

使用微隨體基因座偵測烏頭翁與白頭翁 可能的雜交子代

許祐薰¹，劉小如¹，李壽先²，許育誠^{3,4}

¹中央研究院生物多樣性研究中心；²國立台灣師範大學生命科學系；³國立東華大學自然資源管理研究所；⁴通訊作者 (ycsheu@mail.ndhu.edu.tw)

[摘要] 本研究由目前已經發表的鳥類微隨體基因座中，篩選出適用於烏頭翁與白頭翁的遺傳標記，嘗試建立一套能區分烏、白頭翁的微隨體基因座，將之用於雜交個體的偵測，並試圖解析墾丁地區特有的烏頭亞型個體，是否為雜交所產生的後代。分析來自四種鳥、共67對的微隨體基因座引子後，找出其中九組基因座，在烏、白頭翁或烏頭亞型個體中具有多型性，然族群分化程度 F_{ST} 值在烏頭翁和白頭翁間只有0.021。平均每基因座的對偶基因數為2.89-3.67個，雜合度的觀測值為0.236-0.433，期望值則為0.308-0.409。以其中符合哈地－溫伯格平衡的六個基因座進行貝氏分群測試，顯示所有分析的樣本應屬同一族群。對應分析的結果能解釋的變異量雖然有限，但烏頭翁、白頭翁和烏頭亞型三者在各軸的分佈上有顯著的差異，其中以烏頭翁和白頭翁的分化程度較明顯，烏頭亞型的遺傳組成則介於二者之間。意味外型近似烏頭翁的烏頭亞型個體，可能在其祖代中曾經有白頭翁的基因滲入。

關鍵字：烏頭翁、白頭翁、雜交、微隨體

Detecting Obscure Hybrids of Light-vented Bulbul (*Pycnonotus sinensis formosae*) and Styan's Bulbul (*P. taivanus*) Using Microsatellite DNA

Yu-Hsun Hsu¹, Lucia Liu Severinghaus¹, Shou-Hsien Li²
and Yu-Cheng Hsu^{3,4}

¹Biodiversity Research Center, Academia Sinica, ²Department of Life Science, National Taiwan Normal University, ³Institute of Natural Resources, National Dong Hwa University, ⁴Corresponding author (ycsheu@mail.ndhu.edu.tw)

ABSTRACT The main purpose of this study was to select a set of microsatellite markers in order to distinguish the Styan's Bulbul, Light-vented Bulbul, and suspected hybrids (gray-faced Styan's Bulbul). We screened 67 primer pairs developed from four bird species and found only nine of these loci were polymorphic in Styan's Bulbul, Light-vented Bulbul and/or the gray-faced Styan's Bulbul. After excluding two loci which were not in Hardy-Weinberg equilibrium, and one locus which was monomorphic in both Styan's Bulbul and Light-vented Bulbul, only six polymorphic loci were used in

subsequent analyses. The mean of alleles per locus varied from 2.89 to 3.67, mean of observed heterozygosity ranged from 0.236 to 0.433, and mean of expected heterozygosity ranged from 0.308 to 0.409. No significant population differentiation was found in Styan's Bulbul, Light-vented Bulbul, or gray-faced Styan's Bulbul, as revealed by low F_{ST} value and Bayesian population assignment test. However, correspondence analysis showed significant difference among the three populations on the first two axes (CA1 and CA2). This indicated that these markers could distinguish Styan's Bulbul and Light-vented Bulbul. The gray-faced Styan's Bulbul might be the offspring of backcross between hybrid bulbuls and Styan's Bulbuls. More polymorphic microsatellite markers should be found to distinguish these two bulbuls and identify their hybrids.

Keywords: Styan's Bulbul, Light-vented Bulbul, hybridization, microsatellite

前言

不同物種之間雜交所形成的雜交帶，能夠用來研究許多演化和生態的過程(Pearson and Manuwal 2000)。在研究兩物種的雜交程度時，首要之務是鑑別純種個體和雜交個體。雜交個體常會具有兩親代物種的特徵，呈現中間型的特徵型值。然而，隨著回交的發生，雜交個體的特徵型值可能會逐漸偏向其中某種親代，而沒有明確的區分依據。再者，即使雜交個體型態上相似於其中一個親代物種，其整個遺傳組成仍可能異於該親緣種(Williams et al. 2005)。由於以上原因，使得研究者有時不易根據外部型態將雜交個體和親緣種區別開來。Allendorf等人(2001)認為，在針對物種雜交現象進行保育行動之前，應該先確認該雜交現象為自然或人為因素所造成，並且對其雜交的形式和程度有細部的瞭解，才能依此擬定適當的保育措施。

隨著分子生物技術的發展和電腦運算能力的提升，遺傳標記已經被應用在許多偵測物種雜交狀況的研究中，例如哺乳動物中的北極狐(*Alopex lagopus*, Norén et al. 2006)、狼(*Canis lupus*, Verardi et al. 2006)、魚類中的三棘刺魚(*Gasterosteus aculeatus*, Gow et al. 2006)等。在已發表的研究中，曾使用微隨體基因座(microsatellite)、粒線體DNA (DNA)、擴增片段長度多樣性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)及單核甘酸多樣性

(single nucleotide polymorphism, SNP)等遺傳標記(Bensch et al. 2002, Sætre et al. 2003, Vallender et al. 2007)。其中，微隨體基因座是目前最廣被使用的遺傳標記。微隨體是真核生物細胞核中廣泛分佈的DNA片段，由於其突變速率快，在族群內變異高，且遺傳形式符合孟德爾的遺傳定律，因此適合用來作為物種雜交、親子鑑定、親屬關係和族群分化等研究的遺傳標記(Zhang and Hewitt 2003, Selkoe and Toonen 2006)。此外，微隨體基因座也已經被用在許多種鳥類的雜交研究中，例如：北美斑鴨和綠頭鴨(*Anas fulvigula* and *A. platyrhynchos*, Williams et al. 2005)、斑林鴉和橫斑林鴉(*Strix occidentalis* and *S. varia*, Funk et al. 2007)、棕硬尾鴨和白頭硬尾鴨(*Oxyura jamaicensis* and *O. leucocephala*, Muñoz-Fuentes et al. 2007)等。

在台灣的雀形目鴨科鳥類中，烏頭翁(*Pycnonotus taivanus*)和白頭翁(*P. sinensis formosa*)是兩個親緣關係相近的物種。白頭翁普遍分佈於亞洲東部，在台灣本島則見於北部和西部地區，為特有亞種。烏頭翁則為臺灣特有種，僅分佈於臺灣東部和恆春半島地區(鄭作新等 1987, 王嘉雄等 1991)。這二種鳥的生態需求相同(劉小如 1991)且外型相似，僅在頭部羽毛呈現不同的顏色。二者不論在野外或是人工飼養的環境中都會雜交，且其雜交子代具有繁殖的能力(劉小如 2000, 2005, 2006)。過去台灣的白頭翁和烏頭翁東西為界，近年來因

為白頭翁入侵烏頭翁分布區並與之雜交，使烏頭翁族群之存續受到威脅(劉小如 1990, 1991, 2003)。尤其是許多烏頭翁分布的地區目前都已經有白頭翁的發現記錄。

比較1997年及2003年在墾丁國家公園及鄰近地區進行的調查報告，發現烏頭翁在總調查隻數中所佔的比例減少，而烏、白頭翁雜交個體所佔的比例則有增加的趨勢(劉小如 2003)。在2005年的調查中，也發現在墾丁地區有些貌似烏頭翁的個體，在外型上與典型的烏頭翁有微小差異。這些個體暫時被稱為『烏頭亞型』。其頰、眼先至耳羽呈灰白色，不似台東地區的烏頭翁之頰、眼先至耳羽部分黑白分明(劉小如 2005)。一般來說，烏頭翁和白頭翁的部分雜交子代可由外型直接確定。但若雜交個體經過和烏頭翁(或白頭翁)數代的回交後，可能已無法由外型準確地確認是否有基因滲入的現象。因此，我們懷疑這些烏頭亞型個體為雜交個體和烏頭翁回交數代後產生的子代。如果烏頭亞型個體為回交子代，我們將可偵測到白頭翁的基因滲入烏頭亞型個體的遺傳組成中。

本研究嘗試利用微隨體基因座作為分子遺傳標記，探討烏頭翁與白頭翁的雜交現象。我們的目的地為建立一套用以區分烏頭翁和白頭翁的微隨體基因座組合，並且以這一套微隨體基因座組合檢視烏頭亞型個體是否為回交子代。本研究將以保育遺傳學的角度提供國家公園關於烏頭翁保育工作所需的遺傳資料，以作為未來經營管理需求上的依據。

材料與方法

本研究使用的烏頭翁樣本採自台東縣東河鄉和卑南鄉，白頭翁則採自苗栗縣獅潭鄉。這些地區在過去均未被發現有疑似雜交個體出現，故使用這些個體作為純種烏頭翁和白頭翁的樣本，進行多型性微隨體基因座的篩選和測試。

研究白頭翁基因滲入烏頭翁所需的樣

本，則使用在墾丁地區所採得的烏頭亞型個體。

一、DNA萃取與微隨體基因座的篩選

自我們過去在烏、白頭翁的研究所收集的血液樣本庫中，各取出37隻白頭翁、32隻烏頭翁，以及16隻在墾丁地區採集的烏頭亞型個體，以Gemmell and Akiyama (1996)所發展的方法萃取DNA。再利用從其他鳥類所篩選出的微衛星基因座中，檢測增幅這些基因座的引子是否適用於烏頭翁和白頭翁。我們總共測試來自四種鳥的67對引子，其中22對來自大山雀(*Parus major*, Saladin et al. 2003)、八對來自青山雀(*Parus caeruleus*, Dawson et al. 2000)、19對來自青背山雀(*Parus monticolus*, 羅文穗 2007, Wang et al. 2005)、18對來自繡眼畫眉(*Alcippe morrisonia*, Lin et al. 2009)。利用聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, 以下簡稱PCR)測試這些引子是否可增幅出烏頭翁和白頭翁的DNA片段。對於測試結果可增幅出DNA片段的引子，將其前端引子的5'端分別以HEX, FAM或NED等螢光標記後，先以六隻烏頭翁和六隻白頭翁的DNA為受試對象，測試這些基因座在烏、白頭翁是否具有多型性。

二、烏頭翁和白頭翁微隨體基因型的基因型判定與資料分析

對於上述初步測試結果具有多型性的基因座，我們進行所有樣本的基因型鑑定。先將這些樣本的DNA以具螢光標記的引子進行PCR以增幅微隨體基因座。每一PCR的反應體積為10 μ l，其中包含約60 ng DNA、各0.2 μ M的一對引子、0.1 mM dNTP、1.5-2.5 mM MgCl₂(見表 1)、10 mM Tris-HCL, pH 9.0、50 mM KCL、0.01% (w/V) gelatin、0.1% Triton X-100、0.4 U的聚合酶(Pro Taq DNA polymerase, Protech)。

PCR的作用溫度如下：首先在95°C中反應2分鐘使雙股DNA的兩股變性解開(denaturing)，接著進行40次增幅循環，每一循

環包括：95°C中20秒解開雙股DNA、65-50°C不等的溫度中作用30秒使模版DNA與引子鏈合(annealing)(表1)、72°C中作用30秒進行DNA之複製延伸反應(extension)，最後再於72°C中反應1分鐘進行最後延伸反應。PCR的產物以ABI Prism 3730 自動定序儀 (Applied Biosystems) 進行毛細管電泳反應，再以GeneMapper v3.0(Applied Biosystems)軟體進行基因型的判定，以確定每一個體在該基因座上的對偶基因型。獲得所有個體的基因型資料後，我們利用GENEPOP(Raymond and Rousset 1995)檢視在各族群中，兩兩基因座之間是否存在著連鎖不平衡(linkage disequilibrium)的情形。再以GenAEx 6(Peakall and Smouse 2006)計算各基因座在烏頭翁、白頭翁和烏頭亞型等族群中雜合度的觀測值 (observed

heterozygosity, H_o) 與期望值 (expected heterozygosity, H_e)，並據此測試該基因座是否處於哈地－溫伯格平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium)。此外，我們並計算在每族群中單一基因座的平均對偶基因數(average observed number of alleles per locus, N_A)、出現頻率大於5%的對偶基因數(N_A with frequency > 5%)，以及平均每基因座中某族群特有的對偶基因數(average number of private alleles per locus)等參數。我們也使用GenAEx 6進行分子變方分析(analysis of molecular variance, AMOVA)，計算微體基因座在烏頭翁、白頭翁和烏頭亞型之間的 F_{ST} 值。在哈地－溫伯格平衡、 F_{ST} 值估算和連鎖不平衡的測試中，我們使用邦弗朗尼連續修正法(sequential Bonferroni adjustment)來校正多重比較的 α 值。

表 1. 本研究所使用的九組多型性微體基因座

| 基因座名稱 | 來源物種 | 螢光 種類 | GenBank 序號. | MgCl ₂ (mM) ¹ | Ta (°C) ² | 出處 |
|------------------|---------------------------|----------|----------------|--|-------------------------|---------------------|
| <i>Pca3</i> | <i>Parus caeruleus</i> | FAM | AJ279805 | 1.5 | 60 | Dawson et al. 2000 |
| <i>Titgata67</i> | <i>Parus monticolus</i> | FAM | AY792959 | 2 | 50 | Wang et al. 2005 |
| <i>Tit28</i> | <i>Parus monticolus</i> | HEX | EF440357 | 1.5 | +62-50 / ↓0.3 | 羅文穗 2007 |
| <i>PmaGAn11</i> | <i>Parus major</i> | NED | AY260531 | 1.5 | 65 | Saladin et al. 2003 |
| <i>PmaD22</i> | <i>Parus major</i> | FAM | AY260527 | 1.5 | 60 | Saladin et al. 2003 |
| <i>PmaTAGn33</i> | <i>Parus major</i> | NED | AY260539 | 1.5 | 57 | Saladin et al. 2003 |
| <i>AM64</i> | <i>Alcippe morrisonia</i> | NED | DQ858942 | 2 | +62-50 / ↓0.3 | Lin et al. 2009 |
| <i>AM95</i> | <i>Alcippe morrisonia</i> | NED | DQ858944 | 2 | +62-50 / ↓0.3 | Lin et al. 2009 |
| <i>AM97</i> | <i>Alcippe morrisonia</i> | FAM | DQ858949 | 2 | 55 | Lin et al. 2009 |

* 聚合酶連鎖反應(PCR)時的鎂離子濃度。

** PCR的鍊合溫度。

+ 遞減PCR(touchdown PCR)。

對於符合哈地－溫伯格平衡的微體基因座，我們藉由各基因座中對偶基因的分布頻率，利用STRUCTURE v2.2 軟體進行貝氏分群測試 (Bayesian population assignment,

Pritchard et al. 2000)，推估所有樣本的遺傳組成係來自於幾個族群(K)，以測試這些微體基因座是否能夠區分烏頭翁和白頭翁。

此外，我們也使用對應分析

(correspondence analysis, CA)檢視烏頭翁、白頭翁和烏頭亞型三群鳥的遺傳組成差異性。以符合哈地－溫伯格平衡的微隨體基因座的基因型資料為樣本，將各個對偶基因在每隻個體中的出現與否給予評分，出現在同型合子者給1分，出現在異型合子者給0.5分，未出現者給0分。接著將評分結果進行對應分析，並將每隻個體在對應分析結果的第一軸和第二軸之落點進行Kruskal-Wallis分析，測試其第一軸和第二軸的落點在來源族群間是否存在顯著差異。

結果與討論

一、烏頭翁和白頭翁微隨體基因座的篩選

本研究所測試的67對的微隨體引子，以PCR增幅後有37對可以在烏頭翁和白頭翁中增幅出長度符合預期範圍的DNA片段；進一步測試這些基因座在烏、白頭翁的多型性後，發現只有九個基因座在烏頭翁或白頭翁具有多型性，亦即其他物種的微隨體基因座引子只有13.43%(9/67)適用於烏、白頭翁。這九組微隨體基因座在烏、白頭翁和烏頭亞型的對偶基因數、雜合度的觀測值(H_O)與期望值(H_E)等如表2所示。整體而言，平均每基因座的對偶基因數為2.89-3.67個，雜合度的觀測值為0.236-0.433，期望值則為0.308-0.409。

在各基因座中，有些對偶基因的出現頻率很低。若只考慮出現頻率較高(>5%)的對偶基因，則平均每基因座的對偶基因數在烏頭翁中為2.11個，在白頭翁中有2.67個，在烏頭亞型則有2.33個。在這九個基因座中，都未發現烏頭翁特有的對偶基因。另一方面，這九個基因座上平均每基因座有0.44個白頭翁特有的對偶基因，及0.44個烏頭亞型特有的對偶基因(圖1)。

基因連鎖不平衡測試的結果顯示各微隨體基因座間都沒有顯著基因連鎖現象。*AM95*

在白頭翁中不符合哈地－溫伯格平衡($p<0.001$)、*AM97*在烏頭亞型中不符合哈地－溫伯格平衡($p<0.01$)、*Titgata67*在白頭翁和烏頭翁當中只有一個對偶基因。其餘六組微隨體基因座在三個來源族群中皆符合哈地－溫伯格平衡，因此後續的族群分群測試和對應分析均以此六組基因座的資料進行。

二、烏、白頭翁的族群分化與雜交個體的檢測

以 F_{ST} 值表示各族群間的分化程度，顯示各族群間的分化程度都很低。根據九組微隨體的基因型資料，白頭翁、烏頭翁和烏頭亞型之間，整體的 F_{ST} 值為0.03。在兩族群間比較上，白頭翁和烏頭翁之間的 F_{ST} 值最低，只有0.021；白頭翁和烏頭亞型之間的 F_{ST} 值為0.036；烏頭翁和烏頭亞型之間的 F_{ST} 值最高，為0.047。各成對比較的 F_{ST} 值皆達99%顯著水準($p<0.01$, 999 permutations)。以STRUCTURE v2.2 軟體(Pritchard et al. 2000)進行貝氏分群測試，結果建議所有樣本應屬於同一個大族群($K=1$)。

使用六組符合哈地－溫伯格平衡的微隨體基因座基因型進行對應分析，並以Kruskal-Wallis之單向等級變方分析法進行檢測，顯示三群樣本在第一軸(CA1，可解釋9.01%的差異)和第二軸(CA2，可解釋8.39%的差異)上的分佈有顯著差異($p<0.05$)(圖2)。將各樣本在第一軸上的落點進行變方分析，並使用Dunn兩處理間比較檢定法進行事後檢定，結果顯示白頭翁和烏頭翁在CA1的分佈有顯著不同($p<0.05$)，而白頭翁與烏頭亞型，或烏頭翁與烏頭亞型之間在該軸的分佈則沒有顯著差異(圖3)。

我們也將各樣本在CA2上的落點進行相同的分析，結果顯示白頭翁獨立為一組，其在CA2上的落點位置和烏頭翁及烏頭亞型顯著不同($p<0.05$)，而烏頭翁和烏頭亞型則形成另一組，彼此間沒有顯著差異(圖4)。

表 2. 九組微隨體基因座在烏頭翁、白頭翁和烏頭亞型的對偶基因數、雜合度的觀測值(H_O)與期望值(H_E)

| 基因座名稱 | 種類 | 對偶基因數 | 雜合度的觀測值(H_O) | 雜合度的期望值(H_E) |
|------------------|------|-------|------------------|------------------|
| <i>Pca3</i> | 烏頭翁 | 5 | 0.563 | 0.537 |
| | 白頭翁 | 5 | 0.694 | 0.709 |
| | 烏頭亞型 | 6 | 0.750 | 0.707 |
| <i>Titgata67</i> | 烏頭翁 | 1 | 0.000 | 0.000 |
| | 白頭翁 | 1 | 0.000 | 0.000 |
| | 烏頭亞型 | 2 | 0.125 | 0.117 |
| <i>Tit28</i> | 烏頭翁 | 3 | 0.313 | 0.276 |
| | 白頭翁 | 3 | 0.459 | 0.399 |
| | 烏頭亞型 | 3 | 0.188 | 0.271 |
| <i>PmaGAn11</i> | 烏頭翁 | 2 | 0.094 | 0.089 |
| | 白頭翁 | 2 | 0.270 | 0.234 |
| | 烏頭亞型 | 3 | 0.188 | 0.174 |
| <i>PmaD22</i> | 烏頭翁 | 4 | 0.500 | 0.483 |
| | 白頭翁 | 6 | 0.432 | 0.477 |
| | 烏頭亞型 | 2 | 0.125 | 0.117 |
| <i>PmaTAGn33</i> | 烏頭翁 | 4 | 0.625 | 0.539 |
| | 白頭翁 | 6 | 0.703 | 0.649 |
| | 烏頭亞型 | 3 | 0.188 | 0.525 |
| <i>AM64</i> | 烏頭翁 | 3 | 0.438 | 0.382 |
| | 白頭翁 | 3 | 0.459 | 0.505 |
| | 烏頭亞型 | 2 | 0.375 | 0.469 |
| <i>AM95</i> | 烏頭翁 | 1 | 0.000 | 0.000 |
| | 白頭翁 | 2 | 0.000 | 0.053 |
| | 烏頭亞型 | 2 | 0.125 | 0.117 |
| <i>AM97</i> | 烏頭翁 | 5 | 0.750 | 0.637 |
| | 白頭翁 | 5 | 0.882 | 0.658 |
| | 烏頭亞型 | 3 | 0.063 | 0.275 |
| 平均 | 烏頭翁 | 3.11 | 0.365 | 0.327 |
| | 白頭翁 | 3.67 | 0.433 | 0.409 |
| | 烏頭亞型 | 2.89 | 0.236 | 0.308 |

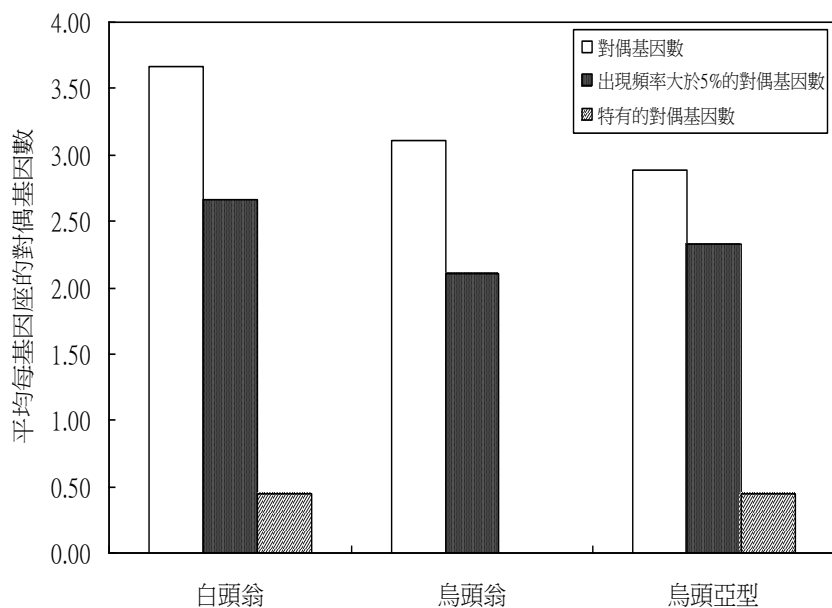


圖 1. 九組微隨體基因座在族群中平均每基因座的對偶基因數、平均每基因座帶有的出現頻率大於5%的對偶基因數，及平均每基因座帶有的族群特有對偶基因數

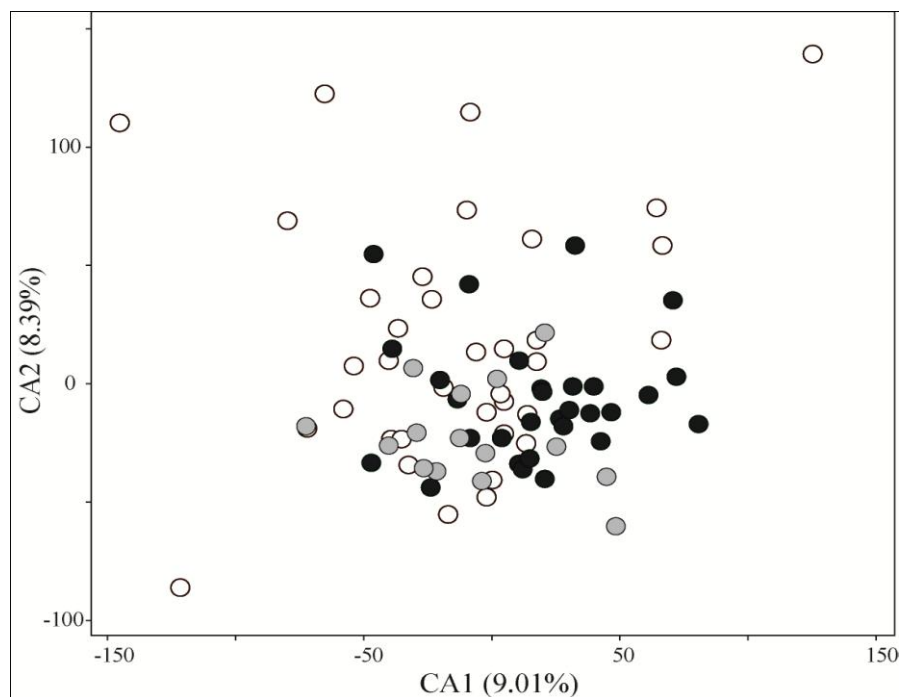


圖 2. 各樣本在對應分析主要二個軸的分佈情形(●烏頭翁，○白頭翁，●烏頭亞型)

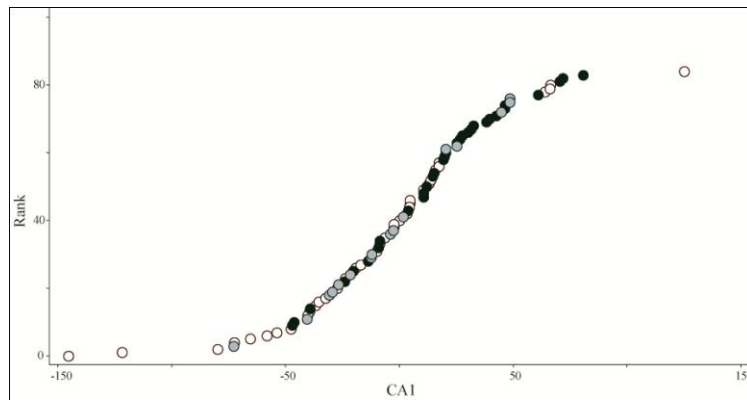


圖 3. 各樣本在對應分析第一軸的分佈情形(●烏頭翁，○白頭翁，●烏頭亞型)

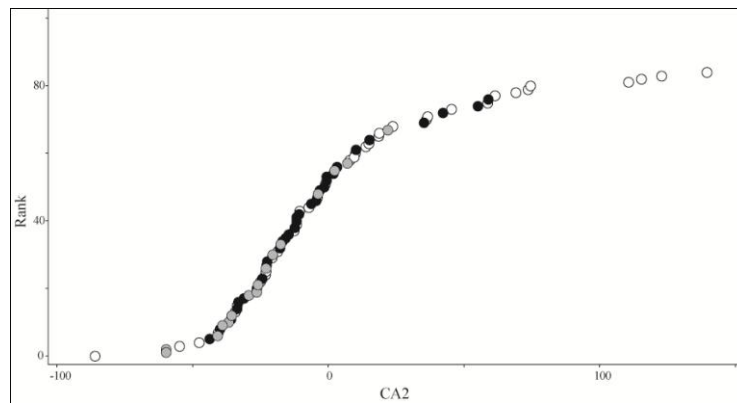


圖 4. 各樣本在對應分析第二軸的分佈情形(●烏頭翁，○白頭翁，●烏頭亞型)

結論

本研究結果發現，無論是貝氏分群測驗，族群間的 F_{ST} 值，或對應分析的結果，都顯示烏頭翁、白頭翁和烏頭亞型個體的遺傳組成非常相似，三者不易區分。其中，兩族群間 F_{ST} 值的微量差異顯示烏頭翁和白頭翁最相近，而烏頭翁和烏頭亞型間的差異較大。另一方面，在對應分析的結果中則顯示：烏頭亞型個體的遺傳組成介於烏頭翁與白頭翁之間，並且和烏頭翁比較相似。造成兩種分析的結果相衝突的原因，可能在於本研究所使用的微隨體基因座無法準確區分烏頭翁和白頭翁。加上能用來分析

的微隨體基因座數量少，所以少數幾個基因座的對偶基因出現頻率，就可能造成分析結果的不同。

Pritchard 等人(2007)曾以微隨體基因型的資料，利用對應分析成功偵測二種鱒魚雜交所造成的基因滲入(genetic introgression)現象。本研究的結果雖然解析度不高，但是在對應分析中仍檢測出烏頭翁和白頭翁在前二個軸的分佈上有顯著的差異。加上族群間的 F_{ST} 值皆顯著不等於零，顯示這二種鳥在微隨體基因座上仍有分化，而烏頭亞型個體在遺傳上較近似烏頭翁，暗示他們可能是雜交個體與烏頭翁經過多代回交後產生的子代。

然而，我們在烏頭亞型個體中發現一些特有的對偶基因，且烏頭亞型個體在三個微隨體基因座中的對偶基因數多於烏、白頭翁，此與烏頭亞型為烏頭翁和白頭翁雜交後代的看法不合。造成此現象的原因，可能是因為本研究所使用的烏、白頭翁樣本未能完全代表烏頭亞型的親代族群，烏頭亞型的親代可能來自距離墾丁更近的族群。

本研究儘管已經嘗試使用多達67對的引子，但僅篩選出九組適用的遺傳標記，跨種測試的低成功率和低多型性，是目前我們無法準確藉由此技術區分烏、白頭翁的主要原因之一。若能針對烏頭翁和白頭翁進行分子選殖，篩選出更多具有高多型性的微隨體基因座，應有助於提高鑑定雜交個體的效力。或是後續若能開發其他更多的多型性遺傳標記，例如AFLP、SNP等，應能夠建立一套可以明確區分烏、白頭翁的遺傳標記，並用以鑑定雜交個體。

雜交在鳥類中是一個廣泛存在的現象。在雀形目的鳥類中，有460個物種有雜交的情形，約佔雀形目總數的8%(Grant and Grant 1992)。雜交帶形成之後，可能會有幾種不同的發展(Futuyma 2005)：

一、因為在不同生態棲位中，天擇會偏好不同的特徵，所以兩個物種都能生活於原有的生態棲位中，雜交帶持續存在。

二、因為雜交個體的適應性較低，使得天擇偏好能增強生殖前隔離的對偶基因，造成兩個親緣種之間形成完全的隔離。

三、雜交個體和親緣種之間的生殖隔離增加，形成第三個物種。

四、其中一個親緣種的適應性特別高，使得雜交帶逐漸偏向另一個物種分佈的區域，促使後者在當地滅絕。

因為雜交可能會造成物種的滅絕(Rhymer and Simberloff 1996)，所以，發展出鑑定雜交個體的技术，並用以監測自然界中物種的雜交現象，對於物種的保育和研究生物演化而言，是一件相當重要的工作。在白頭翁和烏頭翁的

雜交情形中，可能同時包含人為活動造成棲地改變，使兩物種的分布範圍擴張，造成雜交帶自然擴張，以及人為引入放生等影響。若烏、白頭翁持續雜交，雜交子代又能夠和烏頭翁進行回交，所造成基因滲入可能會造成烏頭翁特有性狀或形態的消失。因此，保育烏頭翁將有利於保存台灣特有的生物多樣性。保護純種烏頭翁是保育台灣生物多樣性資源的重要工作。墾丁國家公園是烏頭翁的主要分布區之一，區內的棲地環境極適合烏頭翁的生存。加上國家公園的管理體系、法源依據、以及相對上較充足的保育人力，在此推動烏頭翁的保育工作應較其他地區有更高的成功機會。在烏頭翁保育工作，除嚴格禁止各項放生行為，避免白頭翁因為人類的野放而進入園區外，對於外型上明顯可判定為烏頭翁與白頭翁的雜交後代者，我們也建議加以移除，以減少雜交個體和園區內純種烏頭翁持續進行回交的機會。

誌謝

本研究係由墾丁國家公園管理處補助研究，計畫編號為PG9605-0311。研究期間承蒙墾丁國家公園管理處保育課行政協助；林美珠小姐與中央研究院國家基因型鑑定中心協助進行基因型的鑑定。此外，中華民國國家公園學會徐雅慧小姐協助行政業務，中央研究院生物多樣性研究中心鳥類研究室成員全力協助，都讓我們的研究更加順利，僅此一併致謝。

引用文獻

- 王嘉雄、吳森雄、黃光瀛、楊秀英、蔡仲晃、蔡牧起、蕭慶亮。1991。台灣野鳥圖鑑。亞舍圖書有限公司。台北。
- 劉小如。1990。太魯閣國家公園烏頭翁及白頭翁分布調查。太魯閣國家公園管理處。
- 劉小如。1991。太魯閣國家公園烏頭翁及白頭翁生態及行為研究。太魯閣國家公園管理處。

- 劉小如。2000。烏頭翁與白頭翁分布區之不對等擴張研究。行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告。行政院國科會。
- 劉小如。2003。墾丁國家公園及鄰近地區烏頭翁與白頭翁雜交狀況調查。墾丁國家公園管理處。
- 劉小如。2005。墾丁國家公園烏、白頭翁擴散暨烏頭翁保護區劃設之可行性研究(一)。墾丁國家公園管理處。
- 劉小如。2006。墾丁國家公園烏、白頭翁擴散暨烏頭翁保護區劃設之可行性研究(二)。墾丁國家公園管理處。
- 鄭作新、龍澤虞、鄭寶賚。1987。中國動物誌，鳥綱。科學出版，北京新華發行。北京市。
- 羅文穗。2007。以微體體基因座及主要組織相容性複合體之異型合子度探討青背山雀之配對模式。國立臺灣師範大學碩士論文。國立臺灣師範大學。
- Allendorf FW, RF Leary, P Spruell, and JK Wenburg. 2001. The Problems with Hybrids: Setting Conservation Guidelines. *Trends in Ecology and Evolution* 16:613-622.
- Bensch S, AJ Helbig, M Salomon, and I Siebold. 2002. Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis Identifies Hybrids between Two Subspecies of Warblers. *Molecular Ecology* 11:473-481.
- Dawson DA, O Hanotte, C Greig, IRK Stewart, and T Burke. 2000. Polymorphic Microsatellites in the Blue Tit *Parus Caeruleus* and Their Cross-species Utility in 20 Songbird Families. *Molecular Ecology* 9:1941-1944.
- Futuyma DJ. 2005. Species. *Evolution*. Sinauer Associates. Inc, 353-378pp.
- Funk WC, TD Mullins, ED Forsman, and SM Haig. 2007. Microsatellite Loci for Distinguishing Spotted Owls (*Strix occidentalis*), Barred Owls (*Strix varia*), and Their Hybrids. *Molecular Ecology Notes* 7:284-286.
- Gemmell NJ and S Akiyama. 1996. An Efficient Method for the Extraction of DNA from Vertebrate Tissues. *Trends in Genetics* 12:338-339.
- Gow JL, CL Peichel, and EB Taylor. 2006. Contrasting Hybridization Rates between Sympatric Three-spined Sticklebacks Highlight the Fragility of Reproductive Barriers between Evolutionarily Young Species. *Molecular Ecology* 15:739-752.
- Grant PR and BR Grant. 1992. Hybridization of Bird Species. *Science* 256:193-197.
- Lin R-C, C-C Huang, S-H Li, C-T Yao. 2009. Isolation and characterization of 16 tetranucleotide microsatellite loci from the gray-cheeked fulvetta (*Alcippe morrisonia morrisonia*). *Molecular Ecology Notes*. In press
- Muñoz-Fuentes V, C Vilà, AJ Green, JJ Negro, and MD Sorenson. 2007. Hybridization between White-headed Ducks and Introduced Ruddy Ducks in Spain. *Molecular Ecology* 16:629-638.
- Norén K, L Dalén, K Kvaløy, and A Angerbjörn. 2006. Detection of Farm Fox and Hybrid Genotypes among Wild Arctic Foxes in Scandinavia. *Conservation Genetics* 6:885-894.
- Peakall R and PE Smouse. 2006. GENALEX 6: Genetic Analysis in Excel. Population Genetic Software for Teaching and Research. *Molecular Ecology Notes* 6:288-295.
- Pearson SF and DA Manuwal. 2000. Influence of Niche Overlap and Territoriality on Hybridization between Hermit Warblers and Townsend's Warblers. *Auk* 117:175-183.
- Pritchard JK, M Stephens, and P Donnelly. 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* 155:945-959.
- Pritchard VL.K Jones, and PE Cowley. 2007. Estimation of Introgression in Cutthroat Trout Populations Using Microsatellites. *Conservation Genetics* 8:1311-1329.
- Raymond M and F Rousset. 1995. GENEPOP (version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *Journal of Heredity* 86:248-249.
- Rhymer JM and D Simberloff. 1996. Extinction by Hybridization and Introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics* 27:83-109.
- Sæ tre GP, T Borge, K Lindroos, J Haavie, and Collaborators. 2003. Sex Chromosome Evolution and Speciation in Ficedula Flycatchers. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270:53-59.

- Saladin V, D Bonfils, T Binz, and H Richner. 2003. Isolation and Characterization of 16 Microsatellite Loci in the Great Tit *Parus Major*. *Molecular Ecology Notes* 3:520-522.
- Selkoe KA and RJ Toonen. 2006. Microsatellites for Ecologists: a Practical Guide to Using and Evaluating Microsatellite Markers. *Ecology Letters* 9:615-629.
- Vallender R, RJ Robertson, VL Friesen, and IJ Lovette. 2007. Complex Hybridization Dynamics between Golden-winged and Blue-winged Warblers (*Vermivora chrysoptera* and *Vermivora pinus*) Revealed by AFLP, Microsatellite, Intron and mtDNA Markers. *Molecular Ecology* 16:2017-2029.
- Verardi A, V Lucchini, and E. Randi. 2006. Detecting Introgressive Hybridization between Free-ranging Domestic Dogs and Wild Wolves (*Canis lupus*) by Admixture Linkage Disequilibrium Analysis. *Molecular Ecology* 15:2845-2855.
- Wang MT, YC Hsu, CT Yao, and SH Li. 2005. Isolation and Characterization of 12 Tetranucleotide Repeat Microsatellite Loci from the Green-backed Tit (*Parus monticolus*). *Molecular Ecology Notes* 5:439-442.
- Williams CL, RC Brust, TT Fendley, GR Tiller Jr, and OE Rhodes Jr. 2005. A Comparison of Hybridization between Mottled Ducks (*Anas fulvigula*) and Mallards (*A. platyrhynchos*) in Florida and South Carolina Using Microsatellite DNA Analysis. *Conservation Genetics* 6:445-453.
- Zhang DX, GM Hewit. 2003. Nuclear DNA Analyses in Genetic Studies of Populations: Practice, Problems and Prospects. *Molecular Ecology* 12:563-5

