

# 基于细胞色素 *b* 基因的大河乌猪群体遗传结构研究

唐利洲<sup>1</sup>, 施晓东<sup>1</sup>, 丁伟<sup>1</sup>, 于龙<sup>1</sup>, 王俊杰<sup>1</sup>, 朱磊<sup>1</sup>, 郭松长<sup>2</sup>

(1. 曲靖师范学院生物资源与环境科学学院, 云贵高原生物多样性研究所, 云南曲靖 655011;

2. 中国科学院西北高原生物研究所高原生物适应与进化重点实验室, 青海西宁 810001)

**摘要:**为了弄清大河乌猪群体遗传分化水平和遗传结构,以曲靖市5个地理种群的46个大河乌猪样品为试验材料,采用分子生物学方法测定和分析所有个体的线粒体细胞色素 *b*(Cyt *b*)基因 DNA 序列。分子变异分析结果表明,大河乌猪群体遗传变异主要来自种群内(62.63%),说明该物种群体遗传结构不明显。中性检验结果进一步证实,大河乌猪群体曾发生过种群数量扩张。这种不显著的种群结构主要来自于大规模的引种和扩大繁育,致使各地理种群间的遗传趋同和遗传一致性。研究结果有望为大河乌猪分子遗传选育工作提供重要的基础数据,并为其遗传种质资源的保护提供重要参考。

**关键词:**大河乌猪;线粒体基因;细胞色素 *b*;遗传多样性;遗传结构

**中图分类号:**S813.3

**文献标识码:**A

**文章编号:**1671-7236(2013)04-0045-05

大河乌猪原产于云南省曲靖市富源县大河镇,是采用生长在富源大河一带的大河猪与杜洛克种公猪杂交,应用科技手段经6个世代横交固定,反复选育培育出来的(皮晓波等,2006)。大河乌猪于2002年被国家农业部畜禽品种审定委员会审定为国家级新品种,成为云南省第一、中国第二育成猪新品种。该猪种毛色乌黑,体质结实,体型匀称,体躯较长,背腰平直,胸部宽深,后躯丰满,腹部紧凑、四肢健壮,肢蹄结实;肌肉脂肪含量高,具有肉质好、瘦肉率适中、生长快、耐粗饲、抗逆强等优良特性(司徒乐愉

等,2004)。生长发育性能和繁殖性能好,公猪3月龄、母猪4月龄就可以配种受孕。因其具有骨细皮薄、肉质鲜嫩、后腿比例大、腌制失水率低等优点,是腌制云腿的优质材料。前期研究已涉及该物种的肉质性状检测、生产性能观测、毛色横交固定遗传研究等方面。研究结果显示,大河乌猪肌肉系水力强,肌肉的脂肪含量和 pH 高,保持了大河猪在脂肪酸和氨基酸组成与结构上的优良特性(司徒乐愉等,2004);在不同的饲养条件下,其生产性能无明显差异(李祥等,2004)。研究人员以大河乌猪骨调素基因为遗传标记,探讨了该物种的骨调素基因的功能,并初步揭示该基因可能影响大河乌猪的繁殖性状(尚帮华等,2007)。

迄今为止,有关大河乌猪的研究主要集中于品种优势、养殖技术与经济性性状改良,而基于分子水平的大河乌猪群体遗传特征的研究则相对较少。种群的遗传结构是一种最基本的遗传信息,对遗传结构

**收稿日期:**2012-09-27

**作者简介:**唐利洲(1980—),男,湖南人,博士,副教授,研究方向:动物遗传学。

**通信作者:**郭松长(1976—),男,湖南人,硕士生导师,副研究员,从事动物学研究。E-mail: guo@nwipb.ac.cn

**基金项目:**云南省应用基础研究面上项目(2010ZC149);曲靖师范学院重点项目(2009ZD004)。

the products. The fragment with main epitope sequences, amplified from Ondetstepport vaccine strain via reverse transcription-polymerase chain reaction, was cloned into vector pET28b and expressed through IPTG introduction after transformed into Rosetta™ strain. The product, after purification, was identified by SDS-PAGE, western blotting and indirect enzyme linked immunosorbent assay. After that, the antibody titers of mice immunized with the purified H proteins were determined with neutralization test. The 1113 bp fragment of interest was specifically amplified by RT-PCR and expressed with the introduction of 1.0 mmol/L IPTG at 37 °C. The protein expressed, identified by SDS-PAGE and Western blotting with a size of 42.38 ku, could be recognized by anti-CDV antibody without nonspecific reaction. In the animal experiment, the serum antibody titer was determined to be 2<sup>-3.3</sup> by neutralization test. The target protein was expressed accurately and specifically, showing a good immunogenicity and antigenicity according to the animal experiment, and therefore could be employed as an antigen candidate for the Real-time examination of animal immune condition, which laid the foundations for the development of new-type canine distemper vaccines and ELISA kit for detecting the anti-CDV antibody.

**Key words:** canine distemper virus; haemagglutinin gene; prokaryotic expression; Western blotting; activity

及其影响因子的研究是探讨生物适应意义、物种形成过程及其进化机制的基础,且分子标记技术和针对分子标记的数学计算方法已成为群体遗传学研究的主要手段(包振民等,2011)。线粒体 DNA 分子标记具有母系遗传、分子结构简单、进化速度快和易于测序及分析等特点,已被广泛应用于动物分子系统学、群体遗传学和保护遗传学等相关研究领域。线粒体基因组中的细胞色素 *b*(*Cyt b*)基因则以其进化速度适中和遗传信息丰富等优势,被广泛认为是研究近缘物种间和种内系统进化、遗传分化程度和遗传结构等的重要指标(曹祥荣等,2002)。因此,本研究以线粒体 *Cyt b* 基因作为分子标记,采取分子生物学方法对大河乌猪 5 个地理种群的 *Cyt b* 基因 DNA 序列进行提取、扩增和测序,再利用遗传学软件对序列进行分析,综合探讨大河乌猪群体的遗传结构和遗传分化水平,以期充分了解该猪种整个分布区域的群体遗传结构和遗传分化程度,从而为其遗传资源的保护利用及今后的育种工作提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 主要仪器与试剂** 凝胶成像系统、低温离心机、超纯水仪(Millipore Inc.)、微量可调移液器(Eppendorf AG)、PCR 仪(Biometra);Tris 饱和酚、蛋白酶 K、50×TAE 电泳缓冲液、TE 等。

**1.2 样品采集与 DNA 提取** 试验用 46 个样品分别来源于曲靖市富源县的大河、营上、竹园、富村和老厂 5 个地理种群(表 1)。各取肌肉组织 2 g 左右,置于 95%乙醇中固定,带回实验室置于 -20℃ 冰箱低温保存。采用北京鼎国提供的基因组 DNA 提取试剂盒抽提基因组总 DNA。

**1.3 PCR 扩增及序列测定** 引用王继英等(2009)

中引物进行 *Cyt b* 基因的 PCR 扩增,引物序列为: C1: 5'-CACGACCAATGACATGAAAAATC-3'; C2: 5'-GCTGCGAGGGCGGTAAT-3'。PCR 反应体系为:10×Buffer 5 μL,10 mmol/L dNTP 4 μL,12.5 μmol/L 上、下游引物各 1.5 μL,Ex Tag DNA 聚合酶 2 U,加双蒸水至 50 μL。PCR 反应条件:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,57℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,35 个循环;72℃ 延伸 10 min。扩增产物由北京鼎国生物技术有限公司进行 PCR 扩增产物的纯化、回收与测序。

## 1.4 数据分析

**1.4.1 序列比对** 利用软件 Chromas、Clustal X 1.8(Thompson 等,1997)进行同源排序,并适当手动校对。

**1.4.2 遗传多样性分析** 运用 DnaSP 4.0(Rozas 等,1999,2003)统计序列多态位点数、单倍型数、单倍型多样性及核苷酸多样性。

**1.4.3 种群遗传结构** 通过 Arlequin Ver 3.1(Excoffier 等,1992)分子变异分析 AMOVA (analysis of molecular variance)模块来估算遗传结构。基于 Kimura 2P 模型,计算种群间成对的遗传距离(FST)值。通过软件 MEGA 5.03 构建系统发生邻接树。

**1.4.4 种群历史动态分析** 以 Arlequin Ver 3.1(Excoffier 等,1992,2006)进行错配分析、Tajima's D(Tajima,1989)及 Fu's Fs(Fu,1997)中性检验。

## 2 结果与分析

**2.1 PCR 结果** 所有样品均扩增出 600 bp 左右的片段,目的条带清晰,说明结果可靠,可用于直接测序分析(图 1)。

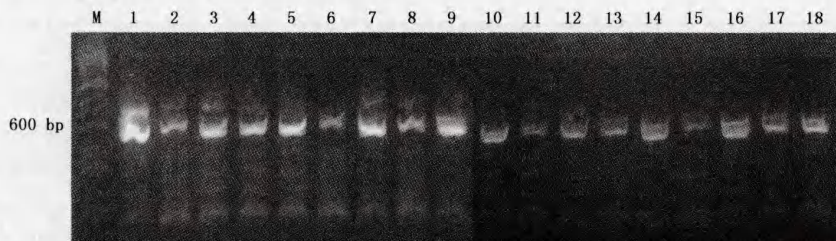


图 1 细胞色素 *b* 基因 PCR 扩增结果

注:M 为 DNA Marker;1~18 为样品。

**2.2 群体遗传多样性** 群体 *Cyt b* 基因的序列分析结果表明,测定的序列长度为 607 bp,其中 A、T、C、G 碱基组成比例为 15.35%、21.88%、36.01%和

26.77%,A+T 含量为 37.23%,C+G 含量为 62.78%,表现出明显的碱基组成偏倚性。5 个地理种群共发现 40 个单倍型和 32 个多态位点,单倍型

多样性指数为  $0.9932 \pm 0.0064$ , 核苷酸多样性指数为  $0.0113 \pm 0.0008$  (表 1)。另外, 5 个地理种群的

单倍型多样性指数基本相同, 而核苷酸多样性以大河的最高, 老厂的最低 (表 1)。

表 1 大河乌猪 5 个地理种群及群体的遗传多样性

多样性指数	地理种群					群体
	大河	营上	竹园	富村	老厂	
样本数	10	10	10	8	8	46
多态位点数	18	14	12	10	6	32
单倍型数	9	9	8	7	7	40
单倍型多样性	$0.9780 \pm 0.0540$	$0.9780 \pm 0.0540$	$0.9333 \pm 0.0773$	$0.9643 \pm 0.0772$	$0.9643 \pm 0.0772$	$0.9932 \pm 0.0064$
核苷酸多样性	$0.0113 \pm 0.0066$	$0.0088 \pm 0.0053$	$0.0075 \pm 0.0046$	$0.0058 \pm 0.0037$	$0.0033 \pm 0.0024$	$0.0113 \pm 0.0008$

2.3 群体遗传结构

2.3.1 分子变异分析 5 个地理种群的 AMOVA 分析结果显示, 种群间变异占总变异的 37.37%, 种群内的变异占总变异的 62.63% (表 2)。种群内的变异组分明高于种群间的变异组分, 即主要变异来源于种群内, 说明大河乌猪群体具有较低的遗传分化水平, 群体存在着不显著的遗传结构。

表 2 大河乌猪群体的分子变异分析

变异来源	自由度 df	方差总和	变异组分	变异比率
种群间	4	59.837	1.37872 Va	37.37
种群内	41	94.75	2.31098 Vb	62.63
总和	45	154.587	15.48408	100
固定指数	$F_{st} = 0.37367 (P < 0.05)$			

2.3.2 种群间遗传距离 5 个地理种群间成对的遗传距离位于 0.2634~0.4523 之间, 其中大河和老厂 2 个地理种群的遗传距离值最大, 为 0.4523; 而大河和营上 2 个地理种群间的遗传距离值最小, 为 0.2634 (表 3)。

表 3 大河乌猪 5 个种群间的遗传距离

	大河	营上	竹园	富村	老厂
大河	0				
营上	0.2634	0			
竹园	0.4208	0.3913	0		
富村	0.4397	0.2676	0.3533	0	
老厂	0.4523	0.3679	0.3318	0.3125	0

2.3.3 群体历史动态分析 大河乌猪 5 个种群及群体的中性检验结果见表 4。由表 4 可知, 大河乌猪 5 个不同种群的 Tajima's D 值分别为 0.33406、0.37644、-0.36975、-0.45791、-0.63262; Fu's Fs 值分别为 -2.24783、-3.36285、-2.60778、-2.81343、-4.53796。Tajima's D 值中大河和营上 2 个地理种群是正数, 竹园、富村和老厂 3 个地理种群是负数, 其 P 值均大于 0.05, 其统计检验不显著。5 个地理种群及群体的 Fu's Fs 值均为负数, 且 5 个种群及群体的统计检验均达到显著水平 ( $P < 0.05$ ), 说明群体遗传结构不稳定, 曾发生过群体数量扩张。

表 4 大河乌猪 5 个种群及群体的中性检验

中性检验参数	大河	营上	竹园	富村	老厂	群体
Tajima's D	0.33406	0.37664	-0.36975	-0.45791	-0.63262	-0.00206
Tajima's D 的 P 值	0.6683	0.6791	0.6791	0.3499	0.3019	0.53556
Fu's Fs	-2.24783	-3.36285	-2.60778	-2.81343	-4.53796	-3.11397
Fu's Fs 的 P 值	0.0109	0.0279	0.0448	0.0315	0.0007	0.04116

错配分布分析结果表明, 大河乌猪群体的错配分布曲线呈现单峰分布, 说明历史种群大小不稳定, 发生过种群扩张事件, 该结果与 Fu's Fs 检验的结果完全一致 (图 2)。

2.3.4 系统发生树 以邻接法 (NJ) 构建的系统发育树表明, 大河乌猪的 5 个地理种群可分为 3 个支系, 从进化的先后顺序排列为: 大河种群为最早分化的一支, 营上种群为第二支, 竹园、富村和老厂 3 个种群为最后分化的一支 (图 3)。

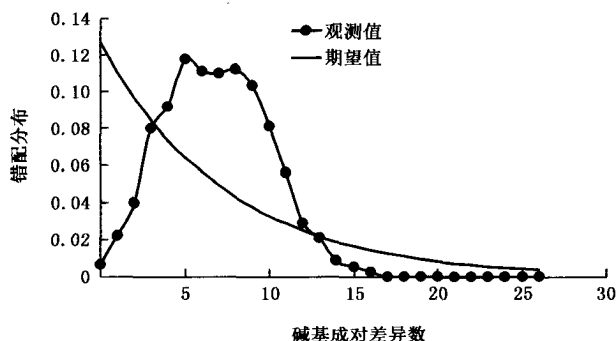


图 2 大河乌猪群体的错配分布图

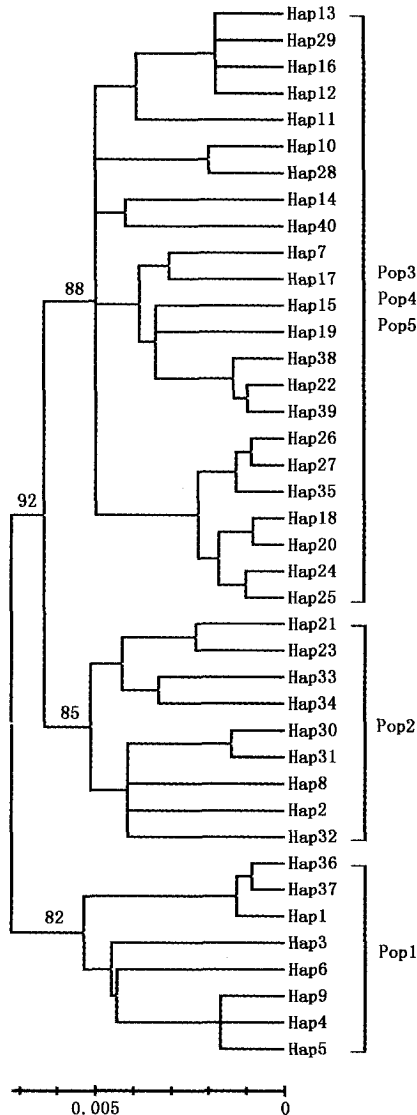


图3 大河乌猪5个种群的邻接树

### 3 讨论

遗传多样性是物种适应环境变化、维持生存与进化的遗传基础,在一定程度上决定了家畜在人为条件下对环境改变的适应能力(葛家春等,2011),而单倍型多样性和核苷酸多样性是研究群体遗传多样性的重要指标。本研究结果显示,大河乌猪群体的单倍型多样性为  $0.9932 \pm 0.0064$ ,而核苷酸多样性为  $0.0113 \pm 0.0008$ ,群体遗传多样性呈现出典型的单倍型多样性高、核苷酸多样性低的特点。这种“高单倍型多样性、低核苷酸多样性”的现象在其他物种中同样存在,其主要原因可能是一个较小的有效祖先种群经历了近期的种群数量扩张(胡玉婷等,2012)。通过 Tajima's D、Fu's Fs 检验及错配分析结果同样表明,大河乌猪群体存在明显的种群数量扩张动态(表4,图2),而这也正是该物种群体遗传

分化程度低,无显著遗传结构的重要佐证(表2)。另外,以邻接法(NJ)构建的 Cyt b 单倍型系统发育树表明,5个种群分化为3个支系,且进化的先后顺序为:大河的一支,营上一支,竹园、富村和老厂一支(图3)。大河乌猪种群分化为这3个支系的可能原因是,从大河乌猪的养殖历史看,大河乌猪首先是在大河镇集中养殖,而后向营上地区扩大养殖范围,最后扩繁至竹园、富村和老厂等区域,所以系统发育上呈现出大河和营上两分支的分化时间较第3支要早。

因此,造成大河乌猪群体遗传结构不稳定的重要原因是:①由于近些年人工扩大繁育,大河乌猪种群在较短的时间内快速繁育成一个大的群体,而在快速扩张过程中,产生出许多新的突变,虽然积累了单倍型的多样性,但缺少足够时间积累核苷酸序列的多样性。②由于人工繁育过程中引入外血缘,致使整个群体的遗传多样性降低,这种遗传多样性降低的现象在不少家养牲畜群体中都有发生(陈丙波等,2001)。这种遗传资源尤其是遗传多样性降低的现象,提醒地方猪种相关部门的管理者应当适度加强有效措施保护好地方猪种的品质资源,防止地方优良品种的退化。③由于5个地理种群间存在显著频繁的基因交流,种群间具有较高的遗传一致性和遗传相似度,既没有因为地理隔离而产生种群分化,也缺乏相对提高遗传多样度的有效措施,从而导致群体遗传变异水平较低和不稳定的种群结构(吴丰春等,2000;陈丙波等,2001;刘德武等,2002;赵晓枫等,2008;张林源等,2010)。

总之,猪种遗传资源的保护对中国乃至世界养猪业的持续发展、动物遗传资源的开发利用和保持良性的生态平衡具有重要意义。大河乌猪为国家级新品种,近年来不断扩大繁育。本研究对其遗传结构进行检测与分析,对于大河乌猪的保种选育和开发利用具有重要的指导意义,并有望为大河乌猪的分子遗传选育工作提供重要的科学依据和基础数据。尽管如此,本研究仅从 Cyt b 基因来研究大河乌猪群体的遗传结构还不够全面,今后应综合利用核内核外各种分子标记进行综合研究,得出更全面、客观的结论,切实制定出保护大河乌猪遗传资源的有效措施。

### 参 考 文 献

1 王继英,郭建凤,赵德云,等. 山东省猪种 mtDNA Cyt b 基因遗传多样性及系统进化研究[J]. 中国农业科学, 2009, 42(5): 1761~1767.

- 2 包振民,王明玲,李艳,等. 基于核基因组标记的群体遗传学研究中的数学分析方法[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2011, 41(11): 48~56.
- 3 皮晓波,连林生,司徒乐愉,等. 大河乌猪毛色固定遗传研究[J]. 养猪, 2006(6): 51~52.
- 4 司徒乐愉,吴安立,皮晓波,等. 大河乌猪肉质特性研究[J]. 养猪, 2004(5): 48~50.
- 5 刘德武,杨关福,李加琪,等. 用RAPD标记分析6个品种猪的群体遗传结构[J]. 畜牧兽医学报, 2002, 33(1): 18~22.
- 6 李祥,荣耀先,杨昌龙,等. 大河乌猪在不同饲养条件下的生产性能观测[J]. 养猪, 2004(3): 15~16.
- 7 陈丙波,周建华,魏泓,等. 西双版纳小耳猪群体遗传结构的RFLP分析[J]. 中国实验动物学报, 2001, 9(1): 15~19.
- 8 吴丰春,甘世祥. 贵州小型香猪群体遗传结构的RAPD分析[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(12): 1162~1165.
- 9 张林源,吴海龙,钟震宇,等. 北京麋鹿苑麋鹿种群的微卫星多态性及遗传结构分析[J]. 四川动物, 2010, 29(5): 505~508.
- 10 尚帮华,杨婷,连林生,等. 骨调素基因多态性及其与大河乌猪繁殖性状相关分析的研究[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2007, 22(6): 843~846.
- 11 赵晓枫,吴俊红,徐宁迎,等. 金华猪遗传结构及其与太湖猪遗传分化的研究[J]. 生物多样性, 2008, 16(4): 339~345.
- 12 胡玉婷,杨少荣,黎明政,等. 鄱阳湖及邻近水系银鲫的种群分化研究[J]. 四川动物, 2012, 31(5): 696~703.
- 13 黄勤华,刘若余. 利用mtDNA细胞色素b分析贵州山羊的系统发育[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(5): 129~132.
- 14 曹祥荣,束峰珏,张锡然,等. 毛冠鹿与3种鹿属动物的线粒体细胞色素b的系统进化分析[J]. 动物学报, 2002, 48(1): 44~49.
- 15 葛家春,许志强,李晓晖,等. 利用线粒体COI序列分析4水系中华绒螯蟹群体遗传学特征[J]. 中国水产科学, 2011, 18(1): 16~22.
- 16 Excoffier L, Smouse P E, Quattro J M, et al. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data[J]. Genetics, 1992, 131: 479~491.
- 17 Excoffier L, Laval G, Schneider S, et al. ARLEQUIN (version 3.1): An integrated software package for population genetics data analysis[J]. Evolutionary Bioinformatics Online, 2006, 1: 47~50.
- 18 Fu Y X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection[J]. Genetics, 1997, 147: 915~925.
- 19 Rozas J, Rozas R. DnaSP version 3: An integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis[J]. Bioinformatics, 1999, 15: 174~175.
- 20 Rozas J, Sanchez-Delbarrio J C, Messeguier X, et al. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods[J]. Bioinformatics, 2003, 19: 2496~2497.
- 21 Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism[J]. Genetics, 1989, 123: 585~595.
- 22 Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The Clustal\_X windows interface: Flexible strategies for multiple alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25: 4876~4882.

## Study on Genetic Structure of Dahe Black Pig Based on DNA Sequence Analyses of Cytochrome *b* Gene

TANG Li-zhou<sup>1</sup>, SHI Xiao-dong<sup>1</sup>, DING Wei<sup>1</sup>, YU Long<sup>1</sup>, WANG Jun-jie<sup>1</sup>,  
ZHU Lei<sup>1</sup>, GUO Song-chang<sup>2</sup>

(1. Yunnan-Guizhou Plateau Institute of Biodiversity, College of Biologic Resource and Environment Science, Qujing Normal University, Qujing 655011, China; 2. Key Laboratory of the Qinghai-Tibetan Plateau Ecosystem and Biological Evolution and Adaptation, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China)

**Abstract:** For revealing the level of genetic divergence and genetic structure of Dahe Black pig, this research was implemented using molecular biological methods that sequenced and analyzed the Cyt *b* DNA sequences based on 46 samples from 5 geographic populations of Qujing city. The AMOVA results showed that most of genetic variation (62.63%) distributed within populations. This could indicate fully that the whole population genetic structure of this species was not evident because of significant gene flow among different populations. The results of neutrality tests further validated that the instable population structure of this whole group could be affected by the population expansion from the artificial selective breeding and introduction breeding. This instable population structure or lower genetic differentiation could be induced by the large-scale introduction and expanding breeding. The significant gene flow induced the genetic convergence in various geographical populations eventually, population expanding and population genetic diversity declined significantly. This study was expected to provide important scientific basis and data for the molecular genetic breeding of Dahe Black pig and for the manager's effective measures to protect the genetic resources of Dahe Black pig.

**Key words:** Dahe Black pig; mitochondrion gene; cytochrome *b*; genetic diversity; genetic structure