

## 应用 30 个微卫星标记分析枫泾猪和小梅山猪的遗传多样性

吴井生<sup>1</sup>, 李新宇<sup>2</sup>, 朱孟玲<sup>1</sup>, 张建生<sup>3\*</sup>

(1.江苏农林职业技术学院,江苏 句容 212400;2.泰州市农业委员会,江苏 泰州 225300;3.镇江牧苑动物科技有限公司,江苏 句容 212400)

**摘 要:**为丰富枫泾猪与小梅山猪的种质特性,评价其保种效果,制订有效的保种方案,对枫泾猪与小梅山猪群体的遗传多样性进行分析,采用 ISAG/FAO 联合推荐的 30 个微卫星标记,分析 2 个猪群的遗传多样性。结果表明:枫泾猪的有效等位基因数( $ne$ )、多态信息含量( $PIC$ )、基因杂合度( $He$ )、基因丰度( $R$ )分别为(3.012 9±0.875 5)、(0.568 4±0.161 8)、(0.635 6±0.157 3)、(4.266 7±1.337 4),小梅山猪的遗传多样性参数中除平均观察等位基因数( $na$ )与基因丰度外,其余均低于枫泾猪;2 个群体间的遗传分化系数( $F_{st}$ )与遗传距离( $D$ )分别为 0.005 3、0.008 7;枫泾猪与小梅山猪的遗传多样性较丰富,遗传分化程度小,均出现杂合子过剩现象,建议加强纯种繁育。

**关 键 词:**枫泾猪;小梅山猪;微卫星标记;遗传多样性

中图分类号:S828.8

文献标志码:A

文章编号:1007-1032(2012)05-0515-04

## Genetic diversity analysis of Fengjing and Xiaomeishan pigs using 30 microsatellite markers

WU Jing-sheng<sup>1</sup>, LI Xin-yu<sup>2</sup>, ZHU Meng-ling<sup>1</sup>, ZHANG Jian-sheng<sup>3\*</sup>

(1.Jiangsu Polytechnic College of Agriculture and Forestry, Jurong, Jiangshu 212400, China; 2.Taizhou Agriculture Commission, Taizhou, Jiangshu 225300, China; 3.Zhenjiang Animal Husbandry Limited Company of Science and Technology, Jurong, Jiangshu 212400, China)

**Abstract:** To enrich the information of the characteristic prosperities, evaluate the effect of breed conservation and make effective conservation measures for Fengjing and Xiaomeishan pigs, a total of 30 microsatellite markers co-recommended by the International Society of Animal Genetics (ISAG) and Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) were used to analyze the genetic diversity of these two breeds. The results showed that genetic parameters  $ne$ ,  $PIC$ ,  $He$ ,  $R$  for Fengjing pigs were (3.012 9±0.875 5), (0.568 4±0.161 8), (0.635 6±0.157 3), (4.266 7±1.337 4), respectively. All of the genetic diversity parameters of Xiaomeishan pigs except  $na$  and  $R$  were less than those of Fengjing pigs.  $F_{st}$  and  $D$  between the two breeds were 0.005 3 and 0.008 7, respectively. The results indicated that Fengjing and Xiaomeishan pigs showed rich genetic diversity, little genetic differentiation and heterozygote excess, indicating pure breeding should be strengthened in the future.

**Key words:** microsatellite; Fengjing pig; Xiaomeishan pig; genetic diversity

枫泾猪与小梅山猪同属于太湖猪,主要分布于江苏、浙江、上海一带,具有性早熟、繁殖力强、哺育能力强、肉质优良、性情温驯等优点。太湖猪已被农业部列入国家级畜禽遗传资源保护名录,是国家级重点保护的遗传资源,并受到国家级保种场保护。江苏农林职业技术学院于 2009 年被农业部

列为国家级太湖猪(梅山猪)保种场实施单位。就保种而言,群体遗传多样性的全面保护比群体数量的扩大更为重要<sup>[1]</sup>。目前,关于利用微卫星标记技术研究畜禽遗传多样性和杂种优势的报道<sup>[2-5]</sup>已不少,但有关枫泾猪与小梅山猪这方面的报道国内外尚少。笔者采用国际动物遗传协会(ISAG)和联合国

收稿日期:2012-06-25

基金项目:江苏省农业三项工程项目(Sx<2011>143);镇江市科技项目(NY2009016)

作者简介:吴井生(1979—),男,江苏泰兴人,博士,主要从事遗传标记与动物育种研究,wujingsheng2@sohu.com; \*通信作者,zjs888318@163.com

粮农组织(FAO)联合推荐的30个微卫星标记来分析枫泾猪与小梅山猪的遗传多样性,旨在丰富枫泾猪与小梅山猪的种质资源,为优化保种方案,评估保种效果提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

49头枫泾猪(40头母猪,9头公猪)和106头小

梅山猪(94头母猪,12头公猪)来自江苏农林职业技术学院镇江牧苑动物科技有限公司。耳样用耳号钳采集(约0.15g),用无水乙醇保存,置冰盒带回实验室,用于基因组DNA提取。*Taq* DNA聚合酶、dNTPs、 $Mg^{2+}$ 等均购自上海生工生物工程技术服务有限公司。

ISAG/FAO联合推荐的30对猪微卫星引物见表1。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

表1 猪30对微卫星引物信息

Table 1 Thirty pair of microsatellite primers for pigs

座位	染色体位置	退火温度/°C	座位	染色体位置	退火温度/°C
S0026	16 (46.9 cM)	55	Sw240	2 (42 cM)	55
S0155	1 (93.9 cM)	55	IGF1	5 (q23-24)	55
S0005	5 (88.2 cM)	55	Sw2406	6 (21.4 cM)	55
Sw2410	8 (-1.3 cM)	50	Sw72	3 (17.8 cM)	55
Sw830	10 (0 cM)	50	S0226	2 (10.2 cM)	55
S0355	15 (13.8 cM)	50	S0090	12 (80.2 cM)	55
Sw24	17 (23.3 cM)	55	Sw2008	11 (14.1 cM)	55
Sw632	7 (104.4 cM)	55	Sw1067	6 (71.4 cM)	55
Swr1941	13 (14.1 cM)	55	S0101	7 (134.9 cM)	55
Sw936	15 (88.5 cM)	55	Sw1828	1 (118.5 cM)	55
S0218	X (114.4 cM)	55	S0143	12 (6.6 cM)	55
S0228	6 (105.2 cM)	55	S0068	13 (62.2 cM)	55
Sw122	6 (83.3 cM)	55	S0178	8 (127.7 cM)	60
Sw857	14 (7.4 cM)	55	Sw911	9 (36.8 cM)	60
S0097	4 (120 cM)	55	S0002	3 (102.2 cM)	60

### 1.2 方法

用常规苯酚-氯仿法抽提基因组DNA,测定基因组DNA的OD值,计算其浓度并稀释至100 ng/ $\mu$ L。PCR扩增体系为20  $\mu$ L,其中,10 $\times$ Buffer 2.0  $\mu$ L, $Mg^{2+}$ (25 mmol/L)2.2  $\mu$ L,dNTPs(10 mmol/L)0.8  $\mu$ L,上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各1  $\mu$ L,DNA模板1  $\mu$ L(100 ng),*Taq* DNA聚合酶(5 U/ $\mu$ L)0.2  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 11.8  $\mu$ L。

PCR扩增反应程序:94 °C预变性10 min;31个循环(94 °C变性1 min,50~60 °C退火30 s,72 °C延伸1 min);最后72 °C延伸10 min,4 °C保存产物。

扩增产物用10%非变性PAGE凝胶电泳分离,用银染法定影和显色,用UVI凝胶成像系统分析结果,采用GM331 DNA Marker作为分子量的标准对照。

### 1.3 数据分析

用ONE-Dscan软件分析基因片段大小,用PopGen32、Fstat293和Excel软件计算有效等位基因数、期望杂合度、多态信息含量等遗传参数。

## 2 结果与分析

### 2.1 微卫星座位PCR产物的电泳结果

30个微卫星座位的PCR扩增效果良好(图1)。

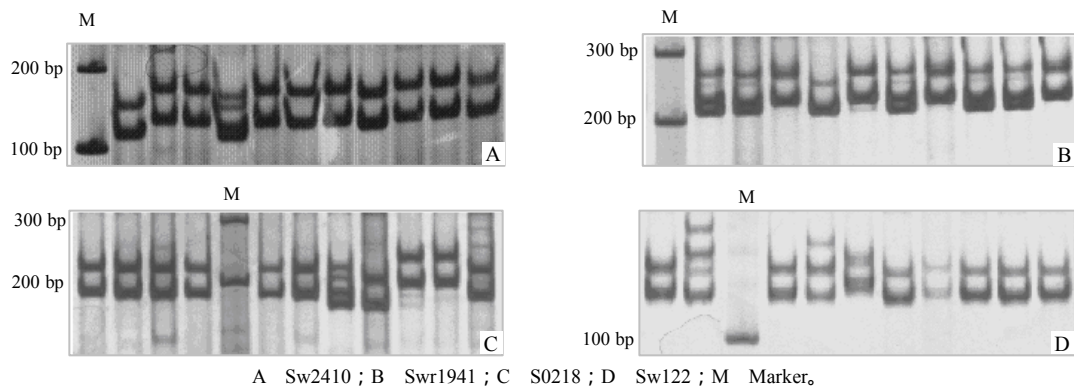


图 1 部分微卫星座位的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR products with microsatellite primers targeting several microsatellite loci

### 2.2 群体内遗传多样性分析

在枫泾猪与小梅山猪群体内 30 个微卫星座位上分别检测到 128、130 个等位基因，共检测到 137 个等位基因；枫泾猪的平均观察等位基因数( $n_a$ )为  $(4.266\ 7 \pm 1.337\ 4)$ ，比小梅山猪低 0.066 6 个，但其平均有效等位基因数( $n_e$ )、平均观察杂合度( $H_o$ )、平均期望杂合度( $H_e$ )和平均 Nei 期望杂合度( $Nei$ )均高于小梅山猪的，分别高 0.203 6、0.006 8、0.024 7 和 0.024 0；枫泾猪和小梅山猪的  $n_e/n_a$  分别为 70.61%和 64.83%。枫泾猪群体的 Shannon 信息指数( $I$ )、多态信息含量( $PIC$ )、群体内多样性( $H_s$ )和基因丰度( $R$ )分别为  $(1.154\ 1 \pm 0.355\ 2)$ 、 $(0.568\ 4 \pm 0.161\ 8)$ 、 $(0.633\ 5 \pm 0.156\ 9)$ 和  $(4.266\ 7 \pm 1.337\ 4)$ 。上述 4 个参数中，枫泾猪的  $I$ 、 $PIC$  和  $H_s$  均高于小梅山猪的，2 个猪群的  $PIC$  均超过了 0.500 0。

### 2.3 群体间遗传关系分析

群体的遗传分化系数( $F_{st}$ )为 0.005 3(表 2)，说明 2 个品种的微卫星变异中大约有 0.53%缘自品种间的分化，贡献最大的座位是 Sw2410( $F_{st}=0.013\ 1$ )，最小的座位为 Sw857( $F_{st}=0.000\ 0$ )。总的近交系数( $F_{it}$ )与群体内近交系数分别为  $-0.347\ 8$ 、 $-0.355\ 0$ ，说明杂合子过剩水平很高，贡献最大的座位为 Sw857( $F_{is}=-1.000\ 0$ )。枫泾猪与小梅山猪间的遗传距离为 0.008 7，遗传一致度为 0.991 3。

## 3 结论与讨论

a. 枫泾猪与小梅山猪的遗传多样性。遗传多样性不仅能给种群带来适应度方面的优势，而且有利于人工育种<sup>[6]</sup>。通过对枫泾猪与小梅山猪遗传多样

表 2 枫泾猪与小梅山猪群体间的遗传分化系数

Table 2 Coefficient of genetic differentiation between Fengjing and Xiaomeishan pig populations

座位	$F_{is}$	$F_{it}$	$F_{st}$
S0026	-0.330 1	-0.323 8	0.004 8
S0155	-0.496 6	-0.478 8	0.011 9
S0005	-0.876 4	-0.876 1	0.000 2
Sw2410	-0.391 0	-0.372 8	0.013 1
Sw830	-0.981 7	-0.981 5	0.000 1
S0355	-0.010 3	-0.005 1	0.005 1
Sw24	-0.193 4	-0.182 4	0.009 2
Sw632	-0.417 9	-0.417 4	0.000 3
Swr1941	-0.330 5	-0.330 0	0.000 4
Sw936	-0.619 6	-0.610 8	0.005 4
S0218	-0.703 6	-0.694 5	0.005 3
S0228	-0.402 8	-0.398 9	0.002 7
Sw122	-0.499 5	-0.494 1	0.003 6
Sw857	-1.000 0	-1.000 0	0.000 0
S0097	-0.359 5	-0.357 5	0.001 5
Sw240	0.082 0	0.089 3	0.007 9
IGF1	0.894 1	0.895 1	0.009 1
Sw2406	-0.563 5	-0.562 3	0.000 7
Sw72	-0.124 4	-0.109 9	0.012 8
S0226	-0.244 0	-0.237 2	0.005 5
S0090	-0.452 4	-0.441 3	0.007 6
Sw2008	-0.657 4	-0.651 4	0.003 6
Sw1067	-0.063 0	-0.061 2	0.001 8
S0101	-0.402 1	-0.390 5	0.008 2
Sw1828	-0.019 8	-0.019 5	0.000 3
S0143	0.479 4	0.480 7	0.002 6
S0068	-0.161 3	-0.155 8	0.004 7
S0178	-0.462 7	-0.450 9	0.008 1
Sw911	-0.480 2	-0.470 1	0.006 8
S0002	-0.300 2	-0.285 4	0.011 3
平均	-0.355 0	-0.347 8	0.005 3

性的微卫星标记分析，发现枫泾猪的  $n_e$ 、 $PIC$ 、 $H_e$  分别为  $(3.012\ 9 \pm 0.875\ 5)$ 、 $(0.568\ 4 \pm 0.161\ 8)$ 、 $(0.635\ 6 \pm 0.157\ 3)$ ，小梅山猪的  $n_e$ 、 $PIC$ 、 $H_e$  分别为  $(2.809\ 3 \pm 0.850\ 0)$ 、 $(0.540\ 3 \pm 0.156\ 7)$ 、 $(0.610\ 9 \pm 0.153\ 6)$ 。与国内外其他猪种相比，这些遗传多样性指标偏低，说明 2 个猪群的遗传多样性偏低。在中国猪种中，荣昌猪的  $n_e$ 、 $H_e$  和  $PIC$  分别为 10.962 1、0.908 4、0.892 5<sup>[7]</sup>；云南大河猪的分别为 5.200、0.792、

0.765<sup>[8]</sup>; 槐猪的分别为 3.771 1、0.730 5、0.717 8<sup>[9]</sup>; 山猪的分别为 3.882、0.686、0.731<sup>[10]</sup>; 海南五指山猪的 *na* 和 *PIC* 分别为 14.590、0.742<sup>[11]</sup>; 藏猪的 *na*、*H* 和 *PIC* 分别为 6.11、0.731 9 和 0.765 9<sup>[12]</sup>。在国外猪种中, 印度地方猪的 *H* 为 0.74<sup>[13]</sup>; 巴西猪种的 *na* 和 *PIC* 分别为 8.960、0.655<sup>[4]</sup>。本研究结果与张桂香等<sup>[14]</sup>的报道一致。张桂香等采用 ISAG/FAO 推荐的 27 个微卫星 DNA 标记, 对 56 个中国猪品种和 3 个引进猪种进行遗传多样性分析, 发现与中国其他类型的地方猪相比, 江海型地方猪的遗传多样性最低, 其聚类分析结果与《中国猪品种志》基本一致<sup>[14]</sup>。枫泾猪与小梅山猪同属于江海型地方猪, 因此, 本研究中这 2 个群体的遗传多样性偏低, 可能跟其固有的自然气候、社会条件与选育习惯等有关。枫泾猪的 *ne* 和 *He* 仅次于姜曲海猪, 高于二花脸猪、东串猪、米猪和梅山猪<sup>[14]</sup>; 枫泾猪的 *PIC* 高于东串猪和梅山猪, 低于其他品种<sup>[14]</sup>, 枫泾猪各微卫星座位的 *PIC* 为 0.020 0~0.767 4, 其中, *PIC* 0.5 的座位数为 23 个, 占总座位数的 76.67%, 平均 *PIC* 为(0.568 4±0.161 8)。根据 Botstein 等<sup>[15]</sup>提出的基因变异程度衡量方法, 枫泾猪群体中大部分微卫星座位都具有高度多态性。从本研究中 2 个猪群的遗传多样性指标来看, 枫泾猪的所有指标(基因丰度除外)均高于小梅山猪, 造成其差异的原因跟品种特异性与样本容量有关。本研究中小梅山猪的多样性指标略高于张桂香等<sup>[14]</sup>报道的指标(小梅山猪的 *ne*、*PIC*、*H* 分别为 2.12、0.39、0.44), 这可能跟群体来源与样本容量的差异有关。

b. 枫泾猪与小梅山猪的遗传分化。枫泾猪与小梅山猪群体的遗传分化系数为 0.005 3, 说明 2 个品种的微卫星变异中大约有 0.53% 缘自品种间的分化; 枫泾猪与小梅山猪间的遗传距离为 0.008 7, 遗传一致度为 0.991 3, 说明这 2 个群体的遗传距离小, 遗传一致度高, 遗传差异小。以上研究结果跟这 2 个猪的品种分类有关。《中国猪品种志》将中国地方猪种划分为华北型、江海型、华中型、华南型、西南型和高原型等 6 大类<sup>[16]</sup>。另外, 本研究中还发现, 总的近交系数与群体内平均近交系数分别为 -0.347 8、-0.355 0; 枫泾猪与小梅山猪这 2 个群体的近交系数分别为 -0.325、-0.368(结果未显示), 说明这 2 个群体内存在杂合子过剩现象, 建议今后对这 2 个群体进一步加强品种选育, 提高基因纯度,

即增加纯合子比例。与同类型江海型地方猪比较, 本研究中枫泾猪与小梅山猪群体内遗传变异多, 遗传多样性丰富, 选择潜力大。

#### 参考文献:

- [1] 曹果清, 李步高, 石建中, 等. 应用 21 个微卫星标记监测马身猪遗传多样性变化趋势[J]. 畜牧兽医学, 2010, 41(8): 932-938.
- [2] Li S J, Yang S H, Zhao S H, et al. Genetic diversity analyses of 10 indigenous Chinese pig populations based on 20 microsatellites[J]. J Anim Sci, 2004, 82(2): 368-374.
- [3] Kim T H, Kim K S, Choi B H, et al. Genetic structure of pig breeds from Korea and China using microsatellite loci analysis[J]. J Anim Sci, 2005, 83(10): 2255-2263.
- [4] Sollero B P, Paiva S R, Faria D A, et al. Genetic diversity of Brazilian pig breeds evidenced by microsatellite markers[J]. Livest Sci, 2009, 123(1): 8-15.
- [5] 王洪程, 曾林森, 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.
- [6] Krishnamurthy K V. Textbook of Biodiversity[M]. Beijing: Chemistry Industry Press, 2006: 33-42.
- [7] 石小青, 范首君, 王金勇, 等. 5 个重庆地方猪种遗传多样性的微卫星分析[J]. 畜牧兽医学报, 2010, 41(12): 1515-1532.
- [8] 杨婷, 连林生. 云南大河猪保种群的微卫星检测[J]. 中国畜牧兽医学报, 2009, 36(11): 85-88.
- [9] 翁润, 赖丽萍, 王寿昆. 微卫星标记分析福建地方品种猪的遗传多样性[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2007, 36(5): 501-504.
- [10] 伍革民, 许晓风, 章熙霞, 等. 利用微卫星 PCR 技术分析山猪的遗传结构[J]. 云南农业大学学报, 2008, 23(1): 79-83.
- [11] 王希龙, 欧江涛, 黄礼光, 等. 海南五指山猪遗传多样性的微卫星分析[J]. 生物多样性, 2005, 13(1): 20-26.
- [12] 李军成, 景志忠, 路彩霞, 等. 微卫星标记对高原藏麻猪的遗传多样性研究[J]. 中国实验动物学报, 2007, 15(5): 355-360.
- [13] Behl R, Sheoran N, Behl J, et al. Genetic analysis of Ankamali pigs of India using microsatellite markers and their comparison with other domesticated Indian pig types[J]. J Anim Breed Genet, 2006, 123(2): 131-135.
- [14] 张桂香, 王志刚, 孙飞舟, 等. 56 个中国地方猪种微卫星基因座的遗传多样性[J]. 遗传学报, 2003, 30(3): 225-233.
- [15] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism[J]. Am J Hum Genet, 1983, 32: 314-331.
- [16] 张仲葛, 李炳坦, 陈效华. 中国猪品种志[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986.

责任编辑: 王赛群