

紅羽土雞種蛋孵化率關聯基因型分析研究⁽¹⁾

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

收件日期：113 年 10 月 8 日；接受日期：114 年 8 月 1 日

摘 要

種蛋孵化率是影響紅羽土雞供給量與經濟效益的關鍵因素之一。本研究以 100 隻紅羽土雞種母雞作為試驗動物，收集第 30、35、40、45、50、55 及 60 週齡共計 2,243 顆種蛋作為種蛋孵化率檢測使用。運用競爭性交替基因特異性聚合酶鏈鎖反應 (Kompetitive Allele-Specific PCR, KASPTM) 技術，來檢測種母雞之 *OCX-32*、*OC-116*、*OCX-36*、*PLCZ1*、*IIPR2*、*IAPP*、*ABCC9*、*KCNJ8* 和 *CACNA1C* 等 9 個可能與蛋殼厚度具相關的基因之 SNP 點。應用 SAS 統計分析軟體進行基因型與性能資料的關聯性分析，並以 Bonferroni 檢定來進行多重均值校正。試驗結果顯示紅羽土雞種母雞於第 30、35、40、45、50、55 及 60 週齡受精種蛋孵化率依序為 88.1、90.2、85.4、85.5、80.7、72.9 及 68.3%，且第 55 與 60 週齡種蛋孵化率較第 50 週齡顯著下降 7.8 與 12.4% ($P < 0.05$)。候選基因 SNP 點位與性狀表現的關聯性分析部分，發現 *OCX-32* 基因 A type 可顯著提升 5.3% 全期檢測週齡受精種蛋孵化率 ($P < 0.05$)，並增加 22.3% 檢測週齡總產蛋數 ($P < 0.05$)。然而，其餘 8 個候選基因對受精種蛋孵化率之影響，皆未達統計顯著水準。未來，會持續擴大選育族群的性狀資料收集與候選基因 SNP 點位的關聯性分析，驗證 *OCX-32* 基因對受精種蛋孵化率及繁殖性狀之影響程度，提升遺傳標識分析準確度。

關鍵詞：紅羽土雞、孵化率、候選基因、單核苷酸鹼基多態性、競爭性交替基因特異性聚合酶鏈鎖反應。

緒 言

種蛋孵化率是影響紅羽土雞供給量與經濟效益的關鍵因素之一，如能提升 0.1% 種蛋孵化率，仍可讓種雞生產者從中獲得更多的利潤，並有效降低孵化場生產雛雞的經濟成本 (Nowaczewski *et al.*, 2022)。Bennett (1992) 研究蛋殼厚度對商用白肉雞種蛋孵化率的影響，結果發現 Arbor Acre 及 Hubbard 商用肉種雞厚蛋殼組於不同產蛋週齡的種蛋孵化率分別為 84% (30 – 35 週齡)、85.8% (40 – 45 週齡)、84.1% (45 – 50 週齡) 及 75.3% (55 – 56 週齡)，皆顯著優於蛋殼較薄之肉種雞種蛋孵化率 (78.4、82.6、77.2 及 65.8%， $P < 0.05$)。Liao *et al.* (2013) 研究純種洛島白蛋雞品系 (pureline Rhode Island White layer) 蛋殼厚度對種蛋孵化率的影響，發現種蛋孵化率與蛋殼厚薄程度存在顯著正相關 ($r = 0.3$, $P < 0.05$)，並且高孵化率 (高於 90%) 較低孵化率 (低於 75%) 種蛋蛋殼厚度厚 6.2% (316.60 ± 4.42 vs. $298.23 \pm 10.79 \mu\text{m}$, $P < 0.05$)。近年，商用白肉雞 (Ross 308 broiler, Aviagen, USA) 自第 25 – 54 週齡的受精種蛋孵化率已達 90.4 – 94.2% (Damaziak *et al.*, 2021)。

行政院農業委員會 (農業部前身) 於 2001 年委託畜產試驗所、國立中興大學、國立嘉義大學及國立屏東科技大學執行臺灣商用土雞性能檢測試驗，分析結果顯示紅羽土雞與黑羽土雞的受精種蛋孵化率分別為 84.5 及 86.1% (李等, 2001)。林等 (2008) 於臺灣土雞不同雜交組合之種蛋受精率、孵化率及胚胎死亡率之比較研究，發現紅羽土雞、黑羽土雞、中興大學土雞品系 (NCHU-DL2) 及畜試土雞 (TLRI-B) 之受精種蛋孵化率分別為 62.0、57.2、75.7 及 68.7%。杜 (2013) 於臺灣土雞種蛋品質與孵化參數分析研究，結果顯示花東雞 (Hua-Tung chicken)、信義雞 (Hsin-Yi chicken)、竹崎雞 (Ju-Chi chicken)、金門雞 (Quemoy chicken)、名古屋雞 (Nagoya chicken) 及石岐雞 (Shek-Ki chicken) 的種蛋孵化率分別為 88.8、87.6、88.5、83.6、87.4 及 83.1%。綜合上述研究報告顯示，臺灣土雞

(1) 農業部畜產試驗所研究報告第 2834 號。
(2) 農業部畜產試驗所遺傳生理組。
(3) 坤諦生技股份有限公司。
(4) 國立成功大學生物科技與產業科學系。
(5) 國立屏東科技大學動物科學與畜產系。
(6) 通訊作者，E-mail: lin0429@mail.tlri.gov.tw。

62.0 – 88.8% 種蛋孵化率相較商用白肉雞 90.4 – 94.2% 種蛋孵化率為低，顯示臺灣土雞種蛋孵化率性能表現仍有改進的空間。

基因選種是加速物種性能改進的重要工具之一。Chakraborty *et al.* (2022) 指出基因選種能增加肉牛 (熱帶氣候之繁殖性狀)、豬 (飼料效率) 及白肉雞 (體重) 等物種性能表現遺傳改進分別為 15 – 44%、23 – 91% 及 20%。在雞第 9 號染色體的 *OCX-32* 基因被認為是能影響蛋殼強度之數量性狀基因座之一 (Takahashi *et al.*, 2009)。*OCX-32* 基因 exons 1, 2, 4 及 6 區域之單核苷酸鹼基多態性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 有可能是影響蛋殼品質之關鍵，並且可作為商用雞種選拔蛋殼品質性狀之參考依據 (Takahashi *et al.*, 2010)。Mann *et al.* (2002) 指出 *OC-116* 基因可能是影響蛋殼性能的關鍵候選基因之一。Dunn *et al.* (2009) 發現 *OC-116* 基因 exon 4 區域之 SNP 可顯著影響蛋殼厚度、蛋殼彈性係數及蛋型指數等蛋殼品質性能表現 ($P < 0.05$)。Cordeiro *et al.* (2013) 發現 *OCX-36* 基因 cDNA 第 211 位置有一 SNP 造成相對應的氨基酸改變 (proline/serine)，並對雞蛋抵抗金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538) 感染的性能表現有顯著差異存在 ($P < 0.05$)。Li *et al.* (2021) 運用全基因組關聯性分析 (genome-wide association study, GWAS) 研究 839 隻白來航 (White Leghorn, WL) 和東鄉雞 (Dongxiang, DX) 雜交 F2 代影響蛋殼碳酸鈣結構的基因，結果發現第 1 號染色體上的 *voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha-1 C (CACNA1C)*、*islet amyloid polypeptide (IAPP)*、*inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 2 (ITPR2)*、*1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase zeta-1 (PLCZ1)*、*ATP-binding cassette sub-family C member 9 (ABCC9)* 和 *ATP-sensitive inward rectifier potassium channel 8 (KCNJ8)* 等 6 個候選基因連鎖的特定 SNP 點位可顯著影響蛋殼碳酸鈣結構。

競爭性交替基因特異性聚合酶鏈鎖反應 (Kompetitive Allele-Specific PCR, KASP™) 技術是由 LGC 公司 (Laboratory of the Government Chemist, LGC, UK) 開發之新一代 SNP 基因檢測技術，此技術具有高通量、低錯誤率、低成本及基因型檢測效率高等優點，被廣泛應用在雞 (Seo *et al.*, 2016)、荷蘭牛 (Zhang *et al.*, 2020) 及綿羊 (Astuti *et al.*, 2023) 等動物的分子標識輔助選拔研究。KASP™ 基因型檢測技術是藉由兩股 5' 端各自帶有 FAM/HEX-labelled 標記螢光與 3' 端分別能辨識突變點鹼基之引子和一股反向引子所構成之 primer mix，並利用帶有兩種不同螢光訊號的兩條 quancher 抑制螢光探針 master mix，對位點進行 PCR 擴增反應，再利用即時螢光核酸定量分析儀 (StepOnePlus™ Real-time PCR System, Thermo Fisher Scientific, USA) 吸光值測定相對應 PCR 產物擴增螢光強度，以判定基因型 (Semagn *et al.*, 2013)

本研究旨在運用 KASP™ 基因型檢測技術，檢測影響蛋殼品質的 9 個候選基因之 SNP 點位，分析影響紅羽土雞蛋殼厚度候選基因對種蛋孵化率的影響，期作為提升種蛋孵化率基因選種的遺傳標識 (genetic marker)，加速種蛋孵化率遺傳改進效率。

材料與方法

本試驗於農業部畜產試驗所遺傳生理組執行影響種蛋孵化率候選基因之基因型檢測與關聯性分析。試驗動物飼養於南部民間畜牧場，試驗動物之使用、飼養及試驗內容皆依據畜產試驗所實驗動物管理小組審查同意書進行 (IACUC 畜試動字 112-34 號)。

I. 試驗動物與飼料配方

以民間畜牧場自家育成第 15 世代 600 隻紅羽土雞種母雞為試驗族群，逢機選取 100 隻種母雞進行種蛋孵化檢測，且試驗期間從 30 至 60 週皆無種母雞死亡，試驗期間各階段飼糧營養分析值如表 1。

II. 採血及基因體 DNA 萃取及純化

本研究採集試驗雞隻翼下靜脈採集血液約 0.5 – 1.0 mL，置入 K₂EDTA 採血管 (BD Vacutainer® Blood Collection Tube, Becton, Dickinson and Company, USA)，混合後供基因體 DNA (genomic DNA, gDNA) 萃取使用。以 gDNA 快速萃取套組 (EasyPure Genomic DNA mini Kit, TransGen Biotech, China) 萃取試驗雞隻 gDNA 後，經乾燥並加入適量 Tris-EDTA 緩衝液進行隔夜回溶，再利用微量分光光譜儀 (NanoDrop™ 2000c Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, USA) 測定 gDNA 濃度，將符合品質標準 OD 260/280 ratios 為 1.8 – 2.0 的 gDNA，並調整濃度為 100 – 150 ng/μL，供作 PCR 反應之模板。

III. 影響蛋殼厚度候選基因之 KASP™ 基因型檢測方法

研究使用影響蛋殼厚度候選基因之 SNP 遺傳標識資訊，列於表 2 (Dunn *et al.*, 2009; Takahashi *et al.*, 2010; Cordeiro *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2021)。KASP™ 測定利用 FAM (– 520 nm) 或 HEX (– 610 nm) 螢光標記引子鑑別

不同基因座 SNP 點位不同類型的核苷酸，純合型分別由 FAM 和 HEX 螢光標示為藍色和紅色，雜合型則呈現 FAM/HEX 螢光標示為綠色。*OCX-32* 與 *PLCZ1* 基因的交替基因鑑定，腺嘌呤 (A) 純合型為藍色，胞嘧啶 (C) 純合型為紅色，AC 雜合型為綠色。*OC-116* 基因的交替基因鑑定，CC 純合型為藍色，鳥糞嘌呤 (G) 純合型為紅色，CG 雜合型為綠色。*OCX-36* 基因的交替基因鑑定，胸腺嘧啶 (T) 純合型為藍色，CC 純合型為紅色，TC 雜合型為綠色。*ITPR2* 基因的交替基因鑑定，CC 純合型為藍色，TT 純合型為紅色，TC 雜合型為綠色。*IAPP* 基因的交替基因鑑定，TT 純合型為藍色，CC 純合型為紅色，CT 雜合型為綠色。*ABCC9* 和 *CACNA1C* 基因的交替基因鑑定，GG 純合型為藍色，AA 純合型為紅色，GA 雜合型為綠色。*KCNJ8* 基因的交替基因鑑定，CC 純合型為藍色，AA 純合型為紅色，AC 雜合型為綠色 (圖 1)。

表 1. 試驗飼糧組成

Table 1. The composition of the experimental diets

Ingredient	1 st stage	2 nd stage	3 th stage	4 th stage	5 th stage
	0 – 3 weeks	4 – 6 weeks	7 – 8 weeks	9 – 23 weeks	24 weeks –
ME, kcal/kg	3,127	3,248	3,232	2,823	2,933
Crude protein, %	19.96	18.63	18.22	14.87	17.28
Crude fat, %	7.77	9.31	8.58	3.91	4.90
Crude fiber, %	2.33	2.39	2.40	3.21	2.37
Calcium, %	0.85	0.80	0.72	0.90	2.53
Available phosphorus, %	0.25	0.23	0.23	0.40	0.29
Lysine, %	1.18	1.09	1.02	0.72	1.00
Methionine, %	0.41	0.44	0.44	0.34	0.38

IV. 種蛋孵化出雛資料庫建置

民間牧場使用商用孵化設備 (Super J, Jamesway Incubator Company, Canada) 進行種蛋孵化作業，第 0 – 18 天孵化溫度為 37.7°C 相對濕度 80%，第 19 – 21 天孵化溫度 37.2°C 相對濕度 70%，於第 18 天進行照蛋，收集試驗紅羽土雞種母雞群第 30、35、40、45、50、55 及 60 週齡種蛋孵化過程 21 天紀錄，另收集包括產蛋數、無精蛋、早期發育中止及晚期發育中止等，並於第 21 天記錄雞雛啄殼未出及成功出雛等數據資料。

V. 候選基因 SNP 與種蛋孵化性能資料關聯性分析

為分析 100 隻紅羽土雞種母雞在不同週齡 (30、35、40、45、50、55 及 60 週齡) 間受精種蛋孵化率的差異，本研究採用線性混合模型 (linear mixed model, LMM) 進行統計分析。所有統計分析均使用 SAS 統計分析軟體 (statistics analysis system, SAS 9.4 TS1M6, 2016) 的 PROC MIXED 程序執行。在模型中，週齡被設定為固定效應 (fixed effect)，以評估不同時間點對孵化率的影響；而個別母雞則被設定為隨機效應 (random effect)，以控制個體間的變異。分析結果以最小平方均值 (least squares means, LSMeans) 呈現，並採用 Bonferroni 法進行多重比較校正以控制第一型錯誤率。

候選基因之基因型與種蛋孵化率之關聯性分析，以 SAS 統計分析軟體 PROC GLM 進行一般線性模式 (general liner model, GLM) 分析，若經變異數分析 (analysis of variance, ANOVA) 達顯著差異水準 ($P < 0.05$)，則以最小平方均值比較處理組間差異，並且運用 Bonferroni 檢定來進行多重均值比較分析校正。關聯性分析模式如下

$$Y_{ij} = \mu + G_i + e_{ij}$$

Y_{ij} 為性狀測定值；

μ 為群體均值；

G_i 為基因位點效應；

e_{ij} 為殘差效應。

表 2. 利用 KASP™ 檢測方法檢測影響蛋殼厚度 9 個候選基因多態性點位及螢光引子資訊
 Table 2. Detail information of genetic markers from nine candidate genes and FAM/HEX-labelled primers designed for KASP™ arrays

Candidate gene	SNP ID	Chromosome	Allele	FAM -labelled allele-specific primer (5' - 3')	HEX-labelled allele-specific primer (5' - 3')
<i>OXC-32</i> ¹	rs312935827	9	A/C	GAGGTACATGTGACAGACGTTTCAT	AGGTACATGTGACAGACGTTTCAG
<i>OC-116</i> ²	rs16400777	4	C/G	CTCTCCCTTGCCCTGAC	GCTCTCTCCCTTGCCCTGAC
<i>OXC-36</i> ³	rs313649603	20	T/C	TGGCTGGATATGGAGCAGCAGA	TGGCTGGATATGGAGCAGCAGG
<i>PLCZ1</i> ⁴	rs314759160	1	A/C	ATTAAATTACTGTATTATTAAGGCTGATTCTA	ATTAAATTACTGTATTATTAAGGCTGATTCTC
<i>ITPR2</i> ⁴	rs314403945	1	T/C	CTCCCCCTTACCCATTCTCTGCC	CTCCCCCTTACCCATTCTCTGCT
<i>IAPP</i> ⁴	rs312653027	1	C/T	CTCAGCAAATATTTGGCTTCCCAGAGA	AGCAAATATTTGGCTTCCCAGAGG
<i>ABCC9</i> ⁴	rs314985144	1	G/A	TGCTGTCTCACTTAGATGAAAGTGATC	TTGCTGTCTCACTTAGATGAAAGTGATT
<i>KCNJ8</i> ⁴	rs15301807	1	A/C	CTACAGAAACATTATCCCTGATATTGC	CCTACAGAAACATTATCCCTGATATTGA
<i>CACNA1C</i> ⁴	rs315771606	1	G/A	TGAATCCTTACATGAAACCCTAACTAATAAG	CTTGAATCCTTACATGAAACCCTAACTAATAAAA

¹ Takahashi *et al.*, 2010; ² Dunn *et al.*, 2009; ³ Cordeiro *et al.*, 2013; ⁴ Li *et al.*, 2021.

結果與討論

運用 KASP™ 技術建置基因型檢測平臺，可有效降低候選基因之基因型鑑定所需的成本和時間 (Chang *et al.*, 2021)。本研究成功建立 KASP™ 基因型檢測技術鑑定 9 個候選基因的不同基因型 (圖 1)，不同的基因型依據 x 軸與 y 軸的不同螢光及強度可以很明顯地區分。Chang *et al.* (2021) 將 KASP™ 方法與聚合酶連鎖反應-限制酶片段長度多型性 (PCR-RFLP) 做基因型結果驗證試驗，比對結果顯示 2 種方法所鑑定的基因型 100% 相同。因此，KASP™ 方法應可符合我國種畜禽動物發展以 SNP 分子標識輔助選拔之需。

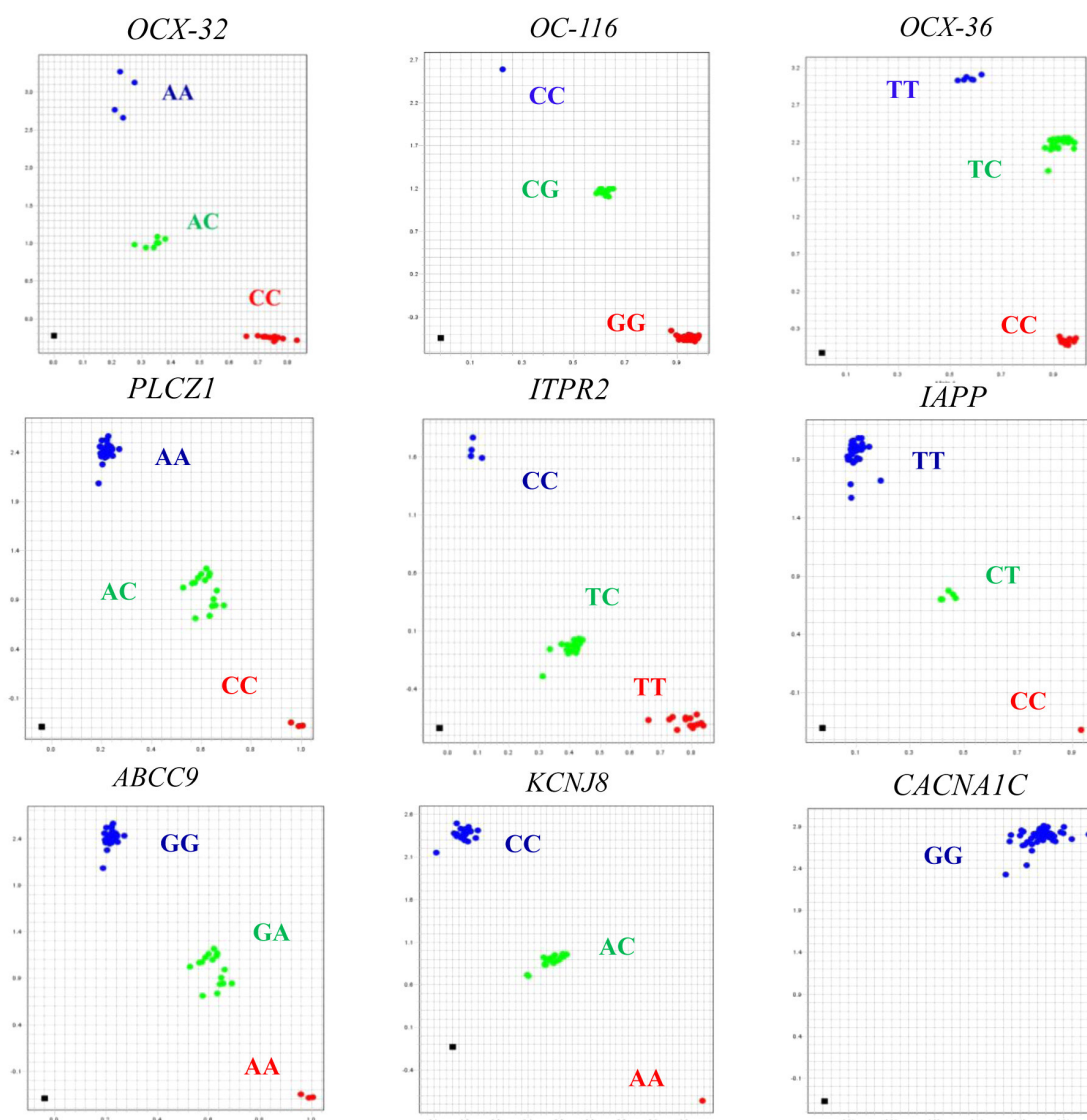


圖 1. KASP™ 基因型檢測技術分析 9 個遺傳標識之基因型分布圖。

OCX-32、*OC-116*、*OCX-36*、*PLCZI*、*ITPR2*、*IAPP*、*ABCC9*、*KCNJ8* 和 *CACNA1C* 基因的基因型結果按順序列出。X 軸顯示了不同水平的 HEX 螢光染料 (紅色)，Y 軸顯示了不同水平的 FAM 螢光染料 (藍色)。標記為藍色和紅色的基因型樣本是不同的純合子；標記為綠色 (FAM/HEX) 的是雜合子。黑色是空白對照樣本。

Fig. 1. The genotyping cluster plots of nine genetic markers by the KASP™ assay.

The genotyping results of *OCX-32*, *OC-116*, *OCX-36*, *PLCZI*, *ITPR2*, *IAPP*, *ABCC9*, *KCNJ8*, and *CACNA1C* genes are listed sequentially. The X-axis illustrated the different levels of fluorophores HEX marked red, and the Y-axis showed the different levels of fluorophores FAM marked blue. The genotyped samples marked blue and red color are different homozygotes; those marked green (FAM/HEX) are heterozygous. Black is the control sample.

本研究收集 100 隻紅羽土雞種母雞於第 30、35、40、45、50、55 及 60 週齡種蛋，共計 2,243 顆。各週齡收集種蛋數、無精蛋、早期發育中止及晚期發育中止、雛雞啄殼未出及成功出雛等數據資料如表 3，試驗期間總計收集 99 顆無精蛋、2,144 顆受精蛋、136 顆早期孵化中止蛋、92 顆晚期孵化中止蛋、11 顆雛雞啄殼未出，以及 1,905 顆

成功出雛等性狀表現紀錄。

不同週齡間受精種蛋孵化率之線性混和模型分析結果顯示(表4)，100隻紅羽土雞種母雞於第30、35、40、45、50、55及60週齡受精種蛋孵化率之線性混和模型數值依序分別為88.1、90.2、85.4、85.5、80.7、72.9及68.3%。第30、35、40、45、50週齡受精種蛋孵化率無顯著水準差異，第55及60週齡受精種蛋線性分析孵化率相較於30-50週齡，受精種蛋孵化率差異達差異顯著水準($P < 0.05$)，並且第55與60週齡受精種蛋線性孵化率較第50週齡顯著下降7.8(80.7 - 72.9%)與12.4%(80.7 - 68.3%)。相較於Hubbard Flex與Ross 308商用肉雞於55-60週齡平均87.4與88.4%受精種蛋孵化率(Damaziak *et al.*, 2021)，臺灣紅羽土雞的受精種蛋孵化率仍有改善的空間。

有關100隻紅羽土雞種母雞共2,144顆受精種蛋孵化率與9個候選基因之一般線性模式分析的結果如表5所示。*OCX-32*基因之AA基因型顯著影響第50週齡受精種蛋孵化率($P < 0.05$)，並較BB基因型提升28.4%(91.6 - 63.2%)種蛋孵化率。若將具有A交替基因的樣本分類為A type(AA與AB基因型)而BB基因型者屬於B type，則*OCX-32*基因A type可顯著提升第30、40及50週齡受精種蛋孵化率達17.0(91.0 - 74.0%)、14.0(87.8 - 73.8%)及21.1%(84.3 - 63.2%)。Damaziak *et al.* (2021)研究分析2個商用肉雞品種(8個Hubbard Flex選育族群；22個Ross 308選育族群)第25-60週齡種蛋孵化紀錄(7,839,250顆Hubbard Flex種蛋；57,167,060顆Ross 308種蛋)，相較於本研究所記錄的1個紅羽土雞選育族群2,243顆種蛋數量，仍需要增加紅羽土雞種雞與種蛋孵化之紀錄數量，才能取得更精準的遺傳標識分析結果。

經美國農業部農業研究署(U.S Department of Agriculture - Agricultural Research Service, USDA-ARS)遺傳育種學家Dr. Hans H. Cheng與美國加州大學戴維斯分校(University of California-Davis, UC Davis)動物科學系Prof. Huaijun Zhou的試驗指導，認為現有收集資料量比較合適的分析應為匯總各檢測週齡後，再進行候選基因與性狀間的關聯性分析。依據分析建議彙整第30、35、40、45、50、55及60週齡檢測種蛋資料後，進一步分析候選基因SNP與全期檢測週齡性能表現的結果顯示，*OCX-32*基因A type可以顯著提升5.3%(88.8 - 83.5%)全期檢測週齡受精種蛋孵化率與增加22.3%全期檢測週齡總產蛋數((21.9 - 17.9) / 17.9 × 100%)。

*OCX-32*蛋白質主要位於蛋殼最外層的角度層(cuticle layer)，基因所產生的蛋白質由輸卵管末端的上皮細胞所分泌，在輸卵管的峽部和子宮區域具高表現量，最終沈積到蛋殼中，其表現量隨蛋殼形成時間延長而遞增，且具有終止蛋殼鈣化的功能(Gautron *et al.*, 2001; Mikšić *et al.*, 2007; Le Roy *et al.*, 2021)。Berrang *et al.* (1999)研究指出蛋殼為禽類產出的獨特礦物質化結構，其功能為防護蛋內容物免除物理性衝擊、細菌入侵及調控雞胚胎發育所需空氣與水分。細菌一旦穿透雞蛋的外部結構蛋殼後，會導致孵化率下降和雛雞受到污染。Xing *et al.* (2007)研究指出，*OCX-32*重組蛋白質可顯著抑制牛羧肽酶(bovine carboxypeptidase)與枯草芽胞桿菌(*Bacillus subtilis*)的生長，並推測*OCX-32*蛋白質為禽類胚胎發育提供保護，增強蛋殼的抗菌特性。綜合上述研究報告，筆者推論*OCX-32*蛋白質的抗菌特性間接解釋本研究發現*OCX-32*基因與受精種蛋孵化率關聯性。

Uemoto *et al.* (2009)研究結果也發現，*OCX-32*基因 exon 2, 3, and 4 區域之SNP可顯著影響169 - 280日齡產蛋比例(egg production ratio)、蛋殼黃色色度b值(yellowness)及蛋中肉斑發生頻率(frequency of meat spots of eggs)。Isfandiari *et al.* (2020)的研究亦印證*OCX-32*基因與產蛋性狀間的關聯性，報告中指出*OCX-32*基因 exon 3 區域之SNP可顯著影響初產日齡($P = 0.02$)。上述前人研究發現*OCX-32*基因SNP與產蛋數量性狀間的關聯性，與本研究分析*OCX-32*基因 exon 6 區域之SNP(rs312935827)對全期檢測週齡總蛋數有顯著影響之關聯結果相似，筆者推論*OCX-32*基因應為產蛋性狀相關的候選基因之一，值得持續進行種雞基因育種研究。

本試驗研究報告中，有關*OC-116*、*OCX-36*、*PLCZ1*、*ITPR2*、*IAPP*、*ABCC9*、*KCNJ8*及*CACNA1C*等8個候選基因與全期檢測週齡種蛋孵化率的關聯性分析，發現SNP皆未有顯著影響關聯性存在，會造成本試驗研究結果與其他學者的試驗結果不盡相同，或許是因本研究所驗證的9個候選基因SNP源自來亨雞(White Leghorn)、洛島紅(Rhode Island Red)、褐色蛋雞品系(ISA brown strain)及東鄉雞(Dongxiang, DX)等4個不同雞種族群，筆者推論可能是因為不同試驗雞種具有不同的品種特異性，導致影響不同雞種性狀性能表現之遺傳標識，無法一體適用於臺灣性有色肉雞-紅羽土雞試驗族群。

結 論

目前分析結果已找到一個影響紅羽土雞受精種蛋孵化率之*OCX-32*候選基因SNP點位。未來仍需要擴大種蛋的收集數量，以利驗證*OCX-32*基因對紅羽土雞受精種蛋孵化率與其他繁殖性狀的影響程度。

表 3. 第 30 至 60 週齡紅羽土雞種蛋收集紀錄

Table 3. The information of collected eggs between 30 to 60 weeks of age from red-feather country chicken

Item	Weeks of age										Overall
	30 th	35 th	40 th	45 th	50 th	55 th	60 th				
Number of collected eggs	299	286	401	375	305	325	252				2,243
Number of non-fertilized eggs	13	8	15	9	17	15	22				99
Number of fertilized eggs	286	278	386	366	288	310	230				2,144
Number of Early dead embryos	13	10	24	24	16	25	24				136
Number of late dead embryos	15	11	14	8	11	12	21				92
Number of hatching failures	0	1	4	5	1	0	0				11
Number of hatched chicks	258	256	344	329	260	273	185				1,905

Sample size = 100.

表 4. 紅羽土雞種母雞 30 - 60 週齡受精種蛋孵化率之線性混合模型分析結果

Table 4. The comparison of fertilized eggs hatchability between 30 - 60 weeks from 100 red-feather country chickens by linear mixed model analysis (LSMeans ± SE)

Hatchability of fertilized eggs, %	Weeks of age						
	30 th	35 th	40 th	45 th	50 th	55 th	60 th
	88.1 ± 2.5 ^a	90.2 ± 2.0 ^a	85.4 ± 2.3 ^a	85.5 ± 2.6 ^a	80.7 ± 3.3 ^a	72.9 ± 3.7 ^b	68.3 ± 4.0 ^c

^{a, b, c} LSMMeans within a row lacking a common superscript differ (P < 0.05).

Sample size = 100.

表 5. 紅羽土雞 (N = 100) 受精種蛋孵化率與候選基因型之一般線性模型分析

Table 5. The association analyses between genotypes and hatchability of fertilized eggs from 100 red-feather country chickens by linear model analysis (LSMeans \pm SE)

Candidate genes	Genotype	N	Hatchability of fertilized eggs, %										Overall	Egg number
			30 th week	35 th week	40 th week	45 th week	50 th week	55 th week	60 th week	Overall				
<i>OCX-32</i>	AA	34	86.8 \pm 4.3 ^{ab}	89.7 \pm 3.5	87.5 \pm 4.0	86.2 \pm 4.5	91.6 \pm 5.5 ^a	78.0 \pm 6.5	72.1 \pm 6.9	89.8 \pm 1.6	22.2 \pm 0.8 ^a			
	AB	49	93.9 \pm 3.6 ^a	89.1 \pm 2.9	88.0 \pm 3.3	84.9 \pm 3.8	79.3 \pm 4.6 ^{ab}	71.2 \pm 5.4	67.3 \pm 5.8	88.0 \pm 1.4	21.6 \pm 0.7 ^a			
	BB	17	74.0 \pm 6.0 ^b	94.1 \pm 5.0	73.8 \pm 5.6	85.6 \pm 6.4	63.2 \pm 7.8 ^b	67.4 \pm 9.1	63.2 \pm 9.8	83.5 \pm 2.3	17.9 \pm 1.2 ^b			
A type*	A type*	83	91.0 \pm 2.7 ^a	89.4 \pm 2.3	87.8 \pm 2.5 ^a	85.4 \pm 2.9	84.3 \pm 3.6 ^a	74.0 \pm 4.1	69.3 \pm 4.4	88.8 \pm 1.0 ^a	21.9 \pm 0.5 ^a			
	B type	17	74.0 \pm 6.0 ^b	94.1 \pm 5.0	73.8 \pm 5.6 ^b	85.6 \pm 6.4	63.2 \pm 7.9 ^b	67.4 \pm 9.1	63.7 \pm 9.7	83.5 \pm 2.3 ^b	17.9 \pm 1.2 ^b			
<i>OC-116</i>	AB	35	91.9 \pm 4.3	87.9 \pm 3.5	84.6 \pm 4.0	89.0 \pm 4.4	74.3 \pm 5.6	74.4 \pm 6.3	70.0 \pm 6.8	87.9 \pm 1.6	21.7 \pm 0.8			
	BB	65	86.0 \pm 3.2	91.4 \pm 2.5	85.9 \pm 2.9	83.5 \pm 3.2	84.2 \pm 4.1	72.1 \pm 4.7	67.4 \pm 5.0	87.9 \pm 1.2	20.9 \pm 0.6			
<i>OCX-36</i>	AA	36	90.0 \pm 4.3	87.0 \pm 3.4	87.3 \pm 3.9	89.6 \pm 4.3	86.8 \pm 5.6	77.0 \pm 6.3	65.0 \pm 6.7	89.3 \pm 1.6	21.5 \pm 8.4			
	AB	47	86.5 \pm 3.7	92.6 \pm 3.0	82.3 \pm 3.4	85.3 \pm 3.8	78.1 \pm 4.9	70.8 \pm 5.5	70.9 \pm 5.9	86.7 \pm 1.4	21.4 \pm 7.3			
	BB	17	88.2 \pm 6.3	90.2 \pm 5.0	90.0 \pm 5.7	77.2 \pm 6.3	75.0 \pm 8.1	70.0 \pm 9.1	68.1 \pm 9.8	88.1 \pm 2.3	19.9 \pm 1.2			
<i>PLCZI</i>	AA	13	84.6 \pm 7.2	80.8 \pm 5.6	85.0 \pm 6.6	70.0 \pm 7.1	70.5 \pm 9.3	79.2 \pm 10.5	82.1 \pm 11.1	84.9 \pm 2.7	19.6 \pm 1.4			
	AB	51	90.4 \pm 3.6	92.6 \pm 2.8	84.7 \pm 3.3	88.7 \pm 3.6	82.0 \pm 4.7	71.7 \pm 5.3	68.1 \pm 5.6	88.1 \pm 1.4	21.4 \pm 0.7			
<i>ITPR2</i>	BB	36	86.1 \pm 4.3	90.0 \pm 3.4	86.6 \pm 4.0	86.4 \pm 4.3	82.5 \pm 5.6	72.4 \pm 6.3	63.7 \pm 6.7	88.6 \pm 1.6	21.4 \pm 0.8			
	AA	62	86.7 \pm 3.3	89.2 \pm 2.6	82.1 \pm 3.0	84.9 \pm 3.3	77.2 \pm 4.3	69.9 \pm 4.8	69.8 \pm 5.1	87.2 \pm 1.2	21.3 \pm 0.6			
	AB	32	90.6 \pm 4.6	92.2 \pm 3.7	90.5 \pm 4.1	84.6 \pm 4.6	86.1 \pm 5.9	78.3 \pm 6.7	62.8 \pm 7.1	88.6 \pm 1.7	21.3 \pm 0.9			
<i>IAPP</i>	BB	6	88.9 \pm 10.6	88.9 \pm 8.4	92.5 \pm 9.5	95.8 \pm 10.7	77.8 \pm 13.7	75.0 \pm 15.4	83.3 \pm 16.4	90.9 \pm 4.0	19.8 \pm 2.1			
	AB	1	100.0 \pm 25.8	100.0 \pm 20.6	100.0 \pm 23.6	100.0 \pm 26.2	100.0 \pm 33.5	100.0 \pm 37.5	100.0 \pm 40.1	100.0 \pm 9.6	20.0 \pm 5.0			
	BB	99	88.0 \pm 2.6	90.1 \pm 2.1	85.3 \pm 2.4	85.3 \pm 2.6	80.5 \pm 3.4	72.6 \pm 3.8	68.0 \pm 4.0	87.8 \pm 1.0	21.2 \pm 0.5			
<i>ABCC9</i>	AA	45	91.5 \pm 3.7 ^{ab}	93.1 \pm 3.0	87.5 \pm 3.5	86.9 \pm 3.9	83.1 \pm 5.0	74.5 \pm 5.6	68.9 \pm 6.0	89.0 \pm 1.4	21.8 \pm 0.7			
	AB	34	78.2 \pm 4.3 ^a	90.2 \pm 3.5	79.2 \pm 4.0	80.8 \pm 4.5	75.5 \pm 5.7	73.1 \pm 6.5	71.6 \pm 6.9	86.1 \pm 1.0	19.8 \pm 0.8			
	BB	21	96.8 \pm 5.4 ^b	83.7 \pm 4.4	91.0 \pm 5.1	90.0 \pm 5.7	84.0 \pm 7.3	69.1 \pm 8.2	61.9 \pm 8.8	88.3 \pm 2.1	22.1 \pm 1.1			
<i>KCNJ8</i>	AA	12	83.3 \pm 7.2 ^{ab}	91.7 \pm 6.0	88.3 \pm 6.8	79.2 \pm 7.6	80.6 \pm 9.7	75.4 \pm 10.8	83.3 \pm 11.6	87.4 \pm 2.8	19.3 \pm 1.4			
	AB	40	96.3 \pm 4.0 ^a	89.0 \pm 3.3	89.1 \pm 3.7	85.3 \pm 4.1	81.6 \pm 5.3	77.7 \pm 5.9	68.5 \pm 6.3	88.3 \pm 1.5	22.8 \pm 0.8			
	BB	48	82.5 \pm 3.6 ^b	90.8 \pm 3.0	81.6 \pm 3.4	87.2 \pm 3.8	80.0 \pm 4.9	68.3 \pm 5.4	64.4 \pm 5.8	87.6 \pm 1.4	20.4 \pm 0.7			
<i>CACNA1C</i>	AA	100	88.1 \pm 2.6	90.2 \pm 2.0	85.4 \pm 2.3	85.5 \pm 2.6	80.7 \pm 3.3	72.9 \pm 3.7	68.3 \pm 4.0	87.9 \pm 9.6	21.2 \pm 0.5			

a, b, c LSMMeans within a genetic marker column lacking a common superscript differ (P < 0.05). * A type is the combination between AA and AB genotype.

誌 謝

本研究源自農業部科技計畫(112 農科 -2.5.2- 畜 -L1) 經費支持。計畫執行期間受到美國農業部農業研究署 (U.S Department of Agriculture - Agricultural Research Service, USDA-ARS) 遺傳育種學家 Dr. Hans H. Cheng、美國加州大學戴維斯分校 (University of California-Davis, UC Davis) 動物科學系 Prof. Huaijun Zhou 及台灣區種豬產業協會林慕堯先生提供資料處理與關聯性分析等建議；民間牧場吳瀚場長協助種蛋孵化資料收集與紀錄；本所遺傳生理組陳若菁、孫佳韻、陳美如及王芬敏等同仁協助種母雞生物遺傳資源萃取、基因型檢測技術建置及資料彙整等支援，特此誌謝。

參考文獻

- 李淵百、吳憲郎、林旻蓉、涂海南、張秀鑾、項延塏、趙清賢、賴元亮、蘇夢蘭。2001。臺灣商用土雞性能介紹—生長與屠體性能。行政院農業委員會畜產試驗所專輯第 75 號，臺南市，第 8 頁。
- 林旻蓉、張伸彰、趙清賢、謝豪晃、陳添福、王治華、賈玉祥、鄭裕信、陳志峰、范揚廣、李淵百。2008。臺灣土雞群不同雜交組合之種蛋受精率、孵化率及胚胎死亡率的比較。中畜會誌 37：221-231。
- 杜玉河。2013。地方雞種雞蛋品質與孵化參數之研究。國立中興大學動物科學系，碩士學位論文，臺中市。
- Astuti, P. K., D. Gavojdian, D. E. Ilie, G. Wanjala, I. Monori, Z. Bagi, and S. Kusza. 2023. Genetic polymorphism in European and African sheep breeds reared in Hungary based on 48 SNPs associated with resistance to gastrointestinal parasite infection using KASP-PCR technique. *Trop. Anim. Health Prod.* 55: 197-209.
- Bennett, C. D. 1992. The influence of shell thickness on hatchability in commercial broiler breeder flocks. *J. Appl. Poult. Res.* 1: 61-65.
- Bennett, C. D. 1992. The influence of shell thickness on hatchability in commercial broiler breeder flocks. *J. Appl. Poult. Res.* 1: 61-65.
- Berrang, M. E., N. A. Cox, J. F. Frank, and R. J. Buhr. 1999. Bacterial penetration of the eggshell and shell membranes of the chicken hatching egg: a review. *J. Appl. Poultry Res.* 8: 499-504.
- Chakraborty, D., N. Sharma, S. Kour, S. S. Sodhi, M. K. Gupta, S. J. Lee, and Y. O. Son. 2022. Applications of omics technology for livestock selection and improvement. *Front. Genet.* 13: 774113-774129.
- Chang, C. C., B. B. I. Silva, H. Y. Huang, C. Y. Tsai, R. J. D. Flores, L. L. Tayo, Y. C. Tyan, M. A. Tsai, G. E. M. Catulin, K. P. Chuang, and J. L. Yang. 2021. Development and validation of KASP assays for the genotyping of racing performance-associated single nucleotide polymorphisms in pigeons. *Genes.* 12: 1383-1392.
- Cordeiro, C. M. M., H. Esmaili, G. Ansah, and M. T. Hincke. 2013. Ovocalyxin-36 is a pattern recognition protein in chicken eggshell membranes. *PLoS One* 8: e84112.
- Damaziak, K., M. Koznaka-Lipka, D. Gozdowski, A. Gołbiewska, and E. Kdziorek. 2021. Effects of broiler breeder strain, age, and eggs preheating profile in single-stage systems on the hatchability of eggs and quality of chicks. *Animal* 15: 100057-100067.
- Dunn, I. C., N. T. Joseph, M. Bain, A. Edmond, P. W. Wilson, P. Milona, Y. Nys, J. Gautron, M. Schmutz, R. Preisinger, and D. Waddington. 2009. Polymorphisms in eggshell organic matrix genes are associated with eggshell quality measurements in pedigree Rhode Island Red hens. *Anim. Genet.* 40: 110-114.
- Gautron, J., M. T. Hincke, K. Mann, M. Panhéleux, M. Bain, M. D. McKee, S. E. Solomon, and Y. Nys. 2001. Ovocalyxin-32, a novel chicken eggshell matrix protein. (Isolation, amino acid sequencing, cloning, and immunocytochemical localization). *J. Biol. Chem.* 276: 39243-39252.
- Isfandiari, P., M. Dadpasand, H. Kharrati-Koopae, H. Atashi1, A. Gharghi, and A. Niazi. 2020. Bioinformatics, phylogenetic and variant association analysis of Ovocalyxin-32 gene reveals its contribution to egg production traits in native chickens. *Anim. Gene* 17-18: 200108-200132.
- Le Roy, N., L. Stapane, J. Gautron, and M. T. Hincke. 2021. Evolution of the avian eggshell biomineralization protein toolkit - new insights from multi-omics. *Front. Genet.* 12: 672433- 672454.
- Liao, B., H. G. Qiao, X. Y. Zhao, M. Bao, L. Liu, C. W. Zheng, C. F. Li, and Z. H. Ning. 2013. Influence of eggshell ultrastructural organization on hatchability. *Poultry Sci.* 92: 2236-2239.
- Li, Q., Z. Duan, C. Sun, J. Zheng, G. Xu, and N. Yang. 2021. Genetic variations for the eggshell crystal structure revealed by

- genome-wide association study in chickens. *BMC Genom.* 22: 786-798.
- Mann, K., M. T. Hincke, and Y. Nys. 2002. Isolation of ovocleidin-116 from chicken eggshells, correction of its amino acid sequence and identification of disulfide bonds and glycosylated Asn. *Matrix Biol.* 21: 383-387.
- Mikš'ík, I., A. Eckhardt, P. Sedláková, and K. Mikulíková. 2007. Proteins of insoluble matrix of avian (*Gallus gallus*) eggshell. *Connect. Tissue Res.* 48: 1-8.
- Nowaczewski, S., M. Babuszkiewicz, T. Szablewski, K. Stuper-Szablewska, R. Cegielska-Radziejewska, Ł. Tomczyk, S. Kaczmarek, A. Sechman, M. W. Lis, M. Kwaś'niewska, P. Racewicz, Ł. Jarosz, A. Ciszewski, T. Nowak, and M. Hejdysz. 2022. Effect of weight and storage time of broiler breeders' eggs on morphology and biochemical features of eggs, embryogenesis, hatchability, and chick quality. *Animal* 16: 100564-100573.
- SAS Institute Inc. 2016. SAS 9.4 TS1M6 Language Reference: Concepts(3rd. ed.). SAS Institute Inc., USA.
- Semagn, K., R. Babu, S. Hearne, and M. Olsen. 2013. Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): overview of the technology and its application in crop improvement. *Mol. Breeding* 33: 1-14.
- Seo, D., H. B. Park, N. Choi, S. Jin, K. N. Heo, C. Jo, T. Gotoh, and J. H. Lee. 2016. Association of SNPs in *AMY1A* and *AMY2A* genes with chicken meat quality and clinical-chemical traits in chicken. *J. Fac. Agr. Kyushu. U.* 61: 121-125.
- Takahashi, H., D. Yang, O. Sasaki, T. Furukawa, and K. Nirasawa. 2009. Mapping of quantitative trait loci affecting eggshell quality on chromosome 9 in an F2 intercross between two chicken lines divergently selected for eggshell strength. *Anim. Genet.* 40: 779-782.
- Takahashi, H., O. Sasaki, K. Nirasawa, and T. Furukawa. 2010. Association between ovocalyxin-32 gene haplotypes and eggshell quality traits in an F2 intercross between two chicken lines divergently selected for eggshell strength. *Anim. Genet.* 41: 541-544.
- Uemoto, Y., C. Suzuki, S. Sato, S. Sato, T. Ohtake, O. Sasaki, H. Takahashi, and E. Kobayashi. 2009. Polymorphism of the ovocalyxin-32 gene and its association with egg production traits in the chicken. *Poultry Sci.* 88: 2512-2517.
- Xing, J., O. Wellman-Labadie, J. Gautron, and M. T. Hincke. 2007. Recombinant eggshell ovocalyxin-32: Expression, purification and biological activity of the glutathione S-transferase fusion protein. *Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Biol.* 147: 172-177.
- Zhang, Y., D. Liang, H. Huang, Z. Yang, Y. Wang, Y. Yu, L. Liu, S. Zhang, J. Han, and W. Xiao. 2020. *Technical note*: Development and application of KASP assays for rapid screening of 8 genetic defects in Holstein cattle. *J. Dairy Sci.* 103: 619-624.

The association analyses between hatchability of fertilized eggs and candidate genes in red-feather country chicken ⁽¹⁾

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

Received: Oct. 8, 2024; Accepted: Aug. 1, 2025

Abstract

Hatchability of fertilized eggs is one of the key factors affecting the market supply and economic efficiency of red-feather country chicken. This study used 100 red-feather country chicken hens as the experimental animals, recording data from 2,243 hatching eggs at 30, 35, 40, 45, 50, 55, and 60 weeks of age as the source for hatchability of fertilized eggs. Using Kompetitive Allele-Specific PCR (KASP™) technology, genotype databases were established for nine candidate genes affecting eggshell thickness, including *OCX-32*, *OC-116*, *OCX-36*, *PLCZ1*, *ITPR2*, *IAPP*, *ABCC9*, *KCNJ8*, and *CACNA1C* genes. Statistical analysis was used to perform association analyses between genotypes and performance data, and Bonferroni correction was applied for multiple comparisons. The research results showed that the hatchability of fertilized eggs from red-feather country breeding hens at 30, 35, 40, 45, 50, 55, and 60 weeks of age were 88.1, 90.2, 85.4, 85.5, 80.7, 72.9, and 68.3%, respectively. Additionally, the hatchability at 55 and 60 weeks of age significantly decreased by 7.8 and 12.4%, compared to 50 weeks. The association analyses between candidate genes and trait performance showed that the A type of the *OCX-32* gene significantly increased the hatchability counted during the tested weeks by 5.3% and improved the number of eggs laid during the tested weeks by 22.3% ($P < 0.05$). However, the effects of the other eight candidate genes on the hatchability of fertilized eggs did not reach statistical significance ($P > 0.05$). In the future, we will continue to expand the collection of trait data from the breeding population and conduct association analyses with candidate genes to verify the effect of the *OCX-32* gene on the hatchability of fertilized eggs and reproductive traits, thereby improving the accuracy of genetic marker analysis.

Key words: Red-feather County Chicken, Hatchability, Candidate genes, Single nucleotide polymorphism, KASP™.

(1) Contribution No. 2834 from Taiwan Livestock Research Institute (TLRI), Ministry of Agriculture (MOA).

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

(3) Quantum Life Biotechnology Co., Ltd.

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

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

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