

南宁市肉牛的 Y 染色体遗传多样性分析

宣泽义¹, 曹艳红¹, 吴柱月¹, 黄明光¹, 陈少梅¹, 王凯悦², 陈宏², 雷初朝^{2*}

(1. 广西壮族自治区畜牧研究所, 广西 南宁 530001; 2. 西北农林科技大学动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要: [目的]为了探究广西南宁市肉牛的父亲系遗传背景与遗传组成。[方法]利用 PCR 扩增、限制性酶切和生物信息学方法,对南宁屠宰场的 73 头肉牛 Y 染色体 *USP9Y* 基因的遗传多态性进行分析。[结果]发现 73 头公牛 *USP9Y* 基因的 PCR 产物具有多态性,2 头牛显示 471 bp 带型,71 头牛显示 552 bp 带型。在 71 个 552 bp 带型中,有 28 个可以被 *SspI* 酶切成 2 条带(338 bp 和 215 bp),表明这 28 头牛为 Y3 单倍型组(38.36%),而其余 43 个不能被 *SspI* 酶切,表明这 43 头牛为 Y2 单倍型组(58.90%)。仅有 2 头牛的 PCR 产物为 471 bp,表明这 2 头牛为 Y1 单倍型组(2.74%)。屠宰牛群的单倍型多样性为 0.5122 ± 0.0309 ,表明屠宰牛群的 Y 染色体遗传多样性较高。[结论]南宁市屠宰牛群的来源比较复杂,有普通牛(Y1 与 Y2 单倍型组)和瘤牛(Y3 单倍型组)2 个父系起源。

关键词: 屠宰牛群; Y 染色体; 遗传多样性; *USP9Y* 基因; 父系起源

中图分类号: S823.8⁺1; S823.9⁺2; Q347 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-9111(2019)03-0005-03

动物 Y 染色体单倍型保持完整,不容易受重组和回复突变的影响,突变率较低,是进化事件的忠实记录者^[1]。Y 染色体单倍型分析可以揭示牛父系起源进化的信息, Götherström 等^[2]利用 Y 染色体单核苷酸多态性(Y-SNPs)定义了家牛 3 个 Y 染色体单倍型组(普通牛 Y1 和 Y2 以及瘤牛 Y3 单倍型组)。Bonfiglio 等^[3]在牛 *USP9Y* 基因的第 26 内含子处鉴定了 1 个新的分子标记,81 bp 的插入能将 Y1 单倍型组与 Y2 和 Y3 单倍型组区分开,而 4 个 Y3 特异性序列变异能把 Y3 单倍型组和 Y2 单倍型组区分开。

我国黄牛品种资源十分丰富,根据 2011 年修订的《中国畜禽遗传资源志:牛志》记载,目前有 53 个地方黄牛品种、8 个培育品种和 11 个国外引入品种^[4]。本研究采集的公牛样本来自广西壮族自治区首府南宁市的一个大型肉牛屠宰场,按照区域地理分布将其统称为“南宁牛”。为了探究广西南宁市肉牛屠宰场屠宰的黄牛 Y 染色体单倍型组组成和父系起源,本研究对所采集的南宁肉牛样本进行 Y 染色体 *USP9Y* 基因多态性分析,以调查南宁屠宰市场上黄牛的父系遗传背景,为了解南宁市场上肉牛的来源与遗传组成奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样本采集与基因组 DNA 提取

在广西南宁市一屠宰场中采集 73 头公牛的耳组织样带回实验室,采用苯酚—氯仿法提取全基因组 DNA,放在 -20 ℃ 保存备用。

1.2 引物合成与 PCR 扩增

参照 Bonfiglio 等^[3]发表的牛 Y 染色体 *USP9Y* 基因序列合成引物,上游引物为: F-5'-AAAC-CCTTCAAGGTAATAAAACAAAA-3',下游引物为 R:5'-CACAGCTCCTCAAAACCAGA-3'。PCR 反应体系为 12.5 μL; ddH₂O 5.00 μL, 2 × Taq Master-Mix 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, 57 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 36 个循环,最后 72 ℃ 延伸 10 min, 4 ℃ 保存。

1.3 PCR 扩增产物检测与酶切分析

用 2% 的琼脂糖凝胶对黄牛 *USP9Y* 基因的 PCR 产物进行电泳检测,根据扩增条带大小进行初步的 Y 染色体单倍型组判型,再用 *SspI* 限制性内切酶对 PCR 产物进行酶切。*SspI* 酶切体系为 8.0 μL; *SspI* 酶(10.0 U/μL) 0.4 μL(TaKaRa 公司), 10 × *SspI* Buffer 0.8 μL, PCR 产物 2.4 μL, ddH₂O 4.4 μL。置

收稿日期: 2019-01-09 修回日期: 2019-01-30

基金项目: 国家肉牛牦牛产业技术体系资助项目(CARS-37), 广西科技重大专项(桂科 AA18118041)

作者简介: 宣泽义(1984—), 男, 广西博白县人, 主要从事牛羊遗传育种与饲料研究。

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

于 37 ℃ 的摇床 1 h 后,用 2% 的琼脂糖凝胶对酶切产物进行电泳检测,根据 PCR 产物被酶切的情况进行单倍型组分析和统计。

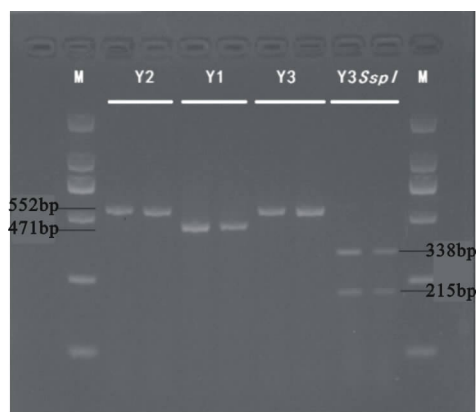
1.4 数据统计分析

用 Arlequin V3.11 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 南宁牛 *USP9Y* 基因 PCR 产物多态性与 *SspI* 酶切鉴定

通过对黄牛 *USP9Y* 基因的 PCR 扩增和电泳检测,结果表明,73 头公牛 *USP9Y* 基因的 PCR 产物显示 471 bp 和 552 bp 两种带型(图 1)。南宁牛有 71 个个体的 PCR 扩增产物为 552 bp,仅有 2 个个体为 471 bp,依据 Bonfiglio 等^[3]的判定标准,这 2 个带型为 471 bp 的南宁牛属于普通牛 Y1 单倍型组,而剩余的 71 头南宁牛是 Y2 还是 Y3 单倍型组需要通过 *SspI* 限制性内切酶酶切的方法来进行进一步区分。利用 *SspI* 酶对这 71 头牛的 PCR 产物进行酶切,发现有 28 头牛的 PCR 产物能被 *SspI* 酶切开出 2 条带(215 bp 和 338 bp),而有 43 头牛的 PCR 产物不能被 *SspI* 酶切开,只有 1 条带 552 bp,说明这 71 头南宁牛中有 28 头牛属于 Y3 单倍型组,43 头牛属于 Y2 单倍型组。



注:M 泳道为 DL2000 marker,自上而下依次为 2 000,1 000,750,500,250,100 bp。

图 1 南宁牛 *USP9Y* 基因的 PCR 产物扩增与酶切多态性

2.2 南宁牛 Y 染色体单倍型频率和单倍型多样性

对 73 头南宁牛中 Y1、Y2 和 Y3 单倍型组个体进行频率统计,结果显示:Y1、Y2 和 Y3 单倍型组分别有 2,48,23 个个体,所占频率分别为 2.74%,58.90% 和 38.36%。单倍型多样性为 0.5122 ± 0.0309 。

3 讨论

家牛 Y-SNPs 标记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^[5-6]。在对国外家牛品种的研究中,Son 等^[7]对东北亚地区蒙古、日本和韩国 3 个国家的牛品种分析表明,这些品种只拥有普通牛 Y 染色体单倍型组,而未检测到瘤牛单倍型组。Götherström 等^[2]和 Ginja 等^[8]对多个欧洲家牛品种进行分析,结果表明欧洲牛为普通牛起源,其中北欧品种主要是 Y1 单倍型组,南欧品种主要是 Y2 单倍型组。Edwards 等^[9]通过分析 138 个欧洲和亚洲牛品种表明,亚洲西南部主要为瘤牛 Y3 单倍型组,Y1 和 Y2 单倍型组主要分布在英国、北欧和俄罗斯地区。

在中国部分地方黄牛品种的父亲系遗传分析中,Li^[10-11]等指出中国北方的家牛主要是 Y2 单倍型组,南方主要是 Y3 单倍型组,中原是 Y2 和 Y3 单倍型组的混合区。利用家牛 2 个经典的 Y-SNPs 标记(*ZFY10* 和 *UTY19*),赵晓诚等^[12]分析了岭南牛的 Y 染色体多态性,指出岭南牛的父亲系起源以瘤牛为主,普通牛为辅;夏小婷等^[13]结合 Y-SNPs 与 Y-STRs 的分型结果,发现关岭牛主要以 Y3 单倍型组为主;李芳玉等^[14]利用 49 头大别山牛的 2 个 Y-SNPs 标记及 2 个 Y-STRs 标记(*INRA189* 和 *BM861*)进行多态性检测,发现大别山牛只有瘤牛 Y3 父亲起源。李秀良等^[15]对 28 头涠洲牛进行分析,结果显示 28 头涠洲牛有 Y3-88-156 和 Y3-90-156 两种单倍型,单倍型频率分别为 89.29% 和 10.71%,说明涠洲牛只有 1 个瘤牛 Y3 父亲起源。从以上研究可以看出,中国南方黄牛主要是 Y3 单倍型组。

在本研究中,通过对 73 头南宁市一屠宰场的黄牛 Y 染色体上 *USP9Y* 基因的多态性分析,发现南宁牛有普通牛(Y1 和 Y2 单倍型组)和瘤牛(Y3 单倍型组)2 个不同的父亲起源,以 Y2 单倍型组为主,还包括少量的 Y1 单倍型组。根据地域分析,南宁牛属于南方黄牛类型,这与常振华等^[1]、Li 等^[10]和李秀良等^[15]指出的中国南方黄牛品种的起源进化不一致,表明南宁市屠宰场屠宰的肉牛来源比较复杂。传统上中国黄牛主要是役用,但近几十年来,人们对黄牛肉用价值的需求大大提高,为了提高我国黄牛的市场竞争力,从国外引入一些肉牛品种,如:以 Y2 单倍型组为主的皮埃蒙特牛、夏洛莱牛、利木赞牛、西门塔尔牛等;以 Y1 单倍型组为主的安格斯牛、荷斯坦牛等来提高我国黄牛的发育性能,导致全国各地的地方品种都因此而混杂,纯种数量急剧减

少。因此,南宁市屠宰场屠宰的肉牛呈现较高的Y2单倍型组频率以及低频率的Y1单倍型组频率,一方面,说明广西地方黄牛品种也大量与国外引进的肉牛品种杂交;另一方面,说明广西南宁市肉牛屠宰场从周边省市大量购买杂交肉牛和少量育肥的奶公犊。从广西南宁市肉牛屠宰场的Y染色体父系起源来看,如火如荼的利用国外商品肉牛品种与全国各地地方黄牛品种的杂交模式,已经遍地开花,连比较偏远、经济相对落后的西南部,如广西地区也不例外。因此,从保护中国丰富的地方黄牛品种资源来看,全国各地加大地方黄牛品质资源的保护已经刻不容缓,如果再不加大保护力度,再过20年左右,中国宝贵的、引以为傲的丰富地方黄牛品种就会消失殆尽。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 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 Biological Sciences, 2005, 272(1579): 2345-2350.
- [3] Bonfiglio S, De G A, Tesfaye K, et al. A novel USP9Y polymorphism allowing a rapid and unambiguous classification of *Bos taurus* Y chromosomes into haplogroups[J]. Animal Genetics, 2012, 43(5): 611-613.
- [4] 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.
- [5] 马志杰,黄永震,党瑞华,等. 日本和牛Y染色体 USP9Y 基因多态性与父系起源研究[J]. 中国牛业科学,2017,43(1):1-3.
- [6] 马志杰,李瑞哲,夏小婷,等. 柴达木黄牛Y-SNPs遗传多样性、群体遗传结构及父系起源[J]. 基因组学与应用生物学,2018, 37(5):1920-1925.
- [7] Son H, Min K, Lee J, et al. Independent mitochondrial origin and historical genetic differentiation in north eastern Asian cattle[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2004, 32(2): 539-544.
- [8] Ginja C, Luís T D G, 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.
- [9] 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: e15922.
- [10] Li R, Zhang X M, Campana M G, et al. Paternal origins of Chinese cattle[J]. Animal Genetics, 2013, 44(4): 446-449.
- [11] Li R, Xie W M, Chang Z H, et al. Y chromosome diversity and paternal origin of Chinese cattle[J]. Molecular Biology Reports, 2013, 40(12): 6633-6636.
- [12] 赵晓斌,林清,左自意,等. 岭南黄牛Y-SNP遗传多样性与父系起源研究[J]. 中国牛业科学,2017,43(4):4-6.
- [13] 夏小婷,邹勇,党瑞华,等. 关岭牛Y染色体遗传多样性与父系起源研究[J]. 中国牛业科学,2018,43(6):6-8.
- [14] 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.
- [15] 李秀良,李芳玉,曹艳红,等. 涠洲牛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.

Y Chromosome Genetic Diversity of Beef Cattle in Nanning City

XUAN Ze-yi¹, CAO Yan-hong¹, WU Zhu-yue¹, HUANG Ming-guang¹, CHEN Shao-mei¹,
WANG Kai-yue², CHEN Hong², LEI Chu-zhao^{2*}

(1. Animal Husbandry Institute of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning, Guangxi 530001;

2. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: [Objective] To explore the paternal genetic background and composition of beef cattle in Nanning city, Guangxi region. [Methods] PCR amplification, restriction enzyme digestion and bioinformatics methods were used to analyze the genetic polymorphism of 73 bulls with USP9Y marker. [Results] The results showed that the PCR products of USP9Y gene in 73 bulls showed the amplification polymorphism with 471 bp and 552 bp. The 71 bulls with 552 bp were digested using SspI enzyme, of which 28 bulls showing two bands (338 bp and 215 bp), were Y3 haplogroup (38.36%), while the remaining 43 bulls only showing 552 bp, were Y2 haplogroup (58.90%). The remaining 2 bulls with 471 bp, was Y1 haplogroup (2.74%). The Y chromosome haplotype diversity of the slaughter cattle population was 0.5122 ± 0.0309 , suggesting that the slaughter cattle population has relatively high paternal genetic diversity. [Conclusion] The study revealed complex composition and two different paternal origins of *Bos taurus* (Y1 and Y2 haplogroups) and *Bos indicus* (Y3 haplogroup) of beef cattle in Nanning slaughterhouse.

Key words: beef cattle; Y chromosome; genetic diversity; USP9Y gene; paternal origins