

中国牛亚科家畜 GH 基因编码区序列的遗传变异研究

耿荣庆^{1,2}, 常洪^{2*}, 李永红², 冀德君², 常春芳², 王兰萍¹, 常国斌²

(1. 盐城师范学院生命科学与技术学院, 盐城 224051; 2. 扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009)

摘要: 采用 PCR 产物直接双向测序法, 分段扩增普通牛、瘤牛、牦牛、大额牛和亚洲水牛共 5 个牛种的 GH 基因, 并拼接成编码区全序列, 分析中国牛亚科家畜不同牛种 GH 基因编码区序列变异及其分子进化特征。结果表明, 牛 GH 基因编码区序列全长 654 bp, 种间核苷酸突变率在 0.1%~1.84%。5 个牛种编码区序列定义了 10 种单倍型, 瘤牛的单倍型多样性最高, 大额牛和水牛均无单倍型多样性。GH 基因编码区序列的密码子使用存在偏倚性, 共发现了 25 个偏好性密码子。核苷酸的替代以转换为主, 转换明显高于颠换, 转换/颠换比为 3.0。非同义突变位点远远少于同义突变位点, 同义与非同义替代发生的速率比都小于或等于 1, 表明 GH 基因编码区序列不受达尔文正选择的影响。以 GH 基因单倍型序列为基础的分子进化树表明, 水牛与普通牛、瘤牛、牦牛、大额牛间分化很明显; 普通牛、瘤牛、牦牛、大额牛间序列分化并不明显, 并且它们共同拥有一条相同的祖先核苷酸序列。说明中国牛亚科家畜 GH 基因编码区序列的变异相当贫乏, 并且由于功能的约束表现得相当保守, 进化速率相当缓慢。

关键词: 牛亚科; 生长激素基因; 编码区序列; 分子进化

中图分类号: S823.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2008)12-1779-06

Variation of Complete Coding Sequence of GH Gene in Chinese Bovinae Species

GENG Rong-qing^{1,2}, CHANG Hong^{2*}, LI Yong-hong², JI De-jun²,

CHANG Chun-fang², WANG Lan-ping¹, CHANG Guo-bin²

(1. School of Life Science and Technology, Yancheng Teachers University, Yancheng 224051, China; 2. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: CDS of GH gene of 5 bovine species *Bos taurus*, *Bos indicus*, *Bos grunniens*, *Bos frontalis* and *Bubalus bubalis* was connected from PCR fragments by standard double-strand DNA sequencing method to analyze the variation and molecular evolution of complete coding sequence (CDS) of growth hormone (GH) gene in Chinese bovine species. The result showed that CDS of GH gene was 654 bp in length and mutation rate was between 0.1% and 1.84% of different bovine species. Total 10 haplotypes were defined according to sequences. *Bos indicus* possessed the highest haplotype diversity and no haplotype diversity was observed in *Bos frontalis* and *Bubalus bubalis*. There was codon usage bias in CDS and 25 preferenced codon were discovered. The predominant substitution model of nucleotide was transition and transition was higher than transversion with the ratio of 3.0. Nonsynonymous sites were far less than synonymous sites. The ratio of synonymous and nonsynonymous substitution were all less or equal to one manifesting that it was not effected by Darwin positive selection. Molecular tree based on haplotype of GH sequence showed that differentiation was very apparent between *Bubalus bubalis* and *Bos taurus*, *Bos indicus*, *Bos grunniens*, *Bos frontalis*. There was no apparent differentiation among *Bos taurus*, *Bos indicus*, *Bos grunniens*, *Bos frontalis* and they shared an alike ancestral sequence. CDS of GH

收稿日期: 2007-11-07

基金项目: 国家自然科学基金(30571323); 江苏省高校自然科学基金基础研究项目(08KJ230002)

作者简介: 耿荣庆(1976-), 男, 江苏盐城人, 讲师, 博士, 主要从事动物遗传资源研究, E-mail: rqqeng@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 常洪, Tel: 0514-7997203, Fax: 0514-7350440, E-mail: hoch@yzcn.net

gene in Chinese bovine species was fairly conservative under functional constraint during the course of evolution together with few variation and low evolution velocity.

Key words: bovine; growth hormone gene; complete coding sequence; molecular evolution

牛生长激素(Bovine Growth Hormone, bGH)是由脑垂体前叶产生的多肽激素,它的合成直接受生长激素基因调控,具有促进牛的生长发育、提高泌乳性能和产肉能力等基本功能^[1-4]。正是由于如此重要的生物学功能,bGH基因的研究得到了广泛的重视。已经将bGH基因定位于第19号染色体上,包含5个外显子、4个内含子以及5'和3'端侧翼序列,全长约2 856 bp^[5]。目前,已有关于中国不同牛种GH基因的研究^[6-8],但涉及的牛种相对较少,缺乏牛种间的比较分析资料,也未见牛亚科家畜GH基因分子进化方面的报道。此外,Forsyth和Wallis^[9]报道,大部分哺乳动物GH基因编码区的进化速率都很缓慢,但在灵长类和反刍动物中却发生了快速进化,相当于其他类群的20~25倍,并将这种在很慢的进化速率中插入了一些类群的快速进化的模式称为“插曲式”的进化模式。研究在测定中国牛亚科家畜不同牛种GH基因编码区序列的基础上,分析其遗传变异特点,为探讨中国牛亚科家畜GH基因编码区序列的分子进化特征以及为进一步阐明适应进化与分子进化的关系提供客观依据。

1 材料与方法

1.1 材料

肝素钠溶液抗凝的血液样本分别取自普通牛(蒙古牛,新疆维吾尔自治区和静县巴音布鲁克区)、瘤牛(雷琼牛,广东省雷州市郊区)、牦牛(巴州牦牛,新疆维吾尔自治区和静县巴音布鲁克区)、大额牛(独龙牛,云南省泸水县老窝乡)和亚洲水牛(海子水牛,江苏省东台市郊区),样本数目分别为19、18、16、20和18头。采用酚-氯仿法提取基因组DNA,TE溶解后-20℃保存。

1.2 PCR扩增和序列测定

依据普通牛GH基因全序列^[10](M57764)设计4对引物,分段扩增GH基因。引物由上海生工生物工程有限公司合成,序列如下:引物1(408-860位,包括部分5'调控区、外显子1及部分内含子1):P1 5'-TCTCAAGCTGAGACCTGTGT-3',P2 5'-GGCCAAATGTCTGGGTGTAGA-3';引物2(805-1 224位,包括部分内含子1、外显子2及部分内含

子2):P1 5'-TTGGGCTTTAGGGCTTCCGAA-3',P2 5'-TGAACCTCCTCAGTTTCCTCCC-3';引物3(1 182-2 072位,包括部分内含子2、外显子3、内含子3、外显子4及部分内含子4):P1 5'-ATCCACACCCCTCCACACAGT-3',P2 5'-CATTTTC-CACCTCCCCTACAG-3';引物4(2 054-2 457位,包括部分内含子4、外显子5及部分3'调控区):P1 5'-TAGGGGAGGGTGGAAAATGGA-3',P2 5'-GACACCTACTCAGACAATGCG-3'。

采用50 μL反应体系,包括10×buffer 5 μL,25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μL,2.5 mmol/L混合dNTP 2 μL,10 pmol/μL的上、下游引物各1 μL,5 U/μL Taq DNA polymerase 0.2 μL,DNA模板100 ng,剩余体积用灭菌水补足。PCR反应程序为:94℃预变性5 min;94℃60 s,59℃50 s,72℃50 s,共32个循环;72℃8 min;4℃保存。

PCR产物在8%的聚丙烯酰胺凝胶上电泳检测扩增效果,银染法显带。将检测到特异性目标片段的PCR产物纯化后送上海生工生物工程有限公司进行双向测序。

1.3 序列分析

人工核对测序结果后,将序列拼接成完整的编码区全序列(以GenBank登录号M57764的序列为参照)。然后分析GH基因编码区序列的变异特点,涉及碱基组成、单倍型多样性、相对同义密码子使用频率(Relative synonymous codon usage, RSCU)^[11]等指标;然后再以单倍型序列构建分子进化树。研究中使用的分析软件主要是Clustalx (Version 1.83)和MEGA(Version 3.1)^[12]。

2 结果与分析

2.1 GH基因编码区序列及其变异

测序结果经对位排列和核对后拼接成完整的编码区全序列(参照普通牛M57764序列),在所有受测个体中都获得了全长为654 bp的编码区序列,其中外显子1为13 bp、外显子2为161 bp、外显子3为117 bp、外显子4为162 bp、外显子5为201 bp,以起始密码子ATG开始,以终止密码子TAG结束。

将5个牛种的全部编码区序列定义为10种单

倍型,普通牛、瘤牛、牦牛和大额牛共享了同一种单倍型,普通牛和牦牛还共享了另外一种单倍型,普通牛、瘤牛、牦牛和亚洲水牛还分别独自享有 2 种、4 种、1 种和 1 种单倍型。牛种内各单倍型的比例如图 1 所示。从单倍型的分布可知,瘤牛的单倍型多样性最高(0.278),普通牛(0.211)和牦牛(0.188)次之,大额牛和水牛均无单倍型多样性。

由图 1 可见,在 5 个牛种 GH 基因编码区序列中,共检测到 16 个变异位点,包括 4 个简约信息位点和 12 个单一变异位点。不同牛种 GH 基因编码区序列的平均碱基组成及碱基在各位密码子中的使用情况见表 1。5 个牛种 GH 基因编码区序列间的碱基组成差异很小,A、T、C、G 碱基的平均含量为 19.4%、20.5%、31.6%和 28.5%;碱基组成中 G+C 的平均含量(60.1%)明显高于 A+T 的平均含量(39.9%)。碱基的使用在第 2 位密码子上是完全相同的,在第 1 位密码子上差异也很小,但在第 3 位密码子上碱基 A

[111222244 455566]	
[7007467915 648904]	
[8237343147 588175]	
<i>Bos indicus</i> -1	CTGGGTAGC TTTGCT	(16.7%)
<i>Bos indicus</i> -2C.....	(2.8%)
<i>Bos indicus</i> -3	.C.....	(8.3%)
<i>Bos indicus</i> -4	.C..... .C....	(63.9%)
<i>Bos indicus</i> -5C....	(8.3%)
<i>Bostaurus</i> -1	.C..... G .C. .A	(5.3%)
<i>Bostaurus</i> -2	.C..... G .C.	(2.6%)
<i>Bostaurus</i> -3	.C..... .C. .A	(63.2%)
<i>Bostaurus</i> -4	.C..... .C.	(28.9%)
<i>Bos grunniens</i> -1	.C..... .C. .A	(2.6%)
<i>Bos grunniens</i> -2	TC..... .C.	(7.9%)
<i>Bos grunniens</i> -3	.C..... .C.	(89.5%)
<i>Bos frontalis</i>	.C..... .C.	(100%)
<i>Bubalus bubalis</i>	.CAACACG. .CCCA.C	(100%)

图 1 GH 基因编码区序列单倍型种类及其在牛种内的比例(%)

Fig. 1 Haplotypes and their percentage of GH gene CDS in bovine species(%)

表 1 牛 GH 基因编码区序列的碱基组成
Table 1 Base composition of bGH gene CDS

物种 Specie	总体 Total				第 1 位密码子 First codon				第 2 位密码子 Second codon				第 3 位密码子 Third codon				%
	A	T	G	C	A1	T1	G1	C1	A2	T2	G2	C2	A3	T3	G3	C3	
普通牛 <i>Bos taurus</i>	19.3	20.6	27.8	32.3	23.2	18.8	28.7	29.4	28.4	31.2	17.0	23.4	6.4	11.9	37.6	44.0	
瘤牛 <i>Bos indicus</i>	19.3	20.8	32.3	27.6	22.9	18.8	28.4	29.8	28.4	31.2	17.0	23.4	6.4	12.5	37.5	43.6	
牦牛 <i>Bos grunniens</i>	19.3	20.7	27.7	32.3	23.1	18.8	28.4	29.7	28.4	31.2	17.0	23.4	6.4	12.1	37.6	43.9	
大额牛 <i>Bos frontalis</i>	19.3	20.6	27.7	32.4	22.9	18.8	28.4	29.8	28.4	31.2	17.0	23.4	6.4	11.9	37.6	44.0	
亚洲水牛 <i>Bubalus bubalis</i>	19.7	19.9	27.2	33.2	23.4	18.8	28.0	29.8	28.4	31.2	17.0	23.4	7.3	9.6	36.7	46.3	
平均数 Average	19.4	20.5	28.5	31.6	23.1	18.8	28.4	29.7	28.4	31.2	17.0	23.4	6.6	11.6	37.4	44.4	

在碱基组成中,数字 1、2 和 3 分别代表密码子第 1、2 和 3 位

Number 1, 2 and 3 represent the 1st, 2nd and 3rd codon positions in base composition, respectively

的含量很低(平均仅为 6.6%),明显低于其在第 1 和第 2 位密码子中的比例。

2.2 密码子使用特点

表 2 列出了 5 个牛种 GH 基因编码区序列的密码子使用情况。从密码子使用频率来看,UUC、CUG、CAG 和 GCC 等都达到或超过 10%以上,其中密码子 CUG 使用频率最高(18.9%);UGU、GAU、AGG 和 AAU 的使用频率都在 1%以下,其中密码子 AGG 使用频率最低(0.2%)。相对同义密码子使用频率 RSCU 是衡量密码子使用偏倚性的重要标准,直观地反映了密码子使用偏倚性的程

度。从 RSCU 值来看,UUC、CUC、CUG、UCC、AGC、UGC、CAU、CAG、GUC、GUG、GAC、GAG、UAC、CCC、CGC、CGG、AUC、ACC、AAC、AAG、GCU、GCC、GGC、GGG 和 UAG 的 RSCU 值都大于 1,即均为偏好密码子,其余的密码子均为非偏好密码子。

2.3 核苷酸替代

在所有测定的序列中,只观察到转换和颠换,未见插入和缺失突变类型(图 1)。在核苷酸的替代模式中,观察到 T ↔ C 的转换、A ↔ G 转换、C ↔ G 颠换以及 A ↔ C 颠换,没有出现 T ↔ A 和 T ↔ G 颠换。

表 2 牛 *GH* 基因编码区序列的密码子使用Table 2 Codon usage of CDS of *bGH* gene

氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	使用频率/% Frequency	RSCU	氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	使用频率/% Frequency	RSCU	
Phe	UUU	4.0	0.57	Pro	CCC	5.0	2.50	
	UUC	10.0	1.43		CCA	1.0	0.50	
Leu	UUG	3.0	0.55	Arg	CCG	2.0	1.00	
	CUU	2.2	0.40		CGU	1.0	0.43	
	CUC	8.8	1.60		CGC	5.0	2.14	
	CUG	18.9	3.44		CGG	5.8	2.48	
Ser	UCU	1.1	0.49	Ile	AGA	2.0	0.86	
	UCC	4.9	2.07		AGG	0.2	0.09	
	UCA	1.9	0.82	Met	AUC	7.0	3.00	
	UCG	2.1	0.88		AUG	6.0	1.00	
	Cys	AGU	1.0	0.43	Thr	ACU	1.0	0.29
		AGC	3.1	1.31		ACC	9.0	2.57
UGU		0.9	0.37	ACA		1.1	0.31	
UGC		4.1	1.63	ACG		2.9	0.84	
Trp	UGG	2.0	1.00	Asn	AAU	0.9	0.31	
His	CAU	1.9	1.29		AAC	5.1	1.69	
	CAC	1.1	0.71	Lys	AAA	3.1	0.56	
Gln	CAG	12.0	2.00		AAG	7.9	1.44	
	Val	GUU	1.0		0.49	Ala	GCU	7.0
GUC		3.0	1.47	GCC	10.0		2.11	
GUG		4.1	2.04	GCA	1.0		0.21	
Asp		GAU	0.9	0.19	GCG		1.0	0.21
	GAC	9.1	1.81	Gly	GGU	1.1	0.36	
Glu	GAA	3.1	0.47		GGC	6.9	2.30	
	GAG	9.9	1.53		GGA	1.0	0.34	
Tyr	UAU	2.0	0.67		GGG	3.0	1.01	
	UAC	4.0	1.33	终止密码子 Terminal codon	UAG	1.0	3.00	

RSCU 是指相对同义密码子使用频率 RSCU denotes relative synonymous codon usage frequency

核苷酸的替代以转换为主,转换明显高于颠换,转换/颠换比为 3.0。

翻译成氨基酸序列后显示,*GH* 基因外显子全序列编码 217 个氨基酸,16 个核苷酸替代位点中 13 个为同义突变,仅有 3 个非同义突变位点。3 个非同义突变位点分别对应于编码的第 35 位氨基酸(甘氨酸↔丝氨酸)、第 138 位氨基酸(赖氨酸↔天冬酰胺)和第 153 位氨基酸(亮氨酸↔缬氨酸)。

根据 Kimura 双参数模型以 Nei-Gojobori 法进一步估计了同义和非同义替代发生的速率比^[13]。结果显示,5 个牛种间同义和非同义替代发生的速率比(d_n/d_s)都小于或等于 1,平均值为 0.980 8,表明 *GH* 基因编码区序列不受达尔文正选择的影响。

2.4 基于 *GH* 基因编码区序列的分子进化树

以定义的 10 种 *GH* 基因编码区单倍型序列为

基础,采用 Kimura 双参数模型,运用 MEGA 软件中的邻近法 (Neighbor Joining, NJ) 构建分子进化树,结果见图 2。

从图 2 中可以看出,水牛 *GH* 基因序列独立为一支,它与普通牛、瘤牛、牦牛、大额牛间分化很明显。普通牛、瘤牛、牦牛、大额牛间序列分化并不明显,而且它们共同拥有一条相同的核苷酸序列。除了普通牛与牦牛之间共享了另一条序列之外,普通牛、瘤牛及牦牛其余的单倍型序列基本上各自成为一类。

3 讨论

3.1 *GH* 基因编码区序列变异特征

研究中,在 5 个牛种内检测到的核苷酸突变率为 0~0.46%,而不同牛种间的核苷酸突变率为

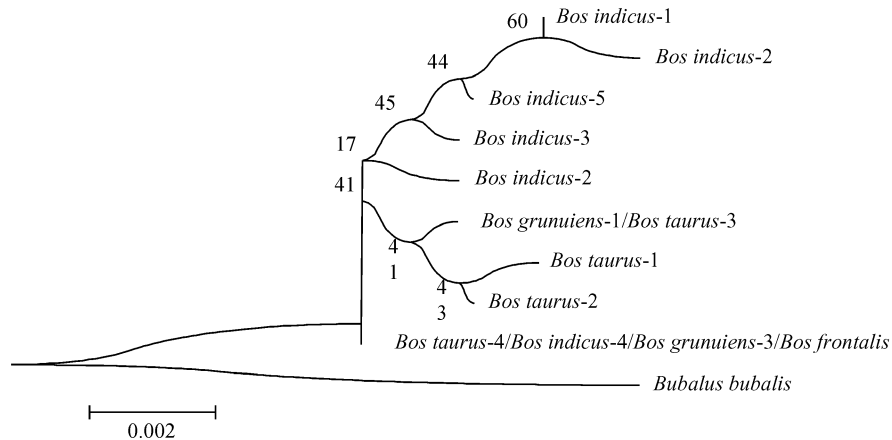


图 2 基于中国牛亚科 GH 基因编码区序列的分子进化树

Fig. 2 Molecular tree based on complete coding sequence of growth hormone gene in Chinese bovine species

0.1%~1.84%，表明牛亚科家畜 GH 基因编码区序列的变异相当贫乏。此外，从 GH 基因编码区序列的密码子使用情况来看，存在密码子使用偏好性，并发现了 25 个偏好性密码子。造成密码子使用偏好性的原因可能与偏倚的突变压及选择压等因素密切相关。

在分子进化过程中，当同义与非同义替代发生的速率比(d_n/d_s) >1 时，表明受到了正向选择的作用；而当速率比 <1 时，表明在进化过程中受到负向选择的作用^[14]。研究中，核苷酸替代方式仅有转换和颠换，没有观察到插入和缺失，而且绝大多数位点间的替代是同义突变，非同义突变(错义突变)位点远远少于同义突变位点，同义与非同义替代发生的速率比平均为 0.980 8。同义与非同义替代发生的速率比 <1 ，表明牛亚科家畜 GH 基因在进化过程中受到负向选择的作用，而不受达尔文正向选择的影响，是净化选择的结果，也进一步提示 GH 基因仍然保持着非常重要的生物学功能。

因此，无论是在种内还是在种间，牛 GH 基因由于功能的约束都表现得相当保守，进化速率相当缓慢。

3.2 中国牛亚科家畜 GH 基因的分子进化关系

牛亚科动物的分子进化研究一直是个热点问题，争论的焦点主要在于属级分类地位的确定和种间系统发生关系的探讨。在属级分类地位的确定上，国内外的报道很多，但仍然存在分歧^[15-20]。然而，对于牛亚科家畜多个物种间系统发生关系的报道则相对较少。根据 MHC DRB3 基因 exon2 序列所构建的牛亚科系统发育树可以看出，亚洲水牛和

非洲水牛的亲缘关系比较近，普通牛和瘤牛的亲缘关系较近，牦牛与欧洲野牛的亲缘关系较近^[21]。基于线粒体 Cyt b 基因序列的分析表明^[22]，中国黄牛与牦牛和欧洲野牛之间的亲缘关系相对较近，而与水牛间的亲缘关系则相对较远；中国牦牛和斑腾牛以及羯牛的亲缘关系相对较近；中国水牛和沼泽型水牛具有较近的亲缘关系。线粒体 Cyt b 基因全序列分析则提示^[23]，中国大额牛群体明显分为 3 支(第 1 支与普通牛相聚，第 2 支与瘤牛相聚，第 3 支与印度野牛相聚)，推测大额牛很可能是印度野牛的家养型或驯化种，而且可能曾受到其他牛种血缘的入侵。由此可见，牛亚科家畜物种间已经发生了较为明显的分化。

研究中，基于 GH 基因编码区序列构建的分子进化树表明，水牛 GH 基因序列不同于普通牛、瘤牛、牦牛以及大额牛，它们之间的遗传分化已经十分明显。普通牛、瘤牛、牦牛、大额牛共同拥有 1 条相同的核苷酸序列，而且除了普通牛外(频率是 28.9%)，这种单倍型序列在种群内都是频率最高的(瘤牛为 63.9%，牦牛为 89.5%，大额牛为 100%)。推测这一共享的序列可能是普通牛、瘤牛、牦牛和大额牛 GH 基因编码区的共同祖先序列，其它的核苷酸序列可以看作是在此基础上发生的随机突变类型(主要是遗传漂变的影响)。

从研究还可以看出，除了普通牛与牦牛之间共享了另 1 条单倍型序列以外，普通牛、瘤牛及牦牛其余的单倍型序列存在明显的种间差异而基本上各自成为一类，有可能在以后的进化过程中逐步产生更加明显的分化，成为各牛种所特有的类型。而普

通牛与牦牛之间共享了另 1 条单倍型序列的原因可能是它们生活在同 1 个地区,通过母系实现的基因交流加上在相同生态环境下经受自然选择的结果,因而不能排除适应进化效应。

此外,绝大多数位点的突变都属于同义突变类型,就不会影响适应进化,也不会产生适应性状差别,即不受适应进化的选择作用。然而,也有少数位点的突变属于非同义突变类型,其反映的分子进化可能是蛋白质乃至形态生理性状的适应进化线索。

参考文献:

- [1] YAO J, AGGREY S E, ZADWORN Y D, et al. Sequence variations in the bovine growth hormone gene characterized by single-strand conformation polymorphisms (SSCP) analysis and their association with milk production traits in holsteins [J]. *Genetics*, 1996, 144:1 809-1 816.
- [2] LAGZIEL A, SOLLER M. DNA sequence of SSCP haplotypes at the bovine growth hormone (bGH) gene[J]. *Animal Genetics*, 1999, 30:362-365.
- [3] UNANIAN M M, BARRETO C C, FREITAS A R, et al. Associations between growth hormone gene polymorphism and weight traits in Nellore bovines[J]. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 2000, 29:1 380-1 386.
- [4] GE W, DAVIS M E, HINES H C, et al. Association of single nucleotide polymorphisms in the growth hormone and growth hormone receptor genes with blood serum insulin-like growth factor I concentration and growth traits in Angus cattle[J]. *Journal of Animal Science*, 2003, 81:641-648.
- [5] FRIES R, EGGEN A, WOMACK J E. The bovine genome map[J]. *Mammalian Genome*, 1993, 4:405.
- [6] 欧江涛, 钟金城, 赵益新, 等. 牦牛生长激素基因的测序和多态性研究[J]. *黄牛杂志*, 2003, 29(2):9-12.
- [7] 高雪, 徐秀容, 许尚忠, 等. 中国地方黄牛 GH 基因遗传多态性研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2005, 36(10):991-995.
- [8] 高雪, 徐秀容, 许尚忠, 等. 影响牛生长发育性状的 GH 基因遗传效应分析[J]. *中国农业科学*, 2006, 39(3):606-611.
- [9] FORSYTH I A, WALLIS M. Growth hormone and prolactin-molecular and functional evolution [J]. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 2002, 7(3):291-312.
- [10] GORDON D F, QUICK D P, ERWIN C R, et al. Nucleotide sequence of the bovine growth hormone chromosomal gene[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1983, 33:81-95.
- [11] SHARP P M, TUOHY T M, MOSURSKI K R. Codon usage in yeast: Clustal analysis clearly differentiates highly and lowly expressed genes[J]. *Nucleic Acids Research*, 1986, 14:5 125-5 143.
- [12] KUMAR S, TAMURA K, NEI M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, 5:150-163.
- [13] NEI M, GOJOBORI T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1986, 3:418-426.
- [14] SUZUKI Y. New methods for detecting positive selection at single amino acid sites[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2004, 59:11-19.
- [15] RITZ R, GLOWATZKI-MULLIS M L, MACHUGH D E, et al. Phylogenetic analysis of the tribe Bovini using microsatellitr[J]. *Animal Genetics*, 2000, 31:178-185.
- [16] WARD T J, BIELAWSKI J P, DAVIS S K, et al. Identification of domestic cattle hybrids in wild cattle and bison species: a general approach using mtDNA markers and the parametric bootstrap [J]. *Animal Conservation*, 1999, 2(1):51-57.
- [17] HASSANIN A, ROPIQUET A. Molecular phylogeny of the tribe Bovini (Bovidae, Bovinae) and the taxonomic status of the Kouprey, *Bos sauveli* Urbain 1937 [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2004, 33:896-907.
- [18] 李齐发, 李隐侠, 赵兴波, 等. 牦牛线粒体 DNA 细胞色素 b 基因序列测定及其起源、分类地位研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2006, 37(11):1 118-1 123.
- [19] 郭松长, 刘建全, 祁得林, 等. 牦牛的分类学地位及起源研究: mtDNA D-loop 序列的分析[J]. *兽类学报*, 2006, 26(4):325-330.
- [20] 李齐发, 李隐侠, 赵兴波, 等. 牦牛线粒体 DNA D-loop 区序列测定及其在牛亚科中分类地位的研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2008, 39(1):1-6.
- [21] 李齐发, 李艳华, 赵兴波, 等. 牛亚科 MHC-DRB3 基因 exon2 的序列变异分析[J]. *农业生物技术学报*, 2005, 13(4):441-446.
- [22] 蔡欣, 陈宏, 雷初朝, 等. 中国 3 个牛种 *cyt b* 基因多态性及其系统发育研究[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2007, 35(2):43-52.
- [23] 李世平, 常洪, 马国龙, 等. 从细胞色素 b 基因全序列探讨大额牛的分子系统发生[J]. *遗传*, 2008, 30(1):65-70.