



张苗爽,郭屹凡,吴丽峰,李竞一. 江汉鸡羽毛花纹新性状“心形镶边羽”的遗传规律解析[J]. 中国农业大学学报,2025,30(04):142-153.
ZHANG Miaoshuang, GUO Yifan, WU Lifeng, LI Jingyi. Inheritance pattern of the new plumage pattern trait “heart-shaped lacing feather” in Jianghan chickens[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2025, 30(04): 142-153.
DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2025.04.12

江汉鸡羽毛花纹新性状“心形镶边羽”的遗传规律解析

张苗爽¹ 郭屹凡¹ 吴丽峰² 李竞一^{1*}

(1. 华中农业大学 动物科学技术学院, 武汉 430070;
2. 湖北欣华生态畜禽开发有限公司, 湖北 安陆 432600)

摘要 为解析江汉鸡“心形镶边羽”(即羽毛末端边缘真黑色素心形沉着)的遗传规律,本研究主要利用大群检测以及构建资源家系2种方法,对江汉鸡“心形镶边羽”表型与其候选基因(*GJA5*、*SOX10*和*MC1R*)的相关突变进行关联分析。结果表明:1) *SOX10*基因上游缺失与江汉鸡“心形镶边羽”性状关联不显著($P>0.05$)。2) *MC1R*基因中4个错义突变(Met71Thr、Glu92Lys、Ala143Thr和His215Pro)及其组成的单倍型均与羽毛中是否有真黑色素沉着显著相关($P<0.05$)。3)在经*MC1R*调控而使羽毛具备真黑色素的沉着能力的前提下,真黑色素沉着的位置主要受*GJA5*基因上游缺失插入突变的影响,因此*GJA5*突变对“心形镶边羽”起主要决定作用($P<0.01$),并表现部分显性遗传以及从性遗传现象。4)联合分析显示:*MC1R*突变对*GJA5*突变存在上位互作效应。5)经过筛选得出*MC1R*的92号氨基酸位点为突变或者杂合型且143号位点野生型,同时*GJA5*上游为突变型时,心形镶边羽的比例最大(85.19%),并以此制定了先挑选表型再检测*MC1R*的2个错义突变最后检测*GJA5*突变的心形镶边羽分子选育方案。本研究通过对心形镶边羽遗传规律的解析,奠定了培育具有“心形镶边羽”的特色地方鸡品种的基础,充分发挥羽色标签性状的作用,增加江汉鸡淘汰蛋鸡的市场竞争力。

关键词 江汉鸡; 心形镶边羽; 分子育种; *GJA5*; *MC1R*

中图分类号 S831.2

文章编号 1007-4333(2025)04-0142-12

文献标志码 A

Inheritance pattern of the new plumage pattern trait “heart-shaped lacing feather” in Jianghan chickens

ZHANG Miaoshuang¹, GUO Yifan¹, WU Lifeng², LI Jingyi^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
2. Hubei Xinhua Ecological Livestock Development Co., Ltd., Anlu 432600, China)

Abstract The purpose of this study was to explore the inheritance pattern and mechanism underlying a newly reported phenotype, namely “heart-shaped lacing feather”, in Jiang Han chickens. This phenotype consists of a heart-shaped eumelanin pattern at the end edge of a feather. In this study, the associations between the phenotypes of heart-shaped lacing feather and its candidate mutations (related mutations of *GJA5*, *SOX10*, and *MC1R* genes) were analyzed mainly through two methods: testing in a large population and in a constructed resource family, followed by the establishment of a molecular breeding protocol for “heart-shaped lacing feather” chickens. The results showed that: 1) There was no significant association between the upstream deletion of *SOX10* gene and the trait of “heart-shaped bordered feather” in Jianghan chicken ($P>0.05$). 2) Four missense mutations in *MC1R* gene (Met71Thr, Glu92Lys, Ala143Thr, and

收稿日期: 2024-03-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(32202663);湖北省重点研发计划项目(2021BBA234)

第一作者: 张苗爽(ORCID: 0009-0007-8804-230X), 硕士研究生, E-mail: zhangmiaoshuang@webmail.hzau.edu.cn

通讯作者: 李竞一(ORCID: 0000-0001-6775-5190), 副研究员, 主要从事家禽遗传与育种研究, E-mail: lijingyi@mail.hzau.edu.cn

His215Pro) and the haplotypes formed by them were all significantly correlated with eumelanism in feathers ($P<0.05$). 3) In the feathers with the ability to deposit eumelanin, mediated by *MC1R*, the specific position of eumelanin in feathers were mainly affected by the indel mutation in the upstream of *GJA5* gene. Thus, the *GJA5* mutation played a major role in determining the “heart-shaped feather” ($P<0.01$), and showed partial dominant inheritance and sex-influenced inheritance; 4) Joint analysis showed that *MC1R* mutations had epistatic effects on *GJA5* mutation; 5) After screening, it was found that individuals with mutated or heterozygous *MC1R* 92 amino acid site, wild-type 143 site, and mutant of *GJA5* upstream, have the largest proportion of heart-shaped feathers (85.19%). Therefore, the molecular breeding protocol for heart shaped lacing feather chickens, consists with selection by phenotype, then the 2 *MC1R* missense mutations, then *GJA5* mutation, were established. This study identified the inheritance pattern of heart-shaped lacing feathers, which laid a foundation for breeding of domestic chickens with this phenotype, giving full play to the role of feather as a labelling trait, and increasing the competitiveness for the spent hens of Jiangnan chicken.

Keywords Jiang Han chicken; heart-shaped lacing feather; molecular breeding; *GJA5*; *MC1R*

鸡的羽色性状可以分为整体羽色与羽毛内花纹。常见的整体羽色包括白羽^[1-4]、黑羽和黄羽,而羽毛内花纹的本质为真黑色素(黑或灰色)与褐黑色素(黄或褐色)在羽毛内部的分布情况^[5]。目前关于鸡羽毛内花纹的研究大部分集中在国外鸡种,例如斑点、常染色体横斑、鹧鸪纹、单镶边、双镶边、闪点等^[6-7],且已报道了与其对应的部分因果突变^[8-11]。根据 Smyth^[6]的总结,影响家鸡羽毛内花纹的突变主要有 *E*、*Pg*、*Ml*、*Db* 和 *Co*。而已知 *E* 的因果突变是黑素皮质素受体 1 (Melanocortin 1 receptor, *MC1R*) 基因的相关突变^[10], *Pg* 也是 *MC1R* 基因^[11], *Ml* 是缝隙连接蛋白 $\alpha 5$ (Gap junction protein alpha 5, *GJA5*)^[8], *Db* 是 *SOX10* (SRY-box transcription factor 10, 性别决定区盒基因)^[9], 而 *Co* 尚未被定位。

而国内关于羽毛内花纹的研究甚少。我国本地鸡种的羽毛花纹具有重大经济价值,例如清远麻鸡因历史悠久、肉质鲜美作为广东省三大名鸡之一受到较多关注,其羽毛花纹是消费者心目中的商品标签之一^[12]。江汉鸡是湖北省的优质蛋鸡,以产蛋著称,但将淘汰的蛋鸡在活禽市场上作为肉用出售,也是符合人们食用老母鸡汤的饮食习惯。新的羽毛花纹性状具有标签性状的作用,期望未来培育出具有较高淘汰鸡价格的优质蛋鸡品系,提升市场竞争力。本课题组之前在湖北省本地鸡种的江汉鸡群体中发现了一种新的羽毛表型,命名为“心形镶边羽”^[13]。因此,本研究拟通过已有报道的与家鸡羽毛内花纹相关的 3 个基因,即 *MC1R*、*GJA5* 和 *SOX10* 基因的相关突变作为“心形镶边羽”的候选突变,进行基因型与表型的关联分析,以探究心形

镶边羽这一独特的地方鸡羽毛花纹的遗传机制。为培育出区分度更高、群体变异更小的具有独特表型的江汉鸡品种提供理论基础,构建出可以稳定遗传“心形镶边羽”的地方鸡品系后便可充分发挥羽色标签性状的作用,提升淘汰蛋鸡的市场竞争力,以进一步提高江汉鸡的经济价值。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究从湖北欣华生态畜禽开发有限公司的江汉鸡保种群中随机选择了 298 羽母鸡个体与 4 羽公鸡个体,并对所有母鸡血液样品进行采集与拍照记录。其中的公鸡与 4 羽母鸡用于建立资源家系,剩下的 294 羽母鸡用于大群检测。根据胸部羽毛是否有真黑色素沉积,以及有真黑色素沉积的羽毛中真黑色素是否分布于羽毛边缘,将个体分为“无真黑色素沉着”(图 1(a))、“边缘真黑色素沉着(即心形镶边羽)”(图 1(b))、“非边缘真黑色素沉着”3 类(图 1(c))。

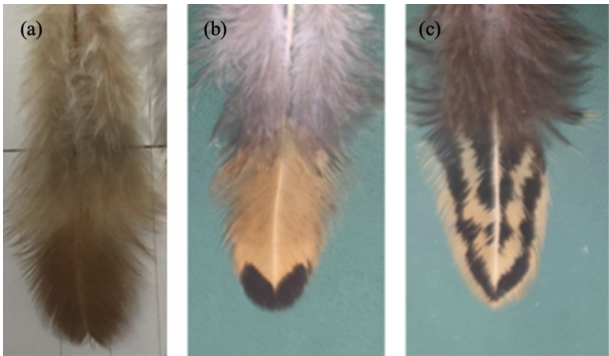
1.2 试验方法

1.2.1 采样与 DNA 提取

将每个样本的 200 μL 的血液样品置于含有 15 μL 4% 柠檬酸钠抗凝剂的 EP 管中, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。使用 DNeasy Blood and Tissue 试剂盒 (QIAGEN) 提取所需样本的 DNA。

1.2.2 PCR 和琼脂糖凝胶电泳

以提取的 DNA 为模板,将配制好的 10 μL 反应体系放入 PCR 仪中进行反应,预变性 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5 min,第一轮循环 14 次(变性 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、15 s,退火 $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、15 s,且每次



(a)无真黑色素沉着;(b)边缘真黑色素沉着羽毛(即心形镶边羽);(c)非边缘真黑色素沉着。
(a)No eumelanin deposition;(b) Eumelanin deposited at the edge (i. e., heart-shaped lacing feather);(c) Eumelanin deposited but not at the edge.

图1 采样羽毛表型分类

Fig. 1 Phenotypic classification of sampled feathers

循环温度降低1℃,延伸72℃、30 s),第二轮循环25次(变性94℃、15 s,退火55℃、15 s,延伸72℃、30 s),终延伸72℃、5 min。体系所用引物见表1,其中GJA5-F1引物与GJA5-R的扩增片段为108 bp,GJA5-F2引物与GJA5-R的扩增片段为133 bp;SOX10-F引物与

SOX10-R1的扩增片段为611 bp,SOX10-F引物与SOX10-R2的扩增片段为1 257 bp。每批次的检测均附加已知基因型的阳性对照以及阴性对照(空白对照)。反应完成后GJA5基因和SOX10基因分别使用3%和1.5%琼脂糖凝胶电泳观察成像。

表1 用于扩增片段长度多态性基因分型的PCR引物序列

Table 1 Sequences of PCR primers for amplified fragment length polymorphisms

目标基因 Target gene	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	引物长度/bp Primer length
GJA5	F1: GAGGGTCAAAGAGAGTGCATGA	22
	R1: GTATAAATTGAATGCAAATGCAAGG	25
	F2: 10N+CAGGTTAGATGCTTATTAACTACTGCTTA	40
SOX10	R1: CCTTGTGGAGACCAGGTGTT	20
	F1: CCTTTGTCTTAAGGCTCCTCTTT	23
	R2: TGCTGAGACATTTGCTGACA	20

注:GJA5突变的检测引物为本研究设计;SOX10突变的检测引物序列来自文献[9]。“10N+”表示5'端的10个随机碱基序列,以增大扩增产物长度。

Note: The detection primers for GJA5 mutations are designed in this study, and the sequences of detection primers for SOX10 mutations are from the literature [9]. “10N+” represents 10 random base sequences to increase the length of the product.

1.2.3 一代测序

一代测序主要用于试验前期对GJA5基因型判定结果进行复核,以及利用混池对MC1R基因的多个SNP突变位点进行初步筛选。测序引物见表2。扩增后样品由北京擎科生物科技有限公司进行一代测序。

1.2.4 KASP基因分型

根据LGC Genomics公司开发的KASP基因分型技术^[14],将配制好的5 μL体系后置置于CFX384实时定量PCR仪中进行反应,预变性94℃、15 min,第一轮循

环9次(变性94℃、20 s,退火延伸61℃、60 s,且每次循环退火温度降低1℃),第二轮循环33次(变性94℃、20 s,退火延伸55℃、60 s),终延伸37℃、60 s,然后仪器记录荧光量,每个样本设置2个重复。根据预试验的结果筛选出来的KASP引物见表3。

1.2.5 构建GJA5基因型分离资源家系

对298羽江汉鸡母鸡进行了检测,发现GJA5与“心形镶边羽”表型高度关联,且国内也未有对江汉鸡GJA5基因的相关研究,故从中挑选个体建立了资源

表 2 PCR-Sanger 测序引物序列

Table 2 PCR-Sanger sequencing primer sequences

目标基因 Target gene	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	产物大小/bp Product size
<i>GJA5</i>	F: AAGCGGGAATGCACAACTAC	709
	R: GAGTCCAACAGCGTGAGTGA	
<i>MC1R</i>	F: CTTTGTAGGTGCTGCAGTTGTG	1 049
	R: ATCCATCCATCCTCCTGTCTGT	

表 3 *MC1R* 与表型关联 4 个 SNP 的 KASP 基因分型引物序列Table 3 Primer sequences of KASP genotyping for the four *MC1R* SNP associated with the phenotypes

基因 Gene	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	引物长度/bp Primer length
<i>MC1R</i> -M71T	F1:GAAGGTGACCAAGTTCATGCTACAGGAATCTGCACTCGCCCAT	43
	F2:GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTCAGGAATCTGCACTCGCCCAC	42
	R:CGGCCAGGCAGCAGATGAAGTA	22
<i>MC1R</i> -E92K	F1:GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCAGCAGCATGAAGAGCGTCTC	42
	F2:GAAGGTCGGAGTCAACGGATTATCAGCAGCATGAAGAGCGTCTT	44
	R:GACATGCTGGTGAGCGTCAGCAA	23
<i>MC1R</i> -T143A	F1:GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCCGTGGACCGCTACATCA	40
	F2:GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGCCGTGGACCGCTACATCG	40
	R:TAGCGCAGCGCATAGAAGATGG	22
<i>MC1R</i> -H215P	F1:GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGAGATGCTGCGCACGT	38
	F2:GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCTGGAGATGCTGCGCACGG	40
	R:CTCATGCTGGTGCTCTACATTACAT	26

家系,即 4 羽 *GJA5* 的突变杂合母鸡与同一群体的 4 羽随机公鸡进行交配后,将获得的 2 羽杂合的 F1 公鸡和 2 羽杂合母鸡进行配种,共获得 21 羽 F2 后代(6 羽 *GJA5* 野生型、10 羽杂合、5 羽突变型)。对资源家系的所有个体进行血样采集与提取、表型记录、*MC1R* 与 *SOX10* 基因分型。

1.2.6 统计检验

采用卡方适合度检验判定基因型与表型的关系, $P<0.05$ 表示显著关联, $P<0.01$ 表示极显著关联, $P>0.05$ 表示关联不显著。

2 结果与分析

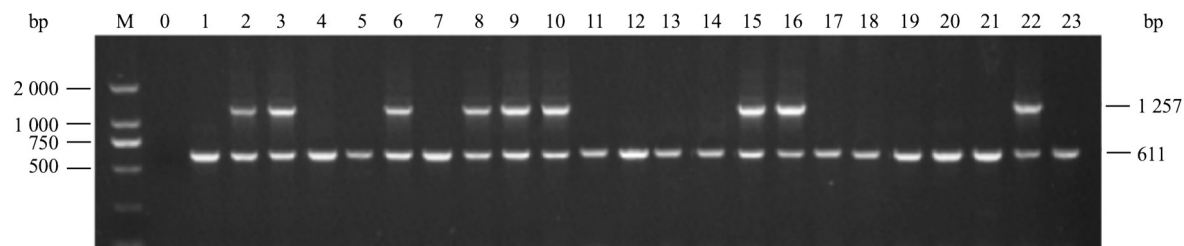
2.1 *SOX10* 与“心形镶边羽”表型的关联分析

在 323 羽大群(包含了 *GJA5* 资源家系 29 羽)中检

测 *SOX10* 的上游缺失突变(图 2),基因型结果显示 285 羽为野生型,38 羽为杂合型,且各基因型均覆盖 3 种表型,没有检测出突变型个体(表 4)。结果显示,*SOX10* 基因与表型“心形镶边羽”的关联差异不显著($P>0.05$)。

2.2 *MC1R* 与“心形镶边羽”的关联分析

在 323 羽个体中,对改变 *MC1R* 基因 71 号、92 号、143 号、215 号氨基酸位点的错义突变进行 KASP 基因分型检测(图 3),71 号氨基酸位点检出率为 99.07%,92 号氨基酸位点检出率为 99.70%,143 号和 215 号氨基酸位点检出率均为 100%。基于设置的重复样本,可见 KASP 对 SNP 的检测结果高效可靠,且其操作过程适合高通量的检测。结果显示在 71 号、92 号和 215 号氨基酸位点为突变型或



M 代表 Marker(2000 Marker);0 表示阴性对照;2、3、5、6、8、9、10、15、16、22 各有 2 条带,为杂合型;1、4、5、7、11~14、17~21、23 各只有 611 bp 一条带,为野生型。
M represents Marker (2000 Marker); Lane 0 indicates a negative control; in each of 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 15, 16, and 22, there are two bands, indicating heterozygote; in each of 1, 4, 5, 7, 11-14, 17-21, and 23 lanes, there is only a 611 bp band, indicating wild-type.

图 2 大群验证个体中 *SOX10* 突变的鉴定

Fig. 2 Genotyping of the *SOX10* mutation in the large population.

表 4 大群体 *SOX10* 基因型与表型统计

Table 4 Statistics of *SOX10* genotypes and phenotypes in the large population

<i>SOX10</i> 基因型的个体数 Number of individuals of <i>SOX10</i> genotype	边缘真黑色素沉着 Marginal eumelanin	非边缘真黑色素沉着 Non-marginal eumelanin	无真黑色素沉着 No eumelanin	总计 Total	卡方值 Chi-square value	χ^2 检验 <i>P</i> 值 <i>P</i> value of Chi-square test
野生 Wild type	97	97	91	285	0.344	
杂合 Heterozygote	15	16	7	38	2.58	
突变 Mutation	0	0	0	0	0	
总计 Total	112	113	98	323	2.92	0.231

杂合型,以及 143 号氨基酸位点为野生型的个体中,无真黑色素沉着的个体较少(表 5)。通过统计学检验,4 个突变位点均显示与羽毛真黑色素沉着极显著关联($P<0.01$),且主要与是否有真黑色素沉着有关,而非真黑色素沉着的位置(边缘或非边缘)。

由于 *MC1R* 的 4 个位点之间存在连锁,因此进一步进行了单倍型分析,其中 250 羽个体组成了 4 种主要的单倍型组合,以及所有位点均为野生型的 H0(表 6),另外的 73 羽各自的单倍型频率较低,故不参与分析。结果显示,单倍型 H2(即 143 号位点突变)抑制真黑色素的沉着,且对 H1 单倍型表现为显性,而其他单倍型(除野生型的 H0 外),均与真黑色素的沉着显著关联($P<0.01$)。

2.3 *GJA5* 与“心形镶边羽”的关联分析

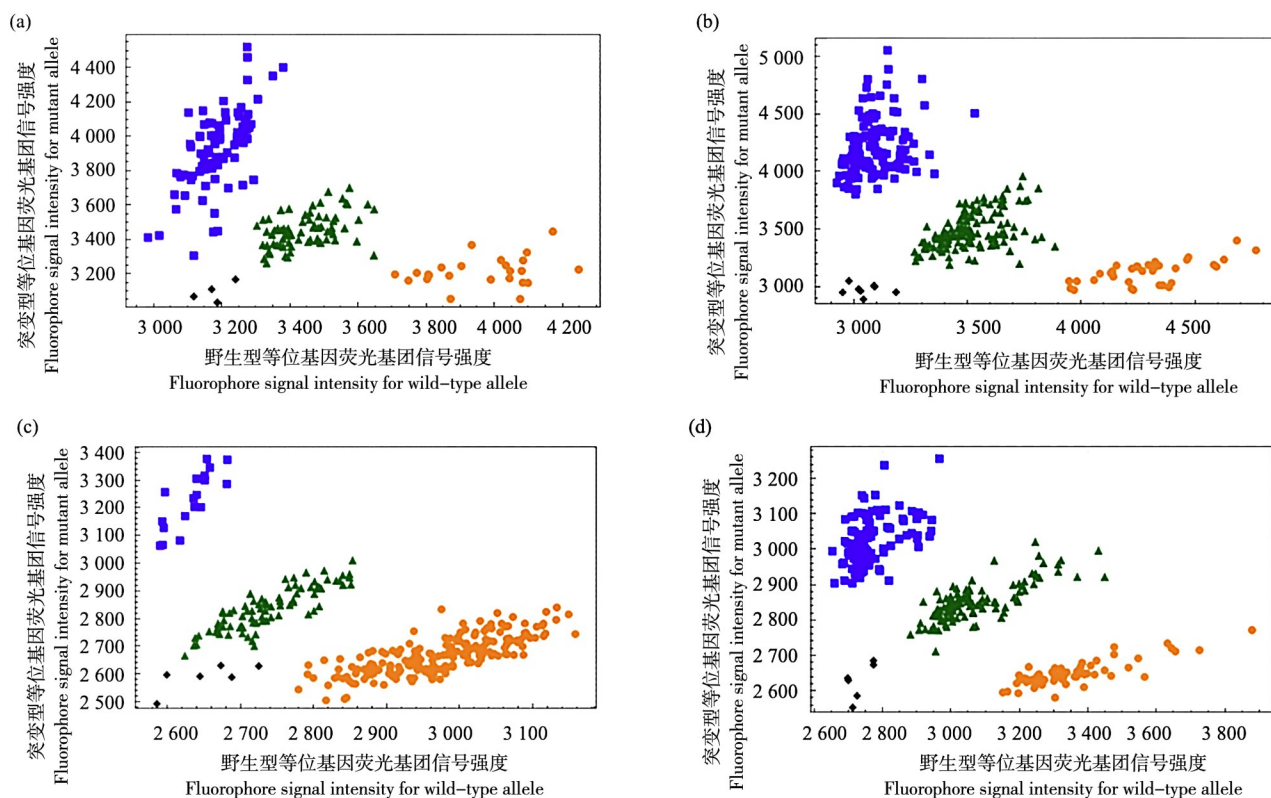
对整个资源家系的基因型与表型进行关联,发现所有具有边缘真黑色素沉着,即“心形镶边羽”表型的个体($n=18$)均为 *GJA5* 基因的突变型或杂合型,且其他表型中($n=11$)未发现 *GJA5* 基因的突变纯合,得出 *GJA5* 基因为影响羽毛边缘真黑色素沉着的关键基因这一结论,且存在显性效应。根据 294 羽大群体和 29 羽资源家系的检测结果(图 4),*GJA5* 突变与“心形镶

边羽”表型存在显著关联($P<0.01$,表 7)。对资源家系中的杂合子个体进一步分析发现,杂合子公鸡全部表现为边缘黑色素沉着,杂合子母鸡则表现出不同的表型,出现从性遗传现象(表 8)。

2.4 *MC1R* 对 *GJA5* 存在上位互作效应

在确定 *GJA5* 和 *MC1R* 与“心形镶边羽”有关联后,对各自有基因型效应的 *GJA5* 突变和 *MC1R* 突变进行了联合分析,以探究两者之间的互作关系。根据羽毛是否有真黑色素沉积,以及有真黑色素沉积的羽毛中真黑色素是否分布于羽毛边缘两种表型分类进行比较,结果通过三维柱状图进行展示:*X* 轴为 *GJA5* 基因型,*Y* 轴代表 *MC1R* 基因型,*Z* 轴数值代表某一表型个体占该基因型总个体数的百分比。各图中沿 *X* 轴方向比较结果显示, *GJA5* 突变对真黑色素是否沉着无明显影响(图 5),沿 *Y* 轴比较发现 *MC1R* 基因 71 号(图 5(a))和 92 号(图 5(b))氨基酸位点突变型、143 号氨基酸位点野生型(图 5(c))、215 号氨基酸位点的野生型和突变型(图 5(d))真黑色素沉着比例大,特别是 143 号位点野生型的作用较明显。

进一步对真黑色素在羽毛中沉着的不同位置



(a) *MC1R* 基因 71 号氨基酸位点基因型(*MC1R*(71):212T>C); (b) *MC1R* 基因 92 号氨基酸位点基因型(*MC1R*(92):274G>A); (c) *MC1R* 基因 143 号氨基酸位点基因型(*MC1R*(143):427A>G); (d) *MC1R* 基因 215 号氨基酸位点基因型(*MC1R*(215):644A>C)。

(a) Genotype of *MC1R* gene amino acid site 71(*MC1R*(71):212T>C); (b) Genotype of *MC1R* gene amino acid site 92(*MC1R*(92):274G>A); (c) Genotype of *MC1R* gene amino acid site 143(*MC1R*(143):427A>G); (d) Genotype of *MC1R* gene amino acid site 215(*MC1R*(215):644A>C)。

图 3 *MC1R* 突变位点的 KASP 基因分型部分结果

Fig. 3 Partial KASP genotyping results at *MC1R* mutation locus

表型进行分析(图6),沿X轴方向比较发现,随着*GJA5*突变等位基因的增多,边缘真黑色素沉着的比例呈现上升趋势,但该趋势仅在上述真黑色素沉着比例较大的特定*MC1R*突变(71、92、215号氨基酸位点突变型、143号氨基酸位点野生型)个体中才比较明显(143号位点的突变型的也显示为*GJA5*效应明显,但实际上143号突变型的个体有羽毛真黑色素沉着的仅有2个(表5),因此不具有统计学意义)。沿Y轴比较发现,*MC1R*基因对边缘真黑色素沉着没有明显作用。综上,*MC1R*基因上位于*GJA5*基因,推测*MC1R*基因作为调控真黑色素沉着的开关,而*GJA5*基因调控真黑色素是否沉着于羽毛边缘。

3 讨论

本研究在我国地方鸡种的羽毛花纹观察中发现了“心形镶边羽”这一独特表型,根据已有报道筛

选出可能相关的候选突变,并通过大群验证和构建资源家系的方法确认了*GJA5*基因的突变和*MC1R*基因4个氨基酸位点的相关突变与“心形镶边羽”相关联。同时本研究结果显示,*SOX10*基因杂合子与野生纯合子与此表型无关联,未在试验群体中检测到其突变型。由于*SOX10*突变(其上游的一个8.3 kb缺失与真黑色素被抑制、褐黑色素合成加强有关)所导致的*D6*等位基因是不完全显性^[9],因此如果该突变对江汉鸡的心形镶边羽表型有影响,则理论上会观察到杂合子与野生纯合子之间的差异。

通过构建资源家系,本研究发现,杂合子公鸡全部表现为“心形镶边羽”,杂合子母鸡则仅有部分表现出该表型,即存在从性遗传。该现象与国外鸡种中双镶边表型(同样是*GJA5*上游突变所致)的限性遗传相反,国外品种中公鸡几乎不表达镶边表型^[8]。且具体的边缘真黑色素分布范围也存在差异,国外鸡种中的黑色镶边包含整个廓羽的边缘,

表 5 大群MC1R基因4个氨基酸位点基因型与表型统计

Table 5 Statistics of genotypes and phenotypes of four amino acid locis in MC1R gene in the large group

MC1R氨基酸位点基因型 Genotype of MC1R amino acid site	边缘真黑色素 沉着 Marginal eumelanin	非边缘真黑色素 沉着 Non-marginal eumelanin	无真黑色素 沉着 No eumelanin	总计 Total	卡方值 Chi-square value	χ ² 检验P值 P value of Chi- square test
71号 TT (Wild type)	13	14	18	45	2.012	
71号 CT (Heterozygote)	55	27	62	144	19.5	
71号 CC (Mutation)	42	72	17	131	27.5	
71号总计 Total	110	113	97	320	49.0	2.25×10 ⁻¹¹ **
92号 GG (Wild type)	9	15	17	41	3.62	
92号 GA (Heterozygote)	58	23	64	145	25.0	
92号 AA (Mutation)	45	74	17	136	29.6	
92号总计 Total	112	112	98	322	58.2	2.33×10 ⁻¹³ **
143号 AA (Wild type)	78	86	29	193	21.8	
143号 AG (Heterozygote)	33	26	59	118	22.2	
143号 GG (Mutation)	1	1	10	12	15.9	
143号总计 Total	112	113	98	323	60.0	2.75×10 ⁻¹⁰ **
215号 AA (Wild type)	31	25	17	73	2.49	
215号 AC (Heterozygote)	47	20	64	131	29.4	
215号 CC (Mutation)	34	68	17	119	28.1	
215号总计 Total	112	113	98	323	60.0	9.41×10 ⁻¹⁴ **

注:**表示基因型与表型的关系为极显著关联($P<0.01$)。下同。
Note:**indicates that the relationship between genotype and phenotype is extremely significant. ($P<0.01$). The same below.

表 6 250羽母鸡MC1R基因单倍型与表型统计

Table 6 Statistics of haplotypes and phenotypes of MC1R in 250 hens

单倍型 Haplotype	边缘真黑色素沉着 Marginal eumelanin	非边缘真黑色素沉着 Non-marginal eumelanin	无真黑色素沉着 No eumelanin	总计 Total	卡方值 Chi-square value	χ ² 检验P值 P value of Chi- square test
MC1R(H0)	0	1	1	2	1.03	
MC1R(H1)	32	64	17	113	28.3	
MC1R(H0H1)	29	7	10	46	17.7	
MC1R(H1H2)	3	6	52	61	79.7	
MC1R(H0H3)	21	7	0	28	23.5	
总计 Total	85	85	80	250	150	1.89×10 ⁻³¹ **

注:H0为4个位点全部为野生型;H1为只有143号位点为野生型,其余3个位点为突变型;H2为只有143号位点为突变型其余3个位点为野生型;H3为只有215位点为野生型,其余3个位点为突变型。
Note: H0 consists of all wild-type in the four loci; H1 indicates that only 143 AA is wild-type and the other three are mutant. H2 indicates that only 143 AA is mutant and the other three are wild-type; H3 indicates that only 215 AA is wild-type and the other three are mutant.

表 7 *GJA5* 基因型与表型统计

Table 7 Statistics of *GJA5* genotypes and phenotypes

<i>GJA5</i> 基因型 <i>GJA5</i> genotype	边缘真黑色素沉着 Marginal eumelanin	非边缘真黑色素沉着 Non-marginal eumelanin	无真黑色素沉着 No eumelanin	总计 Total	卡方值 Chi-square value	χ^2 检验 <i>P</i> 值 <i>P</i> value of Chi-square test
野生 Wild type	20	77	43	140	32.8	
杂合 Heterozygote	63	29	41	133	12.8	
突变 Mutation	29	7	14	50	14.2	
总计 Total	112	113	98	323	59.8	$1.01 \times 10^{-13}^{**}$

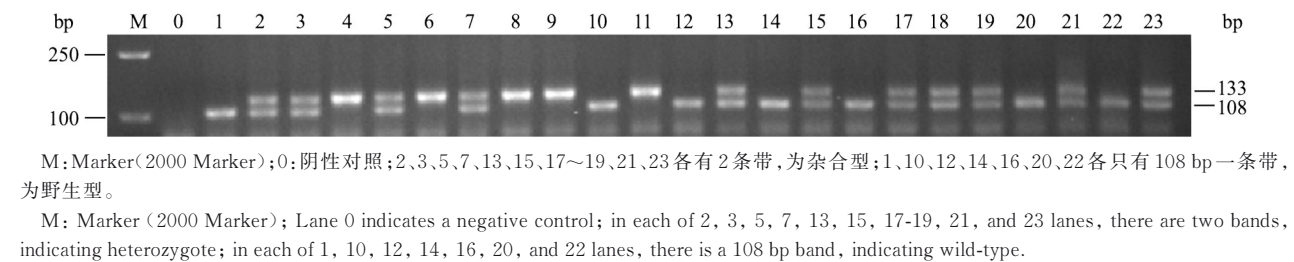


图 4 F2 个体中 *GJA5* 突变的鉴定

Fig. 4 Genotyping of the *GJA5* mutation in F2 individuals

表 8 资源家系 *GJA5* 杂合时公母表型统计

Table 8 Phenotypic statistics of male and female when the *GJA5* mutation is heterozygous in the resource family

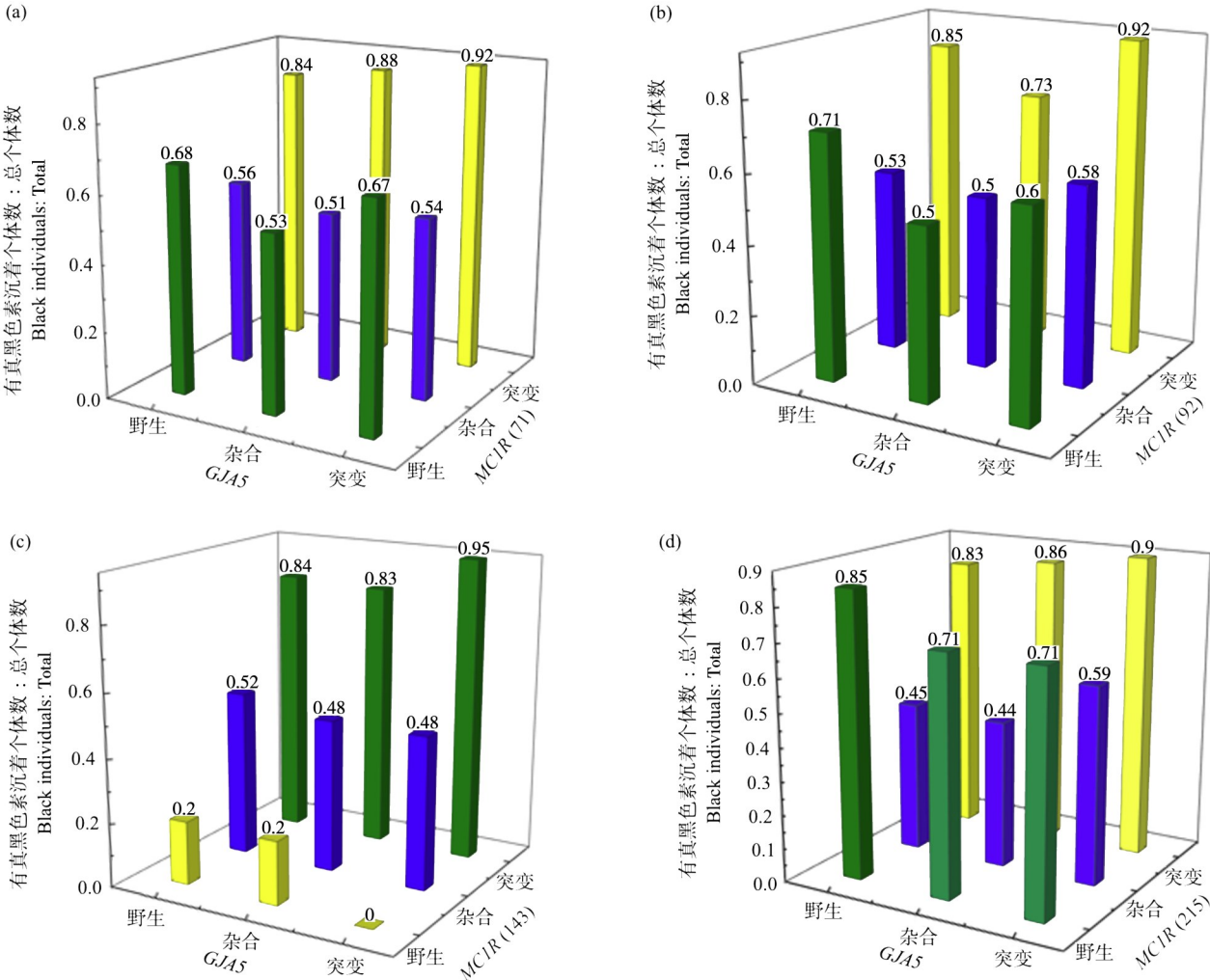
性别 Gender	边缘真黑色素沉着 Marginal eumelanin	非边缘真黑色素沉着 Non-marginal eumelanin	无真黑色素沉着 No eumelanin	总计 Total
公鸡 Rooster	8	0	0	8
母鸡 Hen	4	3	2	9

而在国内鸡种中所观察到的表型仅在羽毛末端存在边缘真黑色素沉着。虽然受相同基因的调控,但却因为遗传背景的不同,表现出了不同的表型。

Li等^[8]发现黑变基因(*Melanotic, Ml*)的因果突变并成功解析了国外观赏鸡双镶边花纹的遗传机制,该突变为 *GJA5* 基因的上游结构变异,可导致 *GJA5* 表达量的变化。根据本研究大群体的检测结果,发现 *GJA5* 突变与“心形镶边羽”表型存在显著关联。但与资源家系的完全关联不同的是,大群中发现了少量 *GJA5* 野生型但表现“心形镶边羽”以及少量 *GJA5* 突变但表现出羽毛末端边缘无真黑色素沉着的个体,这说明该群体中尚有未知的突变产生了与 *GJA5* 突变相同或相反的作用。结合 Andersson等^[7]的总结,因为同样影响羽毛内花纹的 *Co* 基因尚未被定位,所以未能作为本研究的候选突变之一。而 *Co* 基因变异的存在可能就是在江汉鸡没有观察到 100% 的关联的原因之一。本研究将继

续关注这些少数不关联的个体,将利用其挖掘可能包括 *Co* 基因在内的新的羽毛花纹性状关联突变,实现更全面的遗传解析。

经过上世纪的大量杂交研究,已知家鸡的 *E* 位点有至少 8 个等位基因,分别作为黑羽、麻羽、黄羽等有色羽的决定因子^[7]。其中黑羽等位基因 *E*E* 被连锁定位为 *MC1R* 基因,且存在至少一个与黑羽相关的 *MC1R* 错义突变^[10]。同时 Ellett^[15] 与 Ling等^[16] 也报道了与黄羽等位基因 *E*WH* 或 *E*Y* 相关的 *MC1R* 错义突变。故 *MC1R* 被认为是真黑色素与褐黑色素之间切换的开关,且主要在黑色素细胞中表达。根据上述报道, *MC1R* 基因 71、92 号氨基酸突变能增强羽毛中真黑色素的合成,而 143 号氨基酸位点则相反^[10,15-16]。本研究的大群检测结果与前人的报道一致,即 *MC1R* 的这些突变与羽毛花纹表型均存在显著关联。并且还进一步发现了 *MC1R* 突变主要与是否有真黑色素沉着有关,而非真黑色



(a) *MC1R* 基因 71 号氨基酸位点基因型和 *GJA5* 基因型与黑: 不黑表型比例的三维示意图; (b) *MC1R* 基因 92 号氨基酸位点基因型和 *GJA5* 基因型与黑: 不黑表型比例的三维示意图; (c) *MC1R* 基因 143 号氨基酸位点基因型和 *GJA5* 基因型与黑: 不黑表型比例的三维示意图; (d) *MC1R* 基因 215 号氨基酸位点基因型和 *GJA5* 基因型与黑: 不黑表型比例的三维示意图。

(a) Three-dimensional schematic diagram of the ratio between black and non-black phenotype for different combinations of the genotypes of amino acid site 71 in *MC1R* gene and *GJA5* gene; (b) Three-dimensional schematic diagram of the ratio between black and non-black phenotype for different combinations of the genotypes of amino acid site 92 in *MC1R* gene and *GJA5* gene; (c) Tree-dimensional schematic diagram of the ratio between black and non-black phenotype for different combinations of the genotypes of amino acid site 143 in *MC1R* gene and *GJA5* gene; (d) Three-dimensional schematic diagram of the ratio between black and non-black phenotype for different combinations of the genotypes of amino acid locus site 215 in *MC1R* gene and *GJA5* gene.

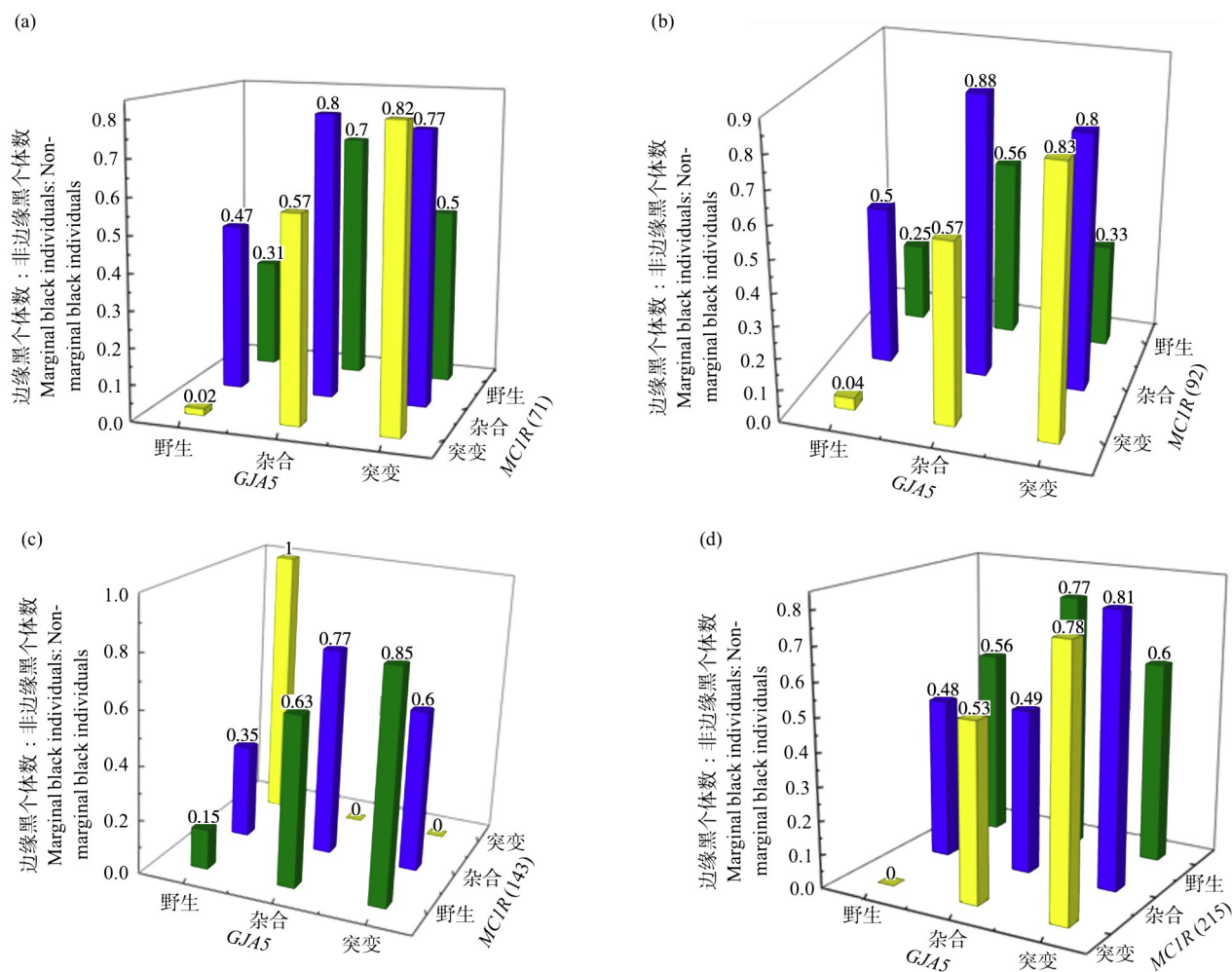
图 5 *GJA5* 和 *MC1R* 突变互作分析 (是否有黑色素沉着表型之间的比较)

Fig. 5 Interaction analysis of *GJA5* and *MC1R* mutations (with vs without eumelanin in the feather)

素沉着的位置。随后对各自有基因型效应的 *GJA5* 突变和 *MC1R* 突变进行了联合分析,从统计的角度得出 *MC1R* 基因对 *GJA5* 基因存在上位互作效应这一结论。这一结论也符合从生物学角度的推论, Inaba 等^[18]发现 *GJA5* 在禽类胚胎背部的真黑素和褐黑素条纹区都有表达,通过鹌鹑胚胎皮肤移植和和缝隙连接蛋白(*GJA5* 编码蛋白所属家族)抑制剂注射等研究,表明黑色素细胞之间可能依赖于 *GJA5* 进行信号交流,并调控真黑素和褐黑素条纹

的产生。Li 等^[8]提出, *GJA5* 介导的信号交流可能直接与 *MC1R* 相关信号通路有关,如 cAMP(环磷酸腺苷, *MC1R* 被激活后的下游信使之一)可能经由缝隙连接蛋白在黑色素细胞之间传递进而影响真黑色素的合成。按照这一理论, *MC1R* 也位于 *GJA5* 基因功能的上游。

培育“心形镶边羽”资源群体虽然可以仅使用表型选择,但需要进行分子选育^[14]的理由包括:一是根据本研究大群检测的结果,该表型的表达不稳



(a) *MC1R* 基因 71 号氨基酸位点基因型和 *GJA5* 基因型与边黑:非边黑表型比例的三维示意图; (b) *MC1R* 基因 92 号氨基酸位点基因型和 *GJA5* 基因型与边黑:非边黑表型比例的三维示意图; (c) *MC1R* 基因 143 号氨基酸位点基因型和 *GJA5* 基因型与边黑:非边黑表型比例的三维示意图; (d) *MC1R* 基因 215 号氨基酸位点基因型和 *GJA5* 基因型与边黑:非边黑表型比例的三维示意图。

(a) Three-dimensional schematic diagram of the ratio between edge black and non-edge black phenotype for different combinations of the genotypes of amino acid site 71 in *MC1R* gene and *GJA5* gene; (b) Three-dimensional schematic diagram of the ratio between edge black and non-edge black phenotype for different combinations of the genotypes of amino acid site 92 in *MC1R* gene and *GJA5* gene; (c) Three-dimensional schematic diagram of the ratio between edge black and non-edge black phenotype for different combinations of the genotypes of amino acid site 143 in *MC1R* gene and *GJA5* gene; (d) Three-dimensional schematic diagram of the ratio between edge black and non-edge black phenotype for different combinations of the genotypes of amino acid site 215 in *MC1R* gene and *GJA5* gene.

图 6 *GJA5* 和 *MC1R* 突变互作分析(真黑色素是否沉着于羽毛边缘)

Fig. 6 Interaction analysis of *GJA5* and *MC1R* mutations (marginal eumelanin vs non-marginal eumelanin)

定,表型相似的个体其基因型不一定相同,通过表型选择所得到的后代可能会出现性状分离;二是因为 *GJA5* 突变为部分显性,特别是公鸡中几乎是完全显性,如果利用分子选育淘汰其中的杂合子将能够比表型选育更迅速地提高群体整齐度;此外,分子选育可以实现早期选择,这对于仅在成年个体中表达的黄麻羽表型的选育尤为重要,能通过早检测早淘汰大幅降低育种成本。

本研究对所有结果进行汇总后发现,当 *MC1R*

基因 92 号氨基酸位点为突变型或者杂合型,143 号氨基酸位点为野生型,且 *GJA5* 基因型为突变型时,“心形镶边羽”个体的比例较高,为 85.19% (23/27)。之所以仅关注 92 号和 143 号氨基酸位点,是因为 *MC1R* 的单倍型分析结果显示,71、92 和 215 这 3 个氨基酸突变位点紧密连锁,而与 143 号氨基酸位点不连锁。因此为了节省分子成本,我们从 *MC1R* 基因 71、92、215 这 3 个连锁突变位点中,选择检测效果最好的 92 号氨基酸位点为代表作为分

子育种方案的1个标记位点,第2个标记位点为与其他3个突变不连锁的143号氨基酸位点。第3个标记位点为 *GJA5* 基因的基因型。

具体分子育种方法为:如果在成年鸡中挑选种鸡,则先通过表型淘汰不表达“心形镶边羽”的个体,剩下个体进行分子检测后选中目标个体(*MC1R* 的92号位点突变或者杂合、且143号位点野生、同时 *GJA5* 为突变型)进行配种,公母均可使用这一方案;如果雏鸡中挑选时目标个体时,无法通过表型进行筛选,可直接通过分子鉴定进行筛选,即可完成“心形镶边羽”资源群体的构建。本研究的分子选育方法为培育“心形镶边羽”育种群,利用羽毛性状的标签作用,提高其经济价值,促进地方优质黄麻羽鸡产业发展将发挥重要的作用。

4 结 论

本研究主要结论如下:

1) 江汉鸡“心形镶边羽”这一羽毛表型受 *GJA5* 和 *MC1R* 2个基因相关突变的调控。

2) 江汉鸡“心形镶边羽”这一羽毛表型具有部分显性与从性遗传的特征。

3) 在江汉鸡“心形镶边羽”的表达过程中, *MC1R* 基因突变对 *GJA5* 基因突变存在上位互作效应,据此可以进行针对“心形镶边羽”的分子选育:选择 *MC1R* 基因92号氨基酸位点为突变型或者杂合型,143号氨基酸位点为野生型, *GJA5* 基因型为突变型的个体留种。

参考文献 References

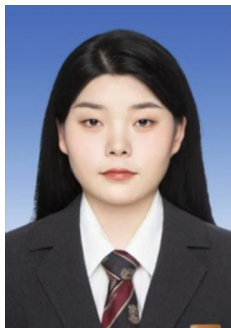
- [1] Kerje S, Sharma P, Gunnarsson U, Kim H, Bagchi S, Fredriksson R, Schütz K, Jensen P, Von Heijne G, Okimoto R, Andersson L. The Dominant white, Dun and Smoky color variants in chicken are associated with insertion/deletion polymorphisms in the *PMEL17* gene [J]. *Genetics*, 2004, 168(3):1507-1518
- [2] Chang C M, Coville J L, Coquerelle G, Gourichon D, Oulmouden A, Tixier-Boichard M. Complete association between a retroviral insertion in the tyrosinase gene and the recessive white mutation in chickens [J]. *BMC Genomics*, 2006;7, 19
- [3] Gunnarsson U, Hellström A R, Tixier-Boichard M, Minvielle F, Bed'Hom B, Ito S, Jensen P, Rattink A, Vereijken A, Andersson L. Mutations in *SLC45A2* cause plumage color variation in chicken and Japanese quail [J]. *Genetics*, 2007, 175(2):867-877
- [4] Kinoshita K, Akiyama T, Mizutani M, Shinomiya A, Ishikawa A, Younis H H, Tsudzuki M, Namikawa T, Matsuda Y. Endothelin receptor B2 (EDNRB2) is responsible for the tyrosinase-independent recessive white (mo(w)) and mottled (mo) plumage phenotypes in the chicken [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(1): e86361
- [5] Roulin A, Ducrest A L. Genetics of colouration in birds [C]. In: *Seminars in Cell & Developmental Biology*. Amsterdam: Elsevier Press, 2013: 594-608
- [6] Smyth J R. Genetics of plumage, skin and eye pigmentation in chickens [M]. In: Crawford, R D. Crawford R D. *Poultry Breeding and Genetics*. Amsterdam: Elsevier Press, 1990, 22:109-167
- [7] Andersson L, Bed'hom B, Chuong C M, Inaba M, Okimoto R, Tixier-Boichard M. *The genetic basis for pigmentation phenotypes in poultry* [C]. In: *In Advances in Poultry Genetics and Genomics*. United Kingdom: Burleigh Dodds Science Publishing, 2020:67-106
- [8] Li J, Lee M O, Chen J, Davis B W, Dorshorst B J, Siegel P B, Inaba M, Jiang T X, Chuong C M, Andersson L. Cis-acting mutation affecting *GJA5* transcription is underlying the Melanotic within-feather pigmentation pattern in chickens [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2021, 118(41), e2109363118
- [9] Gunnarsson U, Kerje S, Bed'hom B, Sahlqvist A S, Ekwall O, Tixier-Boichard M, Kämpe O, Andersson L. The Dark brown plumage color in chickens is caused by an 8.3-kb deletion upstream of *SOX10* [J]. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2011, 24(2):268-274
- [10] Kerje S, Lind J, Schütz K, Jensen P, Andersson L. Melanocortin 1-receptor (*MC1R*) mutations are associated with plumage colour in chicken [J]. *Animal Genetics*, 2003, 34(4):241-248
- [11] Schwochow D, Bornelöv S, Jiang T X, Li J Y, Gourichon D, Bed'Hom B, Dorshorst B J, Chuong C M, Tixier-Boichard M, Andersson L. The feather pattern autosomal barring in chicken is strongly associated with segregation at the *MC1R* locus [J]. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2021, 34(6):1015-1028
- [12] 许继国, 陈国锐, 苏焱南, 聂庆华, 张细权. 清远麻鸡部分外观性状遗传学基础研究进展 [J]. 中国家禽, 2014, 36(22): 38-42
- [12] Xu J G, Chen G R, Su Z N, Nie Q H, Zhang X Q. Research progress on the genetics of some appearance traits in qingyuan maji [J]. *China Poultry*, 2014, 36(22): 38-42 (in Chinese)
- [13] 潘爱奎, 杜金平, 皮劲松, 申杰, 吴艳, 孙静, 梁振华, 张昊, 黄涛, 付明. 湖北地方鸡资源与江汉鸡保种技术方案 [J]. 中南农业科技, 2022, 43(3): 44-47
- [13] Pan A L, Du J P, Pi J S, Shen J, Wu Y, Sun J, Liang Z H, Zhang H, Huang T, Fu M. Hubei local chicken resources and jianghan chicken breed preservation technical scheme [J]. *South-Central Agricultural Science and Technology*, 2022, 43(3): 44-47 (in Chinese)
- [14] Semagn K, Babu R, Hearne S, Olsen M. Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): Overview of the technology and its application in crop improvement [J]. *Molecular Breeding*, 2014, 33(1):1-14
- [15] Ellett A. Melanocortin-1-receptor (MCR-1) gene polymorphisms associated with the chicken E locus alleles [J]. *Inquiry: The University of Arkansas Undergraduate Research Journal*, 2000, 1(1):11
- [16] Ling M K, Lagerström M C, Fredriksson R, Okimoto R, Mundy N I, Takeuchi S, Schiöth H B. Association of feather colour with constitutively active melanocortin 1 receptors in chicken [J]. *European Journal of Biochemistry*, 2003, 270(7):1441-1449
- [17] Inaba M, Jiang T X, Liang Y C, Tsai S, Lai Y C, Wideltz R B, Chuong C M. Instructive role of melanocytes during pigment pattern formation of

the avian skin [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(14):6884-6890

animal breeding[J]. *The Veterinary Journal*, 2000, 160(1): 42-52

[18] Beuzen N D, Stear M G, Chang K C. Molecular markers and their use in

责任编辑: 秦梅



第一作者简介: 张苗爽, 硕士研究生, 家禽遗传育种方向, 主要研究鸡的羽毛发育性状。



通讯作者简介: 李竞一, 博士研究生, 副研究员。主要研究方向为家禽遗传与进化。重点关注家鸡外观性状的基因定位与产蛋抗逆性状的遗传解析。其中部分研究以禽类羽毛为模型, 对色素的分布和花纹的产生进行基础性研究。通过定位外观性状基因的具体突变, 来阐述生物发育过程中外观变化的分子机理。同时对突变的分子进化史进行分析, 以探索家禽在驯化过程中的分子进化规律。目前主要关注毛色等质量性状和产蛋抗逆性状在实际生产, 包括分子育种方面的应用。以第一作者或通讯作者在 *PNAS*、*Molecular Biology and Evolution*、*iMETA*、*Pigment Cell and Melanoma Research*、*Mobile DNA*、*G3* 等杂志发表论文 9 篇, 授权专利 3 项。