



公開
 密件、不公開

執行機關(計畫)識別碼：0009033900

農業部林業及自然保育署114年度林業發展計畫執行成果 報告

計畫名稱：赤腹游蛇的保育遺傳學研究 (第1年/全程
2年)

(英文名稱) Conservation Genetics Studies of
Trimerodytes annularis

計畫編號：114林發-09.3-保-39

全程計畫期間：自 114年1月1日 至 115年12月31日

本年計畫期間：自 114年1月1日 至 114年12月31日

計畫聯絡人：陳怡惠

執行機關：中國文化大學



1140369



114 年度農業部林業及自然保育署林業發展計畫

成果報告

赤腹游蛇的保育遺傳學研究

Conservation Genetics Studies of *Trimerodytes
annularis*

計畫編號：114 林發-09.3-保-39

計畫主持人：陳怡惠 教授

執行單位：中國文化大學生命科學系

計畫期程：中華民國 114 年 4 月至 114 年 12 月



中華民國 114 年 1 月 20 日







目錄

圖表目錄.....	I
摘要.....	II
前言.....	4
一、計畫背景與目的.....	4
二、計畫目標.....	6
材料與方法.....	7
一、分子遺傳標記的開發與測試.....	7
二、組織樣本收集.....	8
三、DNA 萃取、聚合酶連鎖反應與基因型定型.....	8
四、族群遺傳多樣性及遺傳結構分析.....	9
結果與討論.....	10
一、分子遺傳標記的開發與測試.....	10
二、DNA 樣本來源與 PCR 成功率測試.....	10
三、陽明山與龍潭族群的遺傳多樣性.....	11
四、陽明山與龍潭族群的遺傳分化.....	11
參考文獻.....	17





圖表目錄

表 1. 赤腹游蛇微衛星基因座的序列特性及本研究初次設計的引子、PCR 成功率、等位基因數與等位基因範圍。.....	13
表 2. 不同組織與 DNA 來源與是否能成功定型完整 7 個微衛星基因座的樣本數量	14
表 3. 陽明山與桃園龍科族群的微衛星基因座多樣性資料.....	15
表 4. 陽明山與桃園龍科族群的的資料.....	16





摘要

本研究針對瀕臨絕種的第一級保育類野生動物—赤腹游蛇(*Trimerodytes annularis*)建立族群遺傳資料，為未來原地或移地的域內保育及域外策略提供基礎資料。今年度研究結果包括：(1)分子遺傳標記的開發：獲得 7 個微衛星基因座可以在本研究的 50 個赤腹游蛇 DNA 樣本中成功擴增且具有多型性。每個基因座的等位基因數由 2 個至 12 個。各基因座之間皆沒有檢測出連鎖不平衡，且各基因座皆沒有檢測出無效等位基因，適用於族群遺傳分析。(2)DNA 來源與基因型定型成功率：因路殺或不明原因死亡的 45 個組織樣本中，有 27 個樣本可擴增並定型成功。在由剛死亡或活體採樣的組織樣本中，基因座皆成功擴增定型佔採樣組織總數的比例，蛇蛻為 16/18，高於母蛇生產後胎膜的 4/11 和鱗片附加些微皮膚組織 2/8，顯示採集蛇蛻這種非侵入式的組織採樣方法，適合在圈養的環境中當作保育類蛇類動物的 DNA 來源。(3)族群的遺傳多樣性與結構：陽明山族群及桃園龍科族群皆保有一定程度的遺傳多樣性，且存在顯著的遺傳分化，因此目前應將兩族群視為兩個不同的保育單元，分別進行適合的保育與繁殖策略，維持族群整體的遺傳多樣性。

關鍵詞：微衛星 DNA、蛇蛻、族群遺傳、保育單元





Abstract

This study established population genetic data for the endangered protected wildlife species, *Trimerodytes annularis*, to provide baseline information for future *in situ* and *ex situ* conservation strategies. The results of this study included: (1) Development of molecular genetic markers: Seven microsatellite loci were successfully amplified and shown to be polymorphic in 50 DNA samples. The number of alleles per locus ranged from 2 to 12. No linkage disequilibrium was detected among loci, and no null alleles were identified, indicating that these markers are suitable for population genetic analyses. (2) DNA sources and genotyping success rates: Among 45 tissue samples obtained from road-killed individuals or snakes that died from unknown causes, 27 samples were successfully amplified and genotyped. For tissues collected from recently deceased or live individuals, the proportion of successful amplification and genotyping relative to the total number of sampled tissues was highest for shed skins (16/18), followed by postpartum placental membranes from females (4/11), and scales with tiny skin tissue (2/8). These results indicate that collecting shed skins, a non-invasive sampling method, is suitable as a DNA source for protected snake species in captive environments. (3) Genetic diversity and population structure: Both populations from Yangmingshan and Taoyuan Longtan Science Park retained a certain level of genetic diversity. Significant genetic differentiation between these two populations was detected. Therefore, these two populations should be considered distinct conservation units, and tailored conservation and breeding strategies should be implemented for each to ensure the maintenance of overall genetic diversity.

Keywords: microsatellite DNA, shed skin, population genetics, conservation units





前言

一、計畫背景與目的

自然地景(nature landscape)因為近代人類的活動產生了大幅度的變化，而地景改變(landscape modification)對整體的生態系運作功能有負面影響(Naeem *et al.*, 1994; Wright *et al.*, 2021)，是造成全球生物多樣性減少的最主要因素(de Lima Filho *et al.*, 2021; Fischer and Lindenmayer, 2007; Foley *et al.*, 2005; Sala *et al.*, 2000)。地景改變造成野生生物的棲地喪失(habitat loss)、棲地破碎化(habitat fragmentation)及棲地品質劣化(habitat degradation)(如：邊際效應增加)等，並減少每個棲地的生物族群大小、增加各族群間的隔離(isolation)程度、增加播遷的死亡率(dispersal mortality)、增加被掠食率(Fahrig, 2003; Fischer and Lindenmayer, 2007)。進一步地，可能會加劇族群隨機事件(demographic stochasticity)及遺傳隨機事件(genetic stochasticity)(即遺傳漂變(genetic drift))的發生，造成生物族群呈現負成長、遺傳多樣性降低、有效族群大小(effective population size, N_e)減少，最終可能導致族群或物種的滅絕(Fahrig, 2003; Fischer and Lindenmayer, 2007; Porter *et al.*, 2021)。在 IUCN 紅皮書生存受威脅的所有物種中，約 85% 的物種其主要威脅來自地景改變(IUCN, 2020)，且研究顯示地景改變對各個不同動物類群的多樣性多有不利的影響，從哺乳類、鳥類、爬行類、兩棲類到無脊椎動物(Cordier *et al.*, 2021; Didham *et al.*, 1996; Gestich *et al.*, 2021; Kiene, 2021; Recher, 1999; Stuart *et al.*, 2004)，可見地景改變的影響層面之廣及程度之大。

對單一物種來說，地景改變的過程中，除了自然棲地的總面積有某些幅度的減少之外，也造成連續的自然棲地被人工構造物(如：道路、住宅、堤防等)切割成多個小區塊的棲地破碎化現象(Bennett and Fahrig, 2021)。棲地破碎化的過程中，一個物種的大族群被切割成兩個或以上的亞族群(subpopulation)，亞族群為個體數少的小族群，加上不同區塊的棲地間有人為製造的物理隔離，不適合和生物移動，因此生物個體在區塊間的移動受限，使基因交流(gene flow)受阻。若在亞族群間的基因交流順暢時，亞族群間的等位基因還有機會交換，但棲地破碎化中相互隔離的亞族群，彼此間缺乏基因交流，遺傳組成就會產生明顯的遺傳分化(genetic differentiation) (Bennett and Fahrig, 2021; Fahrig, 2003; Fischer and Lindenmayer, 2007)。棲息環境與人類活動重疊的動物物種，受到地景改變的棲地破碎化威脅最為嚴重(Cordier *et al.* 2021)。Ribeiro *et al.* (2021)針對多個小型哺乳類動研究(e.g., Gerlach and Musolf, 2000; Redeker *et al.*, 2006)進行整合分析，結果顯示自然棲地破碎化程度與族群遺傳分化程度呈正相關，可見人為建設造成的阻隔會使動物在族群間的遷徙受阻，族群遺傳交流也降低。





棲地消失及破碎化形成的小族群，因單一小族群的個體數量較少，能擁有的遺傳多樣性(genetic diversity)原本就較大族群少，再加上遺傳漂變的效應，伴隨等位基因隨機固定(random fixation)及異型合子歧異度(或稱雜合性)下降(loss of heterozygosity)，遺傳多樣性會進一步降低(Barrett and Kohn, 1991; Ellstrand and Elam, 1993; Spielman *et al.*, 2004)。棲地破碎化引起的基因交流缺乏，也會導致小族群易有近親交配(inbreeding)，並引起近交衰退(inbreeding depression)的現象，使群遺傳多樣性更加下降，區域滅絕(local extinction)風險提高(Amos and Balmford, 2001; Bennett and Fahrig, 2021; Fahrig, 2003; Fischer and Lindenmayer, 2007; Wright *et al.*, 2007)。過去在美國環頸蜥(*Crotaphytus collaris*)的研究中，多個隔離程度高的小族群之遺傳組成十分單一，遺傳多樣性低(Blevins *et al.*, 2011)；後經過人為的棲地連結度增加的復育措施才恢復基因交流與多樣性(Neuwald and Templeton, 2013)。美國南加州的美洲獅(*Puma concolor*)的案例，發現與其他族群隔離度較高的族群中，除了遺傳多樣性較低、有效族群較小外，族群內個體間的親屬關係度(relatedness)較高，有近親交配(inbreeding)及近交衰退的問題，影響族群的存續(Ernest *et al.*, 2014)。

生存或生殖相關活動仰賴溼地(wetland)類型棲息地的陸域物種，原本的棲地需求就常是非連續性的，一旦棲地受到破壞，受到的衝擊更顯嚴重。舉例來說，Marshall *et al.* (2009)提到因美國中西部在過去的 200 年中，濕地面積減少了約 85%，造成棲息於溼地的半水棲性的銅腹水蛇(*Nerodia erythrogaster neglecta*)族群分布變得十分分散且隔離。而因為銅腹水蛇的個體播遷取決於合適的陸域與水域棲地，Marshall *et al.* (2009)研究發現在密集農業活動區域的族群，族群遺傳結構與其他族群間具有顯著差異，顯示應為蛇類個體因棲地隔離播遷困難而基因交流而受阻。Wood *et al.* (2015)研究棲息於溼地的巨型束帶蛇(*Thamnophis gigas*)，因其棲息的濕地大多數已消失，僅在一些相對較小且孤立的高度改造過的農業濕地中生存；族群遺傳的分析發現，具地理隔離的族群之間的遺傳分化較明顯，且呈現較低的遺傳多樣性、有效族群小、有近親繁殖和族群瓶頸效應現象，影響族群存續。

全世界都面臨濕地面積的大量減少的地景改變且威脅著許多野生動物的存續問題(IUCN, 2020; Ramsar Convention on Wetlands, 2018)，然瀕危野生動物物種的保育遺傳研究與探討卻仍不足(Beebee, 2005; DeWoody *et al.*, 2021; Laikre, 2010; Pärli *et al.*, 2021; Willi *et al.*, 2022)。動物族群或物種的滅絕風險多與族群遺傳多樣性因素有關，滅絕風險高的物種通常有較低的遺傳多樣性(低的異型合子歧異度)(Spielman *et al.*, 2004)。棲地破碎化的過程中，小族群的遺傳多樣性減少，加上族群間基因交流受阻與近親交配引





起的近交衰退，將使族群更加縮小並逐步走進滅絕漩渦(extinction vortex) (Bennett and Fahrig, 2021; Lacy and Lindenmayer, 1995)。棲地破碎化導致族群間遺傳結構分化及族群內遺傳多樣性減少的過程，並無法經由肉眼直接觀察發現，唯有藉助保育遺傳(conservation genetics)/族群遺傳(population genetics)相關的研究，了解遺傳多樣性在族群內及族群間的組成才能發掘。這些族群的遺傳資訊，是現在與未來規劃野生生物族群保育策略中不可或缺的一環(Amos and Balmford, 2001; DeWoody *et al.*, 2021; Garner *et al.*, 2020; Laikre, 2010; Minter *et al.*, 2021)。

本研究針對瀕臨絕種的第一級保育類野生動物—赤腹游蛇(*Trimerodytes annularis*)進行保育遺傳研究。在臺灣因為濕地消失造成赤腹游蛇的棲地減少及破碎化，加上環境污染、外來種等因素的威脅，目前僅剩北部的陽明山區及桃園龍潭附近的極少數族群(毛俊傑, 2025; 賴玉菁 and 毛俊傑, 2012)。有鑑於赤腹游蛇的高度的滅絕風險，農業部林業與自然保育署已啟動多樣的保育行動方案(毛俊傑, 2025)，其中桃園龍潭族群面臨龍潭科學園區擴建開發案的影響(簡稱桃園龍科族群)，棲地持續減少且品質劣化，為防止野外個體數量持續下降，因此 2023 年林業與自然保育署已啟動桃園龍科族群的部分個體，後送至臺北市立動物園收容的行動(毛俊傑, 2025)。本研究配合保育行動方案中的族群與棲地保育行動，建立族群的遺傳資料，為未來原地或移地(translocation)的域內保育(in-situ conservation)及域外保育(ex-situ conservation)策略提供基礎資料。

二、計畫目標

1. 全程目標：

- (1) 建立赤腹游蛇野外族群的遺傳多樣性族群遺傳資訊，了解赤腹游蛇野外族群遺傳組成特性，為未來域內保育規劃建立基礎。
- (2) 建立收容圈養的赤腹游蛇個體的遺傳資訊及親代與子代的譜系關係，為未來建立圈養族群與域外保育規劃建立基礎。

2. 本年度目標：

- (1) 開發適用赤腹游蛇的分子遺傳標記。
- (2) 測試不同組織採集方式的 DNA 質量是否足以進行微衛星基因座擴增。
- (3) 建立陽明山與桃園龍潭科學園區族群的遺傳組成及遺傳多樣性特性，分析兩族群間的遺傳分化程度。





材料與方法

一、分子遺傳標記的開發與測試

為得知野生生物的族群遺傳結構及個體遺傳組成的訊息，科學家陸續開發各種具有代表性的遺傳標記(genetic markers)來進行保育遺傳相關研究。過去數十年來，許多研究以微衛星(microsatellite) DNA 作為遺傳標記(Hauser *et al.*, 2021; Jehle and Arntzen, 2002)。微衛星 DNA 為細胞核中廣泛分佈之簡單重複序列片段，由長度為 1 至 6 個鹼基對形成的重複單位組合而成(Goldstein and Schlötterer, 1999)。微衛星基因座遺傳變異度高(Goldstein and Schlötterer, 1999; Madesis *et al.*, 2013; Selkoe and Toonen, 2006)，能偵測近期的人為改變所造成的族群結構影響，十分適合進行小尺度的保育遺傳相關研究。且微衛星基因座為共顯性(co-dominant)的中性遺傳標記(Goldstein and Schlötterer, 1999; Madesis *et al.*, 2013; Selkoe and Toonen, 2006)，為進行親子關係鑑定的標準分子遺傳標記，適用在野外族群的親屬關係及圈養動物的遺傳譜系關係建立(O'Reilly and Kozfkay, 2014; Städele and Vigilant, 2016)。

擴增微衛星基因座用的引子(primers)常有物種專一性(species-specific)，較少跨分類群使用的通用的引子，需要針對個別物種開發並設計專一性的引子，初期花費時間與成本稍高(Madesis *et al.* 2013)。但可先以親緣關係較近的物種所設計之引子，進行跨物種測試(e.g., Degner *et al.* 2009; van de Vliet *et al.* 2009; Nair *et al.* 2012)，減少初期的開發成本。

本研究在 NCBI 資料庫中搜尋赤腹游蛇及同屬物種的 DNA 序列，並從中搜尋有無微衛星的序列。結果發現有針對中國大陸的赤腹游蛇的 9 個微衛星基因座序列(KU879003-KU879011)，但其他序列經過檢測後皆缺乏大於 10 重複次數的微衛星基因座序列，多樣性有較高機率不足難適用於本研究。然資料庫中與赤腹游蛇親緣關係較近但不同屬的草花蛇(*Xenochrophis piscator*)有開發 9 個微衛星基因座序列(KM408482-KM408489)，因此納入跨種測試的候選基因座。因此，本研究針對以上 18 個微衛星基因座序列並以 Primer 3 (Rozen and Skaletsky, 2000; Untergasser *et al.*, 2012)進行前置與反置引子(forward & reverse primers)設計與測試，測試引子在本研究的族群樣本中的使用成功率。若解析力仍有不足，預計未來將透過部分基因組定序，篩選出更多遺傳標記供族群遺傳分析使用。





二、組織樣本收集

族群遺傳多樣性及建立遺傳譜系關係的實驗需要採集動物組織，進行萃取 DNA 及分子遺傳標記(微衛星基因座)之 PCR 擴增實驗，再經由基因型定型或定序及遺傳分析才能獲得資料。因此，採樣動物的少量組織為實驗之必須，無法以其他方法替代。本研究致力使同一個體以最小量的方式採集動物組織進行遺傳分析，讓採樣過程符合實驗動物 3R 中的減量原則與精緻化的精神。本研究的實驗方式及數量已經中國文化大學實驗動物照護及使用委員會核可。此外，此物種為保育類動物，配合(1)動物保護法(第三章第 15 條)與(2)野生動物保育法(第二章第 18 條)的規定，已完成保育類野生動物利用申請並獲核可。

本研究配合林業保育署的赤腹游蛇野外族群調查研究之相關計畫團隊，收集赤腹游蛇現有的陽明山族群及桃園龍潭族群個體的組織樣本，作為後續實驗之用。個體的組織樣本採取，包含以下方法：(1)野外因陸砂或其他原因死亡個體，與動物園圈養環境中死亡的個體，採集個體的部分組織；(2)動物園個體生長過程中的的蛇皮樣本(蛇蛻)；(3)活體動物個體在注射晶片標記過程中，收集自傷口所滲出之血液；(4)吻肛長(SVL)超過 35 cm 以上的動物，剪取個體腹部一小塊鱗片與其附帶組織(Applied Ecology Research Group, 2004; Beebee, 2008; Dodd Jr., 2016; Schulte *et al.*, 2011; 毛俊傑, 2025)。採集的樣本保存於 95% 以上的酒精溶液中，送回實驗室進行後續實驗步驟。針對活體動物的採集方法中，(2)為非侵入方式的組織採集方式，(3)(4)為輕微地侵入式的採集組織方式，僅以類似針筒注射的小傷口，採集十分少量的組織，符合實驗動物 3R 中的減量原則與精緻化的精神，但(3)-(4)採集到的組織量通常十分微量，需要進行方法學上的檢測，確定組織所萃取出來的 DNA 質量是否足夠進行後續實驗。

三、DNA 萃取、聚合酶連鎖反應與基因型定型

採集到的動物組織樣本，於實驗室內根據 QIAamp DNA Micro kit 的步驟進行組織中的 DNA 萃取後，將乾燥的 DNA 產物溶於 1x TE buffer 中，並保存於 -20°C 環境。聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)為以 DNA 為模版(template)進行微衛星基因座片段之擴增(amplification)。預計 PCR 反應物總體積為 5 μ l，包含 1 μ l DNA 樣本，0.25 units DNA polymerase、2-2.5 mM $MgCl_2$ 、0.1-0.15 mM dNTP、1.0 μ l Taq Buffer、0.1 μ M 前置和反置引子(引子的 5'端以螢光染劑標定)。PCR 熱循環流程如下：首先為 10 分鐘的起始變性反應(95 °C)，接著依序重複以下步驟 35 個循環：95



1140369



C-30 秒、各對引子之適合黏合溫度 30 秒及 72 °C -30 秒，最後是 72 °C-10 分鐘的延長反應。基因型定型(genotyping)的過程為，將 PCR 產物利用定序儀(ABI 3730xL genetic analyzer, Applied Biosystems)的毛細管進行電泳。電泳的結果以電腦軟體 Gene Marker version 2.4.7 軟體進行每個個體的基因座的等位基因判讀。

四、族群遺傳多樣性及遺傳結構分析

獲得所有樣本的微衛星基因座之基因型後，先以 GENEPOP 軟體(Raymond and Rousset, 1995)檢測各基因座間是否有連鎖不平衡(linkage disequilibrium)，若有兩個或以上高度連鎖的基因座，則保留其中一基因座進行後續分析。同時檢測各族群是否偏離哈溫平衡(Hardy-Weinberg equilibrium)，並檢測其異型合子是否過剩(heterozygote excess)或缺失(heterozygote deficiency)，顯著水準根據 Bonferroni correction 設定(原設定的 α 除以配對組數)。

族群遺傳多樣性的相關指數，以 GenAlEx6 軟體(Peakall and Smouse, 2012)分別計算兩族群的以下參數：每一基因座平均的等位基因數目(number of different alleles, N_a)、有效等位基因數(number of effective alleles, N_e)、香農指數(Shannon's Information Index, I ，量化等位基因頻率的多樣性與均勻度的指數)、異型合子觀測值(observed heterozygosity)及異型合子期望值(expected heterozygosity)。另以近親交配係數(inbreeding coefficient, F_{IS})，配合異型合子是否過剩或缺失的檢測，初步評估族群傳組成狀況。

族群遺傳結構的分析，以 GenAlEx6 軟體(Peakall and Smouse, 2012)計算族群間的遺傳指數 F_{ST} (fixation index)，衡量族群間遺傳組成分化程度。 F_{ST} 值介於 0 到 1 之間，可參考 Wright (1984)的分化程度評估標準： $F_{ST} < 0.05$ 為無分化， $0.05 < F_{ST} < 0.15$ 為中度分化， $0.15 < F_{ST} < 0.25$ 為高度分化， $0.25 < F_{ST}$ 為極高度分化。另透過分子變方分析(Analysis of molecular variance, AMOVA)(Excoffier *et al.*, 1992)檢測族群內(個體內與個體間)及族群間之遺傳變異所佔整體變異之比例。





結果與討論

一、分子遺傳標記的開發與測試

本研究針對 NCBI 資料庫中下載的 18 個微衛星基因座的序列分別設計 PCR 用引子後，針對於 2021 年在陽明山國家公園境內拾獲的 8 隻赤腹游蛇死亡個體(陽明山國家公園管理處及宜蘭大學毛俊傑老師提供)之 DNA，進行 PCR 擴增實驗條件及基因型定型測試。測試結果顯示由草花蛇開發的 9 對引子(KM408482-KM408489)皆無法成功進行跨種擴增。針對中國大陸的赤腹游蛇開發的 9 個微衛星基因座(KU879003-KU879011)序列，有 7 個基因座在可以在本研究的樣本中成功擴增且具有多型性，有 2 個基因座(SA051、SA739)目前無法成功擴增(表 1)。目前檢測結果無法成功擴增的 SA051 與 SA739 基因座，將重新嘗試設計引子並再次測試。

在 7 個基因座皆成功擴增並定型成功的 50 個樣本(表 2)中，每個基因座的等位基因數由 2 個至 12 個不等(表 1)，以 SA233 只有 2 個等位基因數最少，多型性最低。各基因座之間皆沒有檢測出連鎖不平衡($P>0.023$, Bonferroni correction)，後續分析不需考慮基因座間之連鎖性質。各族群各基因座哈溫平衡檢測中，僅台北陽明山族群的 SA580 一個基因座偏離哈溫平衡($P=0.039$)，其餘皆無偏離($P>0.05$)，且各基因座皆沒有檢測出具有無效等位基因。因此，本研究以此 7 個基因座的資料為基礎進行遺傳多樣性與結構分析。

二、DNA 樣本來源與 PCR 成功率測試

由於赤腹游蛇為珍貴稀有保育類動物，配合實驗動物 3R 中的減量原則與精緻化的原則，本研究以輕微侵入式或非侵入式的方式採樣組織，目前得組織採樣來源與方式包括：博物館浸泡福馬林的標本、因路殺或不明原因死亡個體的組織、出生後剛死亡的幼蛇胚胎卵膜、母蛇剛生產完的胎膜、動物園收容圈養個體的半片鱗片附加些微皮膚組織及蛇蛻。

由台大動物博物館浸泡過福馬林的 10 個標本樣本中，完全無法成功萃取出 DNA，因此無法進行後續的微衛星基因座 PCR 擴增與基因型定型實驗(表 2)。因路殺或不明原因死亡的組織樣本中，因個體死亡後組織即開始分解，因此死亡時間越久越不利 PCR 擴增與基因型定型實驗的成功率，雖然這類樣本基本上不知死亡時間，但在本研究收取到的 45 個樣本中，目前有 27 個樣本在 7 個基因座能擴增並定型成功。

在由剛死亡或活體採樣的樣本中，7 個基因座皆成功擴增並定型的比例上，蛇蛻(16/18)相較於母蛇生產後的胎膜(4/11)和鱗片附加些微皮膚組織(2/8)的來源高(表 2)，





測可能是因為蛇蛻的收集時間通常在蛻皮後的一天以內，殘留在蛇蛻上的表皮組織量比半片鱗片上的附加皮膚組織量多，加上蛇蛻上干擾 DNA 萃取的物質(如：黏液等)比母蛇生產後的胎膜少。目前的資料顯示，採集蛇蛻是針對活體個體採樣獲得 DNA 的適用方法，且此法為完全非侵入式的方法，適用於保育類蛇類應用。採集蛇蛻的缺點是蛇蛻的收集較適用在個體圈養的環境中可用，野外很難應用；且圈養空間(如：一缸)最好是一個一個個體分開飼養，或僅少數幾隻圈養在同一個空間，才能確認蛻皮的是哪一個個體，以避免重複取樣或辨識 DNA 來源錯誤。

三、陽明山與龍潭族群的遺傳多樣性

在 7 個基因座皆成功擴增並定型成功的 50 個樣本(表 2)中，排除非陽明山或桃園龍科族群的樣本(如：毛俊傑老師提供的早年桃園楊梅族群樣本、寵物店樣本、缺乏來源地點資料的樣本)，並排除動物園中已知有親子關係的幼體個體或已知為兄弟姊妹樣本，共獲得陽明山族群 20 個及桃園龍科族群的 19 個個體的完整基因型資料。兩族群的遺傳多樣性及遺傳分化現況探討以這 39 個樣本的基因型資料進行分析。

陽明山族群平均異型合子率觀測值(H_o)及期望值(H_e)分別為 0.550 及 0.604，桃園龍科族群平均異型合子率觀測值(H_o)及期望值(H_e)分別為 0.654 及 0.652(表 3)。以此指標而言，陽明山族群及桃園龍科族群皆保有一定程度的遺傳多型性，只要進行適合的保育與繁殖策略，應能維持族群整體的遺傳多樣性。

以每基因座平均的等位基因數(N_a)、有效等位基因數(N_e)與香農指數(I)比較，陽明山族群的遺傳多樣性指數皆略低於桃園龍科族群，近親交配指數略高於 0 ($F_{IS}=0.096$)，與族群的平均異型合子率觀測值(H_o)略低於期望值(H_e)趨勢(未達顯著差異水準)，暗示陽明山族群可能存在輕微的非隨機交配或族群隔離效應，推測可能與陽明山族群經歷過較大的棲地改變與數量減少的歷史(毛俊傑, 2025; 毛俊傑 and 姜博仁, 2019)有關。而桃園龍科族群的樣本雖然皆來自動物園的收容個體樣本，但這個結果顯示在經歷開發前的族群保持相當的遺傳多樣性，

四、陽明山與龍潭族群的遺傳分化

族群的遺傳變異組成分析結果，顯示 83%的遺傳變異均存在於個體內，6%存在個體間，11%存在族群。顯示目前於陽明山及桃園龍科族群的個體內的仍保有相當的遺傳多樣性。於動物園收容的桃園龍科族群個體而言，個體內保有高遺傳多樣性，且個體間





有遺傳差異，在圈養環境的繁殖交配中，產出的個體的產出基因單一化的風險較低，有利於未來的域外保育計畫。

在遺傳分化程度上，陽明山族群與桃園龍科族群存在顯著的遺傳分化， F_{ST} 值為 0.110 ($P(\text{rand} \geq \text{data}) = 0.01$)，屬中度分化程度。因此，陽明山族群與桃園龍科族群目前應視為兩個不同保育單元，各別規劃合適的域內或域外保育策略。舉例來說，當任一個族群有個體需緊急收容圈養時，應不與另一個族群的個體混養或交配繁殖，以盡量避免個別族群的遺傳獨特性喪失。





表1. 赤腹游蛇微衛星基因座的序列特性及本研究初次設計的引子、PCR成功率、等位基因數與等位基因範圍。

NCBI Accession Number	Locus Name	Repeat motif	Primer sequences(5'-3')	Successfully amplified	Number of alleles	of Allele size range (bp)
KU879003	SA012	(TG)n	F: ACAAGACATTGGGTGGTGAA R: GGGTGTAAATTTGGGGTTT	Y	8	117-131
KU879004	SA051	(AGAT)n	F: TCTCCTACAAATGATGGATGGA R: CTGGCAGTTGGCATCTCTCT	N		
KU879005	SA233	(CA)n	F: ACCAATACGGAGGGTTGAAA R: GGGTTGGACTAGACGGAAGG	Y	2	136,138
KU879006	SA419	(TATC)n	F: TGAGATCTGGACGAATGCTG R: AAGGCGTTCCAGAGTTATGC	Y	10	172-213
KU879007	SA571	(TCTG)n (CTTT)n (CAT)n	F: TTGAAAGCCACCACTGATCT R: CCCTACAGATGTCACAAGGGATA	Y	6	151-185
KU879008	SA580	(AGAT)n	F: AATTGCTTGAGGCATTCCAG R: TCAGGAAGGGTTGGACTTAGA	Y	12	135-167
KU879009	SA659	(TCTA)n	F: CTTGAGGGTGAGGGGATCTA R: GGCCTAGATAGCCCTTTGGT	Y	9	178-210
KU879010	SA739	(CA)n (TATC)n	F: TGCTCAAGATGTTCCAGCATT R: TCTTTCTCTGGGTGGTGGAG	N		
KU879011	SA741	(ATCT)n	F: TCCACATGGGTGAAGATCAA R: TCACAAGTGGCCAACATAGC	Y	8	114-146





表2. 不同組織與DNA來源與是否能成功定型完整7個微衛星基因座的樣本數量

採集組織時的 個體狀態	組織與 DNA 來源	7 個基因座 皆成功擴增 並定型	未能完全成功擴增 並定型 7 個基因座 (含部分基座成功)	總計
死亡已久或不 知死亡時間	博物館福馬林標本	0	10	10
	死亡個體肌肉或內臟樣本	27	18	45
剛死亡或活體	幼蛇胚胎卵膜	1		1
	母蛇生產後的胎膜	4	7	11
	鱗片附加些微皮膚組織	2	8	10
	蛇蛻	16	2	18
	總計	50	45	95





表3. 陽明山與桃園龍科族群的微衛星基因座多樣性資料

族群	N	Na	Ne	I	H _o	H _e	F _{IS}
陽明山	20	4.571	3.371	1.202	0.550	0.604	0.096
桃園龍科	19	6.286	3.837	1.402	0.654	0.652	-0.012

註：N: 樣本數；接下來為每基因座平均的數值，Na:等位基因數(mean number of alleles per locus)；Ne:有效等位基因數；I: 香農指數(Shannon's Information Index)，量化等位基因頻率的多樣性與均勻度的指數；H_o: 異型合子觀測值(observed heterozygosity)；H_e: 異型合子期望值(expected heterozygosity)；F_{IS}:近親交配指數(inbreeding coefficient)。





表4. 陽明山與桃園龍科族群的遺傳變異資料

Source	df	SS	MS	Est. Var.	%
(變異來源)					
Among Populations (族群間)	1	13.280	13.280	0.279	11%
Among Individuals (個體間)	37	89.336	2.414	0.156	6%
Within Individuals (個體內)	39	82.000	2.103	2.103	83%
Total	77	184.615		2.537	100%





參考文獻

- Amos W, Balmford A (2001) When does conservation genetics matter? *Heredity* **87**, 257-265.
- Applied Ecology Research Group (2004) Guidelines for use of live amphibians and reptiles in field research. *Journal of Herpetology, Supplement* **4**, 1-14.
- Barrett SC, Kohn JR (1991) Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. *Genetics and conservation of rare plants*, 3-30.
- Beebee T (2005) Conservation genetics of amphibians. *Heredity* **95**, 423-427.
- Beebee TJ (2008) Buccal swabbing as a source of DNA from squamate reptiles. *Conservation Genetics* **9**, 1087-1088.
- Bennett JR, Fahrig L (2021) Influence of habitat loss and fragmentation on wildlife populations. In: *Wildlife Management and Landscapes: Principles and Applications*, pp. 96-113. Johns Hopkins University Press.
- Blevins E, Wisely SM, With KA (2011) Historical processes and landscape context influence genetic structure in peripheral populations of the collared lizard (*Crotaphytus collaris*). *Landscape Ecology* **26**, 1125.
- Cordier JM, Aguilar R, Lescano JN, *et al.* (2021) A global assessment of amphibian and reptile responses to land-use changes. *Biological Conservation* **253**, 108863.
- de Lima Filho JA, Vieira RJAG, de Souza CAM, Ferreira FF, de Oliveira VM (2021) Effects of habitat fragmentation on biodiversity patterns of ecosystems with resource competition. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications* **564**, 125497.
- DeWoody JA, Harder AM, Mathur S, Willoughby JR (2021) The long-standing significance of genetic diversity in conservation. *Molecular Ecology* **30**, 4147-4154.
- Didham RK, Ghazoul J, Stork NE, Davis AJ (1996) Insects in fragmented forests: a functional approach. *Trends in Ecology & Evolution* **11**, 255-260.
- Dodd Jr. CK (2016) *Reptile ecology and conservation: a handbook of techniques* Oxford University Press Oxford, UK.
- Ellstrand NC, Elam DR (1993) Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics* **24**, 217-242.
- Ernest HB, Vickers TW, Morrison SA, Buchalski MR, Boyce WM (2014) Fractured genetic connectivity threatens a Southern California Puma (*Puma concolor*) population. *PloS one* **9**, e107985.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**, 479-491.
- Fahrig L (2003) Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **34**, 487-515.
- Fischer J, Lindenmayer DB (2007) Landscape modification and habitat fragmentation: a synthesis. *Global Ecology and Biogeography* **16**, 265-280.





- Foley JA, DeFries R, Asner GP, *et al.* (2005) Global consequences of land use. *Science* **309**, 570-574.
- Garner BA, Hoban S, Luikart G (2020) IUCN Red List and the value of integrating genetics. *Conservation Genetics* **21**, 795-801.
- Gerlach G, Musolf K (2000) Fragmentation of landscape as a cause for genetic subdivision in bank voles. *Conservation Biology* **14**, 1066-1074.
- Gestich CC, Arroyo-Rodríguez V, Saranholi BH, *et al.* (2021) Forest loss and fragmentation can promote the crowding effect in a forest-specialist primate. *Landscape Ecology*, 1-11.
- Goldstein D, Schlötterer C (1999) *Microsatellites: Evolution and Applications* Oxford Univ Press, Oxford.
- Hauser SS, Athrey G, Leberg PL (2021) Waste not, want not: Microsatellites remain an economical and informative technology for conservation genetics. *Ecology and Evolution* **11**, 15800–15814.
- IUCN (2020) The IUCN Red List of Threatened Species. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, <https://www.iucnredlist.org>.
- Jehle R, Arntzen J (2002) Microsatellite markers in amphibian conservation genetics. *Herpetological Journal* **12**, 1-9.
- Kiene F (2021) *Effects of habitat fragmentation on parasite infections in mouse lemurs (Microcebus spp.) and small mammals in northwestern Madagascar*, Dissertation, Hannover, Tierärztliche Hochschule Hannover, 2021.
- Lacy RC, Lindenmayer DB (1995) A simulation study of the impacts of population subdivision on the mountain brushtail possum *Trichosurus caninus* Ogilby (Phalangeridae: Marsupialia), in south-eastern Australia. II. Loss of genetic variation within and between subpopulations. *Biological Conservation* **73**, 131-142.
- Laikre L (2010) Genetic diversity is overlooked in international conservation policy implementation. *Conservation Genetics* **11**, 349-354.
- Madesis P, Ganopoulos I, Tsaftaris A (2013) Microsatellites: evolution and contribution. In: *Microsatellites. Methods in Molecular Biology* (ed. Kantartzi S), pp. 1-13. Humana Press, NJ.
- Marshall JC, Kingsbury BA, Minchella DJ (2009) Microsatellite variation, population structure, and bottlenecks in the threatened copperbelly water snake. *Conservation Genetics* **10**, 465-476.
- Minter M, O'Brien D, Cottrell J, *et al.* (2021) Exploring the potential for 'Gene Conservation Units' to conserve genetic diversity in wild populations. *Ecological Solutions and Evidence* **2**, e12061.
- Naeem S, Thompson LJ, Lawler SP, Lawton JH, Woodfin RM (1994) Declining biodiversity can alter the performance of ecosystems. *Nature* **368**, 734-737.
- Neuwald JL, Templeton AR (2013) Genetic restoration in the eastern collared lizard under prescribed woodland burning. *Molecular Ecology* **22**, 3666-3679.
- O'Reilly PT, Kozfkay CC (2014) Use of microsatellite data and pedigree information in the genetic management of two long-term salmon conservation programs. *Reviews in fish biology and fisheries* **24**, 819-848.





- Pärli R, Lieberherr E, Holderegger R, *et al.* (2021) Developing a monitoring program of genetic diversity: what do stakeholders say? *Conservation Genetics* **22**, 673-684.
- Peakall R, Smouse PE (2012) GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Bioinformatics* **28**, 2537-2539.
- Porter WF, Parent CJ, Stewart RA, Williams DM (2021) *Wildlife Management and Landscapes: Principles and Applications* Johns Hopkins University Press, MD.
- Ramsar Convention on Wetlands (2018) *Global Wetland Outlook: State of the World's Wetlands and Their Services to People* Ramsar Convention Secretariat, Gland, Switzerland.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* **86**, 248-249.
- Recher H (1999) The state of Australia's avifauna: a personal opinion and prediction for the new millennium. *Australian Zoologist* **31**, 11-27.
- Redeker S, Andersen LW, Pertoldi C, *et al.* (2006) Genetic structure, habitat fragmentation and bottlenecks in Danish bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Mammalian Biology* **71**, 144-158.
- Ribeiro SE, de Almeida-Rocha JM, Weber MM, *et al.* (2021) Do anthropogenic matrix and life-history traits structure small mammal populations? A meta-analytical approach. *Conservation Genetics* **22**, 703-716.
- Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology* (eds. Krawetz S, Misener S), pp. 365-386. Humana Press, NJ.
- Sala OE, III FSC, Armesto JJ, *et al.* (2000) Global Biodiversity Scenarios for the Year 2100. *Science* **287**, 1770-1774.
- Schulte U, Gebhard F, Heinz L, Veith M, Hochkirch A (2011) Buccal swabs as a reliable non-invasive tissue sampling method for DNA analysis in the lacertid lizard *Podarcis muralis*. *North-Western Journal of Zoology* **7**, 325-328.
- Selkoe KA, Toonen RJ (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* **9**, 615-629.
- Spielman D, Brook BW, Frankham R (2004) Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 15261-15264.
- Städele V, Vigilant L (2016) Strategies for determining kinship in wild populations using genetic data. *Ecology and Evolution* **6**, 6107-6120.
- Stuart SN, Chanson JS, Cox NA, *et al.* (2004) Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* **306**, 1783-1786.
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, *et al.* (2012) Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* **40**, e115.
- Willi Y, Kristensen TN, Sgrò CM, *et al.* (2022) Conservation genetics as a management tool: The five best-supported paradigms to assist the management of threatened species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **119**, e2105076119.





- Wood DA, Halstead BJ, Casazza ML, *et al.* (2015) Defining population structure and genetic signatures of decline in the giant gartersnake (*Thamnophis gigas*): implications for conserving threatened species within highly altered landscapes. *Conservation Genetics* **16**, 1025-1039.
- Wright AJ, Barry KE, Lortie CJ, Callaway RM (2021) Biodiversity and ecosystem functioning: Have our experiments and indices been underestimating the role of facilitation? *Journal of Ecology* **109**, 1962-1968.
- Wright LI, Tregenza T, Hosken DJ (2007) Inbreeding, inbreeding depression and extinction. *Conservation Genetics* **9**, 833.
- Wright S (1984) *Evolution and the genetics of populations, volume 4: variability within and among natural populations* University of Chicago press.
- 毛俊傑 (2025) 瀕危物種赤腹游蛇保育行動計畫，農業部林業及自然保育署。
- 毛俊傑與姜博仁 (2019) 陽明山國家公園頂湖地區赤腹游蛇(*Sinonatrix annularis*) 族群監測計畫，陽明山國家公園管理處委託報告。
- 賴玉菁、毛俊傑 (2012) 赤腹游蛇、唐水蛇及鉛色水蛇之族群分布及棲地評估(4/4)，行政院農業委員會林務局補助計畫。

