

青海省同德牦牛的母系遗传多样性及群体遗传结构分析

李广祯¹, 马志杰^{1*}, 赵学军², 陈生梅¹, 刘书杰¹, 林元², 李文浩¹

(1. 青海大学畜牧兽医科学院, 青海省高原家畜遗传资源保护与创新利用重点实验室, 青海西宁 810016;

2. 青海省同德县农牧和水利局, 青海同德 813200)

摘要: [目的] 从分子水平上揭示青海省同德牦牛的母系遗传多样性、群体遗传结构和遗传背景。[方法] 本研究采用 PCR 方法和扩增产物双向测序技术, 对 60 头 (32 ♂, 28 ♀) 同德牦牛 mtDNA D-loop 区序列进行了测定。经人工核实校对序列后, 使用 BioEdit、DnaSP、Arlequin 和 Network 等生物信息学软件综合分析其母系遗传多样性、群体遗传结构及系统发育关系。[结果] 同德牦牛 mtDNA D-loop 区序列长度在 890-894 bp 之间, 排除 12 处插入/缺失后共检测到 59 处多态位点, 其中单一多态位点有 17 处, 简约信息位点 42 处; 根据序列间核苷酸变异共确定了 31 种单倍型, 其中 H8 为优势单倍型, 单倍型多样度为 0.935 ± 0.023 , 核苷酸多样度为 0.012 ± 0.006 。与青海其他牦牛品种 (群体) (如高原、环湖、大通牦牛等) 相比, 同德牦牛单倍型多样度较高, 表明其具有较为丰富的母系遗传多样性。使用 MJ 法 (Median-Joining) 构建的网络关系图显示: 同德牦牛 31 种单倍型分布在 A、B、C、D 和 E 5 种单倍型组中, 且其可分为 2 大母系支系, 表明同德牦牛拥有 2 个母系起源。[结论] 同德牦牛群体具有较丰富的母系遗传多样性, 由分布于 2 个母系遗传分支的 5 个单倍型组 (即 A、B、C、D 和 E) 个体组成, 具有 2 个母系起源。

关键词: 牦牛; mtDNA; D-loop 区; 遗传多样性; 群体结构

中图分类号: S823.85

文献标识码: A

文章编号: 1001-9111(2021)03-0017-05

牦牛是生活在以青藏高原为中心及其毗邻高山、亚高山高寒地区的特有珍稀牛种, 其能在气候寒冷、空气稀薄和牧草生长期短的高寒生态环境中自如地生长繁殖, 并为牧民提供肉、奶、皮等生活生产必需品^[1]。同德县隶属于青海省海南藏族自治州, 地处海南、黄南和果洛 3 个青海藏族自治州的交接处, 是一个以牧为主, 农牧结合的少数民族地区, 位于三江源自然保护区青海省东南部九曲黄河第二曲, 气候为典型的高原大陆性气候, 县内平均海拔 3 660 m。畜牧业是该县的主要产业之一, 全县拥有天然草场面积约 4,489,000 hm², 可利用草场面积约 4,308,100 hm²。牦牛和藏绵羊是同德县的优势种畜和宝贵动物遗传资源, 当前, 其牦牛存栏量达 15.6 万头, 藏绵羊 68 万只^[2]。线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) D-loop 区具有母系遗传、结构简单

和进化速度快等特点, 已被广泛应用于猪、羊、牛等家畜的母系遗传多样性、群体遗传结构和进化历史等研究^[3-7]。先前基于 D-loop 序列已对我国多个省 (区) 牦牛品种 (群体) 的遗传多样性、分化和分类等问题进行了研究^[8]。在青海牦牛的母系遗传研究中, 郭松长等^[9]对包括青海省环湖、高原和大通牦牛在内的 10 个我国牦牛品种 (群体) 的 D-loop 区作了测序分析, 表明我国牦牛拥有丰富的遗传多样性, 青海牦牛单倍型多样度最高, 其中环湖、高原和大通牦牛的单倍型多样度分别为 0.985 ± 0.040 、 0.909 ± 0.019 和 0.942 ± 0.030 , 推测青海省可能为家牦牛的驯化中心。Wang 等^[10]对包括 180 头青海牦牛在内的共计 405 头我国牦牛与 47 头野牦牛 D-loop 区进行综合分析, 其中在青海牦牛中共检测到 55 种单倍型, 包括特有单倍型 33 种, 主要分布于

收稿日期: 2020-08-07 修回日期: 2020-08-15

资助项目: 中国科学院“西部之光”人才培养引进计划 (“西部青年学者”) 项目 (3-1); 国家自然科学基金项目 (31960656)。

作者简介: 李广祯 (1997—), 男, 青海民和人, 硕士研究生, 研究方向为动物遗传资源研究。

* 通讯作者: 马志杰 (1978—), 男, 甘肃张家川人, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向为动物遗传资源研究。

A、B、C、D 和 E 5 种单倍型组中,单倍型多样性为 0.892 ± 0.017 。王兴东等^[11]对 155 头青海高原牦牛 *Cytb* 基因和 D-loop 区全序列进行分析,表明高原牦牛单倍型多样度和核苷酸多样性分别为 0.881 和 0.012,研究支持家牦牛和野牦牛划为牛亚科牦牛属的观点。侯孟典等^[12]通过 64 头玉树牦牛与 4 个西藏牦牛品种(群体)(即类乌齐、申扎、帕里和斯布牦牛)D-loop 区遗传多样性比较分析,表明玉树牦牛单倍型多样性最低(0.885 ± 0.034),而申扎牦牛单倍型多样性最高(0.956);玉树牦牛与类乌齐牦牛、帕里牦牛的遗传距离最近,与斯布牦牛和申扎牦牛的遗传距离相对较远,5 个牦牛类群聚类可分为 2 个分支。Yue 等^[13]对大通、环湖和高原牦牛以及其他 10 个家、野牦牛品种(群体)共 742 条 D-loop 序列进行综合分析,表明在家牦牛中大通牦牛单倍型多样性最高(0.945 ± 0.025),高原牦牛单倍型多样性较高(0.914 ± 0.015),而环湖牦牛单倍型多样性最低(0.785 ± 0.048)。李瑞哲等^[14]基于 D-loop 区序列变异对 33 头雪多牦牛母系遗传多样性及遗传背景进行分析,表明雪多牦牛单倍型多样性为 0.900 ± 0.043 ,具有 2 个母系起源。李广祯等^[15]对 34 头曲麻莱牦牛 D-loop 区部分序列进行测定分析,表明其单倍型多样性为 0.952 ± 0.021 ,由 2 个母系支系组成。综上所述,除对其他我国省(区)牦牛品种(群体)的母系遗传研究外^[8],当前研究者已对青海省内部分牦牛品种(群体)如环湖、玉树、曲麻莱、高原、雪多和大通牦牛品种(群体)进行了母系遗传多样性、群体结构组成及遗传背景等分析^[9,11-15]。然而,目前尚未见对青海省同德县牦牛群体的母系遗传多样性、群体遗传结构及系统发育分析的研究报道。鉴于此,本研究基于 mtDNA D-loop 区遗传变异对同德牦牛群体进行母系遗传多样性、群体遗传结构及系统发育探析,以便明确其遗传多样性水平、群体结构组成及遗传背景,为后续同德牦牛遗传资源的合理保护与开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集与基因组 DNA 提取

采用颈静脉采血法,在青海省同德县秀麻乡和河北乡共采集 60 头(32 ♂,28 ♀)牦牛颈静脉血样,使用血液基因组 DNA 提取试剂盒(艾德莱生物科技有限公司,北京)提取基因组 DNA,低温保存备用。

1.2 引物设计合成和 PCR 扩增

使用 Ma 等^[16]在野牦牛研究中运用的引物扩增同德牦牛 mtDNA D-loop 区序列,其上游引物

(PF)为 5'-CTACAGTCTCACCGTCAACC-3',下游引物(PR)为 5'-GGGGTGTAGATGCTTGC-3',引物由上海生工生物工程有限公司合成。

PCR 反应体系为:2 × Prime STAR Max Premix (上海宝生物公司) 12.5 μL,上、下游引物各 1 μL,基因组 DNA 为 1 μL,超纯水 9.5 μL,共计 25 μL。其中 PCR 反应程序为:95 °C 预变性 4 min;95 °C 变性 1 min,62 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 1 min,35 个循环;后 72 °C 延伸 10 min。后对 PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,后送至北京擎科生物有限公司进行测序。

1.3 数据处理与分析

将测序数据使用 Chromas 2.3 软件进行人工核对,确保数据的准确性,再用 BioEdit 7.2.5 软件进行多序列比对(ClustalW Multiple alignment)分析,后采用 DnaSP 5.10.01 软件确定同德牦牛的多态位点和单倍型数目,并使用 Arlequin 3.11 软件计算同德牦牛群体的单倍型多样性(Hd)和核苷酸多样性(Pi)大小,后用 Network 10.1 软件基于单倍型间的核苷酸变异绘制网络中介图(Median-Joining, MJ)以揭示单倍型(组)间的系统发育关系。

2 结果与分析

2.1 同德牦牛 mtDNA D-loop 区序列变异分析

通过测定 60 头同德牦牛的 D-loop 区序列,所测序列长度在 890-894 bp 之间,排除 12 处插入/缺失后共检测到 59 处多态位点,占所分析序列长度的 6.63%。在 59 处多态位点中,有 17 处为单一多态位点,即 123、164、230、255、311、650、709、758、777、797、808、814、816、818、851、868 和 872 位点,占总序列长度的 1.91%;其余 42 处为简约信息位点,分别为 109、116、134、141、173、188、194、221、248、249、250、256、257、267、276、285、293、296、309、310、314、315、317、326、329、334、356、391、392、398、501、539、694、697、720、731、798、800、810、813、884 和 885 位点,约占总序列长度的 4.72%(图 1)。

2.2 同德牦牛的母系遗传多样性分析

对 60 头同德牦牛 D-loop 区序列进行分析,共确定了 31 种单倍型,其中单倍型 H8 由 14 个个体共享,为优势单倍型,单倍型 H9 和 H10 均由 4 个个体共享,H3 和 H29 均由 3 个个体共享,单倍型 H5、H15、H17、H19、H22 和 H28 均由 2 个个体共享,其余的单倍型均由 1 个个体所拥有(图 1)。计算后群体单倍型多样性为 0.935 ± 0.023 ,核苷酸多样性为 0.012 ± 0.006 ,序列平均核苷酸差异 K 值为 7.48。

单倍型名称	变异核苷酸位点	N/Hg
	1111111112222222222222333333333333556667777777888888888888	
	0123467892344555678990111112235999035990235799001111156788	
	96341438410890567765369014576946128190479018778080346818245	
H1	AGACGCTGTGATTCCGGGACATCTACCATACCGGTCGCAATCGATAGTTGGCTTGATGC	1/A
H2	TC.....T.....	1/A
H3	TA.TA.ACA.CTTAA.G.GCTC...GC.TTAA.TA.G.TA.....A.....	3/D
H4	T.....T.....G.....	1/A
H5	T...T...T.....G.....	2/A
H6	T...T...T.....G.....A.A...C.G	1/A
H7	..G.....T.AA..GC.....T..C...G.....	1/B
H8	T.....G.....	14/A
H9	T.AA...C.....C...G.....	4/B
H10	T.A...C.....G.....G.....G.....	4/E
H11	...TA..AC...C.TAA.G.GCTCG..GC..TAA.TA.G.TA.....A.....	1/C
H12	C.T.....T.....G.....	1/A
H13	C..T.AA...C.....C...G.....G	1/B
H14	T.....G..A.....	1/A
H15	C.....T.....G.....	2/A
H16	T.A...C.....G.....G.....	1/E
H17	C.....T.....T.....G.....	2/A
H18	C.T.....A..G.....	1/A
H19	T.....T.....G.....	2/A
H20	CC.T.AA...C.....C..A.G.....G	1/B
H21	C.T.....G.....	1/A
H22	C.T.....G.....C.....	2/A
H23	GC..T.AA...C.....C...GC.....G	1/B
H24	T.....T...A...G.....	1/A
H25	T.....T.....G.....	1/A
H26	C.T.....A..G...A.A.A..A.....	1/A
H27	T.AA...C.....A.C...G.....	1/B
H28	T.....G.....C.....	2/A
H29	T.AA...C...T...C...G.....	3/B
H30	T.AA...C.....A.C...G...A...C...	1/B
H31	T.A...C.....G.....G...C.GA..A.G.A..A.G	1/E

注：“.”代表与 H1 单倍型序列中的核苷酸相同；N 代表分享同一种单倍型的个体数；Hg 代表单倍型组类型。

图 1 同德牦牛 mtDNA D-loop 区 31 种单倍型序列核苷酸变异

将同德牦牛的遗传多样性指数值大小与已报道的 6 个其他青海省牦牛品种(群体)相应数值进行比较分析(表 1),结果表明:在青海省牦牛品种(群体)中,曲麻莱牦牛群体的单倍型多样性值(0.952)

最高,环湖牦牛品种的单倍型多样性(0.785)值最低。相比而言,同德牦牛群体单倍型多样性值(0.935)也较高,表明其具有丰富的母系遗传多样性。

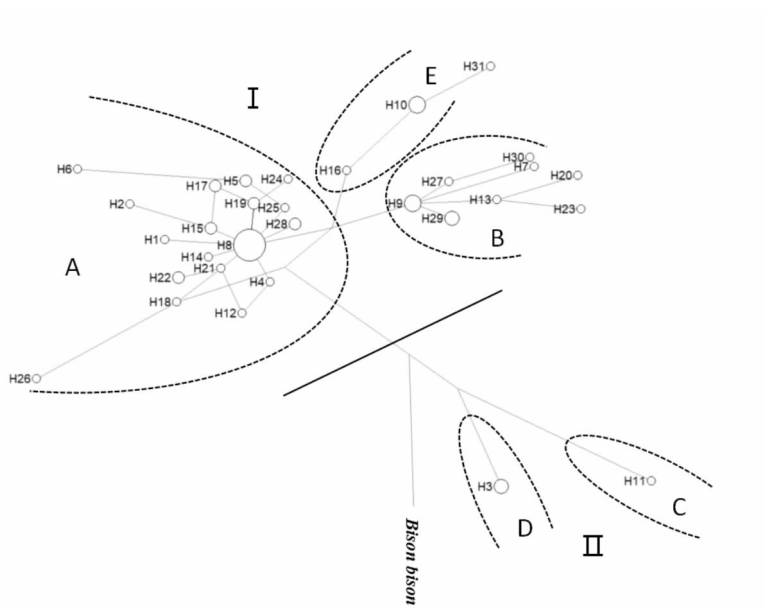
表 1 同德牦牛与 6 个青海省其他牦牛品种(群体)母系遗传多样性指数值大小比较

品种/群体	样本/序列数	单倍型多样性	核苷酸多样性	研究者
环湖牦牛	60	0.785	0.013	Yue 等 ^[13]
大通牦牛	31-34	0.942-0.945	0.014-0.016	郭松长等 ^[9] 、Yue 等 ^[13]
高原牦牛	82-155	0.881-0.914	0.012-0.014	郭松长等 ^[9] 、Yue 等 ^[13] 、王兴东等 ^[11]
玉树牦牛	64	0.885	0.013	侯孟典等 ^[12]
雪多牦牛	33	0.900	0.012	李瑞哲等 ^[14]
曲麻莱牦牛	34	0.952	0.018	李广祯等 ^[15]
同德牦牛	60	0.935	0.012	本研究

2.3 同德牦牛的系统发育分析

从 GenBank 中下载美洲野牛 (*Bison bison*) (GenBank No: EU177871) 的 D-loop 序列作为外群, 与同德牦牛 31 种 D-loop 序列单倍型构建网络关系图(图 2), 结果显示: 31 种单倍型聚为 2 个支系, 其中 H3 和 H11 单倍型为 1 支(即支系 II), 占总

单倍型数的 7% (2/31); 剩余的 29 种单倍型聚为另 1 支(即支系 I), 占总单倍型数的 93% (29/31)。同德牦牛 31 种单倍型隶属于 A、B、C、D 和 E 5 种单倍型组, 所占比例分别为 58% (18/31)、26% (8/31)、3% (1/31)、3% (1/31) 和 10% (3/31)。



注: 圆圈大小与拥有各单倍型的个体数目大小成正比。

图 2 同德牦牛 31 种单倍型构建的 MJ 网络关系图

3 讨论

遗传多样性是生态系统多样性和物种多样性的基础和核心, 物种或居群的遗传多样性大小是长期进化的产物, 是其生存适应和发展进化的前提。家畜遗传多样性是生物多样性的重要组成部分, 与人类未来的生存与发展密切相关。家畜群体遗传变异的高低与遗传结构的差异是其遗传多样性的重要体现。先前对我国野牦牛母系遗传多样性的研究得出, 野牦牛拥有 2~3 个母系遗传分支, 且拥有丰富的遗传多样性, 其单倍型多样性在 0.920~1.000 之间^[10,13,16-17]。而我国家牦牛母系遗传多样性、分化与系统发育的分析表明: 家牦牛品种(群体)间存在较为显著的遗传分化, 无明显的谱系地理结构, 遗传多样性丰富, 其单倍型多样性在 0.785~0.983 之间, 由 2 个母系遗传分支组成^[8-15,17-18]。在青海省牦牛品种(群体)的母系遗传多样性研究中, 已报道的高原、环湖、大通、玉树、雪多和曲麻莱牦牛品种(群体)的单倍型多样性在 0.785~0.952 之间, 核苷酸多样性在 0.020~0.016 之间^[9,11-15]。而在本研究中, 同德牦牛群体的单倍型多样性为 0.935 ± 0.023 , 核苷酸多样性为 0.012 ± 0.006 , 其值与青海省其他 6 个牦牛品种(群体)母系遗传多样性指数值大小相比较, 表明同德牦牛群体拥有较高的母

系遗传变异, 具有丰富的母系遗传多样性。

在对同德牦牛的系统发育分析中, 31 种单倍型可以分为 2 个大的支系, 说明同德牦牛具有 2 个母系起源, 这与先前对家牦牛其他品种(群体)的母系遗传背景的研究结果一致^[8-15,16-18]。在单倍型组网络关系分析中, 同德牦牛单倍型分布在 A、B、C、D 和 E 单倍型组中, 可以看出 A 单倍型组在同德牦牛中占主导地位, 所占比例为 58%, 而 C 与 D 单倍型组所占比例较少, 仅为 6%, 这与 Yue 等^[13]和 Guo 等^[17]对其他家牦牛品种(群体)的研究结果一致, 说明同德牦牛具有与其他家牦牛品种(群体)相似的母系群体遗传结构组成。

4 结论

同德牦牛单倍型多样性为 0.935 ± 0.023 , 核苷酸多样性为 0.012 ± 0.006 , 具有丰富的母系遗传多样性, 其中 H8 为优势单倍型, 31 种单倍型分布在 A、B、C、D 和 E 5 种单倍型组中, 拥有 2 个母系支系, 具有 2 个母系起源。

参考文献:

- [1] WIENERG, HAN JL, LONG RJ. The Yak[M]. 2nd Bangkok: Regional Office for Asia and the Pacific of the Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2003:1-6.
- [2] 郭连云. 青海同德近 50 年气候与草地畜牧业生产的关系[J].

- 草业科学, 2003(1): 77-81.
- [3] ADEOLA A C, OLUWOLE O O, OLADELE B M, et al. Analysis of the genetic variation in mitochondrial DNA, Y-chromosome sequences, and MC1R sheds light on the ancestry of Nigerian indigenous pigs[J]. *Genetics Selection Evolution*, 2017, 49(1): 52.
- [4] TATIANA D, NEKRUZ B, ARSEN D, et al. Maternal Origins and Haplotype Diversity of Seven Russian Goat Populations Based on the D-loop Sequence Variability[J]. *Animals (Basel)*, 2020, 10(9): 1603.
- [5] UPHOLT W B, DAWID I B. Mapping of mitochondrial DNA of individual sheep and goats; rapid evolution in the D loop region [J]. *Cell*, 1977, 11(3): 571-583.
- [6] JIA SHAN-GANG, CHEN HONG, ZHANG GUI-XIANG, et al. Genetic variation of mitochondrial D-loop region and evolution analysis in some Chinese cattle breeds[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2007, 34(6): 510-518.
- [7] TSERANG D M, WEN Yong-li, FU Chang-xiu, et al. Maternal phylogeny of a newly-found yak population in china[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, 13(9): 11455-11470.
- [8] 马志杰. 牦牛线粒体基因组研究进展[J]. *中国农业大学学报*, 2014, 19(3): 154 - 161.
- [9] 郭松长, 祁得林, 陈桂华, 等. 家牦牛线粒体 DNA (mtDNA) 遗传多样性及其分类[J]. *生态学报*, 2008, 28(9): 4286 - 4294.
- [10] WANG ZHAO-FENG, SHEN XIN, LIU BIN, et al. Phylogeographical analyses of domestic and wild yaks based on mitochondrial DNA; newdata and reappraisal [J]. *Journal of Biogeography*, 2010, 37(12): 2332 - 2344.
- [11] 王兴东, 郭宪, 吴晓云, 等. 青海高原牦牛 mtDNA Cytb 基因和 D-Loop 区遗传多样性及系统进化分析[J/OL]. *基因组学与应用生物学*: 1-11 [2020-11-03]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1369.Q.20200928.1108.002.html>.
- [12] 侯孟典, 宋仁德, 王会, 等. 玉树牦牛与四个牦牛群体线粒体 DNA D-Loop 区遗传多样性分析[J]. *家畜生态学报*, 2020, 41(03): 21-26.
- [13] YUE XIANG-PENG, LIANG YU-SHENG, LIANG YU-LIN, et al. Comprehensive investigation of nucleotide diversity in yaks [J]. *Animal Genetics*, 2016, 47(6): 752-755.
- [14] 李瑞哲, 马志杰, 陈生梅, 等. 基于 mtDNA D-loop 序列分析探究青海雪多牦牛的遗传多样性及母系遗传背景[J]. *青海畜牧兽医杂志*, 2018, 48(2): 1 - 3.
- [15] 李广祯, 马志杰, 陈生梅, 等. 青海省曲麻莱牦牛的母亲系遗传多样性及遗传背景探究[J]. *青海大学学报*, 2020, 38(1): 27-31.
- [16] MA ZHI-JIE, ZHONG JIN-CHENG, HAN JIAN-LIN, et al. Genetic diversity and demographic history of wild yak (*Bos grunniens mutus*) inferred from mtDNA D-loop sequences. *African Journal of Biotechnology*, 2010, 9(46): 7805 - 7810.
- [17] GUO SONG-CHANG, PETER S, SU JIAN-PING, et al. Origin of mitochondrial DNA diversity of domestic yaks[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2006(6): 73.
- [18] LAI SONG-JIA, CHEN SI-YI, LIU YI-PING, et al. Mitochondrial DNA sequence diversity and origin of Chinese domestic yak [J]. *Animal Genetics*, 2007, 38(1): 77-80.

Maternal Genetic Diversity and Population Genetic Structure of Tongde Yak in Qinghai Province

LI Guang-zhen¹, MA Zhi-jie^{1*}, ZHAO Xue-jun², CHEN Sheng-mei¹,
LIU Shu-jie¹, LIN Yuan², LI Wen-hao¹

(1. Key Laboratory of Plateau Livestock Genetic Resources Protection and Innovative Utilization, Academy of Animal Science and Veterinary Medicine of Qinghai University, Xining, Qinghai 810016; 2. Agriculture, animal husbandry and Water Conservancy Bureau of Tongde County in Qinghai Province, Tongde, Qinghai 813200)

Abstract: [Objective] To reveal the maternal genetic diversity, population genetic structure and genetic background of Tongde yak population in Qinghai Province at molecular level, the mtDNA D-loop regions of 60 (32 ♂, 28 ♀) Tongde yaks were sequenced and checked manually. [Method] The genetic diversity, population genetic structure and phylogenetic relationship of Tongde yaks were analyzed by BioEdit, DnaSP, Arlequin and Network software. [Results] The length of mtDNA D-loop region of Tongde yaks was 890–894 bp. After excluding 12 In-Del sites, 59 polymorphic sites were detected, including 17 single polymorphic sites and 42 parsimony information sites. 31 haplotypes were identified according to the nucleotide variations among sequences, in which H8 was the dominant haplotype. The haplotype diversity was 0.935 ± 0.023 and the nucleotide diversity was 0.012 ± 0.006 . Compared with other yak breeds (populations) (e. g. Plateau, Huanhu and Datong yak breeds etc.) in Qinghai Province, the haplotype diversity of Tongde yak population was relatively higher, indicating that it had rich maternal genetic diversity. The network diagram constructed by MJ method showed that 31 haplotypes of Tongde yaks were distributed in A, B, C, D and E haplogroups. These haplotypes/haplogroups could be divided into two lineages, which indicated that Tongde yaks had two maternal origins. [Conclusion] Tongde yak population owned rich maternal genetic diversity, which is composed of five haplogroup (A, B, C, D and E) individuals distributed in two genetic lineages with two maternal origins.

Key words: Yak; mtDNA; D-loop region; genetic diversity; population structure