

# 普氏野马与两种新疆地方品种马的 *ELA-DRA* \* *exon2* 的多态性分析

于丽娟<sup>1</sup>, 恩特马克<sup>2</sup>, 凌英会<sup>3</sup>, 马月辉<sup>3</sup>, 马合木提·哈力克<sup>1\*</sup>

(1. 新疆大学生命科学与技术学院, 乌鲁木齐 830046; 2. 新疆野马繁殖中心, 吉木萨尔 831700;

3. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193)

**摘要:** 为了解普氏野马、哈萨克马与焉耆马的 *ELA-DRA* \* *exon2* 的多态性以及等位基因频率分布。本研究采用 PCR-SSCP 技术对普氏野马、哈萨克马与焉耆马的 *ELA-DRA* \* *exon2* 进行分型, 并对不同等位基因进行核苷酸与氨基酸分析。结果显示: 127 匹马中共出现 7 种基因型, 3 种纯合子分别记为 AA、BB、CC; 4 种杂合子分别记为 AB、AC、BC、AD。AA 基因型为哈萨克马与焉耆马的优势基因型, 普氏野马以 CC 基因型为主。经  $\chi^2$  检验后, 3 种类型马的等位基因频率和基因型频率均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。PIC 值与 *He* 值分析表明, 3 种类型马均属于中度多态, 且普氏野马的 PIC 值与 *He* 值比哈萨克马与焉耆马低。

**关键词:** 普氏野马; 主要组织相容性复合体; DRA; SSCP

中图分类号: S821.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2011)03-0369-06

## Polymorphisms of the Gene *ELA-DRA* \* *exon 2* in Przewalski's Horse (*Equus Przewalskii*) and Two Kinds of Xinjiang Local Breeds

YU Li-juan<sup>1</sup>, Entemake<sup>2</sup>, LING Ying-hui<sup>3</sup>, MA Yue-hui<sup>3</sup>, Mahmut · HALIK<sup>1\*</sup>

(1. College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China;

2. Xinjiang Wild Horse Breeding Center, Jimsar 831700, China; 3. Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

**Abstract:** To understand the polymorphism and allele frequency distribution of *ELA-DRA* \* *exon2* in Przewalski's horse (*Equus Przewalskii*), Kazakh and Yanqi horse, *ELA-DRA* \* *exon2* in three types of horses was genotyped by PCR-SSCP methods. Both the nucleotide and the amino acid sequences of the different alleles were analyzed in these horses. The results showed that seven genotypes were detected in 127 horses: three homozygotes named AA, BB and CC, four heterozygotes named AB, BC, AC and AD. AA genotype was dominant in Kazakh and Yanqi horses. CC was the dominant genotype in Przewalski's horse (*Equus Przewalskii*). The chi-square analysis suggested that the allele and genotype frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium in the three horse types. The analysis of PIC and *He* showed that the three horse types belonged to intermediate polymorphism. The values of PIC and *He* in Przewalski's horse (*Equus Przewalskii*) were lower than that in Kazakh and Yanqi horses.

**Key words:** Przewalski's horse (*Equus Przewalskii*); MHC; DRA; SSCP

主要组织相容性复合体 (Major Histocompatibility Complex, MHC) 是由紧密连锁的高

度多态的基因位点所组成的染色体上的一个遗传区域, 其表达产物分布于脊椎动物的细胞表面, 在免疫

收稿日期: 2010-02-05

基金项目: 国家自然科学基金项目资助 (30660025); “十一五” 国家科技支撑计划 (2006BAD13B08)

作者简介: 于丽娟 (1986-), 女, 新疆博州人, 硕士生, 主要从事动物分子遗传学研究, E-mail: yljxinjiang120@sina.com

\* 通讯作者: 马合木提·哈力克, E-mail: yarkandemis17@hotmail.com

反应中起着关键性作用<sup>[1-2]</sup>。通过 MHC 的多态性分析可以提供物种的遗传多样性水平、进化历史和种群动态,以及种群遗传结构等信息,并在濒危物种饲养繁殖种群的遗传管理中有重要应用<sup>[3]</sup>。

马的 MHC 称为马淋巴细胞表面抗原(Equine Lymphocyte Antigen, ELA),位于第 20 号染色体上<sup>[4]</sup>,和其他大多数脊椎动物一样,由 I、II、III 类区域组成,其中 II 类基因包括许多高度表达、高度多态的基因,由它们编码的功能区形成了抗原结合位点(Antigen-Binding Site, ABS),它们的多态性直接与其功能相关,主要反映在对各种疾病的免疫力不同,体现了物种疾病发生率的差异。其中, DRA 基因被认为在 MHC II 类基因中发挥重要的作用。据报道在许多物种中 DRA 基因都是相对保守的<sup>[5-6]</sup>,而在马中并非如此。Albright-fraser 和 Janova 等先后分别利用不同的方法对马属动物的 ELA-DRA \* exon2 的多态性进行研究<sup>[7-8]</sup>,到目前为止,在马属动物中共确定了 17 种 ELA-DRA \* exon2 等位基因,其中的 4 种等位基因在马中被发现。孟青龙等对内蒙古地区的 3 个马品种的 ELA-DRA \* exon2 的多态性进行研究,共确定了 3 种等位基因<sup>[9]</sup>。而对新疆地方品种马与普氏野马 ELA-DRA \* exon2 方面的研究还未见报道。本研究旨在利用 SSCP 技术对普氏野马及 2 种新疆地方品种马的 ELA-DRA \* exon2 遗传多态性进行检测与分析,为进一步研究马 MHC 的抗病、易感性提供科学依据,并为更好的饲养繁殖和保护普氏野马提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

共采集了 127 匹马的血样,其中 47 匹哈萨克马与 50 匹焉耆马的血样分别采自新疆伊犁新源县及巴音郭楞蒙古自治州焉耆县,30 匹普氏野马的血样由新疆吉木萨尔野马繁殖中心提供。采颈静脉血 10 mL,加 ACD 按 6 : 1 混匀抗凝,液氮罐带回, -70 °C 冰箱保存。采用常规的酚-氯仿抽提法提取马基因组 DNA,用 TE 溶解。紫外分光光度计检测基因组 DNA 的浓度和纯度,稀释至 80 ng · μL<sup>-1</sup>, -20 °C 保存备用。

### 1.2 主要试剂

Taq DNA 聚合酶、dNTPs、10×PCR buffer(不含 Mg<sup>2+</sup>)以及 PGM-T 载体、DNA 片段回收纯化试剂盒等均购自天根生化科技(北京)有限公司。

### 1.3 引物设计与 PCR 扩增

参照 Albright-fraser 等<sup>[7]</sup>所报道的 ELA-DRA \* exon2 序列的引物。上游引物为:5'-AGGAT-CACGTGATCATCCAG-3',下游引物为:5'-CAT-TGGTGT TGGAGTGT TG-3'。引物由上海生物工程有限责任公司合成。

PCR 扩增反应体系为:总体积为 20 μL,其中包括 10×Buffer 缓冲液 2.0 μL、10 mmol · L<sup>-1</sup> dNTPs 1.6 μL、上下游引物(各 50 pmol · μL<sup>-1</sup>)各 0.2 μL、Taq DNA 聚合酶 0.3 μL、模板 DNA(80 ng)1 μL、ddH<sub>2</sub>O 补至 20 μL。扩增条件为:95 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,34 个循环;72 °C 延伸 10 min;4 °C 保存。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,UV-1000 凝胶成像系统拍照。

### 1.4 PCR 产物的 SSCP 检测

取 3 μL PCR 产物,加入 12 μL 变性剂(包括 98% 去离子甲酰胺、0.025% 溴酚蓝、0.025% 二甲苯青、10 mmol · L<sup>-1</sup> EDTA(pH 8.0))混匀,98 °C 变性 5 min,冰浴 10 min。变性后的 PCR 产物经 12% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶(Acr : Bis=29 : 1)在 1×TBE 电泳溶液中进行检测。电泳条件为温度 4 °C、电压 140 V,16 h。银染显色后,统计各种基因型的个体数,并用凝胶成像系统拍照。

### 1.5 不同基因型测序

分型之后选取不同的纯合子个体的 PCR 产物送往北京三博远志生物技术有限责任公司进行测序,以 PCR 反应引物作为测序引物,正反两个方向各测 1 次。另外挑选杂合子个体的 PCR 产物用 DNA 片段快速纯化回收试剂盒纯化,回收后的 DNA 片段用 PGM-T 载体连接,然后转化大肠杆菌(*E. coli*)TOP10 菌株,PCR 鉴定后由北京三博远志生物技术有限责任公司完成测序。测序结果用 Mega4 软件分析,检测核苷酸变异位点。并利用 Mega4 软件将核苷酸序列翻译成氨基酸序列进行比对。

### 1.6 数据统计分析

经 SSCP 分型后,统计每种基因型的数量,应用 PopGen32<sup>[10-11]</sup>软件计算其基因型频率、等位基因频率、群体杂合度(Heterozygosity, *H*)、有效等位基因数(Effective allele numbers, *Ne*),利用 Microsatellite-Toolkit 软件<sup>[12]</sup>计算多态信息含量(Polymorphism information content, *PIC*),并检验群体内基因型分布是否符合 Hardy-Weinberg 平衡。用 DISPAN

软件包<sup>[13]</sup>计算 Nei's 遗传距离 ( $D_A$ )<sup>[14]</sup>,采用邻接法 (NJ) 进行聚类分析。将测序得到的不同等位基因序列与从 GenBank 上下载不同马科动物的 *ELA-DRA \* exon2* 序列,用 MEGA4 软件基于 Kimura 双参数模型的邻接法 (Neighbor-joining, NJ) (Bootstrap 抽样 1 000 次) 构建 *ELA-DRA \* exon2* 序列的系统树。

## 2 结 果

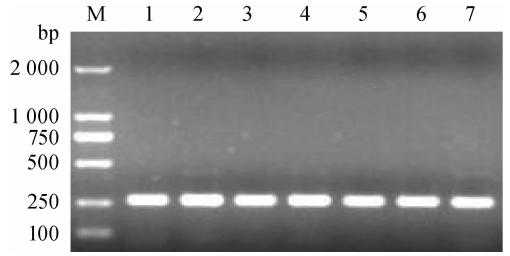
### 2.1 PCR 扩增

PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,得到一条清晰的电泳带,与 Marker DL2000 比较显示:*ELA-DRA \* exon2* 的 PCR 产物的大小在 250 bp 位置,与文献报道的 246 bp 相一致,可以判定所得片段即为 DRA 位点 *exon2*,琼脂糖凝胶电泳检测见图 1。

### 2.2 PCR-SSCP 检测结果

对 PCR 扩增产物进行 SSCP 分析,在所检测的

3 个不同类型 127 匹马中共出现 7 种基因型:3 种纯合子分别记为 AA、BB、CC 型,它们都为双带;4 种杂合子分别记为 AB、AC、BC、AD 型(图 2)。



M. DNA 相对分子质量标准;1~7. 随机个体扩增产物  
M. DL2000 Marker;1-7. Individual PCR products

图 1 *ELA-DRA \* exon2* 的 PCR 扩增产物

Fig. 1 The PCR amplification of gene *ELA-DRA \* exon2*

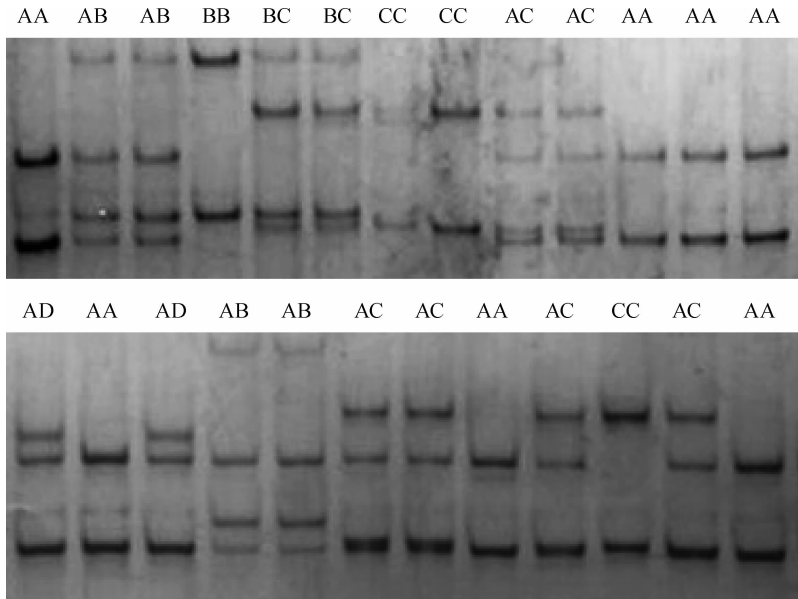


图 2 *ELA-DRA \* exon2* 的 PCR-SSCP 检测

Fig. 2 Detection of gene *ELA-DRA \* exon2* by PCR-SSCP

### 2.3 *ELA-DRA \* exon2* 的群体遗传学分析

2.3.1 *ELA-DRA \* exon2* 的基因型与等位基因频率 统计经 PCR-SSCP 分型后得到各基因型的数量,如表 1 所示,3 种类型马的共有基因型为 AC 型,AA 型在哈萨克马与焉耆马的频率最高,是哈萨克马与焉耆马的优势基因型,而普氏野马的优势基因型为 CC 型。

2.3.2 *ELA-DRA \* exon2* 的等位基因频率及 Hardy-Weinberg 平衡检验 对 3 种类型马的

*ELA-DRA \* exon2* 所检测到的等位基因分别进行等位基因频率计算,并进行 Hardy-Weinberg 平衡检验,结果见表 2。结果显示,哈萨克马与焉耆马以等位基因 A 为主,基因频率分别为 0.734、0.710,普氏野马以等位基因 C 为主。等位基因 D 只在焉耆马中出现。适合性卡方检验结果表明,普氏野马、哈萨克马和焉耆马在该位点均处于 Hardy-Weinberg 平衡 ( $\chi^2 > \chi^2_{0.05}$ )。

表 1 不同类型马的 *ELA-DRA* \* *exon2* 的基因型频率

Table 1 Genotype frequencies of gene *ELA-DRA* \* *exon2* in different horse types

类型 Type	个体数 Number	基因型 Genotype						
		AA	BB	CC	AB	AC	BC	AD
普氏野马 PS	30	0.00(0)	0.00(0)	0.60(18)	0.00(0)	0.17(5)	0.23(7)	0.00(0)
哈萨克马 HSK	47	0.53(25)	0.02(1)	0.00(0)	0.19(9)	0.21(10)	0.04(2)	0.00(0)
焉耆马 YQ	50	0.46(23)	0.00(0)	0.04(2)	0.06(3)	0.34(17)	0.00(0)	0.10(5)

括号里的数字表示个体数

The numbers in the brackets are the number of individuals that belong to the respective genotypes

表 2 不同类型马 *ELA-DRA* \* *exon2* 的等位基因频率及 Hardy-Weinberg 平衡检验

Table 2 Allele frequency and Hardy-Weinberg test of *ELA-DRA* \* *exon2* in different horse types

类型 Type	等位基因 Allele				$\chi^2$
	A	B	C	D	
普氏野马 PS	0.083	0.117	0.800	0.000	1.875
哈萨克马 HSK	0.734	0.138	0.128	0.000	1.043
焉耆马 YQ	0.710	0.030	0.210	0.050	3.453

表 3 不同类型马 *ELA-DRA* \* *exon2* 的纯合度 ( $H_o$ )、杂合度 ( $H_e$ )、有效等位基因数 ( $N_e$ ) 和多态信息含量 ( $PIC$ )

Table 3 Homozygosity, heterozygosity, the number of effective alleles and polymorphism information contents of *ELA-DRA* \* *exon2* in different horse types

类型 Type	纯合度 $H_o$	杂合度 $H_e$	有效等位基因数 $N_e$	多态信息含量 $PIC$
普氏野马 PS	0.655	0.345	1.527	0.313
哈萨克马 HSK	0.570	0.430	1.754	0.387
焉耆马 YQ	0.547	0.453	1.828	0.400

$PIC > 0.5$  为高度多态,  $0.25 < PIC < 0.5$  为中度多态,  $PIC < 0.25$  为低度多态

$PIC > 0.5$  means high polymorphism,  $0.25 < PIC < 0.5$  means intermediate polymorphism,  $PIC < 0.25$  means low polymorphism

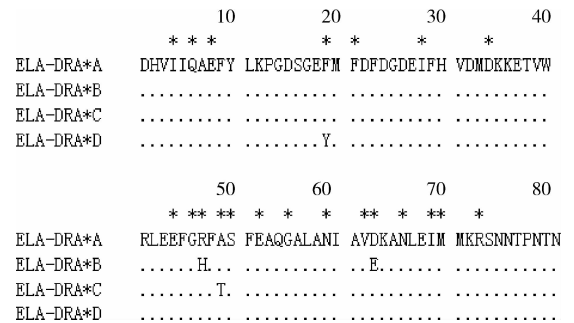
2.3.4 *ELA-DRA* \* *exon2* 的各等位基因序列分析

将测得的不同等位基因的序列与 GenBank 中已公布的序列 (GenBank 登录号 AJ575295.1) 进行比对后发现 5 处发生了突变。A 等位基因在第 38 和 197 位分别发生了 C→G、T→C 的突变, B 等位基因在第 38、142、191 和 197 位分别发生了 C→G、G→A、C→G、T→C 的突变, C 等位基因在第 38、147 和 197 位分别发生了 C→G、G→A、T→C 的突变, D 等位基因在第 38、58、98 和 197 位分别发生了 C→G、T→A、T→C、T→C 的突变。其中第 58、142、147 以及 191 位的突变引起了非同义替换, 且这 4 个突变氨基酸位点属于假定的 PBS 位点<sup>[15]</sup>, 其余突变位点均发生了同义替换 (图 3)。将测序获得的 4 条等位基因序列与 GenBank 中家马的等位基因序列进行比对发现, A、B、C、D 4 种等位基因分别与 *ELA-DRA* \* 0101 (L47174)、*ELA-DRA* \* 0301

2.3.3 *ELA-DRA* \* *exon2* 的纯合度 ( $H_o$ )、杂合度 ( $H_e$ )、有效等位基因数 ( $N_e$ ) 和多态信息含量 ( $PIC$ )

根据 PopGen32 计算出不同类型马 *ELA-DRA* \* *exon2* 的纯合度、杂合度、有效等位基因数和多态信息含量值。从表 3 可以看出, 3 种类型马均属于中度多态, 并且普氏野马的  $PIC$  与  $H_e$  值均低于哈萨克马与焉耆马。

(L47172)、*ELA-DRA* \* 0201 (M60100)、*ELA-ELA-DRA* \* H1d105 (FJ716134) 的序列相同。



(.) 表示与参考序列一致, (\*) 表示假定的 PBS 位点  
(.) indicate residues identical to the reference sequences.  
Putative peptide binding sites are marked with asterisks (\*)

图 3 *ELA-DRA* \* *exon2* 的等位基因氨基酸序列比对  
Fig. 3 Amino acid sequences alignment of gene *ELA-DRA* \* *exon2* alleles

2.3.5 系统进化分析 通过 DISPAN 软件包计算得到 3 种类型马间的遗传距离 ( $D_A$ ) (表 4), 采用邻接法 (NJ) 将 3 种类型马进行聚类分析 (图 4), 结果表明 2 个新疆地方品种马明显聚为一类, 而普氏野马单独聚为一支。

表 4 不同类型马 *ELA-DR A \* exon2* 的遗传距离

Table 4 Genetic distances of *ELA-DR A \* exon2* in different horse types

	哈萨克马 HSK	焉耆马 YQ
焉耆马 RQ	0.049 9	
普氏野马 PS	0.306 1	0.287 8

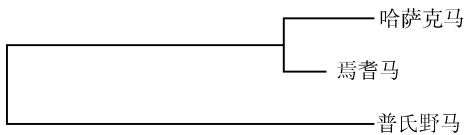


图 4 不同类型马间的聚类分析

Fig. 4 Clustering map among different type horses

本研究将 3 种类型马中分离得到的 4 个 *DR A* 等位基因序列 (Eqca-*DR A \* A*、Eqca-*DR A \* B*、Eqca-*DR A \* C*、Eqca-*DR A \* D*) 与从 GenBank 中下载的平原斑马 (*Equus burchelli*)、家马 (*Equus caballus*)、山斑马 (*Equus zebra*)、驴 (*Equus asinus*)、细纹斑马 (*Equus grevyi*)、蒙古野驴 (*Equus hemionus*)、藏野驴 (*Equus kiang*) 的序列, 用 MEGA4 软件基于 Kimura 双参数模型的邻接法构建 *ELA-DR A* 序列的系统树 (图 5)。从图中可以看出, 家马的等位基因与斑马的等位基因是明显分开的, 且除了家马的 Eqca-*DR A \* JBH11* 等位基因外, 其他家马的等位基因均离树根较近。其中, Eqca-*DR A \* A* 与 Eqca-*DR A \* C* 聚合为一类, Eqca-*DR A \* D* 与 Eqas-*DR A \* JBD3* 聚合为一类。另外, 从图中可以看出驴的等位基因与其他马属动物聚在一起。

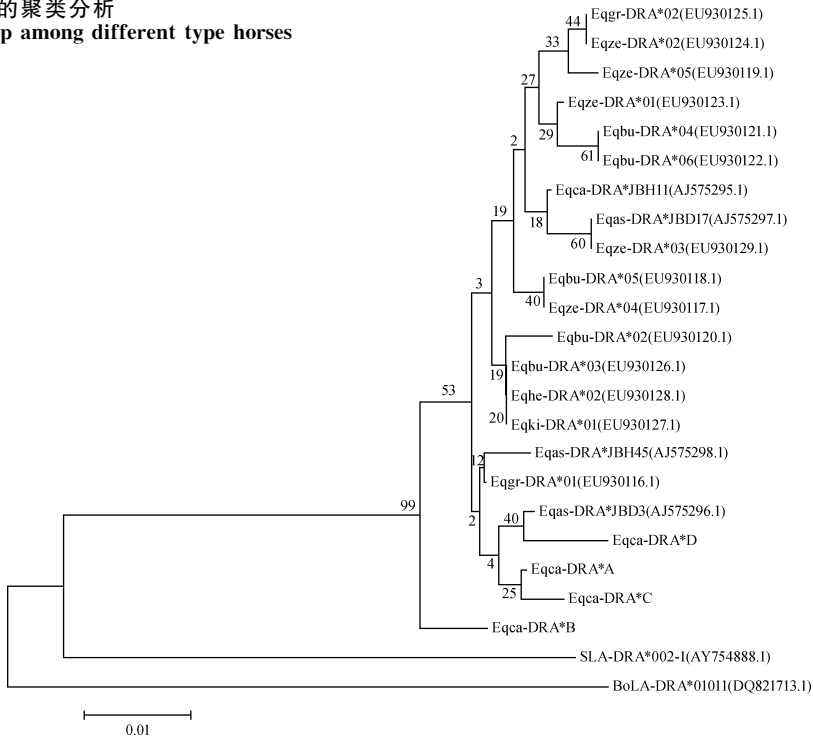


图 5 *ELA-DR A \* exon2* 不同等位基因的聚类分析

Fig. 5 Clustering map among different alleles in *ELA-DR A \* exon2*

### 3 讨论

到目前为止, Albright-fraser 和 Janova 等先后报道了在家马中共存在 *DR A \* 0101*、*DR A \* 0201*、*DR A \* 0301* 及 *DR A \* JBH11* 4 种等位基因<sup>[7-8]</sup>。本研究共检测出了 4 种等位基因, 其中 A、B、C 3 种等位基因分别与已报道的 *DR A \* 0101*、*DR A \* 0301* 和 *DR A \* 0201* 相同<sup>[8]</sup>, D 等位基因与 Gen-

Bank 中已公布的 *ELA-DR A \* Hld105* 相同。由此可以得出家马的 *ELA-DR A \* exon2* 基因存在 5 种等位基因。D 等位基因只在 5 匹焉耆马中被检出, 而在哈萨克马与普氏野马中均未发现此等位基因, 推测 D 等位基因可能是在焉耆马的杂交培育过程中遗留下来的, 也说明了焉耆马与哈萨克马之间的基因交流较少, 均属于较封闭的群体。

另外, 在 3 种类型马中共检出 7 种基因型, 其中

在哈萨克马与焉耆马中都检出了5种基因型,而在普氏野马中只检出了3种基因型。这可能是与它们的育成历史和生境有关,哈萨克马与焉耆马均是当地优良的地方品种马,虽然分别分布在新疆的北疆和南疆地区,但都具有耐高寒和较好的适应能力。而由于现存的普氏野马都是由12匹普氏野马繁育而成<sup>[16]</sup>,因此无论是在 *ELA-DRA* \* exon2 位点所具有的基因型,还是 *He* 与 *PIC* 值都不如2种地方品种丰富。

Hedrick 和 Miller 指出,在濒危物种的饲养繁殖中,需要对个体的遗传背景有详细的了解,以鉴定种群中稀有的等位基因,特别是 MHC 上的稀有等位基因,在制定饲养繁殖方案时注意加以选择<sup>[17]</sup>。通过比较普氏野马的等位基因频率发现,C 等位基因为普氏野马的优势等位基因,而另外2种等位基因的频率较低,应在以后的饲养管理中对这2种等位基因予以保护。

经 Hardy-Weinberg 平衡检验以及 *PIC* 值计算,表明我国新疆吉木萨尔野马繁殖中心的普氏野马在该位点属于中度多态且符合 Hardy-Weinberg 平衡,这可能与普氏野马具有避免近亲繁殖的行为<sup>[18]</sup>以及该中心有计划的进行分群隔离有关。

#### 4 结 论

本研究利用 PCR-SSCP 方法在2种新疆地方品种马及普氏野马的 *ELA-DRA* \* exon2 中共检测出7种基因型,4种等位基因。其中,A、B、C 3种等位基因为3种类型马的共享等位基因,D 等位基因是焉耆马的特有等位基因,这可能与其育成历史有关。3种类型马均属于中度多态,且均符合 Hardy-Weinberg 平衡。

**致谢:**本论文是在导师马合木提·哈力克教授、马月辉研究员的悉心指导下完成的,衷心的感谢二位恩师。本论文的试验工作是在中国农业科学院北京畜牧兽医研究所联合实验室完成,感谢实验室的全体师生在试验过程中给予的指导和帮助!

#### 参 考 文 献:

[1] ANDERSSON L, BOHME J, RASK L, et al. Genomic hybridization of bovine class II major histocompatibility complex genes: I. Extensive polymorphisms of DQA and DQB genes[J]. *Anim Genet*, 1986, 17: 95.

[2] ANDERSSON L, RASK L. Characterization of the MHC class II region in cattle. The number of DQ genes varies between haplotypes[J]. *Immunogenetics*, 1988, 27: 110-120.

[3] 杨光, 陈旭衍, 任文华, 等. MHC 及其在种群遗传学和保护遗传学中的应用[J]. *遗传*, 2002, 24(6): 712-714.

[4] ANSARI H A, HEDIGER R, FRIES R, et al. Chromosomal localization of the major histocompatibility complex of the horse (ELA) by insituhy hybridization[J]. *Immunogenetics*, 1988, 28: 362-364.

[5] TAKADA T, KIKKAWA Y, YONEKAWA H, et al. Analysis of goat MHC class II DRA and DRB genes: identification of the expressed gene and new DRB alleles[J]. *Immunogenetics*, 1998, 48: 408-412.

[6] RUSSEL G C, GALLAGHER A. Polymorphism in the bovine DRA gene detected by PCR-RFLP with the Expand TM PCR system[J]. *Biochemica*, 1996, 1: 34-36.

[7] ALBRIGHT-FRASER D G, REID R, GERBER V, et al. Polymorphism of DRA among equids[J]. *Immunogenetics*, 1996, 43: 315-317.

[8] JANOVA E, MATIASOVIC J, VAHALA J, et al. Polymorphism and selection in the major histocompatibility complex DRA and DQA genes in the family Equidae[J]. *Immunogenetics*, 2009, 61: 513-527.

[9] 孟青龙, 李金莲, 石有斐, 等. 内蒙古地区3个马品种 *ELA-DRA* \* exon2 的 PCR-SSCP 分析[J]. *华北农学报*, 2006, 21(5): 42-44.

[10] NEI M. Analysis of gene diversity in subdivided populations [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1973, 70(12): 3321-3323.

[11] NEI M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. *Genetics*, 1978, 89(3): 583-590.

[12] PARK SDE. Trypanotolerance in west african cattle and the population genetic effects of selection [D]. University of Dublin, 2001.

[13] OTA T. DISPAN: Genetic Distance and Phylogenetic Analysis [D]. Pennsylvania State University, University Park, PA. 1993.

[14] NEI M, TAJIMA F, TATENO Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data [J]. *J Mol Evol*, 1983, 19: 153-170.

[15] BROWN J H, JARDETZKY T, SAPERM A, et al. A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules[J]. *Nature*, 1988, 332: 845-850.

[16] DOLAN J. Przewalski's horse, *Equus Przewalskii* Poliakov 1881, in the United States prior to 1940 and its influence on present breeding [J]. *Zool Garten N F Jena*, 1982, 52(2): 49-65.

[17] HEDRICK P W, MILLER P S. Rare alleles, MHC and captive breeding[J]. *EXS*, 1994, 68: 187-204.

[18] 陈金良, 胡德夫, 王震彪, 等. 野马的婚配制度及雄性杀婴行为[J]. *中国自然杂志*, 2005, (6): 22-23.