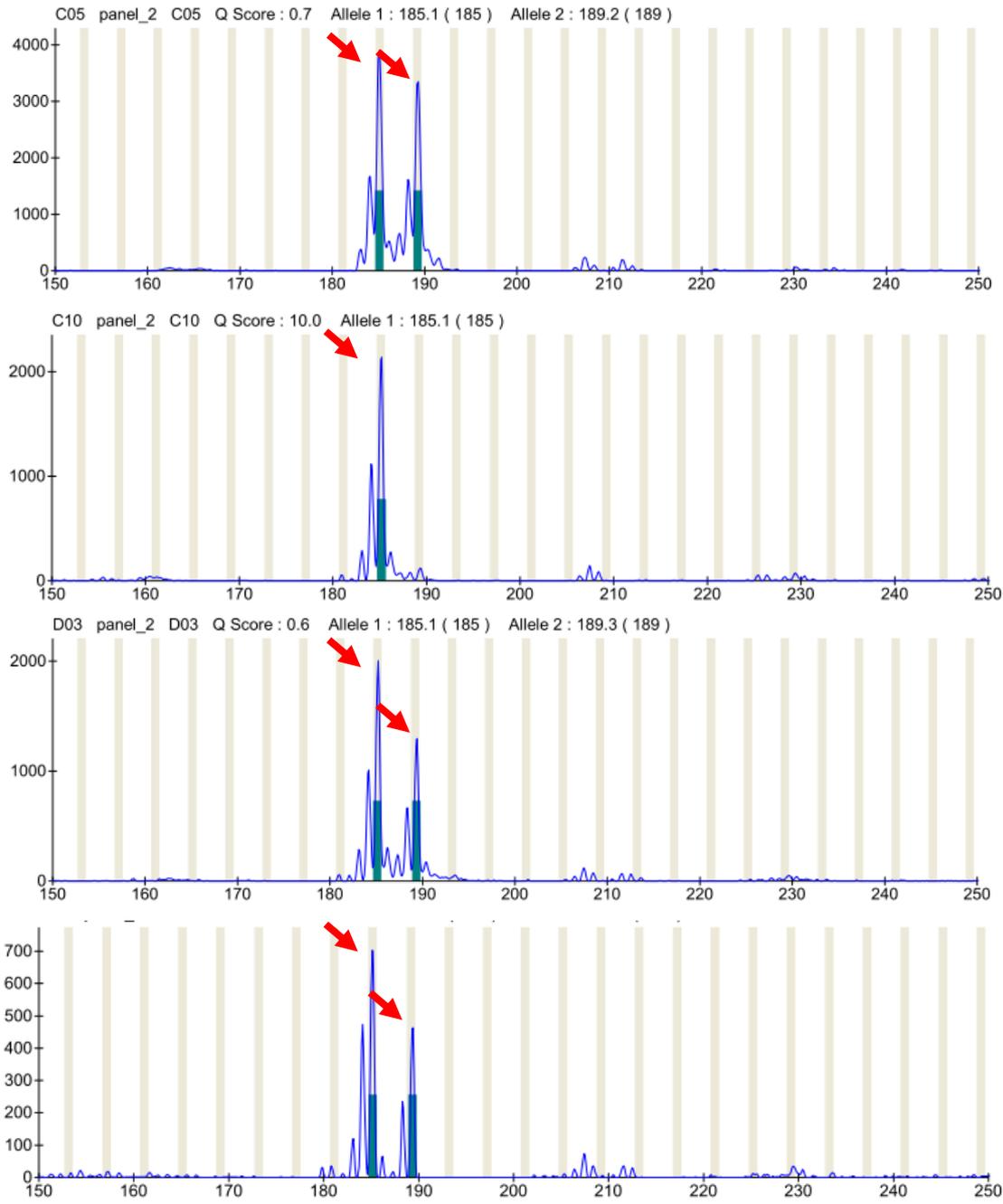
附錄7、本實驗6個微衛星基因座波形圖與動物園石芝菁等人實驗比較圖。  
以下 ZOO 代表臺北市立動物園石芝菁之波形圖，NPUST 代表本實驗波形圖。  
X 軸：鹼基對長度，Y 軸：訊號強度(RFU)。

## UT1

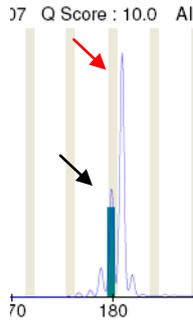
ZOO:



NPUST:



### UT1 波型判斷:



主波帶有三個波，在第二波(黑色箭頭)與第三波(紅色箭頭)間，不同實驗時會有第 2 波強於第 3 波或第 3 波強於第 2 波之情況，在下面將討論到此情形的判讀。

### 判斷標準:

ZOO	NPUST
在上圖，所屬第二個波(黑色箭頭)作為判斷標準	第三波為判斷標準(紅色箭頭)

以上是兩個單位判斷標準不一，可能造成數據上在同 1 對偶基因，做出不同數據。

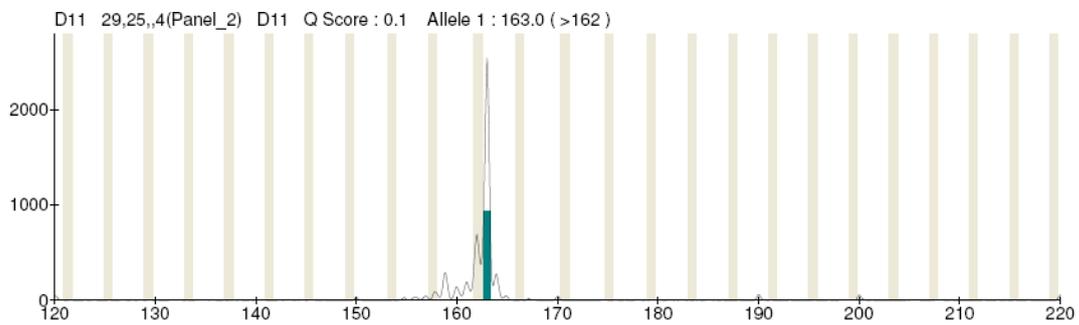
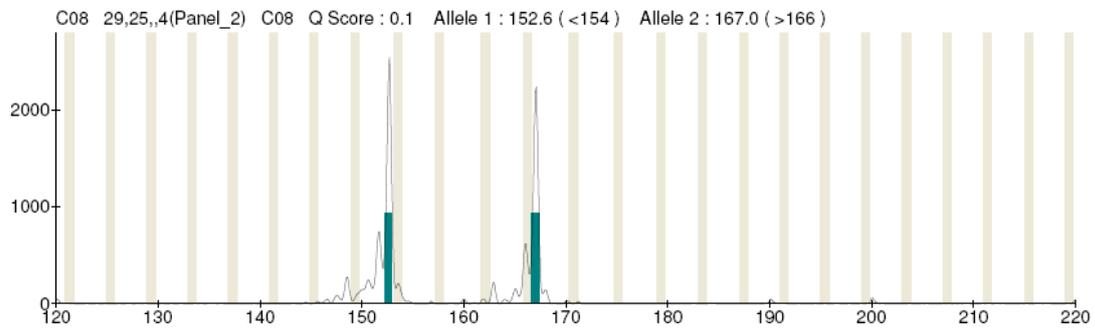
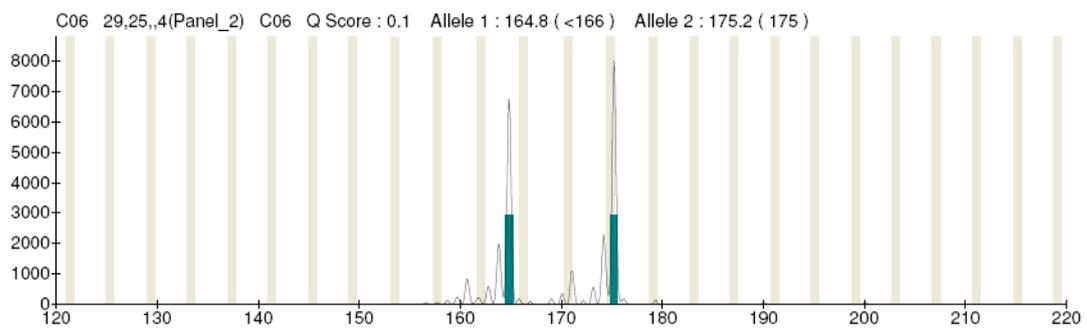
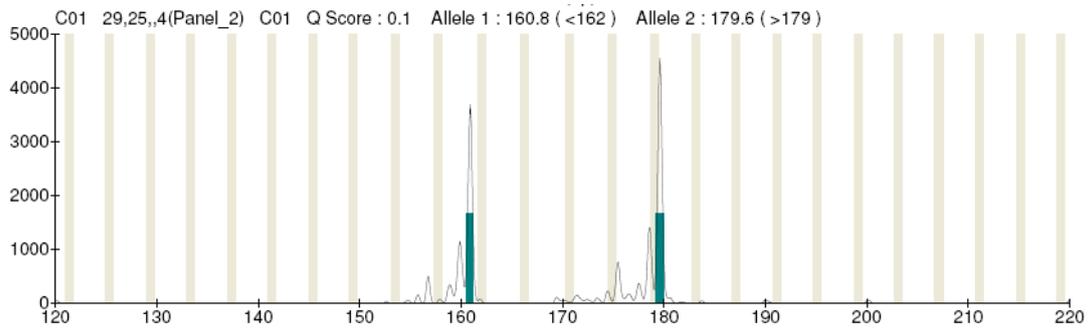
強度高於 100 且波型明確，波判斷於最強之處，視為 1 個對偶基因，如有另 1 個類似波型，兩者強度相差 50% 以內，視為第二個對偶基因。

### 如何校正差異：

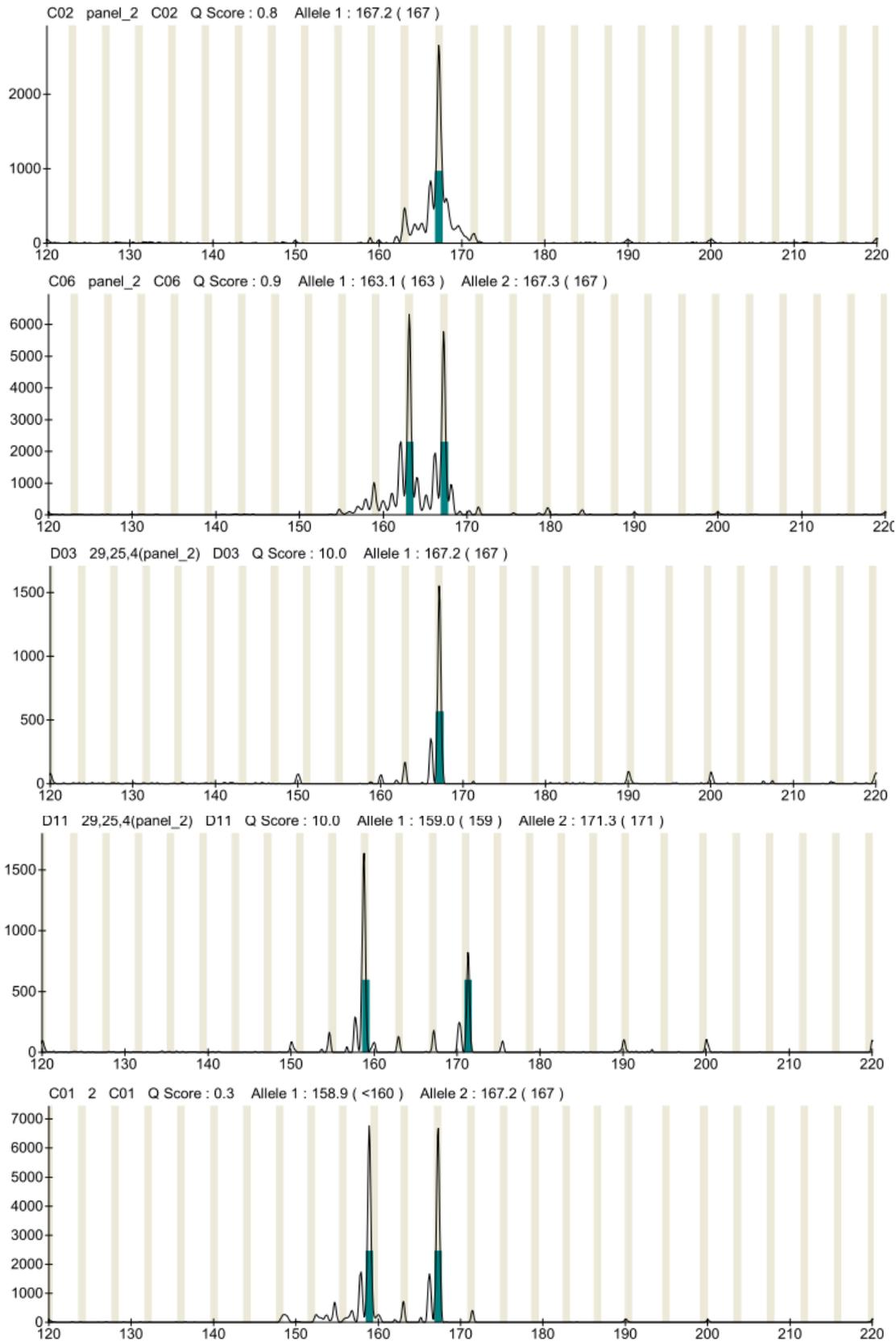
兩者判斷相差約 1bp，如果數據要混合使用，需要再進一步的校正。e.g.ZOO 的 184 與 NPUST 的 185 之對偶基因，其實為同一對偶基因，如果數據要混合，必須統一為 185，不然容易混淆。

# UT4

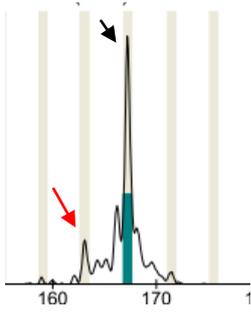
ZOO:



NPUST:



## UT4 波型判斷:



此基因座在前 4bp 前會有一個小波(紅色箭頭)，之後帶出主波(黑色箭頭)

### 判斷標準：

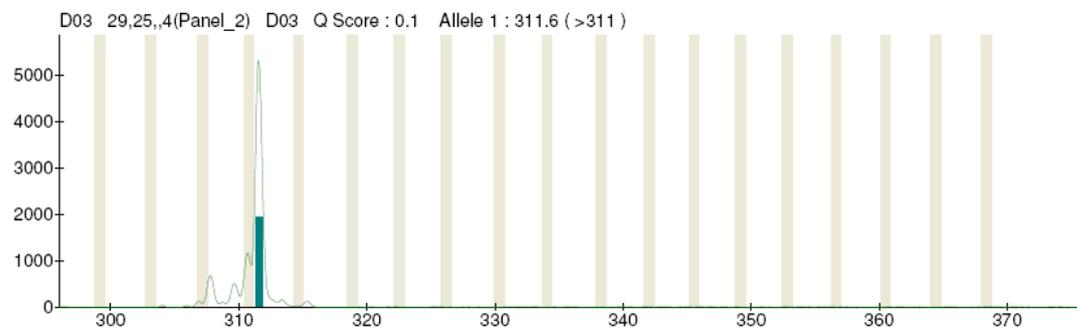
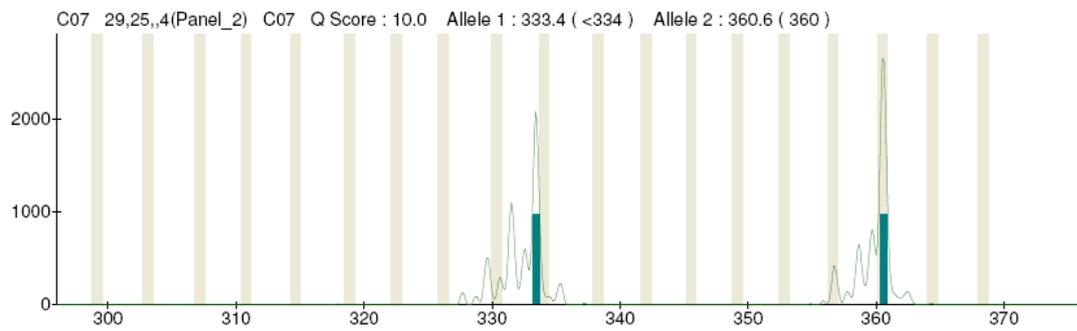
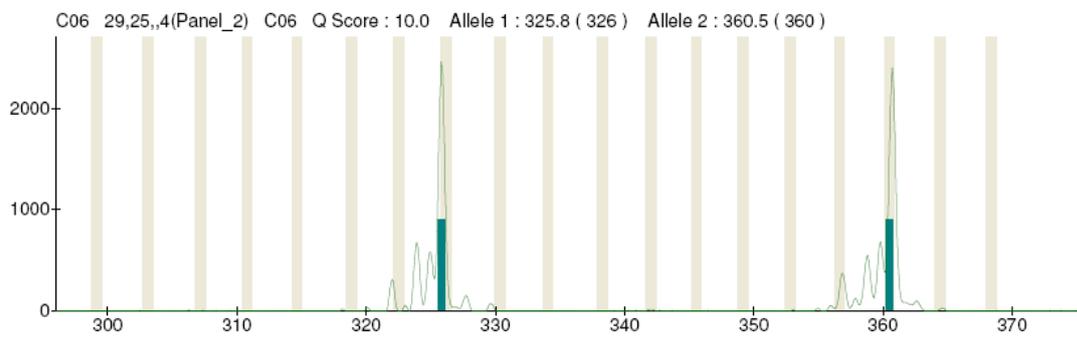
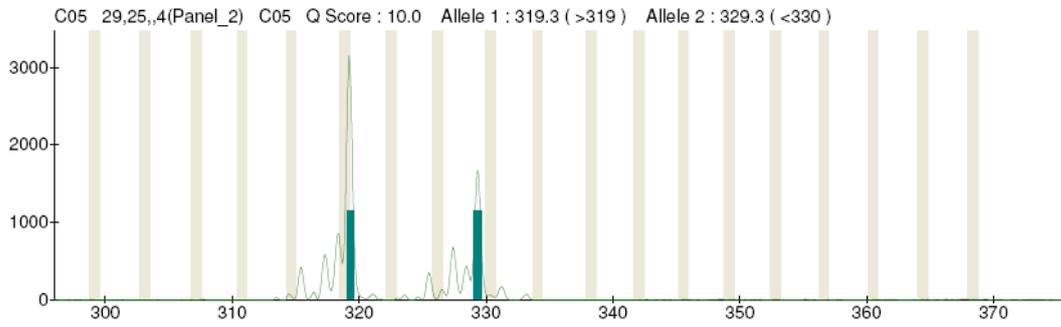
強度高於 100 且波型明確，波判斷於最強之處，視為一個對偶基因，如有另一個類似波型，兩者強度相差 50% 以內，視為第二個對偶基因。

### 如何校正差異：

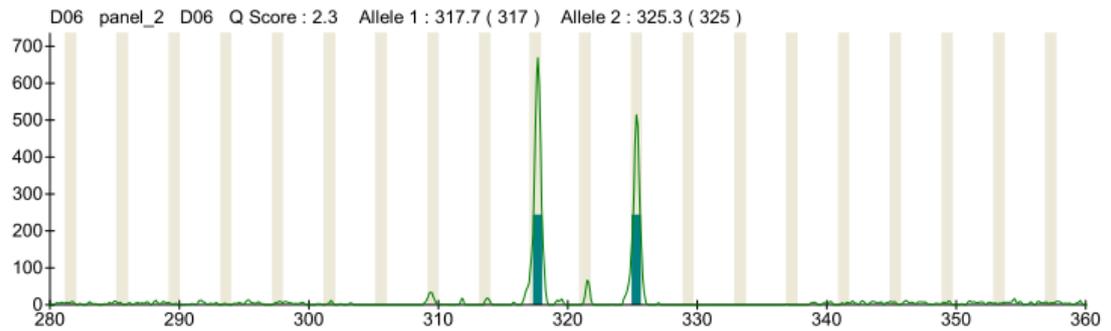
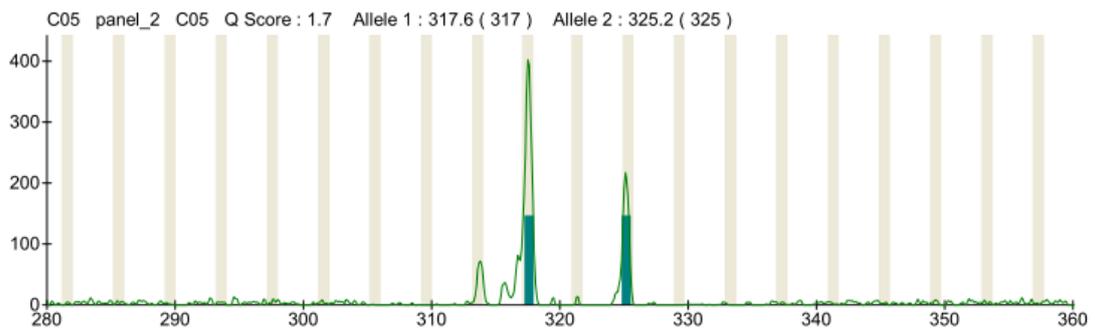
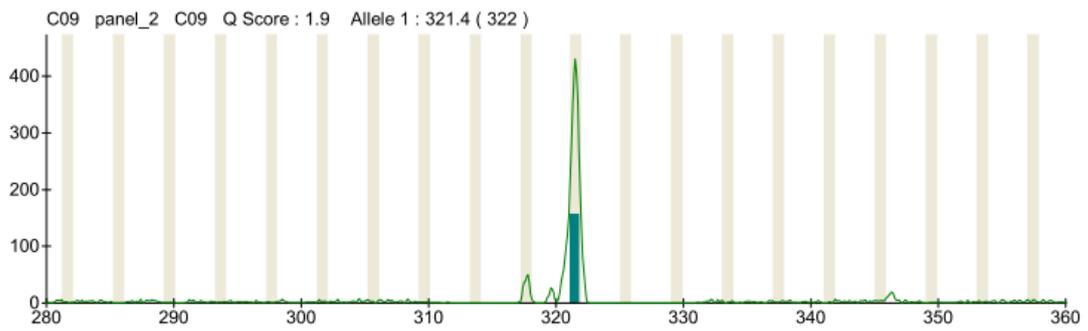
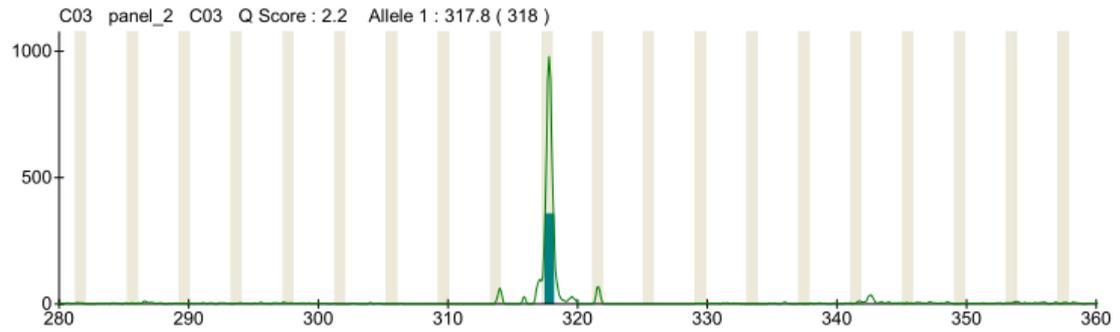
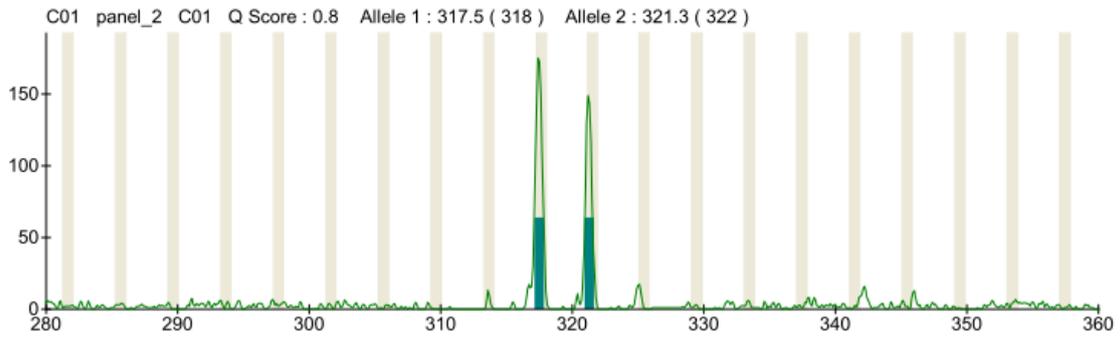
此基因座判斷方法相同，所以不需校正，但須注意軟體有時候會把長度類似的基因座，判持不同的對偶基因(e.g.長度 162.4bp，軟體可能會判斷成 162 或 163)，這點需要注意。

# UT25:

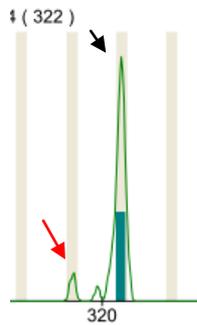
ZOO:



# NPUST:



## UT25 波型判斷:



此基因座在前 4bp 前會有一個小波(紅色箭頭)・在少部分時，此波可能會過弱無法辨識，後方有一主波(黑色箭頭)・

## 判斷標準

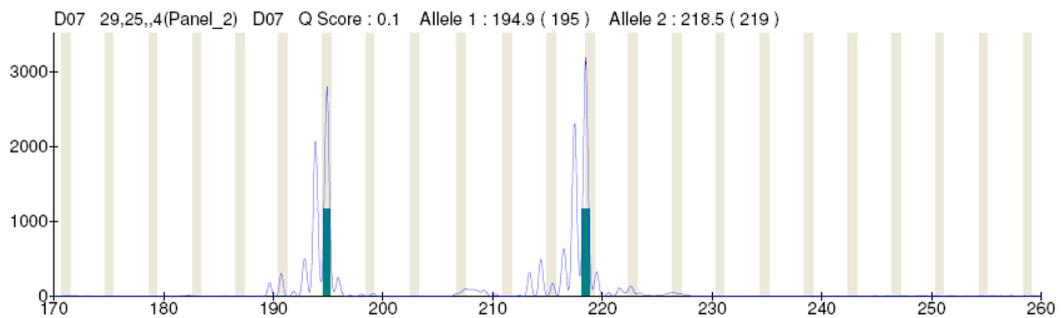
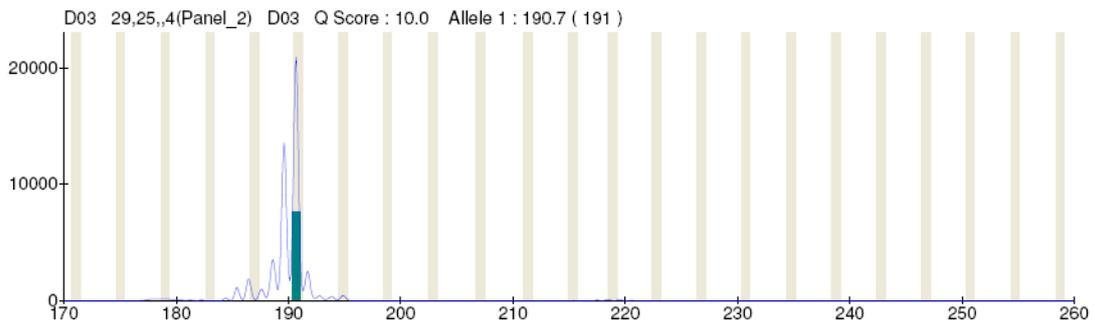
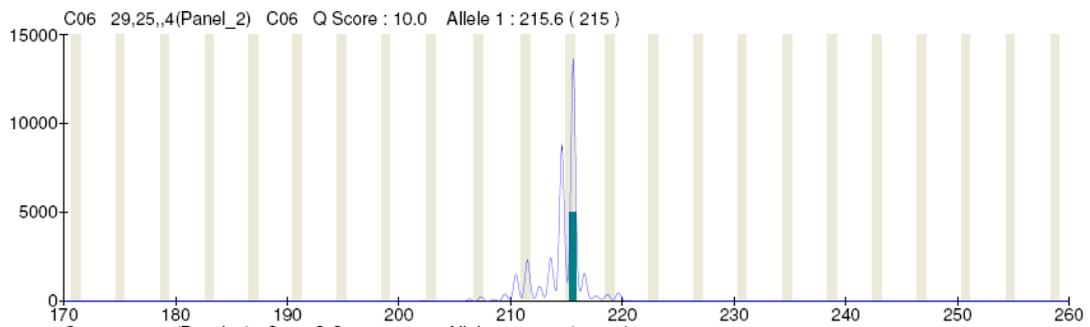
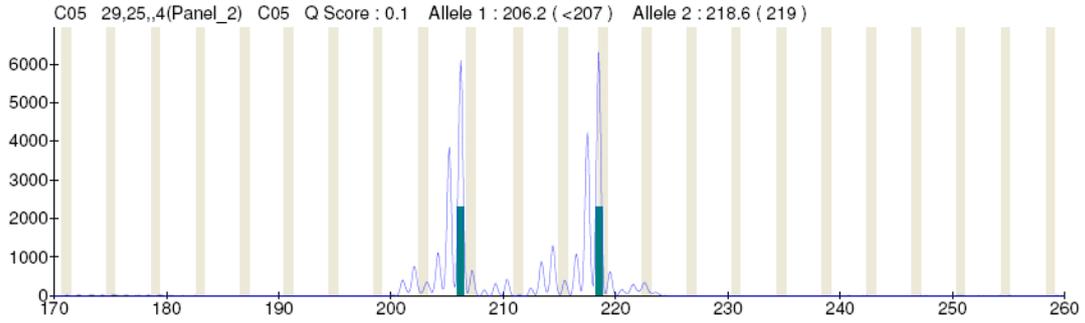
強度高於 100 且波型明確，波判斷於最強之處，視為一個對偶基因，如有另一個類似波型，兩者強度相差 50% 以內，視為第二個對偶基因・

## 如何校正差異：

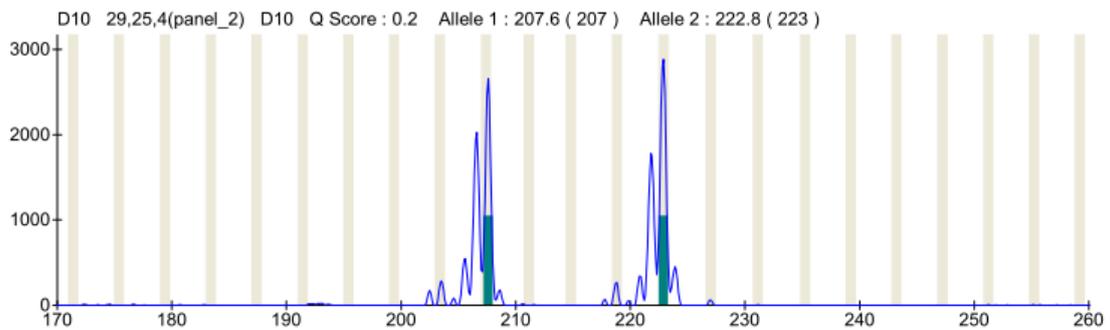
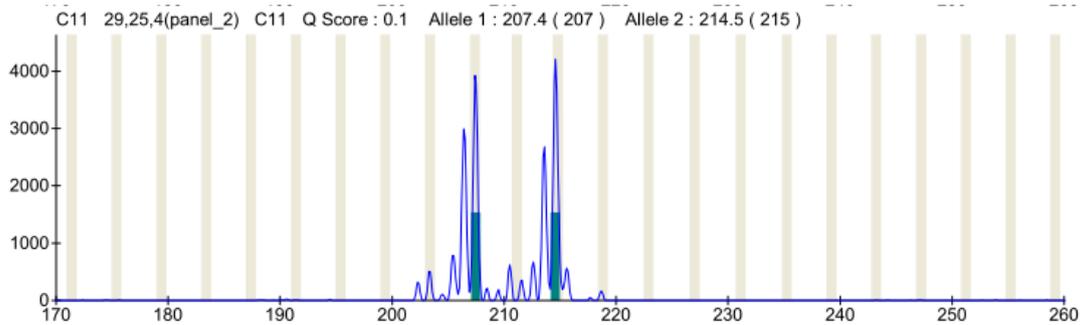
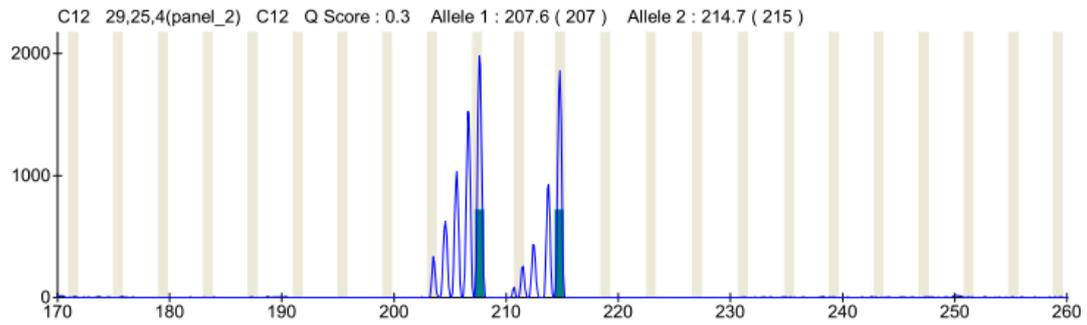
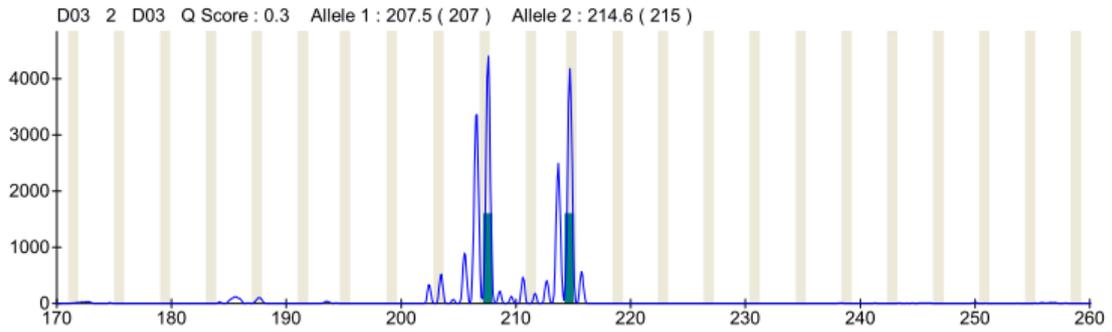
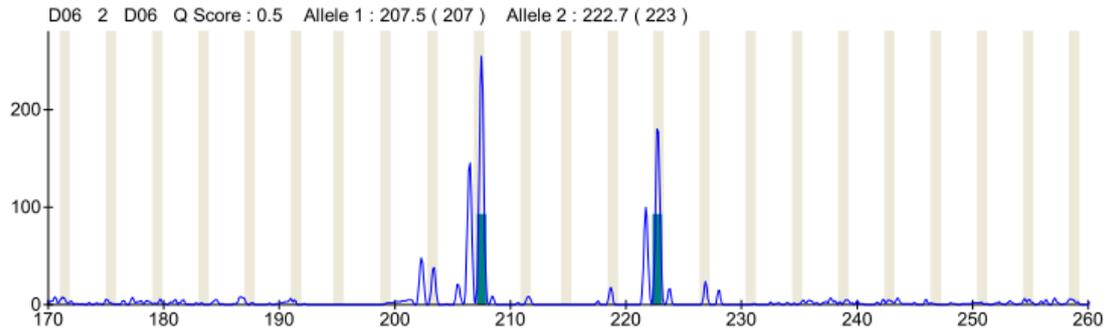
此基因座判斷方法相同，所以不需校正，但須注意軟體有時候會把長度類似的基因座，判持不同的對偶基因(e.g.長度 317.7bp，軟體可能會判斷成 317 或 318)，這點需要注意・

# UT29:

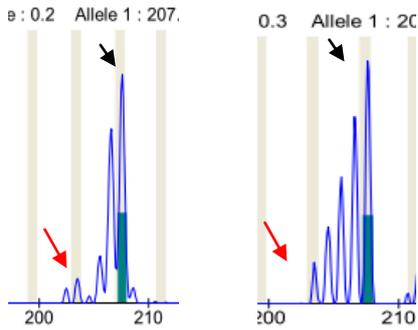
ZOO:



# NPUST:



## UT29 波型判斷:



此基因座在前 4bp 前會有一個小波(紅色箭頭)・在少部分時，此波可能會過弱無法辨識，後方有一主波(黑色箭頭)・

### 判斷標準

強度高於 100 且波型明確，波判斷於最強之處(黑色箭頭)，視為一個對偶基因，如有另一個類似波型，兩者強度相差 50% 以內，視為第二個對偶基因・

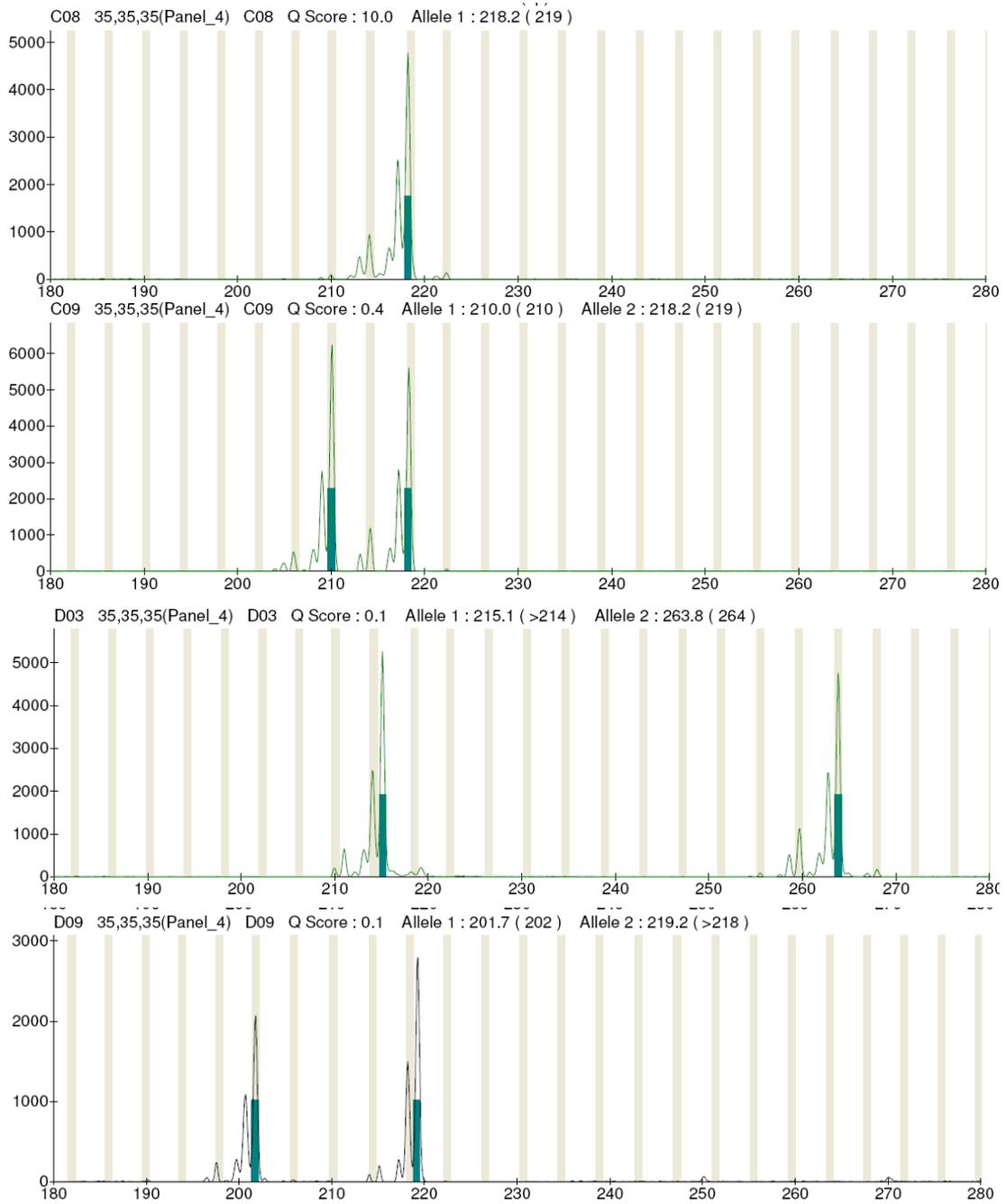
少數情況會發生第二波與第三波等強或稍強，此固定判斷第三波・

### 如何校正差異：

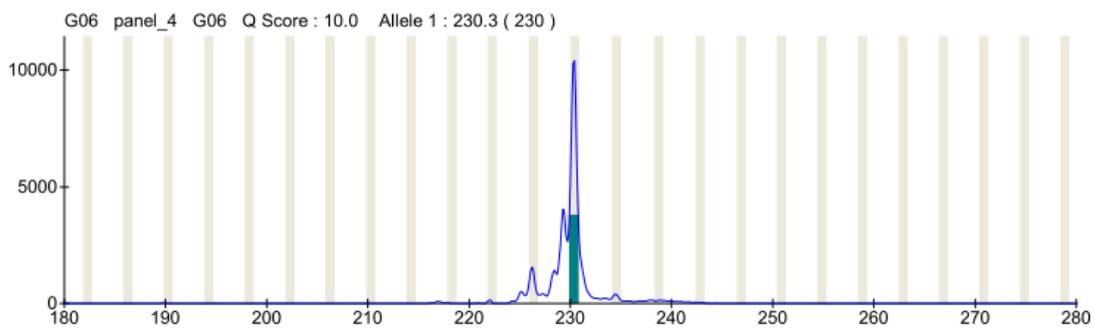
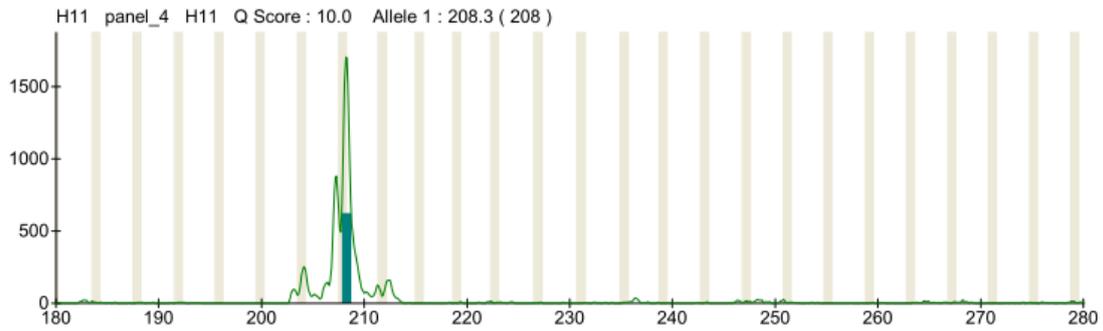
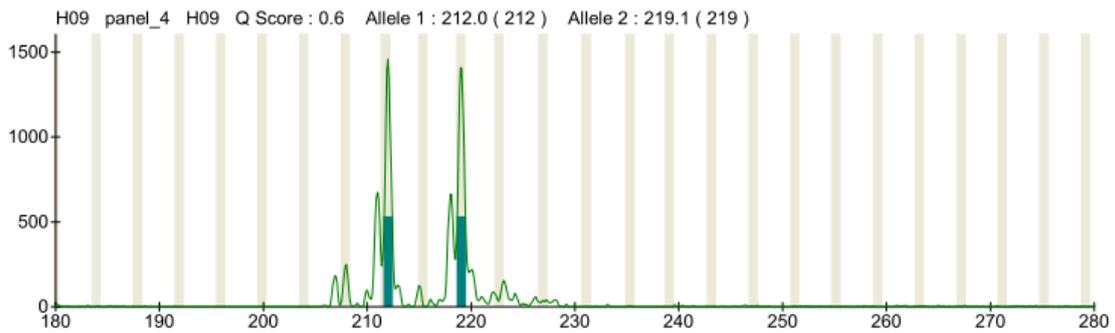
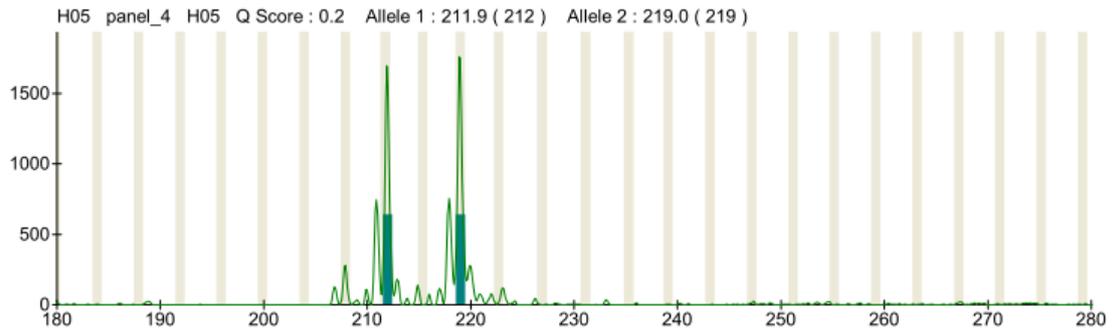
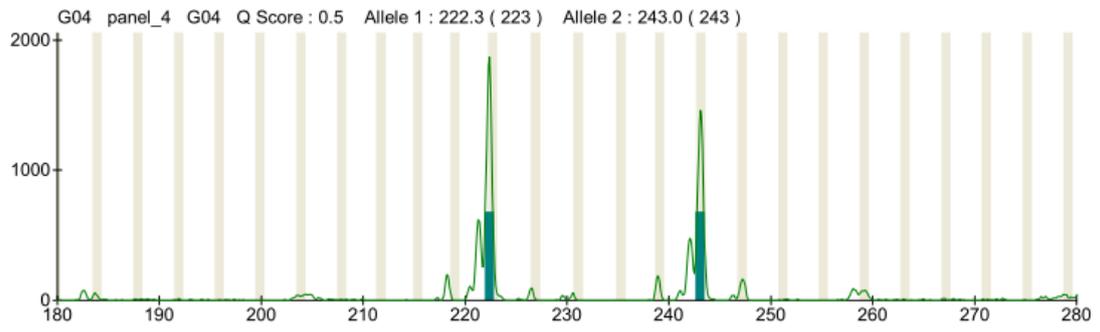
此基因座判斷方法相同，所以不需校正，但須注意軟體有時候會把長度類似的基因座，判持不同的對偶基因(e.g.長度 217.5bp，軟體可能會判斷成 217 或 218)，這點需要注意・

# UT35:

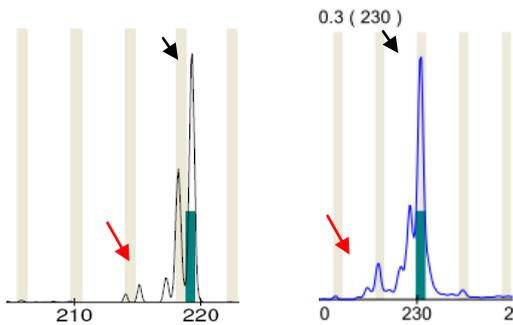
## ZOO:



# NPUST:



## UT35 波型判斷:



此基因座在前 4bp 前會有一個小波(紅色箭頭)・在少部分時，此波可能會過弱無法辨識，後方有一主波(黑色箭頭)・

## 判斷標準

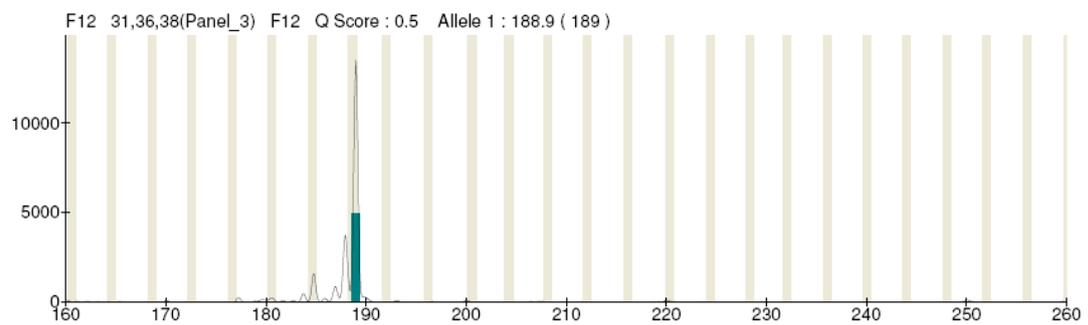
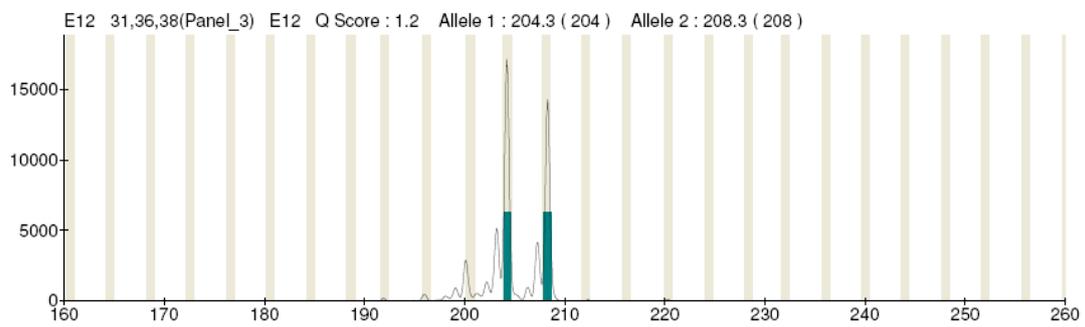
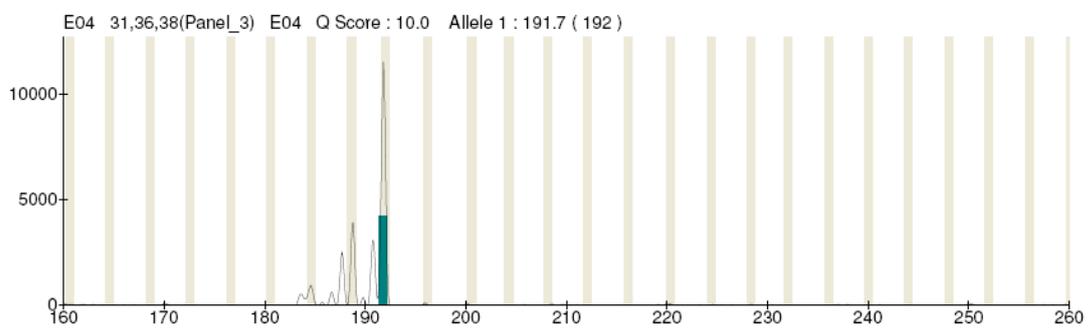
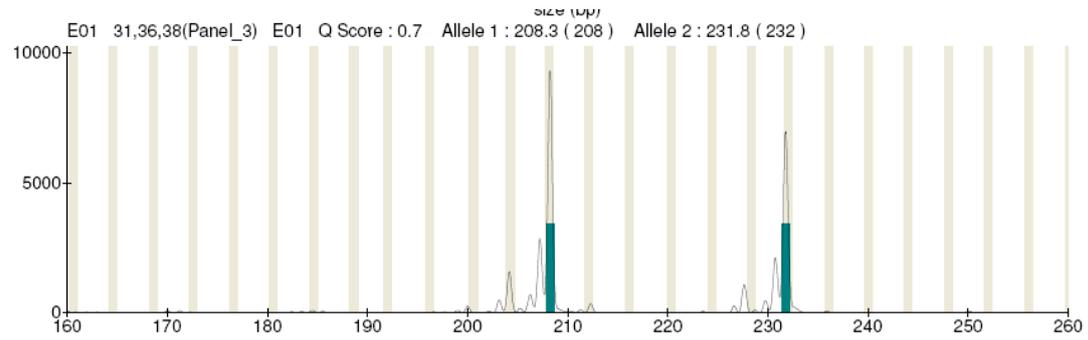
強度高於 100 且波型明確，波判斷於最強之處(黑色箭頭)，視為一個對偶基因，如有另一個類似波型，兩者強度相差 50% 以內，視為第二個對偶基因・

## 如何校正差異：

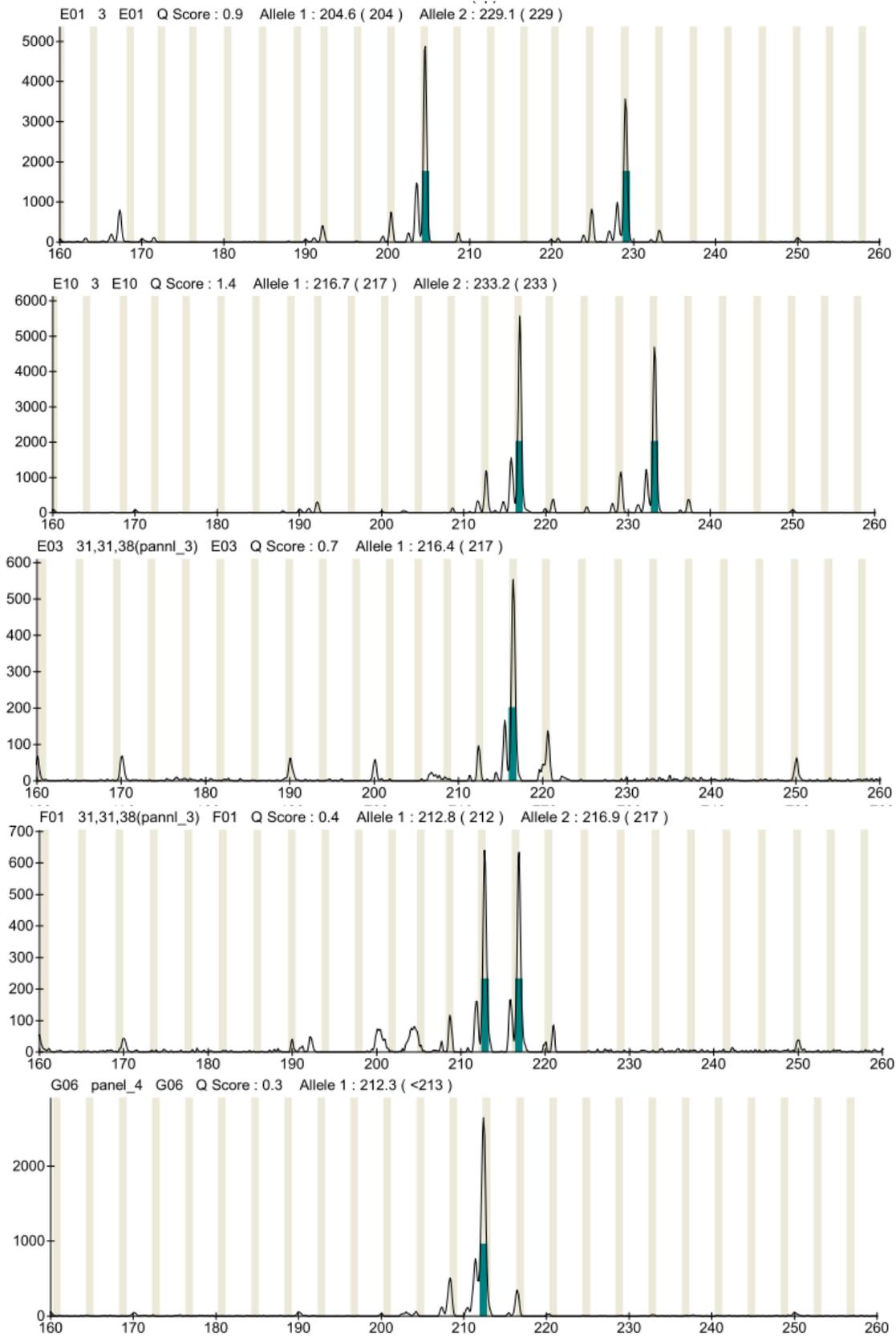
此基因座判斷方法相同，所以不需校正，但須注意軟體有時候會把長度類似的基因座，判持不同的對偶基因(e.g.長度 211.7bp，軟體可能會判斷成 211 或 212)，這點需要注意・

# UT38

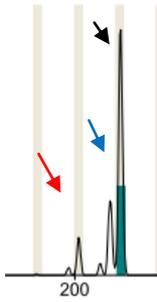
ZOO:



NPUST:



## UT38 波型判斷:



此基因座在前 4bp 前會有一個小波(紅色箭頭)。(在少部分時，此波可能會過弱無法辨識；有可能會高於主波的第二波(藍色箭頭))，後方有一主波(黑色箭頭)。

### 判斷標準

強度高於 100 且波型明確，波判斷於最強之處，視為一個對偶基因，如有另一個類似波型，兩者強度相差 50% 以內，視為第二個對偶基因。

### 如何校正差異：

此基因座判斷方法相同，所以不需校正，但須注意軟體有時候會把長度類似的基因座，判持不同的對偶基因(e.g. 長度 212.3bp，軟體可能會判斷成 212 或 213)，這點需要注意。

## 作者簡介

作者姓名：何冠助

性別：男

通訊地址：812 高雄市小港區桂華街 349 號

電子信箱：coolbrother8237@gmail.com

學歷：高雄市立文山高級中學

國立嘉義大學生物資源學系

國立屏東科技大學野生動物保育研究所碩士班