

滇中牛 Y-SNPs 和 Y-STRs 遗传多样性研究

贾 鹏¹, 王凯悦¹, 亏开兴², 张继才²,
黄必志², 苏相生³, 陈 宏², 雷初朝^{1*}

(1. 西北农林科技大学动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 云南省草地动物科学研究院, 昆明 650212;
3. 云南省双柏县动物疫病预防控制中心, 云南 双柏 675100)

摘 要: [目的] 为探究云南滇中牛的 Y 染色体遗传结构与血统来源, 以为该黄牛品种的资源保护与利用提供科学依据。[方法] 采用 PCR 扩增和荧光分型方法, 对 27 头滇中牛的 Y-SNPs (*UTY19* 和 *ZFY10*) 和 Y-STRs (*INRA189* 和 *BM861*) 遗传多样性进行分析。[结果] 27 头滇中牛包含 Y2 和 Y3 两种单倍型组, 其频率分别为 22.22% 和 77.78%。结合 Y-SNPs 和 Y-STRs 的分型结果, 发现这 27 头滇中牛存在 Y2-90-158、Y3-88-156 和 Y3-90-156 共 3 种 Y 染色体单倍型 (Y-SNP-*INRA189*-*BM861*), Y 染色体单倍型多样性为 0.5128 ± 0.0904 , 其遗传多样性较高。[结论] 滇中牛 Y 染色体遗传多样性较高, 有普通牛和瘤牛 2 个父系起源, 以瘤牛血统为主。

关键词: 滇中牛; Y-SNPs; Y-STRs; 遗传多样性; 父系起源

中图分类号: S823.8⁺1; S823.9⁺4; Q347 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-9111(2019)04-0007-03

滇中牛(曾名楚雄牛)属于役肉兼用型品种, 其中心产区在云南省楚雄、曲靖、大理、滇中、思茅和临沧等地区。滇中牛遗传性能稳定, 具有体质结实、发育匀称、体小力大、耐劳、性情温顺、行动敏捷、善于爬坡等特点, 是我国优良的地方黄牛品种之一^[1]。

Y 染色体遗传信息是对常染色体、X 染色体及线粒体 DNA 的重要补充, 因其遵循严格的父系遗传、单倍型完整等特点, 是研究动物父系遗传多样性、起源和驯化历史等问题的理想工具。近年来, 基于 Y 染色体单核苷酸多态性(Y-SNPs)和微卫星(Y-STRs)分子标记, 国内外学者对家牛(普通牛和瘤牛)进行了较为系统的父系遗传研究, 结果一致表明家牛包含 3 个 Y 染色体单倍型组(即普通牛 Y1 和 Y2 以及瘤牛 Y3 单倍型组)^[2-3] 和 1 个新的 Y1.2 单倍型组^[4], Y-SNPs 标记可以区分这 3 种 Y 染色体单倍型组, 而 Y-STRs 可精细区分各单倍型组内丰富的单倍型, 两种分子标记的结合使用能够更准确地反映家牛 Y 染色体的遗传多样性与起源历史^[5]。

然而, 迄今关于滇中牛品种的遗传多样性、起源和群体遗传结构的相关研究报道较少。Li 等^[6] 分析了 53 头滇中牛线粒体 DNA D-loop 区 910 bp 序列的多态性, 结果表明滇中牛具有普通牛和瘤牛 2 个母系起源, 以瘤牛血统为主。此外, Xia 等^[7] 研究了滇中牛的线粒体 DNA D-loop 区序列, 结果同样支持滇中牛有普通牛和瘤牛 2 种母系起源。关于滇中牛 Y 染色体遗传多样性及父系起源的研究尚未见报道, 因此, 本研究对滇中牛 2 个 Y-SNPs (*UTY19* 和 *ZFY10*) 和 Y-STRs (*INRA189* 和 *BM861*) 进行测序和综合分析, 以期从分子水平分析滇中牛父系遗传多样性、起源和群体遗传结构, 为今后开展该品种的保种、选育策略制定和分子育种提供基础材料。

1 材料与方法

1.1 样本采集与基因组 DNA 提取

在云南省楚雄市双柏县采集 27 头滇中公牛的耳组织样带回实验室, 采用苯酚—氯仿方法提取全

收稿日期: 2019-04-08 修回日期: 2019-04-28

基金项目: 国家肉牛牦牛产业技术体系项目(CARS-37); 云南省后备人才培养计划项目(2018HB045); 重点研发项目(2018BB028)

作者简介: 贾鹏(1995—), 男, 河南南阳人, 硕士生, 主要从事动物遗传资源研究。

* 通讯作者: 雷初朝(1968—), 男, 湖南常宁人, 教授, 博士生导师, 主要从事牛遗传资源研究。

基因组 DNA,提取的基因组 DNA 稀释成 10 ng/ μ L 放在 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。用实验室保存的 5 头荷斯坦公牛(属于典型的 Y1 单倍型组)DNA 做对照。

1.2 引物合成与 PCR 扩增

参照 Ginja^[2] 等和 Götherström^[3] 等报道的 2 个家牛 Y-SNP 标记(*UTY19* 和 *ZFY10*)引物序列信息合成引物,参照 Edwards 等^[8] 发表的 2 对 Y-STR 标记(*INRA189* 和 *BM861*)引物序列信息合成引物。PCR 反应体系为 12.5 μ L: ddH₂O 5.00 μ L, 2 $\times$ Taq MasterMix 6.00 μ L, 上下游引物各 0.25 μ L (10 pmol/ μ L), 模板 DNA 1.00 μ L。扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 53 ~ 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 36 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。用 2% 的琼脂糖凝胶对 PCR 扩增产物进行电泳检测, 将检测合格的 PCR 扩增产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序与荧光分型。

1.3 数据统计分析

结合已经发表的家牛序列(GenBank 登录号分别为 AY936543 和 AF928827), 将 *UTY19* 和 *ZFY10* 的测序结果用 SeqMan v7.1 软件进行比对分析, 找出相应的 SNP 位点。用 GeneMarker V1.91 软件对荧光微卫星标记 *INRA189* 和 *INRA189* 的等位基因大小进行统计。由于不同酶对微卫星结果会产生 1 ~ 2 bp 的影响, 所以本研究同时使用荷斯坦牛微卫星数据做矫正, 以保证结果的准确性。每个个体的单倍型都是利用 Y-SNPs 先确定家牛的单倍型组, 继而结合 Y-STRs 的分型结果, 二者共同确定出每头牛的 Y 染色体单倍型(Y-SNP-*INRA189*-*BM861*)。用 ARLEQUIN V3.0 软件计算单倍型频率和单倍型多样性($H \pm SD$)。

2 结果与分析

2.1 Y-SNPs 多态性

利用 2 个 Y-SNPs 标记(*UTY19* 和 *ZFY10*)对 27 头滇中牛的 PCR 扩增产物进行测序, 并将测序结果与 Ginja 等^[2] 和 Götherström 等^[3] 报道的家牛序列(GenBank 登录号: AY936543 和 AF928827)进行比对分析, 结果表明: *UTY19* 标记在 27 头滇中牛全部为 A 碱基, *ZFY10* 标记在 27 头滇中牛存在 C 和 T 两种碱基(表 1)。参考 Ginja 等^[2] 和 Götherström 等^[3] 对家牛 Y 染色体单倍型组的判定标准, 依据 2 个标记的核苷酸变异确定单倍型组, 结果显示, 27 头滇中牛存在 Y2(22.22%) 和 Y3(77.78%) 2 种 Y 染色体单倍型组, 没有 Y1 单倍型组。

2.2 Y-STRs 多态性

利用 2 个 Y-STRs 标记(*INRA189* 和 *BM861*)对 27 头滇中牛进行 Y 染色体微卫星多态性检测, 在 *INRA189* 座位中共检测到 88 bp 和 90 bp 共 2 种等位基因, 88 bp 对应瘤牛 Y3 单倍型组, 90 bp 在普通牛和瘤牛 2 种单倍型组中均存在, 在这 27 头滇中牛中仅有 3 头滇中牛检测到 88 bp 的等位基因, 其余 24 头滇中牛均检测到 90 bp 的等位基因; 在 *BM861* 座位中检测到 2 种等位基因(156 bp 和 158 bp), 156 bp 和 158 bp 分别对应瘤牛 Y3 和普通牛 Y2 单倍型组。在 *BM861* 座位中, 滇中牛有 6 头属于普通牛 Y2 单倍型组的 158 bp 等位基因, 有 21 头属于瘤牛 Y3 单倍型组的 156 bp 等位基因(表 1)。对照组荷斯坦牛在 *INRA189* 座位中均为 98 bp 等位基因, 在 *BM861* 座位中仅检测到属于普通牛 Y1 单倍型组的等位基因 158 bp。

表 1 滇中牛 Y 染色体单倍型与单倍型频率

样本数	Y-SNPs		Y-STRs		单倍型	单倍型 频率/%
	<i>UTY-19</i>	<i>ZFY-10</i>	<i>INRA189</i> /bp	<i>BM861</i> /bp		
27	A	T	88	156	Y3 - 88 - 156	77.78
	A	C	90	158	Y2 - 90 - 158	22.22

2.3 单倍型频率和单倍型多样性

参照 Edwards 等^[5] 报道的 Y-SNPs 和 Y-STRs 标记结合的单倍型分型方法, 对 27 头滇中牛的单倍型进行分析(Y-SNP-*INRA189*-*BM861*)。27 头滇中牛存在普通牛 Y2(Y2-90-158) 和瘤牛 Y3(Y3-88-

156 和 Y3-90-156) 2 种单倍型组, 其中 Y2-90-158、Y3-88-156 和 Y3-90-156 的单倍型频率分别为 0.222 2, 0.111 1 和 0.666 7, 滇中牛的 Y 染色体单倍型多样性为 0.5128 ± 0.0904 。所有荷斯坦公牛都是 Y1-98-158 单倍型。

3 讨论

云南地处中国与南亚、东南亚接壤的边境地带,云南地方黄牛存在普通牛和瘤牛 2 种血统来源。因此,云南一些地方黄牛品种是普通牛和瘤牛的杂交后代^[6]。据推测,印度瘤牛可能经过云南进入中国,云南滇中牛即是由中国瘤牛和印度瘤牛杂交而成^[9],是云南省滇中地区群众在长期的生产、生活中通过自然与人工选择而成的优良地方黄牛遗传资源。然而,迄今为止,尚未见分子水平上对滇中牛品种的父亲遗传多样性、起源和群体遗传结构的相关研究报道。因此,本研究对 27 头滇中牛的 Y-SNPs (*UTY19* 和 *ZFY10*) 和 Y-STRs (*INRA189* 和 *BM861*) 遗传多样性进行研究。

家牛 Y-SNPs 和 Y-STRs 标记当前已被广泛用于世界牛品种/群体的遗传多样性、群体遗传结构、起源和迁徙路线等研究。在对国外家牛品种/群体的研究中,Ginga 等^[2]对多个欧洲家牛品种的分析表明,欧洲牛为普通牛起源,Y1 单倍型组主要分布在北欧牛品种中,Y2 单倍型组主要分布在南欧牛品种中。随后,Pérez-Pardal 等^[10]在 45 个欧洲和非洲牛群体中检测到 Y1 和 Y2 两种单倍型组,细分为 38 种单倍型。Edwards 等^[5]通过分析 138 个欧洲和亚洲牛品种也表明欧洲牛只拥有普通牛 Y 染色体单倍型组,其中 Y1 主要出现在北欧和西北欧,但在多个伊利比亚牛品种和西南亚牛品种中也有零星分布。

而在国内黄牛品种的父亲遗传分析中,常振华等^[11-12]等先后对中国 16 个地方黄牛品种进行了父亲遗传多样性、群体遗传结构及起源分析,结果一致表明北方黄牛以 Y2 单倍型组为主,南方黄牛以 Y3 单倍型组为主,中原黄牛含普通牛 Y2 和瘤牛 Y3 单倍型组。为了准确判断每一个品种的单倍型多样性及其父亲起源,Xia 等^[7]分析了 34 个中国黄牛品种/群体的 Y-SNPs 和 Y-STRs 多态性,研究结果表明,中国黄牛保持着高度的父亲起源多样性,并且可能拥有许多起源于近东驯化中心的原牛血统。

在本研究中,笔者对滇中牛 2 个 Y-SNPs (*UTY19* 和 *ZFY10*) 和 Y-STRs (*INRA189* 和 *BM861*) 进行父亲遗传分析。研究表明滇中牛由普通牛 Y2 和瘤牛 Y3 单倍型组组成,以 Y3 单倍型组为主。这与侯佳雯^[13-15]等对安徽皖南牛、大别山牛、广西涠洲牛等部分南方黄牛的研究结果基本一致,说明滇中牛具有与中国南方黄牛品种相似的父亲遗传组

成,即以瘤牛 Y3 单倍型组为主。此外,也与 Li^[6-7]等基于线粒体 DNA D-loop 区对滇中牛母系起源的研究结果相吻合。

单倍型多样性是衡量一个群体变异程度的重要指标,单倍型多样性高的群体说明其遗传多样性高,遗传资源丰富。在本研究中,27 头滇中牛的 Y 染色体单倍型多样性为 0.5128 ± 0.0904 ,可以看出该值低于 Xia 等^[7]报道的 34 个中国黄牛品种的整体 Y 染色体单倍型多样性的平均值 (0.607 ± 0.016),但高于国外牛品种的 Y 染色体单倍型多样性平均值 (0.422 ± 0.3)^[5],表明滇中牛的 Y 染色体单倍型多样性和分子遗传多样性相对较高。本研究对滇中牛遗传资源的保护和利用提供了科学依据。

参考文献:

- [1] 国家畜禽遗传资源委员会. 中国畜禽遗传资源志:牛志[M]. 北京:中国农业出版社,2011.
- [2] Ginja C, Telo da Gama L, Penedo M C T. Y chromosome haplotype analysis in Portuguese cattle breeds using SNPs and STRs[J]. *Journal of Heredity*, 2009, 100(2): 148-157.
- [3] Götherström A, Anderung C, Hellborg L, et al. Cattle domestication in the Near East was followed by hybridization with aurochs bulls in Europe[J]. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2005, 272(1579): 2345-2351.
- [4] Pelayo R, Penedo M C T, Valera M, et al. Identification of a new Y chromosome haplogroup in Spanish native cattle [J]. *Animal Genetics*, 2017, 48(4): 450-454.
- [5] Edwards C J, Ginja C, Kantanen J, et al. Dual origins of dairy cattle farming: Evidence from a comprehensive survey of European Y-chromosomal variation[J]. *PLoS One*, 2011, 6(1): e15922.
- [6] Li R, Li C, Liu H, et al. Mitochondrial diversity and phylogeographic structure of native cattle breeds from Yunnan, southwestern China[J]. *Livestock Science*, 2018, 214: 129-134.
- [7] Xia X, Yao Y, Li C, et al. Genetic diversity of Chinese cattle revealed by Y-SNP and Y-STR markers [J]. *Animal Genetics*, 2019, 50(1): 64-69.
- [8] Edwards C J, Gaillard C, Bradley D G, et al. Y-specific microsatellite polymorphisms in a range of bovid species[J]. *Animal Genetics*, 2000, 31(2): 127-130.
- [9] Chen N, Cai Y, Chen Q, et al. Whole-genome resequencing reveals world-wide ancestry and adaptive introgression events of domesticated cattle in East Asia [J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 2337.
- [10] Pérez-Pardal L, Royo L J, Beja-Pereira A, et al. Y-specific microsatellites reveal an African subfamily in taurine (*Bos taurus*) cattle[J]. *Animal Genetics*, 2010, 41(3): 232-241.
- [11] 常振华, 卫利选, 张润锋, 等. 中国黄牛 Y-SNPs 遗传多样性与起源研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2011, 42(11): 1537-1542.

(下转第 62 页)

- 技术出版社,2010;15-30.
- [16] 刘延鑫,孙宇,李业亮,等. 黄芪多糖缓解肉牛短途运输应激的效果研究[J]. 中国畜牧兽医,2017,44(1):87-93.
- [17] 连帅. 复合添加剂缓解出栏肉牛运输应激效果评价[D]. 大庆:黑龙江八一农垦大学,2015.
- [18] 王晓娜,李静,刘仰知,等. 抗应激添加剂对运输应激前后肉牛血清激素及细胞因子的影响[J]. 沈阳农业大学学报,2018,49(2):214-219.

Harm of Beef Cattle Transportation Stress and Preventive Measures for Animal Welfare

WANG Li-mei, WANG Xiao-dong, WANG De-bao, GUO Tian-long, SAI Yin-bayar, ZHAI Xiu *

(Inner Mongolia Academy of Agricultural & Animal Husbandry Sciences, Hohhot 010031)

Abstract: Transportation welfare of beef cattle is one of the important factors related to the development of animal husbandry in Inner Mongolia. As a major province of animal husbandry, Inner Mongolia carries out a large number of transfers of beef cattle every year. Irregular transportation will trigger stress reaction of animals, and then affect the meat quality. Therefore, in actual production, we should pay attention to animal welfare in transportation. Based on the summary of practice and experience, this paper analyzes the problems and harms existing in beef cattle transportation in Inner Mongolia, and puts forward some preventive measures for welfare in the course of transportation, so as to provide reference for improving the transportation welfare of beef cattle.

Key words: beef cattle; transportation; stress; animal welfare

(上接第 9 页)

- [12] Li R, Zhang X M, Campana M G, et al. Paternal origins of Chinese cattle[J]. *Animal Genetics*, 2013, 44(4):446-449.
- [13] 侯佳雯,夏小婷,贾玉堂,等. 皖南牛 Y-STRs 与 Y-SNPs 遗传多样性研究[J]. 中国牛业科学,2018,44(1):30-32.
- [14] 李芳玉,夏小婷,贾玉堂,等. 大别山牛 Y-STRs 与 Y-SNPs 遗传多样性及父系起源研究[J]. 中国牛业科学,2018,44(2):4-6.
- [15] 李秀良,李芳玉,曹艳红,等. 澳洲牛 Y-SNPs 和 Y-STRs 遗传多样性及父系起源研究[J]. 中国牛业科学,2018,44(4):29-31.

Genetic Diversity of Y-SNPs and Y-STRs in Dianzhong Cattle

JIA Peng¹, WANG Kai-yue¹, QU Kai-xing², ZHANG Ji-cai²,
HUANG Bi-zhi², SU Xiang-sheng³, CHEN Hong¹, LEI Chu-zhao^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100; 2. Yunnan Academy of Grassland and Animal Science, Kunming 650212; 3. Shuangbai Center for Animal Disease Control and Prevention, Shuangbai, Yunnan 675100)

Abstract: [Objective] We explored the genetic structure and paternal origins of Y chromosome in Yunnan Dianzhong cattle to provide a scientific basis for the resource protection and utilization. [Methods] PCR amplification and fluorescence genotyping methods were used to detect the genetic diversity of Y-SNPs (*UTY19* and *ZFY10*) and Y-STRs (*INRA189* and *BM861*) in 27 Dianzhong cattle samples. [Results] All 27 Dianzhong samples belong to Y2 and Y3 haplogroup with frequencies of 22.22% and 77.78%, respectively. The Y chromosome haplotypes of Y2-90-158, Y3-88-156 and Y3-90-156 were identified in 27 Dianzhong cattle samples by combining Y-SNPs and Y-STRs genotyping data (Y-SNP-*INRA189*-*BM861*). The Y chromosome haplotype diversity was 0.5128 ± 0.0904 indicating high paternal genetic diversity in Dianzhong cattle. [Conclusions] Dianzhong cattle has high paternal genetic diversity and two paternal origins of *Bos taurus* Y2 and *Bos indicus* Y3, of which, *Bos indicus* Y3 is obviously predominant paternal origin.

Key words: Dianzhong cattle; Y-SNPs; Y-STRs; genetic diversity; paternal origin