

微卫星标记多态性与文昌鸡蛋品质 性状的相关分析

赵东伟¹, 钱 凯², 吴 旭², 李慧芳¹, 陈宽维¹, 汤青萍¹,

(1 中国农业科学院 家禽研究所, 江苏 扬州 225003; 2 扬州大学 动物科学与技术学院, 江苏 扬州 225009)

[摘 要] **【目的】**筛选与蛋品质紧密连锁的微卫星标记, 为蛋品质分子辅助育种提供参考。**【方法】**应用 20 对微卫星标记, 对 40 周龄文昌产蛋母鸡基因座位进行多样性检测, 并对每个个体所产鸡蛋的品质(哈氏单位、蛋质量、蛋壳强度)进行测定, 通过相关分析, 筛选与哈氏单位、蛋质量、蛋壳强度相关的分子遗传标记。**【结果】**20 个微卫星座位的平均多态信息含量为 0.617, 杂合度为 0.190~0.784, 各位点的杂合度均较高, 其中最高的是 LEI0086, 最低的是 LEI0229。影响 40 周龄文昌鸡哈氏单位的标记有 2 号染色体上的标记 MCW0239 和 4 号染色体上的标记 ADL0260; 2 号染色体上的标记 LEI0086 与 40 周龄文昌鸡蛋质量有关; Z 染色体上的标记 LEI0121 与 40 周龄文昌鸡蛋壳强度有关。**【结论】**研究结果为文昌鸡蛋品质的间接选择提供了理论依据。

[关键词] 文昌鸡; 微卫星标记; 基因多态性; 鸡蛋品质; 相关性

[中图分类号] S831.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2009)05-0064-05

Study on the relationship between microsatellite markers and egg quality traits in Wenchang chicken

ZHAO Dong-wei¹, QIAN Kai², WU Xu², LI Hui-fang¹, CHEN Kuan-wei¹, TANG Qing-ping¹

(1 Institute of Poultry Science, Chinese Academy of Agriculture Science, Yangzhou, Jiangsu 225003, China;

2 College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

Abstract: **【Objective】**The research was to try to find microsatellite markers related to egg quality and make preparation for MAS on egg quality. **【Method】**20 microsatellite markers were selected to detect the gene loci of 40w Wenchang chicken breeds. The eight egg traits (including egg weight, shell weight, shell thickness, shell strength, haugh unit, egg shape index, yolk weight, yolk color) were tested in 140 Wenchang chicken individuals. The relationship between microsatellite loci and Haugh unit, egg weight, shell strength was screened by correlation analysis. **【Result】**The results showed that the mean polymorphism information content (PIC) was 0.617 and the mean heterozygosity (H) 0.190—0.784 in 20 microsatellite sites. The highest H was in LEI0086 and the lowest in LEI0229. The markers related to Haugh unit (HU) at 40 weeks were MCW0239 on Chromosome 2 and MCW0260 on Chromosome 4. LEI0086 on Chromosome 2 had an effect on egg weight (EW) and the markers related to shell strength (SS) at 40 weeks was LEI0121 on Chromosome Z. **【Conclusion】**These results could provide basic molecular data and scientific basis for indirect choice of egg quality.

Key words: Wenchang chicken; microsatellite marker; gene variability; chicken egg quality; relationship

* [收稿日期] 2008-07-10

[基金项目] 国家科技基础条件平台项目(2004DKA30450-04); 农业部农业科技跨越计划项目(跨 2005 第 18 号)

[作者简介] 赵东伟(1972—), 男, 陕西咸阳人, 助理研究员, 主要从事家禽育种、营养研究。E-mail: Yzzdw031@163.com

[通信作者] 陈宽维(1953—), 男, 江苏泰州人, 研究员, 主要从事家禽遗传资源及育种研究。E-mail: tqp0979@163.com

鸡蛋因其价格便宜、蛋白质含量高、食用安全等特点,而成为人们日常生活中必不可少的食物之一。作为一个人口大国,我国鸡蛋的消费量非常高,因此鸡蛋产量和品质成为人们最为关心的问题之一。蛋品质育种是提高鸡蛋品质的有效措施,但采用常规的育种方法进行蛋品质育种,进展非常缓慢,而分子育种因其具有准确性高及早期选择性的特点,越来越被育种工作者所关注。标记辅助选择是蛋品质性状选择的有效途径,但前提是要筛选出与性状紧密连锁的标记或控制性状的数量性状位点(QTLs),借助遗传标记的信息来获得性状的遗传信息。

微卫星因具有数量多、分布广、多态性丰富等优点,得以广泛应用。Tuiskula-Haavisto 等^[1]用微卫星标记对影响鸡蛋品质的位点进行了定位,结果发现了影响鸡蛋稀薄蛋白的 QTLs,并将其定位于 3 个染色体上;Yonash 等^[2]用 78 个微卫星标记,研究了 273 只 F₂ 代白来航蛋鸡对马立克病的抗性,结果发现了 14 个抗性 QTLs,其中 7 个位点有显著影响;Andersson 等^[3-4]在猪 4 号染色体上发现了控制脂肪和生长性状的 QTLs;邵根宝等^[5]对猪 13 号染色体部分微卫星标记与肉质性状关系进行研究发现,微卫星位点 S0021 对 pH 值、SW937 对系水力的影响均达到极显著水平,S0293 对嫩度有显著影

响。此外,其他学者也进行了一些相关研究^[6-12]。本研究以 20 个微卫星标记座位的多态性为基础,分析这些标记与文昌鸡哈氏单位(用于表示鸡蛋蛋白浓厚程度的指标,与蛋白浓厚程度成正比)、蛋质量、蛋壳强度间的相关性,以期为文昌鸡蛋品质的间接选择提供理论依据,从而进一步为文昌鸡的开发利用提供参考,同时也为哈氏单位、蛋壳强度、蛋质量的 QTLs 定位及标记辅助选择提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 供试样本 随机挑选 140 只饲养于中国农业科学院家禽性能测定站同一鸡舍内的文昌产蛋母鸡。常规饲养管理,日粮参照美国 NRC 营养标准。

1.1.2 试 剂 所用常规试剂购自化学试剂站,Taq DNA 聚合酶和 dNTPs 均购自北京鼎国生物公司,采用 pBR322DNA/Msp I Markers 作为分子量的标准对照。

1.1.3 微卫星标记(引物) 根据 Tuiskula-Haavisto 等^[1]的研究结果,共选取 20 个微卫星标记(表 1),其中 2 号和 4 号染色体上均选择了 6 个标记,Z 染色体上选择了 8 个标记。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司(Sangon)合成。

表 1 供试 20 对微卫星引物的信息

Table 1 Information of 20 pairs of microsatellite primers in Wenchang chicken							
座 位 Locus	染色体 Chr	位置/cM Location	等位基因/ bp Range of allele	座 位 Locus	染色体 Chr	位置/cM Location	等位基因/bp Range of allele
ADL0309	Chr 2	92	104~123	ADL0260	Chr 4	228~234	114~144
MCW0131	Chr 2	102	201~217	MCW0085	Chr 4	231	273
LEI0086	Chr 2	110~117	232~285	ADL0201	Chr Z	87	140~154
ADL0176	Chr 2	116	184~213	MCW0154	Chr Z	95	171~193
MCW0239	Chr 2	115~143	158~170	LEI0229	Chr Z	103	201~217
ADL0217	Chr 2	113~137	160~182	MCW0246	Chr Z	100	230~238
MCW0191	Chr 4	200	202~232	MCW0241	Chr Z	100	272~278
ADL0240	Chr 4	205	176~204	MCW0294	Chr Z	108	306~317
MCW0122	Chr 4	210	267~277	LEI0111	Chr Z	141	112~140
LEI0119	Chr 4	208~220	97~123	LEI0121	Chr Z	131	220~238

1.2 鸡基因组 DNA 的提取

于 287 日龄翅静脉采集血样 1~2 mL,肝素抗凝,采用常规酚/氯仿方法提取基因组 DNA,对基因组 DNA 浓度进行测定后备用。

1.3 基因组 DNA 的 PCR 扩增

PCR 反应体系 25 μ L,其中模板 DNA 50 ng,10 $\times$ buffer 2.5 μ L,dNTPs 0.2 mmol/L,引物各 5 pmol/L,Mg²⁺ 2.0 mmol/L,Taq DNA 聚合酶 1 U。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,45~68 $^{\circ}$ C(具体按每个引物的退火温度而定)复性

45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30~35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。扩增产物变性后,立即点样于 8 g/L 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离,电泳结束后用硝酸银染色成像。

1.4 鸡蛋品质的测定

连续 5 d 对 40 周龄鸡群全群进行蛋品质测定,以保证每只个体至少有 3 个蛋被测定,共有 124 只个体获得有效记录。采用中华人民共和国农业行业标准(NY/T 823 — 2004)对文昌鸡 3 个蛋品质性状(哈氏单位、蛋质量、蛋壳强度)进行测定。

1.5 数据分析

采用美国安莱公司生产的 Alpha 凝胶系统仪对成像凝胶拍照,目的片段分子量的确定采用 ONE-Dscan 1-D Gel Analysis Software 软件,判别群体各微卫星位点的基因型。利用 POP-Gen32 及 Cervus 软件计算等位基因频率、多态信息含量(Polymorphism Information Content, *PIC*)^[13]、杂和度(Heterozygosity, *H*)^[14]。采用 SPSS 统计软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 微卫星标记的遗传参数分析

用 20 对微卫星引物对文昌鸡进行检测,结果共检测到 79 个等位基因,各座位等位基因数为 2~9 个,根据各微卫星位点等位基因频率,采用 Cervus 软件计算 20 个微卫星的多态信息含量(*PIC*)和杂和度(*H*)。由表 2 可知,多态信息含量最高的微卫

星座位是 LEI0086 (0.737),最低的是 LEI0229 (0.178),平均多态信息含量为 0.617。杂合度为 0.190~0.784,各位点的杂合度均较高,其中最高的是 LEI0086,最低的是 LEI0229。

2.2 微卫星座位与哈氏单位、蛋质量、蛋壳强度的相关性

由于一些位点的某些基因型出现频率太低,缺少分析价值,故在实际统计分析中,将只出现 1 次观察值的基因型不进行多重比较。用最小二乘分析,经多重比较发现,在 20 个微卫星标记座位中,2 号染色体的标记 MCW0239 和 4 号染色体的标记 ADL0260 与 40 周龄文昌鸡哈氏单位呈显著相关。其中 4 号染色体上的 ADL0260 座位有 A、B、C、D、E、F、G 7 个等位基因,在该座位上,DE 基因型所对应的哈氏单位值最小,为 75.78,其分别与 EG、DF、BF、AB、FG、BC 基因型个体差异显著($P<0.05$) (表 3)。

表 2 文昌鸡在 20 个微卫星座位上的遗传参数

Table 2 Genetic parameters of the 20 microsatellite analyzed in Wenchang chicken.

座位 Locus	等位基因数 na	有效等位基因数 ne	<i>PIC</i>	<i>H</i>	座位 Locus	等位基因数 na	有效等位基因数 ne	<i>PIC</i>	<i>H</i>
ADL0176	8	4.73	0.685	0.737	ADL0240	3	2.52	0.524	0.607
MCW0122	3	2.34	0.480	0.576	MCW0246	3	1.99	0.378	0.499
ADL0201	3	2.24	0.457	0.557	ADL0309	3	2.58	0.536	0.616
MCW0294	4	3.61	0.673	0.727	LEI0111	4	3.58	0.671	0.724
MCW0241	4	3.21	0.631	0.692	ADL0217	3	2.48	0.525	0.600
MCW0131	2	1.99	0.374	0.501	MCW0191	3	2.76	0.566	0.641
LEI0086	9	4.35	0.737	0.784	MCW0239	4	2.49	0.530	0.601
LEI0121	5	3.13	0.547	0.623	LEI0229	3	1.23	0.178	0.190
MCW0154	3	3.00	0.593	0.670	MCW0085	4	3.54	0.668	0.721
LEI0119	4	2.95	0.605	0.664	平均 Mean	3.95	2.78	0.617	0.543
ADL0260	4	3.87	0.694	0.745					

表 3 文昌鸡不同基因型个体哈氏单位的比较

Table 3 Comparison on Haugh unit among different genotypes in Wenchang chicken

座位 Locus	基因型 Genotype	样本数 Sample number	哈氏单位 Haugh Unit	标准差 <i>S. D</i>
ADL0260	DE	2	75.78 b	3.43
	EF	3	82.95 ab	2.86
	EG	3	84.36 a	1.17
	DF	20	85.53 a	1.48
	BF	52	85.61 a	1.24
	AB	19	85.77 a	1.21
	FG	22	86.15 a	1.44
	CD	14	83.04 b	3.48
	AC	85	85.57 ab	3.30
	CC	16	86.37 ab	3.46
	BC	4	89.48 a	3.99

注:同列数据后标相同字母者表示差异不显著($P>0.05$),标有不同字母者表示差异显著($P<0.05$)。下表同。
Note:The Values followed by the same letters show the difference is indistinct($P>0.05$),the different letters followed show the difference is distinct($P<0.05$). The same with below.

用最小二乘分析,经多重比较发现,在 20 个微卫星标记座位中,2 号染色体的标记 LEI0086 与 40

周龄文昌鸡蛋质量显著相关。LEI0086 座位有 A、B、C、D、E、F、G、H、I 9 个等位基因。在该座位上,

CD 基因型个体的蛋质量最高,BE 基因型个体的蛋质量最低,两者之间差异显著;AB 基因型个体的蛋质量显著高于 BE 基因型个体,而与其他基因型个体差异不显著(表 4)。

表 4 文昌鸡不同基因型个体蛋质量的比较

座位 Locus	基因型 Genotype	样本数 Sample number	蛋质量/g Egg weight	标准差 S. D
LEI0086	BE	2	39.75 b	2.66
	AI	4	41.95 bc	2.23
	DG	3	42.13 abc	2.38
	AC	6	42.13 abc	2.06
	AD	4	42.78 abc	2.23
	DF	3	43.18 abc	2.38
	BD	49	43.23 abc	1.74
	BG	15	43.77 abc	2.38
	BF	3	43.77 abc	2.38
	AG	14	43.77 abc	1.86
	BC	3	44.43 abc	2.38
	AB	8	44.44 ac	1.98
	CD	7	45.79 a	2.01

用最小二乘分析,经多重比较发现,Z 染色体的标记 LEI0121 与 40 周龄文昌鸡蛋壳强度显著相关。在 LEI0121 座位共检测到 A、B、C、D、E 5 个等位基因;在该座位上,DE 基因型个体的蛋壳强度最低,而 BD 和 CC 基因型个体的蛋壳强度均较高,且二者与 DE 基因型个体差异显著;CC 基因型个体的蛋壳强度比 CD 基因型个体高 30.28%,且差异显著($P<0.05$)(表 5)。

表 5 文昌鸡不同基因型个体蛋壳强度的比较

座位 Locus	基因型 Genotype	样本数 Sample number	蛋壳强度/(kg·cm ⁻²) Shell strength	标准差 S. D
LEI0121	DE	13	4 543 b	551
	BC	4	4 972 abc	702
	CD	77	4 990 bc	483
	AC	9	5 026 abc	584
	AB	5	5 028 abc	764
	BB	3	5 533 abc	698
	CE	2	5 649 abc	480
	BD	6	5 735 ac	634
	CC	2	6 501 a	875

3 讨 论

3.1 微卫星标记的多态性

多态信息含量(PIC)是衡量片断多态性的较好指标。Botstein^[15]等首先提出了用 PIC 衡量基因的变异程度:当 $PIC>0.5$ 时,该位点为高度多态位点;当 $0.25<PIC<0.5$ 时,为中度多态位点;当 $PIC<0.25$ 时,为低度多态位点。在本研究的位点中,LEI0086 位点的 PIC 最高(0.784),LEI0229 位点的 PIC 最低(0.178)。根据 Botstein 等^[15]的 PIC 标准可知,除了 MCW0131、MCW0122、ADL0201、MCW0246 为中度多态,LEI0229 为低度多态外,其他 15 个位点均为高度多态。由此可见,本研究所用的微卫星位点均具有较高的多态性,说明选择的微

卫星位点较为合适,研究结果具有一定的代表性。

基因杂合度又称基因多样性,反映各群体在 n 个位点上的遗传变异,是群体杂合度的度量单位,被认为是度量品种遗传变异的一个最适参数。品种杂合度的高低反应了群体的遗传一致性程度,品种杂合度越低,表明该品种的一致性越高,而品种遗传变异越低,品种遗传多样性越低。本研究中,文昌鸡所有微卫星座位的平均杂合度均高于 0.5,表明其有着丰富的多态性,这与中国地方鸡种的实际繁养情况相符合。中国地方鸡种长期处于散养状态,并且未受到高强度的选择,所以较国外的品种而言,中国地方鸡种拥有更丰富的遗传多样性,同时也说明中国地方鸡种作为保种对象,具有重要的意义及利用潜力。

3.2 与蛋品质性状相关的分子遗传标记

本试验结果表明,2 号染色体 115~143 cM 处的 MCW0239 和 4 号染色体 228~231 cM 处的 ADL0260 与 40 周龄文昌鸡哈氏单位显著相关;2 号染色体 110~117 cM 处的标记 LEI0086 与 40 周龄文昌鸡蛋质量有关;Z 染色体 131 cM 处的 LEI0121 与 40 周龄文昌鸡蛋壳强度有关。Tuiskula-Haavisto 等^[1]研究发现,影响 40 周龄文昌鸡哈氏单位的 QTLs 存在于 2 号染色体 75~133 cM 处和 4 号染色体 209~223 cM 处;影响 60 周龄文昌鸡哈氏单位的 QTLs 存在于 2 号染色体 85~122 cM 处;影响 40 周龄文昌鸡蛋壳强度的 QTLs 存在于 Z 染色体 97~142 cM 处;影响 18~40 周龄文昌鸡蛋质量的 QTLs 存在于 4 号染色体 186~197 cM 处;影响 41~60 周龄文昌鸡蛋质量的 QTLs 存在于 4 号染色体 173~230 cM 处。张龙超^[16]研究发现,影响 40 周龄纯系矮小型蛋鸡哈氏单位的标记有 2 号染色体上的标记 ADL0176、4 号染色体上的标记 MCW0191 和 ADL0260;影响 40 周龄纯系矮小型蛋鸡蛋壳强度的标记为 Z 染色体上的 LEI0229 标记。

本研究得出的 4 号染色体上的 ADL0260 是影响哈氏单位的标记,与张龙超^[16]的研究结果相一致;但得到的影响哈氏单位、蛋壳强度和蛋质量的标记则与张龙超^[16]不同,可能与所研究的鸡品种不同有关。

从本试验的结果可以推测,2 号染色体和 4 号染色体可能存在控制文昌鸡哈氏单位的 QTLs,2 号染色体可能存在控制文昌鸡蛋质量的 QTLs,Z 染色体上可能存在控制文昌鸡蛋壳强度的 QTLs。目前不同研究者关于蛋品质 QTLs 和标记的研究结果差异较大,要对蛋品质 QTLs 进行精确定位,还有待于进一步研究。

[参考文献]

[1] Tuiskula-Haavisto M, Honkatukia M, Vilkki J, et al. Mapping of quantitative trait loci affecting quality and production traits in egg layers [J]. Poultry Science, 2002, 81: 919-927.

[2] Yonash N, Cheng H H, Hillel J, et al. DNA microsatellite linked to QTL affecting antibody response and survival rate in meat 2 type chickens [J]. Poultry Science, 2001, 80: 22-28.

[3] Andersson L, Haley C S, Ellegren H, et al. Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs [J]. Science, 1994, 263(5): 1771-1774.

[4] Andersson E L, Marklund L, Lundström K, et al. Mapping quantitative trait loci for carcass and meat quality traits in a wild boar × large white intercross [J]. J Animal Sci, 1998, 76

: 694-700.

[5] 邵根宝, 贾超, 赵如茜, 等. 猪 13 号染色体部分微卫星标记与肉质性状关系的研究 [J]. 遗传学报, 2005, 32(5): 476-480. Shao G B, Jia C, Zhao R Q, et al. Relationship between microsatellite markers and meat quality in pork 13 chromosome [J]. Genetics Journal, 2005, 32(5): 476-480. (in Chinese)

[6] 邓学梅, 李俊英, 李宁, 等. 基于 F₂ 群体的鸡重要生长性状遗传分析 [J]. 遗传学报, 2001, 28(9): 801-807. Deng X M, Li J Y, Li N, et al. Genetic analysis of chicken growth performance on the base of F₂ generation [J]. Genetics Journal, 2001, 28(9): 801-807. (in Chinese)

[7] 屠云洁, 陈宽维, 沈见成, 等. 利用微卫星标记分析四川 8 个地方鸡品种遗传多样性 [J]. 遗传, 2005, 27(5): 724-728. Tu Y J, Chen K W, Shen J C, et al. 8 local chicken breeds genetic diversity in Sichuan with microsatellite markers [J]. Genetics, 2005, 27(5): 724-728. (in Chinese)

[8] Lyman B, Crittenden, Leonard P. Characterization of a Red Jungle Fowl by White Leghorn backcross genome [J]. Poul Sci, 1993, 72: 334-348.

[9] Bumstead N, Palyga J. A preliminary linkage map of three chicken genome [J]. Genomics, 1992, 13: 690-697.

[10] Crooijmans R P, Dijkhof R J, Poel J J, et al. New microsatellite markers in chicken optimized for automated fluorescent genotyping [J]. Anim Genet, 1997, 78: 427-437.

[11] 陈晖, 郑丽祯, 陈岩峰, 等. 鸡的微卫星 DNA 标记与胴体性状的相关分析 [J]. 中国家禽, 2004, 8(1): 137-140. Chen H, Zheng L Z, Chen Y F, et al. Correlation analysis of microsatellite DNA marker and carcass traits [J]. China Poultry, 2004, 8(1): 137-140. (in Chinese)

[12] 周群兰, 吴信生, 包文斌, 等. 微卫星标记与鹿苑鸡体重的相关性初探 [J]. 扬州大学学报, 2005, 26(2): 25-28. Zhou Q L, Wu X S, Bao W B, et al. Probe into the correlation between microsatellite mark and the body weight of Luyuan chicken [J]. Journal of Yangzhou University, 2005, 26(2): 25-28. (in Chinese)

[13] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. Am J Hum Genet, 1980, 32: 314-331.

[14] 张沅, 张勤. 动物育种原理与方法 [M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1995. Zhang Y, Zhang Q. Principle and method of animal breeding [M]. Beijing: Beijing Agricultural University Publication, 1995. (in Chinese)

[15] Botstein D, White R L, Skolnick M. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. Am J Hum Genet, 1980, 32: 314-331.

[16] 张龙超. 矮小型蛋鸡蛋品质性状遗传分析及相关分子标记的研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2004. Zhang L C. Study on egg quality genetic traits analysis and related molecule marker on dwarf chickens [D]. Beijing: China Agricultural University, 2004. (in Chinese)