

杨明, 李娅兰, 王青来, 等. 分子标记技术及其在种猪选育中的应用[J]. 华南农业大学学报, 2019, 40(S): 127-131.

YANG Ming, LI Yalan, WANG Qinglai, et al. Molecular marker technology and application in pig breeding[J]. Journal of South China Agricultural University, 2019, 40(S): 127-131

# 分子标记技术及其在种猪选育中的应用

杨 明<sup>1</sup>, 李娅兰<sup>1</sup>, 王青来<sup>1</sup>, 刘敬顺<sup>1</sup>, 刘珍云<sup>1</sup>, 罗旭芳<sup>1</sup>, 吴珍芳<sup>1, 2</sup>, 蔡更元<sup>1, 2</sup>

(1 广东温氏种猪科技有限公司, 广东 新兴 527400;

2 国家生猪种业工程技术研究中心/华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642)

**摘要:**本文旨在探索分子标记在种猪育种中的应用方法。本文对影响猪重要经济性状的主效基因及因果突变位点研究的进展进行综述,并对可应用分子标记进行分类,追踪了部分分子标记辅助育种在温氏集团的应用效果,归纳了分子标记在种猪选育中的应用方法。为同行在猪育种中应用分子标记辅助选择技术提供参考。

**关键词:**分子标记技术;种猪;育种;应用

## Molecular marker technology and application in pig breeding

YANG Ming<sup>1</sup>, LI Yalan<sup>1</sup>, WANG Qinglai<sup>1</sup>, LIU Jingshun<sup>1</sup>, LIU Zhenyun<sup>1</sup>,  
LUO Xufang<sup>1</sup>, WU Zhenfang<sup>1, 2</sup>, CAI Gengyuan<sup>1, 2</sup>

(1 Guangdong Wens Pig Breeding Technology Co., Ltd., Xinxing 527400, China; 2 National Engineering Research Center for Breeding Swine Industry/College of Animal Science, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** To explore the application methods of molecular markers in pig breeding, we reviewed the research progress of major effect genes and causal mutation sites for important economic traits, classified the available molecular markers and tracked the application effect of some molecular markers assisted breeding in Wens Group. The application methods of molecular markers in pig breeding were summarized. Molecular marker assisted selection would be widely used in pig breeding.

**Key words:** molecular marker technology; breeding pig; breeding; application

随着数量遗传学和计算机技术的高速发展,猪的育种逐渐系统化、科学化。目前采用的BLUP方法是通过对种猪重要经济性状的表型进行剖析,估算其育种值。该方法可以利用系谱信息和亲缘个体的表型信息对种猪个体进行更加准确的遗传评定,使猪的一些经济性状的遗传改良取得了很大的进展,如日增重和背膘厚。但是BLUP法仍有不足之处,即对于一些限性性状、低遗传力性状以及难以测量的性状,遗传改良进展缓慢、育种效率较低<sup>[1-2]</sup>。随着分子遗传学和分子生物技术的飞速发展,猪的

全基因组测序已经顺利完成,加快了影响畜禽经济性状的主效基因以及因果突变位点的鉴别,使DNA分子标记应用成为一种高效、快捷的育种新方法,此方法称为标记辅助选择(Marker-assisted selection, MAS)<sup>[1-4]</sup>。本文综述近年来种猪相关分子标记的研究和应用进展,并对当前存在问题及未来发展趋势作出讨论,供同行参考。

## 1 分子标记技术概况

随着基因组测序完成以及分子生物学技术的发

收稿日期:2019-08-18

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“扬帆计划”引进创新创业团队项目(2016YT03H062);广州国家现代农业产业技术创新中心创建项目(2018kczx01)

展,人们发现了不同类型的基因组变异,如微卫星(Simple sequence repeats, SSR)、单核苷酸多态(Single nucleotide polymorphisms, SNP)、多碱基的插入/缺失突变(Insertion/Deletion)、拷贝数的变异(Copy number variations, CNVs)等。不同类型的变异检测手段不同,如利用荧光标记的方法检测微卫星,通过酶切或者 SnaPshot 等方法对单核苷酸多态进行判型,而多碱基的插入和缺失突变则可以直接通过 PCR - 琼脂糖凝胶电泳分型,但是对于拷贝数的变异到目前为止还没有一种有效的技术手段可以对其精确的检测分型。这些分子技术的应用,可以大规模检测影响畜禽育种中目标性状的 DNA 分子标记,提高种畜群体中有利等位基因频率,加快遗传改良。

## 2 影响猪重要经济性状的主效基因和 QTL

影响猪经济性状的主效基因和因果突变位点的鉴别是分子育种新技术开展和应用的前提,做到这一点首先需要在全基因组范围内定位到影响这些经济性状的遗传位点(Quantitative trait loci, QTL)。到目前为止,在国际动物基因组数据库中已经报道了与家猪 626 个表型相关的 QTLs 16 516 个(<http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/SS/index>)。21 世纪以来,分子遗传学家们通过深入研究,发现了具有重大应用价值的主效基因及因果突变位点,以及一些和主效基因紧密连锁的分子标记。目前,已经鉴别的影响猪经济性状的主效基因见表 1,其中,部分标记已得到成功验证和应用。

表 1 影响猪重要经济性状的主效基因

基因	性状	适用猪种
兰定尼受体( <i>RYR1</i> )	恶性高温综合症	所有品种
酸肉基因( <i>PRKAG3</i> )	pH/肉色	汉普夏
GP 基因( <i>PHKG1</i> )	糖原醇解潜能	杜洛克
类胰岛素生长样因子 2( <i>IGF2</i> )	肌肉生长和脂肪沉积	杜洛克、大白等
黑皮质激素受体 4( <i>MC4R</i> )	背膘厚/日增重	所有品种
核受体亚家族 6, 组 A, 成员 1( <i>NR6A1</i> )	决定猪的脊椎数, 影响猪体长	合成系
<i>vertnin</i> 蛋白( <i>VRTN</i> )	决定猪的脊椎数, 影响猪体长	所有品种
岩藻糖基转移酶( <i>FUT1</i> )	大肠杆菌 F18 侵染的抗性	所有品种
黏蛋白 13( <i>MUC13</i> )	大肠杆菌 F4ac 侵染的抗性	所有品种
精子鞭毛 2( <i>KPL2</i> )	精子短尾不育症	所有品种

### 2.1 生长胴体性状

目前,已经有多个影响猪生长胴体性状的主效基因及因果突变位点被鉴别,并且部分已经应用于分子育种当中,如类胰岛素生长因子 2(Insulin-like growth factor 2, *IGF2*)基因是影响肌肉生长速度和日增重的主效基因,它的突变可刺激肌肉中 *IGF2* 的表达量提高 3 倍,促使肌肉生长,提高眼肌面积,提高胴体瘦肉率和降低背膘厚等<sup>[5]</sup>。温氏集团对 321 个样本进行了 *IGF2*-IN3-G3072A 位点分型检测,其中包括皮杜 HN213 公猪 311 头、优秀皮特兰 HN111 公猪 10 头。检测结果发现,HN213 仅有 4 头杂合子,其余全是 AA 型,HN111 全为 AA 型,说明该基因在群体中基本纯合。黑皮质激素受体(Melanocortin receptor 4, *MC4R*)是采食量和能量平衡通路中重要的参与因子,其一个错义突变 g. 893 G > A 是影响猪背膘厚及日增重的因果突变<sup>[6]</sup>。2007 年, Mirkawa 等<sup>[7]</sup>发现 *NR6A1* 基因 c. 134 G > A 位点是导致 1 号染色体上猪脊椎数(主要是胸椎数)变异的

因果突变位点,有利基因型可使猪的脊椎数量增加 1 根,它的有利基因型在杜洛克、长白、大白等纯种商业猪种中基本已经固定,但是在合成系中等位基因情况不同,可以用于分子育种。这个结果已经被江西农业大学动物生物技术重点实验室证实。随后,江西农业大学动物生物技术重点实验室发现猪 7 号染色体影响脊椎数的主效基因为 *VNTR*,并已经鉴别到因果突变位点,影响猪的脊椎数 1 根<sup>[8-9]</sup>。

### 2.2 繁殖性状

繁殖性状一般指产仔数,但是公猪的精液品质也属于繁殖性状。2006 年, Sironen 等<sup>[10]</sup>研究发现 *KPL2* 基因是产生精子短尾并直接导致公猪不育的常染色体隐性疾病的因果基因。这是目前繁殖性状中仅有的一个主效基因的因果突变,而其他的分子标记均是与影响繁殖性状中母猪产仔数性状的主效基因紧密连锁的分子标记,如 Rothschild 等<sup>[11]</sup>发现的雌激素受体基因(Estrogen receptor, *EsR*)标记,赵要风等<sup>[12]</sup>发现的促卵泡素 β 亚基基因(*FSH-β*)标

记,施启顺<sup>[13]</sup>发现的催乳素受体基因(*PRLR*)以及核受体辅激活蛋白1基因(*NCOA1*)等。温氏集团在专门化品系选育过程中,根据品系特点分别利用了这些非因果突变位点的标记进行辅助选择,在一定程度上改良了种猪的繁殖性状。

### 2.3 肉质性状

影响猪肉质性状的主效基因有4个,且因果突变位点已经鉴别,可以完全应用于育种实践中。首先,兰呢啶受体基因(Ryanodine receptor, *RYRI*)和酸肉基因(*PRKAG3*)是已经证实的影响猪肉质性状的主效基因。*RYRI*是使猪产生应激综合征(PSS),形成PSE肉的主效基因<sup>[14]</sup>。多年来,温氏集团对全部参与测定的父亲种猪个体进行采样检测,纯隐性公母猪全部淘汰处理,杂合子公猪在不影响群体血源数的情况下可少量纯繁;后备猪选留时隐性纯合子(nn)不得选留,杂合子母猪(Nn)不进行纯繁,很优秀的杂合子公猪(Nn)因血缘关系限制纯繁窝数在10窝以内;通过这一系列的措施已经控制氟烷敏感基因在群体中的分布频率低于10%以下。单磷酸腺苷激活性蛋白激酶γ亚基基因(Protein kinase adenosine monophosphate-activated γ 3-subunit, *PRKAG3*)是导致汉普夏猪酸肉效应的根本原因<sup>[15]</sup>。这2个基因中氟烷基因已经应用于国内外育种实践中,并且已经取得了显著的效果;酸肉基因仅限于汉普夏猪。最近,江西农业大学动物生物技术重点实验室发现了影响西方商业猪种杜洛克、长白、大白等糖原酵解潜能(Glycolytic potential, GP)的主效基因*PHKG1*及因果突变位点和影响猪肌肉中饱和脂肪酸C18:0含量的主效基因。*PHKG1*是除汉普夏外其他猪种中酸肉效应的主效基因,而C18:0基因是所有猪种的肌肉中饱和脂肪酸C18:0含量的主效基因<sup>[16]</sup>。此外,脂肪酸结合蛋白基因(Fatty acid binding proteins, *PABPs*)、激素敏感脂肪酶基因(Hormone sensitive lipase, *HSL*)、脂蛋白脂肪酶基因(Lipoprotein lipase, *LPL*)等均存在与主效基因连锁的分子标记位点,这些研究为肉质性状育种的分子标记研究提供了很好的方向<sup>[17]</sup>。

### 2.4 抗病性状

猪的抗病育种研究较少,目前发现的主效基因仅有*FUT1*和*MUC13*这2个基因,这2个基因都与仔猪腹泻有关。*FUT1*是瑞士科学家Vogeli发现的大肠埃希菌*Escherichia coli* F18ab受体的主效基因,该基因c.307位点的G/A突变只是蛋白丧失功能,不能与大肠埃希菌F18ab结合而使断奶仔猪产生抗性<sup>[18-19]</sup>。江西农业大学动物生物技术重点实验室

经过7年多的研究,发现并鉴别了影响新生仔猪腹泻的大肠埃希菌K88F4ac的受体基因*MUC13*,其标记位点G等位基因为抗性有利基因,A等位基因为易感不利基因<sup>[20]</sup>。温氏集团对290头杜洛克猪群也进行了检测。相比之下,*MUC13*的有利等位基因在杜洛克猪中比较高,在短期内育成抗病配套系的可能性很大,而*FUT1*基因在猪只中有利等位基因频率太低,很难实现其有利基因的筛选。其他一些抗病基因如猪白细胞表面抗原基因(*SLA*)等也进行了部分研究。

## 3 分子标记辅助选择的方法及策略

Meuwissen等<sup>[21]</sup>研究表明,利用分子标记辅助选择育种可以提高猪的日增重,繁殖性能的遗传改良效率8%~38%,胴体性状高达64%。对于分子标记辅助选择改良猪的不同经济性状的方法和策略研究,育种学家们提出了不少有效的方法。

### 3.1 单基因标记辅助选择

单基因标记辅助选择是直接对已经鉴别的某一主效基因的基因型进行选择,培育出此主效基因调控性状的专门化品系。如PIC公司对*FUT1*标记辅助选择的应用,培育出了抗断奶仔猪腹泻品系。PIC公司也曾对*ESR*进行了标记辅助选择,使产仔数的遗传进展提高了30%。温氏集团对*VRTN*、*RYRI*和*MUC13*等基因进行了分子标记辅助选择,培育出了多肋骨长白新品系、抗应激皮特兰新品系以及抗腹泻杜洛克新品系。

目前看来,单基因标记辅助选择仅是大大地加快了猪某一方面经济性状的进展,不符合当前对综合性能的要求。

### 3.2 多基因聚合育种

多基因聚合育种是指对一个群体同时进行多个基因的选育,这是分子育种的一种较为理想的方法。多个基因在世代传递过程中,由于受共同选择、连锁及有效群体数较小等因素影响,导致这些基因出现连锁不平衡。如果选择的多个基因有利等位基因之间存在较强的连锁不平衡,就可能实现在短时间内对一个群体内的多基因聚合育种。但如果一个基因的有利等位基因和其他基因的不利等位基因存在较强的连锁不平衡,就会给多基因聚合育种带来困难,出现顾此失彼的难解之局。1997年,Meijerink等<sup>[22]</sup>发现同在猪6号染色体上的*FUT1*和*RYRI*在瑞士猪群中两者的重组率小于0.04,瑞士长白猪中*FUT1*抗性等位基因(*FUT1<sup>A</sup>*)与*RYRI*的应激易感位点(*RYRI<sup>"</sup>*)处于强连锁不平衡状态,很难同时对2

个基因的有利等位基因进行选育。2008 年, Coddens 等<sup>[23]</sup>的研究发现, 比利时猪群中这 2 个位点不存在显著的连锁不平衡关系。由此可以看出, Meijerink 等<sup>[22]</sup>的研究结果很可能是由于瑞士猪群的特异性以及有效群体较小等原因导致的。最近, 江西农业大学动物生物重点实验室的研究发现, *MUC13* 和 *RYR1* 之间不存在连锁不平衡关系, 可以用于聚合育种<sup>[24]</sup>。温氏集团在杜洛克品系中对 *VRTN*、*RYR1* 和 *MUC13* 这 3 个基因开展了基因聚合育种, 已经在 S22 品系中将 *RYR1* 和 *MUC13* 基因同时优化, 使 S22 杜洛克同时抗应激和抗腹泻。在 S21 品系中将 *VRTN* 和 *RYR1* 同时优化, 使得 S21 杜洛克在具有抗应激特点的基础上增加群体的肋骨数。

在应用多基因聚合育种时, 育种公司需要在参考群体中对选择的多个基因的基因位点进行连锁不平衡分析, 对连锁程度不高的位点或者有利等位基因连锁不平衡程度较高的几个基因进行多基因聚合育种, 以便加快种猪的遗传改良。

### 3.3 基因组选择

随着高通量分型技术和基因组研究的发展, 2001 年 Meuwissen<sup>[25]</sup> 提出一种新的分子育种方法——全基因组选择法。全基因组选择是利用全基因组范围的标记辅助选择, 通过全基因组中大量的标记信息估计出不同染色体片段的育种值, 进而估计出个体全基因组范围的育种值, 以此为依据进行选择。猪的经济性状大部分是数量性状, 而单个基因所能解释的性状遗传效应有限, 与标记辅助育种或多基因聚合育种技术相比较, 基因组选择因其基于全基因组范围的遗传效应, 逐渐成为育种公司重视的一种全新的育种技术。现在已经有多个国际育种公司进行了这方面的研究, 如 PIC 公司及荷兰海波尔公司等。2011 年, 温氏集团在杜洛克核心育种群中也开展了基因组选择研究, 目前已经进入全面应用阶段。

以上这些分子育种的方法可以根据市场的需求以及育种公司的条件进行开展, 并可以通过不同的实施策略和传统的育种方法结合起来, 使其更可靠、高效地推动遗传改良的进度。例如可以同时利用分子的基因型和表型或估计的育种值进行种猪的选留, 或者先通过分子基因型选择再根据其表型和育种估计值的顺序选择法进行选育等。

## 4 结论

分子育种虽然被公认为是提高育种效率的一种有效手段, 但是由于鉴别到的影响目标性状的因果

突变标记较少, 多数为与因果突变位点连锁程度不一的分子标记, 这些与因果突变非紧密连锁的标记产生的效应较低, 不足以快速对畜禽品种进行遗传改良, 因此, 分子标记在育种中的应用, 还存在着许多需要解决的问题。首先, 分子标记的效应问题, 目前已经鉴别和证实的影响猪经济性状的主效基因及因果突变有限, 且有些主效基因的有利等位基因频率太低, 对种猪的选留难度很大; 其次, 在育种实践过程中, 分子育种实施方案的执行力度不够, 对于应该淘汰的个体仍然选留, 致使群体中不利等位基因频率得不到有效降低, 从而影响分子育种的遗传改良效果。

分子标记辅助选择方法已经在国外猪育种发达国家或育种公司广泛应用, 国内的温氏集团已经将分子标记育种作为常规育种技术应用于种猪育种中。其他一些育种公司也开始了这方面的研究应用, 尤其是全基因组选择已经受到越来越多较大的育种公司重视, 当然也有其他育种技术的涌现, 如转基因育种技术也是我国近年来的研究热点。未来, 随着分子生物技术的不断快速发展, 分子标记辅助选择以及转基因育种技术将在猪的育种实践中得到广泛应用。

### 参考文献:

- [1] LANDE R, THOMPSON R. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits [J]. Genetics, 1990, 124:743-756.
- [2] MEUWISSEN T H E. Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing[J]. J Dairy Sci, 1992, 75:1651-1659.
- [3] 鲁绍雄, 吴常信. 动物遗传标记辅助选择研究及其应用[J]. 遗传, 2002, 24(3):359-362.
- [4] 刘鹏渊, 朱军. 标记辅助选择改良数量性状的研究进展[J]. 遗传, 2001, 23(4):375-380.
- [5] VAN LAERE A S, NGUYEN M, BRAUNSCHWEIG M, et al. A regulatory mutation in IGF2 causes a major QTL effect on muscle growth in the pig[J]. Nature, 2003, 425:832-836.
- [6] KIM KS, LARSEN N, SHORT T, et al. A missense variant of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene is associated with fatness, growth, and feed intake traits [J]. Mamm Genome, 2000, 11(2):131-135.
- [7] MIKAWA S, MOROZUMI T, SHIMANUKI S-L, et al. Fine mapping of a swine quantitative trait locus for number of vertebrae and analysis of an orphan nuclear receptor, germ cell nuclear factor (NR6A1) [J]. Genome Res, 2007, 17(5):586 - 593.

- [8] FAN Y, XING Y, ZHANG Z, et al. A further look at porcine chromosome 7 reveals VRTN variants associated with vertebral number in Chinese and Western pigs [J]. PLoS One, 2013, 8(4):e62534.
- [9] YANG J, HUANG L, YANG M, et al. Possible introgression of the VRTN mutation increasing vertebral number, carcass length and teat number from Chinese pigs into European pigs [J]. Sci Rep, 2016, 19(6):19240.
- [10] SIRONEN A, THOMSEN B, ANDERSSON M, et al. An intronic insertion in KPL2 results in aberrant splicing and causes the immotile short-tail sperm defect in the pig [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(13):5006-5011.
- [11] ROTHSCILD M F. The estrogen receptor locus is associated with a major gene influencing litter size in pigs [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93:201-205.
- [12] 赵要风,李宁,肖璐,等.猪FSH $\beta$ 亚基因结构区逆转座子插入突变及其与猪产仔数关系的研究[J].中国科学(C辑),1999,29(1):81-86.
- [13] 施启顺.分子育种成果之猪经济性状主效基因研究进展[J].动物科学与动物医学,2005(9):24-25.
- [14] 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.
- [15] MILAN D, JEON JT, LOOFT C, et al. A mutation in PRKAG3 associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle [J]. Science, 2000, 288 (5469):1248-1251.
- [16] MA J, YANG J, ZHOU L, et al. A splice mutation in the PHKG1 gene causes high glycogen content and low meat quality in pig skeletal muscle [J]. PLoS Genet, 2014, 10(10):e1004710.
- [17] 王重龙,陶立.猪育种中DNA标记辅助选择方法的研究进展[J].中国畜牧兽医,2008,35(2):42-46.
- [18] VOGELI P, MEIJERINK E, FRIES R, et al. A molecular test for the detection of *E. coli* F18 receptors: A breakthrough in the struggle against oedema and post-weaning diarrhoea in swine [J]. Schweiz Arch Tierheilk, 1997, 139(11):479-484.
- [19] KLUKOWSKA J, URBANIAK B, SWITONSKI M, et al. High frequency of M307<sup>A</sup> mutation at FUT1 locus, causing resistance to oedema disease, in an autochthonous polish pig breed [J]. J Anim Breed Genet, 1999, 116(6):519-524.
- [20] REN J, YAN X, AI H, et al. Susceptibility towards enterotoxigenic *Escherichia coli* F4ac diarrhea is governed by the *MUC13* gene in pigs [J]. PLoS One, 2012, 7(9):e44573.
- [21] MEUWISSEN T H E, Goddard ME: The use of marker haplotypes in animal breeding schemes [J]. Genet Sel Evol, 1996, 28:161-176.
- [22] MEIJERINK E, FRIES R, V? GELI P, et al. Two a (1, 2) fucosyltransferase genes on porcine chromo-some 6q11 are closely linked to the blood group inhibitor (S) and *Escherichia coli* F18 receptor (ECF18R) loci [J]. Mammalian Genome, 1997, 8:736-741.
- [23] CODDENS A, VERDONCK F, MULINGE M, et al. The possibility of positive selection for both F18 (+) *Escherichia coli* and stress resistant pigs opens new perspectives for pig breeding [J]. Vet Microbiol, 2008, 126(1/2/3):210-215.
- [24] RUAN G R, XING Y Y, FAN Y, et al. Genetic variation at RYR1, IGF2, FUT1, MUC13 and KPL2 mutations affecting production traits in Chinese commercial pig breeds [J]. Czech J Anim Sci, 2013, 58(2):65-70.
- [25] MEUWISSEN T H, HAYES B J, GODDARD M E. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps [J]. Genetics, 2001, 157:1819-1829.