

两个藏猪类群微卫星DNA遗传多样性的研究^{*}

张亚妮, 张恩平, 吴迪, 张涛, 李相运, 任战军, 耿社民

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 采用5个微卫星引物对2个藏猪类群(合作猪和迪庆猪)及参照群体成华猪的遗传多样性进行了研究。结果表明, 所选的5个微卫星引物均具有多态性, 3个猪种在5个位点的等位基因数为4~8个; 合作猪、迪庆猪和成华猪在5个位点的平均有效等位基因数分别为4.5104、3.0696和3.1250, 位点平均杂合度分别为0.7713、0.6405和0.5197, 平均多态信息含量分别为0.7402、0.5656和0.5798; 遗传分化系数表明, 2个藏猪类群间亲缘关系较近($G_{ST}=22.07\%$), 二者与成华猪的关系较远($G_{ST}=22.46\%$, $G_{ST}=31.11\%$)。

[关键词] 藏猪; 微卫星; 遗传多样性

[中图分类号] S828.8⁺92

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)06-0023-04

藏猪分布于我国青藏高原海拔3 000~4 500 m处, 具有抗逆性强、耐粗饲和适合高原气候等优点, 由于分布范围广, 形成了许多地方类群, 其中合作猪和迪庆猪是2个典型的类群。利用微卫星进行猪的分子遗传标记研究已有大量文献报道^[1~4], 但关于藏猪的遗传多样性的研究, 目前仅见有李相运等^[5, 6]在血液蛋白质方面的研究报道。本研究利用微卫星技术对2个藏猪类群(合作猪和迪庆猪)的遗传多样性进行检测, 同时以地处四川省成都市成华平原中部的成华猪作为参照群体, 以期对藏猪遗传资源的保护和开发利用提供相关理论基础。

1 材料与方法

1.1 样本来源

应用随机抽样法在甘肃省甘南藏族自治州合作市和夏河县抽取39头合作猪血样; 在云南省迪庆藏

族自治州德钦县及其毗邻的西藏自治区芸康县抽取52头迪庆猪血样; 在四川省成都市成华猪场随机采取40头成华猪血样, 加有抗凝剂的血样冷冻保存在-40℃冰箱中备用。

1.2 试验方法

1.2.1 试剂与仪器设备 试剂主要有TaqDNA聚合酶, Tris饱和酚, 丙烯酰胺, 过硫酸铵, 十二烷基磺酸钠, PBR322DNA /map IM arker, 琼脂糖和N, N, N', N'-四甲基乙二胺。仪器有PTC-200扩增仪(美国), DYY-III型电泳槽(北京), ECP 3000三恒多用电泳仪(北京), Icmatic F120制冰机, FA 21048天平, 101A-2干燥箱。

1.2.2 微卫星引物 特异性引物根据GenBank (<http://www.toulouse.inra.fr/lgc/pig/panel/html>) 和Rohrer等^[7]的报道确定, 见表1。

表1 5个微卫星位点的序列、退火温度及染色体的位置

Table 1 The sequence, annealing temperature and chromosomes location of 5 micro-satellite loci

位点 Locus	序列 Sequence	退火温度/℃ Annealing temperature	染色体位置 Chromosomes location
S0005	F: GAGGCA GTGTCTTCTA TTCA R: GCCA TGTGTAAA GTGTTGCT	58	5
SW 769	F: GGTA TGACCAAAA GTCCTGGG R: TCTGCTA TGTGGGAA GAA TGC	60	13
SW 790	F: CTGTGGGA GTGTA GCA TCTTTG R: CA TACA CCCCAG A TGTGG	62	8
SW 781	F: CAACTACGTCCTTCTTTTGGC R: GATCCTTGGTCTGGAAACTTG	62	1
SW 1032	F: ATTGGGTGGACTGA TATGGT R: GATCTA TAAA GTGTAAA TTGTGTGTG	58	14

1.2.3 模板DNA的提取 采用常规的酚抽提法提取DNA。

1.2.4 PCR反应体系及反应程序 PCR反应体系为10×PCR buffer 1.2 μL, dNTP (2.5 mmol/L)

^{*} [收稿日期] 2003-05-09

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(39670530)

[作者简介] 张亚妮(1977-), 女, 陕西渭南人, 在读硕士, 主要从事动物遗传资源研究。

[通讯作者] 张恩平(1966-), 男, 陕西武功人, 副教授, 在读博士, 主要从事动物育种与繁殖研究。

1.0 μL , MgCl_2 (25 mmol/L) 0.9 μL , 引物 (10 pmol) 1.0 μL , TaqDNA 聚合酶 (3 U/ μL) 0.33 μL , 模板 DNA (50 ng/ μL) 2.0 μL , 加纯水使体积达 12 μL 。反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 30 个循环 (94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min) 后, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.5 电泳检测 PCR 反应结束后, 用浓度为 8% 的聚丙烯酰胺凝胶分离产物, 然后用硝酸银染色法显色, 观察并记录结果, 应用 UDP GDS800 成像仪照相。

1.3 数据统计处理

1.3.1 基因频率和基因型频率的计算 设某一基因位点上有 A 和 B 2 个等位基因, 基因频率为 p 和 q , 则:

$$p = (2AA + AB) / 2N, q = (2BB + AB) / 2N$$

式中, AA 为具有 AA 基因型的个体数, BB 为具有 BB 基因型的个体数, AB 为具有 AB 基因型的个体数, N 为具有 AA 和 AB 基因型的个体数之和, 或具有 BB 和 AB 基因型的个体数之和。

1.3.2 位点杂合度 (h) 参见 Nei^[8] 的报道, 按下式计算:

$$h = 1 - \sum_{i=1}^m p_i^2, H = \frac{1}{r} \sum_{i=1}^r h_i$$

式中, p_i 为基因频率, m 为等位基因数, r 为微卫星

位点数, H 为平均位点杂合度。

1.3.3 多态信息含量 (PIC) 按 Botstein 等^[9] 的公式计算。

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^m p_i^2 - \sum_{j=1}^{m-1} \sum_{i=1}^m 2p_i^2 p_j^2$$

$$\overline{PIC} = \frac{1}{r} \sum_{i=1}^r PIC_i$$

式中, $\overline{PIC}$ 为位点平均多态信息含量, r 为微卫星位点数, p_i 和 p_j 分别为等位基因的频率。

1.3.4 有效等位基因数 (N_e) 按下式计算:

$$N_e = 1 / \sum_{i=1}^m p_i^2, \overline{N_e} = \frac{1}{r} \sum_{i=1}^r N_{ei}$$

式中, $\overline{N_e}$ 为平均有效等位基因数。

1.3.5 遗传分化系数 (G_{ST})^[8] 按下式计算:

$$G_{ST} = 1 - H_s / H_T$$

式中, H_s 为亚群间位点平均杂合度, H_T 为总群体平均位点杂合度。

2 结果与分析

2.1 群体遗传多样性的分析

对合作猪、迪庆猪和成华猪的遗传多样性检测结果见表 2。

表 2 5 个微卫星位点的等位基因频率

Table 2 The allelic frequencies of 5 micro-satellite loci

品种 Breed	位点 Locus	A	B	C	D	E	F	G	H
HZ	S0005	0.052 6	0.289 5	0.131 6	0.131 6	0.263 1	0.062 8	0.062 8	0.000 0
	Sw 781	0.082 6	0.155 2	0.155 2	0.379 3	0.086 2	0.034 5	0.086 2	0.017 2
	Sw 769	0.012 8	0.012 8	0.038 5	0.089 8	0.217 9	0.448 7	0.102 6	0.076 9
	Sw 1032	0.089 7	0.051 3	0.218 0	0.243 6	0.051 3	0.141 0	0.192 3	0.012 8
	Sw 790	0.146 8	0.054 1	0.108 1	0.378 4	0.310 8	0.000 0	0.000 0	0.000 0
DQ	S0005	0.155 6	0.289 0	0.188 8	0.188 8	0.177 8	0.000 0	0.000 0	0.000 0
	Sw 781	0.034 5	0.034 5	0.275 9	0.655 1	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0
	Sw 769	0.371 4	0.571 4	0.028 6	0.028 6	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0
	Sw 1032	0.166 7	0.111 1	0.402 7	0.152 7	0.166 8	0.000 0	0.000 0	0.000 0
CH	S0005	0.055 6	0.111 1	0.125 0	0.180 6	0.361 1	0.166 6	0.000 0	0.000 0
	Sw 781	0.100 0	0.842 8	0.028 6	0.028 6	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0
	Sw 769	0.060 6	0.212 1	0.015 2	0.712 1	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0
	Sw 1032	0.042 9	0.357 1	0.214 3	0.128 6	0.142 8	0.085 7	0.028 6	0.000 0
	Sw 790	0.026 3	0.026 3	0.131 6	0.013 2	0.056 8	0.368 4	0.368 4	0.000 0

注: HZ 合作猪; DQ 迪庆猪; CH 成华猪。下表同。

Note: HZ Hezuo pig; DQ Diqing pig; CH Chenghua pig. The following tables are the same.

由表 2 可知, 本试验在 5 个微卫星位点上共检测到了 38 个等位基因, 平均每个位点的等位基因数为 7.6 个。在 S0005 位点, 合作猪有 7 个等位基因, 而迪庆猪和成华猪则分别为 5 个和 6 个; 在 Sw 781 和 Sw 769 位点, 合作猪有 8 个等位基因, 而迪庆猪

和成华猪则为 4 个; 在 Sw 1032 位点, 合作猪、迪庆猪和成华猪的等位基因数分别为 8, 5, 7 个; 在 Sw 790 位点, 迪庆猪未出现多态性, 合作猪和成华猪分别有 5 个和 7 个等位基因。可见对于不同的猪种, 同一微卫星位点的等位基因数是不同的, 这反映

了不同猪种在遗传多样性上的差异。又如在 S0005, Sw 781 和 Sw 769 位点的 G 等位基因, Sw 781, Sw 769 和 Sw 1032 位点的 H 等位基因, 均是合作猪独有的, 而另外 2 个猪种则没有, 这些特有的等位基因可作为合作猪与其他品种区分的标记条带。而在同一位点上等位基因频率的差异, 可能与基因的进化时序有关。

2 2 群体的遗传变异

衡量群体遗传变异的指标目前主要有基因杂合度、多态信息含量和有效等位基因数。由表 3 可知, 合作猪、迪庆猪和成华猪在 5 个位点的平均杂合度分别为 0.771 3、0.640 5 和 0.519 7; 平均有效等位

基因数分别为 4.510 4、3.069 6 和 3.125 0。从这些数据看出, 有效等位基因数多的猪类群, 其杂合度和多态信息含量也高, 而且合作猪的杂合度 ($P < 0.05$) 和多态信息含量 ($P < 0.01$) 均高于成华猪, 显示了藏猪类群具有比成华猪丰富的遗传多样性。根据 Botstein 等^[9]提出的衡量基因变异程度高低的 多态信息含量 (Polymorphism Information Content, PIC) 指标, 3 个猪品种在 S0005 和 Sw 1032 位点均为高度多态位点; Sw 769 和 Sw 781 是合作猪的高度多态位点, 是其他 2 个猪种的中度多态位点。这些也进一步说明了藏猪具有一定的选择潜力。

表 3 3 个品种 5 个微卫星位点的 H , PIC 和 N_e
Table 3 The H , PIC and N_e of 5 micro-satellite loci on 3 pig breeds

品种 Breed	H	PIC	N_e
HZ	0.771 3 b	0.740 2 B	4.510 4
DQ	0.640 5 a	0.565 6 A	3.069 6
CH	0.519 7 a	0.579 8 A	3.125 0

注: 表中不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)。
Note: Different small letters in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$). Different big letters in the same column indicate quite significant different ($P < 0.01$).

2 3 群体间的亲缘关系

3 个猪品种间在各微卫星位点上的遗传距离分化系数见表 4。由表 4 知, 合作猪与迪庆猪的遗传分化系数为 22.07%, 合作猪与成华猪的遗传分化系数为 22.46%, 迪庆猪与成华猪的遗传分化系数为

31.11%, 说明合作猪与迪庆猪的亲缘关系近, 而两者与成华猪的亲缘关系相对较远。试验所得结果与畜牧学实际情况相一致, 即合作猪与迪庆猪都来源于藏猪类群。

表 4 3 个猪品种间的遗传分化
Table 4 Genetic differentiation

群体 Population	H_s	H_T	G_{ST}
HZ 和 DQ HZ and DQ	0.686 8	0.881 3	0.220 7
HZ 和 CH HZ and CH	0.681 5	0.878 9	0.224 6
DQ 和 CH DQ and CH	0.597 0	0.866 6	0.311 1

3 讨 论

群体的遗传变异就其本质而言, 是 DNA 分子的遗传变异, 不同品种或不同类群在遗传上的差异可不同程度地反映在其 DNA 序列上, 因而在 DNA 水平上检测群体的遗传变异, 研究群体间的遗传相关就显得更为重要。应用微卫星分子标记技术对地方猪种进行遗传变异的研究已有很多报道, Nei^[8]指出, 基因杂合度是度量群体遗传变异的一个最适参数。本研究结果表明, 2 个藏猪地方群体的杂合度都在 0.6 以上, 均高于同期参照的成华猪, 也高于商海涛等^[2]估计的贵州小型香猪 (0.402 7)、广州巴马香

猪 (0.345 4) 和版纳小耳猪的两个近交系 (0.328 2 和 0.379 2) 的杂合度; 高于李雪梅等^[3]估计的万安猪 (0.527 8)、长白猪 (0.432 3)、大白猪 (0.549 7) 及杜洛克猪 (0.426 3) 的杂合度; 高于王昕等^[4]估计的滇南小耳猪 (0.597 0)、贵州小型香猪 (0.594 1)、沂蒙黑猪 (0.557 3)、汉中黑猪 (0.547 0)、二花脸猪 (0.579 8) 及金华猪 (0.456 1) 的杂合度。特别是合作猪的基因杂合度显著高于参照群体成华猪 ($P < 0.05$), 这说明在藏猪群体中具有比其他地方猪品种更丰富的基因资源。可见, 保护好藏猪的基因资源, 对于未来我国新品种猪的培育具有重要的科学价值。

[参考文献]

- [1] Alexander L J, Rohrer G A, Beattie C W. Cloning and characterization of 414 polymorphic porcine micro-satellite[J]. *Animals Genetics*, 1996, 27: 137- 148
- [2] 商海涛, 牛 荣, 魏 弘, 等. 三个品系小型猪 35 个微卫星基因座的遗传学研究[J]. *遗传*, 2001, 23(1): 17- 20
- [3] 李雪梅, 谷忠新, 李 奎, 等. 应用微卫星标记对中国 10 个品种猪遗传变异的研究[J]. *山东农业大学学报*, 2000, 3(3): 261- 264
- [4] WANG Xin, CAO Hong-he, Geng She-min, et al. Genetic diversity of 10 indigenous pig breeds in China[J]. *Animal Biotechnology Bulletin*, 2002, 8(1): 140- 145
- [5] 李相运, 常 洪, 任战军, 等. 合作猪、迪庆猪和成华猪的血清运铁蛋白多型性[J]. *甘肃农业大学学报*, 2000, 35(2): 194- 196
- [6] 李相运, 任战军, 常 洪, 等. 合作猪血液蛋白多型性研究[J]. *西北农业大学学报*, 2000, 28(4): 62- 64
- [7] Rohrer G A, Alexander L J, Keele J W A. Micro satellite linkage map of the porcine genome[J]. *Genetics*, 1994, 136: 231- 245
- [8] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals[J]. *Genetics*, 1978, 89: 583- 590
- [9] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32: 314- 331.

Micro-satellite DNA genetic diversity study on two pig populations

ZHANG Ya-ni, ZHANG En-ping, WU Di, ZHANG Tao, LI Xiang-yun,

REN Zhan-jun, GENG She-min

(College of Animal Science and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture
and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The genetic diversity of five micro satellite sites were studied on two Tibetan pig populations (Hezuo pig and DQing pig) and a chenghua pig population as reference. The result showed: The five micro satellite sites have all polymorphism. The allele number of the 5 micro satellite sites in 3 pig breeds were between 4 and 8. The mean effective allele number of the 5 micro satellite sites in Hezuo pig (HZ), DQing pig (DQ) and Chenghua pig (CH) is 4.510 4, 3.069 6 and 3.125 0, respectively. The mean site heterozygosity is 0.771 3, 0.640 5 and 0.519 7, respectively. The mean polymorphism information content is 0.740 2, 0.565 6 and 0.579 8, respectively. The calculation of genetic differentiation coefficient showed that the relationship of the two Tibetan pig populations is close ($G_{ST} = 22.07\%$), and that the relationship between the two Tibetan pig populations and the CH is distant ($G_{ST} = 22.46\%$, $G_{ST} = 31.11\%$).

Key words: Tibetan pig; micro-satellite; genetic diversity