



席苏望,周明芳,成笛,等.探究MC1R基因在江西地方鸡中的变异、单倍型及其对羽色的影响[J].江西农业大学学报,2021,43(2):378-388.

XI S W,ZHOU M F,CHENG D,et al.The variation and haplotype of MC1R gene and its effect on the plumage coloration of indigenous chicken breeds in Jiangxi Province,China[J].Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis,2021,43(2):378-388.

探究MC1R基因在江西地方鸡中的变异、单倍型及其对羽色的影响

席苏望¹,周明芳¹,成笛²,陈开丰³,万磊¹,熊婷¹,
刘秋红¹,陈彪¹,刘三凤¹,毛辉荣^{1*}

(1.江西农业大学动物科学技术学院,江西南昌330045;2.江西省赣州市畜牧研究所,江西赣州360702;3.江西省崇义县农业农村局,江西崇义341300)

摘要:【目的】羽色不仅是家鸡的重要外观特征,因其影响优质活禽上市时消费者的选择,进而还具有重要的经济意义。本研究旨在探究黑素皮质激素受体1(MC1R)基因在江西地方鸡种中的变异及其对羽色的影响。【方法】采用PCR产物直接测序法,对MC1R基因在333个源自东乡绿壳蛋鸡、余干乌骨鸡、南城黑鸡、安义瓦灰鸡、白耳黄鸡、宁都黄鸡、康乐黄鸡、丝羽乌骨鸡、崇仁麻鸡和修水黄羽乌鸡的个体的变异位点进行鉴别,随后利用PHASE软件构建上述变异位点在各鸡群体中的单倍型并分析其与羽色的关系。【结果】共检测到MC1R基因变异位点15个,包括10个错义突变位点、4个同义突变位点和1个缺失突变位点,其中c.366C>G(p.122Ile>Met)和c.547_549delAAC(p.183delAsn)为新发现的变异位点;共检测到31种单倍型(H0-H30),其中6种为新单倍型(H11、H14、H15、H16、H17和H27)并只出现于黄羽和白羽个体中。黑羽个体(东乡绿壳蛋鸡、余干乌骨鸡和南城黑鸡)均含有单倍型H4或H2,二者共同含有c.212T>C(p.71Met>Thr)和c.274G>A(p.92Glu>Lys)位点,其中东乡绿壳蛋鸡仅具有H4一种单倍型。灰羽个体(安义瓦灰鸡)均携带H4或H5单倍型且H5比前者多含有c.636G>A和c.637T>C(p.213Cys>Arg)2个变异位点。此外,单倍型H7比H4多含有c.644A>C(p.215His>Pro)位点,其中黑羽个体中未发现有CC突变型。黄羽群体(白耳黄鸡、宁都黄鸡、康乐黄鸡和修水黄羽乌鸡)的优势单倍型主要为H24和H25。白羽群体(丝羽乌骨鸡)的优势单倍型为H7和H15。【结论】MC1R基因在江西地方鸡种中变异丰富,c.212T>C(p.71Met>Thr)、c.274G>A(p.92Glu>Lys)和c.644A>C(p.215His>Pro)位点与江西地方鸡黑羽形成相关,可将其作为中国地方鸡黑羽性状选育的特异性分子标记;H5单倍型的c.637T>C(p.213Cys>Arg)位点可能与安义瓦灰鸡“灰羽”的形成有关。

关键词:地方鸡;MC1R基因;羽色;黑羽;江西

中图分类号:S831.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1000-2286(2021)02-0378-11

收稿日期:2020-11-16 **修回日期:**2021-01-27

基金项目:国家自然科学基金项目(31660638)、江西省自然科学基金项目(20192BAB204019)、江西农业大学科学研究基金项目(9232305193)、江西省研究生创新专项资金项目(YC2020-S243)和江西省现代家禽产业技术体系(JXARS-09)

Project supported by the National Natural Science Foundation of China(31660638), the Natural Science Foundation of Jiangxi Province of China(20192BAB204019), the Scientific Research Fund of Jiangxi Agricultural University(9232305193), the Graduate Innovation Special Fund of Jiangxi Province of China(YC2020-S243) and the Technology System of Modern Agricultural Poultry Industry of Jiangxi Province(JXARS-09)

作者简介:席苏望,orcid.org/0000-0003-2307-9631,xswjxau@163.com;*通信作者:毛辉荣,副教授,博士,主要从事家禽遗传育种与繁殖研究,orcid.org/000-0003-2588-1521,maohuirong82@hotmail.com。

The Variation and Haplotype of *MC1R* Gene and Its Effect on the Plumage Coloration of Indigenous Chicken Breeds in Jiangxi Province, China

XI Suwang¹, ZHOU Mingfang¹, CHENG Di², CHEN Kaifeng³, WAN Lei¹,
XIONG Ting¹, LIU Qihong¹, CHEN Biao¹,
LIU Sanfeng¹, MAO Huirong^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 2. Ganzhou Animal Husbandry Research Institute, Ganzhou, Jiangxi 360702, China; 3. Agricultural and Rural Bureau of Chongyi County, Chongyi, Jiangxi 341300, China)

Abstract: [Objective] Plumage color is not only an important appearance feature of chicken breeds, but also is of important economic significance because it affects the choice of consumers when quality poultry are put on the market. Jiangxi Province is rich in local chicken resources with unique characteristics, among which feather color is prominent. The purpose of this study was to investigate the variation of *MC1R* gene in Jiangxi local chicken breeds and its effect on feather color. [Method] The variation in *MC1R* gene was identified in 333 samples from Dongxiang blue-shell egg layer, Yugan black bone chicken, Nancheng black chicken, Anyi grey chicken, white ear yellow chicken, Ningdu yellow chicken, Kangle yellow chicken, silky feather black-bone chicken, Chongren partridge chicken and Xiushui yellow feather black-bone chicken via a PCR products re-sequencing method. Then, based on the above mutations the haplotypes were constructed for each animal by a PHASE software and their effects on plumage color were evaluated. [Result] A total of fifteen mutations were detected in the *MC1R* gene, including 10 missense mutations, 4 synonymous mutations and 1 deletion mutations. Among them, both c.366C>G (p.122Ile>Met) and c.547_549delAAC (p.183delAsn) were newly discovered mutation loci, and 31 haplotypes (H0-H30) were constructed, among which 6 new haplotypes (H11, H14, H15, H16, H17 and H27) appeared only in yellow or white feather populations. The haplotype H4 or H2 was found in all black feathered individuals (Dongxiang green shell layer, Yugan black bone chicken and Nancheng black chicken). Both of them contained c.212T>C (p.71Met>Thr) and c.274G>A (p.92Glu>Lys) loci. Dongxiang green shell layer only had H4 haplotype. All the grey feather individuals (Anyi wa-grey chicken) carried H4 or H5 haplotypes, and H5 contained more c.636G>A and c.637T>C (p.213Cys>Arg). In addition, H7 contained more c.644A>C (p.215His>Pro) locus than H4, and CC mutation was not found in all black feather individuals. The dominant haplotypes of yellow feather population (Baier yellow chicken, Ningdu yellow chicken, Kangle yellow chicken and Xiushui yellow feather black-bone chicken) were mainly H24 and H25. In addition, the dominant haplotypes of white feather population (silky silky feather black-bone chicken) were H7 and H15. [Conclusion] *MC1R* gene had abundant variation in Jiangxi local chicken breeds. Comprehensive variation and haplotype analysis showed that the loci affecting black feather formation of Chinese indigenous chicken were c.212T>C (p.71Met>Thr), c.274G>A (p.92Glu>Lys) and c.644A>C (p.215His>Pro). The above three loci can be used as specific molecular markers for breeding black feather traits in Chinese local chickens. Furthermore, c.637 T>C (p.213Cys>Arg) locus of H5 haplotype may be related to the dilution of feather color of Anyi grey chicken.

Keywords: indigenous chickens; *MC1R*; plumage color; black-feather; Jiangxi Province

【研究意义】鸡的羽色虽不是与优质直接相关的重要经济性状,但羽色作为一个品种的独特外观,会直接影响消费者对活禽的挑选,因此一直是国内优质鸡选育的重要性状之一,备受遗传和育种学家所关

注。开展基于中国地方鸡羽色性状的遗传解析将极大丰富家鸡羽色形成的分子机理,同时为地方鸡的外观选育提供有效的分子标记奠定基础。【前人研究进展】鸟类羽色根据其形成模式主要分为两类:一类是基于体内黑色素模式的称为色素色;另一类是基于外源类胡萝卜素的摄入并在体内沉积,与羽毛的微结构有关,被称作结构色,后者一般利用物理结构通过对光线的折射和干涉作用而产生变幻的色彩,可以令鸟类羽毛具有金属光泽。目前所有已鉴别的影响羽色表型的基因均是基于黑色素模式的着色,同时这类羽色表型受遗传因素的影响较大,具有显著的可遗传性^[1]。鸡的羽色变异非常丰富,但目前已发现的羽色功能基因却很有限。根据最新 OMIA (online mendelian inheritance in animals) 在线数据库 (<https://omia.org/home/>) 显示,已有 11 个鸡羽色因果功能基因位点被鉴别,其中影响黑羽的黑素皮质激素受体 1 基因 (Melanocortin 1 Receptors, *MC1R*) 备受关注。

MC1R 基因决定羽色扩展基因座 *E* (*Extension*, *E*), *E* 位点包含 8 个等位基因,各等位基因对应不同的羽色,黑色素沉着按照显隐性关系排列次序为: $E > E^H > E^{WH} > E^+ > E^h > E^s > E^{bc} > E^y$ 。鸡的 *MC1R* 基因位于 11 号染色体上,无内含子,主要编码 G 蛋白偶联受体。研究发现其蛋白表达于黑素细胞,主要负责调控黑色素生成的质量与数量,促进真黑素形成^[2-3]。此外,*MC1R* 基因是控制真黑素和褐黑素形成的开关,通过调控酪氨酸酶的活性影响真黑素和褐黑素的生产和分布,进而影响禽类羽色形成^[4-6]。2003 年, Kerje 等^[5]利用红色原鸡和来航鸡杂交资源群体研究发现 *MC1R* 基因是控制鸡羽色的重要编码基因 (*E* 基因座),并推测 *MC1R* 基因 E92K 突变最可能是导致鸡黑羽的因果突变。Kabir 等^[7]进行了 38 种鸡种 *MC1R* 基因单倍型与羽色的关联性研究,发现鸡羽色的形成与 *MC1R* 基因多态性密切相关。Ling 等^[6]对不同羽色鸡种的 *MC1R* 基因序列比较结果表明, *MC1R* 基因的 E92K 突变与鸡的黑羽有关,同时发现 c.637T>C 位点可能导致 cAMP 信号不响应 α -MSH 而使个体不呈现黑羽表型。2014 年, Dávila 等^[8]在对 13 个西班牙鸡种 *MC1R* 基因检测后发现 c.274G>A 突变导致 *MC1R* 受体激活,进而促进真黑素生产并最终形成黑羽;同时发现 c.637C>T 突变可能是导致真黑素生产功能丧失或下降的因果突变。Guo 等^[9]发现 *MC1R* 基因 c.274G>A 促进真黑素沉积, c.637T>C 导致无 cAMP 信号响应 α -MSH,从而减少真黑素沉积; Zhang 等^[10]发现 c.212T>C 和 c.274G>A 和 c.644A>C 3 位点同时存在于中国地方黑鸡群体的每个个体,该研究小组于 2020 年再次认定上述 3 个位点作为中国地方鸡黑羽的遗传标记^[11]。2020 年, Kabir 等^[7]研究 30 种日本地方鸡种 *MC1R* 基因单倍型与羽色的关联性,结果表明 c.427A>G 和 c.274G>A 突变分别有助于黄褐色羽和黑羽的形成;推测 c.644A>C 突变可能通过抑制 c.274G>A 的作用下使其纯合位点导致鸡羽色呈现似小麦色。

江西地处中国的中部地区,自然资源丰富,地方鸡种资源尤为突出,目前已通过畜禽遗传资源鉴定并收录于《中国畜禽遗传资源志:家禽志》的品种主要有 9 个,分别是东乡绿壳蛋鸡、余干乌骨鸡、南城五黑鸡、安义瓦灰鸡、崇仁麻鸡、泰和丝羽乌骨鸡、广丰白耳黄鸡、康乐黄鸡和宁都黄鸡^[12],此外,修水黄羽乌鸡作为新发现的待鉴定遗传资源也已收录于《江西畜禽遗传资源志》^[13]。江西地方鸡种不仅数量多,且种质特性独特,在羽色表型方面尤为丰富,包括 5 个类型:黑羽鸡(东乡绿壳蛋鸡、余干乌骨鸡和南城五黑鸡)、灰羽鸡(安义瓦灰鸡)、麻羽鸡(崇仁麻鸡),白羽鸡(泰和丝羽乌骨鸡)及黄羽鸡(广丰白耳黄鸡、康乐黄鸡、宁都黄鸡和修水黄羽乌鸡)^[13]。

【本研究切入点】地方特优质肉禽的羽色直接影响消费者在活禽市场的挑选,进而影响优质禽的销售,因此家禽羽色不仅是一种品种的重要外观特征,同时还具有重要的经济效应。江西拥有多达 10 个地方鸡种群体,且羽色类型丰富,但到目前为止,关于江西地方鸡种羽色遗传机制的全面和系统的研究鲜见报道,基于此,本研究以 10 个江西地方鸡种(东乡绿壳蛋鸡、余干乌骨鸡、南城五黑鸡、安义瓦灰鸡、崇仁麻鸡、泰和丝羽乌骨鸡、广丰白耳黄鸡、康乐黄鸡、宁都黄鸡和修水黄羽乌鸡)为研究对象,采用 PCR 产物直接测序法和单倍型法探究 *MC1R* 基因在江西地方鸡种中的变异类型、单倍型分布及其对羽色的影响。【拟解决的关键问题】本试验旨在鉴别 *MC1R* 基因在江西 10 个地方鸡群体中的变异、单倍型分布及其频率分布;进一步探究 *MC1R* 基因各变异和单倍型对江西地方鸡羽色表型形成的影响,尤其是黑羽表型的形成。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验以10个江西地方鸡种群为研究对象,涉及的实验鸡品种、样本数和羽色表型详见表1。所有实验动物样本均来自原种场的核心群体。采集每只受试鸡个体的翅静脉血1 mL并用2% EDTA 抗凝剂处理,存放于-20 °C冰箱备用。

表1 实验动物的品种、采样数及羽色表型

Tab.1 Breeds, sample number and feather color phenotype of experimental animals

品种 Breed	样本数 No.	羽色表型 Plumage color
东乡绿壳蛋鸡 Dongxiang blue-eggshell	36	黑羽
南城五黑鸡 Nancheng black	26	黑羽
余干乌骨鸡 Yugan black-bone	35	黑羽
安义瓦灰鸡 Anyi grey	37	灰羽
泰和丝羽乌骨鸡 Taihe sillie	32	白羽
修水黄羽乌鸡 Xiushui black-bone	34	黄羽
广丰白耳黄鸡 Guangfeng baier	37	黄羽
宁都黄鸡 Ningdu yellow	35	黄羽
康乐黄鸡 Wanzai yellow	26	黄羽
崇仁麻鸡 Chongren partridge	35	麻羽
合计 Total	333	-

1.2 试验方法

1.2.1 DNA提取与质量检测 采用常规酚仿法^[14]提取鸡血液基因组DNA,使DNA溶于TE缓冲液,使用Nano Drop 2000微量紫外分光光度计(赛默飞,美国)检测基因组DNA浓度和纯度,并采用琼脂糖凝胶电泳检测基因组DNA的完整性。然后将质量合格的基因组DNA稀释至20 ng/ μ L的工作液,保存于-20 °C冰箱备用。

1.2.2 引物设计与合成 根据NCBI收录的红原鸡*MC1R*基因序列(GeneBank登录号为AB201629),通过Primer Premier 5.0软件设计引物,引物序列为MF 5'-GCTTTGTAGGTGCTGCAGTT-3'和MR 5'-TC-CACCCATCTGTTTGTCCA-3',扩增片段长度为1 105 bp,引物于北京擎科生物科技有限公司湖南分公司合成。

1.2.3 PCR扩增与测序 PCR扩增反应体系总体积为25 μ L,分别包含1.1 \times T3 Super PCR Mix 12.5 μ L, MF 1 μ L, MR 1 μ L, DNA模板2 μ L,和ddH₂O 8.5 μ L。PCR反应程序为94 °C预变性5 min;随后进行34个循环,1次循环为94 °C变性50 s,59 °C退火45 s和72 °C延伸1min;72 °C延伸13 min;4 °C保存。PCR产物利用1.5%琼脂糖凝胶进行电泳检测,均获得特异性目标条带,部分凝胶成像图片见图1,PCR产物的纯化和双向测序均由北京擎科生物科技有限公司湖南分公司完成。

1.2.4 序列比对和变异位点鉴别 测序结果利用SeqMan(DNASTAR 7.1)软件进行DNA序列比对和分析,检测*MC1R*基因的变异位点并对各个样本进行基因型判定。

1.2.5 单倍型分析 基于各个实验鸡个体的基因型数据采用PHASE v2.1软件^[15]推断获得实验鸡群体的单倍型。

1.2.6 数据处理 利用EXCEL 2019软件统计*MC1R*基因各变异位点在试验品种群体中的基因型频率、单倍型频率,并根据基因型和单倍型在不同羽色地方鸡群体中分布情况,分析其与羽色表型的相关性。

2 结果与分析

2.1 PCR扩增与测序

鸡*MC1R*基因扩增产物电泳图见图1。

续表 2 Continued table 2

突变位点 Mutations	基因型 Genotype	品种样本数 Breed No.									
		黑羽 Black		灰羽 Gray		白羽 White		黄羽 Yellow		麻羽 Partridge	
		东乡 绿壳蛋鸡 Dongxiang blue- eggshell	南城 五黑鸡 Nancheng black	余干 乌骨鸡 Yugan black-bone	安义 瓦灰鸡 Anyi grey	泰和丝羽 乌骨鸡 Taihe sillie	修水黄羽 乌鸡 Xiushui black-bone	广丰白耳 黄鸡 Guangfeng baier	宁都黄鸡 Ningdu yellow	康乐黄鸡 Wanzai yellow	崇仁麻鸡 Chongren partridge
	36	35	26	37	32	34	37	35	26	35	
c.366C>G	CC	1.000	1.000	1.000	1.000	0.938	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	GG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	GC	0	0	0	0	0.062	0	0	0	0	0
c.376G>A	GG	1.000	0.962	0.886	1.000	0.969	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	AA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	GA	0	0.038	0.114	0	0.031	0	0	0	0	0
c.398T>C	TT	1.000	1.000	1.000	1.000	0.281	1.000	0.946	0.914	0.962	1.000
	CC	0	0	0	0	0.188	0	0	0	0	0
	TC	0	0	0	0	0.531	0	0.054	0.086	0.038	0
c.409G>A	GG	1.000	1.000	1.000	0.973	0.844	0.882	0.973	0.943	1.000	0.943
	AA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	GA	0	0	0	0.027	0.156	0.118	0.027	0.057	0	0.057
c.427A>G	AA	1.000	1.000	1.000	0.865	1.000	0.529	0.135	0.057	0.115	1.000
	GG	0	0	0	0	0	0.059	0.460	0.343	0.500	0
	AG	0	0	0	0.135	0	0.412	0.405	0.600	0.385	0
c.486C>T	CC	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.886	1.000	1.000
	TT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	CT	0	0	0	0	0	0	0	0.114	0	0
c.547_549 delAAC	AAC/AAC	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.886	1.000	1.000
	del/del	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	delAAC	0	0	0	0	0	0	0	0.114	0	0
c.552C>T	CC	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.853	0.946	0.914	1.000	1.000
	TT	0	0	0	0	0	0.000	0	0	0	0
	CT	0	0	0	0	0	0.147	0.054	0.086	0	0
c.636G>A	GG	1.000	0.962	0.886	0.595	0.250	0.412	0.139	0.057	0.115	1.000
	AA	0	0	0.000	0.081	0.188	0.118	0.611	0.486	0.577	0
	GA	0	0.038	0.114	0.324	0.562	0.470	0.250	0.457	0.308	0
c.637T>C	TT	1.000	0.962	0.886	0.595	0.187	0.412	0.139	0.029	0.115	1.000
	TC	0	0.038	0.114	0.324	0.594	0.470	0.278	0.457	0.270	0
	CC	0	0	0	0.081	0.219	0.118	0.583	0.514	0.615	0
c.644A>C	AA	1.000	1.000	0.943	0.946	0.406	0.588	0.639	0.829	0.654	0
	CC	0	0	0	0	0.156	0.088	0.083	0	0.115	0.914
	AC	0	0	0.057	0.054	0.438	0.324	0.278	0.171	0.231	0.086

表 3 基于 17 个 SNPs 的 *MC1R* 基因单倍型及氨基酸替换
 Tab.3 *MC1R* haplotypes based on the 17 SNPs and amino acid substitutions

单倍型 Haplotypes	核苷酸位置 Nucleotide position															羽色 Plumage color
	69	212	274	334	366	376	398	409	427	486	547-549	552	636	637	644	
H0 核苷酸 (氨基酸) Nucleotide (amino acid)	C (Asn)	T (Met)	G (Glu)	C (Arg)	C (Ile)	G (Val)	T (Leu)	G (Ala)	A (Thr)	C (Thr)	AAC (Asn)	C (Asn)	G (Ala)	T (Cys)	A (His)	野生型 ^[5] wt
H1	*	C (Thr)	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	灰羽带黑斑点 ^[9] Grey with black spots
H2	*	C (Thr)	A (Lys)	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	黑色羽 ^[6] Extended black
H3	*	C (Thr)	A (Lys)	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	C (Pro)	褐色羽 ^[16] Brown
H4	T	C (Thr)	A (Lys)	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	黑色羽 ^[7] Extended black
H5	T	C (Thr)	A (Lys)	*	*	*	*	*	*	*	*	*	A	C (Arg)	*	黑色羽 ^[7] Extended black
H6	T	C (Thr)	A (Lys)	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	C (Arg)	C (Pro)	未明 ^[9] Unrevealed
H7	T	C (Thr)	A (Lys)	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	C (Pro)	金凤花 ^[5] Buttercup
H8	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	A	*	C (Pro)	未明 ^[9] Unrevealed
H9	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	C (Pro)	未明 ^[9] Unrevealed
H10	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	野生型 ^[9] wt
H11	T	*	*	*	*	*	*	*	*	T	—	*	*	*	*	未知 Unknown(New)
H12	T	*	A (Lys)	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	未明 ^[9] Unrevealed
H13	T	*	A (Lys)	*	*	*	*	A (Thr)	*	*	*	*	*	*	*	褐色羽 ^[8] Brown
H14	T	*	A (Lys)	*	*	*	C (Pro)	*	*	*	*	*	A	C (Arg)	*	未知 Unknown(New)
H15	*	*	A (Lys)	*	*	*	C (Pro)	*	*	*	*	*	A	C (Arg)	*	未知 Unknown(New)
H16	*	*	A (Lys)	*	G (Met)	*	C (Pro)	*	*	*	*	*	A	C (Arg)	*	未知 Unknown(New)
H17	*	*	A (Lys)	*	G (Met)	A (Ile)	C (Pro)	*	*	*	*	*	A	C (Arg)	*	未知 Unknown(New)
H18	*	*	A (Lys)	*	*	A (Ile)	*	*	*	*	*	*	A	C (Arg)	*	黑色羽 ^[5] Extended black
H19	*	*	*	*	*	*	C (Pro)	*	*	*	*	*	A	C (Arg)	*	未明 ^[9] Unrevealed
H20	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	A	C (Arg)	*	野生型 ^[16] wt
H21	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	A	C (Arg)	*	野生型 ^[16] wt

续表 3 Continued table 3

单倍型 Haplotypes	核苷酸位置 Nucleotide position															羽色 Plumage color
	69	212	274	334	366	376	398	409	427	486	547-549	552	636	637	644	
H22	*	*	*	T (Cys)	*	*	*	*	*	*	*	T	A	C (Arg)	*	未明 ^[9] Unrevealed
H23	T	*	*	T (Cys)	*	*	*	*	*	*	*	T	A	C (Arg)	*	未明 ^[9] Unrevealed
H24	T	*	*	*	*	*	*	*	G (Ala)	*	*	*	A	C (Arg)	*	小麦色羽 ^[8] Wheaten
H25	*	*	*	*	*	*	*	*	G (Ala)	*	*	*	A	C (Arg)	*	小麦色羽 ^[16] Wheaten
H26	*	*	*	*	*	*	*	*	G (Ala)	*	*	*	*	C (Arg)	*	小麦色羽 ^[8] Wheaten
H27	*	*	*	*	*	*	*	*	G (Ala)	*	*	*	*	*	*	未知 Unknown(New)
H28	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	C (Arg)	*	野生型 ^[16] wt
H29	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	C (Arg)	C (Pro)	未明 ^[9] Unrevealed
H30	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	C (Pro)	似小麦色羽 ^[7] Wheaten like

红色原鸡携带 H0(AB201629)、H10、H20 和 H28 单倍型,即羽色均为野生型。*表示核苷酸与 H0 单倍型相同,—表示核苷酸缺失

Red jungle fowl carry both H0(AB201629)、H10、H20 and H28 haplotypes, meaning both are wt. Asterisks (*) indicate that the nucleotide is identical with that of H0, Hyphen (—) indicates that the nucleotide is missing

2.3 *MC1R* 基因的单倍型构建及其在江西地方鸡种中的分布频率

依据 *MC1R* 基因编码区的 15 个变异位点共构建了 31 种单倍型(H0-H30),其中 H11、H14、H15、H16、H17 和 H27 均为新发现单倍型,尚未见报道。本研究所构建的各 *MC1R* 基因单倍型的构成信息和在江西地方鸡种中的分布频率详见表 3。据研究表明 H0、H10、H20、H21 和 H28 单倍型为鸡的野生型个体所具有^[15,16],H1-H30 单倍型均是基于 H0 单倍型而确定。由表 3 可知,其中 H1、H10、H27、H28 和 H30 均只含有 1 个变异位点,依次分别是 c.212T>C、c.69C>T、c.274A>G、c.637T>C 和 c.644A>C 变异位点。H2 比 H1 多存在 c.274G>A 变异位点。H2~H7 的共同特征是 2 个错义突变位点(c.212T>C 和 c.274G>A)。其中,相比于 H2, H3 和 H4 分别还存在 c.644A>C 变异位点和 c.69C>T 变异位点。且基于 H4 单倍型, H5 进一步拥有 c.636G>A 和 c.637T>C 变异位点, H6 也进一步发现了 c.637T>C 和 c.644A>C 变异位点; H7 比 H6 少拥有 c.637T>C 变异位点。H8 和 H9 都由 c.69C>T 和 c.644A>C 变异位点组成,两者区别在于 H8 多拥有 c.636G>A 变异位点。H11 是由 1 个新发现的缺失突变位点(c.547_549delAAC)和 2 个已发现的同义突变位点(c.69C>T 和 c.486C>T)组成的。H12 比 H10 多表现 1 个错义突变位点(c.274G>A),但 H13 比 H12 还多存在 c.409G>A 变异位点。H14~H18 共享已报道的 c.274G>A、c.636G>A 和 c.637T>C 变异位点,其中,除共享变异位点外, H15 只拥有 c.398T>C 变异位点;与 H15 的区别在于 H14、H16 和 H18 均多拥有 1 个变异位点(依次是 c.69C>T、c.366C>G 和 c.376G>A),而 H17 是多存在 2 个错义突变位点(c.366C>G 和 c.376G>A)。H19~H25 均发现 c.636G>A 和 c.637T>C 变异位点,其中 H19、H21 和 H25 分别比 H20 多 c.398T>C、c.552C>T 和 c.427A>G 变异位点;于 H21 的基础上, H22 和 H23 还共同拥有 c.3334C>T 和 c.552C>T 变异位点,而二者差异在于 H23 还发现了 c.69C>T 变异位点;且 H24 比 H25 也仅多拥有 c.69C>T 变异位点。H26 比 H25 少发现 c.636G>A 变异位点。H29 表现 2 个错义突变位点,分别是 c.637T>C 和 c.644A>C 变异位点。

MC1R 基因单倍型在 333 羽江西地方鸡中的分布和单倍型频率详见表 4。由表 4 可知,黑羽群体的优势单倍型为 H2 和 H4,其中东乡绿壳蛋鸡群体只发现 1 种单倍型 H4,南城五黑鸡群体中发现每个个体均存在 H4,余干乌骨鸡每个个体均含有 H2 或 H4。灰羽群体(安义瓦灰鸡)的优势单倍型是 H4 和 H5,每个个体都含有 H4 或 H5 单倍型。在崇仁麻鸡中, H7 为优势单倍型,每个个体均含有 H7 单倍型。结合表 3

表 4 各品种 *MC1R* 基因的单倍型频率
Tab.4 Thehaplotypes frequency of *MC1R* in each tested breed

单倍型 Haplotypes	羽色品种 Plumage color									
	黑羽 Black			灰羽 Grey	白羽 White	黄羽 Yellow				麻羽 Partridge
	东乡绿壳蛋鸡 Dongxiang blue-eggshell	南城五黑鸡 Nancheng black	余干 黑鸡 Yugan black	安义 瓦灰鸡 Anyi grey	泰和丝羽乌 骨鸡 Taihe sillie	修水 黄羽乌鸡 Xiushui black-bone	广丰白耳 黄鸡 Guangfeng baier	宁都 黄鸡 Ningdu yellow	康乐 黄鸡 Wanzai yellow	崇仁 麻鸡 Chongren partridge
H0	-	-	-	0.013	-	0.324	0.014	0.071	0.019	-
H1	-	-	-	-	0.016	-	-	-	-	-
H2	-	0.019	0.086	-	-	-	-	-	-	-
H3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.200
H4	1.000	0.943	0.829	0.703	0.031	0.015	-	0.014	-	0.014
H5	-	-	-	0.163	0.016	-	-	-	-	-
H6	-	-	-	-	-	-	-	-	0.019	-
H7	-	-	0.028	0.027	0.359	0.235	0.095	0.014	0.135	0.757
H8	-	-	-	-	-	-	0.014	-	-	-
H9	-	-	-	-	-	-	0.081	-	-	-
H10	-	-	-	-	-	-	0.026	-	-	-
H11	-	-	-	-	-	-	-	0.057	-	-
H12	-	0.019	-	-	-	-	-	-	-	-
H13	-	-	-	0.013	0.078	0.058	0.014	0.029	-	0.029
H14	-	-	-	-	-	-	0.026	-	-	-
H15	-	-	-	-	0.421	-	-	0.043	-	-
H16	-	-	-	-	0.016	-	-	-	-	-
H17	-	-	-	-	0.016	-	-	-	-	-
H18	-	0.019	0.057	-	-	-	-	-	-	-
H19	-	-	-	-	-	-	-	-	0.019	-
H20	-	-	-	0.013	-	0.015	-	0.014	0.019	-
H21	-	-	-	-	-	0.044	-	-	-	-
H22	-	-	-	-	-	0.029	-	0.043	-	-
H23	-	-	-	-	-	-	0.014	-	-	-
H24	-	-	-	-	-	-	0.459	-	-	-
H25	-	-	-	0.068	-	0.265	0.216	0.615	0.693	-
H26	-	-	-	-	-	-	-	0.014	-	-
H27	-	-	-	-	-	-	-	0.014	-	-
H28	-	-	-	-	0.031	-	-	-	0.019	-
H29	-	-	-	-	0.016	-	-	0.029	-	-
H30	-	-	-	-	-	0.015	0.041	0.043	0.077	-
合计 Total	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

-表示此单倍型未出现于品种群体

Hyphen(-)indicates that the haplotypedoesn't occur in the tested breed

可知, H2、H4、H5 和 H7 4 种单倍型中均含有共同的 c.212T>C 和 c.274G>A 2 个错义突变位点, 相较于 H2 单倍型, H4 增加了 c.69C>T 位点, 而 H5 又比 H4 增加了 c.636G>A 和 c.637T>C 变异位点, H7 比 H4 增加了 c.644A>C 变异位点。白羽群体的主要单倍型是 H7 和 H15, 其中泰和丝羽乌骨鸡群体发现较多单倍型, 除 2 个主要单倍型外, 其他单倍型均出现频率较低。此外, 黄羽群体中的单倍型数量最多, 多态性最丰富, 优势单倍型主要是 H0、H7、H24 和 H25; 其中修水黄羽乌鸡群体的主要单倍型是 H0、H7 和 H25, H24 和 H25 单倍型在广丰白耳黄鸡群体属高频单倍型, 宁都黄鸡群体中主要发现 H25, 康乐黄鸡群体主要拥有 H7 和 H25。

3 讨论与结论

本研究通过PCR产物直接测序法在333羽江西地方鸡中共发现*MC1R*基因突变15个,其中2个突变(c.366C>G(p.122Ile>Met)和c.547_549delAAC(p.183delAsn))系新发现,基于上述变异位点,共构建单倍型31条(H0-H30),其中新发现的单倍型有6条(H11、H14、H15、H16、H17和H27),*MC1R*基因众多的变异位点和单倍型被鉴定间接表明江西地方鸡种羽色丰富,内在遗传多样性较好。而本研究在东乡绿壳蛋鸡群体中仅构建了1种单倍型H4,一定程度上说明东乡绿壳蛋鸡的品种纯度高,这与本实验室前期通过芯片技术分析7个江西地方鸡种遗传多样性和血缘组成的结果一致^[18]。

本研究中东乡绿壳蛋鸡、余干乌骨鸡和南城五黑鸡均为纯黑羽的个体,他们均共享有2个错义突变(c.212T>C(p.71Met>Thr)和c.274G>A(p.92Glu>Lys))(表2),表明上述2个位点与江西地方鸡纯黑羽的羽色形成有关。这与Kerje等^[5]通过杂交实验分析发现c.274G>A是西方鸡种纯黑羽表型形成的因果突变并不完全一致;诸多报道也表明c.274G>A突变与家鸡黑羽密切相关^[7-9,17],而Ling等^[6]发现黑色素等位基因Eⁿ只含有c.274G>A多态性位点,而其羽色表现为大部分黑羽,非纯黑羽表型。单倍型构建结果(表3)显示同时含有上述2个错义突变位点在内的单倍型主要有6种(H2-H7);单独含有c.212T>C位点在内的单倍型为H1,而单独含有c.274G>A突变在内的单倍型有7条(H12-H18)。

单倍型结果显示江西地方黑羽个体均含有H2(c.212T>C和c.274G>A)或H4(c.69C>T,c.212T>C和c.274G>A)单倍型,二者均共享有上述c.212T>C和c.274G>A 2个错义突变位点,其中东乡绿壳蛋鸡已由H4固定,这与中国和日本两国的地方黑羽鸡群体的研究结果相一致^[7,9-11]。相较于东乡绿壳蛋鸡只有H4 1种单倍型,南城五黑鸡和余干乌骨鸡还分别具有其他单倍型,表明群体的遗传多样性更丰富。与H4单倍型组成相比,H3单倍型缺少了c.69C>T位点,但同时增加了c.644A>C(p.215His>Pro)位点;H5单倍型组成增加了c.636G>A和c.637T>C(p.213Cys>Arg)位点;H6单倍型增加了637和644位点;H7增加了637位点。崇仁麻鸡的优势单倍型为H7且每个个体都具有H7单倍型,已有的研究表明H7单倍型中的c.644A>C(p.215His>Pro)位点是金凤花(Buttercup)羽色鸡的特定单倍型^[5],c.644A>C变异位点多次被报道具有抑制c.274G>A(或c.212T>C)变异位点的黑色素沉积作用,进而降低*MC1R*基因的活性与表达量,并促进褐色素的形成,最终导致羽毛颜色不呈现黑色^[5,7],而本研究中所有的黑羽个体在c.644A>C位点上均未检测到CC突变型个体,由此可见,决定江西地方鸡黑羽表型的位点除c.212T>C和c.274G>A 2个错义突变外,还需关注c.644A>C位点。

安义瓦灰鸡是近年来江西省新鉴定的资源,因其具有稀有的“瓦灰”羽色表型而著称^[19]。本研究发现,所有的瓦灰鸡个体均含有H4或H5单倍型,以往报道发现c.637T>C突变可能导致不产生cAMP信号响应 α -MSH并减少真黑素生产沉积,进而出现稀释黑色素羽色,比如“灰羽”^[6,8-9,20]。但本研究中,H5单倍型出现在安义瓦灰鸡群体频率较低(0.163),仅能部分解释安义瓦灰鸡的灰羽是由黑羽稀释而来,但不能完整解释灰羽表型的形成,推测可能存在其他位点能够起到稀释黑色素的功效,具体位点有待更深入的研究解析。本研究中虽然在泰和丝羽乌骨鸡中也检测到黑羽突变位点c.212T>C和c.274G>A,但由于*TYR*基因4号内含子上7.5 kb逆转录病毒序列插入造成的*TYR*酶丧失跨膜转运的能力,使黑色素不能沉积于羽毛组织,从而呈现出隐性白羽的表型^[21]。黄羽群体中部分个体检测到H7单倍型,出现这种现象的可能原因是部分黄羽个体在颈部带有麻羽,同时部分个体尾羽中存在少量黑羽。

综上所述,本研究通过对333羽江西地方鸡种中*MC1R*基因的变异位点鉴定和单倍型构建,发现c.212T>C和c.274G>A 2个错义突变共同作用导致中国地方鸡黑羽形成;同时c.637T>C与c.644A>C变异位点能干扰抑制这一共同作用,前者能够对黑色进行稀释从而呈现出安义瓦灰鸡“灰羽”羽色;后者从而促进褐黑素合成,并降低真黑素的合成量,导致羽毛呈现出麻羽等类型的羽色,同时可将c.212T>C、c.274G>A和c.644A>C 3个位点作为中国地方鸡黑羽分子鉴定的有效标记。

致谢:感谢江西省各地方鸡保种场对本研究中样本的支持。

参考文献 References:

- [1] ROULIN A, DUCREST A L. Genetics of colouration in birds[J]. *Semin cell dev biol*, 2013, 24: 594-608.

- [2] LIN J, FISHER D. Melanocyte biology and skin pigmentation[J]. Nature, 2007, 445(7130): 843-50.
- [3] 封竣淇, 徐伟, 黄兰, 等. *MC1R* 基因的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(4): 1141-1148.
FENG J Q, XU W, HUANG L, et al. Research advances on *MC1R* gene[J]. China animal husbandry & veterinary medicine, 2017, 44(4): 1141-1148.
- [4] 杨永升, 邓学梅, 李宁, 等. *MC1R* 是控制鸡黑色素形成的候选主效基因[J]. 生物化学与生物物理进展, 2004, 31(6): 500-505.
YANG Y S, DENG X M, LI N, et al. *MC1R* is the candidate gene regulating melanin synthesis in chicken[J]. Progress in biochemistry and biophysics, 2004, 31(6): 500-505.
- [5] KERJE S, LIND J, K. SCHÜTZ, et al. Melanocortin 1-receptor (*MC1R*) mutations are associated with plumage colour in chicken[J]. Animal genetics, 2003, 34(4): 241-248.
- [6] LING M K, LAGERSTRÖM M C, FREDRIKSSON R, et al. Association of feather colour with constitutively active melanocortin 1 receptors in chicken[J]. European journal of biochemistry, 2003, 270(7): 1441-1449.
- [7] KABIR M H, TAKENOUCI A, HAQANI M I, et al. Discovery of a new nucleotide substitution in the *MC1R* gene and haplotype distribution in native and non-Japanese chicken breeds[J]. Animal genetic, 2020, 51(2): 235-248.
- [8] DÁVILA S G, GIL M G, RESINO-TALAVÁN P, et al. Association between polymorphism in the melanocortin 1 receptor gene and E locus plumage color phenotype[J]. Poultry sci, 2014, 93(5): 1089-1096.
- [9] GUO X L, LI X L, LI Y, et al. Genetic variation of chicken *MC1R* gene in different plumage colour populations[J]. British poultry science, 2010, 51(6): 734-739.
- [10] ZHANG G W, LIAO Y, ZHANG W X, et al. A new dominant haplotype of *MC1R* gene in Chinese black plumage chicken[J]. Animal genetics, 2017, 48(5): 624-624.
- [11] DENG Y, LI B, CHEN H, et al. Haplotypes of three missense mutations in Melanocortin 1 receptor serve as genetic markers for black plumage in Chinese chicken[J]. Animal genetics, 2020, 51(5): 842-843.
- [12] 国家畜禽遗传资源委员会. 中国畜禽遗传资源志·家禽志[M]. 北京: 中国农业出版社, 2011.
China National Commission of Animal Genetic Resources. Animal Genetic Resources in China·Poultry[M]. Beijing: China Agricultural Science Press, 2011.
- [13] 刘亮. 江西畜禽遗传资源志[M]. 南昌: 江西美术出版社, 2016.
LIU L. Animal genetic resources in Jiangxi Province[M]. Nanchang: Jiangxi Fine Arts Publishing House, 2016.
- [14] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular Cloning. A laboratory Manual [J]. Immunology, 2001, 49(1): 895-909.
- [15] STEPHENS M, SMITH N J, DONNELLY P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data[J]. American journal of human genetics, 2001, 68(4): 978-989.
- [16] ELLETT A E, OKIMOTO R. Melanocortin 1-receptor (*MC1R*) gene polymorphisms associated with chickens E locus alleles [J]. University student journal inquiry, 2000, 1: 37-41.
- [17] Takeuchi S, Suzuki H, Hirose S, et al. Molecular cloning and sequence analysis of the chick melanocortin 1-receptor gene [J]. Biochimica et biophysica acta, 1996, 1306(2/3): 122-126.
- [18] CHEN L, WANG X, CHENG D, et al. Population genetic analyses of seven Chinese indigenous chicken breeds in a context of global breeds[J]. Animal genetics, 2019, 50(1): 82-86.
- [19] XU J G, XIE M G, ZOU S Y, et al. Interactions of allele E of the *MC1R* gene with FM and mutations in the *MLPH* gene cause the five-gray phenotype in the Anyi tile-like gray chicken[J]. Genetics & molecular research, 2016, 15(2): gmr.15027633.
- [20] FRÅNDBERG P A, DOUFEXIS M, KAPAS S, et al. Cysteine residues are involved in structure and function of melanocortin 1 receptor; substitution of a cysteine residue in transmembrane segment two converts an agonist to antagonist[J]. Biochemical and biophysical research communications, 2001, 281(4): 851-857.
- [21] CHANG C M, COVILLE J L, COQUERELLE G, et al. Complete association between a retroviral insertion in the tyrosinase gene and the recessive white mutation in chickens[J]. Bmc genomics, 2006, 7(1): 19.