

云南鹅群体遗传结构的随机扩增多态 DNA 分析*

王 磊¹, 霍金龙¹, 苗永旺^{1,2} * *

(1. 云南农业大学动物科学技术学院, 云南 昆明 650201;
2. 云南大学生物资源保护与利用国家重点实验室, 云南 昆明 650091)

摘要: 采用随机扩增多态性 DNA 标记技术对云南鹅主产区 6 个不同地点的 45 个个体进行了群体遗传学分析, 从 85 个随机引物中筛选出的 23 个引物对所有个体的总基因组 DNA 进行了 PCR 扩增, 共检测出 178 条 DNA 片段, 其中 150 条属多态性片段 (多态率 84.27%), 计算了各座位在群体中的基因频率、杂合度和群体 Shannon 多样性指数等参数。结果表明: 云南鹅的群体遗传变异较丰富。

关键词: 云南鹅; 遗传多样性; RAPD; 杂合度; Shannon 多样性指数

中图分类号: S 835.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-390X(2007)02-0265-05

Analysis of Population Genetic Structure of Yunnan Goose Using RAPD Markers

WANG Lei¹, HUO Jin-long¹, MIAO Yong-wang^{1,2}

(1. Faculty of Animal Sciences, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;
2. Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-resources, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract: In this study, random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was used to analysis the genetic diversity of 45 samples from 6 different areas in the hometown of the yunnan goose. 23 polymorphic primers which had been screened out from 85 primers were used to amplify the total genome DNA of 45 yunnan geese, 178 bands were assayed, of which 150 bands (84.27%) were polymorphic. The allele frequencies at each locus, genetic heterozygosity, Shannon index of genetic diversity had been calculated. The results indicated that there is rich variation in the population of Hunan goose.

Key words: Yunnan goose; genetic diversity; RAPD; heterozygosity; Shannon index of genetic diversity

鹅属食植物性饲料的水禽, 在云南多饲养在水草丰富的坝区。云南鹅主要分布在大理、楚雄、文山、德宏、玉溪等地, 以回族和傣族集居的村落饲养较多^[1]。根据毛色, 云南鹅分为灰鹅和白鹅两种类型, 具有早期生长发育快、抗病力强、耐粗饲、耗料少等特点^[1]。云南鹅脖颈细长、前躯上倾、额上有疣状突起等, 具有中国鹅的典型特征^[1]。以往对其群体遗传背景的研究较少, 仅见史宪伟等^[2]采用 mtDNA RFLP 标记从核外基因组的研究, 为了

合理保护和利用云南鹅遗传资源, 从全基因组水平对其群体遗传结构和群体遗传变异研究具有重要的现实意义。

群体遗传结构的研究, 是生物遗传多样性评价的重要内容, 也是遗传资源保护和利用的基础^[2]。目前, 群体遗传结构及遗传多样性检测的方法很多, 但随机扩增多态 DNA (RAPD) 标记自从 20 世纪 90 年代初产生以来, 以其操作简单快捷、检测能覆盖整个基因组 DNA、样品用量少、灵敏度高等待

收稿日期: 2006-06-12

* 基金项目: 云南省教育厅科学研究基金项目资助(5Y0196B)。

* * 通讯作者

作者简介: 王磊(1984-), 女, 黑龙江哈尔滨市人, 硕士研究生, 主要从事动物分子遗传学的研究。

点,为群体遗传结构分析、遗传多样性评价、品种鉴定、亲缘关系和物种的起源与分化研究等提供了强有力的手段。RAPD-PCR 技术产生的大量多态 DNA 标记,已广泛用于分析家禽群体内、群体间及品系内个体间的遗传变异^[3]。SMITH 等^[4]利用 RAPD 标记通过 4 个不同鸡种和 2 个火鸡种内的遗传多态性和种间的遗传关系研究,很好的反映了群体的育种历史;毛国祥等、郝家胜等^[5~7]采用 RAPD 标记对中国鹅的一些品种进行了群体遗传学分析,阐明了所研究鹅品种的群体遗传变异和遗传多样性。本文采用 RAPD 标记对云南鹅群体遗传结构进行分析,探讨其群体内的遗传变异程度,以期摸清云南鹅种质资源的遗传背景,进而为其保存和选育利用提供遗传学依据。

1 材料与方 法

表 1 23 个随机引物序列及 RAPD 的扩增结果

Tab. 1 The Sequences of Primers screened and the PCR results

引物 primer	序列 sequence of primer	扩增条带数 total No. of bands	多态标记数 No. of Plyomorphic bands	多态频率/% frequency of Plyomorphic bands	引物 primer	序列 sequence of primer	扩增条带数 total No. of bands	多态标记数 No. of Plyomorphic bands	多态频率/% frequency of Plyomorphic bands
S4	5' GGACTGGAGT 3'	4	4	100	S130	5' GGAAGCTTGG 3'	9	9	100
S5	5' TGCGCCCTTC 3'	6	6	100	S83	5' GAGCCCTCCA 3'	12	7	58.33
S6	5' TGCTCTGCCC 3'	7	7	100	S84	5' AGCGTGTCTG 3'	7	3	42.86
S7	5' GGTGACGCAG 3'	9	6	66.67	S86	5' GTGCCTAACC 3'	7	7	100
S8	5' GTCCACACGG 3'	10	10	100	S88	5' TCACGTCCAC 3'	5	5	100
S17	5' AGGGAACGAG 3'	6	5	83.33	S92	5' CAGCTCACGA 3'	7	2	28.57
S42	5' GGACCCAACC 3'	9	5	55.56	S94	5' GGATGAGACC 3'	6	5	83.33
S43	5' GTCGCCGTCA 3'	8	7	87.50	S97	5' ACGACCGACA 3'	11	9	81.82
S47	5' TTGGCACGGG 3'	11	11	100	S104	5' GGAAGTCGCC 3'	5	4	80.00
S53	5' GGGGTGACGA 3'	8	7	87.50	S105	5' AGTCGTCCCC 3'	5	4	80.00
S60	5' ACCCGGTGAC 3'	8	7	87.50	S113	5' GACGCCACAC 3'	11	10	90.91
S129	5' CCAAGCTTCC 3'	7	7	100					

1.4 PCR 反应条件及电泳检测

RAPD 反应总体积为 20 μ L,其中含 10 \times Buffer 2 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 1.6 μ L, 2 mmol/L MgCl₂ 1.6 μ L, 5 pmol/ μ L 引物 4 μ L, 13 ng/ μ L 模板 DNA 1 μ L, 0.3 μ L Taq 酶(上海 Sangon 生物工程有限公司)。反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,然后 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,36 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,循环 45 次,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物在 2% 琼脂糖凝胶上电泳检测。

1.5 数据处理与统计分析

利用 Labwork 4.5 软件,根据电泳结果确定每个随机引物扩增条带的大小。

1.1 材料

云南鹅 45 份血样采自永平、潞西、新平、腾冲、文山、景洪等县市农村,个体间避免存在血缘关系,公母各半。每只鹅静脉采血 2 mL,肝素钠抗凝,然后与等体积的 DNA 保存液混合,带回实验室 -70 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。

1.2 总基因组 DNA 的提取与纯化

参照苗永旺等^[8]家鸡基因组 DNA 提取程序进行,并利用紫外吸收法检测、确定 DNA 纯度和浓度。

1.3 随机引物及筛选

本研究随机引物由上海生工生物工程技术公司合成,共 85 条。将 45 个个体的 DNA 分别等量混合,构建 DNA 池,进行引物筛选。根据条带清晰程度,从中共筛选出 23 条引物用于试验分析,见表 1。

1.5.1 杂合度(Heterozygosity)

根据 NEI^[9]的公式计算:

$$h = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 \quad H = \sum_{i=1}^n h_j / r$$

h 为群体内某一座位的杂合度, H 为群体平均杂合度, r 为座位个数。

1.5.2 品种遗传多样性指数

遗传多样性指数(Genetic diversity index)^[10]即 Shannon 多样性指数:

$$H_0 = - \sum p_i \ln p_i$$

P_i 为一条扩增产物存在的频率,或 RAPD 表型频率,根据公式计算出遗传多样性在群体内的分布。

2 结果与分析

2.1 RAPD 扩增结果

23 条引物在所有个体中都产生了不同程度的多态性,共检测到 178 种图带,即检测到 178 个座位,其中多态性图带 150 条。各引物多态性图带频率在 28.57% ~ 100% 之间,平均为 84.27%。每一引物产生的扩增带数在 4 ~ 12 之间,平均为 7.74

条,片段大小在 152 ~ 2343 bp 之间,各引物的扩增图带数、多态标记数及多态频率见表 1。

2.2 各座位等位基因频率

分别统计每一扩增图带在受检群体中的存在的频率(即扩增图带的表型频率),由此得到 178 个座位的等位基因频率结果见表 2。各座位的隐性基因频率介于 0 ~ 0.9775 之间。有 28 个座位处于纯合状态,其它座位均处于杂合状态。

表 2 各座位等位基因频率及杂合度

Tab. 2 The frequencies of alleles and heterozygosity at a locus

引物 primer	座位 locus	等位基因频率 frequency of alleles		杂合度 H	引物 primer	座位 locus	等位基因频率 frequency of alleles		杂合度 H	引物 primer	座位 locus	等位基因频率 frequency of alleles		杂合度 H
		p	q				p	q				p	q	
S4	1	0.789 2	0.210 8	0.332 7	S53	2	0.022 5	0.977 5	0.044 0	S86	7	0.850 9	0.149 1	0.253 7
	2	0.741 8	0.258 2	0.383 1		3	0.057 2	0.942 8	0.107 9		1	0.789 2	0.210 8	0.332 7
	3	0.578 4	0.421 6	0.487 7		4	0.634 9	0.365 1	0.463 6		2	0.741 8	0.258 2	0.383 1
	4	0.850 9	0.149 1	0.253 7		5	0.552 8	0.447 2	0.494 4		3	0.701 9	0.298 1	0.418 5
S5	1	0.701 9	0.298 1	0.418 5	6	0.528 6	0.471 4	0.498 4	4	0.701 9	0.298 1	0.418 5		
	2	0.385 4	0.614 6	0.473 7	7	0.300 8	0.699 2	0.420 6	5	0.528 6	0.471 4	0.498 4		
	3	0.300 8	0.699 2	0.420 6	8	0.442 2	0.557 8	0.493 3	6	0.850 9	0.149 1	0.253 7		
	4	0.789 2	0.210 8	0.332 7	9	0.183 5	0.816 5	0.299 7	7	0.239 9	0.760 1	0.364 7		
	5	0.333 3	0.666 7	0.444 4	10	0.350 2	0.649 8	0.455 1	8	0.850 9	0.149 1	0.253 7		
	6	0.505 6	0.494 4	0.499 9	-	11	0.269 7	0.730 3	0.393 9	9	0.239 9	0.760 1	0.364 7	
S6	1	0.528 6	0.471 4	0.498 4	S53	1	0.789 2	0.210 8	0.332 7	S88	1	0.789 2	0.210 8	0.332 7
	2	0.069 1	0.930 9	0.128 7	2	0.483 6	0.516 4	0.499 5	2	0.130 8	0.869 2	0.227 4		
	3	0.422 6	0.577 4	0.488 0	3	0.741 8	0.258 2	0.383 1	3	0.442 2	0.557 8	0.493 3		
	4	0.850 9	0.149 1	0.253 7	4	1	0	0	4	0.850 9	0.149 1	0.253 7		
	5	0.130 8	0.869 2	0.227 4	5	0.528 6	0.471 4	0.498 4	5	0.057 2	0.942 8	0.107 9		
	6	0.197 2	0.802 8	0.316 6	6	0.634 9	0.365 1	0.463 6	S92	1	1	0	0	
	7	0.850 9	0.149 1	0.253 7	7	0.578 4	0.421 6	0.487 7	2	0.300 8	0.699 2	0.420 6		
S7	1	0.239 9	0.760 1	0.364 7	8	0.156 7	0.843 3	0.264 3	3	1	0	0		
	2	0.269 7	0.730 3	0.393 9	S60	1	0.130 8	0.896 2	0.227 4	4	0.528 6	0.471 4	0.498 4	
	3	0.367 5	0.632 5	0.464 9	2	0.239 9	0.760 1	0.364 7	5	0.666 7	0.333 3	0.444 4		
	4	0.605 6	0.394 4	0.477 7	3	0.225 4	0.774 6	0.349 2	6	0.4625	0.537 5	0.497 2		
	5	1	0	0	4	0.350 2	0.649 8	0.455 1	7	0.333 3	0.666 7	0.444 4		
	6	1	0	0	5	0.118 1	0.881 9	0.208 3	S94	1	0.011 2	0.988 8	0.022 1	
	7	1	0	0	6	0.701 9	0.298 1	0.418 5	2	0.011 2	0.988 8	0.022 1		
	8	0.701 9	0.298 1	0.418 5	7	1	0	0	3	0.701 9	0.298 1	0.418 5		
S8	1	0.093 2	0.906 8	0.169 0	8	0.505 6	0.494 4	0.499 9	4	0.741 8	0.258 2	0.383 1		
	2	0.033 9	0.966 1	0.065 5	S129	1	0.333 3	0.666 7	0.444 4	5	1	0	0	
	3	0.850 9	0.149 1	0.253 7	2	0.350 2	0.649 8	0.455 1	S97	1	1	0	0	
	4	0.789 2	0.210 8	0.332 7	3	0.156 7	0.843 3	0.264 3	2	0.039 2	0.906 8	0.169 0		
	5	0.741 8	0.258 2	0.383 1	4	0.850 9	0.149 1	0.253 7	3	0.211 2	0.788 8	0.333 2		
	6	0.701 9	0.298 1	0.418 5	5	0.605 6	0.394 4	0.477 7	4	0.285 1	0.714 9	0.407 6		
	7	0.552 8	0.447 2	0.494 4	6	0.156 7	0.843 3	0.264 3	5	0.850 9	0.149 1	0.253 7		
	8	0.057 2	0.942 8	0.107 9	7	0.741 8	0.258 2	0.383 1	6	1	0	0		
	9	0.143 7	0.856 3	0.246 1	S130	1	0.528 6	0.471 4	0.498 4	7	0.578 4	0.421 6	0.487 7	
	10	0.741 8	0.258 2	0.383 1	2	0.385 4	0.614 6	0.473 7	8	0.367 5	0.632 5	0.464 9		
S17	1	0.385 4	0.614 6	0.473 7	3	0.170 0	0.830 0	0.282 2	9	0.462 5	0.537 5	0.497 2		
					4	0.578 4	0.421 6	0.487 7	10	0.505 6	0.494 4	0.499 9		

(续表 2)

引物 primer	座位 locus	等位基因频率 frequency of alleles		杂合度 H	引物 primer	座位 locus	等位基因频率 frequency of alleles		杂合度 H	引物 primer	座位 locus	等位基因频率 frequency of alleles		杂合度 H	
		p	q				p	q				p	q		
S42	2	0.367 5	0.632 5	0.464 9	S83	5	0.701 9	0.298 1	0.418 5	S104	1	0.350 2	0.649 8	0.455 1	
	3	0.850 9	0.149 1	0.253 7		6	0.211 2	0.788 8	0.333 2		2	0.634 9	0.365 1	0.463 6	
	4	0.789 2	0.210 8	0.332 7		7	0.422 6	0.577 4	0.488 0		3	0.225 4	0.774 6	0.349 2	
	5	0.442 2	0.557 8	0.493 3		8	0.701 9	0.298 1	0.418 5		4	0.422 6	0.577 4	0.488 0	
	6	1	0	0		9	0.333 3	0.666 7	0.444 4		5	1	0	0	
	1	1	0	0		1	1	0	0		S105	1	0.300 8	0.699 2	0.420 6
	2	0.333 3	0.666 7	0.444 4		2	1	0	0		2	1	0	0	
	3	0.505 6	0.494 4	0.499 9		3	1	0	0		3	0.057 2	0.942 8	0.107 9	
	4	1	0	0		4	1	0	0		4	0.316 9	0.683 1	0.432 9	
S43	5	0.789 2	0.210 8	0.332 7	5	0.350 2	0.649 8	0.455 1	5	0.183 5	0.816 5	0.299 7			
	6	0.105 6	0.894 4	0.188 9	6	1	0	0	S113	1	0.789 2	0.210 8	0.332 7		
	7	0.578 4	0.421 6	0.487 7	7	0.850 9	0.149 1	0.253 7		2	0.634 9	0.365 1	0.463 7		
	8	1	0	0	8	0.442 2	0.557 8	0.493 3		3	0.211 2	0.788 8	0.333 2		
	9	1	0	0	9	0.789 2	0.210 8	0.332 7		4	0.789 2	0.210 8	0.332 7		
	1	0.552 8	0.447 2	0.4944	10	0.850 9	0.149 1	0.253 7		5	0.850 9	0.149 1	0.253 7		
	2	0.285 1	0.714 9	0.407 6	11	0.741 8	0.258 2	0.383 1		6	0.403 7	0.596 3	0.481 5		
	3	0.211 2	0.788 8	0.333 2	12	0.789 2	0.210 8	0.332 7		7	0.850 9	0.149 1	0.253 7		
	4	1	0	0	S84	1	1	0		0	8	1	0	0	
5	0.741 8	0.258 2	0.383 1	2		1	0	0		9	0.254 6	0.745 4	0.379 6		
6	0.442 2	0.557 8	0.493 3	3		0.789 2	0.210 8	0.332 7	10	0.254 6	0.745 4	0.379 6			
S47	7	0.850 9	0.149 1	0.253 7	4	1	0	0	11	0.269 7	0.730 3	0.393 9			
	8	0.105 6	0.894 4	0.188 9	5	0.039 2	0.906 8	0.169 0							
	1	0.069 1	0.930 9	0.128 7	6	1	0	0							
	平均杂合度 (H) ± 标准误 (SE)				H = 0.3073 ± 0.012 94				期望杂合度 (Expectation)				$\mu_H = 0.457 0$		

注: 某一引物检测到的各座位分别以阿拉伯数字(1,2,3,……)表示。

Note: the Arabic numerals (1,2,3,……) denotes the different locus observed by using a primer, respectively.

2.3 群体遗传变异分析

2.3.1 群体杂合度

计算了每个座位的杂合度,由此得出各引物的平均杂合度,结果见表 2。各座位杂合度变化范围在 0~0.499 9 之间。群体平均杂合度为 0.307 3。计算得到群体期望杂合度为 0.457 0,实际杂合度比期望杂合度小。

2.3.2 Shannon 多样性指数

根据 23 条多态引物扩增的 RAPD 谱带的表型频率,计算了群体 Shannon 多样性指数,结果见表 3。每条引物 Shannon 多样性指数变化范围在 0.419 5~4.021 8 之间。群体平均 Shannon 多样性指数为 1.866 0。

表 3 群体 Shannon 多样性指数

Tab. 3 Shannon's index of genetic diversity of the population assayed

引物 primer	遗传多样性指数 index of Shannon genetic diversity	引物 primer	遗传多样性指数 index of Shannon genetic diversity	引物 primer	遗传多样性指数 index of Shannon genetic diversity
S4	0.419 5	S47	4.021 8	S88	1.313 8
S5	0.882 5	S53	1.694 3	S92	1.748 8
S6	2.150 2	S60	2.718 0	S94	0.741 3
S7	1.956 0	S129	2.294 0	S97	3.346 5
S8	2.224 3	S130	3.100 6	S104	1.555 0
S17	1.357 6	S83	1.109 4	S105	1.859 1
S42	1.535 9	S84	0.537 4	S113	2.859 8
S43	2.252 1	S86	1.239 3		
平均数 average ± 标准误 (SE)			$H_0 = 1.866 0 \pm 0.191 2$		

3 讨论

3.1 多态性片段及其频率

本研究从85个随机引物中筛选出的23个引物,对云南鹅45个个体的基因组DNA进行了检测,共产生178条DNA电泳图带,其中150条为多态性标记。23个引物,有18个引物的图带多态性频率在80%以上,平均每个引物的图带多态率为84.27%。多态性图带数及其频率反映了群体选育程度和遗传座位的纯合度高低,多态性图带数及其频率越高,说明群体的选育程度越低。本研究结果显示云南鹅多态性图带频率较高,提示云南鹅群体选育程度低,各座位的纯合度低,群体内存在丰富的遗传变异。

3.2 遗传多样性评估

群体内杂合度和遗传多样性指数是反映群体遗传变异和遗传分化状况的重要指标。本研究各座位的杂合度范围在0~0.4999之间,群体平均杂合度为0.3073,期望杂合度为0.4570。从其期望杂合度来看,其群体遗传变异较大。杨勇等^[11]采用不同的遗传标记对家鸡群体杂合度的分析结果显示,RAPD分析得到的群体平均杂合度比实际杂合度偏小。本研究群体平均杂合度比其期望杂合度小,这与上述结果相一致。本研究群体平均Shannon多样性指数为1.8660,这与已报道的其它鹅品种的遗传多样性指数^[5~7]相比较。以上分析,提示云南鹅群体内遗传变异较丰富,整齐度差,遗传多样性较高。这与史宪伟等^[2]采用mtDNA RFLP标记,从核外基因组的分析结果不一致。云南鹅群体内遗传变异较丰富,与云南鹅饲养管理粗放,没有经过系统选育的实际情况相符。

3.3 云南鹅种质资源的保存及选育利用

云南鹅选育程度低,群体遗传变异丰富,为其进一步选育和多向利用提供了人工选择的基因素材,也为其遗传资源的保护提供了有利条件。但应在合理保护、利用的前提下,加强本品种选育工作,选优去劣,不断提高其生产性能,进一步强化其品种特征。可以根据社会经济需求,有意识地

培育具有不同遗传特征的品系,开展品系杂交,形成规模,提高经济效益。

[参考文献]

- [1] 云南省畜牧局. 云南省家畜家禽品种志[M]. 昆明: 云南科技出版社, 1987.
- [2] 史宪伟,李清,曾凡同,等. 云南鹅不同地理群体线粒体DNA多态性研究[J]. 云南农业大学学报,2000, 13(3):311-314.
- [3] SEMYENOVA S K, VASILVEY V A, RYSKOV A P. RAPD-PCR and DNA fingerprinting in avian genetics: application in the chicken breed identification [J]. Animal Genetics,1994,25 (Suppl. 1):39.
- [4] SMITH E J, JONES C P, BARLETT, et al.. Use of randomly amplified polymorphic DNA markers for the genetic analysis of relatedness and diversity in chickens and turkeys[J]. Poultry Science, 1996,75:579-584.
- [5] 毛国祥,赵万里. 随机扩增多态DNA(RAPD)技术在鹅育种上的应用[J]. 中国家禽,2001,23(8):47-49.
- [6] 郝家胜,周开亚. 皖西白鹅遗传多样性的RAPD分析[J]. 安徽师范大学学报(自然科学版),1999,22(1):40-43.
- [7] 郝家胜,周开亚. 中国鹅5个品种遗传多样性的随机扩增多态DNA分析[J]. 南京农业大学学报,2000, 23(1):58-62.
- [8] 苗永旺,霍金龙,李莲军,等. 从鸡血中快速提取高质量基因组DNA的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医,2005, (12):10-12.
- [9] NEI M, LI W H. Mathematical models for studying genetic distance in terms of restriction endonucleases[J]. Proceeding of the National Academy of Science,1979, 76:5269-5273.
- [10] WACHIRA F N, WANG R, HACKRIT C A, et al.. Detection of genetic diversity in tea (*Camellia sinensis*) using RAPD markers [J]. Genome, 1995, 38: 201-210.
- [11] 杨勇,朱庆,胡刚安. 运用微卫星和RAPD标记分析家鸡群体的杂合度[J]. 黑龙江畜牧兽医,2003, (2):9-10.