

臺北市立動物園 104 年動物認養保育計畫書

提案日期：103 年 11 月 2 日

主持人	臺北市立動物園張廖年鴻助理研究員
計畫編號 / 名稱	104 保研 1_臺灣梅花鹿國內外現生族群遺傳結構比較與溯源
計畫期程	104 年 1 月 8 日至 104 年 12 月 31 日
計畫屬性	<input type="checkbox"/> 動物福利 <input checked="" type="checkbox"/> 保育研究 <input type="checkbox"/> 環境教育 <input type="checkbox"/> 國際交流及人才培訓
經費需求	認養經費 <u>630,000</u> 元
計畫摘要 (需含計畫目標、擬解決問題、重要工作項目)	<p>一、計畫摘要</p> <p>梅花鹿 (<i>Cervus nippon</i>) 廣泛分佈於東亞，範圍從西伯利亞到韓國、中國東部和中南半島越南等地區，在日本和臺灣等島嶼也有分佈。許多地區的梅花鹿族群在 19 世紀前後因獵捕壓力而野外族群數量銳減近乎絕跡，但在各地政府的立法保護下目前族群已有回升的趨勢，因此國際自然保護聯盟 (IUCN) 並未將梅花鹿列入瀕危物種紅皮書中 (Red List)。由於分布範圍極廣，現生梅花鹿目前被分為 13 個亞種，分別是 <i>C. n. aplodontus</i>，日本北本州亞種；<i>C. n. grassianus</i>，中國陝西亞種；<i>C. n. keramae</i>，日本琉球慶良間群島亞種；<i>C. n. kopschi</i>，華南亞種；<i>C. n. mandarinus</i>，華北亞種；<i>C. n. mantchuricus</i>，東北亞種（分布涵蓋中國東北地區、韓國及俄羅斯遠東地區）；<i>C. n. nippon</i>，日本指名亞種（分布於南本州、四國及九州）；<i>C. n. pseudaxis</i>，越南亞種；<i>C. n. pulchellus</i>，對馬島亞種；<i>C. n. sichuanicus</i>，華西亞種；<i>C. n. soloensis</i>，菲律賓亞種（可能已絕滅）；<i>C. n. taioanus</i>，臺灣亞種以及 <i>C. n. yesoensis</i>，北海道亞種 (Whitehead, 1993)。針對不同亞種間比較的分類研究相當少，部分亞種的有效性需要進一步確認。</p> <p>臺灣梅花鹿 (<i>Cervus nippon taioanus</i>) 為梅花鹿臺灣亞種的泛稱，為臺灣特有亞種鹿科動物。過去曾廣泛分布在中低海拔平原及丘陵地，且一度因臺灣原住民對山坡農地的開墾而擴大活動範圍，使得族群數量達到顛峰 (McCullough, 2009)。然而越來越多大陸移民競爭空間資源，以及接踵而來的獵捕壓力，最後一隻野生臺灣梅花鹿可能在 1969 年在野外被射殺 (McCullough, 1974)，往日野生鹿群優遊山林間的景象就此絕跡。所幸，當時在綠島民間養鹿場及臺北市立動物園還保有相當數量的圈養族群，提供了後來 1994 年人工復育、野放到墾丁國家公園的族群種源。然而值得</p>

注意的是，華人圈養梅花鹿取其鹿茸入藥已有千年歷史，長時間鹿隻個體買賣、引入、交流活動缺乏書面資料記錄難以追蹤 (McCullough, 2009)，因此民間圈養的梅花鹿難保未曾與其他亞種個體（如日本亞種）雜交，以培育出更適合取鹿茸的品系。早年臺北市立動物園的臺灣梅花鹿被認為是純種臺灣梅花鹿族群，曾提供個體參與墾丁復育計畫，與來自綠島的梅花鹿個體建立族群。不幸的是，臺北市立動物園原先圈養的梅花鹿族群因群體感染結核病而遭撲滅 (Severinghaus and McCullough, 1996, McCullough and Severinghaus, 1998)，動物園內現有的臺灣梅花鹿族群為由墾丁復育族群再引入的個體所建立，其品系是否為原先奔馳在臺灣平原的臺灣梅花鹿則並無定論。

有鑑於臺灣梅花鹿目前族群品系的親緣地位未明，可提供族群復育參考的生物學背景資料尚未完整，實有進一步釐清目前臺灣境內的梅花鹿族群血緣來源及基因上有否混雜到其他亞種的必要。近代分子生物學技術發展快速，DNA 定序技術的改良大大減少了定序所需的時間、金錢及勞力，研究人員可在短時間內取得大量 DNA 變異訊息。除了應用在人類醫學研究外，DNA 變異訊息也普遍被運用在生物學領域中的系統分類學、親緣演化、族群遺傳學等研究，可以建立物種間/內的親緣關係、探討高分類階層的物種演化，還可進一步利用單一物種族群間的遺傳變異來有效的釐清族群內各個個體的親緣關係，建立準確的家譜，提供該族群研究重要的參考資料。並推論物種族群間的擴散假說，進而討論其族群演化的自然史觀。

王和李 (2002) 曾嘗試就 72 個分別畜養於墾丁、綠島、臺北市立動物園以及私人鹿場的個體樣本討論臺灣現生梅花鹿的族群遺傳變異，並提出利用古老樣本抽取早期個體 DNA 的想法。然而當時選擇定序的片段為粒線體 DNA 片段，定序序列較短 (850pb)，所能呈現的遺傳變異相當少，僅有 5 個變異點，且粒線體 DNA 母系遺傳的特性讓研究者無法從其瞭解族群個體間基因交流的程度，在如此有限的資訊下很難呈現出現生臺灣梅花鹿族群遺傳變異的全貌。國外對於其他梅花鹿亞種（特別是日本亞種 *C. n. nippon*）的生態、行為、族群管理、入侵族群建立與管理、甚至與當地居民的互動都有長期且深入的研究 (Tamate and Tsuchiya, 1995; 徐等, 1998; Tamate et al., 2000; 劉等, 2003; McCullough et al. 2009; Baraneková et al., 2012; Krojerová-Prokešová et al., 2013)。今日我們可站在海內外梅花鹿研究成果的基石上，針對現有的臺灣梅花鹿族群，包括國內的，甚至海外動物園圈養的臺灣梅花鹿族群做一個總體檢，瞭解各族群的遺傳物質組成，並搭配今日定序技術對於化石、先民遺址挖掘出來的動物標本等生物殘骸進行 DNA 萃取及定序，搭配分布於不同地理區的其他亞種個體樣本，繪製出跨越近期人類干擾時空、最符合自然的東亞地區梅花鹿親緣

樹，找出臺灣梅花鹿在東亞哺乳動物地理地理學中的區位及演化史，進而釐清現存臺灣梅花鹿各族群的基因組成及交流假說，整理出對於族群健康與保育遺傳變異之建議，提供日後復育計畫族群管理的參考。

目前臺灣梅花鹿的族群除了人工復育成功，已在野外自行繁殖的墾丁、綠島兩處族群外，在國內外動物園中尚有多個圈養族群，包括臺北市立動物園、美國波士頓 Franklin Park 動物園、美國紐約 Bronx 動物園、韓國首爾動物園以及法國 Parc de la Haute Touche 動物園等等。其中不乏早年即被引渡至國外動物園的族群，極可能保有臺灣梅花鹿原生亞種的遺傳特性。本計畫將透過兩個研究主軸，探討臺灣梅花鹿現生族群的遺傳結構、親緣地位以及日後再進行個體引入野外族群復育的建議。首先是利用現生臺灣梅花鹿族群及先民生活遺跡中的梅花鹿骨骸樣本，建立不同的時間軸上的臺灣梅花鹿遺傳結構，並藉由與其他梅花鹿亞種基因的比較，找出臺灣原生梅花鹿亞種的遺傳結構特徵，建立不受當代人工育種干擾的東亞梅花鹿親緣樹，進而確定臺灣梅花鹿的親緣地位。化石樣本因有取得困難、DNA 序列破碎化普遍、萃取难度大、PCR 引子設計不易等問題，預計樣本數應不會太大。其次將比較國內外現有族群間的遺傳差異，探討不同族群基因的結構狀態，討論是否有亞種間的基因交流存在，並且依據新建立的東亞梅花鹿親緣樹找出最有可能是純種臺灣梅花鹿的族群。而化石樣本的 DNA 序列可能僅能探討粒線體 DNA 部分，其品質不足以應用在微衛星分析上。本研究將讓我們重建臺灣梅花鹿的自然發生史，並重新檢視現階段梅花鹿復育計畫的操作在其遺傳多樣性上是否有所助益，落實族群復育計畫的經營管理。

本園為加強動物族群管理、避免圈養族群基因劣化、增進動物福祉，近年來積極與國內外各保育研究機構緊密聯繫，對內整合臺灣地區各動物園及動物圈養機構的聯繫與動物個體資料統合，對外積極參與國際動物保育事務、尋求相關領域學者專家建議與交流，並藉由舉辦國際研討會將國外專家群引入臺灣，實地觀察國內動物圈養狀況；除了給予建議與指導外，也將臺灣動物的現況訊息帶回其所屬的保育機構中。另外，透過積極參與「世界自然保育聯盟」(IUCN) 及「物種存續委員會」(SSC) 的「保育繁殖專家群」CBSG (Conservation Breeding Specialist Group) 非政府組織強化與國際間保育研究機構的聯繫與合作，並參加會後接續舉辦的世界動物園暨水族館協會 (WAZA) 2015 年會。本計畫預定派 2 員參與 2015 年 CBSG/WAZA 年會，並參訪阿拉伯聯合大公國艾爾艾因動物園。開會及參訪所需天數為 15 天。

二、計畫目標

本研究將完整探究臺灣梅花鹿的起源以及國內外各族群現狀，建立臺

灣本土動物演化的自然史假說，並且建立詳細的親緣/血統關係，回饋給原提供樣本的圈養管理單位當做族群管理的參考。必要時可透過 ISIS 系統整合所有臺灣梅花鹿族群個體的繁殖調度，讓血統純正的梅花鹿臺灣亞種的品系得以保留，避免其他亞種個體混雜其血緣。而族群間的個體基因交流模式等資訊亦可提供國內相關復育計畫參考。

三、擬解決之問題

1. 國內外動物園的梅花鹿樣本蒐集、交流將是本計劃最重要的工作。本園的資料庫已建立各臺灣梅花鹿個體的基本資料，可以掌握園內繁殖家庭的親緣從屬關係。國內各圈養單位亦可透過合作管道取得研究組織樣本及資訊。而國外的族群資訊則透過「動物管理資訊整合系統ZIMS (Zoological Information Management System)」調查有畜養、展示臺灣梅花鹿的動物園或保育機構，得知美洲地區至少有四處動物園畜養了25 頭臺灣梅花鹿個體，主要集中在麻州波士頓法蘭克林動物園 (Franklin Park Zoo, 8頭) 以及紐約的布朗動物園 (Bronx Zoo, 16 頭)。其中布朗動物園與臺北市立動物園有長期的合作交流，本人已與副園長Patrick Thomas討論過此議題，並得其同意提供該園臺灣梅花鹿血液樣本。歐洲地區則已知有3 個機構有畜養臺灣梅花鹿，其中法國Parc de la Haute Touche 動物園已和臺北市立動物園接洽，希望能協助澄清他們梅花鹿的血緣品系。除此之外，尚有未列入ZIMS系統的動物園仍可能保有臺灣梅花鹿個體，如韓國首爾動物園號稱保有四個梅花鹿亞種族群，並有13 頭臺灣梅花鹿個體，將與該園做進一步確認。另外亦將積極尋求日本及中國大陸地區的動物園進行合作，期能取得其他亞洲地區動物園內台灣梅花鹿的樣本，以及其他梅花鹿亞種的組織樣本。
2. 化石DNA亦是本研究能否順利進展的關鍵之一。本計劃將與國立自然科學博物館地質學組張鈞翔主任、生命科學組鳥獸標本室蒐藏經理陳彥君女士合作，蒐集考古遺跡挖掘的獸骨樣本；除了希望取得臺灣出土的早期梅花鹿骨骼標本，也希望透過博物館系統將蒐藏的尺度延伸到國外，希望能搜集到更多地區的不同時空的梅花鹿亞種樣本以供分析比對。化石DNA定序預計採用次世代定序技術 (NGS)，希望克服化石DNA常有的破碎化問題。
3. 本計劃將更進一步加入國際研究計畫，完成國內外各圈養臺灣梅花鹿族群遺傳結構的分析，協助確定其分類地位及族群間親緣關係。

四、重要工作項目

1. 國內外梅花鹿資料蒐集、整理，以及各保育管理單位的橫向聯繫。
2. 取得國內外梅花鹿的血液或組織樣本，建立樣本保存庫。

	<ol style="list-style-type: none"> 3. 完成實驗室 DNA 萃取、PCR 定序及次世代定序等操作。 4. 開發 DNA 微衛星引子，完成 DNA 微衛星分析技術。 5. 出席保育繁殖專家群 2015 年年會、聯繫國外保育研究單位進行資料整合與技術交流。 6. 資料分析及報告撰寫。
<p>實施方法 與步驟（ 條列簡要 述明）</p>	<p><u>實驗前準備工作項目（1—4 月）</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 整合國內外各機構臺灣梅花鹿個體基本資料，並取得可供 DNA 定序分析的組織或血液樣本，建立樣本資料庫。 2. 整理文獻，整理已完成的梅花鹿分子親緣研究及所使用之引子；聯繫國外合作機構，建立資訊分享管道。 <p><u>分子生物實驗操作（2—10 月）</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 完成樣本 mtDNA 定序及分析。 2. 完成化石樣本 DNA 萃取及次世代定序。 3. 完成樣本 DNA 微衛星定序及分析。 <p><u>資料分析整合及報告撰寫（8—12 月）</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 與合作研究機構資訊共享及討論。 2. 完成各項資料整合及數據分析。 3. 出席保育繁殖專家群 2015 年年會。 4. 撰寫報告。
<p>預期成果</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 建立國內臺灣梅花鹿動物基因遺傳資料庫，建立各族群的家族譜系，並藉由與國外研究計畫之結合，將國內個體基因遺傳特徵與化石個體、國外族群做比較，重建臺灣梅花鹿的族群自然史。最後結果將提供臺灣梅花鹿照養單位未來經營管理上之參考，並協助域外保育研究計畫的個體調度。 2. 國內雖已有多位學者完成臺灣梅花鹿族群親緣相關計畫（如王和李，2002），但缺乏比較完整的臺灣梅花鹿親緣及動物地理學方面的論述。本計劃預期成果與前人研究比較將有下述進展：a. 增加海外圈養臺灣梅花鹿族群的分子遺傳資料，與國內族群樣本進行比較，提供未來國內外族群個體移動交流的管理參考；b. 加強臺灣梅花鹿遺傳資料庫的廣度及深度，增加研究比較 DNA 片段長度及基因數量，並建立族群遺傳研究微衛星引子資料庫；c. 建立完整的臺灣梅花鹿親緣架構、確定臺灣梅花鹿的演化自然史及分類地位。 3. 完成相關研究論文 2 篇，並透過撰寫 1 至 2 篇的科教文章介紹本園運用分子生物技術協助臺灣梅花鹿動物的分類地位確定及尋親歷程。

<p>已參與計畫名稱及合作機構</p>	<p>相關專業團隊：<input type="checkbox"/>有 <input checked="" type="checkbox"/>無 (註：國際交流及人才培訓計畫請簡介國際保育組織或培訓參訪機構；其他類型計畫請簡介國內外進行類似工作之專業團隊)</p> <p>建立合作平臺可行性： <input type="checkbox"/>否 <input checked="" type="checkbox"/>是，團隊 <u>Bronx Zoo、Parc de la Haute Touche、Seoul Zoo 與 CBSG</u></p> <p>1. Bronx Zoo、Seoul Zoo 與 Parc de la Haute Touche 都有展示臺灣梅花鹿圈養個體。本研究計畫將與上述單位合作，取得該單位的梅花鹿血液或組織樣本，並分享研究進展及資訊，對國內外臺灣梅花鹿的來源及未來族群管理做出推論及建議。目前分別與 Bronx Zoo 副園長 Patrick Thomas、Parc de la Haute Touche 研究員 Yann Locatelli 及 Seoul Zoo 園長 Jeong-Rae Rho 建立聯繫管道，並開始與前兩個機構洽談臺灣梅花鹿的樣本交流相關事項。</p> <p>2. 保育繁殖專家群(Conservation Breeding Specialist Group) 為 IUCN「物種存續委員會」轄下組織，該工作小組積極協助全球區域性保育工作，本園已加入此組織近十年。</p>
<p>團隊成員在計畫內之角色(擔任之具體工作性質、項目及範圍)</p>	<p>1. 張廖年鴻助理研究員：擬定計畫、確認工作目標、現場統籌規劃、分析資料、撰寫報告。</p> <p>2. 張立人研究助理：協助取得國內臺灣梅花鹿血液等樣本。</p> <p>3. 陳慧倫研究助理：協助整理全球臺灣梅花鹿相關資訊、協助聯繫國外合作機構。</p> <p>4. 侯宣伊技工：蒐集臺灣圈養臺灣梅花鹿遺傳樣本、DNA 技術操作分析、資料蒐集分析。</p> <p>5. 計畫研究助理(待聘)：文獻資料蒐集、DNA 技術操作分析、資料蒐集分析及辦理行政程序</p>
<p>投入計畫之工作時數(每週平均)或比率(%)</p>	<p>1. 張廖年鴻助理研究員：每週約 6 小時。</p> <p>2. 張立人研究助理：每週約 3 小時。</p> <p>3. 陳慧倫研究助理：每週約 2 小時。</p> <p>4. 侯宣伊技工：每週約 20 小時。</p> <p>5. 計畫研究助理(待聘)：每週約 40 小時。</p>
<p>相關專業經驗及過去參與類似計畫之研究成果</p>	<p>1. 本園現有臺灣梅花鹿的活體典藏，並有血液標本及遺傳物質冷凍樣本庫。動物園的分子生物實驗室有著完備的實驗設施及多種野生動物族群遺傳研究方面的相關經驗，目前正進行臺灣圈養紅毛猩猩個體的族群遺傳結構研究。</p> <p>2. 張廖年鴻助理研究員有分類學背景及多年實驗室研究經驗，熟悉分子生物技術在野生動物族群遺傳變異研究上的應用，已發表相關著作十篇。</p>

	<p>3. 張立人研究助理具有多年有蹄動物的醫療經驗。</p> <p>4. 陳慧倫研究助理長年擔任本園動物組與國外動物園專家群的聯繫窗口，有著豐富的國際事務經驗。</p> <p>5. 侯宣伊技工具有實驗室工作經驗，熟悉 PCR 定序操作等相關實驗技能，將協助進行主要的樣本處理及部分定序工作。</p>
<p>計畫優勢 (可複選)</p>	<p>■<u>創新性</u>：<u>整合國內外臺灣梅花鹿遺傳資訊，架構不同的時間軸上的臺灣梅花鹿遺傳結構，建立資訊交流平台</u></p> <p>■<u>前瞻性</u>：<u>整合國內外臺灣梅花鹿個體親緣資料，協助未來族群管理調度之參考。</u></p> <p>□<u>獨特性</u>：_____</p> <p>□<u>國際競爭力</u>：_____</p> <p>■<u>核心保育計畫</u>：<u>臺灣梅花鹿為國內少數幾種大型哺乳動物之一，和臺灣先民的生活息息相關，在生態、生物資源利用、文化等面相都有獨特的意涵，也是本園保育計畫的重點物種。本計畫之最終目標在於透過族群遺傳研究計畫來確定國內圈養族群的分類地位，探討族群間的親緣關係，並藉由研究合作機會與國外保育研究機構接軌，將臺灣圈養的個體融入全世界臺灣梅花鹿的族群管理架構中，與國際單位攜手合作進行梅花鹿的域外保育。</u></p> <p>■<u>動物園精進業務</u>：<u>緊密聯繫國內外鹿科動物保育研究夥伴，成為國際鹿科動物保育架構的重要成員。</u></p> <p>□<u>其他</u>：_____</p>
<p>預期效益 (可複選)</p>	<p>可量化效益</p> <p>■增進動物福祉</p> <p>□改善圈養環境</p> <p>□提升醫療技術</p> <p>■保育教育推廣</p> <p>■提升動物園形象</p> <p>□保育臺灣本土物種</p> <p>■建立保育合作平臺</p> <p>■培訓專業人才</p> <p>□增加遊園人次</p> <p>□其他：_____</p> <p>不可量化效益：<u>可回答執行近 30 年臺灣梅花鹿復育計畫中最核心的疑問「目前所繁殖復育的個體是否為純種臺灣梅花鹿？」，作為臺灣梅花鹿保育相關機構圈養族群管理及個體交換調度之參考。</u></p>

<p>重要參考 文獻(至 少五篇)</p>	<p>(註：環境教育、國際交流及人才培訓計畫免填)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 徐宏發，陸厚基，盛和林，顧長明。1998。華南梅花鹿的分佈和現狀。生物多樣性 6：87-91。 2. 王穎，李壽先。2002。台灣梅花鹿遺傳基因之研究。中華民國國家公園學會。內部委託研究報告。台北。 3. 劉海，楊光，魏輔文，李明，胡錦轟。2003。中國大陸梅花鹿控制區序列變異及種群遺傳結構分析。動物學報 49：53-60。 4. Barančková, M., J. Krojerová-Prokešová, I. V. Voloshina, A. I. Myslenkov, Y. Kawata, T. Oshida, J. Lamka, and P. Koubek. 2012. The origin and genetic variability of the Czech sika deer population. <i>Ecological Research</i> 27: 991-1003. 5. Krojerová-Prokešová, J., M. Barančková, I. Voloshina, A. Myslenkov, J. Lamka, and P. Koubek. 2013. Dybowski's Sika deer (<i>Cervus nippon hortulorum</i>): genetic divergence between natural primorian and introduced Czech populations. <i>Journal of Heredity</i> 104: 312-326. 6. McCullough, D. R. 1974. Status of larger mammals in Taiwan. Tourism Bureau, Taipei. 7. McCullough, D. R. 2009. Sika deer in Taiwan. Page 665 in D. R. McCullough, S. Takatsuki, and K. Kaji, editors. Sika Deer: Biology and Management of Native and Introduced Populations. Springer, Tokyo, Japan. 8. McCullough, D. R. and L. L. Severinghaus. 1998. Recovery program for the endangered Taiwan sika deer. in Z. Zomborszky, editor. Proceedings of the 4th International Deer Biology Congress. 9. Severinghaus, L. L. and D. R. McCullough. 1996. A comprehensive review of the sika deer restoration program in Taiwan. Taipei, Taiwan. 10. Tamate, H. B., A. Okada, M. Minami, N. Ohnishi, H. Higuchi, and S. Takatsuki. 2000. Genetic variations revealed by microsatellite markers in a small population of the sika deer (<i>Cervus nippon</i>) on Kinkazan Island, northern Japan. <i>Zoological Science</i> 17: 47-53. 11. Whitehead, G. K. 1993. The Encyclopedia of Deer. Swan Hill Press, Shrewsbury, UK.
<p>附 件</p>	<p> <input checked="" type="checkbox"/>文件__種 <input type="checkbox"/>圖說____種 <input type="checkbox"/>其他_____ </p>