

林甸鸡和大骨鸡微卫星 DNA 标记 遗传多样性的比较研究

白文林¹, 尹荣焕¹, 赵素君², 曹 亮³, 罗光彬¹, 姜午旗¹

(1. 沈阳农业大学 畜牧兽医学院, 辽宁 沈阳 110161; 2. 四川省畜牧科学研究院, 四川 成都 610066;

3. 黑龙江省农垦总局畜牧局, 哈尔滨 150036)

摘要: 为了从分子水平上揭示林甸鸡和大骨鸡的群体遗传结构, 利用鸡基因组中 5 个微卫星标记, 检测了林甸鸡和大骨鸡群体的遗传多样性。同时探讨了林甸鸡和大骨鸡在国内几个地方鸡种中的系统地位。结果表明, 5 个微卫星位点共检测到 38 个等位基因, 其中 ADL0146 位点的等位基因数 5 个, 为最少, 而 ADL0136 和 ADL0185 两个位点的等位基因数 9 个, 为最多; 5 个微卫星位点的平均等位基因数为 7.6 个。林甸鸡群体内比大骨鸡群体有更丰富的遗传多样性。聚类分析结果显示, 林甸鸡和大骨鸡与边鸡、日照麻鸡及寿光鸡之间有比较密切的亲缘关系; 而林甸鸡和大骨鸡与鲁西斗鸡的亲缘关系均较远。总体而言, 该系统聚类结果与 7 个鸡种的分化与选育历史是一致的。

关键词: 鸡; 微卫星标记; 遗传多样性; 聚类分析

中图分类号: S831 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2005)06-0024-04

Comparative Study on Genetic Diversity of Lindian Chicken and Dagu Chicken Breeds Using Microsatellite DNA Markers

BAI Wen-lin¹, YIN Rong-huan¹, ZHAO Su-jun², CAO Liang³, LUO Guang-bin¹, JIANG Wu-qi¹

(1. College of Animal Science and Veterinary, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China;

2. Animal Science Research Academy of Sichuan, Chengdu 610066, China;

3. Animal Science Bureau, Land Reclamation General Bureau of Heilongjiang 150036, China)

Abstract: For the sake of disclosure of population genetic construction of Lindian chicken and Dagu chicken breeds from molecular level, genetic diversity of Lindian chicken and Dagu chicken was assayed on the basis of 5 microsatellite DNA markers from the chicken gene bank, as well as, the phylogenetic status of Lindian chicken and Dagu chicken was discussed among several native chicken breeds. The results showed, altogether, 38 alleles were detected in 5 microsatellite loci, and among them, the least alleles (5) were detected by ADL0146, and the most alleles (9) were detected by ADL0136 and ADL0185. The average alleles number was 7.6 from 5 microsatellite loci. Genetic diversity in Lindian chicken was more abundant than that of Dagu chicken. The cluster analysis indicated that the consanguinity was close relatively among Lindian chicken, Dagu chicken, Bian chicken, Rizhao Pockmarked chicken and Shouguang chicken breeds; however, the consanguinity was far relatively between Lindian chicken, Dagu chicken and Luxi fighting chicken breeds. As a while, the clustering diagram reflected well the evolutionary and breeding history of the 7 chicken breeds.

Key words: Chicken; Microsatellite markers; Genetic diversity; Cluster analysis

微卫星 DNA 是以 1~6 bp 的短核苷酸为基本单位, 首尾相连组成的串联重复序列。由于微卫星

DNA 标记多态性丰富、信息含量大、共显性和保守性等特点, 使其引物可以在不同实验室间进行交流。

收稿日期: 2005-06-12

基金项目: 沈阳农业大学青年教师科研基金资助

作者简介: 白文林(1974-), 男, 甘肃永靖人, 讲师, 硕士, 主要从事遗传标记与动物育种研究。

目前,很多学者的研究表明,微卫星DNA标记在畜禽品种资源分类、遗传多样性的评估、遗传图谱构建和数量性状基因座(QTL)定位等研究中,表现出日益广阔的应用前景^[1~6]。林甸鸡是我国北方高寒地区的优良地方鸡种,主产于黑龙江省林甸县,具有抗寒、生活力强等特点。因此,对林甸鸡种群的遗传多样性进行研究,弄清其群体遗传结构和系统地位,将是十分必要的。然而,迄今尚未见有关林甸鸡微卫星DNA遗传多样性的研究报道。本研究应用5对鸡微卫星引物对林甸鸡种群内的遗传多样性进行检测,并以大骨鸡做比较分析。同时搜集了我国其他几个地方鸡种相同微卫星位点的资料,初步探讨了林甸鸡和大骨鸡的系统地位。为我国地方鸡种遗传资源的保存和合理的开发利用及进一步的选育提高提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

在黑龙江林甸县随机选择健康的林甸鸡48只(9♂39♀);辽宁复县随机选择健康的大骨鸡34只

表1 5个微卫星位点的引物资料

Tab 1 Primers information of 5 microsatellite loci					
位点 Locus	核心序列 Sequence of core	退火温度 Annealing temperature	染色体号 Source	上游引物(5'-3') Forward primer	下游引物(5'-3') Reverse primer
ADL0136	(TG) ₁₀ TC(TG) ₁₀	53℃	Chro9	TGTC AAGCCCATGTG TATCAC	CCACCTCCCTCTCTGTGTGC
ADL0146	(TG) ₁₇	52℃	Chro2	GACCTGCATGTGCAGTGACC	TGCTTCTCTAACCATTCTCTCT
ADL0176	(GT) ₁₂	52℃	Chro2	TGTG GATTCTGTGTCGTAGC	TTCTCCCGTAAACATGCTCA
ADL0185	(CA) ₁₆	52.5℃	Chro2	CATGCCAGCTGACTCCAGAT	AGCGTTACCTGTTGTGTTGC
ADL0298	(CA) ₁₄	53℃	Chro5	CAAGGCTGGGATTGATGAAA	TGGCGTGTGGGTTTACA AAA

1.4 统计分析

1.4.1 基因型频率和基因频率

基因型频率： $P_{ij} = (j) / N$
基因频率： $P_i = [2(\ddot{u}) + (\ddot{j}_1) + \dots + (\ddot{j}_n)] / 2N$
式中： \ddot{u} 表示纯合子 \ddot{u} 的个体数， \ddot{j}_n 表示杂合子 \ddot{j}_n 的个体数， $j_1 \dots j_n$ 表示与 i 等位基因等显性的第1到 n 个复等位基因， N 表示样本数。

1.4.2 多态信息含量(PIC)

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$
$$\overline{PIC} = \frac{1}{r} \sum_{i=1}^r PIC_i$$
式中， P_i 、 P_j 分别为群体中第 i 、 j 个等位基因的频率， n 为等位基因数， r 为微卫星位点数； PIC_i 为第 i 位点的多态信息含量。

1.4.3 群体杂合度 群体内某一位点的杂合度(h)

(17♂ 17♀)。翅静脉采血,EDTA抗凝,血样置于冰瓶中带回实验室,−20℃保存备用。

1.2 基因组DNA的提取

按常规方法提取鸡基因组DNA,溶于TE中,用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度法双重检测DNA的纯度和浓度,然后稀释成25ng/μL浓度,−20℃保存备用。

1.3 引物的选择与PCR反应

选择文献[7]中已研究过的多态性较好、均位于常染色体上的微卫星引物ADL0136,ADL0146,ADL0176,ADL0185和ADL0298共5对(表1),由大连宝生物公司合成。

PCR反应在50μL体系中进行:10×buffer5μL,MgCl₂(25mmol/L)3μL,dNTPs(10mmol/L)4μL,引物(10pmol/μL)各2μL,模板DNA10μL,TaqDNA聚合酶(5U/μL)0.5μL,灭菌双蒸水23.5μL。PCR扩增产物用浓度为10%~12%的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离、硝酸银染色,凝胶成像系统拍照分析等位基因片段大小及基因型。

和平均杂合度为(H):

$$h = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 \qquad H = \frac{1}{r} \sum_{j=1}^r h_j$$
式中： P_i 为群体某一位点上第 i 个等位基因的频率， n 为某一位点等位基因数， h_j 为第 j 位点的杂合度， r 为位点个数。

1.4.4 有效等位基因数(Ne)

$$N_e = 1 / \sum_{i=1}^n P_i^2 \qquad \overline{N_e} = \frac{1}{r} \sum_{i=1}^r N_{ei}$$
式中， n 为某微卫星位点所具有的等位基因数； P_i 表示第 i 个等位基因的基因频率， N_{ei} 为第 i 位点的有效等位基因数， r 为微卫星位点数。

1.4.5 群体间遗传距离和聚类分析 应用SPSS 11.0(Statistical Package for Social Science)统计软件完成群体间欧氏遗传距离的计算和聚类图的绘制。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果及等位基因

用所选择的 5 对微卫星引物对林甸鸡和大骨鸡 2 个鸡种共 82 只试验个体的基因组 DNA 进行了 PCR 扩增,每一试验个体在各微卫星位点上基本上都产生了较为清晰的、能够准确判断的扩增条带。随机抽取部分样本进行的重复试验表明,微卫星的扩增结果稳定,能够很好的重复。微卫星引物扩增的代表性聚丙烯酰胺凝胶电泳结果见图 1。

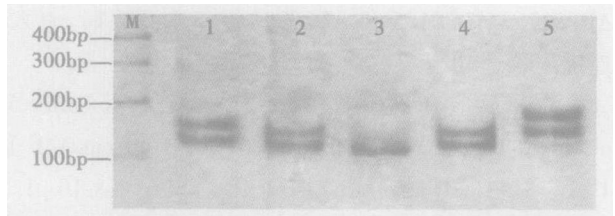


图 1 微卫星引物 ADL0185 部分扩增产物的电泳图谱

Fig 1 Electrophoresis pattern for part PCR results of ADL0185

5 个微卫星位点在林甸鸡和大骨鸡中均呈现丰富的多态性,共检测到 38 个等位基因,其中 ADL0146 位点的等位基因数 5 个,为最少;而 ADL0136 和 ADL0185 两个位点的等位基因数达 9 个,为最多。5 个微卫星位点的平均等位基因数为 7.6 个。同时,每个微卫星位点上各等位基因的频率在 2 个群体间存在一定差异,反映了 2 个鸡种在遗传结构上的差异。每个微卫星位点等位基因数目及片段大小变化范围见表 2。

表 3 各微卫星位点多态信息含量(PIC)、基因杂合度(h)和有效等位基因数(Ne)

Tab 3 Polymorphism information content, gene heterozygosity and effective alleles number of 5 microsatellite loci							
品种 Breeds	项目 Stem	ADL0136	ADL0146	ADL0176	ADL0185	ADL0298	群体平均 Average
林甸鸡	PIC	0.675 4	0.534 9	0.728 6	0.718 7	0.684 3	0.668 3
Lindian	h	0.716 5	0.704 7	0.799 6	0.798 4	0.750 9	0.754 0
chicken	Ne	3.527 3	3.386 4	4.990 0	4.960 3	4.014 5	4.175 7
大骨鸡	PIC	0.542 7	0.515 5	0.701 8	0.688 1	0.651 7	0.619 9
Dagu	h	0.692 9	0.684 4	0.783 7	0.762 4	0.727 1	0.730 1
chicken	Ne	3.256 3	3.168 6	4.623 2	4.208 8	3.664 3	3.784 2

2.3 遗传距离及聚类分析

为了探讨林甸鸡和大骨鸡的系统地位,我们搜集了已发表的边鸡、寿光鸡、广西黄鸡、鲁西斗鸡和日照麻鸡等 5 个国内地方鸡种相同微卫星位点的等位基因频率资料^[7,8],计算了包括林甸鸡和大骨鸡在内的共 7 个鸡种的欧氏遗传距离(表 4),并采用组间连接法进行了系统聚类(图 2)。

表 2 各微卫星位点的等位基因数及片段大小变化范围

Tab 2 The number and size limits of alleles from 5 microsatellite loci

项目 Stem	ADL0136	ADL0146	ADL0176	ADL0185	ADL0298
等位基因数 Alleles number	9	5	7	9	8
最大片段(bp) Max fraction	173	164	222	152	132
最小片段(bp) Min fraction	123	145	186	125	98

2.2 群体遗传多样性

根据 5 个微卫星位点在林甸鸡和大骨鸡 2 个鸡种中的等位基因频率,分别计算了每个微卫星标记在林甸鸡和大骨鸡 2 个群体中的多态信息含量(PIC)、基因杂合度(h)和有效等位基因数(Ne),见表 3。PIC 反映了基因位点在群体中的多样性程度。一般认为,若某个位点的 PIC 大于 0.5,则为高度多态位点;若 PIC 介于 0.2 和 0.5 之间,为中度多态位点;若 PIC 小于 0.2,为低多态位点。由表 3 可见,林甸鸡和大骨鸡的平均多态信息含量均大于 0.5,说明这 2 个鸡种被检测的 5 个位点均为高度多态位点。同时,林甸鸡群体平均多态信息含量为 0.668 3,大于大骨鸡群体的 0.619 9。从基因杂合度和有效等位基因数方面考虑,林甸鸡的平均基因杂合度和平均有效等位基因数分别为 0.754 0 和 4.175 7,均大于大骨鸡的 0.730 1 和 3.784 2。这在一定程度上说明了林甸鸡群体内的遗传多样性比大骨鸡更加丰富。

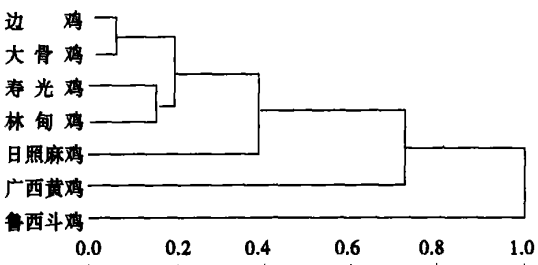


图 2 7 个鸡种的系统聚类图

Fig 2 Clustering diagram of 7 chicken breeds

表 4 7 个鸡种的欧氏遗传距离

Tab 4 Genetic distance of 7 chicken breeds by Ou								
品种 Breeds	代号 Code	BJ	DG	RM	GH	LX	SG	LD
边 鸡 Bian chicken	BJ	0.000 0						
大 骨 鸡 Dagu chicken	DG	0.076 9	0.000 0					
日照麻鸡 Rizhao Pockmarked	RM	0.366 4	0.353 6	0.000 0				
广西黄鸡 Guangxi Yellow chicken	GH	0.686 7	0.696 1	0.620 4	0.000 0			
鲁西斗鸡 Luxi fighting chicken	LX	0.984 2	0.915 2	0.775 9	0.952 2	0.000 0		
寿 光 鸡 Shouguang chicken	SG	0.208 4	0.210 7	0.398 1	0.729 4	0.981 3	0.000 0	
林 甸 鸡 Lindian chicken	LD	0.269 8	0.263 1	0.401 1	0.702 6	0.995 3	0.204 1	0.000 0

由表 4 可见, 林甸鸡与寿光鸡的遗传距离最近, 为 0.204 1; 大骨鸡与边鸡的遗传距离最近, 为 0.076 9; 而林甸鸡和大骨鸡两个鸡种与鲁西斗鸡的遗传距离均为最远, 分别为 0.995 3 和 0.915 2。图 2 表明, 在 0.4 的水平上 7 个鸡种明显的被分为 3 大类。林甸鸡、大骨鸡、边鸡、寿光鸡及日照麻鸡 5 个鸡种之间的亲缘关系比较密切, 为第一大类。而广西黄鸡和鲁西斗鸡均分别单独为一类。该聚类结果与这些鸡种的主要生产方向、已知的鸡种形成史是基本吻合的。

3 讨 论

3.1 关于群体的遗传多样性

遗传多样性是指动物种(群)内不同个体间遗传变异的总和, 是生物多样性的重要组成部分和最本质的体现^[9]。普遍认为, 位点信息多态含量、基因杂合度和有效等位基因数是反映某个群体遗传多样性的合适参数。本研究结果显示, 林甸鸡群体的平均多态信息含量、平均基因杂合度和平均有效等位基因数分别为 0.668 3, 0.754 0 和 4.175 7, 均大于大骨鸡群体的 0.619 9, 0.730 1 和 3.784 2。说明与林甸鸡相比, 大骨鸡的群体遗传多样性相对较贫乏。这与大骨鸡自 50 世纪 20 年代以来, 经历了较系统的人工选育过程是相一致的。但总体上来讲, 林甸鸡和大骨鸡两个群体的遗传多样性均较丰富。说明长期以来, 当地人民虽然对这两个鸡种进行了不同程度的人工选育, 但两个鸡种群体内所承受的选择压力均相对较小, 尚需进一步纯繁选育, 以提高群体的生产性能和整齐度。

3.2 关于群体间的遗传距离及聚类分析

林甸鸡、大骨鸡、边鸡、寿光鸡、日照麻鸡和广西黄鸡均属于肉蛋兼用或蛋肉兼用性鸡种; 而鲁西斗鸡属于玩赏性鸡种, 由于生产目的或用途的不同, 人们在对鲁西斗鸡的选育过程中逐渐产生了与蛋鸡、肉鸡品种较大的遗传分化。本研究中 7 个鸡种的系统聚类结果显示, 处于我国东北地区的林甸鸡和大骨鸡与分布于内蒙古西部的边鸡、山东的寿光鸡及日照麻鸡之间的亲缘关系比较密切, 而与广西黄鸡和鲁西斗鸡的亲缘关系均较远。这一聚类结果与这些鸡种的地理分布、已知的鸡种形成史及主要生产方向的实际情况是基本一致的。因此, 本研究中所选择的 5 个微卫星位点基本上能够正确反映试验鸡种群体间的遗传关系及群体内的遗传多样性。关于林甸鸡和大骨鸡在我国丰富的地方鸡种资源中更加全面的系统地位, 尚有待于进一步充实。

参考文献:

[1] Goldstein D B, Linares A R, Cavalli-Sforza L L, *et al.* An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci [J]. *Genetics*, 1995, 139: 463– 471.

[2] Ponsuksili S, Wimmers K, Schmoll F, *et al.* Comparison of multilocus DNA fingerprints and microsatellites in an estimate of genetic distance in chicken [J]. *The Journal of Heredity*, 1999, 90(6): 656– 659.

[3] Zhou H, Lamont S J Genetic characterization of biodiversity in highly inbred chicken lines by microsatellite markers [J]. *Anim Genet*, 1999, 30(4): 256– 264

[4] Takahashi H, Nirasawa K, Nagamine Y, *et al.* Genetic relationships among Japanese native breeds of chicken based on microsatellite DNA polymorphisms [J]. *J Hered*, 1998, 89(6): 543– 546.

[5] Takezaki N, Nei M. Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA [J]. *Genetics*, 1996, 144: 389– 399.

[6] Vanhala T, Tuiskula-Haavisto M, Elo K, *et al.* Evaluation of genetic variability and genetic distances between eight chicken lines using microsatellite markers [J]. *Poult Sci*, 1998, 77(6): 783– 790.

[7] 陈红菊, 岳永生, 樊新忠, 等. 利用微卫星标记分析山东地方鸡品种遗传多样性 [J]. *遗传学报*, 2003, 30(9): 855– 860.

[8] 白文林, 尹荣焕, 赵素君, 等. 边鸡微卫星 DNA 标记遗传多样性的研究 [J]. *中国家禽学报*, 2004, 8(1): 126– 129.

[9] 陈灵芝. 中国生物的遗传多样性——现状及其保护对策 [M]. 北京: 科学出版社, 1993. 99– 113.