



GENOMICS



行政院農業委員會

林務局

行政院農業委員會林務局 109 年度

歐亞水獺全基因定序及族群遺傳分析
成果報告

採購案號：tfbj-1090613

計畫期間：109 年 12 月 10 日 至 110 年 12 月 9 日

廠商：基龍米克斯生物科技股份有限公司

結案報告日期：111 年 01 月 15 日



目錄

一、中文摘要.....	第 3 頁
二、英文摘要.....	第 4 頁
三、前言.....	第 5 頁
四、工作目標.....	第 9 頁
五、材料與方法.....	第 10 頁
六、結果.....	第 17 頁
七、討論.....	第 47 頁
八、結論.....	第 53 頁
九、參考文獻.....	第 54 頁
十、審查意見答覆.....	第 61 頁
十一、附件.....	第 68 頁



一、中文摘要

歐亞水獺為廣泛分佈於歐亞大陸及北非的食肉目動物，為全球近危物種，已從台灣本島絕跡，目前僅金門有穩定族群，被列為台灣陸域脊椎動物紅皮書中的瀕危物種。本研究以次世代基因組定序方式，分析十四隻金門歐亞水獺的基因組序列，並與來自歐洲的個體基因組序列進行比對，以評估目前金門歐亞水獺的遺傳多樣性、近親交配係數、編碼區非同義與無義突變數及歷史遺傳有效族群動態。結果發現金門的歐亞水獺族群有遺傳多樣性偏低（核基因組： $\pi=0.000959$ ；粒線體基因組 $\pi=0.00003$ ）的現象，可能與末次冰期結束後，遺傳有效族群量偏低(以 SMC++法估算約 2,734 隻)有關。我們發現金門歐亞水獺族群的近交係數（平均 $F_{ROH}=0.00137$ ）並不高，且具多粒線體基因組單倍型（13 隻 2 個單倍型），不支持金門歐亞水獺族群有嚴重近親交配的現象，也不支持該族群為一個長期孤立的子餘族群。根據遺傳救援準則評估，我們認為金門歐亞水獺族群目前並無進行遺傳救援的迫切需求。本研究結果將可提供未來監控金門歐亞水獺族群遺傳多樣性及遺傳健康程度的基準數值，及發展可供歐亞水獺使用的非侵入性取樣遺傳標記系統的基礎資料。

二、 Abstract

The Eurasian otters (*Lutra lutra*) is one of the most widely distributed carnivores in Europe, Asia and north Africa. It is considered as a globally near threaten species by IUCN, and is listed in the Taiwan Terrestrial Vertebrate Red Book as critically endangered. It is extinct from the Taiwan Island, but still has a stable population in Kingman Island along the mainland China coast. This project aims to evaluate the genetic diversity, level of inbreeding, accumulation of mutations in the coding region, and historical genetic effective population trajectory of the Kingman otter population by analyzing genomic variation of otters from the Kingman (n= 14) and Europe (n= 2). We found that the genetic diversity of Kingman otter population is low (nuclear genomic diversity : $\pi=0.0009459$; mitochondrial genomic diversity: $\pi=0.00003$) ; it could be rendered by its low genetic effective population size (N_e estimated by SMC++: about 2,734) since the end of the last glacial period about 18,000 years ago. We also found that Kingman otters have low level of inbreeding coefficient (mean $F_{ROH}= 0.00137$) and multiple mitochondrial haplotypes (2 haplotypes for 13 individuals). Numbers of nonsynonymous and missense mutations in each Kinman otter genome were also estimated. Our results do not support the hypothesis that Eurasian otter in Kingman Island is a long term isolated relict population. Based on the guideline of genetic rescue, the Kinman otter population has no immediate need to perform genetic rescue. Our results should provide the baseline data for future monitoring of the genetic diversity and genetic health of Eurasian otters in Kingman. Our genetic data also provide the base to developing new genetic marker system for noninvasive otter population monitoring or other uses in the future.



三、前言

歐亞水獺 (*Lutra lutra*) 分佈在亞洲、歐洲、非洲北部內陸淡水區域及沿海地區，為古北區分佈最廣泛的食肉目哺乳動物之一 (MacDonald et al., 1994)，現生的歐亞水獺可依型態分為十二個亞種 (Hung & Law, 2016)，目前歐洲地區的歐亞水獺指名亞種 (*L. l. lutra*) 族群數量最多 (MacDonald et al., 1994)，但在亞洲的族群數量資料則極度貧乏 (Conroy et al., 1998)；目前 IUCN 將歐亞水獺的保育等級列為全球近危物種 (near threaten category; Roos et al., 2015)。根據文獻記載 1550-1950 年間歐亞水獺在東亞地區分布廣泛 (Conroy et al., 1998)，以中國為例，從中國東部沿海到西北內陸地區都能見到歐亞水獺的蹤影，但自 1950 年代起，全中國各地都有大量歐亞水獺的毛皮貿易紀錄，接著歐亞水獺在中國的能見度就急遽下降 (Li & Chan, 2018)，目前僅有零星紀錄；類似的族群下降也普遍發生在亞洲其他地區，如今歐亞水獺在亞洲各國普遍列為重要保育物種，但即使受到保護，歐亞水獺在亞洲許多地區包含台灣本島已然滅絕。目前東亞地區僅朝鮮半島的歐亞水獺族群有明顯回復的趨勢 (Jo et al., 2017, 2020)，而東亞的東南沿岸地區則僅在金門島上有穩定的歐亞水獺華南亞種 (*L. l. chinensis*；分布於亞洲大陸的華中、華南、中南半島、泰國、馬來西亞、琉球島及台灣，Hung & Law, 2016) 族群，因此台灣在 2017 年也將歐亞水獺列入紅皮書 (Cheng et al., 2017) 中陸域哺乳類動物的極度瀕危物種。目前對於金門歐亞水獺的族群基礎資料所知有限，僅有李 (2015) 以微衛星標記從糞便樣本辨識出 92 隻個體，並推估目前金門約有 200 隻歐亞水獺 (翁 et al., 2020)；考慮中國大陸東南沿海的開發與棲地破壞情況，及考察廈門已無水獺的蹤跡後，目前推論金門的歐亞水獺族群很可能是一個孤立的子遺族群，難有新的遺傳變異從週邊地區族群流入 (張廖, 2020)。這將使金門的歐亞水獺族群面臨許多困境，除了族群數量容易受到隨機波動而驟降外，在遺傳上更有許多潛在風險，例如小族群會因強烈的遺傳漂變，導致族群內遺傳多樣性快速隨機丟失 (Bijlsma & Loeschcke, 2012)，這會弱化適應未來環境變化的演化潛能 (Barrett & Schluter, 2008; Lai et al., 2019; Lande & Shannon, 1996)，也容易增加有害突變在族群中累積的可能，使得族群內的遺傳負荷 (genetic load) 增加 (Kimura, 1962; Kirkpatrick & Jarne, 2000)，嚴重的話還可能因遺傳崩潰 (genetic meltdown) 而導致族群滅絕 (Gabriel & Bürger, 1994; Rogers & Slatkin, 2017)；此外，小族群內個體有限，因此容易產生近親交配的



狀況，而升高個體健康不佳或繁殖力下降等近交衰退 (inbreeding depression) 的風險 (D. Charlesworth & Charlesworth, 1987; Keller & Waller, 2002)。因此自其他歐亞水獺族群引入個體以帶入新的遺傳變異進行遺傳救援 (genetic rescue)，提升小族群內的遺傳變異，減緩遺傳漂變所造成的不利有害突變累積，以提高族群的適存度 (fitness, Bell et al., 2019; Hedrick & Garcia-Dorado, 2016; Ingvarsson, 2001; Whiteley et al., 2015)，便成為需要被考量的保育手段，到目前為止遺傳救援已累積一些成功的案例 (Whiteley et al., 2015 文獻回顧)，例如引入外來個體，成功提高瀕危的佛羅里達山獅 (*Puma concolor coryi*) 的雜交一代 (F1) 個體的存活率 (Benson et al., 2011)，最近遺傳救援更被展示為促進加勒比海地區瀕危珊瑚復育的有效手段 (Hagedorn et al., 2021)。近年來由於根據路殺個體及野外自動相機紀錄，發現金門水獺個體有心臟肥大及尾部扭曲變形的麒麟尾 (kinky tail) 現象 (袁守立攝影, <https://wuo-wuo.com/topics/wildlife/taiwan-otter-lutra-lutra/1152-otter-conservation02>)。雖然水獺心臟肥大除了可能是遺傳疾病 (例如狗的 arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy 病, Meurs et al., 2010) 外，也可能是老化的現象；而麒麟尾在脊椎動物除了可能是一個受遺傳控制的尾部脊椎發育異常表型 (例如 Wang et al., 2019; Chu, 1986)，也可能是尾部受損導致，因此這些個體的異常性狀，還須經嚴謹的獸醫檢視及遺傳證據檢測是否為遺傳異常所導致，但目前還無任何關於歐亞水獺麒麟尾性狀的遺傳基礎之研究報告，因此並無法對金門歐亞水獺個體的麒麟尾個體是否為近親交配的結果進行檢測。但基於金門水獺族群是一個孤立小族群之前提，保育人士一直在思考進行遺傳救援的可能性，但引入外來個體的遺傳變異，也可能打破瀕危族群對當地環境長期適應所產生的遺傳組合，而導致對當地環境適應性下降的遠交抑制 (outbreeding depression；不同族群雜交子代適存度較低的現象) 的不利後果 (Dobzhansky, 1948, Frankham et al., 2011; Lynch, 1991)；因此必須了解金門歐亞水獺族群的遺傳多樣性及近親交配的程度，以評估其是否需進行遺傳救援 (Hedrick & Fredrickson, 2010)。在過去，個體間的近親交配狀況，需透過譜系資料來推估，但對野生動物而言，譜系資料通常無法完整取得，近年來由於 DNA 定序技術的進步，取得個體完整基因組序列不再遙不可及，基因組序列的取得，將可用來準確估算遺傳的多樣性，更可依基因組中同型合子連續片段 (Run of homozygosity, ROH) 的長度與數量，來推估族群的近親交配程度及遺傳上有效族群大小 (effective population size, N_e)； N_e 是族群遺傳學上一個極為重要的參數，可用來描述一個族群的遺傳特徵 (例如遺傳漂變導致遺傳多樣



性丟失的速度、或者隨機發生近親交配的機率等），及一個族群遺傳多樣性的變化動態， N_e 越小，因遺傳漂變導致遺傳多樣性丟失的速度就越快，隨機發生近親交配的機率就越大；一般來說 N_e 與實際族群數量呈正比，實際族群數量越大 N_e 越大(B. Charlesworth, 2009)，但 N_e 普遍大約為實際族群數量的十分之一(Frankham, 1995a; Palstra & Ruzzante, 2008a)。譜系歷史中如果存在近親交配的現象(McQuillan et al., 2008a)，基因組中的兩條同源染色體會存在同型合子連續片段，近親交配個體的血緣越近、近交發生的時間越近，則預期基因組中 ROH 的片段越多，長度也越長(Ceballos et al., 2018a)，模擬研究的結果顯示，以 ROH 為基礎的近交係數 (F_{ROH} : ROH 片段長度除以基因組總長度；McQuillan et al., 2012)，比從譜系資料計算來的近交係數 (pedigree inbreeding coefficient, F_P) 更能反應個體間由共祖(coancestry)遺傳到相同遺傳片段(identical by descent, IBD)的程度 (Kardos et al., 2018)，不過即使非近期近親交配的異交個體基因組內仍可能攜帶大量較短的 ROH 片段(背景 ROH, background ROH；在一些案例中背景 ROH 總長可 > 4 Mb；McQuillan et al., 2008b)，這些背景 ROH 反映的是遠祖近親交配的狀況，與近期的近親交配無關(Ceballos et al., 2018a)，因此在一些案例中發現，以較長的 ROH 片段（例如 4-5Mb）計算的 F_{ROH} 與 F_P 有較大的相關性，被認為能準確反映近期譜系關係上的近親交配程度(McQuillan et al., 2008b; Kirin et al., 2010)。圖 1 顯示近親交配及族群大小如何影響族群內，個體 ROH 總長度(sum of total ROH length, SROH)及 ROH 總數(number of ROH, NROH)的分佈(Ceballos et al., 2018b): 當族群龐大且無嚴重近親交配 (consanguineous)，或者不同族群間有相當程度基因交流 (admixture) 時，SROH 短、NROH 少；當族群通過瓶頸事件(bottleneck；或者 N_e 小)，或者通過瓶頸事件並有嚴重近親交配時，則 SROH 長、NROH 多；當族群較小，或者大族群卻有嚴重近親交配，SROH 及 NROH 的總長度及數量則居中，整體而言，族群越大（或者跟其他族群有充分基因交流），近親交配的機會越小，ROH 數量越少，長度也越短。以野生動物的 ROH 為例，瑞典瀕危的 wels catfish *Silurus glanis* 個體的平均 F_{ROH} 在 0.3-0.4 之間(Jensen et al., 2021)。而極度瀕危的姬豬 (The pygmy hog *Porcula salvania*)，野外個體的平均 F_{ROH} 為 0.232(L. Liu et al., 2021)。

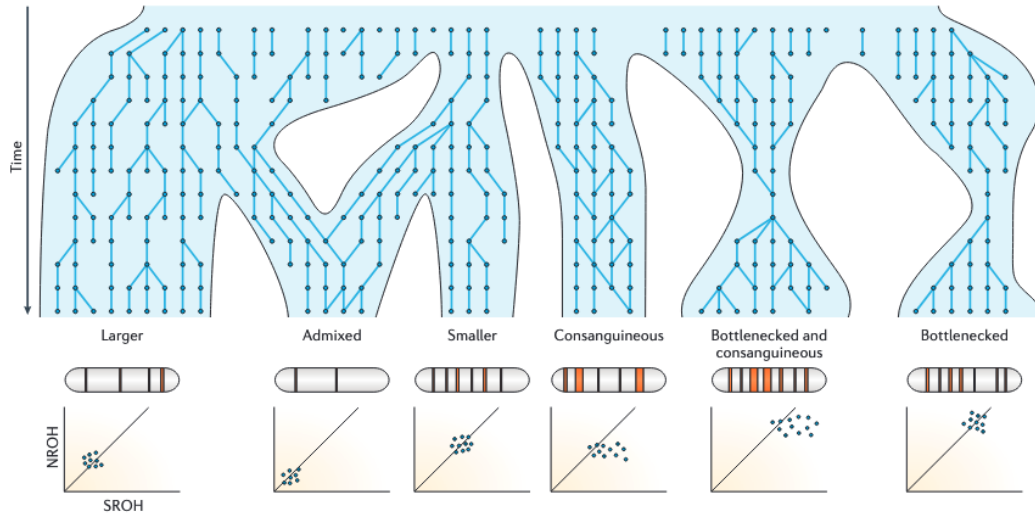


圖 1、族群內個體 ROH 總長度(sum of total ROH length, SROH)及 ROH 總數(number of ROH, NROH)的分佈受到其交配系統及族群大小影響(Ceballos et al., 2018b)。

而一個族群遺傳多樣性的多寡，除了受到近期族群數量的動態變化（例如瓶頸事件及近親交配，導致遺傳漂變導致的遺傳變異隨機丟失加劇，以至 N_e 急遽縮小）的影響，也會受到長期的歷史族群動態的影響(Ellegren & Galtier, 2016)，例如自末次冰盛期（last glacial maximum, LGM，約兩萬兩千年前）結束後，地球氣候的劇烈改變，造成生態環境隨之劇變，也會導致部分生物族群自末次冰盛期後的族群長期萎縮，以致 N_e 縮小（例如蘇門答臘犀牛，Mays et al., 2018），因此金門歐亞水獺族群的遺傳多樣性，除了近期的族群動態影響外，也可能受到長期氣候環境變遷的影響，因此需要透過估算其 N_e 的歷史動態變化，判斷金門的亞洲歐亞水獺 N_e 是否長期穩定，如果遺傳有效族群量約為實際族群的十分之一(Frankham, 1995a; Palstra & Ruzzante, 2008a)，則反映其為一長期孤立的小族群，其遺傳多樣性已在遺傳漂變下，達成平衡；反之，如果遠大於其現生族群量，則表示金門的亞洲歐亞水獺，並非一長期的孤立族群，可能與金門外部的歐亞水獺族群有一定程度的基因交流聯繫，或者是極為近期族群才縮小，遺傳變異與真實族群數量上尚未因遺傳漂變而達成平衡，不足以反映其實際的族群孤立狀況；因此評估金門歐亞水獺的遺傳有效族群量及其歷史動態變化，不但有助了解決定其遺傳多樣性的因子，也有助於間接評估金門亞洲歐亞水獺的族群孤立性程度；近年快速發展的全基因組定技術，便可提供適當的遺傳資料對上述問題進行適當評估。

四、工作目標

1. 評估金門歐亞水獺的遺傳多樣性，並據以估算金門歐亞水獺的歷史性遺傳有效族群數量動態?了解金門歐亞水獺的遺傳有效族群數量是否有長期族群下降的趨勢?
2. 比較歐洲的歐亞水獺及金門的歐亞水獺遺傳多樣性差異，評估金門族群是否比目前歐洲族群的遺傳多樣性為低?
3. 對比歐洲的歐亞水獺，以評估金門歐亞水獺族群以 ROH 估算的近交係數 (F_{ROH}) 是否偏低?
4. 評估不利突變的累積以探討是否存在近交衰退的可能性
5. 以基因組遺傳資料對遺傳救援的必要性提供依據



五、材料與方法

1. DNA 樣本製備

我們總共獲得台北市立動物園與台灣特有生物研究保育中心收集來自金門的路殺、救傷或收容的歐亞水獺組織樣本共 34 件（附錄表一），其中台北市立動物園提供 15 件，其包括一個在動物園內繁殖，為兩隻自金門收容個體(小金與金莎)交配繁殖的子代，而台灣特有生物研究保育中心提供 20 件，這些樣本的採樣年份自 2006-2019 年。我們以修改自 Gemmell & Akiyama (1996)的 LiCl 及氯仿法自組織進行 DNA 萃取，最後將乾燥的 DNA 樣本溶於 2 次水中。然後以 0.7%瓊膠於 TBE 緩衝液中以 100 伏特電流進行電泳，再進行 DNA 片段分析(Fragment analysis) ，以 1,000~48,500bp (base pair, 鹼基對) 片段長的 DNA 濃度為建庫標準，若大於 1,000bp 片段的 DNA 量大於總 DNA 量的 80%，或介於 200~48,500bp 的 DNA 片段濃度小於總 DNA 量 20%，即判定達一般建庫或少量建庫標準而予以建庫(表一)；建庫採用 Illumina 定序平臺的通用型建庫試劑 - KAPA HyperPlus Kit，次世代全基因組定序則採用 Illumina 公司的 Novaseq 6000 定序系統。

2. 生物資訊分析

i. 序列資訊質控修剪

為提高下游分析資料的正確度及可靠性，我們對所獲得的原始序列以 fastp0.21(Chen et al., 2018)進行序列的質性控制，去除定序過程中所加入的 PCR 接頭(Adaptor)序列，及保留定序正確性評分(Phred quality score)達 15(q15)以上(定序錯誤率 <0.0312)的鹼基進行後續分析。

ii. 基因組對照拼裝(mapping)

經質控修剪後的序列，以 BWA-0.7.13 (H. Li & Durbin, 2009)中的 BWA-MEM 功能對照(mapping)到已發表的歐亞水獺完整基因組序列(Mead et al., 2020; BioProject accession number PRJEB35340; <https://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/PRJEB35340>)，該基因組為一隻來自英國的雄性歐亞水獺個體，核基因組全長 2.44G，也包括全長 16,536 鹼基對的粒線體基因組(INSDC accession: LR822067.1)。對照完畢後經 SAMtools-1.3.1 (Li et al., 2009)處理形成的 sam 檔及 bam 檔，依序使用 samtools 參



數 *fixmate*; 選取保留 R1、R2 兩邊 PCR 引物接頭序列正確配對 (proper pair) 的序列 (指令 `samtools view -f3 -F268 -q30`) ; 之後再去除建庫時因 PCR 擴增步驟產生的重複定序序列 (*rmdup*) 後, 最後以 *depth* 功能計算每隻個體基因組經過上述步驟後, 所獲得最終的核基因組及粒線體基因組 DNA 序列的平均覆蓋度 (被定序的次數)。

iii. 個體及族群的單核酸變異點判讀(SNP calling)

經由上述步驟得到最終可用來分析的序列後, 我們以 *GATK v4* (*Genome Analysis Toolkit*, McKenna et al., 2010) 進行個體的單核酸變異點 (SNPs) 判讀, 步驟如下

- a. 首先利用 *samtools faidx* 指令建立參考基因組的索引, 生成 *.fai* 及 *.dict* 等兩個索引文件。
- b. 以 *GATK HaplotypeCaller* 指令, 辨別哪些變異點位為個體單核酸變異點或插缺 (INDEL) 處, 及計算、確定、分配每個樣本的單倍型 (haplotype)。
- c. 為後續族群 SNP 分析, 我們使用 *GATK HaplotypeCaller* 指令製作個體的 *GVCF* 檔案, *GVCF* 檔案在多樣本聯合時有較高的計算效率。
- d. 以 *CombineGVCFs* 指令聯合個體的 *GVCF* 形成族群的 *GVCF* 檔案, 再轉換成 *VCF* 檔案供後續分析利用。

iv. 族群遺傳多樣性估算

a. 核基因組多樣性

核基因組部分, 我們利用族群 *VCF* 檔案計算每隻歐洲水獺個體的 SNP 數量、每隻個體雜合 SNP 位點數及個體的雜合度 (個體雜合 SNP 位點數 / 基因組長度, θ)。我們以 *VCF2Dis* (<https://github.com/BGI-shenzhen/VCF2Dis>) 計算兩個個體間每個 SNP 位點的核苷酸多樣性 (nucleotide diversity, π), 再將所有 SNP 位點的總合除以基因組總長度, 以得到個體間基因組的遺傳距離 (p 距離), p 距離代表兩個基因組間差異的鹼基數占基因組的比例, 而族群內個體的平均遺傳距離即為族群的核苷酸多樣性 (nucleotide diversity, π ; Nei & Li, 1979), 而金門歐亞水獺個體及來自歐洲個體 (含參考基因組的英國個體) 間核基因組序列的平均遺傳距離則為族群間遺傳距離 (d_{xy} ; (Nei & Li, 1979; Nei, 1987), 根據 d_{xy} 及兩個族群的 π 值, 計算兩族群分化後所累積的遺傳差異, 即兩族群間的淨



遺傳距離 d_a ($d_a = d_{xy} - (\pi_1 + \pi_2) / 2$)， π_1 、 π_2 為兩個族群各自的 π 值 (Nei & Li, 1979)。

b. 粒線體基因組

粒線體基因組部分，為降低序列誤差，因粒線體 DNA 具有比核 DNA 在基因組中佔有相當高程度的比例，因此我們在計算每個個體的 SNP 時限制單位點覆蓋度須大於 50 倍為基準，小於 50 倍位點的 SNP 定為遺失(N)。同時也計算歐洲及金門族群的單倍體數。多樣性指標則計算個體間粒線體基因組的 p 距離、族群內個體的核苷酸多樣性，以及金門歐亞水獺個體及來自歐洲個體（含參考基因組的英國個體）間的族群間遺傳距離 d_{xy} ，及淨遺傳距離 d_a 。

v. 歐洲與金門族群分化

為瞭解金門水獺族群與歐洲族群的遺傳分化，我們以主成份分析及親緣關係重建分析來自金門與歐洲水獺個體的基因組變異。

a. 主成份分析

為了解金門與歐洲歐亞水獺的遺傳分化程度，我們以主成份分析（principle component analysis, PCA）對歐洲及金門歐亞水獺族群的地理結構進行分析，為避免有連鎖關係的 SNP 位點會過度加權個體間遺傳的相似性，我們使用 PLINK v1.9 (Purcell et al., 2007) 剔除連鎖不平衡係數 $r^2 > 0.2$ 的 SNP 位點（指令 --indep-pairwise 50kb 5kb 0.2），並剔除 SNP 位點中明顯偏離哈溫平衡 ($p < 0.001$; 指令 --hwe 0.001) 的位點，以濾除可能受到選擇作用的 SNP 位點，然後再以 Plink 進行主成份分析，以第一及第二主成份的分數來綜合描述各個歐亞水獺個體的 SNP 位點變異，而遺傳組成相似的個體會有數值相近的第一及第二主成份分數。

b. 親緣分析

我們以 FastME 2.0 (Lefort et al., 2015) 的鄰接法 (Neighbor-Joining, Saitou & Nei, 1987))，以個體基因組序列間遺傳距離，建構一個歐亞水獺個體的親緣關係樹，由於缺乏適當外群為親緣關係樹定根 (rooting)，個體間親緣關係以無根樹 (unrooted tree，或親緣關係網絡 phylogenetic network) 的方式呈現。

vi. 個體全基因組近交係數 (F_{ROH}) 估算



為評估目前金門歐亞水獺個體的近親交配程度，我們用 PLINK v1.9 計算歐亞水獺個體基因組中同型合子連續片段 (Run of homozygosity, ROH) 的長度，譜系歷史中如果存在近親交配的現象(McQuillan et al., 2008a)，基因組中的兩條同源染色體會存在同型合子連續片段，近親交配個體的血緣越近，近交發生的時間越近，則預期基因組中 ROH 的片段越多，長度也越長 (Ceballos et al., 2018a)。ROH 的界定有兩種方法，第一種是計算同型合子位點連續出現的延伸長度，但這種容易受到因連鎖不平衡而造成變異的 SNP 位點 (single nucleotide variants, SNVs) 非平均分佈於基因組中，也就是當基因組中某些區域的變異過低，會導致高估 ROH 片段數及長度，而影響 ROH 長度的估算(Howrigan et al., 2011)；第二種 ROH 的估算方式則是先找出族群中 SNPs 位點，然後計算連續若干個 SNPs 都是同型合子的長度，相對於第一種方法，這個方法受 SNPs 非均勻分布的影響較小(Howrigan et al., 2011)，因此這個方法曾被用來計算及比較已發表哺乳類動物基因組的 ROH(Brüniche-Olsen et al., 2018)。為將歐亞水獺的結果與其他哺乳類動物基因組進行比較，本研究參考 Brüniche-Olsen et al., (2018)的參數設定，對歐亞水獺的 ROH 進行推估。為避免基因組因低覆蓋度（定序次數過低）造成核苷酸誤判，導致判讀出來的雜合 SNP 數增加，提高假陽性 (type I error) 的機率，我們選用基因組定序平均覆蓋度 ≥ 15 倍的個體進行此項估算，以 20 個同型純合 SNP 當作滑動窗口 (指令 `--homozyg-window-snp 20`)，具有 20 個同型純合 SNP 數(指令 `--homozyg-snp 20`)，及每個滑動窗口允許 1 個雜合位點 (指令 `--homozyg-window-het 1`)，1 個 SNP 誤判(指令 `missing calls`，`--homozyg-window-missing 1`)，相鄰窗口 SNP 重疊閾值 0.01(overlapping, 指令 `--homozyg-window-threshold 0.01`)。由於 Plink 的 `--homozyg` 指令預設只辨識長度 $> 1,000\text{kb}$ 的 ROH 片段，這會忽略不計基因組中長度較短 ($< 1000\text{kb}$) 的 ROH 片段，因此除了使用預設的 $1,000\text{kb}$ 設定外，另外使用指令 `--homozyg-kb 500`，以包含長度 $> 500\text{kb}$ 的較短 ROH 片段。根據預設指令計算將所得 ROH 總長度轉換得到的 F_{ROH} ，稱為 $F_{\text{ROH}1000\text{k}}$ ，而將根據 `--homozyg-kb 500` 指令所得到 ROH 總長度轉換獲得的 F_{ROH} ，則稱為 $F_{\text{ROH}500\text{k}}$ 。

vii. 估算金門水獺族群基因組內編碼區的突變



小族群內的遺傳漂變作用力可大於淘汰不利突變的純化選擇(purifying selection)，導致小族群內累積較多的不利突變(Kimura, 1962; Kirkpatrick & Jarne, 2000)。為評估金門歐亞水獺族群內不利突變累積的狀況，我們對來自金門及歐洲歐亞水獺個體基因組內蛋白質編碼區的突變數量進行估算。

a. 參考基因組的結構與功能註釋

因 NCBI 或 Ensembl 等知名生物技術資訊中心尚未對歐亞水獺進行基因組註釋，為判定歐亞水獺個體基因組編碼區突變數量的估算，我們需先界定歐亞水獺參考基因組中編碼區位置，因此我們進行初步歐亞水獺的基因組註釋。我們採用 Augustus v3.2.3 從頭預測(*Ab initio*)功能，搭配 Augustus 已建立好的 human 模型進行水獺基因組的從頭預測。Augustus 跨支系預測顯示以人類模型預測雞(73.6%)或斑馬魚(80.2%)，準確性雖有不足，但靈敏度(sensitivity)仍有 7 成左右(Hoff & Stanke, 2019)，因此利用人類模型對同為哺乳類的歐亞水獺進行基因組預測應能界定大部分歐亞水獺基因組區域。

由 Augustus 從頭預測(*Ab initio*)得到基因組基因結構後，擷取所有基因序列並轉換為基因蛋白質序列，以蛋白質序列比對人類及小鼠基因庫進行歐亞水獺的基因功能註釋。

b. 編碼區突變位點判定

界定出歐亞水獺參考基因組中編碼區的位置後，我們使用 ANNOVAR (K. Wang et al., 2010)來標明每隻歐亞水獺基因組中編碼區內核苷酸突變種類，我們將核苷酸突變分成三類，第一類是不會改變對應氨基酸編碼的同義突變(synonymous substitutions)，第二類是會改變對應氨基酸編碼的非同義突變(nonsynonymous substitutions)，而第三類是造成蛋白質轉譯提早終止的無義突變(gain stop codon 或 nonsense mutations)；分子生物學認為絕大多數的非同義突變改變蛋白質特性，不利於生物的適存度，而無義突變則會造成蛋白質原有功能的喪失(loss of function, LoF)，會造成適存度上不利的後果。我們會計算每個基因組內所累積各類核苷酸突變的個數。為計算各類核苷酸突變，我們需要區分每個變異 SNP 位點的核苷酸為祖先型或者突變型，在缺乏適當外群基因組序列來輔助判



定下，我們假設一個 SNP 位點的高頻等位基因(allele)為祖先型，而低頻的等位基因則判定為突變型。

viii. 歐亞水獺的歷史族群數量變動

一個族群的遺傳多樣性除了受到當下的族群大小影響外，也會受到長期族群動態的影響，例如基因組數據顯示，瀕危的蘇門答臘犀牛的族群數量，自末次冰期結束後即劇烈下降，因此歐亞水獺的族群多樣性現況是否會受到末次冰期結束後氣候劇烈變化的影響，而存在遺傳多樣性窄化的問題，是需要加以考量的，為了瞭解歐亞水獺的歷史有效族群動態，我們以 PSMC (Pairwise sequentially Markovian coalescent, Li & Durbin, 2011)及 SMC++ (依據 sequentially Markov coalescent 的分析方法, Terhorst et al., 2017) 兩種依據溯祖理論 (coalescent theory) 分析基因組序列的方式，來估算其歷史有效族群的動態。

a. PSMC 分析

PSMC 利用 2 倍體基因組內有數以萬計的基因座(loci)，每個基因座有 2 個等位基因，這 2 個等位基因在族群內有各自獨立的演化歷史，但可追溯到歷史上相同的祖先，所以 PSMC 以溯祖(coalescent)模型，建立這 2 個等位基因起源於最近相同祖先的時間(Time to the most recent common ancestor, TMRCA)，估計每個等位基因的 TMRCA 就能創建基因組中不同段落的 TMRCA 分布，進而推估每個 TMRCA 時間區段的 N_e ，PSMC 的 TMRCA 時間區段大致能回溯到近萬年至百萬年間的有效族群變化動態此外；此外，PSMC 也提供拔靴法，估算所推估 N_e 的信賴區間。PSMC 分析中，我們僅使用體染色體序列進行分析，我們以 7 年為世代長(Hauer et al., 2002)，並將水獺核基因組突變率依據同為食肉目哺乳類狼的核基因組突變率，設定每年每個鹼基 1.5×10^{-9} 的突變率(Koch et al., 2019)，估算歐亞水獺水獺的歷史有效族群動態變化。

b. SMC++分析

SMC++因為可以使用族群每個 SNP 位點的頻譜分布 (site frequency spectrum) 進行族群的 TMRCA 的分析，因此改善 PSMC 一次只能分析一個樣本的限制，且由於能使用族群資訊，所以可以提供更多資訊，提高



分析所提供的時間解析度，推估到萬年以內，直到當代的 N_e 動態變化，不過當樣本數過小時，當代 N_e 的估算應會有較大的誤差；此外，SMC++ 軟體本身並無法如 PSMC 一般，提供估算值得信賴區間，是本方法的一個缺陷。

ix. 金門歐亞水獺遺傳救援評估

為評估金門歐亞水獺族群是否有需要採行遺傳救援的保育策略，我們將以在學術界一篇被廣為引用論文中所提供的準則為依據（Hedrick and Fredrickson, 2010），對金門歐亞水獺族群進行遺傳救援的必要性進行評估。

六、結果

1. 次世代定序質控

我們選擇 17 隻 DNA 斷裂情況較少的個體樣本進行次世代基因組定序，17 隻樣本採集時間主要於 2006 年 (lu_445)、2008 年 (lu_110) 及 2010 ~ 2020 間 (附表一、附圖 1)，其中包括台北市立動物園所提供的 2 隻歐洲個體 (德國、波蘭各一隻)，每隻取得 Illumina 短片段 DNA 序列資料數 (單位 Gb, Giga base, 十億鹼基對) 為 96.85~187.76Gb (附件一)，比對英國定序的參考基因組後，每隻水獺基因組平均定序深度為 39.72 倍~77.01 倍。以 fastp_0.21 進行序列的質性控制後，每隻個體大致去除 19% ~ 23% 的低品質序列 (表二、表三)。

然而定序的 17 隻個體中，族群來源為歐洲波蘭的 Lu_13457 (20130457M40)，在經過上述質控及對照拼裝等步驟後，基因組平均覆蓋度深度急速下降至不到 1 倍基因組的程度，推測雖然此樣本通過上機及建庫前的質、量標準，但仍可能因樣本 DNA 充滿單鏈的斷裂缺刻，所以在電泳時看似完整，但後續處理中斷裂成碎片，以致多數序列在基因組對照拼裝時無法形成有效、適當的成對序列 (proper pair reads)，且在去除重覆序列後所剩無幾，因此將該個體自後續各項分析中排除。

此外其中個體 (lu_cy) 為台北動物園所收容的小金及金莎的子代，為避免與其近親 (大金；樣本 lu_212) 同在分析中，影響後續族群相關分析，因此不將該個體列入族群遺傳多樣性相關計算。

原期中報告時列入分析的 lu_1067 與 lu_7333 兩隻個體，由於被路殺日期為同一天，因此有可能是同一個體，所以在期末分析時隨機移除其中 lu_1067。

本研究各項分析所使用樣本數列於附表二。

表一、建庫 DNA 樣本以 Qubit 及 Nanodrop 微量光譜分析儀進行定量及定性分析

Sample name	Qubit (ng/ul)	Vol. uL	Total (ng)	Nanodrop (ng/ul)	Total (ng)	A260/280	A260/230	Peak (pb)	% (Conc.)	Fragment analysis
lu_13457	52.2	41	2140.2	56.9	2332.9	1.81	1.24	23432	100	Pass
lu_110	430	45	19350	488.8	21996	1.8	1.85	10703	14.5	Pass
lu_1067	689.6	36	24825.6	667	24012	1.87	2.34	26857	88.7	Pass
lu_11	1096	80	87680	1623.4	129872	1.88	1.72	19554	70.7	Pass
lu_16457	310.4	41	12726.4	292.7	12000.7	1.87	2.3	20961	99.8	Pass
lu_212	250	40	10000	249.9	9996	1.56	2.44	8435	96.5	Pass
lu_3044	163.6	39	6380.4	186.7	7281.3	1.85	2.1	11390	99	Pass
lu_3045	127.6	40	5104	141.2	5648	1.86	2.14	11201	100	Pass
lu_408	1248	75	93600	1354.2	101565	1.82	1.18	43296	93.6	Pass
lu_445	576	38	21888	539.4	20497.2	1.83	2.21	24393	100	Pass
lu_455	208	40	8320	201.2	8048	1.86	2.2	28440	98.9	Pass
lu_456	156.8	39	6115.2	169.8	6622.2	1.87	2.2	30433	88.2	Pass
lu_5300	129.6	41	5313.6	122.6	5026.6	1.87	2.17	17778	97.8	Pass
lu_7333	161.6	41	6625.6	196.3	8048.3	1.87	2.04	13612	94.7	Pass
lu_7639	71	39	2769	70.1	2733.9	1.86	2.13	27780	100	Pass
lu_86	574	70	40180	824.9	57743	1.85	1.18	31588	99.6	Pass
lu_cy	48.3	185	8935.5	123.7	22884.5	2.01	1.71	18986	57.8	Hold

備註: DNA 樣本建庫定量、定性分析分析判斷標準:

定量分析及判斷標準							定性分析及判斷標準			
實驗項目	樣品類型	體積	總量	濃度	OD260/280	OD260/230	樣品類型	DNA 完整度-Pass	DNA 完整度-Hold	DNA 完整度-Fail
WGS (De novo, Re-seq)	Genomic DNA	≥20μl	≥ 1 μg	≥ 10 ng/μl	1.8-2.2	> 2.0	Intact DNA	在 10,000~48,500bp 區域中，Avg Size≥20kb 且佔比≥70%	在 10,000~48,500bp 區域中，Avg Size≥15kb 且佔比≥70%	在 10,000~48,500bp 區域中，Avg Size<15kb
							Smear DNA	在 1,000~48,500bp 區域中，% Total (> 1000bp) ≥80%	在 200~48,500bp 區域中，% Total (> 200bp) ≥20%	在 200~48,500bp 區域中，% Total (> 200bp) <20%

WGS: whole genome sequencing;



表二、歐亞水獺每個樣品的總定序量（ 10^9 鹼基對，Gigabase，Gb），通過品質控制（質控）後的序列量（Gb）、原始定序覆蓋深度（基因組的倍數）、通過質控後定序覆蓋深度、及粒線體基因組的定序覆蓋深度。

個體	地點	總定序量 (Gb)	通過質控 (Gb)	原覆蓋深度 (倍)	通過質控覆蓋深度 (倍)	粒線體平均覆蓋深度 (倍)
lu_110	德國	176.40	145.09	73.33	60.31	296.942
lu_13457	波蘭	117.04	92.27	37.84	40.33	40.3295
lu_1067	金門	154.35	150.42	64.30	62.66	295.510
lu_11	金門	129.55	103.24	53.98	43.02	289.280
lu_16457	金門	129.04	102.58	53.82	42.78	295.154
lu_212	金門	154.72	119.13	64.50	49.67	298.061
lu_3044	金門	197.82	126.13	82.46	52.57	297.775
lu_3045	金門	187.77	146.27	78.21	60.93	297.237
lu_408	金門	181.96	131.58	75.80	54.81	292.920
lu_445	金門	178.16	139.66	74.17	58.14	185.811
lu_455	金門	155.24	131.85	64.68	54.93	296.854
lu_456	金門	128.38	102.49	53.52	42.73	297.535
lu_5300	金門	161.33	125.46	67.29	52.33	296.060
lu_7333	金門	163.40	132.32	68.11	55.15	297.352
lu_7639	金門	153.79	120.53	64.07	50.22	296.452
lu_86	金門	134.44	109.00	55.99	45.39	293.724
lu_cy	金門(小金與金莎子代)	159.76	148.04	66.48	61.60	299.564



表三、歐亞水獺每個樣品質控後序列能與參考基因組序列對照拼裝的比率(%)、成對 Illumina 短序列都能對照到參考基因組序列的比率(%)、去除重複序列後的最終序列佔比(%)，以及使用最終清理後序列的基因組定序覆蓋深度。Lu_110 為來自德國個體，Lu_13457 來自波蘭；其餘個體來自金門。

個體	基因組對照拼裝率	成對序列比對率	最終序列使用率	基因組平均覆蓋度
lu_110	97.71%	87.60%	60.61%	36.811
lu_13457	57.91%	19.15%	0.47%	0.057
lu_1067	97.83%	88.13%	63.03%	39.835
lu_11	98.01%	87.33%	62.24%	26.842
lu_16457	98.07%	88.54%	65.04%	27.928
lu_212	98.15%	87.49%	61.05%	30.543
lu_3044	97.94%	87.90%	63.93%	33.844
lu_3045	97.91%	86.99%	60.50%	37.234
lu_408	97.92%	87.53%	62.36%	34.397
lu_445	98.01%	87.74%	59.62%	34.918
lu_455	98.07%	88.94%	64.28%	35.664
lu_456	97.96%	87.19%	63.79%	27.323
lu_5300	98.11%	88.23%	62.56%	32.998
lu_7333	97.83%	87.25%	64.70%	36.104
lu_7639	98.14%	86.82%	63.11%	32.006
lu_86	97.87%	87.46%	61.28%	27.861
lu_cy	98.19%	89.82%	74.07%	45.699



2. 族群遺傳多樣性估算

i. 核基因組多樣性

包含參考基因組個體，14 隻歐亞水獺個體共有 9,926,932 個 SNP 位點，我們計算每隻歐亞水獺個體 SNP 數量、個體雜合 SNP 位點數、個體的雜合度，及族群的核苷酸多樣性(π)後(表四)，發現雖然兩隻歐洲水獺個體平均 SNP 位點數 2,494,951 低於金門族群 4,603,687 ($t=4.95$, $df = 13$, $p=0.0003$)，但金門個體明顯偏高的 SNP 數，部分應是本分析以英國個體為參考基因組所導致；而對於不受參考基因組來源影響的遺傳多樣性指標來說，兩族群個體的平均基因組雜合位點數 (金門族群：2,314,338；歐洲族群：1,860,904)及雜合度度(θ ，金門族群：0.000959；歐洲族群：0.000975)皆無顯著差異($t=1.46$, $df = 13$, $p=0.166$)，而金門及歐洲歐亞水獺族群的基因組核酸多樣性(π)各自為 0.000959 及 0.000975，也是非常接近，因此與目前族群數量尚稱穩定的歐洲水獺族群相比，雖然金門歐亞水獺族群個體數僅約 200 隻，但遺傳多樣性並無明顯偏低的現象；而歐亞水獺的平均個體基因組雜合度與目前已知列為 IUCN 紅皮書易危 (vulnerable)等級的食肉性哺乳動物的基因組雜合度(θ)平均 0.00098 相較，並無著差異($t= -0.20$, $df = 20$, $p=0.843$)，但低於目前已知大部分列為非易危等級的食肉性哺乳動物的基因組雜合度平均值 (0.0039, $t=-3.15$, $df = 27$, $p=0.004$)。我們也計算了金門及歐洲歐亞水獺族群間的平均遺傳距離 (d_{xy}) 為 0.001418，略大於兩個族群內個體間的遺傳差異(表五)，換算為淨遺傳距離 (d_a)，則為 0.000451，約略為 θ 值的一半，顯示歐洲與亞洲族群的分化時間極為相近，若參考狼每年每個鹼基 1.5×10^{-9} 的突變率(Koch et al., 2019)，則金門及歐洲歐亞水獺族群間的淨遺傳距離可換算成約 30 萬年的分化時間。



表四、歐亞水獺個體的核基因組多樣性：每隻個體基因組的 SNP 位點數、雜合 SNP 位點數，雜合度（雜合 SNP 位點數/基因組長度， θ ），及歐洲及金門族群的核酸多樣性（ π ）。mLuLu1 為參考基因組個體，Lu_110 為來自德國個體；其餘個體來自金門。

個體	SNP 數	雜合位點數	雜合度, θ (10^{-3})	核苷酸多樣性(π)
mLutLut1	1,110,592	1,077,390	0.445	
lu_110	3,879,310	2,644,418	1.099	
平均	2,494,951	1,860,904	0.772	0.975
lu_11	4,728,599	2,574,713	1.073	
lu_16457	4,597,228	2,312,487	0.965	
lu_212	4,346,565	1,816,198	0.757	
lu_3044	4,727,683	2,542,785	1.060	
lu_3045	4,516,644	2,187,772	0.911	
lu_408	4,446,008	1,975,598	0.823	
lu_445	4,760,425	2,609,479	1.086	
lu_455	4,745,281	2,558,372	1.066	
lu_456	4,603,049	2,345,728	0.978	
lu_5300	4,367,970	1,830,963	0.764	
lu_7333	4,686,251	2,438,139	1.016	
lu_7639	4,670,781	2,472,731	1.030	
lu_86	4,651,459	2,421,437	1.008	
平均	4,603,688	2,314,339	0.964	0.959
lu_cy	4,695,049	2,480,258	1.032	

表五、歐亞水獺個體間基因組的遺傳距離 (p -距離) 矩陣; mLutlut1: 為來自英國的參考基因組個體, Lu_110 為來自德國個體, 其餘個體來自金門。

	mLutLut1	lu_110	lu_11	lu_16457	lu_212	lu_3044	lu_3045	lu_408	lu_445	lu_455	lu_456	lu_5300	lu_7333	lu_7639
mLutLut1														
lu_110	0.00102													
lu_11	0.00145	0.00142												
lu_16457	0.00146	0.00144	0.00072											
lu_212	0.00147	0.00145	0.00089	0.00092										
lu_3044	0.00146	0.00142	0.00077	0.00081	0.00084									
lu_3045	0.00145	0.00143	0.00089	0.00088	0.00096	0.00086								
lu_408	0.00147	0.00145	0.00093	0.00091	0.00091	0.0009	0.00091							
lu_445	0.00146	0.00142	0.00093	0.00082	0.00087	0.00085	0.00091	0.00092						
lu_455	0.00146	0.00142	0.0008	0.00077	0.00084	0.00084	0.00086	0.00094	0.00079					
lu_456	0.00146	0.00143	0.00084	0.00071	0.00084	0.00083	0.00081	0.00096	0.00079	0.00058				
lu_5300	0.00147	0.00145	0.00085	0.00084	0.00095	0.00092	0.00086	0.00097	0.00092	0.00084	0.00083			
lu_7333	0.00146	0.00143	0.00061	0.00068	0.00087	0.00082	0.00088	0.00092	0.00091	0.00078	0.00074	0.00087		
lu_7639	0.00146	0.00142	0.00086	0.00091	0.00069	0.0008	0.00089	0.00079	0.00094	0.00086	0.00084	0.00095	0.00085	
lu_86	0.00146	0.00143	0.00088	0.00075	0.00088	0.00086	0.00078	0.00095	0.00078	0.00068	0.00051	0.00085	0.00081	0.0009



3. 地理結構（主成份分析及親緣關係分析）

經濾除高度連鎖 ($r^2 > 0.2$) 的 SNP 位點，共獲得 74,466 個非連鎖的獨立 SNP 位點，使用 PCA 分析這些 SNP 位點，結果顯示歐洲族群可以由第一主成份（解釋基因組 2.94% 的變異）的數值，與金門族群明顯區隔，因此兩個族群之間具明顯地理遺傳結構；相對於金門族群的個體（圖 2 綠色點），在第一及第二（解釋基因組 7.68% 的變異）主成份兩條軸線所構成的圖中高度集中分布，歐洲來自英國（圖 2 藍色點）及德國（圖 2 紅色點）的第二主成份數值有些微的差異，這顯示歐洲大陸與不列顛群島的歐亞水獺族群可能也存在一定地理結構，也就是其遺傳組成（等位基因頻率）存有一定的差異；相對的，金門族群個體間的 SNP 位點等位基因，雖然在第一主成分的數值相近，但第二主成份數值高度分散，因此雖然應為同一個地理族群，但個體間存在一定程度的差異。為揭示金門及歐洲族群的遺傳結構，我們也利用個體間的 p -距離繪製親緣關係樹，結果也顯示來自歐洲的兩個個體（參考基因組及德國個體）在無根樹（親緣關係網絡）上形成同一個支系，而所有來自金門的個體聚成一個支系（圖 3），支持亞洲的金門與歐洲個體來自兩個高度結構化的地理族群，但兩個支系間的距離不長，可能是兩個地理族群近期分化的結果。

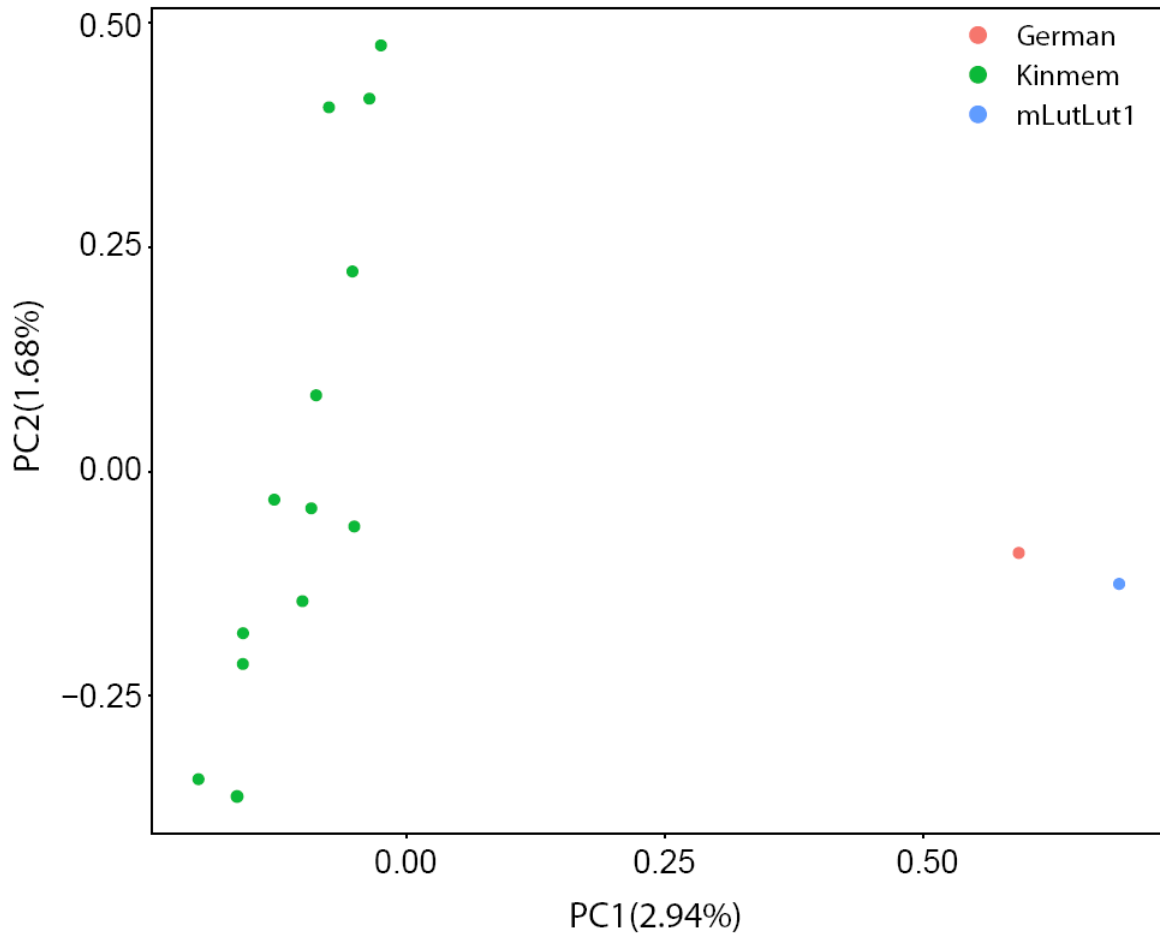


圖 2、核基因組 527,116 個非連鎖獨立 SNP 位點 ($r^2 < 0.2$) 的主成份分析結果。圖中顯示每隻個體第一及第二主成份的分數。來自金門個體(綠色)、來自德國個體(紅色) 及來自英國個體即參考基因組(藍色)。

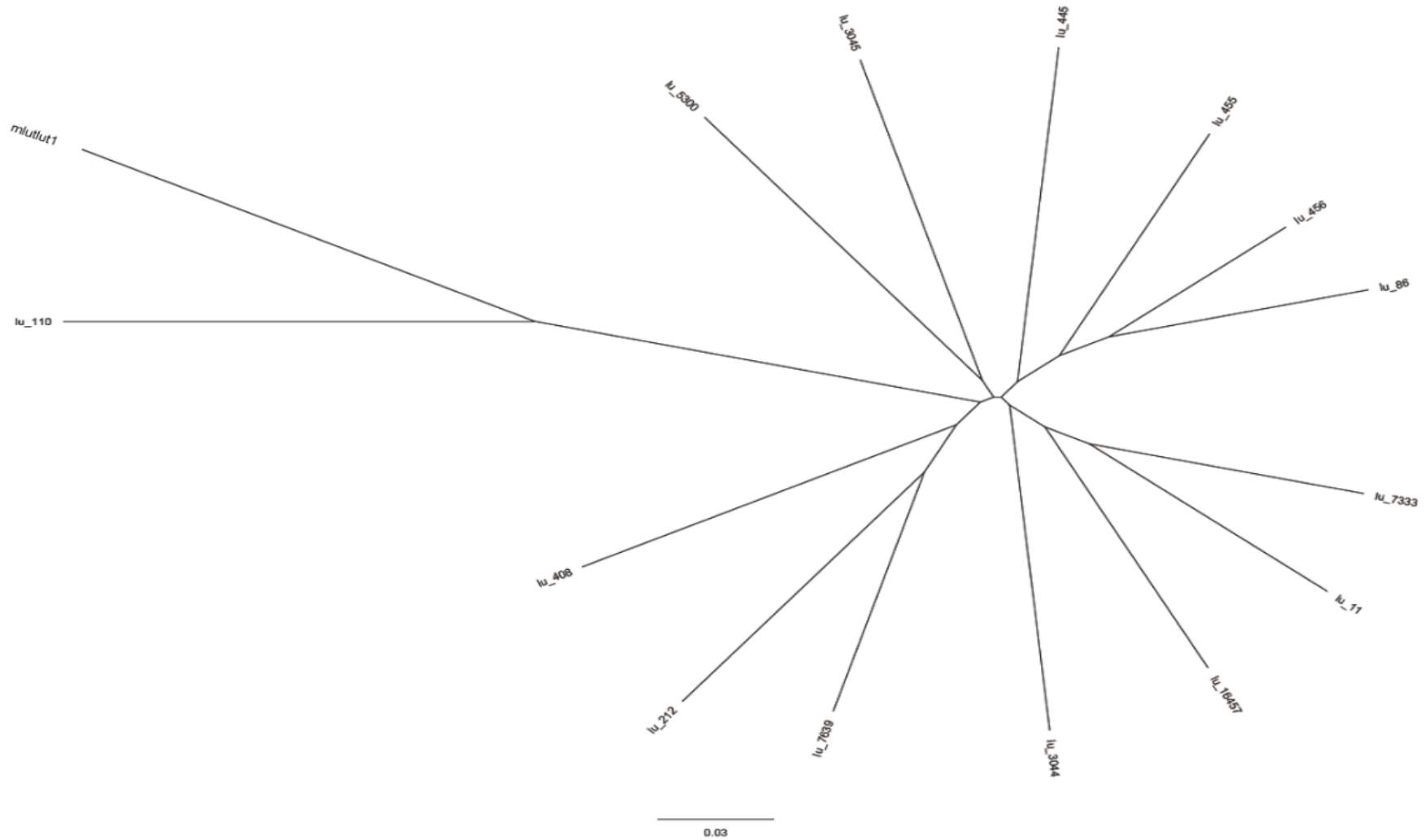


圖 3、根據個體間遺傳距離 (p distance)，以鄰接法繪製全基因組序列無根親緣關係樹。mLutLut1 為英國參考序列個體，lu_110 為來自德國個體，其餘個體皆來自金門（集中在無根樹右側）。



4. 粒線體基因體多樣性與親緣關係分析

以全長 16,536 鹼基對的參考基因組(LR822067.1)粒線體為模板，我們成功自所有 15 隻歐亞水獺序列中，對照拼裝(mapping)出完整粒線體基因組序列，這些粒線體序列的平均定序深度介於 40.33~299.56 倍之間，平均深度為 274.504 倍(表二)，也就是每個鹼基平均被測序 274.504 次。含參考基因組的 2 隻歐洲水獺（包含在基因組分析被剔除的波蘭個體）粒線體基因組由 1 個單倍型構成；而 13 隻金門個體的粒線體序列其中於參考基因組位置 16065 及 16109 位點分別有 5 隻及 2 隻個體，但這兩個位點的定序覆蓋度過低（低於 50 倍），導致可信度偏低，因此將鹼基以缺失(N)處理後，13 隻金門個體粒線體 DNA 序列可分為 2 個單倍型，其間僅具 1 個鹼基對的差異（位於參考基因組 9680 位點，NADH dehydrogenase subunit 3 基因上；表八）， π 值則為 0.00003，若比較歐洲與金門水獺族群內的粒線體核苷酸多樣性兩者相當，這結果與核基因組多樣性都指向個體數量有限的金門族群，擁有與數量更為龐大的歐洲族群相當的遺傳多樣性。我們也計算了歐洲與金門水獺粒線體基因組的差異程度，我們發現歐洲與金門水獺個體的粒線體基因組差異為 59~62 個鹼基對，平均差異 58.59 個鹼基對(表六)，換算為遺傳距離為 0.00359(表七)，也就是每千個鹼基對有 3.59 個差異，換算成歐洲與金門水獺粒線體基因組族群間的淨遺傳距離 (d_a) 則為 0.00358，若以哺乳類動物線粒體基因組每年每個鹼基 9.04×10^{-9} 的突變率(Soares et al., 2013)代入，則可將淨遺傳距離轉換成歐洲與亞洲水獺族群約 39.6 萬年前分化，與核基因所估算的分化時間（30 萬年前）相近。將所有個體粒線體間的遺傳距離以鄰接法繪製親緣關係樹，則歐洲與金門的個體各自形成一個系群(圖 4)，顯示兩地族群間並無近期基因交流，具明顯的地理結構。

表六、歐洲及金門歐亞水獺粒線體基因組遺傳距離，格中數字為兩隻個體的鹼基差異數，粒線體參考基因組全長 16,536 鹼基對。個體 mLutLut1 為英國個體(參考序列 LR822067.1)，lu_110 為來自德國個體，其餘個體為來自金門個體。

	mLutLut1	lu_110	lu_11	lu_16457	lu_212	lu_3044	lu_3045	lu_408	lu_445	lu_455	lu_456	lu_5300	lu_7333	lu_7639
mLutLut1														
lu_110	0													
lu_11	60	60												
lu_16457	61	61	0											
lu_212	61	61	0	0										
lu_3044	59	59	0	0	0									
lu_3045	62	62	1	1	1	1								
lu_408	61	61	0	0	0	0	1							
lu_445	62	62	1	1	1	1	0	1						
lu_455	62	62	1	1	1	1	0	1	0					
lu_456	61	61	1	1	1	1	0	1	0	0				
lu_5300	60	60	1	1	1	1	0	1	0	0	0			
lu_7333	61	61	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1		
lu_7639	61	61	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0
lu_86	60	60	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0

表七、歐洲及金門歐亞水獺粒線體基因組 p 距離。個體 mLutLut1 為英國個體(參考序列 LR822067.1)，lu_110 為來自德國個體，其餘個體為來自金門個體。

	mLutLut1	lu_110	lu_11	lu_16457	lu_212	lu_3044	lu_3045	lu_408	lu_445	lu_455	lu_456	lu_5300	lu_7333	lu_7639
mLutLut1														
lu_110	0.00000													
lu_11	0.00363	0.00363												
lu_16457	0.00369	0.00369	0.00000											
lu_212	0.00369	0.00369	0.00000	0.00000										
lu_3044	0.00357	0.00357	0.00000	0.00000	0.00000									
lu_3045	0.00375	0.00375	0.00006	0.00006	0.00006	0.00006								
lu_408	0.00369	0.00369	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00006							
lu_445	0.00375	0.00375	0.00006	0.00006	0.00006	0.00006	0.00000	0.00006						
lu_455	0.00375	0.00375	0.00006	0.00006	0.00006	0.00006	0.00000	0.00006	0.00000					
lu_456	0.00369	0.00369	0.00006	0.00006	0.00006	0.00006	0.00000	0.00006	0.00000	0.00000				
lu_5300	0.00363	0.00363	0.00006	0.00006	0.00006	0.00006	0.00000	0.00006	0.00000	0.00000	0.00000			
lu_7333	0.00369	0.00369	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00006	0.00000	0.00006	0.00006	0.00006	0.00006		
lu_7639	0.00369	0.00369	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00006	0.00000	0.00006	0.00006	0.00006	0.00006	0.00000	
lu_86	0.00363	0.00363	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00006	0.00000	0.00006	0.00006	0.00006	0.00006	0.00000	0.00000

表八、歐洲(mLuLu1, lu_110)及金門歐亞水獺（其他個體）粒線體基因組變異位點。位置(position)的數字為對應歐亞水獺參考基因組粒線體的位置；黃色底色標示歐洲個體；綠色底色標示金門個體變異位點。各變異位點對應的基因間附註。

position	84	85	814	1334	1471	2716	2788	2950	2980	2992	3061	3139	4059	4194	4311	4387	4632	4734	4883	6171	6246	6621	6699	7072	7186	7375	7564	8161	8314	8386	8428
mLuLu1	C	G	T	T	C	C	A	C	C	T	G	G	C	G	G	G	A	T	T	G	T	C	A	C	T	G	A	A	T	C	T
lu_110	C	G	T	T	C	C	A	C	C	T	G	G	C	G	G	G	A	T	T	G	T	C	A	C	T	G	A	A	T	C	T
lu_11	T	A	C	A	T	T	G	T	T	C	A	A	T	A	A	A	G	C	C	T	C	T	G	T	C	A	G	G	C	T	C
lu_16457	T	A	C	A	T	T	G	T	T	C	A	A	T	A	A	A	G	C	C	T	C	T	G	T	C	A	G	G	C	T	C
lu_212	T	A	C	A	T	T	G	T	T	C	A	A	T	A	A	A	G	C	C	T	C	T	G	T	C	A	G	G	C	T	C
lu_3044	T	A	C	A	T	T	G	T	T	C	A	A	T	A	A	A	G	C	C	T	C	T	G	T	C	A	G	G	C	T	C
lu_3045	T	A	C	A	T	T	G	T	T	C	A	A	T	A	A	A	G	C	C	T	C	T	G	T	C	A	G	G	C	T	C
lu_408	T	A	C	A	T	T	G	T	T	C	A	A	T	A	A	A	G	C	C	T	C	T	G	T	C	A	G	G	C	T	C
lu_445	T	A	C	A	T	T	G	T	T	C	A	A	T	A	A	A	G	C	C	T	C	T	G	T	C	A	G	G	C	T	C
lu_455	T	A	C	A	T	T	G	T	T	C	A	A	T	A	A	A	G	C	C	T	C	T	G	T	C	A	G	G	C	T	C
lu_456	T	A	C	A	T	T	G	T	T	C	A	A	T	A	A	A	G	C	C	T	C	T	G	T	C	A	G	G	C	T	C
lu_5300	T	A	C	A	T	T	G	T	T	C	A	A	T	A	A	A	G	C	C	T	C	T	G	T	C	A	G	G	C	T	C
lu_7333	T	A	C	A	T	T	G	T	T	C	A	A	T	A	A	A	G	C	C	T	C	T	G	T	C	A	G	G	C	T	C
lu_7639	T	A	C	A	T	T	G	T	T	C	A	A	T	A	A	A	G	C	C	T	C	T	G	T	C	A	G	G	C	T	C
lu_86	T	A	C	A	T	T	G	T	T	C	A	A	T	A	A	A	G	C	C	T	C	T	G	T	C	A	G	G	C	T	C
position	8548	9129	9312	9555	9578	9599	9680	10464	10959	11409	11583	11829	11956	12223	12587	12595	13487	13590	13629	14235	14280	14670	15064	15238	15741	15810	15859	15865	16065	16087	16109
mLuLu1	A	A	T	T	A	T	A	G	C	C	A	G	T	C	A	G	A	A	A	G	G	A	C	A	C	A	C	T	T	T	T
lu_110	A	A	T	T	A	T	A	G	C	C	A	G	T	C	A	G	A	A	A	G	G	A	C	A	C	A	C	T	T	T	T
lu_11	G	G	C	C	G	C	A	A	T	T	G	A	C	T	G	A	G	G	G	A	A	G	A	G	T	G	T	C	N	C	C
lu_16457	G	G	C	C	G	C	A	A	T	T	G	A	C	T	G	A	G	G	G	A	A	G	A	G	T	G	T	C	C	C	C
lu_212	G	G	C	C	G	C	A	A	T	T	G	A	C	T	G	A	G	G	G	A	A	G	A	G	T	G	T	C	C	C	C
lu_3044	G	G	C	C	G	C	A	A	T	T	G	A	C	T	G	A	G	G	G	A	A	G	A	G	T	G	T	C	N	C	N
lu_3045	G	G	C	C	G	C	G	A	T	T	G	A	C	T	G	A	G	G	G	A	A	G	A	G	T	G	T	C	C	C	C
lu_408	G	G	C	C	G	C	A	A	T	T	G	A	C	T	G	A	G	G	G	A	A	G	A	G	T	G	T	C	C	C	C
lu_445	G	G	C	C	G	C	G	A	T	T	G	A	C	T	G	A	G	G	G	A	A	G	A	G	T	G	T	C	C	C	C
lu_455	G	G	C	C	G	C	G	A	T	T	G	A	C	T	G	A	G	G	G	A	A	G	A	G	T	G	T	C	C	C	C
lu_456	G	G	C	C	G	C	G	A	T	T	G	A	C	T	G	A	G	G	G	A	A	G	A	G	T	G	T	C	N	C	C
lu_5300	G	G	C	C	G	C	G	A	T	T	G	A	C	T	G	A	G	G	G	A	A	G	A	G	T	G	T	C	N	C	N
lu_7333	G	G	C	C	G	C	A	A	T	T	G	A	C	T	G	A	G	G	G	A	A	G	A	G	T	G	T	C	C	C	C
lu_7639	G	G	C	C	G	C	A	A	T	T	G	A	C	T	G	A	G	G	G	A	A	G	A	G	T	G	T	C	C	C	C
lu_86	G	G	C	C	G	C	A	A	T	T	G	A	C	T	G	A	G	G	G	A	A	G	A	G	T	G	T	C	N	C	C

附註：粒線體基因組註釋根據 GenBank: LC094961.1(Waku et al. 未發表)對歐亞水獺粒線體基因組的基因註釋：位置 1-69: tRNA-Phe; 位置 70-1033: small ribosomal RNA; 位置 1034-1101: tRNA-Val; 位置 1100-2669: large ribosomal RNA; 位置 2670-2744: tRNA-Leu; 位置 2747-3703: NADH dehydrogenase subunit 1; 位置 3703-3771-tRNA-Ile; 位置 3769-3842: tRNA-Gln; 位置 3844-3912: tRNA-Met; 3913-4956: NADH dehydrogenase subunit 2; 4955-5022: tRNA-Trp; 位置 5032-5100: tRNA-Ala; 位置 5102-5174: tRNA-Asn; 位置 5170-5210: origin of L strand replication; 位置 5208-5274: tRNA-Cys; 位置 5275-5342: tRNA-Tyr; 位置 5344-6888:

cytochrome c oxidase subunit I; 位置 6886-6954: tRNA-Ser; 位置 6961-7027: tRNA-Asp; 位置 7028-7711: cytochrome c oxidase subunit II; 位置 7715-7780: tRNA-Lys; 位置 7782-7982: ATP synthase F0 subunit 8; 位置 7943-8623: ATP synthase F0 subunit 6; 位置 8623-9406: cytochrome c oxidase subunit III; 9407-9476: tRNA-Gly; 位置 9477-9824: NADH dehydrogenase subunit 3; 位置 9825-9892: tRNA-Arg; 位置 9893-10189: NADH dehydrogenase subunit 4L; 位置 10183-11560: NADH dehydrogenase subunit 4; 位置 11561-11629: tRNA-His; 11630-11691: tRNA-Ser; 位置 11692-11761: tRNA-leu; 位置 11753-13582: NADH dehydrogenase subunit 5; 位置 13566-14099: NADH dehydrogenase subunit 6; 位置 14100-15313: cytochrome b; 位置 15313-15380: tRNA-Thr; 位置 15380-15446: tRNA-Pro; 位置 15447-16536: D-loop.

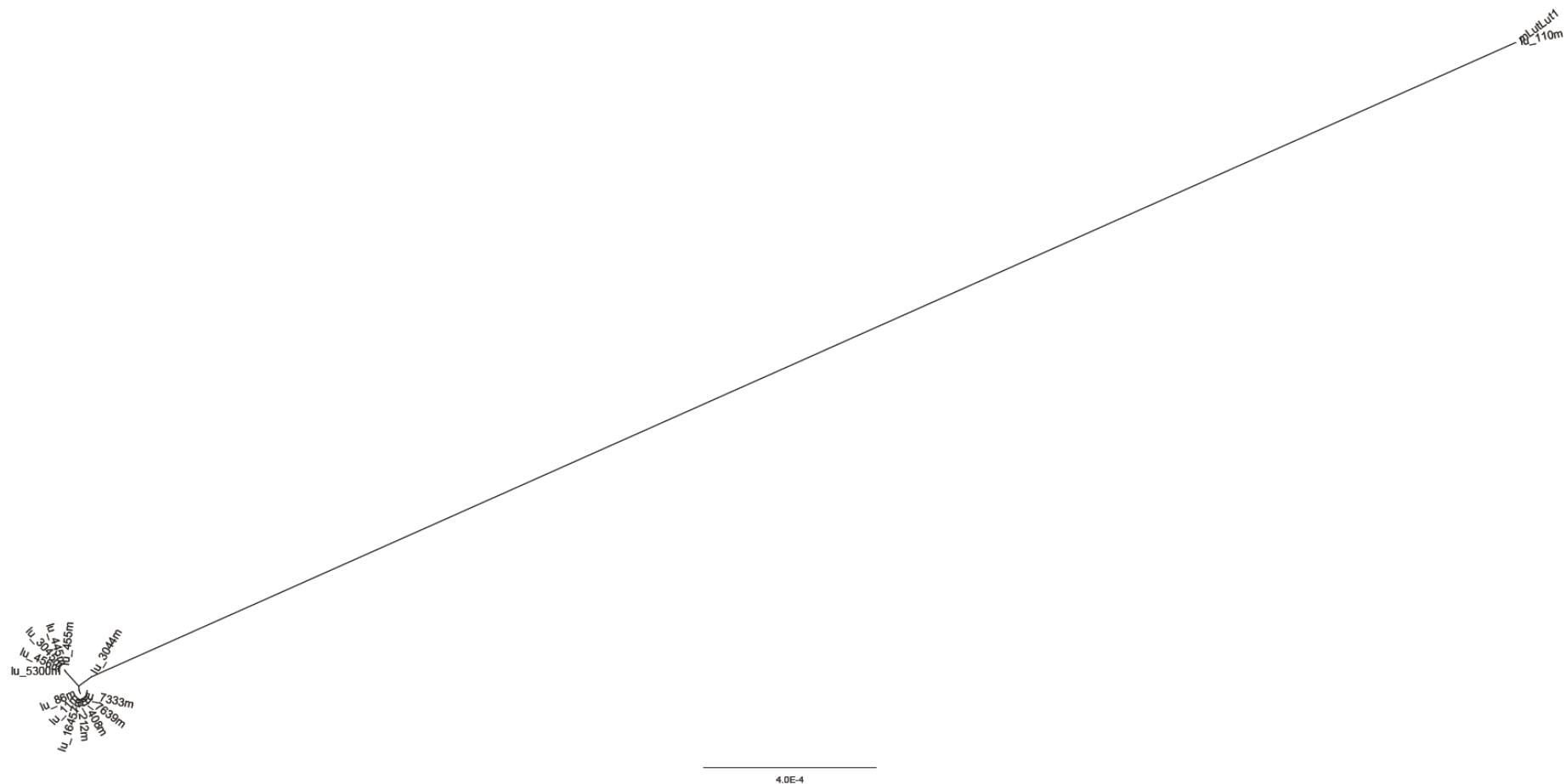


圖 4、由鄰接法繪製全粒線體基因組序列無根親緣關係樹。個體 mLutLut1 為英國個體(參考序列 LR822067.1)，lu_110 為來自德國個體，其餘個體為來自金門個體，歐洲個體聚集在無根樹右側，金門個體則聚集在無根樹左側。



5. 個體全基因組近交係數(F_{ROH})估算

共計算 15 隻歐亞水獺個體 ROH 片段長度(表九 A、B)、佔全基因組長度的比例、以及 ROH 片段長度為基礎的近交係數 (F_{ROH})。以 Plink 預設 ROH 長度所計算的結果,發現其中 7 隻金門的歐亞水獺個體沒有找到明顯的 ROH 片段(長度> 1000kb)。歐洲族群基因組 ROH 片段平均 9.00 個,範圍 1~17 個,ROH 長度加總平均 10770.0Kb,範圍 1379.72 ~ 20160.2Kb, $F_{ROH1000kb}$ 平均 0.00445,範圍 0.00057 ~ 0.00833,金門族群基因組 ROH 片段平均 1.69 個,範圍 0~9 個,每個基因組的 ROH 長度加總平均為 1956.7Kb,範圍 0 ~ 10448.6Kb, $F_{ROH1000kb}$ 平均為 0.00082,範圍 0 ~ 0.00435。若將包含片段長度>500kb 的 ROH 計算在內,發現僅有 2 隻金門的歐亞水獺個體沒有找到明顯的 ROH 片段(長度> 500kb)。歐洲族群基因組 ROH 片段平均 149.50 個,範圍 55~244 個,ROH 長度加總平均 99024.35Kb,範圍 3474.70 ~ 163308.00Kb, $F_{ROH500kb}$ 的平均為 0.04096,範圍 0.01444 ~ 0.06747,金門族群基因組的平均 ROH 片段數為 41.31 個,範圍 0~123 個,每個基因組的 ROH 長度加總平均為 26319.95Kb,範圍 0 ~ 80441.00Kb, $F_{ROH500kb}$ 平均為 0.0110,範圍 0 ~ 0.0335。整體而言,不論歐洲或金門的歐亞水獺基因組中,大多數 ROH 片段長度都介於 500-1000kb 之間,以金門族群為例,>1000kb 的 ROH 片段數,僅佔總數的 4.19%,而每個基因組 ROH 的加總長度,>1000kb 的 ROH 片段長度,僅佔總長度的 7.43%。而金門與歐洲族群間的 ROH 比較,則不論以> 500kb 或>1000kb 計算,金門歐亞水獺個體的 ROH 片段數及總長度都約為歐洲水獺的三分之一,因此基於 ROH 長度計算的金門歐亞水獺近交係數,也約略僅為歐洲水獺的三分之一。

若以 $F_{ROH1000kb}$ 為依據,金門族群個體的近交程度並不比數量更為普遍的歐洲族群來的高。金門歐亞水獺平均 $F_{ROH1000kb} = 0.00082$ 與目前已知肉食性動物 F_{ROH} 平均 0.046 ($t=-1.87$, $df = 34$, $p=0.07$; Brüniche-Olsen et al., 2018; 細節請看附表三)相當,金門歐亞水獺基因組近交係數並無過高的現象(圖 5)。

而台北動物園繁殖個體 lu_cy 的 $F_{ROH500kb}$ 為 0.04925, $F_{ROH1000kb}$ 則為 0.00791,雖高於金門族群其他個體,但不比歐洲個體高。

表九、歐亞水獺個體全基因組近交係數。歐洲個體為 mLutLut1 及 lu_110，其餘則為金門個體。

(A)個體 ROH 片段長度 > 500kb

個體	ROH 數	ROH 長度 (Kb)	平均 ROH 長度 (Kb)	FROH (10 ⁻³)
mLutLut1	244.00	163308.00	669.29	67.47
lu_110	55.00	34740.70	631.65	14.44
平均	149.50	99024.35	650.47	40.96
lu_11	0.00	0.00	0.00	0.00
lu_16457	0.00	0.00	0.00	0.00
lu_212	27.00	16582.30	614.16	6.91
lu_3044	20.00	11853.60	592.68	4.94
lu_3045	69.00	42300.10	613.05	17.62
lu_408	123.00	80411.10	653.75	33.50
lu_445	41.00	24931.80	608.09	10.38
lu_455	62.00	42243.20	681.34	17.60
lu_456	3.00	1628.47	542.82	0.68
lu_5300	44.00	26918.20	611.78	11.23
lu_7333	67.00	42293.20	631.24	17.63
lu_7639	70.00	46222.40	660.32	19.26
lu_86	11.00	6774.95	615.90	2.82
平均	41.31	26319.95	525.01	10.97
lu_cy	171	118363	692.182	49.25

(B)個體 ROH 片段長度 > 1000kb。歐洲個體為 mLutLut1 及 lu_110，其餘則為金門個體。

個體	ROH 數	ROH 長度 (Kb)	平均 ROH 長度 (Kb)	FROH (10 ⁻³)
mLutLut1	17.00	20160.20	1185.89	8.33
lu_110	1.00	1379.72	1379.72	0.57
平均	9.00	10769.96	1282.81	4.45
lu_11	0.00	0.00	0.00	0.00
lu_16457	0.00	0.00	0.00	0.00
lu_212	0.00	0.00	0.00	0.00
lu_3044	0.00	0.00	0.00	0.00
lu_3045	2.00	2115.53	1057.77	0.88
lu_408	9.00	10448.60	1160.95	4.35
lu_445	0.00	0.00	0.00	0.00
lu_455	4.00	4743.07	1185.77	1.98
lu_456	0.00	0.00	0.00	0.00
lu_5300	0.00	0.00	0.00	0.00
lu_7333	1.00	1034.63	1034.63	0.43
lu_7639	5.00	6031.73	1206.35	2.51
lu_86	1.00	1063.88	1063.88	0.44
平均	1.69	1956.73	516.10	0.82
lu_cy	16.00	19012.40	1188.27	7.91

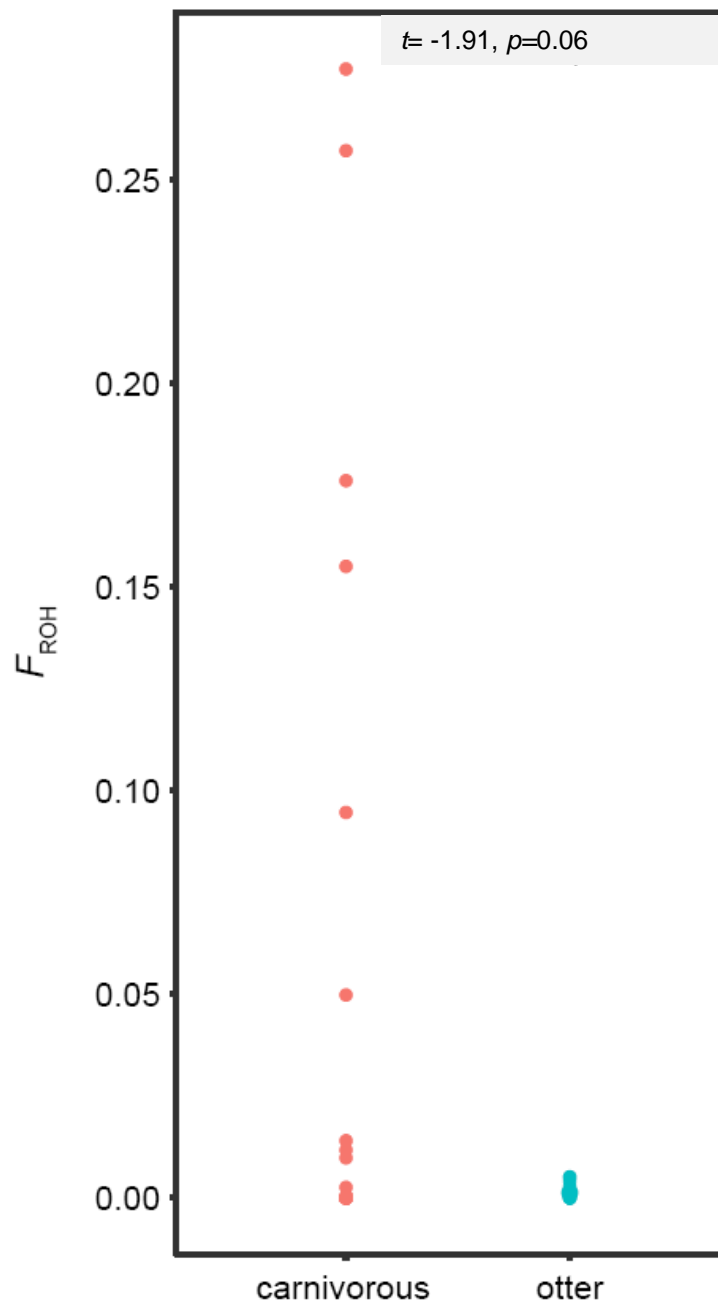


圖 5、參照 Brüniche-Olsen et al., (2018) 肉食性動物個體全基因組 F_{ROH} 與歐亞水獺 F_{ROH} 比較。



6. 金門水獺族群突變的累積

我們以 AUGUSTUS 註釋歐亞水獺參考基因組，初步獲得 50,278 個基因，其中 38,638 個基因完成功能註釋。根據此組基因組預測資訊包含的族群突變數量進行分析，發現每隻金門歐亞水獺平均有 20,810 個同義突變（95% 信賴區間：19410.53-21407.62），15,836 個非同義突變（95% 信賴區間：15454.06-16324.25），以及 624 個無義突變（95% 信賴區間：597.62-650.99）。由於除了來自英國的參考基因組序列，我們只對一隻來自德國的個體進行重定序，且依據 F_{ROH} (表九) 英國的歐亞水獺有較高的 F_{ROH} 比例，近期經歷嚴重瓶頸事件的可能性較大，因此我們僅檢測德國個體基因與金門族群的各類突變數平均數是否相等，首先該德國個體蛋白質編碼區三類突變數個別為 24,304 個同義突變、16,178 個非同義突變、及 512 個無義突變。one-sample t 檢定的結果，發現金門歐亞水獺族群的平均同義突變數明顯低於德國個體 ($t_{d.f.=12} = -8.49, p < < 0.001$)，而平均非同義突變 ($t_{d.f.=12} = 1.44, p > 0.05$) 及無義突變數 ($t_{d.f.=12} = 0.515, p > 0.05$)，則都與德國個體無顯著差別，因此並無證據支持金門歐亞水獺較德國個體的基因組蛋白質編碼區累積更多突變。

7. 歐亞水獺的歷史族群數量變動

我們先以 PSMC 估算兩隻歐洲歐亞水獺基因組所反映的長期歷史有效族群動態，結果顯示歐洲水獺在約約 100 萬年前 N_e 自 1-1.4 萬開始上升，到 4-5 萬年前（約末次冰河期中期）至末次冰盛期（約兩萬年前）間， N_e 便從約 2.5-4.5 萬開始下降，到最後一次冰河於一萬八千年前結束後，降至 1-4.5 千左右 (圖 6 上) (bootstrap 值 1 千~ 1.5 萬；圖 7)；而使用 SMC++ (圖 9) 對兩隻歐洲水獺基因組變異進行近期 N_e 動態聯合推估，則得到相對近期的歷史有效族群數量變化趨勢，自約三十一萬年前開始，歐洲歐亞水獺歷史 N_e 自約 3.3 萬逐漸上升，在約 8-10 萬年前（約上次間冰期）達到 3.8 萬的高峰，然後在末次冰期期間持續下降，到末次冰期結束後約 1.4 萬年前達到最低點 ($N_e = 1861$)，然後逐步回升，至 211 年前達到 1.55 萬，然後又逐漸下降至近期的 8600 左右 (圖 7)。而 PSMC 法根據金門歐亞水獺個體基因組推估歐亞水獺在亞洲的族群動態與歐洲一致：自 1 百萬年前 N_e 自約 1.6 萬開始上升，至約末次冰期中期， N_e 從約 3 萬左右開始下降，但在末次冰期結束後（約，1.5 萬年前）， N_e 開始彈升，有些個體的 N_e 在萬年前甚至上升至 八萬左右 (圖 6 下) (bootstrap 值 500~ 19 萬；圖 7、圖 8)；而 SMC++ 法對金門族群基因組進行近期的遺傳有效族群動態進行聯合估算，



發現 N_e 自 57 萬年前自 2.8 萬，逐漸上升至末次冰期中期(約 6.5 萬年前)約 4.6 萬，然後逐漸下降，到約 1700 年前達到低點(約 1660)，然後逐漸小幅彈升到近期(約 300 年前至今)的 2,734 (圖 7)。以 SMC++ 所估出來的現今有效族群數量遠大於目前金門實際估算約 200 隻的族群數量。由於 SMC++ 是根據 SNP 位點的頻譜分布估算不同時間段的 N_e ，而我們的歐洲及金門的歐亞水獺個體都極為有限，因此 SNP 位點的頻譜分布並不能提供可靠的極近期 N_e 估算，所以應謹慎使用目前 SMC++ 估算的現時 N_e 數值。

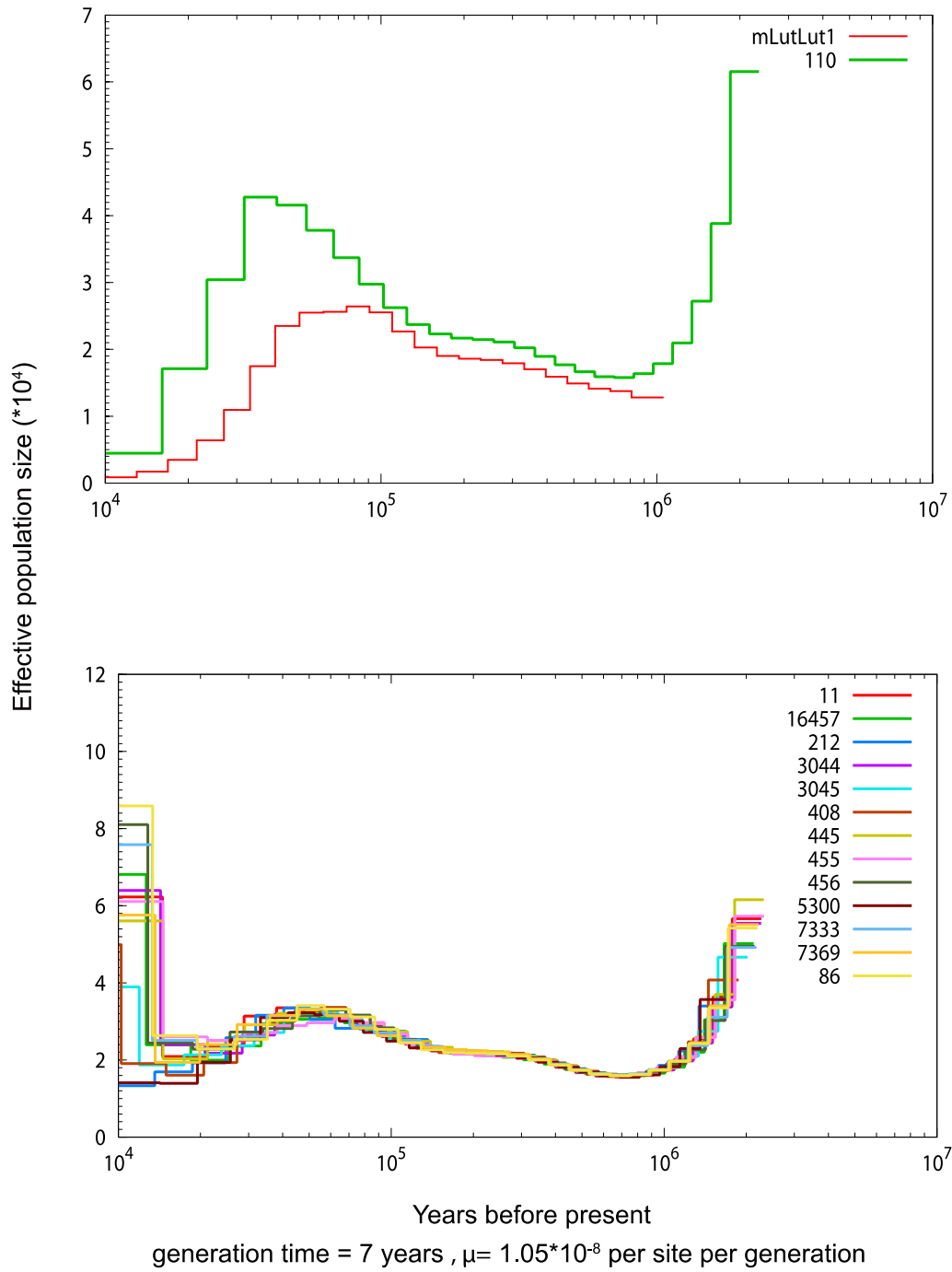


圖 6、PSMC 法所推估歐洲歐亞水獺歷史有效族群動態(上)，及金門歐亞水獺歷史有效族群動態(下)。

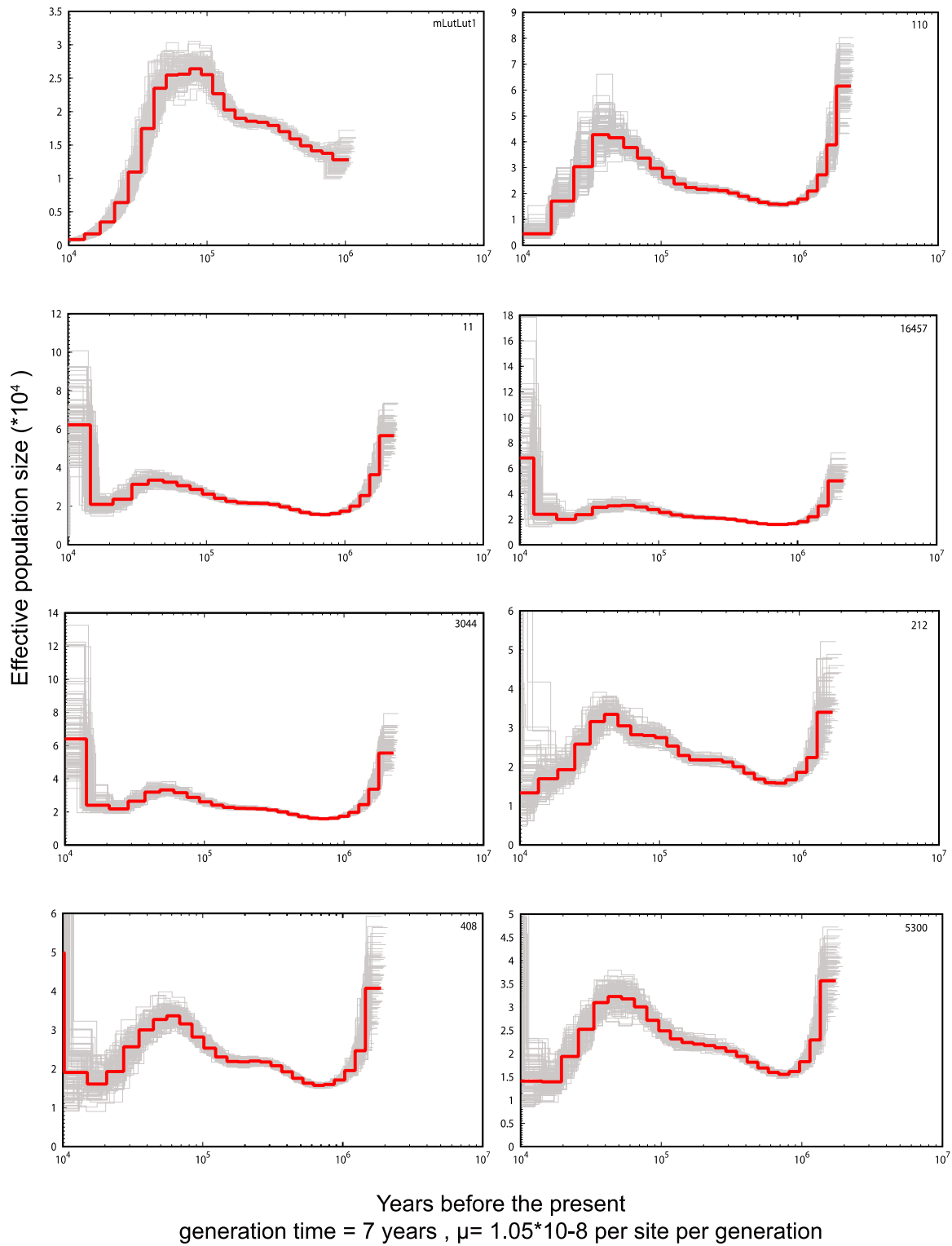


圖 7、以 PSMC 法對每隻歐亞水獺基因組進行 100 次 bootstrap 分析所得歷史有效族群動態範圍(灰線)。歐洲個體為 mLutLut1 及 lu_110，其餘則為金門個體。

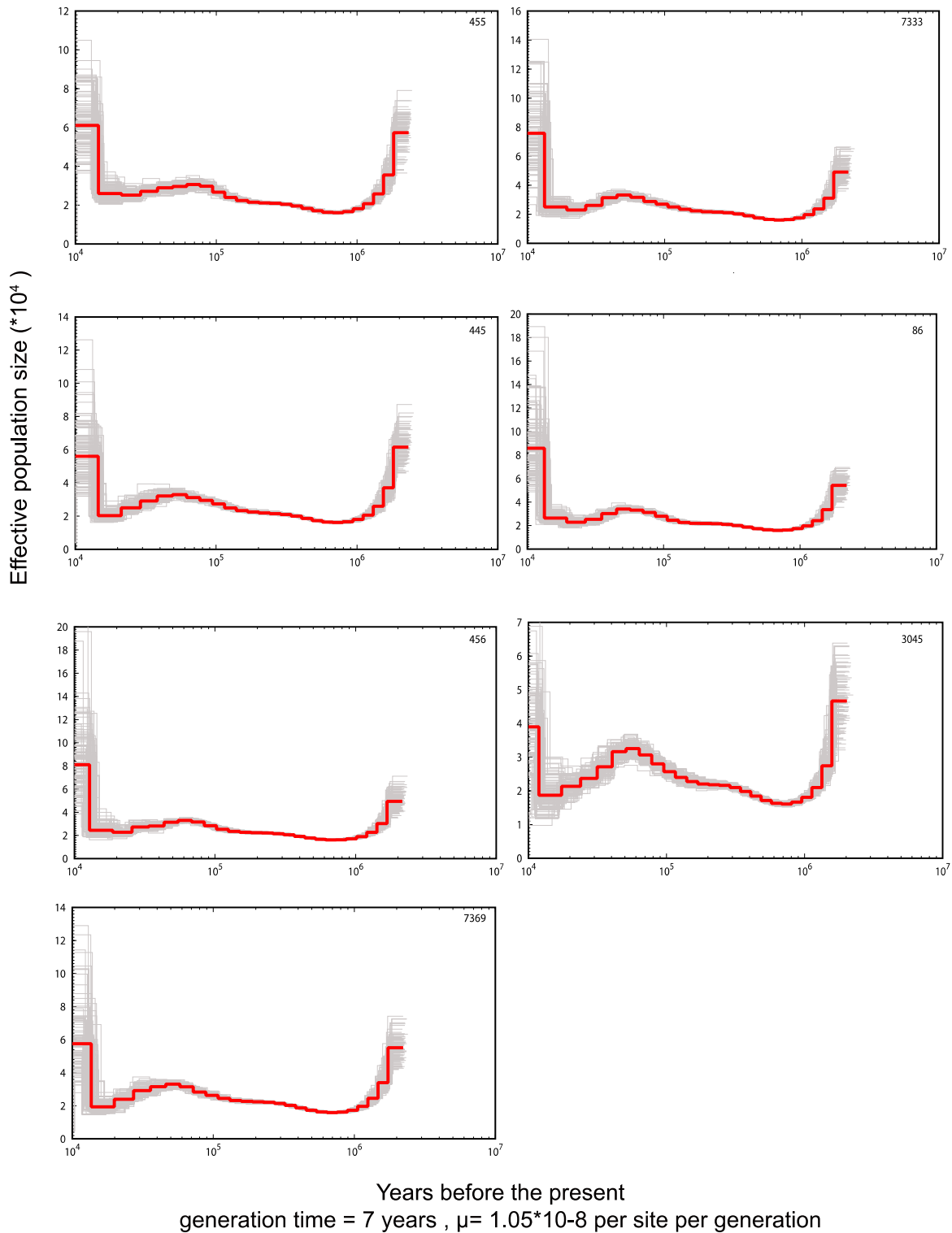


圖 8、以 PSMC 法對每隻金門歐亞水獺基因組進行 100 次 bootstrap 分析所得歷史有效族群動態範圍(灰線)。

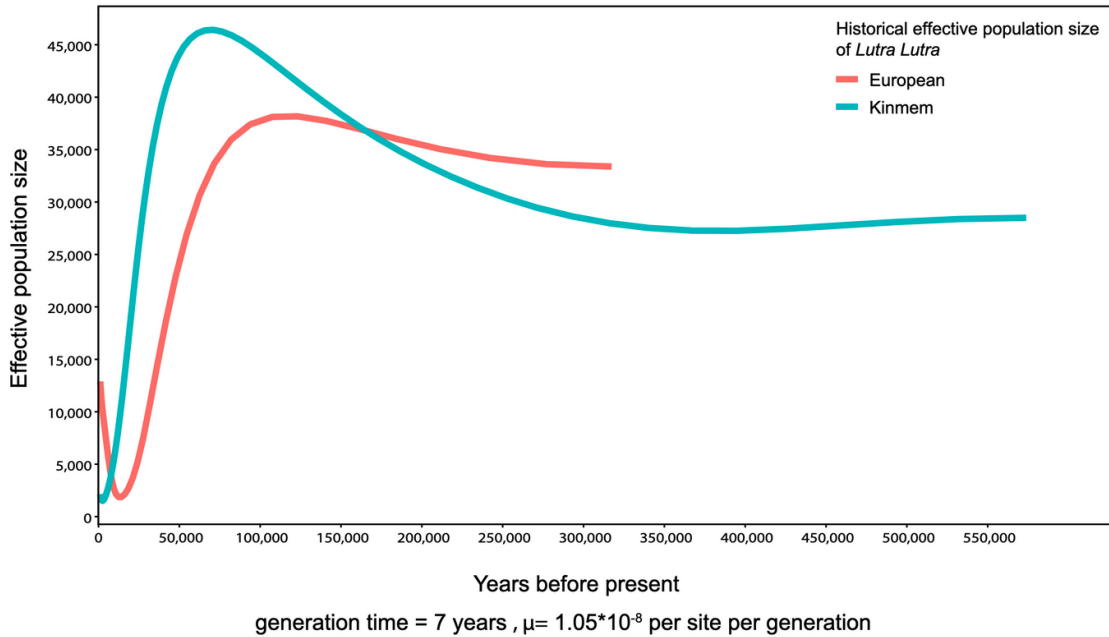


圖 9、以 SMC++ 法推估歐洲（紅色）及金門（綠色）歐亞水獺歷史遺傳有效族群動態。

8. 遺傳救援的準則與評估

著名的族群遺傳學家 Herick 及 Fredrickson 曾對遺傳救援的決策、運作及潛在負面效應提出一份廣為引用的操作準則(Hedrick & Fredrickson, 2010)，我們將這份準則摘譯如下：

(a) 什麼時候該進行遺傳救援？

應該要有證據說明引入的遺傳救援個體對避免族群滅絕的潛在好處，大於將個體引入到瀕危族群的風險。因此在以下三個條件下，遺傳救援是一個可考慮採行的保育手段。

(1) 應該有證據說明瀕危族群的適存度低，或者由譜系資料或分子數據中得出族群內有高近交率的結論，因此，可能透過外來個體的引入減少瀕危族群內的遺傳負荷，而提高適存度。可能的話，應將現生族群的存活率、繁殖成功率等適存度參數與該族群或物種的歷史數據進行比較。族群如果長期存在低數量的現象，有可能是由於生態因素所造成，然而如果該族群有高度滅絕風險，則可透過與其他族群雜交子代的適存性高低，推斷該族群的低適存性是否有遺傳基礎。

(2) 為了成功地進行遺傳救援，應該有一個遺傳關係相近的來源族群，以降低引入外來個體發生遠交抑制(outbreeding depression：即不同族群雜交子代適存度較低的現象)的可能。一般來說，救援族群應與瀕危族群為同一物種，並來自臨近地區或相似的棲息環境。



(3) 在嘗試對野生瀕危族群進行遺傳救援之前，應該有來自圈養族群的實驗數據來支持遺傳救援的有效性。換句話說，應該有交配成功、繁殖良好、雜交後代存活良好的實驗證明，並且沒有證據表明這些種群之間存在遠交抑制。且並有分子實驗數據支持救援和瀕危族群間沒有緊密的親緣關係尤其重要。然而，對於世代較長的物種或難以圈養繁殖的物種，可能無法在啟動遺傳救援之前，以圈養個體進行完整的實驗評估。因此，如果有證據說明瀕危族群適存性低，且存在密切親緣關係的外部族群時，管理者可以主張立即進行遺傳救援管理。

(b) 遺傳救援計劃和管理

一旦決定進行遺傳救援，就應該制定出引進的方案和後續進行的步驟。這些步驟應盡可能縝密考量，並加入一定的靈活性，以應對過程中出現非預期的狀況。以下分三點為遺傳救援和管理提供建議。

(1) 應該採用一個廣為接受且謹慎設計下的移地保育作業規則(**translocation protocol**)，盡可能降低引進外來個體，對瀕危族群產生非遺傳性的負面效應。例如，避免因引入救援族群帶來疾病或對瀕危族群個體行為產生有害的風險。此外，可通過只引進雌性個體、引進整個動物群體、或引進動物到尚未被瀕危族群個體佔據的領土或地點，都可最大限度地減少對原生瀕危族群產生不利的行為效應。

(2) 應該有一個詳盡的監測計劃，以監測所引進的動物及其後代的影響。這需要通過一些方法來識別個體、盡可能全面地監控個體移動、交配行為、存活和繁殖。此外，應及時通過遺傳手段，確定和驗證個體之間的血緣關係，如母子關係、父子關係和其他密切的遺傳關係，以便構建一個準確和完整的受救援族群個體的譜系，以利未來的經營管理。對於某些種群或生物種類型來說，構建完整的譜系是不可能的。在這種情況下，可以根據雜交（如 F1 和回交個體）和非雜交個體（來自供體和瀕危種群的純種個體）的比例，來推估種群內個體遺傳組成在不同時間點的變化。理想情況下，將對其族群增長有最大影響的個體適存度指標，依雜交和非雜交兩類個體進行測量評比，以評估遺傳救援的成果。如無法對個體適存度指標進行估算，則可以估算族群成長率，結合雜交和非雜交個體在族群內比例變化的資訊，來評估遺傳救援的成效。

(3) 應該在一段時間內，甚至持續幾個世代，持續進行遺傳救援管理，並在需要時，修改管理步驟。例如，如果最初遺傳救援的成果的不如預期，那麼進一步的管理，包括在未來幾代進一步引入外來個體，應該是可能的管理選項。或者，如果最初來自來源族群的個體超過預期的數量，那麼未來幾代的進一步引入就應該受到限制。雖然遺傳



救援的執行應該有一定靈活性，但只能依科學上可靠的資訊，來修改遺傳救援的實施步驟。

(c) 遺傳救援潛在的負面遺傳後果

儘管遺傳救援應該對被救援瀕危族群的適存度和族群存續，產生正面的遺傳效應，但也可能產生有害的遺傳後果。這些潛在的負面影響中，有些在初期可能很難被偵測，或其效應也可能並不顯著。以下是遺傳救援的四種潛在負面遺傳後果。

(1) 如果引入過多救援個體進行繁殖，可能會使當地瀕危族群的遺傳和性狀變異（其中一些可能是適應性的）被取代淹沒。為了抵消這種影響，只能引進少數個體，以便遺傳救援能夠成功消除瀕危族群內高頻率的有害變異，但又不至於完全改變原本族群內等位基因頻率，及抹除對當地環境適應有利的變異。此外，如果引進的數量過多，或者引進的個體在繁殖上非常成功，將取代原先瀕危族群的個體，成為該族群未來世代的祖先。這將導致原先瀕危族群的基因變異被取代抹除，而不是遺傳救援（雖然在某些情況下這也許是一個合適的發展）。

(2) 如果遺傳救援後，族群是由救援族群的少數個體（和/或來自瀕危種群的少數個體）進行繁殖產生的話，那麼在接下來的幾代中，可能使有效族群（ N_e ）規模再度縮小。如果是由較多救援群的個體納入繁殖，並且接受救援族群的繁殖貢獻，可降低有效族群縮小的風險。同時，在最初與救援族群個體的雜交時，盡可能納入瀕危族群個體，也可降低有效族群縮小的風險。不過，如果最初雜交後的 F1 和回交個體具有較高的適存度，因很大一部分族群可能是這些少數個體的後代，也將可能難以保持較高的有效族群數量。

(3) 從救援族群中引入個體可能會導致族群適存度暫時性地提高。例如，雜交第一代可能有較高的適存度，因為隱性的、有害遺傳變異的效應將被掩蓋。然而，在雜交第二代和後續的雜交中，可能現有利適應的遺傳變異組合被基因重組打破的現象，而再次導致隱性同型合子的出現，及造成個體適存度降低。事實上，相對於遺傳救援前的瀕危族群，經過遺傳救援族群內的近交抑制也可能會增加。如果瀕危種群被認為具有獨特性（例如，一個亞種的最後剩餘族群），在最初的遺傳救援之後，經營者可能會希望通過與僅剩瀕危族群的個體進行回交，以增加瀕危亞種在救援族群內的繁殖個體。然而，這作法有可能重新成導致瀕危亞種內的遺傳負荷，而導致拯救計劃的失敗。

(4) 從特定的來源族群對特定的瀕危種群進行遺傳救援，可能只能進行一次和/或在第一次嘗試時的效果最好。如果使用同一組瀕危和來源族群進行多次遺傳救援，那麼上



述負面影響可能因為通過不斷引入來源族群的非有害變異，降低造成遺傳負荷的特定位點的有害遺傳變異，在瀕危種群中的頻率。但是對於存留在瀕危種群中的有害變異，來源族群中可能並沒有非有害變異可加以稀釋，或者來源族群本身可能就具有有一些有害變異，會降低瀕危族群的適存度。

9. 金門歐亞水獺進行遺傳救援保育策略之評估

我們將上述遺傳救援準則製成一個簡易查核表(表十)，其中查核表第一大項(遺傳救援時機評估)的第一子項是進行遺傳救援最主要的必要條件：計劃接受遺傳救援的瀕危族群需要有證據顯示其面臨健康或繁殖力下降等適存度降低的問題，或者至少要有譜系或分子數據顯示族群內有高近交率的現象。但目前金門歐亞水獺的基礎研究並無法提供其是否有健康或繁殖力下降等適存度衰退的證據，也缺乏野外數據顯示其近親交配的現況，而本研究的基因組數據也並不支持金門的野外歐亞水獺族群有嚴重近親交配，或者不利突變累積的情形。而遺傳救援準則的第二項則說明欲引入的個體應與被救援族群的遺傳背景相近，否則容易造成遠交抑制等不利後果，目前亞洲的歐亞水獺缺乏全面性的遺傳結構分析，因此無法確認與金門族群親緣關係相近族群之所在，若假設族群親緣與地理距離相關，則考慮引入的族群最好來自目前尚有零星紀錄的中國大陸東南沿海一帶，與金門族群在分類上相同亞種的華南亞種 (*L. l. chinensis*) 個體，但目前引入該地區野生個體幾無可能。而關係到遺傳救援規劃的準則第三條建議，為確認遺傳救援行動的有效性，最好能先在域外保育族群驗證，雜交子代並無適存度下降的跡象，也沒有遠交抑制的證據，基於這項原則，為了將來當金門歐亞水獺族群數量進一步下降，有嚴重的近親交配時，進行遺傳救援而預作準備，可以先考慮引進其他歐亞水獺個體到目前的域外保育族群(例如台北動物園所收容的域外保育族群)，觀察其與金門個體是否能產下健康的雜交子代，作為未來採行遺傳救援行動決策時的重要依據。



表十、歐亞水獺遺傳救援需求估表

項目	子項	金門歐亞水獺現況	建議
遺傳救援時機評估	1. 族群的適存度或高近交率	無視存度下降數據；無高近交率證據	無證據支持金門族群有立即執行遺傳救援之必要
	2. 近緣救援來源族群	歐亞水獺華南亞種	可考慮引進其他域外華南亞種個體進行遺傳救援前測
	於域外保育族群進行遺傳救援印證	有域外保育族群可供遺傳救援前測	可考慮引進其他域外華南亞種個體，在域外保育族群進行遺傳救援前測
遺傳救援規畫與管理	1. 降低外來引入個體的潛在風險	尚無遺傳救援計畫	無法評估
	2. 監控引入成效及不良後果	尚無遺傳救援計畫	無法評估
	3. 視結果調整引入策略	尚無遺傳救援計畫	無法評估
執行遺傳救援後的負面效應評估	1. 降低引入個體數量，避免被救援族群遺傳特徵消失	尚無遺傳救援計畫	無法評估
	2. 儘量提高每隻引入個體的繁殖機會，以避免有效群體量由於繁殖機會不均而下降	尚無遺傳救援計畫	無法評估
	3. 雜交第二代和後續的雜交中，可能會因基因重組而出現有利適應的遺傳變異組合被打破，而適存度下降	尚無遺傳救援計畫	無法評估
	4. 避免自同一來源反覆引進進行救援，以避免有害突變累積	尚無遺傳救援計畫	無法評估



七、討論

雖然歐亞水獺尚未被 IUCN 列為極度瀕危物種，但由於水污染、棲地破碎、獵殺及漁網誤捕等原因，在二十世紀中葉以後，歐亞水獺在歐洲的族群曾經急劇下降，甚至在某些地區局部滅絕，因此歐亞水獺在歐洲，特別是英國更是受到高度關注，有大量的基礎生物學的研究進行(Hung & Law, 2016)，但可能是因為行為隱密不易觀察，目前並無對歐亞水獺的交配系統有研究報導，因此本研究透過分析群基因組序列，提供全球第一個對野生歐亞水獺交配系統的遺傳數據。本研究不但提供了第一組關於東亞地區歐亞水獺基因組多樣性現況的資料，也藉由比對金門歐亞水獺族群與歐洲個體的基因組多樣性資料，對歐亞水獺整個物種的遺傳多樣性與地理遺傳結構，提供初步的認識。而本研究提供巨量歐亞水獺 SNP 遺傳數據，也可供未來開發新的遺傳標記系統，例如 DNA 晶片或陣列（例如 microfluidic array 技術應用於對野生動物非侵入性樣本的遺傳分析 Kraus et al., 2015; von Thaden et al., 2017），這些新技術除了有利使用非侵入性樣本（例如排遺）快速監測金門歐亞水獺族群動態外，由於歐亞水獺的保育也受到其他地區廣泛的重視，新的檢測技術也可供其他國家地區歐亞水獺相關研究所需。

金門歐亞水獺的近交係數與遺傳救援

紀錄顯示 1950 年代後在中國的歐亞水獺大量銳減(Li & Chan, 2018)，中國大陸東南沿海因為龐大經濟開發的壓力歐亞水獺的棲地受到全面的破壞，近年在東南沿海地區只有零星的紀錄(F. Li & Chan, 2018；張廖, 2020)，因此在過去 20 年金門的歐亞水獺族群，一直被認為是該地區僅存的穩定族群(翁 et al., 2020)，由於金門的歐亞水獺族群估計僅有 200 隻左右的個體(翁 et al., 2020)，在缺乏證據支持鄰近族群個體能遷入金門的前提假設下，金門歐亞水獺族群被認為很難逃脫嚴重近親交配的宿命，再加上近年一些金門水獺個體有心臟肥大或尾部扭曲變形的異常現象(袁守立攝影，<https://wuo-wuo.com/topics/wildlife/taiwan-otter-lutra-lutra/1152-otter-conservation02>)，水獺保育人士高度懷疑金門的歐亞水獺族群已產生近交抑制現象，因此引進其他族群的水獺個體參與金門族群的繁殖，作為遺傳救援，便成為一個被考慮的歐亞水獺保育選項。然而對一個族群進行遺傳救援的前提，需要先判明該族群是否因近親交配而產生近交抑制的狀況，或該族群有高度的近親交配的情形(Hedrick & Fredrickson, 2010)，在目前



缺乏野外證據支持金門歐亞水獺有近交抑制的現象，同時也缺乏野外觀察的譜系資料下，根據基因組中 ROH 所估算的近交係數 F_{ROH} ，便成了唯一評估金門水獺是否需進行遺傳救援的科學依據。根據我們的結果，若考慮包含 > 1,000kb 的 ROH 片段，金門歐亞水獺平均 $F_{ROH1000kb} = 0.00082$ ，與目前已知肉食性動物 F_{ROH} (Brüniche-Olsen et al., 2018) 相當，因此目前金門歐亞水獺基因組近交係數並無過高的現象；若與一些瀕危動物族群(例如 *Silurus glanis* Jensen et al., 2021; *Porcula salvania*, Liu et al., 2021) 相比，金門歐亞水獺的 F_{ROH} 更僅為其五分之一至十分之一，因此我們的證據並不支持金門歐亞水獺族群近期有嚴重的近親交配狀況，並不符合遺傳救援指引中，對瀕危族群進行遺傳救援的前提條件，因此並無立即需要對其進行遺傳救援的迫切需求。

金門的歐亞水獺個體有限，如果僅靠金門族群個體繁殖，應該很難避免近親交配的發生，因此我們所觀察到金門歐亞水獺的低近交係數，是否可能藉由來自其他族群個體加入繁殖所帶來基因流所造成？雖然過去李玲玲老師考察金門周邊地區並未發現歐亞水獺蹤跡，但隨著近年中國大陸生態調查的強度增加，在浙江舟山群島、福建北部及廣東珠江口都有歐亞水獺的觀察紀錄(張廖, 2020; 中山大學劉陽教授個人通訊)，由於歐亞水獺可沿著海岸活動，自浙江、福建以至廣東沿岸有許多大大小小的島嶼，可提供歐亞水獺活動停棲的棲地，歐亞水獺的移動能力很強，一個在葡萄牙對亞成體進行無線電追蹤研究，發現歐亞水獺的雄性幼獸平均擴散距離可長達 21 公里 (Quaglietta et al., 2013)，由於金門能提供相對較大面積適合歐亞水獺的棲地，應該有可能吸引在中國大陸東南沿岸活動的殘存歐亞水獺的個體移入。從鄰近地區遷入個體的可能也可從近年排遺 DNA 的微衛星基因型分析得到佐證(張廖, 2020)，根據 2019 及 2020 年自排遺 DNA 分析的結果發現，每年都有相當數量的新個體被發現，這些個體除了是當年新生的幼獸，部分無法判明親代的個體有可能是遷入的個體；另一方面，每年有高比例的歐亞水獺幼獸自金門消失，除了可能意外或其他原因死亡，也被認為可能擴散離開金門(張廖, 2020)，對於金門島上是否有遷入歐亞水獺個體，及遷入個體的性別與數量，則有賴持續分析排遺 DNA 樣本，對金門所有歐亞水獺個體的微衛星基因型完整建檔，並鑑定所有個體的血緣關係，才能正確估算。

雖然金門歐亞水獺族群目前並無進行遺傳救援的迫切需求，但是目前台北動物園有自金門救傷收容個體所建立，人工圈養下繁殖的域外(*ex situ*)保育族群，這個族群除了擔任對公眾普及水獺保育的科學教育任務外，更扮演將來需要時可補充野外族群的任務。由於域外保育族群的個體有限，個體只能在圈養族群中獲得交配機會，在有限



的交配對象下，域外保育族群勢難避免近親個體交配的狀況，所以域外保育族群的適存度極易受到近交抑制的影響(Boakes et al., 2007)。因此，如果要能長期維持歐亞水獺域外保育族群的適存度，適度引入其他個體，以避免因近親交配產生近交抑制的經營管理選項，應該被慎重考慮。以台北動物園的歐亞水獺域外保育族群為例，應考慮繼續收容來自金門的救傷個體，或者與世界上其他動物園取得歐亞水獺華南亞種的個體加入繁殖族群，以降低遠交抑制的風險，並透過譜系或遺傳資料，選擇與域外保育族群個體遺傳背景較不相似的個體進行繁殖(Allendorf et al., 2010 ; Whiteley et al., 2015)，以避免造成不必要的近親交配，或者因遺傳漂變造成遺傳多樣性的隨機丟失。

對域外保育族群引入外來個體，不但對維持其適存度至關重要，而且也可做為當需要對域內 (*in situ*) 保育族群進行遺傳救援時的前導測試。引入外來個體進入域內保育族群繁殖，事實上具有造成遠交抑制等造成適存度下降的風險 (Hedrick & Fredrickson, 2010 ; Whiteley et al., 2015)，因此為避免引入外來個體反而造成域內保育族群適存度進一步下降，依遺傳救援準則，有必要先將外來個體引入域外保育族群，進行遺傳救援的前導測試，觀察引入外來個體是否會對域外保育族群造成不必要的負面效應(Hedrick & Fredrickson, 2010)。雖然根據 F_{ROH} 的結果研判，金門歐亞水獺族群目前並無進行遺傳救援的迫切需求，但是根據李(2015)的研究，金門水獺的蹤跡已自 20 世紀初遍佈全島，到現在自金東地區消失，由於金門島對水獺棲地人為干擾破壞的情形仍然持續中，在缺乏有效的作為以恢復或減緩水獺棲地喪失下，預期金門歐亞水獺族群應該會呈現持續下降的趨勢，金門歐亞水獺的族群負載量將近一步下降，加上中國大陸東南沿海的環境污染及棲地破壞持續加劇，將來也愈來愈不易與其他地區族群達成有效的基因交流，這終將使得金門歐亞水獺成為近親交配嚴重的小族群，而有進行遺傳救援的需求。因此透過在域外保育族群，進行遺傳救援的前導測試，可避免未來直接引入外來遺傳變異對金門水獺族群產生不必要的負面影響。

歐亞水獺的遺傳多樣性

一個生物族群是否能對應環境不斷地變遷而長期維持，與其是否具有能供環境選汰的遺傳變異多寡有密切的關係(Barrett & Schluter, 2008; Lai et al., 2019; Lande & Shannon, 1996)，金門歐亞水獺族群是否能對應不斷變化的環境而長存，部分取決於其遺傳多樣性的多寡。過去根據粒線體 DNA 部分序列的分析，發現金門歐亞水獺的個體都有同樣的單倍型(翁 et al., 2020)，而本研究根據完整粒線體基因組序列發現金門



歐亞水獺的粒線體基因組有二種單倍型，但單倍型間平均僅有 1 個核苷酸的差異，金門歐亞水獺極低粒線體遺傳多樣性，曾被認為是由於缺乏基因流且高度近交的小族群(翁 et al., 2020)所導致。然而粒線體的低度多樣性並非金門族群的特有現象，一個在伊比利半島 31 隻歐亞水獺個體的粒線體高變異控制區變異的研究，也顯示整個伊比利半島只有一個單倍型(PÉREZ-HARO et al., 2005)，除了伊比利半島外，只具單一粒線體單倍型的情形也在歐洲其他地區出現(Cassens et al., 2000)，而歐洲大多數地區歐亞水獺的粒線體基因組遺傳多樣性也是極低，根據 2,000bp 的粒線體序列，整個歐洲 19 個歐洲國家 616 個樣本粒線體的核甘酸多樣性值僅為 0.0014，個體間的序列差異平均僅 2.25bp (Mucci et al., 2010)；除粒線體基因多樣性外，歐洲歐亞水獺核基因組中微衛星標記的多態性也不高，而且不同地理族群的遺傳分化程度也低(Mucci et al., 2010)。雖然根據丹麥一個比較 1880-1990 來自丹麥皮張標本的牙齒所提取的 DNA，與現生族群的微衛星標記的多態性，發現 1960 代後歐亞水獺在丹麥的急劇下降，的確造成微衛星標記多態性的下降(Pertoldi et al., 2001)，但是根據歐洲族群的粒線體及微衛星標記的多態性 Mucci 等人判斷整個歐洲的歐亞水獺族群應該起源於近期同一個冰期避難所的祖先族群。然而根據一個樣本包含歐亞大陸歐亞水獺族群的研究(Waku et al., 2016)及本研究的結果，都指出整個歐亞大陸上歐亞水獺不但在粒線體基因組序列上，甚至核基因組序列的分化程度都很低，因此雖然族群下降會導致遺傳多樣性降低，但不足以解釋整個歐亞大陸族群的低度分化，相反地卻支持了整個歐亞水獺所有現生的地理族群可能都起源於相同的近期冰期避難所；而像歐亞水獺這樣在整個歐亞大陸廣泛分佈，但遺傳上低度分化的物種並不罕見，以 145 種在歐亞大陸廣泛分佈的鳥類為例(Pârâu & Wink, 2021)，其中 85 種的線粒體也是低度分化，這個現象被認為是肇因於最近兩百萬年反覆的冰期循環，在寒冷冰期時，一些物種從絕大部分的歐亞大陸（特別是冰帽覆蓋的高緯度地區）消失，退縮至少數甚至單一的避難所；這些物種在溫暖的間冰期則從避難所擴散到整個廣袤的歐亞大陸上，因為起源自近期相同的冰期避難所，不同地理族群的遺傳多樣性無法高度分化(Pârâu & Wink, 2021)。然而受限於本研究地理取樣的分佈，目前並無法推論歐亞水獺冰期避難所的地理位置。由於粒線體的低度分化並非金門族群的特有現象，因此並不能依此支持金門歐亞水獺族群有高度近交的推論。

歐洲及金門的歐亞水獺除了整個基因組的多樣性相近，我們的突變分析也發現兩者基因組所攜帶的蛋白質編碼區各類突變數也是相近的。由於一個小族群或曾經經



歷嚴重瓶頸事件的族群，受到強烈遺傳漂變的影響，除了容易造成遺傳多樣性的丟失，也容易使得有害突變在族群中不被純化選擇汰除而保留下來 (Kimura, 1962; Kirkpatrick & Jarne, 2000)，以國內著名的保育類鳥種黑面琵鷺 (*Platalea minor*) 為例，全球族群曾下降到僅 288 隻，即使近期族群量已上升至 5,000 隻左右，但對其基因組變異進行分析，發現仍比其未曾有保育風險的姐妹種皇家琵鷺 (*P. regia*) 有較多的蛋白質編碼區突變 (S.-H. Li et al., in press)。因此若根據目前歐洲及金門的歐亞水獺基因組內蛋白質編碼區各類突變數量的比較，並無證據支持金門歐亞水獺的遺傳特徵近似於一個孤立的小族群發生有害突變累積的現象。

歐亞水獺的歷史族群動態

現生歐亞水獺可能在最近一次冰期結束後，自一個或少數冰期避難所擴張而來的假說，不但受到歐亞水獺在整個歐亞大陸上，遺傳多樣性低度分化支持，也可由其 N_e 的變動趨勢得到佐證。根據 PSMC 分析的結果顯示，不論來自歐洲或金門歐亞水獺都在上次溫暖的間冰期 (Eemian, or the last interglacial period, 約 130,000- 115,000 年前，Adams et al., 1999) 左右，其歷史 N_e 有一個數量的高峰 (歐洲族群 N_e 約 13,000-24,000，而金門族群 N_e 約 18,000-36,000；圖 6)，然後 N_e 開始逐漸下降，其中歐洲族群的 N_e 在大約末次冰期結束後達到低點 (N_e 約 200-900)，而亞洲族群，但也約在末次冰結束後 (約 1.7 萬年前) 達到低點 (N_e 約 1,400-22,000)；由於 N_e 一般來說大約是具繁殖力族群個體的 1/10 (Frankham, 1995; Palstra & Ruzzante, 2008b)，和其現今歐亞大陸上廣泛分佈，及 1950 年代前的大量被獵殺的個體數相較，這個數量可能只佔近期歐亞水獺個體數極小一部分，支持歐亞水獺的族群曾萎縮退避至冰期避難所。不過在末次冰期歐亞水獺 N_e 曾一度暴增，這可能與冰期造成水獺棲地破碎化有關；例如，根據古氣候及孢粉資料，在末次冰期中較溫暖的時期 (約 35,000-50,000 年前)，東亞的氣候和植被可能和現代差別不大 (Yu et al., 2007)，隨後的冷期氣候變化主要造成植被改變，進而導致歐亞水獺的棲地破碎化，歐亞水獺在破碎的棲地間有限的基因流，可能反而導致歐亞水獺實際族群數雖然隨著棲地限縮且破碎而下降，但遺傳上的 N_e 卻上升的現象 (Wright, 1943; Nei & Takahata, 1993; De & Durrett, 2007)，現今歐亞水獺的低遺傳多樣性應該部分反應末次冰期結束後低的 N_e 。歐亞水獺基因組序列中所反應末次冰期間 N_e 上升的現象並非特例，也出現在亞洲其他的動物，例如鳥類的畫眉 *Leucodioptron canorum* (S.-H. Li et al., 2009)，或其他華南鳥類 Dong et al., 2017)。



而根據一個同樣以 PSMC 法分析 60 種哺乳動物基因組的研究發現(Y. Liu et al., 2018)，其中 8 種(包括亞洲野驢 *Equus hemionus onager*, 格蘭特斑馬 *Equus quagga boehmi*, 豬尾獼猴 *Macaca nemestrina*, 灰狼 *Canis lupus*, 白尾鹿 *Odocoileus virginianus texanus* 等)和歐亞水獺相似，在末次冰盛期前後 N_e 發生嚴重的收縮；而根據 38 種鳥類基因組序列 PSMC 分析的結果(Nadachowska-Brzyska et al., 2015)，也發現在末次冰期內 N_e 普遍嚴重下降，所以這些哺乳類、鳥類以及我們歐亞水獺的案例，都支持更新世(Pleistocene)，特別是末次冰期以來，氣候的劇烈波動的確對一些生物類群的分佈與數量變化有重要的影響。

根據 PSMC 及 SMC++ 法推估金門歐亞水獺基因組所反應的歷史 N_e 均遠遠大於目前由排遺 DNA 樣本所推估的實際族群數(約 200 隻，翁 et al., 2020)，這也顯示金門歐亞水獺基因組的遺傳變異所反應的是一個遠較金門地理範圍更大的 N_e ，並沒有一個受到長期孤立小族群經歷強烈遺傳漂變而導致遺傳變異丟失或侵蝕(genetic erosion)的遺傳特徵，這與低近交係數 (F_{ROH}) 值及與歐洲個體相當的蛋白質編碼區突變數，都不支持金門的歐亞水獺族群為一個長期封閉孤立的子餘族群。這可能是藉由歐亞水獺的高活動力，金門歐亞水獺族群與鄰近地區的殘存小族群間，可跨過狹窄的海域而有基因流聯繫，持續的基因流能使金門歐亞水獺維持基因組的遺傳變異，也避免近親交配的機會過高。而金門歐亞水獺長期比歐洲族群有較大 N_e ，這也與金門歐亞水獺有較高的雜合度及較低的近交相吻合。



八、結論

依據基因組序列的分析，我們發現不僅金門的歐亞水獺族群有遺傳多樣性偏低的現象，歐洲不論是英國或歐陸的歐亞水獺個體的遺傳多樣性也偏低，因此這個現象無法以金門歐亞水獺是個孤立且高度近親交配的族群來解釋，更可能是歐亞水獺在末次冰盛期後，自一個或少數冰期避難所擴散至整個歐亞大陸有關。而目前金門歐亞水獺族群的近交係數並不高，在缺乏金門歐亞水獺族群有近交抑制或高度近親交配的證據下，目前金門的歐亞水獺族群並無迫切的近交抑制風險，因此並無進行遺傳救援的必要；但是對於進行域外保育的族群，由於族群極為有限，難以避免近親交配的發生，應考慮適時引入遺傳距離相近的華南亞種個體，以注入新的遺傳變異，必免近親交配導致近交抑制及遺傳多樣性丟失的問題，由於金門的歐亞水獺棲地在持續劣化中，加上鄰近區域適合歐亞水獺的棲地也正在大規模消失中，因此未來金門的歐亞水獺族群將更為孤立，有可能逐漸發展成需要進行遺傳救援的小族群，因此在域外保育族群引入個體，也可為未來需要進行遺傳救援而預作準備。本研究結果提供金門歐亞水獺目前族群遺傳多樣性及近親交配係數的現況基準數值，可供未來長期監測比對參考。



九、參考文獻

- Allendorf, F. W., Hohenlohe, P. A., & Luikart, G. (2020). Genomics and the future of conservation genetics. *Nature Reviews Genetics*, *11*(10), 697–709. <https://doi.org/10.1038/nrg2844>
- Barrett, R. D. H., & Schluter, D. (2008). Adaptation from standing genetic variation. *Trends in Ecology & Evolution*, *23*(1), 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.09.008>
- Bell, D. A., Robinson, Z. L., Funk, W. C., Fitzpatrick, S. W., Allendorf, F. W., Tallmon, D. A., & Whiteley, A. R. (2019). The Exciting Potential and Remaining Uncertainties of Genetic Rescue. *Trends in Ecology & Evolution*, *34*(12), 1070–1079. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2019.06.006>
- Benson, J. F., Hostetler, J. A., Onorato, D. P., Johnson, W. E., Roelke, M. E., O'Brien, S. J., Jansen, D., & Oli, M. K. (2011). Intentional genetic introgression influences survival of adults and subadults in a small, inbred felid population. *Journal of Animal Ecology*, *80*(5), 958–967. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2011.01809.x>
- Bijlsma, R., & Loeschcke, V. (2012). Genetic erosion impedes adaptive responses to stressful environments. *Evolutionary Applications*, *5*(2), 117–129. <https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2011.00214.x>
- Boakes, E. H., Wang, J., & Amos, W. (2007). An investigation of inbreeding depression and purging in captive pedigreed populations. *Heredity*, *98*(3), 172–182. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800923>
- Brüniche-Olsen, A., Kellner, K. F., Anderson, C. J., & DeWoody, J. A. (2018). Runs of homozygosity have utility in mammalian conservation and evolutionary studies. *Conservation Genetics*, *19*(6), 1295–1307. <https://doi.org/10.1007/s10592-018-1099-y>
- Cassens, I., Tiedeman, R., Suchentrunk, F., & Hartle, G. (2000). Mitochondrial DNA variation in the European otter (*Lutra lutra*) and the use of spatial autocorrelation analysis in conservation. *Journal of Heredity*, *91*(1), 31–35. <https://doi.org/10.1093/jhered/91.1.31>
- Ceballos, F. C., Joshi, P. K., Clark, D. W., Ramsay, M., & Wilson, J. F. (2018a). Runs of homozygosity: Windows into population history and trait architecture. *Nature Reviews Genetics*, *19*(4), 220–234. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.109>
- Ceballos, F. C., Joshi, P. K., Clark, D. W., Ramsay, M., & Wilson, J. F. (2018b). Runs of homozygosity: Windows into population history and trait architecture. *Nature Reviews Genetics*, *19*(4), 220–234. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.109>
- Charlesworth, B. (2009). Effective population size and patterns of molecular evolution and variation. *Nature Reviews Genetics*, *10*(3), 195–205. <https://doi.org/10.1038/nrg2526>
- Charlesworth, D., & Charlesworth, B. (1987). Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics*, *18*(1), 237–268.
- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., & Gu, J. (2018). fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, *34*(17), i884–i890. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>
- Cheng, H.-C., CHangchien, L.-W., Lin, R.-S., Yang, C.-H., & Chang, S.-W. (2017). *The Red List of Terrestrial Mammals of Taiwan, 2017* (https://www.tesri.gov.tw/Uploads/userfile/A6_2/2019-02-25_1323595093.pdf). Endemic Species Research Institute, COA, EY, R.O.C. (Taiwan). https://www.tesri.gov.tw/Uploads/userfile/A6_2/2019-02-25_1323595093.pdf
- Chu, K. (1986). Mutant allele frequencies in domestic cats of Taiwan. *Journal of Heredity*, *77*(4), 277–278. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a110237>



- Conroy, J., Melisch, R., & Chanin, P. (1998). The Distribution and Status of the Eurasian Otter (*Lutra lutra*) in Asia—A Preliminary Review. *IUCN Otter Spec. Group Spec. Group Bull.*, 15(1), 15–30.
- De, A., & Durrett, R. (2007). Stepping-Stone Spatial Structure Causes Slow Decay of Linkage Disequilibrium and Shifts the Site Frequency Spectrum. *Genetics*, 176(2), 969–981. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.071464>
- Dong, F., Hung, C.-M., Li, X.-L., Gao, J.-Y., Zhang, Q., Wu, F., Lei, F.-M., Li, S.-H., & Yang, X.-J. (2017). Ice age unfrozen: Severe effect of the last interglacial, not glacial, climate change on East Asian avifauna. *BMC Evolutionary Biology*, 17(1), 244. <https://doi.org/10.1186/s12862-017-1100-2>
- Ellegren, H., & Galtier, N. (2016). Determinants of genetic diversity. *Nature Reviews Genetics*, 17(7), 422–433. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.58>
- Frankham, R. (1995a). Effective population size/adult population size ratios in wildlife: A review. *Genetics Research*, 66(2), 95–107. <https://doi.org/10.1017/S0016672300034455>
- Frankham, R. (1995b). Effective population size/adult population size ratios in wildlife: A review. *Genetics Research*, 66(2), 95–107. <https://doi.org/10.1017/S0016672300034455>
- Frankham, R., Ballou, J. D., Eldridge, M. D. B., Lacy, R. C., Ralls, K., Dudash, M. R., & Fenster, C. B. (2011). Predicting the probability of outbreeding depression. *Conservation Biology*, 25(3), 465–475. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2011.01662.x>
- Gabriel, W., & Bürger, R. (1994). Extinction risk by mutational meltdown: Synergistic effects between population regulation and genetic drift. In V. Loeschcke, S. K. Jain, & J. Tomiuk (Eds.), *Conservation Genetics* (pp. 69–84). Birkhäuser. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-8510-2_7
- Gemmell, N. J., & Akiyama, S. (1996). An efficient method for the extraction of DNA from vertebrate tissues. *Trends in Genetics: TIG*, 12(9), 338–339. [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(96\)80005-9](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(96)80005-9)
- Hagedorn, M., Page, C. A., O'Neil, K. L., Flores, D. M., Tichy, L., Conn, T., Chamberland, V. F., Lager, C., Zuchowicz, N., Lohr, K., Blackburn, H., Vardi, T., Moore, J., Moore, T., Baums, I. B., Vermeij, M. J. A., & Marhaver, K. L. (2021). Assisted gene flow using cryopreserved sperm in critically endangered coral. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(38). <https://doi.org/10.1073/pnas.2110559118>
- Hauer, S., Ansorge, H., & Zinke, O. (2002). Reproductive performance of otters *Lutra lutra* (Linnaeus, 1758) in Eastern Germany: Low reproduction in a long-term strategy. *Biological Journal of the Linnean Society*, 77(3), 329–340. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8312.2002.00097.x>
- Hedrick, P. W., & Fredrickson, R. (2010). Genetic rescue guidelines with examples from Mexican wolves and Florida panthers. *Conservation Genetics*, 11(2), 615–626. <https://doi.org/10.1007/s10592-009-9999-5>
- Hedrick, P. W., & Garcia-Dorado, A. (2016). Understanding Inbreeding Depression, Purging, and Genetic Rescue. *Trends in Ecology & Evolution*, 31(12), 940–952. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2016.09.005>
- Hoff, K. J., & Stanke, M. (2019). Predicting Genes in Single Genomes with AUGUSTUS. *Current Protocols in Bioinformatics*, 65(1), e57. <https://doi.org/10.1002/cpbi.57>
- Howrigan, D. P., Simonson, M. A., & Keller, M. C. (2011). Detecting autozygosity through runs of homozygosity: A comparison of three autozygosity detection algorithms. *BMC Genomics*, 12(1), 460. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-460>
- Hung, N., & Law, C. J. (2016). *Lutra lutra* (Carnivora: Mustelidae). *Mammalian Species*, 48(940), 109–122. <https://doi.org/10.1093/mspecies/sew011>



- Ingvarsson, P. K. (2001). Restoration of genetic variation lost – the genetic rescue hypothesis. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(2), 62–63. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(00\)02065-6](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(00)02065-6)
- Jensen, A., Lillie, M., Bergström, K., Larsson, P., & Höglund, J. (2021). Whole genome sequencing reveals high differentiation, low levels of genetic diversity and short runs of homozygosity among Swedish wels catfish. *Heredity*, 127(1), 79–91. <https://doi.org/10.1038/s41437-021-00438-5>
- Jo, Y.-S., Lee, O.-S., Park, T.-J., Kim, H.-N., & Baccus, J. T. (2020). Current distribution and status of the Eurasian otter *Lutra lutra* in South Korea. *Oryx*, 54(5), 743–746. <https://doi.org/10.1017/S0030605318001114>
- Jo, Y.-S., Won, C.-M., Fritts, S. R., Wallace, M. C., & Baccus, J. T. (2017). Distribution and habitat models of the Eurasian otter, *Lutra lutra*, in South Korea. *Journal of Mammalogy*, 98(4), 1105–1117. <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyx037>
- Kardos, M., Åkesson, M., Fountain, T., Flagstad, Ø., Liberg, O., Olason, P., Sand, H., Wabakken, P., Wikenros, C., & Ellegren, H. (2018). Genomic consequences of intensive inbreeding in an isolated wolf population. *Nature Ecology & Evolution*, 2(1), 124–131. <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0375-4>
- Keller, L. F., & Waller, D. M. (2002). Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology & Evolution*, 17(5), 230–241. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(02\)02489-8](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)02489-8)
- Kimura, M. (1962). On the probability of fixation of mutant genes in a population. *Genetics*, 47, 713–719.
- Kirin, M., McQuillan, R., Franklin, C. S., Campbell, H., McKeigue, P. M., & Wilson, J. F. (2010). Genomic Runs of Homozygosity Record Population History and Consanguinity. *PLOS ONE*, 5(11), e13996. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013996>
- Kirkpatrick, M., & Jarne, P. (2000). The Effects of a Bottleneck on Inbreeding Depression and the Genetic Load. *The American Naturalist*, 155(2), 154–167. <https://doi.org/10.1086/303312>
- Koch, E. M., Schweizer, R. M., Schweizer, T. M., Stahler, D. R., Smith, D. W., Wayne, R. K., & Novembre, J. (2019). De Novo Mutation Rate Estimation in Wolves of Known Pedigree. *Molecular Biology and Evolution*, 36(11), 2536–2547. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz159>
- Kraus, R. H. S., vonHoldt, B., Cocchiariro, B., Harms, V., Bayerl, H., Kühn, R., Förster, D. W., Fickel, J., Roos, C., & Nowak, C. (2015). A single-nucleotide polymorphism-based approach for rapid and cost-effective genetic wolf monitoring in Europe based on noninvasively collected samples. *Molecular Ecology Resources*, 15(2), 295–305. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12307>
- Lai, Y.-T., Yeung, C. K. L., Omland, K. E., Pang, E.-L., Hao, Y., Liao, B.-Y., Cao, H.-F., Zhang, B.-W., Yeh, C.-F., Hung, C.-M., Hung, H.-Y., Yang, M.-Y., Liang, W., Hsu, Y.-C., Yao, C.-T., Dong, L., Lin, K., & Li, S.-H. (2019). Standing genetic variation as the predominant source for adaptation of a songbird. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(6), 2152–2157. <https://doi.org/10.1073/pnas.1813597116>
- Lande, R., & Shannon, S. (1996). The role of genetic variation in adaptation and population persistence in a changing environment. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 50(1), 434–437. <https://doi.org/10.2307/2410812>
- Lefort, V., Desper, R., & Gascuel, O. (2015). FastME 2.0: A Comprehensive, Accurate, and Fast Distance-Based Phylogeny Inference Program. *Molecular Biology and Evolution*, 32(10), 2798–2800. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv150>
- Li, F., & Chan, B. P. L. (2018). Past and present: The status and distribution of otters (Carnivora: Lutrinae) in China. *Oryx*, 52(4), 619–626. <https://doi.org/10.1017/S0030605317000400>



- Li, H., & Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25(14), 1754–1760. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>
- Li, H., & Durbin, R. (2011). Inference of human population history from individual whole-genome sequences. *Nature*, 475(7357), 493–496. <https://doi.org/10.1038/nature10231>
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., & 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 25(16), 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Li, S.-H., Liu, Y., Yeh, C.-F., Fu, Y., Yeung, C. K. L., Lee, C.-C., Chiu, C.-C., Kuo, T. H., Chan, F.-T., Chen, Y.-C., Ko, W.-Y., & Yao, C.-T. (n.d.). Not out of the woods yet: Signatures of the prolonged negative genetic consequences of a population bottleneck in a rapidly re-expanding wader, the black-faced spoonbill *Platalea minor*. *Molecular Ecology*, n/a(n/a). <https://doi.org/10.1111/mec.16260>
- Li, S.-H., Yeung, C. K.-L., Feinstein, J., Han, L., Le, M. H., Wang, C.-X., & Ding, P. (2009). Sailing through the Late Pleistocene: Unusual historical demography of an East Asian endemic, the Chinese Hwamei (*Leucodioptron canorum canorum*), during the last glacial period. *Molecular Ecology*, 18(4), 622–633. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.04028.x>
- Liu, L., Bosse, M., Megens, H.-J., de Visser, M., A. M. Groenen, M., & Madsen, O. (2021). Genetic consequences of long-term small effective population size in the critically endangered pygmy hog. *Evolutionary Applications*, 14(3), 710–720. <https://doi.org/10.1111/eva.13150>
- Liu, Y., Liu, B., Pan, X., Shi, Q., Xiao, Z., Li, S., & Li, S. (2018). *Pleistocene mammal population fluctuation patterns inferred by their genomes* (p. 505131). <https://doi.org/10.1101/505131>
- Lynch, M. (1991). The Genetic Interpretation of Inbreeding Depression and Outbreeding Depression. *Evolution*, 45(3), 622–629. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1991.tb04333.x>
- MacDonald, S. M., Mason, C. F., & Europe, C. of. (1994). *Status and Conservation Needs of the Otter (Lutra Lutra) in the Western Palaearctic*. Council of Europe.
- Mays, H. L., Hung, C.-M., Shaner, P.-J., Denvir, J., Justice, M., Yang, S.-F., Roth, T. L., Oehler, D. A., Fan, J., Rekulapally, S., & Primerano, D. A. (2018). Genomic Analysis of Demographic History and Ecological Niche Modeling in the Endangered Sumatran Rhinoceros *Dicerorhinus sumatrensis*. *Current Biology*, 28(1), 70-76.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.11.021>
- McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytzky, A., Garimella, K., Altshuler, D., Gabriel, S., Daly, M., & DePristo, M. A. (2010). The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research*, 20(9), 1297–1303. <https://doi.org/10.1101/gr.107524.110>
- McQuillan, R., Eklund, N., Pirastu, N., Kuningas, M., McEvoy, B. P., Esko, T., Corre, T., Davies, G., Kaakinen, M., Lyytikäinen, L.-P., Kristiansson, K., Havulinna, A. S., Gögele, M., Vitart, V., Tenesa, A., Aulchenko, Y., Hayward, C., Johansson, Å., Boban, M., ... Consortium, on behalf of the Roh. (2012). Evidence of Inbreeding Depression on Human Height. *PLOS Genetics*, 8(7), e1002655. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002655>
- McQuillan, R., Leutenegger, A.-L., Abdel-Rahman, R., Franklin, C. S., Pericic, M., Barac-Lauc, L., Smolej-Narancic, N., Janicijevic, B., Polasek, O., Tenesa, A., MacLeod, A. K., Farrington, S. M., Rudan, P., Hayward, C., Vitart, V., Rudan, I., Wild, S. H., Dunlop, M. G., Wright, A. F., ... Wilson, J. F. (2008a). Runs of Homozygosity in European Populations. *The American Journal of Human Genetics*, 83(3), 359–372. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.08.007>



McQuillan, R., Leutenegger, A.-L., Abdel-Rahman, R., Franklin, C. S., Pericic, M., Barac-Lauc, L., Smolej-Narancic, N., Janicijevic, B., Polasek, O., Tenesa, A., MacLeod, A. K., Farrington, S. M., Rudan, P., Hayward, C., Vitart, V., Rudan, I., Wild, S. H., Dunlop, M. G., Wright, A. F., ... Wilson, J. F. (2008b). Runs of homozygosity in European populations. *The American Journal of Human Genetics*, 83(3), 359–372.

<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.08.007>

Mead, D., Hailer, F., Chadwick, E., Portela Miguez, R., Smith, M., Corton, C., Oliver, K., Skelton, J., Betteridge, E., Doulcan, J. D., Dudchenko, O., Omer, A., Weisz, D., Lieberman Aiden, E., McCarthy, S., Howe, K., Sims, Y., Torrance, J., Tracey, A., ... Blaxter, M. (2020). The genome sequence of the Eurasian river otter, *Lutra lutra* Linnaeus 1758.

Wellcome Open Research, 5. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.15722.1>

Meurs, K. M., Mauceli, E., Lahmers, S., Acland, G. M., White, S. N., & Lindblad-Toh, K. (2010). Genome-wide association identifies a deletion in the 3' untranslated region of Striatin in a canine model of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Human Genetics*, 128(3), 315–324. <https://doi.org/10.1007/s00439-010-0855-y>

Mucci, N., Arrendal, J., Ansorge, H., Bailey, M., Bodner, M., Delibes, M., Ferrando, A., Fournier, P., Fournier, C., Godoy, J. A., Hajkova, P., Hauer, S., Heggberget, T. M., Heidecke, D., Kirjavainen, H., Krueger, H.-H., Kvaloy, K., Lafontaine, L., Lanszki, J., ... Randi, E. (2010). Genetic diversity and landscape genetic structure of otter (*Lutra lutra*) populations in Europe. *Conservation Genetics*, 11(2), 583–599.

<https://doi.org/10.1007/s10592-010-0054-3>

Nadachowska-Brzyska, K., Li, C., Smeds, L., Zhang, G., & Ellegren, H. (2015). Temporal dynamics of avian populations during pleistocene revealed by whole-genome sequences. *Current Biology*, 25(10), 1375–1380. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.03.047>

Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press.

Nei, M., & Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(10), 5269–5273. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.10.5269>

Palstra, F. P., & Ruzzante, D. E. (2008a). Genetic estimates of contemporary effective population size: What can they tell us about the importance of genetic stochasticity for wild population persistence? *Molecular Ecology*, 17(15), 3428–3447.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03842.x>

Palstra, F. P., & Ruzzante, D. E. (2008b). Genetic estimates of contemporary effective population size: What can they tell us about the importance of genetic stochasticity for wild population persistence? *Molecular Ecology*, 17(15), 3428–3447.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03842.x>

Pârâu, L. G., & Wink, M. (2021). Common patterns in the molecular phylogeography of western palearctic birds: A comprehensive review. *Journal of Ornithology*, 162(4), 937–959. <https://doi.org/10.1007/s10336-021-01893-x>

PÉREZ-HARO, M., VIÑAS, J., MAÑAS, F., BATET, A., RUIZ-OLMO, J., & PLA, C. (2005). Genetic variability in the complete mitochondrial control region of the Eurasian otter (*Lutra lutra*) in the Iberian Peninsula. *Biological Journal of the Linnean Society*, 86(4), 397–403. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2005.00536.x>

Pertoldi, C., Hansen, M. M., Loeschcke, V., Madsen, A. B., Jacobsen, L., & Baagøe, H. (2001). Genetic consequences of population decline in the European otter (*Lutra lutra*): An assessment of microsatellite DNA variation in Danish otters from 1883 to 1993.

Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 268(1478), 1775–1781.

<https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1762>

Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A. R., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P. I. W., Daly, M. J., & Sham, P. C. (2007). PLINK: A Tool Set for



- Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses. *The American Journal of Human Genetics*, 81(3), 559–575. <https://doi.org/10.1086/519795>
- Quaglietta, L., Fonseca, V. C., Hájková, P., Mira, A., & Boitani, L. (2013). Fine-scale population genetic structure and short-range sex-biased dispersal in a solitary carnivore, *Lutra lutra*. *Journal of Mammalogy*, 94(3), 561–571. <https://doi.org/10.1644/12-MAMM-A-171.1>
- Rogers, R. L., & Slatkin, M. (2017). Excess of genomic defects in a woolly mammoth on Wrangel island. *PLOS Genetics*, 13(3), e1006601. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006601>
- Roos, A., Loy, A., de Silva, P., Hajkova, P., & Zemanová, B. (2015). *Lutra lutra*. *The IUCN Red List of Threatened Species*, e.T12419A21935287. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-2.RLTS.T12419A21935287.en>
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Soares, P., Abrantes, D., Rito, T., Thomson, N., Radivojac, P., Li, B., Macaulay, V., Samuels, D. C., & Pereira, L. (2013). Evaluating Purifying Selection in the Mitochondrial DNA of Various Mammalian Species. *PLOS ONE*, 8(3), e58993. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058993>
- Terhorst, J., Kamm, J. A., & Song, Y. S. (2017). Robust and scalable inference of population history from hundreds of unphased whole-genomes. *Nature Genetics*, 49(2), 303–309. <https://doi.org/10.1038/ng.3748>
- von Thaden, A., Cocchiararo, B., Jarausch, A., Jüngling, H., Karamanlidis, A. A., Tiesmeyer, A., Nowak, C., & Muñoz-Fuentes, V. (2017). Assessing SNP genotyping of noninvasively collected wildlife samples using microfluidic arrays. *Scientific Reports*, 7(1), 10768. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10647-w>
- Waku, D., Segawa, T., Yonezawa, T., Akiyoshi, A., Ishige, T., Ueda, M., Ogawa, H., Sasaki, H., Ando, M., Kohno, N., & Sasaki, T. (2016). Evaluating the Phylogenetic Status of the Extinct Japanese Otter on the Basis of Mitochondrial Genome Analysis. *PLOS ONE*, 11(3), e0149341. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149341>
- Wang, K., Li, M., & Hakonarson, H. (2010). ANNOVAR: Functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Research*, 38(16), e164–e164. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq603>
- Wang, Z., McSwiggin, H., Newkirk, S. J., Wang, Y., Oliver, D., Tang, C., Lee, S., Wang, S., Yuan, S., Zheng, H., Ye, P., An, W., & Yan, W. (2019). Insertion of a chimeric retrotransposon sequence in mouse *Axin1* locus causes metastable kinky tail phenotype. *Mobile DNA*, 10(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s13100-019-0162-7>
- Whiteley, A. R., Fitzpatrick, S. W., Funk, W. C., & Tallmon, D. A. (2015a). Genetic rescue to the rescue. *Trends in Ecology & Evolution*, 30(1), 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.10.009>
- Whiteley, A. R., Fitzpatrick, S. W., Funk, W. C., & Tallmon, D. A. (2015b). Genetic rescue to the rescue. *Trends in Ecology & Evolution*, 30(1), 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.10.009>
- Wright, S. (1943). Isolation by distance. *Genetics*, 28(2), 114–138.
- Yu, G., Gui, F., Shi, Y., & Zheng, Y. (2007). Late marine isotope stage 3 palaeoclimate for East Asia: A data–model comparison. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 250(1), 167–183. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2007.03.010>
- 張廖年鴻. (2020). 金門歐亞水獺親緣譜系及族群動態研究(1/3). 金門國家公園管理處. <http://www.kmnp.gov.tw/resource/1622509163.pdf>

翁嘉駿, 林良恭, 袁守立, 張廖年鴻, 余珍芳, 吳倩菊, 張仕緯, 陳宗駿, & 洪佩琦.
(2020). 金門歐亞水獺保育行動. 台灣林業, 46, 9-14.



十、審查意見答覆

期中審查部份

林良恭委員

1. 金門過去族群依照資料，有與中國沿海族群交流，內容所設假說為金門「長期」孤立族群是否恰當性，是否能針對這點多做說明？

答覆：已說明。

2. 在基因比對上，歐洲樣本與金門相比樣本數量較少，是否因此在於基因組上有需更考量的地方。

答覆：基因組判讀不受樣本數影響。

3. PCA 分析在於解釋再加強說明

答覆：已說明。

4. 近親交配係數在於長期來看雖然不低，在近期來看結果是否會呈現類同結果。

答覆：需野外工作團隊提供當下樣本以供分析。

林思民委員

1. Lu7333 和 Lu1067 在遺傳上極為接近，兩隻是否有親屬關係 經過檢查表一，兩隻動物發生路殺的時間是同一天。由於兩隻水獺同日發生路殺的機率太低，顯示這兩份樣本可能採自同一隻動物，如是，其中一隻應予刪除。

答覆：已隨機刪除一隻。

2. 書面的圖五，以及簡報的 31 頁，資料來自 Bruniche-Olsen 等人 2018 年發表在 Conservation Genetics 的論文。不過由於該篇論文並未繪製這兩張圖，能否請計畫團隊更仔細說明這兩張圖的製作方式和資料來源？

答覆：已於期末報告製表說明。

3. 摘要與內容之中均提及金門水獺粒線體單倍型的數量比歐洲多。但是因為兩者的樣本數量差距太大（歐洲樣本只有三隻），而即使與過去研究相較，本研究採用粒線體基因組，序列較長，變異自然會較大。因此，粒線體基因組的遺傳多樣性高低並沒有強烈的支持。

答覆：的確沒有明顯差異。

4. 表一附帶許多未予使用的樣本，或許資料可刪除。此外歐洲樣本的背景資料未予納



入，是否可補上？

答覆：仍保留資料，但移至附錄。

5. 就研究團隊中期或長期的計劃而言，是否有進就研究團隊中期或長期的計劃而言，是否有進一步取得歐洲樣本的可能性？

答覆：這需要與歐洲團隊研究與長期的經費支援。

張廖年鴻委員

1. 有關金門水獺「長期」孤立族群，主要是因為1922年後除了金門有明確族群，因此推論與其他族群交流低，故認為金門水獺族群較封閉。

答覆：謝謝委員解釋。

2. 在形容金門水獺族群多及基因多樣性高等用詞宜謹慎使用，以及有效族群變化時間軸過長(上次冰期)，是否應著重解釋1950年代後族群快速下降後之情況。

答覆：PSMC 及 SMC++分析的目的是想了解長期族群的動態，因此受限於方法本身的限制，並不適合用來精準解釋及近期的族群變化。

3. 在形容金門水獺族群多及基因多樣性高等用詞宜謹慎使用，以及有效族群變化時間軸過長(上次冰期)，是否應著重解釋1950年代後族群快速下降後之情況。

答覆：已納入金莎子代，但金莎並未在目前分析的樣本內。

石芝菁委員

1. 資料呈現狀況:有圖表混雜在內容的問題，在於結果呈現及目錄架構附表呈現可更清晰。

答覆：為提供閱讀者方便，還是將圖表插入在正文相關內容附近。

2. 備註可多做說明，如樣本來源來自何單位以及那些個體可作比對分析。

答覆：在附錄表中對相關資訊有加以說明。

3. 遺傳救援的部分多做說明，相關文獻等背景資料可寫在報告供參考，又有哪些執行案例，基因窄化要低到多少才要進行行動？

答覆：已提供遺傳救援準則及相關訊息。



翁嘉駿科長

1. 假設金門族群為長期封閉狀況有些不妥當，需多討論與大陸族群交流狀況？

答覆：已在討論中加以說明。

2. 樣本部分若有不足或不好的，可洽本局再評估選用其他樣本。

答覆：受限於經費，如有必要，將會進一步取得樣本進行分析。

金門縣政府（曾建仁 代傳達）

1. 金門與歐洲在於地理分布本為遠距，具有明顯地裡分隔，如能取得韓國及中國大陸的歐亞水獺遺傳樣本，可增加金門區域水獺的遺傳多樣性時間空間解析度(尤其在於中國沿岸個體)。

答覆：目前正與大陸學術單位合作中。

2. 可就金門地區不同時間取得之水獺樣本進行探討，更能探究近期是否有基因窄化狀況。

答覆：受限於樣本品質，目前取樣樣本，並無法做不同時間段的比對。

曾建仁技士

1. 是否有基因資料庫其他水獺基因序列資料可做比較。

答覆：既有資料庫除參考基因組外無相關資料可供取用。

2. 期末成果希望能有基因救援保育措施介入的標準，如基因窄化程度、基因交流程度等，作為決策評估參考依據。

答覆：已加入遺傳救援指引。

3. 本期成果推算至上次冰河期的有效族群量，能否有較短時間區間的親緣分析工具或指標，就大陸地區經濟開發後的水獺有效族群變化或基因交流減少程度。

答覆：受限於僅有金門樣本，尚無法進行相關分析。



期末審查部份

林良恭委員

1. 有關表 4 的 SNP 位點數及歐洲、金門樣本平均值，金門均高出甚多，有無可能過多估算，造成統計上誤差。

答覆：由於本研究每隻個體的定序覆蓋度都在三十倍以上，符合基因組分析的可靠標準，因此估算錯誤的可能性極低。

2. 報告中有效族群(N_e)估算，冰河期後之 N_e 為 800 隻，而目前金門推估族群約有 200 隻，因此推論金門水獺不是孤立族群，但此時間尺度極大，缺乏時間因素或近代風險的考量。

答覆：SMC++ 所反映的是隨時間變動的有效族群數量變化，可反應相當近期的有效族群量，而非一整個時間段的有效族群。

3. 在金門以外的樣本只有英國、歐洲(德國)樣本 2 隻可供比對，不同區域樣本數落差甚大，能否滿足合理估算及分析。

答覆：主成分分析是統計上一個簡化變數的分析，分析結果反映雖有樣本的變異分佈，歐洲與金門個體的變異分佈明顯區分，並不受樣本數差異的影響。

4. 近交係數估算推論目前金門水獺無遺傳窄化，此結果是否受到前述樣本參考值差異問題所影響，尤其水獺影像監測計畫，完成 3 年工作，麒麟尾的水獺個體記錄次數及分布增加許多。

答覆：前提是麒麟尾是遺傳疾病，目前仍須獸醫學證據支持金門水獺的麒麟尾是遺傳缺陷。此外，我們分析樣本並無盡一兩年足夠的樣本，反應金門族群的即時遺傳現況，這也有賴野外工作團隊提供現今族群樣本以供後續分析。

5. 在遺傳救援工作評估部分，報告引用重要參考文獻，建議以表列準則方式取代目前文字敘述方式，在未來評估或應用時，可清楚對應注意事項或尚未做到的部分。

答覆：已增列相關表格。

6. 報告內容應檢附期中審查委員的意見及回復，有助知道執行單位之回應為何。

答覆：以附於期末報告。

7. 圖 3 親緣關係樹遺傳距離分散，是否與遺傳多樣性擴張有關？

答覆：僅反映較高的遺傳多樣性。



林思民委員

1. 圖 5 是一個跨物種的近交指數比較。如同期中報告時曾經提供的建議：這張圖引用了很多 Bruniche-Olsen et al. (2018) 的數據；但是因為這張圖是重新進行繪製，正好這部分又是讀者會關注的焦點，所以這張圖的資料呈現、繪製方式、以及其他肉食動物代表哪些類群？這些細節建議在報告裡說得更清楚。

答覆：已附上物種名單。

2. 如同前面的委員所提到，表 4 的 SNP 數量差異，代表什麼樣的意義？是否會影響到分析的可信度？如果 SNP 的數量並不會造成分析偏差，那是否在報告書中再寫清楚一點，以降低讀者的疑慮？

答覆：SNP 數是與參考基因組對比而計算出來的數字，由於參考基因組來自英國個體，因此金門的個體一定會有 SNP 數偏高的現象，已在內文加以說明。

3. 金門地區的水獺監測族群大約 200 隻，而遺傳上的有效族群大約 800 隻。這個遺傳有效族群量的推估很有意思。其實照之前的研究，水獺的移動可以達 68 公里，而金門和中國大陸沿岸的距離只有 3 公里。如果連人類和蟒蛇都可以輕易橫渡三公里的距離，對水性更好的水獺而言，可能根本就是半小時之內就能游到的距離。我認為金門和福建沿海的水獺原本就是一個關聯族群 (meta-population)，而這個 800 隻的有效族群量，其實代表的是福建沿海整個族群的一個抽樣估計。不過我同時也好奇的是，這個估算方式有沒有誤差範圍，可供估計或解釋？有哪些因素會影響到有效族群的估算量？

答覆：這個 SMC++ 的有效族群估算一定存在誤差，但可惜程式並未提供估算的方法。若參考 PSMC 的結果，其誤差應該有限。

張廖年鴻委員

1. 報告內容詳盡、資料量大，完成計畫預設目標，謝謝工作團隊的努力與貢獻。

答覆：感謝委員肯定。

2. 族群估算的時間點為上次冰期結束，時間尺度是否適用於現今族群討論？如面對民眾說明是否需作文詞上的調整。

答覆：SMC++ 所反映的是有效族群隨時間的連續變化，而非一個時間段的平均，已在內文加以說明。

3. 水獺離開金門應是一直發生的狀況，但在金門週邊多年未發現族群，是否持續有不同血緣個體補充進入金門，目前調查似乎沒有發現。

答覆：有賴未來更多野外調查及族群監測工作加以解答。

4. 報告中提及歐洲三件 mtDNA 序列中英國與德國個體為同一單倍型 (P. 27)，顯示



mtDNA 的分化程度在歐洲地區相對保守，但在金門內 13 個樣本序列即有 9 個單倍型，以地理尺度比例而言高出甚多，建議團隊在將這資料發表前用 Sanger 定序，重複檢測有變異的 mtDNA 片段。

答覆：歐洲研究僅比對線粒體基因組片段，而我們則比對完整線粒體基因組，因此我們的分析應有較高的解析力；至於 Sanger 定序，則需另覓經費進行；現階段我們以覆蓋度 50 倍作為標準，判斷定序的可靠度，經這個步驟校正後，發現金門水獺的線粒體單倍型僅餘兩個，兩者僅一個鹼基的差異。

5. 建請林務局充分利用本計畫產出之重要資料，後需支持如水獺個體辨識晶片的開發，甚至將此研究開發新工具的流程應用於其他瀕危物種，強化國內野生動物保育研究的執行能力。

答覆：本研究提供大量序列變異資料，可供發展個體辨識晶片的開發。我們的研究流程的確可應用於其他瀕危物種，端視國家社會的保育研究需要。

石芝菁委員

1. 計畫成果累積龐大資料成果，可開啟後續很多相關研究發展，也可做為金門保育工作的基礎。

答覆：感謝委員肯定。

2. P. 21 族群遺傳多樣性估算部分，因可供比較的歐洲樣本較少，而分析結果呈現金門水獺遺傳多樣性並無較低，但仍就比非瀕危等級食肉目物種低，但 SNP 的分析效度是否足夠，請再補充說明。與其他瀕危及非瀕危食肉目物種之比較，建議可表列呈現。

答覆：SNP 數是與參考基因組對比而計算出來的數字，由於參考基因組來自英國個體，因此金門的個體一定會有 SNP 數偏高的現象，因此在與其他物種對比時是以個體雜合度為遺傳多樣性參數，應不受參考基因組序列的影響。

3. 同樣 P. 21，以遺傳距離導出水獺分化時間極短結論，亦請補充說明。

答覆：已加以補充說明。

4. P. 24 地理結構與遺傳分析，得出歐洲與金門兩個地理族群屬近期分化結果，並顯示與周邊地區有基因交流存在，可提供金門保育後續發展或區域合作。

答覆：感謝委員肯定。

5. 歷史族群量分析，以歐洲 2 隻水獺個體為基礎，是否就是德國與波蘭這兩個樣本，是否可解讀整個歐亞水獺族群的歷史變動。由於每隻個體的基因組是由許許多多連鎖片段合組而成，每個連鎖片段都在族群中有獨立的傳遞歷史，因此整個基因組時可反



應整個族群的歷史，因此即使只有兩個個體仍有一定的代表性。

6. P. 58 所列所有樣本表，因進行不同分析所選擇的樣本有所不同，但其備註不夠清楚，建議應詳列使用各樣本所進行之分析，或被剔除未使用之樣本，說明其未使用之原因。

答覆：以增加附表於附錄中說明。

金門縣政府

1. 感謝局裡能協助釐清水獺遺傳多樣性疑義。

答覆：感謝林務局支持這項研究。

2. 金門持續發現異常之麒麟尾，後續將持續關注，未來俟有更多遺傳資料庫數據後再行釐清。

答覆：這有賴獸醫團隊的努力，提供麒麟尾為遺傳缺陷的證據。

袁守立委員

1. 由金門水獺影像記錄及路殺個體資料，可觀察到麒麟尾及心臟病的情況增加，可能有疾病在金門水獺族群中累積，希望未來能有更精細的研究分析。

答覆：這有賴獸醫團隊的努力，以了解麒麟尾及心臟病是否為遺傳缺陷。

十一、附件

附表一、歐亞水獺樣本個體編號、來源地。來自台灣特有生物研究保育中心樣本以阿拉伯字母編碼，來自台北市立動物園樣本以 Z 開頭編碼。

no	組織標本	標本編號	地點	日期	備註_1	備註_2	備註_3	備註_4
1	S3044		金門國家公園			特有生物研究保育中心(特生)		lu_3044
2	S3045	A0333	中正公園	20100430	睪丸(A0333)	特生		lu_3045
3	S3223		金門國家公園	20100701		特生		
4	S3348	T1422			收到日期 20110322	特生		
5	S3349	T1423			收到日期 20110322	特生		
6	S3350	T1424			收到日期 20110322	特生		
7	S3786			2012	車傷	特生		
8	S5299	T1990		201409	僅有組織, 幼缺犬齒, 頭骨碎裂沾海砂	特生		
9	S5300	A0476/T1989	惠民富康農莊 17 號 金門畜產	20141017		特生		lu_5300
10	S5676	T2094	環島東路一段	20140427	路殺社 KMCG20140427	特生		
11	S5677	T2092	金胡鎮與金寧鄉交界處	20140930	路殺社 KMCG20140930	特生		
12	S6559	1429/C2094/T21?	環島公路	20150118	路殺社 KMCG20150118, 不新鮮, 蠅卵多	特生		
13	S6648			20161220	只有肝, 編號 D105037	特生		



14	S6649		陽明湖	20161013	只有肝, 編號 D105028	特生	疑似同 20160457M10	
15	S6650			20161011	只有肝, 編號 D105027	特生	疑似同 20160456M10	
16	S7333	1313/B1540/T394?	高陽路	20190821	RK	特生		lu_7333
17	S7334	T3949	金沙水庫	20190511	中蜈蚣籠溺水死亡	特生		
18	S7547		浦邊附近農場	20200321	家衛所 W109-0955, 胸腔積液	特生		
19	S7548		古崗湖	20200415	家衛所 W109-1250, 浮腫, 皮毛脫落	特生		
20	S7639					特生		lu_7639
z1	20060445M10	無	金門救傷	20060816	無	農授林務字第 0961701136 號		lu_445
z2	20080110M10	D1EC186D		20080308	水晶	農授林務字第 0970110626 號		lu_110
z3	20140166M50	0001CB6A52		20140729	小新	農授林務字第 1031700533 號		
z4	20191374B10	900073000231965	停車場撿到	20191126	蛋捲	農授林務字第 1061700466 號		
z5	20200212M30	00075BC45L		20200719	大金(20140402 金 門)	農授林務字第 1090223756 號		lu_212
z6	20130457M40	000634370B			flora	農授林務字第 1021610837 號		lu_13457
z7	20191403B30	0075D7FC0		20191211	金莎	農授林務字第 1061700466 號		
z8	20180011M10	KC21(金門野動救援協 會之病例編 號:1061220)	1061229 貢糖	20181101	金門縣金湖鎮柏村 國小	農授林務字第 1061700466 號		lu_11

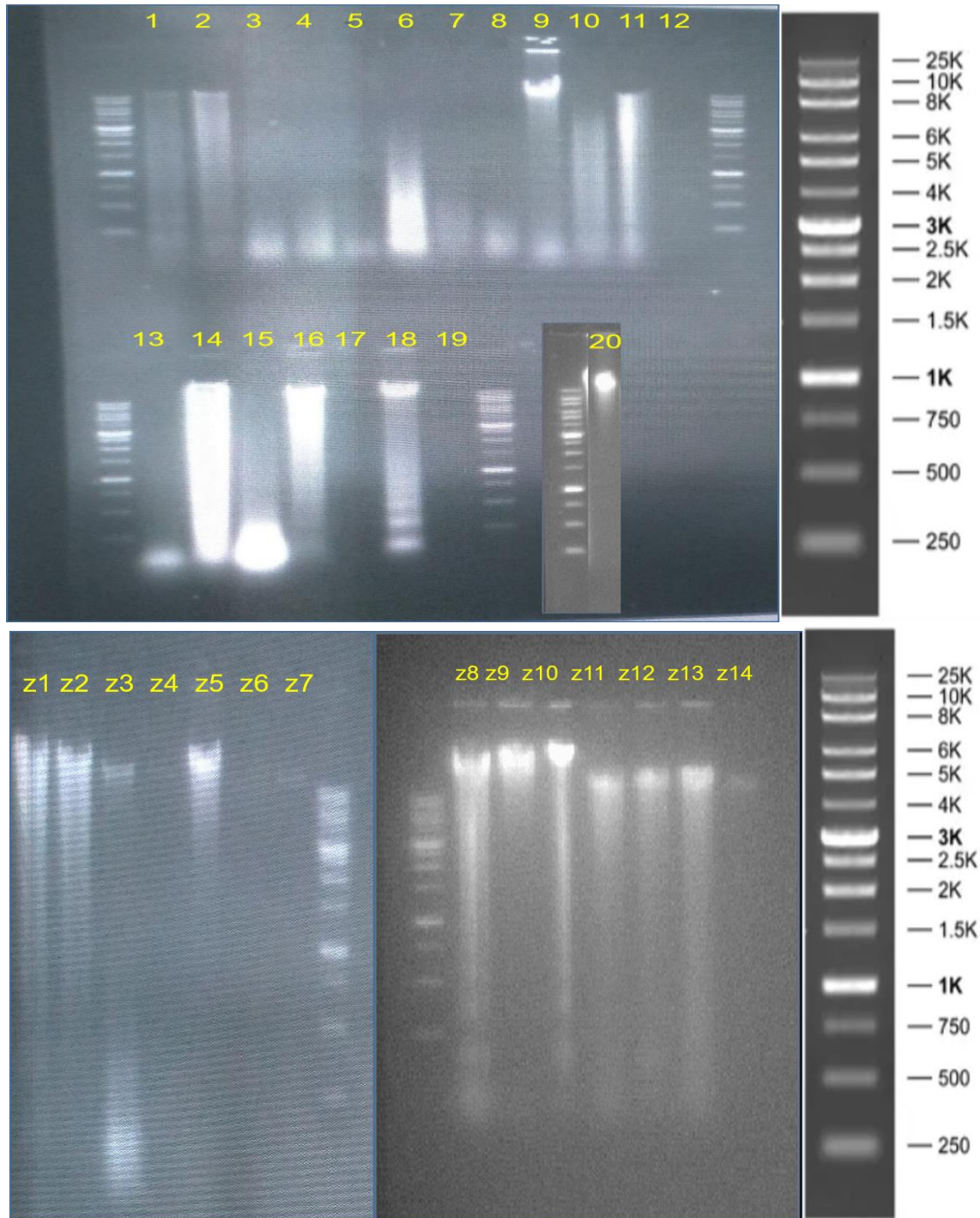
z9	20180086M10		1070228 榮湖(金沙飯店機房)	20180302	老年個體	農授林務字第1061700466 號		lu_86
z10	20180408M10	KC024	西堡(西堡地標附近)	20180930	西堡(西堡地標附近)	農授林務字第1061700466 號		lu_408
z11	20160455M10	KC-12, KWRC 編號 D105014		20160409	成體路殺, 塘頭村莊內, 金蓮寺旁地上	農授林務字第1041700584 號		lu_455
z12	20160456M10	KC-13, KWRC 編號 D105027		20161013	成體路殺; 王獸醫空運睪丸來園, 有留存精液, 沙清路(述美國小路段); No.108 個體(2015 年金門水獺分布變遷與族群生態研究內紀錄)	農授林務字第1041700584 號	疑似同 S6650	lu_456
z13	20160457M10	KC-14, KWRC 編號 D105028		20161011	亞成體路殺, 山外黃海路陽明湖測速照相旁	農授林務字第1041700584 號	疑似同 S6649	lu_16457
z14	20191067M10	KC-277		20190821	路殺	農授林務字第1061700466 號		lu_1067
z15					動物園繁殖			lu_cy

附表二、各項分析所使用樣本數

	歐洲	金門
核基因組多樣性	2	13
粒線體基因多樣性	3	13
主成份分析	2	13
核基因組親緣分析	2	13
粒線體親緣分析	3	13
全基因組近交係數	2	13
PSMC	2	13
SMC++	2	13

附表三、肉食類動物 F_{ROH} 值 (Brüniche-Olsen et al., 2018)。保育類等級(IUCN red list): LC (least concern; 暫無危機), VU (vulnerable; 受脅), EN (endangered; 瀕危), CR (critically endangered; 極度瀕危), DD (data deficient; 資料缺乏)。食性 (Diet category) : C: 肉食性, C*: 頂級掠食者(apex-predator)

Species	Order	Red List status	Diet category	F_{ROH}
<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	Cetartiodactyla	LC	C	1.17×10^{-2}
<i>Chrysochloris asiatica</i>	Afrosoricida	LC	C	1.00×10^{-6}
<i>Echinops telfairi</i>	Afrosoricida	LC	C	2.00×10^{-6}
<i>Eptesicus fuscus</i>	Chiroptera	LC	C	2.00×10^{-6}
<i>Leptonychotes weddellii</i>	Carnivora	LC	C	1.00×10^{-5}
<i>Manis javanica</i>	Pholidota	CR	C	5.00×10^{-6}
<i>Megaderma lyra</i>	Chiroptera	LC	C	0
<i>Myotis brandtii</i>	Chiroptera	LC	C	4.00×10^{-6}
<i>Myotis davidii</i>	Chiroptera	LC	C	9.78×10^{-3}
<i>Odobenus rosmarus</i>	Carnivora	VU	C	2.55×10^{-3}
<i>Orcinus orca</i>	Cetartiodactyla	DD	C	2.77×10^{-1}
<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	Monotremata	NT	C	0
<i>Pteronotus parnellii</i>	Chiroptera	LC	C	4.27×10^{-4}
<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	Chiroptera	LC	C	2.48×10^{-4}
<i>Sorex araneus</i>	Eulipotyphla	LC	C	1.20×10^{-5}
<i>Tursiops truncatus</i>	Cetartiodactyla	LC	C	1.76×10^{-1}
<i>Acinonyx jubatus</i>	Carnivora	VU	C*	1.40×10^{-2}
<i>Felis catus</i>	Carnivora	LC	C*	2.57×10^{-1}
<i>Mustela putorius</i>	Carnivora	LC	C*	9.46×10^{-2}
<i>Panthera pardus</i>	Carnivora	VU	C*	1.60×10^{-5}
<i>Physeter catodon</i>	Cetartiodactyla	VU	C*	7.30×10^{-5}
<i>Sarcophilus harrisii</i>	Dasyuromorphia	EN	C*	4.98×10^{-2}
<i>Ursus maritimus</i>	Carnivora	VU	C*	1.55×10^{-1}



附圖 1、歐亞水獺樣本 DNA 的 0.7%瓊膠電泳圖（100 volt 於 TBE 緩衝液）。樣本編號同表一。使用 XLarge DNA Ladder RTU 標記。XLarge DNA Ladder RTU 分子量階梯(單位：鹼基對，base pair, bp)標記細節見圖右。