

山东省地方绵羊品种微卫星遗传多态性^{*}

苑存忠¹ 王建民^{1**} 马月辉² 曲绪仙³ 尚友国¹ 张宁波¹

(¹ 山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018; ² 中国农业科学院畜牧研究所, 北京 100094; ³ 山东省畜牧兽医总站, 济南 250022)

【摘要】 利用 24 个微卫星标记, 分析了山东省内原有地方绵羊品种的遗传多样性. 结果表明, 在来自 4 个品种共 71 个种群的 164 只绵羊中, 共检测到等位基因 467 个, 有效等位基因占 49.59%, 不同微卫星基因座之间的等位基因数差异大于品种之间的差异; 发现特有等位基因 123 个, 优势等位基因 43 个. 在所有微卫星基因座中, 89% 处于 Hardy-Weinberg 不平衡状态, 有 50% 属于中性基因座. 不同品种的微卫星基因座多态信息含量呈高度多态 ($PI > 0.5$), Shannon 指数较高 ($I > 1.5$), 平均观察杂合度 (范围 0.454 ~ 0.560) 明显低于期望杂合度 (范围 0.831 ~ 0.849), 证明 4 个地方绵羊种群具有丰富的遗传多样性和广泛的遗传基础, 但品种内存在着一定程度的近交. 聚类分析表明, 山东地方绵羊品种遗传进化关系明确, 可划分为鲁西地区的小尾寒羊和大尾寒羊、鲁东地区的山地绵羊和洼地绵羊两大类群, 其遗传距离与地理分布距离相一致.

关键词 绵羊 微卫星标记 多态信息含量 遗传距离

文章编号 1001 - 9332 (2006) 08 - 1459 - 06 **中图分类号** S813.9 **文献标识码** A

Genetic diversity of indigenous sheep breeds in Shandong Province based on microsatellite markers study. YUAN Cunzhong¹, WANG Jianmin¹, MA Yuehui², QU Xuxian³, SHANG Youguo¹, ZHANG Ningbo¹ (¹ College of Animal Science, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China; ² Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China; ³ Station of Animal Husbandry and Veterinary of Shandong Province, Jinan 250022, China). -Chin J Appl Ecol, 2006, 17 (8): 1459 ~ 1464.

By using 24 microsatellite markers, this paper studied the genetic diversity of four indigenous sheep breeds in Shandong Province. 467 alleles were detected from 164 sheep of 71 breeding groups, and the proportion of effective alleles was 49.59%. The differences of the allele number among microsatellite loci were larger than those among breeds. 123 peculiar alleles and 43 dominative alleles were found from these sheep. 89% of the microsatellite markers were not in Hardy-Weinberg, and 50% of them were neutral. All the microsatellite markers were of high polymorphic ($PI > 0.5$), and the values of Shannon indexes were relatively high. The observed heterozygosities (0.454 ~ 0.560) were significantly lower than their expected values (0.831 ~ 0.849). It was suggested that the four indigenous sheep breeds in Shandong Province were highly genetic polymorphic but somewhat inbred. The NJ and UPGRAM dendrograms indicated that the small-tailed and large-tailed Han sheep in west Shandong were closer in genetics, and the Shandi and Wadi sheep in east Shandong were similar. The genetic distances between different sheep breeds were accordant to geographical distances.

Key words Sheep, Microsatellite marker, Polymorphism information content, Genetic distance

1 引言

畜禽地方品种的优异种质特性是在多样化的自然环境、人类生存需求和社会经济变革等综合因素作用下, 历经数千年的自然选择和人工选择而形成的. 因其蕴涵着丰富的能够适应许多特殊生境的遗传变异及在人类食品供应中的重要作用, 成为全球生物多样性保护和利用研究的热点之一^[4,8]. 我国是世界上地方绵羊品种资源最多的国家之一, 自 20 世纪 90 年代以来, 对其遗传多样性和分子进化方面的研究, 已从表型形态描述、生化遗传标记深入到 DNA 分子标记水平, 研究所选择的种群主要分布在相似或相近的生态区域内^[10,18].

山东省境内有 4 个地方绵羊品种类群, 以往对其遗传多样性的研究主要集中在地理分布、形态特征、血液蛋白多态、RAPD 标记、细胞色素 b 基因等方面^[6,15,21], 尚未见利用微卫星标记研究的报道. 微卫星因具有分布广泛、多态信息含量高、呈共显性遗传和检测方便等特点而成为家畜及濒危物种遗传多样性研究的重要工具. 基于此, 本研究借助微卫星标记技术, 评估了山东省现有地方绵羊品种的遗传变异和系统进化状态, 为进一步制定科学的保护和合

^{*} 山东省政府农业良种开发项目 (SD2003RY01) 和国家自然科学基金资助项目 (30371026).

^{**} 通讯联系人. E-mail: wangjn@sdau.edu.cn
2005 - 09 - 11 收稿, 2006 - 06 - 15 接受.

理利用策略提供理论依据。

2 研究地区与研究方法

2.1 自然概况

山东省 (34°23' ~ 38°28' N, 114°47' ~ 122°43' E) 地处黄河下游, 东海之滨, 海岸线长达 3 024 km, 总面积为 1.567 × 10⁵ km²。该地区属于暖温带气候区, 年均气温 11 ~ 14 °C, 年均降雨量 550 ~ 990 mm; 境内黄河冲积平原占 65%, 丘陵山地占 35%, 平均海拔 50 ~ 1 000 m。优越的地理位置、悠久的人文历史、适宜的气候条件和复杂的地势地貌, 为地方绵羊品种资源的形成奠定了基础。2003 年正式列入中国畜禽遗传资源名录的山东地方绵羊品种 (表 1) 主要有小尾寒羊 (Small-tailed Han sheep, ST)、大尾寒羊 (Large-tailed Han sheep, LT)、山地绵羊 (Shandi sheep, SD) 和洼地绵羊 (Wadi sheep, WD), 分别分布在鲁西南黄河冲积扇平原、鲁西北黄泛平原、鲁中南沂蒙山区中低山丘陵和黄河三角洲, 其在生态条件、饲养方式、生产性能和体型结构等方面存在着明显差异^[11, 14]。

表 1 供试地方绵羊品种的采样地点、数量和饲养制度
Table 1 Collection localities, numbers and feeding system of sampled indigenous sheep breeds

品种 Breed	采样地点 Locality	海拔 Altitude (m)	饲养制度 Feeding system	存栏只数 Amount of sheep on hand (×10 ⁵)	采样群 (个体)数 Sample No
ST	嘉祥县 Jiaxiang County	50	舍饲 Confinement	70.0	14 (42)
LT	临清市 Linqing City	50	半舍饲 Semi-confinement	0.1	22 (42)
SD	莱芜市 Laiwu City	500	半放牧 Semi-grazing	2.0	17 (29)
WD	滨州市 Binzhou City	2~10	放牧 Grazing	4.0	18 (40)

2.2 研究方法

选择地理距离较远的品种中心产区县的群体为试验羊群 (表 1), 采用分布区内亚群定点随机抽样法^[3], 即在某一品种的中心产区县市抽 3~6 个乡镇, 每个乡镇抽 2~5 个村, 每个村抽 3~4 个羊群, 每个羊群抽 3~4 只羊, 保证个体之间无亲缘关系。试验羊只均为 1~2 岁之间的经产母羊, 保持原有饲养方式。血样采集方法: 静脉采血, 肝素钠粉末抗凝, -20 °C 冰壶带回实验室冷冻保存。

冻融血 DNA 提取方法参考文献^[12]。提取出的基因组 DNA, 经充分溶解和适当稀释, 再经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测, 确定其无拖尾现象, 浓度和纯度完全符合 PCR 扩增反应的要求。

本研究所用的 30 个绵羊和牛的与生长性状相关的微卫星标记, 从 GeneBank (www. ncbi. nlm. gov; www. roslin. ac. uk; www. thearkdb. org/brow ser) 中选取, 所有引物由北京赛百盛生物工程公司合成, 参考其原扩增条件加以调整后, 进行 PCR 扩增。将扩增产物在 8% 的聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳分析, 银染显色, 再利用电泳凝胶数字图像定量分析系统 (EASIMAN KODAK EDAS) 分析片段大小 (bp), 发现有 24

个微卫星标记在供试绵羊品种中具有较好的多态性。

PCR 反应体系为 12 μl, 组分为 MgCl₂ 1.2 ~ 1.5 mmol · L⁻¹, DNTPs 0.2 mmol · L⁻¹, Primers 0.5 μmol · L⁻¹, Taq DNA 聚合酶 5.0 U, DNA 模板 60 ng 所用分子量 Marker 为 pBR322/MspI

PCR 反应程序: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 50 ~ 62 °C 退火 30 s, 72 °C 30 s, 33 个循环后; 72 °C 延伸 10 min

2.3 统计分析

采用的主要软件有 GDA 1.1^[16]、POPGEN 32^[19] 和 FSTAT 293^[7] 等。

等位基因数 (Number of alleles, Na)、有效等位基因数 (Effective numbers of alleles, Ne)、优势等位基因数 (Dominate alleles, Da) 和特有等位基因数 (Private alleles, Pa) 及其基因频率计算、Hardy-Weinberg 平衡检验等均按文献^[8]方法完成。

平均杂合度 (Heterozygosity, H) 是指测得基因型中杂合子的比例, 即基因多样性 (genetic diversity)。Ho 为观察杂合度, He 为期望杂合度。基本计算公式^[8]:

$$H = \frac{r}{k} \left(1 - \sum_{i=1}^n q_i^2 \right) / r$$

式中, r 为基因座数, q_i 为每个基因座第 i 个等位基因的频率。

多态信息含量 (Polymorphism information content, PIC) 计算公式^[11]:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^m P_i^2 - \sum_{i=1}^{m-1} \sum_{j=k+1}^m 2P_i P_j^2$$

式中, P_i 和 P_j 分别为第 i 和第 j 个等位基因在群体中的频率, m 为等位基因数。

Shannon 信息指数 (I) 计算公式^[11]:

$$I = - \sum_{i=1}^{nr} P_i \log_2 P_i$$

式中, r 为基因座位数, n 为每个基因座位的等位基因数, P_i 为第 i 个基因的频率。

利用微卫星标记等位基因频率计算标准遗传距离和遗传相似系数, 再聚类分析做出邻位相连法 (Neighbor-joining method, NJ) 和除权配对法 (Unweighted pair-group method using arithmetic averages, UPGMA) 系统发育树^[2, 9]。

3 结果与分析

3.1 绵羊品种的等位基因

有效等位基因数是基因一致度的倒数, 反映了等位基因间的相互影响, 也是群体遗传变异的重要测度^[5, 8]。在 4 个绵羊品种的 24 个微卫星基因座上共检测到 467 个等位基因 (表 2), 其中有效等位基因 231.60 个, 占 49.59%。所有品种不同基因座的等位基因数差异较大, 范围是 7 ~ 36 个, 平均为 19.46 个, 其中 agla269、bm6526 和 bms1004 基因座等位基因数均达到 30 个以上, 等位基因数在 10 个

以内的基因座仅有 *bm6444*;有效等位基因数为 3.40~20.78 个,平均 9.65 个.同一品种不同基因座的等位基因数差异也较大,但不同品种所有基因座的等位基因数差异则较小(12.17~13.25 个).

不同品种的特有等位基因是体现品种特征的珍贵基因,不仅可以用来区分不同品种,也可用于不同品种特有经济性状的连锁分析.在 4 个绵羊品种的 24 个微卫星基因座上共检测到 123 个特有等位基因,其中特有等位基因最多的品种是洼地绵羊(38 个),依次为小尾寒羊(36 个)、大尾寒羊(32 个)和山地绵羊(17 个);有 5 个基因座的特有等位基因(占 30%)分布在全部绵羊品种中,但所有特有等位基因的频率都很低(0.0122~0.1316).

优势等位基因是群体中最稳定的基因,与特有基因一样,也体现了群体遗传结构特征,故用分子标记方法跟踪其频率变化可以达到监测群体结构变化的目的^[8].由表 3 可以看出,在 4 个绵羊品种的 22 个微卫星基因座上发现 43 个优势等位基因.其中,很多微卫星基因座的优势等位基因存在于 2 个以上的品种中,或者片段大小差别不大,说明 4 个绵羊品种所处的地理生态环境比较接近,群体结构上有许多相似之处;但也有很多基因座的优势等位基因在不同品种中差别较大,说明这些品种间也存在一定的遗传差异.

3.2 绵羊品种的群体遗传结构检测

利用 Hardy-Weinberg 定律检验 4 个绵羊品种的基因平衡状态,发现大部分基因座都处于不平衡状态.在不同品种上,处于平衡状态的基因座分别是小尾寒羊中的 *bm875*,大尾寒羊中的 *bm4311*,山地绵羊中的 *maf70*、*mb009* 和 *bmc1206*,以及洼地绵羊中的 *bm4311*、*bms574* 和 *bmc1206*.

利用 POPGEN32 对 24 个微卫星基因座进行重复模拟 1 000 次的中性测试,发现在 95% 的置信区间内有 12 个基因座,即: *bm4311*、*maf70*、*bms1004*、*bms1248*、*bm6404*、*bms1714*、*bms875*、*mb009*、*bm1341*、*bm6526*、*bm6444* 和 *bm1277* 属于中性标记,即没有任何表型效应的标记.同时表明本研究所选基因座中至少有 50% 属于非中性标记,其原因可能与历史上的群体迁徙、失控的亲缘交配方式等因素有关^[4,8].

3.3 绵羊品种的遗传多样性

由表 4 可以看出,在 4 个绵羊品种的 24 个微卫星基因座中,只有山地绵羊的 *bm6444* 基因座为中度多态($0.5 > PIC > 0.25$),其余所有基因座的多态信息含量为高度多态($PIC > 0.5$),很多基因座的 PIC 已达 0.9 以上.与此相一致,大部分基因座的期望杂合度(He)也比较高,原因是 He 与 PIC 在内涵上都能反映出物种的遗传多样性.但观察杂合度

表 2 不同基因座上 4 个绵羊品种的等位基因数、有效等位基因数和特有等位基因数

Table 2 N_a , N_e and P_a numbers of four sheep breeds at every microsatellites locus

基因座 Locus	ST			LT			SD			WD			TOTAL		
	N_a	N_e	P_a	N_a	N_e	P_a	N_a	N_e	P_a	N_a	N_e	P_a	N_a	N_e	P_a
<i>bm4311</i>	7	4.08	1	8	5.29	1	7	4.46	0	8	4.44	0	11	4.82	2
<i>maf70</i>	13	5.25	0	17	7.71	1	10	4.4	0	10	5.32	0	17	6.31	1
<i>bms1004</i>	14	6.28	3	14	3.78	3	15	8.72	5	10	6.22	0	31	12.13	11
<i>agla269</i>	26	18.57	2	23	16.64	1	26	17.52	2	21	12.34	2	36	20.78	7
<i>bms1248</i>	13	7.61	3	12	6.62	2	8	3.32	1	10	5.97	0	17	8	6
<i>bm6404</i>	16	5.41	4	12	4.52	1	11	6.92	0	15	6.66	3	22	6.21	8
<i>bms574</i>	9	6.06	0	16	9.8	2	14	7.65	0	20	12.72	5	23	12.93	4
<i>bms1714</i>	16	8.86	4	7	3.49	0	11	5.22	0	11	5.74	0	18	6.77	3
<i>bms1724</i>	15	10.06	1	14	11.17	1	14	9.89	0	13	6.28	1	19	12.58	7
<i>bms875</i>	10	3.47	2	10	4.33	2	9	6.28	1	7	4.47	1	14	5.42	6
<i>mb009</i>	12	5.66	3	7	3.02	2	9	3.83	0	11	3.66	1	17	4.3	6
<i>bm3413</i>	11	9.38	0	13	7.73	2	12	8.34	0	11	7.8	0	15	10.65	2
<i>bm3501</i>	16	7.16	1	11	6.81	0	12	6.35	0	16	8.16	5	21	10.71	6
<i>bm1341</i>	4	2.79	0	4	2.58	0	10	5.64	1	11	3.11	2	12	3.65	3
<i>bms1678</i>	13	9.98	1	12	6.66	0	10	6.4	0	12	8.47	2	16	9.82	3
<i>bms710</i>	11	5.46	1	10	4.89	2	13	7.31	2	9	6.76	0	18	9.6	5
<i>bm1225</i>	18	12.5	3	15	10.31	1	13	8.87	0	22	15.56	7	27	14.39	11
<i>bm203</i>	16	9.94	1	18	8.38	1	14	9.61	1	14	10.17	2	22	11.95	5
<i>mb023</i>	12	6.17	2	12	7.14	0	14	10.32	2	11	6.97	1	18	9.7	5
<i>bm3033</i>	24	18.47	0	22	16.24	0	22	14.5	0	25	17.29	1	29	20.34	1
<i>bmc1206</i>	7	4.58	0	10	6.96	1	9	6.81	1	9	4.53	0	11	6.34	2
<i>bm6526</i>	21	13.67	3	23	13.39	6	17	11.76	1	20	11.29	4	35	15.74	14
<i>bm6444</i>	4	2.55	0	6	3.15	2	4	2.08	0	4	2.29	1	7	3.4	3
<i>bm1277</i>	10	5.79	1	9	3.61	1	8	4.57	0	8	4.41	0	11	5.06	2
平均 Mean	13.25	7.91	36	12.71	7.26	32	12.17	7.53	17	12.83	7.53	38	19.46	9.65	123

(Ho)明显低于 He,则表明群体中纯合子个体较多,存在着一定程度的近交现象,可能与小群体分散饲养条件下种公羊血统来源比较单一有关^[8]。

Shannon指数是用于度量一个随机交配群体中所受选择、突变和遗传漂变的综合影响,其值越大,

说明混乱度越高。所测各品种各个基因座的 Shannon指数均较高 ($I > 1.0$),而在小尾寒羊的 agla269 和 bm3033 基因座上则达到 3.0 以上。

由图 1 可以看出,应用 NJ 法和 UPGMA 法所构建的分子系统树拓扑结构是一致的,表明小尾寒羊

表 3 不同基因座上不同绵羊品种的优势等位基因及其频率

Table 3 Da and the corresponding frequencies of four sheep breeds at 24 microsatellite loci

基因座 Locus	ST		LT		SD		WD	
	Da	频率 Frequency	Da	频率 Frequency	Da	频率 Frequency	Da	频率 Frequency
bm4311	107	0.388	109	0.306	107	0.362	107	0.338
maf70	142	0.345	142	0.232	142	0.414	142	0.284
bm sl004	137	0.250	137	0.439	157	0.224	161	0.276
agla269	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000
bm sl248	144	0.268	146	0.293	142	0.448	0	0.000
bm6404	137	0.317	139	0.297	137	0.259	139	0.264
bm s74	147	0.226	0	0.000	161	0.241	0	0.000
bm sl714	0	0.000	142	0.397	142	0.276	142	0.276
bm sl724	0	0.000	0	0.000	0	0.000	174	0.313
bm s875	120	0.475	118	0.293	122	0.224	120	0.324
mb009	148	0.347	148	0.463	146	0.362	148	0.378
bm3413	0	0.000	194	0.220	0	0.000	202	0.214
bm3501	196	0.286	198	0.207	200	0.259	0	0.000
bm1341	120	0.440	120	0.537	120	0.259	122	0.434
bm sl678	0	0.000	171	0.268	167	0.276	0	0.000
bm s710	118	0.321	110	0.282	118	0.276	0	0.000
bm1225	0	0.000	0	0.000	259	0.200	0	0.000
bm203	0	0.000	241	0.220	0	0.000	0	0.000
mb023	154	0.308	144	0.232	0	0.000	152	0.203
bm3033	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000
bmc1206	133	0.333	0	0.000	139	0.207	131	0.329
bm6526	0	0.000	0	0.000	0	0.000	170	0.200
bm6444	123	0.488	121	0.475	121	0.655	119	0.608
bm1277	112	0.262	112	0.415	110	0.345	110	0.303

表 4 不同绵羊品种每个基因座的多态信息含量、Shannon 指数和杂合度

Table 4 PIC, I and Ho/He of four sheep breeds at every microsatellites locus

基因座 Locus	ST				LT				SD				WD			
	PIC	I	Ho	He	PIC	I	Ho	He	PIC	I	Ho	He	PIC	I	Ho	He
bm4311	0.721	1.619	0.750	0.764	0.786	1.822	0.694	0.822	0.746	1.673	0.862	0.776	0.743	1.708	0.757	0.785
maf70	0.790	2.020	0.452	0.819	0.859	2.384	0.634	0.881	0.751	1.828	0.724	0.786	0.788	1.883	0.460	0.823
bm sl004	0.822	2.117	0.476	0.851	0.706	1.768	0.463	0.745	0.876	2.401	0.621	0.901	0.822	2.052	0.579	0.851
agla269	0.944	3.054	0.732	0.958	0.936	2.948	0.561	0.952	0.941	3.074	0.690	0.960	0.913	2.748	0.528	0.932
bm sl248	0.857	2.267	0.317	0.879	0.834	2.146	0.512	0.859	0.655	1.455	0.276	0.711	0.813	2.017	0.412	0.845
bm6404	0.795	2.073	0.463	0.825	0.746	1.795	0.405	0.789	0.840	2.140	0.483	0.871	0.837	2.186	0.389	0.862
bm s74	0.814	1.921	0.524	0.845	0.895	2.484	0.707	0.909	0.857	2.299	0.414	0.885	0.917	2.731	0.842	0.934
bm sl714	0.877	2.403	0.342	0.899	0.67	1.492	0.282	0.723	0.783	1.907	0.345	0.823	0.805	1.982	0.290	0.837
bm sl724	0.892	2.468	0.625	0.912	0.903	2.526	0.293	0.922	0.890	2.423	0.379	0.915	0.825	2.152	0.375	0.854
bm s875	0.685	1.599	0.525	0.721	0.782	1.752	0.390	0.779	0.821	1.973	0.379	0.855	0.747	1.634	0.351	0.787
mb009	0.808	2.057	0.361	0.835	0.613	1.318	0.300	0.677	0.700	1.615	0.517	0.752	0.686	1.626	0.351	0.737
bm3413	0.883	2.314	0.500	0.905	0.857	2.240	0.390	0.881	0.869	2.289	0.393	0.896	0.859	2.183	0.571	0.885
bm3501	0.848	2.323	0.571	0.871	0.836	2.072	0.195	0.864	0.825	2.097	0.345	0.857	0.866	2.332	0.421	0.889
bm1341	0.570	1.098	0.191	0.650	0.550	1.084	0.098	0.620	0.800	1.938	0.621	0.837	0.627	1.489	0.290	0.688
bm sl678	0.891	2.398	0.610	0.911	0.834	2.124	0.585	0.860	0.826	2.028	0.517	0.858	0.871	2.271	0.474	0.894
bm s710	0.797	1.973	0.262	0.827	0.767	1.796	0.308	0.806	0.851	2.257	0.586	0.878	0.835	1.991	0.368	0.864
bm1225	0.914	2.672	0.512	0.931	0.895	2.459	0.293	0.914	0.877	2.334	0.400	0.905	0.932	2.883	0.405	0.949
bm203	0.891	2.483	0.595	0.910	0.870	2.446	0.537	0.892	0.887	2.431	0.655	0.912	0.894	2.47	0.500	0.914
mb023	0.821	2.088	0.487	0.849	0.845	2.169	0.634	0.871	0.895	2.451	0.724	0.919	0.840	2.111	0.784	0.868
bm3033	0.943	3.028	0.833	0.957	0.935	2.922	0.829	0.950	0.927	2.861	0.759	0.947	0.939	3.009	0.737	0.955
bmc1206	0.751	1.688	0.436	0.792	0.839	2.048	0.512	0.867	0.836	2.016	0.690	0.868	0.748	1.741	0.600	0.791
bm6526	0.922	2.784	0.537	0.938	0.920	2.840	0.463	0.937	0.909	2.621	0.759	0.931	0.905	2.677	0.514	0.925
bm6444	0.531	1.037	0.238	0.616	0.637	1.353	0.25	0.692	0.473	0.964	0.345	0.528	0.513	1.034	0.162	0.571
bm1277	0.807	1.958	0.571	0.837	0.682	1.574	0.561	0.732	0.751	1.705	0.966	0.795	0.739	1.662	0.974	0.784
平均 Mean	0.816	2.144	0.496	0.846	0.800	2.065	0.454	0.831	0.816	2.116	0.560	0.849	0.811	2.107	0.506	0.843

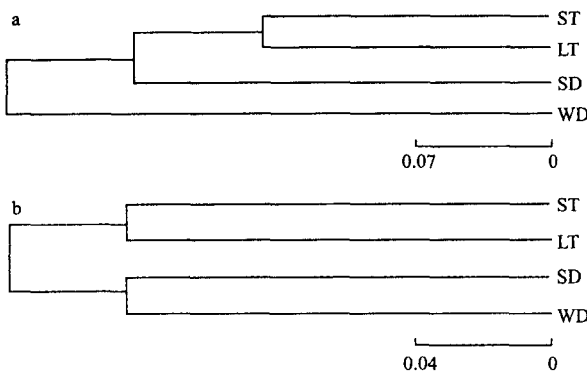


图1 基于24个微卫星标记所构建的4个地方绵羊品种间系统发育树

Fig. 1 Molecular phylogenetic trees of four indigenous sheep breeds based on 24 macrosatellite markers

a) 邻位相接法 NJ; b) 除权配对法 UPGMA.

与大尾寒羊、山地绵羊与洼地绵羊的亲缘关系最近,品种间的遗传距离分别为0.2914和0.3094,遗传相似系数分别为0.7472和0.7339,地理距离分别为171和137 km;洼地绵羊与大尾寒羊则最远,遗传距离和遗传相似系数分别为0.4062和0.6662,地理距离为216 km.

4 讨 论

本研究从4个绵羊品种的24个微卫星基因座中检测到的等位基因数和有效等位基因数分别达到19.46个和9.65个,且同一品种不同基因座的等位基因数差异也较大,多态信息含量、杂合度和 Shannon 指数等多样性参数均比较高,证明这些地方绵羊品种的遗传变异程度较高,遗传基础比较广泛,具有丰富的遗传多样性.但所有品种和基因座的平均观察杂合度明显低于期望杂合度,且大多数基因座处于 Hardy-Weinberg 不平衡状态,说明群体内可能存在一定程度的近交.其主要原因:一是在相近生态区域内的品种分布界线不太分明,尤其是放牧和市场交易过程中基因交流机会较多,加之公母混养的自由配种方式,易表现出致纯合化效应^[3];二是当品种种群数量较少时(如大尾寒羊),会造成近交程度不断升高,致使微卫星基因座有效等位基因数目较少、预期杂合度较低^[13,20].

本研究基于微卫星标记所构建的系统进化树表明,山东省4个地方品种可划分为鲁西地区的小尾寒羊和大尾寒羊、鲁东地区的地绵羊和洼地绵羊两大类群,品种间遗传进化和亲缘关系明确,遗传距离大小与地理分布距离远近相一致,反映出品种形成与进化中的生态学作用^[2,9,17].如小尾寒羊与大尾寒羊同处于鲁西平原,生态条件相似,无地理隔阂,

品种间易于交流,故亲缘关系较近;而洼地绵羊在鲁北滨海草场,山地绵羊则分布在鲁中丘陵山地,虽然其生态环境差别较大,但地理距离较近,随着黄河三角洲不断扩大,人口流动可能促进了品种之间的基因交流.本聚类结果与利用 RAPD 标记^[6]、线粒体细胞色素 b 基因多态性核苷酸基因座^[21]和血液蛋白质多态基因座^[15]等方法的聚类结果不一致,可能是所采用基因座的遗传特征差异造成的.如 RAPD 技术检测的是核基因组碱基的变化,易受到选择压力的影响;线粒体属于核外遗传物质,受到的选择压力小、遗传变异少;血液蛋白质作为生理生化物质,多态性较少,易受海拔、温度等环境因素的影响;而微卫星基因座能特异地定位于染色体的某个部位,呈分布广泛、高度多态和共显性遗传等特征,更加适于研究种群分化、遗传距离和亲缘关系等群体遗传关系^[5,18].

致谢 采样中得到莱芜黑山羊育种研究所、郓城县畜牧局、临清市畜牧局、东营燕顺种羊公司和滨州畜牧兽医研究所等单位的支持.

参考文献

- 1 Arranz JJ, Bayon Y, Primitivo FS. 2001. Genetic variation at microsatellite loci in Spanish sheep. *Small Ruminant Res*, **39**: 3~10
- 2 Buchanan FC, Adams LJ, Littlejohn RP, et al. 1994. Determination of evolutionary relationships among sheep breeds using microsatellites. *Genetics*, **22**: 397~403
- 3 Chen Y-C (陈幼春), Cao H-H (曹红鹤), Li H-B (李宏滨). 2001. Application of random-locating sampling in subpopulation of animal breed. *J Yellow Cattle Sci* (黄牛杂志), **27**(1): 1~3 (in Chinese)
- 4 Chen Y-C (陈幼春), Ma Y-H (马月辉), Wang D-Y (王端云). 2003. Elements and achievement in research on domestic animal biodiversity. *Biodivers Sci* (生物多样性), **11**(5): 407~413 (in Chinese)
- 5 Chu M-X (储明星), Cheng J-H (程金华), Guo W (过 纬). 2001. Preliminary studies of microsatellite markers OarAE101 and BM1329 in five sheep breeds. *Acta Genetica Sin* (遗传学报), **28**(6): 510~517 (in Chinese)
- 6 Du L-X (杜立新), Cao D-G (曹顶国). 2003. Studies on macrosatellites and RAPD markers in Little-tailed Han sheep. *Acta Genetica Sin* (遗传学报), **30**(11): 1041~1044 (in Chinese)
- 7 Li J-M (李钧敏), Jin Z-X (金则新). 2005. Genetic diversity of *Hepatocodium maconoides* natural populations in Zhejiang Province. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), **16**(5): 795~800 (in Chinese)
- 8 Li N (李 宁). 2002. *Animal Genetics* 2nd edition. Beijing: Chinese Agricultural Press. 139~167 (in Chinese)
- 9 Li T (李 涛), Lai X-L (赖旭龙), Zhong Y (钟 扬). 2004. The methods of constructing phylogenetic trees with DNA sequences. *Hereditas* (遗传), **26**(2): 205~210 (in Chinese)
- 10 Ma Y-H (马月辉), Chen Y-C (陈幼春), Feng W-Q (冯维祺), et al. 2002. Germplasm of Chinese domestic animals and their conservation. *Rev China Agric Sci Technol* (中国农业科技导报), **4**(3): 37~42 (in Chinese)
- 11 Qi J-F (齐景发). 2004. Report on Domestic Animal Genetic Resources in China. Beijing: Chinese Agricultural Press. 158~161 (in Chinese)

- 12 Sambrook J, Fritsch EF, Mariatis T, eds. Trans. 1998. Jin D-Y (金冬雁), Li M-F (黎孟枫), Hou Y-D (侯云德), et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition. Beijing: Science Press (in Chinese)
- 13 Schwartz MK, Mills LS, Ortega Y, et al. 2003. Landscape location affects genetic variation of Canada lynx (*Lynx canadensis*). *Mol Ecol*, **12**: 1807 ~ 1816
- 14 Si J-C (司俊臣). 1999. Breeds of Domestic Animal and Poultry in Shandong Province. Shenzhen: Haitian Press 51 ~ 59 (in Chinese)
- 15 Wang G-Z (王桂芝), Wang J-M (王建民). 2001. Study on blood protein polymorphism of Shandong local sheep breeds. *Chin J Anim Sci* (中国畜牧杂志), **37**(1): 8 ~ 10 (in Chinese)
- 16 Wang Z-G (汪志国), Yang Z-P (杨章平), Ma Y-H (马月辉), et al. 2006. Analysis of genetic diversity among seven goat populations in the middle and lower Yangtze River Valley and south mainland near the sea. *Acta Veterinaria Zootechnica Sin* (畜牧兽医学报), **37**(1): 1 ~ 6 (in Chinese)
- 17 Xiao T-F (肖天放), Zeng X-C (曾显成), Wu Q-W (吴其文). 2004. Genetic diversity of Fujian local duck population in different ecological type. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), **15**(5): 879 ~ 882 (in Chinese)
- 18 Xue H (薛辉), Wu X-B (吴孝兵), Yan P (宴鹏). 2005. Application of microsatellite DNA in molecular ecology and strategies for loci isolation. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), **16**(2): 385 ~ 389 (in Chinese)
- 19 Yang Y (杨燕), Ma Y-H (马月辉), Lü S-J (吕慎金), et al. 2004. Genetic diversity in seven Chinese indigenous sheep breeds based on microsatellite analysis. *Biodivers Sci* (生物多样性), **12**(6): 586 ~ 593 (in Chinese)
- 20 Zerger KR, Richardson BJ. 2003. A rapid population expansion retains genetic diversity within European rabbit in Australia. *Mol Ecol*, **12**: 789 ~ 794
- 21 Zhang C-S (张传生), Geng L-Y (耿立英), Wan H-W (万海伟), et al. 2005. Study on sequence variation of mitochondrial cytochrome b gene and phylogenetic relationship of four native sheep breeds. *Acta Veterinaria Zootechnica Sin* (畜牧兽医学报), **36**(4): 313 ~ 317 (in Chinese)

作者简介 苑存忠,男,1979年生,硕士.主要从事动物遗传资源保护及遗传多样性研究,发表论文 5 篇. Tel: 0538-8241448; E-mail: wangjm@sdau.edu.cn

责任编辑 刘丽娟
