

利用 RAPD 标记分析鸵鸟种群的遗传变异

周霞¹,李宁²,张劳¹,崔庆为³

(1. 中国农业大学动物科技学院,北京 100094; 2. 中国农业大学生物技术国家重点实验室,北京 100094;
3. 中垦农牧有限责任公司,北京 102211)

摘要:为探讨分子遗传标记在鸵鸟(*Struthio camelus*)育种中的应用,利用 RAPD 技术分析了我国养殖的三个主要鸵鸟品种内和品种间的遗传变异。蓝颈鸵鸟、澳洲灰和非洲黑三个品种在品种内和品种间显示出低水平的变异。品种间的遗传距离较好地说明了三个品种的育种改良过程,同时预示出用澳洲灰与其他品种鸵鸟进行杂交育种的可行性。选择的 20 条在鸡中能稳定扩增的 RAPD 引物其 75% 能在鸵鸟基因组中扩增出产物,显示出两种禽类 DNA 具有同源性,为今后利用鸡的微卫星引物对鸵鸟进行基因组扫描(genome scan)分析奠定基础。

关键词:鸵鸟;遗传变异;RAPD

中图分类号:Q963

文献标识码:A

文章编号:0253-9772(2001)05-0420-03

The Study of Molecular Genetic Markers on Ostrich Breeding

ZHOU Xia¹, LI Ning², ZHANG Lao¹, CUI Qing-wei³

(1. College of Animal Science, China Agricultural University, Beijing 100094;
2. The State Key Laboratory of Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094;
3. Zhong Ken Agriculture and Husbandry Company, Beijing 102211)

Abstract: To evaluate the molecular genetic markers on ostrich (*Struthio camelus*) breeding, we have analyzed the genetic variability of three main ostrich breeds by using RAPD. The studies show that the Blue, Australia Grey and African Black have low genetic variability. The genetic distance between breeds clearly illustrates the breeding history, at the same time, it also shows the possibility that cross breeding can be applied to Australia Grey and the breeds. 75 percent selected RAPD primers working well in chicken could stably amplify products in ostriches, which implied DNA identity between chicken and ostrich. The work provided a foundation for genomic scanning.

Key words: ostrich; genetic variability; RAPD

近年来,随着世界范围的鸵鸟人工养殖的迅猛发展,鸵鸟养殖作为一种畜牧业新分支正被越来越多的国家认识,其经济价值逐渐被广泛的发掘,其皮、肉、蛋、毛、骨等逐渐得到较全面的开发利用。现人工饲养的鸵鸟主要有“非洲黑”(African blacks)、“澳洲灰”(Australian Grey)、蓝颈鸵鸟(Blue heck)、红颈鸵鸟(Red heck),它们均属于驯养鸵鸟,与野生亚种相比,在许多方面都有了遗传改进^[1]。利用分子遗传标记研究鸵鸟品种、群体间的遗传差异,可以

促进鸵鸟的杂交改良,最大限度地提高鸵鸟的利用效率,避免盲目引种,减少人为的损失。

RAPD 技术简便、快捷,已广泛地应用于种群的遗传变异和亲缘关系分析^[2-5],本研究利用 RAPD 技术分析了这几个品种的群体遗传变异情况,探索将分子遗传标记运用于鸵鸟育种的可行性。

1 材料和方法

1.1 试验动物

收稿日期:2000-11-06;修回日期:2001-01-16

基金项目:国家杰出青年科学基金(39725022)资助

作者简介:周霞(1975-),女,江苏宜兴人,中国农业大学硕士研究生,专业方向:分子遗传学。电话:010-62892768

试验鸵鸟由北京中垦农牧有限责任公司鸵鸟养殖示范基地提供,包括非洲黑、澳洲灰、蓝颈鸵鸟三个品种。

1.2 血样采集和模板制备

三个品种随机抽样数分别为 20、19、26,每个个体 1 ml 血液加 9 ml 禽裂解液,采用改进的高盐法^[7]提取 DNA,稀释成 50 ng/ μ l,取等量个体 DNA 混合成池 DNA。

1.3 PCR 反应及扩增程序

用一个 RAPD 引物(购自生工)KIT(OPSA1-60)及在鸡中能稳定扩增的 20 条随机引物对 3 个品种的池 DNA 样品进行 PCR 扩增。比较同一引物在三品种鸵鸟基因组池 DNA 的扩增结果,即扩增带的有无、多少、位置,扩增结果至少在两个品种间出现差异的引物示为多态性引物。PCR25 μ l 反应体系中含有 10 \times buffer 2.5 μ l, Mg²⁺ 2 mmol/l, dNTP 200 μ mol/l, Primer 8 pmol, Taq 酶 2 U, 模板 DNA 20~50 ng。扩增程序:94 $^{\circ}$ C 变性 5min, 后接 40 个循环,包括 94 $^{\circ}$ C 变性 50s, 36 $^{\circ}$ C 退火 1.5min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5min, 循环结束后 72 $^{\circ}$ C 继续延伸 7min。

1.4 电泳及结果观察

扩增产物用含有 EB(0.5 μ g/ml)的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 1.5~2h, 紫外灯下观察拍照。扩增带的统计以在紫外灯下观察到的带为准,数字 1、0 分别表示有带、无带,数据文件中每一条记录与从小到大的带型分子量相对应。

1.5 RAPD 指纹统计分析方法

(1) 品种内的相似系数

$$B_{ab} = 2b_{ab} / (b_a + b_b)$$

$$BSF(B) = \frac{\sum B_{ab}}{N}$$

这里, b_{ab} 指品种内个体 a 和 b 共享的条带数目, b_a 、 b_b 分别指个体 a 和 b 的条带数目。BSF(B) 为各个引物品种内所有个体间可以比较的 (B_{ab})。

(2) 品种间的校正相似系数

$$B' = 1 + B_{xy} - 0.5(B_x + B_y)$$

这里 B_x 和 B_y 是两个品种各自的相似系数, B_{xy} 是两个品种间所有个体比较的相似系数的平均值。

(3) 遗传距离

$$D_{xy} = -\ln B_{xy} + \ln \sqrt{B_x B_y}$$

以上计算过程通过自编 Fortran 程序完成。

2 结果与讨论

2.1 引物筛选结果

在以三个品种池 DNA 样品为模板的 PCR 扩增中,共使用了 40 条 10 碱基随机引物,其中 8 个未出现扩增产物或产物带型不清晰,18 条引物扩增产物显示出单态的带型,共有 14 条引物(S42、S43、S45、S47、S17、S58、S62、S65、S66、S84、S104、S164、S227、S248)的扩增产物产生清晰可辨的多态性带型。有 9 条引物的扩增产物在池 DNA 样品间表现为单态,而在个体 DNA 样品间表现为多态。其中选择的在鸡中扩增良好的 20 条 RAPD 引物中 75% 能在鸵鸟 DNA 中扩增出产物,这为下一步工作用鸡的荧光引物来对鸵鸟个体进行基因组扫描(genome scan)、构建鸵鸟的连锁图谱奠定了基础。

2.2 个体 DNA 样品 PCR 扩增结果

从 40 条随机引物中筛选出 14 个重复性良好的引物进行个体基因组 DNA 的 PCR 扩增,在蓝颈、澳洲灰和非洲黑三个品种共 65 个个体中获得了 93 条清晰可辨的图带,图带大小在 250~1500bp 之间,其中 37 条为多态性图带(例图 1、2)。平均每个引物可扩增出 6.6 条 RAPD 图带,属于多态性的有 2.6 条。虽然 RAPD 的稳定性较差,但本研究中保持了一致的反应条件(模板浓度、复性温度、镁离子浓度等),同时保证所有个体一起上样、一起进行 PCR 扩增,并且优化了循环条件,故得到的结果较稳定。

2.3 鸵鸟品种内和品种间的相似系数

本试验各引物产生的品种内相似系数在 0.63~1.00 之间,蓝颈、澳洲灰和非洲黑三个鸵鸟品种内 14 条引物的相似系数平均值分别为 0.92、0.90、0.91;品种间的相似系数最小值是 0.83,其它均在 0.90 以上(表 1),说明鸵鸟的养殖虽已有一百多年历史,并且经过了长期的人工选育,但在鸵鸟不同的种群间和同一种群内遗传变异还很小。

试验得出的蓝颈鸵鸟与澳洲灰两个品种之间的遗传距离均值为 4.36×10^{-3} , 小于蓝颈鸵鸟与非洲黑 (6.15×10^{-3})、澳洲灰与非洲黑 (8.05×10^{-3}) 之间的遗传距离,这与三个鸵鸟品种的育成过程相符。在南非最早进行人工饲养的鸵鸟是南非的蓝颈鸵鸟,人工选育过程中引进了其他鸵鸟的血液,形成的鸵鸟被称为“非洲黑”。而 19 世纪和 20 世纪初,澳大利亚将从非洲引进的“非洲黑”与红颈鸵鸟、蓝颈

鸵鸟杂交,成了独特的新的杂交品种澳洲灰,由于澳洲岛国的气候和地域的特性完全不同于其原产地,加上它与其他品种鸵鸟隔绝长达 80 多年,因而形成

了独特的基因库。从本试验来看,将澳洲灰与其他品种鸵鸟杂交,在第一代杂交种中可能出现较显著的杂种优势。

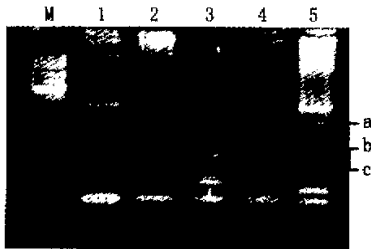


图 1 引物 S227 的 RAPD 图

Fig. 1 RAPD profile of primer S227

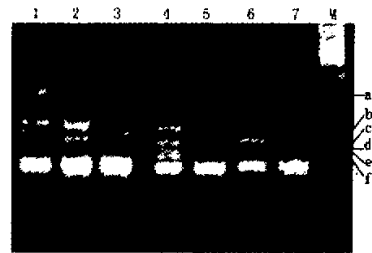


图 2 引物 S17 的 RAPD 图

Fig. 2 RAPD profile of primer S17

2.4 分子遗传标记在鸵鸟育种中应用的展望

目前,鸵鸟育种主要依据外形、生产性状的差异来选择,这些差异易受各种因素的影响,选择效率较低。以鸵鸟的性别鉴定为例,生产中幼龄鸵鸟的性别鉴定一般要在二月龄以后方可进行,且时间越早越易出错,配套出售幼龄鸵鸟(二雌一雄),全为同一性别的情况时有发生,所以在实际工作中,依靠表型选择的方法总有一些不尽人意之处。

济性状的标记辅助选择(MAS)将会得到广泛应用。但现在关于鸵鸟在分子水平的研究还不多,对其基因序列也所知甚少,Vladimir等(1994)证明鸡的抑制基因在 Southern 检测中能 与鸵鸟的基因组 DNA 特异性地杂交,表明两个物种的 DNA 具有同源性,而微卫星在相近物种间具有保守性,如直接利用鸡的微卫星引物来扩增鸵鸟的基因组,不仅可以从分子水平上研究鸵鸟这一经济动物,为今后的育种工作开辟新的途径,而且可以节省大量的劳力和资金。

表 1 鸵鸟各品种间的相似系数与遗传距离

Table 1 Similar coefficient and genetic distance between various ostrich breeds

引物	蓝颈—澳洲灰		蓝颈—非洲黑		澳洲灰—非洲黑	
	B' ($\times 10^{-1}$)	Dxy ($\times 10^{-3}$)	B' ($\times 10^{-1}$)	Dxy ($\times 10^{-3}$)	B' ($\times 10^{-1}$)	Dxy ($\times 10^{-3}$)
S42	9.98	0.70	10.0	0.20	9.99	0.30
S43	9.99	0.27	9.94	2.77	9.99	0.22
S45	9.91	4.58	9.62	18.8	9.94	2.45
S47	9.40	27.1	9.09	42.1	8.33	79.2
S57	9.96	2.09	9.89	5.52	9.66	18.8
S58	9.93	3.35	9.82	8.65	9.99	0.54
S62	9.81	8.42	9.95	2.32	9.87	5.08
S65	9.98	0.99	9.97	1.04	9.83	8.07
S66	9.99	0.68	9.99	0.74	9.99	0.05
S84	9.91	4.13	9.99	0.59	9.98	0.60
S104	10.0	0.15	9.98	0.88	9.99	0.29
S164	9.99	0.18	9.99	0.16	9.94	2.82
S227	9.98	0.89	9.99	0.34	9.99	0.78
S248	9.84	7.52	9.96	2.06	9.99	0.51
平均	9.91	4.36	9.87	6.15	9.82	8.05

在分子水平上研究是探讨新的选种育种方法的有效途径,特别是今后借助分子遗传标记来选择经

参考文献(References):

- [1] Mike Jarvis. The different types of ostrich [J]. The Ratite Journal, 1995, 7: 24.
- [2] Ray S A, et al. Line specific DNA fragments revealed By RAPD - PCR In Birds Divergently selected for Tibial Dyschon Roplasia [J]. Poultry Science, 1993, 72(Suppl): 10.
- [3] Smith E J, et al. Use of random amplified polymorphic DNA marker for the genetic analysis of relatedness and diversity in chickens and turkeys [J]. Poultry Science, 1996, 75: 579~584.
- [4] Zhang X, et al. Random Amplified Polymorphic DNA Comparisons Among Broiler Lines Selected for incidence of Tibial Dyschondroplasia [J]. Poultry Science, 1995, 74: 1253~1258.
- [5] 张细权. 优质鸡遗传多样性的研究 [D]. 中国农业大学博士学位论文, 1999.
- [6] Vladimir Chouljenko, et al. Expression and purification of chicken α -inhibition as a fusion protein with the E. coli maltose binding protein [J]. Abstracts for Eighty-third Annual Meeting of the Poultry Science, 1994, 94.
- [7] 曾福铃. 随机扩增多态性 DNA (RAPD) 在动物遗传育种中的应用初探 [D]. 中国农业大学硕士学位论文, 1995.