

國立臺灣大學生農學院動物科學技術學系

碩士論文



Department of Animal Science and Technology

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

利用 DNA 分子標識進行臺灣黃牛

族群遺傳結構分析與生長性狀相關性之探討

Population genetic structure analysis and growth trait association

using DNA genetic markers for Taiwan yellow cattle

林彤

Tung Lin

指導教授：王佩華 博士

Advisor: Pei-Hwa Wang, Ph.D.

中華民國 104 年 7 月

July, 2015

## 誌 謝



首先要誠摯的感謝指導教授 王佩華博士，老師在學生碩士期間對於本論文悉心的教導，在研究架構及試驗分析上指點我正確的方向，使我在這兩年中獲益良多。也承蒙 宋永義博士、 黃政齊博士及 蕭振文博士在學生論文口試期間提供寶貴的意見與指正，使本論文更加完善。

在研究期間，感謝 林恩仲博士在課業及試驗上的指導，亦感謝農委會畜產試驗所、畜試所恆春分所、金門畜產試驗所、花蓮種畜繁殖場及臺灣大學農業試驗場，提供試驗牛隻樣本並協助採樣。動物育種與資源應用研究室裡，感謝芳裕學長、徐博、怡蓁學姊、瑞軒學長、柏安學長、岳錚學長、蕙婷學姊及雨蓁學姊，對於實驗室事務處理、實驗進行與統計分析上的細心指導；感謝瓊瑛、佳穎、宇軒、晉廷在實驗上的協助。這兩年的日子裡，有實驗室同仁們的陪伴、幫助所產生的革命情感，為我的碩士生活添加了許多美好回憶。

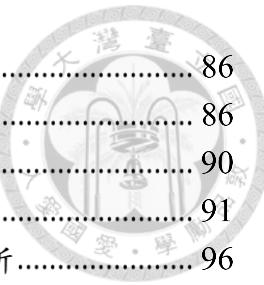
在求學時期，感謝系辦公室的奕雯學姊及位育學長，提醒與協助處理系上大大小小的行政事宜，亦對於系上每一位老師所傳授的專業知識及經驗分享致上最誠摯的謝意，並感謝 R02 班上同學們及朋友們在平常生活與課業上的分享與打氣，讓從外系來到動科這個陌生領域的我並不孤單。

最後，謹以此文獻給我摯愛的家人，縱使在求學路上遇到許多的困難，有你們的體諒與包容，讓我有勇氣及動力去迎接挑戰，讓我知道家永遠是最溫暖的避風港。謝謝你們一路上的支持與鼓勵。

# 目 錄



目錄 .....	I
圖次 .....	III
表次 .....	IV
附圖次 .....	V
附表次 .....	VI
中文摘要 .....	1
Abstract .....	3
壹、前言 .....	5
貳、文獻探討 .....	6
一、臺灣肉牛產業發展概況 .....	6
二、臺灣本地牛隻品種介紹 .....	10
三、DNA 分子標識 .....	15
四、族群遺傳多態性 .....	20
五、微衛星標識在牛隻之研究 .....	30
六、牛隻生長性狀相關候選基因之研究 .....	36
七、牛短脊椎綜合症之研究 .....	42
八、試驗目的 .....	43
參、材料與方法 .....	44
試驗一：牛隻新微衛星標識之開發與應用 .....	44
一、新微衛星標識之開發 .....	44
二、微衛星標識之 PCR 增幅與多態性檢測 .....	50
三、遺傳分析 .....	56
試驗二：利用候選基因法於臺灣黃牛生長性狀相關性之探討 .....	57
一、試驗動物及資料收集 .....	57
二、候選基因多態性分析 .....	57
三、統計分析 .....	63
試驗三：牛隻短脊椎綜合症基因頻率分析 .....	64
一、試驗動物 .....	64
二、基因型分析 .....	64
肆、結果 .....	65
試驗一：牛隻新微衛星標識之開發與應用 .....	65
一、新微衛星基因座之遺傳變異分析 .....	65
二、各族群牛隻之遺傳變異分析 .....	71
三、族群分化與分子變方分析 .....	73
四、遺傳距離與分群 .....	76
五、牛隻個體鑑別率之估算 .....	83



試驗二：利用候選基因法於臺灣黃牛生長性狀相關性之探討 .....	86
一、MYF5 基因於臺灣黃牛之多態性分析.....	86
二、MYF5 基因多態性與臺灣黃牛生長性狀相關性分析.....	90
三、ZBED6 基因於臺灣黃牛之多態性分析.....	91
四、ZBED6 基因多態性與臺灣黃牛生長性狀相關性分析.....	96
五、SREBP1c 基因於臺灣黃牛之多態性分析 .....	97
六、SREBP1c 基因多態性與臺灣黃牛生長性狀相關性分析 .....	100
試驗三：牛短脊椎綜合症基因頻率分析 .....	101
一、短脊椎綜合症之 FANCI 基因型檢測.....	101
二、短脊椎綜合症之 FANCI 基因型頻率分布.....	101
伍、討論 .....	104
試驗一：牛隻新微衛星標識之開發與應用 .....	104
一、新微衛星基因座之遺傳變異分析 .....	104
二、各族群牛隻之遺傳變異分析 .....	106
三、族群分化、遺傳距離與分群 .....	107
四、牛隻個體鑑別率 .....	109
試驗二：利用候選基因法於臺灣黃牛生長性狀相關性之探討 .....	110
一、MYF5 基因多態性與臺灣黃牛生長性狀相關性分析.....	110
二、ZBED6 基因多態性與臺灣黃牛生長性狀相關性分析.....	111
三、SREBP1c 基因多態性與臺灣黃牛生長性狀相關性分析 .....	112
試驗三：牛短脊椎綜合症基因頻率分析 .....	114
陸、結論 .....	115
柒、參考文獻 .....	116
捌、附錄 .....	129



## 圖 次

圖 1 1966 至 2012 年臺灣國產牛肉自給率 .....	9
圖 2 臺灣國產牛肉生產追溯作業流程 .....	9
圖 3 臺灣本地主要肉牛品種之一—臺灣黃牛 .....	14
圖 4 微衛星標識特徵：重複片段之單位大小及重複次數 .....	17
圖 5 DNA 複製之滑動造成微衛星標識的重複片段次數 (a) 增加與 (b) 減少 ..	17
圖 6 (a) 未加權算術平均對群法 (UPGMA) 所建構出有根樹及 (b) 鄰位連接法 (NJ) 所繪製出無根樹 .....	29
圖 7 肌肉調控因子之功能與肌肉生成過程的關係 .....	37
圖 8 自白血球抽取基因組 DNA 之流程 .....	49
圖 9 以 ABI 3730 定序儀進行毛細管電泳分析第一組多引子系統之結果 .....	67
圖 10 以 ABI 3730 定序儀進行毛細管電泳分析第二組多引子系統之結果 .....	67
圖 11 以 ABI 3730 定序儀進行毛細管電泳分析第三組多引子系統之結果 .....	68
圖 12 各牛隻族群利用 15 組新微衛星標識所得鄰位連接法 (NJ) 之親緣關係樹 .....	79
圖 13 各牛隻族群相對位置利用族群遺傳距離所繪製之主成分分析 (PCA) 圖 ..	80
圖 14 各牛隻個體利用 15 組新微衛星標識所得鄰位連接法 (NJ) 之親緣關係樹 .....	81
圖 15 各牛隻個體利用 15 組新微衛星標識所繪製之 STRUCTURE 群集分析圖 (K = 3~8) .....	82
圖 16 全體牛隻族群之個體鑑別率 ( $P_{(ID)}$ ) 與近親個體鑑別率 ( $P_{(ID)sib}$ ) 對不同新微衛星標識數目之折線圖 .....	85
圖 17 臺灣黃牛 <i>MYF5</i> 基因第二內含子片段以 <i>Taq I</i> 限制酶切割之基因型判定 .....	87
圖 18 臺灣黃牛 <i>MYF5</i> 基因第二內含子區域 g.1948A>G 位點以 TaqMan SNP Genotyping Assay 分析之基因型結果 .....	88
圖 19 臺灣黃牛 <i>ZBED6</i> 基因 PCR 產物之 1% 瓊脂膠體電泳圖 .....	92
圖 20 臺灣黃牛 <i>ZBED6</i> 基因第一外顯子區域 g.680C>G 變異位點 (以黃色標示) 之定序結果 .....	93
圖 21 臺灣黃牛 <i>ZBED6</i> 基因第一外顯子區域 g.680C>G 位點以 TaqMan SNP Genotyping Assay 分析之基因型結果 .....	94
圖 22 臺灣黃牛 <i>SREBP1c</i> 基因第九外顯子片段以 <i>Taq I</i> 限制酶切割之基因型判定 .....	98
圖 23 牛隻 <i>FANCI</i> 基因 PCR 產物之 1% 瓊脂膠體電泳圖 .....	102



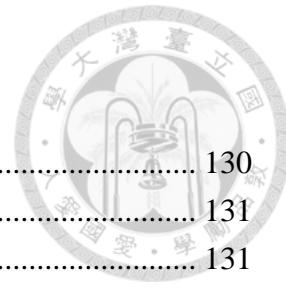
## 表 次

表 1 利用微衛星標識探討牛隻遺傳歧異度與個體鑑別之研究 .....	34
表 2 來自不同場之八個族群牛隻數目一覽表 .....	53
表 3 本試驗三組多引子系統共 15 組牛隻新微衛星標識之標定螢光引子序列 ...	54
表 4 以 PCR 及 PCR-RFLP 分析 <i>ZBED6</i> 、 <i>MYF5</i> 與 <i>SREBP1c</i> 基因之引子序列、PCR 增幅位置、PCR 產物大小、限制酶種類及限制酶作用後之片段大小.	60
表 5 分析 <i>ZBED6</i> 、 <i>MYF5</i> 與 <i>SREBP1c</i> 基因多態性之 PCR 反應條件 .....	61
表 6 <i>MYF5</i> 與 <i>ZBED6</i> 基因位點以 TaqMan SNP Genotyping Assay 之引子及螢光探針序列 .....	62
表 7 利用 15 組新微衛星標識於全體牛隻族群之交替基因範圍、交替基因數 ( $N_a$ )、有效交替基因數 ( $N_e$ ) 及微衛星標識染色體位置 .....	69
表 8 利用 15 組新微衛星標識檢測全體牛隻族群之遺傳變異性 .....	70
表 9 利用 15 組新微衛星標識檢測 10 個牛隻族群及全體犬隻族群之平均遺傳變異性 .....	72
表 10 本試驗各牛隻族群之間的基因交流與 $F_{ST}$ 值 .....	74
表 11 本試驗各牛隻族群內與族群間之分子變方分析 .....	75
表 12 本試驗各牛隻族群之間的遺傳距離數值 .....	78
表 13 全體牛隻族群之 15 組新微衛星標識之個體鑑別率 ( $P_{(ID)}$ ) 與近親個體鑑別率 ( $P_{(ID)sib}$ ) .....	84
表 14 臺灣黃牛 <i>MYF5</i> 基因第二內含子區域 g.1948A>G 位點之基因型、交替基因頻率及哈溫平衡檢測 .....	89
表 15 臺灣黃牛 <i>MYF5</i> g.1948A>G 基因型與生長性狀之相關性分析 .....	90
表 16 臺灣黃牛 <i>ZBED6</i> 基因第一外顯子區域 g.680C>G 位點之基因型、交替基因頻率及哈溫平衡檢測 .....	95
表 17 臺灣黃牛 <i>ZBED6</i> g.680C>G 基因型與生長性狀之相關性分析 .....	96
表 18 臺灣黃牛 <i>SREBP1c</i> 基因第九外顯子區域 g.10781C>G 位點之基因型、交替基因頻率及哈溫平衡檢測 .....	99
表 19 臺灣黃牛 <i>SREBP1c</i> g.10781C>G 基因型與生長性狀之相關性分析 .....	100
表 20 牛隻 <i>FANCI</i> 基因 3.3 kb 缺失之基因型及交替基因頻率檢測結果 .....	103

## 附圖次

附圖 1  $\Delta K$  之折線圖，顯示建議  $K$  值為 3 ..... 129





## 附表次

附表 1 YCA19 基因座於 8 個牛隻族群之交替基因頻率 (%) .....	130
附表 2 YCA21 基因座於 8 個牛隻族群之交替基因頻率 (%) .....	131
附表 3 YCC21 基因座於 8 個牛隻族群之交替基因頻率 (%) .....	131
附表 4 YCC39 基因座於 8 個牛隻族群之交替基因頻率 (%) .....	132
附表 5 YCB03 基因座於 8 個牛隻族群之交替基因頻率 (%) .....	132
附表 6 YCA20 基因座於 8 個牛隻族群之交替基因頻率 (%) .....	133
附表 7 YCA25 基因座於 8 個牛隻族群之交替基因頻率 (%) .....	134
附表 8 YCB09 基因座於 8 個牛隻族群之交替基因頻率 (%) .....	135
附表 9 YCC11 基因座於 8 個牛隻族群之交替基因頻率 (%) .....	135
附表 10 YCA01 基因座於 8 個牛隻族群之交替基因頻率 (%) .....	136
附表 11 YCA18 基因座於 8 個牛隻族群之交替基因頻率 (%) .....	137
附表 12 YCA26 基因座於 8 個牛隻族群之交替基因頻率 (%) .....	138
附表 13 YCC28 基因座於 8 個牛隻族群之交替基因頻率 (%) .....	138
附表 14 YCB06 基因座於 8 個牛隻族群之交替基因頻率 (%) .....	139
附表 15 YCC18 基因座於 8 個牛隻族群之交替基因頻率 (%) .....	140



## 中文摘要

近年來臺灣的國產牛肉市場越來越受到重視，其中臺灣黃牛為我國重要的本土肉牛品種，然而其族群數量卻急遽下降，為了維護臺灣黃牛之純種種源與遺傳歧異度，自 1987 年於農業委員會畜產試驗所恆春分所設立保種場。因此本試驗第一個目標為開發牛隻新微衛星標識 (microsatellite markers)，以分析臺灣黃牛與其他牛隻族群在遺傳結構上的差異。第二，利用單一核苷酸多態性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 標識分析其與臺灣黃牛族群生長性狀之相關性，以利進行未來肉牛的選拔及育種。

本試驗採用選擇性雜合法 (selective hybridization)，將含有重複序列片段 (repeat units) 之探針 (probes) 與一公一母之雜交黃牛基因體 DNA 樣本進行雜合 (hybridization)，以建立微衛星標識豐富化之基因庫 (microsatellite-enriched genomic library)。共開發 15 組新微衛星標識，於 8 個族群共 637 頭牛隻進行檢測，試驗結果顯示，15 組新微衛星基因座之交替基因數 (number of alleles,  $N_a$ ) 與有效交替基因數 (number of effective alleles,  $N_e$ ) 之平均值各為  $8.2 \pm 4.2$  和  $3.0 \pm 1.4$ ；期望異質度 (expected heterozygosity,  $H_E$ ) 與觀測異質度 (observed heterozygosity,  $H_O$ ) 之平均值分別為  $0.588 \pm 0.191$  與  $0.424 \pm 0.164$ ；多態性訊息含量 (polymorphic information content, PIC) 之平均值為  $0.552 \pm 0.188$ ，且其中 10 組具有高度多態性 ( $PIC \geq 0.50$ )。另外， $F_{IS}$  之平均值為 0.184， $F_{IT}$  之平均值為 0.271，而  $F_{ST}$  之平均值為 0.108。全部新微衛星基因座之綜合個體鑑別率 (probability of identity,  $P_{(ID)}$ ) 與綜合近親個體鑑別率 (probability of identity among sibs,  $P_{(ID)sib}$ ) 分別為  $9.8 \times 10^{-12}$  與  $3.1 \times 10^{-5}$ 。利用鄰位連接 (neighbor-joining) 法根據 8 個牛隻族



群之遺傳距離所繪製的親緣關係樹中可觀察到，此 15 組新微衛星標識可明確的區分臺灣黃牛族群與其他牛隻族群。

在第二部分的試驗中，選擇 *MYF5* g.1948 A>G、*ZBED6* g.680C>G 及 *SREBP1* g.10781C>G 此三個基因變異位點，針對 168 頭臺灣黃牛進行生長性狀之相關性分析，所搜集之性狀資料有牛隻的出生重、4、6、8、10 及 12 月齡體重。試驗結果顯示，*MYF5* 基因型在牛隻的 12 月齡體重有趨勢上的影響 ( $P = 0.07$ )，AG 或 GG 基因型的個體相較於 AA 基因型有較重的體重。而在 *ZBED6* 基因， CG 或 GG 基因型的牛隻相較於 CC 基因型有顯著較重的 10 月齡體重 ( $P < 0.05$ )。牛隻 *SREBP1* 基因型則是與出生重有顯著相關 ( $P < 0.05$ )，雜合子個體相較於純合子個體有較重的出生體重。

綜合所述，本試驗所開發之 15 組牛隻新微衛星標識，可供進行國內臺灣黃牛及其他牛隻族群之族群遺傳結構檢測與個體鑑別及產銷履歷之驗證。此外，在本試驗中所使用的三個 SNP 位點有潛力作為肉牛選拔育種之分子標識。

牛短脊椎綜合症 (brachyspina syndrome, BS) 為一種隱性遺傳致死疾病，本症狀形成的原因為牛隻 *FANCI* 基因有 3.3 kb 片段的缺失。本試驗第三個目標為分析臺灣地區荷蘭牛、臺灣黃牛及臺灣水牛族群中帶有此症狀之雜合子個體頻率，結果顯示所檢測之臺灣黃牛及水牛族群皆為正常個體，而在 53 頭荷蘭牛隻中有 5 頭為雜合子，故有必要進行大規模之荷蘭牛族群篩檢，並以選擇性配種的方式，逐步篩除此不良基因。

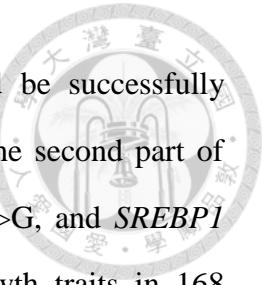
關鍵字：短脊椎綜合症、生長性狀、微衛星標識、族群遺傳結構、臺灣黃牛



## Abstract

In recent years, great importance of the domestic beef market has been attached. The Taiwan yellow cattle is an important indigenous beef cattle breed in Taiwan. However, the population size of the Taiwan yellow cattle has dropped dramatically. Therefore, to preserve germplasm resources and genetic diversity, the conservation population has been maintained in Hengchung Branch of Livestock Research Institute, C.O.A. since 1987. The first goal of this study was to develop novel microsatellite markers to clarify the difference of genetic structure between the Taiwan yellow cattle and hybrid cattle. Secondly, using single nucleotide polymorphism (SNP) markers in analyzing their association with growth traits in the Taiwan yellow cattle for future beef cattle selection and breeding.

A microsatellite-enriched genomic library was constructed from one male and one female hybrid yellow cattle DNA samples using selective hybridization method with mixed probes containing different repeat units. There were 15 sets of novel microsatellite markers were developed and used to analyze 637 cattle sampled from eight populations. The average number of alleles ( $N_a$ ) and effective alleles ( $N_e$ ) were  $8.2 \pm 4.2$  and  $3.0 \pm 1.4$ , respectively. Among these markers, the average expected heterozygosity ( $H_E$ ) and observed heterozygosity ( $H_O$ ) were  $0.588 \pm 0.191$  and  $0.424 \pm 0.164$ , respectively. The estimated average polymorphic information content (PIC) was  $0.552 \pm 0.188$ , and 10 of these markers were highly polymorphic ( $PIC \geq 0.50$ ). The inbreeding coefficient in the subpopulation ( $F_{IS}$ ) was 0.184. The inbreeding coefficient in the total population ( $F_{IT}$ ) was 0.271. The average differentiation among populations ( $F_{ST}$ ) was 0.108. The total probability of identity ( $P_{(ID)}$ ) and the total probability of identity among sibs ( $P_{(ID)sib}$ ) were  $9.8 \times 10^{-12}$  and  $3.1 \times 10^{-5}$ , respectively. The neighbor-joining (NJ) trees were constructed among the eight populations on the basis of the genetic distance estimated from the 15 sets of novel microsatellite markers.



The results indicated that Taiwan yellow cattle populations could be successfully separated from other cattle populations by using these markers. In the second part of this study, three SNP markers: *MYF5* g.1948 A>G, *ZBED6* g.680C>G, and *SREBP1* g.10781C>G, were selected to examine their association with growth traits in 168 Taiwan yellow cattle. The traits studied were the body weight (BW) at birth, 4, 6, 8, 10, and 12 months. Association of *MYF5* genotypes with BW12 were nearly significant ( $P = 0.07$ ), with the genotype AG or GG might have heavier body weight than genotype AA. Individuals with the genotype CG or GG of *ZBED6* gene showed significantly heavier BW10 than genotype CC ( $P < 0.05$ ). Association of *SREBP1* genotypes with BW0 were significant ( $P < 0.05$ ), with the heterozygous genotype have heavier birth weight than homozygous genotypes.

In conclusion, these 15 sets of novel microsatellite markers developed in this study could be applied for monitoring genetic background structure of Taiwan yellow cattle and other cattle populations. Additionally, these three characterized SNPs could be used as potential markers for selection and breeding of beef cattle.

Bovine brachyphina syndrome (BS) is a recessive genetic defect, caused by a 3.3 kb DNA deletion in the bovine *FANCI* gene. The third part of this study was to analyze the frequency of BS carrier in Taiwan Holstein, Taiwan yellow cattle and Taiwan water buffalo population. The result indicated that all of the Taiwan yellow cattle and water buffalo were normal individuals, and 5 of 53 Holstein cattle were BS carriers. This genetic defect should be eliminated gradually by large-scale genotyping and selective mating.

**Keyword:** Brachyphina syndrome, Growth trait, Microsatellite marker, Population genetic structure, Taiwan yellow cattle



## 壹、前言

肉牛產業在臺灣為一較不被重視之畜牧產業，其主要原因是由於民國六十年代開始，農業機械化以及開放國外進口牛肉所影響，依據行政院農業委員會公布的農業統計年報資料，開放國外牛肉進口至今，國產牛肉自給率已不到 10%。然而近年來食品安全問題層出不窮，如美國牛肉曾出現狂牛症、殘留瘦肉精等問題，讓是否開放進口成了爭議性議題，故國產牛肉市場日益受到重視。政府於民國 101 年建立國產牛肉追溯制度，以強化國產牛肉與進口產品的市場區隔。而在國產牛肉中，以臺灣黃牛最為消費者所注意，但因臺灣黃牛為數量稀少的保種族群，且從外表難以與雜種牛區分，容易使生產者及消費者產生混淆，以致市面上業者號稱的臺灣黃牛肉，可能是混雜了臺灣黃牛和外國品種的黃雜牛，甚至為荷蘭牛肉，故需要針對臺灣黃牛及雜種牛開發新的微衛星標識，供族群遺傳結構分析，以利未來應用於產銷履歷上的驗證。

臺灣黃牛的優點眾多，除了耐熱、抗病與繁殖率高以外，在屠體性能方面，屠體之精肉率高、脂肪少且風味佳，品評方面不比外國肉牛品種差，但因其體型小，隨著國外大型牛種以及農機引進，不符經濟效益的黃牛逐漸被淘汰，為了選拔優良生長性狀的牛隻，探討基因與生長性狀間的關聯性，作為未來臺灣黃牛育種的參考依據，有利於提升品種之種源價值。

另外，荷蘭牛是提供人類乳品的重要家畜，經由高度選育與良好的飼養管理，生產大量鮮乳供應人類食物的需求，因此在荷蘭牛所發生的隱性遺傳缺陷會造成酪農重大的經濟損失，故全面篩檢牛隻是否帶有不良基因是乳牛場篩除這些遺傳缺陷的根本之道。

## 貳、文獻探討

### 一、臺灣肉牛產業發展概況



在臺灣早期農業社會，牛對於農家來說是耕種拖運的動力，故臺灣人為了感恩牛隻辛勞而有不食牛肉的習俗。隨著生活水平的提高、產業結構與消費意識的改變，且牛肉因富含鐵質與必需胺基酸多的蛋白質，故已成為國人動物性食品攝取主要來源之一。民國 50 年代初，肉牛生產在臺灣地區是新興的產業，為了大力推廣，政府設立肉牛生產專業區。自民國 55 年至 59 年間，臺灣地區的肉牛雖以年平均 34% 的速度增加，然而總飼養頭數仍相當有限（江，1975）。從民國 60 年代開始，各年度的牛隻生產總數呈現下降的趨勢，這個現象與政府積極推廣農業機械化，耕耘機的數量增加有很大的關係，且於 62 年公告廢止保護耕牛辦法，可以說明臺灣牛隻的生產從役用為主逐漸轉向肉用（孫，2001）。民國 64 年之後，臺灣的牛肉市場進入了另一個階段，政府為了因應日漸高漲的國產牛肉價格以及反制由屠宰商所掌控的牛肉運銷管道，而全面開放國外冷凍牛肉進口，並隨著臺灣經濟發展，勞動價格高漲及貿易自由化，進口牛肉價格便宜，並且行政院於民國 70 年核定「養牛政策與措施方案」明訂養牛事業以乳牛為主，肉牛為輔的策略，因而衝擊國內傳統肉牛產業之生存，農民養牛意願低迷，許多肉牛飼養戶不堪虧損而離牧，使肉牛產業在臺灣成為一不推廣、不鼓勵的產業（呂，2013）。

臺灣國產牛肉供給來源有水牛、黃牛及雜種牛、荷蘭牛之淘汰母牛及闊公牛等。依據民國 104 年第 1 季畜禽統計調查結果顯示，全國內牛總飼養頭數計 33,212 頭，水牛頭數 2,172 頭，黃牛及雜種牛 12,248 頭，乳公牛



18,792 頭，肉牛主要生產縣市為屏東縣、金門縣、臺東縣、花蓮縣及澎湖縣，約占總飼養頭數之 65.64%（行政院農業委員會統計室，2015）。而依據民國 102 年農業統計年報，101 年國內牛隻屠宰頭數 30,923 頭，牛肉產量約 6,103 公噸，與進口牛肉 98,856 公噸相較，自給率僅約 5.81%（行政院農業委員會統計室，2014）（圖 1）。

根據行政院農業委員會的統計資料顯示，美國、澳洲與紐西蘭等三個國家是臺灣牛肉最主要的進口國，占所有牛肉進口重量的 90% 以上，進口價值也超過 95%。顯然進口牛肉主導國內牛肉市場，因而影響國產牛肉的生產利潤（劉等，2013）。然而，近年來世界各地所發生的食物安全之公共議題日益嚴重，如民國 92 年美國宣布第一起狂牛病，以及 100 年起由美國牛肉引發對瘦肉精（主成分為萊克多巴胺，ractopamine）之爭議等。民國 101 年起，臺灣有條件地開放含萊克多巴胺進口牛肉，臺灣民眾對於進口食物安全問題的重視，也與日俱增。因此，食品衛生管理法強制規定必須標示牛肉原料原產地，另外，農委會也積極推動「國產牛肉生產追溯制度」，並於 101 年 11 月 1 日正式啟動國產牛肉追溯資訊系統，利用雲端生產追溯系統將肉牛產業鏈之生產過程資訊化及透明化，不僅能促進產業升級，消費者亦能藉此系統清楚辨識而選用國產牛肉（李，2014）（圖 2）。

為了讓消費者能夠食用到安全衛生國產牛肉，目前政府除了加強肉牛屠宰之衛生檢查與肉品衛生安全檢驗外，業者亦需配合產銷履歷驗證制度。農委會已於民國 96 年訂定牛肉之臺灣良好農業規範（Taiwan good agriculture practice, TGAP），並自 98 年推動牛肉產銷履歷驗證，牛肉產銷履歷驗證體



系可分為肉牛生產端、屠宰端與牛肉分切端，由相關業者向中央畜產會分別申請驗證，99 年起已陸續有合法合格之生產、屠宰及分切場通過驗證。農委會透過建立國產牛肉生產履歷制度及生產追溯系統，提供民眾對飲食安全之資訊需求，增進民眾消費國產牛肉信心，穩定肉牛產業經營業者的收益，提高國產牛肉的競爭力。

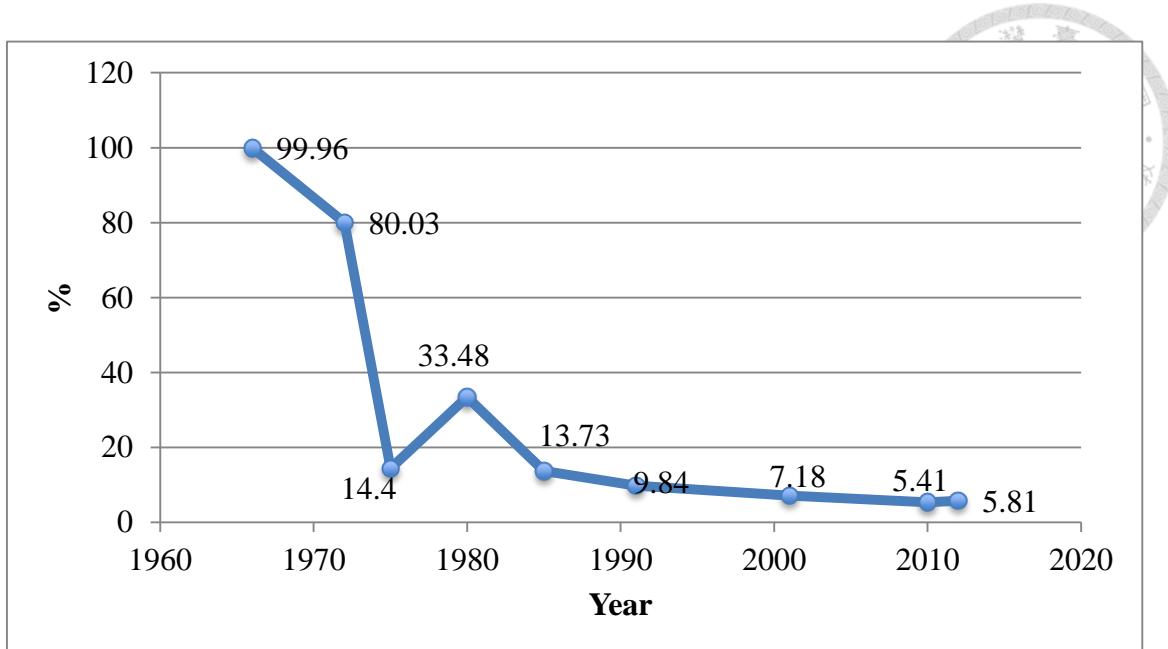


圖 1 1966 至 2012 年臺灣國產牛肉自給率。

Figure 1 Domestic beef self-sufficiency ratio from 1966 to 2012 in Taiwan.

(行政院農業委員會統計室，2014)



圖 2 臺灣國產牛肉生產追溯作業流程。

Figure 2 The operation procedure of domestic beef traceability in Taiwan. (李, 2014)



## 二、臺灣本地牛隻品種介紹

臺灣本地所生產的牛肉其主要品種來源有荷蘭牛之淘汰母牛、閹公牛、臺灣水牛、臺灣黃牛及雜種牛，以下就這三個品種牛隻進行介紹。

### (一) 荷蘭牛 (Holstein-Friesian)

荷蘭牛起源於荷蘭，現在已遍及於世界各國，為目前最主要之乳用牛隻品種。臺灣於 1896 年日治時期時，自日本首次引進荷蘭牛於臺北近郊，開啟臺灣乳牛的畜養事業。二次世界大戰之後，臺灣乳業又隨著日本人的撤退幾乎消失，直至光復後，民間又開始陸續引進荷蘭牛（李等，2006）。

臺灣飼養之荷蘭牛毛色絕大部分為黑白花，黑白相間分明，鼻鏡寬闊，皮薄脂肪少，被毛短而光亮，尾長而細。健康仔牛初生重可達 40 公斤以上，公牛與母牛成熟重分別約為 1,000 公斤與 680 公斤，優質母牛每年平均產乳量可達 10,000 公斤（張與黃，2005）。荷蘭牛為溫帶乳牛，生性喜歡涼爽天氣，然而臺灣炎熱的氣候卻對荷蘭牛的生長及產乳皆有影響。

由於荷蘭牛相較於臺灣本地其他肉牛品種，如水牛、黃牛等，飼養頭數多（行政院農業委員會統計室，2014），體型大、生長速率快，因此我國肉牛產業多配合乳牛產業，利用閹公牛、淘汰乳牛之生產為重要目標。

### (二) 臺灣水牛 (Taiwan water buffalo)

臺灣水牛為印度種之沼澤型水牛 (swamp buffalo)，民國 50 年代，畜產試驗所花蓮種畜繁殖場曾引進摩拉水牛 (murray buffalo)，係屬於河川型



水牛（river buffalo），水牛與普通牛在分類學上為不同屬，所以不能互相交配繁殖。臺灣水牛曾在 1624 年荷據時代由荷蘭人從爪哇引進，到了 1630 年左右明末清初時，為了鼓勵漢人到臺灣開墾，故引進更多的水牛來幫助農民耕作（宋，2003；李等，2006）。自此一直到五、六十年代的臺灣農村，水牛在臺灣的開拓史上，扮演著很重要的地位。

臺灣水牛皮膚為黑灰色，只有稀疏毛髮覆蓋，角向側面及水平方向生長，成年後彎曲成半圓形，並於頸、胸部有兩個白色山形標記。水牛性情溫和，較其他牛種較為晚熟，對臺灣高溫多溼的環境氣候適應力較強，具有耐粗飼、抗病力強的性能（黃等，2007）。臺灣水牛之飼養管理與經營模式，母牛群以全年實行放牧為主，種公牛平時圈飼，僅於繁殖配種季節（9-11 月）混入種母牛群，一起放牧進行配種，經實行季節性配種產仔率可達 83% 以上（黃，1998）。

民國 45 年臺灣有 32.9 萬頭水牛，為水牛飼養頭數的最高峰，但在民國 54 年以後，因環境變遷、產業結構改變，農耕機械取代了大部分役用耕牛，再加上國外冷凍牛肉大量進口，且水牛的繁殖育成緩慢，使養牛事業幾乎無利可圖，造成臺灣水牛頭數日漸減少，依據民國 104 年第 1 季畜禽統計調查結果顯示，水牛頭數已不到 3,000 頭。自民國 75 年開始，於畜產試驗所花蓮種畜繁殖場設立「臺灣水牛培育中心」，建立臺灣水牛保種族群，協助臺灣水牛的保種與推廣工作。黃等人（2007）研究水牛肉用化的可行性，發現如果應用現代化飼養，提供適當營養日糧，水牛在二歲齡以下生長至上市體重（450-500 公斤），所生產的牛肉是細緻、多汁、

嗜口性佳的優質牛肉，可為臺灣水牛開闢另一利用途徑。



### (三) 臺灣黃牛 (Taiwan yellow cattle)

一般人所稱謂的黃牛係指我國的赤牛，根據常等人（1990）的定義為「中國固有的、曾經長期以役用為主的黃牛群體的總稱」，而所謂的黃牛群體意指在中國及其沿海島嶼的各地方品種黃牛，其中亦包括臺灣。依據體型、特徵及地緣關係，臺灣黃牛在分類上是屬於中國黃牛之南方黃牛類型。而黃牛存在於臺灣的歷史來源，早在西元六世紀時的隋、唐時代即可能從中國大陸及沿海移入，1624 年荷據時期，荷蘭人自澎湖引進臺灣黃牛，積極開墾臺灣西南部，而在日治時期，也曾引入印尼牛及印度牛的血緣以改進臺灣黃牛，但改良影響有限，因此臺灣黃牛形成具有獨特遺傳背景的本土品種。由上述可知，臺灣黃牛品種的形成至少歷經近四百年（李，2008）。

臺灣黃牛（圖 3）的體型小，被毛短而密。毛色並不只限於黃色，亦有不同深淺程度的黑、褐、紅、白色及不同的混合色，在面部、頸部、肩部、後腿、四肢前緣、肛門及外陰部一帶毛色較深。角短且大多向兩側外上方生長，尖端微彎，角呈深灰色，角尖近黑色。公牛的肩峰比母牛發達，胸部有垂皮，乳房小（李等，2006）。臺灣黃牛性成熟早，公牛發身日齡為 362 天，體重 260 公斤，女牛發身日齡為 360 天，體重 225 公斤。母牛平均胎距為 361 天，表示臺灣黃牛有良好的繁殖性能，可達到一年一胎之目的。肥育公牛平均兩歲半時屠宰，在屠體性能方面，畜產試驗所研究指出，臺灣黃牛屠體精肉率高、脂肪少、肉色鮮紅且保水性佳，富含多種揮發性香氣成分



及甘胺酸，品評方面不比外國肉牛品種差（李，2000）。

黃牛原本主要供農役耕作之用，其次為肉用，但在臺灣六十年代開始的農村機械化，使黃牛的役用價值逐漸降低；另外，自民國 53、54 年間，畜產試驗所恆春分所由美國引進聖達牛（Santa Gertrudis）並推廣至民間，將臺灣黃牛大量與聖達牛雜交改良，以改進黃牛體型及重量，普受農民歡迎，但相對地卻造成黃牛族群數量迅速減少，加上民國 63 年政府開放國外冷凍牛肉進口，臺灣黃牛因不符經濟效益而瀕臨絕種（李，2000）。民國 76 年開始將臺灣黃牛納入畜產試驗所之「建立家畜禽種源庫及種源利用」計畫，於恆春分所設立保種場，為了永久保存本土種源並維護臺灣畜產之生物多樣性，陸續從臺灣各地及金門地區蒐購黃牛種源，並逐步建立純種黃牛的繁殖育種與飼養管理體系（張，1998）。且於民國 99 年通過農委會品種登記，正式命名為「臺灣黃牛」，102 年更進一步結合產銷履歷的實施，將臺灣黃牛繁殖及生產技術，移轉並授權給民間業者，透過產銷履歷之驗證，建立具有國產品牌特色之臺灣黃牛肉專賣店。

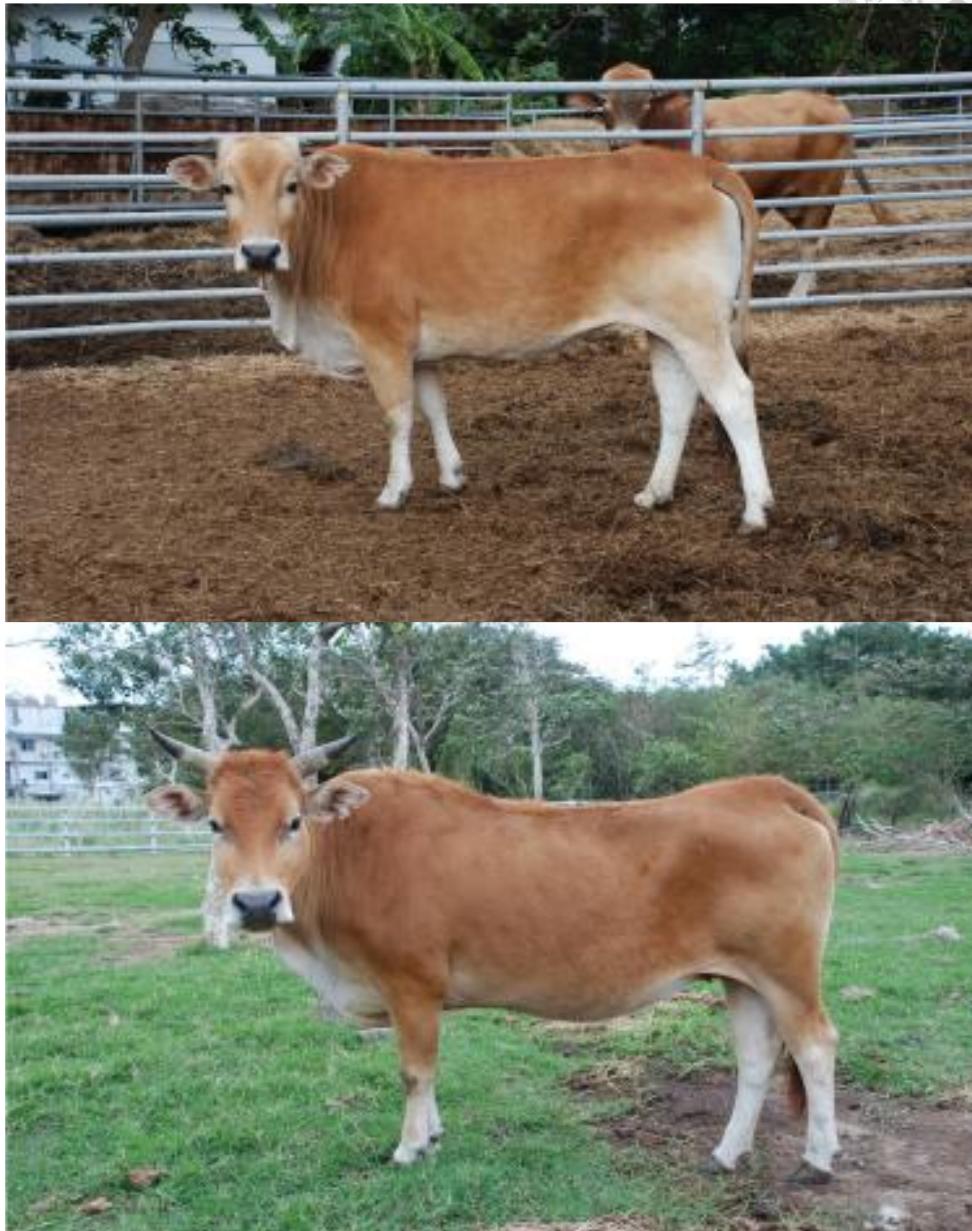


圖 3 臺灣本地主要肉牛品種之一——臺灣黃牛。

Figure 3 One of major beef cattle breeds in Taiwan — Taiwan yellow cattle.

(李光復攝)



### 三、DNA 分子標識

#### (一) DNA 分子標識種類

DNA 分子標識是遺傳標識的一種，可以根據 DNA 序列的多態性來檢測基因變異。分子標識能對不同發育時期的個體、任何組織器官甚至細胞做檢測，數量極多，遍及整個基因組，多態性高，遺傳穩定，不受環境及基因表達與否的限制，短時間可檢測大量樣本，相較於其他技術有較高之準確性等優點，能夠有效率的評估遺傳差異，因此被認為是偵測種源遺傳歧異與進行品種鑑定的良好工具 (Liu and Cordes, 2004)。

DNA 分子標識依照分析原理可區分為三種類型：第一類為利用限制酶切割為基礎所發展的限制片段長度多態性 (restricted fragment length polymorphism, RFLP)，由於限制酶具有專一性辨認特定 DNA 序列的能力，利用不同品種的切位不同，配合限制酶切割而產生不同的 DNA 片段大小，再利用經過設計的探針 (probe) 針對染色體上特定區域進行篩選特定 DNA 片段，最後利用膠片分離來檢測酶切片段的長度多態性；第二類為利用聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 為基礎的分子標識，如隨機增幅多態性 (random amplified polymorphism DNA, RAPD)、增幅片段長度多態性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP)，以及簡單重複序列 (simple sequence repeat, SSR)，也就是微衛星標識 (microsatellite marker)；第三類為以 DNA 序列變異為基礎的分子標識，依據 DNA 序列變異種類可分為單一核苷酸多態性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 及核苷酸的插入與缺失 (insertion/deletion, Indel)。



## (二) 微衛星標識介紹

由 1980 年代以來，出現了許多依據聚合酶鏈鎖反應為基礎方法的多種分子標識，其中微衛星 DNA 分子檢測技術為近數十年來繼形態學分析、生化免疫遺傳分析及細胞遺傳學染色體分析後之新興遺傳標識技術，根據 DNA 序列多態性之分析來進行鑑定工作，是應用於生物遺傳育種、系譜分析和個體、親子鑑定等的一項具有公信力之分子標識。

微衛星標識之 DNA 序列亦稱為簡單重複序列，是指在真核生物基因組中，存有著大量的連續重複序列。其重複的單元為二至六個核苷酸，此單元可重複十至百次，其中最常見的是雙核苷酸重複(dinucleotide repeats)，如  $(GA)_n$ 、 $(TG)_n$  等 (王等, 2011) (圖 4)。以人類的基因體為例，其 CA 雙核苷酸重複片段數量可高達五萬次，且每次出現之序列長度平均約有 30 kb。

微衛星標識因為有重複片段的特性，所以其變異程度也相對較大。變異之機制發生於以下兩種情況，第一種為 DNA 複製時的滑動配對 (slippage)：微衛星標識上之交替基因 (allele) 長度變異的產生是在重複序列複製過程中，由於 DNA 重組時的短暫分離，使得複製中的 DNA 可能有滑動的現象，產生短暫的隆起 (bulge)，造成新股的重複片段有增減的情況 (Ellegren, 2000) (圖 5)；第二種為減數分裂 (meiosis) 時的基因重組 (recombination)：減數分裂時姊妹染色體之間存在不對等的互換 (unequal crossing over)，一段染色體得到較多的重複，另一條染色體得到較少的重複，而造成大量長度不等的交替基因存在 (Sia *et al.*, 1997)。

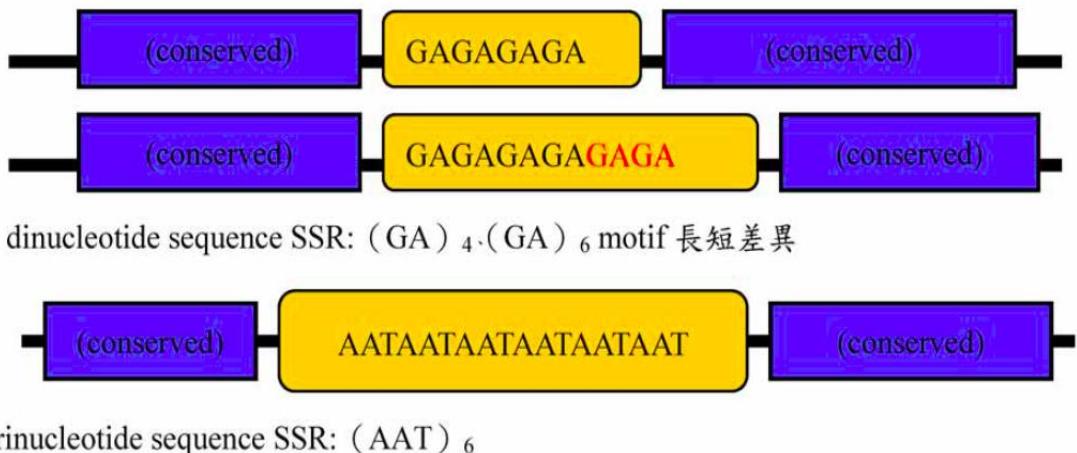


圖 4 微衛星標識特徵：重複片段之單位大小及重複次數。

Figure 4 Characteristics of microsatellite: unit size and number of units.

(王等，2011)

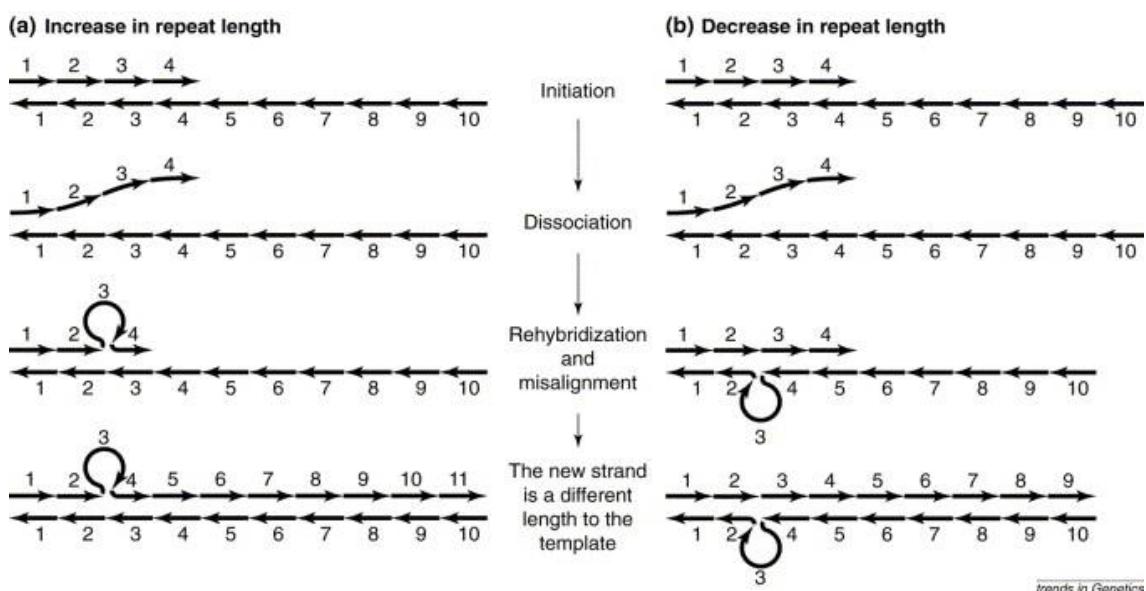


圖 5 DNA 複製之滑動造成微衛星標識的重複片段次數 (a) 增加與 (b) 減少。

Figure 5 Model of microsatellite mutation by replication slippage, cause the repeat

length (a) to increase and (b) to decrease.

(Ellegren, 2000)



### (三) 微衛星標識之特性

由於微衛星標識具有以下優點，因此適合應用於族群遺傳結構分析及親子鑑別等研究。

#### 1. 廣泛分布與豐富性 (widely distributed and abundant)

微衛星基因座廣泛分布於真核生物基因組中，不僅存在於編碼區 (coding region)，且常位於非編碼區 (noncoding region) 之內含子 (intron) 部位，不易影響蛋白質之轉譯及生物的表型，故此分子標識比較不會受到選拔 (selection) 的壓力，為一中性遺傳標識，再加上其豐富性，因此為良好的遺傳標識。此外，在親緣相近的物種，其微衛星基因座兩端的引子位置較為保守 (conserved)，所以無須重新投入基因座選殖的工作，可節省開發新微衛星標識的時間與成本 (O'Reilly and Wright, 1995)。

#### 2. 高度多態性 (high polymorphism)

在不同的生物個體中，微衛星標識的重複單位及重複次數變異非常大，因此造成微衛星 DNA 片段大小呈現高度的多態性。且單一基因座可能包含了數個交替基因，相較於其他遺傳標識，有較高的解析力 (resolution)。而此高程度變異之特性，使得微衛星標識相當適合應用於族群內個體間的研究，也能更容易偵測到物種在近代的族群結構 (Baker, 2000)。



### 3. 共顯性遺傳 (codominant)

微衛星標識遵循孟德爾遺傳定律，子代的微衛星序列之遺傳訊息同時來自父系與母系，使雜合子 (heterozygote) 或純合子 (homozygote) 可清楚被偵測到。此特性使微衛星標識可作為親子鑑定及基因交流等研究的有效工具 (Jarne and Lagoda, 1996)。

### 4. 高度再現性 (high reproducibility)

再現性指的是實驗易於重複，不同的人操作都可以得到相同的結果。且微衛星標識之檢測僅需進行 PCR，並能透過膠體電泳得到精確的片段，方法簡易且花費成本低廉 (Young *et al.*, 2000)。



#### 四、族群遺傳多態性

在自然生物界中，一個物種常常是由很多異質族群所組成，這些異質族群之遺傳結構 (genetic structure) 組成可能相類似，也可能存在著很大的差異。藉由這些異質族群的遺傳組成差異狀況，以及族群所在之環境歷史背景與現況，可進一步推斷是由何種原因所導致此遺傳差異。

族群遺傳學 (population genetics) 從 1930 年代蓬勃發展至今，是一門將孟德爾定律 (Mendel's law) 與其他遺傳原理應用於生物體所有族群的學科，主要的工作則是在檢測物種內遺傳變異 (genetic variation) 的情形以及這些異質族群內和族群間的分布狀況，也就是遺傳結構，並探討各種演化力量對於族群遺傳結構的影響，來了解物種演化的過程 (Wright, 1951)。而物種的遺傳結構除了可以反應演化的趨勢外，各族群內的遺傳組成也隱含了族群演化的潛能 (Schemske, 1984)。影響一物種遺傳結構的因素很多，除了物種本身的特性及分布狀態外，天擇 (natural selection)、基因漂變 (gene drift)、基因交流 (gene flow) 等推動族群演化的主要自然力也具有決定性的影響力。

而研究族群結構時所應用之最基本也最重要的定律，即為哈溫定律 (Hardy-Weinberg equilibrium)。哈溫定律意指一個隨機交配的大族群，若沒有外力的介入時，則世代之間其基因座頻率 (allele frequency) 與基因型頻率 (genotype frequency) 恒為定值不改變 (Wigginton *et al.*, 2005)。而此定律必須符合以下前提：

1. 逢機交配 (random mating)
2. 族群數量必須夠大 (large population size)



3. 沒有個體的遷入或遷出 (no migration)
4. 沒有突變發生 (no mutation)
5. 沒有經過選拔 (no selection)

反之，當生物族群若受到上述不同演化機制的影響而發生改變，則會偏離哈溫平衡，造成不同世代間基因座頻率或基因型頻率的改變。

在利用生物個體基因的各種分子遺傳標識進行研究時，往往會將試驗所得結果進一步來計算族群遺傳統計值，而這些數值變量 (parameters) 代表了各種不同的意義，了解變量的定義則有助於了解族群的現況。因此將各項族群遺傳統計值分述如下進行介紹。

### (一) 族群遺傳與族群結構

#### 1. 族群遺傳

族群遺傳為計算族群內的遺傳變異度，是估計族群中基因多樣性最簡單的方法，常用的統計值之定義及公式如下。

(1) 平均交替基因數 (the mean number of alleles per locus, A)：為族群內所有基因座上交替基因數之總和與基因座總數之比值。

$$A = \frac{1}{m} \left( \sum_{i=1}^m n_i \right)$$

其中  $n_i$ ：為基因座上所有交替基因的個數。

$m$ ：為所有基因座的個數。



(2) 有效交替基因數 (number of effective alleles,  $N_e$ )：用以評估基因座上交替基因分布平均的程度 (Kimura and Crow, 1964)。當各個交替基因座之基因座頻率越趨近於相同時，則有效交替基因數會越接近實際觀測到之交替基因數，通常有效交替基因數越高，基因座的多態性也會較高 (Nei, 1987)。

$$N_e = \left( \sum_{i=1}^n p_i^2 \right)^{-1}$$

其中  $p_i$ ：為基因座上各交替基因之頻率。

$n$ ：為基因座上所有交替基因之個數。

(3) 觀測異質度 (observed heterozygosity,  $H_O$ )：表示每個基因座中所含的雜合子個體在族群內之實際頻率 (Nei, 1987)。

$$H_O = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^{n-1} p_{ij}$$

其中  $p_{ij}$ ：為第  $i$  個基因座中第  $j$  個交替基因之頻率。

$n$ ：為各基因座所有交替基因個數。

(4) 期望異質度 (expected heterozygosity,  $H_E$ )：為根據哈溫定律來估計族群中異質度之期望值 (Nei, 1987)。哈溫定律係假設族群內的個體在單一基因座上有  $A$  和  $a$  兩個交替基因，而  $A$  之基因頻率為  $p$ ， $a$  之基因頻率為  $q$ ，因此族群裡有三種可能的基因型  $AA$ 、 $Aa$ 、 $aa$ 。故在哈溫平衡的狀態下，則：



$$p + q = 1, (p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

而當族群處於哈溫平衡的狀態下，則可利用交替基因頻率來推測基因型頻率。期望異質度公式如下：

$$H_E = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

其中  $p_i$ ：為基因座上各交替基因之頻率。

$n$ ：為基因座上所有交替基因之個數。

(5) 多態性訊息含量 (polymorphic information content, PIC)：表示子代所獲得交替基因來自於父親或母親的同一個交替基因之機率，是以估計基因座的多態性程度 (Bostein *et al.*, 1980)。

$$PIC = 1 - \sum_i^n p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

其中  $p_i, p_j$ ：分別為基因座上第  $i, j$  個交替基因之頻率。

$n$ ：為基因座上所有交替基因之個數。

(6) 哈溫平衡檢定 (Hardy-Weinberg equilibrium, HWE)：哈溫平衡係指在一個逢機交配的大族群中，個體之基因座頻率和基因型頻率為恆定不變。卡方檢定 (Chi-squared test) 為普遍用於檢測兩交替基因頻率是否符合哈溫平衡的方式 (Wigginton *et al.*, 2005)，但由於微衛星基因座上交替基因數目多，各個交替基因頻率分佈不均，故利用 Markov chain Monte Carlo (MCMC) 方法進行費雪精確檢定 (Fisher's exact test) (Guo and Thompson, 1992)。



## 2. 族群結構

在分析族群遺傳結構方面，可應用 Wright's *F*-statistics 中的三個固定指數 (fixation index)： $F_{IS}$ 、 $F_{IT}$  以及  $F_{ST}$ ，來評估族群內和族群間之遺傳變異情形 (Wright, 1978)。

(1)  $F_{IS}$ ：為族群內個體之間近親配種程度的指標。

$$F_{IS} = 1 - \frac{H_O}{H_E}$$

當  $F_{IS}=0$  時，表示族群是處於逢機配種的狀態；而  $F_{IS}>0$  時，表示族群可能有近親配種的情況； $F_{IS}<0$  時，則表示可能有遠親配種 (outcrossing) 的情況發生 (Wright, 1978)。

(2)  $F_{IT}$ ：為評估整個族群內分化程度的指標。

$$F_{IT} = 1 - \frac{H_O}{H_T}$$

(3)  $F_{ST}$ ：為評估族群內各次族群間分化程度的指標。

$$F_{ST} = 1 - \frac{H_E}{H_T}$$

當  $F_{ST}<0.05$  時，表示次族群間有低度分化的情形； $0.05 < F_{ST} < 0.15$  時，表示次族群間有中度分化的情形；而  $0.15 < F_{ST} < 0.25$  時，次族群間為高度分化；而當  $F_{ST} > 0.25$  時，表示次族群間遺傳分化程度非常高 (Wright, 1978)。



其中上述各評估介質所使用公式中之 I、S、T 分別代表個體 (individuals)、次族群 (subpopulations)，以及整體族群 (total populations)。 $H_O$  為族群內所有次族群之觀測異質度的平均； $H_E$  為族群內所有次族群之期望異質度的平均； $H_T$  為將所有次族群個體混合成一大族群後，再計算基因頻率所得到的整體族群期望異質度。而  $F_{IS}$ 、 $F_{IT}$ 、 $F_{ST}$  三者彼此間的關係為：

$$1 - F_{IT} = (1 - F_{ST})(1 - F_{IS})$$

## (二) 個體鑑別

欲檢測一分子標識在族群中能區別個體的效力，通常以個體鑑別率 (probability of identity,  $P_{(ID)}$ ) 來表示，其定義為族群內兩個隨機個體在單一基因座之基因型相同的機率。兩個隨機個體被鑑別出的機率越大，則兩者擁有相同基因型的機率越小。單一基因座之個體鑑別率公式如下 (Paetkau and Strobeck, 1994)：

$$P_{(ID)} = \sum_{i=1}^n p_i^4 + \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^{n-1} (2p_i p_j)^2$$

其中  $p_i, p_j$ ：分別為基因座上第  $i, j$  個交替基因之頻率。

$n$ ：為基因座上所有交替基因之個數。

如果要同時鑑別多個基因座對個體鑑定的效力時，其綜合個體鑑別率為各個基因座的個體鑑別率之乘積。一般來說，分子標識數目越多，以及族群的遺傳多態性越高，則可得到越低的個體鑑別率，而族



群大小亦會影響所需之分子標識數目，因此可以根據族群大小及綜合個體鑑別率，來判斷維持鑑別效力所需之最小分子標識數量。

而當所要鑑別的兩個個體間具有密切親緣關係時，則需使用近親個體鑑別率（probability of identity among sibs,  $P_{(ID)sib}$ ）進行計算，其公式如下（Evett and Weir, 1998）：

$$P_{(ID)sib} = 0.25 + 0.5 \sum_{i=1}^n p_i^2 + 0.5 \left( \sum_{i=1}^n p_i^2 \right)^2 - 0.25 \sum_{i=1}^n p_i^4$$

其中  $p_i$ ：為基因座上各交替基因之頻率。

$n$ ：為基因座上所有交替基因之個數。

由於個體鑑別率的期望值為符合哈溫平衡之結果，故當族群非處於哈溫平衡時，其真實個體鑑別率可能會有偏差，但實際值至多不會超過近親個體鑑別率，故通常會利用近親個體鑑別率對偏離哈溫平衡之族群的個體鑑別率來進行修正（Waits *et al.*, 2001）。

### (三) 遺傳距離 (genetic distance) 與親緣關係樹 (phylogenetic tree)

#### 1、遺傳距離計算

遺傳距離為衡量各個品種或族群之間遺傳差異大小的指標。是以演算法來計算品種或族群間多個分子標識之交替基因型，所構成之距離矩陣，稱為品種或族群間的遺傳距離。以下為 Nei (1972) 所提出之遺傳距離  $D$  公式：

$$D = -\log_e \left( \frac{J_{XY}}{\sqrt{J_X J_Y}} \right)$$



$$\text{其中 } J_X = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m X_{ij}^2 / m$$

$$J_Y = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m Y_{ij}^2 / m$$

$$J_{XY} = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m X_{ij} Y_{ij} / m$$

$J_X$ ：第 X 族群在基因座上之平均交替基因頻率。

$J_Y$ ：第 Y 族群在基因座上之平均交替基因頻率。

$J_{XY}$ ：第 X 及第 Y 族群在基因座上之平均交替基因頻率。

$X_{ij}$ 、 $Y_{ij}$ ：族群 X、Y 在第  $j$  個基因座第  $i$  個交替基因頻率。

$m$ ：所有基因座的數目。

$n$ ：基因座上所有交替基因的個數。

## 2、親緣關係樹

親緣關係樹用以表示具有共同祖先的各個物種間相互演化之關係。而親緣關係樹的建構原理為利用遺傳距離資料進行數學上的幾何圖形分析，便能將欲測樣本根據彼此間的距離值分類為相似或是不同的群集，並顯示成樹狀關係圖。而繪製親緣關係樹的方法主要分為兩種（Barry, 2007），一種為未加權算術平均對群法（unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA），另

一種則是鄰位連接法（neighbor-joining, NJ）。

未加權算術平均對群法為一種簡單的運算方法，其先將各樣本之序列兩兩比對，並以最短遺傳距離找出兩分類群與各分支（branch）和分支節點（node）的距離，再將兩分類群變成一個群集（cluster），



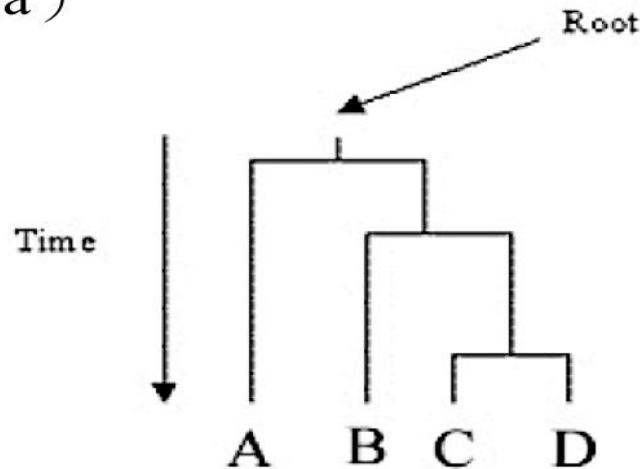
計算各群集間的距離，最後繪製成樹狀圖。此法建構出來的為等距分化（ultrametric）之有根（rooted）樹狀圖（圖 6a），但並非所有樣本之間的演化距離都相等（Barry, 2007），故近年來較少用於建構演化樹。

鄰位連接法是由 Saitou and Nei (1987) 所提出，該方法通過確定遺傳距離最近或相鄰的成對分類單位，使所得到之親緣關係樹的總距離達到最小，相鄰是指兩個分類單位在一無根（unrooted）樹狀圖（圖 6b）中僅透過一個節點相連。相較於未加權算術平均對群法，鄰位連接法可比較不同樣本或不同群集間的遺傳距離，故為目前建構演化樹最常使用的方法。

在繪製出親緣關係樹不同物種群集之間的相關性後，便可利用再取樣值（bootstrap value）來評估群集之間演化的可信度，其值代表所建構出的親緣關係樹具有多少百分比的穩定度，而百分比越大代表這一分支節點越可靠（Felsenstein, 1985）。



( a )



( b )

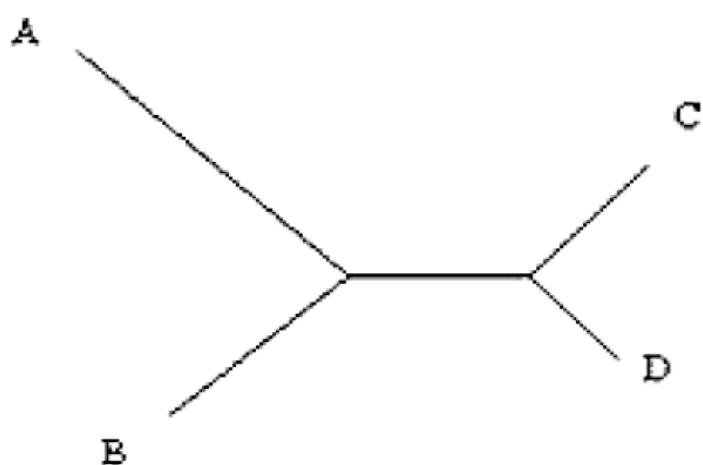


圖 6 (a) 未加權算術平均對群法 (UPGMA) 所建構出有根樹及 (b) 鄰位連接法 (NJ) 所繪製出無根樹。

Figure 6 (a) unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) rooted tree  
and (b) neighbor-joining (NJ) unrooted tree. (Higgs, 2001)



## 五、微衛星標識在牛隻之研究

微衛星標識具有數量多、分布廣、多態性豐富及檢測快速等優點，故目前被廣泛應用於動、植物之遺傳多樣性評估、個體與親緣鑑定、族群結構分析與育種選拔等，也因此微衛星標識成為建構完整遺傳連鎖圖譜（genetic linkage map）時的首選標識。而牛隻最早的微衛星標識之遺傳連鎖圖譜是由 Barendse 等人（1994）所建構，接著亦有學者發表第二代牛隻遺傳連鎖圖譜，是由 1236 組分子標識所組成，圖譜總長為 2990 cM，而標識間平均距離為 2.5 cM，透過建構圖譜對牛隻基因定位奠定了基礎（Kappes *et al.*, 1997）。

另外在遺傳分析方面，聯合國糧農組織（Food and Agriculture Organization, FAO）推薦共 30 組微衛星標識對牛隻族群進行遺傳多樣性的研究（FAO/ISAG, 1993），並於 2004 年更新（FAO/ISAG, 2004）。而後，國際動物遺傳協會（International Society for Animal Genetics, ISAG）推薦共 12 組微衛星標識作為鑑定牛隻親緣關係之最小數目基因座（ISAG Conference, 2008）。

有學者利用 6 組多引子系統（multiplex system）共 22 組微衛星標識，針對美國地區 1,022 隻荷蘭牛，紅安格斯（Red Angus）、西門塔（Simmental）、南德溫（South Devon）、德國黃牛（Gelbvieh）與塞勒斯（Salers）等五個品種，共 311 頭肉牛進行親緣關係之鑑定。結果顯示，此 22 組微衛星標識其 PIC 的平均值為 0.59，並在未知其中一親屬基因型的情況下，綜合第 1 到 3 組多引子系統的 11 個微衛星標識在此六個品種的親子排除率（Exclusion probability, PE）值為 95 至 98%，而結合 1 到 6 組多引子系統的效力則能



在所有品種皆達到超過 99% 的親子排除率，表示此 22 組微衛星標識足以應用於親子鑑別，且具有高度可信度 (Heyen *et al.*, 1997)。

而 Peelman 等人 (1998) 則是使用 7 組多引子系統共 23 組微衛星標識，針對比利時的 4 個品種牛隻：荷蘭牛、比利時藍牛 (Belgian Blue)、比利時紅牛 (Belgian Red Pied) 及東弗蘭德斯 (East Flemish)，共 50 頭進行遺傳多樣性檢測。結果顯示，各個基因座分別在四個品種牛隻中之  $N_e$  範圍為 1.38 至 8.46， $H_o$  範圍為 0.65 至 0.71，PIC 範圍為 0.25 至 0.86。而將此四個品種兩兩組合，從兩個不同品種中隨機選取兩個個體，其綜合  $P_{(ID)}$  範圍在  $1.001 \times 10^{-24}$  和  $2.892 \times 10^{-23}$  之間。該團隊認為此 23 組微衛星標識檢測於這 4 個品種牛隻的個體鑑別效力具有良好的可信度，且為足夠運用的。

另有學者為了評估印度當地品種牛隻的遺傳分化情形以及建立親緣關係資訊，以 20 組微衛星標識針對 3 個位於印度當地的肩峰牛品種：沙希華牛 (Sahiwal)、哈里亞那牛 (Hariana) 以及迪歐尼牛 (Deoni)，共 136 頭牛隻進行檢測。結果顯示，所有微衛星標識在此三個品種的平均交替基因數範圍為 5.2 至 6.5， $H_o$  範圍為 0.42 至 0.59，PIC 範圍為 0.55 至 0.65，且以沙希華牛之遺傳多樣性程度最低，推測是由於其族群數量相較於另外兩個品種牛隻較為少。 $F_{ST}$  為 0.113，表示品種間呈現中度的遺傳分化情形，而  $F_{IS}$  為 0.242，此三個品種牛隻可能多有近親配種或是經過選拔。另從親緣關係樹繪製結果可以得知，哈里亞那牛及迪歐尼牛兩族群間之遺傳距離較近 (Mukesh *et al.*, 2004)。

Zhang 等人 (2007a) 同樣為了分析牛隻遺傳多樣性及族群結構，使用 30



組微衛星標識分析於中國 27 個當地品種黃牛共 1,638 頭，以及 3 個外國品種牛隻共 179 頭。而此 30 組微衛星標識在中國品種黃牛與外國品種牛隻的平均交替基因數分別為 9.093 和 6.885， $F_{ST}$  為 0.092，表示品種間呈現中度的遺傳分化現象。利用 UPGMA 法計算遺傳距離對此 30 個品種牛隻繪製親緣關係樹，結果顯示可將外國品種與中國品種區分，且中國品種黃牛又可區分為兩個群集，其一為 5 個無肩峰品種 (humpless breed) 牛隻，另一群集為 22 個肩峰品種 (humped breed) 牛隻。進一步對 27 個中國品種黃牛進行族群結構分析，結果指出在中國可能有五個獨立歸化的黃牛群集，其中四個為印度牛 (*Bos indicus*) 血緣牛隻，分別主要分布中國長江流域、珠江流域、黃河流域和淮河流域地區。另一群集則為歐洲牛 (*Bos taurus*) 血緣之蒙古牛系，主要分布於中國東北平原、西北牧區、蒙古高原及長城北部。

在中國眾多黃牛品種當中，秦川牛 (Qinchuan) 被列為五大優良黃牛品種之首，但在對秦川牛進行選育的同時，也不斷引進外國品種與其雜交改良，導致秦川牛面臨滅絕的威脅。在中國有學者想要了解秦川牛之族群遺傳多態性及遺傳結構，使用 12 組微衛星標識，研究來自中國陝西省兩個秦川牛保種場的純種秦川牛共 90 頭。結果顯示，此 12 個微衛星標識共檢測到 247 個交替基因，平均每個基因座之交替基因數為 21 個， $N_e$  為 11.9，所有微衛星標識的  $H_0$  範圍介在 0.78 至 0.98 之間，PIC 範圍為 0.77 至 0.94 之間，平均 PIC 為 0.90，每個微衛星標識皆屬於高度多態性，表示所檢測之秦川牛族群在各基因座具有豐富的遺傳多樣性，另外此 12 個微衛星標識的平均固定指數 (fixation index,  $F$ ) 為 -0.0076，代表族群內實際雜合子個體比預



期多，即偏離哈溫平衡的程度不大 (Sun *et al.*, 2007)。

綜合上述文獻，利用微衛星標識可以提供品種內與品種間之遺傳組成資訊，並能加以探討其歷史、地理起源及環境情況。上述研究牛隻族群遺傳多樣性及親子鑑別所使用的微衛星標識列於表 1。



表 1 利用微衛星標識探討牛隻遺傳歧異度與個體鑑別之研究

Table 1 Studies on genetic diversity, individual and parentage identifyon with microsatellite markers for cattle

Microsatellite marker	Breed	Reference
Multiplex 1: TGLA57, MGTG4B, AGLA293, TGLA73	Holstein-Friesian, Red Angus, Simmental,	Heyen <i>et al.</i> ( 1997 )
Multiplex 2: TGLA227, TGLA126, TGLA122	South Devon, Gelbvieh, Salers	
Multiplex 3: TGLA263, TGLA48, TGLA53, MGTG7		
Multiplex 4: URB060, URB002, URB031, URB036		
Multiplex 5: URB038, URB042, URB024		
Multiplex 6: URB014, URB037, URB048, URB059		
Multiplex 1: CSSM014, CSSM016, CSSM022	Holstein-Friesian, Belgian Blue,	Peelman <i>et al.</i> ( 1998 )
Multiplex 2: ETH3, ETH10, ETH225	Belgian Red Pied, East Flemish	
Multiplex 3: BM1818, BM1824, BM2113		
Multiplex 4: TGLA122, TGLA126, TGLA227		
Multiplex 5: MGTG7, TGLA48, TGLA53, TGLA263		
Multiplex 6: SPS113, SPS115, CSSM036		
Multiplex 7: MGTG4B, TGLA57, TGLA73, AGLA293		

表 1 利用微衛星標識探討牛隻遺傳歧異度與個體鑑別之研究（續）

Table 1 Studies on genetic diversity, individual and parentage identifyon with microsatellite markers for cattle (Continued)



Microsatellite marker	Breed	Reference
BM1818, ETH3, ETH10, ETH225, HEL5, HEL9, ILSTS002, ILSTS005, ILSTS006, ILSTS011, ILSTS030, ILST033, ILST034, ILST054, INRA005, INRA035, INRA063, MM8, CSSM66, HAUT24	Sahiwal, Haryana, Deoni	Mukesh <i>et al.</i> (2004)
BM1818, ETH185, HEL13, ILSTS034, ILSTS054, INRA005, INRA023, INRA032, MM12, TGLA227, BM1824, BM2113, HEL5, SPS115, TGLA122, TGLA126, TGLA53, CSSM66, ILSTS006, ETH225, ILSTS011, HAUT24, INRA063, ETH10, HEL9, ETH152, ETH3, ILSTS005, INRA035	Yanbian, Zaobei, Enshi, Xiangxi, Wenling Humped, Wannan, Dabieshan, Guangfeng, Minnan, Guanling, Longlin, Hainan, Nanyang, Jiaxian Red, Qinchuan, Bohai Black, Luxi, Fuzhou, Menggu, Hazake, Yunnan Humped, Pinglu Mountainous, Xuanhan, Sanjiang, Ebian Spotted, Tibetan, Jinnan, Simmental, Charolais, Germany Yellow	Zhang <i>et al.</i> (2007a)
BM1824, BM2113, CSSM66, ETH152, HEL1, HEL13, HEL5, HEL9, INRA005, TGLA126, TGLA227, BM315	Qinchuan	Sun <i>et al.</i> (2007)



## 六、牛隻生長性狀相關候選基因之研究

### (一) 生肌因子 5 基因之研究

#### 1. 生肌因子 5 基因之介紹

生肌因子 5 (Myogenic factor 5, MYF5) 是屬於肌肉調控因子 (myogenic regulatory factors, MRFs) 基因家族成員之一，其他成員還包含生肌分化因子 (Myogenic differentiation 1, MyoD)、肌細胞生成素 (Myogenin, MyoG) 以及生肌因子 6 (Myogenic factor 6, MYF6 or MRF4)，而在肌肉生成 (myogenesis) 過程中，骨骼肌纖維的增生與分化主要是由這些因子所調控 (Weintraub *et al.*, 1991)。

肌肉調控因子皆具有 basic helix-loop-helix (bHLH) 結構，並且會與基因上游啟動子區域的 E-box (CANNTG) 以氫鍵結合，進而使肌肉調控因子來調控肌肉特異性基因的表現 (Blackwell and Weintraub, 1990)。Davis 等人 (1987) 最早發現 *MyoD* 基因，之後陸續發現其他三種肌肉調控因子，並在不同物種之肌肉生成過程中各有其表現時間及模式：在哺乳類動物的胚胎生成過程中，*MYF5* 為 MRFs 中最早被誘發表現的基因，*MYF5* 與 *MyoD* 蛋白可以將纖維母細胞 (fibroblast) 特化為肌纖維母細胞 (myoblast)，在肌纖維母細胞增生的階段是由 *MYF5* 與 *MyoD* 一同調控，*MYF5* 可替代 *MyoD* 的功能，而 *MYF5* 的表現會受到 *MyoD* 抑制；*MyoG* 與 *MYF6* 則使單核的肌肉母細胞融合並伸長成為多核的肌管 (Perry and Rudnick, 2000) (圖 7)。

在小鼠之肌肉調控因子基因剔除 (gene knock-out) 實驗結果顯示，*MYF5* mRNA 表現量會於剔除 *MyoD* 時提高一倍，此時骨骼肌仍正常發

育，但有遲緩生成的現象 (Rudnicki *et al.*, 1992)，而在 *MYF5* 被剔除時，*MyoD*、*MyoG* 及 *MYF6* mRNA 表現量正常，骨骼肌發育亦正常，但同樣有發育遲緩的情況，並且肋骨的生長有嚴重缺陷，造成小鼠在出生後因無法呼吸而死亡 (Braun *et al.*, 1992)，在 *MyoD* 與 *MYF5* 雙基因剔除小鼠實驗中，則是完全沒有骨骼肌的生成 (Rudnicki *et al.*, 1993)。

在牛隻基因組中，*MYF5* 基因位於第 5 號染色體上，覆蓋區間為 0 至 30 cM，是由三個外顯子 (exon) 及兩個內含子 (intron) 所組成，並由第一外顯子編碼 bHLH 結構 (Li *et al.*, 2002)。

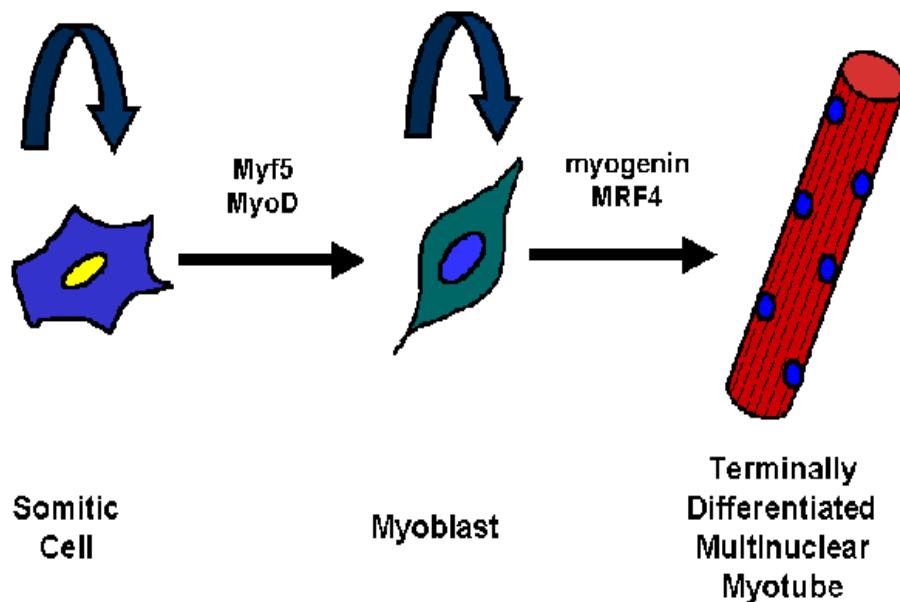


圖 7 肌肉調控因子之功能與肌肉生成過程的關係。

Figure 7 Functional and genetic relationships of the MRFs in myogenesis.

(Perry and Rudnick, 2000)



## 2. 生肌因子 5 基因與牛隻生長與屠體性狀關係之研究

牛隻生長性狀與牛肉產肉量及肉質會受到環境與遺傳因素的影響，遺傳因素可追溯到動物出生前肌肉組織的形成，以及出生後骨骼肌纖維的增生與肥大生長，而這些過程主要是由肌肉調控因子基因家族所控制。Li 等人(2002)發現 *MYF5* 基因於數量性狀基因座 (quantitative trait loci, QTL) 之定位與動物的生長、屠體及肉質性狀有關。故目前已有研究將 *MYF5* 基因作為與牛隻生長及屠體性狀相關的候選基因 (candidate gene)。

有學者在進行波蘭當地荷蘭牛 *MYF5* 基因與屠體性狀相關研究中，發現在 *MYF5* 基因啟動子區域檢測到 g.-723G>T 之 SNP。研究結果並發現 *MYF5* 基因 g.-723G>T 的 SNP 會影響牛隻背最長肌中 *MYF5* 基因的 mRNA 表現量，並且與牛腰脊肉 (sirloin) 瘦肉重及脂肪重有顯著相關 ( $P \leq 0.05$ )，帶有 GG 基因型的牛隻有較高的產肉量 (Robakowska-Hyzorek *et al.*, 2010)。

Seong 等人 (2011) 檢測韓國當地品種牛隻：韓牛 (Hanwoo) 族群 *MYF5* 基因的多態性，並探討與生長和屠體性狀的關係，以作為選拔育種的指標。結果在 *MYF5* 基因第二內含子區域發現有 A1948G 的 SNP，並進一步在相關性分析中發現，帶有 AA 基因型的牛隻有顯著較高的六月齡體重，而帶有 AG 基因型的牛隻則有顯著較大的背脂厚度 ( $P < 0.05$ )。

另 Ujan 等人 (2011) 在郊縣紅牛 (Jiaxian red)、魯西 (Luxi)、南



陽 (Nanyang) 及秦川牛等中國當地四個黃牛品種牛隻發現 *MYF5* 基因第二外顯子區域上有 A1553C 的 SNP 突變，牛隻具有 MM 和 MN 兩種基因型，並將此位點之多態性與牛隻的肉質性狀進行相關性分析。統計分析結果顯示，*MYF5* 基因第二外顯子上 A1553C 的 SNP 與牛隻 18 月齡體重、腰眼肉 (loin eye) 長度、腰眼面積以及保水性 (water holding capacity) 有顯著相關 ( $P < 0.05$ )，帶有 MM 基因型的牛隻在上述性狀具有較好的性狀表現。

綜合上述的試驗研究結果可知，牛隻 *MYF5* 基因的多態性對於牛隻肌肉發育、產肉及屠體性狀的調控具有一定的影響，或許未來在牛隻生長及屠體性狀選拔育種可作為遺傳選拔標識。

## (二) 含 BED 型鋅指蛋白 6 基因之研究

含 BED 型鋅指蛋白 6 (Zinc finger, BED-type containing 6, ZBED6) 為一 DNA 轉位子 (transposon)，存在於胎盤哺乳類動物中，位於 *ZC3H11A* 基因第一內含子上。*ZBED6* 具有一個外顯子，涵蓋超過 900 個密碼子，以及兩個與 DNA 結合的 BED 結構域。此外，*ZBED6* 基因是胎盤哺乳類動物獨有的，且為高度保守。*ZBED6* 基因可編碼為一轉錄因子，且在動物骨骼肌生成與發育過程中，作為 *IGF2* 轉錄時的抑制子 (repressor) (Markljung *et al.*, 2009)。

Markljung 等人 (2009) 將小鼠成肌細胞中的 *ZBED6* 基因進行基因靜默 (gene silencing) 試驗，證實 *ZBED6* 會透過與 *IGF2* 基因第三內含子中的 SNP 位點結合，來抑制 *IGF2* 基因的表達。當 *ZBED6* 基因靜默後，*IGF2* 的



表現量升高，使細胞增殖以及肌管形成的速度加快。在 Huang 等人 (2014b) 於牛隻的基因表現試驗亦有相同的結果，並指出 *ZBED6* 基因在肌纖維的增殖扮演重要的角色。

Huang 等人 (2013a) 發現在牛隻 *ZBED6* 基因中有三個 SNP 位點：*-826G>A*、*680C>G* 與 *1043A>G*，檢測於南陽牛族群中皆具有多態性，並且進行牛隻生長性狀相關性分析後，顯示此三個位點皆會顯著影響牛隻的生長體重 ( $P < 0.05$ )。而相同研究團隊亦發現 *ZBED6* 基因之多態性於秦川牛族群的生長性狀具有顯著影響 ( $P < 0.05$ ) (Huang *et al.*, 2014a)。

綜合上述研究結果可以說明在哺乳動物中，*ZBED6* 是一個重要的轉錄因子，影響發育、細胞增殖和生長。

### (三) 固醇調節元件結合蛋白 1c 基因之研究

動物脂肪代謝受許多因素影響，固醇調節元件結合蛋白家族 (sterol regulatory element-binding proteins, SREBPs) 是重要的轉錄因子，具有 basic helix-loop-helix-leucine zipper (bHLH-Zip) 結構，並且會與目標基因上游啟動子區域的 E-box (CANNTG) 及固醇調節元件 (sterol regulatory elements, SREs) 結合，激活目標基因之轉錄，調控膽固醇的合成，在脂肪酸合成中發揮重要的調節作用 (Eberlé *et al.*, 2004)。

固醇調節元件結合蛋白家族由於 mRNA 的剪接方式不同，而產生功能相同但是結構不同的三種同工型：*SREBP1a*、*SREBP1c* 與 *SREBP2*，*SREBP1* 基因編碼 *SREBP1a* 和 *SREBP1c*，*SREBP1a* 與 *SREBP1c* 由於第一外顯子的不同，因而導致各自的啟動子不同故產生不同的轉錄起始位點，*SREBP2* 則由獨

立的 *SREBP2* 基因編碼而成 (Hannes *et al.*, 2002)。在功能上，*SREBP1a* 的作用主要是優先促進脂肪酸的大量合成，其次才是膽固醇，*SREBP1c* 則是在三酸甘油酯和磷酯形成中起關鍵作用，而 *SREBP2* 主要是促進膽固醇的合成。

在牛隻基因組中，*SREBP1c* 基因位於第 19 號染色體上，其基因全長為 17,482 bp，共有 21 個外顯子。先前已有許多文獻指出 *SREBP1c* 基因於數量性狀基因座之定位會影響乳汁中的脂肪含量、背脂厚度與其他相關屠體性狀 (Taylor *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2004)，而近年來，已有研究發現 *SREBP1c* 基因之多態性亦與牛隻的生長性狀有顯著相關，例如 Huang 等人 (2011b) 研究牛隻 *SREBP1c* 基因第七內含子區域 84 bp 缺失之基因多態性及對中國地區南陽牛生長性狀的影響，在該突變位點檢測到 WW 及 WD 兩種基因型，在生長性狀相關性分析結果顯示，基因型為 WD 的個體相較於 WW 型有顯著較高的出生重、6、12、18 及 24 月齡體重以及平均日增重。Huang 等人 (2011a) 亦發現在牛隻 *SREBP1c* 基因中另有四個 SNP 位點：9807G>A、10781C>G、10914G>A 及 12020C>T，檢測於南陽牛族群進行牛隻生長性狀相關性分析後，顯示 9807G>A、10781C>G 及 10914G>A 此三個位點皆會顯著影響牛隻不同階段的生長體重 ( $P < 0.05$ )。

*SREBP1c* 作為重要的轉錄因子，不但在膽固醇和脂肪酸的合成代謝中發揮重要的調控作用，亦會進一步影響動物之生長與屠體性狀，對此基因在牛隻生長的影響進行深入的研究將為牛隻的選拔育種提供良好的參考依據。



## 七、牛短脊椎綜合症之研究

短脊椎綜合症（brachyspina syndrome, BS）為一種發生在荷蘭牛的隱性遺傳疾病，帶有純合子隱性基因之個體會導致胚胎畸形甚至死亡或死產，在懷孕期過長後出生的小牛，會出現體重過輕，身形和頸部過短，肩胛骨之間突出，和畸形下顎等症狀。此疾病最早被發現於 2006 年的丹麥（Agerholm *et al.*, 2006），而於 2012 年透過次世代定序（next generation sequencing, NGS）成功發現此症狀之形成原因，為在牛隻第 21 號染色體上 Fanconi anaemia complementation group 1 (*FANCI*) 基因有 3.3 kb 片段的缺失，此缺失片段涵蓋 *FANCI* 基因共 37 個外顯子中的第 25 至 27 外顯子區域，並導致移碼突變（frameshift mutation）（Charlier *et al.*, 2012）。目前在各國提出的病例報告中，此症狀之雜合子個體發生頻率在美國為 6%（VanRaden *et al.*, 2011）、荷蘭為 7.4%（Charlier *et al.*, 2012），在中國為 2.2~4.9%（Fang *et al.*, 2013），此遺傳疾病會導致酪農嚴重的經濟損失。



## 八、試驗目的

近年來國人對於外國進口牛肉之安全性時常抱有疑慮，故為提高國產牛肉的競爭力，政府正積極培育及推廣國內高優質肉牛飼養專戶，並嚴格監督國產牛肉生產過程，為國人的食肉健康把關，以及協助發展產銷履歷牛肉驗證制度，建立國產優質牛肉品牌。臺灣黃牛可說是在地化特色牛肉之代表，其膽固醇比一般牛肉低、牛肉香氣更濃郁，但因黃牛體型小，隨著國外大型牛種以及農機引進，不符經濟效益的黃牛逐漸被淘汰，或是與國外品種雜交，純種臺灣黃牛數量已逐漸減少，造成市面上業者號稱的臺灣黃牛肉，其實是混雜了臺灣黃牛和外國品種的黃雜牛，故有必要對臺灣黃牛族群進行保種以維護其種源多樣性。

因此，本研究蒐集來自臺灣本島與金門地區的臺灣黃牛、雜交黃牛，以及臺灣地區的荷蘭牛與臺灣水牛等族群，以了解各品種牛隻之間的遺傳歧異度，並探討族群間與族群內的變異及分化程度，建立族群結構及個體鑑別資訊，接著進一步研究與牛隻生長性狀相關的三個候選基因，進行相關性分析，作為未來臺灣黃牛選拔育種參考的根據。

另外，為了解牛短脊椎綜合症在臺灣荷蘭牛族群發生的頻率現況，及檢測此隱性疾病是否發生於臺灣黃牛與水牛族群，以所蒐集之荷蘭牛、臺灣黃牛及水牛樣本進行基因型頻率的分析。



## 參、材料與方法

### 試驗一：牛隻新微衛星標識之開發與應用

#### 一、新微衛星標識之開發

本試驗參考 Gleen and Schable (2005) 之方法，並調整豐富化所使用之重複序列探針，以選擇性雜合法進行臺灣牛隻新微衛星標識之開發。

##### (一) 試驗動物

試驗動物選擇之考量，是希望日後應用在臺灣黃牛與其他不同品種牛隻都具有多態性，故挑選雜交黃牛一公一母共兩頭個體，其中公牛的遺傳背景組成包含夏洛利 (Charolais)、布拉曼 (Brahman)、利木贊 (Limousin) 及臺灣黃牛；而母牛的遺傳背景組成包含夏洛利、布拉曼、德國黃牛 (Gelbvieh) 及臺灣黃牛。試驗當中採集牛隻血樣並萃取其 DNA 樣本 (GenePure Tech. Co., LTD., Taiwan)，測定其濃度和品質後保存於 -20°C 冰箱備用，所有步驟依照套組說明進行 (GenePure Tech. Co., LTD., Taiwan) (圖 8)。

##### (二) 微衛星標識篩選

###### 1. 限制酵素酶切

取前述兩牛隻個體的 gDNA (100 ng/ $\mu$ L) 各 20  $\mu$ L，利用 *Rsa* I (catalog #R0167S, NEB) 與 *Xmn* I (catalog #R0194S, NEB) 限制酵素進行酶切，反應總體積為 25  $\mu$ L，包含 2.5  $\mu$ L NEB 10 X ligase buffer、0.25  $\mu$ L 100 X BSA、0.25  $\mu$ L 5 M NaCl、以及 *Xmn* I 與 *Rsa* I 各 1  $\mu$ L，置於

37°C 水浴槽反應 40 分鐘。酶切後以 1% 琼脂糖凝膠電泳確認產物是否出現在介於 300 bp 至 1000 bp 之間最適 DNA 片段長度帶狀區域。



## 2. 連接 DNA 片段與連接子

取等體積 SuperSNX24 Forward ( 5'GTTTAAGGCCTAGCTAGC AGAAC3' ) 與 SuperSNX24+4P Reverse ( 5'pGATTCTGCTAGCTAG GCCTTAAACAAAA3' ) 引子，並加入 NaCl 至最終濃度為 100 mM，加熱至 95°C 後慢慢冷卻至室溫以形成雙股連接子( ds SuperSNX linkers )。接著製備接合反應溶液，包含 ds SuperSNX linker 5 μM、10 X ligase buffer、800 units T4 DNA ligase(catalog #M0202S, NEB)，反應總體積為 10 μL。

將先前酶切產物(約 21 μL)加入 10 μL 的接合反應溶液中，置於 16 °C 隔夜反應，並以 SuperSNX24 Forward 做為引子進行 PCR 反應確認接合反應是否成功。反應總體積為 25 μL，包括 1 X PCR buffer、25 μg/mL BSA、0.5 μM SuperSNX24 Forward、150 μM dNTP、2.0 mM MgCl<sub>2</sub>、1 U Taq DNA polymerase ( TAKARA Co., Japan ) 及接合反應產物 2 μL。利用 Veriti® 96-well Thermal Cycler ( ABI PRISM, USA ) 進行 PCR 反應，反應溫度條件為 95°C 變性 2 分鐘;95°C 變性 20 秒、60°C 鏈合 20 秒、72°C 延伸 1.5 分鐘，循環 20 次，最後冷卻至 15°C。反應完畢後，以 1% 琼脂糖膠體進行電泳，檢測 PCR 產物是否成功增幅。



### 3. 豐富化微衛星片段

豐富化是利用標定生物素之重複序列探針 (biotinylated-oligos) 與基因庫中 DNA 片段雜合，再利用含有卵白素 (streptavidin) 的磁珠與之結合，因卵白素與生物素具有親和性，便可利用磁力分離出含重複序列的片段。本研究根據 Glenn and Schable (2005) 所推薦之重複序列種類設計探針，依據相似鏈合溫度調整成三種組合，各含四種探針，分別為：

探針組合一：(TG)<sub>12</sub>、(ACT)<sub>12</sub>、(ACAG)<sub>6</sub>、(ACTG)<sub>6</sub>。

探針組合二：(AG)<sub>12</sub>、(AACT)<sub>8</sub>、(ACAT)<sub>8</sub>、(AAGT)<sub>8</sub>。

探針組合三：(AAG)<sub>8</sub>、(AATC)<sub>6</sub>、(AAC)<sub>6</sub>、(AGAT)<sub>6</sub>。

取 10 μL 先前接合之 gDNA 片段，加入反應溶液使總體積變成 50 μL，反應溶液中包括 25 μL 2 X Hyb solution (12 X SSC, 0.2% SDS) 及上述任一探針組合，每種探針 1 μM。使用 Veriti® 96-well Thermal Cycler (ABI PRISM, USA) 進行雜合反應，先加熱至 95°C 5 分鐘，隨後自 70 °C 起每 5 秒降 0.2°C 直至 50°C，於 50°C 停留 10 分鐘，接著每 5 秒降 0.5°C 直至 40°C，最後冷卻至 15°C。

進行雜合反應的同時，取 50 μL 磁珠 (Dynabeads® M-280 Streptavidin, catalog #11205D, Invitrogen™, CA, USA) 加入 250 μL TE buffer (10 mM Tris pH8, 2 mM EDTA) 混勻，以磁鐵隔著微量離心管吸附磁珠並去除上清液，以此法再加入一次 250 μL TE buffer、兩次 250 μL 1 X Hyb solution (6 X SSC, 0.1% SDS) 清洗磁珠，最後以 150 μL 1 X Hyb solution 重新懸浮磁珠。

將雜合產物加入清洗後之磁珠，以振盪器慢速於室溫中混勻 40 分

鐘後，利用磁鐵吸附磁珠，並去除上清液。再分別加入兩次 400  $\mu$ L washing solution 2 (2 X SSC, 0.1% SDS) 與兩次 400  $\mu$ L washing solution 1 (1 X SSC, 0.1% SDS) 清洗磁珠，移除未與探針雜合的 gDNA 片段及多餘的探針。最後加入一次 200  $\mu$ L TLE buffer (0.01 M Tris-HCl, 0.2 mM EDTA)，以 95°C 加熱 5 分鐘後，盡快取出上清液至新的微量離心管中，並於上清液中加入 22  $\mu$ L NaOAc/EDTA 溶液 (1.5 M NaOAc, 0.25 M EDTA)，再加入 444  $\mu$ L 95% 乙醇後上下倒置混勻，置於 -20°C 20 分鐘，以 14,000  $\times g$  離心 10 分鐘後去除上清液，以 500  $\mu$ L 70% 乙醇清洗產物一次，再離心 5 分鐘後去除上清液，待乙醇完全風乾後，以 25  $\mu$ L 去離子水回溶。再將豐富化產物以上述確認接合反應之 PCR 反應條件進行 PCR，增幅含有重複序列之 gDNA 片段以進行後續試驗。

#### 4. 連接豐富化 DNA 片段與質體並轉形

將經增幅的豐富化產物嵌入 pGEM-T Easy vector (pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector system, Promega, USA)，產物大小估算為 300 bp 至 1,000 bp，以 3 : 1 之 Insert : Vector 比例進行接合反應，反應總體積為 10  $\mu$ L，包含 1 X ligase buffer、pGEM-T Easy Vector 50 ng、T4 DNA ligase 3 units 及經增幅的豐富化產物，於 4°C 反應隔夜。

將載體經轉形作用置入 HIT Competent Cells<sup>TM</sup>-DH5 $\alpha$  (Real Biotech Co., Taiwan) 中。取出 100  $\mu$ L 勝任細胞加入 10  $\mu$ L 重組載體，混勻後於冰上反應 10 分鐘。將菌液均分成四等份，每等份皆混合 8  $\mu$ L IPTG 與

40  $\mu$ L 2% X-Gal 塗於含 ampicillin (100  $\mu$ g/mL) 之 LB 固體培養基，於 37°C 培養 16 小時後，使用滅菌牙籤挑取白色菌落。



## 5. 陽性菌落選殖、定序與引子設計

將菌落以上述確認接合反應之 PCR 反應條件，進行 PCR 確認片段是否成功插入載體。使用滅菌牙籤沾取白色菌落，在反應溶液中攪動即可加入菌落之載體 DNA。根據 PCR 之結果挑出只含單一片段之陽性菌落，轉培養至裝有 4 mL 含 ampicillin (100  $\mu$ g/mL) 之 LB 培養液的 15 mL 離心管，再於 37°C 搖晃培養 16 小時。以鹼處理法 (alkaline lysis) 抽取其質體 DNA (Green and Sambrook, 2012)，並利用 T7 引子以 ABI 3730XL DNA Analyzer (ABI PRISM, USA) 進行 PCR 產物定序。

將定序結果去除載體、連接子及低定序品質序列片段後，經由 Microsatellite repeats finder ([http://insilico.ehu.es/mini\\_tools/microsatellites/](http://insilico.ehu.es/mini_tools/microsatellites/)) 進行序列中含有重複單位之偵測，篩選序列片段中二重複序列重複數 6 次以上或四重複序列重複數 4 次以上者，做為可能存在多態性之最低標準。篩選出的片段則利用 Primer 3 Plus 程式 (Rozen and Skaletsky, 2000) 針對其重複單位兩側序列進行引子設計，並在 Forward 引子之 5' 端加上 CAGtag (5'CAGTCGGCGTATCA 3')，再利用已標定 FAM (ABI PRISM, USA) 螢光之 CAGtag 做為所有引子對的第二 Forward 引子，以避免所有引子皆需標定螢光。

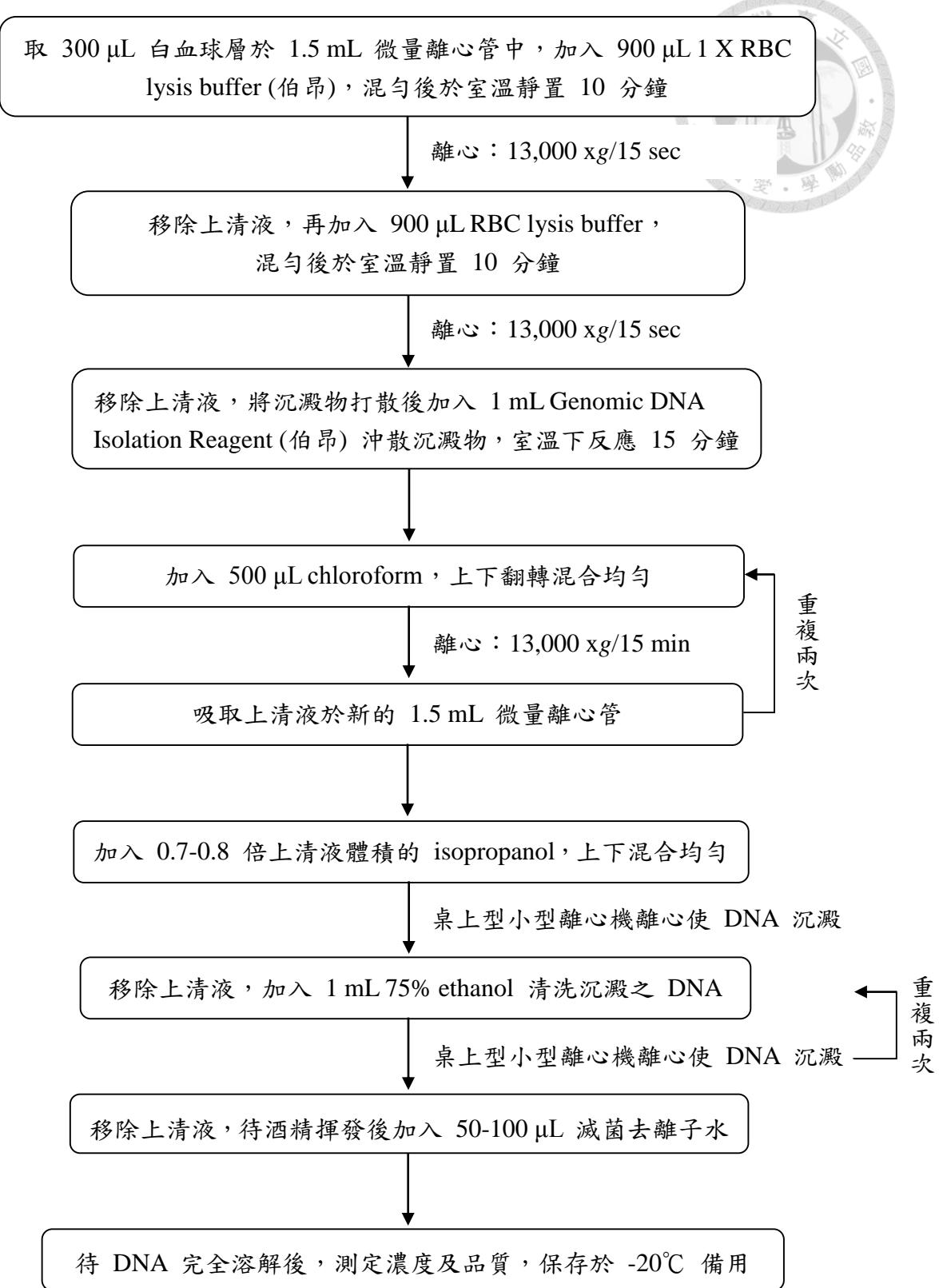


圖 8 自白血球抽取基因組 DNA 之流程。

Figure 8 The flow chart of genomic DNA extraction from leucocytes.

(modified from GenePure Tech. Co., LTD., Taiwan)



## 二、微衛星標識之 PCR 增幅與多態性檢測

### (一) 試驗動物

為檢測新微衛星標識之引子是否可以成功增幅及具有多態性，首先挑選來自行政院農委會畜產試驗所恆春分所（Hengchung Branch of Livestock Research Institute, C.O.A.）共 32 頭牛隻個體，包括 21 頭臺灣黃牛、8 頭雜交黃牛（Hybrid yellow cattle）及 3 頭外國雜交牛（Hybrid foreign cattle）進行微衛星標識多態性檢測。隨後進行共 637 頭牛隻個體之基因型檢測，共包含八個族群牛隻：分別來自畜產試驗所恆春分所之 343 頭臺灣黃牛、70 頭雜交黃牛、24 頭外國雜交牛及 24 頭布拉曼；來自金門縣畜產試驗所（Kinmen County Livestock Research Institute）之 54 頭臺灣黃牛；來自畜產試驗所新化總所（Xinhua Livestock Research Institute）之 26 頭臺灣黃牛與 13 頭荷蘭牛，以及來自畜產試驗所花蓮種畜繁殖場（Hualien Animal Propagation Station of Livestock Research Institute）之 83 頭臺灣水牛。其中雜交黃牛族群的定義為：其個體的遺傳背景組成包含臺灣黃牛及 1 至 3 個外國牛品種；外國雜交牛族群的定義則為：其個體的遺傳背景組成包含 2 至 3 個外國牛品種（表 2）。試樣之 637 頭牛隻血液樣本，皆依前述萃取 gDNA 之方法，進行 gDNA 萃取（圖 8）。

### (二) PCR 增幅與各族群多態性檢測

利用 PCR 檢測新微衛星標識之引子是否可成功增幅，反應總體積為 20  $\mu\text{L}$ ，其中包含 30 ng 模板 gDNA、0.04  $\mu\text{M}$  Forward 引子、0.2  $\mu\text{M}$  Reverse 引



子、 $0.16\text{ }\mu\text{M CAGtag}$ 、 $1\text{ X PCR buffer}$ 、 $0.2\text{ mM dNTP}$  及  $0.025\text{ U }Taq\text{ DNA polymerase}$ 。反應條件為  $95^\circ\text{C}$  變性 4 分鐘； $95^\circ\text{C}$  變性 50 秒、 $60^\circ\text{C}$  鏈合 50 秒、 $72^\circ\text{C}$  延伸 1 分鐘，循環 35 次；最後再以  $72^\circ\text{C}$  延伸 7 分鐘。PCR 反應後，以 1% 琼脂糖膠體進行電泳，確認 PCR 是否成功增幅。

隨後再將成功增幅產物進行樣品盤的製備，使用高密度甲胺（Hi-Di formamide）及 600 Liz 分子量標準品（GeneScan Size Standard GeneScan-600 LIZ）（Applied Biosystems, Foster City, CA, USA）以  $120:1$  比例混合，取  $10\text{ }\mu\text{L}$  加入 96 孔樣品盤，再加入稀釋之 PCR 產物  $1\text{ }\mu\text{L}$ ，進行毛細管電泳分析，測定其增幅產物的片段大小，所得片段大小結果以 Peak scanner 1.0 ( ABI PRISM, USA) 軟體進行基因型分析。

經多態性測試後，選出交替基因數大於等於 3 之 15 組新微衛星標識，進行牛隻個體之基因型檢測。

### （三）建立多引子 PCR 系統（multiplex-PCR system）

利用 NCBI Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) 於歐洲牛基因組資料庫 (*Bos taurus*; taxid: 9913) 進行新微衛星標識染色體位置之搜尋，由比對結果中的產物長度 (product length) 作為判斷之依據。

接著區分不同微衛星標識產物片段大小，再利用 4 種螢光 (FAM, NED, VIC and PET) 標記所得之 15 組新微衛星標識，並分為三組多引子系統進行 PCR 反應（表 3）。第一組多引子系統共 4 對引子，第二組多引子系統共 5 對引子，而第三組多引子系統共 6 對引子。三組多引子系統皆使用相同 PCR

反應條件，為 95°C 變性 4 分鐘； 95°C 變性 50 秒、60°C 鍊合 50秒、72 °C 延伸 1 分鐘，循環 35 次；最後再以 72°C 延伸 7 分鐘。



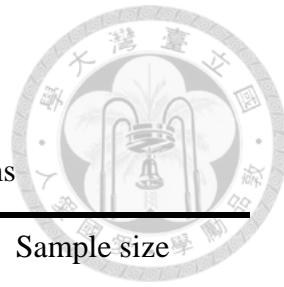


表 2 來自不同場之八個族群牛隻數目一覽表

Table 2 Number of cattle of the eight populations from different farms

Population <sup>1</sup>	Farm <sup>2</sup>	Sample size
Taiwan yellow cattle	Hengchung	343
	Kinmen	54
	Xinhua	26
Hybrid yellow cattle	Hengchung	70
Hybrid foreign cattle	Hengchung	24
Brahman	Hengchung	24
Holstein	Xinhua	13
Taiwan water buffalo	Hualien	83
Total		637

<sup>1</sup> Hybrid yellow cattle: genetic background consisted of Taiwan yellow cattle and 1 to 3 breeds of foreign cattle; Hybrid foreign cattle: genetic background consisted of 2 to 3 breeds of foreign cattle. (The breeds of foreign cattle include: Charolais, Brahman, Gelbvieh, Simmental, Wagyu, Limousin, and Piedmontese)

<sup>2</sup> Hengchung: Hengchung Branch of Livestock Research Institute; Kinmen: Kinmen County Livestock Research Institute; Xinhua: Xinhua Livestock Research Institute; Hualien: Hualien Animal Propagation Station of Livestock Research Institute.

表 3 本試驗三組多引子系統共 15 組牛隻新微衛星標識之標定螢光引子序列

Table 3 Primer sequence of 3 multiplex containing 15 sets of novel microsatellite markers of cattle using fluorescent-labeled primers in this study

Multiplex	Label <sup>1</sup>	Locus	Motif	Chr <sup>2</sup>	Primer sequence (5' → 3')		
					Forward (F)/Reverse (R)		
1	PET	YCA19	(TG) <sub>9</sub>	29	F: TCTCACCAAGTCAGTTGTGTG		
					R: CCCAATCAGTCAGAGACGTG		
	VIC	YCA21	(AC) <sub>8</sub>	11	F: CAAGTCCTGCTCCTCACCTC		
					R: CAAAGTGGGGCAGTGAGATT		
	VIC	YCC21	(AAC) <sub>7</sub>	16	F: TATAGGGGTCGTGGGTTCAA		
					R: AAGTTGCATTTGGCAAGG		
	PET	YCC39	(TGC) <sub>10</sub>	18	F: AGCATTCTCCAAAGGTGGTC		
					R: AGAATCCCAGGGACGAGAAG		
	2	NED	YCA20	(CA) <sub>12</sub>	01	F: AACAAAGGGAGCAAGGGAAAT	
				R: GAAAACATAAAGGCGGTCCA			
		NED	YCA25	(TG) <sub>7</sub> (AG) <sub>9</sub>	22	F: GGGGGCTGATGTTTCATT	
				R: TGATGCAAAACAGCTTCAAA			
		VIC	YCB03	(AAC) <sub>5</sub>	23	F: TGCAAATTTCTCTGGCAAGT	
				R: CAGAAACTGAACAGACCAAGGA			
	FAM	YCB09	(CA) <sub>7</sub>	08	F: CCTTCCCCACTGTCTAAGCA		
					R: ACTGTTGCCAACCAATAGCC		
	FAM	YCC11	(TG) <sub>16</sub>	X	F: CCTTGAAAAGCATTGATTG		
					R: CAGTGAAACACAAAAGAAGACAAGA		

表 3 本試驗三組多引子系統共 15 組牛隻新微衛星標識之標定螢光引子序列（續）

Table 3 Primer sequence of 3 multiplex containing 15 sets of novel microsatellite markers of cattle

using fluorescent-labeled primers in this study (continued)

Multiplex	Label <sup>1</sup>	Locus	Motif	Chr <sup>2</sup>	Primer sequence (5' → 3')	
					Forward (F)/Reverse (R)	
3	PET	YCA01	(AC) <sub>13</sub>	06	F: ACAGTGCATGGGATCACAAA R: TCTATTATGGCGACGAGCAG	
	VIC	YCA18	(CA) <sub>19</sub>	X	F: CAGGGAACCAGATCCCATT R: TTCAATGGAGTGGCATGACT	
	VIC	YCA26	(TG) <sub>7</sub> (TA) <sub>3</sub>	20	F: CAGCAAACGTGGATCTCTC R: TGCTGACTATTCCCAAAGGA	
	NED	YCB06	(TG) <sub>12</sub>	26	F: CTCTCTGGGCAGAACACACA R: GGAGCCGATGAGAGAGGACT	
	FAM	YCC18	(CA) <sub>15</sub>	X	F: CCATGGGGTCACAAAGAAC R: TGAGCATAGCATACCTCCTAGTG	
	PET	YCC28	(CTTT) <sub>4</sub>	08	F: TCTTGGAGATAAGCGGCAAC R: GTTGGTCTTCCTGGTGTGGT	

<sup>1</sup> FAM: blue color fluorescent; NED: yellow color fluorescent; VIC: green color fluorescent; PET: red color fluorescent (ABI PRISM, USA).

<sup>2</sup> Chr.: marker location on chromosomes from *Bos taurus*, according to the results of NCBI Primer-Blast



### 三、遺傳分析

族群的遺傳變異分析乃利用 Microsoft Toolkit (Park, 2001) 計算交替基因數、交替基因頻率、期望異質度、觀測異質度及多態性訊息含量；另用 Cervus 軟體計算有效交替基因數 (Marshall *et al.*, 1998)；並以 GENEPOP (<http://genepop.curtin.edu.au>) 分析 Wright's *F*-statistics 及哈溫平衡檢定；利用 ARLEQUIN 3.5 (Excoffier and Lischer, 2010) 進行分子變方分析 (analysis of molecular variance, AMOVA)，計算族群間、族群內個體間及個體內之變方成分值及其所佔總變方成分之百分比。

使用 Microsatellite Analyser (MSA) (Dieringer and Schlötterer, 2003) 計算族群間與個體間之遺傳距離，並且利用 PHYLIP 套裝軟體 (Felsenstein, 2002) 以鄰位連接法 (NJ) 繪製親緣關係樹。以 STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000) 軟體進行群數分布之模擬分析，依計算 10,000 次後的 10,000 次模擬可能分群 ( $K = 3 \sim 8$ )，每個  $K$  值重複 15 次繪製群集分析圖，並計算  $\Delta K$  值 (Evanno *et al.*, 2005)。另以 GeneAlEx 6.5 (Peakall and Smouse, 2012) 繪製主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA) 圖，確認試驗所檢測臺灣八個族群牛隻之分群情形與族群親緣關係。

另外為評估新微衛星標識進行個體鑑別之可用性，利用 Cervus 軟體 (Marshall *et al.*, 1998) 計算個體鑑別率 ( $P_{(ID)}$ ) 與近親個體鑑別率 ( $P_{(ID)sib}$ )，並依據結合不同數目之新微衛星基因座所產生之綜合個體鑑別率繪製折線圖。



## 試驗二：利用候選基因法於臺灣黃牛生長性狀相關性之探討

### 一、試驗動物及資料收集

本試驗所使用動物為 168 頭臺灣黃牛，係來自行政院農委會畜產試驗所恆春分所。試驗當中收集牛隻血樣並萃取其 DNA 樣本，萃取方法同試驗一所述（圖 8），測定其濃度和品質後保存於 -20°C 冰箱備用。試驗牛隻皆給予特定耳號以辨別身分，生長性狀資料收集來自畜產試驗所恆春分所，記錄臺灣黃牛出生重(birth weight, BW0)、四月齡體重(body weight at age 4 months, BW4)、六月齡體重(BW6)、八月齡體重(BW8)、十月齡體重(BW10)及十二月齡體重(BW12)。

### 二、候選基因多態性分析

以下述不同試驗方法分析 *MYF5*、*ZBED6* 及 *SREBP1c* 三個與牛隻生長性狀相關的候選基因在臺灣黃牛族群中的多態性。

#### (一) 定序 (sequencing)

利用聚合酶連鎖反應，根據 Huang *et al.* (2013a) 所設計的引子序列（表 4）進行 *ZBED6* 基因之片段增幅，分析位點為 *ZBED6* 基因第一外顯子區域 g.680C>G 之變異點。反應總體積為 20 μL，其中包含 50 ng 模板 gDNA、0.08 μM Forward 引子、0.08 μM Reverse 引子、1 X PCR buffer、0.2 mM dNTP 及 0.025 U *Taq* DNA polymerase。其 PCR 反應條件如表 5 所示，反應結束以 1% 琼脂糖膠體進行電泳，確認 PCR 是否成功增幅，並進一步利

用 ABI 3730 DNA Analyzer (ABI PRISM, USA) 進行定序，分析樣本之基因型。



## (二) 限制片段長度多態性 (restricted fragment length polymorphism, RFLP)

利用限制片段長度多態性聚合酶連鎖反應 (PCR-RFLP) 進行 *MYF5* 及 *SREBP1c* 基因之基因型分析，分析位點為 *MYF5* 基因第二內含子區域 g.1948A>G 以及 *SREBP1c* 基因第九外顯子區域 g.10781C>G 之變異點，所使用限制酶皆為 *Taq* I (catalog # R0149) (BioLabs, New England)。

在 *MYF5* 基因，係根據 Drögemüller and Kempers (2000) 所設計之引子 (表 4)，利用 PCR 增幅目標片段，反應總體積為 20 μL，其中包含 50 ng 模板 gDNA、0.06 μM Forward 引子、0.06 μM Reverse 引子、1 X PCR buffer、0.2 mM dNTP 及 0.025 U *Taq* DNA polymerase。其 PCR 反應條件如表 5 所示，反應結束後，以 1% 琼脂糖膠體進行電泳，確認 PCR 是否成功增幅。

在 *SREBP1c* 基因，係根據 Huang et al. (2011a) 所設計之引子 (表 4)，利用 PCR 增幅目標片段，反應總體積為 20 μL，其中包含 50 ng 模板 gDNA、0.06 μM Forward 引子、0.06 μM Reverse 引子、1 X PCR buffer、0.2 mM dNTP 及 0.025 U *Taq* DNA polymerase。其 PCR 反應條件如表 5 所示，反應結束後，以 1% 琼脂糖膠體進行電泳，確認 PCR 是否成功增幅。

反應結束後，將兩個基因增幅片段之 PCR 產物分別以限制酶 *Taq* I 進行反應，反應總體積為 12 μL，包含限制酶 *Taq* I 與 10 X NEBuffer 各 1 μL，以及 PCR 產物 5 μL，於 65°C 水浴槽反應 1 小時，反應完畢後，以 2% 琼

脂醣膠體進行電泳，確認樣本之基因型，其交替基因之片段大小列於表 4。



### (三) TaqMan SNP Genotyping Assay

以定序及酶切結果進行驗證，確認欲檢測基因位點具有多態性後，利用 TaqMan SNP Genotyping Assay 進行本試驗全體黃牛樣本之 *MYF5* 和 *ZBED6* 基因型分析，分析位點包含 *MYF5* 基因第二內含子區域 g.1948A>G 以及 *ZBED6* 基因第一外顯子區域 g.680C>G 之變異點，其引子及探針序列如表 6 所示。試驗所使用之試劑是經由 Applied Biosystems ( Foster City, CA, USA ) 所設計。試劑內含 40 X 引子以及 TaqMan MGB probe ( 標記 FAM 和 VIC 螢光 )。反應總體積為 15  $\mu$ L，包括 40 X 試劑 0.375  $\mu$ L、2 X TaqMan SNP Genotyping Master Mix ( Applied Biosystems, Foster City, CA, USA ) 7.5  $\mu$ L 以及 20 ng 的模板 gDNA。並利用 StepOne Plus thermal cycler ( Applied Biosystems, Foster City, CA, USA ) 進行 PCR 反應，反應溫度條件為 60°C 變性 30 秒；95°C 10 分鐘；95°C 15 及 60°C 1 分鐘循環 40 次，最後為 60 °C 30 秒。PCR 過程中會記錄螢光表現量，並於反應完畢後，使用 StepOne Software v2.1 ( Applied Biosystems, Foster City, CA, USA ) 軟體，分析樣本之基因型並計算基因型頻率。

表 4 以 PCR 及 PCR-RFLP 分析 *ZBED6*、*MYF5* 與 *SREBP1c* 基因之引子序列、PCR 增幅位置、PCR 產物大小、限制酶種類及限制酶作用後之片段大小

Table 4 Primer sequences, SNP region, PCR product size, restriction enzymes, and genotype for *ZBED6*, *MYF5*, and *SREBP1c* by PCR and PCR-RFLP

SNP	Primer sequence (5' → 3')	SNP region	PCR product size (bp)	Restriction enzyme	Genotype (bp)
<i>ZBED6</i> (g.680C>G)	F: CTGGAGGGCTATTGTA  R: TTGCCTGACTTATTGAC	Exon 1	809		
<i>MYF5</i> (g.1948A>G)	F: ACAGCGTCTACTGTCCTGATG  R: CGTGGCATATACTAAGGACAC	Intron 2	445	<i>Taq</i> I, T <sup>CGA</sup>	AA: 445  AG: 445, 352, 93  GG: 352, 93
<i>SREBP1c</i> (g.10781C>G)	F: CGACTACATCCGCTTCCTT  R: CCTCAGCCCTGTCTTC	Exon 9	534	<i>Taq</i> I, T <sup>CGA</sup>	CC: 272, 262  CG: 534, 272, 262  GG: 534



表 5 分析 *ZBED6*、*MYF5* 與 *SREBP1c* 基因多態性之 PCR 反應條件

Table 5 PCR conditions for *ZBED6*, *MYF5*, and *SREBP1c* gene

SNP	PCR condition
<i>ZBED6</i> (g.680C>G)	95°C/3 mins → 94°C/30 sec → 57°C/35 sec → 72°C/45 sec → 72°C/10 mins ↑ 35 cycles
<i>MYF5</i> (g.1948A>G)	94°C/4 mins → 94°C/30 sec → 58°C/1 min → 72°C/1 min → 72°C/4 mins ↑ 38 cycles
<i>SREBP1c</i> (g.10781C>G)	95°C/3 mins → 94°C/30 sec → 63°C/35 sec → 72°C/45 sec → 72°C/10 mins ↑ 35 cycles

表 6 *MYF5* 與 *ZBED6* 基因位點以 TaqMan SNP Genotyping Assay 之引子及螢光探針序列



Table 6 Sequence of primers and fluorescent probes of *MYF5* and *ZBED6* genes for TaqMan SNP Genotyping Assay

SNP	Sequence (5' → 3')
<i>MYF5</i> (g.1948A>G)	
Forward primer	TTTCTGTGACCACCTGACCTTT
Reverse primer	GCTTATTGGCCGCTTAAACTG
VIC-labeled A allele reporter	CACCTTGAAACCC
FAM-labeled G allele reporter	ACCTTCGAAACCC
<i>ZBED6</i> (g.680C>G)	
Forward primer	CTTTATCTCCCTCTGCTGGAA
Reverse primer	CCCTCAGGGCATCAGATACTG
VIC-labeled C allele reporter	ACCCATTGCATTATC
FAM-labeled G allele reporter	ACCCATTCCATTATC



### 三、統計分析

根據畜產試驗所恆春分所飼養之臺灣黃牛生長資料，對牛隻個體生長天數與體重進行線性修正，並將試驗所得資料，以統計分析軟體 SAS v9.2 (SAS Institute, 2009) ，使用一般線性模式（general linear model procedure, GLM）進行變方分析，並以最小平方均值（least squares mean）及特奇公正顯著差異法（Tukey's honest significant difference）進行統計分析，分別以牛隻之生長資料對 *MYF5*、*ZBED6* 及 *SREBP1c* 基因之基因型進行相關性分析。統計分析模型如下所示

$$Y_{ijk} = \mu + S_i + G_j + e_{ijk}$$

$Y_{ijk}$  : 各性狀觀測值

$\mu$  : 族群平均值

$S_i$  : 性別固定效應 ( $i = 1, 2$ )

$G_j$  : 基因型固定效應 ( $j = 1, 2, 3$ )

$e_{ijk}$  : 試驗誤差

在特奇公正顯著差異法分析結果，若試驗顯示  $P < 0.05$  之統計結果，代表固定效應對其性狀有顯著影響；若試驗顯示  $0.05 < P < 0.10$  則表示固定效應對其性狀有趨勢上的影響。



### 試驗三：牛隻短脊椎綜合症基因頻率分析

#### 一、試驗動物

本試驗進行牛短脊椎綜合症之基因型分析，試驗動物使用 53 頭荷蘭母牛，其中 13 頭來自畜產試驗所新化總所，40 頭來自國立臺灣大學 (National Taiwan University)。另使用 229 頭臺灣黃牛，其中 168 頭來自畜產試驗所恆春分所、35 頭來自金門縣畜產試驗所，以及 26 頭來自畜產試驗所新化總所，與來自畜產試驗所花蓮種畜繁殖場之 83 頭臺灣水牛。

#### 二、基因型分析

牛短脊椎綜合症形成的原因為在牛隻第 21 號染色體上的 *FANCI* 基因有 3.3 kb 片段的缺失，故利用涵蓋此 3.3 kb 片段之引子進行 PCR 反應 (Charlier *et al.*, 2012)，增幅特定 DNA 片段以檢測樣本之基因型。反應總體積為 20 μL，其中包含 50 ng 模板 gDNA、1 X Phusion buffer、0.2 mM dNTP 、0.5 mM MgCl<sub>2</sub> 、0.08 μM Forward 引子 (5'-GCTCAAGTAGTTAGTTGCTCCACTG-3') 、0.08 μM Reverse 引子 (5'-ATAAAATAAATAAAGCAGGATGCTGAAA-3') 、及 0.2 U Phusion DNA polymerase。反應條件為 94°C 變性 5 分鐘；94°C 變性 30 秒、64°C 鏈合 45 秒、72°C 延伸 2.5 分鐘，循環 35 次；最後再以 72°C 延伸 10 分鐘。PCR 反應後，以 1% 琼脂糖膠體進行電泳，確認 PCR 是否成功增幅，並判斷基因型，最後計算基因型頻率。



## 肆、結果

### 試驗一：牛隻新微衛星標識之開發與應用

#### 一、新微衛星基因座之遺傳變異分析

本試驗利用 15 組新開發之微衛星標識，針對臺灣 8 個牛隻族群共 637 頭樣本進行基因型分析，結果顯示微衛星標識基因座 YCA25 及 YCC28 在荷蘭牛族群中不具有多態性；在臺灣水牛族群中，除了基因座 YCB06 及 YCC18 具有多態性之外，基因座 YCA19、YCB03 及 YCB09 則沒有檢測出多態性，其餘 10 組則是無法在水牛族群中成功增幅；而在其他 6 個牛隻族群，所有新微衛星標識皆可在三組多引子 PCR 系統中進行增幅並具有多態性（圖 9 至 11）。

根據全體牛隻族群之基因型資料進行遺傳分析結果列於表 7。試驗結果顯示，此 15 組新微衛星標識之交替基因產物大小 (allele size) 範圍在 133 bp 至 251 bp 之間，共觀察到 123 個交替基因，每個基因座的交替基因數 ( $N_a$ ) 範圍在 3 (YCB03 及 YCC28) 至 20 (YCA19) 個之間， $N_a$  平均值為 8.2。有效交替基因數 ( $N_e$ ) 之範圍介在 1.4 (YCB09 及 YCC28) 與 6.3 (YCA19) 之間， $N_e$  平均值為 3.0。

此 15 組新微衛星標識於全體牛隻族群之期望異質度 ( $H_E$ ) 範圍在 0.285 (YCB09) 至 0.843 (YCA19) 之間，其平均值為 0.588；觀測異質度 ( $H_O$ ) 範圍在 0.162 (YCC11) 至 0.696 (YCA01) 之間，其平均值為 0.424。多態性訊息含量 (PIC) 範圍在 0.269 (YCB09) 至 0.826 (YCA19) 之間，其平均值為 0.552 (表 8)。



在整體族群之遺傳分化及近親評估方面， $F_{IS}$  範圍在 -0.171 (YCB09) 至 0.648 (YCA21) 之間，平均值為 0.184，由此平均值為正值可知整體牛隻族群中之次族群 (subpopulation) 內雜合子比例少於預期； $F_{IT}$  之範圍在 -0.105 (YCB09) 至 0.673 (YCA21) 之間，平均值為 0.271，由此平均值為正值可知整體牛隻族群可能有雜合子缺乏的情況。 $F_{ST}$  之範圍在 0.022 (YCC39) 至 0.290 (YCC11) 之間，平均值為 0.108，由平均值可得知全體牛隻族群內存在中度分化之情形 ( $0.05 < F_{ST} < 0.15$ )。利用 fisher's 精確檢定檢測哈溫平衡，結果顯示共有 9 個微衛星標識基因座顯著地偏離哈溫平衡 ( $P < 0.05$ )，且全體牛隻族群於所有基因座亦顯著地偏離哈溫平衡 ( $P < 0.05$ ) (表 8)。

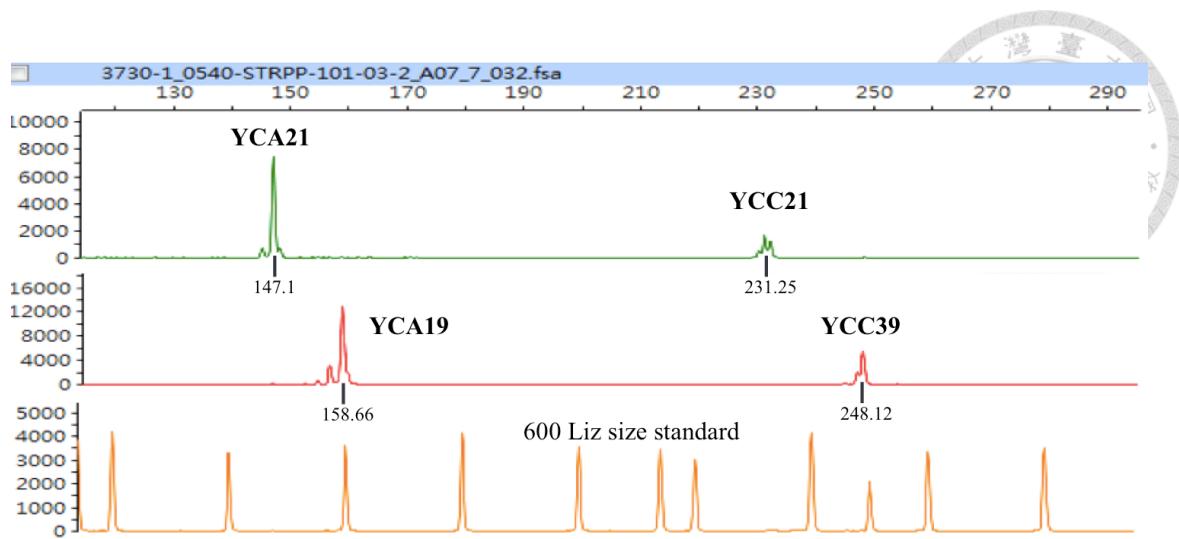


圖 9 以 ABI 3730 定序儀進行毛細管電泳分析第一組多引子系統之結果。

Figure 9 The result of first multiplex PCR capillary electrophoresis using ABI 3730 sequencer.

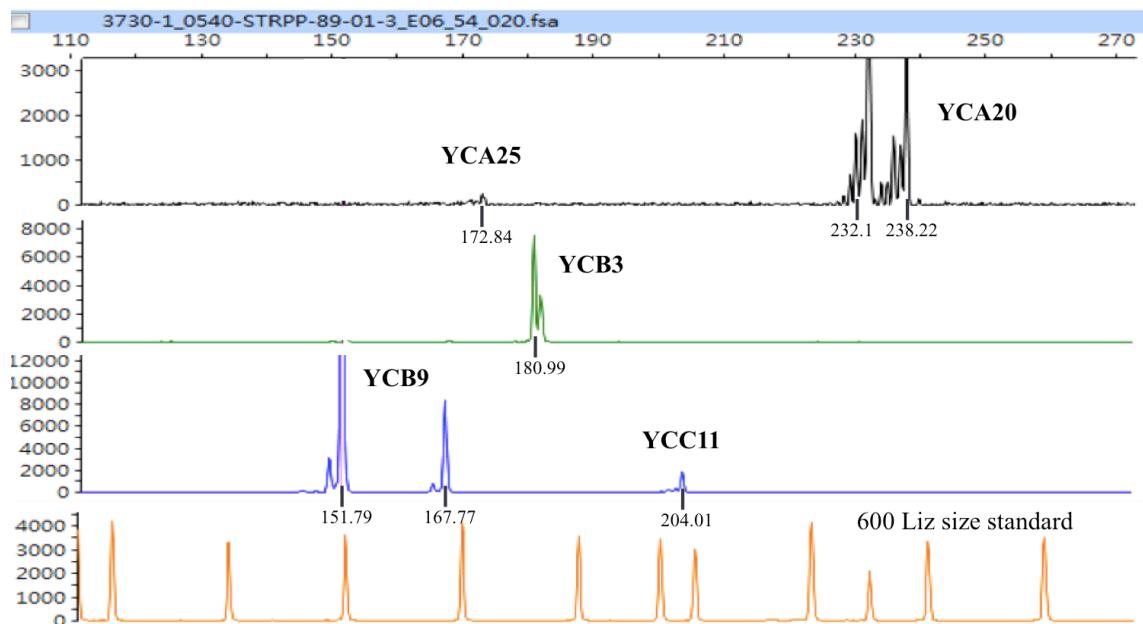


圖 10 以 ABI 3730 定序儀進行毛細管電泳分析第二組多引子系統之結果。

Figure 10 The result of second multiplex PCR capillary electrophoresis using ABI 3730 sequencer.

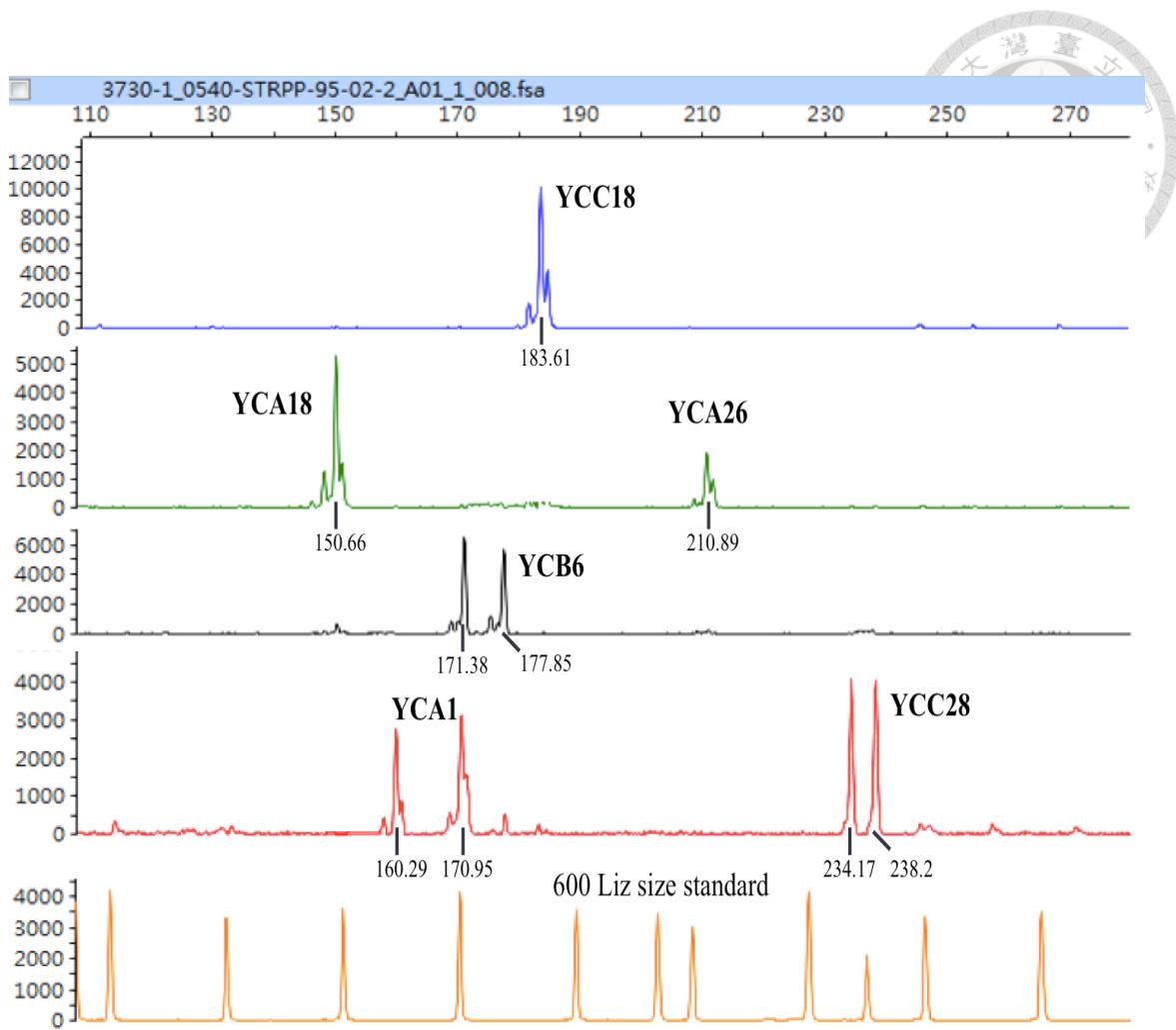


圖 11 以 ABI 3730 定序儀進行毛細管電泳分析第三組多引子系統之結果。

Figure 11 The result of third multiplex PCR capillary electrophoresis using ABI 3730 sequencer.

表 7 利用 15 組新微衛星標識於全體牛隻族群之交替基因範圍、交替基因數 ( $N_a$ )、  
有效交替基因數 ( $N_e$ ) 及微衛星標識染色體位置

Table 7 Results of range of alleles, number of alleles ( $N_a$ ), number of effective alleles  
( $N_e$ ), and locus location on chromosomes for 15 sets of novel microsatellite  
markers in the total cattle population

Locus	Allele size (bp)	$N_a$	$N_e$	Chr. <sup>1</sup>
YCA01	160 - 178	9	5.2	06
YCA18	133 - 159	12	3.5	X
YCA19	150 - 190	20	6.3	29
YCA20	220 - 240	10	4.1	01
YCA21	138 - 161	9	2.7	11
YCA25	152 - 179	9	3.5	22
YCA26	203 - 216	6	2.9	20
YCB03	175 - 181	3	1.8	23
YCB06	161 - 199	10	2.9	26
YCB09	142 - 168	6	1.4	08
YCC11	204 - 220	7	1.5	X
YCC18	172 - 190	8	3.1	X
YCC21	225 - 236	5	2.8	16
YCC28	234 - 246	3	1.4	08
YCC39	236 - 251	6	1.6	18
Mean		8.2	3.0	
SD		4.2	1.4	

$N_a$ : number of alleles;  $N_e$ : effective number of alleles.

<sup>1</sup> Chr.: according to the results of NCBI Primer-Blast.



表 8 利用 15 組新微衛星標識檢測全體牛隻族群之遺傳變異性

Table 8 Genetic variability of the total cattle population genotyped with 15 sets of novel microsatellite markers

Locus	$H_O$	$H_E$	PIC	$F_{IS}$	$F_{IT}$	$F_{ST}$	HWE test	
YCA01	0.696	0.807	0.780	0.074	0.157	0.089	NS	
YCA18	0.432	0.715	0.666	0.380	0.401	0.034	*	
YCA19	0.662	0.843	0.826	0.023	0.252	0.235	*	
YCA20	0.514	0.757	0.716	0.260	0.339	0.107	*	
YCA21	0.208	0.623	0.586	0.648	0.673	0.070	*	
YCA25	0.615	0.717	0.690	0.092	0.159	0.074	*	
YCA26	0.300	0.656	0.604	0.526	0.548	0.045	*	
YCB03	0.421	0.453	0.397	-0.030	0.093	0.119	NS	
YCB06	0.611	0.658	0.621	-0.021	0.095	0.114	NS	
YCB09	0.319	0.285	0.269	-0.171	-0.105	0.056	NS	
YCC11	0.162	0.319	0.305	0.337	0.529	0.290	*	
YCC18	0.353	0.674	0.630	0.361	0.501	0.219	*	
YCC21	0.396	0.645	0.586	0.330	0.402	0.108	*	
YCC28	0.312	0.307	0.273	-0.050	-0.005	0.043	NS	
YCC39	0.353	0.360	0.329	0.003	0.025	0.022	NS	
Mean	0.424	0.588	0.552	0.184	0.271	0.108	*(Total)	
SD	0.164	0.191	0.188	0.239	0.233	0.079		

$H_O$ : observed heterozygosity;  $H_E$ : expected heterozygosity; PIC: polymorphic information content;  $F_{IS}$ : Wright's  $F$ -statistics, within subpopulation inbreeding estimate;  $F_{IT}$ : Wright's  $F$ -statistics, within total population inbreeding estimate;  $F_{ST}$ : Wright's  $F$ -statistics, among subpopulation differentiation estimate; HWE test: Hardy-Weinberg equilibrium test, \* $P < 0.05$ , NS: not significant.



## 二、各族群牛隻之遺傳變異分析

將試驗中 8 個族群牛隻分別進行遺傳變異之檢測，統計結果列於表 9，各族群的  $N_a$  平均值範圍在 0.8 (臺灣水牛族群) 至 6.7 (恆春黃牛族群) 之間； $N_e$  平均值範圍在 0.5 (臺灣水牛族群) 到 2.9 (金門黃牛及雜交黃牛族群) 之間。

在雜合度之檢測結果，各族群的  $H_E$  平均值範圍在 0.184 (臺灣水牛族群) 至 0.570 (雜交黃牛族群) 之間； $H_o$  平均值範圍在 0.186 (臺灣水牛族群) 到 0.478 (雜交黃牛族群) 之間，顯示雜交黃牛族群具有較高遺傳變異性。多態性檢測方面， $PIC$  平均值範圍在 0.171 (臺灣水牛族群) 至 0.522 (恆春黃牛族群) 之間。綜合數值結果，顯示黃牛及雜交牛族群相較於布拉曼、荷蘭牛及臺灣水牛族群有較高的遺傳變異性。

在  $F_{IS}$  平均值方面，平均值範圍在 0.005 (臺灣水牛族群) 至 0.314 (布拉曼族群) 之間，且 8 個牛隻族群數值皆為正值。而哈溫平衡檢測結果顯示，除了荷蘭牛及臺灣水牛族群未偏離哈溫平衡以外，其餘 6 個牛隻族群 (恆春黃牛、新化黃牛、金門黃牛、雜交黃牛、外國雜交牛及布拉曼族群) 皆顯著地偏離哈溫平衡 ( $P < 0.05$ )，推測在臺灣地區或許此 6 個牛隻族群可能有近親配種的情形出現。



表 9 利用 15 組新微衛星標識檢測 10 個牛隻族群及全體牛隻族群之平均遺傳變異性

Table 9 Average genetic variability of 10 cattle populations and the total cattle population genotyped using 15 sets of novel microsatellite markers

Population	N	$N_a$	$N_e$	$H_o$	$H_e$	PIC	$F_{IS}$	HWE test
Yellow cattle (Hengchung)	343	$6.7 \pm 2.6$	$2.6 \pm 0.9$	$0.440 \pm 0.185$	$0.565 \pm 0.175$	$0.522 \pm 0.169$	0.207	*
Yellow cattle (Xinhua)	26	$3.7 \pm 1.6$	$2.2 \pm 1.0$	$0.442 \pm 0.266$	$0.468 \pm 0.219$	$0.413 \pm 0.207$	0.083	*
Yellow cattle (Kinmen)	54	$5.3 \pm 2.7$	$2.9 \pm 1.5$	$0.459 \pm 0.256$	$0.552 \pm 0.240$	$0.506 \pm 0.230$	0.143	*
Hybrid yellow cattle	70	$5.5 \pm 2.8$	$2.9 \pm 1.4$	$0.478 \pm 0.224$	$0.570 \pm 0.231$	$0.521 \pm 0.225$	0.139	*
Hybrid foreign cattle	24	$4.1 \pm 2.1$	$2.7 \pm 1.4$	$0.451 \pm 0.214$	$0.538 \pm 0.230$	$0.479 \pm 0.219$	0.139	*
Brahman	24	$3.8 \pm 1.9$	$2.6 \pm 1.2$	$0.305 \pm 0.229$	$0.500 \pm 0.292$	$0.444 \pm 0.268$	0.314	*
Holstein	13	$2.7 \pm 1.3$	$1.7 \pm 0.6$	$0.313 \pm 0.209$	$0.357 \pm 0.220$	$0.302 \pm 0.189$	0.103	NS
Taiwan water buffalo	83	$0.8 \pm 1.7$	$0.5 \pm 0.9$	$0.186 \pm 0.322$	$0.184 \pm 0.316$	$0.171 \pm 0.294$	0.005	NS
Total population	637	$8.2 \pm 4.2$	$3.0 \pm 1.4$	$0.424 \pm 0.164$	$0.588 \pm 0.191$	$0.552 \pm 0.188$	0.184	*

N: sample size;  $N_a$ : number of alleles;  $N_e$ : effective number of alleles;  $H_o$ : observed heterozygosity;  $H_e$ : expected heterozygosity; PIC: polymorphic information content;  $F_{IS}$ : Wright's  $F$ -statistics, within subpopulation inbreeding estimate; HWE test: Hardy-Weinberg equilibrium test, \* $P < 0.05$ , NS: not significant.



### 三、族群分化與分子變方分析

由 15 組新微衛星基因座所檢測各試驗動物於各基因座之交替基因頻率結果，進一步計算並兩兩比較牛隻族群之間的  $F_{ST}$  與基因流指數 ( $N_m$ ) (表 10)，顯示在 8 個族群中，以雜交黃牛與外國雜交牛族群的分化程度最小 ( $F_{ST} = 0.019$ )，而分化程度最大的則是荷蘭牛與臺灣水牛族群 ( $F_{ST} = 0.637$ )。進一步由  $F_{ST}$  計算出基因交流指數，與  $F_{ST}$  數值結果相對應，以雜交黃牛與外國雜交牛族群的基因交流程度最高 ( $N_m = 12.777$ )，而臺灣水牛族群則是與其餘 7 個牛隻族群有較低度的基因交流情形 ( $N_m < 1$ )。

利用 AMOVA 進行分析，藉以了解整體牛隻族群遺傳變異的分布模式，結果顯示 8 個牛隻族群間 (among populations) 的變方成分為 31% ( $P < 0.01$ )，族群內個體間 (among individual within populations) 的變方成分為 18% ( $P < 0.01$ )，而大部分的變異是分布在個體內 (within individuals)，變方成分為 51% ( $P < 0.01$ ) (表 11)。

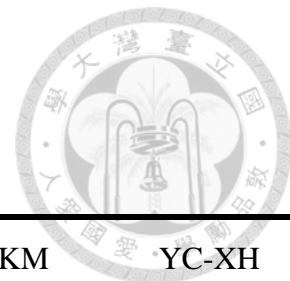


表 10 本試驗各牛隻族群之間的基因交流與  $F_{ST}$  值

Table 10 Gene flow ( $N_m$ ) and  $F_{ST}^1$  among these cattle populations examined in this study

Population <sup>2</sup>	BR	HO	WB	XB	XY	YC-HC	YC-KM	YC-XH
BR	-	1.002	0.172	3.942	3.578	4.331	6.288	2.270
HO	0.200	-	0.143	2.229	2.706	1.207	1.099	0.854
WB	0.593	0.637	-	0.194	0.215	0.209	0.193	0.171
XB	0.060	0.101	0.563	-	12.777	3.295	3.392	1.727
XY	0.065	0.085	0.538	0.019	-	5.115	4.272	2.330
YC-HC	0.055	0.172	0.545	0.071	0.047	-	11.077	7.421
YC-KM	0.038	0.185	0.564	0.069	0.055	0.022	-	5.809
YC-XH	0.099	0.226	0.594	0.126	0.097	0.033	0.041	-

<sup>1</sup> The data above the diagonal are  $N_m$  and below the diagonal are  $F_{ST}$ .

<sup>2</sup> BR: Brahman; HO: Holstein; WB: Taiwan water buffalo; XB: Hybrid foreign cattle; XY: Hybrid yellow cattle; YC-HC: Taiwan yellow cattle (Hengchung); YC-KM: Taiwan yellow cattle (Kinmen); YC-XH: Taiwan yellow cattle (Xinhua).



表 11 本試驗各牛隻族群內與族群間之分子變方分析

Table 11 Hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) within and among cattle populations studied

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance of component
			(% total variance)
Among populations	7	1487.967	1.706 (31)**
Among individual within populations	629	3056.869	1.024 (18)**
Within individuals	637	1791.500	2.812 (51)**
Total	1273	6336.337	5.542

\*\* Represented significant:  $P < 0.01$ .

Fixation indices:  $F_{ST} = 0.308$ ,  $F_{IS} = 0.267$ ,  $F_{IT} = 0.493$ .  $F_{ST}$ : Wright's  $F$ -statistics, among subpopulation differentiation estimate;  $F_{IS}$ : Wright's  $F$ -statistics, within subpopulation inbreeding estimate;  $F_{IT}$ : Wright's  $F$ -statistics, within total population inbreeding estimate. The significance of fixation index was tested with 10,000 permutations.



#### 四、遺傳距離與分群

根據 15 組新微衛星標識之基因型，利用 Nei (1972) 之估算式計算出牛隻族群之間的遺傳距離（表 12），與上述  $F_{ST}$  值結果相似，顯示臺灣水牛族群與其他牛隻族群有最大的遺傳距離（0.646），而雜交黃牛族群與外國雜交牛族群有最小的遺傳距離（0.057）。進一步利用鄰位連接法（NJ）繪製牛隻族群親緣關係樹中（圖 12），全體牛隻族群可分為六個主要的群集：臺灣黃牛、布拉曼、雜交黃牛、外國雜交牛、荷蘭牛及臺灣水牛族群，且臺灣水牛族群與其他牛隻族群之間的 bootstrap value 為 100%，顯示臺灣水牛族群與其他牛隻族群之遺傳距離較遠，可以完全區分。而臺灣黃牛群集又可分為金門黃牛與恆春、新化黃牛兩個次群集。

利用主成分分析(PCA)根據族群間遺傳距離繪製 3D 立體圖（圖 13），其結果顯示第一座標軸（PC1）、第二座標軸（PC2）及第三座標軸（PC3）此三者可分別解釋 62.09、25.16 及 8.05% 的遺傳變異。藉由此三個主座標軸之變異量區分族群之間的遺傳距離，可發現臺灣水牛族群與其他牛隻族群分布距離皆較遠，雜交黃牛族群與外國雜交牛族群分布距離較近，而三個地區族群的臺灣黃牛分佈距離亦接近，且臺灣黃牛新化族群與恆春族群之分布距離，較新化族群與金門族群之分布距離近。

再來計算牛隻個體間的遺傳距離，同樣以鄰位連接法（NJ）繪製牛隻個體之親緣關係樹（圖 14），結果顯示，依此個體親緣關係樹之觀察，可分為六個主要群集：臺灣黃牛、雜交黃牛、外國雜交牛、布拉曼、荷蘭牛及臺灣水牛，其主要群集之區分結果與族群親緣關係樹之結果相似（圖 12）。而另



外使用 STRUCTURE 軟體分析族群結構，在各個假設可能分群的  $K$  值 ( $K = 3 \sim 8$ ) 中，當  $K = 3$  時，主要分成臺灣黃牛、外國血緣牛及臺灣水牛族群；當  $K = 4$  時，荷蘭牛及雜交牛族群可被分離，當  $K = 5 \sim 8$  時，臺灣黃牛金門、新化族群及布拉曼族群被分離，且臺灣黃牛恆春族群再被細分為不同群集（圖 15）。經由計算  $\Delta K$  之結果顯示， $K = 3$  為建議分群數目（附圖 1）。

在  $K = 3$  之分群中，臺灣黃牛可與外國品種牛、雜交牛與臺灣水牛明確分群。



表 12 本試驗各牛隻族群之間的遺傳距離數值

Table 12 Genetic distance among these cattle populations examined in this study

Population <sup>1</sup>	BR	HO	WB	XB	XY	YC-HC	YC-KM	YC-XH
BR	-	0.431	0.637	0.139	0.152	0.150	0.132	0.212
HO	0.431	-	0.532	0.222	0.201	0.383	0.378	0.486
WB	0.637	0.532	-	0.536	0.559	0.600	0.580	0.646
XB	0.139	0.222	0.536	-	0.057	0.170	0.158	0.286
XY	0.152	0.201	0.559	0.057	-	0.092	0.097	0.188
YC-HC	0.150	0.383	0.600	0.170	0.092	-	0.059	0.081
YC-KM	0.132	0.378	0.580	0.158	0.097	0.059	-	0.112
YC-XH	0.212	0.486	0.646	0.286	0.188	0.081	0.112	-

<sup>1</sup> BR: Brahman; HO: Holstein; WB: Taiwan water buffalo; XB: Hybrid foreign cattle; XY: Hybrid yellow cattle; YC-HC: Taiwan yellow cattle (Hengchung); YC-KM: Taiwan yellow cattle (Kinmen); YC-XH: Taiwan yellow cattle (Xinhua).

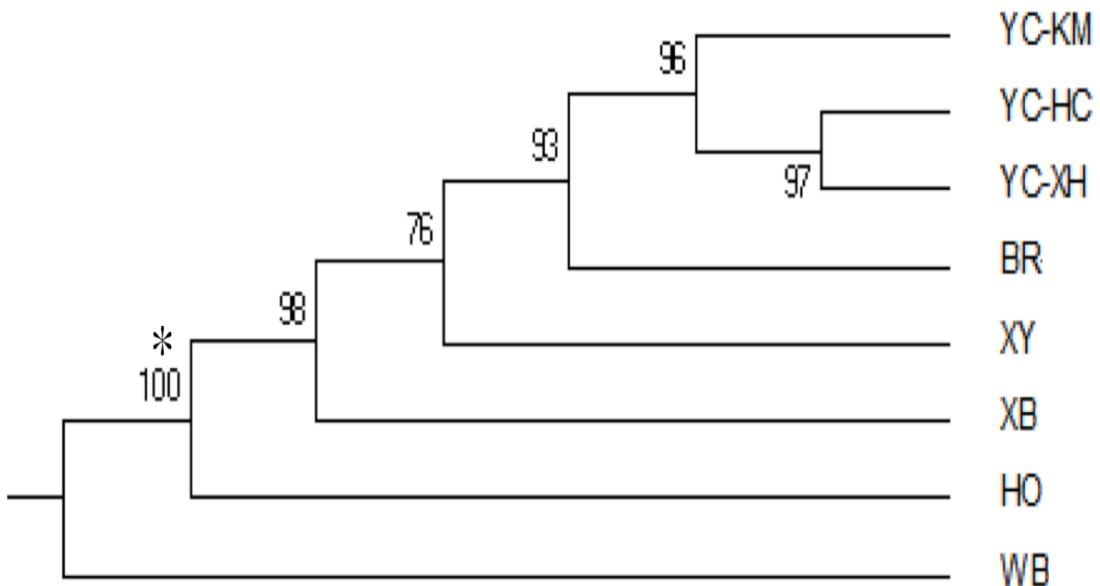


圖 12 各牛隻族群利用 15 組新微衛星標識所得鄰位連接法 (NJ) 之親緣關係樹。

YC-KM：臺灣黃牛（金門）； YC-HC：臺灣黃牛（恆春）； YC-XH：臺灣黃牛（新化）； BR：布拉曼； XY：雜交黃牛； XB：外國雜交牛； HO：荷蘭牛； WB：臺灣水牛。\* 1000 次重複取樣之 bootstrap values。

Figure 12 The neighbor-joining (NJ) tree among 8 cattle populations based on the 15 sets of novel microsatellite markers. YC-KM: Taiwan yellow cattle (Kinmen); YC-HC: Taiwan yellow cattle (Hengchung); YC-XH: Taiwan yellow cattle (Xinhua); BR: Brahman; XY: Hybrid yellow cattle; XB: Hybrid foreign cattle; HO: Holstein; WB: Taiwan water buffalo. \*Bootstrap values generated from 1,000 resampling.

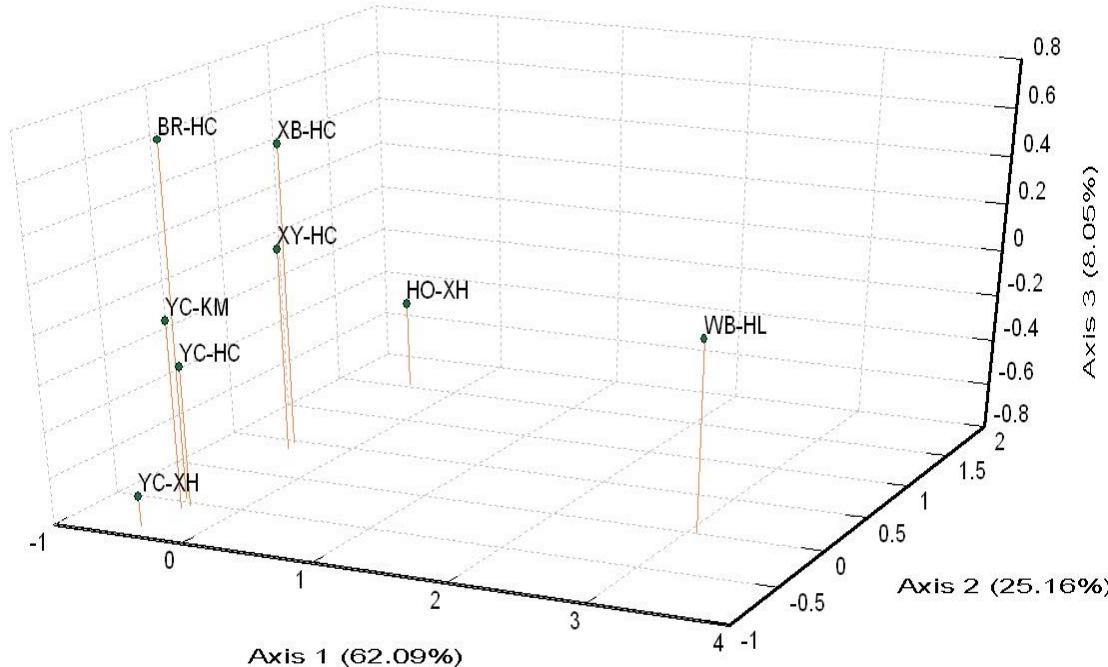


圖 13 各牛隻族群相對位置利用族群遺傳距離所繪製之主成分分析（PCA）圖。

YC-KM：臺灣黃牛（金門）； YC-HC：臺灣黃牛（恆春）； YC-XH：臺灣黃牛（新化）； BR-HC：布拉曼； XY-HC：雜交黃牛； XB-HC：外國雜交牛； HO-XH：荷蘭牛； WB-HL：臺灣水牛。

Figure 13 The principal component analysis (PCA) plot among these cattle population relative positions by population genetic distances. YC-KM: Taiwan yellow cattle (Kinmen); YC-HC: Taiwan yellow cattle (Hengchung); YC-XH: Taiwan yellow cattle (Xinhua); BR-HC: Brahman; XY-HC: Hybrid yellow cattle; XB-HC: Hybrid foreign cattle; HO-XH: Holstein; WB-HL: Taiwan water buffalo.

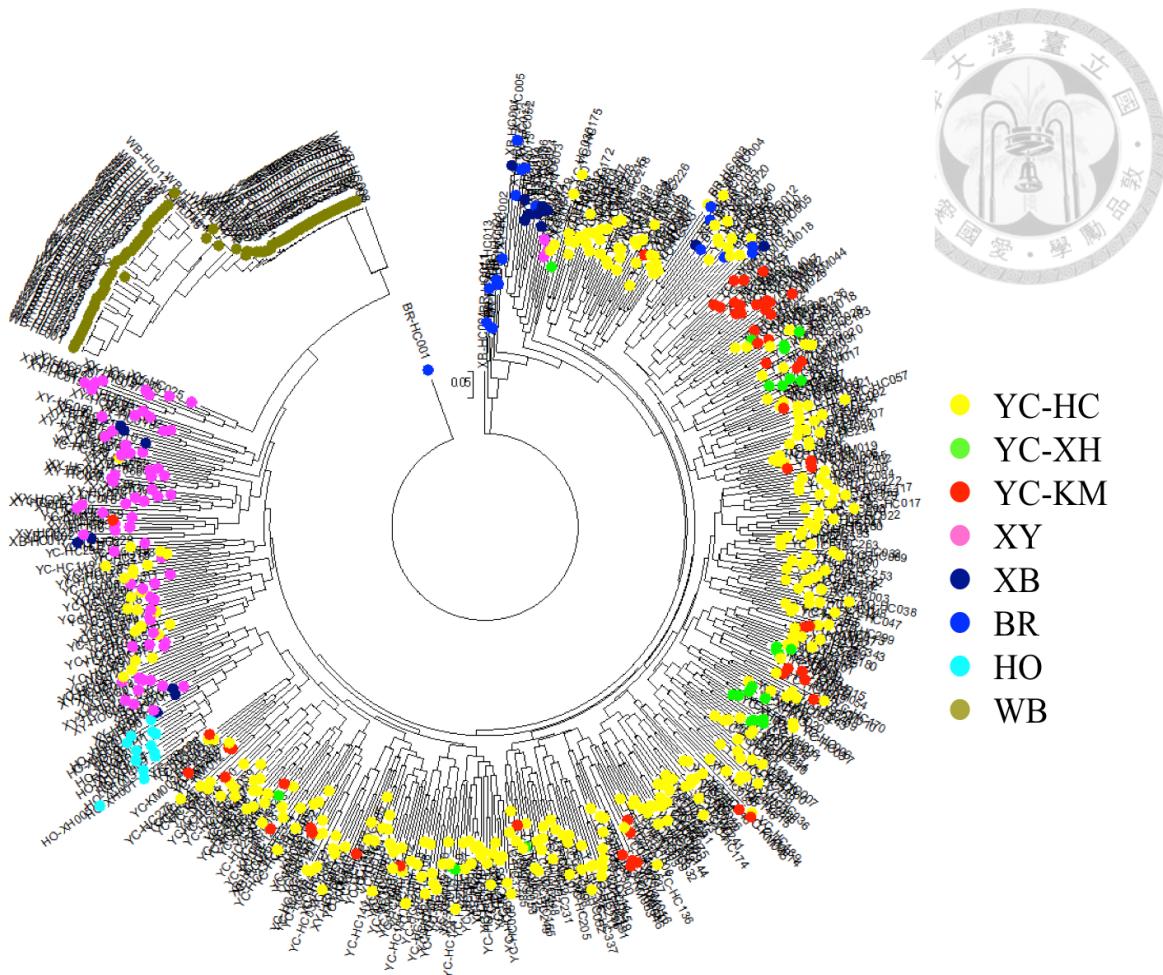


圖 14 各牛隻個體利用 15 組新微衛星標識所得鄰位連接法 (NJ) 之親緣關係樹。

YC-HC：臺灣黃牛（恆春）； YC-XH：臺灣黃牛（新化）； YC-KM：臺灣黃牛（金門）； XY：雜交黃牛； XB：外國雜交牛； BR：布拉曼； HO：荷蘭牛； WB：臺灣水牛。

Figure 14 The neighbor-joining (NJ) tree among these cattle individuals based on the 15 sets of novel microsatellite markers. YC-HC: Taiwan yellow cattle (Hengchung); YC-XH: Taiwan yellow cattle (Xinhua); YC-KM: Taiwan yellow cattle (Kinmen); XY: Hybrid yellow cattle; XB: Hybrid foreign cattle; BR: Brahman; HO: Holstein; WB: Taiwan water buffalo.

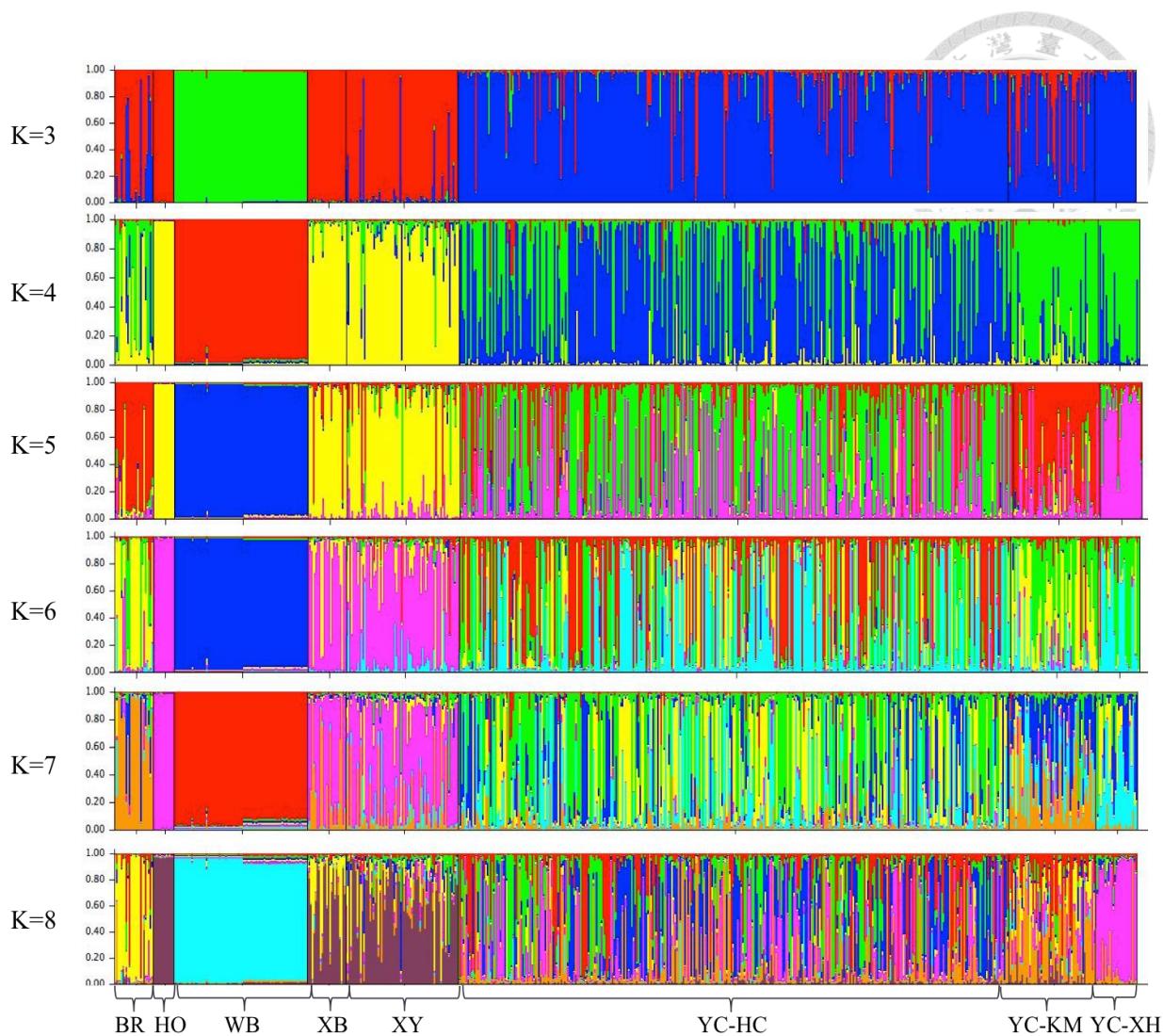


圖 15 各牛隻個體利用 15 組新微衛星標識所繪製之 STRUCTURE 群集分析圖 ( $K = 3 \sim 8$ )。 $K$  值為 STRUCTURE 分析中預設之群集數，以不同顏色表示不同群集。縱軸為個體的基因來源於該群集之比例，且每個圖條表示一個個體。BR：布拉曼；HO：荷蘭牛；WB：臺灣水牛；XB：外國雜交牛；XY：雜交黃牛；YC-HC：臺灣黃牛（恆春）；YC-KM：臺灣黃牛（金門）；YC-XH：臺灣黃牛（新化）。

Figure 15 The STRUCTURE cluster analysis plot ( $K=3 \sim 8$ ) among these cattle individuals based on the 15 sets of novel microsatellite markers.  $K$  is the number of clusters assumed in STRUCTURE analysis, and colors corresponded to clusters. The vertical axis is the proportion of gene resource in individuals from clusters, and each individual is represented by a single bar. BR: Brahman; HO: Holstein; WB: Taiwan water buffalo; XB: Hybrid foreign cattle; XY: Hybrid yellow cattle; YC-HC: Taiwan yellow cattle (Hengchung); YC-KM: Taiwan yellow cattle (Kinmen); YC-XH: Taiwan yellow cattle (Xinhua).



## 五、牛隻個體鑑別率之估算

全體牛隻族群之個體鑑別分析，分別計算 15 組新微衛星標識之個體鑑別率 ( $P_{(ID)}$ )、近親個體鑑別率 ( $P_{(ID)sib}$ )，及綜合全部 15 組新微衛星標識之  $P_{(ID)}$  與  $P_{(ID)sib}$ ，其試驗結果列於表 13。結果顯示，全體牛隻族群於此 15 組新微衛星基因座之  $P_{(ID)}$  範圍在 0.041 (YCA19) 至 0.527 (YCB09)，而綜合  $P_{(ID)}$  為  $9.8 \times 10^{-12}$ 。顯示在臺灣全體牛隻總數須達到且超過千億隻，隨機取得兩牛隻個體在此 15 組新微衛星標識才可能出現為相同基因型。

而當欲探討之族群個體有親屬關係，如全同胞 (full-sib) 或半同胞 (half-sib)，則在計算個體鑑別率時，需以  $P_{(ID)sib}$  進行評估較為適當，因此本試驗假設所有檢測牛隻族群具有近親關係時，計算其  $P_{(ID)sib}$ 。試驗結果顯示，此 15 組新微衛星基因座之  $P_{(ID)sib}$  範圍在 0.339 (YCA19) 至 0.739 (YCB09)，且綜合  $P_{(ID)sib}$  為  $3.1 \times 10^{-5}$ ，顯示全體牛隻族群中有血緣關係之牛隻數量須達到萬隻才會出現兩個體在 15 組新微衛星標識都是相同基因型之情況。

此外，圖 16 為將全體牛隻  $P_{(ID)}$  與  $P_{(ID)sib}$  取對數（以 10 為底）並乘以 -1 後對不同新微衛星標識數目所做之折線圖。從不同數目新微衛星標識之綜合  $P_{(ID)}$  與綜合  $P_{(ID)sib}$  所繪製成的折線圖中，也可推估在確知牛隻族群數量的情況下，若能剛好涵蓋所有族群個體數，其所需新微衛星標識之最低數量。

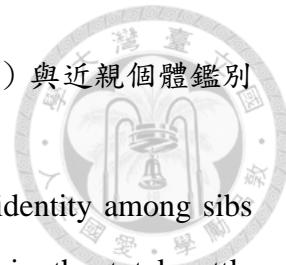


表 13 全體牛隻族群之 15 組新微衛星標識之個體鑑別率 ( $P_{(ID)}$ ) 與近親個體鑑別率 ( $P_{(ID)sib}$ )

Table 13 The probability of identity ( $P_{(ID)}$ ) and the probability of identity among sibs ( $P_{(ID)sib}$ ) of the 15 sets of novel microsatellite markers in the total cattle population

Locus	$P_{(ID)}$	$P_{(ID)sib}$
YCA19	0.041	0.339
YCA01	0.064	0.363
YCA20	0.099	0.397
YCA25	0.107	0.419
YCA18	0.130	0.425
YCC18	0.150	0.451
YCB06	0.154	0.460
YCA26	0.170	0.465
YCC21	0.185	0.474
YCA21	0.186	0.485
YCB03	0.356	0.613
YCC39	0.441	0.680
YCC11	0.478	0.710
YCC28	0.514	0.725
YCB09	0.527	0.739
Combined	$9.8 \times 10^{-12}$	$3.1 \times 10^{-5}$

$P_{(ID)}$ : probability of identity;  $P_{(ID)sib}$ : probability of identity among sibs.

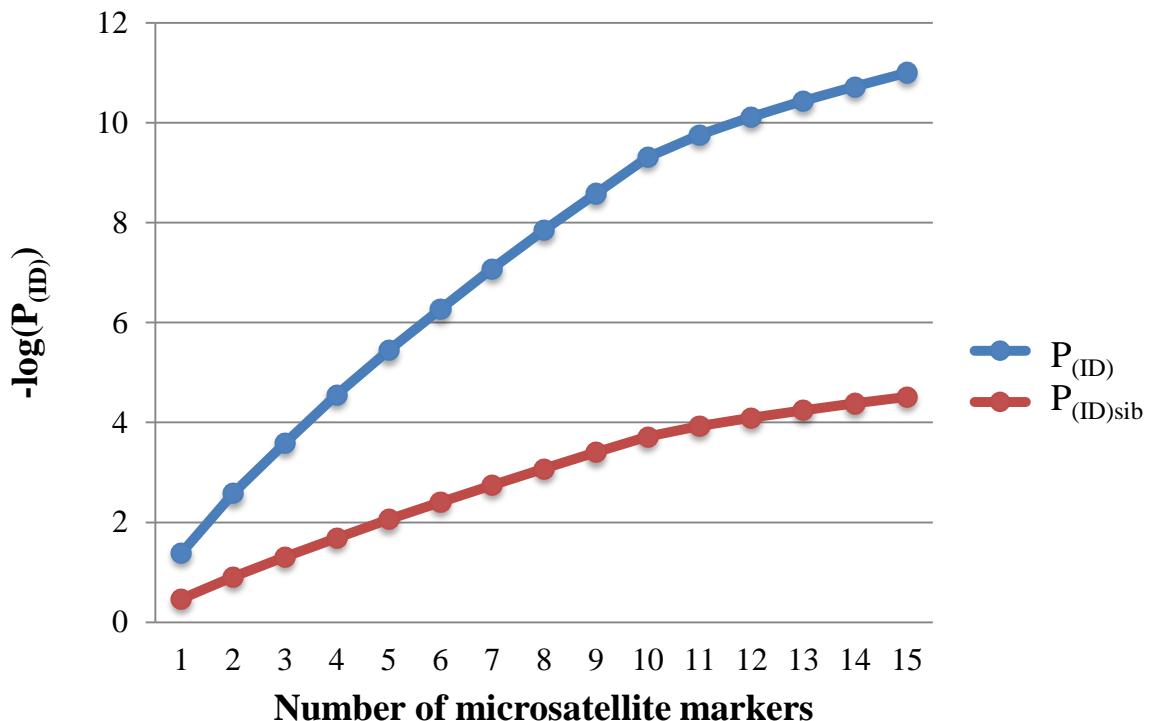


圖 16 全體牛隻族群之個體鑑別率 ( $P_{(ID)}$ ) 與近親個體鑑別率 ( $P_{(ID)sib}$ ) 對不同新微衛星標識數目之折線圖。

Figure 16 The probability of identity ( $P_{(ID)}$ ) and the probability of identity among sibs ( $P_{(ID)sib}$ ) of the total cattle population on the number of novel microsatellite markers of the line graph.



## 試驗二：利用候選基因法於臺灣黃牛生長性狀相關性之探討

### 一、*MYF5* 基因於臺灣黃牛之多態性分析

根據先前文獻顯示，在牛隻 *MYF5* 基因 1948 位點的第二內含子區域具有 A>G 的變異 (Drögemüller and Kempers, 2000)。本試驗首先利用 PCR-RFLP 以 *Taq I* 酶切，分析臺灣黃牛 *MYF5* g.1948A>G 基因型之多態性。以 PCR 增幅出第二內含子之片段共計 445 bp，並以 *Taq I* 切割之結果可區分出 AA、AG 及 GG 三種不同基因型（圖 17），其中 AA 基因型電泳的結果為 445 bp 位置 1 條環帶，雜合子 AG 基因型電泳的結果為 445、352 及 93 bp 位置 3 條環帶，而 GG 基因型則為 352 及 93 bp 位置 2 條環帶。結果顯示個體間基因序列具有多態性。

經由酶切試驗確認 *MYF5* g.1948A>G 於臺灣黃牛具有多態性後，本試驗隨之利用 TaqMan SNP Genotyping Assay 進行全體試驗臺灣黃牛牛隻之基因型檢測，基因型檢測結果顯示與酶切試驗結果相符，可區分出 AA、AG 及 GG 三種不同基因型（圖 18）。並進一步分析其基因型分布情況和頻率，結果如表 14 所示，*MYF5* g.1948A>G 位點於臺灣黃牛主要為 GG 基因型，而 AG 及 AA 基因型牛隻個體數量極少，在共 168 頭牛隻中，AG 及 AA 基因型分別只有 12 頭及 2 頭，故交替基因的頻率有極大的懸殊，交替基因 A 之頻率為 0.05；交替基因 G 為 0.95。進一步利用  $\chi^2$  檢定 *MYF5* g.1948A>G 此基因座於臺灣黃牛族群是否處於哈溫平衡，結果顯示所有檢測的臺灣黃牛族群於此基因座顯著地偏離哈溫平衡 ( $P < 0.05$ )。

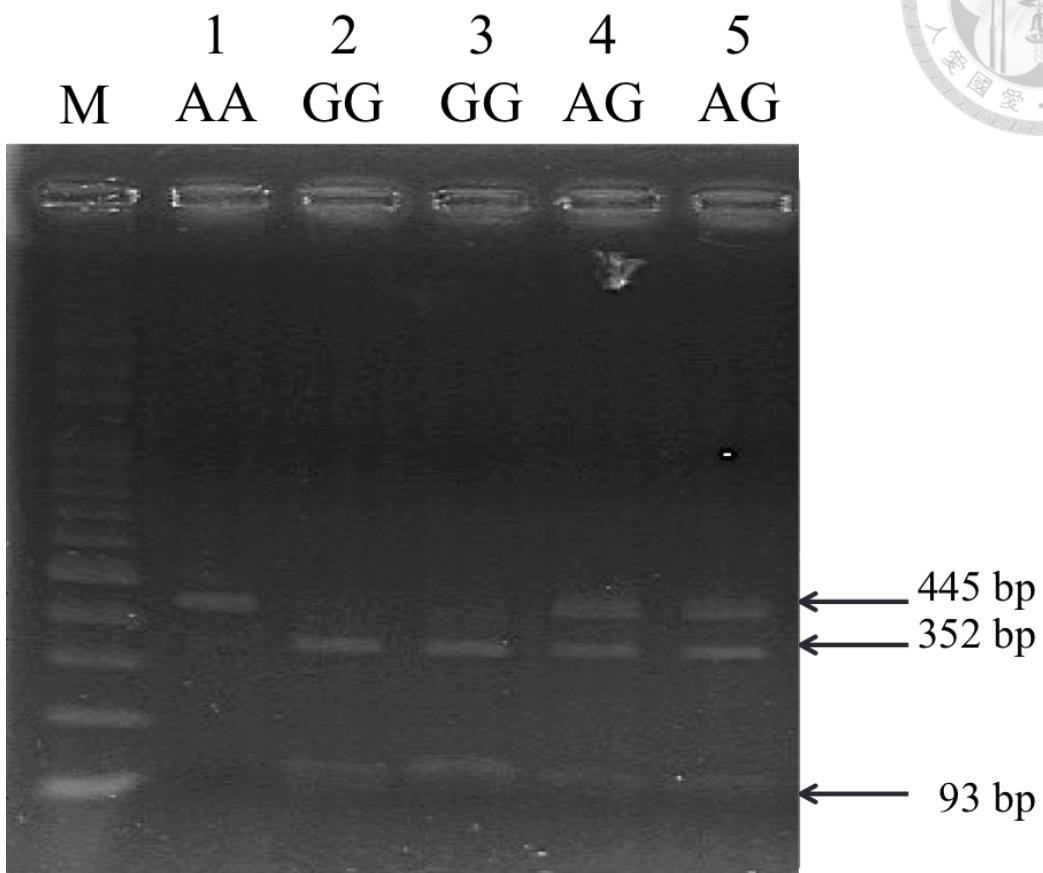


圖 17 臺灣黃牛 *MYF5* 基因第二內含子片段以 *Taq I* 限制酶切割之基因型判定。

Lane 1 : AA 基因型；Lane 2-3 : GG 基因型；Lane 4-5 : AG 基因型；M : 100 bp DNA ladder marker 。

Figure 17 The genotyping of intron 2 fragment of *MYF5* gene in Taiwan yellow cattle by *Taq I* restriction enzyme digestion. Lane 1: AA genotype; Lane 2-3: GG genotype; Lane 4-5: AG genotype; M: 100 bp DNA ladder marker.

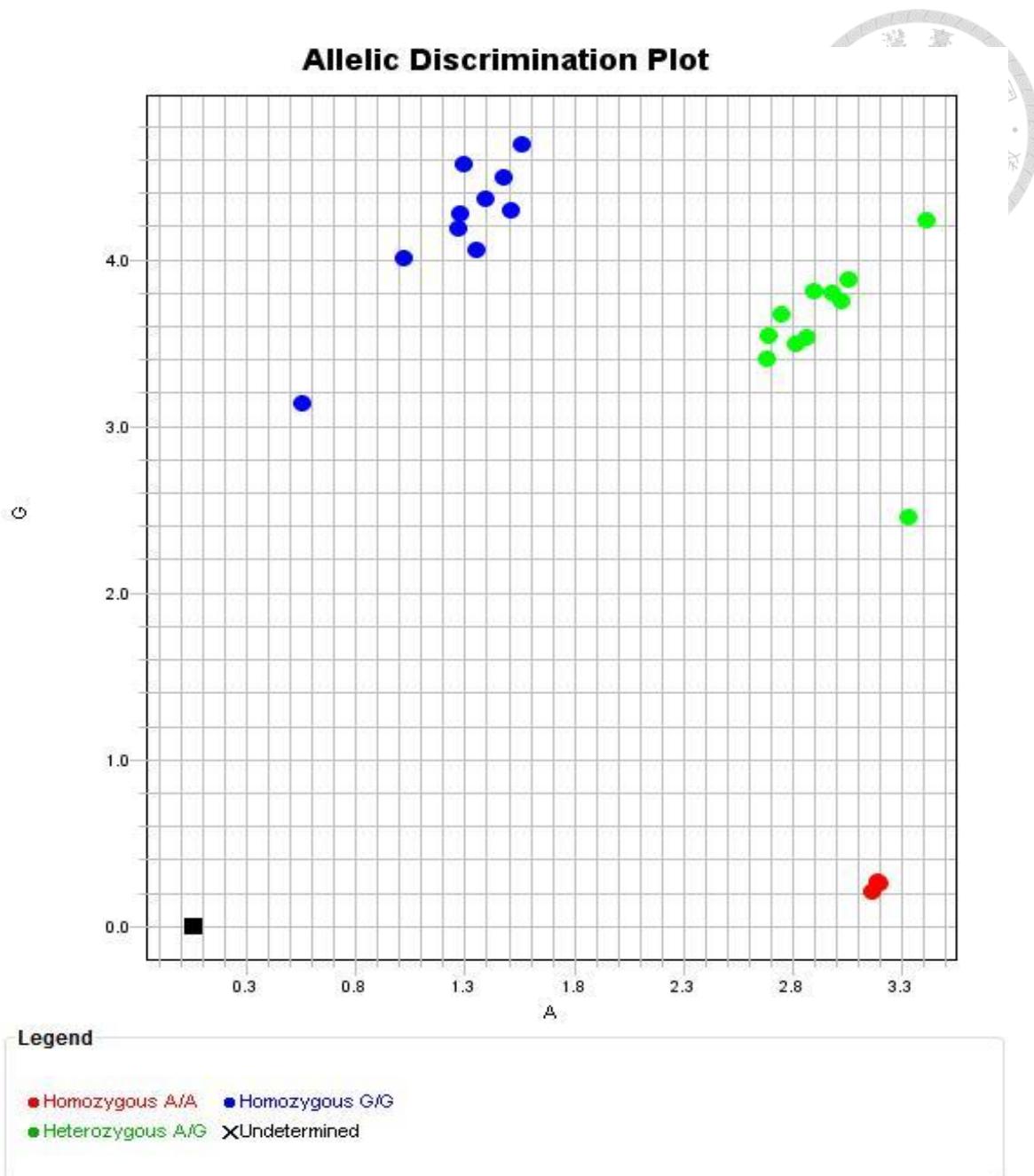


圖 18 臺灣黃牛 *MYF5* 基因第二內含子區域 g.1948A>G 位點以 TaqMan SNP Genotyping Assay 分析之基因型結果。未加 DNA 模板作為對照組 (negative control) 的樣本以 (■) 表示。

Figure 18 *MYF5* gene intron 2 g.1948A>G cluster plot between TaqMan SNP Genotyping Assay in Taiwan yellow cattle. One no template control (■) was included as negative control.



表 14 臺灣黃牛 *MYF5* 基因第二內含子區域 g.1948A>G 位點之基因型、交替基因頻率及哈溫平衡檢測

Table 14 The genotypic, allelic frequencies and Hardy-Weinberg equilibrium test of *MYF5* gene intron 2 g.1948A>G in Taiwan yellow cattle

Breed	Sample size	Genotypic freq. <sup>2</sup>						Allelic freq.		HWE test <sup>3</sup>
		AA		AG		GG		A	G	
		n <sup>1</sup>	Freq.	n	Freq.	n	Freq	Freq.	Freq.	
Taiwan yellow cattle	168	2	0.01	12	0.07	154	0.92	0.05	0.95	*

<sup>1</sup> n: number of specific genotype at specific site.

<sup>2</sup> Freq.: genotypic frequency or allelic frequency.

<sup>3</sup> HWE test: Hardy-Weinberg equilibrium test, \*: significant,  $P < 0.05$ .



## 二、*MYF5* 基因多態性與臺灣黃牛生長性狀相關性分析

將試驗所得之牛隻個體基因型與生長性狀資料，以最小平方值和特奇公正顯著差異法進行一般線性模式變方分析。分析結果如表 15 所示，顯示 3 種基因型在牛隻各階段之生長體重均無顯著差異 ( $P > 0.05$ )，但在牛隻 12 月齡體重具有趨勢上的影響 ( $P = 0.07$ )，基因型為 AG 以及 GG 的個體相較於 AA 基因型的個體有較高的 12 月齡體重。

表 15 臺灣黃牛 *MYF5* g.1948A>G 基因型與生長性狀之相關性分析

Table 15 Association between *MYF5* g.1948A>G genotype and growth traits in Taiwan yellow cattle

Growth traits <sup>1</sup>	<i>MYF5</i> genotype			<i>P</i> value
	AA (2)	AG (12)	GG (154)	
BW0 (kg)	24.0 ± 2.9 (2)	25.1 ± 1.5 (8)	23.8 ± 0.5 (89)	0.679
BW4 (kg)	78.1 ± 14.2 (2)	91.0 ± 5.8 (12)	91.7 ± 1.8 (132)	0.633
BW6 (kg)	100.4 ± 16.9 (2)	126.3 ± 6.9 (12)	126.5 ± 2.1 (143)	0.312
BW8 (kg)	120.4 ± 19.4 (2)	147.6 ± 7.9 (12)	151.5 ± 2.3 (149)	0.259
BW10 (kg)	138.9 ± 22.0 (2)	168.4 ± 9.0 (12)	172.4 ± 3.0 (128)	0.302
BW12 (kg)	140.7 ± 40.7 (2)	194.1 ± 13.5 (9)	196.6 ± 4.0 (122)	0.071

Values are the least square means ± standard error for the trait.

Numbers within parentheses are sample sizes.

<sup>1</sup> Traits under study were body weight at birth (BW0), 4 months (BW4), 6 months (BW6), 8 months (BW8), 10 months (BW10), and 12 months (BW12).



### 三、ZBED6 基因於臺灣黃牛之多態性分析

根據先前文獻顯示，在牛隻 ZBED6 基因第一外顯子區域 680 位點具有 C>G 的變異 (Huang *et al.*, 2013a)。本試驗首先利用 Huang 等人 (2013a) 設計之引子進行 PCR 反應，結果增幅的片段大小為 809 bp (圖 19)，再經由定序分析臺灣黃牛 ZBED6 g.680C>G 基因型之多態性。並從定序結果可區分出 CC、CG 及 GG 三種不同基因型 (圖 20)，其中雜合子 CG 基因型會同時帶有 C 與 G 兩個波峰。結果證實個體間基因序列具有多態性。

經由定序確認 ZBED6 g.680C>G 於臺灣黃牛具有多態性後，本試驗隨之利用 TaqMan SNP Genotyping Assay 進行全體試驗臺灣黃牛牛隻之基因型檢測，基因型檢測結果顯示與定序結果相符，可區分出 CC、CG 及 GG 三種不同基因型 (圖 21)。並進一步分析其基因型分布情況和頻率，結果如表 16 所示，ZBED6 g.680C>G 位點於臺灣黃牛主要為 CG 基因型，其次為 GG，而 CC 基因型牛隻個體數量最少，在共 168 頭牛隻中，CC 基因型只有 11 頭，交替基因 C 之頻率為 0.30；交替基因 G 為 0.70。而在哈溫平衡檢測中，ZBED6 g.680C>G 此基因座在臺灣黃牛是處於哈溫平衡的狀態 ( $P > 0.05$ )。

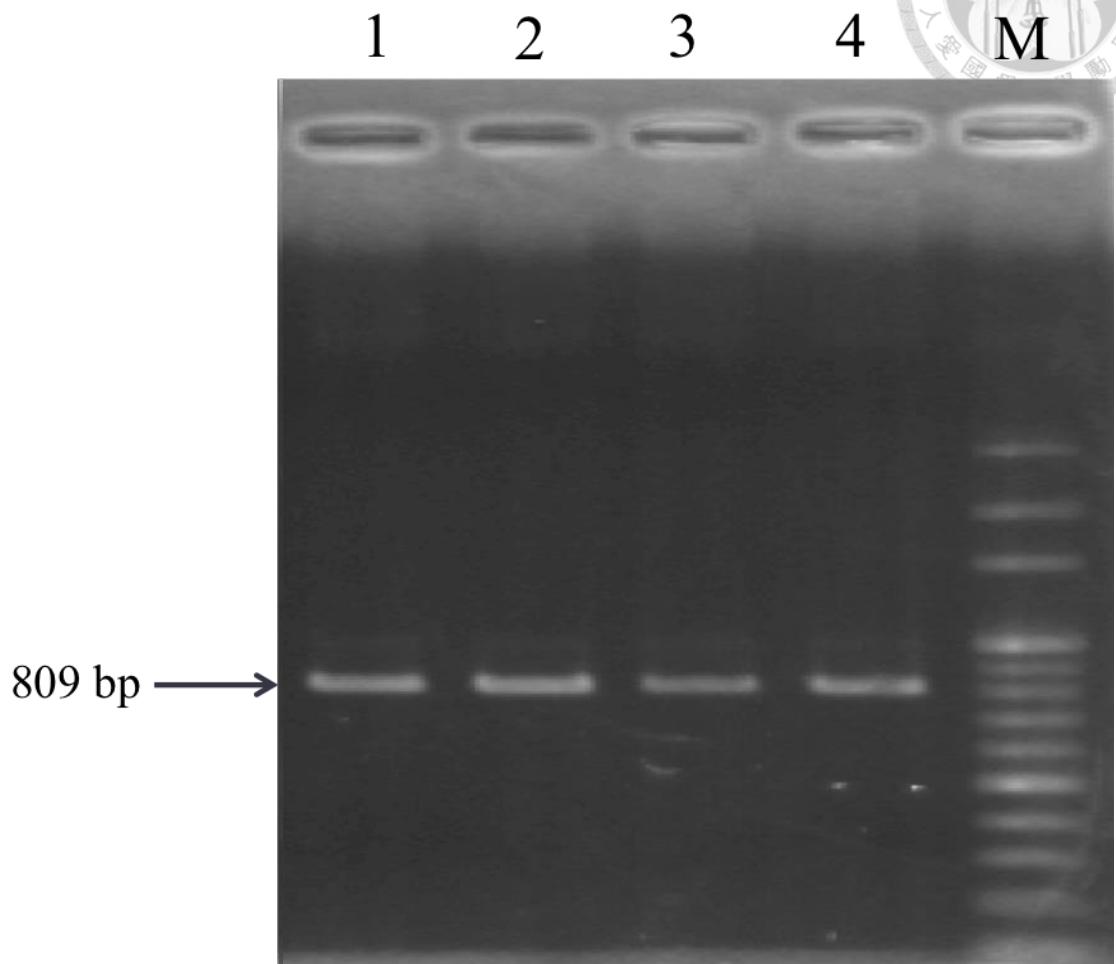


圖 19 臺灣黃牛 *ZBED6* 基因 PCR 產物之 1% 瓊脂膠體電泳圖。Lane 1-4:PCR 產物；M：100 bp DNA ladder marker。

Figure 19 PCR amplification of *ZBED6* gene in Taiwan yellow cattle on 1% agarose gel.

Lane 1-5: PCR products; M: 100 bp DNA ladder marker.

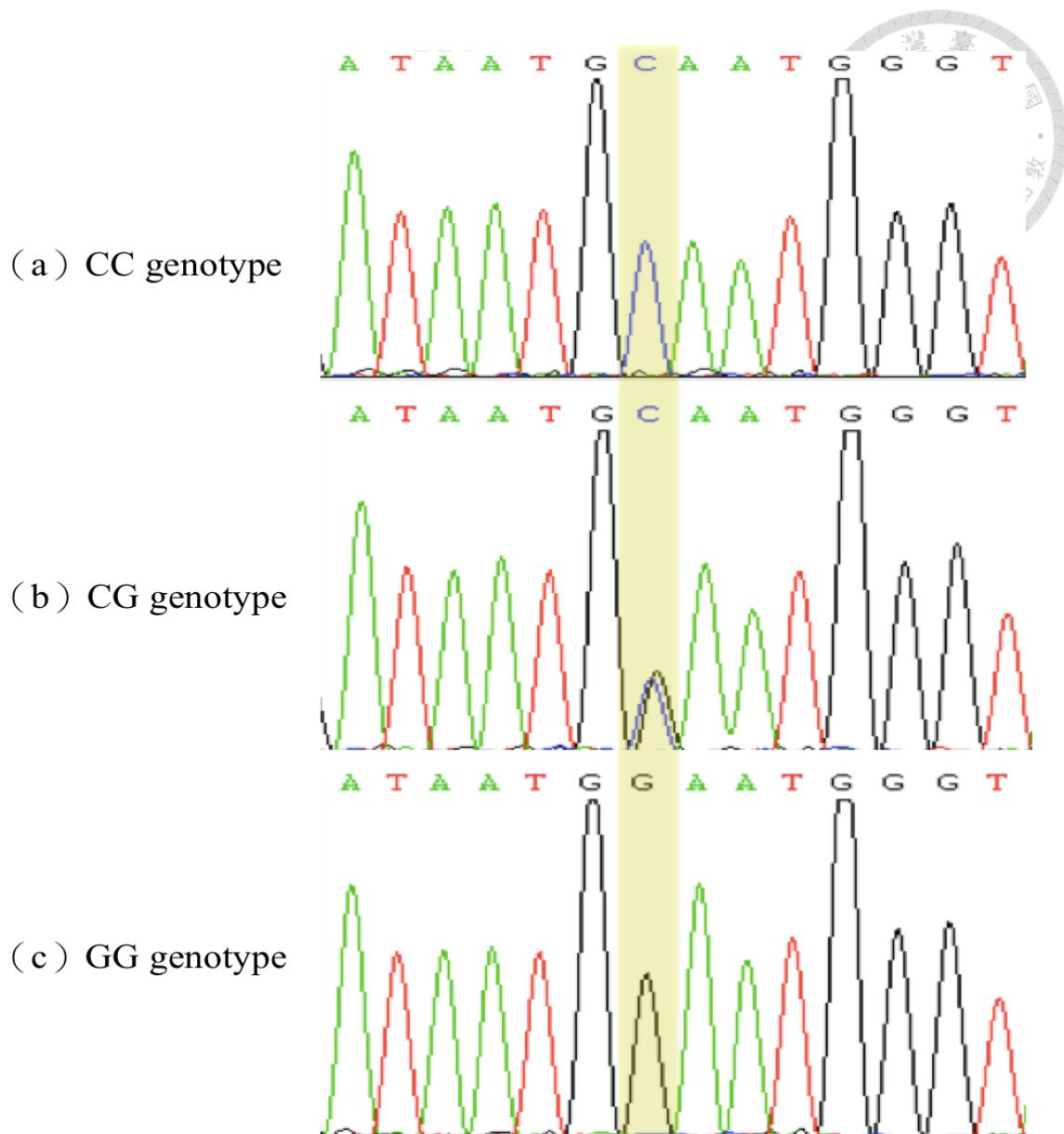


圖 20 臺灣黃牛 *ZBED6* 基因第一外顯子區域 g.680C>G 變異位點（以黃色標示）

之定序結果。 (a) CC 基因型；(b) CG 基因型；(c) GG 基因型。

Figure 20 Sequencing results of *ZBED6* gene exon 1 g.680C>G mutation site (highlight with yellow color) in Taiwan yellow cattle. (a) CC genotype; (b) CG genotype; (c) GG genotype.

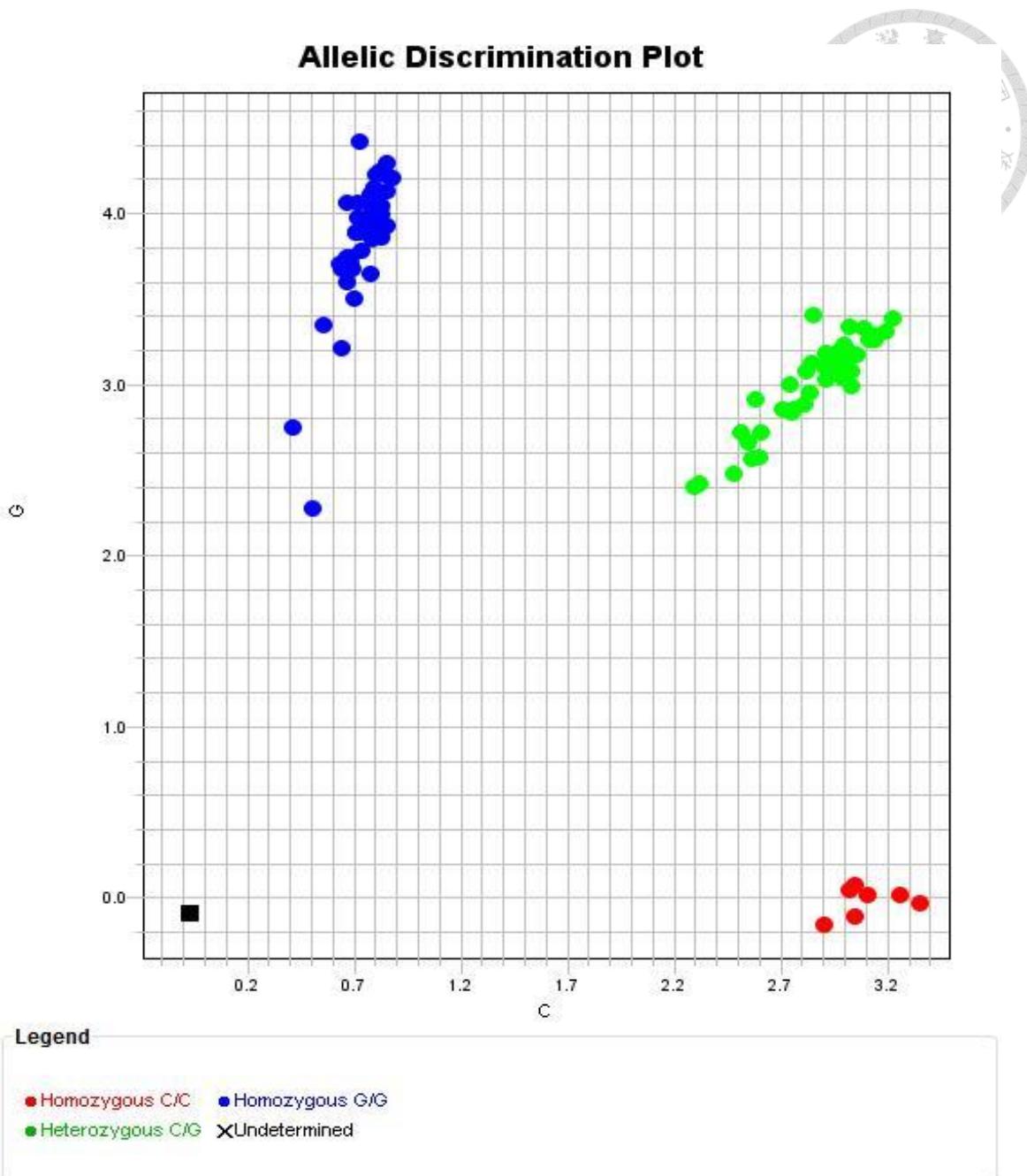


圖 21 臺灣黃牛 *ZBED6* 基因第一外顯子區域 g.680C>G 位點以 TaqMan SNP Genotyping Assay 分析之基因型結果。未加 DNA 模板作為對照組 (negative control) 的樣本以 (■) 表示。

Figure 21 *ZBED6* gene exon 1 g.680C>G cluster plot between TaqMan SNP Genotyping Assay in Taiwan yellow cattle. One no template control (■) was included as negative control.



表 16 臺灣黃牛 *ZBED6* 基因第一外顯子區域 g.680C>G 位點之基因型、交替基因頻率及哈溫平衡檢測

Table 16 The genotypic, allelic frequencies and Hardy-Weinberg equilibrium test of *ZBED6* gene exon 1 g.680C>G in Taiwan yellow cattle

Breed	Sample size	Genotypic freq. <sup>2</sup>						Allelic freq.		HWE test <sup>3</sup>
		CC		CG		GG		C	G	
		n <sup>1</sup>	Freq.	n	Freq.	n	Freq.	Freq.	Freq.	
Taiwan yellow cattle	168	11	0.07	80	0.47	77	0.46	0.30	0.70	NS

<sup>1</sup> n: number of specific genotype at specific site.

<sup>2</sup> Freq.: genotypic frequency or allelic frequency.

<sup>3</sup> HWE test: Hardy-Weinberg equilibrium test, NS: not significant,  $P > 0.05$ .



#### 四、*ZBED6* 基因多態性與臺灣黃牛生長性狀相關性分析

為探討 *ZBED6* 基因第一外顯子區域 g.680C>G 位點多態性與臺灣黃牛生長性狀之相關性，將試驗所得之牛隻個體基因型與生長性狀資料，以最小平方法和特奇公正顯著差異法進行一般線性模式變方分析。分析結果如表 17 所示，顯示 CG 與 GG 基因型較 CC 基因型有顯著較高的十月齡體重 ( $P < 0.05$ )，而在其他階段的生長體重則無顯著影響 ( $P > 0.05$ )。

表 17 臺灣黃牛 *ZBED6* g.680C>G 基因型與生長性狀之相關性分析

Table 17 Association between *ZBED6* g.680C>G genotype and growth traits in Taiwan yellow cattle

Growth traits <sup>1</sup>	<i>ZBED6</i> genotype			<i>P</i> value
	CC (11)	CG (80)	GG (77)	
BW0 (kg)	23.4 ± 2.1 (4)	24.3 ± 0.6 (47)	23.5 ± 0.6 (48)	0.600
BW4 (kg)	90.7 ± 6.4 (10)	94.0 ± 2.4 (69)	88.8 ± 2.5 (67)	0.327
BW6 (kg)	119.8 ± 7.3 (11)	128.3 ± 7.7 (77)	124.4 ± 3.0 (69)	0.432
BW8 (kg)	140.6 ± 8.3 (11)	154.4 ± 3.1 (78)	148.3 ± 3.3 (74)	0.186
BW10 (kg)	152.5 ± 10.4 <sup>b</sup> (9)	177.5 ± 3.7 <sup>a</sup> (70)	166.3 ± 4.1 <sup>a</sup> (63)	0.024
BW12 (kg)	190.6 ± 17.0 (6)	201.0 ± 5.2 (61)	191.2 ± 5.4 (65)	0.398

Values are the least square means ± standard error for the trait.

Numbers within parentheses are sample sizes.

<sup>1</sup> Traits under study were body weight at birth (BW0), 4 months (BW4), 6 months (BW6), 8 months (BW8), 10 months (BW10), and 12 months (BW12).

<sup>a,b</sup> Values with different superscripts within the same row differ significantly at  $P < 0.05$ .



## 五、*SREBP1c* 基因於臺灣黃牛之多態性分析

根據先前文獻顯示，在牛隻 *SREBP1c* 基因第九外顯子區域 10781 位點具有 C>G 的變異 (Huang *et al.*, 2011a)。利用 PCR-RFLP 以 *Taq I* 酶切，分析臺灣黃牛 *SREBP1c* g.10781C>G 基因型之多態性。以 PCR 增幅出第九外顯子之片段共計 534 bp，並以 *Taq I* 切割之結果可區分出 CC、CG 及 GG 三種不同基因型（圖 22），其中 CC 基因型電泳的結果為 272 及 262 bp 位置 2 條環帶，雜合子 CG 基因型電泳的結果為 534、272 及 262 bp 位置 3 條環帶，而 GG 基因型則為 534 bp 位置 1 條環帶。結果證實個體間基因序列具有多態性。

接著並進一步分析試驗中所有牛隻個體其基因型分布情況和頻率，結果如表 18 所示，*SREBP1c* g.10781C>G 位點於臺灣黃牛主要為 GG 基因型，其次為 CG，而 CC 基因型牛隻個體數量最少，在共 168 頭牛隻中，CC 基因型只有 11 頭，交替基因 C 之頻率為 0.25；交替基因 G 為 0.75。而在哈溫平衡檢測中，*SREBP1c* g.10781C>G 此基因座在臺灣黃牛是處於哈溫平衡的狀態 ( $P > 0.05$ )。

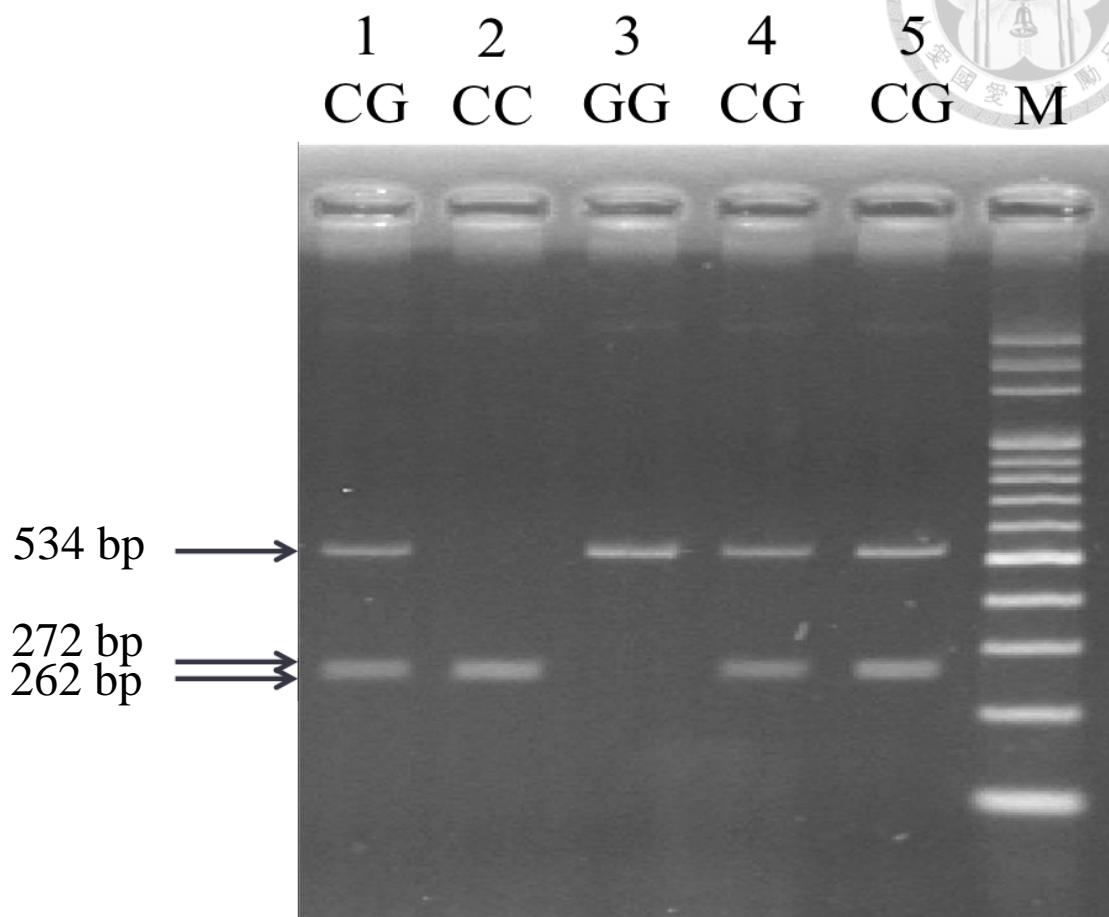


圖 22 臺灣黃牛 *SREBP1c* 基因第九外顯子片段以 *Taq* I 限制酶切割之基因型判定。Lane 1, 4, 5 : CG 基因型；Lane 2 : CC 基因型；Lane 3 : GG 基因型；M : 100 bp DNA ladder marker。

Figure 22 The genotyping of exon 9 fragment of *SREBP1c* gene in Taiwan yellow cattle by *Taq* I restriction enzyme digestion. Lane 1, 4, 5: CG genotype; Lane 2: CC genotype; Lane 3: GG genotype; M: 100 bp DNA ladder marker.



表 18 臺灣黃牛 *SREBP1c* 基因第九外顯子區域 g.10781C>G 位點之基因型、交替基因頻率及哈溫平衡檢測

Table 18 The genotypic, allelic frequencies and Hardy-Weinberg equilibrium test of *SREBP1c* gene exon 9 g.10781C>G in Taiwan yellow cattle

Breed	Sample size	Genotypic freq. <sup>2</sup>						Allelic freq.		HWE test <sup>3</sup>
		CC		CG		GG		C	G	
		n <sup>1</sup>	Freq.	n	Freq.	n	Freq.	Freq.	Freq.	
Taiwan yellow cattle	168	11	0.07	62	0.37	95	0.56	0.25	0.75	NS

<sup>1</sup> n: number of specific genotype at specific site.

<sup>2</sup> Freq.: genotypic frequency or allelic frequency.

<sup>3</sup> HWE test: Hardy-Weinberg equilibrium test, NS: not significant,  $P > 0.05$ .



## 六、*SREBP1c* 基因多態性與臺灣黃牛生長性狀相關性分析

為探討 *SREBP1c* 基因第九外顯子區域 g.10781C>G 位點多態性與臺灣黃牛生長性狀之相關性，將試驗所得之牛隻個體基因型與生長性狀資料，以最小平方值和特奇公正顯著差異法進行一般線性模式變方分析。分析結果如表 19 所示，顯示雜合子 CG 基因型較 CC 及 GG 基因型有顯著較高的出生體重 ( $P < 0.05$ )，而在其他階段的生長體重則無顯著影響 ( $P > 0.05$ )。

表 19 臺灣黃牛 *SREBP1c* g.10781C>G 基因型與生長性狀之相關性分析

Table 19 Association between *SREBP1c* g.10781C>G genotype and growth traits in Taiwan yellow cattle

Growth traits <sup>1</sup>	<i>SREBP1c</i> genotype			<i>P</i> value
	CC (11)	CG (62)	GG (95)	
BW0 (kg)	22.5 ± 0.6 <sup>b</sup> (6)	25.5 ± 0.7 <sup>a</sup> (33)	23.2 ± 0.5 <sup>b</sup> (60)	0.0178
BW4 (kg)	89.6 ± 6.0 (11)	94.2 ± 2.7 (54)	89.8 ± 2.3 (81)	0.4437
BW6 (kg)	130.0 ± 7.3 (11)	124.9 ± 3.2 (57)	126.4 ± 2.7 (89)	0.7963
BW8 (kg)	153.1 ± 8.3 (11)	149.3 ± 3.6 (61)	151.6 ± 3.0 (91)	0.8503
BW10 (kg)	176.2 ± 9.8 (10)	164.9 ± 4.4 (52)	175.5 ± 3.7 (80)	0.1472
BW12 (kg)	198.2 ± 13.6 (9)	197.0 ± 6.4 (43)	195.4 ± 4.8 (80)	0.9667

Values are the least square means ± standard error for the trait.

Numbers within parentheses are sample sizes.

<sup>1</sup> Traits under study were body weight at birth (BW0), 4 months (BW4), 6 months (BW6), 8 months (BW8), 10 months (BW10), and 12 months (BW12).

<sup>a,b</sup> Values with different superscripts within the same row differ significantly at  $P < 0.05$ .



### 試驗三：牛短脊椎綜合症基因頻率分析

#### 一、短脊椎綜合症之 *FANCI* 基因型檢測

為檢測牛隻 *FANCI* 基因是否帶有 3.3 kb 缺失之交替基因，利用涵蓋此 3.3 kb 片段之引子 (Charlier *et al.*, 2012) 進行 PCR 反應，增幅特定 DNA 片段以檢測樣本之基因型。結果顯示有 BB (正常個體) 及 Bb (帶有 BS 之雜合子個體) 兩種基因型 (圖 23)，其中 BB 基因型電泳的結果為 3738 bp 位置 1 條環帶，雜合子 Bb 基因型電泳的結果則為 3738 及 409 bp 位置 2 條環帶。試驗結果顯示，在所檢測之荷蘭牛族群中有雜合子個體的出現。

#### 二、短脊椎綜合症之 *FANCI* 基因型頻率分布

兩個場共 53 頭荷蘭母牛之 *FANCI* 基因 3.3 kb 缺失之基因型頻率分布如表 20 所示，結果顯示在新化場的 13 頭牛隻中，有 3 頭為 Bb 基因型，雜合子頻率為 23%；在臺灣大學的 40 頭牛隻中，有 2 頭為 Bb 基因型，其頻率為 5%。綜合二場牛隻，雜合子個體出現的頻率為 9.4%。另針對三個場共 229 頭臺灣黃牛，以及花蓮場之 83 頭臺灣水牛進行 *FANCI* 基因 3.3 kb 缺失之基因型檢測，結果顯示所有牛隻皆為正常個體 (表 20)。

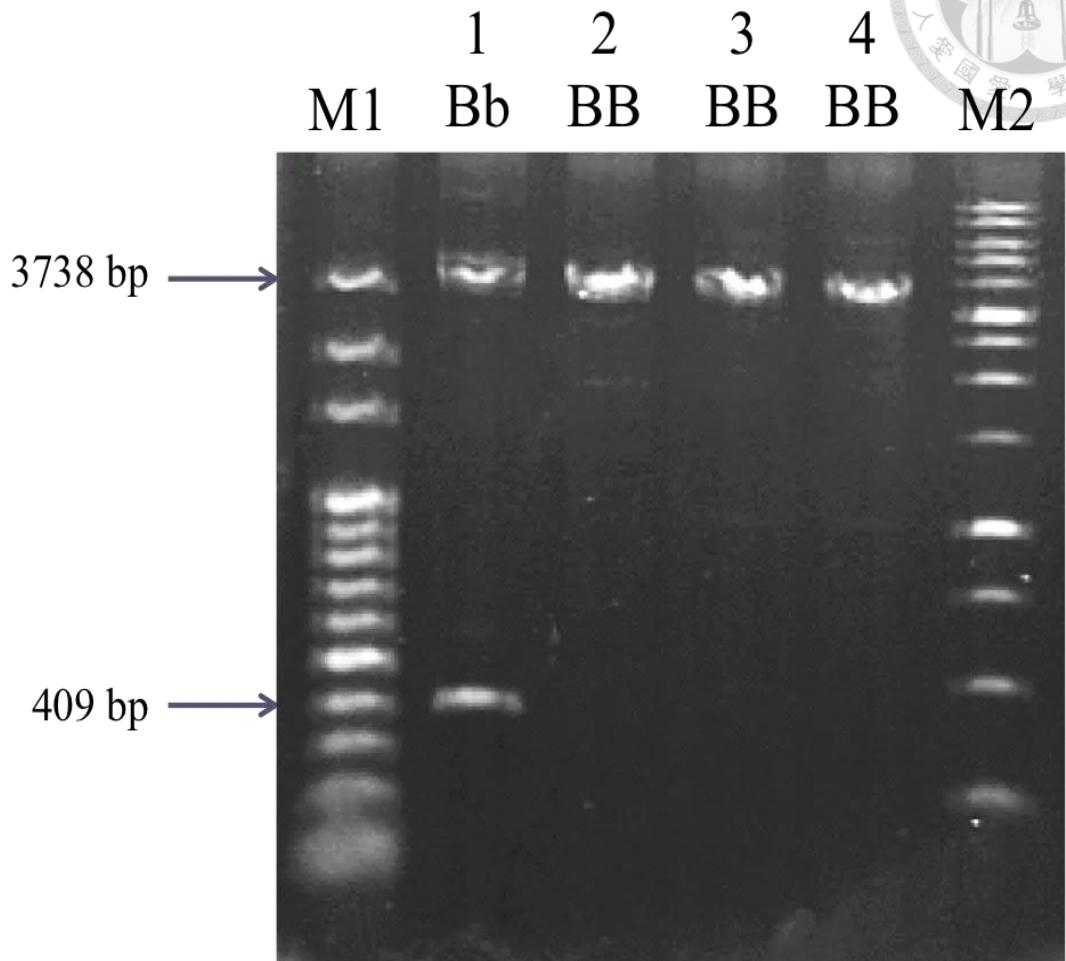
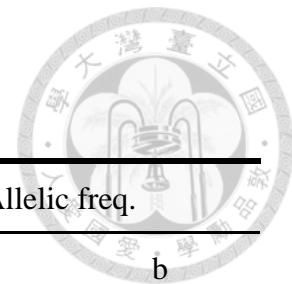


圖 23 牛隻 *FANCI* 基因 PCR 產物之 1% 瓊脂膠體電泳圖。Lane 1：雜合子個體 Bb 基因型；Lane 2-4：正常個體 BB 基因型；M1：100 bp DNA ladder marker；M2：1 kb DNA ladder marker。

Figure 23 PCR amplification of bovine *FANCI* gene on 1% agarose gel. Lane 1: Bb genotype; Lane 2-4: BB genotype; M1: 100 bp DNA ladder marker; M2: 1 kb DNA ladder marker.

表 20 牛隻 *FANCI* 基因 3.3 kb 缺失之基因型及交替基因頻率檢測結果Table 20 The genotypic and allelic frequencies of the bovine *FANCI* gene 3.3 kb deletion

Breed	Farm <sup>1</sup>	Sample size	Genotypic freq. <sup>3</sup>				Allelic freq.	
			BB		Bb		B	b
			n <sup>2</sup>	Freq.	n	Freq.	Freq.	Freq.
Holstein	Xinhua	13	10	0.77	3	0.23	0.88	0.12
	NTU	40	38	0.95	2	0.05	0.98	0.02
Taiwan yellow cattle	Hengchung	168	168	1.00	0	0.00	1.00	0.00
	Kinmen	35	35	1.00	0	0.00	1.00	0.00
	Xinhua	26	26	1.00	0	0.00	1.00	0.00
Taiwan water buffalo	Hualien	83	83	1.00	0	0.00	1.00	0.00

<sup>1</sup> Xinhua: Xinhua Livestock Research Institute, C.O.A.; NTU: National Taiwan University. Hengchung: Hengchung Branch of Livestock Research Institute, C.O.A.; Kinmen: Kinmen County Livestock Research Institute, C.O.A.; Hualien: Hualien Animal Propagation Station of Livestock Research Institute.

<sup>2</sup> n: number of specific genotype at specific site.

<sup>3</sup> Freq.: genotypic frequency or allelic frequency.



## 伍、討論

### 試驗一：牛隻新微衛星標識之開發與應用

#### 一、新微衛星基因座之遺傳變異分析

本試驗利用 15 組從雜交黃牛基因組所開發之新微衛星標識，針對所採集的 8 個牛隻族群進行遺傳變異分析。經檢測後，其中共有 10 組無法在臺灣水牛族群中成功增幅，其可能的原因為在分類上，水牛與其他歐洲牛 (*Bos taurus*) 及印度牛 (*Bos indicus*) 族群雖同屬牛亞科 (Bovinae)，然而歐洲牛及印度牛為牛屬 (*Bos*)，臺灣水牛則為水牛屬 (*Bubalus*)，且染色體數目核型 (karyotype) 也不同，由於演化關係較遠，使本試驗所開發來自歐洲牛及印度牛之部分微衛星標識引子無法黏合而造成 PCR 失敗。

遺傳變異分析結果顯示，此 15 組新微衛星基因座的交替基因數 ( $N_a$ ) 平均值為 8.2，有效交替基因數 ( $N_e$ ) 之平均值為 3.0 (表 7)，此結果顯示大部份的基因座之  $N_e$  遠低於  $N_a$ ，此情形根據各微衛星基因座於整體牛隻族群之基因型頻率可發現 (附表 1 至 15)，例如基因座 YCA18 的  $N_a$  為 12，但其  $N_e$  却只有 3.5，推測其原因可能為其交替基因之頻率分布主要集中在三個交替基因上—149 bp (16.6%)、151 bp (34.7%) 及 157 bp (36.5%)，因此，在交替基因頻率分布極度不均的情況下，造成  $N_a$  與  $N_e$  差距大的情形。

利用此 15 組新微衛星標識檢測試驗牛隻族群所得之  $H_E$  平均值為 0.588，顯示大多數的微衛星標識的  $H_E$  值均落在高期望異質度之範圍 ( $H_E > 0.5$ ) (Fontequ et al., 2014)。而  $H_O$  之平均值為 0.424，其中只有基因座 YCB09 及 YCC28 的  $H_O$  高於  $H_E$ ，其中較值得注意的是基因座 YCA18、



YCC11 及 YCC18 之  $H_O$  有遠低於  $H_E$  的情況，推測是由於此三個基因座皆座落於牛隻的 X 染色體上，雄性個體在此三個基因座之基因型皆為半合子（hemizygote），導致整體觀測異質度下降，故此三個微衛星標識在整體牛隻族群之遺傳歧異度檢測可能有失其準確性。PIC 之平均值為 0.552，落於高多態性訊息含量的範圍（ $PIC > 0.5$ ）（Agha *et al.*, 2008）（表 8）。

相較於國外文獻，有學者使用 30 組微衛星標識分析於中國 27 個當地品種黃牛以及 3 個外國品種牛隻，而此 30 組微衛星標識在所有牛隻的平均交替基因數為 16.55， $H_O$  平均值為 0.703， $H_E$  平均值為 0.725，PIC 平均值為 0.683，學者指出此 30 組微衛星標識分析於牛隻遺傳多樣性為有效的標識（Zhang *et al.*, 2007a）。而本試驗之  $H_O$ 、 $H_E$  與 PIC 三個變量亦具有中度及高度多態性，顯示本試驗所開發之 15 組牛隻新微衛星標識即可有效地分析本試驗所收集之 8 個牛隻族群結構與遺傳變異。

在整體族群之遺傳分化及近親評估方面，以  $F_{IS}$  檢測族群內個體是否有近親配種情形，本試驗中此 15 組新微衛星標識之平均  $F_{IS}$  為 0.184，數值為正值可知整體受測牛隻族群雜合子比例少於預期，可能為近親交配之現象 ( $F_{IS} > 0$ ) (Wright, 1978)。 $F_{IT}$  是檢測整個族群是否有近親交配之傾向，代表的意義與  $F_{IS}$  相似。本試驗中此 15 組新微衛星標識之  $F_{IT}$  平均值為 0.271，其正值亦表示整體族群有近親交配之情形，根據 Tu 等人 (2014) 利用 12 組微衛星標識於臺灣黃牛族群之研究結果，所檢測之臺灣黃牛族群  $F_{IS}$  平均值為 0.186， $F_{IT}$  平均值為 0.235，皆為正值且與本試驗所得結果相似，顯示整體族群以及族群內個體傾向於近親交配，意指國內臺灣黃牛族群有近



親交配的現象。 $F_{ST}$  可用以判斷族群間遺傳分化的情形，而本試驗中此 15 組新微衛星標識之  $F_{ST}$  之平均值為 0.108，由平均值可得知全體牛隻族群內存在中度分化之情形 ( $0.05 < F_{ST} < 0.15$ ) (Wright, 1978)。另在哈溫平衡檢測中，15 組新微衛星標識中有 9 個基因座顯著地偏離哈溫平衡 ( $P < 0.05$ )，意即此 9 個基因座之  $H_0$  與  $H_E$  有顯著差異，並且為雜合子缺失的情況。

## 二、各族群牛隻之遺傳變異分析

將試驗中 8 個族群牛隻分別進行遺傳變異之探討，結果顯示某些族群會存在特有交替基因（附表 1 至 15），尤其以恆春黃牛族群發現在不同基因座具有最多特有交替基因（YCA19：183 bp；YCA21：149, 161 bp；YCC21：236 bp；YCC39：238 bp；YCA20：236 bp.. 等），而在荷蘭牛族群於 YCC18 基因座也有較高頻率之特有交替基因 178 bp (23.1%)。顯示這些特有交替基因存在於牛隻族群在遺傳組成上保有獨特性。

以  $N_a$ 、 $N_e$ 、 $H_0$ 、 $H_E$ 、PIC 五個變量進行微衛星基因座分析本試驗 8 個族群之多態性評估（表 9），結果顯示在恆春黃牛族群有最高的  $N_a$ ，在金門黃牛及雜交黃牛族群有最高的  $N_e$ ，而  $H_0$  及  $H_E$  值皆於雜交黃牛族群為最高，在 8 個族群之 PIC 檢測中，恆春黃牛 (0.522)、金門黃牛 (0.506) 及 雜交黃牛 (0.521) 三個族群落於高多態性訊息含量的範圍 ( $PIC > 0.5$ )，此五個變量於臺灣水牛族群皆為最低。綜合數值結果，顯示臺灣黃牛及雜交黃牛族群相較於其他牛隻族群有較高的遺傳變異性，代表本試驗自雜交黃牛基因組篩選之新微衛星標識確實對臺灣黃牛及雜交牛族群具有專一性。



在  $F_{IS}$  平均值方面，8 個牛隻族群數值皆為正值，且以布拉曼族群之  $F_{IS}$  為最高 (0.314)，其次為恆春黃牛族群 (0.207)，最低數值則是在臺灣水牛族群 (0.005)，在哈溫平衡檢測中，只有荷蘭牛及臺灣水牛族群未偏離哈溫平衡，顯示此兩個族群可能沒有近親配種或是近親的情況不嚴重，而其餘 6 個牛隻族群 (恆春黃牛、新化黃牛、金門黃牛、雜交黃牛、外國雜交牛及布拉曼族群) 皆顯著地偏離哈溫平衡 ( $P < 0.05$ )，推測在臺灣地區或許此 6 個牛隻族群可能有近親配種的現象出現。

### 三、族群分化、遺傳距離與分群

兩兩比較 8 個牛隻族群之間的族群分化以及基因交流程度 (表 10)，結果顯示以雜交黃牛與外國雜交牛族群的分化程度最小並且基因交流程度最大 ( $F_{ST} = 0.019$  ;  $N_m = 12.777$ )，推測是由於此兩個族群飼養於同一場，且其雜交之遺傳背景組成複雜；而由於臺灣水牛與其他牛隻在分類上為不同屬，故臺灣水牛族群與其他牛隻族群的分化程度皆很大並且只有低度的基因交流情形 ( $F_{ST} > 0.5$  ;  $N_m < 1$ )。藉由 8 個族群間遺傳距離的計算也可印證上述結果 (表 12)。另外，根據族群間遺傳距離繪製主座標分析 (PCA) 3D 立體圖 (圖 13)，以三個主座標軸之變異量區分族群之間的遺傳距離，亦可印證遺傳距離最大與最小的牛隻族群，可發現臺灣水牛族群與其他牛隻族群坐落於 3D 圖最遠之兩側，表示分布距離皆較遠，雜交黃牛族群與外國雜交牛族群相對距離較近，荷蘭牛族群與雜交牛族群之相對距離，較荷蘭牛族群與其他牛隻族群之相對距離近，而三個地區族群的臺灣黃牛分布距離亦接近。



而利用鄰位連接法 (NJ) 繪製之牛隻族群親緣關係樹 (圖 12)，在重複取樣 1000 次的分析中，各族群分支的 bootstrap value 皆為 70% 以上，有學者指出繪製族群親緣關係樹時，當兩族群間的 bootstrap value 未大於 70%，顯示這些群集分類並不明顯 (Efron *et al.*, 1996)，表示在本試驗 8 個族群之分類結果皆屬於高度可信之範圍。根據此圖可將全體牛隻族群可分為六個主要的群集：臺灣黃牛、布拉曼、雜交黃牛、外國雜交牛、荷蘭牛及臺灣水牛族群，其中臺灣黃牛群集又可分為金門黃牛與恆春、新化黃牛兩個次群集，是由於部分新化黃牛族群為恆春所移出，故新化族群跟恆春族群遺傳距離較近。另以鄰位連接法 (NJ) 繪製牛隻個體之親緣關係樹 (圖 14)，及利用 STRUCTURE 軟體所繪製之群集分析圖 (圖 15)，其主要群集之區分結果與族群親緣關係樹之結果相符，皆可明確區分臺灣黃牛、外國品種牛、雜交牛與臺灣水牛族群。相較於國外文獻，在中國有學者利用 30 個微衛星標識對 30 個品種牛隻繪製親緣關係樹，結果顯示可將外國品種與中國品種區分，且中國品種黃牛又可區分為兩個群集，其一為 5 個無肩峰品種牛隻，另一群集為 22 個瘤牛品種牛隻 (Zhang *et al.*, 2007a)。而在本試驗中，臺灣黃牛群集亦可將金門黃牛族群分離，顯示黃牛分別在金門地區以及臺灣本島有血統上的差異，此結果與 Tu 等人 (2014) 於臺灣黃牛族群遺傳結構之研究結果相似，可將金門地區黃牛與恆春保種族群黃牛分為兩個群體。然有些定義為恆春黃牛族群之個體卻摻雜於雜交黃牛族群中，可能有血統不純正之疑慮。



#### 四、牛隻個體鑑別率

於牛隻個體鑑別之分析中，全體牛隻族群於此 15 組新微衛星基因座之綜合個體鑑別率 ( $P_{(ID)}$ ) 為  $9.8 \times 10^{-12}$  (表 13)，而根據農委會畜禽統計調查結果統計至 104 年第一季之臺灣牛隻總數約為  $1.5 \times 10^5$  頭（行政院農業委員會統計室，2015），以全體牛隻族群的綜合  $P_{(ID)}$  而言，目前臺灣牛隻族群總數以本試驗所使用之 15 組新微衛星標識進行遺傳分析時，隨機挑選兩頭個體出現完全相同基因型之機率非常低。但由先前計算遺傳變異的結果可得知，臺灣黃牛族群發生近親配種的可能性較高，故因以綜合近親個體鑑別率 ( $P_{(ID)sib}$ ) 來評估較為準確，而全體牛隻族群之  $P_{(ID)sib}$  為  $3.1 \times 10^{-5}$  (表 13)，顯示具有血緣關係之牛隻數量須達到萬隻才會出現兩個體在 15 組新微衛星標識皆為相同基因型的情況，根據 104 年第一季農委會畜禽統計調查結果，目前臺灣黃牛及雜交牛數量約為  $1.2 \times 10^4$  頭（行政院農業委員會統計室，2015），顯示所使用之 15 組微衛星標識在臺灣黃牛與雜交牛族群應可有效進行個體鑑別。



## 試驗二：利用候選基因法於臺灣黃牛生長性狀相關性之探討

### 一、*MYF5* 基因多態性與臺灣黃牛生長性狀相關性分析

在 *MYF5* 基因第二內含子區域有一多態性位點 g.1948A>G，據先前文獻顯示，*MYF5* 基因第二內含子區域 g.1948A>G 在德國地區的荷蘭牛 (Drögemüller and Kempers, 2000)、韓國地區的韓牛與安格斯 (Seong *et al.*, 2011) 以及中國地區的南陽、秦川與晉南三個品種黃牛 (Zhang *et al.*, 2007b) 皆具有多態性，皆檢測出 AA、AG 和 GG 此三種基因型，而在基因型分布結果顯示，荷蘭牛、韓牛與中國黃牛的 G 交替基因頻率較 A 交替基因高；相反的，在安格斯則是以 A 交替基因頻率較高。在本試驗之 *MYF5* 基因第二內含子區域 g.1948A>G 基因型檢測結果顯示，此位點在所檢測之臺灣黃牛樣本中亦具有多態性，同樣為 AA、AG 和 GG 三種基因型，而基因型分布結果是以 GG 基因型頻率遠高於 AG 及 AA 基因型頻率（表 14），此結果與中國地區於南陽牛之檢測結果相似 (Zhang *et al.*, 2007b)，以 AA 基因型的頻率極低，推測是由於此兩品種皆為黃牛品種。

在相關性分析方面，有學者的研究顯示韓牛族群中 *MYF5* 基因第二內含子區域 g.1948A>G 基因型為 AG 及 GG 之個體較 AA 基因型個體，有顯著較高的 12 月齡體重及平均日增重 ( $P < 0.05$ ) (Chung and Kim, 2005)；亦有學者的研究發現此位點在中國秦川黃牛族群中，與牛隻的體高及十字部高具有顯著相關性 (Zhang *et al.*, 2007b)。而在本試驗中 *MYF5* 基因第二內含子區域 g.1948A>G 之基因多態性和臺灣黃牛生長性狀相關性分析結果指出，不同基因型對其生長性狀沒有顯著差異存在 ( $P > 0.05$ )，但 AG 及 GG 基因型較



AA 基因型個體的 12 月齡體重有較高的趨勢 ( $P < 0.1$ ) (表 15)，考慮到此位點在基因型偏分布情況嚴重的樣本結構下，能具有趨勢上的影響，顯示此位點仍有潛力作為輔助選拔的工具。

## 二、*ZBED6* 基因多態性與臺灣黃牛生長性狀相關性分析

在 *ZBED6* 基因第一外顯子區域有一多態性位點 g.680C>G，在本試驗之臺灣黃牛樣本檢測結果顯示此位點具有多態性，具有 CC、CG 及 GG 三種基因型，基因型分布情況顯示臺灣黃牛大部份為 CG 及 GG 基因型，CC 基因型樣本數量則很少 (表 16)，而在先前文獻指出，*ZBED6* 基因第一外顯子區域 g.680C>G 於中國地區南陽牛、秦川牛、晉南牛及荷蘭牛進行檢測，此四個品種牛隻的基因型分佈皆以 CG 基因型佔大多數 (Huang et al., 2013a)。

有學者發現在秦川牛 *ZBED6* 基因編碼區發生突變的單套型 (haplotype) 個體，其肌肉組織中的 mRNA 表現量較野生型 (wild-type) 個體顯著下降，且 *IGF2* 基因 mRNA 表現量顯著上升，進一步促使肌肉細胞增殖 (Huang et al., 2013b)。本試驗 *ZBED6* 基因第一外顯子區域 g.680C>G 基因多態性和臺灣黃牛生長性狀相關性分析結果顯示，CG 與 GG 基因型較 CC 基因型有顯著較高的十月齡體重 ( $P < 0.05$ )，而在其他階段的生長體重則無顯著影響 ( $P > 0.05$ ) (表 17)。在 Huang 等人 (2013a) 的研究中，於南陽牛進行 *ZBED6* 基因第一外顯子區域 g.680C>G 位點多態性和生長體重相關性之分析，結果顯示基因型為 GG 型之個體其 6 月齡與 12 月齡體重相較於 CC 和 CG 型顯著較高 ( $P < 0.05$ )。相較於本試驗，雖試驗的牛隻品種不同，但在 *ZBED6*



基因第一外顯子區域 g.680C>G 位點基因型和牛隻生長性狀相關性之探討，有相類似之結果，即基因型為 CC 之個體有較低的生長體重，為選拔過程中較不希望出現之基因型，因此應用此位點進行臺灣黃牛育種時，建議或許未來可選拔帶有 G 交替基因之牛隻。

### 三、*SREBP1c* 基因多態性與臺灣黃牛生長性狀相關性分析

在 *SREBP1c* 基因第九外顯子區域之多態性位點 g.10781C>G，據先前文獻顯示，*SREBP1c* 基因第九外顯子區域 g.10781C>G 在中國地區的南陽牛、秦川牛、郊縣紅牛與晉南牛四個中國當地黃牛品種 (Huang *et al.*, 2011a) 皆具有多態性，皆檢測出 CC、CG 和 GG 此三種基因型，而基因型頻率結果顯示，在此四個品種牛隻皆以 CG 基因型頻率最高，CC 與 GG 基因型則平均分布，另在中國地區荷蘭牛則無多態性的發現，所檢測的荷蘭牛個體皆為 CC 基因型 (Huang *et al.*, 2011a)。在本試驗之 *SREBP1c* 基因第九外顯子區域 g.10781C>G 基因型檢測結果顯示，此位點在所檢測之臺灣黃牛樣本中亦具有多態性，同樣為 CC、CG 和 GG 三種基因型，而基因型分布結果是以 CG 及 GG 基因型頻率較高，而 CC 基因型頻率極低 (表 18)。

關於 *SREBP1c* 基因多態性的研究常見於豬隻與牛隻脂肪和肉質性狀方面之相關性分析 (Zhao *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013)，而近年來已有研究發現 *SREBP1c* 基因之多態性亦與牛隻的生長性狀有顯著相關，在 Huang 等人 (2011a) 的研究中，於南陽牛進行 *SREBP1c* 基因第九外顯子區域 g.10781C>G 位點多態性和生長體重相關性之分析，結果顯示此位點不同基因



型對牛隻的出生體重及 12 月齡體重具有顯著影響 ( $P < 0.05$ )，以 GG 基因型之個體有較高的體重。在本試驗，*SREBP1c* 基因第九外顯子區域 g.10781C>G 基因多態性和臺灣黃牛生長性狀相關性分析結果顯示，以 CG 基因型個體有顯著較高的出生體重 ( $P < 0.05$ )，而其他階段的生長體重在不同基因型則無顯著差異 ( $P > 0.05$ ) (表 19)。綜合上述研究結果，顯示 *SREBP1c* 基因第九外顯子區域 g.10781C>G 此位點之多態性對於牛隻胎兒時期的生長具有一定影響。



### 試驗三：牛短脊椎綜合症基因頻率分析

於新化場與臺大場進行荷蘭牛之 *FANCI* 基因篩檢後，發現在臺大場 40 頭荷蘭牛中有 2 頭為 *Bb* 基因型雜合子個體 (5%)，而在新化場牛隻則有高比例的 *Bb* 基因型雜合子個體 (23%)，共 13 頭荷蘭牛隻中即有 3 頭為帶有 BS 之雜合子個體，另三個場共 229 頭臺灣黃牛以及花蓮場之 83 頭臺灣水牛皆為正常個體 (表 20)。對照先前各國之雜合子頻率研究，美國的結果為 6% (VanRaden *et al.*, 2011)，荷蘭為 7.4% (Charlier *et al.*, 2012)，在中國為 2.2~4.9% (Fang *et al.*, 2013)，本試驗新化場之荷蘭牛隻雜合子頻率皆高於其他國家研究結果。由於此遺傳缺陷會引起胚胎畸型甚至早期流產或死亡，進而造成酪農重大的經濟損失，故有必要對臺灣荷蘭牛族群進行大規模的篩檢，並且未來在採用國外公牛冷凍精液配種應先進行此基因的分子檢測篩檢，以避免此不良基因的遺傳。



## 陸、結論

本試驗開發共 15 組適用於臺灣牛隻族群之新微衛星標識，對 8 個族群牛隻之遺傳歧異度及族群遺傳結構進行分析，並利用候選基因之多態性，探討其與臺灣黃牛生長性狀之相關性，另外對所搜集的荷蘭牛、臺灣黃牛及臺灣水牛樣本，進行短脊椎綜合症之基因型頻率篩檢。其結果可歸納出下列幾點：

### 一、臺灣牛隻微衛星標識之開發與應用

利用三組多引子系統共 15 組新微衛星標識分析臺灣牛隻族群，結果顯示在臺灣黃牛及雜交牛族群具有高度多態性。由鄰位連接法繪製之牛隻個體親緣關係樹中，可明確地區分臺灣黃牛、雜交牛及其他牛隻族群，此結果表示此些新微衛星標識檢測於牛隻品種或族群差異有良好分辨性。而綜合個體鑑別率及綜合近親個體鑑別率之效力亦可涵蓋 2014 年臺灣牛隻總數及近親族群數量，顯示此 15 組新微衛星標識可作為良好的個體鑑別工具，可應用於未來國產牛肉產銷履歷之驗證。

### 二、利用候選基因法於臺灣黃牛生長性狀相關性之探討

使用 *MYF5* g.1948 A>G、*ZBED6* g.680C>G 及 *SREBP1c* g.10781C>G 此三個基因變異位點於臺灣黃牛進行分析，試驗結果顯示三個位點在所檢測的臺灣黃牛皆具有多態性，且不同基因型在特定性狀上有趨勢或顯著的影響 ( $P < 0.05$ )，故此三個基因之多態性有潛力可作為評估臺灣黃牛生長體重的遺傳標識。

### 三、牛短脊椎綜合症基因頻率分析

本試驗檢測荷蘭牛、臺灣黃牛及臺灣水牛樣本，在荷蘭牛中篩檢出帶有短脊椎綜合症之雜合子個體，故未來有必要對臺灣之荷蘭牛進行擴大族群篩檢，並採用選擇性配種以篩除此不良基因。

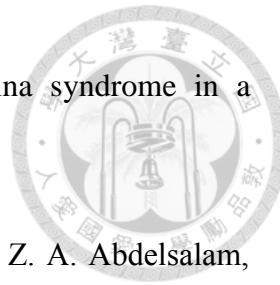


## 柒、參考文獻

- 王之仰、江友中、邱明堂、徐志宏、張誌益、莊國賓、傅龍明、陳又嘉、陳福旗、陳幼光、廖明輝、劉宏仁、鄭雪玲。2011。分子檢測技術實習，第77-110頁。
- 國立屏東科技大學。屏東縣。
- 江榮吉。1975。臺灣東部山坡地肉牛生產之經濟分析。國立臺灣大學農學院農業經濟學系。臺北市。
- 行政院農業委員會統計室。2014。102 年農業統計年報。行政院農業委員會。臺北市。
- 行政院農業委員會統計室。2015。104 年第 1 季畜禽統計調查結果。行政院農業委員會。臺北市。
- 呂秀英。2013。臺灣肉牛之生產成本與利益分析。臺灣銀行季刊。64 (1): 144-164。
- 宋永義。2003。有怎樣的牛便有怎樣的產業文化。台灣畜產種原資訊網。取自：  
[http://www.angrin.tlri.gov.tw/apec2003/apec2003\\_C/TW\\_CULT/TW\\_CULT.htm](http://www.angrin.tlri.gov.tw/apec2003/apec2003_C/TW_CULT/TW_CULT.htm)
- 李光復。2000。臺灣黃牛保種簡介。行政院農業委員會畜產試驗所恆春分所。屏東縣。
- 李光復。2008。臺灣黃牛來源與種原保存工作通述。行政院農業委員會畜產試驗所五十週年所慶學術研討會（遺傳育種）。臺灣省畜產試驗所專輯第113號，臺南縣。
- 李育才。2014。國產與進口農產品分流管理-國產牛肉生產追溯制度。農政與農情，第267期。行政院農業委員會。臺北市。
- 李培芬、陳宛均、徐秀君、黃佩俐、莊聖儀、余忠翰、許榕容、連裕益、李依紋、



- 蕭人瑄、賴均、陳韻如、劉益忠。2006。臺灣的自然資源與生態資料庫III農林漁牧，第182-183頁。行政院農業委員會林務局。臺北市。
- 胡智益、蔡右任、林順福。2011。DNA分子標誌應用在茶樹之現況與潛力。農業生技產業季刊。25：30-37。
- 孫寅瑞。2001。牛肉成為台灣漢人副食品的歷史觀察。國立中央大學歷史研究所碩士論文。桃園市。
- 常洪、耿社民、武彬、陳幼春。1990。中國黃牛生態種特徵及其利用方向：中國黃牛考源-中國黃牛源流考之一。中國農業科學院畜牧研究所。農業出版社。北京。
- 張秀鑾、黃鈺嘉。2005。乳量乳質優勢乳牛品種之簡介。台灣畜產種原資訊網。  
取自：[http://www.angrin.tlri.gov.tw/cow/20051031/2005cow\\_breed\\_3-1.htm](http://www.angrin.tlri.gov.tw/cow/20051031/2005cow_breed_3-1.htm)
- 張秀鑾。1998。台灣本土畜產種原庫之建立與利用。臺灣省畜產試驗所四十週年所慶家畜禽遺傳育種研討會論文集，第168-180頁。臺灣省畜產試驗所專輯第57號，臺南縣。
- 黃志鎧、魏良原、賈玉祥。2007。臺灣水牛再出發。農政與農情，第177期。行政院農業委員會。臺北市。
- 黃志鎧。1998。臺灣水牛保種。臺灣省畜產試驗所四十週年所慶家畜禽遺傳育種研討會論文集，第160-167頁。臺灣省畜產試驗所專輯第57號，臺南縣。
- 劉鋼、徐瑞玲、陳文雄。2013。產地國標示與臺灣消費者對國產牛肉之價格溢酬。人文及社會科學集刊。25 (1)：1-44。



- Agerholm, J. S., F. McEvoy, and J. Arnbjerg. 2006. Brachyspina syndrome in a Holstein calf. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18: 418-422.
- Agha, S. H., F. Pilla, S. Galal, I. Shaat, M. D'andrea, S. Reale, A. Z. A. Abdelsalam, and M. H. Li. 2008. Genetic diversity in Egyptian and Italian goat breeds measured with microsatellite polymorphism. *J. Anim. Breed. Genet.* 125: 194-200.
- Baker, A. J. 2000. Molecular methods in ecology. pp. 235-238. Blackwell Science Ltd., Malden, MA, USA.
- Barendse, W., S. M. Armitage, L. M. Kossarek, A. Shalom, B. W. Kirkpatrick, A. M. Ryan, D. Clayton, L. Li, H. L. Neibergs, N. Zhang, W. M. Grosse, J. Weiss, P. Creighton, F. McCarthy, M. Ron, A. J. Teale, R. Fries, R. A. McGraw, S. S. Moore, M. Georges, M. Soller, J. E. Womack, and D. J. S. Hetzel. 1994. A genetic linkage map of the bovine genome. *Nature Genet.* 6: 227-235.
- Barry, G. H. 2007. Phylogenetic trees made easy: a how-to manual. 3rd ed. Sinauer Assoc. Inc., Sunderland, MA, USA.
- Blackwell, T. K., and H. Weintraub. 1990. Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection. *Science* 250: 1104-1110.
- Bostein, D., R. L. White, M. Skolnick, and R. W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331.
- Braun, T., M. A. Rudnicki, H. H. Arnold, and R. Jaenish. 1992. Targeted inactivation of



the muscle regulatory gene *Myf-5* results in abnormal rib development and perinatal death. *Cell* 71: 369-382.

Charlier, C., J. S. Agerholm, W. Coppieters, P. Karlsson-Mortensen, W. Li, G. de Jong, C. Fasquelle, L. Karim, S. Cirera, N. Cambisano, N. Ahariz, E. Mullaart, M. Georges, and M. Fredholm. 2012. A deletion in the bovine *FANCI* gene compromises fertility by causing fetal death and brachyspina. *PLoS ONE* 7: e43085.

Chung, E. R., and W. T. Kim. 2005. Association of SNP marker in *IGF-I* and *MYF5* candidate genes with growth traits in Korean cattle. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 18: 1061-1065.

Davis, R. L., H. Weintraub, and A. B. Lassar. 1987. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 51:987-1000.

Dieringer, D., and C. Schlötterer. 2003. MICROSATELLITE ANALYSER (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Mol. Ecol. Notes* 3: 167-169.

Drögemüller, C., and A. Kempers. 2000. A *TaqI* PCR-RFLP at the bovine myogenic factor (*MYF5*) gene. *Anim. Genet.* 31: 140-157.

Eberlé, D., B. Hegarty, P. Bossard, P. Ferré, and F. Foufelle. 2004. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 86: 839-848.

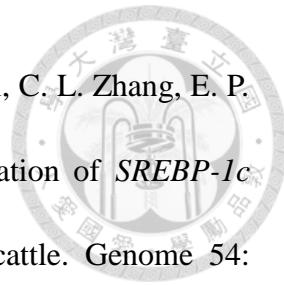
Efron, B., E. Halloran, and S. Holmes. 1996. Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 93: 13429-13434.



- Ellegren, H. 2000. Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends Genet.* 16: 551-558.
- Evanno, G., S. Regnaut, and J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14: 2611-2620.
- Evett, I. W., and B. S. Weir. 1998. Interpreting DNA evidence: statistical genetics for forensic scientists. 1st ed. pp. 126. Sinauer Assoc. Inc., Sunderland, MA, USA.
- Excoffier, L., and H. E. Lischer. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10: 564-567.
- Fang, L., Y. Li, Y. Zhang, D. Sun, L. Liu, Y. Zhang, and S. Zhang. 2013. Identification of brachyspina syndrome carriers in Chinese Holstein cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 25: 508-510
- FAO/ISAG. 1993. Secondary Guidelines: Measurement of Domestic Animal Diversity (MoDAD): Recommended Microsatellite Markers. Retrieved from: <http://dad.fao.org/>
- FAO/ISAG. 2004. Secondary Guidelines: Measurement of Domestic Animal Diversity (MoDAD): New Recommended Microsatellite Markers. Retrieved from: <http://dad.fao.org/>
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.



- Felsenstein, J. 2002. Phylogeny Inference Package (PHYLIP). Department of genomes  
sciences and department of Genetics, Univ. of Washington, Seattle, WA, USA.
- Fonteque, G. V., J. Battilana, E. Paludo, and C. A. D. V. Lima-Rosa. 2014. Genetic  
polymorphism of fifteen microsatellite loci in Brazilian (blue-egg Caipira)  
chickens. *Pesquisa Vet. Brasil.* 34: 98-102.
- Glenn, T. C., and N. A. Schable. 2005. Isolating microsatellite DNA loci. *Meth. Enzymol.* 395: 202-222.
- Green, M. R., and J. Sambrook. 2012. Preparation of plasmid DNA by Alkaline Lysis  
with SDS: Minipreps. Pages 11-14 in Molecular Cloning: A Laboratory Manual.  
Vol. 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Guo, S. W., and E. A. Thompson. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg  
proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48: 361-372.
- Hannes, O., F. Noriko, E. Harald, K. Franz, and P. Wolfgang. 2002. Sterol regulatory  
element binding proteins: relationship of adipose tissue gene expression with  
obesity in humans. *Biochim. Biophys. Acta.* 1575: 75-81.
- Heyen, D. W., J. E. Beever, Y. Da, R. E. Evert, C. Green, S. R. E. Bates, J. S. Ziegler,  
and H. A. Lewin. 1997. Exclusion probabilities of 22 bovine microsatellite markers  
in fluorescsnt multiplexes for semi-automated parentage testing. *Anim. Genet.* 28:  
21-27.
- Higgs, P. 2001. Introduction to Phylogenetics Methods. Manchester Univ. Press, UK.  
Retrieved from: <http://online.itp.ucsb.edu/online/infobio01/higgs/>



- Huang, Y. Z., H. He, J. J. Sun, J. Wang, Z. J. Li, X. Y. Lan, C. Z. Lei, C. L. Zhang, E. P. Zhang, J. Q. Wang, and H. Chen. 2011a. Haplotype combination of *SREBP-1c* gene sequence variants is associated with growth traits in cattle. *Genome* 54: 507-516.
- Huang, Y. Z., E. P. Zhang, J. Wang, Y. T. Huai, L. Ma, F. Y. Chen, X. Y. Lan, C. Z. Lei, X. T. Fang, J. Q. Wang, and H. Chen. 2011b. A large indel mutation of the bovine *ADD1/SREBP1c* gene and its effects on growth traits in some native cattle breeds from China. *Mol. Biol. Rep.* 38: 2037-2042.
- Huang, Y. Z., H. He, Z. Y. Zhan, Y. J. Sun, M. X. Li, X. Y. Lan, C. Z. Lei, C. L. Zhang, and H. Chen. 2013a. Relationship of polymorphisms within *ZBED6* gene and growth traits in beef cattle. *Gene* 526: 107-111.
- Huang, Y. Z., M. X. Li, J. Wang, Z. Y. Zhan, Y. J. Sun, J. J. Sun, C. J. Li, X. Y. Lan, C. Z. Lei, C. L. Zhang, and H. Chen. 2013b. A 5'-regulatory region and two coding region polymorphisms modulate promoter activity and gene expression of the growth suppressor gene *ZBED6* in cattle. *PLoS One* 8: e79744.
- Huang, Y. Z., Y. J. Sun, Z. Y. Zhan, M. X. Li, J. Wang, J. Xue, X. Y. Lan, C. Z. Lei, C. L. Zhang, and H. Chen. 2014a. Expression, SNP identification, linkage disequilibrium, and haplotype association analysis of the growth suppressor gene *ZBED6* in Qinchuan beef cattle. *Anim. Biotechnol.* 25: 35-54.
- Huang, Y. Z., L. Z. Zhang, X. S. Lai, M. X. Li, Y. J. Sun, C. J. Li, X. Y. Lan, C. Z. Lei, C. L. Zhang, X. Zhao, and H. Chen. 2014b. Transcription factor ZBED6 mediates

IGF2 gene expression by regulating promoter activity and DNA methylation in myoblasts. Sci. Rep. 4: 4570-4579.

ISAG Conference. 2008. Amsterdam, The Netherlands. Cattle Molecular Markers and

Parentage              Testing              Workshop.              Retrieved              from:

[http://www.isag.us/Docs/ISAG2008\\_CattleParentage.pdf](http://www.isag.us/Docs/ISAG2008_CattleParentage.pdf)

Jarne, P., and P. J. L. Lagoda. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. Trends Ecol. Evol. 11: 424-429.

Kappes, S. M., J. W. Keele, R. T. Stone, R. A. McGraw, T. S. Sonstegard, T. P. L. Smith, N. L. Lopes-Corrales, and C. W. Beattie. 1997. A second-generation linkage map of the bovine genome. Genome Res. 7: 235-249.

Kimura, M. and J. F. Crow. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. Genetics 49: 725-738.

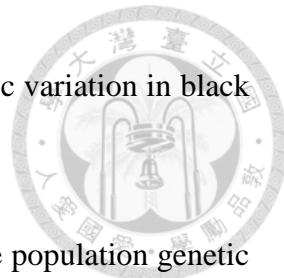
Lee, Y., D. Oh, J. Lee, B. La, and J. Yeo. 2013. Novel single nucleotide polymorphisms of bovine *SREBP1* gene is association with fatty acid composition and marbling score in commercial Korean cattle (Hanwoo). Mol. Biol. Rep. 40: 247-254.

Li, C., J. Basarab, W. M. Snelling, B. Benkel, B. Murdoch, and S. S. Moore. 2002. The identification of common haplotypes on bovine chromosome 5 within commercial lines of *Bos taurus* and their associations with growth traits. J. Anim. Sci. 80: 1187-1194.

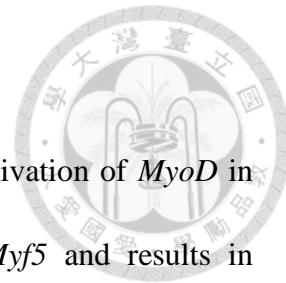
Li, C., J. Basarab, W. M. Snelling, B. Benkel, J. Kneeland, B. Murdoch, C. Hansen, and S. S. Moore. 2004. Identification and fine mapping of quantitative trait loci for



- backfat on bovine chromosomes 2, 5, 6, 19, 21, and 23 in a commercial line of *Bos taurus*. *J. Anim. Sci.* 82: 967-972.
- Liu Z. J., and J. F. Cordes. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238: 1-37.
- Markljung, E., L. Jiang, J. D. Jaffe, T. S. Mikkelsen, O. Wallerman, M. Larhammar, X. Zhang, L. Wang, V. Saenz-Vash, A. Gnirke, A. M. Lindroth, R. Barrés, J. Yan, S. Strömberg, S. De, F. Pontén, E. S. Lander, S. A. Carr, J. R. Zierath, K. Kullander, C. Wadelius, K. Lindblad-Toh, G. Andersson, G. Hjälm, and L. Andersson. 2009. ZBED6, a novel transcription factor derived from a domesticated DNA transposon regulates *IGF2* expression and muscle growth. *PLoS Biol.* 7: e1000256.
- Marshall, T. C., J. Slate, L. E Kruuk, and J. M. Pemberton. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.* 8: 893-894.
- Mukesh, M., M. Sodhi, S. Bhatia, and B. P. Mishra. 2004. Genetic diversity of Indian native cattle breeds as analysed with 20 microsatellite loci. *J. Anim. Breed. Genet.* 121: 416-424.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 106: 283-292.
- Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. pp. 87-88. Columbia Univ. Press, NY, USA.
- O'Reilly, P., and J. M. Wright. 1995. The evolving technology fingerprinting and its application to fisheries and aquaculture. *J. Fish Biol.* 47: 29-55.



- Paetkau, D., and C. Strobeck. 1994. Microsatellite analysis of genetic variation in black bear population. *Mol. Ecol.* 3: 489-495.
- Park, S. D. E. 2001. Trypanotolerance in West African cattle and the population genetic effects of selection. Ph. D. Thesis. Trinity College, Univ. of Dublin, Ireland.
- Peakall, R., and P. E. Smouse. 2012. GeneAlEx ver6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539.
- Peelman, L. J., F. Mortiaux, A. Van Zeveren, A. Dansercoer, G. Mommens, F. Coopman, Y. Bouquet, A. Burny, R. Renaville, and D. Portetelle. 1998. Evaluation of the genetic variability of 23 bovine microsatellite markers in four Belgian cattle breeds. *Anim. Genet.* 29: 161-167.
- Perry, R., and M. Rudnick. 2000. Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation. *Front. Biosci.* 5: 750-767.
- Pritchard, J. K., M. Stephen, and P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Robakowska-Hyzorek, D., J. Oprzadek, B. Zelazowska, R. Olbromski, and L. Zwierzchowski. 2010. Effect of the g.-723G-->T polymorphism in the bovine myogenic factor 5 (*Myf5*) gene promoter region on gene transcript level in the longissimus dorsi muscle and on meat traits of Polish Holstein-Friesian cattle. *Biochem. Genet.* 48: 450-464.
- Rozen, S., and H. J. Skaletsky. 2000. Primer 3 on the WWW for general users and for



- biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* 132: 365-386.
- Rudnicki, M. A., T. Braun, S. Hinuma, and R. Jaenish. 1992. Inactivation of *MyoD* in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene *Myf5* and results in apparently normal muscle development. *Cell* 71: 383-390.
- Rudnicki, M. A., P. N. J. Schnegelsberg, R. H. Stead, T. Braun, H. H. Arnold, and R. Jaenish. 1993. MyoD or Myf5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* 75: 151-1359.
- Saitou, N., and M. Nei. 1987. The Neighbor-joining method: a method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- SAS Institute. 2009. SAS/STAT User's guide, Release 9.2 ed. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Schemske, D. W. 1984. Population structure and local selection in *impatiens pallida* (Balsaminaceae), a selfing annual. *Evolution* 38: 817-832.
- Seong, J., J. D. Oh, I. C. Cheong, K. W. Lee, H. K. Lee, D. S. Suh, G. J. Jeon, K. D. Park, and H. S. Kong. 2011. Association between polymorphisms of *Myf5* and *POU1F1* genes with growth and carcass traits in Hanwoo (Korean cattle). *Genes Genomics* 33: 425-430.
- Sia, E. A., S. Jinks-Robertson, and T. D. Petes. 1997. Genetic control of microsatellite stability. *Mutat. Res.* 383: 61-70.
- Sun, W., H. Chen, C. Lei, X. Lei, and Y. Zhang. 2007. Study on population genetic characteristics of Qinchuan cows using microsatellite markers. *J. Genet. Genomics.*

34: 17-25.

- Taylor, J. F., L. L. Coutinho, K. L. Herring, D. S. Jr. Gallagher, R. A. Brenneman, N. Burney, J. O. Sanders, J. W. Turner, S. B. Smith, R. K. Miller, J. W. Savell, and S. K. Davis. 1998. Candidate gene analysis of *GHI* for effects on growth and carcass composition of cattle. *Anim. Genet.* 29: 194-201.
- Tu, P. A., D. Y. Lin, G. F. Li, J. C. Huang, D. C. Wang, and P. H. Wang. 2014. Characterization of the genetic diversity and population structure for the yellow cattle in Taiwan based on microsatellite markers. *Anim. Biotechnol.* 25: 234-249.
- Ujan, J. A., L. S. Zan, S. A. Ujan, and H. B. Wang. 2011. Association between polymorphism of MyF-5 gene with meat quality traits in indigenous Chinese cattle breeds. Pages 50-55 in IPCBEE. Vol. 13. International Conference on Asia Agriculture and Animal, IACSIT Press, Singapoore.
- VanRaden, P. M., K. M. Olson, D. J. Null, and J. L. Hutchison. 2011 Harmful recessive effects on fertility detected by absence of homozygous haplotypes. *J. Dairy Sci.* 94: 6153-6161.
- Waits, L. P., G. Luikart, and P. Taberlet. 2001. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Mol. Ecol.* 10: 249-256.
- Weintraub, H., R. Davis, S. Tapscott, M. Thayer, M. Kransc, R. Benezra, T. K. Blackwell, D. Turner, R. Rupp, S. Hollenberg, Y. Zhuang, and A. Lassar. 1991. The *myoD* gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage.



Science 251: 761-766.

Wigginton, J. E., D. J. Culter, and G. R. Abecasis. 2005. A note on exact tests of Hardy-Weinberg Equilibrium. Am. J. Hum. Genet. 76: 887-893.

Wright, S. 1951. The genetic structure of populations. Ann. Eugen. 15: 323-354.

Wright, S. 1978. Evolution and the Genetics of Populations, Vol. 4, Variability within and among Natural Populations. pp. 60-89. Univ. Chicago Press, Chicago, USA.

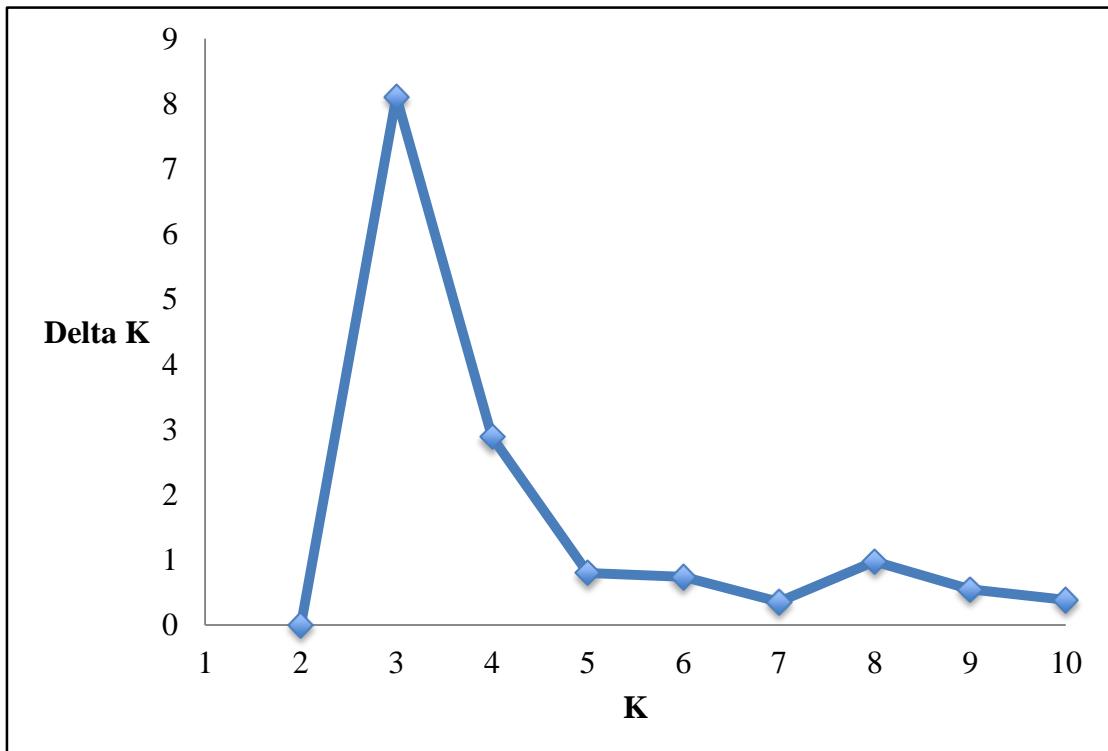
Young A. G., D. Boshier, and T. J. Boyle. 2000. Forest Conservation Genetics: Principles and Practice. CSIRO Publishing, Australia.

Zhang, G. X., Z. G. Wang, W. S. Chen, C. X. Wu, X. Han, H. Chang, L. S. Zan, R. L. Li, J. H. Wang, W. T. Song, G. F. Xu, H. J. Yang, and Y. F. Luo. 2007a. Genetic diversity and population structure of indigenous yellow cattle breeds of China using 30 microsatellite markers. Anim. Genet. 38: 550-559.

Zhang, R. F., H. Chen, C. Z. Lei, C. L. Zhang, X. Y. Lan, Y. D. Zhang, H. J. Zhang, B. Bao, H. Niu, and X. Z. Wang. 2007b. Association between polymorphisms of MSTN and MYF5 genes and growth traits in three Chinese cattle breeds. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 20: 1798-1804.

Zhao, S. M., W. Z. Li, H. B. Pan, Y. Huang, M. H. Yang, H. J. Wei, and S. Z. Gao. 2012. Expression levels of candidate genes for intramuscular fat deposition in two Banna mini-pig inbred lines divergently selected for fatness traits. Genet. Mol. Biol. 35: 783-789.

## 捌、附錄

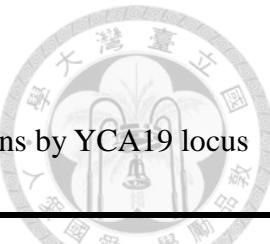


附圖 1  $\Delta K$  之折線圖，顯示建議  $K$  值為 3。

Appendix figure 1 The line graphs of  $\Delta K$ . The best  $K$  value is  $K=3$ .

附表 1 YCA19 基因座於 8 個牛隻族群之交替基因頻率 (%)

Appendix Table 1 Alleles and allelic frequency (%) of eight cattle populations by YCA19 locus



Allele \ Pop <sup>1</sup>	BR	HO	WB	XB	XY	YCHC	YCKM	YCXH	Total
150					1.49	1.95	6.48	7.69	2.10
152				10.00	2.99	0.30			0.81
154				5.00					0.16
156			100.00						13.41
157	2.17	69.23		25.00	25.37	21.02	18.52	11.54	18.50
159				17.50	24.63	40.09	29.63	42.31	29.16
161		7.69			2.24	0.30	3.70		0.89
163		15.38		5.00	11.19	2.10	0.93		2.91
165		3.85			0.75				0.16
167	13.04			10.00	9.70	10.81	12.04	1.92	8.80
169	36.96			17.50	4.48	3.00	6.48		4.60
171						1.20	0.93		0.73
173					0.75		9.26		0.89
175	17.39			5.00	4.48	1.80	0.93	19.23	3.15
177							7.41		0.65
181	19.57				8.21	7.81	2.78	11.54	6.54
183						0.15			0.08
184	6.52			5.00	3.73	9.46	0.93	5.77	6.22
188	4.35								0.16
190		3.85							0.08

<sup>1</sup>Pop: population - BR: Brahman; HO: Holstein; WB: Taiwan water buffalo; XB: Hybrid foreign cattle; XY: Hybrid yellow cattle; YCHC: Taiwan yellow cattle (Hengchung); YCKM: Taiwan yellow cattle (Kinmen); YCXH: Taiwan yellow cattle (Xinhua).

附表 2 YCA21 基因座於 8 個牛隻族群之交替基因頻率 (%)

Appendix Table 2 Alleles and allelic frequency (%) of eight cattle populations by YCA21 locus



Pop <sup>1</sup> Allele \	BR	HO	WB	XB	XY	YCHC	YCKM	YCXH	Total
138		19.23		16.67	27.54	0.47	7.78		5.92
142	23.91				2.90	30.03	31.11	26.09	23.88
147	69.57	80.77		83.33	68.12	48.58	56.67	56.52	55.63
149						0.94			0.58
152					0.72	1.26			0.87
155	6.52				0.72	10.06	4.44	10.87	7.48
157						0.47		2.17	0.39
159						5.50		4.35	3.59
161						2.67			1.65

<sup>1</sup>Pop: population - BR: Brahman; HO: Holstein; WB: Taiwan water buffalo; XB: Hybrid foreign cattle; XY: Hybrid yellow cattle; YCHC: Taiwan yellow cattle (Hengchung); YCKM: Taiwan yellow cattle (Kinmen); YCXH: Taiwan yellow cattle (Xinhua).

附表 3 YCC21 基因座於 8 個牛隻族群之交替基因頻率 (%)

Appendix Table 3 Alleles and allelic frequency (%) of eight cattle populations by YCC21 locus

Pop <sup>1</sup> Allele \	BR	HO	WB	XB	XY	YCHC	YCKM	YCXH	Total
225	15.22	19.23		18.75	7.46	1.20	3.70	2.00	4.07
228		80.77		37.50	38.81	20.21	8.33		21.76
230	41.30			37.50	24.63	25.00	14.81	12.00	23.98
232	43.48			6.25	29.10	53.14	73.15	86.00	49.91
236						0.45			0.28

<sup>1</sup>Pop: population - BR: Brahman; HO: Holstein; WB: Taiwan water buffalo; XB: Hybrid foreign cattle; XY: Hybrid yellow cattle; YCHC: Taiwan yellow cattle (Hengchung); YCKM: Taiwan yellow cattle (Kinmen); YCXH: Taiwan yellow cattle (Xinhua).

附表 4 YCC39 基因座於 8 個牛隻族群之交替基因頻率 (%)

Appendix Table 4 Alleles and allelic frequency (%) of eight cattle populations by YCC39 locus

Pop <sup>1</sup> Allele \	BR	HO	WB	XB	XY	YCHC	YCKM	YCXH	Total
236					0.71	3.70			2.37
238						0.30			0.18
242		11.54			0.71	0.15			0.46
244						5.18	0.93		3.28
248	95.83	57.69		79.17	77.86	75.30	94.44	80.77	78.42
251	4.17	30.77		20.83	20.71	15.38	4.63	19.23	15.30

<sup>1</sup>Pop: population - BR: Brahman; HO: Holstein; WB: Taiwan water buffalo; XB: Hybrid foreign cattle; XY: Hybrid yellow cattle; YCHC: Taiwan yellow cattle (Hengchung); YCKM: Taiwan yellow cattle (Kinmen); YCXH: Taiwan yellow cattle (Xinhua).

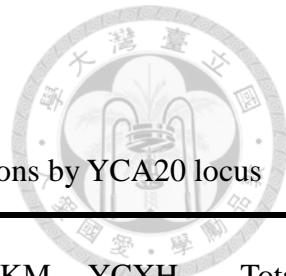
附表 5 YCB03 基因座於 8 個牛隻族群之交替基因頻率 (%)

Appendix Table 5 Alleles and allelic frequency (%) of eight cattle populations by YCB03 locus

Pop <sup>1</sup> Allele \	BR	HO	WB	XB	XY	YCHC	YCKM	YCXH	Total
175	56.82	11.54		56.52	39.23	19.15	36.79	13.46	22.63
178	43.18	88.46	100.00	43.48	60.00	67.88	60.38	82.69	70.05
181					0.77	12.97	2.83	3.85	7.32

<sup>1</sup>Pop: population - BR: Brahman; HO: Holstein; WB: Taiwan water buffalo; XB: Hybrid foreign cattle; XY: Hybrid yellow cattle; YCHC: Taiwan yellow cattle (Hengchung); YCKM: Taiwan yellow cattle (Kinmen); YCXH: Taiwan yellow cattle (Xinhua).

附表 6 YCA20 基因座於 8 個牛隻族群之交替基因頻率 (%)



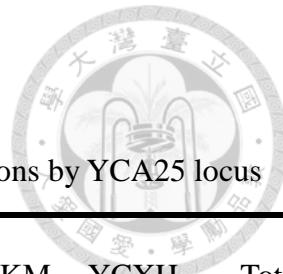
Appendix Table 6 Alleles and allelic frequency (%) of eight cattle populations by YCA20 locus

Allele \ Pop <sup>1</sup>	BR	HO	WB	XB	XY	YCHC	YCKM	YCXH	Total
220		76.92		39.58	41.30	9.37	7.84	10.42	15.98
222	4.35								0.19
224		3.85				0.30			0.28
226					5.80	5.44	5.88	20.83	5.61
228	4.35								0.19
230	34.78			39.58	16.67	13.60	13.73	2.08	15.23
232	56.52	19.23		20.83	24.64	30.97	40.20	2.08	30.09
236						0.60			0.37
238					11.59	39.73	30.39	64.58	31.87
240							1.96		0.19

<sup>1</sup>Pop: population - BR: Brahman; HO: Holstein; WB: Taiwan water buffalo; XB: Hybrid foreign cattle; XY: Hybrid yellow cattle; YCHC: Taiwan yellow cattle (Hengchung); YCKM: Taiwan yellow cattle (Kinmen); YCXH: Taiwan yellow cattle (Xinhua).

附表 7 YCA25 基因座於 8 個牛隻族群之交替基因頻率 (%)

Appendix Table 7 Alleles and allelic frequency (%) of eight cattle populations by YCA25 locus



Allele \ Pop <sup>1</sup>	BR	HO	WB	XB	XY	YCHC	YCKM	YCXH	Total
Allele									
152				2.08	4.29	4.69	4.63		4.00
154	11.36			8.33	3.57	4.69			4.18
156	22.73	100.00		66.67	72.14	46.33	31.48	19.23	48.09
159	31.82			6.25	8.57	11.44	34.26	48.08	15.36
161						0.15	7.41		0.82
163	4.55			2.08	3.57	8.65	10.19	7.69	7.45
173	2.27				3.57	17.89	2.78	25.00	13.09
177	27.27			14.58	3.57	2.64	7.41		4.55
179					0.71	3.52	1.85		2.45

<sup>1</sup>Pop: population - BR: Brahman; HO: Holstein; WB: Taiwan water buffalo; XB: Hybrid foreign cattle; XY: Hybrid yellow cattle; YCHC: Taiwan yellow cattle (Hengchung); YCKM: Taiwan yellow cattle (Kinmen); YCXH: Taiwan yellow cattle (Xinhua).

附表 8 YCB09 基因座於 8 個牛隻族群之交替基因頻率 (%)

Appendix Table 8 Alleles and allelic frequency (%) of eight cattle populations by YCB09 locus

Allele \ Pop <sup>1</sup>	BR	HO	WB	XB	XY	YCHC	YCKM	YCXH	Total
142						0.63	3.33	2.38	0.67
146						0.47	4.44		0.59
152	93.75	88.46	100.00	91.67	94.12	78.14	74.44	71.43	83.89
154		11.54				0.94			0.76
156	6.25			8.33	2.21	4.87	10.00	9.52	4.53
168					3.68	14.94	7.78	16.67	9.56

<sup>1</sup>Pop: population - BR: Brahman; HO: Holstein; WB: Taiwan water buffalo; XB: Hybrid foreign cattle; XY: Hybrid yellow cattle; YCHC: Taiwan yellow cattle (Hengchung); YCKM: Taiwan yellow cattle (Kinmen); YCXH: Taiwan yellow cattle (Xinhua).

附表 9 YCC11 基因座於 8 個牛隻族群之交替基因頻率 (%)

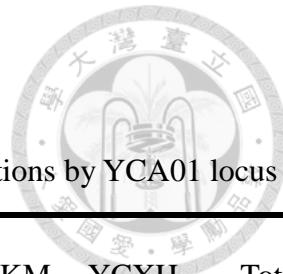
Appendix Table 9 Alleles and allelic frequency (%) of eight cattle populations by YCC11 locus

Allele \ Pop <sup>1</sup>	BR	HO	WB	XB	XY	YCHC	YCKM	YCXH	Total
204	100.00			52.08	40.71	91.17	95.19	100.00	81.95
208				2.08	2.14	1.35			1.20
212		26.92		33.33	34.29	1.35	2.88		7.64
214		7.69			3.57	0.75			1.10
216		11.54		10.42	8.57	0.75	0.96		2.39
218		53.85		2.08	10.71	4.64			5.62
220							0.96		0.09

<sup>1</sup>Pop: population - BR: Brahman; HO: Holstein; WB: Taiwan water buffalo; XB: Hybrid foreign cattle; XY: Hybrid yellow cattle; YCHC: Taiwan yellow cattle (Hengchung); YCKM: Taiwan yellow cattle (Kinmen); YCXH: Taiwan yellow cattle (Xinhua).

附表 10 YCA01 基因座於 8 個牛隻族群之交替基因頻率 (%)

Appendix Table 10 Alleles and allelic frequency (%) of eight cattle populations by YCA01 locus

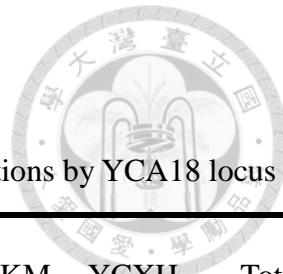


Allele \ Pop <sup>1</sup>	BR	HO	WB	XB	XY	YCHC	YCKM	YCXH	Total
Allele									
160					2.94	7.06	23.15	15.38	7.74
162						0.15			0.09
164					2.94	1.76	8.33		2.28
166	27.08	3.85		22.92	15.44	28.24	17.59	17.31	24.23
168					1.47	2.35		23.08	2.73
171	14.58			12.50	16.91	38.09	9.26	23.08	28.87
174	27.08	96.15		31.25	25.74	1.91	17.59		10.93
176	14.58			20.83	25.00	2.06	0.93		6.01
178	16.67			12.50	9.56	18.38	23.15	21.15	17.12

<sup>1</sup>Pop: population - BR: Brahman; HO: Holstein; WB: Taiwan water buffalo; XB: Hybrid foreign cattle; XY: Hybrid yellow cattle; YCHC: Taiwan yellow cattle (Hengchung); YCKM: Taiwan yellow cattle (Kinmen); YCXH: Taiwan yellow cattle (Xinhua).

附表 11 YCA18 基因座於 8 個牛隻族群之交替基因頻率 (%)

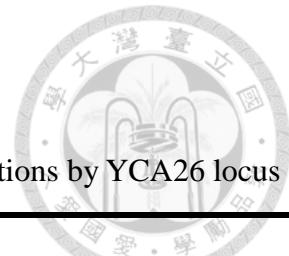
Appendix Table 11 Alleles and allelic frequency (%) of eight cattle populations by YCA18 locus



Allele \ Pop <sup>1</sup>	BR	HO	WB	XB	XY	YCHC	YCKM	YCXH	Total
Allele									
133		11.54			1.43	0.44			0.73
139	4.17			2.08	2.86				0.64
141						0.15			0.09
143	2.08			6.25					0.36
145	2.08			4.17	5.00	5.59	0.93	1.92	4.54
147		3.85			1.43	0.44	1.85	1.92	0.82
149	10.42				10.71	18.09	19.44	36.54	16.61
151	39.58			20.83	25.71	39.26	25.00	44.23	34.66
153							0.93		0.09
155		3.85							0.09
157	27.08	42.31		62.50	40.71	33.68	50.00	15.38	36.48
159	14.58	38.46		4.17	12.14	2.35	1.85		4.90

<sup>1</sup>Pop: population - BR: Brahman; HO: Holstein; WB: Taiwan water buffalo; XB: Hybrid foreign cattle; XY: Hybrid yellow cattle; YCHC: Taiwan yellow cattle (Hengchung); YCKM: Taiwan yellow cattle (Kinmen); YCXH: Taiwan yellow cattle (Xinhua).

附表 12 YCA26 基因座於 8 個牛隻族群之交替基因頻率 (%)



Appendix Table 12 Alleles and allelic frequency (%) of eight cattle populations by YCA26 locus

Allele \ Pop <sup>1</sup>	BR	HO	WB	XB	XY	YCHC	YCKM	YCXH	Total
Allele	BR	HO	WB	XB	XY	YCHC	YCKM	YCXH	Total
203					1.45	1.51	7.45		1.80
206						8.89	4.26		5.70
209	39.58			21.74	10.87	26.51	20.21	17.31	23.00
211	8.33	34.62		17.39	42.03	16.44	9.57		18.60
213	43.75	65.38		60.87	45.65	46.48	58.51	82.69	50.40
216	8.33				0.17				0.50

<sup>1</sup>Pop: population - BR: Brahman; HO: Holstein; WB: Taiwan water buffalo; XB: Hybrid foreign cattle; XY: Hybrid yellow cattle; YCHC: Taiwan yellow cattle (Hengchung); YCKM: Taiwan yellow cattle (Kinmen); YCXH: Taiwan yellow cattle (Xinhua).

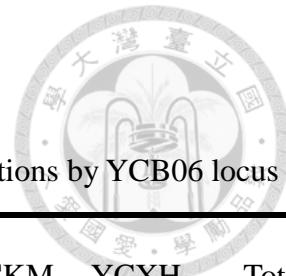
附表 13 YCC28 基因座於 8 個牛隻族群之交替基因頻率 (%)

Appendix Table 13 Alleles and allelic frequency (%) of eight cattle populations by YCC28 locus

Allele \ Pop <sup>1</sup>	BR	HO	WB	XB	XY	YCHC	YCKM	YCXH	Total
Allele	BR	HO	WB	XB	XY	YCHC	YCKM	YCXH	Total
234	2.08			4.35	6.52	18.68	17.59	23.08	15.48
238	97.92	100.00		95.65	93.48	76.91	82.41	76.92	81.79
246					4.41				2.73

<sup>1</sup>Pop: population - BR: Brahman; HO: Holstein; WB: Taiwan water buffalo; XB: Hybrid foreign cattle; XY: Hybrid yellow cattle; YCHC: Taiwan yellow cattle (Hengchung); YCKM: Taiwan yellow cattle (Kinmen); YCXH: Taiwan yellow cattle (Xinhua).

附表 14 YCB06 基因座於 8 個牛隻族群之交替基因頻率 (%)



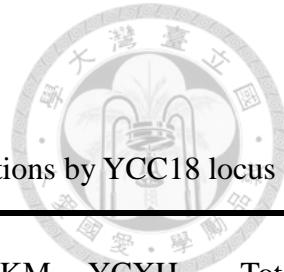
Appendix Table 14 Alleles and allelic frequency (%) of eight cattle populations by YCB06 locus

Allele \ Pop <sup>1</sup>	BR	HO	WB	XB	XY	YCHC	YCKM	YCXH	Total
Allele	BR	HO	WB	XB	XY	YCHC	YCKM	YCXH	Total
161	4.17			6.52	10.71	25.15	25.93	30.77	19.81
169						0.29			0.17
171			29.07						2.11
172	56.25	69.23		56.52	48.57	61.76	35.19	63.46	53.12
174	16.67	11.54		10.87	21.43	0.15	5.56	3.85	4.64
176		15.38	40.70	6.52	5.00	1.18	8.33		5.56
178	22.92	3.85	1.16	19.57	14.29	11.47	25.00	1.92	12.48
182			8.14						0.59
195			10.47						0.76
199			10.47						0.76

<sup>1</sup>Pop: population - BR: Brahman; HO: Holstein; WB: Taiwan water buffalo; XB: Hybrid foreign cattle; XY: Hybrid yellow cattle; YCHC: Taiwan yellow cattle (Hengchung); YCKM: Taiwan yellow cattle (Kinmen); YCXH: Taiwan yellow cattle (Xinhua).

附表 15 YCC18 基因座於 8 個牛隻族群之交替基因頻率 (%)

Appendix Table 15 Alleles and allelic frequency (%) of eight cattle populations by YCC18 locus



Allele \ Pop <sup>1</sup>	BR	HO	WB	XB	XY	YCHC	YCKM	YCXH	Total
Allele									
172			1.16						0.08
176			9.30						0.67
178		23.08							0.50
180	10.42	73.08		31.25	31.43	13.12	14.81	30.77	17.17
182	2.08	3.85	89.53	27.08	8.57	3.94	5.56		11.47
184	31.25			4.17	40.00	64.43	41.67	67.31	49.83
188	41.67			25.00	17.14	18.51	37.96	1.92	18.84
190	14.58			12.50	2.86				1.42

<sup>1</sup>Pop: population - BR: Brahman; HO: Holstein; WB: Taiwan water buffalo; XB: Hybrid foreign cattle; XY: Hybrid yellow cattle; YCHC: Taiwan yellow cattle (Hengchung); YCKM: Taiwan yellow cattle (Kinmen); YCXH: Taiwan yellow cattle (Xinhua).