

赣中南花猪随机扩增多态 DNA 与群体遗传关系的研究

任 军, 黄路生, 高 军, 陈克飞, 丁能水, 林万华, 罗 明

(江西农业大学动物科技学院动物生物技术与生产实验室, 南昌 330045)

摘要:用 RAPD 技术检测了泰和冠朝猪、永丰藤田花猪、瑞金三花猪、兴国茶园猪、上犹花猪、万安花猪、乐安花猪等 7 个赣中南花猪地方类群基因组混合 DNA 的多态性, 经 80 个随机引物扩增筛选, 16 个引物产生了共 44 个多态标记。遗传距离指数计算结果显示: 泰和冠朝猪和瑞金三花猪亲缘关系最近, 而兴国茶园猪与乐安花猪遗传距离最远。各类群的 UPMGA 和 NJ 聚类分析结果与采用生化、免疫和细胞遗传标记分析的结论不尽相同, 在此基础上, 结合现行分类方法, 认为各受试猪群可暂时归并为赣中南花猪类型, 但对泰和冠朝猪和万安花猪的品种归属性应作进一步分析。

关键词:猪; RAPD; 群体遗传; 系统分类

中国分类号: Q953; S828.8

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2000)02-0069-04

Population Genetic Relationships of Ganzhongnan Spotted Pig Breed Inferred from Random Amplified Polymorphic DNA Analysis

REN Jun, HUANG Lu-sheng, GAO Jun, CHEN Ke-fei, DING Neng-shui, LIN Wan-hua, LUO Ming

(Faculty of Animal Science and Veterinary, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: Random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) were used to investigate bulked genomic DNA polymorphism of seven pig populations including Taihe Guanchao, Yongfeng Tengtian Spotted, Ruijin Spotted, Xingguo Chayuan, Shangyou Spotted, Wanan Spotted, and Lean Spotted pig. Eighty random primers were screened, of them, 16 primers generated polymorphic markers with total number of 44. The genetic distance index matrix indicated that the genetic relationship between Taihe Guanchao and Ruijin Spotted pig population was the closest, while that between Xingguo Chayuan and Laan Spotted pig population was the farthest. Our molecular phylogenetic trees constructed by UPMGA and NJ methods were in general consistent with that based on biochemical, immunogenetic and cellular genetic markers except for differences in some populations. It was inferred from this study that all pig populations examined could be temporary classified into one breed, however, the population genetic character of Taihe Guanchao and Wanan Spotted pig populations should be further evaluated.

Key words: pig; RAPD; population genetics; systematic classification

随机扩增多态 DNA (random amplified polymorphic DNA RAPD) 技术是 1990 年由 Williams 和 Welsh 等创建的一项新型的分子标记技术^[1,2], 该技术采用单个的随机短引物 (通常为 5~15bp) 对基因组 DNA 进行聚合酶链式反应 (PCR), 反应产物经琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 得到高度变异的 DNA 指纹

谱带, 进而比较分析 DNA 的多态性。与其他分子标记技术相比, RAPD 技术具有简便、快捷, 实验成本低且无须知道目标序列的有关信息等优点, 这项技术不仅可用于标定目的基因、构建遗传连锁图谱, 同时也为物种种群鉴定, 群体遗传学分析, 起源、进化和分类研究提供了一种十分有用的工具。

收稿日期: 1999-02-22, 修回日期: 1999-08-05

基金项目: 本文受国家自然科学基金 (39660055) 和江西省科委重点科技计划项目资助

作者简介: 任军, 男, 1974 年 9 月出生, 江西省横峰县人, 汉族, 硕士, 助教, 从事动物分子生物学与育种的教学和科研工作

致谢: 本研究在采血过程中, 得到了江西省畜牧局、吉安、赣州地区农业局、各相关县农业局以及各采血单位的大力支持, 在此一并表示感谢。

赣中南花猪是江西的七大大地方品种之一,它分布于江西省吉安、赣州两地区,包括泰和冠朝猪、永丰藤田花猪、瑞金三花猪、兴国茶园猪、上犹花猪、万安花猪、乐安花猪、新干獐江猪等地方花猪类群。这些猪群所处地区毗邻,自然条件和社会经济条件以及群众的生活习惯和猪的饲养管理方式基本相似,其外型特征和生活特性大同小异,故将其划归为同一品种^[3]。过去对赣中南花猪的研究主要集中在形态学、生态学方面,对群体的遗传结构和特点了解不多,猪种分类时偏重于形态特征和地理分布,因而难免存在同种异名或同名异种现象。为了正确而全面地判明赣中南花猪各地方类群的品种归属,20世纪80年代以来,本室人员利用血液蛋白标记、免疫遗传标记和细胞遗传学标记探讨了赣中南花猪种群间的亲缘关系和系统分类^[4-6];本项研究尝试利用RAPD技术检测赣中南花猪8个猪群混合基因组DNA的多态性,据此分析种群间的遗传变异和相互关系,探讨RAPD技术应用于群体遗传变异和亲缘关系研究中的意义和价值,为江西地方猪种系统分类提供新的建议及科学依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验收集了赣中南花猪中7个地方类群51个个体的血样,包括泰和冠朝猪8头、永丰藤田花猪8头、瑞金三花猪4头、万安花猪15头、兴国茶园猪4头、乐安花猪5头、上犹花猪7头,其中前3类猪群选取的是两代内无任何亲缘关系的个体;后4类猪群因无详细系谱资料或血统数太少,则采取中心产区系统随机抽样的方式选取若干个体用于RAPD分析。

1.2 实验方法

基因组DNA的提取、池DNA的制备以及RAPD分析参照文献[7]中的方法进行,所用的80种10碱基随机引物购自美国OPERON公司(编号为OPF1-20,OPG1-20,OPH1-20,OPI1-20)。

1.3 统计分析方法

任意两个猪群之间RAPD标记的片段共享度(F)和遗传距离指数(D)根据Nei和Li的公式^[8]来计算: $F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$, $D = 1 - F$ 。其中 N_{xy} 为类群 X 和类群 Y DNA池PCR扩增分子量相同的DNA片段总数; N_x 、 N_y 分别为类群 X 和类群 Y DNA池PCR扩增产物的DNA片段总数。

根据 D 值,应用PHYLI Φ (phylogeny inference

package) Version 3.5C软件程序(Joe Felsenstein 1993),按照非加权的组平均法(Unweighted paired group method with arithmetic mean,UPGMA)对各猪群进行聚类分析,构建聚类关系图。

2 结果与分析

2.1 DNA的扩增结果

用于扩增7个受试猪群基因组DNA池的80个随机引物中,OPH10、OPH17、OPG1、OPF7、OPF8、OPF17、OPI15、OPI19等8个引物未获得任何扩增产物;而OPH9、OPH20、OPG3、OPI6、OPI16等5个引物扩增产物的条带不清晰,不能明确计数;只有OPH2、OPH3、OPH4、OPH5、OPH12、OPG4、OPG7、OPG13、OPG17、OPF2、OPF16、OPI7、OPI8、OPI9、OPI10、OPI20等16个引物的扩增产物产生了清晰可辨的多态谱带,其余51个引物的扩增产物皆为单态。产生多态标记的16个随机引物的扩增结果列于表2,图2显示了OPI20和OPI07引物的扩增结果。RAPD标记的大小在200~4000bp之间,与他人报道相符^[1,2,9];16种多态引物共产生116个标记(条带),标记数在1~10之间,其中44为多态标记,这表明RAPD技术可迅速提供大量的遗传标记。

2.2 猪群间的片段共享度和遗传距离指数

各猪群间的片段共享度和遗传距离指数如表2所示:受试猪群间的片段共享度在0.7792~0.9491之间,对应于遗传距离指数为0.0509~0.2208。瑞金三花猪和泰和冠朝猪的片段共享度最

表1 16种产生多态的引物及其扩增结果

引物	序列	标记总数	标记可变量
OPF02	5'GAGGATCCCT 3'	7	2
OPF16	5'GGAGTACTGG 3'	8	1
OPG04	5'AGCTGGTCTG 3'	9	3
OPG07	5'GAACCTGCCG 3'	6	2
OPG13	5'CTCTCCGCCA 3'	7	2
OPG17	5'ACCACCGACA 3'	8	2
OPH02	5'TCGGACGTGA 3'	10	5
OPH03	5'AGACGTCCAC 3'	5	3
OPH04	5'GGAAGTCGCC 3'	7	6
OPH05	5'ACTCGTCCCC 3'	8	2
OPH12	5'ACGGCATGT 3'	7	3
OPI07	5'CAGCGACAAG 3'	7	2
OPI08	5'TTGCCCGCT 3'	8	5
OPI09	5'TGGAGAGCAG 3'	3	2
OPI10	5'ACAACGCGAG 3'	8	2
OPI20	5'AAAGTCCGGG 3'	9	2
总计		116	44

表 2 7个猪种(群)间的片段共享度和遗传距离指数

	1	2	3	4	5	6	7
1		0.8993	0.9491	0.8368	0.8996	0.8852	0.9221
2	0.1007		0.9309	0.8555	0.8882	0.9293	0.8881
3	0.0509	0.0691		0.8552	0.8542	0.8694	0.9109
4	0.1632	0.1445	0.1448		0.8561	0.7792	0.8681
5	0.1004	0.1118	0.1458	0.1439		0.8381	0.8531
6	0.1148	0.0707	0.1306	0.2208	0.1619		0.8958
7	0.0779	0.1119	0.0891	0.1319	0.1469	0.1042	

注:1:泰和冠朝猪;2:永丰藤田花猪;3:瑞金三花猪;4:兴国茶园猪;5:上犹花猪;6:乐安花猪;7:万安花猪;上三角为片段共享度,下三角为遗传距离指数。

高(0.9491),相对于其他猪,亲缘关系更近;而乐安花猪和兴国茶园猪之间的遗传距离最大(0.2208),亲缘关系最远。从整体上看,各猪群之间的遗传距离相差不大,遗传分化不明显。

2.3 聚类关系图

为了更直观地体现各猪群间的亲缘关系,我们根据表2的数据,对这7个赣中南花猪群体分别进行了UPMGA聚类分析,其结果如图1所示:泰和冠朝猪和瑞金三花猪,永丰藤田花猪和乐安花猪分别两两相聚,这4者与万安花猪聚成一大类群后,再与上犹花猪相聚,兴国茶园猪最后才与其他6个猪群

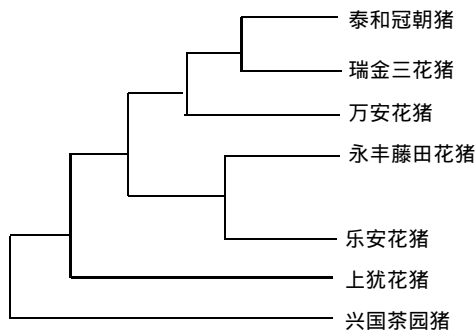


图1 7个赣中南花猪群体的UPMGA聚类关系图

归并为同一大类群。

3 讨论

3.1 关于地方类群间的亲缘关系和系统分类

本次实验中赣中南花猪各地方类群间的亲缘关系及其UPMGA聚类分析结果在一定程度上反映了各猪群的体型外貌差异、地缘分布状况和历史渊源。首先,从整体来看,参试7个赣中南花猪地方类群的亲缘关系与其地理分布基本一致,即地缘毗邻的猪群有着较近的亲缘关系,而地理间隔较大的猪群遗传距离较远。永丰县和乐安县位于江西省中部,两县毗邻;兴国县和上犹县邻近,皆位于赣南地区;这样两地的猪群容易交流,产生较多的血缘融合,因而永丰藤田花猪和乐安花猪表现出更近的亲缘关系,在UPMGAJ聚类图中首先两两相聚为一类,兴国茶园猪和上犹花猪亲缘也较近,不过,泰和县位于赣中,而瑞金市地处赣南,可泰和冠朝猪和瑞金三花猪这两个地理间隔较大的猪群也聚成一类。类似的情况还见于其他人的报道^[4,5]。产生这一现象的可能原因是:1)使用的引物数还有限,不足以检测到此类品种的遗传差异。2)抽样误差,所选取的样本不能

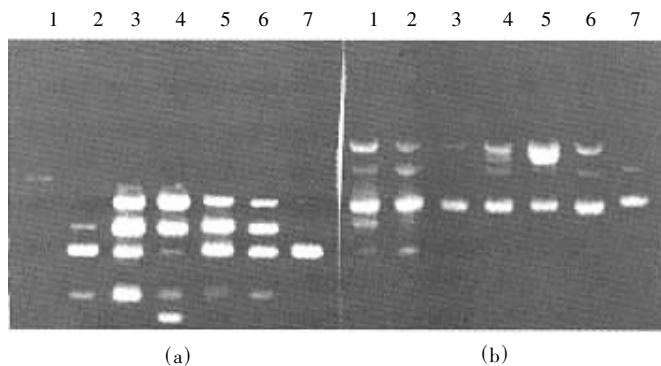


图2 赣中南花猪的RAPD产物

(a)为OPI07的扩增产物,(b)为OPI20的扩增产物;1、2、3、4、5、6、7分别代表万安花猪、乐安花猪、上犹花猪、兴国茶园猪、瑞金三花猪、永丰藤田花猪和泰和冠朝猪。

代表该类品种。3)家猪品种是长期人工选择的产物,而人工选择的是那些与人类生活紧密相关的经济性状,即主要对结构基因选择,家猪基因组只有约 10% 是结构基因,绝大部分为非结构基因序列,这就意味着绝大多数核基因承受的选择压力非常小,甚至为零。它们具有高度的保守性和同源性。因此,形态分化明显的品种间有可能在核基因组的整体水平上差异很小,其 RAPD 扩增产物仍有着较高的片段共享度,从而在聚类关系图上表现出较近的亲缘关系。

与此前本室人员根据血液蛋白、免疫遗传标记和细胞遗传标记对江西地方猪种系统分类的研究结果相比,本次实验与之既有相似之处,又有不同之处,主要分歧在于泰和冠朝猪和万安花猪与其他猪群的亲缘关系以及两者的品种归属问题。在本次实验中,泰和冠朝猪与瑞金三花猪遗传距离较近,而万安花猪在另一类聚类图——NJ 聚类图中单独聚为一类(结果未列出);从黄海根等对冠朝猪、三花猪、茶园猪和万安猪等四个赣中南花猪类群血清 Cp、Tf、Hpx 的多态性的检测结果来看,泰和冠朝猪与瑞金三花猪和永丰藤田花猪的亲缘关系较近,而万安花猪与这 3 者的遗传距离则较远,它与广东蓝塘猪聚为一类^[4];罗明、林树茂等根据 6 个血液蛋白位点 14 个等位基因频率对赣中南花猪的 6 个地方类群进行了聚类分析,结果泰和冠朝猪和新干溧江猪相聚,永丰藤田花猪和瑞金三花猪、万安花猪、信丰花猪相聚,若将这 6 个猪种与全省各类型猪一起作聚类,则万安花猪与萍乡猪相聚^[5];而从梁海平等对万安猪、冠朝猪、瑞金三花猪和乐平花猪的银染核仁组织区(Ag-NORs)多态性的研究中,发现万安猪、冠朝猪、瑞金三花猪这三个赣中南花猪类群间无显著差异,可归为一类,与乐平花猪相区别^[6]。从上研究结果可以看出:总体而言,赣中南花猪各类群的亲缘关系较近,但其中泰和冠朝猪与其他类群亲缘关系究竟如何,万安花猪是否具有其独特的遗传特性而有别于其他猪群,目前仍有争议。有鉴于此,并综合考虑到猪的毛色、外形、生产性能和地理分布,我们认为:可以暂时将泰和冠朝猪、永丰藤田花猪、瑞金三花猪、兴国茶园猪、上犹花猪、万安花猪、乐安花猪、新干溧江猪、遂川左安猪等地方花猪类群归并为同一类型——赣中南花猪,但对冠朝猪和万安花猪有必要采用更多的随机引物或微卫星(SSRs)、AFLP 等其他分子标记技术再作分析,以更为准确地判定其品种归属。

3.2 关于 RAPD 在猪种群遗传关系和系统学研究中的应用

RAPD 标记遍布整个染色体基因组,其多态标记反映了基因组特定区域的 DNA 多态性,因而通过比较不同种群基因组 DNA 池的 RAPD 标记可以全面而客观地揭示各品种 DNA 序列的同源程度,而 DNA 结构是物种根本属性之所在,不同品种 DNA 序列的同源程度直观地体现了品种间亲缘关系的远近,故此 RAPD 技术可以为不同猪种间的亲缘关系和系统学研究提供科学可靠的研究工具。

从本次实验结果来看,用于 RAPD 分析的 80 个随机引物中,有 16 个引物共产生了 44 个多态标记,据此所揭示的赣中南花猪各类群的遗传和分类关系与现行分类结果以及根据免疫、生化和细胞遗传标记基本相符。这些说明 RAPD 技术适合于家猪群体遗传学关系和系统学的研究。由于 RAPD 技术操作简单,避免了杂交、克隆和探针标记等繁琐步骤,分析更为快速,实验成本也大大降低,加之随机引物数目众多,检测范围覆盖整个基因组 DNA 且多态信息含量适中,因而我们相信尽管 RAPD 分析也存在着稳定性、重复性欠佳、绝大多数标记为显隐性标记等不尽人意之处,该技术在未来一段时间内仍将是一种常用的分子标记技术,在畜禽群体遗传学分析、系统分类学以及起源、进化研究领域具有一定的应用前景。

参考文献:

- [1] Williams J C, Kublik A R, Livak K J, *et al.* DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18: 6531 ~ 6535.
- [2] Welsh J, McClelland M, *et al.* Genomic fingerprinting using arbitrary primed PCR and a matrix of pairwise combinations of primers[J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, 19: 5275 ~ 5279.
- [3] 江西省畜牧兽医局. 种畜种禽品种标准及生产技术规范 [M]. 南昌:江西科学技术出版社, 1996.
- [4] 黄海根, 邹峰. 华东南地区部分家猪地方种群的亲缘关系及其起源分化初探[J]. *江西农业大学学报*, 1988, 10(4): 31 ~ 35.
- [5] 罗明, 林树茂, 黄路生, 等. 利用血清蛋白质多态性探讨江西地方猪种的系统分类[J]. *江西畜牧兽医杂志*, 1996, 1: 2 ~ 7.
- [6] 梁海平, 罗明, 朱正义. 江西省几个地方猪种银染核仁组织区(Ag-NORs)异态性的研究[J]. *中国养猪学报*, 1998, 1: 14 ~ 15.
- [7] 任军, 黄路生, 高军. 家猪随机扩增多态 DNA 最佳反应体系的探讨[J]. *江西农业大学学报*, 1999, 21(2): 269 ~ 273.
- [8] Nei M, Li W H. Mathematical models for studying genetic distance in terms of restriction endonucleases[J]. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 1979, 76: 5269 ~ 5273.
- [9] 陈永久, 张亚平, 齐瑾, 等. 中国猪随机扩增多态 DNA 及其亚种分化关系[J]. *遗传学报*, 1998, 25(1): 16 ~ 21.