

西藏牦牛 mtDNA *cytb* 基因的序列多态性及其系统进化分析

姬秋梅¹, 唐懿挺², 张成福¹, 柴志欣², 赵上娟², 信金伟¹, 钟金城^{2*}

(1. 西藏自治区农牧科学院畜牧兽医研究所, 拉萨 850000;

2. 西南民族大学, 动物遗传育种学国家民委-教育部重点实验室, 成都 610041)

摘要: 为从分子水平上探究西藏牦牛类群的亲缘关系、分类地位和遗传多样性, 本研究测定了嘉黎牦牛、桑桑牦牛、桑日牦牛、工布江达牦牛、斯布牦牛、帕里牦牛、康布牦牛、江达牦牛、类乌齐牦牛、丁青牦牛、巴青牦牛等 11 个西藏牦牛类群共 110 头牦牛的细胞色素 b 基因全序列, 分析了其多态性, 并构建了 11 个类群的系统进化树。结果表明: 11 个西藏牦牛类群的细胞色素 b 基因全序列长均为 1 140 bp, 共有单倍型 53 种, 其中新发现的有 49 种, 序列间共有 14 个 SNPs 多态位点, 核苷酸变异类型包括转换和颠换, 无插入和缺失, 以同义突变为, 说明西藏牦牛具有较丰富的遗传多样性。西藏 11 个牦牛类群可分为: 帕里牦牛系、江达牦牛系、巴青牦牛系、桑日牦牛系、类乌齐牦牛系等 5 大系。

关键词: 西藏牦牛; 细胞色素 b 基因; 遗传多样性; 系统进化

中图分类号: S823.85; S813.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)11-1723-10

Genetic Diversity and Evolution Relationship of Tibet Yaks Inferred from mtDNA *cytb*

Ji Qiu-mei¹, TANG Yi-ting², ZHANG Cheng-fu¹, CHAI Zhi-xin², ZHAO Shang-juan²,
XIN Jin-wei¹, ZHONG Jin-cheng^{2*}

(1. Institute of Animal Science and Veterinary, Academy of Agricultural Sciences, Tibet Autonomous Region, Lhasa 850000, China; 2. Key Laboratory of Animal Genetics and Breeding, State Ethnic Affairs Commission and Ministry of Education, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China)

Abstract: In order to explore the classification status and genetic diversity of Tibet yak at the molecular level, the *cytb* gene sequences of Tibet yaks were determined; its sequence polymorphism was analyzed; and the molecular phylogenetic tree was constructed for 110 yaks from 11 groups (Jiali, Sangsang, Sangri, Gongbujiangda, Sibü, Pali, Kangbu, Jiangda, Leiwuqi, Dingqing, Baqing yak). The results showed that the size of cytochrome b gene sequences of 110 yaks are 1 140 bp. 53 haplotypes were identified, 49 haplotypes were newly discovered, 14 SNPs loci among 110 sequences were detected, nucleotide mutation types included conversion and transversion, no insertions and deletions, the main mutations was synonymous mutations, which indicated that Tibetan yaks had abundant genetic diversity. 11 species or groups of Tibet yak can be divided into 5 strains: Pali, Jiangda, Baqing, Sangri, Leiwuqi yak.

Key words: Tibetan yak; *cytb* gene; genetic diversity; phylogenetic evolution

牦牛 (*Bos grunniens*) 是分布在海拔 3 000 m 以上的青藏高原及其毗邻的高寒地区的牛亚科动物,

收稿日期: 2011-08-27

基金项目: 西藏自治区重点科研项目计划资助 (20092-1)

作者简介: 姬秋梅 (1965-), 女, 西藏拉萨人, 博士, 研究员, 主要从事牦牛生产系统研究, E-mail: qiumeiji@hotmail.com

* 通讯作者: 钟金城, E-mail: zhongjincheng518@126.com

是在高寒、空气稀薄、日温差大、牧草生长期短等恶劣的环境条件下,经过长期的自然选择和人工选择形成的一个特殊牛种,具有很强的适应能力,在遗传上是一个极为宝贵的基因库^[1]。家畜品种资源同其它一切资源一样,正确的分类、认识就意味着有可能合理利用和创造财富,对长远经济发展有不可忽视的巨大作用。牦牛遗传多样性及其分类研究一直是牦牛科学研究的重点和热点之一。西藏自治区是我国牦牛的主产区之一,其数量约占全国牦牛总数的1/3,由于特殊的地理特征和生态环境条件形成了嘉黎牦牛、帕里牦牛、斯布牦牛、类乌齐牦牛、工布江达牦牛、桑桑牦牛、桑日额牛、康布牦牛、类乌齐牦牛、丁青牦牛、巴青牦牛等许多地方牦牛品种或类群,牦牛遗传资源十分丰富。这些牦牛类群分布于拉萨、日喀则、山南、阿里、那曲、昌都和林芝地区,贯穿整个西藏自治区,因地理分布的差异不同牦牛类群间可能存在放牧、引种等基因交流,产生不同类群间的分类及亲缘关系。从20世纪70年代起,对西藏自治区的牦牛品种遗传多样性及其分类,分别利用形态遗传标记、生化遗传标记、细胞遗传标记和分子遗传标记对帕里牦牛、嘉黎牦牛和斯布牦牛进行过一些零星的报道,其余牦牛类群的遗传多样性均未进行过系统的研究,且从不同遗传标记层次上获得的结果有较多差异。目前,张成福、赵上娟、柴志欣等通过测定西藏11个牦牛类群的mtDNA D-loop区、COⅢ基因的核苷酸序列及对核苷酸基因组的RAPD多样性进行分析,研究了西藏牦牛的遗传多样性、类群间的亲缘关系和系统进化关系^[2-4]。其中

利用 *cytb* 基因对西藏牦牛的遗传多样性和分子进化方面的研究还尚属空白。

哺乳动物线粒体细胞色素 b(*cytb*) 基因进化速率虽不及 D-loop 快,但由于能用一些通用引物扩增且进化速度适中,一个较小的基因片段可包含从种内到种间乃至到科间的进化遗传信息,因而被广泛用于脊椎动物种内、种间遗传多样性和分类阶元系统进化研究,被认为是了解遗传多样性和解决系统发育问题最可信的线粒体 DNA 标记之一^[5]。

本研究在西藏牦牛的主要分布区选取嘉黎牦牛、桑桑牦牛、桑日额牛、工布江达牦牛、斯布牦牛、帕里牦牛、康布牦牛、江达牦牛、类乌齐牦牛、丁青牦牛、巴青牦牛等11个西藏牦牛品种或类群,共110头牦牛,测定细胞色素 b 基因全序列,分析其遗传多样性,构建系统进化树,并结合生化遗传学、分子生物学、生物信息学、历史学、考古学探讨各牦牛品种或类群之间的进化关系;旨在为西藏牦牛的起源、演化、分类和遗传多样性研究以及遗传资源保护和利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物及基因组 DNA 提取

从11个西藏牦牛品种或类群中,各选取健康成年的牦牛10头,共110头(表1),采集耳组织,75%乙醇保存带回实验室,于-80℃的冰箱中备用。用组织基因组DNA提取试剂盒(购自TianGen生物技术公司)提取基因组DNA。

表1 供试牦牛品种(类群)、数量

Table 1 List of samples used for analyses

分布 Distribution	类群 Group	代码 Code	样本数 Number of samples	采样地点 Sampling location
拉萨 Lhasa	斯布牦牛	SB	10	拉萨
	类乌齐牦牛	LWQ	10	类乌齐县
昌都 Changdu	丁青牦牛	DQ	10	丁青县
	江达牦牛	JD	10	江达县
山南 Shannan	桑日牦牛	SR	10	桑日县
林芝 Linzhi	工布江达牦牛	GB	10	工布江达县
	帕里牦牛	PL	10	帕里镇
日喀则 Rikaze	桑桑牦牛	SS	10	桑桑镇
	康布牦牛	KB	10	康布乡
	嘉黎牦牛	JL	10	嘉黎县
那曲 Naqu	巴青牦牛	BQ	10	巴青县
合计 Total			110	

1.2 PCR 扩增、克隆及测序

根据牛 mtDNA 全序列 (GenBank Accession No. : V00654), 用 Primer Premier 6.0 和 oligo 6.0 软件设计 1 对特异引物对 *cytb* 序列进行扩增, 其中, F: 5'-CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG-3', R: 5'-GGAATTCATCTCTCCCGGTTTACAAGAC-3'。预期扩增目的片段长度为 1 200 bp 左右, 引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。

PCR 扩增体系 (25 μ L): premixEx Taq 12.5 μ L, 上、下游引物各 (20 μ mol \cdot L⁻¹) 1 μ L, 模板 DNA (25~50 ng \cdot μ L⁻¹) 1 μ L, 超纯水 9.5 μ L。

PCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 60 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 75 s, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min; 冷却至 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶 (含 GoldView 核酸染料) 电泳检测, 凝胶成像系统分析检测结果。

根据检测结果, 对 110 头牦牛 mtDNA *cytb* 基因 PCR 产物用胶回收试剂盒 (OMEGA 生物技术有限公司) 进行胶回收分离纯化, 纯化的目的片段与 pMD™ 19-T 载体于 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 后转化到 JM109 感受态宿主菌中培养; 再将菌液涂布在含有 X-Gal 底物、IPTG 诱导物和氨苄青霉素 (Amp^r) 抗生素的 LB 平板上, 利用蓝白斑筛选法筛选; 用接种环挑取白色单一菌落, 在含氨苄青霉素 (Amp^r) 的 LB 液体培养基中培养过夜, 利用质粒提取试剂盒提取菌液质粒, 最后用提取的质粒进行 PCR 反应分析以确保克隆成功^[6]; 检测克隆成功的质粒进行测序。

1.3 数据处理

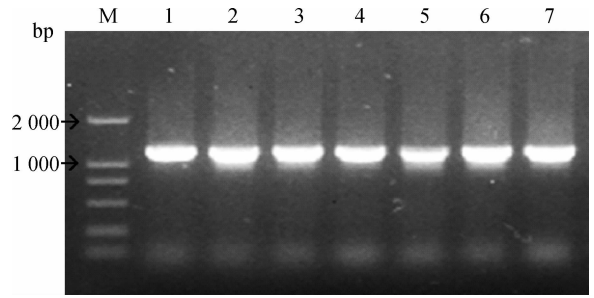
用 DNAMAN 软件对 110 头牦牛的 mtDNA *cytb* 全序列测序结果进行核实、校正, 统计序列的碱基长度和碱基差异。再用 ClustalX 软件进行 *cytb* 全基因序列的比对, 得到的结果分别以“aln”文件格式保存。通过 MEGA4.0、DNAsp、DNASTAR 等软件进行数据分析处理, 构建物种间系统进化树, 置信度由 Boot strap 法检验 (重复次数为 1 000)。

2 结果

2.1 西藏牦牛 mtDNA *cytb* 的 PCR 扩增

参照 DNA 分子量标准及普通牛 mtDNA 全序列 (GenBank Accession No. : V00654), 得知西藏牦牛的 mtDNA *cytb* 基因 PCR 产物大小应在 1 200 bp 左右。从图 1 可见, 西藏牦牛 mtDNA *cytb* 基因 PCR 产物

大小均在 1 200 bp 左右, 与预期结果一致, 说明目的片段克隆成功。



M. DNA 相对分子质量标准; 1~7. 西藏牦牛 mtDNA *cytb* 的 PCR 产物

M. DNA DL2000 marker; 1-7. PCR products of mtDNA *cytb*

图 1 西藏牦牛 mtDNA *cytb* PCR 产物的电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis of the PCR products of mtDNA *cytb* of Tibet yak

2.2 西藏牦牛 mtDNA *cytb* 的遗传多样性

2.2.1 西藏牦牛 mtDNA *cytb* 基因的核苷酸组成

根据测序结果, 并经综合核实、校对, 结果西藏 11 个牦牛品种或类群的 110 头个体的 mtDNA *cytb* 基因全序列长度均为 1 140 bp, 个体间无序列长度差异, 所有序列均以 ATG 为起始密码子, 中间无插入、缺失, 均以终止密码子 AGA 结束, 碱基 A、T、C、G 的平均含量分别为 31.7%、26.3%、28.9% 和 13.1%, A+T 的平均含量为 58%, 显著高于 G+C 平均含量 42%, 表明 11 个品种或类群的 110 头牦牛的 mtDNA *cytb* 基因均富含碱基 A 和 T。

西藏牦牛 110 头个体 *cytb* 基因的平均碱基含量以及密码子中各位点碱基的平均组成见表 2。在密码子第 2、第 3 位点上 G 的含量均较低, 分别为 13.7% 和 3.0%; 第 2 位点上 T 的含量最高 (40.2%), 第 3 位点上 A 的含量最高 (45.4%)。核苷酸中碱基组成的偏向是线粒体蛋白编码基因包括 *cytb* 基因在内的一个典型特征, 密码子第 2 位点 (0.20), 特别是第 3 位点 (0.58) 表现出较强的碱基组成偏向, 而第 1 位点则表现出很弱的偏向 (0.07)。

通过 DNAsp 分析发现, 110 头个体两两之间的同义突变位点数平均为 300.58, 同义突变率 (Ks) 为 0.010 01, 非同义突变率 (Ka) 为 0.001 60, 可见西藏牦牛 *cytb* 基因以同义突变占优势。对碱基替换的分析表明, T/C 转换的可能性最大, T/G 颠换的可能性最小 (表 3)。

表 2 西藏牦牛 *cytb* 基因在密码子第 1、2 和 3 位点上的平均碱基组成Table 2 Average base composition at the first, second and third codon of the *cytb* gene of Tibetan yaks

碱基 Base	平均含量 Mean	第 1 位点 The first locus	第 2 位点 The second locus	第 3 位点 The third locus
胸腺嘧啶 T	26.3±0.19	22.1±0.10	40.2±0.12	16.5±0.60
胞嘧啶 C	28.9±0.19	26.1±0.10	25.6±0.12	35.1±0.60
腺嘌呤 A	31.7±0.07	29.2±0.11	20.5±0.06	45.4±0.14
鸟嘌呤 G	13.1±0.06	22.6±0.08	13.7±0.06	3.0±0.16
碱基组成偏差指数 Deviation index of base composition	0.18	0.07	0.20	0.58

表 3 西藏牦牛 *cytb* 基因的碱基替换频率Table 3 Maximum composite likelihood estimate of the pattern of nucleotide substitution of the *cytb* gene for Tibetan yaks

碱基 Base	腺嘌呤 A	胸腺嘧啶 T	胞嘧啶 C	鸟嘌呤 G
腺嘌呤 A		0.61	0.66	7.69
胸腺嘧啶 T	0.73		36.71	0.30
胞嘧啶 C	0.73	32.91		0.30
鸟嘌呤 G	18.63	0.61	0.66	

2.2.2 西藏牦牛 mtDNA *cytb* 的氨基酸组成

根据 *cytb* 基因的序列推导 *cytb* 的氨基酸序列, 西藏牦牛的 *cytb* 共由 370 个氨基酸组成, 在 11 个类群中, 均含有 20 种氨基酸, 丙氨酸(A)、半胱氨酸(C)、天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)、苯丙氨酸(F)、甘氨酸(G)、组氨酸(H)、异亮氨酸(I)、赖氨酸(K)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、天冬酰胺(N)、脯氨酸(P)、谷氨酰胺(Q)、精氨酸(R)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、缬氨酸(V)、色氨酸(W)、酪氨酸(Y)的含量分别为 7.30%、1.08%、2.98%、1.62%、6.48%、6.75%、3.24%、13.99%、2.70%、15.94%、0.32%、4.58%、5.96%、1.62%、2.44%、5.95%、7.59%、4.59%、0.54%、4.32%。其中苯丙氨酸(F)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、苏氨酸(T)、缬氨酸(V)、丝氨酸(S)等 6 种氨基酸在品种或类群间存在一定的差异。异亮氨酸在巴青牦牛(13.80%)、嘉黎牦牛(13.95%)、桑日牦牛(13.95%)与其它地区牦牛(14.05%)不同, 苯丙氨酸在巴青牦牛(6.51%)、工布江达牦牛(6.47%)、桑日牦牛(6.44%)、丁青牦牛(6.43%)与其它地区牦牛(6.49%)有差异; 亮氨酸在巴青牦牛(15.9%)、工布江达牦牛(16.0%), 苏氨酸在嘉黎牦牛(7.65%)、江达牦牛(7.55%)、工布江达牦牛(7.57%), 缬氨酸在江达牦牛(4.62%)、类乌齐牦牛

(4.57%)、丁青牦牛(4.62%)、桑日牦牛(4.57%), 丝氨酸康布牦牛(5.97%)、斯布牦牛(5.93%)与其它地区牦牛有差异; 其余 14 种氨基酸在各品种或类群间含量均相同。

2.2.3 西藏牦牛 mtDNA *cytb* 基因的核苷酸多态性

对 11 个牦牛品种或类群的 *cytb* 基因全序列的核苷酸变异和多态性进行分析, 结果共检测到了 89 个核苷酸替代突变位点, 约占核苷酸总数(1 140 bp)的 7.81%, 其中单态突变位点 75 个, 简约信息位点 14 个, 平均核苷酸差异数(K)为 4.347 7, 整体核苷酸多样性(*Pi*)为 0.003 814。编码 *cytb* 氨基酸的变异共有 47 个。对所有突变位点进行 Tajima 中性检验, Tajima's D 值为 -2.410 28, $P > 0.10$, 差异不显著, 表明所有的变异符合中性选择。

对 11 个牦牛品种或类群的 *cytb* 基因全序列进行保守区域分析, 全长 1 140 bp 的碱基中发现共有 4 个保守区域, 为保守区域 1(289~332 bp)、区域 2(677~757 bp)、区域 3(790~846 bp)、区域 4(921~974 bp)。在 4 个保守区中 A、T 含量为 55.1%, 略低于总体碱基的 A、T 含量(58.0%)。

西藏 11 个牦牛品种或类群 mtDNA *cytb* 基因的平均核苷酸多样(*Pi*)和基于 Kimura-2-parameter 计算的 11 个牦牛群体内个体间的平均遗传距离

(*d*)具有同一性且差异较明显(表 6),可分为高、中、低 3 个不同的层次。在 11 个群体中,平均核苷酸多样性、平均遗传距离较高的类群有类乌齐牦牛、江达牦牛、巴青牦牛和桑日牦牛,其次是丁青牦牛、康布牦牛、嘉黎牦牛、斯布牦牛,较低的群体有桑桑牦牛、

工布江达牦牛和帕里牦牛。其中以帕里牦牛最为突出,这些参数的大小反映了品种或类群内的遗传多样性和遗传分化程度。品种或类群内部的单倍型数目(*H*)和单倍型多样性(*Hd*)见表 4,也同上述参数一致。

表 4 西藏牦牛 *cytb* 基因的平均核苷酸多样性、个体间的遗传距离和单倍型数

Table 4 Average nucleotide diversity, genetic distance and number of haplotypes of the *cytb* gene for 11 groups of Tibetan yaks

类群 Group	核苷酸多样性 <i>Pi</i>	个体间遗传距离 Gengtic distance among individuals ($d \pm S, E$)	单倍型数 <i>H</i>	单倍型多样性 <i>Hd</i>
类乌齐牦牛 LWQ	0.006 082	0.006 126 \pm 0.001 461	10	1.000 0
江达牦牛 JD	0.005 088	0.005 120 \pm 0.001 242	8	0.933 3
巴青牦牛 BQ	0.004 776	0.004 810 \pm 0.001 411	7	0.911 1
桑日牦牛 SR	0.004 756	0.004 790 \pm 0.001 360	8	0.933 3
丁青牦牛 DQ	0.003 528	0.003 548 \pm 0.000 882	7	0.866 7
康布牦牛 KB	0.003 411	0.003 431 \pm 0.000 963	7	0.911 1
嘉黎牦牛 JL	0.003 275	0.003 292 \pm 0.000 881	7	0.866 7
斯布牦牛 SB	0.002 943	0.002 957 \pm 0.000 889	8	0.933 3
桑桑牦牛 SS	0.002 164	0.002 171 \pm 0.000 790	5	0.800 0
工布江达牦牛 GB	0.002 105	0.002 111 \pm 0.000 592	8	0.933 3
帕里牦牛 PL	0.000 819	0.000 820 \pm 0.000 584	2	0.466 7

利用 DNAsp 分析 110 头牦牛的单倍型分布,同时将 NCBI 已上传的牦牛 *cytb* 基因序列 11 条录入比较 (AY684273、NC_006380、AF091631、EU807949、EU807952、EF494178、EF494177、EU807950、AY374124、EU807951、EF494179),在西藏牦牛的 110 头个体中共检测 *cytb* 基因有 53 种单倍型,其中 4 种与已上传的牦牛 *cytb* 基因有同一单倍型(表 5、图 2),新发现的有 49 种,整体的单倍型多样性为 0.884。

2.3 西藏牦牛 mtDNA *cytb* 基因的系统进化

根据 110 头牦牛 *cytb* 基因的碱基序列利用 DNAsp 软件计算出 11 个品种或类群间的平均遗传距离(核苷酸歧异度, *Dxy*),见表 6,结果表明,类乌齐牦牛与巴青牦牛之间的遗传距离最大,为 0.005 49;类乌齐牦牛与丁青牦牛之间的遗传距离最小,仅为 0.001 56。

基于 Kimura-2-parameter 遗传距离,以 2 头普通牛 (NC_006853, V00654)、1 头瘤牛 (NC_005971)、1 头水牛 (NC_006295)、1 头欧洲野牛 (NC

_013996)、1 头美洲野牛 (NC_012346)、1 头爪哇野牛 (NC_012706)、1 头犀牛 (NC_001779)、2 头白犀牛 (Y07726, NC_001808) 的 *cytb* 基因全序列作为外群;并从 GenBank 下载了 2 头野牦牛 (AY955225、AY955226)、11 头家牦牛 (AY684273、NC_006380、EF494178、EU807951、EF494179、AF091631、EF494177、EU807952、EU807950、EU807949、AY374124) 的资料,构建了西藏牦牛 *cytb* 基因 53 种单倍型的分子系统树,结果表明 53 种单倍型可分为 2 大类,这与图 3 的结果一致。

用西藏 11 个品种或类群的 110 头牦牛 *cytb* 基因做起源分析(图 3),发现西藏牦牛有 2 个母系起源,这与本实验室对 mtDNA D-loop 区的分析结果一致。

根据西藏 11 个牦牛品种或类群间的平均遗传距离(表 6),用 Clustal W、BioEdit、Mega 4 生物软件通过 NJ 法构建了品种或类群间的系统进化树(图 4),并使用 Boot strap 1 000 自展检测系统树各分支的置信度,结果表明,帕里牦牛与康布牦牛首先

聚为一类,然后与桑桑牦牛相聚,这3个品种或类群聚为一类后再与嘉黎牦牛、工布江达牦牛、丁青牦牛、斯布牦牛等聚成一大类,接下来才与江达牦牛相

聚;巴青牦牛与桑日牦牛聚为一类后,再同上述品种或类群聚为更大的一类,最后才与类乌齐牦牛聚合。

表 5 西藏牦牛 11 个品种或类群 *cytb* 基因的单倍型分布

Table 5 *Cytb* gene haplotypes of 11 breeds of Tibetan yaks

单倍型种类 Haplotype	所含个体 Number of haplotypes in samples	单倍型种类 Haplotype	所含个体 Number of haplotypes in samples
HAP-1	JL1、GB8	HAP-29	LWQ1
HAP-2	JL2、K2、AY684273	HAP-30	LWQ3
HAP-3	JL3	HAP-31	LWQ4
HAP-4	JL4、JL5、JL6、JL9、BQ2、BQ3、BQ6、GB4、GB5、GB6、JD6、JD8、JD9、KB1、KB6、LWQ2、PL6、PL7、PL9、SR3、SR4、SR9、DQ3、DQ4、DQ8、DQ10、SS1、SS3、SS6、SS7、SB2、SB3、SB10、NC_006380、AF091631、EU807949	HAP-32	LWQ5
HAP-5	JL7	HAP-33	LWQ8
HAP-6	JL8	HAP-34	LWQ9
HAP-7	JL10、BQ4、JD10、SR8	HAP-35	LWQ10
HAP-8	BQ1	HAP-36	SR1
HAP-9	BQ5	HAP-37	SR5
HAP-10	BQ7、BQ10、LWQ6、SB1、EU807952	HAP-38	SR6
HAP-11	BQ8	HAP-39	SR7
HAP-12	BQ9	HAP-40	SR10
HAP-13	GB1	HAP-41	DQ1
HAP-14	GB2	HAP-42	DQ2
HAP-15	GB3	HAP-43	DQ5
HAP-16	GB7	HAP-44	DQ9
HAP-17	GB9	HAP-45	SS5
HAP-18	GB10	HAP-46	SS8
HAP-19	JD1	HAP-47	SS9
HAP-20	JD2	HAP-48	SB4
HAP-21	JD3	HAP-49	SB5
HAP-22	JD4	HAP-50	SB6
HAP-23	JD5	HAP-51	SB7
HAP-24	JD7、KB8、KB9、KB10、LWQ7、PL1、PL2、PL3、PL4、PL5、PL8、PL10、SR2、DQ6、DQ7、SS2、SS4、SS10、SB8、EF494178、EF494177、EU807950	HAP-52	SB9
HAP-25	KB3	HAP-53	AY374124
HAP-26	KB4	HAP-54	EU807951
HAP-27	KB5	HAP-55	EF494179
HAP-28	KB7	HAP-56	DQ6

```

[                                     1111111 111]
[           1111 1111122222 2333333333 3334444444 4555555555 5556666777 8888999999 9900000000 111]
[      123344567 7999990113 7899914458 9223455557 8991355778 9011123467 7993357568 4778801127 8925677788 233]
[      8240815710 5123577236 2035883848 4473412345 9579649486 5245671672 5292746839 7263666805 3733745616 089]
#HAP-1  ATTATTCTCC ATGAATTCGC GATCTTTAAA ACCATAATTT GTCTAGTATA ATAAACACTC TTTTTTACAC TTAGTTCATC
TCAATCTTCCAAG
#HAP-2  ..G.T.....C.....C...T.....
#HAP-3  .....C.....C...
#HAP-4  .....C.....
#HAP-5  .....C.....G.
#HAP-6  ..G.T.....C.....C...T.....T...
#HAP-7  ....T.....C.C.G....CC....C.....C.....
#HAP-8  .....C.C.C....
#HAP-9  ....T...G...C.C.G....CC...C...G...C.....C.....
#HAP-10 ....T.....C.G....CC...C.....C.....C.....
#HAP-11 ....T.....T...C.G....CC...C.....C.....C.....
#HAP-12 .....C.....C.....
#HAP-13 .....C.....C.....
#HAP-14 .....G.....C...T.....
#HAP-15 .....G.....C.....
#HAP-16 .....G...C.....T.....
#HAP-17 ....T.....C...T.G.....
#HAP-18 .....A.....C...C.....
#HAP-19 GC.....T.....G...C...G.....C.....
#HAP-20 ....T.....TT....C...T.....
#HAP-21 ....T.T.....C.....C...T.....
#HAP-22 ....T.....T.....C...T.....
#HAP-23 ....T.....C.G....CC...C.....C.....AC.....
#HAP-24 ....T.....C...T.....
#HAP-25 .....C.....G.....C.....
#HAP-26 GC...T.....C.G....CC...C.....C.....C.....
#HAP-27 ....T.....C...T.....A...
#HAP-28 .....C.....C.....
#HAP-29 ....TC...AA...C.G....CC...C.....C.....C.....
#HAP-30 .....C.....C.....
#HAP-31 ....T.....CC...T.....G...
#HAP-32 .....C...A.....C.....
#HAP-33 ....T.....C.CG....CC...C.....C.....C.....
#HAP-34 ....T.....C.G....CC...C.C.....C.....CA...A...T...
#HAP-35 ....T.....T...C...T.....
#HAP-36 ....T.....C.C.G....CC...C.....C.....C.....C...
#HAP-37 ....T.....C.G....G.CC...C.....C.....C.....
#HAP-38 .....T.....C.....
#HAP-39 ....T.....C.C.G....CC...C.....C.....C.....C...
#HAP-40 ...C.....C.....
#HAP-41 .....T.C.....
#HAP-42 ....T.....C.G....CC...C.C.....C.....C...G.....
#HAP-43 .....C.....C.....
#HAP-44 ...G.....A.....C...C.....
#HAP-45 ....T.....C...T.....CC...T.....
#HAP-46 .....G.....C.....
#HAP-47 .....G...G.....C...G.....
#HAP-48 ....T.....C...T...A.....
#HAP-49 .....C.....C.....
#HAP-50 .....C...C.....
#HAP-51 ....T.....C...C...T.....
#HAP-52 .....G.....C.....
#HAP-53 .....CTT.....C.....
#HAP-54 .....T.....C.....
#HAP-55 .....C.....GA
#HAP-56 ....T...G.....A...G...C...T.....

```

图 2 西藏牦牛 mtDNA *cytb* 基因的单倍型序列变异

Fig. 2 Sequence variation of haplotypes of mtDNA *cytb* gene for Tibetan yaks

表 6 西藏牦牛 11 个品种或类群间的平均遗传距离

Table 6 Average genetic distances among populations of Tibetan yaks

	PL	LWQ	SB	SS	SR	KB	DQ	BQ	GB	JL
LWQ	0.002 74									
SB	0.003 89	0.002 89								
SS	0.002 60	0.004 23	0.002 49							
SR	0.003 00	0.004 82	0.002 04	0.004 81						
KB	0.004 54	0.002 54	0.003 68	0.002 23	0.002 72					
DQ	0.004 56	0.001 56	0.003 18	0.004 18	0.003 07	0.004 74				
BQ	0.004 98	0.005 49	0.003 07	0.002 04	0.002 37	0.005 09	0.004 39			
GB	0.004 46	0.004 32	0.005 19	0.004 49	0.004 28	0.004 21	0.004 91	0.005 07		
JL	0.003 95	0.005 23	0.004 05	0.003 05	0.003 28	0.004 14	0.004 91	0.004 70	0.002 70	
JD	0.004 91	0.003 35	0.005 25	0.003 53	0.002 89	0.003 82	0.004 33	0.005 26	0.002 07	0.004 74

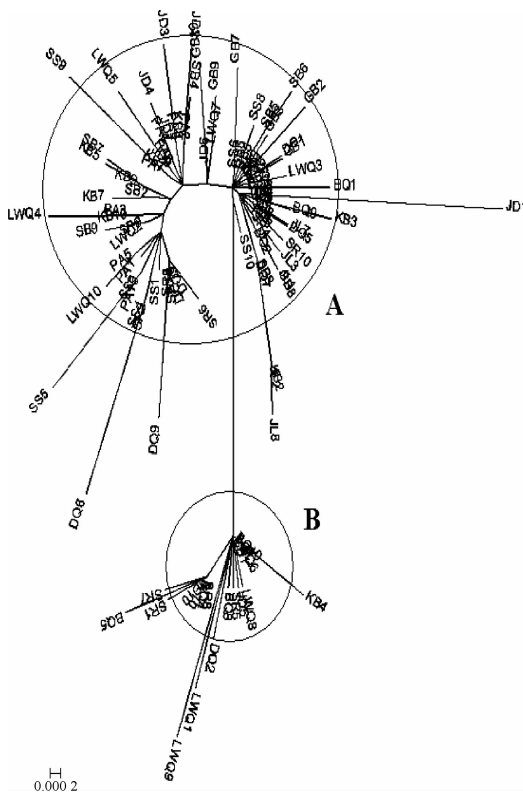


图 3 西藏牦牛 11 个品种或类群的母系起源
Fig. 3 Origin map of 11 groups of Tibetan yaks

3 讨论

3.1 西藏牦牛 *cytb* 基因的遗传多样性

本研究测定了西藏牦牛 11 个品种或类群 110 头牦牛的 *cytb* 基因序列, 结果该基因大小均为 1 140 bp, 共发现 89 个多态位点(单一信息位点 75 个, 简约信息位点 14 个), 新发现 49 种单倍型, 单倍

型多样性为 0.884, 核苷酸多样性为 0.003 814, 各品种或类群间在 *cytb* 的苯丙氨酸(F, Phe)、亮氨酸(L, Leu)、异亮氨酸(I, Ile)、苏氨酸(T, Thr)、缬氨酸(V, Val)、丝氨酸(S, Ser)等 6 种氨基酸上存在差异。

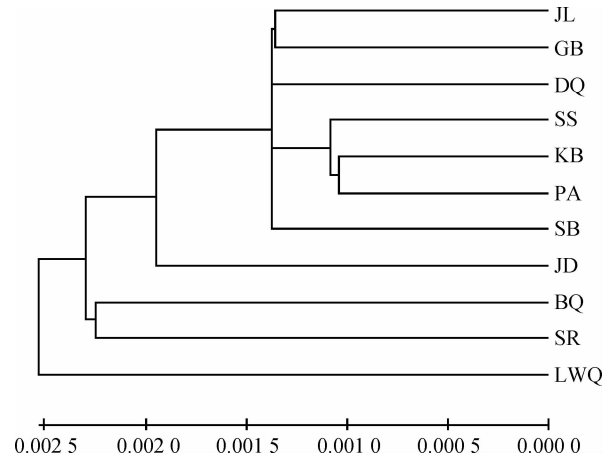


图 4 西藏牦牛品种或类群间的 NJ 分子系统树
Fig. 4 The NJ phylogenetic tree constructed among 11 groups of Tibetan yak

在 11 个西藏牦牛品种或类群的核苷酸变异中, 有转换和颠换, 以转换为主; 没有缺失、插入突变。核苷酸的变异以同义替换为主, 同义替换频率(0.010 01)高于非同义替换频率(0.001 60), 这可能是净化选择的结果。在 mtDNA *cytb* 基因序列密码子位点的突变中, 发生在密码子第 3 位点的突变绝大部分是同义突变, 而在密码子第 1、第 2 位点的突变则大部分引起细胞色素 b 中氨基酸序列改变, 属于错义突变, 颠换导致错义突变的概率远远高于转换, 这符合核苷酸突变的规律。

在本研究的西藏牦牛中,*cytb* 基因的 AT 含量(58%)明显高于 GC 含量(42%),这符合大多数动物 mtDNA AT 含量偏高的普遍特征。另外,*cytb* 基因序列密码子第 3 位核苷酸碱基的组成存在较大的偏向,A 的平均含量最高(45.4%),而 G 的含量最低(3.0%),核苷酸组成偏差指数达到 0.58,高于蔡欣等^[7]测定我国 10 个地方黄牛品种 47 头个体的 *cytb* 基因密码子第 3 位点核苷酸表现出碱基组成偏好(0.45)以及平均整体 AT 含量(56.7%)。cytb 蛋白在呼吸链中起电子传递的作用,其结构具有保守性,对一些微小的突变极为敏感。牦牛与黄牛其生存环境的不同,导致了两者在 *cytb* 结构上的差异,这是否与牦牛的低氧适应性有关,值得进一步研究。

上述西藏牦牛 *cytb* 基因的遗传变异分析结果表明,西藏 11 个牦牛品种或类群具有丰富的遗传多样性。对平均核苷酸多样性和个体间的平均遗传距离的分析发现,两者具有同一性,均可分为高、中、低 3 个层次,11 个品种或类群中类乌齐牦牛相对较高,其群体内的单倍型多样性达到 1,说明类乌齐牦牛相对其他品种或类群具有丰富的遗传多样性。而帕里牦牛无论在个体间的平均遗传距离,还是平均核苷酸多样性及单倍型多样性方面都相对较低,帕里牦牛作为藏区 3 大优良牦牛品种或类群之一,遗传多样性相对较低,是较纯的牦牛品种或类群。而整个藏东北 4 大品种或类群(类乌齐、巴青、丁青、江达)的个体间平均遗传距离、平均核苷酸多样性都高于帕里、斯布、嘉黎及其围绕在这 3 大品种或类群周边的其他品种或类群(如工布江达)。但 11 个品种或类群之间的平均核苷酸歧异度(Dxy)在 0.002 04~0.005 49 之间,低于蔡欣报道的中国黄牛 18 个品种间的平均核苷酸歧异度(0.000 48~0.015 91)^[8],说明所研究的西藏牦牛 mtDNA 多样性不及黄牛丰富,遗传分化程度也相对较低。

3.2 西藏牦牛的系统进化关系

本研究以 *cytb* 基因为标记,基于 Kimura-2-parameter 遗传距离,构建了西藏牦牛 *cytb* 基因单倍型的 NJ 分子系统树。结果西藏牦牛的 49 种单倍型被明显地分为 2 个分支,在有野牦牛的一支中,包含 13 种单倍型,8 个类群的 19 个个体,其中类乌齐、巴青、桑日牦牛各有 4 头,这些品种或类群与野牦牛聚为一类,这可能与他们的起源、驯化有关,特别是以藏东北为典型,这与蔡立^[9-10]的观点相一致。而另一支与现存的野牦牛没有聚在一起,他们与野生

牦牛的关系相对较远,从我国华北、内蒙以及西伯利亚、阿拉斯加等地牦牛考古化石的结果看,无论是现存的野牦牛,还是由野牦牛驯化而来的家牦牛都是起源于欧亚大陆东北部的原始牦牛,这与钟金城^[11]关于野牦牛不是家牦牛始祖、始源或祖先的观点一致。

通过起源分析发现,西藏牦牛起源于 2 个母系祖先,在进化过程中伴随自然因素和人为因素的影响出现相互交流的情况。根据西藏牦牛的聚类结果看,帕里牦牛与康布牦牛首先聚为一类,然后与桑桑牦牛相聚,这 3 个品种或类群聚为一类后再与嘉黎牦牛、工布江达牦牛、丁青牦牛、斯布牦牛等聚成一大类,接下来才与江达牦牛相聚;巴青牦牛与桑日牦牛聚为一类后,再同上述品种或类群聚为更大的一类,最后才与类乌齐牦牛聚合。但考虑到桑日牦牛位于山南地区,巴青牦牛位于那曲地区,两地地理位置相距较远,而巴青牦牛和青海玉树地区牦牛有着部分种群交流,所以作者认为巴青牦牛和桑日牦牛应为 2 类;在本研究中,发现江达牦牛中约有 20% 的个体与野牦牛关系较近,江达牦牛应单独为一类。类乌齐牦牛有着丰富的遗传多样性,综合考古学、历史学等分析类乌齐牦牛应该划为单独的一类。综上所述,从 *cytb* 基因的研究将西藏 11 个牦牛品种或类群大致划分为:帕里牦牛系、江达牦牛系、巴青牦牛系、桑日牦牛系、类乌齐牦牛系等 5 大系是较合理的。

在西藏的 11 个牦牛品种或类群中,类乌齐牦牛群体的遗传多样性最丰富,是本次研究中单倍型最多的品种或类群,结合西藏发展史资料和考古学资料^[12],作者认为,作为昌都地区具有代表性的类乌齐牦牛,随着古羌人和古鲜卑人融合、迁移以及现代西藏各民族的迁移,牦牛也逐步走向青藏高原各地,类乌齐牦牛是西藏牦牛中多样性最丰富,且较为接近牦牛起源的品种或类群,这与本次研究中基于类群间平均核苷酸歧异度建立的系统进化树得出的结果相一致,预示西藏东部可能是家牦牛的起源地之一。嘉黎牦牛与其他地方品种或类群分享着 4 种单倍型,提示嘉黎牦牛与其他地方品种或类群有着广泛的基因交流;这与嘉黎牦牛作为西藏 3 大优良品种或类群之一,分布于西藏牧业发展的腹地地带,牦牛引种覆盖着周边地区的实际情况一致。

在牛种间的聚类分析中,水牛属是牛族中最先分化出来的一支,然后是爪哇野牛、普通牛、瘤牛、欧洲野牛,最后才是美洲野牛以及家牦牛和野牦牛。

与其他牛种的亲缘关系分析表明,西藏牦牛与美洲野牛亲缘关系较近,而与牛属间的关系相对较远,这和 Miyamoto^[13]、Kraus^[14] 和李齐发^[15-16] 等得到的结论一致。支持将牦牛划分为牛亚科中的一个独立属即牦牛属的观点。但早在殷商时期就开始的牦牛与普通牛的杂交^[17-18],在西藏牦牛的起源、进化和形成过程中可能吸收了部分瘤牛和普通牛的基因。

3.3 西藏牦牛 *cytb* 基因作为分子遗传标记

哺乳动物线粒体细胞色素 b(*cytb*)是构成线粒体氧化磷酸化系统复合体Ⅲ的蛋白质之一,其结构和功能在 mtDNA 的 13 个蛋白质编码基因中被了解得最为清楚^[19]。*cytb* 基因一些区域比其它编码基因更保守,存在较强的进化约束;密码子位点突变率有差异,虽然存在一定的进化噪音,分析种内品种间的系统发育有一定困难,变异程度低,但无论如何,*cytb* 是研究相对进化史的最好选择,研究群体遗传变异有较高价值。已经证实,*cytb* 序列在解决亲缘关系很近的分类阶元间的系统关系方面很有用,被认为是解决系统发育问题最可信的线粒体 DNA 标记之一^[20]。

4 结 论

本试验研究了西藏 11 个牦牛类群的细胞色素 b 基因全序列,显示西藏牦牛类群的细胞色素 b 基因全序列长均为 1 140 bp,有单倍型 53 种,序列间有 14 个 SNPs 多态位点,核苷酸变异类型包括转换和颠换,无插入和缺失,以同义突变为主。从细胞色素 b 基因看,西藏牦牛具有较丰富的遗传多样性,11 个牦牛类群可分为:帕里牦牛系、江达牦牛系、巴青牦牛系、桑日牦牛系、类乌齐牦牛系等 5 大系。

参考文献:

- [1] CAI L, WIENER G. The yak. Bangkok[M]. The Regional Office for Asia and the Pacific Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1995.
- [2] 张成福,徐丽娟,姬秋梅,等. 西藏牦牛 mtDNA D-loop 区的遗传多样性及其遗传分化[J]. 生态学报, 2012,32(5):1-9.
- [3] 赵上娟,陈智华,姬秋梅,等. 西藏牦牛 mtDNA COⅢ 全序列测定及系统进化关系[J]. 中国农业科学, 2011,44(23):4902-4910.
- [4] 柴志欣,赵上娟,姬秋梅,等. 西藏牦牛的 RAPD 遗传多样性及其分类研究[J]. 畜牧兽医学报,2011,42(10):1380-1386.
- [5] VLADIMIR O, POLTORAUS A, ZHIVOTOVSKY L A, et al. Mitochondrial DNA sequence diversity in Russians [J]. *FEBS Lett*,1999, 445(1): 197-201.
- [6] AJ 哈伍德. DNA 及 RNA 基本试验技术[M]. 北京: 科学出版社,2002: 242-244.
- [7] 蔡欣,陈宏,雷初朝,等. 从 *CytB* 基因全序列分析中国 10 个黄牛品种的系统进化关系[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2006,22(2):168-171.
- [8] 蔡欣. 中国黄牛母系和父系起源的分子特征与系统进化研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2006.
- [9] 蔡立. 中国牦牛[M]. 北京:农业出版社,1991: 45-47.
- [10] 蔡立. 牦牛的生物学特性[C]. 西南民族学院第一届学术讨论会论文,1963:7-9.
- [11] 钟金城. 牦牛遗传与育种[M]. 成都:四川科学出版社,1996.
- [12] 郑汕. 西藏发展史[M]. 昆明:云南民族出版社,1992.
- [13] MIYAMOTO M, TANHAUSER S M, LAIPIS P J. Systematic relationship in the artiodactyl tribe bovini (family bovidae), as determined from mitochondrial DNA sequences[J]. *Syst Zool*,1989,38:342-349.
- [14] KRAUS F, ARECKI J L, MIYAMOTO M, et al. Mispairing and compensational changes during the evolution of mitochondrial ribosomal RNA[J]. *Mol Biol Evol*,1992, 9(4): 770-774.
- [15] 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.
- [16] 李齐发,李尹侠,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):1118-1123.
- [17] 杨万远. 野牦牛线粒体基因组全序列测定及其系统进化研究[D]. 成都:西南民族大学,2008.
- [18] 杨万远,钟金城,陈雪梅,等. 野牦牛 mtDNA *cytb* 基因全序列测定及系统进化关系[J]. 中国草食动物, 2009,3:8-13.
- [19] HATEFI Y. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system[J]. *Annu Rev Biochem*,1985,54:1015-1069.
- [20] 潘宝平,卜文俊. 线粒体基因组的遗传与进化研究进展[J]. 生物学通报,2005,40(8):1-3.