

秦川牛及其杂种牛肉用性能的 RAPD 标记^{*}

张西峰, 耿社民, 陈 宏, 张建勤, 张丽娟, 顾玉兰, 沈 伟

(西北农林科技大学 畜牧兽医学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 应用 RAPD 技术对秦川牛及其杂种牛进行了遗传多样性和屠宰性能(宰前重、胴体重及净肉重)的遗传标记研究, 结果表明: ① F09 和 CY0814 两条引物共扩增出 13 条 DNA 条带, 平均多型条带频率 0.692, 其中 F09 引物的多型条带频率为 0.5714, CY0814 引物的多型条带频率为 0.8333。② 对肉用性能 RAPD 标记时, CY0814 引物 D 带的 1 型与 0 型对宰前重的效应值离差为 22.17 kg; F09 引物的 A 带 0 型与 1 型对胴体重和净肉重的效应值离差分别为 14.32 和 11.36 kg。③ 在多条带组合效应分析中, CY0814 引物的 ABCD 组合对宰前重的效应值最大(32.2 kg), 大于群体均值 1 个表型标准差; F09 引物的 EFG 组合对胴体重的效应值为 12.53 kg; CY0814 引物的 BC 组合对净肉重的效应值为 12.13 kg。

[关键词] 秦川牛; 肉用性能; RAPD 标记

[中图分类号] S823.8⁺12

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)01-0113-04

秦川牛属役肉兼用型品种, 体格高大, 肉质细嫩, 大理石纹明显, 其肉骨比、瘦肉率和眼肌面积等接近或超过国外肉牛品种的优良特征, 已被全国许多省区引进用以改良当地黄牛, 取得了明显的改良效果^[1], 但秦川牛仍存在生长速度慢、后躯斜尻等方面的严重缺陷。借助分子遗传标记技术, 深入开展秦川牛经济性状 DNA 分子标记的研究, 可改进秦川牛在商品化开发中的缺陷, 特别是对于宰前重、胴体重和净肉重等经济性状, DNA 分子标记辅助选择有其他常规育种技术不可比拟的优越性。本研究目的在于通过对秦川牛及其杂种的 RAPD 分析, 以期寻找与秦川牛肉用性能相关的遗传标记, 为我国牛种资源的开发利用及其标记辅助选择提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源

在陕西省扶风县秦川牛繁育改良推广中心和宝鸡戊寅绿色食品有限公司养牛场随机抽取 13 头牛(其中秦川牛 9 头, 杂种牛 4 头)的血液各 10 mL, 同时测定宰前重、胴体重和净肉率 3 个性状指标。

1.2 试验方法

DNA 的提纯 根据既有的研究结果^[2~4], 从华美生物工程公司(西安分公司)F 和 CY 系列引物中

筛选出 F09、CY0814 两种引物进行 RAPD 分析。PCR 反应体系为: 2 μ L DNA 模板(40 ng/ μ L), 2.5 μ L 10 $\times$ 反应缓冲液, 2.0 μ L dNTPs (2.5 mmol/L), 1.5 μ L MgCl₂ (25 mmol/L), 1.0 μ L Tag DNA 聚合酶(1 mol/ μ L), 2.0 μ L 引物(5 pmol), 加灭菌超纯水至 25 μ L。扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 36 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 循环 38 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

PCR 扩增产物的检测 PCR 扩增产物经质量分数 1.4% 的琼脂糖凝胶电泳检测。以 4~5 V/cm 电压稳压电泳 3~3.5 h, 电泳结果由凝胶自动成像系统成像和分析。

1.3 资料的统计分析^[3~5]

百分差异(PD) = $N / (N_a + N_b) \times 100\%$ 。

平均百分差异(A PD) = $\frac{1}{C} \sum_{i=1}^C PD_i$

平均百分差异均值(M A PD) = $\frac{1}{R} \sum_{i=1}^R A PD_i$

式中, N 为同一引物个体 a 和 b 不同条带数目; N_a , N_b 分别为个体 a 和 b 扩增的总条带数; R 为所用引物的数目。

两个个体同一条带同时出现的平均概率为 p_b (亦即平均带纹相似率), 一条带的平均等位基因频率(q)为

* [收稿日期] 2002-01-04

[基金项目] 国家“863”项目(2001AA 243052); 国家自然科学基金(30070551)

[作者简介] 张西峰(1978-), 男, 山东郓城人, 在读硕士, 主要从事动物育种原理与方法研究。

$$q = 1 - \sqrt{1 - p_b}$$

平均杂合度概率(h): $h = 2(1 - q)/(2 - q)$

1.4 经济性状的最小二乘分析^[4,6]

1.4.1 经济性状资料的最小二乘校正

$$Y_{ij} = \mu + a_i + e_{ij}$$

式中, Y_{ij} 为 a 因素第 i 个水平第 j 个个体经济性状的观察值; μ 为群体均值; a_i 为 a 因素第 i 个水平的效应; e_{ij} 为随机误差。

1.4.2 标记条带或标记条带组合型的最小二乘均值及效应值分析

$$Y_{ij} = \mu + G_i + e_{ij}$$

式中, Y_i 为经济性状观察值; G_i 为第 i 个 RAPD 标记条带或标记条带组合型的效应值; e_{ij} 为随机误差。由此可得, 标记条带或标记条带组合型的最小二乘值 $LSM = \mu + G_i$, 最小二乘效应值 $LSE = Y_{ij} - \mu$ 。

2 结果与分析

2.1 RAPD-PCR 扩增片段多态频率分析

应用 2 个引物对 13 头肉牛基因组 DNA 进行随机扩增, 结果见表 1 和图 1、图 2。

表 1 秦川牛基因组 DNA-RAPD 标记条带的多型频率

Table 1 Polymorphic frequency of RAPD marker in Qinchuan yellow cattle population

引物 Primer	引物序列 Sequence of primer	N	标记条带 Marker band	多型条带 Polymorphic band	多型条带频率 Polymorphic-band frequency
F09	AAGCGGCA G	8	7	4	0.571 4
CY0814	TGGTGCACTC	13	6	5	0.833 3

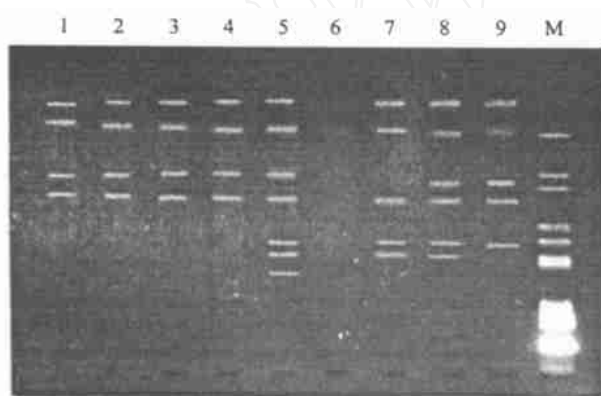


图 1 F09 引物 PCR 扩增图谱

1~9 PCR 产物; M: DNA marker

Fig 1 RAPD patterns generated by primer F09

1- 9 PCR patterns; M: DNA marker

由表 1 可知, 两个引物共扩增出 13 个条带, 其中多型条带 9 个, 平均多型条带频率为 0.692。对单个引物来说, F09 引物的多型条带频率为 0.571 4, CY0814 的多型条带频率为 0.833 3, 说明所选引物具有较丰富的多态性。

表 2 秦川牛群体平均百分差异均值及杂合度

Table 2 The MA PD and heterozyosities in Qinchuan yellow cattle population

引物 Primer	q	h	RAPD	MA PD
F09	0.589 0	0.582 6	0.168 9	
CY0814	0.433 7	0.723 1	0.320 7	0.244 8
平均 Mean	0.511 4	0.652 9	0.244 8	

2.3 RAPD 标记条带的效应值分析

秦川牛及其杂种牛经济性状 RAPD 标记效应值统计结果(表 3)表明, 两个随机引物扩增的标记条带的 1 型和 0 型(带的有无定义为 1 型或 0 型)对

3 个经济性状的效应值, 经 t 检验差异均不显著, 但 F09 引物的 A 带 0 型、G 带 1 型及 CY0814 引物的 D 带 1 型、F 带 0 型的效应值均高于群体平均水平。

图 2 CY0814 引物 PCR 扩增图谱

1~9 PCR 产物; M: DNA marker

Fig 2 RAPD patterns generated by primer CY0814

1- 9 PCR patterns; M: DNA marker

2.2 群体遗传变异分析

从表 2 可知, 由 F09 号引物估测的杂合度和平均百分差异都低于 CY0814 引物, 说明 CY0814 引物比 F09 引物更能反映出秦川牛群体的遗传多样性。

3 个经济性状的效应值, 经 t 检验差异均不显著, 但 F09 引物的 A 带 0 型、G 带 1 型及 CY0814 引物的 D 带 1 型、F 带 0 型的效应值均高于群体平均水平。

表 3 秦川牛经济性状 RA PD 标记条带的最小二乘均值及效应值

Table 3 L SM and L SE of RA PD markers on economic trait in Q inchuan yellow cattle								
引物 Primer	标记条带 Marker band	基因型 Genotype	宰前重/kg Live weight		胴体重/kg Carcass weight		净肉重/kg Beef weight	
			L SM	L SE	L SM	L SE	L SM	L SE
F09	A	1	292.82	- 1.33	151.91	- 1.79	134.44	- 1.42
		0	303.10	8.95	166.23	12.53	145.80	9.94
	E	1	300.10	5.95	155.61	1.91	137.40	1.54
		0	290.70	3.45	151.80	- 1.90	134.28	- 1.58
	F	1	294.77	- 0.62	155.15	1.45	139.47	3.61
		0	295.61	1.46	153.22	- 0.50	134.65	- 1.21
	G	1	303.10	8.95	163.25	9.55	145.80	9.94
		0	292.87	- 1.28	151.91	- 1.79	134.44	- 1.42
CY0814	A	1	308.60	2.84	160.99	- 0.29	138.89	- 3.02
		0	302.45	- 3.31	160.38	- 0.32	145.44	3.53
	B	1	306.18	0.42	161.43	0.73	143.14	1.23
		0	303.44	- 2.32	156.77	- 3.94	145.15	- 6.76
	C	1	306.48	0.72	160.95	0.25	142.88	0.97
		0	303.30	- 2.46	159.92	- 0.78	138.70	- 3.21
	D	1	317.70	11.94	163.87	3.17	143.15	1.24
		0	295.53	- 10.23	158.00	- 2.70	140.47	- 1.44
	F	1	297.82	- 7.94	154.91	- 5.79	141.51	- 0.40
		0	308.14	2.38	162.45	1.75	143.28	1.37

2.4 RA PD 标记条带组合型与经济性状的关系

由表 4 可知, 在 CY0814 引物中, ABC 条带组合型对 3 个经济性状的效应值均为负值, 但其单个条带的效应值之和却为正值; BC 组合型对 3 个经济性状的效应值明显高于 B、C 条带的单独效应值之和。在 F09 引物中, EFG 组合型的宰前重效应值小于 E、F 及 G 3 个条带各自效应值之和, AE 组合型

的宰前重效应值也大于条带 A 和 E 的效应值之和。由此可见, 不同条带组合型对宰前重、胴体重和净肉重的影响可能来自条带间的互作。另外, CY0814 引物 ABCD 组合型对宰前重的效应大于群体均值 1 个表型标准差以上, 可以作为宰前重的候选标记组合型。

表 4 RA PD 标记条带组合型与效应值

Table 4 L SE of RA PD marker band combined type						
引物 Primer	样本数 Sample No.	特异性条带组合型 Band combined type	L SE			
			宰前重/kg Live weight	胴体重/kg Carcass weight	净肉重/kg Beef weight	
F09	8	ABCD	- 5.96	- 1.90	- 0.21	
		EFG	8.94	12.53	11.78	
		AEF	- 7.72	- 9.63	- 0.88	
		AE	11.29	2.33	1.38	
CY0814	13	ABCD	32.20*	12.13	3.16	
		ABC	- 42.51	- 16.44	- 14.10	
		BC	9.77	8.18	12.14	

注: “*” 者为效应值大于 1 个标准误。
Note: * Showed L SE was larger than one standard error

3 讨论与结论

应用分子生物学技术进行牛经济性状与标记间关系的研究已有大量报道。曹红鹤等^[7]分析了微卫星 DNA 标记与南阳牛、皮埃蒙特牛及其杂交后代生长性状的关系, 发现 DVGA-27、DVGA-46 和 DVGA-55 标记对肉牛的生长发育具有显著影响。耿社民等^[8,9]在秦川牛 Tf 和 Hb 位点与体尺、体重

性状关系的分析中发现, 秦川牛体尺、体重的优势基因因为 Tfd1 与 Tfe; 胸深性状 TfeF 型基因的 L SE 值极显著地大于其他各基因型值 ($P < 0.01$)。祝梅香等^[10]对荷斯坦牛乳蛋白标记的研究发现: β^{CN} 位点 B 基因或连锁基因显著地影响乳蛋白率、乳脂率; K-CN 位点和 β^{Lg} 位点的 B 基因或连锁基因分别对乳蛋白率、乳脂率有显著效应^[10]。本试验利用两个随机引物研究了 DNA 分子标记与秦川牛肉用

性能的关系,发现CY0814引物D带的1型与0型对宰前重的效应值离差为22.17 kg, F09引物A带的0型与1型对胴体重的效应值离差为14.32 kg, F09引物A带的0型与1型和G带的1型与0型对净肉重的效应值离差均为11.36 kg。CY0814引物的ABCD组合对宰前重的效应值为32.2 kg, F09

引物的EFG组合对胴体重的效应值为12.53 kg, CY0814引物的BC组合对净肉重的效应值为12.13 kg, 其效应可能来源于组合中各条带间的互作。其中, CY0814引物的ABCD组合对宰前重的效应值大于1个标准差以上。

[参考文献]

- [1] 邱 怀. 现代肉牛生产及产品加工[M]. 西安: 陕西科技出版社, 1995.
- [2] 沈 伟. 绒山羊不同生产水平群体遗传标记的研究[D]. 陕西杨陵: 西北农林科技大学, 2001.
- [3] 秦国庆. 藏山羊遗传标记及其遗传共适应的研究[D]. 陕西杨陵: 西北农林科技大学, 1997.
- [4] Gen shen in, Chang Hong, Q in Guoqing, et al. Genetic marker of cashmere yield and weight on cashmere goats[A]. 中国农业大学主编 Proceedings of international conference on animal science and veterinary medicine towards 21st century[C]. 北京: 中国农业大学出版社, 2000. 198.
- [5] Lynch M. The similarity index and DNA fingerprinting[J]. Molecular Biological Evolution, 1990, 7(5): 478- 484.
- [6] 盛志廉, 吴常信. 数量遗传学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999. 88- 98.
- [7] 曹红鹤, 王雅春, 陈幼春. 探讨微卫星DNA作为皮埃蒙特牛和南阳杂交牛生长性状的遗传标记[J]. 遗传学报, 1999, 26(6): 621- 626.
- [8] 耿社民, 袁志强, 沈 伟, 等. 秦川牛Tf多态性与体尺、体重的关系分析[J]. 中国畜牧杂志, 2000, 36(6): 10- 11.
- [9] 耿社民, 田红霞, 沈 伟, 等. 秦川牛Hb位点与体尺、体重的关系分析[J]. 黄牛杂志, 2000, (2): 13- 16.
- [10] 祝梅香, 张 沅. 北京地区荷斯坦牛乳铁蛋白遗传标记应用研究[J]. 中国农业大学学报, 2000, 5(5): 74- 80.

RAPD marker of beef performance of the Qinchuan yellow Cattle and its hybrid

ZHANG Xi-feng, GENG She-m in, CHEN Hong, ZHANG J ian-q in,
ZHANG L i-juan, GU Yu-lan, SHEN Wei

(College of Animal Science and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Genetic variety and butcher performance (live weight/carcass weight/beef weight) of Qinchuan yellow cattle and its hybrid were analyzed by RAPD marker. The results showed that: ① 13 DNA bands were amplified by the primer of F09 and CY0814, the frequency of polymorphic bands were separately 0.571 4 and 0.833 3 with an average of 0.692. ② The relationship between amplified DNA bands and beef performance was showed, the residual quality of LSE between 1 type and 0 type of CY0814-D band was 22.17 kg on live weight trait; the ones of LSE between 1 type and 0 type of F09 primer were 14.32 kg on carcass weight trait and 11.36 kg on beef weight trait. ③ The effect of multi-bands combined was studied, the LSE of ABCD combined type of CY0814 primer (32.2 kg) was higher than average about one standard deviation of this population, the LSE of EFG combined type of F09 primer was 12.53 kg on carcass weight and the ones of BC combined type of CY0814 primer were 12.13 kg on beef weight.

Key words: Qinchuan yellow cattle; beef performance; RAPD marker