

大河猪 76 个 STR 基因座的遗传多态性

霍金龙¹, 霍海龙¹, 苗永旺^{1,2,*}, 李福泉³, 刘丽仙⁴, 伍革民¹, 欧阳依娜¹, 钱坤⁵

(1. 云南农业大学 动物科学技术学院, 云南 昆明 650201; 2. 云南大学 生物资源保护与利用国家重点实验室, 云南 昆明 650091; 3. 内江职业技术学院 生物技术系, 四川 内江 641100; 4. 云南农业职业技术学院 畜牧兽医系, 云南 昆明 650212; 5. 湖州师范学院, 湖州 313000)

摘要: 大河猪是中国西南中海拔地区代表性猪种之一, 长期以来在当地养猪生产中发挥了重要作用。为了阐明其群体遗传变异情况, 为进一步有效保护和合理利用提供科学依据, 采用分布在家猪 19 对染色体上的 76 个微卫星标记对该猪种 60 个随机抽样个体进行了微卫星 PCR-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。共检测到 347 个等位基因, 所有座位都呈现出多态性, 每个座位的等位基因数在 3—10 个之间, 平均每个座位等位基因数 4.57 个, 有效等位基因数 3.50 个, 群体平均杂合度及平均多态信息含量分别为 0.6962 ± 0.0716 和 0.6441 ± 0.0914 。结果表明, 大河猪群体遗传多样性较丰富, 选择潜力较大。

关键词: 微卫星标记; 大河猪; 遗传多样性; 杂合度; 多态信息含量

中图分类号: Q959.842; Q347 文献标识码: A 文章编号: 0254-5853(2009)01-0105-04

Genetic Diversity of 76 STR Loci in the Dahe Pig

HUO Jin-long¹, HUO Hai-long¹, MIAO Yong-wang^{1,2,*}, LI Fu-quan³,
LIU Li-xian⁴; WU Ge-min¹, OUYANG Yi-na¹, QIAN Kun⁵

(1. Faculty of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-resources, Yunnan University, Kunming 650091, China;

3. Department of Biotechnology, Neijiang Vocational & Technical College, Neijiang 641100, China;

4. Department of Husbandry and Veterinary, Yunnan Agricultural Vocational Technical College, Kunming 650212, China;

5. Huzhou Normal College, Huzhou 313000, China)

Abstract: The Dahe pig is one of the representative indigenous pig breeds in the middle-altitude region of southwest China, and has played an important role in the local meat production for a long time. In order to estimate the genetic variability in its population, as well as provide the guidance and basis of genetic background for its conservation and further utilization, 76 microsatellite loci situated on swine's 19 chromosomes were analyzed for 60 individuals sampled from their natural population by employing PCR and polyacrylamide gel electrophoresis. A total of 347 alleles were detected and all the loci were polymorphic. The number of alleles varied from 3 to 10, with a mean allele and effective allele number of 4.57 and 3.50 at each locus respectively. The mean heterozygosity and polymorphism information content of 76 microsatellite loci were 0.6962 ± 0.0716 and 0.6441 ± 0.0914 , respectively. The results indicated that the genetic diversity of the Dahe pig was rich, and the Dahe pig has a good selection potential for breeding.

Key words: Microsatellite DNA; Dahe pig; Genetic diversity; Heterozygosity; Polymorphism information content

大河猪是中国西南中海拔地区代表性猪种之一, 系乌金猪的一个主要类型, 于 2002 年列入了国家级猪品种资源保护名录。作为云南省具有代表性的地方优良猪种, 饲养历史已有 2000 多年, 中心产区位于云南省曲靖市富源县的大河、营上一带, 因主要集中于大河而被称为大河猪。大河猪的

毛色有黑色和棕色(当地称火毛猪)两种, 大河猪具有极强的抗逆性、耐粗饲能力, 适应性广, 在粗放饲养管理条件下能适应高寒山区、半山区及河谷地区等不同自然气候, 肉质细嫩味美, 是生产“云腿”的重要原料猪种, 素有“大河猪种甲滇东”和“宣威火腿大河猪”之称(The Bureau of Animal

收稿日期: 2008-11-21; 接受日期: 2008-12-26

基金项目: 云南省教育厅科学研究基金项目(07Y40124); 国家自然科学基金项目(30660024); 云南省应用基础研究重点项目(2007C0003Z); 云南省应用基础研究计划面上项目(2006C0034M)

*通讯作者(Corresponding author), E-mail: yongwangmiao999@yahoo.com.cn; Tel: 13700650615

第一作者简介: 霍金龙(1975-), 男, 实验师, 硕士, 主要从事动物分子遗传学方面的研究, E-mail: jinlonghuo@ynau.edu.cn

Husbandry of Yunnan Province, 1987)。

微卫星 DNA(microsatellite DNA), 也称为短串联重复序列(short tandem repeats, STR)、简单序列重复 (simple sequence repeat, SSR), 因具有分布广泛、多态性丰富、共显性遗传、选择中性、易于检测、重复性好、可提供高分辨率的遗传信息等特点, 在度量品种群体遗传结构、遗传多样性等研究方面广为应用(Zhang & Zhang, 2001; Li et al, 2004; Mukesh et al, 2004; Kim et al, 2005)。本研究以微卫星标记为研究手段分析了大河猪的遗传多样性, 以期为其遗传资源保护、合理开发和利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

用于本研究的 60 头 (♂27, ♀33) 大河猪样品采自云南省曲靖地区富源县大河猪主产区, 每头猪取耳组织样, 酒精保存, 低温带回实验室, 用于基因组 DNA 提取。

1.2 基因组 DNA 的制备

参照分子克隆第 3 版的方法提取基因组 DNA (Sambrook et al, 2002), 经琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度法双重检测其纯度和浓度, 稀释成 25 ng/μL 浓度作为 PCR 扩增的模板。

1.3 微卫星引物

自美国农业部 (United States Department of Agriculture) 肉畜动物研究中心 (Meat Animal Research Center) 网站 (<http://www.marc.usda.gov>) 查询 250 个微卫星标记, 由上海生工生物工程技术公司合成, 筛选出 76 个微卫星标记 (Huo et al, 2008)。在家猪 19 对染色体的每对上都尽量分散均匀地检测 4 个微卫星座位。

1.4 PCR 扩增

PCR 反应体系 25 μL, 含模板 DNA 30—50 ng, Mg²⁺ 浓度 1.5 mmol/L, 10×buffer 2.5 μL, dNTP 200 μmol/L, Taq 酶 1.25 U, 引物 0.2 μmol/L。反应条件为: 95℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 55—65℃ 退火 30 s (因座位而异), 72℃ 延伸 30 s, 35 个循环; 72℃ 后延伸 10 min; 4℃ 终止反应。

1.5 电泳及结果记录

PCR 扩增产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测效果后, 取 2 μL 与上样缓冲液混合后在 10% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶上 100 V 电泳 12 h, 银染显色, 美国 UVP 凝胶成像系统照像。

1.6 数据统计及分析

利用与凝胶成像系统配套的 Labwork 4.5 软件, 根据电泳结果确定每个扩增片段的大小并判定个体基因型。然后用 PopGen32 软件 (version 1.31) 计算各微卫星座位的等位基因频率、等位基因数、有效等位基因数及杂合度, 根据 Botstein et al (1980) 的公式计算多态信息含量, 并进行 Hardy-Weinberg 平衡的卡方 (χ^2) 检验。

2 结果

2.1 微卫星扩增结果及多态性

76 个微卫星座位共检测到 347 个等位基因, 所有座位都呈现出多态性, 每个座位的等位基因数在 3—10 个之间, 平均每个座位等位基因数 4.57 个, 有效等位基因数 3.50 个。

2.2 群体遗传变异分析

根据各微卫星座位的等位基因频率计算出各座位的杂合度及多态信息含量 (表 1)。各座位的杂合度在 0.515 0—0.850 0, 群体平均值为 0.6962±0.071 6; 各座位的多态信息含量范围在 0.4604—0.8365, 群体平均值为 0.644 1±0.0914。

3 讨论

Barker(1994)提出在对动物品种进行遗传多样性研究时, 所用的微卫星标记数目不应低于 25, 每个标记座位上至少有 4 个等位基因。世界粮农组织 (FAO) 和国际动物遗传学会 (ISAG) 联合推荐的 27 对微卫星引物在检测猪品种的遗传多样性时多被引用, 但经证实有的引物在中国地方猪品种中 PCR 扩增效果并不理想 (Zhang et al, 2003; Shen et al, 2005; Yao et al, 2006)。本研究详细查阅了美国农业部 (United States Department of Agriculture, USDA) 肉畜动物研究中心 (Meat Animal Research Center, MARC) 网站 (<http://www.marc.usda.gov>) 的资料, 综合考虑了微卫星座位在染色体上的相对位置、等位基因数目、杂合性、片段大小、退火温度等信息, 选取了 250 个微卫星标记, 通过大量基础筛选工作, 原则上尽量做到家猪 19 对染色体的每对都比较分散均匀地检测 4 个微卫星座位, 最后确定了效果较好的 76 对微卫星引物, 利用这些引物检测大河猪种时, 不仅 PCR 扩增效果好, 而且在非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分型时, 电泳带型清楚可辨, 多态性也比较丰富。Barker(1994)还认为样本量

表 1 各座位的杂合度和多态信息含量及哈迪-温伯格平衡检验结果

Tab. 1 Heterozygosity and polymorphism information content at each locus and results of Hardy-Weinberg equilibrium test

座位 Locus	杂合度 <i>H</i>	多态信 息含量 <i>PIC</i>	座位 Locus	杂合度 <i>H</i>	多态信 息含量 <i>PIC</i>	座位 Locus	杂合度 <i>H</i>	多态信 息含量 <i>PIC</i>
S0008	0.695 0	0.643 0	SW1418**	0.625 0	0.551 1	SW769	0.810 0	0.783 8
SW781*	0.580 0	0.491 8	SW252	0.660 0	0.551 1	SW1125	0.790 0	0.836 5
SW974	0.840 0	0.823 5	SW1345	0.625 0	0.551 1	SW1032*	0.705 0	0.649 7
SW705	0.760 0	0.730 2	SW1070	0.735 0	0.695 4	SW761	0.725 0	0.674 6
SWR783*	0.605 0	0.527 0	SW374	0.805 0	0.778 5	SW1557*	0.790 0	0.759 5
SW354	0.565 0	0.482 4	SW790	0.730 0	0.687 3	SW1416	0.685 0	0.627 0
S0010	0.740 0	0.723 3	SW983	0.820 0	0.795 6	S0148	0.705 0	0.681 4
SW1844	0.710 0	0.657 7	SW911**	0.660 0	0.586 2	SW936**	0.730 0	0.680 4
SW72	0.690 0	0.639 8	SW866**	0.745 0	0.697 5	SW1983	0.705 0	0.654 1
SWR978	0.660 0	0.595 8	SW174	0.615 0	0.533 9	SW419*	0.745 0	0.697 5
S0167	0.685 0	0.627 0	SW767	0.705 0	0.652 7	SW382	0.605 0	0.527 0
SW349	0.710 0	0.671 3	SW497	0.790 0	0.760 0	SW262*	0.580 0	0.491 8
SW480**	0.720 0	0.669 2	S0070	0.615 0	0.544 4	S0061	0.650 0	0.584 0
SW45	0.715 0	0.660 9	SW305*	0.605 0	0.527 0	SWR1004	0.765 0	0.727 5
SW286	0.680 0	0.627 7	SWR2071	0.615 0	0.544 4	SWR1120	0.655 0	0.603 0
SW818*	0.850 0	0.834 0	SW1632	0.745 0	0.708 7	SW1031	0.720 0	0.672 3
SW413	0.835 0	0.814 1	SW151*	0.615 0	0.544 4	SW2431	0.665 0	0.603 5
S0005	0.685 0	0.623 4	SW878*	0.625 0	0.554 7	SW1023	0.650 0	0.584 0
SW986**	0.780 0	0.745 4	SW2494*	0.705 0	0.651 5	SW787*	0.635 0	0.559 4
SW378	0.660 0	0.595 8	SW168*	0.705 0	0.651 5	S0062	0.740 0	0.704 5
SW973	0.515 0	0.460 4	SW467	0.660 0	0.612 5	S0177	0.785 0	0.754 4
SW782	0.665 0	0.603 5	S0106	0.585 0	0.494 9	SW949*	0.620 0	0.547 8
SW322*	0.735 0	0.698 2	SW344	0.725 0	0.693 1	SW980	0.660 0	0.601 5
SW2052	0.785 0	0.751 1	SW163	0.710 0	0.656 9	SW2470**	0.685 0	0.627 0
S0064	0.785 0	0.752 8	SW398	0.760 0	0.722 2	SW2588	0.660 0	0.586 2
SW1344	0.615 0	0.533 9						
Mean±SD				<i>H</i> =0.696 2±0.071 6;	<i>PIC</i> =0.644 1±0.091 4			

* 0.01<*P*<0.05; ** *P*<0.01.

至少应达到 25, 最好在 50 以上, 公母各半, 个体间最好三代内无血缘关系, 并且能在表型上代表该品种。根据 Barker(1994)的原则, 本研究抽样检测了 60 头 (♂27, ♀33) 大河猪样品, 采集样品时, 兼顾样本量、公母比例以及样品的代表性, 在大河猪中心分布区域随机取样, 并作了详细调查, 尽量避免存在血缘关系。所以本研究无论从选择的微卫星座位数以及这些座位在每条染色体的覆盖程度和整个猪基因组的覆盖程度上, 还是样本量和样品的代表性上都达到了 Barker(1994)提出的要求, 研究结果具有一定的可靠性。

从等位基因多样性, 即每个座位的等位基因平均数来看, 检测的 76 个座位均具有多态性, 平均每个座位等位基因数 4.57 个, 有效等位基因数 3.50 个。从群体的平均杂合度 (*H*) 和多态信息含量 (*PIC*) 来看, 本研究得到大河猪群体的平均杂合度为 0.6962, 平均多态信息含量为 0.6441。群体的平均杂合度是度量群体变异程度的一个最适参数, 群体的平均杂合度高, 表明该群体的遗传变异大, 遗传

多样性丰富; 平均杂合度低, 遗传变异小, 则遗传多样性匮乏。多态信息含量 (*PIC*) 是表示微卫星座位变异程度高低的一个指标, 当微卫星座位 *PIC* > 0.5 时, 为高度多态性座位; 当 0.25 < *PIC* < 0.5 时, 为中度多态性座位; 当 *PIC* < 0.25 时, 为低度多态性座位 (Vanhala et al, 1998)。本研究的 76 个微卫星座位中有 5 个座位为中度多态性座位, 其余 71 个座位均为高度多态性座位, 所有座位的平均 *PIC* 大于 0.5。综上所述, 等位基因多样性、群体平均杂合度以及平均多态信息含量分析的结果都表明大河猪群体遗传变异较大, 具有丰富的遗传多样性和较高的选择潜力。

Hardy-Weinberg 平衡的卡方 (χ^2) 检验结果显示有 54 个座位处于平衡状态 (见表 1), 占检测座位总数的 71%, 揭示该群体只有少数座位可能受到了选择、迁移、基因交流或取样效应等因素的影响, 大部分座位没有受到影响。

Zhang et al (2003) 利用 26 对微卫星引物检测了 56 个地方猪品种, *H* 在 0.44—0.87 之间, *PIC* 在 0.44

—0.67之间,其中大河猪群体的平均杂合度和多态信息含量分别为0.85和0.83。二者结果不同与所选微卫星标记的多态性、分布多少、样本的差别等有关,虽然本研究所得的群体平均杂合度和多态信息含量较之张桂香等的研究相对较低,但二者的结论大抵一致,都表明大河猪群体遗传多样性比较丰富。为了获得更全面、准确、系统、更具普遍性的结论,本研究对大河猪的所有染色体(包括性染色体)都进行了检测,并且考虑了标记的所有相关信息,所以本研究对单个大河猪品种的遗传多样性的说明上更为客观和精细。研究结论能比较客观地揭示大河猪的遗传变异状况,为其保护和合理利用提供科学依据。从国内外学者对地方猪种的微卫星分析结果看(Van et al, 1995; Fan et al, 1999; Li et al, 2000, 2004; Zhang et al, 2003; Wu et al, 2004; Kim et al, 2005; Shen et al, 2005; Yao et al, 2006; Zhao et al, 2007),大河猪平均杂合度和平均多态信息含量在中国地方猪种中处于较高的水平,也高于国外猪种,属遗传多样性较丰富的地方猪群体。本研究结果对大河猪资源的评估、保护和合理利用具有一定的指导意义。

参考文献:

- Barker JSF. 1994. A global protocol for determining genetic distance among domestic livestock breeds[A]. In: Proceedings of the 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production[C], 21: 501-508.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. *Am J Hum Genet*, 32: 314-331.
- Fan B, Li K, Peng ZZ, Chen Y, Moran C, Gong YZ, Zhao SH. 1999. Genetic variation of 27 microsatellite loci in three indigenous pig breeds[J]. *Chinese Biodiversity*, 7(2): 91-96. [樊斌, 李奎, 彭中镇, Chen Y, Moran C, 龚炎长, 赵书红. 1999. 湖北省三品种猪 27 个微卫星座位的遗传变异. 生物多样性, 7(2): 91-96.]
- Huo JL, Miao YW, Huo HL, Li DL, Liu LX, Liu JP, Li YH. 2008. Genetic diversity of *Sus scrofa* in the southern area of Yunnan province based on microsatellite markers[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 43(6): 137-146. [霍金龙, 苗永旺, 霍海龙, 李大林, 刘丽仙, 刘建平, 李云辉. 2008. 云南南部地区野猪群体的遗传多样性. 动物学杂志, 43(6): 137-146.]
- Kim TH, Kim KS, Choi BH, Yoon DH, Jang GW, Lee KT, Chung HY, Lee HY, Park HS, Lee JW. 2005. Genetic structure of pig breeds from Korea and China using microsatellite loci analysis[J]. *J Anim Sci*, 83: 2255-2263.
- Li SJ, Yang SH, Zhao SH, Fan B, Yu M, Wang HS, Li MH, Liu B, Xiong TA, Li K. 2004. Genetic diversity analyses of 10 indigenous Chinese pig populations based on 20 microsatellites[J]. *J Anim Sci*, 82: 368-374.
- Li XM, Li K, Peng ZZ, Qong YZ. 2000. Study on the genetic diversity of seven pig breeds in China by means of six microsatellite loci[J]. *J of Hebei Vocation-Technical Teachers College*, 14(2): 8-12. [李雪梅, 李奎, 彭中镇, 龚炎长. 2000. 应用微卫星标记对中国 7 个品种猪遗传变异的研究. 河北职业技术师范学院学报, 14(2): 8-12.]
- Mukesh M, Sodhi M, Bhatia S, Mishra BP. 2004. Genetic diversity of Indian native cattle breeds as analysed with 20 microsatellite loci[J]. *J Anim Breed Genet*, 121: 416-424.
- Sambrook J, Russell DW, Huang PT. 2002. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed [M]. Beijing: Science Press. [萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW, 黄培堂. 2002. 分子克隆实验指南(第三版)上册. 北京: 科学出版社, 483-485.]
- Shen XL, Yao SK, Zhang Q, Liu PQ. 2005. Analysis on genetic variability of Xiang-pig by using microsatellite markers[J]. *Guizhou Agricultural Sciences*, 33(6): 22-23. [申学林, 姚绍宽, 张勤, 刘培琼. 2005. 用微卫星标记分析香猪品种内遗传变异的研究. 贵州农业科学, 33(6): 22-23.]
- The Bureau of Animal Husbandry of Yunnan Province. 1987. The Breeds Introduction of Domestic Animals in Yunnan [M]. Kunming: Yunnan Science and Technology Press. [云南省畜牧局. 1987. 云南省家畜家禽品种志. 昆明: 云南科技出版社, 193-198.]
- Vanhala T, Tuiskula-Haavisto M, Elo K, Vilkki J, Maki-Tanila A. 1998. Evaluation of genetic variability and genetic distances between eight chicken lines using microsatellite markers[J]. *Poultry Science*, 77: 783-790.
- Van ZA, Peelman L, Van de WA, Bouquet Y. 1995. A genetic study of four Belgian pig populations by means of seven microsatellite loci[J]. *J Anim Breed Genet*, 112(3): 191-204.
- Wu D, Zhang YN, Zhou ZQ, Zhang YH, Zhang T, Li XY, Ren ZJ, Geng SM. 2004. Analysis of genetic diversity of microsatellite on Hezuo and Diqing pig[J]. *J of Gansu Agricultural University*, (2): 106-109. [吴迪, 张亚妮, 周占琴, 张英汉, 张涛, 李相运, 任战军, 耿社民. 2004. 合作猪和迪庆猪的微卫星遗传多样性分析. 甘肃农业大学学报, (2): 106-109.]
- Yao SK, Zhang Q, Sun FZ, Liu PQ. 2006. Genetic diversity of seven miniature pig breeds (strains) analyzed by using microsatellite markers[J]. *Hereditas (Beijing)*, 28(4): 407-412. [姚绍宽, 张勤, 孙飞舟, 刘培琼. 2006. 利用微卫星标记分析 7 品种(类群)小型猪的遗传多样性. 遗传, 28(4): 407-412.]
- Zhang GX, Wang ZG, Sun FZ, Chen WS, Yang GY, Guo SJ, Li YJ, Zhao XL, Zhang Y, Sun J, Fan B, Yang SL, Li K. 2003. Genetic diversity of microsatellite loci in fifty-six Chinese native pig breeds[J]. *Acta Genetica Sinica*, 30(3): 225-233. [张桂香, 王志刚, 孙飞舟, 陈伟生, 杨国义, 郭式健, 李拥军, 赵小丽, 张沅, 孙军, 樊斌, 杨述林, 李奎. 2003. 56 个中国地方猪种微卫星基因座的遗传多样性. 遗传学报, 30(3): 225-233.]
- Zhang YW, Zhang YP. 2001. Microsatellites and its application[J]. *Zool Res*, 22(4): 315-320. [张云武, 张亚平. 2001. 微卫星及其应用. 动物学研究, 22(4): 315-320.]
- Zhao ZH, Jia Q, Mo FT, Xi JZ, Kang F, Ning LN. 2007. Analysis of genetic polymorphism in Duroc, Landrace and Yorkshire pigs using microsatellite markers[J]. *Jiangsu J of Agr Sci*, 32(2): 103-108. [赵振华, 贾青, 墨锋涛, 锡建中, 康峰, 宁立娜. 2007. 杜洛克、长白和大约克夏纯种猪微卫星多态性分析. 江苏农业学报, 32(2): 103-108.]