

沙皮犬在原产地的 RAPD 初步研究

刘清神, 冯定远, 陈杰, 陈开宇 (华南农业大学动物科学学院, 广东广州 510642)

摘要 从分子水平分析了原产地沙皮犬的遗传背景。以3种类型共25只沙皮犬的血液为材料提取DNA, 进行随机扩增多态DNA (RAPD) 分析。筛选出的12个重复性、多态性好的随机引物, 扩增出96个位点, 分子量在350~2000 bp, 共享带数为17条, 多态性82.29%, 说明沙皮犬存在丰富的遗传多样性。聚类分析的结果表明: 全部骨嘴沙皮犬和大部分肉嘴沙皮犬能分别聚在一块, 与其各自的外部形态特征分类基本相符, 初步从分子水平为沙皮犬各类型的区分提供了理论依据。

关键词 沙皮犬; RAPD; 遗传多样性; 聚类分析

中图分类号 S829.2 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)03-00740-02

Preliminary Study on the Genetic Background of Chinese Shar-pei in its Origin Place with RAPD Technique

LIU Qing-shen et al (College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642)

Abstract Chinese Shar-pei is one of world famous dogs, which were originated from Dali Town, Nanhai district, Foshan City, Guangdong Province, China. Presently, the quantity of Chinese Shar-pei is very few and the genetic situation of this variety is chaotic. To prevent this precious variety from extinction, the experiment in the analysis of the genetic background of this dog variety with RAPD method was firstly conducted. From 25 dogs' blood DNA samples, 12 random primers were selected from total 71 primers. The electrophoresis results of RAPD showed that 12 primers produced 96 bands with molecular weight ranged 350~2000 bp and the shared bands was 17 with polymorphism rate of 82.29%. This showed the rich genetic diversity of the Chinese Shar-pei in its origin place. The clustering analyses of the RAPD of 25 samples of Chinese Shar-pei showed the bone-mouth and meat-mouth sample could be grouped accordingly, which supplied theoretical basis for the sub-classification of this variety.

Key words Chinese Shar-pei; RAPD; Genetic diversity; Clustering analysis

沙皮犬 (Chinese Shar-pei) 原产于我国广东省佛山市南海区大沥镇, 是世界著名的宠物犬品种之一。但在国内, 有关沙皮犬的研究报道不多^[1-2]。自从遗传背景复杂的肉嘴型沙皮犬20世纪90年代进入中国内地市场以来, 经过与骨嘴型沙皮犬杂交, 又产生了骨肉嘴沙皮犬, 致使目前市面上存在着骨嘴、骨肉嘴和肉嘴3种不同的类型, 种质极为混乱, 而原产的骨嘴型沙皮犬正面临着灭绝的危险。近年来, 沙皮犬在原产地数量急剧下降^[3]。笔者数次赴原产地采样, 所见沙皮犬已极少, 最终只采到25个血样。

为了了解原产地沙皮犬种质的遗传现状, 以便对沙皮犬进行合理的保护, 笔者首次利用RAPD技术对原产地的沙皮犬种群进行分子水平上的研究, 试图为沙皮犬的系统分化、育种、分类和保护等提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料 试验动物血样采自广东省佛山市南海区大沥镇的25只沙皮犬。其中公犬6只, 母犬19只; 骨嘴型6只、骨肉嘴型15只、肉嘴型4只。

1.2 方法

1.2.1 沙皮犬血液DNA的抽取。 采用经典饱和苯酚法, 根据王海生等^[4-5]的方法略加改进。

1.2.2 RAPD分析。 取25个DNA样品等量混合, 做成DNA池, 分别加入初步选出的71个随机引物(由上海生工合成) 进行PCR扩增反应, 选择扩增重复性良好、表现出多态性的随机引物进行进一步的RAPD分析。扩增反应体系含25 ng 模板DNA, 1 U Taq 聚合酶, 2 μl 2.5 mmol/L dNTP, 30 ng RAPD 引物, 无菌双蒸水补至25 μl。反应在PCR仪(GeneAmp公司 PCR System 9700) 上进行, 反应程序为: 94 预变性5 min; 继之94 预变性60s, 32 退火60s, 72 延伸90s, 循环40次;

最后72 延伸10 min。

1.2.3 数据统计方法及处理。 用NISYSpc 2.10 聚类分析软件对试验结果进行统计和聚类分析。

2 结果与分析

2.1 RAPD 扩增结果 通过对71条随机引物的筛选, 选出重复性良好、表现出多态性的引物12条, 引物序列和扩增结果见表1。所用的12条引物共扩增出96条带, 每条引物平均扩增8条, 在5~13条间变动, 分子量为350~2000 bp, 共享带数为17, 多态率为82.29%。说明沙皮犬存在丰富的遗传多样性状况。图1、2分别为引物S10和引物AW22457 RAPD 扩增后的电泳图谱。

表1 供试RAPD引物序列和扩增结果统计

引物	碱基序列	记录的带数	条	多态位点	多态性 %
S10	CTGCTGGGAC	9	7	77.78	
S24	AATCGGCTG	6	5	83.33	
S108	GAAACACCCC	8	6	75.00	
Av22417	GCACTGGAGT	10	9	90.00	
Av22418	GGTGACCCAG	9	9	100.00	
Av22419	CTGCTGGGAG	5	1	20.00	
Av22437	TGCGCCGTC	8	7	87.50	
Av22439	GGCTACACC	8	6	75.00	
Av22451	TCTGGTGAGG	6	4	66.67	
Av22454	AGGGCGTAAG	6	6	100.00	
Av22457	AGACGTCAC	13	12	92.31	
Av22471	GTCCTGGGTT	8	7	87.50	
总计		96	79	82.29	

2.2 聚类分析 用NISYSpc 2.10 聚类分析软件所构建的同源树见图3。可以看出, 所有样品具有0.28的最大遗传距离, 在0.28左右的遗传距离的分支节点上分成20和5个样品的2个组。6只骨嘴型的沙皮犬和大部分骨肉嘴型沙皮犬(13只)及1只肉嘴型沙皮犬为一组, 位于上面20个样品的优势群体(组)中。而4只肉嘴型沙皮犬中的3只与小部分骨肉嘴沙皮犬(2只)则处于第2组。从图中可以看出, 聚类分析所构建出来的同源树基本上可以将沙皮犬的骨嘴和肉

基金项目 华南农业大学校长基金资助项目。

作者简介 刘清神(1972-), 男, 江西泰和人, 在读博士, 讲师, 从事特种经济动物研究。

收稿日期 2006-09-12

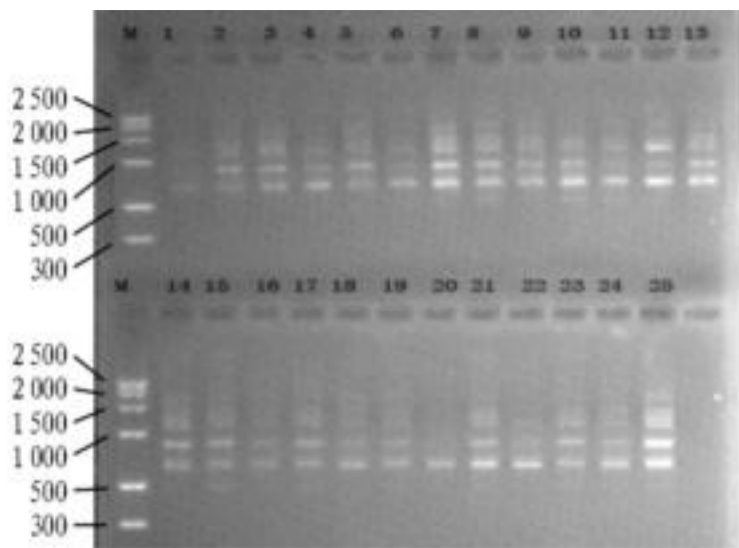


图1 引物S10 RAPD 产物电泳

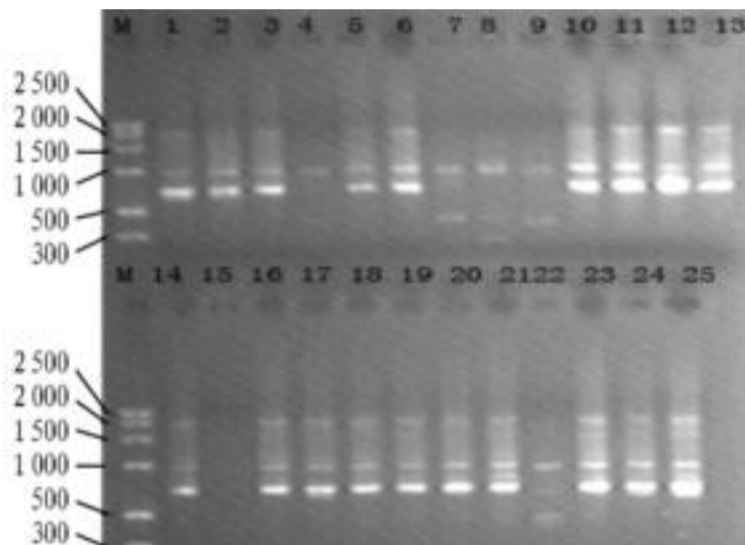
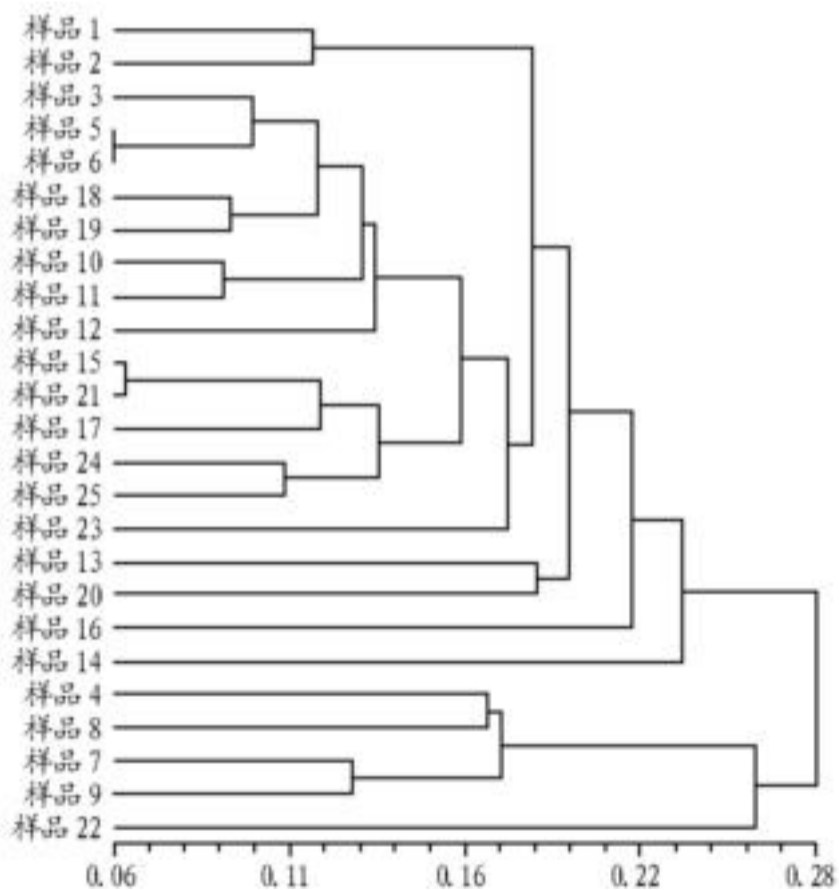


图2 引物Av2457 RAPD 产物电泳



注: 样品1, 2, 3, 10, 12, 23 为骨嘴型, 样品4, 5, 7, 8 为肉嘴型, 其余为骨肉嘴型。

图3 25 个沙皮犬样品同源性聚类分析

嘴2 种类型分别聚类, 与外形分类基本一致, 初步从分子水平为沙皮犬各类型的区分提供了理论依据。总体来看骨嘴类型与骨肉嘴类型的遗传距离较近, 这与骨肉嘴型沙皮犬是由雄性肉嘴型沙皮犬与雌性骨嘴型沙皮犬交配所得后代有关。根据笔者记录的血统, 样品24 和25 是母女关系, 虽然聚连在一起, 但还是存在约0.11 的遗传距离。样品15 虽是样品16 和17 所生, 但样品15 没有和样品16 或17 聚在一块, 这可能是由于样品17 和样品16 之间本来就存在比较大的遗传距离(约0.22)。而样品5 和样品6, 以及样品15 和样品21 则

是分别聚在一起的, 遗传距离很近, 很可能是属于全同胞关系。通过这次采样得知, 肉嘴型沙皮犬的直接祖先除了骨嘴沙皮外, 可能还含有拿破仑犬、美国老虎狗、松狮犬、藏獒、巴哥, 甚至川东猎犬的血统, 其血统复杂, 目前还未考究清楚。初步的RAPD 结果表明, 骨肉嘴沙皮犬一部分与骨嘴沙皮犬聚在一起, 另一部分与肉嘴沙皮犬聚在一起, 很可能是由于肉嘴沙皮犬的遗传背景较为复杂和不明朗所引起, 使原产地目前几种类型的沙皮犬遗传背景较为复杂。

3 讨论

用于抽取DNA 的组织材料有多种, 如用动物的组织、血液、唾液、毛发等。该试验用的是动物的血液。为了确保抽到高质量的DNA 样品, 笔者在预试验时用了3 种不同抽取DNA 的方法(其他2 种为胍盐酸法和血液基因组DNA 少量抽提试剂盒法), 认为最理想的还是传统的饱和苯酚法。

RAPD 在扩增遗传标记上虽然有不够稳定、重复性略低等缺点, 但它可在预先不知道沙皮犬遗传背景的条件下, 快速检测和分析出沙皮犬种群的结构及相互关系^[6-14]。该试验利用RAPD 技术对沙皮犬种质的研究, 由于受样品数量的制约, 对试验结果可能会造成一定的影响。鉴于数量稀少的现状, 建议相关部门尽早成立沙皮犬保种机构, 收集现有的种质, 再进行系统分析。

试验结果显示, 原产地非常有限的沙皮犬数量中, 种质差异较大, 这与该犬长期以来没有进行系统的选育和保种有关。从这次种质调查和采样发现, 传统骨嘴沙皮犬数量已经很少, 肉嘴沙皮犬由于其遗传病多, 在南方数量也变得很少, 其中间型的骨肉嘴沙皮犬数量相对多一些。针对目前沙皮犬种质混乱的局面, 应尽早开展系统研究, 保护好我国原产的沙皮犬。

参考文献

- [1] 陈云, 叶飞娟, 邓佐权. 中国沙皮犬繁殖性能研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2002(9): 11.
- [2] 陈云. 中国沙皮犬常见病防治[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2001(1): 30-31.
- [3] 刘清神, 冯定远, 李海云, 等. 广东省沙皮犬的现状调查与思考[J]. 特种经济动植物, 2006(2): 11-12.
- [4] 王海生, 张文平, 王祥, 等. 饱和苯酚-氯仿抽提与Chelex 100 树脂法提取DNA 在研究犬STR 基因座多态性中的应用比较[J]. 湖北农业科学, 2002(6): 107-109.
- [5] 范海荣, 夏永静, 孙福成, 等. 四种全血基因组DNA 提取方法的比较[J]. 中国动脉硬化杂志, 2002, 10(6): 535-537.
- [6] WELSH J, MCCLELLAND M. Finger printing genomes using PCR with arbitrary primers[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18: 7213-7218.
- [7] WILLIAMS JCK, KUBEKAR, IIVAK KJ, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18: 6531-6535.
- [8] 陈永久, 张亚平, 齐瑾, 等. 中国貉随机扩增多态DNA 及其亚种分化关系[J]. 遗传学报, 1998, 25(1): 16-21.
- [9] OLIVER M, MEEHL MA, LUST G. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) sequences as markers for canine genetic studies[J]. Heredit, 1999, 90(1): 78-82.
- [10] 张建珍, 郭亚平, 张敏, 等. 云南三种稻蝗基因组DNA 的RAPD 多态性分析[J]. 动物分类学报, 2005(3): 447-452.
- [11] 周延清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用[M]. 北京: 北京工业出版社, 2005: 82.
- [12] 李康, 杜晓东, 叶富良. 斑节对虾两个野生种群RAPD 分析[J]. 湛江海洋大学学报, 2005(3): 79-81.
- [13] 李杰, 宋兴国, 李霞. 中国昆明犬种群遗传关系的RAPD 初步研究[J]. 云南农业大学学报, 2005, 20(6): 774-778.
- [14] 黄朝峰, 仲乃琴, 谭萍萍, 等. 利用RAPD 技术分析实验用比格犬的遗传背景[J]. 中国实验动物学报, 2002(2): 65-68.