

熊鷹與林鴟的保育基因體研究

執行單位：國立臺灣師範大學

計畫編號：113 林發-09.3-保-39

研究主持人：李壽先

研究人員：黃莉文

研究期程：中華民國 113 年 4 月至 113 年 12 月



中華民國 114 年 01 月 23 日

目錄

一、中文摘要	第 3 頁
二、英文摘要	第 4 頁
三、前言	第 6 頁
四、工作目標	第 9 頁
五、材料與方法	第 10 頁
六、結果	第 16 頁
七、討論	第 20 頁
八、結論	第 22 頁
九、檢討與建議	第 22 頁
十、圖表目錄	第 23 頁
十一、參考文獻	第 37 頁

一、中文摘要

熊鷹(*Nisaetus nipalensis*) 為大型森林性猛禽，分布於巴基斯坦東北部、喜馬拉雅山脈、中國雲貴高原至東南丘陵與海南島一帶、台灣、中南半島北部山區至緬甸南部及馬來西亞北部，及中國東北等地區，在紅皮書報告中顯示為近危物種(Near Threatened)。熊鷹分布範圍廣泛，在臺灣熊鷹族群數量低，目前在分類上與廣泛分佈於中國雲貴高原至東南丘陵與海南島一帶、中南半島北部山區至緬甸南部及馬來西亞北部等地區的熊鷹因外部型態相似，而歸類為同一亞種，但由於熊鷹為不具長距離遷徙能力的留鳥，可能無法與其他地區熊鷹進行有效基因交流，因此台灣熊鷹可能是一個獨立族群且具有相當的特有性。本研究以次世代基因組定序方式，對 19 隻取自臺灣及 1 隻來至大陸雲南的熊鷹樣本進行全基因組重定序，檢測台灣熊鷹族群遺傳多樣性及歷史遺傳有效族群動態並初步與大陸熊鷹進行比對，結果發現臺灣地區熊鷹遺傳多樣性指標雜合度在 0.0008 至 0.0016 之間，平均核苷酸多樣性 (π) 為 0.0009。主成分分析 (PCA) 表明，臺灣熊鷹與大陸及外群個體有顯著的遺傳區別，親緣樹分析顯示，臺灣個體與大陸及外群個體間存在遺傳分化，這些結果初步顯示台灣熊鷹族群的特有性；而歷史族群數量變動分析顯示，熊鷹的有效族群數量 (N_e) 在過去 100 萬年間經歷多次波動，在近萬年內，有效族群數量保持在 0.8 萬至 0.18 萬之間，這可能反映台灣族群與東亞大陸族群分化前的有效族群量。

二、英文摘要

The mountain hawk-eagle (*Nisaetus nipalensis*) is a large forest-dwelling raptor distributed across northeastern Pakistan, the Himalayas, China's Yunnan-Guizhou Plateau to southeastern hills and Hainan Island, Taiwan, the northern mountainous regions of Indochina, southern Myanmar, north of Malaysia, and northeastern China. It is listed as a Near Threatened species in the IUCN Red List. Despite its wide distribution, the population size of the mountain hawk-eagle in Taiwan is relatively low. Due to similarities in morphological traits, it is classified as the same subspecies (*N. n. nipalensis*) as those distributed across the Yunnan-Guizhou Plateau to southeastern China, Hainan Island, the northern Indochina mountains, southern Myanmar, and Malaysia north. However, as the mountain hawk-eagle is a sedentary bird without long-distance migratory capabilities, it may lack gene flow with populations in other regions. Consequently, the Taiwanese mountain hawk-eagle may represent a distinct evolutionary population. This study used next-generation genome sequencing to perform whole-genome resequencing on 19 samples from Taiwan and one from Yunnan, China, to assess the genetic diversity and historical effective population dynamics of the Taiwanese mountain hawk-eagle population and conduct preliminary comparisons with the mainland population. Results showed that the genetic diversity index of heterozygosity in the Taiwanese mountain hawk-eagle ranged between 0.0008 and 0.0016, with an average nucleotide diversity (π) of 0.0011, which is lower than that of the oriental honey buzzard in Taiwan. Principal Component Analysis (PCA) revealed significant genetic differentiation between the Taiwanese mountain hawk-

eagle and individuals from the mainland and outgroup species.

Phylogenetic analysis showed genetic divergence between Taiwanese individuals and those from mainland and outgroup populations. These results preliminarily indicate the uniqueness of the Taiwanese mountain hawk-eagle population. Historical effective population size (N_e) analysis revealed that the population experienced multiple demographic fluctuations over the past one million years. In the past ten thousand years, the effective population size remained between 8,000 and 1,800 individuals, which may reflect the effective population size before the divergence of the Taiwanese and East Asian mainland populations.

三、前言

生物多樣性包含遺傳多樣性、物種多樣性及生態功能多樣性，其中物種多樣性更是生態系統功能多樣性的關鍵之一，目前的保育的策略多以物種為其基本單位，例如美國的野生動物保育法案就是以物種為保育的單位，而對於生物多樣性的保護，更是以生物多樣性及特有物種數目的高低，劃定生物多樣性熱點，作為規劃保護區的主要依據。所以正確鑑定物種是判斷物種保育位階及依生物多樣性規劃保育區的基石。在過去物種的分類主要依據外部形態特徵，但是近年來分類理論的發展，都認為物種是一個演化上獨立的支系，在形態、生態、甚至遺傳上都未必有明顯的差異，而分子遺傳的技術更讓我們能將一些物種拆分成兩個或更多的物種，而其中一些物種在外部型態難以區分的族群也逐漸被判定為不同物種或者隱藏種，隱藏種的發現對保育工作提出了新的挑戰，例如將數量稀少的台灣特有種誤判為目前整體數量普遍的非特有種，這將低估該物種的保育位階，使該受保護的物種被保育決策單位及人民忽視，以及因此低估一地的物種多樣性，而依據生物多樣性獲特有種熱點規劃的保護區，並無法將這些隱藏的物種至於保護區的保護傘之下。因此本計劃將針對非臺灣特有，但分佈地理範圍廣泛的留鳥種類，以當代的遺傳數據與分析方法，評估這些鳥類的台灣族群是否為獨立的演化分支，也就是是否可能為一個台灣特有的隱藏種，如果判斷為隱藏種，則將對修訂其分類位階，提升為台灣的特有類群或者特有種，希望由此對台灣鳥類的多樣性及特有性有新的認識，由此可對台灣潛在隱藏種的位階加以重新評估，這不但會影響這些類群的保育階級的制定及生物多樣性保育區設立規劃，更高的鳥類特有性更可成為台灣發展國際生態旅遊的關鍵資源。

此外，在目前全球因人類擾動而造成氣候等因子快速變遷，人類活動造

成的環境變動，對生物形成新而強烈的選擇壓力，無法適應環境快速改變的物種，將面臨絕種的命運，而一個物種是否有能應對未來快速環境變遷的韌性 (resilience)，取決於其遺傳多樣性的多寡，因此也將對台灣隱藏種的遺傳多樣性現況進行評估。臺灣非特有的留鳥物種繁多，因此本研究將以留鳥中體型最大的兩種 - 林鵟 (*Ictinaetus malaiensis*) 與熊鷹 (*Nisaetus nipalensis*)，作為研究物種。本研究基於以下兩點原因以臺灣的大型猛禽留鳥作為研究物種。首先，猛禽為森林生態體系的最頂級消費者，可調節食物鏈下層的初級消費者族群數量，以避免初級消費者過度啃食提供整個生態系能量的生產者數量，由於猛禽扮演由上而下 (top-down) 調控生態系的角色，以維持生態體系的穩定 (Banse, 2007)，因此從森林生態系維持的角度，猛禽的保育應該在整個保育政策的制定上，有其優先的地位；其次，臺灣的猛禽留鳥並無特有種，而有些種類的分布範圍更是極為廣泛，因此他們在臺灣島上的族群，極有可能是尚未被偵測到的隱藏物種。以臺灣的林鵟為例，臺灣的林鵟與廣泛分布於中國陝西南部至雲南和安徽南部至福建，廣東中部和海南，向南到中南半島和馬來半島、大巽他群島、蘇拉威西和摩鹿加群島，以及布通島、邦加群島 (佩倫) 和可能在蘇拉群島的林鵟同為指名亞種 *I. m. malaiensis* (Clark, Marks, et al., 2020)；而臺灣的熊鷹則與廣泛分佈於巴基斯坦 (穆裡山區) 東北和印度、尼泊爾和丹的喜馬拉雅山脈，向東至中國南部和海南、中國東部和臺灣，以及向南到東南亞北部，及南部的丹納沙林，還有馬來半島西北部的蘭卡威島)，甚至包括柬埔寨和越南的熊鷹都同屬指名亞種 (*N. n. nipalensis* (Clark, Boesman, et al., 2020))。由於兩種猛禽的地理分佈 (BirdLife International, 2024) 都是高度不連續，且臺灣族群都是非遷徙的島嶼族群，因此和相鄰的族群很可能都因長期缺乏基因交流，增加獨立演化成

為隱藏種的可能性。

目前全台熊鷹的數量則估計為500-1400隻不等(孫, 2007), 而林鵬則尚未有族群調查數據, 但同為頂端大型鳥類掠食者, 其數量應與熊鷹相當或更少。由於族群的遺傳多樣性與其遺傳上的長期有效族群 (effective population size, N_e) 有關, 長期 N_e 越小遺傳多樣性越低, 且越容易隨機丟失遺傳變異 (遺傳漂變, genetic drift), 發生近親交配, 和造成有害突變的累積。一般來說長期 N_e 大約為繁殖族群的十分之一左右(Frankham, 1995), 因此林鵬及熊鷹的長期 N_e 大約在一百左右, 甚至更低, 族群遺傳理論預期低 N_e 的族群, 每世代將持續丟失1/100左右的遺傳多樣性, 這將不利於這兩種猛禽的長期存續, 因此這兩種猛禽的遺傳多樣性現狀, 會是個值得關注的問題。然而, 當下 N_e 的大小也會受到歷史事件影響(Ellegren & Galtier, 2016), 例如冰河期, 或冰期結束的氣候變遷對棲地變化的影響, 黑面琵鷺和歐亞水獺的 N_e 自末次冰期結束後便不斷下降(Li et al., 2024), 因此要了解驅動現生熊鷹及林鵬遺傳多樣性的因子, 也需要將其 N_e 的歷史變遷納入考量。而這兩種猛禽在早期都蒙受很大的獵捕壓力, 這意味著它們也許曾經經歷過近期下降, 甚至通過族群的瓶頸, 族群瓶頸雖然未必會造成遺傳多樣性的顯著下降, 但是瓶頸階段小族群的近親交配, 卻可能對遺傳多樣性的一些特徵(例如異型合子雜合度, 或者自然選擇效率下降, 導致有害突變累積), 產生久遠的不利影響, 即使族群復原也無法即時消弭這些負面影響, 我們在過去對黑面琵鷺的研究, 就發現族群快速增長中的黑面琵鷺, 還可偵測到近親交配的不利影響(Li et al., 2022), 因此了解林鵬與熊鷹的遺傳多樣性、長期及近期的有效族群數量, 及其近親交配產生的影響, 都將對我們如何經營管理這兩種猛禽, 幫助他們的永續, 提供重要的訊息。

四、工作目標

1. 建立熊鷹基因組草圖。為精確對台灣族群熊鷹族群的遺傳多樣性及演化特有性進行準確評估，需要熊鷹完整的基因組序列進行比對，由於目前熊鷹的基因組序列尚未被定序，因此本研究需要先以台灣熊鷹個體採集的樣本，建立基因組草圖，由於新鮮的樣本取得困難，若未能成功完成高品質的基因組草圖，將以相近猛禽的基因組做為比對的依據。
2. 為盡可能取得熊鷹與林鵬的樣本供後續遺傳分析，我們與國內外相關典藏、研究單位及 NGO，包括屏科大野生動物保育研究所、臺北市立動物園、農業部生物多樣性研究所、國立自然科學博物館、國立自然科學博物館鳳凰谷鳥園生態園區、台灣猛禽研究會、臺中市野生動物保育學會等單位，及中國科學院昆明動物研究所等單位合作，藉由博物館借用、救傷、路殺等途徑協助收集組織樣本進行基因組定序及後續分析（表 1）。
3. 目前取得的熊鷹樣本遠較林鵬為多，因此本年度優先送樣已取得的熊鷹樣本進行參考基因組的定序及組裝，以及族群個體的基因組重定序。

五、材料與方法

1. 建立熊鷹基因組草圖

本研究透過國立自然科學博物館鳳凰谷鳥園生態園區幫忙取得一隻熊鷹血液，以氯仿酒精萃取法萃取 DNA 後，以 Nanodrop1000 分光光譜儀(Thermo Fisher Scientific) 測量核酸純度及濃度，並以 0.8% 脈衝場凝膠電泳 (PFGE)，判斷大於 30Kb 長片段 DNA 的破碎程度。DNA 樣本以 Oxford Nanopore Technologies (ONT) 長序列定序技術進行 3 代基因組定序，Oxford Nanopore Technologies 長序列定序基因組定序技術，透過將連續的長 DNA 片段通過奈米孔方式，讀取單條較長的 DNA 序列，避免序列因 PCR 擴增出現的錯誤率及偏好性，改善二代基因組定序方法無法處理重覆的 DNA 序列，但三代的定序方法本身仍自帶高於二代的 Illumina 定序序列的錯誤率，因此需搭配 Illumina 4000 定序平台產生的高精度的短序列資料 80-100GB，用來輔助校正 ONT 的定序錯誤率。

2. 族群個體重定序

我們將所收集的 21 隻臺灣地區熊鷹個體組織，以上述方法進行 DNA 萃取，然後並以 1% 瓊膠於 TAE 緩衝液電泳，判斷樣本 DNA 的破碎程度，避免將過度破碎的 DNA 樣本送樣定序。然後對這些個體的 DNA 樣本進行個體的重定序，重定序以 Illumina 4000 定序平台產生的高精度的短序列資料。而其中 4 隻樣本是自自然科學博物館及生物多樣性研究所標本館中的皮毛標本割取少許腳皮進行定序，但可能因標本製作前樣本的本存狀況不佳，僅成功定序其中 2 隻個體，後續將以 19 隻臺灣地區的熊鷹個體，及 1 隻來自大陸雲南個體，由中國科學院昆明動物所提供的基因組序列，進行後續的族群遺傳分析。

為提升下游分析資料的準確性與可靠性，我們使用 fastp v0.21 (Chen et al., 2018) 對原始序列進行質控處理。此步驟去除了定序過程中加入的

PCR 接頭序列 (linker)，保留定序正確性 (Phred) 評分達到 30 (q30) 以上的高準確度的鹼基序列，進行後續分析。

3. 基因組對照拼裝(mapping)

由於血液樣本不易取得適合高品質的 DNA 樣本，所以我們取得的參考基因組序列並不完整，因此，目前暫以東方蜂鷹基因組作為參考基因組，將重定序的資料進行對照拼裝。我們使用 BWA v0.7.17_1198 (H. Li, 2013) MEM 功能，將經質控修剪後的序列進行比對和拼裝。比對完成後，通過 SAMtools v1.14 (Li et al., 2009) 將結果轉換為 SAM 和 BAM 格式，並依序進行進一步處理，包括使用 fixmate 功能修正配對信息，然後通過指令 `samtools view -f3 -F268 -q30` 保留正確配對的 R1、R2 讀序 (proper pairs)，即 PCR 引物接頭序列正確配對的序列。接著，應用 markdup 功能標識建庫過程中因 PCR 擴增產生的重複序列。最終，通過 depth 計算各個體基因組的平均覆蓋度，進一步分析核基因組 DNA 序列在以上處理步驟後的定序深度。

4. 個體及族群的單核酸變異點判讀 (SNP calling)

在完成前述處理步驟後，我們使用 Bcftools v1.14 (Li, H., 2011) 的 `mpileup` 和 `call` 命令，生成族群單核苷酸變異 (SNP) 的 VCF 檔案。由於我們使用不同物種作為參考進行比對，為減少較短片段和次要染色體的干擾，我們僅保留東方蜂鷹的主要 26 條體染色體及 1 條性染色體，這些序列涵蓋了蜂鷹基因組的 90% 以上。接著，我們使用 `bcftools view` 過濾 VCF 檔案，並只選取位於主要染色體上 2 allele 的 SNP 位點。為避免過多偽陽性的 SNP，我們進一步篩選出基因型質量 (GQ) ≥ 20 且覆蓋度 (DP) 大於 5 的 SNP 位點。此外，我們排除缺失數據超過 80% 的位點，並保留次要等位基因頻率 (maf) 大於 0.05 的 SNP 位點，進行後續的族群遺傳分析。

5. 核基因組遺傳多樣性評估

我們計算每隻熊鷹個體的 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 ）。並 Vcftools (Danecek et al 2011) 計算族群的核苷酸多樣性 (nucleotide diversity, π)。

6. 主成份分析

目前，我們擁有 19 個來自臺灣的熊鷹樣本以及 1 個來自中國雲南的樣本的基因組序列。我們採用主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA) 以分析這兩個地區個體的遺傳分化或地理遺傳結構，PCA 分析的結果會將遺傳變異相近的個體聚集再一起。為了避免存在連鎖關係的 SNP 位點過度影響個體間的遺傳相似性，以及基因組中受到適應性選擇的區域造成 PCA 結果的誤差，評估族群間地理結構時，盡量使用中性及非連鎖的 SNPs，我們剔除了位於性染色體及 CDS 區域的 SNP 位點。再使用 PLINK v1.9 (Purcell et al., 2007) 剔除連鎖不平衡係數 $r^2 > 0.2$ 的 SNP 位點 (`--indep-pairwise 10kb 1kb 0.2`)。另我們也過濾掉次要等位基因頻率小於 0.05 的 SNP 位點 (`--maf 0.05`)，以及顯著偏離哈溫平衡的 SNP 位點 (`--hwe 0.1`)，以排除可能受到選擇壓力影響的位點。接下來，我們利用 gcta64 進行主成分分析 (PCA)，並基於第 1 和第 2 主成分的分數來綜合描述各個體的 SNP 變異特徵。遺傳組成相似的個體在第 1 和第 2 主成分得分上會更為接近，從而反映其地理遺傳結構的相似性。

7. 親緣分析

我們利用 IQ-TREE 2 (Mihn et al 2020) 進行親緣關係樹的建構，透過最大似然法 (Maximum Likelihood, ML) 進行熊鷹個體親緣樹推斷，並使用 SH-aLRT 來比較完整樹與簡化樹的似然值，評估分支的穩定性。此外，IQ-TREE 2 具備自動模型選擇 (ModelFinder) 功能，針對使用 SNP 檔案進行親緣樹建構的情境，搭配 ASC (篩選偏差校正) 模型，以修正由

於 SNP 資料集中篩選偏好可能對親緣樹推斷造成的影響。為了進行親緣分析並避免適應性演化對族群結構對結果的影響，在上述族群 SNP calling 完成後，再刪除位於性染色體及 CDS 區域的 SNP 位點。由最終篩選出 5 百多萬中性的 SNP 位點，從中隨機抽取 10 萬個 SNP，用於親緣樹的建構分析。希望在保留足夠遺傳資訊的同時，減少計算負擔以提高親緣分析的效率和精確度。

8. 台灣、雲南地區熊鷹的遺傳距離

我們利用 VCFtools 計算兩地區都有的 SNP 頻率(--freq)，再使用 Smith 和 Kronforst (2013) 中的公式計算每對族群之間的遺傳距離(dxy) (Nei, 1987; Nei & Li, 1979)。dxy, 該距離計算台灣與雲南個體間基因組序列的平均百分比

9. 以 PSMC、SMC++ 及 Stairway Plot 2 估算熊鷹的歷史族群數量變動

我們採用 PSMC (Pairwise Sequentially Markovian Coalescent) (Li & Durbin 2011) 模型，利用單一個體的雙倍體基因組資料，根據基因組不同區域推斷「最近共同祖先時間」(Time to Most Recent Common Ancestor, TMRCA)。透過分析整個基因組的 TMRCA 分佈，可推測族群在不同歷史時期的有效族群大小變化，從而推斷各時期的族群規模動態。在 PSMC 分析中，因為基因組覆蓋度會影響推斷結果的準確性，我們僅使用覆蓋度超過 20 倍的個體進行分析。此外，基因組突變率採用鳥類基因組的參數，以世代時間為 5 年，每年每鹼基突變率為 2.3×10^{-9} (Smeds et al., 2016)，用於估算熊鷹的歷史有效族群變動。

另 SMC++ (Terhorst et al., 2017) 是透過對整個族群的等位基因頻率進行建模，來推斷歷史族群大小變化，因為使用族群 SNP 位點的頻譜分佈 (site frequency spectrum) 進行族群的 TMRCA 的分析，可以改善 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，推估到更接近現代（萬年以內）的有效族群大小動態變化。

Stairway Plot 2 (Liu & Fu, 2020) 利用 SNP 等位基因頻率進行分析，特別是其支援 folded SFS (Site Frequency Spectrum) 模式，因此可以不用事先知道每個 SNP 的祖先等位基因 (ancestral alleles)。由於非模式物種通常缺乏祖先型等位基因的資訊，Stairway Plot 2 對於這類物種的歷史有效族群大小推斷相對友好且適用。

10. 以 GONE 分析近 200 代期族群有效族群動態

GONE (Santiago et al., 2020) 基於連鎖不平衡 (Linkage Disequilibrium, LD)，利用當代個體的 SNP，結合基因重組率，推算不同時間點的有效族群大小。GONE 特別適合推測近 200 代內的族群歷史動態，由於小族群中遺傳漂變效應更為強烈，導致 LD 水平更高、更易檢測，因此，GONE 還特別適合做小族群或樣本量較小的有效族群推算。因此 GONE 方法能更靈敏地捕捉這些信號，並準確推估近期歷史中的有效族群大小。因熊鷹為非模式物種，我們要知道該物種基因重組率並不容易，因此藉由參考已被研究過的蒼鴉 (*Tyto alba*) 基因組重組率 1.94 cM/Mb 進行臺灣地區熊鷹 GONE 歷史有效族群的估算。

11. 以 ROH (Run of homozygosity) 分析估計個體的近親繁殖係數

為了評估臺灣地區熊鷹的近親交配程度，我們利用 PLINK v1.9 計算了其基因組中的同型合子連續片段 (Run of Homozygosity, ROH) 總長度。根據 McQuillan 等人 (2008a) 的研究，譜系歷史中若存在近親交配，則基因組中的兩條同源染色體的某些區段會來自共同祖先，使基因組中的這些區域出現連續的同型合子片段。且血緣越近或近交時間越近時，發生隨機重組的機會將降低，在近親交配可能降低基因組中異型合子片段的比例機會，又較少發生重組將形成較長的連續同型合子片段。在本研究中，我

們設定以下參數進行分析：以 20 個同型合子 SNP 作為滑動窗口 (--homozyg-window-snp 20)；每個窗口至少需要 20 個同型合子 SNP (--homozyg-snp 20)；允許 1 個雜合位點 (--homozyg-window-het 1)；允許 1 個缺失位點 (--homozyg-window-missing 1)；相鄰窗口的重疊比例為 0.01 (--homozyg-window-threshold 0.01)。此外，我們設定了 --homozyg-kb 500，以捕捉長度超過 500kb 的 ROH 片段。最後，根據計算結果，我們將 ROH 總長度轉換為 FROH (特指長度大於 500kb 的片段，標記為 FROH_{500k}，用以描述臺灣地區熊鷹的近親交配程度。

六、結果

1. 基因組組裝結果

我們使用 SQK-LSK110 試劑 (Oxford Nanopore Technologies [ONT]) 進行基因組建庫。然而，由於未知原因，由血液萃取並溶解後的 DNA 樣品黏稠度較高，未能充分溶解，造成建庫困難，因此被視為風險性建庫。由於當前條件下無法取得其他組織來源的樣本，而不上機則無法確定序列產出效果，我們選擇經過後續的 DNA 純化程序後，進行風險性建庫並上機定序。

我們使用 PromethION 平台進行高通量定序，並以 Guppy v6.3.8 (ONT) 在高精準度模式 (>Q7) 的鹼基轉換進行讀序處理，產生約 8GB 的 ONT 序列。然而，序列的長度 N50 僅 4.6kb，序列數量顯著不足，難以支撐熊鷹 1.2GB 的基因組組裝。隨後，我們採用 Flye v2.7-b1585 (Mikhail K., et al., 2019) 進行 ONT 序列的組裝，結果僅獲得總長度 0.78GB 的組裝序列，平均覆蓋深度僅為 6 倍，組裝支架的 N50 長度為 35.4kb，組裝完整度較低。

在 BUSCO v5 (Manni et al., 2021) 鳥類保守基因集的比對分析中，組裝基因組僅達到 48.4% 的完整基因比對率，亦顯示組裝質量和基因完整度不佳 (表 2)。

由於熊鷹基因組草圖的完整度不理想，我們將採用同為鷹科的東方蜂鷹基因組草圖作為參考基因組，來進行後續的族群遺傳分析。

2. 個體重定序

我們收集了 19 隻臺灣地區的熊鷹個體、1 隻來自大陸的個體，以及 1 隻 *Nisaetus alboniger* 作為外群物種 (BioSample: SAMN25686331，取自 NCBI)。由於各個體的 DNA 品質不一，我們獲得了 16.66 至 134.45 Gb 的 Illumina 短片段 DNA 序列資料。其中一隻個體作為參考

基因組，用於校正三代 ONT 序列，該個體的定序量增加至 130 Gb。若不計算此高覆蓋度個體，其餘個體的 Illumina 短片段序列量範圍為 16.66 ~ 42.35 Gb。經過 fastp 進行 Q30 序列質化分析後，每隻個體大致去除了 6% ~ 18% 的低品質序列。在基因組比對拼裝 (mapping) 後，各個體的基因組對照覆蓋度介於 11 ~ 100 倍之間。若排除該高覆蓋度的定序個體，則其餘個體的基因組對照覆蓋度範圍縮減為 11 ~ 31 倍 (表 3)。

3. 核基因組遺傳多樣性計算

我們利用 5,024,276 個 SNP 位點評估熊鷹的核基因組遺傳多樣性，包括每隻個體的 SNP 數量、雜合 SNP 位點數、個體雜合度及族群的核苷酸多樣性 (π)。由於僅有 1 隻大陸個體，因此族群核苷酸多樣性僅針對臺灣族群計算。在臺灣地區的熊鷹個體中，SNP 數量介於 150.54 萬 ~ 290.95 萬之間，平均約為 253.32 萬；雜合 SNP 位點數在 93.56 萬 ~ 190.04 萬之間，平均約為 153.28 萬；個體雜合度介於 0.0008 ~ 0.0016 之間，平均為 0.0013。整體而言，臺灣族群的核苷酸多樣性 (π) 為 0.0011。由於大陸地區僅有 1 隻個體，其數據顯示該個體的 SNP 數量為 231.79 萬，雜合 SNP 位點數為 173.18 萬，個體雜合度為 0.0015 (表 4)。

4. 主成份分析

在主成份分析中，我們選取了 410,686 個非連鎖獨立的 SNP 位點進行組成成分分析。結果顯示，臺灣地區的熊鷹主要可根據第一主成分 (解釋基因組 3.01% 的變異) 與大陸及外群個體明顯區分開來。此外，雖然有兩隻臺灣個體在主成分得分上與其他臺灣個體稍有偏離，但它們仍與大陸及外群個體保持明顯距離，相較之下更接近臺灣族群。這說明臺灣地區內部可能存在一些遺傳變異，但整體上臺灣族群仍具相對一致的遺傳結構 (圖 1)。

5. 親緣關係

我們在 5,295,160 的 SNP 位點中隨機選取 10 萬個 SNP 位點組成的 SNP fasta 檔案，進行 IQ-TREE 2 的最大似然法親緣樹建構，結果顯示臺灣地區個體形成一個支系，與大陸及外群個體不形成併系群，顯示出一定程度的遺傳分化(圖 2)。

6. 歷史族群數量變動

我們挑選基因組覆蓋度大於 20 倍個體為主，以 PSMC 推估臺灣地區熊鷹的歷史有效族群動態，結果這 12 隻個體 PSMC 大致呈現相同的趨勢，顯示熊鷹約在 100 萬年至近 20 萬年前， N_e 自 1.75 萬~2.4 萬左右，往下到 0.65 萬~1.25 萬左右，又在近 10 萬年前至近 5 萬年前， N_e 自約 0.65 萬~1 萬左右，往上到約 1.5 萬~2 萬，再近 5 萬年前到近 1 萬年前， N_e 又回到 0.65 萬~0.8 萬區間(圖 3)。我們使用 SMC++ 區分譜系 (distinguished lineages; -d) 參數，在 19 隻樣本中，每次隨機選擇 5 隻個體作為區分譜系來進行分析，希望透過此參數更有效的進行族群歷史變遷的重建，SMC++ 結果顯示熊鷹族群從近 100 萬年到近 10 萬年前， N_e 約在 4~6 萬間上下波動，然後在近 10 萬到近 5 萬年前， N_e 由 4 萬左右下降到約 0.5~0.8 萬左右(圖 5)。而 Stairway plot2 結果顯示從近萬年到近千年，熊鷹 N_e 約從 0.8 萬左右下降至約 0.18 萬左右 (圖 6)。GONE 結果顯示，約從 1000 年 (200 代) 至近期，臺灣地區熊鷹族群的有效族群大小介於 543~2381 之間，近 50 年約在 543~893 之間 (圖 7)。

綜合 PSMC、SMC++、Stairway Plot2 及 GONE 的結果，我們發現熊鷹族群在過去 100 萬年內歷史族群數量在一定程度範圍內產生波動，而在近萬年間，有效族群數量維持在約 0.8 萬左右，而近千年再降至 0.18 萬左右，與 GONE 近 200 代結果 2381 相近，然後 GONE 近 50 年的結果約在 543~893 之間。這些歷史動態可能反映了環境變遷或其他選擇壓力對熊

鷹族群的長期影響。

七、討論

因在熊鷹基因組組裝過程遭遇困難，特別是在 DNA 樣本的萃取由於樣品黏稠度較高且無法充分溶解，導致再次純化後，建庫 DNA 量減少及長度未達第三代核酸定序的定序模板長度標準，致使建庫結果不理想，最終導致基因組覆蓋度遠遠不足組裝完整基因組，而拼裝結果也顯示基因組組裝質量不佳，BUSCO 分析中僅顯示 48% 的完整基因配對，顯示基因組完整性及質量低落，只能改以同為鷹科的東方蜂鷹基因組進行參考基因組參與熊鷹的配對組裝。使用非同種的參考基因組進行對照拼裝(mapping)是族群遺傳學中常見的應變策略。透過盡量選擇較親緣較相近物種的參考基因組，和後續的資料過濾，仍能揭示研究族群的基因遺傳結構和歷史動態。台灣熊鷹歷史族群數量變動分析基於 PSMC、SMC++ 和 Stairway Plot2 的分析結果，熊鷹族群在過去 100 萬年間歷史族群數量呈現波動。然在近萬年間，族群數量下降，並在近千年內降至低點。這些變動可能與環境變遷、氣候波動或其他選擇壓力有關，如在更新世期間的歷史族群數量動態顯示，在第四紀氣候波動期間，38 種鳥類物種經歷了族群規模的週期性波動，特別是在最後一次冰河期 (LGP) 開始時，大多數物種的有效族群數量顯著下降。這些波動被認為受氣候變遷引起的，可能反映了物種在冰期及間冰期環境變化的調節 (Nadachowska-Brzyska K et al., 2015)。

而近期有效族群量的估算則顯示，台灣熊鷹的近期有效族群自 800 年前的 2200 持續下降，至 100 年前下降至 1200，而到下降到 20 年前才須於穩定僅餘 540，熊鷹在台灣近代有效族群下降趨勢，可能與台灣這個島嶼的人類開發史有緊密關聯，隨著漢人移入、日據時代以及人口快速增加及工業化，熊鷹的有效族群量不斷快速下降，直至約 20 年前才趨於平緩，降至 540 左右。但這近代有效族群量相較目前熊鷹估計的族群量 500-1400 隻差異並不大，比起一般有效族群量約為真實族群量的 1/7-1/10 相距太

大。這個差距雖然有可能是野外調查低估了實際的族群量，但可能是熊鷹這類大型猛禽的世代時間較長有關，因為大型猛禽的世代時間可長達五年左右，而世代時間越長，族群的波動越小，這會使得族群的有效族群較預期的大。而較大的有效族群也會使得族群近親繁殖的效應下降，因此本研究發現台灣熊鷹個體的近親繁殖係數都極低，毫無近親交配的證據。

而根據系統發育樹與 PCA 分析顯示，台灣族群與同屬一個亞種的雲南個體形成兩個不同的演化支系，而台灣熊鷹是留鳥且在台灣從未觀察到有熊鷹遷徙的證據，這些都一致指向台灣熊鷹是一個獨立的族群，但目前除了台灣以外的熊鷹個體樣本，因此台灣熊鷹是否能被視為一個亞種更需更多的證據支持。不過系統發育樹顯示兩隻用標本腳皮 DNA 定序的個體，雖然和其他台灣個體聚在一個支系內，但自成一個支系，顯示與其他個體存在遺傳上的差異，這個差異也呈現在 PCA 的結果中，這兩個體與其他台灣個體有較相似的遺傳變異。

八、結論

本研究針對臺灣地區熊鷹族群進行了基因組分析及歷史族群動態重建。雖然基因組組裝過程中面臨樣本品質與建庫困難的挑戰，我們使用親緣關係較近的東方蜂鷹基因組作為參考，運用跨物種 mapping 的可行性，為基因組資料不完整的物種提供替代策略，然我們也希望克服困難或再覓尋更適合的組織，再次進行熊鷹參考基因組的組裝。

九、檢討與建議

在本計劃中，我們雖取得了初步的結果，並檢視了熊鷹的基因組結構與族群遺傳多樣性，但在基因組組裝過程中，儘管我們已有多個鳥類基因組組裝經驗，但面對不同樣本，仍呈現不同程度的風險，我們希望後續改善這問題。不過初步結果也增加臺灣地區熊鷹與大陸地區熊鷹可能具有遺傳差距，提高潛在種的可能性。而我們的結果顯示台灣熊鷹族群的遺傳多樣性並不低，這也反映在與遺傳多樣性相關的有效族群大小上，但是台灣熊鷹的有效族群大小相較於估計的族群數量大幅偏高這應該是長世代時間的效應，而近期研究顯示，具有長世代時間的動物由於繁殖成功率低，以致族群個體成員的更新緩慢，因此對任何環境變動，例如棲地消失、疾病感染、或捕獵，都較世代時間短但繁殖成功率較高、個體世代更新快的物種更為脆弱，因此對像熊鷹這種長世代的保育類動物，應該要有更嚴謹的保育措施，尤其是避免棲地進一步消失，才能有效保育這類長世代的生物。

十、圖表目錄

表 1 熊鷹樣本

表 2. BUSCO 比對結果

表 3. 臺灣地區與大陸雲南地區熊鷹每個樣品定序總量 (G)、序列經質控後序列量 (G)，及使用最終清理後序列的基因組定序覆蓋深度 (倍)。 *Nisaetus alboniger* 來自於 NCBI

表 4. 熊鷹核基因組多樣性：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)，及臺灣地區族群的核酸多樣性 (π)

表 5. 臺灣地區個體全基因組個體 ROH 片段長度 > 500kb 的近交係數

圖 1. 410,686 個非連鎖獨立的 SNP ($r^2 < 0.2$) 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。來自臺灣地區個體 (藍色)、來自大陸雲南 (紅色) 及 *Nisaetus alboniger* (紫色)

圖 2. 臺灣地區與大陸地區熊鷹的親緣關係樹

圖 3. PSMC 推估台灣地區熊鷹的歷史有效族群數量

圖 4. 以 PSMC 法對台灣地區熊鷹個體進行 100 次 bootstrap 分析所得歷史有效族群動態範圍(灰線)

圖 5. 以 SMC++法推估臺灣地區熊鷹族群的歷史遺傳有效族群動態，不同深淺藍線為每次隨機選擇 5 隻個體作為區分譜系進行分析的族群歷史變遷重建

圖 6. 以 Stairway Plot2 推估臺灣地區熊鷹族群的歷史遺傳有效族群動態

圖 7. 以 GONE 推估臺灣地區熊鷹族群近 200 代的遺傳有效族群動態

表 1 熊鷹樣本

日期	地點	來源	備註
D533		臺北市立動物園	20140071D10_D1610_1030311 基隆_農授林務字第 1031700533 號
T7462	20080501 台中和平	農業部生物多樣性研究所	標本
T7463	20120825 台東	農業部生物多樣性研究所	標本
T7465	20000709 霧社	農業部生物多樣性研究所	標本
T7467	2020	農業部生物多樣性研究所	
T7503	20240618 鳳凰谷鳥園	國立自然科學博物館鳳凰谷鳥園生態園區	
T7504		臺北市立動物園	20170265M30_ATZ171 左阿前_農授林務字第 1061700466 號
T7505		臺北市立動物園	20090400M20_C1083_農授林務字第 0980108575 號
T7506		臺北市立動物園	20210298B20_B_TZ024_農授林務字第 1090223756 號
T7507		臺北市立動物園	20080520B20_烏來_農授林務字第 0970110626 號
T7513	20220207 南澳	台灣猛禽研究會	
T7514	20231012 宜蘭	屏科大野生動物保育研究所	
T7515	20240214 宜蘭	屏科大野生動物保育研究所	
T7516	20231226 南橫	屏科大野生動物保育研究所	
T7517	20240213 宜蘭	屏科大野生動物保育研究所	
T7518	20240310 宜蘭	屏科大野生動物保育研究所	
T7519	20240402 宜蘭	屏科大野生動物保育研究所	
T7520	20240528 宜蘭	屏科大野生動物保育研究所	

T7521	20240520	南橫	屏科大野生動物保育研究所	
T7464		屏東	農業部生物多樣性研究所	
T7466			農業部生物多樣性研究所	
T7468	2008		農業部生物多樣性研究所	
T7502		六龜	國立自然科學博物館	標本

表 2. BUSCO 比對結果

	ave_odb10
Complete BUSCOs (C)	4035 (48%)
Complete and single-copy BUSCOs (S)	4022 (48%)
Complete and duplicated BUSCOs (D)	3333 (40%)
Fragmented BUSCOs (F)	1211 (15%)
Missing BUSCOs (M)	3092 (37%)
Total BUSCO groups searched	8338

表 3. 臺灣地區與大陸雲南地區熊鷹每個樣品定序總量 (G)、序列經質控後序列量 (G)，及使用最終清理後序列的基因組定序覆蓋深度 (倍)。

Nisaetus alboniger 來自於 NCBI

個體	定序總量 (G)	序列質量 > 30 (G)	序列質量 > 30 (%)	覆蓋深度 (倍)
D533	35.44	33.24	0.94	27.18
T7462	23.00	19.44	0.85	15.50
T7463	16.66	14.07	0.84	11.33
T7465	40.25	37.66	0.94	29.69
T7467	36.21	34.04	0.94	27.17
T7503	134.45	125.76	0.94	100.20
T7504	37.31	34.57	0.93	26.40
T7505	20.32	18.44	0.91	14.05
T7506	42.35	38.88	0.92	22.61
T7507	30.07	27.65	0.92	16.10
T7513	28.02	25.54	0.91	18.68
T7514	28.59	26.72	0.93	21.13
T7515	27.82	25.99	0.93	20.62
T7516	35.81	33.54	0.94	26.72
T7517	32.10	29.34	0.91	20.85
T7518	32.31	30.17	0.93	23.48
T7519	31.54	29.45	0.93	23.00
T7520	20.97	19.30	0.92	14.19
T7521	41.53	38.82	0.93	31.03
V350256575	38.80	31.71	0.82	23.08
<i>Nisaetus alboniger</i>	22.30	22.30	pass	14.84

表 4. 熊鷹核基因組多樣性：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 ），及臺灣地區族群的核酸多樣性（ π ）。

個體	SNP 數	雜合位點數	雜合度 θ	核苷酸多樣性 (π)
D533	2,874,537	1,844,227	0.0016	
T7462	2,241,579	1,273,055	0.0011	
T7463	2,051,533	1,308,951	0.0011	
T7465	2,581,271	1,472,497	0.0012	
T7467	2,573,731	1,461,960	0.0012	
T7503	2,895,222	1,857,486	0.0016	
T7504	2,569,882	1,471,103	0.0012	
T7505	1,505,397	935,644	0.0008	
T7506	2,560,778	1,491,765	0.0013	
T7507	2,510,404	1,600,116	0.0014	
T7513	2,841,084	1,865,810	0.0016	
T7514	2,567,943	1,482,897	0.0013	
T7515	2,847,956	1,833,733	0.0016	
T7516	2,584,825	1,484,666	0.0013	
T7517	2,550,884	1,473,130	0.0012	
T7518	2,473,896	1,443,479	0.0012	
T7519	2,563,393	1,473,522	0.0012	
T7520	2,427,638	1,449,086	0.0012	
T7521	2,909,485	1,900,406	0.0016	
平均	2,533,234	1,532,818	0.0013	0.0009
V350256575	2,317,926	1,731,810	0.0015	
<i>Nisaetus alboniger</i>	1,110,037	996,096	0.0008	

表 5. 臺灣地區個體全基因組個體 ROH 片段長度 > 500kb 的近交係數

個體	ROH 數	ROH 長度 平均 ROH 長度		FROH
		(Kb)	(Kb)	
D533	8	4784.4	598.0	0.00051
T7462	0	0.0	0.0	0.0
T7463	0	0.0	0.0	0.0
T7465	16	9279.0	579.9	0.00049
T7467	16	9302.3	581.4	0.00049
T7503	16	10854.2	678.4	0.00058
T7504	10	5940.1	594.0	0.00050
T7505	0	0.0	0.0	0.0
T7506	1	565.1	565.1	0.00048
T7507	0	0.0	0.0	0.0
T7513	0	0.0	0.0	0.0
T7514	6	3638.4	606.4	0.00051
T7515	1	538.8	538.8	0.00046
T7516	14	8555.2	611.1	0.00052
T7517	2	1093.2	546.6	0.00046
T7518	1	511.9	511.9	0.00043
T7519	2	1028.4	514.2	0.00044
T7520	0	0.0	0.0	0.0
T7521	6	3787.3	631.2	0.00054

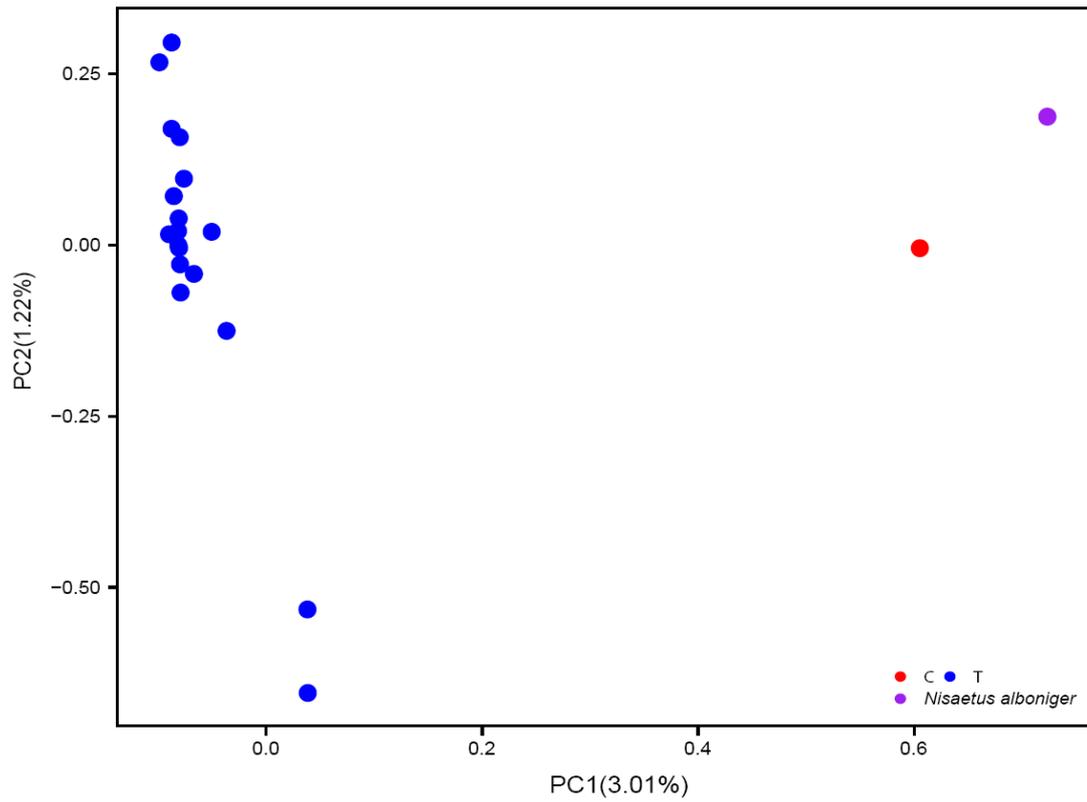


圖 1. 410,686 個非連鎖獨立的 SNP ($r^2 < 0.2$) 的主成份分析結果。圖中顯示每隻個體第一及第二主成份的分數。來自臺灣地區個體 (藍色)、來自大陸雲南 (紅色) 及 *Nisaetus alboniger* (紫色)

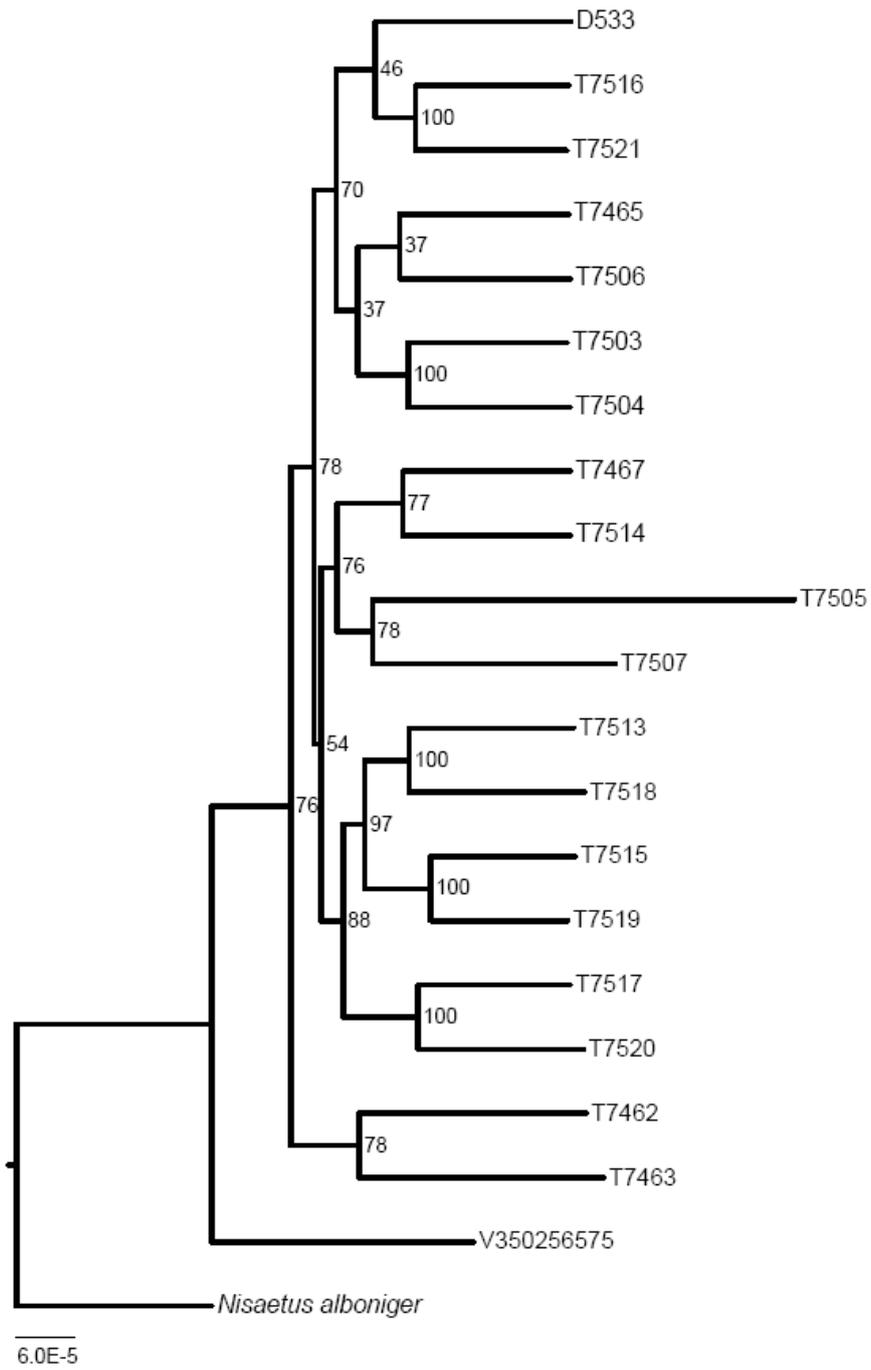


圖 2. 臺灣地區與大陸地區熊鷹的親緣關係樹

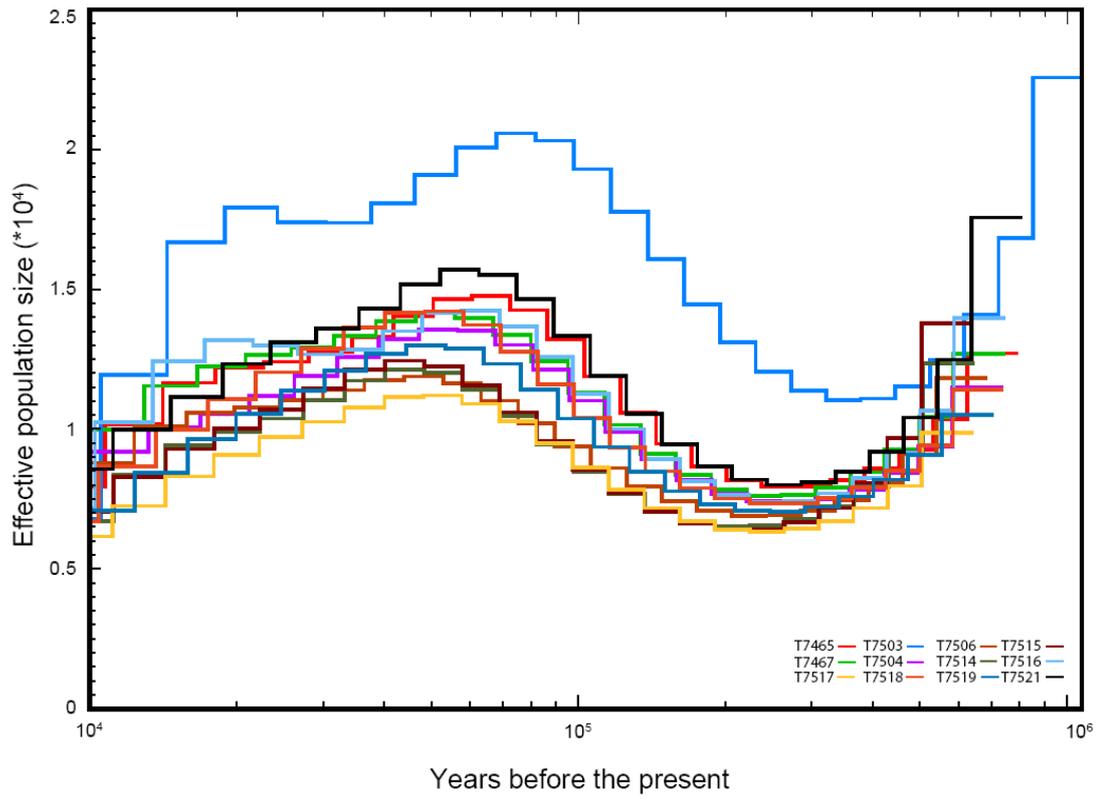


圖 3. PSMC 推估台灣地區熊鷹的歷史有效族群數量

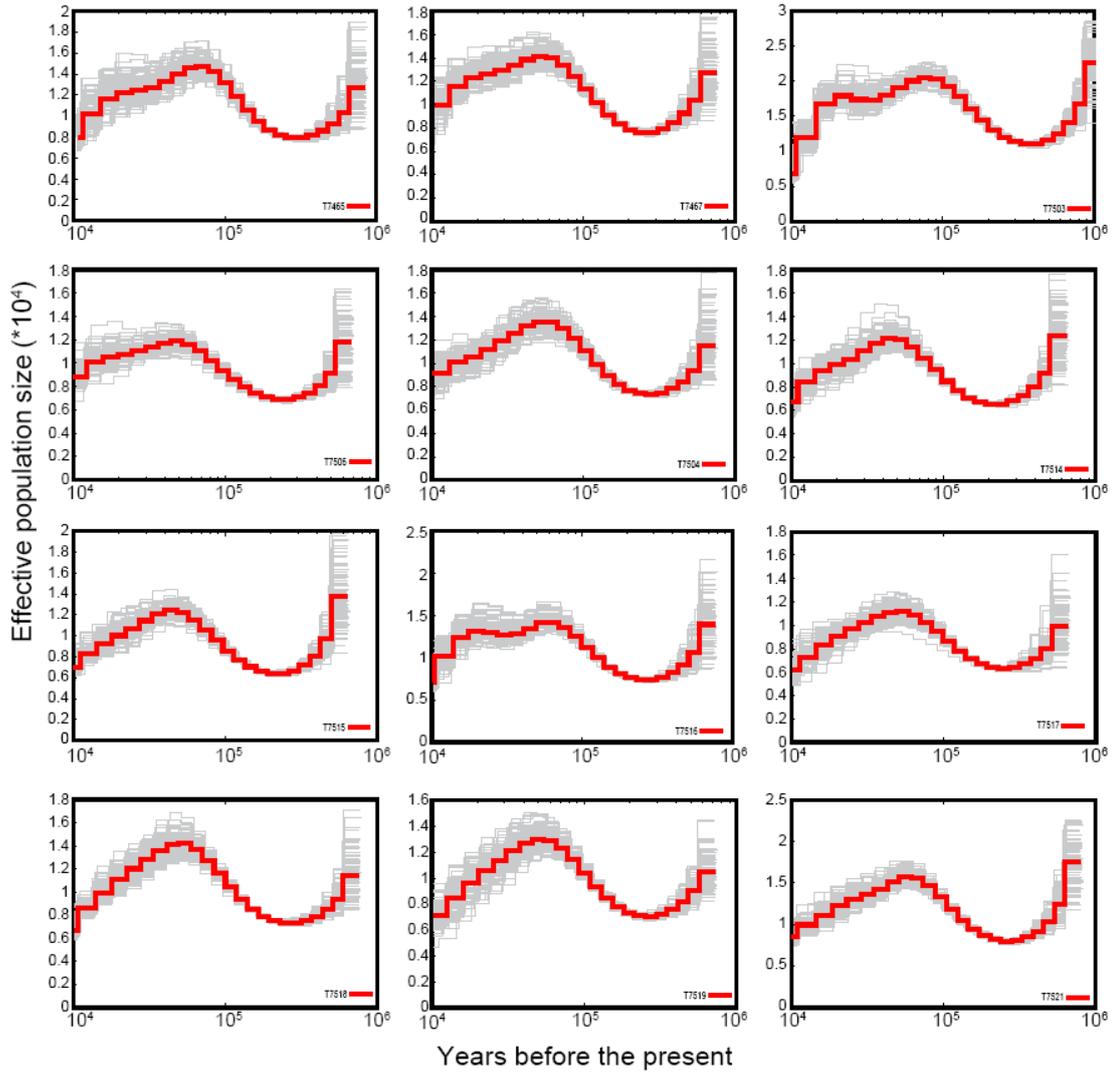


圖 4. 以 PSMC 法對台灣地區熊鷹個體進行 100 次 bootstrap 分析所得歷史有效族群動態範圍(灰線)

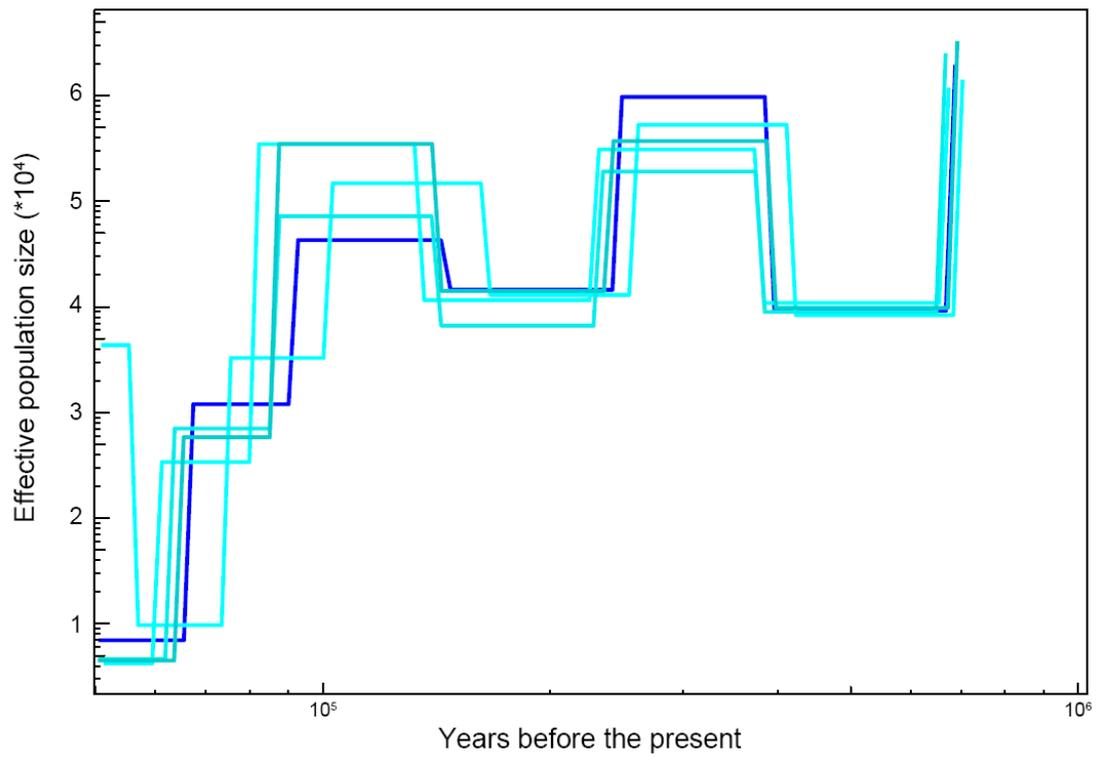


圖 5. 以 SMC++法推估臺灣地區熊鷹族群的歷史遺傳有效族群動態，不同深淺藍線為每次隨機選擇 5 隻個體作為區分譜系進行分析的族群歷史變遷重建

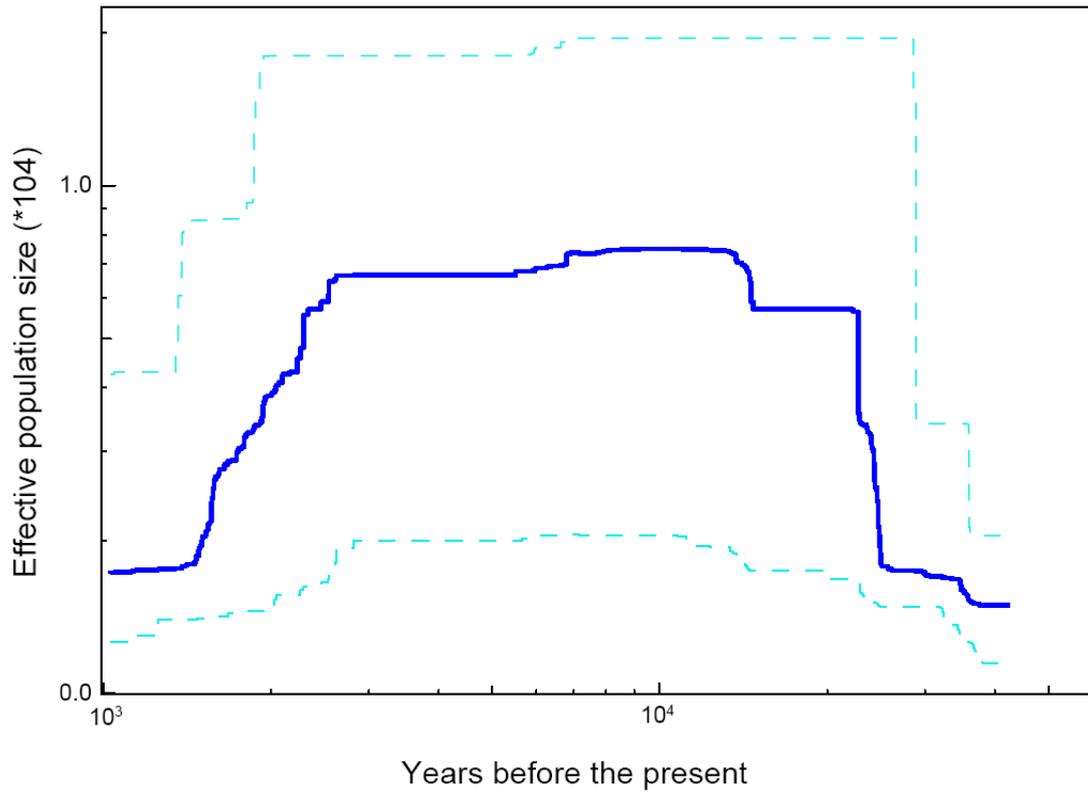


圖 6. 以 Stairway Plot2 推估臺灣地區熊鷹族群的歷史遺傳有效族群動態

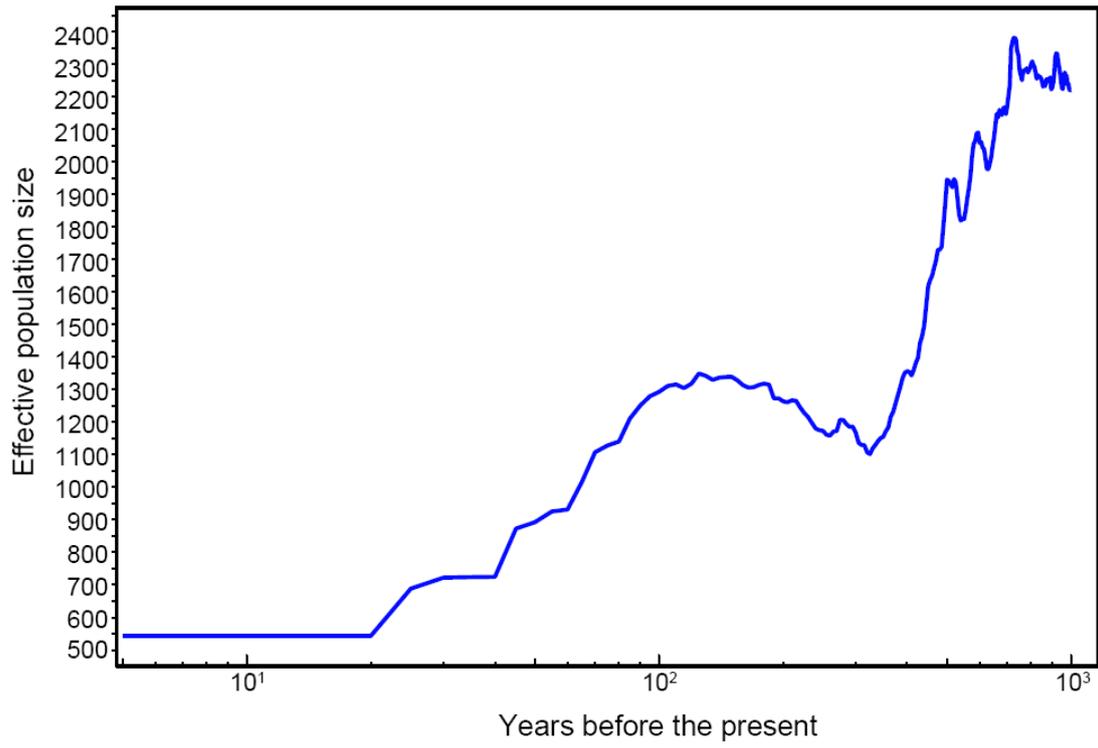


圖 7. 以 GONE 推估臺灣地區熊鷹族群近 200 代的遺傳有效族群動態

十一、 參考文獻

- Banse, K. (2007). Do we live in a largely top-down regulated world?. *Journal of Biosciences*, 32, 791-796.
- Clark, W.S., J. S. Marks, G. M. Kirwan, and P. F. D. Boesman (2020). Black Eagle (*Ictinaetus malaiensis*), version 1.0. In *Birds of the World* (J. del Hoyo, A. Elliott, J. Sargatal, D. A. Christie, and E. de Juana, Editors). Cornell Lab of Ornithology, Ithaca, NY, USA.
<https://doi.org/10.2173/bow.blaeag1.01>
- Clark, W. S., Boesman, P. F. D., Kirwan, G. M., & Marks, J. S., 2020. Legge's Hawk-Eagle (*Nisaetus kelaarti*), version 1.0. *Birds of the World*. Webpage URL: <https://doi.org/10.2173/bow.mouhae2.01>
- Frankham, R. (1995). Effective population size/adult population size ratios in wildlife: a review. *Genetics Research*, 66(2), 95-107.
- Ellegren, H., & Galtier, N. (2016). Determinants of genetic diversity. *Nature Reviews Genetics*, 17(7), 422-433.
- Li, S. H., Yeh, C. F., Jang-Liaw, N. H., Chang, S. W., Lin, Y. H., Tsai, C. E., Chiu, C. C., Chen, C. W., Ke, H. R., Wang, Q., Lu, Y. W., Zheng, K., Fan, P., Zhang, L., & Liu, Y. (2024). Low but highly geographically structured genomic diversity of East Asian Eurasian otters and its conservation implications. *Evolutionary Applications*, 17(1), e13630.
- Li, S. H., Liu, Y., Yeh, C. F., Fu, Y., Yeung, C. K., Lee, C. C., Chiu, C. C., Kuo, T. H., Chan, F. T., Chen, Y. C., Ko, W. Y., & Yao, C. T. (2022). 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*, 31(2), 529-545.

Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., & Gu, J. (2018). fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 34(17), i884-i890.

Li, H. (2013). Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. arXiv preprint arXiv:1303.3997.

Heng Li, Bob Handsaker, Alec Wysoker, Tim Fennell, Jue Ruan, Nils Homer, Gabor Marth, Goncalo Abecasis, Richard Durbin, 1000 Genome Project Data Processing Subgroup, The Sequence Alignment/Map format and SAMtools, *Bioinformatics*, Volume 25, Issue 16, August 2009, Pages 2078–2079, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>

Li H. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics* (2011) 27(21) 2987-93

Danecek, P., Auton, A., Abecasis, G., Albers, C. A., Banks, E., DePristo, M. A., Handsaker RE, Lunter G, Marth GT, Sherry ST, McVean G, Durbin R & 1000 Genomes Project Analysis Group. (2011). The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*, 27(15), 2156-2158.

Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A., Bender, D., Maller J, Sklar P, de Bakker PI, Daly MJ, & 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.

Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., Von Haeseler, A., & Lanfear, R. (2020). IQ-TREE 2: new models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Molecular*

biology and evolution, 37(5), 1530-1534.

Smith, J., & Kronforst, M. R. (2013). Do *Heliconius* butterfly species exchange mimicry alleles?. *Biology letters*, 9(4), 20130503.

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.

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.

Liu, X., & Fu, Y. X. (2020). Stairway Plot 2: demographic history inference with folded SNP frequency spectra. *Genome biology*, 21(1), 280.

Santiago, E., Novo, I., Pardiñas, A. F., Saura, M., Wang, J., & Caballero, A. (2020). Recent demographic history inferred by high-resolution analysis of linkage disequilibrium. *Molecular Biology and Evolution*, 37(12), 3642-3653.

Li, H., & Durbin, R. (2011). Inference of human population history from individual whole-genome sequences. *Nature*, 475(7357), 493-496.

Smeds, L., Qvarnström, A., & Ellegren, H. (2016). Direct estimate of the rate of germline mutation in a bird. *Genome research*, 26(9), 1211-1218.

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 AK, Farrington SM, Rudan P, Hayward C, Vitart V, Rudan I, Wild SH, Dunlop MG, Wright AF, Campbell H. & Wilson, J. F. (2008). Runs of homozygosity in European populations. *The American Journal of Human Genetics*, 83(3), 359-372.

Kolmogorov, M., Yuan, J., Lin, Y., & Pevzner, P. A. (2019). Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nature biotechnology*, 37(5), 540-546.

Manni, M., Berkeley, M. R., Seppey, M., & Zdobnov, E. M. (2021). BUSCO: assessing genomic data quality and beyond. *Current Protocols*, 1(12), e323.

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.

孫元勳、黃永坤、李方儒、洪孝宇, 2007。熊鷹繫放研究初探。2007 台灣鳥類繫放研討會，斗南。12月15日。