

云南地方猪种线粒体 DNA 多态性研究

胡文平 连林生

(云南农业大学动物科技学院, 昆明 650201)

刘爱华 林世英 张亚平

(中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化开放实验室, 昆明 650223)

摘要 本文用 Apa I, Ava I, BamH I, Bcl I, Bgl I, Cla I, Dra I, EcoR I, EcoR V, Kpn I, Pst I, Puv II, Sal I, Sca I, Sma I, Stu I, Xho I 等 18 种限制性内切酶分析云南猪种的 mtDNA 多态性。在全部 18 头个体中只检出一种限制性类型, 结果表明, 云南猪种的 mtDNA 变异度很低, 遗传多样性贫乏, 提示云南猪种起源于一个共同的祖先, 在品种形成的早期可能受到创立者效应的制约。

关键词 云南猪种, 多态性, 线粒体 DNA

动物线粒体 DNA (mtDNA) 由于具有进化速度快, 母系遗传和分子简单易于分析等特点而成为研究近缘种间和种内群体间遗传分化关系的有力工具^[1]。国内外自八十年代中期已开始研究猪种之间的 mtDNA 多态性^[2~4], 发现世界上的家猪具有亚洲起源和欧洲起源两种类型。

云南由于独特的地理位置和复杂多样的气候和地理地貌, 再加上交通闭塞、地理隔离以及众多少数民族特有经济、文化活动, 保留有许多独特的家畜地方品种、类型, 是世界上至今保存最好的和具有特殊优良性状的猪种“基因库”地区^[5]。本文应用 mtDNA RFLP 技术分析云南版纳微型猪、撒坝猪以及大河猪的 mtDNA 多态性, 据此评估云南地方猪种的遗传多样性, 旨在探讨品种的起源和品种间的遗传分化关系, 从而为品种的保存以及品种的选育利用提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料来源 所采集的样品均来自原产于本地的纯种猪, 未受外界猪种血统干扰。1995 年从云南农业大学畜牧实验站采集 4 头版纳微型猪; 1994 年从楚雄州种猪场采 8 头撒坝猪; 1996 年从富源县大河种猪场采 6 头大河猪。

1.2 mtDNA 的提取 取新鲜或冻存的肝脏或肾脏组织按改进的碱变性法进行^[6]。

1.3 限制性内切酶消化 用于限制性片段长度多态分析的 18 种识别六碱基顺序的限制性内

* 本研究由云南省应用基础研究重大项目基金资助。

** 收稿日期 1996-11-11。

切酶是 Apa I, Ava I, BamH I, Bcl I, Bgl I, Bgl II, Cla I, Dra I, EcoR I, EcoR V, Kpn I, Pst I, Puv II, Sal I, Sca I, Sma I, Stu I, Xho I。除 Ava I, Apa I, Bcl I, Cla I, Stu I 五种购自 Promega 公司外,其余均购自华美生物技术公司,反应条件按各自产品推荐的条件进行,酶解溶液体积为 15ul, μg mtDNA 样品加入 5 单位的限制性内切酶,37℃ 消化 4~8h 后,加入 1/5 体积的载样缓冲液(10mmol/L Tris-HCl, 0.2mol/L EDTA, 0.15% 溴酚蓝, 50% 甘油, pH8.0) 终止反应。

1.4 琼脂糖凝胶电泳 以 0.8% 琼脂糖凝胶(含 0.5% $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溴化乙锭)电泳分离,电极缓冲液为 Tris-硼酸缓冲液(pH8.3),电泳时间 8~10h, Eagle Eye II 成像仪观察拍照。

2 结果与讨论

mtDNA 经某种限制性内切酶消化后获得的电泳条带称为限制性片段,这些片段的组合形式即为限制性类型。所用的 18 种限制性内切酶酶切后,每一种酶的限制性片段在检测的所有个体之间均未出现变异,表列示了每一种酶的限制性片段的大小。

表 云南猪种 mtDNA 的限制性片断大小
Table Restriction fragment sizes of mtDNA in Yunnan pigs

限制性内切酶 Restriction endonuclease	识别位点数 Number of cleavage sites	限制性片断大小 Molecular sizes of fragments(Kb)	限制性内切酶 Restriction endonuclease	识别位点数 Number of cleavage sites	限制性片断大小 Molecular sizes of fragments(Kb)
Apa I	3	11.5, 4.2, 0.6	EcoR V	1	16.3
Ava I	2	11.6, 4.7	Kpn I	1	16.3
BamH I	5	10.3, 2.1, 1.8, 1.2, 1.0	Pst I	3	9.3, 5.4, 1.6
Bcl I	7	5.5, 2.6, 2.2, 2.0, 1.7, 1.4, 0.9	Pvu II	2	10.1, 6.2
Bgl I	3	6.7, 5.5, 4.1	Sal I	1	16.3
Bgl II	1	16.3	Sca I	9	3.1, 3.1, 2.3, 1.8, 1.7, 1.4, 1.3, 0.9, 0.7
Cla I	2	9.0, 7.3	Sma I	0	-
Dra I	6	7.6, 2.2, 2.1, 1.8, 1.4, 1.2	Stu I	7	3.9, 3.8, 3.7, 2.6, 1.1, 0.7, 0.5
EcoR I	3	8.3, 4.9, 3.1	Xho I	0	-

所有内切酶在云南三个猪种中均获得相同的限制性类型,这种变异很小的倾向与兰宏等的研究结果基本相符^[2]。兰宏等用 20 种限制性内切酶对中国西南地区的家猪和野猪的 mtDNA 进行研究,发现有 6 种限制性类型,但只存在一个基本型,其他几种限制性类型都是从基本型经过少数几个位点突变产生的。另外,在兰宏等的研究中,曾对撒坝猪(3 头)、大河猪(3

头)进行分析,而本研究撒坝猪、大河猪的样本数分别扩大至8头和6头,而且,撒坝猪样本采集地也不同,但是两者研究结果却基本一致。由此表明,云南家猪的 mtDNA 群分化程度确实非常低。

云南猪种 mtDNA 极其贫乏的多态性,反映了它们在母系起源的一致性,这些猪可能都有一个共同的、较为晚近的野生祖先。猪群体在其形成过程的早期很可能经历过创立者效应的制约。与此形成鲜明对照的是,猪不仅在形态学、生态学特征,而且在其生活环境、生产性能上都存在高度差异。我们对云南猪示中撒坝猪^[7]、大河猪和滇南小耳猪的血液蛋白多态进行研究;本试验中的版纳微型猪系西双版纳境内滇南小耳猪一个类型,版纳微型猪与滇南小耳猪具有相同的血缘关系。结果表明,云南三个猪种的多态位点百分比(p值)为0.1875~0.2121,平均杂合度(H值)为0.0712~0.1027,云南猪种的血液蛋白多态程度较高,反映在蛋白质水平上的遗传多样性较为丰富。由于蛋白或酶的存在受核基因控制,各种蛋白或酶在遗传上表现不同,同一物种的不同品种(类群)相应的蛋白电泳呈现多态现象。因此,mtDNA 遗传多样性的贫乏并不能代表猪的群体遗传结构单一,体现了 mtDNA 和核基因组进化的不平行性,这种现象的产生很可能是长期以来人工强烈定向选择的结果。

参 考 文 献

- [1] Harrison P G. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Tree*, 1989, 1: 6~11
- [2] 兰宏等. 西南地区家猪和猪 mtDNA 遗传多样性研究. *遗传学报*, 1995, 22(1): 28~33
- [3] Watanabe T et al. Polymorphism of mitochondrial DNA in pigs based on restriction endonuclease cleavage patterns. *Biochem. Genet*, 1985, 23: 105~113
- [4] Watanabe T et al. Pig mitochondrial DNA polymorphism, restriction map or ientation, and sequence data. *Biochem. Genet*, 1986, 24: 385~396
- [5] 黄启昆等编著. 云南省家畜家禽品种志. 云南科技出版社, 1988
- [6] 王文等. 一种改进的动物线粒体 DNA 提取方法. *动物学研究*, 1993, 14(2): 197~198
- [7] 胡文平, 连林生. 撒坝猪血液蛋白多态性研究. *云南农业大学学报*, 1995, 10(3): 231~235

The polymorphism of mitochondrial DNA in Yunnan pigs

Hu Wenping, Lian Linsheng et al.

(Yunnan Agricultural University 650201)

Abstract

Eighteen restriction endonucleases, Apa I, Ava I, BamH I, Bcl I, Bgl I, Bgl II, Cla I, Dra I, EcoR I, EcoR V, Kpn I, Pst I, Pvu II, Sal I, Sca I, Sma I, Stu I, Xho I were used to investigate the mitochondrial DNA polymorphism of Yunnan pigs. Among the 18 animals analyzed, only one haplotype was detected. The results indicate that the genetic diversity based on restriction endonuclease cleavage patterns within Yunnan pigs is remarkably scarce. The Yunnan pigs may have originated from a late common ancestor, and were likely impacted by the founder effect.

Key words Yunnan pig breeds, Polymorphism, Mitochondrial DNA