

宋乔乔,柴志欣,钟金城. 牦牛分子育种研究进展[J]. 江苏农业科学,2013,41(10):5-9.

牦牛分子育种研究进展

宋乔乔,柴志欣,钟金城

(西南民族大学/动物遗传育种学国家民委-教育部重点实验室,四川成都 610041)

摘要:系统阐述了开展牦牛分子育种的必要性、研究内容与特点,牦牛生长发育、繁殖、肉质、泌乳、抗病、毛色等性状的相关候选功能基因的研究进展,以及 DNA 分子多态性及其与生产性状的相关性,分析了牦牛分子育种研究和应用中存在的问题,提出了今后开展牦牛分子育种的思路。

关键词:牦牛;分子育种;分子遗传标记

中图分类号: S823.8⁺52 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)10-0005-05

牦牛(*Bos grunniens*)是分布于海拔 3 000 m 以上,以青藏高原为中心及其毗邻高山、亚高山地区的稀有牛种之一。牦牛对高寒草地生态环境条件具有极强的适应性,能提供肉、乳、皮、毛、役等畜产品,是一种“全能型”家畜。全世界现有牦牛 1 760 多万头,其中我国牦牛主要分布于青海、西藏、四川、甘肃、新疆、云南等地区,总数达 1 656 万余头,约占世界牦牛总数的 95%,共分为 12 个牦牛品种或类群,是世界上拥有牦牛数量和品种最多的国家。牦牛能利用一般家畜不能利用的高寒草场,是一种极少与人类争食、争夺生存空间和自然资源的原始家畜品种,是当地牧民和畜牧业经济不可缺少的畜种。在遗传上是一个极为宝贵的基因库。目前,由于受分布地区自然环境条件以及无系谱记录等因素影响,我国牦牛业还是一个比较原始的产业,牦牛仍属生产性能较低的原始牛种,极大地限制了牦牛产区畜牧业经济的进一步发展。要

加快我国牦牛产业发展,根本问题是牦牛良种化和产业化,这就须要通过分子育种技术不断提高牦牛品质,并通过现代生物技术加快扩繁。本文概述了开展牦牛分子育种工作的必要性、研究内容与特点,汇总了 DNA 分子多态性及其与生产性状相关性的研究进展,分析了牦牛分子育种研究和应用中存在的问题,提出了今后开展牦牛分子育种的思路,以期对牦牛分子育种研究提供参考。

1 分子育种研究的内容和特点

分子育种是利用现代分子生物技术,以与生产性状相关的基因为研究对象,选育、培育或改良出符合人类要求的新品种或品系。从目前发展现状看,分子育种包括基因组育种(genomic breeding)和转基因育种(transgenic breeding)2 方面内容。其中,基因组育种是在比较基因组研究和基因组分析的基础上,通过 DNA 标记技术对畜禽数量性状座位进行直接选择,或通过标记辅助导入有利基因,通过标记辅助淘汰(marker assisted culling, MAC)清除不利基因等,以达到更有效地改良畜禽品种的目的。转基因育种则是通过基因转移技术将外源基因导入某种动物的基因组中,育成转基因畜禽新品种(系),从而达到改良重要生产性状如生长率、遗传抗性等或非规范性育种性状如生产人类药用蛋白、工业用酶等的

收稿日期:2013-03-01

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2012BAD13B06)。

作者简介:宋乔乔(1988—),女,甘肃会宁人,硕士研究生,研究方向为基因组与生物信息学。E-mail:qiaoqiao016@qq.com。

通信作者:钟金城,教授,研究方向为动物遗传学。E-mail:zhongjincheng518@126.com。

较强,仅靠财政监督难以保证效果的环节,引入中介机构,实现专业化监管。引入公众或受益群体的监督,通过建立畅通渠道,向下使公众充分获取信息为公众监督提供条件,向上使民意得到有效传递,采取重点检查、不定期检查等多种有效监督方法,实现过程监督、动态监管,追踪问效。(2)建立财政农业投入项目考评机制。有效评价机制,不仅要考评项目资金落实、资金使用及财务管理情况等,还要考评项目实施的经济效益和社会效益,要从深层次上考核使用财政农业资金的建设项目是否建成并发挥预期效益。(3)建立财政农业资金问责制。配套建立对中介机构、项目单位和行政管理部门问责制,提高违规成本,严厉追究违规责任。

参考文献:

[1]陈池波. 构建政府宏观农业投入机制的思考[J]. 农业经济问题,2002(5):52-55.

[2]廉桂萍. 加大财政对农业支持力度 不断提高农业竞争力[J]. 农业经济问题,2003(11):51-53.

[3]文 峰. 我国财政农业投入:绩效、原因、对策——农户经济行为理论视角的分析[J]. 云南财经大学学报,2009(5):39-41.

[4]江苏省农业委员会. 2009 至 2011 年农业投资项目汇编[R]. 2012.

[5]高邮市农业委员会. 高邮市财政支农资金及农业现代化发展情况汇报[R]. 高邮:高邮市农业委员会,2012.

[6]南京市农业委员会. 南京市财政支农资金及相关情况汇报[R]. 南京:南京市农业委员会,2012.

[7]沭阳县农业委员会. 落实财政支农政策建好沭阳现代农业[R]. 沭阳:沭阳县农业委员会,2012.

[8]江苏省农业委员会. 2012 年江苏省农业项目总结汇编[R]. 南京:江苏省农业委员会,2012.

[9]常熟市农业委员会. 常熟市现代农业基地建设的情况汇报[R]. 常熟:常熟市农业委员会,2011.

目标^[1]。转基因育种打破了不同生物物种间的界限,可将外源基因直接导入动物品种中,能够大幅度缩短世代间隔,培育出新品种^[2]。

牦牛分子育种是直接在 DNA 水平上对控制生长发育、肉质、繁殖、泌乳等经济性状的基因型或基因进行选择,具有高效、准确、快速育种的特点,克服了传统纯种选育和杂交改良的缺陷。采用分子育种可使培育动物新品种的周期由过去的 8~10 代缩短到 2~3 代,其主要方法是对经济性状进行基因定位,构建基因组连锁图谱,鉴定和选择杂交后代,利用牦牛的系谱图和亲属信息确定个体的选留,利用目的性状与标记间的关联性进行标记辅助选择,这些措施的综合应用可以大大提高生产性能的选择能力,加快品种改良和新品种培育速度。用分子手段研究目标性状的遗传机理,以及相关分子遗传标记辅助选择的方法和技术是目前动物分子育种研究的热点领域之一。

2 动物分子遗传标记

分子遗传标记能反映个体特异性,可直接以遗传物质的多态性作为标记进行遗传分析。随着研究深入和理论方法的不断完善,分子遗传标记在畜禽分子育种中日益显示出巨大价值。理想的标记应具备以下条件:多态性丰富;数量多,且均匀覆盖整个基因组;遗传标记测定不受年龄、性别、环境等因素限制;共显性,能够准确判断所有可能的基因型^[3]。

分子遗传标记主要分为 3 大类:第一类是以分子杂交为基础的第一代分子标记,以限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)为代表;第二类是以 PCR 为基础的第二代分子标记,以微卫星 DNA (microsatellite repeats),也称简单串联重复序列(simple sequence repeat, SSR)为代表,包括随机扩增多态性(random amplified polymorphism DNA, RAPD)、扩增片段长度多态性(amplification fragment length polymorphism, AFLP)、单链构型多态性标记(single-strand conformation polymorphism, SSCP);第三类是以基因序列为基础的第三代分子标记,以单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)为代表。

近 10 年来,虽然有多种 DNA 分子遗传标记被用于牦牛遗传育种中,但研究和应用的广度和深度较不平衡。其中以 RFLP、RAPD、AFLP、微卫星、mtDNA 标记研究和应用较多^[4]。RFLP 标记是单拷贝编码序列,大多数属单位点上的双位点基因,具有共显性特点,主要应用于遗传连锁图绘制和目的基因标记。微卫星标记遗传重复性好、多态性丰富、操作简单快速,主要应用于基因定位与数量性状位点(QTL)分析,遗传疾病预测与诊断,亲权分析与品种鉴定,杂种优势预测,种群及进化研究和分子标记辅助选择等领域。RAPD 标记能检测到多个基因座位,多态信息含量变化范围大(0.2~0.9),可在对物种没有任何分子生物学研究的情况下进行多态性分析。AFLP 标记多态性强、稳定性好、重复性强,适合于绘制品种的指纹图谱及分类研究。SNP 是基因组中最稳定的点突变,突变率低,尤其是处于编码区的 SNP 具有更高的遗传稳定性。

3 牦牛分子育种研究进展

3.1 牦牛生长发育相关基因

研究表明,与牦牛生长发育性状相关的候选基因主要涉及 3 类。I 类是以包括生长激素(*GH*)为介导的重要基因:*GH*、生长激素受体(*GHR*)、生长激素释放激素(*GHRH*);II 类是以胰岛素生长因子(*IGF*)为介导的重要基因,如:胰岛素生长因子-1(*IGF-1*)、胰岛素生长因子-2(*IGF-2*);III 类是肌肉生长抑制素(*MSTN*)等功能基因^[5]。其中 *MSTN* 通过抑制 MyoD 家族成员转录活性负向控制肌细胞的生长发育,家畜 *MSTN* 基因活性丧失可导致肌肉增大,体重增加,相关研究主要集中在麦洼牦牛、大通牦牛、甘南牦牛、天祝白牦牛、新疆牦牛、青海高原牦牛等重要地方牦牛品种方面。

欧江涛等通过对麦洼牦牛 *GH* 基因的克隆测序和多态性研究,发现牦牛 *GH* 基因酶切位点多态性相对较少^[6]。白晶晶等利用 PCR-SSCP 方法研究了甘南牦牛、天祝白牦牛、青海高原牦牛 *GH* 基因的 5 个外显子及部分内含子序列,发现甘南牦牛在 2 个基因位点上均表现为低度多态,基因多态性相对贫乏,只有第 3 内含子及第 5 外显子表现遗传多态性,经 Hardy-Weinberg 平衡检验发现 3 个牦牛群体均偏离平衡状态^[7-8]。张森等利用 PCR-SSCP 方法研究了大通牦牛、甘南牦牛、天祝白牦牛、新疆牦牛、青海高原牦牛等 5 个牦牛群体的 *GH* 基因和 *GHR* 基因,发现第 3 外显子和第 5 外显子具有 PCR-SSCP 多态性,*GH* 基因第 3 外显子的突变引起 AA 基因型的体重、体长指数显著高于 AB、BB 基因型($P < 0.05$);*GH* 基因第 5 外显子对牦牛生长发育指标无显著影响;而在 *GHR* 基因第 5 外显子的突变引起 AB 基因型的体重指数显著高于 AA、BB 基因型($P < 0.05$)^[9]。高雪研究了牛 *GH* 基因和 *IGF-1* 基因的多态性,发现 *GH* 基因第 5 外显子(*GH-P3*)、3'端(*GH-P4*)位点上 AB 基因型的体重、体高、体斜长、胸围、肉用指数显著高于 AA、BB 基因型($P < 0.05$);*IGF-1* 基因第 2 外显子 AA 型个体的体重、胸围显著高于 AB、BB 基因型($P < 0.05$)^[10]。孙少华等利用 PCR-RFLPs 标记技术对 63 头杂种肉牛 *GH* 基因的第 5 外显子和 3'端区域进行了分析,结果表明 *GH* 基因 AB 型的效应稍高于 AA、BB 型,但差异不显著^[11]。以上研究表明,牦牛育种选择不同于牛和肉牛,可以选择含有第 3 外显子 A 等位基因的个体或含有第 5 外显子 B 等位基因的个体培育。潘和平等利用 PCR-SSCP 方法研究了大通牦牛 *IGF-1* 基因的遗传多态性,结果表明大通牦牛基因型为 AA 的个体生长性状有高于 AB 和 BB 基因型的趋势;等位基因 A 对大通牦牛的体重和体斜长增加有显著优势,因此在幼畜早期选择中,可以选择 AA 型基因作为大通牦牛品种选育的候选基因^[12]。姚玉妮利用 PCR-SSCP 方法研究了大通牦牛、青海高原牦牛、天祝白牦牛、甘南牦牛、新疆巴州牦牛等 5 个群体 *IGF-1* 基因、*IGF-IR* 基因的多态性,发现 *IGF-1* 第 1 内含子上 AA 型与 6 月龄的体重和体斜长存在显著正相关;*IGF-1* 第 1 内含子、*IGF-IR* 第 1 外显子上 AA 基因对 12 月龄体重有显著影响;*IGF-IR-P6* 位点 AA 基因型可使体重和体长显著增加;*IGF-IR-P6* 位点的 AA 基因型为 18 月龄体高的优势基因型^[13]。*IGF-1* 基因和 *IGF-IR* 基因表现的多态与牦牛部分生长性状显著相关,在牦牛育种

工作中,可作为遗传标记。王丁科利用 PCR-SSCP 方法研究了大通牦牛、青海高原牦牛、天祝白牦牛、甘南牦牛、新疆牦牛等 5 个群体 *IGF-Ⅱ* 基因和 *IGF-ⅡR* 基因的多态性,发现 *IGF-Ⅱ* 基因第 7 内含子、第 8 内含子和 *IGF-ⅡR* 基因第 11 内含子具有 PCR-SSCP 多态性,3 个多态片段中仅 *IGF-Ⅱ* 基因第 8 内含子与生长性状有关,且 AA 和 AB 基因型较 BB 基因型体重更大 ($P < 0.01$),但在体高、体斜长、胸围性状方面 AA 与 BB 基因型均不显著^[14]。*IGF-Ⅱ* 基因第 8 内含子发现的多态位点与牦牛部分生长性状相关,因此该位点表现的多态可能是遗传标记之一。梁春年等利用 PCR-SSCP 方法分析了天祝白牦牛、甘南牦牛、青海高原牦牛、新疆巴州牦牛、青海大通牦牛 *MSTN*、*IGF-ⅡR* 基因的多态性,发现 *MSTN* 基因内含子 2 存在的多态位点对周岁牦牛和成年牦牛体重均有显著影响 ($P < 0.05$),不同基因型对周岁牦牛体高和成年牦牛体高的影响均不显著 ($P > 0.05$);*IGF-ⅡR* 基因外显子 1 存在的多态位点对周岁牦牛体高、体斜长、体重等均有显著影响 ($P < 0.05$),不同基因型对周岁牦牛胸围、管围等的影响均不显著 ($P > 0.05$)^[15-16]。*MSTN* 基因第 2 内含子和 *IGF-ⅡR* 基因第 1 外显子发现的多态位点与牦牛部分生长性状显著相关,该 2 位点表现的多态有可能作为遗传标记。笔者认为在牦牛育种工作中应挖掘更多的遗传标记位点,通过选择有利基因型加快牦牛的遗传改良步伐。

3.2 牦牛繁殖性状相关基因

与牦牛繁殖性状相关候选基因的研究主要涉及:促卵泡激素-B(*FSH-B*)、促卵泡素受体(*FSHR*)、促黄体激素基因(*LH*)、生长分化因子 9(*GDF9*)、视黄酸 X 受体 γ 基因(*RXR γ*)、促性腺激素释放激素(*GnRH*)、催乳素受体(*PRLR*)、睾丸决定因子(*SRY*)等。王明亮等利用 PCR-SSCP 方法分析了甘南牦牛、天祝牦牛、大通牦牛、青海牦牛等 4 个种群 667 头牦牛 *FSHR* 基因 5'端及第 1 外显子的多态性,结果表明 *FSHR* 基因 5'端及第 1 外显子不同基因型对产犊间隔影响差异不显著,*FSHR* 基因 5'端及第 1 外显子不能作为控制牦牛产犊间隔的主效基因^[17]。尹荣华等通过 RT-PCR 技术对牦牛 *GDF9* 基因 cDNA 进行克隆测序和序列分析,结果表明,和普通牛相比,牦牛 *GDF9* 基因编码区存在 1 处碱基转换(C \rightarrow T),导致相应氨基酸由丙氨酸(A)转换为缬氨酸(V),由于该处编码的氨基酸位于成熟蛋白区,因此这个氨基酸水平上的差异可能导致蛋白质高级结构发生较大变化,进而引起蛋白功能改变,但该变化是否最终影响牦牛卵泡发育还有待深入研究^[18]。陈雪梅等采用 PCR 法克隆出牦牛 *LHB* 基因序列,通过牦牛与奶牛在 LH 氨基酸序列上的比对发现,存在 3 处残基差异,精氨酸-谷氨酰胺、甲硫氨酸-缬氨酸、苏氨酸-丙氨酸^[19]。这些位点上差异是否造成激素高级结构的差别甚至功能上的不同,及其对杂种后代精子的影响,均有待进一步研究。

3.3 牦牛肉质性状相关基因

与牦牛肉质性状相关候选基因的研究主要涉及:激素敏感脂肪酶(HSL)、脂肪型脂肪酸结合蛋白(A-FABP)、脂蛋白脂肪酶(LPL)、瘦素(Leptin)、钙蛋白酶抑制蛋白(CAST)、钙激活蛋白酶-1(CAPN1)、一磷酸腺苷激活蛋白激酶 γ 3 亚基(PRKAG3)、脂肪酸合酶(FAS)、脂肪细胞定向和分化因子

1(ADD1)、血管生成素相关蛋白-4(ANGPTL4)、硬脂酰辅酶 A 脱氢酶-1(SCD1)。马志杰等研究表明,不同品种牦牛在 *HSL* 基因外显子 I 存在 *Sma* I 酶切多态性,测序结果发现单碱基的改变(G \rightarrow A)导致相应编码氨基酸变化(Gly \rightarrow Arg)^[20]。曹健等利用 PCR-SSCP 技术检测了甘南牦牛、青海牦牛、天祝白牦牛、野牦牛、黄牛的 A-FABP 和 H-FABP 基因部分区段单核苷酸多态性(SNPs),结果表明各年龄段甘南牦牛 A-FABP 基因的 AA 型个体胴体重都高于其他基因型,4.5~5 岁 AA 型嫩度剪切力值>AB 型、BB 型;3~5 岁甘南牦牛 H-FABP 基因的 AA 型个体眼面积最小,BC 型个体胴体重最小,而 AB 型个体眼肌面积最大^[21-22]。因此 A-FABP 基因和 H-FABP 基因可作为牦牛胴体及肉质性状潜在分子标记位点。梁春年等利用 PCR-SSCP 技术对天祝白牦牛、甘南牦牛、大通牦牛、青海高原牦牛、新疆巴州牦牛等 5 个牦牛品种 *LPL* 基因外显子 7 进行了多态性研究,结果表明牦牛 *LPL* 基因外显子 7 存在多态性,该位点多态与牦牛体重、体高、胸围显著相关($P < 0.05$),BB 型个体体重、体高、胸围显著高于 AA 和 AB 型个体^[23]。牦牛 *LPL* 基因第 7 外显子可能作为牦牛肉质性状遗传标记位点。刘自增等报道,天祝白牦牛 *Leptin* 基因可以下调 *SCD1* 基因的转录,*Leptin* 基因的错义突变可能对天祝白牦牛肌肉脂肪 FA 的组成产生影响^[24]。王建华等采用 PCR-SSCP 技术对甘南牦牛 *CAST* 基因内含子和外显子部分序列进行单核苷酸多态性分析,结果表明在牦牛第 2、3、8 内含子以及第 3 外显子上发现多态位点,而在第 8 外显子上没有发现多态位点^[25]。费春红等通过对天祝白牦牛 *CAPN1* 基因的克隆与序列分析,发现牦牛 *CAPN1* 基因编码的氨基酸在 4 个结构域中均具有很好的保守性,而结构域 IV 最为保守^[26]。焦斐采用 PCR-SSCP 结合 DNA 测序技术,对甘南牦牛、天祝白牦牛、大通牦牛共 341 头牦牛 *PRKAG3* 基因与 *FAS* 基因进行单核苷酸多态性检测,研究表明 *PRKAG3* 基因 P1 位点在第 3 内含子发生 A \rightarrow G 突变,AA 基因型个体的失水率显著高于 AB 基因型个体 ($P < 0.05$),P4 位点在第 9 内含子发生 G \rightarrow A 突变,PQ 基因型个体的失水率均显著高于 PP 基因型个体 ($P < 0.05$);*FAS* 基因 F3B 位点上 M 等位基因对牦牛肉脂肪含量起正面效应;F34B 位点上 H 等位基因对牦牛肉脂肪含量起正面效应;F35 位点上 E 等位基因对牦牛肉 pH_{24h} 值与脂肪含量也起正面效应^[27]。因此,*PRKAG3* 基因与 *FAS* 基因可作为牦牛失水率及脂肪含量潜在分子标记位点。柴志欣等利用 PCR-SSCP 和 DNA 测序方法对帕里牦牛、工布江达牦牛、类乌齐牦牛、康布牦牛、桑日牦牛、巴青牦牛、江达牦牛、斯布牦牛、嘉黎牦牛、桑桑牦牛、丁青牦牛等西藏 11 个牦牛类群共 483 头牦牛的 *ADD1* 基因第 2 外显子序列进行遗传多态性分析,结果表明该序列存在 1 处碱基(T)缺失和 1 处碱基突变(A \rightarrow G),11 个牦牛类群均存在严重偏态;除帕里牦牛、巴青牦牛外,其他 9 个牦牛类群均处于中度多态($0.25 < PIC < 0.50$),遗传变异较大^[28]。刘自增采用 PCR-HRMA 技术对甘南牦牛、大通牦牛、天祝牦牛 *SCD1* 基因进行了多态性分析,研究表明在甘南牦牛、大通牦牛、天祝牦牛 *SCD1* 基因中都检测到 1 处碱基突变(T \rightarrow C),位于第 5 外显子,引起氨基酸变化(Val \rightarrow Ala),携带该位点 C 等位基因的个体胴体单不饱和脂肪酸 MUFA 含

量较高^[29]。

3.4 牦牛泌乳性状相关基因

与牦牛泌乳性状相关基因主要集中在乳铁蛋白基因家族和乳上皮黏蛋白(MUC1)基因。乳铁蛋白基因家族主要包括 β -酪蛋白基因(β -CN)、 κ -酪蛋白基因(κ -CN)、 α -乳清蛋白基因(α -La)、 β -乳球蛋白基因(β -Lg)等成员。Rinderknecht 等对牦牛 κ -CN 基因 5'端转录非翻译区和外显子Ⅳ进行了多态性分析,结果表明牦牛与其他牛种间存在一定差异^[30]。毛永江等利用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)对 109 头麦洼牦牛乳蛋白多态性进行分型,结果表明 β -CN、 κ -CN、 α -La 呈单态,而 β -Lg 呈多态,优势基因型为 DD、EE 型,乳蛋白基因座对产奶量、乳常规营养成分及乳蛋白组分的相对含量均无显著影响($P > 0.05$)^[31]。龚卫华等利用 PCR 方法扩增了麦洼牦牛 α -La 基因 5'非翻译区的部分序列,该序列与普通牛的相应序列具有很高的同源性(98.1%),但存在 8 个碱基差异,碱基突变类型包括 1 个缺失、5 个转换、2 个颠换^[32]。毛晓玲等利用 PCR-RFLP 技术分析了麦洼牦牛、九龙牦牛、西藏牦牛 GH、Pit-1、 α -La 基因的多态性,研究表明 GH、Pit-1、 α -La 基因特定位点均未检测到多态性^[33]。樊宝良等扩增并克隆了牦牛 α -乳清蛋白基因全序列,结果表明牦牛 α -乳清蛋白全基因共编码 142 个氨基酸,且牦牛 5'侧翼序列在结构上和普通牛基本相同^[34]。

3.5 牦牛其他性状相关基因

BoLA-DRB 是牛主要组织相容性复合物(MHC)基因家族中的Ⅱ类基因,是该基因家族中最主要的功能基因,所编码的 MHC 抗原与免疫应答和抗病性密切相关。包鹏甲等采用 PCR-RFLP 对天祝白牦牛、甘南牦牛、大通牦牛等 3 个类群 757 个个体的 MHC-DRB3.2 基因进行 PCR-RFLP 分析,结果表明 3 个群体的多态信息含量分别为 0.739、0.754、0.743,均达到高度多态($PIC > 0.50$)^[35]。说明牦牛 DRB3.2 基因具有高度多态性,在牦牛抗病育种和提高牦牛生产性能方面具有独特效力和广泛应用前景。前人研究发现,乳铁蛋白(LF)在抗菌、抗病毒、抗氧化、抗肿瘤、调节免疫等方面起重要作用^[36-37]。裴杰等对天祝白牦牛乳铁蛋白基因的编码区进行克隆和分子特征分析^[38]。

唐懿挺等对麦洼牦牛、斯布牦牛、天祝牦牛、九龙牦牛的黑色素皮质素受体 1(MC1R)基因编码区进行克隆测序及分析,结果表明 4 个牦牛品种间及与普通牛间在 MC1R 基因编码区内共有 13 个碱基差异,无碱基的插入和缺失现象,编码蛋白共有 9 个氨基酸差异^[39]。该研究结果对今后开展 MC1R 基因与牦牛毛色性状的相关分析以及牦牛毛色遗传机理、基因定位、基因表达调控等研究具有重要意义。

4 牦牛分子育种存在问题和研究展望

4.1 牦牛分子育种存在问题

DNA 分子标记技术在牦牛遗传育种研究中的应用及牦牛功能基因的研究方面已取得很大进展,目前已获得许多关于牦牛分子遗传特征的信息,牦牛功能基因研究也随之逐渐朝多个经济性性状展开,研究成果显著,这为今后牦牛的进一步研究和在分子育种方面的应用奠定了良好基础。但是牦牛分

子育种研究还存在许多问题亟须解决:理论研究较多,生产应用较少;对牦牛重要经济性性状功能基因多态性研究较多,而对其多态性与生产性能的相关性分析研究较少,缺乏与生产性能相关性的探讨;对牦牛核外基因组研究相对较少;尚未涉及到牦牛更多重要经济性性状基因精细定位、表达调控研究;部分分子遗传标记(SSCP、SNP、DNA 指纹)在牦牛科研中运用不够深入,未发挥出其应有优势。因此研究者应不断创新,分子遗传学家、分子生物学家、育种家应进一步加强交流与合作,以推动我国牦牛研究发展。此外与国内外其他畜种相比,我国牦牛分子育种研究存在过于分散、简单重复、小规模、研究经费有限等问题。因此在今后牦牛遗传育种研究中,有必要考虑解决以上问题,更好地为牦牛生产服务。

4.2 牦牛分子育种思路

目前普通牛和牦牛的基因组测序已完成,基因图谱的饱和度和大幅度提高。分析控制牦牛重要经济性性状功能基因座位的定位及对相应表型的影响成为今后牦牛分子育种研究的重点;寻找和扩大分子遗传多态性标记的数量,开发和应用新型分子标记已成为分子育种技术研究的热点和重要方向;利用分子辅助标记对目的基因进行分子标记,从而实现对重要经济性性状的标记辅助选择,是进行牦牛分子育种研究的首选方法。随着转基因技术的不断进步,转基因的定点整合、整合率、稳定遗传等问题将会逐步得到解决,从而成为牦牛育种中培育优质、高抗病性新品种的主要途径。

4.2.1 遗传资源的保护 现代育种技术的发展和运用使家畜生产量得到了极大提高,高产品种的育种满足了人类对畜产品的需要,并逐渐取代了固有地方品种,致使某些品种数目锐减。目前我国牦牛数量和品种较多,资源较丰富,牦牛遗传资源的保种问题不是十分突出。但多年来牦牛产区粗放的掠夺式经营管理和良种体系不健全、商品意识淡薄、畜群结构不合理、以自然交配为主等诸多因素,严重影响牦牛群体生产水平的提高,牦牛品种至今仍为生产性能较低的原始品种,甚至使部分地区的牦牛表现出体格变小、体重下降、繁殖率低、抗病力弱、死亡率高“退化”征候。因此,合理开发利用牦牛遗传资源,对部分品种重点保种,并开展活体原位保种、精子冷冻和胚胎冷冻保存、基因文库保存等牦牛遗传资源的保护方法研究是十分必要。

4.2.2 核外基因组的研究 线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 是动物体内唯一存在的核外遗传物质,拷贝数多,突变率高。mtDNA 直接影响体内能量代谢的重要物质-ATP 的合成,进而影响重要经济性性状。由于核外基因组固有的特点,其在我国牦牛遗传多样性、遗传分化、聚类关系、分类、系统发育等研究中是很好的分子遗传标记。因此今后应加强牦牛核外基因组研究,为牦牛遗传资源的合理保护与利用提供理论依据。

4.2.3 比较基因组学研究 人类全基因组序列的分析与比较使比较基因组学成为整个生物学领域最新、最重要、进展最快、影响最大的学科之一。而人类基因组计划的完成和动物基因组计划的实施,为不同物种间比较基因组学的研究提供了契机。目前,多个牦牛经济性性状功能基因与其他物种的比较基因组分析和进化研究表明,大多数核内功能基因能被用于牦牛与其他物种的分子进化分析。因此充分利用人、牛、

猪、羊等物种的科研成果,进一步开展牦牛与其他物种的比较基因组学研究,是提高牦牛基因组研究的一条捷径。

4.3 牦牛分子育种展望

在实际应用中将各种分子遗传标记相互结合、补充,从不同角度全面深入地了解牦牛经济性状的遗传特征,揭示相关功能基因的遗传结构和功能的内在联系,并将研究结果应用于牦牛经济性状的改良和新品种或品系的培育,是今后分子育种的重点之一。此外,通过有意识地选留加以保护优良品种基因,使之不因遗传漂变而丢失;缩短世代间隔,增加选择准确性,从而提高牦牛育种的遗传进展;显著改善牦牛的屠宰率、净肉率、产毛量、抗逆性等生产性能,使之更适合高海拔牧区畜牧业的发展,也是从事牦牛科研、生产者须要考虑的一系列问题。

参考文献:

- [1] 陈宏,张春雷. 中国肉牛分子育种研究进展[J]. 中国牛业科学, 2008,34(4):1-7.
- [2] 林金杏,阎萍,曾宪成. 现代牛分子育种及其发展趋势[J]. 中国牧业通讯,2007(16):88-91.
- [3] 张沅. 家畜育种学[M]. 北京:中国农业出版社,2002.
- [4] 钟金城,陈智华,马志杰,等. 牦牛分子育种的理论与实践[J]. 西南民族大学学报:自然科学版,2006,32(1):114-119.
- [5] 李爱民,马云,蓝贤勇,等. 牦牛分子标记研究进展[J]. 中国牛业科学,2011,37(4):30-34.
- [6] 欧江涛,钟金城,赵益新,等. 牦牛生长激素释放激素基因的克隆及序列分析[J]. 四川畜牧兽医,2003,30(5):27-30.
- [7] 白晶晶,王继卿,胡江,等. 甘南牦牛 *GH* 基因的 SNPs 分析[J]. 中国牛业科学,2009,35(2):1-5.
- [8] 白晶晶,胡江,成述儒,等. 牦牛 *GH* 基因多态性的 PCR-SSCP 分析[J]. 甘肃农业大学学报,2010,45(1):1-5.
- [9] 张森. 牦牛 *GH* 基因和 *GHR* 基因的多态性及生长发育的性状标记[D]. 兰州:甘肃农业大学,2008:1-56.
- [10] 高雪. 牛生长发育性状候选基因的分子标记研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2004.
- [11] 孙少华,李雪梅,魏学蕊,等. 皮埃蒙特杂种肉牛生长激素基因型与体重、日增重的相关性研究[J]. 黄牛杂志,2001,27(4):8-11.
- [12] 潘和平,姚玉妮,梁春年,等. 大通牦牛 *IGF-I* 基因多态性及其与生长性能相关性的研究[J]. 甘肃农业大学学报,2008,43(6):33-37.
- [13] 姚玉妮. 牦牛 *IGF-I* 基因及 *IGF-IR* 基因多态性与生长发育性状关系的研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2008:1-61.
- [14] 王丁科. 牦牛 *IGF-II* 及其受体基因多态与生长发育性状相关性研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2009.
- [15] 梁春年,阎萍,邢成峰,等. 牦牛 *MSTN* 基因内含子 2 多态性及与生长性状的相关性[J]. 华中农业大学学报,2011,30(3):285-289.
- [16] 梁春年. 牦牛 *MSTN* 和 *IGF-IR* 基因的克隆及 SNPs 与生长性状相关性研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2011.
- [17] 王明亮,高旭东,陈鹏,等. 牦牛 *FSHR* 基因部分序列多态性及其与繁殖性状的关联分析[J]. 兽类学报,2012,32(3):239-247.
- [18] 尹荣华,字向东,马志杰,等. 牦牛生长分化因子-9 基因 cDNA 克隆及序列分析[J]. 畜牧兽医学报,2009,40(7):999-1006.
- [19] 陈雪梅,字向东,余劲聪. 牦牛 *LHB* 基因的分子克隆与序列分析[J]. 家畜生态学报,2008,29(1):31-33.
- [20] 马志杰,钟金城,字向东,等. 三个牦牛群体激素敏感脂肪酶(HSL)基因外显子 I 的多态性[J]. 中国农业科学,2009,42(1):370-376.
- [21] 曹健,罗玉柱,胡江,等. 牦牛脂肪型脂肪酸结合蛋白基因(*A-FABP*)多态性分析[J]. 华北农学报,2012,27(4):42-47.
- [22] 曹健. 牦牛 *A-FABP*、*H-FABP* 基因多态性及与胴体和肉质性状关联性分析[D]. 兰州:甘肃农业大学,2012.
- [23] 梁春年,邢成峰,阎萍,等. 牦牛 *LPL* 基因外显子 7 多态性与生长性状相关性的研究[J]. 华北农学报,2010,25(5):16-19.
- [24] 刘自增,阎萍. 天祝白牦牛 *Leptin* 基因和 *SCD1* 基因单核苷酸多态性与肌肉脂肪酸含量的关联性分析[J]. 中国畜牧兽医,2011,38(4):154-158.
- [25] 王建华,杨联,张利平,等. 牦牛 *CAST* 基因部分序列的 SNPs 研究[J]. 甘肃农业大学学报,2010,45(5):1-5.
- [26] 费春红,吴建平,杨联,等. 牦牛 *CAPNI* 基因的克隆与序列分析[J]. 中国生物工程杂志,2007,27(12):90-94.
- [27] 焦斐. 牦牛 *PRKAG3*、*FAS* 基因多态性与肉质相关性研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2012.
- [28] 柴志欣,罗晓林,赵尚娟,等. 西藏牦牛 *ADD1* 基因第 2 外显子的 PCR-SSCP 检测及序列分析[J]. 生物技术通报,2012(1):124-129.
- [29] 刘自增. 牦牛 *OB* 基因和 *SCD1* 基因 SNPs 与肌肉脂肪酸含量的关联性分析[D]. 北京:中国农业科学院,2011:1-54.
- [30] Rinderknecht E, Humble R E. Primary structure of human insulin-like growth factor 2[J]. FEBS Letters,1978,89:283-289.
- [31] 毛永江,钟光辉,郑玉才,等. 麦洼牦牛乳蛋白多态性与泌乳性能相关性的研究[J]. 中国畜牧杂志,2004,40(4):19-21.
- [32] 龚卫华,郑玉才,金素钰. 牦牛 α -乳清蛋白基因 5'-非翻译区部分序列测定及 PCR-RFLP 分析[J]. 西南民族大学学报:自然科学版,2007,33(1):84-87.
- [33] 毛晓玲,杨易,刘文静,等. 牦牛垂体特异转录因子-1、生长激素和 α -乳清蛋白基因多态性的分析[J]. 四川草原,2004(5):23-25.
- [34] 樊宝良,赵志辉,李宁,等. 牦牛 α -乳清蛋白基因的克隆与序列分析[J]. 动物学报,2001,47(6):691-698.
- [35] 包鹏甲,阎萍,梁春年,等. 三个牦牛群体 *DRB3.2* 基因 PCR-RFLP 多态性研究[J]. 黑龙江畜牧兽医,2012(1):1-3.
- [36] Farnaud S, Evans R W. Lactoferrin—a multifunctional protein with antimicrobial properties[J]. Molecular Immunology,2003,40(7):395-405.
- [37] Brock J H. The physiology of lactoferrin[J]. Biochemistry and Cell Biology,2002,80(1):1-6.
- [38] 裴杰,阎萍,姬国红,等. 天祝白牦牛 *LF* 基因克隆及分子特征[J]. 中国农业科学,2009,42(3):1030-1038.
- [39] 唐懿挺,钟红梅,姬秋梅,等. 牦牛 *MC1R* 基因的克隆测序及其分析研究[J]. 生物技术通报,2011(6):88-93.