

淮北灰驴 mtDNA D-loop 区遗传多样性及起源分析

夏晶晶¹, 贾羽晴¹, 税斐¹, 高伟凤¹, 涂小璐², 程智中², 许大双^{1,2*}

(1. 安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036; 2. 安徽省畜禽遗传资源保护中心, 合肥 231283)

摘要: 为分析淮北灰驴遗传多样性与母系起源, 从大群中随机选择 10 匹淮北灰驴, 对其 mtDNA D-loop 区部分序列进行测序, 与 GenBank 已公布的一些驴品种的 mtDNA D-loop 区序列进行比对分析, 并探讨淮北灰驴的遗传多样性与母系起源。结果显示, 在获得的 407 bp D-loop 碱基序列中, 共检测出 28 处变异位点, 8 处碱基对的转换以及 1 处颠换, 其核苷酸多样性 (Pi) 为 0.021 95, 单倍型多样性 (Hd) 为 0.778, 平均核苷酸差异 (K) 为 8.911, 显示淮北灰驴较为丰富的遗传多样性。从 D-loop 区核苷酸序列的 5 种单倍型分析, 发现淮北灰驴可能有 2 个母系起源, 遗传距离表明, 淮北灰驴与克罗地亚家驴之间的遗传距离较近。研究结果从分子水平上为淮北灰驴的遗传资源保护和开发利用提供了参考。

关键词: 淮北灰驴; mtDNA; D-loop 区; 遗传多样性; 起源

中图分类号: S822.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2022)04-0578-05

Analysis on genetic diversity and origin evolution analysis of Huaibei Grey donkey base on mtDNA D-loop region sequence

XIA Jingjing¹, JIA Yuqing¹, SHUI Fei¹, GAO Weifeng¹, TU Xiaolu², CHENG Zhizhong², XU Dashuang^{1,2}

(1. School of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. Anhui Province Livestock and Poultry Genetic Resources Protection Center, Hefei 231283)

Abstract: To investigate the genetic diversity and maternal origin of Huaibei Grey donkey, 10 Huaibei Grey donkeys were randomly selected from the large group, and their mtDNA D-loop sequences of were analyzed by PCR amplification and sequencing technique, and compared with those of some existing donkey breeds sequences in GenBank and explored the genetic diversity and maternal origin of Huaibei Grey donkey. The results showed that 407 bp D-loop base sequences were obtained, 28 polymorphic sites, including 8 conversions and 1 transversion were detected, and the Pi , Hd and K were 0.021 95, 0.778 and 8.911, respectively, indicating abundant maternal genetic diversity of the Huabei Grey donkey. From the analysis of five haplotypes of nucleotide sequences in the D-loop region, it was found that the Huabei Grey donkey might have two maternal origins, and genetic distance indicated that the genetic distance between the Huabei Grey donkey and the Croatian domestic donkey was closer. The results of the present study provide a reference for genetic resources conservation and exploitation of the genetic resources of the Huabei Gray donkey at the molecular level.

Key words: Huaibei Grey donkey; mtDNA; D-loop region; genetic diversity; origin

线粒体 DNA 是独立存在于细胞核染色体之外的唯一遗传物质^[1]。线粒体 DNA 是一种结构稳定存在的核外遗传物质, 在代系传递过程中不存在重组, 遗传方式主要为母系遗传, 不遵循孟德尔遗传定律^[2]。同时线粒体 DNA 也是高度保守的, 因为它的突变率较慢, 因此可用于研究动物的进化关系与起源^[3-6]。D-loop 区是线粒体 DNA 中的非编码区, 其具有高度

变异、碱基中性突变的特征^[7], 是一种重要的分子标记。近年来, 线粒体 DNA D-loop 区的遗传多样性被广泛用于研究物种的起源和进化关系, 如羊^[8]、牛^[9]、鸡^[10-11]等。

目前, 国内外对驴的 mtDNA D-loop 研究比较少^[12-13]。淮北灰驴是安徽省的重要地方品种资源, 2011 年被收录入《中国畜禽遗传资源志·马驴驼志》

收稿日期: 2021-10-25

基金项目: 安徽省重点研究与开发计划项目 (202004a06020049) 和安徽省科技重大专项 (202103b06020015) 共同资助。

作者简介: 夏晶晶, 硕士研究生。E-mail: 761930902@qq.com

* 通信作者: 许大双, 高级兽医师。E-mail: xds0049@163.com

中^[14]。其属小型驴种, 具有适应性好、抗病力强和易管理等特点。目前, 其养殖数量不断减少, 面临濒危。为响应国家对畜禽遗传种质资源的保护号召, 本研究旨在对淮北灰驴进行种质资源调查, 通过测定淮北灰驴线粒体 D-loop 区部分序列, 分析其遗传多样性, 推测其进化关系和起源, 为淮北灰驴的有效保种提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物及其生产性能测定

在安徽淮北灰驴濒危性保种场, 在正常饲养管理水平下, 随机选取发育良好、健康坚实的 30 匹成年公驴和 30 匹成年母驴, 进行体重和体尺测量, 体尺主要测定指标包括体高、体长、胸围和管围。测定时要求其在平坦处站稳, 测定淮北灰驴鬃甲最高点到地面的垂直距离即为其体高; 测定其肩端至臀端的距离, 即为体长; 沿肩胛后角量取的胸部周径, 即为其胸围; 测定其左前肢管部上 1/3 最细处量取的水平周径, 即为管围; 并对其实际称重, 记录采样地点, 样本的性别、年龄、毛色等各项指标。

1.2 血液采集及 DNA 提取

淮北灰驴血样均采自于安徽淮北灰驴濒危性保种场。随机选取健康状况良好的成年淮北灰驴, 公母驴各 5 头, 利用采血针采集其颈静脉血液 3~4 mL 于 EDTA 抗凝管中, -20℃ 保存备用。利用 DNA 试剂盒法提取淮北灰驴血液中 DNA, 用 NanoDrop 4000 检测 DNA 的浓度, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性。

1.3 PCR 扩增及测序

PCR 引物引用 Ivankovic 等^[15]已发表的引物, 正链为 5'-AGTCTCACCATCAACCCCAAAGC-3', 反链为 5'-CCTGAAGTAGGAACCAGATG-3', 引物由南京擎科生物有限公司合成。PCR 扩增体系 (20 μ L): 2 \times PCR Master Mix 10 μ L, 10 μ mol \cdot L⁻¹ 上下游引物各 1.0 μ L, 模板 1.0 μ L, 最后用双蒸水补齐 20 μ L。反应条件设置为 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 33 个循环; 72℃ 终延伸 10 min; 16℃ 保存。利用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行扩增效果检测后, 将样本送至南京擎科生物有限公司进行测序。

表 1 参考基因组信息

Table 1 References genomic information

品种	索马里野驴	亚洲野驴	克罗地亚野驴
来源	非洲	亚洲	欧洲
GeneBank ID	AY569545- AY569547	AF220932-AF220937	AF403063- AF403065

1.4 序列分析

利用 Chromas 软件查看测序结果的峰图, 并进行人工校对; 参考 Xu 等^[16]所测的驴线粒体基因组 D-Loop 区序列, 在 DNA Star 软件中用 Edit seq 程序进行序列剪切, 并生成对应的线粒体 D-loop 控制区序列; DNAMAN 8 软件将序列进行多重比对, 把多重比对的结果导入 DNAsp 5.10.01^[17]软件中, 计算群体单倍型数、单倍型多样性 (Hd)、核苷酸多样性 (Pi) 和核苷酸平均差异数 (K)^[18]。从 NCBI 数据库中下载了欧洲家驴 (AF403063- AF403065)、亚洲野驴 (AF220932-AF220937)、非洲野驴 (AY569545- AY569547) mtDNA D-loop 区序列 (表 1), 用 MEGA7^[19]中的 Kimura 2-parameter (K2P)^[20]模型计算遗传距离, 最后采用邻接法 (NJ)^[21]来构建分子系统发育树, Bootstraps (重复 1 000 次) 检验系统发育树的置信度。

2 结果与分析

2.1 淮北灰驴生产性能测定结果

根据淮北灰驴生产性能测定的结果可知, 成年

公驴体重在 171.84 kg 左右; 体高为 (115.21 \pm 4.45) cm; 体长为 (119.71 \pm 4.60) cm, 体长指数为 103.91%; 胸围为 (125.67 \pm 5.23) cm, 胸围指数为 109.07%; 管围为 (14.08 \pm 0.28) cm, 管围指数为 12.22%。成年母驴各项指标与成年公驴相比较低, 其体重在 146.78 kg 左右; 体高为 (108.35 \pm 4.87) cm; 体长为 (113.19 \pm 1.98) cm, 体长指数为 104.47%; 胸围为 (117.14 \pm 3.25) cm, 胸围指数为 108.11%; 管围为 (12.47 \pm 0.43) cm, 管围指数为 11.51%, 其体型符合《中国畜禽遗传资源志·马驴驼志》^[14]中列出的小型驴种标准。

2.2 DNA 质量检测

DNA 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测质量结果如图 1, 条带清晰明亮、无弥散。DNA 质量高, 完整性良好, 可将其用于下一步的试验。

2.3 引物扩增效果检验

1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测引物的扩增效果 (图 2), 可见与预期片段大小的条带, 且清晰明亮, 无杂带。PCR 产物可以用于后续测序。

表 2 成年淮北灰驴体重、体尺和体尺指数

Table 2 The weight, size and the index of size of adult Huaibei Grey donkey

项目	公 (n=30)	母 (n=30)
体重/kg	171.84	146.78
体高/cm	115.21±4.45	108.35±4.87
体长/cm	119.71±4.60	113.19±1.98
体长指数/%	103.91	104.47
胸围/cm	125.67±5.23	117.14±3.25
胸围指数/%	109.07	108.11
管围/cm	14.08±0.28	12.47±0.43
管围指数/%	12.22	11.51

2.4 淮北灰驴 mtDNA D-loop 区序列遗传多样性分析

所测淮北灰驴的 mtDNA D-loop 区的序列总长度为 407 bp, 其中 A 碱基含量为 30.4%, T 碱基含量为 28.7%, G 碱基含量为 12.8%, C 碱基含量为 28.1%, A+T 含量为 59.1%, 而 G+C 的 40.9% 相对较少。除此之外, 淮北灰驴的 mtDNA D-loop 区的单倍型多样性 (*Hd*) 为 0.778、核苷酸多样性 (*Pi*) 为 0.021 95、平均核苷酸差异 (*K*) 为 8.911。并且

其中共存在 28 处变异, 碱基对 8 处发生了转换, 1 处发生颠换。其高变区主要在 350~407 bp 之间, 57 bp 中共有 14 个变异位点, 并且占了总变异位点的 50%。检测出的淮北灰驴 mtDNA D-loop 区的单倍型及多态位点信息如下所示 (表 3)。

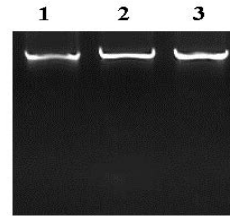


图 1 DNA 琼脂糖凝胶电泳

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of DNA

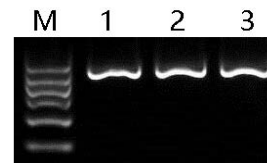


图 2 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳

Figure 2 PCR products of the mtDNA-loop by the agarose electrophoresis

表 3 淮北灰驴 mtDNA D-loop 区的多态位点分布

Table 3 Haplotypes and polymorphic sites of mtDNA D-loop sequence of Huaibei Grey donkey

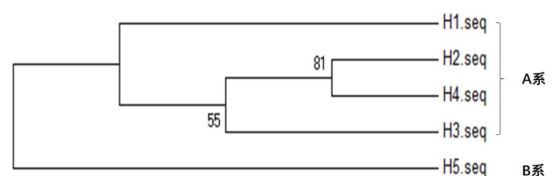
单倍型	单倍群	多态位点分布													
		1	33	39	52	118	129	147	148	193	194	201	211	247	319
参考基因组		A	G	C	T	A	A	C	A	G	A	C	A	C	T
H1	A	T	A	T	C	G	*	T	G	A	G	T	G	T	C
H2	A	*	A	T	C	G	G	T	G	A	*	T	G	T	C
H3	A	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*
H4	A	T	A	T	C	G	G	T	G	A	*	T	G	T	C
H5	B	*	A	T	C	G	*	T	G	A	G	T	G	T	C

单倍型	单倍群	多态位点分布													
		350	355	369	370	371	395	396	397	399	401	403	404	405	407
参考基因组		C	C	C	G	G	T	C	T	T	T	C	A	G	G
H1	A	T	*	T	A	A	*	*	*	A	*	*	*	*	A
H2	A	T	T	T	A	A	*	*	*	A	*	*	*	*	A
H3	A	*	*	*	*	*	*	*	*	A	C	T	C	A	*
H4	A	T	T	T	A	A	*	*	*	A	*	*	*	*	A
H5	B	T	*	T	A	A	C	T	A	A	*	*	*	*	A

注: H1—H5: 单倍型; *: 与“参考基因组”对应位置的碱基相同。

2.5 淮北灰驴 5 种单倍型系统发育分析

分子进化树法 (NJ 法) 对淮北灰驴的 5 种单倍型, 即 H1、H2、H3、H4 和 H5, 进行系统发育树的构建 (图 3)。结果显示, 淮北灰驴 5 种单倍型整体可被分成两支, 即 A 系和 B 系, 因此推测淮北灰驴可能具有两个母系起源。A 系为优势单倍型组, 其包括 4 个单倍型, 占总体的 89%, 而 B 系仅有 1 个单倍型, 仅占总体的 11%。



H1—H5: 单倍型。

图 3 淮北灰驴 5 种单倍型系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree of five haplotypes of Huaibei Grey donkey

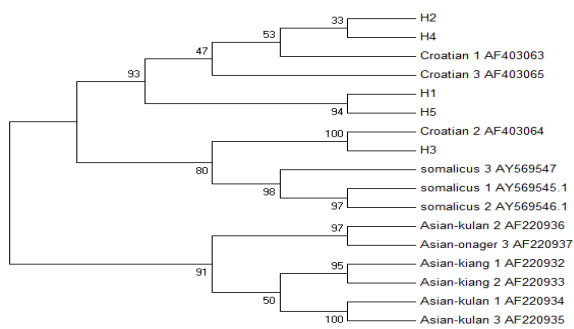


图 4 淮北灰驴 5 种单倍型与 12 条参考基因组的系统发育树
Figure 4 Phylogenetic tree of the five haplotypes of Huaibei Grey donkey and twelve reference genome of mtDNA D-loop

2.6 淮北灰驴与其他品种间的系统发育分析

分子进化树法 (NJ 法) 构建系统发育树, 将淮北灰驴的 5 种单倍型与亚洲野驴、非洲索马里野驴、克罗地亚家驴进行系统发育分析 (图 4), 总共 17 种单倍型共被分成了两个大枝, 其中亚洲野驴的 6 种单倍型单独聚为一支, 而淮北灰驴 5 种单倍型与非洲索马里野驴和欧洲克罗地亚家驴聚为一支, 据此推测淮北灰驴可能有两个母系起源。另外有相关研究表明^[15], 欧洲克罗地亚家驴也起源于非洲野驴, 这一点在本课题组研究中的确也得到了证实。观察遗传距离, 发现淮北灰驴与克罗地亚家驴之间的遗传距离比与非洲家驴遗传距离相对更近。

3 讨论与结论

生产性能是衡量品种特征特性的重要指标, 本研究对淮北灰驴体重、体高、体长、胸围和管围指标进行测定, 结果表明淮北灰驴群体型符合《中国畜禽遗传资源志·马驴驼志》^[14]中列出驴品种标准, 属于小型驴种。mtDNA 核苷酸多样性是检验群体遗传分化和群体多态程度的一个重要指标, mtDNA 单倍型多样性可检测群体内的变异程度。核苷酸多样性和单倍型多样性的临界值为 0.005 和 0.5, 数值越大, 群体多样性程度越高^[22-23]。动物遗传资源多样性可作为品种选育和改良的重要依据, 遗传多样性越丰富, 该群体可供选择的育种素材就越多, 可利用遗传潜力就越大^[24-25]。本研究中, 淮北灰驴 mtDNA D-loop 区核苷酸多样性 (P_i) 为 0.021 95, 单倍型多样性 (H_d) 为 0.778, 平均核苷酸差异 (K) 为 8.911, 表明淮北灰驴群体中存在较丰富的遗传多样性。

mtDNA D-loop 序列现已广泛用于家畜的起源进化中, 对驴的研究方面, Ivankovic 等^[15]第一次对克罗地亚驴进行研究时, 发现了 Y、W 和 Ws 这

3 个单倍型组, 并且将其划分为两个较为原始的母系起源。Beja-Pereira 等^[26]确认索马里野驴、努比亚野驴两个分支的存在, 并将非洲野驴认定为家驴的祖先。Özkan Ünal 等^[27]对 315 头驴的 54 个单倍型进行检测, 确认非洲野驴 (索马里和努比亚) 可能是土耳其本土驴群的祖先。Cozzi 等^[28]通过对意大利驴和欧洲家驴、埃塞俄比亚驴和野驴 mtDNA D-loop 序列的比较, 确定了其母系起源是努比亚野驴。但中国家驴的相关报道甚少, 本研究将淮北灰驴的 5 种单倍型分成了两支, 即 A 系和 B 系, 且可据此推测淮北灰驴可能有两个母系起源。淮北灰驴可能起源于非洲, 并在进化过程中受欧洲克罗地亚家驴影响并发生遗传交流, 在自然选育、地理环境以及人文环境的影响下, 逐渐进化成具有淮北地方特性家驴品种, 并具有较高的遗传保护潜力和开发利用价值。

本研究表明, 淮北灰驴 mtDNA D-loop 区多态性较为丰富, 其与克罗地亚家驴之间的遗传距离较近。本研究结果为淮北灰驴种质资源遗传评估、保护和开发利用提供重要的参考。

参考文献:

- [1] SACCONI C, GISSI C, LANAVE C, et al. Evolution of the mitochondrial genetic system: an overview[J]. Gene, 2000, 261(1): 153-159.
- [2] XIA X, YU J, ZHAO X, et al. Genetic diversity and maternal origin of Northeast African and South American donkey populations[J]. Anim Genet, 2019, 50(3): 266-270.
- [3] 贾媛. 中国地方黄牛线粒体 DNA D-loop 区遗传多样性分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019.
- [4] 徐秋良, 段广莹, 张潇, 等. 淮南猪线粒体 DNA D-loop 遗传多样性及母系起源研究[J]. 中国畜牧杂志, 2020, 56(1): 95-100.
- [5] 黄族豪, 刘迺发. 动物线粒体基因组变异研究进展[J]. 生命科学研究, 2010, 14(2): 166-171.
- [6] 陈念, 赖小平. 动物线粒体遗传系统理论与应用研究进展[J]. 生物技术通报, 2010(3): 25-30.
- [7] 童晓梅, 梁羽, 王威, 等. 藏鸡线粒体全基因组序列的测定和分析[J]. 遗传, 2006, 28(7): 769-777.
- [8] 韩浩园, 权凯, 闫志浩, 等. 河南奶山羊线粒体 D-loop 区遗传多态性和遗传分化研究[J]. 河南农业大学学报, 2020, 54(4): 643-649.
- [9] 黄兴, 柴志欣, 信金伟, 等. 西藏牛亚科部分群体线粒体 DNA 遗传多样性研究[J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2019, 45(2): 117-124.
- [10] 李义书, 侯冠戎, 曹婷, 等. 基于线粒体 DNA D-loop 区全序列分析儋州鸡遗传多样性及其起源进化关系[J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(5): 1439-1446.

- [11] 李兴才, 潘成勇, 李辉, 等. 香炉山鸡线粒体 DNA D-Loop 区遗传多样性及系统进化研究[J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(9): 2633-2641.
- [12] 杨东英. 德州驴线粒体 DNA D-loop 多态性分析[J]. 广东农业科学, 2008 (9): 108-109.
- [13] 雷初朝, 陈宏, 王德解, 等. 关中驴线粒体 DNA D-loop 多态性分析[J]. 中国畜牧杂志, 2004, 40(4): 10-12.
- [14] 国家畜禽遗传资源委员会组. 中国畜禽遗传资源志-马驴驼志[M]. 北京: 中国农业出版社, 2011: 287-290.
- [15] IVANKOVIC A, KAVAR T, CAPUT P, et al. Genetic diversity of three donkey populations in the Croatian coastal region[J]. Anim Genet, 2002, 33(3): 169-177.
- [16] XU X, 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(5): 438-446.
- [17] LIBRADO P, ROZAS J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. Bioinformatics, 2009, 25(11): 1451-1452.
- [18] ROZAS J, SÁNCHEZ-DELBARRIO J C, MESSEGUER X, et al. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods[J]. Bioinformatics, 2003, 19(18): 2496-2497.
- [19] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Mol Biol Evol, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [20] KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. J Mol Evol, 1980, 16(2): 111-120.
- [21] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Mol Biol Evol, 1987, 4(4): 406-425.
- [22] NEI M, TAJIMA F. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases[J]. Genetics, 1981, 97(1): 145-163.
- [23] LIAO Y, MO G, SUN J, et al. Genetic diversity of Guangxi chicken breeds assessed with microsatellites and the mitochondrial DNA D-loop region[J]. Mol Biol Rep, 2016, 43(5): 415-425.
- [24] 杨朝武, 蒋小松, 朱庆. 畜禽遗传资源的经济价值评估[J]. 中国畜牧杂志, 2008, 44(21): 61-64.
- [25] 陈宽维. 我国畜禽遗传资源保护理论与方法[J]. 中国禽业导刊, 2009, 26(23): 26-27.
- [26] BEJA-PEREIRA A, ENGLAND P R, FERRAND N, et al. African origins of the domestic donkey[J]. Science, 2004, 304(5678): 1781.
- [27] ÖZKAN ÜNAL E, ÖZDİL F, KAPLAN S, et al. Phylogenetic relationships of Turkish indigenous donkey populations determined by mitochondrial DNA D-loop region[J]. Animals, 2020, 10(11): 1970.
- [28] COZZI M C, VALIATI P, CHERCHI R, et al. Mitochondrial DNA genetic diversity in six Italian donkey breeds (*Equus asinus*)[J]. Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal, 2018, 29(3): 409-418.