

台灣黑、白水牛之毛髮、皮膚組織學及黑色素含量比較⁽¹⁾

莊璧華⁽²⁾ 林正鏞⁽²⁾ 翁慶豐⁽³⁾

收件日期：97年9月23日；接受日期：98年2月10日

摘要

台灣水牛為本土重要的保種動物之一，水牛基本毛色為灰色或黑色，但在族群中會產生罕見的白水牛，因其數量極為稀少，更需加以保育及研究。為瞭解白水牛毛色形成的可能原因，本試驗主要針對黑、白水牛進行外觀觀察，並對皮膚、毛髮取樣及切片，另對毛髮、皮膚中黑色素（melanin）含量進行測定。白水牛和黑水牛均採全天式放牧飼養，且可適應日照下的環境。白水牛外觀具黑眼睛及皮膚呈棕至灰色，將其皮膚毛髮切片經染色後，如同黑水牛般，可觀察到皮膚基底層黑色素細胞及黑色素顆粒沈積。另外白水牛與黑水牛皮膚之黑色素含量分別為 0.255 ± 0.069 與 $0.632 \pm 0.232 \mu\text{g/mg}$ ；毛髮黑色素含量分別為 0.407 ± 0.306 與 $2.734 \pm 2.409 \mu\text{g/mg}$ ，白水牛顯著低於黑水牛（ $P < 0.05$ ），綜合前述結果顯示，白水牛具有合成黑色素之能力，而非白化症牛。

關鍵詞：白水牛、皮膚、毛髮、黑色素。

緒言

自然界生物的外觀及顏色通常是千變萬化，即使是相同物種，也可能出現不同表現型。以台灣水牛而言，外觀上以灰色或黑色為主，與本試驗的主要對象—白水牛，在毛色外觀上即有顯著的不同。過去在台東及恒春分別有白水牛出生之零星報導。白水牛毛髮呈白色或帶微淡黃色，有時參雜些許黑毛，皮膚依曝曬程度多寡呈淺灰色（背脊部）至粉紅色（腹脇部），具黑眼珠，鼻鏡呈淡灰色，分佈少量豌豆大的黑點，角及蹄為淡黃棕色，帶有棕色條紋。

除此之外，以現場飼養者的經驗而言，白色水牛之育成似乎較黑灰色水牛不易。數據顯示，雌性灰黑仔水牛與白仔水牛之出生體重皆約 30 公斤，在 2~2.5 歲齡時，灰黑水牛之平均體重約 340 公斤，但白水牛平均體重僅為 280 公斤。體重過輕的白水牛，外觀消瘦，死亡率亦較高。能順利

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1503 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所花蓮種畜繁殖場。

(3) 國立東華大學生物技術研究所。

(4) 通訊作者，E-mail：cfweng@mail.ndhu.edu.tw。

成長至成年的母白水牛，體重則與灰黑水牛相當。是否意謂著白水牛帶有未知的先天性疾病？或對環境的抵抗力較弱？目前為止尚無資料可考。

色素細胞（chromatophores）在哺乳類的膚色／毛色來源扮演重要的角色。成熟色素細胞可分為黃色素細胞（xanthophores; yellow），紅色素細胞（erythrophores; red）、彩虹色素細胞（iridophores; iridescent）、白色素細胞（leucophores; white），黑色素細胞（melanophores; black/brown）及藍色素細胞（cyanophores; blue）（Fujii, 2000）。某些動物可利用色素細胞間，黑色素體（melanosome）快速的移動聚集及疏散，進行顏色的改變，如青蛙、變色龍等（Bagnara *et al.*, 1968）。決定膚色最主要的關鍵在於表皮所產生黑色素的種類、多寡、分佈等，而黑色素合成部位在黑色素細胞（melanocyte）。另在表皮基底層之另一重要細胞—角質細胞（keratinocyte），該細胞的功能與黑色素體於胞器中的分佈及匯聚有關，作用方式改變，亦會產生不同的表現型（O'Sullivan *et al.*, 2004）。為了解白水牛毛色形成的可能原因，本試驗先就動物表型進行觀察，製作毛髮及皮膚切片，並進行黑色素（melanin）含量測定，以了解黑白水牛間之差異。

材料與方法

I. 試驗材料

本實驗採用牛群為行政院農業委員會畜產試驗所花蓮種畜繁殖場之水牛保種族群及白水牛族群，共使用在養白水牛 10 頭與逢機選擇之黑水牛 17 頭，白水牛（6 雄 4 雌）的年齡範圍為 3~13 歲，黑水牛（9 雄 8 雌）為 3~18 歲。水牛採牧區放牧飼養，冬季牧草不足時提供盤固拉乾草任飼。實驗材料為水牛之耳朵組織、毛髮。實驗分為：一、外觀鑑定；二、表皮組織切片及毛髮檢查；三、黑色素含量分析。

II. 測量項目與方法

(i) 外觀鑑定

將牛隻固定於頸夾式固定架後，進行水牛外觀如角、蹄、皮膚、毛髮、眼睛之觀察及拍攝。另取牛軀幹不同部位（如背部、腹部、臀部）之毛髮樣品，並剪下一塊耳朵組織（約 2 x 2 x 0.2 cm），進行拍攝，並同時進行耳朵組織切片、黑色素含量測定。

(ii) 表皮組織切片及毛髮檢查

耳朵尖端毛髮剃除後，以清水及酒精進行洗滌及消毒，剪取黑及白水牛耳朵組織約 1 x 1 x 0.1 cm，浸於 10% 福馬林中，再進行冷凍切片（0.6 μ m）製作及 H&E 染色（Hematoxylin and Eosin stain）（Sheehan *et al.*, 1980），利用複式顯微鏡（compound microscope）觀察黑、白水牛黑色素細胞及黑色素顆粒。毛髮之檢測是使用倒立式顯微鏡（Inverted microscope），觀察完整之黑白水牛毛髮之毛囊及毛幹差異性。

(iii) 黑色素含量分析

1. 毛髮黑色素萃取及吸光值檢測

取黑水牛及白水牛各 6 頭，每頭 5 mg 毛髮剪成小片段，加入 100 μ L 滅菌水（5 mg tissue/ 100 μ L），再加入溶解液（30 μ L 的 30% H_3PO_4 及 500 μ L 的 57% HI），混合均勻後，置入有蓋玻璃小管中，在 130°C 下加熱 16 小時。待冷卻後，加入 1.4 mL Isopropanol（J. T. Baker），震盪混合後，再以 3000 xg 離心 10 分鐘，去除上清液。此步驟之目的在移除組織中之 pheomelanin。將 melanin 橘色沈澱物用 1 mL ethanol

混合均勻清洗 2 次並再次離心。加入 1 mL 的 1 M NaOH 及 10 μ L 的 3% H₂O₂ 於沸水中加熱 30 分鐘，冷卻後，以 10,000 xg 離心 1 分鐘，收集上清液，用分光光度計 (Spectrophotometer) 以波長 350 nm 進行吸光值 (O. D.) 分析 (Ito *et al.*, 1993)。

2. 皮膚黑色素萃取及吸光值檢測

12 頭黑水牛及 9 頭白水牛各取 1 g 皮膚，先加水至 10 mL 後均質，取出均質液 100 μ L (10 mg tissue / 100 μ L)，再加入溶解液 (30 μ L 的 30% H₃PO₂ 及 500 μ L 的 57% HI)，混合均勻後，置入有蓋玻璃小管中，依毛髮黑色素萃取及吸光值檢測之方法，進行吸光值分析。

3. Melanin 標準品吸光值檢測

以粉狀墨魚黑色素 (Sepia melanin, Sigma) 為標準品，取 1 mg 溶於 1 mL 滅菌水中，混合均勻後，取 100 μ L (100 μ g / 100 μ L) 混合液，再加入溶解液 (30 μ L 的 30% H₃PO₂ 及 500 μ L 的 57% HI)，混合均勻後，置入有蓋玻璃小管中，依毛髮黑色素萃取及吸光值檢測之方法，進行吸光值測定。

(iv) Melanin 濃度換算

所測得的吸光值 (O. D.) 以下列公式計算：

Tissue 吸光值 / Sepia melanin 吸光值 \times 100 μ g \times 48% 樣品 melanin 量 (μ g) / 100 μ L (Ito *et al.*, 1993)。再將所得數值 \times 1/10，即為每 mg 皮膚組織所含 melanin (μ g) 量；所得數值 \times 1/5，即為每 mg 毛髮所含 melanin (μ g) 量。利用分光光度計進行吸光值測定，試驗所得之資料以 Sigmastat 2.03 (SPSS Inc.) 系統套裝軟體進行統計分析，以 t-test 測定法，比較黑、白水牛間皮膚及毛髮之黑色素含量差異之顯著性。

結果與討論

I. 外觀鑑定

比較試驗白水牛及黑水牛之外觀不同處，巨觀而言，由於色差明顯，白水牛極易於牛群中發現 (Fig. 1 A 及 B)。白水牛全身被覆白毛，角呈淡咖啡色，瞳孔為深黑色，鼻鏡上有棕斑點，蹄有黃色條紋，在太陽照射到的部位，如背部及軀幹，皮膚呈棕至灰色，在太陽不易照射的地方，如腹部及則呈現粉紅色的皮膚 (Fig. 1 C ~ H)。黑水牛毛色為黑色，皮膚呈灰青色，鼻鏡、蹄、角均為黑色 (Fig. 1 I~N)



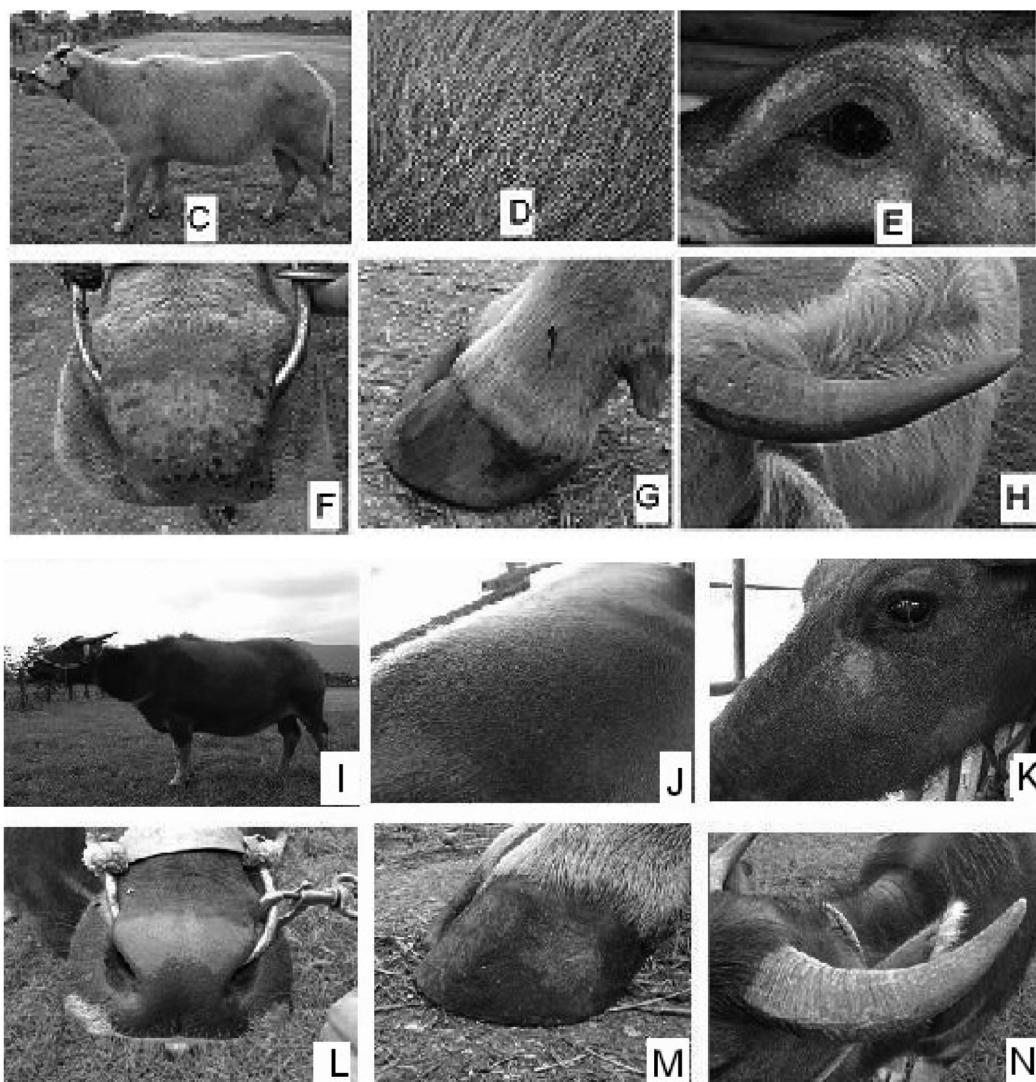


圖 1. 黑色及白色水牛外觀。

Fig. 1. The phenotypes of black and white water buffalos.

A~B: A Group of buffalos-the white ones could be identified easily.

C~H: White buffalo: (E) black eye, (F) black spots on the nose, (G) (H) brown strips on the hoof and horn.

I~N: Black buffalo: (K) black eye, (L) black nose, (M)(N) black hoof and horn.

收集軀幹不同部位的毛髮，白水牛的毛髮呈白至淡黃色，黑水牛的則是棕至黑色（Fig. 2），剃除毛髮的耳朵組織，白水牛的皮膚外觀呈淺棕~棕色，黑水牛的皮膚外觀呈黑色。



圖 2. 黑色及白色水牛之毛髮。

Fig. 2. The hair obtained from black (B) and white (W) water buffalos.

II. 表皮組織切片及毛髮檢查

(i) 表皮組織切片

耳朵表皮組織切片以H&E染色，於複式顯微鏡 40 x 及 100 x 放大倍率下觀察 (Fig. 3 A、B、E 及 F)，發現黑水牛之表皮基底層與真皮層分界處，黑水牛較白水牛明顯。400 x 及 1000 x 倍率下，二者均可見基底層的黑色素細胞及黑色素顆粒沈積於表皮中 (Fig. 3 C、D、G 及 H)，於相同放大倍率下，黑水牛之黑色素顆粒數量明顯較白水牛者多。

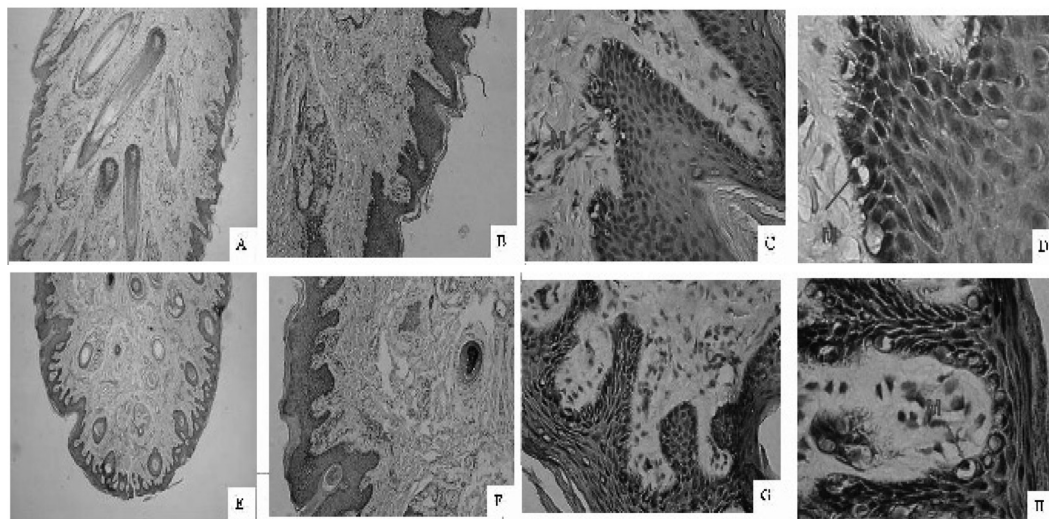


圖 3. 黑色及白色水牛耳朵表皮組織切片。

Fig. 3. Histological sections of the ear epidermis from white and black water buffalos.

A~D: White buffalo; E~H: Black buffalo; M: Melanocyte

在耳朵組織切片可見到毛囊及部份毛幹組織。於 100 x 及 400 x 放大倍率下，可明顯見到黑水牛的毛囊及毛幹中充滿黑色素顆粒 (Fig. 4 C及D)，白水牛之毛囊及毛幹則未見到

黑色素顆粒 (Fig. 4 A 及 B)。

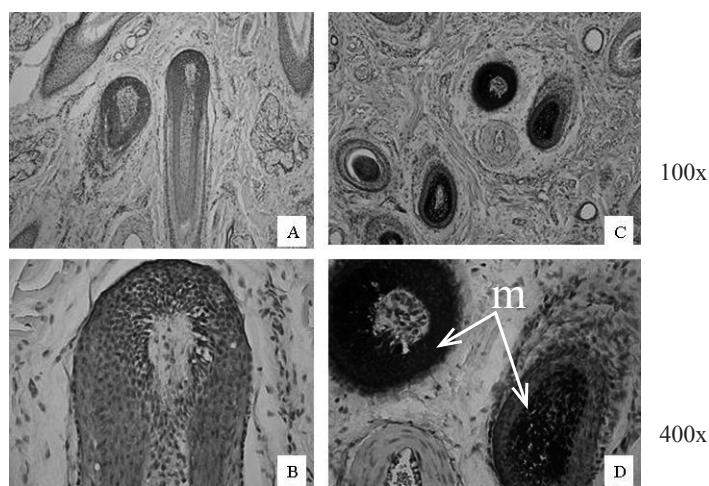


圖 4. 黑色及白色水牛耳朵表皮之部份毛囊組織切片。

Fig. 4. Histological sections of hairs from white and black water buffalos.

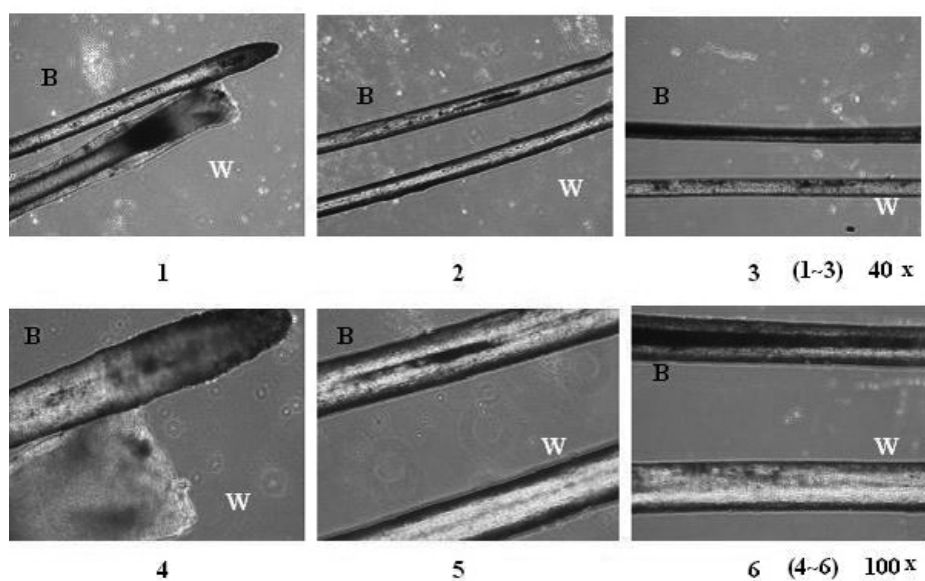
A~B: White buffalo (W)

C~D: Black buffalo (B)

m: Melanin granules

(ii) 毛髮檢查

以倒立式顯微鏡檢查黑、白水牛之毛髮，黑色毛髮由毛囊至毛幹末端均呈現黑色，白色毛髮大致上呈白色透光至毛幹末端，毛囊前端及毛幹處有些許黑色素沈積。黑水牛軀幹處之白毛、黑毛與白水牛軀幹之白毛檢查，可見少許黑色素顆粒沈積 (Fig. 5 之 1~12)，頭部的毛髮亦可清楚區分二者之不同 (Fig. 5 之 13~18)。



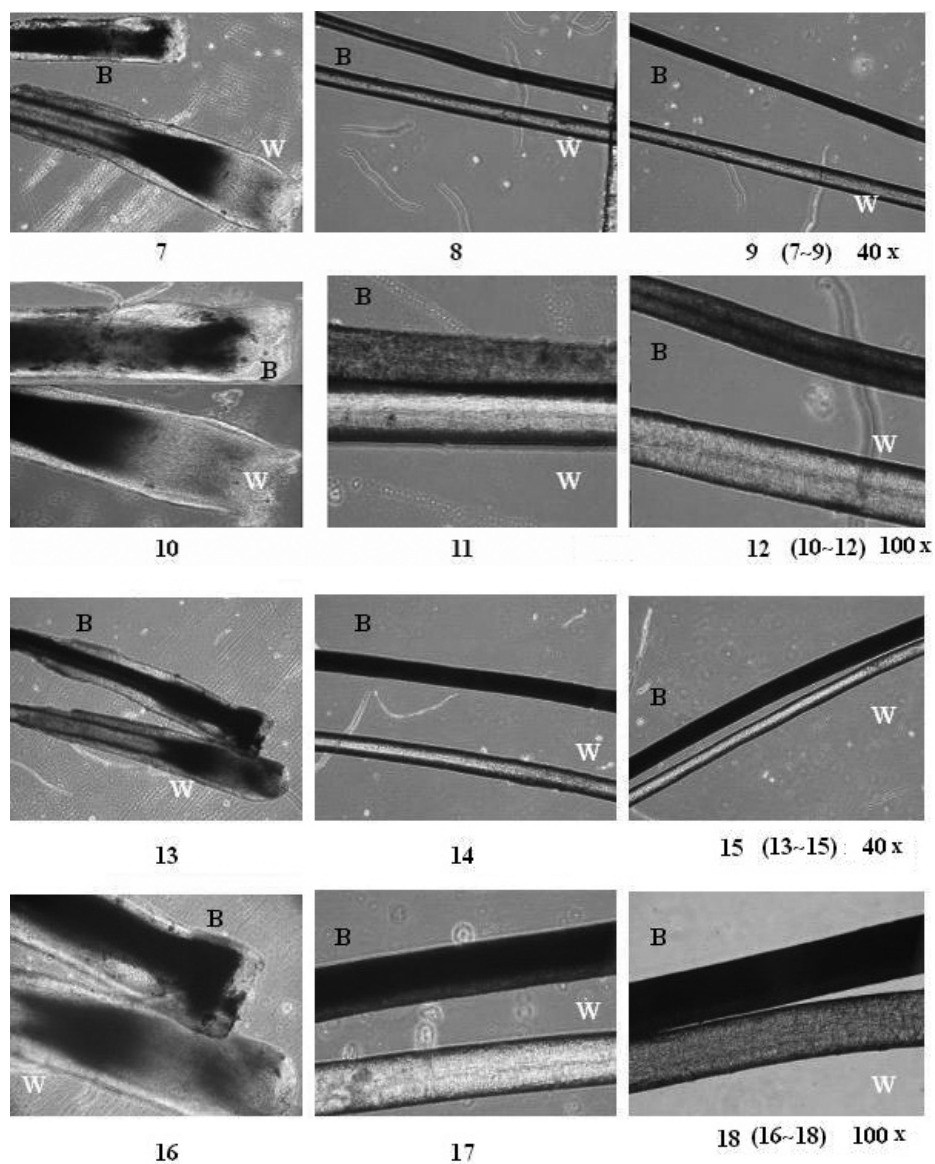


圖 5. 黑色及白色水牛毛髮檢查（倒立式相位差顯微鏡）。

Fig. 5. Observations of hair of the white and black buffalos (inverted microscope).

1~12: Hairs of black (B) and white (W) buffalos on the body trunk.

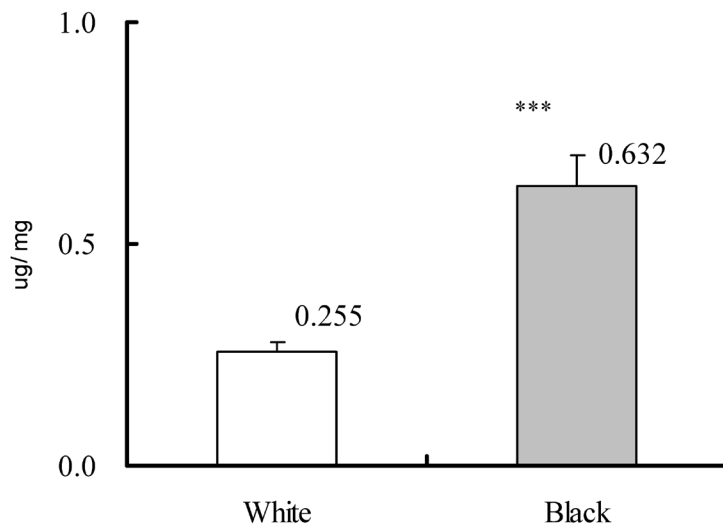
13~18 Hairs of black (B) and white (W) buffalos on the head.

III. 黑色素含量分析

白水牛皮膚之 melanin 含量為 $0.255 \pm 0.069 \mu\text{g/mg}$ ($n = 9$)，黑水牛之含量為 $0.632 \pm 0.232 \mu\text{g/mg}$ ($n = 12$)，黑水牛皮膚之黑色素含量極顯著大於白水牛 ($P < 0.001$) (Fig. 6A)。

白水牛毛髮之 melanin 含量為 $0.407 \pm 0.306 \mu\text{g/mg}$ ($n = 6$)，黑水牛含量為 $2.734 \pm 2.409 \mu\text{g/mg}$ ($n = 6$)，黑、白水牛毛髮黑色素含量具顯著性差異 ($P < 0.05$) (Fig. 6B)。

(A) Skin



(B) Hair

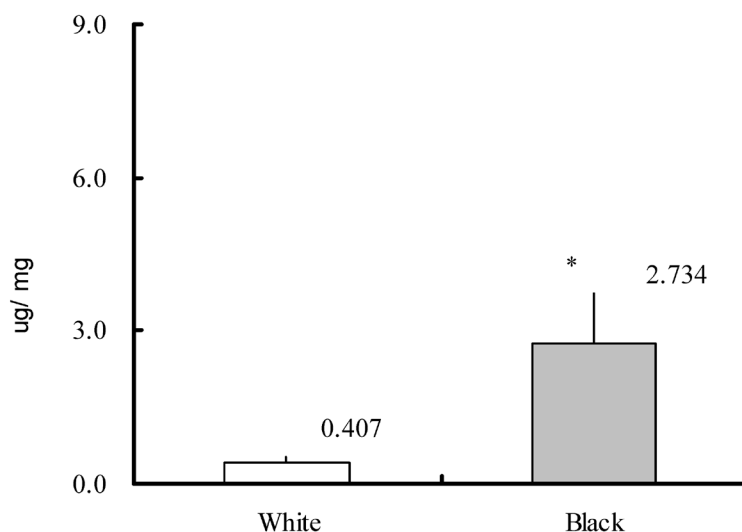


圖 6. 黑色及白色水牛皮膚(A)及毛髮(B)黑色素含量。

Fig. 6. Melanin content in skin (A) and hair (B) samples from white and black buffalos.

*** ($P < 0.001$) or * ($P < 0.05$) is the significant difference between white and black water buffalos.

許多文獻研究顯示，多種生物都有因基因發生突變而產生白化症（albinism）情形，也就是一般所稱的「白子」。有關於 Holstein 牛的白化症仔牛，其皮膚、眼睛、角及蹄均缺乏色素，對於陽光極為敏感，在白天放牧時，白化症牛顯得無精打采，眼睛部份閉合，在晚上時，視力則與正常牛相似（Detlefsen, 1920）。在其他牛種，亦有白化症的案例出現，如 Braunvieh、Shorthorn，Guernsey、Austrian Murboden 和 Swiss brown 等牛種（Schmutz *et al.*, 2004）。由本試驗結果得知，白水牛可適應日照下的環境，白水牛具黑眼睛且皮膚呈棕至灰色。皮膚與毛髮切片於 H&E 染

色下，可觀察到基底層黑色素細胞及黑色素顆粒沈積，另在皮膚及毛髮均可測得黑色素，但其含量顯著較黑水牛低之結果，顯示白水牛具有合成黑色素之功能，與喪失產生黑色素功能的白化症牛不同。

參考文獻

- Bagnara, J. T., J. D. Taylor and M. E. Hadley. 1968. The dermal chromatophore unit. *J. Cell Biol.* 38 (1): 67-79.
- Detlefsen, J. A. 1920. A herd of albino cattle. *J. Hered* 11: 378-379.
- Fujii, R. 2000. The regulation of motile activity in fish chromatophores. *Pigment Cell Res.* 13 (5): 300-319.
- Ito, S., K. Wakamatsu and H. Ozeki 1993. Spectrophotometric assay of eumelanin in tissue samples. *Anal. Biochem.* 215 (2): 273-277.
- O'Sullivan, T. N., X. S. Wu, R. A. Rachel, J. D. Huang, D. A. Swing, L. E. Matesic, J. A. Hammer, N. G. Copeland and N. A. Jenkins. 2004. *dsu* functions in a MYO5A-independent pathway to suppress the coat color of dilute mice. *Proc Natl. Acad. Sci. U S A* 101 (48): 16831-16836.
- Schmutz, S. M., T. G. Berryere, D. C. Ciobanu, A. J. Mileham, B. H. Schmitz and M. Fredholm. 2004. A form of albinism in cattle is caused by a tyrosinase frameshift mutation. *Mamm Genome* 15 (1): 62-67.
- Sheehan, D. C. and B. B. Hrapchak. 1980. Theory and practice of histotechnology. Missouri, Saint Louis, Mosby.

The comparison of histology and melanin contents of hairs and skin between the black and the white Taiwan water buffalo ⁽¹⁾

Pi-Hua Chuang⁽²⁾ Cheng-Yung Lin⁽²⁾ and Ching-Feng Weng⁽³⁾

Received : Sep. 23, 2008 ; Accepted : Feb. 10, 2009

Abstract

Taiwan water buffalo is one of the important animals to be conserved in Taiwan. The morphology of most water buffalo is black or gray in coat color and the white one is rare, valuable and worth to be studied. This study attempted to investigate whether the white coat color of Taiwan water buffalo is albino by means of morphological, biochemical (the melanin content of skin and hairs) and the histology of the ear skin assays.

The experimental white water buffalos and black ones were grazed during daytime and they could tolerate UV exposure. The white water buffalos had black eyes and brown-to-gray skin. Moreover, the melanocytes and the melanin granules of the white water buffalos were observed in the tissue sections as the black water buffalos. The melanin contents in the skin and hairs of white and black water buffalos were 0.255 ± 0.069 and $0.632 \pm 0.232 \mu\text{g/mg}$, 0.407 ± 0.306 and $2.734 \pm 2.409 \mu\text{g/mg}$, respectively. The melanin contents of white water buffalos both in skin and hairs were significantly lower than those of black water buffalos ($P < 0.05$). The results indicated that the ability of melanin synthesis is normal in white water buffalo, suggesting that the Taiwan white water buffalos are not albinos.

Key words : White water buffalo, Skin, Hair, Melanin.

(1) Contribution No.1503 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan. R.O.C.

(2) Hualien Animal Propagation Station, COA-LRI, Hualien, Taiwan, R.O.C.

(3) Institute of Biotechnology, National Dong Hwa University, Hualien, Taiwan, R.O.C.

(4) Corresponding author, E-mail : cfweng@mail.ndhu.edu.tw