

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.00175

西藏牦牛微卫星 DNA 的遗传多样性

李铎¹, 柴志欣¹, 姬秋梅², 张成福², 信金伟², 钟金城¹

1. 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;
2. 西藏自治区农牧科学院畜牧兽医研究所, 拉萨 850009

摘要: 为了解西藏牦牛品种或类群的遗传多样性和亲缘关系, 文章选用 8 对微卫星标记引物, 利用 PCR 和复合电泳银染技术, 通过计算基因频率(P)、有效等位基因数(N_e)、群体杂合度(H_e)、多态信息含量(PIC)和遗传距离(D), 对西藏 11 个牦牛类群共 480 个个体进行了遗传多样性和系统进化分析。结果表明: (1) 8 个微卫星标记在西藏牦牛类群中均表现出多态性, 且均属高度多态位点, 遗传多样性丰富; (2) 8 个微卫星标记的平均多态信息含量在西藏牦牛类群中均高于 0.5, 其中 *HEL13* 最高为 0.8496, *TGLA57* 最低为 0.7349; 在 11 个牦牛类群中, 桑日牦牛的平均多态信息含量最高(0.7949), 该群体内部存在较多的遗传变异; 丁青牦牛最低(0.7505), 则群体相对较纯; (3) 在 11 个牦牛类群中, 其杂合度大小分别为: 桑日(0.8193)>江达(0.8190)>桑桑(0.8157)>巴青(0.8150)>康布(0.8123)>嘉黎(0.8087)>工布江达(0.8054)>斯布(0.8041)>类乌齐(0.8033)>帕里(0.8031)>丁青(0.7831), 西藏东部牦牛的遗传多样性较西部的遗传多样性大, 预示西藏东部可能是牦牛的发源地之一; (4) 根据遗传距离, 用 UPGMA 法构建聚类关系, 表明西藏 11 个牦牛类群可以分为三大类, 即嘉黎牦牛、帕里牦牛、桑桑牦牛、巴青牦牛、类乌齐牦牛、康布牦牛聚为一类, 斯布牦牛、工布江达牦牛、桑日额牛、江达牦牛聚为一类, 丁青牦牛单独成为一类。综上所述, 西藏牦牛的遗传多样性较丰富, 所选微卫星标记可用于西藏牦牛遗传多样性的评估。

关键词: 西藏牦牛; 微卫星; 遗传多样性

Genetic diversity of DNA microsatellite for Tibetan Yak

LI Duo¹, CHAI Zhi-Xin¹, JI Qiu-Mei², ZHANG Cheng-Fu², XIN Jin-Wei², ZHONG Jin-Cheng¹

1. Key Laboratory of Animal Genetics and Breeding, Southwest University for Nationalities, State Ethnic Affairs Commission and Ministry of Education, Chengdu 610041, China;
2. Institute of Animal Science and Veterinary, Academy of Agricultural Sciences, Tibet Autonomous Region, Lhasa 850009, China

Abstract: To assess the genetic diversity and relationship of the Tibetan yak breeds. The genetic diversity and phylogenies of a total of 480 individual from 11 Tibetan yak groups were analyzed using PCR and multiplex gel electrophoresis of silver staining technology with eight pairs of microsatellite markers. The result showed that these markers were highly polymorphic loci with rich genetic diversity in the Tibetan yak populations. The average polymorphic information content

收稿日期: 2012-10-04; 修回日期: 2012-11-26

基金项目: 国家科技支撑计划课题资助(编号: 2012BAD03B02)和西南民族大学研究生学位点建设项目(编号: 2011XWD-S071007)资助

作者简介: 李铎, 硕士, 专业方向: 基因组与生物信息学。E-mail: 12501413@qq.com

通讯作者: 钟金城, 博士, 教授, 研究方向: 动物遗传学。E-mail: zhongjincheng518@126.com

网络出版时间: 2013-1-5 11:07:53

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20130105.1107.001.html>

(*PIC*) in 11 groups of yak were higher than 0.5. The highest *HEL13* was 0.8496, and the lowest *TGLA57* was 0.7349. Among them, the *PIC* of Dingqing yak was minimum (0.7505), indicating that the group is relatively pure. Sangri Yak had the highest *PIC* value (0.7949) indicating greater genetic variation within the groups. Among the 11 groups examined, the order of heterozygosity size was Sangri(0.8193)>Jiangda(0.8190)>Sangsang(0.8157)>Baqing(0.8150)>Kangbu(0.8123)>Jiali(0.8087)>Gongbujiangda(0.8054)>Sibu(0.8041)>Leiwuqi(0.8033)>Pali(0.8031)>Dingqing(0.7831). The groups from eastern Tibet had greater genetic diversity than those from Western Tibet, which indicate that Tibet may be one of the cradles of the yak. According to the genetic distance, the cluster relationship constructed with UPGMA and NJ methods showed that 11 yak groups in Tibet could be divided into three forms. In summary, Tibetan yak has abundant genetic diversity and the selected microsatellite markers can be used to evaluate genetic diversity of Tibetan yak.

Keywords: Tibetan Yak; microsatellite loci; genetic diversity

牦牛是分布于海拔 3 000 m 以上, 以青藏高原为中心及其毗邻的高山、亚高山地区的特有牛种, 能适应高寒、缺氧等极端生态条件, 在遗传资源上是一个极为宝贵的基因库^[1,2]。西藏作为我国牦牛的主产区之一, 全区 71 个县均有牦牛分布, 共有牦牛 492.3 万余头, 占全国牦牛总数的 30%。由于其特殊的地理条件和生态环境, 形成了巴青牦牛、丁青牦牛、康布牦牛、桑桑牦牛、桑日牦牛、江达牦牛、嘉黎牦牛、斯布牦牛、帕里牦牛、类乌齐牦牛、工布江达牦牛等特有的地方品种和类群, 牦牛遗传资源十分丰富。从 20 世纪 50 年代起, 中国牦牛学者主要对牦牛的生产性能进行了深入细致的研究, 进入 20 世纪 90 年代后, 又利用不同的遗传标记从分子水平上对牦牛品种的遗传多样性进行了较深入、系统的研究, 并取得了阶段性的成果^[3~7]。因西藏自

治区特殊的地理位置, 对西藏牦牛的研究仅限于少数品种或类群, 且很少从 DNA 水平上对其遗传多样性、遗传结构和分化进行系统研究, 利用微卫星标记研究西藏多个牦牛类群的遗传多样性、亲缘关系及其分类尚属空白。因此, 本研究利用微卫星 DNA 研究了西藏 11 个牦牛类群的遗传多样性及类群间的系统进化关系, 为评价、保护和利用西藏的牦牛遗传资源提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

从 11 个西藏牦牛品种或类群中, 选取健康成年牦牛, 共 480 头(表 1), 采集耳组织, 75%乙醇保存带回实验室, 于 -80 °C 的冰箱中保存备用。

表 1 实验牦牛类群、数量与采样地点

类群	数量	采样地点	代号
桑桑牦牛	50	西藏自治区日喀则地区昂仁县	SS
帕里牦牛	50	西藏自治区亚东县帕里地区	PL
康布牦牛	50	西藏自治区日喀则地区亚东县康布乡	KB
嘉黎牦牛	50	西藏自治区昌都地区嘉黎县	JL
巴青牦牛	50	西藏自治区那曲地区巴青县	BQ
丁青牦牛	10	西藏自治区昌都地区丁青县	DQ
类乌齐牦牛	25	西藏自治区昌都地区类乌齐县	LW
江达牦牛	50	西藏自治区昌都地区江达县	JD
桑日牦牛	50	西藏自治区山南地区桑日县	SR
工布江达牦牛	50	西藏自治区林芝地区工布江达县	GB
斯布牦牛	45	西藏自治区墨竹工卡县斯布乡	SB
合计	480		

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取及检测

采用动物组织基因组 DNA 提取试剂盒 (TianGen 生物技术公司)提取基因组 DNA。用 1%的琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计双重检测 DNA 的纯度和浓度。

1.2.2 引物设计与 PCR 扩增

用于本研究的牛微卫星标记是由联合国粮农组织(FAO)及国际动物遗传学会(ISAG)推荐, 引物序列及微卫星所在染色体位置见表 2, 引物由上海英俊生物有限公司合成。

PCR总反应体系为 20 μL; 其中, 上、下游引物各 1 μL(10 pmol/μL), DNA 模板 1 μL(200~600 ng/μL), PremixExTaq 预混酶 10 μL, 灭菌 ddH₂O 7 μL。

PCR 扩增程序 94 预变性 4 min; 94 变性 40s, 各引物复性 30 s(复性温度见表 2), 72 延伸 1 min, 35 个循环; 72 延伸 8 min, 4 保存。

PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 自动凝胶成像系统拍照检测, 将检测阳性的 PCR 产物用 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 180V 电泳 80 min, 银染显色, 并用 BIO-RAD 凝胶成像分析系统

统照相并分析。

1.2.3 数据统计与处理

根据标准pBR322 DNA/Msp 计算个体等位基因片段大小, 用凝胶成像系统配套的Analvsis Tools 分析软件确定个体基因型。然后利用DCFA及Popgen 32 Version 1.32 计算不同微卫星位点的相关数据^[8]。

基因型频率计算公式: $P_{ij} = (ij)/N$

基因频率:

$$P_i = [2(ii)+(ij_1)+(ij_2)+...+(ij_n)]/2N$$

公式中 P_{ij} 表示 ij 型的基因型频率, P_i 表示等位基因 i 的频率, ii 表示纯合子 ii 的个体数目, j_1 到 j_n 表示与 i 等位基因共显性的第 1 到 n 个复等位基因, N 表示样本数。

群体内 Hardy-Weinberg 定律适应性检验公式为:

$$\chi^2 = \sum_i^n \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i} (df \geq 2)$$

其中 E_i : 理论值, O_i : 实际观察值, n : 等位基因数。

多态信息含量(PIC)的计算公式为:

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

其中 n 为等位基因数目, P_i 和 P_j 分别为第 i 个和第 j

表 2 8 个微卫星位点的性质及 PCR 反应条件

座位	引物序列(5'→3')	片段大小(bp)	复性温度()	染色体位置
TGLA53	F: GCTTTCAGAAATAGTTTGCATTCA	143~191	55	16
	R: ATCTTCACATGATATTACAGCAGA			
TGLA227	F: CGAATTCCAAATCTGTAAATTTGCT	75~105	55	18
	R: ACAGACAGAACTCAATGAAAGCA			
HEL13	F: TAAGGACTTGAGATAAGGAG	165~191	51.6	11
	R: CCATCTACCTCCATCTTAAC			
INRA005	F: CAATCTGCATGAAGTATAAATAT	120~160	55	12
	R: CTTCAGGCATACCCTACACC			
TGLA57	F: GCTTCCAAAACCTTTACAATATGTAT	77~99	55	1
	R: GCTTTTAAATCCTCAGCTTGCTG			
ILSTS013	F: ACACAAAATCAGATCAGTGG	121~135	58	9
	R: CTTGATCCTTATAGAACTGG			
TGLA73	F: GAGAATCACCTAGAGAGAGGCA	111~143	55	9
	R: CTTTCTCTTTAAATCTATATGGT			
AGLA293	F: GAAACTCAACCCAAGACAACCTCAAG	210~240	55	5
	R: ATGACTTTATTCTCCACCTAGCAGA			

个等位基因在群体中的频率。

群体杂合度(H_e)的计算公式为：

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^m P_i^2$$

其中 m 为等位基因数, P_i 为第 i 个等位基因频率。

有效等位基因数(N_e)的计算公式为：

$$N_e = 1 / \sum_{i=1}^m P_i^2$$

其中 m 表示某微卫星位点所具有的等位基因数; P_i 表示第 i 个等位基因的频率。

固定指数(F)计算公式为：

$$F = (H - H_0) / H$$

其中 H 为随机交配情况下杂合子的期望频率, H_0 为群体杂合子的观察频率。

2 结果与分析

2.1 PCR 产物聚丙烯酰胺凝胶电泳检测

对所选 8 个微卫星位点的 PCR 产物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 结果表明: 在西藏 11 个牦牛类群的 8 个微卫星标记上共发现了 69 个等位基因。其

中在微卫星标记 *TGLA53* 上发现的等位基因最多(13 个); 在标记 *ILSTS013* 上发现的等位基因最少(6 个)。且不同牦牛类群中的等位基因数有明显差异, 桑桑牦牛拥有全部的微卫星等位基因, 而工布江达牦牛只出现 13 个等位基因中的 6 个, 说明工布江达牦牛的变异率明显小于桑桑牦牛。微卫星标记 *TGCA227*、*HEL3* 在帕里牦牛中扩增产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果见图 1。通过电泳谱分析结果表明, 所选 8 个微卫星标记在西藏 11 个牦牛类群中的遗传多态性较丰富。

2.2 西藏牦牛等位基因的分布及频率

西藏牦牛在 8 个微卫星标记中的等位基因数、等位基因及基因频率见表 3。在标记 *TGLA53* 上检测到的等位基因数最多(13 个), 片段长度范围为 143~191 bp, 其中该标记在桑日牦牛中的基因频率最大(0.2900); 在标记 *ILSTS013* 上检测到的等位基因数最少(6 个), 变异范围为 121~135 bp, 该标记在丁青牦牛中的基因频率最大(0.4000)。且同一标记位点在不同牦牛类群中, 以及不同标记位点在同一牦

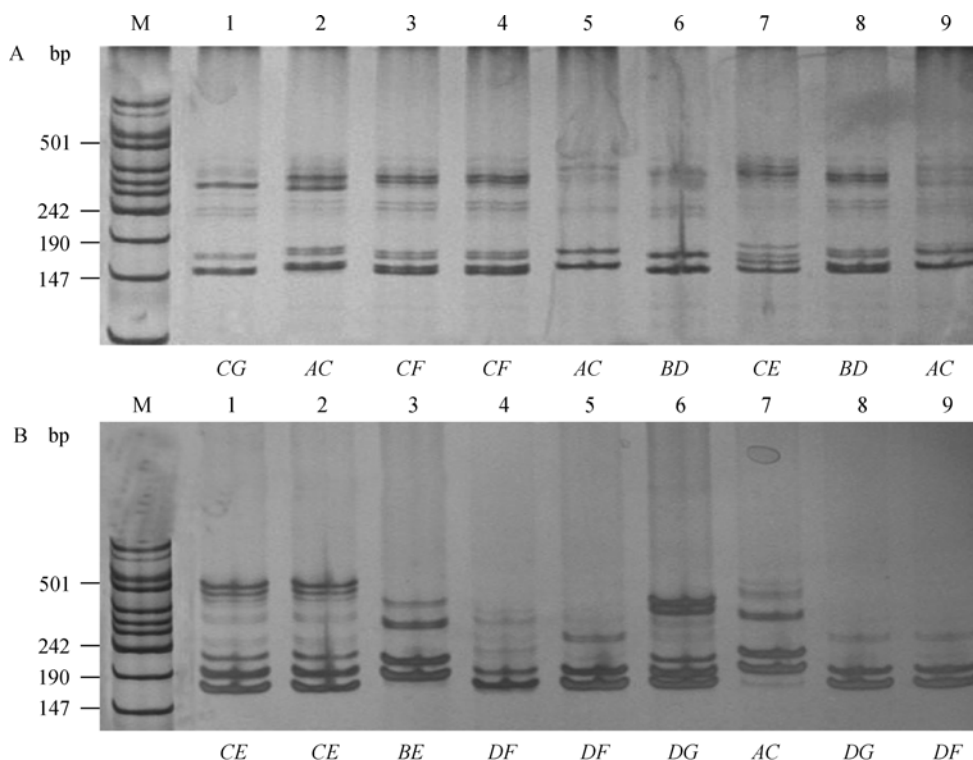


图 1 微卫星位点 *TGLA227*(A)、*HEL3*(B)在帕里(PL)类群中的扩增电泳图

1~9: 帕里类群部分个体 PCR 扩增产物; M: pUC18 DNA/Msp。

牛类群中所占的等位基因数均有较大差异, 说明所选 8 个微卫星标记在西藏牦牛类群中存在多态性, 可以充分反映西藏 11 个牦牛类群的遗传多样性。

2.3 西藏牦牛群体的遗传多样性

西藏 11 个牦牛类群在 8 个微卫星标记上的遗传多样性指标见表 4。在 11 个牦牛类群中, 其杂合度大小分别为: 桑日(0.8193)>江达(0.8190)>桑桑(0.8157)>巴青(0.8150)>康布(0.8123)>嘉黎(0.8087)>工布江达(0.8054)>斯布(0.8041)>类乌齐(0.8033)>帕里(0.8031)>丁青(0.7831), 表明西藏牦牛均具有较丰富的遗传多样性, 这与群体杂合度的分析结果一致, 且西藏东部牦牛的遗传多样性较西藏西部牦牛的遗传多样性大, 预示西藏东部可能是牦牛的发源地之一。

8 个微卫星标记在 11 个牦牛类群中的多态信息含量均高于 0.5, 各标记在不同牦牛类群中均呈高度多态, 其中标记 *HEL13* 最高, 为 0.8496, 显示该标记在西藏牦牛类群中存在较大的遗传变异; 标记 *TGLA57* 最低, 为 0.7349, 说明该标记的变异相对较小; 就 11 个牦牛类群的多态信息含量而言, 桑日牦牛最高(0.7949); 丁青牦牛最低(0.7505)。11 个牦牛类群的等位基因数为 6~13 个, 整个群体的平均等位基因数均值为 8.6250, 有效等位基因数(N_e)为 6.1671, 说明等位基因在牦牛群体中呈不均匀分布。8 个微卫星标记在西藏 11 个牦牛类群中的固定系数(Fis)分别为: *TGLA53*(-0.1175)、*HEL13*(-0.1516)、*INRA005*(-0.2485)、*TGLA57*(-0.2550)、*ILSTS013*(-0.2428)、*TGLA73*(-0.1776)、*AGLA293*(-0.1731)、

表 3 8 个微卫星位点在 11 个类群中等位基因频率

座位	等位 基因数目	等位 基因	基因频率										
			SS	PL	KB	JL	BQ	DQ	LW	JD	SR	GB	SB
<i>TGLA53</i>	13	A	0.0500	0.0800	0.0000	0.0000	0.0200	0.0500	0.0000	0.1200	0.0300	0.1000	0.0222
		B	0.1900	0.1500	0.0700	0.0800	0.0900	0.1000	0.1400	0.2200	0.0600	0.1500	0.1000
		C	0.1200	0.0300	0.0500	0.1600	0.0500	0.1000	0.0000	0.0700	0.2900	0.2200	0.1889
		D	0.1100	0.1600	0.0200	0.0700	0.1000	0.1500	0.1200	0.0700	0.1300	0.1400	0.2222
		E	0.1300	0.0900	0.1300	0.0200	0.1500	0.1500	0.2200	0.0300	0.1500	0.0100	0.0111
		F	0.0600	0.0100	0.0000	0.0000	0.0900	0.1500	0.1200	0.1500	0.0400	0.1900	0.0778
		G	0.1200	0.0800	0.0200	0.1700	0.0800	0.0500	0.0200	0.1800	0.1300	0.0300	0.2667
		H	0.0800	0.2100	0.1900	0.2700	0.1600	0.1500	0.2000	0.1400	0.1300	0.1600	0.0444
		I	0.0400	0.0800	0.2000	0.0700	0.1500	0.1000	0.1400	0.0200	0.0400	0.0000	0.0333
		J	0.0400	0.0300	0.0700	0.1300	0.0600	0.0000	0.0200	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
		K	0.0300	0.0600	0.0300	0.0100	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
		L	0.0100	0.0100	0.0700	0.0200	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0333
		M	0.0200	0.0100	0.1500	0.0000	0.0500	0.0000	0.0200	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<i>TGLA227</i>	10	A	0.1200	0.0900	0.1300	0.3500	0.1400	0.4000	0.1400	0.0700	0.1000	0.0700	0.0667
		B	0.1400	0.3200	0.2300	0.2500	0.2500	0.3000	0.2800	0.1400	0.2500	0.2800	0.2222
		C	0.1900	0.2100	0.1600	0.1100	0.2900	0.1500	0.2800	0.1400	0.2100	0.1300	0.2444
		D	0.1000	0.2800	0.1900	0.1000	0.1100	0.0500	0.1400	0.2300	0.1200	0.1500	0.1667
		E	0.1500	0.0700	0.1300	0.0800	0.0800	0.0500	0.0800	0.1100	0.1200	0.1300	0.0778
		F	0.1400	0.0100	0.1000	0.0500	0.0600	0.0000	0.0600	0.1400	0.1000	0.0700	0.1000
		G	0.0300	0.0000	0.0200	0.0100	0.0400	0.0000	0.0000	0.0600	0.0700	0.1000	0.0778
		H	0.0400	0.0100	0.0200	0.0500	0.0200	0.0000	0.0200	0.0700	0.0100	0.0400	0.0222
		I	0.0400	0.0100	0.0200	0.0000	0.0100	0.0500	0.0000	0.0200	0.0000	0.0300	0.0111
		J	0.0500	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0200	0.0200	0.0000	0.0111
<i>HEL13</i>	11	A	0.0400	0.0500	0.1000	0.1500	0.1000	0.1000	0.1000	0.0900	0.1400	0.1100	0.0667
		B	0.1500	0.1300	0.1800	0.1300	0.1100	0.2000	0.1400	0.1900	0.2300	0.2700	0.2444

(续表 3)

座位	等位 基因数目	等位 基因	基因频率										
			SS	PL	KB	JL	BQ	DQ	LW	JD	SR	GB	SB
INRA005	8	C	0.1900	0.1900	0.2000	0.1400	0.1900	0.2000	0.1200	0.1300	0.0900	0.1300	0.1667
		D	0.1500	0.1400	0.0500	0.1100	0.1000	0.1500	0.1800	0.1300	0.1100	0.0300	0.0778
		E	0.0500	0.1500	0.1900	0.0800	0.1100	0.1000	0.1000	0.0500	0.1600	0.1200	0.2111
		F	0.1000	0.0900	0.1000	0.0900	0.0800	0.1500	0.0800	0.1600	0.1200	0.1700	0.0667
		G	0.1200	0.0800	0.1400	0.1100	0.1500	0.0500	0.0800	0.1100	0.1100	0.0900	0.0889
		H	0.1200	0.0700	0.0400	0.1000	0.1100	0.0500	0.1000	0.0700	0.0100	0.0300	0.0556
		I	0.0400	0.0500	0.0000	0.0800	0.0300	0.0000	0.0800	0.0400	0.0100	0.0400	0.0222
		J	0.0400	0.0500	0.0000	0.0100	0.0100	0.0000	0.0200	0.0200	0.0200	0.0100	0.0000
	7	K	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0100	0.0000	0.0000	0.0100	0.0000	0.0000	0.0000
		A	0.2800	0.2500	0.3400	0.2300	0.1000	0.0500	0.1400	0.0700	0.0900	0.0900	0.0778
		B	0.1900	0.2300	0.2000	0.2400	0.2800	0.3500	0.2200	0.2400	0.2300	0.2800	0.2889
		C	0.1700	0.2800	0.2100	0.2100	0.3300	0.1500	0.2000	0.2000	0.2400	0.2500	0.2778
		D	0.2200	0.1300	0.1700	0.1200	0.1800	0.3000	0.2800	0.2200	0.2300	0.2100	0.2000
		E	0.0800	0.0600	0.0700	0.1100	0.0700	0.0500	0.0600	0.1700	0.1100	0.0800	0.1000
		F	0.0600	0.0200	0.0100	0.0600	0.0400	0.0000	0.0800	0.0600	0.1000	0.0500	0.0444
		G	0.0000	0.0200	0.0000	0.0300	0.0000	0.1000	0.0200	0.0300	0.0000	0.0300	0.0111
TELA57	H	0.0000	0.0100	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0100	0.0000	0.0100	0.0000	
	A	0.2300	0.2600	0.1300	0.1900	0.1400	0.1500	0.0600	0.1900	0.1000	0.1400	0.1667	
	B	0.2600	0.3000	0.2400	0.2200	0.2700	0.2500	0.3800	0.2800	0.3400	0.2700	0.2556	
	C	0.2700	0.2800	0.3000	0.2800	0.2800	0.2500	0.2000	0.2600	0.2100	0.2600	0.2444	
	D	0.1700	0.1200	0.2000	0.1500	0.2100	0.2500	0.2600	0.2300	0.2300	0.2400	0.2556	
	E	0.0500	0.0300	0.1100	0.1200	0.0800	0.1000	0.0600	0.0400	0.0900	0.0700	0.0667	
	F	0.0200	0.0000	0.0200	0.0300	0.0100	0.0000	0.0200	0.0000	0.0200	0.0200	0.0111	
	G	0.0000	0.0100	0.0000	0.0100	0.0100	0.0000	0.0200	0.0000	0.0100	0.0000	0.0000	
ILSTS013	A	0.2200	0.1400	0.1500	0.1500	0.1600	0.0500	0.2400	0.2100	0.1100	0.0900	0.0889	
	B	0.2900	0.2200	0.2500	0.3000	0.2200	0.4000	0.2400	0.1900	0.2400	0.3400	0.3111	
	C	0.2100	0.2700	0.2700	0.2000	0.2900	0.1500	0.2000	0.3300	0.2600	0.1700	0.1667	
	D	0.2500	0.2400	0.1900	0.2000	0.2000	0.2500	0.1800	0.1600	0.2000	0.2400	0.3222	
	E	0.0300	0.1300	0.1000	0.1500	0.0900	0.1500	0.1200	0.0800	0.1100	0.1500	0.0889	
	F	0.0000	0.0000	0.0400	0.0000	0.0400	0.0000	0.0200	0.0300	0.0800	0.0100	0.0222	
	TGLA73	A	0.1100	0.1400	0.1700	0.1600	0.1000	0.1500	0.2000	0.1400	0.1600	0.1300	0.1333
		B	0.2000	0.2200	0.2100	0.1900	0.2000	0.2500	0.2800	0.2000	0.2000	0.2000	0.1778
C		0.2400	0.2700	0.2300	0.2500	0.2300	0.3000	0.1800	0.2100	0.2300	0.2700	0.2556	
D		0.2300	0.1500	0.1700	0.1500	0.2300	0.1500	0.2400	0.2100	0.1900	0.2400	0.1556	
AGLA293	E	0.1500	0.1700	0.1600	0.1700	0.0900	0.1000	0.0800	0.1400	0.0700	0.0800	0.2000	
	F	0.0700	0.0400	0.0600	0.0300	0.0800	0.0500	0.0200	0.0500	0.1000	0.0700	0.0444	
	G	0.0000	0.0100	0.0000	0.0500	0.0700	0.0000	0.0000	0.0500	0.0500	0.0100	0.0333	
	A	0.2800	0.2800	0.2100	0.4100	0.2300	0.2500	0.2600	0.2100	0.2600	0.1700	0.2222	
	B	0.2800	0.3000	0.2600	0.2300	0.2700	0.3000	0.2000	0.3300	0.1300	0.2900	0.2222	
	C	0.2700	0.2300	0.2700	0.1300	0.2700	0.2500	0.3000	0.2300	0.2100	0.2500	0.2667	
	D	0.1400	0.1000	0.1500	0.1300	0.1000	0.0500	0.1200	0.0900	0.2000	0.2000	0.1444	
	E	0.0300	0.0700	0.1000	0.0700	0.0500	0.0500	0.0800	0.0600	0.0600	0.0800	0.0778	
F	0.0000	0.0200	0.0100	0.0000	0.0500	0.0000	0.0200	0.0300	0.0700	0.0100	0.0222		
G	0.0000	0.0000	0.0000	0.0300	0.0300	0.1000	0.0200	0.0500	0.0700	0.0000	0.0444		

表 4 西藏 11 个牦牛类群 8 个微卫星位点的遗传多样性指标

多样性 指标	位点	类群										
		SS	PL	KB	JL	BQ	DQ	LWQ	JD	SR	GB	SB
杂合度 (H)	TGLA53	0.8890	0.8748	0.8656	0.8386	0.8878	0.8750	0.8424	0.8516	0.8350	0.8368	0.8230
	TGLA227	0.8712	0.7722	0.8404	0.7814	0.8096	0.7200	0.7936	0.8620	0.8392	0.8430	0.8358
	HEL13	0.8728	0.8846	0.8486	0.8858	0.8776	0.8500	0.8840	0.8748	0.8546	0.8432	0.8415
	INRA005	0.7982	0.7848	0.7676	0.8144	0.7638	0.7500	0.8032	0.8156	0.8064	0.7970	0.7812
	TGLA57	0.7748	0.7486	0.7830	0.7992	0.7784	0.7800	0.7400	0.7634	0.7688	0.7770	0.7773
	ILSTS013	0.7600	0.7906	0.7944	0.7902	0.7922	0.7300	0.7976	0.7780	0.8042	0.7672	0.7553
	TGLA73	0.8100	0.8060	0.8160	0.8210	0.8248	0.7900	0.7848	0.8276	0.8280	0.8012	0.8180
	AGLA293	0.7498	0.7634	0.7828	0.7394	0.7854	0.7700	0.7808	0.7790	0.8180	0.7780	0.8007
	平均	0.8157	0.8031	0.8123	0.8087	0.8150	0.7831	0.8033	0.8190	0.8193	0.8054	0.8041
多态信 息含量 (PIC)	TGLA53	0.8789	0.8624	0.8513	0.8197	0.8771	0.8617	0.8226	0.8341	0.8162	0.8154	0.8005
	TGLA227	0.8575	0.7237	0.8203	0.7520	0.7849	0.6758	0.7641	0.8471	0.8198	0.8257	0.8158
	HEL13	0.8594	0.8657	0.8291	0.8744	0.8651	0.8319	0.8726	0.8618	0.8378	0.8254	0.8228
	INRA005	0.7681	0.7516	0.7295	0.7883	0.7271	0.7112	0.7749	0.7897	0.7781	0.7679	0.7480
	TGLA57	0.7376	0.7044	0.7493	0.7693	0.7431	0.7439	0.6994	0.7222	0.7336	0.7408	0.7405
	ILSTS013	0.7176	0.7498	0.7632	0.7510	0.7607	0.6876	0.7661	0.7445	0.7756	0.7310	0.7164
	TGLA73	0.7822	0.7777	0.7892	0.7961	0.8015	0.7590	0.7506	0.8041	0.8049	0.7722	0.7926
	AGLA293	0.7051	0.7245	0.7480	0.7031	0.7528	0.7331	0.7472	0.7468	0.7933	0.7421	0.7714
	平均	0.7883	0.7700	0.7850	0.7817	0.7890	0.7505	0.7747	0.7938	0.7949	0.7776	0.7760
有效等 位基因 数(Ne)	TGLA53	9.0090	7.9872	7.4405	6.1958	8.9127	8.0000	6.3452	6.7385	6.0606	6.1275	5.6485
	TGLA227	7.7640	4.3898	6.2657	4.5746	5.2521	3.5714	4.8450	7.2464	6.2189	6.3694	6.0902
	HEL13	7.8616	8.6655	6.6050	8.7566	8.1699	6.6667	8.6207	7.9872	6.8776	6.3776	6.3084
	INRA005	4.9554	4.6468	4.3029	5.3879	4.2337	4.0000	5.0813	5.4230	5.1653	4.9261	4.5711
	TGLA57	4.4405	3.9777	4.6083	4.9801	4.5126	4.5455	3.8462	4.2265	4.3253	4.4843	4.4900
	ILSTS013	4.1667	4.7755	4.8638	4.7664	4.8123	3.7037	4.9407	4.5045	5.1073	4.2955	4.0868
	TGLA73	5.2632	5.1546	5.4348	5.5866	5.7078	4.7619	4.6468	5.8005	5.8140	5.0302	5.4953
	AGLA293	3.9968	4.2265	4.6041	3.8373	4.6598	4.3478	4.5620	4.5249	5.4945	4.5045	5.0186
	平均	5.9321	5.4780	5.5156	5.5107	5.7826	4.9496	5.3610	5.8064	5.6329	5.2644	5.2136

TGLA227(0.0738), 平均固定系数为-0.1595, 其中有 7 个标记的固定系数小于 0(表 5)。平均遗传分化指数(F_{st})为 0.021, 群体间遗传多样性比例(G_{st})为 2.1%, 群体内遗传多样性比例($1-G_{st}$)为 97.9%, 表明西藏牦牛种群内的遗传变异较种群间大, 则本研究西藏 11 个牦牛类群的遗传变异主要存在于种群内。

2.4 西藏牦牛群体间的遗传距离和分类

用 Popgen 32 软件计算各类群间的遗传距离 D (表 6), 用 UPGMA 法构建了类群间的分子关系聚类图(图 2)。结果表明:在 11 个牦牛类群间, 巴青牦牛与类乌齐牦牛的遗传距离最小(0.0528); 而康布牦牛与丁青牦牛间的遗传距离最大(0.1556)。西藏 11

表 5 8 个微卫星位点的固定系数

位点	固定系数		
	F_{is}	F_{it}	F_{st}
TGLA53	-0.1175	-0.0686	0.0438
TGLA227	0.0738	0.1028	0.0314
HEL13	-0.1516	-0.1341	0.0152
INRA005	-0.2485	-0.2191	0.0236
TGLA57	-0.255	-0.2413	0.0109
ILSTS013	-0.2428	-0.2219	0.0168
TGLA73	-0.1776	-0.1679	0.0083
AGLA293	-0.1731	-0.1555	0.0150
平均	-0.1595	-0.1352	0.0210

表 6 西藏牦牛类群间的遗传距离

类群	遗传距离										
	SS	PL	KB	JL	BQ	DQ	LW	JD	SR	BG	SB
PL	0.0710										
KB	0.0827	0.0663									
JL	0.1049	0.0958	0.1086								
BQ	0.0737	0.0589	0.0690	0.1082							
DQ	0.1349	0.1397	0.1556	0.1100	0.1039						
LW	0.0909	0.0933	0.0975	0.1463	0.0528	0.1095					
JD	0.0708	0.0911	0.1319	0.1470	0.0802	0.1564	0.1095				
SR	0.1055	0.1188	0.1206	0.1231	0.0772	0.1313	0.0921	0.1052			
GB	0.1001	0.1046	0.1240	0.1413	0.0921	0.0997	0.1185	0.0814	0.0674		
SB	0.0933	0.0968	0.1370	0.1384	0.0876	0.1259	0.1381	0.0972	0.0664	0.0660	

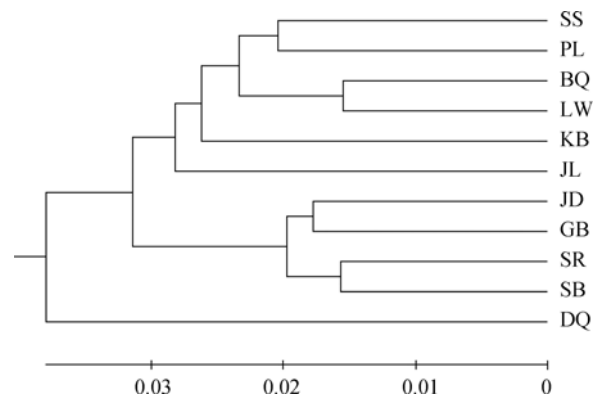


图 2 11 个西藏牦牛群体的 UPGMA 聚类图

个牦牛类群可以分为三大类，即嘉黎牦牛、帕里牦牛、桑桑牦牛、巴青牦牛、类乌齐牦牛、康布牦牛聚为一类，斯布牦牛、工布江达牦牛、桑日额牛、江达牦牛聚为一类，丁青牦牛单独聚为一类。可能与西藏牦牛所处的地理分布有一定的相关性。

3 讨 论

3.1 西藏牦牛的微卫星 DNA(SSR)遗传多样性

牦牛作为青藏高原特有的物种之一，对其遗传多样性的研究，有助于为进一步探讨其起源驯化、品种划分、以及遗传资源的合理保护、开发和利用等提供理论基础。进入 20 世纪 90 年代后，对牦牛遗传多样性的研究主要从生化和 DNA 两个水平展开，其中在 DNA 水平上，主要采用微卫星 DNA (SSR)、RAPD、RFLR、AFLP 等遗传标记技术进行相关研究。其中，微卫星标记以其在基因组中良好的覆盖性、丰富的多态信息含量、检测方便以及共显性遗传等优点

被认为是最理想的分子标记之一^[9~11]。钟金城等^[12]研究表明，5 个牦牛群体中 9 个微卫星标记的平均等位基因数为 6.8 个；本研究结果表明西藏 11 个牦牛类群 8 个微卫星位点的平均等位基因数为 8.6 个，其中标记 *TGLA53* 检测到的等位基因数最多(13 个)，标记 *ILSTS013* 检测到的等位基因数最少(6 个)，这说明不同牦牛类群具有较丰富的遗传多样性。冯冬梅等^[13]利用微卫星标记对牦牛、瘤牛和普通牛的特异性等位基因进行了相关分析，显示这 3 个牛种在不同微卫星标记上等位基因的 DNA 序列存在种属间的特异性差异。在本研究中，8 个微卫星标记在西藏 11 个牦牛类群中共检测到 69 个等位基因，其中标记 *TGLA53*、*HELI3*、*TGLA227* 的等位基因数较多，分别为 13、11、10 个，标记 *ILSTS013* 的最少，仅为 6 个；同一个标记在不同牦牛类群中的等位基因数也不尽相同，如标记 *TGLA53*，在桑桑牦牛中有 13 个等位基因，但在工布江达牦牛中只有 8 个，说明不同的遗传标记在不同牦牛类群中的遗传选择有差异，即受牦牛类群自身遗传背景的影响，也受所选遗传标记的影响。Qi 等^[14]利用微卫星 DNA(SSR)对中国、俄罗斯、蒙古、不丹等 8 个国家的 29 个群体共 1 076 头家牦牛个体中普通牛基因的渐渗现象进行了研究，结果显示不同地区的不同牦牛群体中普通牛基因渐渗水平的高低与海拔高度无显著相关；就本研究而言，通过对西藏 11 个牦牛类群的聚类分析显示牦牛类群的亲缘关系与地理位置相关。

等位基因频率是用来显示一个种群中基因的多样性以及基因库的丰富程度。由表 3 可以看出，各标记位点在不同牦牛类群中等位基因频率差异较

大。其中标记 *TGLA53* 中的等位基因 *K* 在桑桑牦牛、帕里牦牛、康布牦牛和嘉黎牦牛均有分布,但在其他类群中的等位基因频率均为零。标记 *TGLA227* 的等位基因 *F*、*G*、*H* 在丁青牦牛中均为零,而标记 *HEL13* 的该 3 个等位基因在丁青牦牛中均有分布,但标记 *INRA005* 的等位基因 *F*、*H* 在丁青牦牛中均为零。这说明在不同的牦牛类群中,各标记位点的等位基因频率分布不均,存在明显的品种间差异。

群体杂合度(*H*)反映各群体在多个基因位点上的遗传变异程度,是衡量群体变异的重要指标之一。西藏各牦牛类群间的基因杂合度差异不明显,其原因可能与西藏牦牛类群间频繁的基因交流有关,是否与牦牛的适应性、抗逆性有关,值得进一步深入研究。11 个牦牛类群间的多态信息含量介于 0.7505~0.7949 之间,多态信息含量均大于 0.5,属于高度多态位点。其中在遗传多样性分析中,多态信息含量大于 0.7 的微卫星 DNA 为理想的选择标记,鉴于此本研究所选的 8 个微卫星标记均可作为后续遗传连锁分析的候选标记。同时多态信息含量还关系着遗传标记的使用效率和选择潜力,多态信息含量值越大,其杂合子的比例也就越大,作为选择标记的潜力就越大,用于动物遗传育种研究的效果也就越好^[15,16]。就本研究 8 个遗传标记在西藏 11 个牦牛类群中的杂合度、多态信息含量和有效等位基因数来看,标记 *TGLA53* 均最大,表明西藏牦牛在该位点的遗传多样性最丰富,具有较高的选择潜力。固定指数是群体中杂合子频率差异的估计值,通过杂合子频率偏差反映群体在某个位点的遗传分化程度。8 个微卫星标记中, *TGLA227* 位点固定系数为正值,其他标记均为负值,平均固定系数为 -0.1595,表明西藏牦牛类群杂合子的缺陷度不高,即偏离 Hardy-Weinberg 平衡程度不大。

李荣岭等^[17]利用微卫星标记技术研究了中外 12 个普通牛品种的遗传结构,其中所选 *TGLA53*、*TGLA227* 及 *HEL13* 三个微卫星位点与本研究相同,此 3 个标记位点在中外 12 个品种的等位基因数分别为 22、16 和 11;多态信息含量分别为 0.8100、0.7600、0.5600,其等位基因数与本研究中的数据存在差异,这可能由于牦牛与普通牛在生存环境条件及地域分布上存在差异,导致这一结果的显著差异。但在多态信息含量上较为相近,说明同一微卫

星标记在不同牛种间的变异速度相近。Chakraborty 等^[18]、Nei 等^[19,20]指出一个等位基因在一个物种或多个物种中出现的次数越多说明该等位基因本身是原始、保守的;反之,出现次数较少,相对其他等位基因而言则更年轻、更具变异性。在本研究中,标记 *TGLA227* 的 A 等位基因、标记 *INRA005* 的 B 等位基因、标记 *TELA57* 的 B 等位基因以及 *ILSTS013* 的 B 等位基因可能是西藏牦牛类群相应微卫星位点中较为保守的等位基因;此外,所选微卫星位点的等位基因频率在不同牦牛类群中差异明显,这可能与不同牦牛类群长期适应其生存环境、遗传演化有关,是自然选择和人工选择共同作用的结果。

3.2 西藏牦牛的分类

牦牛作为西藏畜牧业生产的主要工具,对牦牛资源的认识、正确分类有助于在育种工作中充分发挥各品种或类群的潜力作用,为合理地利用和保存这些优良基因库提供正确的理论依据。近年来,学者们先后对牦牛品种间亲缘关系及系统进化关系进行了研究,但由于所选研究对象和采用研究方法不同,导致研究结果存在一定差异;加之受分布区自然条件限制,对西藏牦牛品种或类群间亲缘关系和分类一直没有进行过系统研究。本研究中,在 11 个牦牛类群间巴青牦牛与类乌齐牦牛的遗传距离最小,为 0.0528,其亲缘关系较近,而康布牦牛与丁青牦牛间的遗传距离最大,为 0.1556,这一结果也与地理分布的结果一致。西藏 11 个牦牛类群可以分为三大类,即帕里牦牛系、斯布牦牛系和丁青牦牛系。聚类结果与地理分布基本一致,说明所选微卫星 DNA 在西藏牦牛类群中的遗传多样性与地理分布呈一定相关性。西藏 11 个牦牛类群中仅对帕里牦牛、嘉黎牦牛、斯布牦牛 3 个类群的研究较多,而对其他牦牛类群的研究相对较少,可以参考验证分类的资料缺乏,今后有待于从牦牛的地理分布、生态条件、品种育成史、其他 DNA 标记等多方面进一步验证^[21,22]。

参考文献(References):

- [1] 《中国牦牛学》编委会. 中国牦牛学. 成都: 四川科学技术出版社, 1989. DOI
- [2] 钟金城, 赵素君, 陈智华, 马志杰. 牦牛品种的遗传多样性及其分类研究. 中国农业科学, 2006, 39(2): 389-397. DOI
- [3] 赵新全, 祁得林, 杨洁. 青藏高原-代表性土著动物分

- 子进化与适应研究. 北京: 科学出版社, 2008. DOI
- [4] 郭仲平. 群体遗传学导论. 北京: 农业出版社, 1993. DOI
- [5] Shao B, Long R, Ding Y, Wang J, Ding L, Wang H. Morphological adaptations of yak (*Bos grunniens*) tongue to the foraging environment of the Qinghai-Tibetan Plateau. *J Anim Sci*, 2010, 88(8): 2594–2603. DOI
- [6] Leslie DM Jr, Schaller GB. *Bosgrunniens* and *Bosmutus* (Artiodactyla: Bovidae). *Mammalian Species*, 2009, 863: 1–17.
- [7] 柴志欣, 赵上娟, 姬秋梅, 张成福, 信金伟, 钟金城. 西藏牦牛的RAPD遗传多样性及其分类研究. 畜牧兽医学报, 2011, 42(10): 1380–1386. DOI
- [8] 季维智. 遗传多样性研究的原理与方法. 浙江: 浙江科学技术出版社, 1999. DOI
- [9] Arranz JJ, Bayón R, San Primitivo F. Genetic variation at five microsatellite loci in four breeds of cattle. *J Agric Sci*, 1996, 127(4): 533–538. DOI
- [10] Weigend S, Romanov M N. Current strategies for the assessment and evaluation of genetic diversity in chicken resources. *World Poultry Sci J*, 2001, 57(3): 275–288. DOI
- [11] Wright S. Variability within and among natural populations. Chicago: The University of Chicago Press, United States, 1978, 4: 35–49. DOI
- [12] 钟金城, 赵素君, 陈智华, 马志杰. 牦牛品种的遗传多样性及其分类研究. 中国农业科学, 2006, 39(2): 389–397. DOI
- [13] 冯冬梅, 赵会静, 罗玉柱, 韩建林. 牦牛和黄牛三个微卫星基因座种间特异性等位基因分析. 甘肃农业大学学报, 2010, 45(4): 22–27. DOI
- [14] Qi XB, Han JL, Wang G, Rege JEO, Hanotte O. Assessment of cattle genetic introgression into domestic yak populations using mitochondrial and microsatellite DNA markers. *Anim Genet*, 2010, 41(3): 242–252. DOI
- [15] 曹红鹤, 王雅春, 陈幼春, Zhang Y, Ferretti I. 五种微卫星DNA标记在肉牛群体中的研究. 中国农业科学, 1999, 32(1): 69–73. DOI
- [16] Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*, 1980, 32(3): 314–331. DOI
- [17] 李荣岭, 张桂香, 王志刚, 王慧, 韩旭, 王冬蕾, 王均辉. 微卫星标记对 12 个中外牛品种群体遗传结构的研究. 遗传, 2007, 29(12): 1463–1470. DOI
- [18] Chakraborty R, Zhong Y, de Andrade M, Clemens PR, Fenwick RG, Caskey CT. Linkage disequilibria among (CA)_n polymorphisms in the human dystrophin gene and their implications in carrier detection and prenatal diagnosis in duchenne and becker Muscular dystrophies. *Genomics*, 1994, 21(3): 567–570. DOI
- [19] Nei M. Genetic distance between populations. *Am Nat*, 1972, 106(949): 283–292. DOI
- [20] Nei M. The theory and estimation of genetic distance. In: Morton N E. Genet Structure Populations. Honolulu: University of Hawaii Press, 1973, 45–54. DOI
- [21] 蔡立. 中国牦牛. 北京: 农业出版社, 1992. DOI
- [22] 钟金城. 牦牛遗传与育种. 成都: 四川科学出版社, 1996. DOI

• 综合信息 •

2013 年 35 卷第 2 期《遗传》封面说明

牦牛是分布于海拔 3000m 以上, 以青藏高原为中心及其毗邻高山、亚高山地区的珍稀牛种之一, 是牛属动物中能适应高寒气候条件而延续至今的牛种。它能充分利用高寒草地牧草资源, 对高寒草地的生态环境条件具有极强的适应性, 在空气稀薄、寒冷、强辐射、牧草生长期短等恶劣环境条件下能生活自如、繁衍后代, 不与人争地、争粮、争夺自然资源和生存空间, 牦牛业是典型的节粮型畜牧业。牦牛为当地牧民提供奶、肉、毛、役力、燃料等生产和生活必需品, 是该地区牧民的重要生活和经济来源, 也是当地畜牧业经济中不可缺少的重要畜种之一。牦牛作为一种“全能”家畜, 在遗传上是一个极为宝贵的基因库, 对人类有着不可忽视的社会及经济意义。西南民族大学自 20 世纪 50 年代起, 以蔡立教授为代表的一大批牦牛科研工作者就对牦牛开展了以形态、细胞、生化、分子为基础的种质资源与利用、起源演化与分类、遗传改良与选育等一系列的研究, 编著了中国第一本牦牛研究的著作《中国牦牛研究》(1963), 出版了世界上第一本英文版的牦牛专著《The Yak》(1995)。近年来, 又联合西藏农牧科学院畜牧兽医研究所、青海大学、四川省草原科学研究院等单位的科研人员, 对牦牛的分子遗传多样性、基因组与功能基因、选育与改良等进行了一系列的深入研究, 为今后进一步研究和牦牛资源的开发利用奠定了基础。“西藏牦牛微卫星 DNA 的遗传多样性”(见本期第 175~184 页)就是这些研究内容的一部分。“牦牛分子遗传多样性研究进展”(见本期第 151~160 页)对牦牛的分子遗传多样性进行了比较全面系统的综述。封面图片为本研究团队的麦洼牦牛选育群。

(柴志欣, 姬秋梅, 钟金城)