

广西地方鸡微卫星位点 LEI0258 多态性研究

黄勋和,邓春苗,柯振华,谢洁如,陈洁波,钟福生*
(嘉应学院 生命科学学院,广东 梅州 514015)

摘要: 通过微卫星位点 LEI0258 基因分型和基因测序,分析 6 个广西地方鸡品种的遗传变异并构建中介网络图,研究广西地方鸡的遗传多样性与分子进化。结果表明,120 份样品经基因分型,检测到 38 个等位基因,长度为 181 ~ 507 bp,等位基因 205 出现的频率最高(0.125),其次是 275(0.113)、310(0.100) 和 251(0.067)。广西地方鸡保持着较高的遗传多样性水平,观察杂合度、期望杂合度和多态信息含量分别为 0.800、0.943 和 0.936。经测序鉴定出 39 个等位基因,其中 9 个为首次发现。11 个等位基因与已知的 21 种血清型相对应。基于侧翼序列变异信息的中介网络图显示,39 个等位基因分为 3 个进化枝,红原鸡的部分基因存在于这些进化枝中,提示红原鸡可能是广西地方鸡的主要祖先。

关键词: 广西地方鸡; 微卫星; LEI0258; 多态性; 分子进化
中图分类号: S831.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004 - 3268(2017)11 - 0127 - 06

Polymorphisms at the Microsatellite Locus LEI0258 in the Indigenous Chickens from Guangxi Province

HUANG Xunhe, DENG Chunmiao, KE Zhenhua, XIE Jieru, CHEN Jiebo, ZHONG Fusheng*
(School of Life Sciences, Jiaying University, Meizhou 514015)

Abstract: In order to uncover the genetic diversity and molecular evolution of indigenous chicken of Guangxi province, 120 blood samples from 6 breeds were used to microsatellite LEI0258 genotyping and sequencing, and the data were used to analyse genetic variation and construct median-joining network. A total of 38 alleles ranging from 181 bp to 507 bp were found by genotyping, with the allele frequency arrangement of 205 (0.125), 275 (0.113), 310 (0.100) and 251 (0.067). The LEI0258 showed high levels of polymorphism in Guangxi indigenous chickens, with 0.800, 0.943 and 0.936 for observed heterozygosity, expected heterozygosity and polymorphic information content, respectively. Thirty-nine alleles were identified by DNA sequencing, and nine of which were newly found. Eleven alleles of LEI0258 were corresponding to 21 available serotypes of MHC. The median-joining network, which was based on the SNPs and indels found within the flanking sequences, 39 alleles were classified into three clusters, and partial of those were also found in Red junglefowl. Our results pointed out the Red junglefowl origin for Guangxi indigenous chickens.

Key words: Guangxi indigenous chicken; microsatellite; LEI0258; polymorphism; molecular evolution

家禽遗传资源是动物遗传资源的重要组成部分,研究家禽遗传多样性,有助于揭示品种的形成历史及其相互之间的亲缘关系,对科学保护和合理利用地方品种的优良基因库具有重要意义^[1]。微卫

收稿日期:2017-06-16
基金项目:广东省自然科学基金项目(2014A030307018);广东省公益研究与能力建设项目(2015A020208020, 2016A030303068);嘉应学院省市共建重点建设项目(嘉院[2017]27号)
作者简介:黄勋和(1982-),男,广东河源人,副教授,博士,主要从事中国家鸡遗传多样性与进化研究。
E-mail:hxh826@jyu.edu.cn
* 通讯作者:钟福生(1958-),男,湖南衡阳人,教授,博士,主要从事动物生产与畜牧工程方面研究。
E-mail:zfs@jyu.edu.cn

星位点 LEI0258 因位于鸡的 16 号染色体上主要组织相容性复合体 B 区域 (major histocompatibility complex B region, MHC - B) 而与常规的微卫星标记不同^[2]。MHC - B 的遗传多态性通常与宿主的抗病能力相关^[3-4], 并且微卫星位点 LEI0258 与 MHC - B 血清型有较强的对应性^[5]。因此, 近年来微卫星位点 LEI0258 被广泛应用于家鸡的遗传多样性和分子进化研究^[6-10]。黄勋和等^[9]应用 LEI0258 研究了华南家鸡的遗传多样性与进化历史, 发现华南家鸡保持着较高的遗传多样性, 中介网络图分析提示, 红原鸡是华南家鸡的主要祖先, 同时探讨了应用 LEI0258 变异信息进行品种鉴定的可行性。

我国广西地区拥有众多各具特色的本土鸡品种, 其中有 6 个品种入选《中国畜禽遗传资源志·家禽志》^[11], 其在家鸡的驯化研究中具有重要地位。因此, 研究广西地方鸡遗传多样性与种系关系, 不仅可以了解广西地方鸡遗传多样性水平和保护潜力, 也可家鸡驯化起源和扩散研究提供新视野。常规微卫星标记和线粒体 DNA D-loop 研究表明, 广西地方鸡保持着较高的遗传变异水平, 具有较高的选育潜力, 母系起源于东南亚和我国西南地区^[12-14]。本研究应用微卫星 LEI0258 位点变异信息对广西地方鸡进行遗传多样性分析, 评估品种保护潜力, 为了了解广西地方鸡品种资源动态、提高保种选育效果和促进分子进化研究提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料和试剂

本试验采取东兰乌鸡 (DL)、广西麻鸡 (GM)、霞烟鸡 (XY)、龙胜凤鸡 (LS)、南丹瑶鸡 (ND)、广西三黄鸡 (GX) 6 个广西地方品种各 20 份血液样品, 样品均来源于原产地。采用传统的酚氯仿法提取基因组 DNA。PCR 相关试剂购自宝生物工程 (大连) 有限公司, 引物由英潍捷基 (上海) 贸易有限公司合成。

1.2 PCR 扩增与基因分型

引物序列: 带荧光标记的上游引物 LEI0258F 为 FAM - 5' - CACGCAGCAGAACTTGTAAGG - 3', 下游引物 LEI0258R 为 5' - AGCTGTGCTCAGTCCT -

CAGTGC - 3'^[2]。PCR 反应体系: 3 μ L 10 \times PCR Buffer, 2.4 μ L dNTPs (含 Mg^{2+}), 上、下游引物 (20 μ mol/L) 各 0.3 μ L, 1 U *Taq* DNA 聚合酶 (大连宝生物工程有限公司), 50 ng DNA 模板, 用灭菌双蒸水补至 30 μ L。PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 63 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 36 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 对目的亮带大小符合预期的 PCR 产物送上海翼和生物技术有限公司进行基因分型。

1.3 微卫星测序

挑选含不同的等位基因个体 (分布于多个群体的等位基因则挑选不同品种的个体), 经电泳检测后将含有目的亮带的 PCR 产物送往广州艾基生物技术有限公司进行双向测序。

1.4 数据处理

应用软件 Cervus 3.0.3 计算期望杂合度 (expected heterozygosity, *He*)、观察杂合度 (observed heterozygosity, *Ho*)、多态信息含量 (polymorphic information content, *PIC*)、等位基因数 (N_A) 和等位基因频率等^[15]。应用软件 ADZE 1.0 计算群体的等位基因丰度 (*Ar*) 和私有等位基因丰度 (*Ap*)^[16]。应用序列分析软件 MEGA 6.0 编辑整理等位基因序列^[17], 并辅以人工校正。利用软件 SplitsTree 4.10 建立基于侧翼序列变异信息的中介网络图 (median-joining network)^[18]。根据已有研究结果整理血清型与 LEI0258 等位基因的对应关系^[5, 19-20]。

2 结果与分析

2.1 LEI0258 基因型多态性

经过基因分型, 120 个样品中检测到等位基因数 38 个, 片段长度为 181 ~ 507 bp。等位基因频率最高的是 205 (0.125), 其次是 275 (0.113)、310 (0.100) 和 251 (0.067) (表 1)。广西地方鸡大部分品种的观察杂合度较高, 除广西三黄鸡和东兰乌鸡外, 观察杂合度均大于 0.8; 多态信息含量均大于 0.8 (表 2)。由此可见, 广西地方鸡保持着较高的遗传变异水平。

表 1 广西地方鸡群体微卫星位点 LEI0258 等位基因统计

等位基因	东兰乌鸡	广西麻鸡	霞烟鸡	龙胜凤鸡	南丹瑶鸡	广西三黄鸡	个体数	频率
181		4		3		1	8	0.033
183	2						2	0.008
193	2					10	12	0.050
194		1	3			6	10	0.042
203			1				1	0.004

续表 1 广西地方鸡群体微卫星位点 LEI0258 等位基因统计

等位基因	东兰乌鸡	广西麻鸡	霞烟鸡	龙胜凤鸡	南丹瑶鸡	广西三黄鸡	个体数	频率
205	3	5	13	8	1		30	0.125
206		1				2	3	0.013
218						1	1	0.004
238				7			7	0.029
250				1			1	0.004
251	4	2			10		16	0.067
261					3		3	0.013
263					2		2	0.008
275	5	10	1		6	5	27	0.113
276					1		1	0.004
286					1		1	0.004
287		1			1		2	0.008
288		2			4		6	0.025
298	1	1				1	3	0.013
309	2						2	0.008
310	8	3	5	5		3	24	0.100
311						2	2	0.008
312	4	1	6		2	1	14	0.058
322	3	1				1	5	0.021
323				4			4	0.017
324		1		1	1		3	0.013
336	1			4	2		7	0.029
348	3			3	2		8	0.033
360						1	1	0.004
361			1				1	0.004
371		1					1	0.004
372				1			1	0.004
373		1					1	0.004
383		1	4				5	0.021
385		4		2		5	11	0.046
397			3				3	0.013
495	2		1		4		7	0.029
507			2	1		1	4	0.017

表 2 广西地方鸡群体微卫星 LEI0258 遗传变异分析

鸡品种	等位基因多态性			遗传多态性		
	N_A	Ar	Ap	He	Ho	PIC
东兰乌鸡	13	10.548	1.911	0.919	0.650	0.888
广西麻鸡	17	11.268	1.778	0.908	0.850	0.876
霞烟鸡	11	8.439	2.561	0.851	0.850	0.813
龙胜凤鸡	12	9.390	3.293	0.900	0.900	0.866
南丹瑶鸡	14	10.294	3.405	0.899	0.900	0.866
广西三黄鸡	14	9.840	2.666	0.891	0.650	0.856

2.2 LEI0258 核苷酸多态性

根据基因分型的结果,选取 46 个等位基因片段进行双向测序,获得了片段长度从 182 bp 到 501 bp 不等的等位基因 39 个,其中 9 个等位基因为首次发现(表 3)。大部分等位基因经基因分型和基因测序所得的片段长度不同,但也有个别是一致的(193、194、205 和 206)。LEI0258 呈现典型的重复单元结构,分别是长度为 13 bp 的 R13(CTATGTCTTCTTT)和 12 bp 的 R12(CTTTCCTTCTTT),重复次数分别为 1~17 和 2~28 不等,不同的等位基因由这 2 个重复单元在数量上的不同组合构成。在 2 个重复区域

的上游有 55 个碱基(不含引物序列),共发现有 8 个变异位点,主要以碱基替换为主,其次是碱基缺失(如在 -29~-30 出现 TT 碱基缺失)。而在重复区下游的 54 个碱基(不含引物序列)中,鉴定出 6 个变异位点,变异方式以颠换(如 A、T 碱基的颠换)为主,其次是 C/T 转换,并且有少数插入缺失的现象。在片段长度小于 237 bp 的等位基因中,下游 11~18 位点 ATTTTGAG 缺失的现象比较普遍,该多态现象虽然与 Fulton 等^[5]报道的 ATTTGAGG 缺失现象不一致,但与 Han 等^[19]、Chazara 等^[20]和黄勋和等^[9-10,21]的报道结果相同。

表 3 广西地方鸡微卫星 LEI0258 位点等位基因多态性

片段长度/bp	一致大小/bp	上游位点										重复单元				下游位点				B 单倍型	鸡品种	基因登录号				
		-43	-39	-29	-30	-28	-12 ~ -13	-10	-7	-2		R13	R12	T	3	11 ~ 18	ATTTCAG	A	21				27	28	34	T
181	182	A	.	.	.	1	2	.	.	—	A	4	GM, LS, GX	KX365352	
183	182	T	.	.	.	1	2	.	.	—	A	DL	KX365351	
193	193	1	3	.	.	—	15, 1, 11, 61, 27	DL, GX	DQ239495	
194	194	A	.	.	.	1	3	.	.	—	A	BW3	GM, XY, GX	KX365353	
203/206	205	1	4	.	.	—	13	XY, GM, GX	DQ239501	
	205 *	.	.	.	A	1	4	.	.	—	DL, XY, GM, LS, ND		
206	206	A	.	.	.	1	4	.	.	—	A	GX	KX365354	
218	217	1	5	.	.	—	GX	KF534926	
238	237	1	6	LS	KF535087	
250	249	1	7	LS		
251	249 *	1	7	T	DL, GM, ND		
251	249 *	GA	.	G	.	.	1	7	ND		
261	259	.	.	—	1	8	ND	KF535088	
263	261	1	8	15, 2, 29	ND	KX365359	
275	273	1	9	DL, GM, XY, ND, GX	KF534932	
276	273	1	9	T	ND	KF534933	
286/287	283	.	.	—	1	10	GM, ND	KF535090
	288	285	1	10	T	GM, ND	KX365364	
298	295	.	.	—	1	11	5	DL, GM, GX	KX365365	
311	306	.	.	—	A	1	12	—	A	GX	KX365367	
309/310	307	.	.	—	A	1	12	72, 78	DL, GM, XY, LS, GX	DQ239550
	312	309	1	12	T	10, 24, 26, 76	DL, GM, XY, ND, GX	KX365369
322	319	.	.	—	A	1	13	DL, GX	KF534943
322	319 *	1	13	C	GM		
324	319	.	.	—	A	1	13	—	A	GM, LS, ND	KF534943	
323	320	1	13	A	LS	.	.	.	LS	KF535096	
336	332 *	1	14	T	.	G	LS		
336	333	1	14	T	DL, ND	KF534946	
348	345	1	15	T	14	DL, LS, ND	KX365374	
360	356	12	4	GX	KX365375	
361	357	1	16	T	5, 1, 6, 1, 21	XY	KX365376	
371	367 *	G	.	—	A	1	17	GM		
372	369	1	17	A	LS	.	.	.	LS	KF534948	
373	369 *	1	17	T	GM		
383	379	.	.	—	A	1	18	GM, XY	KF535100	
385	381	1	18	T	13, 1	GM, LS, GX	KX365378	
397	393 *	1	19	T	XY		
495	489 *	1	27	DL, XY, ND		
507	501	1	28	XY, LS, GX	KX365387	

注:片段长度通过基因分型检测;一致大小通过测序检测;“.”表示与参考序列具有相同的碱基;“—”表示无参考序列碱基;“*”表示新序列。

2.3 LEI0258 侧翼序列中介网络图分析

除去中间的重叠区域,获得了 39 个等位基因侧翼序列,构建了基于侧翼序列变异信息的中介网络图(图 1)。根据先前的命名方法^[9,20],39 个等位基因分为 3 个进化枝(A、B 和 D),每个进化枝包含等位基因数 7~21 个不等。每个进化枝所包括的品种较丰富,其中南丹瑶鸡、龙胜凤鸡和广西三黄鸡更多地集中在 A 进化枝上。虽然有些等位基因在各个品种中广泛分布(如 205、273、307、309),但大部分

等位基因仅分布于少数品种中,如 193(东兰乌鸡、广西三黄鸡)、283(广西麻鸡、南丹瑶鸡)、379(广西麻鸡、霞烟鸡)等,并且有个别等位基因仅存在于某个单一群体,如 206(广西三黄鸡)、237(龙胜凤鸡)、259(南丹瑶鸡)、357(霞烟鸡)等。综合之前的测定数据分析可知,红原鸡有部分等位基因与这 3 个进化枝相同^[5,9,20],11 个 LEI0258 等位基因与 21 种已知的 MHC 血清型相对应,在每个进化枝都有分布^[22-23]。

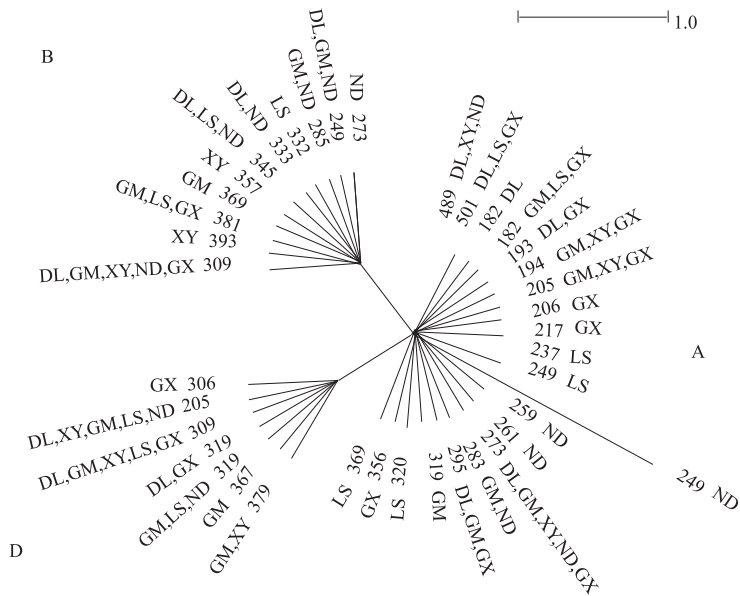


图 1 基于微卫星位点 LEI0258 侧翼区变异信息的中介网络图

3 结论与讨论

群体等位基因丰度、杂合度和多态信息含量可用于评价群体的遗传变异水平^[1]。本研究应用微卫星位点 LEI0258 分析了 6 个广西地方鸡品种的遗传多样性及分子进化。总体上,广西地方鸡保持着较高的遗传多样性水平,如观测杂合度大部分大于 0.8,而多态信息含量均大于 0.8,这与之前的相关报道是相符的^[9,12-14]。通常地方家鸡品种的遗传多样性较高,如文昌鸡、惠阳胡须鸡、五华三黄鸡等^[9],这与品种的群体数量和所受选择压力较小有关^[1]。此外,广西地方鸡微卫星位点 LEI0258 的 11 个等位基因分别与 21 种已知血清型相对应^[22-23],可为其疾病方面的研究提供理论参考。因此,将微卫星位点 LEI0258 作为分子标记研究鸡的群体遗传多样性是可行的。

以 LEI0258 稀有等位基因作为家鸡品种鉴定的依据已得到进一步论证^[9,19]。本研究首次发现的 9 个 LEI0258 等位基因中,有部分是特定品种所特有的,如 249(南丹瑶鸡)、369(广西麻鸡)、332(龙胜

凤鸡)和 393(霞烟鸡),说明 LEI0258 可作为品种鉴定的候选分子标记之一。但由于本研究受限于样品数量,后续研究还需加大样品数量,以及结合形态学特征和其他有效技术,如 DNA 条形码^[24]和细胞色素 b 基因^[25]等进一步的探索。

微卫星位点 LEI0258 由 2 个重复单元(R13、R12)的不同数量组合组成。此外,侧翼序列的变异也可作为等位基因的定义标准,因而等位基因数量众多。目前,除本研究新发现的 9 个广西地方鸡特有基因外,在 GenBank 登录的 LEI0258 等位基因已有 160 个。基于侧翼区变异信息构建的中介网络图显示,广西地方鸡分为 3 个进化枝,而红原鸡中也有部分基因存在于这些进化枝中,因此,广西地方鸡可能起源于红原鸡,与先前的研究相吻合^[9]。

致谢:感谢广西大学夏中生教授、杨秀荣教授、研究生侯宇在采集样品时提供的帮助。

参考文献:

[1] Groeneveld L F, Lenstra J A, Eding H, et al. Genetic di-

- versity in farm animals—A review[J]. *Animal Genetics*, 2010, 41(S1):6-31.
- [2] McConnell S K, Dawson D A, Wardle A, *et al.* The isolation and mapping of 19 tetranucleotide microsatellite markers in the chicken[J]. *Animal Genetics*, 1999, 30(3):183-189.
- [3] Bacon L D, Hunt H D, Cheng H H. Genetic resistance to Marker's disease[J]. *Current Top Microbiology Immunogenetics*, 2001, 255:121-141.
- [4] Lee L F, Bacon L D, Yoshida S, *et al.* The efficacy of recombinant fowlpox vaccine protection against Marek's disease: Its dependence on chicken line and B haplotype[J]. *Avian Diseases*, 2004, 48(1):129-137.
- [5] Fulton J E, Juul-Madsen H R, Ashwell C M, *et al.* Molecular genotype identification of the *Gallus gallus* major histocompatibility complex[J]. *Immunogenetics*, 2006, 58:407-421.
- [6] Izadi F, Ritland C, Cheng K M. Genetic diversity of the major histocompatibility complex region in commercial and noncommercial chicken flocks using the LEI0258 microsatellite marker[J]. *Poultry Science*, 2011, 90:2711-2717.
- [7] Chang C S, Chen C F, Berthouly-Salazar C, *et al.* A global analysis of molecular markers and phenotypic traits in local chicken breeds in Taiwan[J]. *Animal Genetics*, 2012, 43(2):172-182.
- [8] Nikbakht G, Esmailnejad A, Barjesteh N, *et al.* LEI0258 microsatellite variability in Khorasan, Marandi, and Arian chickens[J]. *Biochemical Genetics*, 2013, 51(5/6):341-349.
- [9] 黄勋和, 李丽芝, 张金枫, 等. 华南家鸡 MHC-B 区域复合微卫星位点 LEI0258 的遗传多样性与进化研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2016, 47(11):2175-2183.
- [10] 黄勋和, 张金枫, 谭坤凤, 等. 五华三黄鸡 MHC-B 区域复合微卫星位点 LEI0258 遗传多样性与进化研究[J]. *广东农业科学*, 2016, 43(6):163-168.
- [11] 国家畜禽遗传资源委员会. 中国畜禽遗传资源志·家禽志[M]. 北京:中国农业出版社, 2011.
- [12] 窦新红, 韦凤英, 黄雄, 等. 广西三黄鸡群体遗传多样性研究[J]. *中国家禽*, 2011, 33(15):20-23.
- [13] 廖玉英, 莫国东, 黄英飞, 等. 广西东兰乌鸡的遗传多样性分析[J]. *农业科学与技术*, 2016, 17(1):136-140.
- [14] Liao Y Y, Mo G D, Sun J L, *et al.* Genetic diversity of Guangxi chicken breeds assessed with microsatellites and the mitochondrial DNA D-loop region[J]. *Molecular Biology Reports*, 2016, 43:415-425.
- [15] Kalinowski S T, Taper M L, Marshall T C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment[J]. *Molecular Ecology*, 2007, 16(5):1099-1106.
- [16] Szpiech Z A, Jakobsson M, Rosenberg N A. ADZE: A rarefaction approach for counting alleles private to combinations of populations[J]. *Bioinformatics*, 2008, 24(21):2498-2504.
- [17] Tamura K, Stecher G, Peterson D, *et al.* MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12):2725-2729.
- [18] Huson D H, Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2006, 23(2):254-267.
- [19] Han B, Lian L, Qu L J, *et al.* Abundant polymorphisms at the microsatellite locus LEI0258 in indigenous chickens[J]. *Poultry Science*, 2013, 92(12):3113-3119.
- [20] Chazara O, Chang C S, Bruneau N, *et al.* Diversity and evolution of the highly polymorphic tandem repeat LEI0258 in the chicken MHC-B region[J]. *Immunogenetics*, 2013, 65(6):447-459.
- [21] 黄勋和, 张金枫, 陈洁波, 等. 贵妃鸡 MHC-B 区域微卫星位点 LEI0258 遗传多样性研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2016, 43(12):3300-3305.
- [22] Rogers S L, Kaufman J. High allelic polymorphism, moderate sequence diversity and diversifying selection for B-NK but not B-1ec, the pair of lectin-like receptor genes in the chicken MHC[J]. *Immunogenetics*, 2008, 60(8):461-475.
- [23] Wang H Z, Ma T, Chang G B, *et al.* Molecular genotype identification of different chickens: Major histocompatibility complex[J]. *Journal of Science and Technology*, 2014, 2:1-7.
- [24] 黄勋和, 陈洁波, 何丹林, 等. DNA 条形码技术鉴定中国地方鸡品种的重新评估[J]. *中国农业科学*, 2016, 49(13):2622-2633.
- [25] Yacoub H A, Fathi M M, Sadek M A. Using cytochrome b gene of mtDNA as a DNA barcoding marker in chicken strains[J]. *Mitochondrial DNA*, 2013, 26(2):217-223.