

# 权 利 要 求 书

1、一种配套组合生产深浅壳色绿壳蛋鸡的方法，其特征在于，通过直接引种或分子选育，构建旧院黑鸡、东乡绿壳蛋鸡及芦花鸡基础群，通过家系选择法提高产蛋性能，二系杂交配套的后代生产不同绿色程度的绿壳蛋，并实现雏鸡羽色自别雌雄—；

~~2、根据权利要求1所述的方法，其特征在于，具体包括如下步骤：~~

1) 父系旧院黑鸡 JY 系显性纯合子的筛选：从 60 羽第二世代旧院黑鸡 JY 系健壮公鸡中，用分子标记筛选出旧院黑鸡 JY 系绿壳蛋性状显性纯合子个体；

2) 构建旧院黑鸡、东乡绿壳蛋鸡及芦花鸡基础群：根据生产性能，将步骤 1 中筛选出的绿壳基因显性纯合型个体组成的旧院黑鸡 JY 系及东乡绿壳蛋鸡 LK 系作为父系，将匈牙利引进的黑康蛋鸡母系芦花鸡 LH 系、东乡绿壳蛋鸡 LK 系作为母系；

3) 将步骤 1) 中筛选出的旧院黑鸡 JY 系绿壳基因显性纯合型个体为父本，将东乡绿壳蛋鸡 LK 系作为母本，混合精液人工授精，收集种蛋入孵，得到杂交组合 JL 系；将东乡绿壳蛋鸡 LK 系作为父系，将芦花鸡 LH 系作为母系，混合精液人工授精，收集种蛋入孵，得到杂交组合 LL 系；

4) 杂交组合 LL 的公雏头上有大而不规则的斑块，母雏则无，淘汰公雏，将健康的母雏进行笼养；将杂交组合 JL 健雏进行笼养，待雏鸡培育到 40-50 天能分辨公母时，选取健壮的杂交组合母鸡进行单独培育。

32、根据权利要求 21 所述的方法，其特征在于，所述步骤 1) 中的分子标记筛选方法具体为：

a)、将选取 60 只健康无病的旧院黑鸡 JY 系公鸡翅下采血后，取 25 $\mu$ L 血液与 500 $\mu$ L 的缓冲液、300 $\mu$ L 裂解液和蛋白酶 K (20mg/mL) 混匀后 56 $^{\circ}$ C 金属浴过夜消化，加入 600 $\mu$ L 三氯甲烷后离心取上清加入 500 $\mu$ L 三氯甲烷，再次离心后取上清加入 500 $\mu$ L 的冰异丙醇，-20 $^{\circ}$ C 沉淀 2h，离心后弃上清，依次加入 600 $\mu$ L 无水乙醇、75% 乙醇漂洗，离心后弃上清，60 $^{\circ}$ C 烘干后加入 25 $\mu$ L 的 TE 缓冲液；使用 NanoDrop2000 超微量分光光度计检测 DNA 浓度，

其 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 值为 1.8~1.9 的样品视为合格，于-20℃下进行保存；

b)、以 NCBI 公布的红色原鸡序列 ( NC\_006093.2 ) 为参考，利用 Primer6.0 设计双重 PCR 引物；引物设计方法参考专利用于鉴别绿壳蛋鸡基因型的引物组合物及其应用，申请号：201510194180.6；

- 5 c)、进行 PCR 扩增后，对扩增产物进行凝胶电泳及基因型判定，取扩增产物 3μL 于 1.5 % 的琼脂糖凝胶上在 220V 下进行电泳，根据与 DNA Marker 2000 跑出的标准条带进行对比，根据条带数目及大小判断显性纯合子、显性杂合子以及隐性纯合子的基因型；扩增带型分别定义为 LS/ LS、LS/ CC 和 CC/CC，其中 LS/ LS 为纯合子绿壳蛋基因型，只出现 206bp 的条带；LS/
- 10 CC 为杂合子绿壳蛋基因型，出现 206bp 和 312bp 的条带；CC/CC 为非绿壳蛋基因型，只出现 312bp 的条带；筛选出旧院黑鸡 JY 系绿壳蛋性状显性纯合子个体。

43、根据权利要求 21 所述的方法，其特征在于，还包括：在二系杂交前净化各品系沙门氏菌和鸡白血病。

- 15 54、根据权利要求 21 所述的方法，其特征在于，杂交组合 JL 系具有乌羽、乌皮、乌冠、乌胫、乌肉及产绿壳蛋的理想特征且总体生产性能良好。

65、根据权利要求 21 所述的方法，其特征在于，杂交组合 LL 能够实现雏鸡羽色自别雌雄，母鸡外貌与 LK 系几乎一致，且所产蛋的壳色为墨绿色。