

RAPD 技术分析亲本鸭及其杂交后代的基因组变化

苏 瑛¹, 刘楚吾^{1*}, 叶昌辉¹, 刘 丽¹, 张 锦², 蔡笛扬²

(1. 广东海洋大学, 广东 湛江 524088; 2. 广东省湛江市坡头区畜牧局, 广东 湛江 524045)

摘要: 对樱桃谷鸭和麻鸭及其杂交子代(樱 ♂ × 麻 ♀) 3 个样本的基因组 DNA 进行了 RAPD 标记分析, 探讨了杂种优势产生的分子遗传机制。从 120 个随机引物中筛选出 20 个引物进行扩增, 460 条扩增带中, 有 330 条带具有多态性。群体内相似性指数分别为 0.7888(樱桃谷鸭)、0.7629(麻鸭)和 0.8227(F₁)。F₁ 与母本的相对遗传距离为 0.3300, 与父本为 0.3505, 表明 F₁ 偏向母本。

关键词: 樱桃谷鸭; 麻鸭; 杂交; RAPD; 基因组

中图分类号: S834 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2006)01-0104-04

RAPD Analysis of the Genomic of Parent Ducks and Their Hybrids

SU Ying¹, LIU Chu-wu¹, YE Chang-hui¹, LIU Li¹, ZHANG Jin², CAI Di-yang²

(1. Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

2. Zhanjiang Potou Bureau of Animal Husbandry, Zhanjiang 524045, China)

Abstract: The genomic changes of parent ducks and their hybrid were analyzed with RAPD method. 20 from 120 random primers were used to amplify genomic DNA of Cherry Valley Meat duck, Partridge ducks and their hybrids (C ♂ × P ♀). 460 bands were produced and 330 among them were polymorphism (71.73%). The inter-population similarity indexes were 0.7888 (C), 0.7629 (P) and 0.8227 (F₁) respectively, which showed greater variation among the parent and their hybrids. And the genetic distance between F₁ and its mother was 0.3300, while it was 0.3505 with its father, which indicated that the genome was more similar to its mother.

Key words: Cherry Valley Meat duck; Partridge ducks; Hybrid; RAPD; Genome

传统的杂交育种在遗传改良上取得了举世瞩目的成就, 但通常需要进行大量的试验以寻找合适的杂交组合, 因此, 必须寻求新的杂种优势预测方法。而以形态标记、系谱分析、配合力测定以及同工酶等方法相继用于遗传多样性研究, 但都表现出一定的局限性。近年来, 建立在以 DNA 结构多态性基础上的分子标记技术克服了传统标记的许多缺点, 已发展成为遗传多样性研究的重要工具, 并开始应用

于动物遗传育种^[1~3], 为人们从分子水平上探讨杂种优势的形成机制提供了有效手段, 加快了育种进程。其中, RAPD 分子标记技术因其操作简单快速, 无种属特异性, 有足够的随机引物可供利用^[4], 多态性检出率高等优点, 已逐渐应用于水产、畜禽等杂交育种方面^[5~7], 但在鸭的杂交育种方面目前尚未见报道。通过对樱桃谷鸭和麻鸭杂交组合及 F₁ 的 RAPD 扩增带谱进行分析, 探讨扩增带谱、遗传距离

收稿日期: 2005-09-29

基金项目: 广东省科技攻关项目(A200099A01); 湛江市科技攻关项目(2000-17)

作者简介: 苏 瑛(1962-), 女, 陕西洛南人, 副教授, 在读博士, 主要从事家禽资源及营养生态研究。

通讯作者: 刘楚吾(1952-), 男, 湖南湘乡人, 教授, 博士生导师, 主要从事发育生物学研究。E-mail: swyjs@zjou.edu.cn

与杂种优势的关系,以期能快速、准确地对杂交后代进行分析鉴定,为杂种优势提供分子生物学基础,将其与常规育种技术相结合,以缩短育种周期,培育优质鸭新品种。

1 材料与方法

1.1 材料

试验用亲本樱桃谷鸭(♂)、麻鸭(♀)和杂交 F_1 鸭的血样均采自湛江坡头六旺种鸭场。翅静脉下抽取约1.5 ml血液,ACD抗凝,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA的提取 抽取50 μl 血于1.5 ml Effendorf管中,加入500 μl 的STE(NaCl 100 mmol/L, Tris-HCl 10 mmol/L, EDTA 1 mmol/L pH 8.0), 10 000 r/min离心10 min,弃去上清液,在沉淀中加入50 μl STE溶解沉淀,加入450 μl 裂解液(Tris-HCl 10 mmol/L, EDTA 100 mmol/L, SDS 5 g/L pH=8.0)和蛋白酶K 5 μl ,轻轻摇匀; $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴消化3~4 h,待样品裂解成为澄清粘稠的液体后,然后先用等体积的苯酚/氯仿(1:1)抽提2次,10 000 r/min离心10 min取上清液;再用氯仿抽提1次,10 000 r/min离心10 min取上清液,加2倍体积无水乙醇沉淀,收集DNA絮状沉淀,然后用70%乙醇漂洗2~3次后,室温自然晾干。待无酒精味后,最后加TE(Tris-HCl 10 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, pH 8.0)溶解,紫外分光光度计定量,置 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存备用。

1.2.2 DNA的检测和定量 将母液各取6 μl ,用1.5%的琼脂糖凝胶电泳,根据电泳结果评价所提取DNA的浓度、纯度及完整性,以评估所提取的基因组DNA能否用于PCR。

1.2.3 PCR反应 体系为25 μl ,其中,含有10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 2.0 mmol/L MgCl_2 1 μl , 200 $\mu\text{mol/L}$ dNTPs 1 μl , 随机引物(5 pmol/ μl) 1 μl , 基因组DNA (50 ng/ μl) 1 μl , Taq DNA聚合酶(5 U/ μl) 0.4 μl , 反应混合物用石蜡油覆盖。PCR反应过程依次为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性200 s, $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性20 s, $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火40 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸70 s,经40个循环后再在 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸300 s。每个引物都设立1个空白对照组。

1.2.4 试剂和仪器 试验所用的引物、TaqDNA聚合酶及其配套试剂, dNTPs、 $\lambda\text{DNA/EcoRI+HindII}$ Marker等为华美生物有限公司产品,PCR扩增仪为Hema480。取10 μl 扩增产物经1.5%琼脂糖凝胶

(含0.5 $\mu\text{g/ml}$ EB)电泳,电压5 V/cm,常用荧光染料溴乙锭(EB)染色,用Tanon GIS-2008紫外凝胶分析仪观察DNA条带并拍照分析。

1.2.5 数据处理 群体内个体间遗传相似度计算公式: $F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$, 式中 N_{xy} 为X和Y 2个个体共有的扩增带; N_x 、 N_y 为X和Y个体分别拥有的扩增带。

个体间遗传距离指数 $D = 1 - F$

群体间遗传距离 $(D) = -\ln[S_{ij} / (S_i S_j) 0.5]^{[8]}$ 。式中 S_{ij} 为群体间遗传相似度,表示群体i和群体j间所有配对个体相似系数的平均值, S_i 、 S_j 分别为群体i和群体j内所有配对个体相似系数的平均值。

多态位点频率:将RAPD标记作为等位基因进行多态分析,多态位点频率 $p = \text{多态位点数} / \text{总位点数}$ 。观察分析电泳谱带时,只统计清晰、重复性好的条带。有带计为1,无带计为0,根据D值由UPGMA聚类分析统计软件构建它们的分子进化树。

2 结果

2.1 引物的筛选

从120个系列引物中经预备试验选出重复性好、图谱清晰、具有多态性扩增产物条带数较多的引物35个,从中再选取20个10 bp碱基随机引物(表1),用于对2个亲本及其杂交子代鸭所有个体的基因组DNA进行PCR扩增,引物编号及序列见表1。

2.2 RAPD的扩增结果

为了有利于扩增结果的分析比较和减少系统误差,所有RAPD扩增均在同一扩增仪上和相同批号的试剂下进行,每次扩增均设置不含DNA模板的空白对照。宋林生等研究指出^[10],扩增结果易受外界因素的影响,因此,要严格控制试验条件,才可得到重复理想的扩增效果。

扩增产生的片段数为2~14条,片段大小介于200~4 000 bp。由表1可知,20条引物共产生460条带,其中多态性带330条,占总条带数的71.73%,表明2个亲本及其杂交 F_1 具有显著的多态性。亲本中的母本——麻鸭扩增出的片段总数最多(159条),父本——樱桃谷鸭扩增的片段总数为157条,而 F_1 鸭扩增的片段最少,为134条。父本鸭共享片段最少,为48条;母本和 F_1 的共享片段数均为55条。母本多态位点最多,122条,而 F_1 鸭多态位点最少,仅为91条。部分引物的扩增结果见图1、图2、图3。

3个样本所有的扩增位点可分为以下几种类型:

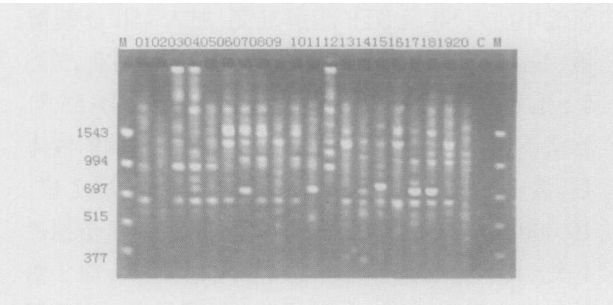
表 1 20 条随机引物 PCR 扩增的总条带与多态性片段数

引物	碱基序列(5'→3')	扩增产物条带数	多态位点数
OPA4	AATCGGGCTG	22	25
OPA6	GGTCCCTGAC	14	14
OPA7	GAAACGGGTG	24	18
OPA8	GTGACGTAGG	28	22
OPA9	GGGTAACGCC	27	17
OPA10	GTGATCGCAG	28	20
OPA12	TCGGCGATAG	31	30
OPA14	TCTGTGCTGG	15	1
OPA16	AGCCAGCGAA	30	25
OPA18	AGGTGACCGT	30	31
OPA20	GTTGCGATCC	22	12
OPF9	CCAAGCTTCC	17	8
OPV6	ACGCCCAGGT	20	12
OPV16	ACACCCACA	22	13
OPV18	TGGTGGCGTT	25	16
OPZ8	GTGGCATCTC	28	17
OPZ9	ACAGCCTGCT	13	9
OPZ11	AAGGTCACC	22	14
OPZ16	AGTCGCCCTT	21	11
OPZ17	GTGGAGTCAG	21	15
SUM		460	330
Mean		23	16.5
多态性比率(%)			71.73

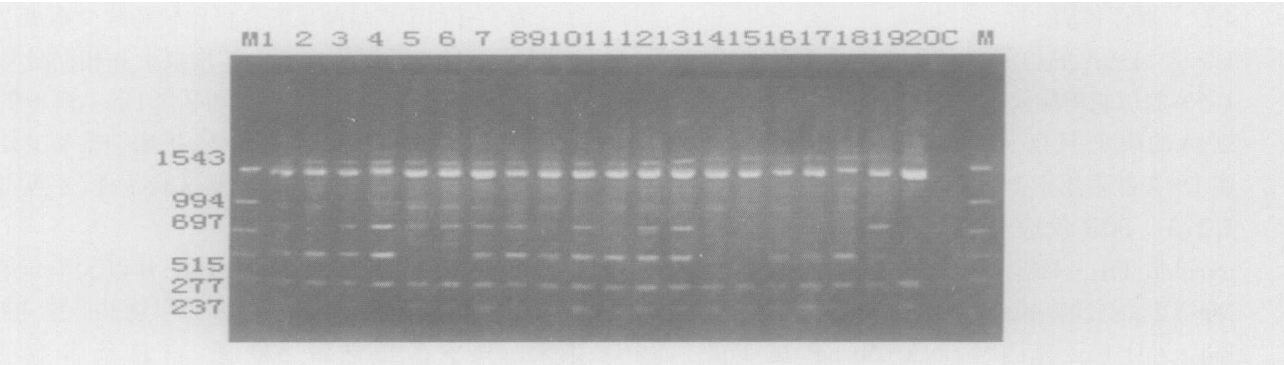
一是杂交 F₁ 和双亲均有的扩增位点, 共 48 个; 二是杂交 F₁ 和它的母本存在 18 个共享位点; 三是仅为两亲本所有的扩增位点 21 个; 四是两亲本和杂交 F₁ 出现各自的特异条带, 但 F₁ 特异性条带较少 (仅有 7 个)。



M—PCR Market; C—空白对照;
图 1 樱桃谷鸭(父本)基因组的 DNA 用随机引物 OPA08 扩增产物电泳图



M—PCR Marker; C—空白对照
图 2 麻鸭(母本)基因组的 DNA 用随机引物 OPA12 扩增产物电泳图



M—PCR Market; C—空白对照
图 3 子代鸭基因组的 DNA 用随机引物 OPA10 扩增产物电泳图

2.3 相似性指数和相对遗传距离

根据 20 个引物的扩增带谱, 进行统计分析, 计算出樱桃谷鸭和麻鸭及其杂交 F₁ 的群体内和群体间的相似性指数和相对遗传距离, 结果见表 2。由表 2 可以看出: 两亲本群体内的相似性指数 S<0.8, 说明两亲本群体内存在一定的遗传变异; 两亲

本群体内的相似性指数分别为 0.7888 和 0.7629, 皆小于杂交 F₁ 的群体内的相似性指数 0.8227, 表明杂交子代群体内的遗传差异比两亲本要低。樱桃谷鸭及其杂交 F₁ 的相对遗传距离为 0.3505, 而麻鸭与其杂交 F₁ 的相对遗传距离为 0.3300。可见, 杂交 F₁ 与两亲本的遗传差异不是对等的, 而是偏向

麻鸭。

表 2 3 个鸭品种间的相似系数和遗传距离

品种	樱桃谷鸭	麻鸭	F ₁
樱桃谷鸭	0.7888	0.3395	0.3505
麻鸭	0.6606	0.7629	0.3300
F ₁	0.6495	0.6700	0.8227

注: 对角线上方为遗传距离, 对角线下方为相似系数。下划线的为群体内遗传相似性系数

3 讨论

试验从 120 个引物中筛选到 20 个引物, 均在 2 个亲本及其杂交后代鸭群体间或群体内检测到了基因组的差异, 但每个引物检测出的差异程度有所不同。20 个引物的 460 条扩增带中, 有 330 条带具有多态性(71.73%), 表明 RAPD 是一种高效的检测 DNA 多态性的方法。在 2 个亲本和 F₁ 群体中, 群体内的遗传相似性指数在 0.7629~0.8227 之间, 显示所研究的鸭具有较高水平的遗传变异。根据 2 个亲本及其杂交后代鸭群体的计算结果, F₁ 和麻鸭的遗传距离为 0.3300, 而与樱桃谷鸭的遗传距离为 0.3505, 说明 F₁ 与麻鸭更接近些。从两亲本和杂交子代表型性状羽色分析, 樱桃谷鸭为纯白色、麻鸭羽色为麻色, 而 F₁ 鸭羽色为浅麻色或部分麻羽。无纯白羽色, 这也反映了其遗传特性。

Melchinger^[10] 认为, 在亲缘关系远的组合中, 遗传距离与杂种优势无相关性。但在遗传距离小于 0.54 的范围内, 亲本间的遗传距离越大, 杂种子代基因组的杂合度越高, 因而杂种优势越强。按 Melchinger 所用的计算方法, 本试验所用的两亲本的遗传距离为 0.3395, 小于 0.54, 且杂交子代群体内的相似性指数皆大于两亲本, 即其杂合性高于两亲本的杂合性, 所以理论上两者杂交可产生杂种优势。实践已经证明, 其杂交后代呈现了明显的杂种优势, 可见用樱桃谷鸭作父本、麻鸭作母本应是理想的亲本组合。

通过分子标记还可对群体进行遗传多样性评价, 确定杂种优势群归属, 监控其遗传多样性变化。显性假说和超显性假说都是建立在遗传差异的基础上, 利用遗传距离预测杂种优势正是遵循这一思路。然而杂种优势是一个非常复杂的生物学现象, 涉及

大量相关基因间的相互组合与互作, 并且受到遗传背景的影响; 利用分子标记遗传距离预测杂种优势尚处于探索阶段, 理论和方法均未成熟, 离育种实践还有一定差距。然而, 随着畜禽遗传图谱的建立, DNA 分子标记必将成为未来预测杂种优势的主要工具, 且已显示出巨大的效力。总之, 通过分子标记揭示育种材料或种质资源间的遗传关系, 为育种家正确选择多样性的杂交亲本, 系统导入新种质, 建立和改良育种群体提供了必要的信息。

参考文献:

[1] Burstin J, Charcosset A, Barriere Y, *et al.* Molecular markers and protein quantities as genetic descriptors in maize II priduction of permance of hybrinds for forage traits.[J] . Plane Breeding, 1995, 114: 427—430.

[2] Lee M, Godshalk E B, Lamkey K R. Association of RFLP among maize in breds with agnomic permance of their crosses[J] . Crop Science, 1989, 29: 1067—1071.

[3] 蒋曹德, 邓昌彦. DNA 标记与动物杂种优势的关系研究进展[J] . 黄牛杂志, 2001, 27(3): 6—9.

[4] 蒋曹德, 邓昌彦, 熊远著. 随机扩增多态 DNA 规范化反应体系的探讨[J] . 生物技术通报, 2002(3): 41—43.

[5] KariElo, Sakul vanoff, Jukka A n. Heritance of RAPD markers and detection of interspecific hybridization with brown trout and Atlantic salmon[J] . Aquaculture, 1997, 55—656.

[6] 万俊芬, 汪小龙, 潘洁, 等. 日本盘鲍×皱纹盘鲍子代杂种优势的 RAPD 分析[J] . 青岛海洋大学学报, 2001, 31(4): 506—512.

[7] 夏德全, 曹莹, 杨弘. 罗非鱼杂交 F₁ 代与亲本的遗传关系及杂种优势的利用[J] . 中国水产科学, 1999, 6(4): 29—32.

[8] 吕雪梅, 杨关福, 张细权, 等. 蛋鸡品系 RAPD 变异及其与杂种优势关系的分析[J] . 遗传, 1999, 21(2): 24—28.

[9] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J] . Proc Natl Acad Sci USA 1979, 76(10): 5269—5273.

[10] 宋林生, 相建海. 日本对虾野生种群和养殖种群遗传结构的 RAPD 标记研究[J] . 海洋与湖沼, 1999, 30(3): 261—266.

[11] Melchinger A E, Lee M, Lamkey K R. Genetic diversity for restriction fragment length polymorphisms and heterosis for two diallel sets of maize inbreds[J] . Theor Appl Genet, 1990, 80: 488—496.