

蒙古羊、兰州大尾羊和哈萨克羊 随机扩增多态DNA分析*

雷雪芹^{1,3}, 陈宏^{1,2}, 刘波¹, 宋述荣¹, 陈玉林¹, 雷初朝¹, 孙维斌¹

(1 西北农林科技大学 动物科技学院 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨陵 712100;

2 徐州师范大学 生物技术研究所, 江苏 徐州 221009; 3 河南科技大学 动物科技学院, 河南 洛阳 471003)

[摘要] 从24个随机引物中筛选出5个引物, 对蒙古羊、兰州大尾羊和哈萨克羊3个绵羊品种共计89个个体进行了随机扩增多态DNA分析, 根据扩增片段计算了蒙古羊、兰州大尾羊和哈萨克羊扩增DNA指纹条带的平均带纹数分别为5.32, 5.28和5.78; 平均带纹相似率分别为0.59, 0.60和0.62; 平均杂合度分别为0.75, 0.78和0.77。用Nei氏片段共享度公式计算了3个群体的遗传距离, 构建了其关系图, 聚类分析结果表明, 蒙古羊与兰州大尾羊的遗传距离最小(0.034), 彼此亲缘关系较近。相对而言, 兰州大尾羊与哈萨克羊的遗传距离最大(0.104), 彼此亲缘关系较远。

[关键词] 蒙古羊; 兰州大尾羊; 哈萨克羊; RAPD; 遗传距离

[中图分类号] S813.3; S826.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)04-0059-04

生物种质资源是以物种为单元的遗传多样性资源, 是人类社会可持续发展的重要物质基础^[1]; 保护家畜遗传多样性是畜牧业生产的重要内容和目标。据估计^[2], 自20世纪70年代以来不到20年的时间, 世界上有40%的畜禽品种已经消失; 目前世界上畜禽品种仍以每两周减少3个品种的速度在丢失^[3]。70年代末和80年代初我国已有10个地方品种消失; 1999年不完全调查结果表明, 我国已有9个畜禽种质资源又已灭绝; 目前71%的猪、44%的马驴、34%的牛、20%的家禽、15%的绵羊或山羊资源受到不同程度的威胁^[1], 家畜遗传资源的保护工作已刻不容缓。在绵羊方面, 近20年来, 我国的不少学者不但从细胞学水平、生化水平对绵羊的遗传多样性进行了分析研究, 而且在分子水平也进行了一定探索^[4~10], 但涉及到本研究中的品种很少, 而且本研究所涉及的兰州大尾羊已被列为受严重威胁的畜禽品种之一^[1]。本研究的目的是通过随机扩增多态DNA指纹分析(RAPD), 探讨蒙古羊、兰州大尾羊和哈萨克羊3个中国地方绵羊品种间的遗传关系, 为今后的遗传资源的保存利用、杂交改良某些经济性状提供遗传学依据。

1 材料与方法

1.1 供试动物

试验共采集89只绵羊血液, 随机在内蒙古阿左旗选取蒙古羊30只; 在甘肃省兰州市郊区选取兰州大尾羊29只; 新疆伊宁市选取哈萨克羊30只。颈静脉采血, 肝素钠抗凝, -70℃保存。

1.2 试验方法

1.2.1 全血基因组DNA的提取 全血基因组DNA的提取参照Chen等^[11]的方法进行。

1.2.2 PCR扩增 PCR扩增反应的反应体系: 2 μL Taq酶(0.5 U/μL), 2 μL MgCl₂ (25 mmol/L), 2.5 μL 10×Buffer, 1.5 μL dNTPs (2.5 mmol/L), 1.0 μL 引物(10 pmol), 100 ng DNA模板, 加超纯水至25.0 μL。PCR扩增程序: 94℃, 2 min→45个循环(90℃, 变性30 s→36℃, 退火1 min→72℃, 延伸2 min)→72℃, 10 min→4℃保存。

1.2.3 扩增产物的电泳 扩增产物的电泳参照Chen等^[11]的方法进行。

1.2.4 RAPD数据统计分析 采用Georges等^[12]和Lynch^[13]的方法进行。

* [收稿日期] 2002-12-18

[基金项目] 教育部留学归国人员启动基金; 中国杨凌生物技术育种中心项目(1999-6); 河南省科技攻关项目(0224050030)

[作者简介] 雷雪芹(1962-), 女, 河南洛宁人, 副教授, 博士, 主要从事动物遗传育种研究。

[通讯作者] 陈宏(1955-), 男, 陕西长安人, 教授, 博士生导师, 主要从事生物技术与动物遗传育种研究。E-mail: chenhong1212@263.net

① 带纹相似率 $BSR = \frac{2N_{xy}}{(N_x + N_y)} \approx Pb$, 式中 N_{xy} 为 x 和 y 个体的共同条带数; N_x 为 x 个体的条带数; N_y 为 y 个体的条带数。平均带纹相似率与两个非亲缘个体一条带同时出现的平均概率 Pb 一致。

② 一条带的平均等位基因频率 $q = 1 - \sqrt{(1 - Pb)}$ 。

③ 平均杂合度的概率 $h = 2(1 - q)/(2 - q)$ 。

④ 群体间的遗传距离 $D_{ij} = -\ln \left[\frac{\overline{S}_{ij}}{\sqrt{\overline{S}_i \cdot \overline{S}_j}} \right]$, 其中, $\overline{S}_{ij}$ 为两群体个体间配对的平均带纹相似率 (BSR); $\overline{S}_i$ 为 i 群体内个体间的平均带纹相似率; $\overline{S}_j$ 为 j 群体内个体间的平均带纹相似率。

2 结果与分析

2.1 引物筛选结果

通过对 24 个引物的筛选, 选用其中 5 个扩增效果较好的引物 OPW 19, 0424-198, CY0814, CY0818, OPQ 05 对蒙古羊、兰州大尾羊和哈萨克羊 3 个品种共 89 个个体基因组 DNA 进行扩增。图 1 为 OPQ 05 引物对兰州大尾羊 10 个个体进行随机扩增的电泳图谱。

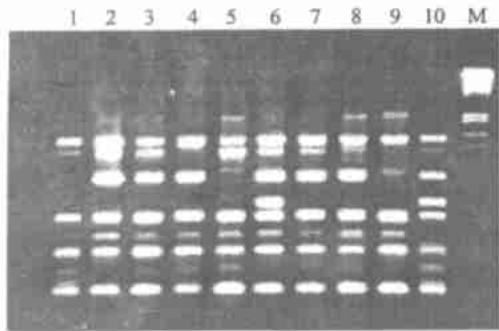


图 1 OPQ 05 引物对兰州大尾羊的 PCR 产物电泳图谱

1~10 不同的个体; M: *EcoR* I / *H* indIII marker

Fig 1 RAPD patterns of primer OPQ 05 in 10 Lanzhou big tail sheep
1- 10 Different individuals of sheep;
; M: *EcoR* I / *H* indIII marker

2.2 RAPD 扩增结果

3 个绵羊基因组 DNA 经 PCR 扩增后, 扩增产物的电泳图谱均显示出比较丰富的 DNA 带纹。对清晰的扩增片段进行统计, 蒙古羊平均产生 5 32 个扩增片段, 兰州大尾羊平均产生 5 28 个扩增片段, 哈萨克羊平均产生 5 78 个扩增片段。

2.3 3 个绵羊品种的带纹相似率

根据公式计算出 3 个绵羊品种内每两个个体间的带纹相似率, 每个品种平均带纹相似率 BSR , 1 条带的平均等位基因频率 q 及平均杂合度 h , 结果列于表 1。

表 1 3 个绵羊品种的等位基因频率、杂合度及平均带纹相似率

Table 1 Allele frequencies, heterozygosity and BSR in three sheep breeds

品种 Breeds	q	h	BSR
蒙古羊 Mongolia sheep	0.40	0.75	0.59±0.15
兰州大尾羊 Lanzhou big tail sheep	0.37	0.78	0.60±0.16
哈萨克羊 Kazakh sheep	0.38	0.77	0.62±0.18
蒙古羊- 兰州大尾羊 Mongolia sheep via Lanzhou big tail sheep	0.39	0.76	0.57±0.14
蒙古羊- 哈萨克羊 Mongolia sheep via Kazakh sheep	0.34	0.79	0.58±0.19
兰州大尾羊- 哈萨克羊 Lanzhou big tail sheep via Kazakh sheep	0.33	0.80	0.55±0.12

从表 1 可以看出, 蒙古羊的一条带的平均等位基因频率较高(0.40), 其次是哈萨克羊(0.38), 兰州大尾羊的最小(0.37), 但三者差异不大。3 个品种的平均杂合度较高, 依次为兰州大尾羊(0.78), 哈萨克羊(0.77)、蒙古羊(0.75)。品种间的等位基因频率较品种内低, 而杂合度却是品种间的高于品种内的; 品种内的带纹相似率均较高(0.59~0.62), 而品种间的带纹相似率则较低(0.55~0.58)。以上 3 个方面的分析均说明了实验数据的有效性。

2.4 品种间的遗传距离

根据品种内、品种间的平均带纹相似率计算出 3 个品种间的遗传距离 D , 其结果列于表 2。从表 2 可看出, 哈萨克羊和兰州大尾羊间的遗传距离最远(0.104), 蒙古羊和兰州大尾羊间最近(0.034), 而蒙古羊和哈萨克羊之间为 0.049, 可见 3 个品种相互间的亲源关系较近。

表 2 3 个品种绵羊的遗传距离

Table 2 The genetic distance (D) among three sheep breeds

品种 Breeds	蒙古羊 Mongolia sheep	兰州大尾羊 Lanzhou big tail sheep	哈萨克羊 Kazakh sheep
蒙古羊 Mongolia sheep	-		
兰州大尾羊 Lanzhou big tail sheep	0.034	-	
哈萨克羊 Kazakh sheep	0.049	0.104	-

2.5 3 个绵羊品种树状聚类图

根据遗传距离构建 3 个绵羊品种树状聚类图

(图2)。图2显示, 蒙古羊和兰州大尾羊先聚在一起, 然后再和哈萨克羊相聚。

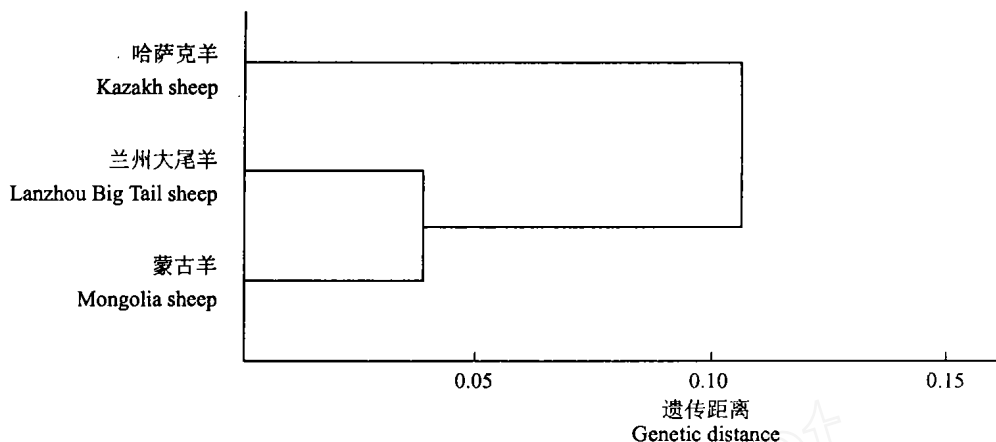


图2 根据遗传距离构建的3个绵羊品种的树状聚类图

Fig 2 Phylogenetic tree of three sheep breeds from values of genetic distance (D)

3 讨论

蒙古羊的平均带纹相似率为0.59, 平均杂合度为0.75, 表明其基因组内有41%的变异; 兰州大尾羊的平均带纹相似率为0.60, 平均杂合度为0.78, 表明其基因组内有40%的变异; 哈萨克羊的平均带纹相似率为0.62, 平均杂合度为0.77, 表明其基因组内有38%的变异。由变异程度可知, 在这3个绵羊品种中, 哈萨克羊品种内个体间基因一致性较好。从杂合度可以看出, 兰州大尾羊的遗传多样性比哈萨克羊和蒙古羊丰富。

蒙古羊与兰州大尾羊的遗传距离为0.034, 蒙古羊与哈萨克羊为0.049, 哈萨克羊与兰州大尾羊为0.104, 根据品种间的遗传距离, 将蒙古羊与兰州大尾羊先聚为一类, 这说明3个绵羊品种中, 蒙古羊与兰州大尾羊的血缘关系相对较近, 哈萨克羊与兰州大尾羊的血缘关系相对较远。据《中国羊品种志》^[14]描述, 兰州大尾羊是清同治(公元1862~1875)年间, 群众从同州(陕西大荔一带)购来同羊与当地绵羊(伏地羊)杂交的后代; 哈萨克羊被认为是肥臀羊或古籍所述的大尾羊, 与前苏联哈萨克斯坦的肥臀羊同源; 蒙古羊和二者之间从传统的尾型上

分也不属于一类。但实验结果与传统的分类方法有一定的出入, 这在他人的实验中也存在同样的问题, 如王桂芝等^[7]采用了3个蛋白位点对山东4个地方绵羊品种进行了研究, 结果认为属于短脂尾型的洼地绵羊和长脂尾型的大尾寒羊的遗传距离很近, 属于一类。杜立新等^[6]用16个RAPD引物对4种绵羊的遗传距离分析认为, 小尾寒羊、大尾寒羊、洼地羊、滩羊的亲缘关系较近, 起源于共同的原始祖先(蒙古羊)。这些均与尾型和品种的起源之说有所不同, 这也许是分子生物学的分类方法对传统分类方法的挑战。另外, 每一个品种的形成都不可避免地进行自然选择和人工选择以及品种间基因的交流, 所以同来源的不同品种间某些遗传特性可能是一致的, 某些遗传机制可能发生了变异, 所以研究的方法不同和所选的DNA标记位点不同可能得出不同的结论。

本文所采用的根据带纹相似率计算遗传距离的方法, 在绵羊的遗传进化方面的应用报道的不多, 但从本研究的分析来看, 此方法比较直接, 而且也较为科学和可信, 但在品种较多和引物较多的情况下, 可能计算较为麻烦, 应借助于一定的软件进行。

[参考文献]

- [1] 马月辉, 冯维祺. 畜禽种质资源评价[J]. 家畜生态, 2002, 23(3): 1-5
- [2] Alderson L. The Chance to Survive[M]. London: A & C Black, 1989
- [3] FAO/UNDP. World watch list for domestic animal diversity[M]. 2nd Edition. Rome: FAO of the United Nations, 1995
- [4] 陈玉林. 我国6个地方绵羊品种血液蛋白多态型研究[J]. 家畜生态, 1999, 20(3): 137-141
- [5] 陈玉林. 中国绵羊的分子进化与遗传多样性研究[D]. 陕西杨陵: 西北农林科技大学, 2000

- [6] 杜立新, 曹顶国, 姜运良. 小尾寒羊微卫星与 RAPD 标记的研究[A]. 第 11 次全国动物遗传育种学术会议论文集[C]. 北京: 中国农业科技出版社, 2001. 96- 99
- [7] 王桂芝, 王建民. 山东地方绵羊品种血液蛋白质多态性研究[J]. 中国畜牧杂志, 2001, 31(1): 8- 10
- [8] 张建中, 张 沅, 叶其铿. 滩羊、寒羊、蒙古羊品种间遗传距离研究[J]. 畜牧兽医学报, 1991, 22(4): 289- 295
- [9] Farid A, Renly E O, Dollard C, et al. Genetic analysis of ten sheep breeds using microsatellite markers[J]. Canadian Journal of Animal Science, 1999, 11: 9- 17
- [10] 代江生, 刘云芳, 高剑峰, 等. 五个绵羊品种的 RAPD 初步分析[J]. 草食家畜, 1998, 1: 11- 13
- [11] Chen H, Leibenguth F. Studies on multilocus fingerprints, RAPD marker and mitochondrial DNA of a gynogenetic fish[J]. Biochem Genet, 1995, 33: 297- 304
- [12] Georges JM, Lequarre A S, Cadelli M, et al. DNA fingerprints in domestic animals using four different minisatellite probes[J]. Cytogenet Cell Genet, 1988, 47: 127- 132
- [13] Lynch M. The similarity index and DNA fingerprinting[J]. Molecular Biological Evolution, 1990, 7(5): 478- 484
- [14] 中国羊品种志编写组. 中国羊品种志[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1989

Study on random amplified polymorphic DNA fingerprints in Mongolian, Lanzhou big tail and Kazak sheep breeds

LEI Xue-qin^{1,3}, CHEN Hong^{1,2}, LIU Bo¹, SONG Shu-rong¹,
CHEN Yu-lin¹, LEI Chu-zhao¹, SUN Wei-bin¹

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry,

Shaanxi Key Laboratory of Agricultural Molecular Biology, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Institute of Biotechnology, Xuzhou Normal University, Xuzhou, Jiangsu 221009, China;

3 College of Animal Science and Technology, Henan Science and Technology University, Luoyang, Henan 471003, China)

Abstract: Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis was used to detect the genetic polymorphisms of 89 individuals of three sheep breeds from Mongolian, Lanzhou big tail and Kazak sheep breeds in China by 5 random primers. The average band sharing rates and probability for a band to be present in the heterozygous state of the three sheep populations were calculated to be 0.59 and 0.75 in Mongolian sheep, 0.60 and 0.78 in Lanzhou big tail sheep and 0.62 and 0.77 in Kazak sheep, respectively. The genetic distance was obtained by BSR. Dendrogram of three sheep breeds was constructed. The results indicated that the relatively closer genetic relationship was between the Mongolian sheep and Lanzhou big tail sheep. Comparatively, the relationship between Lanzhou big tail sheep and Kazak sheep was rather far.

Key words: Mongolian sheep; Lanzhou big tail sheep; Kazak sheep; RAPD; genetic distance