

# 藏系绵羊 mtDNA 和 Y 染色体遗传多样性的检测与系统进化关系的分析

董泽生<sup>1</sup> 高雪<sup>2</sup> 吴燕华<sup>2</sup> 李蕾蕾<sup>3</sup> 付弘赞<sup>4</sup> 张瑞娜<sup>2</sup> 贾功雪<sup>2\*</sup>

(1. 海东市乐都区畜牧兽医站, 青海 海东 810700; 2. 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001;

3. 中华人民共和国农业农村部, 北京 100125; 4. 青海省畜牧总站, 西宁 810008)

中图分类号: S826.8<sup>+</sup>3; S813.1

文献标识码: A

文章编号: 1004-7034(2019)04-0045-05

**摘要:** 为了评估青海地区藏系绵羊各类群的遗传结构与分子进化关系, 试验选择青海地区四个典型的地理生态类群(山谷型、欧拉型、高原型和扎什加型)藏羊, 提取血液基因组 DNA 后, 分别对线粒体 D-loop 区序列和 Y 染色体 Sry 基因序列进行特异性扩增并测序。结果表明: D-loop 序列的核苷酸多样性为  $0.031 \pm 0.004$ , 单倍型多样性为  $0.994 \pm 0.006$ ; 而 Sry 序列的核苷酸多样性为  $0.046 \pm 0.005$ , 单倍型多样性为  $0.861 \pm 0.044$ 。说明高原型藏羊在母系遗传上更接近扎什加型藏羊, 而在父系遗传上扎什加型藏羊与其他三个类群间的隔离较为明显, 三个类群在父系遗传上的基因交流更为频繁。

**关键词:** 藏系绵羊; 线粒体 DNA; Y 染色体; 系统发育; 遗传多样性; 遗传距离

藏系绵羊是青藏高原独立分布、对高原环境高度适应的绵羊品种, 在高原畜牧业发展和当地人民生产生活中具有不可替代的地位<sup>[1]</sup>。据统计, 青海省的藏羊饲养量超过 1 000 万头, 约占全省绵羊总量的 78.8%<sup>[2]</sup>。长期以来, 由于青藏高原的地理屏障, 藏羊很少受到其他绵羊种群的影响, 形成了独特的遗传特征。然而, 随着生态环境的恶化、外来商品羊的引入以及遗传管理和繁育措施的缺乏, 本土藏羊种群正面临着体型变小、生产性能下降等退化威胁<sup>[3]</sup>。依据体型外貌、生产性能与分布地域, 青海藏羊可以划分为不同的类群。除了国家畜禽遗传资源委员会认定的贵德黑裘皮羊外, 还有高原型、山谷型、欧拉型和分布在玉树地区高山牧场、具有独特表型特征的扎什加型藏羊。然而, 目前仍然缺乏对各个藏羊类群的起源、遗传多样性与系统发育关系的系统研究<sup>[4]</sup>。本试验利用线粒体基因组(mtDNA) D-loop 区序列和 Y 染色体 Sry 基因启动子区序列对 4 个典型藏羊类群进行研究, 分别从母源、父源遗传角度对藏羊的遗传多样性、遗传距离和系统进化进行探讨, 以期对藏系

绵羊资源的保护和合理利用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物及样品

山谷型(LD)、欧拉型(HN)、高原型(TJ)和扎什加型(QML)藏羊, 分别采自青海省海东市乐都区、黄南藏族自治州河南蒙古族自治县、海西蒙古族与藏族自治州天峻县和玉树藏族自治州曲麻莱县, 每个类群采集 15 只以上。野外采样时, 每只藏羊颈静脉采血 3.0 mL, 置于含抗凝剂的采血管中, 运回实验室 -80 °C 保存。采样点及样本信息见 179 页彩图 1。

### 1.2 仪器及试剂

血液基因组 DNA 提取试剂盒(型号为 DP318)、DNA 回收试剂盒(型号为 DP209), 购自 Tiangen 公司; Nanodrop 超微量分光光度计(型号为 ND-1000), 购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司; PCR 仪(型号为 A200), 购自杭州朗基科学仪器有限公司; 2×Taq Master Mix(型号为 E005), 购自 Novoprotein 公司。

### 1.3 总 DNA 的提取

取藏系绵羊血液样品 100  $\mu$ L, 使用血液基因组 DNA 提取试剂盒提取总 DNA, 并使用超微量分光光度计测定 DNA 浓度并稀释至 100 ng/ $\mu$ L。

### 1.4 目的片段的扩增与测序

使用引物 D-loop-F (5'-GCCCACTATCAA-CACCCAAAG-3') 和 D-loop-R (5'-AATGGCGA-TTTTAGATGAGATGG C-3') 扩增 mtDNA D-loop 区

收稿日期: 2018-04-09; 修回日期: 2018-11-05

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFC0501805); 青海省重点研发与转化计划项目(2017-NK-114); 青海省自然科学基金项目(2017-ZJ-915Q)

作者简介: 董泽生(1968—), 男, 高级兽医师, 本科, 研究方向为高原家畜育种与饲养管理, qhlddzs@163.com。

\* 通信作者: 贾功雪(1989—), 男, 助理研究员, 博士, 研究方向为高原动物遗传改良, jiaogongxue@nwipb.cas.cn。



823 bp 的目的片段<sup>[5]</sup>;使用引物 Sry-F (5'-AGCTC-CAGAATATTTACTGACCT-3') 和 Sry-R (5'-GAA GGCAAATGCAGAGACAA-3') 扩增 Y 染色体 Sry 基因启动子区 130 bp 的目的片段<sup>[6]</sup>。PCR 扩增体系: 2×Taq Master Mix (Novoprotein) 25.0 μL, 上、下游引物各 2.5 μL, DNA 模板 2.0 μL, 最后用 ddH<sub>2</sub>O 补齐至 50.0 μL。PCR 扩增程序: 94 °C 预变性 90 s; 94 °C 变性 20 s, 58 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 60 s, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min。PCR 扩增结束后, 将 PCR 产物全量加入 2.0% 琼脂糖凝胶中进行电泳, 利用凝胶成像分析仪观察。切下目的片段胶块, 使用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (Tiangen) 进行回收纯化, 将纯化后的样品送至苏州金唯智生物科技有限公司进行测序。

### 1.5 数据的统计分析

全部测序结果使用 MUSCLE 软件进行序列同源性比对; 使用 BioEdit 软件对同源序列进行编辑、拼接和校正; 使用 Mega 软件分别计算 D-loop 与 Sry 序列

的核苷酸组成、遗传距离, 并构建 Neighbor-Joining (NJ) 系统发育树; 使用 DNASP 软件对核苷酸多样性 (Pi)、单倍型多样性 (Hd)、单倍型数 (Hn) 以及平均核苷酸差异数 (Dn) 等进行统计及分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 DNA 多态性分析

基于 GenBank 获取的 D-loop 参考序列 (NC\_001941.1) 与 Sry 参考序列 (AF026566.1), 分别比对全部测序结果。D-loop 序列位于线粒体基因组 15 388~16 210 bp 区域, Sry 序列位于 Y 染色体 Sry 基因启动子区 3 103~3 232 bp 区域。遗传多样性分析显示, D-loop 序列的核苷酸多样性与单倍体多样性分别为 0.031±0.004 和 0.994±0.006, 而 Sry 序列的核苷酸多样性与单倍体多样性分别为 0.046±0.005 和 0.861±0.044。在四个藏羊类群中, D-loop 序列两项参数的波动范围在 0.009~0.052 和 0.939~1.000 之间, 而 Sry 序列两项参数的波动范围在 0.000~0.058 和 0.000~1.000 之间, 见表 1。

表 1 青海藏系绵羊 4 个类群的 D-loop 与 Sry 遗传多样性分析

类群	D-loop				Sry			
	Pi	Hd	Hn	Dn	Pi	Hd	Hn	Dn
LD	0.011±0.001	0.939±0.048	8	8.318	0.053±0.006	0.970±0.044	10	2.742
HN	0.052±0.007	1.000±0.034	12	36.909	0.047±0.006	0.909±0.056	7	2.470
TJ	0.018±0.003	1.000±0.001	12	13.061	0.058±0.009	1.000±0.034	12	2.970
QML	0.009±0.002	0.955±0.057	10	6.515	0.000±0.000	0.000±0.000	1	0.000
合计	0.031±0.004	0.994±0.006	42	21.959	0.046±0.005	0.861±0.044	22	2.395

### 2.2 遗传距离分析

对 4 个类群的 D-loop 与 Sry 序列组间与组内遗传距离分别进行计算, 结果见表 2。

表 2 青海藏系绵羊四个类群 D-loop(对角线以上) 和 Sry(对角线以下) 遗传距离

类群	LD	HN	TJ	QML
LD	0.011/0.055	0.055	0.016	0.013
HN	0.052	0.054/0.049	0.057	0.053
TJ	0.060	0.058	0.018/0.060	0.014
QML	0.045	0.049	0.038	0.009/0.000

由表 2 可知: 依据 D-loop 序列, 各组的组内遗传距离在 0.009~0.054 之间, 组间遗传距离在 0.013~0.057 之间; 依据 Sry 序列, 各组的组内遗传距离在 0.000~0.060 之间, 组间遗传距离在 0.038~0.060 之间。

### 2.3 系统发育关系分析

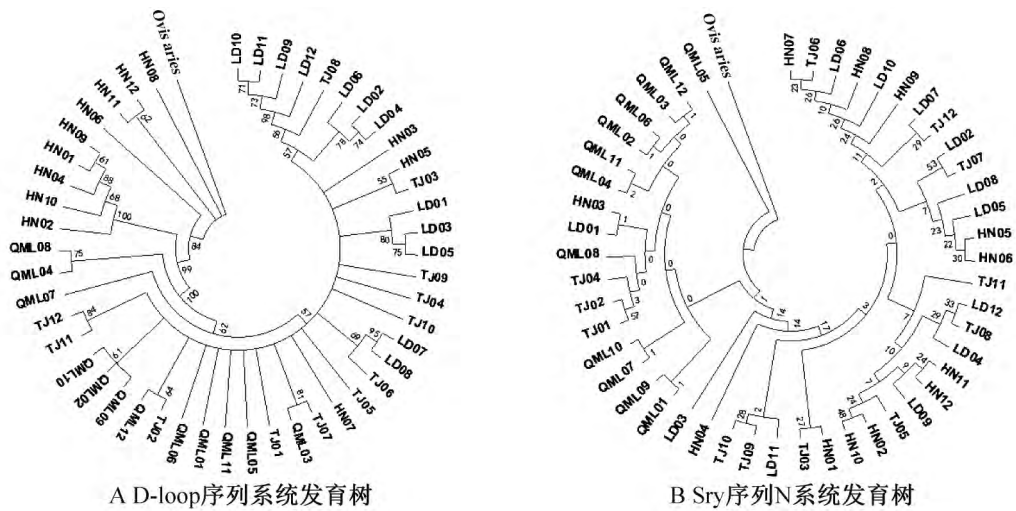
为了进一步分析四个藏羊类群的系统发育关系, 分别构建了 D-loop 序列和 Sry 序列的 NJ 系统发育树, 结果见图 2。

由图 2 可知: 藏羊的父源基因更多源自于东方盘

羊, 而母源基因则与摩仑弗羊更为接近; 在进化关系方面, 从父源遗传上看, 4 个藏羊类群表现出明显不同的进化特征, 其中欧拉型藏羊更接近于山谷型藏羊, 而高原型藏羊与保守的扎什加型藏羊的亲缘关系最近; 从母源遗传上看, 山谷型和高原型藏羊均与扎什加型藏羊相似, 而欧拉型藏羊的进化特征则与其他三种类型藏羊区别较大。

## 3 讨论

探明种群间的遗传多样性和系统发育关系是动物遗传资源保护的必要前提。近年来, 越来越多的研究开始借助分子手段对绵羊的遗传进化进行系统分析<sup>[7]</sup>。Chen S. Y. 等<sup>[8]</sup>对来自 13 个地理区域的 19 个中国本土绵羊品种进行研究, 结果线粒体细胞色素 b 的核苷酸多样性和单倍型多样性分别为 0.006 9~0.023 9 和 0.454 5~1.000 0。而 Liu J. 等<sup>[9]</sup>对藏羊群体 mtDNA D-loop 区的研究结果表明, 藏羊的核苷酸多样性和单倍型多样性分别为 0.009~0.027 和 0.900~1.000, 这与本研究结果一致, 说明藏羊与其他绵羊品种比较具有较高的线粒体遗传多样性<sup>[10]</sup>。而本研究发现, 藏羊 Sry 序列的遗传多样性相对较低, 这之前关于中国和欧亚北部绵羊的报



注: 分别基于 4 个藏羊类群的母源 D-loop 序列多态性和父源 Sry 序列多态性, 以绵羊参考基因组序列为外群分析而来; 不同样本间的遗传距离用数字表示。

图 2 青海藏系绵羊四个类群的 D-loop 序列和 Sry 序列的 NJ 系统发育树

道一致<sup>[11-12]</sup>。青海藏羊保持了更高的核苷酸多样性和单倍型多样性, 这更有利于其对青藏高原环境的适应<sup>[13]</sup>。

先前的藏羊线粒体研究结果显示, 种群内的遗传距离在 0.009~0.039 之间, 种群间的遗传距离在 0.014~0.040 之间<sup>[9]</sup>。关于线粒体遗传距离的结果略高, Sry 序列的遗传距离要高于 D-loop 序列, 说明雌性藏羊的基因交流较雄性更为频繁<sup>[14]</sup>; 而欧拉型藏羊的遗传距离要远高于其他类群, 这可能是由于欧拉型藏羊的地理位置使得其更易受到其他品种的基因渗入。

本研究结果表明, 从母源进化上看, 高原型藏羊更为接近扎什加型藏羊, 而山谷型和欧拉型藏羊则存在一定程度的遗传分化; 从父源进化上看, 三个类群均与扎什加型藏羊存在较大差异, 而三个类群间则存在较丰富的基因交流。本研究对前期关于藏羊系统发育与进化的研究进行了有效补充, 并且提供了关于青海藏羊父系遗传的新证据, 对于各个藏羊类群的保种选育具有重要的指导意义。

#### 参考文献:

[1] ZHAO Y, ZHAO E, ZHANG N, et al. Mitochondrial DNA diversity, origin, and phylogenetic relationships of three Chinese large-fat-tailed sheep breeds [J]. Trop Anim Health Prod, 2011, 43(7): 1405-1410.  
 [2] 郭万春, 郭占泽. 青海藏羊体尺、毛特性及相关性研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2014(09 上): 77-79.  
 [3] ZHAO E, YU Q, ZHANG N, et al. Mitochondrial DNA diversity and the origin of Chinese indigenous sheep [J]. Trop Anim Health Prod, 2013, 45(8): 1715-1722.  
 [4] 晁燕, 毛学荣, 雷良煜, 等. 藏系绵羊 mtDNA 遗传结构及多样性研究 [J]. 家畜生态学报, 2015, 36(10): 16-21.

[5] GUANGXIN E, YONG-JU Z, RI-SU N, et al. Meta-analysis evidence of maternal lineages in Chinese Tibetan sheep using mtDNA D-loop panel [J]. Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal, 2017, 28(4): 579-583.  
 [6] NIEMI M, BLÄUER A, ISO-TOURU T, et al. Mitochondrial DNA and Y-chromosomal diversity in ancient populations of domestic sheep (*Ovis aries*) in Finland: comparison with contemporary sheep breeds [J]. Genet Sel Evol, 2013, 45: 2.  
 [7] ZENG X C, CHEN H Y, HUI W Q, et al. Genetic diversity measures of 8 local sheep breeds in northwest of China for genetic resource conservation [J]. Asian-Australas J Anim Sci, 2010, 23(12): 1552-1556.  
 [8] 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.  
 [9] LIU J, DING X, ZENG Y, et al. Genetic diversity and phylogenetic evolution of Tibetan sheep based on mtDNA D-loop sequences [J]. PLoS One, 2016, 11(7): e0159308.  
 [10] 罗玉柱, 成述儒, BATSUURI L, 等. 用 mtDNA D-环序列探讨蒙古和中国绵羊的起源及遗传多样性 [J]. 遗传学报, 2005, 32(12): 1256-1265.  
 [11] ZHANG G, VAHIDI S M, MA Y H, et al. Limited polymorphisms of two Y-chromosomal SNPs in Chinese and Iranian sheep [J]. Anim Genet, 2012, 43(4): 479-480.  
 [12] ZHANG M, PENG W F, YANG G L, et al. Y chromosome haplotype diversity of domestic sheep (*Ovis aries*) in northern Eurasia [J]. Anim Genet, 2014, 45(6): 903-907.  
 [13] 赵君, 才让闹日, 郭淑珍, 等. 欧拉羊与山谷型藏羊杂交 F1 代羔羊补饲兼放牧育肥试验效果观察 [J]. 畜牧兽医杂志, 2011, 30(3): 24-25.  
 [14] WANG X, CHEN H, LEI C Z. Genetic diversity and phylogenetic analysis of the mtDNA D-loop region in Tibetan sheep [J]. Asian-Australas J Anim Sci, 2007, 20(3): 313-315.

(下转第 51 页)





## 参考文献:

- [1] 杨运清, 缪尧源. 动物生长曲线拟合方法的探讨[J]. 畜牧兽医学报, 1992, 23(3): 219-224.
- [2] 杨海明, 徐琪, 戴国俊. 禽类三种常用生长曲线浅析[J]. 中国家禽, 2004( S1): 164-166.
- [3] 张红, 龚道清, 张军, 等. 溧阳鸡生长曲线分析与拟合的研究[J]. 畜牧与兽医, 2006, 38(2): 7-9.
- [4] 黄骏腾, 苏瑛, 黄汉光, 等. 雷州黑鹅生长规律及其生长曲线模型拟合分析[J]. 广东农业科学, 2015, 42(1): 105-108.
- [5] 肖慎华, 闻涛, 虞德兵, 等. 樱桃谷鸭生长曲线拟合与比较分析[J]. 畜牧与兽医, 2008, 40(11): 45-47.
- [6] 叶保国, 林哲敏, 张艳, 等. 第十四次全国家禽科学学术讨论会论文集[C]. 哈尔滨: 中国农业科学技术出版社, 2009.
- [7] 杨宁, 吴常信, 程端仪. 不同品系鹌鹑的生长曲线分析[J]. 中国家禽, 1990(1): 23-26.
- [8] 张小翠, 王翠玲, 曹平华. 生物统计学理论与 SPSS 软件应用[M]. 北京: 原子能出版社, 2011.
- [9] 李俊营, 詹凯, 杨秀娟, 等. 黄山黑鸡体重生长发育规律研究[J]. 西南农业学报, 2014, 27(3): 1295-1299.
- [10] 马志刚, 陈志峰, 陈遇英. 四川白鹅与籽鹅杂交后代体重、体尺和屠宰性能的研究[J]. 现代畜牧科技, 2018(2): 3-4.
- [11] 苏燕辉, 原小雅, 王苗苗, 等. 扬州鹅及杂交后代生长曲线拟合分析[J]. 中国畜牧杂志, 2016, 52(3): 6-9.

## The analysis of growth curves of different goose varieties( lines)

GU Lihong<sup>1</sup>, LIAO Suya<sup>1,2</sup>, ZHOU Qionxiang<sup>3</sup>, XU Tieshan<sup>4</sup>, YE Baoguo<sup>1</sup>,  
YANG Shaoxiang<sup>1</sup>, XING Manping<sup>1</sup>, LIN Zhemin<sup>1\*</sup>

( 1. Institute of Animal & Veterinary Research, Hainan Academy of Agricultural Sciences, Haikou 571100, China;

2. College of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou 570228, China;

3. Hainan Haipingda Animal Science Group Co., Ltd., Chengmai 571924, China;

4. Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy Tropical Agricultural Sciences, Danzhou 571737, China)

**Abstract:** To explore the growth rules, provide more suitable feeding plan, and present the best production performances of Ding' an goose, Zhe Ding F1 goose (Zhedong White goose male × Ding' an goose female), and Yang Ding F1 goose (Yangchun White goose male × Ding' an goose female), the body weights of 100 geese (with male and female equally) were measured once a week, and the growth curves of each line were fitted using Gompertz model. The results showed that the growth curves of three lines were all well fitted with the fitting relevance ( $R^2$ ), and were higher than 0.99. In addition, Zhe Ding F1 goose and Yang Ding F1 goose had the better growth performances than Ding' an goose, and their growth periods were also shorter than that of Ding' an goose. It indicated that the growth curves of Ding' an goose, Zhe Ding F1 goose and Yang Ding F1 goose could be well fitted using Gompertz model, while the growth curves could be used to analysis the growth rules of geese of Ding' an goose, Zhe Ding F1 goose and Yang Ding F1.

**Keywords:** growth curve; Ding' an goose; cross-breed; production performance; Gompertz model

(019)

(上接第47页)

## Genetic diversity and phylogenetic evolution of mitochondrial DNA and Y-chromosome in Tibetan sheep

DONG Zesheng<sup>1</sup>, GAO Xue<sup>2</sup>, WU Yanhua<sup>2</sup>, LI Leilei<sup>3</sup>, FU Hongyun<sup>4</sup>, ZHANG Ruina<sup>2</sup>, JIA Gongxue<sup>2\*</sup>

( 1. Ledu Animal Husbandry and Veterinary Station of Haidong City, Haidong 810700, China;

2. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China;

3. Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China, Beijing 100125, China;

4. Qinghai Animal Husbandry Station, Xining 810008, China)

**Abstract:** To evaluate the genetic structure and phylogenetic relationships of Tibetan sheep breeds in Qinghai Plateau, the study obtained blood samples from four distributed geographic ecotype populations (Valley Type, Euler Type, Plateau Type and Zhashijia Type). The displacement-loop (D-loop) region on mitochondrial DNA (mtDNA) and the sex determining region Y (Sry) gene sequences on Y chromosome were cloned and sequenced. The results showed that the nucleotide diversity and haplotype diversity were  $0.031 \pm 0.004$  and  $0.994 \pm 0.006$  based on D-loop sequences, and  $0.046 \pm 0.005$  and  $0.861 \pm 0.044$  based on Sry sequences, respectively. The phylogenetic analysis revealed that the Plateau type populations were closely related to Zhashijia Type populations maternally, while Zhashijia Type populations exhibited obvious isolation with other three populations paternally. In contrast, the gene communication among three populations more frequently in the patrilineal genetics.

**Keywords:** Tibetan sheep; mitochondrial DNA; Y-chromosome; phylogenetics development; genetic diversity; genetic distance

(019)

· 畜牧科学 ·

### 藏系绵羊 mtDNA 和 Y 染色体遗传多样性与系统进化

(作者董泽生等,正文见第 45-47,51,179 页)

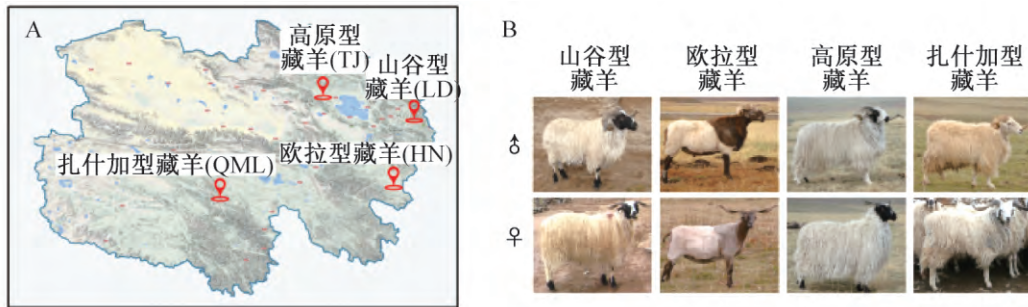


图 1 青海藏系绵羊 4 个类群的地理位置分布(A)和代表性个体(B)

· 畜牧科学 ·

### 不同鹅品种(系)生长曲线分析

(作者顾丽红等,正文见第 48-51,179 页)

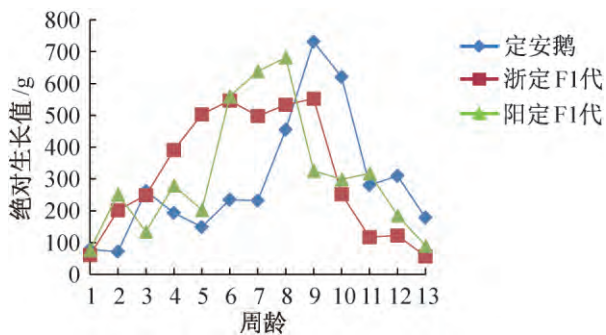


图 1 定安鹅及其杂交组合绝对生长曲线

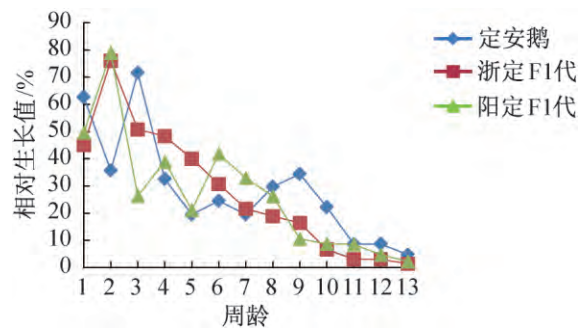


图 2 定安鹅及其杂交组合相对生长曲线

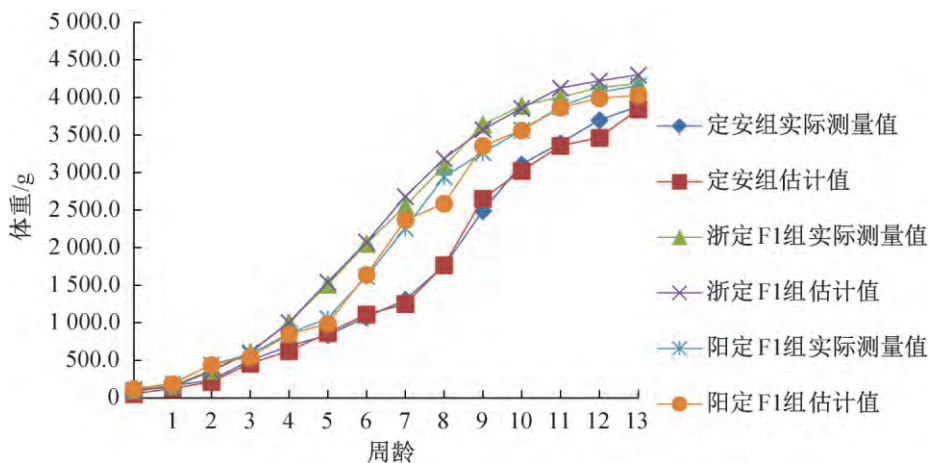


图 3 定安鹅及其杂交组合实际生长曲线与拟合值比较