

基于线粒体控制区变异的水牛群体遗传分析

崔奎青, 刘庆友, 李秀林, 王志强, 石德顺
(广西大学 动物科学技术学院, 广西 南宁 530005)

摘要:为探讨沼泽型水牛与河流型水牛之间的线粒体 D-loop 区差异与进化关系,对 26 头广西本地水牛、8 头贵州贵阳水牛、11 头广西水牛与河流型水牛杂交后代、9 头尼里拉菲和 12 头摩拉水牛(共 5 个群体 66 头水牛个体)的线粒体全长 D-loop 序列进行了扩增测序分析. 结果发现 66 头水牛 912 bp 的 D-loop 多重序列比较有 147 个多态位点,形成 58 个单体型,沼泽型水牛与河流型水牛单体型明显分成 2 簇. 以牛为外群构建的单体型进化树显示,沼泽型与河流型水牛分成明显 2 大支,河流型水牛聚成 1 支,而沼泽型水牛内部又分成 2 个侧支. 通过 Median joining network 分析亦发现 3 个不同的簇,与进化树分析结果一致. 对该区碱基错配分布分析表明,水牛群体在历史上发生 2 次独立的群体扩增事件. 为进一步验证试验结果,从 GenBank 下载了 211 条水牛 D-loop 序列与笔者研究获得的序列整合分析,在共有序列 878 bp 区域中,包含了 158 个多态位点和 129 个单体型,以牛为外群的进化树分析与单体型网络分析表明,沼泽型水牛分成 2 簇,所有的河流型水牛聚集成紧密的 1 簇. 碱基错配分布分析结果呈现 2 个明显的峰,进一步推断水牛群体在历史上发生过 2 次较大的群体扩增事件. 综合上述研究结果推断,沼泽型水牛与河流型水牛来自不同的家养化事件,沼泽型水牛起源于中国,其祖先可能存在 2 个基因池.

关键词:水牛; 线粒体控制区; 多态性
中图分类号:S823 文献标志码:A 文章编号:1001-411X(2013)01-0076-07

Phylogenetic Analysis of Water Buffalo Based on the Polymorphism of Mitochondrial D-loop

CUI Kuiqing, LIU Qingyou, LI Xiulin, WANG Zhiqiang, SHI Deshun
(College of Animal Sciences and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China)

Abstract:To investigate the polymorphism of mitochondrial D-loop in water buffalo, the entire mitochondrial D-loop region of 66 water buffaloes of five different groups were analyzed, and 58 mitochondrial haplotypes with 147 polymorphic sites were detected. The haplotypes of swamp buffaloes and river buffaloes formed two different clusters, based on the phylogenetic trees constructed with ML method using bovine D-loop sequences as outgroup. The trees showed that swamp buffaloes and river buffaloes belong to two distinctly different clusters, and two small clusters were observed in the swamp cluster among the three. By median joining network analysis, three different clusters were also founded, one high diverged clusters between swamp and river buffalo, and two little clusters appeared in the whole swamp cluster. The mismatch distribution analysis showed that there might have been two different indepent population expansion events in the evolution history of buffaloes. Pooled with 211 released D-loop sequences of Genbank, and 129 haplotypes with 158 polymorphic sites were detected in 878 bp multi-aligned region. The phylogenetic tree and median joining network analysis also showed that there were three clusters in all sampled buf-

faloes, two swamp buffalo's clusters and one high diverged river swamps. Two obviously wave crests appeared in the mismatch distribution analysis, which meanted that there might have been two different population expanding events in water buffaloes. Based on the above results, it could be predicted that river and swamp buffaloes decented from two different domestication events, and there were at least two ancestor gene pools in the domestication of swamp buffaloes.

Key words: buffalo; mitochondrial D-loop; polymorphism

在牛科中,水牛有2个属,分别为亚洲水牛 *Bubalus bubalis* 和非洲水牛 *Syncerus caffer*^[1],二者外貌形态基本相似,但在解剖学和遗传学上却存在着明显的差异.非洲水牛至今仍处于野生状态,因此,现在世界上所说的家养水牛,均指由亚洲野水牛驯化而成的水牛^[1].在亚洲,根据外形与行为学将水牛 *Bubalus bubalis* 主要分为河流型(River buffalo)和沼泽型(Swamp buffalo)两大类^[2].这2种水牛在体型外貌、细胞的染色体核型、蛋白质标记及DNA分子标记中均存在一定差异,这已被大量试验所证实^[3-5].亚洲是家养化水牛发源地和最大的栖息地,然而家养水牛的起源问题依然存在很多争议,尤其是沼泽型水牛和河流型水牛是否来自同一个家养驯化地,以及沼泽型水牛与河流型水牛的分化时间等问题,不同学者观点不一^[6-8].哺乳动物mtDNA的遗传过程遵循单性母性遗传方式,即仅通过卵子的细胞质将线粒体遗传物质传到下一代.由于mtDNA结构简单、稳定和它的单性母性遗传方式,在世代传递过程中没有重组,驯化了的家畜一般能保持其祖先mtDNA类型.因此,它作为一种遗传标记,对于研究家畜的起源进化、亲缘关系、畜群遗传结构等方面都具有重要的意义.

中国是沼泽型水牛存栏最多、品种最丰富的国家^[9],为比较分析中国沼泽型水牛与河流型水牛之间的差异,本研究从线粒体D-loop测序入手,详细分析了水牛的群体多态性,并收集了GenBank上登陆的各地水牛线粒体全基因组序列和D-loop序列,对水牛线粒体D-loop序列的变异和家养驯化进程进行了综合分析.

1 材料与方法

1.1 样品的收集

本研究共采集到广西本地水牛、杂交水牛(河流型与沼泽型水牛的杂交后代)、贵州贵阳水牛、巴基斯坦尼里拉菲水牛和印度摩拉水牛等群体的血液样本78份,测序获得了66条高质量的D-loop序列(具体的分布见表1).采集的个体符合该品种的特征,并避开样本个体间的血缘关系,采集到血液样本后立即低温运回实验室.应用分子克隆试验中常规氯仿苯酚法提取血液基因组.

1.2 主要仪器

PCR扩增仪、超纯水仪、-20℃冰箱、-70℃冰箱、水浴锅、电子天平、微型漩涡混合仪(上海)、磁力搅拌器、水平电泳仪、凝胶成像系统和冷冻离心机.

表1 试验水牛样品
Tab.1 The sampled buffalo

来源	群体	数量/头	样品	样品编号
南宁市屠宰场	本地水牛	26	肌肉	BL_02, BL_03, BL_04, BL_05, BL_06, BL_07, BL_08, BL_09, BL_10, BL_11, BL_12, BL_16, BL_17, BL_18, BL_19, BL_20, BL_21, BL_22, BL_23, BL_27, BL_28, BL_29, BL_30, BL_31, BL_33, BL_35
广西水牛研究所	杂交水牛	11	血液	CR_01, CR_02, CR_03, CR_04, CR_06, CR_07, CR_08, CR_09, CR_10, CR_11, CR_13
贵州贵阳市	贵阳水牛	8	血液	Guizhou02, Guizhou03, Guizhou04, Guizhou05, Guizhou06, Guizhou07, Guizhou08, Guizhou11
广西水牛研究所	尼里拉菲	9	血液	NL_01, NL_03, NL_04, NL_05, NL_08, NL_09, NL_10, NL_11, NL_12
广西水牛研究所	摩拉	12	血液	ML_01, ML_03, ML_04, ML_05, ML_07, ML_08, ML_09, ML_10, ML_11, ML_12, ML_13, ML_14

1.3 D-loop 区段的引物设计

根据 NCBI 公布的牛线粒体全基因组序列[gi:52220982]设计 D-loop 引物,序列如下:正链引物为:5'-ATAGCCCCACTACCAACA-3';反链引物为:5'-GGCATTTTCAGTGCCTT-3'。该引物扩增片段长度为 1 031 bp,D-loop 片段长度为 910 bp,位于扩增片段中间部位。

1.4 D-loop 区段的 PCR 扩增

以水牛的全基因组为模板,进行 D-loop 区段的特异 PCR 扩增,扩增产物用琼脂糖凝胶电泳检测,根据 1 kb Ladder 判断产物大小,PCR 反应条件如下:95 ℃ 变性 3 min;执行 35 个循环(94 ℃ 变性 30 s,60 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 1 min);然后 72 ℃ 延伸 6 min,4 ℃ 条件保存。

1.5 PCR 产物的克隆与测序

PCR 产物纯化后,克隆到 pMD18-T 克隆载体上,转化到大肠埃希菌 DH5α,碱裂解法提取重组质粒,将质粒测序。

1.6 序列分析方法和软件

所有测序获得的原始序列应用 DNASTar5.0 软件包的 Editseq、seqMan 进行拼接和手工检查校对,拼接长度小于 900 bp 的进行重新补测,以确保获得全长的 D-loop 序列及提高序列的准确性。对获得的高质量序列,应用 Perl 程序对序列的 GC 含量等进行初步的统计分析,比较各品种之间 D-loop 区序列 GC 含量的差异,同时统计 GenBank 上公布的水牛线粒体全长基因组序列 GC 含量,比较 D-loop 区序列 GC 含量与全长线粒体的差异。应用 Muscle3.6 软件进行多重序列比对,结果用于 DnaSP4.0 软件分析 D-loop 序列的多态性,分析序列间碱基对差异、转换和颠换,获得各品种代表的单体型(Haplotype),并进行群体遗传学分析;对碱基错配分布(Mismatch distribution)进行分析,观察水牛群体的扩增情况。对 DnaSP4.0 获得的 haplotype 进行网络分析,应用 Network4.2.0.1 软件处理各单体型,进一步对单体型间的遗传关联进行分析。随后又以牛的 D-loop 序列为外群,对各品种水牛单体型的发生进行了分析,应用 Mega3.1 构建邻接(Neighbor-joining, NJ)树,PHYML 构建最大似然(Maximum likelihood)树,同时用 Mrbayes-3.1.2 以马尔科夫链蒙特卡洛(MCMC)算法对获得的单体型构建进化树,综合比较各品种单体型之间的进化关系^[10]。

2 结果与分析

2.1 水牛 D-loop 区段的 PCR 扩增与测序

水牛线粒体 D-loop 区同样介于 tRNA-pro 与 tRNA-phe 之间,长约 910 bp,不同种属间稍有差别。为获得沼泽型水牛线粒体 D-loop 序列,本次试验设计的 PCR 扩增引物的上游引物位于 tRNA-pro 与 tRNA-phe 区,预测扩增片段长度在 1 050 bp。PCR 回收产物经电泳检测,结果表明与预期相符。PCR 产物经纯化回收后进行质粒克隆测序,测序结果与 GenBank 上报道的海南沼泽水牛 mtDNA 序列相似性均在 99% 左右,说明 PCR 扩增回收的片段确实由线粒体模板而来,而不是来源于核基因组。

2.2 不同群体水牛 D-Loop 区段碱基分布分析

本研究搜集了 78 份水牛组织与血液样品,经测序拼接分析后共获得 66 条高质量的线粒体 D-loop DNA 序列,其中广西本地沼泽型水牛 26 头,沼泽型水牛与河流型水牛杂交后代 11 头,贵阳水牛 8 头,河流型尼里拉菲水牛 9 头,摩拉水牛 12 头。对 66 条高质量的 D-loop 序列进行了 GC 含量的统计分析结果显示广西本地水牛的 GC 含量为(41.49 ± 0.38)%,杂交后代为(41.00 ± 0.47)%,贵阳水牛为(41.20 ± 0.34)%,尼里拉菲水牛 GC 含量为(40.13 ± 0.28)%,摩拉水牛样品的 GC 含量为(40.31 ± 0.24)%,沼泽型水牛 D-loop 区的 GC 含量略高于河流型水牛,但差异不显著($P > 0.05$)。而从 GenBank 下载的 42 条牛的 D-loop 序列 GC 含量为(38.24 ± 0.16)%,水牛 D-loop 区的 GC 含量明显高于牛的相应区段。

2.3 不同群体水牛遗传距离初步分析

应用 DnaSP 软件对水牛群体的遗传多态性与遗传距离分析显示,河流型水牛 21 个样本产生了 45 个多态位点,16 个单体型,平均核苷酸差异数为 7.609,反映群体遗传多样性的 P_i 值为 0.008。沼泽型水牛 45 个样本产生了 95 个多态位点,42 个单体型,平均核苷酸差异数高达 21.630,群体遗传多样性的 P_i 值为 0.024(表 2)。河流型水牛 P_i 值远低于沼泽型水牛,说明沼泽型水牛群体在线粒体 D-loop 区的遗传多态性远高于河流型水牛。遗传距离分析显示,尼里拉菲水牛与摩拉水牛遗传距离较近(9.435),广西水牛与贵州水牛的遗传距离相对值为 22.260,河流型水牛与沼泽型水牛的遗传距离相对值高达 60.140(表 3)。

表 2 水牛群体的遗传多态性分析¹⁾

Tab.2 Genetic polymorphism analysis of buffaloes						
群体	样本数	分离 位点数	单体 型数	单体型多 样性指数	平均核苷 酸差异数	核苷酸多 样性(P_i)
尼里拉菲	9	35	8	0.972	12.111	0.013
摩拉	12	13	8	0.848	2.167	0.002
河流型	21	45	16	0.948	7.609	0.008
贵州	8	45	7	0.964	21.036	0.023
广西	37	90	35	0.997	21.375	0.023
沼泽型	45	95	42	0.997	21.630	0.024
总计	66	147	58	0.986	36.939	

1) 河流型包括尼里拉菲和摩拉水牛,沼泽型包括广西和贵州水牛.

表 3 水牛群体间的遗传距离¹⁾

Tab.3 Genetic distance analysis of buffaloes						
群体	尼里拉菲	摩拉	河流型	广西	贵州	沼泽型
尼里拉菲	****					
摩拉	9.435	****				
河流型	10.005	5.179	****			
广西	60.117	60.446	60.305	9	****	
贵州	59.264	59.458	59.375	9	22.260	****
沼泽型	59.965	60.270	60.140	0	21.058	21.575

1) 河流型包括尼里拉菲和摩拉水牛,沼泽型包括广西和贵州水牛.

2.4 不同水牛群体 D-loop 区段的单体型与变异分析

用软件 (Muscle 3.6) 对获得的 66 条高质量序列进行多重序列比对, 比对结果用 DnaSP 软件进行分析, 结果显示, 所有 D-loop 区段多重比较区为 912 bp, 包含 147 个突变位点, 共形成 58 个单体型. 其中沼泽型水牛与河流型的单体型明显分成 2 簇, 46 条中国沼泽型水牛与河流型的单体型明显分成 2 簇, 46 条中国沼泽型发现 42 个单体型, 其中广西本地水牛、杂交水牛与贵阳水牛产生的单体型散在分布于沼泽型的单体型中. 21 头河流型水牛形成 16 个单体型, 来自巴基斯坦的尼里拉菲水牛与来自印度的摩拉水牛在河流型水牛的单体型中散在分布.

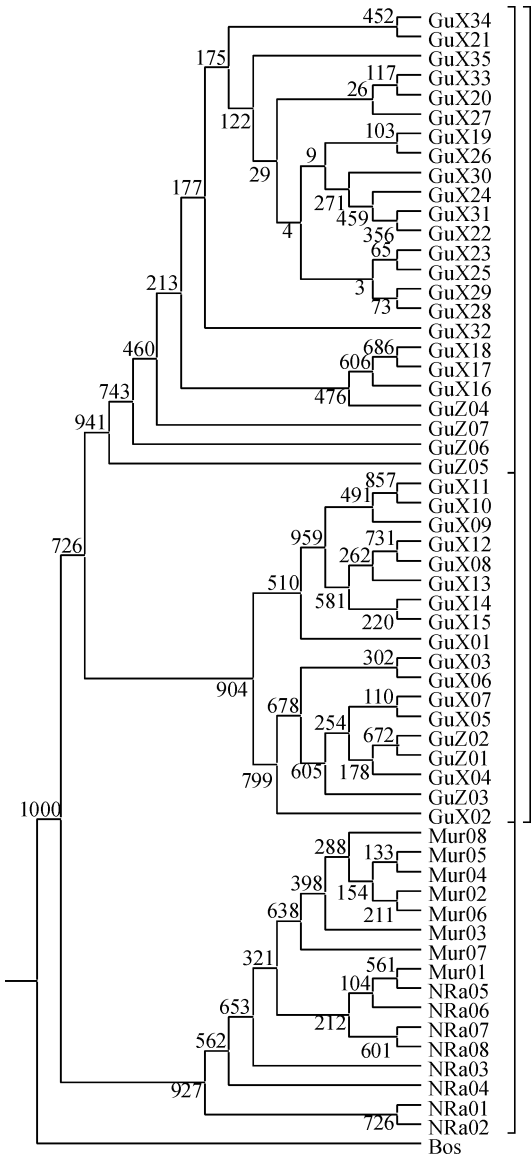
2.5 不同水牛群体 D-loop 区段单型种的系 (Phylogeny) 发生分析

以牛的 D-loop 区序列为外群, 结合试验得到的 66 条高质量的 D-loop 序列, 采用最大似然法 (ML) 对中国沼泽型水牛与来自印度、巴基斯坦的河流型水牛的系统发生进行了分析. 结果 (图 1) 显示: 沼泽型水牛与河流型水牛明显的分成 2 支, 在沼泽型水牛内部又分成明显的 2 支, 广西水牛与贵州水牛在 2 支都有分布; 印度摩拉水牛与巴基斯坦尼里拉菲水

牛聚成单独的一支.

2.6 不同水牛群体 D-loop 区段的单体型网络分析

为进一步观察各单体型之间的遗传距离和遗传发生关系, 应用 Network 软件中介邻接网络法 (Median joining network) 对 66 条 D-loop 序列的单体型序列进行了发生关系分析. 结果 (图 2) 表明: 网络由很明显的 3 个部分组成, 中国沼泽型水牛形成 2 个模块, 2 个模块中都有广西水牛和贵州水牛; 河流型水牛摩拉和尼里拉菲聚成 1 簇, 整个网络形状与进化树的分支组成比较一致.



各分支上的数字为 Bootstrap 1 000 个循环的自举检验值.

图 1 线粒体 D-loop 单体型构建的系统进化树

Fig.1 Phylogeny tree construction of buffalo based on D-loop haplotype

2.7 水牛 D-loop 区段的单体型群体扩增分析

进化树与单体型网络分析均表明, 沼泽型水牛

与河流型水牛可能来自 2 个不同的群体,应用 DnaSP4.0 软件对 D-loop 序列进行了碱基错配的分布 (Mismatch distribution) 分析,以观察水牛群体的扩增情况,结果见图 3. 图 3 中除 0 点的峰值以外,形成 2 个明显的峰,根据人类线粒体遗传分析的经验判断^[11],亚洲家养水牛在历史上发生过 2 次明显的群体扩增过程.

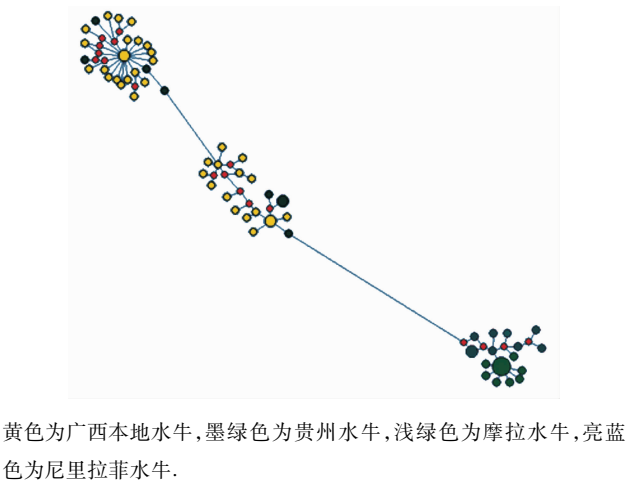


图 2 水牛样本单体型网络分析

Fig. 2 Haplotype network analysis of buffalo

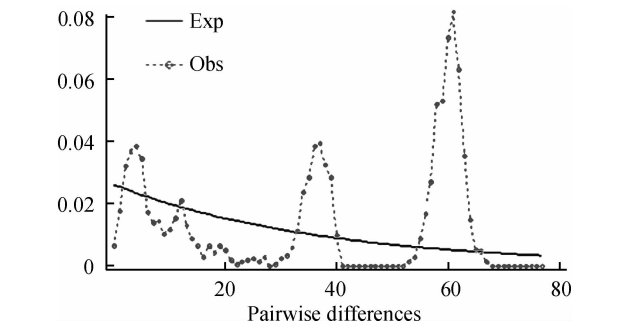


图 3 水牛线粒体 D-loop 序列的错配分布

Fig. 3 Mismatch distribution analysis of buffalo D-loop sequence

2.8 结合 GenBank 已经公布的水牛 D-loop 序列的系统分析

上述研究中,笔者发现中国沼泽型水牛和印度、巴基斯坦水牛在线粒体 D-loop 区明显分成 2 个独立的群体,暗示 2 种水牛可能在历史上发生过不同的群体扩增,2 个群体可能有着不同的家养化历程. 因为本研究采集的 43 头沼泽型水牛样本来自广西和贵州 2 个地方,而摩拉水牛和尼里拉菲水牛是 1953、1975 年中国分别从印度、巴基斯坦引进的河流型水牛的后裔,河流型水牛都采自广西水牛研究所,故可能存在一定的系统误差. 因此笔者从 GenBank 下载了来自世界各国的水牛线粒体 D-loop 序列,结合笔

者研究产生的序列,对水牛的种系发生进行了进一步的遗传分析.

2.8.1 本试验水牛 D-loop 区与已公布的水牛 D-loop 区序列的种系发生分析 从 GenBank 共计下载了 211 条 D-loop 序列,结合本试验 66 条序列和牛 D-loop 外群序列共记 278 条. 用 DnaSP 软件将 77 条沼泽型水牛和 200 条河流型水牛作为 2 个群体分析,结果沼泽型水牛产生 50 个单体型,平均差异核酸位点数 16.520,反应群体遗传多样性的 P_i 值为 0.019,而对应的河流型水牛分别为 79、6.23 和 0.007,同样显示,沼泽型水牛的遗传多样性比河流型丰富.

2.8.2 多国沼泽型水牛与河流型水牛 D-loop 区的单体型网络分析 为进一步观察各单体型的组成与相互关系,本试验对不含外群的 277 条水牛 D-loop 区序列进行的单体型分析,结果共有 878 bp 的共有序列,包含 158 个多态性位点,产生了 129 个单体型. 应用 Network 构建的单体型之间的中介邻接网络同样由 3 个部分组成,见图 4. 河流型水牛与沼泽型水牛遗传距离较远,所有的河流型水牛聚成 1 簇,连接成复杂的网络结构,无法彻底分离,说明河流型水牛可能来自共同的祖先,河流型水牛各品种之间遗传距离较近,品种之间存在杂交;而沼泽型水牛明显地分成 2 个部分,说明沼泽型水牛祖先可能来自 2 个基因池.

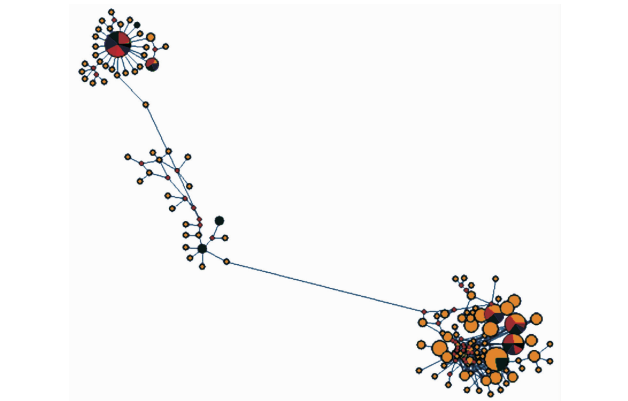


图 4 多国水牛线粒体 D-loop 单体型之间的中介邻接网络分析

Fig. 4 Median joining network analysis of buffalo haplotype from different countries

2.8.3 多国沼泽型水牛与河流型水牛群体扩增分析 笔者对所有的水牛单体型进行了群体扩增分

析,结果(图 5)显示错配分布图除极点 0 处外,有 2 个明显的波峰,显示在水牛的演化过程中存在 2 个明显种群扩增过程.对 77 头沼泽型水牛、200 头河流型水牛单独进行错配分布分析,结果为波形图,说明在沼泽型水牛和河流型水牛种群都存在一个明显的扩增过程,进一步验证了笔者的结论,即沼泽型水牛和河流型水牛分别进行了家养化.

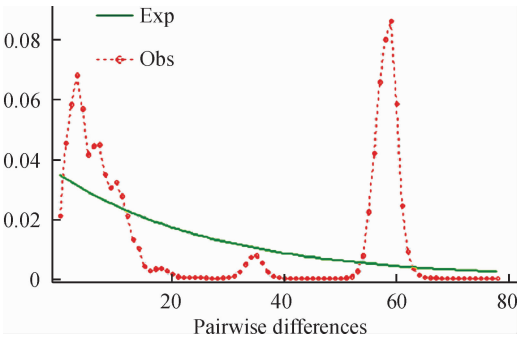


图 5 多国水牛线粒体 D-loop 序列的错配分布
Fig. 5 Mismatch distribution analysis of buffalo
D-loop sequence from different countries

3 讨论

线粒体基因组是母系遗传而且不发生重组的核外 DNA 序列,根据线粒体 DNA 序列积累的突变可以追溯一个物种的母系系统发生史,线粒体的 *Cyt. b* 基因曾成功用于重建牛科的种系发生^[12]. 线粒体 D-loop 区 DNA 序列中被认为是进化速度快、多态性丰富的区段,特别适合研究种群内部个体的遗传关系.除了 D-loop 在线粒体基因组复制过程中发挥重要作用外,多个研究结果表明 D-loop 区是整个线粒体基因组中进化最快的部分^[13]. 所以 D-loop 区 DNA 被广泛用于牛、绵羊和鹿的种系发生研究中^[14-18]. 自然情况下,不同种类动物由于生殖隔离和群体内等位基因的固定,往往造成物种间的基因型没有交叉.相反,一个物种内没有生殖隔离的情况,不同品种间的等位基因既表现出一定程度的相似,又有所不同,分化年代越近的品种间共有的基因型越多,这是根据分子水平差异追溯物种的种系发生的基本原理.物种内的分子变异分析比较常用的是中介邻接网络法,这种算法特别适合非重组 DNA 序列,如线粒体、Y 染色体的分析^[19].

为探讨基于线粒体控制区多态性的水牛遗传进化关系,本研究在水牛遗传资源丰富的广西开展,直接对广西水牛、贵州水牛以及尼里拉菲水牛和摩拉水牛的全长线粒体 D-loop 区测序,从扩增区段、多态位点、变异等方面充分比较沼泽型水牛与河流型水

牛的遗传差异.本研究采取了 ML 方法构建水牛单体型的进化树,并结合中介邻接网络分析与 Mismatch distribution 分析,分析方法先进,而从公共数据库下载的水牛线粒体序列的分析结果再次验证了试验结果的可靠性.本试验组合的最大的数据组包含了 277 条水牛 D-loop 区序列的单体型分析,结果共有 878 bp 的共有序列,包含 158 个多态性位点,产生了 129 个单体型,其中 77 条沼泽型水牛 D-loop 区序列形成 50 个单体型.在中介邻接网络分析中,沼泽型水牛明显地分成 2 个部分,说明沼泽型水牛祖先可能来自 2 个遗传池.最大的沼泽型水牛单体型 XY01 由 8 个品种 21 个个体组成,说明这是 1 个古老的单体型,包括 xy(4)、bh(4)、fa(3)、hz(3)、xl(3)、BL(2)、wz(1)和 Car(1),7 个群体 20 个个体来自中国沼泽型水牛,一个来自巴西的沼泽型水牛个体 Car307.传统观点认为沼泽型水牛只有一个品种,有时被称为 Carabao^[20]. Carabao 这个词来自马来西亚,同样在菲律宾这个词也用来称呼当地的沼泽型水牛,与河流型水牛相互区别.由于巴西部分沼泽型水牛引自于菲律宾,故当地人仍称之为 Carabao,在中介邻接网络中,来自巴西的另一沼泽水牛个体 Car315 与 XY01 直接相连,提示中国各省的水牛,巴西水牛,菲律宾水牛与马来西亚等地沼泽型水牛可能来自共同的祖先.单体型 XY01 涵盖的 21 个个体比较均匀地分布在我国 7 个地区,很难确定沼泽型水牛在我国哪个省份起源;次大的单体型 WZ02 由 BL-23、bh2、xy1 和 wz2、wz3 5 个个体组成,它与 XY01 直接相连.中介邻接网络分析中,河流型水牛聚集成一簇,无法完全分离,最大的单体型 Jaf06 由 18 个个体组成,包括 4 个摩拉个体和 14 个 Jaf 水牛 D-loop 序列,次大单体型 TODA03 由 14 个个体组成,其中 Toda(4)、Bhad(3)、Pan(2)、Mur(2)、Nag(2)、Jaf(1),单体型 BHAD01 同样包含 14 个个体,其中 Bhad(5)、Nag(4)、Jaf(3)、Mur(1)、Pan(1),这充分说明河流型水牛各品种之间遗传距离较近,全世界的河流型水牛可能来自共同的祖先.网络错综复杂难以完全分离,说明河流型水牛之间存在较多的品种之间的杂交.在最大的 3 个河流型水牛单体型中,出现频率最高的 Jaf、Toda 和 Bhad 均来自印度,可以推测河流型水牛的祖先最早发源于印度.在整个网络中,沼泽型水牛与河流型水牛分成完全独立的 2 个部分,遗传距离较远,而沼泽型水牛又明显地分成 2 个部分,说明沼泽型水牛祖先可能来自 2 个遗传池,这与本研究的结果一致.

通过上述研究,我们推测沼泽型水牛与河流型水牛遗传分化时间较早,分别来自不同的家养化过

程,沼泽型家养水牛的祖先来自中国,河流型家养水牛的祖先来自印度. 本研究结果将对我国不同类型和地区水牛群体的遗传特性研究,我国水牛遗传资源的评价、保护与开发利用具有较大意义,同时也对阐明水牛起源和驯化具有重要参考价值.

参考文献:

- [1] HASSANIN A, DOUZERY E J. Evolutionary affinities of the enigmatic saola (*Pseudoryx nghetinhensis*) in the context of the molecular phylogeny of Bovidae[J]. *Proc Biol Sci*, 1999, 266(1422): 893-900.
- [2] COCKRILL W R. Observations on skin colour and markings of the water buffalo (*Bubalus bubalis*) [J]. *Veterinarian*, 1968, 5(1): 29-32.
- [3] AMANO T, MIYAKOSHI Y, TAKADA T, et al. Genetic variants of ribosomal DNA and mitochondrial DNA between swamp and river buffaloes [J]. *Anim Genet*, 1994, 25 (Suppl 1): 29-36.
- [4] BARKER JS, MOORE S S, HETZEL D J, et al. Genetic diversity of Asian water buffalo (*Bubalus bubalis*): Microsatellite variation and a comparison with protein-coding loci [J]. *Anim Genet*, 1997, 28(2): 103-115.
- [5] 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]. *Mol Phylogenet Evol*, 2004, 30(2): 308-324.
- [6] 徐旺生. 中国家水牛的起源问题研究:下 [J]. *四川畜牧兽医*, 2005, 32 (5): 58.
- [7] 苗永旺, 李大林, 霍金龙, 等. 中国水牛的遗传多样性与起源分化 [J]. *中国牛业科学*, 2008, 34 (4): 16-20.
- [8] 齐国强, 咎林森, 张桂香, 等. 中国部分地方水牛品种 mtDNA D-loop 区遗传多样性与起源研究 [J]. *畜牧兽医学报*, 2008, 39 (1): 7-11.
- [9] 章纯熙. 中国水牛科学 [M]. 南宁: 广西科技出版社, 2000.
- [10] 崔奎青. 转基因体细胞克隆水牛与广西水牛的遗传特性研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2007: 78.
- [11] JOBLING M A, HURLES M, TYLER-SMITH C. Human evolutionary genetics: Origins, peoples and disease [M]. New York: Garland Science, 2003.
- [12] HASSANIN A, DOUZERY E J P. The tribal radiation of the family Bovidae (Artiodactyla) and the evolution of the mitochondrial cytochrome b gene [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 1999, 13(2): 227-243.
- [13] SACCONI C, LANAVE C, PESOLE G. Time and biosequences [J]. *J Mol Evol*, 1993, 37(2): 154-159.
- [14] DOUZERY E, RANDI E. The mitochondrial control region of Cervidae: Evolutionary patterns and phylogenetic content [J]. *Mol Biol Evol*, 1997, 14(11): 1154-1166.
- [15] BOYCE W M, RAMEY R R, RODWELL T C, et al. Population subdivision among desert bighorn sheep (*Ovis canadensis*) ewes revealed by mitochondrial DNA analysis [J]. *Mol Ecol*, 1999, 8(1): 99-106.
- [16] CYMBRON T, LOFTUS R T, MALHEIRO M I, et al. Mitochondrial sequence variation suggests an African influence in Portuguese cattle [J]. *Proc Biol Sci*, 1999, 266 (1419): 597-603.
- [17] NAGATA J, MASUDA R, TAMATE H B, et al. Two genetically distinct lineages of the sika deer, *Cervus nippon*, in Japanese islands: Comparison of mitochondrial D-loop region sequences [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 1999, 13 (3): 511-519.
- [18] TROY C S, MacHUGH D E, BAILEY J F, et al. Genetic evidence for Near-Eastern origins of European cattle [J]. *Nature*, 2001, 410(6832): 1088-1091.
- [19] BANDELT H J, FORSTER P, ROHL A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies [J]. *Mol Biol Evol*, 1999, 16(1): 37-48.
- [20] COCKRILL W R. The water buffalo: A review [J]. *Br Vet J*, 1981, 137(1): 8-16.

【责任编辑 柴 焰】