

地方鸡种微卫星 DNA 指纹图谱 建立与遗传多样性研究*

高玉时¹, 李慧芳¹, 陈国宏², 屠云洁¹, 王克华¹, 陈宽维¹

(1. 中国农业科学院家禽研究所, 江苏 扬州 226003;

2. 扬州大学动物科技学院, 江苏 扬州 225001)

摘要: 利用 20 个微卫星标记对我国 19 个地方鸡种保种群进行了遗传检测, 构建了各个品种的微卫星 DNA 指纹图谱, 通过计算各群体的等位基因频率、平均基因杂合度、平均多态信息含量及各群体间的遗传距离, 并用类平均法进行聚类分析, 分析了所研究鸡种的遗传关系。研究表明: 20 个微卫星标记在 19 个地方鸡种保种群共检测到 184 个等位基因, 平均为 9.2 个, 基因频率分布在 0.013 ~ 0.838 之间。19 个地方鸡种平均杂合度在 0.582 4 ~ 0.743 2 之间。其中藏鸡最高, 白耳鸡最低。20 个微卫星座位的平均多态信息含量在 0.523 8 ~ 0.702 3 之间, 均大于 0.5, 表现为高度多态性; 19 个鸡种聚为 6 类。各鸡种的遗传距离及聚类结果与所保存的地方鸡种的地理分布、现实状况是相吻合的, 从而表明用该方法分析品种间的亲缘关系是可行的。

关键词: 地方鸡种; 微卫星; DNA 指纹; 遗传多样性

中图分类号: S 831.2 文献标识码: A 文章编号: 1004 - 390X(2005)03 - 0313 - 06

Construction of Microsatellite DNA Fingerprinting and Analysis of Genetic Diversity of Native Chicken Breeds

GAO Yu-shi¹, LI Hui-fang¹, CHEN Guo-hong², TU Yun-jie¹, WANG Ke-hua¹, CHEN Kuan-wei¹

(1. Institute of Poultry, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Yangzhou 225003, China;

2. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225001, China)

Abstract: Microsatellite DNA Fingerprinting of 19 Native Chicken Breeds were constructed, and the genetic diversity (allele frequency, mean heterozygosity, mean polymorphic information content(PIC), and Nei genetic distances) of 19 them was analyzed by 20 microsatellite markers. The results showed that 184 alleles were detected of 20 microsatellite loci in 19 native chicken breeds, the average number of alleles of each loci was 9.2, the range of heterozygosity was 0.582 4 ~ 0.743 2, the heterozygosity of Zang chicken was the highest(0.743 2), and that of Beier chicken was the lowest(0.582 4). The mean polymorphism information content of 20 microsatellite was 0.523 8 ~ 0.702 3. which is higher than 0.5 and highly polymorphic. By the results of UPGMA tree, six groups were formed from 19 chicken breeds. The results of microsatellite fingerprinting were in accordance with 19 populations' geographical distribution and actual status of 19 chickens. The results of cluster showed that microsatellite fingerpring was feasible to analysize genetic relationships among Chinese native chicken breeds.

Key words: native chicken breed; microsatellite; DNA fingerprinting; genetic diversity

收稿日期: 2005 - 02 - 18

* 基金项目: 江苏省自然科学基金项目资助(BK2002502)

作者简介: 高玉时(1967 -), 男, 江苏扬州市人, 硕士, 副研究员, 主要从事家禽遗传育种研究。

品种资源是遗传多样性的载体,是遗传育种的重要基础。它是人类社会赖以生存和发展的重要生物资源,是满足人类食物与健康的直接来源。畜禽遗传资源已成为世界“生物经济”时代竞争的焦点之一。我国地方鸡种资源丰富,优特性状明显,抗逆性强,是我国乃至世界上宝贵的家禽育种素材。如何对我国地方鸡种的遗传背景进行深层次的分析,发掘利用地方鸡种的优特性状,将资源优势转化为商品优势是当今家禽遗传育种工作者所面临的重要课题。

微卫星(microsatellite)又称简单重复序列(simple sequence repeats, SSRs),以 1~6 bp 的短核苷酸序列为基本单位,呈 10~60 次串联重复随机分布于整个基因组。微卫星 DNA 由于核心序列重复次数的不同,以及重复程度的不同而造成了每个基因座的多态性^[1],微卫星因其有数量多、分布广、多态性丰富、呈共显性遗传方式等方面的优点,已经广泛应用于构建家禽基因连锁图谱、制作家禽指纹图、进行群体遗传结构及遗传关系的分析等方面^[2~10]。

本研究拟通过对国家家禽品种资源基因库以及其他保种区、保种场保存的 19 个地方鸡种建立地方鸡种的微卫星 DNA 指纹图谱,并进行微卫星 DNA 指纹分析,旨在探明这些地方鸡种的遗传变异状况及各品种之间的遗传相关性,为更好地保护地方鸡种资源及其开发利用提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

本研究所用血样来自国家家禽品种资源基因库和其他保种区或保种场保存的品种,共计 19 个品种,各品种名称、数量和来源详见表 1。每个鸡种取 40 个血液样本(公母各半),血样用 ACD 抗凝。

PCR 扩增反应所用 TaqDNA 聚合酶、dNTP 等试剂,以及电泳过程中所用 Marker: pBR322 均购自上海生工生物公司;经筛选的 20 个微卫星引物亦由上海生工生物公司合成。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取

基因组总 DNA 的提取参考《分子克隆实验指南》第二版中介绍的方法并稍作改进。

表 1 19 个地方鸡种序号、名称和来源

Tab. 1 Code, name and source of 19 chicken breeds

序号	品 种	来 源
1	黔东南小香鸡	贵州榕江县种鸡场
2	固始鸡	国家家禽基因库
3	东乡黑鸡	江西东乡黑羽绿壳蛋原种场
4	旧院黑鸡	四川万源县旧院黑鸡原种场
5	兴文乌鸡	四川山地乌鸡原种场
6	盐津乌骨鸡	云南牛赛种鸡场
7	茶花鸡	国家家禽基因库
8	仙居鸡	国家家禽基因库
9	藏鸡	国家家禽基因库
10	北京油鸡	国家家禽基因库
11	寿光鸡	山东省寿光慈伦种鸡场
12	萧山鸡	国家家禽基因库
13	崇仁麻鸡	国家家禽基因库
14	丝羽乌骨鸡	国家家禽基因库
15	鹿苑鸡	国家家禽基因库
16	狼山鸡	国家家禽基因库
17	白耳黄鸡	国家家禽基因库
18	河南斗鸡	国家家禽基因库
19	大骨鸡	国家家禽基因库

1.2.2 引物序列及 PCR 扩增反应条件

(1) 引物序列

本研究所用 20 对微卫星标记分别为 ADL212, ADL210, ADL136, ADL185, MCW150, ADL158, ADL125, MCW4, ADL176, MCW62, MCW88, MCW29, MCW145, MCW104, MCW134, ADL166, MCW120, MCW32, MCW5, ADL231。这些引物的序列见参考文献。

(2) PCR 扩增反应条件

25 μ L 反应体系: 50 ng/ μ L DNA 模板 1.5 μ L, 10 \times buffer 2.5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 1.2~2.0 μ L(因基因座而异), 10 mmol/L dNTP 0.5 μ L, 5 pmol/ μ L 两侧引物各 1 μ L, 5 U/ μ L Taq DNA 聚合酶 0.2 μ L, 用超纯水补足 25 μ L。扩增反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 50~64 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 最终延伸 5~10 min。

1.2.3 电泳及结果记录

扩增产物用 8% 变性聚丙烯酰胺凝胶 200 V 电泳 2 h, 银染拍照。根据不同大小基因片段电泳迁移率的不同, 利用 Alphaimage 数字图像分析系统计算其分子量。

1.2.4 微卫星 DNA 指纹图谱构建

根据电泳结果, 以同一品种 40 个体 20 个位点

上出现的等位基因片段(条带)组合构建鸡种微卫星 DNA 指纹图谱。构建工具用 DNA 指纹图谱构建软件 ZWT1.0 进行。

1.2.5 数据统计和分析

统计各群体的等位基因组成,计算各微卫星基因座分别在各群体中的基因频率、杂合度(heterozygosity, H)、多态信息含量(polymorphic information content, PIC)等指标,计算两两群体间 Nei 氏标准遗

传距离^[12,13],并用 UPGMA 法进行聚类分析,有关计算公式见参考文献[10]。

2 结果与分析

2.1 扩增结果

对 20 个微卫星标记的 PCR 扩增产物,分别用 8%变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,以 pBR322 为标准 Marker,得到 PCR 扩增产物凝胶电泳结果。

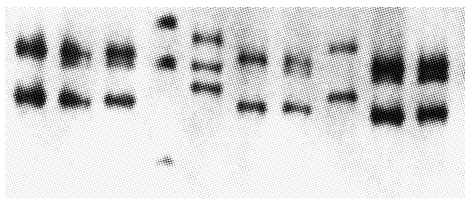


图 1 寿光鸡在ADL185微卫星基因座的部分扩增结果
Fig. 1 A portion of PCR results of ADL185 in Shouguang

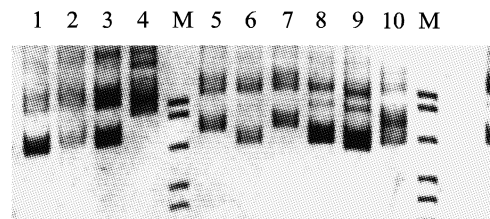
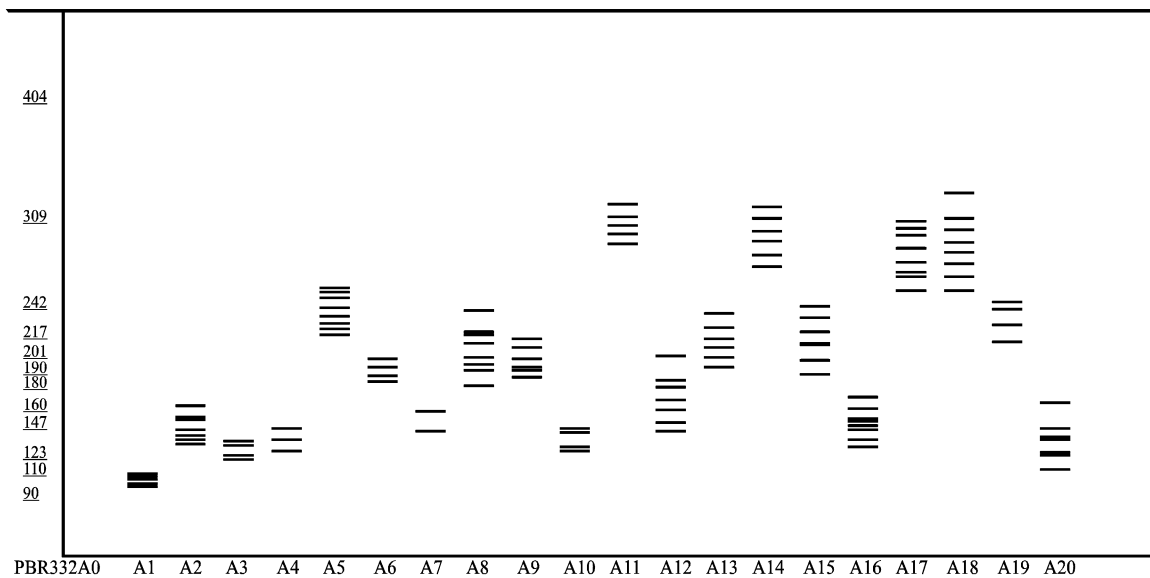


图 2 崇仁麻鸡在MCW150微卫星基因座的部分扩增结果
Fig. 2 A portion of PCR results of MCW150 in Chongren Ma

2.2 地方鸡种微卫星 DNA 指纹图谱

利用 ZWT1.0 软件,根据每个鸡种在 20 个微卫星基因座上的扩增结果,构建了 19 个地方鸡种的

DNA 指纹图谱。图 3 为构建的丝羽乌骨鸡微卫星 DNA 指纹图谱。



PBR322:Marker	A0: 空白 (blank)	A1: ADL212	A2:ADL210	A3:ADL136	A4:ADL185
	A5: MCW150	A6: ADL158	A7:ADL125	A8: MCW4	A9:ADL176
	A10: MCW62	A11:MCW88	A12:MCW29	A13: MCW145	A14:MCW104
	A15:MCW134	A16:ADL166	A17:MCW120	A18:MCW32	A19:MCW5
	A20:ADL231				

图 3 用ZWT1.0软件构建的丝羽乌骨鸡微卫星DNA指纹图谱
Fig. 3 Constructed microsatellite DNA fingerprinting of silkies by ZWT1.0

2.3 19 个地方鸡种保种群 20 个微卫星标记的等位基因

20 个微卫星标记在 19 个地方鸡种保种群共检测到 184 个等位基因,均表现为多态性。其中,等位基因数最多的有 ADL210, MCW62 和 MCW32, 达 19 个;最少的有 MCW145 和 MCW134, 仅 6 个;获得的平均等位基因数为 9.2 个。

2.4 19 个地方鸡种保种群的平均基因杂合度和多态信息含量(表 2)

表 2 19 个地方鸡种保种群的平均基因杂合度和多态信息含量

Tab. 2 Mean heterozygosity and PIC in 19

Chinese native chicken breeds

品 种	H	PIC
黔东南小香鸡	0.692 6	0.644 7
固始鸡	0.702 0	0.653 7
东乡黑鸡	0.679 6	0.654 2
旧院黑鸡	0.707 6	0.699 3
兴文乌鸡	0.726 1	0.685 4
盐津乌骨鸡	0.608 7	0.594 2
茶花鸡	0.733 4	0.693 3
仙居鸡	0.741 9	0.700 2
藏 鸡	0.743 2	0.702 3
油 鸡	0.701 6	0.653 9
寿光鸡	0.712 4	0.671 0
萧山鸡	0.727 9	0.687 7
崇仁麻鸡	0.671 3	0.652 3
丝羽鸡	0.732 4	0.691 5
鹿苑鸡	0.736 6	0.695 3
狼山鸡	0.680 0	0.632 9
白耳黄鸡	0.582 4	0.523 8
斗 鸡	0.702 8	0.654 8
大骨鸡	0.721 4	0.677 5

2.5 各品种间的遗传距离

用 Popgene 软件计算 19 个品种间的 Nei 氏 D_s 遗传距离,并统计了各鸡种的平均遗传距离,详见表 3。东乡黑鸡与鹿苑鸡之间的遗传距离最大,为 0.787 8;旧院黑鸡与兴文乌鸡之间的距离最小,为 0.200 8。从表 3 中看出,河南斗鸡与其他鸡种的平均距离最远,为 0.517;北京油鸡与其他鸡种的遗传距离最近,为 0.347。

2.6 19 个地方鸡种的聚类分析

将计算获得的遗传距离用 NTSYSpc 软件的 UPGMA 法对 19 个地方鸡种保种群进行聚类分析,

聚类结果见图 4。

表 3 19 个地方鸡种间的平均遗传距离

Tab. 3 Mean genetic distance among 19 native chicken breeds

鸡 种	平均遗传距离
黔东南小香鸡	0.370
固始鸡	0.431
东乡黑鸡	0.448
旧院黑鸡	0.378
兴文乌鸡	0.385
盐津乌骨鸡	0.386
茶花鸡	0.414
仙居鸡	0.371
藏 鸡	0.395
油 鸡	0.347
寿光鸡	0.410
萧山鸡	0.405
崇仁麻鸡	0.453
丝羽鸡	0.506
狼山鸡	0.505
鹿苑鸡	0.507
白耳黄鸡	0.355
斗 鸡	0.517
大骨鸡	0.374

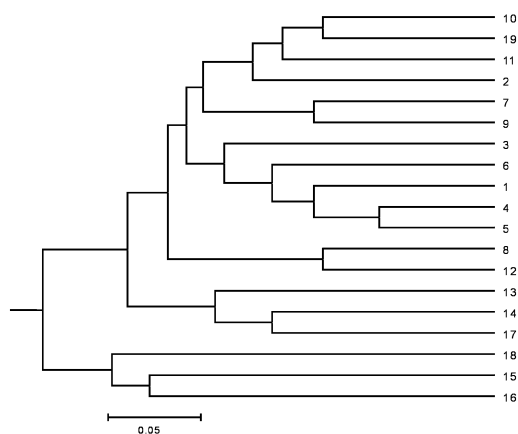


图 4 19 个地方鸡种的 UPGMA 聚类图

Fig. 4 Dendrogram of relationships among 19 Chinese native chicken breeds using UPGMA method of clustering

3 讨论

3.1 地方鸡品种微卫星 DNA 指纹图谱的构建

微卫星在整个基因组中随机分布,不仅大量分布在基因的间隔区和内含子中,而且还分布在基因的外显子和调控区(如启动子、增强子)。据估计,真核生物中大约每隔 10 ~ 15 kb 就存在一个微卫星标记。由于该标记具有数量多、分布均匀、多

态性高、重复性强、适于自动化分析等特点,相对于小卫星、RFLP 和 RAPD 等其他标记要优越得多。因此,用微卫星产生的 DNA 指纹图更能代表基因组的特征。

用微卫星产生 DNA 指纹的方法目前有两种,一是以微卫星的核心序列作探针,在基因组中同时检测多个位点,由于不同个体品种(品系)或群体在被检位点上存在一定的差异,通过电泳和杂交可将这些差异用条带的有或无表现出来,即产生微卫星 DNA 指纹图。但这种方法操作复杂。另一种方法是以互补于两个侧翼序列的寡核苷酸作为引物,通过 PCR 扩增,然后再用测序凝胶电泳或聚丙烯酰胺凝胶电泳分离检测其结果而获得微卫星 DNA 指纹图,这种方法省时,适合于自动化分析。因此,此方法更具应用前景。本研究用第二种方法构建了 19 地方鸡种的微卫星 DNA 指纹图。

随着我国加入 WTO 以及市场经济的不断发展,建立地方鸡品种的 DNA 指纹图谱档案,利用鸡群体(品系、品种)的微卫星 DNA 特征指纹,将该 DNA 指纹分析结果和各鸡群体形态学标记结合,可以为鸡种的亲缘关系鉴定,保护新品种的知识产权提供科学依据。将有利于解决贸易中的产权纠纷,有利于保护地方鸡种种质资源、新品种的知识产权和育种专家的合法权益。

3.2 19 个地方鸡品种群体内遗传分析

群体杂合度(H)表示在被检测基因座上群体中杂合子的频率,它是群体杂合程度的度量单位。群体平均杂合度的高低反映了群体的遗传一致性程度。群体的杂合度越低,反映该群体的遗传一致性越高,而群体的遗传变异就越少,群体的遗传多样性越差。本研究得出,19 个地方鸡种 20 个微卫星标记的平均杂合度在 0.582 4~0.743 2 之间。藏鸡平均基因杂合度最高,为 0.743 2,表明藏鸡群体有丰富的遗传多态性。由于藏鸡从产地引进到基因库仅有两年时间,虽经两个世代的选育,保种群体选育程度仍不高,因此有较高的平均基因杂合度。白耳黄鸡的平均基因杂合度最低,为 0.523 8,表明白耳黄鸡群体有相对较低水平的群体遗传多样性。白耳黄鸡是我所保存较早的品种之一,1988 年就开始引进保存,由于当时引进的鸡群数量小,在经过 15 个世代闭锁繁育后,白耳黄鸡的纯合基因型比率不断增大,因而群体基因杂合度相对较小。群体杂合度的研究结果各品种保存的现实状

况基本相吻合。

多态信息含量(PIC)是衡量等位基因片段多态性的理想指标。当 $PIC > 0.5$ 时该基因座为高度多态基因座, $0.25 < PIC < 0.5$ 时为中度多态性基因座, $PIC < 0.25$ 时为低度多态性基因座^[14]。本研究中,基因库中 19 地方鸡种保种群 20 个微卫星基因座的平均多态信息含量在 0.523 8~0.702 3 之间,均大于 0.5,反映了我国的这些地方鸡种的群体遗传多样性丰富,从而表明这些国家家禽品种基因库在保种过程中实施的“家系等量随机选配法”的效果良好。各品种的平均多态信息含量的高低和群体平均杂合度的研究结果基本一致。

3.3 19 个地方鸡品种群体间遗传分析

群体间的遗传关系一般以等位基因频率计算的两两群体间的遗传距离来估算。遗传距离是研究物种遗传多样性的基础,它反映了所研究群体的系统进化,一般认为群体分化时间越短,遗传距离越小。目前有关遗传距离的公式较多,Takezakit, Nei 等利用计算机模拟研究了一些遗传距离公式,他们都认为 DS 遗传距离较好,并能较为客观地反映品种的遗传分化。故本研究亦以 DS 公式计算遗传距离。遗传距离结果显示,四川省的两个鸡种旧院黑鸡与兴文乌骨鸡遗传距离最近,为 0.200 8,江西省的东乡黑鸡与江苏省的鹿苑鸡遗传距离最远,为 0.787 8。所有 19 个鸡种的平均遗传距离河南斗鸡最远,为 0.517,最近的是北京油鸡。

在本研究的地方鸡种聚类图中,19 个鸡种聚为 6 类。北京油鸡、大骨鸡、寿光鸡和固始鸡聚为一类,仙居鸡、萧山鸡聚为一类,东乡黑鸡、盐津乌骨鸡、黔南小香乌鸡、旧院黑鸡与兴文乌骨鸡聚为一类,茶花鸡和藏鸡聚为一类,崇仁麻鸡、丝羽乌骨鸡、江西白耳鸡聚为一类,河南斗鸡、鹿苑鸡、狼山鸡聚为一类。

第一类群中,大骨鸡又名庄河鸡,主要分布在辽宁省庄河县,大骨鸡的形成历史,据资料记载,早在二百多年前,山东移民带来了大型的寿光鸡,尔后与当地鸡杂交,并经长期选育成为一优良的兼用品种。北京油鸡也是一个很珍贵的兼用品种,与寿光鸡同属黄淮海地区,因而北京油鸡和大骨鸡聚在一起与寿光鸡的桥梁作用有相当大的关系。本研究也证明了这一点。河南固始鸡与北京油鸡都为分布在黄河流域,所以它与北京油鸡、大骨鸡的遗传距离较近。

在保种过程中,对品种的选择一般选择体型外貌、生产性能等表型性状或经济性状,即对编码基因的选择。由于微卫星位点分布在非编码区的居多,仅少数分布在编码区。因此,微卫星受到的选择压力很小。因此,聚类结果应与鸡种的产地分布有较强的遗传相关,而与鸡种的表型性状和生产性能无必然的联系。从获得的聚类图中,第二类群中浙江省的仙居鸡、萧山鸡聚在一起,第五类群中江西省的丝羽乌骨鸡、崇仁麻鸡和白耳鸡这三个品种在体型外貌、经济性能等方面差异都较明显,但能聚到一类,从而证明了上述理论。

从品种系统聚类过程中还可看出,我国地方鸡种间相互交叉、相互牵制的错综复杂的关系,如固始鸡把北京的鸡种与中原的鸡种联系着,东乡黑鸡把西南的几个相毗邻的几个省的鸡种与江西省的鸡种联系着,河南斗鸡将江苏省的两个鸡种联系起来。这一方面说明了我国地方鸡种的起源、演化和形成是相当之复杂,另一方面也说明了随着我国交通、信息的发展,原有地区隔离已经不存在,品种之间的交流越来越频繁,从而导致了各地区品种出现了交叉,有些品种甚至出现了同质化现象。因此,应尽快落实政策,切实保护好我国地方鸡种的遗传多样性刻不容缓。

综上所述,本研究利用微卫星指纹技术进行分析获得的遗传距离和聚类结果,与所保存的地方鸡种的地理分布、现实状况是相吻合的,从而表明用该方法分析品种间的亲缘关系是可行的。

[参考文献]

- [1] WEBER J L. Informativeness of human (dC - dA)_n·(dG - dT)_n polymorphisms[J]. *Genomics*, 1990, 7:524 - 530.
- [2] 张细权. 用微卫星和 RAPD 分析家鸡品种的遗传变异[J]. *遗传学报*, 1998, 25(2): 192 - 199.
- [3] 陈红菊. 利用微卫星标记分析山东地方鸡品种的遗传多样性[J]. *遗传学报*, 2003, 30(9): 855 - 860.
- [4] 吴信生, 陈国宏. 利用微卫星分析技术分析中国部分地方鸡品种的遗传结构[J]. *遗传学报*, 2004, 31(1): 43 - 50.
- [5] TAKAHASHI H, NIRASAWA K, NAGAMINE Y, et al.. Genetic relationships among Japanese native breeds of chicken based on microsatellite DNA polymorphisms [J]. *Journal of Heredity*, 1998, 89(6): 543 - 546.
- [6] VANHALA T, TUISKUL - HAAVISTO M, ELO K, et al.. Evaluation of geneic variability and genetic distances between eight chicken lines using microsatellite markers [J]. *Poultry Science*, 1998, 77: 783 - 790.
- [7] 吴萍. 应用微卫星标记分析中国地方鸡种的遗传变异 [J]. *生物多样性*, 2003, 11(6): 461 - 466.
- [8] ROMANOV M N, WEIGEND S. Analysis of genetic relationships between various populations of domestic and jungle fowl using microsatellite markers [J]. *Poultry Science*, 2001, 80: 1057 - 1063.
- [9] ZHOU H, LAMONT S J. Genetic characterization of bio-diversity in highly inbreed chicken lines by microsatellite markers [J]. *Anim enet*, 1999, 30: 256 - 264.
- [10] 高玉时. 地方鸡品种保种群微卫星指纹分析与保种效监测 [A]. 第九次全国畜禽遗传标记研讨会论文集 [C]. 2004. 124 - 129.
- [11] 王金玉, 龚允陈. 鸡的 DNA 指纹与屠宰性能的相关性研究 [J]. *遗传学报*, 1999, 26(4): 324 - 328.
- [12] NEI M, TAKEZAKI N. Estimation of genetic distance and phylogenetic trees from DNA analysis. Proc. 5th world Congr [J]. *Genet Appl Livest Prod*, Canada, 1992, 21: 405 - 419.
- [13] NEI M. Genetic distance between populations [J]. *Amer Nat*, 1972, 106: 283 - 291.
- [14] BOSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M, et al.. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. *Am J Hum Genet*, 1980, 32: 314 - 331.