

西藏日土藏山羊 ISSR 标记遗传多态性研究

王 永^{1*}, 王 杰¹, 许期树¹, 字向东¹, 欧阳熙¹, 刘鲁蜀¹, 小益西²

(1. 西南民族大学 青藏高原动物遗传资源保护与利用四川省重点实验室, 成都 610041;

2. 西藏自治区农牧科学院, 拉萨 850000)

摘 要: 应用 ISSR 标记分析西藏日土藏山羊的遗传多样性, 为其保护和开发利用提供基础资料。从 93 条 ISSR 引物中筛选出 10 条对 107 只藏山羊进行分析, 数据分析利用 Excel 和 SPSS 软件完成。结果表明, 所筛选出的 10 条引物特异性较好且多态性较高, 共扩增出 112 条清晰的条带, 平均每条引物扩增出 11.2 条带, 其中多态性条带 75 个, 群体多态位点百分率(P)为 66.96%, 扩增片段大小为 219~2 534 bp, 群内个体间遗传相似性指数(s)为 0.460 0~0.740 5, 平均 0.564 7, 个体间平均遗传差异(D)为 0.435 3。根据多态性位点在样本中出现的几率计算出多态性条带的基因频率(f), 频率值的范围为 0.045 5~1.000 0。西藏日土藏山羊的遗传多态性较丰富, 个体间存在差异, 但又具有较好的同质性。

关键词: 藏山羊; ISSR; 遗传多态性

中图分类号: S813.1; S826.83

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)09-1208-05

Analysis of Genetic Diversity in Ritu Tibetan Goats by ISSR

WANG Yong^{1*}, WANG Jie¹, XU Qi-shu¹, ZI Xiang-dong¹, OUYANG Xi¹, LIU Lu-shu¹, XIAO Yi-xi²

(1. Sichuan Provincial Key-Laboratory of Protection and Utilization of Animal Genetic Resources in Qinghai-Tibet Plateau, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China;

2. Academy of Agriculture and Animal Husbandry of Tibet Autonomous Region, Lasa 850000, China)

Abstract: Inter simple sequence repeat (ISSR) was used to analyze the genetic diversity of Tibetan goats population in Ritu county. Ten primers were selected from 93 ISSR primers and then used to detect the genetic diversity in 107 Tibetan goats. The obtained data were analyzed by using Excel 2003 and SPSS11.0 softwares. Ten out of 93 ISSR primers produced 112 DNA bands, among them 75 bands were polymorphic markers and the size of amplified fragment ranged from 219 to 2 534 bp. It indicated that the selected primers were specific and could produce enough polymorphic bands. The proportions of polymorphic loci (P) in Ritu Tibetan goats was 66.96%. The genetic similarity index (s) within the detected population ranged from 0.460 0 to 0.740 5 (with average of 0.564 7). The averaged individual genetic difference (D) was 0.435 3. The gene frequency (f) ranged from 0.045 5 to 1.000 0. These results of ISSR analysis indicated that the Ritu Tibetan goats population presents high level of genetic diversity and genetic variations existed among individuals.

Key words: Tibetan goat; ISSR; genetic diversity

藏山羊世栖青藏高原, 分为高原型和山谷型两个生态类型^[1]。西藏日土县地处藏北高寒地区, 所

分布的藏山羊系高原型藏山羊。尽管秦国庆等^[2]、王杰等^[3]先后采用 RAPD、RFLP 与 SSR 分子标记

收稿日期: 2009-07-27

基金项目: 四川省应用基础项目 (2008JY0067-1)

作者简介: 王 永 (1962-), 男, 四川仁寿人, 教授, 博士, 主要从事动物遗传育种与繁殖的研究

* 通讯作者: 王 永, Tel: 028-85522060, E-mail: wangyong010101@swun.cn

对藏山羊的遗传多态性进行了分析,但尚未见应用 ISSR(inter simple sequence repeat)标记对西藏日土县高原型藏山羊遗传多样性的研究报道。ISSR 标记技术是在 SSR(microsatellite DNA)技术上发展起来的一种新型分子标记技术^[4-5]。与 RAPD、RFLP 等分子标记相比,ISSR 标记具有多态性丰富,灵敏度高、操作方便等诸多优点,已广泛的用于物种的群体遗传学研究^[6]。本研究利用 ISSR 标记对西藏日土藏山羊的遗传多样性进行分析,以期为其保护和开发利用提供基础资料。

1 材料与方 法

1.1 供试动物

在西藏日土县原种羊场,1 395 只随机交配的群体中随机选择成年健康藏山羊公羊 46 只、母羊

61 只,共计 107 只。每只采集血样约 10 mL,EDTA 抗凝,低温保存备用。

1.2 基因组 DNA 提取

参考 Lahiri 等^[7-8]和 Sambrook 等^[9-10]的方法提取基因组 DNA。经琼脂糖电泳及紫外分光光度计法测定样品 DNA 的浓度后,稀释至 $20 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,在 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下保存备用。

1.3 PCR 反应

从 93 条 ISSR 引物^[11-15]中筛选出 10 条引物,经上海基康生物公司合成引物序列,见表 1。反应体系为 $15 \mu\text{L}$ 。程序为 $94 \text{ }^\circ\text{C} 4.5 \text{ min}$, $35 \times (94 \text{ }^\circ\text{C} 30 \text{ s}, 46.6 \sim 55.0 \text{ }^\circ\text{C} 30 \text{ s}, 72 \text{ }^\circ\text{C} 30 \text{ s})$, $72 \text{ }^\circ\text{C} 7 \text{ min}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。扩增产物在 2% 的琼脂糖凝胶中电泳 $1.5 \sim 2 \text{ h}$ (电压 $3 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$),电泳结束,凝胶成像系统扫描记录。

表 1 ISSR 的引物序列

Table 1 Primer sequences of ISSR

引物代码 Primer code	序列 Sequence	缩写 Abbreviation	退火温度/ $^\circ\text{C}$ Tm
A7	AGAGAGAGAGAGAGAGT	$(\text{AG})_8\text{T}$	51.0
A8	AGAGAGAGAGAGAGAGC	$(\text{AG})_8\text{C}$	55.0
A9	AGAGAGAGAGAGAGAGG	$(\text{AG})_8\text{G}$	46.6
A11	GAGAGAGAGAGAGAGAC	$(\text{GA})_8\text{C}$	51.8
A12	GAGAGAGAGAGAGAGAA	$(\text{GA})_8\text{A}$	52.0
A15	CTCTCTCTCTCTCTG	$(\text{CT})_8\text{G}$	51.8
A22	TCTCTCTCTCTCTCTCA	$(\text{TC})_8\text{A}$	52.0
A24	TCTCTCTCTCTCTCTCG	$(\text{TC})_8\text{G}$	52.0
B8	CAACAACAACAACAACA	$(\text{CAA})_8$	52.0

1.4 统计参数

在电泳图谱中每一条带记为一个位点,记录清晰可辨条带。出现扩增条带记为 1,缺失记为 0,建立原始谱带矩阵,利用 Excel 2003 和 SPSS11.0 软件统计位点总数,计算相似性指数(S)^[16],个体平均遗传差异值(MAPD)^[17],群体的多态位点百分率(P)和多态位点频率(f)^[18]。

2 结 果

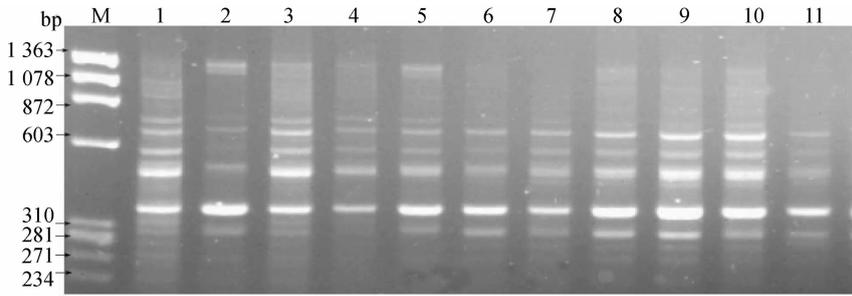
2.1 日土藏山羊群体多态性

10 条 ISSR 引物在日土藏山羊群体共扩增出 112 个条带,平均每条引物扩增出 11.2 条带,其中

多态性条带 75 个,群体的多态位点百分率(P)为 66.96%,扩增的片段大小范围为 219~2 534 bp,其中 A9 扩增的条带和多态性条带均最多,为 18/20(图 1),其次是 A22 为 12/17,A24 扩增的条带最少,仅为 3 条(均为多态性条带)。各条引物在日土藏山羊群体内个体间扩增多态性比例范围 0.400 0~1.000 0(表 2)。

2.2 日土藏山羊群体内相似性指数

在日土藏山羊群体内,经 ISSR 扩增群内个体间遗传相似性指数(S)为 0.460 0~0.740 5,平均 0.564 7,个体平均遗传差异值(MAPD)为 0.435 3(表 2)。说明日土藏山羊群体遗传多态性丰富。



M. Marker 为 Φ X174-*Hae* III digest; 1~11. 为 11 个不同个体的扩增结果

M. Φ X174-*Hae* III digest; 1-11. PCR products

图 1 引物 A9 在日土藏山羊的部分扩增结果

Fig.1 The amplified ISSR pattern by primer A9 in Ritu Tibetan goat population

表 2 日土藏山羊群体内个体间遗传相似性指数与遗传差异和引物扩增条带数

Table 2 Genetic similarity index, genetic differences and number of amplified bands in Ritu Tibetan goat population

项目 Item	引物代码 Primer code										Σ	\bar{x}
	A7	A8	A9	A11	A24	A22	A12	A15	B8	B9		
多态性条带数 No. of polymorphic bands	6	8	4	3	3	12	7	7	7	18	75	7.5
扩增条带总数 Total No. of amplified bands	11	14	10	4	3	17	9	12	12	20	112	11.2
多态性比例 Polymorphism proportion	0.545 5	0.571 4	0.400 0	0.750 0	1.000 0	0.705 9	0.777 8	0.583 3	0.583 3	0.900 0	6.817 2	0.681 7
相似性系数 Genetic similarity index(S)	0.740 5	0.613 5	0.642 8	0.460 0	0.569 1	0.555 0	0.499 3	0.509 3	0.576 7	0.480 2	5.646 5	0.564 7
平均遗传差异值 MAPD	0.259 5	0.386 5	0.357 2	0.540 0	0.430 9	0.445 0	0.500 7	0.490 7	0.423 3	0.519 8	4.353 5	0.435 3

2.3 日土藏山羊群体多态位点频率

值范围为 0.045 5~1.000 0,0.5 以上占 70.0%,平均为 0.376 8(表 3),多态性丰富。

根据 55 个多态性位点在样本中出现的几率,计算多态性条带基因频率(*f*),日土藏山羊群体频率

表 3 日土藏山羊群体内多态位点频率

Table 3 The frequency of polymorphic loci in Ritu Tibetan goat population

位点 Loci	频率 Frequency	位点 Loci	频率 Frequency	位点 Loci	频率 Frequency	位点 Loci	频率 Frequency	位点 Loci	频率 Frequency
A7-1,2,3,6	0.111 1	A8-9	0.227 3	A11-1,3,4	0.428 6	A15-7	0.100 0	B8-1,8,11	0.416 7
A7-4	0.222 2	A8-10	0.363 6	A11-2	0.571 4	A15-8	0.600 0	B8-2,7	0.083 3
A7-5,8	0.388 9	A8-11	0.045 5	A12-1,2,6,7	0.250 0	A22-1,5,7,17	0.090 9	B8-3,4,6,12	0.333 3
A7-7,9	0.666 7	A9-1	0.250 0	A12-3,4,5	0.187 5	A22-2,6,8,10,	0.181 8	B8-5	0.166 7
A7-10	0.944 4	A9-2,11	0.416 7	A12-8	0.562 5	A22-3	0.045 5	B8-9	0.583 3
A8-1	0.136 4	A9-3	0.083 3	A12-9	0.500 0	A22-4,11,13	0.136 4	B8-10	0.666 7
A8-2,4	0.181 8	A9-4	0.500 0	A15-1	0.400 0	A22-9	0.227 3	B9-1,2,13,14,17,18	0.083 3
A8-3,8	0.318 2	A9-5,7	0.583 3	A15-2,6,9	0.500 0	A22-12,15	0.318 2	B9-3,5,6,7,8,9,10,15	0.166 7
A8-5	0.318 2	A9-6	0.750 0	A15-3	0.100 0	A22-14	0.454 5	B9-4,12,16	0.250 0
A8-6	0.090 9	A9-8,10	0.916 7	A15-4	0.700 0	A22-16	0.590 9	B9-11	0.333 3
A8-7	0.681 8	A9-9	0.333 3	A15-5	1.000 0	A24-1,2,3	0.500 0	B9-19,20	0.666 7

3 讨 论

目前,已有多种分子遗传标记被用于探究生物的遗传多样性^[19-21]。自 20 世纪 90 年代 Zietkiewicz 提出 ISSR 标记以来,ISSR 标记作为一种新型的分子标记被用于品种、群体的鉴别、系统发生以及遗传多态性等研究。在国内,ISSR 标记已被用于探究肉鸡^[14]、小黄鱼^[15]、江豚^[22]、水稻^[23]等物种的群体遗传多样性。藏山羊作为青藏高原独特的遗传资源之一,其遗传多样性的分析有利于其遗传资源的合理保护和开发利用。已有报道采用 RAPD、RFLP 与 SSR 等分子标记对山羊以及藏山羊的遗传多态性进行遗传分析的报道^[2-3, 24-28],但目前尚未见采用 ISSR 标记对藏山羊进行群体遗传分析的报道。由于不同分子标记的优缺点不同,故采用不同的分子标记对藏山羊遗传多样性进行评估,从而客观的评价其多样性水平显得十分必要。本研究采用 ISSR 分子标记对日土藏山羊群体进行遗传多态性评估,不仅有助于地方山羊品种(群体)遗传资源的开发利用,也可探究利用不同分子标记开展藏山羊遗传多样性水平研究的差异和优缺点,从而寻找适合的分子标记开展类似研究。

近年有不少研究者,用分子遗传标记对山羊群体的遗传多样性和这些标记与生产性能的关系进行了分析^[2-3, 24-28]。秦国庆等的研究表明:RAPD 技术扩增出的 DNA 片段可作为区分亚东山羊和高原型藏山羊的 DNA 标记^[2]。王杰等也采用 RAPD 技术对四川的山羊和岩羊的遗传关系进行了分析,从 40 对引物中筛选出了 16 对效果较好的引物,并发现山羊和岩羊有 13 条共有条带,岩羊有 4 条特异的条带。并认为山谷型藏山羊和高原型藏山羊之间遗传距离(0.100 5)很小^[26]。李利等用微卫星标记对四川本地的几个山羊品种的遗传关系进行了分析,发现四川的 7 个山羊品种的遗传多样性较为丰富。其选用的 7 个遗传标记都能较好的运用于山羊群体遗传关系的分析^[27]。其他的一些研究者则试图在分子遗传标记和生产性能之间找到相关关系,如姚红卫等发现有些微卫星座位对波尔山羊的出生体质量、出生体长、出生体高、出生胸围等有正效应^[24]。在本研究中,经反复筛选的 10 条 ISSR 引物具有较高的特异性,且多态性条带丰富,表明 ISSR 分子标记可用于藏山羊群体的遗传多态性评估。其中引物 A9 在研究所选用的藏山羊群体中能扩增出的条带

和多态性条带最多(18/20),其次是 A22 为 12/17, A24 扩增的条带最少为 3 条(均为多态性条带)。这一结果表明,日土藏山羊群体具有丰富的遗传多态性。研究中使用 ISSR 方法分析日土藏山羊群体个体间的遗传相似性指数(S)范围为 0.460 0~0.740 5,平均为 0.564 7,小于王杰等人用 RAPD 技术对四川几个山羊群体研究时得到的群体间相似系数为 0.821 6~0.936 的值,但对群体遗传关系的分析结果却确基本一致。这表明,在使用分子遗传标记的时候首先需要选择多态性丰富的标记,并使用同一类标记进行分析,避免在大规模分析群体遗传关系时使用不同的分子遗传标记。本研究还表明,日土山羊个体间平均遗传差异值(MAPD)为 0.435 3(表 2),表明日土藏山羊群体内个体间存在差异,但群体又具有较好的一致性。

本研究利用 ISSR 分子标记得出的藏山羊群体遗传多态性分析与已有的研究结论一致^[2-3],表明藏山羊群体遗传多态性丰富,这说明 RAPD、RFLP、SSR、ISSR 分子标记均可用于藏山羊群体遗传多态性的研究,从而揭示藏山羊的种质特性。

4 结 论

ISSR 分子标记可用于日土藏山羊群体的遗传多态性评估。日土藏山羊群体遗传多态性丰富,但群体内个体间存在差异,揭示该群体具有较大的选育提高潜力,是我国青藏高原宝贵的基因库。

参考文献:

- [1] 欧阳熙,王 杰,王 永,等.藏山羊生态地理分布及其生态类型[J].西南民族学院学报(自然科学版),1995,21(3):264-271.
- [2] 秦国庆,常 洪,陈国宏,等.藏山羊 RAPD 及 RFLP 标记的初步研究[J].西北农业大学学报,1998,26(1):17-20.
- [3] 王 杰,华太才让,欧阳熙,等.藏山羊微卫星 DNA 多态性研究[J].西南民族大学学报(自然科学版),2006,32(3):538-544.
- [4] WANG Z, WEBER J L, ZHONG G, et al. Survey of plant short tandem repeats [J]. *Theor Appl Genet*, 1994, 88(1):1-6.
- [5] WU K S, JONES R, DANNEBERGER L, et al. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning [J]. *Nucl Acids Res*, 1994, 22(15):3257-3258.

- [6] KONING D J D, SCHULMAN N F, ELO K, et al. Mapping of multiple quantitative trait loci by regression in half sib designs [J]. *J Anim Sci*, 2001, 70(3):616-622.
- [7] LAHIRI D K, NURNBERGER J I Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies [J]. *Nucl Acids Res*, 1991, 19(19): 5444.
- [8] LAHIRI D K, SCHNABEL B. DNA isolation by a rapid method from human blood samples: effects of MgCl₂, EDTA, storage time and temperature on DNA yield and quality [J]. *Biochem Genet*, 1993, 31(7):321-325.
- [9] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [M]. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [10] SAMBROOK J, RUSSELL D W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [M], 3rd ed. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [11] BAROIN-TOURANCHEAU A, DELGADO P, PERASSO R, et al. A broad molecular phylogeny of ciliates: Identification of major evolutionary trends and radiations within the phylum [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(20): 9764-9768.
- [12] ZIETKIEWICZ E, RAFALSKI A, LABUDA D, et al. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 1994, 20(2):176-183.
- [13] GUPTA P K, VARSHNEY R K. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat [J]. *Euphytica*, 2000, 113(3):163-185.
- [14] 白秀娟. 圈养东北虎 ISSR 指纹分析初报 [J]. 兽类学报, 2004, 24(1):91-93.
- [15] 许广平, 仲霞铭, 丁亚平. 黄海南部小黄鱼群体遗传多样性研究 [J]. 海洋科学, 2005, 29(11):34-38.
- [16] 任 军, 黄路生, 艾华水, 等. 24 个中外猪种(群)的 AFLP 多态性及其群体遗传关系 [J]. 遗传学报, 2002, 29(9):774-781.
- [17] 任 军, 高 军, 黄路生, 等. 江西省主要地方鸡种的 RAPD 分析及其群体遗传关系的研究 [J]. 遗传, 2001, 23(4):301-305.
- [18] 刘 萍, 孔 杰, 石 拓, 等. 中国对虾黄、渤海沿岸地理群的 RAPD 分析 [J]. 海洋学报(中文版), 2000, 22(5):88-93.
- [19] WILSON O E. *The Diversity of Life* [M]. Cambridge, MA: The Belknap Press of Harvard University Press, 1992.
- [20] 陈灵芝. 生物多样性保护现状及其对策, 生物多样性研究的原理与方法 [M]. 北京: 科学出版社, 1994.
- [21] JOSHI S P, AGGARWAL R K, RANJEKAR P K, et al. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza* [J]. *Theor Appl Genet*, 2000, 100(8): 1311-1320.
- [22] 李东明, 林 刚, 郑劲松. 两个不同江豚群体遗传多样性初步分析 [J]. 南昌大学学报(理科版), 2005, 29(6):545-550.
- [23] 王金花, 罗文永, 陈建伟, 等. 应用 SSR 和 ISSR 标记分析栽培香稻品种的遗传多样性 [J]. 分子植物育种, 2005, 3(1):37-42.
- [24] 姚红卫, 杨利国, 沈 忠, 等. 波尔山羊微卫星标记多态性与生长性能的关系研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(10):1312-1319.
- [25] 王东劲, 侯冠彧, 王文强, 等. 雷州山羊和隆林山羊遗传多样性的微卫星分析 [J]. 中国农学通报, 2007, 23(12): 37-42.
- [26] 王 杰, 徐金瑞, 白文林, 等. 四川几个山羊品种(群体)与岩羊 RAPD 分析 [J]. 畜牧兽医学报, 2003, 34(5):434-437.
- [27] 李 利, 刘成建, 张国俊, 等. 用 5 个微卫星标记分析四川 7 个地方山羊品种的遗传关系 [J]. 中国畜牧杂志, 2009, 45(3): 8-11.
- [28] 陈明华, 王 杰, 华太才让, 等. 四川九个黑山羊品种(群体)X 染色体微卫星 DNA 多态性研究 [J]. 中国草食动物, 2008, 28(1): 13-16.

(编辑 郭云雁)