

澳洲黑天鵝性別鑑定遺傳標記⁽¹⁾

林德育⁽²⁾⁽⁶⁾ 劉瑞珍⁽³⁾ 陳若菁⁽²⁾ 吳國欽⁽⁴⁾
張秀鑾⁽⁵⁾ 吳明哲⁽²⁾

收件日期：95 年 9 月 27 日；接受日期：95 年 11 月 20 日

摘要

澳洲黑天鵝性別為一性單型物種 (monomorphic species)，從外觀不易分辨出雄雌性別，為尋求澳洲黑天鵝性別遺傳標記，本研究應用逢機複製多態性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 分析方法，以行政院農業委員會畜產試驗所彰化種畜繁殖場所飼育的澳洲黑天鵝個體全血 DNA 進行性別遺傳標記探討。第一階段以 6 公 6 母澳洲黑天鵝個體 DNA 作為模版，共使用 220 組寡核苷酸 RAPD 引子進行分析，尋找可區分性別的候選遺傳標記。分析結果顯示 220 組寡核苷酸引子中，引子組 AE03 (5'- CATAgAgCgg -3') 所產出之 PCR 產物中的 670 bp DNA 片段為雌性澳洲黑天鵝特有的片段，可作為區分性別的標記。第二階段，再以引子組 AE03 分析該場全場共 58 隻 (28 公 30 母) 澳洲黑天鵝之 DNA 樣本，檢測結果顯示由引子組 AE03 分析 DNA 判讀之性別均與實際性別完全吻合，準確率為 100% (58/58)；意即所有檢測雌性澳洲黑天鵝 PCR 產物 DNA 片段中均具有 670 bp DNA 片段，而在所有受檢雄性澳洲黑天鵝則無，證實 RAPD 引子組 AE03 可作為區分性別之遺傳標記。

關鍵詞：澳洲黑天鵝、逢機複製多態性 DNA、性別鑑定。

緒言

許多動物為了不同的適應目的而演化出雄雌個體在不同形態學上的差異，這些外表形態包括體型、羽(毛)顏色、羽(毛)型態、喙型等。一般而言，在現今兩性世界裡，性成熟後的動物從外表形態上不易區分出雄性與雌性者稱為性單型 (sexual monomorphism) 動物，如澳洲黑天鵝 (He *et al.*, 2005)，聖芬生鸚鵡 (*Amazona guildingii*) (Russello and Amato, 2001) 及鶴科 Cranes (*Grus*

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1348 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所遺傳育種組。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所生理組。

(4) 行政院農業委員會畜產試驗所彰化種畜繁殖場。

(5) 國立屏東科技大學畜產系。

(6) 通訊作者。E-mail: lin0429@mail.tlri.gov.tw

canadensis) 鳥類等；而從外表形態上很容易區分出雄性與雌性的物種稱為性雙型 (sexual dimorphism) 動物，如獅子、孔雀及番鴨等。鑑別鳥類的性別並非易事，尤其是野生動物，約有一半鳥類在成鳥時仍無法從外觀上分辨出性別，幼鳥的比率更高 (Griffiths *et al.*, 1998)。因此，尋求一種快速且準確的性別鑑定方法為鳥類研究的重要課題。

鳥類性別的決定是由多基因所調控，如Z染色體聯鎖的 (Z chromosome-linked) DMRT1 (double sex and mab-3 related transcription factor 1) 基因與W染色體聯鎖的 (W chromosome-linked) PKCIW (protein kinase C inhibitor) 基因 (Ellegren, 2001; Hu *et al.*, 2005)，應用聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 來鑑別鳥類性別為一理想的方法，Itoh *et al.* (2001) 藉由微量的血樣或羽毛萃取出的 DNA，即可準確地鑑別許多鳥類品種的雄雌。應用 PCR 鑑定鳥類性別的方法已陸續被開發，D'Costa and Petitte (1998) 發展出鑑別已知性別的成年火雞與火雞早期胚 (5 日至孵化) 性別的方法；Duan and Fuerst (2001) 以 CSL 引子成功地鑑定鶴的性別；Clinton *et al.* (2001) 也成功地建立了早期雞胚性別鑑定的檢測方法。

隨機複製 DNA 片段之多態性 (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 分析方法係利用單一寡核苷酸 (10 bp) 為引子，以少量 DNA 為模板，在較為不嚴苛的條件下 (relaxed stringency) 進行 PCR 複製反應，隨機複製出多態性的 DNA 片段作為 DNA 指印 (fingerprint)。由於此一隨機寡核苷酸引子可以與模板 DNA 上許多區域產生接合，如果有二個引子接合點的方向性正確，而且其間的距離大小 (核酸長度) 恰當，就可以複製出該片段來。不同個體間的遺傳組成不同，隨機引子可以接合處不盡相同，因此複製出來的 DNA 片段也就不同，形成多態性遺傳標記 (劉等, 1999)。RAPD 已被應用於分析遺傳變異 (Welsh and McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990)。這些遺傳標記進行基因遺傳分離試驗也證明符合簡單的孟德爾遺傳定律，且是以顯性標記 (dominant markers) 遺傳 (Waugh and Powell, 1992)。Levin *et al.* (1993) 曾利用此法對雞之性染色體作基因定位。本試驗應用 RAPD 的方法分析澳洲黑天鵝雄鵝與雌鵝個體 DNA，以建立澳洲黑天鵝性別鑑定的遺傳標記，提供早期雌雄鑑別的依據。

材料與方法

I. 試驗動物

本試驗共分為兩個階段探討澳洲黑天鵝性別鑑定的 RAPD 遺傳標記，澳洲黑天鵝的樣品皆取自行政院農業委員會畜產試驗所彰化種畜繁殖場 (彰化場)。

(i) 階段一：尋找澳洲黑天鵝性別鑑定的 RAPD 遺傳標記。

選擇經肛門性別鑑別且經成對配種繁殖之性別確認的澳洲黑天鵝成鵝 6 公 6 母，共 12 隻。

(ii) 階段二：確認澳洲黑天鵝性別鑑定的 RAPD 遺傳標記。

分析彰化場全場 58 隻 (28 公 30 母) 澳洲黑天鵝 DNA 樣本。

II. 採血及 DNA 之萃取

(i) 由供試澳洲黑天鵝脛靜脈採集血液約 0.5~1.0 ml，置入含抗凝血劑之採血管中混合後供 DNA 之萃取用。

(ii) 以快速 DNA 萃取套組 (IsoQuick, Microprobe, USA) 萃取 DNA 後，經乾燥並加入適量 TE 緩衝液溶解，再利用光電比色計 (Pharmacia LKB, England) 測定 DNA 濃度並將之調整至最後濃度為 25~35 ng/ μ l 供 PCR 反應之模板 (template)。

III. PCR 反應

- (i) 階段一：利用 220 種長度為 10 bp 的合成寡核苷酸逢機引子 (Operon Technologies, Inc., USA)，以 6 隻雄性與 6 隻雌性澳洲黑天鵝之個體 DNA 做為模板，利用 Taq 聚合酶進行 PCR，反應溶液之總體積為 25 μ l，反應溶液中含下列成分：10 mM Tris-HCl (pH 8.3)、50 mM KCl、2 mM MgCl₂、0.001% gelatin、100 μ M each of dATP, dCTP, dGTP, and dTTP、5 pM primer、200~300 ng of genomic DNA 及 0.5 units of Taq DNA polymerase (Boehringer Mannheim, Germany, BM)。PCR 反應是以自動控溫儀 (Perkin Elmer Cetus, Thermal Cycler, USA) 進行，RAPD-PCR 反應之條件依序為變性 (denature)：94°C 1 分鐘、煉合 (annealing)：36°C 1 分鐘及延長 (extension)：72°C 2 分鐘，連續進行 45 個循環反應，最後將溫度保持在 4°C。
- (ii) 階段二：利用長度為 10 bp 的合成寡核苷酸 AE03 逢機引子 (Operon, USA)，AE03 逢機引子序列為 5'- CATAgAgCgg -3'，以彰化場全場 58 隻澳洲黑天鵝 DNA 樣本為模版進行 PCR 反應，PCR 反應條件與階段一相同。

IV. 電泳分析

PCR 的產物進行 1.5 % 瓊脂糖膠體電泳分析，使用 0.5X 之 TBE (Tris-boric acid-EDTA) buffer 為電泳緩衝液，電泳條件為 150 伏特，電泳時間為 3.5~4.0 小時。電泳完成之膠體經 ethidium bromide 染色後，利用紫外燈 (Spectroline, USA) 觀察 RAPD 指印，並照相 (Spectroline, USA) 記錄結果供資料分析之用。

結果與討論

利用 RAPD 方法分析澳洲黑天鵝 6 公 6 母的 DNA 樣品，在 220 種 Operon 10 bp 寡核苷酸引子組所得之指印中，有 95.5% (210/220) 種引子組可獲得複製 DNA 片段產物 (表 1)，其中可複製出具多態性 DNA 片段的引子組有 55.5% (122/220) 種 (表 2)。又在所增幅出之 RAPD 指印，平均約可產生 8.6 (1,806/210) 條 PCR 產物，而 DNA 片段之長度變異範圍為 0.3-3.0 kb。分析 210 種引子組所產生的 RAPD 指印，其中有一些引子組對澳洲黑天鵝 DNA 所產生之 DNA 片段為相同型態 (圖 1)，另一類則可使不同個體間產生多態性 (圖 2)。依據各個引子組所增幅出的多態性 DNA 片段與對應個體之性別加以比對分析，發現引子組 AE03 所增幅出的 670 bp 多態性 DNA 片段只出現在雌性個體 DNA，而雌性個體 DNA 則無此特異性 DNA 片段 (圖 3)，顯示引子組 AE03 有可能成為澳洲黑天鵝性別鑑定的候選標記。

為再進一步確認引子組 AE03 是否可作為澳洲黑天鵝性別鑑定的遺傳標記，因此，再將彰化種畜繁殖場全場的澳洲黑天鵝 58 隻 (28 公 30 母) 血樣 DNA 進行 RAPD 分析，檢測所有供試之雌性澳洲黑天鵝 DNA 皆可增幅出一條 670 bp 性別特異性 DNA 片段，而雄性者則無此片段。以引子組 AE03 分析所有檢測的澳洲黑天鵝之性別與實際性別完全吻合，鑑定準確率為 100% (58/58)；顯示引子組 AE03 可作為澳洲黑天鵝性別鑑定之遺傳標記。

雖然鳥類性別鑑定的檢測方法已陸續被發表 (Griffiths and Tiwari, 1993; Griffiths *et al.*, 1998; Ito *et al.*, 2001; Russello and Amato, 2001)，由於應用 RAPD 的方法不需再藉由對照反應 (control reactions) 引子的添加 (Clinton, 1994; Clinton *et al.*, 2001)，巢式 PCR (nested PCR) 或限制酶分切來確認，因此，為一簡易方便且準確的檢測方法。蕭等 (1996) 發現 RAPD 引子 AA16 可產生褐色菜鴨與北京鴨母禽特異性 DNA 片段，而引子 AA14 則可產生華鵝母禽特異性 DNA 片段；Bello and

表 1. 不同引子對澳洲黑天鵝 DNA 所複製出之 PCR 產物

Table 1. Information of PCR products amplified with different random primers in Australian Black Swan

Operon ¹ primer kits	Number of amplifiable primers	Number of DNA fragments	Length of DNA fragment (kb)	Unamplifiable primers
AA01~AA20	15	5~12	0.45~2.60	AA04, AA05, AA06, AA13, AA20
AB01~AB20	20	3~16	0.40~2.70	
AC01~AC20	18	1~12	0.30~2.70	AC16, AC18
AD01~AD20	19	6~21	0.40~3.00	AD07
AE01~AE20	20	4~12	0.30~2.30	
AF01~AF20	20	5~15	0.40~2.60	
AG01~AG20	20	1~16	0.35~2.60	
AH01~AH20	19	2~15	0.30~2.60	AH07
AI01~AI20	19	4~16	0.40~2.60	AI15
AJ01~AJ20	20	6~17	0.40~2.60	
AJ01~AJ20	20	6~17	0.40~2.60	

¹ Primer kits (10 bp) from Operon Technologies, Inc., USA.

表 2. 在澳洲黑天鵝 DNA 中可以複製多態性 RAPD 片段之引子

Table 2. Primer kits yield polymorphic bands in Australian Black Swan

Operon primer kits ¹	Primers yielding polymorphic bands
AA01~AA20	AA-01, 02, 03, 07, 08, 10, 11, 12, 14, 17, 18, 19
AB01~AB20	AB-01, 04, 05, 08, 09, 10, 11, 12, 18, 19
AC01~AC20	AC-02, 05, 09, 12, 13, 14, 17, 19
AD01~AD20	AD-01, 02, 05, 06, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 20
AE01~AE20	AE-01, 02, 03, 04, 05, 06, 09, 10, 11, 12, 16, 18, 19
AF01~AF20	AF-02, 04, 05, 07, 09, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 20
AG01~AG20	AG-01, 03, 04, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20
AH01~AH20	AH-01, 02, 06, 09, 11, 13, 14, 15, 18, 19, 20
AI01~AI20	AI-01, 02, 05, 06, 08, 09, 16, 17, 20
AJ01~AJ20	AJ-02, 03, 04, 05, 06, 09, 11, 16, 17, 18
AK01~AK20	AK-01, 03, 04, 05, 06, 09, 13, 14, 15, 18, 20

¹ Primer kits (10 bp) from Operon Technologies, Inc., USA.

Sanchez (1999) 利用 RAPD 引子 D10 鑑別駝鳥性別；林等 (2001) 應用 RAPD 引子 AB14 可產生白羅曼鵝母禽特異性 DNA 片段；Huang *et al.* (2003) 應用 RAPD 引子 AE06 建立雌鵝特異性 DNA 序列，林等 (2003) 應用 RAPD 引子 AI05 可產生雞的母禽特異性 DNA 片段。He *et al.* (2005) 亦應用鳥類性染色體上 CHD1 (chromo-helicase-DNA-binding 1) 基因序列發展出澳洲黑天鵝的分子生物性別鑑定方法。

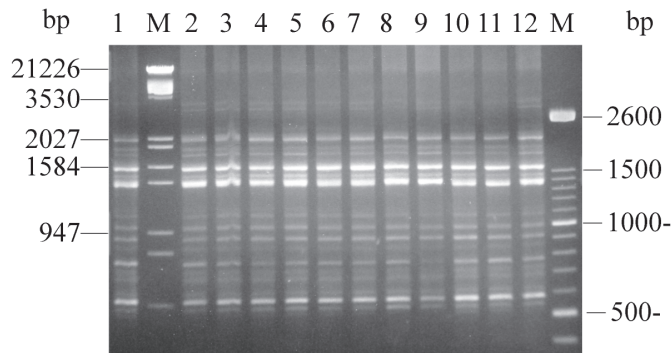


圖 1. 以引子 AD04 (5'- gTAggCCTCA - 3') 在澳洲黑天鵝複製出相同型態之 RAPD 指印。1~6 為雄性澳洲黑天鵝，7~12 為雌性澳洲黑天鵝。M：DNA 分子大小標記。

Fig. 1. The RAPD fingerprint polymorphisms of Australian Black Swan amplified with Operon primer AD04 (5'- gTAggCCTCA -3'). Lanes 1~6 were males and lanes 7~12 were females of Australian Black Swan. M represented molecular size markers.

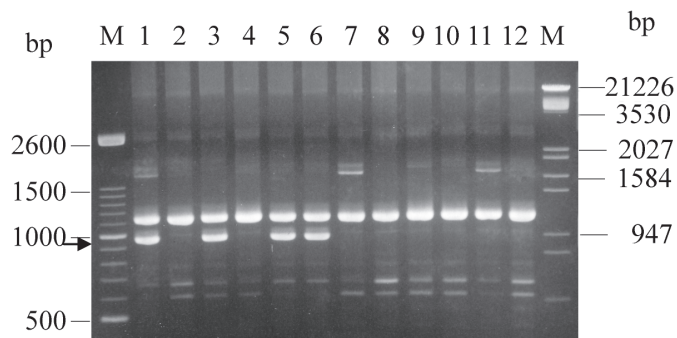


圖 2. 以引子 AD15 (5'- TTTgCCCCgT -3') 在澳洲黑天鵝複製出多態性之 RAPD 指印。1~6 為雄性澳洲黑天鵝，7~12 為雌性澳洲黑天鵝，M：DNA 分子大小標記，黑色箭頭所指為具變異性的 DNA 片段。

Fig. 2. The polymorphic RAPD fingerprint of Australian Black Swan amplified with Operon primer AD06 (5'- TTTgCCCCgT -3'). Lanes 1~6 were males and lanes 7~12 were females of Australian Black Swan. M represented molecular size markers. The band variation among swans was indicated by black arrow.

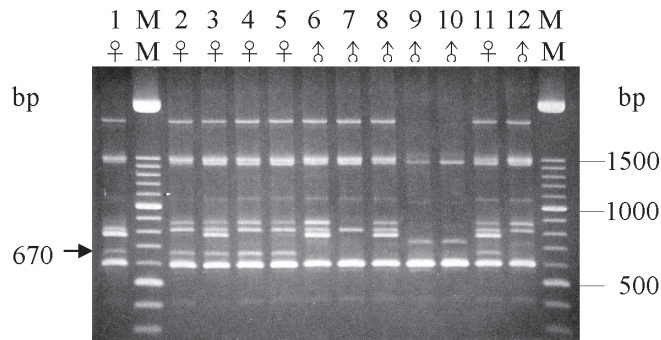


圖 3. 不同性別的澳洲黑天鵝以引子 AE03 檢測所得之 RAPD 指印。其中 1~5 與 11 為澳洲黑天鵝的雌性天鵝，6~10 與 12 為雄性天鵝，M：DNA 分子大小標記，黑色箭頭所指的 DNA 片段為雌性澳洲黑天鵝性別特異性 DNA 片段。

Fig. 3. RAPD products amplified by AE03 in different gender of Australian Black Swan. Lanes 1~5 and 11 were females and lanes 6~10 and 12 were males of Australian Black Swan. M represented molecular size markers. The female-specific DNA fragments was indicated by black arrow.

澳洲黑天鵝是一個性別單型物種的例子，一般無法從外觀輕易區分出雄性或是雌性，由於澳洲黑天鵝多以觀賞用小族群飼養，且通常以成對出售，若無法正確分出性別常造成多年繁殖失敗的情形（He *et al.*, 2005）。澳洲黑天鵝與所有鳥類之雄性個體無明顯的外生殖器可供識別，雄性個體生殖器皆在體內，因此在孵化後至數週齡內不易區分出性別。肛門性別鑑定法乃以肉眼觀察生殖器型狀些微的差異來區分出雛天鵝的性別。這種雛天鵝性別鑑定方法雖已行之多年，其準確率仍未盡理想，性別鑑別師必須受過專業的訓練，且並非大多數受過訓練者都能勝任。本試驗所發展出鑑定澳洲黑天鵝性別的 AE03 引子組標記提供一種準確又快速的性別鑑定技術。

誌謝

本研究承行政院農業委員會 86 年度與 91 公務預算經濟性能遺傳標記之研究經費補助，試驗期間蒙遺傳育種組實驗室與彰化種畜繁殖場同仁協助澳洲黑天鵝血樣處理與飼養管理工作，謹此一併誌謝。

參考文獻

- 林德育、劉瑞珍、陳若菁、葉力子、張秀鑾、戴謙。2001。白羅曼鵝逢機複製多態性 DNA 片段指印之分析。畜產研究 34（1）： 79-87。
- 林德育、劉瑞珍、陳若菁、鍾秀枝、黃祥吉、黃鈺嘉、張秀鑾。2003。雞隻性別鑑定的 RAPD 標記。畜產研究 36（1）： 53-60。

- 蕭振文、劉瑞珍、陳若菁、黃祥吉、戴謙。1996。家禽逢機複製多態性 DNA 之分析。畜產研究 29 (4) : 317-330。
- 劉瑞珍、陳若菁、黃祥吉、林德育、戴謙。1999。利用逢機複製 DNA 片段多態性分析近親台灣土雞之遺傳相似性。中華農學會報 186 : 89-98。
- Bello, N. and A. Sanchez. 1999. The identification of a sex-specific DNA marker in the ostrich using a random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. Mol. Ecol. 8 (4) : 667-669.
- Clinton, M. 1994. A rapid protocol for sexing chick embryos (*Gallus g. domesticus*). Anim. Genet. 25 (5) : 361-362.
- Clinton, M., L. Haines, B. Belloir and D. McBride. 2001. Sexing chick embryos: a rapid and simple protocol. Br. Poult. Sci. 42 (1) : 134-138.
- D'Costa, S. and J. N. Petite. 1998. Sex identification of turkey embryos using a multiplex polymerase chain reaction. Poult. Sci. 77 (5) : 718-721.
- Duan, W. and P. A. Fuerst. 2001. Isolation of a sex-linked DNA sequence in cranes. J. Hered. 92 (5) : 392-397.
- Ellegren, H. 2001. Hens, cocks and avian sex determination. A quest for genes on Z or W? EMBO Rep. 2 (3) : 192-196.
- Griffiths, R., M. C. Double, K. Orr and R. J. Dawson. 1998. A DNA test to sex most birds. Mol. Ecol. 7 (8) : 1071-1075.
- Griffiths, R. and B. Tiwari. 1993. The isolation of molecular genetic markers for the identification of sex. Proc. Natl. Acad. Sci. 90 : 8324-8326.
- He, P. J., J. Q. Yu and S. G. Fang. 2005. Sex identification of the black swan (*Cygnus atratus*) using the locus-specific PCR and implications for its reproduction. Reprod. Domest. Anim. 40 (3) : 196-198.
- Hu, R. Y., Z. K. Li and X. Y. Ding. 2005. Progress in the investigation of Avian sex determination and sex identification. Yi Chuan 27 (2) : 297-301.
- Huang, M. C., W. C. Lin, Y. M. Horng, R. Rouvier and C. W. Huang. 2003. Female-specific DNA sequences in geese. Br. Poult. Sci. 44 (3) : 359-364.
- Itoh, Y., M. Suzuki, A. Ogawa, I. Munechika, K. Murata K and S. Mizuno. 2001. 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. J. Hered. 92 (4) : 315-321.
- Levin, I., L. B. Crittenden and J. B. Dodson. 1993. Genetic map of the chicken Z chromosome using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Genomics 16 : 224-230.
- Russello, M. A. and G. Amato. 2001. Application of a noninvasive, PCR-based test for sex identification in an endangered parrot, *Amazona guildingii*. Zoo Biol. 20 (1):41-45.
- Waugh, R. and W. Powell. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. Trends in Biotech. 10 : 186-191.
- Welsh, J. and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res. 18 : 7213-7218.
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18 : 6531-6535.

Genetic marker for sex identification of Australian Black Swan ⁽¹⁾

Der-Yuh Lin ⁽²⁾⁽⁶⁾, Jui-Jane Liu ⁽³⁾, Jo-Chin Chen ⁽²⁾,
Kuo-Chin Wu ⁽⁴⁾, Hsiu-Luan Chang ⁽⁵⁾ and Ming-Che Wu ⁽²⁾

Received : Sept. 27, 2006 ; Accepted : Nov. 20, 2006

Abstract

To search for a sex identification candidate marker for the Australian black swan, a sexually monomorphic species, whole blood DNAs of individual Australian black swan (from Changhua Animal Propagation Station of Livestock Research Institute, Council of Agriculture) were analyzed by random amplified polymorphic DNA (RAPD). In phase I, 220 different 10-mer primers of arbitrary sequence were used to screen twelve Australian black swan (6 males and 6 females). An RAPD marker (AE03, 5'-CATAgAgCgg-3') demonstrated high sensitivity and accuracy in gender diagnosis. A sex-specific DNA fragment (670 bp) amplified with primer AE03 could be observed in the RAPD fingerprints of females only. The proof stage, phase II, AE03 was used to test other 58 birds (28 males and 30 females) from the Station in Sep. 2001. Results showed that it was 100% (58/58) accurate. The specific DNA fragment (670 bp) amplified with primer AE03 could therefore be a sex identification marker of the black swan.

Key words: Black Swan, Random amplified polymorphic DNA (RAPD), Sexing.

-
- (1) Contribution No.1348 from Livestock Research Institute (LRI), Council of Agriculture (COA), Executive Yuan.
(2) Division of Breeding and Genetics, COA-LRI, Hsinhua, Tainan, R.O.C.
(3) Division of Animal Physiology, COA-LRI, Hsinhua, Tainan, R.O.C.
(4) Changhua Animal Propagation Station, COA-LRI, Changhua, R.O.C.
(5) Department of Animal Science, National Pingtung University of Science and Technology, Pingtung, Taiwan.
(6) Corresponding author, E-mail: lin0429@mail.tlri.gov.tw