



文山牛 Y 染色体遗传多样性与父系起源研究

亏开兴¹, 王凯悦², 张继才¹, 黄必志¹, 陈宁博²,

冯光杰³, 李顺东³, 陈 宏², 雷初朝^{2*}

(1. 云南省草地动物科学研究院, 昆明 650212; 2. 西北农林科技大学动物科技学院, 陕西 杨凌 712100;

3. 云南谷多农牧业有限公司, 云南 广南 663300)

摘 要: [目的] 探究云南文山牛群体 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] 研究采用 PCR 扩增和生物信息学方法, 对 55 头文山牛 Y-SNPs (*UTY19* 和 *ZFY10*) 和 Y-STRs (*INRA189* 和 *BM861*) 遗传多样性进行系统研究。[结果] 55 头文山牛均属于瘤牛 Y3 单倍型组, 结合 Y-SNPs 和 Y-STRs 分型结果, 发现文山牛中存在 Y3-88-156 和 Y3-90-156 两种 Y 染色体单倍型, Y 染色体单倍型多样性为 0.1684 ± 0.0636 。[结论] 云南文山牛只有瘤牛父系起源, 其遗传血统稳定, 纯合度高。

关键词: 文山牛; Y-SNPs; Y-STRs; 遗传多样性; 父系起源

中图分类号: S823.8⁺1; Q347 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-9111(2019)03-0001-04

文山牛又名文山高峰牛, 属役肉兼用型地方黄牛品种, 主要分布于云南省文山壮族苗族自治州的文山、砚山、西畴、麻栗坡、马关、丘北、广南、富宁八县, 其中广南、富宁、丘北、砚山等县海拔 900 m 以上、旱地面积较大的地区分布较多, 以广南、富宁两县结合部的百乐一坡油一带的文山牛最为出名^[1]。文山牛体格结实匀称, 力大耐劳, 繁殖力较强, 性情温顺, 能适应干燥寒冷和潮湿炎热的气候, 是一个优良的役用地方黄牛品种, 并具有较好的肉用性能^[2]。

Y 染色体单倍型频率和地理分布可以提供有关迁徙、雄性基因流以及系统发育关系等信息^[3], 因此, Y 染色体特异性标记已被广泛用于研究人类与动物的父系起源。近年来, 基于 Y 染色体单核苷酸多态性标记 (Y-SNPs) 研究结果, 定义了普通牛 Y1、Y2 和瘤牛 Y3 单倍型组, 以及一个新的 Y1.2 单倍型组^[4-6]。常振华等^[7]利用 Y-SNP 标记, 发现中国黄牛以 Y2 和 Y3 单倍型组为主, Y2 单倍型组在北方牛群体中占优势, Y3 单倍型组在南方牛群体中占优势。而关于家牛 Y 染色体 STR 变异研究, Edwards 等^[8]首先评估了 4 个 Y-STR 特异性标记

在家牛以及相关物种中的遗传多态性。随后, Cai 等^[9]研究发现 2 个 Y-STR 位点 (*UMN2404* 和 *UMN0103*) 可用于区分普通牛和瘤牛血统。近年来, 国内外越来越多的研究已经将二者结合起来分析黄牛群体的 Y 染色体单倍型结构和父系起源历史^[10-11]。Xia 等^[12]分析了 34 个中国黄牛品种/群体的 Y-SNPs 和 Y-STRs 多态性, 结果表明中国黄牛存在丰富的父系遗传多样性, 并且可能拥有许多起源于近东驯化中心的原牛血统。

我国幅员辽阔, 自然环境复杂多样, 孕育了十分丰富的黄牛遗传资源, 到目前为止, 大多数关于文山牛品种遗传多样性的研究主要集中于线粒体水平。文际坤等^[13]通过分析线粒体 DNA 限制性片段长度多态性 (mtDNA RFLP), 表明文山牛同时具有普通牛和瘤牛母系起源, 以瘤牛血统为主。随后, 钱林东等^[14]测定了文山牛 mtDNA D-loop 区全序列并对其进行群体遗传变异进行分析, 结果同样支持云南文山牛具有普通牛和瘤牛两种母系血统来源。然而, 关于文山牛 Y 染色体遗传多样性及父系起源的研究较少。Gou 等^[15]通过比较文山牛的线粒体控制区和 Y 染色体基因片段, 线粒体数据表明, 文山牛存

收稿日期: 2019-01-29 修回日期: 2019-02-26

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

作者简介: 亏开兴 (1975—), 男, 云南祥云人, 副研究员, 主要从事动物遗传育种研究。

* 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。

在普通牛和瘤牛两种母系起源,以瘤牛血统为主;而 Y 染色体系统发育表明,文山牛的父亲起源几乎都是瘤牛。此外, Xia 等^[12]利用 Y-SNPs 结合 Y-STRs 的单倍型分型方法,对 20 头文山牛的父亲起源进行了调查,表明文山牛含有 Y2 和 Y3 两种父亲起源。但之前的研究用到的样本量较少,对文山牛群体的代表性较低。因此,本研究利用 Y-SNPs (*UTY19* 和 *ZFY10*) 和 Y-STRs (*INRA189* 和 *BM861*) 标记,对 55 头文山牛进行单倍型分析和父亲起源研究,为加强云南文山牛种质资源保护和开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样本采集与基因组 DNA 提取

在云南谷多农牧业有限公司那朵牧场采集 55 头文山牛公牛的耳组织样带回实验室,采用苯酚—氯仿方法^[16]提取全基因组 DNA,提取的基因组 DNA

放在 -20 ℃ 保存备用。用本实验室保存的 5 头荷斯坦牛公牛 DNA 做对照。

1.2 引物合成与 PCR 扩增

参照 Götherström 等^[5]和 Ginja 等^[16]报道的 2 个家牛 Y-SNP 标记(*UTY19* 和 *ZFY10*)引物序列信息合成引物(表 1),参照 Edwards 等^[10]发表的 2 对 Y-STR 标记(*INRA189* 和 *BM861*)引物序列信息合成引物(表 2)。

PCR 反应体系为 12.5 μL:ddH₂O 5.00 μL, 2 × Taq MasterMix 6.00 μL,上下游引物各 0.25 μL (10 pmol/μL),模板 DNA 1.00 μL。扩增条件为:95 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,退火 30 s(退火温度见表 1 和表 2),72 ℃ 延伸 30 s,36 个循环,最后 72 ℃ 延伸 10 min,4 ℃ 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分型。

表 1 2 对 Y-SNP 引物信息

标记	引物序列	退火温度/℃	片段大小/bp	位置
<i>UTY19</i>	F - TGATGCCTATATTAGCCATTGACA	53	280	Intron 19
	R - AAAATTCCTTTATGATGTTCCATCC			
<i>ZFY10</i>	F - CCAAAATGGTTGAGCTTTATGA	52	286	Intron 10
	R - GGAGCATAAGTGATCCAATGAA			

表 2 2 对 Y-STR 引物信息

标记	引物序列	退火温度/℃	等位基因范围/bp
<i>INRA189</i>	F - TACACGCATGTCCTTGTTCGG	58	68 ~ 124
	R - CTCTGCATCTGTCCTGGACTGG		
<i>BM861</i>	F - TTGAGCCACCTGGAAAGC	56	144 ~ 158
	R - CAAGCGGTTGCTTCAGATG		

2 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* 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校正,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 分型,二者共同确定出每头牛的 Y 染色体单倍型(Y-SNP-*INRA189* - *BM861*)。用 Arlequin V3.11 软件计算单倍型频率和单倍型多样

度($H \pm SD$)。

3 结果与分析

3.1 文山牛 Y-SNPs 多态性

将 55 头文山牛 2 个 Y-SNPs 标记(*UTY19* 和 *ZFY10*)的 PCR 扩增产物的测序结果,与 Götherström 等^[5]和 Ginja 等^[4]报道的家牛序列(GenBank 登录号:AY936543 和 AF928827)进行比对分析,结果表明:2 个 Y-SNPs 标记在 55 头文山牛中均不具有多态性。与标准序列相比,*UTY19* 标记全部为 C > A 核苷酸颠换,而 *ZFY10* 标记全部为 C > T 核苷酸转换。参考 Götherström 等^[5]和 Ginja 等^[4]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,55

头云南文山牛均为Y3单倍型组,对照组荷斯坦牛均为Y1单倍型组。

3.2 文山牛Y—STRs多态性

利用2个Y—STRs标记(*INRA189*和*BM861*),对55头文山牛Y染色体多态性进行检测。在*INRA189*座位中共检测到88 bp和90 bp两个等位基因,所占个体数分别为49头和6头,均对应瘤牛Y3单倍型组;在*BM861*座位中仅检测到一种等位基因(156 bp),对应瘤牛Y3单倍型组。对照组荷斯坦牛在*INRA189*座位中为98 bp等位基因,在*BM861*座位中仅检测到一种等位基因(158 bp)。

3.3 文山牛Y染色体单倍型频率和单倍型多样性

参照Edwards等^[10]报道的Y—SNPs和Y—STRs标记结合的单倍型分型方法,对55头文山牛的单倍型(Y—SNP—*INRA189*—*BM861*)进行分析,发现55头文山牛均为Y3单倍型组,但有2种单倍型Y3—88—156和Y3—90—156,其中Y3—90—156单倍型频率为0.09,Y3—88—156单倍型频率为0.91,文山牛Y染色体单倍型多样性为 0.1684 ± 0.0636 ;所有的荷斯坦公牛对照组都是Y1—98—158单倍型。

4 讨论

本研究旨在全面了解南方黄牛文山牛品种中Y染色体的遗传多样性,并提供父系起源和群体结构的分子证据。Götherström等^[5]首次从180个现代家牛样本Y染色体基因中(*DBY*、*UBE1Y*、*UTY19*和*ZFY10*)找到了Y—SNP标记,成功区分出家牛的3种Y染色体单倍型组,即普通牛Y1、Y2和瘤牛Y3单倍型组。随后不断有报道验证了Y—SNP标记在研究家牛父系起源的重要作用^[7,10,12]。相比Y—SNP标记,Y—STR标记具有突变率高、多态性丰富等特点。Edwards等^[8]利用不同牛种对4个牛Y—STR标记(*INRA126*、*INRA124*、*INRA189*和*BM861*)的特异性进行筛选,结果表明,*INRA124*、*INRA189*和*BM861*标记在家牛中均展现出普通牛和瘤牛的特异性。*INRA189*和*BM861*标记作为2个经典标记,在本研究中只有*INRA189*表现出多态性。

Li等^[11]对中国16个地方黄牛品种Y—SNP和Y—STR进行多态性分析,发现中国黄牛有普通牛和瘤牛两种父系起源,其中,北方黄牛以普通牛Y2为主,南方黄牛以瘤牛Y3为主。利用Y—SNPs和Y—STRs标记,李芳玉等^[17]、侯佳雯等^[18]分别对大别山牛和皖南牛的遗传多样性和父系起源进行研究,发现大别山牛和皖南牛这两种南方黄牛均以瘤牛为主要的父系起源。然而,大多数关于文山牛品

种遗传多样性的研究主要集中于线粒体DNA。不同于线粒体DNA和常染色体DNA的遗传特征,Y染色体分子遗传标记反映了动物父系遗传特征,提供父系起源证据^[19]。本研究采用Y—SNPs和Y—STRs相结合的单倍型分型方法(Y—SNP—*INRA189*—*BM861*),对55头文山公牛进行了单倍型分析,定义出文山牛2种Y染色体单倍型(Y3—88—156和Y3—90—156),其中Y3—88—156单倍型占明显优势(0.91),这说明文山牛具有与中国南方黄牛相似的血统来源,即以Y3—88—156瘤牛单倍型为主^[12]。结果表明,文山牛只有瘤牛父系起源,这与Gou等^[15]认为文山牛父系起源几乎均为瘤牛研究结果相吻合。此外,也与最近Xia等^[12]报道的对文山牛研究结果一致,20头文山牛存在Y2—102—158和Y3—88—156两种单倍型,其单倍型频率分别为0.05和0.95。

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。Edwards等^[10]报道138个国外牛品种的单倍型多样性平均值为 0.422 ± 0.269 ,Li等^[11]研究发现中国16个中国黄牛品种的单倍型多样性平均值为 0.2258 ± 0.0882 ,Xia等^[12]研究发现34个中国黄牛品种的平均单倍型多样性为 0.607 ± 0.016 ,均大于本研究调查的文山牛单倍型多样性(0.1684 ± 0.0636),然而本研究结果和Xia等^[12]研究发现文山牛单倍型多样性(0.100 ± 0.088)接近,这表明文山牛的分子遗传多样性较低,可能与采样地区的公牛有效群体较小有关;另一方面,也说明文山牛父系种质资源比较纯正,遗传稳定,纯合度高。

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] 王辛,文际坤. 文山牛品种资源及杂交改良效果观察[J]. 中国畜牧杂志,1983(5):21-22.
- [3] Ballantyne K N, Ralf A, Aboukhalid R, et al. Toward male individualization with rapidly mutating Y-chromosomal short tandem repeats[J]. Human Mutation, 2014, 35(8):1021-1032.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [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] Cai X, Chen H, Wang S, et al. Polymorphisms of two Y chromosome microsatellites in Chinese cattle [J]. *Genetics Selection Evolution*, 2006, 38(5): 525-534.
- [10] Edwards C J, Jinja 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.
- [11] Li R, Zhang X M, Campana M G, et al. Paternal origins of Chinese cattle[J]. *Animal Genetics*, 2013, 44(4): 446-449.
- [12] 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.
- [13] 文际坤, 俞英, 赵开典, 等. 云南文山牛和迪庆牛 mtDNA 的多态性研究[J]. 畜牧兽医学报, 1996, 27(1): 94-96.
- [14] 钱林东, 李大林, 张自芳, 等. 云南文山黄牛 mtDNA D-loop 区遗传多样性分析[J]. 云南农业大学学报(自然科学版), 2009, 24(4): 622-625.
- [15] Gou X, Wang Y, Yang S, et al. Genetic diversity and origin of Gayal and cattle in Yunnan revealed by mtDNA control region and SRY gene sequence variation[J]. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 2010, 127(2): 154-160.
- [16] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*[M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [17] 李芳玉, 夏小婷, 贾玉堂, 等. 大别山牛 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(2): 4-6.
- [18] 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.
- [19] Kantanen J, Edwards C J, Bradley D G, et al. Maternal and paternal genealogy of Eurasian taurine cattle (*Bos taurus*) [J]. *Heredity*, 2009, 103(5): 404-415.

Genetic Diversity of Y Chromosome and Paternal Origin of Y-SNPs and Y-STRs in Wenshan Cattle

QU Kai-xing¹, WANG Kai-yue², ZHANG Ji-cai¹, HUANG Bi-zhi¹, CHEN Ning-bo²,
FENG Guang-jie³, LI Shun-dong³, CHEN Hong², LEI Chu-zhao^{2*}

(1. Yunnan Academy of Grassland and Animal Science, Kunming 650212; 2. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100; 3. Yunnan Guduo Agriculture and Animal Husbandry Co. Ltd., Guangnan, Yunnan 663300)

Abstract: [Objective] The genetic structure and paternal origins of Y chromosome in Wenshan cattle were analyzed to provide a scientific basis for the resource protection and utilization of this breed. [Method] PCR amplification and bioinformatics methods were used to detect the genetic diversity of Y-SNPs (*UTY19* and *ZFY10*) and Y-STRs (*INRA189* and *BM861*) in 55 Wenshan cattles. [Results] All the cattle belong to zebu Y3 haplogroup, and two Y chromosome haplotypes (Y3—88—156 and Y3—90—156) were identified by combining Y-SNPs and Y-STRs genotyping data. The Y chromosome haplotype diversity in Wenshan cattle was 0.1684 ± 0.0636 . [Conclusion] Wenshan cattle only had paternal origin of zebu with stable genetic lineage and high homozygosity.

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