

家牦牛线粒体 DNA (mtDNA) 遗传多样性及其分类

郭松长¹, 祁得林², 陈桂华³, 徐世晓¹, 赵新全^{1,*}

(1. 中国科学院高原生物适应与进化重点实验室, 西宁 810008; 2 青海大学农牧学院, 西宁 810001;
3. 湖南省洞口县动物防疫监督站, 邵阳 422300)

摘要:通过分析包括我国 10 个家牦牛品种(类群)在内共 296 个样本的 mtDNA 控制(D-loop)区部分序列的遗传变异,对中国家牦牛的遗传多样性、遗传分化、聚类关系和分类进行了研究。所测序列经比对后,共检测到 61 个变异位点,定义了 77 种单倍型。分析显示青海环湖牦牛的单倍型多样性最高,达 0.9848 ± 0.0403 ,而巴州牦牛单倍型多样性最低,为 0.8000 ± 0.0825 ;核苷酸多样性方面,斯布牦牛存在最为丰富的核苷酸序列变异,核苷酸多样性值为 0.022582 ± 0.011767 ,而巴州牦牛仅为 0.006856 ± 0.002476 ,表明中国家牦牛品种(类群)遗传多样性水平存在较大差异。总体上,中国家牦牛单倍型多样性、核苷酸多样性分别为 0.9251 ± 0.0095 和 0.015265 ± 0.007757 ,呈现出丰富的遗传多样性。聚类分析显示中国家牦牛存在两个聚类簇——斯布牦牛独立为一类;其余 9 个品种(类群)聚为一类,表明家牦牛品种(类群)间遗传距离与地理分布无明显相关。分子变异分析(AMOVA)显示九龙、嘉黎、斯布牦牛构成的组与其余 7 个家牦牛品种(类群)构成的组之间存在极显著的遗传分化($\Phi_{CT} = 0.05285, P < 0.01$),且其品种间/组内遗传分化不显著($\Phi_{SC} = 0.00648, P > 0.05$),支持依据遗传分化程度将中国家牦牛划分为两大类型。AMOVA 支持的分组在品种(类群)组成上与蔡立的研究结果相符,首次为中国家牦牛划分为横断高山型和青藏高原型两种类型提供了源自分子遗传学的证据。

关键词:家牦牛;mtDNA 控制区;遗传多样性;聚类关系;遗传分化;分类

文章编号:1000-0933(2008)09-4286-09 中图分类号:Q346,Q958 文献标识码:A

Genetic diversity and classification of domestic yaks inferred from mitochondrial DNA sequences

GUO Song-Chang¹, QI De-Lin², CHEN Gui-Hua³, XU Shi-Xiao¹, ZHAO Xin-Quan^{1,*}

1 Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China

2 Agricultural and Animal Husbandry College, Qinghai University, Xining 810003, China

3 Animal Epidemic prevention Station of Donghou County, Shaoyang 422300, China

Acta Ecologica Sinica, 2008, 28(9): 4286 ~ 4294.

Abstract: To investigate the genetic diversity, clustering relationship, genetic differentiation and classification, we presented molecular variation analysis of partial mitochondrial(mt) DNA D-loop from 296 individuals encompassing 10 yak breeds. The aligned 637 bp fragments included 61 variable sites, and a total of 77 haplotypes were identified. The genetic diversity analysis demonstrated that there was significant difference between breeds of domestic yaks. Among 10 yak breeds, Huanhu yak and Bazhou yak showed the highest and the lowest haplotype diversity (0.9848 ± 0.0403 and 0.8000 ± 0.0825), respectively. Where as for the nucleotide diversity, Sibuy yak and Bazhou yak presented the highest and the

基金项目:国家重大基础研究计划“973”资助项目(20005CB422005)

收稿日期:2007-10-25; **修订日期:**2008-06-24

作者简介:郭松长(1976~),男,湖南冷水江人,博士,主要从事动物分子生态学研究. E-mail: guo@nwipb.ac.cn

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: xqzhao@nwipb.ac.cn

Foundation item: The project was financially supported by National Basic Research Program of China “973” (No. 20005CB422005)

Received date: 2007-10-25; **Accepted date:** 2008-06-24

Biography: GUO Song-Chang, Ph. D., mainly engaged in molecular ecology of animal. E-mail: guo@nwipb.ac.cn

lowest values (0.022582 ± 0.011767 and 0.006856 ± 0.002476), respectively. In all domestic yaks, a high genetic diversity was observed with 0.9251 ± 0.0095 for haplotype diversity and 0.015265 ± 0.007757 for nucleotide diversity. The clustering relationship indicated that 10 yak breeds could be divided into two clades. The first clade included only Sibuyak, and the second clade consisted of the remaining 9 breeds. The result showed that there is no significant correlation between genetic distance and geographic distribution in yak breeds. Analysis of molecular variance (AMOVA) revealed remarkably significant genetic differentiation ($\Phi_{CT} = 0.05285$, $P < 0.01$) between Jiulong-Sibu-Jiali group and multi-breeds group. However, no significant genetic differentiation was detected among breeds within groups ($\Phi_{SC} = 0.00648$, $P > 0.05$). These data suggested that 10 yak breeds should be classified into two types. Our result accorded with previous study conducted by Professor Caili, and provided direct genetic evidence for reasonable classification of domestic yak breeds.

Key Words: domestic yaks; mtDNA D-loop; genetic diversity; clustering relationship; genetic differentiation; classification

牦牛(*Bos grunniens*)是唯一能适应青藏高原及周边地区特殊生态环境且延续至今的牛种,可分为家牦牛和野牦牛两种,分布于西起帕米尔高原,东至岷山,南自喜马拉雅山南坡,北抵阿尔泰山麓 2 000 ~ 5 000 m 的广大高原、高山、亚高山的寒冷半湿润气候区域,素有“高原之舟”之称。我国是世界上家牦牛数量、品种最多的国家,有家牦牛 1400 多万头,约占世界家牦牛总数的 95% 以上^[1]。由于对高寒生态条件具有极强的适应性,家牦牛不仅是广大藏区人民重要的生产、生活资源(提供奶、肉、毛、役力、燃料等),也是当地民族经济可持续发展的资源依托^[2,3]。

家畜的遗传多样性是生物多样性的的重要组成部分。作为我国宝贵的生物资源和品种基因库,家牦牛丰富的遗传多样性是我国乃至世界牦牛产业持续发展的基础,且家牦牛分类的正确与否对家牦牛遗传资源的合理利用具有重要意义。长期以来,家牦牛的遗传多样性与分类研究因而也成为牦牛科学研究的重点和热点问题。分类上,陆仲磷^[4]依据牦牛的体型结构、毛色、发展历史、产区的生态环境等将我国家牦牛划分为西南高山峡谷型、青藏高原型和祁连山型 3 个类型。蔡立^[5]则依据产区的生态环境条件和牦牛的特征特性,将我国 8 个地方品种或类群的家牦牛分为横断高山型和青藏高原型两大生态类型。其中,属于横断高山型的有九龙牦牛、中甸牦牛、西藏高山牦牛等;青藏高原型则包括麦洼牦牛、青海高原牦牛、天祝牦牛、巴州牦牛、西藏高原牦牛等。随后,研究者先后采用蛋白多态、mtDNA RFLP、微卫星、测序技术等对部分家牦牛品种的遗传多样性和聚类关系^[6~9]进行了研究,但由于涉及品种少、样本量不足,且研究手段、方法不一,研究结果也不尽相同。当前,尽管基于分子标记的研究倾向于支持将我国家牦牛划分为两种生态类型^[6,8,10],但对哪一家牦牛品种(类群)应归入何种生态类型均未做出明确、合理的阐述,有关家牦牛品种(类群)遗传结构与地理分布之间关系的研究也至今未见报道。mtDNA 具有母系遗传、变异速度快等特征,是研究动物遗传多样性、遗传结构和聚类关系等的有效分子标记。基于此,本实验以我国 10 个家牦牛品种(类群)为研究对象,采用测序技术对其 mtDNA D-loop 区部分序列的遗传变异进行分析,目的在于从 DNA 水平揭示牦牛的遗传多样性,并在此基础上进行家牦牛的遗传差异和分子变异等级分析,探讨品种(类群)之间的聚类关系和遗传分化,为我国家牦牛类型的划分、遗传多样性评估及其可持续利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以我国青海、西藏、甘肃、新疆、四川 5 省(区)家牦牛为研究对象,本试验共采集 250 份家牦牛样本。采样时,活体牦牛静脉采血 2 ml 于冻存管中,EDTA-Na₂ 抗凝;屠宰牦牛取肌肉组织少许置于 1.5 ml Eppendorf (EP)管中,封口膜密封。所有采集样品均保存于液氮中直至送回实验室。此外,本研究从 GenBank 获得家牦牛 D-loop 序列 46 条(Accession Number: AY521137-AY521161; DQ007210-DQ007214; DQ007219-DQ007224;

DQ856594-DQ856600; DQ856602-DQ856604)。采样地点、样本信息见图 1 和表 1。

1.2 基因组 DNA 提取

去离子水洗净的肌肉组织约 50 mg 于液氮中研碎,或抗凝血 50 μ l 转移至 1.5 ml Eppendorf 管中。总 DNA 提取参照《分子克隆实验指南》^[11] 进行,并略加改动。

1.3 D-loop 部分序列的扩增及测序

采用 Primer premier 5.0 (Premier Biosoft) 自行设计引物,由上海生工生物工程有限公司合成,序列为: YDF 5'-GTAAAGAGCCTCACCAGTAT-3' 与 YDR 5'-TCCTGTAGCCATTGACTAT-3'。采用 30 μ l 扩增体系,内含模板 DNA 20 ~ 100 ng、10 $\times$ Buffer (Takara) 3 μ l 及 Ex Taq 聚合酶 (Takara) 0.75 U,引物和 dNTPs (Takara) 终浓度分别为 0.1 μ mol/L 与 50 μ mol/L。PCR 在 Tpersonal thermocycler (Biometra) 上进行,循环参数为:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min,34 次循环,包括 94 $^{\circ}$ C 变性 60 s;50.1 $^{\circ}$ C 退火 60 s;72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s;最后 72 $^{\circ}$ C 充分延伸 4 min,扩增产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测其片断大小及亮度。PCR 产物用试剂盒 (中科开瑞,上海) 纯化,并以相同引物及 DYEnamic Dye Terminator Cycle Sequencing Kit 试剂盒 (Amersham Pharmacia Biotech Inc) 进行测序反应。测序反应完毕后进行纯化,在 Megabase 500 自动测序仪 (Amersham Pharmacia Biotech Inc) 上进行测序。

1.4 数据处理

序列经 Clustal X (1.8) 程序^[12] 排序,并适当手动校对。以 Dna SP 4.10.9^[13] 进行多态位点、单倍型多样性 (h) 和核苷酸多样性 (π_n) 分析;采用 MEGA 3 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)^[14] 计算品种 (类群) 间的 Kimura 双参数距离并分别以邻接法 (neighbor joining, NJ)、最小进化法 (minimum evolution, ME) 和非加权配对算术平均值法 (unweighted pair group method with arithmetic means, UPGMA) 构建品种间聚类关系。家牦牛的遗传分化和遗传结构通过 Arlequin Ver3.11^[15] 程序的分子变异分析 (Analysis of Molecular Variance, AMOVA) 模块进行分析,以 Φ_{CT} 、 Φ_{SC} 和 Φ_{ST} 分别表示组间、组内种群间与种群内的分子变异统计量,并采用排列测验法对各 Φ 统计量 (Φ_s) 进行显著性检验 (置换次数为 10000)。本研究中,未知类群家牦牛仅参与总体遗传多样性分析。

2 结果与分析

2.1 序列分析

经测序得各序列有效长度为 636 bp 或 637 bp,所有序列均已提交至 GenBank (Accession Number: DQ138998 ~ DQ139201; DQ139215 ~ DQ139260)。对上述序列与所下载序列进行的核苷酸组成分析表明家牦

表 1 采样信息表

Table 1 Sampled breeds/taxa and collection information from each province

省 (区) Province	品种/类群 Breed/Taxa	采样地点 Locality	样本数 (下载序列数) No. of individuals (No. of downloaded sequences)	总数 Total
Gansu	Unc	Sunan	8	27
	TZ	Tianzhu	19 (12*)	
Qinghai	DT	Menyuan	31	125
	HH	Gonghe	3	
	HH	Haiyan	2	
	HH	Gangcha	2	
	HH	Heimahe	2	
	HH	Dulan	3	
	GY	Yushu	13	
	GY	Maqin	32	
	GY	Dari	37	
Tibet	JLi	Yanshiping	5	84
	JLi	Naqu	4	
	JLi	Anduo	9	
	JLi	Yangbajing	9	
	JLi	Dangxiong	9	
	SB	Lhasa	1	
	SB	Gongga	2	
	SB	Dazi	8	
	SB	Zedang	10	
	PL	Shigatse	11	
	PL	Yadong	4	
	PL	Zhongba	5	
	Unc	Unclear	7 (7*)	
Sichuan	MW	Hongyuan	17 (17*)	27
	JL	Jiulong	10 (10*)	
Xinjiang	Unc	Yiwu	10	35
	Unc	Yecheng	8	
	BZ	Hejing	15	

TZ = 天祝; DT = 大通; HH = 环湖; GY = 青海高原; JLi = 嘉黎; SB = 斯布; PL = 帕里; JL = 九龙; MW = 麦洼; BZ = 巴州; Unclear = 未知类群; 下同 TZ = Tianzhu, DT = Datong, HH = Huanhu, GY = Gaoyuan, JLi = Jiali, SB = Sibiu, PL = Pali, JL = Jiulong, MW = Maiwa, BZ = Bazhou Unclear = taxa remain unclear; The same below; * 括号内数字为 Genbank 中下载序列数 * Number of downloaded sequences

牛中 T、C、A、G 4 种核苷酸的平均比例分别为 27.6% (27.0% ~ 28.1%)、25.1% (24.6% ~ 25.6%)、31.7% (31.4% ~ 32.4%)、15.7% (14.8% ~ 16.0%), 表明牦牛中线粒体 DNA 所测区段富含碱基 A + T, 表现出一定的碱基偏倚性, 显示出牛科动物 mtDNA D-loop 序列碱基组成的共同特征。

全序列共有 61 个变异位点, 存在 4 种变异类型, 即转换(Ts)、颠换(Tv)、插入(Insert)/缺失(Indel)。其中两核苷酸之间突变位点有 59 个, 包括转换位点 56 个 (A↔G 转换 24 个; C↔T 转换 32 个), 颠换位点 3 个 (均为 A↔T); 此外, 还存在两处三核苷酸之间的突变, 即 G↔-↔A 与 T↔A↔C。以 DQ139043 为标准进行比对, 得部分序列的碱基变异分析图如图 2 所示。

2.2 家牦牛遗传多样性

依据 61 个变异位点共定义了 77 种家牦牛单倍型。采用 Arlequin Ver3.11 对我国家牦牛单倍型多样性及核苷酸多样性进行统计分析, 遗传多样性指数见表 2。

由表 2 可知: 总体上, 我国家牦牛存在丰富的遗传多样性, 其单倍型多样性、核苷酸多样性分别为 0.9251 ± 0.0095 和 0.015265 ± 0.007757 。对各品种(类群)的单倍型多样性分析表明: 青海环湖牦牛是单倍型多样性最高的品种(类群), 单倍型多样性值高达 0.9848 ± 0.0403 ; 而巴州牦牛单倍型多样性最低, 仅为 0.8000 ± 0.0825 ; 斯布牦牛单倍型多样性略低于环湖牦牛, 为 0.9571 ± 0.031 ; 大通、嘉黎、九龙、青海高原型牦牛单倍型多样性则分别为 0.9419 ± 0.0279 、 0.9143 ± 0.0308 、 0.9117 ± 0.0327 、 0.9117 ± 0.0327 , 高于天祝牦牛、帕里、麦洼牦牛。核苷酸多样性方面, 斯布牦牛、嘉黎牦牛核苷酸多样性分别为 0.022582 ± 0.011767 和 0.017466 ± 0.009027 , 表明品种(类群)内存在丰富的核苷酸序

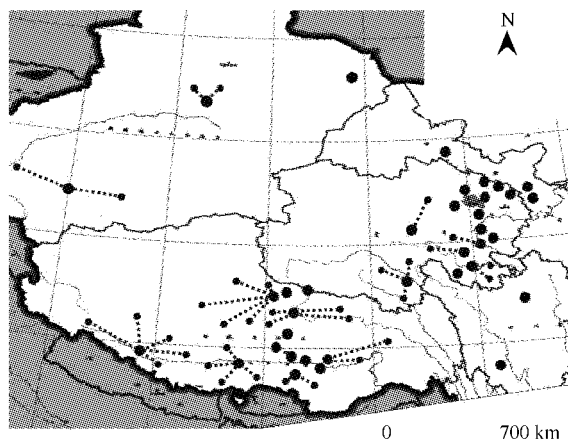


图 1 采样地点

Fig. 1 Geographical distribution of sampled domestic yaks

```

111111 1122222222 222333344]
5678011336 9900123455 677033448
4196467285 3401107034 108056253
DQ139043 AGCGAATGTG CCGGAATCT ATCCGGTCG
DQ139042 ...G... T..AA..C.. .....C..
DQ139075 .....C.. T.....
DQ139105 TATA-. .ACA .TAA. GGTC GCTTAA. TA
DQ139153 .....TA...

```

图 2 部分序列的碱基变异分析

Fig. 2 Nucleotide analysis of partial mtDNA D-loop sequences of domestic yaks

表 2 家牦牛单倍型多样性及核苷酸多样性

Table 2 Haplotype diversity and Nucleotide diversity of domestic yaks

地区 Region	品种/类群 Breed/Taxa	单倍型数 No. H	h (Mean $\pm$ S. D)		π_n (Mean $\pm$ S. D)	
			Breed	Region	Breed	Region
甘肃 Gansu	TZ	9	0.8655 ± 0.0561	0.9117 ± 0.0327	0.010991 ± 0.006087	0.011753 ± 0.006310
青海 Qinghai	DT	19	0.9419 ± 0.0297	0.9272 ± 0.0142	0.016271 ± 0.008487	0.014056 ± 0.007218
	HH	11	0.9848 ± 0.0403		0.010596 ± 0.006050	
	GY	28	0.9091 ± 0.0186		0.013811 ± 0.007131	
西藏 Tibet	JLi	17	0.9143 ± 0.0308	0.9171 ± 0.0193	0.017466 ± 0.009027	0.018577 ± 0.009409
	SB	15	0.9571 ± 0.0311		0.022582 ± 0.011767	
	PL	9	0.8474 ± 0.0613		0.012635 ± 0.006841	
四川 Sichuan	JL	7	0.9111 ± 0.0773	0.9117 ± 0.0327	0.016044 ± 0.009060	0.016130 ± 0.008462
	MW	4	0.8676 ± 0.0684		0.016902 ± 0.009059	
新疆 Xinjiang	BZ	7	0.8000 ± 0.0825	0.8220 ± 0.0350	0.006856 ± 0.002476	0.005838 ± 0.003364
Domestic yaks	—	77	0.9251 ± 0.0095		0.015265 ± 0.007757	

列变异;而巴州牦牛仅为 0.005838 ± 0.003363 , 序列间核苷酸差异平均为 2.46 碱基。从省(区)来看, 青海家牦牛单倍型多样性较高而核苷酸多样性较低, 四川家牦牛单倍型多样性较低而核苷酸多样性较高, 西藏家牦牛则单倍型多样性与核苷酸多样性均较高, 而新疆家牦牛二者均处于较低水平。此外, 对各省(区)的单倍型、特有单倍型数进行统计, 单倍型数分布为青海 46 种, 西藏 31 种, 甘肃 13 种, 四川 13 种, 新疆 8 种; 而特有单倍型分布为青海 31 种, 西藏 16 种, 甘肃 5 种, 四川 3 种, 新疆 5 种。

2.3 牦牛品种(类群)间距离与聚类分析

以 MEGA 3 计算各家牦牛品种(类群)间的距离; 并进行自举检验分析, 以估计标准误。我国牦牛品种(类群)间遗传距离见表 3。

表 3 牦牛品种(类群)间 Kimura 双参数距离(下三角)与标准误(上三角)*

Table 3 Genetic distance(below diagonal) and standard error(above diagonal) between yak breeds/taxa *

品种/类群 Breeds/Taxa	TZ	DT	HH	GY	JLi	SB	PL	JL	MW	BZ
TZ		0.0025	0.0021	0.0023	0.0027	0.0037	0.0023	0.0024	0.0027	0.0018
DT	0.0137		0.0024	0.0025	0.0028	0.0037	0.0025	0.0027	0.0037	0.0020
HH	0.0103	0.0131		0.0022	0.0025	0.0036	0.0021	0.0023	0.0036	0.0015
GY	0.0124	0.0149	0.0121		0.0026	0.0035	0.0023	0.0024	0.0035	0.0017
JLi	0.0140	0.0162	0.0138	0.0150		0.0036	0.0026	0.0027	0.0036	0.0021
SB	0.0207	0.0215	0.0208	0.0207	0.0207		0.0036	0.0036	0.0039	0.0035
PL	0.0117	0.0142	0.0112	0.0129	0.0144	0.0204		0.0024	0.0035	0.0015
JL	0.0131	0.0154	0.0127	0.0142	0.0154	0.0208	0.0135		0.0036	0.019
MW	0.0143	0.0161	0.0137	0.0152	0.0163	0.0212	0.0145	0.0156		0.0033
BZ	0.0077	0.0111	0.0069	0.0094	0.0117	0.0203	0.0084	0.0103	0.0114	

* 种群间遗传距离由 Kimura 双参数模型计算而得 Average genetic distance between populations based on Kimura 2-parameter model

数据分析显示我国家牦牛各品种(类群)间遗传距离变异范围为 0.0069 ~ 0.0215。其中, 斯布牦牛与其余品种(类群)间的遗传距离较大, 环湖牦牛、巴州牦牛与其它牦牛的遗传距离较小。基于 Kimura 双参数距离, NJ、ME 和 UPGMA 算法得到的 10 个家牦牛品种(类群)的聚类关系基本一致, 其 NJ 聚类关系见图 3A。

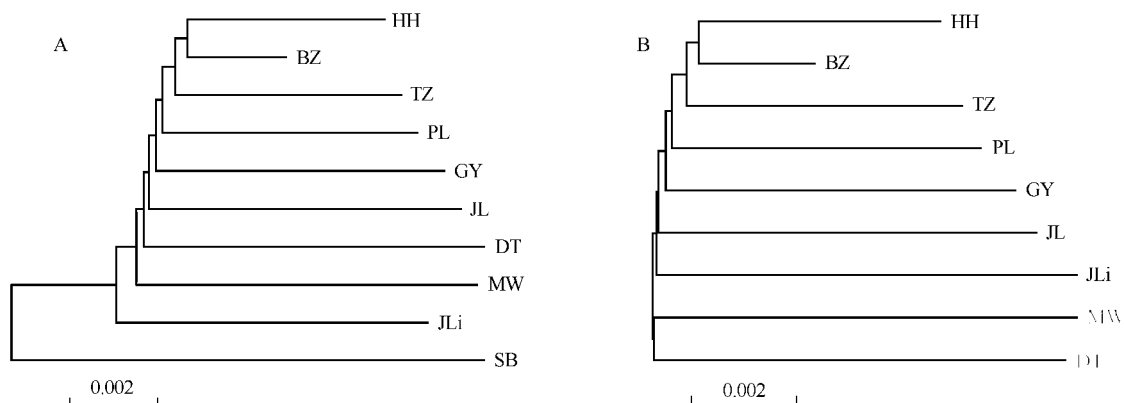


图 3 基于 Kimura 双参数距离的家牦牛品种的 NJ 聚类关系

Fig. 3 Neighbor-joining tree of yak breeds inferred from Kimura 2-parameter distance

A: 10 个家牦牛品种的聚类关系图; B: 除斯布牦牛外其余 9 个家牦牛品种的聚类关系图 A: clustering relationship of 10 breeds; B: clustering relationship of 9 breeds (excluding Sibu yak)

由图 3A 可知青海环湖牦牛与巴州牦牛最先聚在一起, 然后与除斯布牦牛外的其余 7 个个品种(类群)聚为一支, 而斯布牦牛单独构成一支。斯布牦牛未参与聚类分析时, 大通牦牛与麦洼牦牛聚为一类, 而其余 7 个品种(类群)组成另一支(图 3B)。

3.3 遗传结构分析

采用 Arlequin Ver3.11 软件的 AMOVA 模块,通过等级剖分计算不同分组情况下各等级变异在总变异中所占的比例。分组时,除将所有品种(类群)作为一组(分组 I)外,本研究还分别参照蔡立^[5]与陆仲磷^[4]的分类方法,即(1)分为两个类型——横断高山类型和青藏高原类型;(2)3 种类型——西南高山峡谷型、青藏高原型与祁连山型,对 10 个家牦牛品种(类群)进行不同分组。鉴于有关帕里牦牛的分类信息极为有限,在划分为 2 组进行 AMOVA 时,尝试将帕里牦牛分别置于不同组合(分组 II、III)之中。分子变异分析结果见表 4。

表 4 家牦牛品种(类群)的分子变异分析

Table 4 Analysis of molecular variance of domestic yak breeds/taxa in China

组 Group	变异来源 Source of variation	自由度 d. f	变异组分 Variance components	变异比率 Percentage of variation	Φ 统计 Φ -statistics	显著性检验 Significance test
I: [TZ, DT, HH, GY, JLi, SB, PL, JL, MW, BZ]	群体间 Among populations	9	0.14810	3.09	0.03087	0.02346
	群体内 Within populations	253	4.64910	96.91	/	/
II: [JL, SB, JLi], [TZ, DT, HH, GY, PL, MW, BZ]	组间 Among groups	1	0.26111	5.29	0.05285	0.00489
	群体间/组内 Among populations/ Within groups	8	0.03032	0.61	0.00648	0.27175
	群体内 Within populations	253	4.64910	94.10	0.05899	0.03421
III: [JL, SB, JLi, PL], [TZ, DT, HH, GY, MW, BZ]	组间 Among groups	1	0.12477	2.57	0.02569	0.03617
	群体间/组内 Among populations/ Within groups	8	0.08248	1.70	0.01743	0.15445
	群体内 Within populations	253	4.64910	95.73	0.04268	0.03030
IV: [JL, SB, JLi, PL], [GY, MW, BZ], [TZ, DT, HH]	组间 Among groups	2	0.05247	1.09	0.01091	0.13587
	群体间/组内 Among populations/ Within groups	7	0.10777	2.24	0.02265	0.11730
	群体内 Within populations	253	4.64910	96.67	0.03332	0.01760

所有家牦牛品种(类群)作为 1 组(分组 I)进行分析时,品种(类群)间方差组分、 Φ_{ST} 分别为 0.14810 和 0.03087,并达到显著水平($0.01 < P < 0.05$),表明家牦牛品种(类群)间存在显著的遗传差异。然而,进一步的分析表明品种(类群)间遗传分化仅发生于斯布牦牛与天祝、环湖、大通、高原、帕里、巴州牦牛及巴州牦牛与大通、九龙、嘉黎牦牛之间,而其余品种两两间遗传分化不显著。

多分组情况下,AMOVA 显示分组 II、分组 III 与分组 IV 的组间变异组分分别为 0.26111、0.12477 和 0.05247,对应的 Φ_{CT} 则依次为 0.05285、0.02569 和 0.01091;同时,排列测验表明,除分组 IV 的组间遗传分化未达显著水平($P > 0.05$)外,分组 II、分组 III 的组间遗传分化分别达到极显著水平($P < 0.01$)和显著水平($0.01 < P < 0.05$);此外,尽管各分组的品种间/组内的遗传分化均未达显著水平($P > 0.05$),但分组 II 的 Φ_{SC} 值最小,仅为 0.00648;而且,分组 II 保留在组间的分子变异显著高于家牦牛品种间/组内的变异,二者比值高达 8.61,远大于分组 III 和分组 IV 的相应值。可见,分组 II 是最为合理的家牦牛品种分组方式,表明我国家牦牛存在显著的遗传结构。然而,无论采用何种分组方法,品种(类群)内遗传变异对遗传分化的贡献率均在 90% 以上,且达到显著水平($0.01 < P < 0.05$),表明牦牛品种(类群)内遗传变异对遗传结构影响显著。

3 讨论

3.1 牦牛 mtDNA D-loop 序列遗传多样性

家牦牛丰富的遗传多样性是我国乃至世界牦牛产业持续发展的基础。衡量群体 DNA 遗传多样性的重要指标有单倍型多样性(h)与核苷酸多样性(π_n),前者指群体中随机抽取的序列互不相同的概率,后者定义为某一群体内两个随机抽取的 DNA 序列间每个位点的核苷酸差异数。本研究得出我国家牦牛单倍型多样性、核苷酸多样性分别为 0.9251 ± 0.0095 、 0.015265 ± 0.007757 ,与赖松家等以我国 4 个家牦牛品种(类群)和 4 头犏牛共 35 个样本为研究对象得出的结论相符^[9],也与水牛^[16]、黄牛^[17]等牛属动物的遗传多样性信息接

近,表明我国家牦牛存在丰富的 mtDNA 遗传多样性。

从省(区)来看,青海家牦牛单倍型多样性最高,高达 0.9272,但其核苷酸多样性处于较低水平较低,仅为 1.4056。这一结果与青海地区作为家牦牛驯化中心^{[18]①}的地位相符。家养动物在驯化后均会经历一个群体扩张过程^[19, 20]。种群增长能提高其对新突变的保持力^[21, 22]并产生新的单倍型,而对于提高核苷酸多样性而言,时间尚短^[23, 24]。

遗传多样性对种群维持繁衍、抵抗疾病和适应生境变化具有重要意义。在 10 个品种(类群)中,斯布牦牛的遗传多样性尤其是核苷酸多样性较其它品种(类群)更为丰富。斯布牦牛主要分布于西藏日喀则地区,由于该地区地处复杂气候带,能提供多样的生态环境,遗传多样性因而处于较高水平。斯布牦牛是被列入我国濒危等级的家畜品种^[1],其 mtDNA 丰富的遗传变异性表明科学保护这一优良品种具有良好的前景。此外,本研究还对新疆哈密地区伊吾县家牦牛的遗传多样性进行了分析,在 10 头家牦牛中仅发现 2 种单倍型,单倍型多样性为 0.5333 ± 0.0947 ,远低于家牦牛单倍型多样性的平均值 0.9249 ± 0.0095 ,遗传多样性水平与该类种群规模较小和长期生境隔离造成的基因流受阻相符。因此,采取诸如人为的种群间个体交换等措施以提高该种群的遗传多样性显得尤为迫切。

3.2 家牦牛聚类关系

家畜品种(类群)的聚类分析对其遗传资源的合理利用具有重要意义。近 40a 来,相关学者先后对家牦牛品种(类群)间的聚类关系进行过研究,但由于各自所采用的遗传标记和研究对象(品种)不同等原因,研究结果往往存在差异。本研究中,对全国 10 个家牦牛品种(类群)进行了聚类分析,发现 10 个品种(类群)聚为两大类,即斯布牦牛单独构成一类,其余 9 个品种(类群)组成另一个聚类群,这与以往研究存在较大出入。鉴于已有聚类关系研究均未涉及到斯布牦牛,且本研究中斯布牦牛独立形成一支,遗传背景较为特殊,有必要对除斯布牦牛之外的其余 9 个家牦牛品种(类群)的聚类关系进行再分析,以进一步明确各品种之间的聚类关系。聚类分析显示:在斯布牦牛未加入分析的情况下,聚类关系仍将 9 个品种(类群)聚为两支——麦洼牦牛与大通牦牛聚为一类,其余 7 个品种(类群)聚为一类(图 3B),与王玲^②、钟金城^[6]依据 Tf 和 Hb 基因频率构建的聚类格局基本一致,而与钟金城^[8]依据微卫星多态得出的聚类关系差异较大。以上表明,除斯布牦牛在外的 9 个品种在斯布牦牛加入、未加入分析的情况下,其聚类格局发生了明显变化,暗示尽可能地涵括更多品种是构建准确的家牦牛聚类关系的重要前提。

以 Kimura 双参数距离对各家牦牛品种(类群)进行聚类分析未能显示出同一地理区域的种群聚为一类的趋势,如斯布牦牛与西藏其它 3 个家牦牛品种(类群)分别位于不同的两个聚类簇,表明线粒体 D-loop 序列的差异与品种(类群)的地理分布无明显相关。这可能与家牦牛的单一起源^[18]有关,但更有可能是品种(类群)间基因交流的结果。基因流分析也证实了这一点——基于固定指数(F_{st})计算的基因流(Nm)显示大多数品种(类群)间存在较大的基因交流。

3.3 家牦牛遗传结构与分类

家牦牛品种的分类一直是牦牛科学研究的重点和热点问题。本研究应用 Arlequin 程序 AMOVA 模块,首次根据遗传背景差异对我国 10 个家牦牛品种(类群)的遗传结构与分类进行研究。

Φ_{st} 相当于分化指数,Wright 认为分化指数介于 0 ~ 0.05 之间说明分化很弱,0.05 ~ 0.15 之间为中等分化,0.15 ~ 0.25 之间表明分化大,大于 0.25 则分化极大^[25];而且,若组间变量 Φ_{CT} 统计上是显著的,则被认为是该物种最大可能性的种群分化形式^[26]。本研究检测到分组 II 的组间存在中度遗传分化并达到极显著水平($\Phi_{CT} = 0.05285, P < 0.01$),而品种间/组内分化不显著($\Phi_{SC} = 0.00648, P > 0.05$),保留在家牦牛组间的分子

① Qi X B. Geneti diversity, differentiation and relationship of domestic yak populations-a micorsatellite and mitochondrial DNA study. Ph. D. dissertation. Lanzhou: Lanzhou University.

② 王玲. 中国牦牛线粒体 DNA 多态性及遗传分化研究. 硕士学位论文. 雅安: 四川农业大学, 2004.

变异远高于品种间/组内的变异,以上表明分组 II 存在显著的遗传结构,支持将我国 10 个家牦牛品种(类群)划为两大类型,即一类由嘉黎、斯布、九龙牦牛组成一类而另一类包括天祝、大通、环湖、高原、麦洼、帕里和巴州牦牛。根据产区的生态环境条件和牦牛的特征特性,蔡立将我国 8 个地方品种或类群的家牦牛分为横断高山型和青藏高原型两种生态类型^[5]。其中,横断高山型包括九龙牦牛、西藏高山牦牛、中甸牦牛等,青藏高原型包括麦洼牦牛、青海高原牦牛、天祝牦牛、巴州牦牛、西藏高原牦牛等。依据分布地生态、地理条件及血液蛋白多态研究结果,斯布牦牛与嘉黎牦牛均属于西藏高山型^[27, 28]。可见,在两大类型的品种(类群)组成上,获得了与蔡立一致的研究结果(未对中甸牦牛进行研究),表明 DNA 变异支持将我国 10 个家牦牛品种(类群)划分为两种类型——横断高山型和青藏高原型,首次为家牦牛类型的合理划分提供了源自分子遗传学的证据。

基因流和突变是导致遗传分化产生的主要因素。由于分组 II 的品种间/组内遗传分化不显著,且分组 I 大多数品种间存在较大的基因流,故基本上可以排除基因流受阻这一因素,这也表明突变是造成横断高山型与青藏高原型家牦牛间产生遗传分化的主要原因。从所处环境来看,家牦牛生活在高海拔地区,受强紫外线辐射,易发生突变。而横断高山型牦牛与青藏高原型牦牛生境的异质性——横断高山型牦牛分布于高山峡谷地区,为寒冷半湿润型地区,草场以高山灌丛草场为主,局部地区为高山草甸草场,牧草以杂草类为主;而青藏高原型牦牛分布于高原地带,系寒冷半干旱型地区,草场以高山、亚高山草甸草场为主,牧草以禾本科和莎草科草类为主,使突变朝不同方向积累,并最终导致彼此显著遗传分化的产生^[29]。鉴于横断高山型与青藏高原型家牦牛之间显著的遗传分化及其生境的异质性,在以后的家牦牛遗传资源保护和利用中,宜将这两个类型视作不同的基因库。

References:

- [1] Committee of domestic Animal and Poultry Genetic Resources in China. Domestic Animal and Poultry Genetic Resource in China. Beijing: China Agriculture Press, 2004. 18.
- [2] Schaller G B. Wildlife of the Tibetan Steppe. Chicago: University of Chicago Press, 1996.
- [3] Weiner G, Han J L, Long R J. The Yak, 2nd edition. The Regional Office for Asia and the Pacific, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Bangkok, Thailand. 2003.
- [4] Li K L, Lu Z L eds. The selected paper of yak scientific research. Lanzhou: Gansu Nationalities Press, 1990. 27—30.
- [5] Cai L; Chinese Yakology. Beijing: Chinese Agriculture Press, 1992. 45—47.
- [6] Zhong J C, Chen Z H, Zi X D, *et al.* Cluster analysis of yak breeds. Journal of Southwest Nationalities College (Nature Science Edition), 2001, 27(1):92—94.
- [7] Tu Z C, Zhang Y P, Qiu H. Mitochondrial DNA polymorphism and genetic diversity in Chinese yaks. Acta Genetica Sinica, 1998, 25(3):205—212.
- [8] Zhong J C, Zhao S J, Chen Z H, *et al.* Study on genetic diversity and classification of the yak. Scientia Agricultura Sinica, 2006, 39(2):389—397.
- [9] Lai S J, Wang L, Liu Y P, *et al.* Study on mitochondrial DNA Genetic polymorphism of some yak breeds in China. Acta Genetica Sinica, 2005, 32(5):463—470.
- [10] Zhong J C, Chen Z H, Zhao S J, *et al.* Classification of ecological types of the Chinese yak. Acta Ecologica Sinica, 2006, 26(7):2068—2072.
- [11] Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Beijing: Science Press, 2002. 463—470.
- [12] Thompson J D, Gibson T J, Plewinak F, *et al.* The Clustal-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24):4876—4882.
- [13] Rozas J, Sanchez-DelBarrio J C, Messeguer X, *et al.* Dna SP, DNA polymorphism analyses by coalescent and other methods. Bioinformatics, 2003, 19(18):2496—2497.
- [14] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics, 2004, 5(2):150—163.
- [15] Excoffier, Laval L G, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online, 2005, 1:47—50.

- [16] Kierstein G, Vallinoto M, Silva A, *et al.* Analysis of mitochondrial D-loop region casts new light on domestic water buffalo (*Bubalus bubalis*) phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2004, 30(2): 308–324.
- [17] Lai S J, Liu Y P, Liu Y X, *et al.* Genetic diversity and origin of Chinese cattle revealed by mtDNA D-loop sequence variation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2006, 38(1): 146–154.
- [18] Guo S C, Savolainen P, Su J P, *et al.* Origin of mitochondrial DNA diversity of domestic yaks. *BMC Evolutionary Biology*, 2006. <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2148-6-73.pdf>
- [19] Luikart G, Gielly L, Excoffier L, Vigne J, Bouvet J, Taberlet P. Multiple maternal origins and weak phylogeographic structure in domestic goats. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2001, 98(10): 5927–5932.
- [20] Savolainen P, Zhang Y P, Luo J, *et al.* Genetic evidence for an east Asian origin of domestic dogs. *Science*, 2002, 298: 1610–1613.
- [21] Avise J C, Neigel J E, Arnold J. Demographic influences on mitochondrial lineage survivorship in animal population. *Journal of Molecular Evolution*, 1984, 20(2): 99–105.
- [22] Rogers A R. Genetic evidence for a Pleistocene population explosion. *Evolution*, 1995, 49(4): 608–615.
- [23] Avise J C. *Phylogeography: the history and formation of species*. Cambridge MA: Harvard University Press, 2000.
- [24] Nei M, Maruyama T, Chakraborty R. The bottleneck effect and genetic variability. *Evolution*, 1975, 29: 1–10.
- [25] Wright S. *Evolution and the Genetics of Populations vol. 4: Variability Within and Among Natural Populations*. Chicago: University of Chicago Press.
- [26] Paulo O S, Jordan W C, Bruford M W, *et al.* Using nested clade analysis to assess the history of colonization and the persistence of populations of an Iberian Lizard. *Molecular Ecology*, 2002, 11(4): 809–819.
- [27] Chinese Yakology Committee. *Chinese yakology*. Chendu: Sichuan Scientific & Technological Press, 1989. 36–83.
- [28] Chen Z H, Zhong J C, Hu O M, *et al.* A Study on Genetic Polymorphism in Tibetan Yak and Yellow Cattle. *Journal of Southwest Nationalities College (Nature Science Edition)*, 1999, 25(3): 274–277.
- [29] Committee of Bovine Breeds of China. *Bovine Breeds of China*. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Press, 1986. 30–60.

参考文献:

- [1] 中国畜禽遗传资源状况编委会. 中国畜禽遗传资源状况. 北京: 中国农业出版社, 2004. 18.
- [4] 李孔亮, 陆仲璘主编. 牦牛科学研究论文集. 兰州: 甘肃民族出版社, 1990. 27–30.
- [5] 蔡立. 中国牦牛. 北京: 中国农业出版社, 1992. 45–47.
- [6] 钟金城, 陈智华, 字向东, 等. 牦牛品种的聚类分析. *西南民族学院学报(自然科学版)*, 2001, 27(1): 92–94.
- [7] 涂正超, 张亚平, 邱怀. 中国牦牛线粒体 DNA 多态性及遗传分化. *遗传学报*, 1998, 25(3): 205–212.
- [8] 钟金城, 赵素君, 陈智华, 等. 牦牛品种的遗传多样性及分类研究. *中国农业科学*, 2006, 39(2): 389–397.
- [9] 赖松家, 王玲, 刘益平, 等. 中国部分牦牛品种线粒体 DNA 遗传多样性研究. *遗传学报*, 2005, 32(5): 463–470.
- [10] 钟金城, 陈智华, 赵素君, 等. 牦牛生态类型的分类. *生态学报*, 2006, 26(7): 2068–2072.
- [11] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. *分子克隆实验指南*. 北京: 科学出版社, 2002. 463–470.
- [27] 《中国牦牛学》编写委员会. *中国牦牛学*. 成都: 四川科学技术出版社, 1989. 36–83.
- [28] 陈智华, 钟金城, 胡欧明, 等. 西藏牦牛和黄牛遗传多态性研究. *西南民族学院学报(自然科学版)*, 1999, 25(3): 274–277.
- [29] 《中国牛品种志》编写组. *中国牛品种志*. 上海: 上海科学技术出版社, 1986. 30–60.