

中国南方部分黄牛品种 mtDNA D-loop 区的遗传变异与分类分析

周 艳¹, 陈 宏^{1,2}, 贾善刚¹, 雷初朝¹

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100;

2 徐州师范大学 细胞与分子生物学研究所, 江苏 徐州 221116)

【摘要】【目的】检测中国黄牛品种的遗传多样性和遗传亲缘关系。【方法】扩增、测序并分析了8个南方黄牛品种(川南牛、务川牛、温岭牛、隆林牛、湘西牛、郧巴牛、昭通牛、锦江牛)共计40个个体的线粒体D-loop区(mtDNA D-loop)全序列。【结果】共检测到56个变异位点,17个单倍型,平均核苷酸差异(K)为20.364,核苷酸多样性(π)为2.25%,单倍型多样性(Hd)为 0.750 ± 0.074 ;4种碱基A、T、C、G的频率分别为33.2%,28.2%,25.1%和13.5%;56处多态位点中,转换49处(占多态位点87.5%),颠换4处(占7.14%),缺失/插入3处(占5.36%);在样本数量超过3的群体中,锦江牛和昭通牛分别显示出最贫乏和最丰富的遗传多样性;构建的NJ进化树表明,云南昭通牛与其他7个品种的亲缘关系最远。【结论】普通牛较瘤牛具有丰富的遗传多样性,支持普通牛的多地区起源说;云南昭通牛含有不同于印度瘤牛的瘤牛血统,从分子水平上支持云南是潜在的瘤牛起源驯化中心。

【关键词】 黄牛;线粒体D-loop区;遗传多样性

【中图分类号】 S823.8⁺10.2

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2008)05-0007-05

The analysis of genetic variation of mtDNA D-loop region and phylogenesis on some southern Chinese cattle breeds

ZHOU Yan¹, CHEN Hong^{1,2}, JIA Shan-gang¹, LEI Chu-zhao¹

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Institute of Cellular and Molecular Biology, Xuzhou Normal University, Xuzhou, Jiangsu 221116, China)

Abstract: 【Objective】The study was to detect the genetic diversity and relationship of cattle in south China. 【Method】The complete mitochondrial control regions of 40 cattle in 8 breeds were sequenced and analyzed. 【Result】The results showed as follows: 56 variations and 17 haplotypes were detected, average number of nucleotide differences (K) was 20.364, nucleotide diversity (π) 2.25%, and haplotype diversity (Hd) 0.750 ± 0.074 . The frequencies for the A, T, C, G bases were 33.2%, 28.2%, 25.1% and 13.5% respectively. Among the 56 variations, there were 49 transitions, 4 transversions, and 3 insertion/deletion. Jinjiang cattle and Zhaotong cattle showed the most spare and abundant genetic diversity. The NJ tree constructed from the genetic distance displayed the most remote relationship for Zhaotong cattle. 【Conclusion】*B. taurus* had far more abundant genetic biodiversity than *B. indicus* which supported multi-regional origin. And Zhaotong cattle showed a different *B. indicus* type to India *B. indicus* type. This indicated a po-

* [收稿日期] 2007-05-31

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30471238);西北农林科技大学拔尖人才基金项目

[作者简介] 周 艳(1982—),女,陕西咸阳人,在读硕士,主要从事动物遗传研究。

[通讯作者] 陈 宏(1955—),男,陕西西安人,教授,博士生导师,主要从事生物技术与动物遗传育种研究。
E-mail: chen hong1212@263.net

tential origin region for *B. indicus* at molecular level.

Key words: Chinese native cattle;mitochondrial D-loop;genetic diversity

牛是重要的经济动物之一。中国黄牛作为世界牛品种资源宝库的重要组分,其资源十分丰富,有将近 50 个地方品种和 4 个培育品种^[1]。自 20 世纪 80 年代以来,我国大量引进欧美家牛品种,致使固有品种的优良基因库与基因组合体系被破坏。因此,研究我国黄牛的品种分类和遗传多样性,对我国黄牛品种资源保护具有重大意义^[2]。

在我国,对地方黄牛的多样性和起源,已进行了大量卓有成效的研究工作,包括蛋白多态性水平^[3]、染色体水平^[4-5]、线粒体分子水平^[6-7]等不同层面。普遍认为,中国黄牛主要含有欧洲起源的普通牛(*B. taurus*)和印度起源的瘤牛(*B. indicus*)这 2 个物种的血统。其中,北方黄牛受普通牛影响较大,南

方黄牛受瘤牛影响较大,中原黄牛则受到 2 种古牛的共同影响。但中国黄牛除了起源于普通牛和瘤牛 2 个主要血统外,是否还有其他来源,目前尚无定论^[2,6-7]。

本研究分析了 8 个中国南方地方黄牛品种的线粒体 DNA D-loop 区(mtDNA D-loop)全序列,以明确其遗传多样性与品种的亲缘关系,为今后黄牛的遗传育种和资源保护提供参考。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 黄牛血样 采集 8 个南方黄牛品种 40 个个体的血样(见表 1),4 ℃ 运输,—86 ℃ 保存。

表 1 中国南方 8 个黄牛品种的采样信息

Table 1 Information of sampling and sites for the eight breeds in south China

品种 Breed	采样地点 Site	采样数 No.	品种 Breed	采样地点 Site	采样数 No.
川南牛 CN	四川 咏叙 Yongxu,Sichuan	7	湘西牛 XX	湖南 慈力 Cili,Hunan	4
务川牛 WC	贵州 务川 Wuchuan,Guizhou	5	郧巴牛 YB	湖北 郧阳 Yiyang,Hubei	8
温岭牛 WL	浙江 温岭 Wenling,Zhejiang	1	昭通牛 ZT	云南 昭通 Zhaotong,Yunnan	7
隆林牛 LL	广西 隆林 Longlin,Guangxi	1	锦江牛 JJ	江西 高安 Gaoan,Jiangxi	7

1.1.2 主要试剂 蛋白酶 K 购自华美生物工程公司。*Taq* DNA 聚合酶购自大连宝生物工程公司(TaKaRa),琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒购自上海生物工程有限公司。

1.2 黄牛 DNA 的提取

按照 Chen 等^[8]的方法提取黄牛的总 DNA。

1.3 黄牛 mtDNA D-loop 区的 PCR 扩增

1.3.1 引物设计与合成 采用 Loftus 等^[9]公布的特异性引物扩增 D-loop 全序列片段,正链引物为:5'-CTGCAGTCTCACCATCAACC-3',反链引物为:5'-GGGGTGTAGATGCTTGC-3'。自行设计测序引物:5'-CTGCAGTCTCACCATCAACC-3',此引物在上海生共合成。

1.3.2 PCR 扩增 PCR 反应体系共 50 μL:灭菌水 26.5 μL,10 × PCR buffer 5 μL,2 mmol/L dNTPs 5 μL,10 μmol/L 引物 I、Ⅱ各 2 μL,25 mmol/L MgCl₂ 5 μL,5 U/μL *Taq* DNA Polymerase 0.5 μL,DNA 模板 4 μL。反应条件:95 ℃ 4 min;94 ℃ 30 s,60 ℃ 1 min,72 ℃ 90 s,35 个循环;72 ℃ 10 min,4 ℃ 保存。

1.4 黄牛 mtDNA D-loop 区的序列分析

使用凝胶回收试剂盒回收扩增产物中的 D-loop 片段。回收合格的样品送上海英骏公司 ABI 3730 DNA sequencer 测序。以 Anderson 等^[10]测定的普通牛 mtDNA D-loop 序列为标准,经 DNASTar 软件校对序列。使用 Mega3.1 计算序列的碱基组成、变异位点、kimura 双参数遗传距离并构建 NJ 系统进化树;用 DnaSP4.0 软件计算单倍型多样度和核苷酸多样性。

常用参数有多态位点数(*S*,指所取 DNA 样本中具有不同碱基序列的位点数目)、任意两序列之间核苷酸差异的平均数(*K*)、核苷酸多样性(π)和单倍型多样性(*Hd*),其中 *Hd*、 π 的计算根据 Nei^[11]的定义。

2 结果与分析

2.1 中国南方 8 个黄牛品种 mtDNA D-loop 区序列的多态性

分析结果显示,40 个序列在全长 910 bp 中共有多态位点 56 处,占全序列的 6.2%(56/910),其中简约信息位点有 45 处;4 种碱基 A、T、C、G 的出现

频率分别为 33.2%，28.2%，25.1%和 13.5%；平均核苷酸差异 K 为 20.364，核苷酸多样性 π 为 2.25%；在 56 处多态位点中，转换 49 处（占 87.5%），颠换 4 处（占 7.14%），缺失/插入 3 处（占

5.36%），其中有一处是转换颠换共存。除了温岭牛个体中没有发现变异外，其余 7 个中国黄牛品种的 mtDNA D-loop 序列的碱基置换和碱基插入、缺失统计结果见表 2。

表 2 中国南方 7 个黄牛品种的 mtDNA D-loop 区平均核苷酸变异

Table 2 The mtDNA D-loop base variation in seven southern Chinese cattle breeds

突变类型 Mutation type		川南牛 CN		务川牛 WC		隆林牛 LL		湘西牛 XX		郧巴牛 YB		昭通牛 ZT		锦江牛 JJ	
		数目 No.	频率/% P	数目 No.	频率/% P	数目 No.	频率/% P	数目 No.	频率/% P	数目 No.	频率/% P	数目 No.	频率/% P	数目 No.	频率/% P
转换	T↔C	25	53.2	26	56.5	0	0	0	0	27	50.9	24	47.1	1	100
Transition	A↔G	19	40.4	17	37.0	0	0	1	100	21	39.7	22	43.1	0	0
转换合计 Total transition		44	93.6	43	93.5	0	0	1	100	48	90.6	46	90.2	1	100
颠换	T↔G	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1.96	0	0
Transversion	A↔C	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3.77	1	1.96	0	0
	G↔C	1	2.13	1	2.17	0	0	0	0	1	1.89	1	1.96	0	0
颠换合计 Total transversion		1	2.13	1	2.17	0	0	0	0	3	5.66	3	5.88	0	0
插入/缺失	A	2	4.26	2	4.35	0	0	0	0	2	3.77	2	3.92	0	0
Insertion/deletion	G	0	0	0	0	1	100	0	0	0	0	0	0	0	0
插入/缺失合计 Total insertion/deletion		2	4.26	2	4.35	1	100	0	0	2	3.77	2	3.92	0	0
转换/颠换 Transi/ Transver		44.0		43.0		—		—		16.0		15.3		—	
置换/增减 Substitu/ in &. de		22.5		22.0		—		—		25.5		24.5		—	

2.2 中国南方 8 个黄牛品种 mtDNA D-loop 区的单倍型多态性和遗传亲缘关系

56 处多态位点在 40 个个体中定义了 17 种单

倍型，平均单倍型多样性 (Hd) 为 0.750 ± 0.074 。8 个品种的单倍型 (H) 分布以及 Hd 、 π 等遗传信息见表 3。

表 3 中国南方 8 个黄牛品种 mtDNA D-loop 区的遗传信息

Table 3 The genetic information of mtDNA D-loop in eight southern Chinese cattle breeds

品种 Breed	单倍型数 No. H		Hd	$\pi/\%$	品种 Breed	单倍型数 No. H		Hd	$\pi/\%$
	<i>B. indicus</i>	<i>B. taurus</i>				<i>B. indicus</i>	<i>B. taurus</i>		
川南牛 CN	1	4	0.857	2.72	湘西牛 XX	2	0	0.500	0.06
务川牛 WC	1	3	0.900	2.84	郧巴牛 YB	4	1	0.893	2.19
温岭牛 WL	1	0	—	—	昭通牛 ZT	2	4	0.952	2.50
隆林牛 LL	1	0	—	—	锦江牛 JJ	2	0	0.286	0.03

由表 3 可见，云南昭通牛的 Hd 最高，在个体数大于 3 的品种中，锦江牛的 Hd 最小。8 个黄牛品

种间的 Kimura 双参数遗传距离见表 4。

表 4 中国南方 8 个黄牛品种种群间和种群内的平均遗传距离

Table 4 The average genetic distance between group and within group of 8 southern Chinese cattle breeds

品种 Breed	川南 CN	锦江 JJ	务川 WC	湘西 XX	郧巴 YB	昭通 ZT	温岭 WL	隆林 LL
川南 CN	0.028 4							
锦江 JJ	0.026 5	0.000 3						
务川 WC	0.024 8	0.028 8	0.029 8					
湘西 XX	0.026 5	0.000 4	0.028 8	0.000 6				
郧巴 YB	0.026 6	0.013 3	0.027 9	0.013 4	0.023 0			
昭通 ZT	0.025 2	0.035 2	0.024 6	0.035 2	0.031 3	0.026 2		
温岭 WL	0.026 5	0.000 2	0.028 9	0.000 3	0.013 3	0.035 3		
隆林 LL	0.026 5	0.000 2	0.028 9	0.000 3	0.013 3	0.035 3	0.000 0	

表 4 表明，除去样本量不到 3 的品种（不能代表种群），品种间遗传距离介于 0.000 4~0.035 2。

选用欧洲野牛 (U34294) 作为外群，基于 Kimu-

ra-2-parameter 遗传距离，采用 Neighbor-joining 法建立了 8 个黄牛品种 mtDNA D-loop 区的品种聚类图（图 1）。

在图 1 中,湘西牛、锦江牛、温岭牛、隆林牛 4 个品种显示出最近的亲缘关系,昭通牛则有不同于其

他品种的归属地位。



图 1 中国南方 8 个黄牛品种以欧洲野牛为外群的亲缘关系 NJ 聚类树

Fig. 1 NJ tree for 8 southern Chinese cattle breeds with European bison as outgroup

3 讨 论

3.1 中国南方 8 个黄牛品种 mtDNA D-loop 区的核苷酸遗传变异

在 mtDNA 中,碱基置换的概率是碱基插入和缺失的 2~10 倍^[12]。本试验不同品种黄牛 D-loop 区碱基置换与缺失、插入的比值为 22.0~25.5,说明 mtDNA D-loop 区段有更高的置换概率。mtDNA 碱基置换以转换为主,转换远远大于颠换^[13]。本试验中,转换、颠换的概率比在不同品种内的变化范围约为 15~44 倍。雷初朝^[14]发现,转换与颠换的比率在 3.4~44.0,均普遍大于转换/颠换临界值 2.0^[15]。本研究转换以 T、C 互换为主,在 8 个品种中占到 47%~100%。

mtDNA 分子是由平均组成很不均一的片段构成的,G+C 含量在 21%~50%,其中无脊椎动物为 21%~43%,脊椎动物为 37%~50%^[13],本试验中为 38.6%,印证了 G 的相对缺乏。

3.2 中国南方 8 个黄牛品种 mtDNA D-loop 的遗传多样性

中国南方 8 个黄牛品种中,锦江牛、湘西牛品种内的遗传变异较小。除了锦江牛和湘西牛仅有瘤牛血统、而其他黄牛品种(除去样本数量小于 3 的隆林牛和温岭高峰牛)是瘤牛和普通牛的混杂后代这个差别外,可能“创立者效应”也是造成锦江牛和湘西牛 mtDNA 多样性贫乏的原因。郧巴牛和昭通牛显示出较高的品种内遗传变异。

本研究表明,40 个黄牛个体中,14 个普通牛个体具有 11 个单倍型,26 个瘤牛个体具有 6 个单倍型;Lai 等^[6]对中国黄牛 mtDNA D-loop 区的研究发

现,136 个普通牛共享 81 个单倍型,72 个瘤牛共享 15 个单倍型;Cai 等^[16]发现,普通牛有更高的核苷酸多样性和单倍型多样性,说明中国普通牛较中国瘤牛具有更为丰富的遗传变异和遗传多样性,这从一个侧面支持了普通牛的多地区起源说。

一个品种或族群持续演化的潜在可能性,完全取决于品种中现有的遗传多样性大小:具有较大遗传多样性的种群或者是物种,具有较大的演化潜能以适应未来环境的变迁。因此锦江牛和湘西牛这 2 个品种,容易因为单一的遗传多样性在物竞天择的自然选择下变为劣势种群。中国地方固有黄牛品种是基因库中宝贵的一部分,保种工作意义重大。

3.3 中国南方 8 个黄牛品种间的遗传亲缘关系

本研究表明,除去样本量不足 3 头的品种,品种间遗传距离在 0.000 4~0.035 2,与 Jia 等^[17]研究的中国 13 个黄牛品种间遗传距离范围在 0.000~0.049 相比稍小,这与选取品种的地理分布有关。中国畜牧界一致认为,中国黄牛主要起源于欧洲原牛的亚洲变种和印度瘤原牛。本试验的 8 个南方黄牛品种中,湘西牛、锦江牛、隆林牛、温岭牛所有个体均属于瘤牛,这 4 个品种首先聚在一起,郧巴牛具有最多的瘤牛单倍型(4 个)和最少的普通牛单倍型(1 个),因此整体受瘤牛影响偏大,与前 4 个纯瘤牛品种紧接着聚在一起;接着是川南牛、务川牛、昭通牛。据报道,云南黄牛的瘤牛血统不同于印度瘤牛,推测云南可能是另一支瘤牛的发源地^[18]。本试验中,云南昭通牛没有与以普通牛和印度瘤牛为主要血统的其他品种聚在一个等级,显示出独立于其他 7 个品种的地位,因此从分子水平上支持了云南黄牛有着特殊的起源地位,中国云南是一个潜在的瘤牛起源

中心。

[参考文献]

[1] 常 洪. 家畜遗传资源学纲要[M]. 北京：中国农业出版社, 1995:8-71.
Chang H. The synopsis of genetic resource in livestock[M]. Beijing:China Agriculture Publishers,1995:8-71. (in Chinese)

[2] 陈幼春,曹红鹤. 中国黄牛品种多样性及其保护[J]. 生物多样性,2001,9(3):275-283.
Chen Y C,Cao H H. Genetic divergence and conversation of Chinese cattle breeds [J]. Biodiversity Science,2001,9(3): 275-283. (in Chinese)

[3] Nie L,Yu Y,Zhang X Q,et al. Genetic diversity of cattle in SouthChina as revealed by blood protein electrophoresis[J]. Biochem Genet,1999,37:257-265.

[4] 陈 宏,邱 怀,詹铁生,等. 中国四个品种黄牛性染色体多态性的研究 [J]. 遗传,1993,15(4):14-17.
Chen H,Qiu H,Zhan T S,et al. Studies on polymorphism of sex chromosome of four local cattle (*Bos taurus*) breeds in China [J]. Hereditas,1993,15(4):14-17. (in Chinese)

[5] 于汝梁,辛彩云,陈 琳. 中国黄牛 Y 染色体多态性及品种起源演变的探讨 [J]. 中国农业科学,1993,26(5):61-67.
Yu R L,Xin C Y,Chen L. Polymorphism of Y chromosomal in Chinese cattle and approach in the origin and evolution of populations [J]. Agricultura Science in China,1993,26(5):61-67. (in Chinese)

[6] 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 [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution,2006,38:146-154.

[7] Lei C Z,Chen H,Zhang H C,et al. Origin and phylogeographical structure of Chinese cattle [J]. Animal Genetics,2006,37: 579-582.

[8] Chen H,Leibenguth F. Studies on multilocus fingerprints, RAPD markers and mitochondrial DNA of a gynogenetic fish (*Carassius auratus gibelio*)[J]. Biochem Genet,1995,33:297-306.

[9] Loftus R T,Machugh D E,Bradley D G,et al. Evidence for two independent domestications of cattle [J]. Proc Natl Acad Sci USA,1994,91:2757-2761.

[10] Anderson S,Bankier A T,Barrell B G. Sequence and organization of the human mitochondrial genome[J]. Nature,1981, 290:457-465.

[11] Nei M. Molecular evolutionary genetics [M]. New York: Columbia University Press,1987.

[12] Densmore L D,Wright J W,Brown W M,et al. Length variation and heteroplasmy are frequent in mitochondrial DNA from parthenogenetic and bisexual lizards (genus *Cnemidophorus*)[J]. Genetics,1985,110(4):689-707.

[13] 黄 原. 分子系统学——原理、方法及应用[M]. 北京：中国农业出版社,1998.
Huang Y. Molecular systematics——principles, methods and applications [M]. Beijing:China Agriculture Publisher,1998. (in Chinese)

[14] 雷初朝. 中国四个畜种（黄牛、水牛、牦牛、家驴）mtDNA 遗传多样性研究[D]. 陕西杨凌：西北农林科技大学,2002.
Lei C Z. The study of mtDNA genetic diversity in four Chinese livestock [D]. Yangling,Shaanxi:Northwest A & F University,2002. (in Chinese)

[15] Knight A,Mindell D P. Substitutions bias,weighting of DNA sequence evolution,and the phylogenetic positions of fea’s viper [J]. Syst Biol,1993,42(1):18-31.

[16] Cai X,Chen H,Lei C,et al. mtDNA Diversity and genetic lineages of eighteen cattle breeds from *Bos taurus* and *Bos indicus* in China [J]. Genetica,2007,131,175-83.

[17] Jia S G,Cheng H,Zhang G X,et al. Genetic divergence of D-loop region and evolution analysis in some chinese cattle breeds [J]. Acta Genetica Sinica,2007,34(6):510-518.

[18] 田允波,葛长荣,杨亮宇. 云南黄牛的起源与分类地位[J]. 黄牛杂志,1998,24(2):55-60.
Tian Y B,Ge C R,Yang L Y. Origin and classification position of Yunnan Yellow Cattle [J]. Journal of Cattle,1998,24(2): 55-60. (in Chinese)