

四川白鹅与莱茵鹅遗传多态性的比较

王日君¹, 段修军^{1,2}, 董 彪^{1,2}, 孙国波^{1,2}, 卞友庆²

(1. 江苏畜牧兽医职业技术学院, 江苏 泰州 225300; 2. 国家水禽种质资源基因库, 江苏 泰州 225300)

摘要: 选用 10 个微卫星标记检测四川白鹅、莱茵鹅的遗传多样性。结果表明, 10 个微卫星座位共检出 55 个等位基因, 基因频率分布在 0.0000~0.6667, 平均每对引物可检测 5.5 个等位基因; 四川白鹅和莱茵鹅的平均杂合度分别为 0.6561, 0.7010, 平均多态信息含量为 0.6146, 0.6522, 表明 2 个鹅群体遗传变异大。根据基因频率推断, 引物 CKW10, CKW14, CKW18, CKW21, TTUCG5 可作为鹅产蛋、产肉性能的辅助选择标记。

关键词: 鹅; 微卫星标记; 遗传多样性

中图分类号: S835 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2008)12-0117-04

Comparison of the Genetic Diversity of Sichuan Goose and Rhin Goose

WANG Ri-jun¹, DUAN Xiu-jun^{1,2}, DONG Biao^{1,2}, SUN Guo-bo^{1,2}, BIAN You-qing²

(1. Jiangsu Animal Husbandry and Veterinary College, Taizhou 225300, China;

2. National Waterfowl Germplasm Resource Pool, Taizhou 225300, China)

Abstract: In this study, the genetic diversity of Sichuan goose and Rhin goose were analyzed by 10 microsatellite DNA markers, which could provide information for molecule marker assistant choice. The results showed that there were 55 alleles inspected in 10 microsatellite loci. Allele frequencies were 0.0000—0.6667 and the average number of alleles was 5.5. The mean heterozygosity of Sichuan goose and Rhin goose was 0.6561 and 0.7010, respectively. The average value of polymorphism information content (PIC) was 0.6146 and 0.6522. These data indicated that there were high genetic diversity and rich polymorphism existed in Sichuan goose and Rhin goose populations. According to the allele frequencies, CKW10, CKW14, CKW18, CKW21 and TTUCG5 may be used as the molecule marker in studying the relativity to egg or meat.

Key words: Goose; Microsatellite polymorphism; Genetics diversity

四川白鹅是我国中型肉蛋型品种, 其特点是生长快、产蛋量高、繁殖力强、产绒量高, 是我国优良的地方水禽品种; 莱茵鹅个体大、生长快, 但繁殖性能稍差。在产蛋性能上, 四川白鹅的产蛋数明显高于莱茵鹅, 而在初生重、成年体重、日增重等方面, 莱茵鹅显著高于四川白鹅。运用现代分子技术, 寻找出这些优良特性的辅助分子标记, 用于水禽的育种, 是现代育种的行之有效的途径之一。

微卫星 DNA 以 1~6bp 的短核苷酸为基本单位, 呈串联重复状, 具有分布广而均匀、多态性丰富、共显性遗传、检测方法简便、快捷等优点^[1,2], 目前已被广泛应用于各种畜禽品种群体遗传结构和亲缘关系的分析^[3~6], 并取得了许多有价值的研究成果。本研究利用 PCR 方法, 对四川白鹅、莱茵鹅的 10 个微卫星位点进行遗传多态性分析, 并将各引物等位基因频率及相应遗传参数进行比较, 为鹅育种的辅

收稿日期: 2008-09-01

基金项目: 江苏省泰州市科技攻关项目(TL0707)

作者简介: 王日君(1959-), 男, 江苏泰兴人, 副教授, 本科, 主要从事动物遗传育种方面的研究与教学工作。

助标记寻找奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

DNA 样来源: 以江苏畜牧兽医职业技术学院实训基地饲养的四川白鹅、莱茵鹅为素材。采样设计按照常洪^[7] 关于评估遗传多样性抽样公式和样本量

的方法, 每个品种 60 只, 公母比例为 1 : 4。翅静脉采血, 4%EDTA 抗凝, 离心去血浆后, 酚氯仿提取 DNA, 于 TE 中溶解, -20℃保存。

引物: 根据前人的研究结果, 并通过预试验筛选获得 10 对微卫星引物^[8~10]。所用引物均由上海桑尼生物工程技术有限公司合成。引物信息见表 1。

表 1 10 个微卫星引物的序列及 PCR 退火温度

引物名称	引物序列(5'-3')		退火温度(℃)
	上游引物	下游引物	
CKW10	F: ACATCCAGTTTGTGCTGCATAC	R: CAAAGCCCCCATTCAAATAATA	53
CKW12	F: CATAAGTTCTCCCAAACAAGAGTG	R: AGAAAGGGACACACAGCTAACC	53
CKW14	F: AACTGATCCGGCAGAAACTAA	R: ACTTAGCATGCAGCTTCACAAA	58
CKW18	F: AATGTGCTGTGTCACATTCTCC	R: CATCATCCAACGATTCAGACAT	52
CKW21	F: CCCAGAACAGTGCTAGAAGAGG	R: AGCGAGTCACTCCAGTACCTTC	56
CKW32	F: CAGTGCAAGTTACCCACAG	R: TCGAGAGCACTCCATTTTGA	56
CKW49	F: TGAACACACATGCAGACTGG	R: TTGCGAGACAGAGCCTTTT	56
TTUCG5	F: GGGTGTTTCCAACTCAG	R: CACTTTCCTTACCTCACTT	55
G07	F: ACAGGTGATGCTATTATTACG	R: CATTCCTAGGAACAACCTGC	53
WWX1	F: ATGGATGCTAACAAACACTC	R: GTACAAAGGTCATGGAGAAG	55

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增 PCR 扩增体系为 25μL, 包括 10× PCR Buffer (含 25mmol/L Mg²⁺) 2.5μL、10mmol/L dNTPs 2μL、10pmol/μL 上、下游引物各 1μL、5 U/μL rTaq 酶 0.2μL、50 ng/μL DNA 模板 1μL、加 ddH₂O 至 25μL。PCR 扩增条件为 95℃ 预变性 4 min; 94℃ 50 s, 52~60℃ 50 s, 72℃ 60 s, 共 32 个循环; 72℃延伸 10 min, 4℃保存。

1.2.2 电泳及结果记录 先将 PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶中电泳, 结束后用凝胶成像系统检测扩增结果, 条带单一, 位置适合, 方可在 12% 聚丙烯酰胺凝胶中电泳进行分离。10V/cm 电泳 11~12 h 后, 银染显色, 经成像后分析结果。

1.2.3 数据统计分析 等位基因频率: 微卫星呈共显性遗传, 通过其表现型可直接反映基因型。因此, 根据电泳结果可以直接判断出每一个体的基因型; 经过计算可以得出各群体在各微卫星位点上的等位基因频率。

杂合度(He)的计算公式为:

$$He = 1 - \sum_{i=1}^n (P_i)^2$$

其中: n 为等位基因数; P_i 为第 i 个等位基因的频率。

多态信息含量(PIC)的计算公式为:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^k P_i^2 - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k 2P_i^2 P_j^2$$
$$= 2 \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k P_i P_j (1 - P_i P_j)$$

其中: k 为等位基因数目; P_i 和 P_j 分别为第 i 和第 j 个等位基因的频率。

2 结果与分析

2.1 10 个微卫星座位的等位基因大小及频率

四川白鹅和莱茵鹅的 10 个微卫星座位的等位基因频率统计结果见表 2。由表 2 可知, 10 个微卫星座位共检测到 55 个等位基因, 平均等位基因数为 5.5 个, 其中 TTUCG5 的多态性最丰富, 有 9 个等位基因; 最少的也有 4 个等位基因, 分别为 CKW10, CKW12, CKW14, G07。等位基因的频率分布在 0.0000~0.6667。从各微卫星基因座位的等位基因频率来看, 各个等位基因频率分布不均匀, 每个基因座位都有一种相对优势等位基因存在, 如 CKW10 位点中的 128 就是该基因座位的优势等位基因, 在 2 个鹅群体中所占比例较大, 2 个鹅群的优势等位基因几乎一致。但是部分等位基因在不同鹅群中所占的比例存在较大差异, 比如 CKW10 的

119, 128 等位基因, CKW14 的 210, 213 等位基因等。CKW18 的 247, CKW21 的 239, 255 等位基因

表 2 各群体不同微卫星位点的等位基因频率

引物	等位基因	等位基因频率	
		莱茵鹅	四川白鹅
CKW10	119	0.183 3	0.050 0
	125	0.233 3	0.241 7
	128	0.375 0	0.541 7
	132	0.208 3	0.166 7
CKW12	203	0.016 7	0.066 7
	207	0.383 3	0.208 3
	211	0.583 3	0.633 3
	216	0.016 7	0.091 7
CKW14	204	0.608 3	0.666 7
	210	0.233 3	0.125 0
	213	0.091 7	0.158 3
	216	0.066 7	0.050 0
CKW18	232	0.300 0	0.358 3
	237	0.283 3	0.308 3
	247	0.208 3	0.000 0
	252	0.208 3	0.066 7
	262	0.000 0	0.166 7
	267	0.000 0	0.100 0
CKW21	236	0.258 3	0.450 0
	239	0.083 3	0.000 0
	245	0.125 0	0.158 3
	248	0.250 0	0.283 3
	252	0.225 0	0.108 3
	255	0.058 3	0.000 0
CKW32	175	0.366 7	0.241 7
	178	0.216 7	0.275 0
	181	0.250 0	0.166 7
	183	0.133 3	0.100 0
	187	0.016 7	0.016 7
	192	0.008 3	0.083 3
CKW49	201	0.008 3	0.116 7
	190	0.175 0	0.100 0
	193	0.208 3	0.233 3
	196	0.141 7	0.216 7
	201	0.150 0	0.091 7
	204	0.208 3	0.183 3
G07	207	0.116 7	0.175 0
	175	0.041 7	0.158 3
	183	0.541 7	0.533 3
	186	0.358 3	0.258 3
TTUCG5	195	0.058 3	0.050 0
	182	0.358 3	0.591 7
	184	0.008 3	0.066 7
	188	0.058 3	0.033 3
	198	0.216 7	0.041 7
	203	0.125 0	0.008 3
	208	0.083 3	0.025 0
	218	0.066 7	0.041 7
	223	0.083 3	0.066 7
	225	0.000 0	0.125 0
WWX1	153	0.233 3	0.483 3
	156	0.325 0	0.025 0
	160	0.216 7	0.100 0
	163	0.216 7	0.383 3
	172	0.008 3	0.008 3

为莱茵鹅所特有, 而 CKW18 的 262, 267, TTUCG5 的 225 等位基因为四川鹅所特有。

2.2 微卫星基因座位的遗传参数分析

根据各个微卫星位点等位基因频率计算出各个位点和各个鹅群体的杂合度 (He) (表 3)。莱茵鹅的平均杂合度为 0.656 1、四川白鹅的平均杂合度为 0.701 0。

表 3 各群体不同位点的杂合度

引物	莱茵鹅	四川白鹅
CKW10	0.727 9	0.617 9
CKW12	0.512 2	0.542 6
CKW14	0.562 6	0.512 4
CKW18	0.742 9	0.734 3
CKW21	0.794 2	0.680 4
CKW32	0.737 9	0.807 4
CKW49	0.826 4	0.816 0
G07	0.573 1	0.621 3
TTUCG5	0.787 2	0.620 1
WWX1	0.746 0	0.608 8
平均值	0.701 0	0.656 1

根据各个微卫星位点等位基因频率计算出各个位点和各个鹅群体的多态信息含量 (PIC), 结果见表 4。四川白鹅和莱茵鹅的平均多态信息含量分别为 0.614 6 和 0.652 2。在被检测的 10 个微卫星座位中, 莱茵鹅的多态信息含量以 CKW49 最高 (0.802 0), CKW12 最低 (0.411 7)。四川白鹅的多态信息含量以 CKW49 最高 (0.789 5), CKW14 最低 (0.473 7)。除 CKW12、四川白鹅的 CKW14 为中度多态基因座位外, 其余微卫星座位在 2 个鹅群体均为高度多态性基因座位, 表明所选择的微卫星标记在 2 个鹅群体中表现出很高的多态性。

表 4 各群体不同位点的多态信息含量

引物	莱茵鹅	四川白鹅
CKW10	0.690 2	0.593 2
CKW12	0.411 7	0.496 3
CKW14	0.511 8	0.473 7
CKW18	0.695 1	0.690 1
CKW21	0.763 0	0.626 5
CKW32	0.693 7	0.782 1
CKW49	0.802 0	0.789 5
G07	0.493 4	0.563 8
TTUCG5	0.761 0	0.598 7
WWX1	0.700 0	0.531 9
平均值	0.652 2	0.614 6

3 讨论

遗传多样性的研究是探讨生物适应、物种形成及进化机制的基础, 同时, 也是保护生物学的核

心之一。微卫星是由 1~6 个核苷酸重复序列所构成的核心部分和两端的侧翼序列组成。家禽微卫星标记位点等位基因数一般在 2~20 个,大部分是 5~8 个。从本研究结果来看,10 对引物在 2 个鹅群体中共检测到 55 个等位基因,平均等位基因数为 5.5 个(最高 9 个、最少 4 个),表明这些微卫星座位具有较高的多态性。根据微卫星标记的选择标准,有 4 个等位基因就能较好地用于遗传分析^[11],因此可以用这些微卫星标记对四川白鹅和莱茵鹅进行进一步研究。从各个微卫星座位的等位基因频率来看,各种等位基因分布并不均匀,每个位点都有一种或几种优势等位基因存在。微卫星 DNA 的多态性能够充分反映出物种的进化历史,群体中频率最高的等位基因是该物种中最原始、保守的,其余的等位基因则是在进化过程中由于插入、缺失等机制所形成。一般认为这种等位基因形成模式符合逐步突变模型,新等位基因通过核心序列重复数目少量增加或减少而形成。

在微卫星标记技术中杂合度和多态信息含量是估测群体遗传变异度的重要指标。作为遗传多样性度量的最常用杂合度是期望杂合度,即从 1 个基因库中随机抽出的 1 个位点的 2 个拷贝为不同等位基因的概率。此杂合度值越大,群体内的遗传变异越大^[12]。多态信息含量(PIC)是衡量等位基因片段多态性的理性指标。在 1 个群体中,多态信息含量越大,表明该座位杂合子比例越大,提供的遗传信息越多。本研究中,2 个鹅群体 10 个微卫星座位的多态信息含量在 0.4117~0.8020,大多数为高度多态性基因座位。同一微卫星座位不同鹅种间以及同一鹅种不同微卫星座位间的多态信息含量都存在差异。前者反映了不同鹅种间遗传多样性之间的差异,而同一鹅种不同的微卫星座位之间的多态信息含量的差异,是由于在自然和人为的长期选育过程中,不同的微卫星座位所受的选择压力不同造成的。

研究中发现,2 个鹅群体在少数位点的等位基因频率差异较大,部分位点为群体所特有。而 2 个鹅群体在产蛋和产肉性能上差异较大,这是否因为

两者的生产性能选择压力不同而导致频率上的差异,还需进一步验证。

参考文献:

- [1] 张于光,李迪强,肖启明,等.微卫星技术及在动物遗传多样性研究中的应用[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2001,27(5):410-414.
- [2] 刘榜,张庆德,李奎,等.微卫星 DNA 作为遗传标记的优点及前景[J].湖北农业科学,1997(2):49-51.
- [3] Zhou H, Lamont S J. Genetic characterization of biodiversity in highly inbred chicken lines by microsatellite markers[J]. Animal Genetics, 1999, 30(4): 256-264.
- [4] 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 polymorphism[J]. Poultry Science, 2002, 81(10): 1463-1472.
- [5] 龚道清,张红,张军,等.运用微卫星标记分析 11 个鸭种(群)的亲缘关系[J].畜牧兽医学报,2005,36(12):1256-1260.
- [6] 李慧芳,屠云洁,汤青萍,等.6 个中国重点保护地方鹅品种的遗传多样性[J].四川农业大学学报,2005,23(4):466-469.
- [7] 常洪.家畜遗传资源学纲要[M].北京:中国农业出版社,1995.
- [8] 屠云洁,陈宽维,高玉时,等.广东 4 个地方鹅品种的遗传多样性分析[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2007,35(2):53-57.
- [9] 虞德兵,汪峰,洪坤月,等.鹅微卫星(TG)n 基序的克隆及序列比较分析[J].畜牧与兽医,2005,37(12):1-3.
- [10] 杜文兴,虞德兵,刘红林,等.双重抑制 PCR 技术分离鹅微卫星标记[J].南京农业大学学报,2005,28(3):63-67.
- [11] Barker J S F. A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breed[C] // Proceeding of the 5th World Congress on genetics. Applied to livestock production, Guelph and Ontario, Canada, 1994.
- [12] 王存芳,曾勇庆.遗传多样性与畜禽品种资源的保存利用[J].当代畜牧,2001(1):41-43.