

西部地区主要猪品种与野猪遗传聚类分析

庞卫军, 孙世铎, 李 影, 马 健, 杨公社*
(西北农林科技大学动物科技学院, 陕西杨凌 712100)

摘 要: 对八眉猪、内江猪、荣昌猪、汉江黑猪等西部地区地方品种和汉中白猪、长白猪、大白猪、杜洛克猪等 8 个猪品种以及野猪基因组 DNA 混合 DNA 样进行了 RAPD 分析。根据 8 个多态引物的扩增结果计算了遗传距离指数并进行了 UPMGA 聚类分析。结果表明: 长白猪与大白猪亲缘关系最近, 八眉猪和汉江黑猪次之, 而野猪与长白猪的遗传距离最远。综合考虑现行的分类结果及前人研究结果, 认为内江猪、八眉猪和汉江黑猪为一类型, 荣昌猪和汉中白猪可划分为同一类型, 但对野猪与其他品种的亲缘关系应作进一步分析。

关键词: RAPD; 地方猪品种; 遗传距离; 聚类分析

中图分类号: S828 文献标识码: A 文章编号: 1004-1389(2005)01-0121-04

Cluster Analysis of Phylogenesis among Native Pig Breeds and Wild Pig in West China

PANG Wei-jun, SUN Shi-duo, LI Ying, MA Jian and YANG Gong-she*
(College of Animal Science, Northwest A&F University, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract Random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) were used to investigate bulked genomic DNA polymorphism of 8 pig breeds and wild pig in west China including Duroc, Landrace, Large white, Neijiang pig, Rongchang pig, Hanjiang Black pig, Hanzhong White pig, Bamei pig and wild pig. The genetic distance index matrix and UPMGA phylogenetic trees generated from 8 polymorphic primer amplified results showed that the genetic relationship between Landrace and Large white was the closest, while that between wild pig and Large white was the farthest. It was inferred from this study that Neijiang pig, Bamei pig and Hanjiang Black pig could be classified into one type, as the same to Rongchang pig and Hanzhong White pig. However, the population genetic character of wild pig should be further evaluated.

Key words RAPD; Native pig breeds; Genetic distance; Cluster analysis

我国西部地方猪种资源丰富, 拥有 20 余个地方猪品种(群)^[1]。了解这些猪种(群)的遗传多样性及其种群关系, 对于品种的起源进化研究、合理分类和保存以及科学开发利用都具有重要的指导意义。自 80 年代初以来, 研究人员相继利用生化、免疫和细胞学遗传标记探讨了地方猪种(群)品种间的遗传关系、品种的进化和起源以及系统分类, 并取得了一系列的成果。随机扩增多态性 DNA

(Random amplified polymorphic DNA, RAPD)技术是 1990 年由 Welsh 和 Williams 两个研究小组同时在各自的实验室建立起来的一项 DNA 多态检测技术。该技术以 PCR 为基础, 利用一系列单一的人工合成的随机引物序列寡核苷酸链(一般为 10bp)作为引物, 对所研究的 DNA 进行扩增。RAPD 的引物量大, 理论上可以使检测区域几乎覆盖整个基因组。RAPD 非常适用于大批量

收稿日期: 2004-04-28 修回日期: 2004-09-21
基金项目: 国家自然科学基金(39570533)资助项目。
作者简介: 庞卫军(1972-), 男, 博士研究生, 主要从事猪的分子育种研究。

* 通讯作者

样品的群体遗传研究^[2]。该方法自 1990 年建立以来已被广泛地用于多态性分析^[3]、遗传图谱的构建^[4]、筛选鉴定与目标基因紧密连锁的 RAPD 标记^[5]、遗传家系分析^[6]以及品种(系)的亲缘关系鉴定^[7]、抗病基因研究^[8]等。

从分子水平研究八眉猪、内江猪、荣昌猪、汉江黑猪等地方品种和汉中白猪、长白猪、大白猪、杜洛克猪以及野猪遗传结构的研究国内外很少报道。本研究将采用 RAPD 技术分析引入品种、地方品种及培育品种的亲缘关系,探讨 RAPD 技术应用于群体遗传变异和亲缘关系研究的意义和价值,为西部地区地方猪种系统分类提供新的参考和分子水平的依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验采用 8 个猪种和野猪共 265 头作为试验动物,其中杜洛克(DU)30 头,长白(CH)32 头,大白(DA)30 头,内江猪(NE)30 头,荣昌猪(RO)55 头,汉江黑猪(HH)30 头,汉白猪(HB)30 头,八眉猪(BA)20 头和野猪(YZ)8 头。每头猪采血样 5 mL 用 2%~3% 肝素钠抗凝,再取耳组织 0.5 g,放入盛有体积分数 70% 乙醇的冻存管中,血样和耳组织样均装于冰瓶内带回。

1.2 试验方法

1.2.1 猪基因组 DNA 的提取 参考文献[9,10],按常规方法分别从血液和耳组织中提取 DNA。将同品种的所有个体 DNA 分别等量混合,构建 9 个猪群的 DNA 池,并用 TE 稀释至 25 ng/ μ L。

1.2.2 RAPD 分析 20 个随机引物,分为 J、L、I、G 4 组,每组 5 条引物,均由北京鼎国生物工程有限公司合成,用于 9 个猪群 DNA 池及 DNA 的 RAPD 分析。其中, J-3、L-5 引物序列分别为: 5'-AAGAGAGGTG-3'、5'-TGGAGAGGAG-3'。RAPD-PCR 反应体系为 25 μ L,其中含有 10 $\times$ PCR Buffer 2.5 μ L, 5 mmol/L MgCl₂ 2.5 μ L, 2 mmol/L dNTP 1.5 μ L, 5 pmol/L 随机引物 1.0 μ L, 1.0 U/L Taq 聚合酶 1.0 μ L, 25 ng/ μ L 模板 2.0 μ L,去离子四蒸水 14.5 μ L,扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,然后 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 36 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min 38 个循环,最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。扩增产物用 2.0% 琼脂糖凝胶(含 0.5 μ g/mL 溴化乙锭)按 4~5 V/cm 的电压在 1 $\times$

TEA 电泳缓冲液中电泳 2~3 h,紫外灯下观察电泳结果,用 KoDAK 系统立拍成像仪拍照,进行电泳条带的判定分析。

1.3 数据处理

根据 Nei 和 Li 氏公式^[11]计算猪种间 RAPD 标记片段共享度(F)和遗传距离指数(D)。 $F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$, $D = 1 - F$ 其中, N_{xy} 为 X 和 Y 群体池 DNA 扩增产物中分子量相同片段总数; N_x 、 N_y 分别为 X 和 Y 群体池 DNA 扩增产物的 DNA 片段总数。应用 SPSS 统计软件对 D 值进行类平均法系统聚类分析,构建 8 个品种猪和野猪的聚类分析图。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 检测及 RAPD-PCR 图谱

基因组 DNA 的电泳检测结果见图 1,其中 1~9 泳道中的条带分别是杜洛克猪、长白猪、大白猪、内江猪、八眉猪、荣昌猪、汉江黑猪、汉中白猪和野猪基因组 DNA, M 泳道是 DNA Marker, M 泳道中离点样孔最近的带为 23130 bp, 1~9 泳道中基因组 DNA 清晰可见,大于 23130 bp,既无降解也无 RNA,质量很好。随机引物(J-3)对各猪种和野猪的基因组 DNA 扩增的结果见图 2,其中 M 泳道为 Marker(π DNA/HindIII + EcoRI), 1~3、5~10 泳道分别代表长白猪、大白猪、内江猪、杜洛克猪、八眉猪、荣昌猪、汉江黑猪、野猪和汉中白猪的扩增产物。

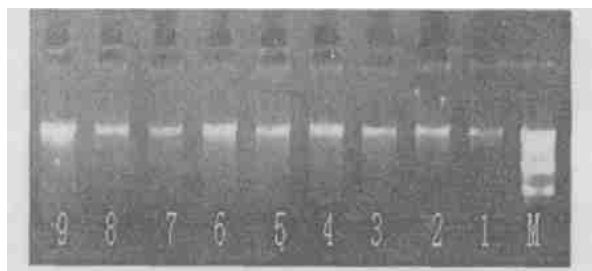


图 1 猪基因组 DNA 检测电泳图谱

Fig. 1 Gel electrophoretogram of pigs DNA

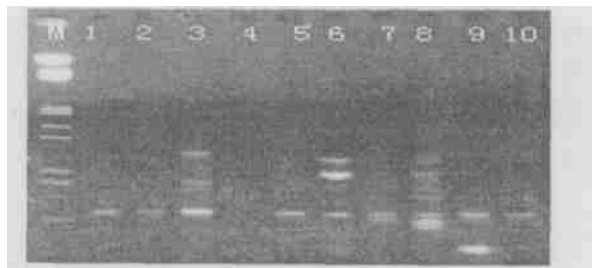


图 2 RAPD-PCR 图谱(J-3)

Fig. 2 Gel electrophoretogram of RAPD-PCR(J-3)

2.2 池 DNA的 RAPD结果分析

用 20个 10碱基随机引物进行池 DNA的 PCR扩增,结果 8个引物的扩增产物表现为多态,6个引物的扩增产物表现为单态,扩增产物的电泳条带数在 1~ 11条之间,平均为 4.1条,另外 6个引物无扩增产物或电泳带型不清晰,舍弃不

用。根据 8个引物 PCR扩增产物表现为多态的 DNA指纹图谱进行统计分析,计算 8个品种和野猪间距离系数(表 1),再用距离系数对各猪品种和野猪进行类平均法系统聚类,得到聚类图(图 3)。

表 1 8个猪品种和野猪间的遗传距离

Table 1 The genetic distance of 8 pig breeds and wild pig									d
Breeds	DU	CH	DA	NE	BA	HH	RO	HB	YZ
DU	0								
CH	0.0460	0							
DA	0.0638	0.0200	0						
NE	0.2128	0.2400	0.2264	0					
BA	0.1915	0.2600	0.2453	0.0833	0				
HH	0.1702	0.2600	0.2264	0.0625	0.0435	0			
RO	0.1064	0.0800	0.1698	0.1250	0.1522	0.1633	0		
HB	0.1277	0.1000	0.1509	0.1458	0.1739	0.1020	0.0980	0	
YZ	0.2927	0.3000	0.2831	0.2500	0.2391	0.2449	0.2549	0.2800	0

Rescaled Distance Cluster Combine

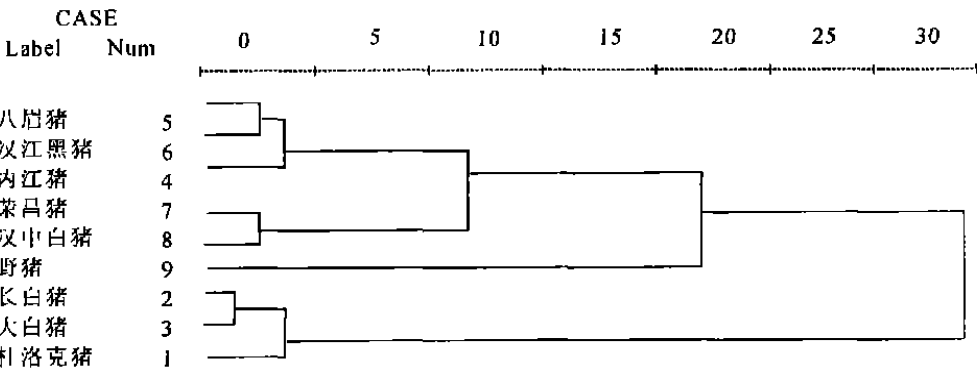


图 3 8个猪品种和野猪的聚类图

Fig. 3 UPMGA phylogenetic trees of 8 pig breeds and wild pig

2.3 品种个体间基因组 DNA的 RAPD结果分析

从 8个扩增产物为多态的随机引物中筛选出 4个特异性强的引物进行个体 DNA的 RAPD分析。结果表明,L-5扩增产物可明显的区别引入品种猪与地方品种,每品种 8个个体,重复 40个个体,结果可靠,故 L-5可作为引入品种和地方品种猪及野猪区别的标记引物。另外,J-3扩增产物在

不同品种中特异性带分布频率不同,根据该引物在不同品种中特异性带频率计算 8个品种猪和野猪群体内的相似系数(表 2),由表 2可以看出,引入品种群体内个体间相似系数明显地高于培育品种、地方品种及野猪,其中杜洛克猪群体内个体间差异最小,而我国地方品种八眉猪、汉江黑猪和内江猪群体内个体间的差异则较大,尤其是八眉猪的群体内个体间差异最大。

表 2 品种内个体间的相似系数

Table 2 Resemblance coefficient of different individuals in same breed

品种 Breeds	DU	CH	DA	NE	BA	HH	RO	HB	YZ
相似系数 Resemblance coefficient	0.9827	0.9826	0.9933	0.9607	0.9565	0.9523	0.9668	0.9704	0.9342

3 讨论

3.1 RAPD标记技术用于保护遗传资源的问题

了解群体的遗传结构对于物种进化和保护生物学研究而言极其重要,它是决定物种保护措施

和策略的依据。Crawford等^[12]认为要保存尽量多的遗传多样性,必须用合适的方法,以准确地测定品种间的遗传分化。常洪^[13]认为要保护一个物种,不论是原地保种还是迁地保种,在制定取样方案时,应了解种群的遗传结构及变异分布情况。

Barker等^[14]指出,决策保种计划时,遗传距离的信息应作为群体遗传结构和品种分化的最基本指标。总之,要保护一个物种的遗传多样性,首先得研究各品种的遗传距离。

本研究以品种间的遗传距离为参数,在此基础上通过类平均聚类分析研究了不同猪种和野猪间的亲缘关系,并且还分析了品种内的相似系数,认为引入品种选育程度高,品种内差异很小,遗传资源贫乏;而地方品种选育程度明显较低,品种内差异较大,遗传资源丰富,是培育新品种的宝贵的遗传材料。

3.2 RAPD标记分析结果的科学性问题

多数结果认为 RAPD亲缘分析结果能够很好地与血缘分化及地理分隔相吻合。但由于一方面 RAPD结果各实验室间重复性较差;另一方面 RAPD谱带来源不清,有可能同一条谱带来源于模板上不同序列。因此有人建议 RAPD结果应与染色体、同工酶、序列及其他研究进行比较,并且和表型联系起来,从而获得该问题可靠的结论。

任军等^[15]用 RAPD分析了赣中南花猪 7个群体。在种群亲缘关系分析时,永丰花猪与乐安花猪聚为一类,兴国茶园猪与上犹花猪聚为一类,这与各猪群地理间隔、血缘交流相吻合。而泰和冠朝猪与瑞金三花猪地理间隔较大也聚为一类,这与黄海根^[16]和罗明^[17]用“生化指纹”分析的结果相似。但与梁海平^[18]的银染核仁组织区法对泰和冠朝猪及万安花猪的亲缘关系及归属问题存在异议,这在 RAPD分析中也体现出来。造成这种差异的原因可能是样本含量小。总之,在对 RAPD反应条件优化后,所得结果可为遗传变异及亲缘关系分析提供有力证据。

本研究结果显示,8个猪品种和野猪亲缘关系与其地理位置表现出一定的相关性,即彼此地理位置靠近的类群,遗传关系往往比较密切。另外,不同猪品种的聚类分析结果与现行的分类情况以及采用生化、免疫和细胞学遗传标记分析的结论基本相似。这与品种育成历史与采样情况相符,因为社会地理环境和育成史是品种间亲缘关系远近的重要因素之一。引入品种的亲缘关系较近,地方品种也因社会地理环境的因素而亲缘关系远近不同,而培育品种都多少受引入品种的影响,亲缘关系较近。值得注意的是野猪与其他猪种的亲缘关系很特殊,为什么是先与我国地方品种和培育品种聚为一类再与引入品种聚为一类

呢?这似乎是与我国猪的起源进化有关,对此还有待进一步研究证实。

参考文献:

- [1] 中国畜牧兽医学会猪学分会,中国猪品种志编写组.中国猪品种志[M].上海:上海科学技术出版社,1986.
- [2] 严华军,吴乃虎. DNA分子标记及其植物遗传多样性研究中的应用[J]. 生命科学, 1996, 8(3): 32~ 36.
- [3] Amau J. The use of RAPD markers in the genetic analysis of plant pathogenic fungus *Cladosporium fulvum* [J]. Cut center, 1994, 25: 438~ 444.
- [4] Amornrat P. Linkage map of random amplified polymorphic DNAs (RAPD) in the silkworm [J]. Bombyx Center Res. Camb, 1995 (66): 1~ 7.
- [5] 雷雪芹. 牛、羊多胎性状的 DNA分子标记研究[D]. 西北农林科技大学博士论文, 2002.
- [6] Susan E W, Isaac P C, Slater R J. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium* [J]. Theor Appl Genet, 1993, 86: 497~ 504.
- [7] 刘德武,杨关福,李加琪,等. 用 RAPD标记分析 6个品种猪的群体遗传结构[J]. 畜牧兽医学报, 2002, 33(1): 18~ 22.
- [8] Stammers M, Harris J, Evans C M, *et al.* Use of random of PCR (RAPD) technology to analyse phylogenetic relationships in the *Lolium/Festuca* complex [J]. Heredity, 1995, 74: 19~ 29.
- [9] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南(第二版) [M]. 金冬雁, 黎孟枫, 译, 侯云德, 校. 北京: 科学出版社, 1999.
- [10] 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯顿 R E, 等. 精编分子生物学指南(第二版) [M]. 颜子颖, 王海林译. 北京: 科学出版社, 1999.
- [11] Nei M, Li W H. Proceeding of the National Academy of Sciences [C]. 1979, 76: 5269~ 5273.
- [12] Crawford A M, Montgomery G W, *et al.* Sheep linkage mapping. Nineteen linkage groups derived from the analysis of paternal half-sib families [J]. Genetics, 1994, 137: 573~ 579.
- [13] 常洪. 中国家畜遗传资源研究 [M]. 西安: 陕西人民教育出版社, 1997.
- [14] Barker J S F. Animal breeding and conservation genetics [A]. In: Conservation Genetic [C]. Editor: Loescheke V. Switzerland, 1994, 381~ 395.
- [15] 任军, 黄路生. 赣中南花猪随机扩增多态 DNA 与群体遗传关系的研究 [J]. 遗传, 2000, 22(2): 69~ 72.
- [16] 黄海根, 邹峰. 华东南地区部分家猪地方种群的亲缘关系及其起源分化初探 [J]. 江西农业大学学报, 1988, 10(4): 31~ 35.
- [17] 罗明, 林树茂. 利用血清蛋白质多态性探讨江西地方猪种的系统分类 [J]. 江西畜牧兽医杂志, 1996, 1: 2~ 7.
- [18] 梁海平, 罗明. 江西省几个地方猪种银染核仁组织区异态性的研究 [J]. 中国养猪学报, 1998, 1: 14~ 15.