

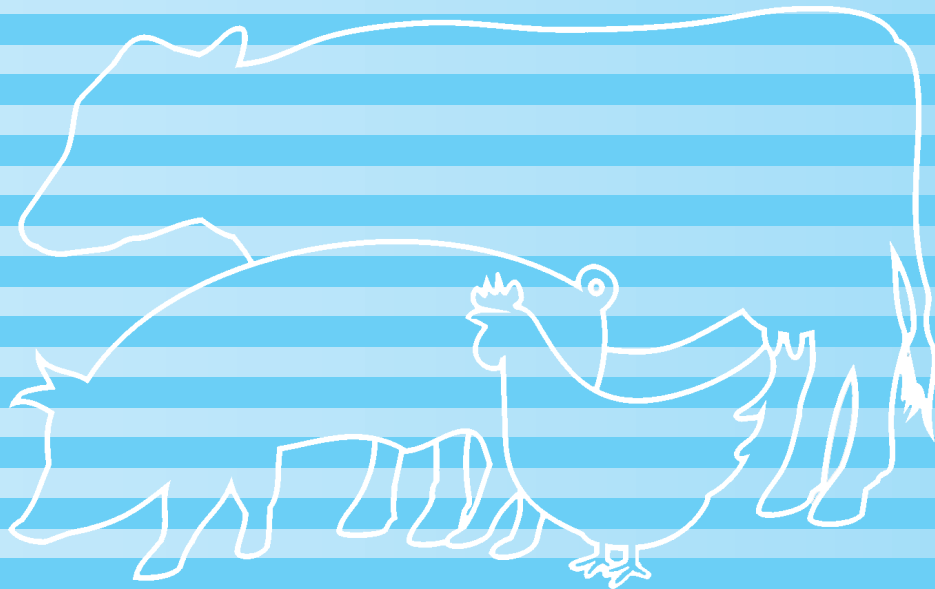
ISSN 0253-9209
DOI: 10.6991/JTLR

畜產研究

第五十七卷 第二期 中華民國一一三年 六月 季 刊

JOURNAL OF TAIWAN LIVESTOCK RESEARCH

Vol. 57 No. 2 June 2024



農業部畜產試驗所

TAIWAN LIVESTOCK RESEARCH INSTITUTE,
MINISTRY OF AGRICULTURE

畜產研究編審委員會

主任委員：黃振芳

審查委員：方珍玲 王佩華 王尚禮 王政騰 王紓愨 王淑音 王勝德 王聖耀
王翰聰 朱有田 朱志成 余 祺 余 碧 吳信志 吳勇初 吳建平
吳錫勳 李固遠 李欣蓉 李姿蓉 李恒夫 李國華 李淵百 李滋泰
沈朋志 周明顯 林正斌 林正鏞 林怡君 林美峰 林義福 林德育
邱智賢 施意敏 洪靖崎 范耕榛 唐品琦 徐濟泰 張世融 張仲彰
張秀鑾 張啟聖 梁筱梅 章嘉潔 莊士德 許振忠 許晉賓 郭彥甫
郭卿雲 郭猛德 陳文賢 陳立人 陳志峰 陳志銘 陳怡兆 陳明汝
陳洵一 陳秋麟 陳嘉昇 陳億乘 黃大駿 黃永芬 黃英豪 楊國泰
楊深玄 楊鎮榮 萬一怒 萬添春 廖御靜 劉秀洲 劉振發 練慶儀
鄭永祥 鄭裕信 蕭振文 魏良原 譚發瑞 蘇天明 蘇忠楨
(以姓名筆劃為序)

編輯委員：李欣蓉 林德育 洪哲明 洪靖崎 張世融 郭卿雲 陳翠妙 廖御靜
(以姓名筆劃為序)

JOURNAL OF TAIWAN LIVESTOCK RESEARCH

J. F. HUANG, EDITOR-IN-CHIEF,
DIRECTOR GENERAL,
TAIWAN LIVESTOCK RESEARCH INSTITUTE, MINISTRY OF AGRICULTURE
HSINHUA, TAINAN, TAIWAN

EDITORIAL ADVISORY BOARD:

C. L. FANG	P. H. WANG	S. L. WANG	C. T. WANG	S. M. WANG
S. Y. WANG	S. D. WANG	S. Y. WANG	H. C. WANG	Y. T. JU
C. C. CHU	C. YU	P. YU	H. C. WU	Y. C. WU
C. P. WU	H. H. WU	G. Y. LEE	S. S. LEE	T. R. LEE
H. F. LEE	K. H. LEE	Y. P. LEE	T. T. LEE	P. C. SHEN
M. H. CHOU	J. B. LIN	C. Y. LIN	Y. C. LIN	M. F. LIN
Y. F. LIN	D. Y. LIN	C. H. CHIU	Y. M. SHY	C. C. HUNG
G. J. FAN	P. C. TANG	C. T. HSU	S. R. CHANG	S. C. CHANG
H. L. CHANG	C. S. CHANG	H. M. LIANG	C. C. CHANG	S. T. CHUANG
C. C. HSU	C. B. HSU	Y. F. KUO	C. Y. KUO	M. D. KUO
W. S. CHEN	L. R. CHEN	C. F. CHEN	C. M. CHEN	Y. C. CHEN
M. J. CHEN	H. I. CHEN	T. L. CHEN	C. S. CHEN	Y. C. CHEN
D. J. HUANG	Y. F. HUANG	I. H. HWANG	G. T. YANG	S. S. YANG
J. R. YANG	Y. N. WAN	T. C. WAN	Y. J. LIAO	H. C. LIU
J. F. LIU	C. Y. LIEN	Y. H. CHENG	Y. S. CHENG	J. W. SHIAU
L. Y. WEI	F. J. TANG	T. M. SU	J. J. SU	

EDITORS:

S. S. LEE	D. Y. LIN	C. M. HUNG	C. C. HUNG	S. R. CHANG
C. Y. KUO	T. M. CHEN	Y. J. LIAO		



畜產研究

編者：農業部畜產試驗所
發行人：黃振芳
發行所：農業部畜產試驗所
地址：臺南市新化區牧場 112 號
電話：(06) 5911211
網址：www.tlri.gov.tw
編輯\印製者：和峰設計
電話：(06) 2089225
出版日期：中華民國 113 年 6 月出版
定價：新台幣 200 元

展售處：

國家書店松江門市：臺北市中山區松江路 209 號 1 樓

五南文化廣場：臺中市北屯區軍福 7 路 600 號

國家網路書店：www.govbook.com.tw

GPN : 2005200015

ISSN : 0253-9209

DOI : 10.6991/JTLR

畜產研究

第 57 卷第 2 期

中華民國 113 年 6 月

目 錄

	頁
1. 牡臺灣梅花鹿生殖性狀之季節性變化林信宏、郭廷雍、康獻仁、張伸彰、楊鎮榮	75
2. 花蓮地區臺灣水牛之生理值、血液學與血液生化學於涼熱季之調查結果陳沛君、莊璧華、魏良原	82
3. 豬隻產仔性狀候選標記 miR-27a 分析法之改進廖仁寶、王思雅、盧昱誼、陳若菁、賴永裕、劉桂柱、程梅萍	91
4. 番鴨誘導多能性幹細胞株之建立與水禽小病毒感染測試劉振發、張家語、曲鳳翔、陳立人	98
5. 以人工戳孔模擬破損探討半乾青貯膠膜包的保存問題王紓愨、陳嘉昇	107
6. 餵飼不同芻料對荷蘭種泌乳末期牛隻瘤胃微生物及乳成分之影響王思涵、廖曉涵、李佳馨、陳小明、蕭振文	114
7. 氣候變遷下乳牛產業面臨的熱平衡管理挑戰-回顧性研究李佳蓉、林怡君	124
8. 雞熱休克蛋白70基因點突變檢測技術開發與基因型分析朱家德、賴永裕、鄧學極、劉宗霖、吳明哲、張秀鑾、林德育	142

牡臺灣梅花鹿生殖性狀之季節性變化⁽¹⁾

林信宏⁽²⁾ 郭廷雍⁽³⁾ 康獻仁⁽²⁾ 張仲彰⁽²⁾ 楊鎮榮⁽³⁾⁽⁴⁾

收件日期：112 年 4 月 19 日；接受日期：112 年 10 月 13 日

摘 要

本研究目的係評估牡臺灣梅花鹿血液生殖內分泌素、陰囊周長與精液性狀等生殖性狀之季節性變化，以提高優良種鹿繁殖效率。試驗選用健康、性成熟牡臺灣梅花鹿 5 頭，每月以電激方式採集精液樣本與頸靜脈採血 1 次，結果顯示，牡臺灣梅花鹿血清中睪固酮濃度於 11 月時達到最高值 10.3 ± 4.8 ng/mL，且 10-11 月間之濃度顯著高於 3-7 月間 ($P < 0.05$)；雌素二醇濃度於 4 月時達到最高值 393.8 ± 42.1 pg/mL，且 2-6 月間之濃度顯著高於 10-12 月間 ($P < 0.05$)；陰囊周長於 9-11 月達到整年度較大之平均值，且顯著大於 3-7 月之周長平均值 ($P < 0.05$)；統計 1-9 月與 9-12 月間精液性狀之平均數據為精液量 0.3 ± 0.2 mL、精子活力 4.0 ± 1.2 、精液濃度 $17.5 \pm 6.9 \times 10^8$ 精子數/mL、精子畸形率 $12.9 \pm 5.1\%$ 、精子存活率 $76.3 \pm 19.3\%$ 、睪丸周長 20.3 ± 1.2 cm 與 pH 值 7.2 ± 0.4 。依據結果，牡臺灣梅花鹿血清中睪固酮濃度與陰囊周長呈季節性變化，且僅能於繁殖季節採集到精液，研究結果可以做為牡臺灣梅花鹿繁殖之參考。

關鍵詞：臺灣梅花鹿 (Formosan sika deer)、生殖性狀 (Reproductive performances)、精液 (Semen)。

緒 言

鹿科動物在偶蹄目動物裡屬於一個高多樣性的族群，目前所知約有 40 個物種和 200 個亞種以上，體型範圍差距甚大，從體重達 700 公斤的阿拉斯加駝鹿 (Alaskan mooses)，到體重僅 9 公斤的南美洲的北方普度鹿 (Northern Pudu) 都有。因此，並無典型代表之鹿科族群，這也反應在繁殖生理差異，有些鹿種呈現高度季節性繁殖模式；在赤道地區的鹿種則呈現非季節性。回顧鹿科繁殖技術的發展，資訊有限且只能用在少數物種上 (Asher *et al.*, 2000)。臺灣梅花鹿 (Formosan sika deer; *Cervus nippon taiouanus*) 為臺灣特有亞種，屬短日照季節性繁殖，且季節性繁殖極為明顯，季節性生殖活動主要是受光照調節，當日照由長變短時啟動繁殖活動，區域性光照影響可自 10 月至隔年 2 月，但主要配種行為集中在 11 至 12 月，成年個體於秋季至隔年春季發情配種，動情週期為 19.3 ± 1.8 天 (Liu *et al.*, 2002)，母鹿在隔年春夏之交際分娩，公鹿則於立春時解角長茸；然而，同樣屬於鹿科 (Cervidae) 之臺灣山羌 (Formosan Reeves' Muntjac; *Muntiacus reevesi micrurus*) 卻無明顯之季節性變化 (鄭, 2006)。其他如馬來西亞水鹿 (Malaysia sambar deer; *Cervus unicolor brookei*) 是非季節性繁殖動物，繁殖高峰期為二月 (Dahlan and Dawend, 2013)。不同鹿種之繁殖特性及模式除受緯度及環境溫度影響外，亦受地形環境、食物種類及供應情況而有所不同，其主控因子乃在鹿群飼養緯度之日照長短所致 (Jackson *et al.*, 1989)。在日本的野生梅花鹿因採食人類種植的農作物，提升年輕鹿隻體型並促進生殖性能早熟 (Hata *et al.*, 2021)。溫帶地區鹿種如美國馬鹿 (American elk; *Crerus canadensis*)，其配種行為發生的時間，則明顯受緯度高低影響，緯度高者其配種季節愈早，但其配種季節之持續時間則愈短 (Suzuki, 1993)。

然而，生性敏感不易操作的臺灣梅花鹿於繁殖上亦面臨晚熟、單胎、發情徵候不易觀察、發情週期不規則及產仔間距長等問題。迄今針對臺灣梅花鹿生殖功能評估之研究甚少，爰本研究的目的在於評估整年度牡臺灣梅花鹿之血液生殖內分泌素、陰囊周長及精液性狀等生殖性狀之季節性變化，建立茸角週期生殖性狀做為種鹿飼養管理、繁殖管理、精液保存及人工授精時之參考，藉以提高優良種鹿之繁殖效率。

(1) 農業部畜產試驗所研究報告第 2767 號。

(2) 農業部畜產試驗所南區分所。

(3) 農業部畜產試驗所遺傳生理組。

(4) 通訊作者，E-mail: jryang@mail.tlri.gov.tw

材料與方法

I. 試驗動物與試驗處理

選用飼養於南區分所屏東場區之健康且性成熟之牡臺灣梅花鹿 5 頭，試驗進行遵照高雄種畜繁殖場實驗動物照護及使用委員會 (Institutional Animal Care and Use Committee) 審定之規定 (KAPS IACUC, No. 110-16)，採個別任食飼養，每日提供盤固草乾草、玉米青貯及苜蓿草塊等粗料與清潔飲水，另每頭鹿隻每日補充 500 g 精料。試驗於 1 月至 12 月進行，參試公鹿自 1 月開始每隔 1 個月進行電激採精與頸靜脈採血 1 次，連續採集 12 個月，以分析公鹿茸角週期之血清睪固酮 (testosterone) 與雌素二醇 (estradiol) 濃度變化。電激採精時量測陰囊周長值，採集之精液則進行精液性狀評估。

II. 精液採集

牡臺灣梅花鹿於採血採精進行前 24 小時先予斷水斷食，採精時以 10% 安耐寧 S (Balanzine; Xylazine 10%, 100 mg/mL, 臺灣) 與舒泰 50 (Zoletil 50; Tiletamine base, 25 mg/mL and Zolazepam base, 25 mg/mL, France)，以 1:2 比例混合之麻醉劑每頭肌肉注射 3 mL，同時每頭肌肉注射 1 mL 阿托品 (Atropine; 1 mg/mL, 臺灣)。鎮靜保定後自頸靜脈採血，再以電激採精器 (Electroejaculator, EJ6CCGS, CGS Products PtyLtd., Australia) 進行電激採精牡鹿精液，待精液流出後以 15 mL 之離心管收集精液樣本，供精液性狀分析及後續試驗使用。

III. 統計分析精液性狀評估

新鮮精液進行下列各性狀評估。

- (i) 精液量 (semen volume)：公鹿所採集之精液原液以微量吸管進行精液量定量。
- (ii) 精子活力 (sperm motility)：各公鹿之精液樣品於採集 5 分鐘內，置於光學顯微鏡 (Nikon SE) 下，以懸滴六級計分法 (0-5) 判斷活力 (吳等, 2002)。
- (iii) 精液濃度 (semen concentration)：各公鹿精液樣本以 3% 生理食鹽水 (saline) 溶液稀釋 200 倍後，再以血球計數板置於正立顯微鏡下計算之。
- (v) 異常形態 (abnormal morphology)：利用苯胺黑 - 伊紅 (nigrosin-eosin, NE) 染色後，隨即使用顯微鏡予以評估 (Ax *et al.*, 2000)。異常形態精子可分為 3 種：1. 第一型形態異常 (primary abnormal morphology)：包括頭部與頭帽異常者；2. 第二型形態異常 (secondary abnormal morphology)：中部含有原生質滴者；3. 第三型形態異常 (tertiary abnormal morphology)：尾部具缺陷者。
- (vi) 精子存活率 (sperm viability)：利用苯胺黑 - 伊紅 (nigrosin-eosin, NE) 染色法評估，即將 5 μ L 原精液與 10 μ L NE 染色劑混合後做成抹片，並置於 37°C 30 秒使抹片儘速乾燥，再置於螢光顯微鏡下觀察，其中呈現紅色或粉紅色者表示為死亡之精子，評估至少 5 個視野內之精子以計算存活率。
- (vi) 睪丸周長 (或稱陰囊周長, scrotal circumference)：使用陰囊量尺 (Scrotal Tape Metric, Neogen, USA) 同時套住兩顆睪丸外圍之最大外徑後讀取數值。
- (vii) pH 值：以 pH meter (Sartorius, PT10 Portable Meter, Germany) 直接測量所採集精液之 pH 值。

IV. 血樣測定

採得血樣經短暫冷藏靜置後，於 5°C 下、以 1500 x g 離心 30 分鐘，以分離血清。分離後，血清分裝貯存於 -20°C 下，以備分析之用。血清睪固酮與雌素二醇濃度之分析採用酵素免疫分析法測定之 (睪固酮：Lot 640，雌素二醇：Lot 606，Immulite 2000 XPi, Siemens, USA)。

V. 血樣測定

試驗資料以統計分析系統 (Statistical Analysis System, SAS, 2005) 套裝軟體進行統計分析，使用一般線性模式程序 (General Linear Model Procedure, GLM) 進行變方分析，再以最小平方均值 (Least Squares Means; LSM) 檢定相互間差異顯著性。

結果與討論

I. 睪固酮、雌素二醇與陰囊週長變化：

試驗結果顯示，牡臺灣梅花鹿之睪固酮平均濃度以 5 月時之 0.4 ± 0.1 ng/mL 為整年度最低值，之後逐漸上升至 11

月達到整年度最高值之 10.3 ± 4.8 ng/mL，且 10-11 月平均濃度顯著高於 3-7 月 ($P < 0.05$) (圖 1)。雌素二醇整年度最低值月份為 11 月之 147.6 ± 35.4 pg/mL，最高值為四月之 393.8 ± 42.1 pg/mL，且 2-6 月平均含量顯著高於 10-12 月 ($P < 0.05$) (圖 2)。血液中之睪固酮濃度於 10-11 月份間均呈現較穩定之高值；但 11 月時之雌素二醇則呈現整年度之最低值，雌素二醇濃度達最高值為四月份之解角期。陰囊周長於 9-11 月達到整年度明顯較大之周長值，分別為 20.7 ± 0.4 、 20.9 ± 0.3 與 20.4 ± 0.4 ，此時期也正好是睪固酮整年度較高時期；3-7 月則呈現明顯之較小周長值，分別為 16.7 ± 0.4 、 15.2 ± 0.6 、 14.6 ± 0.3 、 14.2 ± 0.2 與 15.5 ± 0.2 cm ($P < 0.05$) (圖 3)

睪固酮為雄性最重要的生殖內分泌素之一，試驗結果顯示 3-7 月間之平均濃度均不超過 1.3 ng/mL，至 8-9 月所有鹿隻之血清睪固酮濃度開始上升，於 10-11 月達到最高值，平均濃度超過 10 ng/mL，此後所有鹿隻之睪固酮均迅速下降 (圖 1)。加拿大地區之馬鹿 (Wapiti, American elk)，牡鹿之血液中睪固酮濃度於秋季時快速上升，4-5 週後睪固酮濃度達到最高值 (27 ng/mL) (Haigh *et al.*, 1984)。於南半球之黴鹿 (Fallow deer; *Dama dama*)，其血清中睪固酮濃度於夏季中開始上升，平均睪固酮濃度於 10-11 月最低 (< 1.0 ng/mL)，次年的 4 月中旬可達最大值 (> 12.0 ng/mL)，配種期結束後，睪固酮濃度會迅速下降，於 11 月會達到最低值 (< 1.0 ng/mL)，並以解角日為最低 (< 0.3 ng/mL) (Asher *et al.*, 1987)。一般溫帶鹿科動物，於茸角期間無法收集到含精子之精液樣本，係因此時期血液中睪固酮之濃度最低，睪固酮濃度高低，將影響輔性腺之功能。溫帶地區鹿種之精液量具有季節性變化，可能受季節光照影響，以致輔性腺功能下降，精液量最低時，均發生在睪丸組織退化之時間，可能原因為輔性腺之功能主要受睪固酮濃度高低所影響，當血液睪固酮濃度最低時，無法順利取得精液，即睪固酮濃度高低，將影響輔性腺之活性。

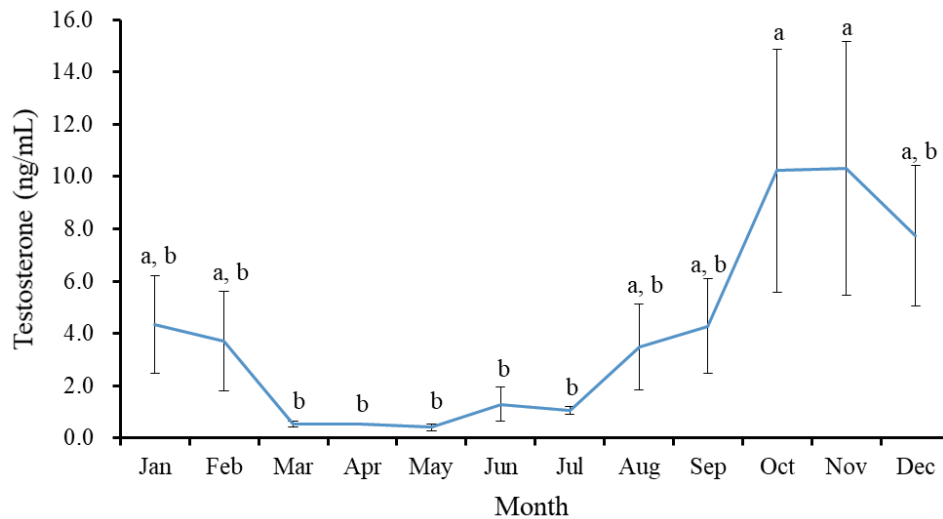


圖 1. 不同月份牡臺灣梅花鹿血液睪固酮變化。

Fig. 1. Changes of testosterone concentration of Formosan sika stag in different months.

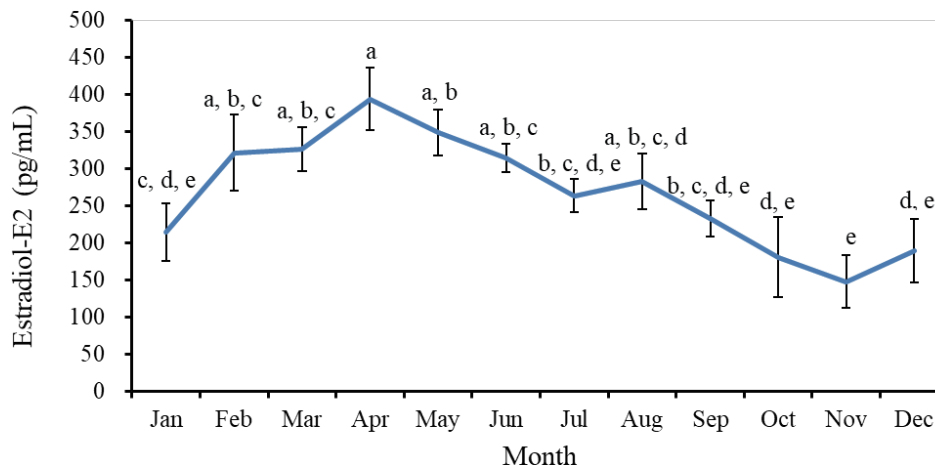


圖 2. 不同月份牡臺灣梅花鹿血液雌素二醇變化。

Fig. 2. Changes of estradiol concentration of Formosan sika stag in different months.

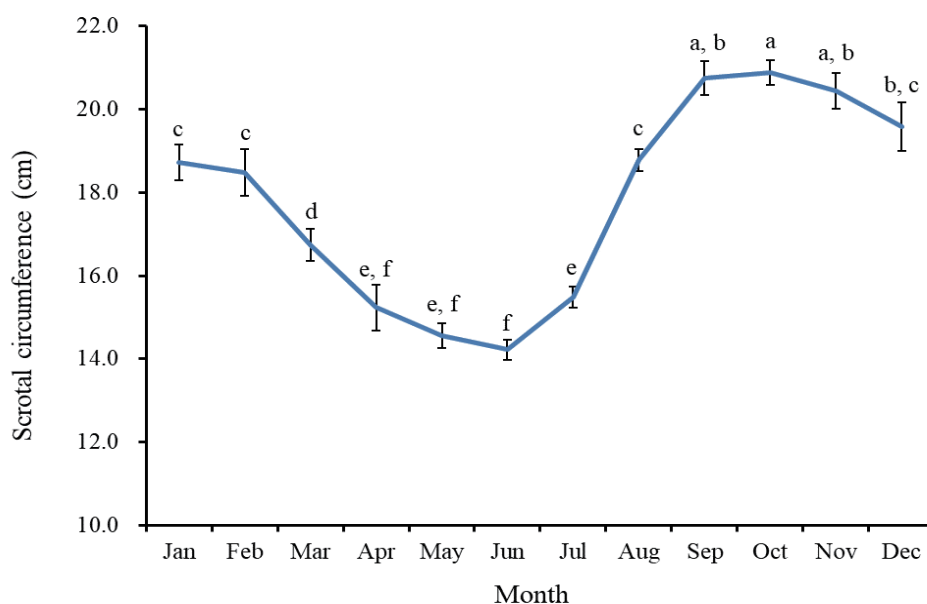


圖 3. 不同月份牡臺灣梅花鹿陰囊周長變化。

Fig. 3. Changes of scrotal circumference of Formosan sika stag in different months.

II. 液性狀評估：

應用電激採精法進行牡臺灣梅花鹿精液採集，所有牡梅花鹿在 3-8 月期間，皆未被採得精液，但於 1-2 月與 9-12 月期間會因個體差異影響採得精液。由表 1 結果顯示，統計 1-2 月與 9-12 月間 5 頭性成熟牡梅花鹿精液之各性狀平均數據為精液量 0.3 ± 0.2 mL、精子活力 4.0 ± 1.2 、精子濃度 $17.5 \pm 6.9 \times 10^8$ 精子數/mL、精子畸形率 $12.9 \pm 5.1\%$ 、精子存活率 $76.3 \pm 19.3\%$ 、睪丸周長 20.3 ± 1.2 cm 與 pH 值 7.2 ± 0.4 ；僅有一頭個體 (ID 04Q-0003) 之活力指數 (2.5 ± 1.2) 與存活率 ($49.5 \pm 24.6\%$) 皆低於其他個體，這說明公鹿個體間之精液品質具極大之差異性，相同之論述於王 (2003) 針對臺灣水鹿精液品質之研究中被證實。本研究所採集 5 頭公鹿之各項精液性狀中，其中 4 頭之冷凍精液製作重要指標如精子活力與存活率均甚佳；且鄭 (2006) 之研究亦顯示以電激採精法取得之臺灣山羊精液量及精子活力與濃度均顯著優於利用假陰道採精法者。因此，利用電激採精法採取梅花鹿精液為可行之策，且所得精液將可應用於後續試驗。大部分鹿隻的精液採集方式是麻醉或鎮靜後使用電激採精 (Asher *et al.*, 1993)。儘管使用麻醉對於供採精鹿隻仍有風險，但相較使用自然交配收集精液的方式，電激採精對操作者更為安全，且比起假陰道採精只能適用於少數受過訓練的動物，此方式可以用在鹿隻且更省時。

表 1. 牡臺灣梅花鹿於 1-2 月與 9-12 月之精液性狀 (Mean \pm SEM)

Table 1. The semen traits of individual Formosan sika stag (Mean \pm SEM)

Items	ID of individuals					Mean \pm SEM
	525	529	Q-09	04Q-0001	04Q-0003	
Month of semen Collection	Sep.- Feb.	Sep.- Nov.	Sep. - Nov.	Sep.- Feb.	Sep. - Dec.	
Number of semen Collection	6	3	3	6	4	
Semen volume (mL)	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.5 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.2
Sperm motility (0-5)	3.8 ± 1.1	4.7 ± 0.5	4.3 ± 1.1	4.5 ± 0.8	2.5 ± 1.2	4.0 ± 1.2
Semen concentration ($\times 10^8$ /mL)	18.9 ± 6.8	17.3 ± 10.2	15.6 ± 5.3	18.7 ± 8.1	15.4 ± 6.2	17.5 ± 6.9
Abnormal morphology (%)	10.0 ± 3.7	10.2 ± 1.2	15.5 ± 9.5	14.3 ± 5.4	15.3 ± 2.6	12.9 ± 5.1
Sperm viability (%)	80.0 ± 13.6	84.5 ± 3.9	74.8 ± 21.1	87.0 ± 8.1	49.5 ± 24.6	76.3 ± 19.3
Scrotal circumference (cm)	21.0 ± 0.8	21.0 ± 0.4	21.2 ± 0.3	19.3 ± 11.1	19.4 ± 1.0	20.3 ± 1.2
pH	7.2 ± 0.3	7.4 ± 0.3	7.0 ± 0.2	7.3 ± 0.5	7.0 ± 0.2	7.2 ± 0.4

溫帶地區鹿種因當地特有的光照週期而表現出高度季節性繁殖模式 (Lincoln, 1985)，這對於採集精液及人工授精應用這兩方面都構成了重大的限制，例如紅鹿和黓鹿此類的雄性鹿種睪丸大小與功能，呈現生殖期和不育期交替現象與戲劇性變化 (Asher *et al.*, 1987, 1996)，此現象反應於季節性變化的精液特徵，在春夏季鹿茸時期精液完全沒有精子，從而發生精子生成缺乏症，嚴重限制採集精液的機會，通常必須在秋季發情後立刻採精，或於繁殖季節中進行收集，然而這段期間牡鹿具強烈攻擊性，易對操作者形成安全疑慮。此外，季節性繁殖的進一步限制是人工授精時機與最佳化受孕率有關，溫帶雌性物種在春季和夏季出現明顯的乏情期，且到秋天開始發情前，普遍對發情同期化處理不會有排卵反應 (Morrow *et al.*, 1992)。因此，大部分的人工授精只得在發情中或後期執行 (Asher *et al.*, 1993)。Lincoln and Short (1980) 指出季節繁殖週期的產生，是溫帶與北極鹿種受到光照改變，進而影響其內源性機制誘導作用，大多數鹿種開始交配的行為在日光逐漸減少的夏末與秋季即為如此。

綜合前述結果，顯示牡臺灣梅花鹿血清睪固酮濃度與陰囊周長之季節性變化具有一致性，在睪固酮濃度下降至最低後解角長茸，8 月開始上升後硬角，且可應用電激採精法於繁殖季節採集到精液。

參考文獻

- 王俊強。2003。牡臺灣水鹿生殖功能之一年內變化與精液之冷凍保存。東海大學畜產學系，碩士論文。
- 吳瑞得、董光中、馮翰鵬、郭財榮、蔡沛學、鄭豐邦。2002。畜養牡臺灣梅花鹿及牡臺灣水鹿之生殖性狀分析：以直腸電激採精法進行精液性狀評估。臺灣獸醫誌 28：204-210。
- 鄭鈞尹。2006。臺灣山羌之睪丸活動性與茸角週期之研究。屏東科技大學畜產學系。碩士論文。
- Ax, R. L., M. Dally, B. A. Didion, R. W. Lenz, C. C. Love, D. D. Varner, B. Hafez, and M. E. Bellin. 2000. Semen evaluation. pp. 365-375. In: *Reproduction in farm animals*. Hafez, E. S. E. and B. Hafez (eds.) Lippincott Williams & Wilkins, South Carolina, USA.
- Asher, G. W., D. K. Berg, and G. Evans. 2000. Storage of semen and artificial insemination in deer. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 195-211.
- Asher, G. W., D. K. Berg, S. Beaumont, C. J. Morrow, K. T. O'Neill, and M. W. Fisher. 1996. Comparison of seasonal changes in reproduction parameters of adult male European fallow deer (*Dama dama*) and hybrid Mesopotamian \times European fallow deer (*D. d. mesopotamica* \times *D. d. dama*). *Anim. Reprod. Sci.* 45: 201-215.
- Asher, G. W., M. W. Fisher, P. F. Fennessy, C. G. Mackintosh, H. N. Jabbour, and C. J. Morrow. 1993. Oestrous synchronization, semen collection and artificial insemination of farmed red deer (*Cervus elaphus*) and fallow deer (*Dama dama*). *Anim. Reprod. Sci.* 33: 241-265.
- Asher, G. W., A. M. Day, and G. K. Barrell. 1987. Annual cycle of liveweight and reproduction changes of farmed male fallow deer (*Dama dama*) and the effect of daily oral administration of melatonin in summer on the attainment of seasonal fertility. *J. Reprod. Fertil.* 79: 353-362.
- Dahlan, L., and J. Dawend. 2013. Growth and reproductive performance of sambar deer in Sabal Forest Reserve of Sarawak, Malaysia. *Trop. Anim. Health Prod.* 45: 1469-1476.
- Haigh, J. C., W. F. Cates, G. J. Glover, and N. C. Rawlings. 1984. Relationships between seasonal changes in serum testosterone concentrations, scrotal circumference and sperm morphology of male wapiti (*Cervus elaphus*). *J. Reprod. Fertil.* 70: 413-418.
- Hata, A., R. Nakashita, T. Anezaki, M. Minami, Y. Fukue, N. Higuchi, H. Uno, Y. Nakajima, M. Saeki, C. Kozakai, and M. B. Takada. 2021. Agricultural crop consumption induces precocious maturity in deer by improving physical and reproductive performance. *Ecosphere* 12: 1-13.
- Jackson, G. L., H. T. Jansen, D. E. Kuehl, and R. D. Shanks. 1989. Time of the sidereal affects responsiveness to the phase-resetting effects of photoperiod in the ewe. *J. Reprod. Fertil.* 85: 221-227.
- Liu, B. T., S. P. Cheng, M. C. Huang, and Y. L. Yu. 2002. Serum progesterone changes in luteal cyclicity and duration of estrous cycle in Formosan sika deer (*Cervus nippon taiouanus*). *Zool. Sci.* 19: 1033-1037.
- Lincoln, G. A. 1985. Seasonal breeding in deer. In: Fennessy, P. F., Drew, K. R. (Eds.), *The Biology of Deer Production*. Bulletin No. 22, Royal Society of New Zealand, Wellington, pp. 165-179.
- Lincoln, G. A., and Short, R. V. 1980. Seasonal breeding: nature's contraceptive. *Recent Prog. Horm. Res.* 36: 1-52.
- Morrow, C. J., G. W. Asher, J. F. Smith, H. N. Jabbour, R. C. Mulley, and L. M. McLeay. 1992. Seasonal effects on the efficacy of intravaginal CIDR devices for oestrous synchronization of farmed fallow deer (*Dama dama*). *Proc. N. Z.*

Soc. Anim. Prod. 52: 165-169.

SAS Institute. 2005. SAS/STAT Guide for personal computers. Ver. 9.1. SAS Institute Inc., Cary, NC.

Suzuki, M. 1993. Reproductive characteristics and morphology of accessory corpora lutea in sika deer in Hokkaido. In *Deer of China* (eds.) N. Ohtaishi, and H. I. Sheng, pp. 356-363. Elsevier Science Publishers. BV, Netherlands.

Effects of the seasonal changes in reproductive performances of Formosan sika stag ⁽¹⁾

Hsin-Hung Lin ⁽²⁾ Ting-Yung Kuo ⁽³⁾ Shann-Ren Kang ⁽²⁾ Shen-Chang Chang ⁽²⁾
and Jenn-Rong Yang ⁽³⁾⁽⁴⁾

Received: Apr. 19, 2023; Accepted: Oct. 13, 2023

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the seasonal changes of reproductive performances including reproductive endocrine, scrotal circumference, semen traits, and to improve the reproductive efficiency of elite breeds of Formosan sika stag. Five healthy and sexually matured males of Formosan sika stag selected for the experiment. The semen samples collected by electric stimulation and jugular vein blood sampling once a month. The results showed that the highest testosterone concentration was 10.3 ± 4.8 ng/mL at Nov., and the value from Oct. to Nov. significantly higher than Mar. to Jul. ($P < 0.05$). The highest estradiol concentration was 393.8 ± 42.1 pg/mL at Apr., and the value from Feb. to Jun. significantly higher than Oct. to Dec. ($P < 0.05$). The scrotal circumference reached the largest average value from Sep. to Nov. in the whole year, and significantly greater than Mar. to Jul. ($P < 0.05$). The average data of semen properties from Sep. to Feb. were that the semen volume 0.3 ± 0.2 mL, sperm motility 4.0 ± 1.2 , semen concentration $17.5 \pm 6.9 \times 10^8$ sperm/mL, abnormal morphology $12.9 \pm 5.1\%$, sperm viability $76.3 \pm 19.3\%$, scrotal circumference 20.3 ± 1.2 cm and pH 7.2 ± 0.4 . In conclusion, the reproductive endocrine concentration and scrotal circumference were consistent with seasonal changes, and the semen could be collected during the breeding season only in Formosan sika stag. According to the results, these can be used as a reference for Formosan sika stag breeding.

Key Words : Formosan sika stag, Reproductive performances, Semen.

(1) Contribution No. 2767 from Taiwan Livestock Research Institute (TLRI), Ministry of Agriculture (MOA).

(2) Southern Region Branch, MOA-TLRI, Pingtung 94644, Taiwan, R. O. C.

(3) Genetics and Physiology Division, MOA-TLRI, HsinHua, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(4) Corresponding author, E-mail: jryang@mail.tlri.gov.tw

花蓮地區臺灣水牛之生理值、血液學與血液生化學 於涼熱季之調查結果⁽¹⁾

陳沛君⁽²⁾ 莊璧華⁽²⁾ 魏良原⁽²⁾⁽³⁾

收件日期：112 年 7 月 24 日；接受日期：112 年 10 月 20 日

摘 要

本試驗調查 2020 年至 2021 年花蓮地區涼季（1 至 2 月）及熱季（6 至 8 月）環境溫、溼度對臺灣水牛（*Bubalus bubalis*）（沼澤型）的生理數值、血液學及血液生化值的影響，供後續研究參考。結果顯示，水牛舍外環境溫濕度指數（temperature-humidity index, THI）於熱季平均為 80.66 ± 3.56 ，涼季平均為 64.17 ± 5.46 ，水牛之呼吸速率及直腸溫度於涼、熱季分別為 20.24 ± 4.63 次 / 分鐘、 $38.36 \pm 0.55^\circ\text{C}$ 及 30.58 ± 10.42 次 / 分鐘、 $38.50 \pm 0.56^\circ\text{C}$ ，於涼、熱季間差異顯著（ $P < 0.05$ ）。血液學檢測結果以紅血球、淋巴球、嗜酸性球、嗜鹼性球於涼季之數值顯著高於熱季（ $P < 0.05$ ）；平均紅血球血紅素量、平均紅血球血紅素濃度及嗜中性球數值，則以熱季顯著高於涼季（ $P < 0.05$ ）。血液生化值檢測結果以尿素氮、肌酸酐及尿酸於熱季顯著高於涼季（ $P < 0.05$ ）；而鹼性磷酸酶、三酸甘油脂等，則以涼季顯著高於熱季（ $P < 0.05$ ）。本次調查顯示熱季較高的環境 THI 值顯著影響臺灣水牛的生理數值，飼養管理者可依氣候變化提早規劃因應措施。

關鍵字：臺灣水牛、血液學、血液生化學。

緒 言

異常的環境溫度、相對濕度、風和降雨被認為是畜牧業生長和生產的潛在危害（Mazzullo *et al.*, 2014）。動物為了維持體溫恆定，必須與所處環境保持熱平衡（Kadzere *et al.*, 2002）。呼吸速率受環境溫度、太陽輻射、相對濕度和風速的影響，其中環境溫度被發現是最具影響力的因素（Singh *et al.*, 2014）。直腸溫度是熱平衡的指標，可以用來評估炎熱環境對動物的生長、泌乳和繁殖等方面的不良影響程度（Silanikove, 2000）。水牛由於黑灰色皮膚和稀疏的毛量，導致表面吸收大量的太陽輻射熱（Marai and Haebe, 2010），但水牛的汗腺密度僅為乳牛的六分之一（Vale, 2007），因此水牛通過出汗散熱的能力較差。當其暴露於炎熱環境下會引起一系列的生理狀態改變，包括攝食量下降、水分、蛋白質、能量和礦物質平衡的紊亂，激素分泌和血液代謝的改變，導致生長和繁殖能力受損（Jasinski *et al.*, 2023）。

溫濕度指數（temperature-humidity index, THI）是常被做為衡量氣候條件對動物熱緊迫程度的指標（Armstrong, 1994; Kadzere *et al.*, 2002; Somparn *et al.*, 2004）。 $\text{THI} \leq 74$ 通常不會對健康動物造成危害， $\text{THI} 75$ 至 78 為警戒狀態，管理者可預見動物增重速度下降。 $\text{THI} 79$ 至 83 為危險狀態，動物增重速度明顯下降，當牛隻被運輸或所處環境過於擁擠時，可能會受到嚴重影響。 $\text{THI} \geq 84$ 為緊急狀態，若無即時修正管理模式，且持續維持不良現狀時，可能導致動物死亡（Somparn *et al.*, 2004; Vale, 2007）。

本研究旨在瞭解臺灣水牛於熱季及涼季的基礎生理數值表現，評估臺灣水牛的熱適應能力，包括呼吸速率、直腸溫度、血液學及血液生化學等數據收集分析，以做為未來因應氣候急遽變化的參考依據。

(1) 農業部畜產試驗所研究報告第 2768 號。

(2) 農業部畜產試驗所東區分所。

(3) 通訊作者，E-mail: lywei@tlri.gov.tw

材料與方法

I. 試驗動物與試驗設計

- (i) 試驗牛隻為 1-2 歲齡臺灣水牛，公、母水牛各 5 頭，共 10 頭，飼養於開放式畜舍，公母分飼於 2 區，2 區牛舍遮蔭棚架平均長 15 公尺、寬 8 公尺，運動場平均長 60 公尺、寬 40 公尺，試驗期間未更換飼養區域。
- (ii) 2020 與 2021 年涼季（1 至 2 月）與熱季（6 至 8 月）每星期選擇一天於 14:00，記錄臺灣水牛直腸溫度、呼吸速率，並於涼季與熱季抽血檢測血液學與血液生化學數值等基礎資料。
- (iii) 本研究涉及動物實驗部分於農業部畜產試驗所東區分所花蓮場區（原單位名稱：行政院農業委員會畜產試驗所花蓮種畜繁殖場）內執行，動物之飼養、使用及實驗內容依行政院農業委員會畜產試驗所花蓮種畜繁殖場實驗動物管理委員會批准之文件（HUIACUC 10909 和 HUIACUC 11008）與試驗準則進行。

II. 檢測項目與方法

- (i) 依據中央氣象局觀測資料查詢系統收集並分析 2020 至 2021 年中央氣象局花蓮觀測站溫濕度紀錄（<https://e-service.cwb.gov.tw/HistoryDataQuery/index.jsp>），1 月至 12 月花蓮地區平均 THI 值以 1 月最低，其後持續上升，最高值落在 7 月，之後持續下降（圖 1），1 至 2 月平均溫度為 $18.8 \pm 2.7^\circ\text{C}$ ，平均濕度為 $77.2 \pm 7.5\%$ ，平均 THI 值為 64.9 ± 4.3 ，視為本次試驗定義之涼季；6 月至 8 月平均溫度為 $28.9 \pm 1.1^\circ\text{C}$ ，平均濕度為 $78.2 \pm 5.8\%$ ，平均 THI 值為 80.9 ± 1.1 ，6-8 月每月平均 THI 值皆高於 80，視為本次試驗定義之熱季。

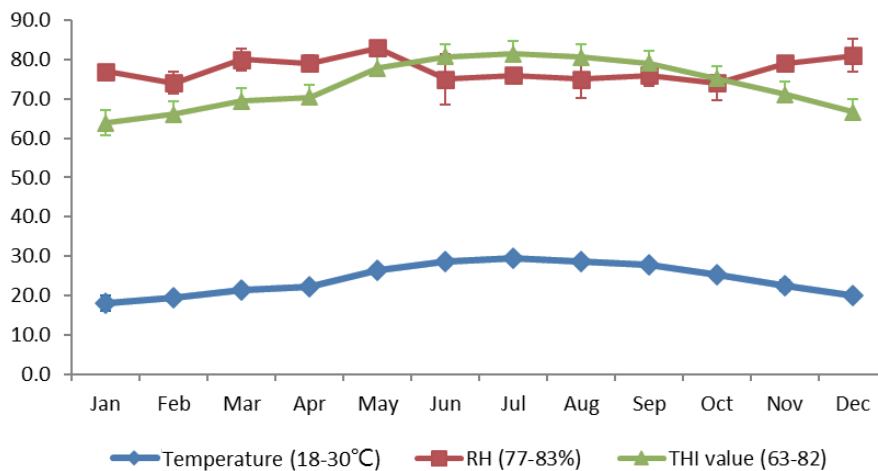


圖 1. 2020-2021 年每月平均溫度、濕度及 THI 值。熱季 6、7、8 月之個別平均溫度及 THI 值顯著大於涼季 1、2 月個別數值。

Fig.1. The mean temperature, relative humidity (RH), and THI value curve from January to December 2020 and 2021. The individual average temperatures and THI values for the hot season (June, July, and August) are significantly higher than those for the cool season (January and February).

- (ii) 環境溫、溼度：於水牛舍外設置溫溼度紀錄器，記錄水牛生活之環境溫度與濕度，並換算成 THI (Kendall and Webster, 2009)。
- (iii) 將試驗牛隻移動至工作欄並進行保定後，測量直腸溫度與呼吸速率，呼吸速率之測量以計算牛隻站立且呈靜止狀態平均 1 分鐘內之側腹起伏數。並於 2020 年與 2021 年之 2 月與 8 月最後一週，自試驗牛隻頸靜脈抽血 3 mL 至 EDTA 抗凝血管 (BD Vacutainer® Lithium Heparin)，送國立中興大學獸醫學院動物疾病診斷中心，以 ProCyte Dx 血液學分析儀 (IDEXX) 進行水牛全血細胞計數 (complete blood count, CBC) 檢驗，包含紅血球 (red blood cell, RBC)、血容比 (packed cell volume, PCV)、血紅素 (Hemoglobin, Hb)、平均紅血球容積 (mean corpuscular volume, MCV)、平均紅血球血紅素量 (mean corpuscular haemoglobin, MCH)、平均紅血球血紅素濃度 (mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC)、血小板 (platelet, PLT)、白血球總數 (white blood cell, WBC)、嗜中性球 (neutrophils)、淋巴球 (lymphocytes)、單核球 (monocytes)、嗜酸性球 (eosinophils) 及嗜鹼性球 (basophils) 等 13

個項目。

- (iv) 水牛之血清生化值檢測，委由立人醫事檢驗所以 TBA™-c16000 臨床化學自動分析儀 (TOSHIBA) 進行表現量分析，項目包含尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN)、肌酸酐 (creatinine, Cre)、尿酸 (uric acid, UA)、總蛋白質 (total protein, TP)、白蛋白 (albumin, Alb)、鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase, Alp)、總膽固醇 (total cholesterol, TC)、三酸甘油酯 (Triglyceride, TG) 等 8 個項目。另外進行皮質醇 (cortisol) 表現量檢測，使用牛隻試劑檢驗套組 Bovine Cortisol (COR) ELISA Kit (Shanghai Coon Koon Biotech Co., Ltd; Shanghai, China)。

III. 統計分析

試驗所得資料以 SPSS 統計軟體 (SPSS ver. 22) (IBM Corp., 2013) 分析，以成對樣本 t 檢定檢測涼、熱季數據之平均數是否有顯著性差異，及獨立樣本 t 檢定檢測公、母水牛於涼、熱季數據之平均數於性別間是否有顯著性差異，以 $p < 0.05$ 的標準下檢測差異。

結果與討論

I. 涼、熱季環境變化對臺灣水牛直腸溫度、體表溫度及呼吸速率影響

本試驗統計 2020 至 2021 年涼季 (1 至 2 月) 及熱季 (6 至 8 月) 水牛舍環境溫度、濕度及 THI 值 (表 1)，三者皆以熱季顯著高於涼季 ($P < 0.05$)；試驗牛群於熱季平均呼吸速率與平均直腸溫度亦皆顯著高於涼季 ($P < 0.05$) (表 1、表 2)。Singh *et al.* (2014) 研究印度國家乳品研究所 (National Dairy Research Institute, NDRI) 飼養之摩拉水牛 (Murrah buffalo) (*Bubalus bubalis*) 暴露於涼季與熱季 (溫差 0°C 至 45°C) 環境下之呼吸速率與直腸溫度，熱季數值皆顯著高於涼季 ($P < 0.05$)。Haque *et al.* (2012) 將摩拉水牛 (12 頭仔牛與 6 頭成牛) 於 22°C、40°C、42°C 和 45°C 的氣候室中分別各暴露 4 小時，監測其直腸溫度和呼吸速率，與熱中性溫度 (22°C) 相比，暴露於 40°C、42°C 和 45°C 4 小時後，仔水牛和成年水牛的呼吸速率和直腸溫度皆顯著增加 ($P < 0.001$)，本試驗條件為自然環境下之平均溫度，試驗結果得出暴露於較高環境平均溫度下，牛隻呼吸速率及直腸溫度顯著高於較低平均環境溫度，與前人研究結果相似，顯示水牛會因環境溫度提高而增加呼吸速率及直腸溫度。

熱季時，不同性別之臺灣水牛，平均呼吸速率均顯著高於涼季 ($P < 0.05$)，惟直腸溫度於涼、熱季未見顯著差異。Abera *et al.* (2021) 等人比較衣索比亞阿維區之福格拉乳牛 (Fogera cattle) 於旱季 (平均 THI 值 72.7 ± 0.5)、短雨季 (平均 THI 值 72.0 ± 0.4) 及長雨季 (平均 THI 值 69.6 ± 0.3) 之呼吸速率與直腸溫度，結果顯示，旱季時牛隻呼吸速率，分別比短雨季與長雨季多出 3.4 和 3.8 次 / 分鐘，而直腸溫度未有顯著性差異。本試驗公、母水牛個別之直腸溫度則於涼、熱季未見顯著差異，推測係因試驗族群飼養區域內皆具有流動水道，且有大型遮陰棚，水牛於熱季時，可至遮陰棚下休憩並尋找水源泡水降溫，因此可能減緩熱季高溫的緊迫，進而影響生理數值。與涼季相比，熱季呼吸速率增加可能是由於組織在緊迫條件下對氧氣的需求量增加所致 (Singh *et al.*, 2014)。為了減少水牛因熱緊迫對生理上的不良影響，可採取相對應的管理措施，為水牛提供天然或人工的遮蔭環境 (樹蔭、畜舍等) 與充足的飲水，水牛因皮膚汗腺較少且膚色呈黑灰色，演化出調節體溫的補償行為，如喜好泡在水池、泥濘中打滾降溫，故應提供水池、泥坑供水牛打滾。牧場管理者也應隨時關注天氣預報，以便因應氣候變化進行滾動式調整 (Somparn *et al.*, 2004)。在熱緊迫下，細胞調節免疫反應會隨之下降，於餵飼中添加抗壞血酸 (維生素 C) 和電解質，亦有助於緩解受熱緊迫的水牛的氧化壓力 (Kumar *et al.*, 2010)。

表 1. 臺灣水牛於涼、熱季之呼吸速率與直腸溫度及其飼養環境之平均溫度、溼度與 THI 值比較

Table 1. The respiration rate and rectal temperature of Taiwan swamp buffaloes during the cool and hot seasons, and average environmental temperature, humidity, and THI.

Seasons	Ambient temperature (°C)	Ambient Humidity (%)	THI value	Respiration rate	Rectal temperature (°C)
Cool	18.31 ± 3.50 ^b	79.96 ± 9.21 ^a	64.17 ± 5.46 ^b	20.30 ± 4.74 ^b	38.34 ± 0.55 ^b
Hot	28.77 ± 2.88 ^a	78.78 ± 8.54 ^b	80.66 ± 3.56 ^a	31.56 ± 11.41 ^a	38.48 ± 0.53 ^a

^{a, b} Means within the same column with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

表 2. 臺灣水牛於涼、熱季之呼吸速率與直腸溫度比較

Table 2. The mean rectal temperature and respiration rate of male and female Taiwan swamp buffaloes in the cool and hot seasons.

seasons	Male (n = 5)		Female (n = 5)	
	Respiration rate/min	Rectal temperature (°C)	Respiration rate/min	Rectal temperature (°C)
Cool	20.86 ± 4.22 ^b	38.31 ± 0.54	19.73 ± 5.17 ^b	38.38 ± 0.57
Hot	30.21 ± 10.95 ^a	38.44 ± 0.44	34.25 ± 11.89 ^a	38.54 ± 0.68

^{a, b} Means within the same column with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

II. 涼、熱季環境變化對臺灣水牛血液學影響

水牛涼、熱季血液學分析結果顯示，嗜中性球、平均紅血球血紅素量及平均紅血球血紅素濃度之熱季數值顯著高於涼季 ($P < 0.05$)，紅血球總數、淋巴球、嗜酸性球及嗜鹼性球數值則以涼季顯著高於熱季 ($P < 0.05$) (表 3)。公臺灣水牛的白血球總數、嗜中性球於涼季顯著高於母臺灣水牛 ($P < 0.05$)，單核球與嗜鹼性球數值則相反，而熱季公臺灣水牛只有淋巴球數值著高於母臺灣水牛 ($P < 0.05$)，其餘數值未見顯著性差異 (表 4)。

嗜中性球與淋巴球調查結果 (表 3) 與前人研究相似，Pereira *et al.* (2020) 將地中海水牛 (Mediterranean buffaloes) 置於不同溫度下觀察其血液學變化，發現嗜中性球數隨環境溫度上升而有上升趨勢，淋巴球則相反。Omram *et al.* (2011) 發現水牛的嗜中性球數值在 42°C 下高於 25°C，淋巴球則相反。Debbarma *et al.* (2020) 研究印度哈里亞納邦國家乳品研究所家畜研究中心之摩拉水牛於冬季、春季、夏季 (THI 分別為 59.27、70.97 及 84) 之血液學變化，發現夏季的紅血球總數與血容比顯著低於冬季與春季，本試驗結果紅血球總數與前人研究相似。Dayal *et al.* (2017) 指出紅血球總數和血紅素的下降，可能歸因於夏季環境影響採食量減少，從而導致紅血球生成減少。在熱緊迫期間，由於水分從組織間隙或消化道移動到血管內，水牛的血液和血漿體積增加，總體水分含量增加，從而導致血容比下降，循環中水分增加可能有助於散熱 (Chaiyabutr *et al.*, 1997)，本試驗未見血容比與血紅素有因季節而有顯著性差異 (表 3)，推測因試驗族群飼養區內有流動水道及遮陰棚，使水牛可於熱季尋找遮蔭及水源泡水降溫，進而影響熱季的血液學數值。Park *et al.* (2021) 比較荷蘭牛與娟姍牛在不同 THI 值下血液學變化，發現荷蘭牛與娟姍牛在高 THI 值 (79.13) 時，嗜酸性球與嗜鹼性球數量均高於低 THI 值 (64.92)，但僅荷蘭牛的數值有顯著性差異，顯示存有品種間差異，並推論嗜酸性球與嗜鹼性球對高溫非常敏感，尤其荷蘭牛更為明顯。熱緊迫致使嗜酸性球和嗜鹼性球對抗原過度反應，使動物在熱緊迫狀態下更容易受到感染。Morar *et al.* (2018) 研究則指出荷蘭牛在遭受熱緊迫 3 週後，其血液樣本之紅血球總數、血紅素、嗜酸性球有下降趨勢。本試驗持續調查 2 年的涼、熱季長期熱緊迫試驗，亦得出水牛的紅血球總數及嗜酸性球於熱季顯著下降，可推測牛隻的血液學數值在短期熱緊迫下即可看出變化，飼養管理者須因應氣候變化應提早進行調整。

表 3. 臺灣水牛涼、熱季血液學數值比較

Table 3. Analysis of the hematological parameters of Taiwan swamp buffaloes in the cool and hot season.

Parameters ¹	Unit	Cool (n = 10)	Hot (n = 10)
RBC	106/ μ L	6.14 ± 0.61 ^a	5.78 ± 0.53 ^b
PCV	%	34.67 ± 3.24	33.43 ± 3.54
Hb	g/dL	11.57 ± 0.80	11.97 ± 1.34
MCV	fL	57.91 ± 2.92	57.45 ± 3.30
MCH	pg	19.36 ± 1.29 ^b	20.62 ± 1.27 ^a
MCHC	g/dL	33.64 ± 0.90 ^b	35.36 ± 1.16 ^a
PLT	103/ μ L	195.80 ± 43.74	211.84 ± 57.44
WBC	103/ μ L	10.99 ± 1.67	11.02 ± 1.73
Neutrophils	%	45.68 ± 8.66 ^b	59.43 ± 6.94 ^a
Lymphocytes	%	35.09 ± 5.58 ^a	25.09 ± 5.25 ^b
Monocytes	%	2.73 ± 0.82	2.56 ± 0.99
Eosinophils	%	12.04 ± 4.86 ^a	9.83 ± 3.72 ^b
Basophils	%	3.73 ± 5.56 ^a	0.37 ± 0.22 ^b

^{a, b} Means within the same row with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$)

¹RBC, PCV, Hb, MCV, MCH, MCHC, PLT, and WBC mean red blood cell, packed cell volume, hemoglobin, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin, mean corpuscular hemoglobin concentration, platelet, and white blood cell.

表 4. 不同性別對臺灣水牛涼、熱季血液學數值之比較

Table 4. Analysis of the hematological parameters of different genders of Taiwan swamp buffaloes in the cool and hot season.

Parameters ¹	Unit	Cool		Hot	
		Male (n = 5)	Female (n = 5)	Male (n = 5)	Female (n = 5)
RBC	106/ μ L	6.18 \pm 0.52	6.11 \pm 0.71	5.81 \pm 0.29	5.75 \pm 0.74
PCV	%	34.71 \pm 3.35	34.63 \pm 3.31	33.62 \pm 2.74	33.21 \pm 4.43
Hb	g/dL	11.53 \pm 0.67	11.60 \pm 0.96	11.98 \pm 0.95	11.96 \pm 1.70
MCV	fL	57.59 \pm 3.12	58.20 \pm 2.87	57.86 \pm 3.19	57.00 \pm 3.54
MCH	pg	19.31 \pm 1.32	19.41 \pm 1.32	20.62 \pm 1.22	20.61 \pm 1.40
MCHC	g/dL	33.78 \pm 1.06	33.51 \pm 0.75	35.66 \pm 1.26	35.05 \pm 1.03
PLT	103/ μ L	204.00 \pm 43.10	187.60 \pm 45.07	202.90 \pm 63.62	221.78 \pm 51.56
WBC	103/ μ L	11.69 \pm 1.66 ^a	10.21 \pm 1.39 ^b	11.33 \pm 1.55	10.68 \pm 1.93
Neutrophils	%	5.81 \pm 0.99 ^a	4.26 \pm 1.17 ^b	6.86 \pm 1.31	6.09 \pm 1.92
Lymphocytes	%	3.87 \pm 0.50	3.92 \pm 1.05	3.07 \pm 0.58 ^a	2.38 \pm 0.67 ^b
Monocytes	%	0.25 \pm 0.04 ^b	0.34 \pm 0.06 ^a	0.27 \pm 0.07	0.28 \pm 0.09
Eosinophils	%	1.19 \pm 0.61	1.38 \pm 0.49	1.11 \pm 0.57	1.03 \pm 0.39
Basophils	%	0.03 \pm 0.01 ^b	0.75 \pm 0.66 ^a	0.03 \pm 0.01	0.31 \pm 0.58

^{a, b} Means within the same line with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

¹RBC, PCV, Hb, MCV, MCH, MCHC, PLT, and WBC mean red blood cell, packed cell volume, hemoglobin, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin, mean corpuscular hemoglobin concentration, platelet, and white blood cell.

III. 涼、熱季環境變化對臺灣水牛血液生化值影響

涼、熱季血液生化值分析結果顯示，多項血液學及血液生化數值尚在正常生理參考值範圍內（表 5），其中三酸甘油酯、嗜酸性球，兩季測得之數值皆比正常生理參考值高，推測可能因本試驗之正常生理參考值係以乳牛之數值為依據，而有品種間生理值差異。公臺灣水牛於涼季肌酸酐、尿酸顯著高於母臺灣水牛（ $P < 0.05$ ），母臺灣水牛尿素氮與總膽固醇於涼季顯著高於公臺灣水牛（ $P < 0.05$ ），於熱季則未有顯著性差異（表 6）。Mahmoud *et al.* (2019) 研究顯示在血液生化學及血液學數值部分，多項數值皆以公水牛明顯高於母水牛。

尿素氮、肌酸酐及尿酸於熱季顯著高於涼季（ $P < 0.05$ ）。Chaudhary *et al.* (2015) 亦發現 Surti 水牛（Surti buffaloes）的尿素氮、肌酸酐值有隨 THI 上升而上升的趨勢。鹼性磷酸酶及三酸甘油酯涼季顯著高於熱季（ $P < 0.05$ ）。Li *et al.* (2021) 指出，荷蘭牛的鹼性磷酸酶隨 THI 值上升而顯著下降（ $P < 0.001$ ），且在低與高 THI 值環境皆會降低抗氧化能力。在高溫、高濕的環境下鹼性磷酸酶活性降低，可能係與腸道和肝臟活性降低，導致能量代謝和內分泌適應反應有關（Abeni *et al.*, 2007）。Joo *et al.* (2021) 研究得出荷蘭牛和娟姍牛的三酸甘油酯會隨著 THI 值上升而下降，與本試驗結果相似。Slimen *et al.* (2016) 指出，受熱緊迫的動物具有更大的腸道和肝臟三酸甘油酯儲存能力，進而降低血中三酸甘油酯濃度，花蓮地區夏季常為高 THI 值環境，水牛亦可能因適應性調節而有降低血中三酸甘油酯數值之情形。

試驗牛隻涼、熱季皮質醇數值無顯著性差異（表 5），皮質醇有生理調節功能，使動物能夠忍受壓力環境（Christison and Johnson, 1972）。可能涉及到下視丘 - 腦下垂體 - 腎上腺皮質軸對參與維持熱平衡的其他內分泌腺體的調節作用（Gudev *et al.*, 2007）。皮質醇會根據不同變因而波動，包括心理壓力和生理緊迫，如低血糖、疾病、發燒、創傷、疼痛、恐懼、消耗體力的活動或極端溫度。這些結果表明，水牛在不同類型的壓力下，會出現不同的荷爾蒙變化（Borghese, 2005）。Bristow and Holmes (2007) 研究安格斯牛皮質醇表現量與焦慮行為的相關性，發現焦慮表現越明顯的牛隻其皮質醇表現量越高。Grasso *et al.* (1999) 發現，給予較充足活動空間的仔水牛，其皮質醇濃度小於活動空間不足的仔水牛。本試驗指出呼吸速率與皮質醇濃度相關係數為 0.49，為中度正相關。Yadav *et al.* (2019) 將摩拉水牛置於 42°C 與 25°C 環境下各觀察 21 天，並於第 1、6、11、16 及第 21 天量測呼吸速率、直腸溫度及皮質醇濃度，發現於 42°C 熱緊迫環境下，水牛呼吸速率、直腸溫度及皮質醇濃度皆高於 25°C 環境。Haque *et al.* (2012) 研究指出，皮質醇濃度有隨環境溫度上升而上升的趨勢（ $P < 0.05$ ），與成年摩拉水牛相比，摩拉仔水牛的皮質醇隨溫度上升而上升的幅度更為顯著，顯示其更容易受到熱緊迫的影響。本試驗於 2020 至 2021 年所測之涼季與熱季間水牛血中皮質醇濃度（36.00 vs. 64.00 ng/dL）雖無顯著（ $P > 0.05$ ）差異，但熱季仍有偏高之趨勢，此也符合前述文獻（Haque *et al.*, 2012; Yadav *et al.*, 2019）所指，皮質醇濃度將隨環境溫度上升而提高的論述。

表 5. 臺灣水牛涼、熱季血液生化值比較

Table 5. Analysis of the blood biochemical parameters of Taiwan swamp buffaloes in the cool and hot season.

Parameters ¹	Unit	Cool (n = 10)	Hot (n = 10)
BUN	mg/dL	12.41 ± 7.01 ^b	17.62 ± 2.27 ^a
Cre	mg/dL	1.72 ± 0.22 ^b	1.94 ± 0.18 ^a
UA	mg/dL	0.50 ± 0.19 ^b	0.61 ± 0.15 ^a
TP	g/dL	6.29 ± 0.65	6.59 ± 0.87
Alb	g/dL	3.24 ± 0.30	3.14 ± 0.30
Alp	IU/L	99.47 ± 26.13 ^a	81.00 ± 27.36 ^b
TC	mg/dL	63.63 ± 8.49	61.05 ± 10.09
TG	mg/dL	41.79 ± 13.64 ^a	33.65 ± 17.38 ^b
Cortisol	ng/dL	36.00 ± 0.00	64.00 ± 43.27

^{a, b} Means within the same row with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$)

¹BUN, Cre, UA, TP, Alb, Alp, TC and TG mean blood urea nitrogen, creatinine, uric acid, total protein, albumin, alkaline phosphatase, total cholesterol, and triglyceride.

表 6. 不同性別臺灣水牛於涼熱季之血液生化學數值比較

Table 6. Analysis of the blood biochemical parameters of different genders of Taiwan swamp buffaloes in the cool and hot season.

Parameters ¹	Unit	Cool		Hot	
		Male	Female	Male	Female
BUN	mg/dL	7.40 ± 4.02 ^b	17.97 ± 5.14 ^a	17.15 ± 1.58	18.20 ± 2.93
Cre	mg/dL	1.85 ± 0.12 ^a	1.57 ± 0.22 ^b	1.99 ± 0.17	1.88 ± 0.18
UA	mg/dL	0.59 ± 0.15 ^a	0.40 ± 0.18 ^b	0.65 ± 0.14	0.56 ± 0.16
TP	g/dL	6.32 ± 0.58	6.25 ± 0.75	6.25 ± 0.88	6.93 ± 0.75
Alb	g/dL	3.28 ± 0.29	3.20 ± 0.32	3.21 ± 0.28	3.08 ± 0.32
Alp	IU/L	103.80 ± 28.54	94.67 ± 23.89	81.80 ± 26.05	80.11 ± 30.31
TC	mg/dL	59.33 ± 8.35 ^b	67.50 ± 6.85 ^a	61.00 ± 11.56	61.11 ± 8.87
TG	mg/dL	39.50 ± 16.83	44.33 ± 9.27	36.20 ± 16.51	31.10 ± 18.72
Cortisol	ng/ml	0.03 ± 0.00	0.04 ± 0.01	0.07 ± 0.05	0.08 ± 0.08

^{a, b} Means within the same line with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$)

¹BUN, Cre, UA, TP, Alb, Alp, TC and TG mean blood urea nitrogen, creatinine, uric acid, total protein, albumin, alkaline phosphatase, total cholesterol, and triglyceride.

結 論

本研究為國內的水牛飼養管理者提供不同氣候下臺灣水牛的生理表現數據，得出在 2020 至 2021 年間，生活於臺灣花蓮地區之水牛其生理數值會隨涼、熱季之環境 THI 值變化而有所改變，在現今氣候多變的情況下，若遭遇久旱、缺水等嚴峻環境，管理者須適時做出調整因應水牛可能發生的熱緊迫危機，期望這項研究結果有助於優化水牛飼養環境，改善水牛的福祉和生產力，提高牧場的經濟效益。

參考文獻

- Abeni, F., L. Calamari, and L. Stefanini. 2007. Metabolic conditions of lactating Friesian cows during the hot season in the Po valley. 1. blood indicators of heat stress. *Int. J. Biometeorol.* 52(2): 87-96.
- Abera, M., Y. Y. Mummed, M. Eshetu, F. Pilla, and Z. Wondifraw. 2021. Physiological, biochemical, and growth parameters

- of Fogera cattle calves to heat stress during different seasons in sub-humid part of Ethiopia. *Animals* 11: 1062.
- Armstrong, D. V. 1994. Heat stress interaction with shade and cooling. *J. Dairy Sci.* 77(7): 2044-2050.
- Borghese, A. 2005. Buffalo production and research. FAO regional office for Europe inter-regional cooperative research network on buffalo (ESCORENA). REU technical series 67, pp. 229-232. Roma, Italy.
- Bristow, D. J. and D. S. Holmes. 2007. Cortisol levels and anxiety-related behaviors in cattle. *Physiol. Behav.* 90(4): 626-628.
- Chaiyabutr, N., S. Komolvanich, S. Sawangkoon, and S. Chanpongsang. 1997. Alterations in potassium homeostasis during heat stress in swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*). *J. Therm. Biol.* 22(3): 207-212.
- Chaudhary, S. S., V. K. Singh, R. C. Upadhyay, G. Puri, A. B. Odedara, and P. A. Patel. 2015. Evaluation of physiological and biochemical responses in different seasons in Surti buffaloes. *Vet. World.* 8(6): 727-731.
- Christison, G. I. and H. D. Johnson. 1972. Cortisol turnover in heat stressed cows. *J. Anim. Sci.* 35: 1005-1010.
- Dayal, S., A. Dey, S. J. Pandian, J. J. Gupta, P. C. Chandran, and I. Ali. 2017. Effect of seasonal variation on physiological parameters in Murrah buffaloes. *Indian J. Anim. Sci.* 87(8): 965-967.
- Debbarma, S., Ashutosh, S. B. Gowda, and G. Kumar. 2020. Seasonal variation of physiological responses, plasma hormones, electrolytes and hematological parameters in buffaloes physiological and biochemical changes in buffaloes. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. Special Issue-10*: 622-629.
- Grasso, F., F. Napolitano, G. D. Rosa, T. Quarantelli, L. Serpe, and A. Bordi. 1999. Effect of pen size on behavioral, endocrine, and immune responses of water buffalo (*Bubalus bubalis*) calves. *J. Anim. Sci.* 77: 2039-2046.
- Gudev, D., S. Popova-Ralcheva, P. Moneva, Y. Aleksiev, Tz. Peeva, P. Penchev, and I. Ilieva. 2007. Physiological indices in buffaloes exposed to sun. *Archiva Zootechnica* 10: 127-133.
- Haque, N., A. Ludri, S. A. Hossain, and M. Ashutosh. 2012. Alteration of metabolic profiles in young and adult Murrah buffaloes exposed to acute heat stress. *Int. J. Appl. Anim. Sci.* 1(1): 23-29.
- IBM Corp. 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Ver. 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.
- Jasinski, F. P., C. Evangelista, L. Basiricò, and U. Bernabucci. 2023. Responses of dairy buffalo to heat stress conditions and mitigation strategies: a review. *Animals* 13: 1260.
- Joo, S. S., S. J. Lee, D. S. Park, D. H. Kim, B. H. Gu, Y. J. Park, C. Y. Rim, M. Kim, and E. T. Kim. 2021. Changes in blood metabolites and immune cells in Holstein and Jersey dairy cows by heat stress. *Animals* 11: 974.
- Kadzere, C., M. Murphy, N. Silanikove, and E. Maltz. 2002. Heat stress in lactating dairy cows: a review. *Livest. Prod. Sci.* 77(1): 59-91.
- Kendall, P. E. and J. R. Webster. 2009. Season and physiological status affects the circadian body temperature rhythm of dairy cows. *Livest. Sci.* 125: 155-160.
- Kumar, B. V. S., G. Singh, and S. K. Meur. 2010. Effects of addition of electrolyte and ascorbic acid in feed during heat stress in buffaloes. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 23(7): 880-888.
- Li, H., Y. Zhang, R. Li, Y. Wu, D. Zhang, H. Xu, Y. Zhang, and Z. Qi. 2021. Effect of seasonal thermal stress on oxidative status, immune response and stress hormones of lactating dairy cows. *Anim. Nutr.* 7: 216-223.
- Mahmoud, R. A. E., M. I. Hamed, and D. R. Ibrahim. 2019. Comparison of normal hematological and biochemical values in male and female buffaloes. *J. Adv. Vet. Res.* 9(1): 8-10.
- Marai, I. F. M. and A. A. M. Haezeb. 2010. Buffalo's biological functions as affected by heat stress-A review. *Livest. Sci.* 127(2-3): 89-109.
- Mazzullo, G., C. Rifici, F. Cammarata, G. Caccamo, M. Rizzo, and G. Piccione. 2014. Effect of different environmental conditions on some haematological parameters in cow. *Ann. Anim. Sci.* 14(4): 947-954.
- Morar, D., V. Ciulan, F. Simiz, T. Mot, I. Hutu, and C. Vaduvae. 2018. Effect of heat stress on haematological parameters in dairy cows. *Lucrari Stiintifice Medicina Veterinara* 61(2): 65-70.
- Omram, F. I., G. Ashour, M. M. Youssef, and M. M. Shafie. 2011. Responses of hematology, blood metabolites, mineral ions and hormonal profile to heat stress for Egyptian buffalo calves. *Egypt. J. Agric. Res.* 89(3): 1129-1140.
- Park, D. S., B. H. Gu, Y. J. Park, S. S. Joo, S. S. Lee, S. H. Kim, E. T. Kim, D. H. Kim, S. S. Lee, S. J. Lee, B. W. Kim, and M. Kim. 2021. Dynamic changes in blood immune cell composition and function in Holstein and Jersey steers in response to heat stress. *Cell Stress Chaperones.* 26: 705-720.
- Pereira, A. M. F., R. A. Vilela, C. G. Titto, T. M. C. Leme-dos-Santos, A. C. M. Geraldo, J. C. C. Balieiro, R. F. Calviello, E. H. B. Junior, and E. A. L. Titto. 2020. Thermoregulatory responses of heat acclimatized buffaloes to simulated heat waves. *Animals* 10(5): 756.

- Silanikove, N. 2000. Effects of heat stress on the welfare of extensively managed domestic ruminants. *Livest. Prod. Sci.* 67: 1-18.
- Singh, A. K., R. Devi, Y. Kumar, P. Kumar, and R. C. Upadhyay. 2014. Physiological changes and blood flow in Murrah buffaloes during summer and winter season. *J. Buffalo Sci.* 3(2): 63-69.
- Slimen, I. B., T. Najjar, A. Ghram, and M. Abdrabba. 2016. Heat stress effects on livestock: molecular, cellular and metabolic aspects, a review. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 100: 401-412.
- Somparn, P., M. J. Gibb, K. Markvichitr, N. Chaiyabutr, S. Thummabood, and C. Ajrabukka. 2004. Analysis of climatic risk for cattle and buffalo production in northeast Thailand. *Int. J. Biometeorol.* 49(1): 59-64.
- Vale, W. G. 2007. Effects of environment on buffalo reproduction. *Ital. J. Anim. Sci.* 6(2): 130-142.
- Yadav, B., G. Singh and A. Wankar. 2021. Acclimatization dynamics to extreme heat stress in crossbred cattle. *Biol. Rhythm. Res.* 52(4): 524-534.

The investigation of physiological, hematological, and blood biochemical parameters of Taiwan swamp buffaloes in the Hualien region during the cool and hot seasons⁽¹⁾

Pei-Chun Chen ⁽²⁾ Pi-Hua Chuang ⁽²⁾ Liang-Yuan Wei ⁽²⁾⁽³⁾

Received: Jul. 24, 2023; Accepted: Oct. 20, 2023

Abstract

This study was to investigate the changes in physiological, hematological, and blood biochemical parameters of Taiwan swamp buffaloes during the different seasons (cool and hot seasons). The experimental results showed significant differences ($P < 0.05$) in ambient temperature, relative humidity, and THI (Temperature-Humidity Index) between the cool and hot seasons. Taiwan swamp buffaloes had significantly higher respiration rates and rectal temperatures (30.58 ± 10.42 breaths/min and $38.50 \pm 0.56^{\circ}\text{C}$) in the hot seasons, in contrast to the cool season (20.24 ± 4.63 breaths/min and $38.36 \pm 0.55^{\circ}\text{C}$) ($P < 0.05$). From the hematological assay, the values of RBC, lymphocytes, eosinophils, and basophils were significantly higher in the cool season than in the hot season ($P < 0.05$). On the contrary, the values of neutrophils, MCH, and MCHC were significantly higher in the hot season compared to the cool season ($P < 0.05$). In terms of blood biochemical analysis, the values of BUN, CRE, and UA were significantly higher in the hot season compared to the cool season ($P < 0.05$), while the ALP and TG were significantly higher in the cool season compared to the hot season ($P < 0.05$). This survey shows that the higher environmental temperature-humidity index (THI) during the hot season significantly affects the physiological values of Taiwan swamp buffaloes. Farm managers can plan responsive measures according to climate change.

Keywords: Taiwan native buffaloes, Hematology, Blood biochemistry.

(1) Contribution No. 2768 from Taiwan Livestock Research Institute, Ministry of Agriculture.

(2) Eastern Region Branch, MOA-TLRI, Ilan 268, Taiwan, R. O. C.

(3) Corresponding author, E-mail: lywei@tlri.gov.tw

豬隻產仔性狀候選標記 miR-27a 分析法之改進⁽¹⁾

廖仁寶⁽²⁾ 王思雅⁽²⁾ 盧昱誼⁽³⁾ 陳若菁⁽²⁾ 賴永裕⁽²⁾ 劉桂柱⁽³⁾ 程梅萍⁽⁴⁾⁽⁵⁾

收件日期：2023 年 8 月 29 日；接受日期：2023 年 10 月 24 日

摘 要

miR-27a 遺傳標記為豬隻產仔性狀候選標記之一，本研究之目的在於利用 MS-PCR (mutagenically separated polymerase chain reaction) 技術改進 miR-27a 基因型鑑別方法，以利於擴大種豬群基因型鑑別，並進行遺傳標記之產業應用性評估。依參考文獻所述，利用 PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) 方式找出不同 miR-27a 基因型，並設計 3 種不同特定引子，測試 PCR 反應物組成與反應溫度及時間，以找出可成功鑑別基因型的組成與條件。以新成功開發的鑑別方法檢測 9 家種豬場 942 頭豬隻基因型，結果顯示 AA、AB 及 BB 型百分比分別為 88.22、11.78 及 0.00%。分析 109 頭具產仔數性狀的母豬基因型，AA、AB 及 BB 型百分比分別為 88.99、11.01 及 0.00%，另由基因型與產仔數性狀之相關性初步分析顯示，AA 型之藍瑞斯與約克夏母豬比 AB 型有較高的產仔數。因此，進行省時省工與節省分析成本之 MS-PCR 方法分析種豬 miR-27a 基因型，有利於擴大種豬群的檢測，以期將標記 miR-27a 納入種豬產仔性狀選育輔助標的，提升種豬之產仔性能。

關鍵詞：產仔數性狀、候選標記、豬。

緒 言

種豬繁殖性能攸關養豬產業競爭力，若能提高種豬繁殖性能，則可減少種豬飼養頭數，進而飼料、管理及廢棄物處理等成本皆有減輕之效。依據 2021 臺灣養豬手冊資料，從示範戶雜交母豬 9,599 胎的數據分析得知，總產仔數與活仔數分別 10.92 與 9.73 頭 (財團法人中央畜產會，2022)，較歐美養豬大國如丹麥每胎可達 19.4 頭之成績，差距甚大 (<https://danbred.com/high-litter-size-with-high-piglet-survival/>)。若欲改善種豬繁殖性能，則可從遺傳育種、營養、畜舍、管理及生物安全方面著手，其中遺傳育種扮演火車頭之重要角色，有優良的遺傳因子，方能期望有良好的性能表現。唯有策略式的持續遺傳育種，族群的性能才可持續改進。

根據 Pig QTLdb 資料庫 (<https://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/SS/index>, data search on Aug. 28, 2023) 顯示，與繁殖性狀 (reproductive trait) 相關的數量性狀基因座 (quantitative trait locus, QTL) 多達 3,976 個，又產仔性狀 (litter trait) 為繁殖性狀重要組成成分之一，占有 1,609 個 QTL。在先前的研究顯示，母豬造骨蛋白 (osteopontin, OPN) 基因型對總產仔數與活仔數有影響，其中一種交替基因與總產仔數，另 4 種與活仔數相關 (廖等，1999)。以豬第 1、6 及 8 號染色體上的多個微衛星型遺傳標記分析藍瑞斯、約克夏、杜洛克及盤克夏 4 個品種經產母豬的基因型，並與其產仔性能資料分析後，發現一些具品種差異且與產仔性能相關的候選遺傳標記，如 SW373、SW1301 及 SW1514 (廖等，2006)；KS140、KS141、KS148、KS168、S188、KS192、SW61 及 SW1843 (廖等，2013)；MP35 和 SW1881 與藍瑞斯母豬產仔性狀顯著相關，SW1129 與約克夏母豬產仔性狀有極顯著相關且具正效應，MP35、SW2406 及 SW1881 則與杜洛克母豬產仔性狀有極顯著相關且具正效應 (廖等，2014)。另於國外許多研究發現，NR4A1 (nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1) 與 GNB2L1 (guanine nucleotide binding protein beta polypeptide 2 like-1) 基因多態性與母豬產仔性狀有顯著相關性，其中 NR4A1 g.3952A > G 對藍瑞斯母豬 TNB (total number born)、NBA (number of piglets born alive)、NWA (number of piglets weaned alive)、LWW (litter weight at weaning) 相關，GNB2L1 g.2373T > C 則對大白豬 (Large White) 母豬的出生窩仔重 (litter weight at birth) 相關 (Kumchoo and Mekchay, 2015)。候選基因 RBP4 (retinol-binding protein 4) AA 型與母豬繁殖性能 TNB、NBA 及

(1) 農業部畜產試驗所研究報告第 2769 號。

(2) 農業部畜產試驗所遺傳生理組。

(3) 台灣區種豬產業協會。

(4) 農業部畜產試驗所副所長室。

(5) 通訊作者，E-mail: mpcheng@mail.tlri.gov.tw

NW (number of piglets weaned) 有統計分析顯著性, A 為有利產仔性能之交替基因 (Marantidis *et al.*, 2016) ; Wang *et al.* (2018) 發現大白豬母豬之 FUT2 (α -1,2 fucosyltransferases) 基因型與產仔數和離乳數有顯著相關性, 並認為 TT 是有利於繁殖性狀的基因型。EXOC4 (exocyst complex component 4) 基因, CC 型杜洛克母豬之 NBA、NW 及 LWW (litter weight at weaning) 高於 CT 與 TT 型者 (He *et al.*, 2021) 。Lei *et al.* (2011) 發現 miR-27a 基因與豬之產仔性狀相關, 而 MicroRNAs (miRNAs) 常為轉錄與後轉錄作用之重要調節因子, miR-27a 基因潛在功能為濾泡的凋亡 (Chhabra *et al.*, 2009) , 且發現基因所在附近含有木乃伊胎之 QTL 。Pang *et al.* (2019) 分析發現 ESR (estrogen receptor) 、FSH β (follicle stimulating hormone b subunit) 、CTNNAL1 (catenin alpha like 1) 及 miR-27a 與大白豬產仔性能有關。

本研究針對產仔性狀相關候選標記 miR-27a 基因型鑑別法予以改進, 採用 MS-PCR (mutagenically separated polymerase chain reaction) 技術開發新的檢測方法, 以取代 PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) 鑑別法, 並將此可降低檢測成本與節省檢測時間之新方法應用於種豬群之基因型分析, 藉以評估標記之產業應用性。

材料與方法

I. 種豬樣品收集

配合台灣區種豬產業協會, 計收集 9 家種豬場 942 頭豬隻血液樣品, 包括杜洛克 371 頭 (公 351 頭、母 20 頭)、藍瑞斯 414 頭 (公 116 頭、母 298 頭) 及約克夏 157 頭 (公 53 頭、母 104 頭), 其中 109 頭母豬具分娩紀錄, 分別為杜洛克 8 頭、藍瑞斯 62 頭及約克夏 39 頭。利用商業核酸萃取套組 (EasyPure® Genomic DNA Kit, TransGen Biotech, China) 進行 DNA 分離純化, 測定濃度後冷凍備用。逢機挑選同胎產仔數高與低的豬隻 DNA 樣品, 並選取具產仔數資料的經產母豬 DNA 樣品, 進行 miR-27a 基因型分析。

II. miR-27a 基因型分析

參考 Pang *et al.* (2019) 進行引子合成與 PCR 反應條件測試, 引子對序列為 5'-TGGTGGTCCAGCTTCTCTCT-3' 與 5'-TGAGCCAGTCTGCACAAATC-3'; PCR 反應組成分為 20–50 ng 模板 DNA、0.25 mM dNTPs、每個引子 0.5 μ M、1 \times 反應緩衝液及 0.5 U (單位) *Taq* 聚合酶 (TaKaRa Bio Inc., Japan), 反應總體積為 20 μ L。利用 PCR 儀器 (SureCycler 8800, Agilent, USA) 進行標的 DNA 片段的增幅, PCR 反應條件: 第一步變性, 94 $^{\circ}$ C、5 min; 第二步循環增幅 35 次, 94 $^{\circ}$ C、30 s, 55 $^{\circ}$ C、45 s, 72 $^{\circ}$ C、1 min; 第三步延長, 72 $^{\circ}$ C、5 min。取 10 μ L PCR 產物進行限制酶之切割作用, 其餘組成分含 1 \times 反應緩衝液、10 U 限制酶 *Hpa*II 及超純水, 反應總體積為 15 μ L, 在 37 $^{\circ}$ C 作用 2.5 h 後, 取 10 μ L 進行 3% 瓊脂膠體電泳分析 (Mupid-2plus, Advance, Japan), 再予以染色成像, 並以影像分析儀 (AlphaImager™, AlphaInnotech, USA) 擷取電泳影像儲存。

III. miR-27a 基因型分析法改進

參考 Kwok *et al.* (1990)、Rust *et al.* (1993) 及 Lockley *et al.* (1996) 等之研究成果, 採用 MS-PCR 技術, 針對 miR-27a 序列分別設計 A 交替基因專一性引子 5'-CCTCCCCAGTGGTAGGATACCCAGGCAGGAGGGGAGAGGTGGCAGGGCAA-3'、B 交替基因專一性引子 5'-GGCAGGCAGGAGGGGAGAGGTGGCAGGGACG-3' 及共用反向引子 5'-GCTTGTGAGCAGGTCCACAGCAAGTCGTG-3', 引子序列中粗體加底線部分為強化基因型結果所做的修飾, 3' 端斜體部分則為核酸變異點, 以進行 PCR 反應組成與溫度條件之測試。PCR 反應組成分為 20–50 ng 模板 DNA、0.25 mM dNTPs、A 交替基因專一性引子 0.067 μ M、B 交替基因專一性引子 0.1 μ M、反向共用引子 0.133 μ M、1 \times 反應緩衝液及 0.5 U *Taq* 聚合酶 (TaKaRa Bio Inc., Japan), 反應總體積為 15 μ L。利用 PCR 儀器 (SureCycler 8800, Agilent, USA) 進行標的 DNA 片段的增幅, PCR 反應條件: 一次增幅, 94 $^{\circ}$ C、1 min, 69 $^{\circ}$ C、1 min, 72 $^{\circ}$ C、1 min; 第二步循環增幅 35 次, 94 $^{\circ}$ C、30 s, 69 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、20 s; 第三步延長, 72 $^{\circ}$ C、5 min。取 10 μ L PCR 產物進行 3% 瓊脂膠體電泳分析 (Mupid-2plus, Advance, Japan), 再予以染色成像, 並以影像分析儀 (AlphaImager™, AlphaInnotech, USA) 擷取電泳影像儲存。

IV. 種豬 miR-27a 基因型與產仔數相關性分析

參考廖等 (2013) 分析具產仔性狀資料之種豬與其基因型之相關性, 以種母豬所具有遺傳標記基因型與其產仔性能, 應用 SAS (Statistical Analysis System) 套裝軟體之一般線性模式 (general linear model, GLM) 與最小平方平均法 (least square means) 進行分析 (SAS, 2013) 。

結果與討論

I. miR-27a 基因型分析法比較

參考 Lei *et al.* (2011) 的檢測方法，將 580 bp 長的 PCR 產物經過限制酶 *HpaII* 作用後，再由電泳分離結果得知 AA 基因型含有 319 與 261 bp 二條帶，AB 基因型則有 319、261、141 及 120 bp 等 4 個條帶（圖 1A）。另外，應用 MS-PCR 的技術，開發一種較省時省工與分析成本的新檢測方法。利用新開發的檢測法，PCR 產物經過電泳分離後，AA 基因型具有 121 bp 的一個條帶，AB 基因型則含有 102 與 121 bp 兩種大小的條帶（圖 1B），另理論上 BB 基因型應僅具一個 102 bp 的條帶。相同樣品經過不同鑑別法分析，發現兩者結果一致，都可獲得樣品的正確基因型資訊（圖 1）。如表 1 所示，以一次分析 48 個樣品為例，應用 MS-PCR 檢測法約可較 PCR-RFLP 法節省 3 小時（50%）的檢測時間（人力操作與限制酶作用時間），以及節省新臺幣 540 元分析成本（半盤 96 孔分析盤 40 元、限制酶 480 元（10 元 / 樣品）、其他耗材 20 元）。若不計分析成本，購置基因晶片分析系統或即時 PCR 定量分析系統，採用比較昂貴的基因晶片或螢光引子、反應試劑和耗材，將可提升分析效率（Wang *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2018; Ding *et al.*, 2021）。本研究開發之新檢測法，僅需利用一般之 PCR 儀器與電泳設備，且以目前種豬產業協會進行種豬重要基因型，如緊迫基因與多產基因分析的操作模式與分析樣品數量而言，此檢測法已可符合基因型分析需求。

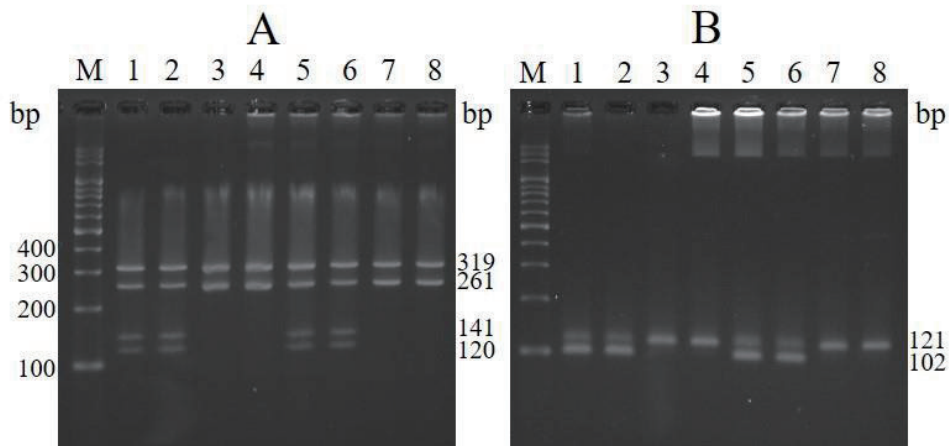


圖 1. miR-27a 基因型電泳分析結果。

A: PCR-RFLP; B: MS-PCR, M: DNA 大小標梯；AA 型：Lanes 3, 4, 7, 8；AB 型：Lanes 1, 2, 5, 6。

Fig. 1. The results of miR-27a genotyping by agarose gel electrophoresis.

Panel A: PCR-RFLP; Panel B: MS-PCR. M: DNA size ladder; AA genotype: Lanes 3, 4, 7, 8; AB genotype: Lanes 1, 2, 5, 6.

表 1. miR27-a 基因型鑑別法比較

Table 1. Comparison of miR-27a genotyping methods

Items	miR-27a genotyping method	
	MS-PCR	PCR-RFLP
Cost, NT\$		
96-well plate	40	80
PCR mixture	69	67
Restriction reaction mixture (<i>HpaII</i>)	-	502
Imaging	84	84
Time, h		
PCR	2	2
Restriction reaction	-	3
Imaging	1	1

A total of 48 samples were identified per test.

II. miR-27a 基因型頻率

以新開發之檢測法分析 9 家種豬場 942 頭豬 DNA 樣品的 miR-27a 基因型，其中 AA 型占 88.22%，AB 型 11.78%，然而並無發現 BB 型（表 2）。進一步分析各品種公、母豬的基因型分布，可得知藍瑞斯公、母豬為 AA 型與 AB 型的百分比分別為 88.79 vs. 90.70%、11.21 vs. 9.30%；約克夏為 81.13 vs. 83.65%、18.87 vs. 16.35%；杜洛克為 88.60 vs. 85.00%、11.40 vs. 15.00%。針對其中 109 頭具產仔數資料的經產母豬，包括 62 頭藍瑞斯豬、39 頭約克夏豬及 8 頭杜洛克豬，進行基因型與交替基因頻率分析，藍瑞斯、約克夏及杜洛克豬為 AA 型與 AB 型的百分比分別為 91.84 vs. 8.06%、87.74 vs. 10.26%、62.50 vs. 37.50%，因此得知 A 交替基因的頻率皆遠大於 B 交替基因（表 3）。Lei *et al.* (2011) 以 PCR-RFLP 方式分析 142 頭大白豬 miR-27a 基因型，結果僅 2 頭為 BB 型，占 1.41%，AB 型有 19 頭，占 13.38%，其餘 121 頭為 AA 型，因此，B 交替基因頻率為 0.081，而 A 交替基因頻率為 0.919。分析 36 頭本地種梅山豬，B 交替基因頻率 0.778 高於 A 交替基因頻率 0.222。另分析 120 頭合成品系 DIV 豬，A 交替基因頻率為 0.850，B 交替基因頻率為 0.150。Pang *et al.* (2019) 分析 432 頭具產仔性狀資料的大白豬母豬，在共計 1,587 胎數資料中，AA 型 1,138 胎，AB 型 388 胎，BB 型 61 胎，其中 BB 型占 3.84%。由上述參考文獻與本研究結果得知，BB 型在大白豬族群占比相當低。推測此結果的可能原因為豬群經過多世代的選育，不良的基因型逐漸汰除而致。另有研究指出，miR-27a 基因位於豬第 2 號染色體中結處，且與所在附近之木乃伊胎 QTL 有連鎖關係 (Holl *et al.*, 2004; Lei *et al.*, 2011)。

表 2. 種豬場豬 miR-27a 基因型分布

Table 2. Distribution of porcine miR-27a genotypes from stock pig farms

Breed	Sex	n	miR-27a genotype percentage, %		
			AA	AB	BB
Landrace	Male	116	88.79	11.21	0.00
	Female	298	90.70	9.30	0.00
	Subtotal	414	90.17	9.83	0.00
Yorkshire	Male	53	81.13	18.87	0.00
	Female	104	83.65	16.35	0.00
	Subtotal	157	82.80	17.20	0.00
Duroc	Male	351	88.60	11.40	0.00
	Female	20	85.00	15.00	0.00
	Subtotal	371	88.41	11.59	0.00
Total		942	88.22	11.78	0.00

n: number of pigs tested.

表 3. 純種經產母豬 miR-27a 基因型頻率

Table 3. miR-27a genotype frequency of parous purebred sows

Breed	n	miR-27a genotype percentage, %			Allele frequency	
		AA	AB	BB	A	B
Landrace	62	91.84	8.06	0.00	0.9597	0.0403
Yorkshire	39	89.74	10.26	0.00	0.9487	0.0513
Duroc	8	62.50	37.50	0.00	0.8125	0.1875
Total	109	88.99	11.01	0.00	0.9450	0.0550

n: number of parous sows tested.

III. miR-27a 基因型與產仔數相關性分析

以 SAS 軟體一般線性模式與最小平方平均法，分析經產母豬 miR-27a 基因型與產仔數性狀相關性時，可發現在初產的分析資料顯示，AA 型藍瑞斯母豬平均產仔數略高於 AB 型 (12.42 ± 0.41 頭 vs. 12.20 ± 1.39 頭)，在全胎次的資料分析，AA 型藍瑞斯母豬平均產仔數高於 AB 型 (13.30 ± 0.26 頭 vs. 11.57 ± 1.09 頭)，另在排除初產的分析資料中，AA 型藍瑞斯母豬平均產仔數顯著高於 AB 型 (14.01 ± 0.30 頭 vs. 10.00 ± 1.77 頭，P < 0.05)；AA 型杜洛克母豬平均產仔數不論初產 (8.20 ± 1.17 頭)、全胎次 (8.40 ± 0.42 頭)、排除初產 (8.50 ± 0.28 頭)，

皆低於 AB 型之產仔數 (9.00 ± 1.51 頭 vs. 9.00 ± 0.66 頭 vs. 9.00 ± 0.51 頭)；然 AA 型約克夏母豬平均產仔數不論初產 (13.40 ± 0.63 頭) 或全胎次 (14.53 ± 0.35 頭)，皆高於 AB 型產仔數 (12.00 ± 1.85 頭與 14.43 ± 0.95 頭)，然在排除初產資料中，AA 型約克夏母豬平均產仔數 (15.10 ± 0.40 頭) 低於 AB 型 (15.40 ± 1.05 頭) (表 4)。Lei *et al.* (2011) 分析 miR-27a 基因型與產仔數相關性，在合成品系 DIV 豬 56 胎初產資料顯示，AA 型之 TNB 為 11.214 ± 0.337 頭顯著高於 BB 型之 8.875 ± 0.772 頭 ($P < 0.01$)，亦高於 AB 型之 9.167 ± 0.892 頭 ($P < 0.05$)。另在 393 全胎次資料中，AA 型 TNB 為 11.560 ± 0.163 頭顯著高於 AB 型之 10.161 ± 0.494 頭 ($P < 0.01$)。在大白豬 50 胎初產資料中顯示，AA 型 TNB 為 10.543 ± 0.442 頭低於 AB 型之 11.333 ± 1.730 頭，但高於 BB 型之 10.000 ± 2.997 頭，另在 165 全胎次的分析資料，AA 型之 TNB 為 10.509 ± 0.231 頭高於 AB 型之 10.481 ± 1.188 頭與 BB 型之 9.725 ± 2.897 頭。Pang *et al.* (2019) 分析大白豬產仔性狀與 miR-27a 基因型的相關性，在 TNB 與 NBA 的比較中，AA 型比 BB 型分別多 0.30 頭與 0.26 頭，AA 型之 TNB 與 NBA 亦比 AB 型分別多 0.28 頭與 0.16 頭，且 TNB-EBV (the estimated breeding value of total number born) 的分析項目，AA 型為 0.45 ± 0.02 頭顯著高於 BB 型之 0.35 ± 0.10 頭 ($P < 0.05$)，但略低於 AB 型之 0.46 ± 0.04 頭。另於木乃伊胎數分析項目，BB 型為 0.50 ± 0.14 頭顯著高於 AB 型之 0.13 ± 0.05 頭 ($P < 0.05$)，亦高於 AA 型 (0.22 ± 0.03 頭)。綜合本研究與相關的文獻結果，AA 型的藍瑞斯與約克夏豬應為往後種豬基因型選育的目標。

表 4. 經產母豬 miR-27a 基因型與產仔數性狀之相關性分析

Table 4. Association analysis between miR-27a genotypes and litter size trait of parous sows

Breed	Parity	No. of litters	Litter size (least square means \pm SE)	
			AA	AB
Landrace	First	62	12.42 ± 0.41	12.20 ± 1.39
	Second to last	72	14.01 ± 0.30^a	10.00 ± 1.77^b
	All	134	13.30 ± 0.26	11.57 ± 1.09
Yorkshire	First	39	13.40 ± 0.63	12.00 ± 1.85
	Second to last	79	15.10 ± 0.40	15.40 ± 1.05
	All	118	14.53 ± 0.35	14.43 ± 0.95
Duroc	First	8	8.20 ± 1.17	9.00 ± 1.51
	Second to last	13	8.50 ± 0.28	9.00 ± 0.51
	All	21	8.40 ± 0.42	9.00 ± 0.66

^{a,b} Means within the same row without the same superscripts differ ($P < 0.05$).

結論

本研究已成功開發省時省工及節省分析成本的 miR-27a 基因型鑑別方法，分析顯示 miR-27a AA 型約克夏母豬比 AB 型有較高的產仔數，又在藍瑞斯母豬方面亦有類似結果，然全胎次的產仔數分析尚未達到顯著差異性水準。未來將擴大種豬群之檢測，驗證 miR-27a 基因標記之可利用性，俾利於種豬群的產仔數性能提升。

誌謝

本研究承農業部（原行政院農業委員會）經費支持（111 農科 -2.1.1- 畜 -L7、112 農科 -2.1.5- 畜 -L1），試驗期間承蒙畜產試驗所遺傳生理組蔡秀容小姐收集種豬資料與多家種豬場之支持，始克其功，特此致謝。

參考文獻

- 財團法人中央畜產會。2022。2021 臺灣養豬統計手冊。第 9 頁。臺北市。
- 廖仁寶、張秀鑾、賴永裕、劉錦條、吳明哲。1999。母豬造骨蛋白遺傳型對新生仔豬存活率之影響。中畜會誌 28：33-39。

- 廖仁寶、黃鈺嘉、賴永裕、顏念慈、吳明哲、張秀鑾。2006。以豬第一號染色體微衛星行遺傳標記交替基因頻率與序列比較經產母豬產仔性能。畜產研究 39：99-110。
- 廖仁寶、黃鈺嘉、賴永裕、吳明哲、張秀鑾。2013。豬第 8 號染色體微衛星型遺傳標記與經產母豬產仔性能之相關性研究。畜產研究 46：21-32。
- 廖仁寶、黃鈺嘉、賴永裕、吳明哲、張秀鑾。2014。豬第 6 號染色體微衛星遺傳標記與經產母豬產仔性能之相關性研究。畜產研究 47：71-82。
- Chhabra, R., Y. K. Adlakha, M. Hariharan, V. Scaria, and N. Saini. 2009. Upregulation of miR-23a, 27a, 24-2 cluster induces caspase dependent and -independent apoptosis in human embryonic kidney cells. PLoS ONE 4: e5848.
- Ding, R., Y. Qiu, Z. Zhuang, D. Ruan, J. Wu, S. Zhou, J. Ye, L. Cao, L. Hong, Z. Xu, E. Zheng, Z. Li, Z. Wu, and J. Yang. 2021. Genome-wide association studies reveals polygenic genetic architecture of litter traits in Duroc pigs. Theriogenology 173: 269-278.
- He, Y., X. Zhou, R. Zheng, Y. Jiang, Z. Yao, X. Wang, Z. Zhang, H. Zhang, J. Li, and X. Yuan. 2021. The association of an SNP in the EXOC4 gene and reproductive traits suggests its use as a breeding marker in pigs. Animals (Basel) 11: 521.
- Holl, J. W., J. P. Cassady, D. Pomp, and R. K. Johnson. 2004. A genome scan for quantitative trait loci and imprinted regions affecting reproduction in pigs. J. Anim. Sci. 82: 3421-3429.
- Kumchoo, T. and S. Mekchay. 2015. Association of NR4A1 and GNB2L1 genes with reproductive traits in commercial pig breeds. Genet. Mol. Res. 14:16276-16284.
- Kwok, S., D. E. Kellogg, N. McKinney, D. Spasic, L. Goda, C. Levenson, and J. J. Sninsky. 1990. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. Nucleic Acids Res. 18: 999-1005.
- Lei, B., S. Gao, L. F. Luo, X. Y. Xia, S. W. Jiang, C. Y. Deng, Y. Z. Xiong, and F. E. Li. 2011. A SNP in the miR-27a gene is associated with litter size in pigs. Mol. Biol. Rep. 38: 3725-3729.
- Lockley, A. K., J. S. Bruce, S. J. Franklin, and R. G. Bardsley. 1996. Use of mutagenically separated PCR for the detection of the mutation associated with porcine stress syndrome. Meat Sci. 43: 93-97.
- Marantidis, A., G. P. Laliotis, and M. Avdi. 2016. Association of RBP4 genotype with phenotypic reproductive traits of sows. Genet. Res. Int. 2016: 4940532.
- Pang, P., Z. Li, H. Hu, L. Wang, H. Sun, S. Mei, and F. Li. 2019. Genetic effect and combined genotype effect of ESR, FSH β , CTNNAL1 and miR-27a loci on litter size in a Large White population. Anim. Biotechnol. 30: 287-292.
- Rust, S., H. Funke, and G. Assmann. 1993. Mutagenically separated PCR (MS-PCR): a highly specific one step procedure for easy mutation detection. Nucleic Acids Res. 21: 3623-3629.
- SAS. 2013. SAS user guide: Statistics. SAS Inst., Cary, NC., USA.
- Wang, Y., X. Ding, Z. Tan, K. Xing, T. Yang, Y. Wang, D. Sun, and C. Wang. 2018. Genome-wide association study for reproductive traits in a Large White pig population. Anim. Genet. 49: 127-131.
- Wu, P., K. Wang, Q. Yang, J. Zhou, D. Chen, J. Ma, Q. Tang, L. Jin, W. Xiao, A. Jiang, Y. Jiang, L. Zhu, M. Li, X. Li, and G. Tang. 2018. Identifying SNPs and candidate genes for three litter traits using single-step GWAS across six parities in Landrace and Large White pigs. Physiol. Genomics 50: 1026-1035.

Genotyping improvement for a candidate marker miR-27a associated with porcine litter size trait ⁽¹⁾

Ren-Bao Liaw ⁽²⁾ Si-Ya Wang ⁽²⁾ Yu-Syuan Lu ⁽³⁾ Jo-Ching Chen ⁽²⁾ Yung-Yu Lai ⁽²⁾
Kuei-Juh Liu ⁽³⁾ and Mei-Ping Cheng ⁽⁴⁾⁽⁵⁾

Received: Aug. 29, 2023 ; Accepted: Oct. 24, 2023

Abstract

The miR-27a genetic marker is one of the candidate markers for porcine litter size traits. The purpose of this study was to use MS-PCR (mutagenically separated polymerase chain reaction) technology to improve the conventional genotyping method of miR-27a, so as to facilitate the genotype identification of more stock pigs and to evaluate the marker availability for the pig industry. According to the references, the different genotypes of miR-27a were identified by the conventional PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) method, and three different specific primers were designed to test the PCR reaction mixture composition and the reaction temperature conditions for successful genotyping. The genotypes of 942 pigs from 9 breeding farms were identified by the newly developed genotyping method, and the results showed that the percentages of AA, AB and BB genotypes were 88.22, 11.78 and 0.00%, respectively. The genotypes of 109 parous sows with litter size trait were analyzed, and the percentages of AA, AB, and BB types were 88.99, 11.01, and 0.00%, respectively. In addition, the preliminary association analysis between genotypes and litter size trait showed that the Landrace and Yorkshire sows with an AA genotype had a higher litter size than those of AB genotype. The newly developed method that saves time, labor and analysis costs can be easily employed to genotype more stock pigs by using a simple equipment. In the future, the marker miR-27a is expected to be incorporated into the breeding scheme of stock pigs to improve their litter size performance.

Key words: Litter size trait, Candidate marker, Pig.

(1) Contribution No. 2769 from Taiwan Livestock Research Institute (TLRI), Ministry of Agriculture (MOA).

(2) Genetics and Physiology Division, MOA-TLRI, HsinHua, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(3) Formosan Farmers Association for Swine Improvement, Taipei 100011, Taiwan, R. O. C.

(4) Deputy Director General Office, MOA-TLRI, HsinHua, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(5) Corresponding author, E-mail: mpcheng@mail.tlri.gov.tw.

番鴨誘導多能性幹細胞株之建立與水禽小病毒感染測試⁽¹⁾

劉振發⁽²⁾ 張家語⁽²⁾ 曲鳳翔⁽²⁾ 陳立人⁽²⁾⁽³⁾

收件日期：2023 年 9 月 7 日；接受日期：2023 年 11 月 2 日

摘 要

本研究目的為建立番鴨誘導多能性幹細胞 (muscovy duck induced pluripotent stem cells, mdiPSCs)，並進行水禽小病毒 (waterfowl Parvovirus) 感染測試，評估此細胞株作為疫苗生產之潛力。試驗利用慢病毒 (lentivirus) 將 LIN28, NANOG, SOX2, OCT3/4, KLF4 和 C-MYC 等轉錄因子轉染番鴨胚胎纖維母細胞 (muscovy duck embryonic fibroblasts, mdEFs)，經約 7 – 10 天後 mdEFs 逐漸由梭狀轉為圓形之上皮細胞形態，持續培養 35 – 40 天後則形成類似幹細胞群落形態。mdiPSCs 體外培養已超過 45 繼代 (380 天)，經分化多能性細胞標誌 AP 與 PAS 染色後呈現陽性反應；使用懸浮小滴培養技術培養，具有形成類胚體 (embryoid body) 能力；顯示所建立之番鴨誘導多能性幹細胞具有分化多能性與分化潛能。以聚合酶連鎖反應進行檢測，證實經水禽小病毒直接感染後之 mdiPSCs，及經病毒感染 mdiPSCs 之回收細胞液共培養的 mdiPSCs，結果均呈陽性反應，證實水禽小病毒可感染本研究建立的 mdiPSCs，並可以在其細胞內順利複製病毒顆粒，顯示本研究建立的 mdiPSCs 可作為水禽小病毒宿主細胞及具疫苗生產之潛力。

關鍵詞：番鴨、胚胎纖維母細胞、誘導多能性幹細胞、水禽小病毒。

緒 言

Takahashi and Yamanaka 於 2006 年首次發表，利用 *Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc*, *Klf4* 等特定的基因轉染至小鼠胚胎纖維細胞 (mouse embryonic fibroblasts, MEFs)，誘導細胞進行再程式化 (reprogramming)，產製出具有分化多能性之幹細胞；並且可以在其衍生的畸胎瘤 (teratoma) 的切片中，檢出分化為軟骨細胞、神經細胞、肌肉細胞、脂肪細胞與上皮細胞等不同胚層的細胞。這是世界第一例的誘導多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs)，因此突破性的研究成果 Yamanaka 與英國科學家 John B. Gurdon 共同獲得 2012 諾貝爾醫學獎之殊榮。迄今 iPSC 已被廣泛應用於疾病模式、藥物篩選及細胞治療等多項生物醫學研究，為幹細胞科技與再生醫學開創全新發展的領域。

家禽幹細胞的來源有二，一是自 stage X 的胚盤細胞分離獲得之胚幹細胞 (embryonic stem cell, ESC)，二是由始基生殖細胞培養而來的胚生殖幹細胞 (embryonic germ cell, EGC) (Pain *et al.*, 1996; van de Lavoie *et al.*, 2006)。Lu *et al.* (2012) 利用哺乳動物的特定的基因 (*POU5F1*, *NANOG*, *SOX2*, *LIN28*, *KLF4*, *C-MYC*) 轉殖到鵝鵝胚胎纖維母細胞 (quail embryonic fibroblasts, qEFs)，成功誘導胚胎纖維母細胞進行再程式化，轉變成具有類似胚幹細胞特性與功能的細胞株，並將誘導後的細胞移植到雞胚胎，也證實誘導後的細胞能在雞胚體內順利移行分化，形成嵌合體 (chimaera)。這是第一例禽類利用哺乳動物基因進行並成功產製家禽誘導多能性幹細胞的研究。

家禽是一種很好的模式生物，常被使用在發育生物學與疾病模式之研究 (Naito 2003; Farzaneh *et al.*, 2016; Farzaneh *et al.*, 2017)。另外，許多疫苗的生產也是利用家禽的胚胎或是初代培養的雞胚纖維母細胞 (primary chicken embryonic fibroblasts) 生產，但此方式確有其潛在的風險，例如無特定病原雞蛋短缺、病毒株毒性過強無法利用雞胚蛋培養。相對地，細胞培養製程技術，是目前世界上公認的疫苗發展的最新趨勢。國外疫苗廠紛紛尋找胚胎蛋之替代生物基質來進行疫苗生產。以流感疫苗生產為例，細胞培養生產流感疫苗之技術已成為最佳替代方案。因此，近年來亦有成功開發利用由鴨的胚幹細胞 (EB66 細胞株) 作為疫苗與蛋白質生產平台 (Olivier *et al.*, 2010)。

目前水禽小病毒疫苗的產製是以最少疾病 (minimum disease, MD) 番鴨 (*Muscovy, Cairina moschata*) 之胚蛋進行生產。然而，番鴨產蛋有季節性，於非產蛋季節恐有胚蛋供應不足之慮。雖然可於非產蛋季節利用人工光照來

(1) 農業部畜產試驗所研究報告第 2770 號。

(2) 農業部畜產試驗所遺傳生理組。

(3) 通訊作者，E-mail: rchen131@gmail.com

調節以持續供應疫苗生產所需之胚蛋。然而，飼養於密閉式水簾鴨舍，因不鏽鋼網狀高床致使鴨隻趾瘤症情形嚴重，進而造成動物福祉問題。本研究擬透過番鴨誘導性幹細胞研究，期望建立番鴨誘導多能性幹細胞株，並評估提供作為未來疫苗生產平台之應用，以及取代現行以胚蛋生產疫苗之可行性；另外，番鴨誘導多能性幹細胞株的建立亦可提供相關生醫研究試驗使用，並能達到減量（reduction）、取代（replacement）、精緻化（refinement）之試驗動物使用目標。

材料與方法

I. 番鴨胚胎纖維母細胞（muscovy duck embryonic fibroblasts, mdEFs）分離與培養

- i. 取入孵 9 天的番鴨胚胎，將血液與蛋黃洗淨後，然後移至另一皿中裝有 10 mL DPBS 的培養皿中將胚體的頭部與內臟去除。
- ii. 將去除頭部與內臟的胚體移至裝有 3 mL 的 0.25% Trypsin / 0.02% EDTA 溶液的 6 cm 無菌培養皿中，以滅菌剪刀將其細切為組織碎片。以無菌之 5 mL 注射筒將上述含組織碎片的 0.25% Trypsin / 0.02% EDTA 溶液吸入注射筒中，再予以推出。重複吸推數次將組織碎片細化之。
- iii. 將細化含組織碎片的 0.25% Trypsin / 0.02% EDTA 溶液注入 6 cm 無菌培養皿中，移入 38.5°C 的二氧化碳培養箱中培養 5 分鐘。
- iv. 將含組織碎片的 0.25% Trypsin / 0.02% EDTA 溶液移到離心管中，加入培養液（DMEM + 10% FBS + 1% Penicillin / Streptomycin, Sigma-Aldrich）到 10 mL，充分混合後，將離心管直立靜置在室溫中 5 分鐘。
- v. 以 358 × g 離心 5 分鐘，移除上清液後將細胞打散後，再加入培養液到 10 mL，以相同條件再離心一次。
- vi. 將細胞數調整成 1×10^6 /mL 置於 10 cm 的培養皿中，移入 38.5°C 與含 5% CO₂ 空氣及相對溼度 100% 培養條件下之培養箱中培養。
- vii. 培養期間每 2 – 3 天更換一次培養液，當細胞長到覆蓋 70 – 80% 之培養皿表面時，立即進行繼代培養或進行冷凍，以維持細胞旺盛的分裂能力。

II. 再程式化（reprogramming）重整因子轉染產製番鴨誘導多能性幹細胞

利用市售的重整因子套組（set of lentivirus : *EF1A-driven LIN28*, *NANOG*, *SOX2*, *OCT3/4*, *KLF4* and *C-MYC*, Cat. # LV01006L, Creative Biogene, USA）進行 mdEFs 細胞再程式化。其外源重整因子基因之轉染操作流程略述如下，先將 6 個再程式化重整因子分裝（3 μ L/ 瓶）置於 -80°C 保存備用。將培養 2 – 3 代後之 mdEFs 取 6×10^5 /mL 的細胞置換到 3 公分的六孔培養盤（Thermo Fisher, Nunclon Delta for adherent cells, Cat. No. 140675）進行培養，並在細胞生長到 50 – 70% 滿後將培養液移除。同時取出已分裝之凍存的再程式化重整因子，置於 30°C 水浴槽解凍後，分別加入已備妥之 1 mL 的培養液，輕輕混合後加入到培養皿中，再加入 2 mL 的培養液，混勻以進行 mdEFs 轉染操作；隨後立即將細胞移入培養箱於 37°C 與含 5% CO₂ 條件下培養，24 小時後移除轉染操作的培養液，並將培養液換為 mTeSR™ 1 Medium (mTeSR™ 1 Complete Kit Cat. #85850, STEMCELL Technologies, USA) 進行後續之細胞誘導培養。約 30 天後再將細胞與經絲裂黴素（mitomycin C）不活化處理之小鼠胎體纖維母細胞（STO mouse embryonic fibroblast, CRL-1503, ATCC）進行共培養約 30 天，再將細胞自與 STO 共培養中分離，重新置換到經 0.1% Matrigel® 處理之 4 孔細胞培養皿進行培養。

III. 誘導多能性幹細胞的特徵檢測分析

收經過誘導後的類幹細胞群落之細胞，選用已被發表用來檢測家禽幹細胞的特徵之細胞標誌鹼性磷酸酶（alkaline phosphatase, AP）抗原活性分析與過碘酸 Schiff 氏染色（periodic acid-Schiff stain, PAS）細胞染色分析，來進行細胞誘導確認。鹼性磷酸酶（alkaline phosphatase, AP）抗原活性分析：將培養盤中的細胞培養液吸除，以 PBS 清洗一次，再加入 1 mL 含 4% 福馬林的無水酒精固定細胞 5 分鐘，以 PBS 清洗二次後，加入 1 mL 反應試劑（alkaline phosphatase detection kit, Chemicon），於室溫下反應 15 分鐘後以 PBS 清洗二次，再以顯微鏡進行呈色反應之觀察。

過碘酸 Schiff 氏染色（periodic acid-Schiff stain, PAS）細胞染色分析：將培養盤中的細胞培養液吸除，以 PBS 清洗一次，再加入 1 mL 含 4% 福馬林的無水酒精固定細胞 5 分鐘，以 PBS 清洗二次後，加入 1 mL Periodic acid (Sigma-Aldrich)，於室溫下反應 5 分鐘後以 PBS 清洗二次。再加入 Schiff reagent (Sigma-Aldrich)，於室溫下反應 15 分鐘後以 PBS 清洗二次，再以顯微鏡進行呈色反應之觀察。

IV. 類胚體（embryoid body, EB）形成測試

利用培養皿之上蓋製作 mTeSR™ 1 Medium 細胞懸浮培養小滴，每滴約 20 μ L。培養皿底部加入 5mL PBS 以提供濕度防止小滴蒸發。將約 2.0×10^6 個未分化之 mdiPSCs 置入單一懸浮培養小滴中，培養於 38.5 °C 與含 5% CO₂ 之空氣的培養箱中，以誘發 EB 形成。

V. 水禽小病毒的感染測試

水禽小病毒是使用水禽小病毒活毒疫苗（動物製藥第 08212 號，家畜衛生試驗所，臺灣）進行感染。操作流程如下：

- i. 將 mdiPSCs (2.0×10^5 /mL) 置於 10 cm 病毒培養皿 (Thermo Fisher, Nunclon Delta for adherent cells, Cat. No. 150464) 以 DMEM + 10% FBS 於 38.5 °C 與含 5% CO₂ 之空氣的培養箱中培養，24 小時後。再換成 DMEM + 2% FBS 繼續培養 12 小時後進行病毒接種。
- ii. 將病毒調整為 $10^{1.5} - 10^{2.5}$ TCID₅₀ / mL，取 500 μ L 輕輕滴入病毒培養皿進行病毒接種，並放置於 38.5 °C 培養箱進行培養。
- iii. 病毒接種後培養 36 – 72 小時，每天觀察細胞是否有發生細胞病變作用 (cytopathic effect, CPE) 或死亡的現象。

VI. 病毒回收

水禽病毒感染細胞後產生 80 – 90% CPE 或死亡時，即將細胞及病毒刮下收集至 15 mL 離心管，以下列步驟進行病毒的回收：

- i. 將大部分的培養液移除，僅留 2 – 3 mL 培養液在培養皿內。
- ii. 以細胞刮杓刮下細胞 / 病毒混合物後，和剩下的培養液混合均勻。
- iii. 將每個培養皿的細胞 / 病毒混合液從培養皿中吸出置於 15 mL 離心管中。於 -80°C 冷凍解凍三次後，以 805 \times g 進行離心 20 分鐘。收集上清液並分裝凍存於 -80°C 冰箱。

VII. 水禽小病毒檢測

將經水禽小病毒感染後回收的細胞及未感染之細胞，利用病毒核酸萃取商業套組 (Xpress Virus DNA/RNA Kit, Cat# K1361-4, BioVision, Inc. USA) 進行 DNA 萃取，再以聚合酶連鎖反應方式進行檢測，針對水禽小病毒檢測所設計之引子：5'-CCAAGCTACAACAACCACAT-3' (sense) 和 5'-TGAGCGAACATGCTATGGAAGG-3' (antisense)。PCR 反應條件為：94 °C，1 分鐘；之後進行 35 個 cycles 的 denature：94 °C，15 秒；annealing：50°C，30 秒；extension：72 °C，30 秒，接著 72°C，5 分鐘後 (final extension)，維持在 4°C。若為陽性者，經電泳分析則可擴增 1 段長度 539 bp DNA 片段 (Zadori *et al.*, 1995.)。

結果與討論

I. 番鴨之胚纖維母細胞分離與誘導多能性幹細胞培養

mdEFs 細胞是源自番鴨孵化第 9 天的胚胎組織分離而得，取得之 mdEFs 細胞以 DMEM+10% FBS (內含 100 U/mL penicillin 及 100 g/mL streptomycin) 之培養液進行培養。自番鴨胚胎組織所分離的 mdEFs 於培養 24 小時後，即進行培養液更換，以移除未貼附的死亡細胞與懸浮的組織碎片，經過 2 – 3 次的培養液更換，即可將未貼附的死亡細胞與懸浮的組織碎片移除乾淨，如此即可得到純化的 mdEFs。之後定期每 2 天更換培養液，經過 48 小時培養後可見 mdEFs 開始增生，約 6 – 7 天時進行繼代，培養的過程中已建立初代之 mdEFs 株 (圖 1) 並凍存。

取培養第 3 代的 mdEFs 進行重整合因子轉染誘導，使用 6 孔培養盤每孔放置約 6×10^5 的細胞，再利用已構築之 iPS Lentivirus-LIN28, Lentivirus-NANOG, Lentivirus-SOX2, Lentivirus-OCT3/4, Lentivirus-KLF4 和 Lentivirus-C-MYC 再程式化重整合因子進行轉染。24 小時後移除轉染液，並將培養液換為 mTeSR1 stem cell medium。培養期間定期更換細胞培養液，並持續觀察 mdEFs 之形態變化。轉染後之初代 mdEFs 經 7 – 10 天培養時，細胞形態逐漸由梭狀轉變為圓形之上皮細胞形態；經 35 – 40 天培養才觀察到細胞開始聚集，形成幹細胞群落 (colonies) 樣態 (圖 2)。此與其他禽類同樣經由再程式化重整合因子轉染進行 iPSC 誘導之研究結果有所不同，雞胚胎纖維母細胞經再程式化重整合因子轉染後，5 – 6 天可觀察到細胞形態改變，約 9 天後細胞即開始聚集形成類幹細胞之群落形態 (Liou *et al.*, 2019)；鵝的胚胎纖維母細胞，經再程式化重整合因子轉染，約 24 小時可見細胞形態的改變，6 天後即形成類幹細胞之群落形態 (Lu *et al.*, 2012)。Fuet *et al.* (2018) 以雞與鴨的胚胎纖維母細胞利用重整合因子轉染，進行雞與鴨 iPSC 誘導之研究指出，雞與鴨分別在轉染後約 5 – 8 天與 30 – 40 天細胞會聚集形成幹細胞之群落樣態，兩者細胞形態改變的時間有顯著的差異。作者推測雖然雞與鴨同為鳥類物種 (avian

species)，但在演化過程中於 6,000 萬年前兩者在基因上已發生了分歧的改變所致。

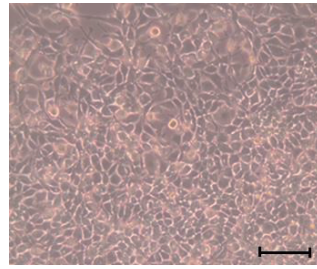


圖 1. 自孵化第 9 天番鴨胚胎分離之鴨胚纖維母細胞 (mdEFs) 的形態。

Fig. 1. The morphology of muscovy duck embryonic fibroblasts (mdEFs) collected from a 9-day-old embryo. Scale bar = 100 μ m.

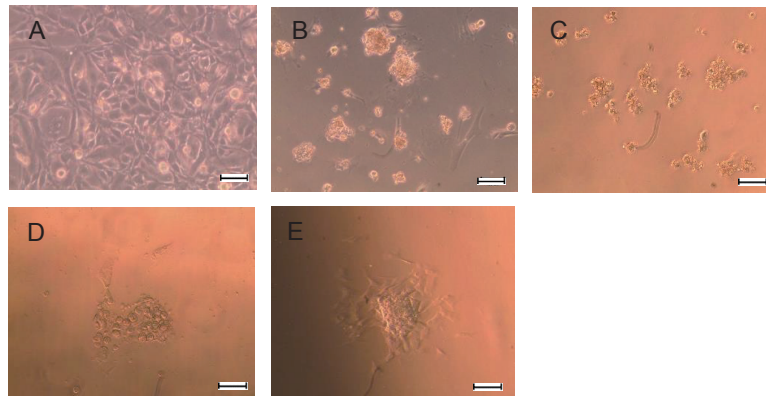


圖 2. 番鴨之胚纖維母細胞 (mdEFs) 經再程式化重整因子 (*LIN28*, *NANOG*, *SOX2*, *OCT3/4*, *KLF4* 和 *C-MYC*) 轉染後之細胞形態。A: mdEFs 再程式化重整因子轉染前; B: 轉染後第 9 天; C: 轉染後第 11 天; D: 轉染後第 32 天。E: 轉染前後第 45 天。

Fig. 2. The morphology of mdEFs infected with reprogramming factors (*LIN28*, *NANOG*, *SOX2*, *OCT3/4*, *KLF4* and *C-MYC*), A: mdEFs prior to infection, B: Day 9 post transduction, C: Day 11 post transduction, D: Day 32 post transduction. E: day 45 post transduction. Scale bar = 100 μ m

本研究經過上述細胞再程式化重整因子轉染後之 mdEFs 雖然有明顯聚集形成幹細胞之群落樣態，惟在初期的誘導培養期間，細胞雖有因再程式化重整因子的導入進行內部基因的重整而改變形態並聚集形成幹細胞之群落，但生長狀態出現增生緩慢的現象。因此，將重整後的細胞置放到經絲裂黴素 (mitomycin C) 不活化處理 STO 作為供養層細胞進行培養，重整細胞在與 STO 供養層細胞共培養的情況下增生緩慢的現象獲得改善。但是重整細胞形成群落的情形不明顯，只出現小的細胞群落，無法像一般胚幹細胞幹細胞可以形成明顯而較為緊湊聚集的細胞群落之樣態。此現象亦發生在鸚鵡 iPSC 的研究中，作者將誘導的鸚鵡 iPSC 自 STO 移除，重新置換到以 0.1% Matrigel[®] 處理之培養皿，並將培養液更換成 mTeSR1 stem cell medium 成功建立鸚鵡 iPSC (Lu *et al.*, 2012)。故本實驗亦參照其操作，在誘導細胞與 STO 共培養約 1 個月後，就將重整細胞自與 STO 共培養中分離，重新置換到以 0.1% Matrigel[®] 處理之 4 孔細胞培養皿。重整細胞自 STO 分離後單獨培養，其生長速率明顯改善，而且增生的細胞會相互聚集形成明顯的細胞群落 (圖 3)。

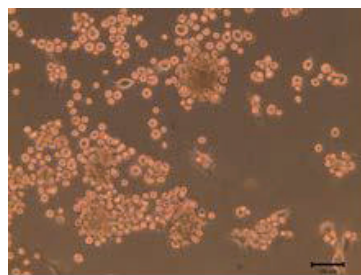


圖 3. mdiPSC 增生聚集形成明顯的細胞群落。

Fig. 3. The mdiPSC proliferated and aggregated to form distinct colonies. Scale bar = 100 μ m.

利用細胞再程式化重整合因子轉染，進行 mdiPSCs 誘導過程中，並非所有 mdEFs 均被成功轉染。因此，在誘導後的培養過程中，於初期仍可觀察到 mdEFs 的存在。惟此現象隨會著細胞繼代培養次數的增加而逐漸減少，約在細胞經過 8 個繼代後就少有發現，持續培養至 12 – 13 繼代後就再也沒有發現 mdEFs 的存在（圖 4）。此乃因 mdEFs 為已分化之細胞，無法於體外長時間的培養，故此等未被重新編程改造因子轉染之 mdEFs 存在的情形會隨著繼代培養時間的增加而減少，最後僅留下有成功被重整合的 mdiPSCs 存活。截至目前 mdiPSCs 已於體外無滋養層培養條件下，培養超過 45 繼代（380 天），並已凍存於液態氮中。冷凍保存的 mdiPSCs 解凍後再培養仍保有良好的存活率與生長效率。

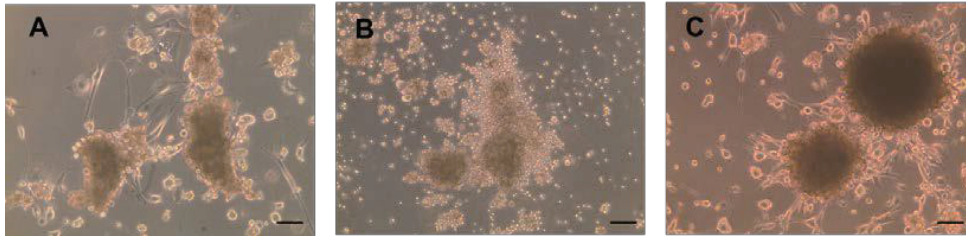


圖 4. mdiPSCs 於不同繼代培養，均呈現類幹細胞之群落形態。A：第 6 代。B：第 12 代。C：第 26 代。

Fig. 4. Colony morphology of mdiPSCs at different passages. A: Passage 6. B: Passage 12. C: Passage 26. Scale bar=100 μ m

II. 誘導多能性幹細胞關鍵標誌檢測

鴨胚生殖細胞（EGCs）之細胞質含有肝醣（glycogen）顆粒，在組織學上可利用 PAS 染劑將肝醣染色獲得證實，並被視為家禽幹細胞的特徵之一（Meyer, 1960）。而細胞中可檢出 AP 之活性表現已被用來鑑定胚幹細胞（ESCs）多能性的關鍵標誌。本研究經細胞再程式化誘導後形成類似幹細胞群落之細胞，是選用上述已被發表用來檢測鴨的 EGCs（Guan *et al.*, 2010）和 PGCs（Chen *et al.*, 2019）的分化多能性細胞標誌 PAS 和 AP 進行分化多能性測試（Jung *et al.*, 2005；van de Lavoie *et al.*, 2006；Liou *et al.*, 2012）。結果顯示經過再程式化誘導後具類似幹細胞群落形態之 mdiPSCs 經以 PAS（培養 20 繼代）與 AP（培養 25 繼代）的檢測均呈陽性反應（圖 5），顯示具有幹細胞之分化多能性。

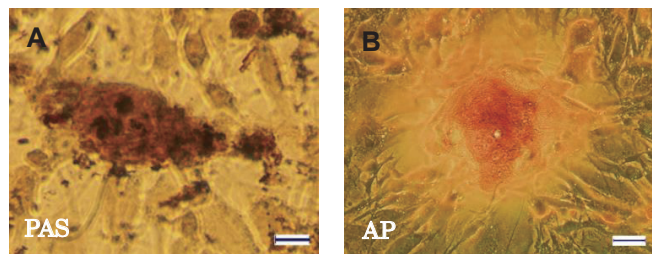


圖 5. mdiPSCs 以 periodic acid-Schiff（PAS）和 Alkaline phosphatase（AP）染色均呈陽性反應。A：PAS 染色（第 20 代）；B：AP 染色（第 25 代）。

Fig. 5. The mdiPSCs were stained positive with periodic acid-Schiff (PAS) and alkaline phosphatase (AP). A: PAS staining (Passage 20). B: AP staining (Passage 25). Scale bar = 50 μ m.

III. 類胚體形成

具有分化多能性的 ESCs 和 EGCs 除了表現特定專一性的細胞標誌外，形成 EBs 亦是 ESCs（Evans and Kaufman, 1981）和 EGCs 具有是分化多能性（pluripotent）的特徵之一。胚幹細胞衍生的 EBs 具分化形成三個胚層的能力及形成各種不同型態的細胞潛能（Doetschman *et al.*, 1985；Shen and Leder, 1992；Desbaillets *et al.*, 2000），因此 EBs 的形成是常被用於測試幹細胞株具三胚層細胞分化潛力的指標。Guan *et al.*（2010）指出鴨 EG 細胞進行懸浮培養約在第 8 天可觀察到 EBs 的形成。本研究取培養 20 繼代的 mdiPSCs 以懸浮培養進行誘發為類胚體測試。結果顯示，mdiPSCs 於懸浮培養 7 – 10 天後觀察可見細胞聚集形成圓球狀結構之類胚體（圖 6），顯示細胞具有體外分化的能力。

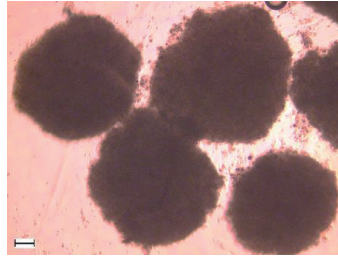


圖 6. 利用懸浮培養可誘發 mdiPSCs 形成類胚體。

Fig. 6. The embryoid body formation of was mdiPSCs induced by hanging-drop culture.
cale bar = 100 μ m.

IV. 小病毒感染測試

為確認建立的細胞株是否可作為水禽小病毒的宿主細胞並複製其病毒顆粒，以評估進一步提供做為疫苗生產之可行性。故使用家畜衛生試驗所生產的水禽小病毒活疫苗對 mdiPSCs 細胞進行水禽小病毒感染測試。mdiPSCs 以 DMEM + 10 % FCS 培養，待細胞生長到約 80 – 90%，將培養液換成 DMEM + 2 % FCS 繼續培養 12 小時後，再進行病毒接種。細胞經病毒接種感染後 48 – 72 小時可觀察到受感染的細胞變圓並收縮之 CPE 或死亡的現象（圖 7）。

Saleh and Khodier (2020) 以源自現場確認感染鵝小病毒 (goose parvovirus, GPV) 的鴨隻分離出 GPV 病毒，將其感染到鴨胚胎纖維母細胞，在感染後 72 小時可觀察到受感染的細胞型態變圓並縮小之 CPE 現象；到 96 – 120 小時，整個單層 (monolayer) 細胞也因小病毒的感染發生細胞剝落情形。上述的感染後發生 CPE 的時間與細胞型態的改變在本實驗亦觀察到相似情形。Zhang *et al.* (2019) 利用間接免疫螢光分析 (indirect immunofluorescence assay, IFA) 法進行 GPV 在 DFEs 複製觀察指出，GPV 在感染後 24 – 48 小時可觀察到複製情形，48 小時病毒快速複製並在 96 時達到複製高峰，於 120 小時後病毒量已趨於穩定。

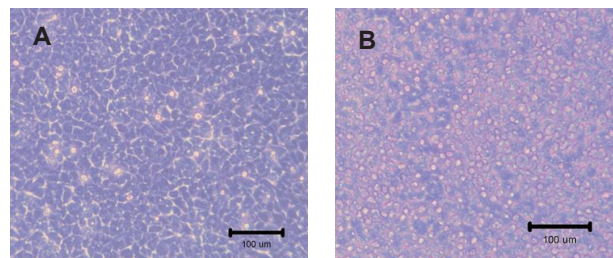


圖 7. mdiPSCs 水禽小病毒感染測試。A：細胞沒有接種水禽小病毒。B：細胞接種水禽小病毒後培養 72 小時，發生細胞病變作用 (CPE)。

Fig. 7. Morphology detection of mdiPSCs after waterfowl parvovirus infection. A: Control cells without infection. B: Cytopathic effect (CPE) exhibited at 72 hours after waterfowl parvovirus infection. Scale bar = 100 μ m.

本研究在病毒感染後約 100 – 120 小時，觀察到約 80 – 90% mdiPSCs 出現 CPE 時，即將 mdiPSCs 連同其培養液進行回收並凍存於 -80°C 。將回收細胞懸浮液以反覆 3 次的 -80°C 冷凍 / 37°C 解凍，致使細胞破裂釋放出病毒顆粒，再進行離心 ($805 \times g / 5$ 分鐘) 回收含有病毒顆粒之上清液。並以此上清液，再次進行 mdiPSCs 之細胞感染，以做為進一步確認水禽小病毒是否可於本 mdiPSCs 之細胞株進行病毒顆粒的複製增殖。

利用前述回收上清液感染後的 mdiPSCs，經 PCR 的方式進行檢測，結果均可檢出表現水禽小病毒專一特有的 539 bp 片段的陽性反應。此結果證實本研究所建立的 mdiPSCs 細胞株確實可作為水禽小病毒宿主細胞，而經水禽小病毒感染後病毒可於細胞內進行複製，且所複製的病毒顆粒亦可再次感染細胞。此外，本研究同時也可以從沒有進行水禽小病毒感染操作的對照組 mdiPSCs 細胞 PCR 檢測呈陰性反應之結果，顯示本實驗建立之 mdiPSCs 細胞株為 parvovirus free (圖 8)。

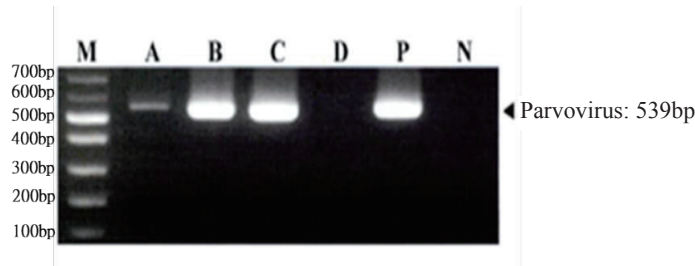


圖 8. 以聚合酶連鎖反應檢測經水禽小病毒感染的 mdiPSCs 細胞。M：100 bp DNA ladder marker。A：以水禽小病毒感染之細胞。B 和 C：以水禽小病毒感染後回收細胞上清液感染之細胞。D：沒有進行水禽小病毒感染之細胞。P：陽性對照組。N：陰性對照組。

Fig. 8. Polymerase chain reaction (PCR) analysis of waterfowl parvovirus-infected mdiPSCs. M: 100 bp DNA ladder marker. A: Cells infected with waterfowl parvovirus. B and C: Cells infected with cell supernatants isolated from the waterfowl parvovirus-infected mdiPSCs. D: The mdiPSCs without infection with waterfowl parvovirus. P: Positive control. N: Negative control.

目前商用疫苗生產主要採用胚胎蛋製程與細胞培養製程二種方式，然而以胚胎蛋來生產疫苗仍是有潛在風險，如一旦爆發禽流感，合格等級蛋源的取得極可能出現不足，以致影響到疫苗生產作業。相對的，細胞培養製程技術，是目前世界上公認的疫苗發展的最近趨勢。國外疫苗廠紛紛尋找替代胚胎蛋的生物基質來進行疫苗生產。以流感疫苗生產為例，細胞培養生產流感疫苗之技術已成為最佳替代方案。Madin-Darby canine kidney cells (MDCK) 和 African green monkey kidney epithelial cells (Vero) 等哺乳類細胞株已被廣泛研究並利用於製造商用的流感病毒疫苗 (Liu *et al.*, 2009; Ehrlich *et al.*, 2012)。然而，雖然已有開發以禽類 iPSC 用作疫苗生產 (Shittu *et al.*, 2016; Liou *et al.*, 2019) 之研究，亦有成功開發利用由鴨子的胚幹細胞 (EB66 細胞株) 作為疫苗與蛋白質生產平臺 (Olivier *et al.*, 2010) 的研究結果，但可用於商業化疫苗生產的禽類 iPSC 細胞株的製程仍尚在起步階段，值得進一步研發使技術製程的進展更為成熟。

國內水禽小病毒疫苗目前是利用 MD 番鴨胚蛋進行生產。因番鴨產蛋具有季節性，於非產蛋季節可能造成胚蛋供應短缺的問題。雖然目前於番鴨非產蛋季節時，可採用人工光照調節來持續供應疫苗生產所需之胚蛋。但在飼養於密閉式水簾鴨舍，為維持飼養區的清淨及避免疾病交互感染與傳播，將番鴨飼養於不鏽鋼網狀高床上，以利清潔與減少糞便飼料等殘存於高床，惟此床面設計致使鴨隻趾痛症情形嚴重，如此造成的動物福祉問題仍需進一步克服。本研究已成功建立番鴨誘導多能性幹細胞株，且此等細胞株之細胞經水禽小病毒感染後，以聚合酶連鎖反應方式進行檢測，結果均呈陽性感感染反應。證實本研究所建立的番鴨誘導多能性幹細胞株可作為水禽小病毒的宿主細胞，其經水禽小病毒感染後病毒可於細胞內進行複製，且所複製產生的病毒顆粒亦可再次感染番鴨誘導多能性幹細胞。後續將利用本研究建立的番鴨誘導多能性幹細胞株供作疫苗生產的可行性測試，期望建立利用禽類 iPSCs 進行疫苗生產的平台，以取代或減少番鴨胚蛋的使用量。

參考文獻

- Chen, Y. C., S. P. Lin, Y. Y. Chang, W. P. Chang, L. Y. Wei, H. C. Liu, J. F. Huang, B. Pain, and S. C. Wu. 2019. *In vitro* culture and characterization of duck primordial germ cells. *Poult. Sci.* 98:1820–1832.
- Desbaillets, I., U. Ziegler, P. Groscurth, and M. Gassmann. 2000. Embryoid bodies: an *in vitro* model of mouse embryogenesis. *Exp. Physiol.* 85: 645–651.
- Doetschman, T. C., H. Eistetter, M. Katz, W. Schmidt, and R. Kenter. 1985. The *in vitro* development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 87: 27–45.
- Ehrlich, H. J., J. Singer, G. Berezuk, S. Fritsch, G. Aichinge, M. K. Hart, E. A. Wael, D. Portsmouth, O. Kistner, and P. N. Barrett. 2012. A cell culture-derived influenza vaccine provides consistent protection against infection and reduces the duration and severity of disease in infected individuals. *Clin. Infect. Dis.* 54: 946–954.
- Evans, M. J. and M. H. Kaufman. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154–156.
- Farzaneh, M., S. Khoshnam, and P. Mozdziaik. 2017. Concise review: avian multipotent stem cells as a novel tool for

- investigating cell-based therapies. *J. Dairy Vet. Anim. Res.* doi:10.15406/jdvar.2017.05.00125.
- Farzaneh, M., S. E. Khoshnam, and M. Nokhbatolfoghahai. 2016. First scientific record of two cases of partial twinning in the chick embryo, *Gallus gallus domesticus*. *Vet. Rec. Case Rep.* doi:10.1136/vetreccr-2016-000353.
- Fuet, A., G. Montillet, C. Jean, P. Aubel, C. Kress, S. R. Gervier, and B. Pain. 2018. NANOG is required for the long-term establishment of avian somatic reprogrammed Cells. *Stem Cell Rep.* 11: 1272–1286.
- Guan, W., Y. Wang, L. Hou, L. Chen, X. Li, W. Yue, and Y. Ma. 2010. Derivation and characteristics of pluripotent embryonic germ cells in duck. *Poult. Sci.* 89: 312–317.
- Jung, J. G., D. K. Kim, T. S. Park, S. D. Lee, J. M. Lim, and J. Y. Han. 2005. Development of novel markers for the characterization of chicken primordial germ cells. *Stem Cells* 23: 689–698.
- Liou, J. F., J. W. Shiau, J. Tailiu, C. Tai, L. R. Chen, and M. C. Chang. 2012. Culture of chicken gonadal primordial germ cells (gPGCs) in chicken embryonic fibroblast (cEF) cells conditioned medium and *in vivo* migration. *J. Anim. Vet. Adv.* 11: 2196–2203.
- Liou, J. F., W. R. Wu, L. R. Chen, and Y. L. Shiue. 2019. Establishment of an induced pluripotent cell line from Taiwan black silkie chick embryonic fibroblasts for replication-incompetent virus production. *Sci. Rep.* <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52282-7>
- Liu, J., X. Shi, R. Schwartz, and G. Kemble. 2009. Use of MDCK cells for production of live attenuated influenza vaccine. *Vaccine* 27: 6460–64603.
- Lu Y., D. W. Franklin, J. J. Brian, L. M. Jennifer, T. J. Erin, G. C. Amalia, B. B. Robert, and L. S. Steven. 2012. Avian induced pluripotent stem cells derived using human reprogramming factors. *Stem Cells Dev.* 21: 394–403.
- Meyer, D. B. 1960. Application of period acid–Schiff technique to whole chick embryos. *Stain Technol.* 35: 83–89.
- Naito, M. 2003. Development of avian embryo manipulation techniques and their application to germ cell manipulation. *Anim. Sci. J.* 74: 157–168. doi:10.1046/j.1344-3941.2003.00101.x.
- Olivier, S., M. Jacoby, C. Brillon, S. Bouletreau, T. Mollet, O. Nerriere, A. Angel, S. Danet, B. Souttou, F. Guehenneux, L. Gauthier, M. Berthomé, H. Vié, N. Beltraminelli, and M. Mehtali. 2010. EB66 cell line, a duck embryonic stem cell-derived substrate for the industrial production of therapeutic monoclonal antibodies with enhanced ADCC activity. *mAbs* 2: 405–415.
- Pain, B., M. Clark, M. Shen, H. Nakazawa, M. Sakurai, J. Samarut, and R. Etches. 1996. Long-term *in vitro* culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development* 122: 2339–2348.
- Resnick, J. L., L. S. Bixler, L. Z. Cheng, and P. J. Donovan. 1992. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* 359: 550–551.
- Saleh, A. A. and M. H. Khodier. 2020. Preliminary studies on the virus causing outbreak of duckling short beak and dwarfism syndrome (SBDS) in Egypt. *J. Appl. Vet. Sci.* 5 (4): 55–60.
- Shen, M. M. and P. Leder. 1992. Leukemia inhibitory factor is expressed by the preimplantation uterus and selectively blocks primitive ectoderm formation *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 8240–8244.
- Shittu, I., Z. Zhu, Y. Lu, J. M. Hutcheson, S. L. Stice, F. D. West, M. Donadeu, B. Dungu, A. M. Fadly, G. Zavala, N. Ferguson-Noel, and C. L. Afonso. 2016. Development, characterization and optimization of a new suspension chicken-induced pluripotent cell line for the production of Newcastle disease vaccine. *Biologicals* 44: 24–32.
- Takahashi, K. and S. Yamanaka. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663–676.
- van de Lavoie, M. C., J. H. Diamond, P. A. Leighton, C. Mather-Love, B. S. Heyer, R. Bradshaw, A. Kerchner, L. T. Hooi, and T. M. Gessaro. 2006. Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature* 441:766–769.
- Zádori, Z., R. Stefancsik, T. Rauch and J. Kisary. 1995. Analysis of the complete nucleotide sequences of goose and muscovy duck Parvoviruses indicates common ancestral origin with adeno-associated virus 2. *Viro.* 212: 562–573.
- Zhang, J., P. Liu, Y. Wu, M. Wang, R. Jia, D. Zhu, M. Liu, Q. Yang, Y. Wu, X. Zhao, S. Zhang, Y. Liu, L. Zhang, Y. Yu, Y. You, S. Chen, and A. Cheng. 2019. Growth characteristics of the novel goose parvovirus SD15 strain *in vitro*. *BMC Vet. Res.* 15: 63–71 <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1807-y>

Establishment of induced pluripotent stem cell line in muscovy duck and its waterfowl parvovirus infection test ⁽¹⁾

Jenn-Fa Liou ⁽²⁾ Chia-Yu Chang ⁽²⁾ Fung-Hsiang Chu ⁽²⁾ and Lih-Ren Chen ⁽²⁾⁽³⁾

Received: Sep. 7, 2023; Accepted: Nov. 2, 2023

Abstract

The purpose of this study was to establish duck induced pluripotent stem cells (md iPSCs) lines from the muscovy duck, and to evaluate their potential for vaccine production. The results showed that the morphology of muscovy duck embryonic fibroblasts (mdEFs) transformed into colony type from spindle type 7-10 days after being infected with lentivirus, which was constructed with reprogramming transcription factors of *LIN28*, *NANOG*, *SOX2*, *OCT3/4*, *KLF4* and *C-MYC*. The transformed cells have been maintained in vitro for more than 45 passages (380 days). These putative md iPSCs continuously expressed pluripotent markers of avian stem cells including AP and PAS antigens. The capability of embryoid body formation of the putative md iPSCs was excellent when induced by hanging-drop culture. These results demonstrated that the md iPSCs line established in this study were pluripotent. The specific 539 bp DNA fragment was recovered in the md iPSCs after infection with waterfowl parvovirus, and also the md iPSCs infected with the cellular content recovered from previously waterfowl parvovirus-infected md iPSCs when detected by polymerase chain reaction. These results showed that md iPSCs cell line with the potential for production of the vaccines against waterfowl parvovirus.

Key words: Muscovy duck, Embryonic fibroblasts, Induced pluripotent stem cells, Waterfowl parvovirus.

(1) Contribution No. 2770 from Taiwan Livestock Research Institute (TLRI), Ministry of Agriculture (MOA).

(2) Genetics and Physiology Division, MOA-TLRI, HsinHua Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(3) Corresponding author, E-mail: rchen131@gmail.com

以人工戳孔模擬破損探討半乾青貯膠膜包的保存問題⁽¹⁾

王紓愨⁽²⁾⁽³⁾ 陳嘉昇⁽²⁾

收件日期：112 年 8 月 2 日；接受日期：112 年 11 月 17 日

摘 要

半乾青貯是降低氣候對乾草調製干擾的重要調節手段，但半乾青貯在貯存期間發生膠膜破損的情形非常常見，且幾乎難以避免。因此，本研究以直徑 90 cm 的中型盤固草膠膜包為材料，進行人工模擬膠膜包破損試驗，測試不同處理情形下對膠膜包小破孔 (< 2 mm) 損壞的影響，以為現場應用的參考。試驗包括 3 個藥劑處理：對照（無藥劑）、乙酸及丙酸銨；4 個封孔處理時間：D0、D1、D3 及 D7 分別為戳孔後立即、1 天、3 天及 7 天處理；3 個貯存時間：戳孔後貯存 42、90 及 231 天，共計進行 16 個盤固草膠膜包。草包於不同貯存時間開封，調查戳孔處是否劣變或發黴，計算損壞百分率。結果顯示，戳孔膠膜包的損壞程度會因不同處理情況而異，對照組的損壞率高於乙酸及丙酸銨處理；草包損壞率有隨封孔處理時間及貯存時間延長而增加的趨勢，整體而言，戳孔後愈早封孔愈好，施用乙酸或丙酸銨再封孔較直接封孔佳，另貯放時間愈長膠膜包損壞的比例愈高。去除損壞部分後，半乾青貯料的發酵品質仍維持在良好或以上的等級，顯示封孔處理有利於保存。膠膜破損是應用半乾青貯一定會面臨的問題，由本試驗結果，良好半乾青貯膠膜包，破損即使 < 2 mm，仍造成盤固草膠膜損壞，及時封孔（1 週內）有助降低損壞。封孔加藥劑控損能力較佳，重封後應盡早利用，以減少長期貯存損失風險。

關鍵詞：盤固草、半乾青貯、破孔、乙酸、丙酸銨。

緒 言

乾燥與青貯發酵是保存牧草營養的二大方法，乾燥是目前國產盤固草最主要的調製方式，臺灣地處亞熱帶，雖然日照充足但不易維持曬草期間長時間的天氣穩定。相對而言，青貯調製的田間損失較低，可以避免牧草為了等待合適收穫乾燥時期而過度生長（老化），或減少田間作業時間，降低氣候不穩定之風險（Rotz and Muck, 1994; Ohmomo *et al.*, 2002），對穩定優質牧草產業的發展是不可或缺的重要技術。半乾青貯（haylage）又名草包青貯（baled silage, baleage）是一種介於乾草與青貯之間的調製方法，主要是將氣候條件無法乾燥至安全含水率以下的牧草，打包後包膜或裝袋青貯保存。半乾青貯調製的前半段作業方式與乾草調製相同，之後等待牧草萎凋至適合的含水率即打包、封膜、貯存，半乾青貯的含水率一般介於 40% – 60% 間，較一般青貯的 60% – 75% 間低，造成其發酵速度較慢、有氧時期較長、微生物相的反應也不盡相同（Bates *et al.*, 1989; Muck, 2013; Coblenz and Akins, 2018）。半乾青貯可以縮短牧草收穫後在田間的作業時間，減少由天候不穩定造成的損失，也適宜保存豆科或禾 / 豆混植之類較難乾燥的高營養牧草，同時良好的發酵不僅能有效保存牧草的營養價值，還可以提高適口性，增進動物採食（王等，2018；陳等，2020）。Borreani *et al.*（2007）的研究即表示利用半乾青貯調製可以提前在氣候不宜進行乾草調製時收穫牧草，且由等營養濃度的乳牛飼養試驗顯示，較乾草收穫提早 4 週收穫所調製半乾青貯的飼養表現優於乾草。但是由於半乾青貯包覆的膠膜為 PE 材質的可拉伸薄膜，很容易在操作、運輸及貯存期間發生破損，是半乾青貯應用上需要注意的問題。因此，本研究以直徑 90 cm 的中型盤固草膠膜包為材料，進行人工模擬膠膜包破損試驗，測試不同的處理情形下對膠膜包小破孔 (< 2 mm) 損壞的影響，以為未來應用的參考。

(1) 農業部畜產試驗所研究報告第 2771 號。

(2) 農業部畜產試驗所南區分所。

(3) 通訊作者，E-mail: smwang@mail.tlri.gov.tw

材料與方法

I. 半乾青貯膠膜包損壞改善試驗：

- (i) 試驗草包：盤固草來自畜產試驗所南區分所試驗區，於 107 年 7 月 10 日進行中型膠膜包製作（直徑 90 cm，乾物率 50% 左右，接種商業菌劑，包膜層數為 8 層），8 月 9 日以調製 1 個月的膠膜包進行人工穿孔模擬貯存期間的意外破孔。單顆草包平放在棧板上，以人為方式於草包側邊上平均刺出 24 個 < 2 mm 的小孔（6 條直行，每行 4 孔），深度約 0.5 cm（圖 1）。
- (ii) 處理：包含 2 種藥劑乙酸（acetic acid）、丙酸銨（ammonium propionate）及對照（無藥劑）3 種處理，及 4 個封孔時間：0 天、1 天、3 天及 7 天，每個膠膜包於戳孔後 0 天、1 天、3 天及 7 天進行前述處理，並以大約 5 cm^2 的膠帶（PVC tape, K. K. Converter Co.）平整封住洞口。每行為一種處理，處理方式如下：對照（直接封孔）、乙酸（由孔洞噴入約 1 ml 30% 乙酸後封孔）、丙酸銨（由孔洞噴入約 1 ml 30% 丙酸銨後封孔），各處理交錯進行，每一處理 2 重複（2 行）。每行 4 孔為 4 個封孔時間：0 天、1 天、3 天及 7 天，由上至下依序進行（圖 1）。共計處理 16 顆膠膜包，封孔處理時間為 8 月 9 日、10 日、12 日及 16 日。

II. 開封調查

- (i) 損壞調查：於戳孔處理後 42、90 及 231 天分別開封 4、4 及 8 個膠膜包，調查草包各處理的損壞情形，2 重複都未發黴或出現草色變深等損壞的情形，損壞率為 0%，其中 1 點出現損壞現象，記錄損壞率為 50%，若 2 點都出現損壞情形，則損壞率為 100%。調查完畢將表面受損部分全部去除，由各部分取樣混合為一樣品測定草包的青貯品質。
- (ii) 青貯發酵品質分析：乾物率為 70°C 下烘乾 48 小時之乾鮮重比。酸鹼值為 20 g 新鮮青貯料加水 180 mL，打碎過濾後以酸鹼度計（Toa pH meter model HM-20S, Japan）測定。乳酸、丁酸及乙酸之測定以氣體層析儀（Shimadzu GC-2014, Japan）依 Jones and Kay（1976）的方法進行。青貯評分（Flieg's score）為依青貯料中乳酸、乙酸與丁酸占總酸之當量百分比各自計分後總加，以評估算青貯料之發酵品質，評分 40 以下青貯失敗、40—60 分為可接受、60—80 分為好的青貯、80 分以上為發酵優良的青貯（許等，1995）。

III. 統計分析：試驗結果以 SAS 軟體（2002）之 GLM procedure 進行變方分析，主效因子為藥劑處理（Chemical）、封孔時間（Seal）及貯存時間（Storage），各主效應均為固定型，各處理平均值再以鄧肯氏多變域測驗（Duncan's Multiple Range Test）進行檢定，比較各處理平均值之間是否達差異顯著。



圖 1. 半乾青貯膠膜包的破損改善試驗。左：草包戳洞（ < 2 mm），中：藥劑處理與封孔，右：開封調查損壞比例。
 Fig. 1. The damage improvement experiment of pangola grass haylage. Left: poking small holes (< 2 mm) on haylage surface, Middle: reagent treatment and sealing, Right: investigation of damage situation.

表 1. 不同處理盤固草半乾青貯損壞率之變方分析

Table 1. Variation analysis of damage rate of pangola grass haylage with different treatments.

Source	DF	SS	MS	F	Pr > F
Chemical	2	2.11718750	1.05859375	10.42	<.0001
Seal	3	3.95182292	1.31727431	12.97	<.0001
Storage	2	3.98046875	1.99023438	19.60	<.0001
Chemical × Seal	6	1.21614583	0.20269097	2.00	0.0694
Chemical × Storage	4	0.27343750	0.06835938	0.67	0.6116
Seal × Storage	6	0.49348958	0.08224826	0.81	0.5637
Chemical × Seal × Storage	6	0.49348958	0.08224826	0.81	0.5637
Error	156	15.84375000	0.10156250		

DF: degree of freedom, SS: sum of square, MS: mean square

結果與討論

本試驗是以每個膠膜包相同處理的兩重複進行損壞率調查，結果如圖 2。膠膜包戳孔的損壞率會因不同藥劑處理、封孔時間及貯存時間而異，但同時可以觀察到多個處理的變異很大（圖 2），表示不同膠膜包間表現並不完全一致，推測可能與各個膠膜包本身的發酵狀態與表面菌相差異有關，確切原因仍待進一步釐清。由各種處理的變方分析結果顯示，藥劑、封孔時間及貯存三個主效應都為極顯著，但二因子及三因子交感均不顯著。平均而言，對照處理的損壞百分率為 62.5%，明顯高於乙酸及丙酸鉍處理的 39.8 及 40.6%，二種藥劑處理間差異不顯著；戳孔後立即封孔（D0）的損壞率 26.0% 顯著低於其他三處理，戳孔後 1 天封孔（D1）的損壞率為 45.8% 顯著優於戳孔後 3 天封孔（D3）的處理，D3 的平均損壞率為 65.6% 高於 D7 的 53.1%，但此二處理間的差異不顯著；隨貯存時間拉長盤固草半乾青貯膠膜包的損壞率上升，貯存 231 天的平均損壞率為 62.0% 顯著高於貯存 90 與 42 天的 31.3% 及 35.4%。貯存 90 天與 42 天間無顯著差異（圖 3）。表 2 為本試驗中所用盤固草膠膜包去除表面損壞後測定的發酵品質，結果顯示，膠膜包乾物率介於 46.2%—52.7% 間，pH 值介於 4.44—5.37 間，乳酸含量介於 1.11%—2.53% 青貯評分都在 77 以上，表示所用的每一試驗草包都製作良好，且封孔處理有助於品質保存。

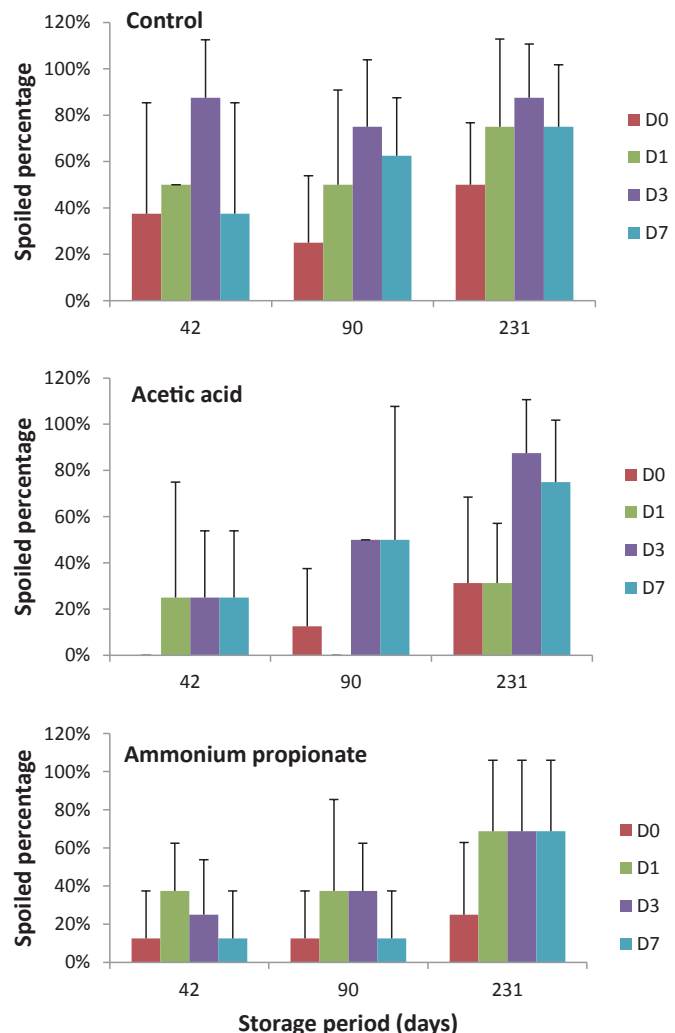


圖 2. 不同藥劑與封孔時間對戳孔處理盤固草半乾青貯膠膜包損壞百分比的影響。D0：戳洞後立即處理並封口、D1：戳洞後 1 天再進行處理及封口、D3：戳洞後 3 天再進行處理及封口、D7：戳洞後 7 天再進行處理及封口。
Fig. 2. The effect of reagent and sealing time on spoiled percentage of poked pangola grass haylage. D0: process reagent treatment and seal immediately after poking a hole, D1: process reagent treatment and seal after 1 day of poking a hole. D3: process reagent treatment and seal after 3 days of poking a hole, D7: process reagent treatment and seal after 7 days of poking a hole.

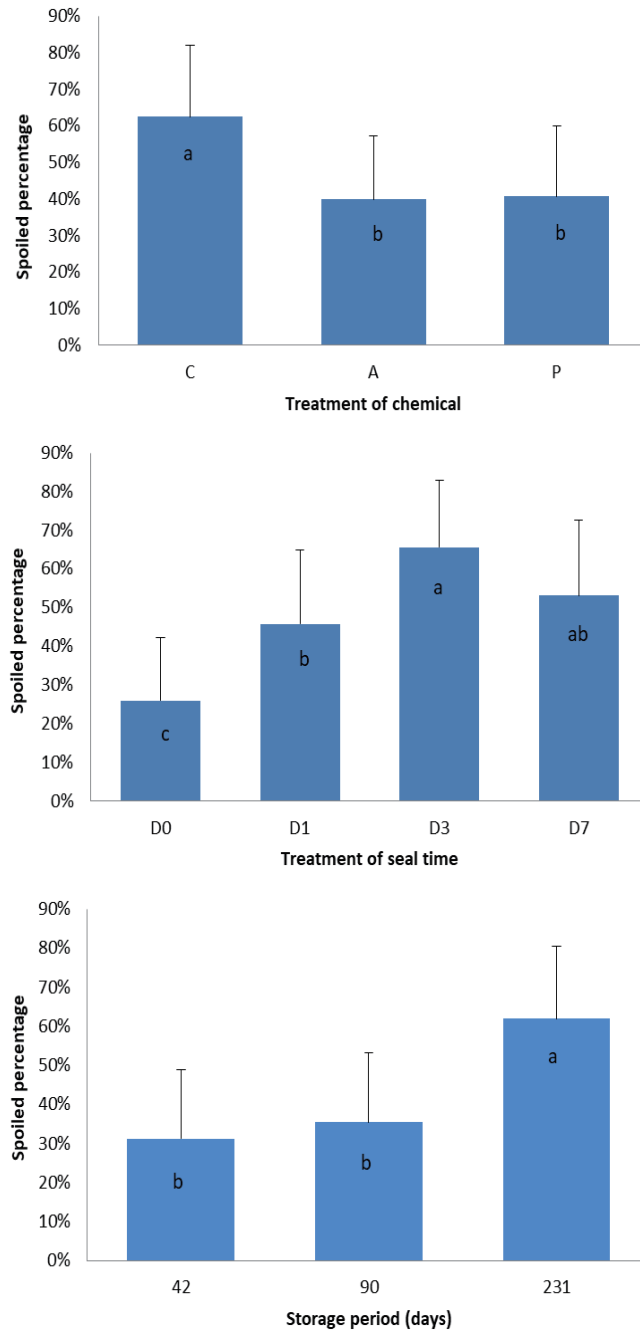


圖 3. 藥劑（上）、封孔時間（中）及貯存（下）對戳孔處理盤固草半乾青貯膠膜包損壞百分率的影響。C：對照（無藥劑）、A：乙酸處理、P：丙酸銨處理。D0、D1、D3、D7：封孔處理，說明如圖 2。

Fig. 3. The effect of reagent (up), seal time (middle) and storage (down) on spoiled percentage of poked pangola grass haylage. C: control (no reagent), A: acetic acid, P: ammonium propionate. D0, D1, D3, D7 description as fig. 2. Means with different letters differ (P < 0.05)

膠膜容易破損是半乾青貯調製利用上的重要缺點之一，不注意可能造成極大的乾物損失甚至無法利用，由 Coblenz and Akins (2018) 的回顧報告，以人為在膠膜刺穿 0、1、10 或 50 個小孔（直徑 3 mm）或 1 個大孔（直徑 21.2 mm）並保存 155 天，以模擬鳥類對膠膜包的損壞試驗發現，孔洞可能導致明顯的品質降低與可利用率的損失，而愛爾蘭農業與食品發展部（Agriculture and Food Development Authority, Teagasc）的資料，一個 3 mm 的小孔有可能造成半乾青貯料 8% 的損失，而一個 24 mm 的大洞可能造成 1/3 的半乾青貯料無法利用（Forristal, <https://www.teagasc.ie/media/website/rural-economy/farm-management/BaleHandling-1.pdf>），但是詳細的研究卻很少。

表 2. 去除損壞部分後，本試驗盤固草半乾青貯膠膜包之青貯發酵品質

Table 2. After removing damage part, the fermentation quality of panola grass haylage used in this study .

Item	Dry matter	pH	Score	Acetic acid	Propionic acid	Butyric acid	Lactic acid
	%			----- % dry base -----			
Mean	48.93	4.83	89	0.33	0.03	0.04	1.57
Min.	46.20	4.44	77	0.18	0	0	1.11
Max.	52.70	5.37	100	0.42	0.07	0.11	2.53

由本試驗結果，乙酸與丙酸銨處理有助於降低損壞率，可能與此二物質均具抑菌性有關。陳等（2019）與黃等（2020）的研究顯示，表面噴灑 3% 丙酸銨有助於抑制苜蓿與盤固草半乾青貯表面黴斑的發生。接種異質乳酸菌可以提高青貯開封穩定性並減少酵母菌與黴菌數量，與異質乳酸發酵可以產生較高的乙酸含量有關（Tabacco, *et al.*, 2011; Auerbach and Theobald, 2020）。Moon（1983）的研究發現乙酸鹽、乳酸鹽及丙酸鹽單獨或混合都可以抑制由青貯料分離出的數種耐酸酵母菌，其中尤以丙酸鹽的效果最佳。本試驗的結果乙酸與丙酸銨的效果相近，但僅由單一試驗結果尚難確認，未來可以進一步試驗確認，亦可以考慮進行修補膠膜包破孔的封孔保護劑開發。

半乾青貯與青貯同樣是以乳酸菌發酵產酸來抑制其他微生物的活動，因此，維持厭氧環境對維持牧草品質非常重要（Rotz and Muck, 1994; Ohmomo *et al.*, 2002; Coblenz and Akins, 2018），原則上草包損壞的風險應與空氣可以進出草包的時間成正比，由圖 3 結果，0 天—3 天期間符合前述原則，但 7 天封孔的損壞程度反而較 3 天來得低，確切的原因不明，需進一步試驗釐清。

貯放時間延長至 231 天的損壞率明顯提高，同時也會降低藥劑處理的效果。有關半乾青貯調製的指引與研究，幾乎都會強調草包應該打包至一定密度並立即或儘快包覆 6 – 8 層 PE 膜，密度較低、包覆不足的膠膜包的貯存性不佳（Nath *et al.*, 2018; Borowski *et al.*, 2021）。整體而言，破損為膠膜包不容易避免的問題，即使是極小的孔洞都可能造成品質劣化及乾物損失，應儘可能注意倉貯環境維護，避免鼠類或其他動物的破壞，並經常注意膠膜包貯放情況，發現破損立即修補，最好能輔以乙酸或丙酸銨等施用，同時儘快開封利用，以降低損失。

結 論

對調製良好的盤固草半乾青貯膠膜包，即使 < 2mm 的小孔仍可能會造成膠膜包的損壞，但如能在短時間內發現並封孔（1 週內），有助於降低損壞的程度；同時封孔並加藥劑處理（乙酸、丙酸銨）之損壞控制能力優於無藥劑處理。此外，破損膠膜重封後仍應儘早利用，以減少長時間貯存造成的損失風險。

參考文獻

- 王紓愨、游翠鳳、陳嘉昇。2018。接種菌株對苜蓿半乾青貯適口性的影響。畜產研究 51(4)：286-292。
- 陳嘉昇、王紓愨、游翠鳳。2020。盤固草半乾青貯捆包前淋雨及乾物率對山羊適口性的影響。畜產研究 53(3)：141-148。
- 陳筱薇、黃孝義、張友義、白崇智、史歲元、李婕伶、石芳其、林佑諭、劉智宏、丘昀融、陳莘惠、游翠鳳、劉信宏、王紓愨、陳嘉昇、王翰聰、陳靜宜、徐濟泰。2019。添加乳酸菌複方與丙酸銨抑制盤固草半乾青貯草捆製作過程發霉之效果。中國畜牧學會會誌 48(1)：1-15。
- 黃孝義、陳筱薇、劉智宏、楊岫秀、游翠鳳、劉信宏、王紓愨、陳嘉昇、徐濟泰。2020。複合型青貯添加物對於國產苜蓿、盤固草半乾青貯品質以及泌乳羊生產表現之影響。中國畜牧學會會誌 49(3)：197-222。
- 許福星、盧啟信、成游貴、卜瑞雄、鄭俊哲。1995。芻料作物青貯調製。台灣省畜產試驗所專輯第 41 號。
- Auerbach, H. and P. Theobald. 2020. Additive type affects fermentation, aerobic stability and mycotoxin formation during air exposure of early-cut rye (*Secale cereale* L.) silage. *Agronomy* 10: 1432.
- Bates, D. B., W. E. Kunkle, T. E. Dawson, A. Berthe, S. C. Denham, C. G. Chambliss, R. C. Cromwell, J. G. Wasdin, and D. L. Wakeman. 1989. Round bale silage — A forage harvesting alternative. p. 45-50, in Proc. 38th Annual Beef Short Course. Univ. Florida, Gainesville, FL.
- Borowski, S., J. Kaszkowiak, and E. Dulcet. 2021. How to harvest haylage bales in sustainable agriculture. *Appl. Sci.* 11: 11508.

- Borreani, G., D. Giaccone, A. Mimosi, and E. Tabacco. 2007. Comparison of hay and haylage from permanent alpine meadows in winter dairy cow diets. *J. Dairy Sci.* 90: 5643-5650.
- Coblentz, W. K. and M. S. Akins. 2018. Silage review: recent advances and future technologies for baled silages. *J. Dairy Sci.* 101: 4075-4092.
- Jones, D. W. and J. J. Kay. 1976. Determination of volatile fatty acid C1-C6 and lactic acid in silage juice. *J. Sci. Food Agric.* 27: 1005-1014.
- Moon, N. J. 1983. Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. *J. Appl. Bacteriol.* 55: 454-460.
- Muck, R. E. 2013. Recent advances in silage microbiology. *Agr. Food Sci.* 22: 3-15.
- Nath, C. D., M. A. Neres¹, K. C. Scheidt, L. dos S. Bersot, S. M. M. Sunahara, J. R. W. Sarto, J. R. Stangarlin, S. D. Gomes, M. J. Sereno, and A. P. Perin. 2018. Characterization of Tifton 85 bermudagrass haylage with different layers of polyethylene film and storage time. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 31(8):1197-1204.
- Ohmomo, S., O. Tanaka, H. K. Kitamoto, and Y. Cai. 2002. Silage and microbial performance, old story but new problems. *JARQ* 36: 59-71.
- Rotz, C. A. and R. E. Muck. 1994. Changes in forage quality during harvest and storage. In : Forage quality, evaluation, and utilization. Eds. Fahey, Jr. G. C., M. Collins, D. R. Mertens and L. E. Moser. American Society of Agronomy, Inc. Madison, p828-868.
- SAS. 2002. SAS ver. 9.0. Statistical Analysis Institute, Inc., Cary. N.C. USA.
- Tabacco, E., S. Piano, A. Revello-Chion, and G. Borreani. 2011. Effect of *Lactobacillus buchneri* LN4637 and *Lactobacillus buchneri* LN40177 on the aerobic stability, fermentation products, and microbial populations of corn silage under farm conditions. *J. Dairy Sci.* 94: 5589-5598.

Discussion on the preservation of pagolagrass haylage by manual poking simulation of film-damage ⁽¹⁾

Shu-Min Wang ⁽²⁾⁽³⁾ and Chia-Sheng Chen ⁽²⁾

Received: Aug. 2, 2023; Accepted: Nov. 17, 2023

Abstract

Haylage is an important adjustment method to reduce the interference of climate on hay processing, but the film damage of haylage during storage is very common and almost unavoidable. Therefore, in this study, a diameter of 90 cm medium-sized pangola grass haylage was used as the material, and each haylage bale was artificially poked 24 holes (< 2 mm) to simulate the film damage that usually happened. A total of 16 bales were used to investigate the effect of different reagents, seal time and storage on the damage rate of these small holes in the haylage. The 3 reagent treatments were control (no reagent), acetic acid and ammonium propionate. The 4 seal times D0, D1, D3 and D7 were sealed immediately, 1 day, 3 days and 7 days respectively after poking and reagent treatment. The storage periods were 42, 90 and 231 days after poking. The results showed that the damage rate of poking holes were different by different treatments. The spoiled percentage of control was higher than the other two reagent treatments (acetic acid and ammonium propionate). The spoiled percentage increased as seal time and storage period increased. Generally, the hole was sealed sooner and stored shorter the result was better. Using acetic acid or ammonium propionate then seal was better than control. After removing the spoiled part, the fermentation quality of these haylage was still kept at a good level which means the treatments used in this study were effective on haylage conservation.

Key words: pangola grass, haylage, poking damage, acetic acid, ammonium propionate.

(1) Contribution No. 2771 from Taiwan Livestock Research Institute (TLRI), Ministry of Agriculture (MOA).

(2) Southern Region Branch, MOA-TLRI, Pingtung 94644, Taiwan, R. O. C.

(3) Corresponding author, E-mail: smwang@mail.tlri.gov.tw.

餵飼不同芻料對荷蘭種泌乳末期牛隻瘤胃微生物 及乳成分之影響⁽¹⁾

王思涵⁽²⁾⁽³⁾ 廖曉涵⁽²⁾ 李佳馨⁽²⁾ 陳小明⁽²⁾ 蕭振文⁽²⁾

收件日期：112 年 8 月 9 日；接受日期：112 年 11 月 24 日

摘 要

本試驗旨在探究餵飼不同禾本科芻料，對荷蘭種泌乳末期乳牛瘤胃微生物及乳成分之影響。挑選產乳量及泌乳天數相近之泌乳牛共計 10 頭，逢機分為盤固草組（P 組）與百慕達組（B 組），每處理組 5 頭泌乳牛。試驗期為 21 天，試驗開始 0 – 18 天為適應期，第 19 天開始連續 3 天進行乳樣收集，並於試驗結束前採集瘤胃液。試驗結果指出，P 組與 B 組乳牛群瘤胃中分別具有 2,071 及 1,974 個獨特微生物物種去氧核醣核酸條碼存在。P 組與 B 組牛群瘤胃微生物均由 *Bacteroidetes*、*Firmicutes*、*Proteobacteria* 及 *Tenericutes* 四個優勢菌門主導。但優勢菌門在兩個處理組樣品相對豐富度有所不同，*Bacteroidetes* 作為第一優勢菌門在 P 組樣本中的相對豐富度為 69.81%，高於 B 組中 67.22%。P 組與 B 組牛群樣本中相對豐富度最高的屬為 *Prevotella*，占比分別為 49.45% 及 50.38%。以屬的級別進行主成分分析（principal component analysis, PCA）以評估處理組之間瘤胃微生物組成的差異，結果顯示 PC1 和 PC2 分別佔瘤胃微生物群組成變異為 22.16% 和 19.73%。在 PC1 變異貢獻度較高的主要細菌為 *Prevotella*，而 *Pseudobutyrvibrio*、*Kineothrix*、*Butyrvibrio* 及 *Alistipes* 則為 PC2 變異貢獻度較高的細菌。P 組與 B 組牛群其產乳量、乳脂肪率、乳蛋白質率、乳糖率、無脂固形物率、尿素氮及檸檬酸等間皆無顯著影響。但是，P 組牛群乳中新合成型脂肪酸（0.98 vs. 0.75 g/100 g of milk）含量顯著高於 B 組（ $p < 0.05$ ）。綜上試驗結果，荷蘭種泌乳末期乳牛群，餵飼不同芻料組成其瘤胃微生物組成相似，但比例不同，瞭解不同禾本科牧草完全混合日糧對泌乳牛群瘤胃核心微生物組成與乳成分變化，將有助於開發出瘤胃穩定且能發揮產能之國產芻料可能最適應用比例。

關鍵詞：完全混合日糧、瘤胃微生物、乳成分。

緒 言

國內酪農業牧草需求在 50 萬噸左右，其中國產牧草約 22 – 25 萬噸，占比為 50%，種類以熱帶牧草盤固草（*Digitaria decumbens*）、尼羅草（*Acroceras macrum*）、青割飼養的狼尾草（*Pennisetum alopecuroides*）與玉米（*Zea mays*）及玉米青貯為主；進口牧草量約 20 萬噸，占比為 40 – 50%，種類以苜蓿草（*Medicago*）、甜燕麥草（*Avena sativa*）、百慕達草（*Cynodon dactylon*）為主（行政院農業委員會農業統計年報，2021）。國產牧草受氣候限制，產季集中在夏天，春夏生長快速但秋冬生長遲緩甚至停滯，使得國產牧草夏季生產過剩，但冬季卻出現不足的現象。爰此，目前常見之方式為於牧草盛產時期調製乾草保存，俾於缺草時利用，但不同成熟度之盤固草，其營養分消化率隨成熟度增加而減少，利用國產牧草作為乳牛完全混合飼糧調配時，依照品質狀況評估使用比例會是穩定瘤胃微生物的關鍵之一。牛隻必須有高的採食量才能有好的產乳性能表現，但牛隻採食量容易受到產乳量、體重、泌乳階段、牧草纖維含量及氣候因素等影響，當夏季熱緊迫嚴重時，牛隻的採食量可能僅為涼季的 75% 或甚至更低，若飼糧選用牧草的中洗纖維（neutral detergent fiber, NDF）含量高，對於牛隻採食量的影響會更為明顯，如盤固草與狼尾草的 NDF 約為 70%，比苜蓿乾草的 45% 高很多，乳牛瘤胃微生物需要較長的分解時間，但瘤胃等消化道空間有限，因此牧草品質會影響牛隻的採食量（李，2010）。盤固草與百慕達草之粗蛋白質（crude protein, CP）與酸洗纖維（acid detergent fiber, ADF）含量分別為 5.9% 及 11.0% 與 42% 及 33.2%（乾基）。兩種草在瘤胃的可利用率差異不大，而除了 ADF 外，分解速度以百慕達草較快（李等，1999）。

(1) 農業部畜產試驗所研究報告第 2772 號。

(2) 農業部畜產試驗所北區分所。

(3) 通訊作者，E-mail: shwang@mail.tlri.gov.tw

乳牛的瘤胃可視為一個厭氧發酵槽，瘤胃微生物具有分解纖維類原料的能力，透過瘤胃微生物對飼料原料的降解產生揮發性脂肪酸 (volatile fatty acid, VFA)，是提供乳牛能量與部分物質之營養前驅物。瘤胃微生物群是指聚集在瘤胃中高密度、多樣性廣且具複雜交互作用的微生物群包括細菌、古細菌、原生動物和真菌等，而細菌約占整體瘤胃微生物總量之 50 – 70%。瘤胃球菌屬 (*Ruminococcus*)、丁酸弧菌屬 (*Butyrivibrio*)、普氏菌屬 (*Prevotella*)、纖維桿菌屬 (*Fibrobacter*)、糞球菌屬 (*Coprococcus*) 及卞淋單胞菌屬 (*Porphyromonas*) 等幾個物種，是構成瘤胃微生物群的核心 (楊, 1997)，其中普氏菌屬、丁酸弧菌屬和瘤胃球菌屬易受到飼糧組成變化影響 (Henderson *et al.*, 2015)。瘤胃中細菌種類至少 7,000 種，乳牛瘤胃細菌以厚壁菌門 (*Firmicutes*) 及擬桿菌門 (*Bacteroidetes*) 為最主要的部份，上述兩者基因組序列分別占細菌類總體的 68 及 12.8%。以往微生物學家利用培養基的方式將瘤胃菌分離並培養，且僅 20% 瘤胃微生物可利用此技術培養 (Krause *et al.*, 2013)。但近年來隨著分子生物技術進展使得瘤胃微生物的研究面向更廣，Wilkinson *et al.* (2018) 利用 16S rRNA 基因擴增子定序進行微生物種類與組成研究，開啟以次世代定序技術 (next-generation sequencing, NGS)，進行各種環境體系微生物及瘤胃微生物菌群之研究可能性。

瘤胃中以厚壁菌門及擬桿菌門之微生物與乳脂肪產量最為相關 (Jami *et al.*, 2014)，但兩者的相對豐富度 (relative abundance) 是互補的，當厚壁菌門的相對豐富度提高時，則可觀察到擬桿菌門下降，此時乳脂肪產量上升。Bainbridge *et al.* (2016) 研究指出，產乳量、乳蛋白質率及乳脂肪量與特定微生物族群有關，這也說明微生物會影響宿主生理條件。乳牛群性能改良計畫 (dairy herd improvement, DHI) 普遍利用傅立葉轉換紅外線光譜法 (Fourier-transform infrared spectroscopy, FTIR) 進行乳成分分析，如乳脂肪、乳蛋白質、乳糖及尿素氮等，這些資料除做為育種選留牛群之依據外，更廣泛地被酪農、營養師或獸醫師作為管理泌乳牛群健康之重要依據。隨著 FTIR 分析技術的進步，生乳中乳脂肪酸含量包括飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸、短、中及長鏈脂肪酸等數據，這類相對複雜且非例行性檢測之乳成分數據，也已經開始出現在常規 DHI 檢測報告中 (Gengler *et al.*, 2016)。本試驗旨在探究餵飼不同禾本科芻料對荷蘭種泌乳末期乳牛瘤胃微生物及乳成分之影響，期提供串聯芻料品質，瘤胃微生物變化及乳成分資料，搭配國產芻料營養成分找出可能最適應用比例。

材料與方法

本試驗於農業部畜產試驗所北區分所泌乳牛舍進行，試驗動物之使用、飼養管理及試驗內容經畜產試驗所北區分所實驗動物管理小組以畜試竹字 111-14 號申請核准在案。

I. 試驗動物飼養管理

本試驗期間為 2022 年 10 月至 12 月，使用荷蘭種 (Holstein-Friesian) 泌乳末期乳牛飼養於行政院農業委員會畜產試驗所北區分所，試驗期為 21 天。試驗開始 0 – 18 天為適應期，第 19 天開始連續採樣 3 天至試驗結束。試驗開始前，挑選產乳量及泌乳天數相近之泌乳牛共計 10 頭，逢機分為兩組，每處理組 5 頭泌乳牛。分為盤固草組 (Pangola hay group, P 組) 與百慕達組 (Bermuda hay group, B 組) 等兩組試驗牛群，資料分別為產乳量 (28.7 ± 2.4 與 29.0 ± 2.6 kg)、泌乳天數 (323 ± 45 與 330 ± 41 days)，以同畜舍不同欄位分隔試驗牛群以利試驗進行。泌乳牛飼糧依據 NRC (2001) 乳牛營養標準配製之完全混合日糧 (total mix ration, TMR)，組成包含百慕達草或盤固草、苜蓿乾草、大豆殼粒、玉米青貯、大豆粕與以玉米和大豆粕為主之精料，每日配製並餵飼兩次，分別於上午 5:00 配製 1/3 量並餵飼及下午 2:30 配製 2/3 量並餵飼，配製量的增減以隔天回收時有 5 – 10% 剩料為準，另以自動給水槽供應乾淨飲水及礦鹽任食。試驗使用之盤固草 (A254 品系) 為禾本科 *Digitaria* 屬多年生熱帶牧草，收穫來源為畜產試驗所北區分所牧草區，收割期為 2022 年 6 至 8 月，先以割草機切割後待其萎凋 (65% 含水率)，再以翻草機反覆進行翻草至含水率 10% 以下，最後以集草機與打包機進行收穫包裝；試驗使用之百慕達草來源為美國。本試驗使用之盤固草及百慕達草一般營養成分分析結果如表 1 所示，盤固草之 CP、粗脂肪 (Ether extract, EE)、NDF 及 ADF 含量依序為 4.10%、1.17%、61.37% 及 34.19%；百慕達草之 CP、EE、NDF 及 ADF 含量依序為 9.39%、1.89%、58.10% 及 31.04%。

II. 乳成分檢測項目與方法

- (i) 產乳量及乳樣：每日擠乳兩次，分別為清晨 5:00 與下午 4:00，由乳量計紀錄個別牛隻產乳量，於試驗期第 19 天至第 21 天，連續 3 天採集個別牛隻上午及下午乳樣，混合個別牛各日上午下午乳樣後，送至畜產試驗所北區分所牛乳檢驗室分析一般乳成分。
- (ii) 生乳成分分析儀器：使用丹麥 FOSS 公司 MilkoScan™ FT+ 及 Fossomatic™ FC 進行生乳成分分析，項目包含乳脂肪率、乳粗蛋白質率、乳糖率、無脂固形物率、尿素氮、檸檬酸及乳脂肪酸組成等。並安裝 Fatty Acid

Origin 脂肪酸分析模組進行乳脂肪酸分析。

- (iii) Fatty Acid Origin 乳脂肪酸分析模組原廠定義：新合成型脂肪酸 (*de novo fatty acids*) 涵蓋範圍為 C4:0、C6:0、C8:0、C10:0、C12:0、C14:0 及 C14:1 脂肪酸；混合型脂肪酸 (*mixed fatty acids*) 涵蓋範圍為 C16:0 及 C16:1 脂肪酸；預製型脂肪酸 (*preformed fatty acids*) 涵蓋範圍為 C15:0、C17:0、C18:0、C18:1、C18:2、C18:3、C20:0、C20:2、C 22:0 及 C24:0 脂肪酸。

表 1. 盤固草與百慕達草之營養成分分析

Table 1. The analysis of Pangola hay and Bermuda hay

Items ¹	Pangola hay*	Bermuda hay*
Dry matter, %	91	94
CP, %	4.10	9.39
EE, %	1.17	1.89
NDF, %	61.37	58.10
ADF, %	34.19	31.04

* (% DM basis)

¹ CP = Crude protein; EE = Ether extract; NDF = neutral detergent fiber; ADF = Acid detergent fiber.

III. TMR 採樣及分析

於試驗期第 19 天至第 21 天，連續 3 天採集對照組與試驗組之 TMR，暫存於 -20°C，待均勻混合連續 4 天樣品後，以 55°C 烘乾 48 小時，熱秤得乾物質率後，依 AOAC (1990) 法進行乾物質、CP 及 EE 分析。依據 Van Soest *et al.* (1991) 方法分析 ADF 及 NDF。

IV. 瘤胃液採集與分析

- (i) 瘤胃液採集：兩組試驗牛群共計 10 頭皆於試驗期第 21 天進行瘤胃液採集，採集開始時間為上午 8:30，以口入瘤胃管 oral stomach tubing (OST) 搭配真空幫浦的技術採集。瘤胃管及抽吸探頭在使用前利用消毒水與清水處理後，靜置至乾燥後使用。荷蘭種泌乳牛成牛口入瘤胃管深入約 180 – 220 cm 後，即開啟真空幫浦進行瘤胃液抽吸，瘤胃液抽吸量約 250 mL，立即以 pH 檢測計 (WTW pH 3310 Germany) 測定瘤胃液 pH 值，隨後放置乾冰中保存，經前處理後取其中 50 mL 進行後續菌相分析。
- (ii) 瘤胃多源基因體萃取：利用商業化套組 (QIAamp PowerFecal DNA Kit, Qiagen) 進行瘤胃內容物中多源基因體 DNA 之萃取，DNA 濃度利用分光光度計 Qubit 4.0 Fluorometer (Thermo Scientific) 分析並調整為 1 ng/ul。
- (iii) 瘤胃細菌多樣性分析：全長 16S 基因 (V1-V9 區域) 由具 16S 基因專一性引子進行擴增，並依據 Pacbio 流程操作，及使用 SMRTbell 進行資料構建和測序。

V. 統計分析

試驗所得數值資料，使用 QIIME2 比對 MAFFT 與 NCBI 數據庫進行 ASVs 之間的序列相似性多重序列比對分析。二維散點圖用於可視化主成分分析 (principal component analysis, PCA) 得分向量，以評估試驗處理組間瘤胃微生物的相似性、趨勢和分組。利用 SAS 套裝軟體 (SAS, 2002)，計算使用不同處理組牛群之產乳量及乳成分平均數，並利用單因子變異數分析 (ANOVA) 比較組間的平均數差異，用 mean ± SD 表示，以 $\alpha = 0.05$ 為檢定顯著水準。

結果與討論

飼養乳牛第一要考慮的就是纖維的供應，纖維的充分採食有助於維持牛隻健康、微生物功能、泌乳性能及乳脂率。植物內含纖維素多寡會隨著其成熟度而逐漸增加，這也是影響動物乾物質採食量的最主要因素 (Buxton *et al.*, 1997)。豆科牧草如苜蓿草葉片及莖桿之 NDF 含量分別約為 25% 與 40 – 50%；而禾本科牧草如百慕達草葉片及莖桿之 NDF 含量則分別約為 50% 與 70% (Buxton *et al.*, 1995)。相較於豆科植物，反芻動物需要花較多咀嚼及反芻時

間將禾本科牧草的纖維磨碎，微生物附著於纖維顆粒表面分泌酵素降解纖維（McAllister *et al.*, 1994），小顆粒纖維相較於大顆粒的消化率來得快，因為小顆粒有較多的表面積暴露，有助於瘤胃微生物進行消化。芻料品質與瘤胃微生物附著或消化纖維的效率有關，直接或間接對反芻動物營養獲得造成影響。

表 2. 兩組試驗泌乳牛完全混合日糧之組成及營養成分

Table 2. Ingredients and nutrient composition of the total mixed ration for two groups of experimental lactating cows.

Ingredient items	Total mixed ration (% as DM basis) group ¹	
	P	B
Corn silage	22.96	22.90
Bermuda hay	-	12.96
Pangola hay	12.72	-
Alfalfa hay	14.38	14.34
Concentrate ²	29.31	29.23
Soybean hull	12.72	12.68
Soybean meal, 44% CP	5.33	5.32
Lipid ³	1.58	1.58
Sodium bicarbonate	0.80	0.80
Premix ⁴	0.20	0.20
Total	100	100
Calculated values (% as DM basis)		
DM, %	44	44
CP, %	16.4	17.2
EE, %	3.40	3.50
NDF, %	36.4	34.5
ADF, %	21.9	20.4
NEL ⁵ , Mcal/kg	1.52	1.52

¹ P = Pangola hay group; B =Bermuda hay group.

² Concentrate included ground rice (29.4%), ground corn (29.4%), soybean meal (28.5%), fish meal (3%), molasses (5%), salt (1.2%), limestone (1%), dicalcium potassium (0.8%), sodium bicarbonate (0.8%), magnesium oxide (0.4%), vitamin premix (0.03%), and mineral premix (0.02%). (as fed basis).

³ Lipid: Energy Booster 100® dry fat supplement contains 98% total fatty acids.

⁴ Each kilogram of premix contains Vit. A, 10,000,000 IU; Vit. D3, 1,600,000 IU; Vit. E, 70,000 IU; Fe, 50g; Cu, 10g; Zn, 40g; I, 0.5g; Se, 0.1g; Co, 0.1g.

⁵ NEL value is calculated according to NRC (2001).

李等（1991）曾分別以不同成熟度之盤固草作消化測定結果指出，盤固草的營養分消化率與總可消化營養分，均隨成熟度增加而減少。盤固草草高 50 – 70 公分收割者，全年可獲較佳乾物產量及品質較優之芻料，故適當時期採收可以得到最佳之攝取量、產量、成分與營養價值，為維持盤固草良好品質必須於適割時期收穫（卜等，1993）。黃等（2011）將全臺灣飼料成分分析結果盤點並彙集成冊內容指出，日曬盤固草（乾基）CP 含量介於 6.0 至 6.8%；EE 含量介於 1.8 至 2.0%；NDF 含量介於 73.9 至 74%；ADF 含量介於 43.3 至 44.3%。另外，日曬百慕達草（乾基）CP 含量約 10.9%；EE 含量約 2.1%；NDF 含量約 69.9%；ADF 含量約 33.9%。整體而言，盤固草與百慕達草雖同為禾本科牧草，但就營養成分而言百慕達草之 CP 及 EE 含量較盤固草高。本試驗使用之盤固草或百慕達草 CP、EE、NDF 及 ADF 皆低於上述結果，可能的原因為氣候變遷影響國產及進口牧草品質。以國內而言，2020 至 2021 年出現無颱風且連續乾旱及高溫，使得畜產試驗所北區分所 2022 年盤固草雖於適割期收穫，卻由於前幾年無法配合天候施肥導致牧草生長不如往年。本試驗期間採集之 TMR 營養成分計算結果如表 2 所示，盤固草 TMR 之 CP、EE、NDF 及 ADF 含量依序為 16.4%、3.4%、36.4% 及 21.9%；百慕達草 TMR 之 CP、EE、NDF 及 ADF 含量依序為 17.2%、3.5%、34.5% 及 20.4%。不同種類禾本科牧草，雖可藉由配方計算將兩個處理組 TMR 之 CP 與 EE 符合泌乳牛需求，但 NDF 與 ADF 的含量仍略有差異。乳牛乾物質採食量的主要影響因子為 NDF 而影響消化率的主要飼糧因子為 ADF（李等，1999）。同時，分所收穫之盤固草以圓捆包方式打包，需在加入 TMR 前先切短至 10 到 15 公分長度，但仍無法十分

均勻；而百慕達草則直接在調製 TMR 時直接混入 TMR 中攪拌。雖然，盤固草與百慕達草品質及調製過程，皆有可能會造成牛群採食量及消化過程中的差異，本研究探討不同芻料對瘤胃微生物及乳成分之影響，初步推論當盤固草品質偏低且占比不高的情形下具有差異。

一般而言，瘤胃中的 pH 值約為 6 – 7，但會因飼糧組成變化而造成微生物菌群消長與揮發性脂肪酸組成之變化。瘤胃中的丙酸及丁酸可透過腸壁吸收做為反芻動物的能量來源，反芻動物唾液中含大量的碳酸氫鈉、碳酸氫鉀和尿素，可有助於瘤胃 pH 值之穩定，同時發酵過程中產生的氨也有利於微生物生長（宋，2006）。本試驗 P 組及 B 組牛群之瘤胃 pH 值平均分別 6.71 (n= 4) 與 6.82 (n= 5)，說明兩組試驗牛群瘤胃狀態穩定。近年來，許多研究報告建議捨棄操作分類單元 (operational taxonomic units, OTU) 的分類方式，轉而採用去噪 (Denoising) 方法，獲得解析度更高的擴增子序列變體 (amplicon sequence variants, ASVs) (Knight *et al.*, 2018)，因此，本試驗結果以校正擴增子序列錯誤的演算模型 (divisive amplicon denoising algorithm, DADA) (Rosen *et al.*, 2012)。P 組與 B 組乳牛群瘤胃中分別具有 2,071 及 1,974 個獨特微生物物種去氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 條碼，存在與不同處理組間 (如圖 1)，此結果說明不同芻料組成之 TMR 可能會造成荷蘭種泌乳末期乳牛瘤胃微生物組成之差異。Roques *et al.* (2023) 研究報告指出，透過 ASVs 來表示瘤胃微生物群的豐富和多樣性，以了解不同飼糧組成對瘤胃微生物群造成之差異。試驗結果指出，與飼餵晚割青貯 (late mown silage diet, LMS) 飼糧之乳牛相比，飼餵一般青貯 (control silage diet, CS) 飼糧的乳牛在 820 個 DNA 條碼中有 547 個在兩組間具有顯著差異。其中，瘤胃球菌科和琥珀弧菌科 (*Succinivibrionaceae* families) 含量在 LMS 組的乳牛瘤胃中顯著低於 CS 組 ($p < 0.001$)；相反，LMS 組乳牛瘤胃中克里斯滕氏菌 (*Christensenellaceae* families) 含量明顯較高 CS 組 ($p < 0.001$)。另外，與飼餵高草本植物青貯 (herb rich silage diet, HRS) 的乳牛相比，LMS 組的乳牛在 820 個 DNA 條碼中有 347 個在兩組間具有顯著差異，HRS 組的乳牛瘤胃之變形菌門 (*Proteobacteria*) 含量明顯比 LMS 組的乳牛更豐富 ($p = 0.03$)。上述試驗與本試驗相似皆說明瘤胃微生物群的組成會受到飼糧之強烈影響。

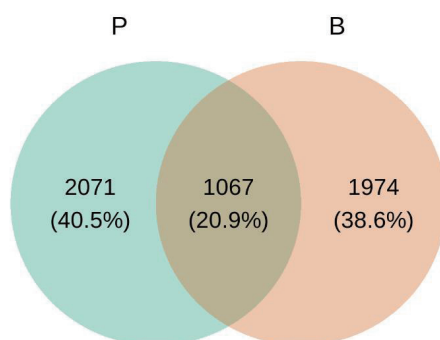


圖 1. 飼餵不同芻料組成完全混合日糧，對荷蘭種泌乳末期乳牛瘤胃微生物之影響。兩個橢圓代表兩個處理組，重疊區域代表盤固草組 (P) 與百慕達組 (B) 之間相同的子序列變體量。

Fig. 1. Effect of different grasses TMR for rumen microbiota of Holstein late lactation milking cows. Each ellipse represents one group. The overlapping regions between the ellipses represent as the amplicon sequence variants (ASVs) that are shared between the Pangola hay group (P) and Bermuda hay group (B).

瘤胃內細菌的總數與各細菌族群多寡，皆會受飼料來源而改變，例如當飼料中精料含量多，則會使乳酸桿菌的數目增加。乳牛採食牧草並分解纖維素作為營養來源，瘤胃微生物具備降解植物纖維素及半纖維素的能力 (Koike and Kobayashi, 2009)，而影響瘤胃微生物降解的能力包括牧草種類、作物成熟度及微生物族群多寡 (Castillo-Gonzalez *et al.*, 2014)。由圖 2 可知，P 組與 B 組牛群瘤胃微生物均由擬桿菌門 (*Bacteroidetes*)、厚壁菌門 (*Firmicutes*)、變形菌門及軟壁菌門 (*Tenericutes*) 四個優勢菌門主導。各優勢菌門在兩個處理組樣品相對豐富度也有所不同，擬桿菌門作為第一優勢菌門在 P 組樣本中的相對豐富度為 69.81%，高於 B 組中 67.22%；而第二優勢菌門的厚壁菌門在 P 組樣本中為 18.61%，低於 B 組中 22.92%。健康牛群瘤胃微生物群在門的級別，大部分屬於擬桿菌門及厚壁菌門 (De Oliverira *et al.*, 2013)。由圖 3 可知，P 組與 B 組牛群瘤胃微生物樣本中，相對豐富度最高的屬為普氏菌屬，P 組與 B 組牛群樣本中普氏菌屬占比分別為 49.45% 及 50.38%。普氏菌屬、瘤胃球菌屬和丁酸弧菌屬在泌乳牛的瘤胃中含量最豐富，也是乾乳早期的優勢菌屬 (Xue *et al.*, 2018)。普氏菌屬為主要利用非結構性碳水化合物化合物的細菌品種，也是瘤胃中數目最多的細菌。這類細菌具有分解大分子非結構性碳水化合物 (如澱粉) 的酵素，但卻沒有分解植物纖維的酵素，不過仍可利用纖維的分解產物，如水溶性纖維寡糖、纖維二糖及葡萄糖。同時，這類細菌偏好胺基酸和胜肽作為細胞內蛋白質合成所需氮源，對酸度容忍度較高，即使 pH 值低於 5 仍可存活。Henderson *et al.* (2015) 研究指出普氏菌屬、丁酸弧菌屬和瘤胃球菌屬易受到飼糧組成變化影響，說明 P 組與 B 組牛群樣本中普氏菌屬占比些許差異的

可能原因。Xue *et al.* (2018) 為了解不同泌乳天數對牛群瘤胃中 VFA 含量影響，將泌乳天數自 90 天至 219 天分成四個組，結果發現不同泌乳天數區間其牛群瘤胃中 VFA 含量具有顯著差異 ($p < 0.01$)，此結果也說明不同泌乳階段之牛群瘤胃微生物群具有差異。本試驗兩組選用牛群泌乳天數平均皆大於 305 天屬泌乳末期，其瘤胃微生物群結果比較應無受泌乳天數影響。另外，利用 PCA 分析，了解餵飼不同芻料組成 TMR 對荷蘭種泌乳末期牛瘤胃主要微生物組成豐富度差異之影響如圖 4 所示，以屬的級別進行 PCA 以評估處理組之間瘤胃微生物組成的差異。PCA 圖顯示，PC1 和 PC2 分別佔瘤胃微生物群組成變異為 22.16% 和 19.73%，在 PC1 變異貢獻度較高的主要細菌為 *Prevotella*，而 *Pseudobutyrvibrio*、*Kineothrix*、*Butyrvibrio* 及 *Alistipes* 則為 PC2 變異貢獻度較高的細菌。綜上，本試驗結果說明荷蘭種泌乳末期乳牛群在不同芻料組成餵飼下其瘤胃微生物組成相似，但比例不同。

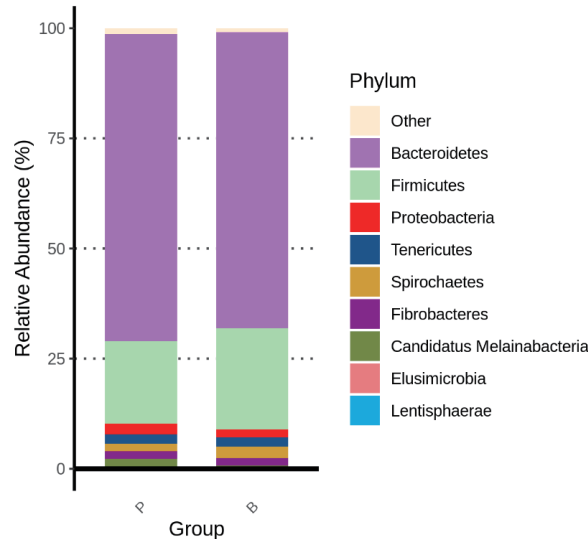


圖 2. 餵飼不同芻料組成完全混合日糧，對荷蘭種泌乳末期乳牛瘤胃微生物組成在門級別豐富度差異之影響。

Fig. 2. Effect of different grasses TMR for major rumen microbiota at the phylum level relative abundance of late lactation Holstein milking cows.

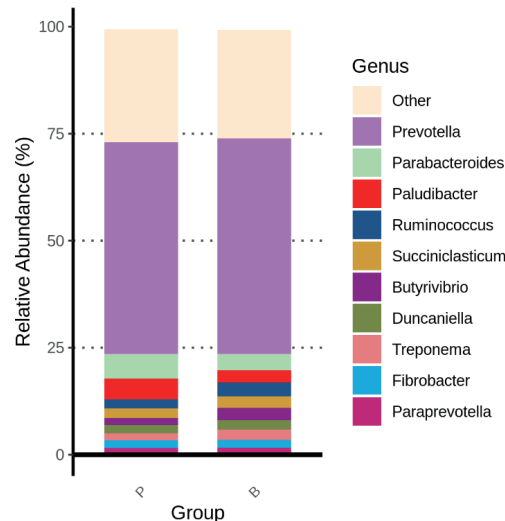


圖 3. 餵飼不同芻料組成完全混合日糧，對荷蘭種泌乳末期乳牛瘤胃微生物在屬級別豐富度差異之影響。

Fig. 3. Effect of different grasses TMR for major rumen microbiota at the genus level relative abundance of late lactation Holstein milking cows.

表 3 為餵飼不同芻料組成 TMR 對荷蘭種泌乳末期乳牛產乳量及乳成分影響之結果，P 組與 B 組牛群其產乳量 (29.58 vs. 28.28 kg)、乳脂肪率 (4.14 vs. 3.55%)、乳蛋白質率 (3.24 vs. 3.48%)、乳糖率 (4.72 vs. 4.91%)、無脂固形物率 (8.67 vs. 9.01%)、尿素氮 (13.78 vs. 14.53 mg/dL) 及檸檬酸 (155 vs. 141 mg/dL) 等間皆無顯著影響。乳脂肪率、乳蛋白質率與灰分會隨泌乳期之泌乳天數之增加而增加，但乳糖卻稍減 (宋，2006)。P 組及 B 組試驗牛群之平均起始泌乳天數，分別為 323 ± 45 及 330 ± 41 天，皆屬於泌乳末期，試驗選用泌乳末期牛群進行可能

是造成本試驗處理組與對照組產乳量與乳品質間無顯著差異之原因。Jami *et al.* (2014) 研究指出，瘤胃中以厚壁菌門及擬桿菌門之微生物與乳脂肪產量最為相關，且兩者的相對豐富度 (relative abundance) 是互補的，當厚壁菌門的相對豐富度提高時，可觀察到擬桿菌門下降，則此時乳脂肪產量上升。前述研究結果與本試驗結果相異，B 組厚壁菌門在占比高於 P 組，但 B 組乳脂肪率結果並未高於 P 組，主要的差異為本試驗使用之 TMR 組成芻精料比的原因，Jami *et al.* (2014) 試驗飼糧之芻精料比為 30 : 70。影響牛乳脂肪酸組成之因素很多，主要可分成動物、飼料和環境因素。動物因素包括牛隻品種、胎次和泌乳階段等；環境因素如季節、牛群管理及擠乳頻率等；飼料因素則以飼料與草料種類為主 (Jensen, 2002)。表 4 為餵飼不同芻料組成 TMR 對荷蘭種泌乳末期乳牛乳脂肪酸組成影響之結果，P 組與 B 組牛群其總飽和脂肪酸 (2.9 vs. 2.27 g/100 g of milk)、總不飽和脂肪酸 (1.01 vs. 0.98 g/100 g of milk)、混合型脂肪酸 (1.55 vs. 1.33 g/100 g of milk) 及預製型脂肪酸 (1.36 vs. 1.23 g/100 g of milk) 無顯著影響。但 P 組牛群其乳中新合成型脂肪酸 (0.98 vs. 0.75 g/100 g of milk) 含量顯著高於 B 組 ($p < 0.05$)。乳腺在合成脂肪時，所需要的脂肪酸來源主要可分為兩類，第一種是乳腺用來自瘤胃發酵產生之乙酸 (acetic acid) 及 β -羥基丁酸 (β -hydroxybutyrate) 自行合成脂肪酸，乳脂中所有含十個碳數以下脂肪酸皆由此而來。第二種是乳腺吸收血液中現成的脂肪酸，主要來自食物和身體其他組織製造，少部分來自於瘤胃微生物合成，含乳脂中含十個至十六個碳數的脂肪酸約有一半在乳腺中合成，另一半來自血脂。若脂肪酸來源受到限制，乳脂的生成便會減少。本試驗結果顯示，兩個處理組在乳脂肪率的部分並無顯著差異，但 P 組與 B 組牛群乳脂中的新合成型脂肪酸卻有顯著差異 ($p < 0.05$)，說明乳腺利用來自瘤胃發酵產生之乙酸及 β -羥基丁酸來源，可能受到不同芻料組成 TMR 影響，但須進一步評估瘤胃發酵產物變化才能釐清。

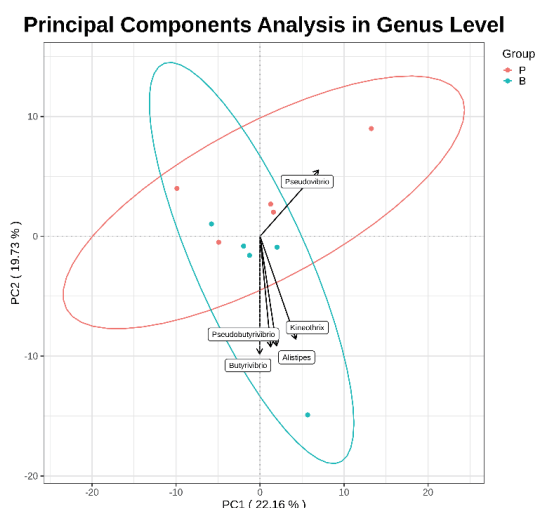


圖 4. 不同芻料組成完全混合日糧對荷蘭種泌乳末期乳牛瘤胃微生物在屬級別豐富度差異之主成分分析結果。

Fig. 4. Principal component analysis (PCA) plots of rumen bacterial communities between Pangola hay group (P) or Bermuda hay group (B) TMR.

表 3. 餵飼不同芻料組成完全混合日糧，對荷蘭種泌乳末期乳牛產乳量及乳成分之影響

Table 3. Effect of different grasses TMR for milk composition of Holstein late lactation milking cows.

Item	Groups ¹		p-value
	P (n ² = 5)	B (n = 5)	
Milk yield, kg/d	29.58 ± 2.90	28.28 ± 2.46	0.59
Milk composition			
Fat, %	4.14 ± 1.55	3.55 ± 0.31	0.07
Crude protein, %	3.24 ± 0.30	3.48 ± 0.35	0.95
Lactose, %	4.72 ± 0.23	4.91 ± 0.54	0.08
Solid not-fat, %	8.67 ± 0.42	9.01 ± 0.34	0.63
Urea nitrogen, mg/dL	13.78 ± 2.04	14.53 ± 4.16	0.30
Citric acid, mg/dL	155 ± 21	141 ± 27	0.76

Mean ± standard deviation.

¹ P = Pangola hay group; B = hay group.

² n = number of cows.

表 4. 餵飼不同芻料組成完全混合日糧，對荷蘭種泌乳末期牛乳脂肪酸組成之影響

Table 4. Effect of different grasses TMR for milk fatty acids composition of Holstein late lactation milking cows.

Item	Groups ¹		p-value
	P (n ² = 5)	B (n = 5)	
Total saturated fatty acid, %	2.90 ± 1.30	2.27 ± 0.23	0.06
Total unsaturated fatty acid, %	1.01 ± 0.30	0.98 ± 0.13	0.33
De novo fatty acid ³ , %	0.98 ± 0.44	0.75 ± 0.06	<0.05
Mixed fatty acid, %	1.55 ± 0.57	1.33 ± 0.10	0.06
Preformed fatty acid, %	1.36 ± 0.44	1.23 ± 0.15	0.20

Mean ± standard deviation.

¹ P = Pangola hay group; B= Bermuda hay group.

² n = number of cows.

³ De novo fatty acid (C4:0, C6:0, C8:0, C10:0, C12:0, C14:0 and C14:1), mixed fatty acid (C16 and C16:1), preformed fatty acid (C15:0, C17:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3, C20:0, C20:2, C 22:0 and C24:0).

結 論

荷蘭種泌乳末期乳牛，餵飼不同禾本科牧草完全混合日糧，會造成其瘤胃微生物組成及乳成分變化。P 組與 B 組牛群瘤胃微生物均由 *Bacteroidetes*、*Firmicutes*、*Proteobacteria* 及 *Tenericutes* 四個優勢菌門主導；P 組與 B 組牛群樣本中，相對豐富度最高的屬為 *Prevotella*，占比分別為 49.45% 及 50.38%；以屬的級別進行 PCA 以評估處理組之間瘤胃微生物組成的差異，結果顯示 PC1 和 PC2 分別佔瘤胃微生物群組成變異為 22.16% 和 19.73%。P 組與 B 組牛群其產乳量、乳脂肪率、乳蛋白質率、乳糖率、無脂固形物率、尿素氮及檸檬酸等間皆無顯著影響。但是，P 組牛群其乳中新合成型脂肪酸 (0.98 vs. 0.75 g/100 g of milk) 含量顯著高於 B 組 ($p < 0.05$)。綜上試驗結果，荷蘭種泌乳末期乳牛群在不同芻料組成餵飼下其瘤胃微生物組成相似，但比例不同。可能由於飼糧造成瘤胃微生物組成差異，也使得乳脂肪中與瘤胃發酵有關之新合成型脂肪酸比例在兩組間有顯著差異。瞭解不同禾本科牧草完全混合日糧對泌乳牛群瘤胃核心微生物組成與乳成分變化，將有助於找出國產芻料可能最適應用比例。

誌 謝

試驗期間感謝畜產試驗所北區分所乳牛科技系現場工作同仁，協助試驗牛群飼養管理及樣本收集。

參考文獻

行政院農業委員會農業統計年報。2021。110 年農業生產之牧草。

<https://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/book/Book.aspx>.

卜瑞雄、施意敏、陳吉斌、陳茂墻。1993。不同割期對盤固草產量、化學成分與營養價值之影響。中畜會誌 22:373-386。

李春芳、卜瑞雄、施意敏、陳茂墻。1991。盤固草 A254 (*Digitaria decumbens*, A254) 不同生長期之營養價值。畜產研究 24:59-65。

李春芳、陳吉斌、蕭宗法。1999。盤固草與百慕達草對荷蘭種泌乳牛飼養價值比較。畜產研究 32:353-364。

宋永義。2006。新編乳牛學。華香園出版社。臺北市。

李春芳。2010。反芻動物 (乳牛、肉牛)。畜牧要覽飼養與營養篇。華香園。臺北市。

黃英豪、李春芳、廖宗文、李免蓮、余碧、沈添富、林俊臣、姜樹興、洪平、徐濟泰、許振忠、許福星、盧金鎮、顏宏達、施柏齡、劉芳爵、范耕榛、王仁得。2011。臺灣飼料成分手冊。行政院農業委員會畜產試驗所專輯第 147 號。臺灣。

楊价民。1997。瘤胃生態系統與反芻動物對養分的利用。藝軒圖書出版社。臺北市。

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists International). 1990. *Official Methods of Analysis*. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists International, Arlington, VA. USA.
- Bainbridge, M. L., L. M. Cersosimo, A. D. G. Wright, and J. Kraft. 2016. Rumen bacterial communities shift across a lactation in Holstein, Jersey and Holstein × Jersey dairy cows and correlate to rumen function, bacterial fatty acid composition and production parameters. *FEMS Microbiol Ecol.* 92(5):1-14.
- Buxton, D. R., D. R. Mertens, and K. J. Moore 1995. Forage quality for ruminants: plant and animal considerations. *Prof. Anim. Sci.* 11: 121-131.
- Buxton, D. R. and D. D. Redfearn. 1997. Plant limitations to fiber digestion and utilization. *The J. Nutr.* 127. 814S-818S.
- Castillo-Gonzalez, A. R., M. E. Burrola-Barraza, J. Dominguez-Viveros, and A. Chavez-Martinez. 2014. Rumen microorganisms and fermentation. *Microorganisms fermentation ruminal. Arch. Med. Vet.* 46:349-361.
- De Oliveira, M. N. V., K. A. Jewell, F. S. Freitas, L. A. Benjamin, M. R. Tótola, A. C. Borges, C. A. Moraes, and G. Suen. 2013. Characterizing the microbiota across the gastrointestinal tract of a Brazilian Nelore steer. *Vet. Microbiol.* 164: 307-314.
- Gengler, N., H. Soyeurt, F. Dehareng C. Bastin, F. Colinet, H. Hammami, M.-L. Vanrobays, A. Lainé, S. Vanderick, C. Grelet, A. Vanlierde, E. Froidmont, and P. Dardenne. 2016. Capitalizing on fine milk composition for breeding and management of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 99:4071-4079.
- Henderson, G., F. Cox, S. Ganesh, A. Jonker, W. Young, and P. H. Janssen. 2015. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Sci. Rep.* 5: 14567.
- Jensen, R. G. 2002. The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *J. Dairy Sci.* 85:295-350.
- Jami, E. B., A. White, and I. Mizrahi. 2014. Potential role of the bovine rumen microbiome in modulating milk composition and feed efficiency. *PLoS One.* 9:1.
- Koike, S. and Y. Kobayashi, 2009. Fibrolytic rumen bacteria: their ecology and functions. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 22:131-138.
- Krause D.O., T. G. Nagaraja, A. D. G. Wright, and T. R. Callaway. 2013. Rumen microbiology: leading the way in microbial ecology. *J. Anim. Sci.* 91:331-341.
- Knight, R., A. Vrbanac, B. C. Taylor, A. Aksenov, C. Callewaert, and J. Debelius. 2018. Best practices for analysing microbiomes. *Nat Rev Microbiol.* 1 Nature Publishing Group.
- McAllister, T. A., H. D. Bae, G. A. Jones, and K. J. Cheng. 1994. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *J. Anim. Sci.* 72:3004-3018.
- NRC (National Research Council). 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. National Academies Press, Washington, DC. USA. 5: 43-85.
- Rosen, M.J., B. J. Callahan, D. S. Fisher, and S. P. Holmes. 2012. Denoising PCR-amplified metagenome data. *BMC Bioinf.* 13:283.
- Roques, S., L. Koning, J. van Riel, A. Bossers, D. Schokker, S. Kanti Kar, and L. Sebek. 2023. Influence of agroecology practices on rumen microbiota associated with methane emission in dairy cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 303:115716.
- SAS. 2002. *SAS User's guide: Basics*, 2002 edition. SAS institute Inc., Cary, NC.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74 : 3583-3597.
- Wilkinson T. J., S. A. Huws, J. E. Edwards, A. H. Kingston-Smith, K. Sui-Ting, M. Hughes, F. Rubino, M. Friedersdorff, and C. J. Creevey. 2018. CowPI: a rumen microbiome focused version of the PICRUST functional inference software. *Front. Microbiol.* 9:1095.
- Xue, M.; H. Sun, X. Wu, L. L. Guan, and J. Liu. 2018. Assessment of rumen microbiota from a large dairy cattle cohort reveals the pan and core bacteriomes contributing to varied phenotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* 84: 00970-18.

The effect of different forage on rumen microbiota and milk composition of Holstein late lactation milking cows ⁽¹⁾

Szu-Han Wang⁽²⁾⁽³⁾ Hsiao-Han Liao⁽²⁾ Chia-Xin Lee⁽²⁾ Hsiao-Ming Chen⁽²⁾
and Jen-Wen Shiau⁽²⁾

Received: Aug. 9, 2023; Accepted: Nov. 24, 2023

Abstract

The objective of this was to compare the milking cow's microbiota profiles and milk composition by feeding different forage total mix rations. A total of 10 late lactation milking cows with similar milk production and lactation days were selected, and five lactating cows were in each Pangola hay (P) or Bermuda hay (B) group. In the experimental period, cows were pre-fed for 18 days. Milk samples were collected in the last three days, and rumen fluid samples were only collected at the end of the experimental period. The results showed 2,071 and 1,974 DNA barcoding of unique microbial species in the rumen of dairy cows in groups P and B, respectively, and between different treatment groups. At the phylum level, the rumen microorganisms of the P and B groups were dominated by four dominant bacteria, including *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, and *Tenericutes*. Nevertheless, the relative abundance of the dominant phylum in the samples of the two treatment groups was different. The relative abundance of Bacteroides as the first dominant phylum in the samples of group P was 69.81%, which was higher than that of 67.22% in group B. The genus with the highest relative abundance in group P and B cattle samples was *Prevotella*, accounting for 49.45% and 50.38%, respectively. PCA analysis indicated that *Prevotella* was the major bacteria with higher contributions to variability, *Pseudobutyrvibrio*, *Kineothrix*, *Butyrvibrio*, and *Alistipes* were major contributors to PC2 variability. No significant differences existed between groups P and B of milk yield, fat, protein, lactose, solids not-fat, urea nitrogen, and citric acid content. However, the content of *de novo* fatty acids (0.98 vs. 0.75 g/100 g of milk) in the milk of group P was significantly higher than that of group B ($p < 0.05$). To summarize the results, the composition of rumen microbiota in milking cows fed with different ration compositions was similar, but the proportions differed. Understanding the changes in rumen core microbial composition and milk composition of milking cows with different forage complete mixed diets will help to develop the most suitable ratio of domestic forage that is stable in the rumen and capable of utilizing production capacity.

(1) Contribution No. 2772 from Taiwan Livestock Research Institute (TLRI), Ministry of Agriculture (MOA)

(2) Northern Region Branch, MOA-TLRI, Miaoli 36843, Taiwan, R. O. C.

(3) Corresponding author, E-mail: shwang@mail.tlri.gov.tw.

氣候變遷下乳牛產業面臨的熱平衡管理挑戰 - 回顧性研究⁽¹⁾

李佳蓉⁽²⁾⁽³⁾ 林怡君⁽³⁾⁽⁴⁾

收件日期：112 年 7 月 31 日；接受日期：112 年 12 月 8 日

摘 要

聯合國氣候變遷專門委員會（Intergovernmental Panel on Climate Change）調查報告預估，未來 30 年地表平均氣溫會上升達 1.5°C，中緯度陸地升溫可能高達 3°C，而高緯度陸地可能達 4.5°C，高溫環境已是乳牛產業最重要的挑戰之一。環境中高乾球溫度、高濕度、高輻射與低空氣流動易造成牛隻熱緊迫（heat stress）。熱緊迫影響乳牛行為與生理，進而導致產乳量下降和能量負平衡，增加繁殖障礙風險，甚至造成牛隻死亡。在環境條件、曝露時間、個體差異與品種等條件相互影響下，牛隻的狀態可用熱負荷（heat load）一詞描述與定義牛隻熱平衡表現。牛隻處於高熱緊迫環境或高熱負荷狀態都有相似的生理表現，包含呼吸速率、心跳、體溫與飲水量增加，採食量、活動量與臥坐行為減少等。無論是溫度或風速的單一指標，或是複合型指標，都能用於評估熱緊迫程度對牛隻的影響。當環境指標超過一定數值（閾值），牛隻生理與行為反應會出現劇烈變化。不同地區、不同牛種與不同生產階段的牛隻都會有不同的熱負荷閾值。要減少牛隻體內熱量進而緩解熱負荷，主要有二種方法，包含減緩熱生成以及加速熱散失。在氣候變遷下，詳細了解乳牛在熱緊迫環境的各種反應，有利制定管理戰略，讓牛隻提高耐熱性的同時維持生產力，而透過育種可以從根本改善乳牛對熱的適應，再結合以牛為本的熱平衡管理手段，可尋找對環境永續最佳管理策略。

關鍵詞：熱緊迫、熱負荷、氣候變遷、熱平衡管理。

緒 言

聯合國氣候變遷專門委員會（Intergovernmental Panel on Climate Change）報告顯示，近百年來人類造成全球地表平均溫度增加 1.07°C（Lee *et al.*, 2023）。然而，IPCC 預估在 2030 年到 2052 年之間，地表平均氣溫會上升達 1.5°C，而陸地的溫度變化會高於地表均溫，中緯度地區升溫可高達 3°C、高緯度地區則可達 4.5°C（IPCC, 2018）。依據交通部中央氣象局觀測站觀測資料顯示，1911 至 2020 年間臺灣年平均氣溫上升約 1.6°C，溫度上升速度在最近 30 年有增加趨勢（科技部等，2021）。隨著氣候變遷，臺灣四季分布亦隨之改變，21 世紀初夏季長度已增加為 120 至 150 天，冬季則縮短為約 70 天，未來夏季長度預估增長至 155 至 210 天，冬季長度則縮短至 0 至 50 天。因此在氣候變遷下，面對溫度逐年上升，乳牛飼養場的管理策略必須比過去更加積極。

熱緊迫會影響乳牛生產效率，包含產乳量和受孕率（Burhans *et al.*, 2022），進而影響牧場獲利能力。熱緊迫甚至會增加牛隻死亡風險，Vitali *et al.*（2009）調查發現，乳牛夏季死亡率高於春季，當溫溼度指數（temperature-humidity index, THI）大於 80 時，乳牛死亡率會顯著上升。特別是死亡經常發生在極端高溫後幾天，死亡率升高當下環境溫度可能不再具威脅性，讓農民往往忽略極端高溫的影響（Burhans *et al.*, 2022）。

本回顧性研究的目的包含（1）熱緊迫環境對牛隻行為與生理上的改變、（2）探討評估乳牛熱平衡狀態的相關指標，並整理（3）熱平衡管理與熱應對戰略，及（4）動物福祉與環境永續。

I. 熱緊迫對牛隻的影響

當環境條件足以限制牛隻代謝熱損失，或當周圍溫度高於動物表面溫度，或是動物從其他物體獲得輻射熱時，恆溫動物維持恆定體溫的能力可能會受到影響（Dikmen and Hansen, 2009）。影響動物體溫的四個主要環境因素是

(1) 農業部畜產試驗所研究報告第 2773 號。
(2) 農業部畜產試驗所畜產經營組。
(3) 國立中興大學動物科學系。
(4) 通訊作者，E-mail: ycl2019@nchu.edu.tw

乾球溫度、濕度、輻射和空氣流動，這些環境條件使環境狀態高於動物熱中性區（thermal neutral zone）的溫度範圍，對牛隻造成影響進而產生熱緊迫（heat stress）（Buffington *et al.*, 1981; Dikmen and Hansen, 2009）。在不考慮環境適應性以及產乳量的狀況下，單純以溫度而論，泌乳牛熱舒適溫度帶上限為 25 至 26°C（Berman *et al.*, 1985; Kadzere *et al.*, 2002）。

然而，熱緊迫僅考慮環境條件對牛隻引起的生理反應，並未考慮動物個體因素。熱負荷（heat load）一詞則結合了動物個體因素和環境條件對動物的累積影響（Hahn, 1999），比起熱緊迫，熱負荷更適合描述動物的熱平衡（Lees *et al.*, 2019）（圖 1）。動物體內高熱負荷狀態對生產、繁殖和福祉都會產生不利影響（Nordlund *et al.*, 2019），行為和生理反應等可量化數據，可以當作熱負荷的指標（Lees *et al.*, 2019）。

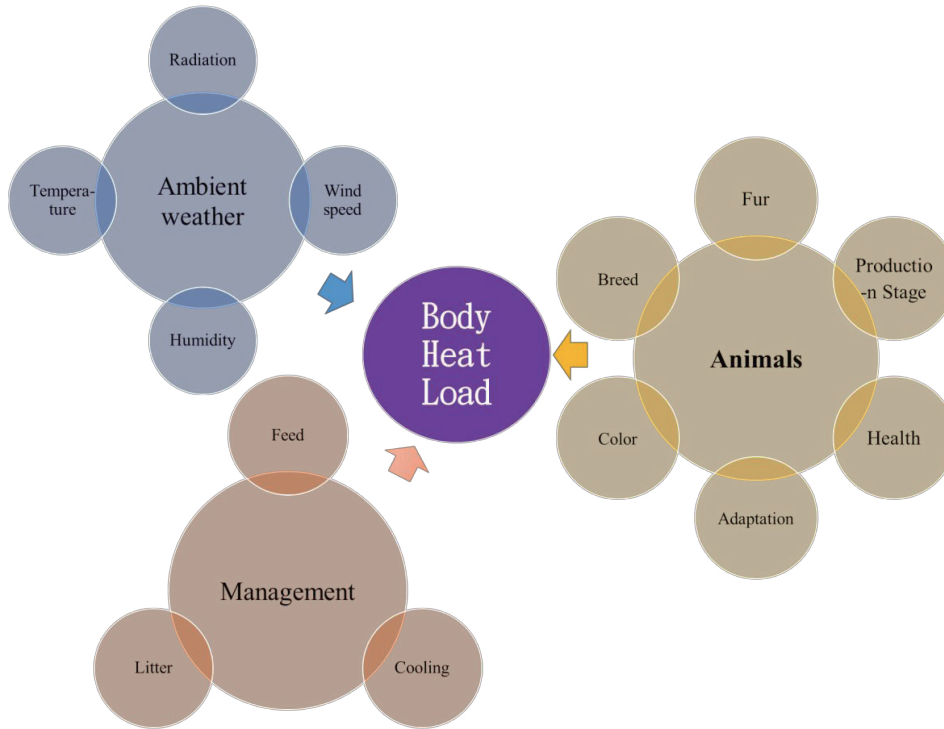


圖 1. 影響牛隻體內熱負荷的因素涉及環境因子、動物個體因素以及飼養管理。環境因子包含環境溫度、濕度、風速和輻射熱（Dikmen and Hansen, 2009）；動物個體因素包含品種（Carvalho *et al.*, 2018）、毛髮型態（Gebremedhin and Wu, 1998）、生產階段（Kovacs *et al.*, 2020）、健康狀態（Gaughan *et al.*, 2008）、適應性（Hammami *et al.*, 2013）與毛髮顏色（Gebremedhin *et al.*, 2008）都會影響體內熱負荷；飼養管理的日糧（West, 1999）、降溫措施（Levit *et al.*, 2021）以及墊料狀態（Gaughan *et al.*, 2008）也會影響牛隻熱負荷。

Fig. 1. Factors influencing the internal heat load of cattle encompass environmental factors, individual animal characteristics, and husbandry management. Environmental factors include ambient temperature, humidity, wind speed, and radiant heat (Dikmen and Hansen, 2009). Individual animal characteristics comprise breed (Carvalho *et al.*, 2018), fur type (Gebremedhin and Wu, 1998), production stage (Kovacs *et al.*, 2020), health status (Gaughan *et al.*, 2008), adaptability (Hammami *et al.*, 2013), and fur color (Gebremedhin *et al.*, 2008), all of which can influence the heat load. Additionally, feed management (West, 1999), cooling measures (Levit *et al.*, 2021), and litter conditions (Gaughan *et al.*, 2008) of husbandry management can impact the heat load of cattle.

泌乳牛正常體溫在 38.3 至 38.9°C 之間（Sjaastad *et al.*, 2010），當環境溫度和濕度持續增加時，對牛隻體內熱量累增的影響會加劇（West, 2003）。在熱緊迫期間，反芻動物透過各種途徑，減少熱量產生同時增加熱量損失，以維持正常體溫（Bernabucci *et al.*, 2010）。當牛隻本身產熱和環境所造成的熱緊迫時間增加時，動物無法排除過多的體熱，便會發展成致命的病症（Burhans *et al.*, 2022），當牛隻體溫達 42°C 就有可能致死（Sjaastad *et al.*, 2010）。熱致死的進程涉及動物體內多系統功能障礙和失衡，包含電解質失調、不穩定的血液 pH 值和胃腸道高通透性等（Burhans *et al.*, 2022），牛隻最終因熱毒性和熱敗血症二條途徑而死亡（Lim, 2018）。熱毒性涉及直接熱組織損傷，包括細胞膜的液化以及細胞內蛋白質和細胞器的變性；熱敗血症則涉及內毒素血症、氧化傷害、敗血症和全身炎症等。如果出現足以致命的熱緊迫環境，牛隻不一定會在達到特定溫度後突然死亡，或是所有動物一起死亡（Burhans *et al.*, 2022）。

為應對體內增加的熱，牛隻會有一連串反應。Polsky and von Keyserlingk (2017) 將乳牛應對熱緊迫環境的反應，總結為行為和生理二大類。行為反應包括增加飲水量、減少採食量和改變採食時間、尋找陰涼處、減少活動和增加站立時間等；生理反應包括增加呼吸速率、出汗以及降低產乳量等。本研究整理熱緊迫或乳牛高熱負荷造成的影響，並比照分成行為反應與生理反應進行探討。

(i) 行為反應

1. 採食與營養

熱緊迫環境下泌乳牛採食模式會改變 (Hahn, 1999)，並且減少乾物質採食量 (dry matter intake, DMI) (West, 2003)，DMI 下降的結果導致產乳量下降 (Spiers *et al.*, 2004)。當氣溫、溫濕度指數和直腸溫度，其中一種數值升高超過閾值，就會影響 DMI 進而影響產乳效率 (West, 2003)。熱緊迫環境下 DMI 下降是必然結果，因為降低 DMI 是乳牛維持核心體溫的重要戰略 (Lees *et al.*, 2019)。然而，熱緊迫致使 DMI 減少僅占產乳量降幅的 35%，其他下降因子和牛隻代謝發生變化有關 (Rhoads *et al.*, 2009)，代謝變化包含因胰島素作用減少進而改變體內營養分配，此過程會阻止泌乳牛的葡萄糖調節 (Bernabucci *et al.*, 2010)。熱緊迫環境除了造成能量攝取不足，牛隻還必須耗費額外的能量增加喘氣速率與增加站立時間，能量需求比沒有熱緊迫更高 (Lees *et al.*, 2019)。採食行為與能量需求相反的狀況下，讓牛隻營養管理面臨更嚴峻的挑戰。

在 Spiers *et al.* (2004) 模擬熱緊迫環境的試驗中，DMI 在環境溫度升高後第 1 天即受到抑制，但 DMI 並不會因長期暴露在熱環境後有所恢復 (Spiers *et al.*, 2018)，亦即不會產生適應性或出現代償機制增加採食量。長期熱緊迫環境下，DMI 長期減少導致動物進入生理能量負平衡狀態，呈現消瘦且較低的體態評分 (body condition score, BCS) (Rhoads *et al.*, 2009)。為了維持乳牛產乳量同時減輕 DMI 下降，降低草料和增加精料來增加日糧的能量密度是一種減少熱緊迫負面影響的有效戰略 (Renaudeau *et al.*, 2012)。

2. 飲水

呼吸與發汗造成動物體內水分流失，乳牛在熱緊迫狀態下水的攝取量會上升 (Hahn, 1999)，當溫度上升 1°C，飲水量增加約 1.2 公升 (West, 2003)，但在嚴重熱緊迫情況下，動物的口渴會被高熱引起的精神狀態抑制，無法喝水會加劇熱緊迫的脫水效應 (Ganong, 2005)，水分攝取不足會加劇熱緊迫致死的進程 (Burhans *et al.*, 2022)。

3. 躺臥行為

增加站立是減少乳牛體溫的行為之一，Allen *et al.* (2015) 研究發現，乳牛在熱緊迫期間會增加站立時間，同時減少躺臥時間，站立可以使乳牛有更多表面積曝露於空氣中，並通過對流和蒸發作用進行冷卻。隨著熱緊迫程度增加，平均每日總躺臥時間減少，但是每日總躺臥次數不會出現顯著變化 (Zähner *et al.*, 2004)。站立每小時可以減少體溫 $0.25 \pm 0.03^\circ\text{C}$ ，躺臥則會增加體溫 $0.5 \pm 0.02^\circ\text{C}$ ，隨著 THI 上升，躺臥增加體溫的速度也會變快 (Nordlund *et al.*, 2019)。

4. 其他行為

Schütz *et al.* (2010) 研究顯示，在有限空間中，熱緊迫環境會增加牛隻攻擊互動 (aggressive interactions)，增加陰影面積後則可有效減少攻擊互動。牛在感受到熱時，會主動尋找涼爽的地方，例如有遮蔭的棚架 (Tresoldi *et al.*, 2016)。若畜舍內有使用灑水降溫，牛隻選擇空氣溫度相對較低的畜舍並避免被水淋濕頭部 (Chen *et al.*, 2015)。不同生產階段的乳牛也會有不同的行為反應，經產牛出現推擠行為的概率較初產牛高 ($P < 0.05$)，然而無論經產牛還是初產牛，推、撞和追逐的攻擊行為都在下午達到頂峰 (Pilatti *et al.*, 2019)。此外，在高熱緊迫環境下，發情導致活動步數增加的現象會變得不明顯，後續的受孕率也會下降 (Polsky *et al.*, 2017)。牛隻應對熱緊迫之行為反應相關研究如表 1。

(ii) 生理反應

1. 呼吸、出汗等反應

出汗和喘氣是動物在熱緊迫環境下表現出的兩種主要自主反應 (Lees *et al.*, 2019)，出汗導致皮膚表面的蒸發作用增加，而在喘氣時，體內水分以蒸發的形式將熱從肺部帶走 (Gebremedhin *et al.*, 2008)。當排汗降溫不足以恢復正常的核心溫度時，乳牛會嘗試通過增加呼吸速率和減少產生代謝熱來降溫 (Silanikove, 2000)，隨著溫度升高呼吸速率上升 (Spiers *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2020)，在炎熱和乾燥的環境條件下，出現喘氣反應 (即流口水、張嘴或伸出舌頭) 的牛，比沒有喘氣反應的牛有更高的呼吸頻率 (Tresoldi *et al.*, 2016)。但是 Zhou *et al.* (2023) 研究發現，呼吸所造成的蒸散量並沒有隨著溫度上升而增加，增加的蒸散量主要來自出汗，且出汗造成的熱蒸散量遠大於呼吸。呼吸和出汗通常可以成功減少體熱，避免引起致死的致病機轉，但是當環境處於極端熱緊迫狀態下，出汗和呼吸可以減少的熱量還是有極限 (Burhans *et al.*, 2022)。

除了呼吸和發汗速率外，心跳速率與直腸溫度都和熱緊迫程度呈正相關 (Bouraoui *et al.*, 2002)，當 THI 值從 68 增加到 78 時，觀察到直腸溫度增加 0.5°C ，心跳和呼吸速率則每分鐘分別增加 6 次和 5 次。許多研究亦都

表 1. 牛隻對熱緊迫行為反應的相關性研究
 Table 1. Research on the correlation between the behavioral responses of cattle to heat stress.

Animals	Sizes	Behavioral indicators	Environment parameters	Results	Reference
Holstein cows	157 heads in 3 barns	Standing	THI	Standing ratio increased as THI over 68.	Allen <i>et al.</i> , 2015
Holstein cows	20 heads	Lying bouts; Daily lying time	THI	The lying bouts unchanged, but the daily lying time decreased as THI increased.	Nordlund <i>et al.</i> , 2019,
Holstein cows	12 heads	DMI	AT	DMI decreased as AT raised.	Spiers <i>et al.</i> , 2004
Beef cattle	32 heads in 4 drylots	Seek for shade	AT	Use shade and avoid uncooled areas	Tresoldi <i>et al.</i> , 2016
Holstein cows	12 heads	Water intake, feed intake, resting behavior, and agonistic behaviors	AT, RH, and WS	Agonistic behaviors increased and feed intake decreased as THI raised	Pilatti, 2019

DMI is dry matter intake; AT is ambient temperature; RH is relative humidity; WS is wind speed or air velocity; THI is temperature-humidity index.

顯示熱緊迫程度增加，會導致呼吸速率 (Spiers *et al.*, 2004; Mader *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2022) 和直腸溫度 (Allen *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2022) 上升。Li *et al.* (2020) 研究發現，平均呼吸速率和平均直腸溫度之間存在非常強的相關性，平均呼吸速率每分鐘增加 4.8 次，平均直腸溫度則增加 0.1°C，而觸發生理反應顯著失控的熱緊迫環境，所對應的直腸溫度為 38.6°C、平均呼吸速率則是每分鐘 48 次。

當乳牛處在較高熱負荷狀態，生理反應包括出汗、呼吸以及循環調整 (Burhans *et al.*, 2022)，但其他如心跳速率、瘤胃蠕動速度對應直腸溫度的反應可能不顯著或是沒有顯著規律 (García *et al.*, 2020)。熱負荷對不同生產階段或產乳量的影響程度不同 (Gaughan *et al.*, 2008)，也會有不同的生理表現，例如經產牛出現喘氣的機率較初產牛高 ($P < 0.05$) (Pilatti *et al.*, 2019)，而高產乳牛身體產熱量與心跳速率較低產牛高 (Purwanto *et al.*, 1990)，此外直腸溫度隨著泌乳天數 (day in milk, DIM) 增加而逐漸下降 (Bewley *et al.*, 2008)。牛隻應對熱緊迫之呼吸、心跳、體溫及蒸散率等反應相關研究如表 2。

2. 血液生化

哺乳動物因熱而過度換氣的反應分成兩個階段 (Tresoldi *et al.*, 2016)，第一階段是呼吸急促，包括呼吸頻率增加和潮氣量減少，第二階段則是呼吸過度。呼吸過度狀態下，仍可看到高呼吸速率和喘氣行為，但與初始呼吸急促相比，呼吸速率較降低，而潮氣量增加有助於蒸發冷卻，此外血液中 CO₂ 濃度降低導致呼吸性鹼中毒 (Burhans *et al.*, 2022)，這種呼吸性鹼中毒現象會在牛隻曝露於熱緊迫環境後數小時內出現 (Schneider *et al.*, 1988)，血液 pH 值偏高的狀態下會刺激腎臟排泄碳酸氫鹽 (HCO₃⁻) 以維持血液 pH 值穩定，轉為代償性代謝性酸中毒 (Burhans *et al.*, 2022)。這種酸中毒 - 鹼中毒的往復循環反映在乳牛尿液 pH 值的晝夜變化上，在較熱的下午 pH 值升高，然後在較冷的夜間和清晨 pH 值會降低 (Schneider *et al.*, 1988)。代謝性酸中毒還可能進一步減少採食量，因為血液 pH 值下降和 DMI 下降之間存在正相關 (Zimpel *et al.*, 2018)

呼吸速率增加會導致酸鹼紊亂，而出汗會導致血中電解質失衡。汗液中會分泌大量的 K⁺ (Kadzere *et al.*, 2002)，汗液中 K⁺ 的分泌隨溫度和熱緊迫持續時間升高而增加。而 Na⁺ 在熱緊迫環境下，則會透過流涎和尿液加速排出體外 (Burhans *et al.*, 2022)，其中唾液中包含了中和血液和瘤胃 pH 值的 HCO₃⁻，唾液流失加劇了代謝性酸中毒的進程。

雖然前述回顧提及「曝露於熱緊迫環境下乳牛會增加飲水量」，但由於排汗增加、喘氣與流涎造成的水分蒸散和唾液損失，以及腹瀉造成的水分損失，都會對牛隻體內水平衡造成負面影響。一旦攝水量不足以應付水分損失導致牛隻脫水；脫水會對血漿總量產生影響，除了導致凝血功能障礙外，更限制動物的體溫調節能力，二種機制都增加了熱緊迫致死的風險 (Burhans *et al.*, 2022)。

乳牛在熱負荷程度增加下，體內血流被引導至皮表，試圖透過輻射傳導減少體內熱量，核心血液減少影響消化與吸收效率 (Silanikove, 2000)。營養吸收後在肝臟的能量、脂質和蛋白質代謝亦會改變，不僅引起氧化自由基造成肝功能損害，還會危及免疫反應並降低繁殖性能 (Bernabucci *et al.*, 2010)。

許多血液生化值亦為隨著熱緊迫程度增加而改變 (Koubkova *et al.*, 2002)，例如：當空氣溫度從 18°C 增加到 32°C 時，血清白蛋白 (albumin) 和血中尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 會增加、高產乳牛的丙胺酸氨基轉移酶 (alanine transaminase, ALT) 活性隨著空氣溫度增加而降低。熱緊迫初期血液濃縮導致葡萄糖、血容比 (hematocrit, Hct) 和總蛋白質 (total protein, TP) 便顯著上升，葡萄糖會在快速上升後快速下降。

除了血液生化值外，體內熱休克蛋白 (heat shock protein, HSP) 會隨熱緊迫而增加，部分 HSP 會保護細胞不受傷害，例如熱緊迫下，泌乳牛乳腺細胞中 HSP70 會上升，主要負責保護乳腺細胞免受到傷害 (Hu *et al.*, 2016)。

3. 繁殖

對全年皆進行繁殖配種的生產者來說，熱緊迫環境是個大問題 (Polsky and von Keyserlingk, 2017)。熱緊迫環境對乳牛的繁殖力產生明顯負影響，尤其是在熱帶和亞熱帶地區炎熱潮濕的夏季 (Baruselli *et al.*, 2020)。當環境溫度從 29.7°C 升高到 33.9°C 後，首次配種的受孕率從 25% 下降到 7% (Cavestany *et al.*, 1985)，而夏季熱緊迫導致受孕率下降幅度達 20 至 30% (De Rensis and Scaramuzzi, 2003)。當平均 THI 達 73 以上，受胎率便會從 31% 下降到 12%，無論是配種前還是配種後，熱緊迫環境都對受胎率有負面影響，而配種前 21 天至前 1 天的熱緊迫對受孕率影響最大 (Schüller *et al.*, 2014)。人工授精 (Artificial insemination, AI) 當天乳牛的直腸溫度也是一種指標，當 AI 期間直腸溫度高於 39.1°C 時，第 60 天的受孕率從 21% 下降到 15% (Pereira *et al.*, 2013)。母牛高體溫不僅會導致受精失敗，也會導致早期胚胎死亡。夏季熱緊迫期間從泌乳牛身上採集的卵母細胞在體外受精後發育到囊胚的能力也會明顯降低 (Baruselli *et al.*, 2020)，此現象和卵子發育過程中卵母細胞遭遇高體溫導致細胞熱休克有關 (Roth, 2017)。

II. 環境指標對動物之影響

儘管核心體溫 (陰道或直腸) 或呼吸速率為動物曝露於熱緊迫環境提供了有價值的資訊，但這兩種監測措施

表 2. 牛隻應對熱緊迫之呼吸、心跳、體溫及蒸散率等生理反應與奶量變化相關研究

Table 2. Researches on the correlation between the physiological responses of cattle such as respiration, heartbeat, body temperature and evapotranspiration rate and changes in milk volume in response to heat stress.

Animals	Sizes	Physiological indicators	Environment parameters	Results	Reference
Holstein cows	16 heads	HR, RT, RR, and salivary cortisol	THI	HR, RT and RR increased as THI raised.	Kovács <i>et al.</i> , 2020
Holstein cows	139 heads	RT and RR	AT, RH, and THI	RR increased as THI raised.	Pinto <i>et al.</i> , 2020
Holstein cows	14 heads in spring; 14 heads in summer	HR, RT, RR, cortisol, and thyroxine	THI	HR, RT, and RR increased as THI raised, while no difference in cortisol and thyroxine.	Bourroui <i>et al.</i> , 2002
Beef cattle	17,560 heads in 13 feedlots	Panting score	HLI	Mean panting score increased as HLI raised.	Gaughan <i>et al.</i> , 2008
Multi-breed of beef cattle and Holstein cows	177 heads in 7 studies	ER and ST	AT, RH, WS, and SR	SR and WS effected ER and ST. RH effected ER.	Gebremedhin <i>et al.</i> , 2008
Holstein cows	23,963 heads	MY and SCC	THI, THIadj, HLI, ETL, ESI, and CCI	SCC increased and MY decreased as each index raised.	Hammami <i>et al.</i> , 2013
Holstein cows	45 heads	RT	AT, RH, and WS	The RT was affected by AT.	Li <i>et al.</i> , 2020
Holstein cows	20 heads	VT	THI	As THI raised, VT raised faster while lying.	Nordlund <i>et al.</i> , 2019,
Holstein cows	12 heads	MY, RR, and RT	AT	RR, RT, and increased as AT raised; MY decreased as AT raised.	Spiers <i>et al.</i> , 2004
Holstein cows	20 heads	RR, RT, and ST	AT, RH, and WS	The ST was affected by AT and WS, but without RH.	Zhou <i>et al.</i> , 2022
Multi-breed of beef cattle and Holstein cows	177 heads in 7 studies	ER and ST	AT, RH, WS, and SR	SR and WS effected ER and ST. RH effected ER.	Gebremedhin <i>et al.</i> , 2008

MY is milk yields; RT is rectal temperature; VT is intravaginal temperature; ST is skin temperature; HR is heart rate; RR is respiration rate; SCC is somatic cell count; ER is evaporation rate or sweating rate; AT is ambient temperature; RH is relative humidity; WS is wind speed or air velocity; SR is solar radiation; THI is temperature-humidity index; THIadj is adjusted THI; HLI is heat load index; ETL is equivalent temperature index; ESI is environmental stress index; CCI is comprehensive climate index

在大規模生產場中長期使用不切實際，此外，數據的「時間不連續」問題，使動物與環境之間的關係不一定準確（Bewley *et al.*, 2008），相對於動物數據，環境資訊可以透過在牧場欄舍安裝各類感測器，並被動取得環境數據。透過各類環境數據的研究，可以估算牛隻生理及產能上的變化，除了預測風險外，還可以制定降溫戰略。

本篇將環境數據分四個部分探討，包含：（1）單一環境指標、（2）複合環境指標、（3）環境指標閾值以及（4）結合時間概念的指標運用。

(i) 單一環境指標

1. 溫度

溫度和熱緊迫程度常常被放在一起討論。雖然牛隻熱中性帶上限溫度為 25 至 26°C，然而環境溫度對呼吸速率和直腸溫度的影響在 19 至 26°C 的熱中性帶就已經出現（Zhou *et al.*, 2022）。大多數情況下，隨著溫度升高，呼吸速率、直腸溫度、體表溫度都會升高（Gaughan *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2020），乳牛的呼吸速率和出汗量通常隨著溫度增加而增加，但是乳牛個體之間的差異很大（Zhou *et al.*, 2023）。

環境溫度不僅影響直腸溫度和呼吸速率，還影響採食量進而影響產乳量（Chen *et al.*, 2013），並增加牛隻站立時間（Zahner *et al.*, 2004）。當環境溫度達到 25 至 27°C 時，DMI 開始下降；當溫度從攝氏 20°C 上升到 29°C 時，乳牛的產乳量降低了 23%（Spiers *et al.*, 2004）。但是，DMI 開始下降的環境溫度受日糧類型和組成影響，例如隨著溫度上升，草料比例高的日糧 DMI 下降速度較快（Beede and Collier, 1986）。

2. 濕度

雖然許多研究顯示溫度和直腸溫度為顯著正相關，但當牛隻長期處在相對濕度（relative humidity, RH）高於 90% 的環境，對生理和產能的負面影響可能超過溫度。Shiao *et al.*（2011）研究發現，乳牛在使用水簾系統降溫的低溫高濕環境中，直腸溫度、採食量以及泌乳量都比處在相對高溫但低濕（相對 THI 較水簾舍高）的牛群差，其原因為高濕度抑制汗液的蒸散作用，導致牛隻無法透過發汗紓解體內熱負荷，最終導致即便環境溫度和 THI 相對低，但熱負荷程度卻相對較高的情形。出汗是熱帶地區反芻動物散熱的最重要途徑（Kennedy, 1995），在溼度增加的狀態下，牛隻出汗都顯著下降（Gebremedhin *et al.*, 2008），不僅如此，RH 和皮膚表面的蒸發率之間存在反比關係，因為當 RH 較高時，蒸發冷卻功效會減弱（Gebremedhin and Wu, 1998; Gebremedhin *et al.*, 2008）。在低風速環境下，高濕度環境抑制乳牛總體蒸發量的增加速率，且高濕度環境總蒸發量低於低濕度環境總蒸發量（Zhou *et al.*, 2023）。

Zhou *et al.*（2022）研究發現，RH 顯著影響高產乳牛的呼吸速率、直腸溫度和泌乳性能。隨著溫度上升，採食量在高濕度（60 – 90%）環境下，下降的幅度較中（45 – 70%）、低（30 – 50%）濕度環境明顯（Burhans *et al.*, 2022; Zhou *et al.*, 2022），泌乳性能和乳蛋白質亦會顯著減少（Zhou *et al.*, 2022）。

3. 空氣流動速度（風速）

皮膚的蒸發冷卻是熱環境中熱負荷緩解機制的主要模式，蒸發冷卻作用會隨著風速的增加進一步增強（Gebremedhin and Wu, 1998; Gebremedhin *et al.*, 2008）。不同牛種對風速的反應也不同，Gebremedhin *et al.*（2008）研究發現，風速越高白色牛的出汗率就越高。荷蘭乳牛在低風速環境（0.1 m/s）的體表溫度和直腸溫度都明顯比中（1.0 m/s）、高（1.5 m/s）風速環境高（Zhou *et al.*, 2022）。

調節風速被廣泛運用在緩解乳牛熱負荷。乳牛淋浴降溫之後，風速越高呼吸速率及體表溫度的下降變化就越高，亦即熱負荷緩解的效果越好（Tresoldi *et al.*, 2018a），而且淋浴後吹風的風速可以延長低體溫的持續時間，當水流量大於每分鐘 1.3 L 時，後續吹風的風速每增加 1 m/s，可使體溫保持在對照值以下約 27 分鐘（Chen *et al.*, 2015）。

4. 輻射熱

相對於溫度、濕度和風速，輻射熱對牛隻影響的研究相對少。除了乳牛場多建有含屋簷畜舍，牛隻在高溫環境下，會主動尋找遮蔭（Tresoldi *et al.*, 2016），大幅減少輻射熱對牛隻的影響，因此輻射熱對牛的影響多在沒有屋簷的圈飼肉牛。Gebremedhin *et al.*（2008）研究發現，隨著太陽輻射增加，牛隻體溫會上升，而且輻射熱會影響牛隻體表蒸散率，當輻射熱大於 600 W/m² 時，濕潤體表的蒸散速率顯著低於無輻射熱的環境。當熱緊迫程度較低時，總體輻射熱對乳牛的躺臥和站立行為沒有顯著影響（Provolo and Riva, 2009）。

(ii) 複合型環境指標

1. 傳統 THI 指標

NRC（1971）的 THI 計算公式是目前常用於牛隻評估熱緊迫的指標。例如 Bouraoui *et al.*（2002）研究發現，當 THI 達 69 以上乳量即開始顯著下降，而下降幅度以簡單線性回歸公式推算，THI 每增加 1 個單位，乳量下降 0.41 公升；在放牧牛的試驗中，每增加 1 個 THI 單位，乳牛站立的時間增加 0.14%，吃草、躺臥和反芻行為時間分別減少 0.30、0.04 和 0.70%（Morales-Piñeyrua *et al.*, 2022）；畜舍環境 THI 每增加 1 個單位，乳牛平均躺臥時間減少 18.1 分鐘（Nordlund *et al.*, 2019）。當 THI 大於 68 時，躺臥總時間會顯著減少（Heinicke *et al.*, 2018），而隨

著 THI 上升，直腸溫度、躺臥時間和乳汁中的皮質醇濃度也會上升 (Zähner *et al.*, 2004)。

Armstrong (1994) 提出溫度濕度指數對應牛隻熱緊迫程度分級，該分級方法被廣泛使用在評估乳牛的熱緊迫程度 (Dikmen and Hansen, 2009)。在 Armstrong (1994) 的分類下，當 $THI < 72$ 時牛隻為舒適的無熱緊迫狀態； $72 \leq THI < 78$ 為輕度熱緊迫； $78 \leq THI < 89$ 為中度熱緊迫； $89 \leq THI < 99$ 為重度熱緊迫；而當 $THI > 99$ 即會出現死亡。THI 指標所對應的熱緊迫程度可以用來評估與解釋乳牛的生理與行為改變，例如當 THI 達到 69 以上，乳量開始下降 (Bouraoui *et al.*, 2002)，而當 THI 達 72 以上時，下降更為明顯，THI 達到 80 或以上產乳量下降了 23% 到 28%。欄中的每日平均 THI 從 68.5 增加到 79.0，平均每日躺臥時間從每天 9.5 小時減少到每天 6.2 小時 (Nordlund *et al.*, 2019)。

在 THI 值較高的環境，氣候變化對動物的影響會更明顯 (Polsky and von Keyserlingk, 2017)，此外，即使使用同一條 THI 公式，在不同的研究環境下會出現不同的熱緊迫程度分類，例如 De Rensis *et al.* (2015) 將 $THI < 68$ 定義為乳牛的熱危險區之外，在 THI 為 68 至 74 時觀察到輕微的熱緊迫跡象，當 THI 達 75 時，生產性能會急劇下降 (進入下一個熱緊迫階段)。

雖然 THI 能解釋乳牛直腸溫度的變化，但 THI 是根據環境參數制定的，通常沒有參考牛隻體溫 (Dikmen and Hansen, 2009)。而不同種 THI 公式有不同的濕度或乾球溫度加權比重，可以用於解釋不同的環境條件 (Bohmanova *et al.*, 2007)。傳統 THI 公式，溫度比重較濕度大，因此 THI 針對呼吸與體溫的預測值僅略高於單獨的乾球溫度 (Dikmen and Hansen, 2009)。對於不同溫度與溼度比重的 THI 公式，Bohmanova *et al.* (2007) 以產乳量產出指標，發現在濕度高的地區使用濕度權重較大的 THI 公式更符合牛群狀況，而濕度權重較低的 THI 公式適合低濕度區域的牛隻反應。

2. 其他複合型指標

除了傳統溫度與濕度公式之外，結合風速和輻射熱的指標陸續被計算出來，並被應用於熱緊迫與熱負荷研究。例如 Gaughan *et al.* (2008) 以喘氣指數作為牛隻對熱的行為指標，針對 17,560 隻肉牛體內熱負荷程度，結合風速與輻射研發出 heat load index (HLI) 公式。後續研究發現，牛隻鼻鏡汗水的出汗量與 HLI 相關性高於 THI (García *et al.*, 2020)。

Hammami *et al.* (2013) 以乳量與體細胞變化分析六種評估熱緊迫程度的環境指標，包括 THI (NRC, 1971)、adjusted THI (THIadj; (Mader *et al.*, 2006))、HLI (Gaughan *et al.*, 2008)、equivalent temperature index (ETI; (Baeta *et al.*, 1987))、environmental stress index (ESI; (Moran *et al.*, 2001))、comprehensive climate index (CCI; (Mader *et al.*, 2010))，其中 THIadj、HLI、ETI 和 CCI 公式包含風速，而 THIadj、HLI、ESI 和 CCI 公式包含輻射熱，六種指標對乳量和體細胞變化都有很高的關聯性。另一份研究比較了 THI、ETI 和 predicted respiratory rate (PRR) 三種環境複合指標，三種指標都與泌乳牛體內溫度呈正相關，但 PRR 不能作為乳牛夜間熱緊迫程度的指標 (Carvalho *et al.*, 2018)。

由於環境指標與動物生理常常不是直線型關係，除了公式化的環境複合型指標外，透過複合指標的分析與二次方建模，更能有效預估牛隻生理反應 (Li *et al.*, 2020)。例如：與直腸溫度有最佳擬合度的最簡單模型，是以乾球溫度和 RH 的二次方線性模型 (Dikmen and Hansen, 2009)。Li *et al.* (2020) 研究發現，結合產乳量、時間段和環境溫度的二次方模型，對預估呼吸數有更好的解釋能力。透過模型模擬和分析，從最有解釋力的公式中可進一步發現，環境溫度、RH、風速、時間段和產乳量對乳牛熱負荷變化影響的相對重要性分別為 76、3、5、8 和 8%。在另一個有高度解釋力的公式中，可以計算出該飼養環境下，風速每增加 1.7 m/s 可以降低核心體溫 0.1°C。

(iii) 環境指標閾值

閾值是目標發生某種變化所對應條件的值。Heinicke *et al.* (2018) 將 THI 設為 X 值、乳牛行為產出為 Y 值，並將資料分成獨立二段線性迴歸模型，以赤池資訊量準則 (Akaike information criterion; AIC) (Akaike, 1974) 計算出有最小值的最佳擬合線性模型，並定義該模型對應斷點的 X 軸值為閾值，當 X 軸達閾值以上，所對應的 Y 軸有不一樣的斜率變化。以 AIC 搭配斷點分析，Heinicke *et al.* (2018) 發現躺臥行為的 THI 閾值為 67，其結果與 Allen *et al.* (2015) 研究中 THI 達到 68 以上乳牛站立比例顯著增加的結果相似。

Hammami *et al.* (2013) 以乳量、乳成分和體細胞做為目標，比較六種不同環境複合指標的影響，六種不同的指標有各自的乳量閾值，而同一種指標對應乳成分、乳量和體細胞也有不同的閾值。

傳統的 THI 主要用於溫帶地區的熱緊迫指標，但熱帶、亞熱帶和地中海氣候條件下的乳牛表現可能會有不同閾值 (Hammami *et al.*, 2013)，事實上，雖然 Armstrong (1994) 年提出溫度濕度指數對應牛隻熱緊迫程度，當 THI 達 72 以上才屬於輕度熱緊迫，但許多研究皆顯示，依照傳統熱緊迫程度進行飼養管理，可能高估了環境的熱緊迫閾值。例如：Bouraoui *et al.* (2002) 研究發現當 THI 達 69 以上，乳量顯著下降，並非熱中性帶；Hammami *et al.* (2013) 研究發現，當 THI 62 以上，乳量會以不同速度下降；當超過 65 的 THI 閾值時，蜂巢胃

表 3. 牛隻熱緊迫與熱負荷閾值之相關研究
Table 3. Researches on the correlation on the environment parameters thresholds of cattle heat stress and heat load.

Animals	Sizes	Production stage	Indicators of animals	Thresholds of Environment parameters	Reference
Holstein cows	14 heads in spring; 14 heads in summer	DIM 144 – 150	MY	Threshold of MY was THI 69.	Bouraoui <i>et al.</i> , 2002
Beef cattle	17,560 heads in 13 feedlots	-	Panting score	HLI 86, while genotype, coat color, health status effected the threshold.	Gaughan <i>et al.</i> , 2008
Holstein cows	16 heads	Bull calves	RT, RR, HR, and salivary cortisol	Thresholds of RR, HR, RT, and salivary cortisol were THI 82.4, 78.3, 88.1, and 88.8 respectively	Kovács <i>et al.</i> , 2020
Holstein cows	139 heads	DIM 118.3 ± 67.1	RT and RR	Respiration rate of standing and lying cows were THI 70 and 65 respectively.	Pinto <i>et al.</i> , 2020
Holstein cows	157 heads in 3 barns	DIM 125 - 161	Standing ratio	Threshold of standing ratio was THI 68	Allen <i>et al.</i> , 2015
Holstein cows	28 heads in 3 barns	DIM 0 - 165	Reticular temperature	Threshold of reticular temperature was THI 70.	Ammer <i>et al.</i> , 2016
Holstein cows	23,963 heads	DIM 5 - 330	MY and SCC	Thresholds of MY and SCC were THI 62 and 66 respectively.	Hammami <i>et al.</i> , 2013
Holstein cows	45 heads	DIM 31 - 150	RT	Threshold of RT was 20.4°C. RH and WS effect the threshold of RT.	Li <i>et al.</i> , 2020
Holstein cows	20 heads	DIM 206 ± 39	RT and RR	Thresholds of RT and RR occurred at AT between 19 to 26°C.	Zhou <i>et al.</i> , 2022

MY is milk yields; RT is rectal temperature; HR is heart rate; RR is respiration rate; SCC is somatic cell count; AT is ambient temperature; RH is relative humidity; WS is wind speed or air velocity; THI is temperature-humidity index.

溫度顯著增加，當 THI 達 70 以上時，蜂巢胃溫度會更進一步增加 (Ammer *et al.*, 2016)。單一指標方面，Li *et al.* (2020) 研究發現，當環境溫度達 20.4°C 以上，直腸溫度會以不同的速度增加，這溫度區間與 (Zhou *et al.*, 2022) 研究的環境溫度 19°C 以上及對體溫產生影響相似，但遠低於 25°C。牛隻熱緊迫與熱負荷閾值之相關研究如表 3。

高估熱緊迫閾值的可能性包含：多數閾值研究建立在乾熱氣候下的肉牛場 (如 THI 和 HLI)，其飼養管理與生理代謝和泌乳牛有所不同；其次是乳牛的生產階段會影響對熱的敏感性，例如高產牛的體溫大於低產牛；小乳牛呼吸速率的 THI 閾值為 82、體溫 THI 閾值為 88 (Kovacs *et al.*, 2020)，比成牛的閾值高上許多。除此之外，健康狀況和糞肥管理等因素都會影響閾值。Gaughan *et al.* (2008) 研究發現健康和不健康的牛隻，喘氣指數的 HLI 閾值不同，不健康的牛隻熱負荷閾值較低；而墊料潮濕的環境會降低牛隻熱負荷閾值。曝露時間也會影響閾值，例如呼吸速率和直腸溫度的閾值都隨著曝露時間增長或濕度增加而降低 (Zhou *et al.*, 2022)，此外，也有沒有明顯閾值的生理反應，例如皮表溫度 (Zhou *et al.*, 2022)。這些結果都證實，單純以環境指標作為緊迫嚴重程度是一個相對且不精確的分類 (Burhans *et al.*, 2022)，個體實際熱負荷狀態往往不同，並且受許多不易量化的因素影響。

(iv) 指標結合時間概念的運用

複合型環境指標除了單獨應用於估算牛隻反應外，也可以計算獨立閾值，而結合閾值與持續時間，則成了另一套評估牛隻熱負荷程度的評估方式。

Gaughan *et al.* (2008) 在建立 HLI 的同時，建立了 accumulated heat load (AHL) 模型，曝露程度由曝露強度和持續時間計算，環境當下 HLI 大於 86 時，AHL 可能小於 1；反之，環境當下 HLI 小於 70 時，AHL 可能大於 50。在高 HLI 卻低 AHL、或是低 HLI 卻高 AHL 的狀況下，都可以見到牛隻喘氣增加，而喘氣反應與 AHL 有較高的相關性，這可以合理解釋喘氣程度總在午後達到高峰，而非最熱的正中午。在夜間溫度持續高於熱中性帶的高溫多濕地區，夜間相對低溫環境下的呼吸速率反而大於日間相對高溫的清晨 (蕭等, 2009; Li *et al.*, 2020)。此外，體溫並非隨著 THI 上升而立即上升 (Chen *et al.*, 2013)，而是有幾個小時的延滯，甚至在夜間才呈現高值 (Allen *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2020)。因此，如果不考慮持續時間帶來的影響，牛的熱負荷狀況可能會被低估 (Gaughan *et al.*, 2008)。

如果連續兩天都很熱，牛會帶著前一天累積的熱，使第二天 HLI 閾值下降 (Gaughan *et al.*, 2008)。Spiers *et al.* (2018) 研究發現，泌乳牛曝露在熱緊迫環境下，短時間 (3 天) 內採食量與泌乳量都會減少，但隨著曝露時間增長 (7 至 10 天)，採食量沒有顯著再減少，但是泌乳量會比短時間曝露顯著再減少，早晨第一次擠乳尤為嚴重。此外，產乳量與第 0 天的 THI 較無關連，但與前三天的 THI 呈顯著線性關係 (Morales-Piñeyrua *et al.*, 2022)，這結果可能和長時間的曝露有關。

除了連續數小時或數天的熱累積，Heinicke *et al.* (2018) 提出熱負荷持續時間 (heat load duration; HLD) 的觀點，將每日超過閾值的累計時間定義為 HLD，並分析泌乳牛的行為表現。研究結果發現，在 THI 68 以下的環境，即使日平均 THI 相同，每日總臥坐時間會隨著 HLD 增加而減少。這種現象無論高產、中產或低產都有出現。

III. 熱緩解應對策略

隨著氣候變遷全球平均溫度逐年升高 (Lee *et al.*, 2023)，熱緩解策略在畜牧生產系統中變得越來越重要。早期為減少熱緊迫對乳牛影響的基本管理方案包含「物理改變」、「遺傳改良」以及「飼養管理」三面向 (Beede and Collier, 1986)。而 Lees *et al.* (2019) 則提出相似的「陰影結構」、「基因組選擇」以及「飼養管理」三方面。其中物理改變及陰影結構皆指向減少環境因子所帶來的熱負荷累積。本研究將熱緩解應對策略分為：(1) 針對日糧、日常操作與動物畜舍的「飼養管理」、(2) 針對環境指標與牛隻本身的「熱平衡管理」，以及 (3) 與熱耐受基因育種有關的「永續經營」。

(i) 飼養管理

在畜舍方面，堆肥牛舍系統為每隻動物提供更大的床面積，如果管理得當，它可以增加乳牛的舒適度，並可減少熱緊迫帶來的攻擊行為 (Pilatti *et al.*, 2019)。且乾燥舒適的墊料可以減少牛隻的熱負荷閾值 (Gaughan *et al.*, 2008)。

健康牛隻的熱負荷閾值較高 (Gaughan *et al.*, 2008)，但是長期熱緊迫容易導致乳牛出現能量負平衡與消瘦，對健康有更進一步的負面影響，因此維持足夠的營養採食是一大關鍵。高熱負荷期間 DMI 的減少和流向胃腸道的血液減少，必須增加每單位日糧中可吸收營養的濃度以滿足日常需要 (Lees *et al.*, 2019)。由於粗飼料 (草料) 比例較高的日糧會讓牛隻 DMI 下降的更快 (Beede and Collier, 1986)，提高精料量減輕 DMI 降低的負面影響是一種戰略 (Polsky and von Keyserlingk, 2017)。而產熱量與反芻動物的採食量呈正相關，產熱與攝食時間密切相關 (Brown-Brandl *et al.*, 2003)，乳牛體內產熱會在餵食後 3 小時達到高峰 (Purwanto *et al.*, 1990)，因此在採食後乳牛熱負荷相對高的時間段，須確保降溫措施正常運作。

當天氣變化出現熱緊迫壓力時，必須同時考慮多種壓力源對家畜的影響 (Lees *et al.*, 2019)，牛隻本身的生產階段和產乳量都是不同的壓力源，除此之外，飼養管理的操作都可能對牛造成壓力。例如：高溫環境下牛隻飲水量增加，如果供水速度不足以供應牛隻飲水，則會給牛隻帶來更多的負面影響。此外，熱緊迫環境會增加站立的時間，若管理上增加精料比例來維持牛隻營養攝取水平，牛蹄健康的偵測和管理強度需要同時納入考量。

繁殖管理方面，雖然繁殖管理並不直接導致熱緊迫閾值發生變化，但為了保持全年生育率，在較冷的月份生產胚胎或採取卵子是一個有效的管理戰略 (Baruselli *et al.*, 2020)。在熱中性季節採取未受熱破壞的高品質卵母細胞，並在熱緊迫季節進行胚胎移植，繞過卵母細胞和早期胚的熱敏感時期，直接移植對熱較不敏感的囊胚進而提升受孕率 (Baruselli *et al.*, 2020)。

(ii) 熱平衡管理

雖然牛隻在面對熱增加的環境會以一系列行為反應和生理變化，來試圖緩解體內持續增加的熱，但往往無法完全釋放，造成體溫持續上升，所以人為介入牛隻的熱平衡成為一項重要措施。乾乳牛和非懷孕牛正常體溫為 38.0 至 38.5°C、泌乳牛正常體溫為 38.3 至 38.9°C (Sjaastad *et al.*, 2010)，最大化減少牛隻體溫超出 39°C 的時間，是一個明確的目標 (Levit *et al.*, 2021)。有降溫措施的狀況下，即使畜舍溫度上升，採食量也可以維持相似水平 (Chen *et al.*, 2013)。雖然影響牛隻熱負荷的環境因素包含溫度、濕度、風速以及輻射，但熱能改變方式則以傳導、對流與輻射為主 (Lees *et al.*, 2019)。所有機制都取決於溫度梯度，隨著環境溫度升高，動物利用的冷卻機制發生轉變，即從非蒸發轉變為蒸發使熱損失 (West, 2003)。針對牛隻進行降溫管理，是維持牛隻正常表現的一種有效手段，本研究分別從牛隻角度與人為管理的角度討論熱平衡管理，並將人為管理歸納成「減少體熱增加」與「加速體熱減少」二種手段分別探討。

1. 從牛隻角度

在探討人為管理介入乳牛熱負荷狀態前，瞭解乳牛習性和生理反應是重要課題。

乳牛的體溫可以代表乳牛熱負荷程度，但體溫變化在不同的環境下，會有不同的結果。牛隻夜間體溫明顯大於日間 (Mundia and Yamamoto, 1997)，因此夜間降溫為必要措施。而產乳量是否能夠在熱緊迫環境下得到維持，除了營養攝取有關外，還和乳牛是否能回到正常體溫的低值有關 (Spiers *et al.*, 2018)，而非體溫最高值和平均值影響乳產量。泌乳牛不同生產階段亦會有不同的熱負荷反應，因此產量高的泌乳牛比起一般牛隻應有較密集或強度較佳的降溫戰略。此外，如前述提及的，毛色、牛種和健康程度都有不同的熱負荷閾值 (Gaughan *et al.*, 2008)，以相同的熱平衡管理措施對待每一種牛，可能無法滿足所有牛隻需求。

在高熱緊迫的環境下，牛隻本身的降溫反應可能會失去效用。除了在行為反應章節提到的飲水慾望被抑制以外，站立降溫的效果也會受到影響。站立是乳牛降低體溫的一種方法，但是當 THI 達 80 以上，站立將不會再有降溫效果，而當 THI 達 85 以上時，站著不僅無法降低體溫，體溫還會上升 (Nordlund *et al.*, 2019)。

因地出現的牛隻反應和曝露時間造成的代償反應，可能會影響正確的降溫決策或研究結果。因地出現的反應例如：蕭等 (2009) 研究發現，夜間體表溫度大於日間體表溫度，但是 (Zhou *et al.*, 2022) 分析顯示皮表溫度不受 RH 影響，但受風速影響並與環境溫度呈正相關。若以呼吸當作評估牛隻熱負荷的生理參數，須注意呼吸存在代償反應。透過氣候室比較熱緊迫不同曝露時間的牛隻反映，發現曝露 1 小時牛隻呼吸速率會上升，但是曝露時間達 8 小時後，呼吸速率反而比曝露 1 小時還低 (Zhou *et al.*, 2022)，呼吸代償可能和血液中酸鹼平衡與代償有關 (Burhans *et al.*, 2022)，因此在以呼吸速率評估熱緊迫程度的研究或降溫決策，不僅要同時考量曝露強度、曝露時間，與曝露時間造成的代償。

牛隻習性對散熱管理或散熱結果有一定影響。以發汗蒸散為例，牛隻整個身體表面都可以與環境進行熱交換 (Turnpenny *et al.*, 2000)，Zhou *et al.* (2023) 比較牛隻背部局部皮膚和總皮膚水分日蒸發量的關係，二者之間有高度相關，但牛隻站臥動作和活動狀態對出汗率有一定影響，進而影響蒸發結果。若牛隻因社會位階或蹄病造成的長時間站立或長時間臥坐，可能會導致散熱結果偏離預期。

淋浴與畜舍灑水可以有效的緩解乳牛體內熱負荷 (Chen *et al.*, 2013, 2015; Tresoldi *et al.*, 2018b; Levit *et al.*, 2021)。必須注意的是，在人為管理介入後，牛隻的體溫變化曲線會因管理不同而改變 (Levit *et al.*, 2021)，例如在 24 小時灑水的高濕度環境，雖然可以有效降低日間體溫，但夜間體溫卻維持在高值 (Chen *et al.*, 2013)，對照無灑水組全日最高體溫維持在日間傍晚。

總前述所見，不同氣候、畜舍環境與降溫戰略都會影響牛隻體溫變化，特別是在氣溫變化劇烈的狀況下，牛隻體溫變化不一定符合預期，因此在評估乳牛體內熱負荷時，應考慮各種可能反應與代償，而利用時時監測技術與工具可以幫助牧場做對牛最佳的降溫管理決策 (Levit *et al.*, 2021)。不能忽視的是，即使降溫措施對體溫平衡有所幫助，但是乳牛繁殖力仍無法回到冬季水準 (De Rensis and Scaramuzzi, 2003)。

2. 減少體熱增加

乳牛在高溫環境下會主動尋找遮蔭 (Tresoldi *et al.*, 2016)，畜舍內輻射熱的影響會大幅減少，此外乳牛會主

動選擇溫度較低的畜舍 (Chen *et al.*, 2013)。若透過降低環境溫度，可讓皮表的輻射熱傳導至空氣中以減少體內熱量 (Silanikove, 2000)。在 THI 未達 80 的環境，牛隻可以利用站立降低體溫，因此提供遮蔭及降低環境溫度和 THI 是一個明確的目標。

在低濕度環境下，透過水霧減少牛舍 THI 是另一個可行的方法。Calegari *et al.* (2012) 研究顯示，透過每分鐘噴灑 6.8 – 0.76 L 水霧加上風扇蒸散，THI 比其他陰影區域少 2.93 單位 (82.27 vs. 85.20)。

此外，影響牛隻轉換躺臥變成站姿的決定因素，是躺臥時間體溫的淨增加量 (Nordlund *et al.*, 2019)，躺臥期間每小時增加的體溫隨 THI 上升而上升。改善牛床材質或溫度、或是針對牛床提供風扇，可能是減少體熱增加的有效戰略。

日糧方面，消化草料會產生較大的熱能，因此提高日糧能量密度或是使用食餘熱較低的食用脂肪可以改善熱緊迫環境下的體熱增加 (West, 1999)。

3. 加速體熱減少

相對於減少牛隻體熱增加的手段，加速體熱減少的方法非常多樣，主要包含二大類：提供灑水（集中淋浴或食槽灑水）以熱傳導方式直接帶走體熱，以及增加風速提高蒸散作用帶走熱。

增加風扇和灑水裝置，可以增加身體熱量損失，降低體溫和改善 DMI (West, 2003)。對牛灑水後 3 分鐘，牛隻呼吸速率即會出現顯著差異，體溫則約 15 分鐘後出現顯著差異 (Chen *et al.*, 2015)。在遮蔭棚架下，不同組合的灑水與吹風處理，都可以讓牛隻體溫較對照組低 (Tresoldi *et al.*, 2018b)。單次淋浴無論是淋浴 0.5、1.5、3 還是 13 分鐘，呼吸速率與體表溫度都會在淋浴後 30 分鐘回到對照組水平 (Tresoldi *et al.*, 2018a)，於牛隻進食時進行 3 分鐘灑水、12 分鐘停止灑水的處理，3 輪操作後可讓體溫低於對照組 2 小時 (Chen *et al.*, 2015)。而八次淋浴 (9 輪 0.5 分鐘淋浴 4.5 分鐘吹風) 對體溫、採食和乳量的恢復效果都比三次淋浴更有效 (Tresoldi *et al.*, 2018b; Levit *et al.*, 2021)。每隻牛淋到的總水量 58.8 L 範圍內，水量越大體溫降低的效果越好 (Chen *et al.*, 2015; Tresoldi *et al.*, 2018b)，風速每秒 4 m 範圍內，風速越大淋浴後降溫效果越好 (Tresoldi *et al.*, 2018b)，而灑水降溫的用水量 and 吹風乾燥時間沒有太大的差異 (Tresoldi *et al.*, 2018a)。

在濕度過高的情況下，體表蒸散作用被抑制 (Gebremedhin *et al.*, 2008)，使用蒸發冷卻來減輕高濕度地區泌乳牛的體溫有爭議，例如使用水簾降溫系統雖然大幅降低環境 THI，但 RH 全日維持在 93% 以上，導致牛隻體溫長時間高於正常範圍 (Shiao *et al.*, 2011)。因此高濕度環境，僅能朝增加風速來提高牛隻蒸散速率 (Zhou *et al.*, 2022)。

隨著溫度上升呼吸速率會增加，有趣的是，由呼吸造成的熱損失並無顯著差異 (Zhou *et al.*, 2023)，主要的熱減少來自體表蒸散作用。在每隻牛淋到的總水量 15.6 L 的狀況下，風速每增加 1 m/s 可使體溫保持在基線以下 27 分鐘 (Chen *et al.*, 2015)。此外，夜間風扇降溫的效果較日間風扇降溫的效果佳 (Spiers *et al.*, 2018)，主要因素為牛隻體溫否能在夜間回歸到正常體溫的低值有關。

值得注意的是，多數灑水降溫研究在低濕度國家進行，而乳牛產熱與蒸散熱損失在濕度 75% 以下並無顯著差異 (Zhou *et al.*, 2023)，符合平均相對濕度 80% 以上的基礎研究較少，高溫多濕環境下的灑水與降溫仍建議重新試驗有效組合，避免高濕度帶來負面影響。

某些飼料添加劑可以緩解乳牛熱緊迫，例如酵母菌發酵產物。日糧中投予酵母菌發酵產物在平均 THI 屬於輕度熱緊迫的環境下，可以增加 DMI 並維持體重 (Zhu *et al.*, 2015)，並提高乳牛產乳量與乳成分 (Bruno *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2015)，長期投予可能讓體溫降回正常溫度區間 (Zhu *et al.*, 2015)，其功效可能和皮膚血管舒張，增加皮表血流提高熱傳導冷卻有關 (Salvati *et al.*, 2015)

(iii) 基因育種與永續經營

如果動物沒有對應環境挑戰的適應力或是適應能力不足，都可能出現生理功能問題 (Fraser *et al.*, 1997)。每日常規的熱平衡管理可能不足以應對長期的氣候變遷以及極端氣候，幸運的是許多研究皆顯示，牛隻在不同品種的熱耐受程度不同。

Gaughan *et al.* (2008) 研究發現，體表出汗率在品種之間和毛色之間有顯著差異。毛髮密度和厚度、毛髮長度以及膚色也是影響蒸發冷卻的因素 (Gebremedhin and Wu, 1998)，不同雜交比例的牛種也有不同的熱耐受性 (Carvalho *et al.*, 2018)。即使同樣是荷仕登 (Holstein) 乳牛，在不同地區和環境對熱緊迫的反應和適應也不同 (Hammami *et al.*, 2013)。

在溫熱季節下尋找體溫調節能力較佳的母牛作供胚牛，讓耐受性基因遺傳下去，是從基因方面減輕熱緊迫影響的一種戰略 (Baruselli *et al.*, 2020)。公牛精液方面，現階段已經透過育種引入光滑毛髮基因 (SLICK Gene)。擁有 SLICK Gene 的乳牛不僅有短而光滑的毛髮，出汗率較一般乳牛高，因此可以更有效地調節體溫 (Dikmen *et al.*, 2008)。此外，HSP 70 及其突變基因 HSPA1L 突變基因，都可以提升牛的熱耐受性 (Hansen, 2020)。

戰略性地控制產乳性狀也是一種潛在方法。高產母牛有較低的熱耐受性，比起高產乳牛的乳量降幅，低產乳

牛受熱的影響程度較小 (Lees *et al.*, 2019)。雖然高產乳牛短時間可以帶來較多的乳量，但要讓乳牛有較高終生淨值並讓酪農得到相對高的收益，必須減少疾病、減少淘汰率，讓牛進入第三或第四胎生產 (Horváth *et al.*, 2017)，高乳量的牛承受較高的熱負荷導致繁殖、生理與產能的負面影響，其飼養效率以及終生效益在長期高溫多濕區域是否有較佳淨值仍需更多研究。

IV. 動物福祉與環境永續

良好的健康是動物福祉的核心 (Fraser *et al.*, 1997)。但是乳牛某些應對熱緊迫的反應可能會對動物福祉造成負面影響，例如減少採食而造成的飢餓、嚴重喘氣造成的口渴問題，除此之外還有長時間站立導致跛腳，以及熱緊迫牛隻攻擊行為增加都會造成額外的疼痛與傷害，嚴重時可能致死。雖然有許多環境指標對應牛隻生理和行為的研究，但是卻鮮少有將熱與動物福祉連結在一起的研究 (De Vries *et al.*, 2011)，但若進行動物福祉量測，躺臥行為的計算不得不考量當下熱緊迫程度 (Nordlund *et al.*, 2019)，因此熱產生的負面影響和動物福祉息息相關。而耐熱育種是以牛為出發、應對熱環境的重要根基，連續幾代的選育可能增強後代應對氣候變遷的能力，搭配熱平衡管理使牛群具備調適 (acclimation) 短時間的天氣變化和適應 (adaptation) 長期氣候變遷的能力，在未來提高牛的福祉和生產力 (Lees *et al.*, 2019)。

面對熱平衡管理時，除了維持乳牛生產效率並確保牛的生活質量外，減少對環境的影響與永續管理是重要議題。天氣炎熱的狀況下，不僅乳牛飲水量隨之增加，乳牛場往往提升灑水和淋浴的降溫強度。而蒸發冷卻用水、乳牛飲用水和擠乳過程的清洗水是商業乳牛場飲用水的 3 種主要用途 (Polsky and von Keyserlingk, 2017)。一份調查報告顯示，泌乳牛每頭每日的平均飲水量可能超過 90 L，而擠乳系統的每頭每日平均清潔水可能超過 30 L (Krauß *et al.*, 2016)。降溫方面，Chen *et al.* (2015) 研究發現畜舍食槽灑水系統雖然可以有效降低乳牛體溫，但是實驗過程噴灑總量 15.6 L 的水，實際灑到乳牛身上僅有灑出水量的 35%，大於一半的水都直接灑到地面，造成水資源浪費，對水資源相對匱乏的飼養區來說，這類降溫模式需要謹慎使用。

V. 未來趨勢與研究探討

全面了解影響乳牛熱負荷的因素，包括環境指標變化劇烈程度、飼養管理造成的影響，以及動物個體因素造成的差異，有助於短時間內建立更適合動物的緩解「戰術」；研發熱平衡管理的中程「戰略」，以因應氣候變遷數年至十數年內之變化，除增加動物福祉外，戰略使牛場生產力與生產效率得以維持；即使加強降溫管理，仍有時間、資源與人力的極限，若能以牛隻適應性與熱耐受性為著眼點，從遺傳上進行育種納入長期的熱平衡應對「策略」可能才是根本之道。

在「戰術」上，牧場修正夏季日糧配方、利用時時天氣參數調整降溫時間、引進降溫設備，以及增加降溫強度都是有幫助的做法。在科技研究上，從前述公式、模型與解釋度的研究可以知道，不同飼養環境、牛群與生長階段會有不同的模型，因此研究符合當地氣候條件的適地化模型，以該模型評估當地動物的熱緊迫反應與熱負荷情形，會比沿用國外不同氣候條件的模型更加精確。適地模型除了有助於降溫成效的評估，滾動式預測未來數年內氣候變化挑戰下牛隻的反應與規劃降溫強度。

在「戰略」上，雖然臺灣年雨量在未來不會有顯著變化 (科技部等, 2021)，但年最大連續不降雨日數會有上升趨勢，亦即炎熱的旱季不僅會延長、旱季的水資源會更為匱乏，導致夏季需水量高時面臨乾旱的威脅。若以水進行蒸散降溫為主要方法，研發省水降溫或循環水降溫系統是解決方法之一，以最少水量和精準灑水節省支出，並透過水資源再利用增加降溫水的來源。若是面臨長期乾旱的挑戰，增加有效風流與減少環境溫度是解決的方法，然而如何增加有效風流需結合熱力學和畜牧飼養等不同領域，才能有效將風吹到往動物身上，盡可能減少擾流、繞流與死區 (dead space)。

在長期「策略」上，如何永續經營是最終目標。除了不斷更新與瞭解氣候挑戰對牛隻帶來的影響，以及解決熱平衡管理與有限資源的衝突外，尋找能適應高溫高濕環境的牛隻品系或遺傳選育是長期策略的重要工作之一。因應高溫時間延長，增加散熱強度的戰術可以預期用水量與用電量大幅增加，面臨的問題不僅僅是水電資源與降溫時間有限，營運成本會顯著提高，因此尋求能在適度降溫管理下，達到目標產能的牛群，才能從根本減緩負面影響、節省資源，並達到永續目標。

結 論

氣候變遷下全球地表溫度還會持續上升，在夜間無進入熱中性帶的持續高溫環境，造成乳牛體熱無法緩解，過高的體溫導致乳牛乳量、乳品質與繁殖效能下降，進而造成經濟損失。傳統上，熱緊迫會造成乳牛各種生理與行為反應，這些反應可以透過單一或複合環境指標進行評估或推算，但結合熱緊迫程度、時間以及乳牛各種狀態的熱負荷概念，更精準描述與定義了牛隻熱平衡表現。為了舒緩牛隻體熱，熱平衡管理除了增加對流、蒸發以及減少輻射

等針對降低環境造成的熱緊迫程度外，透過冷水傳導與吹風蒸散亦是管理層面的重要手段。而透過育種可以從根本改善乳牛對熱的適應，再結合以牛為本的熱平衡反應，可尋找對環境永續最佳熱管理策略。

參考文獻

- 科技部，中央研究院環境變遷研究中心，交通部中央氣象局，臺灣師範大學地球科學系，和國家災害防救科技中心。2021。IPCC 氣候變遷第六次評估報告之科學重點摘錄與臺灣氣候變遷評析更新報告。
- 蕭宗法、楊德威、李恒夫、謝昭賢、李善男、李春芳。2009。以水簾牛舍紓解荷蘭泌乳牛熱緊迫可行性評估 I. 牛舍環境與牛隻生理反應。中國畜牧學會會誌 38: 183-198。
- Akaike, H. 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control* 19: 716-723.
- Allen, J. D., L. W. Hall, R. J. Collier, and J. F. Smith. 2015. Effect of core body temperature, time of day, and climate conditions on behavioral patterns of lactating dairy cows experiencing mild to moderate heat stress. *J. Dairy Sci.* 98: 118-127.
- Ammer, S., C. Lambertz, and M. Gauly. 2016. Is reticular temperature a useful indicator of heat stress in dairy cattle? *J. Dairy Sci.* 99: 10067-10076.
- Armstrong, D. 1994. Heat stress interaction with shade and cooling. *J. Dairy Sci.* 77: 2044-2050.
- Baeta, F., N. Meador, M. Shanklin, and H. Johnson. 1987. Equivalent temperature index at temperatures above the thermoneutral for lactating dairy cows. *ASAE (87-4015)*: 21.
- Baruselli, P. S., R. M. Ferreira, L. M. Vieira, A. H. Souza, G. A. Bó, and C. A. Rodrigues. 2020. Use of embryo transfer to alleviate infertility caused by heat stress. *Theriogenology* 155: 1-11.
- Beede, D. and R. Collier. 1986. Potential nutritional strategies for intensively managed cattle during thermal stress. *J. Anim. Sci.* 62: 543-554.
- Berman, A., Y. Folman, M. Kaim, M. Mamen, Z. Herz, D. Wolfenson, A. Arieli, and Y. Graber. 1985. Upper critical temperatures and forced ventilation effects for high-yielding dairy cows in a subtropical climate. *J. Dairy Sci.* 68: 1488-1495.
- Bernabucci, U., N. Lacetera, L. H. Baumgard, R. P. Rhoads, B. Ronchi, and A. Nardone. 2010. Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domesticated ruminants. *Animal* 4: 1167-1183.
- Bewley, J., M. Einstein, M. Grott, and M. Schutz. 2008. Comparison of reticular and rectal core body temperatures in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91: 4661-4672.
- Bohmanova, J., I. Misztal, and J. B. Cole. 2007. Temperature-humidity indices as indicators of milk production losses due to heat stress. *J. Dairy Sci.* 90: 1947-1956.
- Bouraoui, R., M. Lahmar, A. Majdoub, and R. Belyea. 2002. The relationship of temperature-humidity index with milk production of dairy cows in a Mediterranean climate. *Anim. Res.* 51: 479-491.
- Brown-Brandl, T., J. Nienaber, R. Eigenberg, G. Hahn, and H. Freetly. 2003. Thermoregulatory responses of feeder cattle. *J. Therm. Biol.* 28: 149-157.
- Bruno, R. G., H. M. Rutigliano, R. Cerri, P. H. Robinson, and J. E. Santos. 2009. Effect of feeding *Saccharomyces cerevisiae* on performance of dairy cows during summer heat stress. *Anim. Feed Sci. Technol.* 150: 175-186.
- Buffington, D., A. Collazo-Arocho, G. Canton, D. Pitt, W. Thatcher, and R. Collier. 1981. Black globe-humidity index (BGHI) as comfort equation for dairy cows. *Transactions of the ASAE* 24: 711-0714.
- Burhans, W. S., C. A. Rossiter Burhans, and L. H. Baumgard. 2022. Invited review: Lethal heat stress: The putative pathophysiology of a deadly disorder in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 105: 3716-3735.
- Calegari, F., L. Calamari, and E. Frazzi. 2012. Misting and fan cooling of the rest area in a dairy barn. *Int. J. Biometeorol.* 56: 287-295.
- Carvalho, G. A. D., A. K. D. Salman, P. G. D. Cruz, F. R. F. D. Silva, J. Halfen, and E. Schmitt. 2018. Relationship between thermal comfort indices and internal temperature of grazing lactating Holstein× Gyr cows in western Amazonia. *Acta Amazonica* 48: 191-196.
- Cavestany, D., A. El-Wishy, and R. Foote. 1985. Effect of season and high environmental temperature on fertility of Holstein cattle. *J. Dairy Sci.* 68: 1471-1478.
- Chen, J. M., K. E. Schütz, and C. B. Tucker. 2013. Dairy cows use and prefer feed bunks fitted with sprinklers. *J. Dairy Sci.*

96: 5035-5045.

- Chen, J. M., K. E. Schütz, and C. B. Tucker. 2015. Cooling cows efficiently with sprinklers: Physiological responses to water spray. *J. Dairy Sci.* 98: 6925-6938.
- De Rensis, F., I. Garcia-Ispierto, and F. Lopez-Gatius. 2015. Seasonal heat stress: Clinical implications and hormone treatments for the fertility of dairy cows. *Theriogenology* 84: 659-666.
- De Rensis, F. and R. J. Scaramuzzi. 2003. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow—a review. *Theriogenology* 60: 1139-1151.
- De Vries, M., E. Bokkers, T. Dijkstra, G. Van Schaik, and I. De Boer. 2011. Invited review: Associations between variables of routine herd data and dairy cattle welfare indicators. *J. Dairy Sci.* 94: 3213-3228.
- Dikmen, S., E. Alava, E. Pontes, J. Fear, B. Dikmen, T. Olson, and P. Hansen. 2008. Differences in thermoregulatory ability between slick-haired and wild-type lactating Holstein cows in response to acute heat stress. *J. Dairy Sci.* 91: 3395-3402.
- Dikmen, S. and P. Hansen. 2009. Is the temperature-humidity index the best indicator of heat stress in lactating dairy cows in a subtropical environment? *J. Dairy Sci.* 92: 109-116.
- Fraser, D., D. M. Weary, E. A. Pajor, and B. N. Milligan. 1997. A scientific conception of animal welfare that reflects ethical concerns. *Anim. Welf.* 6: 187-205.
- Ganong, W. 2005. Central regulation of visceral function: Thirst. *Review of Medical Physiology* 240-241.
- García, Z. A. C., R. C. Gaona, and H. F. Díaz. 2020. Design and testing of a sweat meter for the cutaneous evaporation determination in cattle. *J. Anim. Behav. Biometeorol.* 8: 223-228.
- Gaughan, J., T. L. Mader, S. Holt, and A. Lisle. 2008. A new heat load index for feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 86: 226-234.
- Gebremedhin, K. G., P. Hillman, C. Lee, R. Collier, S. Willard, J. Arthington, and T. Brown-Brandl. 2008. Sweating rates of dairy cows and beef heifers in hot conditions. *Transactions of the ASABE* 51: 2167-2178.
- Gebremedhin, K. G., and B. Wu. 1998. Sensible and latent heat losses from wet-skin surface and fur layer. In: 2001 ASAE Annual Meeting. p 1.
- Hahn, G. L. 1999. Dynamic responses of cattle to thermal heat loads. *J. Anim. Sci.* 77: 10-20.
- Hammami, H., J. Bormann, N. M' hamdi, H. H. Montaldo, and N. Gengler. 2013. Evaluation of heat stress effects on production traits and somatic cell score of Holsteins in a temperate environment. *J. Dairy Sci.* 96: 1844-1855.
- Hansen, P. J. 2020. Prospects for gene introgression or gene editing as a strategy for reduction of the impact of heat stress on production and reproduction in cattle. *Theriogenology* 154: 190-202.
- Heinicke, J., G. Hoffmann, C. Ammon, B. Amon, and T. Amon. 2018. Effects of the daily heat load duration exceeding determined heat load thresholds on activity traits of lactating dairy cows. *J. Therm. Biol.* 77: 67-74.
- Horváth, J., Z. Tóth, and J. Mikó. 2017. The analysis of production and culling rate with regard to the profitability in a dairy herd. *Advanced Research in Life Sciences* 1: 48-52.
- Hu, H., Y. Zhang, N. Zheng, J. Cheng, and J. Wang. 2016. The effect of heat stress on gene expression and synthesis of heat-shock and milk proteins in bovine mammary epithelial cells. *Anim. Sci. J.* 87: 84-91.
- IPCC, S. 2018. 2018: Global Warming of 1.5 °C. An IPCC Special Report on the Impacts of Global Warming of 1.5 °C above Pre-Industrial Levels and Related Global Greenhouse Gas Emission Pathways, in the Context of Strengthening the Global Response to the Threat of Climate Change, Sustainable Development, and Efforts to Eradicate Poverty. Sustainable Development, and Efforts to Eradicate Poverty [V. Masson-Delmotte, P. Zhai, HO Pörtner, D. Roberts, J. Skea, PR Shukla, A. Pirani, W. Moufouma-Okia, C. Péan, R. Pidcock, S. Connors, JBR Matthews, Y. Chen, X. Zhou, MI Gomis, E. Lonnoy, T. Maycock, M. Tignor, T. Waterfield (eds.)]. <http://www.ipcc.ch/report/sr15>
- Kadzere, C. T., M. Murphy, N. Silanikove, and E. Maltz. 2002. Heat stress in lactating dairy cows: a review. *Livest. Prod. Sci.* 77: 59-91.
- Kennedy, P. 1995. Comparative adaptability of herbivores to tropical environments. Recent developments in the nutrition of herbivores: Proceedings of the 4th International Symposium.
- Koubkova, M., L. Knizkova, P. Kunc, H. Hartlova, J. Flusser, and O. Dolezal. 2002. Influence of high environmental temperatures and evaporative cooling on some physiological, hematological and biochemical parameters in high-yielding dairy cows. *Czech J. Anim. Sci.* 47: 309-318.
- Kovacs, L., F. L. Kezer, P. Poti, N. Boros, and K. Nagy. 2020. Short communication: Upper critical temperature-humidity index for dairy calves based on physiological stress variables. *J. Dairy Sci.* 103: 2707-2710.
- Krauß, M., K. Drastig, A. Prochnow, S. Rose-Meierhöfer, and S. Kraatz. 2016. Drinking and cleaning water use in a dairy

- cow barn. *Water* 8: 302.
- Lee, H., K. Calvin, D. Dasgupta, G. Krinner, A. Mukherji, P. Thorne, C. Trisos, J. Romero, P. Aldunce, and K. Barrett. 2023. AR6 Synthesis Report: Climate Change 2023. Summary for Policymakers.
- Lees, A. M., V. Sejian, A. L. Wallage, C. C. Steel, T. L. Mader, J. C. Lees, and J. B. Gaughan. 2019. The Impact of Heat Load on Cattle. *Animals (Basel)* 9:322.
- Levit, H., S. Pinto, T. Amon, E. Gershon, A. Kleinjan-Elazary, V. Bloch, Y. A. Ben Meir, Y. Portnik, S. Jacoby, A. Arnin, J. Miron, and I. Halachmi. 2021. Dynamic cooling strategy based on individual animal response mitigated heat stress in dairy cows. *Animal* 15: 100093.
- Li, G., S. Chen, J. Chen, D. Peng, and X. Gu. 2020. Predicting rectal temperature and respiration rate responses in lactating dairy cows exposed to heat stress. *J. Dairy Sci.* 103: 5466-5484.
- Lim, C. L. 2018. Heat sepsis precedes heat toxicity in the pathophysiology of heat stroke-a new paradigm on an ancient disease. *Antioxidants (Basel)* 7.
- Mader, T. L., M. S. Davis, and T. Brown-Brandl. 2006. Environmental factors influencing heat stress in feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 84: 712-719.
- Mader, T. L., L. J. Johnson, and J. Gaughan. 2010. A comprehensive index for assessing environmental stress in animals. *J. Anim. Sci.* 88: 2153-2165.
- Morales-Piñeyrúa, J. T., J. P. Damián, G. Banchemo, and A. C. SantAnna. 2022. The effects of heat stress on milk production and the grazing behavior of dairy Holstein cows milked by an automatic milking system. *J. Anim. Sci.* 100: skac225.
- Moran, D. S., K. B. Pandolf, Y. Shapiro, Y. Heled, Y. Shani, W. Mathew, and R. Gonzalez. 2001. An environmental stress index (ESI) as a substitute for the wet bulb globe temperature (WBGT) . *J. Therm. Biol.* 26: 427-431.
- Mundia, C. and S. Yamamoto. 1997. Day–night variation of thermoregulatory responses of heifers exposed to high environmental temperatures. *J. Agric. Sci.* 129: 199-204.
- Nordlund, K. V., P. Strassburg, T. B. Bennett, G. R. Oetzel, and N. B. Cook. 2019. Thermodynamics of standing and lying behavior in lactating dairy cows in freestall and parlor holding pens during conditions of heat stress. *J. Dairy Sci.* 102: 6495-6507.
- NRC. 1971. A Guide to Environmental Research on Animals. National Academy of Sciences Washington, DC.
- Pereira, M., A. Rodrigues, T. Martins, W. Oliveira, P. Silveira, M. Wiltbank, and J. Vasconcelos. 2013. Timed artificial insemination programs during the summer in lactating dairy cows: Comparison of the 5-d Cosynch protocol with an estrogen/progesterone-based protocol. *J. Dairy Sci.* 96: 6904-6914.
- Pilatti, J. A., F. M. C. Vieira, F. Rankrape, and E. S. Vismara. 2019. Diurnal behaviors and herd characteristics of dairy cows housed in a compost-bedded pack barn system under hot and humid conditions. *Animal* 13: 399-406.
- Polsky, L., and M. A. G. von Keyserlingk. 2017. Invited review: Effects of heat stress on dairy cattle welfare. *J. Dairy Sci.* 100: 8645-8657.
- Polsky, L. B., A. M. Madureira, E. L. Drago Filho, S. Soriano, A. F. Sica, J. L. Vasconcelos, and R. L. Cerri. 2017. Association between ambient temperature and humidity, vaginal temperature, and automatic activity monitoring on induced estrus in lactating cows. *J. Dairy Sci.* 100: 8590-8601.
- Provolo, G. and E. Riva. 2009. One year study of lying and standing behaviour of dairy cows in a freestall barn in Italy. *J. Agric. Eng.* 40: 27-34.
- Purwanto, B., Y. Abo, R. Sakamoto, F. Furumoto, and S. Yamamoto. 1990. Diurnal patterns of heat production and heart rate under thermoneutral conditions in Holstein Friesian cows differing in milk production. *J. Agric. Sci.* 114: 139-142.
- Renaudeau, D., A. Collin, S. Yahav, V. De Basilio, J.-L. Gourdine, and R. Collier. 2012. Adaptation to hot climate and strategies to alleviate heat stress in livestock production. *Animal* 6: 707-728.
- Rhoads, M. L., R. P. Rhoads, M. J. VanBaale, R. J. Collier, S. R. Sanders, W. J. Weber, B. A. Crooker, and L. H. Baumgard. 2009. Effects of heat stress and plane of nutrition on lactating Holstein cows: I. Production, metabolism, and aspects of circulating somatotropin. *J. Dairy Sci.* 92: 1986-1997.
- Roth, Z. 2017. Effect of heat stress on reproduction in dairy cows: insights into the cellular and molecular responses of the oocyte. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 5: 151-170.
- Salvati, G., N. M. Júnior, A. Melo, R. Vilela, F. Cardoso, M. Aronovich, R. Pereira, and M. Pereira. 2015. Response of lactating cows to live yeast supplementation during summer. *J. Dairy Sci.* 98: 4062-4073.
- Schüller, L., O. Burfeind, and W. Heuwieser. 2014. Impact of heat stress on conception rate of dairy cows in the moderate

- climate considering different temperature–humidity index thresholds, periods relative to breeding, and heat load indices. *Theriogenology* 81: 1050-1057.
- Schütz, K., A. Rogers, Y. Poulouin, N. Cox, and C. Tucker. 2010. The amount of shade influences the behavior and physiology of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 93: 125-133.
- Schneider, P., D. Beede, and C. Wilcox. 1988. Nycterohemeral patterns of acid-base status, mineral concentrations and digestive function of lactating cows in natural or chamber heat stress environments. *J. Anim. Sci.* 66: 112-125.
- Shiao, T. F., J. C. Chen, D. W. Yang, S. N. Lee, C. F. Lee, and W. T. Cheng. 2011. Feasibility assessment of a tunnel-ventilated, water-padded barn on alleviation of heat stress for lactating Holstein cows in a humid area. *J. Dairy Sci.* 94: 5393-5404.
- Silanikove, N. 2000. Effects of heat stress on the welfare of extensively managed domestic ruminants. *Livest. Prod. Sci.* 67: 1-18.
- Sjaastad, O. V., O. Sand, and K. Hove. 2010. *Physiology of domestic animals*. Scan. Vet. Press.
- Spiers, D., J. Spain, M. Eilersieck, and M. Lucy. 2018. Strategic application of convective cooling to maximize the thermal gradient and reduce heat stress response in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 101: 8269-8283.
- Spiers, D., J. Spain, J. Sampson, and R. Rhoads. 2004. Use of physiological parameters to predict milk yield and feed intake in heat-stressed dairy cows. *J. Therm. Biol.* 29: 759-764.
- Tresoldi, G., K. E. Schütz, and C. B. Tucker. 2016. Assessing heat load in drylot dairy cattle: Refining on-farm sampling methodology. *J. Dairy Sci.* 99: 8970-8980.
- Tresoldi, G., K. E. Schütz, and C. B. Tucker. 2018a. Cooling cows with sprinklers: Spray duration affects physiological responses to heat load. *J. Dairy Sci.* 101: 4412-4423.
- Tresoldi, G., K. E. Schütz, and C. B. Tucker. 2018b. Cooling cows with sprinklers: Timing strategy affects physiological responses to heat load. *J. Dairy Sci.* 101: 11237-11246.
- Turnpenny, J., A. McArthur, J. Clark, and C. Wathes. 2000. Thermal balance of livestock: 1. A parsimonious model. *Agricultural and Forest Meteorology* 101: 15-27.
- Vitali, A., M. Segnalini, L. Bertocchi, U. Bernabucci, A. Nardone, and N. Lacetera. 2009. Seasonal pattern of mortality and relationships between mortality and temperature-humidity index in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92: 3781-3790.
- West, J. W. 1999. Nutritional strategies for managing the heat-stressed dairy cow. *J. Anim. Sci.* 77: 21-35.
- West, J. W. 2003. Effects of heat-stress on production in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 86: 2131-2144.
- Zhou, M., A. Aarnink, T. Huynh, I. van Dixhoorn, and P. G. Koerkamp. 2022. Effects of increasing air temperature on physiological and productive responses of dairy cows at different relative humidity and air velocity levels. *J. Dairy Sci.* 105: 1701-1716.
- Zhou, M., P. W. G. Groot Koerkamp, T. T. T. Huynh, and A. J. A. Aarnink. 2023. Evaporative water loss from dairy cows in climate-controlled respiration chambers. *J. Dairy Sci.* 106: 2035-2043.
- Zhu, W., B. Zhang, K. Yao, I. Yoon, Y. Chung, J. Wang, and J. Liu. 2015. Effects of supplemental levels of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on lactation performance in dairy cows under heat stress. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 29: 801-806.
- Zimpel, R., M. B. Poindexter, A. Vieira-Neto, E. Block, C. D. Nelson, C. R. Staples, W. W. Thatcher, and J. E. P. Santos. 2018. Effect of dietary cation-anion difference on acid-base status and dry matter intake in dry pregnant cows. *J. Dairy Sci.* 101: 8461-8475.
- Zähner, M., L. Schrader, R. Hauser, M. Keck, W. Langhans, and B. Wechsler. 2004. The influence of climatic conditions on physiological and behavioural parameters in dairy cows kept in open stables. *Anim. Sci.* 78: 139-147.

A review study on environmental heat stress and heat load management in the dairy cattle under climate change ⁽¹⁾

Chia-Jung Lee ⁽²⁾⁽³⁾ and Yi-Chun Lin ⁽³⁾⁽⁴⁾

Received: Jul. 31, 2023; Accepted: Dec. 8, 2023

Abstract

According to the investigation report by the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) , it is estimated that the average earth surface temperature will rise by 1.5°C in the next 30 years. The temperature increase in mid-latitude regions could reach approximately 3°C, while in high-latitude regions, it could reach 4.5° C. Heat stress has become one of the most significant challenges in the dairy industry. High dry-bulb temperature, humidity, radiation, and low air movement in the environment create a heat stress environment for cows. Environmental heat stress affects the behavior and physiology of dairy cows, leading to a decrease in milk production, energy imbalance, increased risk of hoof diseases and reproductive disorders, and even cow mortality. The heat balance state exhibited by cows, influenced by environmental conditions, exposure time, individual factors, and breeds, can be described by the term "heat load," which more accurately defines and describes the heat balance status of cows. Cows exhibit similar physiological responses when subjected to high heat stress environments or high heat load conditions, including increased respiration rate, heart rate, body temperature, and water intake, as well as decreased feed intake, activity, and lying behavior. When environmental indicators exceed threshold values, cows' physiological responses will vary to different degrees. Different regions, cattle breeds, and production stages have different heat load thresholds. Both single indicators such as temperature or wind speed and composite indicators can be used to assess the impact of heat stress severity on cows. There are two main methods to reduce heat load in cows' bodies: reducing heat production and accelerating heat dissipation. Under climate change, a detailed understanding of various responses and adaptability of dairy cows during heat stress environments is beneficial for developing strategies that enhance cows' heat tolerance while maintaining productivity. Through breeding, heat adaptation in dairy cows can be fundamentally improved. Combined with cow-centered heat balance management measures, optimal strategies for environmentally sustainable management can be sought.

Key Words: heat stress, heat load, climate change, heat balance management.

(1) Contribution No. 2773 from Taiwan Livestock Research Institute (TLRI), Ministry of Agriculture (MOA).

(2) Livestock Management Division, MOA-TLRI, Tainan 71246, Taiwan R. O. C.

(3) National Chung Hsing University 40227, Taiwan, R. O. C.

(4) Corresponding author, E-mail: ycl2019@nchu.edu.tw

雞熱休克蛋白 70 基因點突變檢測技術開發 與基因型分析⁽¹⁾

朱家德⁽²⁾ 賴永裕⁽²⁾ 鄧學極⁽³⁾ 劉宗霖⁽⁴⁾ 吳明哲⁽²⁾ 張秀鑾⁽⁵⁾ 林德育⁽²⁾⁽⁶⁾

收件日期：112 年 9 月 12 日；接受日期：112 年 12 月 20 日

摘 要

熱休克蛋白家族 (heat shock proteins, HSPs) 是生物因應熱緊迫狀態的關鍵生物指標。在生物處於熱緊迫或其他壓力環境下，熱休克蛋白 70 (heat shock 70 protein, HSP70) 是維持正常蛋白質結構與減緩組織損傷不可或缺的調控因子。本研究旨針對紅羽土雞、黑羽土雞及烏骨雞等臺灣有色肉雞種 *HSP70* 基因 *C667G* 基因型頻率分佈，應用單股結構多態性檢測技術 (polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism, PCR-SSCP) 與螢光引子標記之競爭性交替基因特異性聚合酶鏈鎖反應 (kompetitive allele-specific polymerase chain reaction, KASP™) 等 2 種基因型檢測平臺，進行雞隻 *HSP70* 基因點突變多態性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 基因型鑑定。結果顯示，2 種基因型檢測技術分析 *HSP70* 基因 AA、AB 及 BB 基因型 100% 相符 ($P < 0.01$)，驗證此 2 種技術可相互替代應用，而 KASP™ 更可效縮短基因型檢測時間與降低成本費用。商用紅羽土雞、黑羽土雞及烏骨雞的 *HSP70* 基因的交替基因 A 頻率分別為 0.40、0.35 及 0.04。未來，可依據臺灣有色肉雞品種 *HSP70* 基因之基因型頻率差異，探討熱緊迫環境下 *HSP70* 基因對臺灣有色肉雞經濟性狀表現之影響。

關鍵詞：雞、熱緊迫、熱休克蛋白基因、競爭性交替基因特異性聚合酶鏈鎖反應。

緒 言

熱休克蛋白家族 (heat shock proteins, HSPs) 是從細菌至人類等生物體細胞中普遍存在的重要蛋白質，HSPs 對於保護細胞免受各種壓力的損害至關重要，特別是在高溫等極端環境下，故 HSPs 被認為是生物因應熱緊迫狀態的關鍵生物指標 (Tang *et al.*, 2011; Balakrishnan *et al.*, 2023)。在熱緊迫或其他壓力的環境下，HSPs 具有維持蛋白質結構完整，以及減緩組織損傷的功能角色 (Gething and Sambrook, 1992)。熱休克蛋白 70 (heat shock 70 protein, HSP70) 為 HSPs 家族中重要的成員之一。Liew *et al.* (2003) 在早期飼餵與熱緊迫的試驗條件下，每天 2 小時暴露在 $38 \pm 1^\circ\text{C}$ 和 80% 相對濕度的環境中，紀錄 192 隻公白肉雞 (Cobb) 的 HSP70 蛋白質量對傳染性華氏囊炎 (infectious bursal disease, IBD) 抵抗力及生長速率等表現，發現 HSP70 蛋白質量與華氏囊組織病理得分 (Bursal Histological Score) 呈顯著負相關 ($r = -0.33$, $P = 0.0008$)，並認為 HSP70 蛋白質量可增強白肉雞對熱緊迫的耐受性與抗病力。Yu *et al.* (2008) 探討在 0、2、3、5 和 10 小時等不同時間長短的熱緊迫，從 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 迅速升高到 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 的環境下，100 隻白肉雞 (Arbor Acres) 心臟組織中 HSP60、HSP70、HSP90 蛋白質和 mRNA 表現量，於受熱緊迫的 2 小時後，HSP60、HSP70 和 HSP90 的蛋白質量與 mRNA 表達量皆顯著上升，並認為此 3 種 HSPs 是高溫環境下雞自體保護蛋白質。Gabriel *et al.* (2002) 針對 41°C 與 44°C 熱緊迫對雞胚胎 *HSP70* mRNA 表現量的關係研究中，結果發現在 44°C 的孵化溫度下，*HSP70* 表達量大幅上升，其 mRNA 表達量是在正常孵化條件下 (37.5°C) 的 15 倍。

林等 (2005) 依據美國國家生物技術資訊中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 公開雞 *HSP70* 基因序列 (GenBank J02579)，應用聚合酶連鎖反應與單股結構多態性 (polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism, PCR-SSCP) 技術，鑑定 *HSP70* 基因的 SNPs 變異，該試驗分析 84 隻來亨雞、48

(1) 農業部畜產試驗所研究報告第 2774 號。

(2) 農業部畜產試驗所遺傳生理組。

(3) 坤諦生技股份有限公司。

(4) 國立成功大學生物科技與產業科學系。

(5) 國立屏東科技大學動物科學與畜產系。

(6) 通訊作者，E-mail: lin0429@mail.ttri.gov.tw

隻白肉雞、104 隻紅羽土雞、99 隻畜試土雞近親品系 L7、174 隻近親品系 L9、155 隻近親品系 L11 及 162 隻近親品系 L12，共計 826 隻雞隻 *HSP70* 基因型。結果顯示，來亨雞、白肉雞、紅羽土雞、畜試土雞近親品系 L7、L9、L11 及 L12 的 *HSP70* 基因 A 交替基因頻率分別為 0.03、0.09、0.37、0.93、0.59、0.62 及 0.63。本土雞種畜試土雞近親品系及紅羽土雞的交替基因 *HSP70* A 頻率顯著地高於外國雞種來亨蛋雞及白肉雞基因頻率 ($P < 0.001$)。Tamzil *et al.* (2013a) 運用 PCR-SSCP 檢測平臺分析 Ayam Kampong、Arabic 及商用雞種等 3 個雞種的 *HSP70* 基因序列 (GenBank J02579)，結果發現在 Ayam Kampong 的 *HSP70* 基因有七個基因型 (AA、AB、AC、CC、AD、DD 和 BC 基因型)，Arabic 的 *HSP70* 基因有六個基因型 (AA、AB、AC、CC、AD 和 BC 基因型)，商用雞種的 *HSP70* 基因有一個 DD 基因型，進行基因型與性狀間的關聯性分析後，發現雞對熱緊迫的耐熱或抗熱參數與 *HSP70* 基因型有關 (Tamzil *et al.*, 2013b)。

PCR-SSCP 是一種具有操作簡單與成本低廉優勢的單核苷酸多態性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 檢測技術，其原理基於 DNA 序列發生 SNP 點位變異、缺失或插入時所造成單股 DNA 有結構上的差異，可在非變性聚丙烯醯胺凝膠電泳過程中產生不同程度的泳動位移，藉此差異作為基因型判定的依據，然基因型檢測時間較長 (6-7 小時) 且易受電泳溫度、電泳緩衝液濃度、凝膠濃度及甘油濃度等外在因素影響 (Konstantinos *et al.*, 2008)。

KASP™ 是由 LGC 公司 (Laboratory of the Government Chemist, LGC, UK) 開發之新一代 SNP 檢測技術，其基本程序是藉由兩股 5' 端各自帶有 FAM/HEX-labelled 標記螢光與 3' 端分別能辨識突變點鹼基之引子和一股反向引子所構成之 primer mix，並利用帶有兩種不同螢光訊號的兩條 quencher 抑制螢光探針 master mix，對 SNP 位點進行 PCR 擴增反應，達到一定程度的 PCR 擴增反應後，再利用 Real-time PCR 吸光值測定相對應 PCR 產物擴增螢光強度，以判定基因型 (Semagn *et al.*, 2013)。此技術具有高通量、低錯誤率、低成本及基因型檢測效率高等優點，被廣泛應用在玉米 (Nair *et al.*, 2015)、小麥 (Rasheed *et al.*, 2016) 與大豆 (Shi *et al.*, 2015) 等作物，以及荷蘭牛 (Zhang *et al.*, 2020)、臺灣有色肉雞 (朱等, 2022a)、臺灣商用豬種 (朱等, 2022b) 與哈薩克馬 (Liu *et al.*, 2020) 等動物的分子標識輔助選拔研究。

本研究旨在運用 KASP™ 基因型檢測技術，建置臺灣有色肉雞熱休克蛋白 70 基因之基因型檢測平臺，以 KASP™ 具備的高準確性與基因型鑑定時程短之優勢，提升種禽分子標識輔助育種效率。

材料與方法

本試驗於農業部畜產試驗所遺傳生理組執行試驗動物 *HSP70* 基因型檢測與分析。試驗動物飼養於民間畜牧場，試驗動物之使用、飼養及試驗內容皆依據畜產試驗所實驗動物管理小組批准之文件與試驗準則進行 (IACUC 畜試動字 110-38 號)。

I. 試驗動物

以民間畜牧場自家育成之第 15 世代紅羽土雞 120 隻、第 4 世代黑羽土雞 120 隻及第 13 世代烏骨雞 120 隻等雞隻為試驗動物，共計 360 隻。

II. 採血及基因體 DNA 萃取

本研究採集試驗雞隻翼下靜脈採集血液約 0.5 – 1.0 mL，置入含抗凝血劑 EDTA-K₃ (VACUETTE® TUBE, Greiner Bio-One GmbH, Austria) 之採血管中混合後供基因體 DNA (gDNA) 萃取用。以 gDNA 快速萃取套組 (EasyPure Genomic DNA mini Kit, TransGen Biotech, Beijing) 分別萃取試驗雞隻 gDNA 後，經乾燥並加入適量 T.E. 緩衝液 (Tris-EDTA) 溶解，再利用微量分光光譜儀 (NanoDrop 2000c, Thermo Fisher Scientific, USA) 測定 gDNA 濃度，將符合品質標準 OD 260/280 ratios 為 1.8 – 2.0 的 gDNA 調整濃度為 100 – 150 ng/μL，供作 PCR 反應之模板 (Semagn *et al.*, 2013)。

III. *HSP70* 基因之 PCR-SSCP 基因型檢測平臺建置

以林等 (2005) 發表 *HSP70* 基因 PCR-SSCP 基因型檢測平臺之引子序列。以正向引子序列 5'-TTTGATGCCAAGCGTCTCAT-3' 與反向引子 5'-ATCTCCTCTGGGAAG AAGGT-3' 進行 PCR 反應 (預熱反應 94°C, 5 分鐘後，連續進行 94°C, 40 秒、62°C, 30 秒及 72°C, 30 秒的 35 個循環反應，最後延長反應 72°C, 5 分鐘)。將 PCR 擴增片段以 GenePhor 電泳設備 (GenePhor Electrophoresis Unit from GE Healthcare, Amersham Pharmacia Biotech, Sweden) 進行 SSCP 基因型分析。取 5 μL PCR 反應後的產物與 5 μL denaturing buffer 於離心管中，混合均勻置於 95°C, 12 分鐘後立刻置入冰中，使 PCR 反應後的產物變性。取 6 μL 混合液置入 GeneGel Excel 12.5/24 Kit (polyacrylamide gel T: 12.5%, C: 2%) 電泳膠片，以 600V, 25 mA, 15W, 15°C 的條件電泳 120 分鐘。電泳結束後

以 GeneStain Automated Gel Stainer (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden) 進行染色 30 分鐘，待呈像後判讀基因型。

IV. *HSP70* 基因之 KASP™ 基因型檢測平臺建置

依 NCBI 公開雞 *HSP70* 基因序列 (GenBank J02579) 與 Ensembl (<https://www.ensembl.org>) Red Jungle fowl (GRCg6a) 序列資料 (5:53,059,707 - 5:53,060,326) 比對後，設計 KASP™ 基因型檢測引子。A 交替基因 guanine 正向引子 5'- CAGACATGAAGCACTGGCCG-3' 標記 FAM 螢光、B 交替基因 cytosine 正向引子 5'- CAGACATGAAGCACTGGCCC-3' 標記 HEX 螢光及反向引子 5'- TGAGCACCATAGAGCTGATC-3'，並以即時聚合酶鏈鎖反應儀 (Applied Biosystems StepOne™ System, Thermo Fisher Scientific, USA) 進行 KASP™ 基因型檢測。KASP™ 反應綜合液包括 DNA (50 ~ 100 ng/μL) 1.5 μL、2X master mix (FRET cassettes、ROX™ passive reference dye、Taq 聚合酶及 MgCl₂) 5 μL、ddH₂O 3.3 μL 與 assay mix (一個正向 FAM™ 螢光標記引子、一個正向 HEX™ 螢光標記引子、一個反向互補引子，以及 FRET cassettes) 0.2 μL，共計 10 μL。KASP™ 反應依序為 (A) 95°C 預變性 15 分鐘；(B) 10 個循環的 95°C 變性 20 秒與 66 – 60°C 黏合 60 秒，每個循環降低 0.6°C；(C) 26 個循環的 95°C 變性 20 秒與 55°C 黏合 60 秒，並以儀器內建 StepOne Software v2.3 軟體進行基因型判別。

V. *HSP70* 基因序列定序

依 NCBI 公開雞 *HSP70* 基因序列 (GenBank J02579) 比對 Ensembl (<https://www.ensembl.org>) Red Jungle fowl (GRCg6a) 序列資料 (5:53,059,707 - 5:53,060,326) 後，設計正向引子 5'-TGCGAGC GAGCAAGTGACT G -3' 與反向引子 5'- TCCAAGCCATAGGCAA TAGCAG -3'，以核苷酸自動定序儀 (Applied Biosystems 3500 xL Genetic Analyzer, Thermo Fisher Scientific, USA) 進行定序。

結果與討論

本研究以 PCR-SSCP 基因型檢測技術建置紅羽土雞、黑羽土雞及烏骨雞 *HSP70* 基因之基因型。試驗樣本經 PCR 擴增 155 bp 目標片段產物後，進行 SSCP 取得電泳結果。每個基因型皆有單股與雙股區域，基因型的鑑定由單股區域呈現的不同分子量片段，可區分 AA、AB 及 BB 基因型 (圖 1)。

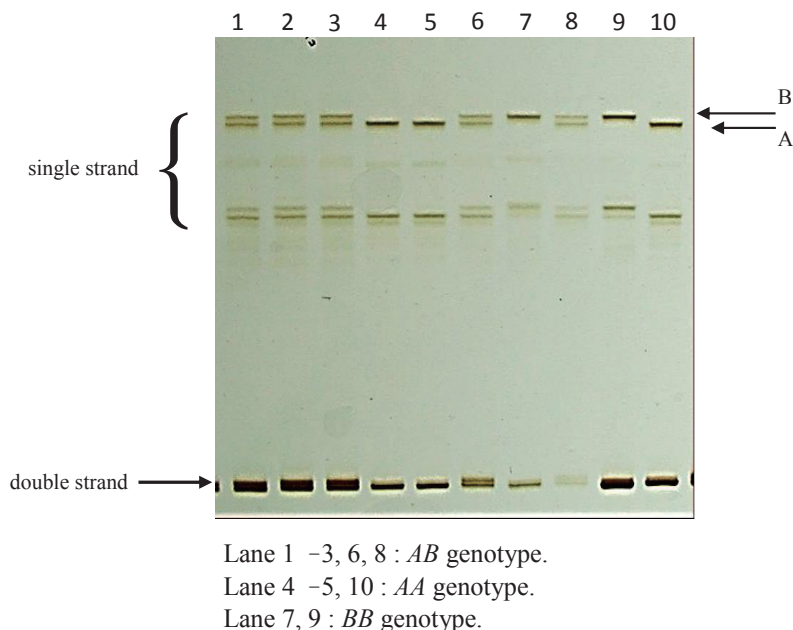


圖 1. 以 PCR-SSCP 檢測技術分析雞 *HSP70-C667G* 之電泳圖。

Fig. 1. Genotyping result of *HSP70-C667G* by PCR-SSCP.

本研究開發建立之 KASP™ 基因型檢測平臺技術進行 *HSP70-C667G* 基因型鑑定，以 PCR 反應條件擴增 119 bp 目標片段產物，結果如圖 2。KASP™ 螢光標記可明確地區分三種基因型，其中近 X 軸 (HEX 螢光強度) 為 *HSP70-BB* 純合子基因型，近 Y 軸 (FAM 螢光強度) 為 *HSP70-AA* 純合子基因型，中間綠點 (FAM/HEX 混合螢光強度) 為 *HSP70-AB* 雜合子基因型，方塊黑點則為空白對照。

本試驗研究為進一步驗證 KASP™ 基因型檢測技術之準確性，依 NCBI 公開 *HSP70* 基因序列 (GenBank J02579) 設計定序引子，並經 PCR 擴增長度為 619 bp 產物後，以核苷酸自動定序儀進行雙向定序，將定序結果與 Ensembl (<https://www.ensembl.org>) Red Jungle fowl (GRCg6a) 序列資料 (5:53,059,707 - 5:53,060,326) 進行序列比對。結果顯示 AA 純合子基因型者 *HSP70-667* 鹼基為 G (guanine) (圖 3A)，PCR 擴增定序序列第 330-339 bp 之 DNA 序列為 TGGCCGTTCC；BB 純合子基因型者 *HSP70-667* 鹼基為 C (cytosine)，PCR 擴增定序序列第 330-339 bp 之 DNA 序列為 TGGCCCTTCC (圖 3C)。

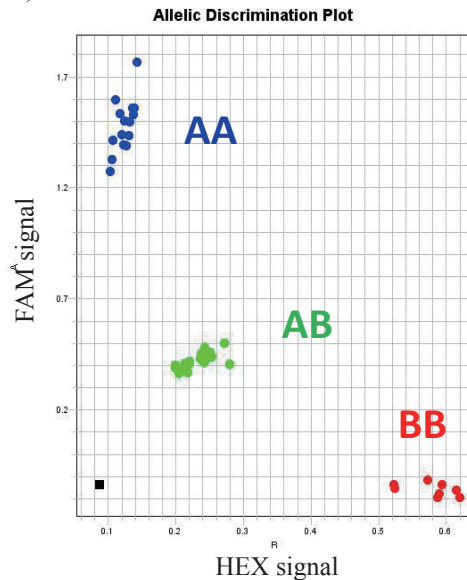


圖 2. 應用 KASP™ 檢測技術分析雞 *HSP70-C667G* 之基因型圖。AA 純合子基因型呈現 FAM 螢光標記為藍色，BB 純合子基因型呈現 HEX 螢光標記為綠色，AB 雜合子基因型呈現 FAM/HEX 螢光標記為綠色，空白樣本以黑點表示。

Fig. 2. Genotyping cluster plots of *HSP70-C667G* by the kompetitive allele-specific PCR (KASP™) assay. The genotyped samples marked blue are AA homozygotes; those marked red are BB homozygotes; those marked green are AB heterozygous. Black is the control.

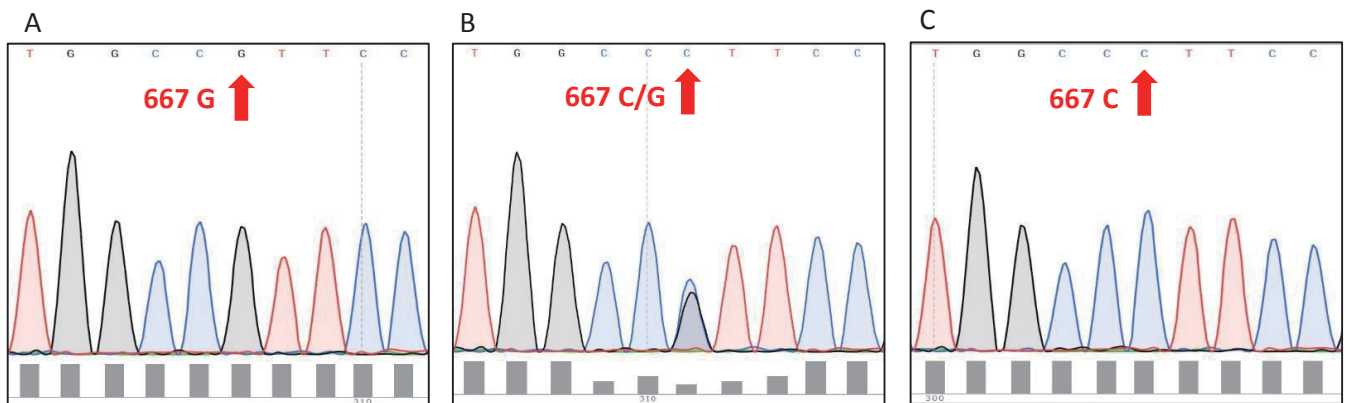


圖 3. 雞 *HSP70-C667G* 之 (A) AA (*HSP70-667G*)、(B) AB (*HSP70-667C/G*) 及 (C) BB (*HSP70-667C*) 基因型定序圖。
Fig. 3. Sequencing profile of (A) AA (*HSP70-667G*), (B) AB (*HSP70-667C/G*), and (C) BB (*HSP70-667C*) homozygotes of

朱等 (2022a) 已成功運用 KASP™ 技術建立雞隻 *PRLR* 基因 SNP 點位 *C617T* 之基因型檢測平臺。經實際比較 KASP™ 與 PCR-SSCP 基因型檢測時間，發現 KASP™ 僅需要 PCR-SSCP 的 1/3 時間，即可完成基因型鑑定工作，並以 DNA 序列定序 *PRLR* 基因 *PP*、*PR* 及 *RR* 基因型後，證實 KASP™、PCR-SSCP 及 DNA 序列定序法等三種檢測法判定基因型之結果其相關性均達 100% 一致。Chang *et al.* (2021) 將 KASP™ 基因型檢測法運用於賽鴿乳酸脫氫酶 A (*lactate dehydrogenase A, LDH-A*)、粒線體細胞色素 B (*mitochondrial cytochrome B, MTCYB*) 和多巴胺受體 D4 (*dopamine receptor D4, DRD4*) 等 3 個基因共 4 個 SNPs 的鑑定，並進行 KASP™ 與 PCR-RFLP 測試法工作時間與試劑耗材之比較分析，發現 2 種基因型檢測方法的鑑定準確率達到 100%，然而 KASP™ 工作時間通常僅需 2.5 小時，而 PCR-RFLP 則需要約 7 小時才能完成同等樣本數量的基因型分析。如果將人員工作執行時間納入成本分析，KASP™ 的整體成本將比 PCR-RFLP 低大約三倍。

本試驗研究應用 PCR-SSCP 與 KASP™ 等 2 種基因型檢測技術，比較紅羽土雞、黑羽土雞及烏骨雞共 360 個試驗樣本之 *HSP70* 基因型鑑定結果，2 種基因型檢測技術分析 *HSP70* 基因 *AA*、*AB* 及 *BB* 基因型 100% 相符（表 1），驗證此 2 種技術可相互替代應用。商用紅羽土雞、黑羽土雞及烏骨雞的 *HSP70* 基因的交替基因 A 頻率分別為 0.40、0.35 及 0.04。

結 論

藉由 2 種不同基因型檢測技術的比較，發現 KASP™ 基因型檢測平臺除具備基因型鑑定的高正確度外，更可有效縮短工作時間及降低人工與耗材試劑成本，應可符合我國種畜禽動物發展以 SNP 分子標識輔助選拔之需。未來，如依據本研究分析臺灣有色肉雞不同品種（系）*HSP70* 基因之基因型頻率結果，探討熱緊迫環境下 *HSP70* 基因對臺灣有色雞隻經濟性狀性能表現之影響，另可進一步了解作為臺灣有色肉雞遺傳選育的參考資訊。

誌 謝

研究團隊感謝農業部科技計畫（110 農科 -2.5.3- 畜 -L1）經費支持，民間牧場與遺傳生理組同仁協助採樣、資料處理與實驗技術等支援，特此誌謝。

參考文獻

- 朱家德、林德育、賴永裕、梁筱梅、楊深玄、劉宗霖、張秀鑾、吳明哲、蕭振文。2022a。雞泌乳素接受體基因點突變多態性基因型檢測技術平臺開發與應用。畜產研究 55：47-55。
- 朱家德、林德育、賴永裕、吳明哲、張秀鑾。2022b。即時聚合酶鏈鎖反應檢測豬 *UBE3C* 基因點突變多態性之基因型分析。中畜會誌（增刊）51：94。
- 林德育、鍾秀枝、黃鈺嘉、黃祥吉、林宗貴、吳明哲。2005。雞種的熱休克蛋白 70 基因頻率。中畜會誌（增刊）34：135。
- Balakrishnan, K. N., S. K. Ramiah, and I. Zulkifli. 2023. Heat shock protein response to stress in poultry: A Review. *Animals* 13: 317-345.
- Chang, C. C., B. B. I. Silva, H. Y. Huang, C. Y. Tsai, R. J. D. Flores, L. L. Tayo, Y. C. Tyan, M. A. Tsai, G. E. M. Catulin, K. P. Chuang, and J. L. Yang. 2021. Development and validation of KASP assays for the genotyping of racing performance-associated single nucleotide polymorphisms in pigeons. *Genes*. 12: 1383-1392.
- Gabriel, J. E., A. F. da Mota, I. C. Boleli, M. Macari, and L. L. Coutinho. 2002. Effect of moderate and severe heat stress on avian embryonic *hsp70* gene expression. *Growth Dev. Aging* 66: 27-33.
- Gething, M. J., and J. Sambrook. 1992. Protein folding in cell. *Nature* 355: 33-45.
- Liew, P. K., I. Zulkifli, M. Hair-Bejo, A. R. Omar, and D. A. Israf. 2003. Effects of early age feed restriction and heat conditioning on heat shock protein 70 expression, resistance to infectious bursal disease, and growth in male broiler chickens subjected to heat stress. *Poult. Sci.* 82: 1879-1885.
- Liu, L. L., C. Fang, H. Y. Ma, X. Yu, S. P. Lv, and W. J. Liu. 2020. Development and validation of KASP markers for the milk traits genes in Kazakh horse. *J. Appl. Anim. Res.* 48: 293-299.
- Konstantinos, K. V., P. Panagiotis, V. T. Antonios, P. Agelos, and N. V. Argiris. 2008. PCR-SSCP: a method for the molecular analysis of genetic diseases. *Mol. Biotechnol.* 38: 155-163.
- Nair, S. K., R. Babu, C. Magorokosho, G. Mahuku, K. Semagn, Y. Beyene, B. Das, D. Makumbi, P. L. Kumar, M. Olsen, and P. M. Boddupalli. 2015. Fine mapping of *Msv1*, a major QTL for resistance to Maize Streak Virus leads to development of production markers for breeding pipelines. *Theor. Appl. Genet.* 128: 1839-1854.
- Rasheed, A., W. Wen, F. M. Gao, S. N. Zhai, H. Jin, J. D. Liu, Q. Guo, Y. J. Zhang, S. Dreisigacker, X. C. Xia, and Z. G. He. 2016. Development and validation of KASP assays for genes underpinning key economic traits in bread wheat. *Theor. Appl. Genet.* 129: 1843-1860.
- Semagn, K., R. Babu, S. Hearne, and M. Olsen. 2013. Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele

- Specific PCR (KASP) : overview of the technology and its application in crop improvement. *Mol. Breeding* 33: 1-14.
- Shi, Z., S. Liu, J. Noe, P. Arelli, K. Meksem, and Z. Li. 2015. SNP identification and marker assay development or high-throughput selection of soybean cyst nematode resistance. *BMC Genomics* 16: 314.
- Tamzil, M. H., R. R. Noor, P. S. Hardjosworo, W. Manalu, and C. Sumantr. 2013a. Polymorphism of the heat shock protein 70 gene in Kampong, Arabic and commercial chickens. *J. Vet.* 14: 317-326.
- Tamzil, M. H., R. R. Noor, P. S. Hardjosworo, W. Manalu, and C. Sumantr. 2013b. Acute heat stress responses of three lines of chickens with different Heat Shock Protein (HSP) 70 genotypes. *Int. J. Poult. Sci.* 12: 264-272.
- Tang, C., Z. M. Zhang, and H. Yue. 2011. Clone and prokaryotic expression of *Hsp70* gene of the broiler. *J. Southwest Univ. Natl. Nat. Sci. Ed.* 37: 401-404.
- Yu, J., E. Bao, J. Yan, and L. Lei. 2008. Expression and localization of Hsps in the heart and blood vessel of heat-stressed broilers. *Cell Stress Chaperon.* 13: 327-335.
- Zhang, Y., D. Liang, H. Huang, Z. Yang, Y. Wang, Y. Yu, L. Liu, S. Zhang, J. Han, and W. Xiao. 2020. Technical note: development and application of KASP assays for rapid screening of 8 genetic defects in Holstein cattle. *J. Dairy Sci.* 103: 619-624.

表 1. 應用 PCR-SSCP 與 KASP™ 檢測技術鑑定 HSP70-C667G 之基因型比較表
 Table 1. Comparison of the HSP70-C667G genotype via PCR-SSCP and KASP™ genotyping platform.

Breed	N	HSP70-C667G						P-value ⁴			
		Observed genotypic frequencies by PCR-SSCP ¹ (%)			Observed genotypic frequencies by KASP™ ² (%)				Accuracy ³ (%)		
		AA	AB	BB	Frequency of A allele	AA	AB			BB	
Red-feather native chicken	120	22 (18.4)	52 (43.3)	46 (38.3)	96 (0.40)	22 (18.4)	52 (43.3)	46 (38.3)	96 (0.40)	100	<0.01
Black-feather native chicken	120	18 (15.0)	49 (40.8)	53 (44.2)	85 (0.35)	18 (15.0)	49 (40.8)	53 (44.2)	85 (0.35)	100	<0.01
Silkie	120	5 (4.2)	0 (0.0)	115 (95.8)	10 (0.04)	5 (4.2)	0 (0.0)	115 (95.8)	10 (0.04)	100	<0.01

¹ PCR-SSCP: polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism.

² KASP™: competitive allele-specific polymerase chain reaction.

³ Accuracy analyzed by the Pearson correlation coefficient between PCR-SSCP and KASP™ methods.

⁴ P-value significance based on SAS PROC CORR procedure.

The establishment of a genotyping platform for the Heat Shock Protein 70 gene and analysis of genotypic distribution in Taiwan native chicken ⁽¹⁾

Chia-Te Chu ²⁾ Yung-Yu Lai ⁽²⁾ Hsueh-Chi Teng ⁽³⁾ Tsung-Lin Liu ⁽⁴⁾ Ming-Che Wu ⁽²⁾
Hsiu-Luan Chang ⁽⁵⁾ Der-Yuh Lin ⁽²⁾⁽⁶⁾

Received: Sep. 12, 2023 ; Accepted: Dec .20, 2023

Abstract

The heat shock protein family (HSPs) is a critical biomarker for organisms responding to heat stress conditions. Under heat stress or other stressful environments, the heat shock 70 protein (*HSP70*) is an indispensable regulatory factor for maintaining the proper protein structure and mitigating tissue damage. The purpose of this study was to analyze the genotype frequency distribution of the *HSP70* gene in Taiwan colored native chickens including red-feathered native chicken, black-feathered native chicken and silkies. The single nucleotide polymorphism (SNP) genotypes of the chicken *HSP70* gene were identified by two genotyping platforms, polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) and the fluorescent primer marked kompetitive allele-specific polymerase chain reaction (KASPTM). The results illustrated that the *HSP70* gene genotypes *AA*, *AB*, and *BB* analyzed by both detection techniques were 100% consistent, confirming that these techniques can be interchangeably used. Furthermore, KASPTM can effectively reduce working time and economic expenditure. The allele *A* frequencies of *HSP70* gene in red-feathered native chickens, black-feathered native chicken, and silkies were 0.40, 0.35, and 0.04, respectively. In the future, the influence of the *HSP70* gene on economic traits under heat stress conditions can be discovered based on the differences in the genotype frequency of the *HSP70* gene in different chicken breeds in Taiwan.

Key Words: chicken, heat stress, HSPs, KASPTM

(1) Contribution No. 2774 from Taiwan Livestock Research Institute (TLRI), Ministry of Agriculture (MOA).

(2) Genetics and Physiology Division, MOA-TLRI, HsinHua, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(3) Quantum Life Biotechnology Co., Ltd.

(4) Department of Biotechnology and Bioindustry Sciences, National Cheng Kung University, Tainan 701, Taiwan. R.O.C.

(5) Department of Animal Science, National Pingtung University of Science and Technology. Pingtung 912, Taiwan. R.O.C.

(6) Corresponding author, E-mail: lin0429@mail.tlri.gov.tw.

農業部畜產試驗所「畜產研究」稿約

(民國 94 年 3 月修訂)

(民國 108 年 12 月修訂)

(民國 111 年 11 月修訂)

(民國 112 年 8 月修訂)

- I. 本刊為學術性刊物，刊載有關畜產科學原創性研究報告及學術性專題論著。
- II. 本刊為季刊，每年 3 月、6 月、9 月及 12 月底出版。
- III. 文稿之排列順序為標題、摘要、緒言、材料與方法(學術性專題論著可略)、結果、討論(結果與討論可合為一節)、結論(可略)、誌謝(可略)及參考文獻。以中文撰寫者，須附英文摘要(Abtract)，以英文撰寫者，則附中文摘要。中英文摘要以不超過五百字為原則，須列中英文相對應之 3 至 6 個關鍵詞。
- IV. 文稿書寫格式，主要參考 Journal of Animal Science：
 - (i) 文稿請用 Word 檔 A4 紙張格式，內文以 12 號字型繕打，中文採新細明體，英文採 Times New Roman，圖表置於內文之後。行距採用行距 1.5，版面設定中等邊界(上下 2.54cm，左右 1.91cm)，並編碼連續行號。
 - (ii) 文字敘述之編號依序為 I、(i)、1、(1)、A、(a)。圖表以圖 1、表 1 等順序表示。中文稿件之圖表標題及圖說請中英並列，圖表內文字請以英文呈現。文字敘述用英文者，圖表中之文字僅用英文。
 - (iii) 本刊以黑白印刷為原則，圖表務求印刷後可清楚分辨標示，並請以電腦繪製，以利排版。
 - (iv) 單位及縮寫：
 1. 單位使用公制，習見之符號及縮寫不必另附中文。專門名詞無適當譯名者可從原文。
 2. 以下常用之縮寫可直接撰寫於本刊稿件不須另作定義：
 - (1) 長度：km、m、cm、mm、 μm 。
 - (2) 重量：kg、g、mg、 μg 。
 - (3) 體積：L、mL、 μL 。
 - (4) 時間：wk、d、h、min、s。
 - (5) 其他： $^{\circ}\text{C}$ 、pH、cal、rpm。
 - (v) 統計分析達顯著差異性請以 *、^a、^b、^c 等上標標示，並於表下方說明。
 - (vi) 參考文獻：
 1. 正文中須書出參考文獻之作者姓氏與年份：
 - (1) 西文文獻之作者僅一人者，書一人之姓如 (Johnson, 1991)；作者為二人者，書二人之姓如 (Johnson and Hobbs, 1991)；作者為三人或以上者，用第一人之姓後再書 *et al.* 如 (Johnson *et al.*, 1991)。
 - (2) 中文文獻之作者僅一人者，書一人之姓氏如 (趙, 1990)；作者為二人者，書二人之姓氏如 (趙及錢, 1990)；作者為三人或以上時，則於第一人姓氏後再加一等字如 (趙等, 1990)。
 2. 參考文獻列示以確經引用者為限，排列次序為作者、年份、題目、發表刊物名稱、卷數、頁數等依次書寫，例如：
 - (1) 期刊類
 - 王政騰、朱慶誠。1991。土番鴨繫留、電昏、放血、燙毛等屠宰條件之探討。畜產研究 24：133-140。
 - 胡怡浩、姜延年、陳銘正、潘金水。1991。北京鴨雜交品系與商業品系肉鴨之生長及屠體性能之比較。畜產研究 24：141-148。
 - Ayub, M. and M. Shoaib. 2009. Studies on fodder yield and quality of sorghum alone and in mixture with guar under different planting techniques. Pak. J. Agri. Sci. 46: 25-29.
 - Hsu, F. H., C. J. Nelson, and A. G. Matches. 1985. Temperature effects on germination of perennial warm-

season forage grasses. *Crop Sci.* 25: 215-220.

(2) 書本類

朱純燕。2001。水禽類小病毒蛋白基因之分子選殖及抗原性分析。國立中山大學生物科學系，博士論文，高雄市。

李登元。1979。乳牛學。臺灣商務印書館，臺北市，第 300 - 322 頁。

American Oil Chemists Society (AOCS). 1980. Official and Tentative Methods of the American Oil chemists Society. 3rd ed. Am. Oil Chem. Soc., Champaign, IL, USA.

Association of Official Agricultural Chemists (AOAC). 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, VA, USA.

Tai C. 1985. Duck breeding and artificial insemination in Taiwan. *Duck Production Science and World Practice*, pp. 193-203. University of New England, Armidale, Australia.

Wang, Y. C. 1985. Regrowth ability of Napier grass (*Pennisetum purpureum* Schumach) in the dry, cold season in Taiwan. *Proceedings of the XV International Grassland Congress*, pp. 1239-1241. Kyoto, Japan.

(3) 其他類

農業部。2023。農業統計年報。 <https://agrstat.moa.gov.tw/sdweb/public/book/Book.aspx>。

農業部。2023。農業部農業資料統計查詢。 <http://agrstat.moa.gov.tw/sdweb/public/maintenance/Announce.aspx>。

SAS. 2015. SAS/STAT® 14.1. SAS Institute Inc., Cary, NC. USA.

SPSS. 2008. SPSS Statistics for Windows, Version 17.0. SPSS Inc., Chicago, IL. USA.

3. 中日文獻以第一作者姓氏筆劃多少為序，西文以第一作者姓氏之拼音先後排列，並按中文、日文、西文之次序排列。
 4. 西文期刊名稱請用縮寫，縮寫請參照美國國家醫學圖書館線上資料庫 (NLM Catalog) 之 IOS (Information and documentation) 縮寫。
 5. 參考文獻皆不編號。
- V. 本刊編輯委員會保有修改與退稿之權利。稿件經本刊接受後，作者進行出刊校稿時，不得擅自更改內容及數據。
 - VI. 稿件經本刊委員會轉請專家審查，編輯委員會根據專家審查意見通知投稿人，是否接受刊載，或須修改後始可刊載。本刊無提供稿費。
 - VII. 稿件經本刊接受後，該稿件之全部或部份，不得投稿其他刊物，以不同語文投稿其他刊物亦所不許。本刊具專屬版權，刊登權屬發行單位畜產試驗所所有，非經本所書面同意，不得轉載或轉移他處發表。如有上述情事，相關法律責任由作者自負，本刊有拒絕接受其投稿之權利。
 - VIII. 自民國 93 年開始實施之計畫，其論文如涉及使用脊椎動物進行科學應用計畫者，請撰稿者檢附該計畫經所屬機構動物實驗管理小組審議認可之文件。

JOURNAL OF TAIWAN LIVESTOCK RESEARCH

Vol. 57 No. 2

June 2024

CONTENTS

	Page
1. Effects of the seasonal changes in reproductive performances of Formosan sika stag <i>Hsin-Hung Lin, Ting-Yung Kuo, Shann-Ren Kang, Shen-Chang Chang and Jenn-Rong Yang</i>	75
2. The investigation of physiological, hematological, and blood biochemical parameters of Taiwan swamp buffaloes in the Hualien region during the cool and hot seasons <i>Pei-Chun Chen, Pi-Hua Chuang, and Liang-Yuan Wei</i>	82
3. Genotyping improvement for a candidate marker miR-27a associated with porcine litter size trait <i>Ren-Bao Liaw, Si-Ya Wang, Yu-Syuan Lu, Jo-Ching Chen, Yung-Yu Lai, Kuei-Juh Liu, and Mei-Ping Cheng</i>	91
4. Establishment of induced pluripotent stem cell line in muscovy duck and its waterfowl parvovirus infection test <i>Jenn-Fa Liou, Chia-Yu Chang, Fung-Hsiang Chu, and Lih-Ren Chen</i>	98
5. Discussion on the preservation of pagolagrass haylage by manual poking simulation of file-damage <i>Shu-Min Wang, and Chia-Sheng Chen</i>	107
6. The effect of different forage on rumen microbiota and milk composition of Holstein late lactation milking cows <i>Szu-Han Wang, Hsiao-Han Liao, Chia-Xin Lee, Hsiao-Ming Chen, and Jen-Wen Shiau</i>	114
7. A Review Study on Environmental Heat Stress and Heat Load Management in the Dairy Cattle under Climate Change <i>Chia-Jung Lee, and Yi-Chun Lin</i>	124
8. The establishment of a genotyping platform for the Heat Shock Protein 70 gene and analysis of genotypic distribution in Taiwan native chicken <i>Chia-Te Chu, Yung-Yu Lai, Hsueh-Chi Teng, Tsung-Lin Liu, Ming-Che Wu, Hsiu-Luan Chang, Der-Yuh Li</i>	142

行政院新聞局出版事業登記證局版台省誌字第六七七號
中華郵政新營字第十八號執登記為雜誌交寄

ISSN 0253-9209
DOI: 10.6991/JTLR



9 770253 920004

GPN: 2005200015

定價：新臺幣二〇〇元