

云岭牛无角性状的分子鉴定与应用

李 常¹, 王 宁¹, 刘玉香¹, 刁开兴²,
张继才², 黄必志², 雷初朝^{3*}

(1. 陕西省佳县畜牧技术推广站, 陕西 佳县 719200; 2. 云南省草地动物科学研究院, 昆明 650212;
3. 西北农林科技大学动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要: [目的] 对云岭牛的无角性状进行分子鉴定, 以加快云岭牛无角品系的培育速度。[方法] 采用 PCR 扩增与琼脂糖电泳分型的方法。[结果] 在 263 头云岭牛中, 221 头牛的基因型与其无角与有角性状完全一致, 分子鉴定成功率为 83.03%, 还有 42 头云岭牛 (16.97%) 不能正确鉴定其无角与有角性状。[结论] 分子鉴定技术可以有效鉴定云岭牛的无角与有角性状, 将缩短云岭牛的无角品系选育进程。

关键词: 云岭牛; 无角性状; 有角性状; 分子鉴定

中图分类号: S823; Q347 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-9111(2020)03-0022-03

牛角性状是由基因控制的, White 等^[1] 通过研究发现牛无角对有角是显性。Medugorac 等^[2] 通过对欧洲 1 675 头不同普通牛品种的有角与无角性状进行研究, 发现 202 bp 片段的插入缺失 (P_{202ID}) 导致欧洲普通牛表现为无角性状, 该插入缺失位于 1 号染色体的 *IFNAR2* 和 *OLIG1* 基因之间, 不改变编码序列或剪接位点。在荷斯坦牛中存在 260 kb 单倍型与其无角性状密切相关, 该 260 kb 单倍型包含 5 个完全连锁的突变位点 (P_{51D} 、 $P_{C1654405A}$ 、 $P_{C1655463T}$ 、 $P_{C1768587A}$ 和 P_{80kbID})。 P_{51D} 突变由 12 bp 序列 (ttctcagaatag) 更换为 7 bp 序列 (cgcatca), 从而导致无角荷斯坦牛中该序列多了 5 bp 碱基序列; P_{80kbID} 表示 80 kb 重复序列位于纯合无角荷斯坦牛染色体的末端区域; 还有 3 个 SNPs 分别位于第 1 654 405 (G→A), 1 655 463 (C→T) 和 1 768 587 (C→A) 位。这 5 个突变位点为荷斯坦奶牛无角性状所特有。因此, 携带 1 个或 2 个拷贝的 P_{202ID} 等位基因的牛表现为无角, 其基因型分别为 P_p 或者 P_P 。牛有角性状由 p_{rs} 基因控制, 无角性状由 P_C 和 P_F 基因控制。 P_F 、 P_C 、 p_{rs} 是 3 个复等位基因; 而 P_F 、 P_C 是 2 个等显性复等位基因。 P_C 和 P_F 基因是根据无角牛起源的地区来命名的: 起源于凯尔特地区的无角牛携带的单倍型 P_{202ID} 用 P_C 表示, 而起源于荷斯坦地区的无角

牛携带的 5 个完全连锁的突变位点用 P_F 表示。因此, 无角牛包括纯合无角 P_F/P_F 、 P_C/P_C 和 P_C/P_F 3 种基因型, 杂合无角 P_C/p_{rs} 、 P_F/p_{rs} 2 种基因型, 而有角牛只有 p_{rs}/p_{rs} 一种基因型。因此, 理论上讲, 基于这 6 个无角突变位点就能鉴定该牛是无角牛还是有角牛。本研究旨在检测云岭牛种公牛和核心群母牛的有角与无角性状, 所选云岭牛血统纯正, 无荷斯坦奶牛血统。因此, 通过 PCR 扩增方法对 P_{202ID} 位点进行检测, 理论上可以有效鉴定云岭牛的有角与无角性状及其相应的基因型, 为云岭牛无角品系的选育提供分子遗传学证据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

试验自小哨示范牧场云岭牛核心育种场采集 263 头云岭牛 (250 头无角云岭牛、13 头有角云岭牛) 耳组织样本, -20℃ 保存。

1.2 基因组 DNA 提取及 PCR 扩增测序

利用酚-氯仿法提取基因组 DNA。利用 Medugorac 等^[2] 和曾璐岚等^[3] 发表的 P_{202ID} 引物进行 PCR 扩增。PCR 体积为 12.5 μ L: 2 $\times$ Reaction Mix 6.25 μ L, 20 ng/ μ L DNA 模板 1.0 μ L, 上、下游引物 (10 pmol/ μ L) 各 0.2 μ L, 去离子水 4.85 μ L。PCR

收稿日期: 2020-01-11 修回日期: 2020-01-20

基金项目: 云南省后备人才培养计划项目 (2018HB045); 云南省重大科技专项 (2019ZG011); 国家肉牛牦牛产业技术体系项目 (CARS-37)

作者简介: 李常 (1992—), 男, 陕西宝鸡人, 硕士, 主要从事畜牧技术推广工作。

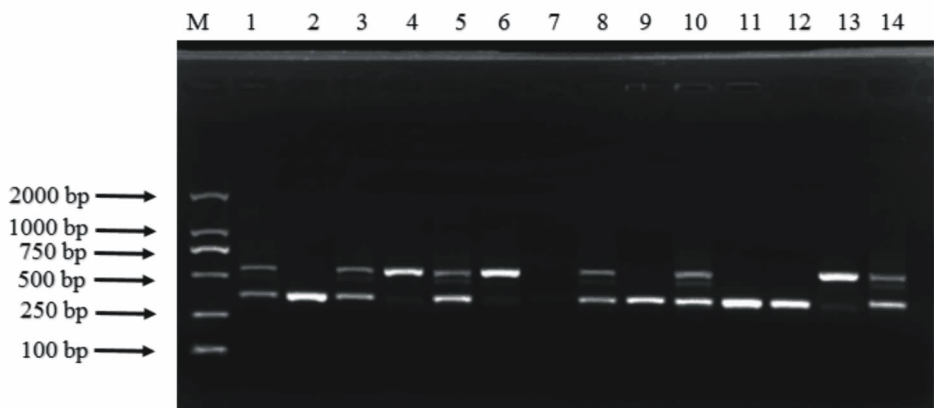
* 通讯作者: 雷初朝 (1968—), 男, 湖南常宁人, 教授, 博士生导师, 主要从事牛遗传资源研究。

扩增程序:95 ℃预变性 5 min,34 个循环(94 ℃变性 40 s,59 ℃退火 40 s,72 ℃延伸 30 s),72 ℃延伸 10 min,4 ℃保存。PCR 产物用 1% 的琼脂糖电泳检测,在凝胶成像系统下观察并拍照,以此判断基因型。

2 结果与分析

用 P_{2021D} 引物对 263 头云岭牛(250 头无角云岭牛、13 头有角云岭牛)的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,扩增结果如图 1 所示;对扩增片段大小进行统计及基因型分析,云岭牛的有角与无角性状的分子鉴定结果如表 1。由图 1 和表 1 可以看出,无角云岭牛又分为纯合无角牛和杂合无角牛。纯合无角云岭牛(公牛 5 头,母牛 44 头)的基因型为 P_C/P_C,只有 1

条扩增带 571 bp,其基因型频率为 18.63%;杂合无角云岭牛(其中公牛 9 头,母牛 158 头)的基因型为 P_C/p_{rs},有 2 条扩增带,分别为 571 bp 和 369 bp,其基因型频率为 63.50%,无角云岭牛总的基因型频率为 82.13%。有角云岭牛(公牛 1 头,母牛 4 头)为隐性纯合子,其基因型为 p_{rs}/p_{rs},只有 1 条扩增带 369 bp,其频率为 1.90%。以上这 221 头云岭牛的基因型与云岭牛有角与无角性状完全一致,分子鉴定的成功率为 84.03%。但是,本试验也检测到 8 头有角云岭牛(公牛 2 头,母牛 6 头)为杂合无角牛基因型(P_C/p_{rs}),其基因型频率为 3.04%;34 头无角云岭牛(母牛 34 头)为有角基因型(p_{rs}/p_{rs}),其基因型频率为 12.93%,总计有 15.97% 的分子鉴定结果与云岭牛已知的无角与有角性状不相符。



注:1,3,5,8,10,14 泳道基因型为 P_C/p_{rs};2,9,11,12 泳道基因型为 P_{rs}/p_{rs};4,6,13 泳道基因型为 P_C/P_C;7 泳道为空白对照。

图 1 云岭牛 P_{2021D} 引物扩增的牛角性状多态性

表 1 云岭牛单倍型 P_{2021D} 的 PCR 扩增片段大小、基因型与基因型频率

性状	<i>n</i>	扩增片段大小/bp	基因型	基因型频率/%
无角牛(9 头 ♂,158 头 ♀)	167	571 + 369	P _C /p _{rs}	63.50
无角牛(5 头 ♂,44 头 ♀)	49	571	P _C /P _C	18.63
有角牛(1 头 ♂,4 头 ♀)	5	369	p _{rs} /p _{rs}	1.90
有角牛(2 头 ♂,6 头 ♀)	8	571 + 369	P _C /p _{rs}	3.04
无角牛(34 头 ♀)	34	369	p _{rs} /p _{rs}	12.93

3 讨 论

长期以来,牛无角表型都是选择和研究的目 标。随着肉牛业的快速发展,规模化养殖水平越 来越高,在现代集约化饲养条件下,牛角不仅没有 什么价值,还会对牛和人造成伤害。另外,牛长一 对大角就需要消耗一定的营养物质,从而导致饲 料转化率下降。因此,培育无角牛成了时代的需 要,这样做既不违背去角引起的动物福利原则, 又能提高肉牛的

养殖效益。 在本试验中,221 头云岭牛的基因型与其角 的性状完全对应,成功率为 84.03%,远低于夏 南牛 100% 成功率^[3]。还有 15.97% 云岭牛与 已知的无角与有角性状不相符。原因有三点:第 一,可能云岭牛无角与有角性状的记录有误,但 错误率不会这么高;第二,可能与普通牛特殊 的无角与有角性状的致因突变有关,例如,蒙 古国牦牛的无角基因来自于无角蒙古牛起源, 其无角突变为复杂的 P_{2191D} 位点^[4];

第三,可能与云岭牛含有瘤牛血统有关,因为云岭牛是由婆罗门牛、莫累灰牛和云南黄牛采用三元杂交选育而来,婆罗门牛属于瘤牛。牛无角与有角性状的致因突变都是在普通牛中鉴定出来的,瘤牛无角与有角的基因突变是否与普通牛一致,尚没有遗传学证据。尽管 Koufariotis 等^[5]通过对4头无角和46头有角婆罗门牛的全基因组进行重测序分析,发现3头为纯合无角牛,1头为杂合无角婆罗门牛,其无角基因与凯尔特突变基因 P_C 一致,为 P_{202ID} 单倍型,但也不能排除瘤牛可能有独特的无角基因和突变位点。Chen 等^[6]通过对48头无角和16头有角蜀宣花牛的 P_{202ID} 、 P_{80kbID} 和 P_{219ID} 变异进行基因分型,发现蜀宣花牛存在已知的3种候选突变(P_{202ID} 、 P_{80kbID} 和 P_{219ID}),而 P_{202ID} 突变占主导地位。但是,他们的研究还发现1头无角蜀宣花牛没有携带这3种候选突变中的任何一种,提示还有别的突变影响牛的无角性状,表明决定牛有角与无角性状的基因突变可能有多个基因参与。因此,要完全弄清楚牛无角突变的分子机制,还需要更多的深入研究。

4 应用

尽管本研究的分子鉴定技术用于鉴定云岭牛无角与有角性状的成功率为84.03%,但并不妨碍本研究的分子鉴定技术用于云岭牛无角品系的选育与应用。为了加快云岭牛无角品系的选育速度,最重要的是鉴定无角种公牛为纯合基因型 P_C/P_C ,其次,鉴定云岭无角牛核心母牛群也为纯合基因型 P_C/P_C ,再让纯合无角公牛 P_C/P_C 与纯合无角母牛 P_C/P_C 交配,那么后代全为无角牛。这样,只要有足够的纯合无角公牛与无角母牛,理论上经过一代这样的选种选配,其后代均为纯合无角公牛与母牛,无角牛品系的选育就完成了。因此,利用无角牛基因的分子鉴定技术,可以大大缩短无角牛品系的选育时间。尽管黄牛的世代间隔长,又是单胎动物,只要严格利用经过分子鉴定的纯合无角公牛与母牛进行选种选配,完全可以在5~10年内选育出云岭牛无角新品系。

参考文献:

- [1] WHITE W, IBSEN H. Horn inheritance in Galloway-Holstein cattle crosses[J]. *Journal of Genetics*, 1936,32:33-49.
- [2] MEDUGORAC I, SEICHTER D, GRAF A, et al. Bovine polledness: An autosomal dominant trait with allelic heterogeneity[J]. *PLoS One*, 2012,7:e39477.
- [3] 曾璐岚,郝新兴,祁兴磊,等. 夏南牛无角性状的分子鉴定技术及应用[J]. *中国牛业科学*, 2017,43(4):27-29,33.
- [4] KOUFARIOTIS L, HAYES B J, KELLY M, et al. Sequencing the mosaic genome of Brahman cattle identifies historic and recent introgression including polled [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8:17761.
- [5] CHEN S Y, LIU L, FU M, et al. Simultaneous introgression of three POLLED mutations into a synthetic breed of Chinese cattle [J]. *PLoS One*, 2017,12:186862.
- [6] MEDUGORAC I, GRAF A, GROHS C, et al. Whole-genome analysis of introgressive hybridization and characterization of the bovine legacy of Mongolian yaks [J]. *Nature Genetics*, 2017,49:470-475.

Molecular Identification and Application of Polled Trait in Yunling Cattle

LI Chang¹, WANG Ning¹, LIU Yu-xiang¹, QU Kai-xing²,
ZHANG Ji-cai², HUANG Bi-zhi², LEI Chu-zhao^{3*}

(1. The Extension Station of Animal Husbandry Technology of Jiaxian County in Shaanxi Province, Jiaxian, Shaanxi 719200;

2. Yunnan Academy of Grassland and Animal Science, Kunming 650212;

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

Abstract: [Objective] It will speed up the breeding of polled strain in Yunling cattle through identifying the polled trait of Yunling cattle using molecular genetics technology. [Method] PCR amplification and agarose gel electrophores methods were used. [Result] Among 263 Yunling samples, the genotypes of 221 Yunling samples were completely consistent with the polled and horned traits, the molecular identification rate was 83.03%. However, the polled and horned traits of 42 Yunling samples (16.97%) cannot be identified correctly. [Conclusion] The molecular identification technology is effective to identify the polled and horned traits of Yunling cattle, which will shorten the breeding program of the polled line in Yunling cattle.

Key words: Yunling cattle; polled trait; horned trait; molecular identification