

藏鸡群体遗传多样性研究

杜志强^{1,2}, 曲鲁江¹, 李显耀¹, 胡晓湘², 黄银花², 李宁², 杨宁¹

(1. 中国农业大学动物科技学院, 北京 100094; 2. 中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094)

摘要:藏鸡的体型外貌和生活习性与红色原鸡非常相似,是具有自己独特群体遗传特性的高原地方鸡种。为了有效保护并合理利用这一遗传资源,我们采用多重 PCR 与半自动荧光标记微卫星聚丙烯酰胺凝胶电泳相结合的方法检测了 20 个微卫星基因座的多态性,并随机抽取藏鸡群体中部分个体进行个体体形特征与生产性能的统计。结果表明藏鸡群体的 20 个微卫星基因座的多态等位基因数为 4~10 个,平均值为 7.25 个/基因座,多态信息含量(C_{PI})和杂合度(H)平均值分别为 0.67、0.74。大染色体较较小染色体的微卫星标记多态性程度要高。藏鸡群体的微卫星基因座多态性丰富,也解释了生产性能不均,外貌表现迥异的群体遗传特性。

关键词:藏鸡;多重 PCR;微卫星标记多态性;群体遗传

中图分类号:Q348

文献标识码:A

文章编号:0253-9772(2004)02-0167-05

Genetic Diversity in Tibetan Chicken

DU Zhi-Qiang^{1,2}, QU Lu-Jiang¹, LI Xian-Yao¹, HU Xiao-Xiang²,
HUANG Yin-Hua², LI Ning², YANG Ning¹

(1. College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. State Key Laboratory for Agrobiotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: Morphological traits and living habit of Tibetan chicken, which is an aboriginal chicken breed on plateau with its own characteristic populational genetic features, are in great common with the Red Jungle Fowl, the assumed ancestry of domestic chicken. To fully exploit this chicken resource, Multiplex PCR with semi-automated polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) using fluorescently labeled microsatellite primers was used to detect the polymorphism at 20 microsatellite loci. At the same time, we randomly test the individual morphology and performance. It showed that numbers of polymorphic alleles were 4~10, with mean value 7.25 per locus. Polymorphism Information Content (C_{PI}) and Heterozygosity (H) had mean values 0.67 and 0.74, respectively. Macrochromosomes had relatively higher polymorphism than microchromosomes ($P > 0.05$). In all, high polymorphisms at microsatellite loci related to the uneven production performance and morphological discrepancy of population genetic characteristics in Tibetan chicken.

Key words: Tibetan chicken; multiplex PCR; microsatellite polymorphism; population genetics

我国具有十分丰富而宝贵的动物遗传资源。藏鸡是其中一个重要的地方品种,主要分布于我国青藏高原海拔 2200~4100 米的半农半牧区、雅鲁藏布

江中游流域河谷区和藏东三江中游高山峡谷区。它能适应恶劣多变的高寒气候环境,体型轻小,较长而低矮,且头高尾低、呈船形,胸肌发达,向前突出。其

收稿日期:2003-01-24;修回日期:2003-04-22

基金项目:国家杰出青年基金资助项目(30225032)[Funded by National Outstanding Youth Project(30225032)]

作者简介:杜志强(1975-),男,安徽人,博士,专业方向:动物遗传育种与繁殖

通讯作者:杨宁(1964-),男,四川人,博士生导师,专业方向:动物遗传育种与繁殖。E-mail:nyang@cau.edu.cn

致谢:感谢美国农业部鸟类疾病与肿瘤实验室的 Hans H. Cheng 教授(Michigan 州立大学)提供荧光标记微卫星引物!

性情活泼,富于神经质,好斗性强。翼羽和尾羽发达,部分保留了飞翔的特性。总体来看,其体型外貌和生活习性与家鸡祖先红色原鸡非常近似,且人工选择程度较低^[1]。

微卫星标记是当前在动植物遗传育种领域中运用最为广泛的分子标记,因其简便快速易行,可以高密度覆盖整个基因组,为动物基因定位和遗传操作打下基础^[2~8]。鸡的基因组已有 2000 多个标记可以使用,其中有将近 1000 多个微卫星基因座,可以用于研究群体内及群体间的遗传结构和差异,对数量性状基因座(quantitative trait loci, QTLs)的定位也发挥了很大的作用^[9~12]。

为了研究藏鸡的群体遗传结构特点,为今后采取合理的保种措施和更加有效的利用打下基础,我们选用 20 个荧光标记的微卫星基因座,采用多重 PCR 方法,结合半自动聚丙烯酰胺凝胶电泳进行基因型分析,同时分析了藏鸡在内地平原地区的适应性及其生产性能。

1 材料和方法

1.1 试验群体

随机抽取饲养在北京南口鸡场的 60 只藏鸡(26 ♂ 34 ♀),翅静脉抽取血样,使用试剂盒(Pro-mega™)提取基因组 DNA。该场于 2001 年 8 月在西藏自治区拉萨市和林芝地区收集 2 万余枚种蛋,经照蛋透视后将其中 1 万枚运至该鸡场孵化后饲养。

1.2 多重 PCR

荧光标记微卫星引物由 Hans H. Cheng 教授惠赠。选用 20 对微卫星引物,每对引物中的一条标记 3 种荧光染料(6FAM 蓝、TET 绿、HEX 黄)中的一种,TAMRA(红)作为分子量内标。按组合好的多重 PCR 系统进行反应,反应条件为:94℃ 5min;94℃ 40s,退火温度(1) 1min,72℃ 1min;94℃ 40s,退火温度(2) 1min,72℃ 1min;94℃ 40s,退火温度(3) 1min,72℃ 1min;72℃ 40min,4℃ 恒温。

反应产物经稀释后于 ABI Prism 377 DNA Sequencer(美国应用生物系统公司)上电泳,聚丙烯酰胺胶浓度为 4.5%,电泳时间为 2h。

1.3 统计分析

使用 GeneScan 3.1™和 Genotyper 2.5™软件(Perkin Elmer 公司)分析各微卫星基因座的多态等位基因信息,并计算了两个遗传信息指数:多态信息

含量(polymorphism information content, C_{PI})和杂合度(heterozygosity, H)。

其计算公式分别为:

$$C_{PI} = 1 - \sum_{i=1}^j P_i^2 - 2 \sum_{i=j+1}^j \sum_{j=1}^{i-1} P_i^2 P_j^2,$$

$$H = \frac{2N}{2N-1} \left(1 - \sum_{j=1}^l P_j^2\right)$$

P_i 和 P_j 分别为群体中有 1 个等位基因的第 i 和第 j 个等位基因的频率^[13]。 N 为样本含量,假设群体处于 Hardy-Weinberg 平衡。

随机抽取藏鸡群体中部分个体进行表型记录和生产性能指标的统计。

2 结果与分析

2.1 微卫星基因座多态分析

表 1 所示的微卫星基因座多态分布中,藏鸡群体基因座的多态等位基因数为 4~10 个,20 个基因座的平均等位基因数达到 7.25 个。 C_{PI} 值分布在 0.44~0.82 之间, H 值在 0.47~0.90 之间,20 个基因座的 C_{PI} 和 H 平均值分别为 0.67、0.74。这充分表明藏鸡群体的微卫星基因座多态性丰富,变异程度较高。在微卫星基因座的性别分布中,公鸡的平均等位基因数、 C_{PI} 和 H 值较母鸡的稍低,但不存在显著差异($P>0.05$)。公母鸡的杂合度都达到了一个较高的水平,说明公母鸡的选育程度都较低,存在较大的变异度,人工选择的水平较低。按染色体大小对微卫星标记进行分类统计表明,虽然微卫星的等位基因数在大染色体上(MAC)要低于小染色体(MIC),但 MAC 的 C_{PI} 和 H 值要高于 MIC,差异未达到显著水平($P>0.05$)。

2.2 藏鸡群体遗传特性分析

2.2.1 外貌特征

在随机抽取的 60 只藏鸡中,快羽公鸡约占 12.61%,而慢羽公鸡约占 8.1%;快羽母鸡约占 4.5%,而慢羽母鸡约占 15.32%,母鸡全部为单冠。所抽样本中公、母鸡中均有 1 只毛脚鸡。由表 2 可以看出,按胫色不同可分为白、黑、黑胫毛脚、黄、青等几类,主要以白色为主(公鸡 50.45%;母鸡 60.36%)。按照羽毛的主要颜色,母鸡可分成麻、白、黑、黄、灰白、芦花等主要几类,并以麻色为主;而公鸡的则有黑尾金颈、黑红、白、黑、黑白灰、红、黄、灰等几类,黑尾金颈占绝大部分。

表 1 藏鸡群体中 20 个微卫星基因座的 C_{PI} 和 H 值及其性别分布Table 1 C_{PI} and H values at 20 microsatellite loci and their sexual distribution in Tibetan chicken

微卫星基因座 Microsatellite	染色体 Chromosome	藏鸡 Tibetan chicken			公鸡(♂) Sire			母鸡(♀) Dam		
		等位基因数 No. of alleles	C_{PI}	H	等位基因数 No. of alleles	C_{PI}	H	等位基因数 No. of alleles	C_{PI}	H
MCW0112	1	7	0.74	0.84	5	0.68	0.73	5	0.69	0.73
MCW0023	1	5	0.74	0.79	4	0.72	0.76	3	0.74	0.78
MCW0145	1	6	0.67	0.83	6	0.74	0.77	6	0.78	0.81
MCW0058	1	7	0.52	0.86	6	0.71	0.75	6	0.76	0.80
MCW0166	2	7	0.76	0.79	7	0.68	0.72	6	0.74	0.78
MCW0137	2	8	0.64	0.68	4	0.67	0.72	6	0.63	0.67
ADL0280	3	5	0.52	0.64	5	0.60	0.66	3	0.50	0.57
MCW0032	5	4	0.82	0.84	4	0.68	0.72	4	0.67	0.72
MCW0178	7	10	0.75	0.78	7	0.75	0.78	8	0.76	0.79
MCW0095	8	8	0.79	0.90	4	0.79	0.82	5	0.75	0.78
MCW0160	8	5	0.54	0.57	4	0.46	0.50	6	0.47	0.50
MCW0015	Z	9	0.65	0.77	5	0.65	0.68	5	0.64	0.67
平均数 Mean	MAC ^a	6.75	0.68	0.77	5.08	0.68	0.72	5.25	0.68	0.72
MCW0134	9	6	0.72	0.73	3	0.55	0.63	4	0.63	0.67
MCW0097	11	5	0.44	0.47	5	0.29	0.32	5	0.51	0.56
ADL0123	11	9	0.69	0.80	7	0.76	0.79	8	0.61	0.67
MCW0123	14	7	0.57	0.78	6	0.59	0.64	8	0.67	0.72
ADL0304	18	7	0.65	0.76	6	0.71	0.75	3	0.60	0.66
MCW0094	19	8	0.78	0.81	6	0.72	0.76	7	0.78	0.81
ADL0299	28	8	0.53	0.62	6	0.54	0.57	5	0.49	0.55
平均数 Mean	MIC ^a	7.14	0.63	0.71	5.57	0.59	0.64	5.71	0.61	0.66
MCW0069	E46C08W18	8	0.71	0.78	7	0.71	0.74	7	0.75	0.78
总体平均数 Overall average		7.25	0.67	0.74	5.35	0.65	0.69	5.5	0.66	0.70

注:a是指将鸡 1~8 号染色体、Z 染色体定为大染色体(MAC),而将其余已知的定为小染色体(MIC)。

Note: a: Chromosomes 1 to 8 and Z of chickens are designated as MAC, and the other known chromosomes as MIC.

表 2 藏鸡的外貌特征分布(%)

Table 2 Appearance distribution of Tibetan chicken(%)

羽色 Feather color	白	黑	黄	黑红	黑尾金颈	红	黑白灰	灰	芦花	灰白	麻
♂	3.57	3.57	7.14	25.00	30.36	16.07	12.50	1.79	0.00	0.00	0.00
♀	16.40	29.10	14.55	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	7.27	1.82	30.91
胫色 Shank color	白	黑	黄	青							
♂	50.45	37.84	8.11	3.60							
♀	60.36	30.63	1.80	7.21							

2.2.2 生长特性

由藏鸡鸡群抽样公鸡 31 只,母鸡 40 只进行体重测量。由表 3 可以看出,该鸡群的生长均匀度较差,变异较大,体型大小差异明显。公鸡体重在各周龄都较母鸡体重高,但两者差异不显著($P>0.05$)。

8 周龄公鸡体重的变异系数是 18.95%,母鸡体重的变异系数为 16.17%;17 周龄公、母鸡体重的变异系数分别为 17.34%、14.51%;23 周龄分别为 12.86%、17.42%。这说明藏鸡公鸡变异性较母鸡要高,且整个群体的多样性丰富,是研究体型大小对

表 3 藏鸡的生长发育特性(克)
Table 3 Growth characteristics of Tibetan chicken (gram)

周龄 Week		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
♂	平均 Mean	53.1	78.0	116.9	165.8	256.0	311.1	395.6	456.5	524.7	610.3	680.4	776.7
		±1.6	±6.5	±10.2	±10.5	±18.9	±19.4	±30.3	±86.5	±110.6	±106.2	±146.3	±147.3
♀	平均 Mean	52.6	72.4	110.4	148.4	223.3	273.3	342.7	401.3	450.1	519.2	542.3	574.2
		±1.8	±1.5	±1.7	±4.2	±9.2	±13.2	±14.6	±64.9	±88.5	±84.6	±104.8	±94.6
周龄 Week		13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
♂	平均 Mean	851.0	899.9	1037.9	1089	1142.0	1164.0	1353.6	1384.7	1303.2	1313.0	1352.6	
		±137.5	±156.7	±178.0	±194.6	±198.5	±199.4	±160.3	±183.5	±218.4	±266.3	±174.9	
♀	平均 Mean	658.8	686.6	774.9	788.6	823.3	833.7	916.9	961.2	990.4	972.0	1000.3	
		±102.4	±106.8	±139.9	±128.7	±119.5	±135.4	±123.5	±113.5	±154.2	±163.9	±174.3	

环境适应性的有益素材。

2.2.3 繁殖性能

对 940 只左右的藏鸡母鸡进行产蛋记录,发现最早于 132 日龄开产,虽然种蛋受精率较低(66.13%),但受精蛋孵化率达 80.60%,健雏率也达到 92.78%,说明藏鸡平原化对其整体繁殖性能的影响较小。依据蛋壳颜色测定值范围,即褐壳 20~50,粉壳 40~70,白壳蛋 >75,对藏鸡蛋壳颜色进行测定。发现约有 70% 蛋壳颜色分布在 67~80 之间,而白壳蛋只约占 25%,故大部分蛋壳颜色测定值落在粉壳范围,其中浅粉色约占总体的 50%。即藏鸡的蛋壳颜色大多数为粉色,白壳只占一小部分。

3 讨论

了解藏鸡的遗传多样性,弄清其遗传规律,有助于研究中国地方鸡种的遗传多样性规律。藏鸡的羽色和胫色变异较大,具有丰富的多样性。生长性能较差,增重缓慢,且个体间差异较大,体型都偏小,也许自然选择较人工选择对藏鸡的进化有更大的影响。藏鸡平原化后造成鸡蛋受精率降低,但其开产日龄提前,产蛋数有所提高,在一定程度上弥补了繁殖性能的不足。蛋壳颜色包含了白色、粉色等多种颜色,是研究蛋壳颜色遗传变化规律的良好素材。无论从生产性能和体型外貌来看,藏鸡无疑是研究我国地方鸡种丰富遗传多样性的有效材料。

由于微卫星标记具有多态丰富、共显性、操作简

单等特点,被用于鸡种多样性,以及群体内及群体间的遗传结构和差异研究^[9~12]。微卫星基因座的多态性分析表明 20 个基因座的多态等位基因数众多, C_{PI} 值和 H 值较高,从分子水平上证明藏鸡是具有丰富遗传多样性的中国地方高原鸡种。这些杂合度较高、亲缘关系较远的个体作为亲本来构建用于 QTL 定位的资源家系,可以提高 QTL 的检测性能^[12~14]。在微卫星基因座的性别分布中,公鸡的平均等位基因数、 C_{PI} 和 H 值都较母鸡的稍低,但都达到了一个较高的水平,说明公母鸡的选育程度都较低,存在较大的变异度。在鸡的 39 对染色体中,大染色体(MAC)有 6 或 8 对,有时也将性染色体归为大染色体一类,剩下的为小染色体(MIC)。小染色体约占整个鸡基因组的 30%,且富含 CpG,所含基因数目比大染色体要高 2 倍,且表现出较高的活性^[15~17]。不同的基因同生产性状的联系程度不同,但是由于在小染色体上分布有大量的基因,因而小染色体比大染色体的变异要相对较少。这可以直接表现在基因的多态程度上,或间接由分子标记表现出来。

本试验按染色体大小对微卫星标记进行的分类统计表明,微卫星的多态性程度在大染色体上较小染色体要高。可见,在自然选择的作用下,小染色体上由于具有更多的基因,同生产性状间的联系也许要比大染色体更加紧密,因而决定同其连锁的微卫星标记呈现出弱的多态性。如果所选用的标记数目足够多,在一定程度上从标记上也能直接反映出鸡

的大小染色体所具有的自身结构和功能特点。

通过分析表型及生产性能的记录,以及分子水平的检测,可以看出藏鸡群体由于高原的特殊生境条件,及其较广的分布范围,经过多年的进化,已经形成了符合当地自然条件的特殊品系。再加上一些外源鸡种的引入,所以形成了现在形态各异、生产性能低下且差异较大的各小群体^[1]。而若要提高藏鸡群体的生产性能,必须要进行选育提纯工作。

参 考 文 献 (References):

- [1] Editorial section of the "Poultry Breeds in China". Poultry breeds in China. Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1988,78. 《中国家禽品种志》编写组. 中国家禽品种志. 上海:上海科学技术出版社,1988,78.
- [2] Vanhala T, Tuiskula-Haavisto M, Elo K, Vilkkki J, Maki-Tanila A. Evaluation of genetic variability and genetic distance between eight chicken lines using microsatellite markers. *Poultry Science*, 1998, 77:783~790.
- [3] Zhou H, Lamont S J. Genetic characterization of biodiversity in highly inbred chicken lines by microsatellite markers. *Animal Genetics*, 1999, 30:256~264.
- [4] Romanov M N, Weigend S. Analysis of genetic relationship between various populations of domestic and Jungle Fowl using microsatellite markers. *Poultry Science*, 2001, 80: 1057 ~ 1063.
- [5] Weigend S, Romanov M N. Current strategies for the assessment and evaluation of genetic diversity in chicken resources. *World's Poultry Science Journal*, 2001, 57:275~288.
- [6] Kim K S, Yeo J S, Choi C B. Genetic diversity of north-east Asian cattle based on microsatellite data. *Animal Genetics*, 2002, 33:201~204.
- [7] Vignal A, Milan D, Sancristobal M, Eggen A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet Sel Evol*, 2002, 34:275~305.
- [8] Notter D R. The importance of genetic diversity in livestock populations of the future. *J Anim Sci*, 1999, 77:61~69.
- [9] ZHANG Xi-Quan, LÜ Xue-Mei, YANG Yu-Hua, LIU Jing-Shun, YANG Guan-Fu, WU Xian-Hua. Population genetic variability of microsatellite polymorphisms and RAPDs in Chinese chicken breeds in Guangdong. *Acta Genetica Sinica*, 1998, 25(2): 112~119.
张细权,吕雪梅,杨玉华,刘敬顺,杨关福,吴显华. 用微卫星多态性和 RAPD 分析广东地方鸡种的群体遗传变异. *遗传学报*, 1998,25(2):112~119.
- [10] Smith E J, Lyons L A, Cheng H H, Suchyta S P. Comparative mapping of the chicken genome using the East Lansing reference population. *Poultry Science*, 1997, 6:743~747.
- [11] Schmid M, Nandra I, Burt D W. First report on chicken genes and chromosomes 2000. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 2000, 90:169~218.
- [12] Hillel J. Map-based quantitative trait locus identification. *Poultry Science*, 1997, 76:1115~1120.
- [13] Botstein D, White R L, Skolnick M, David R W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*, 1980, 32: 314 ~ 331.
- [14] Zhu J J, Lillehoj H S, Cheng H H, Pollock D, Sadjadi M, Emara M G. Screening for highly heterozygous chickens in outbred commercial broiler lines to increase detection power for mapping quantitative trait loci. *Poultry Science*, 2001, 80:6~12.
- [15] McQueen H A, Fantes J, Cross S H, Clark V H, Archibald A L, Bird A P. CpG islands of chicken are concentrated on microchromosomes. *Nature Genetics*, 1996, 12:321~324.
- [16] McQueen H A, Siriaco G, Bird A P. Chicken microchromosomes are hyperacetylated, early replicating and gene rich. *Genome Research*, 1998, 8:621~630.
- [17] Smith J, Bruley C K, Paton I R, Dunn I, Jones C T, Windsor D, Morrice D R, Law A S, Masabanda J, Sazanov A, Waddington D, Fries R, Burt D W. Differences in gene density on chicken macrochromosomes and microchromosomes. *Animal Genetics*, 2000, 31:96~103.