

## 第一章 緒 論

### 第一節 研究緣起及目的

#### 一、前言

台灣黑熊(*Ursus thibetanus formosanus*)是台灣唯一原產的熊類，屬亞洲黑熊的種群之一。由於近幾十年來台灣自然環境過度開發及人為活動頻繁，使得該物種的分布範圍大幅縮減。目前黑熊多侷限於地形較崎嶇陡峭或高海拔、人為活動較少的山區，其族群也處於受威脅的狀態(Wang 1999, Hwang and Wang 2006, 黃美秀等 2012)。在台灣，台灣黑熊為「瀕臨絕種」的保育類動物，此物種也被列為世界自然保育聯盟(IUCN)紅皮書上的易危物種(VU, Vulnerable)(IUCN 2009)。雖然黑熊為國內保育類野生動物，然而獵殺或販賣黑熊的新聞或消息仍是偶有所聞(Hwang 2003)，凸顯出積極採取保護此物種存續的行動的重要性及迫切性。

成功的黑熊保育不僅依賴人們對於野生動物經營管理上的認識，包括社會、經濟、行政、組織的因素，更有賴研究及經營管理單位對於熊類生基本物學資訊的累積(Peyton et al. 1999)。瀕危物種的保育及經營管理，除了需要了解該物種的生態及行為等資訊外，還需具備其遺傳多樣性及族群遺傳結構等分子遺傳的基礎資料，方可擬定有效的保育單位(Frankham et al. 2002)。有鑑於保育瀕危物種的迫切性，以及長期生態研究對於野生動物經營管理之必要性，本計畫將接續過去於玉山國家公園所進行之台灣黑熊生態研究，擬定另一階段延續性的長期研究計畫。藉由四年(2006–2009)的長期資料收集及累積，增加我們對於此物種於野外的行為和棲地利用等生態習性，以及族群和遺傳特性的瞭解，並提供相關的經營管理單位實質的保育建議，作為成功保育該物種的依據。

#### 二、台灣黑熊與櫟實之關係

台灣黑熊除了野外數量稀少、動物習性隱蔽且機警之外，台灣山區的植群林相複雜、遮蔽度高、地形崎嶇、交通不便，皆使野外研究黑熊的族群及生態習性的作業十分困難。玉山國家公園大分地區為台灣黑熊生態研究的重要根據地，1998至2002年期間，玉山國家公園管理處與研究者(黃美秀、吳煜慧、王穎等)密切合作，在園區進行捕捉繫放和無線電追蹤黑熊等各項相關研究，累積相當多的寶貴資料(王穎及黃美秀 1999; 2000, 王穎及吳煜慧 2001, Hwang et al. 2002, Hwang 2003, 吳煜慧 2004)。為接續過去(1998 - 2002)於玉山國家公園東部園區進行台灣黑熊捕捉繫放和無線電追蹤的研究，2006-2009年即針對大分地區，長期監測台灣黑熊等大型哺乳動物的豐富度，以及該區殼斗科青剛櫟(*Cyclobalanopsis glauca*)森林的物候和結果量變動，並探討二者之關係。

玉山國家公園東側的重要黑熊棲息地—大分地區，主要的殼斗科植物為青剛櫟，其果實是許多動物的食物來源，包括鳥類、齧齒類、大型草食動物和黑熊等，不同物種對青剛櫟果實的利用方式和程度則有所差異。殼斗科(Fagaceae)植物的堅果為熊類以及許多其他野生動物在秋冬季或入冬前的重要食物來源。櫟樹在森林中的組成和數量，以及季節性的結果和其果實產量的差異，會造成食物資源的可得性和豐富度變動，而影響野生動物群落的組成(Koenig and Knops 2005, McShea et al. 2007)和族群動態(Wentworth et al. 1992, Elkinton et al. 1996, McShea 2000, Greenberg and Parresol 2002)。

櫟實是營養豐富的食物資源，擁有高含量的脂質和碳水化合物，加上容易消化和高代謝能的特性，櫟實可視為高度濃縮形式的食物能源(Pekins and Mautz 1987, Kirkpatrick and Pekins 2002)。因此，櫟實的生產和動物的覓食行為對大型哺乳動物的許多生態層面都有直接或間接的重要影響，包括繁殖、生存、活動和生長(Vaughan 2002)。對美洲黑熊(*U. americanus*)的研究發現，其分布狀況、族群動態、活動範圍、移動距離、活動模式、繁殖速率、繁殖成功率、食性、棲地利用和冬眠行為等都會受櫟實生產影響(Garshelis and Pelton 1981, Rogers 1987, Eiler et al. 1989, Smith and Pelton 1990, Noyce and

Garshelis 1997, Powell et al. 1997, Vander Wall 2001, Vaughan 2002)。

在世界上許多有殼斗科植物分布的地理區，森林性的熊類(如美洲黑熊及亞洲黑熊)與殼斗科森林之間，有密不可分的關係(Hwang et al. 2002, Vaughan 2002, McDonald and Fuller 2005)。這些地區的黑熊(也包括台灣黑熊)，秋冬季值堅果大量結果時，會出現大量覓食堅果的現象(reviewed by Hwang et al. 2002, Kirkpatrick and Pekins 2002)。此時期的覓食活動和秋季堅果的產量對於黑熊的移動、活動範圍、食性組成、營養、母熊生殖率、幼熊存活狀況亦有直接或間接的影響，甚至影響黑熊被人類獵捕或是人熊衝突的程度(Mattson 1998, Vaughan 2002, Costello et al. 2003, Hashimoto et al. 2003)。

過去研究者於玉山國家公園東側園區的長期野外調查(Hwang 2003, 林冠甫 2009)發現，大分地區為台灣黑熊於秋冬季出沒較頻繁的地區，且青剛櫟結果量的變動對於台灣黑熊的活動有決定性的影響。不同種類的殼斗科櫟實於秋冬季的結果量有逐年波動的現象，且黑熊於此季節的食性和活動模式也隨之變動。2006-2009年於大分地區進行台灣黑熊族群相對豐富度和青剛櫟果實產量的監測，透過自動照相機和痕跡調查的資料皆發現，台灣黑熊的相對豐富度於各年之青剛櫟結果季皆顯著大於非青剛櫟結果季，且青剛櫟結果季時，黑熊會增加夜間活動的頻度。此外，青剛櫟的結果狀況有明顯的年間差異，而黑熊豐富度的年間變動亦與結果量的多寡一致，熊毛陷阱記錄的相對豐富度同樣呈現相同的季節和年間趨勢(Hwang and Garshelis 2007, 黃美秀等 2009a)。然前期的調查方法，卻僅限於台灣黑熊相對豐富度的監測，若進一步透過分子技術的應用，將可協助推估園區台灣黑熊的族群數量。

### 三、分子技術於保育遺傳上的運用

台灣黑熊在野外所需的活動範圍十分廣大，可超過  $100 \text{ km}^2$  (Hwang 2003)。因此個體的活動領域很容易受人為開發造成的棲地破碎化所阻隔，使族群間的基因交流降低或完全隔離，造成小族群自交、基因同質化等問題。這對現有族群數量已經稀有的台灣黑熊而言，可能會造成更嚴重的威脅。目前野外威脅台灣黑熊的因素持續存在之餘，黑熊於全島各地族群的遺傳多樣性、結

構現況，以及有效族群究竟為何，則成為擬定有效的保育策略的重要議題。

瀕危物種的保育及經營管理，除了需要了解該物種的生態及行為等資訊外，還需具備其遺傳多樣性及族群遺傳結構等分子遺傳的基礎資料，方可擬定有效的保育單位(Frankham et al. 2002)。成功的監測及管理瀕危物種取決於正確的族群結構及數量資訊(Sloane et al. 2000)。但在傳統的樣本採樣上，對於野外數量稀少、動物習性隱蔽且機警的動物而言，台灣山林林相複雜、遮蔽度高、地形崎嶇與交通不便，使得野外研究黑熊的族群及生態習性的作業十分困難。此外，在野生動物研究上鼓勵使用替代辦法(Woodruff 1993)，因為對於有些目標物種，捕捉和處理程序有時可能具破壞性，或者在某些情況下並不適當，或是不被允許(Chu et al. 2006)。藉由採集動物的排遺、毛髮、蛻皮、尿液、精液等樣本獲得到基因資訊來分辨個體，如同透過生理標記來分辨個體的功能，無需捕捉處理或標記動物，屬於非侵入式的採樣方法(noninvasive genetic sampling, Pearse et al. 2001)。非侵入性採樣方式之最大優點為不需直接接觸目標動物，減少了取樣上的限制，並降低對動物的可能干擾，採樣時也無取樣數量的顧慮，在需要保育之物種研究上提供相當大的幫助(Chu et al. 2006)。

藉由毛髮陷阱取樣及收集排遺可在不干擾動物行為的情況下，可以增加樣本數(Taberlet et al. 1999, Waits and Paetkau 2005)。二者也是近年來研究熊類族群遺傳訊息的主要技術，毛髮分析的長處包括：(1)可取得具有代表性的樣本。(2)研究範圍可涵蓋廣大地區，並找出稀有且隱密的動物。(3)可區別近似種、個體或是性別。(4)基因分析可計算多個族群。(5)可應用在各種棲地型態。(6)可收集一種以上的物種樣本。(7)裝設器材較輕也較便宜。(8)可合併使用誘餌及被動方法以增進採樣品質並降低偏差(Kendall and McKelvey 2008)。利用排遺進行研究分析的優點為(1)可從 DNA 中，可得知此物種的數量，分佈和性別比例。(2)萃取出來的 DNA 量較高(與毛髮比較)。(3)可以提供食性、內分泌、內寄生蟲等資料(Wasser et al. 2004)。

在近年來分子技術發展快速，利用聚合酶連鎖反應(polymerase chain

reaction, PCR)為基礎而開發技術被用以區分及鑑定不同的物種、族群、個體層次之研究，可提供更準確的遺傳資訊，以利回答多項族群結構問題，並輔助傳統的鑑定方法。這些技術包含微衛星 PCR (microsatellite PCR)(Baleiras Couto et al. 1996)、粒線體 PCR (mitochondria PCR)(Kohn et al. 1995)、核 DNA PCR(nuclear DNA PCR)(Flagstad et al. 1999)等。分子演化所透露的遺傳訊息能顯現出物種的遺傳結構，透過這些分生技術也可了解母系遺傳及父系遺傳、棲地破碎化程度、親緣關係(phylogeny)、有效族群量、族群結構(population structure)、基因轉殖(gene transfer)、基因交流(gene flow)及等問題(Kirmaier et al. 2009)。

微衛星 DNA(Microsatellite DNA)，又稱短串重複序列(short tandem repeat, STR)，由 1-6 個鹼基重複組成(Tautz 1989)，長度約為 60-1000 bp，重複單元的數目及重複的程度，都可以造成微衛星 DNA 片段的長度差異(Ashley and Dow 1994)。微衛星 DNA 屬父系與母系遺傳，由於這是在基因序列上一段沒有控制任何性狀的片段，故較不受的天擇的篩選，所有保留了所有突變的記錄，因其演化速度較快，相對短的時間內就產生了個體差異，遂可當做辨識個體的標記，通常使用於族群層次及個體辨識之研究(Woodruff 1993)。因此，利用微衛星(microsatellite)可當做是捕捉標放再捕捉法(capture-mark-recapture)中的標記，以估計族群量，並能鑑定個體間的親緣關係，估算有效繁殖族群。

微衛星具有以下的優點，適合用在個體辨識、物種判別與確認親緣上的確認。(1)廣泛存在於真核生物體中。(2)多型性(Polymorphism)：微衛星基因座有高度的遺傳變異，有些基因座可能包含了十多種等位基因(allele，O'Connell et al. 1998)，相對其他 DNA 指紋技術此方法的鑑定力高出數十倍。(3)共顯性遺傳(Codominant)：父、母系的微衛星基因座可以在子代同時被表現，此為共顯性遺傳，遵循孟得爾遺傳定律。(4)中性遺傳(Neutral genetic)：重複片段的 DNA 不會被轉錄或轉譯，不影響生物的表現型，故不受天擇或人擇的影響。(5)保守性：相似的物種具有類似重複片段 DNA 指紋。

微衛星 DNA 技術是用螢光物質標記在核酸引子，利用標記過的引子進

行 PCR 增幅 DNA 樣品特定的微衛星基因座片段，之後以毛細管電泳或是其他方式偵測帶有螢光的 PCR 產物，以判定其片段大小與鑑定其基因型(李俊億及謝幸媚 2008)。此技術因所需 DNA 樣本較少，再現性高，容易判定基因型、多態性高、片段短容易複製(Goodwin et al. 2007)，而成為鑑識個體及親子關係，以及微量證據的舉證之最主要工具。因為所需要的 DNA 量不需要很高，因此可以利用個體的毛髮或排遺等低含量的 DNA 樣本，萃取出實驗所需的 DNA 量。

#### 四、台灣黑熊遺傳學研究

目前發表有關台灣黑熊遺傳變異的研究共有三篇報告，其中的兩項研究的樣本多來自於圈養個體，少數樣本來自野生個體且來源不明(儲瑞華等 2000，陳元龍及楊吉宗 2002)，另一篇利用野外黑熊樣本的研究則是比較台灣與世界其他地區黑熊的遺傳的變異(Tasi et al., 2009)。此三篇都利用粒線體 DNA (Mitochondrial DNA) 序列的多樣性去探討黑熊於較大尺度空間上的遺傳差異。因此對於野外台灣黑熊的族群遺傳結構及個體間的遺傳多樣性上，尚無有系統的研究。利用粒線體 DNA 進行族群遺傳結構分析有幾項優點：母系遺傳(maternal inheritance)、無重組(non-recombination)、單一鹼基的點突變(point mutation)與演化數率快(Wallace et al., 1999)。另外，粒線體 DNA 中有一段為高度變異區，稱做 D-loop 或 control region，突變速率較快，常被用來做為分析不同族群間遺傳距離的材料。

微衛星 DNA 為多個 1 至 6 個核苷酸之串聯重複序列所組成，散布於真核生物之染色體中，在物種內具保留性且突變率高，易形成序列長度改變之突變。而由於突變率高(每一世代每一個微衛星 DNA 突變率約為  $10^{-3}$ )，所以在個體間具高度多型性(Litt and Luty 1989, Weber and May 1989)，常被作為遺傳分子標記研究個體間的親屬關係。以微衛星標記來進行個體辨識分析，同一組微衛星標記不一定適用在不同的族群或亞種。因為須依賴該組微衛星標記所檢測的不同族群間是否具有多型性(polymorphism)與該族群內的親屬關係(lineage)，這會影響到微衛星遺傳標記對個體鑑別的準確度。原因是族群間

的基因座多型性不高以至於不易區別不同族群間個體遺傳差異。而族群內的親屬關係都很接近的話，則基因型多型性低，以至於不易區別族群內的個體遺傳差異。因此，若要提高微衛星標記在不同族群內進行個體鑑別的準確度，選擇適合微衛星標記與所採用微衛星的數量是影響檢測個體鑑別的準確度的重要因素(Huang *et al.*, 2005)。目前尚無一組適合做為野生台灣黑熊個體鑑別的微衛星遺傳標記被開發出來。

就瀕危物種的保育經營管理而言，除了有必要發展族群估計族群遺傳豐富的工具，提供未來族群遺傳監測的計劃之外，也需要建立長期的遺傳資料庫，藉以估算國家公園內台灣黑熊的族群數量、有效族群數量、遺傳多樣性、近親指數與族群結構等等。大分地區為台灣黑熊生態研究的重要根據地，加上台灣黑熊季節性聚集此區的特性，故可視為台灣黑熊族群的高密度基準區(high-density benchmark, Steinmetz and Garshelis 2010)，適合作為長期族群監測和生態研究的區域。此對於玉山國家公園及全島瀕危的台灣黑熊之永續性經營管理，皆具有十分重要的價值。有鑑於保育瀕危物種的迫切性，以及長期生態研究及監測對於野生動物經營管理之必要性，本計畫將延續前期於玉山國家公園所進行的台灣黑熊生態研究，研擬另第二階段第三年的生態研究及監測。

因此，本計劃擬利用粒線體 D-loop DNA 序列的多型性，分析 2008 年與 2011 年搜集之大分地區台灣黑熊族群是否有差異。因前人研究曾分析 2008 年 30 個大分台灣黑熊個體之 D-loop，結果指出一個單套行(haplotype)。所以，我們希望再挑出其中一年(總樣本數與 2008 年差不多)的 30 個台灣黑熊樣本做 D-loop 分析，以與 2008 年比較，看是否有發現其它的單套型。若有，則可能有以下情形。(1) 野外樣本採集或是取樣分析 D-loop，有抽樣誤差的情形，原本應該有兩個以上的基因單套行。(2) 假設抽樣上無誤差，則推估有外來族群遷入或擴大。若無發現新的單套行，我們將可懷疑大分的台灣黑熊有遭遇瓶頸效應(Bottleneck effect)的可能。

另外，我們也希望可以開發出更多微衛星遺傳標記，並計算這些遺傳標

記在分析大分地區台灣黑熊族群的多樣性資訊豐富度(polymorphism information content)，最後估算所開發出之微衛星遺傳標記對大分地區台灣黑熊個體鑑別的準確度。微衛星遺傳標記對個體鑑別的準確度，取決於該組的微衛星遺傳標記所檢測不同族群間對偶基因的多型性及該族群內的親屬關係。估算的方法採用分派檢定(Assignment Test)，方法大致上是將幾個已知個體樣本，以一組開發出來的微衛星遺傳標記做基因型分析，來檢測該個體是否有分派到正確族群或個體的正確率。若分派正確度低，則該組微衛星遺傳標記將不易區別不同族群間或族群內的個體遺傳差異。



## 第二節 第三年(2012年)計畫工作項目

- (1) 持續監測大分地區永久樣區第 7 年殼斗科堅果的年產量，以及台灣黑熊之相對豐富度和食性。
- (2) 持續利用熊排遺偵測犬和毛髮陷阱收集野外台灣黑熊排遺及毛髮樣本，於玉山國家公園轄區範圍內及鄰近地區有系統地收集樣本，建立第 7 年黑熊遺傳資料庫。
- (3) 利用遺傳分子生物學技術分析於大分地區及園區其他地區所收集之台灣黑熊遺傳樣本，估算台灣黑熊於園區及之於大分的可能移動模式和族群分布情況。
- (4) 測試與挑選適合分析台灣黑熊族群間遺傳變異之分子標誌。



## 第二章 研究方法及過程

### 第一節 研究地區

大分地區位於花蓮縣卓溪鄉拉庫拉庫河流域(北緯 23°22' 25" 47，東經 121°05' 21" 49)，地處中央山脈，屬於玉山國家公園東側園區，該區海拔約由闊闊斯溪溪床 1,100 m 至大分山 2,000 m。由南安管理站附近的山風登山口入山，單程需步行 40 km，耗費三日。

此區原為布農族南投郡社群東遷的第一個據點，長久來為布農族傳統的活動領域。至日治台期間，也是八通關越嶺道路上的一段，日本政府並在此區設置大分駐在所，爾後因教化撫育和集團移住的政策實施下，將原住民陸續搬遷至平地。因此，大分地區有著相當豐富的人文史蹟(林一宏 2005)。自 1998 年開始，大分地區成為台灣黑熊生態研究的重要根據地(Hwang 2003，吳煜慧 2004)。Hwang(2003)的研究指出，秋冬季時，當大分地區的櫟樹大量結果時，黑熊會聚集到此食用櫟實，顯示大分地區是台灣黑熊非常重要的棲息地。

大分地區優勢林型為細葉饅頭果-青剛櫟型(*Glochidion rubrum*-*C. glauca*)，並可細分為台灣肉桂-青剛櫟(*Cinnamomum insulari-montanum*-*C. glauca*)及金毛杜鵑-台灣二葉松(*Rhododendron oldhamii*-*Pinus taiwanensis*)二亞型(黃美秀等 2009b)。青剛櫟為該區非常優勢的喬木層組成樹種，出現頻度和出現密度皆最高，分別為 67%和 24.7 棵/100 m<sup>2</sup>；優勢度則是台灣二葉松(33.5 cm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup>)和青剛櫟(22.7 cm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup>)最高。喬木樹種的相對重要值(important value index, IVI)以青剛櫟最高(27.5%)，台灣二葉松次之(20%)，其餘樹種皆小於 11%(黃美秀等 2009b)。

## 第二節 青剛櫟果實豐富度之監測

### 一、目視估計(Visual survey)

延續前期使用的調查樣線(圖 2-2.1)，在每隔 20 m 的兩側，挑選並標記 2 棵胸高直徑大於 10 cm 的青剛櫟樹木，並於開始落果前(通常十月中旬)，以同樣的目視法(visual counts)估算該年青剛櫟結果季的相對結果豐富度指標。我們採用兩種目視估計法：Koenig 法(Koenig et al. 1994)乃觀測者針對標記的樹木，利用望遠鏡任意選擇樹冠上的枝條，15 秒內所計數到的果實，再移至該樹的另一側，另 15 秒內所計數到的果實。二筆結果相加，即代表該樹於 30 秒內所得的結果豐富度指標。另一為 Grave 修正指數(Graves' modified scale, cited in Koenig et al. 1994)，乃主觀將該樹之整體結果量界定為四種等級：0=沒有觀察到堅果，1=仔細搜尋後可發現少量堅果，2=有一些堅果，3=堅果產量不錯，4=堅果產量十分豐盛。

### 二、種子陷阱(Seed trap)

為瞭解每年結果季青剛櫟果實產量的變動，我們將沿樣線每隔 50 m 的兩側，延續前期標記的樣樹，總計 197 棵(黃美秀等 2009)。於果熟至開始落果前(約 10 月上半或中旬)至結果結束(次年 1 月底或 2 月)，將 0.85 m\*0.85 m 的蘭花網作為種子陷阱，置於樹冠下離地面約 1 m 的高度。每月上山調查期間收集陷阱內的掉落櫟實，下山烘乾後，分類、測量及記錄櫟實完好狀況、數量和乾重，以計算不同月份的相對出現量。

依據青剛櫟果實狀況，將櫟實先分為完整果實及受損果實。完整果之計算包括烘乾後的果徑大於 6 mm 者，或果徑大於 5 mm 之所有成熟果實(外型飽滿者判定之)。受損果乃是櫟實經動物食用後，遺留的破碎的果皮和部分果肉，遂依據每個種子陷阱上破碎果皮之大小及數量，並以 4 等級(即 0.25、0.5、0.75、1 顆)為單位估計全部累計的受損櫟實數量。

為了釐清青剛櫟樣樹之間結果量是否有空間自相關的因素影響，我們以半變異數(semi-variance)估算空間自相關，分析 197 棵架設種子陷阱的青剛櫟

樣樹。空間自相關是指點與點間具有相關，本分析在每一個距離下進行 500 次模擬，分析的距離區間為 50 公尺，分析以 R 之 GeoR 軟體進行(Bivand et al., 2008)。

### 三、地面落果區塊

為了瞭解掉落至地面的櫟實的留存狀況，以及野生動物對地面櫟實的利用程度，研究者監測地面上落果的留存狀況和數量。自 2009 年起，沿穿越線並間隔約 50 m，挑選一棵已標記為種子陷阱的青剛櫟樣樹，於樹冠層下地勢較平緩的地面上，且避開種子陷阱所投射至地面的範圍，設置並標記 1 m<sup>2</sup> 的地面區塊(ground plot)，總共 100 個。青剛櫟季每月例行調查時，計數殘存於各區塊較飽滿或內果徑大於 8.5 mm 的完整櫟實數量，之後在放回原處。選擇果徑大於 8.5 mm 的原因，乃參考過去研究者採拾成熟、新鮮的青剛櫟餵食圈養黑熊，隨機選取測量 100 顆果實，其中果徑最小者為 8.5 mm (鍾雨岑，私人通訊)，故本研究以此為標準，方便野外現場調查時比對大小。

由於每次調查日期大多集中於每個月的月初，故種子陷阱中的掉落物和地面區塊的殘存櫟實皆為上個月的累積量，故在資料呈現上，遂以調查期的上個月份表示，並計算各月的果實累積總量。此外，為瞭解地面上櫟實被移除的數量和速率，我們比較同一月份種子陷阱和地面區塊的果實累積情形，計算 2 種方法於單位面積(1 m<sup>2</sup>)上所收集之完整果實數量，種子陷阱乃以調查期間各月果實總數除以該月陷阱數量後，再除以 0.7225(m<sup>2</sup>)，而地面區塊面積為 1 m<sup>2</sup>，故直接將累計的果實總數除以 100(區塊數)。

### 第三節 監測台灣黑熊之相對豐富度

#### 一、台灣黑熊於青剛櫟結果季之活動痕跡年度調查

為了監測台灣黑熊於整個青剛櫟結果期間對於樣區堅果的利用狀況，我們於各年青剛櫟結果季結束後，即次年2月，沿著調查青剛櫟果實的8條樣線(T1-T8, 5.2 km, 圖 2-2.1)，由2位有經驗的調查者分別檢視兩側3 m內所有胸高徑大於10 cm的青剛櫟樹木，計數樹幹上該季黑熊留下爪痕或折枝痕的樹木。2011年結果季，同時調查樣線3 m內胸高直徑大於5 cm的青剛櫟樹數量。今年僅以二種指標來評估該結果季黑熊的相對活動程度，分別為1 km內的所有熊爪痕樹的棵數、以及1 km內的熊痕跡單位(5 m內的所有熊痕跡，皆視為同一筆熊痕跡單位)的數量。

為了增加該季黑熊活動(痕跡)指標的調查範圍，另加入鄰近區域的二條樣線：一為大分山屋至塔達芬崩壁的日據古道，約3.25 km，另一為大分南側，沿闊闊斯溪西岸至賽柯的古道，長1.8 km(編號S, 圖 2-2.1)。另為了解黑熊對於不同樣線利用櫟實的情況，我們計數調查樣線兩側3 m內所有胸高直徑大於5 cm的青剛櫟樹的數量，以計算樣線內青剛櫟樹出現熊痕跡的比例。

本研究監測青剛櫟結果豐富度區域位於大分，為了解青剛櫟果實產量和黑熊活動痕跡之關係，分析時將資料分為大分和賽柯兩區域。本年度活動指標以平均1 km內所有熊爪痕樹的棵數及熊痕跡單位數量評估。每50 m有無熊痕跡出現的頻度，因考量GPS量測距離誤差過大，故今年度不做此項分析。

#### 二、熊毛陷阱

本計畫除持續利用前期設置的熊毛陷阱，並利用非侵入性方法監測台灣黑熊活動的時空變動。熊毛陷阱依Woods et al. (1999)研發之方式架設。鐵絲圍籬中央懸掛兩個黑熊構不到的底片盒或寶特瓶，高度至少2 m，裡面分別裝有沾浸不同氣味劑(如果實、肉類、蜂蜜口味)的棉花球。氣味劑為美國專

門研發用來吸引熊類前來。黑熊於跨越或穿過圍籬時，一小撮的毛髮便會留在圍籬上的倒鈎上。

除大分地區，本研究從 2009 年 6 月開始陸續在佳心至多美麗路段設置熊毛陷阱，海拔分布從 795 m-2,015 m。陷阱架設地點主要以稜線為主，最遠離步道 100 m。總計架設了 10 個熊毛陷阱，其中位在瓦拉米及多美麗的兩個陷阱已撤離；目前登山口至瓦拉米設置 2 個，瓦拉米至抱崖共 3 個，抱崖至多美麗稜線共 3 個(表 2-3.1)。

青剛櫟結果季期間，每月檢視熊毛陷阱及更新氣味劑，並收集留在鈎刺上的毛髮。若有涉及跨月收集毛髮時，資料分析則以更新氣味劑後一個月內的主要月份作為毛髮收集的記錄月份，即分析所採用的時間為盡可能反應出陷阱實際運作的時間。毛髮樣本保存於小型紙袋中。在紙袋寫上採集日期、採集人、採集陷阱名稱、毛髮所在的鐵絲編號、物種。帶回實驗室的樣本以 -20°C 保存，以待後續分析。

表 2-3.1、大分以外的東部園區熊毛陷阱架設地點及時間一覽表。

陷阱代號	地點	海拔	X 座標	Y 座標	架設日期	熊毛 (撮)
HT-Beauty	多美麗稜線	2015	261155	2585732	2009/6/3	3
HT-Police*	多美麗	1837	262316	2584877	2009/6/3	0
HT-Jiasin	佳心	795	271044	2582819	2009/8/4	5
HT-Walami *	瓦拉米	1023	268332	2583914	2009/9/13	0
HT-Polices	多美麗	1814	262345	2584989	2009/11/12	14
HT-Hwang	黃麻	877	268799	2581186	2009/11/13	0
HT-Soil	土多袞	1483	266395	2585187	2009/11/13	8
HT-Shili	十里	1701	264364	2583689	2009/11/13	7
HT-Green	綠駐在所	1246	266994	2583541	2009/12/15	4
HT-Apron	八號停機坪	1826	262455	2582791	2009/12/14	8

\*HT-Police 和 HT-Walami 分別於 2009 年 11、12 月拆撤。

### 三、台灣黑熊食性分析

野外調查期間，研究者逢機收集所發現的黑熊排遺，一般多在步道、調查樣線上，搜尋範圍通常是路徑二側各 1-5 m 處。然若發現附近有黑熊破壞的折枝，研究者亦會主動前往探究，並尋找相關熊痕跡(包括排遺)。發現排遺後，紀錄日期、時間、地點、植被型態、排遺排放處，另編號紀錄大致的排遺內容物和新舊程度。新舊程度乃依照排遺當時的色澤、濕度、分解狀況來評估，並將排遺排放至採樣時間分為五級：(1)新鮮(0-2 天)；(2)3-7 天；(3)1-2 週；(4) 3-4 週；(5)1 個月以上。同時以全球定位系統(Global Positioning system, GPS；機型：GARMIN GPSmap 60CSx)紀錄位置座標。之後裝入封口袋，帶回實驗室，利用 0.7 mm 孔徑的篩網沖水過濾後，以肉眼及解剖顯微鏡檢視內含物類別。

排遺內含物分析將內含物分為六大類，包括堅果、漿果、昆蟲、莖葉、哺乳動物及其他。我們分析各類食物的出現頻度(frequency of occurrence, FO)和相對重要性(或相對體積，relative volume, RV)，計算方式參考 Hwang et al. (2002)。出現頻度計算公式為  $FO_i(\%) = (n_i/N) * 100$ ，其中 N 為總排遺數， $n_i$  為含有 i 食物的排遺數。相對重要性計算方式為  $RV_i(\%) = \sum V_i/N$ ，其中 N 為總排遺數， $\sum V_i$  為 i 食物在每堆排遺中所佔體積百分比例的總合。



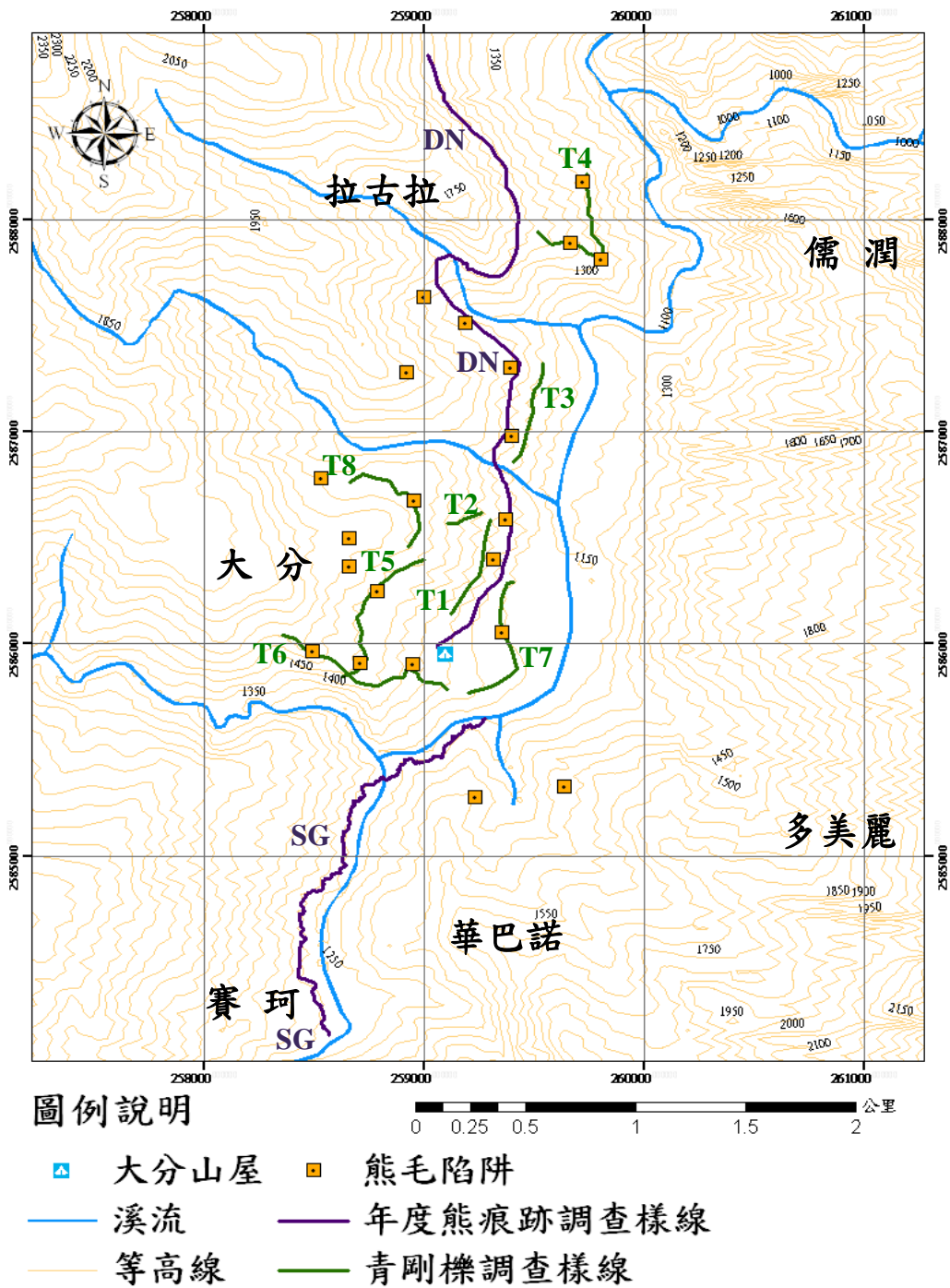


圖 2-2.1、大分研究樣區長期調查樣線及樣點的分布，包括青剛櫟調查樣線、年度熊痕跡調查樣線和熊毛陷阱(座標系統：TWD-67)。

## 第四節 野外台灣黑熊遺傳樣本收集和分析

### 一、收集野外台灣黑熊排遺

野外調查期間，蒐集黑熊排遺，以採穿越樣線上排遺，搜尋範圍通常是穿越樣線二側約 1-5 公尺處。然若發現附近有黑熊破壞的折枝，亦會主動前往探究，並尋找相關熊痕跡(包括排遺)。發現排遺後，紀錄日期、相對位置，以相機拍照紀錄，以及全球定位系統(Global Positioning System；機型：GARMIN GPSmap 60CSx)紀錄位置座標(TWD67 大地基準)。另編號紀錄大致的排遺內容物和新舊程度，其中新舊程度乃依照排遺當時的色澤、濕度、分解狀況來評估，並將排遺排放至採樣時間分為五級：(1)新鮮(0-2 天)；(2)3-7 天；(3)1-2 週；(4)3-4 週；(5)1 個月以上。

採樣黑熊排遺時，將樣本分裝於 A、B 兩管。樣本管為內含 10 ml 95% 酒精的 15 ml 離心管，以竹籤刮取排遺表面裝入離心管中，取表面目的是為了刮取熊腸黏膜細胞，每管排遺體積約 5 ml。A、B 兩管後續存放於-20 °C 之冷凍庫。

### 二、實驗室的遺傳分析

#### (一) 排遺 DNA 萃取方法

本研究黑熊排遺樣本的 DNA 萃取依據 Favorgen Stool DNA Isolation Mini kit 的說明書方法，在取樣方法部分略做修改後進行。

取樣方法：取 2g 排遺樣本裝入 15 ml 離心管中，加入 1xPBS 至 8 ml 處，充分混勻後靜置冰上 5 分鐘，離心 1,000 rpm、4°C、10 分鐘。用滅菌滴管吸取上清液與上層灰白色泥質裝入新的 15 ml 離心管，離心 3,500 rpm、4°C、20 分鐘。再用滅菌滴管吸去上清液丟棄，留下沉澱物。

Favorgen Kit 之方法：以 300 $\mu$ l 之 SDE1 buffer(kit 內含)沖洗及懸浮沉澱物，吸入裝有 0.2 g 玻璃纖維珠的小管中，並加入 20  $\mu$ l Proteinase K，震盪混勻 5 分鐘。放入 70°C 之水浴槽水浴 10 分鐘，並每 3 分鐘震盪一次。結束後加入

100 $\mu$ l 之 SDE2 buffer，震盪混勻，稍微離心並輕拍後靜置冰上 5 分鐘。再以 14000 rpm 離心 5 分鐘，取出上清液至新的 1.5 ml 離心管，加入 200  $\mu$ l SDE3 buffer，震盪混勻，稍微離心後輕拍，靜置室溫 2 分鐘。再以 14,000 rpm 離心 2 分鐘，取 250  $\mu$ l 上清液至新的 1.5 ml 離心管，加入 250  $\mu$ l SDE4 buffer 與 100% 酒精，震盪混勻後稍微離心，將所有混合物加入 kit 所附的 SDE Column，離心 14,000 rpm、1 分鐘，倒去濾液。加入 750  $\mu$ l Wash buffer，離心 14,000 rpm，1 分鐘，倒去濾液，重複此步驟。第二次倒去濾液後，再次離心 14,000 rpm，3 分鐘，將 column 移至新的 1.5 ml 離心管。加入 50  $\mu$ l、60°C 的 ddH<sub>2</sub>O，靜置 2 分鐘，離心 14,000 rpm，1 分鐘，得到 50  $\mu$ l 之 DNA。

今年所採用的排遺 DNA 萃取方法有別於去年所用的方法，改用專門抽排遺 DNA 的套組(KIT)，速度更快，且消耗的排遺更少，去年是用 proteinase K/ phenol/ chloroform 方法(Kocher et al. 1989)，所花費的時間是 KIT 法的兩倍，消耗樣本更是兩倍之多不等(表 2-4.1)。

表 2-4.1、排遺 DNA 萃取方法之比較。

排遺 DNA 萃取方法	Proteinase K/ phenol/ chloroform 方法	Favorgen Stool DNA Isolation Mini kit
萃取速度	12 小時	6 小時
樣本消耗	3~5 公克不等	2 公克

(二) 粒線體 D-loop 序列聚合酶連鎖反應 polymerase chain reaction, PCR) 增幅 D-loop 片段

本研究利用針對台灣黑熊所設計之 D-loop 引子(圖 2-4.1)進行聚合酶連鎖反應，反應總體積為 25  $\mu$ l，包含滅菌去離子水 15  $\mu$ L，引子(Forward 端，10  $\mu$ M) 1  $\mu$ l，引子(Reversed 端，10  $\mu$ M) 1  $\mu$ l，dNTP(2.5 mM each) 2  $\mu$ l，10 倍的 PCR 緩衝液 2.5  $\mu$ l，Taq 聚合酶 0.5  $\mu$ L，與排遺萃取出 DNA 3  $\mu$ l。

在溫度循環機(Applied Biosystems Veriti™ Thermal Cycler)中進行 40 次的

聚合酶連鎖反應，反應條件為：步驟一，94°C、5分鐘；步驟二、94°C、30秒，56°C-63°C、30秒，68°C、2分鐘，步驟二進行40cycle。步驟三，68°C、10分鐘。

反應完畢後，將標準液(Thermo 100 bp DNA ladder)加入瓊脂膠片最左邊的孔，取 PCR 產物 2  $\mu$ l，以 0.5 倍 TBE 緩衝液(buffer)進行 1% 的瓊脂糖凝膠電泳(Agarose gel electrophoresis)，條件為電壓 100 伏特、時間 35 分鐘，檢視結果。實驗中使用的正控制組(Positive control)為一雌性圈養黑熊個體的組織樣本(來源自屏東科技大學野生動物收容中心)。與一個負控制組(Negative control)以 ddH<sub>2</sub>O 替代 DNA template，確保實驗無污染的疑慮。未成功增幅 D-loop 片段之樣本，即不繼續進行性別鑑定與微衛星基因座分析之實驗。

### (三) PCR 產物之純化(Clean up)

將通過 D-loop 測試之 PCR 產物純化(Clean up)，使用 Geneaid Gel/PCR Fragment Extraction kit，按照說明書上的方法進行純化的步驟。先在 1.5 ml 離心管中加入 kit 所附之 DF buffer 100  $\mu$ l，加入 20  $\mu$ l PCR 產物，震盪混勻後稍微離心。將混合物移至 kit 所附之 SDE column 中，以 14,000 rpm 離心 30 秒，倒去濾液。沿著管壁加入 600  $\mu$ l 之 Wash buffer，靜置一分鐘後，以 14,000 rpm 離心 30 秒，倒去濾液。再次以 14,000 rpm 離心三分鐘。將 column 移至新的 1.5 ml 離心管，加入 20  $\mu$ l 65°C 之滅菌去離子水，靜置 2 分鐘。以 14,000 rpm 離心 2 分鐘後得到產物 20  $\mu$ l。取純化後的產物 2  $\mu$ l，以 0.5 倍 TBE 緩衝液(buffer)進行 1% 的瓊脂糖凝膠電泳(agarose gel electrophoresis)，條件為電壓 100 伏特、時間 35 分鐘，檢視結果。並取 3  $\mu$ l 純化產物送定序。

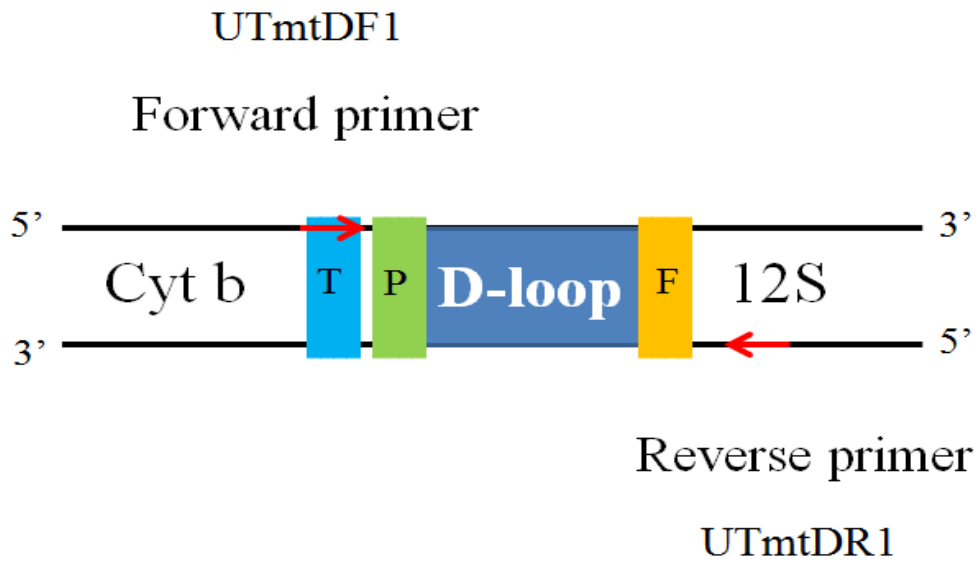


圖 2-4.1、擴增台灣黑熊 D-loop DNA 序列之引子示意圖。箭頭代表引子黏合位置以及複製方向。T 代表：Thr tRNA；P 代表：Pro tRNA；F 代表：Phe tRNA；Cytb 代表：cytochrome b；12S 代表：12S ribosomal RNA。

(四) 聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)增幅微衛星片段

本研究利用石芝菁等人(Shih et al. 2009)針對台灣黑熊所篩選之 6 組微衛星基因座(microsatellite loci)引子(UT1、UT4、UT25、UT29、UT35、UT38) 進行聚合酶連鎖反應(Polymerase chain reaction: PCR)。六條 Forward 引子為配合使用之毛細管電泳機器(ABI 3730 DNA Analyzer)，皆由 ABI 公司重新合成帶有藍、綠、紅色三種不同螢光的引子。反應總體積為 10  $\mu$ l，包含滅菌水 5.2  $\mu$ l，引子(Forward 端，10  $\mu$ M)0.4  $\mu$ l，引子(Reversed 端，10  $\mu$ M)0.4 $\mu$ l，dNTP(2.5 mM each)0.8  $\mu$ l，10 倍的 PCR 緩衝液 1  $\mu$ l，Taq 聚合酶 0.2  $\mu$ L，與排遺萃取出 DNA 2  $\mu$ l。

在溫度循環機(Applied Biosystems Veriti™ Thermal Cycler)中進行 42 次的聚合酶連鎖反應，反應條件為：步驟一，94°C、5 分鐘；步驟二、94°C、30 秒，60°C、30 秒，68°C、25 秒，步驟二進行 42cycle。步驟三，68°C、7 分鐘。反應完畢後，將標準液(Thermo 100 bp DNA ladder)加入膠片最左邊的孔，取

PCR 產物 2  $\mu$ l，以 0.5 倍 TBE 緩衝液(buffer)進行 2% 的瓊脂糖凝膠電泳(agarose gel electrophoresis)，電壓為 100 伏特、時間 35 分鐘，檢視結果。實驗中使用的正控制組(Positive control)為一雌性圈養黑熊個體的血液樣本(來源自屏東科技大學野生動物收容中心)。負控制組(Negative control)以滅菌去離子水替代 DNA template，確保實驗無污染的疑慮。

#### (五) 基因型判定

聚合酶連鎖反應的產物置於 96 孔盤中，以 LIS-500 作為校正標準，並以 ABI PRISM 3730 DNA Analyzer 自動定序儀及 Peak Scanner Software v1.0 軟體進行基因型(genotyping)判讀。為了避免等位基因遺漏(allelic dropout)及假性等位基因(false allele)造成誤判基因型及假性個體的機會，以重複多次 PCR 的方式減少假性等位基因出現(Taberlet et al. 1996)。每組基因座進行重複且獨立的聚合酶連鎖反應，最少三次。

#### (六) 資料分析

經過毛細管電泳所得到的基因型，使用 GENE CAP 軟體(Wilberg and Dreher 2004)判讀及計算個體鑑別率(probability of identity: P(ID))，此為「族群內兩個不同個體進基因座基因分型時，具有同樣的基因型的機率」；一般建議該數值必須小於 0.01，實驗方具有鑑別力(Miller et al. 2002)後。同時利用此軟體檢視有無重複的基因型，如果出現兩樣本的基因型只有 1-2 個基因座為不同的基因型(mismatch-pairs)，則再對此基因座進行一次 PCR，確認基因型是否正確。在共顯性遺傳的分子標記上，單一基因座之 P(ID) 計算方式如下(Waits et al. 2001)：

$$P_{(ID)} = \sum_{i=1}^n P_i^4 + 4 \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^{n-1} P_i^2 P_j^2$$

其中的  $p_i$  與  $p_j$ ，分別為基因座上第  $i, j$  個交替基因頻率。

除判讀出之遺傳訊息辨別出個體數及出現的頻率之外，同時使用軟體 CERVUS (Kalinowski et al. 2007)計算每個基因座的觀測異質度 (Observed heterozygosity,  $H_O$ )與理論異質度 (Expected heterozygosity,  $H_E$ )、 $H_O$  常被用為做為族群內遺傳變異分析的依據。一般來說，較高的  $H_E$  值代表的是族群有較高的遺傳歧異度。另以 Genepop (Raymond and Rousset 1995)分析這些基因座的對偶基因是否符合哈溫平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium, HWE)，並採用費氏精確測驗法(Fisher's exact test)來評估有無偏離哈溫平衡。另以 FSTAT 軟體計算  $F_{IS}$  值，再檢定其 95%信賴區間(confidence interval)(Goudet 1995)， $F_{IS}$  值的意義是用來評估族群是否偏離哈溫平衡。當  $F_{IS}>0$  時，表示族群可能有近親交配的現象；反之  $F_{IS}<0$  時，則表示可能有遠親交配的情況產生。 $F_{IS}$  的計算定義如下(Wright 1978)：

$$F_{IS} = 1 - \frac{H_O}{H_E}$$





## 第三章 結果與討論

### 第一節 大分地區氣象監測

本研究使用從 2010 年 1 月開始，在大分駐在所架設的微氣象站。目前資料收集至 2012 年 5 月，其間則因架設氣象站的公司所聘僱的人員，現場操作不當，造成氣象站資料無法寫入儲存的記憶卡，共計 6 個月份沒有氣象資料(2010 年 4 月至 6 月；2011 年 9 月至 11 月)，3 個月份各只有一天氣象資料(2010 年 3 月和 7 月、2011 年 8 月)。

初步已收集的氣象資料顯示，大分地區年平均溫度為  $13.2\pm 4.1^{\circ}\text{C}$ ，月均溫以 5 月至 9 月較高，溫度在  $16.9\text{-}19.6^{\circ}\text{C}$  間。冬季月均溫皆小於  $15.5^{\circ}\text{C}$ (圖 3-1.1.a)。各月平均相對濕度為 71.2% 至 88.3%，年平均相對濕度為  $79.6\pm 4.6\%$ (圖 3-1.1.b)。累積降雨量在 2010 年 9、10 月最高分別達 529 mm、259 mm，其中 9 月兩量為目前大分地區氣象站記錄到的最高雨量記錄。2011 年 5 月至 7 月雨量為 106 至 186 mm 間較高。2012 年降雨量最高為 5 月 132.5 mm。其他月份降雨量皆在 100 mm 以下(圖 3-1.1.c)。以單日累積降雨量來看，以 2010/9/19 的 257 mm 為最高，依序為 2011/6/21 的 100.7 mm 和 2010/10/22 的 96 mm，此三日豐沛降雨量皆因颱風所造成(2010/9/19-20 凡那比颱風，2010/10/21-22 梅姬颱風，2011/6/21 海馬颱風)。其他單日累積降雨量皆在 75 mm 以下。

由於持續性的氣象資料因人為疏失，而導致監測性的數據嚴重缺失，對於欲長期觀察樣區的季節性及年間氣象變化，實在遺憾。由於架設氣象站的該公司表示，記憶卡能存取約 1 年半的資料，故只需固定半年或一年前往樣區進行更換，因此本研究建議後續能由在該區從事研究的特定團隊或適當人選進行記憶卡存取的工作，並同時節省人事成本。

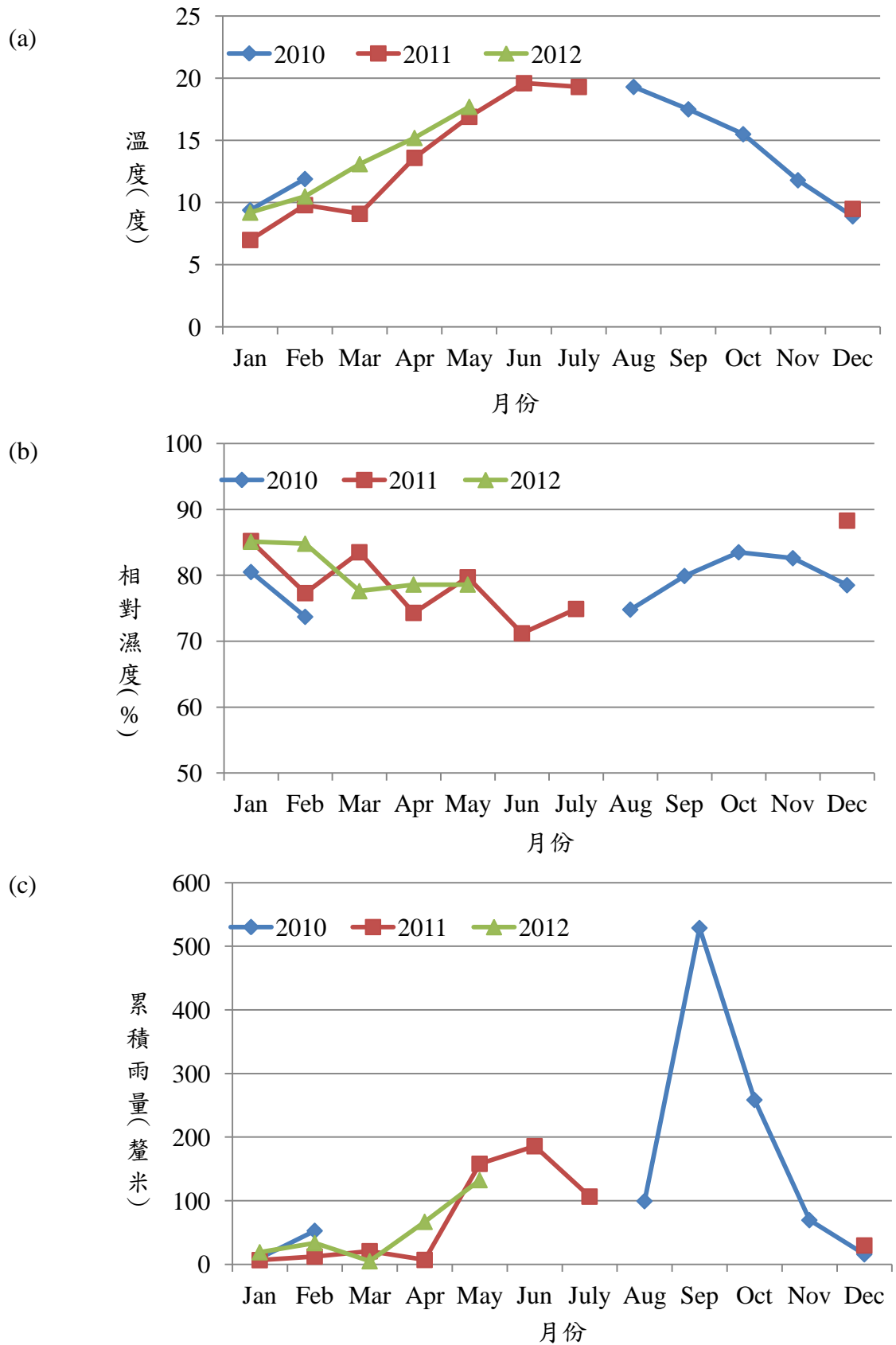


圖 3-1.1、2010 年 1 月至 2012 年 5 月大分地區的(a)月均溫、(b)相對濕度和(c)累積降雨量。

## 第二節 青剛櫟果實豐富度之監測

### 一、青剛櫟目視估計(visual survey)

本研究於 2012 年 10 月日至日，利用望遠鏡目視掃描 346 棵青剛櫟果實監測永久樣樹，以 Graves'修正指數估算 2012 年青剛櫟結果季的結果量，結果指數之平均等級為  $1.75 \pm 1.02 (\pm SD)$ ，以指數 2 有一些堅果者最多佔 46%，其次依序為仔細搜尋後可發現少量堅果者(指數 1)佔 23.1%，樹上沒有觀察到果實者(指數 0)佔 12.7%，堅果產量不錯者(指數 3)佔 12.4%，和堅果產量十分豐盛者(指數 4)佔 5.8%(圖 3-2.1)。

與 2006-2011 年資料比較，2012 年的 Graves'修正指數平均值低於 2008 年 ( $2.20 \pm 1.15$ )、2010 年 ( $2.03 \pm 1.02$ ) 與 2011 年 ( $1.9 \pm 0.98$ ) 年。2012 年樣樹的 Graves'修正指數 0-2 的比例約 82%，指標 3 與指標 4 的比例分別為 12.4% 與 5.8%。

利用 30 秒內計數青剛櫟果實數量，2012 年為  $42.8 \pm 40.8$  顆/棵，且年間結果量變化之趨勢，與 Graves'修正指數之估計結果相似，僅次於 2008 年的  $56.1 \pm 46.9$  顆/棵、2010 年的  $54.1 \pm 44.3$  顆/棵及 2011 年  $49.2 \pm 42.5$  顆/棵。整體看來 2006-2012 年間的調查結果，利用 30 秒內計數與 Graves'修正指數兩種方法所估算的平均結果趨變化頗為一致(圖 3-2.2)。

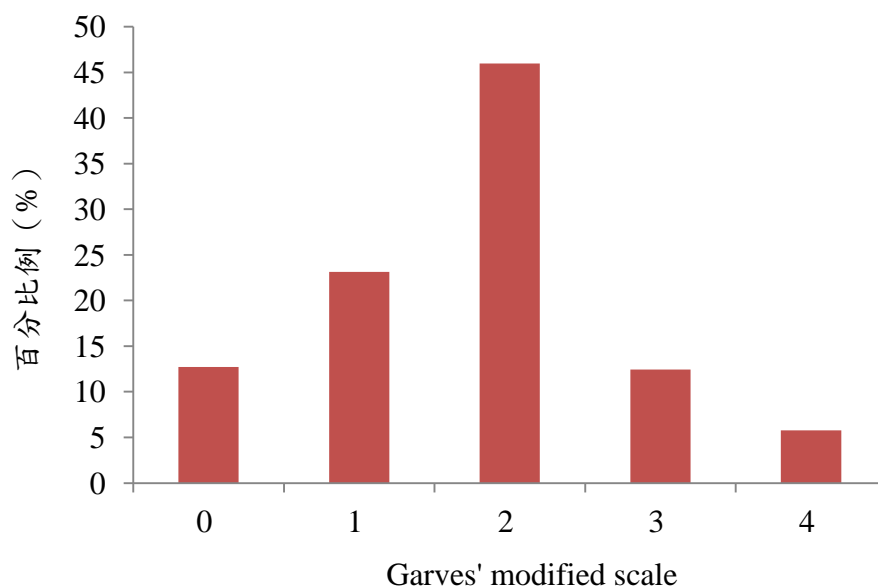


圖 3-2.1、2012 年目視法調查大分地區青剛櫟落果前的結果量(Graves' modified scales: 0=沒有觀察到堅果, 1=仔細搜尋後可發現少量, 2=有一些, 3=產量不錯, 4=產量十分豐盛)

4=產量極豐富)。

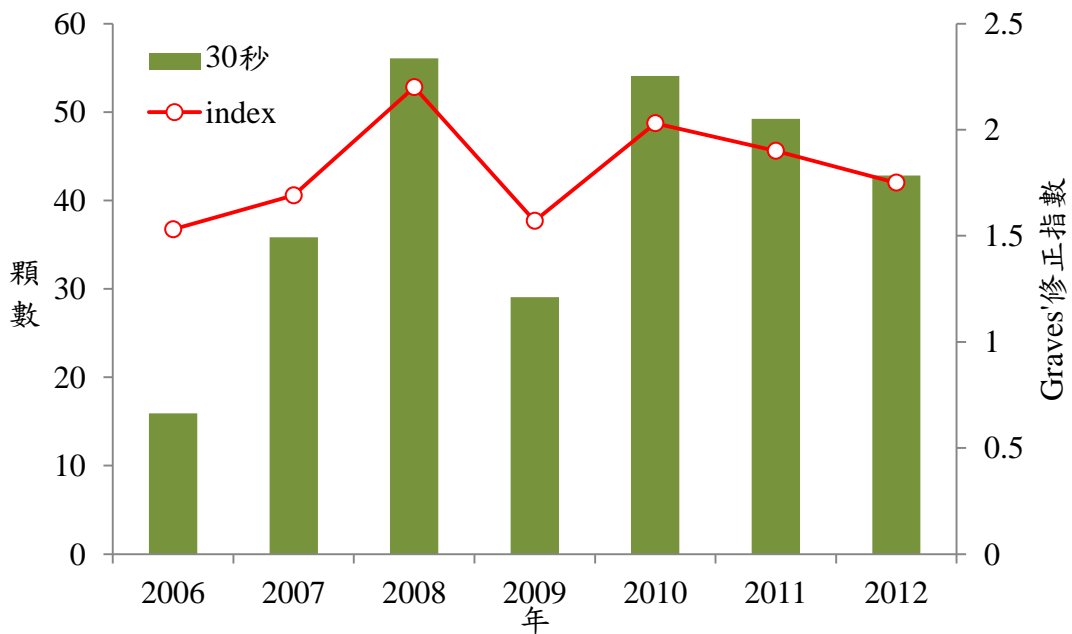


圖 3-2.2、2006-2012 年利用兩種目調查法，調查大分地區 青剛櫟落果前的樹上結果量。綠色為 30 秒計數法，紅色為 Graves'修正指數。

## 二、種子陷阱

本研究自 2011 年 10 月中至 2012 年 2 月底架設種子陷阱，歷時約 127 天，每隔一個月收集掉落在種子陷阱內的青剛櫟果實，以估算 2011 年青剛櫟結果季的果實產量。每次收集種子時，若種子陷阱受外力而傾倒或歪斜時，將不列入計算。今年度每月有效種子陷阱數為 186 至 196 個不等。

2011 年青剛櫟結果季每個種子陷阱內，各月平均完整果實以 11 月為最高  $5.9 \pm 8.3$  顆，12 月  $5.2 \pm 8.04$  顆、10 月次之  $3.5 \pm 7.2$  顆次之，最低為 1 月  $3.46 \pm 6$  顆。各月受損果實則以 12 月為最高  $1.7 \pm 6.2$  顆，11 月  $0.96 \pm 3.6$  顆、1 月  $0.9 \pm 2.5$  顆分別次之，10 月為最低  $0.84 \pm 1.8$  顆(圖 3-2.3)。將果實總量轉換成每平方公尺單位面積的果實顆數，則 2011 年青剛櫟果實的估計生產總量(包括完整果和受損果)為  $30.5$  顆/ $m^2$ ，其中完整果實量代表為地面活動動物的食物可得度，為  $25$  顆/ $m^2$ 。

以青剛櫟季的各月變化來看，平均每個陷阱收集的完整果實數以 11 月最高，為 5.9 顆/陷阱，12 月次之(5.2 顆/陷阱)、10 月及 1 月分別都為 3.5 顆/陷阱。受損果實以 12 月最高(1.7 顆/陷阱)，其次依序為 11 月(1 顆/陷阱)、1 月(0.9 顆/陷阱)、

10月(0.5顆/陷阱)。掉落果實總量以11、12月同樣為最高(6.9顆/陷阱)，其次為1月(4.4顆/陷阱)、10月(4顆/陷阱)(圖3-2.3)。此落果量的月間變化與前期監測結果模式類似，比較特別的是，唯獨1月完整果實落果量為歷年次高，僅次於2008年青剛櫟落果豐年(3.9顆/陷阱)。其他年份1月完整果實落果量皆低於1顆/陷阱。

和前五年(2006-2010年)的結果季相較，2011年受損果比例是歷年來最低(18.4%)，前五年受損果比例範圍32%-47%。但2011年平均每個種子陷阱的完整果實數卻僅次於2008和2010年(分別為28.7顆和25顆)。受損果的數量反應樹棲型棲青剛櫟掠食者利用的程度，根據之前的調查顯示樹上潛在掠食者包括台灣獼猴、台灣黑熊、條紋松鼠、赤腹松鼠和長吻松鼠，鳥類則有松鴉、星鴉和綠鳩(郭彥仁 2012)。推測可能因其他區域殼斗科豐富度變化有關，今年黑熊來大分覓食新鮮痕跡的發現時間以12月底至1月初為主，可能樹上結果沒有殘餘太多，所以導致受損果較少。

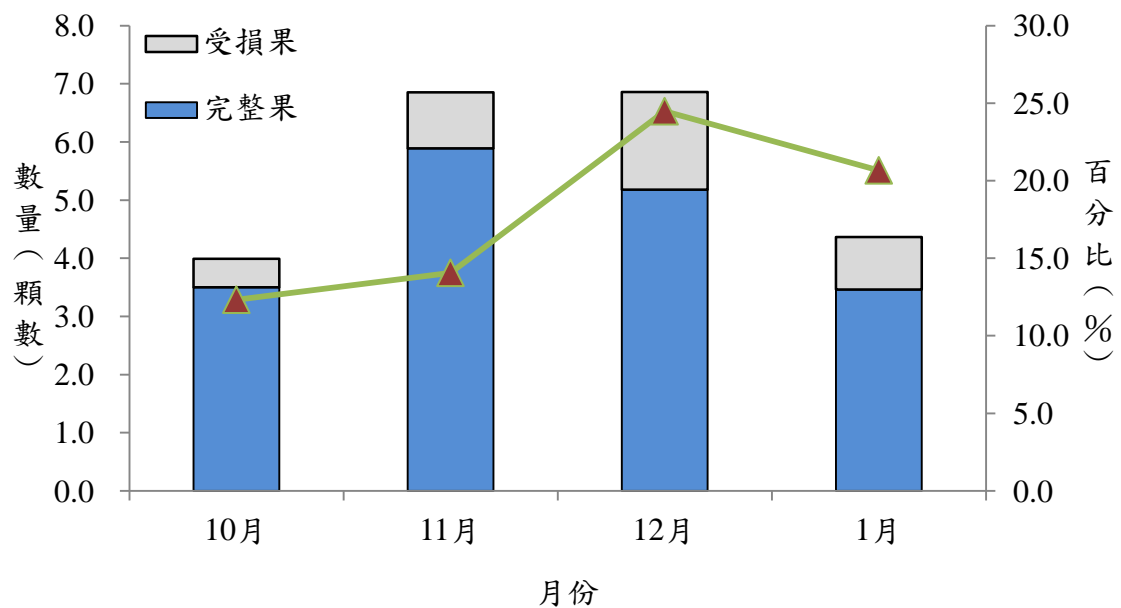


圖 3-2.3、2011 年青剛櫟結果季，平均每個種子陷阱(0.85\*0.85 m<sup>2</sup>)收集青剛櫟落果之情況。

從 2006~2011 年間，果實產量在年間有所差異(One-way anova,  $F=8.247, df=5, p<0.01$ )。至今以 2008 年為 61 顆/m<sup>2</sup> 最高，2010 年、2007 年、2011 年分別為 51.2 顆/m<sup>2</sup>、36.1 顆/m<sup>2</sup>、30.5 顆/m<sup>2</sup> 依序次之，2006 年和 2009 年為 28 顆/m<sup>2</sup>、21 顆/m<sup>2</sup> 最低(圖 3-2.4)。利用事後檢定 Scheff's 法哪些年間有差異，結果顯示 2006、2007、2009 及 2011 年都與 2008 年有顯著差異( $p<0.05$ )，其中又以 2009 年差異最大。而 2008 年與 2010 年間果實產量無差異。顯示 2008、2010 年為果實產量較好的年分，與其他年有所差異。

與前 5 年青剛櫟結果季月份變化的比較，2011 年 10 月至 1 月平均每個陷阱受損果實量為歷年來最低，平均每個陷阱總果實量也僅高於 2009 年(15.1 顆/陷阱)；而 2011 年各月完整果實量則僅低於果實產量豐盛的 2008 年(3.9 至 12.1 顆)及 2010 年(0.7 至 9.7 顆)。

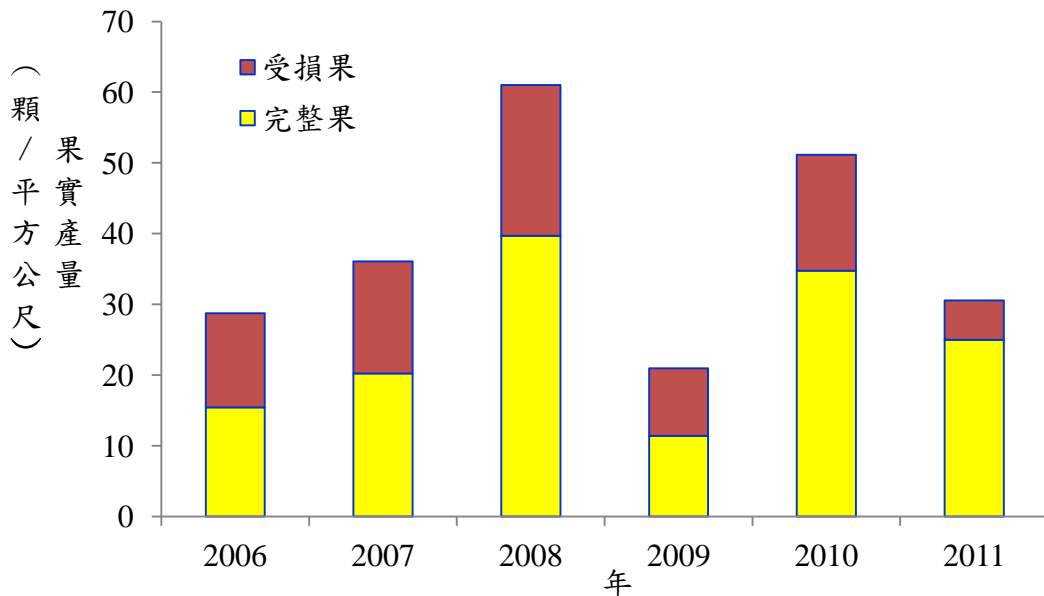


圖 3-2.4、2006~2011 年平均每個種子陷阱在青剛櫟產季(10~2 月)的果實產量。

種子陷阱擺設位置的選擇，儘量避開上方有非樣樹的其他樹冠，但這在系統性取樣的前提下，仍無法避免，陷阱上方僅有樣樹樹冠者佔 30%。就 2011 年來看，陷阱上方的樹冠重疊與否，與該季累計的集果量無顯著相關(有： $22.6\pm 26.7$  vs. 無： $22.0\pm 22.1, F=0.025, P=0.87$ )。這可能與陷阱位置的選擇已經儘量避開重疊的樹冠有關。

2011 年結果季利用種子陷阱(n=176)各月所收集到的青剛櫟果實，包括被動物取食破壞的受損果實數量、完整果實數量，以及前二者之總量，分別與利用 30 秒計數法估計該樣樹的結果量指標作相關性檢定，結果顯示除了受損果實與 30 秒計數之關係呈現不顯著( $r=0.14$ , Pearson correlation)，其他比較則皆呈現顯著相關( $r=0.39-0.40$ ,  $P<0.001$ )。利用種子陷阱該季的收集量，亦隨 Grave 指數增加而增加( $F_{4, 171}=11.3$ ,  $P<0.001$ ) (表 3-2.1)，但後續 Scheffe 法多重比較顯示，每個 Grave 指數的等級大多僅與相鄰的一等級皆未達顯著差異水準而已，例如在所有 10 組配對比較中，僅有配對指數 0-1、1-2、1-3、3-4 未達顯著差異。這顯示 Grave 指數與種子陷阱計量法有相當的一致性。

我們另以半變異數(semi-variance)估算樣樹的空間自相關。空間自相關是指點與點間具有相關，圖中的 x 軸為距離，y 軸為半變異數(semi-variance)。以蒙地卡羅法 (Monte Carlo simulations)所估算之 95%信賴區間(上下虛線)，若在區間內即符合逢機即無空間自相關的虛無假說。結果顯示分別在 0~1,000 m 不同距離下檢視，樣樹間皆不受空間自相關的影響，也就是樣樹間結果量彼此沒有互相影響(圖 3-2.5)。

表 3-2.1、2011 年青剛櫟樣樹 Grave's 修正指數與其平均每個種子陷阱累計收集之櫟實年平均產量之關係。

Grave's 修正指數	種子陷阱數	年平均果實量	標準差
0	16	1.28	2.80
1	34	18.76	23.52
2	87	20.04	22.11
3	32	35.04	28.37
4	7	61.07	26.09

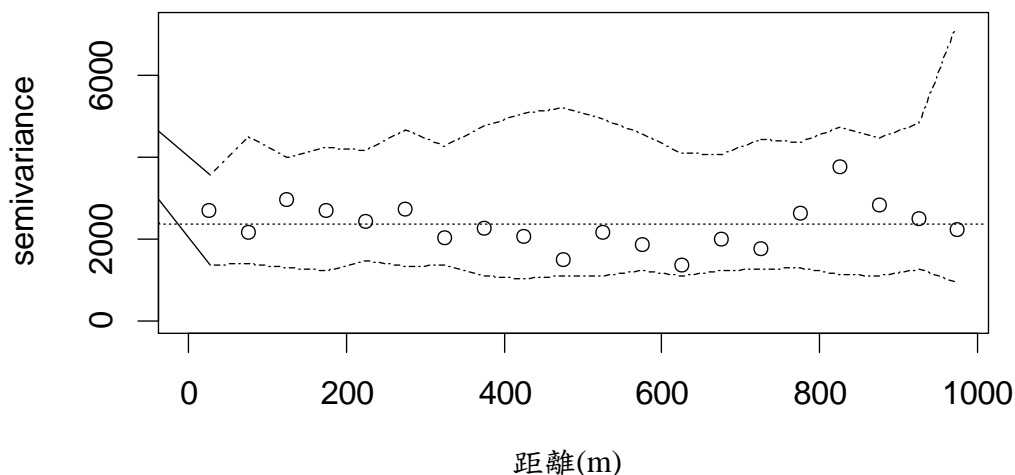


圖 3-2.5、利用半變異數分析 197 顆種子陷阱樣樹的空間自相關情況。

從調查樣帶的角度來看，2011 年種子陷阱青剛櫟產量的結果，各樣線每個種子陷阱的集果量沒有顯著差異(One-way anova,  $F=0.197$ ,  $df=7$ ,  $p>0.05$ )，以 T3 和 T4 最高( $25.2\pm 22.1$ 、 $25.1\pm 15.9$  顆/陷阱)，T1 最低( $18.4\pm 31.8$ /陷阱)(圖 3-2.6)，顯示同一樣線上樣樹的結果變化很大。雖然各穿越線所處地理位置有所不同，有些位於稜線或河階平台上，不同的日照接收時間、強度或坡度等微棲地因素對於同一地區的樣樹的果實產量可能有限。反之，較大尺度的氣候變化和樹木本身的狀況則可能是其他的影響因素(Koenig et al. 1994)。

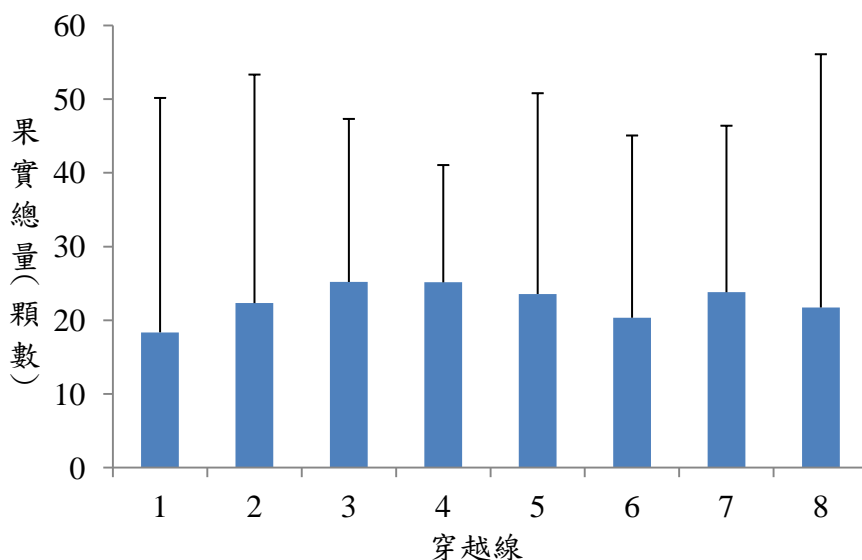


圖 3-2.6、2011 年種子陷阱於各調查樣帶的平均累計集果量(青剛櫟)。



## 三、地面區塊青剛櫟果實留存狀況

地面區塊落果調查從 2011 年 10 月至 2012 年 2 月間進行。地面區塊平均果實數從 9 月 0.29 顆數/m<sup>2</sup> 漸增至 11 月 4.8 顆數/m<sup>2</sup> 為高峰，地面區塊出現果實之百分比也在 11 月為最高(63%)。與 2007、2009、2010 年青剛櫟季的調查結果比較，平均果實數與出現果實比例的在月份間的變化趨勢大致相同，都以 11、10 月為最高及次高。地面果實被移除量以 12 月為最高(9.4 顆數/m<sup>2</sup>)，1 月、11 月分別為 7 顆數/m<sup>2</sup>、6.5 顆數/m<sup>2</sup> 次之，10 月為最低(2 顆數/m<sup>2</sup>)(表 3-2.2)。與過去幾年移除量的結果相比，通常到 1-2 月時移除量是大幅地降低(1-1.2 顆數/m<sup>2</sup>)。而 2011 年青剛櫟季 1-2 月移除量(7 顆/m<sup>2</sup>)較其他年高出 7 倍之多。

從種子陷阱的平均落果數量來看，除了 2008 年之外，2011 年 1-2 月為 4.8 顆數/m<sup>2</sup> 也較其他年份高(0.1-0.9 顆數/m<sup>2</sup>)。推測可能今年青剛櫟結果期較長，所以 1-2 月完整落果量較往年多，而有較高的移除量，其因素是否與今年冬季雨量較多等氣候因子相關，則需要繼續長期監測。

表 3-2.2、2011 年 10 月至 2012 年 2 月青剛櫟結果季期間，大分青剛櫟森林中，地面區塊(n=100)和種子陷阱(n=197)各月所收集青剛櫟完整果實的數量。

年份	月份	地面區塊*		種子陷阱*	地面果實 被移除量 (顆數/m <sup>2</sup> )	地面果實 被移除百 分比例
		平均果實數 (顆數/m <sup>2</sup> )	出現果實 之百分比 例	平均果實數 (顆數/m <sup>2</sup> )		
2011	Sep	0.29	15%			
	Oct	3.1	43%	4.8	2.0	40%
	Nov	4.8	63%	8.2	6.5	57%
	Dec	2.6	39%	7.2	9.4	78%
2012	Jan(-Feb)	0.38	31%	4.8	7.0	95%

\*地面區塊面積為 1x1 m<sup>2</sup>；種子陷阱面積為 0.85x0.85 m<sup>2</sup>。

#### 四、青剛櫟生產量估算及週期預測

我們選擇 11 棵結果較多的青剛櫟樹，ANOVA 分析顯示，每顆青剛櫟的濕重分別與月份和樣樹，以及二者間的交互作用有關( $F=135.8、96.2、5.27$ ； $P<0.05$ )。青剛櫟於 12 月的平均重量為 1.62 g (SD=0.56)，明顯較 11 月 1.27 g (SD=0.56) 重。

若假設大分地區青剛櫟分布及落果皆為均勻的情況，根據研究者長期活動於該區的觀察，利用 GIS 勾勒出該區青剛櫟分布面積，約為 5 km<sup>2</sup>。當在青剛櫟盛產時(累計落果量 61 顆/m<sup>2</sup>，2008 年)，大分地區青剛櫟總產量為 30,500 萬顆。進一步以單顆平均濕量(1.45 g/顆)換算的話，則盛產期的產量高達 442.25 公噸；若以最低產量年(2009，21 顆/m<sup>2</sup>)來看，則整體產量約為 152.25 公噸。

就大分地區捕獲的黑熊成體體重而言，雌雄成體的平均體重為 80 公斤 (Hwang 2003)，故每日所需的基本代謝能(basal metabolic rate, BMR)為 1,758 kcal，而在一般活動下維生所需(2\*BMR, Justice and Smith 1992)為 3,516 Kcal。由於黑熊吃青剛櫟多僅食入果仁部位，而將殼吐掉，故 11 及 12 月採集該地青剛櫟的平均乾重為 0.488 g，以板栗的營養含量來看(總能 395.2 Kcal/100g dry mass，陳亞萱 2009)，則一顆青剛櫟果仁可產生 1.92 Kcal。進一步將黑熊對於櫟實(板栗)總能的平均表面消化率(74.5%)列入考量的話，則每隻黑熊每日至少需攝食 2,464 顆青剛櫟，相當於 3.573 公斤的櫟實(濕重)。當地的結果季的於盛產期時，相當於可以提供滿足一隻熊 247,551 天的維生代謝能所需，在欠年時仍可提供滿足一隻熊 85,222 天的維生代謝能所需。若一隻黑熊密集停留於此區四個月，則該區櫟實產量仍可滿足 700-2,1050 隻黑熊所需。雖然我們知道青剛櫟的掠食者另有其他各類動物，如昆蟲、鳥類或哺乳等，但此初步分析顯示大分地區的櫟實所提供的食物資源對黑熊或其他野生動物都有舉足輕重的角色。

為預測大分地區青剛櫟的結果週期動態，我們以時間序列之回歸移動平均模型 (Autoregressive Integrated Moving Average Model, ARIMA) 進行資料分析。以此模型估算自 2006 年 10 至 2012 年 1 月 64 個月間，各月分完整結果量與時間的關係，並利用 Akaike's Information Criteria (AIC)，選取最佳模式。結果顯示，最佳模式為 ARIMA (2, 3, 2) 模式。然而，以此模式為基礎預測未來產量時，發現預測值隨時間增加，未能合理推估季節與年間變化。推測原因可能在於，結實量為連續變化，以月為預測單位，並不理想。較合理的預測單為應為年。然而，六年的監測時間仍然太短，無法建立可靠的時間序列模式。

櫟樹的結果狀況受很多因素影響，包括遺傳、植株空間分布、氣候、動物活

動、疾病及微棲地條件等，而影響櫟實結果週期的因素也十分複雜，且常隨樣區或物種而有差異(Greenberg and Parresol 2002, Koenig and Knops 2002, Lusk et al. 2007)。然本研究受限於調查的環境因素資料及時間長度不足，無法對結果狀況的年間變化進行充分的詮釋，故建議持續長期的監測，加強氣候條件的掌握，以期深入瞭解結果週期及機制。Koenig et al. (1994)指出櫟實欠收並非完全逢機所致，通常發生於前一年盛產之後，這與本研究於 2009 年觀察到結果欠年尾隨於豐年之後的情況相符。結果週期的預測若就單一調查樣點來說，一般至少需時 30 年(林宜靜 私人通訊)，這對補給困難的大分而言，持續的種子陷阱監測並非易事。但是，根據本研究發現十月所用的兩種指標皆與種子陷阱收集量成顯著相關來看，簡單的指標評估方式可以在果熟初期提供一可靠的資訊，不僅是一經濟實惠的監測方式，亦可提供園區黑熊族群動態重要的參考資訊。

### 第三節 台灣黑熊相對之豐富度

#### 一、青剛櫟結果季黑熊活動痕跡的年度調查

2012 年 2 月底，在大分地區(9 條調查樣線)和賽柯地區(1 條調查樣線)進行 2011 年青剛櫟結果季的年度黑熊活動痕跡調查。另今年調查計數穿越線兩側 3 m 內胸高直徑大於 5 cm 的青剛櫟樹，以評估穿越線內有熊痕跡的青剛櫟樹比例。穿越線內有熊痕跡的青剛櫟樹比例最高為 T4(32.7%)，T3、T6 分別是 14.4% 和 9.4% 為次高，T5 則沒有發現今年度任何熊痕跡為最低(表 3-3.1)。這可能與小尺度結果量差異影響黑熊空間上棲地利用有關。從歷年監測資料來看，T7 有熊痕跡的青剛櫟樹比例平均為最低 2.5%，最高為 T4 平均 24.7% 的青剛櫟樹有熊痕跡。若比較年間差異，2008 年整體穿越線有熊痕跡的青剛櫟樹比例最高為 24.7%(n=8)，2010、2011 年分別為 22.8% 和 8.9% 次之，2007 年為 5%，2006 年為 4%，2009 年為 1.4% 最低。

賽柯地區的兩種黑熊活動分別為 0.7 棵爪痕樹/km、0.7 單位/km(表 3-3.1)。在調查樣帶上，有熊痕跡的青剛櫟樹比例為 0.5%，與 2009 年相同為歷年來最低(0.5%-18.3%)。此區域青剛櫟季時熊活動痕跡歷年來都低於大分地區，但有觀察到不少今年在台灣肉桂的黑熊爪痕和折枝。相較於大分，黑熊對於利用賽柯地區的森林有時間性的差異。

調查樣線上青剛櫟樹熊痕跡指數與以目視 30 秒計數法評估各樣帶平均結果量成正相關(Spearman correlation,  $r=0.952$ ,  $P<0.01$ ,  $n=8$ )，但與落果累積量無顯著相關(Spearman correlation,  $r=0.405$ ,  $P=0.32$ ,  $n=8$ )。

## 二、青剛櫟調查樣樹上熊痕跡於的年度調查

2012 年 2 月針對青剛櫟樣樹( $n=346$ )調查年度熊活動痕跡的狀況，其中約 80% 的樣樹沒有發現任何熊上樹或覓食痕跡，6.6% 的樣樹有熊爪痕無折枝，折枝為 8.6%，有嚴重折枝的樣樹比例為 6.6% (圖 3-3.1)。檢視該年度樣樹結果狀況與黑熊利用樣樹之程度，Graves' 指數與 30 秒計數兩項結果指標都與黑熊利用樣樹程度成顯著相關(Spearman correlation,  $r=0.268$  ;  $r=0.282$ ,  $p<0.01$ ,  $n=346$ )，顯示黑熊爬上該樹取食果實程度隨樹結果狀況而增。也就是說，野外觀察發現熊痕跡的樣樹大多為結果較好的情況，其中僅有一棵有熊痕跡的樣樹中(有熊爪痕無折枝)無結果。另有些熊折枝或覓食平台的樣樹，出現黑熊重複利用的跡象。除了結果量之外，黑熊選擇青剛櫟樹取食櫟實的行為是否另受其他因素如單寧酸含量等影響，則值得進一步追蹤。

表 3-3.1、2011 年青剛櫟結果季結束後，大分及賽柯地區各樣帶黑熊痕跡的調查結果。

樣帶	熊痕跡 ( $n=187$ )	熊痕 跡單 位	穿越 線長 度(m)	每公里 內之熊 爪痕樹	每公里內 之熊痕跡 單位	樣樹 (棵)	熊爪痕 樹比例 (%)	每公里內之 熊爪痕樹比 例(%/Km)
大分-T1	4	4	500	8	8	150	2.7	5
T2	4	4	200	20	20	65	6.2	31
T3	30	30	500	60	60	209	14.4	29
T4	72	71	850	85	84	220	32.7	38
T5	0	0	800	0	0	215	0.0	0
T6	27	27	1000	27	27	286	9.4	9
T7	4	4	750	5	5	250	1.6	2
T8	2	2	600	3	3	46	4.3	7
DN	44	44	3250	14	14	611	7.2	2
平均( $\pm$ SD)				<b>24.7<math>\pm</math>29</b>	<b>24.5<math>\pm</math>28.7</b>		<b>8.4</b>	
賽柯	1		1800	0.7	0.7	186	0.5	

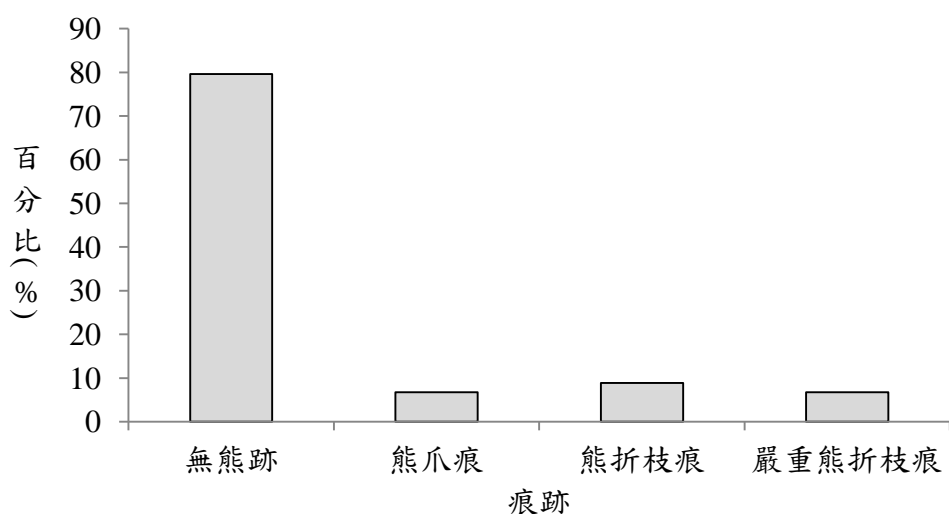


圖 3-3.1、2011 年青剛櫟結果季，青剛櫟樣樹上出現台灣黑熊不同痕跡的百分比例(n=346)。

### 三、熊毛陷阱

#### (一)大分地區

2011 年 10 月至 2012 年 2 月，大分地區共啟用 66 月次的熊毛陷阱，總計收集到 47 撮熊毛，整體發現熊毛的陷阱比例為 25.8%(各月 12-47%)。陷阱發現熊毛的數量以 2010 年 12 月為最多(n=25 撮)，1 月 17 撮次之，明顯高於 10 月和 11 月所收集的熊毛 2-3 撮(表 3-3.2)。此趨勢亦顯示於各月有熊毛記錄之陷阱比例，以及平均每一陷阱收集到的熊毛撮數，皆以 2010 年 12 月最高，分別為 47%、1.47 撮(n=17)，其次為一月。可見當季黑熊的出現頻度依次為 12 月、1 月、10 月、11 月。

2011 年青剛櫟結果季平均各月有熊毛記錄的陷阱比例和平均每一陷阱熊毛撮數分別為  $25 \pm 17\%$  和  $0.7 \pm 0.65$  撮。以 2007-2011 年的結果季而言，大分地區熊毛陷阱的有熊毛陷阱之比例、平均各陷阱熊毛撮數，與黑熊活動痕跡的兩種指標趨勢相同類似，2011 年的結果僅次於 2008 年( $62 \pm 13.6\%$ 、 $2.5 \pm 1.1$  撮)和 2010 年( $38 \pm 26.4\%$ 、 $1.68 \pm 1.85$  撮)，足見熊毛陷阱為一偵測黑熊相對活動程度的可靠指標。

表 3-3.2、2011 年 10 月至 2012 年 1 月大分地區各月熊毛陷阱收集到的熊毛狀況。

月份	熊毛 撮數	有熊毛記錄 陷阱數	啟用 陷阱數	有熊毛記錄的 陷阱比例(%)	平均每一陷阱 熊毛撮數
2010 年					
10 月	3	2	15	13.3	0.2
11 月	2	2	17	11.8	0.12
12 月	25	8	17	47.1	1.47
2011 年					
1 月	17	5	17	29.4	1
小計	47	17	66	25.8	

## (二)大分以外的東部園區區域

大分以外的東部園區區域，研究期間自 2009 年起共啟用熊毛陷阱 116 月次，共收集 57 撮熊毛，收集到熊毛之陷阱比例為 18.1%(表 3-3.3)。就 2011 年青剛櫟結果季(2011 年 10 月至 2012 年 2 月)共收集 32 撮熊毛，以 12 月收集為最多(n=13)。熊毛記錄的陷阱比例和平均每一陷阱熊毛撮數分別為 28±5.4%和 0.81±0.5 撮(表 3-3.3)。其中 12 月有熊毛記錄之陷阱比例，以及平均每一陷阱收集到的熊毛撮數分別為 37.5%、1.63 撮為最高。

總體而言，大分以外地區 2011 年青剛櫟季期間熊毛記錄的陷阱比例為 29%，略高於大分地區(25.8%)。但由於其他的熊痕跡，如排遺或樹上爪痕依然主要出現於大分，顯示在青剛櫟結果期間雖仍有部分黑熊廣泛活動於大分以外的地區，但黑熊的活動狀況在大分地區仍是相對地頻繁。我們也懷疑，在大分地區持續地使用氣味劑偵測黑熊的活動狀況，是否因黑熊的學習行為而導致造訪率偏低。大分以外地區的東部園區環境，雖無成片青剛櫟純林的狀況(黃美秀等 2009)，但是無干擾的完整植被有豐富的樟科和殼斗科植物社會組成，在秋冬季會有不同的殼斗科果實陸續結果，如青剛櫟、狹葉櫟、鬼櫟、錐果櫟等，也會吸引黑熊前來覓食。以 2012 年為例，步道於土多滾(18 K)至多美麗地區，十月值鬼櫟大量結果為歷年罕見，沿途發現多處黑熊的折枝和排遺。因此，若欲詳細瞭解黑熊之於園區的時空利用狀況，大尺度的重要食物資源的分布和豐富度的監測則屬必要。

表 3-3.3、大分以外東部園區的熊毛陷阱，各月所收集到的熊毛狀況。

月份	熊毛 (撮)	收集到熊毛 之陷阱數	啟用陷 阱數	收集到熊毛之 陷阱比例(%)	平均每一陷阱 熊毛撮數
2009 年					
12 月	4	2	8	25	0.5
2010 年					
1 月	0	0	8	0	0
2 月	0	0	8	0	0
4 月	10	3	7	43	1.4
6 月	0	0	8	0	0
10 月	1	1	8	12.5	0.13
11 月	1	1	8	12.5	0.13
12 月	0	0	8	0	0
2011 年					
1 月	0	0	8	0	0
2 月	9	3	6	50	1.5
10 月	4	2	7	28.6	0.57
11 月	3	2	8	25	0.38
12 月	13	3	8	37.5	1.63
2012 年					
1 月	4	2	8	25	0.5
2 月*	8	2	8	25	1
總計	57	7	116	18.1	

\*為 2012 年 6 月所複查收集。

#### 四、台灣黑熊食性分析

在大分地區青剛櫟季期間，2011 年共發現 148 坨黑熊排遺，以 1 月發現最多 (n=101, 47%)；2010 年發現 249 坨排遺，以 12 月最多 (n=116, 68%) (表 3-3.4)。2012 年青剛櫟季累計至 12 月，共收集了 26 坨排遺樣本 (12 月 20 坨，10、11 月各收集了 3 坨)。相較於 2011 年，今年 12 月時青剛櫟果實大多已落果，但黑熊覓食痕跡並不如往年時豐富。同時大分山屋今年在 11 月底至 12 月初時進行整修工程，根據前人經驗(吳煜慧 2004)，工程進行時產生的噪音、氣味等干擾，會影響黑熊到大分地區覓食活動。此因素可能是造成今年目前黑熊排遺收集較少的原因之一。

我們分析 397 坨排遺樣本，包括 2010 年 226 個及 2011 年 143 個樣本。二年的熊排遺內含物皆以堅果類出現頻度為最高(大於 94%) (表 3-3.5)。2010 年的排遺內含物以堅果類的青剛櫟出現頻度最高(94.7%)，其次為哺乳動物(3.5%)及漿果類

(3.5%)、草莖(1.3%)。漿果類包括呂宋莢蒾、台灣蘋果。哺乳動物包括台灣水鹿、台灣野山羊、山羌，以及首次記錄的刺鼠。

2011 年排遺內含物同樣以堅果類出現頻度最高(97.2%)，其次其次為漿果類(4.2%)、哺乳動物(1.4%)、莖葉類(2.1%)。哺乳動物包括台灣水鹿、台灣野山羊。漿果類包括呂宋莢蒾、山柿、木薑子，以及一未知果實。二年的熊排遺內含物的相對重要性以堅果類的青剛櫟為最高(96.8%)，其次為漿果類、莖葉類、哺乳動物(表 3-3.5)。

台灣黑熊是以植物性食物為主的雜食性動物，秋、冬季以富含脂肪的堅果類為主食(Hwang et al., 2002)。兩年的食性分析結果皆顯示以青剛櫟佔各食物類別相對頻度、相對重要性為最高，但也因排遺大多在大分地區青剛櫟優勢林內拾獲使然。雖然過去的研究指出，當青剛櫟缺乏時，黑熊取食哺乳動物有增加的趨勢，但本研究二年的哺乳類含量差異並非特別明顯，或許也與此二年的結果狀況差異不大有關係，因為本研究 2011 年的青剛櫟產量略低於前年(51.2 顆/m<sup>2</sup>)(黃美秀等 2011)。另一方面，由於青剛櫟結果時，樣區會吸引許多草食性動物前來覓食，其中水鹿(*Rusa unicolor*)和野豬(*Sus scrofa taiwanus*)在大分地區於青剛櫟結果季的豐富度甚至可達非結果季的兩倍以上(林冠甫 2008)。

表 3-3.4、2011-2011 年大分地區青剛櫟季各月所紀錄之黑熊排遺數量。

	10 月	11 月	12 月	1 月	2 月	總計
2010	10	11	116	93	19	249
2011	1	2	22	101	24	148
總計	11	13	137	193	43	397

\*青剛櫟季年份以該年 10 月至隔年 2 月表示，如 2007 年即表示 2007 年 10 月至 2008 年 2 月



表 3-3.5、2010 年 12 月至 2012 年 1 月，玉山國家公園東部園區台灣黑熊排遺中，各食物類別的出現頻度 FO(%)和相對重要性 RV(%)。

食物類別	種類	學名	2010 年青剛櫟季 (n=226)		2011 年青剛櫟季 (n=143)	
			FO	RV	FO	RV
莖葉	未知		1.3	1.33	2.1	1.08
堅果	青剛櫟	<i>Quercus glauca</i> Thunb. ex Murray	94.7	94.4	97.2	96.78
漿果	呂宋莢蒾	<i>Viburnum luzonicum</i>	2.65	3.76	0.7	0.03
	山蘋果	<i>Malus doumeri</i>	0.88	0.18		
	山柿	<i>Diospyros japonica</i> Sieb. & Zucc			1.4	0.56
	木薑子	<i>Litsea</i>			0.7	0.7
	未知種子				1.4	0.63
哺乳動物	台灣水鹿	<i>Cervus unicolor</i>	2.2	0.18	0.7	0.17
	台灣野山羊	<i>Capricornis swinhoci</i>			0.7	0.04
	山羌	<i>Muntiacus reevesi</i>	0.9	0.09		
	刺鼠	<i>Niviventer coxingi</i>	0.44	0.03		

## 第四節 台灣黑熊遺傳分析

### 一、台灣黑熊粒線體 DNA 之 D-loop 全長序列擴增

#### (一) D-loop 引子之黏合(annealing)溫度測試

因所設計來擴增 D-loop 全長序列的引子之  $T_m$  值為  $51.3^{\circ}\text{C}$  (順向端引子) 及  $59.3^{\circ}\text{C}$  (逆向端引子)，故以五種不同的黏合溫度(分別為  $50^{\circ}\text{C}$ 、 $53^{\circ}\text{C}$ 、 $56^{\circ}\text{C}$ 、 $59^{\circ}\text{C}$  及  $62^{\circ}\text{C}$ )來測試最佳 PCR 黏合溫度。首先，利用圈養台灣黑熊(編號：UT14)的排遺樣本作為最佳 PCR 黏合溫度之測試樣本。正控制組為圈養台灣黑熊 UT43 之血液 DNA，顯示所用緩衝液、Taq 聚合酶、dNTP 等沒有問題；負控制組也顯示沒有污染。結果顯示黏合溫度在  $56^{\circ}\text{C}$  與  $59^{\circ}\text{C}$  之條件下 PCR 產物較多且無非專一性(non specific)片段(圖 3-4.1)。而為了日後分析台灣黑熊粒線體 DNA 的多樣性與做為抽取野外排遺 DNA 品質的指標與增加微衛星基因座 PCR 擴增成功率，本研究以  $56^{\circ}\text{C}$  的黏合溫度做為進行後續擴增 D-loop 片段的條件。

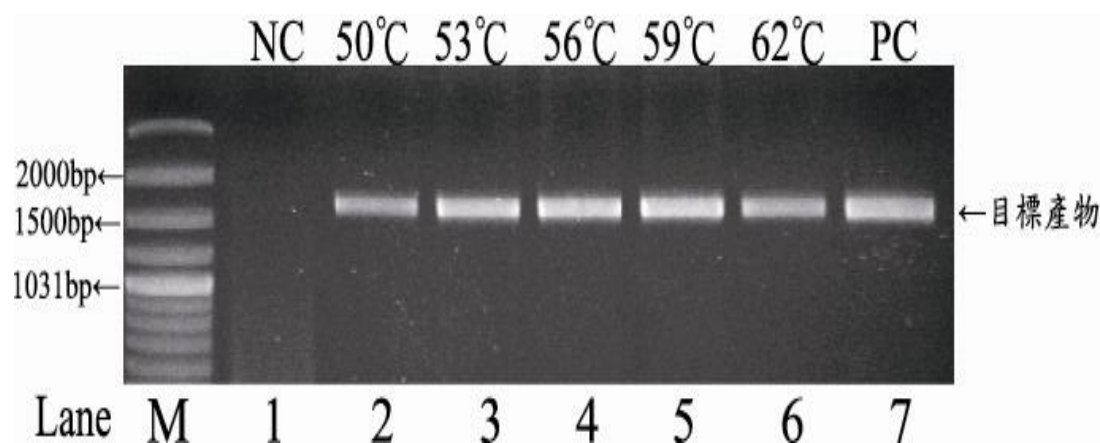


圖 3-4.1、圈養台灣黑熊(編號：UT14)排遺樣本在五種不同黏合溫度下測試後於瓊脂電泳膠圖的結果。Lane M：100bp Marker；Lane 1：負控制組(NC)；Lane 2-6：黏合溫度依序為  $50^{\circ}\text{C}$ 、 $53^{\circ}\text{C}$ 、 $56^{\circ}\text{C}$ 、 $59^{\circ}\text{C}$  及  $62^{\circ}\text{C}$ ；Lane 7：以圈養台灣黑熊之血液樣本 DNA 為 PCR 之正控制組(PC)。

#### (二) 野外排遺粒線體 D-loop DNA 全長序列擴增結果

以 2011 年 12 月至 2012 年 1 月之純化後野外排遺 DNA 進行 D-loop 片段 PCR 擴增實驗，部分結果如圖 3-4.2 所示。顯示野外排遺經 PCR 擴增 D-loop

片段的產物產量有不一的現象，雖然不同的排遺樣本所能擴增出的 D-loop DNA 濃度並不一致，但顯示產物有專一性、主要的目標 PCR 產物片段。PCR 產物經過純化(clean up)去除多餘引子與 dNTP 之程序，50bp 以下之引子與 dNTP 有明顯減少，顯示純化有成功(圖 3-4.3)。

將台灣黑熊之 D-loop 擴增純化後之 PCR 產物以 Forward 端引子送 DNA 定序，表示 FBDF120157(玉山分)野外排遺 DNA 樣本的 D-loop 定序結果之原始資料(圖 3-4.4)。每一個波峰代表一個鹼基，分別有 A、T、C、G，皆以不同的顏色代表。本實驗的 DNA 序列分析能判讀在 700 個鹼基對前並無檢測到無法判讀的核苷酸序列(以 N 顯示)。經判讀後顯示屬 D-loop 序列長度可達 631 鹼基對。此定序結果與 NCBI 的基因資料庫比對後，確定此樣本的來源確實為台灣黑熊排遺。樣本經 D-loop 序列擴增後，隨後進入公母鑑別與微衛星基因座增幅。

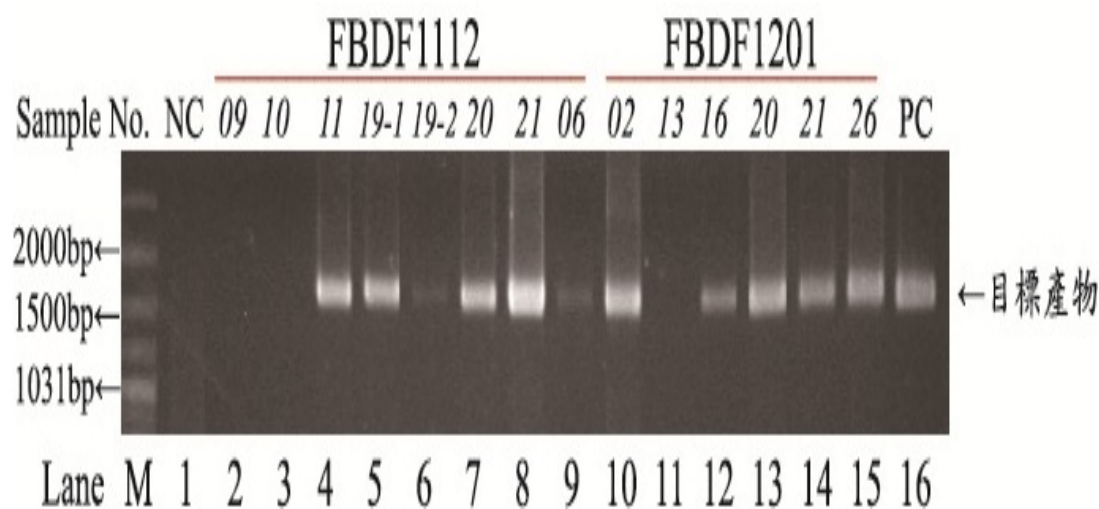


圖 3-4.2、部分台灣黑熊野外排遺 D-loop 全長 DNA 擴增之實驗結果。Lane M：100bp marker；Lane 1：負控制組(NC)；Lane 2-9：2011 年 12 月之野外黑熊排遺擴增後 PCR 產物；Lane 10-15：2012 年 1 月之野外排遺 DNA；Lane 16：以編號 UT43 血樣萃取 DNA 為模板之正控制組(PC)。

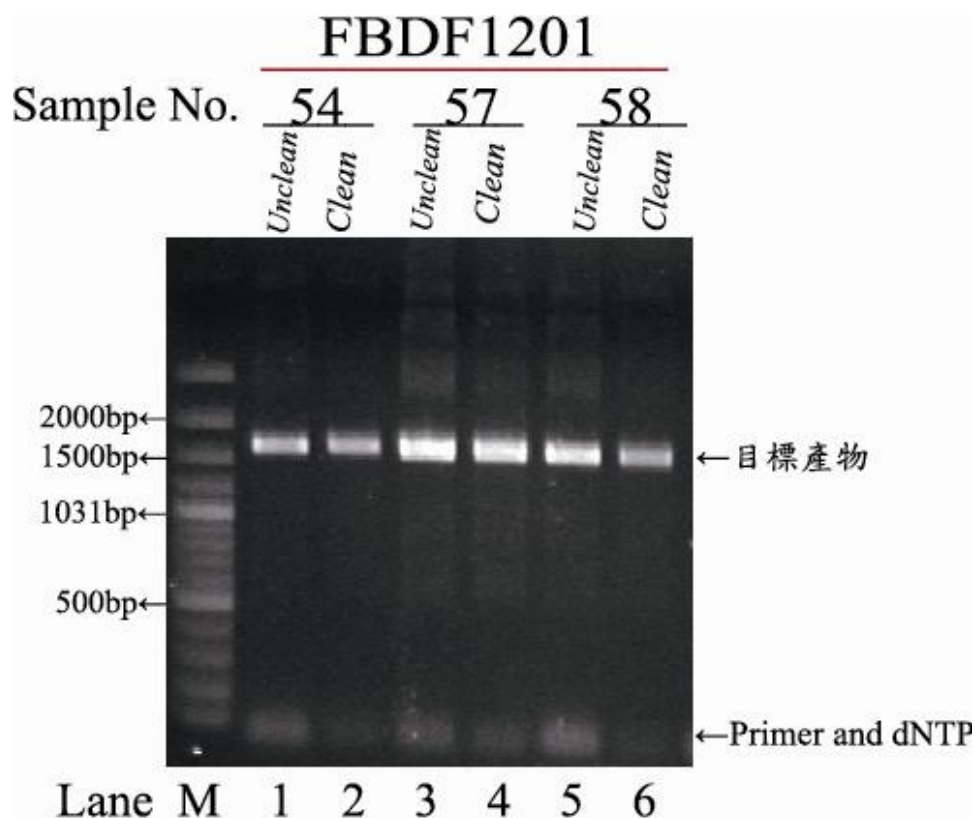


圖 3-4.3、不同台灣黑熊排遺樣本之 D-loop PCR 產物純化前與純化後(去除未反應之 dNTP 與引子, C), 可看出多餘片段有減少的現象。Lane M: 100bp marker ; lane1-2 : 54 號野外排遺 PCR 產物純化前(lane 1)與純化後(lane 2) ; lane3-4 : 57 號野外排遺 PCR 產物純化前(lane 3)與純化後(lane 4) ; lane5-6 : 58 號野外排遺 PCR 產物純化前(lane 5)與純化後(lane 6)。

## 二、微衛星基因座分析

### (一) 基因多樣性

2011 年 10 月至 2012 年 2 月共收集到 123 個黑熊排遺樣本, 挑選出新鮮度 1~4 的樣本, 共萃取 118 個 DNA 樣本, 成功 D-loop 序列擴增的個數是 56 個, 成功率為 0.47(表 3-4.1)。此外本實驗也將過去兩季成功性別鑑定的黑熊排遺 DNA, 也一併進行 D-loop 序列擴增。2010 年的排遺 DNA 序列之 D-loop 擴增成功率高達 0.87, 約比 2011 年的樣本多出二倍的成功率(表 3-4.2)。2009 年與 2010 年的排遺 DNA 樣本是有先經過性別鑑定篩選的樣本而後再擴增 D-loop DNA 片段, 因此在 D-loop 序列擴增方面, 成功率比較高。

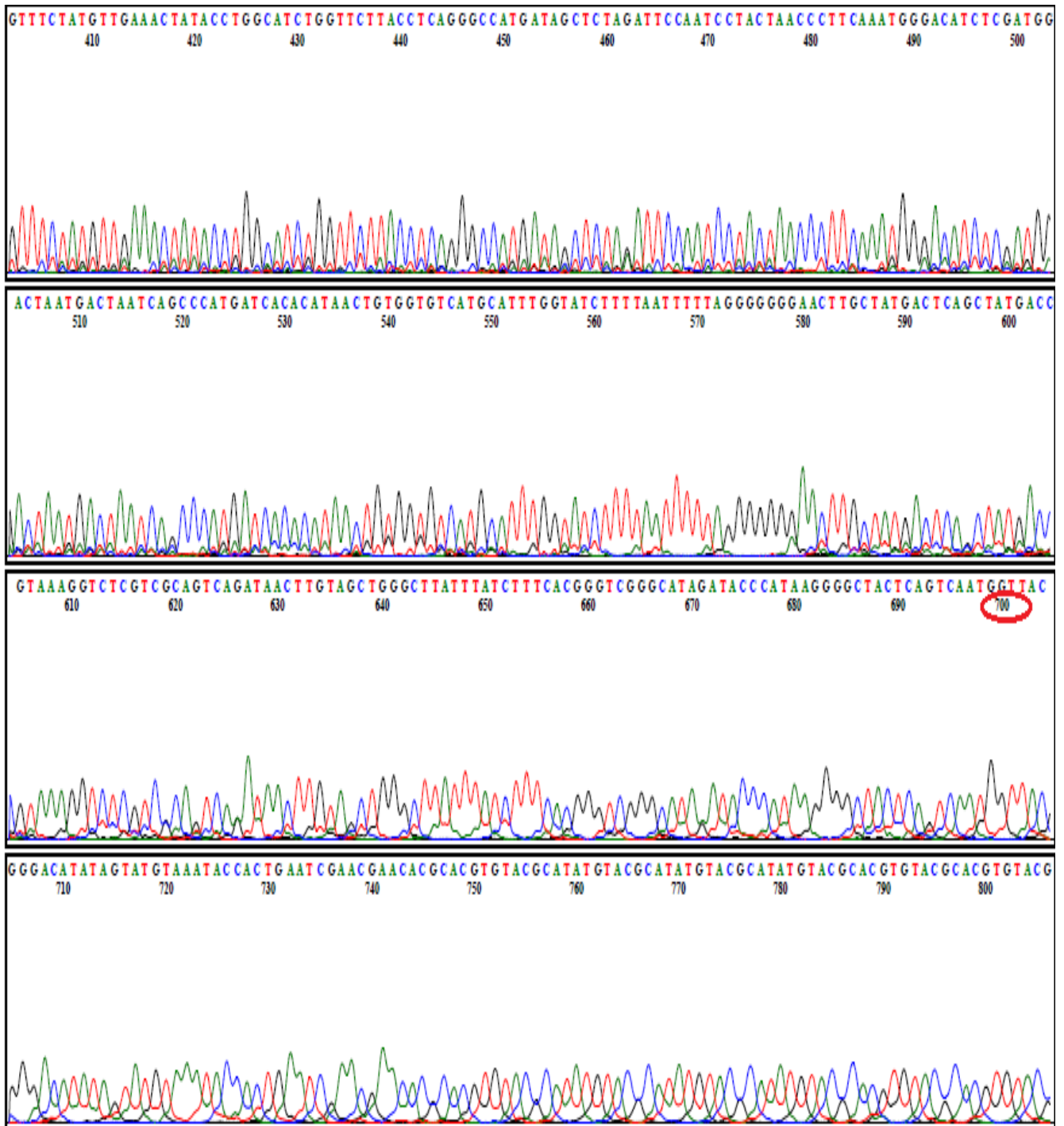


圖 3-4.4、此圖是 FBDF120157 野外排遺 DNA 樣本的 D-loop 順向端定序結果原始資料。每一個波峰代表一個鹼基，分別有 A、T、C、G，皆以不同的顏色代表。第 70 個到 700 個鹼基對，為本次實驗能判讀 D-loop 序列的範圍。

**表 3-4.1、2011 年大分地區青剛櫟結果季黑熊排遺收集狀況，以及初步遺傳分析結果。**

	2011 青剛櫟結果季			總計
	Nov	Dec	<sup>a</sup> Jan	
樣本數	22	100	1	123
DNA 萃取數	21	96	1	118
D-loop 序列增幅成功數	15	41	0	56
D-loop 序列增幅成功率(%)	71	43	0	47

<sup>a</sup> 隔年一月

**表 3-4.2、過去大分地區 2009、2010 及 2011 年的台灣黑熊排遺 DNA 萃取數量與 D-loop 全長 DNA 擴增分析統計結果。**

	2009	2010	2011	總計
DNA 樣本數	17	176	118	311
D-loop 序列增幅成功數	4	83	56	143
D-loop 序列增幅成功率(%)	24	47	47	46

## (二) 螢光直接標定擴增微衛星基因座引子之專一性檢測

本實驗利用石芝菁等人(Shih et al. 2009)針對台灣黑熊所篩選出的 10 組微衛星中的其中 6 組微衛星基因座進行分析。前兩年的計劃分析的微衛星基因座原為 10 組(UT1、UT3、UT4、UT23、UT25、UT29、UT31、UT35、UT38)，後經何冠助(2012)的研究分析，提出 UT3、UT23 與 UT31、UT36 片段專一性較差；擴增成功率不佳等原因，刪除此四個基因座，留下 UT1、UT4、UT25、UT29、UT35 與 UT38 此 6 組基因座進行個體辨識。為降低非專一性擴增微衛星基因座，另外因應毛細管電泳系統的更換，機器中激發螢光團(flurophore)與接收散色光之律片系統亦不相同，因此委由 ABI(Applied Biosystems)公司重新合成新的螢光引子(表 3-4.3)。

新的螢光引子與舊螢光引子的差別為：(1)新螢光引子的螢光直接連接於專一性擴增引子的 5' 端，為傳統上所使用的方法，之後以傳統型螢光引子稱之；(2)舊螢光引子的螢光則標幟在 M13 引子與 CAG 之上，而每條引子的 5'端也帶有 M13 與 CAG 之序列在舊的擴增系統中，PCR 反應同時會加入帶有螢光之 M13/CAG、Forward 及 Reverse 等三組引子同時作用，其目的乃為節省螢光標記的成本(Schuelke 2000)，之後以經濟型螢光引子稱之。

表 3-4.3、台灣黑熊微衛星標記之螢光引子序列。

微衛星 基因座	引子序列(Forward 端，5'-3')	T <sub>a</sub> (°C)	<sup>d</sup> Allele size(bp)	<sup>e</sup> Ex. (nm)	<sup>f</sup> Em. (nm)
UT1	<sup>a</sup> PET- AGCAACTCTTCTCAGATGTTTCACAAA	60	160~176	558	595
UT4	PET- GAGTTATTGGCACTAAAATCTAATG	60	139~164	558	595
UT25	<sup>b</sup> 6-FAM-GCTCAGGGCGTGATCCCAGAG	56	296~315	494	518
UT29	<sup>c</sup> VIC- GACATTGCCTTTTACAGAGCAG	60	188~220	538	554
UT35	6-FAM- ACTCCCTAGTAAGTAGAAAGCACAC	60	202~231	494	518
UT38	VIC- ATTATTGATGAGCAGGGACAG	60	178~214	538	554

<sup>a</sup>一種螢光標記，在毛細管電泳中被雷射激發後發出紅色螢光。<sup>b</sup>一種螢光標記，在毛細管電泳中被雷射激發後發出藍色螢光。<sup>c</sup>一種螢光標記，在毛細管電泳中被雷射激發後發出綠色螢光。<sup>d</sup>對偶基因序列長度。<sup>e</sup>激發波長，可接受能量達到激發狀態的波長，單位是奈米。<sup>f</sup>散色波長，在激發狀態下發射能量的波長，單位是奈米。

本實驗在重複先前實驗時，發現 M13/CAG 引子因 melting temperature 與同反應中專一擴增微衛星基因座之引子，會有競爭、dimer 與黏合溫度不同狀況，會對 PCR 反應產生干擾，以致於反應失敗或出現非專一性片段，易造成誤判(如圖 3-4.5)；在將 M13/CAG 序列從反應中去除後，只加入帶有螢光團之專一性引子進行微衛星基因座 PCR 擴增，則出現專一性 PCR 產物(圖 3-4.6)。

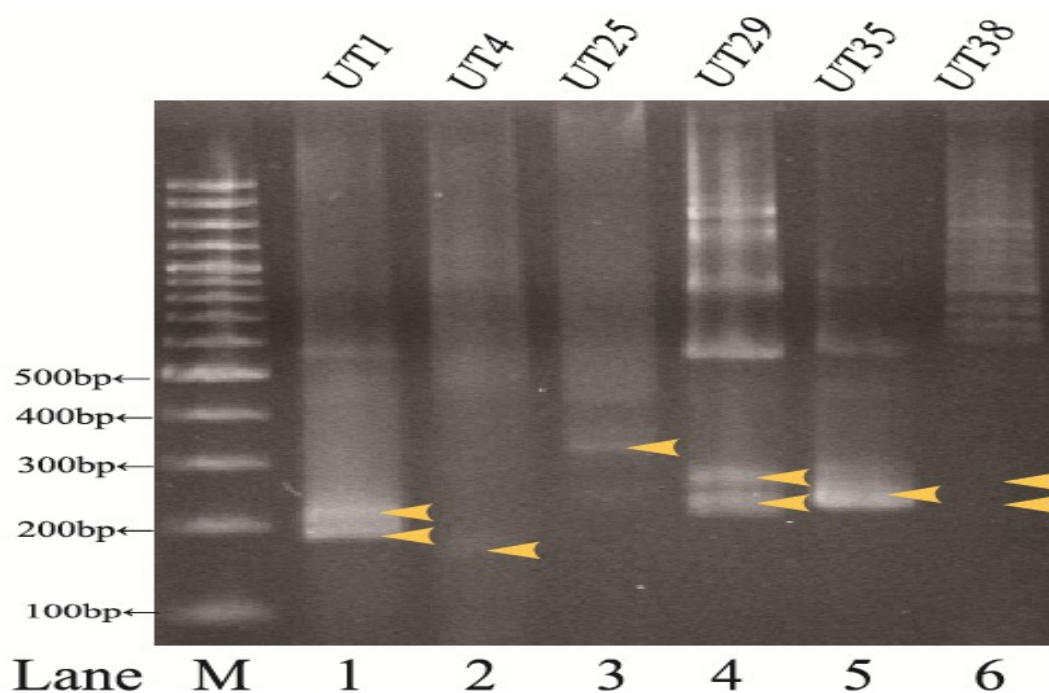


圖 3-4.5、利用圈養台灣黑熊之血液樣本抽出之基因組 DNA，依 Schuelke (2000) 與 Shih et al. (2009)所述之較經濟螢光標記微衛星基因座 PCR 擴增法，利用帶有不同螢光團之 M13/CAG 序列引子共同進行之 PCR 結果。Lane M：100bp marker；Lane1-6：UT1、UT4、UT25、UT29、UT35 與 UT38 微衛星基因座之對偶基因。箭頭指示的位置為擴增後預計微衛星基因座之對偶基因之片段長度。

然舊有經濟螢光標記微衛星基因座 PCR 擴增法的引子不含螢光團，無法進行毛細管電泳時進行螢光激發，檢測對偶基因長度。因此由 ABI 公司另外合成直接鍵結螢光團之專一性新的傳統型引子(表 3-4.3)。以圈養台灣黑熊(編號 UT15)的血液樣本抽出之基因組 DNA 為模板測試傳統型引子 PCR 擴增效果與專一性，結果如圖 3-4.7。測試結果顯示新的引子專一性與反應產物較多。本實驗日後即採用新合成的傳統型螢光引子與擴增平台進行微衛星基因座分析。



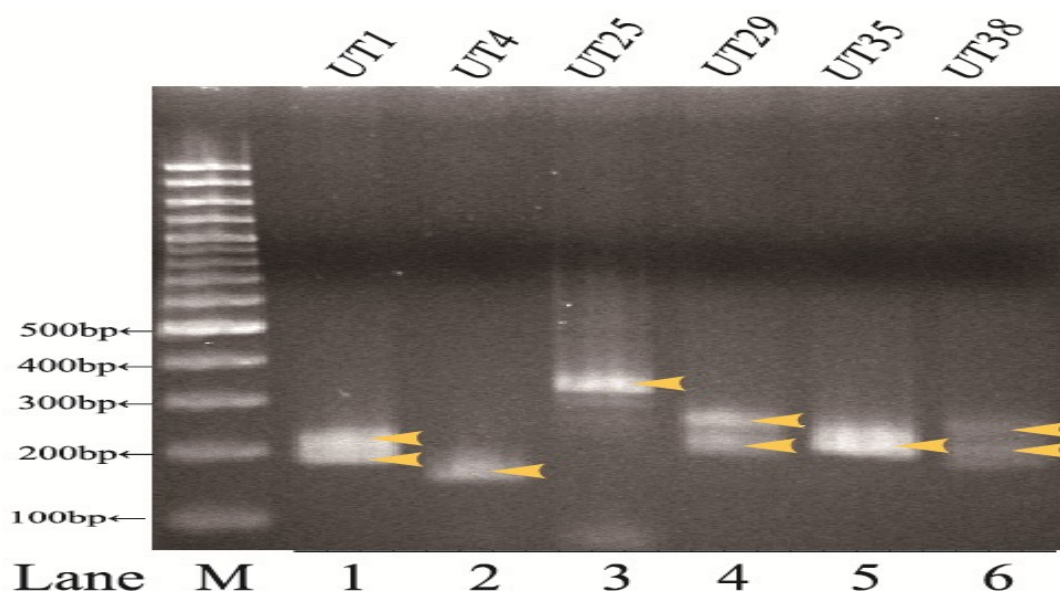


圖 3-4.6、利用圈養台灣黑熊之血液樣本抽出之基因組 DNA，以不帶螢光之經濟型引子進行專一性擴增之 PCR 產物進行 2% 瓊脂膠體電泳分析結果(PCR 反應無添加帶有螢光團之 M13 引子)。Lane M : 100bp marker ; Lane1-6 : UT1、UT4、UT25、UT29、UT35 與 UT38 微衛星基因座之對偶基因。箭頭指示的位置為擴增後預計微衛星基因座之對偶基因之片段長度。

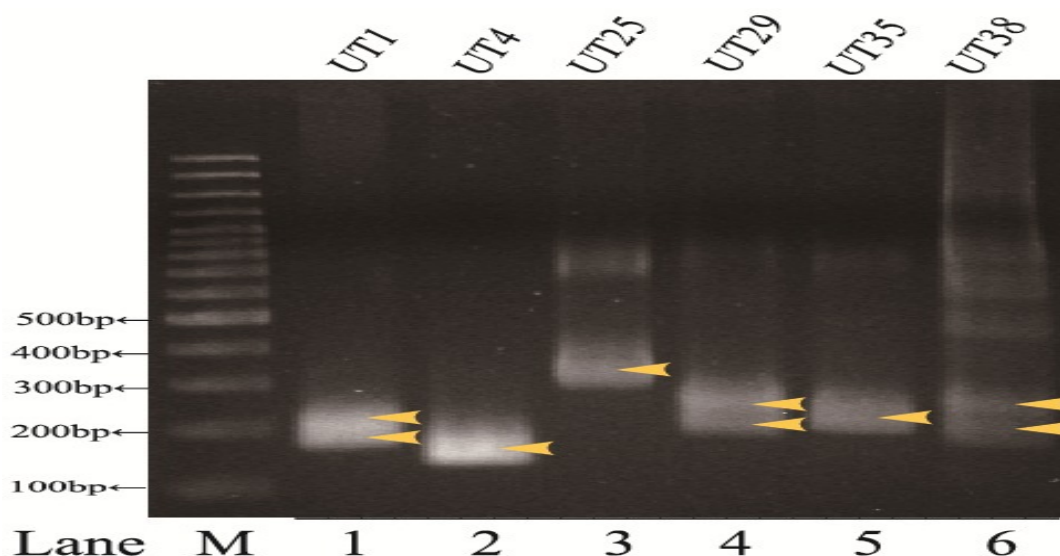


圖 3-4.7、利用圈養台灣黑熊之血液樣本抽出之基因組 DNA，以帶螢光之傳統型引子進行專一性擴增之 PCR 產物進行 2% 瓊脂膠體電泳分析結果(PCR 反應無添加帶有螢光團之 M13 引子)。Lane M : 100bp marker ; Lane1-6 : UT1、UT4、UT25、UT29、UT35 與 UT38 微衛星基因座之對偶基因。箭頭指示的位置為擴增後預計微衛星基因座對偶基因片段長度。

經濟型螢光引子與傳統型螢光引子的毛細管電泳分析如圖 3-4.8 至 13，將圖 3-4.5 與圖 3-4.7 之微衛星基因座擴增後 PCR 產物進行毛細管電泳，以 Peak Scanner 軟體分析後如下，圖 3-4.8 至 3-4.13。

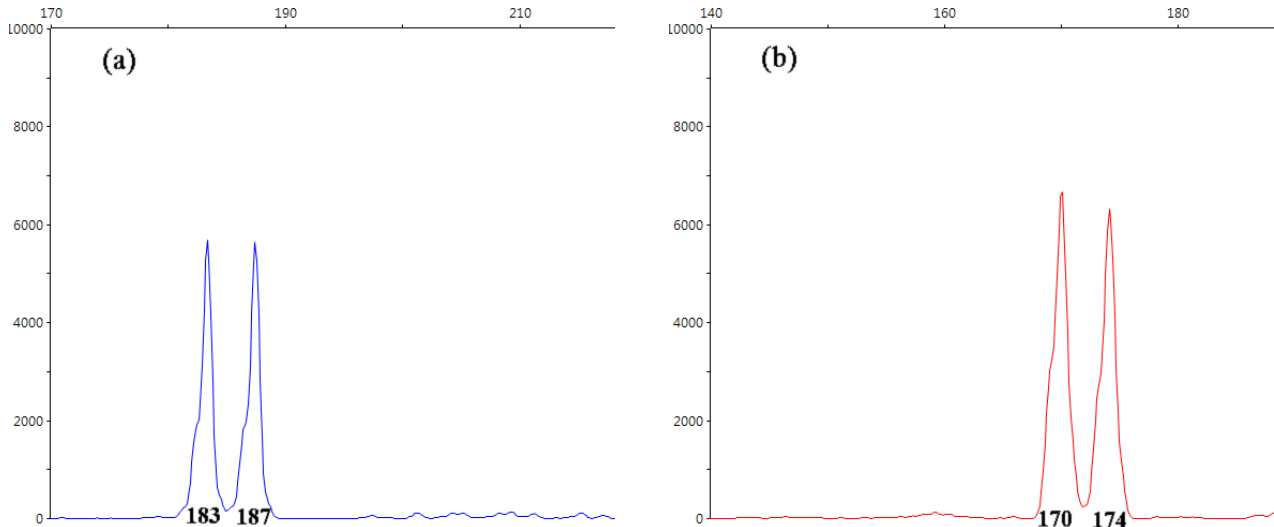


圖 3-4.8、UT1 微衛星基因座之對偶基因型之毛細管電泳分析圖，圖中 X 軸為鹼基對之長度(在毛細管中泳動時間)，Y 軸為螢光訊號強度(Relative fluorescence units, RFU)。(a)：UT1 微衛星基因座之經濟型螢光標記微衛星基因座 PCR 擴增法對偶基因長度與螢光強度；(b)：傳統型螢光引子與新的微衛星基因座擴增平台之對偶基因長度與螢光強度。

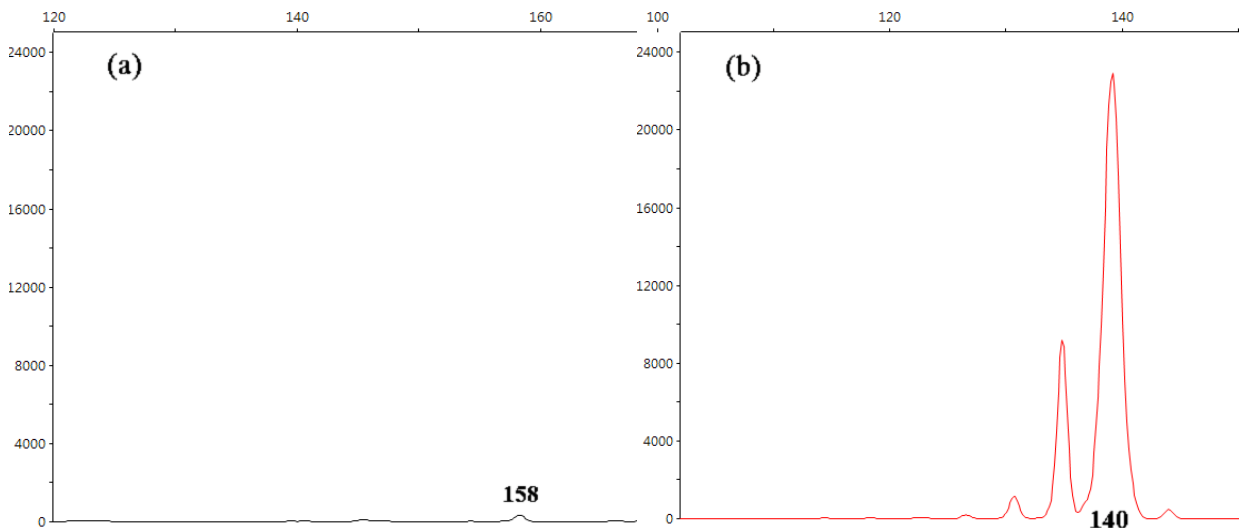


圖 3-4.9、UT4 微衛星基因座之對偶基因型之毛細管電泳分析圖，圖中 X 軸為鹼基對之長度(在毛細管中泳動時間)，Y 軸為螢光訊號強度(Relative fluorescence units, RFU)。(a)：UT4 微衛星基因座之經濟型螢光標記微衛星基因座 PCR 擴增法對偶基因長度與螢光強度；(b)：傳統型螢光引子與新的微衛星基因座擴增平台之對偶基因長度與螢光強度。

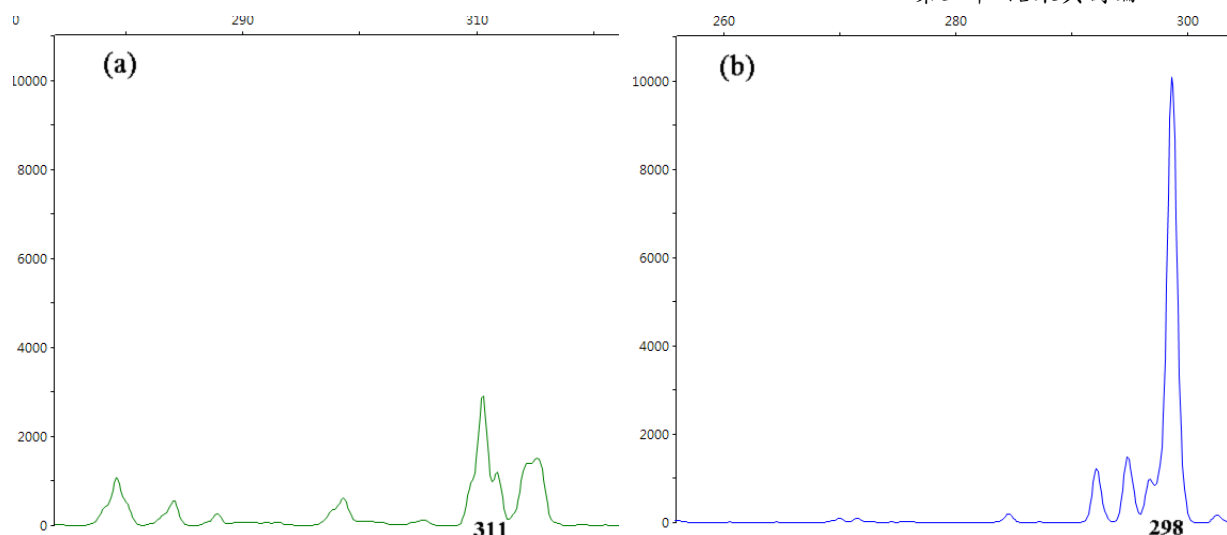


圖 3-4.10、UT25 微衛星基因座之對偶基因型之毛細管電泳分析圖，圖中 X 軸為鹼基對之長度(在毛細管中泳動時間)，Y 軸為訊號強度(Relative fluorescence units, RFU)。(a)：UT25 微衛星基因座之經濟型螢光標記微衛星基因座 PCR 擴增法對偶基因長度與螢光強度；(b)：傳統型螢光引子與新的微衛星基因座擴增平台之對偶基因長度與螢光強度。

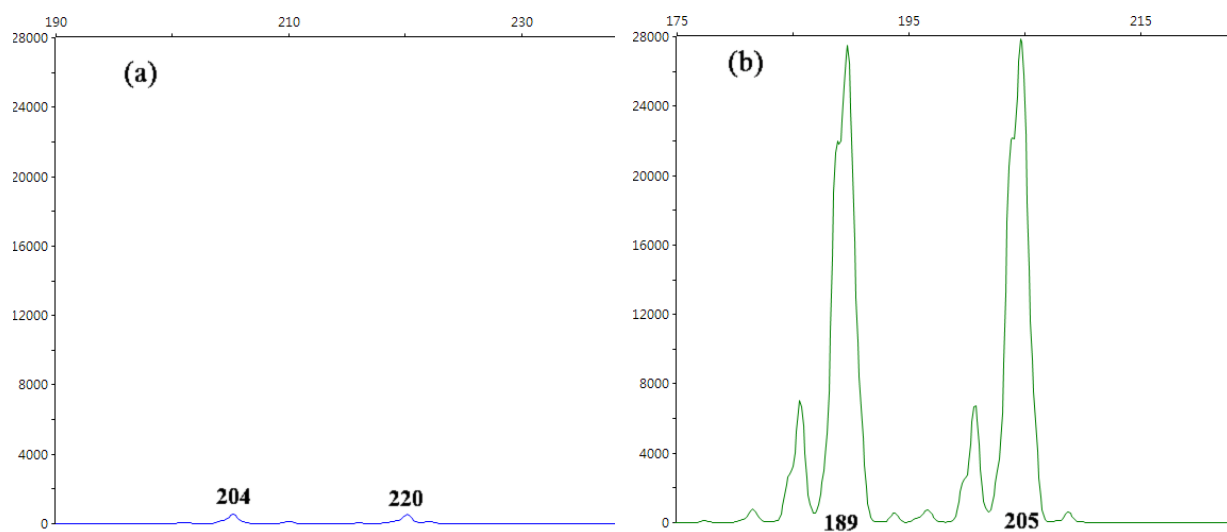


圖 3-4.11、UT29 微衛星基因座之對偶基因型之毛細管電泳分析圖，圖中 X 軸為鹼基對之長度(在毛細管中泳動時間)，Y 軸為訊號強度(Relative fluorescence units, RFU)。(a)：UT29 微衛星基因座之經濟型螢光標記微衛星基因座 PCR 擴增法對偶基因長度與螢光強度；(b)：傳統型螢光引子與新的微衛星基因座擴增平台之對偶基因長度與螢光強度。

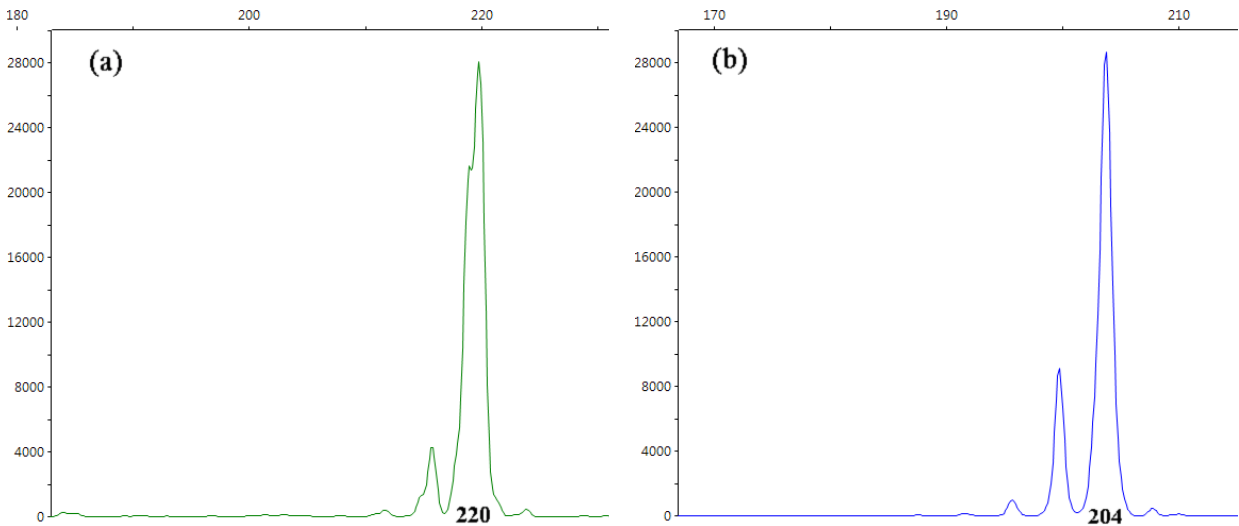


圖 3-4.12、UT35 微衛星基因座之對偶基因型之毛細管電泳分析圖，圖中 X 軸為鹼基對之長度(在毛細管中泳動時間)，Y 軸為訊號強度(Relative fluorescence units, RFU)。 (a)：UT35 微衛星基因座之經濟型螢光標記微衛星基因座 PCR 擴增法對偶基因長度與螢光強度；(b)：傳統型螢光引子與新的微衛星基因座擴增平台之對偶基因長度與螢光強度。

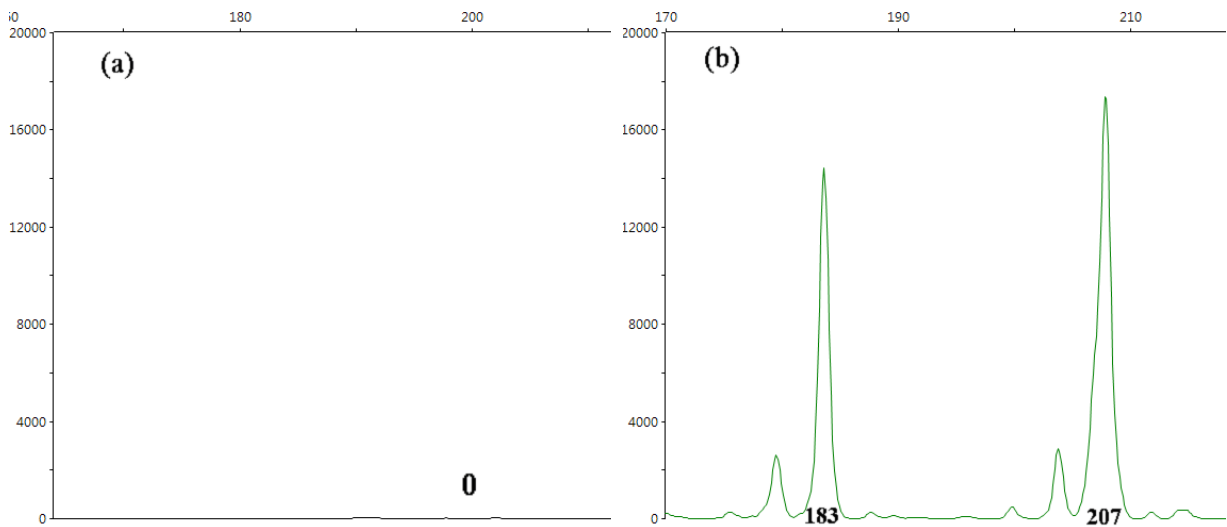


圖 13-4.13、UT38 微衛星基因座之對偶基因型之毛細管電泳分析圖，圖中 X 軸為鹼基對之長度(在毛細管中泳動時間)，Y 軸為訊號強度(Relative fluorescence units, RFU)。 (a)：UT38 微衛星基因座之經濟型螢光標記微衛星基因座 PCR 擴增法對偶基因長度與螢光強度；(b)：傳統型螢光引子與新的微衛星基因座擴增平台之對偶基因長度與螢光強度。

由圖 3-4.8 至 3-4.13 中可看出，微衛星基因座之經濟型螢光標記微衛星基因座 PCR 擴增法與傳統型微衛星基因座擴增平台的結果有以下差異。(1)判讀出的鹼基長度；(2)訊號強度；(3)螢光波形；(4)專一性。經濟型擴增系統因帶有 M13/CAG 序列之故，判讀出的鹼基長度會比新螢光引子長約 13-18 左右。訊號強度方面，經濟型螢光引子中 UT4、UT29、UT38 的訊號弱到難以判讀甚至無法判讀。波形判讀方面也有差距，如經濟型螢光引子 UT25 的主要波峰附近出現其他類似的波形，容易因此而判定為異型合子，但此樣本其實是同型合子。傳統型螢光引子不需另外扣除 M13/CAG 的序列長度，即可得知鹼基的原始長度，且訊號強度皆強，波形也完整，容易判讀，以上皆是此實驗採用傳統型螢光引子進行微衛星基因座分析的原因。

以圈養黑熊之血液樣本測試完成後，則以野外排遺樣本與傳統型微衛星基因座擴增平台進行實驗，以電泳膠確認結果後進行毛細管電泳，列舉出兩個樣本呈現於附錄一。

### (三) 微衛星基因座分析

從 2009 年到 2011 年之已純化的排遺 DNA 樣本中，粒線體 D-loop 序列成功增幅的樣本為 143 個，其中成功判讀 5 個微衛星基因座的樣本為 108 個，經 GeneCap 分析結果總共辨識出 71 個個體(表 3-4.4)。2009 年由於受到大分地區之青剛櫟產量普遍下降的影響，而收集到的黑熊排遺樣本比起其他年度少約 4 倍至 8 倍不等，因此分析的樣本就少，所以只有 4 個樣本成功通過分析，分別為不同的個體。2010 年及 2011 年通過粒線體 D-loop 擴增分析之樣本分別為 83 個及 56 個，但是成功判讀 5 個微衛星基因座的樣本分別為 79 及 25，成功率足足差了兩倍之多，推測原因是 2010 年進行微衛星基因座分析之樣本有經過性別鑑定及粒線體 D-loop 增幅測試的篩選，但 2011 年的分析樣本因時間因素，未及進行性別鑑定分析，只經過粒線體 D-loop 增幅測試之篩選，因此 2010 年進行微衛星基因座分析的排遺 DNA 樣本品質上會優於 2011 年的樣本。

此外，在本次實驗發現 2011 年的排遺 DNA 樣本在微衛星基因座平均增幅失敗率達到 34%，是 2010 年的 7 倍，又 2010 年的 UT25 微衛星基因座增幅失敗率高達六成，是其它基因座的兩倍之多。因此，我們認為本次實驗所使用的套組(Kit)DNA 萃取方法雖然快速，但是在 DNA 品質上不及於過去用的

proteinase K/ phenol/ chloroform 方法(Kocher et al. 1989)，在接下來的實驗，萃取排遺 DNA 的方法上需回歸過去採用 proteinase K/ phenol/ chloroform 方法，並加以調整成適合用在台灣黑熊排遺樣本上，進行排遺 DNA 萃取。

個體鑑別的結果中，2009 年共有 4 個分析微衛星基因座之樣本，皆為不同的個體；而在 2010 年則有 79 個成功判讀微衛星基因座之樣本中，鑑別出 50 個個體，其中有 14 個個體之樣本有重覆獲取的情形。但在 2011 年有 25 個成功判讀微衛星基因座之樣本中，卻鑑別出 23 個個體(表 3-4.4)，只有一個個體之樣本有重覆獲取的情形，幾乎是一個樣本即是一個個體，與 2010 的情況差異甚大。然樣本在先前步驟篩選下，篩去大部分的樣本，像是 2011 年 118 個 DNA 樣本只有 25 個樣本成功進入遺傳多樣性分析(表 3-4.4)。因此潛在的重覆個體之樣本也因此無法進入後序分析，而有一個樣本就有一個個體的情形。

在 2009 年及 2010 年間有一個個體重覆被偵測到，2010 年及 2011 年間則有 5 個個體重覆被偵測到，但在 2009 年及 2011 年間則無重覆個體被偵測到，這三年間亦是。此結果顯示，年間的重覆個體情形似乎沒有一個很高的比率。若不考慮大部份樣本因實驗失敗而被淘汰掉的影響下，台灣黑熊個體在每年的青剛櫟結果季重回到大分地區情形並不常見，可能原因是大分地區周圍潛在的台灣黑熊植物性主食相較下亦有很高的豐富度，因而台灣黑熊在食物利用上並不侷限在大分地區。所以，未必每一隻台灣黑熊都會進入到大分地區。另外，本實驗只經過第一次微衛星基因座分析之獨立實驗，需後續要繼續重覆幾次獨立實驗，避免等位基因缺失(allelic dropout)的情形造成微衛星基因型的誤判，方可有更正確的微衛星基因型判定。

雖然第一次的微衛星基因座分析還未到最精確的結果，但是就只針對這些成功分析的樣本來看，各基因座的多態信息量(PIC)皆大於 0.25(表 3-4.5)，代表各基因座的遺傳訊息多型性是適合做為遺傳多樣性分析。此外，整體的個體鑑別率(P(ID))小於 0.01(表 3-4.5)(Miller et al. 2002)，這代表這組微衛星基因座鑑別力夠，可以用來做族群量估算。但雖說可以做族群量估算，但是在台灣黑熊在野外分群狀況、行為、分布遷移及生活史的資料及各種參數還未齊全的情況下，要做出精確的族群量估算還是有疑慮的。

遺傳多樣性分析的部分，2009年及2011年之成功判讀微衛星基因型的樣本數及個體數過少，不適合進行遺傳多樣性的分析。因此，先進行2010年大分地區台灣黑熊的遺傳多樣性的分析。2010年成功判讀微衛星基因座的樣本共有50個個體，以這50個個體做為遺傳多樣性分析的樣本，結果如表3-4.5，該6個基因座中，最多有12個對偶基因，最少有2個對偶基因，整個平均有6.7個對偶基因。在有效對偶基因方面，指該族群基因座的對偶基因是否分布均勻，理想族群該數值會等於實際對偶基因數。故本研究的數據意味著對偶基因頻率皆相同且均勻分布，其中微衛星基因座UT1及UT35的有效對偶基因數較接近實際對偶基因數，而UT4的有效對偶基因數則明顯低於實際的對偶基因數，但平均有效對偶基因數4.2與平均對偶基因數6.7並沒有明顯差距。

在觀測異質度( $H_O$ )，結果顯示，除了微衛星基因座UT1及UT25以外皆大於0.7，平均是0.701。雖說相較於Paetkau(2003)使用非入侵性族群調查法，利用5-7個基因座調查21個熊類(包括棕熊、美洲黑熊及懶熊)族群的遺傳資訊，遺傳觀測值異質度為 $0.7 < H_O < 0.8$ ，則本研究的觀測值(0.701)介於此其調查範圍內。若比較同種在日本的亞洲黑熊之平均異質度，該研究使用6個基因座檢測所得為0.66 (Saito et al. 2008)。上述與熊類經營管理尚屬健全的日本亞洲黑熊或北美洲之美洲黑熊的初步以字面上的數字比較來看，本研究結果的黑熊觀測異質度顯示，玉山國家公園的台灣黑熊尚維持著較高的歧異度。但是本研究的微衛星基因座組合與國外的是不同的系統，各基因座突變機率各有不同，很難有標準化的比較。因此，若要與國外的黑熊族群做比較，需要用相同的微衛星基因座組合進行分析，方可有系統的比對。

本研究所偵測到的黑熊個體大部分集中於青剛櫟季節活動於大分地區，青剛櫟結果季結束或該區堅果可及度降低之後，便陸續離開此區域。事實上，大部分的這些黑熊個體一年的大部分時間都不在大分地區(Hwang et al 2010)。黑熊季節性利用大分地區，就取樣的大分地區（青剛櫟分布面積約為 $5 \text{ km}^2$ ）而言，表示此族群有明顯遷入及遷出現象，此則違反哈溫平衡定律之封閉族群假定；反之，若以整個玉山國家公園範圍為族群活動的空間，這也是無線電追蹤的實際情況，則不見得有違此定律，這應該也是較有意義的族群定義。另有學者指出台灣黑熊繁殖期為2-7月(楊吉宗等 2006)，然此時原本可能季節性聚集於大分地區則已返回其一般的活動範圍(Hwang et al 2010)。如果這些個體在不

同地方繁殖，那怕非繁殖季暫時性地聚集一處，則來自不同區域的個體間仍可能存在著地理上遺傳分化的差異。因此，野外台灣黑熊分群狀況尚未明朗情況下，本研究結果的黑熊觀測異質度可能有高估或是低估的情形。

$F_{IS}$  值代表一個族群的近親交配程度，數值若大於 0，則代表有近親交配，小於 0 則代表遠親交配，等於或接近 0 的話，則就表示隨機交配，本研究結果各微衛星基因座之  $F_{IS}$  值偏低且接近 0，所以整體來看是接近 0 的，代表玉山國家台灣黑熊族群是接近隨機交配的狀態。此外，哈溫平衡檢測的結果雖然各微衛星基因座之  $p$  值(費氏精確檢驗法，95%的信賴區間)差異甚大，但整體來看是顯著偏離哈溫平衡的。符合哈溫平衡的定義是：在一個封閉(無遷入遷出)且夠大的族群中，個體間隨機交配，基因型頻率在每一世代皆相等，若偏離哈溫平衡則代表此族群為非隨機交配或有個體遷入遷出的可能，但是華倫德效應(Wahlund effect)的發生也有可能造成判定哈溫平衡有誤的可能。華倫德效應是說明一個大族群下分有多個亞族群，每個亞族群各有不同的對偶基因頻率，即使各亞族群符合哈溫平衡，但合併統計之後異質度下降，顯示為偏離哈溫平衡。

早期的無線電追蹤資料顯示，黑熊個體離開大分之後，有四散分別往東或往西的趨勢，二邊的個體活動範圍除大分地區之外並無重疊(Hwang et al. 2010)，故繁殖季或許應鮮有接觸的機會。若就此情況來看，華倫德效應的確可能存在，而且也可能違反哈溫平衡之隨機交配假定。然由於國內目前缺乏多年長期追蹤黑熊個體的資料，個體跨年度的移動資訊不足，且樣本數有限，因此除非增進此方面資訊的收集，或增加大分以外區域黑熊遺傳資訊的建構，否則台灣的黑熊並沒有詳細資料可以佐證。因此，本研究亦建議對於台灣黑熊是否會因生殖隔離(isolating mechanism)，而造成亞族群的產生，也是未來值得深入探討的方向。



表 3-4.4、2009 年 10 月到 2012 年 2 月的台灣黑熊排遺 DNA 微衛星基因座增幅後，第一次毛細管電泳分析的初步結果。

	2009	2010	2011	總計
已純化 DNA 樣本數	17	176	118	311
已經過性別鑑定的篩選	4	95	-- <sup>a</sup>	
D-loop 序列增幅成功樣本數	4	83	56	143
微衛星基因座判讀成功樣本數 <sup>b</sup>	4	59	21	84
判別個體數(重複個體數) <sup>c</sup>	4(0)	50(14)	23(1)	71
前年重複出現之個體數		1	5	

<sup>a</sup> 未進行該項檢定。<sup>b</sup> 成功判讀 5 個以上微衛星基因座的個體。<sup>c</sup> 該年有相重覆的個體之個體數。

表 3-4.5、大分地區台灣黑熊排遺樣本（2010 年 10 月至 2011 年 2 月）之個微衛星基因歧異度。Locus：基因座；N：判別成功樣本數；k：對偶基因數目；Ne：有效對偶基因數；H<sub>o</sub>：觀測異質度；H<sub>e</sub>：理論異質度；PIC：多態信息量；P(ID)：個體鑑別率；F<sub>IS</sub>：近親交配指數，Inbreeding coefficient；HW：哈溫平衡顯著性(P-value)。

Locus	N	k	Ne	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	PIC	P(ID)	F <sub>IS</sub>	HW
UT1	35	2	1.9	0.543	0.481	0.362	0.387	-0.131	0.494
UT4	41	12	4.4	0.78	0.781	0.745	0.081	0.001	*** <0.001
UT25	39	5	2.9	0.615	0.658	0.599	0.166	0.065	0.534
UT29	36	7	5.0	0.833	0.813	0.773	0.069	-0.025	** 0.008
UT35	40	6	5.1	0.775	0.812	0.773	0.067	0.047	* 0.022
UT38	41	8	5.2	0.78	0.818	0.782	0.061	0.046	0.645
平均	47.7	6.7	4.2	0.701	0.723	0.675		0.026	
總和							1.29×10 <sup>-6</sup>		0.0005***

\*\*\*P-value < 0.001。 \*\*P-value < 0.01。 \*P-value < 0.05。



## 第四章 結論與建議

### 第一節 結論

2011 年青剛櫟果實的估計生產總量(包括完整果和受損果)為 30.5 顆/m<sup>2</sup>，從調查樣帶的角度來看，各樣線每個種子陷阱的集果量沒有顯著差異。從 2006 ~2011 年間，果實產量在年間有所差異，其中以 2008 年為 61 顆/m<sup>2</sup> 最高，2006 年和 2009 年為 28 顆/m<sup>2</sup>、21 顆/m<sup>2</sup> 最低。

若假設大分地區青剛櫟分布及落果皆為均勻的情況，樣區約 5 km<sup>2</sup>，當在青剛櫟盛產時(累計落果量 61 顆/m<sup>2</sup>，2008 年)，青剛櫟總產量為 30,500 萬顆生產量高達 442.25 公噸；若以最低產量年(2009，21 顆/m<sup>2</sup>)來看，則整體產量約為 152.25 公噸。這些食物相當於可以滿足一隻熊 85,222-247,551 天的活動維生所需的代謝能。此顯示顯示大分櫟實所提供的食物資源對黑熊或其他野生動物都有舉足輕重的角色。

熊毛陷阱陷阱的逐年調查顯示，大分地區於青剛櫟結果季時，黑熊的活動狀況(包括出現時間和數量)雖受該季結果狀況左右，但也受外圍地區食物資源的豐度影響。例如，今年大分以外的東部園區值鬼櫟盛產，研究者於十月便發現許多黑熊爬樹取食櫟實的記錄；反之，即至 11 月，大分仍僅發現零星的熊痕跡。2011 年大分地區發現熊毛的陷阱比例為 25.8%(各月 12-47%)，但同時期仍可於大分以外的地區發現黑熊觸動熊毛陷阱的情況，唯比例較低，且月間的變化較大，可見仍有相當比例的個體廣泛地活動於大分以外的園區範圍。

為預測大分地區青剛櫟的結果週期動態，本研究發現迄今累積的六年的監測資料仍無法建立可靠的時間序列模式。一般建議此類計畫為期 20-30 年的持續監測，因此建議持續的資料收集。另由於二種目視法和種子陷阱的櫟實結果量估算呈顯著相關，因此後續的持續監測可考量利用簡易的方式從事之。

野外黑熊排遺 DNA 萃取純化步驟，建議先判定排遺新鮮程度，再來需通過粒線體 DNA 純化與核 DNA 公母鑑別，以提高微衛星基因座 PCR 擴增成功率。野外黑熊排遺 DNA 微衛星多型性較不適合以含 M13/CAG 與無螢光標定專一性引子(經濟型，含三種引子)進行研究分析。本研究所利用之 6 個微衛星 DNA 標記，分析野外台灣黑熊具多型性資訊，適合進行分析野外台灣黑熊族群遺傳研究。玉山分區台灣黑熊族群仍具遺傳多樣性，唯較精確族群數量估

算仍需累積更多遺傳、行為、分布遷移與生活史研究資料。

## 第二節 建議

1. 本研究受限於調查的環境因素資料及時間長度不足，尚無法對結果狀況的年間變化進行充分的詮釋，故建議持續長期的監測（一般建議 20-30 年），並加強氣候條件的掌握，以期深入瞭解結果週期及機制。
2. 除了大分地區之外，園區內重要的黑熊食物資源的分布和豐度，以及各種潛在人為干擾的持續性監測皆是瞭解黑熊活動，或甚人熊衝突的關鍵因素，建議強化大尺度的跨域或跨學科之整合研究。
3. 由於持續性的氣象資料因人為疏失，而導致樣區監測性的數據遺漏，對於欲長期觀察樣區的季節性及年間氣象變化，實在遺憾。由於氣象站所用之記憶卡能存取約 1 年半的資料，故只需固定半年或一年前往樣區進行更換。因此，本研究建議後續能由在該區從事研究的特定團隊或適當人選進行記憶卡存取的工作，並同時節省人事成本。
4. 玉山分區台灣黑熊族群仍具遺傳多樣性，唯較精確族群數量估算仍需累積更多遺傳、行為、分布遷移與生活史研究資料。為此，利用人造衛星之無線電追蹤系統進一步瞭解個體的移動行為和活動範圍，以深入解釋遺傳資訊所代表的生態意涵。
5. 本研究因為目前只完成第一次微衛星基因座分析獨立實驗，為了避免等位基因遺漏(allelic dropout)及假性等位基因(false allele)造成誤判基因型及假性個體的機會，需要經過二次以上的獨立實驗後，方可較明確地確認基因型。一旦基因型確認後，持續進行遺傳資訊的分析，如等位基因數目、觀察及理論異質度( $H_o$  and  $H_c$ )、多態信息量(PIC)、近親交配指數( $F_{IS}$ )等。
6. 野外黑熊排遺 DNA 微衛星基因座 PCR 擴增與分析平台已建立，建議繼續驗證 2008 年資料與持續大分地區未來黑熊族群遺傳品質監控。藉由整合這些多年累積的遺傳分析結果，以期進行年間及大尺度的深入探討，對於園區台灣黑熊族群之遺傳，以及之於大分地區の利用，將能提供寶貴的資訊。  
本研究利用過去研究者所發表的 10 組微衛星基因座中的 6 組進行聚合酶反應，建議持續完成野外黑熊排遺 DNA 其他 4 組微衛星基因座分析，以增加排遺樣本個體辨識與分群正確性。

## 謝 誌

本研究承蒙內政部營建署玉山國家公園管理處長期提供經費補助及各項行政上的協助，以及王穎、楊吉宗委員對於本研究提供諸多寶貴建議。野外繁重調查工作特別感謝陳邦光、秦庭妮、陳昇衛、賴智恩、蔡蕙雯、陳正忠、魯增勇、黃鏗達、李文瑄、白欽源、陳詩佳、陳常鈞、黃秉鈞、彭漢華等人之熱情協助。此外，遺傳分析亦感謝 台灣大學朱有田副教授研究室之研究生和助理們(李一泓、黃瀨瑩、龔明祥、李冠逸、洪千翊、張郁琦)，以及屏科大翁國精博士和錢曉薇等人，撥冗協助指導相關遺傳樣本的分析技術，以及資料的分析和詮釋；感謝中央研究院國家基因體研究中心提供毛細管電泳分析的幫忙。另感謝潘怡如小姐對種子陷阱所收集的青剛櫟果實進行持續的分類和分析，以及林宜靜博士協助相關資料的分析，並提供寶貴意見。

### 附錄一、大分地區野外台灣黑熊排遺樣本 DNA，經傳統擴增系統 微衛星基因座增幅之毛細管電泳波型圖

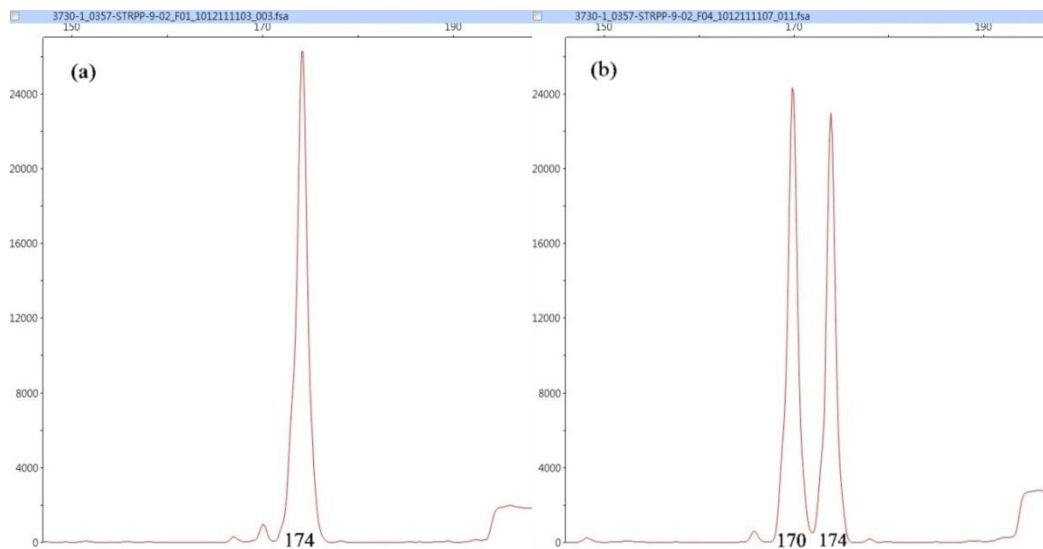


圖 A-1、UT1 微衛星基因座之對偶基因型之毛細管電泳分析圖，圖中 X 軸為鹼基對之長度(在毛細管中泳動時間)，Y 軸為訊號強度(Relative fluorescence units, RFU)。(a)：2010 年 12 月台灣黑熊野外排遺樣本，編號 1103。(b)：2010 年 12 月台灣黑熊野外排遺樣本，編號 1107。

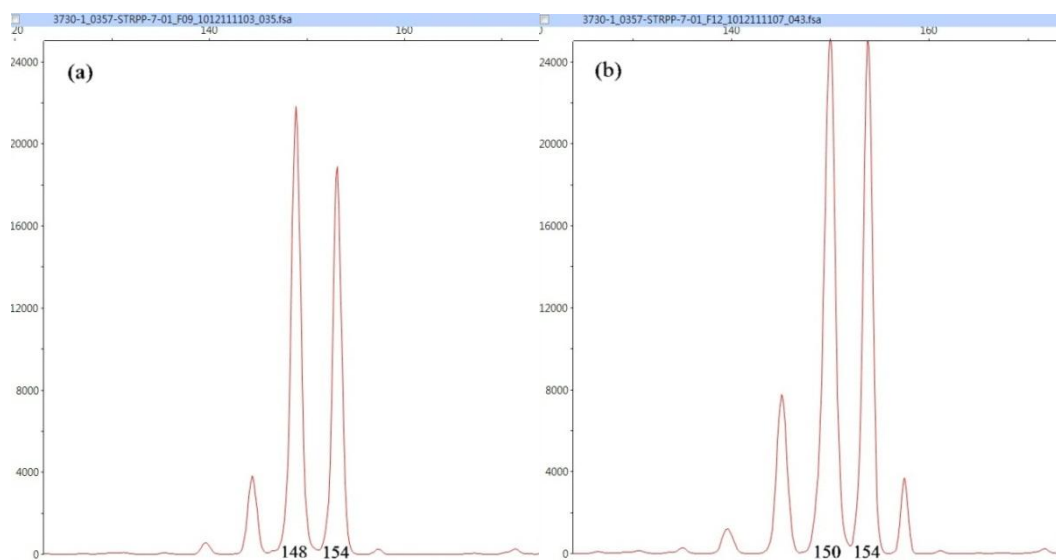


圖 A-2、UT4 微衛星基因座之對偶基因型之毛細管電泳分析圖，圖中 X 軸為鹼基對之長度(在毛細管中泳動時間)，Y 軸為訊號強度(Relative fluorescence units, RFU)。(a)：2010 年 12 月台灣黑熊野外排遺樣本，編號 1103。(b)：2010 年 12 月台灣黑熊野外排遺樣本，編號 1107。

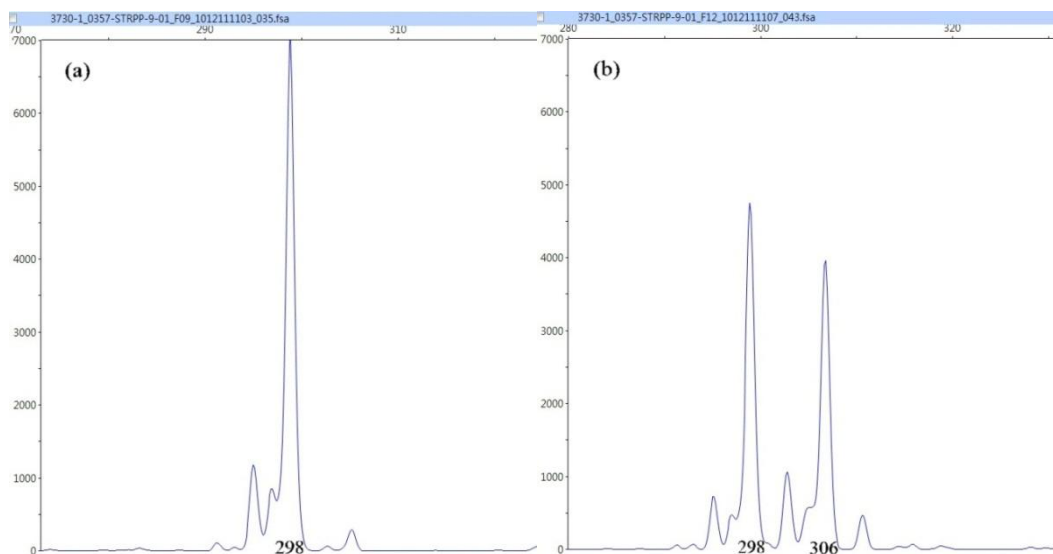


圖 A-3、UT25 微衛星基因座之對偶基因型之毛細管電泳分析圖，圖中 X 軸為鹼基對之長度(在毛細管中泳動時間)，Y 軸為訊號強度(Relative fluorescence units, RFU)。(a)：2010 年 12 月台灣黑熊野外排遺樣本，編號 1103。(b)：2010 年 12 月台灣黑熊野外排遺樣本，編號 1107。

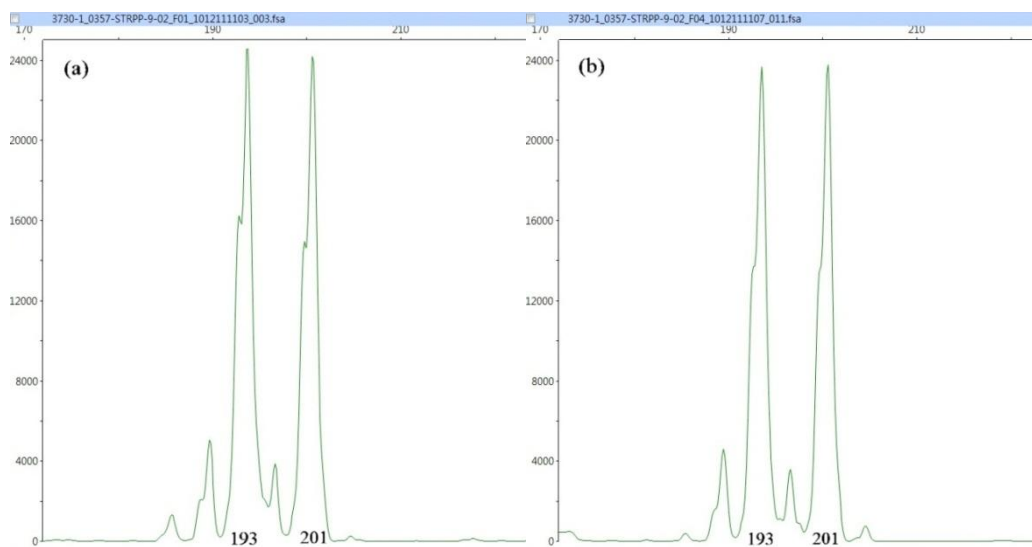


圖 A-4、UT29 微衛星基因座之對偶基因型之毛細管電泳分析圖，圖中 X 軸為鹼基對之長度(在毛細管中泳動時間)，Y 軸為訊號強度(Relative fluorescence units, RFU)。(a)：2010 年 12 月台灣黑熊野外排遺樣本，編號 1103。(b)：2010 年 12 月台灣黑熊野外排遺樣本，編號 1107。

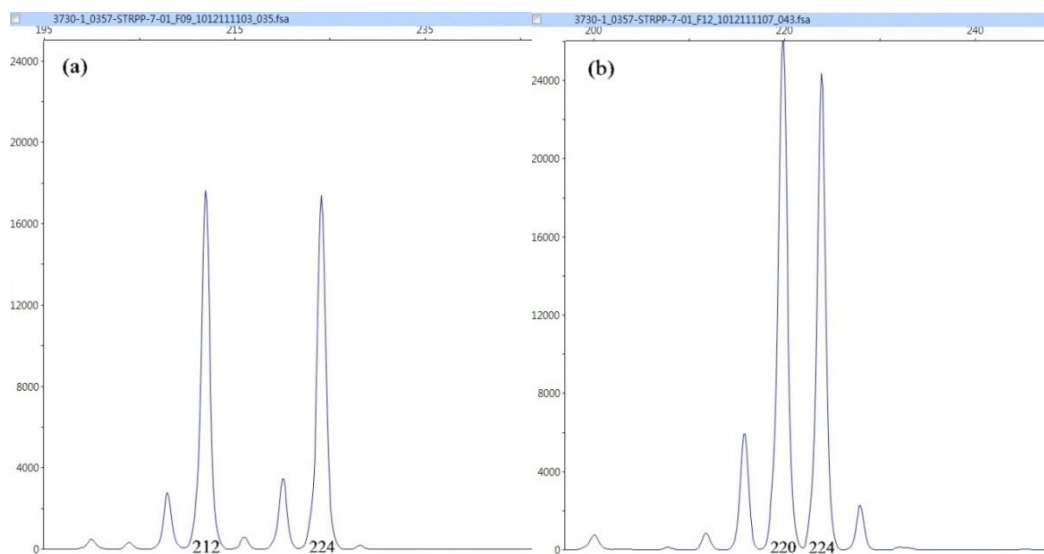


圖 A-5、UT35 微衛星基因座之對偶基因型之毛細管電泳分析圖，圖中 X 軸為鹼基對之長度(在毛細管中泳動時間)，Y 軸為訊號強度(Relative fluorescence units, RFU)。(a)：2010 年 12 月台灣黑熊野外排遺樣本，編號 1103。(b)：2010 年 12 月台灣黑熊野外排遺樣本，編號 1107。

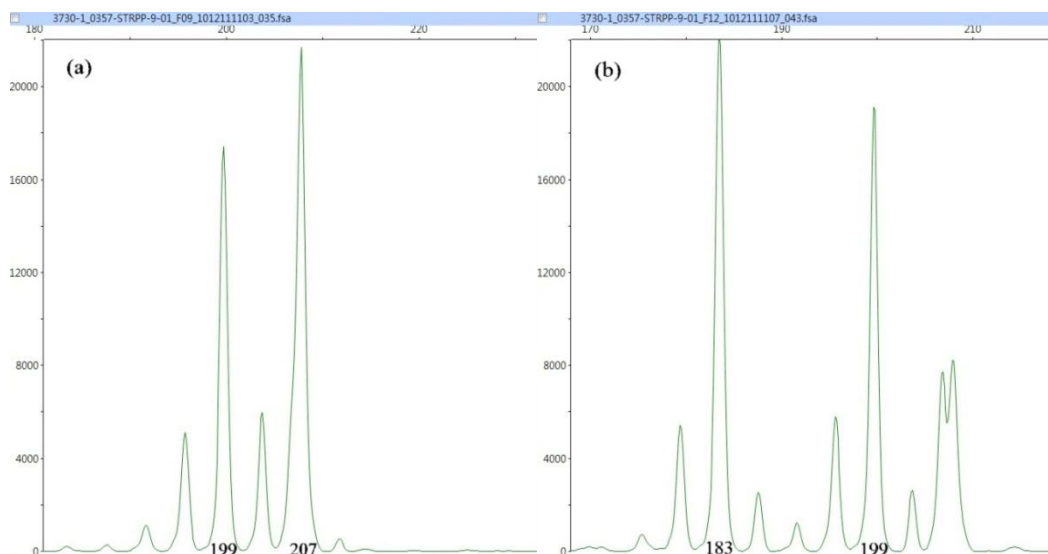


圖 A-6、UT38 微衛星基因座之對偶基因型之毛細管電泳分析圖，圖中 X 軸為鹼基對之長度(在毛細管中泳動時間)，Y 軸為訊號強度(Relative fluorescence units, RFU)。(a)：2010 年 12 月台灣黑熊野外排遺樣本，編號 1103。(b)：2010 年 12 月台灣黑熊野外排遺樣本，編號 1107。



## 附錄二、「玉山國家公園台灣黑熊族群生態及遺傳狀況評估研究(3/4)」委託研究計畫採購案評選會議紀錄

一、會議時間：101 年 1 月 31 日下午 14 時 30 分

二、評選地點：本處 1 樓多功能教室

三、主持人：吳副處長祥堅

記錄：賴佳儀

四、評選單位及人員：詳簽到簿

五、列席單位及人員：

(一)本處本案工作小組：賴佳儀(代表)

(二)參評廠商：

國立屏東科技大學：黃教授美秀(計畫主持人)

六、評選會議議程報告：本處保育研究課(略)

七、評選委員會之組成、協助評選之人員及其工作事項：

(一)本案評選(審)委員會計有 5 人，委員應到人數 5 人，實到人數 5 人，符合政府採購法「採購評選委員會審議規則」第 9 條(略)：「本委員會會議之決議，應有委員總額二分之一以上出席」之規定，另出席委員中之外聘專家、學者實到 2 人，亦符合同條項(略)：「出席委員中之外聘專家、學者人數應至少二人，且不得少於出席委員人數三分之一」之規定。準此，本次評選委員出席已符合採購法規定，依法召開評選會會議。

(二)本案依「採購評選委員會組織準則」成立評選委員會，由本處保育研究課負責評選會組成、評選方式說明、評選統計、評選紀錄等事宜，行政室負責評選會資格審查、100 年 12 月 28 日辦理第 1 次公告限制性招標取得書面報價及服務建議書，101 年 1 月 10 日截止收件，計 1 家廠商(國立屏東科技大學)投標。

(三)本案投標廠商，經查行政院公共工程委員會網站，非屬拒絕往來廠商。經檢查廠商投標文件，其將證件封及服務建議書乙式 10 份裝入封套密封，並於封套外部清楚標示採購標的名稱，符合投標須知第二十二項之規定。

(四)經檢查證件封內證明文件數量、種類及服務建議書份數，廠商資格符合投標須知第十九點「投標廠商資格條件及應備之證明文件」，並經與會人員確認。

(五)經資格審查結果，國立屏東科技大學資格符合。

(六)101 年 1 月 17 日召開本案評選工作小組會議，就投標廠商之服務建議書擬具初

審意見，並於 1 月 31 日本案評選委員會議當場執交各委員參考。

#### 八、委員評選意見之紀錄：

- (一)本年度為為 4 年計畫之第 3 年，工作規劃詳盡，不僅針對核心區並擴充其他樣區點，工作團隊相當盡力。
- (二)服務建議書內容於計畫工作項目之序號錯亂，且欠缺 2010 年資料(P.9)、預期成果誤將 2011 年列為今年度(P.17)及預定進度甘梯圖缺二個項目之說明(P.18)，請修正。
- (三)2008 年已利用 Microsatellite PCR 鑑定 100 隻台灣黑熊個體，關於 2009~2011 年之樣本其數量、重要個體數等數據是否已做分析？建議分析後可與 2008 年樣本分析作比對是否有重複並做族群估算，對於今年及往後實驗設計有相當幫助。
- (四)服務建議書內文提到「遺傳資料庫」，係指遺傳物質基礎資料或遺傳資訊？可在服務建議書或報告書內解釋說明。
- (五)關於台灣黑熊遺傳資料分析，建議可藉由大分區域(小尺度)的遺傳多樣性與全島(大尺度)的樣本作分析比較得知台灣黑熊遺傳多樣性及遺傳組成等，俾利推測台灣黑熊於大分或全島之族群生態狀況。
- (六)因野外蒐集樣本不易，建議將已蒐集樣本儘可能作遺傳分析資料並可將 2008 年 100 隻台灣黑熊 microsatellite 資料作 assignment test。
- (七)建議將歷年來於玉管處園區內研究調查資料轉換利用做為宣導保育成果之推廣，俾利本處對於環境教育解說之題材。
- (八)本案如獲得標，請依上述評選意見，修正計畫建議書。

#### 九、評選結果：

- (一)各出席評審委員所核給參與評審廠商，得分皆超過 70 分，1 號廠商國立屏東科技大學經評審結果，平均得分 82.6 分最高且序位第 1 並經評審委員會過半數之同意，取得優先議價權，簽奉處長或代理人核示後，辦理後續事宜。
- (二)本案之評選評比表及評選委員聲明書密封後併本紀錄存檔。

#### 十、散會：15 時 50 分。

#### 對於審查意見與會議決議之回應及辦理情形

- (一)遵照辦理

(二)遵照辦理

(三) 關於 2009 年～2011 年之樣本其數量、重覆個體數等數據已做分析，並已呈現在這次的研究報告中。在接下來的一年，會將四年（2008 年～2011 年）的大分台灣黑熊樣本及個體做一個整合，將會在明年的期末報告中呈現。

(四) 服務建議書內文提到的「遺傳資料庫」係指目前所有樣本分析的微衛星基因座，整合其基因型之原始資料所建立的野外台灣黑熊族群遺傳資料庫。這遺傳資料庫若健全地發展下去，其功能有：鑑別個體的種源（是否是台灣黑熊）、更能精確鑑別個體、親子鑑定等

(五) 分析全島的野外台灣黑熊族群之遺傳資訊，這部分一直是我們想去努力並去了解的地方，由於礙於人力以及經費上的限制，一直無法找到適當的時機著手進行。但我們會盡可能的尋找一切的辦法以及協助，評估過可行性之後視情況執行。

(六) 由於 2008 年分析的樣本所採用的微衛星基因座擴增法是經濟型擴增系統，在這次的研究報告有提到，經濟型擴增系統成功率與實驗再現性都比我們現在用的傳統型擴增系統都還來的低。因此我們會針對 2008 年的原始資料重新評估，篩選出可信的數據後，進行四年的資料統整，到時會有更完整的遺傳資料庫資料，以利分派檢定（assignment test）的準確性。

(七)遵照辦理，將盡力配合玉管處之需求。

(八)遵照辦理

### 附錄三、「玉山國家公園台灣黑熊族群生態及遺傳狀況評估研究(3/4)」委託研究案期中審查會議紀錄

一、時間：中華民國 101 年 7 月 3 日(星期二)下午 3 時 30 分

二、地點：本處 3 樓第 1 會議室

三、主持人：游處長登良

四、列席單位及人員：詳附件

五、承辦單位報告：略

六、受託機構報告：國立屏東科技大學(黃副教授美秀)略

七、審查意見：

- (一)建議能進一步呈現落果物候青剛櫟果實量與黑熊痕跡量化之歷年資料相關性，以推論青剛櫟之果實量與大分地區黑熊活動量長期的關係。
- (二)關於遺傳分析之技術 D-loop 與 Microsatellite 是否同時針對所有樣本進行分析宜作評估。
- (三)建議整理目前已萃取之各年度的 DNA 樣本數，根據已建立方法，進行遺傳變異的分析。
- (四)建議在報告中應將 D-loop 分析之完整序列例示列出來，以增加結果之說服力。
- (五)期中報告內第 15 頁所述利用毛髮樣品萃取 DNA 之方法，可能造成大部份 DNA 的喪失，如何改善建議宜斟酌。
- (六)期中報告內第 29 頁圖 3-4.1，如果如口頭報告所言，若以粘合溫度 56°C 為適當，建議須再考量，其尚有多條雜 bands 存在，可能會影響分析結果之準確度。

八、審查結論：

- (一)審查會議經出席委員之審查及本處業務單位之查核，本計畫之工作進度及項目，與委託案契約書所訂相符，期中審查通過。請依契約書之規定，函送前期款的經費核銷資料辦理第二期款撥付事宜。
- (二)請計畫執行單位就審查意見，於契約書工作要求範圍內作必要之補充及修正，並就上述各項意見提出對應之處理情形，列表納入期末報

告書之附錄中。

九、散會(下午 4 時 45 分)

### 對於審查意見與會議決議之回應及辦理情形

- (一) 遵照辦理，將於期末報告中提出成果報告
- (二) 由於拾獲台灣黑熊排遺之野外樣本新鮮程度不同，雜質隨食性而異，抽取純化 DNA 品質不一。為驗證台灣黑熊排遺萃取 DNA 的品質，提高微衛星基因座擴增成功率。粒線體 D-loop 序列與性別鑑定基因之擴增成功與否提供第一階段樣本篩選，淘汰掉可能非黑熊排遺樣本及 DNA 品質低劣的樣本，以減少分析微衛星基因座上不必要的浪費。此外，將樣本的 D-loop 序列進行基因單套型分析，可以做為台灣遺傳分析與個體鑑別的重要輔佐資料。
- (三) 今年度依據過去經驗，已將抽取 DNA 的方法、微衛星引子螢光標記方式、PCR 擴增條件與目前以萃取純化 2010 與 2011 年排遺樣本，分別為 176 個與 118 個。2010 年樣本已做完粒線體 D-loop 序列分析(83 個成功)與性別鑑定(95 個成功);2011 年樣本已做完 D-loop 序列分析(56 個成功)，但未作性別鑑定。將這兩年共 139 個樣本進行 6 個微衛星基因座擴增與基因型分析、Polymorphism information content (PIC)、observed heterozygosity ( $H_O$ )、expected heterozygosity ( $H_E$ )、effective allele number、 $F_{IS}$  與驗證 Hardy-Weinberg equilibrium 結果列於表 3-4.5。
- (四) 請詳閱本報告之圖 3-4.4，該樣本為分析的其中一大分台灣黑熊 Forward 端 D-loop 序列，約 631 個鹼基對。
- (五) 以毛囊萃取 DNA 所獲得的基因組 genomic DNA 量會相當少，若經過 silicon 純化會喪失更多 DNA。目前所用的方法應是相對上較可靠的方法，唯 DNA 沈澱時可會失去更多 DNA。故修改 DNA 沈澱步驟為：以與作用體積等量的 isopropanol 取代 2 倍量絕對酒精沈澱，其中加入 0.5-1 g/mL glycogen 增加沈澱效果。
- (六) 期中報告 29 頁所顯示的結果為 D-loop 序列經 PCR 擴增 40 個 cycle 的結果。再結果 56、59 與 62°C 黏合溫度會產生非專一性雜訊。判斷原因有三：(1)排遺 DNA(模版)濃度太高；(2)cycle 太多；(3)引子專一性不夠。改善

方式：(1)可嘗試加入不同濃度的 formamide，增加引子專一性；(2)降低排遺 DNA 濃度；(3)降低 PCR cycle 數。因每份野外排遺所能萃取出 DNA 濃度與純度皆不盡相同，且排遺 DNA 濃度低，目標模版濃度無法確定，故無法以 OD 吸光值的獲得可靠 DNA 濃度。未來將第一次 D-loop PCR 的結果為參考標準決定第二次 PCR 的模板 DNA 使用量，並降低 PCR cycle 數，同時酌加 formamide 增加專一性。

## 附錄四、「玉山國家公園台灣黑熊族群生態及遺傳狀況評估研究(3/4)」委託研究計畫期末審查會議紀錄

一、時間：中華民國101年12月17日(星期一)下午15時30分

二、地點：本處3樓第1會議室

三、主持人：游處長登良

四、列席單位及人員：

(一)本案受託單位及人員：國立屏東科技大學黃教授美秀(主持人)

(二)本處參加人員：詳簽到簿影本

六、委託機構(國立屏東科技大學黃教授美秀)簡報：(略)

七、審查意見：

(一)遺傳分析中提到近親交配指數，其中不同Locus有相當差異，關於指數差異多少值得堪憂？

(二)青剛櫟產量可維持黑熊隻數，其計算源自代謝能及總能之計算，再行推估是否有高估或低估的情況。又其四個月內可滿足700~2050隻黑熊所需，建議討論時多加以說明。

(三)各年判別台灣黑熊個體數其中重複比率如何？亦有說明或可根據以往繫放資料進行探討又未來另增加4個Locus之分析，對現有個體判別效率如何？是否能提出成本效益分析

(四)研究內文以“1km”表示樣帶，或可用面積表示

(五)本區有無其他之櫟種，其相對重要性如何，宜有說明

(六)青剛櫟果實產量與自動相機資料如有，宜作比較。

(七)99年度所辨識100隻不同黑熊個體，關於本次試驗採用排遺DNA套組(KIT)鑑定其數量是否具差異。未來是否可確定採用此種遺傳分析方法(排遺DNA套組(KIT)方法)分析台灣黑熊遺傳多樣性？

八、審查結論：

(一)請將評選會議、期中審查會議之審查意見列表納入該報告書之附錄中，建請補充修正之，並請將上述審查意見及辦理情形製表納入期末報告書之附錄中。

- (二) 審查會議經出席委員之審查及本處業務單位之查核，本計畫之工作進度及項目，與委託研究計畫契約書所訂相符，期末審查通過。
- (三) 依照本處結案報告所提供相關封面及範例等格式內容，製作與撰寫正式報告書，並依契約書之規定，函送正式報告書100份與全文電腦檔光碟10份（含依「國家公園學報稿約格式」之論文1篇），連同各期款的經費核銷資料（詳如契約書之附件1），送本處審查後辦理結案、撥付餘款相關事宜。

九、散會：(下午 5 時 30)

### 對於審查意見與會議決議之回應及辦理情形

- (一) 以單一個遺傳標記觀察一個族群有無嚴重的近親交配現象是不夠的，往往會以多種遺傳標記整合來看，由於每個基因座的突變速率不盡相同，未必所有基因座的異質度在隨機交配的族群中都是高的，所以要以多個遺傳標記去分析，以整體的數值來看會比較可信。
- (二) 遵照辦理，並且針對專業語彙可能產生誤解的部份，進一步解釋說明。
- (三) 年間重覆採集的個體之個體比率頗低，2010年與2011年間只有5隻個體重覆，已過去的系放資料似乎某種程度也符合此年間低重複個體比率。此外，外來再增加4個基因座的分析是為了增加分派檢定的精確性，未來可以找出最符合鑑別度高且經濟的微衛星基因做組合。
- (四) 遵照辦理，已於內文中做說明。
- (五) 園區的植物相調查過去已委託專人調查，堅果種類繁多。不同的種類於分布和豐度上不盡相同，年間的結果狀況變動也很大，但尚無大尺度的調查資料，而台灣黑熊的利用程度似乎也有所差異。在園區，黑熊常見會取食的種類，常見的除青剛櫟之外，尚有鬼櫟、狹葉櫟、椎果櫟、森氏櫟等，而堅果類的台灣胡桃也很常。
- (六) 有關青剛櫟果實產量與自動相機的資料，於早期研究調查報告(如2007年及2008年中)有詳盡紀錄。
- (七) 從2009年到2011年之已純化的排遺DNA樣本中，粒線體D-loop序列成功增幅的樣本為143個，而其中成功判讀5個微衛星基因座的樣本為108個，經GeneCap分析結果總共辨識出71個個體(表3-4.4)。2009年



由於受到大分地區之青剛櫟產量普遍下降的影響，而收集到的黑熊排遺樣本比起其他年度少約 4 倍至 8 倍不等，因此分析的樣本就少，所以只有 4 個樣本成功通過分析，分別為不同的個體。而 2010 年及 2011 年通過粒線體 D-loop 擴增分析之樣本分別為 83 個及 56 個，但是成功判讀 5 個微衛星基因座的樣本分別為 79 及 25，成功率足足差了兩倍之多，推測原因是 2010 年進行微衛星基因座分析之樣本有經過性別鑑定及粒線體 D-loop 增幅測試的篩選，但 2011 年的分析樣本因時間因素，未及進行性別鑑定分析，只經過粒線體 D-loop 增幅測試之篩選，因此 2010 年進行微衛星基因座分析的排遺 DNA 樣本品質上會優於 2011 年的樣本。此外，在本次實驗發現 2011 年的排遺 DNA 樣本在微衛星基因座平均增幅失敗率達到 34%，是 2010 年的 7 倍，又 2010 年的 UT25 微衛星基因座增幅失敗率高達六成，是其它基因座的兩倍之多。因此我們認為本次實驗所使用的套組(Kit)DNA 萃取方法雖然快速，但是在 DNA 品質上不及於過去用的 proteinase K/ phenol/ chloroform 方法(Kocher et al. 1989)，在接下來的實驗，萃取排遺 DNA 的方法上需回歸過去採用 proteinase K/ phenol/ chloroform 方法，並加以調整成適合用在臺灣黑熊排遺樣本上，進行排遺 DNA 萃取。



## 參考書目

- Abrahamson, W. G., and J. N. Layne. 2002. Relation of ramet size to acorn production in five oak species of xeric upland habitats in south-central Florida. *American Journal of Botany* 89:124-131.
- Abrahamson, W. G., and J. N. Layne. 2003. Long-term patterns of acorn production for five oak species in xeric Florida uplands. *Ecology* 84:2476-2492.
- Beguín, J., M. Prevost, D. Pothier, and S. D. Co te. 2009. Establishment of natural regeneration under severe browsing pressure from white-tailed deer after group seed-tree cutting with scarification on Anticosti Island. *Canadian Journal of Forest Research* 39:596-605.
- Calvino-Cancela, M. 2007. Seed and microsite limitations of recruitment and the impacts of post-dispersal seed predation at the within population level. *Plant Ecology* 192:35-44.
- Chu, J. H., Y. S. Lin, and H. Y. Wu. 2006. Applicability of non-invasive sampling in population genetic study of Taiwanese Macaques (*Macaca cyclopis*). *Taiwania* 51:258-265.
- Costello, C. M., D. E. Jones, R. M. Inman, K. H. Inman, B. C. Thompson, and H. B. Quigley. 2003. Relationship of variable mast production to american black bear reproductive parameters in New Mexico. *Ursus* 14:1-16.
- Darley-Hill, S., and W. C. Johnson. 1981. Acorn dispersal by the blue jay (*Cyanocitta cristata*). *Oecologia* 50:231-232.
- DeMattia, E., B. Rathcke, L. Curran, R. Aguilar, and O. Vargas. 2005. Effects of Small Rodent and Large Mammal Exclusion on Seedling Recruitment in Costa Rica. *Biotropica* 38:196-202.
- Egbert, A. L., and A. W. Stokes. 1976. The social behaviour of brown bear on an Alaskan salmon stream. *Bears: Their Biology and Management* 3:41-56.
- Eiler, J. H., W. G. Wathen, and M. R. Pelton. 1989. Reproduction in black bears in the Southern Appalachian Mountains. *The Journal of Wildlife Management* 53:353-360.
- Elkinton, J. S., W. M. Healy, J. P. Buonaccorsi, G. H. Boettner, A. M. Hazzard, and H. R. Smith. 1996. Interactions among gypsy moths, white-footed mice,

- and acorns. *Ecology* 77:2332-2342.
- Elston, J. J., and D. G. Hewitt. 2010. Intake of Mast By Wildlife in Texas and the Potential for Competition with Wild Boars. *The Southwestern Naturalist* 55:57-66.
- Espelta, J. M., P. Cortes, R. Molowny-Horas, and J. Retana. 2009. Acorn crop size and pre-dispersal predation determine inter-specific differences in the recruitment of co-occurring oaks. *Oecologia* 161:559-568.
- Forget, P.-M., J. E. Lambert, P. E. Hulme, and S. B. V. Wall. 2005. Seed fate: predation, dispersal, and seedling establishment.
- Frankham, R., J. D. Ballou, and D. A. Briscoe. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 617pp.
- Garshelis, D. L. 2006. On the allure of noninvasive genetic sampling - putting a face to the name. *Ursus* 17:109-123.
- Garshelis, D. L. 2009. Family Ursidae (bears). Pages 448-497 in D. E. Wilson, and R. A. Mittermeier, eds. *Handbook of the Mammals of the World. Volume 1: Carnivores*. Lynx Edicions, Barcelona, Spain.
- Garshelis, D. L., and K. V. Noyce. 2008. Seeing the world through the nose of a bear – Diversity of foods fosters behavioral and demographic stability. Page 139-163 in T.E. Fulbright, D. G. Hewitt, eds. *Wildlife science: linking ecological theory and management applications*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Garshelis, D. L., and M. R. Pelton. 1981. Movements of black bears in the Great Smoky Mountains National Park. *The Journal of Wildlife Management* 45:912-925.
- Garshelis, D. L., H. Wang, D. J. Wang, X. J. Zhu, S. Li, and W. J. McShea. 2008. Do revised giant panda population estimates aid in their conservation? *Ursus* 19:168-176.
- Goodrum, P. D., V. H. Reid, and C. E. Boyd. 1971. Acorn Yields, Characteristics, and Management Criteria of Oaks for Wildlife. *The Journal of Wildlife Management* 35:520-532.
- Goossens, B., and M. Bruford. 2009. Non-invasive genetic analysis in conservation. Pages 167-201 in G. Bertorelle, M. W. Bruford, H. C. Hauffe, A. Rizzoli, C. Vernesi, editors. Cambridge University Press, New York, USA.
- Goudet, J. 1995. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate

- F-statistics. *Journal of Heredity* 86:485-486.
- Greenberg, C. H. 2000. Individual variation in acorn production by five species of southern Appalachian oaks. *Forest Ecology and Management* 132:199-210.
- Greenberg, C. H., and B. R. Parresol. 2002. Dynamics of acorn production by five species of Southern Appalachian oaks. Pages 149-172 in W. J. McShea, and W. M. Healy, eds. *Oak forest ecosystems: ecology and management for wildlife*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.
- Haas, J. P., and E. J. Heske. 2005. Experimental study of the effects of mammalian acorn predators on red oak acorn survival and germination. *Journal of Mammalogy* 86:1015-1021.
- Hashimoto, Y., M. Kaji, H. Sawada, and S. Takatsuki. 2003. Five-year study on the autumn food habits of the Asiatic black bear in relation to nut production. *Ecological Research* 18: 485-492.
- Hung, C. M., S. H. Li, and L. L. Lee. 2004. Faecal DNA typing to determine the abundance and spatial organisation of otters (*Lutra lutra*) along two stream systems in Kinmen. *Animal Conservation* 7:301-311.
- Huygens, O. C., T. Miyashita, B. Dahle, M. Carr, S. Izumiyama, T. Sugawara, and H. Hayashi. 2003. Diet and feeding habits of Asiatic black bears in the Northern Japanese Alps. *Ursus*: 236-245.
- Hwang, M. H. 2003. Ecology of Asiatic black bear (*Ursus thibetanus formosanus*) and people-bear interactions in Yushan National Park, Taiwan. Dissertation, University of Minnesota, Twin Cities, Minnesota.
- Hwang, M. H., and D. L. Garshelis. 2007. Activity patterns of Asiatic black bears (*Ursus thibetanus*) in the Central Mountains of Taiwan. *Journal of Zoology* 271:203-209.
- Hwang, M. H., and Y. Wang. 2006. The status and management of Asiatic black bears in Taiwan. Pages 107-110 in K. e. a. Yamazaki, ed. *Understanding Asian Bears to Secure Their Future*. Japan Bear Network Press, Japan.
- Hwang, M. H., D. L. Garshelis, and Y. Wang. 2002. Diets of Asiatic black bears in Taiwan, with methodological and geographical comparisons. *Ursus* 13:111-125.
- Hwang, M.-H., D. L. Garshelis, Y.-H. Wu, and Y. Wang. 2010. Home ranges of Asiatic black bears in the Central Mountains of Taiwan: Gauging whether a reserve is big enough. *Ursus* 21:81-96.

- IUCN. 2009. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2009.1.  
<[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Accessed 1 July 2009.
- Johnson, P. S., S. R. Shifley, and R. Rogers. 2009. The ecology and silviculture of oaks. CABI publishing, Cambridge, MA.
- Justice, K. E. and F. A. Smith. 1992. A model of dietary fiber utilization by small mammalian herbivores, with empirical results for *Neotoma*. *American Naturalist* 139:398-416.
- Kalinowski, S. T., M. L. Taper, and T. C. Marshall. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16:1099-1106.
- Kennedy, P. G. 2005. Post-dispersal seed predation varies by habitat not acorn size for *Quercus chrysolepis* (Fagaceae) and *Lithocarpus densiflora* (Fagaceae) in central coastal California. *Madrono* 52:30-34.
- Kirkpatrick, R. L., and P. J. Pekins. 2002. Nutritional value of acorns for wildlife. Pages 173-181 in W. J. McShea, and W. M. Healy, eds. *Oak forest ecosystems: ecology and management for wildlife*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.
- Kitamura, S., T. Yumoto, P. Poonswad, S. Suzuki, and P. Wohandee. 2008. Rare seed-predating mammals determine seed fate of *Canarium euphyllum*, a large-seeded tree species in a moist evergreen forest, Thailand. *Ecological Research* 23:169-177.
- Kocher T.D, Thomas W.K, Meyer A, Edwards S.V, Paabo S, Villablanca F.X, Wilson A.C. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 6196.
- Koenig, W. D., and J. M. H. Knops. 2002. The behavioral ecology of masting in oaks. Pages 129-148 in W. J. McShea, and W. M. Healy, eds. *Oak forest ecosystems: ecology and management for wildlife*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.
- Koenig, W. D., and J. M. H. Knops. 2005. The mystery of masting in trees. *American Scientist* 93:340-347.
- Koenig, W. D., J. M. H. Knops, W. J. Carmen, M. T. Stanback, and R. L. Mumme. 1994. Estimating acorn crops using visual surveys. *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere* 24:2105-2112.

- Koenig, W. D., J. M. H. Knops, W. J. Carmen, M. T. Stanback, and R. L. Mumme. 1996. Acorn production by oaks in central coastal California: influence of weather at three levels. *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere* 26:1677-1683.
- Kohn, M. H., E. C. York, D. A. Kamradt, G. Haugt, R. M. Sauvajot, and R. K. Wayne. 1999. Estimating population size by genotyping faeces. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 266:657-663.
- Kohn, M., F. Knauer, A. Stoffella, W. Schroder, and S. Paabo. 1995. Conservation genetics of the European brown bear-a study using excremental PCR of nuclear and mitochondrial sequences. *Molecular Ecology* 4:95-103.
- Layne, J. N., and W. G. Abrahamson. 2004. Long-term trends in annual reproductive output of the scrub hickory: Factors influencing variation in size of nut crop. *American Journal of Botany* 91:1378-1386.
- Leiva, M. J., and R. Fernandez-Ales. 2003. Post-dispersive losses of acorns from Mediterranean savannah-like forests and shrublands. *Forest ecology and management* 176:265-271.
- Lusk, J. J., R. K. Swihart and J. R. Goheen. 2007. Correlates of interspecific synchrony and interannual variation in seed production by deciduous trees. *Forest Ecology and Management* 242: 656-670.
- Long, R. A., P. MacKay, W. J. Zielinski, and J. C. Ray. 2008. *Noninvasive survey methods for carnivores*. Island Press, Washington, DC, 385pp.
- MacKay, P., D. A. Smith, R. A. Long, and M. Parker. 2008a. Scat detection dogs. Pages 141-182 in R. A. Long, P. MacKay, W. J. Zielinski, and J. C. Ray, eds. *Noninvasive survey methods for carnivores*. Island Press, Washington, DC.
- MacKay, P., W. J. Zielinski, R. A. Long, and J. C. Ray. 2008b. Noninvasive research and carnivore conservation. Pages 1-7 in R. A. Long, P. MacKay, W. J. Zielinski, and J. C. Ray, eds. *Noninvasive survey methods for carnivores*. Island Press, Washington, DC.
- Mattson, D. J. 1998. Diet and morphology of extant and recently extinct northern bears. *Ursus* 10:479-496.
- McDonald, J. E., and T. K. Fuller. 2005. Effects of spring acorn availability on black bear diet, milk composition, and cub survival. *Journal of Mammalogy* 86:1022-1028.
- MacDougall, A. S., A. Duwyn, and N. T. Jones. 2010. Consumer-based limitations

- drive oak recruitment failure. *Ecology* 91:2092-2099.
- McShea, W. J. 2000. The influence of acorn crops on annual variation in rodent and bird populations. *Ecology* 81:228-238.
- McShea, W. J., and G. Schwede. 1993. Variable acorn crops: responses of white-tailed deer and other mast consumers. *Journal of Mammalogy* 74:999-1006.
- McShea, W. J., and W. M. Healy. 2002. Oak forest ecosystems: ecology and management for wildlife. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.
- McShea, W. J., W. M. Healy, P. Devers, T. Fearer, F. H. Koch, D. Stauffer, and J. Waldon. 2007. Forestry matters: Decline of oaks will impact wildlife in hardwood forests. *Journal of Wildlife Management* 71:1717-1728.
- Miller, C. R., P. Joyce, and L. P. Waits. 2002. Assessing allelic dropout and genotype reliability using maximum likelihood. *Genetics* 160:357-366.
- Moles, A. T., and M. Westoby. 2004. Seedling survival and seed size: a synthesis of the literature. *Journal of Ecology* 92:372-383.
- Moore, J. E., and R. K. Swihart. 2008. Factors affecting the relationship between seed removal and seed mortality. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* 86:378-385.
- Munoz, A., and R. Bonal. 2007. Rodents change acorn dispersal behaviour in response to ungulate presence. *Oikos* 116:1631-1638.
- Munoz, A., R. Bonal, and M. Diaz. 2009. Ungulates, rodents, shrubs: interactions in a diverse Mediterranean ecosystem. *Basic and Applied Ecology* 10:151-160.
- Murphy, M. A., L. P. Waits, and K. C. Kendall. 2003. The influence of diet on faecal DNA amplification and sex identification in brown bears (*Ursus arctos*). *Molecular Ecology* 12:2261-2265.
- Noyce, K. V., and D. L. Garshelis. 1997. Influence of natural food abundance on black bear harvests in Minnesota. *The Journal of Wildlife Management* 61:1067-1074.
- Ochiai, K. 1999. Diet of the Japanese serow (*Capricornis crispus*) on the Shimokita Peninsula, northern Japan, in reference to variations with a 16-year interval. *Mammal Study* 24:91-102.
- Ohnishi, N., T. Saitoh, Y. Ishibashi, and T. Oi. 2007. Low genetic diversities in



- isolated populations of the Asian black bear (*Ursus thibetanus*) in Japan, in comparison with large stable populations. *Conservation Genetics* 8:1331-1337.
- Ostfeld, R. S., C. G. Jones, and J. O. Wolff. 1996. Of mice and mast. *BioScience* 46:323-330.
- Paetkau D, Calvert W, Stirling I, Strobeck C. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology* 4: 347-354.
- Paetkau, D. 2003. An empirical exploration of data quality in DNA-based population inventories. *Molecular Ecology* 12:1375-1387.
- Pagès, M., C. Maudet, E. Bellemain, P. Taberlet, S. Hughes, and C. Hänni. 2009. A system for sex determination from degraded DNA: a useful tool for palaeogenetics and conservation genetics of ursids. *Conservation Genetics* 10:897-907.
- Paine, C. E. T., and H. Beck. 2007. Seed predation by neotropical rain forest mammals increases diversity in seedling recruitment. *Ecology* 88:3076-3087.
- Pearse, D. E., C. M. Eckerman, F. J. Janzen, and J. C. Avise. 2001. A genetic analogue of 'mark-recapture' methods for estimating population size: an approach based on molecular parentage assessments. *Molecular Ecology* 10:2711-2718.
- Pekins, P. J., and W. W. Mautz. 1987. Acorn usage by deer: significance of oak management. *Northern Journal of Applied Forestry* 4:124-128.
- Peter, D., and C. Harrington. 2002. Site and tree factors in Oregon white oak acorn production in western Washington and Oregon. *Northwest Science* 76:189-201.
- Peyton, B., C. Servheen, and S. Herrero. 1999. An overview of bear conservation planning and implementation. Pages 8-24 in C. Servheen, S. Herrero, and B. Peyton, eds. *Bears: status survey and conservation action plan*. IUCN/SSC Bear and Polar Bear Specialist Groups, IUCN, Gland, Switzerland.
- Powell, R. A., J. W. Zimmerman, and D. E. Seaman. 1997. *Ecology and behaviour of North American black bears : home ranges, habitat, and social organization*. (1st edition). Chapman and Hall, London ; New York. 203pp.
- Raymond, M., and F. Rousset. 1995. GENEPOP (version 3.4) population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86:248-249.
- Rogers, L. L. 1987. Effects of food-supply and kinship on social-behavior,

- movements, and population-growth of black bears in northeastern Minnesota. *Wildlife Monographs*:1-72.
- Roth, J. K., and S. B. Vander Wall. 2005. Primary and secondary seed dispersal of bush chinquapin (Fagaceae) by scatterhoarding rodents. *Ecology* 86:2428-2439.
- Russell, F. L., and N. L. Fowler. 2004. Effects of white-tailed deer on the population dynamics of acorns, seedlings and small saplings of *Quercus buckleyi*. *Plant Ecology* 173:59-72.
- Russell, F. L., D. B. Zippin, and N. L. Fowler. 2001. Effects of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) on plants, plant populations and communities: a review. *The American Midland Naturalist* 146:1-26.
- Saito, M., K. Yamauchi, and T. Aoi. 2008. Individual identification of Asiatic black bears using extracted DNA from damaged crops. *Ursus* 19:162-167.
- Schupp, E. W. 1990. Annual variation in seedfall, postdispersal predation, and recruitment of a neotropical tree. *Ecology* 71:504-515.
- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18:233-234.
- Sharp, W. M., and V. G. Sprague. 1967. Flowering and Fruiting in the White Oaks. Pistillate Flowering, Acorn Development, Weather, and Yields. *Ecology* 48:243-251.
- Shea, K. L., and E. E. Stange. 1998. Effects of deer browsing, fabric mats, and tree shelters on *Quercus rubra* seedlings. *Restoration Ecology* 6:29-34.
- Shimoda, K., K. Kimura, M. Kanzaki, and K. Yoda. 1994. The regeneration of pioneer tree species under browsing pressure of Sika deer in an evergreen oak forest. *Ecological research* 9:85-92.
- Shih, C. C., C. C. Huang, S. H. Li, M. H. Hwang, and L. L. Lee. 2009. Ten novel tetranucleotide microsatellite DNA markers from Asiatic black bear, *Ursus thibetanus*. *Conservation Genetics* 10:1845-1847.
- Shimada, T., T. Saitoh, E. Sasaki, Y. Nishitani, and R. Osawa. 2006. Role of Tannin-Binding Salivary Proteins and Tannase-Producing Bacteria in the Acclimation of the Japanese Wood Mouse to Acorn Tannins. *Journal of Chemical Ecology* 32:1165-1180.
- Sloane, M. A., P. Sunnucks, D. Alpers, L. B. Beheregaray, and A. C. Taylor. 2000. Highly reliable genetic identification of individual northern hairy-nosed

- wombats from single remotely collected hairs: a feasible censusing method. *Molecular Ecology* 9:1233-1240.
- Smith, T. R., and M. R. Pelton. 1990. Home ranges and movements of black bears in a bottomland hardwood forest in Arkansas. Pages 213-218 in *International Conference on Bear Research and Management*.
- Sork, V. L., J. Bramble, and O. Sexton. 1993. Ecology of mast-fruited in three species of North American deciduous oaks. *Ecology* 74:528-541.
- Steinmetz, R., and D. L. Garshelis. 2010. Creation of a monitoring network for Asiatic black bears. *International Bear News* 19:12.
- Sun, S., X. M. Gao, and L. Z. Chen. 2004. High acorn predation prevents the regeneration of *Quercus liaotungensis* in the Dongling mountain region of north China. *Restoration Ecology* 12:335-342.
- Taberlet, P., J. J. Camarra, S. Griffin, E. UhrÈS, O. Hanotte, L. P. Waits, C. Dubois-Paganon, T. Burke, and J. Bouvet. 1997. Noninvasive genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear population. *Molecular Ecology* 6:869-876.
- Taberlet, P., L. P. Waits, and G. Luikart. 1999. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecology & Evolution* 14:323-327.
- Taberlet, P., S. Griffin, B. Goossens, S. Questiau, V. Manceau, N. Escaravage, L. P. Waits, and J. Bouvet. 1996. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research* 24:3189-3194.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17:6463-6471.
- Tremblay, J. P., J. Huot, and F. C. O. Potvin. 2007. Density related effects of deer browsing on the regeneration dynamics of boreal forests. *Journal of Applied Ecology* 44:552-562.
- Tsai, C. L., Chou, Y.C., Shih, C.C., Cheng, H.C., Yang, C.C., and Kao, H.W. 2009. The complete mitochondrial genome of the Formosan black bear (*Ursus thibetanus formosanus*). *Zootaxa* 1971:50-58.
- Urban, N. A., and R. K. Swihart. 2010. Small mammal responses to forest management for oak regeneration in southern Indiana. *Forest Ecology and Management*.
- Urbieta, I. R., I. M. Pérez-Ramos, M. A. Zavala, T. Marañón, and R. K. Kobed. 2008. Soil water content and emergence time control seedling establishment

- in three co-occurring Mediterranean oak species. *Canadian Journal of Forest Research* 38:2382-2393.
- Vander Wall, S. B. 2001. The evolutionary ecology of nut dispersal. *Botanical Review* 67:74-117.
- Vaughan, M. R. 2002. Oak trees, acorns, and bears. Pages 224-240 in W. J. McShea, and W. M. Healy, eds. *Oak forest ecosystems: ecology and management for wildlife*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.
- Waits, L. P., and D. Paetkau. 2005. Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: a review of applications and recommendations for accurate data collection. *Journal of Wildlife Management* 69:1419-1433.
- Waits, L. P., G. Luikart, and P. Taberlet. 2001. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Molecular Ecology* 10:249-256.
- Wang, Y. 1999. Status and management of the Asiatic black bear in Taiwan. Pages 213-215 in C. Servheen, C. Herrero, and B. Peyton, eds. *Bears: status survey and conservation action plan*. IUCN, Gland, Switzerland.
- Wasser, S. K., B. Davenport, E. R. Ramage, K. E. Hunt, M. Parker, C. Clarke, and G. Stenhouse. 2004. Scat detection dogs in wildlife research and management: application to grizzly and black bears in the Yellowhead Ecosystem, Alberta, Canada. *Canadian Journal of Zoology* 82:475-492.
- Weerasinghe, U. R., and S. Takatsuki. 1999. A record of acorn eating by sika deer in western Japan. *Ecological Research* 14:205-209.
- Wentworth, J. M., A. S. Johnson, P. E. Hale, and K. E. Kammermeyer. 1992. Relationships of acorn abundance and deer herd characteristics in the Southern Appalachians. *Southern Journal of Applied Forestry* 16:5-8.
- White, G., and K. Burnham. 1999. Program MARK: survival estimation from populations of marked animals. *Bird Study* 46:120-138.
- Wilberg, M. J., and B. P. Dreher. 2004. GENECAP: a program for analysis of multilocus genotype data for non-invasive sampling and capture-recapture population estimation. *Molecular Ecology Notes* 4:783-785.
- Wolgast, L. J., and B. B. Stout. 1977. Effects of age, stand density, and fertilizer application on bear oak reproduction. *Journal of Wildlife Management* 41:685-691.

- Woodruff, D. S. 1993. Non-invasive genotyping of primates. *Primates* 34:333-346.
- Woods, J. G., D. Paetkau, D. Lewis, B. N. McLellan, M. Proctor, and C. Strobeck. 1999. Genetic tagging of free-ranging black and brown bears. *Wildlife Society Bulletin* 27:616-627.
- Wright, S. 1978. *Evolution and the Genetics of Populations*. vol. 4. Variability Within and Among Natural Populations. University of Chicago Press, Chicago.
- Yu, H. T. 1994. Distribution and abundance of small mammals along a subtropical elevational gradient in central Taiwan. *Journal of Zoology* 234:577-600.
- 王穎、吳煜慧。2001。玉山國家公園台灣黑熊之生態及人熊關係之研究(三)。內政部營建署玉山國家公園管理處。44 頁。
- 王穎、黃美秀。1999。玉山國家公園台灣黑熊之生態及人熊關係之研究(一)。內政部營建署玉山國家公園管理處。50 頁。
- 王穎、黃美秀。2000。玉山國家公園台灣黑熊之生態及人熊關係之研究(二)。內政部營建署玉山國家公園管理處。64 頁。
- 石芝菁、陳慧倫、賴靜怡。2007。台灣黑熊親緣關係建立與保育遺傳應用。台北市立動物園。13 頁。
- 宋延齡、鞏會生、曾治高、王學志、朱樂、趙納勛，2005。鬣羚食性的研究。*動物學雜誌* 40:50-56。
- 何冠助。2012。玉山國家公園大分地區台灣黑熊遺傳多樣性初探。國立屏東科技大學碩士論文。85 頁。
- 吳幸如，1993。台灣野豬棲地利用及行為之研究。國立台灣師範大學碩士論文。89 頁。
- 吳煜慧。2004。玉山國家公園台灣黑熊之生態學研究。國立東華大學碩士論文。70 頁。
- 李俊億、謝幸媚。2008。親子鑑定的演算邏輯。台大出版中心，台北市。第 26 頁。
- 林讚標，1995。數種殼斗科植物種子之儲藏性質-赤皮、青剛櫟、森氏櫟與高山櫟。林業試驗所研究報告季刊 10(1)：9-13。

- 林一宏。2005。八二籽一四五米【八通關越道路東段史話】。內政部營建署玉山國家公園管理處。285 頁。
- 林冠甫。2009。玉山國家公園大分地區櫟實結果對於大型哺乳動物豐富度之影響。國立屏東科技大學碩士論文。115 頁。
- 吳海音。2002。玉山國家公園大分至南安地區野生哺乳動物之相對豐度調查。內政部營建署玉山國家公園管理處。29 頁。
- 周蓮香。1990。玉山國家公園新康區動物相調查報告。內政部營建署玉山國家公園管理處。74 頁。
- 邱昌宏。2006。圈養亞洲黑熊之食物偏好，國立屏東科技大學碩士論文。44 頁。
- 翁國精。2008。玉山國家公園新康山區暨南二段中大型哺乳動物調查計畫。內政部營建署玉山國家公園。
- 張照群。2007。溪頭地區柳杉人工林不同冠層開闊度之微環境變化、種子發芽及苗木之生長表現。國立台灣大學碩士論文。
- 陳元龍、楊吉宗。2002。台灣地區野生及圈飼黑熊遺傳變異之初探。特有生物研究，4:73-77。
- 陳炤杰、蔡哲民、陳惠玲、王秀惠。2009。玉山國家公園鳥類之資源清查與族群監測系統規劃及資料庫建置。內政部營建署玉山國家公園管理處。62 頁。
- 陳亞萱。2009。亞洲黑熊之表面消化率及校正係數。國立屏東科技大學碩士論文。75 頁。
- 郭彥仁。2012。玉山國家公園大分地區野生動物對青剛櫟(*Cylobalanopsis glauca*)種子和苗木存活之影響。國立屏東科技大學碩士論文。77 頁。
- 黃美秀、林冠甫、張書德、何冠助、葉炯章。2009a。玉山國家公園台灣黑熊族群生態學及保育研究(4/4)。內政部營建署玉山國家公園管理處。133 頁。
- 黃美秀、林冠甫、賴秀芬。2008。玉山國家公園台灣黑熊族群生態學及保育研究(3/4)。內政部營建署玉山國家公園管理處。75 頁。
- 黃美秀、林冠甫。2007。玉山國家公園台灣黑熊族群生態學及保育研究(2/4)。內政部營建署玉山國家公園管理處。48 頁。

- 黃美秀、祈偉廉、吳尹仁。2006。玉山國家公園台灣黑熊族群生態學及保育研究(1/4)。內政部營建署玉山國家公園管理處。53 頁。
- 黃美秀、潘怡如、蔡幸蒨、郭彥仁、林冠甫。2010。台灣黑熊分布預測模式及保育行動綱領之建立(1)。行政院農業委員會林務局保育研究系列第 98-23 號。127 頁。
- 黃美秀、賴秀芬、林冠甫、葉慶龍。2009b。玉山國家公園台灣黑熊重要棲息地-大分地區之植群生態及森林更新。國家公園學報，19:62-82。
- 楊吉宗、毛嘉洪、張耿瑞、何東輯、詹芳澤。2006。利用糞類固醇激素監測圈飼台灣黑熊的繁殖狀態。特有生物研究 8(1)：1-12。
- 劉仝。2011。溪頭地區六種台灣原生闊葉樹種葉部特性及昆蟲植食程度。國立台灣大學碩士論文。
- 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。