湖北省三品种猪 27 个微卫星座位的遗传变异^{*}

樊 斌¹ 李 奎^{1**} 彭中镇¹ Y Chen² C Moran²
龚炎长¹ 赵书红¹

1 (华中农业大学畜牧兽医学院动物分子生物学与育种实验室 , 武汉 430070)
2 (Department of Animal Science , University of Sydney , NSW 2006 , Australia)

摘 要 采用国际动物遗传学会(ISAG)和联合国粮农组织(FAO)共同推荐的 27 个微卫星标记 ,对湖北省 3 个主要地方猪种(通城猪、清平猪和阳新猪)的遗传变异进行了检测。计算出各个品种的基因杂合度、各个座位的多态信息含量及品种间的遗传距离。结果表明 ,3 个地方猪种的平均基因杂合度分别为 0.7489、0.6987 和 0.6273 ,遗传多样性比较丰富 ,通城猪和清平猪亲缘关系较近 ,而两者与阳新猪亲缘关系略远。

关键词 地方猪种 ,遗传多样性 ,微卫星

Genetic variation of 27 microsatellite loci in three Hubei indigenous pig breeds/FAN Bin¹⁾ , LI Kui¹⁾ , PENG Zhong-Zhen¹⁾ , Y Chen²⁾ , C Moran²⁾ , GONG Yan-Zhang¹⁾ , ZHAO Shu-Hong¹⁾

Abstract Genetic variability within and among three indigenous pig breeds (Tongcheng Pig , Qingping Pig and Yangxin Pig) in Hubei Province was surveyed , by means of 27 microsatellite loci recommended by ISAG (the International Society for Animal Genetics) and FAO(Food and Agriculture Organization). Genetic heterozygosity of each pig breed , polymorphism information content of each microsatellite locus and genetic distances among these populations were calculated. The results showed that allelic number and frequencies at the same locus obviously differed among the breeds. Some alleles were shared by all breeds , for instance 159bp , 162bp and 164bp in S0155 , and 110bp in Sw72 , while some other alleles were observed only in a single breed , such as 94bp and 96bp in Sw72 that were found solely in Yangxin Pig , 233bp , 245bp and 249bp in S0288 were in Tongcheng Pig , 249bp and 253bp in Sw90 were in Qingping Pig. Therefore , the common alleles (such as 158bp , 162bp and 164bp in S0155) are likely to be the oldest and the most distinctive for the native pig breeds of China. Geneic heterozygosity of three pig breed is 0.7489 , 0.6987 and 0.6273 respectively , indication high genetic diversity. Genetic relationship between Tongcheng Pig and Qingping Pig is closer than their relationship with Yangxin Pig.

Key words indigenous pig breed , microsatellites , genetic diversity

Author 's address 1) Lab of Animal Molecular Biology and Breeding , College of Animal Science and Veterinary Medicine , Huazhong Agricultural University , Wuhan 430070
2) Department of Animal Science , University of Sydney , NSW 2006 , Australia

家猪在我国传统农区中一向被称为“ 六畜之首 ”。我国劳动人民在长期生产实践中育成了许多具特色的地方猪种 ,湖北省便有着十分丰富的猪品种资源 ,《湖北省家畜家禽品种志》介绍的监利猪、通城猪、鄂西黑猪、阳新猪和清平猪 5 个品种 ,均收入到《中国猪品种志》^[1 2]里。然而随着国外著名商品猪种的大量引入 ,三元杂交模式的逐步推广 ,地方猪种受到强烈冲击 ,数量骤降 ,血统数锐减(如阳新猪) ,甚至消失(如监利猪) ,遗传多样性日显贫乏^[3 4]。因

收稿日期 :1998 - 07 - 17 ;修改稿收到日期 :1998 - 12 - 29
^{*}“ 九五 ”农业部畜牧业重点科研专题资助项目(95 牧 - 01 - 02 - 01)和国家自然科学基金资助项目(39870594)的部分内容
^{**} 通讯作者

此 ,对我省地方猪种遗传多样性现状的研究、评估和保护 ,在现实中已是当务之急。

微卫星(microsatellite)是近些年发展起来的一种新型 DNA 分子标记 ,具有数量多、广布于生物体整个基因组、多态性丰富、进化所受选择压力小等特点 ,在度量品种遗传多样性、估测品种间遗传距离及构建系统发生树等研究中显示出巨大的优势^[5]。为此本研究采用国际动物遗传学会和联合国粮农组织共同推荐的 27 个微卫星标记 ,检测湖北省 3 个地方猪种(通城猪、清平猪和阳新猪)在 DNA 水平上的变异 ,估测彼此间的遗传距离^[6]。据此 ,初步探讨这 3 个品种的遗传多样性和遗传分化关系 ,为揭示其遗传结构、遗传背景及开展下一步品种资源保存、遗传育种工作提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

本研究所用血样取自原产地谱系可靠的种猪场。其中通城猪(TC ,16 头)采自通城县种猪场 ,清平猪(QP ,10 头)采自当阳市种猪场 ,阳新猪(YX ,4 头)采自阳新县种猪场。以上均来自彼此隔离的不同血统。每头猪从前腔静脉抽取全血置于等量 EDTA-SDS 裂解液中 ,摇匀后携回实验室提取其 DNA ,冷冻保存待用。

1.2 试验方法

裂解液配制 ,DNA 提取所用试剂配制及操作步骤按照本实验室建立的方法进行^[7]。DNA 提取后经适量 TE 缓冲液溶解 ,用 DNA 微量测定仪检测其浓度。

本试验所采用的 27 个微卫星分布于猪 1 ~ 17 号常染色体和 X 染色体上。其中 CGA、S0155 :chr. 1(即位于第一号染色体 ,以下类同) ;Sw240、S0226 :chr. 2 ;Sw72、S0002 :chr. 3 ;S0227 :chr. 4 ;JGF1、S0005 :chr. 5 ;Sw122、S0228 :chr. 6 ;S0101、Sw632 :chr. 7 ;S0225、S0178 :chr. 8 ;Sw911 :chr. 9 ;Sw951 :chr. 10 ;S0386 :chr. 11 ;S0090 :chr. 12 ;S0215、S0068 :chr. 13 ;Sw857 :chr. 14 ;S0355、Sw936 :chr. 15 ;S0026 :chr. 16 ;Sw24 :chr. 17 ;S0218 :chr. X。引物序列详见资料^[6]。

PCR 反应体系共 12 μ l ,含模板 25 ~ 50 ng , Mg^{2+} 1.5 mM ,dNTP 200 μ M ,荧光引物 30 ng ,Goldstar 聚合酶 0.25 u ,TMAC 1 mM。反应条件 95 $^{\circ}C$ 5 min 94 $^{\circ}C$ 30 s 55 ~ 60 $^{\circ}C$ 45 s (因座位而异) ,72 $^{\circ}C$ 90 s 35 个循环 ,72 $^{\circ}C$ 10 min。PCR 扩增产物通过 PE 公司 ABI 373 DNA 全自动测序仪检测 ,利用 GENESCAN 软件分辨出基因型。

1.3 数据处理

包括等位基因频率、基因杂合度、座位多态信息含量(PIC)、Nei 氏标准遗传距离和 Rogers 遗传距离的计算^[8,9]。

2 结果

2.1 由个体的基因型 ,计算出 3 个地方猪种 27 个微卫星的等位基因频率见表 1。

从表 1 可见 ,在同一微卫星座位上 3 个地方猪种具有的等位基因数目和频率明显呈现出差异。一些等位基因如 S0155 的 158bp、162bp、164bp ,Sw72 上的 110bp 为 3 个品种所共有。一些等位基因为某个品种特有 ,如 Sw72 的 94bp、96bp 只出现在阳新猪中 ,S0288 的 233bp、245bp、247bp、249bp 只在通城猪中出现 ,S0090 的 249bp、253bp 则为清平猪所独有。

表 1 3 个地方猪种 27 个微卫星的等位基因频率
Table 1 Allele frequencies at 27 microsatellite loci in three indigenous pig breeds

座位/基因 Locus/Allele	通城猪 TC	清平猪 QP	阳新猪 YX	座 位/基因 Locus/Allele	通城猪 TC	清平猪 QP	阳新猪 YX
S0155				S0090			
154	0	0	0.1250	233	0.0556	0	0
156	0.4615	0.0556	0	241	0.0556	0.0833	0
158	0.1538	0.1111	0.2500	243	0.1667	0	0.3333
160	0	0.0556	0	245	0	0.1667	0
162	0.1154	0.3333	0.1250	247	0.3889	0.4167	0.1667
164	0.2307	0.3333	0.5000	249	0.2222	0	0
166	0.0385	0.1111	0	251	0.1111	0.1667	0.5000
Sw72				253	0	0.1667	0
94	0	0	0.3750	Sw936			
96	0	0	0.3750	88	0	0.1000	0
100	0.0417	0.1111	0	96	0.0357	0.0500	0
102	0.2085	0.5000	0	98	0.1071	0.0500	0.1250
104	0.0833	0	0	100	0.1785	0	0
106	0	0.1111	0	104	0	0	0.5000
108	0.1250	0	0	108	0	0	0.1250
110	0.3333	0.1667	0.2500	110	0.6429	0.6060	0
112	0.1250	0.1111	0	112	0	0.2000	0.2500
114	0.0833	0	0	116	0.0375	0	0
S0288				...	...	...	...
221	0	0.0555	0	Sw632			
223	0	0	0.1250	159	0.5357	0.3000	0
225	0.0833	0.0555	0	161	0.1071	0.0500	1.0000
227	0.0833	0.0555	0	163	0.0714	0.3500	0
229	0.1667	0.3889	0	165	0.0357	0.1000	0
231	0.0417	0.1667	0.1250	168	0.0357	0	0
233	0.0834	0	0	170	0.0357	0	0
235	0	0	0.1250	172	0.1429	0	0
237	0.0147	0.1111	0.2500	174	0.0357	0.0500	0
239	0.1667	0	0.1250	176	0	0.1500	0
243	0	0.2222	0.1250				
245	0.2083	0	0				
247	0.0834	0	0				
249	0.0417	0	0				

2.2 由表 1 计算出 3 个地方猪种的基因杂合度和 27 个微卫星的多态信息含量见表 2。

由表 2 可见 ,ISAG 和 FAO 推荐的 27 个微卫星在 3 个地方猪种中几乎均呈高度多态座位 (PIC 大于 0.5)。不同微卫星在同一猪种、不同猪种中的变异程度也各有差异 ,如 Sw857 座位在通城猪、清平猪中呈高度多态 ,在阳新猪中为中度多态。阳新猪中的 27 个微卫星大都呈高度多态 ,但 Sw857、S0101、Sw951 为中度多态 ,Sw632 为单态。此外还可看出 ,通城猪、清平猪、阳新猪的平均基因杂合度分别为 0.7489、0.6987 和 0.6293 ,此由高到低的顺序与按平均多态信息含量得到的结果一致。

表 2 3 个地方猪种的基因杂合度和信息多态含量

座 位 Locus	基因杂合度 Genetic heterozygosity			多态信息含量 Polymorphism information content		
	通城猪 TC	清平猪 QP	阳新猪 YX	通城猪 TC	清平猪 QP	阳新猪 YX
S0155	0.6955	0.7470	0.6563	0.6839	0.7188	0.6489
Sw72	0.7987	0.6852	0.6563	0.7907	0.6783	0.6167
S0288	0.8681	0.7531	0.8438	0.8667	0.7447	0.8398
S0090	0.7531	0.7361	0.6111	0.7367	0.7249	0.6111
Sw936	0.5407	0.5850	0.6563	0.5399	0.5562	0.6484
...	...	...	...	...	...	...
Sw632	0.6709	0.7523	0.0000	0.6641	0.7454	0.0000
平 均 Average	0.7489	0.6987	0.6293	0.7433	0.6839	0.6094

2.3 3 个地方品种间的 Nei 氏标准距离和 Rogers 遗传距离采用 GENE IN POPULATION 软件计算。结果见表 3。

表 3 3 个地方猪种间的遗传距离

Table 3 Genetic distances among three indigenous pig breeds

	通城猪 TC	清平猪 QP	阳新猪 YX
通城猪(TC)	0	0.399	0.877
清平猪(QP)	0.317	0	0.900
阳新猪(YX)	0.431	0.438	0

注 :上三角(右)为 Nei 氏标准遗传距离,下三角(左)为 Rogers 遗传距离

Note :The upper-triangle (right) is Nei's standard distance and the lower-triangle (left) , Rogers' distance.

两种遗传距离的结果均表明 ,通城猪和清平猪有着较近的亲缘关系 ,且两者与阳新猪的亲缘关系略远。

3 讨论

3.1 品种内的遗传多样性

微卫星由两或三核苷酸重复序列所构成的核心部分和两端的侧翼序列组成。侧翼序列使微卫星特异地定位于基因组某一位置 ,核心部分碱基重复数目的不同则是形成微卫星多态性的基础。不同品种在同一微卫星座位上等位基因数目和频率的差异体现出其遗传上的差异 ,并可借此区分品种的类型。共有的等位基因在该物种基因组中可能最为古老、保守 ,其余等位基因则是在进化过程中由于插入、缺失等突变机制所造成^[10 ,11]。由此可认为本实验的 27 个微卫星座位上 3 个品种共享的等位基因(如 S0155 座位上的 158bp、162bp、164bp 等)是我国地方猪种最为原始、最具特征的。不同品种在漫长进化过程和人为选择下 ,其微卫星核心序列重复数发生不同方向、不同程度的变异 ,从而形成了本身特有的“ DNA 指纹图 ”。

基因杂合度(genetic diversity)又称基因多样性 ,一般认为它是度量品种变异的一个最适参数。平均基因杂合度的大小近似反映出遗传结构变异程度的高低。Nei 和 Takezaki 认为微卫星比传统的血型、蛋白质多态座位更具多态性 ,由其计算出的基因杂合度值在 0.3 ~ 0.8 之

间,因此在估测遗传距离,尤其是亲缘关系较近的种群间,以及绘制系统发育树时显得更为精确和高效^[12]。利用血型、蛋白质多态标记检测猪的平均杂合度一般在 0.1 左右。聂龙等测得西南地区 6 个地方猪种平均杂合度为 0.038~0.066^[13],胡文平等测得云南 3 个地方猪种的平均杂合度在 0.0712~0.1027 之间^[14]。微卫星应用研究中, van Zeveren 等用 7 个微卫星座位研究 4 个比利时猪种的结果在 0.54~0.67 之间^[15], Dimoski 等借助 18 个微卫星座位测得约克夏、大白猪(英系约克夏)的平均杂合度分别为 0.53 和 0.60^[16]。本研究利用 27 个微卫星座位测得通城猪、清平猪、阳新猪的平均基因杂合度值分别为 0.7489、0.6987 和 0.6293,不仅比国外猪种的高,而且远远高于用于血型、生化遗传标记测得的家猪平均杂合度值。这表明 3 个地方猪种核基因变异程度较国外的高,遗传多样性比较丰富。3 个地方猪种按品种内遗传变异程度大小依次排列为通城猪、清平猪和阳新猪。

3.2 品种间遗传分化关系

两种遗传距离计算得到的结果都显示,通城猪和清平猪的亲缘关系较近,它们与阳新猪相距均略远。通城猪属于华中两头乌一大类群,形成历史悠久,是湖北省著名的地方良种之一。清平猪分布于江汉平原向鄂西北山区过渡地带,体型、外貌上兼有西南、华北和华中 3 种猪种类型的特征。阳新猪产于长江中游两岸,从华北和华中型猪种杂交后代中选育而成。我国地方猪种分为 6 大类群,通城猪和清平猪属于华中型,阳新猪属于江海型^[2]。本研究结果与此相一致。

此外从表 1 还可看出,通城猪和清平猪在 27 个微卫星座位上检测到的等位基因数目多,分布较均匀,阳新猪则数目较少,分布多极端。这可能与试验所用的样本含量即样本大小、样本内个体数有关,虽然我们采用的样品均来自不同的血统,但并不能囊括该品种在该座位上的全部等位基因,这有待进一步扩大样本含量。从理论上讲,分子标记的座位数比样本内个体数更为重要,座位数越多,其可靠性程度越高^[8,17]。因此,本研究利用 27 个微卫星座位对湖北省 3 个地方猪共 30 个血统的研究结果,具有很高的可信度。

致谢 杨玉芬、徐三平、熊昌平、黄既同、郭万虎、余三星、骆传教等同志在采集血样过程中给予大力支持,特此致谢。

参 考 文 献

1 《湖北省家畜家禽品种志》编委会. 湖北省家畜家禽品种志. 武汉:湖北科学技术出版社,1985,25~66

2 张仲葛,李炳坦,陈效华等. 中国猪品种志. 上海:上海科学技术出版社,1986

3 陈幼春. 中国家畜多样性保护的意义. 生物多样性,1995,3(3):143~146

4 彭中镇,曹胜炎,杨兴柱,李奎. 猪的遗传改良. 北京:农业出版社,1994,222~238

5 Takezaki N, Nei M. Genetic distance and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics*, 1996, 144:389~399

6 Milan D. Recommendations for PiGMap diversity studies. <http://www.toulouse.inra.fr/lgc/pig/panel/control>

7 李雪梅,龚炎长,赵书红等. 现场裂解猪全血提取 DNA. 河北农业大学学报,1997,20(4):84~86

8 Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individual. *Genetics*, 1978, 89:583~590

9 May B, Krueger C C, Eng W et al. GENES IN POPULATION (Version 2). *A computer program for analysis of genetic data*, 1995

10 Arranz J J, Bayon R, San Primitivo F et al. Genetic variation of five microsatellites loci in four breeds of cattle. *J. Agri. Sci.*, 1996, 27:533~538

11 Buchanan F C, Adamas L J, Littlejohn R P et al. Determination of evolutionary relationships among sheep

breeds using microsatellites. *Genomics* ,1994 ,**22** :397 ~ 403

12 Nei M , Takezaki N. Estimation of genetic distance and phylogenetic trees from DNA analysis. *Proc. 5 th World Congr. Genet. Appl. Livest. Prod.* , Canada ,1994 ,**21** :405 ~ 411

13 聂龙 ,施立明. 西南地区地方品种猪血液蛋白遗传多样性研究 ,生物多样性 ,1995 ,**3** (1) :1 ~ 7

14 胡文平 ,连林生等. 云南地方猪种血液蛋白多态性研究. 遗传 ,1997 ,**19** (5) :30 ~ 33

15 Van Zeveren A , Peelman L , van de Weghe A et al. A genetic study of four Belgian pig populations by means of seven microsatellite loci. *J. Anim. Breed. Genet.* ,1995 ,**112** :191 ~ 204

16 Dimsoki P et al. Population characteristics of Yorkshire (Y) and Large White (LW) pigs on the microsatellite allelic frequencies. *Anim. Genet.* ,1996 ,(Suppl. 2) :37

17 李俊雅 ,于汝梁等. 模拟群体中基因座位数对 Nei 遗传距离的影响. 中国动物遗传育种研究 ,北京 :中国农业科技出版社 ,1997 ,115 ~ 118