

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.01439

应激 QTL 座位 22 个微卫星标记与猪应激性状指标的关系

王晓娜¹, 汪秀星¹, 赵茹茜², 薛春阳¹, 刘香¹, 陈杰^{1,2}

1. 南京农业大学动物科技学院, 南京 210095;

2. 南京农业大学动物医学院, 农业部动物生理生化重点开放实验室, 南京 210095

摘要: 以皮特兰猪和二花脸猪为亲本建立的 F₂ 资源群体的 52 头猪进行 2 h 运输应激实验, 将仔猪出生后第 3、10 和 17 d 的 “Backtest” 评分(BS3、BS10、BS17)以及运输后各个体的血浆应激和代谢相关激素水平 Insulin、ACTH、Cortisol、T3 和 T4 作为运输应激性状指标。利用 22 个微卫星标记, 对这些应激指标进行相关性分析。结果表明: 各位点等位基因数为 3~8 个, 杂合度为 0.4155~0.7432, 多态信息含量为 0.3651~0.8150。方差分析显示: SW1808($P<0.01$)和 SW0320($P<0.05$)对 ACTH 有显著影响; SW1303 对 Insulin、SW1092 对 Cortisol、SW0320 对 T3、S0101 对 T4 以及 SW2446 对 BS3 影响达到显著水平($P<0.05$); SW2446($P<0.01$)、SW1816($P<0.05$)和 SW0092($P<0.05$)对 BS10 有显著影响; SW2108、SW1816 和 SW1023 对 BS17 有显著影响($P<0.05$)。结果表明这 11 个微卫星标记对实验中的应激性状指标存在显著影响。

关键词: 猪; 微卫星标记; 运输应激; 翻背测试; 应激性状; 相关分析

Effects of 22 microsatellite DNA markers on stress traits in F₂ population of pigs

WANG Xiao-Na¹, WANG Xiu-Xing¹, ZHAO Ru-Qian², XUE Chun-Yang¹, LIU Xiang¹, CHEN Jie^{1,2}

1. College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. Key Laboratory of Animal Physiology & Biochemistry of Ministry of Agriculture, College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: In the present study, we analyzed the effects of 22 microsatellite DNA loci on behavior responses and plasma concentration of hormones related to stress and metabolism following transport trial in pigs. These subjects were selected from the segregating F₂ generation of a Pietrain (PIE) × Erhualian (EHL) cross, and the two swine strains differ in stress tolerance. A so-called Backtest Score (BS) at 3, 10 and 17 days after birth (BS3, BS10 and BS17) was implemented to assess the behavior responses for each piglet. Plasma concentrations of Insulin, ACTH, Cortisol, T3 and T4 in pigs were measured after the 2 hours' transport. One-way ANOVA was applied to analyze the relation between microsatellite polymorphisms and stress tolerance markers including BS and concentration of hormones. The results revealed that the allelic number was 3–8, heterozygosity was 0.4155–0.7432 and polymorphism information content was 0.3651–0.8150. SW1808

收稿日期: 2008-01-27; 修回日期: 2008-07-13

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(编号: 30430420)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30430420)]

作者简介: 王晓娜(1982-), 女, 河北石家庄人, 硕士研究生, 专业方向: 分子生物学。Tel: 025-84395919; E-mail: 2005105007@njau.edu.cn

通讯作者: 陈杰(1973-), 男, 江苏南通人, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 分子生物学。Tel: 025-84395278; E-mail: jiech1119@njau.edu.cn

致谢: 感谢农业部动物生理生化重点开放实验室提供的样品、运输实验以及激素水平测定的工作。

($P < 0.01$) and *SW0320* ($P < 0.05$) had significant effect on ACTH. The effect of *SW1303* on Insulin, *SW1092* on Cortisol, *SW0320* on T3, *SO101* on T4, and *SW2446* on BS3 reached a significant level at $P < 0.05$, respectively. The effects of *SW2446* ($P < 0.01$), *SW1816* ($P < 0.05$) and *SW0092* ($P < 0.05$) on BS10 were significant, and the effects of *SW2108*, *SW1816* and *SW1023* on BS17 were also significant ($P < 0.05$). Our study suggested that these 11 microsatellites in swine were closely associated with behavior responses and stress tolerance in response to transport.

Keywords: pig; microsatellite DNA markers; transport stress; Backtest; stress trait; correlation analysis

应激导致内环境平衡紊乱^[1], 引起机体产生心理(认知和情感)、行为(战斗或逃跑)及生理(神经内分泌和代谢)等途径来应对环境挑战^[2]。运输是养猪生产中最重要应激因素之一, 在运输过程中驱赶装卸、颠簸、冷热刺激、拥挤和相互撕咬以及对陌生环境的恐惧等都存在着严重的应激反应, 使生长发育受到影响, 免疫力和肉质下降, 甚至死亡^[3]。

应激状态下一些生理和行为反应可以通过实验方法观测, 部分种群或个体在面对应激时表现出一定程度的应激耐受并且受到的损伤较小, 其生理和行为反应模式与应激敏感品种相比也存在较大差异^[4,5]。研究表明应激引起生理过程或行为模式在很大程度上决定于遗传, 并且在出生后很长时间内维持相对稳定。例如, 皮质醇(Cortisol)是应激的终产物, 心理应激引起的Cortisol的遗传力大约是0.33~0.97^[6]。翻背测试(Backtest)评分可将仔猪分为不同的个性模式或神经类型^[7], 仔猪的Backtest分级与成年猪的行为反应一致^[8,9]。然而, 由于环境因素对下丘脑-垂体-肾上腺(Hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA)轴的效应较大, 目前对于应激涉及的遗传基础所知甚少。QTL分析可用于分离鉴定复杂性状的多条染色体上的分子标记, 目前, 已鉴定出一些应激导致的生理或行为反应相关的QTLs^[10-13], 以及对基础Cortisol水平的QTLs定位^[14-16]和反映应激的Cortisol水平变化QTLs定位^[16-19]。

迄今为止, 对于猪应激机理方面的理论研究较少, 已知的氟烷敏感基因(*Halothane*, *Hal*)^[20]是猪应激综合征(Porcine stress syndrome, PSS)^[21]的主效基因, 但是*Hal*基因与PSS之间的关系并不是“一对一”的关系, *Hal*基因并不是决定猪应激敏感性的唯一基因。那么, 是否有一些QTL与猪的神经反应类型或行为反应模式连锁? 本研究以皮特兰×二花脸的F₂代猪为实验材料, 根据猪遗传连锁图谱和相关报道, 以猪的应激QTL定位信息为基础, 研究微卫

星标记与行为反应(Backtest Score)和运输应激后血浆激素水平ACTH、Cortisol、胰岛素(Insulin)、三碘甲腺原氨酸(T3)和甲状腺激素(T4)的相关性。

1 材料和方法

1.1 材料

以我国著名地方品种二花脸猪(抗应激品种)和国外引进品种皮特兰猪(应激敏感品种)为亲本, 通过杂交形成F₁代(皮×二), F₁代横交形成F₂代分离群体。出生时取所有个体的耳组织用于DNA提取。

1.2 方法

1.2.1 微卫星座位的选择

根据猪遗传连锁图谱 The USDA MARC Swine Gene Map 和 Desautels 等^[18]的报道, 在猪1、5、7、8、17、18号染色体上已确定的应激相关QTL座位内选取微卫星座位及相应的引物, 共选择了22个微卫星座位, 其引物序列及相应的QTL座位信息见表1。微卫星引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2.2 性格鉴定

通过翻背测试(Backtest)^[22, 23]在出生后第3、10和17 d对F₂代仔猪进行性格鉴定, 计算每只仔猪的翻背评分(Backtest Score, BS), 分别记为BS3、BS10和BS17。

1.2.3 运输实验

选出健康、发育良好的52头F₂代猪, 常规方式饲养, 在140~150日龄、体重达到(65±5) kg时进行慢性颈静脉血管瘘管手术, 术后1周恢复健康状况后进行2 h的运输实验, 将猪放入特制的猪栏(70 cm×45 cm×50 cm)后抬上卡车。整个运输过程中猪只相互隔离, 运输密度为65 kg/m², 以30~40 km/h的车速行驶, 每次运输起始时间和运输路线一致。运输结束后, 静脉注射巴比妥钠麻醉后进行宰杀。

表 1 22 个微卫星位点的特征及 PCR 反应条件
Table 1 Characters of 22 microsatellites and conditions of PCR

标记位点 Lable site	染色体或连 锁群 Chromosome	图谱位置 Relative position (cM)	引物序列 Primer sequence(5 3)	长度范围 Size range (bp)	复性温度 Annealing temperature ()
S0101	7	134.9	F: GAATGCAAAGAGTTCAGTGTAGG R: GTCTCCCTCACACTTACCGCAG	196~224	58
SW2537	7	139.5	F: CAGACTGTTCTGAGGCTCCC R: CAGAGCCTCCCTGCTCAC	148~176	62
SW2108	7	141.2	F: TGCTCCTGTCTGGAGTTATCG R: AACAAATGTGGCAAAGGAAGG	132~156	65
SW2446	7	148	F: GAGAGAGGTGGCAGAACCAG R: AGGGACAGAGCTGCATGTG	147~153	65
SW1816	7	151.3	F: AGCTCAGCTCTGCACTAGGC R: TAACCCAGTGGGAGCAGAAG	92~120	60
SW764	7	156	F: TAGCAGATTGTTTAGCCTCTGTG R: AAGCATCTTTTCTAAGCACAACA	112~130	60
SW1303	7	156.6	F: GTATGCTGCGAGGAGGCC R: GAGGGCCACAAGTACAGCC	129~155	62
SW1808	18	0	F: CCAAAAAAGTGGAAGTGTAAAGCC R: TACGGATGGATGGAGACAGG	106~149	60
SW2540	18	1.5	F: AAATTAGGTTCTCCACGGAGC R: AAACACCTAACCAAGGTCACACC	88~110	58
SW1023	18	5	F: AACCTGCTGAGCCACAGTG R: GCAAGTACCCAATCTTTTTC	90~132	60
S0112	1	121.3	F: AATCCTGAGTATCCTTAATCAGGC R: TGACATGATGCAGAGAAGGAGTC	201~214	58
SW0320	1	121.5	F: TCCCACAATCCCTGACTACC R: AATCTTGGTTTAATTTGAGGGC	162~168	58
SW373	1	119.5	F: TTTGCTGCAAAGCAATGTTC R: GGTAGGATTCAATAACACCTGG	152~170	55
SW705	1	122.6	F: CTGAAAGTCTTGAGATGAAACGC R: TGTAGAGCATTTTCAGAGGAAGC	145~163	62
SW0056	1	127.1	F: AAGCCACATCTCTCTTCT R: ATAAGTTGCCCCCTACAC	79~117	58
SW840	17	48.6	F: CCTGGAAACAACCTAAGTGTCC R: TTCCACATTAGTTCCGGGAC	121~137	55
CH13	17	56.4	F: TTGGCATCCTTGTGAAAACC R: TTCATATGCTGCAGGTGTGGC	119~147	62
SW1920	17	56.4	F: GATCCGTATCTATAGCCACCTG R: ATGAAAGCTACCAACCTTCC	90~130	58
SW1092	1	95.8	F: CCTGCTATGTCTTATTGGGAGG R: GATCCTGCATTGCCAAGG	224~314	58
SW1311	1	100.8	F: CAAATCATTGACTGCAGAAAAAC R: GCCTGGGTGTTAAGTAACAAAAC	156~178	58
S0092	5	72.3	F: GGGAAACACTAAATCACTTGCCAT R: GGGATCAAGACTTCACACTCCCAT	130~150	60
S0178	8	127.7	F: TAGCCTGGGAACCTCCACACGCTG R: GGCACCAGGAATCTGCAATCCAGT	99~128	65

1.2.4 收集血样

运输结束后立即采集血样, 血样放入预先经肝素抗凝处理的离心管中, 以 3 000 r/min 离心 5 min, 取血浆放入-20 冰箱中待用。

1.2.5 测定激素浓度

ACTH、Cortisol、Insulin、T3 和 T4 均采用放射免疫法测定。测定方法按放免检测试剂盒(购自上

海生物制品研究所)说明书进行。

1.2.6 基因组 DNA 提取

用标准的苯酚-氯仿方法提取基因组 DNA, 基因组 DNA 于 TE 溶液中溶解,-20 保存。

1.2.7 PCR 扩增及染色

PCR 扩增反应体系为 25 μL: 其中基因组 DNA 为 100 ng, 10×PCR 缓冲液 2.5 μL, 25 mmol/L MgCl₂

1.5 μL , 2.5 mmol/L dNTPs 2 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 引物各 0.25 μL , *Taq* 酶(TaKaRa *Taq*TM, 购自宝生物工程(大连)有限公司)1.0 U, 50 ng/ μL 模板 2 μL , 加 ddH₂O 至 25 μL 。PCR 反应程序: 94 预变性 3 min; 94 变性 30 s, 复性 30 s, 72 延伸 30 s, 共 33 个循环; 最后 72 延伸 5 min。各引物复性温度见表 1。取 8 μL PCR 反应产物加 4 μL 上样缓冲液, 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 银染法显色。

1.2.8 个体基因型判断

用 GelKoc2000TM 凝胶自动成像系统分析扩增微卫星片段大小及标记基因型。

1.2.9 数据统计和分析

根据 Bostein^[24] 公式计算多态信息含量 (Polymorphic information content, PIC):

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2(P_i P_j)^2$$

式中 P_i 和 P_j 分别为群体中第 i, j 个等位基因频率, n 为等位基因数。

有效等位基因数 (Number of efficient alleles, E) 按下式计算:

$$E = 1 / \sum_{i=1}^n P_i^2$$

式中 i 为位点数, P_i 为等位基因频率, n 为等位基因数。

杂合度 (Heterozygosity, H) 可根据文献[25]计算:

$$H = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2$$

式中 i 为位点数, P_i 为等位基因频率, n 为等位基因数。

用 SPSS 11.5 For Windows 软件的 Bivariate Correlations 程序分析各性状间的相关性; One-way

ANOVA 程序分析微卫星标记基因型间应激相关性状的差异, 确定显著影响应激性状的微卫星标记。 $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 微卫星标记的扩增和电泳

本研究所选用的 22 个微卫星均具有较高的多态性, 将微卫星扩增产物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 典型的微卫星标记(*S0101*)的电泳带型如图 1 所示。扩增条带为 1 条的为纯合子, 扩增条带为 2 条的为杂合子, 采用 Excel、SPSS 11.5 等软件对实验数据进行统计学分析处理。从图中可以看出, 电泳条带清晰, 分型清楚, 可以用于基因型分析。

2.2 微卫星的多态性检测

不同微卫星位点作为遗传多样性研究指标的可行性与其自身及在特定群体中表现出的遗传特性有关。本研究对所选用的 22 个微卫星位点在 F_2 代猪群体中表现出, 的特性包括杂合度、多态信息含量等进行了统计分析, 结果见表 2。

2.3 应激指标间的相关性分析

表 3 列出了 8 个主要猪应激指标间的表型相关。结果表明: Insulin 与 BS10 负相关 ($P < 0.05$); BS17 与 BS3 正相关 ($P < 0.01$); BS17 与 BS10 正相关 ($P < 0.05$)。

2.4 微卫星标记与运输应激指标 “BacktestScore” 的方差分析

检测到 11 个微卫星标记与不同性状间存在显著相关 ($P < 0.05$ 或 0.01) (表 4), 其中 *S0101* 和 *SW840* 对 T4 有显著影响 ($P < 0.05$); *SW2108* 对 BS17 有显著影响 ($P < 0.05$); *SW2446* 对 BS3 有显著影响 ($P < 0.05$), 对 BS10 有极显著影响 ($P < 0.01$); *SW1816* 分别对 BS10 和 BS17 有显著影响 ($P < 0.05$); *SW1303* 对 Insulin 有显著影响 ($P < 0.05$); *SW1023* 对 BS17 有极显著影响

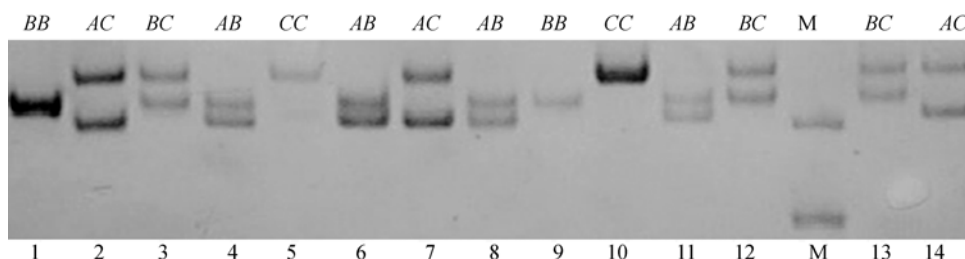


图 1 微卫星 *S0101* 的聚丙烯酰胺凝胶银染结果

M: 50 bp DNA ladder marker; 1~14: 代表个体编号; A~C: 分别代表微卫星的等位基因。

Fig. 1 Genotypes of microsatellites *S0101* with silver stained

M: 50 bp DNA ladder marker; 1~14: Denote individual number; A~C: Denote different alleles of microsatellites.

($P<0.01$); *SW1808* 对 ACTH 有极显著影响($P<0.01$); *SW0320* 对 T3 和 ACTH 有显著影响($P<0.05$); *SW0092* 对 BS10 有显著影响($P<0.05$); *SW1092* 对 Cortisol 有显著影响($P<0.05$)。各标记基因型应激指标的多重比较见表 5。

3 讨论

3.1 资源群体的实验设计与微卫星的遗传多样性

本实验采用远交群体 F_2 设计, 亲本为皮特兰猪和二花脸猪。皮特兰猪是国外引进品种, 瘦肉率高, 性情

暴躁, 是典型的应激敏感型猪种。二花脸猪为本地猪种, 性情温和, 肥胖型, 并且行为和反应的活跃性较低, 肾上腺分泌过多, 为抗应激品种^[23]。从测定 F_2 群体的 Backtest 评分和血浆激素水平统计的结果看, 应激指标在个体间存在不同程度的差异。该资源群体杂合度范围 0.39~0.76, 多态信息含量范围 0.36~0.82, 目标性状和标记在 F_2 群体中均表现出较好的分离。在此基础上, 本研究选取已知应激 QTL 座位内的微卫星标记与应激指标进行相关分析, 旨在寻找与运输应激耐受相关的分子遗传标记。

表 2 22 个微卫星座位点在 F_2 猪群体中的多态性
Table 2 Polymorphisms of 22 microsatellite loci in F_2 population of pigs

标记位点 Lable site	等位基因数 Number of allele	多态信息含量 PIC	有效等位基因数 Number of efficiency alleles	杂合度 H
<i>S0101</i>	3	0.4848	2.2482	0.5552
<i>SW764</i>	5	0.6527	3.2330	0.6906
<i>SW2108</i>	5	0.6725	3.5877	0.7213
<i>SW2446</i>	5	0.6242	2.9539	0.6614
<i>SW2537</i>	5	0.6621	3.4647	0.7114
<i>SW1303</i>	3	0.5322	1.7111	0.4155
<i>SW1816</i>	5	0.6974	3.7845	0.7364
<i>SW2540</i>	6	0.5796	2.8016	0.6430
<i>SW1808</i>	8	0.8150	3.8942	0.7432
<i>SW1023</i>	3	0.4860	2.2687	0.5592
<i>SW705</i>	5	0.6798	3.6372	0.7251
<i>SW0056</i>	7	0.4534	1.8919	0.4714
<i>S0112</i>	6	0.7267	4.2059	0.7622
<i>SW373</i>	4	0.4674	2.0573	0.5139
<i>SW0320</i>	4	0.5715	2.7522	0.6367
<i>SW1920</i>	5	0.6051	3.0338	0.6704
<i>CH13</i>	3	0.4505	2.0520	0.5127
<i>SW840</i>	4	0.3651	1.6498	0.3939
<i>SW1092</i>	6	0.5221	2.2155	0.5486
<i>SW1311</i>	5	0.7317	3.1205	0.6795
<i>SW0092</i>	5	0.5840	2.8550	0.6498
<i>S0178</i>	4	0.5823	2.8561	0.6499

表 3 F_2 群体应激指标之间的相关系数
Table 3 Correlation coefficient between stress traits in F_2 population

性状 Trait	Insulin	T3	Cortisol	T4	ACTH	BS3	BS10	BS17
Insulin	1							
T3	0.286	1						
Cortisol	0.023	-0.124	1					
T4	0.111	0.264	0.045	1				
ACTH	0.053	0.163	-0.191	0.129	1			
BS3	0.246	-0.227	-0.123	0.059	0.119	1		
BS10	-0.309*	-0.078	-0.056	0.118	-0.091	0.128	1	
BS17	-0.173	-0.083	0.000	-0.023	0.0260	0.343**	0.239*	1

注: *表示差异显著($P<0.05$); **表示差异极显著($P<0.01$)。
Notes: * indicates significant difference ($P<0.05$); ** indicates extremely significant difference ($P<0.01$).

表 4 标记与性状间的方差分析结果(F 值)Table 4 The analysis of variance between traits and loci (F -value)

标记位点 Lable site	ACTH	Cortisol	Insulin	T3	T4	BS3	BS10	BS17
<i>S0101</i>	1.659	0.494	1.808	1.513	2.945*	1.337	0.196	2.084
<i>SW764</i>	0.870	0.376	1.141	0.373	1.118	0.852	0.858	0.658
<i>SW2108</i>	0.714	0.522	1.079	0.767	0.997	0.912	1.065	2.572*
<i>SW2446</i>	2.433	0.136	0.516	2.078	0.885	2.635*	5.203**	1.967
<i>SW2537</i>	1.768	0.941	0.482	1.868	2.187	1.105	0.953	0.628
<i>SW1816</i>	0.213	0.221	1.268	0.670	0.576	2.568	3.210*	2.784*
<i>SW1303</i>	0.884	1.023	3.484*	0.260	0.876	0.839	1.151	0.531
<i>SW1023</i>	0.312	1.767	1.855	1.637	0.579	0.173	0.417	5.543**
<i>SW2540</i>	0.169	0.928	0.108	1.848	1.197	1.027	2.003	1.512
<i>SW1808</i>	5.178**	1.740	0.342	0.811	0.726	0.674	1.047	0.510
<i>SW705</i>	0.795	0.673	0.581	0.546	1.609	0.242	1.606	1.119
<i>SW0056</i>	2.197	1.368	1.236	0.775	0.025	1.507	1.333	0.646
<i>CH13</i>	1.619	0.825	0.322	1.750	0.220	0.454	0.874	0.049
<i>SW840</i>	0.516	0.062	1.214	1.092	2.809*	0.137	1.627	2.364
<i>S0112</i>	0.139	1.303	0.383	0.958	0.590	0.685	0.860	0.289
<i>SW0320</i>	3.887*	0.431	1.033	3.560*	0.631	1.882	1.474	2.155
<i>SW1311</i>	1.431	0.720	1.352	0.989	0.705	1.155	0.701	0.184
<i>SW0092</i>	1.799	0.391	0.822	0.542	1.257	0.503	2.953*	2.203
<i>SW0178</i>	0.327	1.335	2.352	1.131	0.791	0.966	1.236	0.722
<i>SW373</i>	0.472	1.937	1.606	0.415	2.349	0.260	0.598	0.384
<i>SW1920</i>	1.241	0.370	0.990	1.310	1.610	1.942	1.083	1.074
<i>SW1092</i>	1.223	2.763*	1.030	2.495	1.049	0.120	1.098	1.014

注: *表示差异显著($P<0.05$); **表示差异极显著($P<0.01$).

Notes: * indicates significant difference ($P<0.05$); ** indicates extremely significant difference ($P<0.01$).

3.2 应激指标的选择

动物在应激状态下, HPA 轴功能增强, ACTH 和 Cortisol 水平会发生不同程度的增加^[26]。Insulin 是机体重要的代谢激素, 其主要功能是调节血糖水平的稳定, 肾上腺髓质-交感神经(Adrenomedullary-sympathetic, SAM)信号的加强可引起外周组织对 Insulin 和能量的需求增加, 从而导致 Insulin 分泌减少^[27]。T3 和 T4 能增强糖原、蛋白质、脂肪的分解, 有利于机体能量的供给。应激状态下甲状腺素的合成与分泌会减少, Cortisol 的大量释放可抑制 T3 和 T4 的合成和释放, 并且 T4 向 T3 转换受阻^[28]。运输应激伴随着血浆应激激素(ACTH 和 Cortisol)水平的升高, 而代谢相关激素(Insulin、T3 和 T4)水平下降, 其变化水平可以反映应激特性和应激时的代谢水平^[23, 28, 29]。另外, 从研究运输应激的文献来看, 较为传统的内分泌学指标有血浆或特定器官(肾上腺)的 Cortisol、 β -内啡肽(β -endorphin)、醛固酮和甲状腺素等^[30, 31]。另外, 根据 Backtest 评分, 可将仔猪

应对应激的行为反应分为不同的反应模式^[7]。综上所述, 本研究将运输应激后的血浆 ACTH、Cortisol、Insulin、T3 和 T4 等激素水平及仔猪 Backtest 评分作为猪的应激指标。

3.3 微卫星位点与应激指标的方差分析

国内有关猪的微卫星标记与应激相关性状的研究报导较少。国外的研究报道主要是根据应激的生理过程, 进行应激生理及行为性状的 QTL 定位。Edfors-Lilja 等^[32]研究发现了猪 SSC2、SSC6 和 SSC12 上影响应激导致的白血球增殖(leukocyte proliferation)的 QTL, 在 SSC6 和 SSC12 上影响 IL-2 的 QTL, 以及 SSC8 上影响应激的嗜中性粒细胞数量变化的 QTL。类似的报道还有: 应激的肌酸激酶 CK20(Creatine kinase)相关的 QTL 定位到 SSC6-8、SSC12 和 SSC16^[33-35]。Desautels 等^[18, 36]利用梅山猪 \times 大白猪杂交的 368 头 F_2 代为实验材料, 将应激前后血浆 Cortisol 水平的 QTL 定位到 SSC7(104.4~156 cM)上及 SSC18(0~3 cM); 应激后血浆 ACTH 水平的

表 5 11 个微卫星位点不同基因型在应激指标上的多重比较

Table 5 The multicomparison for stress traits of different genotypes in 12 microsatellite loci

标记位点 Lable site	基因型 Genotype	样本数 No.	ACTH	Cortisol	Insulin	T3	T4	BS3	BS10	BS17
S0101	AB	5	6.1099	95.4659	7.6223	0.3998	24.0185 ^a	4.00	2.73	2.67
	AC	3	16.6440	135.3950	7.7508	0.5973	32.3687 ^{ab}	4.63	3.00	4.38
	BB	16	5.4878	117.1477	9.6598	0.5911	32.8303 ^{ab}	3.22	2.91	2.41
	BC	21	11.4202	111.0510	10.6442	0.5743	32.5633 ^{ab}	4.06	2.73	2.27
	CC	4	9.1038	106.0978	9.1144	0.4786	43.6295 ^b	3.40	2.80	2.40
SW2108	AB	4	8.2120	108.7941	11.9426	0.6045	31.3573	4.20	2.20	2.80 ^{ab}
	AC	3	—	117.3420	11.9382	0.6840	32.5892	3.00	2.78	2.11 ^{ab}
	AD	7	8.8282	87.5447	9.9845	0.6164	28.7394	3.00	2.18	1.91 ^{ab}
	BB	6	13.5165	118.4143	10.4173	0.6101	35.8657	3.33	3.11	4.00 ^a
	BC	5	—	120.2659	9.5295	0.5150	27.7665	3.57	2.57	2.14 ^{ab}
	BD	17	7.8426	115.2720	9.3258	0.5288	33.3879	4.03	2.57	2.06 ^b
	DD	3	—	92.5928	7.3933	0.4650	31.2815	4.00	3.83	2.33 ^{ab}
SW2446	AA	9	11.1106	107.3339	8.9466	0.5145	31.6021	3.53 ^{ab}	2.00 ^a	1.93
	BB	27	7.7008	114.3159	10.1961	0.5819	32.3684	3.51 ^a	2.66 ^a	2.45
	CC	5	4.7536	118.6146	9.7524	0.4558	37.6298	4.38 ^{ab}	2.75 ^{ab}	2.75
	DD	3	5.1943	99.6693	9.1047	0.4003	26.0175	5.33 ^b	4.44 ^b	3.89
	EE	5	18.5956	113.9448	8.8031	0.6802	35.2526	3.56 ^{ab}	3.33 ^{ab}	2.78
SW1816	BB	18	9.1535	113.1908	9.6460	0.6059	33.3527	3.16	2.57 ^a	2.52 ^a
	BD	5	5.2898	110.1040	11.9394	0.5521	33.4151	4.43	1.86 ^a	1.86 ^a
	CE	13	7.8291	101.9013	9.1222	0.5560	31.6848	4.09	3.30 ^a	2.04 ^a
	DD	7	10.4105	111.4333	9.1901	0.4946	29.6173	4.46	2.31 ^a	3.46 ^a
SW1303	AA	15	7.4389	111.2395	8.0956 ^a	0.5635	36.1488	3.50	2.71	2.75
	AB	11	8.9003	120.0844	10.2960 ^{ab}	0.5288	32.0304	4.38	2.75	2.13
	AC	13	12.8874	96.0199	11.1218 ^b	0.5395	31.5433	3.82	2.81	2.64
	BB	5	5.6800	135.4363	8.1904 ^{ab}	0.6205	30.1815	3.83	3.50	2.83
	CC	5	6.6184	119.8756	11.1361 ^{ab}	0.5674	29.0585	3.25	2.13	2.13
SW1023	AA	3	10.5867	67.7207	6.5620	0.6205	33.5907	3.50	2.25	1.75 ^a
	AC	24	7.9794	122.0316	9.4977	0.5082	31.6335	3.94	2.83	2.51 ^a
	BB	4	7.0171	113.3938	11.0104	0.5780	29.5340	3.56	2.44	4.67 ^b
	CC	16	10.6208	105.0225	10.1667	0.6223	35.0355	3.81	2.93	2.30 ^a
SW1808	AD	11	5.6761 ^a	96.7421	9.9554	0.5913	30.0872	3.57	3.22	2.74
	BH	3	8.6010 ^{abc}	83.3547	9.8850	0.4813	24.8960	3.75	1.50	3.50
	CE	5	25.4090 ^b	114.4383	10.6885	0.5655	36.1961	3.80	2.20	2.60
	CI	9	8.3857 ^{abc}	131.6884	9.7417	0.4789	33.4496	4.33	2.95	2.48
	DE	3	8.4735 ^{abc}	87.5370	7.7545	0.6087	35.3093	3.00	3.00	2.63
	DH	3	22.7195 ^b	99.5048	10.1498	0.6828	34.4240	4.25	2.75	3.25
	EH	10	4.8575 ^{ac}	138.1155	10.2068	0.5982	35.3035	3.87	3.13	2.07
SW840	AC	4	7.6820	115.9198	11.1016	0.5920	33.9116 ^{ab}	3.60	1.60	1.20
	AD	8	6.4258	108.0924	10.9546	0.5215	33.0466 ^{ab}	3.53	2.87	2.00
	BB	5	13.6670	108.5093	8.7671	0.6801	42.8943 ^a	3.83	3.50	3.50
	CC	32	9.0246	113.8554	9.3759	0.5401	30.8231 ^b	3.83	2.82	2.71
SW0320	AB	6	18.7568 ^a	109.2476	8.3210	0.5207 ^{ab}	32.7816	4.45	3.36	3.18
	AC	3	—	92.6478	11.9812	0.8313 ^a	31.4588	5.14	3.57	3.57
	BC	9	7.1973 ^b	114.8526	10.0031	0.4793 ^b	30.1347	3.59	2.92	2.33
	BD	15	7.6173 ^{ab}	124.7012	9.1739	0.5814 ^{ab}	34.2291	3.57	2.64	1.79
	CC	9	7.9369 ^{ab}	106.5457	10.0303	0.5928 ^{ab}	35.2187	3.64	2.54	2.89
SW0092	AA	5	15.9331	101.4050	11.3251	0.5808	31.2161	3.50	2.17 ^a	2.17
	AC	6	6.9747	109.7518	9.6264	0.4850	39.7439	4.38	3.46 ^a	2.77
	AD	22	7.4226	110.3745	9.7253	0.5413	30.4206	3.71	2.76 ^a	2.38
	AE	8	15.2374	112.9118	8.2850	0.6233	35.5467	4.00	3.62 ^a	3.69
	DD	4	3.6833	138.2166	10.3184	0.5016	29.7245	3.43	2.15 ^a	2.29
	DE	3	7.6820	122.4297	10.6325	0.5762	33.8855	3.67	1.33 ^a	0.67
	BC	4	4.1172	168.5969 ^a	7.6194	0.3343	28.5765	3.67	3.67	3.00
SW1092	CC	18	12.3770	108.2184 ^a	9.2899	0.5645	33.5240	3.76	2.84	2.45
	CE	6	9.2438	97.5037 ^a	10.6996	0.4892	28.9184	3.50	2.90	1.70
	CF	12	8.1399	121.0411 ^a	8.9901	0.6070	36.2272	3.91	2.36	2.78
	DE	3	4.0200	88.1547 ^a	10.3848	0.4927	27.4630	3.50	3.25	2.50

注: 同列数据上标字母不同者表示差异显著($P<0.05$)。Note: Data in the same column with different superscripts means significant difference ($P<0.05$).

QTL 定位到 SSC17(54 cM 和 125 cM)和 SSC1(116 cM); 应激后血糖水平的 QTL 定位在 SSC5(17 cM)和 SSC8(142 cM)上。在此基础上, 本研究采用这些已定位的 QTLs 区域的微卫星标记与 F₂ 代猪群(皮×二)的应激性状进行相关分析, 筛选应激相关的微卫星标记。

研究结果表明, SSC1 上的 *SW1092* 与应激后的 Cortisol 相关, *SW0320* 与应激后 ACTH 相关。Desautes 等^[18, 36] 将应激 ACTH 水平变化的 QTL 定位于 SSC1, 因为 ACTH 调节 Cortisol 水平的变化, 那么这个 QTL 可能对 Cortisol 水平有影响。与翻背测试(Backtest)指标相关的标记位于 SSC7 和 SSC18 上。在 SSC7 上, *SW2446* 与 BS3 相关, *SW1816* 和 *SW2446* 与 BS10 相关, *SW2108* 和 *SW1816* 与 BS17 相关, SSC18 上的 *SW1023* 与 BS17 相关, 这些标记均位于已报道的应激相关 Cortisol 水平 QTL 区域内。已有的研究表明, Cortisol 水平与 Backtest 实验中的抵抗行为有关, Backtest 评分较高的猪, 其唾液中 Cortisol 水平显著较低, 代表了一种行为-生理反应模式^[9, 37], 本研究在 Cortisol 水平 QTLs 区域内检测到的微卫星标记与 Backtest 的相关与以上的研究结果是一致的。*SW0320*(SSC1)与 T3 显著相关, *S0101*(SSC7)和 *SW840*(SSC17)与 T4 相关, 由于这些微卫星标记均位于 Cortisol 或 ACTH 水平的 QTL 区域内, 因此这种相关可能反映了应激过程中 Cortisol 的大量释放对 T3/T4 合成和分泌的抑制^[28]。*SW1303*(SSC7)与 Insulin 显著相关, 该标记位于已报道的应激相关 Cortisol 水平 QTL 座位内。应激状态下, 儿茶酚胺、糖皮质激素等分泌增加, 激活糖原分解, 抑制 Insulin 分泌, Insulin 的分泌受到 Cortisol 的调节, 但是目前还没有关于应激 Insulin 水平相关的 QTL 定位报道。

应激的生理和行为反应是一种复杂的性状, 反映了机体对应激反应的多条通路, 给寻找鉴定抗应激的标记造成了一定难度。本实验根据应激相关性状的 QTL 定位信息选择了 22 个微卫星标记, 其中 11 个标记对这些性状影响显著。对猪运输应激耐受的标记辅助选择具有一定的理论指导意义, 其研究结果有待在生产实践中进一步验证。

参考文献(References):

- [1] Miller DB, O'Callaghan JP. Neuroendocrine aspects of the response to stress. *Metabolism*, 2002, 51: 5–10.
- [2] Mormede P, Courvoisier H, Ramos A, Arvy MN, Ousova O, Desautes C, Duclos M, Chaouloff F, Moisan MP. Molecular genetic approaches to investigate individual variations in behavioral and neuroendocrine stress responses. *Psychoneuroendocrinology*, 2002, 27: 563–583.
- [3] Heetkamp M, Schrama JW, de Jong L, Swinkels JWGM, Schouten WCP, Bosch MW. Energy metabolism in young pigs as affected by mixing. *J Anim Sci*, 1995, 73: 3562–3569.
- [4] Castanon N, Mormede P. Psychobiogenetics: adapted tools for the study of the coupling between behavioral and neuroendocrine traits of emotional reactivity. *Psychoneuroendocrinology*, 1994, (19): 257–282.
- [5] Geverink NA, Parmentier HK, de Vries Reilingh G, Schouten WG, Gort G, Wiegant VM. Effect of response to backtest and housing condition on cell-mediated and humoral immunity in adult pigs. *Physiol Behav*, 2004, 80: 541–546.
- [6] Federenko IS, Nagamine M, Hellhammer DH, Wadhwa PD, Wust S. The heritability of hypothalamus pituitary adrenal axis responses to psychosocial stress is context dependent. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89: 244–6250.
- [7] van Erp-van der Kooij, Kuijpers AH, van Eerdenburg FJ, Tielen MJ. A note on the influence of starting position, time of testing and test order on the backtest in pigs. *Appl Anim Behav Sci*, 2001, 73: 263–266.
- [8] Bolhuis JE, Schouten WG, de Leeuw JA, Schrama JW, Wiegant, VM. Individual coping characteristics, rearing conditions and behavioural flexibility in pigs. *Behav Brain Res*, 2004, 152: 351–360.
- [9] Ruis MA, te Brake JH, Engel B, Buist WG, Blokhuis HJ, Koolhaas JM. Adaptation to social isolation. Acute and long-term stress responses of growing gilts with different coping characteristics. *Physiol Behav*, 2001, 73: 541–551.
- [10] Cui ZH, Ikeda K, Kawakami K, Gonda T, Nabika T, Masuda J. Exaggerated response to restraint stress in rats congenic for the chromosome 1 blood pressure quantitative trait locus. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2003, 30: 464–469.
- [11] Dumas P, Pausova Z, Kren V, Krenova D, Pravenec M, Dumont M, Ely D, Turner M, Sun Y, Tremblay J, Hamet P. Contribution of autosomal loci and the Y chromosome to the stress response in rats. *Hypertension*, 2000, 35: 568–573.
- [12] Henderson ND, Turri MG, DeFries JC, Flint J. QTL analysis of multiple behavioral measures of anxiety in mice. *Behav Genet*, 2004, 34(3): 267–293.
- [13] Tarricone BJ, Hingtgen JN, Belknap JK, Mitchell SR, Nurnberger JI Jr. Quantitative trait loci associated with the behavioral response of B×D recombinant inbred mice

- to restraint stress: a preliminary communication. *Behav Genet*, 1995, 25: 489–495.
- [14] Harper JM, Galecki AT, Burke DT, Pinkosky SL, Miller RA. Quantitative trait loci for insulin-like growth factor I, leptin, thyroxine, and corticosterone in genetically heterogeneous mice. *Physiol Genomics*, 2003, 15: 44–51.
- [15] Potenza MN, Brodtkin ES, Joe B, Luo X, Remmers EF, Wilder RL, Nestler EJ, Gelernter J. Genomic regions controlling corticosterone levels in rats. *Biol Psychiatry*, 2004, 55: 634–641.
- [16] Solberg LC, Baum AE, Nasim A, Kazuhiro S, Renhua Li, Turek FW, Takahashi JS, Churchill GA, Redei EE. Genetic analysis of the stress-responsive adrenocortical axis. *Physiol Genomics*, 2006, 27: 362–369.
- [17] Buitenhuis AJ, Rodenburg TB, van Hierden YM, Siwek M, Cornelissen SJ, Nieuwland MG, Crooijmans RP, Groenen MA, Koene P, Korte SM, Bovenhuis H, van der Poel JJ. Mapping quantitative trait loci affecting feather pecking behavior and stress response in laying hens. *Poult Sci*, 2003, 82: 1215–1222.
- [18] Desautels C, Bidanel JP, Milant D, Iannuccelli N, Amigues Y, Bourgeois F, Caritez JC, Renard C, Chevalet C, Mormede P. Genetic linkage mapping of quantitative trait loci for behavioral and neuroendocrine stress response traits in pigs. *J Anim Sci*, 2002, 80: 2276–2285.
- [19] Roberts AJ, Phillips TJ, Belknap JK, Finn DA, Keith LD. Genetic analysis of the corticosterone response to ethanol in BXD recombinant inbred mice. *Behav Neurosci*, 1995, 109: 1199–1208.
- [20] Rempel WE, Lu M, El KS, Kennedy CFH, Irvin LR, Mickelson JR, Louis CF. Relative accuracy of the halothane challenge test and a molecular genetic test in detecting the gene for Porcine Stress Syndrome. *J Anim Sci*, 1993, 71: 1395.
- [21] Zhang W, Kuhlers DL, Rempel WE. Halothane gene and swine performance. *J Anim Sci*, 1992, 70 (5): 1307–1313.
- [22] Geverink NA, Schouten WG, Gort G, Wiegant VM. Individual differences in behavioural and physiological responses to restraint stress in pigs. *Physiol Behav*, 2002, 77, 451–457.
- [23] Li LA, Xia D, Bao ED, Wei S, Xiao JS, Bao JW, Chen WH, Chen J, Hartung J, Zhao RQ. Erhualian and Pietrain pigs exhibit distinct behavioral, endocrine and biochemical responses during transport. *Livestock Science*, 2008, 113, 169–177.
- [24] Bostein DRL, White M, Sholnick L. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am J Hum Genet*, 1980, 32: 314–331.
- [25] Nei M, Roychoudhury AK. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics*, 1974, 76: 379–390.
- [26] Johnson EO, Kamilaris TC, Chrousos GP, Gold PW. Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neurosci Biobehav Rev*, 1992, 16: 115–130.
- [27] Hangalapura BN, Nieuwland MG, Buyse J, Kemp B, Parmentier HK. Effect of duration of cold stress on plasma adrenal and thyroid hormone levels and immune responses in chicken lines divergently selected for antibody responses. *Poult Sci*, 2004, 83: 1644–1649.
- [28] LI Shi-Ze, YANG Huan-Min, YUAN Xue-Jun, YANG Yu-Ying, JIN Rui. Effect of cold stress on some endocrine activities in healthy chickens. *Chin J Appl Environ Biol*, 1998, 4(2): 167–169.
李士泽, 杨焕民, 袁学军, 杨玉英, 靳锐. 冷应激对健康雏鸡某些内分泌活动的影响. *应用与环境生物学报*, 1998, 4(2): 167–169.
- [29] Helmreich DL, Crouch MN, Dorr P, Parfitt DB. Peripheral triiodothyronine (T3) levels during escapable and inescapable footshock. *Physiol Behav*, 2006, 87: 114–119.
- [30] Lambooy E, Hulsege B, Klont RE. Effects of housing conditions of slaughter pigs on some post mortem muscle metabolites and pork quality characteristics. *Meat Sci*, 2004, 66(4): 855–826.
- [31] Fazio E & Ferlazzo A. Evaluation of Stress During Transport. *Vet Res Commun*, 2003, 27(1): 519–524
- [32] Edfors-Lilja I, Watrang E, Andersson L, Fossum C. Mapping quantitative trait loci for stress induced alterations in porcine leukocyte numbers and functions. *Anim Genet*, 2000, 31: 186–193.
- [33] Yue BG, Stratil A, Kopečný M, Schroffellova D, Jr J Schroffell, Hojny J, Cepica S, Davoli R, Zambonelli P, Brunsch C, Sternstein I, Moser G, Bartenschlager H, Reiner G, Geldermann H. Linkage and QTL mapping for Sus scrofa chromosome 6. *J Anim Breed*, 2003, 120(1): 45–55.
- [34] Pierzchala M, Kuryl J, Reiner G, Bartenschlager H, Moser G, Geldermann H. Linkage and QTL mapping for Sus scrofa chromosome 16. *J Anim Breed*, 2003, 120(1): 126–131.
- [35] Beeckmann P, Moser G, Bartenschlager H, Reiner G, Geldermann H. Linkage and QTL mapping for Sus scrofa chromosome 8. *J Anim Breed Genet*, 2003, 120(1): 66–73.
- [36] Desautels C, Bidanel JP, Mormede P. Genetic study of behavioural and pituitary-adrenocortical reactivity in response to an environmental challenge in pigs. *Physiol Behav*, 1997, 62: 337–345.
- [37] Koolhaas JM, Korte SM, De Boer SF, Van Der V, Van Reenen CG, Hopster H, De Jong I, Ruis MA, Blokhuis HJ. Coping styles in animals: current status in behavior and stressphysiology. *Neurosci Biobehav Rev*, 1999, 23: 925–935.