应用微卫星标记分析中国地方鸡种的遗传变异

吴 萍¹ 李奕仁¹ 王金玉² 陈宽维³

1(中国农业科学院蚕业研究所农业部蚕桑产业产品质量检验检测中心, 镇江 212018)

2(扬州大学畜牧兽医学院, 扬州 225009)

3(中国农科院家禽研究所, 扬州 225003)

摘要 : 利用 8 个微卫星位点对中国 9 个地方鸡种和 1 个引进品种进行了遗传检测。计算出了各品种的平均杂合度、平均多态信息含量(PIC)及品种间的遗传距离 , 并进行了系统聚类。结果表明 : 8 个微卫星位点上共检测到了 54 个等位基因 , 每个位点上平均为 6.75 个。各位点平均多态信息含量为 0.5071 ~ 0.7434 , 均表现出了高度多态性。各群体平均杂合度较高 , 为 0.5564 ~ 0.7135 , 说明我国地方鸡种有着较丰富的遗传多样性。地方鸡种间的遗传距离相对较远 , 10 个鸡种共分为三大类。研究结果对我国鸡种资源的评估、保存和预测杂种优势具有一定的指导意义。

关键词 : 亲缘关系 , 品种特征 , 进化和选择

中图分类号 : S813 文献标识码 : A 文章编号 : 1005 - 0094(2003) 06 - 0461 - 06

Analysis of genetic variation of Chinese native chicken breeds using microsatellite markers

WU Ping¹ , LI Yi-Ren¹ , WANG Jin-Yu² , CHEN Kuan-Wei³

1 *Quality Inspection Centre for Sericulture Products , Ministry of Agriculture , Sericultural Research Institute , Chinese Academy of Agricultural Science , Zhenjiang 212018*

2 *College of Animal Science and Veterinary Medicine , Yangzhou University , Yangzhou 225009*

3 *Institute of Poultry Science , Chinese Academy of Agricultural Sciences , Yangzhou 225003*

Abstract : Genetic variation of ten chicken breeds , including nine native breeds and one introduced breed Yellow Bantam from France , was studied using eight microsatellite markers covering seven chromosomes. A total of 54 alleles were detected from eight microsatellite loci , and the average number of alleles per locus was 6.75. All microsatellite loci were highly polymorphic , with the mean PIC ranging from 0.5071 to 0.7434. All populations showed high levels of heterozygosity with the lowest value of 0.5564 for Yellow Bantam and the highest value of 0.7135 for Xianju chickens. A dendrogram was constructed based on DA distance. The ten populations grouped into three clusters : the introduced breed formed a separate branch , while the second branch comprised Chahua chickens and Gushi chickens , and the third branch included the other seven native chicken breeds. The results may be useful as an initial guide in evaluating the level of genetic variation , developing conservation strategies and predicting heterosis.

Key words : genetic relationship , chicken breeds , evolution and selection

我国地理环境和生态条件复杂多样 , 在长期自然选择和人工选择过程中形成了十分丰富的鸡种资源。据有关资料报道(<http://www.202.102.100.98/yzzj/Default.htm>) , 全球畜禽品种为 3019 种 , 其

中中国有 597 种 , 占全球总数量的 19.89%。以鸡为例 , 列入《中国家禽品种志》的有 27 种 , 加上列入各省市家禽品种志的品种共计达 89 种。地方禽种既是珍贵的自然资源 , 也是价值极高的经济资源 , 其

遗传多样性是未来家禽品种改良和适应生产条件变化的遗传基础,是保持农牧业长期发展和制定合理开发资源产业政策的基本依据。然而,由于外国鸡种大量引进并频繁地与当地鸡种杂交,使得有些地方鸡种极度杂合化,原有独特基因丢失殆尽,一些珍贵鸡种濒临灭绝。面对这样的严峻形势,畜禽品种资源保护已引起国内外有识之士的高度重视,被联合国粮农组织列为世界性的研究课题。

早在 1991 年,程光潮等就用血型 and 蛋白质多态分析了地方鸡种的群体结构(程光潮等,1991),吕雪梅等(1999)用 RAPD 标记分析了蛋鸡品系的遗传变异及其与杂种优势的关系。近年来,微卫星标记因其在基因组中分布均匀、多态性好、呈共显性遗传等优点,被广泛应用于群体亲缘关系与遗传变异的研究。张细权等(1998)用微卫星与 RAPD 分析了广东鸡种的遗传结构和亲缘关系;朱庆和李亮(2002)用 10 个微卫星标记对四川地方乌骨鸡的 5 个群体的遗传多样性进行了检测。Takahashi *et al.* (1998)利用 8 个微卫星标记分析了日本 10 个地方鸡种和 1 个进口鸡种的遗传距离,并据此将它们划分为三类。很多学者的研究均证实了微卫星 DNA 是研究群体遗传结构的一个十分有效的遗传标记。

本文利用微卫星标记分析不同鸡种的群体结构和遗传变异,旨在探讨不同品种间亲缘关系和变异程度,进行品种间遗传距离测定和聚类分析,为正确评价各品种遗传多样性的资源价值、制定合理可行的保种方案、开展配合力测定以及预测杂种优势等提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

样本:随机抽样选取地方鸡种白耳鸡(Q)、萧山鸡(G)、茶花鸡(O)、泰和丝毛乌骨鸡(A')、北京油鸡(U)、大骨鸡(B)、固始鸡(E)、仙居鸡(A)、尤溪麻鸡(C)和引进品种矮脚黄鸡(J)各 22~30 只(由中国农业科学院家禽研究所提供)。

引物:参考 Cheng (1997)和 Cheng & Grittenden (1994),选用 8 对微卫星 DNA 引物,引物由上海基康生物工程公司合成(表 1)。

试剂:全血 DNA 提取试剂盒、10 × buffer、Taq 酶和 dNTP 等为北京鼎国生物工程公司产品。

仪器:PCR 仪为 Forotec Thermal Cycler TC-96/T/H(a)型,DYY-III 24A 型电泳槽由北京六一仪器厂提供,Alpha Imager 凝胶成像系统由 Alpha Innotech Corporation 生产。

1.2 方法

DNA 提取:翅静脉采血 1 mL,ACD 抗凝,按照全血 DNA 提取试剂盒步骤(作适当改动)提取。

PCR 扩增:反应体系 25 μL,模板 DNA 25~50 ng,10 × buffer 2.5 μL(含 Mg^{2+} 2.0 mmol/L),dNTP 0.2 mmol/L,Taq 酶 1 U,双向引物各 82.5 ng。循环参数 95℃ 2 min,94℃ 30 s,50~60℃(因位点而异)30 s,72℃ 40 s,35 个循环,72℃ 最终延伸 5 min。

PCR 检测:3% 琼脂糖抽测是否有扩增产物以及扩增产物是否在所需的长度范围内,8% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,银染、照像。

1.3 统计分析

参考有关文献(樊斌等,1999;商海涛等,2001),在 Excel 中计算等位基因频率、群体杂合度(Nei & Roychoudhury,1974)、多态信息含量和遗传距离(D_A)(Nei *et al.*,1983)。采用 SPSS 软件用最

表 1 微卫星位点引物序列
Table 1 Primer sequences of microsatellite loci

引物 Primer	序列 Sequence		染色体 Chromosome number	退火温度(℃) Annealing temperature
ADL185	CATGGCAGCTGACTCCAGAT	AGCGTTACCTGTTGCGTTTGC	2	52
MCW88	TGCAAATGAACGTATCATGC	TCCAATCCTAGAACTCTTATG	2	57
MCW5	ACCTCCTGCTGGCAAATAAATT	TCACCTTAGCTCCATCAGGATTCA	4	55
MCW120	CTATGTAAAGCTTGAATCTTCA	ATTCTGGGTGCTAATTTACC	7	55
ADL44	AAGTGCTTTATTGAAGTAGA	CTGTGCTGTTGCGTTAGTTG	12	50
MCW217	GATCTTTCTGGAACAGATTTTC	CTGCACTTGGTTCAGGTTCTG	18	60
ADL289	ATGCTATCTTAGAGGTGCTC	AATTGAAATCACTTTGCTCA	23	52
MCW135	ATATGCTGCAGAGGGCAGTAG	CATGTTCTGCATTATTGCTCC	9	54

短距离法进行系统聚类。

2 结果

2.1 群体内的遗传变异

由表 2 可看出 ,各位点上的平均多态信息含量均大于 0.5 ,为高度多态位点。其中 ,ADL289 最低 ,为 0.5071 ,MCW217 最高 ,为 0.7434。

由表 3 可看出 ,各鸡种在 8 个位点的平均杂合度较高 ,为 0.5564 ~0.7135。由高到低的排列顺序依次为 A(仙居鸡)、B(大骨鸡)、C(尤溪麻鸡)、A’ (泰和丝毛乌骨鸡)、O(茶花鸡)、G(萧山鸡)、U(北京油鸡)、Q(白耳鸡)、E(固始鸡)和 J(矮脚黄鸡)。

表 2 各位点的平均杂合度与平均多态信息含量
Table 2 Mean heterozygosity and mean PIC in eight microsatellite loci

	微卫星位点 Microsatellite loci							
	ADL289	MCW88	ADL185	ADL44	MCW120	MCW135	MCW217	MCW5
平均杂合度 Mean heterozygosity	0.5732	0.6606	0.7107	0.5898	0.6672	0.6513	0.7786	0.6470
平均多态信息含量 Mean PIC	0.5071	0.6125	0.6602	0.5320	0.6155	0.6029	0.7434	0.6113

表 3 各鸡种的平均杂合度和平均多态信息含量
Table 3 Mean heterozygosity and mean PIC in ten chicken breeds

	B	C	O	E	A’	G	A	Q	J	U
平均杂合度 Mean heterozygosity	0.6966	0.6882	0.6810	0.5932	0.6821	0.6802	0.7135	0.6284	0.5564	0.6783
平均多态信息含量 Mean PIC	0.6500	0.6417	0.6290	0.5234	0.6332	0.6380	0.6808	0.5722	0.4999	0.6378

B :大骨鸡 ;C :尤溪麻鸡 ;O :茶花鸡 ;E :固始鸡 ;A’ :泰和丝毛乌骨鸡 ;G :萧山鸡 ;A :仙居鸡 ;Q :白耳鸡 ;J :矮脚黄鸡 ;U :北京油鸡
B , Big bone chicken ;C , Youxi partridge chicken ;O , Chahua chicken ;E , Gushi chicken ;A’ , Taihe silkies chicken ;G , Xiaoshan chicken ;A , Xianju chicken ;Q , White earlobes chicken ;J , Yellow bantam ;U , Beijing fatty chicken.

表 4 10 个鸡种间的遗传距离
Table 4 The genetic distance between ten chicken breeds

	B	C	O	E	A’	G	A	Q	J
B									
C	0.4873								
O	0.6416	0.6268							
E	0.5983	0.6840	0.4849						
A’	0.5059	0.5757	0.5113	0.6118					
G	0.5312	0.5167	0.4390	0.4710	0.4591				
A	0.4165	0.4561	0.6790	0.5875	0.3555	0.3953			
Q	0.4697	0.6435	0.7117	0.5648	0.5251	0.4183	0.3856		
J	0.5769	0.6326	0.5845	0.7190	0.5888	0.6203	0.5230	0.5085	
U	0.5608	0.5421	0.5523	0.5446	0.3826	0.4892	0.5831	0.5212	0.5075

鸡种代号同表 3 Chicken breed codes correspond to those in Table 3.

地方鸡种的平均杂合度均高于引进品种矮脚黄鸡。

2.2 遗传距离及系统聚类

由表 4 可看出 :中国地方鸡种与矮脚黄鸡的遗传距离都较远 ,都大于 0.5。其中 ,固始鸡与矮脚黄鸡的距离最远 ,为 0.7190。中国地方鸡种间的遗传距离差异也较大 ,为 0.3555 ~0.7117。

由图 2 可看出 ,10 个鸡种共分为三大类 :外国鸡种自成一类 ;茶花鸡与固始鸡为一类 ;其余 7 个鸡种为一类。在第三类中 ,泰和丝毛乌骨鸡、北京油鸡、仙居鸡、白耳鸡、大骨鸡、萧山鸡等 6 个专用品种的亲缘关系相对较近 ;尤溪麻鸡与其他地方鸡种间的亲缘关系相对较远。

图1 MCW217 位点在 B 群体中的 8% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳的部分图谱
1 ~ 11 代表 B 群体中的不同个体。Marker : PBR322/*Msp*-I
Fig.1 Denaturation PAGE of MCW217 in Population B
1 ~ 11 represent different individuals in population B.

图2 10 个品种的系统聚类图
Fig.2 A dendrogram based on genetic distances between ten chicken breeds

3 分析和讨论

3.1 品种内遗传变异

多态信息含量(polymorphism information content , PIC)通常用来表示微卫星位点的杂合程度。当 PIC > 0.5 时 ,该位点为高度多态位点 ;当 PIC 在 0.25 ~ 0.5 时 ,为中度多态位点 ;当 PIC < 0.25 时 ,则为低度多态位点。本研究的 8 个微卫星位点均表现出了高度多态性。共检测到 54 个等位基因 ,不同等位基因间片段大小的差异不等 ,有的仅为 2 个 bp (图 1)。每个位点上的平均等位基因数为 6.75 个。数目最多的是 MCW135 位点 ,242 个个体中共检测到 14 个等位基因 ;最低的是 MCW5 位点 ,226 个个体中共检测到 6 个等位基因。张细权等(1998)用 MCW5 等微卫星 DNA 研究广东鸡种的遗传变异时

检测到 3 个等位基因 ,比本研究的要少 ,这可能是因为本次检测个体数较多。

基因杂合度(heterozygosity , H)又称基因多样性 ,是度量品种变异的一个最适参数。平均基因杂合度的大小近似地反映出遗传结构变异程度的高低 :杂合度越高 ,表明群体的遗传多样性越高。本研究得出的杂合度为 0.2657 ~ 0.8316 ,这与 Takezaik & Nei (1996)认为微卫星计算出的杂合度值为 0.3 ~ 0.8 的结果相似。各鸡种的平均杂合度为 0.5564 ~ 0.7135。朱庆和李亮(2002)用微卫星分析四川乌骨鸡的杂合度为 0.4709 ~ 0.7019 ;Vanhala *et al.* (1998)用 9 个微卫星标记分析了 8 个品系的鸡的遗传变异 ,所有微卫星标记均表现出了多态性 ,平均每个位点的等位基因为 4 ~ 13 个 ,杂合度从 0 ~ 0.91 不等 ;Romano & Weigendts (2001)用 14 个微卫

星标记检测了 20 个鸡种共 224 个个体的遗传变异，等位基因数为 2 ~ 21，每个位点上的平均等位基因数为 11.2。我国地方鸡种的杂合度比矮脚黄鸡的要高，说明我国地方鸡种可能具有比矮脚黄鸡更丰富的遗传多样性，地方鸡种还可以进一步地纯繁选育，以提高各群体的遗传一致性。

不同品种在同一微卫星位点上等位基因数目和频率的差异体现出其遗传上的差异。本研究发现，在 MCW217 位点以及 ADL185 位点上，大小分别为 176 bp 和 160 bp 的等位基因为 U 品种(北京油鸡)所独有。这可能说明了北京油鸡在漫长的进化过程中，受其独特的地理环境和饲养模式以及人工选择等因素的影响，形成了具本品种特征的遗传基因，而在 MCW5 位点上，大小为 214 bp 和 219 bp 的等位基因为所有品种所共有。这些等位基因可能是我国地方鸡种中最原始、最具特征的。

本次研究中的 8 个微卫星位点在 10 个群体中检测的等位基因数目和片断大小与 Crooijmans *et al.*(1996)在三个参考家系(E ,C ,W)的研究有差异。例如，他们在 MCW135 和 MCW5 上分别检测到 7 个和 4 个等位基因，大小分别为 124 ~ 150 bp 和 189 ~ 259 bp。本研究在这两个位点上分别检测到 14 和 6 个等位基因，大小分别为 126 ~ 154 bp 和 214 ~ 226 bp。这说明中国地方鸡种与外国鸡种相比存在显著差异，形成了区别于其他外国鸡种的特有的等位基因。

3.2 种间的遗传距离与系统聚类

Takezaki & Nei(1996)将群体间遗传距离的各种计算方法分别在 IAM/SMM 情况下进行计算机模拟，用 NJ 构建系统发生树来评价不同的遗传距离在构建聚类图上的相对有效率。研究发现，在 IAM/SMM 下，DC 和 DA 在构建系统发生树方面优于其他方法，因而本文采用了 DA 估算遗传距离。

本研究中，外国鸡种自成一类，分化程度较高的 6 个专用鸡种亲缘关系较近(蛋用、兼用、药用等)。仙居鸡原产于浙江省，白耳鸡主要分布在江西省，在浙江省江山县有少量分布，这两个品种均为优良的蛋用品种，泰和丝毛乌骨鸡分布在江西省，是一个著名的药用性品种，大骨鸡又名庄河鸡，主要分布在辽宁省庄河县。关于大骨鸡的形成历史，据资料记载(郑丕留，1988)，早在 200 多年前，山东移民带来了大型的寿光鸡，尔后与当地鸡种杂交，并经长期选育

成为一个优良的兼用品种。北京油鸡以肉质鲜美、蛋重而著称，也是一个很珍贵的兼用品种，与寿光鸡同属黄淮海区，萧山鸡又名“越鸡”，与大骨鸡一样，体型都较大，尤溪麻鸡为福建的一个原始品种，由于地理隔离和特殊的生态条件影响，使其与其他地方鸡种差异较大，固始鸡将东南区和西南区的鸡种(茶花鸡)联系起来。综上所述，我国地方鸡种有着独特的形态特征和经济特性。

程光潮等(1991)用血型 and 蛋白质多态基因等绘制的聚类图与本文有异同处，其中，固始鸡与茶花鸡，泰和丝毛乌骨鸡与北京油鸡的聚类结果与本文的一致，但白耳鸡与仙居鸡的聚类结果差异较大，这可能是因为所利用的遗传标记不同。微卫星分布均匀，其丰富的多态性在度量品种遗传多样性等研究中较其他遗传标记显示出了巨大的优势。在多态性、平均杂合度以及群体间遗传距离方面，微卫星位点值均高于蛋白质位点值；微卫星与 RFLP、RAPD 比较，在重复性、检测工艺上更为可靠与方便；在度量杂合度时，微卫星与 DNA 指纹具有很强的相关性(Ponsuksili，1999)。

本文所选用的引物均表现为高度多态性，每个位点的等位基因数均大于 6，采用 Takezaki 等推荐的 DA 估测遗传距离，用一个外国鸡种作为对照，绘制了系统聚类图(图 2)。由于地方鸡种资源十分丰富，要确切地掌握种内遗传变异和种间遗传关系，还需增加检测位点数、扩大样本量，综合考虑多种遗传标记的研究结果。

参考文献

Cheng H. H. 1997. Mapping the chicken genome. *Poultry Science*, **76**: 1101 – 1107.

Cheng H. H. and Crittenden L. B. 1994. Microsatellite markers for genetic mapping in the chicken. *Poultry Science*, **73**: 539 – 546.

Cheng G-C(程光潮), Zhou D-W(周德旺), Wu L-C(吴丽城), Duan Z-X(段章雄), Wang L(王力), Zhang T(张婷), Liu K-F(刘坤凡) and Zheng X-H(郑小惠). 1991. Studies of the blood-group of chicken. X. Analysis of blood-group and plasma protein polymorphism in eleven Chinese native fowl breeds. *Acta Genetica Sinica* (遗传学报), **18**(5): 415 – 423. (in Chinese)

Crooijmans R. P., Graen A. F., Van Kampen A. J., Van der Beek S., Van der Poel J. J. and Groenen M. A. 1996. Preliminary linkage map of the chicken (*Gallus domestics*)

genome based on microsatellite markers: 77 new markers mapped. *Poultry Science*, **75**: 746 – 754.

Fan B(樊斌), Li K(李奎), Peng Z-Z(彭中镇), Chen Y., Moran C., Gong Y. C. (龚炎长) and Zhao S-H(赵书红). 1999. Genetic variation of 27 microsatellite loci in three Hubei indigenous pig breeds. *Chinese Biodiversity (生物多样性)*, **7**(2): 91 – 96. (in Chinese)

Lu X-M(吕雪梅), Yang G-F(杨关福), Zhang X-Q(张细权), Dai C-R(戴彩润) and Lu C-B(卢传斌). 1999. Studies of RAPD variability of chicken lines and its relationship to heterosis. *Hereditas(遗传)*, **21**(2): 24 – 28. (in Chinese)

Nei M. and Roychoudhury A. K. 1974. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics*, **76** (2): 379 – 390.

Nei M., Tajima F. and Tateno Y. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution*, **19**: 153 – 170.

Ponsuksili S., Wimmers K., Schmoll F., Horst P. and Schellander K. 1999. Comparison of multilocus DNA fingerprints and microsatellite in an estimate of genetic distance in chicken. *The Journal of Heredity*, **6**: 656 – 659.

Romano M. N. and Weigendts S. 2001. Analysis of genetic relationships between various populations of domestic and jungle fowl using microsatellite markers. *Poultry Science*, **80**: 1057 – 1063.

Shang H. T.(商海涛), Niu R.(牛荣), Wei H(魏泓), Huang Z. B.(黄中波), Gan S. X.(甘世祥), Wang A. D.(王爱德) and Zeng Y. Z.(曾养志). 2001. Genetic analysis of 35 microsatellite loci in three miniature pig breeds. *Hereditas(遗传)*, **23**(1): 17 – 20. (in Chinese)

Takahashi H., Nirasawa K., Nagamine Y., Tsudzuki M. and Yamamoto Y. 1998. Genetic relationships among Japanese native breeds of chicken based on microsatellite DNA polymorphisms. *The Journal of Heredity*, **89**: 543 – 546.

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

Vanhala T., Tuiskula-Haavisto, M., Elo K., Vilki J. and Maki-Tanial A. 1998. Evaluation of genetic variability and genetic distances between eight chicken lines using microsatellite markers. *Poultry Science*, **77**: 783 – 790.

Zhang X-Q(张细权), Lu X-M(吕雪梅), Yang Y-H(杨玉华), Liu J-S(刘敬顺), Yang G-F(杨关福) and Wu X-H(吴显华). 1998. Population genetic variability of microsatellite polymorphisms and RAPDs in Chinese chicken breeds in Guangdong. *Acta Genetica Sinica(遗传学报)*, **25**(2): 112 – 119. (in Chinese)

Zheng P-L(郑丕留). 1988. *Poultry Breeds in China(中国家禽品种志)*. Shanghai Scientific and Technical Publishers, Shanghai, 28 – 29. (in Chinese)

Zhu Q(朱庆) and Li L(李亮). 2002. Genetic diversity in Sichuan black bone chicken lines as revealed by microsatellite DNA markers. *Sichuan Animal and Veterinary Sciences (四川畜牧兽医)*, **29**(8): 523 – 526.

(责任编辑:时意专)

《中国生态学》简介

《中国生态学》由兰州大学出版社 2003 年出版,作者为兰州大学生命科学学院的张正春、王勋陵、安黎哲等。全书分为三篇,第一篇介绍了中国生态学的概念和理论,第二篇为中国生态学应用与发展,第三篇回顾总结了中国古代的生态学理论和实践。

作者详细论述了中国生态学的概念系统和基本理论体系,概述了中国生态学的模型系统,探讨了中国传统文化的生态学原理以及中国古代生态学思想对现代科学、文化等各个方面的深刻影响。特别是对于儒家和道家的生态学思想、中国古代的山水诗和山水画的科学价值、“风水理论”的生态学依据、中国古代园林的设计理论以及建筑思想都有独到的见解,并用中国生态学的概念和理论对现代生态学的有关问题进行了阐释。最后,作者提出了生态学的统一理论和生命科学的“大一统理论”。

本书可供从事生态学、生命科学、环境科学、科学史、文化史、中国传统文化,包括传统哲学、美学、文学、医学、易学、经学等领域的研究人员参考,也可用作大学相关专业学生和研究生的教学参考书。

邮购地址:兰州市天水路 298 号兰州大学生命科学学院甘肃省植物学会(邮政编码:730000);联系人:徐世健,刘艳红;电话:0931-4967180;传真:0931-4967181;手机:13038769251;13919170189;E-mail:liuyh@gstc.gov.cn 或 xutxzyhm@163.com