论文

猪 *Pitx2c* 基因 4 个 SNPs 的鉴定及其与肉质性状的关联分析

吴望军^①, 左波^①, 任竹青^①, Hapsari A.A.R.^②, 雷明刚^①, 徐德全^①, 李凤娥^①, 熊远著^{①*}

① 华中农业大学动物科技学院, 农业部猪遗传育种重点开放实验室/农业动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 武汉 430070;

② Faculty of Animal Agriculture, Diponegoro University, Tembalang Campus-Semarang, 50275, Indonesia

* 联系人, E-mail: xiongyz@public.wh.hb.cn

收稿日期: 2010-10-28; 接受日期: 2011-02-28

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2006CB102102)、国家高技术研究发展计划(批准号: 2006AA10Z1D6)、国家自然科学基金(批准号: 30800782)和高等学校博士学科专项科研基金(批准号: 20070504064)资助项目

摘要 为研究猪 *Pitx2c* 基因与肉质性状的关系, 在猪 *Pitx2c* 基因中共发现了 8 个 SNPs 位点, 对其中的 4 个 SNPs 位点在 4 个商业猪种及 8 个中国地方猪种进行了等位基因频率检测, 并在大白×梅山猪 F₂ 资源家系中进行了性状关联分析. 结果显示, 位点 c.474C>T($P<0.01$) 及 c.636C>T($P<0.05$) 与肉色(MCV1)存在显著或极显著相关; 位点 c.*37G>A 及 c.*47G>A 与滴水损失(DLR)、系水力(WHC)及肉色(MCV1)均存在显著相关($P<0.05$). 连锁不平衡分析表明, 临近的位点两两之间存在连锁不平衡(LD). 单倍型分析显示, 存在两种主要单倍型, 并且两拷贝的单倍型-CCGG-有利于肉质的改善.

关键词
关联分析
单倍型
Pitx2c
肉质
猪

肉类含有重要蛋白质成份, 是人类营养的主要组成部分. 对肉品质的改善将有利于提高消费者对肉的接受与感知能力. 因此, 在育种中进行肉类品质的改善有十分重要的意义. 在猪的育种中, 过去育种者主要关注的是猪的生长率、饲料转化率以及瘦肉率^[1]. 然而, 对这些性状的强度选择导致猪产生严重的不良反应, 如行为异常、生理功能紊乱, 以及免疫能力下降^[2], 在肉质方面将会增加 PSE 肉的出现, 减少肌肉脂肪的含量^[3,4]. 因此, 近年来在猪的品种改良中对肉质性状的改良越来越受到人们的关注.

在过去的几十年里, 传统的育种方法有效的改善了猪的生长率、饲料转换率及瘦肉率, 但对肉质性

状的改良进展缓慢. 随着分子生物学与基因组学的发展, 标记辅助选择(MAS)逐渐受到人们的关注, 因为标记辅助选择不仅可以选择传统育种方法能进行选择性状, 如利用 MCR4 基因的多态性标记可以用于对大理石纹的选择, 也可以选择传统育种方法不能选择的性状, 如受性别、年龄限制的性状, 以及肉质性状. 此外, 育种工作者可以利用 MAS 剔除有害的突变基因^[5-9], 在育种中能增加选择的精度与选择反应的强度. 鉴定主效基因或鉴定与主效基因紧密连锁的分子标记是开展 MAS 应用的基础. 然而, 目前仅有少数几个主效基因被成功鉴定出来, 如兰尼受体基因 1(RYR1)、酸肉基因(RN)与胰岛素样生长因

英文版见: Wu W J, Zuo B, Ren Z Q, et al. Identification of four SNPs and association analysis with meat quality traits in porcine *Pitx2c* gene. Sci China Life Sci, 2011, 54, in press

子 2(IGF2)^[6,10,11]. 单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)是一类在哺乳动物基因组分布最广的 DNA 遗传变异, 这类变异非常适合应用于产肉动物遗传改良的标记辅助选择. 目前, 科研工作者虽然已鉴定出大量的与经济性状有关联的 SNPs 标记^[12~16], 但可以真正应用于分子育种的很少. 目前主要有 3 种用于鉴定主效基因的方法^[17]: 利用分离群体来观察主效基因是否分离、基因组扫描法和候选基因法, 与其他两种方法相比, 候选基因法相对直接, 且成本较低^[18~20].

Pitx2c 是一个与配对相关的同源基因, 最初是作为一个影响人的 Rieger 综合征(显性遗传病)的重要基因被鉴定出来^[21]. 对 *Pitx2* 基因缺失的小鼠进行研究表明, *Pitx2c* 在多个器官的发育中起着重要的作用, 如体壁、眼、右肺动脉异构、心脏、垂体腺、牙齿等^[22,23]. 有研究证实, *Pitx2* 可结合一般的生长信号通路对特异性细胞的增殖起调控作用^[24], 同时可以促进肌细胞的增殖, 抑制肌细胞的分化^[25]. 此外, 许多研究报道, *Pitx2* 与肌肉的生长发育存在密切的关系^[26~31]. 近期, 本实验成功克隆了猪 *Pitx2c* 基因的 cDNA 全长(GenBank 登录号: HM030975), 与人类基因组进行图谱比较后, 将其定位于 8 号染色体上的一个影响肉质性状的 QTL 区. 进一步的组织表达谱显示, 猪 *Pitx2c* 基因在骨骼肌中的表达水平非常高(数据未显示).

综上所述, 本研究将猪的 *Pitx2c* 作为一个影响骨骼肌生长与肉质性状的候选基因进行了研究, 旨在寻找猪 *Pitx2c* 基因中的 SNPs 位点, 并进一步分析这些 SNPs 位点的多态性与肉质性状的关系.

1 材料与方法

1.1 实验动物

两个大白猪×梅山猪 F₂ 资源家系用于性状关联分析, 共计 334 头个体. 实验猪群来自华中农业大学精品猪场(中国, 武汉). 所有动物根据不同年龄段按照标准的饲养制度进行饲喂, 一日 2 次进食, 自由饮水. 按《种猪测定原理与方法》上的测定方法对 F₂ 代群体进行屠宰^[32]. Yang 等人^[33]对本研究所用动物的饲喂与屠宰后性状的测定进行了详细描述. 同时, 在 12 个猪种中进行了等位基因频率分析, 这些猪种中包括 4 个国外猪种(100 头大白猪、37 头长白猪、28 头皮特兰猪和 27 头杜洛克猪)与 8 个中国地方猪种(50 头梅山猪、25 头清平猪、18 头通城猪、19 头二花脸猪、19 头监利猪、7 头合作猪、19 头皖南猪和 12 头阳新猪).

1.2 猪 *Pitx2c* 基因 SNP 的鉴定

为了探索猪 *Pitx2c* 基因中的 SNPs 位点, 设计了 2 对扩增引物 Pitx2c-4F, Pitx2c-4R 和 Pitx2c-7F, Pitx2c-7R(表 1), 以大白猪和梅山猪的 cDNA 为扩增模板, 对 *Pitx2c* 基因的整个编码区进行 SNPs 扫描. 同时利用另一对引物 Pitx2c-6F 和 Pitx2c-6R(表 1), 以大白猪和梅山猪的 DNA 为扩增模板, 对其第一内含子中的 SNPs 进行扫描. PCR 反应在 GeneAmp PCR system 9600(Perkin Elmer, Foster City, Ca, USA)上进行. PCR 反应体系: 1.25 U LA Taq 聚合酶(TaKaRa); 1×LA PCR 缓冲液 II (Mg²⁺ Plus); 每种 dNTP 0.2 μmol/L; 0.2 μmol/L 的上下游引物; 0.5 μL cDNA

表 1 引物信息

基因名称	引物名称	引物序列(5'→3')	结合区域	产物大小(bp)	退火温度(℃)
SNP 检测引物					
<i>Pitx2c</i>	Pitx2c-7F	CTGGGTGCTGGGAAGTGA	5'非翻译区	854	58.5
	Pitx2c-7R	GCTGGCTGGTGAAGTGAGT	外显子 2		
	Pitx2c-4F	AGCGGACTCACTTCACCAG	外显子 2	787	60.5
	Pitx2c-4R	GAGTGCCACGACCTTCTA	3'非翻译区		
	Pitx2c-6F	CTTTGCCCACTCTTGTTTC	外显子 1	1428	57.3
	Pitx2c-6R	TCTTCTTGGACGGGTCTTCA	外显子 2		
基因分型引物					
<i>Pitx2c</i>	PE1-1F	CAAGAATCGCCGGGCCAAAT	外显子 2	296	57.1
	PE1-1R	TCACCGCTGAGGGCACCAT	外显子 2		
	PE1-2F	CGCAGTTCAACGGGCTTAT	外显子 2	407	57.4
	PE1-2R	GCTGGAGTGCTGCTTTGCT	外显子 2		
	F1	GTGTGAGCTGCGCCCACT	3'非翻译区	105	55
	R1	TCTTGAGTGCCACGACCT	3'非翻译区		
	S1	GGGATCCTAGGACCGTGC	3'非翻译区	—	28

模板或 1 μL 的 DNA 模板, 最后加水补足 25 μL 体系. PCR 反应程序如下: 94 $^{\circ}\text{C}$ 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 优化的退火温度 30 s(表 1); 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 30 个循环. PCR 产物用 2.0% 琼脂糖进行凝胶电泳检测, 利用 Gel Extraction Kit 胶回收试剂盒(上海生工, 中国)进行 PCR 产物的纯化回收. 将纯化的 PCR 产物连接到 pMD18-T 载体(TaKaRa, 日本), 然后转化 DH5 α 大肠杆菌. 至少 3 个独立的阳性克隆送北京华大基因有限公司(BGI)进行双向测序, 利用 DNASTAR 软件对所测的序列进行比对, 寻找潜在的 SNP 位点.

1.3 基因分型方法

多态位点 c.474C>T 位于翻译起始位点下游 474 bp 处, 而 c.636C>T 位于翻译起始位点下游 636 bp 处. 多态位点 c.*37G>A 位于终止密码子下游 37 bp 处, 而 c.*47G>A 位于终止密码子下游 47 bp 处(提交 GenBank, 登录号: HM030975). 利用 PCR-RFLP 与焦磷酸测序的方法在大白猪 $\times$ 梅山猪 F_2 资源家系对这些位点进行进一步的基因分型. 重新设计了 PE1-1F/R 与 PE1-2F/R 引物对(表 1), 分别对 c.474C>T 与 c.636C>T 两个位点进行 PCR 扩增, 同时建立相应的 *Bpu*II-PCR-RFLP 与 *Hind* II-PCR-RFLP 方法对它们进行分型. PCR 反应体系为 25 μL , 包括 1 U *Taq* 聚合酶(Fermentas); 1 $\times$ PCR 缓冲液; 每种 dNTP 0.2 $\mu\text{mol/L}$; 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物; 2 mmol/L MgCl_2 , 模板 1 μL 基因组 DNA. PCR 反应程序如下: 94 $^{\circ}\text{C}$, 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$, 40 s; 优化的退火温度(表 1)40 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 34 个循环. 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min. PCR 产物利用相应的限制性内切酶 37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切 6 h, 然后用 2.5% 琼脂糖凝胶电泳判别分型.

利用焦磷酸测序的方法对 3'非翻译区的突变位点 c.*37G>A 与 c.*47G>A 进行基因分型. 使用焦磷酸测序系统(PyrosequencingTM Systems, Biotage)中的引物设计软件(Assay Design Software)设计焦磷酸测序扩增引物与焦磷酸测序引物. 根据软件所设计出的引物结果, 对扩增引物 R1 添加生物素标记, 使用 HPLC 方法(高效液相色谱法)进行引物纯化. 而其他引物不需要加生物素标记, 用一般的生物合成方法合成即可(PAGE 法). 扩增引物 F1 与 R1(表 1)所扩增的片段长为 105 bp. 聚合酶链式反应在 35 μL 体系中进行, 包括 1 $\times$ PCR 缓冲液; 每种 dNTP 0.2 $\mu\text{mol/L}$; 2 mmol/L MgCl_2 , 5 pmol 的上下游引物; 1 U *Taq* 聚合酶

(Fermentas); 模板 1 μL 基因组 DNA. PCR 反应程序如下: 94 $^{\circ}\text{C}$, 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 55 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 s, 执行 40 个循环. 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min. 然后利用所设计的焦磷酸测序引物 S1 对所扩增的基因片段测序. 测序反应在 PSQ 96MA 磷酸测序仪(Biotage)中进行, 测序反应所用的试剂为 Pyro Gold Reagent Kit (Biotage), 样品前处理与测序操作按照试剂与仪器生产厂家所提供的说明进行.

1.4 统计分析

利用在线工具 chi-square test 对 4 个多态位的基因型在 F_2 代资源家系中分型进行了哈德温伯平衡检验(<http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>), 利用 HAPLOVIEW 4.2 软件对 4 个位点之间的连锁不平衡进行了分析^[34]. 利用 PHASE version 2.1 对 F_2 代个体进行了单倍型构建^[35].

使用 SAS software package(SAS Institute, Cary, NC, USA)中的一般线性模型程序(GLM)对 SNPs 与性状之间的关系进行分析. 利用 Duncan's 方法对不同基因型之间的表型值进行了显著性检验, $P < 0.05$ 定为差异显著. 下面是本研究所采用的 GLM 统计模型: $T_{ijk} = \mu + S_i + Y_j + G_k + b_{ijk}X_{ij} + e_{ijk}$. T_{ijk} 为所观察的表型值, μ 代表最小二乘均值, S_i 代表性别效应($i=1$ 表示公猪, $i=0$ 表示母猪), Y_j 代表年效应($j=1$ 表示 2003, $j=2$ 表示 2004), G_k 代表基因型效应($k=1, 2, 3$), b_{ijk} 为回归系数, e_{ijk} 为随机残差. 运用 REG 程序分析加性效应与显性效应, 加性效应用 -1, 0 和 1 分别代表纯合基因型, 杂合基因型与另一种纯合基因型, 显性效应用 1, -1 和 1 分别代表纯合基因型, 杂合基因型与另一种纯合基因型. 单倍型与性状的关联分析利用同样的模型进行.

2 结果

2.1 猪 *Pitx2c* 基因组 SNP 扫描

共设计了 3 对引物用来扫描 *Pitx2c* 基因组序列中的 SNPs, 包括整个编码区, 部分非翻译区与第一内含子区, 序列长共计 2489 bp. 结果共扫描到 8 个潜在的 SNPs 位点, 包括编码区的 2 个同义突变位点(c.474C>T 与 c.636C>T), 2 个 3'非翻译区的突变位点(c.*37G>A 与 c.*47G>A)(提交 GenBank, 登录号: HM030975), 另外 4 个突变位点位于第一内含子中

(GenBank 登录号: HM030974).

2.2 不同品种中等位基因频率分析

利用引物对 PE1-1F 与 PE1-1R 来检测 c.474C>T 多态位点, PCR 产物长 296 bp, 扩增产物用限制性内切酶 *Bpu1102I* 消化进行基因型判别, 当等位基因为 C 时可产生一条 296 bp 的带, 当等位基因为 T 时, 可产生 247 与 49 bp 两个条带(图 1(A)). 引物对 PE1-2F 与 PE1-2R 用来分析 c.636C>T 多态位点, 所扩增 PCR 产物长为 407 bp, 扩增产物用限制性内切酶 *Hind II*

消化进行基因型判别, 当等位基因为 T 时可产生一条 407 bp 的带, 当等位基因为 C 时, 可产生 135 与 272 bp 两条带(图 1(B)). 同时, 利用焦磷酸测序的方法分析了 3' 非翻译区的两个突变位点 c.*37G>A 与 c.*47G>A. 表 2 列出了 4 个位点在不同猪群中的基因型频率与等位基因频率. 在 c.474C>T 与 c.636C>T 两个位点中, C 等位基因在中国地方猪种中占绝对优势. 而在 c.*37G>A 与 c.*47G>A 两个位点中, G 等位基因在中国地方猪种中占明显优势.

图 1 猪 *Pitx2c* 基因多态位点 c.474C>T(A)与 c.636C>T(B) PCR-RFLP 分型结果
M: DL2000

表 2 基因型频率与等位基因频率^{a)}

品种	外显子 2 的多态位点											
	c.474 C>T						c.636 C>T					
	基因型频率			等位基因频率			基因型频率			等位基因频率		
	No.	TT	CT	CC	T	C	No.	TT	CT	CC	T	C
大白猪	100	88	9	3	0.945	0.055	34	31	3	0	0.977	0.023
长白猪	37	36	1	0	0.993	0.007	32	32	0	0	1	0
皮特兰猪	28	16	10	2	0.804	0.196	24	12	10	2	0.763	0.237
杜洛克猪	27	7	17	3	0.608	0.392	27	4	15	8	0.397	0.603
清平猪	25	0	0	25	0	1	22	0	0	22	0	1
梅山猪	50	0	0	50	0	1	46	1	0	35	0.030	0.970
通城猪	18	0	0	18	0	1	17	0	0	17	0	1
二花脸猪	19	0	1	18	0.014	0.986	—	—	—	—	—	—
监利猪	19	0	0	19	0	1	—	—	—	—	—	—
合作猪	7	0	1	6	0.038	0.962	—	—	—	—	—	—
皖南猪	19	0	1	18	0.014	0.986	—	—	—	—	—	—
阳信猪	12	0	0	12	0	1	—	—	—	—	—	—

品种	3'非翻译区的多态位点											
	c.*37 G>A						c.*47 G>A					
	基因型频率			等位基因频率			基因型频率			等位基因频率		
	No.	AA	AG	GG	A	G	No.	AA	AG	GG	A	G
大白猪	31	31	0	0	1	0	31	27	4	0	0.935	0.065
长白猪	27	27	0	0	1	0	27	26	1	0	0.982	0.018
皮特兰猪	28	14	14	0	0.750	0.250	28	14	12	2	0.714	0.286
杜洛克猪	27	7	18	2	0.593	0.407	27	7	15	5	0.537	0.463
清平猪	25	0	4	21	0.080	0.920	25	0	4	21	0.080	0.920
梅山猪	28	1	4	23	0.107	0.893	28	1	4	23	0.107	0.893

a) —: 示没有进行分型的品种

2.3 单位点 SNP 与肉质性状的关联分析

哈德温伯平衡检测显示, 猪 *Pitx2c* 基因中 4 个多态位点在大白×梅山 F₂ 代资源家系中均符合哈德温伯平衡(表 3). 单个 SNP 与肉质性状之间的关联分析结果如表 4 所示. 关联分析表明, SNP 位点 c.474C>T 与背最长肌肉色值(MCV1)存在极显著关系($P<0.01$), 而 SNP 位点 c.636C>T 与背最长肌肉色值呈显著相关($P<0.05$), 并且两个位点均表现出显著的显性效应. 另外, 位于 3'非翻译区的突变位点(c.*37G>A 与 c.*47G>A)均与背最长肌滴水损失(DLR)、背最长肌失水率(WHC)及背最长肌肉色值存在显著相关($P<0.05$), 并且这两个突变位点在所分析的 3 个肉质性状中均表现出显著的显性效应, 特别是 c.*47G>A 位点在 MCV1 表现出极显著的显性效应($P<0.01$). 有

趣的是, 编码区的 2 个突变位点(c.474C>T 与 c.636C>T)具有相似的关联分析结果, 均与 MCV1 存在显著的相关性, 而 3'非翻译区的突变位点(c.*37G>A 与 c.*47G>A)与所有分析肉质性状均存在相似的关联分析结果.

2.4 单倍型分析

利用 HAPLOVIEW 4.2 软件对猪 *Pitx2c* 基因中的 4 个 SNP 位点所形成的单位块与 LD 进行分析. 结果显示, 在这 4 个 SNPs 中仅预测到一个单倍块(图 2). LD 分析表明, 编码区的 2 个突变位点 c.474C>T 与 c.636C>T 处于连锁状态($r^2=0.85$), 而 3'非翻译区的突变位点 c.*37G>A 与 c.*47G>A 处于紧密连锁状态($r^2=0.95$). 另外分析结果显示, 编码区与 3'非翻译区的两相邻突变位点的 c.636C>T 与 c.*37G>A 也处

表 3 检测的 SNP 位点在 F₂ 代资源家系中的基因型分布结果

外显子 2 的多态位点					
SNP	Line ^{a)}	基因型			HWE ^{b)}
		CC	CT	TT	
c.474C>T	LMF2	68	146	69	0.590
c.636C>T	LMF2	69	147	73	0.760
3'非翻译区的多态位点					
SNP	Line	基因型			HWE
		AA	AG	GG	
c.*37 G>A	LMF2	74	137	71	0.630
c.*47 G>A	LMF2	71	140	71	0.920

a) 来源于大白猪与梅山猪的 F₂ 代杂交群体; b) 哈德温伯平衡检验 P 值

表 4 猪 *Pitx2c* 基因多态性与肉质性状的关联分析结果^{a)}

SNP	性状	基因型($\bar{x} \pm SE$)			遗传效应($\bar{x} \pm SE$)	
外显子 2 的多态位点						
c.474 C>T	MCV1(LD)	CC(<i>n</i> =68)	CT(<i>n</i> =146)	TT(<i>n</i> =69)	加性效应	显性效应
		18.733±0.140 ^{AB}	18.966±0.095 ^A	18.516±0.140 ^B	-0.105±0.098	-0.173±0.068*
c.636 C>T	MCV1(LD)	CC(<i>n</i> =69)	CT(<i>n</i> =147)	TT(<i>n</i> =73)	加性效应	显性效应
		18.911±0.310 ^{ab}	19.258±0.197 ^a	18.575±0.273 ^b	-0.165±0.098	-0.257±0.069*
3'非翻译区的多态位点						
c.*37 G>A	DLR%(LD)	AA(<i>n</i> =74)	AG(<i>n</i> =137)	GG(<i>n</i> =71)	加性效应	显性效应
		6.401±0.178 ^{ab}	6.806±0.131 ^a	6.338±0.181 ^b	-0.030±0.126	-0.220±0.091*
	WHC%(LD)	91.298±0.235 ^{ab}	90.753±0.173 ^b	91.379±0.241 ^a	0.040±0.168	0.295±0.121*
c.*47 G>A	MCV1(LD)	18.645±0.133 ^b	19.014±0.098 ^a	18.682±0.136 ^b	0.015±0.095	-0.173±0.068*
		AA(<i>n</i> =71)	AG(<i>n</i> =140)	GG(<i>n</i> =71)	加性效应	显性效应
	DLR%(LD)	6.378±0.181 ^{ab}	6.807±0.129 ^a	6.342±0.181 ^b	-0.020±0.128	-0.225±0.091*
c.*47 G>A	WHC%(LD)	91.326±0.240 ^{ab}	90.754±0.171 ^b	91.371±0.241 ^a	0.020±0.170	0.300±0.121*
	MCV1(LD)	18.614±0.135 ^b	19.022±0.097 ^a	18.681±0.136 ^b	0.035±0.096	-0.188±0.068**

a) MCV1: 背最长肌肉色; DLR: 背最长肌滴水损失; WHC: 背最长肌失水率; 同一排不同小写字母表示差异显著($P<0.05$); 同一排不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$). * $P<0.05$, ** $P<0.01$

图 2 猪 *Pitx2c* 基因 SNPs 之间的连锁不平衡(LD)分析
标记之间显示的配对 LD 值(r^2). 阴影代表标记之间所处的连锁状态, 较暗的阴影表示两标记之间处于较高的连锁关系; 利用 HAPLOVIEW 4.2 软件中默认的算法(置信区间)对 SNPs 所形成的单倍块进行预测. 预测到一个单倍块, 单倍块中包含了 c.*37G>A 与 c.*47G>A 两个多态位点. 括号中显示了每种单倍型的群体频率

表 5 单倍型与单倍型频率分析结果^{a)}

索引	单倍型	E(freq) ^{a)}	SE ^{b)}
1	CCAA	0.016894	0.002761
2	CCAG	0.000146	0.000497
3	CCGA	0.001812	0.000601
4	CCGG	0.459048	0.002680
5	CTAA	0.015679	0.003205
6	CTAG	0.001953	0.001064
7	CTGG	0.004605	0.002106
8	TCAA	0.009468	0.001537
9	TCGG	0.007721	0.001496
10	TTAA	0.458881	0.003064
11	TTAG	0.007223	0.001165
12	TTGG	0.016549	0.002288

a) a: E(freq)示单倍型频率; b: SE 示标准误差

表 6 猪 *Pitx2c* 基因单倍型与肉质性状的关联分析结果^{a)}

性状	LSM(SE) ^{a)}			P 值		
	11 ^{b)}	12 ^{c)}	22 ^{d)}	11-12	11-22	12-22
MCV1	18.764(0.173)	19.026(0.123)	18.530(0.180)	0.220	0.352	0.024
DLR%	6.446(0.235)	6.853(0.167)	6.339(0.244)	0.161	0.753	0.084
WHC%	91.240(0.312)	90.697(0.222)	91.392(0.324)	0.159	0.737	0.079

a) MCV1: 背最长肌肉色; DLR: 背最长肌滴水损失; WHC: 背最长肌失水率. a: LSM(SE)表示最小二乘均值与标准误差; b: 11 表示单倍型 1, -CCGG-与单倍型 1, -CCGG-的结合; c: 12 表示单倍型 1, -CCGG-与单倍型 2, -TTAA-的结合; d: 22 表示单倍型 2, -TTAA-与单倍型 2, -TTAA-的结合

于连锁状态($r^2=0.82$). 此外, HAPLOVIEW 4.2 软件预测到 2 个标签 SNPs, 它们分别是 c.474C>T 与 c.*37G>A. 利用 PHASE 软件构建了 4 个 SNPs 位点的单倍型, 共发现了 12 种单倍型, 主要由 2 种单倍型组成, 单倍型 1(-CCGG-)与单倍型 2(-TTAA-), 分别占到单倍型总数的 45.9%与 45.88%, 两种单倍型占到单倍型总数的 91.78%(表 5). 接下来对单倍型与肉质性状进行了关联分析, 结果如表 6 所示. 由于一些单倍型数量很少(表 5), 在进行关联分析时, 仅将带有单倍型 1 与单倍型 2 的 F₂ 代资源家系个体进行了分析. 结果显示, 单倍型与 MCV1 存在显著相关($P<0.05$), 而与 DLR 及 WHC 接近显著水平($P<0.1$)(表 6).

3 讨论

肉是由屠宰后产肉动物的骨骼肌组织所形成的. 骨骼肌组织由许多不同类型的细胞组成, 而肌纤维是骨骼肌组织的主要组成部分. 骨骼肌形成是一个极为复杂的过程, 其中涉及到许多的调控因子^[36]. 因此, 深入了解这些调控因子在骨骼生长与发育过程

中的作用对猪育种中肉质的改善具有重要意义。

许多研究表明, *Pitx2c* 基因在肌肉发育中起着非常重要的作用^[26,27,29,37,38]。本实验室近期发现, *Pitx2c* 基因在骨骼肌中高水平表达。因此, 选择猪的 *Pitx2c* 基因作为一个影响猪肉品质的候选基因, 并利用白×梅山 F₂ 代资源家系研究了 *Pitx2c* 基因多态性与重要经济性状的关系。

连锁不平衡分析表明, SNPs c.474C>T, c.*37G>A 与 c.636C>T 处于连锁状态($r^2>0.8$), 而 3'非翻译区的突变位点 c.*37G>A 与 c.*47G>A 处于紧密连锁状态($r^2=0.95$)。以上结果提示, 这些连锁的 SNPs 位点可能对相同的性状具有一致的影响效应。正如预期, 4 个多态位点的多态性均与 MCV1 存在显著相关, 并且均表现出显著的显性效应(表 4)。虽然编码区的两个突变位点 c.474C>T 与 c.636C>T 显示与 MCV1 均存在显著相关(单独分析或联合分析), 并且带有 C 等位基因的个体表现出更高的 MCV1 值, 但这两个位点对 MCV1 值的效应稍有不同。暗示着猪 *Pitx2c* 基因的不同变异对 MCV1 存在不同的影响效应。另外, 编码区的两个突变位点 c.474C>T 与 c.636C>T 等位基因频率在商业猪群与中国地方猪群存在显著差异, C 等位基因在中国地方猪种占绝对优势, 有些地方品种 C 等位基因的频率甚至达到了 1(表 2), 这与中国地方猪种具有更高的肉质值相一致。此外, 3'非翻译区的突变位点 c.*37G>A 与 c.*47G>A 均与 DLR, WHC 和 MCV1 存在相一致的显著相关(表 4), 并且两位点在 DLR 与 WHC 上均显现出显著的显性效应($P<0.05$), 这也间接地支持了这两个位点处于紧密连锁状态的结论。此外, 3'非翻译区的突变位点 c.*37G>A 与 c.*47G>A 的等位基因频率在商业猪群与中国地方猪群也存在明显的差异, 在两个位点中 G 等位基因在中国地方猪种均具有很高的频率。与 AA 基因型个体相比, 带有 GG 基因型的个体具有更高的 MCV1 与 WHC, 而具有更低的 DLR, 虽然这些差异没有达到显著水平, 但结果符合中国地方猪种具有更好肉质特性的事实。进一步, 发现突变位点 c.*37G>A 与 c.*47G>A 对 MCV1, DLR 与 WHC 均表现

出超显性效应。与带有纯合基因 GG 的个体相比, 带有杂合基因型 AG 的个体具有更高 MCV1 与 DLR, 而具有更低的 WHC($P<0.05$)。以上结果提示, 当突变位点 c.*37G>A 与 c.*47G>A 的等位基因为 G 时将会具有更好的猪肉品质, 但杂合基因不利于肉质的改善。众所周知, 肉的 pH 与肉色、滴水损失以及失水率均存在很大的关系。然而本研究并未发现突变位点 c.*37G>A 与 c.*47G>A 的多态性与 pH 存在显著相关。但研究结果显示, 带有纯合基因型 GG 的个体比 AA 基因个体具有更高的 pH(数据未显示)。如果 AA 基因型个体的肉质具有更低的 pH, 那么带有 AA 基因型的个体将具有更高的 DLR 与低的 WHC^[39-42]。有趣的是, 本实验室所获得的结果与以上结论一致。此外, 本研究同时显示, 杂合基因个体具有最低的 pH, 提示这些位点对 pH 可能具有超显性效应。虽然本实验结果暗示, c.*37G>A 与 c.*47G>A 的多态性与 pH 很可能存在相关, 但仍需进一步在其他的猪群对 c.*37G>A 与 c.*47G>A 的多态性与 pH 的关系进行鉴定。

从单标记的关联分析结果可以推断, 提高突变位点 c.474C>T 与 c.636C>T 等位基因 C 的频率与 c.*37G>A 与 c.*47G>A 等位基因 G 的频率将会有利于肉品质的改善。为了验证该推测, 进一步做了单倍型与肉质性状的关联分析, 结果显示单倍型与 MCV1 存在显著相关($P<0.05$), 而与 DLR 和 WHC 接近显著相关($P<0.1$)(表 6)。因此, 推测猪 *Pitx2c* 基因的不同变异对 MCV1, DLR 与 WHC 具有不同影响效应, 而且这些效应的差异可能是由于变异的位置差异与位点之间存在相互作用所致。

本研究首次鉴定了猪 *Pitx2c* 基因的多态性, 进一步分析了这些位点的多态性与肉质性状的关系。在所分析的 4 个多态位点中, 连锁不平衡分析结果表明, 相邻两位点之间处于连锁状态。有趣的是, 4 个位点的多态性均对 MCV1 具有显著的影响效应。虽然本实验结果显示猪 *Pitx2c* 基因的遗传变异与肉质性状存在显著相关, 但仍需在其他商业猪群中对这种关系做进一步的证实。

参考文献

- Ollivier L, Gue'blez R, Webb A J, et al. Breeding Goals for Nationally and Internationally Pig Breeding Organisations. 4th ed. Edingburgh, UK: World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, 1990
- Rauw W M, Kinas E, Noordhuizen-Stassen E N, et al. Undesirable side effects of selection for high production efficiency in farm animals: a review. Livest Prod Sci, 1998, 56: 15-33

- 3 Hermes S, Luxford B G, Graser H U. Genetic parameters for lean meat yield, meat quality, reproduction and feed efficiency traits for Australian pigs 2. Genetic relationships between production, carcass and meat quality traits. *Livest Prod Sci*, 2000, 65: 249–259
- 4 Lonergan S M, Huff-Lonergan E, Rowe L J, et al. Selection for lean growth efficiency in Duroc pigs influences pork quality. *J Anim Sci*, 2001, 79: 2075–2085
- 5 Carr C C, Morgan J B, Berg E P, et al. Growth performance, carcass composition, quality, and enhancement treatment of fresh pork identified through deoxyribonucleic acid marker-assisted selection for the Rendement Napole gene. *J Anim Sci*, 2006, 84: 910–917
- 6 Fujii J, Otsu K, Zorzato F, et al. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science*, 1991, 253: 448–451
- 7 Hamilton D N, Ellis M, Miller K D, et al. The effect of the Halothane and Rendement Napole genes on carcass and meat quality characteristics of pigs. *J Anim Sci*, 2000, 78: 2862–2867
- 8 Miller K D, Ellis M, McKeith F K, et al. Frequency of the Rendement Napole RN- allele in a population of American Hampshire pigs. *J Anim Sci*, 2000, 78: 1811–1815
- 9 Moeller S J, Baas T J, Leeds T D, et al. Rendement Napole gene effects and a comparison of glycolytic potential and DNA genotyping for classification of Rendement Napole status in Hampshire-sired pigs. *J Anim Sci*, 2003, 81: 402–410
- 10 Le Roy P, Naveau J, Elsen J M, et al. Evidence for a new major gene influencing meat quality in pigs. *Genet Res*, 1990, 55: 33–40
- 11 Nezer C, Moreau L, Brouwers B, et al. An imprinted QTL with major effect on muscle mass and fat deposition maps to the IGF2 locus in pigs. *Nat Genet*, 1999, 21: 155–156
- 12 Fan B, Lkhagvadorj S, Cai W, et al. Identification of genetic markers associated with residual feed intake and meat quality traits in the pig. *Meat Sci*, 2010, 84: 645–650
- 13 Ovilo C, Fernandez A, Rodriguez M C, et al. Association of MC4R gene variants with growth, fatness, carcass composition and meat and fat quality traits in heavy pigs. *Meat Sci*, 2006, 73: 42–47
- 14 Piorkowska K, Tyra M, Rogoz M, et al. Association of the melanocortin-4 receptor (MC4R) with feed intake, growth, fatness and carcass composition in pigs raised in Poland. *Meat Sci*, 2010, 85: 297–301
- 15 Sieczkowska H, Kocwin-Podsiadla M, Zybert A, et al. The association between polymorphism of PKM2 gene and glycolytic potential and pork meat quality. *Meat Sci*, 2010, 84: 180–185
- 16 Rothschild M, Jacobsont C, Vaske D. The estrogen receptor locus is associated with a major gene influencing litter size in pigs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 201–205
- 17 te Pas M F W, Everts M E, Haagsman H P. *Muscle Development of Livestock Animals: Physiology, Genetics and Meat Quality*. Wallingford: CABI Publisher, 2004. 428
- 18 de Vries A G, Sosnicki A, Garnier J P, et al. The role of major genes and DNA technology in selection for meat quality in pigs. *Meat Sci*, 1998, 49: 245–255
- 19 Gerbens F, Harders F L, Groenen M A, et al. A dimorphic microsatellite in the porcine H-FABP gene at chromosome 6. *Anim Genet*, 1998, 29: 408
- 20 Short T H, Rothschild M F, Southwood O I, et al. Effect of the estrogen receptor locus on reproduction and production traits in four commercial pig lines. *J Anim Sci*, 1997, 75: 3138–3142
- 21 Semina E V, Reiter R, Leysens N J, et al. Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, RIEG, involved in Rieger syndrome. *Nat Genet*, 1996, 14: 392–399
- 22 Gage P J, Suh H, Camper S A. Dosage requirement of Pitx2 for development of multiple organs. *Development*, 1999, 126: 4643–4651
- 23 Lin C R, Kioussi C, O'Connell S, et al. *Pitx2* regulates lung asymmetry, cardiac positioning and pituitary and tooth morphogenesis. *Nature*, 1999, 401: 279–282
- 24 Kioussi C, Briata P, Baek S H, et al. Identification of a Wnt/Dvl/beta-Catenin --> *Pitx2* pathway mediating cell-type-specific proliferation during development. *Cell*, 2002, 111: 673–685
- 25 Martinez-Fernandez S, Hernandez-Torres F, Franco D, et al. *Pitx2c* overexpression promotes cell proliferation and arrests differentiation in myoblasts. *Dev Dyn*, 2006, 235: 2930–2939
- 26 Abu-Elmagd M, Francis-West P, Munsterberg A. Wnt signalling via *Pitx2* regulates somite and limb myogenesis. *Mech Dev*, 2009, 126: S213–S213
- 27 Amanda E Z L, Qian M, Gage P J. *Pitx2* is critical for the survival and specification of extraocular muscles. *Dev Biol*, 2008, 319: 536
- 28 L'Honore A, Coulon V, Marcil A, et al. Sequential expression and redundancy of *Pitx2* and *Pitx3* genes during muscle development. *Dev Biol*, 2007, 307: 421–433

- 29 Shih H P, Gross M K, Kioussi C. Expression pattern of the homeodomain transcription factor Pitx2 during muscle development. *Gene Expr Patterns*, 2007, 7: 441–451
- 30 Shih H P, Gross M K, Kioussi C. Cranial muscle defects of Pitx2 mutants result from specification defects in the first branchial arch. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 5907–5912
- 31 Zhou Y F, Cheng G, Dieter L, et al. An altered phenotype in a conditional knockout of Pitx2 in extraocular muscle. *Investig Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50: 4531–4541
- 32 Xiong Y Z, Deng C Y. *Principle and Method of Swine Testing*. Beijing: Chinese Agriculture Press, 1999
- 33 Yang H, Xu Z Y, Lei M G, et al. Association of 3 polymorphisms in porcine troponin I genes (TNNI1 and TNNI2) with meat quality traits. *J Appl Genet*, 51: 51–57
- 34 Barrett J C, Fry B, Maller J, et al. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, 2005, 21: 263–265
- 35 Stephens M, Smith N J, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet*, 2001, 68: 978–989
- 36 Buckingham M, Bajard L, Chang T, et al. The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J Anat*, 2003, 202: 59–68
- 37 Dong F Y, Sun X X, Liu W, et al. Pitx2 promotes development of splanchnic mesoderm-derived branchiomeric muscle. *Development*, 2006, 133: 4891–4899
- 38 Evans A L, Gage P J. The essential role of Pitx2 in extraocular muscle development. *Dev Biol*, 2006, 295: 384–385
- 39 de Vries A G, van der Wal P G, Long T, et al. Genetic parameters of pork quality and production traits in Yorkshire populations. *Livest Prod Sci*, 1994, 40: 277–289
- 40 Otto G, Roehe R, Looft H, et al. Comparison of different methods for determination of drip loss and their relationships to meat quality and carcass characteristics in pigs. *Meat Sci*, 2004, 68: 401–409
- 41 Hermes S, Luxford B G. Genetic parameters for lean meat yield, meat quality, reproduction and feed efficiency traits for Australian pigs 2. Genetic relationships between production, carcass and meat quality traits. *Livest Prod Sci*, 2000, 65: 249–259
- 42 Knapp P, Willam A. Genetic parameters for lean meat content and meat quality traits in different pig breeds. *Livest Prod Sci*, 1997, 52: 69–73