

『代表性生態系經營管理-
合歡山高海拔生態系長期生態研究計畫(二)
-太魯閣國家公園鳥類遺傳多樣性調查』

受委託者：國立台灣師範大學

研究主持人：李壽先

研究助理：葉佳芬

太魯閣家公園委託辦理報告

中華民國 99 年 12 月

目次

目次.....	I
表次.....	IV
圖次.....	V
摘要.....	VI
第一章 緒論	1
第一節 研究緣起與背景	1
第二節 計畫目標.....	4
第二章 研究方法及過程	5
第一節、高海拔地區台灣特有種鳥類—栗背林鴿組織樣本的收集	5
第二節、基因遺傳多樣性標記的建立	6
第三節、資料分析.....	13
第三章 結果	19
第一節 個體繫放及血液樣的採集	19
第二節 栗背林鴿粒線體細胞色素b基因及微衛星體基因座的遺 傳多樣性分析.....	20
第三節 栗背林鴿歷史族群數量改變分析	23
第四章 討論與結論	27

第一節 討論.....	27
第二節 結論.....	33
第五章 主要建議事項	35
致謝.....	37
附錄一 本計畫參與期間於野外繫放所採集鳥種數.....	49
附錄二 5 組--Tcy9(a)、TG11-011(b)、Titgata02(c)、GC-GATA15(d)、 Pwgata4(e) 微衛星基因典型頻譜圖.....	52
附錄三 5 組微衛星基因Tcy9(a)、TG11-011(b)、Titgata02(c)、 GC-GATA15(d)、Pwgata4(e)之對偶基因頻率(allele frequency)圖	53
附錄四 5 組微衛星基因進行親子鑑定的排除沒有血親關係父母的機 率	56
附錄五 太魯閣國家公園管理處 99 年度委託研究計畫「代表性生態系 經營管理之合歡山高海拔生態系長期生態研究網計畫(二)－太魯 閣國家公園鳥類遺傳多樣性調查」期中簡報會議紀錄	57
結論：本期中簡報審查通過，准予備查。請受託單位依合約規定備妥 相關資料請領第二期款。	58
附錄六 太魯閣國家公園管理處 99 年度委託研究計畫「代表性生態系 經營管理之合歡山高海拔生態系長期生態研究網計畫(二)－太魯 閣國家公園鳥類遺傳多樣性調查」期末簡報會議紀錄	59

相關參考文獻61

表次

表 1. 454 定序結果含有微衛星體基因重覆片段之序列	38
表 2. 栗背林鴿部分粒線體細胞色素 b 序列(1070bp)遺傳多樣性分析。單套型個數(h)；單套型多樣性指數(hd)；核苷酸多樣性指數(π)及 Fu and Li's D* 檢測及 Tajima's D 檢測	39
表 3. 9 組 (Tcy9、TG11-011、Titgata02、GC-GATA15、PwGATA4、TcyII45、PMAPT 2-43、GC-GATA23) 具有多型性之微衛星基因座基礎資料之引子序列、每組基因對偶基因數(k)、樣本數(N)、異型合子歧異度觀察值(H_{Obs})、異型合子歧異度預期值(H_{Exp})及哈溫平衡檢測 P 值 (*表顯著性)	40
表 4. 本計畫分析所用之 5 組(Tcy9、TG11-011、Titgata02、GC-GATA15、PwGATA4)微衛星基因任兩組微衛星體基因座間有基因連鎖現象檢測，Bonferroni 校正 type I error 的臨界值($\alpha=0.005$)。	41
表 5. 栗背林鴿瓶頸效應事件檢測，樣本數(N)、對偶基因數(K)、異型合子歧異度觀察值(H_{Obs})及在 IAM 突變模式下檢測突變-漂變平衡(mutation-drift equilibrium, H_{eq})。顯著值(p 值)檢測採用 one-tail Wilcoxon test。	42

圖次

- 圖 1. 栗背林鴿樣本採集點43
- 圖 2. 栗背林鴿族群大小變動檢測之 mismatch distribution 測試，藍色柱狀圖表示粒線體細胞色素 b 兩兩序列比較差異觀測值 (observed frequency of pairwise differences)，紅線表示預期狀況下的族群擴張模式模擬分布圖。44
- 圖 3. 檢測栗背林鴿粒線體細胞色素 b 基因歷史族群變動事件之貝氏天際線圖。X 軸表示多少單位年以前的時間(unit of years ago)，主要依據 1×10^{-8} 的每個位點/每年/鹼基置換速率(substitutions rate per site per year)換算而成，Y 軸表示有效族群數量及世代長度。中間黑色實線表示貝氏天際線的估計值，上下兩條灰線表示上下 95%信賴區間。45
- 圖 4. LAMARC 貝氏分析單倍體基因(haploid)粒線體細胞色素 b 基因的序列分析栗背林鴿歷史有效族群數量 Θ (theta)46
- 圖 5. LAMARC 貝氏分析單倍體基因(haploid)粒線體細胞色素 b 基因的序列分析栗背林鴿歷史有效族群成長速率參數 g.....47
- 圖 6. 栗背林鴿於台灣高海拔分佈範圍48

摘要

關鍵詞：栗背林鴿、歷史族群、高海拔、冰河、氣候變化

族群數量如何隨著時間及環境氣候因子變化產生變動，是生態學，演化學及保育生物學上的重要課題之一。陸域生態系的生物可能受溫溼度等氣候因子的更動，促使生物因適應新的變化，在族群數量上產生變化；例如最後一次冰河期結束至今的氣候暖化，導致大多數物種的族群數量增加及分布範圍擴張的現象。近年來，全球暖化對高海拔生物的數量及分布所造成的衝擊，備受全球關注，但卻少有資料探討最後一次冰河期結束至今，長期氣候變遷過程中物種數量的改變趨勢。本計畫採用現今普遍分布於台灣高海拔地區的鳥類—栗背林鴿 (*Luscinia johnstoniae*) 作為模式，透過栗背林鴿的粒線體細胞色素b基因及微衛星體基因變異，依群遺傳理論建構栗背林鴿族群歷史族群數量變動趨勢，其中粒線體細胞色素b基因序列以錯位分布 (mismatch distribution) 分析的結果與族群擴張模式的預期分布相吻合；而貝氏天際線 (Bayesian skyline plot) 分析則顯示，從過去14500年至今栗背林鴿歷史族群變動具有微幅族群擴張現象，而依據所有粒線體細胞色素b基因序列到其最近共祖時間 (time to the most recent common ancestor, TMRCA)，我們推估栗背林鴿長期歷史有效族群數量約為17萬，其結果與LAMARC貝氏祖族群成長分析的結果相似，LAMARC

貝氏分析同時顯示在歷史上族群具正成長的趨勢 ($g = 829.24$)；另利用微衛星體基因座估測栗背林鴿是否承受瓶頸效應事件的結果亦顯示，栗背林鴿族群數量並未經歷瓶頸效應事件。綜合以上，本計畫各項分析結果皆顯示栗背林鴿歷史族群雖有族群擴張現象，至今族群數量的變動相對穩定，此結果亦能作為目前認為因人類活動導致全球暖化問題，其是否導致高海拔生物族群大小的改變的一個監測基準值。

第一章 緒論

第一節 研究緣起與背景

為因應全球暖化及環境變遷等趨勢，暨爭取太魯閣國家公園加入世界遺產，提升國家國際地位等目的，藉由長期生態研究及群體整合型研究，調查釐清衝擊對象與程度，期共同保護台灣珍貴稀有物種遺產等，爰辦理「代表性生態系經營管理」等計畫。

太魯閣國家公園面積涵蓋 9200 公頃，海拔高度相差超過 3000 公尺，園區內包含了多種棲地類型。中橫公路貫穿其間，也使各區域受到不同程度的人類利用。近年來有些地區已停止農耕活動。這些區域都提供探討區內天然及人為等各種棲地類型對生物影響的適合場域。但全球氣候變遷的情況下，在台灣高山特有物種的影響可能比平地更大，在溫度不斷上升的趨勢下，高山生態系特有動、植物的海拔分布範圍將日漸上移，進而影響特定物種族群數量的改變。因此，藉由長期生態研究探討釐清氣候變遷衝擊台灣對特有物種族群數量及分布的影響相當重要，但除了近期環境變遷所造成的影響，高海拔生物的分布及數量也受到長期氣候變遷的影響，例如自上次冰期在一萬八千年前結束後，氣候逐漸變，也使得適應較低溫度的生物逐漸向高海拔分布，但由於缺乏化石資料，我們無從了解，這些高海拔生物在這個過程中，數量變化的幅度有多大；但是近年來族群遺傳理論及分析技術的進步，使得我們有可能從現生族群的遺傳多樣性重新建構生物族群數量上的歷史性變動趨勢，這將有助於我們了解此外並可藉由分析可能影響園區內生物遺傳多樣性的因子。藉由了解鳥類在生物多

樣性形成過程中扮演的角色，可有助於太魯閣國家公園生態系經營計畫之擬訂。

台灣是個擁有高山的大陸性島嶼，具有超過 200 座海拔高於 3000 公尺以上的山峰，若將 4000 公尺分為三等分，一般稱海拔 2600 公尺以上區域為高海拔山區，是中海拔雲霧林帶針闊葉混合林的上層。高海拔山區主要的植被類型為針葉林，種類包括台灣鐵杉林、台灣雲杉林、台灣冷杉林、圓柏灌叢林、岩碎地高山植物區、玉山箭竹、高山芒、台灣二葉松林等，大都為單一純林的優勢種。一般認為生物的數量和活躍性因氣候、植被及地形等因素，物種多樣性的趨勢大致隨海拔增加，多樣性呈現逐漸下降的趨勢。對高海拔生物種而言，其適應高海拔環境的低溫、低氧氣濃度及高輻射相對嚴苛的環境，更易受氣候變遷影響，使其族群分布或族群結構產生改變；因此，藉由探討台灣高山特有物種歷史族群數量的變動，可得知因長期歷史性環境或氣候變異，影響台灣特有物種族群結構或族群數量的改變情況，而此將提供長期生態研究或保育課題一良好的背景資料。

族群數量會隨著時間及環境氣候因子的變化產生變動，此種波動是生態及演化生物學或保育生物學中一個重要課題。陸域生態系統的組成主要由氣候塑造形成，氣候的變化可能影響個體生理、形態或行為上的改變，且氣候的變異更促使了生態系各族群的出生率、死亡率、

移入率、遷出率等族群變動結構上有所變化，使生物族群量增加或減少，族群數量、族群結構改變，並影響了生物物種的空間分布。前人研究顯示降雨量或溫度變異等氣候變化，會使可供給的食物量發生變化，物種適合繁殖時間或築巢地點改變，影響物種生存或繁殖成功，進而影響族群的數量密度(Sæther 2004)。

對鳥類而言，氣候變動在非繁殖季節 (non-breeding season) 中主要影響鳥類冬季的存活率(winter survival)。冬季是一整年當中鳥類生存最危困的時間，在冬季因可利用的食物量相對減少的情況下，使鳥類族群數量因食物減少，促使族群數量因產生密度依賴(density dependence) 調整而跟著減少 (Sæther 2004)。在繁殖季節(breeding season)中，氣候變化會影響鳥類的繁殖成功率(Leech & Crick 2007 文獻回顧)，進而影響下一年族群的補充率(recruitment rate)，使得族群數量產生改變。另因鳥類的飛行能力，而被認為是有較佳擴張能力的生物；當鳥類進入一個新的環境中，因適應當地特殊的環境所產生的選汰壓力，在行為或生理上可能會產生與原分布範圍族群相異的一些變化。例如在高海拔地區的蜂鳥，為適應山區夜間寒冷的氣候，而發展出蟄伏 (torpor) 的行為，藉著降低體溫，減少夜間熱量消失，而得以在寒冷的山區存活 (Evans & Heiser 2004)，山區鳥類為了因應溫度變化的影響，有些種類會有降遷 (altitudinal migration) 行為，即在冬季會移動到海拔較低的地區度冬，待春季回暖後再回到較高海拔地區。在台灣，有許多於山區活動的鳥類也都有降遷的行為，其中也包含了栗背林鴿 (許 2003)，經調查顯示栗背林鴿於冬季時可能降遷到中、高海拔交接之霧林帶。對於分佈於高海拔地區的鳥類族群而言，高海拔山區其低溫、低氧的環境，應與居住於較低海拔環境族群

面臨極為不同的選汰壓力。另一方面由於高海拔棲地面積較為局限，使其族群數量更易因氣候或其他外在環境因子變動而產生更快速的變化。如，全球氣候變遷對高山特有的動、植物海拔分佈範圍改變(例如其最低海拔下限向上移動)、可驅使特定物種的族群數量減少甚或滅絕 (Sekercioglu 2008)。另外，由於高山生物群聚的組成要比中、低海拔群聚簡單，因此當某一生物族群數量的變動，可能會嚴重影響高海拔物種群聚的組成 (Pounds *et al.*, 1999)，故討論台灣特有物種數量的變化，了解此物種過去到現在族群數量的變動，未來將是生物保育和棲地經營管理決策中相當重要的基礎資料，並可協助設立相對適用的保育政策。

第二節 計畫目標

本計畫利用台灣高海拔特有鳥類物種栗背林鴿為例，透過栗背林鴿遺傳多樣性之遺傳標記的建立，建構栗背林鴿現今遺傳多樣性資料，並探討其歷史族群數量變動狀況，對照全球最近一次冰河消退時間，推測其族群數量的變化與長期氣候變遷間的相關性，以了解氣候變遷對台灣特有種鳥類族群數量的影響。此研究結果將對台灣特有物種的分布成因，以及因氣候變異可能產生的數量變化，提供一可靠資訊，並可作為因應全球暖化及生物物種族群結構、數量改變問題做長期監測之基準值，並對生態系經營管理提出建議。

第二章 研究方法及過程

第一節、高海拔地區台灣特有種鳥類—栗背林鴿組織樣本的 收集

1. 個體的繫放及血液樣的採集

本計畫於採集證申請通過後開始進行目標鳥種—栗背林鴿的血樣採集及標放，另在研究期間為避免捕捉到過多的幼鳥或亞成鳥，避免過多具親緣關係的基因遺傳數據使推估數據產生偏差 (bias)，因此，樣本採集從 2010 年 3 月始至 8 月底，大概為繁殖季鳥類繁殖期間，在申請許可的採集數量及範圍內以霧網進行鳥類繫放，捕捉到的個體分別(1)記錄捕獲日期和 GPS 地點座標；(2)在跗蹠骨套上有編號的金屬環；(3)於腋下靜脈採集約 20ul 的血液，或採集些許初增生羽毛管，置於 800ul 的 100% 酒精中，並攜回實驗室凍於 -80°C 冷凍庫得以長久保存，供後續 DNA 萃取與遺傳分析用。完成下列操作的個體立即於原地野放。若繫放過程中捕獲其他未申請之保育類鳥種，則即刻野放，不進行任何操作。

2. 個體 DNA 萃取

首先利用蛋白分解酶 (Proteinase K) 水解細胞膜及蛋白質後，再利用 LiCl/ chloroform 使蛋白質變性 (denature) 且溶解於有機

層中，後再利用酒精沉澱使 DNA 沉澱出來，同時將殘留的 LiCl / chloroform 或其他鹽類溶在酒精中後將其丟棄，而純化出的 DNA 可加入純水 (ddH₂O) 再溶解，並保存於-20°C 冷凍庫(Gemmell & Akiyama, 1996)。

第二節、基因遺傳多樣性標記的建立

1. 粒線體細胞色素 b (cytochrome b) 基因的建立

在本實驗室早期研究鳥類粒線體細胞色素 b 序列之引子中(未發表)，經過多次篩選，選擇可順利擴增栗背林鴿序列之引子如下為本計畫所用。

NDL : 5'-TAGGATCTTTCGCCCTATC-3'

H1006 : 5'-TTGTTTGATCCTGTTTCGTG-3'

cytb 332F- 5'-AGAAACCTGAAACGTCGGAG-3'

Thr 30R- 5'-CAAGACCAATGTTTTTCATAAACTAT-3'

利用聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction; PCR) 擴增粒線體DNA 細胞色素b 1143 bp。PCR 的反應體積為12.5μL，包含濃度0.25μM 的一對引子，以及0.5mM dNTP, 10mM Tris-HCl, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.4U Taq DNA 聚合酶(Amersham Biosciences)，反應條件如下：

95°C: 2分鐘

95°C: 30秒

55°C: 40秒

72°C: 1分鐘

進行45個循環

最後在72°C下使產物繼續延長工作7分鐘

PCR 產物接著以 ABI 3130xl 自動定序儀(APPLIED BIOSYSTEMS) 進行雙向毛細管電泳定序反應，所得序列利用軟體 SEQUENCHER4.7 (Gene Codes) 以目視法進行序列校對與合併(alignment)。

2. 微衛星體基因 (microsatellite) 的建立

(1) 本研究擬以核 DNA 中微衛星體基因座為遺傳標記，建立台灣特有種鳥類—栗背林鴿的遺傳多樣性資料庫。微衛星體基因座是以 2-10 個鹼基為單元，重複出現的 DNA 片段，廣泛分布於真核生物的細胞核中(Tautz 1993)，為近年來在族群遺傳研究中廣被使用的一種遺傳標記。由於微衛星基因座的突變速率快，在族群內變異高，且遺傳形式為共顯性遺傳，因此非常適合用來作為個體鑑定、親子鑑定、親屬關係、族群分化及族群數量估算等研

究的遺傳標記（例如：Hsu 2003；Huang 2007）。但在使用微衛星體基因座進行研究的最大限制之一是跨種應用的可行性低，較無法借用自其他物種篩選出的微衛星體基因座，因此在研究之初，必須針對研究的物種進行分子選殖（molecular cloning），篩選適用於特定物種的微衛星體基因座以利實驗進行。

研究方法

a. DNA 萃取

個體的 DNA 萃取同上述描述。

b. 微衛星體基因座之開發

b-1. 微衛星體(microsatellite)基因座的增殖

參照Hsu *et al.* (2003)微衛星體基因作篩選之方法

b-1-1 在DNA萃取後使用限制酶(restriction enzyme)酵素

HaeIII, *RsaI*,及*AluI*將DNA分子切成長度約200-600鹼基對 (base pair ,bp)且斷面平滑(blunt end)的小片段。

b-1-2 接著加入 Shrimp Alkaline Phosphatase (Amersham

Biosciences)，去除DNA 5'端的磷酸根，避免DNA片段的再度接合，後加入SNX連接子(SNX linker，長度約 20bp的已知序列)使接上各被限制酶切斷的DNA片段。

b-1-3 聚合酵素鏈鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)增

幅上述接有SNX linker的DNA片段，在每管50 μ L的聚合酶鏈反應液中包含50 ng DNA，與SNX linker 序列互補的引子(primer)各0.2 μ M，dNTP 0.5mM，1x PCR 緩沖液(10mM Tris-HCl, PH 9.0, 50mM KCl)，1.5mM MgCl₂及0.4 U *Taq* DNA聚合酶(GE Biosciences)，將混合好的聚合酶鏈反應液以聚合酶鏈反應機器(iCycler Thermal Cycler，Bio-Rad)進行增幅，增幅的反應溫度：95 $^{\circ}$ C反應5分鐘後，另外在95 $^{\circ}$ C反應1分鐘，55 $^{\circ}$ C反應1分鐘，70 $^{\circ}$ C反應2分鐘下進行30次的循環反應，在70 $^{\circ}$ C下另反應5分鐘。

b-1-4 利用帶有 (CAG)₁₀、(AAAG)₁₀重覆序列的生物素寡核酸(oligonucleotide)探針，與上述反應中的DNA片段雜合(hybridization)，這些單股的(CAG)₁₀、(AAAG)₁₀片段會藉由氫鍵與含有微衛星體基因座的DNA片段結合成雙股結構，再以外覆卵白素 (streptavidin)的磁珠Dynabeads MyOne (Dyna[®])和生物素產生鍵結，使緊抓住此雙股結構，再以磁力吸附此帶有微衛星體基因座的DNA片段，並且與其餘不含微衛星體基因座的DNA片段分離，之後利用95 $^{\circ}$ C的高溫將含有微衛星的DNA與單股的(CAG)₁₀、(AAAG)₁₀片段分離，以回收含有微衛星體的

DNA 片段。此步驟為增頻(enrichment)，目的在增加後續實驗操作中，實際帶有微衛星體之DNA片段的比例。

b-1-5 再一次利用聚合酵素鏈鎖反應增幅回收的片段(反應液及反應時間同上述)，最後將這些片段送至Roche 454 GS-FLX系統作定序反應。

c. Roche 454 GS-FLX System/焦磷酸定序

c-1-1 羅氏454定序儀是454生命科學這家生技公司於2005年發表的新一代定序機器，其歸屬於羅氏藥廠診斷(Roche Diagnostics)分部。以一種新方法-焦磷酸定序方法為定序基礎，可在4小時中定出 2.5×10^7 base，大約是傳統方法的100倍。另外2008年10月釋出的GS-FLX平台將可產出100萬條且每條長度約400bp的片段，而利用此新定序方法將有效減少因細菌轉殖增生(cloning)失敗的風險，及因細菌轉殖增生技術之養菌、挑菌等所需的人力、時間以及金錢。

c-1-2 焦磷酸定序(Pyrosequencing)是一種利用生物發光蛋白質，如螢火蟲的螢光素(luciferase)，來偵測核酸連接在引子序列後所釋放的焦磷酸團(pyrophosphate, PPi)，主要利用幾種生化反應的組合來測定在DNA合成過程中會產生的焦磷酸團特徵，進而將PPi轉換成ATP，ATP再

促使螢光素酶(luciferase)放出冷光(bioluminescenc)，此放出的冷光強度經冷光儀(luminometer)偵測後，轉讀成 DNA 序列。有別於 Sanger 定序方法，包括無須利用電泳進行 DNA 的序列分析，DNA 片段不必事先的螢光標記，且分析時不再局限於 96 孔盤內進行，因此可同時進行多檢體序列分析。另因反應特性的限制，無法精準讀序長片段序列(相較於 Sanger 定序方法)，但此限制目前已可經由生物資訊分析方法將各片段序列拼接起來，或者像篩選微衛星體基因本身所需片段長度便較短，大多為 400bp 以下，因此不大受此限制影響。

(2) 實驗為避免因初次使用上述篩選微衛星體基因方法得到不適用之微衛星基因座，將視研究進度需求，從已發表文獻中尋找可用的微衛星體基因座標記，如林鴿屬的藍尾鴿 (*Tarsiger cyanurus*) 微衛星體基因座 6 組(Satio *et al* 2006)，鸚嘴亞科的粉紅鸚嘴(*Paradoxornis webbianus bulomachus*)微衛星體基因座 12 組，畫眉科大陸畫眉(*Garrulax canorus*)微衛星體基因座 8 組(Huang *et al* 2004)，藪鳥(*Liocichla steerii*)微衛星體基因座 7 組(Yeung *et al* 2004)，繡眼畫眉微衛星體基因座

21 組(Lin *et al* 2009)，山雀科青背山雀(*Parus monticolus*) 微衛星體基因座 13 組 (Wang *et al* 2005；羅 論文 2007)，大山雀(*Parus major*) 衛星體基因座 6 組 (Saladin *et al.*, 2003；Lee *et al* 2009) 藍山雀(*Cyanistes caeruleus*) 衛星體基因座 1 組 (Otter *et al* 1998；Lee *et al* 2009)，鶯科大葦鶯(*Acrocephalus arundinaceus*) 衛星體基因座 1 組(Hansson *et al* 2000; Lee *et al* 2009)，梅花雀科斑馬雀(*Taeniopygia guttata*) 衛星體基因座 2 組 (Replogle *et al* 2008；Slate *et al* 2007；Lee *et al* 2009)，管舌鳥科萊桑擬管舌鳥 (*Telespiza cantans*) 衛星體基因座 1 組 (Tarr *et al* 1998；Lee *et al* 2009)，鴿科東方環頸鴿 (*Charadrius alexandrinus*) 衛星體基因座 1 組(Kupper *et al* 2007；Lee *et al* 2009)，繡眼鳥科灰胸繡眼(*Zosterops lateralis chlorocephala*) 衛星體基因座 1 組(Degnan *et al* 1999；Lee *et al* 2009)，共 80 組。進行微衛星體基因座標誌的跨種測試，首先透過聚合酶連鎖反應分別增幅上述 80 組微衛星體基因座標誌，聚合酶連鎖反應液的體積為 10uL，包含 0.2mM 的一對引子，0.5mM 的 dNTP，10mM 的 Tris-HCl，50mM KCl，0.25U 的 *Taq* DNA polymerase，聚合酶連鎖反應條件如下：

95°C: 1分鐘

95°C: 30秒

65-50°C: 40秒

72°C: 30秒

進行35次循環

最後在 72°C 下使產物繼續延長工作 2 分鐘

之後將增幅成功的聚合酶連鎖反應之產物於 MegaBACE

1000 自動定序儀(Amersham Bioscience)進行毛細管電泳，並使用

軟體 GENETIC PROFILER 2.2 (Amersham Biosciences)進行基因

型的判讀，從中選擇 PCR 擴增容易且具有多型性(polymorphism)

的微衛星體基因座進行後續栗背林鴿族群遺傳分析之用。

第三節、資料分析

1. 基因多樣性(genetic diversity)資料分析

a. 粒線體細胞色素 b 基因序列基因多樣性資料分析

經過軟體SEQUENCHER v4.7 (Gene Codes) 及目視法進行序列校對與合併(alignment)後，分別在 Dnasp 4.901 (Rozas *et al.*, 2003)及 Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier *et al* 2010)軟體進行栗背林鴿粒線體細胞色素b序列之遺傳多樣性參數的估算，包含單套型個數(h, number of haplotype)、單套型多樣性(hd, haplotype

diversity)、核苷酸多樣性(π , nucleotide diversity), 及變異點個數(S , number of polymorphic sites)。並同時進行Fu & Li (1993) D^* 檢測和Tajima (1989) D 檢測的檢定, 以檢測族群內產生的遺傳變異是否符合中性假說 (neutral hypothesis test) 預期, 而不受到天擇或族群大小變動影響。

b. 微衛星體基因遺傳多樣性資料分析

利用軟體CERVUS 3.0.3 (Marchall *et al.* 2007) 計算每個基因座對偶基因個數(number of alleles, K), 異型合子(heterozygosity)的觀測值(H_{exp})與期望值(H_{obs}), 且使用GENEPOP 3.3 (Raymond and Rousset, 1995) 檢測這些基因座的基因型頻率是否符合達成哈溫平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium) 下的預期及其中任何兩組間基因座是否有連鎖不平衡(linkage disequilibrium)現象。

2. 歷史族群數量變動的推估

a. 以粒線體細胞色素b基因序列估算栗背林鴿歷史族群數量變動

a-1. 利用 Dnasp 4.901 及 Arlequin 3.5.1.2 軟體分析栗背林鴿族群大小是否產生變化。採用錯位分布 (mismatch distribution) (Schneider & Excoffer 1999) 方法比較族群內兩兩個體核苷酸 (nucleotide) 間變異點差異數之分布, 與族群大小穩定不變的預設族群 (constant population size) 所產生的預期分布相比, 藉此推

估族群大小發生的變動。若錯位分布的分布模式為雙峰狀，表示為穩定族群，假若呈單峰狀分布則表示族群在歷史上曾經歷快速族群擴張 (population expansion)的現象 (Excoffier 2004)。

a-2. 利用 BEAST v1.6.1(Drummond & Rambaut 2003a) 軟體，依據溯祖理論 (Bayesian coalescent) 在貝氏統計推論下 (Bayesian inference)，根據粒線體細胞色素 b 基因序列提供的資訊，推估過去歷史性族群變動趨勢 (demographic history)，並估算所有粒線體細胞色素 b 基因序列的最近共同祖先時間(time to the most recent common ancestor, TMRCA)。推估 DNA 序列所使用的鹼基突變取代模式(substitution model)採用 GTR+G 模式，以 $1*10^8$ 次 MCMC (Markov chain Monte Carlo)鏈，以每 10,000 次模擬記錄一次方式，結合譜系關係(genealogy)算出的最近共祖時間，並產生貝氏天際線(Bayesian skyline plot) 的 95%信賴區間。然後以 Tracer v1.5 (Drummond & Rambaut 2003b)軟體去除(burn-in)前 10%模擬結果，再進行 BEAST 溯祖結果的檢視，而鹼基突變取代率(substitution rate)則採用雀形目(Passeriformes)鳥類粒線體細胞色素 b 基因每年(per year)/每個鹼基位(per site)的突變取代率 (substitution rate per site per year)之平均值 $1.0*10^{-8}$ 鹼基突變取代

(Klicka & Zink 1997 ; Li *et al* 2009)做為估算時間之分子鐘的校正
值。

a-3. 採用 LAMARC v2.1.2 (Beerli & Felsenstein 1999, 2001;
Kuhner 2006) 軟體以貝氏分析模擬溯祖分析族群成長狀況，以
 $\Theta = Ne\mu$ (針對線粒體基因) 為理論基礎，估算族群的有效族群數
量(Ne)。有效族群數量指在一特定時間內可經由繁殖對族群作出
貢獻的個體數量，雙倍體(diploid)的族群大小，基因在中性突變：
每年(per year)/每個鹼基位(per site)/每代(per generation)的演化速
率下，族群的有效族群數量為 $\Theta = 4Ne$ ，而粒線體基因為單倍體
的母系遺傳基因(haploid)，用其推出的有效族群數量則為
 $\Theta = Ne$ 。此外，LAMARC 軟體更加上族群成長參數(g)，以族群
大小呈現指數變動速率(exponential population growth rate)，以
 $\Theta_t = \Theta_{\text{present time}} \exp^{(-gt)}$ 推估族群變動方向，因此當族群成長參數(g)
為正值時表示族群為正向成長(population grew)，而當 g 為負值時
表族群成長為負(population shrank)。

分析採用 Bayesian priors 方式，以軟體預設值分長、短兩鏈
運算，短鏈部份以 500 代 (500 generations)、每 20 步(20 steps as
intervals)記錄一次估算值，而長鏈部分則採用 10,000 代 (10,000

generations) 、每 20 步(20 steps as intervals)記錄一次方式的 MCMC 模擬模式計算族群的有效族群數量及族群大小變動狀況。

b. 以微衛星體基因座估算栗背林鴿的瓶頸效應(bottleneck)事件

利用 BOTTLENECK v1.202 (Piry *et al* 1999)軟體，偵測栗背林鴿族群數量變動的歷史中是否發生瓶頸效應事件。探討在一特定的時間內，異型合子歧異度的擴增(heterozygosity excess)或異型合子歧異度減少(heterozygosity deficit)的現象；一般來說生物族群若沒有發生瓶頸事件，族群內基因突變應遵循 mutation-drift equilibrium 的模式，族群中異型合子歧異度的擴增(heterozygosity excess)或減少(heterozygosity deficit) 的機率應該沒有顯著差異，但假若發生瓶頸效應族群應在短時間內喪失相當程度的對偶基因(allele)，使族群的異型合子歧異度明顯減少，呈現異型合子歧異度減少(heterozygosity deficit)的現象，然而族群在一定的時間內族群大小開始回復，將因為新的突變產生，對偶基因數快速增加，大於理想或隨機變動的族群，呈現異型合子歧異度的擴增(heterozygosity excess)。因此，BOTTLENECK 軟體運算藉由比較族群異型合子歧異度觀察值(observed heterozygosity, H_{obs})與利用

溯祖(Coalescent)模擬出的平均異型合子歧異度預期值(average expected heterozygosity, H_{exp})，經過標準差(standard deviation, SD)的處理後，及考慮微衛星體基因於 infinite allele model(IAM)的突變模式下，檢測族群內異型合子歧異度的擴增或異型合子歧異度減少的狀況，偵測是否發生瓶頸效應事件。

第三章 結果

第一節 個體繫放及血液樣的採集

從 2010 年 3 月始至 8 月底於合歡農場(2668m)、奇萊登山口(3098m)、碧綠神木(2154m)、松泉崗(2588m)、820 林道(2588m)、天巒池步道(2920m)、松雪樓附近(3150m)、合歡山小風口(3000m)、關原(2375m)、合歡古道(2910m)及大禹嶺(2540m)等地進行多次採集(附錄一)；由於常見栗背林鴿活動於台灣鐵杉、雲杉、冷杉等針葉樹中低層，玉山圓柏、高山杜鵑等高山灌叢，及玉山箭竹和其它禾本科、芒草草生地中活動，因此，採集時於上述各地觀察到栗背林鴿蹤跡處，並配合其領域性及多於林緣活動的特性張網捕抓。共得栗背林鴿樣本 43 隻，其中 6 隻因血樣不足以萃取足夠的 DNA 樣本進行後續分析，因此最後共自 37 隻栗背林鴿取得進行後續基因分析的樣本。這 37 隻栗背林鴿包含 24 隻雄性個體及 13 隻雌性個體，採集地點及隻數如圖(1)：

第二節 栗背林鴿粒線體細胞色素b基因及微衛星體基因座的遺傳多樣性分析

一、粒線體細胞色素 b 基因之遺傳多樣性分析

運用 Dnasp 4.901 及 Arlequin 3.5.1.2 軟體進行栗背林鴿粒線體細胞色素 b 基因序列之遺傳多樣性參數包含單套型個數(h , number of haplotype)、單套型多樣性(hd , haplotype diversity)、核苷酸多樣性(π , nucleotide diversity), 及變異點個數(S , number of polymorphic sites)及 Fu and Li's D^* 檢定 (1993) 和 Fu and Li's 檢定 (1989) 的檢測, 結果如表(2)

整體而言, 栗背林鴿的細胞色素b基因序列的多樣性並不高: 在 43 隻栗背林鴿中共成功增幅 37 隻個體細胞色素b基因序列, 共有 1070bp(鹼基對)在每隻個體都能清楚判讀, 其中共有 6 個發生鹼基替換(substitution)的變異點, 都是以鹼基置換(transition)的方式產生替換(同為嘌呤(purine) A/G 置換率 0.28%; 嘧啶(pyrimidine) T/C 置換率 0.28%), 單套型個數(h)為 7; 單套型多樣性指數(hd)為 0.592; 核苷酸多樣性指數(π) 為 0.00095。

中性檢測 Fu and Li's D^* 檢測值為 0.387 ($p=0.57$); Tajima's D 檢測值為 -0.786 ($p=0.24$), 不論是 Fu and Li's D^* 檢測及 Tajima's D 檢測的檢測值皆未顯著偏離零, 說明我們所選用的這段粒線體細胞色

素 b 基因序列在族群內的變異並未偏離中性假說的預期值，因此可能未受選汰壓力影響，而族群量在近期歷史上也未經劇烈增減。

二、微衛星體基因座的建立及微衛星體基因之遺傳多樣性分析

- a. 於本年度初利用上述研究方法說明(b) 進行栗背林鴿微衛星體基因座篩選，並送至明新生技公司進行 454 定序。結果共定出 8432 個序列，其中含有 2 至 6 不等的重複片段序列共 197 個，其中扣除 46 個重複定序片段，共有 151 個片段可提供微衛星體基因座引子設計。

PCR 擴增引子設計使用 MsatCommander (Faircloth 2008) 軟體及目視法，由 151 個含有微衛星體重覆片段的序列中設計可順利擴增此片段之引子，結果僅能設計 1 組可用引子供後續 PCR 實驗用，而其它片段雖含有微衛星體基因，但因側邊序列 (flanking region) 太短或甚至缺少側邊序列，因此無法順利擺放引子位置。而此組引子在順利完成 PCR 擴增並以 MegaBACE 1000 自動定序儀進行毛細管電泳後，發現此段基因在族群中的多型性為零，故無法用來進行後續族群內基因遺傳多樣性分析用。

- b. 為使後續微衛星體分析順利進行，我們接著著手進行利用其他物種所分離出的 80 組微衛星體基因引物，進行跨種測試 (見研究方法第二節 2. (2))，企圖從這 80 組微衛星體基因座中，選擇對栗背林鴿 PCR 擴增容易，且在族群內具有多型性 (polymorphism) 的微衛星體基因座，進行後續栗背林鴿族群遺傳分析之用。跨種測試的結果顯示，可成功擴增 17 組其他鳥類所分離的微衛星基因座 (21.25%)，其中有 9 組微衛星基因座在栗背林鴿族群內具有基因型多型性 (11.25%)。
- 另為符合各種族群遺傳分析方法的前提假設 (assumptions)，以

避免產生估測各項族群遺傳參數時的偏差，我們使用 Genepop v3.4 軟體 (Raymond & Rousset, 1995) 檢驗此 9 組微衛星體(表 3)基因型頻率是否偏離哈溫平衡(Hardy-Weinberg equilibrium)下的預期，及其中任何兩組微衛星標記間是否存有連鎖不平衡(linkage disequilibrium)，結果共發現 4 組微衛星基因(TcyII45、PATMP 2-43、GC-GATA23)的基因型頻率明顯偏離哈溫平衡的預期值，其他 5 組微衛星基因，另經 Bonferroni 校正型一錯誤(type I error)的顯著臨界值($\alpha=0.005$)之後，並未顯示任何兩組微衛星體基因座間有基因連鎖現象(表 4)，因此適用於後續分析。這 5 組微衛星基因如表顯示，其各基因座的異型合子歧異度頻率觀測值(H_{Obs})的分佈為 0.063-1.000 (平均值為 0.582)，而異型合子歧異度頻率預期值(H_{Exp}) 的分佈為 0.092-0.930 (平均值為 0.577)，對偶基因個數(K)的分佈為 3-15 個 (平均為 9 個)。5 組微衛星基因典型基因型判別見附錄二，而其在族群中對偶基因的頻率分布圖如附錄三，各微衛星對偶基因頻率大致呈現單峰分布，僅 Tcy9 的對偶基因頻率分布似雙峰分布。

第三節 栗背林鴿歷史族群數量改變分析

a. mismatch distribution

我們利用 Dnasp 軟體中 mismatch distribution 的功能完成族群

大小變動 (population size change) 分析，mismatch distribution 的結果(圖 2)與預期之族群擴張模式下的普瓦松分布(Poisson Distribution)相近。依據 Excoffier (2004) 討論說明假若 mismatch distribution 分布呈單峰狀表示族群有族群擴張 (population expansion) 現象，而本研究 mismatch distribution 分布則呈現半單峰現象，說明栗背林鴿歷史族群有族群擴張跡象，且此擴張現象為較近期間發生。

b. 貝氏天際線分析

貝氏天際線利用天際線圖 (skyline plot) 的結果顯示從過去 14500 年至今栗背林鴿歷史族群大小大致穩定，而且具有微幅族群擴張的現象(圖 3); 這項結果與孢粉化石所建構的台灣植被變遷的時間大致吻合：大約 12,000~24,000 年前，台灣的植被已與現今海拔相似(Liew & Chung 2001)，而根據 Tuskada (1966) 推估 14,000~12,000 年前是冰河期後氣候快速改善，適合亞熱帶低海拔生物快速成長期間(Lin *et al* 2008)。因此，假設栗背林鴿的族群量若與植被分布隨氣候暖化上移至現今海拔後，則貝氏天際線的結果顯示，栗背林鴿的族群量與其相關的植被，自 14500 年前開始即保持穩定的族群量。另計算貝氏天際線時，同時也推算所有栗

背林鴿粒線體細胞色素 b 基因單倍型的最近共祖時間 (time to the most recent common ancestor, TMRCA) 為 0.0017374，由於溯祖理論指出以粒線體基因而言，TMRCA 約略等於 Θ ($Ne\mu$ ， Ne ：遺傳有效族群量； μ ：突變率)，以 1.0×10^{-8} 鹼基突變取代/每年做為分子鐘的校正值，經換算後栗背林鴿歷史上長期有效族群數量為 173,740。

c. LAMARC 貝氏分析

LAMARC 貝氏分析：以單倍體基因(haploid)粒線體細胞色素 b 基因的序列進行分析發現，栗背林鴿歷史有效族群數量參數 Θ ($Ne\mu$) 為 0.0017319(圖 4)，以 1.0×10^{-8} 鹼基突變取代/每年做為分子鐘的校正值換算栗背林鴿歷史長期有效族群數量為 171,900，與 BEAST 所推算栗背林鴿粒線體細胞色素 b 基因 TMRCA 所轉換的歷史有效族群數量大致相吻合。另外利用 LAMARC 所估出的族群指數成長速率參數 (g) +829.24(圖 5)，表示栗背林鴿在過去歷史上應有族群擴張族群成長現象，這結果也與貝氏天際線所顯示的族群變動趨勢相吻合。

d. 栗背林鴿族群瓶頸效應事件的偵測

利用 BOTTLENECK v1.202 (Piry *et al* 1999)軟體，在 infinite

allele model (IAM)的突變模式下，檢測是否有異型合子歧異度的擴增(heterozygosity excess)或異型合子歧異度減少(heterozygosity deficit)的現象產生，結果顯示(表 5)。異型合子歧異度觀察值與異型合子歧異度預期值沒有顯著差異($P_{\text{heterozygosity excess}}=0.68$)，說明異型合子歧異度在栗背林鴿族群內沒有顯著的擴增(heterozygosity excess)或顯著的減少(heterozygosity deficit)的現象產生，表示栗背林鴿歷史族群沒有遭遇瓶頸事件影響。

第四章 討論與結論

第一節 討論

雖因粒線體細胞色素 b 基因的低變異提供的資訊有限，使推斷時間無法繼續往前回溯到最近冰河的最盛期-24000 年之前，但一般而言生態棲位於高海拔生物，在冰河期氣候較冷階段生物可能會隨著溫度降低而分佈到比較低海拔部份，而在冰河期過後溫度回升，生物可能由此回到原來高海拔部分，經過這樣的變動生物的歷史族群數量可能隨之減少，但就貝氏天際線的結果顯示最少在 14500 年前至今栗背林鴿的族群雖有些微成長狀況，但大致穩定；然而錯位分布及 LAMARC 族群成長分析的結果，則一致顯示栗背林鴿歷史上曾有顯著族群擴增現象，因此栗背林鴿的族群過張可能發生在 14500 年前，即最近一次冰期結束後；另利用微衛星基因偵測瓶頸事件，結果顯示栗背林鴿族群沒有瓶頸效應歷史，亦不違背上述族群成長的結果。

而根據粒線體細胞色素 b 基因的變異所推估栗背林鴿長期歷史性有效族群數量約為 17 萬，雖然目前遺傳資料無法估算栗背林鴿現今的有效族群數量，但於野外採樣時沿著林緣行走很容易就能看到栗背林鴿身影，及栗背林鴿廣泛分佈於台灣高海拔山區

(圖6)，因此經由上述資料結果推測太魯閣國家公園境內栗背林鴿的有族群櫻相當大且穩定。

栗背林鴿粒線體遺傳多樣性

本計畫透過台灣高海拔特有鳥類物種栗背林鴿遺傳多樣性之遺傳標記的建立，呈現太魯閣國家公園區內栗背林鴿族群現今遺傳多樣性資料，由部分粒線體細胞色素 b 基因序列之遺傳多樣性資料檢視栗背林鴿基因多樣性，單套型多樣性值為 0.592 ± 0.085 、核苷酸多樣性為 0.00095 ± 0.0002 (≈ 0.001)。參考已發表且同樣使用細胞色素 b 序列，檢視台灣現生鳥類遺傳多樣性資料，如台灣畫眉 (*Leucodioptron taewanum*) 細胞色素 b 基因單套型多樣性值為 0.910 ± 0.056 、核苷酸多樣性為 0.003 ± 0.000 (Li *et al* 2006)；藪鳥 (*Liocichla steerii*) 核苷酸多樣性為 0.002 (Bailey *et al* 2010)，兩者的遺傳多樣性都比栗背林鴿為高；但栗背林鴿的遺傳多樣性與同屬高海拔分布的酒紅朱雀台灣亞種 (*Carpodacus vinaceus formosanus*) 略高：細胞色素 b 基因單套型多樣性值為 0.39、核苷酸多樣性為 0.0006 (吳 2009 碩士論文)；因此栗背林鴿核苷酸多樣性呈現稍低情況，可能與其侷限分布於高海拔地區有關，因此對於基因單套型多樣性及核苷酸多樣性稍低情況，並不反應瀕危狀況下的遺

傳多樣性。

有效族群量高估的可能性

有效族群數量是指在一特定時間內可經由繁殖對族群作出貢獻的個體數量，有效族群大小決定基因多樣性(genetic variation)損失的速度；近親個體配對機會或將有害基因留在族群內的機率，因此偵測有效族群的大小評估或預測野生族群近親配對機會及檢測基因的多樣性是遺傳保育管理制定不可或缺的資料，採用族群遺傳估算方式替補了人力普查的不足。一般來說實際的族群數量大約為有效族群數量的 10 倍大(Frankham 1995)，所以對照推算的栗背林鴿有效族群數量約 17 萬，10 倍大則約為 170 萬，卻也無法排除高估的可能性。利用貝氏天際線圖法使用 Markov chain Monte Carlo (MCMC)的方法，配合溯祖理論重建親緣關係樹，所推算的有效族群數量方法，大致可受到突變率高低、族群大小、族群間基因流動及天擇影響，當一族群與祖先分開後與其他族群間還有基因交流的話，那溯祖理論的推算會更往上延伸，而高估了有效族群數量；雖然本計畫採集的栗背林鴿樣本大致為同個族群，但可能與台灣其他山區的栗背林鴿無法有充分的基因交流，致使台灣全島的栗背林鴿族群具高度結構，而無法排除因

為栗背林鴿具有族群結構使利用溯祖理論高估了有效族群數量。

栗背林鴿微衛星體遺傳多樣性

本計畫原擬應用次世代 454 定序技術在微衛星基因的開發上，雖然 454 定序結果顯示，可以輕易獲得大量內含重覆核酸片段的序列，但這些重覆核酸片之側邊序列較短，並無法用以設計 PCR 引子，致使無法據以順利開發栗背林鴿專屬的微衛星體標記。但在自其他鳥類所發展的微衛星標記中，經跨種測試仍找到 8 組可使用於栗背林鴿的多態性微衛星體基因，這顯示利用既有為其他鳥類所發展的微衛星體標記，應可作為發展未來其他台灣雀形目鳥類所需遺傳標記的重要來源。雖然我們發現其中 3 組微衛星基因的基因型頻率並不符合哈溫平衡的預測，但這結果也可能是因為樣本數不足，或基因型判讀中無法有效判讀所導致缺失資料 (missing data) 過多所致，未來若能補足以上缺失，也許這 3 組微衛星基因仍可供日後研究栗背林鴿之族群遺傳與行為生態所需。

跨種使用微衛星基因使分析的限制

微衛星體基是近年來在族群遺傳研究中廣被使用的一種遺傳標記，缺乏廣泛性引子(universal primer)，需要針對欲偵測物種特

別選殖設計專一性引子為使用上的大限制，此問題雖然可利用跨種測試解決，但因為”跨種”測試，加上微衛星體演化突變速率較快(10^{-3} ； 10^{-4})，常因測試物種遺傳距離太遠增加跨種測試的困難度，且每個物種基因的演化速率不同，使原本專一性的微衛星基因在跨種的使用上，雖有基因型多型性，但卻容易發生不符合微衛星基因突變演化-stepwise mutation 的模式，增加分析時的困難。Stepwise 突變模式說明微衛星體基因發生突變時通常依循它的重覆片段數，如兩重覆數(di-repeat)、三重覆數(tri-repeat)或四重覆數(tetra-repeat)等，產生增加或減少 1 個單元(1 unit)重覆數的方式發生(Valde *et al* 1993)，然而可能因為每個物種微衛星基因的演化速率不同，使得突變的產生不遵循 stepwise mutation 模式，此困擾將呈現在分析上，在眾多已釋出的族群遺傳分析軟體中，運用微衛星體基因分析的前提假設大部設定皆需符合 stepwise mutation 模式，此方式便增加微衛星體基因在分析上的困難，而本計畫也遭受此困境，無法更進一步利用微衛星基因檢測栗背林鴿歷史族群的變動。

未來從事與栗背林鴿相關研究的有效遺傳標記

雖然栗背林鴿為台灣特有種，但對其生活史所知卻極為有

限，例如 目前對栗背林鴿遺傳婚配制度研究資料就相當缺乏。

栗背林鴿於繁殖季時(每年3月下旬到8月中旬)主要棲息在台灣高海拔2600公尺到3550公尺，針、闊葉混合林和針葉林下濃密的矮叢中，繁殖配對採社會性一夫一妻制，築巢於路旁土牆或石壁縫隙中 (劉等 2010)，由於栗背林鴿具有明顯的雌雄二型性，因此雄性可能存在強烈的生殖競爭，而雌鳥對雄鳥也可能依雄鳥外型表徵的差異而有強烈的擇偶偏好。 鳥類婚配系統在過去二十年，因分子遺傳標記的發展而有革命性的進展，在過去有93%的燕雀目鳥類被認為屬於社會性一夫一妻的婚配制度， 但經分子遺傳標記的檢測，卻發現其中有86%的物種具有偶外配對且有非婚生子代(extra-pair paternity, EPP)的現象(Griffith *et al* 2002)，例如與栗背林鴿同屬的藍喉鴿(*Luscinia svecica*)被發現有26%子代為非婚生子代(EPP) (Johnsen & Lifjeld 2003)，因此，栗背林鴿的婚配繁殖制度是否真的如社會婚配制般為一夫一妻制、是否有非社會配對的非婚生子代等相關研究議題，應是一個值得探究的有趣議題，而這些知識也有助於國家公園，提升對所擁有的鳥類資源之解說材料。而本研究所篩檢出符合哈溫平衡預期的這5組微衛星基因，具有高度多態性，利用CERVUS軟體檢測這5組微衛星基因對於上述問題應用的可能性結果顯示(附錄四)，栗背林鴿這5

組微衛星體基因的多型性運用在親子鑑定上，當不知父母雙方的基因型時，不從候選父母(candidate parent)中排除沒有血親關係的父母(unrelated candidate parent)機率有13% (First parent non-exclusion probability)，反過來看可排除機率有87%；而當知道父母雙方其中一方基因型時，不從候選父母(candidate parent)中排除沒有血親關係的父母機率有3% (second parent non-exclusion probability)，因此有97%的機率可排除沒有血親關係的父母，這顯示這5組微衛星體基因有足夠的潛力提供日後研究栗背林鴿配對繁殖研究、親子鑑定等研究之候選基因。

第二節 結論

雖然依照目前粒線體細胞色素 b 基因序列無法更加往前回溯到最近冰期時間栗背林鴿歷史族群動態，且亦因資料有限無法有效評估栗背林鴿現今有效族群數量，但綜合本計畫研究結果顯示至少在 14500 年，在最近冰河期結束至今，生態棲位侷限於高海拔的栗背林鴿歷史族群有些微族群擴張現象，且其中也沒有遭受瓶頸效應影響，另經 TMRCA 回推歷史有效族群量約為 17 萬的結果推測太魯閣國家公園栗背林鴿族群大小應該相當穩定，此結果亦能當為一個監測基準值，回應目前認為的全球暖化問題是否導致

高海拔生物族群大小的改變。此外，本計畫採用跨種測試方式針對栗背林鴿尋找可行性的微衛星體基因，此也提供國家公園未來針對栗背林鴿遺傳婚配系統、親子鑑定或其它族群遺傳相關研究的基礎，且有利上述研究的執行。

第五章 主要建議事項

立即經營管理建議說明：依據本計畫結果回推由 12500 年前至今太魯閣國家公園栗背林鴿族群有族群擴張現象，就距離最後一次冰河--18000 年結束後，溫度回升生物由較低海拔回到原來高海拔生態棲位，經過這樣的變動生物的歷史族群數量可能隨之減少，但就栗背林鴿而言貝氏天際線的結果顯示最少在 12500 年前至今栗背林鴿的族群有些微成長狀況， TMRCA 推估栗背林鴿歷史有效族群數量約為 17 萬且 LAMARC 族群成長分析也顯示族群呈正成長的情況，推測太魯閣國家公園境內栗背林鴿族群大小應該相當穩定，因此對於立即的經營管理措施沒有太大的建議。

長期經營管理建議說明：可利用此計畫結果及建立的基因遺傳資料為基礎，以特有種鳥類—栗背林鴿基因遺傳資料或有效族群數量為基準點，監測高海拔地區特有種鳥類遺傳多樣性及族群變動狀況。另劉(1991)以玉山國家公園內新中橫公路及玉山林道栗背林鴿繁殖成功失敗為例，發現栗背林鴿繁殖成功失敗與洞口面積、洞之大小、坡度、覆蓋度、距路面遠、岩壁高、洞之方位、海拔高度、陽光照到與否、水源遠近及巢的大小均無顯著差異，但與路面距離有顯著不同，推測導致栗背林鴿繁殖失敗其中主要原因是因為距離路面太近，受遊

客或掠食者的干擾或捕食影響所致，因此就國家公園管理角度而言，目前是否會因為全球暖化問題導致栗背林鴿族群數量變化影響雖需持續追蹤，但就本計畫結果推測太魯閣國家公園栗背林鴿族群為一穩定族群來看，於近期較不擔心區內栗背林鴿族群有較大的波動性改變，反而是在經營管理上可以借鏡劉(1991)的結果，在栗背林鴿或其它鳥種繁殖期間盡量宣導、教育遊客應該減少及避免對繁殖鳥類的干擾，宣導制訂觀賞鳥類或鳥類攝影手則，並加強巡邏防止偷巢或破壞巢等影響鳥類繁殖行徑，持續維持園區內一定的生物量。

致謝

我們感謝太魯閣國家公園計畫經費的支持，國家公園承辦人員朱何宗先生的協助，東華大學許育誠教授實驗室人員及徐中琪小姐協助野外樣本採集，李壽先教授實驗室洪心怡、林美珠、林容仟小姐協助實驗室工作進行及特有生物保育中心高海拔試驗站野外工作的協助，使本計畫得以順利完成。

表 1. 454 定序結果含有微衛星體基因重覆片段之序列

含有微衛星體重覆片段						
總共定出片 段	重覆定序片 段	2 個重覆 (di-repeat)	3 個重覆 (Tri-repeat)	4 個重覆 (Tetra-repeat)	5 個重覆 (Penta-repeat)	6 個重覆 (Hexa-repeat)
8432	46	17	1	123	1	9

(本計畫)

表 2. 栗背林鴿部分粒線體細胞色素b序列(1070bp)遺傳多樣性分析。單套型個數(h)；單套型多樣性指數(hd)；核苷酸多樣性指數(π)

及Fu and Li's D* 檢測及Tajima's D 檢測

	h	Hd±SD	π ±SD	S	Fu & Li D* test	Tajima D test
Dnasp	7	0.592±0.085	0.00095±0.0002	6	0.387 p= 0.57	-0.786 p=0.24
Arlequin	7	0.5916±0.085	0.00095±0.0002	6		-0.786 p=0.25

(本計畫)

表 3.9 組 (Tcy9、TG11-011、Titgata02、GC-GATA15、PwGATA4、TcyII45、PMAPT 2-43、GC-GATA23) 具有多型性之微衛星基因座基礎資料之引子序列、每組基因對偶基因數(k)、樣本數(N)、異型合子歧異度觀察值(H_{Obs})、異型合子歧異度預期值(H_{Exp})及哈溫平衡檢測P值 (*表顯著性)

Locus	Sequence 5'-3'	k	N	H_{Obs}	H_{Exp}	p value (HWE)	Reference
Tcy9	F: ATGGCTTGGAAGGACTGTG R: gtttctTGGCAAACAATGTCAAAG	15	17	1	0.93	0.2	Satio <i>et al</i> 2006
TG11-011	F: ACAAACTAAGTACATCTATATC R: TAAATACAGGCAACATTGG	4	35	0.457	0.442	1.0	Lee <i>et al</i> 2006
Titgata02	F: ACCTCCAGGATGGGGACTCC R: TTGTCTTTTGGGTTGCCTGA	7	30	0.633	0.677	0.37	Wang <i>et al</i> 2005
GC-GATA15	F: CAGAGTTTTACAAAGCCTCTGC R: GACTATGGAAAATCAATCAAGG	14	33	0.758	0.746	0.89	Huang <i>et al</i> 2004
PwGATA4	F: ACTGGACTGTCCACATGGA R: CGTGCCTTCGCAAGTTGG	3	32	0.063	0.092	0.05	尚未發表
TcyII45	F: ACATACCAAAGTCACCTGGA R: gtttctCAATGGGTAAAGTAT TATTGCAT	18	28	0.786	0.95	0.002*	Satio <i>et al</i> 2006
PMAPT 2-43	F: ACAGGTAGTCAGAAATGGAAAG R:GTATCCAGAGTCTTTGCTGATG	8	35	0.429	0.576	0.007*	Lee <i>et al</i> 2006
GC-GATA23	F: ACCAGAAAGGTCTGACAAGG R: CTACAAAAAAGTGCAATTGCAG	4	33	0.273	0.667	0*	Huang <i>et al</i> 2004

(本計畫)

表 4. 本計畫分析所用之 5 組(Tcy9、TG11-011、Titgata02、GC-GATA15、PwGATA4)微衛星基因任兩組微衛星體基因座間有基因連鎖現象檢測，Bonferroni校正type I error的臨界值($\alpha=0.005$)。

	Tcy9	TG11-011	Titgata02	GC-GATA15	PwGATA4
Tcy9	-				
TG11-011	0.8868	-			
Titgata02	0.4432	0.0888	-		
GC-GATA15	1.0000	0.5335	0.1837	-	
PwGATA4	0.3658	0.0134	1.0000	0.4916	-

(本計畫)

表 5. 栗背林鴿瓶頸效應事件檢測，樣本數(N)、對偶基因數(K)、異型合子歧異度觀察值(Hobs)及在IAM突變模式下檢測突變-漂變平衡 (mutation-drift equilibrium, Heq)。顯著值(p值)檢測採用 one-tail

Wilcoxon test。

Locus	N	K	Hobs	Heq	S.D.	(Hobs-Heq)/sd
Tcy9	26	14	0.942	0.926	0.021	0.753
TG11-011	70	4	0.442	0.456	0.17	-0.085
Titgata02	60	7	0.677	0.671	0.116	0.053
GC-GATA15	66	14	0.746	0.846	0.048	-2.095
PwGATA4	64	3	0.092	0.356	0.176	-1.502

P heterozygosity excess =0.68

P heterozygosity excess over combined dataset =0.74

(本計畫)

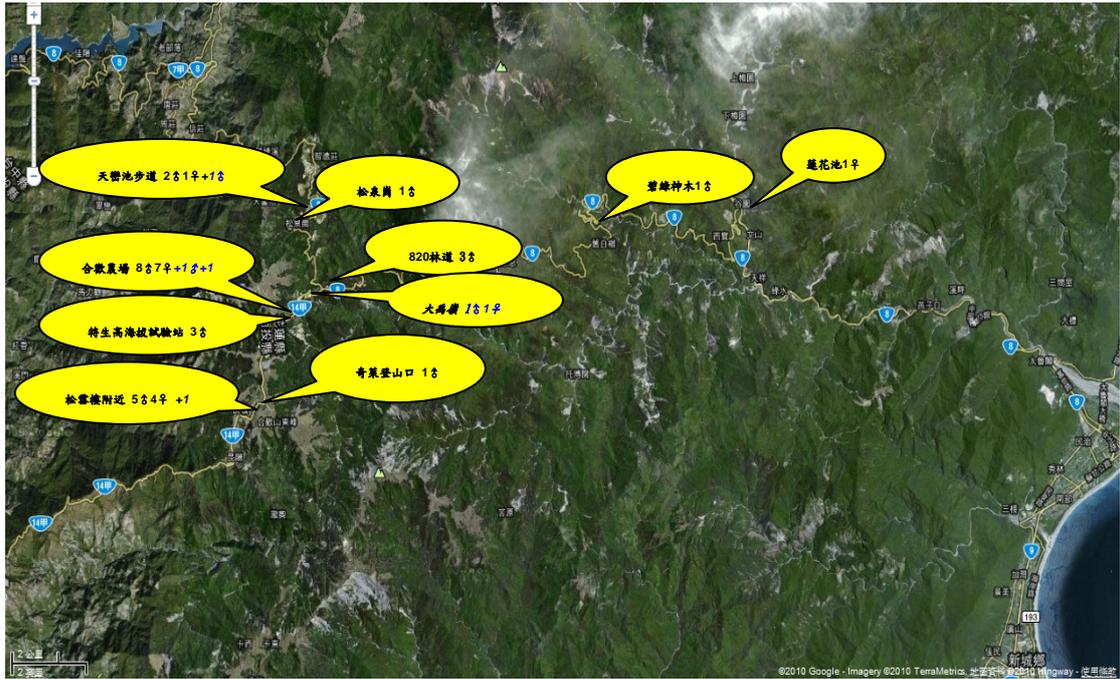


圖 1. 栗背林鴿樣本採集點

(本計畫)

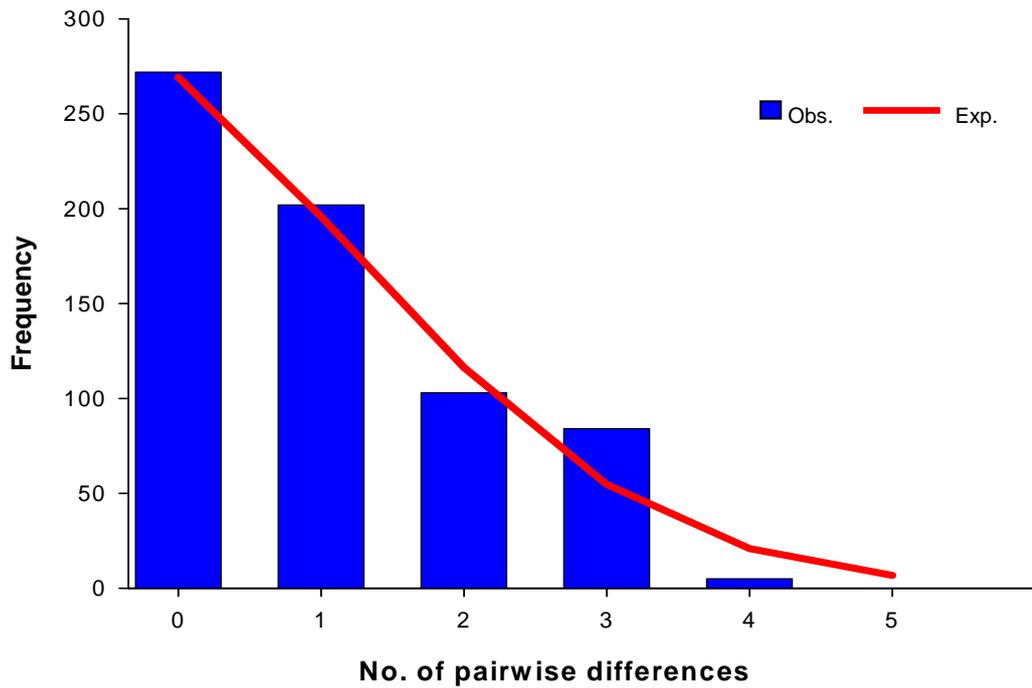


圖 2. 栗背林鴿族群大小變動檢測之mismatch distribution測試，藍色柱狀圖表示粒線體細胞色素b兩兩序列比較差異觀測值(observed frequency of pairwise differences)，紅線表示預期狀況下的族群擴張模式模擬分布圖。

(本計畫)

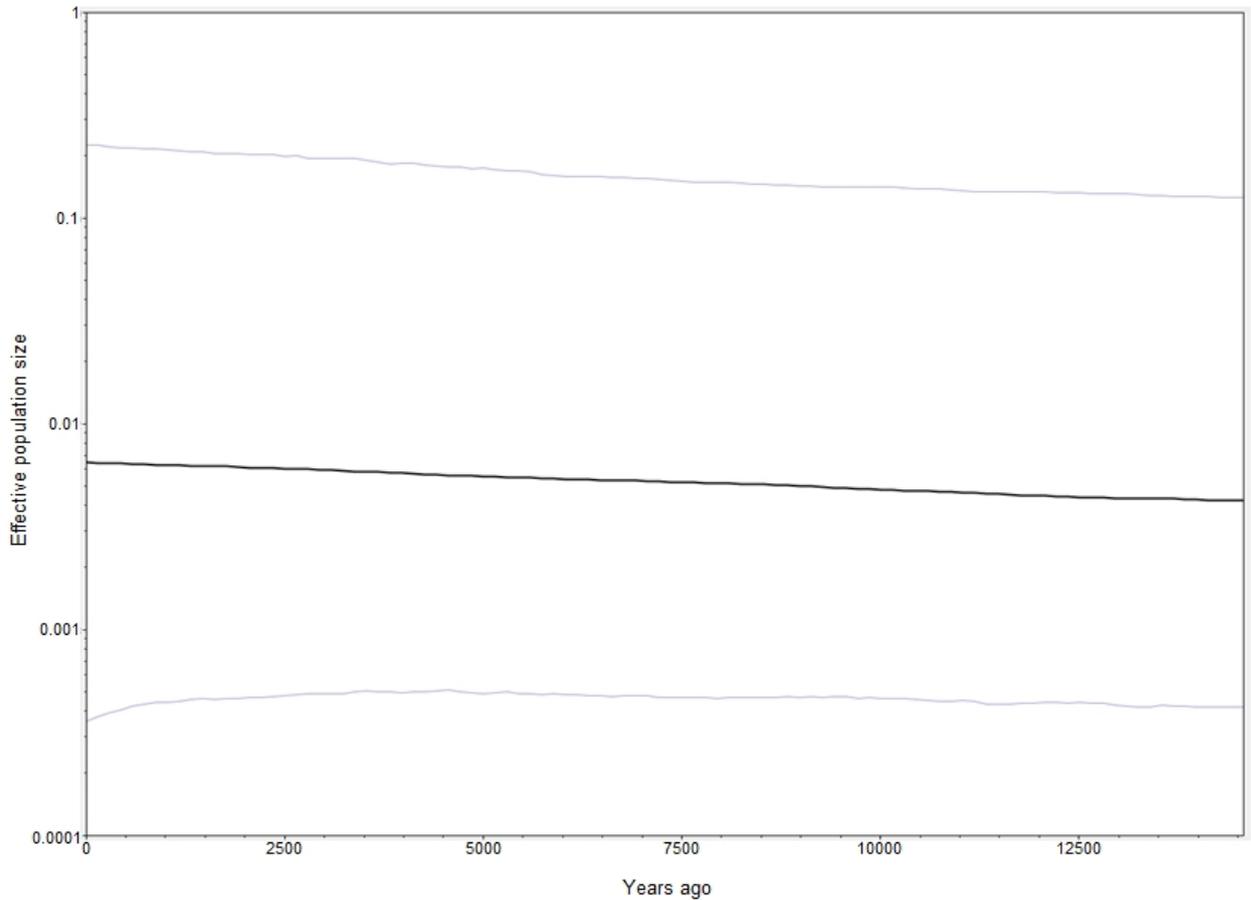


圖 3. 檢測栗背林鴉粒線體細胞色素b基因歷史族群變動事件之貝氏天際線圖。X軸表示多少單位年以前的時間(unit of years ago)，主要依據 1×10^{-8} 的每個位點/每年/鹼基置換速率(substitutions rate per site per year)換算而成，Y軸表示有效族群數量及世代長度。中間黑色實線表示貝氏天際線的估計值，上下兩條灰線表示上下 95% 信賴區間。

(本計畫)

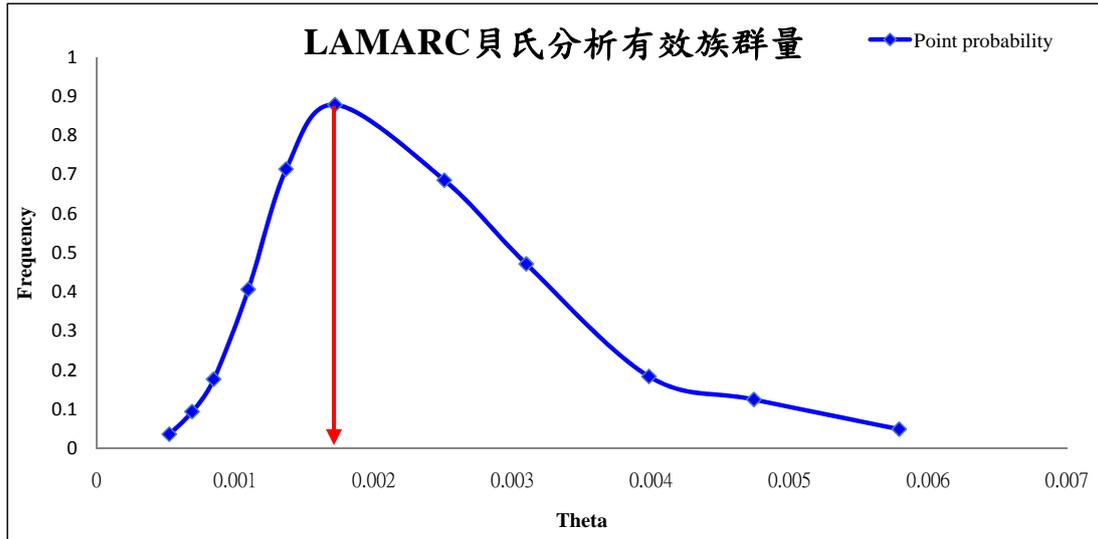


圖 4. LAMARC 貝氏分析單倍體基因(haploid)粒線體細胞色素b基因的序列分析栗背林鴿歷史有效族群數量 Θ (theta)

(本計畫)

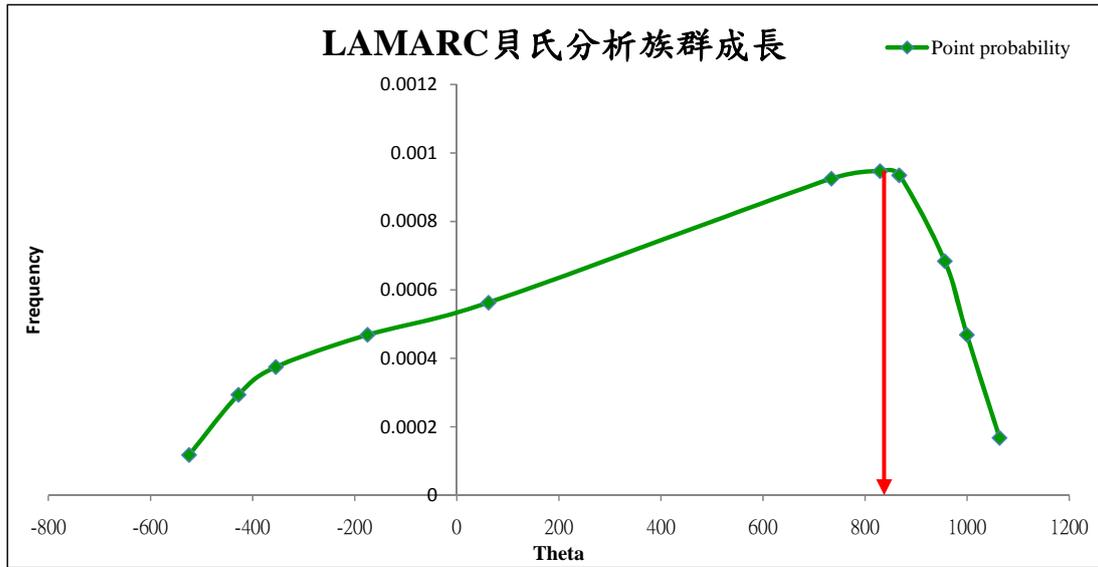


圖 5. LAMARC 貝氏分析單倍體基因(haploid)粒線體細胞色素b基

因的序列分析栗背林鴿歷史有效族群成長速率參數g

(本計畫)

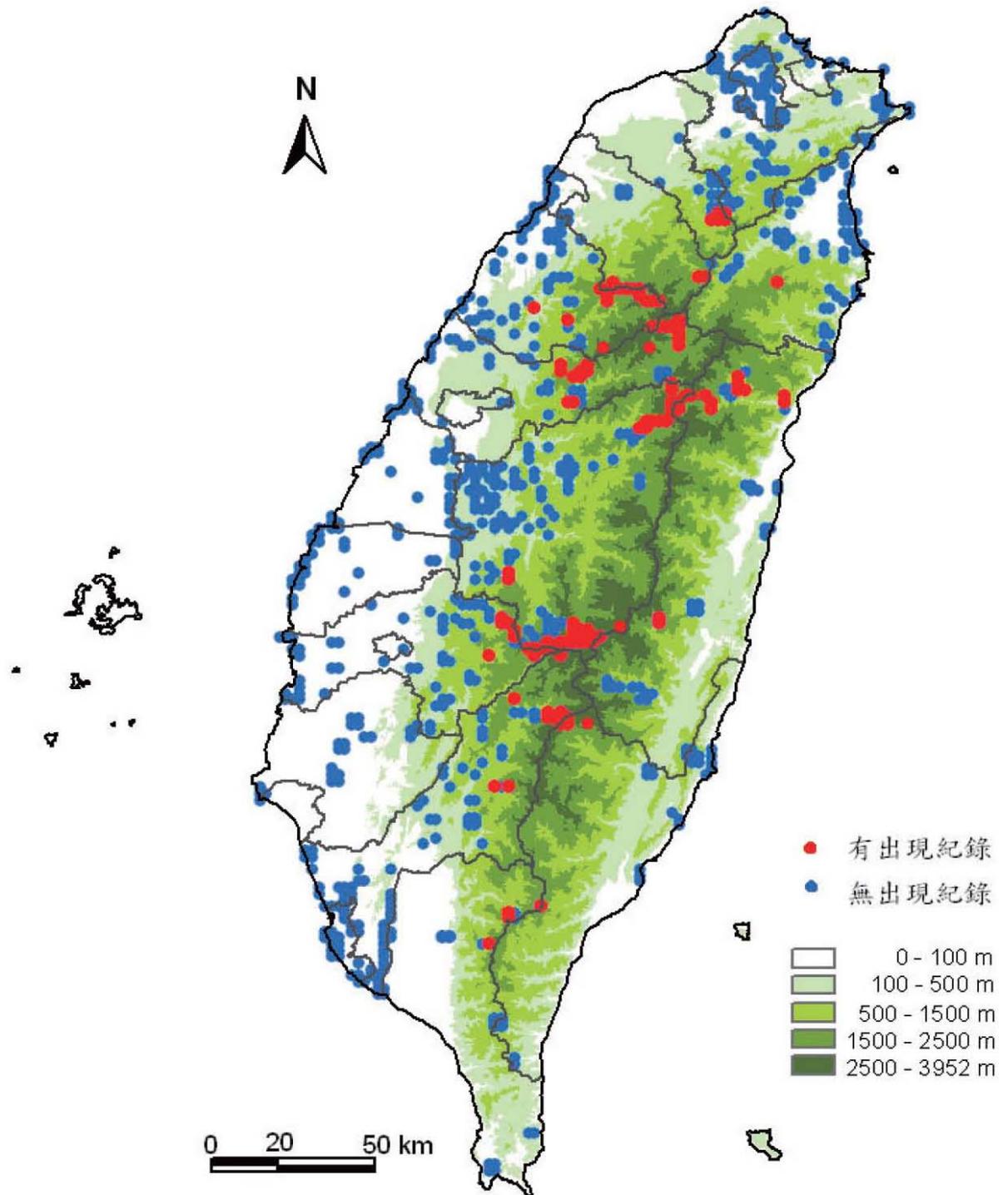


圖 6. 栗背林鴉於台灣高海拔分佈範圍

(本計畫)

附錄一 本計畫參與期間於野外繫放所採集鳥種數

中文名	學名	繫放點	隻數
鶉科	Muscicapidae		
栗背林鶉	<i>Luscinia johnstoniae</i>	松雪樓	10
		合歡農場	17
		大禹嶺	2
		蓮花池	1
		碧綠神木	1
		松泉崗	1
		奇萊登山口	1
		特生高海拔工作站後	3
		820 林道	3
		天巒池步道	4
白眉林鶉	<i>Luscinia indica Vieillot</i>	松雪樓	2
		合歡山小風口	2
		合歡農場	1
		合歡古道	1
		特生高海拔工作站後	7

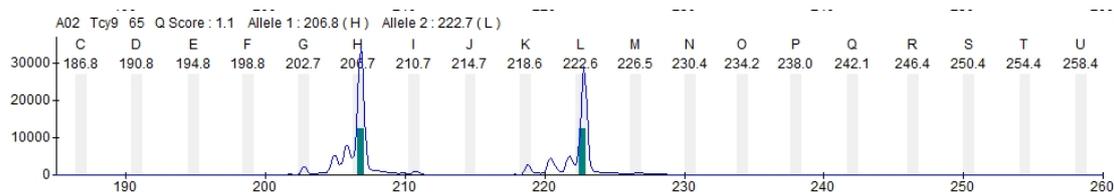
畫眉科	Timaliidae		
山紅頭	<i>Stachyris ruficeps</i>	關原	3
金翼白眉	<i>Garrulax morrisonianus</i>	合歡農場	4
藪鳥	<i>Liocichla steerii</i>	合歡農場	1
粉紅鸚嘴	<i>Paradoxornis webbianu</i>	合歡農場	3
鱗胸鷓鴣	<i>Pnoepyga albiventer</i>	特生高海拔工作站後	1
黃羽鸚嘴	<i>Paradoxornis verreauxi</i>	特生高海拔工作站後	5
灰頭花翼	<i>Alcippe cinereiceps</i>	關原	3
		合歡農場	6
		合歡古道	2
		特生高海拔工作站後	1
鶯科	Sylviidae		
深山鶯	<i>Cettia acanthizoides</i>	合歡農場	1
		合歡古道	4
長尾山雀科	Aegithalidae		
紅頭山雀	<i>Aegithalos concinnus</i>	合歡農場	2
雀科	Fringillidae		
灰鶯	<i>Pyrrhula erythaca</i>	特生高海拔工作站後	1
酒紅朱雀	<i>Carpodacus vinaceus</i>	奇萊登山口	1

		合歡農場	1
		特生高海拔工作站後	2
		松雪樓	2
<hr/>			
山雀科	Paridae		
煤山雀	<i>Parus ater</i>	關原	1
<hr/>			

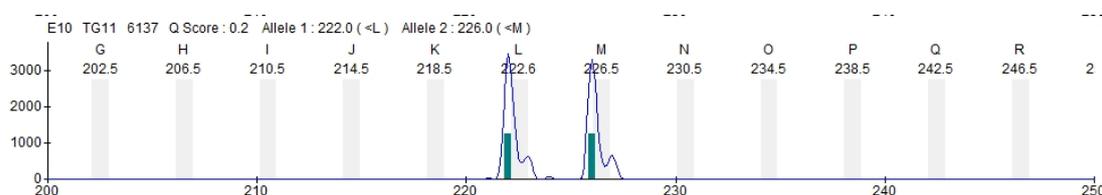
附錄二 5 組--Tcy9(a)、TG11-011(b)、Titgata02(c)、GC-GATA15(d)、

Pwgata4(e) 微衛星基因典型頻譜圖

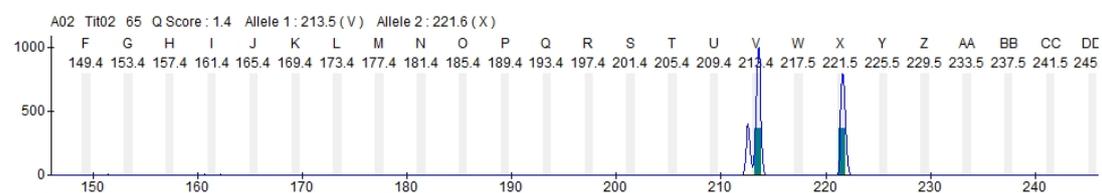
a. Tcy9



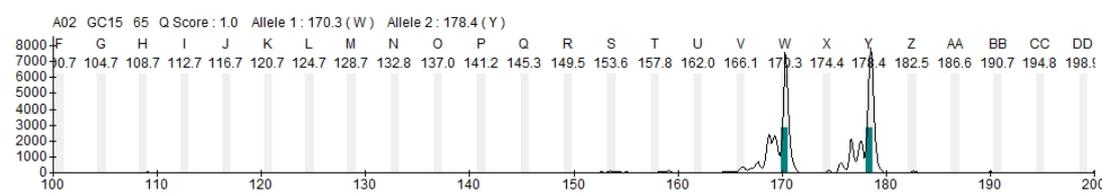
b. TG11-011



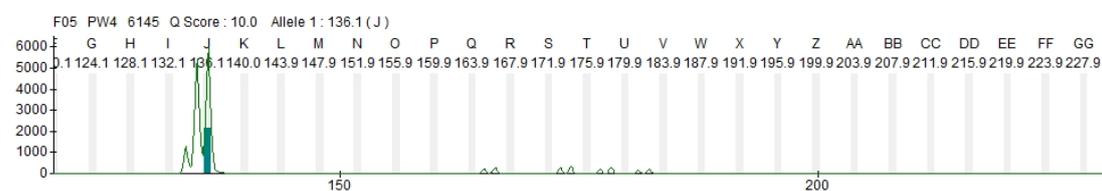
c. Titgata02



d. GC-GATA15

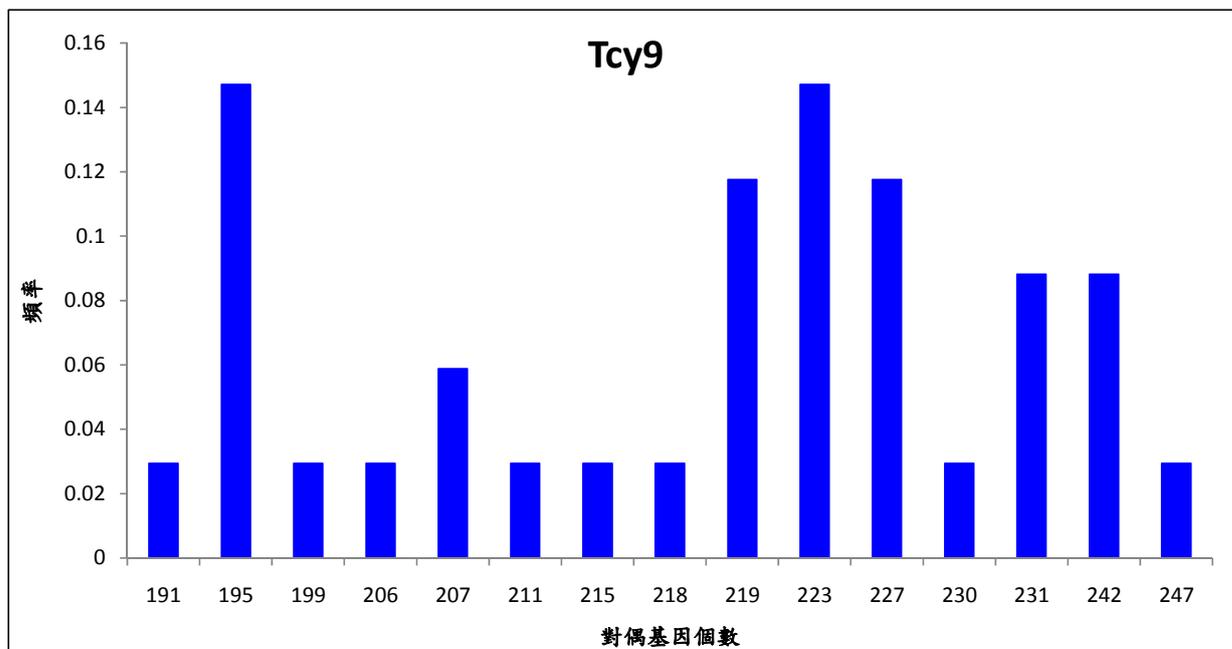


e. Pwgata4

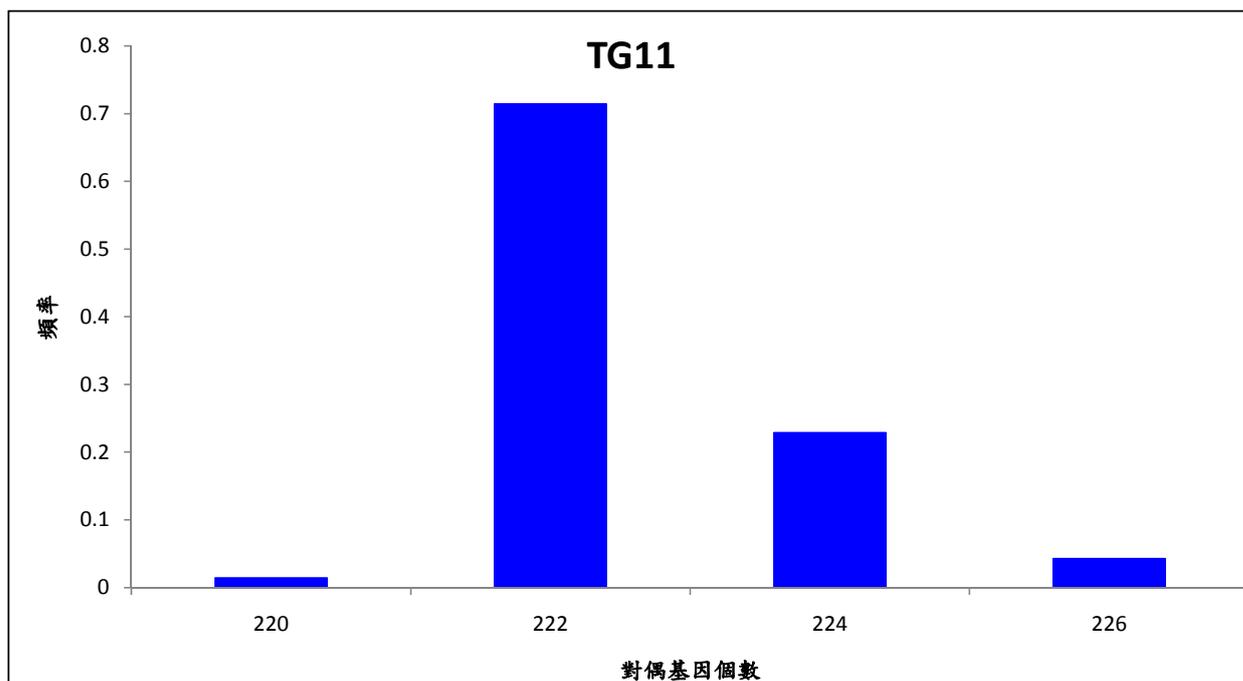


附錄三 5 組微衛星基因Tcy9(a)、TG11-011(b)、Titgata02(c)、
GC-GATA15(d)、Pwgata4(e)之對偶基因頻率(allele frequency)圖

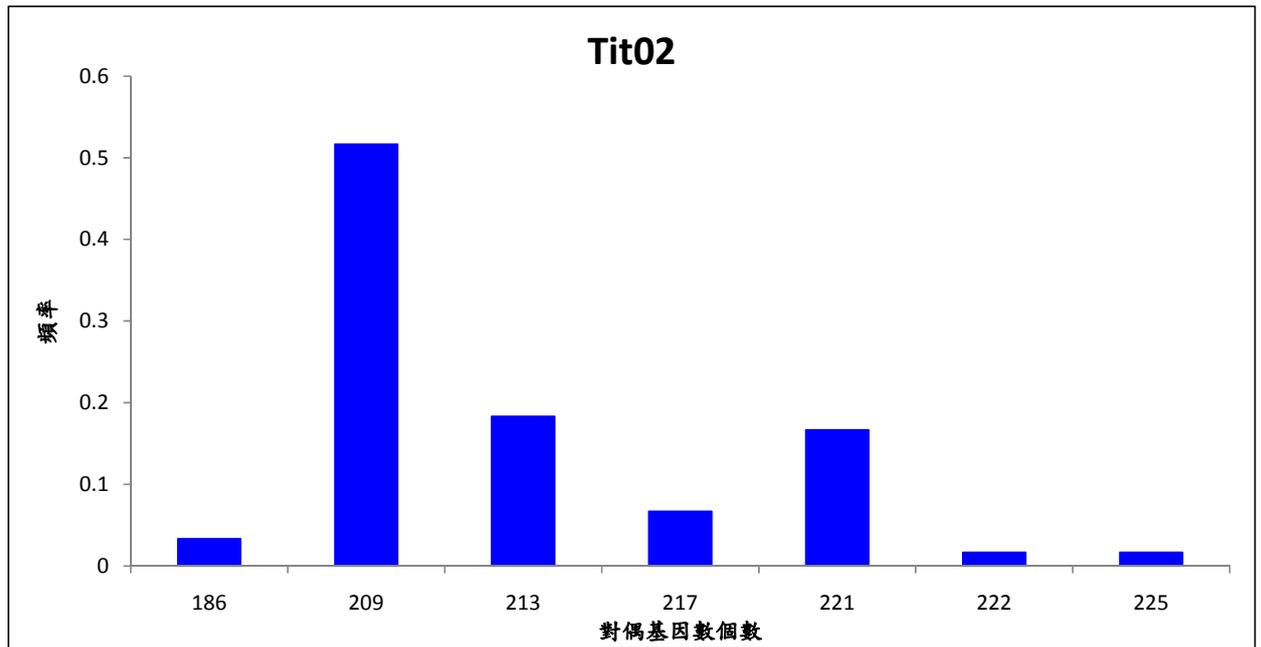
a. Tcy9



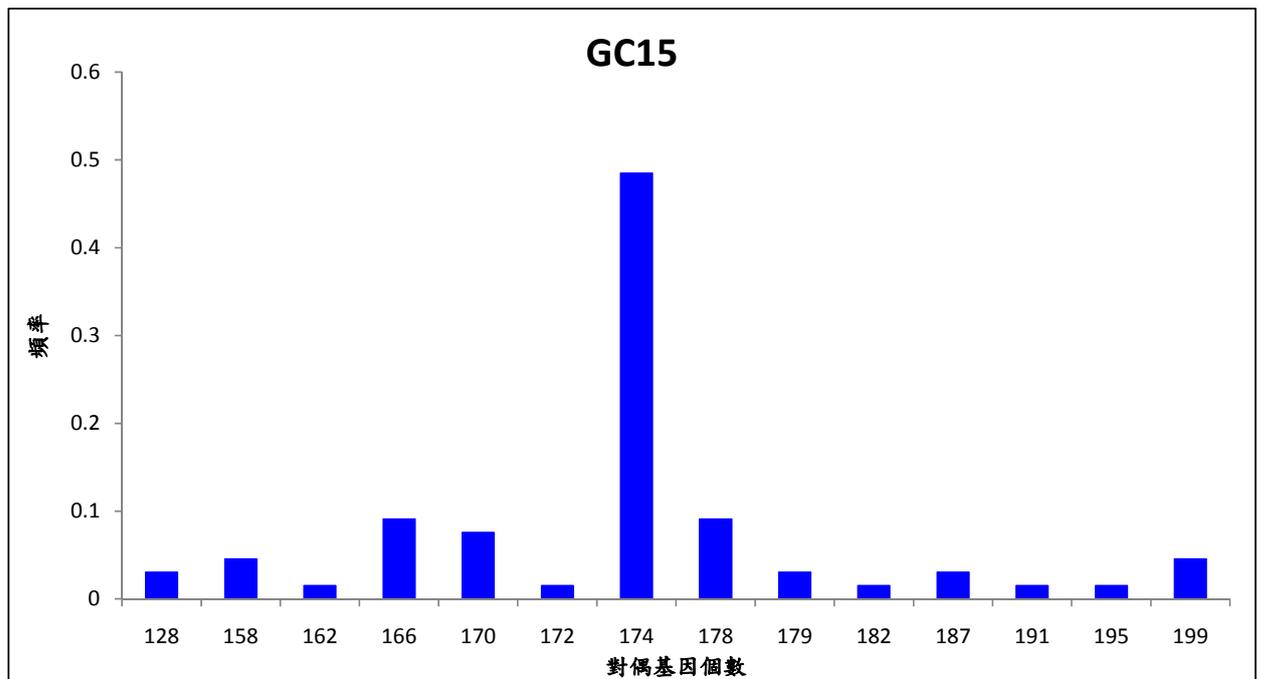
b. TG11-011



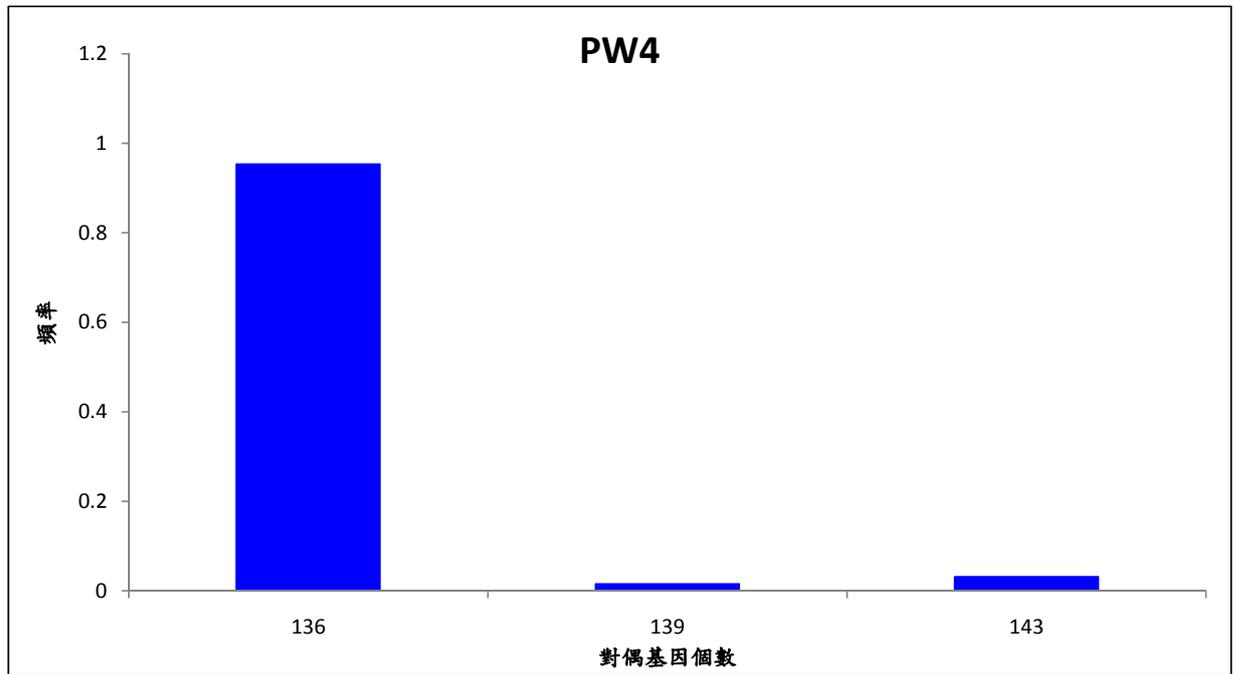
c. Titgata02



d. GC-GATA15



e. Pwgata4



附錄四 5 組微衛星基因進行親子鑑定的排除沒有血親關係父母的機
率

樣本數 (Number of individuals)	37
微衛星基因組數 (Number of loci)	5
平均對偶基因數 (Mean number of alleles per locus)	8.6
平均異型合子歧異度預期值 (Mean expected heterozygosity)	0.577
排除沒有血親關係的父母機率 (不知雙親父母找其中之一雙親) [Combined non-exclusion probability (first parent)]	0.1352
排除沒有血親關係的父母機率 (知道其中之一雙親找另一雙親) Combined non-exclusion probability (second parent)	0.0355

附錄五 太魯閣國家公園管理處 99 年度委託研究計畫「代表性生態系
經營管理之合歡山高海拔生態系長期生態研究網計畫(二) - 太魯閣
國家公園鳥類遺傳多樣性調查」期中簡報會議紀錄

太魯閣國家公園管理處 99 年度委託研究計畫
「代表性生態系經營管理之合歡山高海拔生態系長期生態研究網
計畫(二) - 太魯閣國家公園鳥類遺傳多樣性調查」
期中簡報會議紀錄

一、時間：99 年 6 月 1 日 上午 11 時 00 分
二、地點：本處會議室
三、主持人：游處長登良 記錄：朱何宗
四、報告人：李壽先教授
五、出席人員

張副處長登文	
許祕書英文	
企劃經理課	張美惠
解說教育課	王愛萍
遊憩服務課	陳嘉明
環境維護課	
保育研究課	陳信山 朱何宗 高俊華 楊國榮 林國榮
綠水管理站	鄧月娥
布洛灣管理站	
合歡山管理站	
蘇花管理站	

六、討論：

- (一) 目前採樣分析的 30 個栗背林鴿樣本有 24 個來自於合歡農場，其餘地區的樣本數量則較少是否有可能影響粒線體 DNA 中色素 B 之遺傳多樣性分析。
- (二) 樣本數少確有可能影響分析結果，但以栗背林鴿這種鳥而言，牠有冬季海拔降遷的行為，因此推測其活動模式及領域應屬與非固著性，然而確切的影響有賴於更深入的生態研究。
- (三) 合歡山松雪樓附近鳥況良好，但遊客干擾較頻繁，在調查樣區選取時供參酌。
- (四) 在全球氣候變遷平均氣溫逐漸升高的衝擊下，越是壓縮的林帶或林線以上的生態系，所受到的影響越大，國家公園可及早規劃保種的工作。
- (五) 本研究預計以栗背林鴿粒線體 DNA 中色素 B 之遺傳多樣性配合 Bayesian 理論探討過去族群變動歷史，並發展微衛星基因座突變模式推估栗背林鴿的歷史族群量，以供管理處經營管理參考。

結論：本期中簡報審查通過，准予備查。請受託單位依合約規定備妥相關資料請領第二期款。

附錄六 太魯閣國家公園管理處 99 年度委託研究計畫「代表性生態系
經營管理之合歡山高海拔生態系長期生態研究網計畫(二)－太魯閣
國家公園鳥類遺傳多樣性調查」期末簡報會議紀錄

太魯閣國家公園管理處 99 年度委託辦理計畫
「代表性生態系經營管理之合歡山高海拔生態系長期生態
研究網計畫(二)－太魯閣國家公園鳥類遺傳多樣性調查」
期末簡報會議記錄

- 一、時間：99 年 12 月 1 日 下午 15 時
- 二、地點：本處會議室
- 三、主持人：游處長登良 記錄：朱何宗
- 四、報告人：李壽先教授
- 五、出席人員

張副處長登文	
許祕書英文	許英文
企劃經理課	張士萍
解說教育課	黃志強 連鳳時
遊憩服務課	張淑貞
環境維護課	
保育研究課	陳俊山 柯泉 葉雨芳
天祥管理站	
布洛灣管理站	
合歡山管理站	王如暉
蘇花管理站	
	林展興、許育誠

六、討論：

- (一) 受託單位已於會議前提送期末報告書面資料 15 份，內容進度符合合約規定。
- (二) 本研究從粒線體 DNA 色素 B 之遺傳多樣性分析推估過去的 14500 年至今栗背林鴿歷史族群有微幅擴張的現象，且栗背林鴿的長期歷史有效族群量約為 17 萬隻，與實際觀測數量應該吻合，顯示栗背林鴿至今族群數量變動相對穩定；此結果可作為氣候暖化壓力下，高海拔生物族群大小改變的一個監測基準值。
- (三) 在全球氣候變遷平均氣溫逐漸升高的衝擊下，越是壓縮的林帶或林線以上的生態系，所受到的影響越大，本研究模式可提供未來其他物種監測評估參考。
- (四) 本研究針對栗背林鴿微衛星基因座開發出 5 組引子，未來極有潛力應用在其他相關生態學研究，例如配對繁殖研究、親緣關係等。

七、結論：

- (一) 與會人員相關意見，請受託單位納入參考。
- (二) 期末報告撰寫格式請依內政部委託研究作業規定辦理。
- (三) 本期末簡報審查通過，准予備查。請受託單位依會議結論修正書面報告，俟完成驗收後，依合約規定備妥相關資料請領第三期款。

相關參考文獻

王穎、陳炤杰。(1992)。太魯閣國家公園中高海拔鳥類資源之調查研究。內政部營建署太魯閣國家公園管理處。

吳昫群。(2009)。酒紅朱雀物種區劃研究。國立台灣師範大學生命科學系碩士論文。台北。

許皓捷。2003。台灣山區鳥類群聚的空間及季節變異。國立台灣大學動物學研究所博士論文。台北。

許皓捷。2006。太魯閣國家公園鳥類群聚之研究（一）。內政部營建署太魯閣國家公園管理處。

許皓捷。2007。太魯閣國家公園鳥類群聚之研究（一）。內政部營建署太魯閣國家公園管理處。

劉小如、丁宗蘇、方偉宏、林文宏、蔡牧起、顏重威。(2010)。台灣鳥類誌。行政院]農業委員會林務局。台北。

劉良力。(1991)。栗背林鴿生物學研究。國立台灣師範大學生命科學系碩士論文。台北。

羅文穗。(2006)。以微衛星體基因座及主要組織相容性複合體之異型合子度探討青背山雀之配對模式。國立台灣師範大學生命科學系碩士論文。台北。

Almany G, De ArrudaM, Arthofer W *et al.* (2009) Permanent genetic resources added to molecular ecology resources database 1 May 2009–31 July 2009. *Molecular Ecology Resources*, 9, 1460–1466.

Barr KR., Lindsay DL., Athrey G., Lance RF., Hayden TJ., Tweddale SA. & Leberg PL. (2008) Population structure in an endangered

- songbird: maintenance of genetic differentiation despite high vagility and significant population recovery. *Molecular Ecology* 17: 3628-3639.
- Beaumont MA, Zhang W, Balding DJ. (2002) Approximate Bayesian Computation in Population Genetics. *Genetics*, 162, 2025-2035.
- Beerli P, Felsenstein J. (1999) Maximum-likelihood estimation of migration rates and effective population numbers in two populations using a coalescent approach. *Genetics*, **152**, 763–773.
- Beerli P., Felsenstein J (2001) Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA*, 93, 4563–4568.
- Bos, DH., Gopurenko D., Williams R.N. and DeWoody J.A. (2008) Inferring population history and demography using microsatellites, mitochondrial DNA, and major histocompatibility complex (MHC) genes. *Evolution* 62: 1458-1468.
- Cornuet JM, Santos F, Beaumont MA, *et al.* (2008) Inferring population history with DIY ABC: a user-friendly approach to Approximate Bayesian Computation. *Bioinformatics*, 24, 2713-2719.
- Degnan SM, Robertson BC, Clegg SM, Moritz CC (1999) Microsatellite primers for studies of gene flow and mating systems in white-eyes (*Zosterops*). *Molecular Ecology*, 8, 159–160.
- Drummond AJ & Rambaut A (2003a) BEAST version 1.0. Available from <http://evolve.zoo.ox.ac.uk/beast/>.
- Drummond AJ & Rambaut A (2003b) TRACER version 1.0. Available from <http://evolve.zoo.ox.ac.uk/beast/>.

- Evans, H. and Heiser JB. (2004) What's inside: anatomy and physiology.
In: Handbook of Bird Biology (S., R. Podulka, W. Rohrbaugh, Jr., and R. Booney eds.) The Cornell Lab of Ornithology. Ithaca, NY.
- Excoffier L (2004) Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion : lessons from the infinite-island model. *Molecular Ecology*, 13, 853-864.
- Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetic analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10, 564–567.
- Faircloth, BC. (2008) MSATCOMMANDER: detection of microsatellite repeat arrays and automated, locus-specific primer design. *Molecular Ecology Resources* 8:92-94.
- Fu YX., Li WH. (1993) Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, 133, 693-709.
- Gemmell NJ. & Akiyama S. (1996) An efficient method for the extraction of DNA from vertebrate tissues. *Trends in Genetics*, 338-339.
- Hansson B, Bensch S, Hasselquist D, Lillandt BG., Wennerberg L, Von Schantz T. (2000) Increase of genetic variation over time in a recently founded population of great reed warblers (*Acrocephalus arundinaceus*) revealed by microsatellites and DNA fingerprinting. *Molecular Ecology*, 9, 1529–1538.
- Hsu YC, Severinghaus LL, Lin YS, Li SH (2003) Isolation and characterization of microsatellite DNA markers from the Lanyu scops owl (*Otus elegans botelensis*). *Molecular Ecology Notes* 3,

595-597.

- Huang CC, Lin RC, Li SH and Lee LL. (2007) Characterization of polymorphic tetranucleotide microsatellite loci from the Siberian weasel (*Mustela sibirica*). *Molecular Ecology Notes* 7, 483-485.
- Huang, YJ., Chen, C. & Li, SH. (2004) Polymorphic tetranucleotide microsatellite loci in the Hwamei (*Garrulax canorus canorus*) (Timaliidae). *Molecular Ecology Notes*. 4,170–172.
- Johnsen A and Lifjeld JT. (2003) Ecological constraints on extrapair paternity in the bluethroat. *Oecologia* 136, 476–483.
- Kalinowski ST., Taper ML., Marshall TC. (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16, 1099–1006.
- Klicka J., Zink RM. (1997) The importance of recent ice ages in speciation: a failed paradigm. *Science*, 277, 1666–1669.
- Kuhner MK (2006) LAMARC 2.0: maximum likelihood and Bayesian estimation of population parameters. *Bioinformatics*, 22, 768–770.
- Küpper C, Horsburgh GJ, Dawson DA *et al.* (2007) Characterization of 36 polymorphic microsatellite loci in the Kentish plover (*Charadrius alexandrinus*) including two sex-linked loci and their amplification in four other *Charadrius* species. *Molecular Ecology Notes*, 7, 35–39.

- Leberg, P. (2005) Genetic approaches for estimating the effective size of populations. *Journal of Wildlife Management* 69: 1385-1399.
- Li SH., Li JW., Han LX., Yao CY., Shi H., Lei FM. and Yen C. (2006) Species delimitation in the Hwamei *Garrulax canorus*, *Ibis* 148, 698–706.
- Li SH., Yeung CK., Feinstein J., Han LX., Le MH., Wang CX., and Ding P. (2009) Sailing through the Late Pleistocene: unusual historical demography of an East Asian endemic, the Chinese Hwamei (*Leucodioptron canorum canorum*), during the last glacial period. *Molecular Ecology*, 18, 622–633.
- Lee JW., Jang BS., Dawson DA., Burke A. and Hatchwell BJ. (2009) Fine-scale genetic structure and its consequences in breeding aggregations of a passerine bird. *Molecular Ecology*. 18, 2728-2739.
- Leech DI. & Crick HQP. (2007) Influence of climate change on the abundance, distribution and phenology of woodland bird species in temperate regions. *Ibis*, 149, Supplement 2, 128-145.
- Liew PM. and Chung NJ. (2001) Vertical migration of forests during the last glacial period in subtropical Taiwan. *Western Pacific Earth Sciences*, 1, 405-414.
- Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB & Pemberton JM. (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7, 639-655.
- McKay BD, Mays HL Jr, Peng YW, Kozak KH, Yao CT, Yuan HW (2010)

- Recent range-wide demographic expansion in a Taiwan endemic montane bird, Steere's Liocichla (*Liocichla steerii*) BMC Evolution Biology, 10, 71
- Otter K., Ratcliffe L., Michaud D., Boag PT. (1998) Do female blackcapped chickadees prefer high-ranking males as extra-pair partners? Behavioral Ecology and Sociobiology, 43, 25–36.
- Piry S., Luikart G., Cornuet JM. (1999) BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. Journal of Heredity, 90, 502-503.
- Pounds JA., Fogden MPL & Campbell JH. (1999) Biological response to climate change on atropical mountain. Nature 398: 611- 615.
- Raymond M., Rousset F. (1995) GENEPOP (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. Journal of Heredity **86**, 248-249.
- Ramakrishnan U., Storz JF., Taylor BL. & Lande R. (2004) Estimation of genetically effective breeding numbers using a rejection algorithm approach. Molecular Ecology 13: 3283-3292.
- Repogle K., Arnold AP., Ball GF *et al.* (2008) The Songbird Neurogenomics (SoNG) Initiative: Community-based tools and strategies for study of brain gene function and evolution. BMC Genomics, 9, 131.
- Rozas J, Sanchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analysis by the coalescent and other methods. Bioinformatics, 19, 2496–2497.
- Sæther BE., Sutherland WJ. & Engen S. (2004) Climate influences on avian population dynamics. Pages 185-209 in A. Moller, W. Fiedler,

- and P. Berthold, editors. *Birds and Climate Change*. Elsevier Academic Press.
- Saladin V., Bonfils D., Binz T. Richner, H. (2003) Isolation and characterization of 16 microsatellite loci in the Great Tit *Parus major*. *Mol. Ecol. Notes* 3, 520–522.
- Satio DS, Morimoto G, Fukunaga A, Ueda K. (2006) Isolation and characterization of microsatellite markers in red-flanked bushrobin, *Tarsiger cyanurus* (Aves: Turdidae). *Mol Ecol Notes* 6, 425–442.
- Schneider S. & Excoffier L (1999) Estimation of demogeographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. *Genetic*, 152, 1079-1089.
- Sekercioglu CH., Schneider SH., Fay JP. & Loarie SR. (2008) Climate change, elevational range shifts, and bird extinctions. *Conservation Biology*, 22, 140–150.
- Slate J., Hale M., Birkhead T. (2007) Simple sequence repeats in zebra finch (*Taeniopygia guttata*) expressed sequence tags: a new resource for evolutionary genetic studies of passerines. *BMC Genomics*, 8, 52
- Tautz D. (1993) Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequence, pp. 21–28 in *DNA Fingerprinting: Current State of the Science*, edited by S. D. J. PENA, R. CHAKRABORTY, J. T. EPPLIN & A. J. JEFFREYS. Birkhäuser Publishing, Basel, Switzerland.
- Wang MT., Hsu YC., Yao CT, Li SH. (2005) Isolation and characterization of 12 tetranucleotide repeat microsatellite loci from the green-backed tit (*Parus monticolus*). *Molecular Ecology Notes*.

5, 439–442.

Yeung C, Huang YJ, Li SH (2004) Development of polymorphic microsatellite markers for the Steere's Liocichla (*Liocichla steerii*). Molecular Ecology Notes, 4, 420–422.

Zhang, DX. & Hewit GM. (2003) Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. Molecular Ecology 12: 563-584.

代表性生態系經營管理-合歡山高
海拔生態系長期生態研究計畫(二)
- 鳥類遺傳多樣性研究

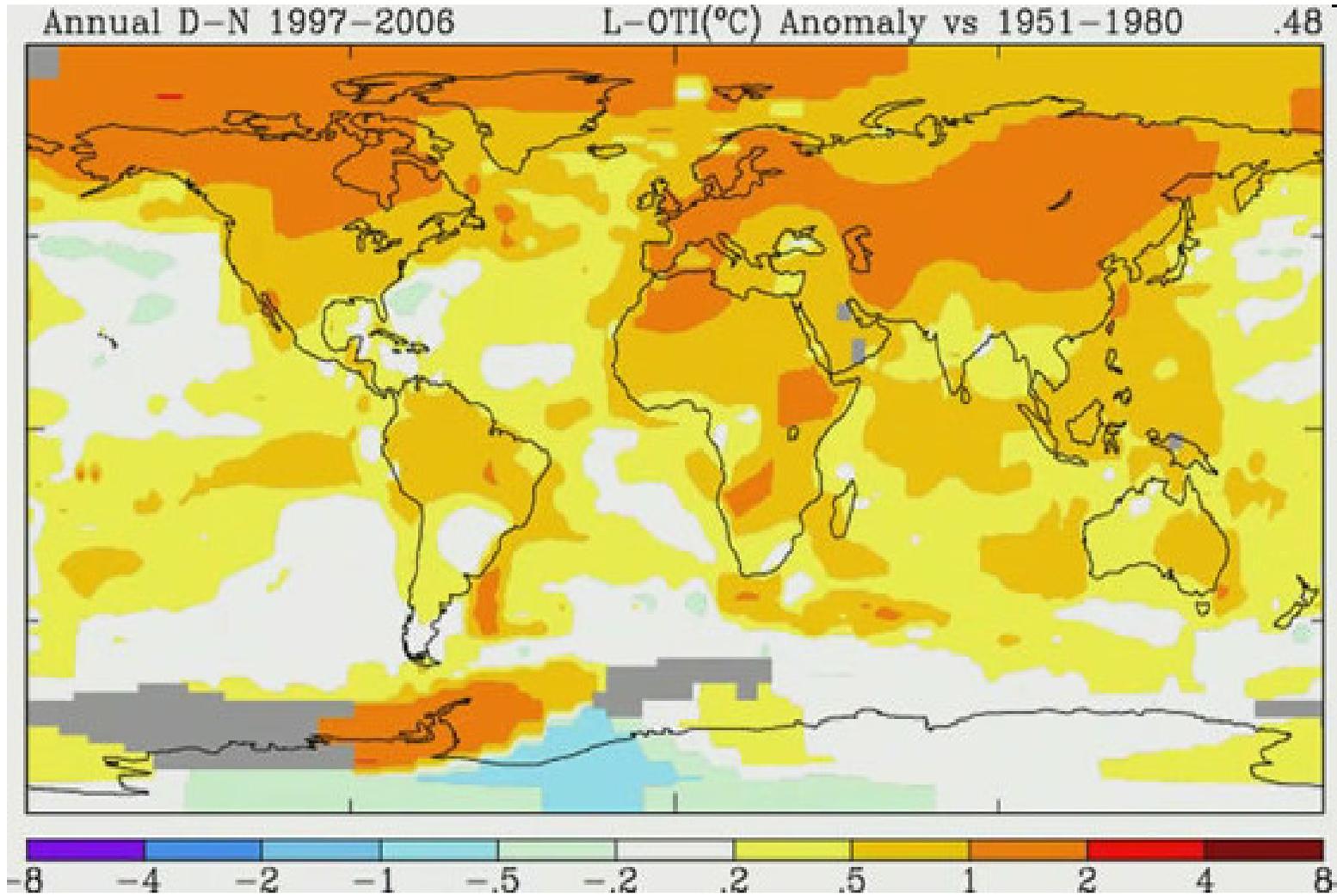
期末報告

李壽先教授

國立台灣師範大學生命科學系

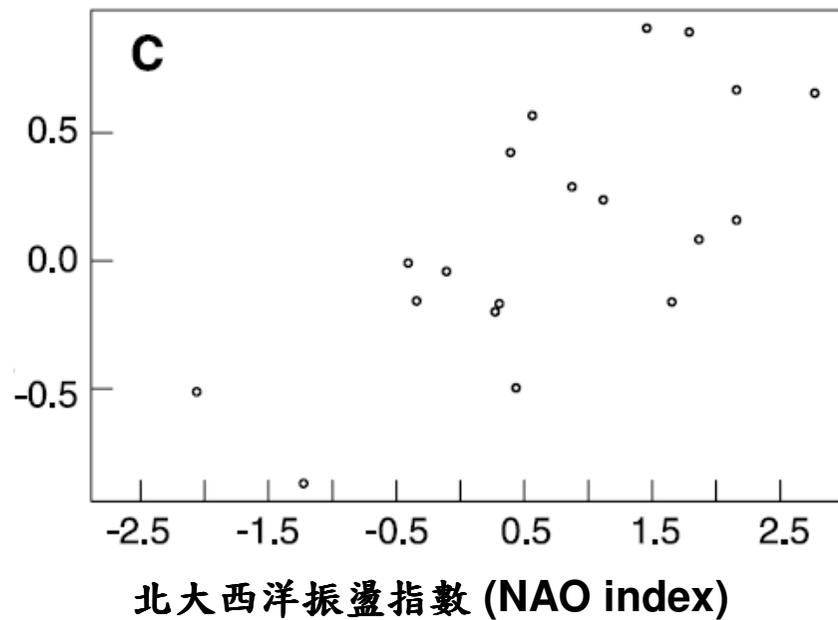
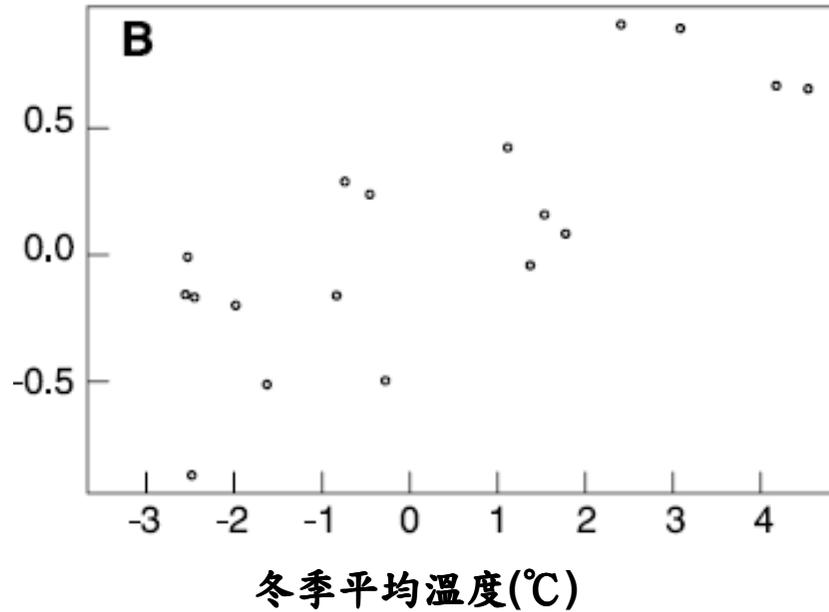


http://images.google.com.tw/imgres?imgurl=http://communities.canada.com/vancouver/sun/cfs-file.ashx__key=CommunityServer.Components.PostAttachments/00/00/34/80/35/globalwarming.jpg&imgrefurl=http://communities.canada.com/vancouver/sun/blogs/thesearch/archive/2009/04/23/who-cares-less-about-global-warming.aspx&usq=__ISJFWSoHCoBi2UDrm6pU37peWO-&h=640&w=445&sz=333&hl=zh-TW&start=1&tbid=Vu7PzR3egaEEXM.&tbid=137&tbw=95&prev=/images%3Fq%3Dglobal%2Bwarming%26gbv%3D2%26h%3Dzh-TW



<http://geology.com/news/images/global-warming-map-animation.jpg>

族群大小改變



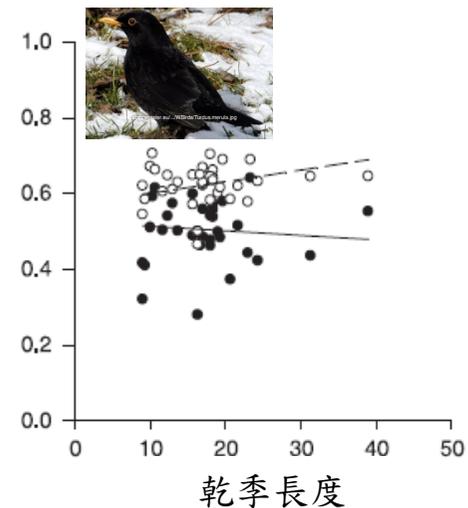
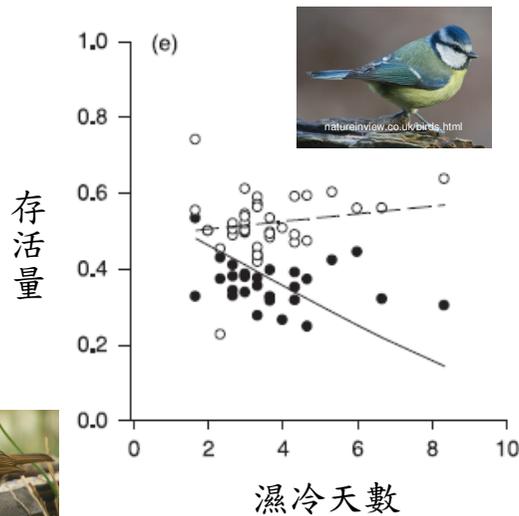
Sæther *et al*, 2000, *Science*, 287, p854



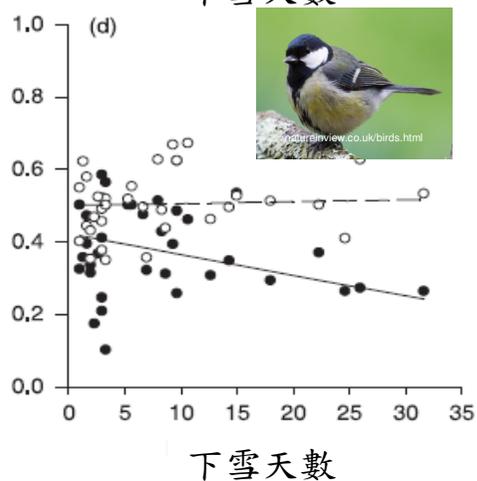
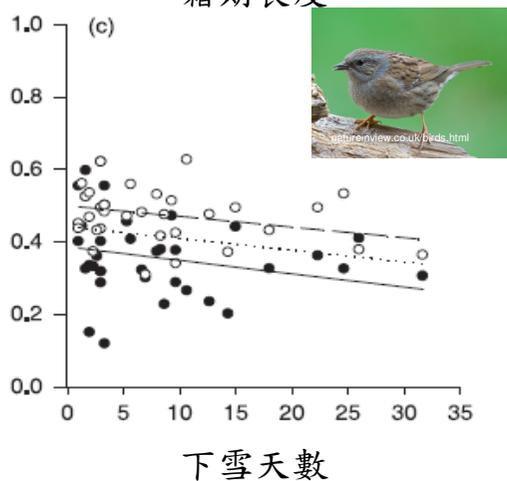
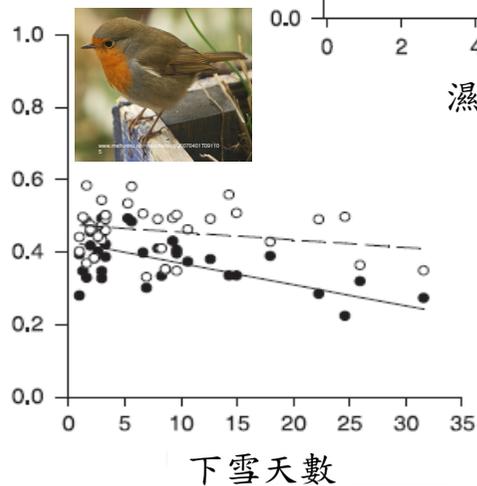
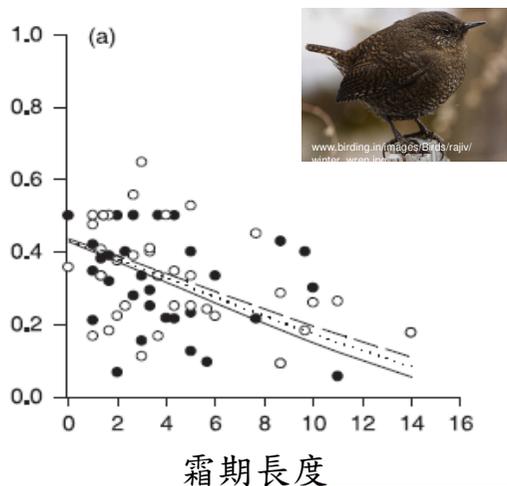
氣候變化影響雀形目 鳥類(passerine)存活

weather-dependent survival

Robinson *et al*, 2007, *Ibis*, 149, p357



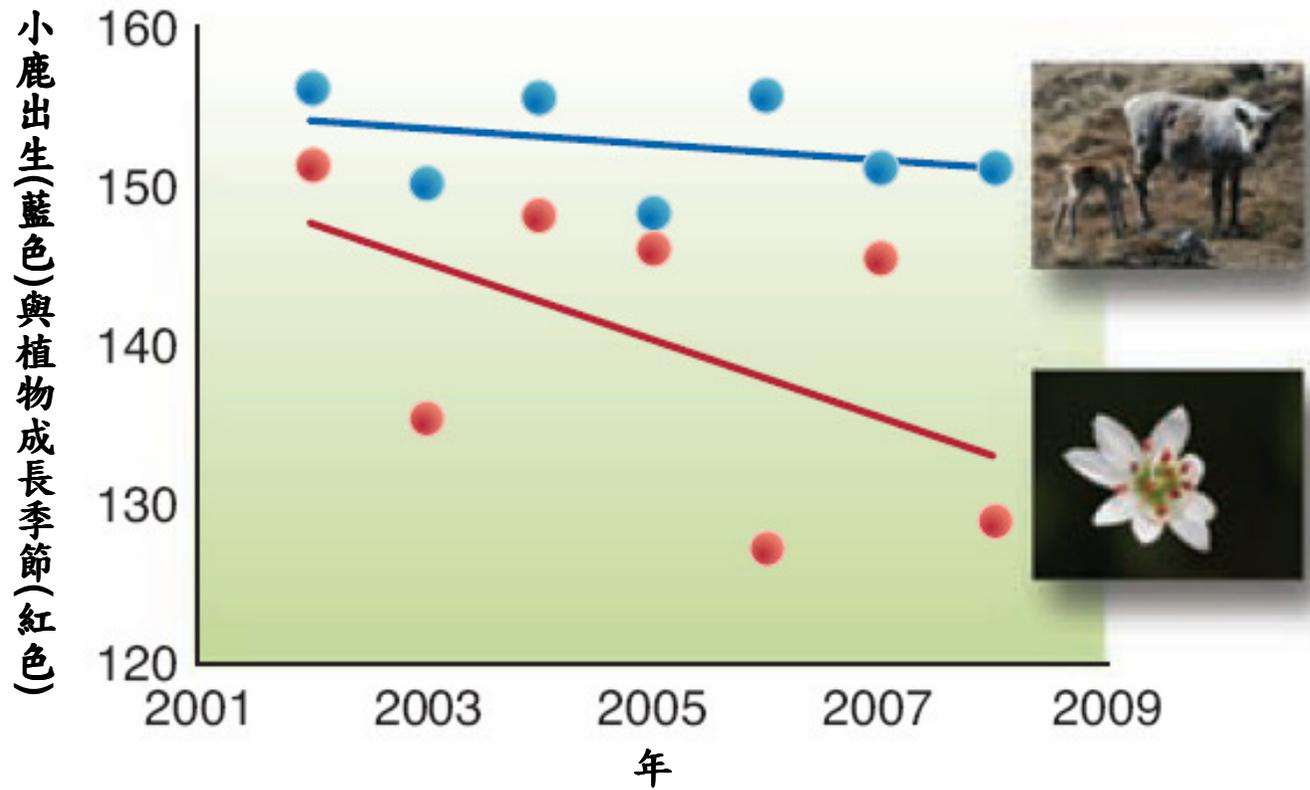
存活



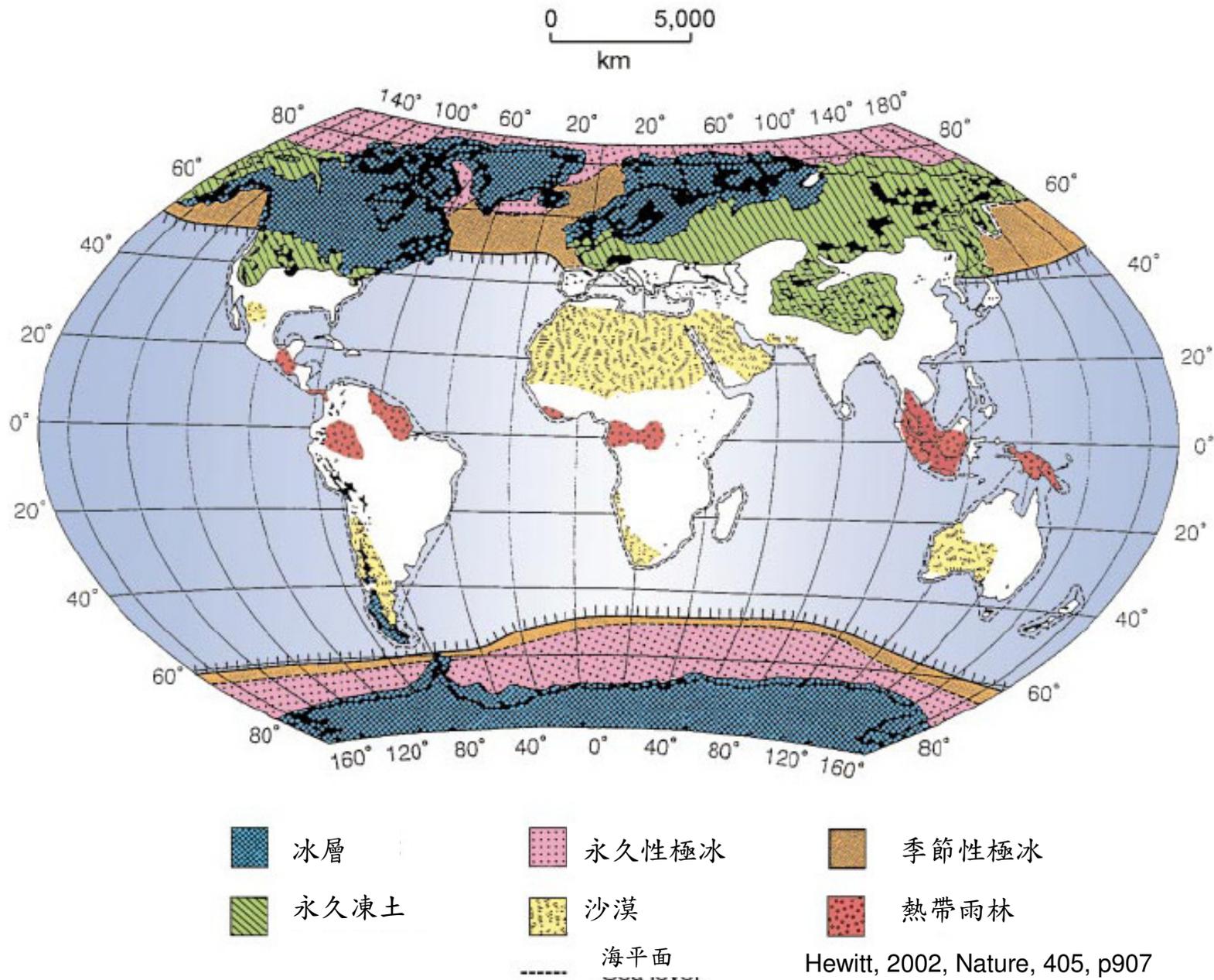
- 成鳥
- 第一年期幼鳥
- 成鳥
- 第一年期幼鳥

暖化使北美馴鹿主要食物(植物)成長季節逐年提早

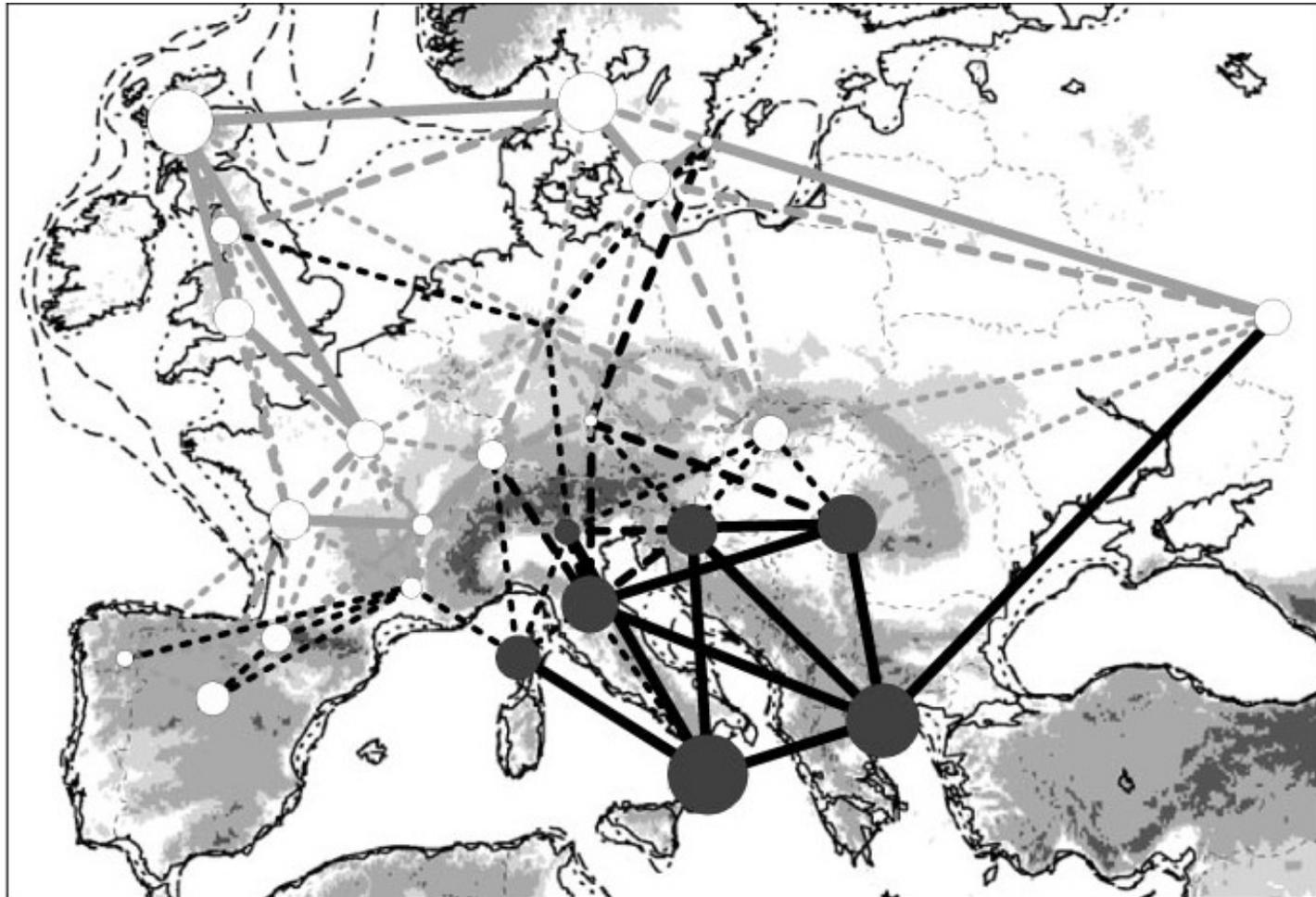
Post *et al*, 2009, Science, 325, p1355



最近冰河期冰河範圍



冰河期間中、高海拔地區族群間遺傳分化程度大



● 族群間遺傳分化程度大於平均值
○ 族群間遺傳分化程度小於平均值

250-500 m
500-1000 m
>1000 m

Petit, 2003, Science, 300, p1653

冰河期後—物種拓殖 (colonizations)



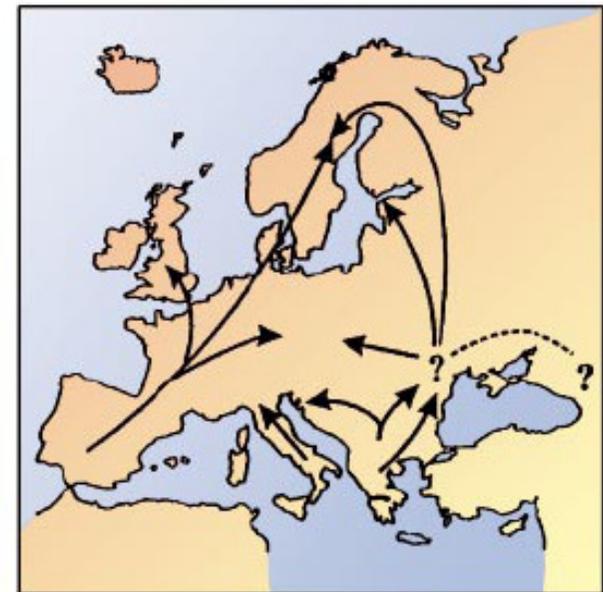
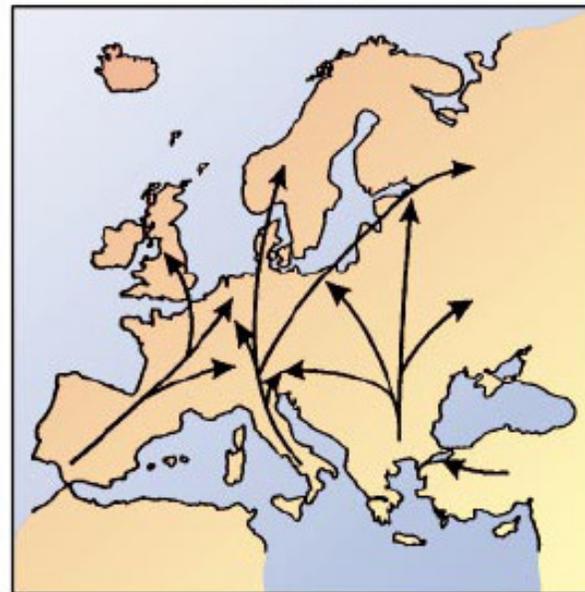
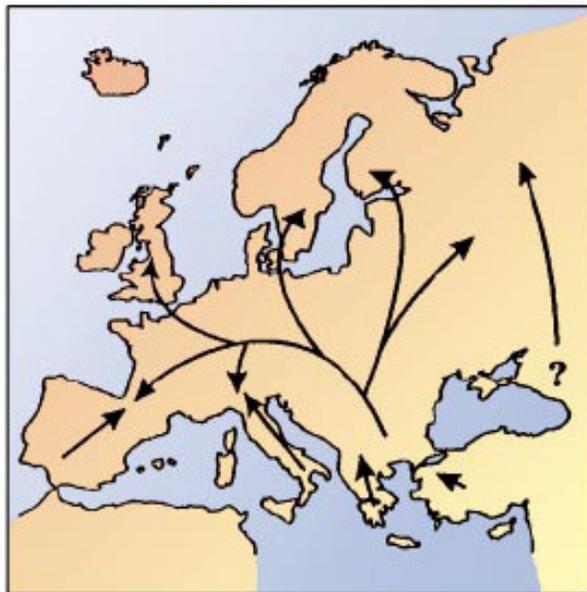
Grasshopper



Hedgehog



Bear

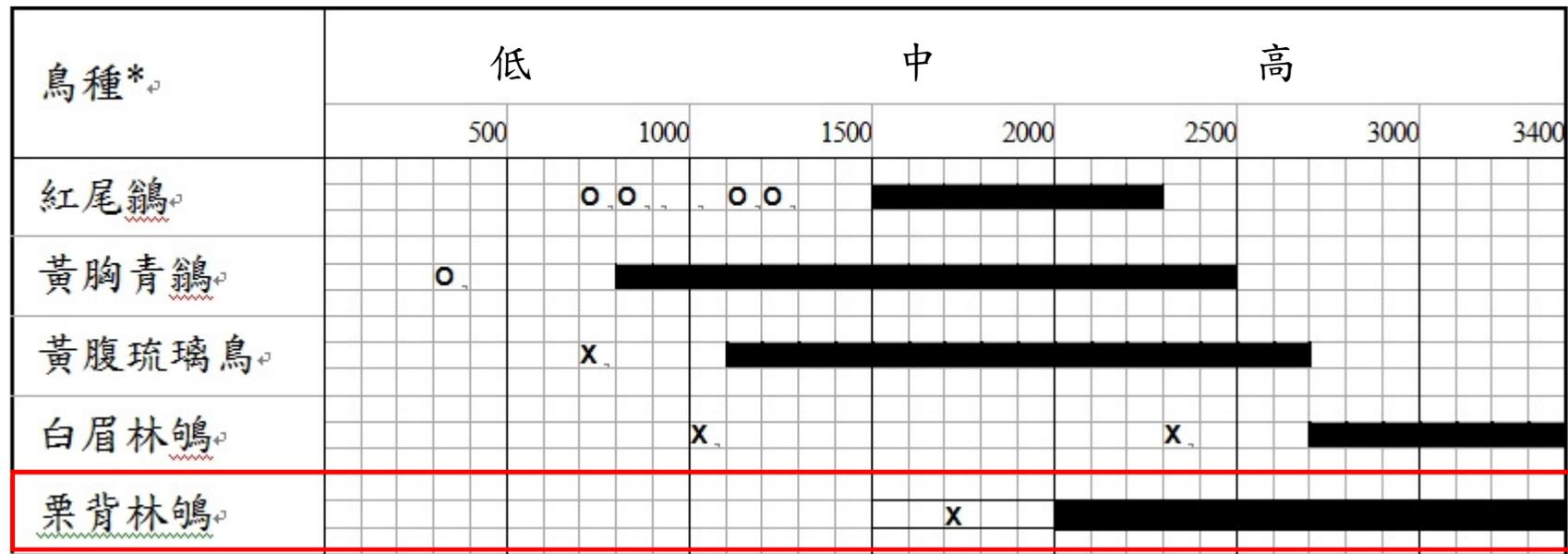


Hewitt, 2002, Nature, 405, p907

計畫目標

- 了解高海拔指標性鳥種從過去至現在族群變化趨勢
- 估算指標性鳥種有效族群數量
 - 評估族群之遺傳多樣性與未來演化潛能
 - 提供追蹤未來全球氣候變遷對指標物種衝擊的基準

太魯閣國家公園栗背林鴿海拔分布



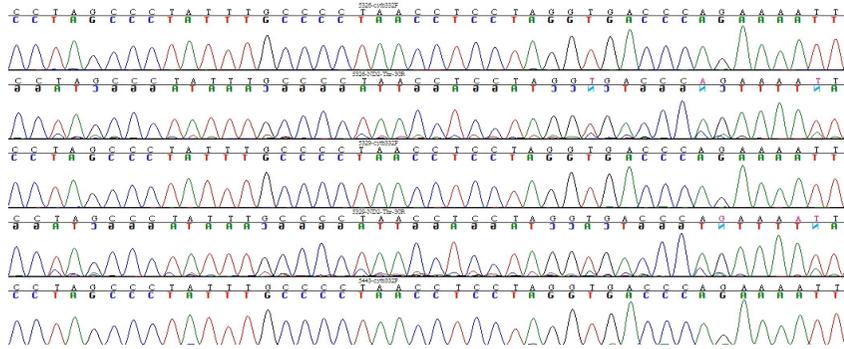
海拔分布範圍(m) ■ 連續分布；x 繁殖季零星分布

許皓捷, 2006

工作項目

1. 收集高海拔地區台灣特有種鳥類—栗背林鴿的組織樣本，並建立遺傳多樣性的遺傳標記。
2. 探討栗背林鴿族群歷史性數量改變，並對照全球冰河時間，推測其族群數量的變化與氣候變遷間的相關性。
3. 建構栗背林鴿現今遺傳多樣性資料，以做長期監測之基準值。

粒線體基因細胞素素b定序

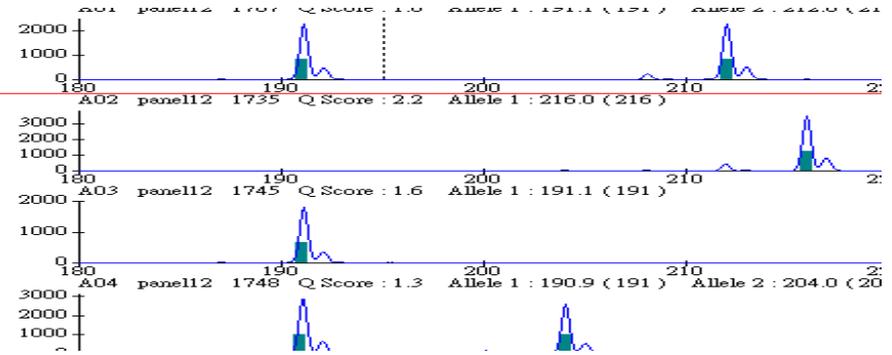


基因多樣性資料分析
(Dnasp 4.901、Arlequin 3.5.1.2)

歷史族群數量變動的推估

- mismatch distribution
(Dnasp 4.901、Arlequin 3.5.1.2)
- 貝氏天際線(Bayesian skyline plot)
(BEAST v1.6.1)
- LAMARC 族群成長分析
(LAMARC v2.1.2)

微衛星體標記篩選

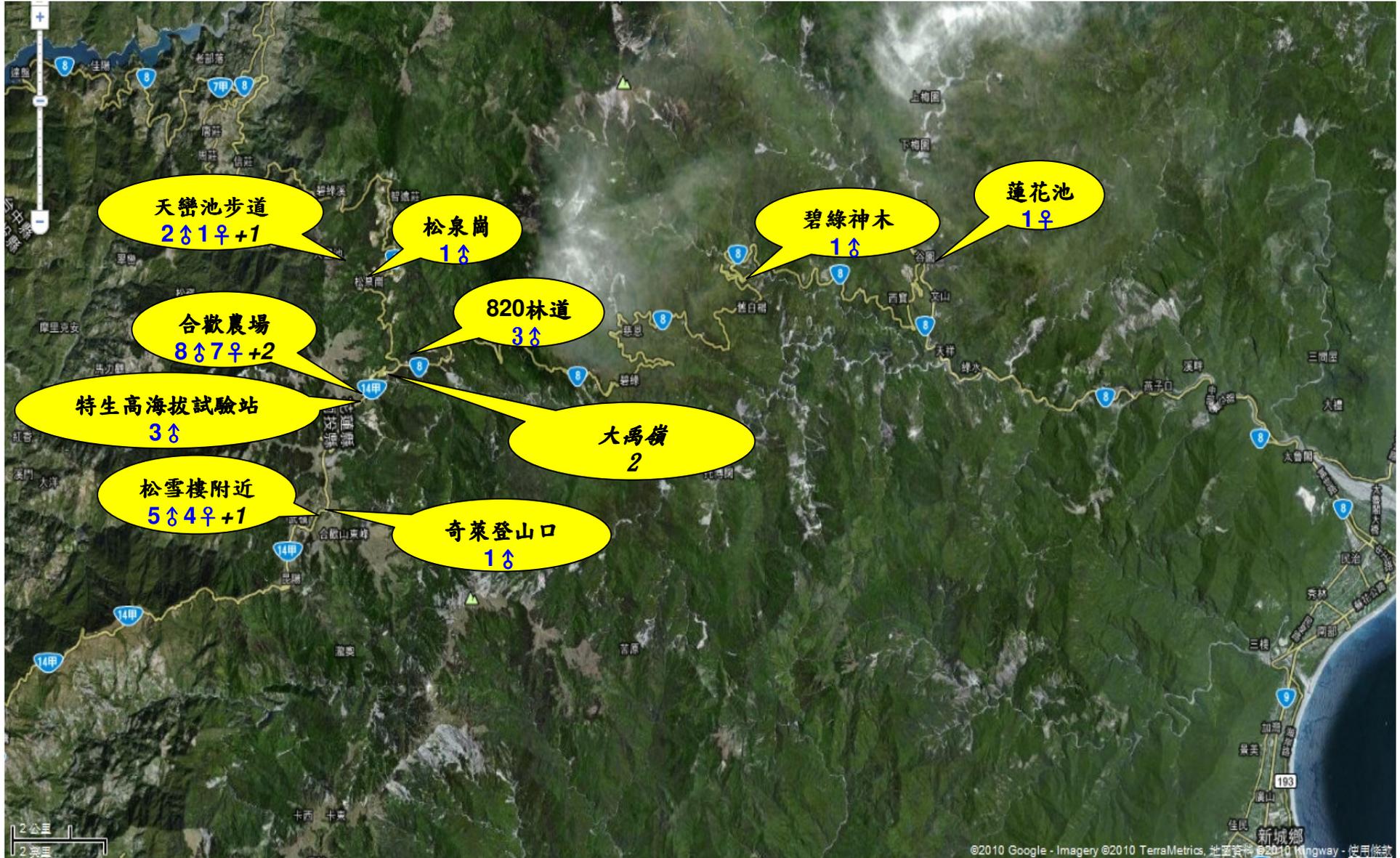


基因多樣性資料分析
(CERVUS 3.0.3)

瓶頸效應(bottleneck)事件偵測
(BOTTLENECK v1.202)

- 探討栗背林鴿族群歷史性數量改變，對照全球冰河時間，推測族群數量的變化與氣候變遷間的相關性
- 建構栗背林鴿現今遺傳多樣性資料，以做長期監測之基準值

使用栗背林鴿樣本雄24隻、雌13隻 (共採集43隻)



粒線體基因遺傳多樣性

	h	S	Hd±SD	$\pi \pm SD$	Fu & Li D* test	Tajima D test
 Dnasp	7	6	0.592±0.085	0.00095±0.0002	0.387 <i>p</i> = 0.57	-0.786 <i>p</i> =0.24
Arlequin	7	6	0.5916±0.085	0.00095±0.0002		-0.786 <i>p</i> =0.25

(Dnasp 4.901 及 Arlequin 3.5.1.2)



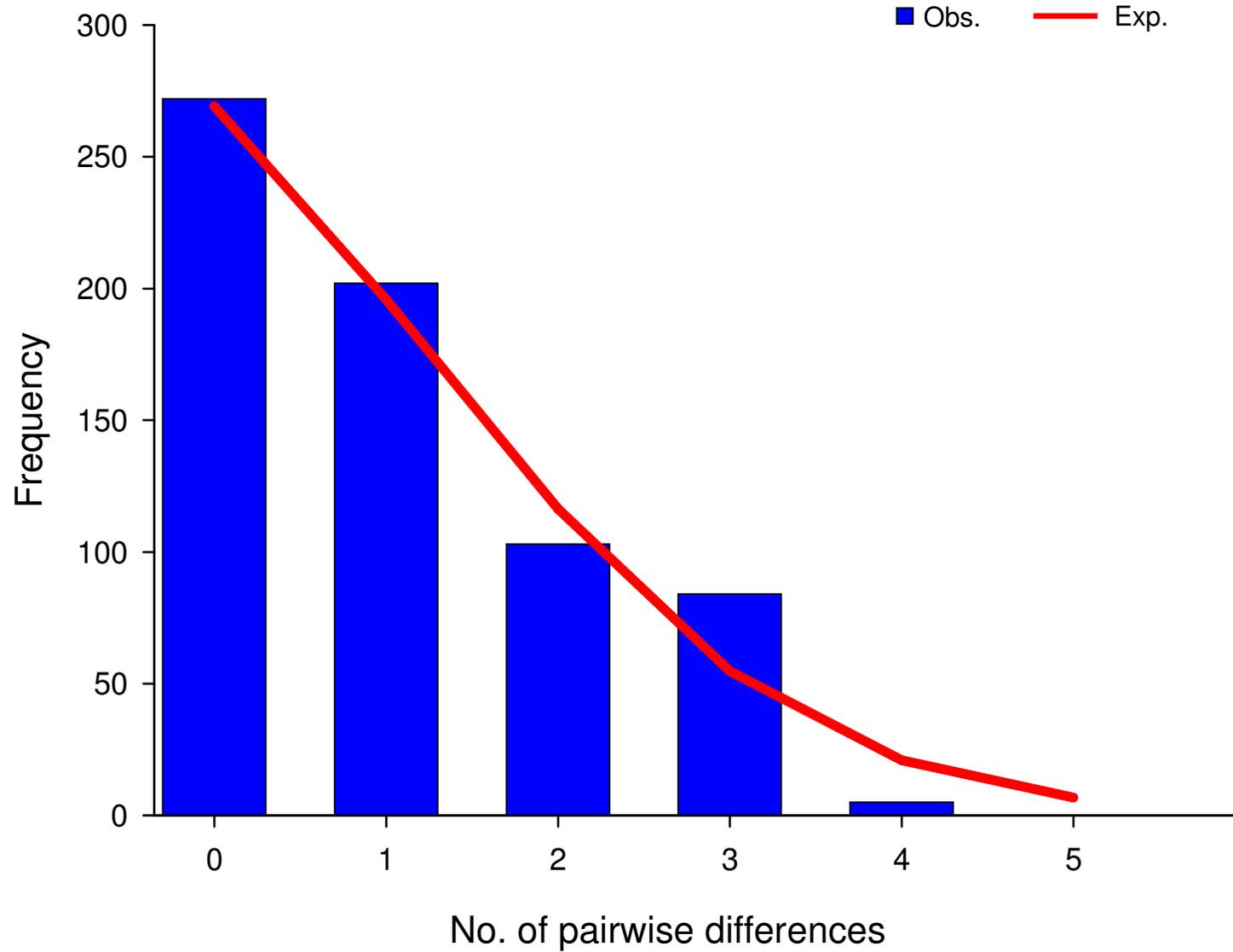
細胞色素b基因序列(1070bp)的多樣性低?高?



	Hd±SD	$\pi \pm SD$	分布範圍	Reference
栗背林鴉 (<i>Luscinia johnstoniae</i>)	0.592±0.085	0.00095±0.0002	2600~3500m	本計畫
酒紅朱雀 (<i>Carpodacus vinaceus formosanus</i>)	0.39	0.0006	2000m以上	(吳 2009 碩士論文)
藪鳥 (<i>Liocichla steerii</i>)		0.002	1000~2800m	(McKay <i>et al.</i> , 2010, BMC Evolution biology, 10, p71)
台灣畫眉 (<i>Leucodioptron taewanum</i>)	0.910 ± 0.056	0.003 ± 0.000	平地~1000m	(Li <i>et al.</i> , 2006, IBIS, 148, p698)



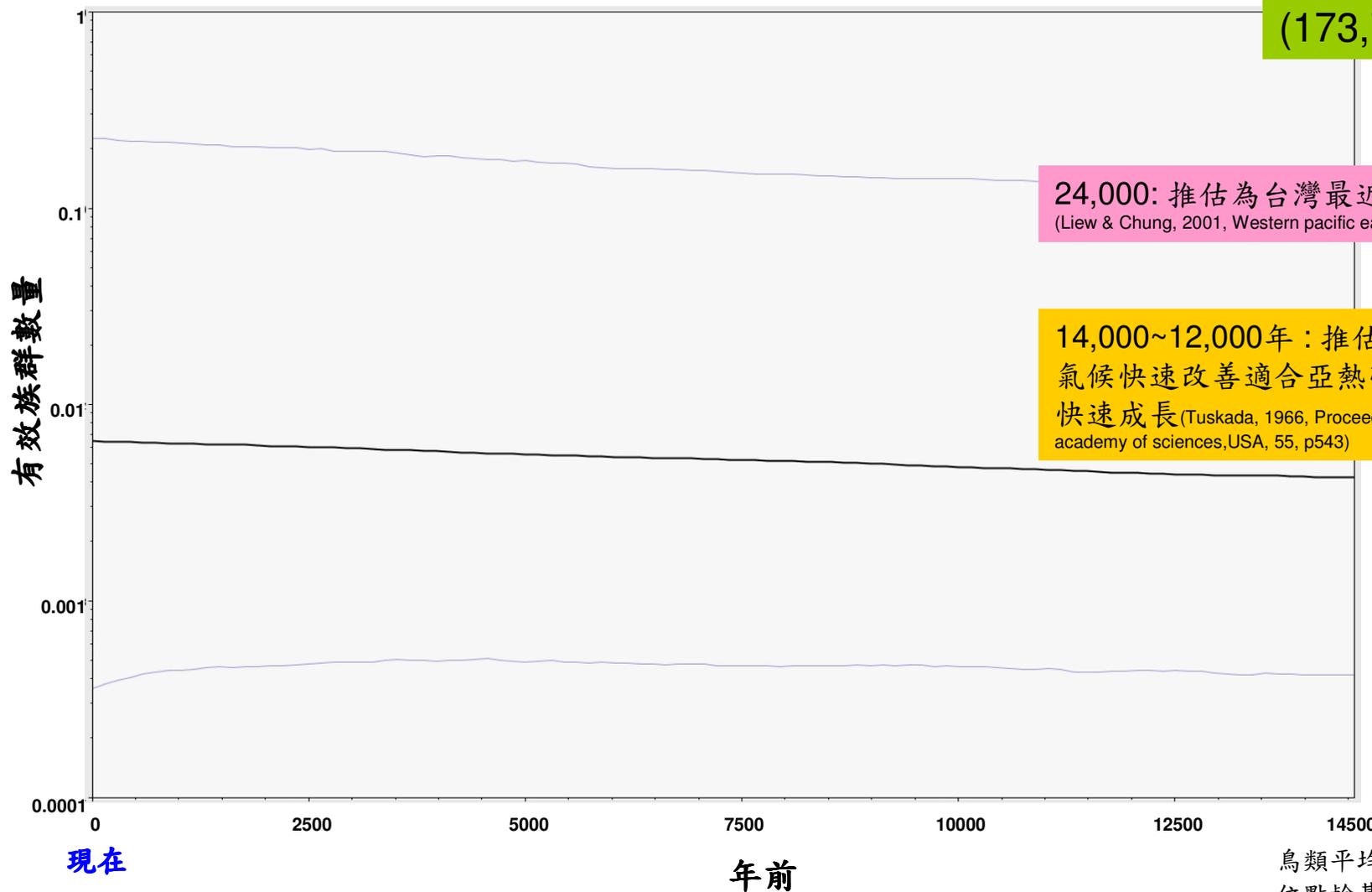
栗背林鴿族群擴張現象



歷史族群數量變動推估

貝氏天際線法(Bayesian skyline plot)

TMRCA:推估最近共祖時間內
栗背歷史有效族群數量約為17萬
(173,740)



24,000: 推估為台灣最近一次冰盛期
(Liew & Chung, 2001, Western pacific earth sciences, 1, p405)

14,000~12,000年: 推估為冰河期後
氣候快速改善適合亞熱帶低海拔生物
快速成長(Tuskada, 1966, Proceeding of national
academy of sciences,USA, 55, p543)

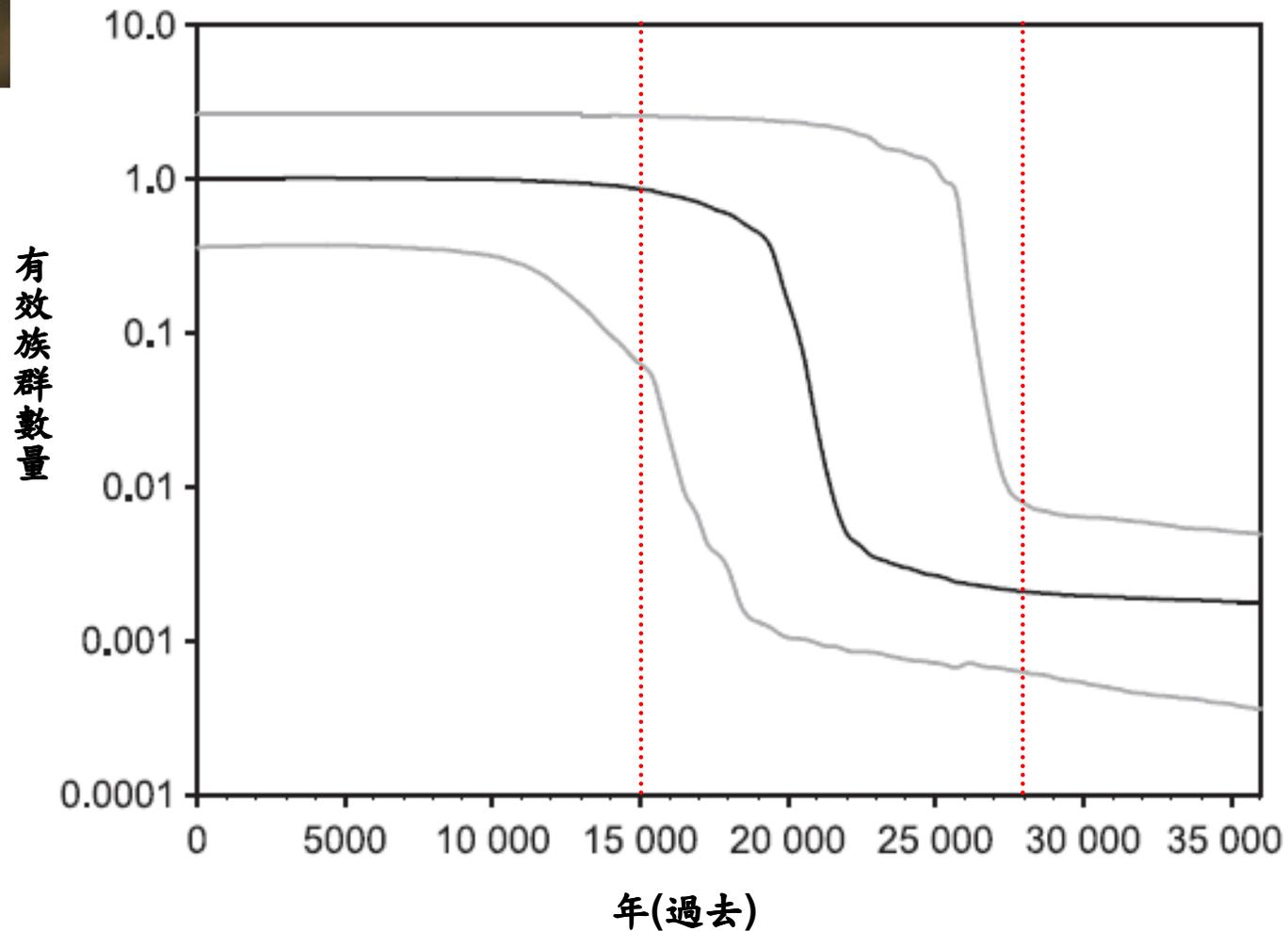
鳥類平均粒線體基因每
位點鹼基置換速率/每年
 1.0×10^{-8}



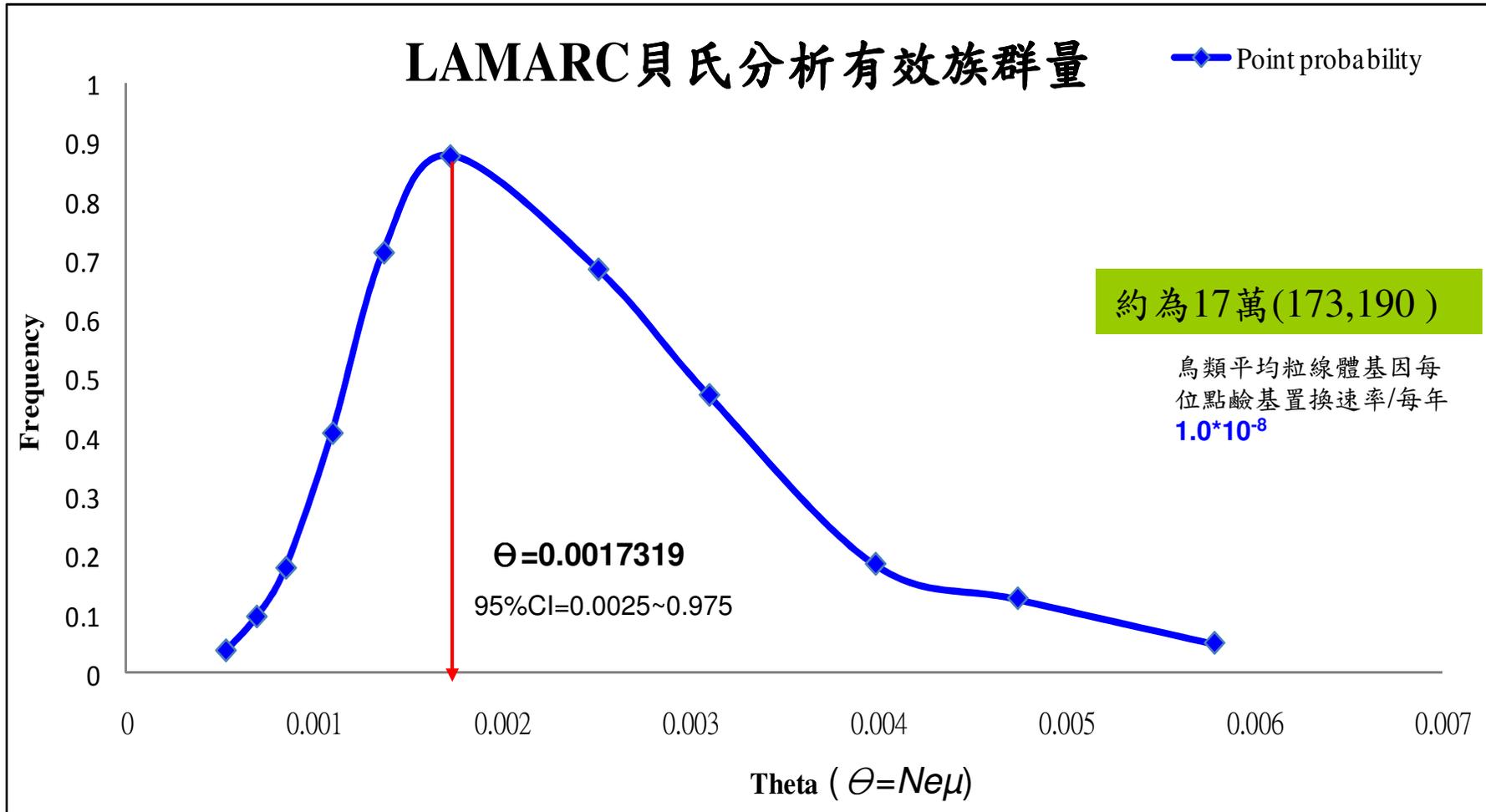
小蜂(*Ceratosolen* sp. 1) 歷史

有效族群 稜果榕廣泛分布於台灣低海拔

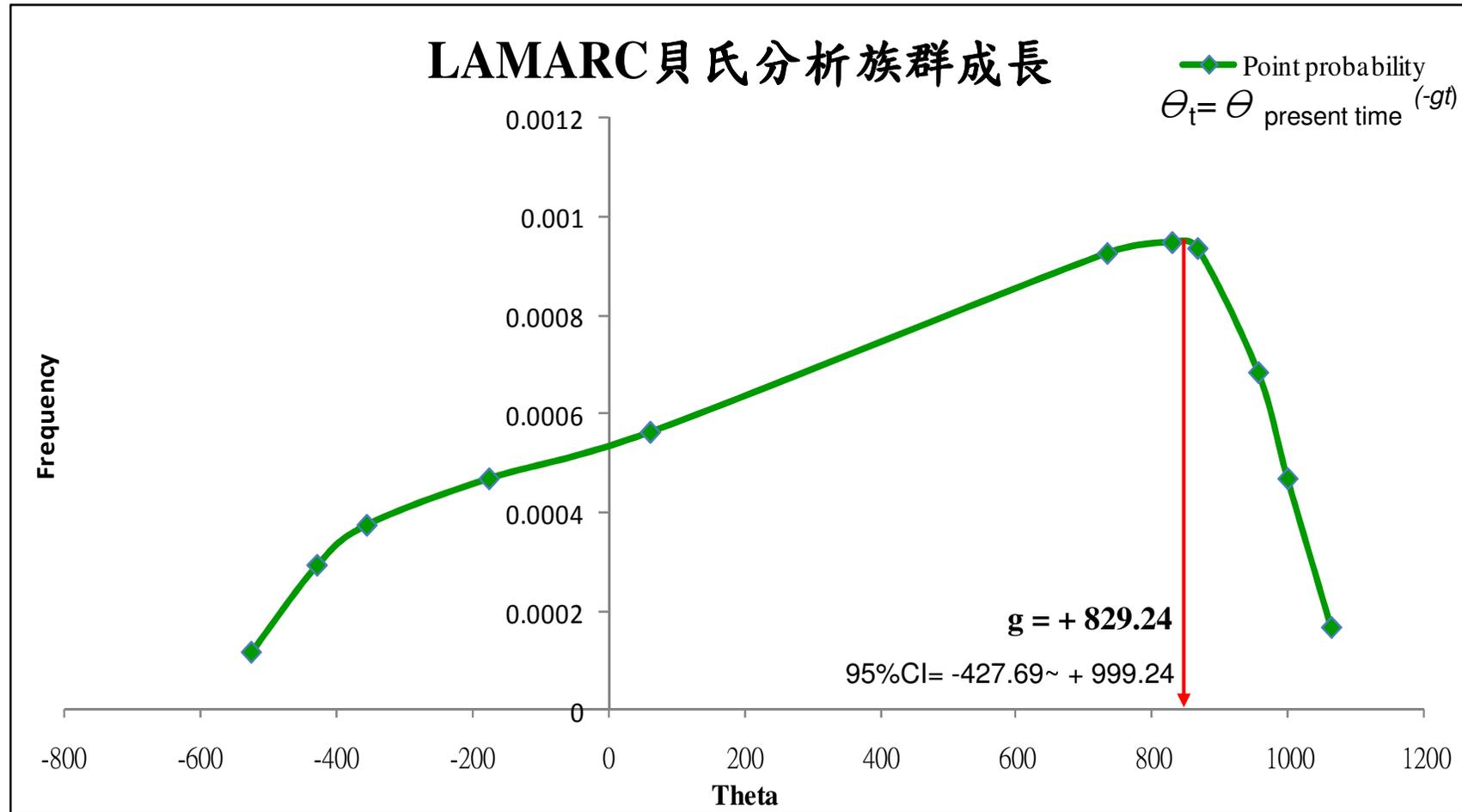
Lin *et al*, 2008, *Molecular Ecology*, 17, p5008



LAMARC 貝氏分析有效族群數量



歷史族群數量正成長



結論一

- 栗背林鴿自14500年前至今族群數量大致穩定
 - 但錯位分布分析及貝氏溯祖分析皆顯示栗背林鴿族群曾快速成長
 - 栗背林鴿族群成長應在最近一次冰盛期結束後，氣候快速暖化的階段
- 栗背林鴿的長期有效族群量約17萬隻

應用次世代定序下的 微衛星體基因座篩選

含有微衛星體重複片段

總共定出片段	重複定序片段	2個重複 (di-repeat)	3個重複 (Tri-repeat)	4個重複 (Tetra-repeat)	5個重複 (Penta-repeat)	6個重複 (Hexa-repeat)
8432	46	17	1	123	1	9

有151個片段可提供微衛星體基因座引子設計

紅脇藍尾鶇 (*Tarsiger cyanurus*) GenBank Accession

Locus	Sequence	Accession
Tcy9	F: ATGGCTTGGAAAGGACTGTG R: gtttctTGGCAAACAATGTCAAAG	446
Tcy12	F: TTGCTGGTAATGGCAGAATG R: gtttGCAAAGGAAATGAAGGATT	447
Tcy13	F: TGCAGAAGCAAGACTCAAAAA R: GGATGGTTAGTATTTTCTACCTV	448
Tcy15	F: GCTCATAAGAGAGGGGACTAAAA R: gtttTGGCCCAATACAAGATTTC	AB233449
TcyII32	F: cagtggggcgatcaTTTGGGAAATCTTGCTTGGT R: gtttctTGGATGTCATGAACAGGTGA	AB233450
TcyII45	F: cagtggggcgatcaACATACCAAAAGTCACCTGGA R: gtttctCAATGGGTAAAGTATTATGTCAT	AB233451



Primer set	EMBL accession no.	Primer sequences (5'-3')†
Aar4-Gga5	U82388 AF234988	F: [6-FAM]JAGCWATTKTCTAWCATRGTITGTGCATC R: CTAACATAAGATGAYTAAGGTCTCTGG
Calex-05	AM072453	F: [HEX]TCCAGCTGAAGTCTTTCOOGTGAAT R: GTTCTCTT-TCCACACCTGTTCGACAGTTCATA
LOX1	Y16820	F: GTTCTCTT-ATGATGGTAAGTCTAATGAAAGC R: [NED]CCACACACATTCACCTCTATG
PAT MP 2-43	AM056063	F: [HEX]ACAGGTAGTCAGAAATGGAAAG R: GTATCCAGAGTCTTTCCTGATG
Pcaμ3	AJ279805	F: [6-FAM]GGTGTITGTGAGCCGGGG R: TGTTACAACCAAGCGGTCAATTG
PmaD22	AY260527	F: [6-FAM]GATCAGAGCTTGCCCTCAACAC R: GTTCTCTT-CTGGGCTGAAATACCTACCC
Tc.11B4E-CEST(B)	AF036265	F: [6-FAM]CCTGGTGTATAGCAGT R: TAGCGAGATGCCCTGTGTATG
TG11-011	AF076670	F: [6-FAM]JACAACTAAGTACAT R: TAAATACAGGCAACATGG
Tsu6	AF076670	F: GTTCTCTT-CATAGTGATGCCCTC R: [6-FAM]CCAGTGTCTCTTAAAT
Tsu6	AF076670	F: TCCCAAGACATCCCAT R: CTGGTGTAGGTGCTGTG
Tsu6	AF076670	F: [HEX]CCAGTACCGTATTTGTAGGCA R: TGGAGCGGTGATTTGTTCAAT
Tsu6	AF076670	F: [HEX]CTTCTCTGCTATAAGGCCACAGG R: AAGTGATCACATTTATTTGAATAT
Tsu6	AF076670	F: [NED]CCAATGGCTCTCTAGAATGG R: CAGTGTGCTATGAGATGAAGG
Tsu6	AF076670	F: [HEX]CCAGGCATTTGCTGTACTCG R: GCTGGTGTCTGTCAGTCCAC

References



大華鶇
(*Acrocephalus arundinaceus*)



藍山雀
(*Cyanistes caeruleus*)



大山雀
(*Parus major*)



斑馬雀
(*Taeniopygia guttata*)



灰胸繡眼
(*Zosterops lateralis chlorocephala*)

共80組

繡眼畫眉 (*Alcippe morrisonia*)



Molecular Ecology Resources 2009,9, p1460
PERMANENT GENETIC RESOURCES NOTE
Permanent Genetic Resources added to Molecular Resources Database 1 May 2009-31 July 2009

Locus	Core motif	Primer (5')	Primer (3')	GenBank accession
GC-GATA08	(GATA) ₁₂	F: CTGGACAGAAACCCCAATG	R: TGAACTACTTACCAGATATCATCCAGC	AY366082
GC-GATA10	(GATA) ₁₂	F: CTGGACAGAAACCCCAATG	R: TGAACTACTTACCAGATATCATCCAGC	AY366076
GC-GATA11	(GATA) ₁₀	F: CTGGACAGAAACCCCAATG	R: TGAACTACTTACCAGATATCATCCAGC	AY366077
GC-GATA13	(GATA) ₁₃	F: TTCTCTCCAGGAAACCCCTTGC	R: TGAACTACTTACCAGATATCATCCAGC	AY366078
GC-GATA14	(GATA) ₁₀	F: TGATCAGATTTGTTTATCTGG	R: GGTATATCCCATGGACTGTTC	AY366079
GC-GATA15	(GATA) ₁₂	F: CAGAGTTTTCAAAAGCCTCTGC	R: GACTATGGAAAATCAATCAAGG	AY366080
GC-GATA22	(GATA) ₁₂	F: GACCAGAATCCACCCTGCACGC	R: AGAGGAATGAATAAAAGCCAGTG	AY366081
GC-GATA23	(GATA) ₇	F: ACCAGAAAGGTCTGACAAGG	R: CTACAAAAAAGTGCAATTCGACG	AY366075



大陸畫眉
(*Garrulax canorus*)

Locus	Repeat motif	Primer (5')	Primer (3')	GenBank accession
lsgata7	(gata) ₁₁	F: CTGGACAGAAACCCCAATG	R: TGAACTACTTACCAGATATCATCCAGC	AY366082
lsgata12	(gata) ₇ gaca	F: CTGGACAGAAACCCCAATG	R: TGAACTACTTACCAGATATCATCCAGC	AY366077
lsgata15	(gata) ₁₂	F: TTCTCTCCAGGAAACCCCTTGC	R: TGAACTACTTACCAGATATCATCCAGC	AY366078
lsgata17	(gata) ₁₀	F: TGATCAGATTTGTTTATCTGG	R: GGTATATCCCATGGACTGTTC	AY366079
lsgata21	(gata) ₈ gaca	F: CAGAGTTTTCAAAAGCCTCTGC	R: GACTATGGAAAATCAATCAAGG	AY366080
lsgata24	(gata) ₁₁	F: GACCAGAATCCACCCTGCACGC	R: AGAGGAATGAATAAAAGCCAGTG	AY366081
lsgata25	(gata) ₁₀	F: ACCAGAAAGGTCTGACAAGG	R: CTACAAAAAAGTGCAATTCGACG	AY366075



藪鳥
(*Liocichla steerii*)



青背山雀
(*Parus monticolus*)

Wang et al., 2005, Molecular Ecology Note, 5, p439

其它未發表



粉紅鸚嘴
(*Paradoxornis webbianus bulomachus*)

5組微衛星基因多樣性

Locus	Sequence 5'-3'	K	N	H _{Obs}	H _{Exp}	p value (HWE)	Reference
Tcy9	F: ATGGCTTGGAAAGGACTGTG R: gtttctTGGCAAACAATGTCAAAG	15	17	1	0.93	0.2	Satio <i>et al</i> 2006
TG11-011	F: ACAAACTAAGTACATCTATATC R: TAAATACAGGCAACATTGG	4	35	0.457	0.442	1.0	Lee <i>et al</i> 2006
Titgata02	F: ACCTCCAGGATGGGGACTCC R: TTGTCTTTTGGGTTGCCTGA	7	30	0.633	0.677	0.37	Wang <i>et al</i> 2005
GC-GATA15	F: CAGAGTTTTTCACAAAGCCTCTGC R: GACTATGGAAAATCAATCAAGG	14	33	0.758	0.746	0.89	Huang <i>et al</i> 2004
PwGATA4	F: ACTGGACTGTCCACATGGA R: CGTGCCTTCGCAAGTTGG	3	32	0.063	0.092	0.05	尚未發表
		平均	8.6	29.4	0.582	0.577	

每組基因對偶基因數(k)；樣本數(N)；異型合子歧異度觀察值(H_{Obs})；異型合子歧異度預期值(H_{Exp})；哈溫平衡(HWE)檢測P值

另有四組多態性微衛星基因偏離哈溫平衡

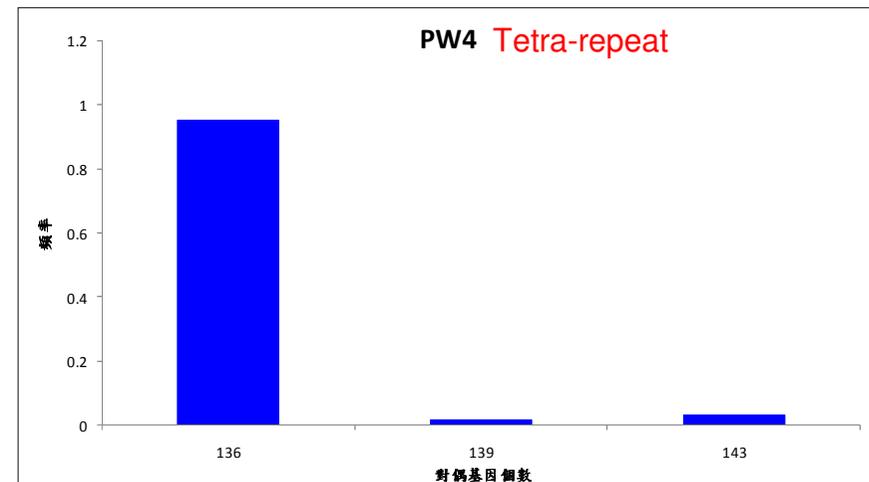
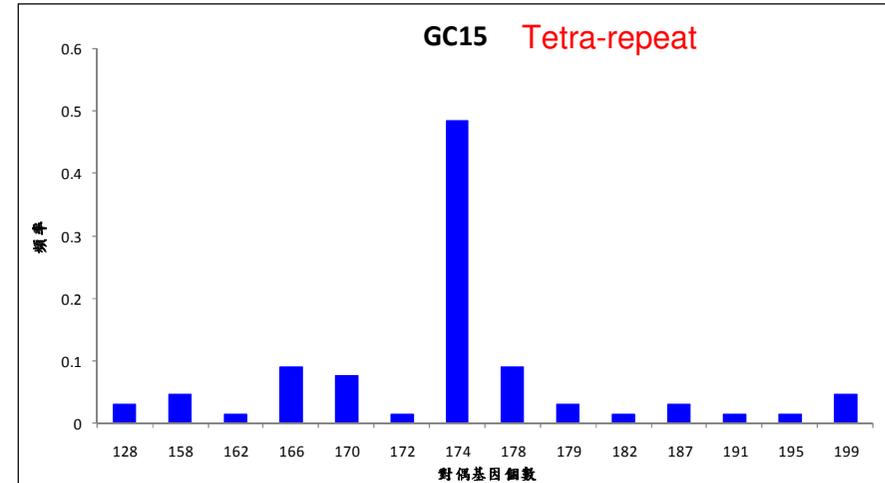
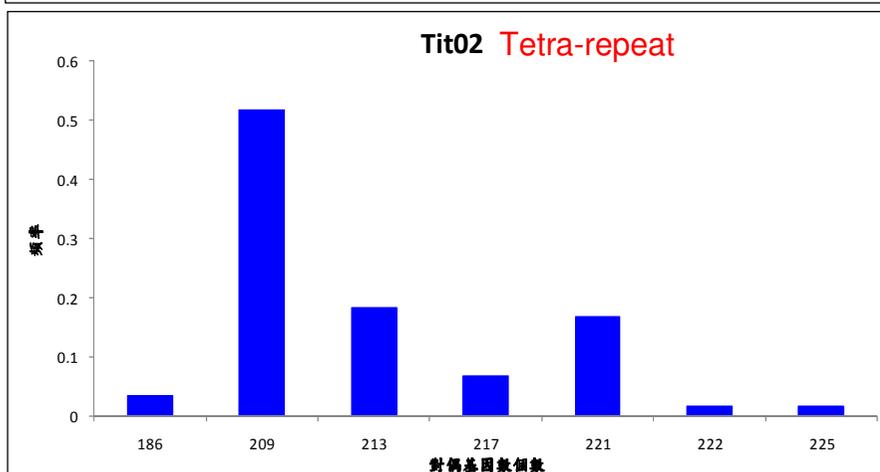
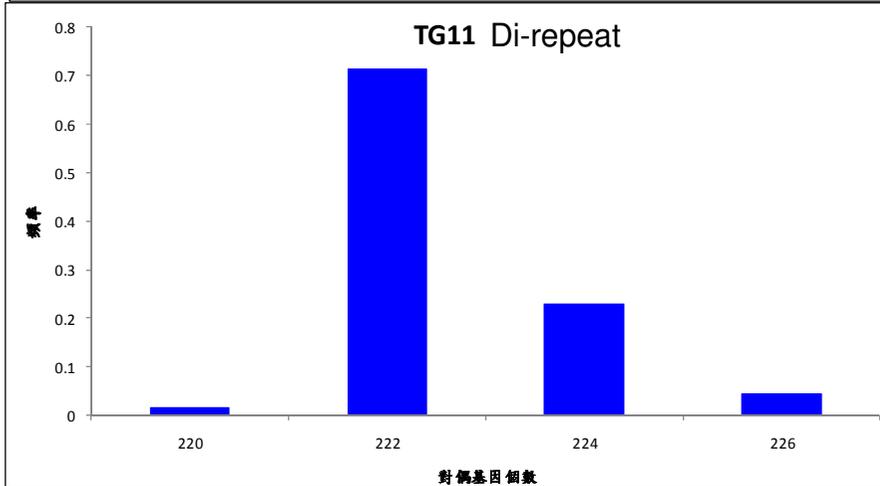
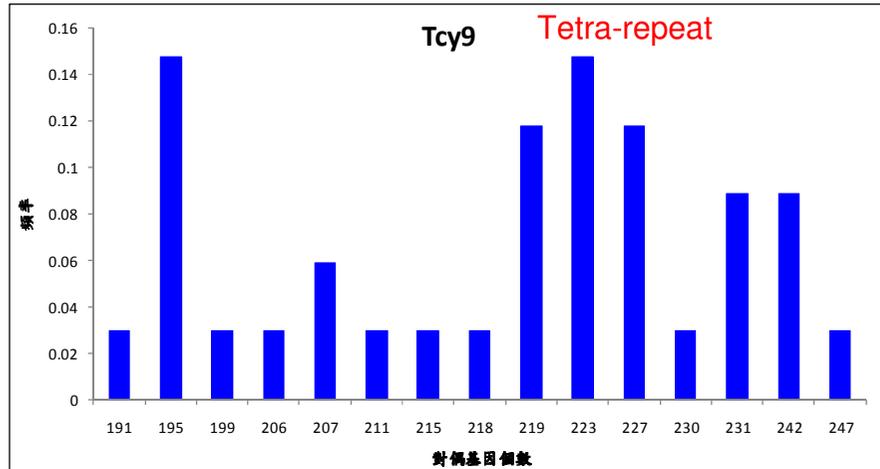
任兩組微衛星體基因座間有基因連鎖現象檢測

	Tcy9	TG11-011	Titgata02	GC-GATA15	PwGATA4
Tcy9	-				
TG11-011	0.8868	-			
Titgata02	0.4432	0.0888	-		
GC-GATA15	1.0000	0.5335	0.1837	-	
PwGATA4	0.3658	0.0134	1.0000	0.4916	-

Bonferroni校正type I error的臨界值($\alpha = 0.005$)

5組微衛星基因頻譜圖

4組偏離逐步突變模式



栗背林鴿歷史事件中沒有發生瓶頸事件 (以Bottleneck軟體分析)

Locus	N	K	Hobs	Heq	S.D.	(Hobs-Heq)/sd
Tcy9	26	14	0.942	0.926	0.021	0.753
TG11-011	70	4	0.442	0.456	0.17	-0.085
Titgata02	60	7	0.677	0.671	0.116	0.053
GC-GATA15	66	14	0.746	0.846	0.048	-2.095
PwGATA4	64	3	0.092	0.356	0.176	-1.502
					$P_{\text{heterozygosity excess}} = 0.68$	
					$P_{\text{heterozygosity excess over combined dataset}} = 0.74$	

樣本數(N) ; 對偶基因數(K) ; 異型合子歧異度觀察值(Hobs) ; IAM突變模式下檢測突變-漂變平衡(mutation-drift equilibrium, Heq)
異型合子歧異度過多檢測($P_{\text{heterozygosity excess}}$)

總結2

- 454定序結果雖然篩得大量含微衛星片段，但資料不足以設計引物
- 跨種擴增的微衛星基因座，因大多不符逐步突變模式(stepwise mutation model)，僅可進行瓶頸效應測試
- 栗背林鴿歷史事件中沒有發生瓶頸事件，與DNA序列推得之族群擴張結果相符



- 雌雄二色型
- 強烈領域
- 易觀察
- 數量普遍



同屬的藍喉鵯(*Luscinia svecica*)
約有26%子代為非婚生子代 (EPP)
(Johnsen & Lifjeld 2003)

- 栗背林鵯有偶外受孕?
- 母鳥偶外受孕比例?
- 偶外受孕子代比例?
- 雄鳥獲得偶外受孕機會?
 - 羽色?
 - 歌聲?
 - 領域大小?
 - 免疫力?
- 偶外受孕子代
 - 免疫力
 - 大小
 -

微衛星親緣鑑定之高效力

樣本數 (Number of individuals)	37
微衛星基因組數 (Number of loci)	5
平均對偶基因數 (Mean number of alleles per locus)	8.6
平均異型合子歧異度預期值 (Mean expected heterozygosity)	0.577
排除沒有血親關係的父母機率 (不知雙親父母找其中之一雙親) [Combined non-exclusion probability (first parent)]	0.1352
排除沒有血親關係的父母機率 (知道其中之一雙親找另一雙親) Combined non-exclusion probability (second parent)	0.0355

結論

- 栗背林鴿有歷史性族群擴張現象
- TMRCA推估歷史有效族群數量約為17萬
- 獲得目前栗背林鴿遺傳多樣性基礎資料，以供未來監測比對
- 篩選出的栗背林鴿具多態性的微衛星體基因，可提供未來進行
 - 栗背林鴿遺傳婚配系統
 - 親子鑑定
 - 其它族群遺傳相關研究的執行

經營管理建議

- 以十年為期，監測栗背林鴿遺傳多樣性及有效族群變動趨勢
- 對分布海拔更局限的物種進行遺傳監測
- 對栗背林鴿行為生態進行研究，以豐富國家公園自然資源解說

致謝

- 太魯閣國家公園計畫經費支持
- 國家公園朱何宗先生行政協助
- 洪心怡、林容仟、林美珠、儲瑞華小姐協助野外樣本採集及實驗室工作進行
- 東華大學許育誠教授實驗室人員及徐中琪小姐協助野外樣本採集
- 特有生物保育研究中心高海拔工作站提供野外工作協助