

台灣長鬃山羊個體間粒線體DNA之12S rRNA 及 cytochrome b 序列分析比較

洪東奇¹ 賴淑雅¹ 黃獻文¹ 梁佑全² 歐柏榮²

¹行政院農業委員會特有生物研究保育中心 南投縣集集鎮民生東路1號

²東海大學畜產學系 台中市台中港路三段181號

摘要

本研究是從19隻台灣長鬃山羊的樣本中定出其粒線體 DNA的12S rRNA (395 bp) 及cytochrome b (307 bp)的部分DNA序列，比較 DNA序列的結果顯示其中 12S rRNA有 4種單套型 (haplotype)，各單套型之間的遺傳變異在 0.3%至 0.8%之間，顯示在台灣長鬃山羊個體間的粒線體 DNA 的 12S rRNA 演化速率很慢，利用這段基因的序列可作為物種間的鑑定。而cytochrome b DNA序列經比對共得到6種單套型，各單套型之間的遺傳變異在 0.3%至 2.0%之間，和12S rRNA比較，其具有較快的演化速率及較大的變異。利用cytochrome b親緣樹關係分析結果，發現台灣長鬃山羊的遺傳變異可分為兩群，一群位在花蓮太魯閣地區，一群位在臺東地區，而兩群之間推測可能存在有地理條件上的阻隔，這結果顯示著台灣長鬃山羊的基因差異性可能是由於臺灣的地理條件的阻隔所造成演化上的差異。

關鍵詞：台灣長鬃山羊、粒線體 DNA、cytochrome b、12S rRNA

收件日期：2000年9月28日

接受日期：2001年1月31日

緒言

台灣長鬃山羊 *Formosan serow* (*Naemorhedus swinhoei*) 是分布於臺灣唯一偶蹄目牛科的大型草食性動物，全身黑褐色，背頸中央一帶為黑色，膝頭為黑色，頰、喉和上頸部為黃褐色，雌雄皆有一對洞角，呈圓錐狀；為臺灣特有種。

有關台灣長鬃山羊的分布，據呂光洋 (1988) 的調查認為在臺灣本島分布範圍仍然相當廣闊，由南到北均有，垂直分布於海拔 1,000m至 3,000m；目前山羊族群大部分以

2,000m 以上之原始林為主，並以中央山脈及海岸山脈未受人類干擾地區為主，但較低海拔地區仍可發現。另依據玉山國家公園 (歐及林 1990)、雪霸國家公園 (李及羅 1994) 及太魯閣國家公園 (呂等 1990) 對該轄區內的台灣長鬃山羊的調查報告均顯示台灣長鬃山羊分布仍然很廣。

台灣長鬃山羊的真正數量並不清楚，但有過度獵捕的壓力，即使在野生動物保育法執行後，仍然有相關執行機關查獲獵捕山羊的案例，尤以臺東及花蓮兩縣較多，故在進行台灣長鬃山羊的保育工作，除了宣導勿獵

捕食用及進行台灣長鬃山羊棲息地保護及經營管理外，建立台灣長鬃山羊之遺傳結構 DNA 序列之資料庫，也是當前重要的工作。此 DNA 序列庫的建立不僅可用來鑑定是否為偷獵捕之台灣長鬃山羊外，更可追蹤其親緣關係及未來應用於復育工作上。

動物細胞內之粒線體 DNA 是一小形 (僅約 16 Kb) 且結構簡單的一雙股封閉的環狀基因，僅存在於細胞質的粒線體內，能夠自行複製，在粒線體內有很高的複製數量，如在老鼠的一細胞內有 5,000-10,000 個粒線體 DNA，並經由母系而遺傳。部分物種粒線體 DNA 的序列已全部被定序出來，如人類 (Anderson *et al.* 1981) 及牛 (Anderson *et al.* 1982)，包含 13 個 protein-coding 基因、2 個 rRNA (12S 及 16S)、22 個 tRNA 基因和一段控制區 (D-loop control region)。

由於粒線體 DNA 於複製過程缺乏修補能力，故於複製過程中發生單一鹼基突變 (point mutation) 及長度突變 (length mutation) 的機率較高，經由長時間的累積而超越其各物種的演化速率，利用檢視粒線體 DNA 內發生突變速率可以算出物種的演化速率 (Wilson *et al.* 1985)，故利用粒線體 DNA 高的演化速率，可用於探討同一物種族群間或族群內之歧異度及各物種間的親緣關係與演化上的關係。

在粒線體 DNA 中，cytochrome b 及 12S rRNA 常用於調查各物種間的演化速率及親緣關係 (Irwin *et al.* 1991; Graybeal 1993; Gemmell and Westerman 1994; Chikuni *et al.* 1995; Nagata *et al.* 1995; Oshida *et al.* 1996; Masuda *et al.* 1996)，故本研究的目的即在建立台灣長鬃山羊之粒線體 DNA 中 cytochrome b 及 12S rRNA 之 DNA 序列，並分析比較個體間差異。

材料與方法

一、樣本的收集

收集來自花蓮、臺東、南投、臺北市立動物園及相關單位的台灣長鬃山羊樣本共 19 隻 (表 1)。

二、DNA 的抽取

取樣本的肌肉研磨後，採用 phenol/chloroform 法抽取細胞核酸 (total DNA)，抽取的細胞 DNA 則以 1.2% 瓊脂膠體 (agarose gel) 電泳檢視並用分光光度計 (Beckman DU640) 定量後，保存於 4°C 下。

三、PCR 核酸引子 (primers)

用來擴增 (amplification) 及定序 (sequencing) 粒線體 DNA 內之 12S rRNA 及 cytochrome b 基因所需的引子序列則採用 Kocher *et al.* (1989) 及 Masuda *et al.* (1996) 的文獻中所設計的。這些引子分為輕股 (light strand) 及重股 (heavy strand)，編號則代表引子的 3' 端在人類粒線體 DNA 內的位置：12S rRNA，L1091 (5' -AATGGATCCAAACTGGATTAGATACCCCACTAT-3') 及 H1478 (5' -TTAAGAATTCGAGGGTGACGGGCGGTGTGT-3')；cytochrome b，L14841 (5' -GCCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3') 及 H15149 (5' -GCCCTCAGAATGATATTGTCCTCA-3')；這些引子劃線部分的核苷酸序列在人類 (human; Anderson *et al.* 1981) 及牛 (bovine; Anderson *et al.* 1982) 具有相同的序列。

四、聚合酶連鎖反應 (PCR)

對 12S rRNA 及 cytochrome b 進行雙股 DNA 擴增與延伸的 PCR 反應所使用的試劑，採用 AmpliTaq Gold reagent kit (Perkin-Elmer)，並依據製造商所提供的說明書操作整個 PCR 反應包括 5 μ l 的 10X PCR buffer，5 μ l 的 25 mM MgCl₂ Solution，各 1 μ l 的 10 mM

表1. 在本研究中台灣長鬃山羊的樣本編號、來源及各樣本cytochrome b、12S rRNA 的單套型

Table 1. Sample numbers and collection localities of the Formosan serow and the haplotypes of their cytochrome b and 12S rRNA

Sample number	Localities	Haplotype	
		cytochrome b	12S rRNA
IM306	臺東利嘉林道	NS1	TA1
IM364	臺東延平地區	NS1	TA3
IM365	臺東延平地區	NS1	TA1
IM315	臺東關山地區	NS1	TA2
IM376	臺東壠坵地區	NS1	TA3
IM377	臺東壠坵地區	NS1	TA3
IM378	未知	NS1	TA3
IM096	花蓮太魯閣地區	NS3	TA1
IM097	花蓮太魯閣地區	NS3	TA1
IM098	未知	NS2	TA2
IM366	花蓮太魯閣地區	NS3	TA1
IM374	花蓮銅門地區	NS4	TA4
IM375	花蓮地區	NS5	TA1
IM121	南投地區	NS6	TA2
IM134	南投地區	NS1	TA3
IM135	南投地區	NS1	TA1
ZM059	臺北市立動物園	NS1	TA1
ZM749	臺北市立動物園	NS2	TA2
ZM750	臺北市立動物園	NS2	TA2

dATP、dCTP、dGTP、dTTP，0.25 μ l AmpliTaq Gold (1.25 unit/reaction)，各5 μ l 的10 μ M的輕重兩股引子，5 μ l 的template DNA (1 μ g)，20.75 μ l 的 ddH₂O，使反應總體積為 50 μ l。

整個PCR的反應使用Perkin-Elmer Thermal Cycler 480，其條件為先在 95°C下加熱 10分鐘後，進行 94°C 1分鐘、55°C 1分鐘、72°C 2分鐘的循環流程，總共完成40次循環，將此 PCR產物以含 0.05%溴化乙錠之3% 瓊脂膠體電泳後在紫外光激發下觀察照相。

五、DNA定序

PCR產物的純化採用 QuickStep PCR Purification Kit (EdgeBioSystems)，所得到的純 PCR產物 DNA利用BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer) 及Perkin-Elmer Thermal Cycler 480進行標定反應，反應後的產物在 ABI 310 DNA自動定序儀定序。

六、DNA序列分析

經由定序完成的資料，採用Lasergene套裝軟體 (Dnastar, Wisconsin 1999) 分析並編輯每一樣本的DNA序列並進行排列 (alignment) 比對，遺傳距離 (sequence genetic distance) 的分析則採用MEGA 電腦程式軟體 1.01版

		40		80
TA1	GCTTAGCCCT	AAACATAAAT	AATTATAAAA	ACAAAATTAT
TA2
TA3T.....
TA4
GTLC.....G.....
BVLC.G..C.T..TA...TTA..
		120		160
TA1	CTTGGCGGTG	CITTATATCC	ATCTAGAGGA	GCCTGTTCTA
TA2G.....
TA3
TA4
GTLC..T.....
BVLT.....A..T.....
		200		240
TA1	TTCAGTCTAT	ATACCGCCAT	CCTCAGCAA	CCCTAAAAAG
TA2
TA3
TA4
GTLA.....T.....
BVLA.....G.AC.....C..A..AA.....
		280		320
TA1	GGTCAAGGTG	TAACCTATGG	AATGGGAAGA	AATGGGCTAC
TA2
TA3
TA4T.....
GTLG.....C..-A.....
BVLA.....C....CAC.A...G...C...GC...TT.....
		360		395
TA1	GAAACTAATG	ACCAAAGGAG	GATTAGCAG	TAAACTAAGA
TA2
TA3
TA4
GTLT...AG.....T.....
BVLC...ATT.....

圖1. 比對台灣長鬃山羊12S rRNA的 395 bp序列的 4種單套型，點狀符號表示與第一個序列(TA1)的 395 bp相同。橫線部分表示無鹼基。以GTL(市售羊肉)及BVL(Anderson *et al.* 1982)的序列當作外群。

Fig. 1. Alignment sequences of the haplotypes of mitochondrial 12S rRNA (395 bp) of the Formosan serow (TA1-TA4), goat meat (GTL) purchased from supermarket, and bovine (BVL) cited from Anderson *et al.* (1982) (dots, nucleotides identical to those in the sequence of TA1; dashes, gaps at nucleotide sites).

(Kimura *et al.* 1993)中的Kimura's two-parameter genetic distance 方法估算，而親緣關係樹的建立同樣採用MEGA程式軟體中neighbor-joining method (Saitou and Nei 1987) 及 unweighted pair-group method with arithmetic mean (UPGMA; Sneath and Sokal 1973)。

結 果

一、12S rRNA 基因的 DNA 序列

分析12S rRNA基因部分的序列共 395 bp (base pair) (不含引子)，得到 4種單套型，分別為**TA1** (IM135、IM365、IM366、IM096、IM097、ZM059、IM375)、**TA2** (IM121、IM315、IM306、IM098、ZM749、ZM750)、**TA3** (IM364、IM134、IM376、IM377、IM378) 及**TA4** (IM374) (表1及圖1)。

利用Kimura's two-parameter genetic distance method 對台灣長鬃山羊的 12S rRNA 中4種單套型的395 bp做遺傳距離的估算，則發現4種單套型間的遺傳距離變異度最小的只有0.3% (1/395 bases)，而最大則為 0.8%

(3/395 bases)。從 12S rRNA的序列比較結果顯示，在台灣長鬃山羊的粒線體中 12S rRNA 部分基因是相當一致的，族群內的遺傳變異並無顯著差異。此外利用市售的羊肉及牛 (Anderson *et al.* 1982) 為外群 (outgroup) 進行比對結果，其差異分別達到 5.6% -5.9% (21-22/395 bases) 及 9.7% -10.0% (35-36/395 bases；表2)。

二、cytochrome b DNA序列

分析這 19隻主要來自臺東、花蓮及南投地區的台灣長鬃山羊 cytochrome b的序列共 307 bp (不含引子)，得到有 6種單套型，分別為**NS1** (IM121、IM134、IM135、IM315、IM306、IM364、IM365、ZM059、IM376、IM377、IM378)、**NS2** (IM749、IM750、IM098)、**NS3** (IM096、IM097、IM366)、**NS4** (IM374)、**NS5** (IM375) 及**NS6**(IM121)。在這 6種單套型的 307 bp中有 6個位置發生鹼基替換，結果如表 1及圖 2。

利用kimura's two-parameter distance method 對台灣長鬃山羊 6種單套型的 307 bp 做遺傳距離的估算，可以發現這 6種單套型

表2. 台灣長鬃山羊的 4種12S rRNA 單套型的Kimura兩參數遺傳距離(右上角部分)及核 苷酸替換數(左下角部分)之比較

Table 2. Kimura's two-parameter genetic distance (%) (above diagonal) and the numbers of nucleotide substitutions (below diagonal) among the haplotypes of 12S rRNA (395 bp) of the Formosan serow (TA1-TA4), goat meat (GTL) purchased from supermarket, and bovine (BVL) cited from Anderson *et al.* (1982)

	TA1	TA2	TA3	TA4	GTL	BVL
TA1		0.5	0.3	0.3	5.6	9.7
TA2	2		0.8	0.8	5.6	9.7
TA3	1	3		0.5	5.9	10.0
TA4	1	3	2		5.9	9.9
GTL	21	21	22	22		9.7
BVL	35	35	36	36	35	

	20	40	70
NS1	CTTCGGCTCC CTCTGGGCA TCTGCTTAAT TCTACAAATC	CTAACAGGCC TATTCTGGC AATACACTAT	
NS2
NS3
NS4
NS5
NS6T.....
JSbC.....A.....
	90	110	140
NS1	ACATCCGACA CAACAACAGC ATTTTCTTCT	GTAACACACA TTTGCCGAGA TGTAAACTAT	GGCTGAATTA
NS2	.T.....
NS3G.....
NS4	T.....G.....
NS5G.....
NS6
JSbC.....C.....
	160	180	210
NS1	TCCGATACAT ACACGCAAAC GGGGCATCAA	TATTCTTTAT CTGCCTATTC ATACACGTAG	GACGAGGCCT
NS2
NS3A.....T.....
NS4
NS5A.....
NS6
JSbT.....G..G.....
	230	250	280
NS1	ATACTATGGA TCGTACACTT TCTTAGAAAC	ATGAAACATC GGAGTAATTC TCCTACTCAC	AACGATAGCC
NS2G.....
NS3T.....
NS4
NS5T.....
NS6
JSbA.....C.....A.....
	300		
NS1	ACAGCATTCA TAGGCTATGT CCTACCG		
NS2		
NS3		
NS4		
NS5		
NS6		
JSbA.....		

圖2. 比對台灣長鬃山羊 cytochrome b 的 307 bp 序列的 6 種單套型，點狀符號表示與第一個序列 (NS1) 的 307 bp 相同。JSb (日本長鬃山羊) 從基因銀行編號 D32191 號得到，用來當外群。

Fig. 2. Alignment sequences of the haplotypes of mitochondrial cytochrome b (307 bp) of the Formosan serow (NS1 - NS6) and the Japanese serow (JSb) (dots, the nucleotides identical to those in the sequence of NS1). The sequence for JSb is got from GenBank accession number D32191.

間 cytochrome b DNA遺傳距離的差異範圍從最小的0.3 % (1/307 bases) , 到最大可達到 2.0 % (6/307 bases) (表3) , 此結果顯示長鬃山羊個體間 cytochrome b的遺傳變異具有差異性。另外我們以日本長鬃山羊為外群, 比較 cytochrome b 的 307 bp, 結果其遺傳距離差異在 3.7 % 至 5.1 % (11-15/307 bases) , 具有明顯差異 (表3) 。

為了解這 19隻台灣長鬃山羊的親緣關係, 我們採用 neighbor-joining 方法及 unweighted pair-group method with arithmetic mean (UPGMA) 方法建立其親緣樹 (phylogenetic tree) , 結果如圖3及圖4。不論使用 neighbor-joining 或 UPGMA的方法均可將這 19隻的長鬃山羊分為A (NS3、NS5) 及B(NS1、NS2、NS6) 兩群, 其中A群的來源均來自花蓮太魯閣地區 (IM096、IM097、IM366 及在花蓮市區查獲的IM375) , 而 B群則均來自臺東地區及南投地區。另外來自花蓮銅門村附近的IM374 (NS4) , 雖然用neighbor-joining 方法時與A群親緣較近 (圖3) , 而用 UPGMA方法時, 則屬於B群 (圖4) 。但經由對 DNA序列進行 1,000次 replications 之

bootstrap test , UPGMA方法於 NS4與 NS1、NS6 間所產生的可信度只有 25 % , 低於50 % 。而用 neighbor-joining 方法於NS4與NS3、NS5 間其可信度則達69 % , 故採用neighbor-joining 方法將NS4 (IM374) 歸於A群。

討 論

由本研究結果得到這 19隻台灣長鬃山羊的粒線體 DNA中部分 12S rRNA (395 bp) 4種單套型的遺傳變異相當小 (0.3 % -0.8 %) , 顯示台灣長鬃山羊族群中粒線體 12S rRNA的序列較為穩定, 不易突變。若拿這段基因與市售火鍋羊肉及於 1982年所發表的牛粒線體 DNA中的同一段 12S rRNA (Anderson *et al.* 1982) 做比較, 台灣長鬃山羊與市售羊肉和牛的差異分別達到 5.6%-5.9% 及 9.7%-10.0% (表2) , 很容易將此兩物種分開, 故利用這段 12S rRNA的基因除了能夠作為不同物種間的親緣關係的建立外, 也可以用於台灣長鬃山羊肉的鑑定, 可作為臺灣查緝盜捕野生動物產製品時一個有利工具。

本研究利用從不同地點得到 19隻台灣長

表3. 台灣長鬃山羊的 6 種 cytochrome b 單套型的Kimura兩參數遺傳距離 (右上角部分) 及 核 苷 酸 替換數 (左下角部分) 之比較

Table 3. Kimura's two-parameter genetic distance (%) (above diagonal) and the numbers of nucleotide substitutions (below diagonal) among the haplotypes of cytochrome b (307 bp) of the Formosan serow (NS1-NS6) and the Japanese serow (JSb)

	NS1	NS2	NS3	NS4	NS5	NS6	JSb
NS1		0.7	1.3	0.7	1.0	0.3	3.7
NS2	2		2.0	1.3	1.7	1.0	4.4
NS3	4	6		1.3	0.3	1.7	5.1
NS4	2	4	4		1.0	1.0	4.4
NS5	3	5	1	3		1.3	4.8
NS6	1	3	5	3	4		4.1
JSb	11	13	15	13	14	12	

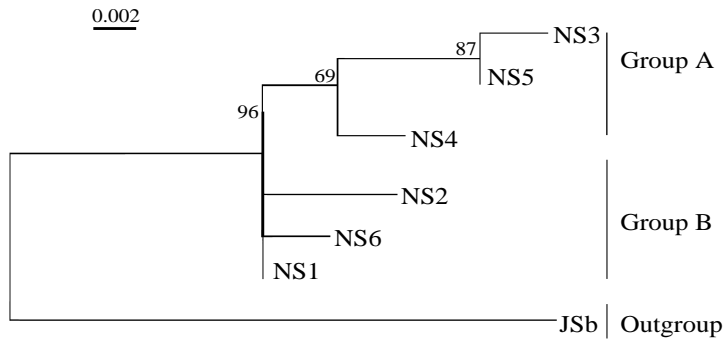


圖3. 利用the neighbor-joining 方法建立6種台灣長鬃山羊粒線體DNA cytochrome b 單套型的親緣樹關係圖，以日本長鬃山羊(JSb)當外群。

Fig. 3. Phylogenetic trees constructed for six haplotypes of mtDNA cytochrome b sequences of the Formosan serow (NS1-NS6), using the neighbor-joining method with Kimura's two-parameter genetic distance and the haplotype of the Japanese serow (JSb) as an outgroup (the bootstrap value derived from 1,000 replications is indicated as a number at each node when the value is >50 %).

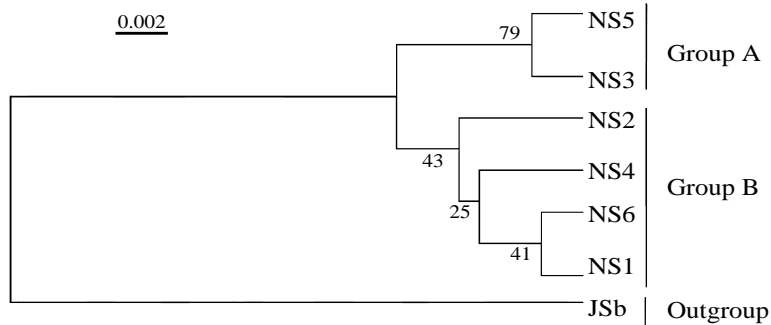


圖4. 利用UPGMA 方法建立6種台灣長鬃山羊粒線體DNA cytochrome b 單套型的親緣樹關係圖，以日本長鬃山羊(JSb)當外群。

Fig. 4. Phylogenetic trees constructed for six haplotypes of mtDNA cytochrome b sequences of the Formosan serow (NS1-NS6) using the UPGMA method with Kimura's two-parameter genetic distance method and the haplotype of the Japanese serow (JSb) as an outgroup (the bootstrap value derived from 1,000 replications is indicated as a number at each node).

鬃山羊樣本(圖5)分析 cytochrome b 中 307 bp 得到 6種單套型，其變異在 0.3 % -2.0 % 之間，由親緣樹關係(圖3及圖4)初步可分為A及B兩群的遺傳變異，在 Tamate *et al.* (1998) 研究日本梅花鹿的 cytochrome b 報告中指出，根據 cytochrome b 的 DNA 序列 (367 bp)

可將日本梅花鹿分成北日本群與南日本群。在我們的研究中也得到與 Tamate *et al.* (1998) 相似的結果。若再分析A、B群之組成則發現A群中的NS3(IM366、IM096、IM097)、NS5(IM375)均來自花蓮太魯閣地區及來自木瓜溪流流域銅門地區的NS4(IM374)，而B群則來自

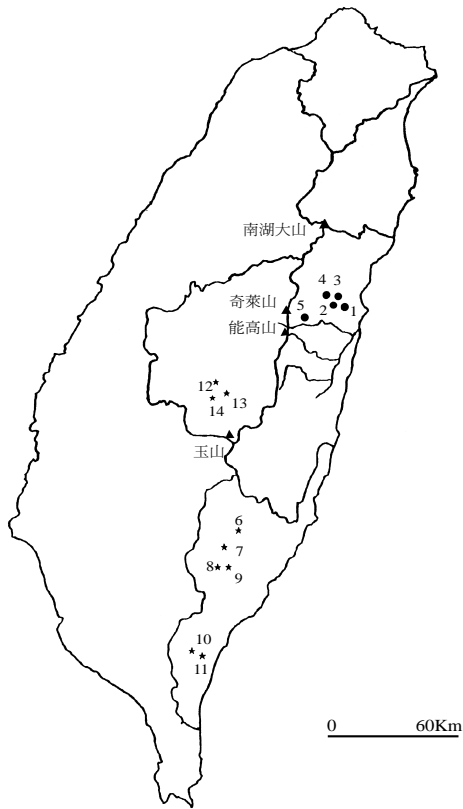


圖5. 本研究其中14隻台灣長鬃山羊來源位置圖。其中編號1.為IM375；2.為IM096；3.為IM097；4.為IM366；5.為IM374；6.為IM315；7.為IM306；8.為IM364；9.為IM365；10.為IM376；11.為IM377；12.-14.分別為IM121、IM134及IM135。

Fig. 5. The map showing the collection localities of 14 Formosan serows used in this study (the locality numbers correspond to those in Table 1 : 1, IM375;2, IM096;3, IM097;4, IM366;5, IM374;6, IM315;7, IM306;8, IM364;9, IM365;10, IM376;11, IM377;12-14, each with IM121,IM134 and IM135, respectively).

臺東及南投地區。故由研究結果推測 A、B兩群間可能存在有地理條件上的阻隔 (biogeographical boundary)，經由地理條件上

的阻隔而造成演化上的差異。最近我們繼續定序這些台灣長鬃山羊粒線體 DNA中演化速率較快且遺傳變異較大的 D-loop，得到更顯著的變異及相同遺傳上的分群 (unpublished data)。

本研究已建立台灣長鬃山羊的粒線體 DNA的 12S rRNA 及 cytochrome b基因的部分序列及多種單套型，顯示台灣長鬃山羊在臺灣的族群具有多樣性，並由分析的結果推測台灣長鬃山羊的族群在臺灣可能受地理條件的阻隔並經演化造成遺傳上的差異而有分群現象，本研究將繼續收集更多樣本並以 D-loop為對象，探討台灣長鬃山羊在臺灣的歷史分布，以作為經營管理或設立保護區的依據。

誌謝

感謝行政院農業委員會特有生物研究保育中心顏主任仁德的支持與幫忙；感謝南投縣政府、臺東縣政府、花蓮縣政府、臺北市立動物園 (ZM059、ZM749、ZM750)、國立自然科學博物館 (IM096、IM097、IM098) 及屏東科技大學野生動物保育學系 (IM374、IM375、IM376、IM377、IM378) 等單位提供之樣本；特別感謝屏東科技大學裴家騏博士、東海大學林良恭博士及客座教授押田龍夫博士所提供之寶貴意見。也感謝林碧如小姐在實驗室的協助與幫忙。

引用文獻

- 呂光洋、黃郁文。1988。台灣長鬃山羊之生態學研究。行政院農業委員會77年生態研究第014號。pp. 49。
- 呂光洋、張巍薩、花炳榮及曹潔如。1990。文山、天祥地區台灣長鬃山羊棲息地環境之調查。太魯閣國家公園印製。

- 呂光洋、邱劍彬、陳宜隆、張巍薩、陳賜隆、林政彥及徐開宇。1989。關山區哺乳類調查及長鬃山羊棲息環境之評估。玉山國家公園印製。
- 歐保羅、林良恭。1990。玉山國家公園東埔區哺乳類動物調查報告(三)。玉山國家公園印製。
- 李玲玲、羅仕治。1994。雪霸國家公園大型哺乳動物族群與習性之研究(武陵地區)。雪霸國家公園印製。
- Anderson, S., A. T. Bankier, B. G. Barrell, M. H. L. de Bruijn, A. T. Coulson, J. Drouin, I. C. Eperon, D. P. Nierlich, B. A. Roe, F. Sanger, P. H. Schreier, A. J. H. Smith, R. Staden, and I. G. Young. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-465.
- Anderson, S., M. H. L. de Bruijn, A. R. Coulson, I. C. Eperon, F. Sanger, and I. G. Young. 1982. Complete sequence of bovine mitochondrial DNA conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *Journal of Molecular Biology* 156: 683-717
- Chikuni, K., Y. Mori, T. Tabata, M. Saito, M. Momma, and M. Kosugiyama. 1995. Molecular phylogeny based on the κ -casein and cytochrome b sequences in the mammalian suborder ruminantia. *Journal of Molecular Evolution* 41: 859-866.
- Gatesy, J., D. Yelon, R. Desalle, and E. S. Vrba. 1992. Phylogeny of the bovidae (artiodactyla, mammalia), based on mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Molecular Biology and Evolution* 9(3): 433-446.
- Gemmell N., and M. Westerman. 1994. Phylogenetic relationships within the class mammalia: A study using mitochondrial 12S RNA sequences. *Journal of Mammalian Evolution* 2(1): 3-23.
- Graybeal, A. 1993. The phylogenetic utility of cytochrome b: Lesson from bufonid frogs. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2(3): 256-269.
- Irwin, D. M., T. Kocher, and A. C. Wilson. 1991. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution* 32: 128-144.
- Kocher, T. D., W. K. Thomas, A. Meyer, S. V. Edwards, S. Paabo, F. X. Villablanca, and A. C. Wilson. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 86: 6196-6200.
- Kumar, S., K. Tamaru, and M. Nei. 1993. MEGA: Molecular Evolution Genetic Analysis. Version 1.01. Pennsylvania State University Park.
- Masuda, R., J. V. Lopez, J. P. Slattery, N. Yuhki, and S. T. O'Brien. 1996. Molecular phylogeny of mitochondrial cytochrome b and 12S rRNA sequences in the felidae: Ocelot and domestic cat lineages. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 6(3): 351-365.
- Nagata, J., R. Masuda, and M. C. Yoshida. 1995. Nucleotide sequences of the cytochrome b and the 12S rRNA genes in the Japanese sika deer *Cervus nippon*. *Journal of Mammalogical Society of Japan* 20(1): 1-8.
- Oshida, T., R. Masuda, and M. C. Yoshida. 1996. Phylogenetic relationships among Japanese species of the Family Sciuridae (mammalia, rodentia), inferred from nucleotide sequences of mitochondrial 12S ribosomal

- RNA genes. *Zoological Science* 13: 615-620.
- Saitou, N., and M. Nei. 1987. The Neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Sneath, P. H., and R. R. Sokal. 1973. *Numerical Taxonomy: The Principle and Practice of Numerical Classification*. W. H. Freeman and Company, San Francisco.
- Tamate, H. B., S. Tatsuzawa, K. Suda, M. Izawa, T. Dot, K. Sunagawa, F. Miyahira, and H. Tado. 1998. Mitochondrial DNA variations in local populations of the Japanese sika deer, *CERVUS NIPPON*. *Journal of Mammalogy*, 79(4): 1396-1403.
- Wilson, A. C., R. L. Cann, S. M. Carr, M. George, U. B. Gyllensten, K. M. Hellm-Bychowski, G. Higuchi, S. R. Palumbi, E. M. Prager, R. D. Sage, and M. Stoneking. 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society* 26: 375-400.

Sequences of the 12S rRNA and the Cytochrome b Genes of the Formosan Serow *Naemorhedus swinhoei*

Dong-Chi Horng¹, Shu-Ya Lai¹, Hsien-Wen Huang¹, Yu-Chuan Liang² and Bor-Rung Ou²

¹Taiwan Endemic Species Research Institute, Chichi, Nantou, Taiwan

²Department of Animal Science, Tunghai University, Taichung, Taiwan

Partial sequences of mitochondrial 12S rRNA (395 bp) and cytochrome b (307 bp) of the Formosan serow *Naemorhedus swinhoei* from 19 different sources were determined by direct sequencing after PCR amplification. Four haplotypes were detected for the 12S rRNA and six for the cytochrome b. Genetic distance divergence between the haplotypes was estimated to be less than 0.8 % for the 12S rRNA and 0.3 % -2.0 % for the cytochrome b. The results indicate that the genetic evolution rate is faster and the nucleotide sequence is more variable for the cytochrome b than for the 12S rRNA. The phylogenetic tree data revealed that the Formosan serow in Taiwan is divided into two geographical populations: one in the Taroko area of Hua-lien and the other in the Taitung area with somewhere as the boundary.

Key words: Formosan serow, mitochondrial DNA, cytochrome b, 12S rRNA

Accepted: September 28, 2000

Received: January 31, 2001