

BMV 牛、婆罗门牛及云南黄牛遗传多样性及群体遗传结构研究

张飞, 咎林森*, 刘建勇, 张佳兰 (1. 西北农林科技大学, 陕西杨凌 712100; 2. 云南省肉牛和牧草研究中心, 云南昆明 650212)

摘要 选用 BMV 牛、婆罗门牛和云南黄牛作为研究动物群体, 对 5 个微卫星 DNA 座位的遗传变异及多态性进行分析, 以了解其群体遗传结构及 BMV 牛的育成情况。结果显示: 5 个位点在 3 个群体中的多态信息含量分别为 0.670 8、0.567 6 和 0.630 7, 呈高度多态性。平均杂合度 BMV 牛最高为 0.689 7, 婆罗门牛为 0.570 1, 云南黄牛为 0.607 8, 3 个群体均表现出较高的遗传多样性。

关键词 BMV 牛; 婆罗门牛; 遗传结构; 微卫星

中图分类号 Q756 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)18-05461-02

Study on the Genetic Diversity and Population Genetic Structure of BMV, Brahman and Yunnan Local Cattle

ZHANG Fei et al (Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract Three cattle breeds including BMV, Brahman and Yunnan yellow, were used as the experimental population. The genetic variations and polymorphisms of five microsatellite loci were analyzed to determine the population structure and breeding progress of BMV, Brahman and Yunnan local yellow cattle. The polymorphic information content of the three groups was 0.670 8, 0.567 6 and 0.630 7 in turn. The average heterozygosity of three groups was 0.689 7, 0.570 1 and 0.607 8 respectively. The result showed all of three populations displayed high genetic diversity.

Key words BMV cattle; Brahman; Population structure; Microsatellite

微卫星 (SSR) 突变模式反映着物种的进化历史, 某物种内或物种间蕴藏着该物种基因组中最为古老、保守的序列, 能提供丰富的突变信息和等位基因位点, 因此根据微卫星多态性提供较高的多态信息含量和杂合度, 为群体遗传结构、家畜品种的鉴定、群体分化及法医鉴定等领域广泛应用^[1-3]。BMV 牛(1/2 婆罗门牛、1/4 墨累灰、1/4 云南黄牛)是云南省肉牛和牧草研究中心培育的热带、亚热带肉牛新品系, 具有婆罗门耐热抗蝇优点和莫累灰高繁殖性能以及云南黄牛适应性强的特性^[4]。

该研究采用微卫星标记技术, 从分子水平上研究婆罗门牛、云南黄牛及其杂交后代 BMV 牛的群体遗传结构, 以期当前及以后的育种工作提供指导或参考, 从而为 BMV 牛的进一步选育提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料。云南省肉牛与牧草研究中心的小哨示范牧场、曲靖市马龙县马鸣乡牧场和思茅云南黄牛原种牧场分别采集了婆罗门牛、BMV 牛和云南黄牛的血样, 尾根或颈静脉采血 10~15 ml/头, 0.2% 的肝素钠抗凝。其中婆罗门牛 56 头, BMV 牛 65 头, 云南黄牛 58 头。

1.1.2 主要化学药品及试剂。Taq 聚合酶、甲叉丙烯酰胺、DNA Marker dNTP、北京鼎国生物公司的全血 DNA 提取试剂盒、TEMED 等。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取。按照试剂盒说明逐步提取。

1.2.2 基因组 DNA 浓度及纯度检测。以 λ -DNA/EcoR + Hnd 作分子量标记, 用 2% 琼脂糖凝胶电泳分析, 经 EB 染

色把各基因组 DNA 带的亮度、位置同标准分子量进行对照, 来判断基因组 DNA 的浓度和质量。

1.2.3 微卫星引物。试验所选用的微卫星位点均来自 <http://www.projects.roslin.ac.uk>, 由上海生物工程技术服务有限公司合成。其序列及相应参数见表 1, 其中退火温度、 Mg^{2+} 浓度、等位基因大小、等位基因数为试验所得数据。

1.2.4 PCR 扩增。

(1) 反应体系 (15 μ l): Buffer 1.5 μ l、dNTP 1.5 μ l、 Mg^{2+} 1.5 μ l、Taq 酶 0.2 μ l (5 U μ l)、上下游引物各 0.25 μ l、DNA 模板 1.0 μ l、水 7 μ l。

(2) PCR 反应条件: PCR 扩增程序: 94 4 min 94 30 s 45 s 72 40 s, 共 35 个循环, 反应结束后 72 延伸 10 min。2.0% 琼脂糖凝胶检测 PCR 产物的特异性。

1.2.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳及等位基因大小的判别。经琼脂糖检测效果好的产物用 12% 的聚丙烯酰胺凝胶进行电泳: 250 V 电压预电泳 5 min, 向 PCR 扩增产物中加入 7 μ l 上样缓冲液然后点样电泳。电泳条件: 电压 150 V, 4~5 h。染色: 银染。用美国 Gel-Pro Analyzer 3.1 凝胶分析系统分析等位基因片段大小。

表 1 微卫星 DNA 引物及 PCR 反应条件

微卫星位点	染色体	退火温度	引物序列 (5' 3')	等位基因大小 / bp	
				max	min
HEL1	15	59.0	P1: CAACAGCTATTAAACAAGCA P2: AGGCTACAGTCCATGGGATT	126	106
BM824	1	60.0	P1: GAGCAAGGIGITTTTCCAATC P2: CATTCTCCAACCTGCTTCTTG	210	126
TGLA126	20	57.0	P1: CTAATTAGAAATGACAGAGGCTTCT P2: TTGGTCTCTATCTCTGAAATATCC	122	112
EIHB	19	60.0	P1: GAACCTGCCCTCTCTGCAITGG P2: ACTCTGCCTGTGGCCAAGTAGG	124	104
EIHI0	5	67.5	P1: GTTCAGGACTGGCCCTGCTAACA P2: CCTCCAGCCCACTTCTCTCTCIC	240	212

1.2.6 数据处理。用软件 POPGENE 计算^[5] H W 平衡下的平均观察杂合度 (H_{obs})、期望杂合度 (H_{exp})、等位基因频率、有效等位基因、F 值。用聚类分析软件计算多态信息含量。

2 结果与分析

2.1 微卫星 DNA 的多态性 各等位基因在 3 个品种 (系) 的分布频率见表 2。5 个位点均为 2 bp 重复, 其等位基因片段

基金项目 云南省省院省校科技合作项目“利用群选群育开放式育种新技术加快云南热带牛 (BMV) 的选育进程”(2005XY02); 农业部“948”项目“肉牛产业链关键技术引进和中国安全优质牛肉生产体系建设”。

作者简介 张飞 (1981-), 男, 土家族, 贵州沿河人, 硕士研究生, 研究方向: 动物遗传育种。* 通讯作者, 博士生导师, 教授, E-mail: zarls@yahoo.com.cn。

收稿日期 2007-03-20

数量、大小及有效等位基因数见表3。5个座位中共检测到37个等位基因,其中BM1824最多(9个),ETH10最少(6个),平均等位基因数为7.4个。在3个群体中,HEL1位点等位基因98 bp频率最高(0.369 4);BM1824位点等位基因192 bp频率最高(0.504 5);TGLA126位点等位基因122 bp频率最高(0.396 4);ETHB位点等位基因120 bp频率最高(0.421 2);ETH10位点等位基因212 bp频率最高(0.445 9),见表2。

表2 3个群体5个微卫星位点等位基因频率分布

位点	等位基因	群体			总数	
		BMY牛	婆罗门牛	云南黄牛		
HEL1	114	0.396 2	0	0	0.094 6	
	112	0.066 0	0.051 0	0.116 7	0.090 1	
	110	0.103 8	0.122 4	0.091 7	0.101 4	
	108	0.141 5	0	0	0.033 8	
	106	0.066 0	0.112 2	0.100 0	0.094 6	
	104	0.094 3	0.132 7	0.108 3	0.110 4	
	102	0.113 2	0.112 2	0.102 3	0.105 9	
	98	0.018 9	0.469 4	0.481 0	0.369 4	
	BM1824	210	0.113 2	0.020 4	0.033 3	0.049 5
		208	0.103 8	0.051 0	0.075 0	0.076 6
192		0.471 7	0.540 8	0.504 2	0.504 5	
190		0.075 5	0.051 0	0.087 5	0.076 6	
188		0.075 5	0.142 9	0.075 0	0.090 1	
186		0.066 0	0.071 4	0.070 8	0.069 8	
184		0	0.122 4	0.095 8	0.078 8	
178		0.094 3	0	0	0.022 5	
176		0	0	0.058 3	0.031 5	
TGLA126		122	0.037 7	0.469 4	0.525 0	0.396 4
	120	0.509 4	0.112 2	0.133 3	0.218 5	
	118	0.094 3	0.173 5	0.108 3	0.119 4	
	116	0.113 2	0.010 2	0.008 3	0.033 8	
	114	0.132 1	0.102 0	0.116 7	0.117 1	
	112	0.113 2	0	0	0.027 0	
	110	0	0.132 7	0.108 3	0.087 8	
	ETHB	124	0.075 5	0.540 8	0.116 7	0.200 5
		120	0.566 0	0.061 2	0.504 2	0.421 2
		118	0.066 0	0	0	0.015 8
116		0.056 6	0.151 3	0.058 3	0.078 8	
114		0.094 3	0.081 6	0.091 7	0.090 1	
110		0.075 5	0.040 8	0.087 5	0.074 3	
ETH10	240	0.066 0	0.122 4	0.141 7	0.119 4	
	224	0.084 9	0.163 3	0.133 3	0.123 9	
	222	0.094 3	0	0	0.022 5	
	220	0.141 5	0.091 8	0.166 7	0.144 1	
	218	0.084 9	0.112 2	0.183 3	0.144 1	
	212	0.594 3	0.112 2	0.516 7	0.445 9	

该研究中6个微卫星位点的等位基因分布不均匀,每个位点都有1种或几种等位基因频率较高。3个群体中均发现了特异等位基因,HEL1的114、108 bp, BM1824的178 bp, TGLA126的112 bp, ETHB的118 bp及ETH10的222 bp为BM Y牛所特有;ETH10的240 bp为婆罗门牛所特有;BM1824的176 bp为云南黄牛所特有,所有的特异位点的频率都很低,有的只出现了1次。

表3 等位基因大小及在3个群体中的有效等位基因数

微卫星位点	等位基因数	等位基因大小							有效等位基因数		
		114	112	110	108	106	104	102		98	
HEL1	8	114	112	110	108	106	104	102	98	5.069 0	
BM1824	9	210	208	192	190	188	186	184	178	176	3.455 3
TGLA126	7	122	120	118	116	114	112	110			4.125 2
ETHB	7	124	120	118	116	114	110	104			3.969 6
ETH10	6	240	224	222	220	218	212				3.696 5
Man	7.4										4.063 3

2.2 固定指数的估计 在现实的动物群体中,每个亚群体内的基因型频率并不一定遵循H W平衡,所以每个亚群体的F值(固定指数)不一定为0^[6], $F_{IT} > F_{IS}$,而度量亚群体间的遗传差异程度的 F_{st} 为0.103 0(表4),也就是说群体间的遗传变异为10.30%,而89.70%的变异缘于群内的个体差异。

表4 3个品种(系)群体固定指数的估计值

微卫星位点	F_{IT}	F_{IS}	F_{st}
HEL1	0.355 4	0.211 7	0.106 0
BM1824	0.346 1	0.327 7	0.013 7
TGLA126	0.409 3	0.245 3	0.116 3
ETHB	0.307 6	0.137 9	0.129 7
ETH10	0.383 0	0.181 5	0.145 7
Man	0.360 1	0.219 9	0.103 0

2.3 群体遗传结构 BM Y牛的平均杂合度最高为0.689 7,婆罗门牛为0.570 1,云南黄牛居于两者之间为0.607 8;BM Y牛、婆罗门牛及云南黄牛的多态信息含量分别为:0.670 8、0.567 6和0.630 7,见表5。基因杂合度又称基因多样性,被认为是度量品种遗传变异的一个最适参数。品种杂合度越低,表示该品种的遗传一致性越高,而品种遗传变异越低,品种遗传多样性越低。表5表示在该研究的3个品种(系)中,BM Y牛的遗传变异程度最高,遗传多样性最丰富,但也反映了该品种的遗传一致性最差,表明该牛在未来还可以进一步地纯繁选育,以提高该品种的遗传一致性。婆罗门牛的遗传变异最小,反映了该品种的遗传一致性最高。

表5 5个微卫星位点在3品种(系)中的平均等位基因数、多态信息含量、有效等位基因数和杂合度

品种	样本数	等位基因数	多态信息含量	有效等位基因数	杂合度
BM Y牛	65	6.60	0.670 8	3.36	0.689 7 ± 0.069 3
婆罗门牛	56	6.00	0.567 6	3.18	0.570 1 ± 0.028 8
云南黄牛	58	6.20	0.630 7	3.26	0.607 8 ± 0.024 1

BM Y牛的平均等位基因数为6.60个,有效等位基因数为3.36;婆罗门牛和云南黄牛的有效等位基因数分别为3.18和3.26(表5),并且平均有效等位基因数均符合大于2的要求^[7]。Hnes等提出等位基因在群体中分布越均匀,有效等位基因数越接近所检测到的等位基因的绝对数^[8]。该研究的5个微卫星位点的平均有效等位基因数小于所检测到的等位基因的绝对数。

3 讨论

一个群体中的遗传变异范围通常由平均基因多样性(通常称平均杂合度)来度量,常用的杂合度是指在H W平衡假设下平均期望杂合度值。该研究中,BM Y牛、婆罗门和云南黄牛都有较高的平均期望杂合度,分别为0.689 7、0.570 1和0.607 8。BM Y牛的杂合度值最高,而一直进行纯种繁育的婆罗门牛和云南黄牛也拥有较高的杂合度值,这不仅因为不同座位具有不同的突变速率或受到不同的进化选择压力,还因为相同的座位因历史原因有相似的 H_{exp} 值^[9]。BM Y牛的多态信息含量、杂合度和有效等位基因指标都比婆罗门牛和云

(上接第5462页)

南黄牛要高,说明婆罗门牛和云南黄牛较纯,而其杂种BMY牛的遗传变异较大,很好地解释了BMY牛继承了终端父本婆罗门牛的很多优良特性,如良好的母性,高产肉性能,抗痹,耐热性等^[10],这也正是杂种优势利用所追求的结果。

试验所研究的3个群体间的遗传变异(10.34%)比开兴等研究的小哨牛群间的(6.17%)要大^[3],而与欧洲牛品种(10%~11%)相近^[11],这可能是采样牧场不同所造成的群体间的差异。表明BMY牛的整齐度还有待于进一步提高,横交固定工作取得了一定的成果,但还需要进一步加强。种内显著不同的种群间和同一种群内的遗传变异表现为遗传多样性,种内遗传多样性或变异性愈丰富,物种对环境变化的适应能力愈大,其进化的潜力也就愈大^[11],该研究中云南黄牛表现出了较高的遗传多样性,其作为母本或父本在杂交改良和培育中国热带、亚热带肉牛新品种(系)方面有很高的利用价值。

3个群体的平均期望杂合度都比较高,表明在某些微卫星位点可能存在与一些数量经济性状相连锁的现象,有待深入研究并为BMY牛的肉用育种方向提供理论依据。

参考文献

- [1] MACHUGH DE, LOFTUS RT, CUNNINGHAM P, et al. Genetic structure of seven European cattle breeds assessed using 20 microsatellite markers [J]. *Animal Genetics*, 1998, 29(5): 333-340.
- [2] EGGEN A, FRIES R. An integrated cytogenetic and mitotic map of the bovine genome [J]. *Animal Genetics*, 1995, 26(4): 215-236.
- [3] 开兴, 朱芳贤, 吴桂生, 等. 用6个微卫星座位遗传多样性研究BMY牛和婆罗门牛的群体遗传结构[J]. *遗传*, 2006, 28(3): 285-290.
- [4] 杨国荣, 朱芳贤, 王安奎, 等. BMY热带肉牛的生长性能研究[J]. *黄牛杂志*, 2003, 29(4): 11-14.
- [5] BRADLEY D G. Rsdlin institute 2002 [EB/OL]. [2007-01-12]. <ftp://ftp.nimicrosoft.com/Softlib/MSLHLES/HPGL.EXE>.
- [6] NEI M. *Molecular evolutionary genetics* [M]. New York: Columbia University Press, 1987.
- [7] BARKER J S F. A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds. [C]// 5th, *World Genet Appl Livest Prod. [S.l.]*: [s.n.], 1994: 501-508.
- [8] HINES HC, ZIKAKIS J P, HAENLENG F, et al. Linkage relationships among loci of polymorphisms in blood and milk of cattle [J]. *J Dairy Sci*, 1981, 64(1): 71-76.
- [9] CIAMPOLINI R, MOAZAMI-GOUDARZI K, VAIMAN D, et al. Individual multi-locus genotypes using microsatellite polymorphisms to permit the analysis of the genetic variability within and between Italian beef cattle breeds [J]. *Journal of Animal Science*, 1995, 73(11): 3259-3268.
- [10] 文际坤, 杨国荣, 赵开典, 等. BMY牛的扩繁和选育研究[J]. *云南畜牧兽医*, 2003(3): 1-4.
- [11] 张细权, 李加琪, 杨关福. *动物遗传标记* [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1997: 135.