

# 中国家驴 mtDNA D-loop 遗传多样性与起源研究

葛庆兰<sup>1</sup>, 雷初朝<sup>1</sup>, 蒋永青<sup>1</sup>, 陈宏<sup>1,2</sup>, 张伟<sup>1</sup>, 党瑞华<sup>1</sup>, 郑惠玲<sup>1</sup>, 张爱玲<sup>1</sup>, 李天鹏<sup>3</sup>

(1. 西北农林科技大学动物科技学院 陕西省农业分子生物学重点实验室, 杨凌 712100;

2. 徐州师范大学细胞与分子生物学研究所, 徐州 221116; 3. 河南省安阳县畜牧局, 安阳 455000)

**摘要:** 对我国 12 个家驴品种 126 个个体(包括引用 26 个个体)的 mtDNA D-loop 区 399 bp 进行分析, 共检测到 36 种单倍型 37 个多态位点, 其单倍型多样性为 0.466 7~0.977 8, 核苷酸多样性为 0.001 2~0.028 5, 表明我家驴的遗传多态性丰富。与 3 条努比亚野驴、3 条索马里野驴和 6 条亚洲野驴的序列构建 NJ 系统发育树, 首次证明我家驴的母系起源为非洲野驴中的索马里驴和努比亚驴, 亚洲野驴不是中国家驴的祖先。本文还讨论了我家驴可能的迁徙路线。

**关键词:** 中国家驴; mtDNA D-loop; 遗传多样性; 起源

中图分类号: Q953

文献标识码: A

文章编号: 0336-6964(2007)07-0000-00

## Mitochondrial DNA D-loop Genetic Diversity and Origin of Chinese Domestic Donkeys

GE Qing-lan<sup>1</sup>, LEI Chu-zhao<sup>1</sup>, JIANG Yong-qing<sup>1</sup>, CHEN Hong<sup>1,2</sup>, ZHANG Wei<sup>1</sup>,

DANG Rui-hua<sup>1</sup>, ZHENG Hui-ling<sup>1</sup>, ZHANG Ai-ling<sup>1</sup>, LI Tian-peng<sup>3</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University,

Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Yangling 712100,

China; 2. Institute of Cellular and Molecular Biology, Xuzhou Normal

University, Xuzhou 221116, China; 3. Anyang Animal Husbandry

Bureau of Henan Province, Anyang 455000, China.)

**Abstract:** All 126 mtDNA D-loop sequences 399 bp in length from 12 Chinese domestic donkey breeds were analyzed, including 26 sequences published before. The results revealed 36 different haplotypes with 37 variable sites. The haplotype diversity and the nucleotide diversity were 0.466 7~0.977 8 and 0.001 2~0.028 5, respectively, indicating high level of genetic diversity in Chinese domestic donkeys. A Neighbor-joining tree constructed using 36 haplotypes of Chinese domestic donkeys, 3 sequences from Nubian wild ass, 3 sequences from Somali wild ass and 6 sequences belonging to Asian wild ass firstly showed the maternal origin of Chinese domestic donkeys was from Somali and Nubian wild ass in Africa but not from Asian wild ass. We also discussed transport of donkeys among different regions in China.

**Key words:** Chinese domestic donkeys; mtDNA D-loop; genetic diversity; origin

我国的养驴历史悠久, 驴种资源丰富, 根据其体格大小可以分为大型、中型和小型驴 3 种类型。我家驴多集中在属中温带和暖温带气候的西北、华

北、西南以及东北的部分地区, 尤以黄河中下游的渭河、淮河、海河流域和新疆、甘肃的河西走廊分布最多<sup>[1]</sup>。但由于与牛、羊、猪、鸡等相比其经济价值较

收稿日期: 2006-07-26

基金项目: 西北农林科技大学青年学术骨干人才支持计划(No. 01140304); 西北农林科技大学青年科研基金

作者简介: 葛庆兰(1981-), 女, 河南人, 硕士生, 主要从事动物遗传学研究

\* 通讯作者: 雷初朝(1968-), 男, 湖南人, 博士, 副教授, Email: leichuzhao1118@126.com

低,因而对家驴的研究甚少。历史上,家驴在非洲、亚洲、欧洲(主要是地中海地区)、南美洲、北美洲以及澳大利亚的广大农区曾作为主要的驮运动物。但随着农业机械化的推进和运输业的快速发展,在许多国家,家驴作为运输工具逐渐被淘汰,驴群的数量和质量大幅度下滑。但近几年来,随着人们生活水平的提高,肉驴业的开发与养殖有所升温。驴肉营养价值很高,加之家驴为农民散养,以吃草料为主,所产驴肉是纯天然的绿色食品,所以非常受消费者的青睐。

线粒体 DNA (mtDNA) D-loop 序列已被广泛用于家畜的起源进化、亲缘关系和群体遗传结构研究<sup>[2~4]</sup>。在对家驴的研究方面,Ivankovic 等<sup>[5]</sup>首次研究了克罗地亚地区 3 个家驴品种的 mtDNA 遗传多样性,共发现 3 个单倍型组,分属于 2 个母系起源;Aranguren-Mendez 等<sup>[6]</sup>研究了西班牙 6 个驴种和非洲 2 个驴种 mtDNA 的遗传多样性,发现驴的非洲起源有两个分支即努比亚野驴和索马里野驴;Beja-pereira<sup>[7]</sup>等对世界范围内的家驴进行系统研究,证明家驴的非洲起源观点,并通过分析细胞色素 b 基因全序列估计了这两个分支的分化时间约在 0.303~0.910 百万年前。Lopez 等<sup>[8]</sup>证明了 Mexican Creole 驴为非洲起源。然而对中国家驴的母系起源与遗传多样性研究的报道甚少,只有雷初朝等<sup>[9]</sup>对中国 5 个家驴品种 26 个个体的 mtDNA 遗传多样性进行过研究,指出中国家驴有两个母系来源,可能起源于非洲野驴,但并未指出是否起源于努比亚野驴和索马里野驴。因此,有必要进一步扩大样本量来研究中国家驴的起源进化与遗传多样性,为我国家驴遗传资源保护与利用提供科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 样品的采集

本研究采集了我国 3 大类型(大型、中型和小型)家驴的血样,测序所用的样本数为 100 个。其中大型驴为关中驴和德州驴,分别采自陕西扶风县关中驴场和山东德州市,样本数均为 7 个;中型驴为庆阳驴、佳米驴和泌阳驴,分别采自甘肃庆阳市、陕西米脂县和河南泌阳县,样本数分别为 10 个、6 个和 12 个;小型驴为蒙古驴、西吉驴、淮北灰驴、凉州驴、太行驴、新疆驴和云南驴,分别采自内蒙古库仑旗、宁夏西吉县、安徽淮北市、甘肃武威市、河南林州市、新疆伊宁市和云南楚雄市,样本数分别为 20 个、7

个、5 个、5 个、12 个、5 个和 4 个。另外本研究还引用了我们以前发表的 26 条中国家驴序列,其中包括关中驴 6 条、佳米驴、凉州驴、新疆驴和云南驴各 5 条<sup>[9]</sup>。

### 1.2 总 DNA 的提取、mtDNA D-loop 区的 PCR 扩增、纯化及序列测定

采用酚-氯仿法从血液中提取总 DNA。特异性引物的正链为 P28:5'-AGTCTCACCATCAACAC-CCAAAGC-3',反链为 HF:5'-CCTGAAGTAG-GAACCAGATG-3'<sup>[5]</sup>。正链引物位于 Xu 等<sup>[10]</sup>所测的驴 mtDNA D-loop 区的 L15418 位点,反链引物位于 H15838 位点。PCR 反应体系总体积为 50  $\mu\text{L}$ ,10 $\times$ Buffer、1.5 mmol/L MgCL<sub>2</sub>和 0.25 mmol/L dNTPs 各 5  $\mu\text{L}$ ,Taq DNA 聚合酶(TaKaRa Biosystems)1.5 U,基因组总 DNA 约 50 ng。反应条件为:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,55  $^{\circ}\text{C}$  退火 60 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 90 s 35 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  充分延伸 10 min;4  $^{\circ}\text{C}$  保存。PCR 产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测其大小、纯度及亮度。每个样品取 2  $\mu\text{L}$  用于检测,对于扩增效果良好且足量的样品,则将每个样品中余下的 48  $\mu\text{L}$  PCR 产物用柱式 PCR 回收试剂盒进行纯化与回收,送北京英杰公司测序。

### 1.3 数据处理

所测得的 100 条中国家驴 mtDNA D-loop 序列用 DNASTAR 软件包进行校正,结合我们以前已发表的 26 条中国家驴的 mtDNA D-loop 序列共 126 条序列,均为 399 bp。再用 CLUSTALX<sup>[11]</sup> 软件进行同源序列比对,最后用分子进化遗传分析软件 MEGA2.0<sup>[12]</sup> 确定单倍型数目与多态位点,并用 Kimura 双参数法构建 NJ 系统树,并对拓扑图中的各个分支的支持率进行 1 000 次自展法重抽样检验。单倍型多样性(Haplotype diversity, h)、核苷酸多样性(Nucleotide diversity,  $\pi$ )和碱基对平均差异数(Mean No. of pairwise differences)用 Arlequin2.0<sup>[13]</sup> 软件进行统计。

## 2 结果与分析

### 2.1 中国家驴 mtDNA D-loop 遗传多样性

分析了 126 条中国家驴的 mtDNA D-loop 序列,共发现 36 种单倍型,37 个多态位点,见图 1。在这些多态位点中没有插入和缺失,只发现 1 个颠换,其余 36 个均为转换,表明碱基的替换有明显的偏倚,这与动物线粒体 DNA 碱基的变异特点是相一

致的。

[	11111	1111112222	222222223	3333333	
[	3445603456	6822490012	3455667788	3666888	
[	8622531280	12328096744	6027065702	63482234	N
Hap1	AAATCTGATT	GTAACAAATG	CCACTCCACC	TTCITAA	1
Hap2	.....A.....	.....T.....	.....	.....	1
Hap3	.....A.....	.....T.....	.....	.....	3
Hap4	.....G.....	.....T.....	.....	.....	1
Hap5	.....G.....	.....T.....	.....	.....	4
Hap6	.....G.....	.....	.....	.....	3
Hap7	.....G.....	.....T.....	.....	.....	10
Hap8	.....G.....	.....G.....	.....T.....	.....	2
Hap9	.....G.....	.....G.....	.....C.....	.....T.....	1
Hap10	.....G.....	.....G.....	.....T.....	.....T.....	1
Hap11	.....G.....	.....GG.....	.....T.....	.....	2
Hap12	.....G.....	.....GG.....	.....CT.....	.....	1
Hap13	.....G.....	.....G.....	.....T.....	.....	1
Hap14	.....G.....	.....G.....	.....T.....	.....CT.....	1
Hap15	.....G.....	.....G.....	.....G.....	.....TC.....	1
Hap16	.....G.....	.....G.....	.....T.....	.....TC.....	1
Hap17	.....G.....	.....G.....	.....TC.....	.....	11
Hap18	.....G.....	.....G.....	.....G.....	.....TC.....	1
Hap19	.....G.....	.....G.....	.....T.....	.....	1
Hap20	.....G.....	.....G.....	.....G.....	.....T.....	2
Hap21	.....G.....	.....G.....	.....G.....	.....CT.....	1
Hap22	..G.CT.A..C	.....G.CA	..G.C...T	..CTCCGG	1
Hap23	..G.CTCA..C	.....G.CA	..C...T	..CTCCGG	1
Hap24	..G.CT.A..C	.....G.CA	..C...T	..CTCCGG	32
Hap25	GGGCT.A..C	.....G.CA	..C...T	..CTCCGG	1
Hap26	GG.CT.A..C	.....G.CA	..C...T	..CTCCGG	1
Hap27	..G.CT.A..CC	.....G.CA	..C...T	..CTCCGG	1
Hap28	..G.CT.A..CC	.....G.CA	..C...T	..CTCCG	1
Hap29	..G.CT.A..C	.....G.CA	..C...TT	..CTCCG	2
Hap30	..G.CT.A..C	.....G.CA	..C...TT	..CTCCGG	1
Hap31	..G.CT.A..C	.....G.CA	..C...T	..CTCCG	13
Hap32	..G.CT.A..C	.....G.CA	..C...T	..CTCCG	6
Hap33	..G.CT.AG.C	.....G.CA	..C...T	..CTCCGG	1
Hap34	..G.CT.A..C	.....G.CA	..C...T	..TCCG	5
Hap35	..G.CT.A..C	.....CA	..TC...T	..CTCCGG	8
Hap36	..G.CT.A..	.....CA	..TC...T	..CTCCGG	2

图 1 中国家驴 mtDNA D-loop 36 种单倍型的多态位点。N 代表样本数，“.”代表与第一条序列相同的碱基。

Fig. 1 MtDNA D-loop sequence variations detected in 36 haplotypes of Chinese domestic donkeys. N referred to the number of samples. Identity with the first sequence is denoted by a dot“.”.

从图 1 可见,在这 36 种单倍型中,21 种为各品种特有的单倍型,15 种为品种间或品种内的共享单倍型。在 15 种共享单倍型种,最大的共享单倍型 Hap24 包含除新疆驴和德州驴之外 10 个品种的 32 个个体,单倍型 Hap7、Hap17 和 Hap31 均包含 10~13 个个体,单倍型 Hap32、Hap34 和 Hap35 均包含 5~8 个个体,其它 8 种共享单倍型都含有 2~4 个个体。在索马里驴支系中,Hap24、Hap31 是主要的单倍型,其它单倍型都是以 Hap24 为中心形成“星状”结构;在努比亚驴支系中,Hap7、Hap17、Hap5、Hap8 是主要的单倍型,其它单倍型都是以 Hap7 为中心形成“星状”结构。从表 1 可以看出,中国家驴的单倍型数目在每个品种中分布不同,最

小为 2,最大为 10;其单倍型多样性、核苷酸多样度和碱基对平均差异数分别为 0.466 7~0.977 8、0.001 2~0.028 5 和 0.467 5~11.351 8,均以凉州驴最小,新疆驴最大。中国家驴的平均单倍型多样度和核苷酸多样性分别为 0.905 5 和 0.022 8,表明中国家驴具有丰富的遗传多样性。

### 2.2 中国家驴单倍型间的系统发育分析

在构建系统发育树时,引用了 3 条非洲索马里野驴的序列,GenBank 登录号为: AY569545-AY569547;引用了 3 条非洲努比亚野驴的序列,这是由 Dr. Albano Beja-pereira 友好提供的;还引用了 6 条亚洲野驴的序列,GenBank 登录号为: 3AF220932-AF220933, AF220934-AF220936, AF220937。本研究共引用 12 条野驴序列,代表 12 种单倍型。对这 12 种野驴的单倍型和中国家驴的 36 种单倍型用 Kimura 双参数距离构建 NJ 系统发育树(见图 2)。从图 2 可以看出:中国家驴的母系

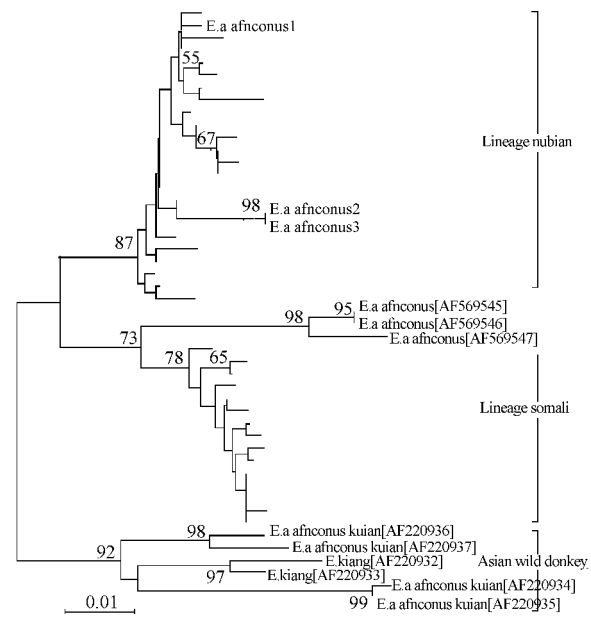


图 2 中国家驴 36 个单倍型和 3 条索马里野驴序列、3 条努比亚野驴序列、6 条亚洲野驴序列构建的 NJ 系统发育树。图中数字为各分支 1 000 次自展法重抽样的置信值(只有置信值 ≥ 50 % 的被标记出来)

Fig. 2 NJ phylogenetic tree of 36 mtDNA D-loop haplotypes of Chinese donkey sequences, three Somali wild donkey sequences, three Nubian wild donkey sequences and six Asian wild donkey sequences. Numbers at the two lineages denote the bootstrap percentages of 1 000 replications (only those ≥ 50 % are shown).

起源为非洲起源,并分为两个支系即索马里野驴起源和努比亚野驴起源。在所分析的126条中国家驴的序列中有76条属于索马里驴支系,代表15种单倍型,占中国家驴个体数的60.32%(76/126);有50条属于努比亚驴支系,代表21种单倍型,占39.68%(50/126)。各品种在这两个支系中的具体

分布情况见表1。中国家驴的序列和亚洲野驴的序列没有聚在一起,说明亚洲野驴不是中国家驴的母系祖先。从表1我们可以看出,除凉州驴只有索马里驴支系外,其它11个中国家驴品种中均有索马里驴和努比亚驴支系分布,提示mtDNA起源与各品种的地理分布和体格大小没有必然的联系。

表1 中国12个家驴品种的遗传多样性指数  
Table 1 Genetic diversity indices in 12 Chinese donkey breeds

品种 Breed	样本数 Samples	索马里支系 Lineage Somali		努比亚支系 Lineage Nubian		单倍型 多样性 Haplotype diversity	核苷酸 多样性 Nucleotide diversity	碱基对平均 差异数 Mean no. of pairwise differences
		单倍型 Haplotype	样本数 Samples	单倍型 Haplotype	样本数 Samples			
		关中驴 GZ	13	2	7			
德州驴 DZ	7	1	2	3	5	0.809 5± 0.129 8	0.020 1± 0.012 2	8.001 9± 4.236 0
蒙古驴 MG	20	6	14	4	6	0.915 8± 0.039 5	0.021 0± 0.011 3	8.374 7± 4.047 5
西吉驴 XIJ	7	3	3	3	4	0.952 4± 0.095 5	0.027 7± 0.016 4	11.030 9± 5.717 0
庆阳驴 QY	10	5	6	3	4	0.955 6± 0.059 4	0.025 6± 0.014 5	10.221 2± 5.103 5
佳米驴 JM	11	4	8	3	3	0.818 2± 0.119 1	0.021 4± 0.012 1	8.553 6± 4.285 6
泌阳驴 BY	12	3	7	4	5	0.833 3± 0.100 2	0.026 2± 0.014 5	10.466 3± 5.136 4
淮北灰驴 HUB	5	1	2	2	3	0.800 0± 0.164 0	0.027 8± 0.017 8	11.086 3± 6.085 3
凉州驴 LZ	10	2	10	0	0	0.466 7± 0.131 8	0.001 2± 0.001 3	0.467 5± 0.443 4
太行驴 TH	12	5	8	2	4	0.909 1± 0.056 2	0.021 2± 0.011 9	8.472 3± 4.217 8
新疆驴 XJ	10	5	5	4	5	0.977 8± 0.054 0	0.028 5± 0.016 0	11.351 8± 5.632 7
云南驴 YN	9	3	4	5	5	0.972 2± 0.064 0	0.027 2± 0.015 5	10.842 0± 5.452 2

### 3 讨论

关于中国家驴的起源进化,主要有两种观点:(1)传统的观点认为中国家驴起源于非洲野驴,驯化后经阿拉伯地区进入中国;(2)现代的观点认为除非洲野驴外,中国驴种还可能起源于亚洲野驴(*Equus asinus*)—即騾驴(*Equus asinus hemionus*)亚种<sup>[1]</sup>。

这是因为,一方面,亚洲野驴的驯化中心伊朗、阿富汗和中国的疆相邻,青海、西藏和内蒙古又都是亚洲野驴重要的分布区;另一方面,中国家驴在皮毛颜色及其它外部特征上与亚洲野驴十分相似<sup>[1]</sup>。然而,在本研究中,并没有发现中国家驴与亚洲野驴聚在一起(图2),因此,本研究支持中国家驴起源于非洲野驴的观点。值得注意的是,在本研究的12个家

驴品种中有 11 个品种均含有非洲野驴的两个支系,表明它们都对中国家驴的起源有影响,尤以索马里野驴的影响较大。

从表 1 可以看出,中国家驴各品种在索马里驴和努比亚驴两个支系中的分布与其地理分布和体格大小没有明显的关系,表明在中国的历史长河中,随着人口的流动和商业贸易,中国家驴存在着相当高的基因渐渗过程,这和 Beja-pereira 等<sup>[7]</sup>的研究结果是一致的,这种现象在山羊和猪上也同样存在。中国家驴除凉州驴只含有索马里驴支系,其遗传多态性较低外,其它各品种均含有非洲野驴的两个支系,表现了很高的遗传多样性。

研究证明起源中心的群体与从起源中心分离出去的群体相比具有更高的单倍型和核苷酸多样性。通过对中国家驴 126 条序列进行比较发现,新疆驴的单倍型多样性、核苷酸多样性和碱基对平均差异数是最高,其次为云南驴、庆阳驴、西吉驴、蒙古驴和太行驴,其他品种的驴则较低。因此我们可以推测中国家驴的发源地在新疆,可能的传播路线为:(1)从新疆经由宁夏、甘肃,到陕西的关中平原(古长安在唐代及其以前的许多朝代是中国的政治经济文化中心);(2)同时中国家驴还有一部分从新疆向北到内蒙、向南到云南省;(3)最后,中国的家驴再由关中平原传播到中国的其它地区。这个推断与历史记载<sup>[1]</sup>是基本吻合的。必须指出,我们的这个假设仅仅反映了一种趋势,要确切的证明中国家驴的传播路线,还需要做大量细致的研究工作。

总之,本研究从分子水平证明了中国家驴具有丰富的遗传多样性,并证明了中国家驴的非洲母系起源。本文还讨论了中国家驴可能的迁徙路线。要进一步探讨中国家驴的遗传多样性和起源问题,还需要从微卫星和 Y 染色体等方面开展工作,以提供更多的遗传学证据。

#### 参考文献:

[1] 谢成侠. 中国马驴品种志[M]. 上海:上海科技出版社,1987.

[2] Giuffra E J, Kijas M H, Amarger V, *et al.* The Origin of the domestic pig: Independent domestication and subsequent introgression [J]. *Genetics*, 2000,

154:1 785~1 791.

- [3] Guo J, Du L X, Ma Y H, *et al.* A novel maternal lineage revealed in sheep (*Ovis aries*) [J]. *Anim Genet*, 2005, 36: 331~336.
- [4] Lai S J, Liu Y P, Liu Y X, *et al.* Genetic diversity and origin of Chinese cattle revealed by mtDNA D-loop sequence variation [J]. *Mol Biol Evol*, 2006, 38: 146~154.
- [5] Ivankovic A, Kavar T, Caput P, *et al.* Genetic diversity of three donkey populations in the Croatian region [J]. *Anim Genet*, 2002, 33: 169~177.
- [6] Aranguren-Mendez J, Beja-Pereira A, Avellanet R, *et al.* Mitochondrial DNA variation and genetic relationships in Spanish donkey breeds (*Equus asinus*) [J]. *J Anim Breed Genet*, 2004, 121: 319~330.
- [7] Beja-pereira A, England P R, Ferrand N, *et al.* African origins of the domestic donkey [J]. *Science*, 2004, 304:1 781.
- [8] Lopez C, Alonso R, Aluja A, *et al.* Study of the genetic origin of the Mexican Creole Donkey (*Equus asinus*) by means of the analysis of the D-Loop region of mitochondrial DNA [J]. *Trop Anim Heal Prod*, 2005, 7: 173~188.
- [9] 雷初朝,陈宏,杨公社,等. 中国驴种线粒体 DNA D-loop 多态性研究 [J]. *遗传学报*, 2005, 32(5): 481~486.
- [10] Xu X F, Gullberg A, Arnason U. The complete mitochondrial DNA (mtDNA) of the donkey and mtDNA comparisons among four closely related mammalian species-pairs [J]. *J Mol Evol*, 1996, 43: 438~446.
- [11] Thompson J D, Gibson T J, Pelewniak F, *et al.* The Cluster-X Windows interface: Flexible strategies ed. for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25: 4 876~4 882.
- [12] Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, *et al.* MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software. Arizona State University, Tempe, AZ, USA. 2001.
- [13] Schneider S, Roessli D, Excoffier L. Arlequin: A software for population genetic data analysis. Ver 2.0. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland. 2000.