

利用微卫星标记分析中国地方鸡种的遗传多样性*

曲鲁江 李显耀 徐桂芳 陈宽维 杨红杰 张龙超
吴桂琴 侯卓成 徐桂云 杨 宁 **

(中国农业大学动物科技学院, 北京 100094; 全国畜牧兽医总站, 北京 100026; 中国农业科学院
家禽研究所, 扬州 200331)

摘要 中国幅员辽阔, 拥有丰富的鸡种遗传资源. 由于中国地方鸡种生产性能相对较低, 很难与国内外家禽公司育成的商业品种竞争, 现存数目较少, 有些已经濒临灭绝. 为了进一步了解中国地方鸡品种的遗传多样性状况, 本研究采集了分布于中国各地的 78 个地方鸡品种血样, 并利用分布于 13 条染色体上 27 个微卫星标记进行分析. 通过对 2740 个样本的检测分析发现, 在所有 27 个微卫星座位中, 等位基因数从 6~51 个不等, 平均值为 18.74. 所检测的 78 个品种的杂合度(H)均在 0.5 以上, 所有品种的平均杂合度值为 0.622, 多态信息含量(PIC)平均值为 0.573. 与国外的同类研究相比, 这一结果表明中国的地方鸡品种具有更加广泛的遗传多样性. 在 27 个微卫星座位中, 总群内亚群的固定系数(F_{ST})从 0.065(LEI0166)到 0.209(MCW0078)不等, 平均值为 0.106. 在检测的位点中, 只有LEI0194 位点在所有的群体中均偏离了Hardy-Weinberg平衡(HWE), 而其他位点基本上都处于Hardy-Weinberg平衡状态. 由于小群体中的基因漂移及非随机交配, 一些保种场保存的地方品种(如狼山鸡)的杂合度相对较低, 而保种区的品种由于保种群群体较大, 杂合度也就相对较高. 中国地方鸡品种的高杂合度与其表型多样性是一致的. 通过Nei氏遗传距离和邻接法将中国地方鸡种进行聚类, 结果表明, 中国地方鸡品种可以分为六大类, 分类结果与品种的地理分布基本一致. 通过分子生物学手段进行中国地方鸡品种的遗传多样性分析, 将对中国地方鸡品种的利用和保护提供重要的理论依据.

关键词 中国 鸡 地方品种 遗传多样性 微卫星标记

中国一直被认为是鸡的驯养中心之一. 据考古学研究报告, 早在公元前 6000 年中国就有了家鸡饲养的历史^[1]. 目前, 中国的养鸡数量居世界第一, 其中蕴含了丰富的遗传资源, 而品种众多的地方鸡种

收稿日期: 2004-11-24; 接受日期: 2005-09-25

* 国家杰出青年基金(批准号: 30225032)、教育部博士点基金(批准号: 20020019011)及农业部畜禽种质资源保护项目资助

** 联系人, E-mail: nyang@cau.edu.cn

更是遍及中国的大江南北. 中国丰富的地貌和各地迥异的气候使得很多品种在体型、羽色等方面具有与众不同的特色. 如, 三黄鸡(羽色、胫色和皮肤颜色均为黄色)在华南地区颇受欢迎, 丝羽乌骨鸡等乌骨鸡更是被作为一种营养品和中药而闻名, 北京油鸡则以其鲜美的肉质, 美丽的外表而被称为“宫廷黄鸡”. 然而, 由于很多地方鸡种产蛋量和产肉量性能相对较低, 故现在的饲养数量较少.

目前, 家禽遗传多样性的降低引起了越来越多的关注^[2]. 人类活动对自然和生态环境的影响, 在世界范围内已导致了物种的灭绝, 而种内的遗传多样性也同样受到威胁而大大降低. 和世界很多国家一样, 由于生产性能较低而导致中国部分家鸡品种濒临灭绝, 如河北省的坝上长尾鸡; 而与商业品种杂交, 也导致部分品种发生了变化. 然而, 这些宝贵的遗传资源可能被用作现今及未来的育种素材; 一些现在看似不重要的基因可能会对未来的遗传育种工作带来利益, 而那些存在于部分地方鸡种中对特殊环境较适应的等位基因也是鸡遗传资源不可或缺的一部分.

为了探讨更好的家禽保种方式, 需要对我国家禽遗传资源的现状进行大规模的调查, 并采用先进的技术手段进行遗传多样性研究. 在现代分子生物学手段中, 微卫星遗传标记非常适合遗传多样性方面的研究, 尤其是对物种内不同群体的分子遗传关系研究^[3-6]. 一些研究采用微卫星遗传标记研究了鸡不同群体之间的遗传关系^[6-13]. 本研究以微卫星标记为研究手段分析了中国 78 个地方鸡种的遗传多样性.

1 材料与方法

1.1 地方鸡群体

本研究分析了分布于中国各地的 78 个地方鸡种. 所有的地方品种血样均采自该品种的原产地, 每个品种的采样样本量为 30~62(有两个例外: 米易鸡 14 只, 瓦灰鸡 18 只). 78 个中国地方鸡种的样本数量、产地及基本特性见表 1.

1.2 血样的采集及基因组 DNA 的提取

每只鸡翅下静脉采血 3~5 mL, 置于盛有抗凝剂

ACD(0.48%柠檬酸, 1.32%柠檬酸钠, 1.47%葡萄糖)的离心管中. 取 30 μ L 新鲜血样用于基因组 DNA 的提取, 步骤如下: 溶血, 蛋白酶 K 孵育, 分别用酚、酚/氯仿(1:1, v/v)及氯仿抽提, 乙醇沉淀后溶于 400 μ L 的 TE 中.

1.3 微卫星基因型的测定

用所选的微卫星标记分析 2740 只鸡个体的 DNA 样品, 所采用的 27 个微卫星标记分布于鸡的 1~11, 13 和 17 号常染色体上, 其中 21 个标记在 AVIANDIV 项目中被使用^[14]. 所用引物见表 2. PCR 反应体系为 15 μ L, 含鸡基因组模板 20~50 ng, Mg^{2+} 浓度为 1.5 mmol/L, Tris-Cl 10 mmol/L (pH = 8.3), 1 mmol/L TMAC, 0.1% Triton X-100, 0.01% gelatin, dNTP 200 μ mol/L, DNA 聚合酶 0.5 U, 上、下游引物各 295 nmol/L.

PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C, 5 min; 35 $\times$ (94 $^{\circ}$ C, 1 min; 46 $^{\circ}$ C, 1 min; 72 $^{\circ}$ C, 1 min); 72 $^{\circ}$ C, 10 min. PCR 产物在 6%~10% 的变性聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳后银染检测^[15]. 此外, 为了校正本实验的结果, 利用来自于 AVIANDIV 项目的 9 只鸡的 DNA 样品作为参照样本进行对照检测.

1.4 统计分析

利用 Cervus 软件^[16]计算各个微卫星位点的观察和期望杂合度及同源度. 多态信息含量(PIC)与杂合度(H)的计算公式见 Botstein 等人^[17].

连锁不平衡及 Hardy-Weinberg 的偏离度检验采用 Cervus 软件中 Fisher 精确检验. 以杂合度值及微卫星座位上的等位基因数来反应遗传多样性. 并计算任何一个群体与其他 77 个品种所组成的群体的 Nei 氏^[18,19]平均遗传相似性(MGI)和平均遗传距离(MGD). 通过 Genepop, Dispan 和 Mega2.1 计算各个群体间的 Nei 氏遗传距离并构建所有群体的分子聚类树.

2 结果

2.1 群体遗传多样性

78 个品种的遗传多样性测定结果见表 3. 中国的地方鸡种表现出较高的杂合度及广泛的遗传多样性. 所有群体的平均杂合度均超过了 0.5, 27 个微卫星位

表 1 78 个中国地方鸡种的品种名、样本数量、产地及特性

品种名(样本数)	产地	特性	品种名(样本数)	产地	特性
矮脚鸡(32)	贵州 ^{a)}	短胫	米易鸡(14)	四川 ^{a)}	麻羽
白耳鸡(32)	江西 ^{b)}	三黄特征, 白耳	沐川乌骨鸡(48)	四川 ^{b)}	乌骨
北京油鸡(61)	北京 ^{b)}	毛腿, 黄羽	南丹瑶鸡(31)	广西 ^{b)}	麻羽或黄羽
边鸡(32)	山西 ^{b)}	黄羽或麻羽	宁都三黄鸡(32)	江西 ^{b)}	三黄特征
茶花鸡(31)	云南 ^{b)}	麻羽	浦东鸡(32)	上海 ^{b)}	黄羽, 红羽或黑羽
崇仁麻鸡(32)	江西 ^{b)}	麻羽	黔东南小香鸡(31)	贵州 ^{b)}	麻羽, 体型较小
大骨鸡(62)	辽宁 ^{b)}	红羽或麻羽	清远麻鸡(32)	广东 ^{b)}	麻羽
东乡绿壳蛋鸡(32)	江西 ^{b)}	黑羽, 产绿壳蛋	陕北鸡(31)	陕西 ^{a)}	多种羽色
峨嵋黑鸡 (32)	四川 ^{a)}	黑羽	石棉草科鸡(32)	四川 ^{b)}	黑羽
福建丝绒乌骨鸡 (31)	福建 ^{b)}	丝羽, 多趾	寿光鸡(32)	山东 ^{b)}	黑羽
广西三黄鸡(31)	广西 ^{b)}	三黄特征	双莲鸡(32)	湖北 ^{a)}	麻羽
固始鸡(47)	河南 ^{b)}	多种颜色	丝羽乌骨鸡(48)	江西 ^{b)}	丝羽, 乌骨
固原鸡(32)	宁夏 ^{a)}	黄羽或麻羽	太白鸡(32)	陕西 ^{a)}	麻羽
海东鸡(32)	青海 ^{a)}	多种颜色	桃源鸡(31)	湖南 ^{b)}	黄羽, 较高
河南斗鸡(48)	河南 ^{a)}	斗鸡	腾冲雪鸡(32)	云南 ^{b)}	乌骨
和田鸡(32)	福建 ^{b)}	淡黄羽色	藏鸡(32)	西藏 ^{a)}	体型较小
洪山鸡(32)	湖北 ^{b)}	三黄特征	吐鲁番斗鸡(48)	新疆 ^{a)}	斗鸡
淮北麻鸡(32)	安徽 ^{a)}	麻羽	瓦灰鸡(18)	江西 ^{b)}	麻羽
淮南三黄鸡(32)	安徽 ^{a)}	三黄特征	威宁鸡(31)	贵州 ^{a)}	麻羽
怀乡鸡(32)	广东 ^{b)}	三黄特征	文昌鸡(32)	海南 ^{b)}	黄羽或麻羽
黄郎鸡(32)	湖南 ^{b)}	三黄特征	汶上芦花鸡(32)	山东 ^{a)}	芦花羽
惠阳胡须鸡(32)	广东 ^{b)}	体型小, 有胡须	武定鸡(32)	云南 ^{a)}	红羽或麻羽, 较高
泸定鸡(32)	四川 ^{a)}	麻羽	乌蒙乌骨鸡(47)	贵州 ^{a)}	乌骨
江汉鸡(32)	湖北 ^{a)}	多种羽色	仙居鸡(31)	浙江 ^{b)}	黄羽或黑羽,
江山乌骨鸡(47)	浙江 ^{b)}	乌骨	萧山鸡(32)	浙江 ^{b)}	黄羽
金湖乌鸡(48)	福建 ^{b)}	乌骨	霞烟鸡(32)	广西 ^{b)}	三黄特征
济宁百日鸡(32)	山东 ^{a)}	黄羽或麻羽	杏花鸡(31)	广东 ^{b)}	三黄特征, 体型较小
静宁鸡(31)	甘肃 ^{a)}	黄羽或麻羽	兴文乌骨鸡(47)	四川 ^{b)}	黑羽或白羽, 乌骨
旧院黑鸡(31)	四川 ^{b)}	黑羽	西双版纳斗鸡(48)	云南 ^{a)}	斗鸡
康乐鸡(32)	江西 ^{b)}	黄羽	宣州鸡(31)	安徽 ^{b)}	麻羽
狼山鸡(32)	江苏 ^{b)}	黑羽或白羽	阳山鸡(32)	广东 ^{b)}	三黄特征
琅琊鸡(32)	山东 ^{b)}	麻羽	盐津乌骨鸡(47)	云南 ^{b)}	乌骨
凉山崖鹰鸡(32)	四川 ^{a)}	麻羽	余干乌骨鸡(47)	江西 ^{b)}	乌骨
灵昆鸡(32)	浙江 ^{a)}	三黄特征	云龙矮脚鸡(32)	云南 ^{a)}	短胫
溧阳鸡(32)	江苏 ^{b)}	体型较大	鄯阳白羽乌鸡(32)	湖北 ^{b)}	白羽, 乌骨
略阳鸡(31)	陕西 ^{a)}	乌骨	鄯阳大鸡(48)	湖北 ^{a)}	黄羽, 乌骨
卢氏鸡(32)	河南 ^{b)}	麻羽	漳州斗鸡(47)	福建 ^{a)}	斗鸡
鲁西斗鸡(47)	山东 ^{b)}	斗鸡	正阳三黄鸡(32)	河南 ^{b)}	三黄特征
鹿苑鸡(31)	江苏 ^{b)}	黄羽, 体型较大	竹乡鸡(32)	贵州 ^{a)}	黑羽及黑皮

a) 保存于原产地保种区内的品种; b) 保护于保种场的品种

点在 78 个群体的平均杂合度及 PIC 值分别为 0.622 与 0.573, 平均等位基因数为 6.00; 位于江苏省的狼山鸡杂合度最低, 但也达到了 0.505, PIC 值为 0.456; 杂合度最高的群体为湖北省的双莲鸡, 杂合度和 PIC 值分别为 0.678 和 0.633.

2.2 平均遗传相似性与平均遗传距离

任何一个品种与其他 77 个品种的 MGD 和 MGI 值见表 3. MGD 值从 0.043(淮北麻鸡)到 0.251(漳州斗鸡)不等, 平均值为 0.097. MGI 的平均值为 0.908, MGI 值最大的江汉鸡为 0.958, 最小的漳州斗鸡为 0.778.

2.3 微卫星标记的多态性

所有的微卫星标记均表现出较高的多态性(表 2). 一些等位基因在部分群体中频率较低(如北京油鸡中的一些稀有等位基因), 而部分群体含有品种群体特异的等位基因(如漳州斗鸡中的特异等位基因). 27 个微卫星标记在所检测群体中的平均等位基因数为 18.64, 最少的为 6 个, 最多的则达到了 51 个.

所有标记在总群的平均杂合度和 PIC 值分别为 0.693 和 0.652. 其中多态性最高的为 LEI0234, 在总群中含有 51 个等位基因, 群体间平均等位基因数为 13.05, 平均杂合度和 PIC 值分别为 0.921 和 0.916. 微

表 2 27 个微卫星标记的多态性

座位	位置		等位基因数		杂合度	多态信息含量	观察杂合度
	染色体	染色体位置	总群	群体平均			
ADL0112	10	114	7	2.74	0.496	0.396	0.436
ADL0158	10	19	15	5.56	0.700	0.673	0.516
ADL0210	11	54	17	5.97	0.751	0.712	0.504
ADL0268	1	288	14	4.94	0.725	0.678	0.606
LEI0094	4	225	25	9.78	0.835	0.823	0.741
LEI0166	3	300	7	3.85	0.623	0.549	0.580
LEI0192	6	114	51	12.94	0.887	0.883	0.770
LEI0194	1	55	43	8.74	0.832	0.818	0.420
LEI0234	2	72	51	13.05	0.921	0.916	0.791
MCW0014	6	96	15	4.5	0.679	0.619	0.592
MCW0032	5	116	27	9.69	0.819	0.805	0.696
MCW0034	2	230	15	6.63	0.727	0.697	0.615
MCW0037	3	317	9	3.22	0.656	0.586	0.523
MCW0067	10	61	9	3.32	0.638	0.566	0.605
MCW0069	E46C08W18	23	18	7.91	0.814	0.791	0.703
MCW0078	8	87	9	2.49	0.204	0.196	0.114
MCW0081	5	123	12	3.27	0.450	0.386	0.357
MCW0103	3	210	7	2.24	0.474	0.376	0.423
MCW0111	1	118	20	5.65	0.725	0.683	0.606
MCW0120	7	121	14	6.78	0.829	0.806	0.598
MCW0134	9	132	22	7.47	0.815	0.793	0.720
MCW0145	1	455	27	7.15	0.778	0.749	0.616
MCW0206	2	117	17	5.36	0.708	0.664	0.595
MCW0216	13	28	8	3.63	0.456	0.424	0.366
MCW0222	3	28	6	3.35	0.649	0.579	0.515
MCW0295	4	75	16	6.18	0.745	0.708	0.628
MCW0330	17	41	25	5.67	0.763	0.729	0.649
总计			18.74	6	0.693	0.652	0.566

表 3 78 个中国地方鸡种的多态性及聚类结果

名称	$H^a)$	多态信息含量	$P^{b)}$	平均等位基因数	平均遗传距离	平均遗传相似性	聚类结果 ^{c)}
					Nei(1978)	Nei(1978)	
狼山鸡	0.505	0.456	1	4.37	0.137	0.872	5
河南斗鸡	0.532	0.486	1	5.04	0.141	0.868	1
鹿苑鸡	0.533	0.488	0.96	4.81	0.182	0.833	5
崇仁麻鸡	0.537	0.489	0.93	4.74	0.122	0.885	7
边鸡	0.543	0.497	0.96	4.74	0.147	0.863	6
东乡绿壳蛋鸡	0.556	0.511	0.96	5.15	0.107	0.898	7
北京油鸡	0.576	0.521	0.96	5.44	0.122	0.884	4
江山乌骨鸡	0.581	0.532	1	5.81	0.085	0.918	6
白耳鸡	0.585	0.533	1	5.11	0.101	0.904	7
凉山崖鹰鸡	0.586	0.541	1	5.37	0.199	0.819	4
金湖乌鸡	0.586	0.539	0.96	5.63	0.099	0.905	5
萧山鸡	0.589	0.541	1	5.44	0.126	0.881	5
丝羽乌骨鸡	0.592	0.542	1	5.37	0.093	0.911	6
鲁西斗鸡	0.593	0.544	0.96	6.11	0.109	0.896	1
漳州斗鸡	0.594	0.543	1	5.63	0.247	0.780	2
灵昆鸡	0.595	0.548	1	5.85	0.082	0.921	6
海东鸡	0.597	0.521	0.96	4.62	0.117	0.8896	1
福建丝绒乌骨鸡	0.597	0.549	1	5.56	0.091	0.912	2
武定鸡	0.602	0.555	1	6.07	0.093	0.911	4
固原鸡	0.603	0.534	0.96	5.62	0.104	0.901	1
茶花鸡	0.608	0.554	1	5.26	0.164	0.848	2
琅琊鸡	0.609	0.561	1	5.41	0.055	0.946	6
宁都三黄鸡	0.609	0.556	1	5.48	0.059	0.942	7
浦东鸡	0.613	0.559	1	5.07	0.121	0.886	5
吐鲁番斗鸡	0.621	0.532	1	6.2	0.116	0.890	1
鄯阳大鸡	0.621	0.567	1	5.7	0.084	0.919	7
康乐鸡	0.622	0.574	0.96	5.52	0.099	0.906	5
怀乡鸡	0.623	0.574	1	5.96	0.063	0.939	2
泸定鸡	0.625	0.578	1	5.67	0.105	0.900	3
沐川乌骨鸡	0.625	0.584	1	6.59	0.061	0.940	6
汶上芦花鸡	0.625	0.571	0.96	5.59	0.109	0.896	5
乌蒙乌骨鸡	0.625	0.576	1	6.19	0.139	0.870	4
静宁鸡	0.626	0.562	0.96	5.96	0.077	0.925	1
略阳鸡	0.626	0.577	1	5.85	0.056	0.945	6
陕北鸡	0.626	0.583	1	6.04	0.067	0.935	6
仙居鸡	0.626	0.581	0.96	5.78	0.063	0.938	2
溧阳鸡	0.627	0.582	1	6.11	0.089	0.915	5
正阳三黄鸡	0.629	0.581	1	5.93	0.090	0.914	5
洪山鸡	0.629	0.583	1	6.04	0.052	0.949	6
余干乌骨鸡	0.629	0.582	0.96	6.41	0.093	0.911	6

续表 3

名称	$H^{a)}$	多态信息含量	$P^{b)}$	平均等位基因数	平均遗传距离	平均遗传相似性	聚类结果 ^{c)}
					Nei(1978)	Nei(1978)	
固始鸡	0.630	0.582	1	7.33	0.041	0.959	6
黔东南小香鸡	0.630	0.585	0.96	5.74	0.073	0.929	4
瓦灰鸡	0.630	0.585	0.96	6.37	0.051	0.950	6
霞烟鸡	0.632	0.588	0.96	6.41	0.060	0.941	2
淮南三黄鸡	0.633	0.583	0.96	6.52	0.036	0.964	6
矮脚鸡	0.633	0.583	1	5.93	0.189	0.828	5
兴文乌骨鸡	0.635	0.589	1	6.67	0.077	0.925	6
寿光鸡	0.635	0.577	1	5.22	0.145	0.865	5
阳山鸡	0.635	0.584	1	6.00	0.074	0.928	2
旧院黑鸡	0.636	0.586	1	5.67	0.116	0.890	3
惠阳胡须鸡	0.636	0.587	1	6.19	0.056	0.945	2
桃源鸡	0.637	0.593	0.96	6.26	0.091	0.912	5
淮北麻鸡	0.640	0.596	1	6.56	0.035	0.965	6
清远麻鸡	0.640	0.597	1	6.11	0.057	0.944	2
江汉鸡	0.641	0.598	1	6.33	0.035	0.965	6
杏花鸡	0.642	0.594	1	6.19	0.069	0.933	2
石棉草科鸡	0.644	0.600	1	6.74	0.076	0.927	3
郧阳白羽乌鸡	0.644	0.600	0.96	7.00	0.064	0.938	6
宣州鸡	0.644	0.598	1	6.30	0.063	0.938	6
和田鸡	0.644	0.601	0.96	6.52	0.041	0.959	2
太白鸡	0.645	0.600	1	6.07	0.084	0.919	5
卢氏鸡	0.645	0.601	1	6.56	0.063	0.938	6
米易鸡	0.648	0.604	1	5.81	0.078	0.924	3
大骨鸡	0.648	0.596	1	6.67	0.058	0.943	7
文昌鸡	0.650	0.605	1	6.33	0.085	0.918	6
云龙矮脚鸡	0.651	0.606	1	6.52	0.074	0.929	4
盐津乌骨鸡	0.657	0.607	0.96	7.00	0.076	0.931	7
南丹瑶鸡	0.657	0.609	0.96	6.41	0.072	0.930	2
黄郎鸡	0.660	0.614	0.96	6.44	0.053	0.948	5
威宁鸡	0.661	0.616	1	6.30	0.117	0.889	4
西双版纳斗鸡	0.662	0.614	1	7.59	0.091	0.913	2
藏鸡	0.662	0.613	1	6.07	0.088	0.915	2
峨嵋黑鸡	0.663	0.618	1	6.52	0.102	0.903	3
广西三黄鸡	0.663	0.616	1	7.19	0.060	0.941	6
济宁百日鸡	0.666	0.621	1	6.78	0.046	0.954	6
腾冲雪鸡	0.669	0.626	1	6.96	0.086	0.918	2
竹乡鸡	0.670	0.624	1	6.30	0.065	0.937	4
双莲鸡	0.678	0.633	1	6.81	0.059	0.942	5
平均	0.622	0.573	0.99	5.99	0.0906	0.914	

a) H 示所有标记的杂合度; b) P 示多态性标记的频率; c) 1 示西北型, 2 示华南型, 3 示西南 I 型, 4 示西南 II 型, 5 示华东型, 6 示华中型, 7 示其他

卫星标记 MCW0078 的杂合度最低, 在总群中共有 9 个等位基因, 群体间平均等位基因数为 2.24, 平均杂合度及 PIC 分别为 0.204 与 0.196.

2.4 遗传分化分析

27 个微卫星位点在所有群体内各亚群体的固定系数(F_{ST}) 在 0.065(LEI0166)~0.209(MCW0078)之间变动, 平均值为 0.106; 整个群体的个体固定系数(F_{IT}) 的范围为 0.061(MCW0067)~0.492(LEI0194), 均值为 0.187; 亚群体内的个体固定系数(F_{IS}) 为 -0.008 (MCW0134)~0.400(LEI0194), 均值为 0.091.

大多数的检测位点都处于 Hardy-Weinberg 平衡 (HWE) 状态, 而 LEI0194 在所有群体均偏离了 HWE, 同时该位点也具有较高的 F_{IS} 值, 这也反映了为什么期望杂合度要比观察杂合度高的原因. 其他少数位点在部分群体也有一定的偏离, 但在这些位点偏离 HWE 的群体并不一致(未列出数据).

2.5 品种聚类结果

根据基因型分析结果, 以 NJ 法, 用所得到的遗传距离数据建立了品种的分子聚类树. 根据聚类结果可以将中国地方鸡种分为六大类, 所得分类结果与该品种的地理分布基本一致(图 1). 其中, 有 6 个品种聚类为西北型, 15 个品种聚类为华南型, 15 个品种聚类为华东型, 5 个品种聚为西南 I 型, 8 个品种聚类为西南型 II 型及 22 个品种聚类为华中型(表 3).

3 讨论

3.1 鸡微卫星标记的选择

选择合适的微卫星标记对遗传多样性研究是十分关键的一步. 本文所使用的 27 个微卫星标记有较广泛的基因组覆盖率并表现出了高度的多态性. 其中 21 个微卫星标记与欧洲 AVIANDIV 研究项目中所使用的一致^[8,14]. 微卫星座位上的等位基因数为 6~51 不等. 在 LEI0192 及 LEI0234 座位上均检测到 51 个等位基因. 在 AVIANDIV 项目中这两个位点的等位基因数分别为 37 和 23^[14]. 这种等位基因数的差别主要是由于研究群体的不同而引起的.

研究所使用的微卫星标记基本上都处于 HWE,

只有一个座位(LEI0194)在所有群体中都偏离了 HWE. 这种偏离可能是由于非随机交配、选择和小群体的基因漂变而造成的. 研究中所使用的群体, 很多是来自保种区, 群体也较大, 基本上可以认定其处于随机交配状态. 因此, 群体大小及非随机交配应该不是引起位点 LEI0194 偏离 HWE 的主要原因. 这种偏离也可能是由于 LEI0194 位点与影响重要经济相关性状的基因之间的紧密连锁; 而基因型判定过程中的错误也是引起偏离的重要原因, 如凝胶可能在分析仅差一个碱基的等位基因时还不够精确, 而导致部分杂合子错判, 这也解释了为什么该位点的几个等位基因常常处于纯合状态的现象.

3.2 中国地方鸡种的遗传多样性

本研究所有的研究群体均表现出较高的遗传多样性, 这与 Du 等人^[20]研究藏鸡和 Zhang 等人^[12,13]研究 10 个中国地方鸡种的结果一致. 同时还发现中国地方鸡种的杂合度值要明显高于其他蛋鸡、肉鸡等商业品系^[6,21~23]及欧洲地区的部分地方品种^[8]. 而双莲鸡(0.678)及藏鸡(0.662)的杂合度甚至高于红色原鸡的 *Gallus Gallus spadiceus* (0.640)及 *Gallus Gallus gallus* (0.600)亚种^[8].

主要培育自地方鸡种的优质鸡生产在中国发展得非常快. 鸡肉的风味、嫩度甚至羽色等性状都是消费者挑选的指标, 而丰富的品种遗传多样性为鸡种的育种改良提供了广阔的遗传基础. 育种家也可以通过杂交等方式从其他的品种中导入不同的优良特性, 如肉质和繁殖性状等, 以及利用杂种优势. 由于中国特有的环境条件及生产系统, 丰富的遗传多样性也能为选育适应特殊环境的品种提供有价值的遗传资源.

许多中国地方鸡种(如藏鸡)分布于相对封闭的环境, 以相对较大的群体保存于保种区中. 它们基本上没有经历过严格的人工选择, 而基因漂变的作用也远不及小群体, 因此这些群体有相对较高的遗传多样性(表 3). 另一方面大多数中国地方鸡种位于经济发达地区, 在自然条件下很少能发现, 往往以小群体保存于保种场内. 非随机交配及小群体基因漂变可能导致了杂合度降低, 如狼山鸡、东乡绿壳蛋鸡及

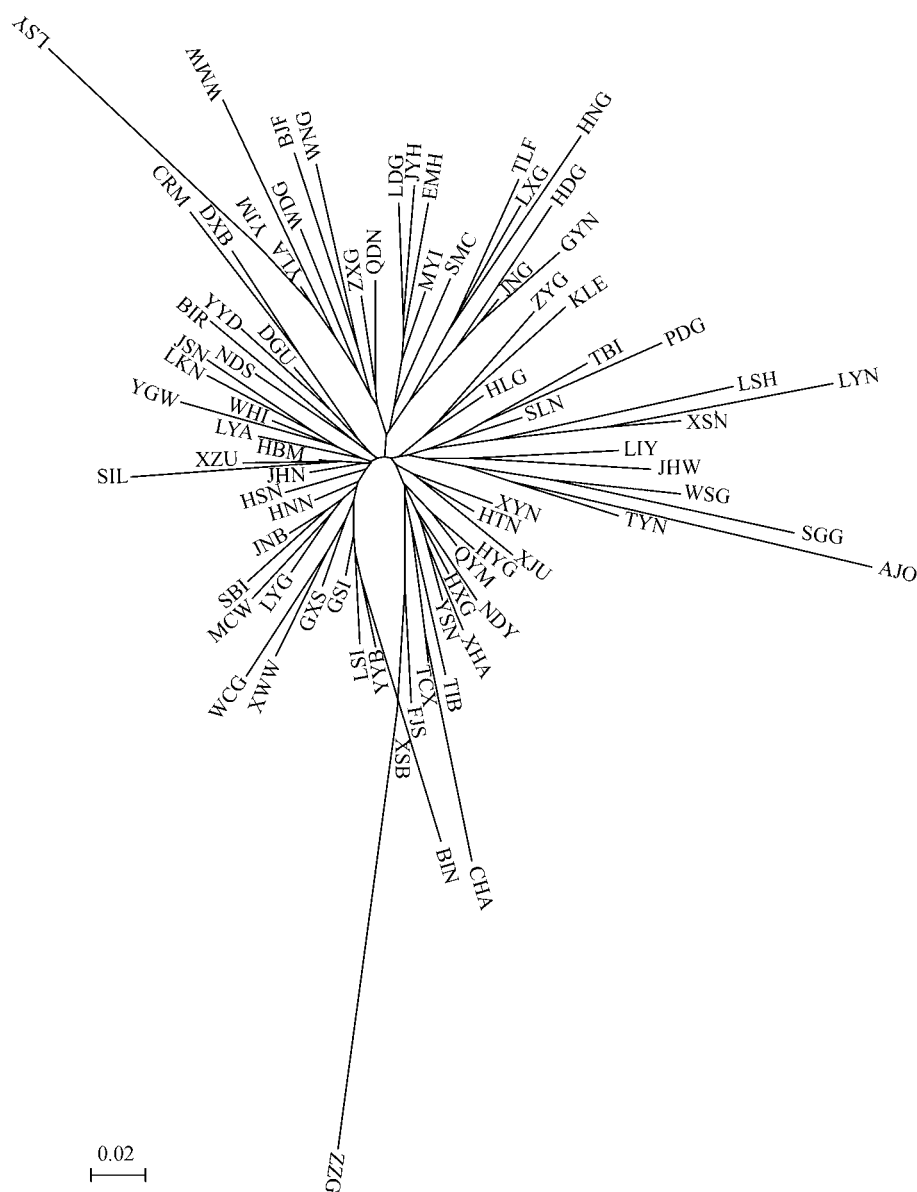


图 1 地方鸡种的分子聚类树

AJO 示矮脚鸡; BIN 示边鸡; BIR 示白耳鸡; BJF 示北京油鸡; CHA 示茶花鸡; CRM 示崇仁麻鸡; DGU 示大骨鸡; DXB 示东乡绿壳蛋鸡; EMH 示峨嵋黑鸡; FJS 示福建丝绒乌骨鸡; GSI 示固始鸡; GXG 示广西三黄鸡; GYN 示固原鸡; HBM 示淮北麻鸡; HDG 示海东鸡; HLG 示黄郎鸡; HNG 示河南斗鸡; HNN 示淮南三黄鸡; HSN 示洪山鸡; HTN 示和田鸡; HXG 示怀乡鸡; HYG 示惠阳胡须鸡; JHN 示江汉鸡; JHW 示金湖乌鸡; JNB 示济宁百日鸡; JNG 示静宁鸡; JSN 示江山乌骨鸡; JYH 示旧院黑鸡; KLE 示康乐鸡; LDG 示泸定鸡; LIY 示溧阳鸡; LKN 示灵昆鸡; LSH 示狼山鸡; LSI 示卢氏鸡; LSY 示凉山崖鹰鸡; LXG 示鲁西斗鸡; LYA 示琅琊鸡; LYG 示略阳鸡; LYN 示鹿苑鸡; MCW 示沐川乌骨鸡; MYI 示米易鸡; NDS 示宁都三黄鸡; NDY 示南丹瑶鸡; PDG 示浦东鸡; QDN 示黔东南小香鸡; QYM 示清远麻鸡; SBI 示陕北鸡; SGG 示寿光鸡; SIL 示丝羽乌骨鸡; SLN 示双莲鸡; SMC 示石棉草鸡; TBI 示太白鸡; TCX 示腾冲雪鸡; TIB 示藏鸡; TLF 示吐鲁番斗鸡; TYN 示桃源鸡; WCG 示文昌鸡; WDG 示武定鸡; WHI 示瓦灰鸡; WMW 示乌蒙乌骨鸡; WNG 示威宁鸡; WSG 示汶上芦花鸡; XHA 示杏花鸡; XJU 示仙居鸡; XSB 示西双版纳斗鸡; XSN 示萧山鸡; XWW 示兴文乌骨鸡; XYN 示霞烟鸡; XZU 示宣州鸡; YGW 示余干乌骨鸡; YJW 示盐津乌骨鸡; YLA 示云龙矮脚鸡; YSN 示阳山鸡; YYB 示鄯阳白羽乌鸡; YYD 示郧阳大鸡; ZXG 示竹乡鸡; ZYG 示正阳三黄鸡; ZZG 示漳州斗鸡

鹿苑鸡已经以小群体在保种场保存了 20 年以上, 这种长期的保种场保种方式可能引起这些品种的遗传多样性降低. 这些品种的杂合度值分别为 0.505, 0.511 和 0.533. 该结果也表明需要采用更大的保种群体和更好的保种方法, 从而避免群体的近交衰退及基因漂变.

中国地方鸡种高度的遗传多样性与其表型(如体型、羽色及其他一些质量或数量性状)的多样性相一致. 地方鸡种往往以散养方式饲养, 几乎没有经过高强度的人工选择也是其多样性较丰富的原因, 而高度的遗传多样性对鸡种的保护和利用都是很重要的. 根据本实验结果建立的中国地方鸡种遗传多样性数据库, 在今后的保种和利用中将发挥重要作用. 值得注意的是, 较其他国家的鸡种而言, 中国地方鸡种拥有更丰富的遗传多样性, 这也反应了中国地方鸡种形态多样的特点. 通过综合 DNA 分子标记数据、表型数据及群体的历史等信息, 就有可能制定出更合理的保种方案.

虽然有些群体的样本比较少, 但有些遗传关系较近的群体可能是由于标记数目较少和品种数量太大, 而非群体样本较少而难以区分^[24,25]. 尽管如此, 通过对所构建的分子聚类树进行分析, 发现聚类结果较好地反应了群体间的相互关系, 并据此而将中国地方鸡种分为了六大类. 有趣的是, 本研究的五个斗鸡品种聚到了两个分化枝: 西双版纳斗鸡和漳州斗鸡聚于华南型, 吐鲁番斗鸡、河南斗鸡和鲁西斗鸡聚于西北型; 漳州斗鸡与其他中国地方鸡种的遗传距离最远, 这与曲鲁江等用线粒体D-loop区的序列变异分析中国地方鸡种所得出的结果一致, 二者都印证了漳州斗鸡可能是来源于菲律宾或印度尼西亚的观点^[26].

本研究的聚类结果与品种的地理分布基本一致, 但也有一些例外, 如位于中国东北的大骨鸡聚于华东型, 而北京油鸡则聚于东南型. 聚类结果与地理分布不一致并非结果不可信, 抽样误差及少数个体的基因型分析错误, 都会导致聚类结果的不同.

综上所述, 研究结果表明微卫星标记是分析遗传变异及生物多样性的工具, 利用 DNA 标记信息及表型数据, 有助于人们制定出更加可靠的保种

方案.

致谢 非常感谢中国农业大学动物科技学院和中国农业科学院江苏家禽研究所有关工作人员在样品采集及实验室工作过程中付出的劳动和心血. 感谢法国国家农业科学院(INRA)Michele Tixier-Boichard 博士提供的参照样本.

参 考 文 献

- 1 West B, Zhou B X. Did chickens go north? New evidence for domestication. *J Arch Sci*, 1988, 14: 515~533[DOI]
- 2 Fulton J E, Delany M E. Poultry genetic resources-operation rescue needed. *Science*, 2003, 300: 1667~1668[DOI]
- 3 Buchanan F C, Adams L J, Littlejohn R P, et al. Determination of evolutionary relationships among sheep breeds using microsatellites. *Genomics*, 1994, 22: 397~403[DOI]
- 4 MacHugh E, Lofftus R T, Barley D G, et al. Microsatellite DNA variation within and among European cattle breeds. *Proc Roy Soc Biol Sci*, 1994, 256: 25~31
- 5 Romanov M N, Weigends S. Genetic diversity in chicken populations based on microsatellite markers. In *Proc. of the Conference "From Jay Lush to Genomics: Visions for Animal Breeding and Genetics"*. Ames, Iowa, USA, 1999. 174
- 6 Crooijmans R P M A, Groen A F, van Kampen A J A, et al. Microsatellite polymorphism in commercial broiler and layers lines estimated using pooled blood samples. *Poult Sci*, 1996, 72: 334~348
- 7 Hillel J, Korol A, Kirzner V, et al. Biodiversity of chickens based on DNA pools: First results of the EC funded project AVIANDIV. In *Proceedings of the Poultry Genetic Symposium*. Mariensee, Germany, 1999
- 8 Hillel J, Groenen M A M, Tixier-Boichard M, et al. Biodiversity of 52 chicken populations assessed by microsatellite typing of DNA pools. *Genet Sel Evol*, 2003, 35: 533~557[DOI]
- 9 Weigend S, Hillel J, Groenen M A M, et al. Assessment of biodiversity in a wide range of chicken breeds by genotyping DNA pools for microsatellite loci. In *Proc. of the 27th International Conference on Animal Genetics*. Minneapolis, USA, 2000. 83
- 10 Weigend S, Romanov M N, Current strategies for the assessment and evaluation of genetic diversity in chicken resources. *World's Poult Sci J*, 2001, 57: 275~288[DOI]
- 11 Romanov M N, Weigend S, Using RAPD markers for assessment of genetic diversity in chickens. *Arch Geflugelkd*, 2001, 65: 1~4
- 12 Zhang X, Leung F C, Chan D K, et al. Comparative analysis of allozyme, random amplified polymorphic DNA, and microsatellite polymorphism on Chinese native chickens. *Poult Sci*, 2002, 81: 1093~1098
- 13 Zhang X, Leung F C, Chan D K, et al. Genetic diversity of Chinese native chicken breeds based on protein polymorphism, randomly amplified polymorphic DNA, and microsatellite polymor-

- phism. *Poult Sci*, 2002, 81: 1463~1472
- 14 Rosenberg N A, Burke T, Elo K, et al. Empirical evaluation of genetic clustering methods using multilocus genotypes from 20 chicken breeds. *Genetics*, 2001, 159: 699~713
- 15 Qu L J, Li X Y, Wu G, Yang N. Efficient and sensitive method of DNA silver staining in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 2005, 26: 99~101[DOI]
- 16 Marshall T. User's Manual for Cervus. University of Edinburgh, UK. 1998
- 17 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
- 18 Nei M. Genetic distance between populations. *Am Nat*, 1972, 106: 283~293
- 19 Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 1978, 89: 583~590
- 20 Du Z Q, Qu L J, Li X Y, et al. Genetic Diversity in Tibetan Chicken. *Hereditas*, 2004, 26: 167~171
- 21 Ponsuksili S, Wimmers K, Schmoll F, et al. Comparison of multi-locus DNA fingerprints and microsatellites in an estimate of genetic distance in chickens. *Hered*, 1999, 90: 656~659[DOI]
- 22 Vanhala T, Tuiskula-Havisto M, Elo K, et al. Evaluation of genetic variability and genetic distances between eight chicken lines using microsatellite markers. *Poult Sci*, 1998, 77: 783~790
- 23 Zhou H, Lamont S J. Genetic characterization of biodiversity in highly inbred chicken lines by microsatellite markers. *Anim Genet*, 1999, 30: 256~264[DOI]
- 24 Shriver M D, Jin L, Boerwinkle E, Deka R, et al. A novel measure of genetic distance for highly polymorphic tandem repeat loci. *Mol Biol Evol*, 1995, 12: 914~920
- 25 Chu J Y, Huang S Q, Kuang J M, et al. Genetic relationship of populations in China. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 11763~11768[DOI]
- 26 Wu D C, Yang Z. Game chickens. In: *Chinese Game Chickens*, Huhhot: Yuanfang Publisher, 1993. 4~7