

红色原鸡群体遗传多样性

霍海龙^① 霍金龙^① 李大林^② 苗永旺^{①*} 伍革民^① 李月体^③

(^① 云南农业大学动物科学学院 昆明 650201; ^② 云南省家畜改良工作站 昆明 650021;

^③ 云南省德宏州野生动物收容救护中心 潞西 678407)

摘要: 为了阐明红色原鸡的群体遗传结构,以对其有效保护提供遗传学依据,采用 33 个微卫星标记对其群体中 56 个个体进行了 PCR-聚丙烯酰胺多态性电泳检测。33 个微卫星座位共检测到 140 个等位基因,所有座位都呈现出多态性,每个座位的等位基因数在 2~8 个之间,平均每个座位等位基因数 4.24 个,有效等位基因数 3.30 个。根据等位基因频率,计算出的群体表现杂合度、期望杂合度及多态信息含量分别为 0.798 0、0.650 6 和 0.594 8。结果表明,红色原鸡群体遗传多样性较丰富。

关键词: 微卫星标记;红色原鸡;杂合度;多态信息含量;遗传多样性

中图分类号: Q953 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2007)05-131-05

Genetic Diversity of Red Jungle Fowl

HUO Hai-Long^① HUO Jin-Long^① LI Da-Lin^② MIAO Yong-Wang^{①*} WU Ge-Min^① LI Yue-Ti^③

(^① Faculty of Animal Science, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201;

^② Station of Domestic Animal Breeds in Yunnan Province, Kunming 650021;

^③ The Rescue Center for Wild Animals in Dehong, Yunnan Province, Luxi 678407, China)

Abstract: In order to assess the genetic diversity in the population of Red Jungle Fowl in Yunnan Province and provide genetic basis for its conservation and utilization, 33 chicken-specific microsatellite loci were assayed in 56 individuals by using polyacrylamide gel electrophoresis. A total of 140 alleles were detected in the 33 loci. All the loci were polymorphic and the number of alleles varied from 2 to 8, with a mean number of 4.24 alleles and 3.30 effective alleles per locus. The observed heterozygosity, expected heterozygosity and polymorphism information content of 33 microsatellite loci were 0.798 0, 0.650 6 and 0.594 8, respectively. Our data indicate that there is high genetic diversity in natural population of Red Jungle Fowl.

Key words: Microsatellite markers; Red Jungle Fowl; Heterozygosity; Polymorphism information content; Genetic diversity

红色原鸡 (*Gallus gallus*) 属鸟纲 (Aves) 鸡形目 (Galliformes) 雉科 (Phasianidae) 原鸡属 (*Gallus*), 是国家二级重点保护鸟类。在我国有两个亚种, 滇南亚种 *G. gallus spadiceus* 分布于中国云南西南部和南部; 海南亚种 *G. gallus jabouillei* 分布于云南东南部、广西西南部和海南省等地^[1]。自达尔文提出家鸡起源于红色原鸡以来, 红色原鸡作为家鸡的祖先已被人们普遍接受。红色原鸡对研究家鸡的起源与分化,

以及人工选择对动物的遗传性状改变的影响具有重要价值, 而且是未来家禽育种的宝贵基因库, 因此, 近年来针对红色原鸡的研究受到科学界的广泛关注^[2-7]。由于人类活动的影响, 红

基金项目 云南省教育厅科学研究基金项目 (No. 5Y0196B);

* 通讯作者, E-mail: miaoyw1@ynau.edu.cn;

第一作者介绍 霍海龙, 男, 硕士研究生; 研究方向: 分子遗传学; E-mail: huohailong2006@126.com.

收稿日期: 2007-03-21, 修回日期: 2007-07-17

色原鸡种群数量日益减少,其保护应引起足够重视。为了有效保护及合理利用红色原鸡这一宝贵遗传资源,并为揭示家鸡的起源分化提供依据,本研究对来自云南的红色原鸡滇南亚种样品,采用微卫星标记进行了群体遗传学研究,以揭示其群体遗传多样性状况。

1 材料与方法

1.1 实验材料 本研究共采集了 56 只(♂ 14, ♀ 42)红色原鸡的血液样品,其中 52 只采自云南省德宏州野生动物收容救护中心(该地原鸡 1999 年形成人工种群,采样时群体大小在 300 只左右,为成年个体随机采样),4 只采自云南省西双版纳州原鸡饲养爱好者(个体间无直接血缘关系)。每只原鸡翅下静脉取血 2 ml,肝素钠抗凝, -20℃ 冻存。

1.2 基因组 DNA 提取 参照苗永旺等^[8]的方法提取基因组 DNA。检测基因组 DNA 的纯度和浓度,然后稀释成 25 ng/μl 浓度,作为 PCR 扩增的模板 DNA。

1.3 微卫星引物 所用 33 对微卫星引物均查自 <http://iowa.thearkdb.org> 网站,由上海生工生物工程技术有限公司合成,其序列、退火温度等信息参考文献^[9]。

1.4 PCR 扩增 PCR 反应体系 25 μl,含模板 DNA 30 ~ 50 ng, Mg²⁺ 1.5 mmol/L, 10 × buffer 2.5 μl, dNTP 200 μmol/L, Taq 酶 1.25 U、引物 0.2 μmol/L。反应条件:95℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 1 min, 55 ~ 65℃ 退火 1 min(因座位而异), 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环;72℃ 后延伸 10 min;4℃ 终止反应。

1.5 电泳及结果记录 PCR 扩增产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测效果后,取 2 μl 与上样缓冲液混合,在 10% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶上 100 V 电泳 12 h,银染显色,美国 UVP 凝胶成像系统照像。

1.6 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)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,根据 Botstein 等^[10]的公式计算多态信息含量,并进行 Hardy-Weinberg 平衡的卡方(χ^2)检验。

2 结果与分析

2.1 微卫星扩增结果及多态性 33 个微卫星座位共检测到 140 个等位基因,所有座位都呈现出多态性,每个座位的等位基因数在 2 ~ 8 个之间,平均每个座位等位基因数 4.24 个,有效等位基因数 3.30 个。ADL0257 和 MCW0094 座位的等位基因数最多,有 8 个;而座位 MCW0252、MCW0122、MCW0035、MCW0294 及 LEI0254 等位基因数最少,各有 2 个;其他座位有 3 ~ 7 个等位基因。图 1 为 MCW0104 座位部分个体的 PCR 扩增结果。各座位的等位基因频率、等位基因数、有效等位基因数和 Hardy-Weinberg 平衡的卡方检验结果见表 1, MCW0122、MCW0120、ADL0121、MCW0134、MCW0035、MCW0198、MCW0330 及 MCW0285 等 8 个座位处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。

2.2 群体遗传变异分析 根据各微卫星座位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(表 2)。各座位的表观杂合度在 0.000 0 ~ 1.000 0 之间,群体平均值为 0.798 0;期望杂合度在 0.186 6 ~ 0.823 1 之间,群体平均值为 0.650 6;各座位的多态信息含量范围在 0.169 2 ~ 0.800 7 之间,群体平均值为 0.594 8。期望杂合度和多态信息含量最高的座位是 MCW0094,分别为 0.823 1 和 0.800 7;最低的座位是 MCW0122,分别为 0.186 6 和 0.169 2。

3 讨论

衡量单个座位遗传多样性的一些指标主要有等位基因多样性、表观杂合度和期望杂合度等^[11]。为了准确评价一个群体或种群的遗传多样性,必须有整个基因组的遗传变异信息,单个座位的信息不可能准确地解释一个物种或一个群体所有座位的遗传多样性,所以通常用

表 1 各座位的等位基因频率、等位基因数、有效等位基因数及卡方值

Table 1 Allele frequencies, number of alleles, effective number of alleles and Chi-square value at each locus

座位 Locus	等位基因频率 Allele frequencies								等位基因数 Allele number	有效等位基因数 Effective allele number	卡方值 Chi-square
	p_1	p_2	p_3	p_4	p_5	p_6	p_7	p_8			
ADL0251	0.156 3	0.583 3	0.260 4						3	2.31	9.355 3*
ADL0188	0.083 3	0.208 3	0.239 6	0.270 8	0.156 3	0.041 7			6	4.83	53.314 5**
ADL0257	0.093 8	0.145 8	0.083 3	0.281 3	0.270 8	0.052 1	0.062 5	0.010 4	8	5.10	49.278 4**
ADL0190	0.166 7	0.104 2	0.114 6	0.354 2	0.260 4				5	4.08	30.302 0**
MCW0252	0.218 8	0.781 2							2	1.52	24.397 3**
MCW0224	0.062 5	0.166 7	0.166 7	0.416 7	0.187 5				5	3.73	38.652 6**
MCW0122	0.104 2	0.895 8							2	1.23	0.578 7
MCW0170	0.093 8	0.291 7	0.208 3	0.270 8	0.135 4				5	4.37	47.932 9**
MCW0005	0.270 8	0.239 6	0.395 8	0.093 8					4	3.38	27.940 2**
MCW0240	0.031 3	0.229 2	0.229 2	0.052 1	0.218 8	0.239 6			6	4.67	115.465 1**
MCW0029	0.270 8	0.156 3	0.229 2	0.208 3	0.093 8	0.041 7			6	4.90	68.551 1**
MCW0176	0.020 8	0.229 2	0.135 4	0.166 7	0.260 4	0.187 5			6	4.94	96.044 6**
MCW0120	0.083 3	0.343 8	0.458 3	0.114 6					4	2.87	10.362 4
ADL0121	0.093 8	0.343 8	0.208 3	0.354 2					4	3.38	5.999 8
MCW0134	0.072 9	0.510 4	0.395 8	0.020 8					4	2.36	5.193 3
MCW0035	0.364 69	0.635 441							2	1.86	0.621 6
MCW0097	0.156 3	0.343 8	0.500 0						3	2.55	47.000 0**
MCW0198	0.041 7	0.270 8	0.687 5						3	1.83	6.741 3
MCW0104	0.020 8	0.145 8	0.114 6	0.364 6	0.114 6	0.239 6			6	4.20	57.269 0**
LEI0098	0.208 3	0.229 2	0.291 7	0.270 8					4	3.93	91.605 4**
MCW0080	0.354 2	0.552 1	0.093 8						3	2.28	30.799 0**
MCW0330	0.114 6	0.468 8	0.322 9	0.093 8					4	2.89	11.452 0
MCW0217	0.062 5	0.145 8	0.239 6	0.343 8	0.208 3				5	4.10	35.533 7**
MCW0094	0.031 3	0.062 5	0.072 9	0.177 1	0.072 9	0.093 8	0.270 8	0.218 8	8	5.65	146.334 5**
MCW0165	0.281 3	0.166 7	0.385 4	0.166 7					4	3.53	69.868 8**
MCW0285	0.052 1	0.156 3	0.593 8	0.197 9					4	2.39	11.526 7
MCW0328	0.270 8	0.229 2	0.500 0						3	2.66	39.499 7**
ADL0284	0.166 7	0.114 6	0.177 1	0.375 0	0.145 8	0.020 8			6	4.26	90.641 5**
LEI0075	0.072 9	0.322 9	0.375 0	0.229 2					4	3.03	33.256 1**
MCW0294	0.500 0	0.500 0							2	2.00	47.000 0**
MCW0154	0.145 8	0.187 5	0.395 8	0.270 8					4	3.49	28.506 4**
LEI0254	0.625 0	0.375 0							2	1.88	49.162 2**
MCW0119	0.354 2	0.489 6	0.156 3						3	2.57	43.337 9**

p_i 代表某座位第 i 个等位基因的频率。 p_i is the frequency of the i th allele at a locus, $i = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8$.

* $0.01 < P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

多座位遗传多样性参数的平均值来描述一个群体的遗传多样性^[11]。多个座位期望杂合度的平均值,又称群体基因多样性,因为它受样本取样的影响较小,所以,常用它来度量群体的遗传多样性,其高低可反应群体的遗传一致性程度^[10]。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。表观杂合度是一个座位的杂合子数除以观察个体

总数,它与期望杂合度相比,更易受样本大小等因素的影响,但多座位平均数也可反应群体的遗传多样性。本研究采用 33 对微卫星引物,对来自云南的红色原鸡滇南亚种的 56 个样品进行了检测分析。从等位基因多样性,即每个座位的等位基因平均数来看,该红色原鸡群体 33 个座位均具有多态性,平均每个座位等位基因数 4.24 个,有效等位基因数 3.30 个。这揭示

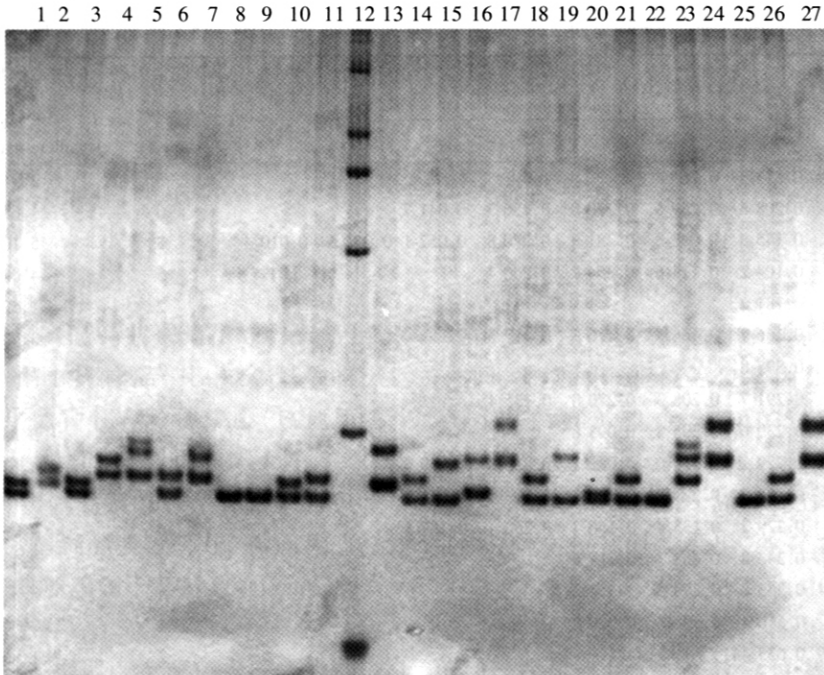


图 1 部分样品 MCW0104 座位的 PCR 扩增产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测结果

Fig. 1 The PAGE image of PCR products at MCW0104 locus

1 - 11, 13 - 27 为红色原鸡样品; 12. DNA 分子量标准 DL2000.

1 - 11, 13 - 27. Samples of Red Jungle Fowl; 12. DNA Marker-DL2000.

表 2 各座位的表观杂合度、期望杂合度及多态信息含量

Table 2 Observed heterozygosity, expected heterozygosity and polymorphism information content at each locus

座位 Locus	表观杂合度 Observed <i>H</i>	期望杂合度 Expected <i>H</i>	多态信息含量 <i>PI</i> C	座位 Locus	表观杂合度 Observed <i>H</i>	期望杂合度 Expected <i>H</i>	多态信息含量 <i>PI</i> C
ADL0251	0.395 8	0.567 5	0.501 4	MCW0198	0.604 2	0.452 3	0.381 0
ADL0188	1.000 0	0.792 8	0.761 0	MCW0104	0.875 0	0.761 7	0.726 7
ADL0257	1.000 0	0.803 8	0.777 6	LEI0098	1.000 0	0.745 7	0.698 2
ADL0190	1.000 0	0.755 0	0.716 4	MCW0080	0.895 8	0.561 0	0.477 0
MCW0252	0.104 2	0.341 8	0.283 4	MCW0330	0.645 8	0.654 1	0.593 8
MCW0224	0.979 2	0.731 8	0.692 8	MCW0217	1.000 0	0.755 9	0.715 9
MCW0122	0.208 3	0.186 6	0.169 2	MCW0094	0.979 2	0.823 1	0.800 7
MCW0170	1.000 0	0.771 1	0.733 5	MCW0165	0.895 8	0.716 8	0.666 5
MCW0005	1.000 0	0.703 8	0.649 3	MCW0285	0.500 0	0.581 2	0.532 2
MCW0240	1.000 0	0.786 0	0.751 3	MCW0328	0.979 2	0.624 1	0.553 5
MCW0029	1.000 0	0.795 8	0.764 8	ADL0284	1.000 0	0.765 4	0.732 5
MCW0176	1.000 0	0.798 0	0.766 8	LEI0075	1.000 0	0.697 3	0.639 1
MCW0120	0.625 0	0.651 7	0.588 7	MCW0294	1.000 0	0.500 0	0.375 0
ADL0121	0.708 3	0.704 2	0.648 4	MCW0154	0.895 8	0.713 5	0.663 1
MCW0134	0.520 8	0.577 0	0.490 6	LEI0254	0.000 0	0.468 8	0.358 9
MCW0035	0.520 8	0.463 3	0.356 0	MCW0119	1.000 0	0.610 5	0.532 5
MCW0097	1.000 0	0.607 4	0.530 4				
Mean ± SD		0.798 0 ± 0.291 2	0.650 6 ± 0.147 8			0.594 8 ± 0.162 8	

该群体遗传多样性较为丰富。从该群体表观杂合度和期望杂合度来看,其群体平均值分别为 0.798 0 和 0.650 6,表明两者存在一致性,即群体杂合度较高,揭示出该群体具有较丰富的遗传变异。

多态信息含量(PIC)是根据 Botstein 等^[10]提出的公式计算出来的,它是衡量微卫星 DNA 座位变异程度高低的重要指标。当微卫星座位 $PIC > 0.5$ 时,揭示该座位为高度多态性座位;当 $0.25 < PIC < 0.5$ 时,为中度多态性座位;当 $PIC < 0.25$ 时,为低度多态性座位。本研究 33 个微卫星座位的平均 PIC 为 0.594 8,其中,有 25 个座位 $PIC > 0.5$,为高度多态性座位;7 个座位 $0.25 < PIC < 0.5$,为中度多态性座位,只有一个座位 MCW0122 的 PIC 是 0.169 2,为低度多态性座位,但所占比例很小(0.30%)。可见,多态信息含量分析的结果与等位基因多样性、表观杂合度和期望杂合度所反映的结果相一致,表明云南红色原鸡群体遗传变异较大,遗传多样性较丰富。

本实验室叶朗惠等^[9]采用相同的引物检测了由红原鸡经一定驯化而成的原始地方鸡种——茶花鸡的遗传多样性,结果显示,群体的平均期望杂合度和多态信息含量分别为 0.612 9 和 0.527 6。本研究结果与之相比稍高,但经统计检验,两者期望杂合度平均值差异不显著($P > 0.05$),但平均多态信息含量差异显著($P < 0.05$),揭示红色原鸡群体遗传变异与茶花鸡相当或比之稍丰富。

Hardy-Weinberg 平衡的卡方(χ^2)检验结果显示只有 MCW0122、MCW0120、ADL0121、MCW0134、MCW0035、MCW0198、MCW0330 及 MCW0285 等 8 个座位处于平衡状态,揭示该群体的一些座位可能受到了选择、迁移、基因交流或取样效应等因素的影响。

致谢 本研究样品采集过程中得到了云南农业大学潘伟荣老师、云南德宏州畜牧局何朝阳副局长、德宏州畜牧兽医站创向辉站长、德宏州泸西市畜牧站汤守锐站长及云南西双版纳州畜牧兽医站刘建平畜牧师等的鼎力帮助,在此表示衷心感谢!

参 考 文 献

- [1] 中国科学院中国动物志编辑委员会. 中国动物志 鸟纲: 第四卷 鸡形目. 北京: 科学出版社, 1978, 148 ~ 154.
- [2] Hillier L W, Miller W, Birney E, et al. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature*, 2004, **432**: 695 ~ 716.
- [3] Grimwood J, Schmutz J. Fowl sequence. *Nature*, 2004, **432**: 679 ~ 680.
- [4] Wong C K, Liu B, Wang J, et al. A genetic variation map for chicken with 2.8 million single-nucleotide polymorphisms. *Nature*, 2004, **432**: 717 ~ 722.
- [5] Wallis J W, Aerts J, Groenen M A, et al. A physical map of the chicken genome. *Nature*, 2004, **432**: 761 ~ 764.
- [6] Romanov M N, Weigend S. Analysis of genetic relationships between various populations of domestic and jungle fowl using microsatellite markers. *Poultry Science*, 2001, **80**(8): 1 057 ~ 1 063.
- [7] Hillel J, Groenen M A, Tixier-Boichard M, et al. Biodiversity of 52 chicken populations assessed by microsatellite typing of DNA pools. *Genet Sel Evol*, 2003, **35**(5): 533 ~ 557.
- [8] 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 方法的研究. 黑龙江畜牧兽医, 2005, (12): 10 ~ 12.
- [9] 叶朗惠, 苗永旺, 霍金龙等. 茶花鸡群体遗传多样性. 动物学杂志, 2006, **41**(2): 37 ~ 42.
- [10] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*, 1980, **32**: 314 ~ 331.
- [11] 法兰克汉 R, 巴卢 J D, 布里斯科 D A(黄宏文, 康明译). 保育遗传学. 北京: 科学出版社, 2005, 47 ~ 62.