

肉牛群体遗传变异的微卫星多态性分析^①

孙少华^② 桑润滋

师守堃

(河北农业大学动物科技学院)

(中国农业大学动物科技学院)

贾青 李运起 田树军 李雪梅

(河北农业大学动物科技学院)

摘要 利用6个微卫星位点分析了8个肉牛杂交亲本群体的遗传结构和遗传变异,结果表明:8个肉牛群体平均多态信息含量和平均杂合度较高,其范围分别为0.57~0.71和0.59~0.73。以海伏特牛和利木赞牛与三个母牛种群(FN,ZH,FU)间遗传距离为最大。由邻结法绘制的系统聚类图能清晰、客观地反映8个肉牛群体的地理分布、遗传分化特点,以及亲缘关系远近程度。这些研究为肉牛的杂交改良奠定了基础。

关键词 肉牛;微卫星DNA;群体遗传变异

分类号 S823; Q75; Q31

Study on Genetics Variation of Microsatellite in Beef Cattle Population

Sun Shaohua^① Sang Runzi^① Shi Shoukun^② Jia Qing^① Li Yunqi^①

Tian Shujun^① Li Xuemei^①

^① Hebei Agricultural University, College of Animal Science and Technology, Bao Ding 071001;

^② China Agricultural University, College of Animal Science and Technology, Beijing 100094)

Abstract Using six microsatellite locus, the genetic structure and genetic variation of eight beef cattle populations were analysed. The result showed that the mean size of polymorphism information contents and the mean heterozygosity index in the population are 0.57~0.71 and 0.59~0.73 respectively. It is largest in terms of genetic distance for crossing between Hereford, Limousin and FN, ZH, FU Cattle population. The clustering dendrograph drawn by a of method of neighbor-joining can clearly reflect the geography distribution, the feature of genetics differentiation, and genetic relationships among eight cattle populations. These studies help providing information for cross-improvement for beef cattle.

Key words beef cattle; microsatellite DNA; genetic variation

牛是人类长期强度选择和杂交培育的动物,积累了丰富的遗传变异基础,形成了各具特色的众多地方品种。人们要合理的保存和利用这些品种资源,就必须了解现有品种的群体遗传结构和遗传变异,以最大限度地提高保护和利用的效率。遗传变异主要是由遗传物质DNA差异造成的,因而利用分子遗传标记直接研究DNA的变异性具有很大意义。微卫星标记是继RFLPs标记之后近几年才发展起来的一种新的分子遗传标记,它与RFLPs, RAPD及小卫星

收稿日期: 1999-05-08

①国家“九五”,“重中之重”肉牛项目(96-003-03-11)资助。

②孙少华,保定市河北农业大学动物科技学院,071001

DNA 标记比较,具有数量大,分布广、且均匀,多态信息含量高、分析方便等优点,成为后来者居上,在生物技术领域展示出极其诱人的应用前景。国外有许多的报道^[1~2],利用微卫星技术研究牛的群体遗传结构、遗传变异,而国内还未见报道。本研究利用微卫星 DNA 多态性分析技术对 8 个肉牛群体遗传结构、遗传变异进行了分析,为肉牛的杂交利用提供了理论依据。

1 材料与方 法

1.1 样 本 的 采 集 和 DNA 的 抽 提

3 个母本种群、100 个不相关个体血样分别来自赞皇县西本杂种牛 38 头、丰宁—隆化县西本杂种牛 39 头,抚宁县荷本杂种牛 23 头;5 个父本品种、62 个不相关个体冻精样品为夏洛来 19 头,利木赞 13 头,皮埃蒙特 13 头,安格斯 9 头,海伏特 8 头。

从血样中提取 DNA 参考 Sambrook^[3]方法,从冻精中提取 DNA 参考 Lien^[4]方法。

1.2 PCR 引物的选择及 PCR 反应条件的确定

根据 Barker^[5]微卫星选择标准,参考 Michael^[6]等发表的 6 个牛微卫星 PCR 引物序列(表 1)。PCR 反应条件参考原文献,稍做修改。4 种 dNTP 浓度全部改用为 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,在总体积 20 μL 下,用德国 Personer cycler PCR 仪进行 PCR 扩增。

表 1 6 个位点微卫星引物及 PCR 条件

微卫星位点	染色体	片段长度 (bp)	多态信息 含量	$c(\text{Mg}^{2+})/$ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	退火温度 $t/^\circ\text{C}$	引物序列 5'—3'
IDVGA11	8	205~259	0.37	1.5	65	CCT TCT GGC AAC CAC CTA TTT G CCA CCT AAG TGT CTC CTG ATG GA
BM2113	2	125~149	0.74	1.5	58	GCT GCC TTC TAC CAA ATA CCC CTT CCT GAG AGA AGC AAC ACC
BM1824	1	172~196	0.77	1.5	59	GAG CAA GGT GTT TTT CCA ATC CAT TCT CCA ACT GCT TCC TTG
ETH225	9	141~167	0.76	2.0	68	GAT CAC CTT GCC ACT ATT TCC T ACA TGA CAG CCA GCT GCT ACT
ETH10	5	209~225	0.44	1.5	68	GTT CAG GAC TGG CCC TGC TAA CA CCT CCA GCC CAC TTT CTC TTC TC
ETH3	19	105~131	0.71	2.0	65	GAA CCT GCC TCT CCT GCA TTG G ACT CTG CCT GTG GCC AAG TAG G

1.3 凝胶电泳及微卫星基因型判定

PCR 扩增反应结束后,根据卢圣栋方法^[7],用 8% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 PCR 扩增产物,并用银染法显色,观片灯观察电泳结果并拍照。以 PBR322/MSPI 为分子量标记物,根据里德伍克公式^[8]计算微卫星 DNA 片段分子量方法,判定肉牛个体基因型。

1.4 统计分析方法

微卫星等位基因频率可直接计算获得;多态信息含量(polymorphism information contents, PIC)根据 Bostein 公式^[9]计算;有效等位基因数(effective number of alleles)根据 Hines 公式^[10]计算;平均杂合度根据根井正利公式^[11]计算;遗传距离根据 Nei 标准遗传距离公式^[12]计算;系统聚类分析根据 Saitou and Nei 提出的 Neighbor-Joining 方法^[13]。以上数据处理均编

程在奔腾Ⅰ计算机上完成。

2 结果与分析

2.1 肉牛群体内遗传变异(表2)

平均有效等位基因数最高为抚宁荷本杂种牛(5.28),最低为皮埃蒙特(3.23);平均多态信息含量和平均杂合度均为赞皇西本杂种牛最高(分别为0.71和0.73),最低为安格斯牛(分别为0.57和0.59)。

表2 肉牛微卫星DNA的群体内遗传变异

遗传变异 测度	杂交亲本群体								平均
	FN ^①	ZH	FU	CL	LM	PT	AG	HF	
多态信息含量	0.60	0.71	0.68	0.59	0.64	0.61	0.57	0.683	0.64
有效等位基数	3.48	4.88	5.28	3.33	3.39	3.23	3.40	4.13	3.89
平均杂合度	0.62	0.73	0.70	0.61	0.68	0.65	0.59	0.72	0.66

①FN——丰宁、隆化西本杂种牛, ZH——赞皇西本杂种牛, FU——抚宁荷本杂种牛, CL——夏洛来, LM——利本赞, PT——皮埃蒙特, AG——安格斯, HF——海伏特牛。

2.2 肉牛群体间的遗传变异(表3)

由6个微卫星位点分析8个肉牛杂交亲本群体间遗传变异——遗传距离(表3),可以看出:在丰宁、隆县区,以FN为母本,以引进的5个公牛品种CL,LM,PT,AG和HF为父本的群体间遗传距离大小依次为:HF,LM,AG,PT和CL组合;在赞皇和抚宁县区,分别以ZH牛和FU为母本,以5个引进公牛品种为父本的群体间遗传距离大小依次均为:HF,LM,PT,AG和CL组合。总的来看,3个县区的父、母本群体间遗传距离均以HF组合和LM组合为最大。

表3 肉牛品种(或群体)间遗传距离

品种	FN	ZH	FU	CL	LM	PT	AG	HF
FN		0.107 89	0.124 64	0.141 89	0.336 14	0.244 73	0.247 73	0.480 20
ZH	0.107 89		0.127 69	0.114 55	0.288 87	0.250 55	0.185 08	0.396 96
FU	0.124 64	0.127 69		0.128 45	0.285 00	0.207 89	0.187 14	0.430 10
CL	0.141 89	0.114 55	0.128 45		0.187 46	0.223 82	0.276 14	0.494 17
LM	0.336 14	0.288 87	0.285 00	0.187 46		0.313 44	0.378 24	0.511 40
PT	0.244 73	0.250 55	0.207 89	0.223 82	0.313 44		0.334 45	0.462 90
AG	0.247 73	0.185 08	0.187 14	0.276 14	0.378 24	0.334 45		0.415 65
HF	0.480 20	0.396 96	0.430 10	0.494 17	0.511 40	0.462 90	0.415 65	

2.3 系统聚类分析

根据微卫星DNA多态性分析计算出的遗传距离进行Neighbor-Joining法聚类(图1),可见:由大型的原法国CL和LM牛,以及邻国意大利的PT牛聚为第一类;由英国的中小型肥牛AG和HF聚为第二类;由含中国黄牛血液的FN、ZH和FU聚为第三类。这一结果与8个牛群体的地理分布、遗传分化等实际情况相符。

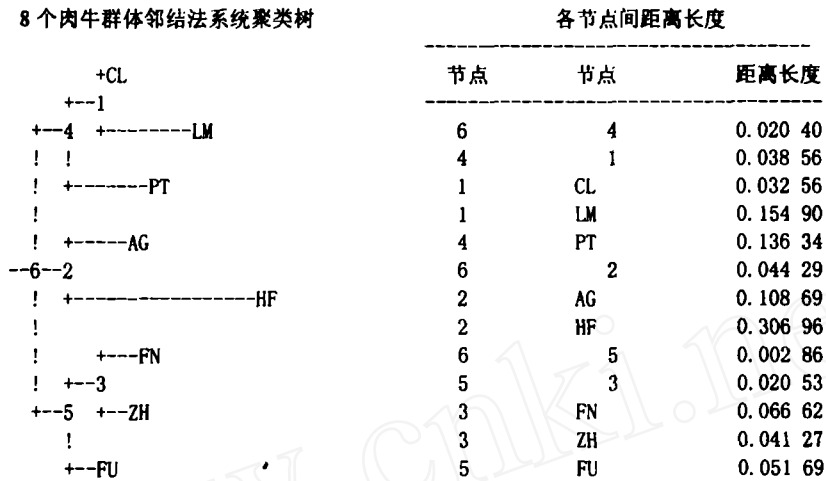


图1 8个肉牛亲本群体系统聚类图(无根树)

3 讨论

3.1 关于微卫星位点多态性

由表1看出:6个微卫星位点的多态信息含量(PIC)范围为0.57~0.71,根据Vaiman^[14]确定位点多态性标准:PIC>0.5为高度多态性位点,0.5>PIC>0.25为中度多态性位点,PIC<0.25为低度多态性位点。6个位点中IDVGA11和ETH10为中度多态性位点,其余4个位点在0.5以上,均为高度多态性位点。由6个位点微卫星计算的遗传距离所绘制的系统聚类图,能清晰客观地反映了这8个牛群的地理分布、遗传分化特点以及亲缘关系远近程度。

3.2 关于群体内遗传变异

多态信息含量(PIC)和平均杂合度都是表示群体内遗传变异大小的测度。PIC高、杂合度大,说明群体内基因一致性差、遗传变异大、选择潜力也大;反之,PIC低、杂合度小,则说明群体遗传变异性小、选择潜力也小。由表2可以看出,由6个微卫星位点得到的平均多态信息量和平均杂合度均高,其范围分别为0.57~0.71和0.59~0.73。并且二者在8个牛群体中排列顺序基本是一致的。从多态信息含量看,只有夏洛来(0.59)和安格斯(0.57)稍低外,其余6个群体PIC均在0.6以上,这与Vaiman^[14]的牛微卫星平均多态信息含量为0.6的结果相似。

3.3 关于群体间的遗传变异

品种(或群体)间的遗传变异用遗传距离表示。从表3和图1看出,河北的3个母牛群体间(FN,ZH和FU)存在着遗传差异。FN和ZH牛虽都为西本杂种牛,但它们的遗传背景不同。ZH牛是属于中原黄牛的本地黄牛改良而来;FN牛是由属于北方牛的蒙古牛改良而来;FU牛是以多含蒙古牛、复州牛等北方牛血液的本地黄牛与荷斯坦牛杂交而来。这三个种群虽然存在着差异,但在系统树上聚为一类,说明它们都来源于中国黄牛这一大系统,比其他5个国外引入品种的亲缘关系近。

从表3和图1还可看到:在3个区县的父、母本杂交组合中,与HF牛组合或LM牛组合的遗传距离最大,并且HF牛、LM牛与河北3个区县的FN,ZH和FU牛的亲缘关系也最远。根据杂种优势理论,预测与HF牛或LM牛组成的杂交组合能产生较大的杂种优势。我们此后

的在这3个区县的肉牛杂交组合试验也证明了这一预测的准确性。

综上所述,利用6个微卫星位点分析8个肉牛杂交亲本群体内和群体间的遗传变异以及亲缘关系是非常有效的,可为我国肉牛品种(或群体)的杂交改良提供了理论依据。

承蒙中国农科院畜牧研究所许尚忠副研究员、曹红鹤副研究员对本研究的帮助和支持,在此表示感谢。

参 考 文 献

- 1 Machugh D E, Loftus R T, Cunningham P, et al. Genetics structure of seven European cattle breeds assessed using 20 microsatellite marker. *Anim Genet*, 1998, 29:333~340
- 2 Peelman L J, Mortiaux F, Zeveren A V, et al. Evaluation of the genetic variability of 23 bovine microsatellite markers in four Belgian cattle breeds. *Anim Genetics*, 1998, 29:161~167
- 3 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, et al. *Molecular cloning A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, N Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1991
- 4 Lien S. A method for isolation of DNA from frozen(A. I) bulls semen. *J Anim Breed Genet*, 1990, 107:74
- 5 Barker J S F. A global protocol for determining genetic distance among domestic livestock breeds. *Proc 5th world Congr Genet Appl Livest Prod*, 1994, 21:501~508
- 6 Michael D B, Steven M K, John W K, et al. A genetic linkage map for cattle. *Genetics*, 1994, 136:619~639
- 7 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术. 北京:高等教育出版社, 1993
- 8 里德伍克 D, 里姆斯 B D 主编. 赵大健, 孙存等译. 核酸电泳技术. 北京:科学出版社, 1989
- 9 Bostein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic Linkage map in man using restriction fragment Length polymorphisms. *Amer J Hum Genet*, 1980, 32:314~331
- 10 Hines H C. Linkage relationships among loci of polymorphisms in blood and milk of cattle. *J Dairy Sci*, 1981, 64:71~76
- 11 根井正利著. 汪家玉译. 分子群体遗传学与进化论. 北京:农业出版社, 1983
- 12 Nei M. Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 1972, 106:283~292
- 13 Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method; A new method for reconstruction phylogenetic tress. *Mol Biol Evol*, 1987, 4:406~425
- 14 Vaiman D, Mercier D, Moazai-goudarzik, et al. A set of 99 cattle microsatellites characterization synteny mapping and polymorphism. *Mammalian Genome*, 1994, 5:288~297