

# RAPD 分析山西主要地方山羊品种的遗传多态性

杜美红<sup>1</sup>, 李步高<sup>2</sup>, 周忠孝<sup>2</sup>

(1. 中国农业大学生物学院, 北京 100094; 2. 山西农业大学动物科技学院, 太谷 030801)

中图分类号: S827.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2005)02-0202-03

现代分子生物技术的飞速发展, 为动物育种提供了新的方法和手段, 在 DNA 水平上检测物种的遗传结构和遗传多样性, 越来越受到人们的重视。以 PCR 为基础的 DNA 多态性检测技术以其检测灵敏度高、操作简便、安全、快捷、经济等优点<sup>[1,2]</sup>, 逐步广泛地应用于动植物研究中。山西境内现存 3 个山羊群体, 分别为阳城白山羊、黎城大青羊和吕梁黑山羊<sup>[3]</sup>, 在长期自然选择的条件下, 各具特征, 生产性能和生存环境均有差异, 是良好的种质资源。通过对本地山羊 RAPD 标记进行研究, 分析它们的分子群体遗传结构, 以期了解其群体遗传多样性和亲缘关系, 为品种遗传资源的合理利用、科学管理以及保护生物多样性等提供基础资料和科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

山西省黎城种羊场的黎城大青羊 25 只(Q)、阳城山区的阳城白山羊 25 只(W)、吕梁山区的吕梁黑山羊 25 只(H); 随机抽取样本进行血液的采集, 采用常规酚-仿抽提法<sup>[4]</sup>提取基因组 DNA。

### 1.2 PCR 扩增及其电泳检测

先用 2 组共 40 个引物对各品种的 DNA 混合样进行扩增, 从中筛选出条带清晰且出现多态的引物共 10 个, 然后对每一个个体进行扩增。反应总体积为 25  $\mu$ L, 反应体系为灭菌三蒸水 12.5  $\mu$ L, 10 $\times$  Buffer (含 20 mmol/L MgCl<sub>2</sub>) 2.5  $\mu$ L, dNTPs 5  $\mu$ L, Taq 聚合酶 0.5  $\mu$ L (2 U/ $\mu$ L), 8 pmol/L 引物 2.5  $\mu$ L, 15 ng/ $\mu$ L 模板 DNA 2  $\mu$ L, 反应混合物用 20  $\mu$ L 石蜡油覆盖。反应程序<sup>[5]</sup>为: 94  $^{\circ}$ C 预变性 3

min; 94  $^{\circ}$ C 变性 1 min, 37  $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 40 个循环后 72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 4  $^{\circ}$ C 终止。每次 PCR 反应均设不含 DNA 模板的空白对照。反应产物以 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离, 以  $\lambda$ DNA/EcoRI+Hind III Marker 指示 DNA 扩增带的分子大小, 经 EB 染色后, 凝胶于紫外凝胶自动成像仪上观察电泳图谱, 并在紫外灯下拍照。

### 1.3 数据统计

遗传距离采用 Nei 氏<sup>[6]</sup>遗传距离计算片段共享度来计算个体间的遗传距离, 公式如下:

$$S_{ab} = 2N_{ab} / (N_a + N_b)$$

$$D = 1 - 2N_{ab} / (N_a + N_b)$$

其中:  $S_{ab}$  是个体  $a$ 、 $b$  相似性系数,  $N_a$  是  $a$  个体扩增的总带数,  $N_b$  是  $b$  个体扩增的总带数,  $N_{ab}$  是  $a$  个体和  $b$  个体共享有的带数。

遗传多样性指数采用 Shannon 指数<sup>[7]</sup>计算, 公式如下:

$$\text{各品种的遗传多样指数: } H_o = - \sum \pi \ln \pi$$

$$\text{总群体遗传多样性指数: } H_s = - \sum \pi \ln \pi$$

$$\text{各种群平均遗传多样性指数: } H_{pop} = 1/n \sum H_o$$

其中:  $\pi$  是一条扩增带在某种群内出现的频率,  $\pi$  为一条扩增带在总群体中的分布频率,  $n$  为种群数目。由此计算遗传多样性,  $H_{pop}/H_s$  为遗传多样性在群体内的比例,  $Gst = (H_s - H_{pop})/H_s$  则为遗传多样性在群体间所占比例。根据遗传距离, 采用 UPGMA 方法, 在 PHILIP 软件上构建反应群体间和个体间遗传关系的系统聚类图。

## 2 结果与分析

### 2.1 RAPD 扩增结果

用 10 条随机引物对 3 个品种 75 只山羊个体基因组 DNA 进行扩增, 共检测到 105 个位点, 其中 67 个为多态位点, 多态片段占总扩增片段比例为

收稿日期: 2003-11-21

基金项目: 山西省青年基金(20001041)

作者简介: 杜美红(1974-), 女, 山西太谷人, 博士生, 研究方向为生物化学与分子生物学。Tel: 010-62732144, E-mail: ligangcau@sina.com

63.81%, 地方山羊品种具有丰富的多态性。多态片段在不同山羊品种中的分布也不同, 黎城大青羊、阳城白山羊的多态频率(分别为 69.52%, 68.57%) 高于吕梁山羊(63.81%), 见表 1。

表 1 山羊品种 10 条引物 RAPD 扩增结果

Table 1 The results of RAPD amplification from 10 primers

引物	总条带数	不同条带数	多态标记在品种中的分布			多态频率/%
			Q	W	H	
OPP03	6	4	5	5	3	66.67
OPP08	11	9	8	7	7	81.81
OPP14	11	9	6	3	5	81.81
OPP15	13	8	10	8	9	61.54
OPP18	13	7	11	9	8	53.85
OPQ02	8	5	8	5	4	62.5
OPQ04	9	5	6	8	7	55.56
OPQ06	10	6	6	9	6	60
OPQ12	12	6	8	8	8	50
OPQ14	12	8	9	10	10	66.67
总数	105	67	73	72	67	
多态/%		63.81	69.52	68.57	63.81	

Q 代表黎城青山羊, W 代表阳城白山羊, H 代表吕梁黑山羊。下表同

Q, W, H denote Licheng Daqing, Yangcheng white and Luliang black goats respectively. The same below

表 2 山羊品种的遗传多样性指数( $H_0$ )

Table 2 The genetic diversity index ( $H_0$ ) of native goat breeds

引物 Primer	Q	W	H	$H_{pop}$	$H_{sp}$	$H_{pop} / H_{sp}$	$G_{st}$
OPP03	0.364 2	0	0	0.121 4	0.796 2	0.152 5	0.847 5
OPP08	0	0.424 7	0	0.141 6	0.825 6	0.171 5	0.828 5
OPP14	0.478 3	0.555 7	0.253 7	0.429 2	0.906 9	0.473 3	0.526 7
OPP15	0.647 1	0.533 8	0.146 9	0.442 6	0.987 6	0.448 2	0.551 8
OPP18	0.434 6	0.477 1	0.321 3	0.411 0	0.898 2	0.457 6	0.542 4
OPQ02	0.234 2	0	0.187 6	0.140 6	0.773 2	0.181 8	0.818 2
OPQ04	0	0.768 0	0	0.256 0	0.876 2	0.292 2	0.707 8
OPQ06	0	0.396 9	0	0.132 3	0.664 8	0.199 0	0.801 0
OPQ12	0.354 8	0	0.254 3	0.203 0	0.830 0	0.244 6	0.755 4
OPQ14	0.774 5	0.342 3	0.381 6	0.499 5	0.941 4	0.530 6	0.479 4
平均	0.328 8	0.349 9	0.154 5	0.277 7	0.850 0	0.315 1	0.684 9

### 2.3 3 个品种的遗传分化

根据 Nei 氏的群体间相似系数和片段共享度分

### 2.2 本地山羊品种的遗传变异

根据 10 条多态引物扩增的 RAPD 谱带在品种内的分布, 用 Shannon 指数计算了 3 个山羊品种的遗传多样性指数, 见表 2。黎城大青羊、阳城白山羊、吕梁黑山羊种内变异系数分别为 0.328 8、0.349 9、0.154 5, 群体遗传分化指数为 68.49%, 明显高于群体内分化指数 31.51%, 说明有 68.49% 的遗传变异存在于群体间。表明各品种遗传分化已比较明显, 李步高对山西地方山羊血液生化遗传分析及分类地位的研究中也证实了这一点<sup>[8]</sup>。本地山羊群体中, 阳城白山羊群体内发生变异程度最大。主要因为它们所处的自然环境优越, 当地农民群众进行精心选育和饲养管理的结果, 也与外来品种基因交流较多有关。所以在杂交改良的同时注意原种基因库的保存, 资源的合理利用。吕梁黑山羊遗传变异程度很小, 基本上处于原始品种状态。但是在长期自然生态环境条件作用下, 吕梁黑山羊对吕梁山区贫瘠恶劣的自然环境具有特殊的适应能力, 形成了自己独特的遗传资源。所以吕梁黑山羊现有的能够适应当地生态条件的有利基因必须加以保护, 防止丢失, 应在保护原有品种的基础上, 加以改良提高。

别计算得到 3 个品种间遗传距离以及个体间的相似系数(见表 3), 3 个品种间的遗传距离介于 0.182 7

~ 0.288 4。群体间相似系数 0.711 6~ 0.817 3, 用 UPGMA 方法将 3 个品种进行聚类, 从群体间聚类树状图(见图 1)可以看出, 黎城大青羊与阳城白山羊先聚成一类群, 亲缘关系接近, 而后与吕梁黑山羊又聚为一类, 亲缘关系较远。黎城大青羊、阳城白山羊所处的原始生态地理条件和人工选择的方向基本

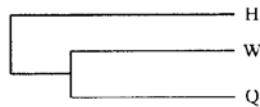


图 1 山西地方山羊 3 个品种的聚类图

Fig. 1 Dendrograms of three breeds of Shanxi native goats

表 3 山羊品种间的遗传相似系数及遗传距离

Table 3 The genetic distances and similarity coefficients among the native breeds

	Q	W	H
Q		0.817 3	0.711 6
W	0.182 7		0.805 0
H	0.288 4	0.195 0	

上三角数据为遗传相似系数, 下三角数据为 Nei 氏遗传距离

Upper triangle represents genetic similarity coefficients and lower triangle represents Nei's genetic distances

相同, 群体来源也较一致, 具有大致相同的生产性能, 因而遗传基础也较一致。

#### 参考文献:

- [1] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers [J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18: 7213~ 7218.
- [2] Williams J G, 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.
- [3] 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. 3~ 4.
- [4] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 [M]. 金冬雁, 黎孟枫, 侯云德, 等译. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1999.
- [5] 傅俊江, 李麓芸, 徐湘, 等. 一种提高 RAPD 技术扩增效率的有效方法 [J]. *遗传*, 2000, 22 (4): 251~ 252.
- [6] Nei M, Li W. Mathematical populations [J]. *AM Nature*, 1979, 106: 283~ 292.
- [7] Wachria F N, Waugh R, Hackett CA, et al. Detection of genetic diversity in tea (*Camellia Sinensis*) using RAPD markers [J]. *Genome*, 1995, 38: 201~ 210.
- [8] 李步高. 山西地方山羊血液生化遗传分析及分类地位的研究 [D]. 太谷: 山西农业大学, 1998.

## Genetic Variation of Shanxi Native Goat Breeds by RAPD Analysis

DU Meirong<sup>1</sup>, LI Burgao<sup>2</sup>, ZHOU Zhong-xiao<sup>2</sup>

(1. College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. College of Animal Science and Technology, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

**Abstract:** Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis was used with 10 primers to assess genetic variability in Shanxi native goats (Yangcheng White, Licheng Daqing, Lüliang Black). The results showed as follows: 1. The DNA of 3 breeds provided a great number of molecular markers with high polymorphism. 2. According to their RAPD fingerprinting map, the genetic distance and average band similarity among 3 breeds were calculated, 0.182 7 between Yangcheng White Goat and Licheng Daqing Goat is the smallest. Cluster analysis also showed that Licheng Daqing Goat and Yangcheng White Goat from alike region had a smaller distance. 3. The genetic diversity and its partition within and between populations of the 3 populations were calculated by using Shannon index. The genetic diversity index of Licheng Daqing, Yangcheng White, Lüliang Black were 0.328 8, 0.349 9 and 0.154 5 respectively, Genetic differentiation (Gst) was estimated to be about 68.49% among 3 populations. The results indicated that the genetic variation was mainly among breeds; the genetic character of Lüliang Black Goat was peculiar in native breeds indicating that protection and further selection should be strengthened.

**Key words:** RAPD; native goats; genetic distance; genetic variation