

绵羊、山羊和岩羊 mtDNA 的 RFLP 及其遗传分化研究

李祥龙², 郑桂茹², 张亚平¹

(1. 中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化开放研究实验室, 昆明 650223;

2. 河北农业技术师范学院动物科学系, 昌黎 066600)

摘要: 本文用 15 种识别 6 碱基的限制性内切酶 Apa I、BamH I、Bgl I、Bgl II、Cla I、Dra I、EcoR I、EcoR V、Hae II、Hind III、Kpn I、Pvu II、Pst I、Sac I 和 Sal I 对绵羊、山羊和岩羊 mtDNA 的限制性片断长度多态性进行了比较研究, 以探讨其遗传分化关系。共检测到 75 个酶切位点, 41 种限制性态型, 其中绵羊和山羊、绵羊和岩羊以及山羊和岩羊的共享位点数分别为 15、8 和 14, 共享位点所占比率分别为 19.74%、10.53% 和 18.42%。绵羊和山羊、绵羊和岩羊以及山羊和岩羊基本单倍型间的遗传距离分别为 0.0557、0.0640 和 0.0311, 平均 mtDNA 多态度(或称核苷酸差异均数)分别为 5.7182%、6.5847% 和 3.1860%。

关键词: 绵羊; 山羊; 岩羊; 线粒体 DNA; 限制性片断长度多态性; 遗传分化

中图分类号: S813 **文献标识码:** A **文章编号:** 0366-6964(2000)04-0289-07

绵羊、山羊和岩羊分别属于偶蹄目(*Artiodactyla*)、牛科(*Bovidae*)的绵羊属(*Ovis*)、山羊属(*Capra*)和岩羊属(*Pseudois nayaur*)^[1]。早期的考古学及形态学研究认为绵羊和山羊是由山羚羊(*Rupicaprids*, goat-antelops)在更新世(170 万年)的早期由南亚或北非进化而来^[2]。70 年代中期对绵羊和山羊及其野生近缘种所做的细胞遗传学研究亦提示绵羊和山羊是由具有 30 对染色体的一个共同祖先(*Rupicaprid*)进化而来, 山羊的核型更接近于祖先的核型^[3]。有的学者认为岩羊是山羊的野生祖先之一^[4]。而有的却认为岩羊是绵羊的近缘种, 因为其核型组成与绵羊一致^[3]。甚至岩羊属中的两个种 *P. nayaur* 和 *P. Schaeferi* 也分别被称为含有 *sheep* 在内的青羊(Greater Blue Sheep)和矮岩羊(Dwarf Blue Sheep)^[1]。可见, 绵羊、山羊和岩羊之间在系统进化方面可能的确存在着较为紧密的遗传亲缘关系, 但三者之间的遗传分化关系仍存在较大分歧。因此有必要利用现代分子生物学技术从分子水平研究其遗传分化关系。

高等动物线粒体 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)是一共价闭合的环状双链 DNA 分子, 由于其分子量小、结构简单稳定以及单性母性遗传方式, 在世代传递过程中无重组, 驯化了的家畜一般能保持其野生祖先的 mtDNA 类型, 因此已成为目前研究动物起源进化及系统分化的理想研究对象。在绵羊和山羊方面虽然也有一些研究报道^[5-7], 但还很少从 mtDNA 限制性片断长度多态性(RFLP)角度对其进行系统地分析和比较。而且迄今为止, 也还未见有关于岩羊 mtDNA 多态性以及与其近种属比较的研究报道。因此, 本文利用 16 种限制性内切酶

收稿日期: 1998-10-09

作者简介: 李祥龙(1963-), 男, 河北丰南人, 副教授, 博士。

研究了绵羊、山羊和岩羊 mtDNA 的 RFLP, 为它们的起源、遗传分化以及亲缘关系的研究提供基础资料和科学依据。

1 材料和方法

1.1 动物组织样品来源和试剂

14 只乌珠穆沁羊的肾脏采自内蒙古自治区的包头; 15 只辽宁绒山羊的肾脏采自辽宁省的盖县; 2 只岩羊的肾脏和肝脏采自贵州省罗甸县及广西南宁。所有样品均低温运送到实验室, - 20℃保存备用。

15 种识别 6 碱基的限制性内切酶 Apa I (进口)、BamH I、Bgl I、Bgl II、Cla I (进口)、Dra I、EcoR I、EcoR V、Hae II(进口)、Hind III、Kpn I、Pvu II、Pst I、Sac I 和 Sal I 及配套缓冲液, 除进口酶为 Promega 公司产品外, 其余均为华美生物技术公司产品; Rnase I 为德国 Boehringer Mannheim 公司产品; SDS 为 Sercel 进口分装, 用时重结晶; 其它试剂均为国产分析纯。

1.2 试验方法和数据处理

利用王文等的方法进行 mtDNA 的提取和纯化^[8]。参照 Lan H. 等的方法进行限制性内切酶消化和琼脂糖凝胶电泳^[9]。参照 Nei 和 Li 的数据分析方法计算各种单倍型间的片段共享度(F)^[10]:

$$F = 2N_{xy} / (N_x + N_y) \dots\dots\dots (1)$$

其中, N_{xy} 是 x 、 y 两类型间共有的酶切片段数, N_x 和 N_y 分别是 x 和 y 两类型的片段总数。据此可得到两个类型间的遗传距离 P :

$$P = 1 - \{ [(F^2 + 8F)^{1/2} - F] / 2 \}^{1/r} \dots\dots\dots (2)$$

其中 r 为限制性内切酶识别序列的碱基数。根据各种单倍型间的遗传距离以及在群体中所占的比例计算衡量群体遗传多态程度(或称核苷酸多样性指数)的 π 值,

$$\pi_A = \sum A_i A_j P_{ij} \dots\dots\dots (3)$$

其中 A_i 、 A_j 分别是第 i 、 j 种限制性类型在 A 群体中所占的百分数, P_{ij} 是 i 、 j 两类型间的遗传距离。任意两个群体 A、B 间的平均 mtDNA 多态度(或称核苷酸差异均数)为:

$$\pi_{AB} = \sum A_i B_j P_{ij} \dots\dots\dots (4)$$

其中, A_i 和 B_j 分别是第 i 和 j 类型在 A 和 B 群体中所占的百分数($i \neq j$)。

2 结果和讨论

2.1 绵羊、山羊和岩羊 mtDNA 的限制性态型

本文共检测到 75 个酶切位点, 41 种限制性态型(如图 1 的 Apa I、EcoR V 和 Pvu II 电泳图), 其中绵羊和山羊、绵羊和岩羊以及山羊和岩羊的共享位点数分别为 15、8 和 14, 共享位点所占比率分别为 19.73%、10.52% 和 18.42%(表 1)。

绵羊、山羊和岩羊 mtDNA 的分子量大小为 16.0 kb, 与兰蓉等^[5]和 Upholt 等^[6]的研究结果一致或接近, 与陈宏^[7]和 Meng Shijie 等^[11]测得的长度稍有差异, 可能是制作标准曲线时的误差所致, 这种差异并不影响对结果的比较与分析。

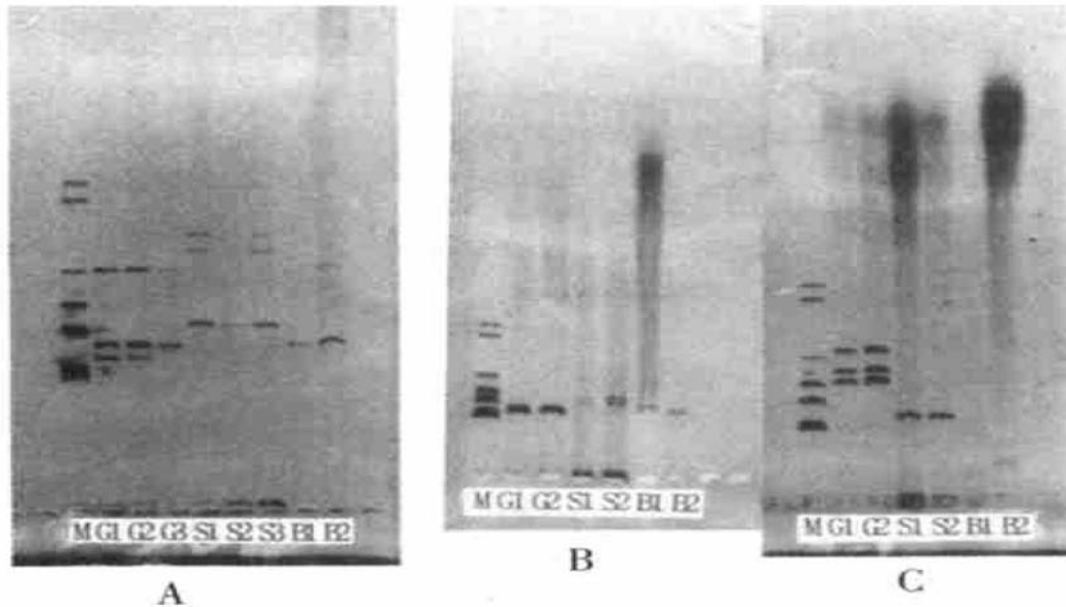


图1 山羊、绵羊和岩羊 mtDNA 的 Apa I (A)、EcoR V (B) 和 Pvu II (C) 酶切电泳图谱
M 为 λ DNA/ Hind III, G、S 和 B 分别为山羊、绵羊和岩羊, 1、2 和 3 为个体号

Fig. 1 Cleavage patterns of mtDNA of goat, sheep and bharal digested with
Apa I (A), EcoR V (B) and Pvu II (C)

M is the marker of λ DNA/ Hind III, G, S and B represent the goat, sheep and bharal
respectively. The number 1, 2 and 3 represents the individuals

与陈宏^[7]利用 5 种内切酶(Hind III、Bgl II、EcoR V、EcoR I 和 BamH I)对包括 10 只绵羊和 1 只山羊在内的 6 个物种的研究相比较,我们发现的态型较多,如表 1 中的 Hind III- B、Bgl II- B、EcoR I- B 均为山羊所有,而陈宏^[7]仅用了一个山羊个体,因此不可能检测到这些变异类型。本文中发现的绵羊的 BamH I- B 在陈宏^[7]的研究中没有出现,而只有 BamH I- C, BamH I- B 在乌珠穆沁羊中为主要类型,占 92.86% (13/14), BamH I- C 仅为 7.14% (1/14),但在陈宏^[7]所研究的国外绵羊品种中全部为 BamH I- C,因此 BamH I- B 和 BamH I- C 可能代表着不同的母系祖先的 mtDNA 类型,由此可推测我国的绵羊品种与国外绵羊品种之间可能存在着不同的母系起源,同时也有必要研究不同绵羊品种 mtDNA 的 RFLP,以从分子水平上探讨其起源问题。

2.2 绵羊、山羊和岩羊 mtDNA 的限制性类型及其遗传分化关系

根据绵羊、山羊以及岩羊群体中所有酶的限制性态型,可以将其划分为 9 种基因单倍型(表 2)。单倍型 I、II、III、IV 和 V 为山羊的单倍型,在山羊群体中所占的比例分别为 60.00%、13.33%、13.33%、6.67% 和 6.67%,因此,单倍型 I 为山羊的基本单倍型;单倍型 VI、VII 和 VIII 为绵羊的单倍型,在绵羊群体中所占比例分别为 85.70%、7.15% 和 7.15%,可见单倍型 VI 为绵羊的基本单倍型;本文中岩羊只有一种单倍型 IX。

表 1 绵羊、山羊和岩羊 mtDNA 的限制性态型和酶切片段分子量的比较

Table 1 The restriction morphs of mtDNA of sheep, goat and bharal

| 态 型 Restriction morph | 识别位点数 Number of site | 酶切片段分子量(kb) Molecular size |
|---|-------------------------|-----------------------------------|
| Apa I - A(山羊 Goat) | 2 | 11.7, 4.3 |
| - B(绵羊 Sheep) | 3 | 9.0, 4.0, 2.8 |
| - C(岩羊 Bharal) | 2 | 11.7, 4.3 |
| BamH I - A(山羊 Goat) | 4 | 6.8, 4.2, 3.8, 1.2 |
| - B(绵羊 Sheep) | 4 | 6.3, 4.2, 4.0, 1.5 |
| - C(绵羊 Sheep) | 4 | 9.1, 4.2, 1.5, 1.2 |
| - D(岩羊 Bharal) | 3 | 6.8, 5.0, 4.2 |
| Bgl I - A(绵羊, 山羊 Sheep, Goat) | 1 | 16.0 |
| - B(绵羊 Sheep) | 2 | 10.0, 6.0 |
| - C(岩羊 Bharal) | 3 | 10.0, 4.0, 2.0 |
| Bgl II - A(山羊, 岩羊 Goat, Bharal) | 4 | 6.5, 6.1, 2.0, 1.4 |
| - B(山羊 Goat) | 3 | 7.5, 6.5, 2.0 |
| - C(绵羊 Sheep) | 4 | 6.1, 4.5, 4.0, 1.4 |
| Cla I - A(山羊 Goat) | 2 | 9.0, 7.0 |
| - B(山羊 Goat) | 3 | 9.0, 5.7, 1.3 |
| - C(绵羊 Sheep) | 1 | 16.0 |
| Dra I - A(山羊 Goat) | 7 | 3.9, 3.5, 2.3, 1.9, 1.6, 1.5, 1.3 |
| - B(绵羊 Sheep) | 6 | 4.8, 3.9, 2.3, 2.1, 1.6, 1.3 |
| - C(岩羊 Bharal) | 6 | 3.9, 3.7, 3.5, 2.3, 1.9, 0.7 |
| EcoR I - A(山羊 Goat) | 5 | 4.5, 4.0, 3.3, 2.7, 1.5 |
| - B(山羊 Goat) | 4 | 8.5, 3.3, 2.7, 1.5 |
| - C(绵羊 Sheep) | 3 | 10.0, 3.3, 2.7 |
| - D(岩羊 Bharal) | 1 | 16.0 |
| EcoR V - A(山羊, 岩羊 Goat, Bharal) | 1 | 16.0 |
| - B(绵羊 Sheep) | 2 | 9.0, 7.0 |
| Hae II - A(山羊 Goat) | 4 | 8.0, 3.6, 3.0, 1.4 |
| - B(绵羊 Sheep) | 2 | 14.6, 1.4 |
| Hind III - A(山羊 Goat) | 4 | 8.0, 4.0, 2.5, 1.5 |
| - B(山羊 Goat) | 3 | 12.0, 2.5, 1.5 |
| - C(绵羊 Sheep) | 3 | 13.7, 1.5, 0.8 |
| Kpn I - A(绵羊, 山羊 Sheep, Goat) | 1 | 16.0 |
| - B(岩羊 Bharal) | 0 | 无切点(no site) |
| Pst I - A(山羊 Goat) | 2 | 11.0, 5.0 |
| - B(绵羊, 岩羊 Sheep, Bharal) | 1 | 16.0 |
| Pvu II - A(山羊 Goat) | 3 | 6.5, 5.2, 4.3 |
| - B(绵羊 Sheep) | 1 | 16.0 |
| - C(岩羊 Bharal) | 0 | 无切点(no site) |
| Sac I (绵羊, 山羊, 岩羊 Sheep, Goat, Bharal) | 1 | 16.0 |
| Sal I - A(绵羊, 山羊 Sheep, Goat) | 1 | 16.0 |
| - B(山羊 Goat) | 2 | 8.1, 7.9 |
| - C(岩羊 Bharal) | 0 | 无切点(no site) |

表 2 绵羊、山羊和岩羊的限制性类型
Table 2 The mtDNA haplotypes of sheep, goat and bharal

| 单倍型 | 态 型 Morph | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----------|--------|-------|--------|-------|-------|--------|---------|--------|---------|-------|-------|--------|-------|
| Hap. | Apa I | BamH I | Bgl I | Bgl II | Cla I | Dra I | EcoR I | EcoR II | VHae I | Hind II | Kpn I | Pst I | Pvu II | Sal I |
| I | A | A | A | A | A | A | A | A | A | B | A | A | A | A |
| II | A | A | A | B | A | A | B | A | A | B | A | A | A | A |
| III | A | A | A | A | B | A | B | A | A | A | A | A | A | A |
| IV | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | B |
| V | A | A | A | A | B | A | A | A | A | B | A | A | A | A |
| VI | B | B | B | C | C | B | C | B | B | C | A | B | B | A |
| VII | B | C | B | C | C | B | C | B | B | C | A | B | B | A |
| VIII | B | B | A | C | C | B | C | B | B | C | A | B | B | A |
| IX | A | D | C | A | / | C | D | A | / | / | B | B | C | / |

根据公式(1)和(2)计算的绵羊和山羊、绵羊和岩羊以及山羊和岩羊基本单倍型间的遗传距离分别为 0.0557、0.0640 和 0.0311, 按照哺乳动物 mtDNA 的碱基突变率为每百万年 1% 计算^[12], 则绵羊和山羊的分歧时间大约发生在 557 万年左右, 绵羊和岩羊在 640 万年左右, 山羊和岩羊在 311 万年左右。

迄今为止, 关于绵羊和山羊的分歧年代不是十分清楚。Geist 认为绵山羊的分化在更新世 (170 万年) 以前^[2]。Fitch 等根据蛋白质进化的研究结果指出, 绵羊和山羊在进化过程中的分歧年代最可能的时间大约为 500 万年左右^[13]。而 Payne 则认为绵羊属和山羊属是在旧石器时代(约 15 万年)晚期由单一的绵羊山羊亚科(*Caprovine*)的近交群体分化而来。本研究得到的绵羊和山羊分歧年代与 Fitch 等的结果较为接近^[13]。

根据 Meng Shijie 等利用 8 种限制性内切酶对绵羊、牛和扭角羚的 mtDNA 的研究结果, 按照哺乳动物 mtDNA 的碱基突变率为每百万年 1% 计算, 绵羊和牛的分化年代为 931 万年左右, 绵羊和扭角羚间为 674 万年左右, 牛和扭角羚间为 722 万年左右^[11]。结合本文研究结果, 说明这几种牛科动物首先是绵羊和牛发生分化, 其次是牛和扭角羚, 然后是绵羊和扭角羚, 最后是绵羊和岩羊以及山羊和岩羊的分化。这一分化年代与 Marc 等引用的化石资料所显示的大多数牛科动物可以追溯到 600~700 万年相一致^[14], 也与 Marc 等对包括山羊在内的多种牛科动物 mtDNA 的 12S 和 16S rRNA 基因和邻近的 3 个 tRNA 基因比较后所得到的分化年代在 700~2000 万年左右的下限相接近^[15]。

根据公式(3)计算的山羊 mtDNA 多态度(π 值)为 0.1487%, 绵羊为 0.0323%, 岩羊为 0; 根据公式(4)计算的绵羊和山羊间平均 mtDNA 多态度为 5.7182%, 绵羊和岩羊间为 6.5847%, 山羊和岩羊间为 3.1860%。表明三个属间的遗传分化比较明显, 绵羊和岩羊间遗传分化最明显, 其次为绵羊和山羊间, 最后为山羊和岩羊间。而绵羊和山羊本身则分化程度较低, 岩羊则更低。绵羊和山羊间 5.7182% 的平均 mtDNA 多态度也与 Upol 等^[6]指出的绵羊和山羊间的 mtDNA 核苷酸差异为 6%~11% 较为接近。

由三种动物 mtDNA 基本单倍型间的遗传距离和 mtDNA 多态度可以看出, 山羊和岩羊间的遗传亲缘关系比绵羊与岩羊间更近一些, 这一点似乎与细胞遗传学的研究结果不一致^[3]。虽然有些学者也认为岩羊是山羊的野生祖先^[4], 但本文只是表明山羊与岩羊间的遗传分化较

低, 亲缘关系较近, 至于岩羊是否为山羊的野生祖先还不能作出肯定回答, 需要利用更为先进的测序技术研究更多目前尚存的野生山羊的 mtDNA 类型。

参考文献:

- [1] 谭邦杰编著. 哺乳动物分类名录[M]. 中国医药科技出版社, 1992. 4, 431.
- [2] Geist, V. Mountain sheep: a study in behavior and evolution [M]. University of Chicago Press, Chicago/London, 1971.
- [3] 常宏主编. 家畜遗传资源学纲要 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1995. 5, 67~ 68.
- [4] 李志农主编. 中国养羊学 [M]. 北京: 农业出版社, 1993. 6, 1.
- [5] 兰蓉, 洪琼花, 高源汉, 等. 云南绵羊线粒体 DNA 遗传多态性研究 [J]. 遗传, 1998, 20(1): 20~ 23.
- [6] Upholt W B and Dawid I B. Mapping of mitochondrial DNA of individual sheep and goats: Rapid evolution in the D loop region [J]. Cell, 1977, 11: 571~ 583.
- [7] 陈宏. 五个畜种和一个鱼种的多位点 DNA 指纹, RAPD 标记的研究和线粒体 DNA 的限制性分析[J]. 黄牛杂志, 1997, 23(3): 1~ 7.
- [8] 王文, 施立明. 一种改进的动物线粒体 DNA 提取方法[J]. 动物学研究, 1993, 14(2): 191~ 198.
- [9] Lan H. and Shi L M. The origin and genetic differentiation of native breeds of pigs in southwest China: An approach from mitochondrial DNA polymorphism [J]. Biochemical Genetics, 1993, 31: 51~ 60.
- [10] Nei M and Li W H. Mathematic model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. PNAS USA, 1979, 76: 5269~ 5273.
- [11] Meng Shijie and Wang Pingzhong. Mitochondrial DNA polymorphisms for takin, cattle and sheep in bovidae [C]. Proceedings of international conference on animal biotechnology, 1997, 174~ 177.
- [12] Brown W K. Evolution of animal mitochondrial DNA. In: Evolution of genes and proteins [M]. Nei M. and Koehn R K. eds., Sunderland. 1983.
- [13] Fitch W M. and Landley C H. Protein evolution and the molecular clock [J]. Fed Proc, 1976, 35, 2092~ 2097.
- [14] Marc W, Allard Michael M, Miyamoto L, et al. DNA systematics and evolution of the artiodactyl family Bovidae [J]. Proc Natl Acad Sci, 1992, 89: 3972~ 3976.

STUDY ON THE GENETIC DIFFERENTIATION AMONG SHEEP, GOAT AND BHARAL BASED ON THE RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM OF mtDNA

Li Xianglong², Zheng Guiru², Zhang Yaping¹

(1. Laboratory of Cellular and molecular Evolution, Kunming Institute of Zoology,
Chinese Academy of Science, Kunming, 650223;
2. Hebei Agrotechnic Nomal College, Changli, 066600)

Abstract: The restriction fragment length polymorphism (RFLP) of mitochondrial DNA (mtDNA) of sheep, goat and bharal were studied using 15 restriction endonucleases recognizing 6 base

pair, Apa I, BamH I, Bgl I, Bgl II, Cla I, Dra I, EcoR I, EcoR V, Hae II, Hind III, Kpn I, Pst I, Pvu II, Sac I and Sal I, in order to investigate the phylogenetic relationship between them. The results indicated that 76 restriction sites and 40 restriction morphs were detected, which could be sorted into 9 haplotypes. Between sheep and goat, sheep and bharal, goat and bharal, the fragments shared together by them were 15, 8 and 14 respectively, the ratios of fragments shared together were 19.74%, 10.53% and 18.42% respectively, the genetic distance were 0.0557, 0.0640 and 0.0311, the average polymorphic degree (π value) were 5.7182%, 6.5847% and 3.1860%.

Key words: Sheep; Goat; Bharal; mtDNA; RFLP; Genetic differentiation

下 期 目 次 预 告

- 1 粗料型日粮真胃灌注棕榈油对肉牛能量和蛋白质转化效率影响的初步研究
- 2 回-直肠吻合猪的排泄频率及其对水的代谢变化
- 3 中国家养动物多样性概况
- 4 豫州褐蛋鸡羽色自别雌雄准确率下降的原因及对策
- 5 半番鸭白色羽毛性状的选择及其效应分析
- 6 两种杂种牛的产奶性能及泌乳曲线
- 7 我国主要地方山羊品种随机扩增多态 DNA 研究
- 8 不同世代改良型路南奶山羊血液免疫学参数的比较研究
- 9 黄芩白术对 LPS 诱导流产小鼠的保胎作用及子宫内 TNF- α 含量的影响
- 10 马立克氏病疫苗胚胎免疫鸡红细胞免疫功能的研究
- 11 高钠所致肺动脉高压肉鸡肺细小动脉病理改变的图象分析
- 12 贵州猪、牛志贺样毒素大肠杆菌的检出与鉴定
- 13 鸡毒支原体抗原在大肠杆菌中的表达
- 14 马杜霉素在鸡组织中残留消除及临床毒性的研究
- 15 猴卡氏肺孢子片肺炎模型的建立及蒿甲醚的疗效试验
- 16 桑嫩艾美耳球虫(*Eimeria tenella*) BJ 株 SO₇ 基因在大肠杆菌中的表达
- 17 家畜伊氏锥虫灭活苗制备及免疫研究观察