

7 种鹤形目鸟类性别的分子鉴定

田秀华^① 刘铸^① 何相宝^{①②} 白素英^{①③}

(^①东北林业大学野生动物资源学院 哈尔滨 150040; ^②哈尔滨北方森林动物园 哈尔滨 150040;

^③国家林业局野生动植物检测中心 哈尔滨 150040)

摘要: 生境破碎化和非法狩猎已经使很多鸟类陷入了濒危境地, 笼养繁殖进行迁地保护及再引入的保护措施已经具有举足轻重的作用, 鸟类性别鉴定对于有效的繁殖至关重要。然而对珍稀濒危鸟类进行安全、方便和准确的性别鉴定一直是个难题。本文运用 CHD 基因的一对引物 2550F/2718R, 对 7 种鹤形目鸟类: 大鸨(*Otis tarda*)、丹顶鹤(*Grus japonensis*)、蓑羽鹤(*Anthropoides virgo*)、灰鹤(*G. grus*)、白鹤(*G. leucogeranus*)、白头鹤(*G. monacha*)和灰冠鹤(*Balearica regulorum*)共 48 只鸟, 进行了有效的性别鉴定。研究结果不但对 7 种鹤形目鸟类的笼养繁殖和个体交换起到了指导作用, 而且为今后的再引入提供了有利条件。本研究的性别分子鉴定方法适用于 7 种鹤形目鸟类, 具有安全、方便、准确等特点, 并且可以推广使用。

关键词: 鹤形目; 性别鉴定; CHD 基因

中图分类号: Q75 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2006)05-62-06

The Molecular Sexing of 7 Species of Gruiformes

TIAN Xiu-Hua^① LIU Zhu^① HE Xiang-Bao^{①②} BAI Su-Ying^{①③}

(^① College of Wild Life Resources, Northeast Forestry University, Harbin 150040;

^② Harbin North Forest Zoo, Harbin 150040; ^③ Center for Wild Fauna and Flora, National

Bureau of Forestry Administration, Harbin 150040, China)

Abstract: Fragmented geographical distribution and illegal hunting have lead to endangered status of many bird species. Breeding programs in captivity and reintroduction of birds to their habitats are important for protecting endangered species. Thus it is important to identify the bird sex in order to make couples that can produce fertile eggs. Currently, it is difficult to identify the bird sex by a safe, convenient and accurate method. Sexes of 48 birds from 7 species of Gruiformes [Great Bustard(*Otis tarda*), Red-crowned Crane(*Grus japonensis*), Demoiselle Crane(*Anthropoides virgo*), Common Crane(*G. grus*), Siberian White Crane(*G. leucogeranus*), Hooded Crane(*G. monacha*), Grey Crowned Crane(*Balearica regulorum*)] have been identified by primer 2550F/2718R (CHD gene). This research not only makes breeding programs in captivity possible, but also will offer assistance for reintroduction of birds back to their habitats in the future. This method has shown its advantage as a safe, convenient and accurate method for bird sexing.

Key words: Gruiformes; Sexing; CHD gene

生境破碎化和非法狩猎已经使很多鸟类陷入了濒危境地, 因此在鸟类保护方面, 笼养繁殖进行迁地保护及再引入的保护措施已经具有举足轻重的作用。鸟类性别鉴定对于成功分离成对的亲本, 进行有效的繁殖至关重要。然而, 全世界的鸟类中有 60% 是单态性鸟(monomorphic

birds), 即雌雄同型^[1]。即使对于一些雌雄异型

基金项目 黑龙江省科技攻关项目(No. GC04B519);

第一作者介绍 田秀华, 女, 硕士; 研究方向: 鸟类饲养繁殖及保护生物学研究; E-mail: tianxiu-hua@163.com。

收稿日期: 2006-03-20; 修回日期: 2006-04-27

鸟类来说,只有在性成熟后,雌雄在形态上才有区别,所以对鸟类进行性别鉴定是非常困难的,特别是对雏鸟进行安全和准确的性别鉴定就更加困难。目前国内主要应用行为或生理等性别鉴定方法^[2],这些方法存在准确度低和易对动物产生伤害等诸多缺点,不适用于珍稀濒危鸟类的性别鉴定^[1],因此本研究采用 DNA 分子鉴定方法进行性别鉴定。

鹤形目鸟类包括雌雄同型和雌雄异型两类,鸱科为雌雄异型,鹤科为雌雄同型。鹤形目包括很多珍稀濒危鸟类,在本文所研究的 7 种鹤形目鸟类中,大鸨(*Otis tarda*)、丹顶鹤(*Grus japonensis*)、白鹤(*G. leucogeranus*)、白头鹤(*G. monacha*)为国家一级保护鸟类;蓑羽鹤(*Anthropoides virgo*)、灰鹤(*Grus grus*)为国家二级保护鸟类;灰冠鹤(*Balearica regulorum*)在我国没有分布,为非洲特有物种。为了满足对这些珍稀濒危鸟类的科学研究和人工繁殖要求,本研究对哈尔滨北方森林动物园 7 种鹤形目鸟类的部分成体和所有亚成体的性别进行鉴定。

随着分子生物学的发展,目前已经有很多可靠的标记进行鸟类性别分子鉴定,如:ATP5A1 基因^[3]和 EEO.6 序列^[4],ATP5A1 操作较麻烦,并且 ATP5A1 在物种间变异较大^[5],EEO.6 序列对 W 染色体上的特异性片段进行扩增,雄性不被扩增,因此雌性会产生一条扩增带,所以如果有其他因素导致 PCR 反应失败,则很可能造成性别误判。杨光等 2000 年利用 RAPD 对 3 种鹤进行过研究,但是 RAPD 操作起来比较繁琐。本研究期望找到一种方便、有效的方法^[6]。

目前,对于非平胸鸟类来说,应用最多的是 CHD 基因。鸟类的 CHD 基因位于性染色体上,鸟类的性染色体为 ZW 型,雄性为 ZZ,雌性为 ZW。CHD 基因在非平胸鸟类中有两个同源拷贝,CHD-W 和 CHD-Z,其中 CHD-W 为 W 连锁,CHD-Z 为 Z 连锁^[7,8]。1995 年,Griffiths 和 Tiwari 第一个发现了与 W 染色体连锁的 CHD-W 基因,全称为染色体螺旋蛋白基因(Chromobox-helicase-DNA binding gene)^[9],随后发现这个基

因非常保守,并且几乎所有非平胸雌性鸟类都具有 CHD-W 基因^[10],从此这个基因开始用于鸟类性别分子鉴定。其原理为:直接通过特异性引物对 Z 和 W 2 个染色体上同源的特异序列进行 PCR 扩增。根据在 CHD-Z、CHD-W 基因中内含子大小的不同,由于雌性为 ZW 型,雄性为 ZZ 型,因此对 PCR 扩增产物电泳检测时,雌性为 2 条带,雄性为 1 条带。目前,引物 P2/P8^[11]是运用 CHD 基因进行鸟类性别鉴定最普遍的引物;引物 2550F/2718R^[12]以其诸多优点正在被推广应用。因此本研究选用这 2 个分子标记对鹤形目 7 种鸟类进行性别鉴定研究。

1 材料与方法

1.1 材料

样本来自于哈尔滨北方森林动物园笼养条件下的 7 种鹤形目鸟类,已知性别的有大鸨 4 只:DB1(♀)、DB2(♀)、DB3(♂)和 DB4(♂);丹顶鹤 5 只:D1(♀)、D2(♂)、D3(♀)、D4(♂)和 D5(♀);蓑羽鹤 2 只:S4(♂)和 S5(♀);灰鹤 2 只:H2(♂)和 H3(♀);白鹤 2 只:B3(♀)和 B4(♂);白头鹤 2 只:BT6(♂)和 BT7(♀);灰冠鹤 2 只:G1(♂)和 G2(♀)。个体为已经通过成体形态和行为进行过性别鉴定,并且通过繁殖证实的个体。待测性别的有丹顶鹤 12 只:D6、D7、D8、D9、D10、D11、D12、D13、D14、D15、D16 和 D17;蓑羽鹤 3 只:S1、S2 和 S3;灰鹤 1 只:H1;白鹤 4 只:B1、B2、B5 和 B6;白头鹤 5 只:BT1、BT2、BT3、BT4 和 BT5;灰冠鹤 4 只:G3、G4、G5 和 G6。取样方式为采取非损伤性取样,收集脱落的羽毛^[13]。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取

每个个体取 2 根飞羽的羽髓,样本在消化前加入 10 μl 1 mol/L DTT 以破坏二硫键。用酚-氯仿法对样本基因组 DNA 进行提取^[14]。提取产物的含量和纯度均在蛋白质核酸分析仪 DU 640(Beckman 公司)上进行检测。样品用 TE 调整 DNA 终浓度至 100 ng/μl,样品保存于 4℃ 备用。

1.2.2 PCR 扩增

反应体系为 10 μl,含 200 μmol/L 的 dNTP,1.5 mmol/L 的 MgCl₂,Primer 各 2

pmol, *Taq* DNA polymerase 0.5 U (大连宝生物公司) 模板为 100 ng。反应过程为: 预变性 94℃ 3 min, 变性 94℃ 30 s, 退火 49℃ 45 s, 延伸 72℃ 30 s, 共循环 30 次, 完成最后一次循环后 72℃ 延伸 7 min。所运用的两对引物为: P2 (5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3') 和 P8 (5'-CTCCCAA-GGATGAGRAAYTG-3')^[11] 2550F (5'-GTT ACTGATTCGTCTA CGAGA-3') 和 2718R (5'-ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3')^[12]。

1.2.3 电泳及结果记录 取 10 μl PCR 扩增产物, 在 3% 的琼脂糖凝胶上电泳 30 min, 用凝胶成像仪 (Vilber Lourmat 公司) 进行拍照记录结果。电泳结果中, 单条带表示此个体性别为雄

性, 双带表示此个体性别为雌性。

2 结果

2.1 2 对引物的有效性 利用 19 只已知性别的个体对 2 对引物的有效性进行了验证, 用引物 P2/P8 进行扩增, 琼脂糖凝胶电泳检测雌雄均只显示出 1 个条带, 因此, 不能方便、有效的对 7 种鹤形目鸟类进行性别鉴定。而引物 2550F/2718R 的扩增产物清晰显示, 雌性为 2 个条带, 雄性为 1 个条带, 因此, 能方便有效的对这 7 种鸟类进行性别鉴定。图 1 为 2 对引物电泳对比结果的部分图片。

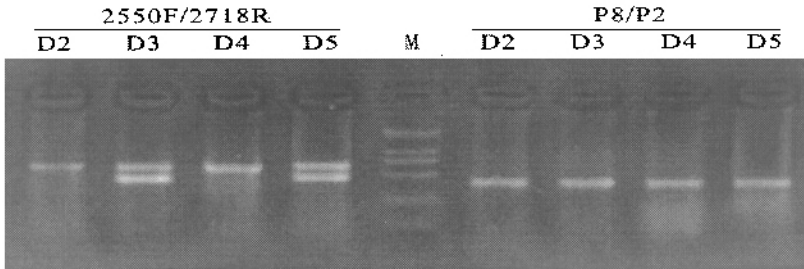


图 1 2 对引物 P8/P2 和 2550F/2718R 性别鉴定结果对比图

Fig. 1 Results of the sex identification using 2 primers P8/P2 and 2550F/2718R

M: 引物 (Maker); D2 ~ D5: 个体编号 (No. of bird).

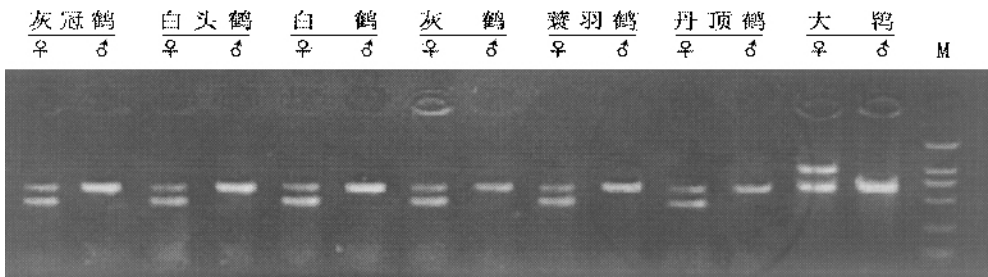


图 2 引物 2550F/2718R 对 7 种鹤形目鸟类性别鉴定结果图

Fig. 2 Results of sex identification for 7 different species of Gruiformes

2.2 7 种鹤形目鸟类性别鉴定结果 利用筛选出的有效引物 2550F/2718R 对鹤形目 7 种鸟类中已知性别的 19 只个体进行鉴定, 确定 PCR 反应条件以及模板的用量。19 只已知性别个体的性别鉴定结果见表 1, 结果与已知性别相符, 准确率为 100%。

对鹤形目 7 种鸟类 29 只未知性别鸟类的

性别进行了鉴定, 结果见表 2。图 2 表示利用引物 2550F/2718R 对 7 种不同种鸟类雌雄个体进行性别鉴定的部分电泳检测结果图。

3 讨论

3.1 2 对引物的有效性分析 引物 P2/P8 和 2550F/2718R 尽管扩增的不是同一个内含子, 但

表 1 7 种鹤形目鸟类中已知性别个体鉴定结果

Table 1 Results of sex identification for known sexing birds in 7 species of Gruiformes

编号 No. of bird	已知 性别 Known sex	鉴定 性别 Identified sex	编号 No. of bird	已知 性别 Known sex	鉴定 性别 Identified sex
DB1	♀	♀	S5	♀	♀
DB2	♀	♀	H2	♂	♂
DB3	♂	♂	H3	♀	♀
DB4	♂	♂	B3	♀	♀
D1	♀	♀	B4	♂	♂
D2	♂	♂	BT6	♂	♂
D3	♀	♀	BT7	♀	♀
D4	♂	♂	G1	♂	♂
D5	♀	♀	G2	♀	♀
S4	♂	♂			

表 2 7 种鹤形目鸟类中未知性别个体鉴定结果

Table 2 Results of sex identification for sex-unknown birds in 7 species of Gruiformes

编号 No. of bird	鉴定性别 Identified sex	编号 No. of bird	鉴定性别 Identified sex	编号 No. of bird	鉴定性别 Identified sex
D6	♀	D16	♀	BT1	♀
D7	♀	D17	♂	BT2	♀
D8	♂	S1	♀	BT3	♀
D9	♀	S2	♀	BT4	♀
D10	♀	S3	♀	BT5	♀
D11	♀	H1	♂	G3	♂
D12	♂	B1	♀	G4	♀
D13	♀	B2	♀	G5	♂
D14	♀	B5	♀	G6	♂
D15	♀	B6	♀		

性别鉴定原理相同。但是在一些物种中, P2/P8 扩增 CHD-Z 基因和 CHD-W 基因的 PCR 产物大小十分相似, 琼脂糖凝胶电泳很难区分 CHD-Z 基因和 CHD-W 基因。本研究中的 7 种鹤形目鸟类就面临着此类情况。面对这种情况一般改用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 也有的采用限制性内切酶对 P2/P8 的 PCR 扩增产物进行酶切, 然后再进行琼脂糖凝胶电泳^[15]。另外, 研究显示 CHD-Z 基因进化速度较快^[16, 17], 所以引物 P2/P8 所扩增 CHD-Z 基因的内含子在一些物种中自

身出现多态性, 导致 P2/P8 对 CHD-Z 基因的 PCR 扩增产物出现 2 个或多个等位基因^[18]。这样有时雄性的电泳结果会出现两条带, 必须进行认真分型, 才能进行性别鉴定。但是特殊情况下, CHD-W 基因和某个 CHD-Z 等位基因只差 1~2 bp 时, 分型判读非常困难, 只有通过毛细管电泳才能解决此类难题。而变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和毛细管电泳比琼脂糖凝胶电泳操作繁琐, 不能达到操作简单、快捷的目的。因此放弃了这对引物, 没有对其进行进一步研究。

引物 2550F/2718R 扩增 7 种鹤形目鸟类雌雄个体的产物明显不同, 易于区别, 见图 1、2。另外, 现有的研究表明, 引物 2550F/2718R 所扩增的目标片段还不存在 CHD-Z 基因和 CHD-W 基因的 PCR 产物大小十分相似、CHD-Z 基因的 PCR 扩增产物自身多态性现象^[18]。引物 2550F/2718R 与引物 P2/P8 相比, 还存在一个优点, 就是被扩增出的 CHD-W 基因片段小于 CHD-Z 基因片段, 由于在 PCR 反应中小片段占有优势, 特别在 PCR 反应很弱的情况下, 只要电泳结果中出现 CHD-W 基因的扩增产物, 就会很准确的进行性别鉴定, 然而, 引物 P2/P8 通常扩增出的 CHD-W 基因产物大于 CHD-Z 基因产物, 在 PCR 反应很弱的情况下, 则很容易产生误判^[19]。因此, 笔者采用引物 2550F/2718R 来建立 7 种鹤形目鸟类性别的分子鉴定方法。

3.2 7 种鹤形目鸟类性别鉴定结果分析 只有准确的性别鉴定才能保证人工繁殖和人工育种的正确进行。此研究成功地对哈尔滨北方森林动物园 7 种鹤形目鸟类未知性别的成体和所有亚成体进行了性别鉴定, 有利于今后的人工繁殖工作, 特别是亚成体的性别鉴定有利于其尽早配对, 进行繁殖。同时也发现某些种类的雌雄比例失调, 如: 白头鹤 5 只亚成体 (BT1、BT2、BT3、BT4 和 BT5) 都为雌性, 这种情况很可能影响未来哈尔滨北方森林动物园白头鹤的繁殖。鉴于这种结果, 已经向哈尔滨北方森林动物园提出了建议: 对当年将繁殖出的白头鹤个体进行性别鉴定, 也可以用当年的雄鹤与这些亚成体配对; 可以与其他动物园和保护区进行

个体交换。此项研究对动物园中鹤类的繁殖起到了指导作用。2003 年白鹤饲养人员通过几年的观察发现 B5 和 B6 2 只白鹤的行为完全不同,因此被确定为—对繁殖亲本,进行单笼饲养进行繁殖,但一直未能成功。通过表 1 可以看出 B5 和 B6 为—对雌鹤,因此根据本实验的结果已经将其分离,重新择偶配对进行繁殖。

在本研究性别鉴定的 7 种鹤形目鸟类中,大鸨不但与其他鸟类不是同科,而且属于雌雄异型。大鸨成体的外型雌雄存在着很大差别,但雏鸟的性别用常规方法很难区分,这给各动物园和保护区之间的大鸨雏鸟引进和交换带来了极大困难。本研究为了解决这方面的问题,对大鸨的性别进行了鉴定。为今后大鸨雏鸟的性别鉴定提供了有效的途径和可靠的方法。从图 2 上可以看出,大鸨的带型与其他 6 种鸟类有着明显的区别。对于其他 6 种鸟类来说,引物 2550F/2718R 在 W 染色体上的扩增片段小于 Z 染色体上的扩增片段。但是对于大鸨来说正好相反,引物 2550F/2718R 在 W 染色体上的扩增片段大于 Z 染色体上的扩增片段。目前国内已经利用引物 2550F/2718R 对很多鸟类进行了性别鉴定,引物 2550F/2718R 在 W 染色体上的扩增片段大于 Z 染色体上的扩增片段这种现象本研究为首次报道。为此,对引物 2550F/2718R 扩增大鸨的 W 染色体和 Z 染色体上产物进行了测序分析,发现 2550F/2718R 扩增大鸨的 W 染色体产物长度为 1 034 bp,Z 染色体产物长度为 656 bp,2 个产物在序列上具有同源性,表明 W 染色体产物并非其他非特异性扩增。由于现有的研究显示 CHD-W 基因非常保守,不容易出现变异^[17 20 21],然而,大鸨与其他鸟类相比出现了极大的变异,这种结果产生的具体原因还不清楚,待于进一步研究。

综上所述,本研究所运用的性别分子鉴定方法非常适用于所研究的 7 种鹤形目鸟类,且显示出安全、方便、准确等诸多优点。实验所用的引物 2550F/2718R 在位于稳定外显子^[22],为通用引物,可以推广到其他物种。本实验采取非损伤性取样,不但满足笼养珍稀濒危鸟类的

研究要求,还可以推广到野外的珍稀濒危鸟类。目前,本研究方法只针对部分非平胸鸟类进行,有待于今后逐步完善和进一步推广使用。

参 考 文 献

- [1] Bermúdez-Humarán L G ,Garcíagarcía A ,Leal-Garza C H ,*et al.* Molecular sexing of monomorphic endangered *Ara* birds. *Journal of Experimental Zoology* 2002 **292** : 677 ~ 680.
- [2] 李刚,杨水云,周航等.鸟类性别鉴定技术研究进展.动物学杂志 2003 **38**(5): 106 ~ 108.
- [3] Itoh Y ,Ogawa A. Identification of the sex of a wide range of carinatae birds by PCR using primer sets selected from chicken EE0.6 and its related sequences. *The American Genetic Association* 2001 **9** : 2 315 ~ 2 321.
- [4] Orgawa A ,Solovei I ,Hutchison N. Molecular characterization and cytological mapping of a non-repetitive DNA sequence region from the W chromosome of chicken and its use as a universal probe for sexing Carinatae bird. *Chromosomes* , 1997 **5** : 93 ~ 101.
- [5] Eason D ,Millar G D ,Cree A ,*et al.* A comparison of five methods for assignment of sex in the takahe (Aves : Porphyrio mantelli). *The Zoological Society of London* 2001 **253** : 281 ~ 292.
- [6] 杨光,陈红卫,杨玉等.几种鹤性别的分子生物学鉴定.四川大学学报(自然科学版) 2000 **37**(6): 911 ~ 915.
- [7] Lessells K ,Mateman C. Molecular sexing of birds. *Nature* , 1996 **383** : 761 ~ 762.
- [8] Griffiths R ,Kom R. A CHD1 gene is Z chromosome linked in the chicken. *Gallus domesticus* . *Gene* ,1997 **197** : 225 ~ 229.
- [9] Griffiths R ,Tiware B. Sex of the last wild Spix' s macaw. *Nature* ,1995 **375** : 454.
- [10] Griffiths R ,Daan S ,Dijkstra C. Sex identification in birds using two CHD genes. *Proceedings of the Royal Society of London* , Series B ,1996 **263** : 1 251 ~ 1 256.
- [11] Griffiths R ,Double M C ,Orr K ,*et al.* A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology* ,1998 **7** : 1 071 ~ 1 075.
- [12] Fridolfsson A K ,Ellegren H. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *Journal of Avian Biology* , 1999 **30** : 116 ~ 121.
- [13] Taberlet P ,Waits L P ,Luikart G. Noninvasive sampling : look before you leap. *Trends in Ecology and Evolution* ,1999 **14** : 323 ~ 327.
- [14] 田秀华,刘铸,白素英.珍稀濒危鸟类微量取样及 DNA 提取的研究.经济动物学报 2005 **9**(4): 215 ~ 218.
- [15] Sacchi P ,Soglia D ,Maione S ,*et al.* A non-invasive test for sex identification in Short-toed Eagle. *Molecular and Cellular*

- Probes* 2004 ,**18** : 193 ~ 196.
- [16] Fridolfsson A ,Ellegren H. Molecular evolution of the avian CHD1 genes on the Z and W sex chromosomes. *Genetics* , 2000 ,**155** : 1 903 ~ 1 912.
- [17] Montell H ,Fridolfsson A ,Ellegren H. Contrasting levels of nucleotide diversity on the avian Z and W sex chromosomes. *Molecular Biology and Evolution* ,2001 ,**18**(11) : 2 010 ~ 2 016.
- [18] Dawson D A ,Darby S ,Hunter F M ,*et al.* A critique of avian CHD-based molecular sexing protocols illustrated by a Z-chromosome polymorphism detected in auklets. *Molecular Ecology Notes* 2001 ,**1** : 201 ~ 204.
- [19] Arnold K E ,Orr K J ,Griffiths R. Primary sex ratios in birds : problems with molecular sex identification of undeveloped eggs. *Molecular Ecology* 2003 ,**12** : 3 451 ~ 3 458.
- [20] Sundström H ,Webster M T ,Ellegren H. Is the rate of insertion and deletion mutation male biased ? molecular evolutionary analysis of avian and primate sex chromosome sequences. *The Genetics Society of America* 2003 ,**164** : 259 ~ 268.
- [21] Mc-Culloch D ,Gems D. Evolution of male longevity bias in nematodes. *Aging Cell* 2003 ,**2** : 165 ~ 173.
- [22] Inoue-Murayama M ,Ueda Y ,Yamashita T ,*et al.* Molecular sexing of Japanese cormorants used for traditional fishing on the Nagara River in Gifu City. *Animal Science Journal* ,2002 ,**73** : 417 ~ 420.