

中国地方鸡种资源不同保种方法的分子检测^{*}

李慧芳¹,高玉时¹,苏一军¹,张学余¹,马月辉²,陈宽维^{1**}

(1. 中国农业科学院家禽研究所,江苏 扬州 225003; 2. 中国农业科学院畜牧研究所,北京 100094)

摘要: 采用 13 对高度多态的微卫星标记对我国 7 个受国家重点保护的地方鸡种的原地保护和异地保存两种活体保种方法的保种效果进行了检测,计算了各品种的遗传杂合度和多态信息含量,比较了各品种在不同保种方法之间的遗传参数。结果表明:7 个品种在两种保种方法中都有高度多态性,但异地保存的品种的多态性较原地保护的品种的多态性要多;虽然两种方法的保种效果较好,但是原地保护和异地保存之间在同一品种内的遗传变异并不相同。

关键词: 鸡品种资源; 微卫星标记; 遗传多样性; 遗传距离

中图分类号: S 831.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 390X(2006)02 - 0228 - 03

Molecular Evaluation of Different Conservation Measures of Chinese Indigenous Chicken Breeds

LI Hui-fang¹, GAO Yu-shi¹, SU Yi-jun¹, ZHANG Xue-yu¹, MA Yue-hui², CHEN Kuan-wei¹

(1. Poultry Institute, Chinese Academy of Agriculture Science, Yangzhou 225003, China;

2. Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agriculture Science, Beijing 100094, China)

Abstract: In order to conserve the genetic diversity of domestic fowl and animal, we ordinarily took origination and displacement measures. This experiment studied the two different conservative effects of 7 indigenous chicken breeds in China by using 13 microsatellite markers with high polymorphisms. Those chicken breeds included Chahua, Langshan, Dagu, Silky, Xianju, Beijing fatty, and Henan game chicken. We calculated the genetic parameters of mean heterozygosity (H) and polymorphic information content (PIC) of each breed in two conservative zones, and analyzed the parameters' difference of each breed. The results showed that each breed was of high polymorphisms, but the polymorphisms of displacement were more than that of origination. Although the effects of two measures were better, the genetic variation of each breed had some difference between two measures.

Key words: chicken; microsatellite; heterozygosity; polymorphic information content

动物品种资源的保存正受到世界各国的高度重视,我国畜禽遗传资源丰富,它们在畜牧生产和新遗传资源形成中发挥了重要作用。研究和保护动物的遗传多样性已成为保护生物学关注的热点。只有掌握了物种的多样性水平和群体的遗传结构,才能制定有效的保护策略和措施。目前中国畜禽

品种资源保护主要采取两种方式,即原地保护和异地保存。上述方式互为补充,构成现阶段中国畜禽遗传资源保护工作的主体^[1]。

微卫星是目前普遍使用的分子遗传学标记,微卫星标记具有多态性高,共显性,易于鉴定,检测重复性好,在基因组中广泛分布等优点,目前在遗传图

收稿日期: 2005 - 10 - 15

*基金项目:“国家科技基础条件平台 资助项目 (2004DKA30450 - 04);国家“863”计划资助项目 (2001AA243081);江苏省自然科学基金资助项目 (BK2002502) **通讯作者

作者简介:李慧芳 (1974 -),女,山西孟县人,助理研究员,在读博士,主要从事家禽遗传资源的研究。

谱的构建、QTL定位、分子遗传多样性研究、家系鉴定等方面均得到了普遍应用^[2-6]。本研究以微卫星标记对原产地和国家家禽品种资源基因库分别保存的列入国家级品种资源重点保护的鸡品种资源大骨鸡、河南斗鸡、仙居鸡、北京油鸡、丝羽乌骨鸡、茶花鸡、狼山鸡的保种效果进行了遗传分析,旨在评价同一品种不同保种方式的保种现状和效果。

1 材料和方法

1.1 材料来源

原产地品种来自各自的保种场(区):大骨鸡来自辽宁省庄河县(1998年建场);河南斗鸡来自河南省开封市(1986年建区);仙居鸡来自浙江仙居城关镇石卡村(1970年建场);北京油鸡来自中国农业科学院畜牧研究所(1972年建场);丝羽乌骨鸡来自江西省泰和县泰和鸡原种区(1980年建区);茶花鸡来自西双版纳州景洪市嘎洒镇曼醒村(1997年建场);狼山鸡来自江苏如东县狼山鸡场(1958年建场)。各保种场(区)的群体数量均在上千只以上,群内随机交配,随机留种,保种群不做目的选择。异地保存的品种来源于国家家禽品种资源基因库:大骨鸡于1998年从原保种场引种保存;河南斗鸡于2001年从原产地搜集整理并保存;仙居鸡于1968年从原产地搜集整理并保存;北京油鸡于1980年从原保种场引种保存;丝羽乌骨鸡于1970年从原产地搜集整理并保存;茶花鸡于2002年从原保种场引种保存;狼山鸡于1968年从原保种场引种保存。在国家家禽品种资源基因库保存的这些品种各群体数量在400只,采用了家系随机交配等量留种。原产地品种和异地保存品种的采样工作在2000年完成。每品种采集60只鸡的血样,每个品种采样设计的公母之比为1:4,公鸡12只,母鸡48只,完全符合评估遗传多样性抽样公式和样本含量的要求。翅静脉采血,用常规的酚/氯仿提取DNA,用琼脂糖含量为0.8%(W/V)的凝胶电泳检测质量后,置于4℃保存备用。

1.2 微卫星引物及扩增产物检测

筛选13对鸡品种应用较好的微卫星引物ADL136, ADL166, ADL176, ADL185, ADL210, ADL212, MCW104, MCW145, MCW150, MCW32, MCW4, MCW134, MCW120。所选引物均表现为多态性好,特异性强且相互不连锁。

PCR扩增反应体系:50 ng/ μ L DNA模板

1.5 μ L, 10 \times buffer 2.5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 1.2~2.0 μ L(因基因座而异), 10 mmol/L dNTP 0.5 μ L, 5 pmol/ μ L 两侧引物各1 μ L, 5 U/ μ L Taq DNA聚合酶 0.2 μ L, 用超纯水补足25 μ L。扩增反应程序为94℃预变性10 min, 94℃变性40 s, 50~64℃退火40 s, 72℃延伸40 s, 35个循环, 72℃最终延伸5~10 min。扩增产物95℃变性5 min后立即点样于8%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离,采用pBR322DNA/Msp^I Markers作为分子量的标准对照,电泳结束后用硝酸银染色,经成像后分析结果。

1.3 数据分析

由于微卫星标记基因呈共显性,因此可以直接从表型获知其基因型,并可根据等位基因出现的次数计算其基因频率。根据公式计算各微卫星基因座的等位基因分别在鸡各品种中的多态信息含量(polymorphism information content, PIC),同时计算各群体全部微卫星基因座的遗传杂合度(heterozygosity, H)。

2 结果与讨论

根据各微卫星位点等位基因频率度量群体内遗传变异的指标:杂合度(H)和多态信息含量(PIC),7个品种所有位点杂合度和多态信息含量均值,结果见表1。

由表1可见,各个微卫星位点大部分有较高的杂合度,杂合度均值均大于0.5,最大可达0.858(河南斗鸡MCW120位点),7个品种的PIC均值均大于0.5,表现出丰富的多态性。从两种不同保种效果计算的各品种在所有微卫星位点的平均杂合度和平均多态信息含量结果看,发现两种方法在7个品种各座位的平均杂合度之间的差异不显著,对于不同的保种效果而言,各保种场保护的品种在尽可能多的位点上的平均杂合度之间的差异不显著,是他们工作的主要方向;而多态信息含量仅茶花鸡种的异地保存的PIC均值显著大于原产地保护的PIC均值,其他6个品种所有位点的PIC均值在两保种方法之间差异不显著。根据VANHALA^[7]确定的微卫星位点PIC>0.5时,属于高度多态的标准,表明这7个品种在不同保种方法之间均属于高度多态性,但异地保存的品种的多态性较原地保护的品种的多态性要多。这也反映出两种方法的保种效果较好,各品种都维持了中国地方鸡品种内具有较高多样性这一特点,也实现了尽量不使

未来可能利用的遗传基因丢失的保种原则。

从 7 个品种不同保种方法在各座位的遗传参数来看,原地保护的 7 个品种在 4 个位点 ADL212, MCW 145, MCW 134, MCW 104 有低的杂合度出现,而异地保存的仅在 2 个位点 ADL136, ADL185 出现低的杂合度;原地保护的 7 个品种在 2 个位点 ADL166, MCW 032 有高的杂合度出现,而异地保存的在 4 个位点 ADL136, MCW004, MCW 145, MCW 120 出现高的杂合度;两种保种方法保护的 7 个品种的多态信息含量在所有位点出现的高低情况与杂合度的情况基本一致。从以上分析可以看出,虽然两种方法的保种效果较好,但是原地保护

和异地保存之间在同一品种内很多位点的遗传变异并不相同,主要原因有二:一是保种的方法不同,尽管原产地在保种时,尽量保持原有的遗传基础不变,但在保种方法上仍有一定的不足之处,如有的原产地保种场在保种的过程中,进行了有方向性的选择,这虽然有利于当时的生产需要,也有利于所选择性状的有利基因的保存,但是却有可能使遗传基础变窄,从而可能会导致一些潜在优势的基因丢失;二是环境的影响,尽管环境的作用在短期内影响不大,但也不可忽视。不同保种环境的饲养条件、营养水平和疾病控制等因素都有可能存在差异,从而会使保护的鸡种发生相应的变化。

表 1 中国 7 个地方鸡品种不同保种方法的遗传参数

Tab. 1 Genetic parameters of the two different conservative effect of 7 indigenous chicken breeds in China

保种方法 conservation measures	位点 locus	丝毛乌骨鸡 Silky		仙居鸡 Xianju		茶花鸡 Chahula		北京油鸡 Beijing fatty		河南斗鸡 Hennan game		大骨鸡 Dagu		狼山鸡 Langshan	
		H	PC	H	PC	H	PC	H	PC	H	PC	H	PC	H	PC
		异地	ADL212	0.659	0.698	0.684	0.724	0.637	0.728	0.673	0.767	0.674	0.724	0.673	0.711
	ADL210	0.612	0.673	0.661	0.709	0.739	0.644	0.775	0.699	0.684	0.731	0.677	0.726	0.640	0.692
	ADL136	0.752	0.783	0.701	0.749	0.836	0.697	0.853	0.734	0.348	0.380	0.667	0.714	0.688	0.729
	ADL185	0.612	0.673	0.630	0.688	0.612	0.476	0.668	0.573	0.701	0.748	0.559	0.630	0.685	0.734
	MCW 150	0.740	0.770	0.719	0.761	0.765	0.756	0.796	0.788	0.792	0.817	0.721	0.758	0.676	0.723
	MCW 004	0.819	0.840	0.812	0.832	0.773	0.797	0.803	0.823	0.721	0.763	0.812	0.834	0.766	0.795
	ADL176	0.702	0.736	0.630	0.688	0.666	0.720	0.579	0.646	0.464	0.559	0.493	0.575	0.439	0.543
	MCW 145	0.570	0.570	0.761	0.761	0.593	0.593	0.823	0.823	0.773	0.773	0.744	0.745	0.722	0.722
	MCW 134	0.717	0.757	0.687	0.733	0.570	0.636	0.788	0.814	0.730	0.767	0.771	0.801	0.441	0.543
	MCW 104	0.743	0.778	0.724	0.764	0.796	0.819	0.763	0.793	0.736	0.759	0.649	0.685	0.713	0.753
	ADL166	0.705	0.742	0.815	0.837	0.811	0.830	0.751	0.783	0.654	0.703	0.817	0.838	0.726	0.761
	MCW 120	0.833	0.852	0.783	0.811	0.812	0.834	0.717	0.756	0.858	0.873	0.500	0.586	0.771	0.800
	MCW 032	0.834	0.851	0.787	0.814	0.800	0.823	0.724	0.759	0.692	0.740	0.704	0.744	0.684	0.733
原产地	ADL212	0.737	0.777	0.447	0.554	0.375	0.508	0.491	0.589	0.417	0.534	0.441	0.550	0.691	0.739
	ADL210	0.485	0.581	0.528	0.613	0.602	0.669	0.751	0.792	0.404	0.525	0.625	0.694	0.502	0.594
	ADL136	0.807	0.838	0.660	0.715	0.758	0.796	0.802	0.831	0.824	0.852	0.488	0.583	0.512	0.602
	ADL185	0.686	0.741	0.642	0.699	0.718	0.760	0.499	0.591	0.592	0.666	0.522	0.607	0.554	0.630
	MCW 150	0.703	0.757	0.687	0.743	0.490	0.585	0.673	0.730	0.445	0.552	0.638	0.703	0.702	0.755
	MCW 004	0.665	0.721	0.729	0.714	0.638	0.699	0.611	0.668	0.560	0.635	0.699	0.750	0.712	0.755
	ADL176	0.807	0.838	0.726	0.767	0.726	0.771	0.666	0.718	0.789	0.823	0.736	0.782	0.687	0.738
	MCW 145	0.689	0.742	0.718	0.768	0.388	0.513	0.641	0.704	0.712	0.761	0.729	0.778	0.671	0.728
	MCW 134	0.399	0.521	0.658	0.774	0.703	0.757	0.527	0.611	0.634	0.695	0.689	0.747	0.687	0.743
	MCW 104	0.656	0.715	0.492	0.585	0.664	0.719	0.548	0.630	0.605	0.671	0.440	0.549	0.424	0.538
	ADL166	0.607	0.67	0.816	0.844	0.735	0.779	0.666	0.718	0.773	0.807	0.829	0.855	0.809	0.840
	MCW 120	0.646	0.704	0.732	0.775	0.787	0.821	0.737	0.779	0.532	0.616	0.593	0.663	0.474	0.573
	MCW 032	0.525	0.61	0.714	0.765	0.549	0.628	0.806	0.837	0.743	0.786	0.764	0.802	0.690	0.745
平均遗传参数	异地	0.748 ^a	0.715 ^a	0.759 ^a	0.722 ^a	0.756 ^a	0.724 ^a	0.751 ^a	0.711 ^a	0.718 ^a	0.679 ^a	0.719 ^a	0.676 ^a	0.714 ^a	0.666 ^a
	原产地	0.709 ^a	0.647 ^a	0.717 ^a	0.658 ^a	0.693 ^a	0.626 ^b	0.708 ^a	0.648 ^a	0.686 ^a	0.618 ^a	0.697 ^a	0.630 ^a	0.691 ^a	0.624 ^a

注:表中相同字母者表示差异不显著 ($P > 0.05$),不同字母者表示差异显著 ($P < 0.05$)。

(下转第 245 页)

达到 93.8%。湿度 90% 48 h 后萌发率 51.4%, 湿度 66% 时孢子基本不萌发, 湿度 75% 时, 有极少量孢子萌发, 85% 湿度下, 孢子萌发明显增多, 营养条件的影响渐趋明显。SDAY 营养液中, 72 h 后萌发达到 34.6%, 在 1% 葡萄糖液中, 72 h 后萌发也达到了 25.9%。

比较表 1 和表 2 可看出, 在高湿度下 (95% ~ 100%), 蜡蚧轮枝菌 K9803 菌株在相同湿度、营养和时间等条件下芽生孢子的萌发不如分生孢子, 最高萌发率分别为 83.5% 和 93.8%, 相差大约 10 个百分点。在湿度 66% 时二者基本都不萌发。

3 小结

综上所述, 湿度是蜡蚧轮枝菌昆明菌株

KM9803 芽生孢子和分生孢子萌发的首要条件, 芽生孢子萌发所需湿度在 75% 以上, 分生孢子则在 85% 时开始大量萌发, 湿度合适时, 营养条件可以促进孢子萌发。

[参考文献]

- [1] 陈吉棣. 蜡蚧轮枝菌及其在生防中的应用 [J]. 生物防治通报, 1985, 1(4): 32 - 37.
- [2] 王克勤, 刘春来, 于振民, 等. 蜡蚧轮枝菌防治温室白粉虱应用研究 [J]. 黑龙江农业科学, 1999, (5): 9 - 11.
- [3] 张仙红, 李文英. 菜青虫感染蜡蚧轮枝菌后的组织病理变化 [J]. 昆虫学报, 2003, 46(5): 655 - 659.
- [4] 方中达. 植病研究方法 [M]. 北京: 农业出版社, 1981.

(上接第 230 页)

总而言之, 家禽遗传资源的保护包括保护现有的品种、保护特殊的生态型以及保护品种中特殊的变异类型, 避免混杂、退化或灭绝, 其实质是保护品种 (或类型) 基因库。遗传资源的保存不仅只是基因的保存, 而且也是为了满足人类精神的需要, 每个品种都有其独有的社会、历史和文化背景^[8]。目前中国家禽品种资源保护采取的原地保护和异地保存两种方法的保种效果都较好, 互为补充, 建议原产地保种场在加强保护群体遗传多样性的同时, 应合理注意品种的选育, 在不丧失地方鸡品种遗传特性的前提下, 扩大群体, 并与其它鸡品种进行基因交流, 以利用其遗传多样性, 促进资源优势的转化。

[参考文献]

- [1] 齐景发, 贾幼陵, 何新天, 等. 中国畜禽遗传资源状况 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2004.
- [2] 吴信生, 陈国宏, 王德前, 等. 利用微卫星分析技术分析中国部分地方鸡品种的遗传结构 [J]. 遗传学报,

2004, 31(1): 43 - 50.

- [3] 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.
- [4] 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的遗传多样性 [J]. 遗传学报, 2003, 30(9): 855 - 860.
- [5] 李慧芳, 章双杰, 陈宽维, 等. 我国重点保护地方鸡品种的遗传变异 [J]. 中国农业大学学报, 2005, 10(3): 21 - 24.
- [6] 张细权, 吕雪梅, 杨玉华, 等. 用微卫星和 RAPD 分析分析家鸡品种的遗传变异 [J]. 遗传学报, 1998, 25(2): 112 - 119.
- [7] VANHALA T, TUISKULIA-HAAVISTO M, ELO K, et al. Evaluation of genetic variability and genetic distance between eight chicken lines using microsatellite marker [J]. Poultry science, 1998, 77: 783 - 790.
- [8] 王淑辉, 田万强, 曾林森, 等. 畜禽遗传资源保存研究进展 [J]. 黄牛杂志, 2001, 27(6): 6 - 10.