



论 文

黄体(*yellow*⁰)是果蝇小体重的一个标记

李新海, 邓学梅*

中国农业大学动物科技学院, 北京 100193

* 联系人, E-mail: deng@cau.edu.cn

收稿日期: 2009-03-02; 接受日期: 2009-03-25

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2006CB102101)和国家自然科学基金(批准号: 30771535)资助项目

摘要 标记辅助选择(marker-assisted selection, MAS)是现代育种的一种重要手段,但是在研究中经常发现与数量性状基因座位(quantitative trait loci, QTL)连锁的标记效应不稳定,这使得 MAS 在动物育种中成功应用的报道很少,人们甚至怀疑 MAS 在实际应用中的效果. 本研究首次利用模式生物果蝇来研究是否能够找到应用到 MAS 中的有效标记. 采用 F₂ 设计将带有黄体(*y*⁰)标记(X 染色体上 *yellow* 基因的一个隐性突变)的品系分别与 3 个不带此标记的品系进行正反杂交,结果发现 F₂ 代中, *y*⁰ 标记与小体重显著相关($P < 0.001$),而且这种相关不随遗传背景的改变而消失. 标记效应在雌雄中分别达到了 $0.95\sigma_p$ (表型标准差)和 $0.68\sigma_p$. 以 *y*⁰ 为标记,通过 20 代标记辅助导入(marker-assisted introgression, MAI),将 *y*⁰ 所处的 DNA 区段导入到野生型品系中,结果使野生型雌雄体重分别降低了 13% 和 7% ($P < 0.0001$),从而成功建立了小体重果蝇品系,实验证明确实存在一个与 *y*⁰ 紧密连锁的小体重 QTL. 利用 *y*⁰ 标记和白眼(*white*)标记进行深度 MAI,进一步将一个小于 1.5 cM 的 *y*⁰ 标记区段导入到野生型品系中,同样导致了野生型果蝇相同程度的体重降低. 可见,果蝇的小体重 QTL 位于 *y*⁰ 标记区段,遗传距离不超出 1.5 cM 的范围. PCR 和 Southern 杂交的结果显示,此标记处的 *y* 基因发生了缺失,可能影响了果蝇的正常生长发育. 本实验充分证明,应用到 MAS 育种中的 QTL 有效标记是存在的,并且可以用于培育新的品系.

关键词果蝇
小体重
黄体
数量性状座位
标记辅助选择
标记辅助导入

随着越来越多的分子标记被发现并被应用到基因组范围的相关分析中,畜禽中影响经济数量性状的大量基因和标记得到鉴定^[1]它们正在或将要应用到标记辅助选择(marker-assisted selection, MAS)或标记辅助导入(marker-assisted introgression, MAI)中^[2],这为那些难以用传统育种方法加快遗传进展的性状的提高提供了机会^[3]. Dekkers^[2]统计了正在应用的和可用的一些基因或标记,主要有猪(*Sus scrofa*)的氟烷基因(RYR)、胰岛素样生长因子-2 (IGF-2)、牛的肌肉生长抑制素基因(Myostatin)^[4]等.

尽管此前的研究得到了大量影响数量性状的座位和连锁标记,但是它们大多来源于实验群体. 而实验群体得到的效应在育种群体中可能会发生很大改变. Spelman 和 Bovenhuis 就发现与没有应用数量性状基因座位(quantitative trait loci, QTL)的育种过程相比,将一个实验中发现的 QTL 应用于育种时,反而导致了遗传进展的降低,他们认为,要将 QTL 的实验结果应用到育种中,必须首先将这些结果在育种群体中进行验证^[5]. 家畜家禽的世代间隔长、繁殖速率低、养殖费用高、对标记辅助选择(MAS)的应用效果难以

度量, 因此, MAS 在畜牧业育种中成功应用的报道很少. 在大多数文献中, MAS 仅仅被提及具有美好的发展前景, 还有一些文献则是用计算机模拟来评估 MAS 在应用中的潜力^[3].

果蝇作为一种模式生物, 世代间隔短, 培养操作容易, 而且其全基因组草图在 2000 年就已经得到, 一直以来深受遗传学家的喜爱^[6]. 果蝇不仅可以用作人类疾病研究的模型, 还可以用来研究数量性状的遗传学机制^[7]. 用果蝇研究小体重, 找到影响体重的基因, 同样可以为大动物体重数量遗传机制的揭示提供借鉴. 本实验充分利用果蝇数量大, 易于获得的优势, 用它进行 MAS 的模拟研究, 探讨是否能够找到应用到 MAS 中的小体重有效标记.

本实验室在长期的果蝇培养中发现, 体表颜色为黄色的果蝇品系体重一直较小, 用它与其他品系杂交时也出现 F₂ 代黄体的果蝇体重偏低, 因此怀疑黄体是个小体重标记. 黄体基因(*yellow*), 是一个果蝇体表色素模式控制的一个重要基因, 其功能失效, 会导致体表黑色素急剧减少而使体表颜色变为黄色^[8]. 而黑色素对于果蝇的正常生长发育至关重要, 它是果蝇身体表皮硬化的重要成分而且还具有重要的免疫作用^[9,10]. 因此, 黄体基因可能是个小体重座位. 本研究首先对黄体标记与小体重的相关性进行了确认, 并对它的分子特征进行了鉴定, 最后从标记效应大小、标记与 QTL 的连锁程度以及标记效应在不同背景下的表现一致性等方面探讨了标记是否能够应用到 MAS 中.

1 材料和方法

1.1 果蝇品系

本研究使用了 4 个果蝇品系, 以其所携带的突变基因分别命名为 y^0 , *OR*, *w* 和 *e*; 其中, y^0 带有黄体基因 *yellow* 的隐性突变(y^0), 位于 *X* 染色体端部 0 cM, 突变个体的体色为黄色^[8], 在实验中作为小体重的表型标记; *OR* 是来自 Bloomington 果蝇中心的标准野生型; *w* 带有 *white* 隐性突变基因, 位于 *X* 染色体上离端部 1.5 cM 的地方, 使果蝇眼呈现白色; *e* 带有 *ebony* 隐性突变基因, 位于 3 号染色体上, 体色为黑檀体. 对于 *y* 座位而言, 后 3 个品系均是野生型.

所有果蝇均培养在含有 10 mL 标准玉米琼脂糖

培养基(含酵母粉 1.2%)的培养管中. 培养管规格 180 mm(长)×20 mm(管口直径). 果蝇培养环境条件: 温度为 25±0.5℃, 相对湿度为 50%±7%.

1.2 F₂ 杂交模式

本文采用 Broman 等人^[11]讨论过的正反杂交方式, 用品系 y^0 分别与其他 3 个品系进行正反交, 利用杂交 F₁ 代的雌雄个体进行交配得 F₂ 代(图 1).

1.3 MAI 品系的建立

MAI 是一种经典的 QTL 定位方法, 在果蝇刚毛的定位中, 多有应用^[12]. 本研究将可能存在 QTL 的 y^0 标记区段从 y^0 品系导入到 *OR* 的遗传背景中, 这样就可以在一个一致遗传背景下得到标记的效应.

如第一个 MAI 品系的建立过程(图 2(A)), 本实验用 y^0 雄蝇与 *OR* 雌蝇杂交所得 G₁ 代雌蝇与 *OR* 雄蝇回交, 选择 G₂ 代黄体表型的 y^0 雌蝇再次与 *OR* 雌蝇回交, 循环 G₀ 和 G₁ 过程, 得到连续与野生型回交 20 代的 G₂₀ y^0 雄蝇个体. 然后用 G₂₀ y^0 雄蝇个体来与 *OR* 雌蝇交配得到的雌蝇再与 G₂₀ y^0 雄蝇交配, 选取后代中表型为黄体的雌雄个体交配最终得到品系 $y^0(OR)20$. 这样就以 y^0 为标记, 将 y^0 品系中 y^0 所在染色体区段导入到了 *OR* 遗传背景中.

在回交过程中, y^0 品系的 *Y* 染色体在 G₀ 回交中就已经从 *OR* 遗传背景中剔除出去, 而常染色体, 每代的交配都将被替换一半, 这样 20 代以后也被替换为 *OR* 的常染色体. 至于 *X* 染色体, 由于本实验仅仅选择 y^0 标记个体, 因此仅 y^0 标记区段被保留下来, 而其它的则被替换掉. 由于果蝇 *X* 染色体之间的交换仅发生在奇数代雌蝇杂合子中, 这样 20 代回交后, 有 10 次交换事件发生. 由于交换使得留在 *OR* 遗传背景中的导入片段为 y^0 标记左右约 10 cM^[13]. 而 *y* 位于 *X* 染色体的端部 0 cM 处, 因此导入的区段就是约 10 cM.

为了将导入区段进一步缩短, 本实验引入了另一个与 y^0 标记仅相距 1.5 cM 的 *w* 标记. 首先按照 $y^0(OR)20$ 的方法建立品系 *w(OR)20*, 此品系含有与 $y^0(OR)20$ 差不多大的导入片段, 而其他的遗传背景同 $y^0(OR)20$ 一样为 *OR*. 在品系 *w(OR)20* 中导入的 *w* 片段, 并不影响果蝇的体重. (经 *t* 检验发现, *w(OR)20* 与 *OR* 品系之间体重差异不显著, 其中雌蝇 $P=0.257$, 雄蝇 $P=0.462$).

如图 2(B), 用 $y^0(OR)20$ 雄蝇与 $w(OR)20$ 雌蝇交配得到 G21 雌蝇, 用其与 OR 雄蝇交配, 在 G22 后代中选择 y 与 w 之间发生交换的表型为黄体、白眼睛的雄蝇 y^0w 个体(G22). 这样 $y^0(OR)20$ 中的 w^+ 区段就被 $w(OR)20$ 的 w 区段所替代(如图 2(B)中 G22 代染色体上的黑框所示). 然后, 再经过图中后面的两次回交, 会得到 y 和 w 之间经过第二次交换的 G24 y^0w^+ 雄蝇个体(黄体色, 红眼睛), 此时导入的区段就变为了 w 基因座左侧的一段更小的区段(图 2(B)中 G24 染色体上的白框区段). 由于 w 位于 X 染色体上 1.5 cM 处, 因此导入区段就小于 1.5 cM. 利用 G24 y^0w^+ 雄蝇个体最终建立了第二个标记辅助导入品系 $y^0(OR)24$.

以上的 MAI 过程中, 可能会发生意外的交换事件, 如 y^0 品系中常染色体的部分片段仍然留在了两 MAI 品系中, 或者 w 片段留在了 $y^0(OR)24$ 品系中. 本实验所有的 MAI 都是同时进行了 10 个重复, 最终每个 MAI 品系均建立了 10 个家系, 用于最终的结果分析. 这样从统计学出发, 来消除意外事件可能带来的实验偏差. 如果 y^0 标记与小体重 QTL 连锁足够紧密, 则导入的区段一定会导致 OR 体重的降低.

1.4 果蝇体重测定

本研究选取的测定性状为羽化后 6~8 天的果蝇体重, 此时的果蝇经过一个阶段的生长后, 处于一个体重较为稳定的时期. 测定时间选取晚上 8:00~12:00, 主要是为避免由产卵带来的体重上的差异. 据观察, 果蝇产卵有很强的昼夜规律, 产卵一般在白天, 以清晨最多, 而晚上则较少排卵.

每个果蝇品系和每个杂交组合 F2 代的体重测定, 均选取 8~12 个重复管, 每个管中分性别, 每种测定表型各取 8~12 只果蝇进行称重. 所有果蝇均采用精度为十万分之一克的天平单只称重. 文中所有的体重数据记录单位均为 0.00001g.

1.5 y^0 基因区域的扩增及 Southern 杂交检测

采用软件 primer premier 5.0 设计 y 基因及其左右 2 kb 左右区段的系列扩增引物 8 对(表 1).

Southern 杂交采用罗氏公司地高辛试剂盒. 分别提取品系 y^0 和 OR 各 40 只雌蝇的基因组 DNA^[14], 用限制性内切酶 *Bss*T1 酶切过夜后电泳转膜^[15], 然后用地高辛标记的 y 基因外显子 2 上一段 710 bp 的序

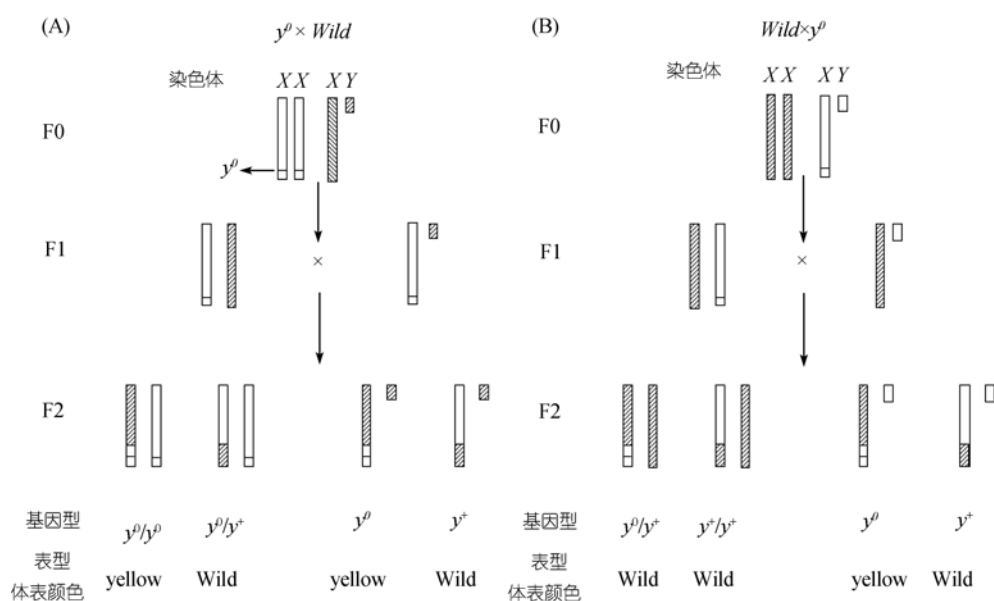


图 1 F₂ 杂交模式图

(A) y^0 品系为母本的正交; (B) y^0 品系为父本的反交; Wild 代表除黄体品系 y^0 以外的其他 3 个品系中的任意一个; 杂交模式中, yellow 和 Wild 表示果蝇体表颜色为黄色和野生型; y 品系与 OR 和 w 品系杂交的 F2 后代, 表型为黄色和灰色(野生型), 但是 y 品系与 e 品系的杂交由于 e 基因存在的原因, 使得 F2 后代表型在黄色和灰色之外, 还有黑色等其它颜色, 本实验将由 y 基因纯合导致的表型统称为 yellow, 而非 y 基因纯合导致的表型统称为 Wild.

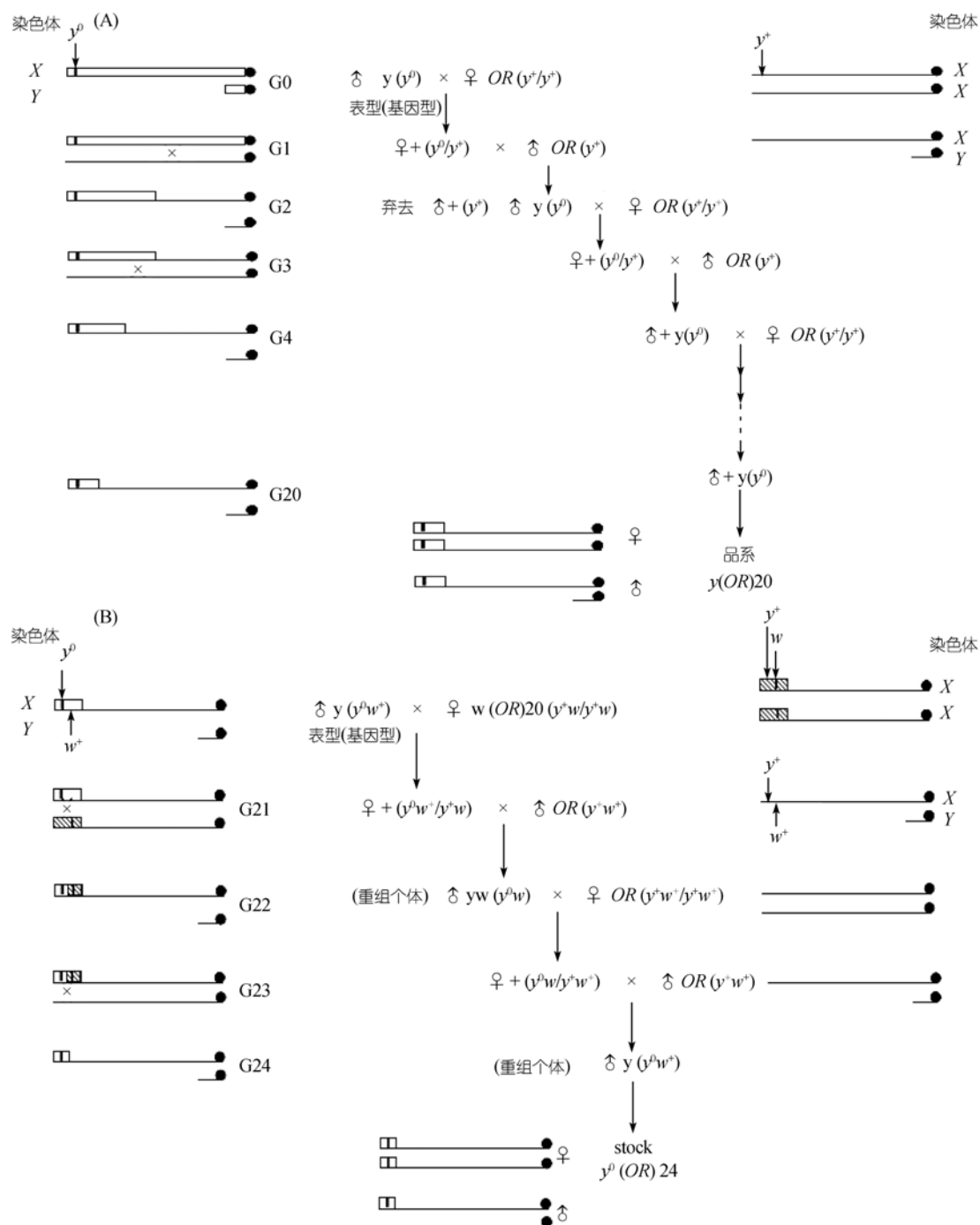


图 2 MAI 品系的建立

(A) 为利用 y^0 标记建立的 MAI 品系; (B) 为利用 y^0 和 w 两个标记建立的标记辅助导入品系; y 和 w 基因是 X 染色体上的隐性基因, 在雄蝇中均为半纯合子, 可以由突变表型(野生型果蝇体表颜色为灰色, 眼睛为红色, y 突变基因的 y 个体表型为黄色, w 突变基因的 w 个体表型是白眼, yw 个体则是同时具有黄色白眼个体)直接判定它们在雄蝇中的基因型

列(用引物对 5'-AGCCATTAGCACGGCAGTTACCA T-3' 和 5'-TCCAGGACTTGTTTCAGTTCCCAGG-3'扩增得到, 退火温度 65℃)作探针与膜上的 DNA 杂交, 最后按地高辛试剂盒的步骤显色.

1.6 数据分析方法

由于果蝇的体重是一个性别二态性性状, 因此本研究的所有结果均分性别进行分析. 采用 SAS 软件 8.02 的 GLM 程序进行, 下面模型中, $e(error)$ 为随机效应外, 其余效应均为固定效应.

(1) 品系间体重差异比较模型 1. $Y_{ijk}=\mu+S_i+V(S)_{j(i)}+e_{ijk}$ (分性别计算), Y_{ijk} 是第 i 个品系第 j 个管的第 k 个体的体重; μ 是总平均值; S 是 *stock*, 为品系效应; $V(S)$ 是 *vial(stock)*, 为嵌套于品系内的培养试管效应, e_{ijk} 是剩余随机残差.

(2) F₂ 代 QTL 与标记的相关性检测分析模型 2. $Y_{ijk}=\mu+M_i+V_j+e_{ijk}$ (分性别计算), Y_{ijk} 是第 i 个标记型第 j 个管的第 k 个体的体重; M 是 *marker*, 标记效应; V 是 *vial*, 培养试管效应.

(3) 标记、杂交组合和性别间互作分析模型 3. $Y_{ijklm}=\mu+C_i+V(C)_{j(i)}+Sex_k+M_l+C_i*Sex_k+C_i*M_l+Sex_k*M_l+C_i*Sex_k*M_l+e_{ijklm}$, Y_{ijklm} 是第 i 个杂交组合第 j 个管

第 k 个性别第 l 个标记型的第 m 个体的体重; C 是 *cross*, 为杂交组合效应; $V(C)$ 为嵌套于 *cross* 内的培养试管效应; Sex , 为性别效应; M 为标记效应.

2 结果与分析

2.1 亲本品系间的体重比较

本课题组在以前的实验中发现, y^0 品系的果蝇体重总是小于其他品系. 本研究首先测定了 4 个亲本品系 y^0 , *OR*, *w*, *e* 的体重, 然后用模型 1 进行统计分析. 结果表明, 不论雌蝇还是雄蝇, 在相同测量条件下, y^0 的体重均极显著地($P<0.0001$)小于非黄体品系(*OR*, *w* 和 *e*)(图 3). 因此, 可以猜测在 y^0 标记附近存在降低果蝇体重的 QTL.

2.2 y^0 标记与小体重的相关分析

如 Falconer 和 Mackay^[16]所著, 通过比较 F₂ 代标记型之间的数量性状的差异可以来确定 y^0 标记与小体重的相关性. 本实验利用 y^0 品系与 *OR*, *w* 和 *e* 进行正反交, 对得到的 6 个杂交组合的后代进行不同标记基因型之间的体重比较.

如图 1 所示, 由于 y^0 是 X 染色体上的隐性等位基因, 因此 F₂ 代所有雄蝇均为半纯合子, 可以直接由

表 1 PCR 所用的 8 对引物^{a)}

引物	引物序列(5'—3')	退火温度/℃	预期扩增片段长度/bp
P1 U	ATCTGCGGAGGTCGTAAAAC	55	350
P1 L	ATTGGCAGGTGATTTTGAGC		
P2 U	GGCGATGGTCATTAGAGCATTAC	56	737
P2 L	CCTTTCGCTGGGTTTGGTATGAT		
P3 U	CTCCTGGCCTTACAATTTACTTG	56	753
P3 L	TTGGTCCTTTAGTCGGGTATT		
P4 U	TGATTACCCGAACACTGAAC	56	396
P4 L	TCGCTCCTGAAGTTTGTAAG		
P5 U	TATGGCTTGTTTGACATGATG	54	742
P5 L	TCGAAAGCATTCTAGACGTAC		
P6 U	GAAGGCATTGTTCTGTGACTC	54	617
P6 L	CCGATTGCTTTGACTAATTG		
P7 U	GCCATTAGCACGGCAGTTAC	57	824
P7 L	ATGGGCGAAAGGGACATACC		
P8 U	CGGCTTGATTGCTTACTCCTG	57	851
P8 L	CCTTTGGCACCTCCACTCCTG		

a) P1U 是第一对引物上游引物, P1L 指第一对引物的下游引物, 其余类推

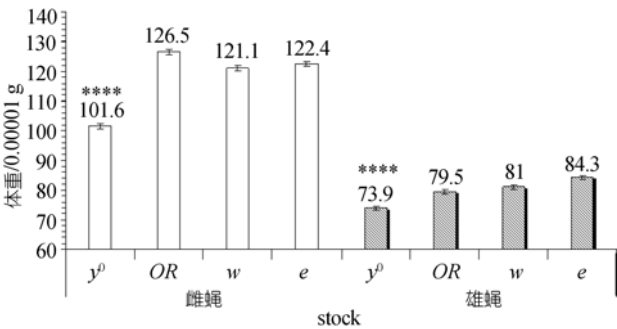


图 3 亲本品系的体重比较

**** 体重均极显著地小于其他品系($P<0.0001$)

标记的表型来判定基因型。而雌蝇则分为两种情况，在 y^0 为母本的正交中，雌蝇的基因型仍然可以由表型来判定，但是反交雌蝇由于杂合子与野生型纯合子的表型相同而无法判定。本研究通过下面的实验首先进行了标记杂合子与野生型纯合子这两种基因型之间的比较。

由于 w 基因为 X 染色体上的与 y 仅相距 1.5 cM 的距离，因此可以用 w 作为 y 野生型等位基因 y^+ 的标记。本文利用杂交组合 w 品系雌蝇与 y^0 品系雄蝇交配得到基因型分别为 y^0w^+/y^+w 与 y^+w/y^+w 的后代，利用眼睛的眼色来指示 y 基因座位的杂合子与野生型纯合子，从而比较它们的体重差异。如表 2 所示，两者之间无显著差异($P=0.7405$)。因此可以认为 y^0 标记效应对于相应的野生型标记是完全隐性的，在下面的分析中，本实验不再比较反交中的雌蝇组合，而正交中将杂合子雌蝇直接当作野生型纯合子对待。

表 2 在 w 雌蝇与 y^0 雄蝇进行的杂交中 y^0/y^+ 杂合子 和 y^+/y^+ 纯合子的体重差异比较/0.00001g

基因型	表型	体重	差值	P 值
y^0w^+/y^+w	灰体	113.3±1.4	0.7	0.7405
y^+w/y^+w	红眼			
	灰体	112.6±1.4		
	白眼			

根据表型 (黄体色或野生型体色)，本研究进行了 9 对比较，其中差值(dev)即是 y^0 标记对于野生型的体重降低效应值(表 3)。从表 3 可以得出以下结论: (i) 雌蝇 3 个正交组合和雄蝇的 6 个正反交组合中，黄体表型的体重均极显著的小于野生型表型的体重 ($P<0.001$)，说明 y^0 与果蝇小体重显著相关; (ii) 以标准差为单位的差值表示， y^0 标记的效应平均雌雄分别为 $0.95 \sigma_P$ 和 $0.68 \sigma_P$ ，其连锁的 QTL 效应属于中等程度大小; (iii) 尽管在所有的杂交实验中，存在着很强的互作 (表 4 中，将整个 F_2 代 3 个正交组合的数据利用模型 3 进行方差分析后发现，4 种互作方差组分均达到了极显著的水平， $P<0.01$)，但是从降低体重的角度看，黄体标记在不同组合中的效应还是一致的，那就是它在各个组合中均具有显著降低果蝇体重的效应。

从以上结果可以发现， y^0 标记与小体重是显著相关的。在接下来的实验中，本实验将这个标记应用到标记辅助导入中以期能够得到小体重的果蝇品系，来进一步确认与 y^0 标记连锁的小体重 QTL 的存在，并确定标记与此 QTL 的连锁紧密程度。

表 3 F_2 代各杂交组合的黄色标记效应/0.00001g

杂交组合	雌蝇			雄蝇		
	dev±SE ^{a)}	P 值	效应(Dev/ σ_P) ^{b)}	dev±SE	P 值	效应(Dev/ σ_P)
$y^0 \times OR^{c)}$	11.3±1.0	<0.0001 ^c	0.78	5.0±0.6	<0.0001	0.66
$OR \times y^0$				6.6±0.5	<0.0001	0.90
$y^0 \times w$	16.0±1.3	<0.0001	0.95	3.7±0.8	0.0008	0.42
$w \times y^0$				5.6±0.9	<0.0001	0.52
$y^0 \times e$	21.9±1.4	<0.0001	1.13	6.2±0.9	<0.0001	0.62
$e \times y^0$				8.2±1.0	<0.0001	0.68
平均	16.38		0.95	5.88		0.68

a) 用野生型体重与黄体体重的差值，SE 是标准误; b) 用以表型标准差为单位的两标记间差值表示的黄色标记降低体重的效应; c) 用品系 y^0 雌蝇与 OR 雄蝇做杂交亲本，其余杂交组合以此类推，每个杂交中前为父本后为母本

表 4 杂交中杂交组合、性别和标记间的互作方差分析

方差来源 ^{a)}	DF	均值	F 值
C	2	15449.28	115.24****
V(C)	36	519.13	3.87****
sex	1	345646.6	2578.31****
M	1	43970.33	327.99****
C*sex	2	11767.04	87.77****
C*M	2	1183.65	8.83***
sex*M	1	12542.85	93.56****
C*sex*M	2	770.80	5.75**
Error	1512	134.06	

** 0.05<P<0.01; *** 0.0001<P<0.001; **** P<0.0001

a) 各方差组分看材料与方法中的模型 3 中的解释

2.3 通过MAI来进一步确定与y⁰标记相关小体重QTL的存在

在材料与方法 1.3 中, 本实验建立了两个 MAI 品系. 如果 y⁰ 标记与果蝇小体重密切相关, 那么 y⁰ 所在的染色体片段导入到野生型背景中应该起到降低基础群体体重的作用. 如图 4 所示, 计算各 MAI 品系体重的最小二乘均值并进行体重差异的比较.

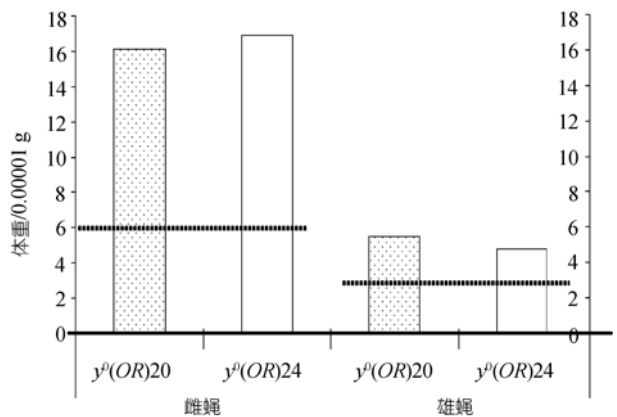


图 4 两 MAI 品系相对于野生型品系 OR 的体重降低值
图中雌蝇和雄蝇中的虚线是 $P=0.0001$ 的显著性阈值(雌蝇 5.99, 雄蝇 2.92)

品系 y⁰(OR)20 的体重雌雄分别比 OR 低 0.161 mg 和 0.055 mg, 均达到了差异极显著的水平($P<0.0001$). 相对于 F₂ 杂交, MAI 品系与 OR 具有更一致的遗传背景, 因此, 两者的差值就是标记相对于 OR 品系的体重降低效应值. 这个效应值, 雌雄果蝇分别达到了野

生型果蝇体重的 13% 和 7%. 因此, 与 y⁰ 标记连锁的小体重 QTL 确实存在, 并且就位于导入的 y⁰ 标记区段上.

y⁰ (OR)20 品系的导入区段约 10 cM, 是一个相当大的片段, 接下来, 本研究利用 y⁰ 和 w 做标记, 进一步将导入区段缩小到了 1.5 cM 的区间上(图 2). 如图 4 所示, 这个导入片段导致了如 y⁰ (OR)20 品系相似的体重降低. 因此, 本研究利用 MAI 的方法, 将与 y⁰ 标记连锁的 QTL 定位到了小于 1.5 cM 的区间上.

将两 MAI 品系相对于 OR 的体重降低值作为 y⁰ 标记的效应值, 与 F₂ 杂交比较, 并不小于 F₂ 杂交得到的 y⁰ 标记效应值. 此外, 两 MAI 品系 y⁰(OR)20 与 y⁰(OR)24 之间的体重无显著差异 (雌蝇, $P=0.5669$, 雄蝇, $P=0.7244$), 充分说明 y⁰ 标记的效应是很稳定的.

2.4 对黄体突变区域的 DNA 序列分析

本实验对 y⁰ 标记进行了分子上的鉴定, 从 Flybase(<http://flybase.org>)中检索, y 基因全长 4737 nt, 共有两个外显子. 本实验设计了 8 对引物(表 1)对 y⁰ 品系和 OR 品系的 yellow 基因进行扩增中. 结果发现, 在阳性对照 OR 中, 均得到了正常的扩增条带, 而在黄体品系中始终得不到目的片段, 图 5 为 8 对引物和一对阳性对照引物的扩增结果. 因此推测在品系 y⁰ 中, yellow 基因可能是缺失的.

为验证此确为缺失, 用 yellow 基因外显子 2 上一段 710 bp 的序列做探针, 进行 Southern 杂交, 结果显示, 阳性对照组野生型基因组的 2.4 kb 酶切目的片段上有信号, 而黄体品系果蝇没有信号(图 5). 说明 yellow 基因在 y⁰ 品系中确实是一个缺失.

3 讨论

3.1 在标记辅助选择中 y⁰ 标记可以有效地标记果蝇的小体重

此前在各种家畜家禽中已经开展了大量的 QTL 定位研究, 如牛 (*Bos taurus*)^[17]、猪^[18]和鸡 (*Gallus gallus*)^[19]等. 作为一个与生产量息息相关的重要经济性状, 体重一直是育种研究者所注重的, 目前其 QTL 在各物种中的定位仍然在继续进行着^[20-22]. QTL 研究的一个主要目的是利用 MAS 将其应用到育种规划

中, 目前这方面的研究日益增多^[23,24]. Dekkers^[2] 对 MAS 在商业上应用进行了汇总, 发现尽管分子遗传信息已经产业项目中应用了几十年, 但是 QTL 在实际育种中的应用效果并没有达到最初的期望值. 更多的研究还是停留在实验室研究阶段, 真正应用的还是很少. 主要原因在于实验中得到的 QTL 效应经常受互作影响导致估计出现误差, 实验群体的 QTL 在育种群体中并不一定仍然与标记相连锁, 而且大动物中进行 MAS 的费用高, 世代间隔长, 育种效果又很难保障^[25]. 因此, 有必要利用模式生物来研究 MAS 在实际应用中出现的问題, 从而为大动物 MAS 的开展提供有益的参考. 本研究就是应用果蝇来研究一个小体重标记在 MAS 中的应用可能性.

标记要应用到标记辅助选择中, 需要注意两个方面的问题, 一个是标记所连锁 QTL 的效应, 另一个是标记与 QTL 的连锁程度. Moreau 等人^[26]模拟研究发现, QTL 效应越大, 其与标记之间的连锁越紧密, 则应用到标记辅助选择中取得的选择效率会越高.

在 F_2 杂交和标记辅助导入实验中, 与果蝇小体重相关的 QTL 已经被确证是存在的, 其效应大小雌雄分别达到了 $0.95\sigma_p$ 和 $0.68\sigma_p$, 均为中等程度大小的效应, 适于标记辅助选择的应用.

MAI 已经被成功应用到果蝇的刚毛数基因的研究中, 如 *achaete-scute* 复合体上的 *Notch*^[27], *scabrous*^[28], *Deleta*^[29]等. 在这些研究中, QTL 虽然被确认是存在的, 但是其导入片段大约为 20 cM, 无法利用

MAI 进行进一步的精细定位. 在我们的研究中, 利用 y^0 和 w 标记建立的 MAI 品系 $y^0(OR)24$ 含有的导入区段小于 1.5 cM, 首次利用 MAI 的方法达到了精细定位的目的, 证明了标记与 QTL 连锁紧密, 其连锁率小于 1.5%.

标记辅助选择的成功也取决于 QTL 在不同群体和环境中的效应表现一致性^[2]. Spelman 和 Bovenhuis^[5]提到来源于实验群体的 QTL 可能会由于互作或标记与 QTL 连锁相的改变而在育种群体中消失不见, 如影响猪产仔数的 *ESR (oestrogen receptor gene)* 基因. Rosthschild 等^[30]于 1991 年首次报道了一种 ESR 的多态与猪产仔数存在显著相关, Short 等人^[31]和 Isler 等人^[32]也确认了这种相关的存在; 但是 Gibson 等人^[33]却没有在猪群中发现此标记与产仔数的相关性. 因此, 将发现的 QTL 应用到育种群体中时一定要首先验证一下 QTL 在育种群体中是否仍然具有与实验群体一致的效应^[25]. 本研究 F_2 杂交中, 尽管在杂交群体、性别与标记型间均存在着显著的互作, 但是在所有的杂交组合中, y 表型的体重均小于野生型表型(表 3), 而且两个 MAI 品系中的标记效应也是稳定的(图 4). 这充分证明 y^0 标记降低体重的效应在不同杂交群体中是一致的, 这也保证了两个标记辅助导入品系的成功建立.

鉴于黄体标记具有中等程度大小的效应, 与 QTL 的连锁率小于 1.5%, 而且其效应在不同杂交环境中具有一致性, 因此可以用黄体品系进行 MAS 的

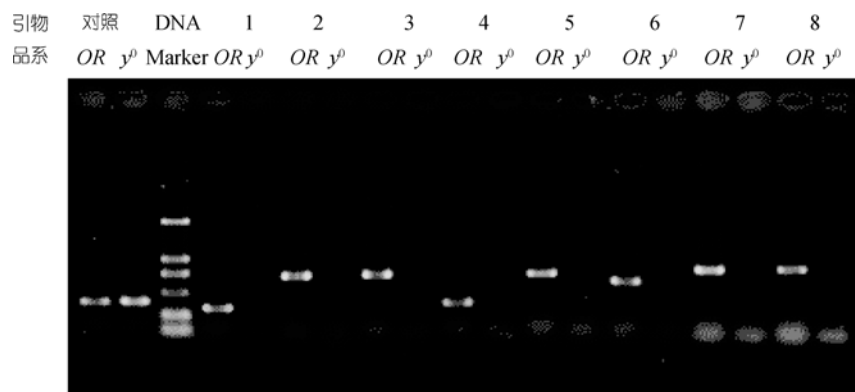


图 5 品系 OR, y^0 进行 PCR 扩增的结果

OR 品系均为阳性对照品系, 对照为 *Or1a*(odorant receptor 1a)基因 DNA 序列上设计的一对引物(5'-TGCTTTAGGCGTGAGTTTAC-3', 5'-GGTGTTTAGGAGGAAGGTTT-3'), 是阳性对照引物, 片段长度为 395 bp, 在两个品系中均扩增到目的片段; 1 至 8 分别对应表 1 中的 8 对引物

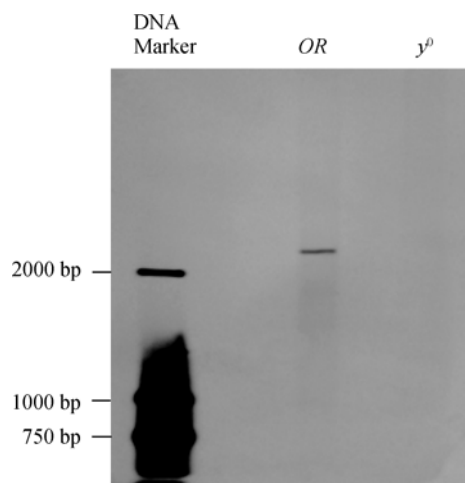


图6 *y* 基因的 Southern 杂交分析

野生型 *OR* 品系出现 2.4 kb 目的条带, 而 *y⁰* 品系则没有

模拟研究。此外, 黄体表型从果蝇一羽化就可以清楚的鉴别, 这样可以对其进行早期选择。由于其在所有的雄蝇中均是半纯合子, 而雌蝇的杂合子与野生型纯合子的效应大小不存在差异, 其隐性纯合子也可以直接从表型鉴定, 因此可以大大地降低基因型分辨的费用。因此, *y⁰* 标记适合应用于标记辅助选择中。

3.2 从 QTL 到基因

MAS 中, 最有效的标记就是基因本身, 而研究 QTL 的目的也是要找到所有影响性状的基因, 研究各基因的特征, 最终来揭示数量性状的遗传结构^[7]。这就要求不仅仅要将 QTL 尽量精细地定位, 还要找到那个真正发挥作用的基因。

大动物体重性状的研究大多集中在对 QTL 座位的定位上^[20-22]。但是要将这些座位定位到单个的基因上, 就要困难的多。因为精细定位需要的群体数量大, 而大动物养殖费用又高。作为模式生物果蝇, 就可以利用其培养方便费用低, 群体数量大容易获得的优势来进行体重性状 QTL 的精细定位, 进而进一步研究这些 QTL 的功能。尤其是对那些与大动物具有高度同源的基因进行研究, 可以直接为大动物体重性状遗传机制的研究提供方向。

目前果蝇的体重数量性状的研究还有待开展, 到目前为止还未有全基因组扫描方面的系统工作, 但是在已研究的大量基因中, 已经发现了许多对体

重有影响的基因, 如 *giant*^[34], *Cyclin D*^[35], *Diminutive*^[36], *dwarf with scute*(<http://flybase.org/reports/FBgn0005027.html>)等。这些基因的功能研究必会促进对体重性状遗传机制的最终揭示。

本研究通过 MAI 的方法将降低体重的一个 QTL 定位到了 X 染色体上一个小于 1.5 cM 的区间内。而且对标记分子特征进行研究发现, 在 *y⁰* 品系中的 *yellow* 基因是完全缺失的。

yellow 基因在果蝇的发育中起着非常重要的作用, 一旦功能失效, 体表黑色素急剧减少^[8]。而黑色素在果蝇免疫, 表皮硬化, 抗菌抗虫等方面有着重要的功能^[9,10], 其减少会导致体表保水能力的下降, 对不适生存环境(紫外线、病菌入侵)的抵抗降低, 这些极可能会引起生长发育受阻。王哲鹏等人^[37]已经发现, *y⁰* 品系对紫外线的抵抗力显著低于野生型品系。在腐败培养基中, 我们也发现黄体果蝇体重只有野生型果蝇的一半。这些都预示着 *yellow* 缺失可能是产生体重降低的原因。

在家养动物中, 表皮毛色有着显著的多态性, 经常被用作品种的特征标记。家猪中有很多品种表皮颜色为白色, 这是由于表皮缺乏黑色素导致。控制这个性状的基因称之为 *Dominant white* 等位基因, 研究发现是由于编码肥大细胞和干细胞生长因子受体基因 *KIT* 发生突变导致的^[38]。目前发现了 *Dominant white* 两类突变, 其中一类为重复突变, 一类为剪切突变^[39,40]。其中在猪中的重复突变, 会产生过量或异位表达, 对色素沉着有着非常大的影响, 但此类突变的纯合猪个体并不影响其生活力。而另一类剪切突变则影响了基因的功能, Pielberg 等人^[38]检测发现有一种剪切突变可能是纯合致死突变, 而在小鼠中早已发现此类剪切突变确实存在严重的缺陷或致死效应。在 *y⁰* 果蝇品系中, *yellow* 基因的缺失使得基因功能完全丧失, 影响到了黑色素的形成。这种缺失效应可能是果蝇小体重产生的原因。这要求我们从分子生理生化通路进一步进行深入研究来确认。

本研究在果蝇中找到了一个能够应用于 MAS 的有效小体重标记, 并利用此标记成功建立了两个小体重果蝇品系。利用找到的标记, 可以用果蝇对动物标记辅助选择的实际应用进行模拟研究, 而非仅仅利用电脑进行数据的模拟预测。

致谢 感谢北京生命科学研究所以袁荣文实验室为本研究提供野生型果蝇品系 *OR*, 感谢加拿大圭尔夫大学的陈留红博士, 日本理化学研究所发生与再生科学综合研究中心的 Douglas Sipp 研究员, 中国农业大学的赵春江、方美英老师对稿件进行的修改。

参考文献

- Andersson L. Genetic dissection of phenotypic diversity in farm animals. *Nat Rev Genet*, 2001, 2: 130—138 [DOI](#)
- Dekkers J C M. Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: strategies and lessons. *J Anim Sci*, 2004, 82(E.Suppl.): E313—E328
- Dekkers J C M, Hospital F. The use of molecular genetics in improvement of agricultural populations. *Nat Rev Genet*, 2002, 3: 22—32 [DOI](#)
- Charlier C, Farnir F. The *mh* gene causing double-muscling in cattle maps to bovine chromosome 2. *Mamm Genome*, 1995, 6: 788—792 [DOI](#)
- Spelman R J, van Arendonk J A M. Effect of inaccurate parameter estimates on genetic response to marker assisted selection in an outbred population. *J Dairy Sci*, 1997, 80: 3399—3410
- Bier E. *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nat Rev Genet*, 2005, 6: 9—23 [DOI](#)
- Mackay T F C. The genetic architecture of quantitative traits. *Annu Rev Genet*, 2001, 35: 303—339 [DOI](#)
- Wittkopp P J, Vaccaro K, Carroll S B. Evolution of *yellow* gene regulation and pigmentation in *Drosophila*. *Curr Biol*, 2002, 12: 1547—1556 [DOI](#)
- Nappi A J, Christensen B M. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: applications to insect innate immunity. *Insect Biochem Mol Biol*, 2005, 35: 443—459 [DOI](#)
- Suderman R J, Dittmer N T, Kanost M R. Model reactions for insect cuticle sclerotization: cross-linking of recombinant cuticular proteins upon their laccase-catalyzed oxidative conjugation with catechols. *Insect Biochem Mol Biol*, 2006, 36: 353—365 [DOI](#)
- Broman K W, Sen S, Owens S E, et al. The X chromosome in quantitative trait locus mapping. *Genetics*, 2006, 174: 2151—2158 [DOI](#)
- Mackay T F C. Quantitative trait loci in *Drosophila*. *Nature Rev Genet*, 2001, 2: 11—20 [DOI](#)
- Crow J F, Kimura M. An Introduction to Population Genetics Theory. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1970. 94—95
- Sullivan W, Ashburner M, Hawley S. *Drosophila* protocols. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000. 431—432
- Sambrook J, Russell D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 492—499
- Falconer D S, Mackay T F C. Introduction to Quantitative Genetics. 4th ed. Essex: Longman, 1996. 361—363
- Gutiérrez-Gil B, Wiener P, Nute G, et al. Detection of quantitative loci for meat quality traits in cattle. *Anim Genet*, 2008, 39(1): 51—61 [DOI](#)
- Duthie C, Simm G, Doeschl-Wilson A, et al. Quantitative trait loci for chemical body composition traits in pigs and their positional associations with body tissues, growth and feed intake. *Anim Genet*, 2008, 39(2): 130—140 [DOI](#)
- Wright D, Kerje S, Lundström K, et al. Quantitative trait loci analysis of egg and meat production traits in a red junglefowl×White Leghorn cross. *Anim Genet*, 2006, 37(6): 529—534 [DOI](#)
- Guo Y M, Lee G J, Archibald A L, et al. Quantitative trait loci for production traits in pigs: a combined analysis of two Meishan × Large White populations. *Anim Genet*, 2008, 39(5): 486—495 [DOI](#)
- Huang Y, Haley C S, Hu S, et al. Detection of quantitative trait loci for body weight and conformation traits in Beijing ducks. *Anim Genet*, 2007, 38(5): 525—526 [DOI](#)
- Gao Y, Hu X X, Du Z Q, et al. A genome scan for quantitative trait loci associated with body weight at different developmental stages in chickens. *Anim Genet*, 2006, 37(3): 276—278 [DOI](#)
- Lahav T, Atzmon G, Blum S, et al. Marker-assisted selection based on a multi-trait economic index in chicken: experimental results and simulation. *Anim Genet*, 2006, 37(5): 482—488 [DOI](#)
- Kim K S, Lee J J, Shin H Y, et al. Association of melanocortin 4 receptor(MC4R) and high mobility group AT-hook 1(HMGA1) polymorphisms with pig growth and fat deposition traits. *Anim Genet*, 2006, 37(4): 419—421 [DOI](#)

- 25 Spelman R J, Bovenhuis H. Moving from QTL experimental results to the utilization of QTL in breeding programmes. *Anim Genet*, 1998, 29: 77—84[DOI]
- 26 Moreau L, Charcosset A, Hospital F, et al. Marker-Assisted Selection Efficiency in Populations of Finite Size. *Genetics*, 1998, 148: 1353—1365
- 27 Long A D, Lyman R F, Morgan A H, et al. Both naturally occurring insertions of transposable elements and intermediate frequency polymorphisms at the achaete-scute complex are associated with variation in bristle number in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 2000, 154: 1255—1269
- 28 Lyman R F, Lai C, Mackay T F C. Linkage disequilibrium mapping of molecular polymorphisms at the scabrous locus associated with naturally occurring variation in bristle number in *Drosophila melanogaster*. *Genet Res*, 1999, 74: 303—311[DOI]
- 29 Lyman R F, Mackay T F C. Candidate quantitative trait loci and naturally occurring phenotypic variation for bristle number in *Drosophila melanogaster*: the Delta-Hairless gene region. *Genetics*, 1998, 149: 983—998
- 30 Rothschild M F, Larson R G, Jacobson C, Pearson P. Pvu polymorphisms at the porcine oestrogen receptor locus (ESR). *Anim Genet*, 1991, 22(5): 448
- 31 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
- 32 Isler B J, Irvin K M, Neal S M, et al. Examination of the relationship between the estrogen receptor gene and reproductive traits in swine. *J Anim Sci*, 2002, 80: 2334—2339
- 33 Gibson J P, Jiang Z H, Robinson J A B, et al. No detectable association of the ESR Pvu mutation with sow productivity in a Meishan × Large White F2 population. *Anim Genet*, 2002, 33: 448—450[DOI]
- 34 Yucel G, Small S J. The role of Giant in anterior patterning in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol*, 2006, 295(1): 449[DOI]
- 35 Emmerich J, Meyer C A, et al. *Cyclin D* does not provide essential Cdk4-independent functions in *Drosophila*. *Genetics*, 2004, 168(2): 867—875[DOI]
- 36 Johnston L A, Prober D A, Edgar B A, et al. *Drosophila myc* regulates cellular growth during development. *Cell*, 1999, 98(6): 779—790[DOI]
- 37 Wang Z P, Liu R, Wang A, et al. Phototoxic effect of UVR on wild type, ebony and yellow mutants of *Drosophila Melanogaster*: Life Span, fertility, courtship and biochemical aspects. *Sci China Ser C Life Sci*, 2008, 51: 885—893[DOI]
- 38 Marklund S, Kijas J, Rodriguez-Martinez H, et al. Molecular basis for the dominant white phenotype in the domestic pig. *Genome Res*, 1998, 8: 826—833
- 39 Pielberg G, Olsson C, Syvänen A C, et al. Unexpectedly high allelic diversity at the KIT locus causing Dominant white color in the domestic pig. *Genetics*, 2002, 160: 305—311
- 40 Johansson A, Pielberg G, Andersson L, et al. Polymorphism at the porcine Dominant white/KIT locus influence coat colour and peripheral blood cell measures. *Anim Genet*, 36: 288—296