

蒙古马 mtDNA D-loop 区遗传多样性与 多重母系起源

王小斌, 秦 芳, 张云生, 张春梅, 陈 宏, 雷初朝

(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)

[摘 要] **【目的】**对蒙古马 mtDNA D-loop 区 247 bp 序列进行遗传多样性分析,探讨蒙古马的起源。**【方法】**采用 PCR 方法、测序技术及生物信息学方法,将本试验所测得的 21 匹蒙古马的 mtDNA D-loop 区序列,与 GenBank 中公布的 43 条蒙古马的对应序列,及世界范围内家马、普氏野马和内蒙古地区古马的 mtDNA D-loop 区序列一起进行系统发育分析。**【结果】**蒙古马具有 39 种单倍型,37 个多态位点,核苷酸多样性(π)为 $0.027\ 56 \pm 0.009\ 67$,单倍型多样性(h)为 0.979 ± 0.007 ,表明蒙古马 mtDNA 遗传多样性非常丰富。引用世界家马、古马、普氏野马和蒙古马共 1 074 条 mtDNA D-loop 序列及本研究中 21 条 mtDNA D-loop 序列,共同进行系统发育分析,结果显示,蒙古马分布于 A、B、C、D、E 和 F 支系。**【结论】**蒙古马为多重母系起源,且与国内古马的母系起源几乎一致,推测蒙古马可能是中国北方家马的重要母系来源。

[关键词] 蒙古马; mtDNA D-loop; 遗传多样性; 支系; 母系起源

[中图分类号] S821.8⁺11.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2010)03-0047-05

Mitochondrial DNA D-loop genetic diversity and multiple maternal origins in Mongolian horses

WANG Xiao-bin, QIN Fang, ZHANG Yun-sheng, ZHANG Chun-mei,
CHEN Hong, LEI Chu-zhao

(Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, College of Animal Science and Technology,
Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】**The study was to detect the genetic diversity and origin of Mongolian horses, mitochondrial DNA of 247 bp from Mongolian horses was analyzed. **【Method】**Mitochondrial D-loop sequences of 247 bp from 21 Mongolian horse samples, together with data available from GenBank including 43 Mongolian horses, horses across the world, Przewalskii and ancient horse of Inner Mongolian Region were analyzed by PCR, sequencing and bioinformatics methods. **【Result】**The results revealed that a total of 39 haplotypes with 37 polymorphic sites were found in 64 D-loop sequences of Mongolian horses. The nucleotide diversity (π) and haplotype diversity (h) estimated were $0.027\ 56 \pm 0.009\ 67$ and 0.979 ± 0.007 , respectively, showing rich mitochondrial genetic diversity in Mongolian horses. Phylogenetic analysis based on the published domestic horse, Przewalskii, Mongolian horses and ancient horse sequences collected from GenBank, revealed that Mongolian horses fall into lineages A, B, C, D, E and F. **【Conclusion】**Mongolian horses demonstrated multiple maternal origins, which is almost consistent with that of ancient Chinese horses. Mongolian horses might play important roles in the origins of domestic horses in Northern China.

* [收稿日期] 2009-04-26

[基金项目] 教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-07-0699);西北农林科技大学科研专项(07ZR004)

[作者简介] 王小斌(1982—),男,山西吕梁人,硕士,主要从事动物遗传学研究。E-mail:xb_w_contact@126.com

[通信作者] 雷初朝(1968—),男,湖南常宁人,教授,博士生导师,主要从事动物遗传资源研究。E-mail:leichuzhao1118@126.com

Key words: Mongolian horses; mitochondrial DNA D-loop; genetic diversity; lineage; maternal origin

家马在人类历史进程中扮演着非常重要的角色,参与了农业、军事、政治、文化、商业等各种人类活动,在家养动物驯化史中意义重大。世界范围内家马的起源和驯化细节还不清楚,对我国家马的认识也有待深入。家马在我国历史上一直处于重要地位,被称为六畜之首。我国古代先民培育了许多优良的地方马品种,蒙古马便是其中之一^[1]。

线粒体 DNA 由于具有许多优点,被广泛应用于动物起源进化、亲缘关系和群体遗传结构的研究,其中对家马的研究取得了重要进展。国外 Vila 等^[2]提出家马有 6 个支系(A~F),表明家马具有多个母系起源;Jansen 等^[3]进一步提出,家马还存在 G 支系,即含有 7 大支系,可以分为 17 个亚支系;McGahern 等^[4]进一步证实,家马具有 7 大支系,19 个亚支系;Luís 等^[5]揭示了美洲家马的伊比利亚半岛起源。国内对家马的线粒体 DNA 研究相对滞后,雷初朝等^[6]在国内最早进行了 2 匹关中马的线

粒体 DNA D-loop 序列研究;芒来等^[7]对中国蒙古马和英纯血马的 mtDNA 高变区序列进行了比较研究,发现蒙古马 mtDNA 高变区具有丰富的多态性;蔡大伟等^[8-9]用中国古马线粒体 DNA 研究了其起源;此外,蔡大伟等^[10]分析了藏马与世界家马的亲缘关系;苏锐等^[11]揭示了关中马具有多个母系起源。本研究通过分析蒙古马 mtDNA D-loop 区的遗传信息,并结合分析大量的国内外研究数据,欲探究蒙古马的遗传多样性与母系起源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

在内蒙古锡林郭勒盟相对偏远地区采集 21 份蒙古马血样,ACD 抗凝,低温带回实验室,于-80 ℃冰箱中冻存待用。另引用 GenBank 中已发表的家马(包括蒙古马)、古马和普氏野马共 1 074 条 mtDNA D-loop 区 247 bp 序列作为分析材料(表 1 与表 2)。

表 1 蒙古马 mtDNA D-loop 区序列的 GenBank 登录号

Table 1 Mongolian horses mtDNA D-loop sequences collected from GenBank

品种 Breed	GenBank 登录号 GenBank accession number
蒙古马(43) Mongolian horse	DQ297622-DQ297633,DQ297637-DQ297638,DQ327986-DQ328001,AF014413-AF014415,AF072996,AB329587,AB329592,AB329604,AB329606,AB329618,AB329622-AB329623,AB329625,AB329628

表 2 马 mtDNA D-loop 区序列的 GenBank 登录号

Table 2 Horse mtDNA D-loop sequences collected from GenBank

品种 Breed	GenBank 登录号 GenBank accession numbers
欧洲(432) Europe	AF481247-AF481258,AF481291-AF481323,AJ413672-AJ413681,AJ413682-AJ413723,AJ413731-AJ413735,AJ413825-AJ413828,AJ413833-AJ413901,AJ413919-AJ413926,AY246186-AY246194,AY246209-AY246230,AY246236-AY246241,AY24624-AY246258,AY057409-AY057435,AF168689-AF168705,AY462421-AY432455,DQ327852-DQ328057,EU580148-EU580172
中亚和非洲(135) Middle Asia and Africa	AF481232-AF481246,AF481259-481290,AJ413629-AJ413648,AJ413650-AJ413657,AJ413724-AJ413730,AY246174-AY246185,AY246195-AY246200,AF465995-AF466005,AF132568-AF132594
伊比利亚(211) Iberia	AJ413615-AJ413628,AJ413649,AJ413658-AJ413671,AJ413736-AJ413745,AJ413901-AJ413918,AY246231-AY246235,AY246242-AY246247,AY246259-AY246265,AY293975-AY293984,AY525091-AY525096,AY805641-AY805664,EU256606-EU256605,EF014970-EF014989,EF686021-EF686045
东亚(103) East Asia	AF481324-AF481334,AY246201-AY246208 (Korea),AB329588-AB329589,AB329596,AB329598,AB329600,AB329620,AB329609,AB329614,AB329624,AB329626-27,AY049720,AY049718-19,AF169009-AF169010,AF014405-AF014408 (Korea),AF354425-AF354441 (Korea),DQ327838-DQ327847(关山马 Guan Mountain horse),FJ392562-FJ392580(德保矮马 Debao pony),DQ986464-DQ986479(藏马 Tibetan horse)
普氏野马(6) Przewalskii	AJ413830-AJ413832,AF014409,AF072994-AF072995
古马(144) Ancient horse	DQ327848-DQ327851,EU093030-EU093073,EU559575-EU559585,FJ624150-FJ624157,DQ683525-DQ683544,AF326668-AF326679,AJ876891,AJ876883-AJ876890,AJ876892,DQ900922-DQ900930(Chinese Ancient horses),EU931584-931609(Chinese Ancient horses)

1.2 DNA 的提取及线粒体 DNA D-loop 区的扩增、纯化与序列测定

采用常规的酚-氯仿法提取马的总 DNA。特异性引物选用 Ivankovic 等^[12]设计的位于线粒体 15 494~15 740 区域(参考序列 X79547^[13])的 D-loop 引物。正链引物为 P28: 5'-AGT CTC ACC

ATC AAC ACC CAA AGC-3',反链引物为 HF: 5'-CCT GAA GTA GGA ACC AGA TG-3'。

PCR 反应体系总体积为 50 μL。反应条件为: 95 ℃预变性 4 min;94 ℃变性 30 s,55 ℃退火 30 s;72 ℃延伸 60 s,35 个循环;72 ℃充分延伸 10 min,4 ℃保存。PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,用

凝胶回收试剂盒对 PCR 产物进行纯化与回收,委托上海生物工程有限公司进行测序。

1.3 数据处理

利用 DNASTAR5.0 和 ClustalX (1.83)软件,对本研究中 21 条蒙古马和 GenBank 中已发表的 1 074条马的 mtDNA D-loop 247 bp 序列进行校对与同源序列比对分析,用 DnaSP 3.99 和 Mega 2.1 软件统计单倍型及核苷酸多态性指标,并构建 NJ 系统树,用 Network 5.10 软件进行系统发育网络分析,用 Arlequin 3.1 软件进行分子差异分析(AMO-VA)和群体配对值(Fst)分析。

2 结果与分析

2.1 蒙古马 mtDNA D-loop 核苷酸的遗传多样性

对 21 条蒙古马 mtDNA D-loop 序列进行分析,检测到蒙古马有 11 种新的 mtDNA D-loop 单倍型,23 个多态位点(图 1),结合 GenBank 中已公布的 43 条蒙古马序列,共发现 39 种单倍型,37 个核苷酸多态位点。蒙古马的单倍型多样性(h)和核苷酸多样性(π)分别为 0.979 ± 0.007 和 $0.027\ 56 \pm 0.009\ 67$,表现出丰富的遗传多态性。

[	1111111111	1111111111	1111111111	11111111]	JMG18	TCATGCACCG	AAGTTTGACA	ACTAACGACT	CCAGTTA
[	5555555555	5555555555	5555555555	55555555]	OMG02	...T.....	GG...A...	A...A..GCC	G
[	4445555555	5566666666	6666666667	77777777]	JMG45	...T.....	G....A...	A...A...CC	G
[	9990233488	5900000112	334456680	0122234]	LIMGB08	...T.....	A...	A...A...CC	G
[	4568148245	5701234576	054996733	9806870]	OMG04	...T.....A	A...	A.....CC	...A..G
LIMGB09	TCACGCACCG	AAGTTTGATA	GCTAGTGATT	CCAGTTA	NMG23	...T.....A	A...	A...A...CC	G
LIMGB07	...T.....	A.....C.	C..		MNH53	...T.....	..A.....	A...A...CC	...A..G
JMG06	...T.....	.G.....A.....C.			LIMGB02	...T.....	.G....A...	A...A..GCC	
LIMGB10	...T...T.A	.G.....AT...A.CC			OMG03	...T.....	.G....A...	A.C.A..GCC	
LIMGB17	...T...T..	.G.....AT...A.CC			LIMGB11	...T.....	.G.....A...	A...A..GCC	
LIMGB06	...T...T.A	G..AT...A.CC			LIMGB12	...T.....	.G....A...	A.....CC	...A..
MNH05	...T...T.A	A....A.C.	.T....		NMG02	...TA....	A...	A...A...CC	
NMG14	...T...T.A	.G.....A....A.C.			JMG20	...T.....A	A...	A...A...C.	
MNH24	...T.....	C....A....A.C.			JMG01	.T.T.....	C....A...	A...A...C.	..G....
NMG09	...T.....	A....A.C.			NMG28	.T.T.....	C....G	A...A...C.	..G....
NMG07	...TA....A	A.....C.	C.		LIMGB01	...T.....	C....A...	A...A...C.	..G....
NMG08	...T..G..A	A...A...C.	T....		NMG24	...T.....A	C....A...	A...A...C.	..G....
LIMGB04	...T..G.TA	A.....C.	T....		LIMGB03	C.GT.T...A	CA...A..GA..C.		
OMG01	...T..G...G.	A.....C.	T....		JMG38	C.GTAT...A	CA...A..GA..C.		
NMG26	...T..G...G.	A...A...C.	T....		LIMGB05	C.GT.T...A	CCA...A..GA..C.		
MNH34	...T....A...C.	A...A...C.			MNH19	C.GT.T...A	CC...A..GA..C.		
NMG04	...T.....	...C.....A...A...C.			NMG16	C.GT.T...A	CC...A..GA..C.		

图 1 蒙古马 39 种 mtDNA D-loop 单倍型的多态位点
阴影表示本研究发现的单倍型

Fig. 1 Polymorphic sites of 39 mitochondrial D-loop haplotypes detected in Mongolian horses
The blacks stand for the new haplotypes

2.2 蒙古马的系统发育树

应用本试验获得的 21 条蒙古马 mtDNA D-loop 区序列数据,并引用 GenBank 中已发表的 43 条蒙古马 mtDNA D-loop 区序列数据,另外包括东亚、中亚和非洲、欧洲、伊比利亚半岛等地的 1 031 条主要家马品种以及普氏野马和国内外古马 mtDNA D-loop 区序列数据共同进行系统发育分析。结果显示,蒙古马在除 G 支系外的世界家马 7 大支系(A—G)^[2-4]中的其余 6 个支系均有分布(图 2),频率分别为:A 37.5%,B 7.8%,C 12.5%,D 15.6%,

E 3.2% 和 F 23.4%;对上述 4 个地区的家马序列进行 AMOVA 分析,发现差异主要来自家马群体内。Fst 分析得出,蒙古马在 F 支系的分布频率显著高于欧洲、中亚和非洲家马。

将引用的国内古马 35 条序列与蒙古马 64 条序列联合分析,结果检测到 56 种单倍型,发现我国蒙古马和古马存在较多的共享单倍型,还发现我国古马 13 种独立的单倍型,与蒙古马的序列差异很小。用 56 种单倍型构建我国蒙古马和古马的 NJ 系统发育树(图 3),发现国内古马分布于支系 A—G。

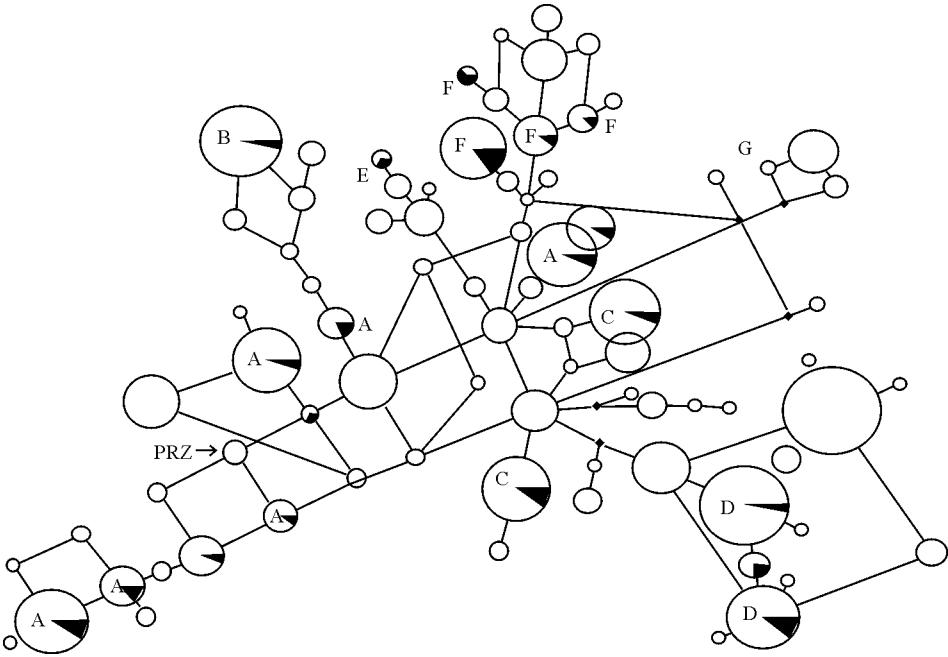


图 2 马 1 095 条 mtDNA D-loop 区序列的 Network 图

黑色区域为蒙古马,A—G 代表各支系,PRZ 代表普氏野马

Fig. 2 Network map of 1 095 horse mtDNA D-loop sequences

The blacks stand for the distribution of Mongolian horses,A—G refers to seven lineages and PRZ stands for Przewalskii horses

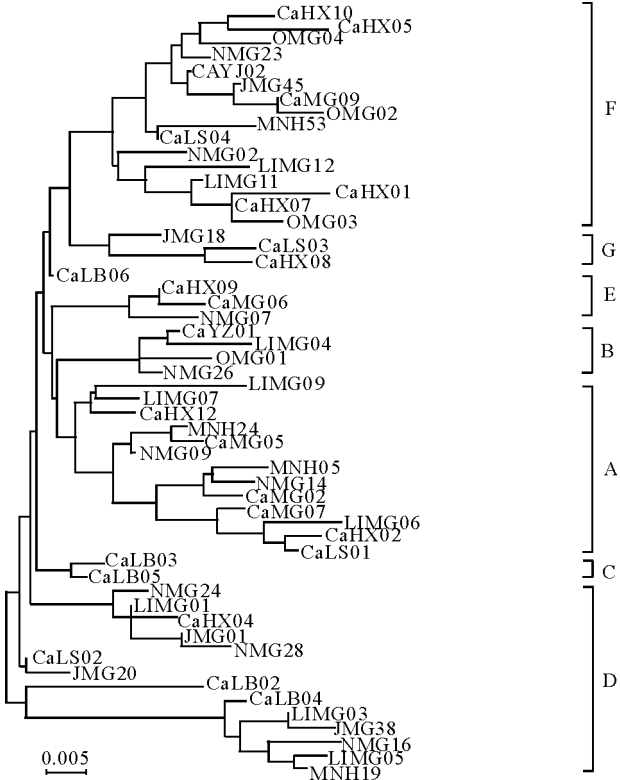


图 3 中国蒙古马与古马 mtDNA D-loop 单倍型 NJ 系统树

NMG 为本试验数据,JMG,LIMG,OMG,MNH 为 GenBank 蒙古马数据;CaMG,CaHX,CaLB,CaLS,CaYZ,CaYJ 为国内古马数据

Fig. 3 Neighbor-joining tree based on Chinese Mongolian horses and ancient horses mtDNA D-loop haplotypes

NMG are our data;JMG,LIMG,OMG and MNH are modern Mongolia horses data collected from GenBank;

CaMG,CaHX,CaLB,CaLS,CaYZ,CaYJ are Chinese ancient samples

3 讨 论

有研究表明,世界家马为多母系起源,可以分为 7 大支系,19 个亚支系^[2-4]。蒙古马遗传多样性丰富,核苷酸多样度和单倍型多样度与世界多数马品种基本一致;与国内家马相比较,蒙古马较关中马高,与藏马相近^[9-11],这与芒来等^[7]研究的蒙古马遗传多样性丰富的结论一致。蒙古马 39 种单倍型分布于 A、B、C、D、E 和 F 6 大支系中。1 095 条马序列中,各支系比例表现出地理分布特征,B、C 支系单倍型数量较少,C 支系多分布于北欧,东亚家马(包括蒙古马)在 F 支系的分布频率较其他地区家马高得多;而广泛存在于欧洲、中东和非洲的 A、D 支系,蒙古马分布也较多,暗示存在共同的母系祖先。需特别指出的是,此前被广泛关注的普氏野马独立存在于 A 支系的一个亚支,暗示其没有参与到现代家马的驯化中,但亲缘关系较近^[3-4,8]。对蒙古马与东亚地区家马的联合分析表明,我国藏马和德保矮马 F 支系频率较低,在驯化或迁移过程中可能与蒙古马存在差异,但与关山马亲缘关系很近;此外,支持韩国家马由中国蒙古马迁移形成的观点^[14]。

引用国内古马的最新研究数据,包括内蒙古地区大山前遗址(夏家店上层和下层文化时期)、井沟子遗址(中国北方青铜时代晚期)的 9 匹古马 mtDNA 序列(其时间跨度为 2 000~4 000 年前),及内蒙古和河南地区的 35 份古马样品(约 2 500 年前)数据^[8-9],与蒙古马联合分析,发现蒙古马与这些古马存在广泛的共享单倍型,NJ 系统发育分析表明有较近的亲缘关系。古马除在蒙古马分布的 A、B、C、D、E 和 F 支系分布有单倍型外,还在 G 支系中有少部分单倍型,表明古马与蒙古马有多重母系起源,可能来自共同的母系祖先。结合国内其他家马品种数据,推测蒙古马可能是中国北方家马的重要母系来源。

[参考文献]

[1] 中国畜牧兽医学会编委会. 中国马驴品种志 [M]. 上海:上海科学技术出版社,1986.
Editorial Committee of the “Breeds of Domestic Animal and Poultry in China”. Horse and ass breeds in China [M]. Shanghai: Science and Technical Publishers, 1986. (in Chinese)

[2] Vila C, Leonard J A, Gotherstrom A, et al. Widespread origins of domestic horse lineages [J]. Science, 2001, 29: 474-477.

[3] Jansen T, Forster P, Levine M A, et al. Mitochondrial DNA and

the origins of the domestic horse [J]. PNAS, 2002, 99: 10905-10910.

[4] McGahern A, Bowe M A M, Edwards C J, et al. Evidence for biogeographic patterning of mitochondrial DNA sequences in Eastern horse populations [J]. Anim Genet, 2006, 37: 494-497.

[5] Luis C, Bastos-Silveira C, Cothran E G, et al. Iberian origins of New World horse breeds [J]. J Hered, 2006, 97: 107-113.

[6] 雷初朝, 陈宏, 杨公社, 等. 关中马 mtDNA D-Loop 序列多态性分析 [J]. Animal Biotechnology Bulletin, 2002, 8(1): 213-215.
Lei C Z, Chen H, Yang G S, et al. Study on mtDNA D-loop genetic diversity in Guanzhong horse [J]. Animal Biotechnology Bulletin, 2002, 8(1): 213-215. (in Chinese)

[7] 芒来, 李金莲, 石有斐. 中国蒙古马与国外纯血马 mtDNA D-loop 高变区序列比较 [J]. 遗传, 2005, 27(1): 91-94.
Mang L, Li J L, Shi Y F. Sequence comparing of mtDNA D-loop varied region in Chinese Mongolian horse and external thoroughbred horse [J]. Hereditas, 2005, 27(1): 91-94. (in Chinese)

[8] 蔡大伟, 韩璐, 谢承志, 等. 内蒙古赤峰地区青铜时代古马线粒体 DNA 分析 [J]. 自然科学进展, 2007, 17(3): 107-112.
Cai D W, Han L, Xie C Z, et al. Mitochondrial DNA analysis of Bronze Age horses recovered from Chifeng region, in Inner Mongolia, China [J]. Progress in Nature Science, 2007, 17(3): 107-112. (in Chinese)

[9] Cai D W, Tang Z W, Han L, et al. Ancient DNA provides new insights into the origin of the Chinese domestic horse [J]. Journal of Archaeological Science, 2009, 36(3): 835-842.

[10] 蔡大伟, 韩璐, 李胜男, 等. 西藏马线粒体 DNA D-loop 区的遗传多样性 [J]. 吉林大学学报: 理学版, 2007, 45(5): 873-878.
Cai D W, Han L, Li S N, et al. Genetic diversity of mitochondrial DNA D-loop sequences in Tibetan horses [J]. Journal of Jilin University: Science Edition, 2007, 45(5): 873-878. (in Chinese)

[11] 苏锐, 谢文美, 张云生, 等. 关中马 mtDNA D-loop 区遗传多态性分析 [J]. 西北农业学报, 2008, 17(6): 17-20.
Su R, Xie W M, Zhang Y S, et al. Study on mtDNA D-loop genetic diversity in Guanzhong horses [J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2008, 17(6): 17-20. (in Chinese)

[12] Ivankovic A, Kavar T, Caput P, et al. Genetic diversity of three donkey populations in the Croatian region [J]. Anim Genet, 2002, 33: 169-177.

[13] Xu X, Arnason U. The complete mitochondrial DNA sequence of the horse, Equus caballus: extensive heteroplasmy of the control region [J]. Gene, 1994, 148: 357-362.

[14] Kim K I, Yang Y H, Lee S S, et al. Phylogenetic relationships of Cheju horses to other horse breeds as determined by mtDNA D-loop sequence polymorphism [J]. Anim Genet, 1999, 30(2): 102-108.