

西农萨能奶山羊随机微卫星扩增多态 DNA (RMAPD) 与经济性状的相关性

蓝贤勇¹⊙, 陈宏^{1,2}⊙*, 潘传英¹, 张永德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, 杨凌 712100;

2. 徐州师范大学细胞与分子生物学研究所, 徐州 221116)

摘要: 利用随机微卫星扩增多态 DNA (RMAPD) 技术分析 69 只西农萨能奶山羊基因组 DNA 的多态性与产奶性状(第 1~5 胎产奶量和平均产奶量)、产羔数(第 1~5 胎产羔数和平均产羔数)和体尺指标(初生重、成年体重、胸围、管围、体高、体斜长)的相关性。RMAPD 与 3 个经济性状的相关性结果表明: 66 个标记条带分别对产奶量、产羔数及初生重、体重、体高等体尺指标有显著或极显著的标记效应 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。其中, 23 个标记条带(14 个正向效应标记和 9 个负向效应标记)与产奶量有关, *HEL1r*+F09 的 C、D、J、K 和 L 带对第 3~5 胎及平均产奶量有显著的标记效应, 尤其是 J 带对第 5 胎产奶量有极显著的正向标记效应; 23 个标记条带(11 个正向效应标记和 12 个负向效应标记)与产羔数有关, *HEL1r*+F09 的 J 带、*MF20f*+P4 的 H 带、*HEL1f*+F09 的 E 带和 *MF20f*+F09 的 A、D 带对产羔数有极显著的标记效应; 20 个标记条带(9 个正向效应标记和 11 个负向效应标记)与体尺指标有关, *HEL1f*+F09 的 G 带、*HEL1r*+F09 的 E 带对初生重有极显著的标记效应, *HEL1r*+OPW19 的 M 带对胸围有极显著的标记效应 ($P < 0.01$)。

关键词: 奶山羊; 随机微卫星扩增多态 DNA (RMAPD); 产奶量; 产羔数; 体尺指标

中图分类号: S827.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2006)06-0523-07

Association of Random Microsatellite Amplification Polymorphic DNA with Economic Traits in Xinong Saanen Dairy Goat

LAN Xian-yong¹⊙, CHEN Hong^{1,2}⊙*, PAN Chuan-ying¹, ZHANG Yong-de¹

(1. College of Animal Science and Technology, Northwest Agriculture and Forestry University, Shaanxi Key Laboratory of Agricultural Molecular Biology, Yangling 712100, China;

2. Institute of Cellular and Molecular Biology, Xuzhou Normal University, Xuzhou 221116, China)

Abstract: Random microsatellite amplification polymorphic DNA (RMAPD) technique was used to analyze association of polymorphisms of Xinong Saanen dairy goats with economic traits (including milk yields in different lactations, litter size in different birth and body sizes such as birth weight, body weight, stature, body size, shank girth and heart girth). The results about associations of RMAPD with three economic traits indicated that 66 bands had significantly effect on milk yield, litter sizes and body sizes ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Among those, 23 bands (including 14 positive bands and 9 negative bands) significantly affected milk yield, especially band C, D, J and K of *HEL1r*+F09 which produced significantly effect on milk yield from third lactation to

收稿日期: 2005-06-22

基金项目: 国家自然科学基金(30070551); 农业部留学人员活动基金(1999-12D); 陕西省自然科学基金(99SM06); 西北农林科技大学拔尖人才支持计划; 西北农林科技大学研究生教育创新计划项目(05YCH018)资助

作者简介: 蓝贤勇(1979-), 男, 江西南康人, 博士生, 主要从事动物遗传学研究; E-mail: lan342@163.com; ⊙: 并列第一作者

* 通讯作者: 陈宏(1955-), 男, 陕西西安人, 教授、博导, 主要从事生物技术与动物遗传育种研究; E-mail: chen hong1212@263.net

fifth lactation and average milk yields; 23 bands (including 11 positive bands and 12 negative bands) significantly affected litter sizes, especially band J of *HEL1r*+F09, band H of *MFW20f*+P4, band E of *HEL1f*+F09, band A and D of *MFW20f*+F09 which significantly associated with litter sizes; 20 bands (including 9 positive bands and 11 negative bands) had significantly effect on body sizes. For example, band G of *HEL1f*+F09, band E of *HEL1r*+F09 significantly associated with birth weight, and band M of *HEL1r*+OPW19 produced the same marked effect on heart girth ($P < 0.01$).

Key words: dairy goat; random microsatellite amplification polymorphic DNA (RMAPD); milk yield; litter size; body sizes

随机微卫星扩增多态 DNA (random microsatellite amplification polymorphic DNA, RMAPD) 是利用随机引物和微卫星上游或下游引物一起作为扩增的引物, 在 *Taq* DNA 聚合酶及其缓冲液、dNTPs 和模板 DNA 等共同作用下进行 PCR 扩增的一种新型分子标记^[1-4]。由于 RMAPD 标记也具有 DNA 标记的特点, 因此, RMAPD 和 RAPD、RFLP、微卫星等其他分子标记一样在动物遗传育种方面具有广阔的应用前景, 如: 群体遗传结构分析、物种亲缘关系鉴定、标记辅助选择、基因组图谱构建、杂种优势预测等领域。

然而目前, RMAPD 标记技术在遗传育种领域的标记研究工作还未开展。为此, 本研究首次利用 RMAPD 技术对 69 只西农萨能奶山羊基因组 DNA 进行标记研究, 拟分析 RMAPD 与产奶量、产羔数和体尺指标之间相关性, 从而发现适用于经济性状标记辅助选择的 DNA 标记, 以期为 RMAPD 的应用提供参考, 为奶山羊的遗传育种提供资料。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

所用血样来自陕西千阳种羊场核心群的无血缘关系的 69 只西农萨能奶山羊, 每只颈静脉采血 10 mL, 抗凝剂抗凝, 低温带回实验室, 并置于 -80°C 保存备用; 同时, 收集该羊场前 5 胎产奶量和产羔数资料及体尺指标记录(初生重、成年体重、体高、体斜长、胸围和管围)。64 条随机引物和 13 对牛微卫星引物(如 *HEL1*)、6 对绵羊的微卫星引物(如 *BMS2508*)和 2 对鱼微卫星引物(如 *MFW20*), 由上海生物工程有限公司合成。其中, 部分随机引物和微卫星引物序列及其相关信息见表 1。 *Taq* DNA 聚合酶及其缓冲液、 MgCl_2 、dNTPs、SD004 marker 等购自 Fermentas 公司。

1.2 基因组 DNA 的分离、稀释与混合 DNA 池的制备

血样基因组 DNA 的分离参照 Chen 等^[5]的方法; 用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度法检测 DNA 的纯度与浓度; 将高纯度 DNA 稀释为 $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$, 4°C 保存, 用于 RMAPD 分析; 据西农萨能奶山羊的前 5 胎产奶量和产羔数数据及初生重、成年体重、体高、体斜长、胸围和管围等资料分别将 69 份基因组 DNA 分为不同的高产组(大于群体 1 个标准差以上)和低产组(低于群体 1 个标准差以下), 然后按组以每份基因组 DNA $25 \mu\text{L}$ 的量等量混合制备不同的 DNA 池, 用于 RMAPD 引物的筛选。

1.3 RMAPD 反应

参考 RMAPD 正交试验的体系^[1,6]并略作调整, 建立适用本研究的 RMAPD 体系: $1.6 \mu\text{L}$ $10 \times$ PCR 缓冲液, $2.0 \mu\text{L}$ MgCl_2 (25 mmol/L), $1.6 \mu\text{L}$ *Taq* DNA 聚合酶 ($0.5 \text{ U}/\mu\text{L}$), $0.64 \mu\text{L}$ dNTPs (2.5 mmol/L), $0.32 \mu\text{L}$ 微卫星上游或下游引物 (P_M) (10 pmol/L), $0.8 \mu\text{L}$ 随机引物 (PR) (10 pmol/L), $11.2 \mu\text{L}$ DNA 模板 (50 ng/mL), $9.04 \mu\text{L}$ 超纯水, 总计 $20.0 \mu\text{L}$; 参考 RAMP 程序^[7]并略作调整: 95°C 预变性 4 min \rightarrow 40 个循环 (94°C 变性 30 s \rightarrow X $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s \rightarrow 72°C 延伸 45 s \rightarrow 94°C 变性 30 s \rightarrow 36°C 退火 60 s \rightarrow 72°C 延伸 90 s) \rightarrow 72°C 最后延伸 10 min (注: X $^{\circ}\text{C}$ 为不同微卫星引物的退火温度)。

1.4 RMAPD 引物筛选及 RMAPD 产物的电泳检测

利用 64 条随机引物和 42 条微卫星上游或下游引物组合的 RMAPD 引物, 在相同 RMAPD 体系和程序等条件下对不同的混合 DNA 池进行扩增, 筛选出确切的随机引物和微卫星引物组合的 RMAPD 引物; 挑选扩增带纹明亮、条带清晰且在高产组和低产组间产生差异的 RMAPD 引物用于西农萨能奶

山羊基因组 DNA 的 RMAPD 研究;利用 RMAPD 引物对奶山羊基因组 DNA 进行 RMAPD 研究;

RMAPD 产物用 4% 琼脂糖凝胶电泳检测,并用 KODAK120 系统成像、统计条带大小。

表 1 RMAPD 中所用微卫星和 RAPD 序列及其相关信息

Table 1 Sequences of microsatellite and random primers in RMAPD primers and their information

引物 Primers	名称 Name	引物序列 Primer sequences	退火温度 Annealing T/°C	简称 Abbreviations
微卫星引物 Microsatellite primers(PM)	BMS2508	F: TTTCTGGGA TTACAA AATGCTC	63	BMS2508f
		R: TTTCTTAGGGGAGTGTGTTGATTC		BMS2508r
	MFW20	F: CAGTGAGACGATTACCTTGG	58	MFW20f
		R: GTGAGCAGCCAACATTGAAG		MFW20r
HEL1	F: CAACAGCTATTTAAC AAGAAGGA	56	HEL1f	
	R: AGGCTACAGTCCATGGGATT		HEL1r	
随机引物 Random primers (PR)	P4	CTAGACACCCA	36	P4
	OPW19	CAAAGCGCTC	36	OPW19
	F09	CCAAGCTTCC	36	F09

1.5 RMAPD 的数据分析

RMAPD 是系列谱带,属于多位点标记,故采用 Lynch^[8]方法进行分析。统计指标包括带纹相似率(BSR)、基因频率(q)、平均杂合度(h)及遗传多样性指数(H): $-\sum Mi \ln Mi$ (注:i=1,2,3...n), 其中, M_i 是第 i 条扩增带在群体内出现的频率。这些指标利用 Excel 表格和自编 C++ 程序进行统计分析。

1.6 RMAPD 与产奶量、产羔数和体尺指标间的统计分析

统计 RMAPD 扩增条带时,记有该标记的个体为“1”,记没有的为“0”;把“1”、“0”作为两种基因型,有多态扩增条带产生的位点当作多型基因位点;群体中的某个基因型个体数大于 3 时才进行统计分析。利用以下线性模型,借助 SPSS(11.0)软件分析 RMAPD 标记条带对产奶量、产羔数、初生重等体尺指标的效应值。

RMAPD 标记条带效应值的最小二乘分析模型: $Y_{ij} = \mu + G_i + E_{ij}$

其中: Y_{ij} —第 i 条带的经济性状观察值; μ —为群体均值;

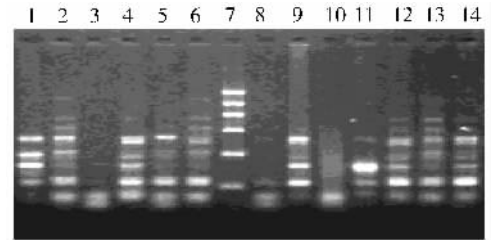
G_i —第 i 条带的效应值; E_{ij} —随机误差。

2 结果与分析

2.1 西农萨能奶山羊 RMAPD 遗传结构分析

本研究从西农萨能奶山羊群体不同高、低生产组中筛选出 7 对 RMAPD 引物对基因组 DNA 进行 RMAPD 扩增,发现扩增条带清晰、带纹明亮且多态

性丰富(见图 1)。据产物电泳图谱,对每个引物的扩增片段按带纹分子量由大到小的顺序编号,依次定为 A,B,C,...。分别计算每条带纹的基因频率,统计每个个体的扩增产物的带数,进而计算了群体的条带共享率(BSR)与遗传多样性指数(H)。



7. SD004 marker ;其余.不同个体

7. SD004 marker ; Others lanes are different individuals

图 1 RMAPD(MFW20f+P4)产物电泳图

Fig. 1 The electrophoresis pattern of PCR products for MFW20f+P4 in Saanen goat

片段统计结果显示:片段大小为 102 ~ 1 120 bp,共扩增出群体 1 467 条总条带,79 条位置不同的条带,其中 68 条具有多态性,多态带频率为 68/79 即 86.1%。经统计分析发现,西农萨能奶山羊群体的 BSR 的变化幅度:0.385~0.576, H 的变化幅度:1.970~4.490, q 值变化幅度:0.216~0.349, h 的变化幅度:0.789~0.879。

2.2 RMAPD 标记条带与产奶量的相关分析

RMAPD 标记条带与西农萨能奶山羊前 5 胎及平均奶量的相关分析结果表明(见表 2):在显著水

准 $P=0.05, 0.01$ 水平上共发现 23 个标记条带(14 个正向效应标记和 9 个负向效应标记);与第 1~5 胎及平均产奶量显著相关的标记数分别是 4、3、3、

6、4 和 3 个; *HEL1r*+*F09* 的 C、D、J、K 和 L 带对第 3~5 胎产奶量有显著的标记效应,尤其是 J 带对第 5 胎产奶量有极显著的正向标记效应。

表 2 RMAPD 标记条带与西农萨能奶山羊产奶量的相关分析

Table 2 Association of marker bands in RMAPD with milk yields in Xinong Saanen goat

引物(P_M+P_R)	带纹 Band	带型 Type	第 1 胎 1 st lactation	第 2 胎 2 nd lactation	第 3 胎 3 rd lactation	第 4 胎 4 th lactation	第 5 胎 5 th lactation	平均 Average
<i>BMS2508f</i> + <i>P4</i>	C	0	381.18	606.42	492.74	743.98	700.80	595.41
		1	382.84	616.90	673.47*	756.52	633.24	559.79
	D	0	376.78	618.67	666.59*	756.99	633.24	559.62
		1	418.60	593.58	473.35	739.68	700.80	605.46
<i>HEL1f</i> + <i>F09</i>	J	0	362.67	496.01	608.35	652.94	643.75	537.09
		1	379.74	610.47*	625.85	771.95*	692.85	595.36*
<i>HEL1r</i> + <i>F09</i>	C	0	396.30	597.73	620.45	623.50	581.18	556.51
		1	379.26	562.87	625.92	745.31*	686.24	590.23
	D	0	347.61	569.35	639.75	633.18	622.52	568.28
		1	403.60	579.16	614.40	750.96*	669.30	583.44
	J	0	379.88	575.75	643.64	701.48	592.03	568.18
		1	410.23	573.35	535.66	761.82	797.40**	625.08
	K	0	356.02	584.62	579.42	728.77	731.80*	793.85
		1	397.90	570.21	649.32	711.55	578.23	579.99
	L	0	384.42	548.42	578.91	695.98	690.23	551.38
		1	385.69	623.54	694.59*	740.51	597.40	623.85*
<i>MFW20f</i> + <i>F09</i>	G	0	382.44*	625.85	609.98	759.68	768.78*	586.54
		1	363.08	502.45	651.00	699.20	616.23	572.58
	H	0	383.76*	663.82	630.20	—	—	567.45
		1	371.35	538.44	624.03	—	—	590.12
	O	0	362.62	582.30	623.56	734.08	—	573.47
		1	555.50	589.50	667.10	797.10	—	731.11*
P	0	379.27	572.53	666.39	748.03	669.96	587.70	
	1	364.17	618.59*	480.93	707.64	760.17	559.52	
<i>HEL1r</i> + <i>OPW19</i>	H	0	402.03	595.95	621.53	761.86*	692.61	591.85
		1	376.87	528.40	571.63	674.37	719.23	582.46
<i>MFW20f</i> + <i>P4</i>	B	0	392.05	598.68*	640.58	738.18*	690.93	601.31
		1	403.53	474.93	510.71	705.48	602.72	565.72
	E	0	329.64	545.09	613.00	732.73	725.46	567.67
		1	416.10*	590.03	615.08	730.01	664.63	604.86
I	0	383.60	551.88	593.31	686.72	680.26	581.46	
	1	407.68	609.18	634.72	774.55*	683.11	613.66	
<i>MFW20r</i> + <i>P4</i>	D	0	374.84	581.51	611.11	707.82	640.66	575.46
		1	426.33	302.32	605.17	757.10	778.46*	609.09
	E	0	400.44*	585.16	607.00	722.84	675.05	582.73
		1	283.20	600.63	625.45	711.27	779.40	592.27

“0”. 无扩增条带;“1”. 有扩增条带; P_M . 微卫星引物; P_R . 随机引物; “—”. 因结果分析中样本量不到 3 而未进行结果统计; * . $P<0.05$; * * . $P<0.01$

“0”. No band; “1”. Band; “ P_M ”. Microsatellite primer; “ P_R ”. Random primer; “—”. No statistical data; * . $P<0.05$; * * . $P<0.01$

2.3 RMAPD 标记带纹与产羔数的相关分析

RMAPD 标记条带与西农萨能奶山羊前 5 胎及平均产羔数的相关分析结果表明(见表 3):在 $P=0.05, 0.01$ 水平上共发现 23 个标记条带(11 个正向效应标记和 12 个负向效应标记);与第 1、2 和 4 胎及平均产羔数显著相关的标记数分别是 7、6、4 和 6

个;*HEL1r*+F09 的 C、D、J 带对第 1、2、4 胎及平均产羔数的标记效果很好,尤其是 J 带对第 1 胎产羔数有极显著的负向标记效应;此外,*MFW20f*+P4 的 H 带、*HEL1f*+F09 的 E 带对第 1 胎产羔数有极显著的标记效应;*MFW20f*+F09 的 A、D 带也具有极显著的标记效应。

表 3 RMAPD 标记条带与西农萨能奶山羊产羔数的相关分析

Table 3 Association of marker band in RMAPD with litter sizes in Xinong Saanen goat litter size

引物(P_M+P_R)	带纹 Band	带型 Type	第 1 胎 1 st lactation	第 2 胎 2 nd lactation	第 3 胎 3 rd lactation	第 4 胎 4 th lactation	第 5 胎 5 th lactation	平均 Average
<i>BMS2508f</i> +P4	C	0	1.000	2.000	2.000	2.000	2.000	1.967
		1	1.500*	1.850	1.900	2.000	2.333	1.870
<i>HEL1f</i> +F09	E	0	1.700**	1.790	1.929	1.917	1.800	1.896
		1	1.000	1.846	1.800	2.000	2.250	1.861
	F	0	1.667	2.000*	1.889	2.000	2.000	1.993*
		1	1.556	1.571	1.900	1.889	2.000	1.724
M	0	2.000	2.100*	2.000	2.000	2.000	2.118*	
	1	1.375	1.682	1.846	1.939	2.000	1.778	
<i>HEL1r</i> +F09	C	0	1.333	1.692	2.000	1.333	1.500	1.678
		1	1.636	1.952	1.917	2.083*	2.250	1.990*
	D	0	2.000	1.583	2.000	1.333	1.667	1.667
		1	1.400	2.000*	1.900	2.083*	2.333	1.997*
	J	0	1.667**	1.862	1.941	1.727	1.750	1.865
		1	1.000	1.800	2.000	2.500*	2.500	1.929
<i>MFW20f</i> +F09	A	0	1.625**	2.000	1.938	1.833	1.750	1.927
		1	1.000	1.667	1.667	2.000	2.000	1.800
	D	0	1.455	1.875	1.867	1.857	1.778	1.825
		1	—	2.333*	2.000	—	2.000	2.286**
<i>MFW20f</i> + P4	B	0	1.533	1.800	1.895	2.000	2.000	1.849
		1	—	2.000*	2.000	1.667	2.000	1.976
	D	0	1.571	1.793	1.882	1.933	2.000	1.848
		1	1.000	2.000*	2.000	2.000	2.000	1.942
H	0	1.615**	1.828	1.878	1.941	2.000	1.866	
	1	1.000	1.800	2.000	2.000	2.000	1.881	
<i>MFW20r</i> +P4	C	0	1.625*	1.938	1.875	2.250*	2.000	1.913
		1	1.000	12.765	1.889	1.714	2.167	1.802
	G	0	1.714*	1.909	2.000	2.000	2.125	1.951*
		1	1.000	1.727	1.667	2.000	2.000	1.673

2.4 RMAPD 标记条带与体尺指标的相关性分析

RMAPD 标记条带与西农萨能奶山羊出生重、体重及体尺指标的相关分析结果表明(见表 4):在 $P=0.05, 0.01$ 水平上发现 20 个标记条带(9 个正向

效应标记和 11 个负向效应标记);*HEL1f*+F09 的 G 带、*HEL1r*+F09 的 E 带对初生重有极显著的标记效应,*HEL1r*+OPW19 的 M 带对胸围有极显著的标记效应($P<0.01$)。

表 4 RMAPD 标记条带与西农萨能奶山羊体尺及初生重等指标的相关分析

Table 4 Association of marker band in RMAPD with body sizes in Xinong Saanen goat

引物 (P _M +P _R)	带纹 Band	带型 Type	初生重/kg Birth weight	体高/cm Stature	体斜长/cm Body size	胸围/cm Heart girth	管围/cm Shank girth	体重/kg Body weight
BMS2508f+P4	B	0	3.15	66.67	76.56	84.89	8.30	45.38
		1	3.35	69.89*	80.22*	87.89	8.33	50.33*
	C	0	3.03	71.33*	78.66	88.67	8.00	50.67
		1	3.27	67.67	78.33	85.93	8.38*	47.33
	D	0	3.27	67.67	78.33	85.93	8.38*	47.30
		1	3.03	71.33*	78.67	88.67	8.00	50.67
HEL1f+F09	G	0	3.33	68.79	78.21	85.29	8.25	46.64
		1	3.70**	70.67	78.50	86.00	8.33	48.83
	K	0	3.39	69.93*	78.55	85.91	8.30	47.89
		1	3.42	66.00	77.10	83.40	8.10	44.00
HEL1r+F09	E	0	3.61**	69.58*	78.28	86.89*	8.29	47.92
		1	2.91	66.00	76.94	83.63	8.25	45.25
MFW20f+F09	D	0	3.48*	69.93	77.90	85.43	8.24	47.19
		1	2.93	68.00	80.30	84.00	8.64	47.20
	G	0	3.55*	70.38	78.06	85.12	8.39	47.65
		1	3.13	68.00	78.94	85.44	8.17	46.33
	J	0	3.40	69.60	77.98	84.57	8.27	46.78
		1	3.20	70.00	81.33	90.33*	8.67	50.33
HEL1r+OPW19	C	0	3.13	66.50	76.88	84.38	8.25	45.69
		1	3.45	70.25*	79.84*	86.14	8.25	47.93
	M	0	3.44	69.96	78.31	87.08**	8.35	48.50
		1	3.07	67.33	78.95	83.22	8.11	45.11
MFW20r+P4	A	0	3.44*	68.64	78.30	85.40	8.25	47.22
		1	2.80	70.00	76.00	87.00	8.00	43.00
	H	0	3.76*	68.40	77.40	85.80	8.20	48.80
		1	3.32	68.76	78.40	85.38	8.25	46.64

3 讨论

3.1 RMAPD 标记的可靠性

随机微卫星扩增多态 DNA (RMAPD) 是以随机引物和微卫星上游或下游引物一起作为扩增引物的标记方法。张永德等^[1,3] 和蓝贤勇等^[2,4] 对 RMAPD 与微卫星标记、RAPD 标记进行比较性研究,发现它们的主要区别在于:①引物不同:微卫星标记引物包括微卫星上游和微卫星下游引物;RAPD 引物长度一般为 9~11 bp,系随机单引物;RMAPD 引物是随机引物和微卫星上游或下游引物的组合。②扩增程序不同:RMAPD 扩增是随机引物程序和微卫星扩增程序的组合,其扩增时间大约是 RAPD 和微卫星扩增时间的总和。③重复性不同:RMAPD 标记的重复性介于两者之间。由此可见,RMAPD 标记有别于微卫星和 RAPD 标记,但

是它们之间有相似之处。因此,认为 RMAPD 标记是一种新型分子标记,系 RAPD 标记的一种广义的延伸,但又不完全等同于 RAPD 标记^[1,2]。由于该标记方法中含有随机引物,故能影响 RAPD 的因素也可能影响 RMAPD。陈宏等^[6] 详细分析了影响 RAPD 标记可重复性和稳定性的几种因素,指出引物的种类、长度、浓度、DNA 的质量和浓度、扩增条件和操作技术等对 RAPD 结果有影响,说明在进行生物遗传分析时必须进行 RAPD 方法的优化和标准化,这样才能够得到可靠、稳定的结果。本研究中,西农萨能奶山羊血样 DNA 的质量非常好,没有降解,且 DNA 样品还进行了纯化,这为 RMAPD 的可靠性提供了坚实的基础;此外,本研究严格控制实验条件,反复试验 RMAPD 程序,还利用正交试验设计筛选 RMAPD 扩增体系^[1,3],这些为 RMAPD 的可靠性提供了良好的保证。

3.2 RMAPD 标记条带与西农萨能奶山羊经济性状的相关性

本研究首次利用 RMAPD 方法扩增西农萨能奶山羊基因组 DNA 79 个基因位点,并分析这些基因位点与产奶量、产羔数和体尺指标之间的相关性,发现 *HEL1r*+F09 等 7 对 RMAPD 引物的 23 个标记条带与西农萨能奶山羊产奶量有显著或极显著相关($P<0.05$, $P<0.01$), *MFW20f*+F09 等 6 对 RMAPD 引物的 23 个标记条带与产羔数显著或极显著相关($P<0.05$, $P<0.01$), *HEL1r*+OPW19 等 6 对 RMAPD 引物的 20 个标记条带与初生重等体尺指标显著或极显著相关。其原因可能是这些扩增位点与影响产奶量、产羔数以及初生重、体重、体高等体尺指标的某染色体某功能 DNA 片段连锁,或这些扩增位点本身就是这些功能 DNA 片段的一部分;其原因还可能是这些扩增位点与影响奶山羊早期发育的早期发育基因连锁,亦或这些位点本身就是早期发育基因的组成部分。结果提示,这些 RMAPD 为点对产奶量、产羔数及其他等经济性状有显著或极显著的影响。

本研究还发现 *HEL1r*+F09 标记条带对产奶性状、产羔性状和初生重、体高等体尺指标均有显著标记效应,尤其是 J 带对第 5 胎产奶量有极显著的正向标记效应、J 带对第 1 胎产羔数有极显著的负向标记效应、E 带对初生重有极显著的标记效应,提示这些扩增位点很可能与影响山羊产奶、产羔和生长发育的早期功能 DNA 片段有较为紧密的连锁关系,亦或本身就是影响早期生长发育的功能 DNA 片段,因为影响生长发育的早期功能 DNA 片段能产生“一因多效”的现象;*HEL1f*+F09 的 E 带、G 带分别对产羔数和初生重有极显著的标记效应,也可能是基因的“一因多效”的结果。

3.3 RMAPD 标记与奶山羊经济性状的选择

奶山羊产奶性状、产羔性状是非常复杂的数量性状,受遗传和环境因素的共同影响,且均为遗传力较低的数量性状,尤其是产羔性状的遗传力一般只有 0.1 左右。利用标记辅助选择(MAS)选育,可以缩短这些性状的选择时间、加大强度以及提高准确性,从而极大地提高了这种低遗传力性状的遗传进

展,达到选育提高的目的。本研究分析 RMAPD 标记条带与西农奶山羊产奶量、产羔数的相关性发现, *HEL1r*+F09、*MFW20f*+F09 等标记对产奶量有显著影响,为此,它们可作为产奶性状标记辅助选择有效的单分子标记;*HEL1r*+F09 的 J 带、*HEL1f*+F09 的 E 带、*MFW20f*+P4 的 H 带和 *MFW20f*+F09 的 A 带对第 1 胎产羔数有极显著的影响,为此,此 4 个标记条带可作为产羔数性状标记辅助选择的有效的联合分子标记。如果在育种实践中能利用这些联合分子标记对产羔数进行选择,不仅可以提高选择的准确度和精确度,还可以提高奶山羊群体的产羔数。此外,认为 *HEL1r*+F09 的 G 带、*HEL1r*+OPW19 的 M 带等亦可作为奶山羊初生重、体重等标记辅助选择的有效分子标记。

参考文献:

- [1] 张永德,范光丽,雷初朝,等. 朱鹮随机微卫星扩增多态 DNA(RMAPD)研究[J]. 遗传, 2005, 27(6): 915~918.
- [2] 蓝贤勇,陈宏,张永德,等. 一种新型的分子标记方法——随机微卫星扩增多态 DNA(RMAPD)[J]. 遗传, 2006, 28(1): 78~84.
- [3] 张永德. 朱鹮人工饲养种群的 DNA 多态性研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2004.
- [4] 蓝贤勇. 西农萨能奶山羊经济性状的 DNA 分子标记及 5 个山羊品种 DNA 多态性研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2004.
- [5] Chen H, Leibenguth F. Studies on multilocus fingerprints, RAPD markers and mitochondrial DNA of a gynogenetic fish (*carassius auratus gibelio*) [J]. *Biochemical Genetics*, 1995, 33: 297~306.
- [6] 陈宏,孙维斌,雷初朝,等. RAPD 标记稳定性的影响因素探析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2003, 31(5): 139~142.
- [7] Wu K S, Jones R, Danncherger L, *et al.* Detection of microsatellite polymorphisms without cloning[J]. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22: 3 527~3 258.
- [8] Lynch M. The similarity index and DNA fingerprinting [J]. *Molecular Biological Evolution*, 1990, 7(5): 478~484.