

熊琪,陈文娟,彭健,等.MC4R 和 NR6A1 基因与大白猪×清平猪 F₂ 黑色群体的经济性状关联分析[J].湖北农业科学,2019,58(5): 88-91.

MC4R 和 NR6A1 基因与大白猪×清平猪 F₂ 黑色群体的经济性状关联分析

熊琪¹,陈文娟²,彭健²,柴进²,刘洋¹,陈明新¹,杨军³,杨峰³,蒋思文²

(1.湖北省农业科学院畜牧兽医研究所/动物胚胎工程及分子育种湖北省重点实验室,武汉 430064;2.华中农业大学动物科技学院/农业动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室,武汉 430070;3.当阳市清平种猪场,湖北 当阳 444100)

摘要: 选择 MC4R 和 NR6A1 基因分别对大白猪与清平猪杂交群体 F₂ 后代中黑色个体的胴体和生长进行关联性分析,以期在生产实践中对清平猪杂交品系的选育提供理论依据。结果表明,MC4R 的优势基因为 G 等位基因,不同基因型明显影响背膘厚,AA 型个体的平均日增重与 AG 型个体差异显著 ($P<0.05$),与 GG 型个体差异极显著 ($P<0.01$),其有利基因型为 GG 型;NR6A1 的优势基因为 A 等位基因,不同基因型对背膘厚的影响差异明显,其对胴体和生长性状的有利基因分别为 A 和 G 等位基因。

关键词: 清平猪;候选基因;胴体性状;生长性状;关联性分析

中图分类号:S828 文献标识码:A

文章编号:0439-8114(2019)05-0088-04

DOI:10.14088/j.cnki.issn0439-8114.2019.05.021

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Elucidating the relationship between MC4R, NR6A1 gene and economic traits of black pigs in Yorkshire×Qingping F₂ breed

XIONG Qi¹, CHEN Wen-juan², PENG Jian², CHAI Jin², LIU Yang¹, CHEN Ming-xin¹,
YANG Jun³, YANG Feng³, JIANG Si-wen²

(1.Hubei Key Laboratory of Animal Embryo Engineering and Molecular Breeding/Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064, China; 2.Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics, Breeding, and Reproduction of Ministry of Education/College of Animal Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 3.Qingping Pig Farm in Dangyang City, Dangyang 444100, Hubei, China)

Abstract: MC4R and NR6A1 genes were selected to conduct correlation analysis on carcass and growth of black individuals in the offspring of F₂ hybridized populations of Yorkshire pigs and Qingping pigs respectively, in order to provide some theoretical basis for breeding Qingping pig hybrid lines in production practice. The results are as follows: the dominant gene of MC4R is G allele, the difference of different genotypes on backfat thickness is obvious, the average daily gain of AA individuals is significantly different from AG individuals ($P<0.05$), and the positive genotype is GG compared with GG individuals ($P<0.01$). The dominant gene of NR6A1 is A allele, and the effect of different genotypes on backfat thickness is obvious. The favorable genes for carcass and growth characters are A and G alleles, respectively.

Key words: Qingping pigs; candidate genes; carcass traits; growth traits; association analysis

黑素皮质素受体-4 (Melanocortin-4 Receptor, MC4R) 属于跨膜 G 蛋白耦联受体 (G-Protein Coupled Receptor, GPCRs) 家族, 是在下丘脑中合成的一种多肽类物质^[1]。MC4R 大量存在于中枢神经系统中, 其与

配体结合后通过 G 蛋白提高腺苷酸环化酶 (Adenylyl cyclase, AC) 的活性, 再激活蛋白激酶 (Protein kinase A, PKA) 调控细胞内 cAMP 的浓度^[2,3]。因此 MC4R 能调节动物的脂肪沉积与物质代谢, 维持体内能量

收稿日期: 2018-11-01

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFD0502000); 湖北省农业科技创新行动经费资助项目

作者简介: 熊琪 (1981-), 女, 湖北武汉人, 副研究员, 博士, 主要从事动物分子育种的研究工作, (电话) 13072716772 (电子信箱) phenixq@163.com;

通信作者: 蒋思文, 教授, 主要从事动物遗传育种与繁殖的研究工作, (电话) 027-87280408 (电子信箱) jiangsiwen@mail.hzau.edu.cn。

的动态平衡,在影响动物采食量、体重以及能量稳态方面发挥着重要的调控作用^[1,4]。Kim 等^[3]首次报道猪 *MC4R* 基因高度保守区内发生了一个错义突变 Asp298Asn, 并指出该位点的多态性与背膘厚和生长速度有关。李星润等^[1]对杜洛克、长白、大白共 569 头猪的 *MC4R* 基因进行了研究,结果表明在杜洛克和大白猪中对生长和胴体性状有利的基因型分别为 GA 型和 AA 型, 而长白猪中不同基因型差异不显著。李庆岗等^[5]研究发现淮猪新品系猪群中 GG 型与 AA 型相比,生长速度更快,活体背膘更薄。*MC4R* 基因是公认的对猪生长和胴体性能有影响的主效基因之一,很多研究结果证明,猪 *MC4R* 基因的多态性与生长率、背膘厚和采食量呈强相关,是畜禽生长性状的重要候选基因之一^[1,5-7]。

生殖细胞核因子(Nuclear receptor subfamily 6 group A member 1, *NR6A1*)属于核受体超家族,该家族是一组配体激活的,通过在信号分子与转录应答间建立联系的转录因子家族。*NR6A1* 位于 *SSC1* 与椎骨数量变化相关的 QTL 区域,能调节细胞的生理过程,尤其是胚胎干细胞的生长和分化,影响生殖与神经系统的发育,与脂肪沉积、产仔数和猪的脊椎数等性状有关^[8-10]。Rubin 等^[11]对猪的全基因组进行了测序,分析发现猪的体长性状和椎骨数目的变化与 *NR6A1*、*PLAG1* 和 *LCORL* 基因显著相关。Yang 等^[12]检测了 3 个西方猪种和 7 个中国猪种共 519 头猪 *NR6A1*(c.575T>C)位点等位基因的频率,结果表明 T 等位基因在西方猪种中基本固定,中国猪种里岔黑猪中 T 等位基因频率达到 0.585,他们推测里岔黑猪中可能引入了西方猪种的血液,且里岔黑猪较高的椎体数量(平均脊椎数为 21.5 个)与 *NR6A1* 基因的多态性有关。范家萌等^[13]对东北民猪和荷包猪进行了 *NR6A1* 基因单核苷酸多态性检测,结果显示 *NR6A1* 基因与体尺性状相关,并指出其是调节民猪生长性状的功能基因。

清平猪是国家级保护目录品种,繁殖性能好,但其生长速度较外来猪种慢。目前黑色猪肉在市场上被认为是地方优质猪肉的一个显著标志。因此,期望利用分子标记早期辅助选择的手段,培育出兼具清平猪和外来猪种优良特性的毛色为纯黑清平猪新品系。对一些影响清平猪胴体与生长的关键基因进行关联分析,可以为后期高效利用分子标记早期辅助选择,加快培育出新清平猪品系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验样品

所有的试验猪群均来自湖北省当阳市清平种猪

场,其中 F₁ 为清平猪(♀)与法系大白猪(♂)的杂交后代,F₂ 群体是 F₁ 群体横交所选留的黑色个体。用于基因型频率分析的 F₂ 群体黑猪个体约 600 头。在全部黑色 F₂ 群体中,主要记录了 219 头雌性个体的眼肌面积和 100 kg 背膘厚等胴体性状,以及 83 头雌性个体的平均日增重和达 100 kg 日龄等生长性状。利用常规的酚/氯仿抽提法提取基因组 DNA, DNA 样品被稀释成 50 ng/μL 备用。

1.2 试验所需试剂

PCR 扩增引物由奥科生物技术公司合成,引物详细信息见表 1。*Taq* 酶等分子生物学试剂购自 TaKaRa。试验中常规试剂购自华中农业大学设备科。

1.3 *MC4R* 基因 G158A 突变位点与 *NR6A1* 基因 A200G 突变位点的测序分型

根据候选基因测序引物信息(表 1),交测序公司合成测序引物。以样品的全基因组 DNA 为模板,配制候选基因的 PCR 反应体系,进行 PCR 扩增。吸取 10 μL 样本送往武汉基诺赛克公司进行多态性测序,测序步骤包括:①首先使用捕获引物捕获各目标位点的 DNA 序列,然后回收产物并质检合格后依据 Illumina 文库构建流程完成 Paired-end(PE)测序文库的构建。②取各个样本等量 DNA 构建一个 PE 文库并在 Illumina Hiseq 测序仪上进行 PE150 测序。③对于下机的原始数据,首先进行数据质控,得到高质量的 cleandata, 然后使用 BWA 软件将 cleandata 分解到各目标位点,得到 SAM 格式的比对结果,再使用软件 samtools 将 SAM 格式的文件转换成 BAM 格式,接着使用 Picard 工具中的 SortSam 对 BAM 文件中的 reads 进行排序,得到最终的 BAM 文件。最后,使用 GATK 确定各目标位点的基因型以及测序深度。

表 1 候选基因的测序引物序列

位点	引物序列(5'→3')
<i>MC4R</i>	TACCCTGACCATCTTGATTG
	ATAGCAACAGATGATCTCTTTG
<i>NR6A1</i>	TGACCCCTAGATGATGCTTTTC
	AACAGGGCTTCAGAGAGCAA

1.4 统计分析

利用 Excel 表格对候选基因进行基因型频率和基因频率的计算。不同基因型对繁殖性状值的最小二乘分析使用 SAS(8.0 版)的 GLM(General linear model)软件包进行,关联分析的模型为 $Y = \text{总体均值} + \text{基因型效应} + \text{残差}$,其中 Y 为性状表型值。加性效应 = $(\bar{X}_{BB} - \bar{X}_{AA})/2$,显性效应 = $\bar{X}_{AB} - (\bar{X}_{AA} + \bar{X}_{BB})/2$,其中

\bar{X}_{AA} 、 \bar{X}_{AB} 和 \bar{X}_{BB} 分别表示 AA 型个体、AB 型个体和 BB 型个体对应的表型数据的平均值。用 t 检验进行显著性分析,确定有利基因和有利基因型。

2 结果与分析

2.1 候选基因多态性位点的基因和基因型频率的统计分析

候选基因的基因和基因型频率见表 2, 由表 2 可知, 用测序方法共检测了 1 257 头 F_2 群体的 *MC4R* 基因的多态性, 其中 F_2 黑猪 318 头, 其 3 种基因型频率趋势均为 $AG > GG > AA$, 优势基因均为 G 等位基因; F_2 群体中 *NR6A1* 基因具有多态性, 其 A 等位基因和 G 等位基因的基因频率分别为 0.579 3 和 0.420 7, 优势基因为 A 基因。

表 2 *MC4R* 与 *NR6A1* 基因的基因型频率

群体	基因	基因型	检出数	基因型频率	等位基因	基因频率
F_2	<i>MC4R</i>	AA	42	0.132 1	A	0.377 4
		AG	156	0.490 6	G	0.622 6
		GG	120	0.377 4		
	<i>NR6A1</i>	AA	172	0.317 3	A	0.579 3
		AG	284	0.524 0	G	0.420 7
		GG	86	0.158 7		

2.2 *MC4R* 不同基因型与胴体性状的关联性分析

MC4R 不同基因型与 F_2 群体胴体性状的关联性分析结果如表 3 所示。*MC4R* 基因的 AA 型个体和 AG 型个体的眼肌面积比 GG 型的分别高 0.38 cm^2 和 0.91 cm^2 , 但是 3 种基因型之间差异不显著。*MC4R* 不同基因型对 100 kg 背膘厚的影响为 $AA > AG > GG$, 加性效应为 1.35 mm, 且 AA 型个体与 AG 型和 GG 型个体差异均显著 ($P < 0.05$)。

表 3 F_2 群体中 *MC4R* 不同基因型与胴体性状的关联性分析

具体性状	基因型(样本容量)			基因效应值	
	AA(20)	AG(97)	GG(73)	加性效应	显性效应
眼肌面积/ cm^2	29.11±4.49	29.64±4.58	28.73±5.05	-0.19	0.72
100 kg 背膘/mm	19.19±2.91 a	16.66±4.28 b	16.49±4.12 b	-1.35	-1.19

注: 数值由均值±标准差组成, 括号内的数字为对应的样本容量; 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$); 下同

2.3 *MC4R* 不同基因型与生长性状的关联性分析

MC4R 不同基因型与 F_2 群体生长性状的关联性分析结果如表 4 所示。*MC4R* 基因不同基因型对平均日增重的影响趋势为 $GG > AG > AA$, GG 型和 AG 型个体比 AA 型个体分别高 0.06 kg 和 0.05 kg, 且

AA 型个体和 AG 型个体差异显著 ($P < 0.05$), 与 GG 型个体差异极显著 ($P < 0.01$)。3 种基因型对达 100 kg 日龄的加性效应为 2.61 d, 其中 GG 型个体比 AG 型个体短 4.1 d, 3 种基因型差异不显著。

这些结果表明 *MC4R* GG 基因型的背膘最薄, 日增重最大, 且不同基因型之间的差异明显, 因此该基因的多态性位点可以作为 F_2 群体选育的指标之一。

表 4 F_2 群体中 *MC4R* 不同基因型与生长性状的关联性分析

具体性状	基因型(样本容量)			基因效应值	
	AA(4)	AG(21)	GG(13)	加性效应	显性效应
平均日增重/kg	0.42±0.01 aA	0.47±0.09 bAB	0.48±0.07 abB	0.03	0.02
达 100 kg 日龄/d	267.82±12.74	277.13±48.27	273.03±31.16	2.61	6.71

2.4 *NR6A1* 不同基因型与胴体性状的关联性分析

NR6A1 不同基因型与 F_2 群体胴体性状的关联性分析结果如表 5 所示。*NR6A1* 不同基因型对眼肌面积的影响趋势为 $AA > AG > GG$, 加性效应为 0.19 cm^2 , 3 种基因型差异均不显著。*NR6A1* 对 100 kg 背膘厚的影响为 $AA < AG < GG$, AA 型个体比 AG 型和 GG 型分别低 0.19 mm 和 2.25 mm, 且与 GG 型差异显著 ($P < 0.05$)。这些结果表明 *NR6A1* 基因对眼肌面积和 100 kg 背膘厚等胴体性状的有利基因型为 AA 型。

表 5 F_2 群体中 *NR6A1* 不同基因型与胴体性状的关联性分析

具体性状	基因型(样本容量)			基因效应值	
	AA(54)	AG(112)	GG(25)	加性效应	显性效应
眼肌面积/ cm^2	29.70±5.10	29.48±4.86	28.52±3.17	-0.19	0.72
100 kg 背膘/mm	16.86±3.63 b	17.05±4.37 b	19.11±4.15 a	-1.35	-1.19

2.5 *NR6A1* 不同基因型与生长性状的关联性分析

NR6A1 不同基因型与 F_2 群体生长性状的关联性分析结果如表 6 所示。*NR6A1* 3 种基因型对平均日增重的影响为 $AG > GG > AA$, AG 型和 GG 型个体的平均日增重比 AA 型的分别高 0.053 kg 和 0.037 kg, 且 AA 型与 GG 型差异接近显著水平 ($P \approx 0.05$)。*NR6A1* 不同基因型对达 100 kg 日龄的影响为 $GG < AG < AA$, 且 AG 型和 GG 型个体达 100 kg 日龄比 AA 型分别低 14.74 d 和 25.26 d, 且 AA 型与 GG 型的差异也接近显著水平 ($P \approx 0.08$)。这些结果表明 *NR6A1* 基因的 G 等位基因对平均日增重和达 100 kg 日龄等生长性状有利。

表 6 F₂ 群体中 *NR6A1* 不同基因型与生长性状的关联性分析

具体性状	基因型(样本容量)			基因效应值	
	AA(21)	AG(39)	GG(8)	加性效应	显性效应
平均日增重/kg	0.437±0.073	0.490±0.080	0.474±0.063	0.03	0.02
达 100kg 日龄/d	281.88±38.50	267.14±41.36	256.62±23.20	2.61	6.71

3 小结与讨论

MC4R 不同基因型与背膘厚相关性的研究结果并不一致, 本试验发现 *MC4R* 基因的 GG 型和 AG 型个体背膘厚比 AA 型平均薄 2.70 mm 和 2.53 mm, 二者均与 AA 型差异显著 ($P < 0.05$), 与李庆岗等^[5]对淮猪新品系的研究结果相符。*MC4R* 基因对眼肌面积的影响为 AG>AA>GG, 差异不显著。结合文献报道, 推测 *MC4R* 基因的 GG 型能降低背膘厚, 从而提高胴体瘦肉率。目前对 *NR6A1* 基因多态性的研究主要集中于肋骨数、体长和体尺等性状^[11,13], 对该基因与胴体性状的关联分析研究较少。本试验研究发现 *NR6A1* 基因的 AA 型比 AG 型和 GG 型的平均眼肌面积分别高 0.22 cm² 和 1.18 cm², 平均背膘厚分别薄 0.19 mm 和 2.25 mm, 且 3 种基因型对背膘厚的影响差异明显, 推测 *NR6A1* 基因的 AA 型个体可能具有更优良的胴体性能, 即 GG 突变型个体对脊椎数等生长性状有利, 但是可能与某些胴体性状负相关, 这一结果与 Huang 等^[14]在 PIC 猪上的发现相符。因此在进行清平猪杂交后代胴体性状的选育时, 可以选择性淘汰部分 *NR6A1* 基因的 GG 型个体和 *MC4R* 基因的 AA 型个体, 筛选出 AA-GG(*NR6A1-MC4R*) 个体, 从而提高有利基因在群体中的频率。同时需要扩大胴体性状分析的样本容量, 对候选基因继续进行验证, 以确定其对群体的选育是否有准确的指导作用。

MC4R 基因不同基因型对平均日增重的影响趋势为 GG>AG>AA, 3 种基因型对达 100 kg 日龄的加性效应为 2.61 d, 推测 *MC4R* 对生长性状的有利基因为 G 等位基因, 该基因可能提高猪的生长速度, 降低育种周期, 这与李庆岗等^[5]、韩雪蕾等^[15]、肖石军等^[16]的研究结果相符, 表明 *MC4R* 基因对不同猪种的影响可能具有一致性, 因此可以将其作为清平猪杂交群体生长性状选育的候选基因。

根据试验结果, 对 F₂ 群体胴体和生长性能的选育工作提出如下建议: ① *NR6A1* 基因的 AA 野生型对胴体性能有利, 但是大量文献报道其突变型 GG 与脊椎数正相关, 因此需要针对具体的育种目

标对群体的 *NR6A1* 基因进行选育。② *MC4R* 基因对胴体和生长性状的有利基因均为 G 等位基因, 因此在进行 F₂ 群体的选育时应保留 GG 型个体, 从而在降低群体背膘厚的同时提高生长速度。

参考文献:

- [1] 李星润, 兰国湘, 王孝义, 等. 猪 *MC4R* 基因 Asp298Asn 位点多态性及其与生长性状的关联[J]. 畜牧与兽医, 2016, 48(2): 23-27.
- [2] 张 鑫, 李方方, 朱宇旌, 等. 黑皮质素受体-4: 生物学特征、作用机理和影响因素[J]. 动物营养学报, 2015, 27(3): 683-690.
- [3] KIM K S, LARSEN N J, ROTHSCCHILD M F. Linkage and physical mapping of the porcine melanocortin-4 receptor (*MC4R*) gene[J]. J Anim Sci, 2000, 78(3): 791-792.
- [4] ANDERSSON L, GEORGES M. Domestic-animal genomics: deciphering the genetics of complex traits[J]. Nat Rev Genet, 2004, 5(3): 202-212.
- [5] 李庆岗, 陶 立, 季 香, 等. *MC4R* 基因在淮猪中的多态性及其与生长性状和背膘厚的相关性[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(3): 999-1000.
- [6] 王怀禹. 黑素皮质素受体 4 (*MC4R*) 基因多态性与动物生长性能的相关性研究[J]. 养殖与饲料, 2010(5): 1-5.
- [7] 赵乔辉, 董文华, 刘 颖, 等. 猪 *MC4R* 基因 G892A 位点对生长和繁殖性能的遗传效应分析[J]. 中国畜牧杂志, 2014, 50(19): 5-9.
- [8] MIKAWA S, SATO S, NII M, et al. Identification of a second gene associated with variation in vertebral number in domestic pigs[J]. BMC Genet, 2011, 12(1): 5.
- [9] KLOMTONG P, CHAWEEWAN K, PHASUK Y, et al. *MC1R*, *KIT*, *IGF2*, and *NR6A1* as markers for genetic differentiation in Thai native, wild boars, and Duroc and Chinese Meishan pigs[J]. Genet Mol Res, 2015, 14(4): 12723-12732.
- [10] WANG Y, ZHANG Y, DAI X, et al. *NR6A1* couples with cAMP response element binding protein and regulates vascular smooth muscle cell migration[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2015, 69: 225-232.
- [11] RUBIN C J, MEGENS H J, MARTINEZ B A, et al. Strong signatures of selection in the domestic pig genome[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(48): 19529-19536.
- [12] YANG G, REN J, ZHANG Z, et al. Genetic evidence for the introgression of Western *NR6A1* haplotype into Chinese Licha breed associated with increased vertebral number[J]. Anim Genet, 2009, 40(2): 247-250.
- [13] 范家萌, 于 浩, 刘 娣. 民猪 *NR6A1* 基因的单核苷酸多态性检测及连锁不平衡研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016(1): 87-89.
- [14] HUANG J, ZHANG M, YE R, et al. Effects of increased vertebral number on carcass weight in PIC pigs[J]. Anim Sci J, 2017, 88(12): 2057-2062.
- [15] 韩雪蕾, 杨华威, 王维民, 等. 猪 *IGF2*、*MC4R*、*JHDMIA* 及 *TEF-1* 多基因标记遗传效应研究[J]. 中国农业科学, 2011, 44(8): 1694-1701.
- [16] 肖石军, 颜 瑛, 任 军, 等. *MC4R* 基因主效位点在中外猪种中的遗传多样性及其与生长肥育性状的关联性分析[J]. 畜牧兽医学报, 2006, 37(9): 841-845.



知网查重限时 **7折** 最高可优惠 **120元**

本科定稿，硕博定稿，查重结果与学校一致

立即检测

免费论文查重: <http://www.paperyy.com>

3亿免费文献下载: <http://www.ixueshu.com>

超值论文自动降重: http://www.paperyy.com/reduce_repetition

PPT免费模版下载: <http://ppt.ixueshu.com>
