

甘肃境内6个牦牛群体 mtDNA D-环序列 遗传多样性与聚类分析

成述儒¹, 曾玉峰², 王欣荣¹, 张利平¹, 吴建平¹

(1. 甘肃农业大学 动物科学技术学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 中国农业科学院 兰州畜牧与兽药研究所, 甘肃 兰州 730050)

摘要: 利用线粒体 DNA 分子标记研究了甘肃境内 6 个牦牛群体的遗传多样性, 并进行了聚类和网络关系分析。结果表明: 甘肃境内 6 个牦牛群体 240 个个体的 mtDNA D-loop 全序列长度变异为 891 ~ 895 bp, (G + C) 含量为 38.80%, (A + T) 含量为 61.20%, 说明甘肃境内 6 个牦牛群体 mtDNA D-loop 区富含 A 和 T。6 个牦牛群体 240 个体 mtDNA D-loop 序列共发现 60 个变异位点, 变异主要集中在 200 ~ 400 bp 之间, 说明该区域为牦牛 mtDNA D-loop 区的高变区。240 个牦牛 mtDNA D-loop 序列共发现 41 种单倍型, 在玛曲牦牛和碌曲牦牛群体发现的单倍型数最多, 均为 21 个, 其次为夏河牦牛群体 (18 个), 在天祝白牦牛群体发现的单倍型数最少 (11 个)。单倍型多样度和平均核苷酸差异数(k) 分析表明, 来自于甘南州的 3 个牦牛群体的遗传多样性最丰富, 而天祝白牦牛群体最低。41 个单倍型序列构建的系统发生树和网络关系分析表明, 甘肃境内 6 个牦牛群体可能具有 2 个母系起源。

关键词: mtDNA D-loop; 遗传多样性; 母系起源; 牦牛

中图分类号: S823.03 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2014)03-0016-06

Genetic Diversity and Cluster Analysis of Six Yak Populations in Gansu Province Using Mitochondrial D-loop Sequence

CHENG Shu-ru¹, ZENG Yu-feng², WANG Xin-rong¹, ZHANG Li-ping¹, WU Jian-ping¹

(1. Faculty of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

2. Lanzhou Institute of Husbandry and Pharmaceutical Science of Chinese Academy of Agricultural Science, Lanzhou 730050, China)

Abstract: The analysis of genetic diversity, cluster and network relationship were carried out on mtDNA D-loop sequence of 6 yak populations in Gansu province. The results showed that: The length variation of complete mtDNA D-loop sequence was from 891 to 895 base pairs; the (G + C) content was 38.80%, the (A + T) content was 61.20%, which showed that mtDNA D-loop region was rich in A and T. There were 60 variable sites were found in mtDNA D-loop sequence in 6 yak populations. The variations were mainly concentrated in the range of 200 to 400 base pairs, indicating that the region is highly variable region of yak mtDNA D-loop region. Forty one haplotypes were found in 240 yak Individuals, and the number of haplotype found in Maqu yak and Luqu yak populations were the most, which was 21, and that followed by Xiahe yak populations (18). The minimum number of haplotypes (11) was found in Tianzhu white yak. Haplotype diversity and average number of nucleotide differences (k) analysis showed that the most abundant genetic diversity of 3 yak populations in Gannan, but Tianzhu White Yak population was the lowest. Forty one haplotypes constructed phylogenetic trees and networks relationship analysis showed Gansu 6 yak populations may have two maternal origin.

Key words: mtDNA D-loop; Genetic diversity; Maternal origin; Yak

遗传多样性是生物适应和进化的物质基础, 是生物生存发展的前提, 是生物长期进化的结果, 也是

收稿日期: 2014-03-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30960164)

作者简介: 成述儒 (1976-), 男, 甘肃张掖人, 副教授, 博士, 主要从事生物技术与动物育种研究。

人类赖以生存的物质基础^[1]。通过遗传多样性的研究可以揭示物种(群体)的进化历史,为进一步分析其可能的进化演化趋势提供重要的参考。甘肃属中国五大牧区,牦牛(*Bos grunniens*)畜种资源丰富,主要分布于甘肃的甘南高寒草原牧区和祁连山高寒草甸牧区。对牦牛遗传多样性的研究经历了形态学、细胞遗传学、生化遗传学和现代分子生物学的几个研究阶段。牦牛遗传多样性分子水平的研究主要集中在微卫星 DNA^[2-4]、线粒体 DNA^[5-6]和相关功能基因^[7-8]研究上。线粒体 DNA 是动物体唯一的核外遗传物质载体,由于 mtDNA 随着线粒体进行独立的复制、母系遗传、进化速度快且不受核基因的影响,从而忠实地保存了物种进化过程中的变异信息,在动物遗传多样性研究和系统进化研究中受到青睐。RFLP 技术是早期开展 mtDNA 研究工作的主要手段。Wang wen 等^[9]采用 RFLP 技术用 20 种限制性内切酶对云南某地的普通马和矮种马的 mtDNA 进行酶切分析,结果表明,目标群体具有丰富的遗传多样性。Loftus 等^[10]和 Bradley 等^[11]对几个牛品种的 mtDNA D-环区的序列进行了分析测定,结果表明,印度瘤牛与其他地区的牛品种呈现显著的分离状态,并与非洲牛和欧洲牛形成了 2 个具有明显差异的世系,成为 2 个独立的驯化事件;研究认为非洲和欧洲大陆上的原牛是非洲牛和欧洲牛的祖先。Miyamoto 等^[12]对牦牛、普通牛、美洲野牛的 mtDNA 的保守区域和 D-loop 高变区序列进行了测定研究,结果显示牦牛与美洲野牛关系较近,而与普通牛较远。Qi xue-bin^[13]对中国等 8 个国家的 26 个牦牛群体的线粒体 DNA D-loop 进行了全序列测定研究,发现了 4 种主要的单倍型,结果表明青藏高原是牦牛起源的中心。雷初朝等^[14]对中国部分黄牛品种线粒体 DNA D-环遗传多样性的研究证明中国黄牛是普通牛和瘤牛为主混合起源的学说。蔡欣等^[15]基于 mtDNA *cytb* 基因全长序列,对牦牛、水牛和中国黄牛的遗传多样性和系统发育关系进行了分析,发现牦牛与爪哇牛和印度野牛的关系较近。Dorji 等^[16]对牦牛、欧洲牛、不丹瘤牛和印度瘤牛的线粒体 DNA 进行 16S rRNA 基因测序,分析结果表明 16S rRNA 基因具有多态性。

虽然牦牛遗传多样性研究在分子水平的报道较多,但还没有对甘肃境内不同地域的牦牛群体遗传多样性和分类研究的报道。鉴于此,研究对甘肃境内 6 个牦牛群体,利用线粒体 DNA 标记技术进行遗传多样性和聚类研究,旨在为甘肃境内牦牛群体的遗传资源评价和系统发育研究提供科学依据,促进

这些地方牦牛群体资源的合理开发、可持续利用和有效保护工作的顺利开展。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验共采集牦牛血样 240 份,牦牛血样均来自于甘肃境内,血样信息见表 1。牦牛保定后,颈静脉采血 6~8 mL/只于 10 mL 采样管中,加 1 mL ACD (柠檬酸,柠檬酸钠和葡萄糖)抗凝剂抗凝,盖好采样管盖后缓慢上下翻转或轻摇采样管,使抗凝剂与血样混合均匀,防止溶血现象的发生。于 24 h 内带回实验室,放入 -70 ℃ 的超低温冰箱冻存,以备基因组 DNA 提取,开展后续试验研究。

表 1 采样群体、地点及样本含量

Tab. 1 Sampling group, location and sample content

群体 Population	采样地点 Sampling location	样本数量 No. of sample
玛曲牦牛群体 Maqu Yak	玛曲县	40
碌曲牦牛群体 Luqu Yak	碌曲县	40
夏河牦牛群体 Xiahe Yak	夏河县	40
肃南牦牛群体 Sunan Yak	肃南县	40
天祝牦牛群体 Tianzhu Yak	天祝县	40
天祝白牦牛群体 Tianzhu White Yak	天祝县	40
合计 Total		240

注:天祝牦牛群体为天祝非白牦牛群体。

Note: Tianzhu Yak is the population of non-white yak in Tianzhu.

1.2 mtDNA D-loop 序列扩增引物

用于扩增牦牛 mtDNA D-loop 序列 PCR 扩增引物来自参考文献[13],引物序列如下:上游引物为 YAK-F: 5'-CTGCAGTCTCACCATCAACCC-3',下游引物为 YAK-R: 5'-GCTGGGACCAAACCTATGTGT-3';扩增产物长度约 1 050 bp。

1.3 PCR 扩增体系

根据试验检测需要,用于牦牛 mtDNA D-loop 序列扩增的 PCR 采用 30 μL 体系,其中 10 × PCR reaction buffer (MgCl₂) 3.0 μL, dNTP (2.5 mmol/L) 1.0 μL,引物各 1.0 μL (10 pmol/μL), *Taq*-polymerase 0.3 μL, ddH₂O 23.7 μL 反应条件为:95 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 30 s,62 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,30 个循环,72 ℃ 10 min,然后在 -4 ℃ 保存,进行下一步的操作。

1.4 mtDNA D-loop 序列数据分析软件

牦牛 mtDNA D-loop 全序列数据分析主要用到的生物软件包括 ChromasVersion 1.45、Clustal X、Dnasp 4.0、MEGA 2.1 和 NETWORK 4.1.0.9。

个,这可能与天祝白牦牛群体数量不大有关。单倍型多样性在玛曲牦牛群体和碌曲牦牛群体都较高,其值均在 0.900 以上,但在天祝白牦牛群体较低,仅为 0.662,其次在肃南牦牛群体中也较低,为 0.754 (表 2)。核苷酸多样度的数值反映的结果与单倍型多样性反映的结果一致,平均核苷酸差异数(K)以

表2 6个牦牛群体中长度为648 bp的单倍型的多样性参数

Tab.2 Diversity parameters of the D-loop haplotypes in 6 domestic yak populations

群体 Populations	样本 Samples	单倍型数 No. of haplotypes	单倍型多样性 Hd \pm SD	核苷酸多样性 Pi (π)	平均核苷酸差异数 K
玛曲牦牛群体 Maqu Yak	40	21	0.911 \pm 0.021	0.0185	16.47
碌曲牦牛群体 Luqu Yak	40	21	0.902 \pm 0.033	0.0183	16.24
夏河牦牛群体 Xiahe Yak	40	18	0.883 \pm 0.024	0.0126	15.65
肃南牦牛群体 Sunan Yak	40	14	0.754 \pm 0.026	0.0076	10.76
天祝牦牛群体 Tianzhu Yak	40	16	0.834 \pm 0.028	0.0153	13.54
天祝白牦牛群体 Tianzhu White Yak	40	11	0.662 \pm 0.031	0.0036	8.20

用 41 个研究发现的牦牛 mtDNA D-loop 的单倍型序列和邻接法 (NJ) 构建的系统发生树 (Kimura 两参数法) 表明, 这 41 个单倍型序列在系统发生树中分为明显的 2 支 (图 3), 呈现出上支含有最多的单倍型序列 (33 条), 下支所含单倍型数最少 (8 条)。由图 3 可以看出, 这 41 个单倍型序列聚为 2 大类, 在 41 个牦牛 mtDNA D-loop 的单倍型序列中, I 类和 II 类单倍型所占的比例分别是 80.42% (33) 和 19.58% (8); I 类单倍型个体数为 207 头, 占较大的优势 (86.25%), 而 II 类单倍型个体数为 33 头 (13.75%)。其中单倍型 H2、H3、H7、H16 和 H27

针对试验涉及的甘肃境内 6 个牦牛群体 240 个个体的 mt DNA D-loop 的序列构建群体水平的邻接系统发生树 (Kimura 两参数法), 结果见图 4。从图 4 可以看出, 6 个牦牛群体聚为明显的 2 类, 即来自于甘南藏族自治州的 3 个牦牛群体 (玛曲牦牛、碌曲牦牛和夏河牦牛) 首先聚为一类, 而来自于祁连山地区的天祝牦牛、天祝白牦牛和肃南牦牛 3 个群体聚为另一类, 这种分支结果与甘肃境内 6 个牦牛群体 15 个微卫星座位的等位基因数据分析的聚类分析结果相一致, 因而从核内遗传物质 (微卫星 DNA) 和核外遗传物质 (线粒体 DNA) 2 个水平证明了这一结果。这种聚类结果与甘肃境内 6 个牦牛群体的地理距离具有一定的关系。

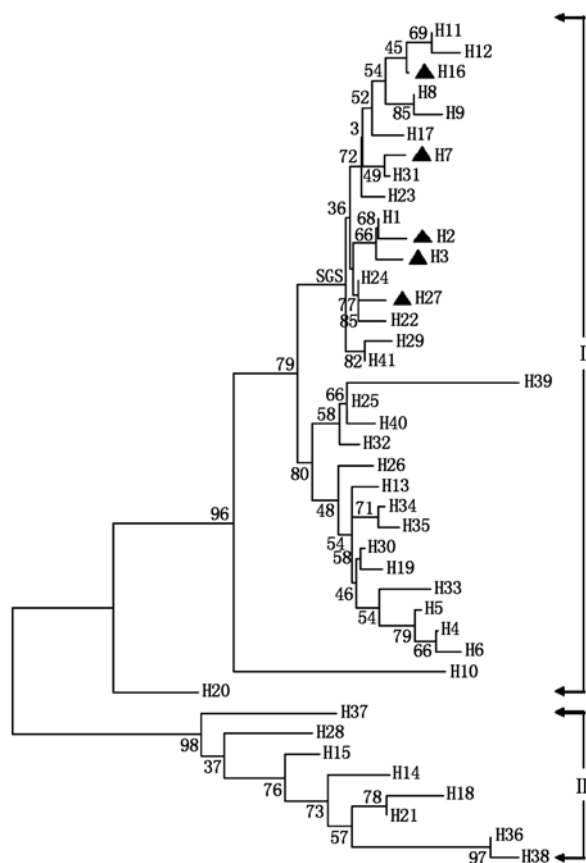


Fig.3 Phylogenetic tree of 41 haplotypes using the neighbor-joining (NJ)



Fig.4 Phylogenetic tree of 6 yak populations in Gansu Province using mtDNA D-loop sequence

用计算机软件 NETWORK 4.1.0.9 对甘肃境内 6 个牦牛群体的 41 个线粒体 DNA D-loop 单倍型序列进行网络关系分析,网络关系分析比系统发育树给出了更多的信息,不仅能够给出像系统发育树一样的明显分支结果,而且还可以看出不同单倍型间

条),表明 I 类单倍型在 6 个群体中占有较大的优势。对甘肃境内 6 个牦牛群体的 41 个线粒体 DNA D-loop 单倍型序列进行网络关系分析,结果表明甘肃境内 6 个牦牛群体 41 个单倍型序列的网络关系分析结果呈明显的 2 支,这种分支结果与 6 个牦牛群体 41 个单倍型序列的聚类分析结果一致,这说明甘肃境内的 6 个牦牛群体可能具有 2 个母系起源。野牦牛作为家牦牛的野生近祖,经典分类学常分为祁连山型和昆仑山型 2 种类型,研究推测天祝白牦牛、天祝牦牛和肃南牦牛 3 个群体牦牛的母系起源为祁连山型野牦牛,而玛曲牦牛、碌曲牦牛和夏河牦牛 3 个群体牦牛的母系起源为昆仑山型野牦牛,推测结果从 6 个牦牛群体的地理分布上得到了初步验证,并与钟金城等^[18]和赖松家等^[6]研究认为家牦牛有 2 个母系起源或来自一个杂合基因库的结果一致。

4 结论

研究发现甘肃境内 6 个牦牛群体 240 个个体的 mtDNA D-loop 全序列长度变异为 891 ~ 895 bp,分析表明甘肃境内 6 个牦牛群体线粒体 DNA D-loop 区富含 A 和 T。240 个体 mtDNA D-loop 序列共发现 60 个变异位点,变异主要集中在 200 ~ 400 bp 之间,为牦牛 mtDNA D-loop 区的高变区。遗传多样性分析表明 6 个牦牛群体中来自甘南藏族自治州的 3 个牦牛群体的遗传多样性都较丰富,而天祝白牦牛群体的遗传多样性最低,应该引起重视。mtDNA D-loop 的单倍型序列构建的系统发生树和网络关系分析表明,甘肃境内 6 个牦牛群体可能具有 2 个母系起源。

参考文献:

- [1] 曹家树,曾广文,缪 颖. 生物适应进化及其分子机制[J]. 大自然探索,1997,16(4):51-54.
- [2] 李齐发,赵兴波,罗晓林,等. 牦牛基因组微卫星富集文库的构建与分析[J]. 遗传学报,2004,31(5):489-494.
- [3] 成述儒,王欣荣,曾玉峰. 甘肃境内 6 个牦牛群体微卫星标记遗传多样性及遗传结构分析[J]. 农业生物技术学报,2012,20(12):1424-1432.
- [4] 廖信军,常 洪,张桂香,等. 中国 5 个地方牦牛品种遗传多样性的微卫星分析[J]. 生物多样性,2008,16(2):156-165.
- [5] 李齐发,李隐侠,赵兴波,等. 牦牛线粒体 DNA D-loop 区序列测定及其在牛亚科中分类地位的研究[J]. 畜牧兽医学报,2008,39(1):1-6.
- [6] 赖松家,王 玲,刘益平,等. 中国部分牦牛品种线粒体 DNA 遗传多态性研究[J]. 遗传学报,2005,32(5):463-470.
- [7] 邝良德,林亚秋,徐亚欧,等. 九龙牦牛脂肪细胞型脂肪酸结合蛋白基因(AFABP)的克隆及其表达谱[J]. 农业生物技术学报,2010,18(6):1098-1102.
- [8] 闫 伟,罗玉柱,杨 勤,等. 牦牛瘦素受体基因(LEPR)多态性分析[J]. 农业生物技术学报,2011,19(2):323-329.
- [9] Wang W, Liu A H, Lin S Y, *et al.* Multiple genotypes of mitochondrial DNA within a horse population from a small region in Yunnan province of China [J]. *Biochemical Genetics*, 1994, 32(9-10):371-378.
- [10] Loftus R T, MacHugh D E, Bradley D G, *et al.* Evidence for two independent domestications of cattle [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(7):2757-2761.
- [11] Bradley D G, MacHugh D E, Cunningham P, *et al.* Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(10):5131-5135.
- [12] Miyamoto M M, Tanhauser S M and Laipis P J. Systematic relationship in the artiodactyls tribe Bovini (Family Bovidae), as determined from mitochondrial DNA sequences [J]. *Systematic Zoology*, 1989, 38(2):342-349.
- [13] Qi Xue-bin. Genetic diversity, differentiation and relationship of domestic yak populations: a microsatellite and mitochondrial DNA study [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2004.
- [14] 雷初朝,陈 宏,杨公社,等. 中国部分黄牛品种 mtDNA 遗传多态性研究[J]. 遗传学报,2004,31(1):57-62.
- [15] 蔡 欣,陈 宏,雷初朝,等. 中国 3 个牛种 *cytb* 基因多态性及其系统发育研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2007,35(2):43-46,52.
- [16] Dorji T, Mannen H, Namikawa T, *et al.* Diversity and phylogeny of mitochondrial DNA isolated from mithun *Bos frontalis* located in Bhutan [J]. *Animal Genetics*, 2010, 41(5):554-556.
- [17] Zardoya R, Meyer A. Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving relationships among vertebrates [J]. *Mol Biol Evol*, 1996, 13(7):933-942.
- [18] 钟金城,柴志欣,姬秋梅,等. 西藏牦牛的遗传多样性及其系统进化研究[J]. 西南民族大学学报:自然科学版,2011,37(3):368-378.