

農委會林務局九十六年度科技計畫期末報告

計畫名稱： 台灣彩蝠遺傳多樣性及保育遺傳之研究(II)

(第 2 年/全程 3 年)

(英文名稱) The genetic diversity and conservation genetics
studies of the Taiwanese woolly bat (*Kerivoula*) (II)

計畫編號： 96農科-11.1.2-務-e1(2)

全程計畫期間： 95 年 6 月 26 日至 97 年 12 月 31 日

本年計畫期間： 96 年 5 月 10 日至 96 年 12 月 31 日

計畫主持人：方引平

執行機關：國立嘉義大學

中文摘要

本研究針對台灣近期發現的台灣彩蝠，進行族群遺傳結構與交流分析，並嘗試探討台灣彩蝠族群交流是否受主要棲所—竹林塊狀化分布的影響。因此，本研究全程擬以三年的時間，分析台灣彩蝠的族群遺傳多樣性，並探討其地理分佈與棲地的關係，推估關連族群的大小及其歷史變動，以提供保育遺傳上的建議。本年度(第二年)增加16隻個體，累積共88隻樣本，成功定序出85隻個體的粒線體DNA細胞色素b基因與23隻個體的粒線體DNA控制區部分片段。結果發現，兩種遺傳標記物皆顯示台灣彩蝠的基因單型可以明顯區分為兩個系群。系群I的單型主要分布於北部，而系群II則較局限於南部區域，但亦許多地點同時擁有兩個系群的單型。此外，控制區部分片段的結果，發現有13隻樣本具有插入(80bp)的現象，但以系群I較多，且兩系群發生插入的位置不同。藉由族群間的分化指數與mismatch distribution分析結果推測，台灣彩蝠之兩系群皆屬近期擴張的族群。其中，系群I向西南與東部擴張，系群II往西北與東部擴張。而本年度加入微隨體基因座的測試，目前已測試16組引子，其中有9組可成功擴增，經銀染後觀察，有8組具有多型性。此一分子標記可以釐清兩系群間基因交流的現況，為明年度進一步了解棲地零碎化與族群交流關係的重要方法之一。

Abstract

This study focused on the population genetics and gene flow of the Taiwanese woolly bat (*Karivoula* sp.), a new species of Taiwan, and tried to understand the effect that bamboo forest fragmentation has on the population structure of the Taiwanese woolly bat in three years. The results of the second year reveal that there are two lineages of the Taiwanese woolly bat base on two molecular markers, Mitochondrial DNA cytochrome b and control region. The most haplotypes of lineage 1 are wildly distributed over north Taiwan, and the haplotypes of lineage 2 are distributed in south Taiwan. Base on *Fst* value, mismatch distribution analysis and nested clade analysis, we suppose the two lineages of the Taiwanese woolly bat are demographic expansion recently. Moreover, we examined 16 microsatellites loci, and 8 loci seem to be polymorphism. Next year, we will focus on the population gene flow of the Taiwanese woolly bat by this molecular marker, and examine the influence of habitat fragmentation to the Taiwanese woolly bat.

一、前言：

台灣彩蝠為近期發現的台灣新記錄屬的新種蝙蝠(Fang and Lee, 發表中)。最近的調查研究發現，其生態需求與其他台灣的蝙蝠頗為不同。台灣彩蝠多在竹林或其鄰近地區捕獲(江, 2006)，並曾發現其以竹節為棲所，且與同為森林性蝙蝠的台灣管鼻蝠相比較，其棲所亦多為竹子(Li *et al.*, 2007)，此一生態習性極為特殊，推測其出現與竹林的相關性極高。然而台灣地區竹林在的分布雖廣，但分布特性與人為活動有所相關，造成竹林棲地在部分區域呈現塊狀化分布(或零碎化)。此外，竹林的經濟價值在各地產業發展不同，部分地區已無經營管理，形成竹林自然演替，是否對於台灣彩蝠族群有所影響，亦值得探討。

棲地零碎化(habitat fragmentation)對許多無脊椎動物、兩棲類、爬蟲類、鳥類和哺乳動物的影響是很複雜的，每個物種對於棲地尺寸改變或棲地隔離的反應也有所不同。通常棲地零碎化，會間接降低物種的生存率及繁殖率，進而降低其總族群量。而在鳥類或是蝙蝠，即使牠們比其他脊椎動物具有較強的移動能力，但仍然會受到影響。Hobbs 和 Saunders(1993)指出，在澳大利亞西部的黃痔吸蜜鳥(*Lichenostomus ornatus*)由於棲地零碎化而使族群數量下降，甚至到地區性滅絕。Antongiovanni & Metzgers (2005)發現在亞馬遜森林裡的食蟲性鳥類，對環境變化敏感的數個鳥種，不會出現在小片段的森林裡。另外 Brosset *et al.* (1996)發現在法屬圭亞那森林砍伐地區的矛鼻蝠類(phylostomid)之蝙蝠種類豐富度下降，許多森林性的蝙蝠物種也較少分布在此或是完全不出現。在一些熱帶地區，由於人類對土地的需求量增加，使得森林的砍伐面積也逐漸擴大，因此有許多研究探討在森林裡生活的生物，面對棲地破碎化時所產生的變化。例如，分布在墨西哥的香蕉蝠(*Musonycteris harrisoni*)，森林破碎化影響牠們的覓食行為，使得牠們只在未受干擾的森林裡覓食。另外，Law & Anderson (2000)發現在澳洲的 *Vespadelus pumilus*，兩性選擇棲所時皆偏好在直徑較大的樹種，且雌性偏好在成熟的森林裡覓食，並推測森林地景發生零碎化時，會對此種蝙蝠造成衝擊。雖然蝙蝠具有飛行能力，但仍會受到棲地零碎化的影響。而台灣彩蝠選擇棲所時偏好於竹林，所以當竹林分布呈不連續性及缺乏管理時，是否對其族群有所影響是值得探討。

以往對於生物面臨棲地破碎化時，大多使用觀察法或捕捉法等方式，得知是否影響其族群動態。Schulze *et al.* (2000)利用霧網捕捉在瓜地馬拉內提卡爾國家公園(Tikal National Park)的蝙蝠，得知大型的食果性蝙蝠主要分布在連續的森林，小型的食果性蝙蝠主要分布在森林片段，主要是由於食物的來源而影響其分布，至於其他的食蟲性蝙蝠則由於捕捉率較低，因此難以藉此快速評估棲地零碎化的影響，但在森林片段所捕獲的食蟲性蝙蝠數量近似於零，或許可證明這些食蟲性蝙蝠較易受棲地零碎化影響。而近年來分子技術越來越進步，提供更有效的方式來得知族群結構，因此也常利用這些技術來評估生物的族群動態。Mossman & Waser (2001)利用微隨體 DNA 探討棲地零碎化對美國印第安納白足鼠(*Peromyscus leucopus*)族群結構的影響，除了證實微隨體 DNA 的確能檢驗出族群內的分化程度外，並得知棲地零碎化對印第安納白足鼠的遺傳結構有所影響。

另外 Rossiter *et al.* (2000)亦利用微隨體 DNA 探討英國地區蹄鼻蝠(*Rhinolophus*

ferrumequinum) 在棲地分布呈零碎化的族群遺傳結構，得知在英格蘭和威爾斯的群體在遺傳上有所隔離。Salgueiro *et al.* (2004) 以粒線體 DNA D-loop 序列探討在亞速爾群島 (Azores Islands) 的特有種亞速爾夜蝠 (*Nyctalus azoreum*) 遺傳結構，發現其棲地因島嶼分布而呈零碎化，對島嶼間族群的交流似乎有所影響。並認為由遺傳結構的地理分布，在保育管理上應分為兩個管理單位。Lloyd (2003) 以粒線體 DNA 的多基因序列探討紐西蘭地區的紐西蘭短尾蝠 (*Mystacina tuberculata*)，在棲地呈零碎化分布的族群遺傳結構，得知紐西蘭短尾蝠可以分為六個系群。而後以粒線體 DNA 控制區域片段探討其族群擴散歷程，發現其族群之擴張與退縮歷程與棲地相關。並以系群與地理分布配合後，認為可分為三個演化顯著單位 (ESUs)。

在台灣探討的例子並不多，但對竹林棲地依賴性及高的諸羅樹蛙則有類似的探討。盧和呂 (2005) 探討棲地零碎化對諸羅樹蛙族群遺傳結構之影響，結果顯示族群的基因交流並不順暢。至於同樣具有飛行能力的台灣小蹄鼻蝠，雖然為一演化顯著單位，但南部的族群動態與其他地區不同 (Chen *et al.*, 2006)。因此，利用分子遺傳標記探討台灣彩蝠的族群結構，除能了解台灣彩蝠的遺傳多樣性外，還能有效的了解台灣彩蝠在棲地呈零碎化分布時，對其遺傳結構的影響，進而評估其族群動態。

因此，本研究主要利用台灣彩蝠的族群遺傳物質，包括粒線體 DNA Cytochrome b 基因與控制區 (D-loop)，以及微隨體 DNA 基因座，進行族群遺傳結構的分析，並配合探討其地理分佈與棲地 (竹林) 的關係，推估關連族群的大小及其歷史變動。本研究的結果可以瞭解台灣彩蝠是否受到棲地零碎化影響而有遺傳分化，進而推論其族群擴散的形式，並在保育遺傳及相關保育上提供建議。所得之遺傳多樣性資料亦可增加台灣野生動物遺傳物質資料庫。

本年度除了持續增加各地的樣本數外，亦選用高度變異的粒線體 DNA 控制區序列 (D-loop)，作為族群遺傳變異分析，以深入了解台灣彩蝠族群的遺傳結構。並嘗試自行設計選殖微隨體 DNA 基因，或利用 Genbank 及相關研究報導之微隨體 DNA 基因引子進行測試，以篩選出有效之微隨體 DNA 基因座，應用於第三年的實驗分析。此外，配合地理資訊系統的分析，確認台灣彩蝠與竹林的相關性，並嘗試整理分析台灣彩蝠遺傳分化與竹林棲地零碎化的相關性。

二、材料方法

除了延續先前的野外採集與分子遺傳實驗外。並與相關研究人員合作(台灣大學生態學與演化生態學研究所李玲玲教授及行政院農委會特有生物保育與研究中心鄭錫奇組長提供樣本)，取得適當數量的台灣彩蝠樣本進行分析。重要工作項目如下：

1. 台灣彩蝠的採集：

本年度主要選定西南部與東部進行採樣，以補足第一年資料的不足，並描繪出其族群遺傳結構與地理分區之關聯性。此外，針對各地竹林概況進行瞭解與記錄，以配合遺傳多樣性分析。每個地區的樣本數約為五至十隻。在所選定的採樣點依經驗在其通道使用器具捕捉，捕捉器具為霧網及豎琴網。霧網與豎琴網主要架設在其通道上，在霧網部分，使用蝙蝠偵測器得知有蝙蝠，並以掃網幫助將蝙蝠趕入霧網中，提高捕捉效率。捕捉器具主要於日落前架設完畢，霧網部分於晚上九點半至十點結束捕捉，豎琴網部分則視當地環境，可擺設整夜，並於隔日早上巡視。捕捉個體測量後剪取其翼膜並原地放飛，所得之翼膜組織則保存進行後續處理。

2. DNA 萃取及聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)

每一樣本取其肌肉組織1mg左右或一片翼膜組織，將其置於1.5ml 離心管均質化後，並利用標準phenol/chloroform流程或以DNA Purification Kits萃取DNA，所獲DNA溶於30-100 μ l無菌水或保存液(TE buffer)中，取1 μ l 以0.8% agarose gel進行濃度檢測，再取剩餘原液以適當倍率稀釋之以供之後進行聚合酶連鎖反應。最後將萃出的DNA置於-20 $^{\circ}$ C的冰箱中保存待用。

在粒線體DNA Cytochrome b基因部分，使用L14724(5' -CGA AGC TTG ATA TGA AAA ACC ATC GTT G-3')搭配自行設計的引子：KCBH747 (5' - TAG GTC AGG GGA GAA TAG GAC-3')的組合，加上另外以L15162(5' -GCA AGC TTC TAC CAT GAG GAC AAA TAT C-3')或自行設計的 KCBL479(5' -CTC GTA GAA TGA ATC TGA GG-3') 搭配通用引子H15915(5' -AAC TGC AGT CAT CTC CGG TTA ACA AGA C-3')進行聚合酶連鎖反應，分別擴增粒線體DNA Cytochrome b基因的前、後兩個片段，每一樣本反應總體積為50 μ L，含模板DNA 2 μ L、每一primer各1 μ L、dNTP 4 μ L、Taq buffer 5 μ L、100X的BSA 0.5 Ml及Taq 0.1 μ L。PCR反應起始溫度為94 $^{\circ}$ C反應10分鐘，接著為38個循環，每一循環為94 $^{\circ}$ C 40秒、45-48 $^{\circ}$ C 40秒、72 $^{\circ}$ C 60秒，循環結束後72 $^{\circ}$ C 10分鐘。控制區部分，以通用引子CRLmP(5' -CCC CAC CAT CAA CAC CCA AAG CTG A-3')與CRH16750(5' -CCT GAA GTA GGA ACC AGA TG-3')(Wilkinson & Chapman, 1991)進行聚合酶連鎖反應，擴增粒線體DNA控制區前段序列，每一樣本反應總體積為50 μ L，含模板DNA 2 μ L、每一primer各1 μ L、dNTP 4 μ L、Taq buffer 5 μ L、100X的BSA 0.5 Ml及Taq 0.1 μ L。PCR反應起始溫度為94 $^{\circ}$ C反應10分鐘，接著為38個循環，每一循環為94 $^{\circ}$ C 35秒、55-60 $^{\circ}$ C 35秒、72 $^{\circ}$ C 55秒，循環結束後72 $^{\circ}$ C 10分鐘。將所得產物以1.3%洋菜膠跑電泳，以ethidium bromide染色後在紫外光燈下確認是否為正確片段，而後交由明欣生技公司進行定序。

利用國外學者Dr. Rossiter 提供之彩蝠屬蝙蝠微體基因座引子，測試在台灣彩蝠的適用性。利用各組引子對台灣彩蝠DNA進行聚合酶連鎖反應，之後以銀染進行DNA片段的解析，以初步檢視適合性。每一樣本反應總體積為25 μ L，含模板DNA 1 μ L、每一primer 各0.5 μ L、dNTP 2 μ L、Taq buffer 2.5 μ L、100X的BSA 0.25 M1及Taq 0.05 μ L。PCR反應起始溫度為94 $^{\circ}$ C反應15分鐘，接著為38個循環，每一循環為94 $^{\circ}$ C 30秒、50-65 $^{\circ}$ C 30秒、72 $^{\circ}$ C 30秒，循環結束後72 $^{\circ}$ C 3分鐘。將所得產物以9% PAGE在垂直電泳槽中以230伏特電泳4個小時，之後以銀染進行DNA片段解析。

3. 資料分析

將成功定序之樣本資料匯入BioEdit 7.0.4.1 排序比較，經人為方式把粒線體DNA Cytochrome b全片段(1140 bp)序列整理出。使用MEGA 3.1軟體(Kumar *et al.*, 2004)以Kimura 2-parameter model (Kimura, 1980)計算彼此鹼基對替換(transition)與鹼基對顛換(transversion)之間的比值，並建立親緣關係樹(Neighbor-joining tree)及計算單型間遺傳距離、系群間與系群內平均遺傳距離。並使用DNASP 4.0 (Rozas *et al.*, 2003)中Tajima D test、Fu and Li' s D* test 及Fu and Li' s F*test (Fu and Li, 1993)進行中性檢測(neutral test)，檢測是否使用的分子遺傳標記在演化上是中性的。且計算基因單型歧異度 (haplotype diversity)、核苷酸歧異度(nucleotide diversity, π)、族群分化指數 (Fixation index, F_{ST})及序列間pairwise difference做Mismatch distribution分析。此外，以TCS 1.21將基因單型以最簡約分析做網狀圖(network)。

再以Arlequin 3.1(Excoffier *et al.*, 2005)分析族群間的粒線體DNA Cytochrome b 基因序列彼此分化的程度，利用分子變方分析(analysis of molecular, AMOVA)(Excoffier *et al.* 1992)，首先檢測族群內、族群間及區域間與系群間的變異程度是否達到顯著差異。之後計算raggedness index (HRag)與sum of the squared deviation (SSD)(Harpending,1994)，並檢測是否符合Mismatch distribution預期的族群擴張模式。分別選取各系群樣本數2以上之族群，各自計算兩兩族群間之 F_{ST} 值，之後以SigmaPlot繪製兩兩族群間 F_{ST} 值與地理距離之關係圖，並以SYSTAT 11檢測其相關性是否達到顯著。

三、結果

本研究目前取得台灣地區 24 個地點之台灣彩蝠共 88 個樣本，樣本採集分布如圖一，目前成功定序出 85 隻個體的粒線體 DNA Cytochrome b 基因。利用雙股 DNA 聚合酶連鎖反應(PCR)增幅產生的 Cytochrome b 全片段，在所有個體中並沒有發現任何序列長度的變異，沒有插入(insertion)或是缺失(deletion)。所分析的 Cytochrome b 序列長度為 1140bp。Cytochrome b 序列中平均鹼基頻率(base frequency)：A 佔 30.9%，T 佔 29.5%，C 佔 26.5%，G 佔 13.1%，以 A 與 T 所佔的比例較高；鹼基對替換與鹼基對顛換之間的比值 transition/transversion 約為 12.39。Cytochrome b 序列中沒有變異的位點有 1099 個，有變異的位點有 41 個，其中 parsimony informative sites 為 31 個，parsimony uninformative site 為 10 個。變異非平均分布於三個位點，第一位點的變異有 13 個，佔 31.7%，第二位點有變異的有 3 個，佔 7.3%，第三位點有變異的有 25 個，佔 61%，變異集中在第三個位點。經由 Tajima's D test 及 Fu and Li's D and F test 檢測，此段基因為中性($P > 0.1$, NS)，受到天擇的影響甚少。

分析 85 隻個體的 Cytochrome b 序列，共出現了 18 個基因單型(haplotype)。各區域擁有的基因單型(haplotype)數目、基因單型歧異度(haplotype diversity)、核苷酸歧異度(nucleotide diversity; π)如表一所示。以西北部區域的基因單型數最多，有 12 種基因單型。各地區的族群基因單型歧異度介於 0~1 之間，其中以高雄梅蘭、台東紅石林道與宜蘭無名溪的基因單型歧異度最高(haplotype diversity=1)，而桃園巴陵、新竹司馬庫斯、高雄美瓏與宜蘭南澳南林道族群的基因單型歧異度最低(haplotype diversity=0)。而核苷酸歧異度以台東紅石林道族群最高(2.02%)，表示台東紅石林道地區的各基因單型差異最大；桃園巴陵、新竹司馬庫斯、高雄美瓏與宜蘭南澳南林道地區最低(0%)，表示桃園巴陵、新竹司馬庫斯、高雄美瓏與宜蘭南澳南林道地區每個基因單型彼此之間沒有差異。利用 Kimura 2-parameter model 計算個體之間的遺傳距離，得知不同個體的遺傳距離最大為 0.0233，最小值為 0，平均遺傳距離為 0.0093。

利用 Neighbor-joining method 所建構出的親緣關係樹型圖(圖二)中可以得知，基因單型大致上可分成兩大系群。系群內與系群間遺傳距離如表二所示，得知系群內平遺傳距離不大，但系群間平均遺傳距離則高達 0.0188。各種基因單型出現的頻率如表三所示，大部份基因單型只出現在一個區域，只有少數(KS1與KS4)同時出現在三個區域(圖三、表四)。

系群 I 有 56 隻個體，具 11 個基因單型。各區域擁有的基因型數目、基因型歧異度、核苷酸歧異度如表五所示。以西北部區域之基因單型數最多，8 種基因單型。各地區的族群基因型歧異度介於 0~0.674 之間，以新竹白蘭族群的基因型歧異度最高(haplotype diversity=0.674)，而新竹關西、宜蘭大同、新竹司馬庫斯與宜蘭南澳南林道之族群的基因型歧異度最低(haplotype diversity=0)。核苷酸歧異度以嘉義水社寮族群最高(0.09%)，表示其各基因型差異最大；新竹關西、宜蘭大同、新竹司馬庫斯與宜蘭南澳南林道地區最低(0%)，表示其每個基因型彼此之間沒有差異。多數基因型只出現在一個地點，只有 3 個(KN1, KN6及KN7)出現在兩個地點以上(表四)，比例為 3:11。

系群II有29隻個體，具有7種基因單型。各區域擁有的基因型數目、基因型歧異度、核苷酸歧異度如表六所示。各區域基因單型數差異不大，以西北部與西南部較多，4種基因單型。各地區的族群基因型歧異度介於0~0.5之間，以台南東山與嘉義大埔族群的基因型歧異度最高(haplotype diversity=0.5)，而桃園巴陵、嘉義水社寮與高雄美瓏之族群的基因型歧異度最低(haplotype diversity=0)。核苷酸歧異度以嘉義大埔族群最高(0.13%)，表示其各基因型差異最大；桃園巴陵、嘉義水社寮與高雄美瓏地區最低(0%)，表示其每個基因型彼此之間沒有差異。多數基因型只出現在一個地點，只有3個(KS1, KS2及KS4)出現在兩個地點以上(表四)，比例為3:7。

分析其族群遺傳分化指數(F_{ST} 值)(表七、表八、表九)，系群I與系群II皆在西北部與西南部間所得之 F_{ST} 值為最小，東部與西南部間所得之 F_{ST} 值為最大。不分系群時，在西北部與西南部的族群遺傳分化指數卻是最大。另外，選取樣本數大於2之族群，所繪製兩兩族群間之 F_{ST} 值與地理距離之關係圖(圖四、圖五)，發現在系群I與系群II皆無顯著相關($P=0.116$ & $P=0.796$)。

將所得基因單型以最簡約法則所得之網狀圖(圖六)，亦分成兩群，兩系群雖然在各區域皆有分布，但有12個基因單型只在一個地點分布。利用分子變方分析(AMOVA)得知區域間與系群間的遺傳結構(表十)，在區域間、區域內族群間與族群內個體間的差異並不大。但在系群間差異高達91.45%，系群內族群間與族群內個體間的差異很低(5.45% & 3.09%)。各自系群的區域間差異較低(0.08% & 13.74%)，且不顯著，而區域內族群間與族群內個體間的差異較高，且極為顯著。因此後續討論序列變異時，會多以系群來區分，而以地理區則較少。

將兩系群個體兩兩比較其鹼基差異數，並繪製其 mismatch distribution 圖。結果系群I呈單峰狀分布(圖七)，系群II呈雙峰狀分布(圖八)，兩系群的 H_{Rag} 與SSD值皆符合族群擴張模式(表十一)。而 $Fu's F_s$ 的檢測亦顯示系群I的族群為明顯的近期擴張，但在系群II卻較不顯著。

粒線體DNA控制區(D-loop)部分，目前成功定序出23隻個體。利用雙股DNA聚合酶連鎖反應增幅產生的控制區部分片段，發現有13隻個體有序列長度上的變異，為插入(insertion) 80個鹼基對。所分析的粒線體DNA控制區序列長度為498bp。控制區序列中平均鹼基頻率：A佔36.8%，T佔29.7%，C佔19.3%，G佔14.2%，以A與T所佔的比例較高；無鹼基對顛換。序列變異位置如附錄所示。經由Tajima's D test及Fu and Li's D and F test檢測，此段基因為中性($P>0.1$)，受到天擇的影響甚少。

分析控制區部分序列，共有18個基因單型。利用Kimura 2-parameter model計算個體之間的遺傳距離，得知不同個體的遺傳距離最大為0.034，最小值為0，平均遺傳距離為0.016。而利用Neighbor-joining method 所建構出的樹型圖(圖九)與Cytochrome b序列結果相似，亦分為兩個系群。系群內與系群間遺傳距離如表十二所示，得知系群內平均遺傳距離不大，但系群間遺傳距離則高達0.0246。

系群I部分，有12隻個體，共9種基因單型，其中11隻個體在序列上有插入(80bp)的

現象，位置為鹼基排列整齊起始點算起第32到111的位置。基因型歧異度與核苷酸歧異度分別為0.955與0.00736。系群II部分，有11隻個體，共9種基因單型，其中2隻個體在序列上有插入的現象，位置為鹼基排列整齊起始點算起第112到191的位置。基因型歧異度與核苷酸歧異度分別為0.891與0.00609。兩系群在地理上的分布與Cytochrome b序列結果相似(圖十)，可是系群I沒有插入的基因單型只分布在西南區，而系群II具有插入的基因單型只分布在西南部。

微隨體基因座部分，目前已測試16組引子，其中有9組可成功擴增，經銀染後觀察，有8組具有多型性。各基因座代號、重複片段與對偶基因大小如表十三所示。此一初步結果，應可應用於日後明確分析台灣彩蝠的族群遺傳結構與交流。

四、討論

台灣彩蝠以目前的調查記錄顯示，應為中、低海拔物種，且在遺傳結構上可分為兩個系群(lineages)。分析Cytochrome b序列兩個系群的分布，其中系群I的基因單型在分布上有由北向南遞減的趨勢；而系群II分布與系群I相比，則較普遍，但仍以西南部為主。此外較特別的是，許多地點具獨有的基因單型，如小烏來、泰安溫泉、水社寮與鹿寮水庫等。而水社寮族群缺乏較普遍分布的單型(KN6, KS4)，似乎顯示此族群與其他地區的交流不順暢。而在網狀圖中(nested clade analysis)，系群I以KN1與KN6數量最多，且在西北部區域皆有分布，雖然系群I於三個區域皆有分布，但以西北部的基因單型數量最多，推測系群I族群起源可能在西北部，或是曾以西北部為避難所。另外，Fu' s Fs檢測與mismatch distribution結果皆支持系群I為近期擴張的族群。雖然兩兩族群間之 F_{ST} 值與地理距離無顯著相關性，但區域間的 F_{ST} 值以西北部與西南部較低，或許是中央山脈對系群I的基因交流仍有所影響，也不排除是因為台灣彩蝠對竹林棲所有較高的依戀性所造成。系群II在三個區域皆有分布，由TCS結果所推測的祖先基因單型KS4，在西南部的數量較多，因此推測系群II族群之起源地或避難所在西南部。另外，在近期族群擴張假說檢測中，HRag與SSD值支持系群II為近期擴張的族群，而藉由Fu' s Fs檢測與mismatch distribution結果，推測系群II近期族群在數量上有所波動。而根據兩兩族群間之 F_{ST} 值與地理距離相關性及區域間 F_{ST} 值的結果，亦顯示西部與東部有所阻隔。

另外，在粒線體DNA控制區，雖然兩個系群都有80個鹼基對的插入，但系群I具有插入的基因單型較多(8:2)，且兩系群插入的位置不同。因此，推測兩系群分化後才產生插入，且系群I產生插入的時間較系群II早，但缺乏最近物種做為外群，因此仍有待後續研究。由Cytochrome b序列與控制區部分序列所建構之親緣關係樹狀圖，系群II族群分化成兩小群，推測台灣彩蝠分化成兩系群後，系群II近期又經歷一次分化，而Fu' s Fs test與mismatch distribution結果亦支持此推論。

以母系遺傳之分子標記物分析台灣彩蝠的族群遺傳結構，得知分成兩個系群，雖然兩系群的族群動態有所不同，但在某些地點有其獨有基因單型，是否因台灣彩蝠棲地零碎化，還是其母性個體對出生地有依戀性，造成此特殊的單型分布現象與區域間的遺傳分化指數高，則有待利用微隨體DNA等遺傳標記物來釐清。當然，造成此一現象的原因亦有可能是樣本數的不足所致。另外，目前進行台灣彩蝠微隨體基因座的篩選，已初步判定有8組引子適用於台灣彩蝠，有助於後續對台灣彩蝠族群間交流的研究。

此外，關於台灣彩蝠與竹林棲地的相關性亦有重要發現。Li *et al.* (2007)對木柵動物園中的台灣彩蝠進行無線電追蹤。兩週的定位發現，其棲所絕大部分為綠竹(*Bambusa oldhamii*)竹洞，其他少數亦是於竹叢中發現，且追蹤的個體多日使用距離相近的竹洞。因此更證明台灣彩蝠與竹林棲地息息相關。根據多年的調查資料，已知台灣彩蝠會使用的竹種包括：綠竹、籐篙竹(*Phyllostachys lithophila*)、桂竹(*Phyllostachys makinoi*)與麻竹(*Dendrocalamus latiflorus*)，這些竹種多是人為利用的重要種類，因此，後續應了解竹林環境與人為活動是否對台灣彩蝠有所影響。並且利用微隨體DNA等遺傳標記物，推估其族群動態與有效族群，進而了解彩蝠是否受到棲地零碎化的影響。之後對於台灣彩蝠進行保育時，藉由族群遺傳結構，提供有效的保育單元。

五、結論與建議

結果顯示台灣彩蝠具有兩個系群，代表台灣彩蝠曾經歷過特殊的族群分化事件，或許與其他大部分哺乳動物一樣，曾受到冰河期棲地與環境結構的改變的影響，族群避居於特定的避難所。而台灣彩蝠對於竹林的偏好，或許更加深棲地改變對其族群分化的作用。然而現今竹林的分布是否對其族群擴張與交流有所影響，仍須進一步探討。但無論如何，台灣彩蝠的保育單元除了全島整體族群外，本研究的初步結果建議，應將兩個系群視為不同的保育單元，以進行後續的管理與研究。

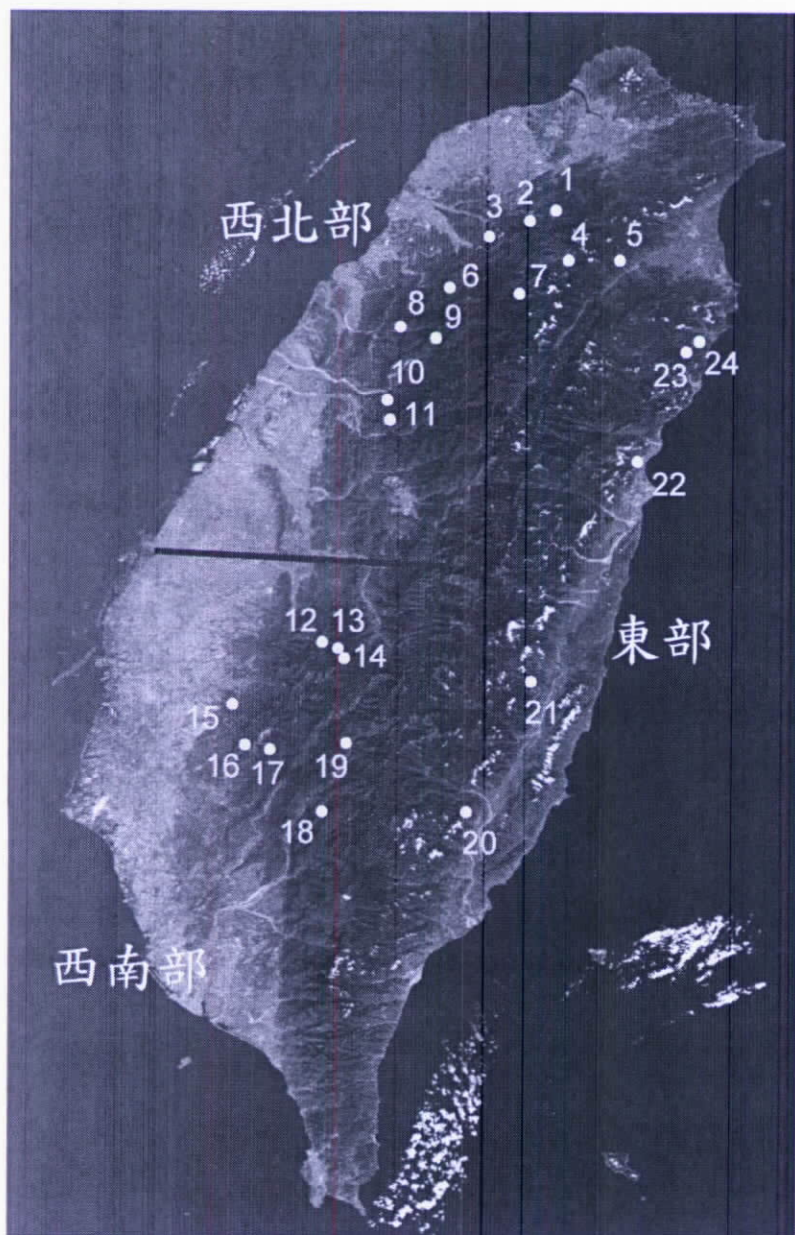
針對台灣彩蝠與竹林的關係與其保育價值，有待更多的研究來說明。而日後對於竹林的經營利用或移除，則須考量竹林生態中特殊物種的需求與影響，提出更佳策略，以利林業管理與生態保育。

六、參考文獻

1. 江集鯉。2006。新竹白蘭地區台灣彩蝠食性與覓食策略之研究。國立台灣大學動物學研究所碩士論文。
2. 盧建名、呂光洋。2005。棲地零碎化對諸羅樹蛙族群遺傳結構影響之探討。動物行為與生態 2005 年聯合學術年會論文集 0-70。黃生、張崑雄、楊正澤、吳聲海、郭雅惠合編。
3. Antongiovanni, M., and J. P. Metzger. 2005. Influence of matrix habitats on the occurrence of insectivorous bird species in Amazonian forest fragments. *Biological Conservation*, 122: 441-451.
4. Brosset, A., P. Charles-Dominique, A. Coxkle, J. F. Cosson, and D. Masson. 1996. Bat communities and deforestation in French Guiana. *Can. J. Zool.*, 74: 1974-1982.
5. Chen, S. F., Rossiter S. J., Faulkes C. G., and G. Jones. 2006. Population genetic structure and demographic history of the endemic Formosan lesser horseshoe bat (*Rhinolophus monoceros*). *Molecular Ecology*, 15, 1643 - 1656.
6. Excoffier, L., Smouse P. E., and J. M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131, 479 - 491.
7. Excoffier, L., Laval G., and S. Schneider. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
8. Fu, Y. X. and W. H. Li. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, 133: 693-704.
9. Harpending, M. M. 1994. Signature of ancient populations growth in a low resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*, 66, 591 - 600.
10. Hobbs, R.J., and D.A. Saunders. 1993. Effects of landscape fragmentation in agricultural areas. In: Moritz, C., Kikkawa, J. (Eds.), *Conservation Biology in Australia and Oceania*. Surrey Beatty and Sons, Chipping Norton, Sydney, Australia, pp. 77-95.
11. Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111-120.
12. Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei. 2004. MEGA3: integrated software for

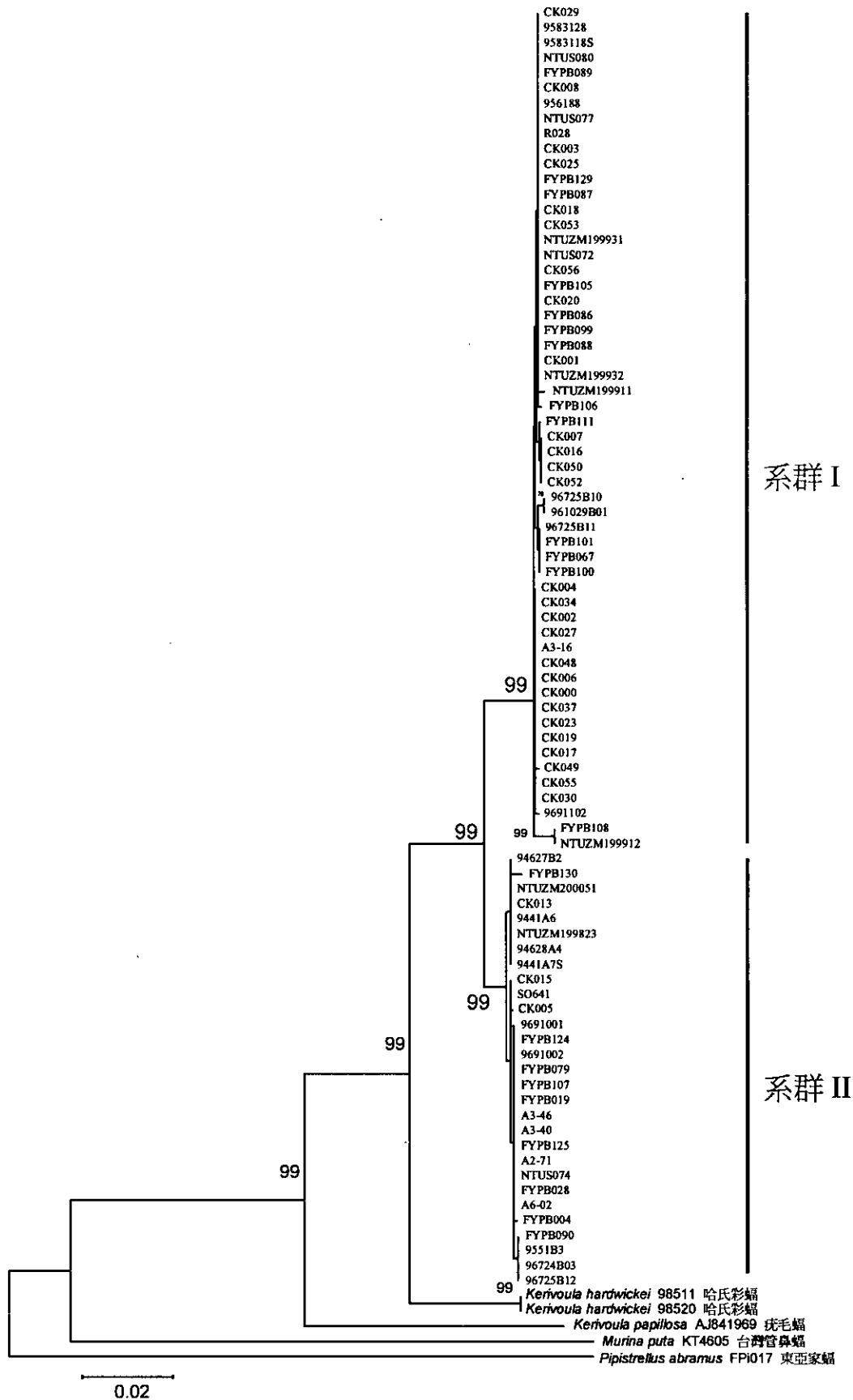
molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5: 150-163.

13. Law, B. S., and J. Anderson. 2000. Roost preferences and foraging ranges of the eastern forest bat *Vespadelus pumilus* under two disturbance histories in northern New South Wales, Australia. *Austral Ecology*, 25: 352-367.
14. Li, K., J. Chiu, C. W. Chu, Y. S. Huang, and S. F. Chen. 2007. Roost selection of two woodland bats in the Taipei Zoo forest. (Short report)
15. Lloyd, B. D. 2003. Intraspecific phylogeny of the New Zealand short-tailed bat *Mystacina tuberculata* inferred from multiple mitochondrial gene sequences. *Systematic Biology*, 52: 460-476.
16. Lloyd, B. D. 2003. The demographic history of the New Zealand short-tailed bat *Mystacina tuberculata* inferred from modified control region sequences. *Molecular Ecology*, 12: 1895-1911.
17. Mossman, C. A., and P. M. Waser. 2001. Effects of habitat fragmentation on population genetic structure in the white-footed mouse (*Peromyscus leucopus*). *Can. J. Zool.*, 79: 285-295.
18. Rossiter, S. J., G. Jones, R. D. Ransome, and E. M. Barratt. 2000. Genetic variation and population structure in the endangered greater horseshoe bat *Rhinolophus ferrumequinum*. *Molecular Ecology*, 9: 1131-1135.
19. Rozas, J., J. C. Sanchez-Delbarrio, X. Messeguer, and R. Rozas. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19: 2496-2497.
20. Salgueiro, P., Coelho, M. M., Palmeirim, J. M., and M. Ruedi. 2004. Mitochondrial DNA variation and population structure of the island endemic Azorean bat (*Nyctalus azoreum*). *Molecular Ecology*, 13: 3357-3366.
21. Schulze, M. D., N. E. Seavy, and D. F. Whitacre. 2000. A Comparison of the Phyllostomid Bat Assemblages in Undisturbed Neotropical Forest and in Forest Fragments of a Slash-and-Burn Farming Mosaic in Petén, Guatemala. *Biotropica*, 32(1): 174-184.
22. Wilkinson, G. S., and A. M. Chapman. 1991. Length and sequence variation in evening bat d-loop mtDNA. *Genetics*, 128: 607-617.

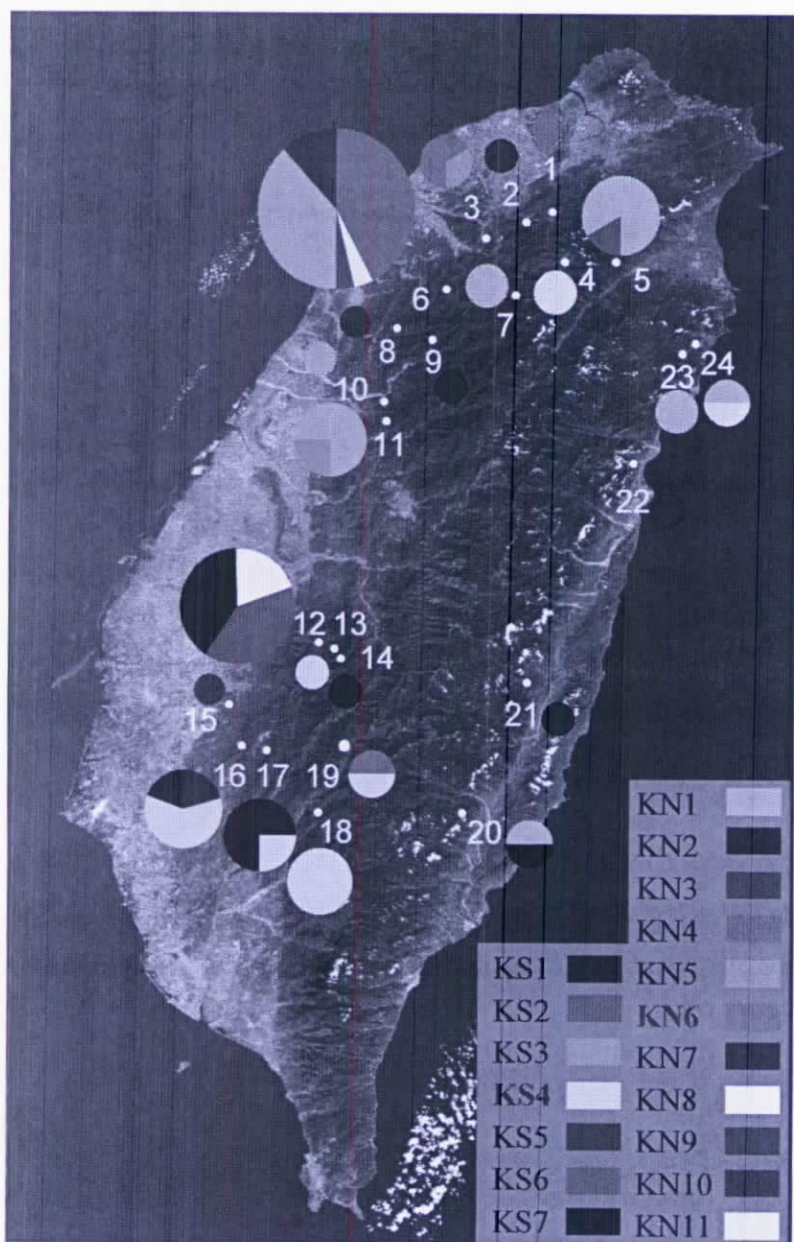


- | | |
|---------------------|----------------------|
| 1. 桃園縣復興鄉小烏來 (1) | 13. 嘉義縣竹崎鄉龍雲渡假村 (1) |
| 2. 桃園縣復興鄉奎輝 (1) | 14. 嘉義縣阿里山鄉米洋溪 (1) |
| 3. 新竹縣關西鎮赤柯山 (3) | 15. 台南縣白河鎮鹿寮水庫 (1) |
| 4. 桃園縣復興鄉巴陵 (2) | 16. 台南縣東山鄉仙公廟 (5) |
| 5. 宜蘭縣大同鄉破礮溪 (6) | 17. 嘉義縣大埔鄉茄苳村 (4) |
| 6. 新竹縣五峰鄉白蘭 (29) | 18. 高雄縣桃源鄉美瓏林道 (4) |
| 7. 新竹縣尖石鄉司馬庫斯 (2) | 19. 高雄縣桃源鄉梅蘭林道 (2) |
| 8. 苗栗縣泰安鄉泰安溫泉 (1) | 20. 台東縣海端鄉紅石林道 (2) |
| 9. 苗栗縣泰安鄉司馬限林道 (1) | 21. 花蓮縣卓溪鄉三民林道 (1) |
| 10. 台中縣東勢鎮四角林林場 (1) | 22. 花蓮縣秀林鄉大禮大同步道 (2) |
| 11. 台中縣和平鄉若茵農場 (4) | 23. 宜蘭縣南澳鄉南澳南林道 (2) |
| 12. 嘉義縣竹崎鄉水社寮 (10) | 24. 宜蘭縣南澳鄉無名溪 (2) |

圖一、台灣彩蝠 24 個採集地點，括號中為樣本數

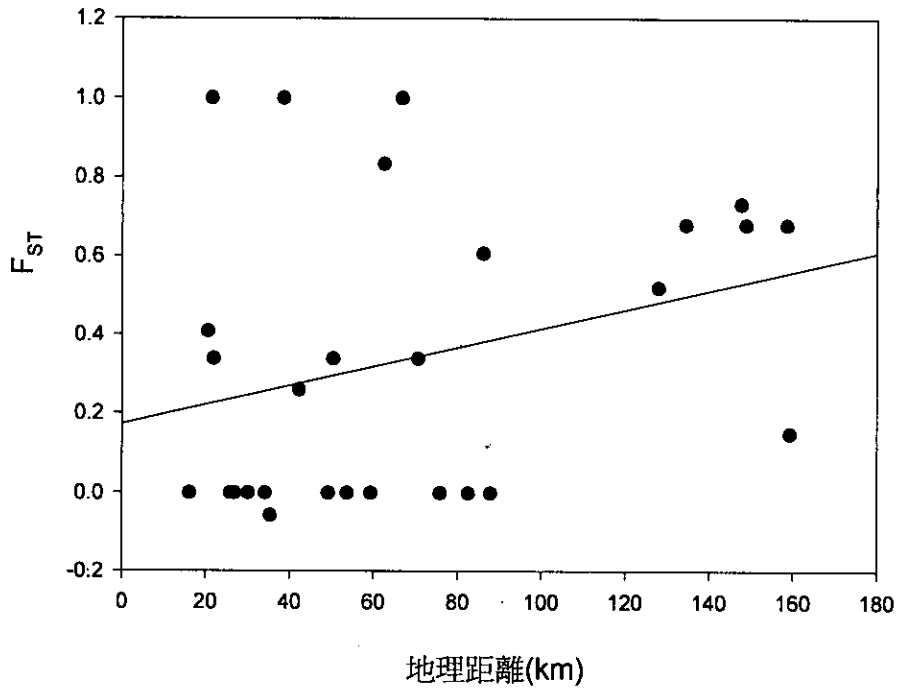


圖二、利用 Cytochrome b 序列，以 Neighbor-joining method 所建構出的親緣關係樹狀圖

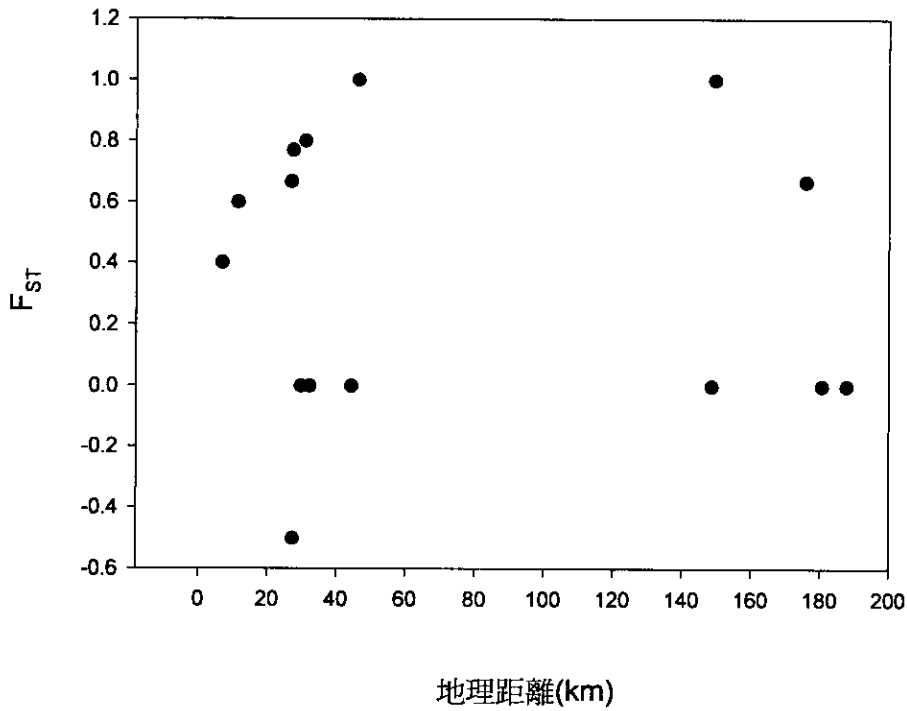


- | | |
|------------------------|-------------------------|
| 1. 桃園縣復興鄉小烏來 1 (1:0) | 13. 嘉義縣竹崎鄉龍雲渡假村 1(0:1) |
| 2. 桃園縣復興鄉奎輝 1(0:1) | 14. 嘉義縣阿里山鄉米洋溪 1(1:0) |
| 3. 新竹線關西鎮赤柯山 3(2:1) | 15. 台南縣白河鎮鹿寮水庫 1(0:1) |
| 4. 桃園縣復興鄉巴陵 2(1:1) | 16. 台南縣東山鄉仙公廟 5(2:3) |
| 5. 宜蘭縣大同鄉破礮溪 6(5:1) | 17. 嘉義縣大埔鄉茄苳村 4(1:3) |
| 6. 新竹縣五峰鄉白蘭 27(21:6) | 18. 高雄縣桃源鄉美瓏林道 4(2:2) |
| 7. 新竹縣尖石鄉司馬庫斯 2(1:1) | 19. 高雄縣桃源鄉梅蘭林道 2(1:1) |
| 8. 苗栗縣泰安鄉泰安溫泉 1(1:0) | 20. 台東縣海端鄉紅石林道 2(1:1) |
| 9. 苗栗縣泰安鄉司馬限林道 1(1:0) | 21. 花蓮縣卓溪鄉三民林道 1(1:0) |
| 10. 台中縣東勢鎮四角林林場 1(0:1) | 22. 花蓮縣秀林鄉大禮大同步道 1(1:0) |
| 11. 台中縣和平鄉若茵農場 4(4:0) | 23. 宜蘭縣南澳鄉南澳南林道 2(0:2) |
| 12. 嘉義縣竹崎鄉水社寮 10(8:2) | 24. 宜蘭縣南澳鄉無名溪 2(1:1) |

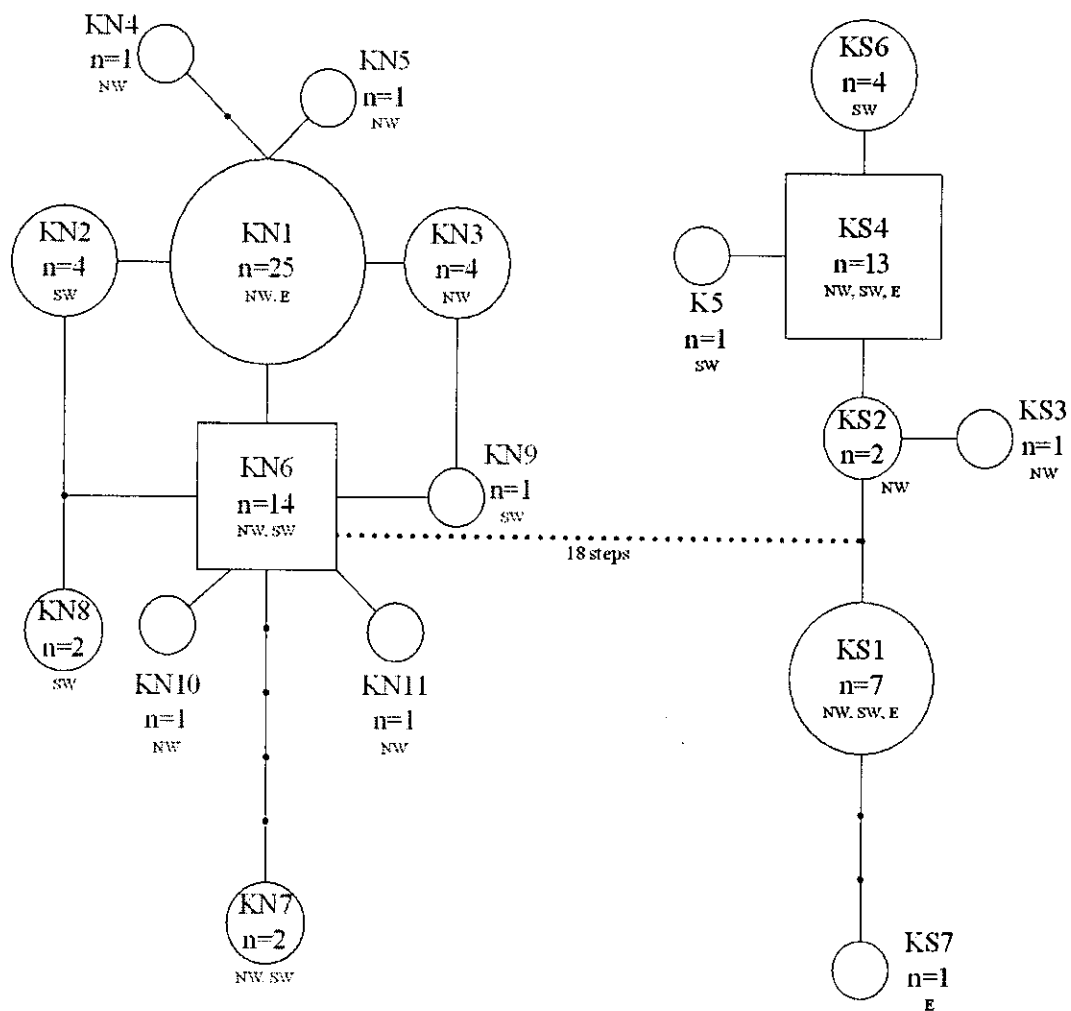
圖三、基因型之分布圖。(顏色表示各基因型，圓餅圖之比例為個體數比，地點後數字代表個體數，括弧內為性別數，雄左雌右。)



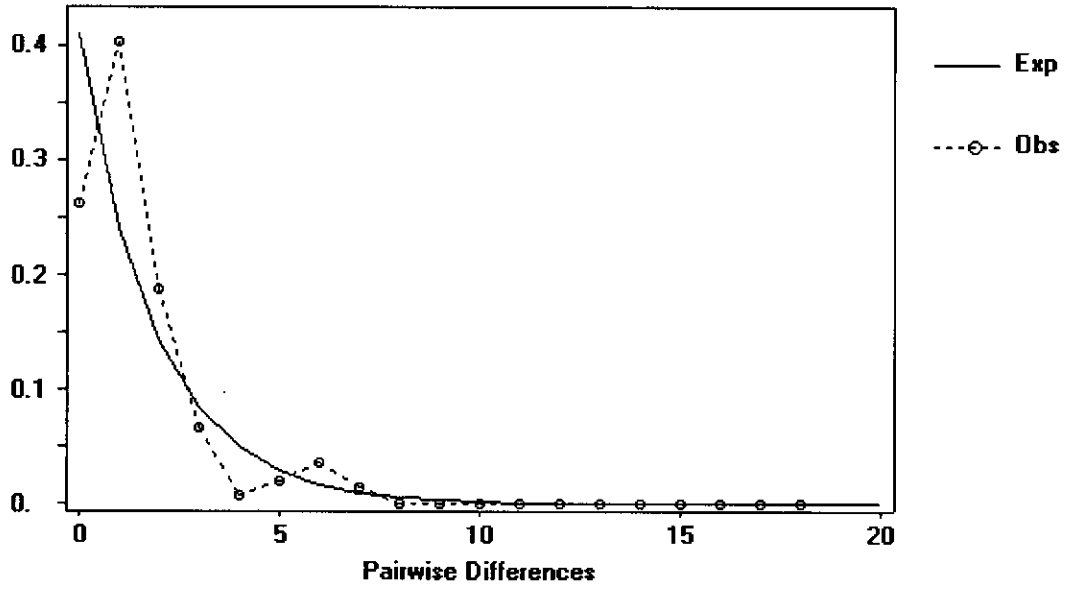
圖四、系群 I 兩兩地點間 F_{ST} 值與地理距離關係圖



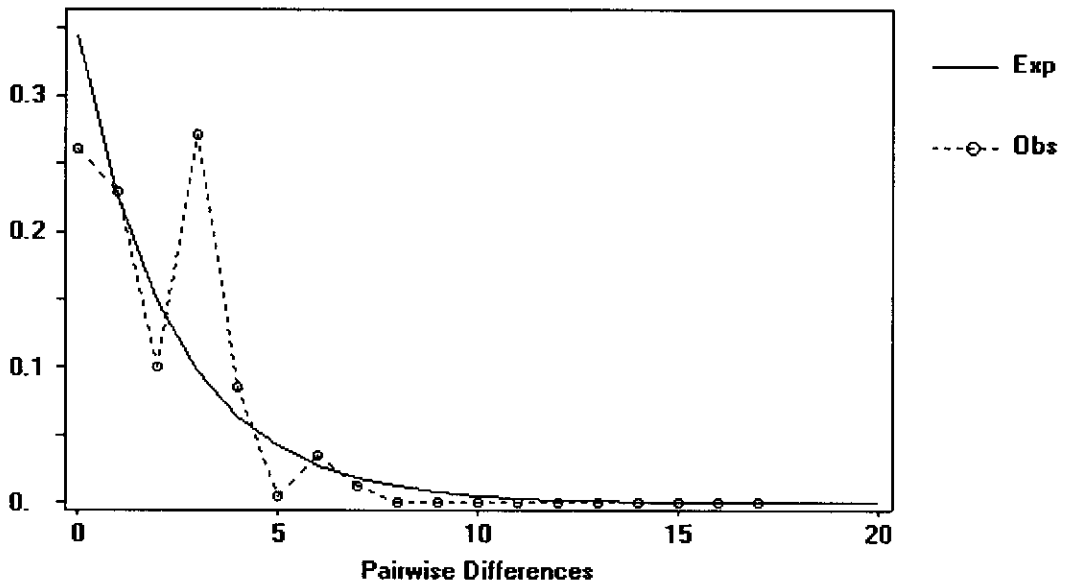
圖五、系群 II 兩兩地點間 F_{ST} 值與地理距離關係圖



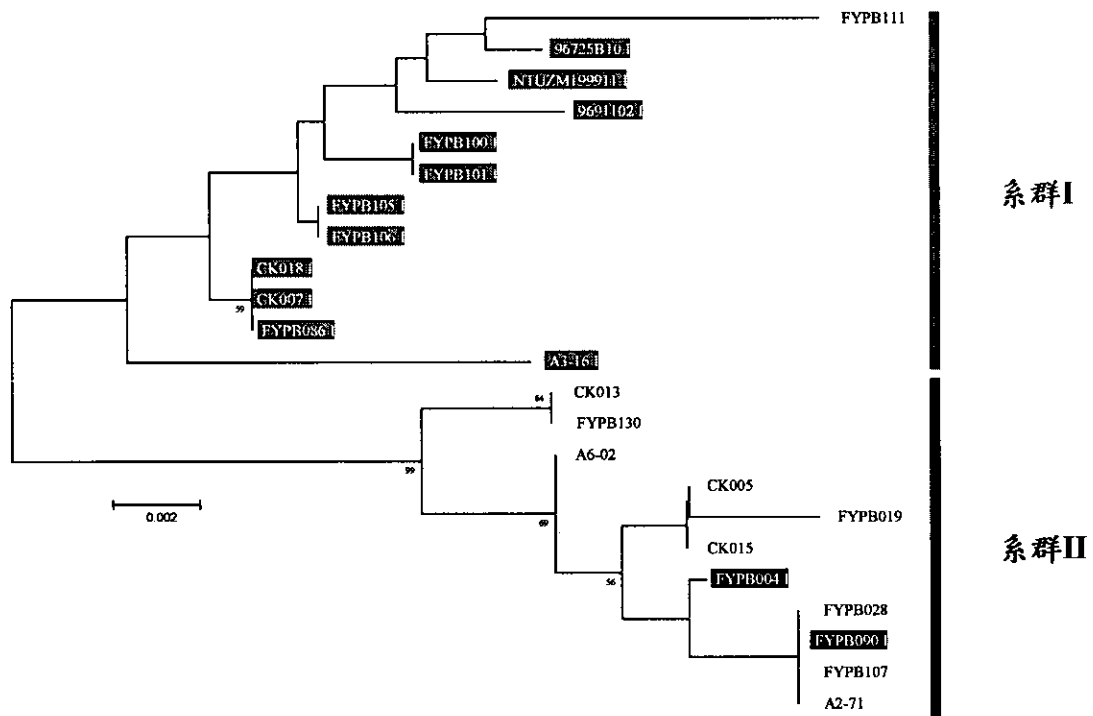
圖六、將基因型以最簡約分析所得之網狀圖(network)，n 代表基因型數目，NW、NS 與 E 分別代表西北部、西南部與東部地區。



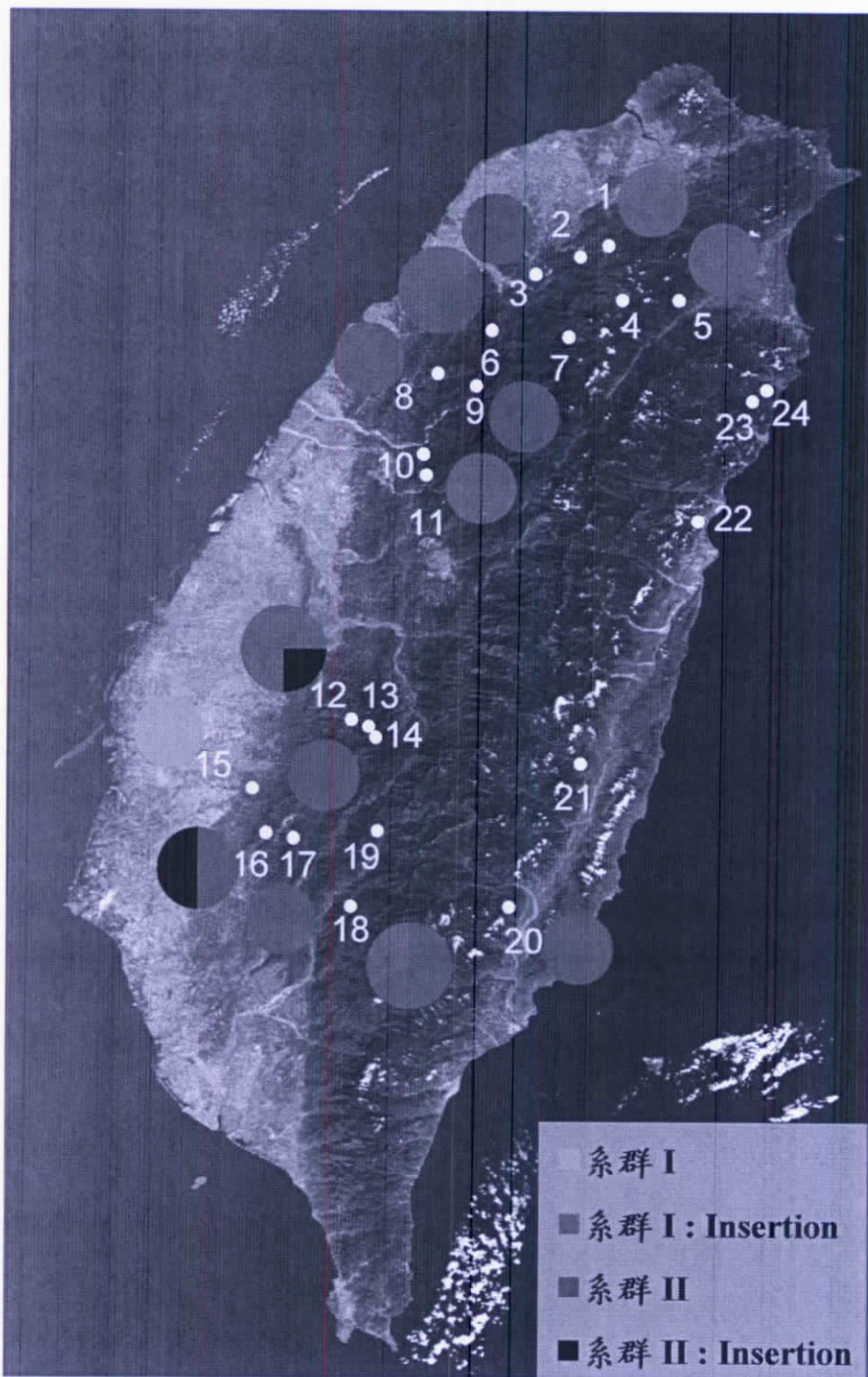
圖七、利用 Cytochrome b 序列，系群 I 的 mismatch distribution 分析圖



圖八、利用 Cytochrome b 序列，系群 II 的 mismatch distribution 分析圖



圖九、利用控制區部分序列，以 Neighbor-joining method 所建構出的親緣關係圖



- | | |
|------------------|-------------------|
| 1. 桃園縣復興鄉小烏來 1 | 12. 嘉義縣竹崎鄉水社寮 4 |
| 3. 新竹縣關西鎮赤柯山 1 | 13. 嘉義縣竹崎鄉龍雲渡假村 1 |
| 5. 宜蘭縣大同鄉破礮溪 1 | 15. 台南縣白河鎮鹿寮水庫 1 |
| 6. 新竹縣五峰鄉白蘭 3 | 16. 台南縣東山鄉仙公廟 2 |
| 8. 苗栗縣泰安鄉泰安溫泉 1 | 17. 嘉義縣大埔鄉茄苳村 1 |
| 9. 苗栗縣泰安鄉司馬限林道 1 | 18. 高雄縣桃源鄉美瓏林道 3 |
| 11. 台中縣和平鄉若茵農場 2 | 20. 台東縣海端鄉紅石林道 1 |

圖十、利用 D-loop 部分序列，台灣彩蝠兩系群之分布圖，地點後數字為樣本數

表一、台灣彩蝠的 Cytochrome b 全片段分析個體之採樣地點、各地區分析樣本數、各地區基因單型數目、基因單型歧異度、核苷酸歧異度

區域	地點	數量	單型數目	單型歧異度	核苷酸歧異度
西北部	桃園小烏來	1	1	-	-
	桃園奎輝	1	1	-	-
	新竹關西	3	2	0.667	0.0117
	桃園巴陵	2	1	0	0
	宜蘭大同	6	2	0.333	0.0059
	新竹白蘭	27	5	0.698	0.0020
	新竹司馬庫斯	2	1	0	0
	苗栗泰安溫泉	1	1	-	-
	苗栗司馬限	1	1	-	-
	台中東勢	1	1	-	-
	台中和平	4	2	0.5	0.0004
	Total	49	12	0.748	0.0047
西南部	嘉義水社寮	10	3	0.711	0.0111
	嘉義龍雲	1	1	-	-
	嘉義米洋溪	1	1	-	-
	台南鹿寮	1	1	-	-
	台南東山	5	3	0.7	0.0091
	嘉義大埔	4	2	0.5	0.0013
	高雄美瓏	4	1	0	0
	高雄梅蘭	2	2	1	0.0175
	Total	28	9	0.831	0.0096
東部	台東紅石林道	2	2	1	0.0202
	花蓮三民林道	1	1	-	-
	花蓮大禮大同	1	1	-	-
	宜蘭南澳南林道	2	1	0	0
	宜蘭無名溪	2	2	1	0.0184
Total	8	4	0.750	0.0111	

表二、利用 Cytochrome b 序列，系群內與系群間的遺傳距離(K2P)

	系群 I	系群 II
系群 I	0.0013	
系群 II	0.0188	0.0017

註：對角線上為系群內

表三、台灣彩蝠各地區族群所擁有的基因單型種類(haplotype)、數目(number)、
基因單型頻率(haplotype frequency), 及其所屬的系群(lineages)

區域	地點	基因單型	數量	基因單型頻率	系群	
西北部	桃園小烏來	KN4	1	0.0204	I	
		KN7	1	0.0204	I	
	新竹關西	KN6	2	0.0408	I	
		KS3	1	0.0204	II	
	桃園巴陵	KS4	2	0.0408	II	
		宜蘭大同	KN1	5	0.1020	I
	KS2		1	0.0204	II	
	新竹白蘭	KN1	10	0.2040	I	
		KN3	4	0.0816	I	
		KN6	11	0.2249	I	
		KN11	1	0.0204	I	
		KS2	1	0.0204	II	
	新竹司馬庫斯	KN1	2	0.0408	I	
	苗栗泰安溫泉	KN10	1	0.0204	I	
	苗栗司馬限	KS1	1	0.0204	II	
	台中東勢	KN1	1	0.0204	I	
	台中和平	KN1	3	0.0612	I	
		KN5	1	0.0204	I	
	西南部	嘉義水社寮	KN2	4	0.1429	I
			KN8	2	0.0714	I
KS6			4	0.1429	II	
嘉義龍雲		KS4	1	0.0357	II	
嘉義米洋溪		KS1	1	0.0357	II	
台南鹿寮		KN9	1	0.0357	I	
台南東山		KN7	1	0.0357	I	
		KS4	3	0.1071	II	
		KS5	1	0.0357	II	
嘉義大埔		KS1	3	0.1071	II	
		KS4	1	0.0357	II	
高雄美瓏		KS4	4	0.1429	II	
高雄梅蘭		KN6	1	0.0357	I	
		KS4	1	0.0357	II	
東部		台東紅石林道	KN1	1	0.125	I
	KS7		1	0.125	II	

花蓮三民林道	KS1	1	0.125	II
花蓮大禮大同	KS1	1	0.125	II
宜蘭南澳南林道	KN1	2	0.25	I
宜蘭無名溪	KN1	1	0.125	I
	KS4	1	0.125	II

表五、台灣彩蝠系群 I Cytochrome b 全片段分析個體之採樣地點、各地區分析樣本數、各地區基因單型數目、基因單型歧異度、核苷酸歧異度

區域	地點	數量	單型數目	單型歧異度	核苷酸歧異度
西北部	桃園小烏來	1	1	-	-
	桃園奎輝	1	1	-	-
	新竹關西	2	1	0	0
	宜蘭大同	5	1	0	0
	新竹白蘭	26	4	0.674	0.0008
	新竹司馬庫斯	2	1	0	0
	苗栗泰安溫泉	1	1	-	-
	台中東勢	1	1	-	-
	台中和平	4	2	0.5	0.0004
	Total	43	8	0.674	0.001
西南部	嘉義水社寮	6	2	0.533	0.0009
	台南鹿寮	1	1	-	-
	台南東山	1	1	-	-
	高雄梅蘭	1	1	-	-
	Total	9	5	0.806	0.0024
東部	台東紅石林道	1	1	-	-
	宜蘭南澳南林道	2	1	0	0
	宜蘭無名溪	1	1	-	-
	Total	4	1	0	0

表六、台灣彩蝠系群 II Cytochrome b 全片段分析個體之採樣地點、各地區分析樣本數、各地區基因單型數目、基因單型歧異度、核苷酸歧異度

區域	地點	數量	單型數目	單型歧異度	核苷酸歧異度
西北部	新竹關西	1	1	-	-
	桃園巴陵	2	1	0	0
	宜蘭大同	1	1	-	-
	新竹白蘭	1	1	-	-
	苗栗司馬限	1	1	-	-
	Total	6	4	0.867	0.0014
西南部	嘉義水社寮	4	1	0	0
	嘉義龍雲	1	1	-	-
	嘉義米洋溪	1	1	-	-
	台南東山	4	2	0.5	0.0004
	嘉義大埔	4	2	0.5	0.0013
	高雄美瓏	4	1	0	0
	高雄梅蘭	1	1	-	-
	Total	19	4	0.667	0.0013
東部	台東紅石林道	1	1	-	-
	花蓮三民林道	1	1	-	-
	花蓮大禮大同	1	1	-	-
	宜蘭無名溪	1	1	-	-
	Total	4	3	0.833	0.0026

表七、系群 I 各區域間之遺傳分化指數(F_{ST})

	西北部	西南部	東部
西北部			
西南部	0.171		
東部	0.200	0.342	

表八、系群 II 各區域間之遺傳分化指數(F_{ST})

	西北部	西南部	東部
西北部			
西南部			
東部			

西北部		
西南部	0.073	
東部	0.150	0.235

表九、各區域間之遺傳分化指數(F_{ST})

	西北部	西南部	東部
西北部			
西南部	0.425		
東部	0.175	0.020	

表十、利用 Cytochrome b 序列，針對不同分群進行分子變方分析(AMOVA)的結果。
NW 代表西北部，NS 代表西南部，E 代表東部

Group	Local population	Phylogroup	Lineage I	Lineage II
	NW/SW/E	Lineage	NW/SW/E	NW/SW/E
Among groups	31.74*	91.45***	0.08	13.74
Among samples, within groups	23.31**	5.45***	57.03***	64.58***
Within samples	44.95***	3.09***	42.89***	21.67***

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $P < 0.001$

表十一、系群樣本數與近期族群擴張假說檢測(F_u ' s F_s statistic, goodness-of-fit distribution)結果

	樣本數	$P(F_S)$	$P(HRag)$	$P(SSD)$
系群 I	56	0.02	0.19	0.18
系群 II	29	0.39	0.46	0.41

表十二、利用 D-loop 部分序列，系群內與系群間的遺傳距離(K2P)

	系群 I	系群 II
系群 I	0.0083	
系群 II	0.0246	0.0056

註：對角線上為系群內

表十三、彩蝠屬微體基因座各基因座測試結果。○表擴增成功或能擴增出具有多型性的片段

Locus	擴增	多型性	Repeat motif (5' -3')	Allele size range (bp)
Kpa02				
Kpa04				
Kpa08	○	○	(G) ₃ (A) ₃ (GACA) ₂ (GA) ₁₀	217-245
Kpa13	○	○	(T) ₃ (CT) ₃ CT (C) ₃ (T) ₃ (CT) ₅ (A) ₃	173&177
Kpa16	○	○	(GA) ₃ (G) ₃ (A) ₃ GAAC (GA) ₅ GG (GA) ₇	215-239
Kpa18	○			
Kpa19				
Kpa22	○	○	(GT) ₁₈	234-248
Kpa24	○	○	(GA) ₁₉	217-237
Kpa26	○	○	(CT) ₁₅	108-164
Kpa27				
Kpa30				
Kpa32	○	○	(CA) ₂₁	162-214
Kpa36				
Kpa46	○	○	(GATA) ₄ GGTA (GATA) ₇	158-172
Kpa47				

附錄 台灣彩蝠粒線體 DNA 控制區部分序列變異位置

3	32/	3	40/	5	56/	5	6	61/	6	69/	8	81/	1	113/	3	136/	3	4	4	142/	9	0	1	3	4	5	6	7	7	9	0	0	1	3	5	7									
2	38	9	54	5	58	9	0	67	8	79	0	111	2	134	5	138	9	0	1	191	2	3	8	0	7	9	1	5	9	4	9	0	5	6	5										
ND1	A	7bp	T	15bp	C	3bp	A	T	7bp	G	11bp	T	31bp	G	22bp	C	3bp	A	T	G	50bp	G	T	C	T	C	G	T	A	A	A	C	A	T	C	A	A								
ND2	G						
ND3	G						
ND4	G						
ND5	A	G							
ND6	.	.	C	G							
ND7	.	.	C	T	G							
ND8	.	.	C	C	T	.					
ND9	G						
SD1	.	.	C	G	C	A	.	T	.	G	C	A	T	G	.					
SD2	.	.	C	G	C	A	.	.	.	G	C	A	T	G	.				
SD3	.	.	C	G	C	T	G	.			
SD4	.	.	C	G	C	T	G	.			
SD5	.	.	C	G	C	T	G	.		
SD6	.	.	C	G	C	T	G	.		
SD7	.	.	C	G	C	T	G	.		
SD8	G	.	C	G	C	G	T	G	.	
SD9	G	.	C	G	C	G	T	G	.