

# 中国西南地区 5 个地方绵羊群体 mtDNA 遗传多样性及系统进化研究

管松<sup>1,2</sup>, 何晓红<sup>1</sup>, 浦亚斌<sup>1</sup>, 叶绍辉<sup>2</sup>, 关伟军<sup>1</sup>, 马月辉<sup>1\*</sup>

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100094; 2. 云南农业大学动物科学技术学院, 昆明 650201)

**摘要:** 采用 PCR-SSCP 技术及 mtDNA D-loop 序列分析相结合的方法, 对我国云南昭通绵羊、腾冲绵羊、宁蒗绵羊及西藏的多玛绵羊、江孜绵羊 5 个地方绵羊群体共 232 个个体进行遗传多样性及系统进化分析。PCR-SSCP 分析显示, 在西藏的多玛绵羊和江孜绵羊中均检测到线粒体编码区的 Cyt b 和 ND2 基因的 3 种单倍型 A、B 和 C, 且在西藏的多玛绵羊、江孜绵羊中 C 单倍型比例高于 B 型; 而在云南的昭通绵羊、腾冲绵羊和宁蒗绵羊中只检测到单倍型 A 和 B。根据不同的单倍型从 5 个群体中筛选出 39 个样品进行 mtDNA D-loop 区克隆测序, 经过系统进化分析揭示西藏绵羊存在 A、B、C 3 种 mtDNA 单倍型; 而云南绵羊只存在 A、B 2 种 mtDNA 单倍型。以上基于 PCR-SSCP 和 D-loop 区序列的分析结果一致提示西藏绵羊有 3 个母系来源, 云南绵羊有 2 个母系来源。基于 mtDNA D-loop 序列的多态性分析结果显示西藏多玛绵羊和江孜绵羊的单倍型多样性(Hd)、核苷酸多样性(Pi)及平均核苷酸差异数(k)均高于云南 3 个地方绵羊品种, 提示西藏绵羊遗传多样性较丰富, 云南绵羊遗传多样性相对贫乏。

**关键词:** 绵羊; mtDNA; 遗传多样性; 系统进化

中图分类号: S826.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2007)03-0219-06

## Study on mtDNA Genetic Diversity and Phylogeny Evolution of 5 Indigenous Sheep Populations in Southwest China

GUAN Song<sup>1,2</sup>, HE Xiao-hong<sup>1</sup>, PU Ya-bin<sup>1</sup>, YE Shao-hui<sup>2</sup>, GUAN Wei-jun<sup>1</sup>, MA Yue-hui<sup>1\*</sup>

(1. *Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China*; 2. *College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China*)

**Abstract:** The genetic diversity and Phylogeny evolution of 232 individuals of 5 indigenous sheep populations in Southwest China was analyzed with PCR-SSCP technology and mtDNA D-loop sequenced. The five indigenous populations included Tengchong, Zhaotong, and Ninglang sheep from Yunnan and Duoma and Jiangzi sheep from Tibet. PCR-SSCP analyses revealed that three hypotypes A, B, and C of mitochondrial Cyt b and ND2 genes were detected in Duoma and Jiangzi sheep from Tibet and the rate of hypotypes C is higher than that of B; whereas only hypotypes A and B found in Tengchong, Zhaotong, and Ninglang sheep from Yunnan. mtDNA D-loop sequences of 39 individuals chosen from the five according to different hypotypes were sequenced. Phylogenetic analysis indicated that three mtDNA lineages A, B, and C were found in Tibetan sheep and only lineages A and B in Yunnan sheep. These results from PCR-SSCP and D-loop sequences consistently indicated that Tibet sheep derived from three maternal origins, While Yunnan sheep derived from two maternal origins. Polymorphism analyses showed that values of nucleotide diversity and average number of nucleotide differences in Tibetan sheep were higher than

收稿日期: 2006-03-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(30371026); 国家科技基础条件平台项目(2005DKA21101)

作者简介: 管松(1979-), 女, 硕士, 主要从事动物遗传育种研究

\* 通讯作者: 马月辉, E-mail: yuehui.ma@263.net

those of Yunnan sheep. This suggested that the level of genetic diversity in Tibetan sheep is higher than that in Yunnan sheep.

**Key words:** sheep ; mitochondrial DNA ; genetic diversity; phylogeny evolution

线粒体 DNA(Mitochondrial DNA mtDNA)是动物细胞内唯一的核外遗传物质,其结构呈共价、闭合的环形分子,分子量小、进化速度快、无组织特异性、遗传上具有自主性及遵循严格的母系遗传。这些特点使得 mtDNA 分子标记已成为研究动物遗传多样性及起源进化的有力工具。到目前为止,利用 mtDNA 研究牛<sup>[1,2]</sup>、猪<sup>[3]</sup>、山羊<sup>[4]</sup>等家养动物的起源进化已取得许多有意义的成果。

我国对绵羊<sup>[5~9]</sup> mtDNA 的研究也取得很大的进展,但是基于 mtDNA D-loop 区的序列分析并不多见,特别是针对一些偏远地区的地方品种。因此,本文采用 PCR-SSCP 技术和 mtDNA D-loop 区序列测定相结合的方法对云南的(昭通、腾冲、宁蒗)绵羊及西藏的(多玛、江孜)绵羊 5 个地方绵羊群体的起源分化、遗传多样性及群体间的遗传关系进行研究,以期确定这些绵羊群体的起源及分类、群体间的遗传结构和亲缘关系以及品种遗传资源的合理利用和保护等提供基础资料和科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

采集云南省昭通绵羊(ZS)48只、腾冲绵羊(TC)38只、宁蒗绵羊(NL)48只及西藏的多玛绵羊(DM)50只、江孜绵羊(JZ)48只共232只绵羊的耳组织,用75%无水乙醇浸泡并冻存于-70℃冰箱备用。

### 1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 取约 20 mg 耳组织,剪碎,放入 1.5 mL 的 Eppendorf 离心管内,用蛋白酶 K 消化过夜,然后依次用饱和酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)和氯仿:异戊醇(24:1)分别抽提 2 次,再用无水乙醇(-20℃)沉淀和 70%的乙醇洗涤,离心甩干,最后溶于 30 $\mu$ L 的 TE 中。

1.2.2 PCR-SSCP 分析 为了避免 mtDNA D-loop 直接测序带来的盲目性,本试验选取 mtDNA 非控制区的 Cytb、ND2、ND4、ND5、ND1、co I I 等几个基因对 5 个群体共 232 个样品进行多态性分析,筛选不同基因型的个体作 mtDNA D-loop 区克隆测序。引物根据 GenBank(NCBI)上发表的绵羊线粒

体 DNA 全序列(登录号为 AF010406),利用 Primer5.0 软件自行设计;PCR 扩增体系为 25  $\mu$ L;扩增条件:95℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,50~60℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,经 33~35 个循环;72℃延伸 8 min;4℃保存。引物不同,退火温度略有差异。PCR 扩增产物经 2%的琼脂糖凝胶电泳检测后,取 10.0  $\mu$ L PCR 扩增产物加入 10.0  $\mu$ L 变性缓冲液(98%去离子甲酰胺,10mmol/L EDTA(pH8.0),0.025%二甲苯菁及 0.025%溴酚蓝,20  $\mu$ L/mL 甘油),瞬时离心,经 98℃高温变性 10 min,立即至于冰上 10 min 后,取 10  $\mu$ L 经过 12%的聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳条件:4℃、150 V 电泳 12~16 h。采用硝酸银染色法染色,凝胶成像系统成像后判断带型。

1.2.3 线粒体 D-loop 区序列的克隆测序 根据 PCR-SSCP 结果筛选出 39 个样品进行 D-Loop 区克隆测序。D-Loop 区 PCR 扩增所用引物根据 GenBank 上绵羊线粒体全基因序列(登录号为:NC\_001941),采用 Primre Primer5.0 软件设计。引物序列:正链引物 L<sub>15359</sub>:5' CCTCCCTAAGACT-CAAGGAAGAAGC 3';反链引物 H<sub>161</sub>:5' CTT-GATACCTGCTCCTTTTAGTCCT3'。该引物扩增片段长度为 1 443 bp,能较容易地扩增出完整的 D-loop 区片断;扩增体系为 25  $\mu$ L。扩增条件:95℃预变性 4 min;94℃变性 30 s,56℃退火 30 s,72℃延伸 30 s(共 33 个循环);72℃充分延伸 10 min;4℃保存。PCR 产物经过 2%的琼脂糖凝胶纯化回收后,用北京天为时代提供的 pGEM-Teasy 快速连接试剂盒连接、经 TOP10 感受态细胞转化后 LB 培养,筛选阳性菌落克隆,提取质粒做酶切和 PCR 扩增鉴定。挑选克隆成功的个体将菌液送交上海生工测序部测序。

1.2.4 数据分析 线粒体 DNA 编码区的几个基因,根据 PCR-SSCP 结果,统计不同的基因型在不同群体中所占的比列。并筛选样品。线粒体 D-loop 区原始序列采用 Contig 序列拼接软件将每个单克隆的双向测序结果进行拼接,经过校正后,应用 BioEdit7.0 软件及 DNASTAR 软件包中的 Editseq 应用程序截取 D-loop 片段,并将其转换成轻链序列。

然后利用 Bioedit 软件中的 Clustal W Multiple Alignment 应用程序和 DNASTAR 软件包中的 MegAlign 进行多重比对。用 DnaSP4.0<sup>[10]</sup> 进行遗传多样性和单倍型分析,MEGA3.0<sup>[11]</sup> 软件用于碱基变异位点、系统进化及群体聚类分析。Network 4.1.1.2<sup>[12]</sup> 用于网络分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 带型判断

PCR-SSCP 结果的带型判断根据 Hiendleder 等<sup>[13]</sup>、Guo<sup>[14]</sup> 的命名方法命名为 A、B、C 3 种类型。结果显示,在西藏的多玛绵羊、江孜绵羊群体中均检出线粒体 DNA 编码区的 Cyt b、ND2 两个基因的 A、B 和 C 3 种单倍型,并且在西藏的 2 个群体中 C 型比例高于 B 型;Cytb 基因在江孜绵羊群体中均检出 3 种单倍型,见图 1。而在云南的昭通绵羊、腾冲绵羊、宁蒗绵羊 3 个群体中只检出 A、B 两种单倍型,没有检出 C 型。总体以 A 单倍型为主。Cyt b、ND2 两个基因在所有的类群中基因型完全连锁。各类群基因型所占比例见表 1。

### 2.2 系统进化分析和网络分析

经过测序成功的 39 条序列(登录号为: DQ460429-DQ460467)经过比对后,以山羊的 D-loop 序列作为外群体、kimura 模型、NJ 法建立群

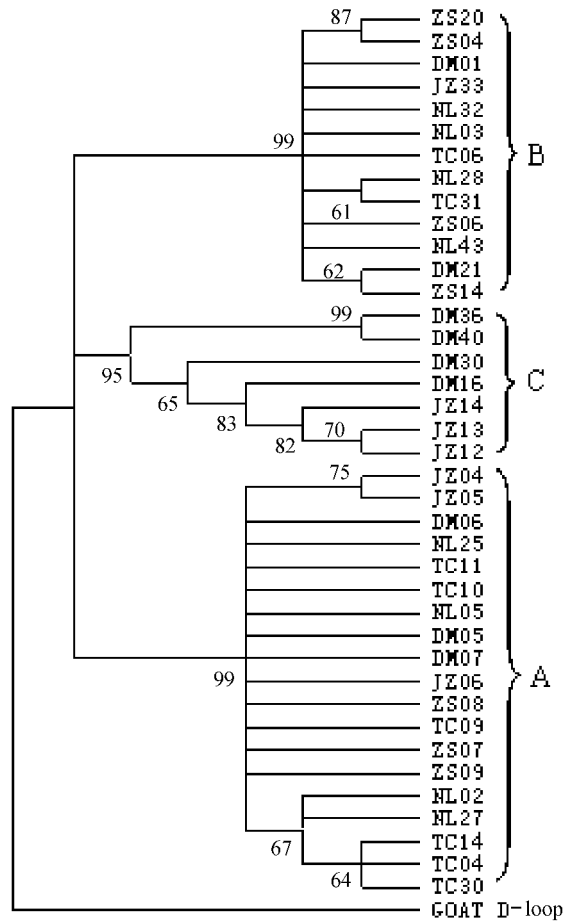


图 2 绵羊 D-loop 树(NJ 法)[软件:MEGA3.0]  
Fig. 2 D-loop tree of *Ovis aries* (NJ method)

体间系统发育树,并对拓扑图进行了自展检验(bootstrap),重复抽样次数为 1 000 次。所建的系统进化树见图 2(本文只列出其中一种),可以看出,不同的聚类方法得到的系统进化树拓扑结构相似,聚类过程中每组单倍型组内的个体没有发生改变,即 39 个个体存在 mtDNA D-loop 区 3 种单倍型组,命名为 A、B 和 C。每组单倍型所占的比例为:A:48.7%、B:33.3%、C:18%。值得注意的是:C 单倍型只存在西藏的江孜、多玛绵羊群体中,而且西藏的两个群体中 C 单倍型比例高于 B 单倍型;而云南的 3 个绵羊群体只存在 A、B 2 种单倍型;结果与 PCR-SSCP 分析结果一致。本试验再次将 3 种单倍型序列分别与 Hiendleder. S 等发表的 A、B 单倍型序列(登录号为 AF039578(A), AF039577(B))进行多重比对,发现 A、B 型与 Hiendleder. S<sup>[13]</sup> 定义的两单倍型相对应,C 单倍型序列存在很大的差异。说明 C 单倍型确实为 mtDNA D-loop 区新型单倍型,

ACAA AAA ACA ACC CABAAAC CAAA

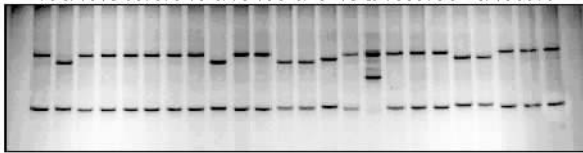


图 1 Cytb 扩增片段 SSCP 结果(江孜绵羊)

Fig. 1 The results of PCR-SSCP of Cytb and the samples come from Jiangzi sheep

表 1 5 个绵羊群体 mtDNA 的 3 种单倍型频率  
Table 1 Three genotypes frequencies of mtDNA in five sheep populations

群体 Populations	样品数量 No. of samples	单倍型频率 haplotypes frequencies/%		
		A	B	C
多玛绵羊(DM)	50	58.0	18.0	24.0
江孜绵羊(JZ)	48	72.9	6.3	20.8
宁蒗绵羊(NL)	48	77.1	22.9	0
昭通绵羊(ZS)	48	62.5	37.5	0
腾冲绵羊(TC)	38	63.2	26.3	10.5

并且每种单倍型类型与编码区的 Cytb、ND2 2 个基因根据 PCR-SSCP 分析预先估计的单倍型一一对应;而 ND4 基因在云南的腾冲绵羊中所检出的 C 型,经过测序发现并没有形成新的 mtDNA D-loop 区 C 单倍型。基于以上一致的结果提示了西藏绵羊存在 3 个母系祖先,云南绵羊只存在两个母系祖先。

网络分析适合于推断大样本且个体间的遗传距离比较近的种内水平的系统发育关系,是目前分析 mtDNA 单倍型序列之间的关系的的有效方法。本研究利用 Network 网络分析软件分别对西藏、云南两个地方绵羊群体进行网络分析,见图 3、图 4。可以看出西藏的两个地方绵羊群体集聚成 3 个单倍型族群(A、B、C),云南绵羊聚集成两个单倍型族群(A 和 B),族群内个体间联系紧密,遗传距离较近,族群间遗传距离较远。且无论是西藏绵羊还是云南绵羊,各单倍型族群完全独立,族群间没有复杂的网络关系,这也进一步证实了西藏绵羊确实存在 3 个母系来源,云南绵羊只存在 2 个母系来源。

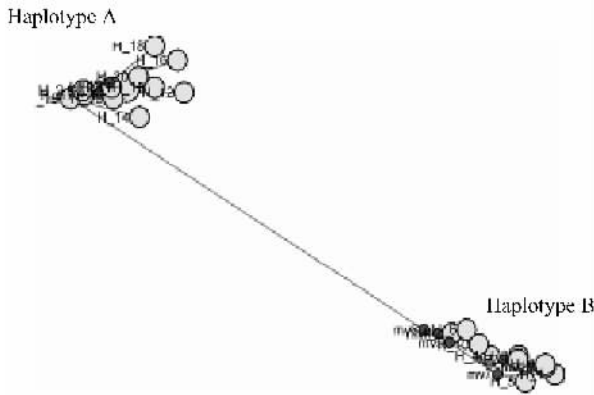


图 3 云南绵羊群体单倍型网络关系[Network 4.1.1.2]

Fig. 3 The median joining network of yunnan sheep

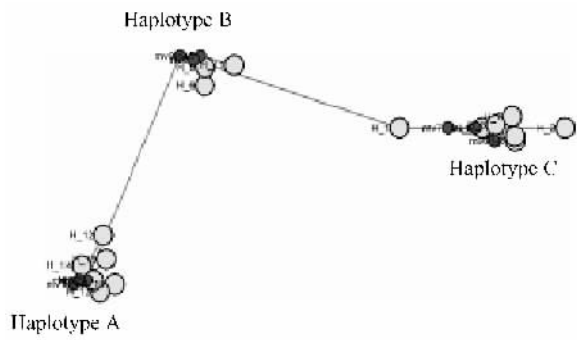


图 4 西藏绵羊群体单倍型网络关系[Network 4.1.1.2]

Fig. 4 The median joining network of Tibetan sheep

### 2.3 线粒体 D-loop 序列变异

线粒体 D-loop 区存在不同的重复序列(Repeated sequence, RS),有串联重复序列,也有非串联重复序列;有的两种串联重复序列都有,也有由多个相似的基元序列组成的复合、基元序列重复序列。重复序列以 75 bp 最长见。不同的物种重复序列所在的位置不同,同种动物不同个体的基元重复数也不同。因此,造成 D-loop 区序列的长度发生了变异。这种差异在个体间表现为 mtDNA 分子的长度变异(Molecule size variation),在个体内表现为异质现象(Heteroplasmy)。本试验将 39 条序列与 Hiendleder. S 等发表的 A、B 单倍型序列(登录号为 AF039578(A), AF039577(B))及绵羊线粒体 DNA 全序列(登录号为 AF010406)标准序列进行比对发现。A、B 型序列与 Hiendleder. S 定义的 A、B 2 种单倍型序列基本一致,而 C 型存在很大差异。主要是碱基发生变异的位置及类型不同。分子类型也有差异,A 单倍型以序列长度为 1 182 bp 的分子类型为主,B 单倍型以序列长度为 1 181 bp 的分子类型为主,C 单倍型以序列长度为 1 184 bp 的分子类型为主。39 个序列中,有 1 个序列长度为 1 257 bp(A 单倍型),1 个序列长度为 1 256 bp(B 单倍型),1 个序列长度为 1 259 bp(C 单倍型),1 个序列长度为 1 107 bp(A 单倍型),这些分子类型都是 75 bp 重复单元的重复所造成的。

### 2.4 线粒体 D-loop 区序列多态性分析

由于本试验所研究的 5 个绵羊群体在起源进化上存在很大差异,即西藏、云南 2 个地方绵羊品种存在不同的母系起源。因此,分别对两个地方绵羊品种进行线粒体 D-loop 区序列多态性分析将更有实际意义。

通过单倍型分析:西藏多玛、江孜绵羊无共享单倍型,单倍型比例较高,均为 100%;核苷酸多样性( $\pi$ )分别为 0.032、0.030;平均核苷酸差异数(k)为 37.44、35.96。而云南的昭通绵羊、宁蒗绵羊、腾冲绵羊除腾冲绵羊个体 3 和 8 共享一种单倍型外,其余个体无共享单倍型。昭通、宁蒗绵羊单倍型比例均为 100%;核苷酸多样性( $\pi$ )、平均核苷酸差异数(k)分别为:0.026、30.48;0.023、24.79;腾冲绵羊单倍型比例为 87.5%,核苷酸多样性( $\pi$ )、平均核苷酸差异数(k)为 0.021、22.86。可见,西藏的两个地方绵羊群体线粒体 D-loop 区序列多态性比较丰富。云南绵羊群体线粒体 D-loop 区序列多态

性相对贫乏。各项遗传多样性参数见表 2。多玛、江孜绵羊线粒体 D-loop 区 A、T、C、G 碱基的平均含量分别为 33.0%、29.7%、22.8%、14.5%；云南的昭通绵羊、宁蒗绵羊、腾冲绵羊线粒体 D-loop 区 A、T、C、G 碱基的平均含量分别为 33.0%、

29.6%、22.9%、14.5%。碱基含量差异很小。39 个个体线粒体 D-loop 区碱基变异有转换、插入、缺失,没有颠换。以转换为主,且 T<—>C 的转换比例明显高于 A<—>G 转换。

表 2 5 个群体 mtDNA D-loop 区单倍型的多样性参数

Table 2 Diversity parameters of the mtDNA D-loop haplotypes in five breeds

群体 Populations	群体含量 No. of sequences	单倍型数量 No. of Haplotype	单倍型比例 (1%) Haplotype proportion	Hd±SD	π	k
多玛绵羊(DM)	9	9	100	1.000±0.052	0.032	37.44
江孜绵羊(JZ)	7	7	100	1.000±0.076	0.030	35.96
宁蒗绵羊(NL)	8	8	100	1.000±0.063	0.023	24.79
昭通绵羊(ZS)	7	7	100	1.000±0.076	0.026	30.48
腾冲绵羊(TC)	8	7	87.5	0.964±0.077	0.021	22.86

Hd, 单倍型多样性; π, 核苷酸多样性; k, 平均核苷酸差异数

Hd, Haplotype diversity; π, Nucleotide diversity; k, Average number of nucleotide differences

## 2.5 聚类分析

此外,为了分析群体间的亲缘关系,本试验根据群体间的遗传距离构建亲缘关系聚类图(见图 5),结果西藏的多玛(DM)、江孜(JZ)两个绵羊群体聚为一类,而云南的宁蒗(NL)与昭通(ZS)绵羊遗传距离最近,首先聚为一类,再与腾冲(TC)绵羊聚为一大类。也可以看出云南的绵羊群体之间遗传关系较近。同时还构建了 A、B 两种单倍型树(图 6、图 7),结果与图 5 形状基本一致;西藏的多玛(DM)、江孜绵羊(JZ)始终独立成支聚为一类,与云南的 3 个绵羊群体亲缘关系较远。云南的绵羊群体中,昭通(ZS)与宁蒗绵羊(NL)遗传距离始终较近,腾冲绵羊(TC)独立成支。

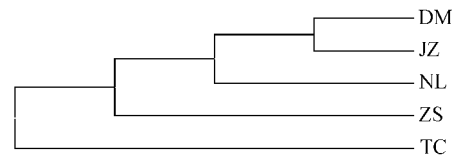


图 6 A 单倍型树 (NJ 法)

Fig. 6 NJ tree of haplotype A

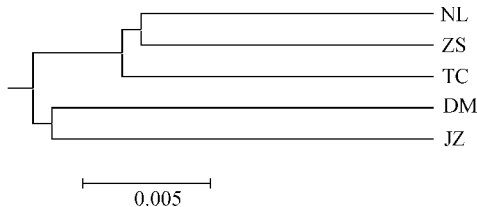


图 5 群体间的遗传距离聚类图

Fig. 5 UPGAM tree of distance

## 3 讨论

目前,对于西藏绵羊的遗传多态性和品系分化研究仍处于较低的水平;而且对于云南绵羊的起源一直存在着两种观点<sup>[15]</sup>,一些人认为云南绵羊源于

西藏高原,而另一些学者则认为云南绵羊是起源于本土,这两种观点均是从形态学、地质考古学、动物地理学、解剖学等方面去考证物种的进化,并未从分子生物学的角度提出有力的证据。随着生物技术的不断发展,兰蓉等<sup>[16]</sup>通过对云南的德钦绵羊、昭通绵羊、腾冲绵羊群体进行 mtDNA 限制性片段长度多态性分析(RFLP),结果表明,云南绵羊群体间亲缘关系较近,揭示云南绵羊可能起源于同一个共同祖先。后来,兰蓉等<sup>[17]</sup>又对云南这 3 个地方(昭通、腾冲、德钦)绵羊进行同工酶及血液蛋白多态性研究,结果得出相同的结论:即 3 个绵羊群体间的遗传距离值都较小,亲缘关系较近;而且云南绵羊与印

度、尼泊尔绵羊关系较近,而与西藏绵羊关系较远。他们从生化遗传学角度否定了云南绵羊源于西藏的论点,并支持云南绵羊起源于云南本土的观点。

本研究通过对西藏的2个地方群体和云南的3个地方群体进行 mtDNA 编码区 PCR-SSCP 分析及 D-loop 区系统进化分析发现:西藏绵羊存在 mtDNA A、B、C 3种单倍型,结果与涂正超<sup>[18]</sup>等结论一致。新的发现是:在西藏的2个品种中,C单倍型比例高于B单倍型;而云南绵羊只存在 mtDNA A、B 2种单倍型。由此揭示西藏绵羊来源于3个母系祖先;云南绵羊来源于两个母系祖先。这一结论进一步证实了云南、西藏绵羊的在起源上存在很大差异。另外,通过对5个地方绵羊群体序列多态性研究发现:西藏绵羊 mtDNA 遗传多态性比较丰富,云南绵羊 mtDNA 多态性相对贫乏。关于西藏绵羊遗传多样性,本试验与涂正超<sup>[18]</sup>的结论不尽一致,涂正超的结论是藏绵羊遗传多样性较为贫乏,本研究得到的结论是西藏绵羊遗传多样性相对丰富。关于云南绵羊 mtDNA 多态性及群体间的亲缘关系:本研究结论与兰蓉等<sup>[16]</sup>的结论基本一致。

那么为什么云南绵羊只存在两个母系祖先呢?本研究作出以下推断:绵羊在传播过程中基因丢失、或者云南绵羊因为特殊的地理环境,长期隔离,在闭锁的环境中生活,与外界交流较少,群体间近交系数较高,导致某些基因流失,长期进化形成现有的类群。不过本研究所选群体数量有限,还需对大量的群体进行研究,并结合其他资料才能做出准确的判断。

**致谢:**感谢中国农业科学院北京畜牧兽医研究所的郭军博士、宋雪梅博士、方华硕士、刘丽莉硕士在本研究中给予的帮助。

#### 参考文献:

- [1] 涂正超,张亚平,邱 怀. 中国牦牛线粒体 DNA 多态性及遗传分化[J]. 遗传学报, 1998, 25(3): 205~212.
- [2] 赖松家,刘延鑫,李学伟,等. 四川黄牛品种线粒体 DNA 遗传多样性研究[J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(9): 887~892.
- [3] 黄勇富,张亚平,邱祥聘,等. 猪线粒体 DNA 多态性与中国地方猪种起源分化的关系[J]. 遗传学报, 1998, 25(4): 322~329.
- [4] Chen S Y, Su Y H, Zhang Y P, *et al.* Mitochondrial diversity and phylogeographic structure of Chinese domestic goats[J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2005, 37(3): 804~814.
- [5] 贾永红,简承松,朱文适,等. 贵州绵羊线粒体 DNA (mtDNA)多态性研究[J]. 西南农业学报, 1998, 12(1): 100~105.
- [6] 李祥龙,田庆义,刘铮铸,等. 几个绵羊品种线粒体 DNA 限制性片段长度多态性比较研究[J]. 畜牧兽医学报, 2001, 32(4): 295~298.
- [7] 赵兴波,李 宁,王爱华,等. 绵羊(*Ovis aries*)线粒体 DNA 的遗传变异类型研究[J]. 自然科学进展, 2001, 11(12): 1 326~1 328.
- [8] 李祥龙,张增利,巩元芳,等. 我国主要地方绵羊品种遗传亲缘关系[J]. 中国兽医学报, 2004, 24(5): 508~511.
- [9] 李祥龙,巩元芳,贾 青,等. 我国主要地方绵羊品种 mtDNA D-loop 区 PCR-RFLP 研究[J]. 遗传, 2006, 28(2): 165~170.
- [10] Rozas J, Messeguar X, Rozas R, *et al.* *DnaSP*, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods[J]. *Bioinformatics*, 2003, 19(18): 2 496~2 497.
- [11] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. *Brief Bioinform*, 2004, 5(2): 150~163.
- [12] Bandelt H J, Forster P, Rohl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies [network4. x is available from [http:// www.fluxus-engineering.com/sharenet. htm](http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm)] [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1999, 16: 7~48.
- [13] Hiendleder S, Mainz K, Plante Y, *et al.* Analysis of mitochondrial DNA indicates that domestic sheep are derived from two different ancestral maternal sources; no evidence for contributions from urial and argali sheep[J]. *J Hered*, 1998, 89(2): 113~120.
- [14] Guo J, Du L X, Ma Y H, *et al.* A novel maternal lineage revealed in sheep (*Ovis aries*) [J]. *Anim Genet*, 2005, 36(4): 331~336.
- [15] 黄启昆. 云南省家畜家禽品种志[M]. 昆明: 云南科技出版社, 1987, 123~129.
- [16] 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.
- [17] 兰 蓉,洪琼花,张 俊,等. 云南不同地区绵羊血液蛋白多态性研究[J]. 草食家畜(季刊), 2002, 114(1): 43~46.
- [18] 涂正超,张亚平. 藏绵羊线粒体 DNA 遗传多样性研究[J]. 畜牧兽医学报, 1998, 29(2): 132~135.