

务川黑牛微卫星座位遗传多样性分析

吴 芸^{1*}, 蒋自立¹, 田 雄², 马培江³

(1. 遵义师范学院 生物系, 贵州 遵义 563000; 2. 务川仡佬族苗族自治县饲草饲料站, 贵州 务川 564300;

3. 务川仡佬族苗族自治县柏村镇畜牧兽医站, 贵州 务川 564300)

摘要: 以贵州地方牛优良品种务川黑牛为研究对象, 选取分布于其 7 条染色体上的 ETH10、ILSTS033、CSSM66、BM2113、ETH225、BM1818 和 CSRM60 共 7 对微卫星引物进行遗传多样性分析。结果共检测到 21 个等位基因, 每个微卫星座位等位基因数为 2~5 个, 7 个微卫星座位均未达到 Hardy-Weinberg 平衡。7 个位点的平均等位基因数、平均有效等位基因数、平均期望杂合度、平均多态信息含量分别为 $3.000\ 0 \pm 1.154\ 7$ 、 $2.377\ 3 \pm 0.585\ 4$ 、 $0.558\ 4 \pm 0.101\ 6$ 、 $0.475\ 9 \pm 0.125\ 1$, 说明务川黑牛具有良好的遗传多样性。为务川黑牛种质资源保存和改良提供了试验基础。

关键词: 务川黑牛; 微卫星; 遗传多样性; 遗传变异

中图分类号: S823.8 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2012)12-0141-05

The Analysis of Genetic Diversity of
Microsatellite Loci in Wuchuan Black CattleWU Yun^{1*}, JIANG Zi-li¹, TIAN Xiong², MA Pei-jiang³

(1. Biology Department of Zunyi Normal College, Zunyi 563000, China; 2. Fodder and Forage Grass Station of Wuchuan Gelos and Miao Nationality Autonomous County, Wuchuan 564300, China; 3. Animal Husbandry and Veterinary Station of Bocun Town in Wuchuan Gelos and Miao Nationality Autonomous County, Wuchuan 564300, China)

Abstract: Wuchuan black cattle is a good local breed in Guizhou province. In this study, the genetic diversity of Wuchuan black cattle was analyzed by 7 selected pairs of microsatellite loci which distribute on seven different cattle chromosomes, including ETH10, ILSTS033, CSSM66, BM2113, ETH225, BM1818 and CSRM60. The results showed that 21 alleles were found, the allele numbers of each locus changes from 2 to 5 and all of these microsatellite loci didn't reached the Hardy-Weinberg equilibrium. The average number of alleles, average effective number of alleles, average expected heterozygosity and average polymorphism information content were $3.000\ 0 \pm 1.154\ 7$, $2.377\ 3 \pm 0.585\ 4$, $0.558\ 4 \pm 0.101\ 6$ and $0.475\ 9 \pm 0.125\ 1$, respectively. All the data represent us a good genetic diversity of Wuchuan black cattle. To provide an experimental basis for germplasm consensation and improvement of Wuchuan black cattle.

Key words: Wuchuan black cattle; microsatellite; genetic diversity; genetic variation

微卫星是指以 1~6 bp 短核苷酸序列为重复单位组成的简单串联重复序列, 因重复次数及重复程度不一致而产生序列多态性, 又称简单序列重复 (simple sequence repeats, SSR)、短串联重复 (short tandem repeats, STR)、简单序列长度多态性 (simple sequence length polymorphism, SSIP)^[1], 是 20

世纪 80 年代末期发展起来的 DNA 标记^[2]。

牛基因组中约每 188 kb 就含有 1 个微卫星, 分布非常广泛。微卫星可用于构建遗传图谱^[3]、QTL 定位和遗传变异及多样性分析^[4]。Navani 等^[5]选择分布于各染色体上的 108 个微卫星座位进行多态性分析, 其中 61 对显示出不同的分型, 平均等位基

收稿日期: 2012-06-13

基金项目: 遵义市科技项目 (遵市科合社字 2010-09)

作者简介: 吴 芸 (1982-), 女, 重庆人, 讲师, 主要从事动物分子遗传学研究。E-mail: kyzywy002@163.com。* 为通讯作者。

因数为 4.50 ± 0.20 , 平均期望杂合度为 0.66 ± 0.02 , 分析结果为亚洲水牛全基因组研究奠定了基础。Ihara 等^[6]利用 3 820 个微卫星座位建立了牛综合遗传图谱, 在 95% 置信区间内以遗传分辨率 0.8 cM 建立覆盖 3 160 cM 的遗传图谱, 该图谱由 29 条常染色体连锁群体和 1 个性别特异的 X 染色体连锁群体组成, 为具有经济性状的基因定位研究提供了试验基础。

务川黑牛是贵州省优良地方畜种, 具有体形较小、行动灵活、体质结实、结构匀称、劳力较强、耐粗饲和抗病力强等优点, 是值得推广和保护的地方牛品种^[7]。其产肉性能较好, 肉质鲜美细嫩, 是一种低脂肪、高蛋白、氨基酸和脂肪酸比例适当、口感风味好的营养肉品^[8]。林瑞意等^[9]研究了务川黑牛线粒体 DNA 中的细胞色素 b (Cytochrome b, *Cyt b*) 基因多态性, 目前对其核基因组遗传多样性的研究尚未见报道, 为此, 本研究选取分布于务川黑牛不同染色体上的 7 对微卫星座位进

行遗传多样性分析, 以期为务川黑牛种质资源保存和改良提供试验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象 研究中所用 32 个务川黑牛血样均采集自贵州务川仡佬苗族自治县仡佬牧业公司种牛场, 颈静脉采血, EDTA 抗凝, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。血液基因组提取试剂盒 (上海生工生物工程技术服务有限公司) 提取务川黑牛 DNA, 并用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测提取效果。

1.1.2 引物筛选 根据联合国粮农组织 (FAO) 推荐 (<http://www.fao.org>) 和 Bishop 等^[10] 的资料, 筛选 9 对微卫星引物, 分布于不同染色体。由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。9 对微卫星引物中筛选出 7 个扩增条带清晰的位点, 所选引物均为特异性强、相互之间不连锁的微卫星位点。7 对微卫星引物信息见表 1。

表 1 7 对微卫星引物信息

引物名称	<i>T_m</i> 值	染色体	引物序列	等位基因范围
BM1818-F	56.1	23	AGCTGGGAATATAACCAAAGG	253~272
BM1818-R			AGTGCTTTCAAGGTCCATGC	
BM2113-F	60.2	2	GCTGCCTTCTACCAAATACCC	123~143
BM2113-R			CTTCCTGAGAGAAGCAACACC	
CSRM60-F	60.0	10	AAGATGTGATCCAAGAGAGAGGCA	96~116
CSRM60-R			AGGACCAGATCGTGAAAGGCATAG	
CSSM66-F	62.2	14	AATTTAATGCACTGAGGAGCTTGG	184~198
CSSM66-R			ACACAAATCCTTTCTGCCAGCTTGA	
ETH10-F	58.2	5	GTTCAGGACTGGCCCTGCTAACA	212~224
ETH10-R			CCTCCAGCCCACTTTCTCTCTCTC	
ETH225-F	58.0	9	GATCACCTTGCCACTATTTCTCT	141~159
ETH225-R			ACATGACAGCCAGCTGCTACT	
ILSTS033-F	58.0	12	TATTAGAGTGCTCAGTGCC	132~158
ILSTS033-R			ATGCAGACAGTTTTAGAGGG	

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 扩增 扩增体系为: PCR 扩增反应总体积 20 μL , 其中模板 DNA 40 ng, $10\times$ buffer 2.0 μL , dNTP 200 $\mu\text{mol/L}$, Mg^{2+} 20 mmol/L, 上、下游引物各 0.5 $\mu\text{mol/L}$, *Taq* 酶 1 U。反应条件: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, $52\sim 64\text{ }^{\circ}\text{C}$ 复性 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 30 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 检测出的微卫星 PCR 用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分型, 银染显色, 用凝胶成像系统观察电泳检测结果并照相。

1.2.2 数据统计与分析 以 pBR322/*Msp* I 为分子 Marker, GeneMapper 进行微卫星基因型分析。利用 GENEPOP Version 4.0.10^[11-12] 计算等位基因

频率 (allele frequencies)、有效等位基因数 (effective number of alleles) 和 Hardy-Weinberg 平衡检验。期望遗传杂合度 (expected heterozygosity) 和观察遗传杂合度 (observed heterozygosity), 多态信息含量 (polymorphism information content, PIC) 根据 Botstein 等^[13] 公式自编程序计算。

2 结果与分析

2.1 务川黑牛基因组 DNA 检测

提取的 DNA 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果见图 1。由图 1 可知, 所提取基因组 DNA 条带整齐、亮度均一, 所提取基因组 DNA 完整性较好, 经紫外分光光度计检测, 其 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 值在 1.6~1.8, 表明基因组 DNA 不需要进一步纯化, 可直接

用于 PCR 扩增试验。

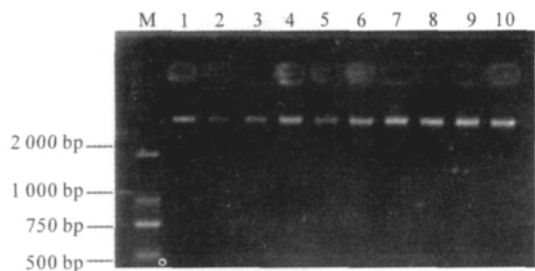


图 1 务川黑牛基因组提取电泳检测结果

2.2 务川黑牛 7 个微卫星座位 PCR 产物检测

7 个微卫星座位扩增后,用 1.5%琼脂糖凝胶电泳进行 PCR 产物检测,结果见图 2。图中条带明亮且不一,由于微卫星重复次数不同,导致上下条带间有几个或几十个碱基数差异,而琼脂糖凝胶电泳不具有单碱基分辨率。对 7 个微卫星 PCR 产物进行 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,结果扩增产物条带清晰,基因分型明显,可用于下步试验分析,见图 3。

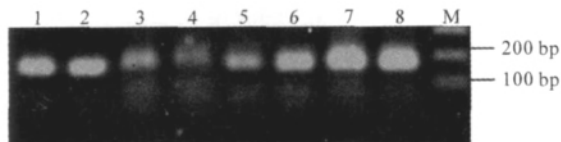


图 2 务川黑牛微卫星座位 CSSM 66 扩增产物检测结果

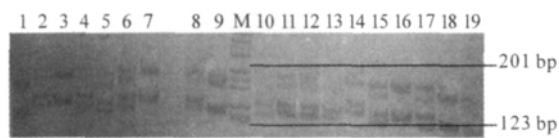


图 3 务川黑牛微卫星 ETH225 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测结果

2.3 务川黑牛微卫星座位等位基因变异

同一微卫星座位上等位基因数目和频率不同可能反映家畜品种内或品种间差异^[14]。由表 2 可见,务川黑牛 7 个微卫星座位共有 21 个等位基因,平均

每个座位 $3.000\ 0\pm1.154\ 7$ 个等位基因。其中 ILSTS033 的等位基因数最多,有 5 个;共有 16 641 0 个有效等位基因,平均有效等位基因数 $2.377\ 3\pm0.585\ 4$ 个。每个座位的有效等位基因从 1.716 7~3.419 0 个不等,其中 ILSTS033 位点有效等位基因数最多,为 3.419 0 个;优势等位基因是物种进化过程中最保守、存在时间最长的等位基因,7 个微卫星座位均具有频率大于 0.4 的优势等位基因。

2.4 务川黑牛群体遗传多样性分析

根据微卫星座位的等位基因频率和相关公式,计算出各座位的表观遗传杂合度、期望遗传杂合度和多态信息含量。7 个微卫星座位表观杂合度在 0.218 8~0.687 5,群体平均值为 $0.450\ 9\pm0.175\ 7$ 。7 个微卫星座位期望杂合度在 0.417 5~0.707 5,平均期望杂合度为 $0.558\ 4\pm0.101\ 6$ 。多态信息含量在 0.330 3~0.662 7 波动,群体均值为 $0.475\ 9\pm0.125\ 1$ 。ILSTS033 期望杂合度最高,说明遗传多样性最高。根据马尔科夫链(Markov chain)模型,利用 GENEPOP Version 4.0.10 对每个微卫星座位进行 Hardy-Weinberg 平衡检验,结果表明,7 个微卫星位点均不处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。

多态信息含量(PIC)能反映某个遗传标记所包含或所能提供的遗传信息容量,用于对标记基因多态性的估计,多态信息含量越大提供的遗传信息越高。PIC>0.5 为高度多态,该遗传标记具备高度的可提供遗传信息性;0.5>PIC>0.25 为中度多态,该遗传标记能比较合理地提供遗传信息;PIC<0.25 为低度多态,该遗传标记对遗传信息可供性较差^[15]。7 个微卫星座位中,ETH10、ILSTS033、ETH225 和 CSRM60 的 PIC 大于 0.5,属于高度多态。其余均为中度多态,无低度多态位点。ILSTS033 多态信息含量最高,为 0.662 7,属于高度多态,CSSM66 期望杂合度和 PIC 最低,提供遗传信息较少。

表 2 微卫星座位等位基因频率、等位基因数和有效等位基因数

座位	染色体	等位基因 数/个	有效等位基因 数/个	等位基因频率				
				P1	P2	P3	P4	P5
ETH10	5	3	2.531 5	0.484 4	0.375 0	0.140 6		
ILSTS033	12	5	3.419 0	0.171 9	0.437 5	0.234 4	0.125 0	0.031 3
CSSM66	14	2	1.716 7	0.703 1	0.296 9			
BM2113	2	2	1.908 7	0.390 6	0.609 4			
ETH225	9	3	2.403 8	0.125 0	0.531 3	0.343 8		
BM1818	23	2	1.952 3	0.578 1	0.421 9			
CSRM60	10	4	2.709 0	0.187 5	0.218 8	0.531 3	0.062 5	
平均值±标准差		3.000 0±1.154 7	2.377 3±0.585 4					

表 3 微卫星座位表观杂合度、期望杂合度、PIC 和 Hardy-Weinberg 检验

座位	表观杂合度(H ₀)	期望杂合度(He)	Hardy-Weinberg	多态信息含量(PIC)
ETH10	0.5	0.604 98	NS	0.524 2
ILSTS033	0.5	0.707 5	NS	0.662 7
CSSM66	0.281 3	0.417 5	NS	0.330 3
BM2113	0.218 8	0.476 1	NS	0.362 8
ETH225	0.625 0	0.584 0	NS	0.504 8
BM1818	0.343 8	0.487 8	NS	0.368 8
CSRM60	0.687 5	0.630 9	NS	0.577 8
平均值±标准差	0.450 9±0.1757	0.558 4±0.101 6		0.475 9±0.125 1

注：NS 表示未达到 Hardy-Weinberg 平衡。

3 讨论

有效等位基因数是基因纯合度的倒数,反映等位基因的相互影响,是群体遗传变异的指标之一,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^[16]。本研究中,7个微卫星座位的等位基因数在2~5,平均等位基因 $3.000\ 0 \pm 1.154\ 7$,平均有效等位基因数为 $2.377\ 3 \pm 0.585\ 4$ 。ILSTS033的有效等位基因数和等位基因数相差1.581 0,表明该微卫星座位上等位基因分布不均匀,若样本量足够大,可推测在务川黑牛选育过程中 ILSTS033 位点受到更大选择压力,导致等位基因分布不均匀。

群体中频率最高的等位基因是该物种最原始、最保守的基因,其余等位基因是在进化过程中由该等位基因突变形成^[17]。本研究的7个微卫星座位中,ILSTS033等4个座位含有3个及以上等位基因,且都包含1个高频等位基因,高频等位基因受遗传漂变影响容易被固定,而低频等位基因可能被消除。但低频等位基因是物种进化的结果,反映群体的遗传多样性,务川黑牛选育、保种工作的开展需要考虑稀有等位基因的保护。

期望杂合度是假定各基因座位符合 Hardy-Weinberg 平衡前提下算得的杂合度。表观杂合度是一个微卫星座位杂合子数除以观察个体总数,它与期望杂合度相比,更易受样本大小等因素影响。平均杂合度是多个期望杂合度的平均值,称为群体基因多样性,它受样本取样影响较小,常作为遗传多样性的度量指标,平均期望杂合度越高,群体遗传一致性越低,遗传多样性越丰富^[18]。某群体中遗传变异范围可由平均遗传杂合度来度量,杂合度越高说明遗传多样性越丰富。本研究分析的7个微卫星标记均具有较高的期望杂合度,表明务川黑牛具有丰富的遗传多样性和较高的选择潜力。研究还发现,

7个微卫星位点均不处于 Hardy-Weinberg 平衡状态,可能是因为采样对象随机性不够和样本数过少。

多态信息含量是衡量基因片段多态性的良好指标,并反映出研究群体可提供的遗传信息程度。7个微卫星座位中有4个高度多态座位,分别是 ILSTS033、CSRM60、ETH10 和 ETH225,其余3个均为中度多态位点,无低度多态座位,说明务川黑牛具有良好的遗传多样性。PIC 值还可表现该位点的可用性和使用效率,某群体中 PIC 越大,其杂合子比例越高,提供的遗传信息越多,本研究选取的微卫星座位可为务川黑牛遗传多样性分析提供充分信息。7个位点中 ILSTS033 多态信息含量最高,达到0.662 7,表明务川黑牛在该位点的遗传信息更为丰富,相比其他座位有更高的选择潜力。本研究首次对务川黑牛核基因组中微卫星座位进行遗传变异分析,为地方品种保种选育提供了一定试验基础。

参考文献:

- [1] Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. Strategies for microsatellite isolation; a review[J]. *Molecular Ecology*, 2002, 11(1): 1-16.
- [2] 储明星, 周国利, 金海国, 等. 7个微卫星座位与北京荷斯坦母牛体细胞评分关系的研究[J]. *遗传学报*, 2005, 32(5): 471-475.
- [3] Barendse W, Armitage S, Kossarek L, et al. A genetic linkage map of the bovine genome[J]. *Nature Genetics*, 1994, 6(3): 227-235.
- [4] Acosta A, Uffo O, Sanz A, et al. Genetic diversity and differentiation of five Cuban cattle breeds using 30 microsatellite loci[J]. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 2012, 2: 1-8.
- [5] Navani N, Jain P, Gupta S, et al. A set of cattle microsatellite DNA markers for genome analysis of riverine buffalo (*Bubalus bubalis*) [J]. *Animal Genetics*, 2002, 33(2): 149-154.
- [6] Ihara N, Takasuga A, Mizoshita K, et al. A comprehen-

- sive genetic map of the cattle genome based on 3802 microsatellites[J]. *Genome Research*, 2004, 14(10a): 1987-1998.
- [7] 徐建忠,梁瑞钦,龙飞等. 务川黑牛品种简介[J]. *中国牛业科学*, 2010, 36(5): 71-73.
- [8] 许万里,杨正德,刘政柏,等. 务川黑牛肉质的营养特性[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2010(2): 59-60.
- [9] 林瑞意,杨胜林,徐龙鑫. 贵州务川黑牛 mtDNA *Cyt b* 基因遗传多样性研究[J]. *云南农业大学学报: 自然科学版*, 2010, 25(5): 622-625.
- [10] Bishop M D, Kappes S M, Keele J W, *et al.* A genetic linkage map for cattle[J]. *Genetics*, 1994, 136(2): 619-639.
- [11] Raymond M, Rousset F. GENEPOP (version 1. 2): population genetics software for exact tests and ecumenicism[J]. *Journal of Heredity*, 1995, 86(3): 248-249.
- [12] Rousset F. Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2008, 8(1): 103-106.
- [13] 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(3): 314-331.
- [14] 罗永发,王志刚,李加琪,等. 采用微卫星标记分析 13 个中外牛品种的遗传变异和品种间的遗传关系[J]. *生物多样性*, 2006, 14(6): 498-507.
- [15] Vanhala T, Tuiskula-Haavisto M, Elo K, *et al.* Evaluation of genetic variability and genetic distances between eight chicken lines using microsatellite markers [J]. *Poultry Science*, 1998, 77(6): 783-790.
- [16] 王洪程,咎林森,宋付标,等. 秦川牛微卫星基因位点遗传多样性分析[J]. *中国农学通报*, 2011, 27(11): 10-14.
- [17] 侯冠玉,马月辉,道尔吉. 微卫星 DNA 在草食动物遗传育种中的研究与应用[J]. *中国草食动物*, 2003, 23(3): 39-40.
- [18] 杨泽宇,苗永旺,李大林,等. 德宏水牛微卫星标记分析的群体遗传变异[J]. *动物学研究*, 2007, 28(6): 659-663.

(上接第 97 页) 由此可见,吡虫啉 1.4 g/kg 拌种、噻虫嗪 1.0~2.0 g/kg 拌种对小麦安全,且可明显提高小麦千粒重和产量。

麦蚜是小麦的常发性重要害虫,小麦整个生育期均可能遭受其危害,新烟碱类杀虫剂吡虫啉和噻虫嗪拌种对麦蚜整个发生期均具有较好的防治效果,吡虫啉用量 1.4~2.0 g/kg、噻虫嗪用量 1.0~4.0 g/kg 拌种在小麦出穗前、扬花期和灌浆期对麦蚜的防治效果分别为 96.02%~100%、93.12%~100%和 84.19%~98.31%,出穗前不需要防治,出穗后不同年份蚜虫发生程度差别较大,均在中等偏重水平,但拌种区未达到防治指标,5 月 15 日后蚜虫自然减退明显,因此,新烟碱类杀虫剂拌种区小麦整个生育期均不需要防治。若穗蚜发生特别严重的年份,拌种区蚜虫已达到防治指标,且 5 月 15 日后蚜虫自然减退不明显,则防治 1 次即可。

参考文献:

- [1] 曹雅忠,李克斌,尹姣,等. 小麦蚜虫不断猖獗原因及控

制对策的探讨[J]. *植物保护*, 2006, 32(5): 72-75.

- [2] 王随保,陈斌,王义,等. 小麦蚜虫及黄矮病综合防治研究综述[J]. *山西农业科学*, 2003, 31(2): 69-71.
- [3] 韩晓莉,潘文亮,高占林,等. 害虫对新烟碱类杀虫剂抗药性研究进展[J]. *华北农学报*, 2007, 22(增): 28-32.
- [4] 马学芹. 邹平县小麦蚜虫的抗药性研究[J]. *天津农业科学*, 2009, 15(3): 84-86.
- [5] 刘爱芝,李素娟,韩松. 吡虫啉拌种对小麦蚜虫的控制效果及增产作用研究初报[J]. *河南农业科学*, 2005(11): 63-64.
- [6] 刘爱芝,陶岭梅,韩松,等. 吡虫啉拌种控制全生育期小麦蚜虫有效剂量评价[J]. *植物保护*, 2009, 35(2): 10-12.
- [7] 孔祥英,朱志凌,郭凯泉,等. 不同播期小麦拌种剂应用效果研究[J]. *上海农业科技*, 2008(6): 53-54.
- [8] 刘爱芝,杨艳春. 吡虫啉拌种对小麦种子萌发和生长效应的影响[J]. *河南农业科学*, 2009(11): 84-86.
- [9] 党志红,李耀发,潘文亮,等. 吡虫啉拌种防治小麦蚜虫技术及安全性研究[J]. *应用昆虫学报*, 2011, 48(6): 1676-1681.