

杨明, 温淑贤, 王青来, 等. 氟烷基因在皮特兰猪群体中的分子标记辅助选择研究[J]. 华南农业大学学报, 2018, 39(6): 1-4.

氟烷基因在皮特兰猪群体中的分子标记 辅助选择研究

杨 明¹, 温淑贤¹, 王青来¹, 刘珍云¹, 曾海玉¹, 吴珍芳^{1,2}, 蔡更元^{1,2}

(1 广东温氏食品集团股份有限公司/国家生猪种业工程技术研究中心, 广东 新兴 527439;

2 华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】探索氟烷基因 (*RYRI*) 在皮特兰猪群体中的辅助选择育种方法, 以提高猪群的猪肉质量。【方法】利用 PCR-RFLP 的方法检测 509 头皮特兰猪中 *RYRI* 基因的等位基因频率, 利用回归模型分析基因型与选育性状之间的相关性, 采用 Bootstrap 方法分析等位基因频率与选育性状的相关性。【结果】在皮特兰猪群体中 *RYRI* 基因优势等位基因 (N) 频率占 81.73%。NN 基因型个体在日增质量方面表现明显优势, 在背膘 EBV、父系指数及母系指数中 Nn 基因型个体表现较好, nn 基因型个体在肢蹄方面表现好于其他 2 种基因型。n 等位基因频率达 19% 时, 选育性状表现平衡; 大于 19% 时, 则瘦肉率较高, 背膘较薄, 体型较好; 小于 19% 时, 则生长速度较快。【结论】若皮特兰猪选育方向更注重瘦肉率、背膘厚、体型外貌等, 可不优化 *RYRI* 基因; 若是更注重生长速度、饲养抗应激、屠宰后肉质等方面的性状改良, 则建议全面纯化皮特兰猪群体至 *RYRI* 基因优势等位基因纯合。

关键词: 氟烷基因; 皮特兰猪; 分子标记辅助选择; 基因型; 等位基因频率
中图分类号: S813.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2018)06-0001-04

Marker-assisted selection of *RYRI* gene in Pietrain pig population

YANG Ming¹, WEN Shuxian¹, WANG Qinglai¹, LIU Zhenyun¹, ZENG Haiyu¹, WU Zhenfang^{1,2}, CAI Gengyuan^{1,2}
(1 Guangdong Wens Foodstuff Co., Ltd./National Engineering Research Center for Breeding Swine Industry, Xinxing 527439, China; 2 College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】To develop marker-assisted selection(MAS) technology of *RYRI* gene in breeding of Pietrain pig populations, and improve pork quality in pig populations. 【Method】PCR-RFLP assay was used to detect the allele frequency of *RYRI* gene in 509 Pietrain pigs. The correlation between genotype and phenotype was analyzed using regression model. The correlation between allele frequency and phenotype was analyzed using the Bootstrap method. 【Result】The predominant allele (N) frequency of *RYRI* gene was 81.73% in the Pietrain pig population. The pigs with NN genotype had better performance in daily gain, the pigs with Nn genotype were better in backfat EBV, maternal and paternal indexes, and the pigs with nn genotype were better in limb trait. Breeding performance was in balance when n allele frequency was 19%. When n allele frequency was above 19%, the pigs had higher lean meat content, thinner backfat, and better body shape. When n allele frequency was below 19%, the pigs had higher growth rate. 【Conclusion】When body shape, lean meat content, back fat thickness were more important goals for Pietrain pig breeding, it is suggested to increase n

收稿日期:2018-04-02 网络首发时间:2018-08-27 11:52:21
网络首发地址:<http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20180824.1426.002.html>
作者简介:杨 明 (1985—), 女, 博士, E-mail: 359311126@qq.com; 通信作者: 蔡更元 (1970—), 男, 研究员, 博士, E-mail: cgy0415@163.com
基金项目: 广东省应用型科技研发专项资金项目 (2015B020231010); 广东省“扬帆计划”引进创新创业团队项目 (2016YT03H062)

allele frequency in the population. When growth rate, anti-stress, and meat quality after slaughter are more important goals for breeding, it is suggested to purify the predominant allele (N) of *RYR1* gene in the population.

Key words: *RYR1* gene; Pietrain pig; marker assisted selection; genotype; allele frequency

猪应激综合症是指猪在遭受多种不良因素的刺激后,引发的非特异应激反应,如猪在运输、高热、转群、争斗以及饥饿条件下,可能会出现死亡现象,或者屠宰后猪肉苍白、柔软,渗水等,从而影响猪肉品质,给养猪业带来巨大经济损失。前人研究发现,猪 6 号染色体上的兰尼定受体基因 (*Ryanodine receptor 1*, *RYR1*) 的 cDNA 第 1 843 号核苷酸由胞嘧啶 (C) 突变为胸腺嘧啶 (T),导致第 615 位精氨酸变为胱氨酸,从而引起其结构和功能的改变,致使发生猪恶性高温综合症 (Malignant hyperthermia syndrom, MHS)^[1-2]。*RYR1* 是第 1 个被鉴别的影响家猪重要经济性状的主效基因,也称为氟烷基基因。应激敏感个体 (基因型为 nn) 易在高温、长途运输、鞭打等应激条件下, Ca^{2+} 迅速大量非正常释放,引起肌肉持续收缩,从而导致猪应激综合症的发生,产生灰白肉 (PSE 肉)^[3-4]。自该基因被鉴别以来,许多学者对其深入研究,建立了成熟快捷的 PCR-RFLP 和 PCR-SSCP 基因检测方法^[2,5-6],全球育种人员利用此基因开展分子育种工作,在种猪核心群中快速、准确地剔除应激不利等位基因携带者 (Nn/nn),建立抗应激的专门化品系。但是在选育过程中,有些学者发现了氟烷基基因 nn 型虽然致使猪发生应激,导致肉质变差,但是 nn 型的猪生长性能好、日增质量高、杂合子瘦肉率高^[7-9],这使得育种专家在应用氟烷基基因选育时产生矛盾心理,没有准确的标准来衡量氟烷基基因的改良程度。针对这一问题,温氏集团通过群体基因频率分析、基因型与性状相关分析以及基因频率与性状的相关分析等,结合育种目标综合评估后,制定了适宜、高效的氟烷基基因分子标记辅助选择方案,培育了与育种目标相符合的抗应激皮特兰品系。

1 材料与方法

1.1 试验时间与地点

本试验于 2013 年 6 月至 2017 年 12 月在广东温氏食品集团股份有限公司国家生猪种业工程技术研究中心完成。

1.2 试验材料

试验动物来自广东温氏食品集团股份有限公

司国家生猪种业工程技术研究中心研发基地清远一区原种场皮特兰核心群体。试验样本为 509 头皮特兰种猪核心群个体。

试验样品处理方法是利用耳号钳剪取已经利用体积分数为 75% 的乙醇溶液消毒过耳尖的待检猪只耳样 2~3 g,放入 1.5 mL 装有体积分数为 75% 的乙醇溶液的离心管内, -80 ℃ 条件下保存。

1.3 基因型判型

利用 *Hha* I PCR-RFLP 法^[1]检测 *RYR1* 基因 cDNA 第 1 843 个碱基 C>T 突变位点的基因型。

1.4 表型测定

表型测定方法依据广东省种猪测定中心测定标准执行^[10]。

1.5 统计方法

通过 R 软件分析生长性状表型与基因型之间的关联性,回归模型为: $y=\mu+Z\alpha+e$ 。其中, y 为所测得的表型值向量, μ 为总体平均值向量, Z 为基因型的指示矩阵, α 为 SNP 加性效应值, e 为残差向量。

采用 Bootstrap 方法,随机抽取 160 个个体数据,重复 1 000 次,获得 1 000 个 n 基因频率且与之对应的平均生产性能表型,开展 n 基因频率与生产性状表型相关分析。采用 R 软件的 TukeyHSD 函数对方差分析显著的性状进行多重检验。

2 结果与分析

2.1 氟烷基基因型频率和等位基因频率

509 头温氏核心群皮特兰猪中,氟烷基基因的 NN、Nn 和 nn 基因型数量分别为 326、180 和 3 头,基因型频率分别占 64.05%、35.36% 和 0.59%。氟烷基基因优势等位基因 (N) 频率占 81.73%, n 基因频率占 18.27%。

2.2 氟烷基基因型与皮特兰猪生长性状相关分析

氟烷基基因与生长性状相关分析如表 1 所示。氟烷基基因在皮特兰群体中与背膘 EBV 极显著相关,与肢蹄评分、日增质量、母系指数、父系指数等表型极显著或显著相关,与其他性状不相关。NN 型个体在生产性能日增质量方面表现明显优势,在背膘 EBV、父系指数及母系指数中 Nn 型个体表现较好,但是 nn 型个体在肢蹄评分方面表现略好于其他 2 种基因型,但差异不显著。

表 1 氟烷基基因型对皮特兰猪生长性状的关系¹⁾

Table 1 The relationship between *RYR1* genotype and growth performance in Pietrain pigs

表型	NN型	Nn型	nn型	P
背膘EBV	-0.26±0.58a	-0.45±0.51b	-0.28±0.32ab	0.007 2***
肢蹄评分	7.45±0.76ab	7.66±0.72a	8.25±0.35a	0.017 3**
校正30~100 kg日增质量/g	846.28±80.33a	833.50±76.53a	703.23±100.57b	0.018 8**
母系指数	113.66±16.14a	117.01±15.71a	97.77±6.96a	0.031 2*
父系指数	113.66±16.14a	117.01±15.71a	97.77±6.96a	0.031 2*
体高/cm	56.86±3.15a	57.59±3.10a	60.00±0.00a	0.055 8
校正100 kg背膘厚/mm	11.18±1.32a	10.88±1.40a	10.07±0.33a	0.087 9
校正100 kg体质量日龄	156.61±8.83a	157.12±8.72a	169.66±9.61a	0.106 0
出生质量/kg	1.64±0.32a	1.67±0.34a	1.90±0.27a	0.340 0
体长/cm	111.54±3.77a	112.03±3.84a	113.00±0.00a	0.465 0
校正100 kg瘦肉率/%	67.58±1.81a	67.63±1.94a	68.15±0.78a	0.886 0

1)表中数据为平均值±标准差;“*”、“**”和“***”分别表示在0.05、0.01和0.001的水平显著相关;同行数据后凡具有一个相同小写字母者,表示不同基因型间差异不显著($P>0.05$, Tukey法)

2.3 氟烷等位基因频率与皮特兰生长性状相关分析

皮特兰作为终端父系猪种,将其瘦肉率、日增质量、背膘厚以及父系指数作为最终评估指标,分别与氟烷基因 n 等位基因频率进行相关性分析,如图 1

所示, n 等位基因频率对不同的性状产生不同的影响,群体氟烷 n 基因频率越高瘦肉率越高,父系指数越高,背膘厚越薄,所以日增质量随着氟烷 n 基因频率越高而越低。而在群体氟烷 n 基因频率达 19% 时,各性状相关性达到平衡。

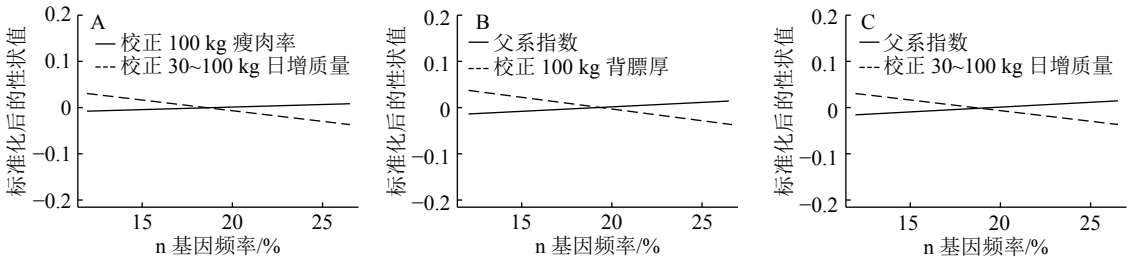


图 1 皮特兰猪群体氟烷等位基因频率与生产性状的相关性

Fig. 1 The relationship between *RYR1* allele frequency and production trait in Pietrain pig population

3 讨论与结论

现今,大多数关于氟烷基基因的辅助选择研究没有考虑到企业实际操作,尤其是完全纯化的方案没有考虑国内的市场主要是活猪市场这一现状以及大量种猪选择淘汰对企业效益的影响,可操作性不强,没有建立较为实用的分子育种方案。温氏集团通过多年的氟烷基基因辅助选择工作,发现皮特兰群体中氟烷基基因 n 等位基因频率与其体型外貌呈负相关, nn 型个体背膘更薄,这与刘显军等^[11]的研究结果一致。 n 等位基因频率越高,猪的日增质量越低,与徐晓波等^[12]的研究结果一致。

另外,根据分子标记的特性等不同的分子标记需要建立不同的分子选育方法,如在同样的皮特兰

<http://xuebao.scau.edu.cn>

群体中,抗断奶前仔猪腹泻基因 *MUC13* 的分子标记辅助选择方案制定,其优势等位基因在群体中的频率非常低,有利基因型与体高、头型评分、肢蹄评分等体型外貌性状呈极显著负相关,仅与校正 100 kg 瘦肉率生产性状呈正相关。根据目前市场需求分析制定的皮特兰选育方案中,体型外貌为重点选育方向。综合考虑,在同样的皮特兰群体中暂不开展 *MUC13* 的分子标记辅助选择^[13]。而本研究方案制定的原理与其类似,但是分析方面不同,因为很多研究学者研究发现氟烷基基因对不同经济性性状的影响差异较大^[12, 14-17],完全的优化可能造成部分经济性性状的衰退,不优化在应激死亡和肉质方面经济损失非常大,建议合理利用,但是目前还没有学者给出具体的可行性方案。针对这一问题,本研究通过

分析群体的基因频率与经济性状的相关性,结合市场需求给出皮特兰氟烷基基因分子标记辅助选育可行方案。如:针对体型外貌作为现有中国市场重要选择标准的这一现状,显然,氟烷基基因在皮特兰群体中不适宜完全纯化,但是若是 n 频率过高,种猪应激反应灵敏,且影响肉质,综合考虑,应该确保将 n 频率控制在一定范围。通过本研究分析结果可以得出以下结论:温氏皮特兰群体中的氟烷基基因分子标记辅助选择育种,若侧重考虑生长速度(日增质量与校正 100 kg 体质量日龄)等性状,则完全纯化较好。若是较为注重体型外貌和瘦肉率等性状,则不需对群体进行氟烷基基因纯化, nn 型个体优势明显。若是想兼顾日增质量和瘦肉率等性状,在温氏皮特兰群体中需要将现有群体氟烷基基因频率控制在 19% 左右较为合适。现有市场调查分析发现,商品猪买家偏重考虑体型、肌肉丰满度等方面,但是日增质量也是重要经济主选性状。针对此种情况,暂定实时监控皮特兰核心群体的氟烷基基因频率情况,使核心群频率控制在 19% 左右即可。其他育种公司,可根据本研究的分析方法,制定符合自我育种目标的氟烷基基因分子标记辅助选择方案。

参考文献:

- [1] FUJII J, OTSU K, ZORZATO F, et al. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia[J]. *Science*, 1991, 253(5018): 448-451.
- [2] VÖGELI P, BOLT R, FRIES R, et al. Co-segregation of the malignant hyperthermia and the Arg615-Cys615 mutation in the skeletal muscle calcium release channel protein in five European Landrace and Pietrain pig breeds[J]. *Anim Genet*, 1994, 25(Suppl 1): 59-66.
- [3] SMITH C, BAMPTON P R. Inheritance of reaction to halothane anaesthesia in pigs[J]. *Genet Res*, 1977, 29(3): 287-292.
- [4] CHEAH K S, CHEAH A M, CROSLAND A R, et al. Relationship between Ca^{2+} release, sarcoplasmic Ca^{2+} , glycolysis and meat quality in halothane-sensitive and halothane-insensitive pigs[J]. *Meat Sci*, 1984, 10(2): 117-130.
- [5] NAKAJIMA E, MATSUMOTO T, YAMADA R, et al. Technical note: Use of a PCR-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) for detection of a point mutation in the swine ryanodine receptor (*RYR1*) gene[J]. *J Anim Sci*, 1996, 74(12): 2904-2906.
- [6] 付言峰, 李京励, 林皓. 猪氟烷基基因的 RFLP 技术检测及其对繁殖性能的影响[J]. *家畜生态学报*, 2010, 31(5): 13-16.
- [7] GARDEN A E, HILL W G, WEBB A J. The effects of halothane susceptibility on some economically important traits in pigs 1. Litter productivity[J]. *Anim Sci*, 1985, 40(2): 351-358.
- [8] POMMIER S A, HOUDE A. Effect of the genotype for malignant hyperthermia as determined by a restriction endonuclease assay on the quality characteristics of commercial pork loin[J]. *J Anim Sci*, 1993, 71(2): 420-425.
- [9] 李林祥, 官继承, 李倩. 氟烷基基因对猪生产性能和肉质质量的影响[J]. *饲料研究*, 2012(11): 12-13.
- [10] 刘望宏, 倪德斌, 胡军勇. 种猪性能测定的关键技术与应用[J]. *养殖与饲料*, 2014(9): 1-5.
- [11] 刘显军, 陈静, 边连全, 等. 氟烷基基因对猪胴体性能的影响[J]. *江苏农业学报*, 2010, 26(1): 217-218.
- [12] 徐晓波, 葛云山, 刘铁铮, 等. D1、SJ 系猪氟烷基基因的检测及不同基因型产肉性能间的差异[J]. *上海农业学报*, 1998, 14(2): 7-10.
- [13] 杨明, 王青来, 刘敬顺, 等. *MUC13*、*FUT1* 基因在 2 个种猪核心群的分子标记辅助选择研究[J]. *华南农业大学学报*, 2015, 36(6): 1-8.
- [14] 蒋思文, 邓昌彦, 熊远著, 等. 猪氟烷基基因与猪生产性状关系的初步研究[J]. *华中农业大学学报*, 1995, 14(4): 374-376.
- [15] 张建军. 氟烷基基因对猪生产经济性性状的影响[J]. *福建畜牧兽医*, 2016, 38(1): 17-19.
- [16] SIMPSON S P, WEBB A J, WILMUT I. Performance of British Landrace pigs selected for high and low incidence of halothane sensitivity[J]. *Anim Sci*, 1986, 43(3): 493-503.
- [17] 邓雯, 庞有志, 马彦博, 等. 猪氟烷基基因的研究进展[J]. *家畜生态*, 2004, 25(4): 156-160.

【责任编辑 庄 延】