

中国 7 个绵羊品种 mtDNA D-loop 区序列的系统发育与起源研究

赵倩君, 关伟军, 郭 军, 乔海云, 何晓红, 浦亚斌, 傅宝玲, 敖 红, 李 奎, 马月辉*

(中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100094)

摘 要: 为探讨中国绵羊的起源、进化及遗传多样性, 对新疆、内蒙古、西藏、云南、宁夏、山东等地区 7 个地方绵羊品种和 1 个外来品种共 59 个体的线粒体 D-loop 全序列进行了测序分析。7 个地方绵羊群体的单倍型多样性(Hd)和核苷酸多样性(π)分别平均为 0.996 0 和 0.030 6, 表明我国地方绵羊品种的控制区遗传变异丰富。系统发育和网络进化分析均将中国绵羊分为 3 个明显的支系, 揭示中国绵羊存在 3 个独立的母系起源; 并发现欧洲摩佛仑羊与支系 B 聚在一起, 表明摩佛仑羊与中国绵羊有较近的亲缘关系。对 mtDNA D-loop 的 3 个支系进行核苷酸不配对分布曲线分析和 Fu's 中性检验, 结果显示 3 个支系的分布曲线均呈单峰形, 且中性检验差异显著, 表明绵羊 3 个支系可能曾经历群体扩张。

关键词: 绵羊; 线粒体 DNA; 控制区; 起源

中图分类号: S826.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2008)04-0417-06

Origin and Phylogenetics of Seven Chinese Sheep Breeds Based on D-loop Sequence

ZHAO Qian-jun, GUAN Wei-jun, GUO Jun, QIAO Hai-yun, HE Xiao-hong,

PU Ya-bin, FU Bao-ling, AO Hong, LI Kui, MA Yue-hui*

(*Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China*)

Abstract: To investigate the origin, evolution and genetic diversity of Chinese domestic sheep (*ovis*), complete D-loop sequences of 59 individuals from 7 local breeds from Xinjiang, Inner Mongolia, Tibet, Yunnan, Ningxia and Shandong and 1 imported breed were sequenced. Haplotype diversity (Hd) and nucleotide diversity (π) among 7 Chinese sheep population were 0.996 0 and 0.030 6 averagely, which indicate genetic variance within control region of Chinese sheep is abundant. Neighbour-joining tree was constructed based on 59 D-loop sequences from 8 domestic sheep populations together with previously published wild sheep sequences. It supports there are three distinct lineages (A, B and C) in Chinese sheep. Mouflon was clustered with lineage B, which showed that it had close relationship with Chinese sheep. Further median-joining network analysis also showed three lineages were determined in Chinese sheep. The result suggests that Chinese sheep derived from three independent maternal ancestors. Analysis of mismatch distribution showed unimodal distribution of three lineages. And Fu's test of selective neutrality revealed that three lineages were in departure from the neutrality, which the difference were significant ($P < 0.001$). It implies three lineages of Chinese sheep ever experienced population expansion possibly.

收稿日期: 2007-03-12

基金项目: “十一五”科技支撑计划(2006BAD13B08); “863”高技术专题(2006AA10Z198); 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所“家畜种质资源研究与创新”科技创新团队(ywf-td-1); 基本科研业务费专项“绵羊核心种质构建、重要基因发掘”(ywf-qn-8)

作者简介: 赵倩君(1980-), 女, 内蒙古包头人, 博士生, 主要从事动物遗传资源分子评价, E-mail: zqj126@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 马月辉, Tel: 010-62813463, E-mail: yuehui.ma@263.net

Key words: sheep; mtDNA; control region; origin

绵羊是人类较早驯化的家养动物,据考古学、解剖学证据及外貌形态特征,有学者认为中国也可能是家绵羊的起源中心之一^[1-5]。国外学者对线粒体控制区序列的研究表明绵羊有两个母系起源,其中欧洲的摩佛伦羊为家绵羊的母系始祖之一,同时排除了赤羊和盘羊作为家绵羊祖先的可能性^[6-9],而最新报道家绵羊可能至少存在 3 个母系起源^[10-14]。我国学者应用线粒体 DNA 标记开展了中国地方绵羊品种的遗传多样性研究,但关于我国的绵羊的起源仍存争议,有学者认为我国绵羊为双起源,也有学者认为我国绵羊存在 3 个母系起源^[10-11,13-17]。虽然已从分子水平对我国绵羊群体起源进化开展了相关研究,但以往研究对象很少涉及我国古老的绵羊品种一如西藏、云南和宁夏地区的

绵羊群体,因此有必要较全面的选择不同的地理分布区域进一步对中国绵羊起源进化进行研究。

本研究选取 7 个来源、分布地区与尾型不同的地方绵羊群体,对 mtDNA 控制区全序列进行测序分析,旨在探讨其起源进化和群体遗传结构,这对于我国绵羊起源进化研究、种质资源保护与开发都具有一定的指导意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以中国 7 个绵羊品种和 1 个引入品种的耳缘组织为试验材料(表 1)。剪取约 10 mg 耳缘组织,置于 75%乙醇中,于-70℃保存。

表 1 样本信息

Table 1 Information of sample

品种/群体代号 Breed/code	来源 Sources	尾型 Tail types	样本数量 Number of sample
苏尼特羊 Sunite sheep, SU	内蒙古苏尼特旗 Sunite county, Inner Mongolia	短脂尾 Short-fat tail	8
滩羊 Tan sheep, TAN	宁夏 Ningxia	短脂尾 Short-fat tail	9
阿勒泰绵羊 Altay sheep, A	新疆阿勒泰 Arletai region, Xinjiang	脂臀 Fat-rump	9
迪庆绵羊 Diqing sheep, DQ	云南香格里拉 Shangri-la country, Yunnan	细瘦尾 Thin tail	9
岗巴绵羊 Gangba sheep, GB	西藏岗巴县 Gangba county, Tibet	细瘦尾 Thin tail	9
豫西脂尾羊 Yuxi Fat-tailed sheep, YX	河南 Henan	长脂尾 Long-fat tail	8
大尾寒羊 Fat-tailed sheep, DW	山东临清市 Linqing city, Shandong	长脂尾 Long-fat tail	7
南非肉用美利奴 SA Mutton Merino, M	山西沁水县 Qinshui county, Shanxi	细瘦尾 Thin tail	2

1.2 方法

基因组 DNA 采用常规的酚氯仿抽提法提取,具体参考分子克隆^[18]。根据 Hiendler 等引物(正向引物:5'-TCATCTAGGCATTTTCAGTG-3',反向引物 5'-CTCACCATCAACCCCAAAGC-3')扩增线粒体 D-loop 区^[8]。其中每个品种随机选取 7~9 个体进行扩增测序。

PCR 反应体系体积为 12 μ L, MgCl₂ (1.5 mmol/L) 1.2 μ L, 10 \times buffer 1.2 μ L, dNTPs (0.25 mmol/L) 1.2 μ L, Primer mix (0.5 μ mol/L) 1.0 μ L, Taq DNA 聚合酶 1U 和 DNA 模板 50~100 ng。PCR 反应条件:95℃ 5 min; 94℃ 30 s,

55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 30 个循环;最终 72℃ 10 min, 4℃ 保存。

PCR 产物经琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒 (Tiangen, 天根生化科技有限公司) 进行纯化回收;取纯化产物与 PMD18-T 载体 (TAKARA) 连接,然后转化到大肠杆菌 DH5 α 菌株;筛选阳性克隆的质粒 DNA 进行测序。引物合成、测序由上海生物工程技术服务有限公司完成。

1.3 数据分析方法

应用 Clustal X (1.83) 软件对 D-loop 区序列比对并进行手工校对;利用 Dnasp 4.0 软件进行单倍型多样性、核苷酸多样性等分析;用 MEGA 3.0

软件分析变异位点,并采用邻接法(Neighbour-joining)和最大似然法(Maximum likelihood),以 Kimura 双参数模型构建系统发育树,并对拓扑图进行了自展检验(Bootstrap),重复抽样次数为 1 000 次。应用 NETWORK4.1.10 进行单元型网络分析。采用 Arlequin2.0 软件以核苷酸不配对分析(Mismatch analysis)和中型检验两种方法估测群体在过去是否发生扩张或经受多重瓶颈效应^[19]。

2 结果

2.1 绵羊线粒体 D-loop 区遗传变异分析

本研究中 7 个群体 59 个个体共发现 57 种单倍

型,其中 59 个个体的线粒体控制区全序列发现 206 个变异(多态)位点,其中 105 个单态位点(Singleton polymorphic site);101 个简约信息位点(Parsimony informative polymorphic site)。碱基 T、C、A、G 的含量分别为 29.8%、22.9%、32.9%和 14.4%。A+T 平均含量为 62.7%,C+G 平均含量为 37.3%,A、T 含量明显高于 C、G。7 个绵羊群体的核苷酸多样性和单倍型多样性见表 3。

2.2 系统发育分析

结合 GenBank 已发表的 D-loop 区序列,其中包括摩佛伦羊(AY091487/88)、盘羊(AY091490/91)、东方盘羊(AY091493/94)和羴羊(AJ238205、

表 2 7 个中国地方绵羊群体 D-loop 区遗传多样性参数(Mean±s)

Table 2 Genetic diversity parameters of D-loop in 7 Chinese local sheep populations (Mean±s)

群体 Population	单倍型多样性 Haplotype diversity	核苷酸多样性 Nucleotide diversity	平均核苷酸差异数 Average number of nucleotide differences
SU	1.000±0.052	0.030 4±0.002 7	31.611
A	1.000±0.062	0.028 6±0.004 0	29.143
DQ	0.972±0.064	0.029 2±0.002 9	32.222
GB	1.000±0.052	0.031 7±0.002 9	37.389
YX	1.000±0.076	0.029 0±0.004 1	32.000
DW	1.000±0.096	0.035 7±0.004 8	42.133
TAN	1.000±0.052	0.029 4±0.002 8	30.722
平均 Average	0.996±0.065	0.030 6±0.003 5	33.603

AJ238293、AJ238296、AJ238297)、欧洲家绵羊(AF039578)和墨西哥的家绵羊(AY582801-03)线粒体控制区序列,利用 MEGA3.0 软件选用邻接法(Neighbor-joining)和最大似然法(Maximum likelihood),构建绵羊线粒体 D-loop 区系统发育树,NJ 树和 ML 树(图略)均将中国绵羊分为(A、B 和 C)3 大支系。根据以前学者的研究结果及发表序列特征确定 3 大支系,其中支系 A(亚洲型),支系 B(欧洲型)和支系 C(新发现)(图 1)。7 个中国地方绵羊群体在 3 个支系中均有分布,而南非肉用美利奴羊仅在支系 B 中检测到。摩佛伦羊、欧洲和美洲的家绵羊与支系 B 聚在一起,表明摩佛伦羊对于中国绵羊的母系祖先形成产生过影响;而未发现羴羊、东方盘羊和盘羊对中国绵羊的母系起源形成贡献的分子依据。

2.3 网络分析

应用软件 NETWORK4.1.1.1(www.fluxus-engineering.com),采用中介网络分析法(Median

joining)对 8 个绵羊群体的线粒体控制区序列进行分析。网络结构图显示中国地方绵羊群体分为 3 个支系(图 2),且每个支系呈“星状”,支持 NJ 树的分析结果,提示我国绵羊存在有 3 个独立的母系起源。

2.4 群体扩张

核苷酸不配对分布曲线(Mismatch distribution)分析显示支系 A、B 和 C 均呈现单峰泊松分布;同时经 Fu's 中性检验,A、B、C 的 Fu's 值为 16.67($P=0.000$)、10.35($P=0.002$)、7.68($P=0.001$),显著偏离中性突变,表明绵羊群体的支系 A、B、C 在过去经受了群体扩张。

3 讨论

3.1 中国绵羊的群体遗传变异

单倍型多样性(Hd)和核苷酸多样性(π)为衡量群体 mtDNA 遗传变异的重要参数,群体的单倍型多样性和核苷酸多样性越高,说明群体的遗传变异



图 1 基于 D-loop 序列采用 NJ 法构建绵羊群体的系统发育树

Fig. 1 The Neighbor-joining phylogenetic tree constructed among sheep populations based on D-loop sequence

越丰富。兰蓉和涂正超对云南和青海的藏羊 mtDNA 限制性内切酶分析结果表明核苷酸多样性分别为 0.088% 和 0.12%；巩元芳等对我国 9 个地方绵羊品种 mtDNA 控制区 RFLP 分析表明核苷酸多样性仅为 0.014 2%，受试绵羊群体遗传变异较为贫乏^[15,20-21]。本研究分析则显示我国地方绵羊线粒体变异较为丰富，7 个群体线粒体的核苷酸多样性 (π) 平均值为 2.93%，其中大尾寒羊的核苷酸多样性值最高，为 3.420%，其次是滩羊，为 2.981%；豫西脂尾羊的核苷酸多样性值最小 (2.781%)；线粒体控制区的单倍型多样性丰富，群体间共享单倍型较少，单倍型多样性高达 0.972~1.000。与 LI 等采用测序

法对我国绵羊品种的 mtDNA 控制区部分序列分析的研究结果相似 ($\pi=0.0365$, $Hd=0.878$)^[16]。不同研究的结果显示绵羊的控制区的遗传变异参数差异较大，可能是由于采用的方法不同所造成，RFLP 法检测变异的灵敏度低于测序法；其次与所选序列有关，本研究选取了控制区全序列，而其他研究选择了控制区的高变区。

3.2 起源进化分析

关于绵羊的起源、驯化地及其传播路线众说纷纭，是亚欧两个起源还是存在多个起源一直存在争议。考古学学者认为近东“肥沃的新月形”地区为家畜驯化地，并以此为中心向周围地区扩散^[22]。早

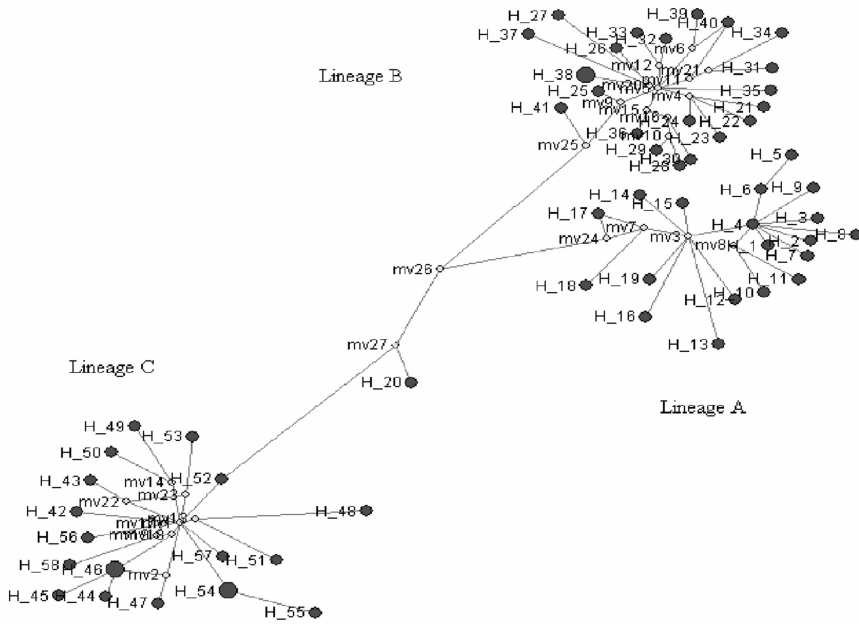


图 2 8 个绵羊群体的网络进化分析

Fig. 2 Network analysis based on mtDNA haplotypes of 8 sheep populations

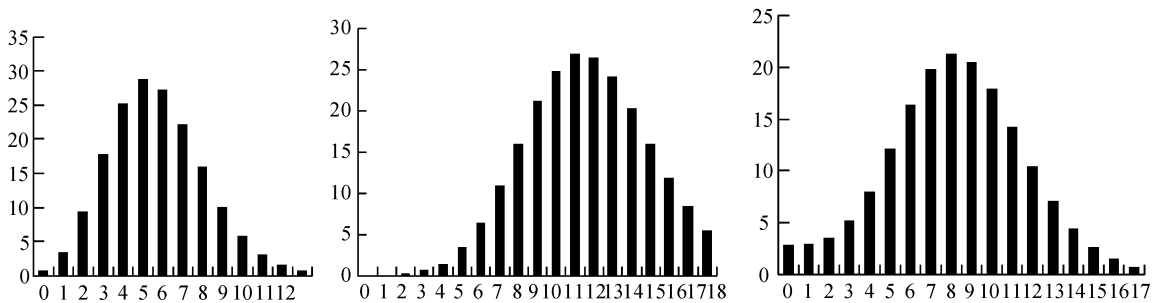


图 3 绵羊群体 D-loop 区核酸不配对分析:支系 A(左),支系 B(中),支系 C(右)

Fig. 3 Mismatch distribution of sheep mtDNA D-loop lineage A (left), lineage B (middle) and lineage C (right)

在 1996 年 Wood 等发现绵羊的线粒体 DNA 存在两种类型;Hiendler 通过对线粒体分析表明家绵羊有两个母系始祖,其中之一与欧洲摩弗伦有关,但盘羊、东方盘羊等对家绵羊的基因库无贡献^[7-8]。关于中国绵羊的起源进化研究早期以考古学研究、绵羊的外形特征及解剖学为依据,认为盘羊和赤盘羊及其亚种与中国家绵羊最有血缘关系。巩元芳、赵兴波等采用限制性酶切片多态性和测序分析线粒体控制区,结果同样表明中国绵羊存在亚洲和欧洲两大起源^[15-17]。通过对中国、蒙古、土耳其及近东等地区的绵羊线粒体 DNA 分析认为绵羊还存在第 3 个独立的母系起源^[10-11,13-14]。而最新对欧洲、高加索及中亚地区的绵羊的 mtDNA 控制区序列分析发现现代家绵羊存在 4 个支系,其中在高加索地区

绵羊发现了 4 种单倍型组,中亚地区的绵羊发现 3 种单倍型组,而在欧洲北部绵羊群体中未检测到 C 单倍型组,揭示欧洲不是唯一的绵羊驯化地,近东也可能是驯化地区,推测可能存在由近东经俄罗斯抵达欧洲这一绵羊母系迁移路线。目前至于支系 C 和支系 D 是母系起源、还是基因渗入形成,还需进行深入研究^[23]。根据 D-loop 全序列构建了 7 个来源不同的绵羊群体的 NJ 树表明存在 3 个支系,从而验证中国绵羊存在有 3 个独立的母系起源。Chen 和 Pedrosa 估计(A、B、C)3 个支系发生分化时间大约在 16 万年~76 万年,远远早于绵羊的驯化时间(8 000~9 000 年前)^[11-12],暗示绵羊至少有 3 个支系是在不同地区独立驯化的^[12,23]。

网络分析法由动物学家 Udo Rempe 提出,该方

法较传统的系统发育分析方法更适合于家养动物系统发育关系的分析,适合种内水平系统发育关系的研究,已被应用于人类、家养动物等进化研究^[24]。从图4可以看到,中国的绵羊群体明显分为3个支系,且3个支系呈“星状”相对独立,印证了NJ法系统发育分析结果,揭示中国绵羊存在3个母系起源。核酸不配对分布曲线分析及中型检验表明中国绵羊的3个支系在过去的驯化中经受过扩张作用,这与Tapio等研究结果一致^[23]。

通过对线粒体控制区全序列系统发育分析和网络进化研究,显示我国绵羊存在3个独立的起源。但是上述研究仅仅从线粒体基因组——母系角度对绵羊起源进行考察,而忽略了父系对于绵羊起源演化的影响,应从核基因或Y染色体进一步进行深入研究。

参考文献:

[1] 谢成侠. 中国养牛羊史(附养鹿简史)[M]. 北京:农业出版社,1985.

[2] 冯维祺. 我国古代绵羊品种形成初考[J]. 农业考古, 1991, 3: 338-345.

[3] 薄吾成. 藏羊渊源初探[J]. 农业考古, 1987, 1: 276-280.

[4] 李志农. 中国养羊学[M]. 北京:农业出版社,1993.

[5] 中国羊品种志编写组. 中国羊品种志[M]. 上海:上海科学技术出版社,1988.

[6] WOOD N J, PHUA S H. Variation in the control region sequence of the sheep mitochondrial genome [J]. Anim Genet, 1996, 27(1): 25-33.

[7] HIENDLEDER S, KAUPÉ B, WASSMUTH R, et al. Molecular analysis of wild and domestic sheep questions current nomenclature and provides evidence for domestication from two different subspecies[J]. Proc R Biol Sci, 2002, 269: 893-904.

[8] HIENDLEDER S, MAINZ K, PLANTE Y, et al. Analysis of mitochondrial DNA indicates that domestic sheep are derived from two different ancestral maternal sources: no evidence for contributions from urial and argali sheep[J]. Heredity, 1998, 89: 113-120.

[9] MEADOWS, J R S, LI K, KANTANEN J, et al. Mitochondrial sequence reveals high levels of gene flow between breeds of domestic sheep from Asia and Europe[J]. Heredity, 2005, 96: 494-501.

[10] GUO J, DU L X, MA Y H, et al. A novel maternal lineage revealed in sheep (*Ovis aries*) [J]. Anim

Genet, 2005, 36(4): 331-336.

[11] CHEN S Y, DUAN Z Y, SHA T, et al. Origin, genetic diversity, and population structure of Chinese domestic sheep[J]. Gene, 2006, 376(2): 216-223.

[12] PEDROSA S, UZUN M, ARRANZ J J, et al. Evidence of three maternal lineages in near eastern sheep supporting multiple domestication events[J]. Proc R Soc Lond Biol Sci, 2005, 272: 2 211-2 217.

[13] 管松, 何晓红, 浦亚斌, 等. 中国西南地区5个地方绵羊群体 mt DNA 遗传多样性及系统进化研究[J]. 畜牧兽医学报, 2007, 38(3): 219-224.

[14] 成述儒, 韩建林, OLIVER HANOTTE, 等. 中国绵羊群体 mtDNA D-loop 的遗传多样性分析[J]. 甘肃农业大学学报, 2005, 140(4): 440-447.

[15] 巩元芳, 李祥龙, 刘铮铸. 我国主要地方绵羊品种 mt DNA 细胞色素 b 基因 PCR-RFLP 研究[J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(7): 649-653.

[16] LI X L, GONG Y F, LIU Z Z, et al. Study on tandem repeat sequence variation in sheep mtDNA D-loop region [J]. Acta Genetica Sinica, 2006, 33(12): 1 087-1 095

[17] 赵兴波, 储明星, 李 宁, 等. 绵羊线粒体 DNA 控制区 5'端序列 PCR-SSCP 与序列分析[J]. 遗传学报, 2001, 28(3): 225-228.

[18] SAMBROOK H, FRITSH E F, MANIATIS T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. Beijing: Science Press, 2003.

[19] SCHNEIDER S, ROESSLI D, EXCOFFIER L. Arlequin ver. 2.000; A software for population genetic data analysis [available from <http://lgb.unige.ch/arlequin/software/>]. University of Geneva, Switzerland, 2000.

[20] 兰 蓉, 洪琼花, 高原汉, 等. 云南绵羊线粒体 DNA 遗传多态性研究[J]. 遗传, 1998, 20(1): 20-23.

[21] 涂正超, 张亚平. 藏绵羊线粒体 DNA 遗传多样性研究[J]. 畜牧兽医学报, 1998, 29(2): 132-135.

[22] LOFTUS R T, MACHUGH D E, BRADLEY D G, et al. Evidence for two independent domestication in cattle[J]. Proc Natl Acad Sci, 1994, 91: 2 575-2 761.

[23] TAPIO M, MARZANOV N, OZEROV M, et al. Sheep Mitochondrial DNA variation in European, Caucasian, and central Asian areas [J]. Mol Biol Evol, 2006, 23(9): 1 776-1 783.

[24] BANDEL T H J, FORSTER P, ROHL A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies[J]. Mol Biol Evol, 1999, 16: 37-48.