

隆林牛与邕县红牛线粒体 DNA 全基因组 遗传多样性比较研究

宣泽义¹, 陈嘉磊², 陈少梅¹, 易显凤^{1,3}, 文信旺^{1,3},
肖正中^{1,3}, 汪燕玲¹, 雷初朝^{2*}

(1. 广西壮族自治区畜牧研究所, 南宁 530001; 2. 西北农林科技大学动物科技学院, 陕西杨凌 712100;
3. 广西家畜遗传改良重点实验室, 南宁 530001;)

摘要: [目的] 本研究旨在从基因组水平探究隆林牛和邕县红牛的线粒体 DNA (mtDNA) 全基因组遗传多样性与母系起源, 并对 2 个黄牛品种的 mtDNA 全基因组遗传多样性进行比较分析。 [方法] 采用全基因组重测序及生物信息学方法。 [结果] 在 15 头隆林牛和 28 头邕县红牛 mtDNA 全基因组序列中, 共检测到 36 种单倍型, 其中邕县红牛有 26 种单倍型, 隆林牛仅有 8 种单倍型, 2 个黄牛品种共享 2 种单倍型。邕县红牛和隆林牛的平均单倍型多样性 (Hd) 分别为 1.000 和 0.943, 平均核苷酸多样性 (Pi) 分别为 0.0080 和 0.0053, 表明其遗传多样性丰富。构建的系统发育树表明, 隆林牛和邕县红牛具有瘤牛和普通牛两个母系支系。 [结论] 隆林牛以瘤牛起源为主, 邕县红牛为普通牛与瘤牛的混合起源, 这 2 个地方黄牛品种具有独特的母系遗传信息, 表现出明显的母系遗传差异。

关键词: 隆林牛; 邕县红牛; mtDNA 全基因组; 遗传多样性; 母系起源

中图分类号: S823

文献标识码: A

文章编号: 1001-9111(2022)03-0001-05

在人类文明演进的过程中, 牛一直扮演着重要的角色, 在古代, 牛不仅是食物来源, 更是重要的农业生产资料。我国幅员辽阔, 自然条件复杂多样, 良好的生态环境孕育了极具特色的地方黄牛品种。按照《中国畜禽遗传资源志——牛志》记载, 中国目前拥有 53 个地方黄牛品种^[1]。按照地理分布和起源差异, 中国黄牛可以分为北方黄牛、中原黄牛和南方黄牛三大类。从牛的起源进化来看, 北方黄牛主要是普通牛起源, 栖息地在黄河流域以北; 南方黄牛以瘤牛起源为主, 在中国南方大量分布; 中原黄牛则属于普通牛和瘤牛的混合起源, 在黄河中下游和淮河流域都有大量分布^[2]。

广西壮族自治区地处我国南部, 气候温暖湿润, 降水充沛, 高温持续时间较长。在独特的气候条件和劳动人民的精心选育下, 逐渐形成了优良的广西地方黄牛品种——隆林牛。隆林牛中心产区在隆林县境内, 在西林县与田林县也有分布^[1]。隆林牛体格中等, 躯体结构匀称, 性情温顺, 肌肉饱满, 耐粗饲、

耐劳, 适应性好, 肉质细嫩、屠宰率较高, 是理想的役肉兼用品种^[3]。邕县红牛是中国八大地方良种之一, 主要分布在邕县、宝丰、鲁山等县, 其体型外貌特征明显, 全身被毛多呈红色, 具有肉质好、耐粗饲性强和繁殖力高等特点^[1]。

线粒体 DNA (mtDNA) 具有不发生重组、严格遵循母系遗传、多态性丰富等特点, 被广泛用于追溯家牛的母系起源和分类研究^[4-12]。家牛 mtDNA 具有丰富的遗传多样性, 已经发现 7 种显著分化的 mtDNA 支系: 包括 T1-T5 及 I1 和 I2 支系^[6-12]。Lai 等^[6]对中国西南地区 14 个品种共 84 头黄牛的 mtDNA D-loop 区进行分析, 发现中国黄牛的母系可分为普通牛和瘤牛两大支系。Lei 等^[7]对 231 头中国地方黄牛进行 mtDNA D-loop 区的遗传多样性分析, 发现中国黄牛存在 4 个普通牛支系 (T1-T4) 和两个瘤牛支系 (I1 和 I2)。Jia 等^[8]对亚洲 6 个国家的家牛 mtDNA D-loop 区序列进行分析, 在中国黄牛中检测到亚单倍型组 T1A、T3A、T3B 和单倍型组 T5。Xia

收稿日期: 2022-05-17 修回日期: 2022-05-27

基金项目: 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系 (CARS-37); 广西重点研发计划 (桂科 AB21220018)。

作者简介: 宣泽义 (1984—), 男, 学士, 主要从事牛羊遗传育种与饲料研究。

* 通讯作者: 雷初朝 (1968—), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事牛遗传资源研究。

等^[9]分析了 170 个“土雷诺-蒙古牛”群体的线粒体 DNA 基因组数据,发现有普通牛 T1-T4 支系,并伴有瘤牛 I 支系及 P、Q 和牦牛支系。对我国肉牛培育品种云岭牛的 mtDNA 全基因组分析发现,共有 T1-T4、T6 和 I1、I2 共 7 种支系,证实云岭牛品种具有丰富的线粒体 DNA 遗传多样性^[10]。

目前,仅有郟县红牛 mtDNA D-loop 区遗传多样性与母系起源的研究^[4],未见郟县红牛 mtDNA 全基因组序列遗传多样性的报道。尽管 Xia 等^[12]对广西隆林牛、涠洲牛与南丹牛 3 个地方黄牛品种的 mtDNA 全基因组进行了分析,但有关隆林牛与郟县红牛 mtDNA 全基因组的比较研究未见报道。因此,本研究对 15 头隆林牛和 28 头郟县红牛的 mtDNA 全基因组序列进行比较分析,以探究隆林牛和郟县红牛的遗传多样性与母系起源,为隆林牛和郟县红牛的种质资源保护和开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 数据来源

本研究使用的 15 头隆林黄牛和 28 头郟县红牛 mtDNA 全基因数据来源于本团队的黄牛全基因组重测序原始数据(表 1)和已发表的文献^[2, 11-12]。另外从 GenBank 下载 T1-T5、I1 和 I2 共 7 个 mtDNA 全基因组序列(EU177841, AY676856, EU177839, AB074964, EU177862, EU177868, AF492350)作对照,对共计 50 条 mtDNA 全基因组序列进行系统分析。

表 1 隆林牛与郟县红牛 mtDNA 基因组的个体号与单倍型

单倍型	个体号	单倍型	个体号
Hap1	JX65	Hap19	LL26, LL7
Hap2	JX56	Hap20	JX70
Hap3	JX58	Hap21	JX71
Hap4	JX80	Hap22	LL14, LL15
Hap5	JX55	Hap23	LL31
Hap6	JX21	Hap24	LL28
Hap7	LL25	Hap25	JX61
Hap8	JX66	Hap26	JX77
Hap9	JX76	Hap27	JX1M
Hap10	JX84	Hap28	JX63
Hap11	JX81	Hap29	JX74, LL10
Hap12	JX69	Hap30	JX68
Hap13	LL37	Hap31	JX75
Hap14	LL38	Hap32	JX78
Hap15	JX73	Hap33	JX79
Hap16	JX83	Hap34	JX82
Hap17	JX8M	Hap35	LL11, LL32
Hap18	JX72	Hap36	JX57, LL13, LL23, LL24

1.2 数据分析

用 TRIMMOMATIC 软件^[13]对隆林牛、郟县红牛和下载的 7 个牛 mtDNA 全基因组标准序列数据进行质量控制,使用 BWA-MEM 软件^[14]将质控后的 clean reads 映射到普通牛参考基因组(ARS-UCD1.2_Btau5.0.1Y; GCF_002263795.1)的线粒体基因组(GenBank:AY526085.1)上,再将 BAM 比对转化为 FASTQ 文件,最后使用 Mapping Iterative Assembler v1.0 (MIA, <https://github.com/mpieva/mapping-iterative-assembler>)组装 mtDNA 基因组序列。

使用 DnaSP v5.10 软件^[15]对所有隆林牛和郟县红牛的 mtDNA 全基因组序列进行比对分析,并对单倍型和可变位点数目进行统计,确定隆林牛和郟县红牛的单倍型和单倍型组类型,并整理统计相关的遗传多样性参数,如单倍型多样性(Hd),核苷酸多样性(Pi)和平均核苷酸差异数(K)。利用 MEGA 5.0 软件^[16]对隆林牛和郟县红牛的 mtDNA 基因组序列进行比对分析,并进行人工校正,构建其 mtDNA 基因组的单倍型系统发育树(IQ-Tree)。

2 结果与分析

2.1 隆林牛和郟县红牛 mtDNA 全基因组遗传多样性

使用 DnaSPv 5.10 软件对 15 头隆林牛和 28 头郟县红牛构成的 mtDNA 全基因组数据集进行比对分析,用以评估其 mtDNA 的遗传变异情况并追溯母系起源。隆林牛 15 个 mtDNA 全基因组序列,定义 10 种单倍型,郟县红牛 28 个 mtDNA 全基因组序列,定义 28 种单倍型(表 2)。隆林牛和郟县红牛 43 个 mtDNA 全基因组序列,共定义 36 种单倍型,其中郟县红牛有 26 种单倍型;隆林牛仅有 8 种单倍型,单倍型 Hap29 和 Hap36 由 2 个黄牛品种共享(表 1)。隆林牛和郟县红牛 mtDNA 基因组的遗传多样性和支系组成见表 2。

从表 2 可以看出,郟县红牛的单倍型多样性(Hd ± SD)为 1.000 ± 0.010,略高于隆林牛(0.943 ± 0.040),其核苷酸多样性(Pi ± SD)、平均核苷酸变异数(K)也高于隆林牛,说明这 2 个黄牛品种有丰富的 mtDNA 遗传多样性,但郟县红牛的遗传多样性更高一些。隆林牛和郟县红牛 43 个 mtDNA 全基因组序列的平均单倍型多样性(Hd ± SD)为 0.989 ± 0.009,平均核苷酸多样性(Pi ± SD)为 0.0074 ± 0.0006。

表 2 隆林牛与邕县红牛的 mtDNA 全基因组遗传多样性和支系组成

品种	样本	支 系				单倍型	K	Hd ± SD	Pi ± SD
		T2	T3	T4	I1				
邕县红牛	28	1	6	6	15	28	130.3	1.000 ± 0.010	0.0080 ± 0.0005
隆林牛	15	0	1	2	7	10	81.5	0.943 ± 0.040	0.0053 ± 0.0019
合计	43	1	7	8	20	36	121.2	0.989 ± 0.009	0.0074 ± 0.0006

注:Hd,单倍型多样性;Pi,核苷酸多样性;SD,标准偏差

2.2 隆林牛和邕县红牛 mtDNA 全基因组系统发育树

使用 iTOL v5 工具^[17],将 7 条 T1-T5 和 I1-2 支系的 mtDNA 全基因组序列,与 15 头隆林牛和 28 头邕县红牛定义的 36 种 mtDNA 全基因组序列单倍型构建系统发育树(IQ-Tree)(图 1),发现隆林牛和邕县红牛均有普通牛 T 支系和瘤牛 I 支系两大母系起源(表 2),其中 T 支系拥有 16 种单倍型,占 44%(16/36),I 支系包含 20 种单倍型,占 55%(20/36)。

具体来说,28 头邕县红牛 mtDNA 全基因组定义 28 种单倍型,含有 T2、T3、T4 及 I1 支系,分别占 3.6%(1/28)、21.4%(6/28)、21.4%(6/28)和 53.6%(15/28),即:T 支系占 46.4%,I 支系占 53.6%,表明普通牛与瘤牛对邕县红牛的影响基本一致。15 头隆林牛 mtDNA 全基因组定义 10 种单倍型,含有 T3、T4 和 I1 支系,分别占 10%(1/10)、20%(2/10)和 70%(7/10),即:T 支系占 30%,I 支系占 70%,表明瘤牛对隆林牛的影响占主导地位。

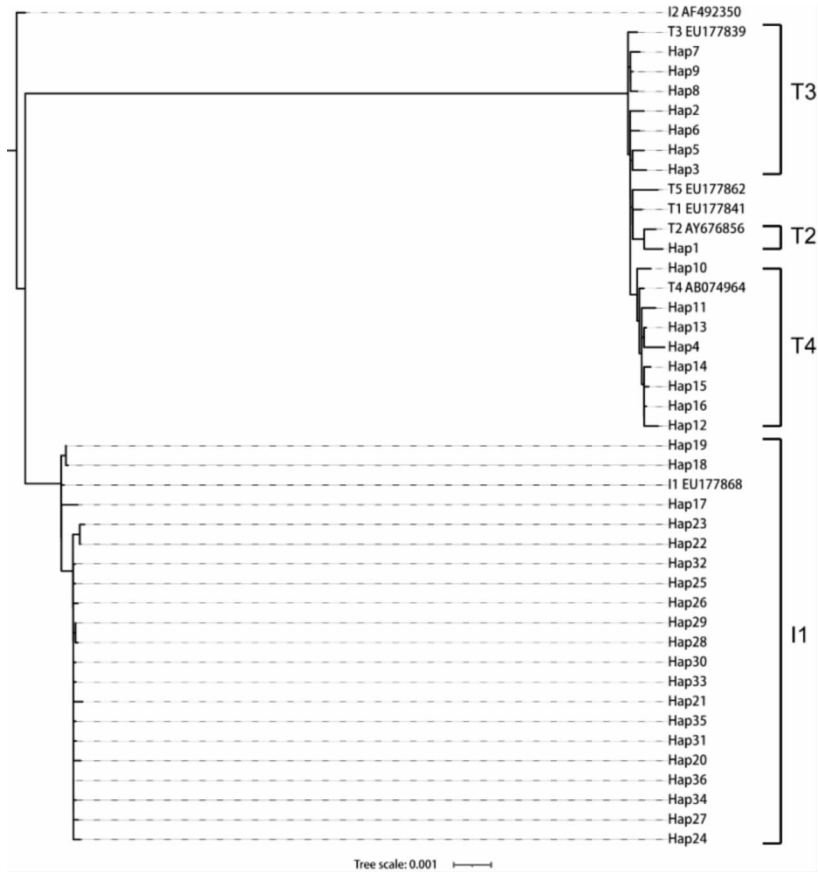


图 1 隆林牛和邕县红牛 mtDNA 全基因组构建的系统发育树

3 讨论

家牛 mtDNA 遗传多样性和系统发育关系的研究,目前大多是针对 mtDNA D-loop 区进行的^[4-8]。

隆林牛分布于中国南方瘤牛区,邕县红牛则在普通牛和瘤牛血统较为混杂的中原地区。目前关于中国黄牛 mtDNA 全基因组遗传多样性的研究不多^[9, 10, 12]。早先对 mtDNA D-loop 区的研究,证明中

国黄牛有普通牛和瘤牛两大母系起源^[18,19]。前人的研究发现现代家牛至少有7种mtDNA支系,在非洲分布的主要是T1支系;T2和T3支系主要在近东地区和欧洲大陆;而T4支系为东北亚地区所特有^[20];I1和I2单倍型组则常见于印度次大陆和中国南方黄牛群体^[21,19]。本研究对15头隆林牛和28头邕县红牛的mtDNA全基因组序列进行联合分析,共确定36种单倍型,其中隆林牛有8种特有单倍型,邕县红牛有26种特有单倍型。有趣的是,隆林牛和邕县红牛的共享单倍型仅有2种,推测这两个黄牛品种可能在漫长的时间尺度上拥有少量共同母系祖先群体。在隆林牛中发现3个支系:普通牛T3(10%)和T4(20%)支系,瘤牛I1支系(70%),说明隆林牛的母系起源以瘤牛为主;在邕县红牛中发现4个支系:普通牛T2(3.6%)、T3(21.4%)、T4(21.4%)、瘤牛I1(53.6%)支系,表明普通牛与瘤牛对邕县红牛的母系影响基本一致,这是邕县红牛的显著特点。上述结果表明,这2个地方黄牛品种各自拥有独特的母系遗传信息,表现出明显的母系遗传差异。

本研究发现28头邕县红牛和15头隆林牛的单倍型多样性分别是 1.000 ± 0.010 和 0.0943 ± 0.040 ,其遗传变异程度均要高于中国地方黄牛的平均水平^[18,19,22],并且邕县红牛的遗传多样性水平相对更高。推测这可能与其所处的地理位置有关,邕县红牛的主产区在中国中部,而中原地区多为普通牛与瘤牛的混合血统,其普通牛与瘤牛的比例基本一致,加上中原开阔的地理位置、良好的生态环境等都为牛种的基因交流带来极大的便利,不同牛种血统的渗入使邕县红牛群体拥有丰富的遗传多样性;相比之下,隆林牛的母系起源以瘤牛为主,普通牛为辅,这是由于隆林牛主产区多为南方山区,潮湿炎热,寄生虫很多,而瘤牛恰恰能耐热抗寄生虫,故隆林牛以瘤牛为主,更能适应当地的环境。隆林牛是广西地区重要的地方黄牛遗传资源,邕县红牛是我国中原地区代表性地方黄牛品种之一。鉴于目前我国政府对畜禽遗传资源高度重视,要求应保尽保。因此,尽管本研究发现隆林牛和邕县红牛mtDNA基因组遗传多样性丰富,但近30年来国外商品肉牛大量与我国地方黄牛品种进行杂交改良,导致我国地方黄牛品种遗传资源持续萎缩和混杂,故对我国地方黄牛品种资源保护的力度还需进一步加大。本研究从母系遗传角度对隆林牛和邕县红牛品种进行了系统评估,为其遗传资源保护提供了科学依据。

参考文献:

- [1] 国家畜禽遗传资源委员会编. 中国畜禽遗传资源志—牛志[M]. 中国农业出版社, 2011.
- [2] CHEN N, CAI Y, CHEN Q, et al. Whole-genome resequencing reveals world-wide ancestry and adaptive introgression events of domesticated cattle in East Asia[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 2337.
- [3] 宣泽义, 曹艳红, 贾鹏, 等. 隆林黄牛 Y-SNPs 遗传多样性与起源研究[J]. *中国牛业科学*, 2019, 45(5): 14-16.
- [4] 许星龙, 夏小婷, 陈宁博, 等. 邕县红牛 mtDNA D-loop 区遗传多样性与母系起源研究[J]. *中国牛业科学*, 2021, 47(5): 21-23.
- [5] 雷初朝, 陈宏, 杨公社, 等. 中国部分黄牛品种 mtDNA 遗传多态性研究[J]. *遗传学报*, 2004, 31(1): 57-62.
- [6] 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 Phylogenet Evol*, 2006, 38(1): 146-154.
- [7] LEI C Z, CHEN H, ZHANG H C, et al. Origin and phylogeographical structure of Chinese cattle[J]. *Anim Genet*, 2006, 37(6): 579-582.
- [8] JIA S, CHEN H, ZHANG G, et al. Genetic variation of mitochondrial D-loop region and evolution analysis in some Chinese cattle breeds[J]. *J Genet Genomics*, 2007, 34(6): 510-518.
- [9] XIA X T, ACHILLI A, LENSTRA J A, et al. Mitochondrial genomes from modern and ancient Turano-Mongolian cattle reveal an ancient diversity of taurine maternal lineages in East Asia[J]. *Heredity*, 2021, 126(6): 1000-1008.
- [10] XIA X, QU K, LI F, et al. Abundant genetic diversity of Yunling cattle based on mitochondrial genome[J]. *Animals*, 2019, 9: 641.
- [11] XIA X, ZHANG S, ZHANG H, et al. Assessing genomic diversity and signatures of selection in Jiaxian Red cattle using whole-genome sequencing data[J]. *BMC Genomics*, 2021, 22(1): 43.
- [12] XIA X, HUANG G, WANG Z, et al. Mitogenome diversity and maternal origins of Guangxi cattle breeds[J]. *Animals*, 2020, 10: 19.
- [13] BOLGER A M, LOHSE M, USADEL B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(15): 2114-2120.
- [14] LI H, DURBIN R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(14): 1754-1760.
- [15] LIBRADO P, ROZAS J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(11): 1451-1452.
- [16] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Mol Biol Evol*, 2011, 28(10): 2731-2739.

- [17] LETUNIC I, BORK P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation[J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(W1): W293-W296.
- [18] JIA S, ZHOU Y, LEI C, et al. A new insight into cattle's maternal origin in six Asian countries[J]. *J Genet Genomics*, 2010, 37(3): 173-180.
- [19] XIA X, QU K, ZHANG G, et al. Comprehensive analysis of the mitochondrial DNA diversity in Chinese cattle[J]. *Anim Genet*, 2019, 50(1): 70-73.
- [20] MANNEN H, KOHNO M, NAGATA Y, et al. Independent mitochondrial origin and historical genetic differentiation in North Eastern Asian cattle[J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2004, 32(2): 539-544.
- [21] CHEN S, LIN B Z, BAIG M, et al. Zebu cattle are an exclusive legacy of the South Asia neolithic[J]. *Mol Biol Evol*, 2010, 27(1): 1-6.
- [22] 李双, 夏小婷, 李付强, 等. 温岭高峰牛线粒体 DNA 全基因组遗传多样性分析[J]. *中国牛业科学*, 2022, 48(2): 28-32.

Comparison of Genetic Diversity of Mitochondrial DNA on Longlin Cattle and Jiaxian Red Cattle

XUAN Ze-yi¹, CHEN Jia-lei², CHEN Shao-mei¹, YI Xian-feng^{1,3}, WEN Xin-wang^{1,3},
XIAO Zhen-zhong^{1,3}, WANG Yan-lin¹, LEI Chu-zhao^{2*}

(1. *The Animal Husbandry Research Institute of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning, Guangxi 530001*;

2. *College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100*;

3. *Guangxi Key Laboratory of Livestock Genetic Improvement, Nanning, Guangxi 530001*)

Abstract: [Objective] This study was conducted to explore the genetic diversity of mitochondrial DNA (mtDNA) genome and maternal origin of Longlin cattle and Jiaxian Red cattle from the genome level, as well as to comparatively analyze the genetic diversity of mtDNA genome of the two cattle breeds. [Method] Whole-genome resequencing and bioinformatics methods were used. [Result] A total of 36 haplotypes were detected in mtDNA genome sequences of 15 Longlin cattle and 28 Jiaxian Red cattle, of which 8 haplotypes and 26 haplotypes were found in Longlin cattle and Jiaxian Red cattle, respectively, and only two haplotypes were shared by them. The average haplotype diversity (Hd) and nucleotide diversity (Pi) of Longlin cattle and Jiaxian Red cattle were 1.000, 0.943, and 0.0080 and 0.0053, respectively, demonstrating rich genetic diversity in Longlin cattle and Jiaxian Red cattle. The phylogenetic tree showed that Longlin cattle and Jiaxian Red cattle had two maternal lineages with taurine and indicine. [Conclusion] Longlin cattle were mainly derived from taurine, Jiaxian Red cattle was derived from a mixture of taurine and indicine. The two local cattle breeds had unique maternal genetic information and showed obvious maternal genetic differences.

Key words: Longlin cattle; Jiaxian Red cattle; mtDNA genome; genetic diversity; maternal origin