

利用微卫星标记分析北京油鸡的遗传多样性

张剑, 初芹, 张尧, 刘华贵* (北京市农林科学院畜牧兽医研究所, 北京 100097)

摘要 [目的]探讨北京油鸡的遗传多样性。[方法]采用 29 对微卫星标记对北京油鸡保种群的 192 个个体进行遗传多样性检测, 并通过计算等位基因数、等位基因频率、期望杂合度(He)和多态信息含量(PIC)分析群体内的遗传变异情况。[结果]在 29 个微卫星标记中共检测到 171 个等位基因, 每个微卫星座位的等位基因数在 2~14 个, 平均等位基因数为 5.90 个; 多态信息含量和期望杂合度的平均值分别为 0.53 和 0.59, 均大于 0.5, 表现为高度多态性; 除 5 个位点(MCW0069、ADL0112、MCW0183、LEI0234 和 MCW0016)外, 其余 24 个微卫星位点都处于基因平衡状态。[结论]北京油鸡保种群具有丰富的遗传多样性。北京油鸡在北京市农林科学院榆堡种鸡场得到了较为妥善的保存。

关键词 北京油鸡; 微卫星标记; 遗传多样性

中图分类号 S834.89 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)27-10963-03

Genetic Variations of Beijing You Chicken Revealed by Microsatellite Markers

ZHANG Jian et al (Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Beijing Municipal Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097)

Abstract [Objective] To discuss the genetic diversity of Beijing You chicken. [Method] Twenty-nine microsatellite markers were used to analyze the conservation efficiency of Beijing You chickens preserved population. Genotypes were detected in 192 samples. The genetic variations among the populations were calculated by the number of alleles, gene frequency, expected heterozygosity (He), and Polymorphism Information Content (PIC) values. [Result] The results showed that 171 alleles were detected. All loci detected in the study showed polymorphism and the number of alleles ranged from 2 to 14 in the population and the average observed number of alleles was 5.90. High polymorphism was found in the population, and the average of He and PIC values were 0.53 and 0.59 each more than 0.5. Most of these loci were at Hardy-Weinberg equilibrium except five loci (MCW0069, ADL0112, MCW0183, LEI0234, MCW0016). [Conclusion] Beijing You chickens preserved population in the Yufa conservation farm of Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences (BAAFS) was shown to have retained substantial biodiversity, indicating that the conservation programs are efficient.

Key words Beijing You chicken; Microsatellite marker; Genetic diversity

我国是世界上家畜、家禽驯化最早的国家之一。在我国各处发掘的新石器时代遗址中就有畜禽的遗迹。我国所拥有的地方鸡种资源在世界上是独一无二的, 有的还具有独特的基因类型^[1]。北京油鸡是原产于京郊的优良地方鸡种, 以外貌独特、肉蛋品质优良而著称。该鸡种起源于清朝, 具有“三黄”、“三毛”以及“五趾”等外貌特征。北京市农林科学院畜牧兽医研究所从 1972 年开始从事北京油鸡的保种和选育工作, 迄今已有 40 多年的历史, 并对该鸡种进行了种质特性的测定, 研究了小群保种的方法。但目前对保种效果的监测还局限于常规育种技术手段, 未深入到分子水平。例如观察鸡种的体型外貌、统计各世代生产性能(产蛋量、开产日龄和生长性能)的变化等均是从事型上来反应保种群各世代在质量遗传性状上的稳定性。

微卫星标记是目前普遍使用的分子遗传学标记方法。较以往的标记而言, 微卫星标记具有多态性高、共显性、易于鉴定、检测重复性好以及在基因组中分布广泛等优点, 在鸡遗传图谱的构建^[2]、QTL 定位^[3-4]、分子遗传多样性^[5-6]以及家系鉴定等方面均得到了普遍的应用。曲鲁江等利用 28 个微卫星标记分别对北京油鸡及大骨鸡等 2 个优良地方鸡种

在不同保种场的保种效果进行了研究^[7]。高玉时等选择 20 个微卫星标记对国家家禽品种资源基因库中保存的 11 个地方品种保种群进行了遗传检测^[8]。总体而言, 不同保种场、不同检测年份和不同的微卫星位点对群体的遗传多样性状况的评价存在较大差异。笔者对北京市农林科学院畜牧兽医研究所榆堡原种场保存的北京油鸡进行微卫星 DNA 多态性分析, 计算其等位基因频率、基因平均杂合度和多态信息含量, 建立北京油鸡保种群微卫星标记档案, 以期监测保种效果、及时调整保种方案提供科学基础, 并为资源的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 北京市农林科学院畜牧兽医研究所榆堡原种场北京油鸡保种群采用“家系等量随机选配法”进行保种。保种群在逐代繁殖过程中, 人工控制各家系繁殖平衡, 即选留作亲本的个体在数目上基本是等量分布, 选留的种鸡数量不足时, 公鸡采用本家系的后代, 母鸡适当从其他家系中补充, 每个保种群选留的鸡只, 各自合并随机重组新的家系, 并反复检查配种方案, 验证每个新的家系无全同胞、半同胞予以组配, 严格控制近交系数的增长速度。试验所用血样即采用以上方法进行保种的北京油鸡保种群, 共采取了 192 个血液样本, 其中公鸡 48 只, 母鸡 144 只, 所取样本尽可能平均分布于各个家系。每只鸡翅下静脉采血 2.0~3.0 ml, 置于盛有 0.5 ml 抗凝剂的离心管中, 混匀后于 -20℃ 低温保存。

1.2 微卫星引物、PCR 扩增及其检测 根据联合国粮食与农业组织 (FAO) 和国际动物遗传学会 (ISAG) 联合推荐的微

基金项目 北京市农林科学院科技创新能力建设专项; 国家肉鸡产业技术体系专项 (CARS-42-Z02); 国家自然科学基金青年基金项目 (31001004)。

作者简介 张剑 (1978 -), 男, 江西新余人, 副研究员, 博士, 从事家禽遗传育种研究, E-mail: zhangjiancau@yahoo.com.cn。* 通讯作者, 土家族, 研究员, 博士, 从事家禽遗传育种研究, E-mail: liuhuagu66@163.com。

收稿日期 2013-08-11

卫星 DNA 遗传多样性检测的标记^[9],选择 29 对微卫星位点(表 1)。引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成,上游引物 5'端标记 6-FAM、HEX 或 TEM 荧光,分子量内标为 GeneScanTM-350 TAMRA^{TMS}TANDARD。PCR 扩增体系为 15 μ l,含鸡基因组模板 50 ng, *Taq* DNA 聚合酶(Takera)0.5 U, dNTP 终浓度 200 μ mol/L,引物 50 ng, Mg^{2+} 浓度为 2.5 mmol/L, $10 \times$ buffer 1.5 μ l,按各引物条件于 PCR 仪(PTC200)上进行扩增。然后,根据目的片段大小、所标记的荧光进行组合,用 ABI3730XL 全自动基因分析仪进行检测,微卫星基因型用仪器自带软件 GeneMapper Version4.0 进行分析。

1.3 数据统计分析方法 使用 Excel Microsatellite Toolkit version 3.1 (http://oscar.gen.tcd.ie/_sdeparck/ms-toolkit) 计算多态信息含量(PIC)。等位基因频率、等位基因数(*N*)、有效等位基因数(*Ne*)、观察杂合度(*Ho*)、期望杂合度(*He*)以及群体基因频率 Hardy-Weinberg 平衡的卡方检验使用 POPGEN32 软件计算。

2 结果与分析

2.1 微卫星扩增多态性 由表 2 可知,各引物在大多数个体中均检测出所需大小的条带,并表现出一定的多态性。在 29 个微卫星标记中共检测到 171 个等位基因。标记的等位基因数目有一定差异,每个微卫星座位的等位基因数在 2~14 个。等位基因数最多的为 LEI0234,为 14 个;最少的为 MCW0098 和 MCW0103,仅有 2 个等位基因。平均观察等位基因数为(5.90 \pm 3.03)个,平均有效等位基因数为(2.82 \pm 1.24)个。

表 1 29 对微卫星引物信息

序号	微卫星位点	染色体或连锁群	退火温度// $^{\circ}$ C	等位基因范围
1	ADL0112	Chr. 10	58	120 ~ 134
2	ADL0268	Chr. 1	60	102 ~ 116
3	ADL0278	Chr. 8	60	114 ~ 126
4	LEI0094	Chr. 4	60	247 ~ 287
5	LEI0166	Chr. 3	60	354 ~ 370
6	LEI0192	Chr. 6	60	244 ~ 372
7	LEI0234	Chr. 2	60	216 ~ 364
8	MCW0014	Chr. 6	58	164 ~ 186
9	MCW0016	Chr. 3	60	138 ~ 206
10	MCW0020	Chr. 1	60	179 ~ 185
11	MCW0034	Chr. 2	60	212 ~ 246
12	MCW0037	Chr. 3	64	154 ~ 160
13	MCW0067	Chr. 10	60	176 ~ 186
14	MCW0069	E60C04W23	60	158 ~ 176
15	MCW0078	Chr. 5	60	135 ~ 147
16	MCW0081	Chr. 5	60	112 ~ 135
17	MCW0098	Chr. 4	60	261 ~ 265
18	MCW0104	Chr. 13	60	190 ~ 234
19	MCW0111	Chr. 1	60	95 ~ 120
20	MCW0123	Chr. 14	60	76 ~ 100
21	MCW0165	Chr. 23	60	114 ~ 119
22	MCW0183	Chr. 7	58	296 ~ 326
23	MCW0206	Chr. 2	60	221 ~ 249
24	MCW0216	Chr. 13	60	139 ~ 149
25	MCW0222	Chr. 3	60	220 ~ 226
26	MCW0248	W29M15	60	205 ~ 225
27	MCW0330	Chr. 17	60	256 ~ 300
28	MCW0103	Chr. 3	64	266 ~ 271
29	MCW0295	Chr. 4	60	88 ~ 106

表 2 各微卫星标记的等位基因大小及等位基因数

位点	片段长度 bp	观察等位	有效等位
		基因数// <i>N_a</i>	基因数// <i>N_e</i>
MCW0037	150,152,154	3	2.62
MCW0123	75,77,79,81,83,85,87,89,91,93	10	5.46
MCW0222	218,220,222,224	4	1.30
MCW0069	154,156,158,160,162,164,170	7	2.33
MCW0295	84,86,88,94,96	5	2.94
MCW6206	223,229,231,243	4	1.87
ADL0268	100,104,106,108,110,112,114	7	2.96
LEI0192	256,276,288,292,296,300,316,318,340,372	10	5.29
MCW0014	162,172,174,176,186	5	3.20
ADL0112	122,124,128,130	4	2.27
MCW0103	267,271	2	1.93
MCW0248	209,213,217	3	2.00
ADL0278	111,115,117,119,121	5	2.68
MCW0020	178,180,182,184	4	1.74
MCW0098	256,258	2	1.10
MCW0104	185,187,195,201,205,207,219	7	2.66
MCW0165	115,117,119	3	1.90
MCW0330	255,267,273,275,285,287	6	3.07
LEI0094	184,248,256,258,262,264,266,268,284	9	2.90
MCW0067	174,176,178,180,182,184,186	7	2.53
MCW0081	113,118,133	3	1.96
MCW0034	220,222,224,228,232,244	6	2.95
MCW0078	134,136,138,140,142,144,146	7	3.18
MCW0183	294,296,298,300,302,304,312,314,316,318,320,322,324	13	5.42
LEI0166	347,351,359	3	1.93
LEI0234	257,261,263,275,279,287,295,297,299,305,308,311,317,327	14	6.04
MCW0216	137,139,141,143,145	5	2.30
MCW0016	138,140,142,144,146,148	6	2.65
MCW0111	95,97,99,101,103,105,106	7	2.67
平均		5.90 \pm 3.03	2.82 \pm 1.24

2.2 杂合度和多态信息含量测定 由表 3 可知,除了

MCW0098 以外,其余微卫星座位均有较高的杂合度及多态

信息含量。期望杂合度及多态信息含量最大分别可达 0.84 和 0.82 (LEI0234), 群体的平均观察杂合度、平均期望杂合度及平均多态信息含量分别为 (0.58 ± 0.16) 、 (0.59 ± 0.16) 和 (0.53 ± 0.17) ; 均值都高于 0.50, 表现出丰富的多态性。

对各个座位基因频率 Hardy-Weinberg 平衡进行了卡方检验, 除 5 个位点 (MCW0069、ADL0112、MCW0183、LEI0234 和 MCW0016) 处于不平衡状态外, 其余 24 个位点均处于平衡状态, 说明保种群体基本处于平衡状态。

表 3 各微卫星标记遗传参数

位点	观察杂合度 (H_o)	期望杂合度 (H_e)	多态信息含量 (PIC)
MCW0037	0.62	0.62	0.55
MCW0123	0.86	0.82	0.80
MCW0222	0.23	0.23	0.22
MCW0069	0.50	0.57	0.53
MCW0295	0.64	0.66	0.59
MCW6206	0.45	0.47	0.41
ADL0268	0.72	0.66	0.60
LEI0192	0.79	0.81	0.79
MCW0014	0.66	0.69	0.63
ADL0112	0.55	0.56	0.47
MCW0103	0.53	0.48	0.37
MCW0248	0.54	0.50	0.38
ADL0278	0.62	0.63	0.58
MCW0020	0.42	0.43	0.39
MCW0098	0.08	0.09	0.09
MCW0104	0.59	0.63	0.58
MCW0165	0.40	0.48	0.37
MCW0330	0.68	0.68	0.63
LEI0094	0.54	0.66	0.61
MCW0067	0.58	0.61	0.54
MCW0081	0.52	0.49	0.38
MCW0034	0.69	0.66	0.61
MCW0078	0.69	0.69	0.65
MCW0183	0.81	0.82	0.79
LEI0166	0.48	0.48	0.37
LEI0234	0.65	0.84	0.82
MCW0216	0.56	0.57	0.52
MCW0016	0.78	0.62	0.56
MCW0111	0.62	0.63	0.58
平均	0.58 ± 0.16	0.59 ± 0.16	0.53 ± 0.17

3 讨论

多态信息含量 (PIC) 是衡量基因变异程度高低的一个指标。当 $PIC > 0.5$ 时, 基因座为高度多态座位; 当 $0.25 < PIC < 0.5$ 时, 基因座为中度多态座位; 当 $PIC < 0.25$ 时, 基因座为低度多态座位^[10]。同时, 多态信息含量关系到该座位可用性及使用频率, 多态信息含量越高, 在一个群体中, 该座位上杂合子比例则越大, 提供的遗传信息就越多。试验结果表明, 29 个微卫星座位中有 19 个位点处于高度多态, 8 个位点为中度多态, 2 个位点 (MCW0098、MCW0222) 为低度多态座位。29 个微卫星座位的平均 PIC 为 0.53, 能够为评价北京油鸡的遗传多样性提供充分地信息, 但有 2 个位点为低度多态, 提供的信息较少, 可在以后的遗传评估中舍去或替换

成高度多态的位点。

杂合度又称为基因多样性, 一般认为是度量群体遗传变异的一个最适参数。在该试验中, 北京油鸡的平均期望杂合度为 0.59, 表明北京油鸡具有丰富的遗传多样性和较高的选择潜力, 同时采用的保种方法效果明显, 有效地保存了群体的遗传变异。试验中北京油鸡的 PIC 以及期望平均杂合度均值分别为 0.53 和 0.59, 与曲阜江等研究结果相同^[7]; 而高玉时等 (2004) 利用 20 个微卫星标记对国家家禽品种资源基因库中保存的 11 个地方品种保种群进行了遗传检测分析, 得出北京油鸡平均 PIC 及 He 值分别为 0.653 9 和 0.701 6^[8]。这可能与样品来自不同的保种场、采用的微卫星标记不同有关。

通过 Hardy-Weinberg 平衡的卡方检验发现, 绝大多数位点处于平衡状态, 反应了所抽取的样本和数目基本能够反应群体的实际情况, 但少数几个标记却处于不平衡状态。这种不平衡状态也许是该位点本身真实存在着不平衡, 也可能是由于样本的原因造成的假不平衡, 这种假不平衡可能是由于检测方法引起的。因为在检测微卫星位点时, 存在于检测样本中的微卫星位点部分等位基因可能不能检出, 而造成“哑等位基因”的出现。

试验利用 29 个微卫星位点分析北京油鸡群体内的遗传参数, 发现北京油鸡保种群具有丰富的遗传多样性, 具有较高的保种价值, 表明在保种的过程中所采用的保种方法是可行的, 为进一步对北京油鸡种质资源的保存和利用提供了科学依据。

参考文献

- [1] 《中国家畜家禽品种志》编委会. 中国家畜品种志 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1998.
- [2] JACOBSSON L, PARK H B, WAHLBERG P, et al. Assignment of fourteen microsatellite markers to the chicken linkage map [J]. J Poultry Sci, 2004, 83: 1825 - 1831.
- [3] MCELROY J P, DEKKERS J C M, FULTON J E, et al. Microsatellite markers associated with resistance to Marek's disease in commercial layer chickens [J]. J Poultry Sci, 2005, 84: 1678 - 1688.
- [4] LEDUR M C, FAIRFULL R W, MCMILLAN I, et al. Genetic effects of aging on egg production traits in the first laying cycle of white leghorn strains and strain crosses [J]. Poul Sci, 2000, 79: 296 - 304.
- [5] VANHALA T, TUISKULA-HAAVISTO M, ELO K, et al. Evaluation of genetic variability and genetic distances between eight chicken lines using microsatellite markers [J]. J Poultry Sci, 1998, 77: 783 - 790.
- [6] TU Y J, CHEN K W, ZHANG S J, et al. Genetic diversity of 14 indigenous grey goose breeds in china based on microsatellite markers [J]. Asian - Austral J Anim Sci, 2006, 19: 1 - 6.
- [7] 曲阜江, 吴桂琴, 李显耀, 等. 采用微卫星 DNA 标记分析部分地方鸡种保种场的保种效果 [J]. 遗传学报, 2004, 31 (6): 591 - 595.
- [8] 高玉时, 杨宁, 李慧芳, 等. 我国地方鸡品种保种群微卫星多态性分析与分子标记档案的建立 [J]. 遗传, 2004, 26 (6): 859 - 864.
- [9] Secondary Guidelines for Development of National Farm Animal Genetic Resources Management Plans; Measurement of Domestic Animal Diversity (MoDAD) [R]. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1998: 49 - 50.
- [10] BOTSTEIN 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.
- [11] 张福平, 朱秋劲, 王文涛, 等. 贵州柳源香鸡 mtDNA 控制区的遗传多样性分析 [J]. 西南农业学报, 2012 (5): 1916 - 1919.