

出國報告(出國類別：研究)

種畜禽遺傳多樣性維護 與活化利用研習

服務機關：行政院農業委員會畜產試驗所

姓名職稱：謝佳容 助理研究員

派赴國家：美國

出國期間：109 年 3 月 4 日至 3 月 23 日

報告日期：109 年 5 月 15 日

摘要

為完備周全臺灣種畜禽遺傳資源之維護與管理，畜產試驗所謝佳容助理研究員奉派於 109 年 3 月 4 日至 3 月 23 日期間赴美國 National Center for Genetic Resources Preservation (NCGRP) 研習種畜禽遺傳多樣性維護與其活化利用。NCGRP 的任務明確，主要負責執行美國 National Animal Germplasm Program；在人員編制上，負責動物種原庫的主要有 5 人。NCGRP 本身並無動物飼養場，所有具經濟或研究價值的種畜禽全以種原物質的型態凍存於種原庫中，節省人力與經費上的負擔。目前收存的畜禽種原樣本型態以精液與血液為大宗，採樣的對象主要是各研究單位保種族群與育種公司的異地備份。NCGRP 在硬體設施上，備有 2 台發電機可維持至少 21 天的供電量，容量 3 萬公升的液態氮儲存槽兩座，儲存有可維持所有液態氮桶運作 3 個月的液態氮量。目前使用的種原樣本管理軟體為 Animal-Grin V2，其中收錄了動物個體的表型、基因型、管理方式與生產模式，同時保有其系譜資料，作為其族群內遺傳相關的評量基礎。一個健全的種原庫是由成熟的細胞凍存技術、完整的遺傳與表型紀錄及完善的資訊系統所構成。種畜禽遺傳多樣性的維護與活化利用是需要經年累月的持續進行方能彰顯其價值。族群的遺傳結構與多樣性是需要持續監控的，因為隨著世代的演進，族群的遺傳結構與多樣性會發生變化，而遺傳多樣性監測的頻率取決於家畜禽的世代間距。研習美國畜禽種原維護與利用的作法與成效，並盼與美國畜禽遺傳多樣性研究團隊進行種原交流合作工作。

目次

壹、目的	3
貳、過程	4
參、計畫內容	4
一、種原庫的人員編制與管理	5
二、種原庫的運作概況	7
三、種原遺傳資源管理系統建構	9
四、種原遺傳資源的凍存流程與解凍後的活性再確認	11
五、保種族群大小的判定、種原遺傳資源的收集及其遺傳多樣性的 監測與族群的重建	13
六、種原庫管理與風險評估	16
七、與路易斯安那州立大學及科羅拉多州立大學交流情形	18
肆、心得與建議	20
伍、參考文獻	22
陸、照片紀實	24

壹、目的

隸屬於美國農業部(USDA)的 National Center for Genetic Resources Preservation (NCGRP) 成立於 2002 年，其前身為創立於 1958 年的 National Seed Storage Laboratory (NSSL)，首要任務即是保存美國農業的重要種原，並且藉由分子生物與數量遺傳技術分析種原的遺傳多樣性，以了解其遺傳多樣性的程度，指引業者免去因遺傳多樣性消退伴隨而來的種原維護問題與困境。因此，奉派前往 NCGRP 針對種畜禽保種族群大小與其遺傳多樣性監測、細胞及遺傳物質的凍存流程、解凍後受精與受孕能力確認、種原保種風險評估與管理進行研習，並學習美國種原庫維護管理、種原庫的運作模式與種原活化再利用等資訊，做為我國參考，且就我國現行種原保存模式、種畜禽遺傳多樣性監測及其育種策略與美 NCGRP 的專家學者交換意見。以期建立臺灣國家畜禽種原遺傳多樣性監測與風險管理機制，並開啟臺美雙方在種畜禽遺傳資源交流共享之平台。

貳、過程

日期	起迄地點	行程內容
3 月 4 日 (三)	臺灣桃園 - 美國柯林斯堡	去程，經洛杉磯轉機至丹佛後，搭車至柯林斯堡。
3 月 5 日 (四) - 3 月 6 日 (五)	National Center for Genetic Resources Preservation (NCGRP), USDA 美國科羅拉多州柯林斯堡	向 NCGRP 國家種原保存計畫負責人 Dr. Harvey Blackburn 報到，學習美國種原庫運作現況。
3 月 7 日 (六) - 3 月 8 日 (日)		研習資料整理。
3 月 9 日 (一) - 3 月 13 日 (五)		研習運用系譜集群分析的方式進行種原的收集，並以數量遺傳與分子標記技術評估保種族群大小與其遺傳多樣性監測與學習美國種原庫管理與風險評估。
3 月 14 日 (六) - 3 月 15 日 (日)		研習資料整理。
3 月 16 日 (一) - 3 月 20 日 (五)		研習細胞及遺傳物質的凍存流程、解凍後受精與受孕能力確認並學習建構種原資料庫，文件化種原資訊並進行備份，友善化種原資料庫架構。
3 月 21 日 (六) - 3 月 23 日 (一)	美國柯林斯堡 - 臺灣桃園	返程，搭車至丹佛搭機，經舊金山轉機返回臺灣。

參、計畫內容

此次研習 (3 月 4 日至 3 月 23 日) 適逢新冠肺炎疫情於美國爆發之際，3 月 18 日在中心負責人 Blackburn 博士與位於華盛頓特區的 USDA 總部視訊會議後，即於隔日全面測試網路連線與電腦設備，3 月 20 日起從一般行政人員開始實施在家辦公。科羅拉多州政府因疫情宣布各級學校延長春假，身為學齡兒童家長的員工可以自請在家辦公。以人為根本，搭配電腦網路設備，機動而有彈性地面對處理危機是值得我們做為參考的。

一、種原庫的人員編制與管理

一個健全的種原庫是由成熟的細胞凍存技術、完整的遺傳與表型紀錄及完善的資訊系統所構成。而種原庫的運作需要一個團隊來維持，唯有團隊成員能各司其職，合作無間，種原庫方能順暢運作。

目前，NCGRP(圖 1)的工作人員約 50 來位，而負責動物種原庫的主要有 5 人(圖 2)。負責人 Harvey Blackburn 博士本身為動物遺傳學家，其為奠定 NCGRP 家畜禽種原保存基礎的元老，負責綜理 NCGRP 的各項事務，定期出席全美各種畜禽協會年會，聽取產業界所遭遇的困難並提供適當的協助。此外，每兩年一次赴聯合國糧農組織 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) 說明美國在家畜禽種原保存與多樣性維護的現況。Phillip Purdy 博士為動物生理學家，負責種原遺傳資源樣本的凍存規劃與優化其凍存程序，同時也進行家禽生殖生理的相關研究。Ted Manahan 先生為程式工程師，重整原先的作物種原管理系統，開發目前 NCGRP 針對家畜禽種原所使用的種原遺傳資源管理軟體「Animal-Grin V2」，並隨時依據使用者需求進行修正。Carrie Wilson 女士為種原遺傳資源



圖 1. 位於科羅拉多州柯林斯堡的 NCGRP，緊鄰科羅拉多州州立大學。

管理系統主要負責人，舉凡種原遺傳資源的凍存入庫/提取、入庫管理及種畜禽資料的登錄都由她經手。此外，也從事種畜禽族群遺傳分析研究，目前正針對在養的杜洛克 (Duroc) 種豬與種原庫收納的樣本進行遺傳多樣性分析。Scott Spiller 先生為實驗室技術人員，主要負責種原樣本凍存與品質分析，同時也肩負實驗室管理之責。人員雖少但術業有專攻，而分工明確使其各司其職，方能發揮團隊最大的效能。

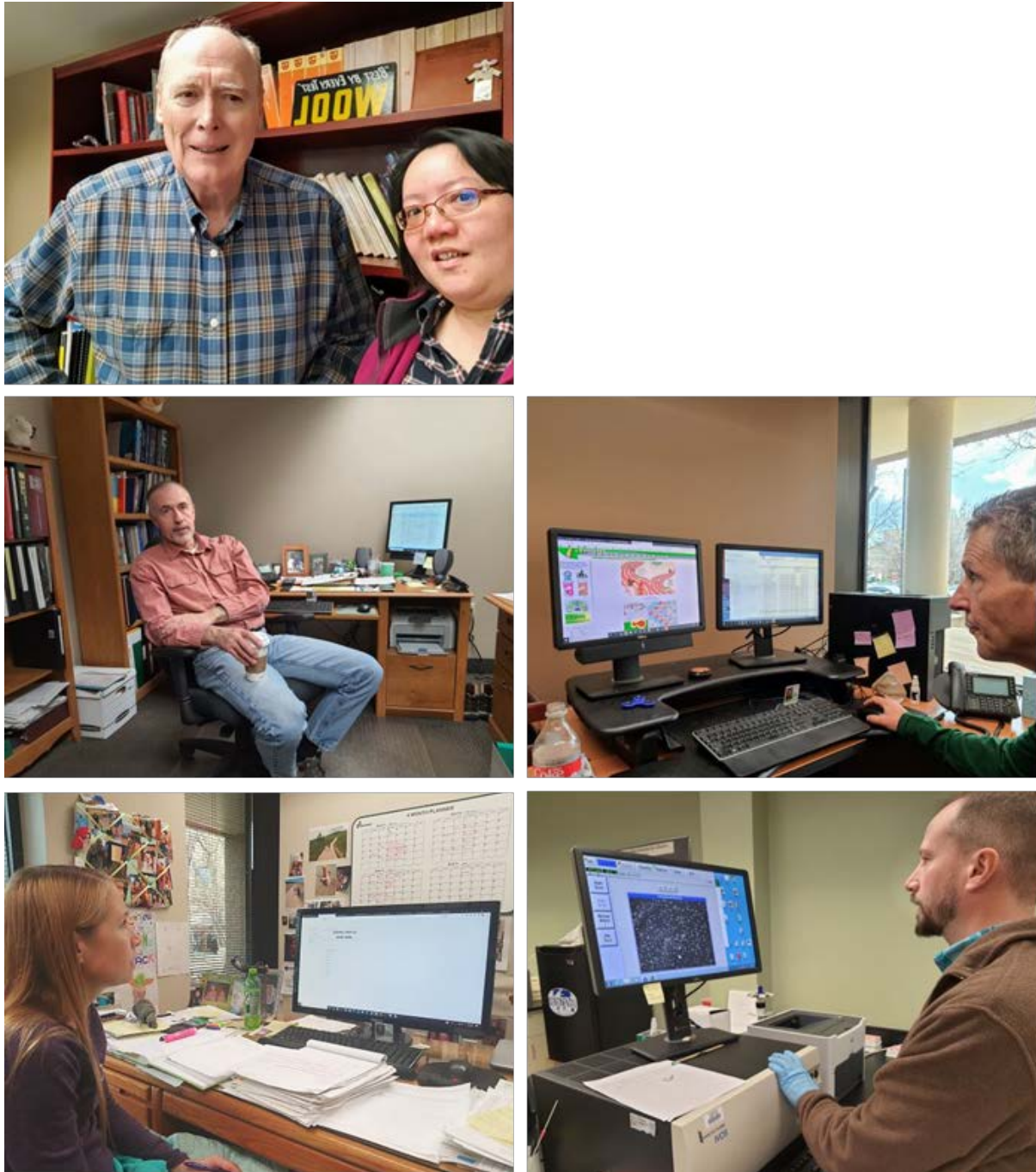


圖 2. 左上為筆者 (右) 與 Harvey Blackburn 博士、中左為動物生理學家 Phillip Purdy 博士、中右為程式工程師 Ted Manahan 先生、左下為動物遺傳學家 Carrie Wilson 女士與右下的實驗室技術人員 Scott Spiller 先生。

由於 NCGRP 所肩負的是屬於國家級的畜禽種原保存任務，故其預算經費是相對穩定的。其研究經費、人員薪資與差旅費用完全由固定預算支付，研究人員無需撰寫計畫申請研究經費，但仍可依其研究進度或與其他機構的合作研提計畫與申請經費，並可用此額外的經費聘用實習生與臨時人員。在研究人員的管理上，研究人員每週以工作 40 小時為限，出勤時間可自行調整，具有彈性以應付多元化的研究工作。USDA 轄下的研究人員依據任務分類，再依據其類別決定評核項目。如 Category 1 研究人員，其任務為從事基礎研究，每年需至少發表兩篇學術論文；而 Category 4 研究人員，其任務為管理與維護種原庫，主要工作內容為收集動物樣本、樣本的品質管理與種畜群遺傳多樣性監控等，故學術發表並非評核的要項。實驗室技術人員除負責樣本冷凍存取等實驗室的工作外，另需負責實驗室的一般庶務，如耗材與藥品的購置與管理等。明確的分工使研究人員能專注於試驗設計的規劃與研究報告的撰寫。而在研究績效的管理上，研究計畫為每年考評一次，每五年對研究單位進行一次績效盤點。研究人員每年評核一次，針對其在學術發表、計畫申請、產業輔導、受邀演講與開設農民訓練課程等的表現進行評核。

二、種原庫的運作概況

位於科羅拉多州的柯林斯堡 (Fort Collins) 因為終年相對濕度維持在 30% 左右，極適合種子長期的存放，因此在 1950 年代被選為設立 NCGRP 的前身-- National Seed Storage Laboratory (NSSL) 的所在。而時至今日，NCGRP 廣泛地收納應用於美國農業的重要作物及畜禽種原，因此除了動物種原的凍存設施，植物種原的凍存與管理也自成一個體系。作物多以種子的形態保存在 -18°C 的環境下，因種子在經過長時間的存放後會累積氧化傷害，所以種子在凍存後每十年需進行一次發芽試驗，以確定種子的活性 (圖 3)。



圖 3. 左為存放種子的 -18°C 庫房，右為進行種子檢查與活性試驗的實驗室。

目前，NCGRP 建置有 220 個大型液態氮桶，可容納 3,000 件種子與 70,000 筆精液樣本 (圖 4)。在動物的遺傳資源樣本的收集上，已收藏有 41 個物種，其中包含 9 種家畜、2 種家禽、3 種昆蟲、17 種淡水魚、5 種海水魚及 5 種水生無脊椎動物；囊括了 168 個品種，55,652 個動物個體的樣本。NCGRP 種原庫運作的靈魂在於強大的種畜禽遺傳資源管理系統 Animal-Grin V2，除了種原遺傳資源的庫存系統外，也可登載動物個體的表型、基因型、生產管理方式與其系譜資料於 Animal GRIN Database 中 (圖 5) (Blackburn, 2018)。Animal GRIN Database 提供遺傳育種研究人員與相關業者一個友善的平台，可進行個別畜禽基因型與系譜資料的調閱、遺傳資源樣本的存取與育種相關工具資源的運用。而藉由 Animal-Grin V2 管理系統，畜禽遺傳資源樣本的提取與寄存申請皆可由線上辦理。

此外，NCGRP 本身不進行品種的選育，也不提供業者家畜禽育種選拔的諮詢服務；對於產業的服務主要在於提供業者種畜禽遺傳資源的異地備份與協助畜群遺傳多樣性的監控。美國的畜牧業者，無論是大型的私人公司或是小型的農場，在有需要動物選育上的相關協助時，可就近尋求地區大學如各州州立大學或 USDA 轄下的其他相關機構如位於內布拉斯加州的 Clay Center 的學者或研究人員協助。而目前 NCGRP 僅針對美國國內業者提供服務，並沒有接受外國的種原的異地備份。



圖 4. NCGRP 建置有 220 個大型液態氮桶，可容納 3,000 件種子與 70,000 筆精液樣本。

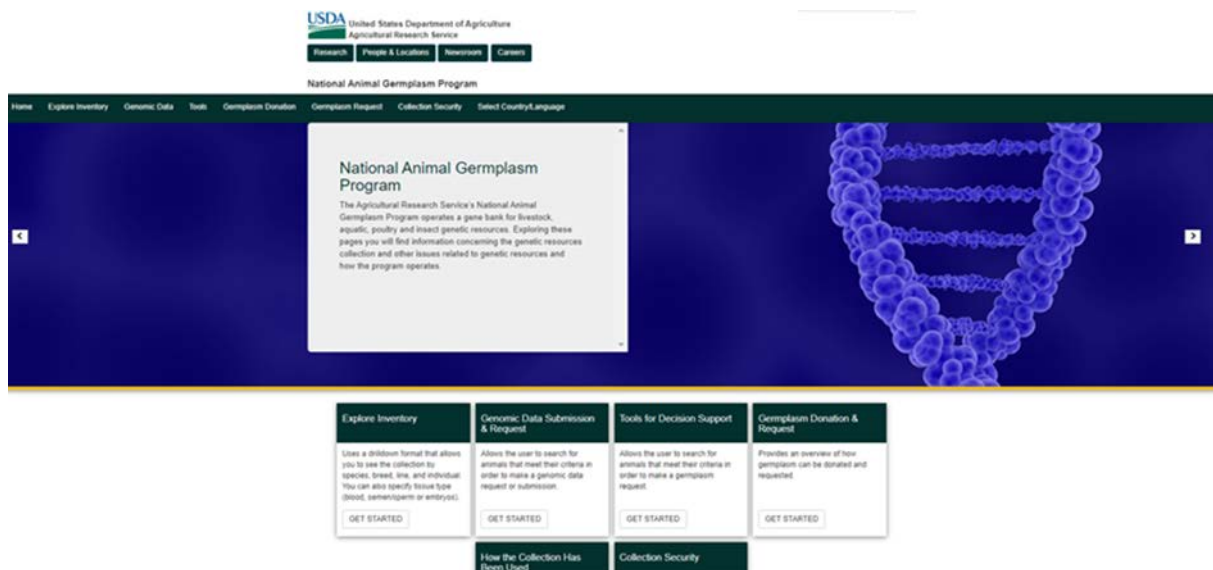


圖 5. Animal GRIN Database 提供遺傳育種研究人員與相關業者一個友善的平台，可進行個別畜禽基因型與系譜資料的調閱、遺傳資源樣本的存取與育種相關工具資源的運用。

三、種原遺傳資源管理系統建構

NCGRP 使用的種原遺傳資源管理軟體 Animal-Grin V2，是由 NCGRP 所開發，是為使用經年的 Animal-Grin V1 經由系統工程師 Ted Manahan 先生重整的進化版。NCGRP 一直以來與加拿大及巴西在種原遺傳資源管理系統的研發上合作密切，近期墨西哥也投入相關的研發工作。

Manahan 先生認為選擇適合的程式語言是建構管理系統與資料庫的基礎。因此，Animal-Grin V2 是以 Ruby 語言為骨幹，其具有靈活好運用與易於擴充的特性，並在編寫程式時可以輕鬆處理錯誤狀況，使系統工程師能輕易上手，皆是 Ruby 語言的優勢。而種原資料庫與種原遺傳資源管理系統的連結則是運用 SQL (Structured Query Language)，讓龐大的資料庫能依使用者的需求進行管理。此外，在資安條件許可下，善用雲端硬碟進行備份，可減輕資料庫在備份上的負擔。

相較於 Animal-Grin V1，Animal-Grin V2 更強調提供使用者一個友善的平台，以直覺式或下拉式選單讓使用者能輕鬆查詢 Animal GRIN Database (USDA, ARS, 2020) 中的資訊，並提高其使用的意願。Animal GRIN Database 的架構如圖 6，為四大區塊所組成，分別為種原遺傳資源庫存、遺傳訊息的存取、遺傳育種相關支援工具與種原遺傳資源樣本的存取。因此，使用者可線上進行種原遺傳資源樣本捐獻或提取的申請，以下就種原遺傳資源樣本寄存流程為例詳加說明 (圖 7)。

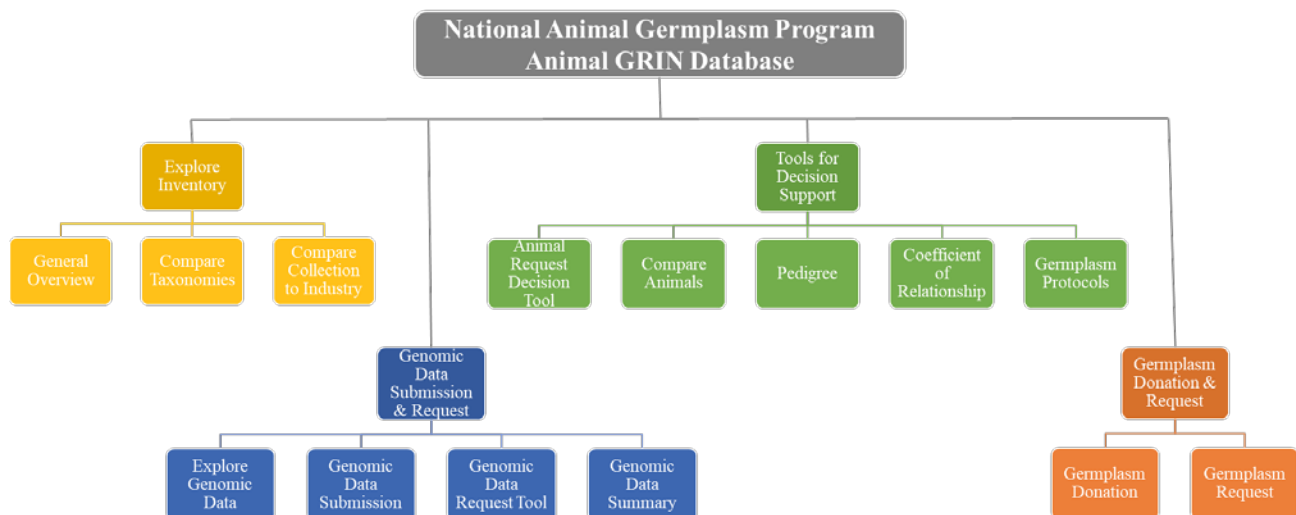


圖 6. Animal GRIN Database 的主要架構。

在寄存種原遺傳資源樣本前，申請者須於線上完成申請作業，待種原遺傳資源管理系統負責人 Carrie Wilson 女士通知送樣日期等相關訊息，申請者方能寄送樣本。Wilson 女士在通知申請者何時送樣的同時也會告知實驗室技術人員 Scott Spiller 先生，請其就種原樣本的型態與數量準備相關試劑與耗材。大型育種公司本身具備有製備冷凍精液的能力，故申請異地備份的種原遺傳資源樣本多為已完成冷凍的精液麥管，裝在攜帶型液態氮桶 (dry shipper) 中，由一般快遞公司運送至 NCGRP。若小型個體戶牧場提出種原遺傳資源樣本捐獻申請，則由 NCGRP 提供採樣所需之耗材與運費。依據標準程序採集樣本後，與協助保持低溫的冰包以隔熱恆溫之容器包裝，在常溫下快遞至 NCGRP 進行後續的冷凍程序。當種原遺傳資源樣本抵達 NCGRP，Wilson 女士即會給予每個樣本在種原遺傳資源管理系統中專屬的 ID，同時在管理系統中建立此 ID 的資訊，登打其物種、品種，畜主等相關資料，其後 Spiller 先生也依據此 ID 進行凍存及入庫作業。種原樣本在實驗室的檢測結果、凍存樣本數量與其於種原庫中的存放位置等資訊均須回報上傳於種原遺傳資源管理系統。另一方面，對於種原遺傳資源物質的提取領用，則需通過 NCGRP 負責人的審核，在判斷有無利益衝突的考量下，有權決定是否放行。

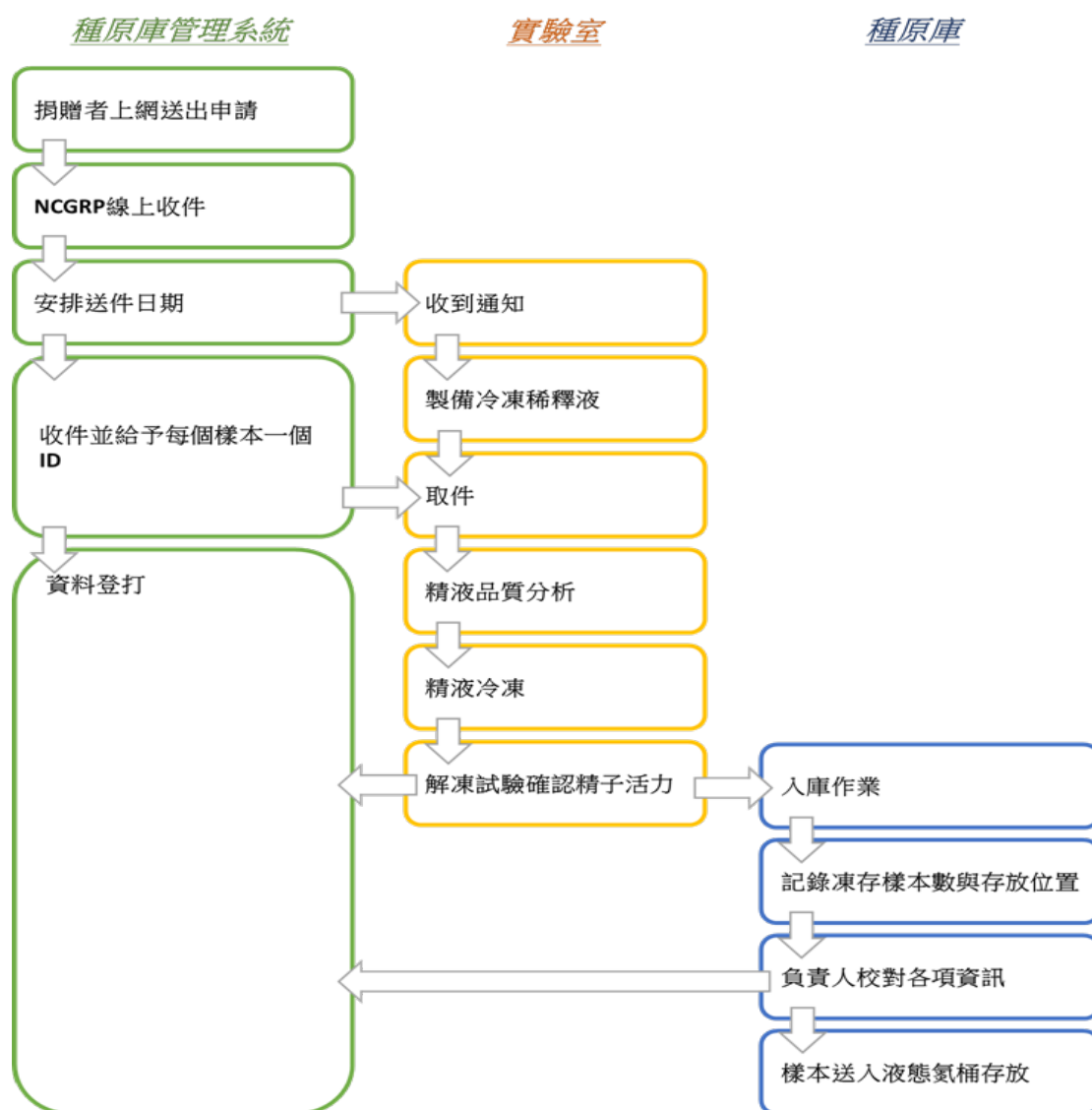


圖 7. 種原遺傳資源樣本寄存流程。

四、種原遺傳資源的凍存流程與解凍後的活性再確認

目前 NCGRP 收納的畜禽種原遺傳資源樣本型態以精液與血液為大宗，另有少量的胚胎與組織；採樣的對象主要是各研究單位保種族群與育種公司的異地備份，僅有少量具研究目的的雜交動物被收納其中。

因為 DNA 在血球中保存的狀態較萃取後單獨以 DNA 型態存放穩定，且並非所有個體都需要萃取其 DNA，故以全血的形式保存畜禽的遺傳物質即綽綽有餘。而動物生理學家 Purdy 博士進一步指出，以目前的技術已可由全血中純化纖維母細胞，因此全血的凍存不僅滿足在遺傳物質如 DNA 萃取上的需求，也達到凍存體細胞的目的。每個動物個體可採得約 5 mL 的全血，全血以添加終濃度為 10% 的 DMSO 進行冷凍，冷凍後的血樣可經歷至少四次的反覆解凍冷凍而不影

響其品質。在精液的處理方面，冷凍前須進行精液品質檢測，記錄精液來時的溫度、酸鹼度、精液量、濃度與精子數等數值，再以 Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) 了解精子存活狀況與泳動能力後方進行凍存。依據動物種類選擇凍存操作步驟，NCGRP 在 Animal GRIN Database 上提供了標準化的凍存程序 (https://agrin.ars.usda.gov/protocols_page_dev?language=EN&record_source=US)，可作為實驗室實務上的參考。精液在與抗凍稀釋液均勻混合後，以自動充填機分裝至 0.5 mL 的麥管 (straw) 並彌封，利用程式降溫儀或液態氮降溫裝置進行冷凍流程。完成冷凍流程後，每個樣本隨即取一支麥管解凍，再次以 CASA 檢視精子存活程度與泳動能力，確認精子本身的耐凍能力及冷凍程序是否正確的執行完成。冷凍的種原遺傳資源樣本在經過清點數目與確認彌封完好後，依序放入液態氮桶中存放，並記錄存放的位置，在實驗室負責人校對無誤後完成入庫作業。所有種原樣本的檢測結果都將上傳至種原遺傳資源管理系統，便於日後的提取與管理。而在此以豬隻精液凍存為例，詳加介紹如陸、照片紀實。

對於精液與卵在解凍後受精與受孕能力是否需定期確認上，Blackburn 博士持否定的看法。Blackburn 博士強調動物細胞在液態氮接近 -196°C 的儲存環境下十分穩定，不若植物種子有隨時間累積氧化傷害的疑慮。因此，與其將人力物力花的事後工程浩大且曠日廢時的確認上，不如在一開始就確認樣本的品質與使用可靠的凍存流程，其包括抗凍稀釋液的選擇、降溫條件的設定等。Blackburn 博士提到先前路易斯安那州州立大學研究團隊利用凍存約 45 年、30 年及 10 年的安格斯 (Angus) 公牛精液以人工授精待配母牛進行懷孕試驗，結果顯示三組間母牛的懷孕率與產犢率無顯著差異 (Carwell, 2010)。另有智利的研究團隊以 CASA 分析已凍存 45 年、40 年、25 年及 10 年的荷蘭牛 (Holstein) 公牛精液，各組在存活率、精子泳動能力與頭帽完整度上均無顯著差異 (Ramírez-Reveco et al., 2016)。相似的試驗結果也在山羊、綿羊與豬上獲得驗證 (Salamon, 1976; Stroble et al., 2002)。

動物生理學家 Purdy 博士除了從事細胞凍存生理相關研究，同時也致力於家禽人工授精器材的開發。雞隻冷凍精液在解凍後的受精率不佳一直是冷凍精液在養雞產業推廣使用上的障礙；該團隊近期的研究中發現，在進行母雞人工授精時，如能越過儲存精液的儲精小管 (sperm storage tubules) 再注入精液，則能提高受精率 (Das et al., 2008)。而過去雞隻的人工授精

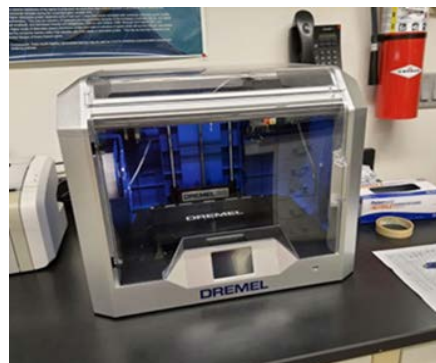


圖 8. 以 3D-Printer 打造更便利的人工授精器材供家禽現場使用。

不是使用玻璃製的注精器就是使用一般實驗室常用的 pipette tip，前者單價高耗損率也高，後者雖然便宜但前端過於尖銳易傷害母雞生殖道。為此 Purdy 博士嘗試利用 3D-Printer 技術，模擬雞隻生殖道構造，打造可以更深入生殖道的注精器，以提升冷凍精液在人工授精後的受精率 (圖 8)。

五、保種族群大小的判定、種原遺傳資源的收集及其遺傳多樣性的監測與族群的重建

NCGRP 本身並無豢養動物，USDA 轄下的研究單位所飼養的畜禽皆是用於營養試驗或遺傳疾病監控等特殊研究目的，並非以活體動物來維持族群的遺傳多樣性。Blackburn 博士建議，所有具經濟或研究價值的種畜禽應盡量以種原遺傳資源物質的型態凍存於種原庫中，節省人力與經費上的負擔 (Blackburn et al., 2019)。如需維持活體種畜禽族群，則保種族群的規模須詳加考慮。保種族群大小的判定是基於有效族群規模 (effective population size, N_e) 的計算，而有效族群是指在理想的群體中，有隨機遺傳漂變 (genetic drift) 發生下，能產生相同對偶基因或等量近親交配的個體數量 (FAO, 2012)。並且，其與近親速率 (rate of inbreeding, ΔF) 有著 $\Delta F = 1 / (2N_e)$ 的關係，因此在考量近親衰退與其他可能造成遺傳多樣性窄化的情況下，FAO 建議保種族群在短期內最少維持在 50 個個體是可以被接受的 (FAO, 2013)。

隨著世代的演進，染色體在發生互換重組甚至是突變之後，族群的遺傳結構與多樣性也隨之發生變化，因此族群的遺傳結構與多樣性是需要持續監測的，而族群遺傳結構與多樣性監測的關鍵是如何採樣 (sampling) 與監測頻率。首先，具有代表性的採樣才能忠實的反應族群的遺傳結構。而採樣的數量取決於欲覆蓋的對偶基因頻率 (allele frequency, P)，因此可以參考

$$\text{採樣個體數} = 1 - (1 - P)^{2N}$$

的公式， N 為公畜禽數目，計算採樣數量。此外，可以系譜或分子遺傳標記的資料為基礎，利用 Ward's clustering technique (圖 9) 協助周全採樣的代表性。另一方面，遺傳多樣性監測的頻率則是取決於家畜禽的世代間距。如豬隻的世代間距為 2 年，則選擇在 2 至 3 世代，也就是 4 至 6 年後，再次針對此一族群進行遺傳多樣性分析，了解其遺傳分化指數 (fixation index)、對偶基因頻率與純合性序列 (runs of homozygosity) 等相關資訊。Blackburn 博士認為近親雜交並非壞事，在實務上反而可以做為育種策略的一部分。

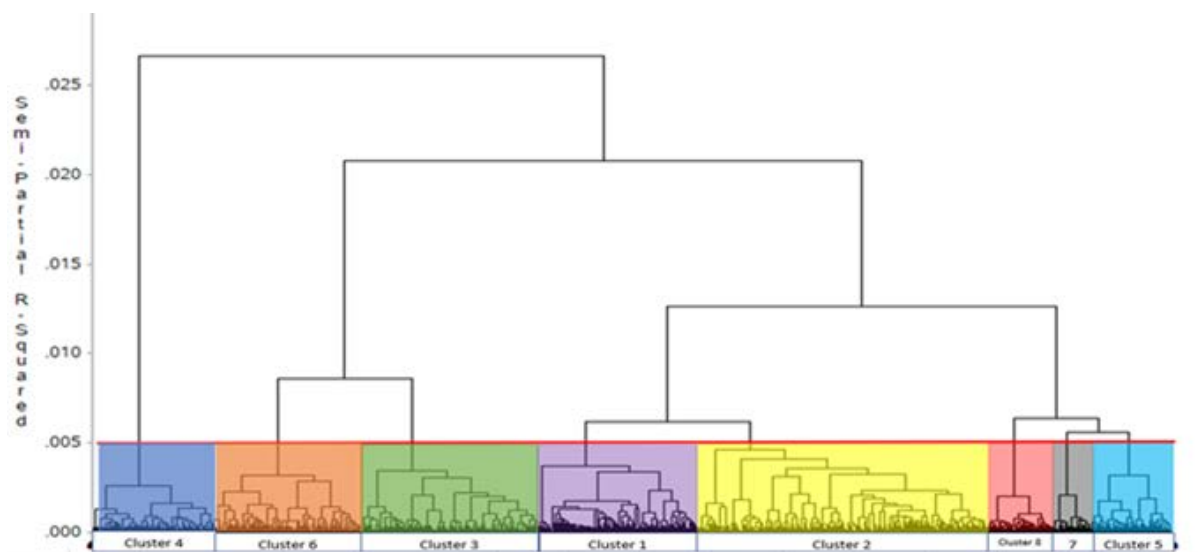


圖 9. 以 Ward's clustering technique 分析杜洛克豬群。摘自 Wilson 女士 2019 年於「Capturing genetic diversity: an assessment of the nation's gene bank in securing Duroc pigs」之簡報。

Blackburn 博士也建議近年來生物資訊科技突飛猛進，善用活用電腦軟體來處理龐大的種原遺傳資源數據甚為重要，例如可使用 Animal Breeder Toolkit 藉由 pseudo-mating 來計算個體的近親係數與其他育種所需的參考數值，ADMIXTURE 與 STRUCTURE 等軟體則可協助進行畜群的遺傳結構分析，GenAlEx 則可在 Microsoft Excel 的環境下操作，針對 SNP (Single nucleotide polymorphism) 等遺傳訊息進行運算。同時，Blackburn 博士也強調，種原遺傳多樣性的監測除了可以運用新穎的分子遺傳學工具如 SNP 晶片來進行，使用完整系譜資料以傳統數量遺傳學的方式加以分析，也是可以達到相同的目的 (圖 10)。

種畜群在定期的遺傳監測下能有效避免遺傳多樣性的窄化，然當需要自種原庫引種，重建畜群時，基於家畜與家禽在生理及遺傳上的差異會以不同的方式進行種畜禽族群的復育。

在家畜方面，先前的研究中以 Y 染色體上的遺傳訊息進行溯源，發現 2010 年北美地區現役的荷蘭牛公牛中，分別有 48.78%與 51.06%是來自於 Pawnee Farm Arlinda Chief 與 Round Oak Rag Apple Elevation 這兩頭生於 1960 年代的傑出公牛的血脈 (Yue et al., 2015)。而為了提升荷蘭牛牛群的遺傳多樣性，賓州州立大學 (Pennsylvania State University) 的 Chad Dechow 副教授與 NCGRP 合作，由種原遺傳資源資料庫中尋獲一頭與前述兩頭公牛全無血緣關係的公牛於 1954 年凍存的精液樣本，藉由此樣本企圖重新引入遺傳變異至荷蘭牛群中。因此，以此精

液與優質荷蘭牛母牛的卵子進行體外受精，再將受精卵植入代孕女牛的子宮中，待其分娩即可獲得有別於 99%現役牛隻血緣的個體（圖 11）。

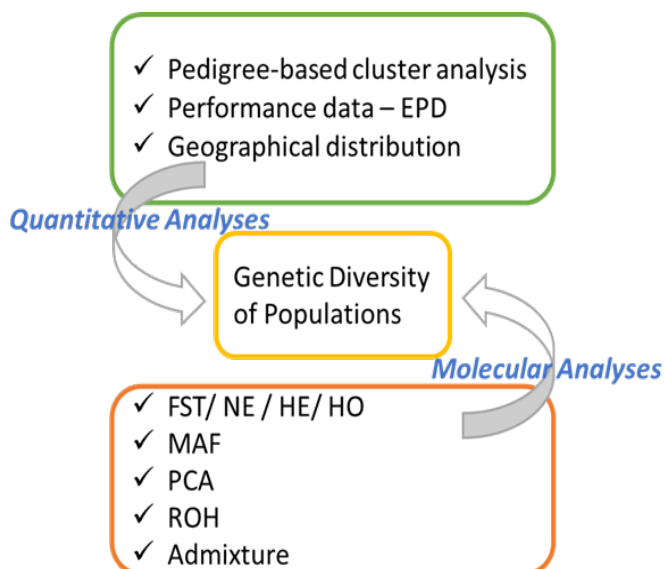


圖 10. 運用新穎的分子遺傳學工具與傳統數量遺傳學的演算，雙管齊下監測種原族群的遺傳多樣性。



圖 11. 賓州州立大學嘗試提升荷蘭牛群遺傳多樣性而培育的小牛於 2017 年出生。

<https://news.psu.edu/story/522505/2018/05/21/science-and-technology/holsteins-born-penn-state-improve-genetic-diversity>

另一個例子則是已知 Napole 與 Halothane 基因在以隱性同型合子出現時會對豬肉肉質造成不良的影響，而普渡大學 (Purdue University) 發現帶有 Napole 與 Halothane 基因突變的豬隻，在肉質性狀上表現優異。在 2003 年將帶有突變的 Napole 與 Halothane 基因的公豬精液凍存於 NCGRP。於 2007 年，普渡大學擬藉由隱性同型合子豬群的重建，針對此二基因對豬肉肉質的影響進一步了解。於是取用先前凍存在 NCGRP 的精液進行人工授精，在 F1 公豬中有 14/25 為帶有此二基因的異型合子，再一次雜交後即可獲得帶有此二基因同型合子的 F2 (FAO, 2015)。

在家禽方面，鳥類由雌性的 ZW 性染色體決定子代的性別，如僅凍存公禽精液勢必會失去 W 染色體與粒線體 DNA 上的遺傳訊息，因此凍存母禽的卵巢組織或胚胎的始基生殖細胞 (primordial germ cells, PGC) 也是在種原遺傳資源保存時需要列入考慮的項目 (Silversides et al., 2012)。卵巢組織需取自捐贈者 (donor) 一日齡雛雞或 7 至 8 日齡的火雞加以凍存，在需進行族群重建時再將卵巢組織以外科手術的方式移植至接受者 (recipient) 雞隻，待接受者雞隻生長發育至性成熟後，以與捐贈者同品系的雞隻精液對其進行人工授精，即可生產出捐贈者雞隻

品系的雛雞，達到復育族群的目的 (Liu et al., 2010)，而目前成功率約 40%。此外，也可使用始基生殖細胞作為重建族群的起點，但相較於卵巢組織的移植，在程序上複雜許多。首先，從孵化至第三日的捐贈者雞胚中抽取全血凍存，待需要時由全血中分離出 PGC 細胞，接著將其植入具 PGC 細胞缺陷的接受者雞胚中，繼續孵化流程，至雞隻孵化後再行以 PCR 鑑定 PGC 是否移植成功 (Petitte, 2006)。在家禽族群重建的成本上，Blackburn 博士指出，保存活體族群在三年內是最經濟的，但隨著時間的增長情勢會出現轉變。因此，若一個族群在五年間不再被使用，則建議以凍存的方式進行種原備份。而不可諱言的，在沒有經費的顧慮下，使用卵巢移植技術，配合人工授精，是一個可以在短時間內重建族群的方式 (Silversides et al., 2012)。

六、種原庫管理與風險評估

進入 NCGRP 的訪客需事先提交個人資料，如姓名與身分證字號或護照影本等給 USDA 管理處建檔與查核。NCGRP 的員工進入此建築需刷門禁卡，同時鍵入個人密碼，並依據權限區分人員可進出的空間，如僅有實驗室負責人能進入種原遺傳資源樣本凍存的庫房，一般的實習生或清潔人員無權進入 (圖 12)。NCGRP 的電腦及網路使用是受管制的，如同門禁一般，人員需插卡與鍵入密碼方能使用。人員在種原庫管理系統的登入登出都會留下紀錄，而種原遺傳資源管理系統內的資料也定期備份至雲端與其他 USDA 轄下研究機構的伺服器中。

NCGRP 無論是建築物本身或是凍存種原遺傳資源樣本的液態氮桶皆有設置監測器 24 小時監控，監測器連結警報系統 (圖 13)，當有異常發生時警報系統會藉由電話或簡訊通知負責人，請其前來處理。也因此，須將如何處理各項異常狀況繪製成簡單的流程圖並編製成“Continuity Operations Plan”供負責人查閱，以便即時修正異常處 (圖 14)。NCGRP 對於種原遺傳資源凍存設施有規劃預備空間，供急難如洪水、龍捲風乃至於戰爭導致建築設備損毀時撤退之用。Blackburn 博士提醒，針對臺灣特有的颱風與地震應該要有在面對淹水與建築物損毀狀況下的備案。因此，在進行風險評估時除了實驗室人員，應邀請機電人員與建築相關人員加入討論。在種原遺傳資源樣本冷凍設施上，NCGRP 備有 2 台發電機以因應意外停電，並可維持至少 21 天的供電量。容量 3 萬公升的液態氮儲存槽兩座，儲存有可維持所有液態氮桶運作 3 個月的液態氮量。Blackburn 博士提到 -80°C 冰箱會在用電量上造成極大的負擔，且其壓縮機使用壽命有限，在使用上有不確定性，通常直至冰箱本身警報響起才知道是壓縮機出問題了，因此不建議使用 -80°C 冰箱存放畜禽種原遺傳資源樣本。



圖 12. 門禁森嚴，依據權限制分人員活動區域。



圖 13. 液態氮桶由監測器 24 小時監控，並可自動填充液態氮。

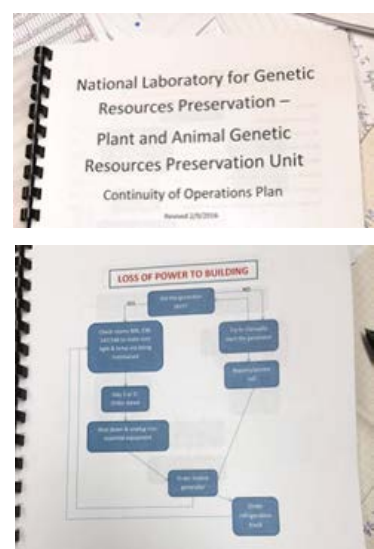


圖 14. 在異常發生時，簡單明瞭的 Continuity Operations Plan 提供正確的指引。

在種原遺傳資源凍存的風險管理上，Blackburn 博士認為收到樣本後所有處理的操作步驟都已標準化，故過程中最大的風險來自於動物本身的狀態、樣本採集的過程與運輸的狀況。由於 NCGRP 本身並未豢養動物，所以在生物安全的防護上，著重於種原樣本採集後的前處理。種原樣本所用的保存液與稀釋液中需加入抗生素，避免病菌散播危害實驗室人員。凍存種原遺傳資源樣本的庫房內裝設有攝影機，監看人員進出，其液態氮桶等相關冷凍設施也應每 2 週由負責人員巡查一次，確保其運作順暢。

此外，種原庫冷凍設施每日的運作雖可由自動監測器協助管控，但對於種原庫管理的品質仍須至少每季確認一次。種原庫管理品質可藉由抽測來確認，隨機由種原遺傳資源管理系統資料庫中選取數個樣本 ID，接著前去這些樣本所在的液態氮桶內確認這些樣本存放的位置與數量是否正確，必要時可針對這些樣本進行解凍試驗，了解其細胞活性。種原庫管理品質測試結果須上傳登載於種原遺傳資源管理系統中備查。

最後，NCGRP 作為聯邦政府轄下的研究機關，有責任為產業及其他研究單位提供服務，而無償提供畜禽種原遺傳資源樣本與其相關資料是最主要的服務項目。由於種原遺傳資源樣本大多來自各研究單位、大型育種公司與小型畜牧場的捐獻，在冷凍入庫後即屬國家財產，因此 NCGRP 的研究人員在與其他機構特別是私人公司洽談合作事宜時，對於種原遺傳資源樣本及相關資料的取用須詳載於

合約中，且合約內容須經由法務單位協助確認周全，避免在未來發生爭端的風險。

七、與路易斯安那州州立大學及科羅拉多州州立大學交流情形

NCGRP 針對種畜禽遺傳資源採樣與人工生殖技術的相關器材，除了自行研發也與其他科研單位密切合作，利用 Photolithography 技術開發用於畜牧現場的各項器材，以達到省工省時與省錢的目的。與路易斯安那州州立大學 (Louisiana State University) AgCenter 研究團隊的 Yue Liu 博士合作，嘗試在 polydimethylsiloxane 上以 photolithography 的技術模擬血球計數盤，刻畫出細微的方格，可於顯微鏡下進行精液鏡檢與精子數計算 (圖 15)。除了 NCGRP 配合協助提供豬精液的鏡檢結果，其他合作單位也協助提供水生動物如斑馬魚等的精液及卵的檢測結果。希望藉由資料的累積優化產品品質，提供業者輕便經濟的精液鏡檢選項。

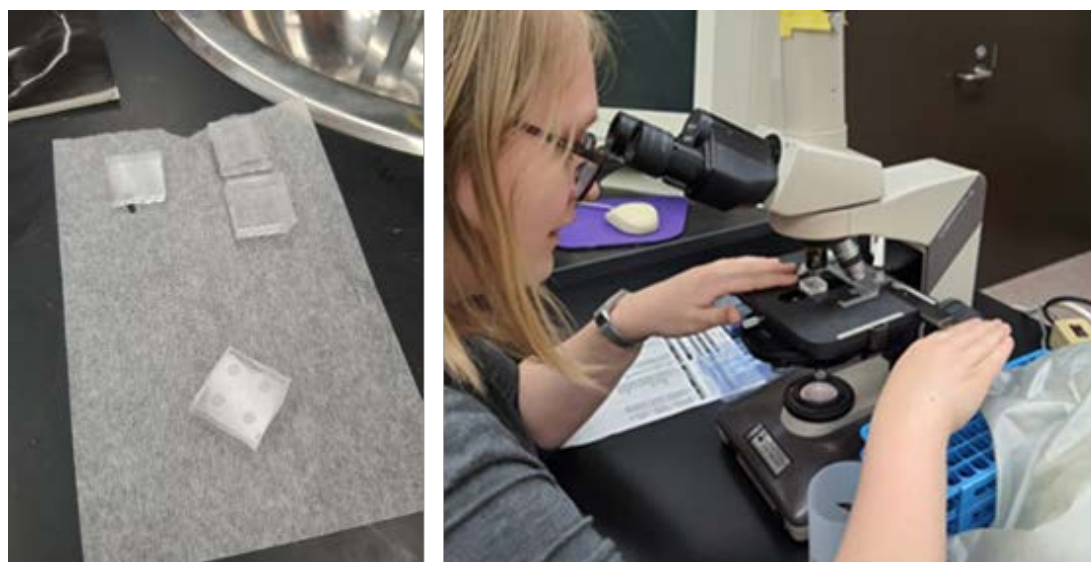


圖 15. 左為 polydimethylsiloxane 以 photolithography 技術刻畫出細微的方格模擬血球計數盤，右為實際在顯微鏡下使用的情形。

此外，在 Blackburn 博士的引薦下與於科羅拉多州州立大學 (Colorado State University) 任教的 Milton Thomas 教授請益美國肉牛產業的發展與現況(圖 16)。Thomas 教授長年致力於肉牛的選育，尤其在安格斯牛、布蘭格斯牛與布拉曼牛的育種，並且導入基因體學、轉錄組學及蛋白質體學於難以測量的性狀，如繁殖能力等



圖 16. Milton Thomas 教授。

的研究。

在肉牛飼養上，科羅拉多州就地利之便，運用母牛/小牛比與飼料來源的優勢，成為美國第五大牛肉生產州，僅次於德州、內布拉斯加州、堪薩斯州與奧克拉荷馬州。科羅拉多州境內即有兩家大型肉牛育種公司—Leachman 與 Altenburs，供應州內肉牛場肉種牛、精液與胚胎。美國幅員遼闊，所飼養的肉牛品種會隨著飼養地區而做調整。如位於南方的德州氣候炎熱多以飼養布蘭格斯牛 (Brangus) 為主，其為布拉曼牛 (Brahman) 與安格斯牛的雜交子代，3/8 布拉曼牛的血統給予牛隻較佳的耐熱性。並為了進一步提升牛肉品質，讓布蘭格斯牛回交安格斯牛，獲得肉質更佳的雜交子代，另取名為 Ultra-black。

1990 年代為因應高階消費市場，美國肉牛業者嘗試引入和牛與安格斯牛雜交，生產高品質的牛肉，而的確也顯著提升高品質牛肉的生產。在美國牛肉品質，以霜降程度為標準分為—Prime、Choice 及 Select 三個等級的生產配比上，相較於過去美國牛肉 80% 落於 Choice 級，僅 20% 為 Prime 級；在和牛的投入後，Prime 級的牛肉產量大幅提升，甚至出現超越 Prime 級定義的霜降程度牛肉。為此，Thomas 教授笑著說，或許我們美國的牛肉品質評級標準得要來修訂一下了呢！

自 2010 年起，為了追求更高的霜降程度，美國在肉牛產業的支持下發軔純種和牛的研究。1970 年代，NCGRP 在因緣際會下凍存了來自日本純種黑毛和牛的遺傳資源物質，因此美國成為在日本禁止純種和牛出口後，少數能夠進行純種和牛研究的國家。Thomas 教授聽聞臺灣珍貴種原—源興牛源自日本的但馬牛，具有和牛的血統，便積極與筆者討論未來在和牛研究上合作的可能性，運用 SNP 的分析，了解和牛族群的遺傳結構與基因多樣性，進一步揭開和牛高肉質背後的遺傳組成之謎。

肆、心得與建議

一、心得

Blackburn 博士對於種原庫運作的挑戰做了說明。首先，如何獲得產業界及其他研究機構的認同，使其了解種原庫的重要性，能給予他們的服務，進而樂於使用種原庫資源，是種原庫永續發展並達到活化種原的關鍵。今天美國的畜牧產業十分成熟，乃是近 50 年來一步一腳印的累積。從 1970 年代 BLUP 分析開始被應用在動物育種後，經過 USDA 遺傳育種學者多年的教育訓練，1990 年代起各種畜禽協會已有能力對前來登錄的畜禽進行 BLUP 分析，並提供各項分析數值給農戶作為選種育種的參考。時至今日，大型的育種公司已有能力自行對種畜群進行遺傳評估。因此，與產業間的互動絕不是一蹴可幾的，需要經年累月的交流，方能建立良好的合作關係。再者是如何確認實驗室工作人員能切實遵循標準作業程序，完成收樣、樣本冷凍與入庫凍存。因此人員的教育訓練十分重要，務必讓實驗室人員了解他們所從事的工作，除了能提升工作品質外，更能維護自身在實驗室的安全。而搭配定期的抽測，可再次確認整個作業流程是否有違失，並進行補救。此外，樣本凍存的標準作業程序需與時俱進，但如何確認新的作業程序是否真的適用是關鍵。因此實驗室人員不僅是進行日常的樣本凍存工作，更負責研發優化各物種的樣本冷凍標準作業程序，並進一步確認新作業程序的可靠度。最後，Blackburn 博士強調種畜禽遺傳多樣性的維護與種原的活化利用是需要經年累月的持續進行方能彰顯其價值，無論起步的時間晚，經費如何捉襟見肘，人員設備還不到位，去做就對了！

新方法、舊方法，有用的就是好方法。因定序科技日新月異，許多物種的 SNP 晶片也都商品化，所以目前 NCGRP 開始廣泛使用 SNP 晶片在種畜禽族群的遺傳分析上，Blackburn 博士認為使用 SNP 晶片所獲得的遺傳訊息，相較於微衛星標誌分析，更易於與其他研究人員交流分享。然在經費有限的情況下，不可能針對每個族群每個個體進行遺傳分析，此時就有賴於應用傳統數量遺傳的方法，由系譜資料中分析個體或族群的遺傳組成，一樣能達到畜禽遺傳多樣性監測的目的。美方認為入庫後的種畜禽樣本即屬國家財產，因此在與其他機構特別是私人公司洽談合作事宜時，由法務單位協助周全合約內容，避免在未來發生爭端，而這部分是我們在致力於種原活化利用與推廣時須加以重視的。

二、建議

- (一) NCGRP 負責人 Blackburn 博士是一位對研究充滿熱情的學者，於 20 年前接下 NCGRP 的管理工作，奠定今日美國畜禽種原遺傳資源保存的基礎與規模。其慷慨允諾在臺灣種畜禽遺傳多樣性研究領域上給予協助，並且樂意與我方進一步的合作。希冀藉由此次研習除了了解美國在畜禽種原維護與利用的作法與成效，更開啟與 NCGRP 在畜禽遺傳多樣性研究後續合作的橋梁。
- (二) 種原庫的運作絕非靠一己之力可以達成的，需結合動物遺傳育種、動物生理、細胞凍存與資料庫建置及資訊工程等領域的專家一起，方能成事。故應針對人員的配置、種畜禽遺傳資源的採樣、凍存與庫存管理等項目進行規劃，俾利周全種原庫的功能與運作。

伍、參考文獻

- Blackburn, H. D. 2018. Biobanking genetic material for agricultural animal species. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 6: 14.1-14.14.
- Blackburn, H. D., C. S. Wilson, and B. Krehbiel. 2019. Conservation and utilization of livestock genetic diversity in the United State of America through gene banking. *Diversity* 11: 244-253.
- Carwell, D. B. 2010. Pregnancy rates in beef cattle artificially inseminated with frozen-thawed aged beef semen. Master thesis. Louisiana State University. USA.
- Das, S. C., N. Isobe, and Y. Yoshimura. 2008. Mechanism of prolonged sperm storage and sperm survivability in hen oviduct: a review. *AJRI* 60: 477-481.
- FAO. 2012. Cryoconservation of animal genetic resources. *FAO Animal Production and Health Guideline* pp. 77.
- FAO. 2013. In vivo conservation of animal genetic resources. *FAO Animal Production and Health Guideline* pp. 141.
- FAO. 2015. The Second Report on The State of The World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture. pp. 301.
- Liu, J., Y. Song, K. M. Cheng, and F. G. Silversides. 2010. Production of donor-derived offspring from cryopreserved ovarian tissue in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Biology of Reproduction* 83: 15-19.
- Petitte, J. N. 2006. Avian germplasm preservation: embryonic stem cells or primordial germ cells? *Poultry Science* 85: 237-242.
- Salamon, S. 1976. Fertility of ram and boar semen after long-term storage. *Proc. VIIIth Intern. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insemin., Krakow* 1. pp. 224.
- Silversides, F. G., P. H. Purdy, and H. D. Blackburn. 2012. Comparative costs of programmes to conserve chicken genetic variation based on maintaining living populations or storing cryopreserved material. *British Poultry Science* 53: 599-607.
- Stroble, K. A., T. S. Stewart, and R. L. Krisher. 2002. Duration of cyropreservation has no effect on fertilizing ability of boar spermatozoa. *Theriogenology* 59: 212.
- Ramírez-Reveco, A., J. L. Hernández, and P. Aros. 2016. Long-term storing of frozen semen at -196°C does not affect the post-thaw sperm quality of bull semen. *Cryopreservation in Eukaryotes. Chapter 6.* pp. 91-102.
- USDA. ARS. 2020. Animal GRIN Database.

https://agrin.ars.usda.gov/main_webpage_dev/ars?language=EN&record_source=US.

Yue, X-P., C. Dechow, and W-S. Liu. 2015. A limited number of Y chromosome lineages is present in North American Holsteins. *J. Dairy Sci.* 98: 2738-2745.

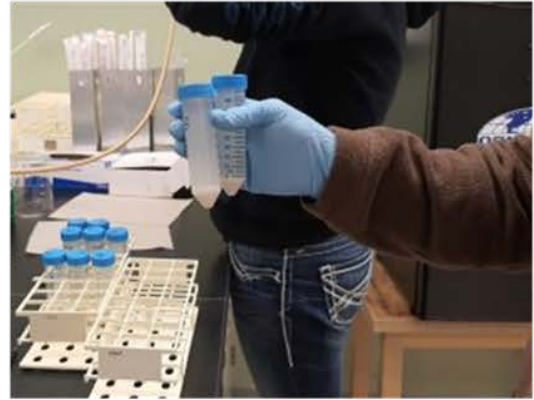
陸、照片紀實

豬隻精液冷凍流程

(I) 精液狀態及品質確認



1. 豬精液稀釋後與冰包以可隔絕溫度的保麗龍容器裝箱，以常溫宅配運送至NCGRP。



4. 精液以800 RCF在15°C下離心10分鐘，離心後除去上清液，記錄沉澱精子體積。



2. 收到精液樣本後先測量其溫度，確認精液溫度維持在15°C至17°C之間，並在樣本上標註由種原資料庫所提供的編號。



5. 取25uL精子與5mL的二次水混合均勻，以分光光度儀判讀濃度，再依據標準曲線讀取每毫升中的精子數。



3. 接著，測定精液的pH值，確認其pH值在6.7到7.1之間。



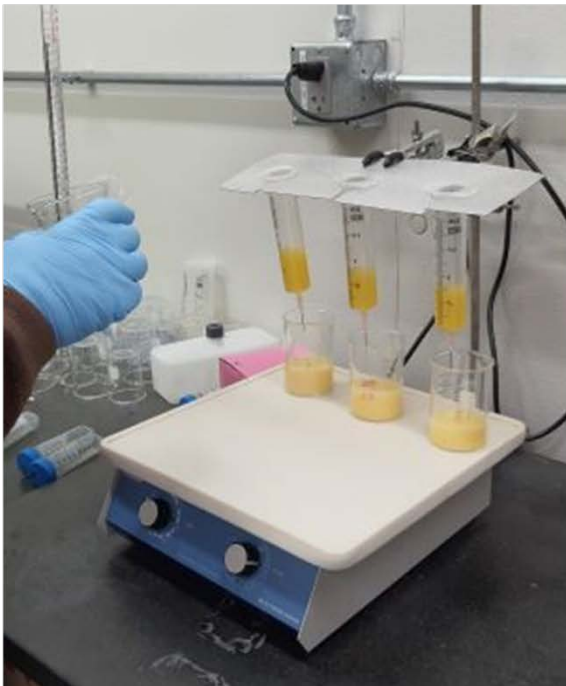
6. 在進行CASA分析前須先將稀釋樣品用的BTS緩衝液與玻片加熱至39°C。主要由CASA所獲得的資訊為精子的活力與泳動情形，這些資料將會一併上傳至種原資料庫裡。

豬隻精液冷凍流程

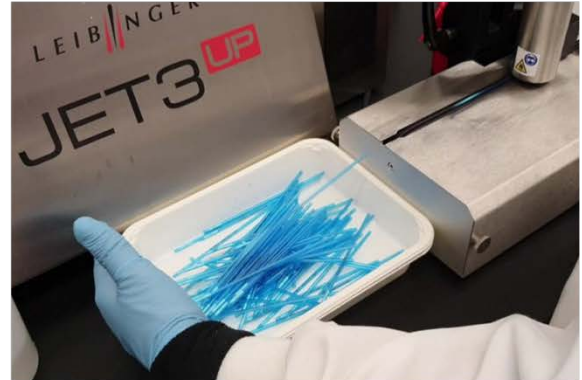
(II) 精液冷凍前稀釋與分裝



1. 每頭公豬精液以製備0.5 mL的麥管160支為基礎，計算所需要的精子量與冷凍稀釋液用量。精子在與cooling extender均勻混合後靜置於5°C的環境下1.5至2小時。



2. 緩慢加入freezing extender均勻混合。



3. 0.5 mL麥管先以標籤機將此樣本的批號與日期列印在其上。



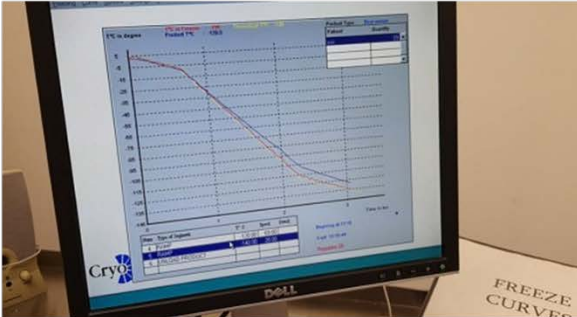
4. 在5°C的環境下使用自動充填機將精液注入麥管並彌封。



5. 彌封好的麥管平躺於麥管架上，並在此時挑出彌封不良或注入過多空氣的麥管。

豬隻精液冷凍流程

(III) 精液冷凍

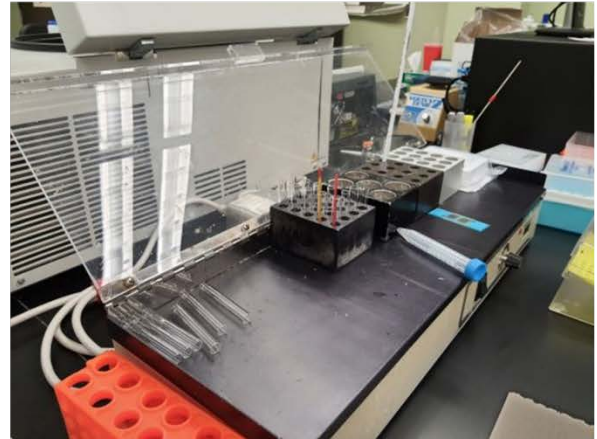


1. 啟動程式降溫儀，選擇豬精液適用的降溫模式，將麥管架依序放入程式降溫儀，程式降溫儀將在3.5分鐘內將精液由0°C降溫至-140°C。

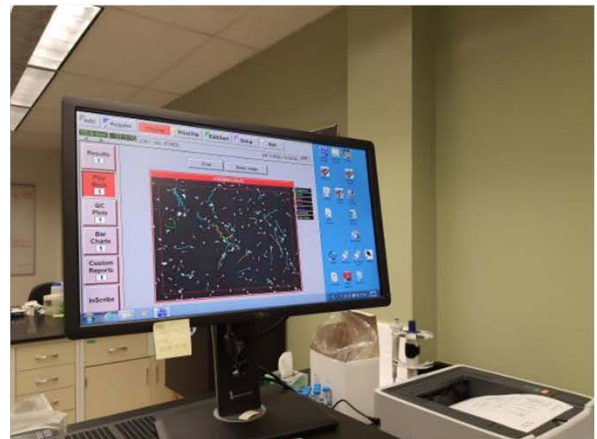


2. 取出完成冷凍的麥管，倒入液態氮中，準備進行入庫程序。

(IV) 冷凍精液解凍試驗



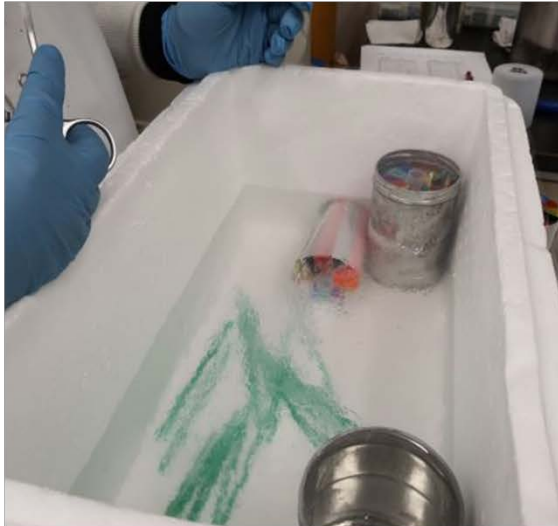
1. 每個樣本各取一支麥管進行解凍試驗，將麥管置於50°C水浴槽20秒解凍，接著與稀釋液在39°C環境下靜置7分鐘，完成解凍。



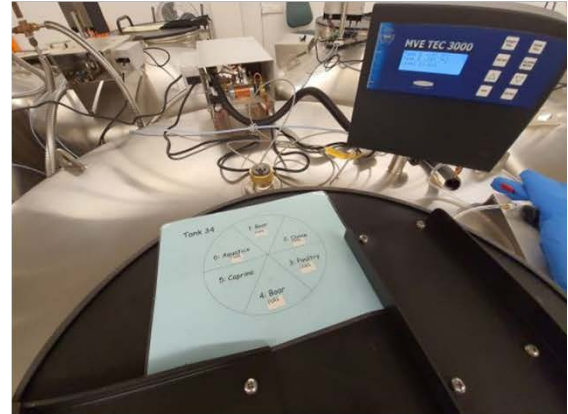
2. 解凍後的精液即可以CASA了解其精子活力與泳動程度，精子活力呈現異常者可再取一麥管測試。

豬隻精液冷凍流程

(V) 精液冷凍入庫與庫存管理



1. 麥管暫時置於液態氮中，再次確認麥管是否有不良品，接著依種原庫編號將麥管一一放入儲存小管中，清點並紀錄麥管數。



3. 將麥管送入液態氮桶存放則完成冷凍精液入庫的工作。精液的各项性狀會由種原資料庫管理員上傳至種原資料庫，供研究人員參考。

Species BOAR Tank 73.5 Date 3-11-20

Goblet <u>9A</u>		
PIE	NAGP ID	#STRAWS
A		
B		
C		
D		
E		
F		
G	57137	20
H		20
I		20
J		20
K		20
L		20

Goblet <u>10A</u>		
PIE	NAGP ID	#STRAWS
A	57351	20
B		20
C		20
D		20
E		20
F	57352	20
G		20
H		20
I		20
J		20
K		20
L		20

Goblet <u>9B</u>		
PIE	NAGP ID	#STRAWS
A	57137	20
B		18
C	57350	20
D		20
E		20
F		20
G		20
H		20
I		20
J		20
K	57351	20
L		20

Goblet <u>10B</u>		
PIE	NAGP ID	#STRAWS
A	57352	20
B	57353	20
C		20
D		20
E		20
F		20
G		20
H		16
I		20
J	57354	20
K		20
L		20

Inventoried by: _____ Verified by: _____

2. 在液態氮桶紀錄表上載明存放的位置，待種原庫負責人員再次確認各項資料與麥管數。