

金刚鹦鹉性别的快速分子生物学鉴定

朱向蕾, 王瑛莹, 周立晨* (上海动物园, 上海 200335)

摘要 应用引物 2550F/2718R 对上海动物园内蓝黄金刚鹦鹉和红绿金刚鹦鹉的 *CHD* 基因进行 PCR 扩增, 进行性别鉴定。经过琼脂糖凝胶电泳发现: 雄性个体扩增出 1 条片段, 大小 647 bp; 雌性个体扩增出 2 条片段, 大小分别为 630 和 411 bp。蓝黄金刚鹦鹉群体的雌雄比为 10:17, 红绿金刚鹦鹉群体的雌雄比为 5:4。该方法能准确、快速、有效地进行 2 种金刚鹦鹉的性别鉴定, 为该鸟类种群饲养繁育提供基础性性别信息。

关键词 金刚鹦鹉; 性别鉴定; *CHD* 基因

中图分类号 S865.3⁵ 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)01-0099-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.01.025



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Rapid Molecular Biology Identification of the Sex of Macaw

ZHU Xiang-lei, WANG Ying-ying, ZHOU Li-chen (Shanghai Zoo, Shanghai 200335)

Abstract Primers 2550F/2718R were used to amplify *CHD* gene of *Ara ararauna* and *Ara chloropterus* in Shanghai Zoo by PCR. Agarose gel electrophoresis results showed that the male individuals amplified one band with the length of 647 bp, while the female individuals amplified two bands with the length of 630 and 411 bp respectively. The male-female ratio of *A. ararauna* was 10:17. The male-female ratio of *A. chloropterus* was 5:4. This method could accurately, quickly and effectively identify the sex of two species of macaw, and provide the basic sex information for the feeding and breeding of macaw population.

Key words Macaw; Sex identification; *CHD* gene

金刚鹦鹉隶属鹦形目鹦鹉科, 原产于美洲热带地区, 属于大型攀禽, 已列入《世界自然保护联盟》(IUCN) 濒危物种红色名录。目前国内多家动物园引入饲养金刚鹦鹉, 但其繁殖率较低, 种群质量堪忧。影响金刚鹦鹉繁殖的因素很多, 包括营养、激素水平、气候、温湿度、群体密度以及性别比例等。

性别作为基础信息, 是鸟类主要的生物学特征。鸟类性别不仅会影响繁殖配对和育种, 而且会对饲养管理、遗传疾病防治、生态学、种群遗传分析以及濒危珍稀鸟类的保护研究等方面具有重要影响^[1-2]。然而, 世界上超过 50% 的鸟类属于单态性鸟类, 雌雄同型, 该类型鸟类无论成鸟还是幼鸟均很难从外观形态上进行性别判定^[3], 金刚鹦鹉亦是如此。鹦鹉性别鉴定的方法有很多。吴建民等^[4]总结了目前鹦鹉性别鉴定的常用技术方法, 包括形态学方法(行为判定、翻肛判定、外科手术判定、排泄物类固醇判定、叫声判定、体尺测量判定、羽色伴性遗传判定等)、细胞生物学方法、分子生物学方法(随机多态性 DNA、微卫星、小卫星)等方法。然而, 这些方法的成功与否取决于实验室基础设施和研究人员的专业知识及经验积累, 有的过程烦琐, 耗时较长, 因此探索快速、准确、有效的鉴定方法对于珍稀鸟类饲养管理与繁育工作十分必要。

以 *CHD* 基因(chromobox-helicase-DNA binding gene)为基础的分子生物学方法已经被广泛应用于非平胸目鸟类的性别鉴定中^[5]。*CHD* 基因全称为染色体螺旋蛋白基因, 属于功能性基因, 非平胸目鸟类有 2 个同源拷贝 *CHD-W* 和 *CHD-Z*, 雄性个体只有 1 个拷贝 *CHD-Z*; 琼脂糖凝胶电泳

果只显示 1 条条带, 雌性个体有 2 个拷贝 *CHD-Z* 和 *CHD-W*, 可显示出 2 条条带, 双阳性的带型特征排除了假阴性的可能, 结果准确可靠^[6], 可作为鸟类性别鉴定的有效方法。

目前, 尚未见到国内有针对金刚鹦鹉的性别鉴定相关报道。笔者通过分子生物学手段在已有研究的基础上, 采用非损伤性取样的方式快速、准确地鉴定蓝黄金刚鹦鹉(*Ara ararauna*) 和红绿金刚鹦鹉(*Ara chloropterus*) 的性别, 以期为今后动物园进一步开展金刚鹦鹉的饲养管理、繁殖育种及物种保护奠定理论和技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集 采集上海动物园内正常饲养的 36 只金刚鹦鹉的羽毛, 其中蓝黄金刚鹦鹉 27 只, 红绿金刚鹦鹉 9 只。采集样品均为鸟类胸部羽毛, 确保羽根完整, 常温干燥保存或 -80 °C 下长期冷冻保存。

1.1.2 主要试验设备与试剂 主要试验设备有凝胶成像系统(Tanon 1600)、PCR 仪(Jena Biometra TRIO)、电泳仪(Tanon EPS 300)、电泳槽、移液枪(Eppendorf)等。主要试剂: MightyAmp™ DNA Polymerase Ver. 3 Kit、50 bp DNA Ladder Marker、6× Loading Buffer 均购自宝生物工程(大连)有限公司。引物 2550 F(5'-GTTACTGATTCGTCTACGAGA-3') 和 2718R(5'-ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3')^[7] 由英潍捷基公司合成。

1.2 PCR 反应 应用引物 2550F 和 2817R 对 *CHD* 基因进行扩增, PCR 反应体系为 20 μL, 各组分浓度按试剂盒推荐体系设置, 其中样本 DNA 剪取 1 mm 长 2~3 段羽根, 补充 ddH₂O 至 20 μL。退火温度为 48 °C, PCR 反应在 PCR 仪上进行。

1.3 琼脂糖凝胶电泳

1.3.1 琼脂糖凝胶的制备 琼脂糖凝胶浓度为 1.5%, 用电

基金项目 上海市绿化和市容管理局科研专项(GZ180409); 上海动物园科技攻关项目(SZ170305)。

作者简介 朱向蕾(1985—), 女, 河北冀州人, 工程师, 硕士, 从事野生动物科学研究工作。* 通信作者, 工程师, 博士, 从事野生动物科学研究工作。

收稿日期 2021-04-19

子天平称取琼脂糖 4.5 g,加入锥形瓶中,添加 30 mL 1×TAE 后将锥形瓶置于微波炉中加热,沸腾直至琼脂糖完全溶解。用流水将锥形瓶中液体冷却至 50~60 ℃,加入 EB 染料 4 μL,混匀,倒入凝胶模具中,室温放置 30 min 以上,备用。

1.3.2 琼脂糖凝胶电泳。PCR 扩增产物中添加 6×Loading Buffer 2~3 μL,混匀后取 10 μL 上样,在 1.5%的琼脂糖凝胶上 120 V 稳压,电泳 35 min,电泳完毕后,通过凝胶成像系统进行拍照并记录结果。产物为 1 条条带的为雄性个体,产物为 2 条条带的为雌性个体,电泳产物由宝生物工程(大连)有限公司进行测序。

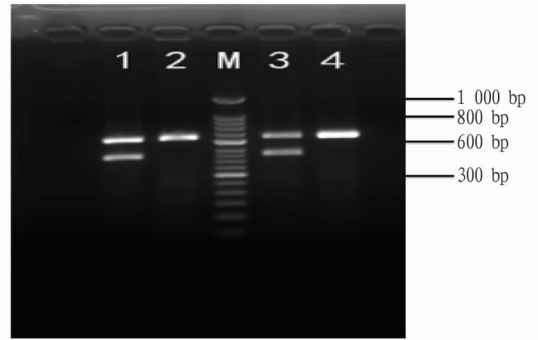
2 结果与分析

2.1 羽根样品 PCR 检测及方法的有效性验证 以已知性别的蓝黄金刚鹦鹉和红绿金刚鹦鹉为例,分别以血液抽提的 DNA 和羽根样品为模板,利用 2550F/2718R 引物扩增金刚鹦鹉的 *CHD* 基因片段,验证以羽根为样品直接进行 PCR 检测的有效性和可靠性。

如图 1 所示,2 种金刚鹦鹉的雄性个体均扩增出 1 条条带,经克隆测序与 GenBank 数据库中登录序列比对,大小为 647 bp;雌性个体均扩增出 2 条条带,一条为 630 bp,另一条为 411 bp。2 种金刚鹦鹉血液组 DNA 与羽根样品 PCR 扩增结果相一致,且与已知性别结果相吻合。从电泳结果来看,以未经核酸提取纯化的羽根为模板扩增得到的 PCR 产物条带清晰度和产物浓度与血液组 DNA 相比无明显差异,也无明显非特异性扩增,可用于该种金刚鹦鹉的性别鉴定。

2.2 金刚鹦鹉的性别鉴定 利用引物 2550F/2718R 对金刚鹦鹉种群中未知性别的个体进行性别鉴定,结果如图 2 所示。从图 2 可以看出,条带大小与已知性别条带大小相同,准确率达 100%。红绿金刚鹦鹉群体中雌性 5 只、雄性 4 只,雌雄比为 5:4;蓝黄金刚鹦鹉群体中雌性 10 只、雄性 17 只,

雌雄比为 10:17。



注:1,2 为蓝黄金刚鹦鹉,3,4 为红绿金刚鹦鹉,M 为 50 bp DNA Ladder Marker

Note:1,2. *A. ararauna*;3,4. *A. chloropterus*;M. 50 bp DNA Ladder Marker

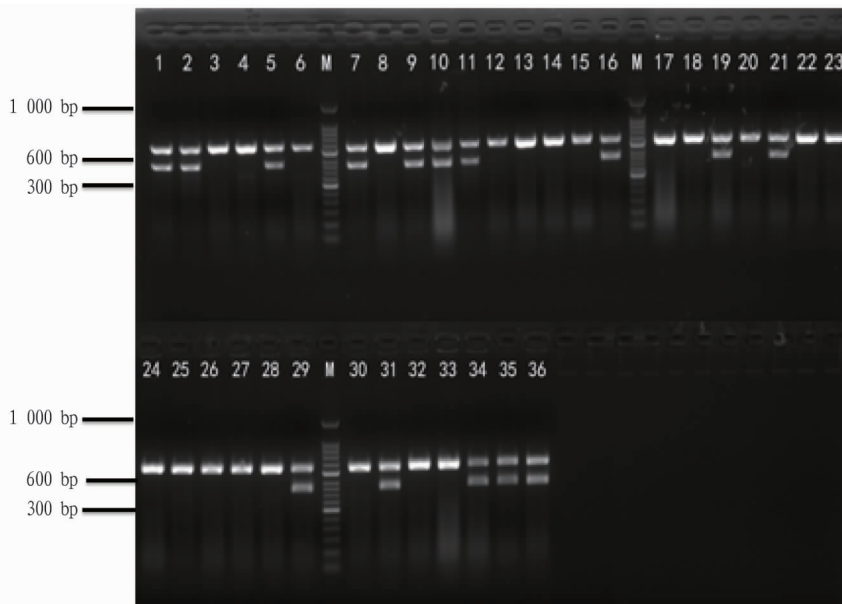
图 1 金刚鹦鹉 *CHD* 基因扩增结果

Fig.1 The amplification results of *CHD* gene in macaw

3 讨论

世界上鸟类资源丰富,且大多为单态性鸟类。金刚鹦鹉羽毛色彩艳丽,深受人们的喜爱,但是其性别无论是幼鸟还是成鸟均很难从外观判别,种群中性别结构难以判定,给繁殖配对造成了一定的困扰,也给鸟类管理和保护、鸟类生态学、行为学研究等方面带来不便,因此鸟类的性别鉴定对于金刚鹦鹉这种珍稀鸟类的繁殖育种、保护研究具有重要意义。

随着分子生物学技术的发展,利用 PCR 方法进行鸟类的性别鉴定已取得突破性进展,基于性染色体上特定基因 *CHD* 同源拷贝的大小差异,应用 PCR 技术进行鸟类性别鉴定的方法已经被应用于多种动物保护繁育的研究中。Griffiths 等^[8]从小蓝金刚鹦鹉的羽毛中提取 DNA,并利用引物



注:1~27 为蓝黄金刚鹦鹉,28~36 为红绿金刚鹦鹉,M 为 50 bp DNA Ladder Marker

Note:1-27. *A. ararauna*;28-36. *A. chloropterus*;M. 50 bp DNA Ladder Marker

图 2 金刚鹦鹉性别鉴定结果

Fig.2 Sex identification results of macaw

(P1、P2、P3)进行PCR扩增,结合限制性内切酶 *DdeI* 对其进行性别鉴定,但其花费时间较长。Cerit 等^[9]利用引物 P2/P8 对鸡尾鹦鹉进行了性别鉴定,结果发现 P2/P8 引物对于一些目的片段相近的条带难以区分,亦需要通过限制性内切酶来分离目的条带,过程比较烦琐。胡锐颖等^[10]、田秀华等^[11]应用引物 2550F/2718R 对大多数鹤形目、鸊形目鸟类进行了性别鉴定,目前尚未见到将该引物应用于鸊形目鸟类金刚鹦鹉的相关报道。

该研究应用 2550F/2718R 引物对金刚鹦鹉羽毛样本的 *CHD-W* 基因进行 PCR 扩增,采集样本为非侵入性且不需麻醉即可获得的羽毛,尤其针对金刚鹦鹉这种珍稀鸟类更应避免和减少对鸟类的损伤和应激,且羽毛样本采集、保存和运输等都十分方便,结合分子生物学快速、准确的特点,简化了 DNA 提取的步骤,使得性别鉴定用时更少,鉴定结果更准确可靠,效率更高,有很好的可靠性,为该物种在分子水平上进行性别鉴定奠定了基础^[12-13]。

该研究检测了上海动物园蓝黄金刚鹦鹉和红绿金刚鹦鹉的群体性别结构,其雌雄比分别为 10:17 和 5:4,蓝黄金刚鹦鹉中雄性较多,繁殖配对难以均衡,种群中雄性过多也容易引发打斗,尤其是繁殖季节容易造成外伤、应激等不利影响,在一定程度上不利于种群发展,建议优化雌雄比,因为较高的雌性比例更有利于提高种群的繁殖潜力。

(上接第 98 页)

为管理是主动提高动物福利的有效措施,动物福利是动物园一切运营活动的基础,动物园的核心职能是物种保护,但核心行动是保持动物处于积极的福利状态。

在现代动物园中,动物行为越来越受到关注,动物园亚洲象行为管理也逐渐发展成为一套由多个组件构成的管理方法。行为管理的运行能够在有限的人工圈养环境中尽可能地满足动物的复杂需求,在生理层面和心理层面同时提高动物福利。行为管理是五项组件的综合运用,其中任何一项工作的进步都会促进其他方面的协同进步。同样地,任何一个组件的不足也必然导致其他组件的功能受阻。行为管理的各项组件都与饲养员有密切的关系,主要体现在饲养员的日常操作中,是以饲养员为主力、为圈养亚洲象提供最佳照顾的工作方式。

保护大象这一物种不仅保存了该物种的基因多样性,而且需要为大象提供和保护它们学习“象群文化”和自然行为的环境。同大型类人猿一样,大象行为不仅仅来源于本能,也需要通过后天学习,做到真正的“保护”,而不仅仅是“保存”,圈养象群中许多自然学习的行为和文化要素应该尽可能地维持下去。

参考文献

- [1] ITO H, SUDO-YAMAJI A, ABE M, et al. Sex identification by alternative polymerase chain reaction methods in Falconiformes [J]. *Zoological science*, 2003, 20(3): 339-344.
- [2] JENSEN T, PERNASETTI F M, DURRANT B. Conditions for rapid sex determination in 47 avian species by PCR of genomic DNA from blood, shell-membrane blood vessels, and feathers [J]. *Zoo biology*, 2003, 22(6): 561-571.
- [3] GRIFFITHS R, DOUBLE M C, ORR K, et al. A DNA test to sex most birds [J]. *Molecular ecology*, 1998, 7(8): 1071-1075.
- [4] 吴建民, 梁靓, 王建发, 等. 鸊鹚性别鉴定方法的研究进展 [J]. *畜牧与饲料科学*, 2018, 39(12): 37-40.
- [5] 刘铸, 白素英, 田秀华. CHD 基因与非平胸鸟类性别鉴定 [J]. *生物技术通报*, 2006(S1): 147-150.
- [6] 包文斌, 胡飞, 徐琪, 等. 鸟类性别鉴定的分子生物学方法 [J]. *中国畜牧兽医*, 2007, 34(10): 33-36.
- [7] FRIDOLFSSON A K, ELLEGREN H. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds [J]. *Journal of avian biology*, 1999, 30(1): 116-121.
- [8] GRIFFITHS R, TIWARI B. Sex of the last wild spix's macaw [J]. *Nature*, 1995, 375: 454.
- [9] CERIT H, AVANUS K. Sex identification in avian species using DNA typing methods [J]. *World's poultry science journal*, 2007, 63(1): 91-100.
- [10] 胡锐颖, 耿昕, 马珺, 等. 一种简单通用的鸟类性别分子鉴定技术 (简报) [J]. *实验生物学报*, 2003, 36(5): 401-404.
- [11] 田秀华, 刘铸, 何相宝, 等. 7 种鸊鹚目鸟类性别的分子鉴定 [J]. *动物学杂志*, 2006, 41(5): 62-67.
- [12] BELLO N, FRANCINO O, SÁNCHEZ A. Isolation of genomic DNA from feathers [J]. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 2001, 13(2): 162-164.
- [13] SEGELBACHER G. Noninvasive genetic analysis in birds: Testing reliability of feather samples [J]. *Molecular ecology notes*, 2002, 2(3): 367-369.

参考文献

- [1] 张立. 中国亚洲象现状及研究进展 [J]. *生物学通报*, 2006, 41(11): 1-3, 64.
- [2] 张恩权, 李晓阳, 古远. 动物园野生动物行为管理 [M]. 北京: 中国建筑工业出版社, 2018: 35.
- [3] 张恩权, 李晓阳, 古远. 动物园野生动物行为管理 [M]. 北京: 中国建筑工业出版社, 2018: 44.
- [4] 张恩权, 李晓阳, 古远. 动物园野生动物行为管理 [M]. 北京: 中国建筑工业出版社, 2018: 41-44.
- [5] 徐正强, 裴恩乐, 张峰. 圈养野生动物饲养管理的原理和技术 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2014: 105.
- [6] DESMOND T, LAULE G. Use of positive reinforcement training in the management of species for reproduction [J]. *Zoo biology*, 1994, 13(5): 471-477.
- [7] FAGEN A, ACHARYA N, KAUFMAN G E. Positive reinforcement training for a trunk wash in Nepal's Sorking elephants: Demonstrating alternatives to traditional elephant training techniques [J]. *Journal of applied animal welfare science*, 2014, 17(2): 83-97.
- [8] FOWLER M E, MIKOTA S K. *Biology, medicine, and surgery of elephants* [M]. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2008.
- [9] 祝朝台, 马晓萍, 钱程, 等. 圈养大熊猫的部分行为训练 [J]. *野生动物学报*, 2019, 40(2): 463-466.
- [10] 雷钧, 卫泽珍, 刘珑, 等. 黑猩猩正强化行为训练探讨 [J]. *野生动物学报*, 2019, 40(1): 182-186.
- [11] 董文杰, 孙洋, 魏韵清, 等. 圈养东北虎尾部采血训练 [J]. *当代畜牧*, 2020(4): 53-55.
- [12] 张恩权, 李晓阳, 古远. 动物园野生动物行为管理 [M]. 北京: 中国建筑工业出版社, 2018: 235-237.