

RAPD 标记遗传距离与猪杂种优势相关性的研究

张凤伟¹, 蒋曹德², 邓昌彦¹, 熊远著¹

(¹华中农业大学动物科技学院 / 猪遗传育种农业部重点实验室, 武汉 430070; ²西南农业大学生命科学学院, 重庆 400716)

摘要: 【目的】探讨利用 RAPD 分子标记技术预测杂种优势的可能性。【方法】利用 RAPD 技术测定 6 个亲本群体间的遗传距离, 对亲本群体间遗传距离与 10 个经济性状的杂种优势率进行相关性分析。【结果】亲本间遗传距离与日增重、料重比、屠宰率和平均背膘厚的杂种优势率呈正相关, 与瘦肉率、瘦肥肉比、皮率、眼肌面积的杂种优势率呈负相关。并且遗传距离与料重比和眼肌面积杂种优势率的相关系数达到显著程度 ($P < 0.05$), 而与瘦肉率、内脂率等性状杂种优势率的相关系数则非常小。【结论】亲本间的遗传距离与杂种优势的相关程度随不同性状而异。

关键词: RAPD 标记; 遗传距离; 杂种优势

Study on Correlation Between Genetic Distance and Heterosis Percentage of Pig with RAPD Marker

ZHANG Feng-wei¹, JIANG Cao-de², DENG Chang-yan¹, XIONG Yuan-zhu¹

(¹ Key Laboratory of Pig Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070; ² College of Animal Science, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716)

Abstract: 【Objective】The study forecasted the possibility of heterosis by the molecular marker of RAPD. 【Method】The genetic distances of 6 parental lines of pigs was detected with RAPD, and scientists calculated the association between heterosis percentages of 10 economic traits and genetic distances among populations of parental lines. 【Result】Results showed that genetic distances were positively correlated with the heterosis percentages of the average daily gain, ratio of feed to lean meat, dressing percentage and average back-fat thickness. It negatively correlated with that of the lean percentage, ratio of lean meat to fat, lion eye area and skin percentage. Moreover, the correlation between genetic distance and the ratio of feed to meat, and between genetic distance and the lion eye area were significant ($P < 0.05$). 【Conclusion】The correlation between genetic distance and heterosis percentage varied with different traits.

Key words: RAPD marker; Genetic distance; Heterosis percentage; Pig

0 引言

【研究意义】杂交是现代动物生产的主要方式, 对于杂交效果的分析 and 预测也因此变得日益重要。传统的配合力测定方法不仅费时费力, 而且由于表型受环境影响, 测定结果稳定性差, 从而限制了杂种优势的利用。因而从分子水平上预测杂种优势具有重要的意义。【前人研究进展】随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 是 1990 年

Williams^[1]和 Welsh^[2]在 PCR 技术的基础上发展起来的一种新型 DNA 多态检测技术。该技术除了具有简捷、灵敏、DNA 用量少、成本低等优点外, 还可以检测整个基因组的多态性, 且多态性检出率高。因此被广泛应用到群体遗传结构分析、系谱鉴定、基因定位及杂种优势预测等领域。【本研究切入点】猪的大多数经济性状不仅受本身遗传基础的影响, 还受环境的制约, 使杂种优势的利用与预测具有不确定性。随着分子标记技术的产生与广泛的应用, 利用多态性遗传标记

收稿日期: 2005-10-19; 接受日期: 2006-02-26

基金项目: 国家“973”计划 (G2000016105) 和国家“863”计划 (2001AA243031)

作者简介: 张凤伟 (1979-), 男, 内蒙古通辽人, 博士, 研究方向为猪分子遗传学与育种。Tel: 13237144479, 027-87287486; E-mail: zfw2004790921521@126.com。通讯作者邓昌彦 (1949-), 湖北武汉人, 教授, 研究方向为猪分子遗传学与育种。Tel: 027-87287390; E-mail: dengchy@mail.hzau.edu.cn

研究不同群体之间的亲缘关系,进而对后代的杂种优势进行有效预测也成为一个新的课题。【拟解决的关键问题】笔者试图利用 RAPD 技术估测亲本群体间的遗传关系,并分析 RAPD 参数与猪的主要经济性状杂种优势的相关性,探讨利用 RAPD 分子标记技术预测杂种优势的可能性。

1 材料与方法

1.1 猪群来源与亲本池 DNA 的制备

本试验所用的试畜均来自华中农业大学精品猪场,其中包括:长白公猪 29 头、长白母猪 22 头、大白公猪 19 头、大白母猪 21 头、梅山公猪 35 头、梅山母猪 26 头、大长 33 头、长大 37 头、大梅 116 头、梅大 47 头。为了获得 4 个杂交组合在重要经济性状上的杂种优势率,对纯种及杂交进行组合肥育试验,试验参照美国 NRC 标准配制饲料,肥育期测定平均日增重及料重比,肥育期结束后屠宰采血,并进行胴体性状测定,测定方法按熊远著^[3]的方法进行。按常规方法(蛋白酶 K 消化、苯酚—氯仿抽提、乙醇沉淀)提取 6 个亲本群体的血液 DNA^[4],用于估计亲本间的 RAPD 标记遗传距离。提取的 DNA 稀释成 $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$,然后每个样吸取 $20 \mu\text{l}$,将同一亲本群体混合于一管中,制成 6 个亲本群体的池 DNA,置于 -20°C 冰箱中保存。

1.2 随机扩增多态 DNA (RAPD) 检测

首先用 228 个引物分别对 6 个亲本群体池 DNA 进行扩增,从中筛选出多态性丰富且条带清晰、主带重复性好的引物,然后对 6 个亲本群体池 DNA 进行正式扩增,每个反应至少 2 次重复,并且设立不含模板的阴性对照。PCR 反应体系总体积 $25 \mu\text{l}$,其中模板 DNA 100 ng , $10 \times \text{buffer}$ $2.5 \mu\text{l}$, dNTP $2.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, MgCl_2 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,引物 $5 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$, TaqDNA 聚合酶 2 U (Operon 公司)。用 9600PCR System (Ver1.05) 扩增仪扩增。反应程序为: 94°C 预变性 4 min,然后 94°C 1 min, 40°C 1 min, 72°C 2 min, 40 个循环,最后 72°C 后延伸 10 min。PCR 产物在含 $0.5 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ EB 的 1.5% 琼脂糖凝胶、 $1 \times \text{TAE}$ 缓冲液中, $3 \sim 5 \text{ v} \cdot \text{cm}^{-1}$ 电泳 $3 \sim 4 \text{ h}$ 。最后在紫外灯下观察,用数码相机拍照。

1.3 统计分析方法

清晰易辨且能重复的带记为“1”,否则记为“0”。遗传距离的计算采用 Nei 公式^[5, 6]: $S=2\text{Nab}/(\text{Na}+\text{Nb})$, $D=1-S$ 。式中 S 为带纹相似性系数, Nab 为亲本群体 a 和亲本群体 b 共同具有的带纹数,

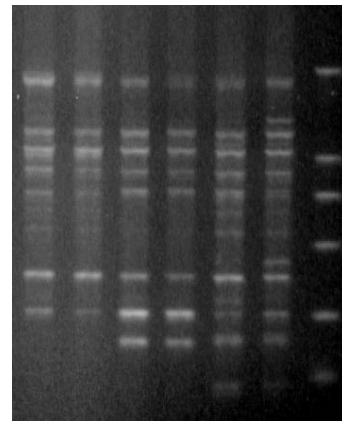
Na、Nb 分别为亲本群体 a 和亲本群体 b 各自具有的带纹数, D 为两亲本群体间遗传距离。

2 结果与分析

2.1 RAPD 扩增结果

在所采用的 228 个引物中共有 187 个在混合 DNA 中可扩增出较清晰的带型。其中有 42 个引物扩增结果为单态,其余引物均产生了不同程度的多态。从能够产生多态性的引物中筛选出 36 条多态性丰富且条带清晰、主带重复性好的引物,其中 22 条引物在相同品种不同性别中产生了多态。表 1 为这 36 条引物的扩增情况。36 条引物在 6 个亲本群体中扩增的总条带数为 494 条,平均每条引物 13.72 条,多态条带数为 247 条,平均每条引物 6.86 条,多态频率为 0.5。单个引物获得条带数在 $5 \sim 20$ 之间,条带大小处于 $100 \sim 2500 \text{ bp}$ 不等。图 1 是引物 S12 扩增后的电泳结果。

1 2 3 4 5 6 M



1~6 泳道分别为长白猪(♀)、长白猪(♂)、大白猪(♀)、大白猪(♂)、梅山猪(♀)、梅山猪(♂); M 为 Marker DL 2 000
1-6: landrace (♀), landrace (♂), large white (♀), large white (♂), meishan (♀), meishan (♂); M: marker DL 2 000

图 1 S12 扩增电泳图谱

Fig. 1 RAPD amplification with primer S12

2.2 亲本间的带纹相似系数与遗传距离

对 36 条引物的扩增结果进行记录,其中模糊和重复性差的条带不计在内。根据 Nei 公式计算 4 个杂交组合亲本间带纹相似系数与遗传距离,结果列于表 2。从表 2 可以看出,杂交组合梅大、大梅、长大和大长亲本群体间带纹相似系数分别为 0.7792、0.7681、0.8561 和 0.8482,相应的遗传距离分别为 0.2208、0.2319、0.1439 和 0.1518。

表 1 36 条引物的扩增情况

Table 1 Bands amplified with 36 primers

引物 Primer	条带数 No. of bands	多态数 No. of polymorphic bands	多态条带在各亲本群体中的分布 Distribution of polymorphic bands in parental populations					
			长白 ♂	长白 ♀	大白 ♂	大白 ♀	梅山 ♂	梅山 ♀
			Landrace ♂	Landrace ♀	Large white ♂	Large white ♀	Meishan ♂	Meishan ♀
S12	12	7	1	1	1	2	3	5
S17	17	10	3	3	4	4	6	6
S22	17	9	1	0	2	0	3	4
S25	10	4	1	2	1	1	1	2
S28	11	6	6	6	2	2	0	0
S29	10	3	1	0	0	0	3	3
S37	17	10	4	4	4	4	5	5
S38	12	6	2	2	3	3	4	4
S53	12	6	1	1	3	2	4	4
S55	14	5	2	2	3	3	3	3
S62	16	8	2	1	2	3	7	7
S64	17	6	2	2	4	4	4	4
S65	13	6	5	5	3	3	1	3
S66	20	12	5	6	6	7	10	9
S75	16	9	3	3	6	6	4	4
S85	13	7	6	6	6	6	1	1
S90	13	5	4	4	4	3	1	1
S93	15	5	2	2	1	1	4	4
S97	10	5	2	2	3	3	3	3
S100	12	5	1	1	1	1	4	5
C11	13	6	4	4	1	5	1	3
G10	10	4	3	2	1	1	2	2
G18	14	6	1	1	4	2	6	4
H04	13	7	3	1	5	4	5	4
H09	10	6	2	3	2	2	2	2
H13	18	9	5	5	4	4	5	5
E14	16	6	6	5	3	2	2	2
E20	13	7	2	2	7	6	4	4
I05	14	9	1	1	6	5	3	3
I09	8	5	5	3	5	4	2	1
I14	17	11	6	6	4	4	4	4
J06	11	5	2	3	3	2	3	4
J18	20	12	4	4	7	7	5	5
L02	19	9	6	4	5	4	3	3
L09	5	3	2	2	3	3	1	1
L20	16	8	2	3	2	1	3	5
Total	494	247	108	102	121	114	122	129

表 2 各亲本间的带纹相似系数和遗传距离

Table 2 Similar coefficients and genetic distances between parental lines

杂交组合 Crossbreed	双亲总带数 No. of total bands from parents		双亲共有带数 (Nab) No. of mutual bands from parents(Nab)	带纹相似系数 Similar coefficient	遗传距离 Genetic distance
	父 (Na) Father (Na)	母 (Nb) Mother (Nb)			
	梅大 Meishan × Large white	407	399	314	0.7792
大梅 Large white × Meishan	405	410	313	0.7681	0.2319
长大 Landrace × Large white	393	399	339	0.8561	0.1439
大长 Large white × Landrace	405	392	338	0.8482	0.1518

2.3 杂交组合亲本间遗传距离与其经济性状杂种优势率的相关系数

根据 SAS 统计分析软件之 CORR 过程, 计算 4 个杂交组合亲本群体间遗传距离与其经济性状杂种优势率之间的相关系数, 结果列于表 3。由表 3 可见亲本间遗传距离与 10 个经济性状杂种优势率的相关系数的绝对值在 0.2928~0.9737 之间。有的呈正相关(日

增重、料重比、屠宰率、平均背膘厚), 有的呈负相关(瘦肉率、肉脂比、眼肌面积、皮率)。并且遗传距离与料重比和眼肌面积杂优势率的相关系数达到显著程度 ($P < 0.05$), 而与肥肉率、内脂率等性状杂优势率的相关系数则非常小。结果显示亲本间的遗传距离与杂种优势的相关程度随不同性状而异。

表 3 10 个经济性状的杂种优势率及其与亲本间遗传距离的相关系数

Table 3 Heterosis percentage of 10 traits and their correlation coefficients with genetic distances

	日增重 ADG	料重比 RFM	屠宰率 CY	内脂率 IFP	瘦肉率 LMP	肥肉率 FP	肉脂比 RLF	眼肌面积 LEA	平均背膘厚 ABT	皮率 SP
梅大 MLW	15.59	-5.49	0.14	0.16	-2.26	5.42	-35.60	-4.31	9.99	-6.85
大梅 LWM	12.15	-4.04	0.64	13.67	-1.84	30.32	-40.21	-1.60	18.39	-12.85
长大 LLW	11.39	-9.37	-0.32	7.92	-2.14	24.73	-26.52	11.07	6.53	-9.15
大长 LWL	7.01	-7.91	0.31	-1.52	0.75	-4.61	10.26	11.83	3.70	-3.65
<i>r</i>	0.6834	0.9714*	0.6623	0.3404	-0.4742	0.2921	-0.7069	-0.9675*	0.8573	-0.5321

“*” : 表示相关显著($P < 0.05$)

“**”: Indicating significant difference ($P < 0.05$), MLW: Hybrids of Meishan (δ) and Large white (φ), LWM: Hybrids of Large white (δ) and Meishan (φ), LLW: Hybrids of Landrace (δ) and Large white (φ), LWL: Hybrids of Large white (δ) and Landrace (φ), ADG: Average daily gain ($\text{kg}\cdot\text{d}^{-1}$), RFM: Ratio of feedstuff to meat, CY: dressing percentage (%), IFP: Interiorfat percentage (%), LMP: Lean meat percentage (%), FP: Fat percentage, RLF: Ratio of lean meat to fat, LEA :Lion eye area(cm^2), ABT: Average backfat thickness(mm), SP: Skin percentage (%)

3 讨论

RAPD 扩增所用的引物为 10 碱基随机引物, 在 PCR 反应时允许引物的 5'端有 1~4 个碱基的错配, 这是导致 RAPD 技术重复性差最根本的原因^[7]。因此为了使结果更具可靠性, 筛选稳定性好的引物至关重要。同时, 无多态或多态性差的引物不能真实的反映群体间的亲缘关系, 因而这类引物在引物筛选时应予以剔除。只有重复性好且多态性丰富的引物才能保证扩增结果的可靠性。但是扩增结果重复性与多态性的度量并没有一个公认的标准, 主要还是依靠试验者的经验判断。这就使不同的试验者即便使用相同的引物分析相同群体的遗传距离, 所得的结果也不尽相同。但笔者认为通过 RAPD 技术获得的、具有重要意义的并不是各个群体间遗传距离的绝对数值, 而是根据这些值的相对大小所得的群体间的亲缘关系, 或者是这些值与性状值、杂种优势率的相关关系。同时, 不同的引物所获得的遗传距离也不尽相同, 甚至相差很大。但是, 随着引物数量的增加, 各个引物所得遗传距离的相对大小却趋于稳定的数值。这说明所用的引物越多, 所得结果也就越可靠。本试验也证实了这一点: 根据 36 条引物的扩增结果, 梅大和大梅亲本群体间遗传距离(0.2208、0.2319)比较相近, 但远大于长大和

大长亲本群体间的遗传距离(0.1439、0.1518), 这一结果与长白、大白都是国外猪种, 而梅山猪是中国本地猪种的实际情况相符。同时也与施启顺等^[8]分析所得的长大和大长亲本间遗传距离(0.1431、0.1572)十分吻合。这进一步说明了 RAPD 技术可以为不同品种、品系间的亲缘关系和系统学研究提供科学可靠的研究工具。

猪的大多数经济性状表现为数量性状特点, 不仅受本身遗传基础的影响, 还受环境的影响, 这给杂种优势的利用与预测带来了很大的不确定性。随着分子标记技术的产生与日益完善, 能否应用多态性遗传标记研究不同群体之间的亲缘关系, 进而对后代的杂种优势进行有效预测的问题也应运而生。在这个研究领域, 不少学者进行了积极的探索。刘荣宗等^[9]利用 RAPD 技术对猪的 4 个杂交组合亲本间遗传距离与 F_1 代若干性状的杂种优势率进行了相关分析。结果表明: 亲本间 RAPD 标记的遗传距离与 F_1 代日增重、屠宰率、料重比的杂种优势率呈极显著正相关。赵凯等^[10]利用 RAPD 技术测定了 9 个杂交组合亲本间的遗传距离。结果表明: RAPD 标记遗传距离与 F_1 代平均日增重、屠宰率和瘦肉率显著正相关, 与平均背膘厚、饲料转化率呈显著负相关。施启顺等^[8]测定了 7 个品种(杂交组合)的 RAPD 参数。结果表明: 亲本间 RAPD 标

记遗传距离与料重比、屠宰率的杂种优势率呈正相关,与眼肌面积、瘦肉率的杂种优势率呈负相关。本试验研究结果(除瘦肉率外)基本上与上述结果相符。同时,由本试验结果与上述学者的研究结果可以看出,亲本间的距离与杂种优势的相关程度因性状而异。引起这一现象的原因可能是:(1)不同性状产生杂种优势的机制不同,一般而言,遗传力低的性状在杂交时应具有较高的杂交优势。(2)遗传距离所反应的是两个群体基因组整体水平上的差异,而两个群体某一性状的遗传差异与整体水平的遗传差异有时并不一致。同时,不同性状的遗传差异也并不相同。尽管如此,结合其他学者的研究结果,可以认为,利用 RAPD 标记遗传距离估测猪主要经济性状的杂种优势,具有重要参考价值。

4 结论

选择 36 条多态性丰富且条带清晰、主带重复性好的 10 碱基随机引物,利用 RAPD 技术分析了猪的 4 个杂交组合梅大、大梅、长大、大长亲本群体间的遗传距离与其主要经济性状杂优率的相关性。研究结果显示亲本间的遗传距离与杂种优势的相关程度随不同性状而异。因而,在利用 RAPD 技术估测猪主要经济性状杂优率的育种实践中,应根据不同的性状制定不同的育种计划。

References

- [1] Williams J G K, Kubelik A R, Libak J et al. DNA Polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18: 6531-6535.
- [2] Welsh J, McClelland C. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18 (24): 7213-218.
- [3] 熊远著.种猪测定原理及方法.北京:中国农业出版社,1999: 57-118.
Xiong Y Z. *Introduction to Breeding Pig Measurement*. Beijing: China Agricultural Press, 1999: 57-118. (in Chinese)
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatic T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 464-467.
- [5] Nei M, Li W H. Mathematic model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1979, 76: 5269-5273.
- [6] 张继全,邵春荣,王毓英,陈幼春. Nei 氏标准遗传距离的估测精度. *畜牧兽医学报*, 1998, 29 (1): 27-32.
Zhang J Q, Shao C R, Wang Y Y, Chen Y C. Accuracy of the estimation of Nei's standard genetic distance. *Acta Veterinaria Et Zootechnica Sinica*, 1998, 29 (1): 27-32. (in Chinese)
- [7] Neale D B, Harry D E. Genetic mapping in forest trees: RFLPs, RAPDs and beyond. *AgBiotech News and Information*, 1994, 6: 107-114.
- [8] 施启顺,王忠华,黄生强,柳小春. RAPD 标记与猪主要经济性状杂种优势的关系. *湖南农业大学学报*, 2002, 28 (4): 326-329.
Shi Q S, Wang Z H, Huang S Q, Liu X C. Relationship between genome RAPD markers and heterosis of major economic traits in pigs. *Journal of Hunan Agricultural University*, 2002, 28 (4): 326-329. (in Chinese)
- [9] 刘荣宗,施启顺,柳小春,陈斌,黄生强,贺长青. 利用 RAPD 标记预测猪部分经济性状杂种优势的研究.见:中国动物遗传育种研究进展—第九次全国动物遗传育种学术讨论会论文集.北京:中国农业科学出版社,1997: 78-82.
Liu R Z, Shi Q S, Liu X C, Chen B, Huang S Q, He C Q. Study on forecasting the heterosis of partial economic traits by RAPD markers in pigs. In: *Proceedings of 9th National Symposium on Animal Genetics and Breeding*. Beijing: China Agricultural Science & Technology Press, 1997: 78-82. (in Chinese)
- [10] 赵凯,张周平,杨公社,周继平,魏雅萍. 用 RAPD 标记选配猪杂交组合的研究. *中国畜牧杂志*, 2001, 37(2): 17-19.
Zhao K, Zhang Z P, Yang G S, Zhou J P, Wei Y P. Study on selected mating of highbrid combination by RAPD markers in Pig. *Chinese Journal of Animal Science*, 2001, 37(2): 17-19. (in Chinese)

(责任编辑 闫龙凤)