

菜鴨微衛星標記應用於不同番鴨族群遺傳多態性之探討⁽¹⁾

張怡穎⁽²⁾⁽⁴⁾ 魏良原⁽²⁾ 陳怡蓁⁽³⁾ 劉秀洲⁽²⁾

收件日期：110 年 2 月 9 日；接受日期：110 年 8 月 23 日

摘 要

為探討菜鴨微衛星標記用於不同番鴨族群遺傳結構研究及跨世代遺傳監測之可行性，本研究應用 11 組菜鴨微衛星標記進行五結黑色番鴨 3 個世代 (BMg9、BMg13 及 BMg16)、白色番鴨畜試 1 號 302、304 族群 (L302g23、L304g23) 及最少疾病番鴨族群 (MDg12) 之遺傳分析。結果顯示，本研究之菜鴨微衛星標記在不同番鴨族群分別有 6 至 8 組標記具中至高度多態性 ($PIC > 0.25$)，可供應用於後續遺傳結構探討。五結黑色番鴨第 9、13 及 16 代的平均交替基因數從 3.2 降至 3.0 個、平均觀測異質度從第 9 代最高 0.406 降至第 16 代 0.340、平均期望異質度亦從第 9 代最高 0.466 降至第 16 代 0.420，顯示隨世代數增加，五結黑色番鴨遺傳多態性有輕微下降的趨勢，但其有效交替基因數在跨世代皆維持恆定，且世代間無分化或僅有輕度分化。白色番鴨三個族群，平均交替基因數自 2.2 至 2.4、平均有效交替基因數自 1.6 至 1.7，平均觀測異質度最高為 0.358 (L304g23)、最低為 0.287 (MDg12)，平均期望異質度最高為 0.352 (L304g23)，最低為 0.315 (L302g23)。相較五結黑色番鴨，11 組菜鴨微衛星標記在 3 個白色番鴨族群之遺傳多態性普遍較為低下。在不同白色番鴨族群中，白色番鴨畜試 1 號除 APT012、APT033 以外，其餘標記大多顯示其有遠親配種趨勢，而最少疾病番鴨族群則有 3 組微衛星標記無多態性。本研究結果將應用於各番鴨族群後續遺傳監測，並供作其他番鴨保種研究參考，以促進番鴨種原永續經營利用。

關鍵詞：菜鴨微衛星標記、遺傳多態性、遺傳結構、番鴨。

緒 言

番鴨原產南美秘魯，早自 17 世紀便引入臺灣，早期民間主要飼養黑色番鴨，作為土番鴨父系或冬季進補食材之用 (周及黃, 1970; 洪等, 1996)。然於民國 50、60 年代，大體型白色番鴨自澳洲、美國與荷蘭等地引進，並大量推廣用於改善後裔土番鴨毛色，或引黑色番鴨與白色番鴨雜交，致黑色番鴨飼養數量大幅減少 (康等, 1992)。由於黑色番鴨在我國仍有其定位及市場，為維護珍貴種原，行政院農業委員會畜產試驗所宜蘭分所於民國 76 年自嘉義與宜蘭地區引進黑色番鴨 (康等, 1993)，自第 8 代開始逢機分為 15 個家族，應用家族輪迴系統配種，並於民國 102 年將該族群命名為五結黑色番鴨，供民間黑色番鴨種原更新使用 (行政院農業委員會畜產試驗所, 2013)。

除黑色番鴨，畜產試驗所另育有白色番鴨畜試 1 號，其始於民國 73 年法國贈送之番鴨種蛋 80 枚，由行政院農業委員會畜產試驗所宜蘭分所 (簡稱宜蘭分所) 孵出 38 隻雛鴨 (27 公、11 母)；民國 82 年由法國國家農業研究院再帶來 30 枚 ST4 品系種蛋，再孵出 18 隻雛鴨 (3 公、15 母)，其中 1 公與 7 母併入第 6 代種親群，自第 0 代至第 8 代採用 10 週齡體表型性狀作為選拔指標，第 8 代開始，此族群的選拔指標由體表型值改為累加性遺傳值，各代皆避開祖父母代全同胞或半同胞關係進行配種；第 13 代公母鴨 10 週齡體重分別達 4,137 及 2,536 g，此品系目前作為肉用純系或商業土番鴨之終端公鴨使用 (行政院農業委員會畜產試驗所, 2007)。

為供應國內生醫產業資材所需，宜蘭分所自白色番鴨畜試 1 號第 13 代又分離出最少疾病番鴨 (Minimal disease Muscovy duck, MD) 族群，在其第 12、26 及 40 週齡採血、離心血清，委由行政院農業委員會家畜衛生試驗所進行水禽小病毒及病毒性肝炎抗體檢定，淘汰檢定陽性的鴨隻，留下的鴨隻 (約 80%) 才作為種鴨，用於生產無水禽小病毒抗體之胚蛋、雛鴨，供作水禽小病毒疫苗或相關試驗，主要供應對象包括家畜衛生試驗所、瑞寶基因、臺灣生物製劑等，(魏, 2014)，近三年胚蛋加雛鴨供應量每年皆達 3,000 隻 (枚) 以上 (邱, 2020)。最少疾病番鴨族群先

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2677 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所宜蘭分所。

(3) 東海大學畜產與生物科技學系。

(4) 通訊作者，E-mail: yychang@mail.tlri.gov.tw。

前為整群逢機配種，考量族群數量小，為避免嚴重近親衰退，此族群自第 12 代開始逢機分為四個家族，進行家族輪迴配種。

前述番鴨族群或因族群較小，或經長年選拔，為保存珍貴種原，根據聯合國糧食及農業組織建議，另應以分子標記探討遺傳結構，觀察族群分化，並監測其是否受近親衰退影響 (FAO, 2012)。各種分子標記中，微衛星標記因具有廣布於真核生物基因組、較不受選拔影響、交替基因數多、多態性訊息含量豐富等特性 (Liu and Cordes, 2004; Tamaki, 2007; Gemayel *et al.*, 2010)，廣泛應用於各國鴨隻保種研究，如 Sultana *et al.* (2017) 應用 24 組微衛星標記分析韓國及孟加拉的當地鴨種的遺傳多態性；Hariyono *et al.* (2019) 為制定印尼 8 個國家種原本土鴨種的保種策略，應用 22 組微衛星標記分析其類緣關係；Zhang *et al.* (2019b) 應用 12 組微衛星標記估算 21 個中國鴨種的遺傳距離，並結合族群資訊進行邊際多樣性 (Marginal diversity) 分析，以協助制定種原保存優先順序；Lai *et al.* (2020) 自褐色菜鴨再篩選 17 組新微衛星標記，並加上原有 7 組標記，進行褐色菜鴨及白色菜鴨遺傳多態性分析，供後續遺傳監測使用。

然針對番鴨進行的遺傳結構研究較少，大多研究仍利用篩選自鴨的微衛星標記於番鴨分析 (Zhang *et al.*, 2019b)，其多態性常有偏低之情形。如 Maak *et al.* (2003) 之研究，在 18 組標記中，僅有 11 組具多態性；又 Ahmadi *et al.* (2007) 研究之 12 組標記，僅有 9 組可於番鴨增幅，且各基因座觀測所得之交替基因僅有 1 – 4 個，目前針對番鴨開發微衛星標記相關文獻僅一篇，且僅有 4 組標記 (Stai and Hughes, 2003)。為擴增可應用於黑色番鴨遺傳監測之標記數量，先前研究應用自褐色菜鴨基因體篩選之微衛星標記，且經於黑色番鴨測試可增幅者共 11 組，進行五結黑色番鴨第 9、13 代之多態性測試及遺傳結構分析，結果顯示 11 組微衛星標記皆具多態性 (張等, 2015)。為探討前述標記作為不同番鴨族群遺傳結構研究及跨世代遺傳監測工具之可行性，本研究應用同樣 11 組微衛星標記進行五結黑色番鴨第 9、13 及 16 代跨世代遺傳分析，另建立白色番鴨族群包括最少疾病番鴨第 12 代、白色番鴨畜試 1 號 302 及 304 族群之遺傳歧異度資訊，供未來遺傳監測參考。

材料與方法

I. 試驗動物

供試動物為宜蘭分所之五結黑色番鴨第 9、13 及 16 代族群 (BMg9、g13 及 g16)、最少疾病番鴨第 12 代族群 (MDg12)、白色番鴨畜試 1 號 302、304 族群第 23 代 (L302g23、L304g23)，其中 BMg9、BMg13 及 MDg12 之基因型鑑定為先前研究獲得 (張等, 2015；張等, 2018b)。五結黑色番鴨每世代族群數量約 180 隻，自第 8 代開始，保種計畫將該族群個體隨機分為 15 個家族並實施輪迴配種，並於第 9、13 及 16 代族群皆自每家族逢機採樣公、母各 1 隻，各世代各採樣 30 隻。最少疾病番鴨每世代族群數量約 120 隻，其種原來源為白色番鴨畜試 1 號第 13 代，此族群原採逢機配種，自 2015 年相關計畫將第 12 代族群逢機分為四個家族，開始輪迴配種，於同年自四家族分別採樣 2 公 5 母，共 28 隻 (魏, 2015)。白色番鴨畜試 1 號 302、304 族群第 23 代 (L302g23、L304g23)，族群數量分別約有 487 及 95 隻，於 2016 年依親代配種組合各採 1 公 1 母，兩族群分別採樣 50 隻、27 隻 (表 1)。

本研究涉及之動物試驗於畜產試驗所宜蘭分所執行，動物之使用、飼養及實驗內容係依據行政院農業委員會畜產試驗所宜蘭分所實驗動物照護及使用小組審查核准 (畜試宜動字第 105002 號) 之試驗準則進行。

表 1. 應用菜鴨微衛星標記進行遺傳分析之番鴨族群資訊

Table 1. Information of Muscovy duck populations using Tsaiya duck-derived microsatellite markers for genetic analysis

Population ¹	Generation	No. of drake	No. of duck
BM	9	16	16
	13	15	15
	16	15	15
MD	12	8	20
L302	23	25	25
L304	23	14	13

BM: Wujie Black Muscovy; MD: minimal disease Muscovy duck; L302: White Muscovy LRI 1 L302 population; L304: White Muscovy LRI 1 L304 population.

II. 微衛星標記分析

採集自上述試驗動物之翅靜脈採集新鮮血液，依 EasyPure Genomic DNA mini kit (Biomax, Taiwan) 說明書指示微調 (張等, 2016) 進行基因組 DNA 之萃取。所得基因組 DNA 置入 -20°C 保存備用。

使用之微衛星標記篩選自褐色菜鴨 (Hsiao *et al.*, 2008)，再從其中挑選於菜鴨及番鴨皆有多態性者如表 2，包括 APT001、APT004、APT008、APT010、APT012、APT017、APT020、APT025、APT026、APT032 及 APT033，共 11 組。針對前述試驗動物萃取所得之基因組 DNA 進行 PCR，其反應總體積為 10 μ L，其中包含 50 ng 模板基因組 DNA、正反引子各 0.2 μ M、1 X PCR buffer、1.5 mM MgCl₂、0.2 mM dNTP 及 0.375 U *Taq* DNA polymerase (TAKARA Co., Japan)。反應條件為 94°C 變性 10 分鐘，接著進行以下循環 30 次，包括 94°C 變性 20 秒、60°C 鍊合 30 秒及 72°C 延伸 30 秒，最後再以 72°C 延伸 10 分鐘。PCR 反應後，以 TBE 緩衝液製備 1% 瓊脂糖膠進行電泳確認產物。PCR 產物經稀釋與基因標準品 (GeneScan 500 Liz size standard) 混合製備成樣品盤，送國家基因體醫學研究中心 (National Center for Genome Medicine) 經 ABI 3730 序列分析儀 (Applied Biosystems, USA) 分析辨別 PCR 產物片段大小，取得分析原始檔後，再以 Peak Scanner v1.0 software (Applied Biosystems, USA) 人工判讀各微衛星標記之基因型。

表 2. 11 組菜鴨微衛星標記引子序列、鍊合溫度及所在鴨染色體資訊

Table 2. Primer sequences, annealing temperature and orthologous microsatellites in the duck genome scaffold of the 11 Tsaiya duck-derived microsatellite markers

Locus ¹	Primer sequences (5' → 3')	Ta (°C) ²	Duck genome scaffold no. ³
APT001	F: GTCCCACTGGTTTGCTGTCC R: ACTACGCATGGCAGTGAGGTT	60	1,509
APT004	F: GGGCAGGAAAATCTCCTGAAT R: TCTCAGTGGCTGAGCGGTC	60	192
APT008	F: CAAAGAAATCCTAGAACATCATTCAAAT R: TCTTCTGGCTTTTCACCTTAGTTTAGTA	60	358
APT010	F: CACTCAGGCTTTTAGGTCCATTAATA R: CATCTGAGAATGCACTTACTGTCAAA	60	1,199
APT012	F: TTGAGCCTCAGGTTCTAAACTCCTA R: TCATAACATTTTACAGACCAGTTTTCAGA	60	5
APT017	F: TGGATGGACAGACGGGTGA R: TGGAAGTTTTGATTTCTAGTGCTTACA	60	481
APT020	F: TTCCAAGTTTGTTCATGCCAATAGA R: CTGACCATGTTAGGGCGTTTTAG	60	197
APT025	F: TCCTAAGAAACGTTGCTTCATAGACC R: GAGTTAAGCTTCATCACTCTGTGACTG	60	121
APT026	F: CCCTGAAAGGCTGTTTTATATATCCA R: ATGTAAATAAAGTAGCCTTGCACGGT	60	477
APT032	F: TCACTTTCTTGACTCTCCTTGTTTT R: TGACTTGAATTCTGTTTACAGGATAAATG	60	45
APT033	F: CTTACCCCTACCTCATAAGGAAGT R: ATCCAAATCTGCAAGGTGAGTATTA	60	14

¹ Hsiao *et al.* (2008), developed from Tsaiya duck.

² Annealing temperature.

³ The orthologous microsatellites in the duck genome scaffold.

III. 遺傳變異與族群遺傳結構之統計分析

為探討族群之遺傳多態性及標記可用性，本研究利用 Cervus 3.0 軟體 (Kalinowski *et al.*, 2007) 針對前項所得基因型資料計算交替基因數目 (Number of alleles, N_a)、觀測 (Observed heterozygosity, H_o) 與期望異質度 (Expected

heterozygosity, H_E) (Nei, 1978) 及多態性訊息含量 (Polymorphic information content, PIC) (Botstein *et al.*, 1980), 並以 POPGENE 1.32 軟體 (Yeh *et al.*, 1997) 計算有效交替基因數目 (Number of effective alleles, N_e) 等遺傳變異及進行哈溫平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium) 檢定 (Guo and Thompson, 1992)。

族群分析部分使用 FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2002) 依 Weir and Cockerham (1984) 所述計算 Wright's F -statistics 之族群近交係數 (Within-population inbreeding coefficient, F_{IS}) 與族群分化指數 (Population genetic differentiation, F_{ST}) (Wright, 1965) 以評估族群近親及族群間分化程度。另本研究利用統計軟體 R 的 adegenet 套件進行族群主成分分析 (Principal component analysis) 並繪圖 (Jombart and Ahmed, 2011), 另以 STRUCTURE 2.3 軟體 (Pritchard *et al.*, 2000) 進行群數分布之模擬分析, 其計算開始模擬 5,000 次後 500,000 次可能的分群數 K ($K = 2 - 10$), 每個 K 值重複模擬 20 次, 並利用 STRUCTURE HARVESTER v0.6.91 程式 (Earl and vonHoldt, 2012) 依 Evanno 法 (Evanno *et al.*, 2005) 估算最適 K 值 (分群數) 以探討家族輪迴、長期選育對於族群分化的影響。

結果與討論

I. 微衛星標記多態性

為探討族群之遺傳多態性及標記可用性, 本研究利用 11 組菜鴨微衛星標記進行五結黑色番鴨第 9、13 及 16 代 (BMg9、g13 及 g16)、最少疾病番鴨第 12 代 (MDg12)、白色番鴨畜試 1 號 302、304 族群第 23 代 (L302g23、L304g23) 遺傳分析, 於前述番鴨族群共觀測到 47 個交替基因, 各基因座所含交替基因數為 2 至 7 個, 平均每基因座含 4.3 個交替基因, 遠低於褐色菜鴨之 5.8 個 (張等, 2018a), 亦稍低於白色菜鴨之 4.6 個 (張等, 2016); 有效交替基因數介於 1.2 (APT017) 至 3.9 (APT020) 個, 平均每基因座具有 2.2 個有效交替基因。觀測異質度介於 0.107 (APT001) 到 0.572 (APT008、APT025), 平均為 0.340; 期望異質度介於 0.176 (APT017) 到 0.745 (APT020), 平均為 0.477。多態性訊息含量介於 0.168 (APT017) 到 0.708 (APT020), 平均為 0.434。在 11 組微衛星標記中, 僅有 7 組具中至高度多態性 ($PIC > 0.25$); 五結黑色番鴨部分 (BMg9、BMg13 及 BMg16), 有效交替基因數介於 1.0 (APT010) 至 3.9 (APT020) 個, 平均每基因座具有 2.1 個有效交替基因。觀測異質度介於 0.033 (APT010) 到 0.707 (APT020), 平均為 0.375; 期望異質度介於 0.032 (APT010) 到 0.750 (APT020), 平均為 0.443。多態性訊息含量介於 0.032 (APT010) 到 0.704 (APT020), 平均為 0.393。11 組微衛星標記中, 8 組標記具中至高度多態性 ($PIC > 0.25$); 白色番鴨 (MDg12、L302g23 及 L304g23) 部分, 有效交替基因數介於 1.0 (APT001) 至 2.4 (APT026) 個, 平均每基因座具有 1.7 個有效交替基因。觀測異質度介於 0 (APT01) 到 0.602 (APT008), 平均為 0.310; 期望異質度介於 0 (APT001) 到 0.592 (APT026), 平均為 0.353, 多態性訊息含量介於 0 (APT001) 到 0.530 (APT026), 平均為 0.298。在 11 組微衛星標記中, 僅 APT026 具高度多態性 ($PIC > 0.5$), 另 3 組標記 (APT001、APT004 及 APT017) 僅有低度多態性。有效交替基因數與褐色菜鴨 (3.2 個)、白色菜鴨 (2.8 個) 相較低了許多。在標記多態性部分, 黑色番鴨及白色番鴨皆有部分標記僅具低度多態性訊息含量, 其中部分原因應係使用跨物種標記。文獻指出某些高多態性標記可能因跨物種標的序列旁供引子黏合區域之突變累積, 造成無法增幅, 在增幅測試時即被剔除 (Primmer *et al.*, 1997); 又或菜鴨基因組中高多態性區域與不同屬之番鴨有所差異, 使得標記之多態性及專一性因跨屬利用而有所折扣 (Van Hoof *et al.*, 1999)。由於截至目前番鴨仍少有專一性標記可用, 故本研究仍嘗試使用來自褐色菜鴨基因組開發之 33 組微衛星標記 (Hsiao *et al.*, 2008) 中, 11 組可於黑色番鴨增幅並具多態性者 (張等, 2015) 在白色番鴨族群進行遺傳分析, 然於白色番鴨應用時, 多態性又進一步下降, 此應與五結黑色番鴨引進係作種原保存, 採家族輪迴配種維持族群遺傳多態性, 而白色番鴨則以經過 20 餘個世代選拔所致。然在不同番鴨族群中, 分別有 6 至 8 組標記具中至高度多態性 ($PIC > 0.25$), 顯示本研究使用之菜鴨微衛星標記可應用於番鴨遺傳結構研究 (Elston, 2005; Zhang *et al.*, 2019a)。

II. 遺傳變異分析

五結黑色番鴨各世代及白色番鴨各族群之觀測交替基因分布如表 3 所示。五結黑色番鴨不同世代間所具有交替基因頻率大致皆接近, 僅有少數標記疑有特有交替基因, 如第 9 代特有 APT008 之 188 bp 及 APT032 之 233 bp, APT020 無 169 bp、APT033 無 229 bp; 第 16 代於 APT010 無 192 bp 等, 但這些片段基因頻率大多小於 0.05, 亦有可能是採樣數量較小, 影響這些片段是否被觀測。惟第 13 及第 16 代在 APT012 皆出現部分樣本一直無法成功增幅的情形, 但這些樣本使用其它標記基因型鑑別時皆正常, 另第 9 代個體在 APT012 分析亦正常, 故推測第 13 及 16 代個體可能是在引子黏合位置發生突變, 造成增幅失敗、交替基因缺失 (Hoffman and Amos, 2005)。

表 3. 五結黑色番鴨第 9、13 及 16 代 (BMg9、BMg13、BMg16)、最少疾病番鴨第 12 代 (MDg12)、白色番鴨畜試 1 號 302 及 304 族群 (L302g23、L304g23) 觀測之交替基因

Table 3. Observed alleles of the 9th, 13th and 16th generation of Wujie Black Muscovy (BMg9, BMg13, BMg16), the 12th generation of minimal disease Muscovy duck (MDg12), the 23rd generation of White Muscovy LRI 1 302 and 304 population (L302g23 and L304g23)

Population	APT001	APT004	APT008	APT010	APT012	APT017	APT020	APT025	APT026	APT032	APT033											
BMg9	228 ¹	0.73 ²	289	0.73	164	0.39	184	0.98	157	0.72	169	0.94	173	0.39	120	0.03	134	0.17	201	0.37	217	0.29
	260	0.27	297	0.27	172	0.18	192	0.02	161	0.19	177	0.06	185	0.02	124	0.19	138	0.28	225	0.02	225	0.71
					176	0.42			177	0.09			189	0.38	128	0.27	142	0.55	229	0.27		
					188	0.02							193	0.20	132	0.45			233	0.02		
BMg13	228	0.63	289	0.78	164	0.35	184	0.97	157	0.75	169	0.93	169	0.05	120	0.17	134	0.05	201	0.28	217	0.18
	260	0.37	297	0.22	172	0.03	192	0.03	161	0.03	177	0.07	173	0.37	124	0.16	138	0.18	225	0.02	225	0.78
					176	0.62			177	0.05			185	0.13	128	0.31	142	0.77	229	0.33	229	0.03
									null	0.17			189	0.23	132	0.33			237	0.37		
BMg16													193	0.17	136	0.03						
													201	0.05								
	228	0.63	289	0.82	164	0.33	184	1.00	157	0.82	169	0.90	169	0.07	120	0.18	134	0.22	201	0.27	217	0.12
	260	0.37	297	0.18	172	0.13			161	0.02	177	0.10	173	0.32	124	0.10	138	0.17	225	0.07	225	0.83
MDg12					176	0.53			null	0.16			185	0.13	128	0.22	142	0.62	229	0.38	229	0.05
													189	0.12	132	0.47			237	0.28		
													193	0.33	136	0.03						
													201	0.03								
L302g23	228	1.00	289	1.00	164	0.67	184	1.00	161	0.13	165	0.11	169	0.72	116	0.02	134	0.15	201	0.67	221	0.74
					176	0.09			177	0.63	169	0.89	185	0.28	128	0.30	138	0.19	209	0.33	225	0.26
					180	0.24			null	0.24					132	0.44	142	0.39				
															136	0.02	150	0.28				
L302g23															140	0.22						
	228	1.00	285	0.05	164	0.57	184	0.71	161	0.33	165	0.04	169	0.87	116	0.04	134	0.29	201	0.85	221	0.30
			289	0.95	176	0.22	192	0.29	177	0.60	169	0.96	185	0.13	128	0.72	138	0.01	209	0.15	225	0.70
					180	0.20			181	0.03					132	0.24	142	0.68				
L304g23																	150	0.02				
	228	1.00	285	0.06	164	0.72	184	0.74	161	0.13	165	0.24	169	0.56	128	0.83	134	0.39	201	0.70	221	0.46
			289	0.94	176	0.20	192	0.26	177	0.72	169	0.76	185	0.44	132	0.17	138	0.02	209	0.30	225	0.54
					180	0.07			null	0.15							142	0.54				
																	150	0.06				

¹ Fragment size (bp) of PCR product.

² Allele frequencies.

白色番鴨部分，最少疾病番鴨可發現 11 組微衛星標記中 APT001、APT004 及 APT010 無多態性，11 組標記中僅有三組標記 (APT008、APT025 及 APT026) 具 3 個以上交替基因；白色番鴨畜試 1 號之 302 及 304 族群於 APT001 亦無多態性，11 組標記中分別有 4 組 (APT008、APT012、APT025 及 APT026) 及 2 組標記 (APT008 及 APT026) 具 3 個以上交替基因。由於最少疾病番鴨為白色番鴨畜試 1 號第 13 代分離出來，顯示 APT001 可能於分離前即無多態性，而 APT004 及 APT010 應是在分離出最少疾病番鴨後才無多態性。最少疾病番鴨與白色番鴨畜試 1 號 302、304 族群交替基因分布及基因頻率皆大致相同，僅最少疾病番鴨於 APT025 具有 136、140 bp 兩特有交替基因。比較五結黑色番鴨與白色番鴨，可看到五結黑色番鴨具較大的交替基因分布差異，因白色番鴨各族群目前各僅有一個世代資訊，後續需增加可用的微衛星標記數量或進行其它白色番鴨族群、世代分析後，才能進一步確認此差異是否為黑色番鴨與白色番鴨間的差異或不同管理措施造成。另外，與黑色番鴨相同，白色番鴨三個族群亦於 APT012 出現疑似無效交替基因，後續應進一步定序確認。

表 4 至表 6 分別為五結黑色番鴨第 16 代、最少疾病番鴨第 12 代、白色番鴨畜試 1 號 302 及 304 族群之遺傳變異，表 7 則為各族群之平均遺傳變異。比較五結黑色番鴨第 9、13 及 16 代，在平均交替基因數從 3.2 降至 3.0 個、平均觀測異質度從第 9 代最高 0.406 降至第 16 代 0.340、平均期望異質度亦從第 9 代最高 0.466 降至第 16 代 0.420，各項參數皆有輕微下降的趨勢，且族群近交指數微幅上升，第 16 代有一組標記偏離哈溫平衡，但有效交替基因數在三世代皆持平為 2.1 個，顯示前述交替基因頻率變化可能由遺傳漂變或基因頻率較低未被採樣造成，主要交替基因仍留存於族群中。比較白色番鴨三個族群，平均交替基因數自 2.2 至 2.4、平均有效交替基因數自 1.6 至 1.7，平均觀測異質度最高為 0.358 (L304g23)、最低為 0.287 (MDg12)，平均期望異質度最高為 0.352 (L304g23)，最低為 0.315 (L302g23)，平均多態性訊息含量最高為 0.282 (L304g23)，最低為 0.263 (L302g23)，可看到三個族群在以上參數之差距皆甚小。與 Ahmadi *et al.* (2007) 分析北伊朗番鴨相較，該研究使用之 12 組標記中有 3 組具 4 個以上交替基因，平均交替基因數為 2.4 個，有效交替基因數為 2.2 個，觀測異質度平均為 0.44，期望異質度為 0.41，交替基因數略低於本研究之黑色番鴨，而與白色番鴨接近，有效交替基因數、觀測及期望異質度則接近、但略高於本研究黑色番鴨。此外 Wu *et al.* (2008) 將 Maak *et al.* (2000) 及 Maak *et al.* (2003) 於鴨開發之 20 組微衛星標記應用於浙江番鴨族群，平均有效交替基因數達 5.7 個，但同一標記 (如 AJ515883 與

表 4. 應用 11 組菜鴨微衛星標記分析五結黑色番鴨第 16 代之遺傳變異

Table 4. Genetic variations of the 16th generation of Wujie Black Muscovy (BMg16) with the 11 Tsaiya duck-derived microsatellite markers

Locus	Fragment (bp)	N _a ¹	N _e ²	H _O ³	H _E ⁴	PIC ⁵	F _{IS} ⁶
APT001	228 – 260	2	1.9	0.267	0.472	0.357	0.434
APT004	289 – 297	2	1.4	0.233	0.305	0.255	0.236
APT008*	164 – 176	3	2.4	0.333	0.597	0.509	0.442
APT010	184	1	1.0	0.000	0.000	0.000	NA
APT012	157 – 161	2	1.0	0.040	0.040	0.038	0.000
APT017	169 – 177	2	1.2	0.133	0.183	0.164	0.273
APT020	169 – 201	6	4.0	0.700	0.764	0.713	0.084
APT025	120 – 136	5	3.2	0.733	0.702	0.646	-0.044
APT026	134 – 142	3	2.2	0.467	0.554	0.486	0.157
APT032	201 – 237	4	3.3	0.700	0.709	0.639	0.013
APT033	217 – 229	3	1.4	0.133	0.294	0.267	0.548
Average		3.0	2.1	0.340	0.420	0.370	0.214
SD		1.5	1.0	0.272	0.272	0.247	0.208

¹ Number of alleles.

² Expective number of alleles.

³ Observed heterozygosity.

⁴ Expected heterozygosity.

⁵ Polymorphic information content.

⁶ Wright's fixation index, within population inbreeding estimate.

* Represented significant (P < 0.05) departure from Hardy-Weinberg equilibrium.

NA: not available.

APH02) 在 Maak *et al.* (2003) 中之交替基因數為 5 個，在 Wu *et al.* (2008) 的有效交替基因數卻達 9 個以上，且 20 組標記除 1 組無多態性，其餘觀測異質度自 0.6757 至 0.9118，平均觀測異質度達 0.8079，各標記皆有雜合度過高情形，可能有假交替基因 (False allele) 之虞 (Hoffman and Amos, 2005)，囿於兩篇研究皆無試驗番鴨族群之詳細遺傳背景、配種資訊，尚難做進一步判斷。

表 5. 應用 11 組菜鴨微衛星標記分析最少疾病番鴨第 12 代之遺傳變異

Table 5. Genetic variations of the 12th generation of minimal disease Muscovy duck (MDg12) with the 11 Tsaiya duck-derived microsatellite markers

Locus	Fragment (bp)	N _a ¹	N _e ²	H _O ³	H _E ⁴	PIC ⁵	F _{IS} ⁶
APT001	228	1	1.0	0.000	0.000	0.000	NA
APT004	289	1	1.0	0.000	0.000	0.000	NA
APT008	164 — 180	3	2.0	0.667	0.498	0.429	-0.339
APT010	184	1	1.0	0.000	0.000	0.000	NA
APT012	161 — 177	2	1.4	0.048	0.285	0.239	0.832
APT017	165 — 169	2	1.2	0.148	0.201	0.178	0.264
APT020	169 — 185	2	1.7	0.407	0.409	0.321	0.005
APT025	116 — 140	5	3.0	0.667	0.677	0.601	0.015
APT026	134 — 150	4	3.5	0.630	0.729	0.665	0.136
APT032	201 — 209	2	1.8	0.444	0.453	0.346	0.020
APT033	221 — 225	2	1.6	0.148	0.391	0.310	0.621
Average		2.3	1.7	0.287	0.331	0.281	0.194
SD		1.3	0.8	0.281	0.260	0.230	0.374

¹ Number of alleles.

² Expective number of alleles.

³ Observed heterozygosity.

⁴ Expected heterozygosity.

⁵ Polymorphic information content.

⁶ Wright's fixation index, within population inbreeding estimate.

NA: not available.

較特別的是白色番鴨畜試 1 號 302 及 304 族群在族群近交指數遠低於五結黑色番鴨及最少疾病番鴨，檢視表 7 可發現 302 及 304 族群分別有 5 組及 7 組標記的族群近交指數具遠親配種趨勢 ($F_{IS} < 0$)。經查白色番鴨畜試 1 號平均選拔百分率在母鴨為 39.6%，高於褐色菜鴨畜試一號 (19.6%)、褐色菜鴨畜試三號 (24.9%)；公鴨為 9.1%，介於褐色菜鴨畜試一號 (13.7%)、褐色菜鴨畜試三號 (5.9%) 之間 (行政院農業委員會畜產試驗所，2005；2007；2008)，且皆避開祖父母代全同胞或半同胞進行配種。雖然此族群經過長期選拔，以微衛星標記檢測之多態性甚低，但仍具相當低的族群近交指數。而最少疾病番鴨族群先前為整群逢機配種，自第 12 代，即本研究採樣族群，始逢機分為四個家族，開始進行輪迴配種，相較於白色番鴨畜試 1 號，此族群平均近交指數偏高，且多 2 組標記無多態性。後續應以此次資料為基準，持續進行遺傳監測，並增加番鴨可用標記數量及基因型鑑定之個體數量，進行跨世代分析以獲得較精準之遺傳監測結果；同時或可考量現場管理狀況，增加輪迴配種家族數以避免嚴重近親衰退。

III. 遺傳結構分析

進一步合併五結黑色番鴨及白色番鴨族群之基因型資料，利用統計軟體 R 的 *adegenet* 套件進行族群主成分分析，至第二主成分之累積比例約 0.24，至第三主成分亦僅增至 0.30，故取第一與第二主成分繪圖 (圖 1)，結果顯示以 11 組菜鴨微衛星標記可完全區分五結黑色番鴨及白色番鴨族群。五結黑色番鴨部分，如同表 4 所示，三世代之交替基因分布、頻率十分相似，主成分分析圖中三世代之範圍大小及分布中心極為接近，尤以第 13 代及第 16 代幾乎完全交疊。白色番鴨部分，三個族群呈部分交疊，並未完全分開，其中以最少疾病番鴨族群與白色番鴨畜試 1 號 304 族群較為接近；然白色番鴨畜試 1 號 302 與 304 族群間交疊範圍較大，顯示其親緣關係更為接近。

表 6. 應用 11 組菜鴨微衛星標記分析白色番鴨畜試 1 號 302 及 304 族群第 23 代之遺傳變異

Table 6. Genetic variations of the 23rd generation of White Muscovy LRI 1 302 and 304 population (L302g23 and L304g23) with the 11 Tsaiya duck-derived microsatellite markers

Locus	L302g23							L304g23							
	Fragment (bp)	Na ¹	N _e ²	H _O ³	H _E ⁴	PIC ⁵	F _{IS} ⁶	Fragment (bp)	Na ¹	N _e ²	H _O ³	H _E ⁴	PIC ⁵	F _{IS} ⁶	
APT001	228	1	1.0	0.000	0.000	0.000	NA	APT001	228	1	1.0	0.000	0.000	0.000	NA
APT004	289	2	1.1	0.100	0.096	0.090	-0.042	APT004	289	2	1.1	0.111	0.107	0.099	-0.037
APT008	164 – 180	3	2.4	0.612	0.587	0.517	-0.043	APT008	164 – 180	3	1.8	0.519	0.440	0.382	-0.180
APT010	184	2	1.7	0.460	0.416	0.327	NA	APT010	184	2	1.6	0.370	0.391	0.310	NA
APT012	161 – 177	3	2.0	0.313	0.495	0.397	0.368	APT012	161 – 177	2	1.3	0.130	0.264	0.225	0.508
APT017	165 – 169	2	1.1	0.082	0.079	0.075	-0.038	APT017	165 – 169	2	1.6	0.481	0.372	0.299	-0.293
APT020	169 – 185	2	1.3	0.220	0.228	0.201	0.035	APT020	169 – 185	2	2.0	0.577	0.503	0.372	-0.147
APT025	116 – 140	3	1.7	0.400	0.427	0.361	0.063	APT025	116 – 140	2	1.4	0.346	0.292	0.245	-0.185
APT026	134 – 150	4	1.8	0.510	0.455	0.374	-0.121	APT026	134 – 150	4	2.3	0.704	0.567	0.467	-0.242
APT032	201 – 209	2	1.3	0.260	0.258	0.222	-0.008	APT032	201 – 209	2	1.7	0.444	0.425	0.330	-0.045
APT033	221 – 225	2	1.7	0.280	0.424	0.332	0.340	APT033	221 – 225	2	2.0	0.259	0.507	0.374	0.489
Average		2.4	1.6	0.294	0.315	0.263	0.062	Average		2.2	1.6	0.358	0.352	0.282	-0.015
SD		0.8	0.4	0.190	0.193	0.159	0.174	SD		0.8	0.4	0.216	0.174	0.135	0.302

¹ Number of alleles.² Expective number of alleles.³ Observed heterozygosity.⁴ Expected heterozygosity.⁵ Polymorphic information content.⁶ Wright's fixation index, within population inbreeding estimate.

NA: not available.

表 7. 應用 11 組菜鴨微衛星標記分析五結黑色番鴨第 9、13 及 16 代 (BMg9、BMg13、BMg16)、最少疾病番鴨第 12 代 (MDg12)、白色番鴨畜試 1 號 302 及 304 族群 (L302g23、L304g23) 之平均遺傳變異

Table 7. The average of genetic variations of the 9th, 13th and 16th generation of Wujie Black Muscovy (BMg9, BMg13, BMg16), the 12th generation of minimal disease Muscovy duck (MDg12), the 23rd generation of White Muscovy LRI 1 302 and 304 population (L302g23 and L304g23) with the 11 Tsaiya duck-derived microsatellite markers

Population [*]	N ¹	N _a ²	N _e ³	H _O ⁴	H _E ⁵	PIC ⁶	dHWE ⁷	F _{IS} ⁸
BMg9	32	3.2	2.1	0.406	0.466	0.403	0	0.133 ± 0.236
BMg13	30	3.2	2.1	0.376	0.423	0.369	0	0.150 ± 0.299
BMg16	30	3.0	2.1	0.340	0.420	0.370	1	0.214 ± 0.208
MDg12	28	2.3	1.7	0.287	0.331	0.281	0	0.194 ± 0.374
L302g23	50	2.4	1.6	0.294	0.315	0.263	0	0.062 ± 0.174
L304g23	27	2.2	1.6	0.358	0.352	0.282	0	-0.015 ± 0.302

¹ Sample size.

² Number of alleles.

³ Number of effective alleles.

⁴ Observed heterozygosity.

⁵ Expected heterozygosity.

⁶ Polymorphic information content.

⁷ Number of markers departed from Hardy-Weinberg equilibrium.

⁸ Wright's fixation indice, within population inbreeding estimate and standard deviations.

* BMg9 and BMg13 were conducted in Chang *et al.* (2015, in Chinese), and MDg12 was genotyped in Chang *et al.* (2018b, in Chinese), and the other populations were conducted in this study.

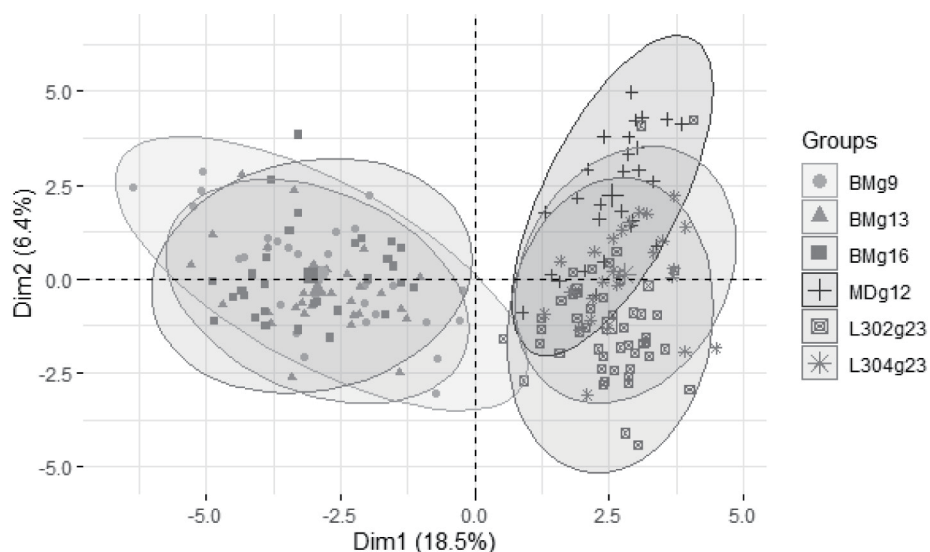


圖 1. 利用 11 組微衛星標記分析五結黑色番鴨第 9、13 及 16 代 (BMg9、BMg13、BMg16)、最少疾病番鴨第 12 代 (MDg12)、白色番鴨畜試 1 號 302 及 304 族群 (L302g23、L304g23) 之主成分分析圖，橫軸及縱軸分別為第一及第二主成分與所解釋變異數比例。

Fig. 1. The results of principal component analysis of the 9th, 13th and 16th generation of Wujie Black Muscovy (BMg9, BMg13, BMg16), the 12th generation of minimal disease Muscovy duck (MDg12), the 23rd generation of White Muscovy LRI 1 302 and 304 population (L302g23 and L304g23) from the 11 Tsaiya duck-derived microsatellite markers. The horizontal and vertical axis are the ratio of the first and second principal components to the explained variance, respectively.

根據 STRUCTURE 軟體 (Pritchard *et al.*, 2000) 分析結果 (圖 2) 經 Evanno 法估算 (Evanno *et al.*, 2005)，最適 K 值為 2，分別為五結黑色番鴨與白色番鴨。雖目前白色番鴨各族群在遺傳結構上無法完全獨立分別，然繪成長條圖觀測，如 K = 3，可清楚看到最少疾病番鴨跟白色番鴨畜試 1 號 302 及 304 族群明顯區別，另白色番鴨畜試 1 號兩個族群之遺傳組成亦有些微不同。

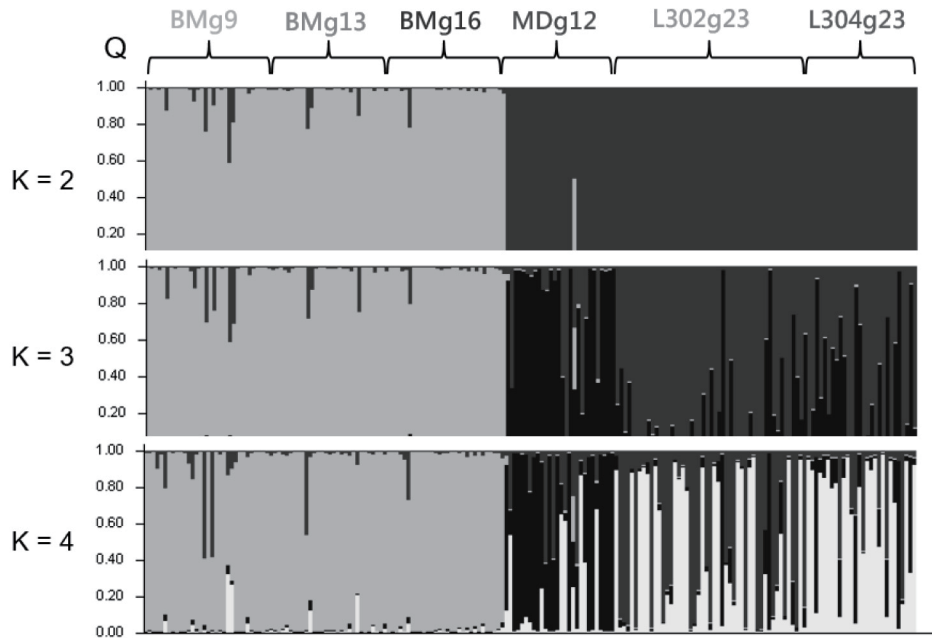


圖 2. 五結黑色番鴨第 9、13 及 16 代 (BMg9、BMg13、BMg16)、最少疾病番鴨第 12 代 (MDg12)、白色番鴨畜試 1 號 302 及 304 族群 (L302g23、L304g23) 以 STRUCTURE 軟體進行分群分析之結果。可能分群數 (K) 設為 2、3 及 4，最適 K 值為 2；Q：個體基因源自該群集之比例，不同群集以不同顏色表示，縱軸每圖條代表一個體。

Fig. 2. Genetic cluster analysis for the 9th, 13th and 16th generation of Wujie Black Muscovy (BMg9, BMg13, BMg16), the 12th generation of minimal disease Muscovy duck (MDg12), the 23rd generation of White Muscovy LRI 1 302 and 304 population (L302g23 and L304g23) using STRUCTURE software. K: possible number of subpopulation from 2 to 4, the optimal K value in this study is 2. Q: proportional membership of Brown Tsaiya ducks to genetic clusters. Colors correspond to different genetic clusters. Each vertical bar represents a single individual.

五結黑色番鴨及白色番鴨族群之族群分化分析結果如表 8 所示，根據 Wright(1965) 所述，當族群分化指數小於 0.05 表幾乎無分化；介於 0.05 至 0.25 表低至中度分化；而大於 0.25 時表高度分化。各族群兩兩相較之下，五結黑色番鴨世代間幾乎無分化 ($F_{ST} = -0.0001 - 0.0211$)，白色番鴨三族群間皆為低至中度分化，但以最少疾病番鴨族群與白色番鴨畜試 1 號 302 族群之分化程度最高 ($F_{ST} = 0.1381$)，白色番鴨畜試 1 號 302 族群與 304 族群分化程度最低 ($F_{ST} = 0.0576$)。此與先前主成分分析、STRUCTURE 軟體分析結果一致。

表 8. 利用 11 組微衛星標記分析五結黑色番鴨第 9、13 及 16 代 (BMg9、BMg13、BMg16)、最少疾病番鴨第 12 代 (MDg12)、白色番鴨畜試 1 號 302 及 304 族群 (L302g23、L304g23) 之遺傳分化指數 (對角線右上)

Table 8. The F_{ST} value based on 11 microsatellite markers for the 9th, 13th and 16th generations of Wujie Black Muscovy (BMg9, BMg13, BMg16), the 12th generations of minimal disease Muscovy duck (MDg12), the 23rd generation of White Muscovy LRI 1 302 and 304 population (L302g23 and L304g23)

Population	BMg9	BMg13	BMg16	MDg12	L302g23	L304g23
BMg9	—	0.0145*	0.0211*	0.2977*	0.2912*	0.2864*
BMg13		—	-0.0001	0.3476*	0.3248*	0.3217*
BMg16			—	0.3524*	0.3395*	0.3350*
MDg12				—	0.1381*	0.0994*
L302g23					—	0.0576*
L304g23						—

* F_{ST} with significant differentiation ($P < 0.05$).

綜觀番鴨遺傳結構研究，大多僅跟其他家鴨進行品種間的比較 (Ahmadi *et al.*, 2007)，甚至有將黑白羽色番鴨當作同一族群混合進行分析 (Zhang *et al.*, 2019b)。不同番鴨族群間的研究如 Oguntunji and Ayorinde (2014)，為保育及提升種原應用目的，希望透過表型檢定區分不同生態型來源番鴨族群，以失敗告終。又如 Paramasivam

et al. (2017) 自 Genbank 資料庫比較來自印度、法國及中國不同品系之番鴨 69 隻個體，共 13 種 D-loop 序列單倍型 (haplotype)，在 D-loop 491 bp 序列中僅有 12 個變異位置，以法國與中國番鴨遺傳分化較高 ($F_{ST} = 0.6826 - 0.7295$)，印度跟中國與法國的遺傳分化則居中 ($F_{ST} = 0.2098 - 0.3655$)，接近本研究黑色番鴨與白色番鴨之遺傳分化指數 ($F_{ST} = 0.2864 - 0.3524$)，有趣的是該試驗中國未知品系番鴨樣本與法國番鴨序列完全一致，分化程度為 0，此可能因粒線體 DNA 在遺傳資訊上缺乏核內 DNA 演化資料，且分型較不足，故較難進行遺傳監測等需較高解析度之研究 (Wan *et al.*, 2004)。以上結果顯示，本研究透過菜鴨微衛星標記建立之各番鴨族群之遺傳多態性資訊可供作其他番鴨保種研究之良好參考。未來仍應定期收集番鴨族群遺傳物質，並將本研究結果應用於後續遺傳監測、比較，以促進番鴨種原永續經營利用。

結 論

本研究利用 11 組菜鴨微衛星標記進行五結黑色番鴨跨世代遺傳結構比較，並建立白色番鴨各族群之遺傳多態性資訊，在不同番鴨族群中，分別有 6 至 8 組標記具中至高度多態性，顯示相關跨物種標記可應用於番鴨遺傳結構研究。五結黑色番鴨遺傳多態性有隨世代輕微下降的趨勢，但有效交替基因數在跨世代比較皆維持恆定，且世代間無分化或僅有輕度分化；11 組菜鴨微衛星標記在白色番鴨三個族群之多態性雖皆低下，然白色番鴨畜試 1 號多項標記顯示其有遠親配種趨勢，相較之下最少疾病番鴨族群有 3 組微衛星標記無多態性，後續除持續進行性能監測外，可能需增加更多標記資訊及白色番鴨族群之基因型鑑定，才能更加精確進行白色番鴨之遺傳監測。未來仍應定期收集番鴨族群遺傳物質，並將本研究結果應用於後續遺傳監測、比較，以促進番鴨種原永續經營利用。

誌 謝

本研究承行政院農業委員會經費支持 (105 農科 -2.5.4- 畜 -L1(3))，並承科技部生技類核心設施平臺維運計畫下之國家基因體醫學研究中心協助微衛星標記基因型分析。試驗期間承蒙林阿葉、林秀齡、林美葉、柯惠君、陳淑惠、馮國銘及黃順和等宜蘭分所同仁協助試驗之進行，特此誌謝。

參考文獻

- 行政院農業委員會畜產試驗所。2005。「褐色菜鴨畜試一號」品系登記審定書。
- 行政院農業委員會畜產試驗所。2007。「白色番鴨畜試 1 號」品系登記審定書。
- 行政院農業委員會畜產試驗所。2008。「褐色菜鴨畜試三號」品系登記審定書。
- 行政院農業委員會畜產試驗所。2013。「五結黑色番鴨」品系登記審定書。
- 周光宇、黃暉煌。1970。臺灣的養鴨。中國農村復興委員會畜牧第 8 號，臺北市，第 2-5 頁。
- 邱如均。2020。最少疾病番鴨穩定供應及生產效率提升研究。行政院農業委員會畜產試驗所 109 年度科技計畫研究報告。
- 洪福隆、田正德、陳明造。1996。家飼番鴨的歷史 (六)。中國畜牧雜誌 28：97-101。
- 康清亮、李舜榮、胡怡浩、黃振芳。1993。褐色菜鴨、白色菜鴨、黑色番鴨種原保存族群的生長及產蛋性能之觀察。畜產研究 26：317-326。
- 康清亮、李舜榮、黃振芳、胡怡浩、王政騰。1992。菜鴨、黑色番鴨種原保存與利用。八十一年度畜產評議會工作報告。
- 張怡穎、黃振芳、魏良原、蕭孟衿、劉秀洲。2015。五結黑色番鴨種原保存與菜鴨微衛星標識於其遺傳監測之初探。中畜會誌 44：131-146。
- 張怡穎、劉秀洲、陳怡蓁、丁詩同、王佩華、林恩仲、蕭孟衿、黃振芳。2016。微衛星標記應用於白色菜鴨保種族群與宜蘭白鴨臺畜一號遺傳結構之探討。畜產研究 49：138-147。
- 張怡穎、張惠斌、魏良原、陳怡蓁、丁詩同、王佩華、林恩仲、黃振芳、陳志峰、劉秀洲。2018a。微衛星標記應用於不同褐色菜鴨品系族群遺傳結構之探討。中畜會誌 47：221-238。
- 張惠斌、張喬茵、魏良原、張怡穎、劉秀洲。2018b。最少疾病番鴨之疾病篩除與生產供應。中畜會誌 47：277-

289。

- 魏良原。2014。強化最少病原番鴨供應及品質提升。行政院農業委員會畜產試驗所 103 年度科技計畫研究報告。
- 魏良原。2015。強化最少病原番鴨供應及品質提升。行政院農業委員會畜產試驗所 104 年度科技計畫研究報告。
- Ahmadi, A. K., G. Rahimi, A. Vafaei, and H. Sayyazadeh. 2007. Microsatellite analysis of genetic diversity in Pekin (*Anas platyrhynchos*) and Muscovy (*Cairina moschata*) duck populations. *Int. J. Poult. Sci.* 6: 378-382.
- Botstein, D., R. L. White, M. Skolnick, and R. W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331.
- Earl, D. A. and B. M. vonHoldt. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.* 4: 359-361.
- Elston, R. C. 2005. Polymorphism Information Content. *Encyclopedia of Biostatistics*. New York: John Wiley & Sons.
- Evanno, G., S. Regnaut, and J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14: 2611-2620.
- FAO. 2012. Phenotypic characterization of animal genetic resources. FAO Animal Production and Health Guidelines No. 11. Rome.
- Gemayel, R., M. D. Vences, M. Legendre, and K. J. Verstrepen. 2010. Variable tandem repeats accelerate evolution of coding and regulatory sequences. *Annu. Rev. Genet.* 44: 445-477.
- Goudet, J. 2002. FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Version 2.9.3. Department of ecology and evolution, Lausanne University, Lausanne, Switzerland.
- Guo, S. W. and E. A. Thompson. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48: 361-372.
- Hariyono, D. N. H., D. Maharani, S. Cho, P. Manjula, D. Seo, N. Choi, J. H. P. Sidadolog, and J. H. Lee. 2019. Genetic diversity and phylogenetic relationship analyzed by microsatellite markers in eight Indonesian local duck populations. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 32: 31-37.
- Hoffman, J. I. and W. Amos. 2005. Microsatellite genotyping errors: detection approaches, common sources and consequences for paternal exclusion. *Mol. Ecol.* 14: 599-612.
- Hsiao, M. C., H. C. Liu, Y. C. Hsu, Y. H. Hu, S. H. Li, and S. R. Lee. 2008. Isolation and characterization of microsatellite markers in Tsaiya duck. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 21: 624-627.
- Jombart, T. and I. Ahmed. 2011. adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics* 21: 3070-3071.
- Kalinowski, S. T., M. L. Taper, and T. C. Marshall. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol. Ecol.* 16: 1099-1106.
- Lai, F. Y., Y. Y. Chang, Y. C. Chen, E. C. Lin, H. C. Liu, J. F. Huang, S. T. Ding, and P. H. Wang. 2020. Monitoring of genetically close Tsaiya duck populations using novel microsatellite markers with high polymorphism. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 33: 888-901.
- Liu, Z. J. and J. F. Cordes. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238: 1-37.
- Maak, S., K. Neumann, R. Gattermann, and R. Gattermann. 2000. First seven microsatellites developed for the Peking duck (*Anas platyrhynchos*). *Anim. Genet.* 31: 228-241.
- Maak, S., K. Wimmers, S. Weigend, and K. Neumann. 2003. Isolation and characterization of 18 microsatellites in the Peking duck (*Anas platyrhynchos*) and their application in other waterfowl species. *Mol. Ecol. Notes* 3: 224-227.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Oguntunji, A. O. and K. L. Ayorinde. 2014. Multivariate analysis of morphological traits of the Nigerian Muscovy ducks (*Cairina moschata*). *Arch. Zootec.* 63: 483-493.
- Paramasiva, K., S. S. Vyshnava, D. K. Kanderi, and C. Pertoldi. 2017. Genetic diversity of Muscovy ducks revealed by mtDNA D-loop. *IOSR J. Biotechnol. Biochem.* 3: 11-18.
- Primmer, C. R., T. Raudsepp, B. P. Chowdhary, A. P. Møller, and H. Ellegren. 1997. Low frequency of microsatellites in the avian genome. *Genome Res.* 7: 471-482.
- Pritchard, J. K., M. Stephens, and P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data.

- Genetics 155: 945-959.
- Stai, S. M. and C. R. Hughes. 2003. Characterization of microsatellite loci in wild and domestic Muscovy ducks (*Cairina moschata*). Anim. Genet. 34: 387-389.
- Sultana, H., D. Seo, N. R. Choi, Y. S. Kim, P. Manjula, M. S. A. Bhuiyan, K. N. Heo, and J. H. Lee. 2017. Genetic diversity analyses of asian duck populations using 24 microsatellite markers. Korean J. Poult. Sci. 44: 75-81.
- Tamaki, K. 2007. Molecular forensics. In: Minisatellite and microsatellite DNA typing analysis. pp. 71-86. John Wiley & Sons, Ltd. England.
- Van Hooft, W. F., O. Hanotte, P. W. Wenink, A. F. Groen, Y. Sugimoto, H. H. Prins, and A. Teale. 1999. Applicability of bovine microsatellite markers for population genetic studies on African buffalo (*Syncerus caffer*). Anim. Genet. 30: 214-220.
- Wan, Q. H., H. Wu, T. Fujihara, and S. G. Fang. 2004. Which genetic marker for which conservation genetics issue? Electrophoresis 25: 2165-2176.
- Weir, B. S. and C. C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution 38: 1358-1370.
- Wright, S. 1965. The interpretation of population structure by F-Statistics with special regard to systems of mating. Evolution 19: 395-420.
- Wu, Y., X. L. Liu, S. S. Hou, and W. Huang. 2008. Study on genetic diversity of six duck populations with microsatellite DNA. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 21: 776-783.
- Yeh, F. C., R. C. Yang, T. B. J. Boyle, Z. H. Ye, and J. X. Mao. 1997. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.
- Zhang, X. X., J. S. Ran, T. Lian, Z. Q. Li, C. W. Yang, X. S. Jiang, H. R. Du, Z. F. Cui, and Y. P. Liu. 2019a. The single nucleotide polymorphisms of myostatin gene and their associations with growth and carcass traits in Daheng broiler. Braz. J. Poult. Sci. 21: eRBCA-2018-0808.
- Zhang, Y., L. Wang, Y. Bian, Z. Wang, Q. Xu, G. Chang, and G. Chen. 2019b. Marginal diversity analysis of conservation of Chinese domestic duck breeds. Nat. Res. 9: 13141.

Study on the genetic diversities in different Muscovy duck populations with the microsatellite markers derived from Tsaiya duck ⁽¹⁾

Yi-Ying Chang ^{(2) (4)} Liang-Yuan Wei ⁽²⁾ Yi-Chen Chen ⁽³⁾ and Hsiu-Chou Liu ⁽²⁾

Received: Feb. 9, 2021; Accepted: Aug. 23, 2021

Abstract

The aim of this study was to investigate the feasibility of Brown Tsaiya duck-derived microsatellite markers as a tool for genetic-structure research and across-generation genetic monitoring in different Muscovy duck populations. We applied eleven Brown Tsaiya duck-derived microsatellite markers to conduct genetic analysis in three generations of Wujie Black Muscovy (BMg9, BMg13 and BMg16) and three white Muscovy duck populations, including the 23rd generation of White Muscovy LRI 1 302 and 304 populations (L302g23 and L304g23), and minimal disease Muscovy duck (MDg12). The results showed that there were 6 to 8 Tsaiya duck-derived microsatellite markers with intermediate to high PIC (polymorphism information content) in different Muscovy duck populations. The average number of alleles in Wujie black Muscovy decreased from 3.2 (BMg9) to 3.0 (BMg16), the average observed heterozygosity decreased from 0.406 (BMg9) to 0.340 (BMg16), and the average expected heterozygosity also decreased from 0.466 (BMg9) to 0.420 (BMg16). There was a slight decrease in the genetic diversity of Wujie Black Muscovy, as the number of generations increased; however, the number of effective allele remained constant across generations while there was no differentiation or only slight differentiation between generations. On the other hand, the three white Muscovy duck populations had an average number of alleles ranging from 2.2 to 2.4 and an average number of effective alleles ranging from 1.6 to 1.7. The highest average observed heterozygosity was 0.358 (L304g23), the lowest was 0.287 (MDg12), and the highest average expected heterozygosity was 0.352 (L304g23), the lowest was 0.315 (L302g23). The 11 Tsaiya duck-derived microsatellite markers showed lower genetic diversities in all three white Muscovy duck populations, when compared with Wujie black Muscovy. However, most of the other markers, except for APT012 and APT033, showed outbreeding trends in the two populations of White Muscovy LRI 1, while three markers remained fixed in MDg12. The results of this study may apply to subsequent and regular genetic monitoring, as well as reference for other conservation research in promoting the sustainable management of Muscovy duck populations.

Key words: Tsaiya duck-derived microsatellite markers, Genetic diversity, Genetic structure, Muscovy duck.

(1) Contribution No. 2677 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Ilan Branch, COA-LRI, Ilan 26846, Taiwan, R. O. C.

(3) Department of Animal Science and Biotechnology, Tunghai University, No.1727, Sec. 4, Taiwan Blvd., Xitun District, Taichung 40704, Taiwan, R.O.C.

(4) Corresponding author, E-mail: yychang@mail.tlri.gov.tw.