

台灣地區野生及圈養黑熊遺傳變異之初探

陳元龍 楊吉宗

行政院農業委員會特有生物研究保育中心 南投縣集集鎮民生東路1號

摘 要

本研究共定序出1隻馬來熊(*Ursus malayanus* Raffles)及11隻亞洲黑熊(*Ursus thibetanus*)的12S rRNA基因(391個鹼基)及16S rRNA基因(425個鹼基)序列,在亞洲黑熊部分,3隻確定為亞洲黑熊台灣亞種,其餘8隻則為不確定來源之圈養亞洲黑熊。定序結果,兩個基因在亞洲黑熊與馬來熊間有明顯差異,建議可做為此兩種間鑑別的依據。在台灣黑熊亞種及圈養的亞洲黑熊之間,分別只有3個鹼基發生轉移變異,由於基因變異性低,該二個基因應不適作為亞洲黑熊亞種間的鑑別。

關鍵詞: 台灣黑熊、粒線體DNA、12S rRNA、16S rRNA

收件日期: 2001年5月23日

接受日期: 2001年10月11日

台灣黑熊(*Ursus thibetanus formosanus* Swinhoe, 1864)為亞洲黑熊分布於台灣的特有亞種,早期廣泛分布於台灣地區,尤以海拔1,000到3,000m的森林地帶較多(王及陳1991),近年來因棲地破壞及過度狩獵,致使本種動物備受威脅,數量亦急遽減少(Wang 1990),於1989年依野生動物保育法被列為瀕臨絕種野生動物。有關亞洲黑熊的亞種分類相當紊亂,儲等(2000)提出亞洲黑熊可分大陸地區的模式種、日本亞種及台灣亞種,而汪(1998)則於「中國瀕危動物紅皮書-獸類」一書中,指中國境內亞洲黑熊分成五個亞種;由於亞洲黑熊分布廣泛,不同地區、海拔高度的黑熊在外形上往往有些許變異,故以外形來區分不同的亞種相當困難,且易產生爭議性。台灣地區所產的亞洲黑熊,在上述的分類皆為一獨立亞種,且台灣地區因台灣海峽之隔,與大陸地區的亞洲黑熊在自然狀況下應無基因交流,故保育台灣黑熊對維護亞

洲黑熊遺傳多樣性而言,實為一個相當重要的工作。近來分子生物技術日新月異,利用該項技術探討種間的類緣關係或是種內的亞種及族群界定亦相當普遍,在動物方面特別是粒線體DNA的應用,由於粒線體DNA複製過程缺乏修補機制,發生變異機率高於體染色體,且具有母系遺傳的特性,故常用於探討動物類緣關係、族群結構、生物地理等方面的研究(Avise *et al.* 1986; Ball *et al.* 1988; Gemmell and Westerman 1994; Masuda *et al.* 1996)。由於以往對於台灣黑熊遺傳變異相關研究相當稀少,且台灣黑熊在野外亦不易發現,欲取得其組織樣本更是不易,因此,初步利用民間現有圈養的黑熊及部分確定為台灣黑熊個體的組織,進行粒線體DNA內12S rRNA基因及16S rRNA基因序列變異的研究,期望能對黑熊的遺傳變異有更多的了解。

本研究共取得1隻馬來熊及11隻黑熊血液樣本,包括1隻雪山地區在台灣黑熊、1隻玉

山地區的野生台灣黑熊及9隻圈養的黑熊。這9隻圈養的黑熊之中，由台北市立動物園所提供的1隻證實為台灣黑熊亞種(儲等 2000)，其餘圈養黑熊皆無法確定是否為台灣亞種。黑熊經麻醉後抽取頸靜脈血液，再以phenol/chloroform-salt法(Sambrook *et al.* 1989)純化染色體DNA，並進行12S rRNA基因及16S rRNA基因的PCR反應，在總體積100 μ l的反應液中含有200 ng的黑熊純化染色體DNA、1倍的PCR緩衝液(50 mM KCl，2 mM MgCl₂，1 mM β -mercaptoethanol)、200 μ M dNTP混合液及兩股各20 pmol的粒線體DNA引子(16S-1F：5'-GTGCAAAGGTA GCATAATCA-3'；16S-4R：5'-TGTCC TGATCCAACATCGAG-3'，Hoelzel and Green 1992；L1091：5'-AATTGGATCCAA CTGGGATTAGATACCCACTAT-3'；H1478：5'-TTAAGAATTCGAGGGTGAC GGGCGGTGTGT-3'，Masuda *et al.* 1996)。PCR的反應於溫度循環器進行，反應條件為：95°C預熱5分鐘，再以94°C 1分鐘，50°C 30秒，72°C 1分鐘反應35個循環，最後以

72°C反應10分鐘，反應完畢後將混合液中的DNA純化，以自動定序法定出16S rRNA基因(分別使用16S-1F及16S-4R為定序引子)及12S rRNA基因(分別使用H1478S及H1254S為定序引子)(Masuda *et al.* 1996)片段序列。定序結果，在12S rRNA基因部分，亞洲黑熊定出391個鹼基，馬來熊則定出390個鹼基，亞洲黑熊與馬來熊存在13個鹼基變異，包括1個鹼基缺失(deletion)、1個鹼基易位(transversion)及11個鹼基轉移(transition)；在亞洲黑熊之間，存在3個鹼基變異，皆為轉移變異，其中已確定為台灣亞種的3隻黑熊之中，來自雪山者與另2隻來自玉山與台北市立動物園者僅有1個鹼基變異(nt 197 G→A)，且此鹼基變異僅發生於雪山台灣黑熊，其餘圈養黑熊與玉山台灣黑熊皆為相同鹼基(圖1)。在16S rRNA基因部分，除野生玉山台灣黑熊未完整定序完成外，其餘黑熊及馬來熊定出425個鹼基，亞洲黑熊與馬來熊之間有34個鹼基變異，包括2個鹼基易位及32個鹼基轉移；在亞洲黑熊之間僅有3個鹼基變異，皆為轉移變異，該3個變異位置在已確定為台灣黑熊亞種者(來

```

1 GCGTGCTTCA TTGCCTTATT CAACCAAGCT CTCTATTCTT GGTTTACTAC 50
51 TAAATCCACC TTTAGTTTTT AGTTTCATAA AAACCTTTCGT AGGTTGTTCT 100
101 TGAATAGAAA ATGTAGCCCA TTTCTTCCCA TCCCATGGGT TACACCTTGA 150
151 CCTAACTTTT TTATGCAAGA TGATTATGCT TACTCTTTTT CCTTTTGAGG 200
201 GTTTGCTGAA GATGGCGGTA TATAGACTGG ATTAGCAAGG GGCGGTGAGG 250
251 TCTATCGGGG TTTATCGATT ACAGAACAGG CTCCTCTAGG GGGGTTTAAA 300
301 GCACCGCCAA GTCCTTTGAG TTTTAAGCCG TTGCTAGTAG TTCTCTGGCG 350
351 AATAATTTTG TTTGATAAAT TATTTATGTT TAAGGCTAAG C 391

```

圖1. 亞洲黑熊12S rRNA基因的391 bp序列。所定序的11個樣本中，共有3個鹼基發生轉移變異，分別以粗體字母表示，其中具框線者僅來自雪山的樣本為G，其餘樣本皆為A。

Fig. 1. A sequence of mitochondrial 12S rRNA (391 bp) gene of *Ursus thibetanus*. The bold letters represent the transition nucleotides in the 391 nucleotides of the 11 Asian black bears. The framed bold transition nucleotide from Shei-Shan sample is G, and from the other samples is A.

自雪山者與來自台北市立動物園者)完全相同(圖2)。綜合以上結果,亞洲黑熊在12S rRNA及16S rRNA基因的變異相當小,只各占所定序完成鹼基之0.77%及0.71%,應無法用來協助釐清圈養黑熊與台灣黑熊之親緣關係,亦即不適合用來研究黑熊亞種間的相關問題。由於在粒線體的DNA當中,控制區域是最易發生變異的區域(Brown *et al.* 1986; Southern *et al.* 1988),而rRNA及tRNA則最不易發生。本研究的結果在12S rRNA基因序列部分,在已確定為台灣亞種的3隻黑熊當中,來自雪山者與另1隻來自玉山及1隻台北市立動物園者僅有1個鹼基的變異。由於本研究的樣本數不多,再加上樣本來源有許多未確知之處,故仍須取得確定典型黑熊亞種之樣本,並增加樣本數目,分析並比較其基因序列,方能探究各黑熊亞種間之遺傳變異情形。

謝 誌

感謝玉山國家公園、台北市立動物園、

高雄市立壽山動物園、曾秋菊主任、吳俊明先生、劉進發先生、蔡昇泉先生、黃美秀小姐提供黑熊血液樣本,以及本中心何東輯站主任、詹文輝先生、吳清明先生、林宗宏先生、詹芳澤先生、塗清祥先生協助採集黑熊血液,張簡琳玲博士協助英文摘要及圖說修正。

引用文獻

王穎、陳添喜。1991。台灣黑熊之生態調查及其經營管理策略(II)。行政院農業委員會。

汪松。1998。中國瀕危動物紅皮書—獸類。科學出版社。

儲瑞華、吳海音、林曜松。2000。台灣黑熊(*Selenarctos thibetanus formosanus*)的DNA鑑定初探。動物園學報12: 25-34。

Avise, J. C., S. Helfman, C. Saunder, and L. S. Hales. 1986. Mitochondrial DNA differentiation in North Atlantic eels :

```

1  ACCAACATCC  GAAAAACCCA  CCCATTAGCC  AAAATCATCA  ACAACTCACT  50
51  CATTGATCTC  CCAGCACCAT  CAAATATCTC  AGCATGATGA  AACTTTGGAT  100
101 CCCTCCTCGG  AGTATGCCTA  ATCCTACAGA  TTCTGACAGG  CCTATTTCTA  150
151 GCTATACACT  ACACATCAGA  CGCGACTACA  GCCTTTTCAT  CAGTCGCCCA  200
201 TATTTGCCGA  GACGTCCATT  ACGGATGAAT  TATCCGATAC  ATACATGCAA  250
251 ACGGAGCCTC  CATGTTCTTC  ATCTGCCTAT  TCATACACGT  AGGACGGGGC  300
301 TTGTATTATG  GCTCATACT  ACTCTCAGAA  ACATGAAACA  TTGGCATCAT  350
351 CCTCCTATTT  ACAGTTATAG  CCACCGCATT  CATAGGATAC  GTCCTACCCT  400
401 GAGGACAAAT  ATCATTCTGA  GGAAT  425
    
```

圖2. 亞洲黑熊16S rRNA基因的425 bp序列。所定序的樣本中,共有3個鹼基發生轉移變異,分別以粗體字母表示,而確定為台灣黑熊亞種者其基因序列完全相同。

Fig. 2. A sequence of mitochondrial 16S rRNA (425 bp) gene of *Ursus thibetanus*. There were only 3 transition nucleotides represented by the bold letters in the sequences. The sequences between *Ursus thibetanus formosanus* are identical.

- Population genetic consequence of an unusual life history pattern. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 83: 4350-4354.
- Ball, R. M. Jr., S. Freeman, F. C. James, E. Bermingham, and J. C. Avise. 1988. Phylogeographic population structure of red-winged blackbirds assessed by mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 85: 1558-1562.
- Brown, W. G., G. Gadaleta, G. Pete, C. Saccone, and E. Sbisà. 1986. Structural conservation and variation in the D-loop containing region of vertebrate mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Biology* 192: 503-511.
- Gemmell N., and M. Westerman. 1994. Phylogenetic relationships within the class mammalia: A study using mitochondrial 12S rRNA sequences. *Journal of Mammalian Evolution* 2(1): 3-23.
- Hoelzel, A. R., and A. Green. 1992. Analysis of population level variation by sequencing PCR-amplified DNA. pp. 159-187. *In*: A. R. Hoelzel (ed.). *Molecular genetic analysis of populations: A practical approach*. Oxford University. Oxford.
- Masuda, R., J. V. Lopez, J. P. Slattery, N. Yuhki, and S. J. O'Brien. 1996. Molecular phylogeny of mitochondrial cytochrome b and 12S rRNA sequences in the Felidae: Ocelot and domestic cat lineages. *Molecular Biology and Evolution* 6(3): 351-365.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning : A laboratory manual* (2nd edition). Cold Spring Harbor Laboratory. New York.
- Southern, S., J. S. Peter, and E. D. Andrew. 1988. Molecular characterization of cloned mitochondrial genome. *Journal of Molecular Evolution* 28: 32-42.
- Wang, Y. 1990. Status and management of the Formosan black bear in Taiwan. *International Conference Bear Research and Management* 8: 1-4.

Mitochondrial DNA-sequences of Wild and Captive Asian Black Bears (*Ursus thibetanus* Cuvier) in Taiwan

Yen-Long Chen and Chieh-Chung Yang

Taiwan Endemic Species Research Institute, Chichi, Nantou, Taiwan

Abstract

Partial gene sequences of mitochondrial 12S rRNA (391 bp) and 16S rRNA (425 bp) were compared among one captive sun bear (*Ursus malayanus* Raffles) and 11 Asian black bears (*Ursus thibetanus* Cuvier). The latter consisted of two wild and one captive Taiwan black bear (*Ursus thibetanus formosanus* Swinhoe) and eight captive individuals of unknown geographical origins. There were distinct interspecific differences in the sequences between the sun bear and the Asian black bears with 13 nucleotide variations (one deletion, one transversion and 11 transitions) for 12S rRNA and 34 variations (two transversions and 32 transitions) for 16S rRNA. For the Asian black bears, there were only three transitions for each of 12S rRNA and 16S rRNA; the variations were too small for distinction of its geographical populations.

Key words: *Ursus thibetanus formosanus*, mitochondrial DNA, 12S rRNA, 16S rRNA

Received: May 23, 2001

Accepted: October 11, 2001