

台灣梅花鹿遺傳基因分析之研究

Genetic Variation of Formosan Sika Deer(*Cervus nippon taiouanus*)

受委託者：中華民國國家公園學會

研究主持人：王穎

協同主持人：李壽先

研究助理：銀琬春、王佳琪

內政部委託研究報告

中華民國 91 年 12 月

致謝

本研究承內政部營建署墾丁國家公園管理處之支持，十分感謝。研究期間，管理處李養盛處長、朱豐志副處長、保育課劉新明課長、陳文明先生提供行政事物協助，在此表示深摯的謝意。在梅花鹿採樣方面，感謝屏東科技大學的吳永惠老師協助採集墾丁梅花鹿血液的樣本，台北市立動物園協助提供梅花鹿血液樣本，台東成功董秋成船長協助綠島梅花鹿採集，墾丁梅花鹿復育工作人員、國立台北師範學院陳順其老師、及野生動物研究室方志仁、郭正彥先生及黃凰綺、黃妃珊、黃哲群小姐幫忙採樣的工作。此外，並感謝國立台灣博物館提供古老梅花鹿標本。另中興獸醫系董光中老師提供血液保存的方法及鹿場樣本採集，警察大學李俊億老師、謝幸媚老師、蔡麗琴老師、朱聖宇先生在實驗過程中的殷切指導，師大分子遺傳實驗室的林美珠、李麗卿小姐為定序所做的努力，姚秋如小姐及林思民先生在分析軟體上的細心教導，在此一併致謝。

台灣梅花鹿遺傳基因分析之研究

中文摘要-----	i
英文摘要-----	ii
一、 前言-----	1
二、 材料與方法-----	3
三、 結果-----	6
四、 討論-----	7
五、 族群健康與保育遺傳變異之建議-----	9
六、 參考文獻-----	10
表 1. 台灣梅花鹿現生個體採集及定序數量-----	13
表 2. 台灣梅花鹿及其他種類個體之序列變化位置-----	14
表 3. 台灣梅花鹿與不同亞種間的差異-----	15
表 4. 台灣梅花鹿與其他梅花鹿亞種之遺傳變異距離-----	15
圖 1. 台灣梅花鹿與其他地區梅花鹿之親緣樹狀圖-----	16
附錄 1. 墾丁國家公園瓊麻館梅花鹿採樣紀錄-----	17
附錄 2. 墾丁國家公園社頂工作站梅花鹿採樣紀錄-----	18
附錄 3. 台北市立動物園梅花鹿個體資料-----	20
附錄 4. 綠島梅花鹿個體採集記錄-----	21
附錄 5. 二林鹿場採樣記錄-----	21
附錄 6. 台灣博物館之梅花鹿標本資料-----	22
附錄 7. 引子(Primer)的種類-----	22
附錄 8. 台灣梅花鹿及其他種類個體之粒線體序列 (cytochrome b) -----	23

摘要

自 2002 年 1 月至 12 月,共收集現生及古老梅花鹿(*Cervus nippon taiouanus*) 樣本 111 個,其中現生樣本中有 72 隻個體成功定序,分屬墾丁國家公園(n=56)、台北市立動物園(n=4)、綠島(n=9)、二林農場(n=3)。就粒線體定序結果顯示,已定序出 cytochrome b 共 850 bp,其中有 5 個變異點,分屬 5 種基因型。墾丁族群有 4 種基因型,除 3 隻分屬不同基因型外,餘皆為同一基因型。綠島與動物園族群各皆為 1 種基因型,前者與墾丁有別,後者與墾丁相同。比較台灣各區間及其與其他亞種種群之遺傳距離,顯示綠島與墾丁屬同一種群,而台灣梅花鹿在遺傳基因型上具有特異性,與其他不同亞種體系有相當之距離,其中與台灣親緣最接近者是中國四川梅花鹿亞種,而與日本各亞種間之差異性較高。

Abstract

From 2002 Jan to Dec, portion of mitochondrial DNA cytochrome b (850bp) from 72 Formosan Sika deer (*Cervus nippon taiouanus*) in 4 areas (Kenting, n=56; Taipei Zoo, n=4; Green Island, n=9; Urling Farm, n=3) were sequenced. Five genotypes from 5 variation sites were identified. Four genotypes were found in Kenting population. Except 3 individuals (3 different types), the rest were all belong to the same genotype. Sample from Green Island and Taipei Zoo, each belonged to 1 genotype. The former was different from Kenting population, while the later was similar to Kenting population. Phylogenetic tree from different samples within the island and different subspecies from existing data using MEGA2 analysis showed that genetic distance within different populations in Taiwan was relatively small. They could be classified as the same subspecific population. The Formosan Sika deer was relatively closed to Sichun subspecies, while it was distant away from Japanese subspecies.

一、前言

台灣梅花鹿(*Cervus nippon taiouanus*)為台灣特有亞種，過去曾有大量族群生活於中低海拔的平原及丘陵地，然而由於受到強大的狩獵壓力，復以其棲息地因農業開發而遭破壞，導致野外族群數量銳減。根據McCullough (1974) 在台灣進行大型哺乳類調查報告指出，野生梅花鹿可能已於民國58年在野外絕跡，所幸在動物園及民間養鹿場尚有大量飼養族群使其種源得以保存。

為了保存台灣梅花鹿之固有品系，並使其回復野性重返山林，墾丁國家公園管理處遂於民國73年著手進行台灣梅花鹿復育計畫，歷經10年的準備及放養階段後，於民國83年1月進入野外追蹤階段，目前已有梅花鹿族群於野外自由生活，然目前台灣梅花鹿與民間鹿場飼養之梅花鹿，包括其他可能引進之亞種群共同列屬家畜名目，無法受到野生動物法之保障，為解決台灣梅花鹿之法律定位問題，復育族群的遺傳結構及其與其他亞種群間之變異情形如何，有了解必要。

近年來由於分子生物學進展迅速，藉由遺傳物質之標誌 (marker)，可協助生物地理及演化等問題之分析。粒線體基因 (mtDNA) 為一有效分析工具，提供極佳的標誌來定義族群、追蹤個體或具親源關係族群之演化歷史、或建立系統演化樹。粒線體基因為一環形雙股密閉DNA，在脊椎動物中，每個細胞中約存在1000-10000個數 (multiple copies)。粒線體基因為母系遺傳，很少或不會重組，由37個基因組成，包含2個ribosomalRNA基因 (rRNAs)，22個transfer RNA基因 (tRNAs)，另有一non-coding region，在脊椎動物中又名D-loop，在其他種群又名A+T rich 或control region(控制區域)。細胞色素b基因 (cytochrome b; cyt b) 位於tRNA上，長度約1kb。

就梅花鹿粒線體之基因而言，Tamate and Tsuchiya (1995) 曾分析日本梅花鹿亞種的多型性，顯示粒線體序列約16600bp。就梅花鹿細胞色素b序列而言，Nagata et al. (1995) 首次發表日本梅花鹿粒線體細胞色素b序列。Tamate et al. (1998) 由細胞色素b探討日本梅花鹿7個亞種的遺傳差異，由演化分枝樹顯示可分為南北兩群，北 (Hokkaido-Honshu)、南 (Kyushu) 兩群的分化為近年來產生，南北生物地理分隔地點在 Honshu本島。Kuwayama and Ozawa (2000) 分析日本梅花鹿、歐洲紅鹿 (European red deer, *Cervus elaphus* in

Europe) 美洲紅鹿(Wapiti, *Cervus elaphus* in Asia and North America) 的細胞色素b序列，顯示Wapiti和Sika deer的親緣關係較近，和傳統認為歐洲紅鹿和美洲紅鹿親緣關係近的結果不同。

就梅花鹿粒線體D-loop之遺傳分析而言，Nagata *et al.* (1999) 分析日本梅花鹿不同族群間的遺傳變異，由粒線體D-loop分析顯示日本梅花鹿分南北兩群 Nagata *et al.*(1998)分析北海道梅花鹿族群D-loop遺傳變異，具有4個轉換突變 (transitional mutation) 位置。

具有多型性的微衛星體，亦是一有效之族群遺傳研究工具 (Hughes and Queller, 1993)，目前已被廣泛應用在個體血緣關係 (Queller, *et al.*, 1993; Morin *et al.*, 1994; Blouin *et al.*, 1996)、近似種與雜交的鑑定 (Gottelli *et al.*, 1994; Roy *et al.*, 1994; Harr *et al.* 1998)。

就梅花鹿微衛星體之DNA分析而言，Tamate *et al.*(2000)利用微衛星體分析日本梅花鹿一個島嶼(Kinkazan Island)小族群(20%)的遺傳變異，顯示雖然族群數量小，然仍然具有相當之微衛星體變異。Nagata *et al.* (1998) 利用三個微衛星體位置比較本州和北海道梅花鹿族群遺傳差異 Goodman *et al.*(1999)利用微衛星體探討紅鹿(*Cervus elaphus*) 和梅花鹿的雜交問題。Okada and Tamate (2000) 利用微衛星體進行譜系分析，結果顯示微衛星體在研究梅花鹿的社會結構和行為上是一個好工具，尤其是在監測近親交配狀態上。Goodman *et al.* (2001) 分析日本梅花鹿的14個族群的微衛星體，顯示日本梅花鹿遺傳上分兩個族群，由於19世紀後人類活動，受到棲地分割及瓶頸效應的影響。大多數現生個體的基因分化，族群歧異的變異可能來自於最近的基因漂變影響。

其他探討梅花鹿遺傳基因研究，包含利用RAPD方法檢測日本梅花鹿族群遺傳變異 (Fukui *et al.*,2001)，Tamate *et al.* (1995) 的研究亦顯示RAPD是一個好方法來了解梅花鹿族群遺傳變異。

就台灣梅花鹿之遺傳分析而言，谷及王 (1992) 曾初步探討台灣梅花鹿之遺傳特性，結果顯示所取樣之台灣梅花鹿屬於同一起源，並與其他三個亞種在粒線體之序列有所差異，然由於分析之樣本及序列有限，仍有待進一步確認，故本研究擬增加樣本數，並包括早期台灣梅花鹿樣本之收集，同時增加粒線體序列之定序範圍，以進行遺傳分析，期能了解台灣梅花鹿與其他梅花鹿之遺傳差異。

二、材料與方法

於 2002 年 1 月至 12 月，分別至墾丁國家公園及其他地區收集現生復育鹿群及飼養族群個體之樣本，並收集古老花鹿標本比較，所得之結果，則與現存之各亞種群之遺傳特性進行對比，以了解復育種群遺傳特性，茲將實施方法分為現生個體採集、古老細胞收集、樣本分析等三部份，敘述如下：

（一）現生個體採集

1. 墾丁國家公園

於 9 月 29 日至墾丁國家公園瓊麻館進行第一次採樣，共採集 37 隻梅花鹿個體(26 雌 11 雄)(附錄 1)。於 10 月 26 日至墾丁國家公園社頂復育區進行第二次採集，共採集 52 隻個體(24 雌 28 雄)(附錄 2)。

2. 台北市立動物園

由台北市立動物園提供六隻梅花鹿(3 雌 3 雄)血液樣本(附錄 3)。

3. 綠島地區

由台東市成功鎮董秋成先生協助採集養鹿場之梅花鹿血液樣本，共採集 13 隻雄性個體(附錄 4)。

4. 二林梅花鹿場

二林鹿場養殖水鹿、紅鹿、梅花鹿以及混種之品系，專營鹿茸產品，由中興獸醫系董光中老師協助採集，共採集梅花鹿 3 隻，紅鹿 2 隻，水鹿 1 隻。另採集雜交個體 2 隻，分別為水鹿與梅花鹿混種，紅鹿與梅花鹿混種(附錄 5)。

（二）古老細胞收集

就古老梅花鹿樣本而言，由台灣博物館提供標本 8 份，包含 4 隻成鹿，2 隻小鹿，及 2 個鹿角，其中 6 隻為日據時代遺留(附錄 6)。另由屏東來義鄉原住民頭目提供梅花鹿鹿皮服飾之樣本一份台東金峰鄉原住民提供鹿角樣本一份。

（三）粒線體(mtDNA)定序及分析

1. DNA 萃取

(1)取 1500 ul 微量離心管,加入 1x digestion buffer (1%SDS, 1mg/ml

DTT, 0.5mg/ml proteinase K, 10mM Tris-HCl pH 8.0, 2mM EDTA) 與組織，置於 56⁰ C 之恆溫槽反應。

(2)隔夜取出，加入一倍體積 5M LiCl 與兩倍體積氯仿(chloroform: isoamyl alcohol=24:1), 搖盪 30 分鐘;以 12.5k rpm 離心,取上清液。

(3)在上清液加入兩倍體積的 100%室溫酒精，混合均勻後，12.5k rpm 離心 15 分鐘，倒掉上清液，再以 200 ul 75%酒精清洗 DNA 沈澱物，繼以 12.5k rpm 離心 5 分鐘，小心抽乾酒精，可見白色或透明 DNA 沈澱物黏附於管壁上，自然乾燥數小時，以去除殘餘酒精，最後加入 50ul 無菌水溶解 DNA。產物的確定:取 1ul DNA 溶液，1ul 6 倍的染色溶液(loading dye)及 4 ul TE buffer，放入 0.8% 瓊脂凝膠(agarose gel)中，電泳槽中放入 1 倍 TBE buffer，以 100 伏特電壓電泳約 40 分鐘後，將瓊脂凝膠放入 200 ml 去離子水中，並加入 10 ul 溴化乙啶(EtBr 10mg/ml)，水平搖盪 40 分鐘，將染色液倒掉，加入 200ml 去離子水，脫去多餘的溴化乙啶，再以紫外光照射瓊脂凝膠，查看是否有 DNA 存在。

2.以雙股 DNA 聚合酶連鎖反應大量增幅 DNA

(1)引子的設定

先期試驗: 聚合酶連鎖反應及定序反應的引子(primer)為 L15408 和 H16498(Kuwayama and Ozawa,2000), L15408 位於 cytochrome b 基因輕股(light strand)，序列為 5'- ATA GAC AAA ATC CCA TTC CA -3'，H16498 位於 cytochrome b 基因重股(heavy strand)，序列為 5'- CCT GAA GTA GGA ACC AGA TG -3'。由這兩個引子所增幅的 DNA，長度約為 1140 個鹼基對。經過 PCR 與定序之後，我們發現無法定出良好品質之 DNA 序列(因為在序列會形成 loop 結構，無法順利讀出後續 DNA 序列)，故另行設計新的重端引子。

自行設計引子:利用 SequencherTM4.0 輸入由 NCBI 上所查到現有的六個亞種梅花鹿 cytochrome b gene，找出變異性區域，再利用 FASTPCR 就基因保守區域去做測試，找出最適當的 primer 序列 L83 與 R924，此二條引子經 PCR 與定序反應測試後，均相當合適，故我們將選取 L83 與 R924 為定序的引子組合(附錄 7)。

(2)聚合酶連鎖反應

聚合反應時，反應液 25ul 中包括 5 ul 10 倍反應緩衝溶液(50Mm KCl, 10 Mm Tris-HCl pH 8.3)，200mM dNTP(即分別含有 200mM

dATP、dCTP、dGTP、dTTP)，並加上 10pm 所需增幅的一對引子，1ul 粗 DNA 為模板，4 units Supertherm 聚合酶，充分混勻後，將反應管放入溫度循環控制儀(thermal cycler)，先以 94°C 加熱 5 分鐘，再進行 32-35 次下述之流程：

- a. 94°C 40 秒，將雙股 DNA 變性解開(denaturing)。
- b. 50°C 30 秒，使互補雙股片段與引子鍊合(annealing)。
- c. 72°C 1 分 20 秒，此時聚合酶進行反應，再引子 3'端延伸聚合反應(extension)。
- d. 最後加熱 72°C 10 分鐘，讓反應不全的片段繼續複製完成。

(3)定序

將 PCR 產物以 Exo I and SAP Kit 純化後，依照 MegaBACE DNA Analysis System 所建議之步驟，進行定序反應，反應是在 BIO-RAD iCycler 溫度循環控制儀進行。接著在 MegaBACE 500 自動定序儀讀取 DNA 序列，並以 Sequence Analyzer 軟體進行 Base Calling 與 scf 檔案輸出。

(三)建立 DNA 序列矩陣與基因樹之建構

將每隻個體 DNA 之 scf 檔載入 Sequencher™4.0，予以對齊並校正。接著將所得的 contig 結果以 MEGA 檔案型式輸出，即為 DNA 序列矩陣，接著進入 MEGA(Molecular Evolutionary Genetic Analysis, Version 2.1)軟體中，計算不同序列的距離(Distance 指令)，以及不同亞種之梅花鹿比較族群親緣關係，包括 P-Distance 及 Tamura-Nei distance，並以兩種常用之距離法(Distance method):UPGMA 及 Neighbor Joining，建構基因樹，並以 Bootstrap 法重複抽樣 2000 次，以檢測樹狀圖之可信度。

並將所得結果與其他亞種之梅花鹿序列相比。包含 *Cervus nippon yezoensis* (Japan, Hokkaido 日本北海道)、*Cervus nippon Nippon* (Japan, Kyushu and Shikoku 日本九州及四國)、*Cervus nippon mageshimae* (Japan, Tanegashima and Mageshima Islands 日本鹿耳島縣馬毛島)、*Cervus nippon pulchellus* (Japan, Tsushima Island 日本對馬島)、*Cervus nippon keramae* (Japan, Kerama Islands 日本沖繩群島)、*Cervus nippon sichuanicus*(中國四川)(Kuwayama and Ozawa,2000)。

三、結果

(一) 樣本之成功定序數量

自 2002 年 1 月至 12 月，研究人員至台灣四個地區收集樣本，共收集現生梅花鹿 111 個樣本，其中有 72 隻個體成功定序（表 1，附錄 8）。就墾丁之個體而言，共成功定序 56 隻（35 雌 21 雄）（附錄 1、2）。就台北市立動物園而言，有 4 隻個體成功定序（3 雌 1 雄）（附錄 3）。就綠島而言，有 9 隻雄性個體成功定序（附錄 4）。就二林農場而言，有 3 隻梅花鹿個體成功定序，另有四隻個體成功定序，分別為紅鹿、水鹿、水鹿與梅花鹿混種、紅鹿與梅花鹿混種（附錄 5）。

就古老梅花鹿樣本而言，皆已萃取出 DNA，然由於 DNA 斷裂十分嚴重，無法一次做出較長的片段做比較，所以必須設計更小的 primer 來定序適宜的片段。此外，古老梅花鹿個體間保存方式的差異亦可能影響萃取的 DNA 長短，故需進一步設計不同的 primer 來進行所需長度之定序。

(二) 定序結果

就梅花鹿粒線體 DNA 序列而言，已定序出 cytochrome b 850bp。比較台灣梅花鹿與其他地區梅花鹿之遺傳差異，由親緣樹狀圖顯示綠島及墾丁梅花鹿屬於同一亞種群（圖 1）。就台灣三個現生梅花鹿族群而言，在已分析的 850 個序列中，僅有 5 個變異點，5 個基因型（表 2），其中墾丁族群有 4 種基因型態，內 53 隻個體為同一基因型，其餘 3 隻分別為不同基因型。就綠島而言，為 1 種基因型態，與墾丁不同基因型，而動物園亦僅有一種基因型態，與墾丁大多數個體屬同型。與台灣親緣最接近的是中國大陸四川的梅花鹿亞種，而與其他日本亞種間之變異度較大（表 3、表 4）。

就台灣梅花鹿序列之變化位置（variable site）而言，顯示現生梅花鹿的基因型變異位置甚少。

(三) 遺傳分析

由 Neighbor-Joining method 所建構之基因樹（圖 1）顯示台灣梅花鹿動物園族群與墾丁族群相同，綠島個體屬同一群，台灣本島族群與綠島地區僅有 1 變化位置之差異，其分歧距離小，或可視為同一單元（亞種）。其與現生其他梅花鹿種群親緣關係甚近，然仍有相當的距離，反應出台灣梅花鹿係屬獨立之種群。

四、討論

本研究共定序台灣梅花鹿粒線體細胞色素 b 基因(cytochrome b) 長 850bp。就其他研究而言，王及谷 (1992) 定序台灣梅花鹿細胞色素 b 基因 5'端 264bp，3'端 375bp。Cook *et al.* (1999) 定序台灣梅花鹿 cytochrome b 共 450 bp。Li *et al.* (1999) 分析中國梅花鹿細胞色素 b 共 367bp。Wang *et al.* (1997) 分析梅花鹿角基座細胞色素 b 共 307bp。Nagata *et al.* (1995) 首次發表日本梅花鹿粒線體 DNA 序列，細胞色素 b 共 367bp。Chikuni *et al.* (1994) 分析梅花鹿等 8 種哺乳動物及 5 種鳥類的細胞色素 b 共 646bp。Kuwayama and Ozawa (2000) 分析日本梅花鹿的細胞色素 b 共 1140bp。茲將本研究之序列與其他研究之序列相較，由 MEGA2 之樹狀圖比較各亞種之間的距離，顯示亞種之間的差異很大，台灣梅花鹿與其他亞種的差異性是足以表示出是不同的亞種體系。Wilson(未發表資料) 利用微衛星體分析越南、蘇俄、中國、台灣、日本、英國等地的梅花鹿遺傳特性，亦顯示台灣梅花鹿和其他地方的種群有明顯差異。故台灣梅花鹿在遺傳基因型上具有特異性，應沒有與其他梅花鹿亞種混種的現象。

台灣現生梅花鹿的兩個野生繁殖群分別在墾丁國家公園及綠島。由 Cytochrome b 序列分析顯示墾丁梅花鹿與綠島梅花鹿的遺傳相似度遠高於與其他亞種間的遺傳關係，Wilson(未發表資料) 的梅花鹿微衛星體分析亦顯示綠島與墾丁非常相似，因此兩者在演化上可視為同一單元(亞種)。然由於墾丁國家公園及綠島族群間的基因型分布明顯不同，因此二者在演化上可能有不同的來源。就墾丁梅花鹿之種源而言，係民國 73 年復育計畫進行時，由台北市立動物園及飼養場引入之種群，原始來源記錄均不詳。就綠島梅花鹿之種源而言，可能係綠島居民祖先自台灣遷移來此時所帶來的，鹿種來源地是新港或台東成廣澳(成功鎮)，養殖歷史可追溯至清道光年間(1821-1850)，發展至今，養鹿成為居民主要的副業，屬小規模飼養，1965 年綠島鄉公所以公共造產方式養殖梅花鹿，由於入不敷出，1986 年綠島鄉公所將公共造產養殖的 195 頭全數野放山中，遂開始有野生族群的存在(郝，1995)。由序列分析顯示，綠島之基因型為墾丁族群所無，故可考慮將兩地間族群相互引進做配對，以增加各族群內的變異度。

本研究所採用之古老細胞來源為標本之皮毛，有少數保存完整的樣本個體可以萃取出 DNA，但由於 DNA 斷裂嚴重，所以無法一次定序出較長的片段。就其他相關微量或受破壞 DNA 研究而言，Chikuni

et al. (1994) 嘗試分析梅花鹿等 8 種哺乳動物及 5 種鳥類肉製品的細胞色素 b，所得之序列 (646bp) 仍相當完整，顯示 DNA 序列是一個鑑定肉品種類的好方法。Matsunaga *et al.* (1998) 以 cytochrome b 比較紅鹿和其他相近偶蹄目動物肉製品的相似性，雖然受到烹調的影響，肉製品的 DNA PCR 產物會降低，然而紅鹿在攝氏 120 度高溫下，仍可被偵測到 DNA。Wang *et al.* (1997) 亦嘗試分析梅花鹿角基座細胞色素 b，所得之序列共 307bp。雖然古老或曾受破壞之組織，在萃取 DNA 上具有相當之困難性，然仍有相當之發展空間，故未來擬根據現生梅花鹿 DNA 的變異點位置設計適宜的 primer 來擴增長度，以和現生個體之 DNA 序列進行比較。

五、族群健康與保育遺傳變異之建議

- 1.墾丁與綠島梅花鹿族群的種源不同，可考慮將兩者間相互引進做雜交配對，以便增加各個族群內的變異度。
- 2.建立個體的遺傳變異資料庫:利用細胞核內染色體做微衛星體多樣性的比較，進而有計畫分析個體間的不同差異以建立遺傳資料庫。
- 3.要建立遺傳多樣性的管理:作基因譜系的追蹤，並做計劃性的配對，以減少遺傳變異者雜交導致遺傳多樣性的消失。
- 4.增加族群數量，以維持或減緩目前遺傳多樣性的消失速度。
- 5.對於免疫相關的基因，如M H C 基因進行多型性分析，並據以進行計畫性繁殖，以維持族群長期的疾病抵抗力。

六、參考文獻

- Avice, J. C., J. Arnold, R.M. Ball. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18:489-522.
- Blouin, M.S., Parsons, M., Lacaille, V. and Lotz, S. (1996) Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness. *Molecular Ecology*, 5, 393-401.
- Boore, J. L. 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res.*27:1767-1780.
- Chikuni, K., T. Tabata, M. Saito, and M. Monma. 1994. Sequencing of mitochondrial cytochrome b genes for the identification of meat species. *Animal Science & Technology* 65(6):571-579.
- Chikuni, K., Y. Mori, T. Tabata, M. Saito, M. Monma, M. Kosugiyama. 1995. Molecular phylogeny based on the kappa-casein and cytochrome b sequence in the mammalian suborder ruminantia. *Journal of Molecular Evolution* 41(6):859-866.
- Fukui, E., M. Koganezawa, and M. Yoshizawa. 2001. Genetic analysis of Japanese sika deer in Nikko National Park by random amplified polymorphic DNA method. *Animal Science Journal* 72(9):200-206.
- Goodman, S. J., H. B. Tamate, R. Wilson, J. Nagata, S. Tatsuzawa, G. M. Swanson, J. M. Pemberton, and D. R. McCullough. 2001. Bottlenecks, drift and differentiation: the population structure and demographic history of sika deer (*Cervus nippon*) in the Japanese archipelago. *Molecular Ecology*. 10(6):1357-1370.
- Goodman, S. J., N. H. Barton, G. Swanson, K. Abernethy, and J. M. Pemberton.

1999. Introgression through rare hybridization: a genetic study of a hybrid zone between red and sika deer (genus *Cervus*) in Argyll, Scotland. *Genetics* 152(1): 355-371.
- Gottelli, D., Sillero-Zubiri, C., Applebaum, G.D., Roy, M.S., Girman, D.J., Garcia-Moreno, J. *et al.* (1994) Molecular genetics of the most endangered canid - the Ethiopian wolf *Canis simensis*. *Molecular Ecology*, 3, 301-312.
- Harr, B., Zangerl, B., Brem, G. and Schlotterer, C. (1998) Conservation of locus specific microsatellite variability across species: a comparison of two *Drosophila* sibling species *D. melanogaster* and *D. simulans*. *Molecular Biology and Evolution*, 15, 176-184.
- Hughes, C.R. and Queller, D.C. (1993) Detection of highly polymorphic microsatellite loci in a species with little allozyme polymorphism. *Molecular Ecology*, 2, 131-137.
- Kuwayama, R. and T. Ozawa. 2000. Phylogenetic relationships among European red deer, Wapiti, and Sika deer inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 15(1):115-123.
- Li, M., X. M. Wang, H. L. Sheng, H. Tamate, R. Masuda, J. Nagata, N. Otaishi. 1999. Mitochondrial DNA divergence and phylogeny of four species of deer of the genus *Cervus*. *Acta Zoologica Sinica* 45(1):99-105.
- Matsunaga, T., K. Chikuni, R. Tanabe, S. Muroya, H. Nakai, K. Shibata, J. Yamada, and Y. Shinmura. 1998. Determination of mitochondrial cytochrome B gene sequence for red deer (*Cervus elaphus*) and the differentiation of closely related deer meats. *Meat Science* 49(4):379-385.
- McCullough, D. R. 1974. Status of Larger mammals in Taiwan. Tourism Bureau. 36pp.
- Morin, P.A., Moore, J.J., Charkraborty, R., Lin, L., Goodall, J. and Woodruff, D.S. (1994) Kin selection, social structure, gene flow and the evolution of chimpanzees. *Science*, 265, 1193-1201.
- Nagata, J. R. Masuda, and M. C. Yoshida. 1995. Nucleotide sequences of the cytochrome b and the 12S rRNA genes in the Japanese sika deer *Cervus Nippon*. *Journal of the Mammalogical Society of Japan* 20(1):1-8.
- Nagata, J., R. Masuda, H. B. Tamate, S. I. Hamasaki, K. Ochiai, M. Asada, S. Tatsuzawa., K. Suda, H. Tado, M. C. Yoshida. 1999. Two genetically distinct lineages of the sika deer, *Cervus Nippon*, in Japanese islands: comparison of mitochondrial D-loop region sequences. *Molecular Phylogenetics & Evolution*

13(3):511-519.

- Nagata, J., R. Masuda, K. Kaji, K. Ochiai, M. Asada, and M. C. Yoshida. 1998. Microsatellite DNA variations of the sika deer, *Cervus Nippon*, in Hokkaido and Chiba. *Mammal Study* 23(2):95-101.
- Okada, A. and H. B. Tamate. 2000. Pedigree analysis of the sika deer(*Cervus nippon*) using microsatellite markers. *Zoological Science* 17(3):335-340
- Polziehn, R. O. and C. Strobeck. 1998. Phylogeny of wapiti, red deer, sika deer, and other North American cervids as determined from mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics & Evolution* 10(2):249-258.
- Queller, D.C., Strassmann, J.E., and Hughes, C.R. (1993) Microsatellites and kinship. *Trends in Ecology Evolution*, 8, 285.
- Roy, M.S., Geffen, E., Smith, D., Ostrander, E.A. and Wayne, R.K. (1994) Patterns of differentiation in Northern American wolf-like canids, revealed by analysis of microsatellite loci. *Molecular Biology and Evolution*, 11, 553-570.
- Tamate, H. B. and T. Tsuchiya. 1995. Mitochondrial DNA polymorphism in subspecies of the Japanese Sika deer, *Cervus Nippon*. *Journal of Heredity* 86(3):211-215.
- 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(*Cervus nippon*) on Kinkazan Island, northern Japan. *Zoological Science*. 17(1):47-53.
- Tamate, H. B., K. Shibata, and T. Tsuchiya. 1995. Assessment of genetic variations within populations of Sika deer in Japan by analysis of randomly amplified polymorphic DNA(RAPD). *Zoological Science* 12:669-673.
- Tamate, H. B., S. Tatsuzawa, K. Suda., M. Izawa, T. Doi, K. Sunagawa, F. Miyahira, and H. Tado. 1998. Mitochondrial DNA variation in local populations of the Japanese sika deer, *Cervus Nippon*. *Journal of Mammalogy* 79(4):1396-1403.
- Wang, J., G. He, W. Fu, B. Su, W. Wang, Y. Zhang, Y. Lu, M. He, Z. Zhu. 1997. Extraction and sequenceing of trace DNA from *Cornu cervi panotrichum*. *Zhongguo Zhongyap Zazhi* 22(10):579-583.
- Wolstenholme, D. R. 1992. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *Int. Rev. Cytol.* 141:173-216.
- 谷喬，王穎。1992。台灣梅花鹿品系之分析。內政部營建署墾丁國家公園管理處。28 頁。

郝欣榮。1995。台灣野生鹿與養殖鹿的地理研究。國立台灣師範大學地理所碩士論文。92 頁。

表 1. 台灣梅花鹿現生個體採集及定序數量

	採樣數量			已定序數量		
	♀	♂	總合	♀	♂	總和
墾丁國家公園	50	39	89	35	21	56
綠島	0	13	13	0	9	9
台北市立動物園	3	3	6	3	1	4
二林鹿場	0	3	3	0	3	3

表 2. 台灣梅花鹿及其他種類個體之序列變化位置 (VARIABLE SITES)

編號	變化位置序列										
Kt1	AAAAGAGAGA	GTGGGCTAAG	ACTAATGATT	GAAGTGAAGG	GGGCGGGGCA	GTCGAAAGTA	ACTTGGGGGA	TAGGTTAAGT	AGGGCCGAAA	AAGGGGTGAG	A
Zoo35	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-
kt13	-----	-----	-----	---C---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-
kt14	-----A-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-
kt11	---AG---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-
G12	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---C---	-----	-----	-----	-
G3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---C---	-----	-----	-----	-
G9	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---C---	-----	-----	-----	-
G8	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---C---	-----	-----	-----	-
G6	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---C---	-----	-----	-----	-
G7	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---C---	-----	-----	-----	-
G5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---C---	-----	-----	-----	-
W1	-----AG-G	ACA-AT--G-	G-C---A-C-	T---AG---	AAAT--A---	-C-AGG-A--	-T--AAAA-	C----GG--	GAAAT-A-GG	-GAAA-----	-
ta1	-----G	ACA-AT--G-	G-C---A-C-	T---AG---	AAAT--A---	-C-AGG-A--	-T--AAAA-	C----GG--	GAAAT-A-GG	-GAAA-----	-
R1	-----	A-AAAT-GGA	-T----A-CA	-G---AG-AA	---TAAATG	---AGG---G	-TC-CAA---	--AACC---C	--AAT-A--G	----AAC---	-
lin1	-----	----T-GGA	-T----A-CA	---T-AG-AA	---TA-AATG	---AGG---G	-TC-CAA---	--AACC---C	--AAT-A--G	----AAC---	-
sichuanicus	-----	----T----	G--G---G--	----A----	--T---A--G	-----G--C-	-----	-----	----T-----	-G-A-A----	-
keramae	GGG-----	A-A--TC-G-	-----C--C-	--G--AG---	-----G	--TA-GG---	-TC---AA--	-G-A---A-	G--AT-----	-----G-	-
pulchellus	GGG-----	A-A--TC-G-	-----C--C-	--G--AG---	-----G	--TA-GG---	-TC---AA--	-G-A---A-	G--AT-----	-----GA-	-
nippon	GGG-----	A-A--TC-G-	-----C--C-	--G--AG---	-----G	--TA-GG---	-TC---A--	-G-A---A-	G--ATT-----	-----G-	-
mageshimae	GGGG-----	A-A--TC-G-	----GA--C-	--G--AG---	-----G	--TA-GG---	-TC--AAA-G	-G-A---A-	G--AT-----	-----G-	-
yesoensis	G--G-----	--A--T----	-----C-	----AGG--	-----G	A--A-G----	G-C--A-A--	---A-----	---AT--G--	G--A-A-AG-	G

表 3. 台灣梅花鹿與不同亞種間的差異

梅花鹿亞種	分布位置	遺傳差異 hap base
Yesoensis	日本北海道	26
Nippon	日本九州四國	29
mageshimae	日本鹿耳島縣馬毛島	33
pulchellus	日本對馬	30
Keramae	日本沖繩	29
sichuanicus	中國四川	14

表 4. 台灣梅花鹿與其他梅花鹿亞種之遺傳變異距離

		1	2	3	4	5	6	7
Kt	{ 1 }							
Sichuanicus	{ 2 }	0.017						
Keramae	{ 3 }	0.035	0.040					
Pulchellus	{ 4 }	0.037	0.042	0.001				
Nippon	{ 5 }	0.035	0.040	0.002	0.004			
Mageshimae	{ 6 }	0.040	0.045	0.003	0.007	0.008		
Yesoensis	{ 7 }	0.032	0.032	0.030	0.032	0.030	0.030	

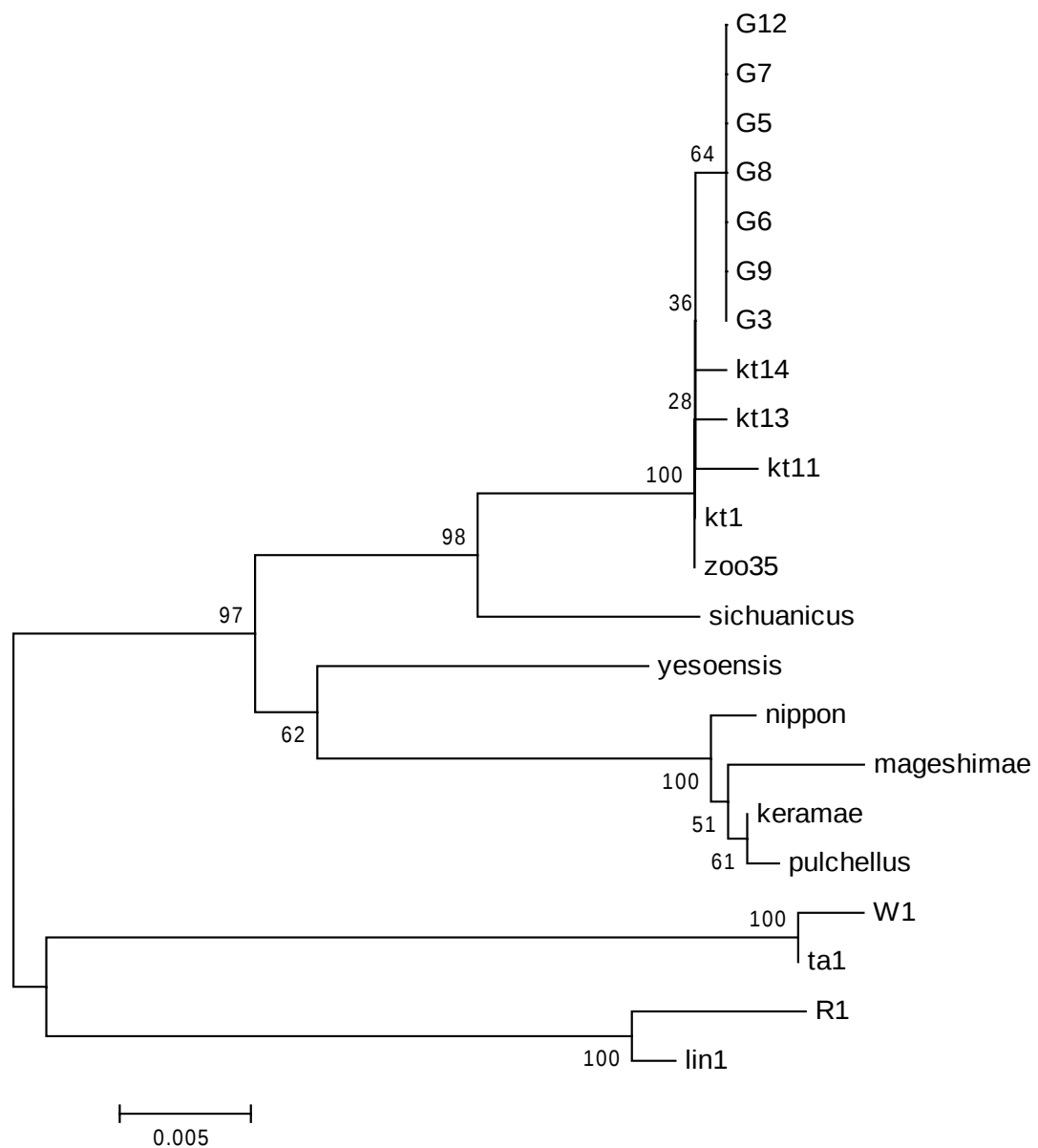


圖 1. 台灣梅花鹿與其他地區梅花鹿之親緣樹狀圖(G:綠島 Kt:墾丁、zoo:動物園、W:水鹿、ta:水鹿與梅花鹿混種、R:紅鹿、lin:紅鹿與梅花鹿混種)

附錄 1.墾丁國家公園瓊麻館梅花鹿採樣記錄

採樣順序	D N A 分析編號	耳標號碼	性別	成功定序
1.	Kt1		F	
2	Kt2		F	
3	Kt3		M	
4	Kt4		F	
5	Kt5		F	
6	Kt6	612	M	
7	Kt7	45	M	
8	Kt8		F	
9	Kt9	580	F	
10	Kt10	574	M	
11	Kt11	611	F	
12	Kt12	573	F	
13	Kt13	552	M	
14	Kt14	607	F	
15	Kt15	559	F	
16	Kt16	71	F	
17	Kt17	553	F	
18	Kt18	556	F	
19	Kt19	609	F	
20	Kt20	557	M	
21	Kt21	936	F	
22	Kt22	551	M	
23	Kt23		F	
24	Kt24	47	M	
25	Kt25		M	
26	Kt26	579	F	
27	Kt27		F	
28	Kt28	610	F	
29	Kt29	58	F	
30	Kt30	562	M	
31	Kt31		FA	
32	Kt32		FA	
33	Kt33	602	M	
34	Kt34		FA	
35	Kt35	74	F	
36	Kt36	54	F	
37	Kt37		F	

備註: 性別:F-雌;M-雄 ; A-幼

1-6 號移至九鵬基地

附錄 2.墾丁國家公園社頂工作站梅花鹿採樣記錄

採樣 順序	DNA分 析編號	耳標				性別	體重 (Kg)	角的 型式	成功 定序
		號碼	位置	顏色	新舊				
1.	Kt44	585	L	紅	O	M	43	角	
2	Kt45	0001	L	黃	N	F	9	-	
3	Kt46	75	R	黃	O	F	33	-	
4	Kt47	49	R	橙	O	M	64.8	三叉	
5	Kt48	66	R	黃	O	F	43	-	
6	Kt49	0002	L	橙	N	M	70.5	三叉	
7	Kt50	0003	R	橙	N	M	48.5	三叉	
8	Kt51	591	L	紅	O	M	29	短角	
9	Kt52	584	L	紅	O	F	32.5	-	
10	Kt53	595	L	紅	O	F	32	-	
11	Kt54	42	L	紅	O	M	65.5	三叉	
12	Kt55	0004	R	橙	N	M	59.8	三叉	
13	Kt56	502	L	紅	O	M	33	-	
14	Kt57	73	R	黃	O	M	51.5	二叉	
		568	L	紅	O				
15	Kt58	0005	R	橙	N	F	17	-	
16	Kt59	608	L	紅	O	M	57	三叉	
17	Kt60	587	R	橙	O	F	31.1	-	
18	Kt61	512	L	紅	O	M	64.6	三叉	
19	Kt62	596	L	紅	O	F	36	-	
20	Kt63	0006	?	橙	N	F	17	-	
21	Kt64	0007	?	橙	N	F	19	-	
22	Kt65	597	L	紅	O	F	37.4	-	
23	Kt66	0008	R	橙	N	M	67.2	三叉	
24	Kt67	566	L	紅	O	M	49	三叉	
25	Kt68	600	L	紅	O	M	65	三叉	
26	Kt69	575	L	紅	O	F	31	-	
27	Kt70	594	L	紅	O	M	估 49	三叉	
28	Kt71	69	R	黃	O	M	55	三叉	
29	Kt72	511	R	紅	O	M	58.5	三叉	

30	Kt73	578	L	紅	O	M	45	二叉
31	Kt74	0009	L	橙	N	F	15	-
32	Kt75	508	L	紅	O	M	37	二叉
33	Kt76	598	L	紅	O	M	51.5	三叉
34	Kt77	514	L	紅	O	M	71.5	三叉
35	Kt78	0010	L	橙	N	F	11	-
36	Kt79	0011	R	橙	N	M	65	三叉
37	Kt80	576	L	紅	O	M	50	三叉
38	Kt81	588	L	紅	O	M	34.5	短角
39	Kt82	572	L	紅	O	F	20	-
40	Kt83	571	L	紅	O	F	30	-
41	Kt84	567	L	紅	O	F	35	-
42	Kt85	586	L	紅	O	F	38.5	-
43	Kt86	0012	R	橙	N	F	40	-
44	Kt87	564	L	紅	O	F	28	-
45	Kt88	560	L	紅	O	F	30	-
46	Kt89	582	L	紅	O	F	39	-
47	Kt90	583	L	紅	O	F	35	-
48	Kt91	584	L	紅	O	F	39	-
49	Kt92	507	L	紅	O	M 亡		三叉
50	Kt93					M 亡		三叉
51	Kt94					M 亡		三叉
52	Kt95	0013	L	橙	N	M	61.9	?

備註: 49-51 號已死亡於龍舍中，可能由於打鬥所致。

位置:L-左耳;R-右耳

新舊:O-舊的耳標;N-新的耳標

性別:F-雌;M-雄

附錄 3. 台北市立動物園梅花鹿個體資料

性別	晶片號碼 (ISIS)	體重 (K g)	體溫 °C	出生日期	定序	備註
♀	0123DD1A	55	40.27	82.12.15		
♀	013BCCDA	48	39.28	82.12.25		
♂	01D3242B	61		83.11.07		
♀	0142D017	49	40.08	83.12.09		
♀	0142CA7F	51	40.51	85.07.06		
♀	01D33673	48		81.08.29		
♀	01D36AA1	49	40	85.07.14		
♂	01D231FD	58	39.99	87.07.14		D N A 分析編號 zoo39
♀	00147471	39	41.68	87.07.30		原 90 年混養，91.03.05 隔離
♂	2A3ECF	60	40.17	88.07.18		
♀	012522EA	30	41.33	88.07.20		原 90 年混養，91.03.05 隔離
♂	0200D6BA	43	40.01	89.09.29		D N A 分析編號 zoo38
♂	6050540	24	41.02	90.07.09		D N A 分析編號 zoo37
♀	00143F72	42	38.23	80.03.01		D N A 分析編號 zoo34
♀	012409C4	66		80.03.01		91.03.05 混養
♀	01D2D9AE	52.5	39.54	80.03.01		
♀	0142C251	69	39.83	80.03.01		
♀	013AA181	57	39.87	81.07.20		D N A 分析編號 zoo35
♀	0123F2CC	55	39.57	81.07.17		
♀	01D2C921	41	39.92	81.08.23		
♀	0122F088	49	39.43	80.03.01		91.03.05 混養
♀	01D2C97B	44	39.80	80.03.01		D N A 分析編號 zoo36

備註：體溫及體重記錄日期—2002 年 3 月 5 日

附錄 4.綠島梅花鹿個體採集記錄

採樣順序	D N A 分析編號	性別	成功定序
1	G1	M	
2	G2	M	
3	G3	M	
4	G4	M	
5	G5	M	
6	G6	M	
7	G7	M	
8	G8	M	
9	G9	M	
10	G10	M	
11	G11	M	
12	G12	M	
13	G13	M	

附錄 5.二林鹿場採樣記錄

採樣順序	D N A 分析編號	性別	種類	成功定序
1	lin2	M	梅花鹿	
2	lin235	M	梅花鹿	
3	lin35	M	梅花鹿	
4	R1	M	紅鹿	
5	R2	M	紅鹿	
6	ta1	M	水鹿與梅花鹿混種	
7	W1	M	水鹿	
8	lin1	M	紅鹿與梅花鹿混種	
9	lin37	M	紅鹿與梅花鹿混種	

附錄 6. 台灣博物館之梅花鹿標本資料

編號	類型	來源	採樣部位	性別
TMMA.0032	成鹿	日據時代遺留	腹部後方	♂
TMMA.0060	小鹿	日據時代遺留	上顎皮	
TMMA.0133	成鹿	日據時代遺留	腹部側方	♀
TMMA.0191	成鹿	台南養鹿場	右耳耳內	♂
TMMA.0197	成鹿	日據時代遺留	耳朵	♀
TMMA.0261	小鹿	贈送	眼睛周圍, 蹄中間	
TMMA.0283	角	日據時代遺留	角基部	♂
TMMA.0284	角	日據時代遺留	角基部	♂

附錄 7. 引子(Primer)的種類

名稱	序列	來源
H16498	5'-CCTGAAGTAGGAACCAGATG-3'	Kuwayama and Ozawa,2000
H15915	5'-GGAATTCATCTCTCCGGTTTAGAC-3'	Kuwayama and Ozawa,2000
pro-R	5'-GTGGGGGTAGCTATTTAATGAA-3'	自行設計
L15408	5'-ATAGACAAAATCCCATTCCA-3'	Kuwayama and Ozawa,2000
L14841	5'-CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3'	Kuwayama and Ozawa,2000
pro-L	5'-TACAGCTTTCTACTCAAC-3'	自行設計
* L83	5'-CATCCTGATGAAATTTCGGCTC	自行設計
* R924	5'-TGCTGCGTTGTTTGGACGTG	自行設計

* 本研究所採用者

附錄 8.台灣梅花鹿及其他種類個體之粒線體序列 (cytochrome b)(850bp)

kt1	TGCGTTGTTT	GGACGTGTGA	AGAAAAGGCA	TGAGAATCAA	GATTAGGATA	GATGAGACTA	GGGCTAAGAC	TCCTCCTAGT	TTGTTGGGAA	TTGATCGTAG
zoo35	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
kt13	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
kt14	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----A--	-----
kt11	-----	-----	-----	-----	-----	-----AG--	-----	-----	-----	-----
G12	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G9	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G8	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G6	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G7	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
W1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	A-----G--	-----	-----	-----
ta1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
R1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
lin1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
sichuanicus	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
keramae	-----	-----	---G---	---G---G	-----	-----	-----	-----	-----	-----
pulchellus	-----	-----	---G---	---G---G	-----	-----	-----	-----	-----	-----
nippon	-----	-----	---G---	---G---G	-----	-----	-----	-----	-----	-----
mageshimae	-----	-----	---G---	---G---G	-----G	-----	-----	-----	-----	-----
yesoensis	-----	-----	---G---	-----	-----G	-----	-----	-----	-----	-----

kt1	GATTGCGTAT	GCAAATAGGA	AGTATCATTC	GGGTTTGATG	TGAGGGGGTG	TGCTGAGTGG	ATTTGCTGGG	GTATAGTTGT	CTGGATCTCC	AAGCAGGTCT
zoo35	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
kt13	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
kt14	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
kt11	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G12	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G9	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G8	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G6	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G7	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
W1	-----	--G-----	-A--C----	A-----A	-----	--T-----	-----	--G-----	---G-----	-----C
ta1	-----	--G-----	-A--C----	A-----A	-----	--T-----	-----	--G-----	---G-----	-----C
R1	-----	-----	-A-----	A----A-A	-----	--T-----	G-----	--G----A-	-----	---T-----
lin1	-----	-----	-----	-----	-----	--T-----	G-----	--G----A-	-----	---T-----
sichuanicus	-----	-----	-----	-----	-----	--T-----	-----	-----	---G-----	-----
keramae	-----	-----	-A-----	A-----	-----	--T---C--	-----	--G-----	-----	-----
pulchellus	-----	-----	-A-----	A-----	-----	--T---C--	-----	--G-----	-----	-----
nippon	-----	-----	-A-----	A-----	-----	--T---C--	-----	--G-----	-----	-----
mageshimae	-----	-----	-A-----	A-----	-----	--T---C--	-----	--G-----	-----	-----
yesoensis	-----	-----	-----	A-----	-----	--T-----	-----	-----	-----	-----

kt1	GGTGCGAATA	ATACTAGTAA	TATTAGGAAG	AGTATTAGAA	GTAAGATGCC	TAAGATATCT	TTGATAGTAT	AGTAAGGATG	GAAGGGGATT	TTGTCTGCGT
zoo35	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
kt13	-----	-----	-----	-----	-----	-----C--	-----	-----	-----	-----
kt14	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
kt11	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G12	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G9	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G8	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G6	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G7	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
W1	-----	-----	----A----	---C--T--	-----	-----	--A-G----	-----	--A-A----	--A-----
ta1	-----	-----	----A----	---C--T--	-----	-----	--A-G----	-----	--A-A----	--A-----
R1	-----	-----	----A----	---CA----	---G-----	-----	--A-G----	-A-----	A-----	-----
lin1	-----	-----	----A----	---CA----	-----	---T-----	--A-G----	-A-----	A-----	-----
sichuanicus	-----	G-----	-----G--	-----	-----	-----	--A-----	-----	-----	--T-----
keramae	-----	-----	---C-----	---C-----	-----	---G-----	--A-G----	-----	-----	-----
pulchellus	-----	-----	---C-----	---C-----	-----	---G-----	--A-G----	-----	-----	-----
nippon	-----	-----	---C-----	---C-----	-----	---G-----	--A-G----	-----	-----	-----
mageshimae	-----	-----G-	---A-----	---C-----	-----	---G-----	--A-G----	-----	-----	-----
yesoensis	-----	-----	-----	---C-----	-----	-----	--A-G--G-	-----	-----	-----

kt1	CCGATGGGAT	TCCTGTTGGG	TTGTTGGATC	CTGTCTCGTG	AAGGAAGAGT	AAATGTACTA	TAGCGAGTGC	TGCGATGATG	AATGGAAAAA	TAAAGTGGAA
zoo35	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
kt13	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
kt14	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
kt11	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G12	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G9	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G8	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G6	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G7	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
W1	-T-----	-----	--A-----	-----	-----	-----	-----	C-----A	----G-G--	-----
ta1	-T-----	-----	--A-----	-----	-----	-----	-----	C-----A	----G-G--	-----
R1	-T----A--	----A----	--A--A----	----T----	-----	--G-----	-----	-----A	----G-G--	-----
lin1	-T----A--	-----	--A--A----	----T----	-----	--G-----	-----	-----A	----G-G--	-----
sichuanicus	-----	-----	--A-----	-----	-----	--G-----	-----	-----	-----G--	-----
keramae	-----	-----	-----	-----	-----	--G-----	-----	--T-----A	-----G--	-----
pulchellus	-----	-----	-----	-----	-----	--G-----	-----	--T-----A	-----G--	-----
nippon	-----	-----	-----	-----	-----	--G-----	-----	--T-----A	-----G--	-----
mageshimae	-----	-----	-----	-----	-----	--G-----	-----	--T-----A	-----G--	-----
yesoensis	-----	-----	-----	-----	-----	--G-----	---A----	-----A	-----G--	-----

kt1	AGCGAAAAAT	CGGGTTAGGG	TTGCTTTATC	TACTGAAAAG	CCCCCTCAGA	TTCATTTCGAC	TAGGTTTGTG	CCAATGTATG	GAATTGCTGA	GAGGAGGTTG
zoo35	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
kt13	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
kt14	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
kt11	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G12	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-C-	-----	-----	-----
G3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-C-	-----	-----	-----
G9	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-C-	-----	-----	-----
G8	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-C-	-----	-----	-----
G6	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-C-	-----	-----	-----
G7	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-C-	-----	-----	-----
G5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-C-	-----	-----	-----
W1	--A----	-----	-----	-----	--T-----	-----	-----A	----A----	-----	---A-----
ta1	--A----	-----	-----	-----	--T-----	-----	-----A	----A----	-----	---A-----
R1	-----	-----	-----G--	-----	--T-----	-C-----	-----C	----A----	-----	---A-----
lin1	-----	-----	-----G--	-----	--T-----	-C-----	-----C	----A----	-----	---A-----
sichuanicus	-----	-----C-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
keramae	G-----	-----	-----	-----	--T-----	-C-----	-----	-----	-----	---A-----
pulchellus	G-----	-----	-----	-----	--T-----	-C-----	-----	-----	-----	---A-----
nippon	G-----	-----	-----	-----	--T-----	-C-----	-----	-----	-----	-----
mageshimae	G-----	-----	-----	-----	--T-----	-C-----	-----	-----A----	-----	---A-----
yesoensis	-----	-----	-----	-----G--	-----	-C-----	-----	-----A----	-----	-----

kt1	GTGATGACTG	TTGCTCCTCA	GAATGATATT	TGTCCTCATG	GTAGGACATA	TCCTACGAAT	GCTGTGGCTA	TAAGTGTAAA	TAGGAGGATT	ACTCCGATGT
zoo35	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
kt13	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
kt14	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
kt11	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G12	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G9	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G8	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G6	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G7	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
W1	--A-----	-----	-----	-----	---A----	C-----	-----	-----	-----	-----
ta1	--A-----	-----	-----	-----	---A----	C-----	-----	-----	-----	-----
R1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---A--A-C-	-----
lin1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---A--A-C-	-----
sichuanicus	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
keramae	--A-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-G-----	-----A--	-----
pulchellus	--A-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-G-----	-----A--	-----
nippon	--A-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-G-----	-----A--	-----
mageshimae	--A-----	-----	-----	-----	-----G--	-----	-----	-G-----	-----A--	-----
yesoensis	--A-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----A--	-----

kt1	TTCATGTCTC	TAGAAAAGTA	TATGATCCGT	AGTACAGGCC	TCGTCCTACA	TGTATGAATA	GGCAGATGAA	GAATATTGAC	GCCCCGTTTG	CGTGTATGTA
zoo35	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
kt13	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
kt14	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
kt11	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G12	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G9	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G8	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G6	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G7	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
W1	-----	----G--G	-----	-----	-----G	---A---	-A-----	A-----T	-----	-----A--
ta1	-----	----G--G	-----	-----	-----G	---A---	-A-----	A-----T	-----	-----A--
R1	---C----	-----	-----	-----	---C----	-----	-A-----	A-----T	-----	-----A--
I in1	---C----	-----	-----	-----	---C----	-----	-A-----	A-----T	-----	-----A--
sichuanicus	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----T	-----	-----
keramae	-----	-----	-----	-----A--	-----G	-----	-----	A-----T	-----	-----
pulchellus	-----	-----	-----	-----A--	-----G	-----	-----	A-----T	-----	-----
nippon	-----	-----	-----	-----A--	-----G	-----	-----	A-----T	--T-----	-----
mageshimae	-----	-----	-----	-----A--	-----G	-----	-----	A-----T	-----	-----
yesoensis	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	A-----T	-----	-----

kt1	TCGAATAATT	CAACCATAAT	TGACATCTCG	ACAGATATGG	GTGACAGAGG	AGAATGCTGT	TATTGTGTCG	GATGTATAGT	GTATTGCTAG	GAATAGGCCT
zoo35	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
kt13	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
kt14	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
kt11	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G12	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G9	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G8	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G6	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G7	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
#W1	-----G---	--G-----	-----G-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----
ta1	-----G---	--G-----	-----G-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----
R1	-----G---	--G-----	-----G-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----
lin1	-----G---	--G-----	-----G-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----
sichuanicus	-----G---	--G-----	-----G-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----
keramae	-----G---	--G-----	-----G-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----
pulchellus	-----G---	--G-----	-----G-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----
nippon	-----G---	--G-----	-----G-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----
mageshimae	-----G---	--G-----	-----G-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----
yesoensis	-----G---	--G-----	-----G-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----	-----A-----

kt1	GTGAGAATTT	GTAGGATTAG	ACAAATTCCT	AGTAAGGAGC	CGAAATTTCA
zoo35	-----	-----	-----	-----	-----
kt13	-----	-----	-----	-----	-----
kt14	-----	-----	-----	-----	-----
kt11	-----	-----	-----	-----	-----
G12	-----	-----	-----	-----	-----
G3	-----	-----	-----	-----	-----
G9	-----	-----	-----	-----	-----
G8	-----	-----	-----	-----	-----
G6	-----	-----	-----	-----	-----
G7	-----	-----	-----	-----	-----
G5	-----	-----	-----	-----	-----
W1	-----	-----	-----	-----	-----
ta1	-----	-----	-----	-----	-----
R1	-----	-----	-----	-----	-----
lin1	-----	-----	-----	-----	-----
sichuanicus	-----	-----	-----	-----	-----
keramae	----G----	-----	-----	-----	-----
pulchellus	----G----	---A----	-----	-----	-----
nippon	----G----	-----	-----	-----	-----
mageshimae	----G----	-----	-----	-----	-----
yesoensis	--A-G----	-----	-----	---G----	-----