

利用微卫星座位研究蓝孔雀的遗传结构

Analysis of Genetic Diversity in Blue Peafowl by Microsatellite Markers

廖玉英, 孙俊丽, 张冰, 黄丽霞

LIAO Yu-ying, SUN Jun-li, ZHANG Bing, HUANG Li-xia

(广西壮族自治区畜牧研究所, 广西南宁 530001)

(Guangxi Institute of Animal Science, Nanning, Guangxi, 530001, China)

摘要:利用 7 对鸡的微卫星引物对蓝孔雀基因组进行种间扩增, 其中 4 对引物能扩增出特异性条带。4 个微卫星座位在蓝孔雀群体内均具有遗传多样性, 基因杂合度分别为 0.8775、0.7325、0.5000、0.7288, 多态信息含量分别为 0.8751、0.7239、0.3750、0.7123, 有效等位基因数为 8.1633、3.7383、2.0000、3.6866。4 个微卫星座位在蓝孔雀群体中属于多态性座位, 可以作为蓝孔雀群体遗传多样性的标记辅助选择位点。

关键词:蓝孔雀 遗传结构 微卫星

中图分类号:S839 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-9164(2009)03-0338-04

Abstract: Genetic diversity in Blue peafowl population was analyzed by four microsatellite markers. Results showed that this four microsatellite markers had very high genetic diversity in Blue peafowl. Gene heterozygosity range was from 0.5000 to 0.8775, polymorphism information content (PIC) from 0.3750 to 0.8751, effective number of alleles (N_e) from 2.0000 to 8.1633. Four microsatellite markers used in this article can be adopted in marker assisted selection of genetic diversity in Blue peafowl population.

Key words: blue peafowl, genetic diversity, microsatellite markers

孔雀又名越鸟、南客, 属鸟纲、鸡形目、雉科、孔雀属。世界上共有两种孔雀, 即绿孔雀 (*Pavo muticus*) 和蓝孔雀 (*Pavo cristatus*), 绿孔雀又称爪哇孔雀, 是我国的一级保护动物, 仅分布于云南南部和中部地区; 西双版纳是“孔雀的故乡”; 蓝孔雀又称印度孔雀, 分布于印度和斯里兰卡, 目前有两个突变形态: 白孔雀和黑孔雀^[1]。

我国的蓝孔雀属于引进种, 作为特禽人工饲养, 具有开发利用价值。我国对蓝孔雀的饲养始于 1987 年, 目前全国拥有大中型养殖企业 50 多家, 存栏总量 10 万只左右^[1]。在特禽生产日益成为畜牧业重要组成部分的今天, 了解蓝孔雀的遗传多样性, 弄清其遗传规律, 为其遗传资源的保护和开发利用提供科学依据, 具有十分重要意义。至今为止, 国内外有关孔雀遗传结构多样性的研究并不多, 仅见常弘等^[2,3]对野生

与笼养绿孔雀种群及柯亚永等对笼养蓝孔雀种群多样性所进行的 RAPD 分析; 朱世杰等^[4]对孔雀线粒体细胞色素 b 基因全序列进行了分析并研究孔雀的系统进化关系; 邹东方等^[5]对孔雀活化素基因 DA 亚基成熟肽序列进行克隆和序列分析, 并认为白孔雀来源于绿孔雀; 以及陈涛等利用微卫星座位对蓝孔雀群体和包文斌等^[1,6]利用微卫星标记对蓝孔雀和绿孔雀群体进行了种间和种内遗传资源多样性分析。

微卫星又称为短串联重复 (STR) 或简单重复序列 (SSR), 是 19 世纪 80 年代末期发展起来的一种新型 DNA 标记, 一般由 1~6bp 的短核苷酸为核心序列, 呈串联重复状分布于生物整个基因组, 重复数在 10~20 次之间, 具有分布广泛、多态信息含量高、呈共显性遗传、保守性强及检测方便快捷等特点而倍受青睐, 已成为遗传连锁图谱的构建、分子进化与系统发育研究、遗传疾病诊断、标记辅助选择以及经济性状的 QTL 定位等的主要分子标记之一^[7]。为了从分子水平探究蓝孔雀繁殖性能与遗传多样性的关系, 本研究利用 7 对鸡微卫星标记对广西畜牧研究所饲养

收稿日期: 2009-05-02

作者简介: 廖玉英 (1970-), 女, 副研究员, 主要从事家禽育种及营养研究。

的蓝孔雀的基因组 DNA 多态性进行分析,评价它们的群体遗传结构,为蓝孔雀新品系的选育及孔雀资源更有效的保护与开发利用提供理论依据及参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验共采集 20 只蓝孔雀血样,其中 15 只雌孔雀,5 只雄孔雀,由广西畜牧研究所蓝孔雀饲养场提供。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 的抽提

采用常规的酚-氯仿抽提方法提取蓝孔雀的基因组 DNA。

1.2.2 微卫星标记的选择

根据 USDA 最新鸡微卫星标记遗传连锁图,选择 7 对各微卫星座位彼此不连锁,扩增效果好,多态信息含量大,重复次数多,等位基因数目在 4 个以上的微卫星座位作为研究对象。选择的 7 对微卫星引物序列中,只有 4 对可以扩增出目的片段,引物序列及退火温度见表 1。

表 1 4 对微卫星引物序列及其退火温度

Table 1 Microsatellite primer sequences and Annealing Temperature of four microsatellite

基因座位 Locus	引物序列 Primer sequences	退火温度 Annealing temperature (C)	等位基 因范围 Allele size (bp)
ADL0251	F: TTT GGC TTA GGG TGA TGC TG R: CGT GCT CCA CAC AGG AAT GT	52	115-150
MCW0080	F: GAA ATG GTA CAG TGC AGT TGG R: CCG TGC ATT CTT AAT TGA CAG	55	91-114
MCW0294	F: ACT GAA CAG AAA CAG TCT TCC R: CTT CTC TAG ATG TCC ACT ACC	54	101-115
MCW0285	F: AGT TGG AGG TTA TAT TAC GGG R: TAT GAC ATA ATC CAC GCT GAG	52	168-220
MCW0328	F: ATG GAA ACA GAT GGA GCT GGC R: CTC CAA TCC CAG GCT CCA AC	58	197-237

1.2.3 PCR 反应体系及反应条件

PCR 反应体系为 10 × buffer 2.0 μl, dNTP (10nmol/L) 0.2 μl, Mg²⁺ (25mmol/L) 1.6 μl, 引物 (10pmol) 0.8 μl, Taq DNA 聚合酶 (1U/μl) 0.8 μl, 模板 DNA 3 μl, 加双蒸水至 20 μl。PCR 反应程序: 94 °C 预变性 5min; 94 °C 变性 1min, 退火 1min, 72 °C 延伸 1min, 32 个循环; 72 °C 延伸 10min, 4 °C 保存。

1.2.4 电泳检测

PCR 产物经 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶分离微卫星等位基因,银染法显色,经 Alpha Innotech 公司的凝胶成像系统拍照并用其携带的 Alphamager 软件分析各微卫星座的等位基因大小。对于带型不明确

的个体做 1~2 次重复检测。

1.3 数据的统计分析

微卫星呈共显性遗传,对测得的基因型做简单统计即可计算出等位基因频率。本文采用 GENEPOP (Version 3.3) 计算在蓝孔雀群体中这 4 个微卫星座的各等位基因频率、多态信息含量 (Polymorphism Information Content, PIC)、有效等位基因数 (Effective number of alleles, Ne)、基因杂合度 (Gene Heterozygosity, He) 等^[8]。

2 结果与分析

2.1 扩增产物的电泳结果

用 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 MCW0294 和 MCW0080 两个座位部分样品的 PCR 扩增产物的 PAGE 电泳结果 (图 1、图 2) 是呈现出多态性。

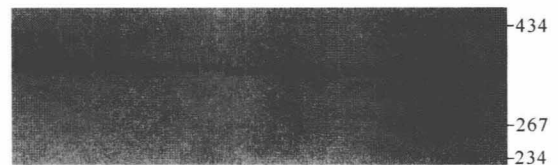


图 1 MCW0294 座位扩增产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

Fig. 1 The PAGE image of PCR products at MCW0294 locus (Marker-pBR322)

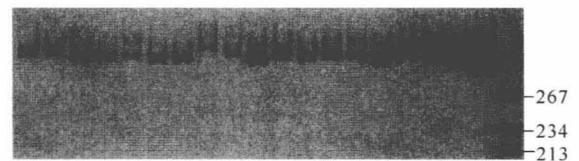


图 2 MCW0080 座位扩增产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

Fig. 2 The PAGE image of PCR products at MCW0080 locus

2.2 4 个微卫星座位在蓝孔雀群体中的遗传多样性分析

由表 2 可知,本实验利用 4 个微卫星座位在蓝孔雀群体中共检测到 20 个等位基因,平均每个座位的等位基因数为 5 个,其中微卫星座 MCW0294 检出 9 个等位基因,即 345~411bp;微卫星座 MCW0080 共检出 5 个等位基因,即 303~321bp;微卫星座 MCW0285 检出 2 个等位基因,即 92~154bp;微卫星座 ADL0251 共检出 4 个等位基因,即 128~144bp。各微卫星座位等位基因在蓝孔雀群体中的分布不均匀 (见表 3),每个微卫星座都有其优势等位基因的存在,如:MCW0294 位点 D 等位基因,

MCW0080 位点 E 等位基因,以及 ADL0251 位点的 A 等位基因。在同一位点上等位基因频率的差异,可能与基因的进化时序有关。值得一提的是,MCW0285 位点在所检测的蓝孔雀群体中只有 2 个等位基因,而且频率相同,为 0.5000。

表 2 4 个微卫星座位在蓝孔雀群体中的等位基因(bp)

Table 2 Allele of four microsatellite loci in Blue peafowl population (bp)

基因座位 Locus	A	B	C	D	E	F	G	H	I
MCW0294	411	407	405	397	393	359	355	349	345
MCW0080	321	315	307	305	303	—	—	—	—
MCW0285	154	92	—	—	—	—	—	—	—
ADL0251	144	142	130	128	—	—	—	—	—

表 3 4 对微卫星座位在蓝孔雀中的等位基因频率

Table 3 Allele frequency of four microsatellite loci in Blue peafowl population

基因座位 Locus	A	B	C	D	E	F	G	H	I
MCW0294	0.1000	0.1000	0.0750	0.1750	0.0500	0.1250	0.1000	0.1500	0.1250
MCW0080	0.1250	0.1250	0.2000	0.1250	0.4250	—	—	—	—
MCW0285	0.5000	0.5000	—	—	—	—	—	—	—
ADL0251	0.3500	0.1500	0.2750	0.2250	—	—	—	—	—

2.3 4 个微卫星座位在蓝孔雀群体中的遗传变异参数分析

基因杂合度、多态信息含量和有效等位基因数是衡量群体遗传结构和变异的指标,基因杂合度越高,群体的遗传多样性越高;杂合度越低,群体的遗传一致性越高^[9]。由表 4 可知,本研究中的 4 个微卫星座位在蓝孔雀群体中的基因杂合度为 0.8775~0.5000。多态信息含量为 0.8751~0.3750,其中 MCW0294 多态信息含量最高,MCW0285 多态信息含量最低,其中,MCW0294、MCW0080 和 ADL0251 属于高度多态微卫星座位,MCW0285 属低度多态微卫星座位。4 个微卫星座位的有效等位基因数为 8.1633~2.0000,以 MCW0294 最大。这些结果说明蓝孔雀群体基因变异大,具有较高的选择潜力。

表 4 4 个微卫星座位在蓝孔雀中的遗传变异参数

Table 4 Estimators of genetic variability of four microsatellite loci in Blue peafowl population

基因座位 Locus	He	PIC	Na	Ne
MCW0294	0.8775	0.8751	9.0000	8.1633
MCW0080	0.7325	0.7239	5.0000	3.7383
MCW0285	0.5000	0.3750	2.0000	2.0000
ADL0251	0.7288	0.7123	4.0000	3.6866

3 讨论

3.1 近缘物种间微卫星引物的适用性

微卫星两端的侧翼序列在生物的基因组中,特别是在具有高度近亲关系的种间具有不同程度的保守性,这就使得种间扩增成为可能。关于微卫星标记在近缘动物间的相互使用已有很多报道。Moore S S 等^[10]利用牛的微卫星引物对羊基因组 DNA 进行扩增,发现 56% 的引物在羊中有扩增产物,其中 42% 的扩增产物表现出多态性。Levin I 等^[11]用鸡的特异微卫星引物扩增火鸡基因组 DNA,结果发现 92% 的引物能够扩增到 PCR 产物,有 33% 的鸡特异微卫星座位可以用于火鸡的基因组分析以及遗传连锁图谱的构建。吴艳等^[12]利用鸡的微卫星引物对六个不同品种的鸭群体的遗传结构及之间的遗传关系进行研究,结果发现这几对鸡微卫星座位可作为鸭群体遗传多样性的标记选择位点。本研究应用 7 对鸡微卫星引物对蓝孔雀基因组 DNA 进行 PCR 扩增,其中有 4 对微卫星引物扩增产物明显,其中 3 对属于高度多态微卫星座位。这使得今后可利用鸡的微卫星引物开展孔雀微卫星标记的种间扩增,筛选一定数量的微卫星标记用于孔雀群体遗传学研究,不仅可增加孔雀遗传图谱的标记密度,还有助于构建雉科鸟类比较遗传图谱和识别其它雉科鸟类的同线群。

3.2 蓝孔雀群体遗传多样性

根据微卫星座位选择标准,每个微卫星座位至少应该有 4 个等位基因,才能较好地用于遗传多样性评估。从实验结果来看,MCW0294、MCW0080、MCW0285、ADL0251 微卫星座位分别有 9、5、2、4 个等位基因,只有 MCW0285 微卫星座位少于 4 个等位基因,其它 3 个微卫星座位均多于 4 个等位基因,因此,MCW0294、MCW0080、ADL0251 3 个微卫星座位可以用于蓝孔雀遗传多样性评估。由于本研究所用的微卫星座位标记数偏少,对蓝孔雀群体间遗传关系的准确评估,还有待于进一步的研究。

3.3 蓝孔雀群体遗传变异

群体的遗传变异就其本质而言,使 DNA 分子的遗传变异,不同品种或不同类群在遗传上的差异可以不同程度地反映在其 DNA 序列上,因而在 DNA 水平上检测群体的遗传变异,研究群体的遗传结构就显得更为重要^[13~16]。基因杂合度也称为基因多样性,一般认为它是度量群体遗传变异的一个最适参数^[15]。平均基因杂合度的大小反映群体遗传结构和变异程度的高低。应用微卫星分子标记技术对蓝孔雀进行遗传变异研究的报道很少。本研究利用 4 个鸡微卫星座位

位对蓝孔雀进行研究,得出基因杂合度在 0.8775~0.5000 之间,尤其是 MCW0294、MCW0080 和 ADL0251 微卫星座位,群体遗传多样性丰富,说明蓝孔雀群体基因变异大,具有较高的选择潜力,今后可将它们作为候选遗传标记用于性状和标记间的连锁分析。

多态信息含量(PIC),最初用于连锁分析时对标记基因多态性的估计,现常用来表示微卫星多态性高低的程度,当 $PIC > 0.5$ 时,该位点为高度多态座位;当 PIC 为 $0.25 \sim 0.5$ 时,为中度多态座位;当 $PIC < 0.25$ 时,则为低度多态座位^[17]。多态信息含量关系到该座位可用性及使用效率,多态信息含量越大,在一个群体中,该座位杂合子比例则越大,提供的遗传信息就越高。本研究有 3 个微卫星座(MCW0294、MCW0080、ADL0251)的多态信息含量大于 0.5,处于高度多态,1 个位点属于中度多态性位点,均可以作为蓝孔雀遗传多样性的标记辅助选择位点。

有效等位基因数(N_e)是基因一致度的倒数,反映等位基因间的相互影响,也可作为群体遗传变异的一个指标,尤其在保护遗传学研究中,有时更强调等位基因数目对种群的影响。但是有效基因数目容易受到样本量的影响。本研究中 4 个微卫星座位的有效等位基因数分别为 8.1633、3.7383、2.0000、3.6866,其中 MCW0285 座位只有 2 个等位基因,可能与本实验样本量偏小有关,另一方面也提示我们部分鸡的微卫星引物在孔雀中所提供的多态信息含量较少且基因频率分布不均匀,寻找孔雀自身的微卫星标记还十分必要。

参考文献:

- [1] 陈涛,苗永旺,霍金龙,等.利用微卫星标记分析蓝孔雀群体的遗传多样性[J].云南农业大学学报,2006,21(3):346-350.
- [2] KE Ya-yong,CHANG Hong,ZHANG Guo-ping. Analysis of genetic diversity for wild and captive green peafowl populations by random amplified polymorphic DNA technique[J]. Journal of Forestry Research,2004,15(3):203-206.
- [3] 柯亚永,常弘,苏应娟,等.笼养蓝孔雀两个种群的随机扩增多态 DNA 分析[J].中山大学学报:自然科学版,2002,41(1):123-124.
- [4] 朱世杰,常弘,张国萍,等.孔雀属孔雀线粒体细胞色素 b 基因全序列分析及其系统进化研究[J].中山大学学报:自然科学版,2004,43(6):45-47.
- [5] 邹方东,童芯铤,岳碧松.孔雀活化素基因(activin) βA 亚基成熟肽序列的分子克隆及其对白孔雀起源与分类的佐证分析[J].遗传,2005,27(2):231-235.
- [6] 包文斌,陈国宏,束婧婷,等.孔雀微卫星因无筛选及其遗传多样性分析[J].遗传,2006,28(10):1242-1246.
- [7] Barker J S F. A global protocol for determining genetic distance among domestic livestock breeds;In proceedings of the 5th world congress on genetics applied to livestock production[C]. Guelph, Ontario, Canada. 1994, 21: 501-508.
- [8] Liu Jun-Er, Qiao Chuan-Ling, Hou Xin. A useful population genetics software package-GENEPOP [J]. Chinese Biodiversity, 2000, 8(2):238-240.
- [9] 张亚妮,张恩平,吴迪,等.两个藏猪类群微卫星 DNA 遗传多样性的研究[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2004,32(6):23-26.
- [10] Moore S S, Sargeant L L, King T J, et al. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species [J]. Genomics, 1991, 10: 654-670.
- [11] Levin I, Cheng H H, Baxter-Jones C, et al. Turkey microsatellite DNA loci amplified by chicken-specific primers [J]. Animal Genetics, 1995, 26: 107-110.
- [12] 吴艳,侯水生,刘小林,等.4 个微卫星标记分析 6 个鸭群体之间的遗传关系[J].畜牧兽医学报,2006,37(4):389-395.
- [13] 王昕,陈宏,曹红鹤.10 个地方猪群体的系统聚类分析[J].遗传,2005,27(5):715-718.
- [14] 王希龙,欧江涛,黄礼光,等.海南五指山猪遗传多样性的微卫星分析[J].生物多样性,2005,13(1):20-26.
- [15] 王昕,曹红鹤,耿社民,等.利用微卫星标记对中国 4 种小型猪的遗传多样性研究[J].畜牧兽医学报,2002,23(6):530-532.
- [16] 商海涛,牛荣,魏泓,等.三品系小型猪 35 个微卫星基因座的遗传学研究[J].遗传,2001,23(1):17-20.
- [17] Slatkin M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies [J]. Genetics, 1995, 139: 457-462.

(责任编辑:邓大玉)