

壹、前言

對於一個瀕臨絕種的物種來說，長期野外族群監測是非常重要的，透過族群監測我們可以進一步了解這瀕危族群的健康狀況與續存力與否，這有助於制定一個有效率的保育經營管理的策略。族群監測最常見的是估算族群量，正確估算族群數量是必要的。在近年來動物福利蔚為風潮的情況下，加上考量捕捉標記的研究方法的成效，利用及結合非侵入性遺傳採樣技術研究方法，已廣泛應用於野生動物族群的估計 (Kohn *et al.*, 1999)。

個體鑑別的資料可以視為一種捕捉標記的資料，再配合系統性採樣，未來可以進行估算野外族群的族群量、活動範圍、繁殖模式以及親屬結構。再進一步分析統計各個的對偶基因頻率，就可以得到族群遺傳結構、遺傳變異以及基因流動等相關資料數據。

瀕危物種保育經營管理，除了需要瞭解該物種的生態及行為等資訊外，還需具備其遺傳多樣性及族群遺傳結構等遺傳基礎資料，方可擬定有效的保育方針。臺灣黑熊於 1989 年依據野生動物保育法，被列為瀕臨絕種保育類動物。玉山國家公園是目前國內有關臺灣黑熊生態研究資料累積最豐富，也是國內黑熊活動最為頻繁之處，但初步研究資料顯示其粒線體 DNA 多樣性偏低，而核基因組之遺傳結構至今尚不清楚 (Shih *et al.*, 2009a)。臺灣山林林相複雜與地形崎嶇，因此獲得野外黑熊活體遺傳樣本十分困難。在近年來分子技術發展快速，利用聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction) 為基礎，進而從野外獲得黑熊排遺萃 DNA 用以鑑別不同的物種、物種演化、族群遺傳結構、甚至個體鑑別之研究變得可行。

一、非侵入式的採樣方法 (noninvasive genetic sampling)

野生動物研究鼓勵使用替代辦法 (Woodruff, 1993)，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)。藉由採集動物的排遺、毛髮、蛻皮、尿液、精液等樣本獲得到基因資訊來分辨個體，無需捕捉處理或標記動物，屬於非侵入式的採樣方法 (noninvasive genetic sampling, Pearse *et al.*, 2001)。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，採樣時也無取樣數量的顧慮，在需要保育之物種研究上提供相當大的幫助 (Chu *et al.*, 2006)。

藉由毛髮陷阱取樣及收集排遺可在不干擾動物行為的情況下，可以增加樣本數 (Taberlet *et al.*, 1999; Waits and Paetkau, 2005)。二者也是近年來研究熊類族群遺傳訊息的主要技術，毛髮分析的優點包括：(1) 可取得具有代表性的樣本；(2) 研究範圍可涵蓋廣大地區；(3) 可區別近似種、個體或是性別；(4) 基因分析可計算多個族群；(5) 可應用在各種棲地型態；(6) 裝設器材較輕也較便宜；(7) 可合併使用誘餌及被動方法以增進採樣品質並降低偏差 (Kendall and McKelvey, 2008)。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、分佈和性別比例；(2) 萃取出來的 DNA 量較毛囊高；(3) 可以提供食性、內分泌、內寄生蟲等資料 (Wasser *et al.*, 2004)。

臺灣屬亞熱帶，玉山國家公園大分地區海拔約 1,500 公尺，7 月均溫 20 °C，海拔低、溫度與濕度高，野外排遺 DNA 降解快。排遺中含有其他動植物細胞組織，且食性常隨季節而變化，故排遺內含物較為複雜，尤其是食肉目，臺灣黑熊即為一例。黑熊排遺包括植物與動物，分別如青剛櫟，以及山羌等其他物種。因此，利用排遺中 DNA 進行 PCR 鏈鎖反應擴增 (polymerase chain reaction, PCR)，若 DNA 引子 (primer) 設計不佳或過程複雜，常會造成結果受所採食消化之相似的哺乳動物 DNA 序列干擾，進而造成專一性低，無法成功重複個體鑑別、性別鑑定或野外族群遺傳結構之毛細管電泳結果。

二、粒線體 DNA 分子標記

粒線體是分布在哺乳動物的細胞質中，由於粒線體在精卵結合時，

精子的粒線體會排除在外，因此粒線體皆由母性遺傳而來，其 DNA（呈環狀）來自母方粒線體基因組的遺傳資訊（Dawid and Blackler, 1972）。粒線體 DNA 於複製時 DNA 聚合酶修補（repair）專一性較差，加上沒有組織蛋白（Histone）的保護，因此粒線體 DNA 平均出現突變點位的機率為核 DNA 平均的 10 倍（Brown *et al.*, 1979）。粒線體 DNA 控制區（control region，又稱 D-loop 序列）為非編碼基因（non-coding gene）外，其他 DNA 序列都可以轉錄成 RNA，因此 D-loop 序列突變機率較其他區域為高亦較能保留複製錯誤的序列，因此常被用來探討物種鑑別與亞種內親緣關係。

三、微衛星 DNA 分子標記

微衛星 DNA 廣泛分布在真核生物染色體中，為由數個重複單位（motif）組成的短片段重複序列（short tandem repeat, STR），每個重複單位由 2 到 8 個鹼基組成。當染色體中基因組 DNA（genomic DNA）複製發生滑動股錯誤配對（slipped strand mispairing）或 DNA 重組時，可能會造成重複序列重複次數改變，或使短片段發生變異，又微衛星 DNA 是非編碼基因較能保留其遺傳變異，故微衛星具有高度變異性（Li *et al.*, 2002），其突變速率為 10^{-3} （Weber and Wong, 1993）。此外，其 DNA 序列大多是 100 至 300 個鹼基的短片段，有利於運用在如非侵入性採樣 DNA 樣本的增幅，配合螢光標記引子與毛細管電泳設備使用，提高微衛星序列的訊息靈敏度，並將微衛星基因座之對偶基因多型性量化，經數據分析後，可用來探討親屬關係鑑定、遺傳組成與關係以及個體鑑別（Xu *et al.*, 2001）。

在臺灣黑熊的相關遺傳研究方面，Shih *et al.*（2009b）針對臺灣黑熊研發了 10 組微衛星分子標記。後由何冠助（2012）以其中的 6 組基因座對玉山國家公園大分地區之臺灣黑熊進行遺傳多樣性的初探，藉由毛髮及排遺 DNA 樣本進行初步研究，並獲得許多研究技術上的突破。

過去以微衛星標記基因座進行圈養臺灣黑熊遺傳多樣性的研究，大

多以血液樣本作為核 DNA 的來源 (Shih *et al.*, 2009a)。為了節省經費，在 PCR 擴增時，除加入一對微衛星標記基因座之專一性引子，其引子 3' 端外加上與一段與 M13 引子互補序列，另外加入螢光團共價鍵結標定之 M13 引子上 (以下稱經濟型)。因此擴，增每個基因座須 3 個引子：一對含有 M13 互補序列的專一性引子與一個帶有螢光團的 M13 引子。因此只要將 3~6 種不同螢光團標定在 3~6 個 M13 引子上即可適用各個微衛星基因座的擴增。進行 PCR 擴增，同時將螢光標定 M13 引子與一對含有 M13 引子互補序列的微衛星標記基因座引子放在含有 DNA 聚合酶與模版的試管中進行反應 (附錄 1)。此經濟型螢光標記法的優點是不同螢光標定的 M13 引子可以用在不同基因座的微衛星基因座擴增，因此無論分析幾對微衛星基因座，每個研究螢光標定只需要頂多 3 至 6 組不同螢光標定的 M13 引子。這方法可節省每個微衛星基因座須個別標定引子螢光的費用，成本較經濟。唯 PCR 擴增時 M13 引子必須與基因座另一引子配對，其 GC 比與 Tm 值不一定相同，因此擴增專一性較差，尤其分析 DNA 品質不佳的樣本，如排遺樣本。以不同於傳統將螢光團 (fluorophore) 直接標定 (以下稱傳統型) 在每個欲的擴增微衛星標記基因座引子上，因此每個微衛星基因座專一性引子上皆須各自標定螢光。例如，20 組微衛星標記需要標定 20 組螢光引子 (附錄 2)。其缺點是螢光標定成本高且不能換螢光顏色。因此，如何決定何種方法適用在野外台灣黑熊的研究，尚待進一步釐清。

四、性別鑑定

野外熊科性別鑑定與瞭解性別比例有助於瞭解有效族群量、族群動態與保育行為研究 (Pagès *et al.*, 2009)。哺乳類動物的性別鑑定方法是利用 X 染色體及 Y 染色體兩性染色體的差異做為鑑別的依據，由於哺乳類動物的雄性個體含有 X 跟 Y 染色體，而雌性個體只有 X 染色體，常做為性別鑑定系統的遺傳標記。過去曾被利用在熊科動物的性別鑑定系統的遺傳標記有：(1) SRY gene，僅 Y 染色體上有，由於是成為雄性決定基因，又稱為性別決定基因。其檢定方法通常會搭配 ZF gene 遺傳標記當做實驗的正控制組 (Taberlet *et al.*, 1993; Pagès *et al.*, 2009; Murphy *et al.*,

2003)。(2) Amelogenin gene，在 X 跟 Y 染色體上皆有，但是 Y 染色體上的 Amelogenin gene 約有 54 個鹼基的缺失 (Deletion) (Yamamoto *et al.*, 2002)。若要運用在排遺 DNA 樣本上會面臨到最大的問題是外源性 DNA 的干擾，由於 Amelogenin gene 為所有哺乳動物共有之基因，因此若雌性肉食者攝食雄性之獵物，其排遺當中便會含有雄性動物之 DNA，此時以 Amelogenin gene 檢測即可能造成誤判 (Murphy *et al.*, 2003; Pagès *et al.*, 2009)。另先前研究發現，部分母熊之排遺 DNA 進行 SRY gene 檢測也出現陽性結果或於瓊脂膠體電泳上出現模糊的條帶導致無法判別，推測可能是攝食之動植物 DNA 中含有類似序列，或者是體染色體中有 SRY 基因相似的遺傳序列，進而造成偽陽性之結果 (Taberlet *et al.*, 1993)。因此，欲從圈養或野外臺灣黑熊獲得正確的個體與性別遺傳資訊必須有賴最佳化 PCR 引子設計、螢光標定等實驗策略與方法步驟。雖然目前，利用排遺 DNA 進行瀕危臺灣野外黑熊族群遺傳研究是較可行且急迫解決的方法，但如何最佳化排遺 DNA 引子螢光標定的實驗策略與方法步驟，則成為急需解決的問題。

五、利用非侵入性遺傳樣本進行個體鑑別

利用非侵入性遺傳樣本 (DNA-based) 進行個體鑑別然後再利用 capture-recapture 統計原理進行野外族群估算研究，是近 10 年來快速發展的方法 (Lukacs *et al.*, 2005)。Woods *et al.* (1999) 首先利用 DNA-based capture-recapture 方法估算野外黑熊族群數量，也提出如何必免錯估的方法 (error-prevention method)。爾後，許多學者也將此方法應用在估算野外其他熊科族群密度、存活率 (Survival rate)、遷移速率 (Emigration rate)、狀態轉變速率 (state transition rate) 與族群變動有限速率 (finite rate of population change) 的例子 (Kendall and Nichols, 2002; Kendall *et al.*, 1997)。與實際獲得數據比較，已獲得相當可信的結果 (Paetkau, 2003)，例如應用在野外黑熊 (*Ursus americanus*) 與棕熊 (*U. arctos*) 的族群估算上 (Taberlet *et al.*, 1997; Woods *et al.*, 1999; Sollmann *et al.*, 2012; Mowat and Strobeck, 2000; Poole *et al.*, 2001; Boulanger *et al.*, 2001)。

六、研究目的

現階段對於保育臺灣黑熊最迫切的資訊之一是族群量的估計。然臺灣黑熊生性隱蔽，活動範圍廣大及野外族群量不多，且大多處在地型崎嶇，交通不便，後援補給難以到達的深山內，不易以捕捉或目擊的方式進行族群監測，因此利用非侵入性採樣技術以及分子遺傳技術可望克服目前實驗困難的窘境，但是相關技術在臺灣黑熊尚未成熟且標準化。因此，本研究目的是建立臺灣黑熊個體鑑別流程並應用在野外排遺樣本上，且透過此技術流程可以從野外臺灣黑熊排樣本萃取遺傳物質 DNA 之外，還可以（1）擴增與定序 D-loop 序列，並以 PCR 成功與否來控管 DNA 樣本品質；（2）從多組微衛星基因座的基因型判定，取得個體鑑別資料；（3）進行性別鑑定，取得個體的性別資料。並且對此流程進行適用性的評估。

貳、文獻回顧

一、亞洲黑熊分布與遺傳研究現況

亞洲黑熊 (*Ursus thibetanus*) 是現今尚存的 8 種熊科動物之一。亞洲黑熊 (*Ursus thibetanus*) 屬於哺乳動物門 (Mammalia)，食肉目 (Carnivora)，熊科 (Ursidae)，熊亞科 (Ursinae)。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 (Servheen *et al.*, 1999)，毛色黑其胸部上白色月牙型的斑紋，為最明顯的特徵。目前共分為 7 個亞種：1) 西藏黑熊 (*U. t. thibetanus*) 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；2) 巴基斯坦黑熊 (*U. t. gedrosianus*) 分布於伊朗東南部，巴基斯坦中南部；3) 長毛黑熊 (*U. t. laniger*) 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)；4) 西南黑熊 (*U. t. mupinensis*) 分布於中國中南部；5) 東北黑熊 (*U. t. ussuricus*) 分布於俄羅斯遠東地區，中國東北，朝鮮半島；6) 日本黑熊 (*U. t. japonicus*) 僅分布於日本；7) 臺灣黑熊 (*U. t. formosanus*) 僅分布於臺灣島 (Garshelis *et al.*, 2009)。臺灣黑熊分布於亞洲黑熊的最東南邊，由臺灣海峽與亞洲大陸隔離。目前的亞洲黑熊正普遍面臨著族群量下降的危機，並在國際自然保護聯盟 (IUCN) 中被列為易危 (Vulnerable) 的保育等級。

Hwang *et al.* (2008) 分析三個不同亞洲黑熊亞種 (分別為東北、四川、臺灣) 完整粒線體 DNA 序列，約 17,000 鹼基對，發現亞洲黑熊粒線體 DNA 控制區的第二區域 (Domain II) 存在著不同長度與鹼基之串聯重複 (Tandem repeat)，每個亞種有不同的形式的長度與鹼基之串聯重複序列，推測此長度與鹼基之串聯重複序列可做為亞種在遺傳分類的依據。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%；西南黑熊次之 (*U. t. mupinensis*)。利用貝葉氏親緣關係樹 (Bayesian phylogenetic tree) 分析，顯示這三種熊在同一枝系上。

Choi *et al.* (2010) 的文獻中也獲得相似結果，此篇文獻中亦提到，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。

二、臺灣黑熊分布現況

臺灣黑熊 (*Ursus thibetanus formosanus*)，是亞洲黑熊分布在臺灣的一個特有亞種。在蔡幸蒨於 2011 年利用黑熊有／無之空間資料，以 Maxent 模式分布預測研究指出，臺灣黑熊偏好分布海拔在 1000 公尺至 2500 公尺。該模式預測分布範圍上大致分成兩個面積大且分布連續的核心區域，第一大區域是臺灣北部的雪霸國家公園、太魯閣國家公園與棲蘭野生動物重要棲息地南部，第二大區域是臺灣南部的玉山國家公園、關山野生動物重要棲息地、雙鬼湖自然保留區與大武山自然保留區北部。但是北部區域因由於有中橫及新中橫公路穿越以及有許多果茶園與觀光遊憩的經濟活動，因此棲地破碎化與人類活動干擾較為嚴重。除了這兩大核心區域外還有兩個小面積且隔離的區域，分別是北插天山自然保留區以及海岸山脈，此區的棲息地破碎化以及族群隔離更為嚴重 (蔡幸蒨, 2011)。玉山國家公園大分地區為台灣黑熊重要棲地。玉山國家公園東側一大分地區，此區域的優勢喬木組成樹種是青剛櫟，為殼斗科 (Fagaceae) 植物，出現密度與出現頻度皆最高，分別是 24.7 棵 / 100 m² 與 67 % (黃美秀等, 2009)。其果實是許多動物的食物來源，包括鳥類、嚙齒類、大型草食動物和黑熊等，不同物種對青剛櫟果實的利用方式和程度則有所差異。殼斗科 (Fagaceae) 植物的堅果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。臺灣黑熊在每年青剛櫟結果季 (每年 10 月至隔年 1 月) 會聚集在大分地區覓食而形成一個熱點，因此大分地區逐成為研究臺灣黑熊的重要據點 (Hwang *et al.*, 2002; Kirkpatrick and Pekins, 2002)。

三、臺灣黑熊分類地位與遺傳研究現況

臺灣黑熊在分類地位上是亞洲黑熊的一個特有亞種 (Swinhoe, 1864)。在國內被列為 I 級保育類動物，為瀕臨絕種的物種。由於亞洲黑熊無法利用型態特徵來區分不同亞種，然在臺灣很多圈養單位的黑熊是從民間捐贈或是私有查緝而來，大多無從得知其原生資料，因此很多無法確定其是否為臺灣黑熊 (儲瑞華等，2000)，對於域內保育增加了些困難度。近年來分子遺傳技術蓬勃發展，利用此技術探討種間的親緣關係或是種內的亞種及族群界定是相當普遍 (陳元龍和楊吉宗，2002)。

國內對於臺灣黑熊遺傳分類研究方面，儲瑞華等人 (2000) 分析台北市立動物園的圈養 11 隻黑熊與 4 隻玉山國家公園的野生黑熊，體內的粒線體 DNA (mitochondrial DNA) 控制區 (control region) 中的部分 DNA 片段序列 (共 532 個核苷酸)，發現共 48 個核苷酸取代點 (substation site)，11 種基因單套型 (haplotype)。他們也分析細胞色素的部分 DNA 片段 (共 397 個鹼基)，分析個體間只看到 3 個核苷酸取代點。推測亞洲黑熊個體間之粒線體控制區 DNA 有著較高的變異性。玉山國家公園野生黑熊 4 個個體具有相同 (只有 1 種) 單套型。並推測動物園部份個體為臺灣黑熊，部份個體可能非臺灣黑熊。2002 年，陳元龍與楊吉宗利用粒線體基因組中的 12S rRNA (391 個鹼基) 與 16S rRNA (425 個鹼基) 序列進行 1 隻馬來熊 (*Ursus malayanus* Raffles) 與 11 隻亞洲黑熊間的遺傳變異，發現亞洲黑熊間此兩基因核苷酸取代比例僅有 0.77 % 及 0.71 %，推測，此兩基因無法做為亞洲黑熊亞種間遺傳分類的依據。在 Shih *et al.* (2009a) 利用粒線體控制區 DNA 部分序列分析 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 個基因單套型。在建構的鄰近結合法 (Neighbor-joining) 親緣關係樹分析方面，臺灣黑熊樣本自成一個單系群 (Monophyletic group)，顯示臺灣黑熊與其它地理區域亞洲黑熊已有顯著遺傳變異與遺傳分化。2012 年，石芝菁等人以粒線體控制區 DNA 部分序列 (共 700 個鹼基) 分析 77 個確定來源亞洲黑熊樣本 (46 個為臺灣黑熊、9 個西藏黑熊、17 個西南黑熊、8 個東北黑熊)，發現 46 個臺

灣黑樣本僅分析出 5 個基因單型，且臺灣黑熊樣本在 Neighbor-joining 親緣關係樹分析成單系群 (1000 bootstrap value 為 88)，其遺傳特徵明顯與其他亞洲黑熊不同。值得注意的是，在玉山國家公園中採集到的 30 個樣本，結果僅有 2 個基因單套型。若 30 個野外樣本全為不同個體，則顯示玉山國家公園境內臺灣黑熊之粒線體遺傳多樣性偏低。

Shih *et al.* (2009b) 利用圈養台灣黑熊，成功開發 10 組具 4 個核苷酸重複序列之微衛星基因座 (tetranucleotide microsatellite loci)，經 27 隻確定為台灣黑熊個體樣本檢測，顯示每個基因座具有 5 至 15 個對偶基因 (allele)，觀測遺傳歧異度 (observed heterozygosity, H_o) 從 0.556 至 0.889。因此推測這 10 組微衛星基因座應可以做為台灣黑熊與亞洲黑熊的遺傳特徵評估。2012 年，石芝菁等人利用這 10 個微衛星基因座分析同樣的 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有明顯遺傳分群。Shih *et al.* (2009b) 的研究，尚無法證實這 10 組微衛星基因座是否可做為臺灣黑熊的個體鑑別運用上。另外，野外臺灣黑熊活體樣本 (如血樣或肌肉組織) 難以取得，排遺樣本成分組成複雜，且 DNA 降解快，開發一個穩定由排遺萃取 DNA 分析其微衛星基因座之多型性之平臺實有必要。

但這些台灣黑熊與亞洲黑熊的研究，幾乎利用圈養獲救傷或圈養亞洲黑熊，只有少部份的個體可確認是臺灣黑熊，許多圈養個體無法確認是否為臺灣黑熊。野外台灣黑熊遺傳結構研究至今未被研究，而不易獲得野外黑熊個體遺傳樣本是野外黑熊研究一大限制因子；另外，野外研究台灣黑熊遺傳結構的方法亦未被建立，則是另一個需要克服研究的工作。

參、材料與方法

一、樣本來源

(一) 圈養黑熊遺傳樣本

為了要建立臺灣黑熊的個體鑑別流程，我們利用圈養已知個體亞洲黑熊的血液或組織 DNA 來進行各項實驗流程與技術的標準樣品。通過血液與組織抽取純化 DNA 進行微衛星標記擴增再現性與波形檢測後，再利用牠們的排遺樣本來確認我們建立的技術條件是否適用在從圈養黑熊排遺樣本抽取 DNA 來進行微衛星標記分析研究上。本實驗所採用的黑熊圈養個體之樣本以及樣本類型如表 1 所示，採集排遺樣本前，會先確認該場域中所有排遺是 1 隻獨立黑熊個體所排泄的，再進行採樣。排遺採集方法如下：(1) 挑選完整無被任何外力破壞，且具有新鮮光澤的排遺。(2) 以滅菌過的竹籤夾取無接觸過地面的上部分排遺，裝入 50 ml 離心管中。(3) 加入 95 % 酒精使排遺完全浸泡於中，置入 -20°C 冰箱保存。血液樣本則是利用黑熊例行性健康檢查的機會，請獸醫執行採集血液，取莫約 10 c.c. 的血液並裝入含有抗凝血劑 (EDTA) 的集血管中，暫放在 4°C 冷藏，於當天進行 DNA 的萃取。唯一的組織樣本是來自屏東保育類野生動物收容中心 (PTRC) 的死亡個體 (黑糖糕)，經獸醫解剖後，請獸醫協助剪取莫約 10 g 脂肪含量少的肌肉組織，浸泡於 95 % 酒精，置 -80°C 保存。

(二) 野外黑熊遺傳樣本

採集臺灣黑熊排遺樣本的樣區位在玉山國家公園的大分地區(圖 1)，採樣頻率是每個月一次前往樣區採集，時間從 2010 年 10 月至隔年 2 月，分成 5 次採樣，共採集 251 份排遺。採樣方式是走 8 條穿越樣線 (T1~T8，圖 1)，總長度約 5.2 公里，沿路採集黑熊排遺樣本，會依排遺外型判定是否是臺灣黑熊排遺。採集與記錄排遺資訊方法如下：(1) 先拍照並記錄 GPS 點位及時間；(2) 判定排遺新鮮程度，判定方法是參考屏科

大哺乳動物生態研究室的判定方法及經驗，等級分成 1~5 (1: 2 天內；2: 3 至 7 天；3: 超過 1 周至 2 周內；4: 超過 2 周至 4 周內；5: 1 個月以上)；(3) 再將排遺樣本裝進適當大小的夾鏈袋中，封好；(4) 回山屋後將黑熊排遺裝進 15 ml 離心管中，並加入 95 % 的酒精 (乙醇)，使排遺全浸泡於酒精中。(5) 下山後於 -20°C 保存，並盡速進行排遺 DNA 的萃取。此 251 個排遺樣本依新鮮程度 1 至 3、少部分新鮮程度 4 以及 17 個無新鮮程度記錄的排遺樣本於 2011 年間進行 DNA 萃取，一共萃取 176 分排遺 DNA。經過 ZF/ SRY 性別鑑定，一共有 95 個樣本鑑定成功。但是後續發現當時採用的性別鑑定有雌性會誤判成雄性的情形，因此該次的性別鑑定結果不採用。

二、臺灣黑熊個體鑑別之技術建立流程

利用圈養臺灣黑熊的血液樣本與排遺樣本建立個體鑑別流程之技術 (如圖 2)，分成兩個部分，首先以臺灣黑熊血液 DNA 進行實驗 (圖 2A)，待成功自臺灣黑熊血液 DNA 穩定擴增微衛星基因座後即以臺灣黑熊排遺 DNA 進行實驗。從圈養黑熊之血液樣本抽取基因組 DNA，做為 DNA 抽取技術標準化的依據。接著針對臺灣黑熊設計可擴增 D-loop 全長的引子，並以臺灣黑熊的血液 DNA 做為模板，測試出最適擴增 (PCR) 條件。以圈養臺灣黑熊的血液 DNA 作為模板，測試出最適 PCR 擴增臺灣黑熊的微衛星標記條件，若無法成功擴增的微衛星標記則捨棄不予採用。最後以臺灣黑熊血液 DNA 進行適合臺灣黑熊的性別鑑定方法，測試出最適擴增 (PCR) 條件。以上用血液 DNA 測試完實驗條件後，再進行第二部分 (如圖 2B)。從圈養黑熊排遺樣本抽取 DNA，做為該技術套用在野外黑熊排遺樣本 DNA 抽取的依據。接著以先前設計好的引子來擴增 D-loop 全長的引子，並以臺灣黑熊的排遺 DNA 做為模板，測試出最適擴增 (PCR) 條件。以圈養臺灣黑熊的排遺 DNA 作為模板，測試出最適 PCR 擴增臺灣黑熊的微衛星標記條件，若無法成功擴增的微衛星標記則捨棄不予採用。接著將圈養臺灣黑熊排遺 DNA 用篩選剩下的微衛星基因座進行 PCR，經毛細管電泳，進行基因型判讀，若有判讀困難的微衛星標記則不予採用。確認成功擴增分析圈養臺灣黑熊排遺 DNA 之微衛星基因型後，以排

遺為樣本進行圈養黑熊個體鑑別的盲測，經過個體鑑別的盲測，依盲測結果的準確性，決定所篩選出的微衛星基因座組合是否適用在臺灣黑熊個體鑑別上。最後以臺灣黑熊排遺 DNA 進行適合臺灣黑熊的性別鑑定方法，測試出最適擴增（PCR）條件。

（一）DNA 萃取

從臺灣黑熊的血液或組織萃取 DNA，採用 Wizard® Genomic DNA Purification Kit 此套組萃取 DNA，並依照此產品說明書進行實驗：

1、血液樣本

從黑熊個體抽出約 10 ml 的血液，裝入含有 EDTA 的收集管中，加以搖晃均勻。在均勻的狀態下於 4 °C 中以 2,000 g 離心 15 分鐘。離心後會分成三層（上：血清；中：白血球；下：紅血球），吸去上層的血清後將中層的白血球吸取至 15 ml 離心管中，加入 5 ml 的 Cell Lysis Solution，上下搖晃 10 分鐘後，在 4 °C 下以 2000 g 離心 10 分鐘。吸去上清液後加入 5 ml 的 Cell Lysis Solution，上下搖晃 10 分鐘後於 4 °C 中以 2,000 g 離心 10 分鐘。吸去上清液後加入 5 ml 的 Nuclei Lysis Solution 以及 25 µl 的 RNase A (4 mg/ml)，於 37 °C 中上下搖晃 15 分鐘後置於室溫上下搖晃 15 分鐘。加 1.65 ml 的 Protein Prediction Solution 後搖晃均勻，在 4 °C 下以 2,000 g 離心 10 分鐘。吸取上清液至新的 15 ml 離心管後於 4 °C 下以 2,000 g 離心 10 分鐘，再重複此步驟一次。加入 5 ml 的異丙醇 (Isopropanol) 後輕輕地上下搖晃 3 分鐘，在 4 °C 下以 2000 g 離心 5 分鐘。倒去上清液後加入 1 ml 70 % 的乙醇將沉澱物全部沖起，再全部吸起裝入 1.5 ml 的離心管，在 4 °C 下以 14,000 rpm 離心 5 分鐘。倒去上清液，再加入 1 ml 70 % 的乙醇，在 4 °C 下以 14,000 rpm 離心 5 分鐘。倒去上清液，離心管倒置自然風乾後加入適量的 65 °C 二次水回溶 DNA，並以 -20 °C 保存。

2、組織樣本

從死亡的圈養黑熊個體（黑糖糕）獲取約 10 g 的肌肉組織中，切取約 100 mg 的組織進行 DNA 萃取。首先將肌肉組織切成細碎，裝入 1.5 ml 離心管中。將 500 μ l 的 Nuclei Lysis Solution 與 120 μ l 的 0.5 M EDTA 混合均勻後取出其中 600 μ l 加入切碎的肌肉組織中，再加 17.5 μ l 的 Proteinase K (20 mg/ml) 後於 55 °C 中上下搖晃 16 小時。加 3 μ l 的 RNase Solution，於 37 °C 中上下搖晃 30 分鐘。加入 200 μ l 的 Protein Precipitation Solution 後搖晃均勻，於室溫中以 14,000 rpm 離心 4 分鐘。取上清液裝至新的 1.5 ml 離心管中，加入 600 μ l 的異丙醇，上下搖晃 3 分鐘後於室溫中以 14,000 rpm 離心 2 分鐘。倒去上清液，加入 600 μ l 的 70 % 乙醇後於室溫中以 14,000 rpm 離心 1 分鐘，再重複此步驟一次。倒去上清液後直接以 14,000 rpm 離心 3 分鐘，再倒去上清液後倒置離心管自然風乾。最後加入適量的 65 °C 二次水回溶 DNA 至完全溶解，並以 -20 °C 保存。

3、排遺樣本

從排遺萃取 DNA 則參考 Parsons *et al.* (1999) 發表的 DNA 萃取方法，並做適當的修改。萃取方法乃取 2 g 排遺樣本裝入 15 ml 離心管中，加入 95% 酒精至 8 ml 處，充分混勻後靜置冰上 5 分鐘，離心 3,300 rpm、4°C、10 分鐘。用滅菌滴管吸取上清液與上層灰白色泥質裝入新的 15 ml 離心管，於 4°C 離心 3500 rpm、20 分鐘。再用滅菌滴管吸去上清液丟棄，留下沉澱物。在含有沉澱物的離心管中加入 1.8 ml 之 2 X CTAB 緩衝液 (2% Hexadecyltrimethylammonium bromide, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, Parsons *et al.*, 1999) 沖洗及懸浮沉澱物，於室溫搖晃兩小時後，以 3,500 rpm 離心 20 分鐘、4°C。取 1.8 ml 上清液，加入同體積之氯仿 (Chloroform)，均勻搖晃後以 13,000 rpm 離心 5 分鐘、24°C。取 1.6 ml 上清液，加入同體積之氯仿，均勻搖晃後以 13,000 rpm 離心 5 分鐘、24°C。取 1.2 ml 上清液，加入同體積之異丙醇 (Isopropanol)，放入 -20°C 10 分鐘，取出後室溫搖晃 30 分鐘。以 13,000 rpm 離心 5 分鐘、4°C。倒去液體，加入 1 ml 70% 酒精，以 13,000 rpm 離心 4 分鐘、4°C。將殘餘酒精吸去後倒置風乾，依照 QIAGEN DNeasy® Tissue kit 之說明書，以此套組進行 DNA 純化 (Purification)，其實驗步驟乃將風乾後的 DNA 加入

180 μ l 的 ATL Buffer 及 20 μ l 的 Proteinase K (20 mg/ml)，置於 55 $^{\circ}$ C 中 10 分鐘，其間不時搖混均勻。再加入 200 μ l 的 AL Buffer，置於 70 $^{\circ}$ C 中 10 分鐘，其間不時搖混均勻。再加入 200 μ l 100 % 的乙醇，混合均勻後全部吸取加入 DNeasy Mini Spin Column 內，以 9,000 rpm 離心 1 分鐘。將 Spin Column 移置新的 Collection Tubes，加入 500 μ l 的 AW1 Buffer，以 9,000 rpm 離心 1 分鐘。將 Spin Column 再一次移至另一個新的 Collection Tubes，加入 500 μ l 的 AW2 Buffer，以 14,000 rpm 離心 4 分鐘。將 Spin Column 移置 1.5 ml 離心管中，置於 55 $^{\circ}$ C 中 25 分鐘。再加入 AE Buffer，置於 65 $^{\circ}$ C 中 10 分鐘，以 9,000 rpm 離心 2 分鐘完成純化。最後將 DNA 放置 65 $^{\circ}$ C 中 20 分鐘以除去 DNase。萃取及純化後的排遺 DNA 存放於 -20 $^{\circ}$ C。

(二) D-loop 序列擴增與定序

1、D-loop 序列擴增

為了要擴增臺灣黑熊的 D-loop 序列全長，本研究參考發布於 NCBI 的臺灣黑熊粒線體全長序列 (Accession number: NC_009331) 來設計擴增 D-loop 序列的引子。5'端引子 (UTF-CR (F)) 設計在粒線體的羥丁胺酸 tRNA 基因的位置 (圖 3)，3'端引子 (UTF-CR (R)) 則設計在 12S 核糖體 RNA 基因的位置，此組引子序列分別是 UTF-CR(F): 5'- TGTAAG-CCAAAAACGGAGAATA -3' 與 UTF-CR (R) : 5'- CACTGGAGCGCGG-AGACTTACAT -3'，預計 PCR 產物片段大小是 1,838 個鹼基對 (bp)。擴增 D-loop 序列反應是採用 BD AdvantageTM 2 PCR Kit 套組 (Clontech)，其反應條件參照說明書的建議: 1 倍的 BD AdvantageTM 2 SA PCR Buffer、0.2 mM 的 dNTP Mix (Thermo)、0.4 μ M 的引子 (UTF-CR(F) 與 UTF-CR (R))、1 倍的 BD AdvantageTM 2 Polymerase Mix 與 100 ng 的血液 DNA 模板 (若是排遺 DNA 則改加入 3 μ l 的 DNA)，在 25 μ l 的總反應體積中，加入在 PCR tube 內。接著利用溫度循環控制儀 (Veriti 96 Well Thermal Cycler, ABI, California) 以下列的循環條件: 先經過 94 $^{\circ}$ C 5 分鐘 (Initial denaturing) 之後，再以 94 $^{\circ}$ C 30 秒鐘 (Denaturing)、56 $^{\circ}$ C 30 秒鐘

(Annealing)、68 °C 2 分鐘 (Elongation) 為一個循環，共 40 個循環，最後以 68 °C 10 分鐘 (Final elongation) 使反應完全，反應結束後使之降溫至 4 °C 保存。為了確認是否有擴增成功目標產物，將擴增出的產物取 1 µl 進行電泳，於 1 % 的瓊脂膠體在 0.5 % 的 TBE (Tris/Borate/EDTA) 緩衝液中，以 100 伏特下進行。電泳結束後將膠體以 0.5 µg/ml 的溴化乙錠 (Ethidium Bromide, SIGMA, USA) 染色，再以紫外光顯色並照相，檢視其電泳構型來確認增幅出的片段大小以及品質是否與預期一致。

2、D-loop 序列定序

為了取得臺灣黑熊的 D-loop 序列，將 D-loop 擴增出來的產物拿去定序，定序之前會將產物純化 (clean up)，純化方法採用 Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid) 此套組進行純化，並參照說明書操作，如下：取出 20 µl 的 D-loop 擴增產物，加入 100 µl 的 DF Buffer 後混合均勻，再將全部吸取至 DF Column 中，以 14000 rpm 離心 30 秒鐘，倒去收集液。加入 600 µl 的 Wash Buffer 至 DF Column 中，靜置 1 分鐘後以 14000 rpm 離心 30 秒鐘，倒去收集液，再以 14000 rpm 離心 3 分鐘。將 DF Column 移置新的 1.5 ml 離心管，加入 20 µl 的 65 °C 去離子水，靜置 2 分鐘後以 14000 rpm 離心 2 分鐘。最後將純化過的擴增產物取出 1 µl 進行電泳，於 1 % 的瓊脂膠體在 0.5 % 的 TBE 緩衝液中，以 100 伏特下進行。電泳結束後將膠體以 0.5 µg/ml 的溴化乙錠 (SIGMA, USA) 染色，再以紫外光顯色並照相，檢視其純化後的 DNA 品質是否良好。將純化後的產物以 ABI PRISMTM Dye Terminator Cycle Sequence Kit (Applied Biosystems Division, Perkin-Elmer Cetus) 標定，並以 ABI 3730XL DNA 定序分析儀 (ABI, California) 分析 DNA 序列。定序用的引子 SF1: 5'- TCTACCCTC-CCCAAGACTCAAG -3'，可以讀 D-loop 序列 1 至 685 bp。

(三) 微衛星基因座擴增及基因型判讀

本研究參考 Shih 等人 (2009b) 發表針對臺灣黑熊研發的微衛星基因座，挑選出 8 組基因座：UT1、UT3、UT4、UT25、UT29、UT31、UT35、

UT38 (表 2) 進行各樣本擴增及基因型分析。各基因座的 5'端引子皆有接上螢光團 (DS-33, ABI, California) (表 2)。擴增這 8 組微衛星基因座是採用 BD Advantage™ 2 PCR Kit 套組 (Clontech), 其反應條件參照說明書的建議: 1 倍的 BD Advantage™ 2 SA PCR Buffer、0.2 mM 的 dNTP Mix (Thermo)、0.4 μM 的引子 (UTF-CR (F) 與 UTF-CR (R))、1 倍的 BD Advantage™ 2 Polymerase Mix 與 50 ng 的血液 DNA 模板 (若是排遺 DNA 則改加入 2 μl 的 DNA), 在 10 μl 的總反應體積中, 加入在 PCR tube 內。接著利用溫度循環控制儀 (Veriti 96 Well Thermal Cycler, ABI, California) 以下列的循環條件: 先經過 94 °C 5 分鐘 (Initial denaturing) 之後, 再以 94 °C 30 秒鐘 (Denaturing)、56~62 °C (各基因座的溫度不一, 詳見表 4) 30 秒鐘 (Annealing)、68 °C 25 秒鐘 (Elongation) 為一個循環, 共 40 個循環, 最後以 68 °C 10 分鐘 (Final elongation) 使反應完全, 反應結束後使之降溫至 4 °C 保存。擴增後的產物則以 ABI 3730XL DNA 定序分析儀 (ABI, California) 進行基因型分析, 再以 Peak Scanner Software v1.0 此軟體呈現波型圖來判讀基因型。為了避免或是減少對偶基因丟失 (allelic dropout) 及假性對偶基因 (false alleles) 發生, 本研究採用重複獨立擴增法 (multiple tubes approach) 來判定基因型 (Hung *et al.*, 2004, Taberlet *et al.*, 1996)。判定流程與標準如下:

1. 各 DNA 樣本經過一次所有基因座的擴增。若超過一半 (>4) 的基因座擴增失敗的樣本, 則重新從排遺樣本抽取 DNA, 重新進行實驗。若一半以上 (≥4) 的基因座擴增成功的樣本, 則進到下一個判定步驟。
2. 判定樣本各基因座的基因型, 大至分 3 類: (1) 異型合子, 且波型清楚明確, 則可判定該基因型。(2) 同型合子, 且波型清楚明確, 則需要再進行 2 至 5 次的序列擴增, 進入下一個判定步驟。(3) 擴增失敗或是波型不清楚明確, 則需要再進行 3 至 5 次的序列擴增, 進入下一個判定步驟。
3. 經過 2 至 5 次的序列擴增, 判定樣本各基因座的基因型, 大至分 4 類: (1) 其中一次基因型判定中, 判定為異型合子, 且波型清楚明確,

則可判定該基因型。(2) 有 3 次基因型判定中，判定為同型合子，且波型清楚明確，則可判定該基因型。(3) 3 次基因型判定中，只有兩種相異的同型合子，且波型清楚明確，則可組合起來判定為異型合子。(4) 經過 5 次基因型判定，依然無法判定其基因型，則此樣本的基因座設為缺值，若此樣本超過一半 (>4) 的基因座為缺值，則捨棄該樣本，不予分析。

(四) 個體鑑別及單盲試驗

個體鑑別的方法是利用 Genecap 軟體 (Wilberg and Dreher, 2004) 比對各樣本所有基因座之基因型組合，各基因座之基因型全相同則判為相同個體，若有不同則判為相異的個體，以達到個體鑑別的目的。如果出現兩樣本的基因型有 1 個以下的對偶基因相異，則再對兩樣本該基因座進行一次獨立的基因型判定，確認基因型是否正確。

為了測試我們挑出的 8 組微衛星基因座可否是運用在野外臺灣黑熊個體鑑別上，設計了一個個體鑑別的盲測試驗，方法如下：

1. 從 7 隻圈養黑熊個體 (表 1) 採集 2 至 3 份獨立排遺樣本。
2. 請他人從中挑選出 15 個排遺樣本，並重新標記樣本盲測代號 (BT1~BT15)，而操作實驗者不知盲測代號所代表的個體與個體數。
3. 先請他人萃取排遺 DNA，經 PCR 擴增 D-loop 後，確認排遺 DNA 品質可以進行實驗後，再交由實驗操作者進行後續實驗。擴增 8 組微衛星基因座，再採用重複獨立擴增法 (multiple tubes approach) 來判定基因型。
4. 將各樣本之各微衛星基因座判定出來的基因型以 Genecap 軟體進行個體鑑別，並檢視鑑別出個體的數目是否與實際的結果相符。

後續我們從盲測的樣本中，將一組已知親屬關係的家族樣本挑出來進行親子關係比對，也就是根據子代的每個基因座的對偶基因型分別遺傳自 2 個親代 (父母) 的基因型。

(五) 性別鑑定

本研究採用兩套性別鑑定方法，一組是參考 SE47/SE48 標記(表 3)，位在性染色體上的 *Amelogenin* (AMEL) 基因上，於 Y 染色體有 54 個鹼基對的缺失 (deletion)，因此可做為性別判別的標記。經過 PCR 擴增後雄性個體 XY 染色體會被擴增出 2 條不同長度的序列 (245 bp、191 bp)，分別來自 X、Y 染色體；而雌性的 XX 染色體只呈現一條 245 bp 序列。可是此組性別鑑定方法應用在亞洲黑熊上，於瓊脂膠體電泳圖上顯示，雄性個體固定會有非專一性的第 3 條序列 (約 300 bp) 被擴增出來 (Yamamoto *et al.*, 2002)。由於這段基因序列在脊椎動物上是某種程度保守，並非熊科專一的序列，若運用在臺灣黑熊的排遺 DNA 擴增會有外源性 DNA (臺灣黑熊所攝食的哺乳類動物) 非專一擴增的可能。另一組是參考熊科動物專一的 MP-ZF-F/ MP-ZF-R 與 MP-SRY-Ursus/ MP-SRY-1R-Ursus 標記 (Pagès *et al.*, 2009) (表 3)，分別位在性染色體的 zinc finger (ZF) 基因以及 Y 染色體僅有的性別決定區域 (sex-determining region of Y-chromosome, SRY) 基因。判別方式是看 SRY 基因是否有被擴增出來，若同時成功擴增 SRY 與 ZF 序列 (115 bp、144 bp) 則判為雄性；只成功擴增 ZF 序列 (144 bp) 則判為雌性；只成功擴增 SRY 序列則判為無效，需重新 PCR 擴增。但是此組的性別鑑定方法在過去的研究中，部分少數雌性個體經 SRY 序列 PCR 後，於瓊脂膠體電泳圖顯示有近 115 bp 的序列被擴增出來，雖然此假訊號會弱很多，可是依然會影響性別判斷的正確性 (Taberlet *et al.*, 1993)。為了改善上述兩組性別鑑定在判讀上的可信度與準確性，本研究結合螢光引子標記技術，將性別鑑定標記 (SRY, ZF 與 AMEL) 於引子的 5' 端接上螢光標記 (DS-33, ABI, California) (表 3)，期望利用毛細管電泳高解析度與高靈敏度提高性別判讀的正確性。

此兩套的 PCR 反應皆採用 BD Advantage™ 2 PCR Kit 套組 (Clontech)，其反應條件參照說明書的建議：1 倍的 BD Advantage™ 2 SA PCR Buffer、0.2 mM 的 dNTP Mix (Thermo)、0.4 μM 的引子 (UTF-CR (F) 與 UTF-CR (R))、1 倍的 BD Advantage™ 2 Polymerase Mix 與 20 ng 的血液 DNA

模板（若是排遺 DNA 則改加入 1.5 μl 的 DNA），在 10 μl 的總反應體積中，加入在 PCR tube 內。接著利用溫度循環控制儀（Veriti 96 Well Thermal Cycler, ABI, California）以相同的循環條件（除了 Annealing 的溫度以外）：先經過 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 分鐘（Initial denaturing）之後，再以 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒鐘（Denaturing）、62（AMEL）或 65（ZF/SRY） $^{\circ}\text{C}$ 30 秒鐘（Annealing）、68 $^{\circ}\text{C}$ 1 分鐘（Elongation）為一個循環，共 40 個循環，最後以 68 $^{\circ}\text{C}$ 10 分鐘（Final elongation）使反應完全，反應結束後使之降溫至 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。擴增後的產物則取 1 μl 進行電泳，於 2 % 的瓊脂膠體在 0.5 % 的 TBE（Tris/Borate/EDTA）緩衝液中，以 100 伏特下進行。電泳結束後將膠體以 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的溴化乙錠（Ethidium Bromide, SIGMA, USA）染色，再以紫外光顯色並照相，檢視該次實驗成功與否。接著以 ABI 3730XL DNA 毛細管電泳分析儀（ABI, California）進行基因型分析，再以 Peak Scanner Software v1.0 此軟體呈現波型圖來判讀基因型以及性別，並評估毛細管電泳在性別鑑定的效用相較於瓊脂膠體電泳。

三、臺灣黑熊個體鑑別流程

依圈養臺灣黑熊的組織或排遺 DNA 進行個體鑑別之相關技術建立後，本研究設計出一個野外臺灣黑熊個體鑑別流程（如圖 4）。實驗流程如下：將新鮮度在 2 周內（新鮮程度：1~3）的排遺進行 DNA 萃取。萃取後的 DNA 進行 D-loop 序列的擴增。成功擴增 D-loop 序列的樣本進行序列定序。成功擴增 D-loop 序列的樣本接著進行第一次微衛星基因座之擴增。有半數以上的微衛星基因座在第一次擴增有成功的樣本，則進行多次的多組微衛星基因座擴增與基因型判定。超過半數的微衛星基因座之基因型是明確的樣本，則採用此多組基因型資料進行個體鑑別分析。將個體鑑別出的個體，進行性別鑑定。以下情況會將樣本捨棄或重新萃取 DNA：新鮮程度超過 2 周（新鮮程度：4、5）的排遺則捨棄。擴增 D-loop 序列失敗的樣本，則重新萃取 DNA，再進行後續實驗。超過半數的微衛星基因座在第一次擴增時失敗的樣本，則重新萃取 DNA，再進行後續實驗。半數以上的微衛星基因座之基因型是無法確認的樣本，則捨棄不予分析。本研究採用的野外樣本是來自玉山國家公園大分地區 2010

年 10 月至隔年 2 月青剛櫟結果季所採集的臺灣黑熊排遺樣本。最後探討排遺樣本的新鮮程度與 D-loop 序列擴增成功率。

四、遺傳資料分析

大分地區鑑別出來的臺灣黑熊個體之成功定序出來的 D-loop 序列 (685 bp)，經過 DNASTAR Lasergene MegAlign Version 7.1.0 軟體進行序列比對後，以 BEAST v1.7 軟體製做貝葉斯親緣發生樹 (Bayesian phylogenetic tree)，是以 GTR+G 的核苷酸演化模式下，計算 5×10^8 次所整合出來 (Drummond *et al.*, 2012)。同時加入 1 隻雪霸國家公園的臺灣黑熊個體 (NC_009331)，以及其他亞種 (四川亞種：NC_008753、DQ402478；東北亞種：EF667005、EU264527、EU264507；指名亞種：EF58726、NC_011118)，並以美洲黑熊 (NC_003426) 做為外群 (out group) 一起分析。

經過多次微衛星基因座擴增法所判定的基因型，使用 Cervus version 3.0.3 (Kalinowski *et al.*, 2007) 計算個體鑑別率 (probability of identity, $P_{(ID)}$)，此為「族群內隨機 2 個不同的個體，具有相同基因型的機率」，代表一個遺傳標記對於個體鑑別的解析力，值越小越有鑑別力，反之則越沒有鑑別力 (Waits *et al.*, 2001)。個體鑑別率的公式：

$$P_{(ID)} = \sum p_i^4 + \sum \sum (2p_i p_j)^2$$

p_i 與 p_j 分別代表基因座中第 i 與 j 個對偶基因的頻率，又 i 不等於 j (Paetkau and Strobeck, 1994)。其公式中的對偶基因頻率是符合哈溫平衡的假設，此公式所算出來的值為理論的期望值 (theoretical expected $P_{(ID)}$)，因此算出的個體鑑別率為標準值的上限 (Waits *et al.*, 2001)。但是此公式無考量到樣本數的偏差，所以本研究則採用修正樣本數偏差的個體鑑別率公式：

$$P_{(ID)unbiased} = \frac{n^3(2a_2^2 - a_4) - 2n^2(a_3 + 2a_2) + n(9a_2 + 2) - 6}{(n-1)(n-2)(n-3)}$$

n 代表樣本數， a_i 代表：

$$a_i = \sum_j p_j^i$$

p_j 代表基因座中第 j 個對偶基因的頻率 (Paetkau *et al.*, 1998; Waits *et al.*, 2001)。本文則將此公式所算出的個體鑑別率皆以「期望個體鑑別率」稱之。另外，假設隨機挑選出的 2 個不同的個體互為手足，則其個體鑑別率稱為「手足個體鑑別率」($P_{(ID)sib}$)，公式如下：

$$P_{(ID)sib} = 0.25 + (0.5\sum p_i^2) + \left[0.5(\sum p_i^2)^2\right] - (0.25\sum p_i^4)$$

p_i 代表基因座中第 i 個對偶基因的頻率 (Evetts and Weir, 1998; Waits *et al.*, 2001)。由於其假設是隨機挑選出的個體間皆互為手足關係，因此個體間享有同一個來源的基因型，所以有較高的基因型相似度，個體鑑別率往往比一般情況還要高，通常以此當做個體鑑別率最保守的數值，為標準值的下限 (Waits *et al.*, 2001)。基因座的個體鑑別率各別算出後，再統計整體的多組基因座 (multiple loci) 之個體鑑別率。統計方式是將各基因座的個體鑑別率相乘積 (Waits *et al.*, 2001)。此外我們依每個微衛星標記的個體鑑別率進行排序，排列出最佳且有足夠的個體鑑別度的微衛星基因座組合。

除了計算個體鑑別率，同時使用軟體 Cervus version 3.0.3 (Kalinowski *et al.*, 2007) 計算每個基因座的觀測異質度 (Observed heterozygosity, H_O) 與理論異質度 (Expected heterozygosity, H_E)。並同時計算出多型性資訊含量 (polymorphic information content, PIC)，其意義為遺傳標記含有的資訊多寡，其值介於 0 到 1 之間，其定義公式如下 (Botstein *et al.*, 1980)：

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

p_i 及 p_j 代表基因座中第 i 個及第 j 個對偶基因的頻率。

在假設 2010 年青剛櫟結果季 (10 月至隔年 2 月) 於玉山國家公園大分地區所採集之臺灣黑熊為同一族群下，另以 Genepop 軟體 (Raymond and Rousset, 1995) 分析這些基因座的對偶基因是否符合哈溫平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium, HWE)，並採用費氏精確測驗法 (Fisher's exact test) 來評估有無偏離哈溫平衡，再檢定其 95% 信賴區間 (confidence interval)。

最後利用 PopGene (Yeh *et al.*, 1995) 軟體計算有效對偶基因數 (effective number of alleles, A_e)，其值的意義是一基因座中真正對該族群對偶基因頻率有影響的對偶基因的數目，其定義公式如下：

$$A_e = \frac{1}{\sum p_i^2}$$

p_i 代表基因座中第 i 個對偶基因的頻率。

肆、結果

一、臺灣黑熊個體鑑別之技術建立

(一) 圈養黑熊樣本之 D-loop 序列擴增與定序

自圈養黑熊的排遺與血液樣本萃取 DNA，經過 D-loop 序列 PCR 後，於瓊脂膠體電泳顯示，皆能專一地被擴增出約 1838 bp 的序列產物(圖 5)。定序後經比對發現，確實為臺灣黑熊的 D-loop 序列，因此本研究設計的引子能有效擴增與定序出目標產物。

(二) 圈養黑熊排遺樣本的個體鑑別之單盲試驗

為了驗證所使用的 8 組微衛星標記的重複性與正確性，同時也檢驗研究方法與技術的可行性，我們利用盲測去檢定上述事項。從 7 頭已知的圈養黑熊個體，收集 15 個排遺(因此有重複收集的排遺)，經過了多次微衛星基因座擴增法(Multiple tubes approach)與基因型判讀。實驗結果鑑定為 8 隻個體，實際的正確結果則是 7 隻個體，盲測的結果與實際的有一隻個體的誤差。測試的基因型結果如表 4，在鑑別出 8 隻個體(A~H)中有 6 隻個體(A~F)是完全正確的，其餘 2 隻個體(G、H)原應該是相同的個體(TE8)，卻錯判成相異的個體。進一步檢驗基因型原始資料發現，2 個錯判的樣本(BT4 與 BT15)，其微衛星基因座 UT3 與 UT31 是相異的，因此分析軟體(Genecap)判斷 BT4 與 BT15 為不同的個體(表 4)。BT4 與 BT15 的 UT3 基因座的基因型分別為 249, 253 與 245, 253，兩者皆異型合子，雖然有相同的 253 此對偶基因，但卻有相異的 249 與 245 對偶基因。BT4 與 BT15 的 UT31 基因座的基因型分別為 320, 320 與 296, 320，一為同型合子，另一為異型合子，而且皆有 320 此對偶基因。此外，7 隻個體中有 4 隻是臺灣黑熊，另 3 隻為不確定為臺灣黑熊的亞洲黑熊(其中包含 TE8)。

將已知親屬關係的個體從單盲試驗的樣本挑出來進行親子關係比對，

挑出的親代個體為 PC1 與 PC2，而 PC3 是已知基因型的子代，比對結果除了 UT25 基因座於親代 PC2 是缺值外，PC3 每個基因座的對偶基因型皆符合遺傳自 2 個親代（父母）的基因型（表 5）。

（三）性別鑑定於瓊脂膠體電泳與毛細管電泳的比較

將圈養臺灣黑熊個體之排遺或血液 DNA 樣本進行 2 組性別鑑定，即 AMEL 與 ZF/ SRY，從瓊脂膠體電泳顯示，雄性個體於 AMEL 擴增上會固定多出 1 條約 300 bp 的非預期產物（圖 6）；雌性個體則有一條產物，表現正常。另一方面，雌性個體於 SRY 擴增上會不固定出現似雄性才有的 115 bp SRY 片段產物（圖 6），但是訊號偏弱，但是對於判定性別上還是有疑慮；雄性個體則皆表現正常。將同樣的 PCR 產物經毛細管電泳顯示，於 AMEL 性別鑑定的雄性個體並無檢測出非專一性產物的訊號，而且 2 清楚的訊號皆座落在預期的位置上（圖 7）；雌性個體則亦表現正常。在 ZF/ SRY 性別鑑定方面，雌性個體於 SRY 產物位置有檢測到訊號（圖 8），但是相對與 ZF 產物訊號低很多，約 ZF 產物訊號的 0.25 倍不到；雄性個體則有 2 清楚的訊號，亦表現正常。

二、臺灣黑熊個體鑑別

（一）排遺樣本篩選及 D-loop 序列擴增

從 2010 年 10 月至隔年 2 月於玉山國家公園大分地區所採集的排遺樣本，總共收集了 251 份排遺樣本，其中以 12 月及 1 月樣本數量最多（表 6），從新鮮程度 1 至 3、另挑選 6 個新鮮程度 4 以及 17 個無新鮮程度記錄的排遺樣本中，共萃取出 176 個排遺 DNA 樣本，於 2011 年間有經過性別鑑定實驗，雖然後續發現其結果不可信，但其中 95 個排遺 DNA 樣本之性別鑑定標記成功被增幅出來，因此後續實驗則以這 95 個排遺 DNA 樣本進行 D-loop 序列擴增。最後，總計有 83 個排遺 DNA 樣本成功被增幅出 D-loop 序列，擴增成功率 87 %（表 6）。

將 D-loop 擴增之產物純化後以 SF1 引子進行定序，定序出來 D-loop 前段 1 至 685 bp 的序列，配合個體的資料共取得了 32 個 D-loop 序列（1 ~ 685 bp），有 3 隻個體定序失敗。經與 NCBI GenBank 比對，確定為臺灣黑熊排遺。再以貝葉斯親緣分析法（Bayesian phylogenetic analyses）製成親緣關係樹（phylogenetic tree）（圖 9），並以一個雪霸國家公園的個體以及其它地區的亞洲黑熊亞種一併加入分析，另以美洲黑熊做為外群，結果顯示大分地區的臺灣黑熊与其它地區的亞洲黑熊在演化上能明顯分歧出來（後驗機率：1）。

（二）個體鑑別及 8 組微衛星基因座多樣性分析

從 2010 年 10 月到隔年 2 月的排遺樣本中，成功擴增 D-loop 的 83 個排遺，其 DNA 進行 8 組微衛星基因座增幅及毛細管電泳之基因型判定，各基因座分析顯示，83 個樣本之 8 組微衛星基因座皆成功擴增及判讀出來，並無缺值 Genecap 軟體分析顯示，總共辨識出 35 個個體，其中有 19 隻個體的排遺樣本有重複被拾獲，剩下 16 隻個體的排遺樣本僅被收集到 1 次。

這 35 個熊個體於 8 組微衛星基因座多樣性分析顯示，基因座之對偶基因數以 UT31 的 12 個最大，以 UT1 的 2 個最小，平均是 7 個（表 7）。有效對偶基因數依然以 UT31 的 8.4 個最大，以 UT1 的 1.7 個最小，有效對偶基因座的平均是 4.5 個（表 7）。多型性資訊含量（polymorphism information content, PIC）其值介於 0.332 到 0.87 之間，其中除了 UT1(0.332) 以外，皆大於 0.5。該值若大於 0.5 代表該基因座具有高度資訊有利做為多型性分析工具；若介於 0.25 至 0.5 之間則代表該基因座是有一般量的資訊；若低於 0.25，則是略有資訊。本研究結果平均為 0.68，是大於 0.5 的。在觀測異質度(H_O)部分，平均是 0.76，除了微衛星基因座 UT1(0.426) 之外，皆大於 0.7（表 7）。期望異質度 (H_E) 其值介於 0.426 到 0.894 之間，平均是 0.73。平均觀測異質度略高於期望異質度 (H_E)。

2010 年 10 月至隔年 2 月的大分地區之 35 個臺灣黑熊個體，以 8 組

微衛星基因座多樣性鑑別出臺灣黑熊個體之個體鑑別率：期望個體鑑別率為 7.9×10^{-9} ($P_{(ID) HW}$)，以及手足個體鑑別率為 8×10^{-4} ($P_{(ID) sib}$) (表 7)。每個微衛星標記，其期望個體鑑別率介於 0.316(UT31)至 0.646(UT1)，由大至小排列分別為 UT31、UT35、UT38、UT29、UT3、UT25、UT4、UT1。

在此 8 個微衛星基因座中，個體鑑別率的計算，依每個微衛星基因座之對偶基因數由大到小排列，再依此順序將各基因座的個體鑑別率逐一乘積起來，如表 8 所示。將加入計算的基因座數目從 1 到 8 的個體鑑別率各別計算出來，發現期望個體鑑別率在前 2 個基因座組 (UT31 與 UT38) 合所算出的個體鑑別率值為 0.0015，即可達到低於 0.01；而親屬個體鑑別率則是在前 5 個基因座組合(UT31、UT38、UT3、UT29 與 UT4) 所算出的個體鑑別率值為 8.3×10^{-3} ，亦可達到低於 0.01。另外，再依每個微衛星基因座之期望異質度由大到小排列，同樣方式計算個體鑑別率，如表 9 所示，發現期望個體鑑別率同樣在前 2 個基因座組合所算出的個體鑑別率值 (0.0015) 即可達到低於 0.01；親屬個體鑑別率則也是在前 5 個基因座組合所算出的個體鑑別率值 (6.14×10^{-3}) 亦可達到低於 0.01。

(三) 排遺樣本的性別鑑定

在 2010 年 10 月至隔年的 2 月於大分地區我們偵測到的臺灣黑熊個體之性別鑑定結果發現，AMEL 性別鑑定方法於總共 35 個個體皆成功鑑定出來，鑑定出 24 個雄姓，以及 11 個雌性。另經 ZF/SRY 性別鑑定分析，則檢定出 24 個雄性，10 個雌性，以及 1 個鑑定失敗 (表 10)。其中兩鑑定方法檢測出的雄性個體皆一致；雌性個體中 AMEL 方法鑑定出來的 11 個個體中有 1 個在 ZF/SRY 系統中是鑑定失敗，其餘皆一致。故結合這兩套系統的分析結果，顯示鑑定出 24 個雄性、11 個雌性，雌雄性別比為 1：2.18。

伍、討論

一、臺灣黑熊個體鑑別之技術

(一) D-loop 序列擴增與控管排遺 DNA 品質

本研究所設計擴增臺灣黑熊 D-loop 序列的引子能在圈養黑熊的排遺與血液 DNA 專一地擴增出目標產物，經定序後的序列比對，確實是臺灣黑熊的序列。在個體鑑別單盲試驗中，15 個排遺 DNA 樣本皆有成功擴增出 D-loop 序列，做為 DNA 品質控管的依據。這 15 個樣本中有 10 個樣本之 8 組微衛星基因座皆成功被判讀出來，剩下 5 個雖沒有全部基因座被判讀出來，但至少要有 6 個以上的基因座是成功的。雖然這些有 1 至 2 個基因座沒被判讀出來，但是在個體鑑別單盲試驗中卻沒有把 2 相異個體的樣本錯判成同個體。因此，就此單盲試驗的結果來看，經過 D-loop 序列 PCR 成功的樣本在後續的微衛星基因座之基因型判讀，皆有很高的成功率，可以做為 DNA 品質控管的依據。

經過 D-loop 擴增成功的 83 個排遺 DNA 樣本，後續的 8 組微衛星遺傳標記皆成功增幅出來並基因型皆能判讀成功。有 100% 的成功率，可能是因為只針對於 2011 年間性別鑑定標記成功增幅的 DNA 樣本進行後續實驗，同等於 DNA 樣本被篩選過 2 次，所以保留下來樣本的具有較好的 DNA 品質。因此，我們建議臺灣黑熊個體鑑別流程中，可以先以 D-loop 序列擴增，做為一個檢測排遺 DNA 品質與確定排遺所屬物種，後以性別鑑定再篩選一次 DNA 樣本品質，這是一個相當好的技術調整，可有效避免擴增品質不良排遺 DNA 的步驟，同時達到減少實驗成本的成效。將擴增產物定序，再配合後續的個體鑑別的結果，可以取得野外個體的 D-loop 序列的基因單套行，可以作為分析臺灣黑熊親緣關係的輔助資料，增加臺灣黑熊的遺傳資料庫。而性別鑑定則可以做為個體鑑別的分標記之一。

(二) 微衛星基因座之個體鑑別單盲試驗

為了確定本研究微衛星基因座組合是否適用在臺灣黑熊排遺樣本上來進行個體鑑別、確定微衛星專一性及重複性，本研究進行一組單盲試驗。被錯判成相異個體的 BT4 與 BT15 樣本的 UT3 微衛星基因座的基因型皆為異型核子，具有相同基因型 253 對偶基因，相異的對偶基因分別是 249 與 245，剛好相差 1 個重覆單位，因此推測可能是 PCR 過程中，發生滑移造成 249 對偶基因少 1 個重覆單位 (deletion)。但是一我們有再針對此基因座這兩樣本進行重複實驗確認基因型，結果依然如此。因此推測另一個可能是排遺 DNA 本身品質差，常有降解的情形，造成 BT15 樣本只能擴增到 245 對偶基因。但是，由於在其它樣本中亦有 249 對偶基因，因此也有可能在實驗過程中有發生汙染的情形，造成 BT4 擴增出 249 對偶基因。另一個在 BT4 與 BT15 樣本的基因型有差異的微衛星基因座是 UT31，前者為同型合子，後者為異型合子，皆有 320 對偶基因，推測可能 BT4 樣本的 296 對偶基因沒有被增幅出來，此情況被稱為對偶基因丟失 (allelic dropout) (Taberlet *et al.*, 1996)。或者有可能是基因座擴增中隨機增幅出來的假訊號，此情況被稱為假對偶基因 (false alleles) (Taberlet *et al.*, 1996)，造成 BT15 樣本擴增出 296 假性對偶基因。此外，微衛星基因座若是非專一性的，亦可能造成個體鑑別錯誤的情形。

單盲試驗的 7 隻黑熊個體中，有 4 隻個體是確認為臺灣黑熊，另 3 隻個體為不確定為臺灣黑熊的亞洲黑熊。臺灣黑熊的樣本皆能個體鑑別出來，但是排遺樣本 BT4 與 BT15 來自同一個體 TE8 為不確定為臺灣黑熊的亞洲黑熊，這 2 個排遺樣本在微衛星基因座 UT3 與 UT31 之基因型相異而個體鑑別上錯判成相異的個體。假若 TE8 確定不為臺灣黑熊的亞洲黑熊，有可能是因為微衛星基因座 UT3 與 UT31 使用在非臺灣黑熊的亞洲黑熊上的專一性較差所造成，況且此微衛星基因座組本身就是專為臺灣黑熊所研發設計的。但是若 TE8 確定為臺灣黑熊，則有可能這 2 個微衛星基因座在臺灣黑熊上專一性較差，則可能需要捨棄 UT3 與 UT31 微衛星基因座，再另外參考其他的微衛星基因座。

單盲試驗結果顯示，UT3 與 UT31 可能不適用在非臺灣黑熊的亞洲

黑熊或臺灣黑熊上。但是於單盲試驗的臺灣黑熊個體只有 4 隻，可能不足有代表性，因此需要多增加已知的臺灣黑熊個體樣本進行測試。但是有礙於現今圈養的黑熊大多數為不確定為臺灣黑熊的亞洲黑熊，也在此建議未來進行野外臺灣黑熊捕捉繫放來增加已知個體的樣本數，進行單盲試驗對微衛星基因座的適用與否做確認。此外，同時也需要增加其他對臺灣黑熊具有專一性的微衛星標記進行測試與挑選，可以增加微衛星標記的選擇。

(三) 性別鑑定於瓊脂膠體電泳與毛細管電泳上判讀比較

這次研究中以進行 AMEL 性別鑑定，發現雄性臺灣黑熊在瓊脂膠體電泳上會呈現 3 個不同長度的 PCR 產物，在 Yamamoto *et al.* (2002 年) 也提到在亞洲黑熊上會有此情況。但利用螢光標記與毛細管電泳分析後，並無出現第 3 個非專一性的 PCR 產物，因此研判其被擴增出來的非專一性的 PCR 產物非由帶有螢光之正向端引子所擴增出來的，可能是由兩條 3' 端引子所夾出來的片段，或是 3' 端引子自黏的結果。若要確定此推論需要以基因選殖 (gene cloning) 方法，將非專一性的 PCR 產物轉殖到質體中，透過細菌複製後，抽出質體 DNA 進行定序方可確定該不明的第 3 條產物之序列為何。在 ZF/ SRY 性別鑑定方面，雌性個體於 SRY 標記 PCR 會不固定被增幅出疑似 SRY 產物，雖在瓊脂膠體電泳上訊號相較 ZF 產物訊號弱，但訊號還是夠明顯使得判讀上會誤判成雄性，因此本研究不採信於 2011 年間所進行的性別鑑定。然而透過螢光引子與毛細管電泳設備下，雌性個體於 SRY 產物位置亦不固定會偵測到訊號，但是相較於 ZF 產物訊號是偏低的，且發現皆不超過 ZF 產物訊號的 0.25 倍，因此可設定訊號標準值來判定雌性或偽雌性。本研究認為透過螢光標記與毛細管電泳設備下的訊號量化的方式，有助於對性別鑑定提高準確度與解析度。

有鑑於本研究以圈養樣本進行性別鑑定測試，於毛細管電泳呈現結果，這次 ZF/ SRY 性別鑑定用在 35 個野外個體樣本上，若於 SRY 產物位置有訊號，但不超過 ZF 產物訊號強度的 0.25 倍，則判為雌性。以此

判別標準的結果，除了 1 隻個體無法鑑別以外，其餘個體與 AMEL 的結果完全一致。然由於野外樣本屬性別未知狀況，因此還不能證明這二個性別鑑定方法，以及針對 ZF/ SRY 所設計的判別標準是完全正確的，而須以圈養已知性別的個體進行多次測試後，方可下定論。此外，在這次於野外樣本性別鑑定發現，少部分樣本擴增的產物量偏少，於瓊脂膠體電泳上難以用肉眼看出訊號，即使肉眼看得出來也無法肯定其性別，但是於毛細管電泳上則可偵測得到，且是清楚的訊號，可以辨識其性別。因此建議使用螢光標記與毛細管電泳設備可增加性別鑑定的靈敏度。

二、玉山國家公園大分地區臺灣黑熊個體之性別比例與遺傳多樣性分析

(一) D-loop 序列擴增與遺傳演化分析

將 32 個大分地區臺灣黑熊 D-loop 序列以貝葉斯親緣分析法建構親緣關係樹，並同時加入一個雪霸國家公園的個體以及其他亞洲黑熊的亞種（東北亞種、指名亞種、四川亞種）一起分析。大分地區與雪山地區可明顯分成兩群，但本研究所分析雪霸地區臺灣黑熊的樣本太少，需增加樣本與其它樣區樣本，才能確定大分地區與雪山地區臺灣黑熊是否具有不同單套型。在臺灣黑熊與其他亞洲黑熊的演化關係方面，本研究與 Tasi 等人以 12 個粒線體蛋白質編碼區基因製做貝葉斯親緣發生樹的結果一致，臺灣亞種與指名亞種演化關係較近，與四川亞種關係較遠（Tasi *et al.*, 2009）。過去 Hwang 等人同樣是以貝葉斯親緣分析法分析亞洲黑熊的粒線體序列全長以及部分 D-loop 序列（251 bp）的結果，也與本研究的結果相當一致，臺灣亞種與東北亞種演化關係較近，同樣是與四川亞種關係較遠。因此，本研究的亞洲黑熊演化分析有相當的可信度。

(二) 個體鑑別及 8 組微衛星基因座多樣性分析

本研究以 8 組微衛星基因座分析 2010 年 10 月至隔年 2 月（青剛櫟結果季）共 83 個排遺成功擴增 DNA 樣本，經由 Genecap 軟體共鑑別出 35 隻個體，平均 2.37 個排遺 DNA 樣本鑑別出 1 個個體。從玉山國家公

園大分地區取得的 251 個排遺樣本，因為樣線分布廣，又臺灣黑熊於青剛櫟結果季會在大分地區隨處移動 (Hwang *et al.*, 2010)，因此這 251 個排遺樣本具有代表性，但是在經過排遺新鮮程度篩選以及 D-loop 序列擴增成功與否，最後只有 83 個樣本分析到最後能檢定出基因型，約有 3 分之 2 的樣本沒分析到最後，因此鑑別出的 35 隻個體有可能是低估的情形，但還無法下定論。

多型性資訊含量 (polymorphism information content, PIC) 表示分子標誌提供的資訊多寡，在本研究 8 組微衛星遺傳標記分析大分地區的臺灣黑熊，平均多型性資訊含量高於 0.5。有鑑於個體鑑別的單盲試驗結果，在不考慮使用 UT3 與 UT31 微衛星基因座下，此組分子標記平均多型性資訊含量依然高於 0.5，顯示具有高度資訊含量，適合對大分地區臺灣黑熊進行遺傳多樣性分析。雖然 UT1 微衛星標記的多型性資訊含量低於 0.5，介於 0.25~0.5 一般資訊含量之間，該分子標記依然有其重要性。因為 UT1 微衛星標記於 2010 年大分地區青剛櫟結果季的臺灣黑熊只發現 2 種對偶基因，可能因此造成本身多型性資訊含量比其他 7 組基因座還低。

在分析 2010 年 10 月至隔年 2 月大分地區臺灣黑熊的遺傳多樣性方面，期望異質度 (H_E) 的部分，除了 UT1 (0.426) 及 UT4 (0.644) 基因座之理論異質度小於 0.7 之外，其餘微衛星基因座的理論異質度皆大於 0.7，平均為 0.73。另外，大分地區臺灣黑熊所檢測到觀測異質度 (H_O)，除 UT31 與 UT35 外，均高於理論異質度 (H_E)。各微衛星的基因座之哈溫平衡檢測結果皆顯示為無顯著偏離哈溫平衡。綜合以上結果顯示，玉山國家公園大分地區在青剛櫟季所聚集的臺灣黑熊可能仍保有相當的遺傳歧異度，顯示該區在青剛櫟季所聚集的臺灣黑熊目前可能尚維持著合理範圍內的遺傳多樣性。由於本研究所探究的樣區是一個臺灣黑熊因食物季節性豐度變動的熱點 (Hwang *et al.*, 2002; Kirkpatrick and Pekins, 2002)，加上該季為青剛櫟結果豐年，黑熊個體聚集程度高，所以現階段遺傳多樣性分析結果可以適當代表整個玉山國家公園或者是大分地區的臺灣黑熊族群遺傳多樣性。

我們以最保守的手足個體鑑別率來看，只要選出其中5個微衛星基因座，即可達到低於0.01可做為族群量估算的建議標準 (Taberlet and Luikart, 1999; Mills et al., 2000)，其中5個基因座的組合中，以UT31、UT35、UT38、UT29、UT3的組合擁有最低的個體鑑別率。可是有鑑於個體鑑別的單盲試驗結果，在不考慮使用UT3與UT31微衛星基因座下，未來若要分析野外臺灣黑熊的族群量，則可以利用UT35、UT38、UT29、UT25以及UT4這5個微衛星基因座之組合來進行估算，其手足個體鑑別率為0.001，亦可達到低於0.01，即可在減少實驗成本與時間的情況下，可有效進行族群量估算，但這部分仍需先進行圈養個體的評估研究。

(三) 青剛櫟結果季之臺灣黑熊性別比例

本研究於玉山國家公園大分地區所偵測到的 35 隻臺灣黑熊個體，結合 AMEL 與 ZF/ SRY 性別鑑定結果，鑑定出 24 隻雄性與 11 隻雌性個體，雌雄性別比是 1：2.18。在過去 1998 至 2000 年間的捕捉資料顯示，共捕捉到 13 隻雄性與 2 隻雌性臺灣黑熊個體，雌雄性別比是 1：6.5 (Hwang et al., 2010)，與我們的研究結果皆是雄性大於雌性。由於本研究樣區的青剛櫟林於結果季會大量結青剛櫟實，大分地區頓時形成食物資源豐富且密集的地區，使得臺灣黑熊雄性個體會佔據較優的區域停留食用，並且會驅趕雌性或較為弱勢的個體 (Hwang et al., 2010)，雄性個體停留時間較長，因此無論是用陷阱捕捉或是透過排遺檢取，所偵測到的雄性個體數量會比雌性個體來的多。此外，本研究的所偵測到的雄性個體數是雌性的 2.18 倍，遠低於過去的捕捉資料的 6.5 倍，可能的原因是透過陷阱捕捉會有性別選擇差異，而排遺檢取卻較沒有此情形。又雄性個體停留時間比雌性個體長，因此雄性個體有較高的中陷阱機率，而雌性個體停留時間短，但是在經過時依然會遺留排遺，因此反而容易被偵測到。

陸、結論

玉山國家公園大分地區於青剛櫟結果季（2010 年 10 月至 2011 年 2 月）共個體鑑別出 35 隻臺灣黑熊個體，其期望個體鑑別率與手足個體鑑別率皆低於 0.01，代表此微衛星標記組適合做族群量估算。從中取得 32 條部分 D-loop 序列（685 bp），臺灣黑熊與其他地區的亞洲黑熊（四川亞種、東北亞種、指名亞種）在 D-loop 序列的演化分析，臺灣黑熊能明顯獨立分出一個系群，其演化關係與過去研究結果相比，都相當一致。在這 35 隻個體，我們鑑別出 24 隻雄性、11 隻雌性，Amel 與 ZF/SRY 性別鑑定的結果相當一致。遺傳多樣性分析顯示，多型性資訊含量大於 0.5，代表此微衛星基因座組適合做遺傳多樣性分析。此外，玉山國家公園臺灣黑熊尚具有高度的遺傳異質度。

針對本研究的設計的臺灣黑熊個體鑑別流程做了以下建議：

一、臺灣黑熊個體鑑別流程上，建議先以 D-loop 序列增幅及定序，取得 D-loop 序列資料，接著以性別鑑定取得性別資料，同時也可以做為個體鑑別分子標記之一。經過這 2 次排遺 DNA 的篩選，加強控管排遺 DNA 的品質。

二、建議利用螢光標記與毛細管電泳設備進行臺灣黑熊排遺 DNA 樣本的性別鑑定，相較於瓊脂膠體電泳，能更有準確度、解析度以及靈敏度。

三、由於單盲試驗結果顯示，有個體鑑別錯誤發生在亞洲黑熊做為個體鑑別的微衛星基因座，需要多增加已知臺灣黑熊個體的樣本進行單盲試驗，來確認其正確性。此外，同時也需要增加其他對臺灣黑熊具有專一性的微衛星標記進行測試與挑選，可以增加微衛星標記的選擇。

參考文獻

- 何冠助 (2012) 玉山國家公園大分地區臺灣黑熊遺傳多樣性之初探。國立屏東科技大學碩士論文。85 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。
- 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家公園管理處。133 頁。
- 蔡幸蒨 (2011) 臺灣黑熊(*Ursus thibetanus formosanus*)族群相對豐富度及分布預測模式。國立屏東科技大學碩士論文。115 頁。
- 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 12: 25-34。
- Beckmann, J. P., and J. Berger (2003) Using black bears to test ideal-free distribution models experimentally. *Journal of Mammalogy* 84: 594-606.
- Botstein, D., R. L. White, M. Skolnick, and R. W. Davis (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32: 314-331.
- Boulanger, J., and B. McLellan (2001) Closure violation in DNA-based mark-recapture estimation of grizzly bear populations. *Canadian Journal of Zoology* 79: 642-651.
- Brown, W. M., M. George, Jr., and A. C. Wilson (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of*

Sciences of the United States of America 76: 1967-1971.

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(4): 258-265.

Dawid, I. B., and A. W. Blackler (1972) Maternal and cytoplasmic inheritance of mitochondrial DNA in *Xenopus*. *Developmental Biology* 29: 152-161.

Drummond, A. J., M. A. Suchard, D. Xie, and A. Rambaut (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* 29: 1969-1973.

Garshelis, D.L., and Steinmetz, R. (IUCN SSC Bear Specialist Group) (2008) *Ursus thibetanus*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 11 November 2013.

Garshelis, D.L., M. R. Pelton, C. R. Mclaughlin, and K. V. Noyce (2009) Family Ursidae (Bears). p.448-497. In: Wilson, D. E., and A. Mittermeier (eds.) *Handbook of the Mammals of the World*. Lynx Edicions in association with Conservation International and IUCN, Spain.

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, 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.

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., 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.

IUCN (2013) IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 11 November 2013.

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.

Kendall, W. L., J. D. Nichols, and J. E. Hines (1997) Estimating temporary emigration using capture–recapture data with pollock’s robust design. *Ecology* 78: 563-578.

Kendall, W. L. and J. D. Nichols (2002) Estimating state-transition probabilities for unobservable states using capture-recapture/resighting data. *Ecology* 83: 3276-3284.

Kendall, K. C. and K. S. McKelvey (2008) Hair collection. Pages 141-182 in R. A. Long, P. MacKay, W. j. Zleilinski, and J. C. Ray eds. *Noninvasive*

survey methods for carnivores. Volume 1: Island Press, Washington, DC, USA.

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, USA.

Kohn, M. H., and R. K. Wayne (1997) Facts from feces revisited. *Trends in Ecology & Evolution* 12: 223-227.

Kohn, M. H., E. C. York, D. A. Kamradt, G. Haught, R. M. Sauvajot, R. K. Wayne (1999) Estimating population size by genotyping faeces. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 266: 657-663.

Li, Y. C., A. B. Korol, T. Fahima, A. Beiles and E. Nevo (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology* 11: 2453-2465.

Lukacs, P. M. and K. P. Burnham (2005) Review of capture–recapture methods applicable to noninvasive genetic sampling. *Molecular Ecology* 14: 3909-3919.

Mills, L. S., J. J. Citta, K. P. Lair, M. K. Schwartz, and D. A. Tallmon (2000) Estimating animal abundance using noninvasive dna sampling: promise and pitfalls. *Ecological Applications* 10: 283-294.

Mowat, G. and C. Strobeck (2000) Estimating population size of grizzly bears using hair capture, DNA profiling, and mark-recapture analysis. *The Journal of wildlife Management* 64: 183-193.

- Murphy, M. A., L. P. Waits, and K.C. Kendallrine (2003) The influence of diet on faecal DNA amplification and sex identification in brown bears (*Ursus arctos*). *Molecular Ecology* 12: 2261-2265.
- 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.
- Paetkau, D. (2003) An empirical exploration of data quality in DNA-based population inventories. *Molecular Ecology* 12:1375-1387.
- 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. *Review of Paleobotany and Palynology* 62: 339-362.
- 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.
- Poole, K. G., G. Mowat, and D. A. Fear (2001) DNA-based population estimate for grizzly bears *Ursus arctos* in northeastern British Columbia, Canada. *Wildlife Biology* 7: 105-115.
- Raymond, M. and F. Rousset (1995) GENEPOP (Version 1.2): population

genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248-249.

Servheen, C., S. Herrero, B. Peyton, K. Pelletier, K. Moll, and J. Moll (1999) Bears: status survey and conservation action plan. Volume 44. IUCN/SSC Bear and Polar Bear Specialist Groups. IUCN/SSC Gland, Switzerland and Cambridge, UK.

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.. International Symposium on Conservation of the Asiatic Black Bear, Taipei, Taiwan. p52-53 (Oral 4-2).

Shih C. C., C. C. Huang, 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* 10: 1845-1847.

Solberg, K. H., E. Bellemain, O. M. Drageset, P. Taberlet, and J. E. Swenson (2006) An evaluation of field and non-invasive genetic methods to estimate brown bear (*Ursus arctos*) population size. *Biological Conservation* 128: 158-168.

Sollmann, R., B. Gardner, J. L. Belant (2012) How does spatial study design influence density estimates from spatial capture-recapture models? *PLoS ONE* 7: e34575.

Swinhoe, R. (1864) Descriptions of four new species of Formosan birds; with further notes on the ornithology of the island. *Ibis* 6: 361-370.

Taberlet, P., H. Mattock, C. Dubois-Paganon, and J. Bouvet (1993) Sexing

free-ranging brown bears *Ursus arctos* using hairs found in the field.
Molecular Ecology 2: 399-403.

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.

Taberlet, P., J. J. Camarra, S. Griffin, E. Uhrès, O. Hanotte, L. P. Waits, C. Dubois-Paganon, T. Burke, and J. Bouvet (1997) Noninvasive genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear population. *Molecular Ecology* 6: 869-876.

Taberlet, P. and G. Luikart (1999) Non-invasive genetic sampling and individual identification. *Biological Journal of the Linnean Society* 68: 41-55.

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.

Waber, J. L., and C. Wong (1993) Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics* 2: 1123-1128.

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.

Waits, L. P., and D. Paetkau (2005) Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: a review of applications and recommendations for accurate data collection. *Journal of Wildlife Management* 69(4):

1419-1433

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.

Woodruff, D. S. (1993) Non-invasive genotyping of primates. *Primates* 34(3): 333-346.

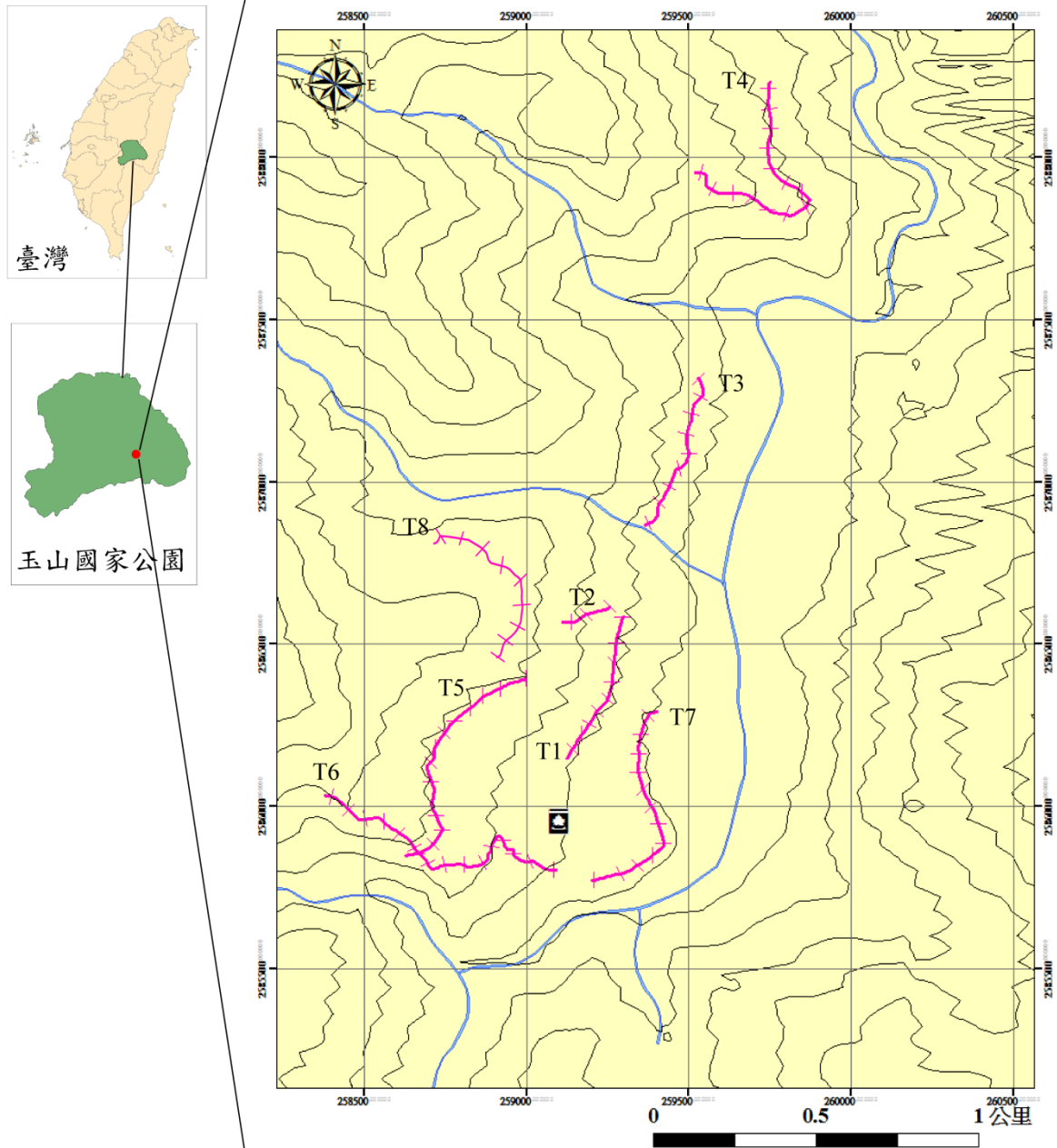
Woods, J. G., D. Paetkau, D. Lewis, B. N. McLellan, M. Proctor, and C. Strobeck (1999) Genetic tagging of free-ranging black and brown bears. *Wildlife Society Bulletin* 27: 616-627.

Wright, S. (1978) *Evolution and the Genetics of populations. Vol. 4. Variability Within and Among Nature Populations.* University of Chicago Press, Chicago, USA..

Xu, Y. C., Z. C. Pan, Z. R. Xu, S. H. Yang, Y. Jin, and S. Y. Bai (2001) Status of microsatellite as genetic markers in cervids. *Journal of Forestry Research* 12: 55-58.

Yeh, F. C., and R. Yang, University of Alberta, and T. Boyle, Centre for International Forestry Research (1999)
<http://www.ualberta.ca/~fyeh/>

Yamamoto, K., T. Tsubota, T. Komatsu, A. Katayama, T. Murase, I. Kita, and T. Kudo (2002) Sex identification of Japanese black bear, *Ursus thibetanus japonicus*, by PCR based on amelogenin gene. The Journal of Veterinary Medical Science 64(6): 505-508.



圖例說明

- 大分山屋
- 採樣樣線(T1~T8)
- 等高線
- 溪流

圖1、玉山國家公園大分研究樣區及其調查採樣樣線分布。調查樣線 (T1~T8) 總長度約5.2公里。

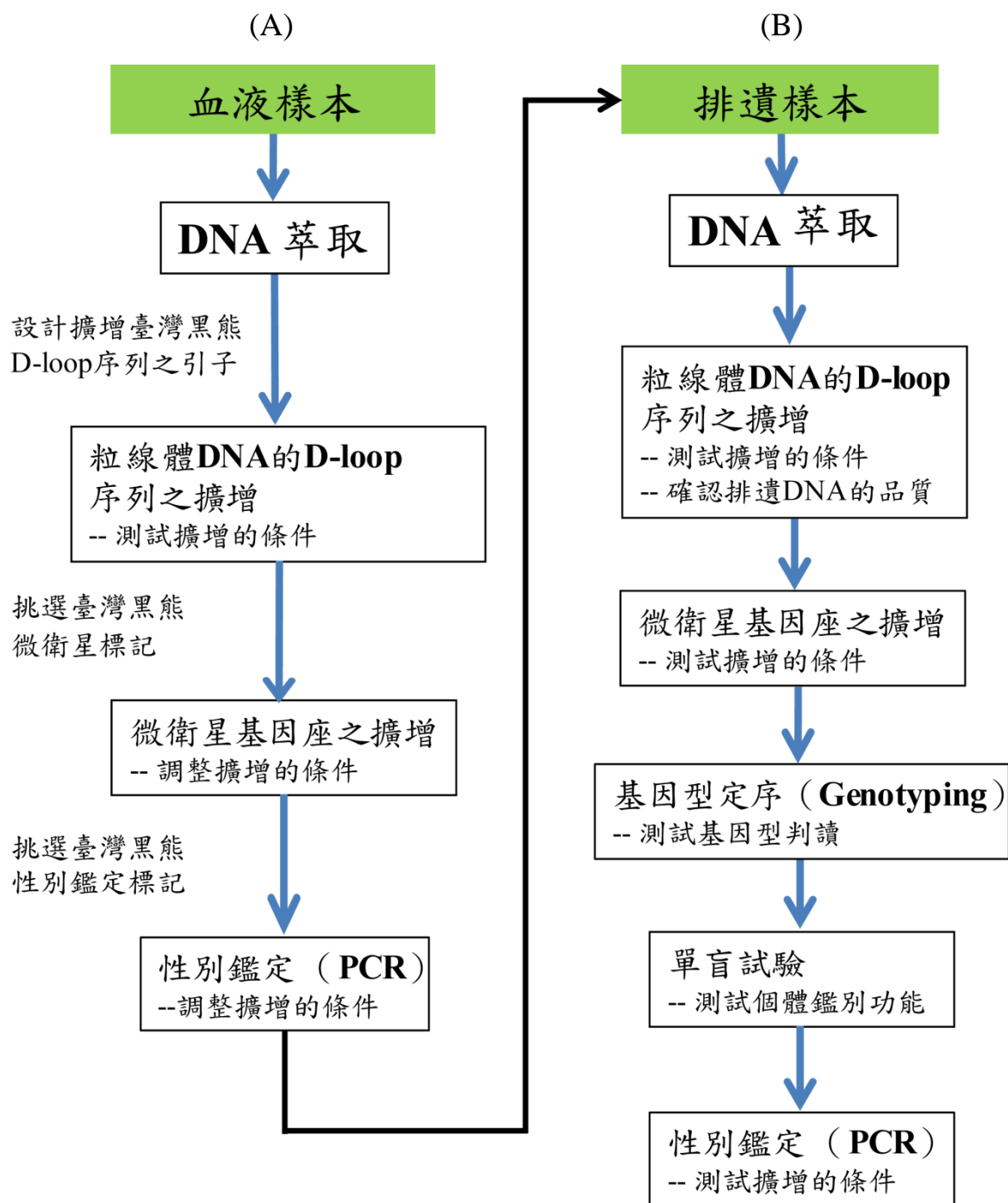


圖2、鑑別臺灣黑熊個體之分子生物技術的建立與流程。箭頭代表每個技術建立成功後進到下一個階段。左側 (A) 以圈養黑熊之血液DNA作為模板，進行實驗條件測試；右側 (B) 以圈養黑熊之排遺DNA作為模板，進行實驗條件測試。

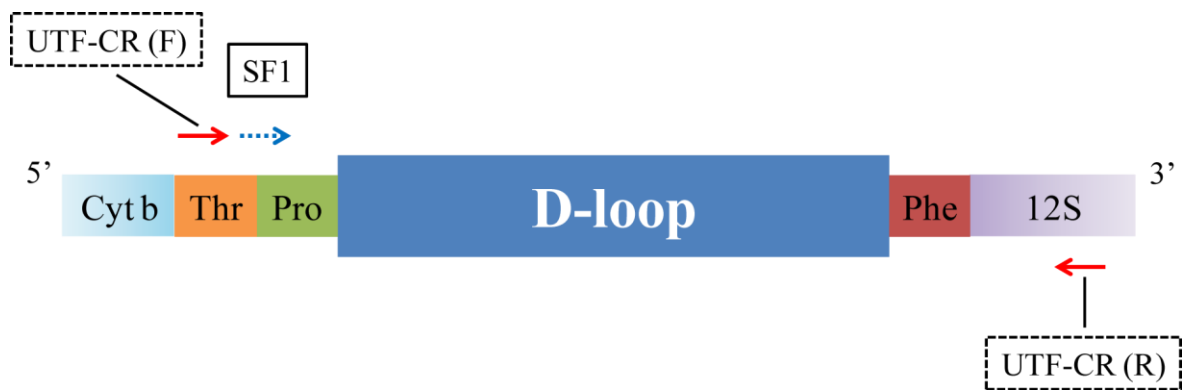


圖3、臺灣黑熊粒線體D-loop序列擴增與引子位置。實線箭頭代表引子位置以及複製方向，5'端引子（Forward primer）：UTF-CR (F)，3'端引子（Reverse primer）：UTF-CR (R)。虛線箭頭代表DNA定序用引子位置以及定序方向：SF1（5'端）。Thr代表羥丁胺酸轉運RNA（Threonine）；Pro代表脯胺酸轉運RNA（Proline）；Phe代表：苯基丙胺酸轉運RNA(Phenylalanine)；Cyt b代表色素細胞b基因（cytochrome b）；12S代表：12S核糖體RNA（12S ribosomal RNA）基因。

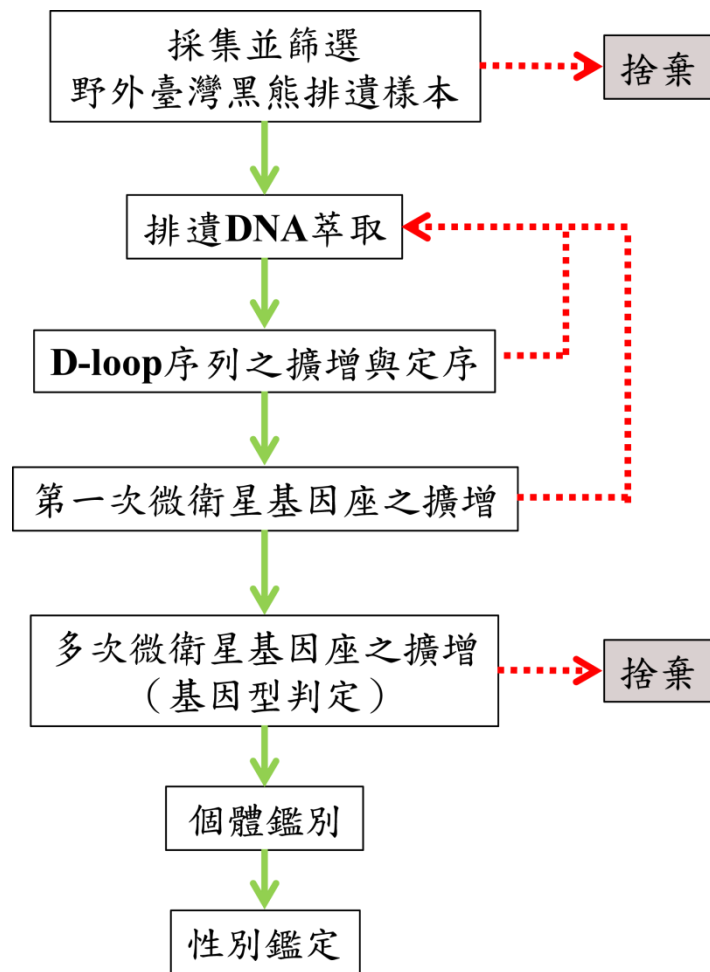


圖4、野外臺灣黑熊個體鑑別之流程。實線箭頭代表每個階段實驗成功後，進到下一個階段的實驗流程。虛線箭頭代表實驗失敗後所採取的對策流程。

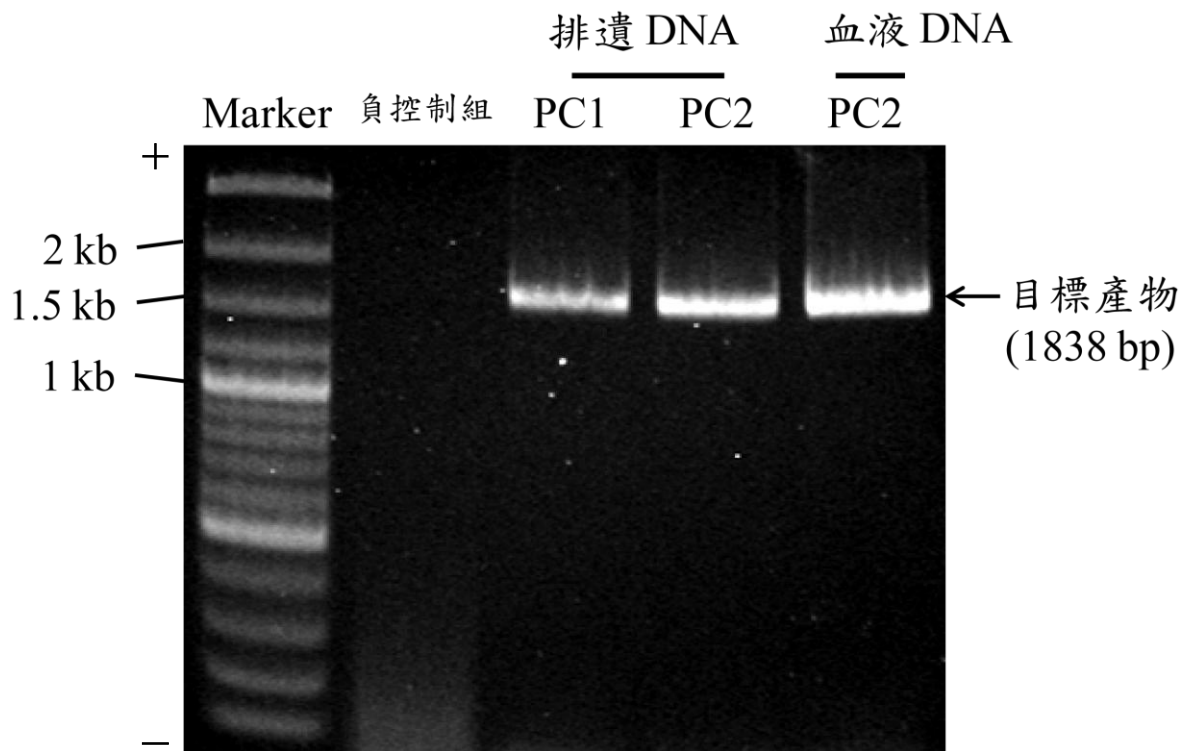
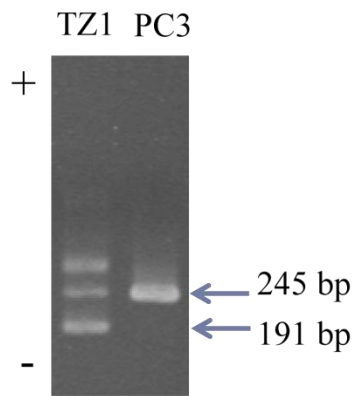


圖 5、圈養臺灣黑熊排遺及血液 DNA 進行 D-loop 序列擴增。Marker：Fermentas 100 bp DNA Ladder Plus；PC1：圈養臺灣黑熊－黑皮；PC2：圈養臺灣黑熊－黑妞。樣本來源皆來自國立屏東科技大學保育類野生動物收容中心。

(A)
AMEL



(B)
ZF/ SRY

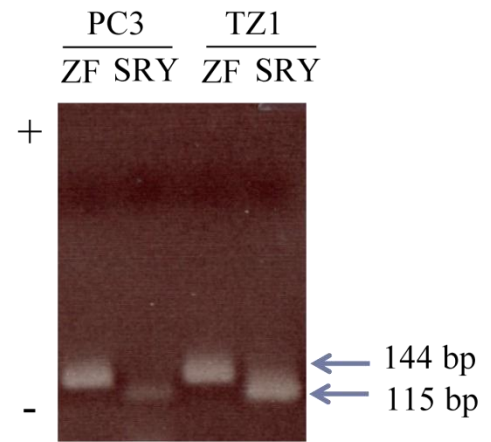
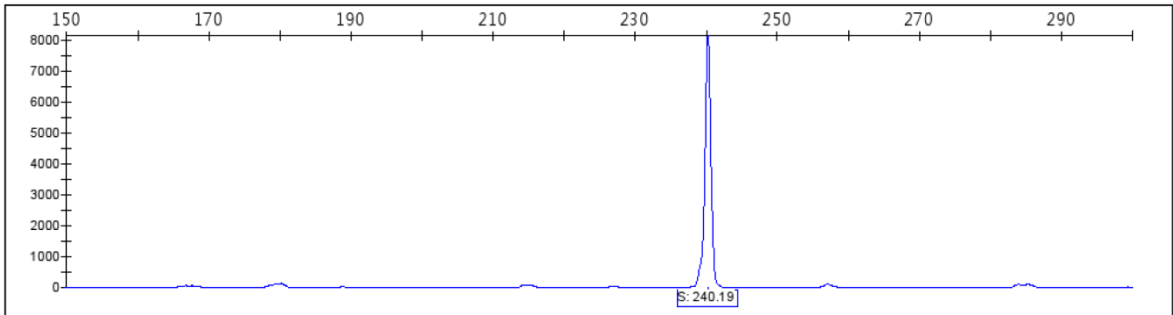


圖6、圈養臺灣黑熊血液DNA性別鑑定之瓊脂膠體電泳。TZ1為雄性臺灣黑熊，而PC3為雌性臺灣黑熊。

(A)



(B)

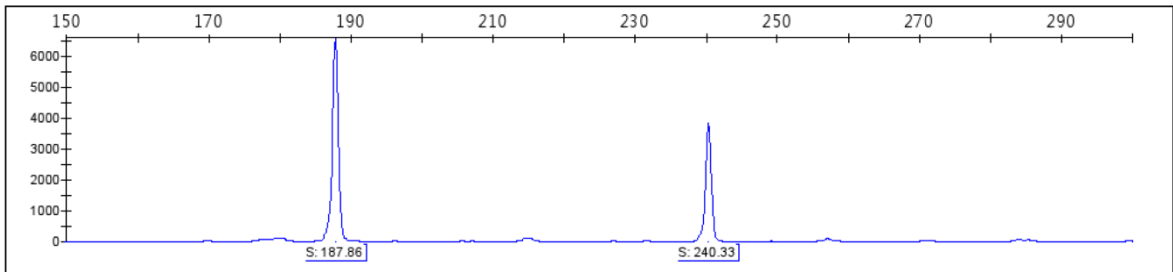
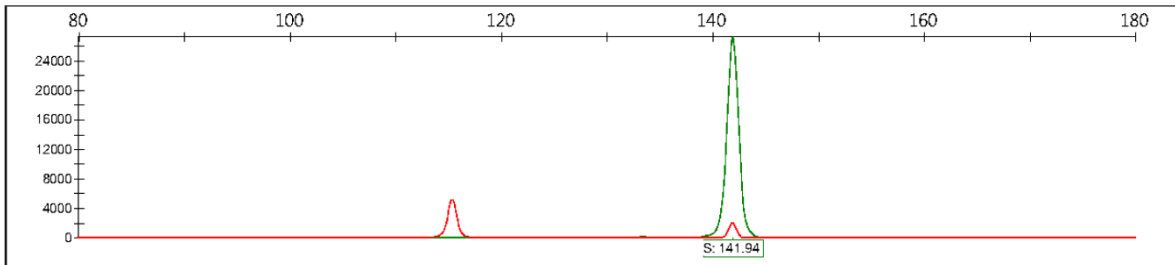


圖7、螢光標定之臺灣黑熊AMEL引子進行性別鑑定之毛細管電泳。橫座標代表對偶基因的基因型（鹼基對長度）；縱座標代表相對訊號強度（relative fluorescence units, RFU）。A：雌性圈養臺灣黑熊—PC3。B：雄性圈養臺灣黑熊—TZ1。於187 bp長度的藍色波峰是Y染色體中的AMEL基因被擴增的訊號；240 bp長度的藍色波峰是X染色體中的AMEL基因被擴增的訊號。

(A)



(B)

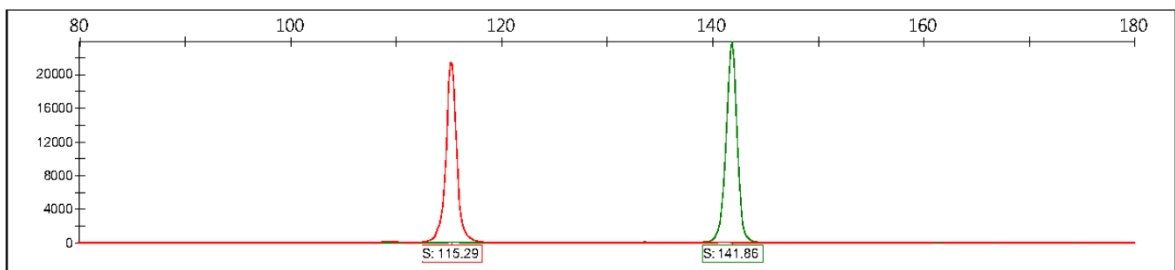


圖 8、螢光標定之臺灣黑熊 ZF/SRY 引子進行性別鑑定之毛細管電泳。橫座標代表對偶基因的基因型 (鹼基對長度)；縱座標代表相對訊號強度 (relative fluorescence units, RFU)。A：雌性圈養臺灣黑熊—PC3。B：雄性圈養臺灣黑熊—TZ1。紅色波峰是 SRY 基因被擴增出來的訊號；綠色波峰是 ZF 基因被擴增出來的訊號。

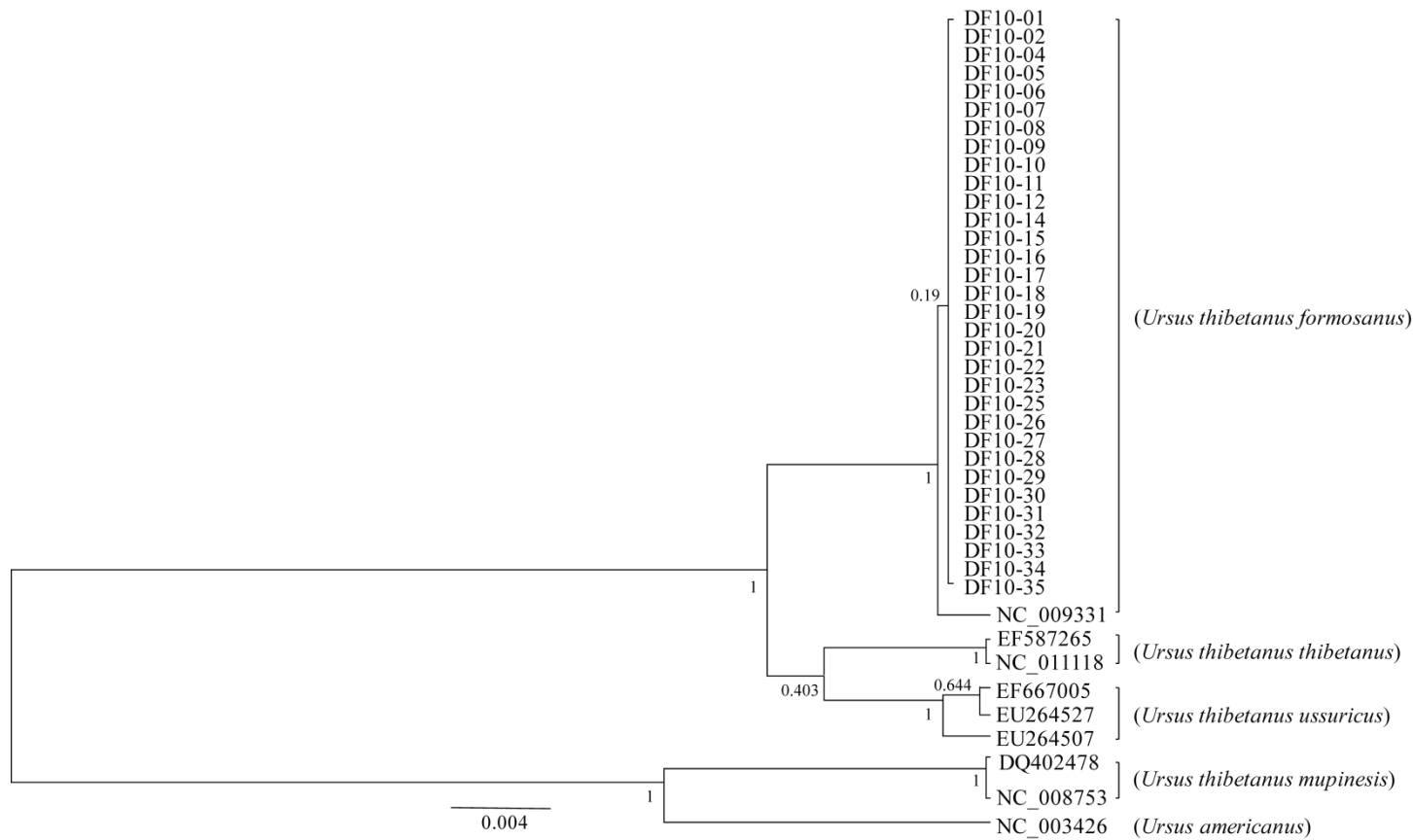


圖9、貝葉斯親緣分析法建構臺灣黑熊與亞洲黑熊親緣關係樹。其中包括32隻大分地區臺灣黑熊個體 (DF10-01 ~02、DF10-04~12、DF10-14~23、DF10-25~35)，1隻雪霸國家公園的臺灣黑熊個體 (NC_009331)，以及其他亞種 (四川亞種：NC_008753、DQ402478；東北亞種：EF667005、EU264527、EU264507；指名亞種：EF58726、NC_011118) 之D-ooop序列前半部1到685個鹼基對，並以美洲黑熊(NC_003426)做為外群(out group)。後驗機率表示在各分支之前，而左下的比例尺代表遺傳距離。

表1、本研究所採用圈養黑熊遺傳樣本之相關資訊。

個體代號	呼名	性別	物種 ^a	樣本型態	來源單位 ^b
PC1	黑皮	♂	臺灣黑熊	排遺、血液	PTRC
PC2	黑妞	♀	臺灣黑熊	排遺、血液	PTRC
PC3	黑糖糕	♀	臺灣黑熊	組織	PTRC
SZ3	貝兒	♀	臺灣黑熊	排遺	SSZ
TE1	卡特	♂	亞洲黑熊	排遺	ESRI
TE2	阿里	♂	臺灣黑熊	排遺	ESRI
TE5	Bingo	♀	亞洲黑熊	排遺	ESRI
TE8	八佰	♂	亞洲黑熊	排遺	ESRI
TZ1	小三	♂	臺灣黑熊	排遺、血液	TZ

^a 亞洲黑熊在此代表尚無法確認是臺灣亞種的黑熊。^b PTRC：國立屏東科技大學保育類野生動物收容中心；SSZ：高雄市壽山動物園；ESRI：特有生物研究保育中心；TZ：臺北市立動物園。

表2、本研究所使用臺灣黑熊微衛星基因座之螢光引子序列及相關資訊。

微衛星基因座	引子序列 (5'-3')	短片段重覆單位	黏合溫度 (°C)	產物大小 (bp)
UT1	F ^a : PET ^b - AGCAACTCTTCTCAGATGTTACAAA R: CCCAGGTCAGCACTTGGCATA C	(GAAA) ₉ GGGA(GAAA) ₁₀	60	160~176
UT3	F: VIC - AAGACATACAGAAGCCAAGACTAG R: TACTCAATTACAAAGGATAACTATA	(GAAA) ₁₈	62	240~266
UT4	F: PET - GAGTTATTGGCACTAAAATCTAATG R: CTGCAAATCCCTGCTCAACTTTC	(GAAA) ₆ GAGA(GAAA) ₁₁	60	139~164
UT25	F: 6-FAM - GCTCAGGGCGTGATCCCAGAG R: GGCTCCCCTGCACTAGAGATTTAAC	(GAAA) ₂ (GA) ₁₂ (GAAA) ₁₆	56	296~315
UT29	F: VIC - GACATTGCCTTTTACAGAGCAG R: GGGCAGATCTCAACCACCATAAGC	(GAAA) ₂ AA(GAAA) ₁₇	60	188~220
UT31	F: PET - AATAAACTGATGCAGCCATACTAG R: CTGCCACTGAATCTTCTGATCTTAG	(GAAA) ₁₇ GG(GAAA) ₃	62	299~353
UT35	F: 6-FAM - ACTCCCTAGTAAGTAGAAAGCACAC R: CCCACAGGATGGGCTCAAGAA	(GAAA) ₁₅	60	202~231
UT38	F: VIC - ATTATTGATGAGCAGGGACAG R: CTAAAGCAACAACATGTGAATG	(GAAA) ₂₄	60	178~214

^a F (Forward) 代表5'端的引子；R (Reverse) 代表3'端引子。^b PET、VIC、6-FAM代表接黏在5'端引子的螢光標記，分別接受558、538、494 nm (奈米) 波長的激發光後會分別發出595、554、518 nm波長的散射光 (分別是紅、綠、藍色)。

表3、臺灣黑熊的性別鑑定之螢光引子序列及相關資訊。

性別鑑定標記	引子序列 (5'-3')	黏合溫度 (°C)	產物大小 (bp)
AMEL			
SE47	F ^a : 6-FAM ^b - CAGCCAAACCTCCCTCTGC	62	245, 191
SE48	R: CCCGCTTGGTCTTGTCTGTTGC		
ZF / SRY			
MP-ZF-F	F: VIC- GACAGCTGAACAAGGGTTG	65	144
MP-ZF-R	R: GCTTCTCRCCGGTATGGATG		
MP-SRY-Ursus	F: PET- TGGTCTCGTGATCAAAGGCGC	65	115
MP-SRY-1R-Ursus	R: GCCATTTTTTCGGCTTCCGTAAG		

^a F (Forward) 代表5'端的引子；R (Reverse) 代表3'端引子。^b 6-FAM、VIC、PET代表接黏在5'端引子的螢光標記，分別接受558、538、494 nm波長的激發光後會分別發出595、554、518 nm波長的散射光（分別是紅、綠、藍色）。

表4、以8組微衛星標記進行7隻圈養黑熊個體之15份排遺樣本個體鑑別的單盲試驗結果。3位數字代表各樣本之微衛星基因座之基因型的PCR擴增片段長度 (bp)，「-」表示缺值。

個體代號	樣本代號	UT1	UT3	UT4	UT25	UT29	UT31	UT35	UT38	個體鑑別結果
PC1	BT2	170, 170	241, 257	139, 153	298, 298	189, 205	- -	204, 220	183, 207	A
	BT6	170, 170	241, 257	139, 153	298, 298	189, 205	340, 340	204, 220	183, 207	A
	BT10	170, 170	241, 257	139, 153	298, 298	189, 205	340, 340	204, 220	183, 207	A
PC2	BT9	170, 174	237, 241	- -	- -	189, 205	340, 340	204, 204	183, 207	B
	BT11	170, 174	237, 241	139, 139	- -	189, 205	340, 340	204, 204	183, 207	B
TE5	BT13	170, 214	257, 261	137, 139	290, 322	177, 197	376, 376	188, 196	183, 183	C
	BT5	170, 214	257, 261	137, 139	290, 322	177, 197	376, 376	188, 196	183, 183	C
TZ1	BT3	170, 174	249, 249	149, 153	302, 302	189, 189	340, 344	220, 220	207, 211	D
	BT14	170, 174	249, 249	149, 153	302, 302	189, 189	340, 344	220, 220	207, 211	D
TE1	BT8	214, 226	261, 261	139, 141	290, 292	177, 201	274, 274	196, 216	191, 191	E
	BT12	214, 226	261, 261	139, 141	290, 292	177, 201	274, 274	196, 216	191, 191	E
TE2	BT1	170, 170	249, 253	145, 153	298, 302	189, 201	320, 348	228, 228	191, 195	F
	BT7	170, 170	249, 253	145, 153	298, 302	189, 201	- -	228, 228	191, 195	F
TE8	BT4	170, 214	249, 253	137, 153	290, 298	197, 201	320, 320	204, 228	183, 195	G
	BT15	170, 214	245, 253	137, 153	- -	197, 201	296, 320	- -	183, 195	H

* A~H表示檢測出之不同的個體。

表5、以8組微衛星標記進行已知系譜圈養臺灣黑熊的親子鑑定結果。

親屬關係	個體代號	微 衛 星 基 因 座							
		UT1	UT3	UT4	UT25	UT29	UT31	UT35	UT38
親代(父)	PC1	170, 170	241, 257	139, 153	298, 298	189, 205	336, 336	204, 204	183, 207
親代(母)	PC2	170, 174	241, 241	139, 139	-, -	189, 205	336, 336	204, 220	183, 207
子代	PC3	170, 170	241, 257	139, 139	298, 298	189, 205	336, 336	204, 204	183, 207

* 表中3位數字代表各樣本微衛星基因座之基因型的PCR擴增片段長度 (bp)。

表6、2010年玉山國家公園大分地區青剛櫟結果季（10月至次年2月）臺灣黑熊排遺之蒐集與D-loop分析資訊與結果。

年度 月份	2010			2011		總和
	十月	十一月	十二月	一月	二月	
樣本數	10	11	116	93	21	251
DNA 萃取數	7	10	93	60	6	176
性別鑑定標記成功增幅*	2	8	61	23	1	95
D-loop 序列增幅成功數	2	8	49	23	1	83
D-loop 序列增幅成功率 (%)	100	100	80	100	100	87

* 於2011年進行的性別鑑定。

表 7、2010 年玉山國家公園大分地區青剛櫟結果季（10 月至次年 2 月）臺灣黑熊之微衛星基因座之遺傳資訊。

基因座	樣本數	對偶 基因數	有效對偶 基因數	觀測異質度	期望異質度	多型性 資訊含量	期望 個體鑑別率	手足 個體鑑別率	近親 交配係數	哈溫平衡
UT1	35	2	1.7	0.486	0.426	0.332	0.425	0.646	-0.142	NS ^a
UT3	35	8	3.7	0.8	0.738	0.69	0.111	0.414	-0.086	NS
UT4	35	7	2.7	0.743	0.644	0.58	0.188	0.479	-0.156	NS
UT25	35	6	3.2	0.743	0.7	0.643	0.143	0.441	-0.063	NS
UT29	35	7	4.9	0.886	0.808	0.767	0.071	0.369	-0.097	NS
UT31	35	12	8.4	0.829	0.894	0.87	0.025	0.316	0.074	NS
UT35	35	6	5.6	0.743	0.832	0.794	0.058	0.354	0.108	NS
UT38	35	8	5.4	0.857	0.826	0.791	0.058	0.358	-0.039	NS
平均	35	7 ±2.6	4.5 ±2	0.76 ±0.12	0.73 ±0.14	0.68 ±0.16	-	-	-0.05	-
整體	-	-	-	-	-	-	7.9×10 ⁻⁹	0.0008	-	-

* 多型性訊息含量...

^a NS 代表無顯著偏離哈溫平衡。

表 8、玉山國家公園大分地區臺灣黑熊之不同的微衛星基因座數目之個體鑑別率（以各基因座的對偶基因數目大小排序）。

微衛星基因座 ^a	UT31	UT38	UT3	UT29	UT4	UT35	UT25	UT1
對偶基因數	12	8	8	7	7	6	6	2
期望個體鑑別率	0.026	0.058	0.111	0.071	0.188	0.058	0.143	0.425
手足個體鑑別率	0.317	0.358	0.414	0.369	0.479	0.354	0.441	0.646
整體期望個體鑑別率 ^b		1.51×10^{-3}	1.67×10^{-4}	1.19×10^{-5}	2.23×10^{-6}	1.3×10^{-7}	1.85×10^{-8}	7.88×10^{-9}
整體手足個體鑑別率 ^b		0.113	0.047	0.017	8.3×10^{-3}	2.94×10^{-3}	1.3×10^{-3}	8.37×10^{-4}

^a 依每個微衛星基因座之對偶基因數目由大到小排序，若對偶基因數目相同則以該個體鑑別率由小到大排序。

^b 累積整體個體鑑別率，例如： 1.51×10^{-3} 是 UT31 與 UT38 的整體期望個體鑑別率； 1.67×10^{-4} 是 UT31、UT38 與 UT3 的整體期望個體鑑別率，以此類推。

表 9、玉山國家公園大分地區臺灣黑熊之不同的微衛星基因座數目之個體鑑別率（以各基因座期望異質度大小排序）。

微衛星基因座 ^a	UT31	UT35	UT38	UT29	UT3	UT25	UT4	UT1
期望異質度 (H_E)	0.891	0.832	0.826	0.808	0.738	0.7	0.644	0.426
期望個體鑑別率	0.026	0.058	0.058	0.071	0.111	0.143	0.188	0.425
手足個體鑑別率	0.317	0.354	0.358	0.369	0.414	0.441	0.479	0.646
整體期望個體鑑別率 ^b		1.51×10^{-3}	8.75×10^{-5}	6.21×10^{-6}	6.89×10^{-7}	9.8×10^{-8}	1.85×10^{-8}	7.88×10^{-9}
整體手足個體鑑別率 ^b		0.112	0.04	0.015	6.14×10^{-3}	2.71×10^{-3}	1.3×10^{-3}	8.37×10^{-4}

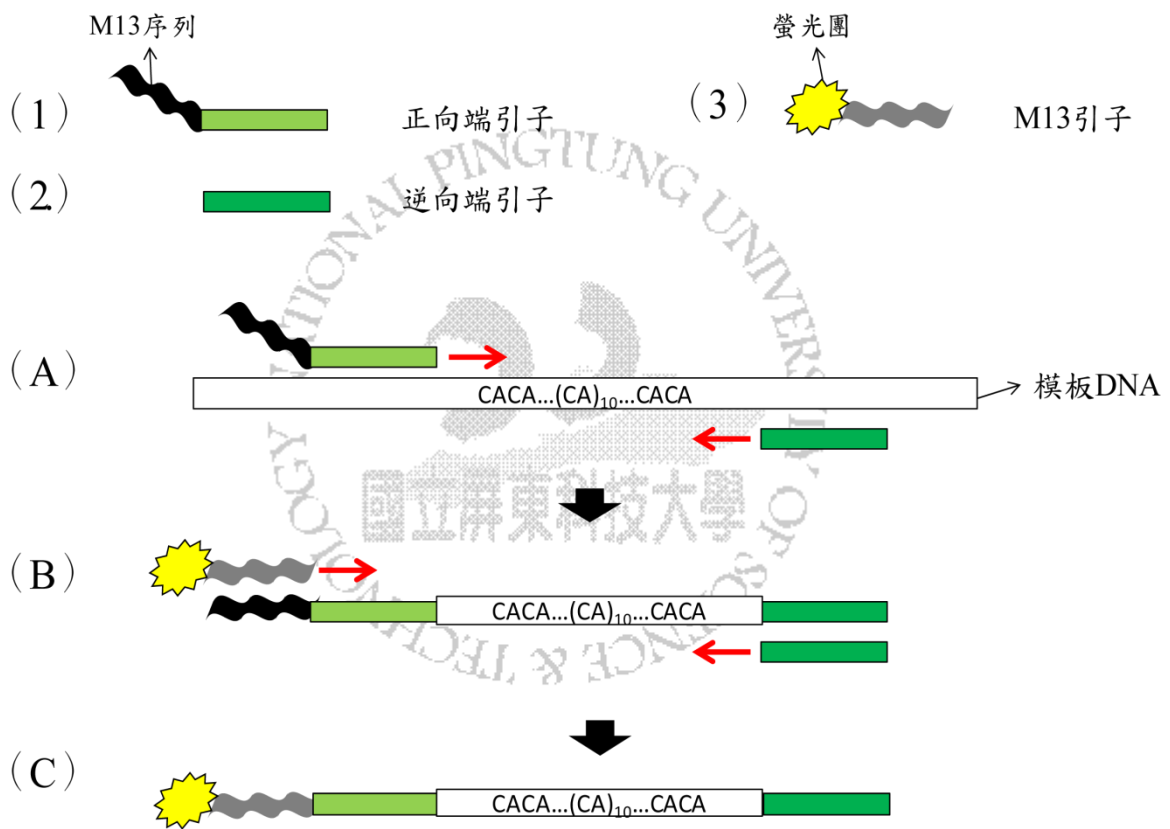
^a 依每個微衛星基因座之期望異質度由大到小排序。

^b 累積整體個體鑑別率，例如： 1.51×10^{-3} 是 UT31 與 UT38 的整體期望個體鑑別率； 8.75×10^{-5} 是 UT31、UT35 與 UT38 的整體期望個體鑑別率，以此類推。

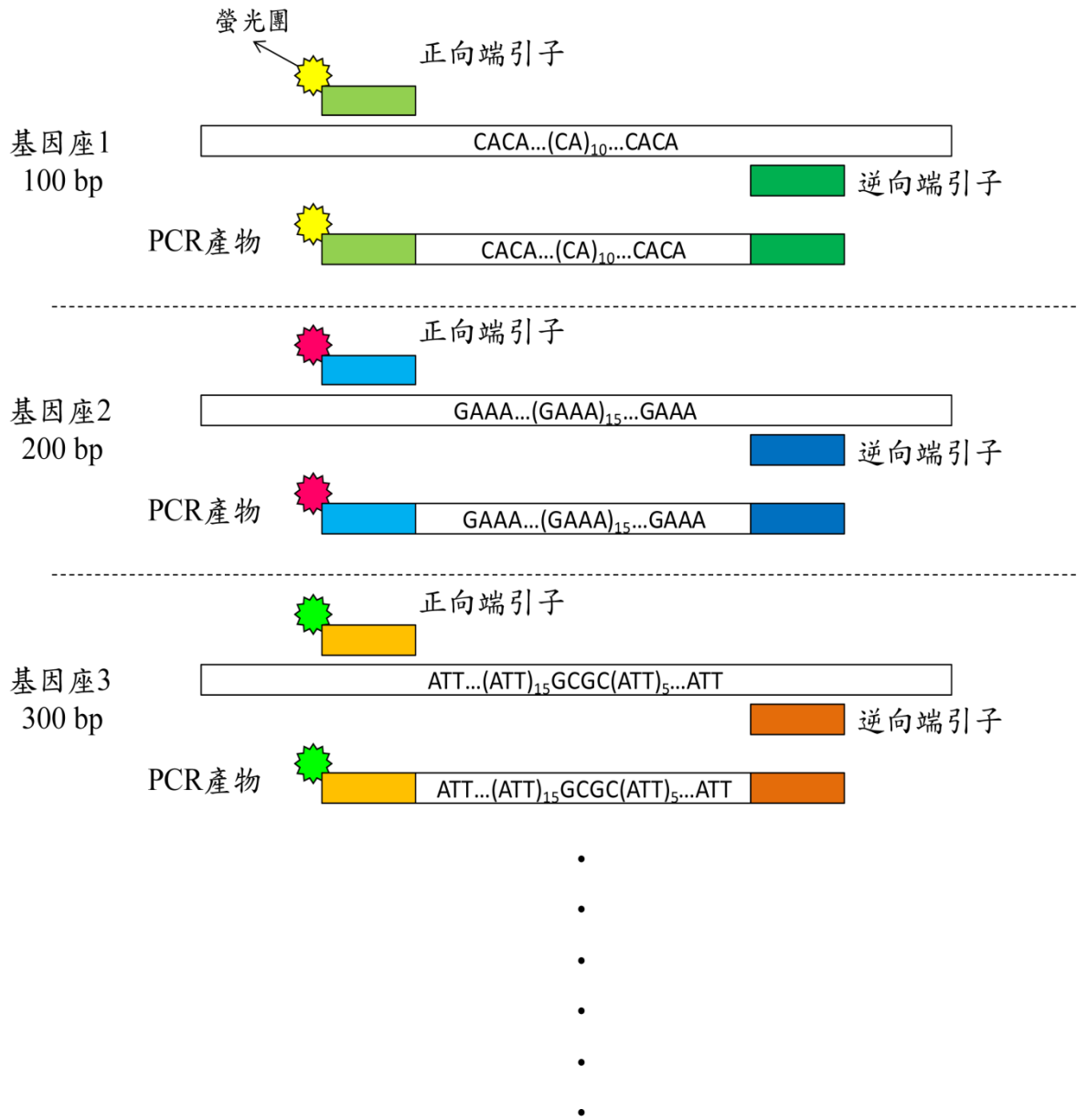
表 10、2010 年玉山國家公園大分地區青剛櫟結果季（10 月至次年 2 月）
 檢測出 35 隻臺灣黑熊個體之性別鑑定結果。

方法	性別	AMEL			總計
		雄	雌	不明	
ZF/SRY	雄	24	0	0	24
	雌	0	10	0	10
	不明	0	1	0	1
	總計	24	11	0	35

附錄 1、經濟型螢光標記法之引子及其 PCR 示意圖。圖上半部為 3 段引子：(1) 在 5' 端接有 M13 序列的正向端引子。(2) 逆向端引子。(3) 在 (5) 端帶有螢光團的 M13 引子。以這 3 段引子進行微衛星標記擴增：(A) 正向端引子與逆向端引子進行初始擴增。(B) M13 引子與逆向端引子進行最終擴增。(C) 帶有螢光團的最終 PCR 產物。

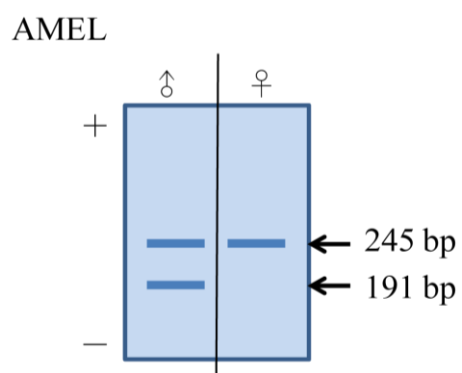


附錄 2、傳統型螢光標記法之引子及其 PCR 示意圖。螢光團直接標記在正向端引子的 5'端，在不同基因座的引子，可接上不同色的螢光團，但若要換其它色的螢光團則需要另外重新合成。

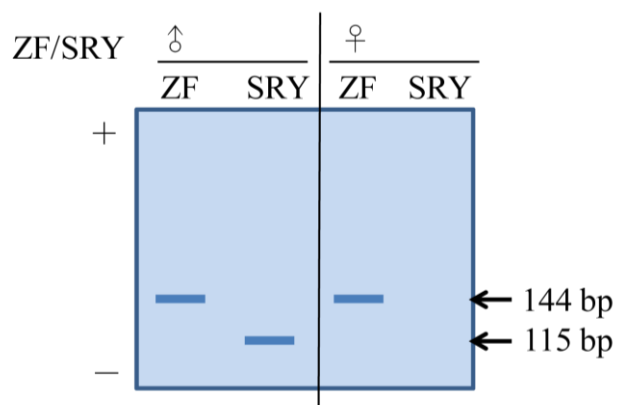


附錄3、AMEL與ZF/ SRY性別鑑定方法。於瓊脂膠體電泳顯示擴增長度差異。

(1)



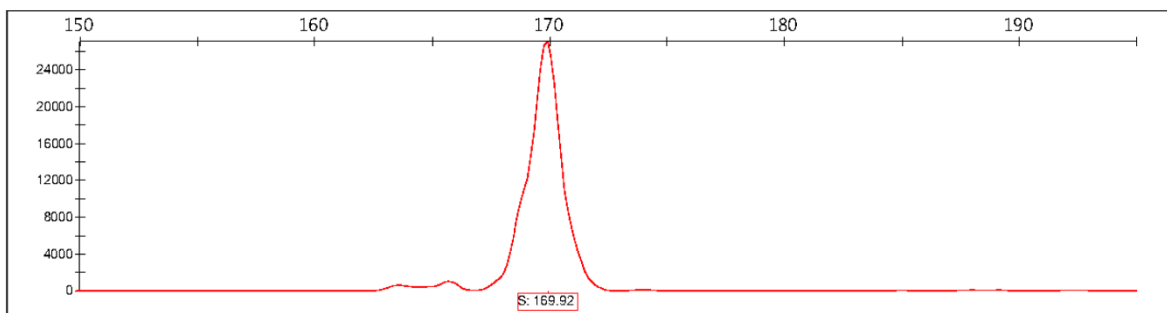
(2)



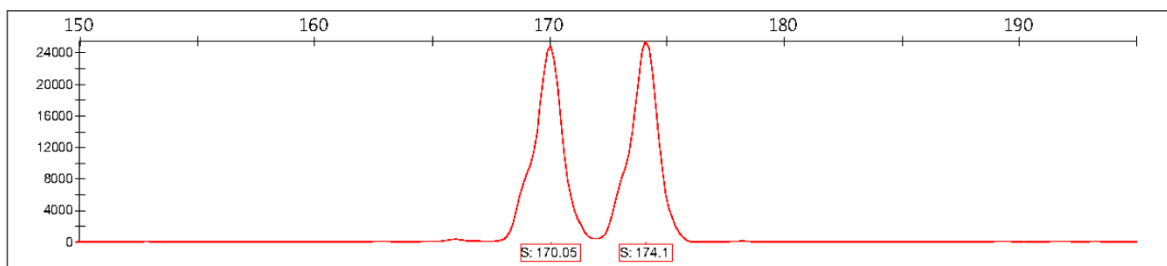
附錄 4、自 2010 年 10 月至隔年 2 月於玉山國家公園大分地區偵測到的 8 組微衛星基因座的基因型之標準波形圖。橫座標代表對偶基因的基因型 (鹼基對長度)；縱座標代表相對訊號強度 (relative fluorescence units, RFU)。各波形圖左上角 2 組 3 位數字代表基因型。

UT1

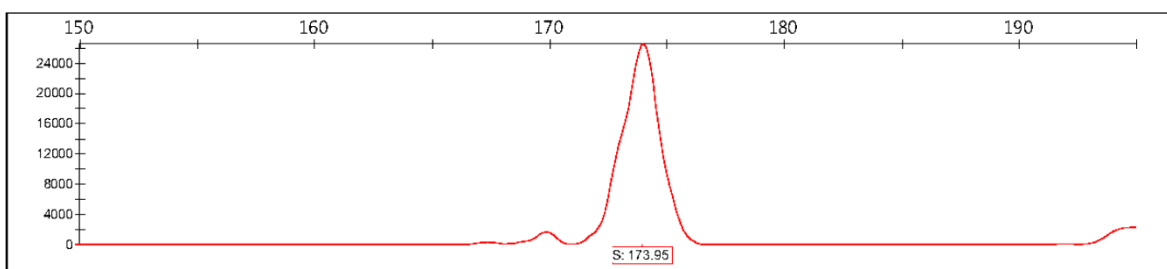
170, 170



170, 174



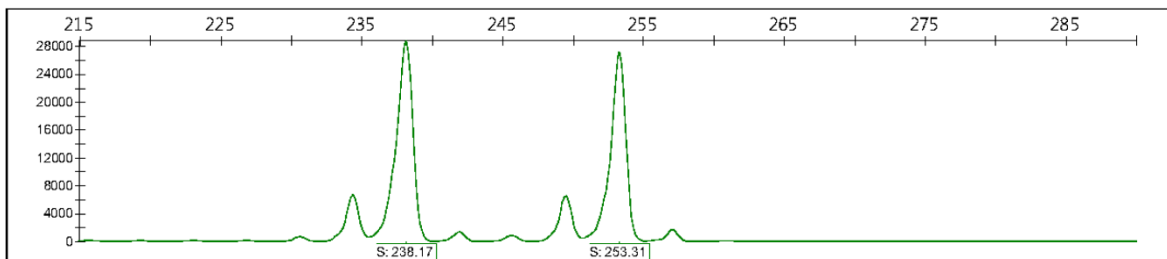
174, 174



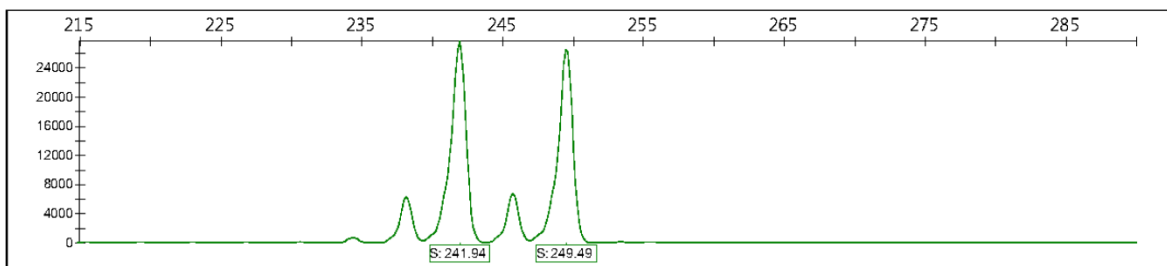
附錄 4 (續)、自 2010 年 10 月至隔年 2 月於玉山國家公園大分地區偵測到的 8 組微衛星基因座的基因型之標準波形圖。

UT3

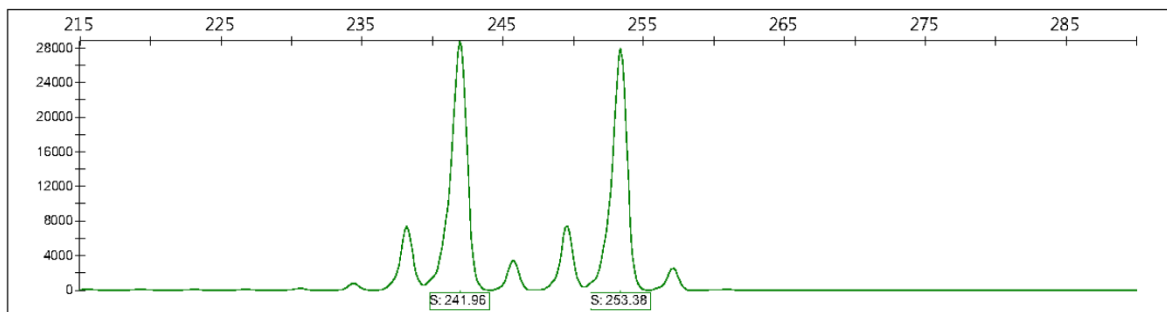
237, 253



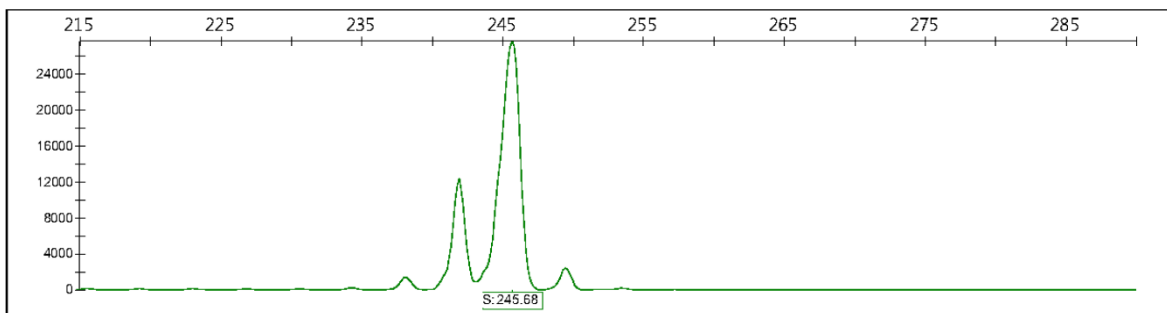
241, 249



241, 253



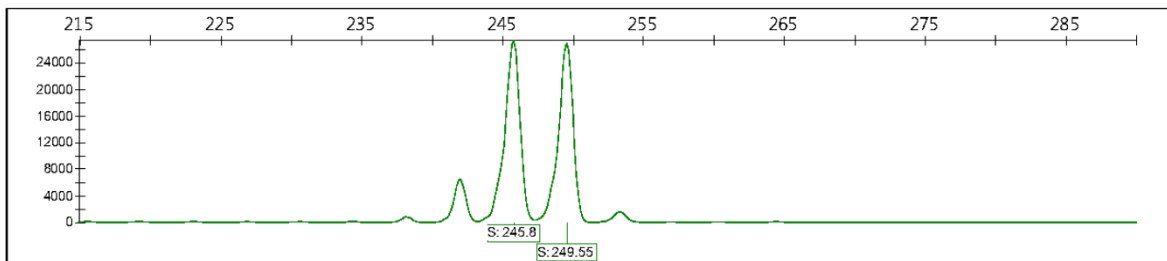
245, 245



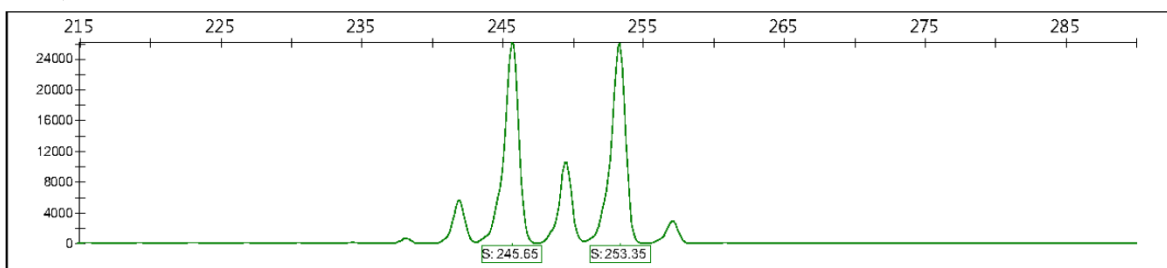
附錄 4 (續)、自 2010 年 10 月至隔年 2 月於玉山國家公園大分地區偵測到的 8 組微衛星基因座的基因型之標準波形圖。

UT3 (續)

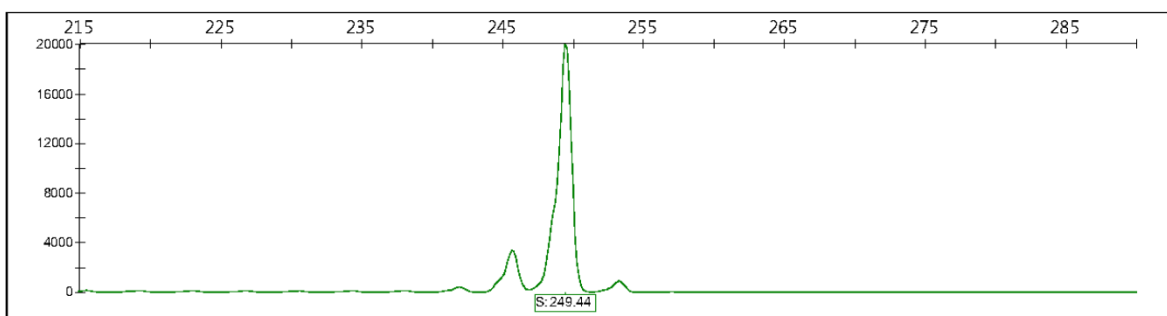
245, 249



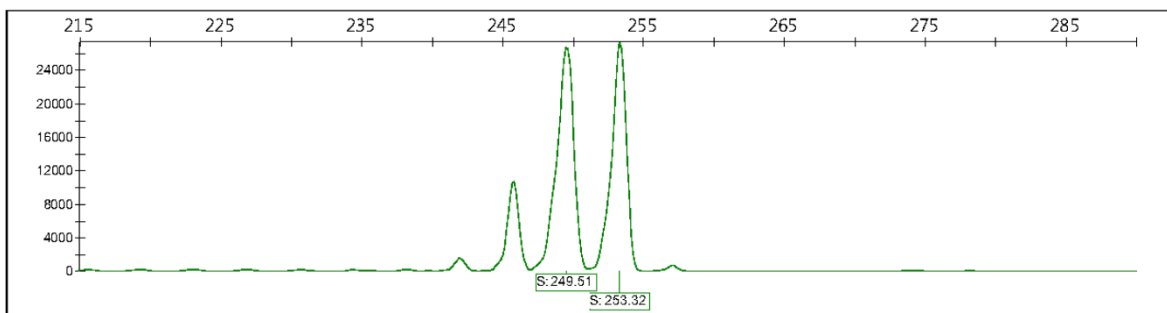
245, 253



249, 249



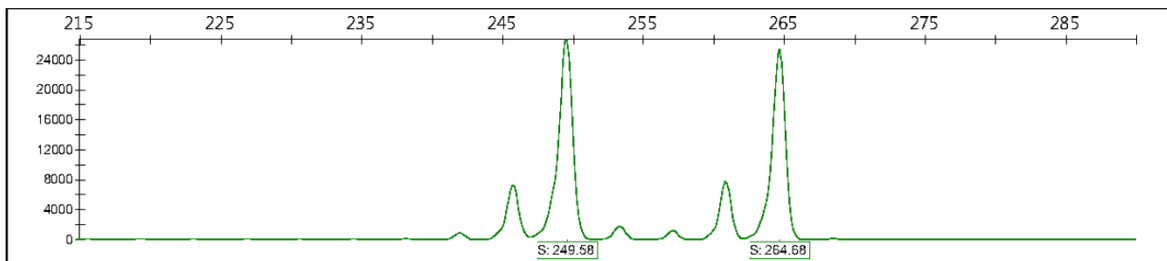
249, 253



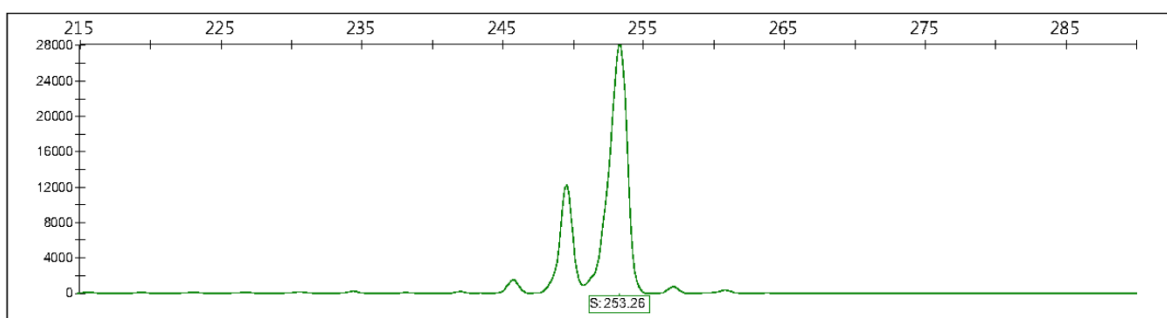
附錄 4 (續)、自 2010 年 10 月至隔年 2 月於玉山國家公園大分地區偵測到的 8 組微衛星基因座的基因型之標準波形圖。

UT3 (續)

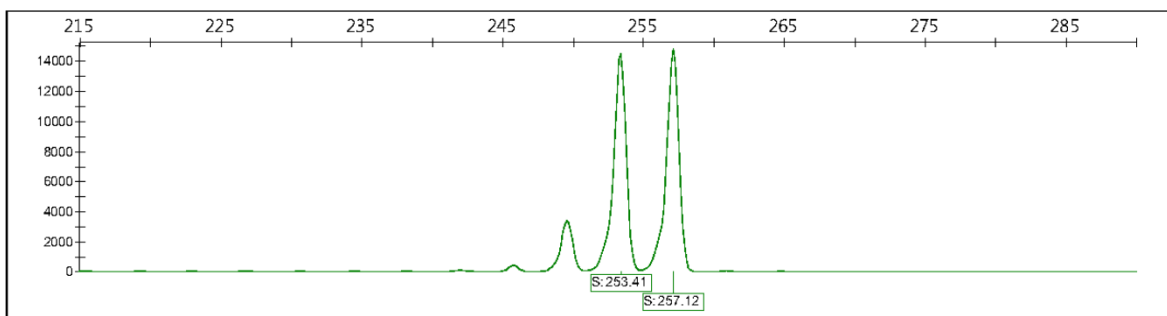
249, 265



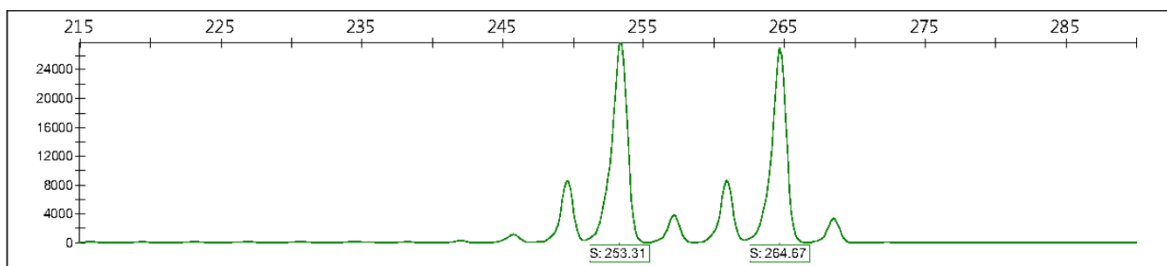
253, 253



253, 257



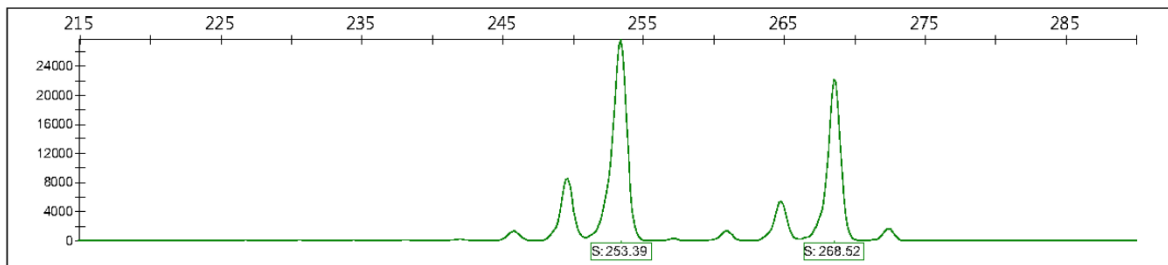
253, 265



附錄 4 (續)、自 2010 年 10 月至隔年 2 月於玉山國家公園大分地區偵測到的 8 組微衛星基因座的基因型之標準波形圖。

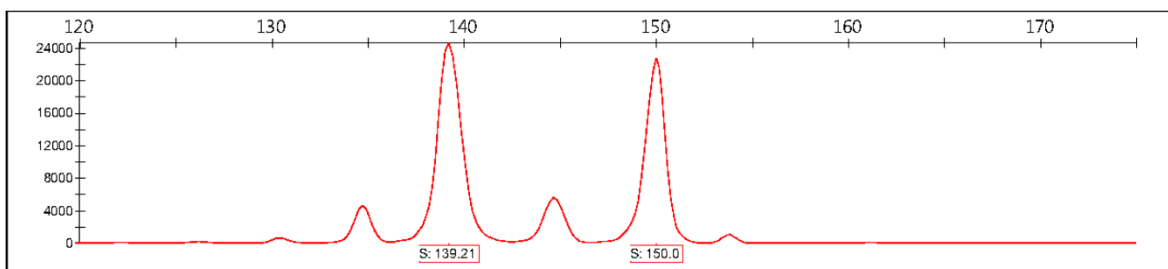
UT3 (續)

253, 269

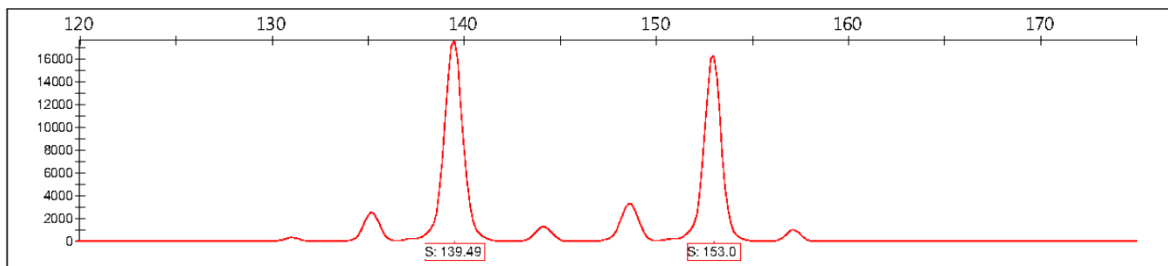


UT4

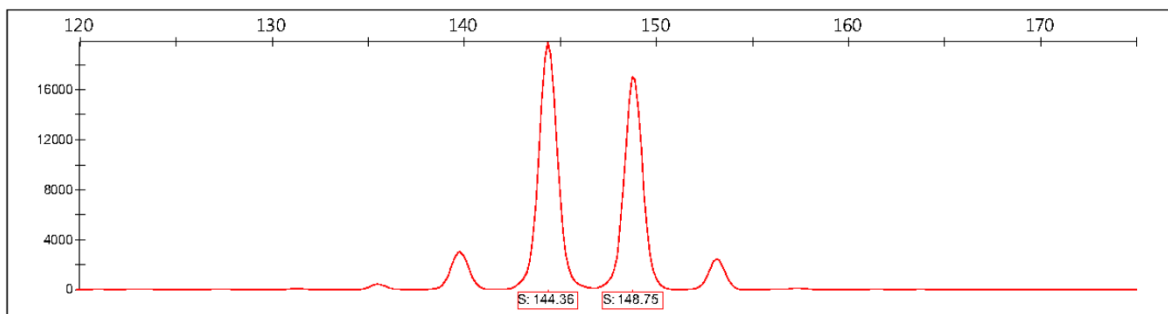
139, 149



139, 153



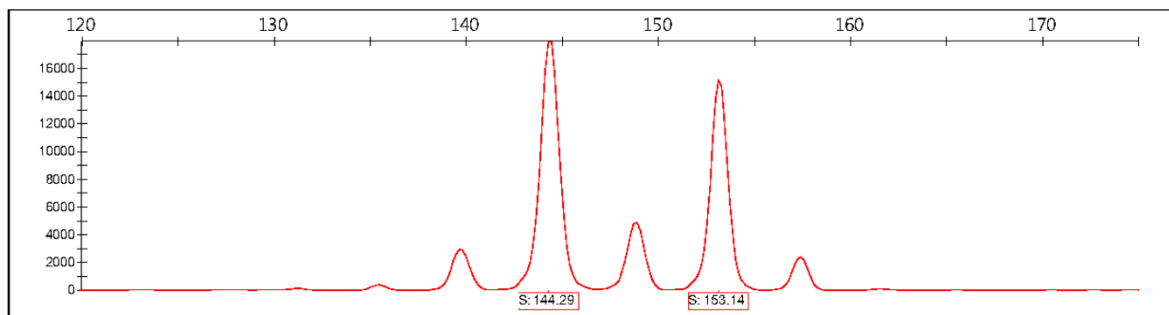
145, 149



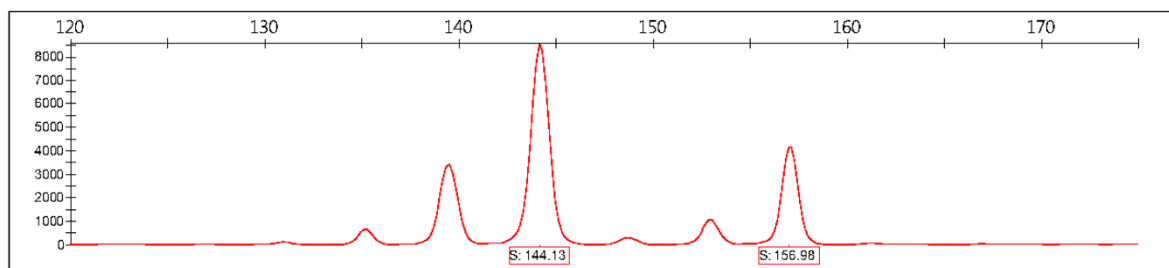
附錄 4 (續)、自 2010 年 10 月至隔年 2 月於玉山國家公園大分地區偵測到的 8 組微衛星基因座的基因型之標準波形圖。

UT4 (續)

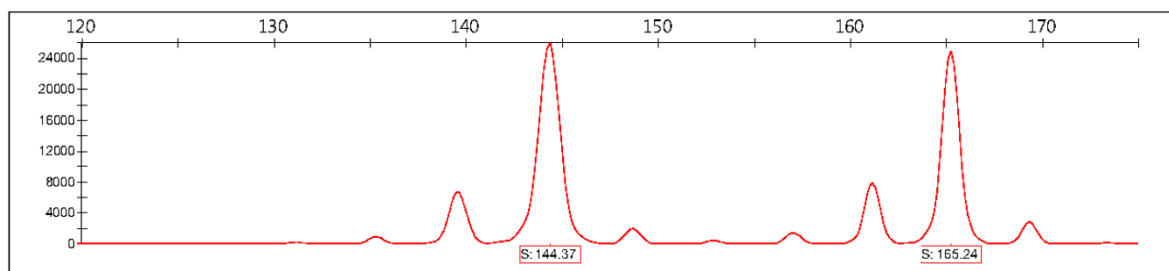
145, 153



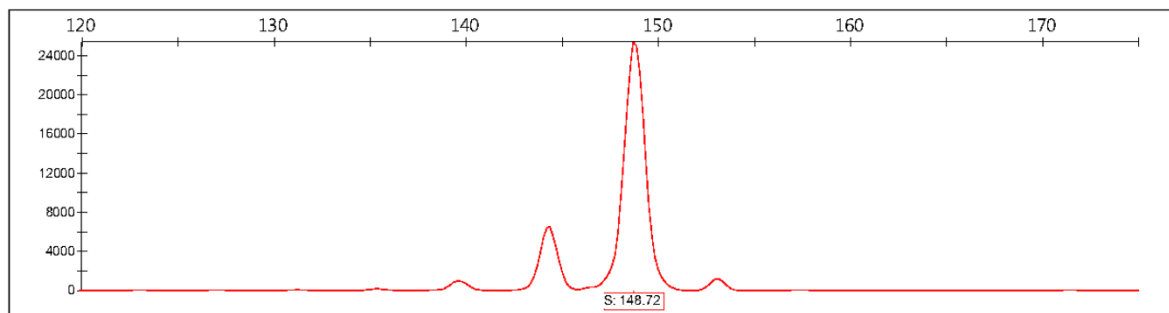
145, 157



145, 165



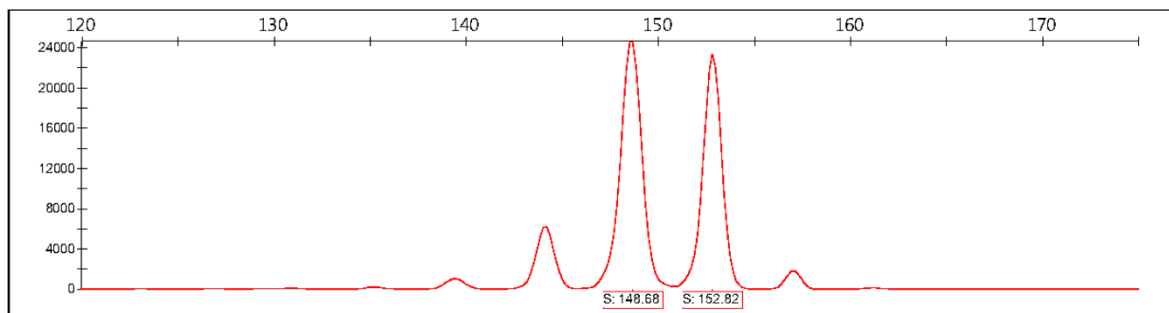
149, 149



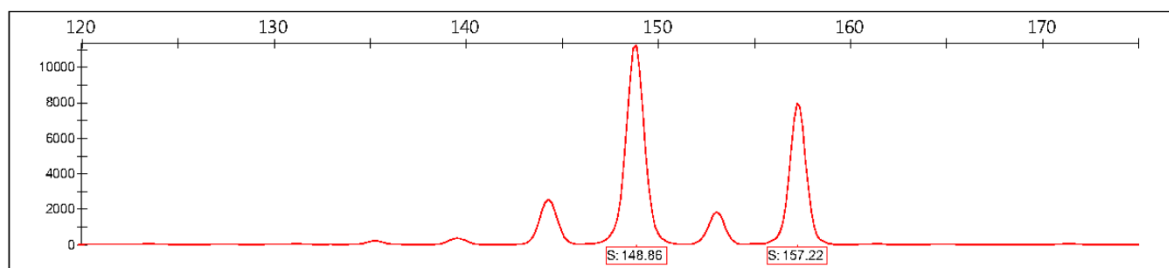
附錄 4 (續)、自 2010 年 10 月至隔年 2 月於玉山國家公園大分地區偵測到的 8 組微衛星基因座的基因型之標準波形圖。

UT4 (續)

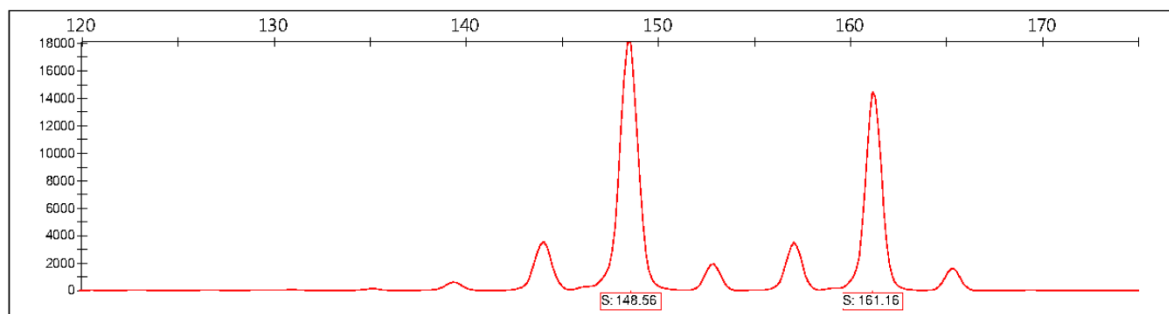
149, 153



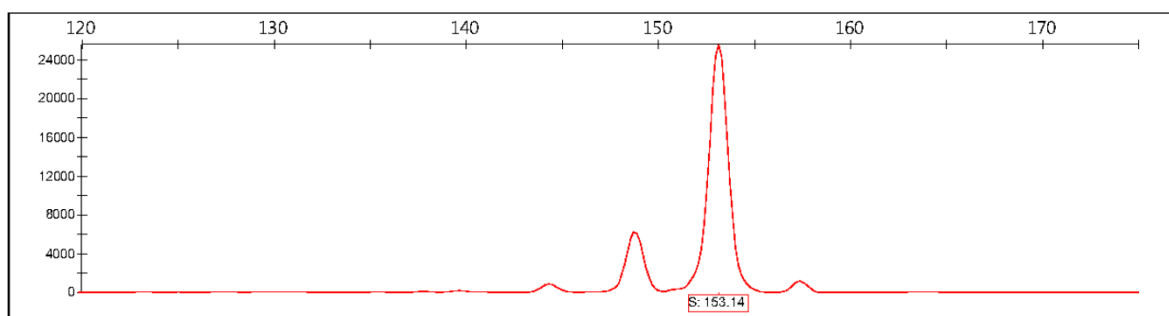
149, 157



149, 161



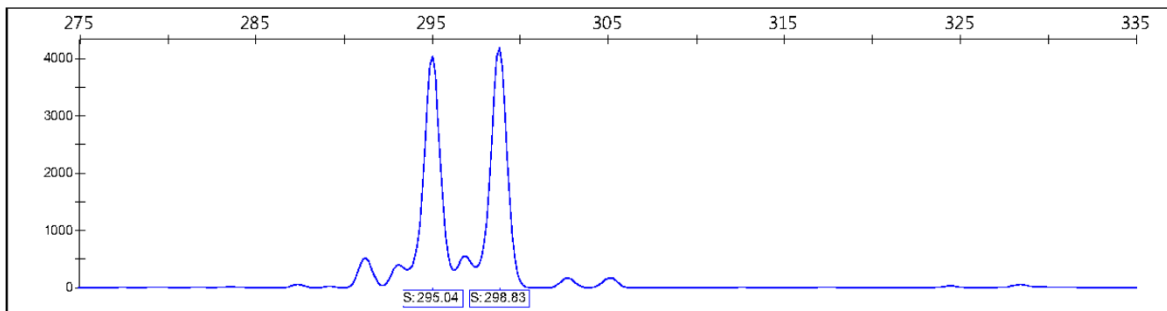
153, 153



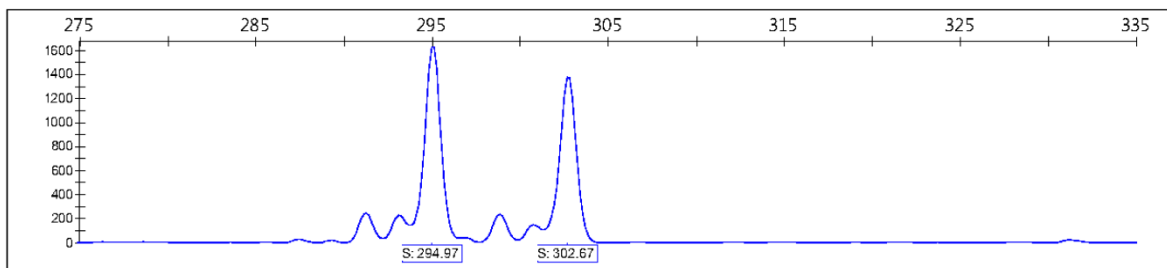
附錄 4 (續)、自 2010 年 10 月至隔年 2 月於玉山國家公園大分地區偵測到的 8 組微衛星基因座的基因型之標準波形圖。

UT25

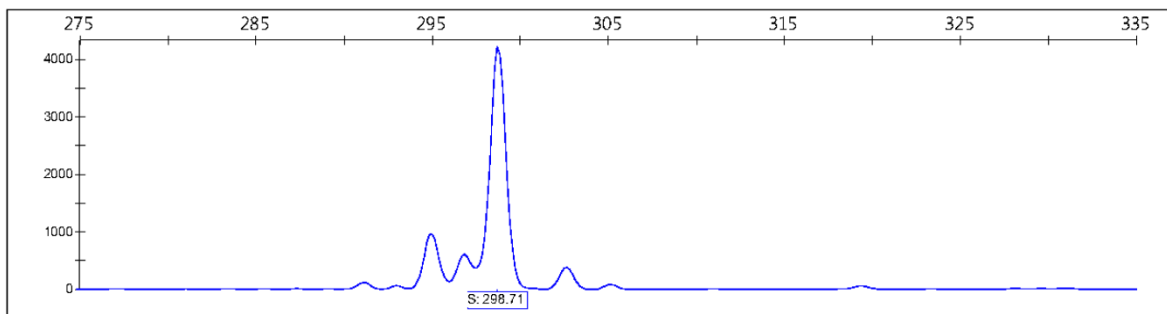
294, 298



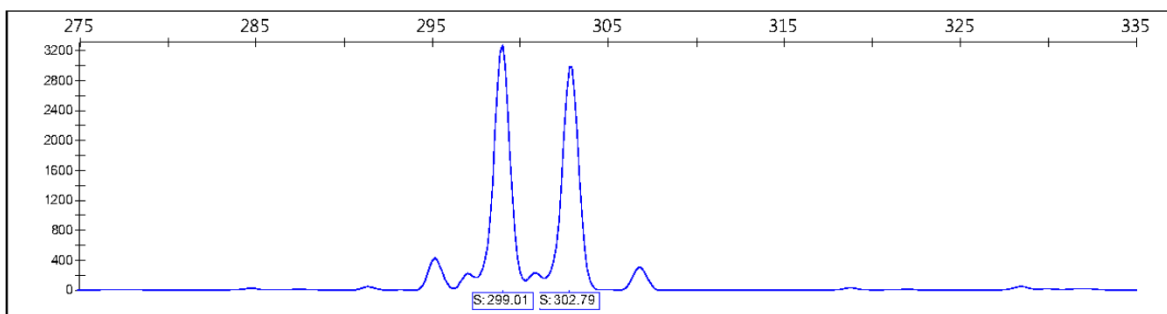
294, 302



298, 298



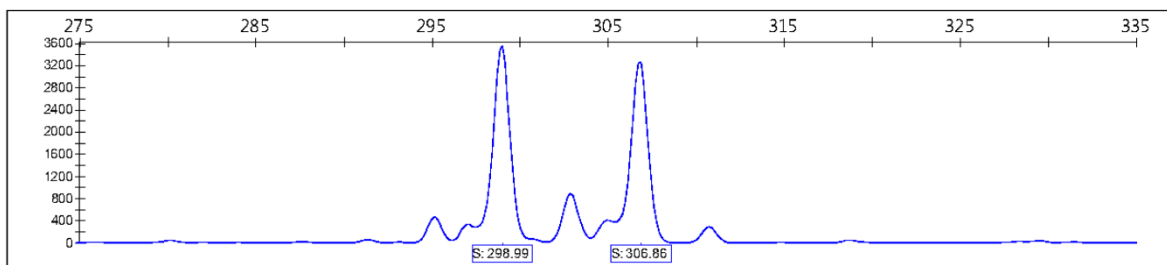
298, 302



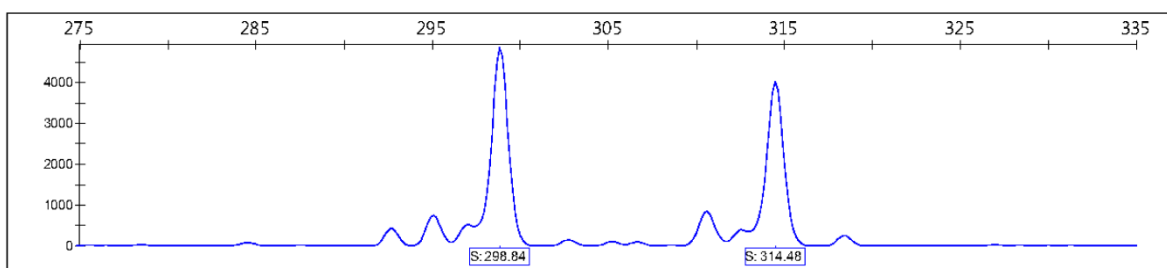
附錄 4 (續)、自 2010 年 10 月至隔年 2 月於玉山國家公園大分地區偵測到的 8 組微衛星基因座的基因型之標準波形圖。

UT25 (續)

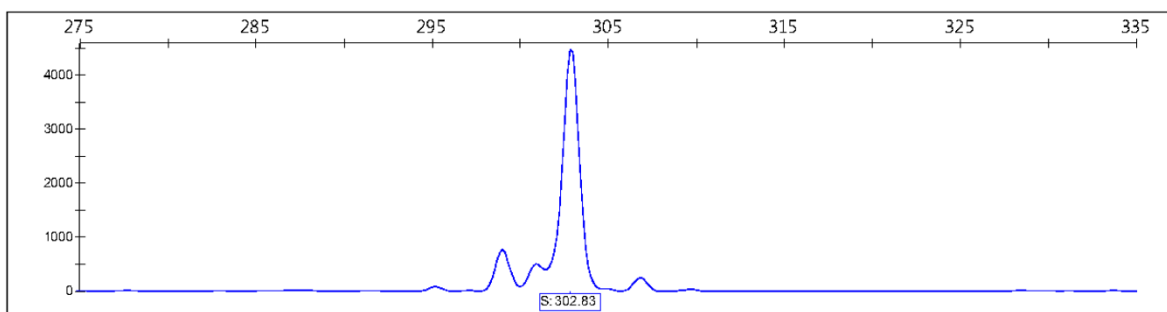
298, 306



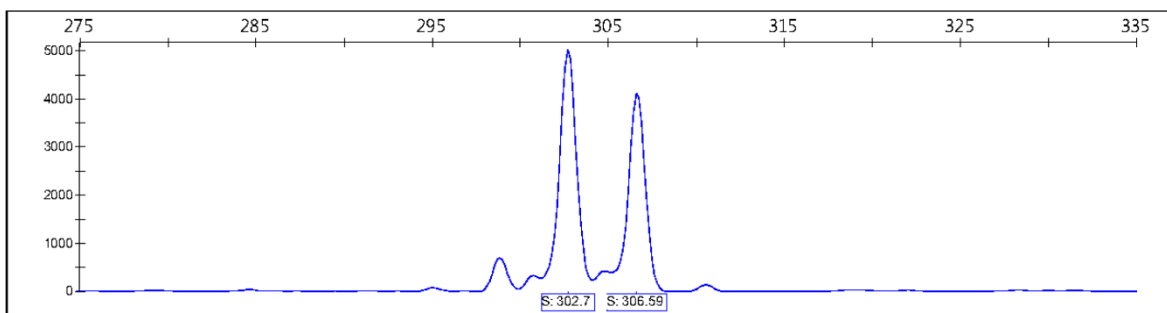
298, 314



302, 302



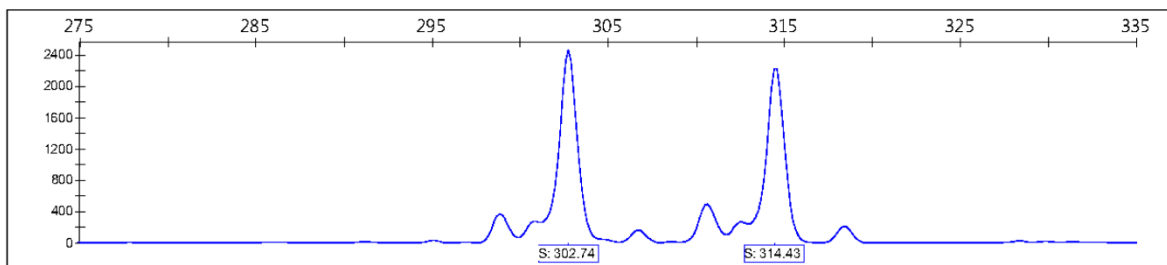
302, 306



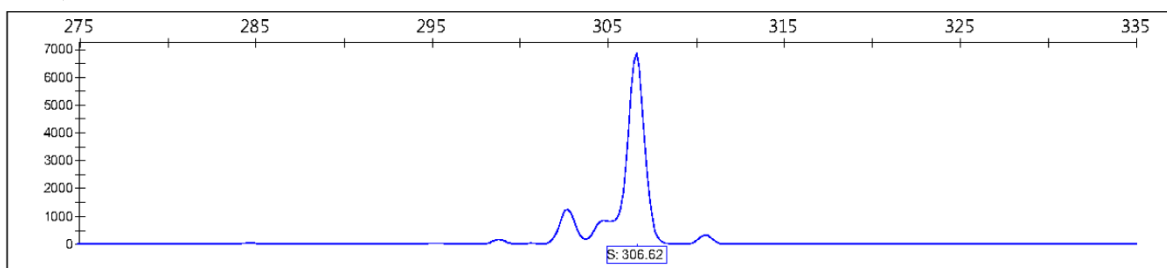
附錄 4 (續)、自 2010 年 10 月至隔年 2 月於玉山國家公園大分地區偵測到的 8 組微衛星基因座的基因型之標準波形圖。

UT25 (續)

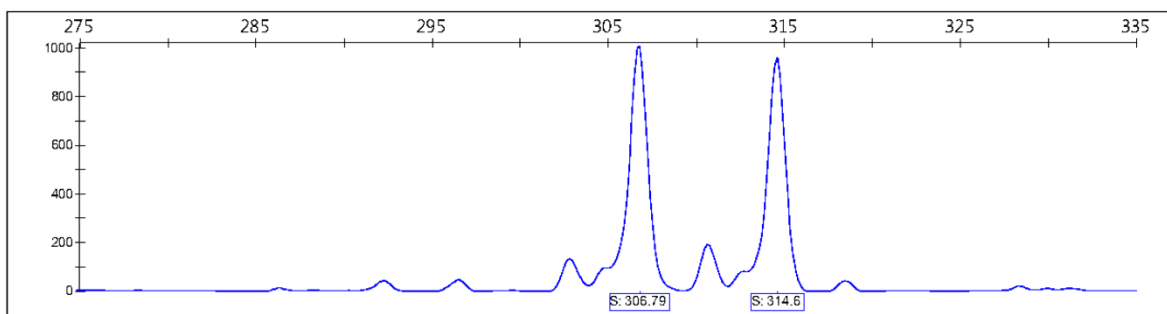
302, 314



306, 306

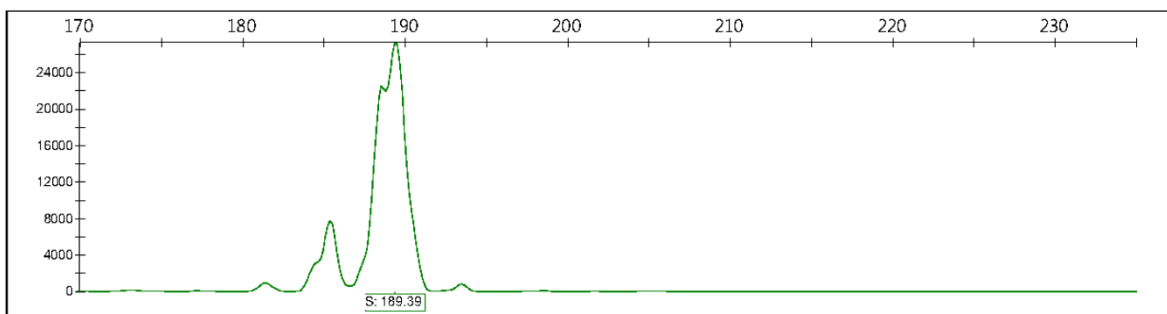


306, 314



UT29

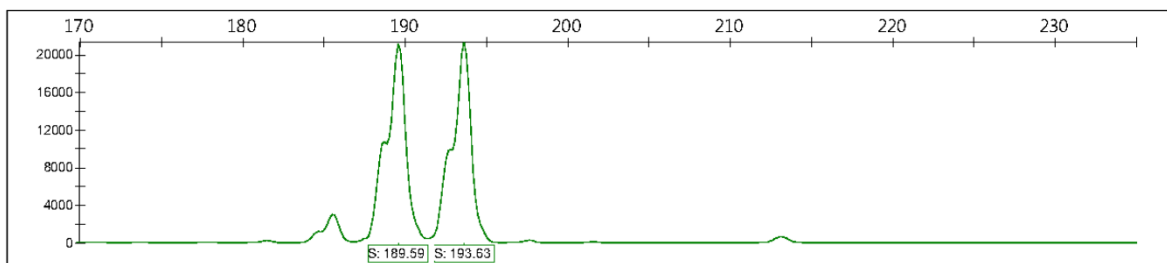
189, 189



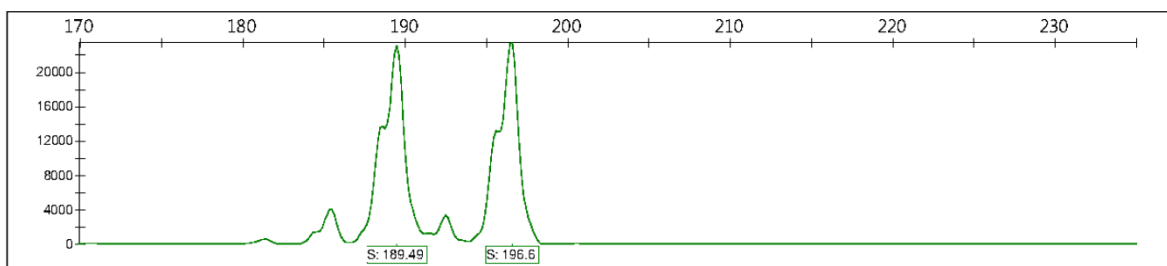
附錄 4 (續)、自 2010 年 10 月至隔年 2 月於玉山國家公園大分地區偵測到的 8 組微衛星基因座的基因型之標準波形圖。

UT29 (續)

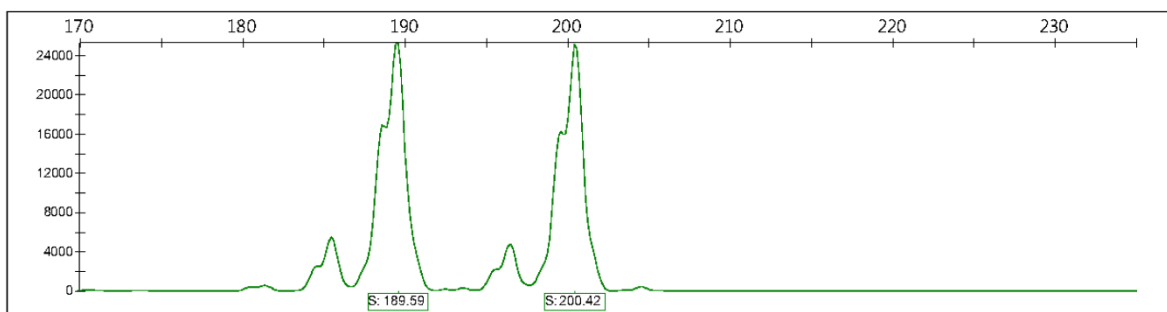
189, 193



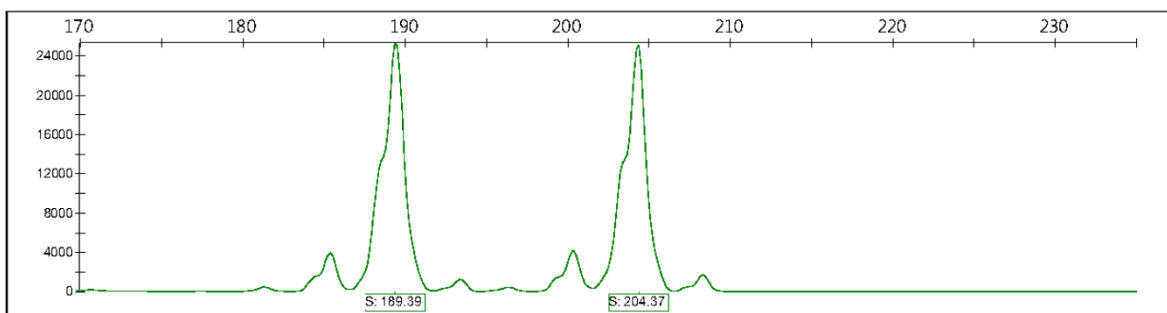
189, 197



189, 201



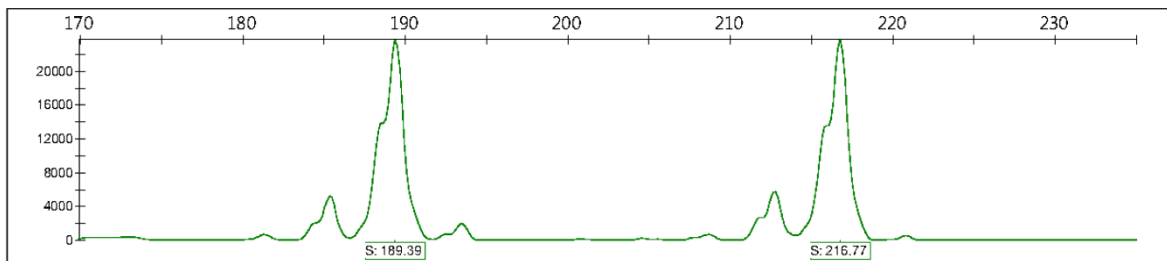
189, 205



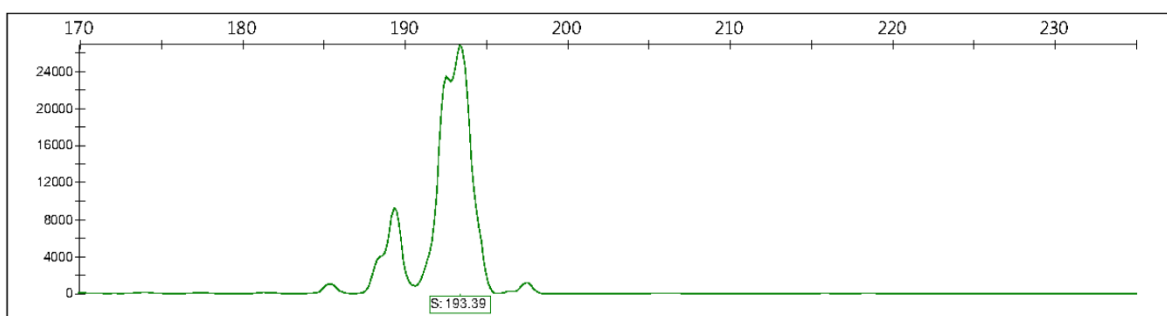
附錄 4 (續)、自 2010 年 10 月至隔年 2 月於玉山國家公園大分地區偵測到的 8 組微衛星基因座的基因型之標準波形圖。

UT29 (續)

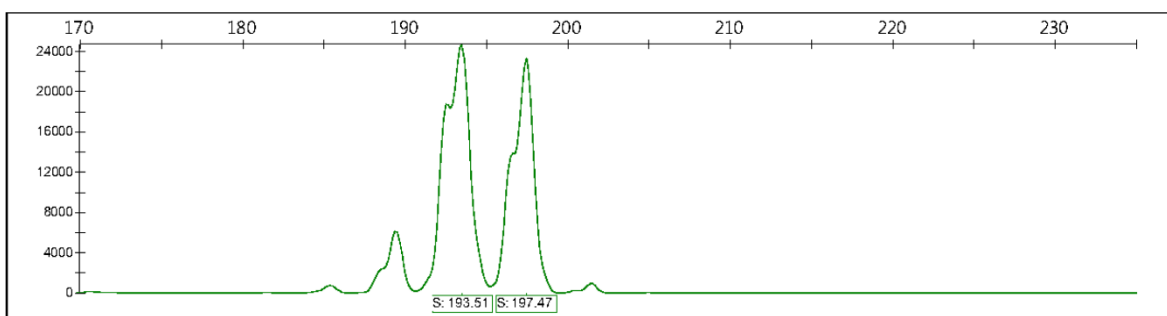
189, 217



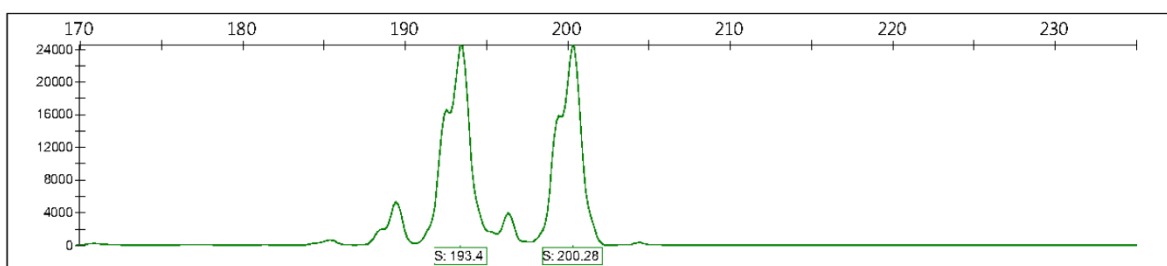
193, 193



193, 197



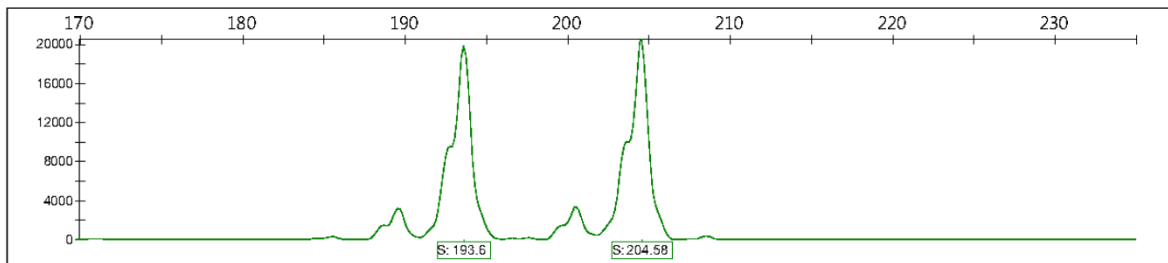
193, 201



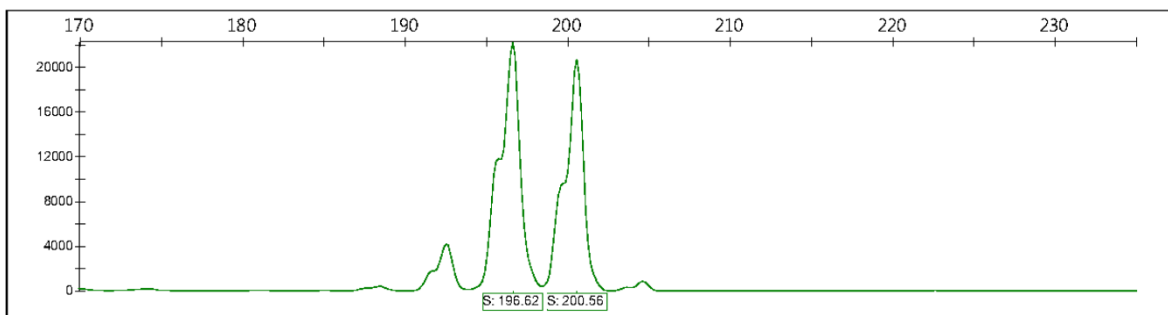
附錄 4 (續)、自 2010 年 10 月至隔年 2 月於玉山國家公園大分地區偵測到的 8 組微衛星基因座的基因型之標準波形圖。

UT29 (續)

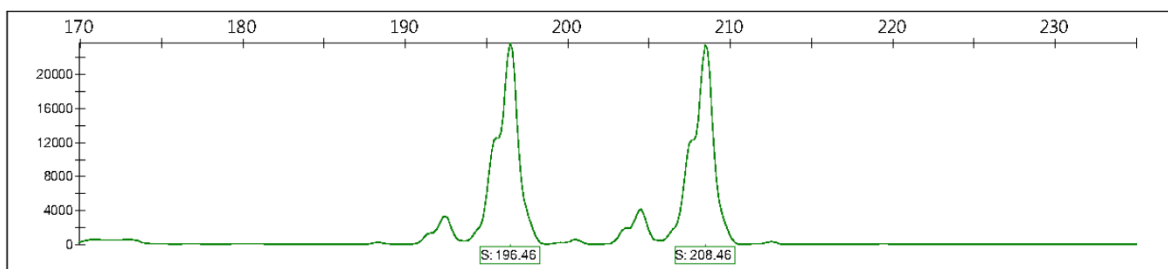
193, 205



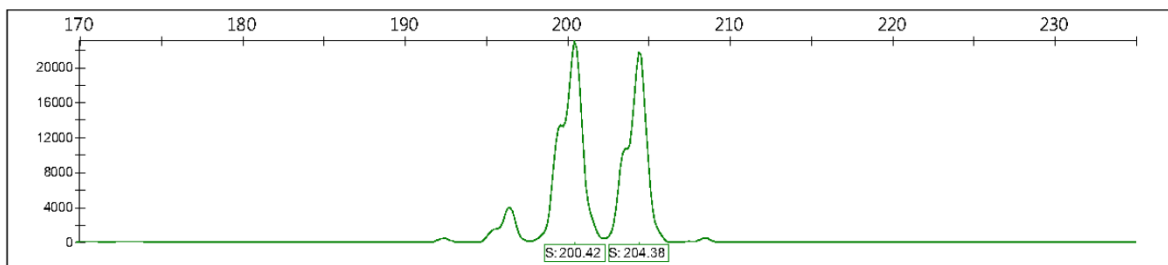
197, 201



197, 209



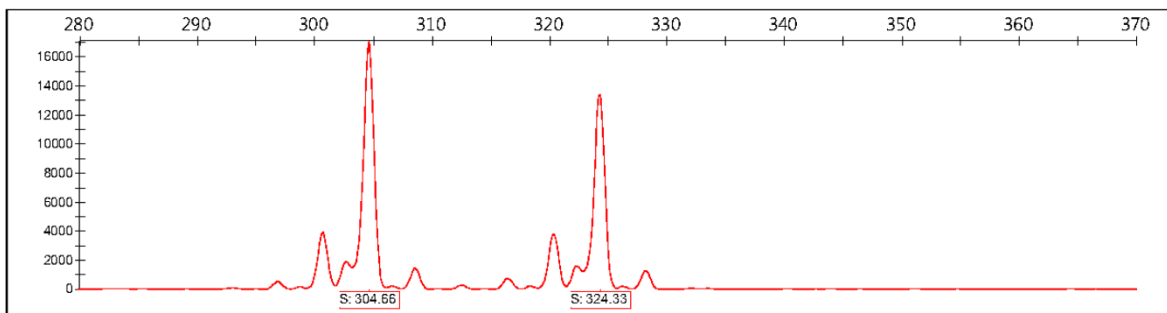
201, 205



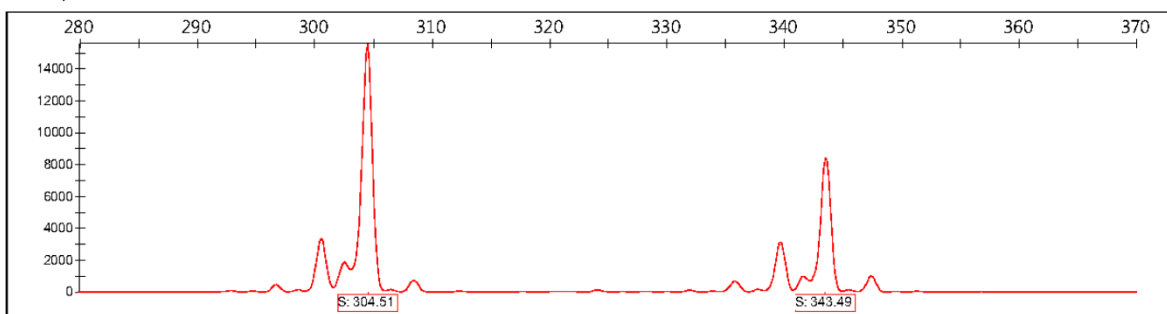
附錄 4 (續)、自 2010 年 10 月至隔年 2 月於玉山國家公園大分地區偵測到的 8 組微衛星基因座的基因型之標準波形圖。

UT31

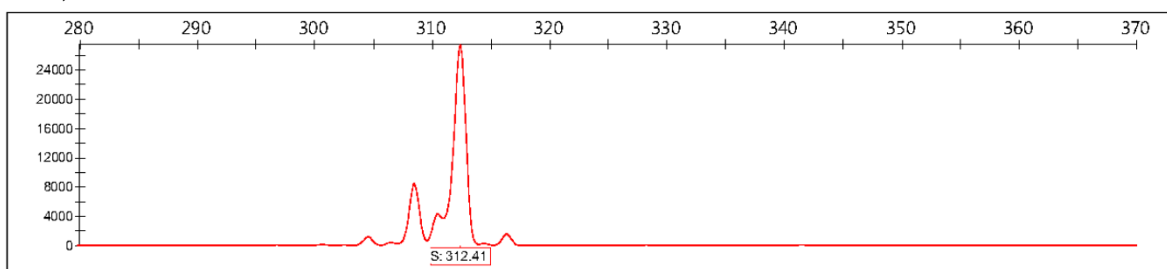
304, 324



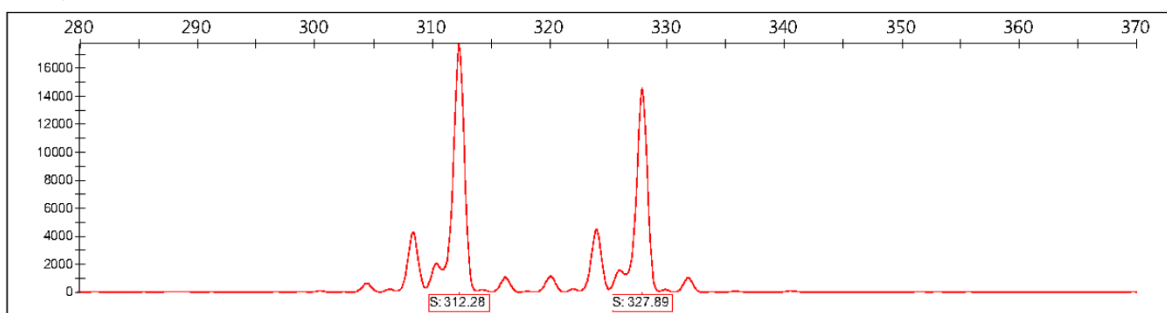
304, 344



312, 312



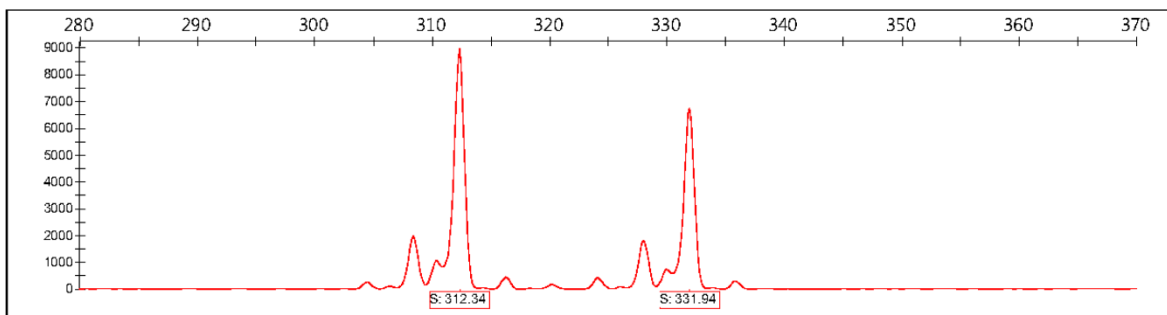
312, 328



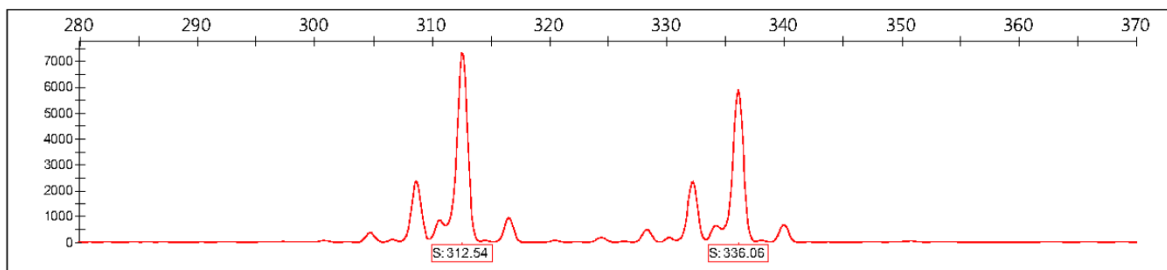
附錄 4 (續)、自 2010 年 10 月至隔年 2 月於玉山國家公園大分地區偵測到的 8 組微衛星基因座的基因型之標準波形圖。

UT31 (續)

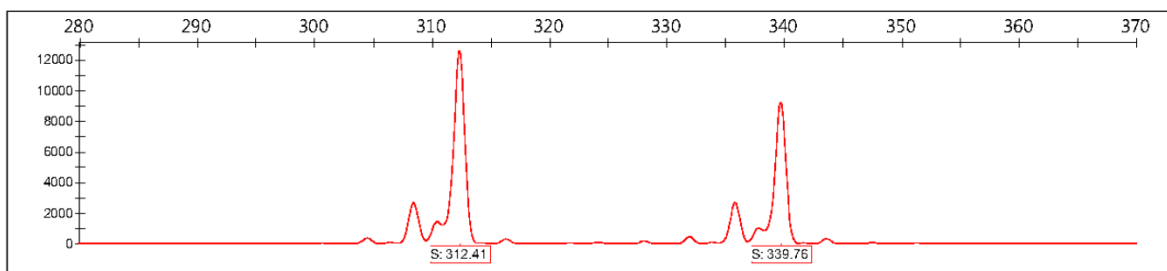
312, 332



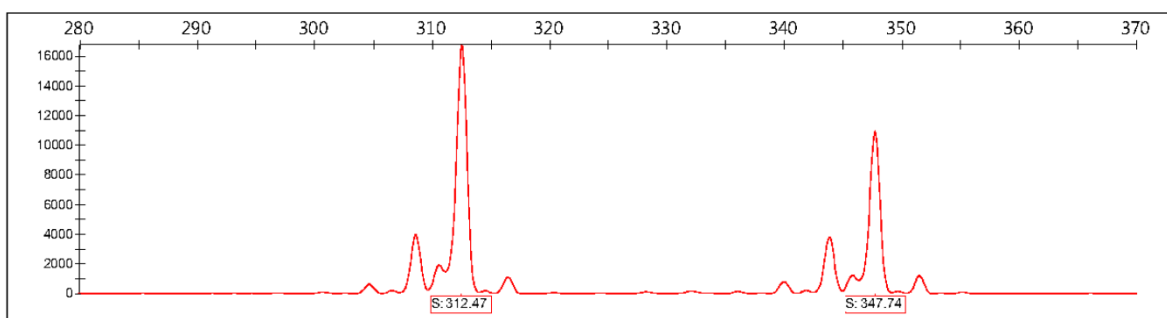
312, 336



312, 340



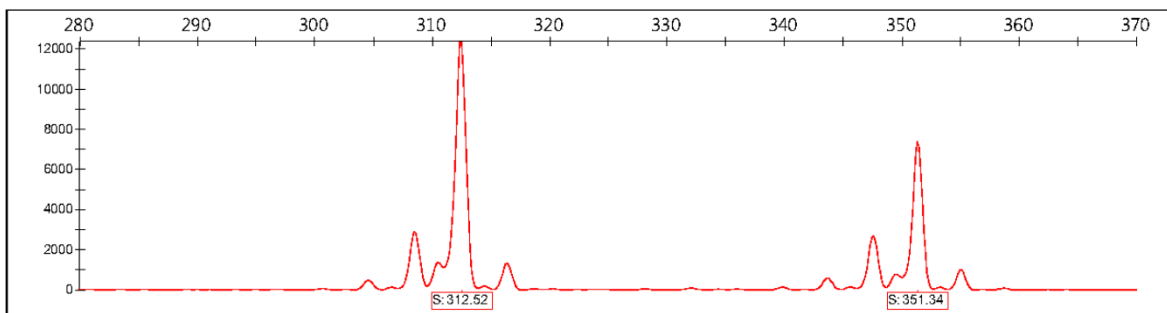
312, 348



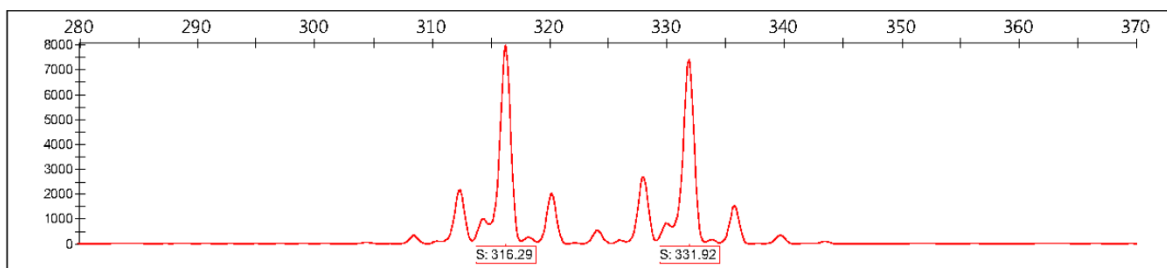
附錄 4 (續)、自 2010 年 10 月至隔年 2 月於玉山國家公園大分地區偵測到的 8 組微衛星基因座的基因型之標準波形圖。

UT31 (續)

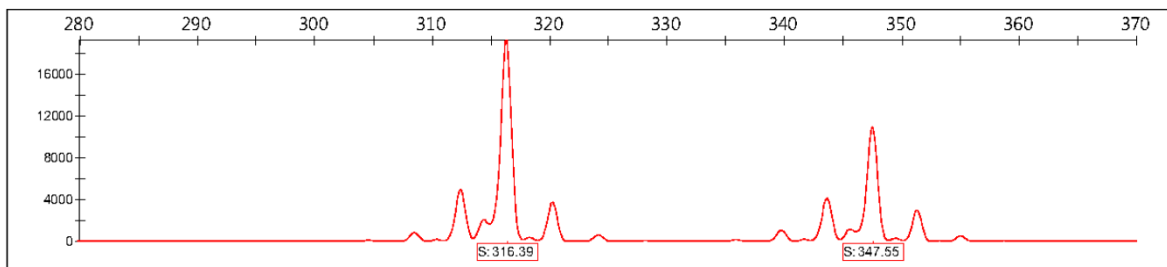
312, 352



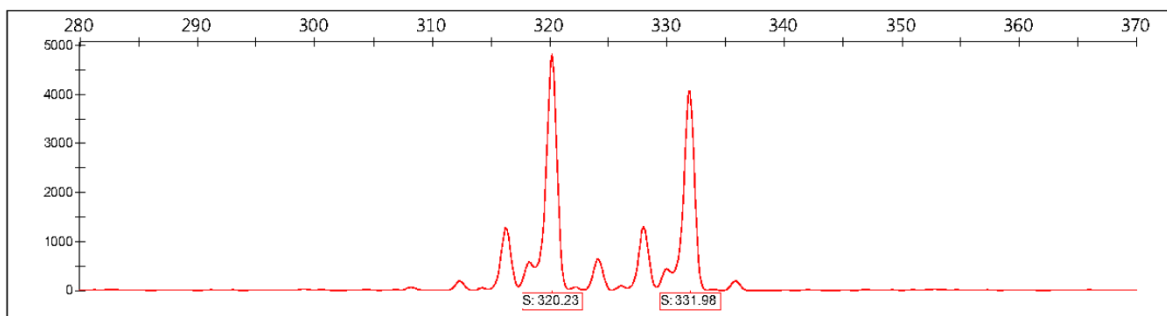
316, 332



316, 348



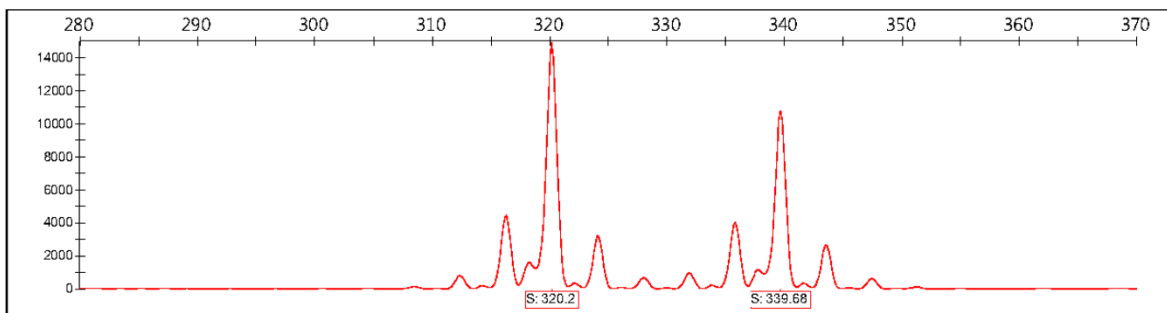
320, 332



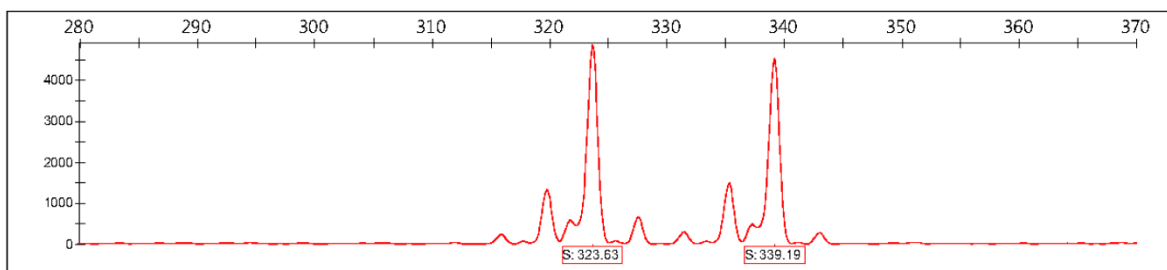
附錄 4 (續)、自 2010 年 10 月至隔年 2 月於玉山國家公園大分地區偵測到的 8 組微衛星基因座的基因型之標準波形圖。

UT31 (續)

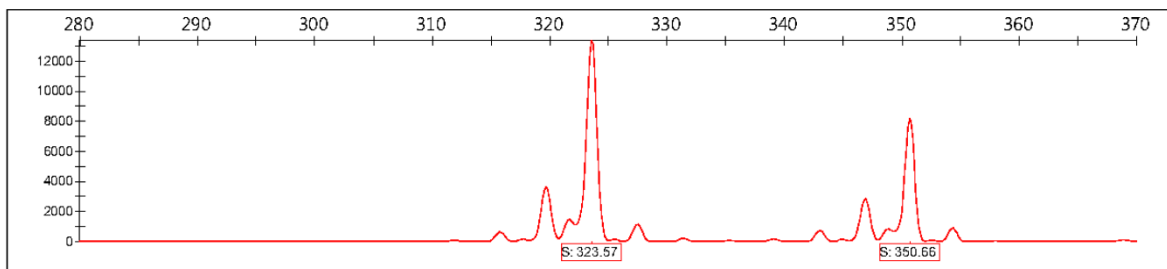
320, 340



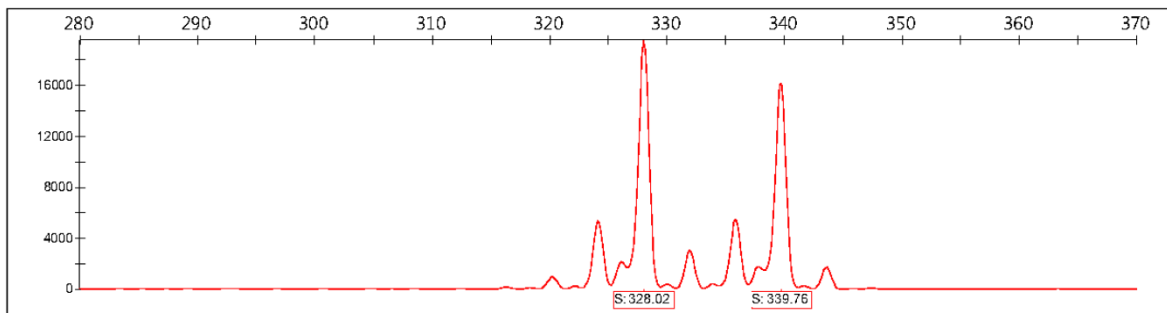
324, 340



324, 352



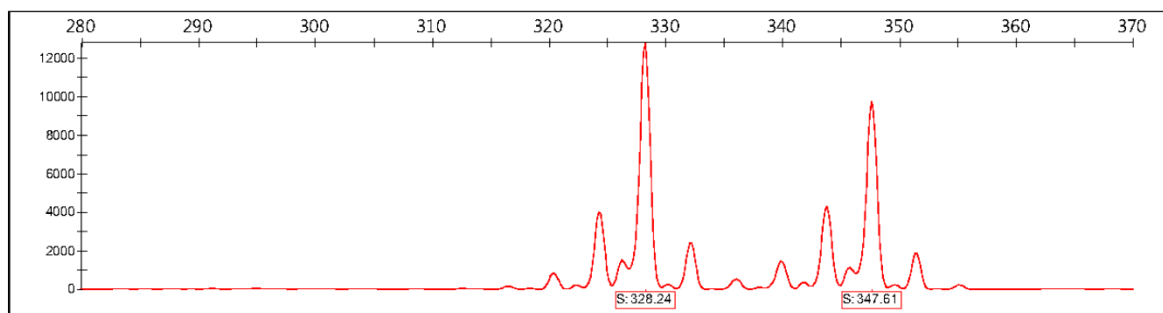
328, 340



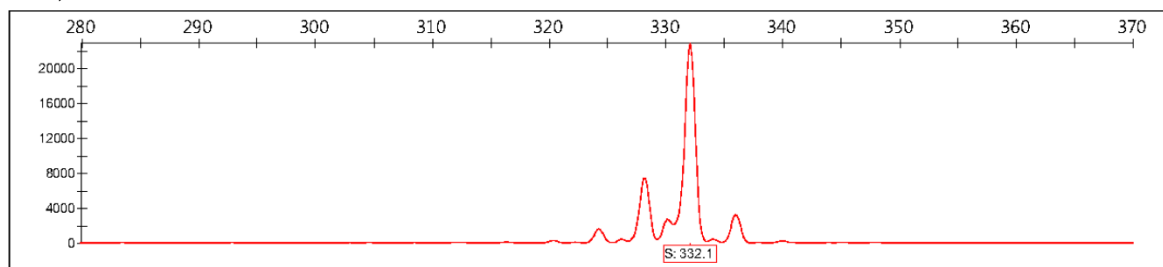
附錄 4 (續)、自 2010 年 10 月至隔年 2 月於玉山國家公園大分地區偵測到的 8 組微衛星基因座的基因型之標準波形圖。

UT31 (續)

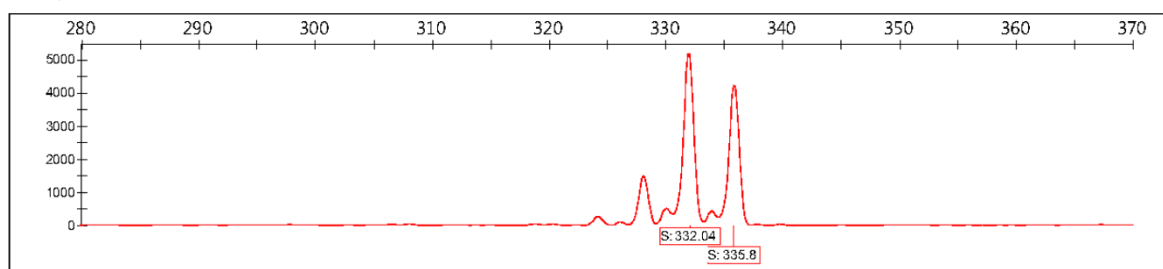
328, 348



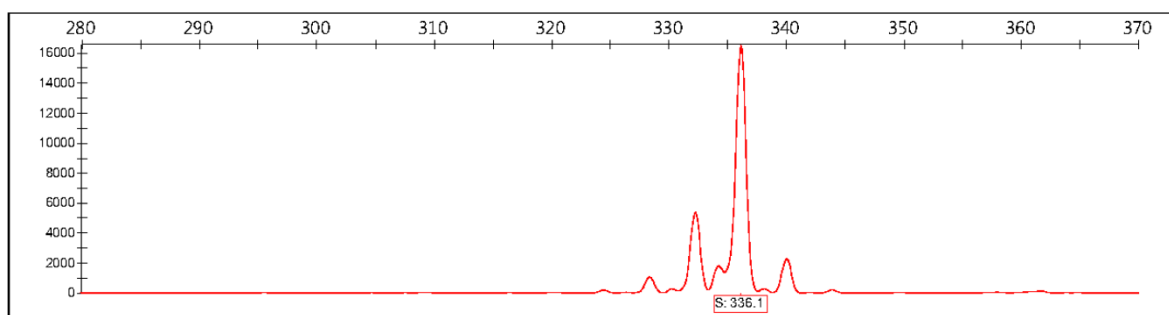
332, 332



332, 336



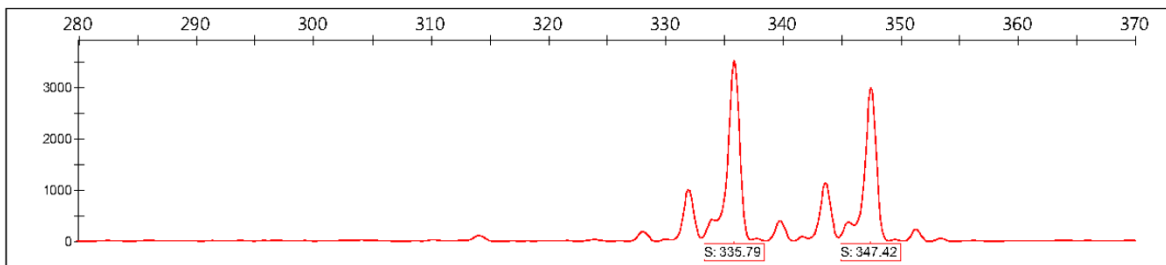
336, 336



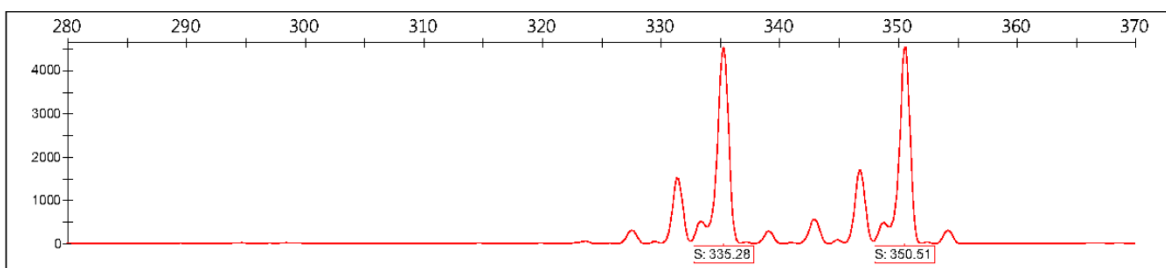
附錄 4 (續)、自 2010 年 10 月至隔年 2 月於玉山國家公園大分地區偵測到的 8 組微衛星基因座的基因型之標準波形圖。

UT31 (續)

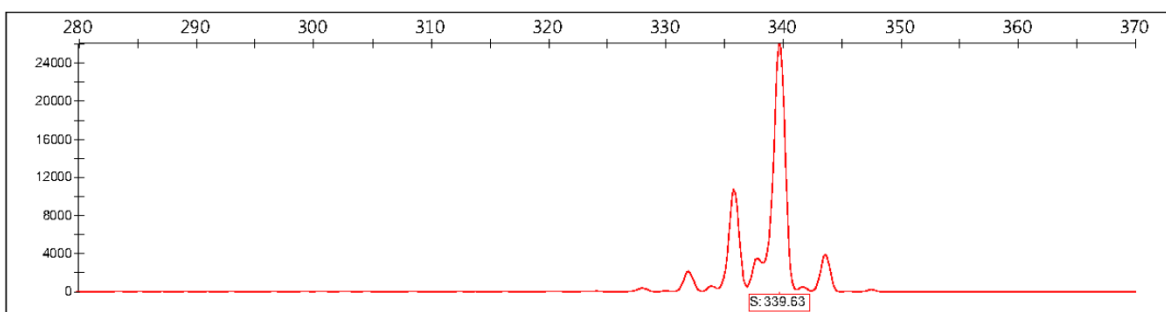
336, 348



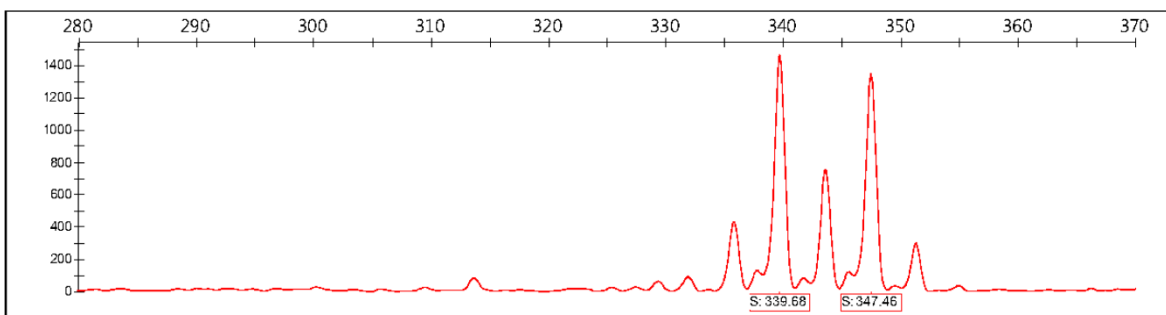
336, 352



340, 340



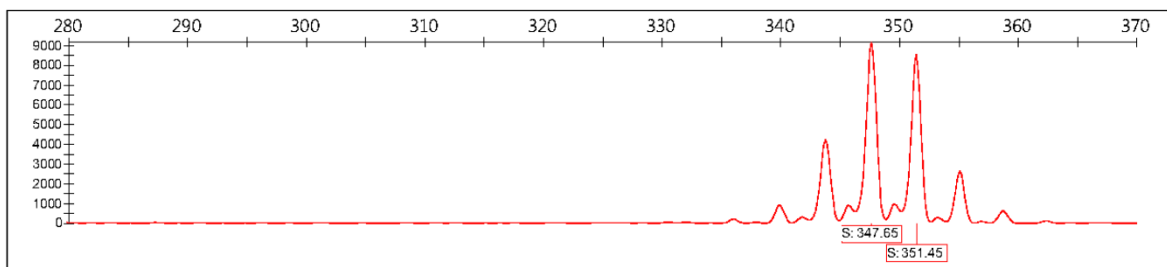
340, 348



附錄 4 (續)、自 2010 年 10 月至隔年 2 月於玉山國家公園大分地區偵測到的 8 組微衛星基因座的基因型之標準波形圖。

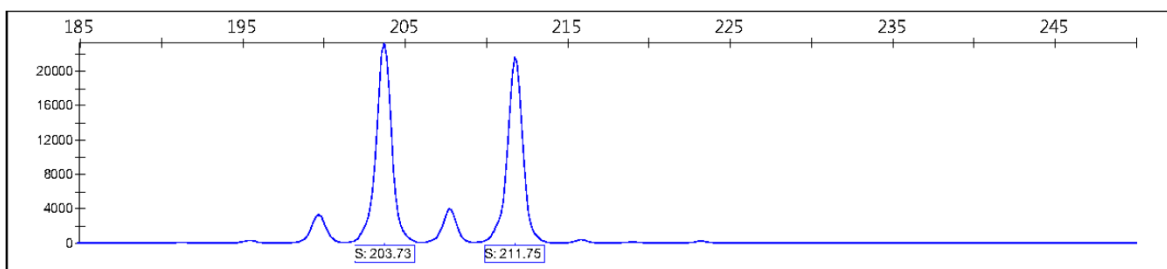
UT31 (續)

348, 352

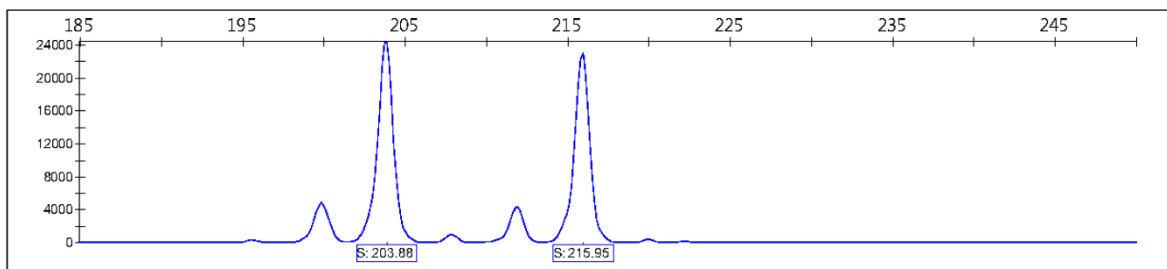


UT35

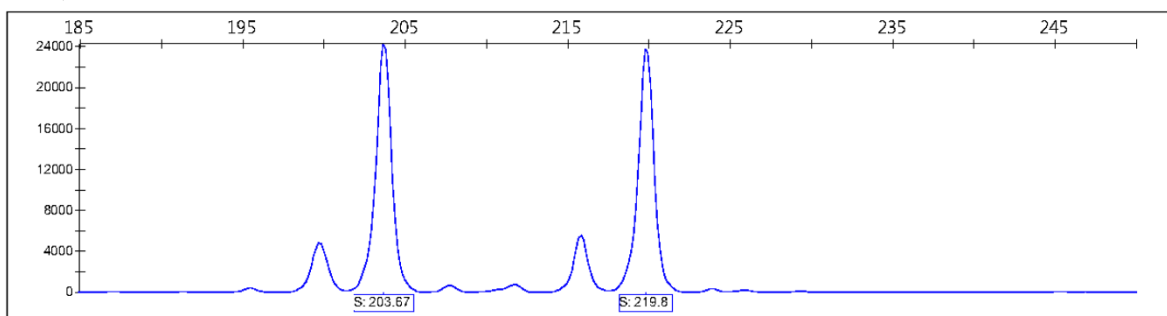
204, 212



204, 216



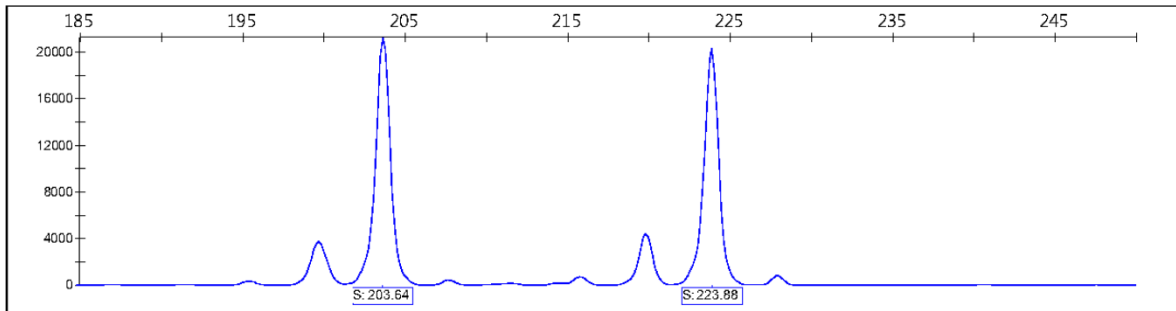
204, 220



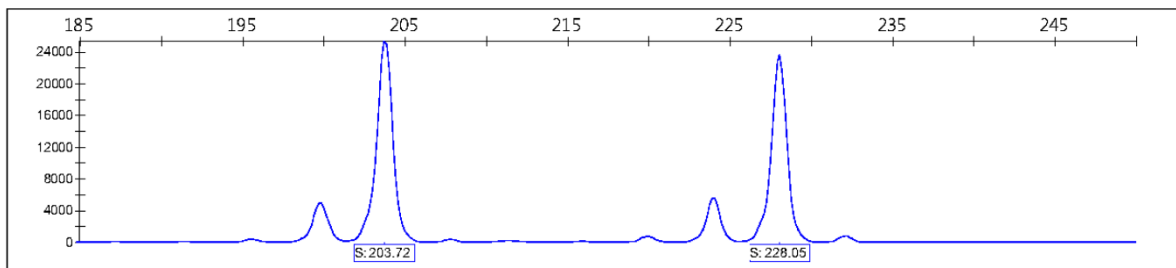
附錄 4 (續)、自 2010 年 10 月至隔年 2 月於玉山國家公園大分地區偵測到的 8 組微衛星基因座的基因型之標準波形圖。

UT35 (續)

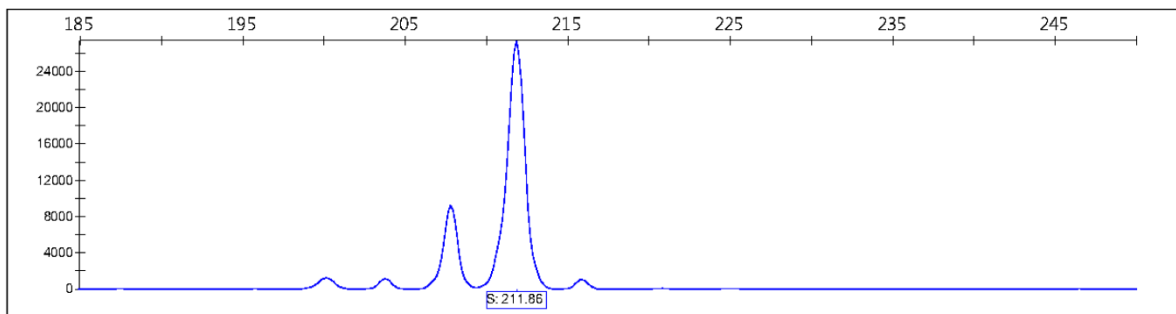
204, 224



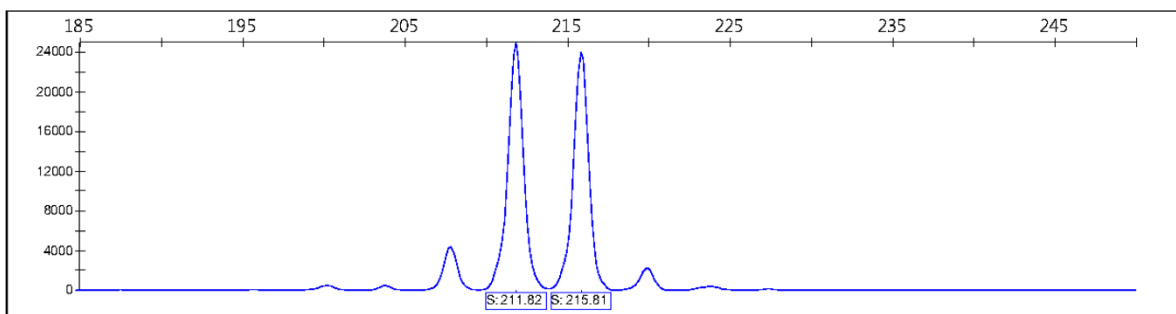
204, 228



212, 212



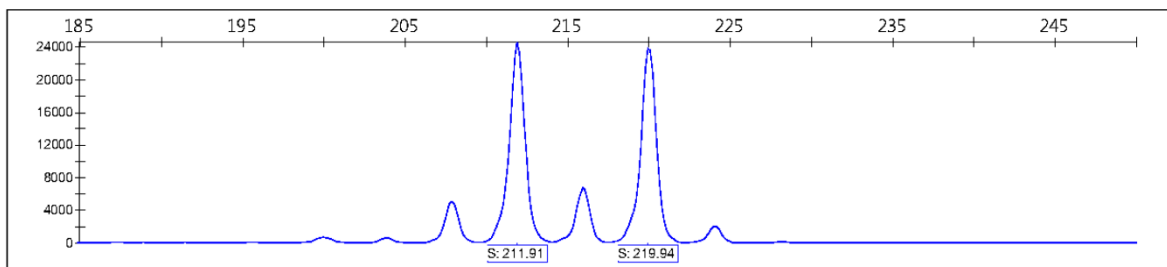
212, 216



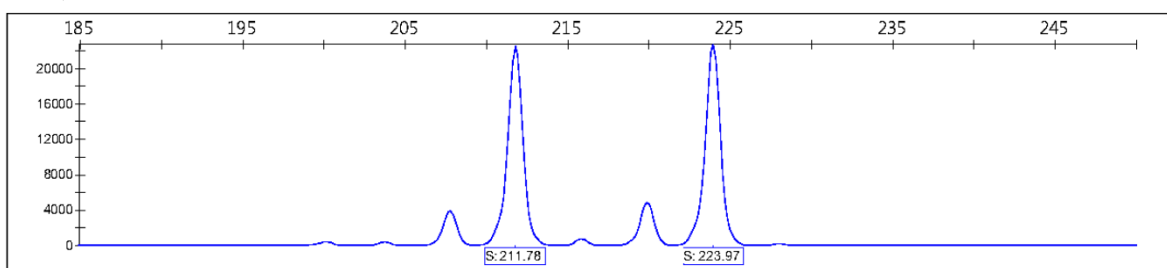
附錄 4 (續)、自 2010 年 10 月至隔年 2 月於玉山國家公園大分地區偵測到的 8 組微衛星基因座的基因型之標準波形圖。

UT35 (續)

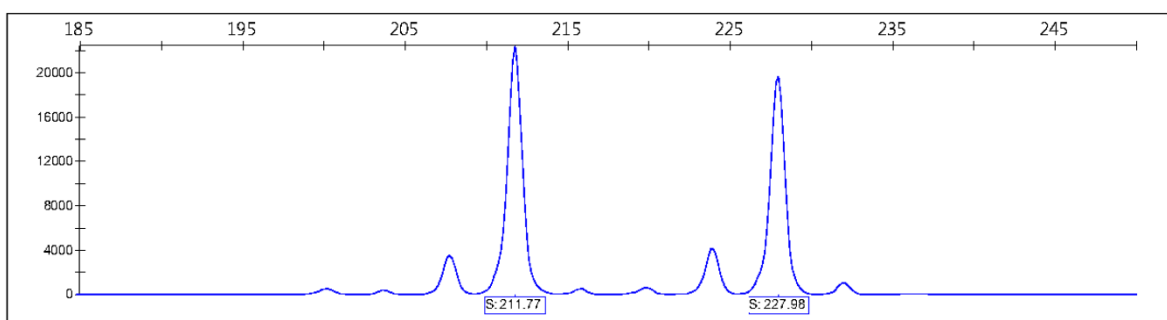
212, 220



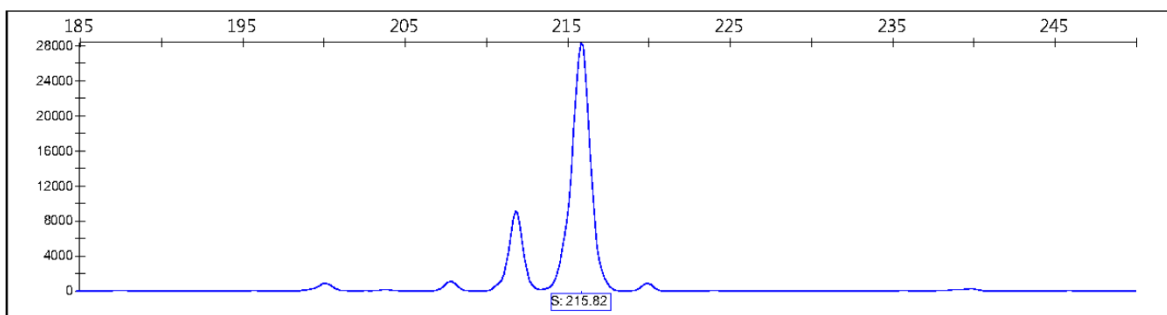
212, 224



212, 228



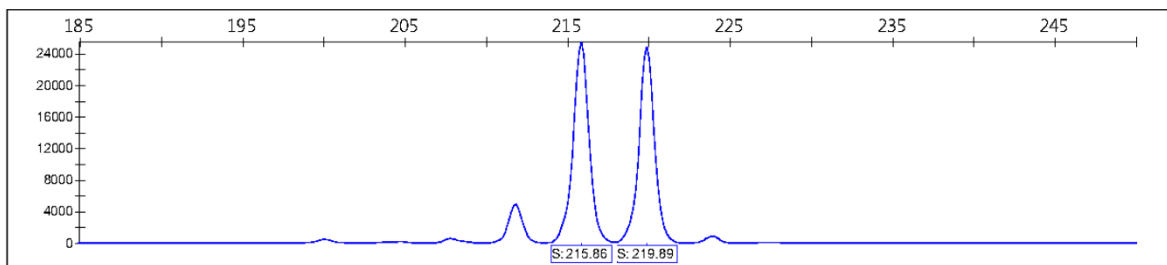
216, 216



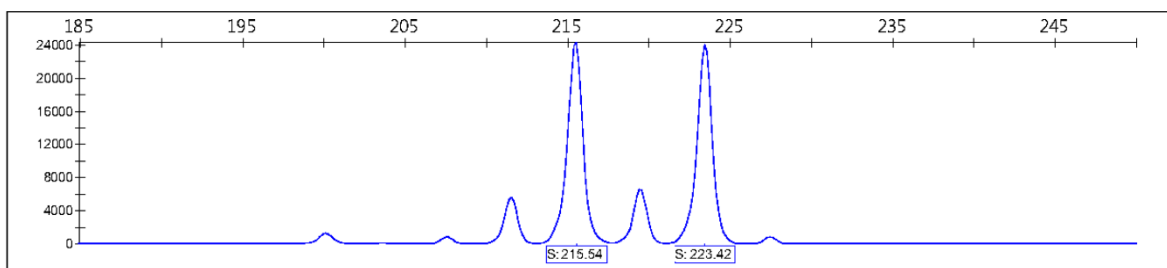
附錄 4 (續)、自 2010 年 10 月至隔年 2 月於玉山國家公園大分地區偵測到的 8 組微衛星基因座的基因型之標準波形圖。

UT35 (續)

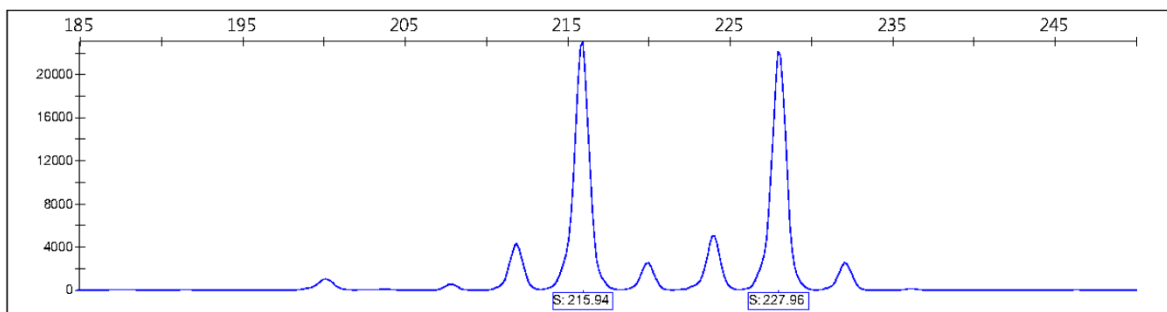
216, 220



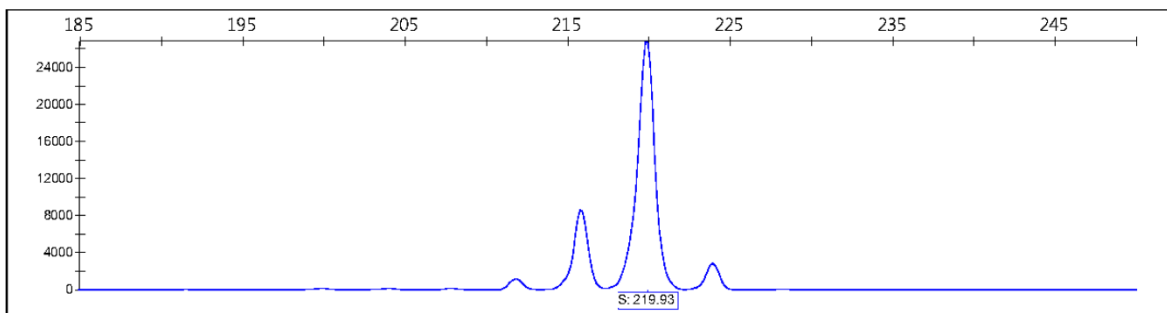
216, 224



216, 228



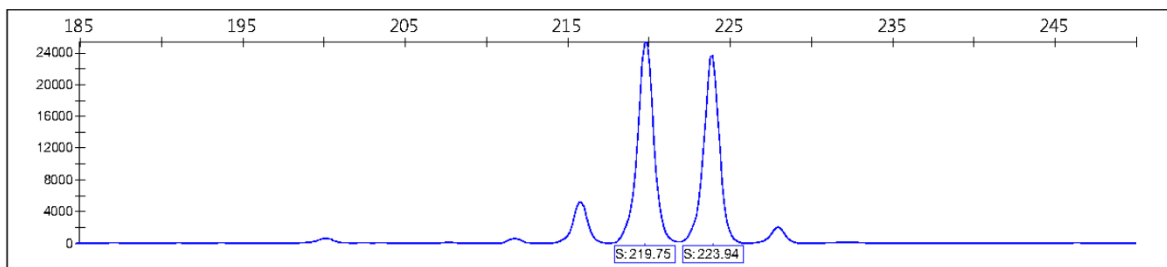
220, 220



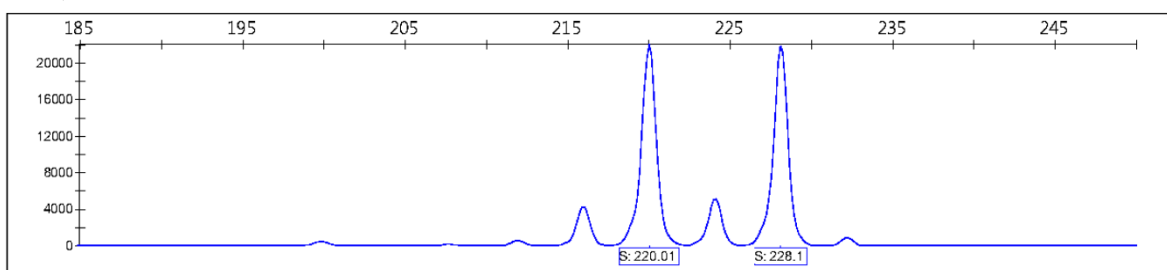
附錄 4 (續)、自 2010 年 10 月至隔年 2 月於玉山國家公園大分地區偵測到的 8 組微衛星基因座的基因型之標準波形圖。

UT35 (續)

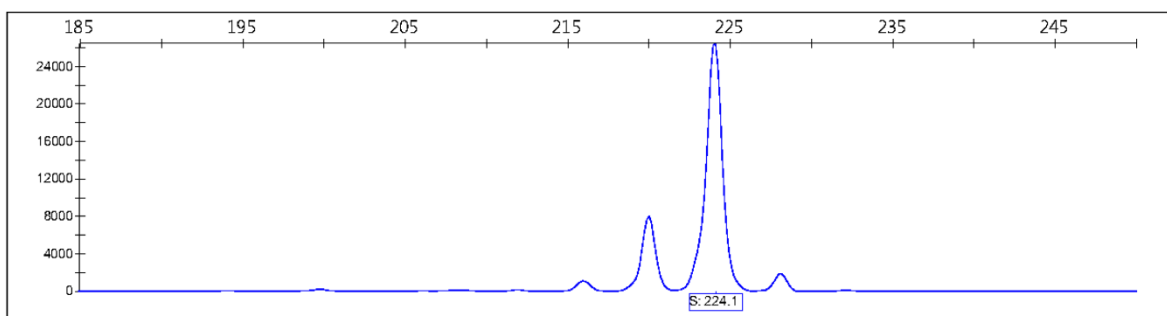
220, 224



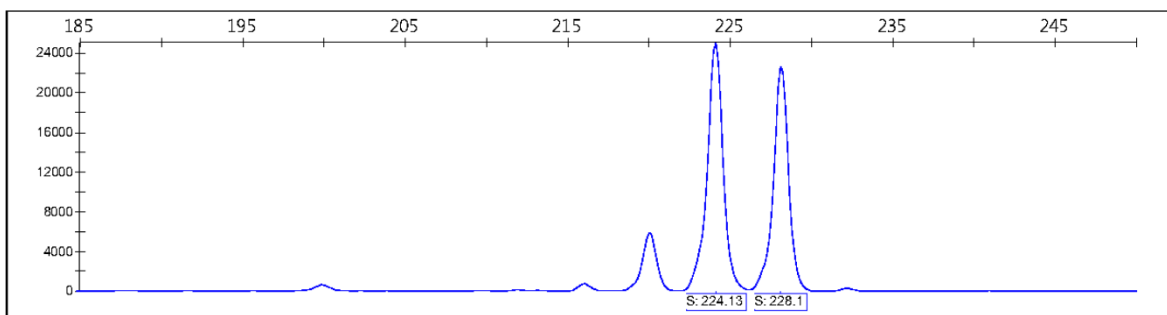
220, 228



224, 224



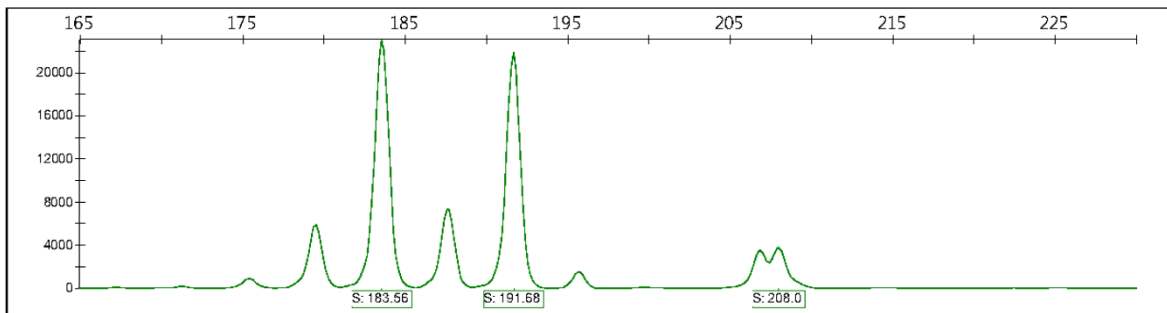
224, 228



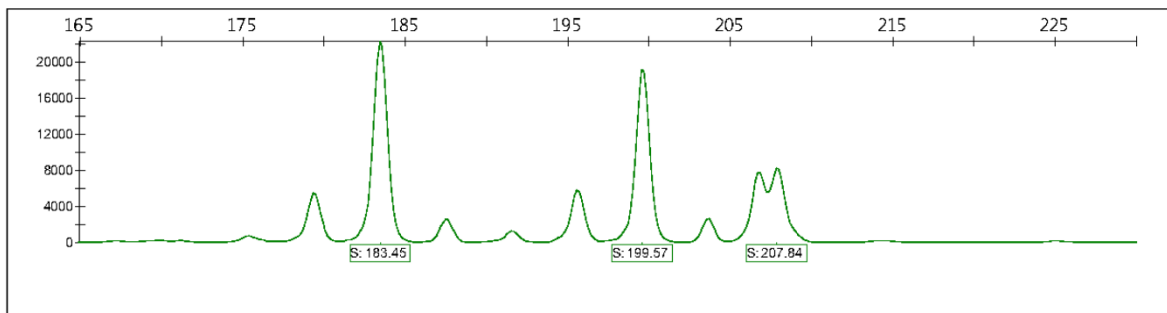
附錄 4 (續)、自 2010 年 10 月至隔年 2 月於玉山國家公園大分地區偵測到的 8 組微衛星基因座的基因型之標準波形圖。

UT38

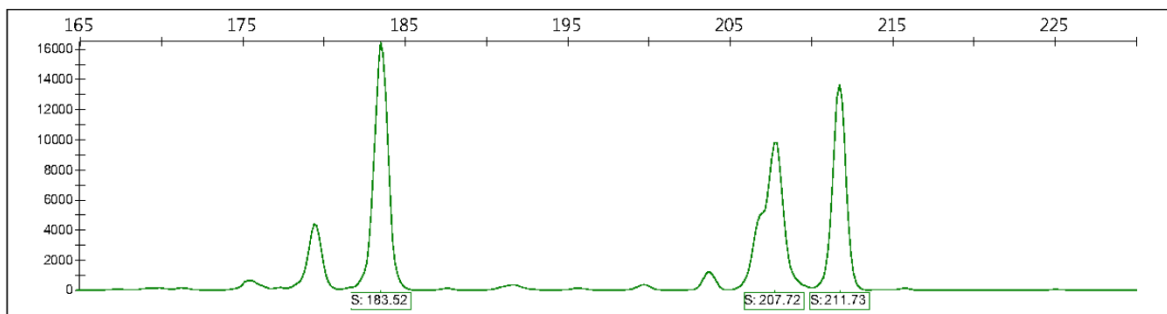
183, 191



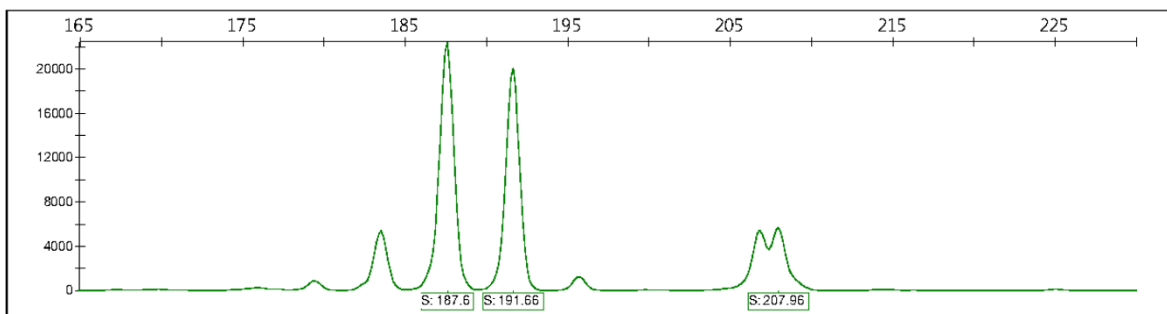
183, 199



183, 211



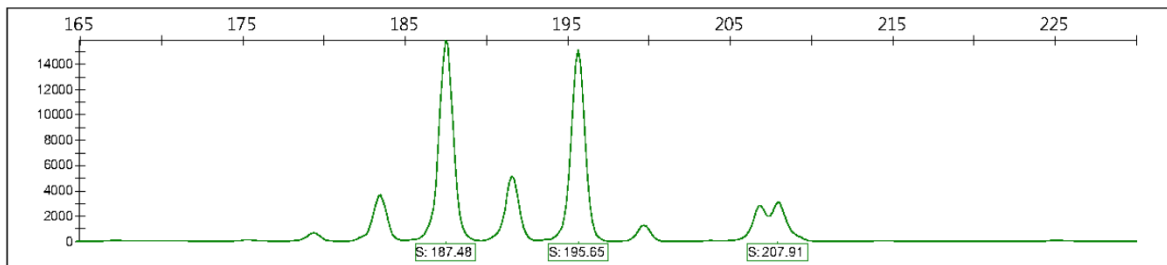
187, 191



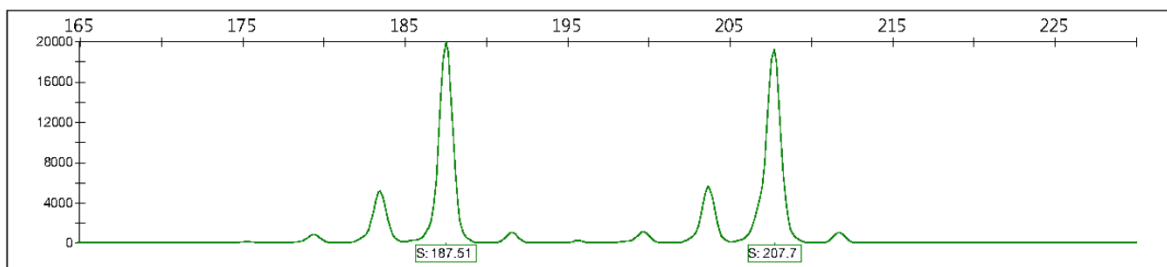
附錄 4 (續)、自 2010 年 10 月至隔年 2 月於玉山國家公園大分地區偵測到的 8 組微衛星基因座的基因型之標準波形圖。

UT38 (續)

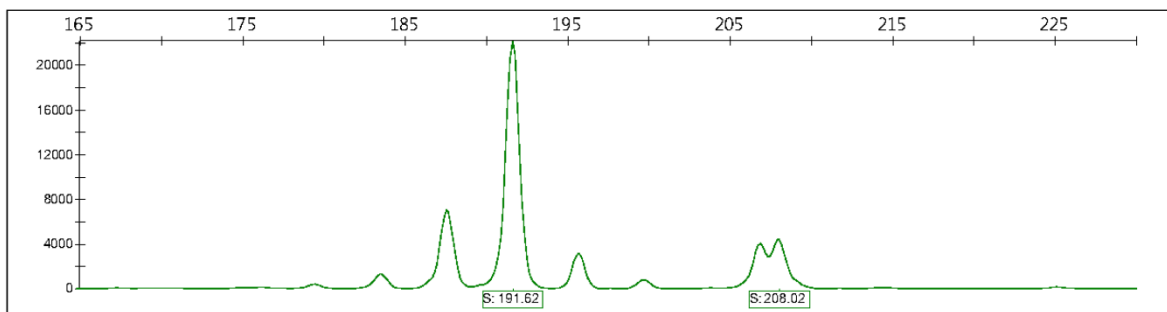
187, 195



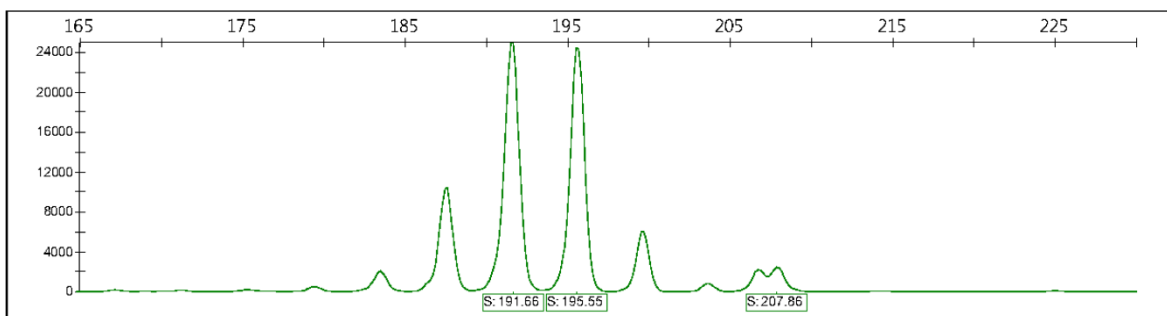
187, 207



191, 191



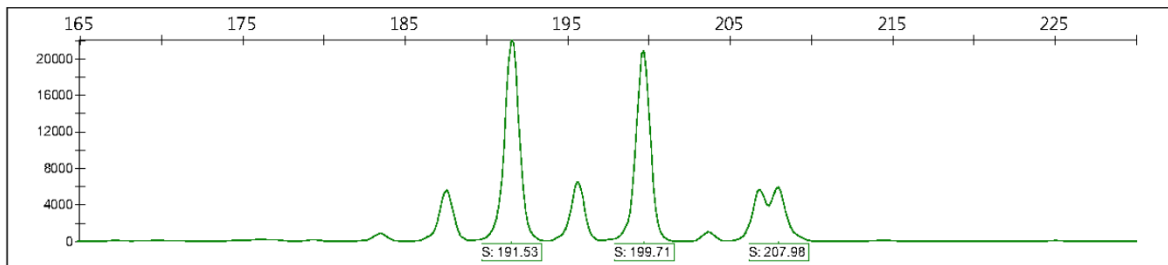
191, 195



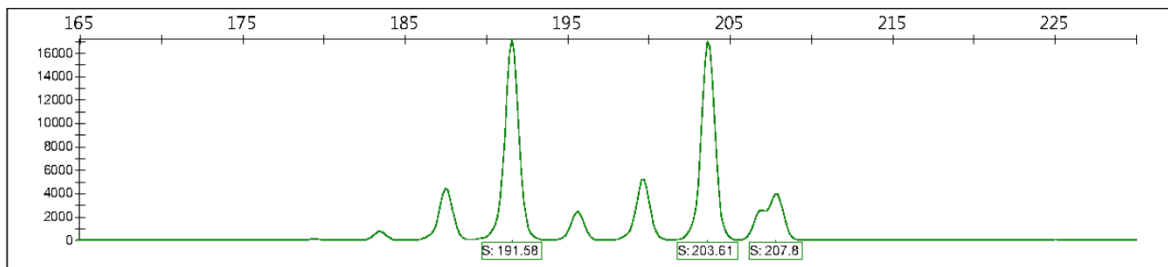
附錄 4 (續)、自 2010 年 10 月至隔年 2 月於玉山國家公園大分地區偵測到的 8 組微衛星基因座的基因型之標準波形圖。

UT38 (續)

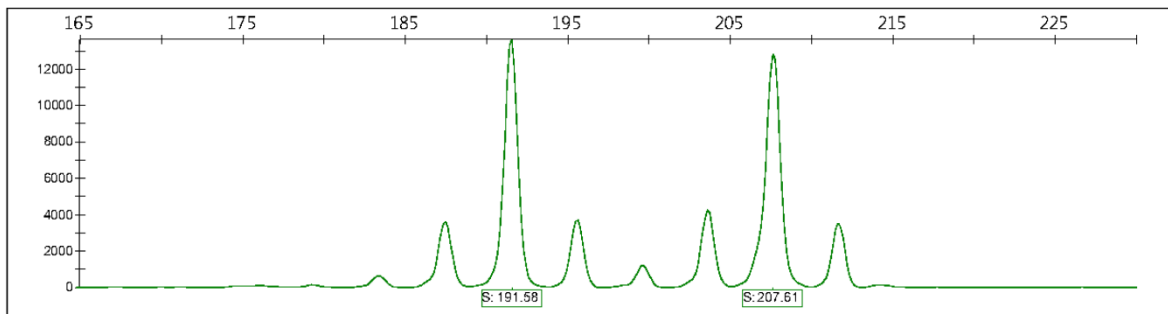
191, 199



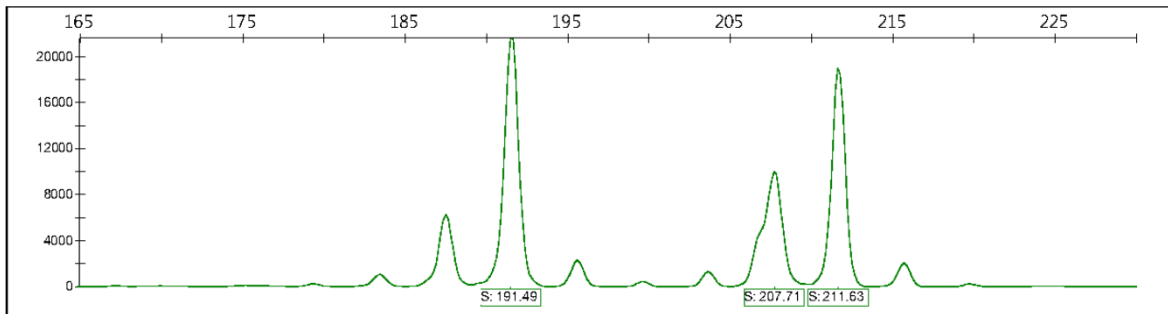
191, 203



191, 207



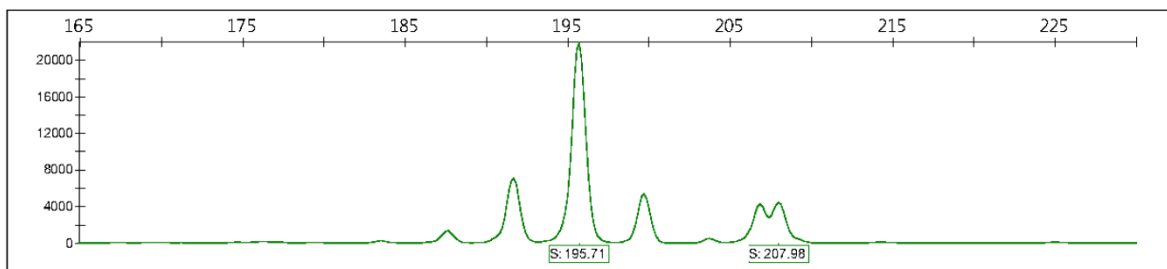
191, 211



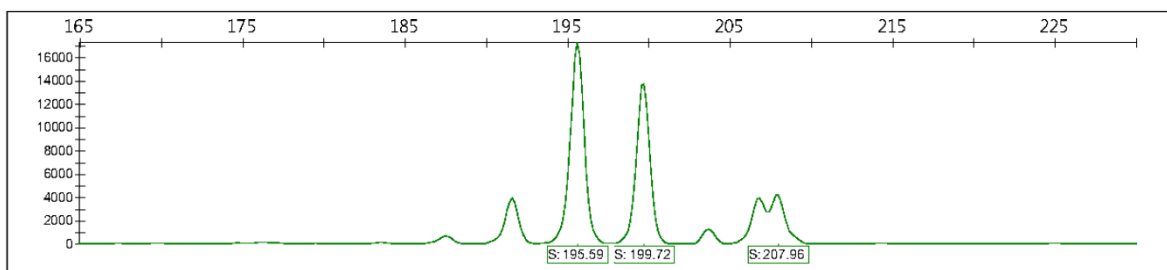
附錄 4 (續)、自 2010 年 10 月至隔年 2 月於玉山國家公園大分地區偵測到的 8 組微衛星基因座的基因型之標準波形圖。

UT38 (續)

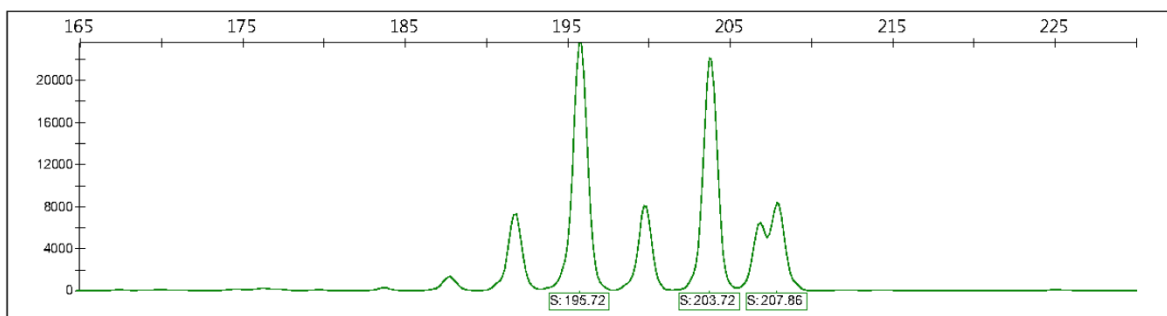
195, 195



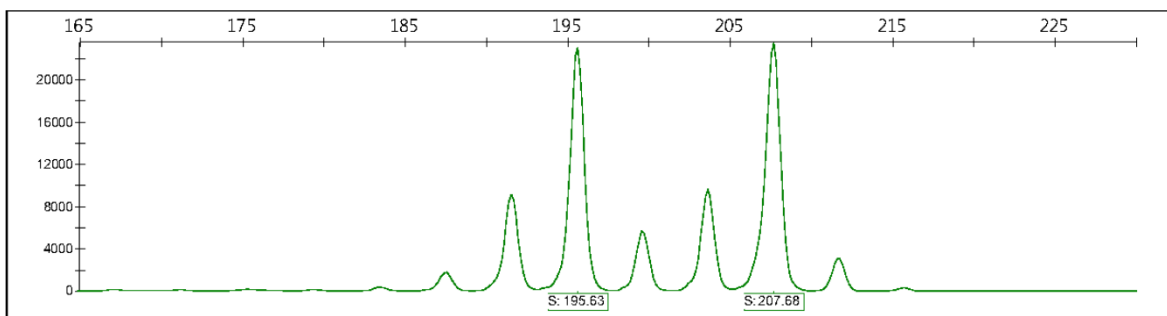
195, 199



195, 203



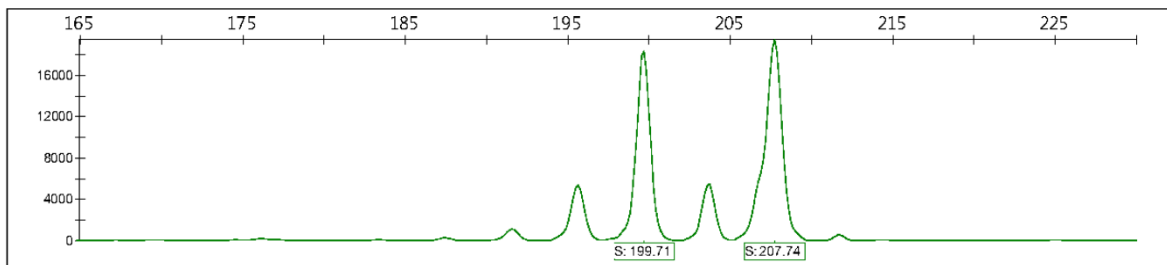
195, 207



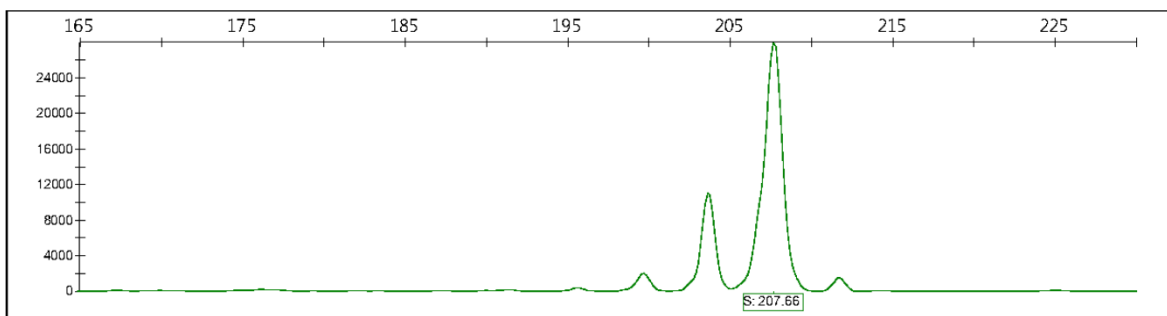
附錄 4 (續)、自 2010 年 10 月至隔年 2 月於玉山國家公園大分地區偵測到的 8 組微衛星基因座的基因型之標準波形圖。

UT38 (續)

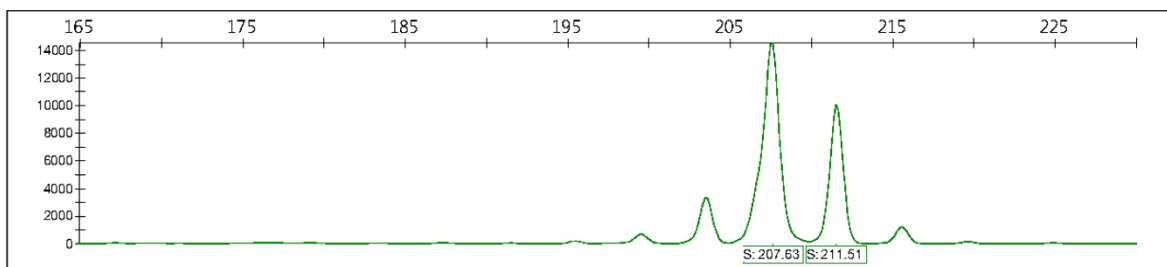
199, 207



207, 207



207, 211



作者簡介

姓名：陳昇衛 (Shengwei Chen)

性別：男

電子信箱：moth1024@gmail.com

學歷：中山醫學大學 生物醫學科學學系

國立屏東科技大學 野生動物保育研究所

