

文山山地乌骨鸡微卫星 DNA 多态性分析*

苗永旺^{1,2}, 叶朗惠¹, 陈涛¹, 霍金龙¹, 李大林³

- (1. 云南农业大学 动物科学技术学院, 云南 昆明 650201;
2. 云南大学, 云南省生物资源保护与利用重点实验室, 云南 昆明 650091;
3. 云南省家畜改良工作站, 云南 昆明 650021)

摘要: 利用位于家鸡 24 条染色体上的 33 个微卫星标记对云南文山山地乌骨鸡 50 个个体进行了遗传多样性检测。共检测到 118 个等位基因, 每个座位等位基因数目从 2 到 9 个不等, 平均等位基因数为 3.5758 ± 1.5619 , 有效等位基因数在 1.4274 ~ 6.1250 之间, 平均为 2.9750 ± 1.1389 ; 群体平均表观杂合度、期望杂合度及平均多态信息含量分别为 0.8927 ± 0.2172 , 0.6214 ± 0.1259 和 0.5447 ± 0.1528 。研究表明: 文山山地乌骨鸡群体内存在丰富的遗传多样性。

关键词: 文山山地乌骨鸡; 微卫星标记; 遗传变异; 多态信息含量; 杂合度

中图分类号: S 831.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-390X (2009) 01-0063-04

DNA Polymorphisms of Black-bone Chicken Population in Wenshan Mountainous Region Based on Microsatellite Markers

MIAO Yong-wang^{1,2}, YE Lang-hui¹, CHEN Tao¹, HUO Jin-long¹, LI Da-lin³

- (1. College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;
2. Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-resources, Yunnan University, Kunming 650091, China;
3. Domestic Animal Breeding and Crossbreed-improvement Station of Yunnan Province, Kunming 650021, China)

Abstract: In the present paper, the microsatellite DNA polymorphisms of 50 individuals sampled from the chicken population of Wenshan mountainous region, Yunnan province, were assayed by using PCR and polyacrylamide gel electrophoresis. Out of 33 microsatellite loci tested which are located on chicken's 24 chromosomes, a total of 118 alleles were detected, and the number of alleles varied from 2 to 9, while the number of effective alleles varied from 1.4274 to 6.1250, giving the mean value of 3.5758 ± 1.5619 alleles and 2.9750 ± 1.1389 effective alleles per locus. The average observed heterozygosity, expected heterozygosity and polymorphism information content were estimated as 0.8927 ± 0.2172 , 0.6214 ± 0.1259 and 0.5447 ± 0.1528 , respectively. The results revealed that the genetic variability in the chicken population analyzed was rich.

Key words: chicken of Wenshan mountainous region; microsatellite DNA; genetic variation; polymorphism information content; heterozygosity

收稿日期: 2008-01-31

* 基金项目: 云南省教育厅科学研究基金项目 (5Y0196B); 国家自然科学基金项目 (30660024); 云南省应用基础研究重点项目 (2007C0003Z); 云南省应用基础研究计划面上项目 (2006C0034M)。

作者简介: 苗永旺 (1964-), 男, 内蒙古通辽人, 教授, 主要从事家养动物遗传学研究。

E-mail: yongwangmiao999@yahoo.com.cn

文山山地乌骨鸡主产于云南省文山州西畴县, 又名西畴山地乌骨鸡, 是当地人民在长期的生产生活中选育而成的地方优良品种, 具有耐粗饲, 抗病力强, 骨皮乌黑、肉嫩味鲜、品质纯正等特点。该鸡群居性、打斗互啄性强, 善走动, 爱飞翔、胆小怕惊, 食性杂, 生长较慢。从外貌特征上看, 有白毛乌骨、黑毛乌骨、斑毛乌骨几种类型, 以白毛乌骨乌肉者最佳。目前, 群体数量在 200 万只以上。该鸡是发展云南养鸡业的宝贵遗传资源, 但长期以来, 较少受到人们研究的干预, 故对其种质遗传特性知之甚少。为了从分子水平上阐明其群体的遗传变异状况, 为其有效保种和选育利用提供理论依据和遗传背景资料, 本文采用在动物群体遗传变异、遗传结构以及群体遗传关系研究方面广泛使用的微卫星 DNA^[1-4] 为遗传标记, 结合 PCR 和凝胶电泳技术, 对文山山地乌骨鸡群体遗传变异进行了检测和分析。

1 材料与方法

1.1 材料

50 只 (♀: 28, ♂: 22) 文山山地乌骨鸡的血液样品, 采自西畴县的鸡街、董马、法斗和蚌谷等乡镇。个体间避免存在直接血缘关系, 每只鸡翅下静脉采血 2 mL, 与等体积的 DNA 保存液混合, 带回实验室 -70 °C 冰箱保存。

1.2 基因组 DNA 的制备

参照苗永旺等^[5]的方法提取基因组 DNA。提取的基因组 DNA 经琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度法双重检测其纯度和浓度, 然后稀释成 50 ng/μL 浓度, 作为 PCR 模板。

1.3 微卫星多态性检测

1.3.1 微卫星引物

研究所用微卫星引物均引自 <http://iowa.thearkdb.org> 网站, 由上海生工生物工程技术有限公司合成。筛选出的 33 个微卫星座位分别位于常染色体 1~19, 23, 26~28 和性染色体 Z 等 24 条染色体上。它们分别是 ADL0251, ADL0188, ADL0257, ADL0190, MCW0252, MCW0224, MCW0122, MCW0170, MCW0005, MCW0240, MCW0029, MCW0176, MCW0120, ADL0121, MCW0134, MCW0035, MCW0097, MCW0198, MCW0104, LEI0098, MCW0080, MCW0330,

MCW0217, MCW0094, MCW0165, MCW0285, MCW0328, ADL0284, LEI0075, MCW0294, MCW0154, LEI0254 和 MCW0119。

1.3.2 PCR 反应体系及条件

PCR 反应体系为 25 μL, 含模板 DNA 50 ng, Mg²⁺ 浓度 1.5~2.5 mmol/L (因座位而异), 10 × buffer 2 μL, dNTP 200 μmol/L, Taq 酶 1.25 U, 引物 0.1~1 μmol/L, 按各引物条件于德国 Biometra T gradient PCR 仪上进行扩增。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 10 min; 然后 94 °C 变性 1 min, 50~60 °C (因座位而异) 退火 50 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 后延伸 4 min。

1.3.3 PCR 产物电泳检测

PCR 产物先在 1.5% 的琼脂糖凝胶上进行检测, 然后取 PCR 产物 5 μL 与 2 μL 上样缓冲液混合后, 上样, 在 50 V 电压下 10% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳 18~36 h。银染显色成像, 保存。

1.4 数据统计分析

利用与凝胶成像系统配套的 Labwork 4.5 软件, 确定扩增片段大小并判定个体基因型。然后用 PopGen32 软件 (version 1.31)^[6] 计算各微卫星座位的等位基因频率、等位基因数、有效等位基因数、表观杂合度、期望杂合度, 并根据 Botstein 等^[7]的公式利用 Excel 计算多态信息含量。

2 结果与分析

2.1 微卫星扩增多态性

本研究 33 个微卫星座位均呈现多态性, 共检测到 118 个等位基因。每个座位检测到的等位基因数在 2~9 不等, 平均每个座位的等位基因数为 3.5758 ± 1.5619 个。各座位的有效等位基因数在 1.4274~6.1250 之间, 平均为 2.9750 ± 1.13893 。结果见表 1。

2.2 杂合度和多态信息含量

根据微卫星座位的等位基因频率计算出各座位的表观杂合度、期望杂合度及多态信息含量等参数, 结果见表 1。所检测的 33 个微卫星座位的表观杂合度范围在 0.0000~1.0000 之间, 平均为 0.8927 ± 0.2172 ; 期望杂合度在 0.4200~0.8367 之间, 平均为 0.6206 ± 0.1261 ; 多态信息含量 (PIC) 的范围在 0.2546~0.8157 之间, 平均多态信息含量为 0.5448 ± 0.1528 。

表 1 各座位的等位基因数、有效等位基因数、表观杂合度、期望杂合度及多态信息含量

Tab. 1 Allele number, effective allele number, observer heterozygosity, expected heterozygosity and polymorphism information content at each locus

座位 locus	等位基 因数 na	有效等位 基因数 ne	表观杂 合度 Obs Het	期望杂 合度 Exp Het	多态信 息含量 PIC	座位 locus	等位基 因数 na	有效等位 基因数 ne	表观杂 合度 Obs Het	期望杂 合度 Exp Het	多态信 息含量 PIC
ADL0251	4.000 0	3.964 8	1.000 0	0.747 8	0.700 6	MCW0198	4.000 0	3.384 3	0.965 5	0.704 5	0.656 0
ADL0188	7.000 0	6.125 0	1.000 0	0.836 7	0.815 7	MCW0104	4.000 0	3.272 4	0.724 1	0.694 4	0.640 4
ADL0257	5.000 0	3.773 6	1.000 0	0.735 0	0.694 7	LEI0098	2.000 0	2.000 0	1.000 0	0.500 0	0.375 0
ADL0190	3.000 0	2.261 3	1.000 0	0.557 8	0.460 0	MCW0080	3.000 0	2.322 6	1.000 0	0.596 4	0.476 7
MCW0252	2.000 0	2.000 0	1.000 0	0.500 0	0.375 0	MCW0330	3.000 0	2.455 7	0.633 3	0.592 8	0.513 5
MCW0224	3.000 0	2.619 9	0.965 5	0.618 3	0.541 9	MCW0217	2.000 0	1.965 1	0.866 7	0.491 1	0.370 5
MCW0122	2.000 0	2.000 0	1.000 0	0.500 0	0.375 0	MCW0094	9.000 0	5.644 3	0.931 0	0.822 8	0.796 0
MCW0170	5.000 0	4.051 7	0.928 6	0.753 2	0.712 5	MCW0165	4.000 0	3.713 0	1.000 0	0.730 7	0.681 1
MCW0005	3.000 0	2.203 2	0.633 3	0.546 1	0.453 2	MCW0285	2.000 0	1.427 4	0.366 7	0.299 4	0.254 6
MCW0240	4.000 0	3.773 6	0.866 7	0.735 0	0.686 9	MCW0328	3.000 0	2.965 4	1.000 0	0.662 8	0.588 6
MCW0029	4.000 0	3.742 2	1.000 0	0.732 8	0.683 2	ADL0284	6.000 0	5.256 2	1.000 0	0.809 8	0.781 5
MCW0176	4.000 0	3.704 1	0.846 2	0.730 0	0.680 6	LEI0075	2.000 0	2.000 0	1.000 0	0.500 0	0.375 0
MCW0120	3.000 0	2.624 0	1.000 0	0.618 9	0.538 1	MCW0294	2.000 0	2.000 0	1.000 0	0.500 0	0.375 0
ADL0121	3.000 0	2.704 0	0.730 8	0.630 2	0.554 5	MCW0154	4.000 0	3.130 4	1.000 0	0.680 6	0.621 8
MCW0134	2.000 0	2.000 0	1.000 0	0.500 0	0.375 0	LEI0254	2.000 0	1.724 1	0.000 0	0.420 0	0.331 8
MCW0035	4.000 0	2.359 1	1.000 0	0.576 1	0.484 8	MCW0119	4.000 0	2.870 8	1.000 0	0.651 7	0.584 9
MCW0097	4.000 0	2.137 8	1.000 0	0.532 2	0.422 6						
Mean \pm SD	na = 3.575 8 \pm 1.561 9; ne = 2.975 0 \pm 1.138 9; Obs Het = 0.892 7 \pm 0.217 2; Exp Het = 0.621 4 \pm 0.125 9; PIC = 0.544 7 \pm 0.152 8										

3 讨论

本研究采用 33 个微卫星标记, 对文山山地乌骨鸡的群体遗传变异进行了检测分析。从等位基因多样性来看, 该鸡平均每个座位的等位基因数为 $3.575 8 \pm 1.561 9$ 个; 平均有效等位基因数为 $2.975 0 \pm 1.138 9$, 揭示该群体等位基因多样性较丰富。表观杂合度与期望杂合度是衡量群体遗传变异的重要指标, 但表观杂合度与期望杂合度相比, 更易受样本大小等因素的影响, 因此, 常用期望杂合度来衡量群体的遗传多样性的高低^[8]。群体平均期望杂合度值越高, 反映群体的遗传一致性就越低, 其遗传多样性就越丰富。从群体杂合度来看, 本研究的表观杂合度平均为 $0.892 7 \pm 0.217 2$; 平均期望杂合度为 $0.621 4 \pm 0.125 9$, 两者结果存在一致性, 都是较高的杂合度, 提示该鸡群体遗传变异较丰富。多态信息含量 (PIC) 是衡量微卫星 DNA 座位变异程度高低的理想指标。按照 Vanhala 等确定位点多态性标准^[9], 当

某微卫星座位 $PIC > 0.5$ 时, 即表明该座位为高度多态座位; $0.25 < PIC < 0.5$ 时, 为中度多态座位; $PIC < 0.25$ 时, 该座位为低度多态座位。本研究文山山地乌骨鸡群体的 33 个微卫星座位中, 19 个微卫星座位属于高度多态座位, 其他 14 个属于中度多态座位, 群体平均多态信息含量为 $0.544 7 \pm 0.152 8$, 揭示了该鸡属于高度多态的群体。这与杂合度分析结果相一致, 表明文山山地乌骨鸡群体遗传变异较大, 遗传多样性较丰富。

本研究结果与其他云南地方鸡相比^[10~14], 文山山地乌骨鸡的遗传多样性与版纳斗鸡、尼西鸡和盐津乌骨鸡相当, 比茶花鸡稍高, 但比武定鸡低。文山山地乌骨鸡群体内存在丰富的遗传变异, 揭示该鸡种选育程度不高, 选育潜力较大, 这一结果对合理保护和利用该鸡种资源具有一定的指导意义。

[参考文献]

[1] BARKER J S F. Conservation of livestock breed diversity

- [J]. *AGRI*, 1999, 25: 33-43
- [2] 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.
- [3] SAITBEKOVA N, GAILLARD C, OBEXER - RUFF G, et al. Genetic diversity in Swiss goat breeds based on microsatellite analysis [J]. *Animal Genetics*, 1999, 30: 36-41.
- [4] MUKESH M, SODHI M, BHATIA S, et al. Genetic diversity of Indian native cattle breeds as analysed with 20 microsatellite loci [J]. *J. Anim. Breed. Genet.*, 2004, 121: 416-424.
- [5] 苗永旺, 霍金龙, 李莲军, 等. 从鸡血中快速提取高质量基因组 DNA 的研究 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2005, (12): 10-12.
- [6] YE H F C, YANG R C. POPGENE Version 1. 31. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis [Z]. University of Alberta and Center for International Forestry Research, 1999.
- [7] 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.
- [8] Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. *Introduction to Conservation Genetics* [M]. Cambridge University Press, 2002.
- [9] Vanhala T, Tuiskula-Haavisto M, Elo K, et al. Evaluation of genetic variability and genetic distances between eight chicken lines using microsatellite markers [J]. *Poultry Science*, 1998, 77: 783-790.
- [10] 叶朗惠, 霍金龙, 苗永旺, 等. 尼西鸡遗传多样性微卫星标记分析 [J]. *动物学研究*, 2006, 27 (2): 68-74.
- [11] 叶朗惠, 苗永旺, 霍金龙, 等. 茶花鸡群体遗传多样性 [J]. *动物学杂志*, 2006, 41 (2): 37-42.
- [12] 钱林东, 陈涛, 霍金龙, 等. 武定鸡群体遗传变异的微卫星标记分析 [J]. *云南农业大学学报*, 2006, 21 (5): 651-656.
- [13] 陈涛, 霍金龙, 苗永旺, 等. 版纳斗鸡群体遗传多样性研究 [J]. *云南农业大学学报*, 2007, 22 (3): 393-395, 400.
- [14] 陈涛, 苗永旺, 霍金龙, 等. 盐津乌骨鸡微卫星 DNA 多态性研究 [J]. *云南农业大学学报*, 2007, 22 (4): 543-546.

~~~~~

(上接第 50 页)

- [7] 徐福元. 国内外松墨天牛天敌的研究利用进展 [J]. *世界林业研究*, 1998, (3): 41-45.
- [8] 王四宝, 樊美珍, 李增智, 等. 松墨天牛天敌微生物的研究利用进展 [J]. *昆虫知识*, 2003, 40 (4): 299-303.
- [9] 张翌楠, 杨忠岐. 松墨天牛的天敌及其对寄主的控制能力研究 [J]. *植物保护*, 2006, 32 (2): 9-14.
- [10] 杨希, 黄金水, 何学友, 等. 管氏肿腿蜂及其带菌室内防治松墨天牛幼虫试验 [J]. *福建林业科技*, 2005, 32 (3): 94-99.
- [11] SHIMAZU M, SATO H. Microbial control of the pine sawyer, *Monochamus alternatus*, by *Beauveria bassiana* [C] // *International Symposium on pine Wilt Disease Caused by pine wood Nematode*, Beijing, 1995.
- [12] 胡加付, 缪凯, 董振辉, 等. 利用白僵菌防治松墨天牛的试验研究 [J]. *安徽农业大学学报*, 2006, 33 (3): 332-336.
- [13] 李建武. *生物化学实验原理和方法* [M]. 北京: 北京大学出版社, 2002.
- [14] 唐启义, 冯明光. *实用计算机统计分析及其计算机处理平台* [M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [15] 周性恒, 朱洪兵, 肖文忠. 南京地区松墨天牛病原真菌的调查研究 [M] // 杨宝君, 朱克恭, 周元生, 等. *中国松材线虫病的流行与治理*. 北京: 中国林业出版社, 1995.