

## 云南水牛 mtDNA D-loop 遗传多样性研究

亏开兴<sup>1</sup>, 金显栋<sup>1</sup>, 张继才<sup>1</sup>, 尹以昌<sup>2</sup>, 李红伟<sup>3</sup>,  
和嘉荣<sup>4</sup>, 和占星<sup>2</sup>, 罗再仁<sup>5</sup>, 雷初朝<sup>6</sup>, 黄必志<sup>1\*</sup>

(1. 云南省草地动物科学研究院, 昆明 650212; 2. 德宏州畜牧站, 云南 德宏 678400;

3. 红河州畜牧技术推广站, 云南 蒙自 661100; 4. 云南省种畜繁育推广中心, 昆明 650212;

5. 盈江县农业农村局, 云南 盈江 679300; 6. 西北农林科技大学动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

**摘要:** [目的] 探究云南 3 个水牛品种(德宏水牛、滇东南水牛、盐津水牛)的 mtDNA D-loop 区的遗传多样性与母系起源。[方法] 采用 PCR 扩增、测序及生物信息学方法。[结果] 本研究共分析了 215 条云南水牛 mtDNA D-loop 全序列, 检测到 107 个多态位点, 定义了 86 种单倍型。结果表明, 云南 3 个水牛品种的 mtDNA 遗传多样性非常丰富, 其中, 滇东南水牛的遗传多样性最高(Hd: 0.946 ± 0.017, Pi: 0.0162 ± 0.0018), 盐津水牛的遗传多样性最低(Hd: 0.805 ± 0.063, Pi: 0.0141 ± 0.0031)。系统发育分析结果表明, 在 3 个云南水牛品种中检测到 2 个主要支系(A 和 B 支系及其亚支系)及 1 个稀有支系 C, 其中 A 支系为主要支系(79.07%), 且经历了强烈的群体扩张。[结论] 云南 3 个水牛品种具有丰富的 mtDNA 遗传多样性, 主要有 A 与 B 2 个母系起源。

**关键词:** 云南水牛; mtDNA D-loop; 遗传多样性

**中图分类号:** S823.8<sup>+</sup>3

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1001-9111(2020)06-0001-04

水牛是热带、亚热带地区的重要家养动物, 能为人类提供肉、奶等, 且是水稻种植区的重要役用动物。根据核型、表型等将水牛分为两种类型: 江河型水牛( $2n = 50$ )和沼泽型水牛( $2n = 48$ )<sup>[1]</sup>。几乎所有的中国水牛均为沼泽型水牛。云南省水牛饲养量位居全国第二, 主要分布于德宏、西双版纳、昭通、红河、大理、临沧、昆明郊县等地<sup>[2]</sup>。德宏水牛、滇东南水牛与盐津水牛是云南省最主要的 3 个地方品种。在距今约 3000 年前的“沧源崖画”依稀刻有水牛和水牛角, 表明云南水牛文化源远流长。

哺乳动物线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 结构简单、遵循母系遗传, 且无重组、进化快, 被广泛地用于动物的系统发育、演化和遗传多样性等方面的研究中<sup>[3]</sup>。线粒体 DNA 的高变区 (mtDNA D-loop), 变异速率为其它片段的 5~10 倍, 是研究动物母系遗传的常用分子标记。迄今为止, 在水牛上已有大量基于 mtDNA D-loop 的研究<sup>[4-8]</sup>。目前的研究表明, 沼泽型水牛可以分为 2 个主要支系

(A、B 及其亚支系) 和 3 个稀有支系 (C、D、E)<sup>[6-8]</sup>。而云南地区的水牛具有较高的遗传多样性, 且位于沼泽型水牛的驯化中心<sup>[6-8]</sup>。亏开兴等通过对 29 条滇东南水牛 mtDNA D-loop 序列进行分析, 将滇东南水牛分为 A、B 两个支系<sup>[9]</sup>; 张自芳等通过对 35 条滇东南水牛 mtDNA D-loop 序列的进一步分析, 也检测到 A、B 两个支系, 且在 B 支系中检测到了两个亚支系 (B1 和 B2)<sup>[10]</sup>。本研究通过对 3 个云南水牛品种 (德宏水牛、滇东南水牛与盐津水牛) 的 mtDNA D-loop 全序列进行分析, 以探讨云南水牛的遗传多样性及母系起源, 对促进云南水牛的种质资源保存和持续利用具有重要意义。

### 1 材料与方法

#### 1.1 水牛样品信息

从红河州蒙自县采集 29 头滇东南水牛血样, 从德宏州采集 32 头德宏水牛血样, 颈静脉血 3~5 mL, 肝素钠抗凝, 低温运回实验室, -20℃ 保存备

收稿日期: 2020-08-18 修回日期: 2020-09-20

基金项目: 云南省中青年学术和技术带头人后备人才培养对象 (2018HB045); 云南省应用基础研究面上项目 (2007C130M); 国家肉牛牦牛产业技术体系项目 (CARS-37)。

作者简介: 亏开兴 (1975—), 男, 研究员, 博士, 主要从事动物遗传育种研究。

\* 通讯作者: 黄必志 (1964—), 男, 研究员, 博士生导师, 主要从事山地畜牧业研究。

用。按常规酚/氯仿法提取水牛的总 DNA, 稀释至  $20 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。此外, 从已发表的论文中获取 154 个云南水牛 mtDNA D-loop 数据(德宏水牛 71 个, 滇东南水牛 54 个和盐津水牛 29 个)<sup>[7,8]</sup>。

## 1.2 水牛 mtDNA D-loop 区的引物、PCR 扩增与序列测定

水牛 mtDNA D-loop 区 PCR 引物参照 Kierstein 等<sup>[11]</sup>发表的文献, 正向引物 L15617:  $5' - \text{TAGT-GCTAATACCAACGGCC} - 3'$ , 反向引物 H399:  $5' - \text{AG-GCATTTTCAGTGCCTTGC} - 3'$ , 测序内引物 1 为:  $5' - \text{CCATCAACACACCTGACC} - 3'$ , 测序内引物 2 为:  $5' - \text{CCATGCTCACACATAACTGTGC} - 3'$ 。PCR 扩增反应:  $94^\circ\text{C}$  预变性 4 min, 然后  $94^\circ\text{C}$  变性 1 min,  $56^\circ\text{C}$  退火 1 min,  $72^\circ\text{C}$  延伸 1 min, 36 个循环;  $72^\circ\text{C}$  后延伸 7~10 min。利用正反链双向测序, 并用两个内引物进行重叠测序, 以获得水牛完整 mtDNA D-loop 区序列, 测序由上海生工生物技术有限公司完成。

## 1.3 数据分析

序列由 DNASTar 5.0 软件包 Seqman 人工校对。利用 DnaSP 5.0 软件计算单倍型多样性、核苷酸多样性、平均核苷酸差异数。利用 IQ-tree 构建 ML 系统发育树。

# 2 结果与分析

## 2.1 水牛 mtDNA D-loop 长度变异及其序列特征组成

分析发现 215 条云南水牛 mtDNA D-loop 全序

表 1 云南 3 个水牛品种的 mtDNA 遗传多样性参数

| 水牛品种  | 个体数 | 单倍型数 | 单倍型多样性(Hd)        | 核苷酸多样性(Pi)          | 平均核苷酸差异数(k) |
|-------|-----|------|-------------------|---------------------|-------------|
| 德宏水牛  | 103 | 48   | $0.907 \pm 0.023$ | $0.0141 \pm 0.0017$ | 12.60       |
| 滇东南水牛 | 83  | 46   | $0.946 \pm 0.017$ | $0.0162 \pm 0.0018$ | 14.58       |
| 盐津水牛  | 29  | 10   | $0.805 \pm 0.063$ | $0.0141 \pm 0.0031$ | 12.66       |
| 总计    | 215 | 86   | $0.894 \pm 0.019$ | $0.0148 \pm 0.0012$ | 13.20       |

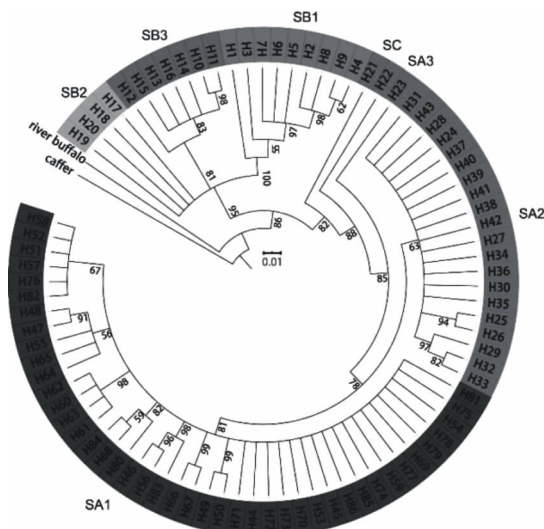


图 1 云南 3 个水牛品种的 ML 系统发育树

列长度为 900~917 bp, 这种长度变化主要是由于水牛 mtDNA D-loop 全序列含有 3 个 Poly G/C/T (7~10 个重复) 插入缺失结构导致的。水牛 mtDNA D-loop 全序列由 A、T、G、C 四种碱基组成, 其中 A 碱基含量最高 (31.0%), 其次为 T (27.6%) 和 C (26.3%), G 碱基含量最低 (15.1%)。A+T 的平均含量为 58.6%, G+C 的平均含量为 41.4%, A+T 的平均含量明显高于 G+C, 表现出碱基的偏好性。

## 2.2 云南水牛的 mtDNA 遗传多样性

对这 215 头水牛 mtDNA D-loop 全序列进行比对, 共检测到 107 个变异位点, 定义了 86 种单倍型。分析结果表明, 这 3 个云南水牛品种的 mtDNA 遗传多样性非常丰富(表 1)。其中, 德宏水牛、滇东南水牛和盐津水牛的单倍型多样性(Hd)分别为  $0.907 \pm 0.023$ 、 $0.946 \pm 0.017$  和  $0.805 \pm 0.063$ , 核苷酸多样性(Pi)分别为  $0.0141 \pm 0.0017$ 、 $0.0162 \pm 0.0018$  和  $0.0141 \pm 0.0031$ , 平均核苷酸差异数(k)分别为 12.60、14.58 和 12.66。相比于德宏水牛和滇东南水牛, 盐津水牛的遗传多样性较低。

## 2.3 云南水牛 mtDNA D-loop 系统发育分析

以非洲水牛为外群, 利用 IQ-tree 构建云南水牛 ML 树。ML 系统发育树的结果表明, 在 3 个云南水牛品种中存在 A 和 B 两个主要支系, 以及稀有支系 C(图 1)。其中, A 支系又可以细分为 A1、A2 与 A3 亚支系, B 支系可细分为 B1、B2 与 B3 亚支系。

## 2.4 网络分析

构建了云南 3 个水牛品种的网络关系图(图 2), 从图 2 可以看出, 215 头水牛可分为 2 个主要支系(A 支系和 B 支系)和稀有支系 C(仅在 1 头德宏水牛中检测到), 此结果与 ML 系统发育树得到的结果一致。其中, A 支系又可以分为 A1、A2 与 A3 亚支系, B 支系可分为 B1、B2 与 B3 亚支系, 且 A1 与 A2 亚支系形成明显的星形结构, 说明沼泽型水牛 A 支系在驯化传播过程中经历了强烈的群体扩张。在这 215 个个体中, A 支系为主要支系, 占 79.07%, B 支系仅占 20.47%。

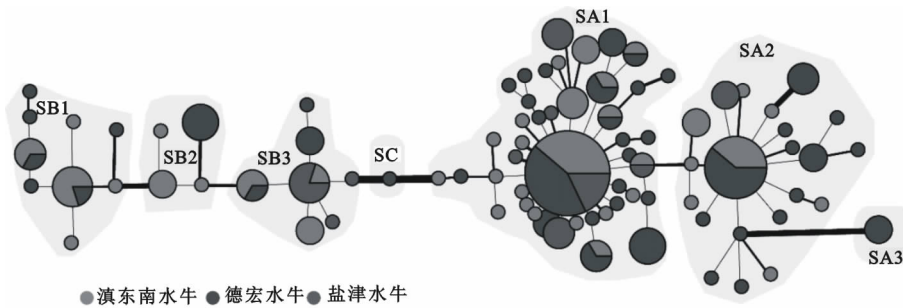


图2 云南3个水牛品种的 mtDNA D-loop 网络结构

### 3 讨论

研究共分析了 215 头云南水牛的 mtDNA D-loop 序列(900~917 bp),包括 103 头德宏水牛、83 头滇东南水牛、29 头盐津水牛,其碱基含量分为为: A(31.0%)、T(27.6%)、C(26.3%)和 G(15.1%),呈现明显的碱基偏好性,这与脊椎动物的特征一致<sup>[12]</sup>。此外,A+T 的含量明显高于 G+C,这与其他物种的研究结果一致,说明物种之间的 mtDNA D-loop 含量相似<sup>[13,14]</sup>。

单倍型多样性(Hd)和核苷酸多样性(Pi)常用来衡量一个群体 mtDNA 的变异程度。本研究结果表明,在这 3 个云南水牛品种中,滇东南水牛的遗传多样性最高(Hd: 0.946 ± 0.017, Pi: 0.0162 ± 0.0018),盐津水牛的遗传多样最低(Hd: 0.805 ± 0.063, Pi: 0.0141 ± 0.0031),这与之前的研究结果相似<sup>[8]</sup>。盐津水牛较低的遗传多样性,可能与检测的样本数较少有关。总的来说,与中国其他地区的水牛相比,云南地方水牛呈现出较高的遗传多样性<sup>[7,8]</sup>。越来越多的研究表明,沼泽型水牛可能在中国西南与东南亚交接地区被驯化,而云南水牛如此高的遗传多样性也印证了这一观点<sup>[7,15-17]</sup>。

沼泽型水牛分为 2 个主要支系(A 和 B 支系)及 3 个稀有支系(C、D、E)<sup>[10-13]</sup>。本研究结果表明,云南 3 个水牛品种存在 A(A1, A2, A3)和 B(B1, B2, B3)2 大支系及稀有支系 C,未检测到稀有支系 D 和 E。其中,A 支系为主要支系,占 79.07%,这和发表的研究结果一致<sup>[7,18-20]</sup>。此外,网络图的结果表明,A 支系呈现明显的星形结构,说明沼泽型水牛 A 支系在驯化传播过程中经历了强烈的群体扩张。

### 参考文献:

[1] FISCHER H, ULBRICH F. Chromosomes of the Murrah buffalo and its crossbreds with the Asiatic swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) [J]. Zeitschrift für Tierzüchtung und Züchtungsbiologie, 1967, 84(1/4): 110-114.

[2] 王春兰,李红伟,李乔仙,等. 云南水牛的遗传多样性研究进展

[J]. 中国草食动物科学, 2015, 35(6): 49-51.

[3] IRWIN D M, KOCHER T D, WILSON A C. Evolution of the cytochrome b gene of mammals[J]. Journal of Molecular Evolution, 1991, 32(2): 128-144.

[4] 张桂香,王志刚,樊睿,等. 我国水牛地方品种线粒体 D-loop 区遗传变异与起源分化[J]. 生物技术通报, 2009(4): 107-111.

[5] 谢文美,苏锐,张晓明,等. 中国水牛 mtDNA D-loop 区遗传多样性与母系起源[J]. 中国牛业科学, 2009, 35(5): 3-7.

[6] WANG S Q, CHEN N B, CAPODIFERRO M R, et al. Whole mitogenomes reveal the history of swamp buffalo: initially shaped by glacial periods and eventually modeled by domestication[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 4708.

[7] ZANG Y, LU Y, YINDEE M, et al. Strong and stable geographic differentiation of swamp buffalo maternal and paternal lineages indicates domestication in the China/Indochina border region[J]. Molecular Ecology, 2016, 25(7): 1530-1550.

[8] SUN T, WANG S Q, CHANTHAKHOUN V, et al. Multiple domestication of swamp buffalo in China and South East Asia[J]. Journal of Animal Breeding and Genetics, 2020, 137(3): 331-340.

[9] 亏开兴,和占星,苗永旺,等. 滇东南水牛 mtDNA 控制区遗传多样性及其系统地位分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2011, 39(9): 73-80.

[10] 张自芳,刘丽仙,钱林东,等. 滇东南水牛线粒体 DNA 控制区遗传多样性分析[J]. 云南农业大学学报(自然科学版), 2012, 27(1): 49-54.

[11] KIERSTEIN G, VALLINOTO M, SILVA A, et al. Analysis of mitochondrial D-loop region casts new light on domestic water buffalo (*Bubalus bubalis*) phylogeny[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2004, 30(2): 308-324.

[12] LIN C S, SUN Y L, LIU C Y, et al. Complete nucleotide sequence of pig (*Sus scrofa*) mitochondrial genome and dating evolutionary divergence within Artiodactyla[J]. Gene, 1999, 236(1): 110-114.

[13] WANG X, MA Y H, CHEN H, et al. Genetic and phylogenetic studies of Chinese native sheep breeds (*Ovis aries*) based on mtDNA D-loop sequences[J]. Small Ruminant Research, 2007, 72(2/3): 232-236.

[14] LIU R Y, Yang G S, LEI C Z. The genetic diversity of mtDNA D-loop and the origin of Chinese goats[J]. Acta Genetica Sinica, 2006, 33(5): 420-428.

- [15] SUN T, SHEN J F, ACHILLI A, et al. Genomic analyses reveal distinct genetic architectures and selective pressures in buffaloes [J]. *GigaScience*, 2020, 9(2): giz166.
- [16] SINGH R, KUMAR S L, MISHRA S K, et al. Mitochondrial sequence-based evolutionary analysis of riverine – swamp hybrid buffaloes of India indicates novel maternal differentiation and domestication patterns[J]. *Animal Genetics*, 2020, 51(3): 476-482.
- [17] COLLI L, MILANESI M, VAJANA E, et al. New insights on water buffalo genomic diversity and post-domestication migration routes from medium density SNP chip data[J]. *Frontiers in Genetics*, 2018, 9(3): 53.
- [18] LEI C Z, ZHANG W, CHEN H, et al. Independent maternal origin of Chinese swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) [J]. *Animal Genetics*, 2007, 38(2): 97-102.
- [19] LEI C Z, ZHANG W, CHEN H, et al. Two maternal lineages revealed by mitochondrial DNA D-loop sequences in Chinese native water buffaloes (*Bubalus bubalis*) [J]. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 2007, 20(4): 471-476.
- [20] YUE X P, LI R, XIE W M, et al. Phylogeography and domestication of Chinese swamp buffalo[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56552.

## Genetic Diversity of mtDNA D-loop Region in Yunnan Buffaloes

QU Kai-xing<sup>1</sup>, JIN Xian-dong<sup>1</sup>, ZHANG Ji-cai<sup>1</sup>, YIN Yi-chang<sup>2</sup>, LI Hong-wei<sup>3</sup>, HE Jia-rong<sup>4</sup>,  
HE Zhan-xing<sup>2</sup>, LUO Zai-ren<sup>5</sup>, LEI Chu-zhao<sup>6</sup>, HUANG Bi-zhi<sup>1\*</sup>

(1. *Yunnan Academy of Grassland and Animal Science, Kunming, Yunnan 650212*; 2. *Animal Husbandry Station of Dehong Prefecture, Dehong, Yunnan 678400*; 3. *Animal Husbandry Technology Promotion Station of Honghe Prefecture, Mengzi, Yunnan 661100*; 4. *Yunnan Breeding Stock and Breeding Promotion Center, Kunming, Yunnan 650212*; 5. *Bureau of Agriculture and Rural Affairs of Yingjiang, Yingjiang, Yunnan, 679300*; 6. *College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100*)

**Abstract:** [Objective] The aim of the study was to explore the genetic diversity of mtDNA D – loop region of three Yunnan buffalo breeds. [Method] The complete mitochondrial DNA (mtDNA) D – loop regions of 215 buffaloes were analyzed using PCR, sequencing and bioinformatics methods. [Result] A total of 107 polymorphic sites were detected, which defined 86 haplotypes. Among the three buffalo breeds, Diandongnan buffalo breed showed the highest genetic diversity ( $H_d: 0.946 \pm 0.017$ ,  $P_i: 0.01620 \pm 0.00179$ ), while Yanjin buffalo showed the lowest genetic diversity. The phylogenetic analysis results showed that two main lineages (A and B with their sub – lineages) and one rare lineage (C) were detected in Yunnan buffaloes. The lineage A was extremely frequent in Yunnan buffaloes, and experienced a strong population expansion. [Conclusion] The genetic diversity of these three Yunnan buffalo breeds were abundant, and mainly originated from two lineage A and B of swamp buffalo.

**Key words:** Yunnan buffalo; mtDNA D-loop; genetic diversity