

Genetics Diversity of Six Yak Populations in Tibet Naqu

Wangdui Basang¹, Luobu Danjiu², Yanbin Zhu¹, Zhandui Pingcuo¹, Yangla Dawa¹, Shizhen He², Wendong Xie²

¹Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Tibet Autonomous Region, Lhasa Tibet

²Nagqu City Grassland Station, Tibet Autonomous Region, Naqu Tibet

Email: basangwd@163.com

Received: May 5th, 2019; accepted: May 23rd, 2019; published: May 30th, 2019

Abstract

A total of 359 individuals were genetically analyzed using genetic diversity of six yak ecological groups in Tibet using 12 microsatellite loci. The study showed that the average *PIC* values of the six yak ecological populations were found to be highly polymorphic. At the same time, the observed heterozygosity was from 0.5189 ± 0.0323 to 0.6380 ± 0.0345 ; the allele number distribution was from 4.25 ± 2.01 to 5.17 ± 2.72 ; and the polymorphic information content was 0.5004 to 0.5443. According to Hardy-Wenbergen equilibrium analysis (*HWE*), it was found that the three groups (the Nine Villages in Nima Township, Nierong County, the 11 villages in Nima Township, Nierong County, and the farm group in Naqu Jiali County) have 3 loci that significantly deviate from *HWE*; and only one microsatellite in the Sancun group of Xima Township in Naqu Jiali County was deviated significantly from equilibrium. The inbreeding coefficient (F_{IS}) and the inter-population genetic differentiation coefficient (F_{ST}) ranged from -0.059 to 0.153 and 0.00297 to 0.11431 , respectively. In addition, analysis of the genetic structure of STRUCTURE revealed that the best genetic background was $K = 2$. Through F_{ST} , phylogenetic tree, and STRUCTURE population structure analysis, it revealed that the clustering of the population was in accordance to their management background and geographical distribution. Therefore, this study provides a scientific data for the protection of genetic resources in those local yak populations of Tibet.

Keywords

Yak, Tibet, Genetic Diversity, Microsatellite

西藏那曲地区六个地方牦牛品种遗传多样性分析

巴桑旺堆¹, 旦久罗布², 朱彦宾¹, 平措占堆¹, 达娃央拉¹, 何世丞², 谢文栋²

文章引用: 巴桑旺堆, 旦久罗布, 朱彦宾, 平措占堆, 达娃央拉, 何世丞, 谢文栋. 西藏那曲地区六个地方牦牛品种遗传多样性分析[J]. 世界生态学, 2019, 8(2): 150-156. DOI: 10.12677/ije.2019.82020

¹西藏自治区农牧科学院畜牧兽医研究所, 西藏 拉萨

²西藏自治区那曲市草原站, 西藏 那曲

Email: basangwd@163.com

收稿日期: 2019年5月5日; 录用日期: 2019年5月23日; 发布日期: 2019年5月30日

摘要

利用12个微卫星座位对西藏6个地方生态类群359个牦牛个体进行了遗传多样性评估。结果显示群体观测杂合度为 0.5189 ± 0.0323 至 0.6380 ± 0.0345 , 等位基因数分布为 4.25 ± 2.01 至 5.17 ± 2.72 , 多态信息含量为 0.5004 至 0.5443 , 故6个群体遗传多样性丰富。利用哈德温伯格平衡分析发现, 三个群体(那曲聂荣县尼玛乡九村群体、那曲聂荣县尼玛乡十一村群体、那曲嘉黎县牧场群体)中发生显著偏离的微卫星数最多, 均有3个位点偏离哈代温伯格平衡; 而那曲嘉黎县夏玛乡三村群体中只有1个微卫星显著偏离平衡。群体内近交系数(F_{IS})和群体间遗传分化系数(F_{ST})的变化范围分别为 $-0.059 \sim 0.153$ 和 $0.00297 \sim 0.11431$ 。对STRUCTURE遗传结构进行分析, 发现最佳遗传背景 $K = 2$ 。通过 F_{ST} 遗传分歧分析, 系统发育树和STRUCTURE群体结构对群体的结构划分, 发现所研究群体结构均表现出与管理背景及地理位置分布存在联系。故, 本研究对西藏地方牦牛群体遗传资源的保护提供了科学数据基础。

关键词

牦牛, 西藏, 遗传多样性, 微卫星

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

牦牛是分布于海拔 3000 m 以上, 以青藏高原为中心及其毗邻的高山、亚高山地区的特有牛种, 能适应高寒、缺氧等极端生态条件, 在遗传资源上是一个极为宝贵的基因库, 是“世界屋脊”著名的景观牛种。自 20 世纪 70 年代以来, 国内外学者通过形态学、细胞遗传学、生化遗传学和分子遗传学标记等手段, 为牦牛遗传多样性的研究积累了十分丰富的资料。如曾玉峰[1]利用微卫星和线粒体 DNA 两种分子标记方法研究了甘肃省六个牦牛群体的遗传多样性; 罗辉等[2]和蔡欣等[3]分别利用微卫星分子标记研究了麦洼牦牛内的遗传多样性; 钟金城等[4]利用微卫星分析标记对麦洼牦牛、九龙牦牛、大通牦牛、天祝白牦牛的遗传多样性及其分类进行研究; 毛永江等[5][6]利用微卫星标记和血液蛋白基因座标记方法研究了青海高原牦牛内的遗传多样性; 张浩[7]利用微卫星对甘肃省天祝县的 5 个天祝白牦牛群体进行了近交系数的研究; 李铎等[8]利用微卫星 DNA 研究了西藏 11 个牦牛类群的遗传多样性及类群间的系统进化关系; 廖信军等[9]应用 16 对微卫星 DNA 标记评估了 5 个中国地方牦牛(帕里牦牛、斯布牦牛、西藏高山牦牛、麦洼牦牛和九龙牦牛)品种内遗传变异和品种间遗传关系; 田应华等[10]利用微卫星标记对云南中甸牦牛进行了群体遗传变异分析。

西藏作为我国牦牛的主产区之一, 全区 76 个县(区)均有牦牛分布, 共有牦牛 457 万余头, 占全国牦牛总数的 30%。从 20 世纪 50 年代起, 中国牦牛学者主要对牦牛的生产性能进行了深入细致的研究。进

入 20 世纪 90 年代后, 又利用不同的遗传标记从分子水平上对牦牛品种的遗传多样性进行了较深入系统的研究, 并取得了阶段性的成果。

本研究利用微卫星 DNA 研究了西藏那曲地区的六个地方牦牛生态类群的遗传多样性, 为今后西藏自治区牦牛遗传资源的相关研究、地方资源保护与利用提供了可借鉴方法和理论依据。

2. 材料与方法

从 6 个西藏牦牛品种或类群中, 选取健康成年牦牛, 共 133 头(表 1), 采集静脉血带回实验室, 于-80℃ 的冰箱中保存备用。实验牦牛类群、数量与采样地点详见表 1。

Table 1. Sample collection information and sample size

表 1. 样品采集信息及样本量

采样地点	数量	群体代码
那曲嘉黎县夏玛乡三村	20	B
那曲嘉黎县牧场	25	J
那曲聂荣县牧场	22	N
那曲聂荣县尼玛乡九村	23	NO
那曲聂荣县尼玛乡十一村	23	S
那曲当雄县龙仁乡	20	X
合计	133	

用基因组 DNA 提取试剂盒(DP304, 天根生化科技有限公司)提取全血中的基因组 DNA, -20℃ 保存。参考联合国粮农组织(FAO)和国际动物遗传学会(ISAG)联合推荐的引物, 本研究选取了其中 12 对牛遗传多样性评价体系微卫星位点, 并在引物序列上游 5'-端加上 FAM 或 ROX 荧光标记, 以便检测。将引物进行组合扩增, 并对 PCR 过程进行优化, 荧光标记, 获得 PCR 产物。所用引物和片段大小见表 2。

Table 2. Yak microsatellite locus primer sequence, fragment size and annealing temperature information table

表 2. 牦牛微卫星座位引物序列、片段大小及退火温度信息表

引物名称	引物序列 5'-3'	片段长度	标记类型	退火温度
BM2113	F: GCTGCCTTCTACCAAATACCC R: CTTAGACAACAGGGGTTTGG	123~151	FAM	57
TGLA126	F: CTAATTTAGAATGAGAGAGGCTTCT R: TTGGTCTCTATTCTCTGAATATTC	107~121	FAM	55
ILSTS008	F: GAATCATGGAATTCTGGGG R: TAGCAGTGAGTGAGGTTGGC	175~187	FAM	58
ILSTS050	F: AAATCAGACACCCAGTTTCC R: GTTTTCTACACGAGTTGGC	161~183	ROX	55
BM1824	F: GAGCAAGGTGTTTTTCCAATC R: CATTCTCCAAGTCTTCCTTG	180~194	FAM	57
ETH225	F: GATCACCTTGCCACTATTTCCT R: ACATGACAGCCAGCTGCTACT	144~162	FAM	64
SPS115	F: AAAGTGACACAACAGCTTCTCCAG R: AACGAGTGTCTAGTTTGGCTGTG	234~254	ROX	64

Continued

BGR3012	F: GACAGGAAGTAGGATGATGGTT R: TGGGAGATGGTGAAGGACAGGG	200~300	FAM	52
BGR3020	F: GACTTCCCTTTTCACTTTTCAC R: AGAGGAACGCAACAGGGGAAT	200~300	ROX	51
TGLA53	F: GCTTTCAGAAATAGTTTGCATTCA R: ATCTTCACATGATATTACAGCAGA	143~191	FAM	55
TGLA73	F: GAGAATCACCTAGAGAGAGGCCA R: CTTTCTCTTTAAATTCTATATGGT	111~143	ROX	55
AGLA293	F: GAAACTCAACCCAAGACAACCTCAAG R: ATGACTTTATTCTCCACCTAGCAGA	210~240	FAM	55

采用 20 μL 反应体系, 其中各组分的终浓度分别为 dNTPs 0.2 mmol/L、 Mg^{2+} 1.5 mmol/L、混合上下游引物 0.5 mmol/L、Taq 酶 5 U/ μL 、DNA 模板 1 μL (约 60 ng)。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ ~60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 经过 35 个循环; 于 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 产物用 ABI 3130 xl 全自动基因分析仪进行分型检测。

数据分析参数及工具包括: Microsatellite Toolkit 软件[11]计算各遗传位点的等位基因数(Number of alleles, N_A)、多态信息含量(Polymorphic information content, PIC)、观察杂合度(Observed Heterozygosity, H_O)和期望杂合度(Expected Heterozygosity, H_E)等参数。Arlequin 3.5 软件[12]计算物种内群体间遗传分化指数(F_{ST})。GENEPOP 3.4 软件[13]进行哈德温伯格平衡检验(Hardy-Weinberg Equilibrium, HWE)。Fstat 2.9 软件[14]计算群体近交系数(F_{IS})。Structure [15]计算群体结构, STRUCTURE Harvester [16]计算最佳 K 值, CLUMPP [17]软件和 DISTRICT 1.1 [18]用来做图。PHYLIP version 3.68 [19]计算群体间的关系并构建系统发育数。

3. 结果与分析

首先, 12 个微卫星位点在 6 个群体中的遗传多样性结果如表 3 所示, 结果显示 BGR3012 位点的期望杂合度($H_E = 0.0128$)、观测杂合度($H_O = 0.0119$)和多态信息含量($PIC = 0.0128$)均是最低的, 而 TGLA73 位点的期望杂合度($H_E = 0.8650$)、观测杂合度($H_O = 0.8238$)和多态信息含量($PIC = 0.7976$)均是最高。等位基因数从 BGR3012 位点的 2 个到 SPS115 位点的 14 个, 12 个位点在 6 个地方牦牛群体中的平均等位基因数为 7.75。这个 12 个位点中有 5 个位点在这六个群体中均没有偏离哈德温伯格平衡, AGLA293 位点的在 5 个群体中偏离哈德温伯格平衡(表 3)。

就位点而言, 在 6 个那曲地方牦牛群体的 133 个个体的 12 个微卫星中共发现了 93 个等位基因数, 平均等位基因数为 7.75, 本研究选取的 12 个微卫星位点中, BGR3012 和 AGLA293 两个位点为低度多态, BGR3020 位点为中度多态, 其余的 9 个位点为高度多态。说明各牦牛群体遗传多样性水平较高且存在着遗传差异, 有足够的基因资源存在于牦牛群体内。与前人研究结果相似, 如: 罗辉等[1]发现 15 个微卫星位点在麦洼牦牛的平均等位基因数为 9.2670; 蔡欣等[3]研究表明麦洼牦牛中 4 个微卫星位点的平均等位基因数为 7; 钟金城等[10]研究表明 4 个牦牛品种中的 9 个微卫星的的平均的等位基因数为 6.8; 曾玉峰[4]研究表明甘肃的 6 个地方牦牛群体的 15 个微卫星中的平均等位基因数为 9.73; 以上研究中的微卫星位点的 PIC 值都大于 0.5, 属于高度多态位点(表 3)。

计算 6 个群体中的 12 个微卫星位点的遗传多样性数据结果如表 4 所示。在这六个群体中, 期望杂合度的范围是 0.5654 ± 0.0673 (J)到 0.6256 ± 0.0669 (X); 观测杂合度在 NO 群体中最小为 0.5189 ± 0.0323 , 在 X 群体中最大为 0.6380 ± 0.0345 ; 平均等位基因数的最小值为 4.25 ± 2.01 (B), 最大值为 5.17 ± 2.72 (NO);

六个群体的多态信息含量均大于 0.5 (0.5004 至 0.5443), 均为中度多态; 近交系数在 J 群体中最低为 0.014, 在 NO 群体中最高为 0.127; B 群体中只有 1 个位点偏离了哈代温伯格平衡, N 和 X 群体中有 2 个位点偏离了哈代温伯格平衡, J、NO 和 S 群体中有 3 个位点偏离了哈代温伯格平衡。

Table 3. Genetic diversity of 12 microsatellite loci
表 3. 12 个微卫星位点的遗传多样性

Locus	H_E	H_O	PIC	N_A	HWE
BGR3012	0.0128	0.0119	0.0128	2	2
BM2113	0.4537	0.3263	0.6885	3	2
SPS115	0.7702	0.7113	0.6655	14	0
ETH225	0.7017	0.6353	0.7289	8	0
TGLA73	0.8650	0.8238	0.7976	12	1
AGLA293	0.4741	0.4145	0.1984	10	5
BGR3020	0.4732	0.3676	0.4873	5	1
ILSTSO50	0.6852	0.6207	0.6836	9	0
TGLA53	0.7581	0.7037	0.7076	13	1
TGLA126	0.6988	0.6222	0.7202	5	0
BM1824	0.7071	0.6425	0.6624	8	0
ILSTS008	0.5599	0.4498	0.6252	7	2

Table 4. Expected heterozygosity (H_E), observed heterozygosity (H_O), mean allele number (N_A), polymorphic information content (PIC), inbreeding coefficient (F_{IS}), and deviation from Hardy Weinberg equilibrium (HWE)
表 4. 期望杂合度(H_E)、观察杂合度(H_O)、平均等位基因数(N_A)、多态信息含量(PIC)、近交系数(F_{IS})和偏离哈代温伯格平衡数(HWE)

群体	$H_E \pm SD$	$H_O \pm SD$	MN_A	PIC	F_{IS}	HWE
B	0.5828 $\pm$ 0.0782	0.6138 $\pm$ 0.0341	4.25 $\pm$ 2.01	0.5166	-0.055	1
J	0.5654 $\pm$ 0.0673	0.5574 $\pm$ 0.0297	4.75 $\pm$ 2.70	0.5004	0.014	3
N	0.6153 $\pm$ 0.0652	0.5783 $\pm$ 0.0321	4.33 $\pm$ 2.02	0.5408	0.061	2
NO	0.5924 $\pm$ 0.0747	0.5189 $\pm$ 0.0323	5.17 $\pm$ 2.72	0.5382	0.127	3
S	0.5984 $\pm$ 0.0644	0.5825 $\pm$ 0.0303	4.67 $\pm$ 2.71	0.5246	0.027	3
X	0.6256 $\pm$ 0.0669	0.6380 $\pm$ 0.0345	4.67 $\pm$ 2.15	0.5443	-0.042	2

就群体而言, 只有 B 和 X 群体的期望杂合度小于观测杂合度, 其他 4 个群体的期望杂合度均大于观测杂合度。这跟 F_{IS} 的结果相同, F_{IS} 小于 0 表示杂合度过剩, 因此期望杂合度小于观测杂合度。6 个群体中那曲 6 个地区牦牛群体的期望杂合度范围以及观测杂合度范围都低于甘肃地区的 6 个牦牛群体的期望杂合度范围和观测杂合度范围。群体内的 PIC 值也要低于甘肃地区的牦牛群体[4]。

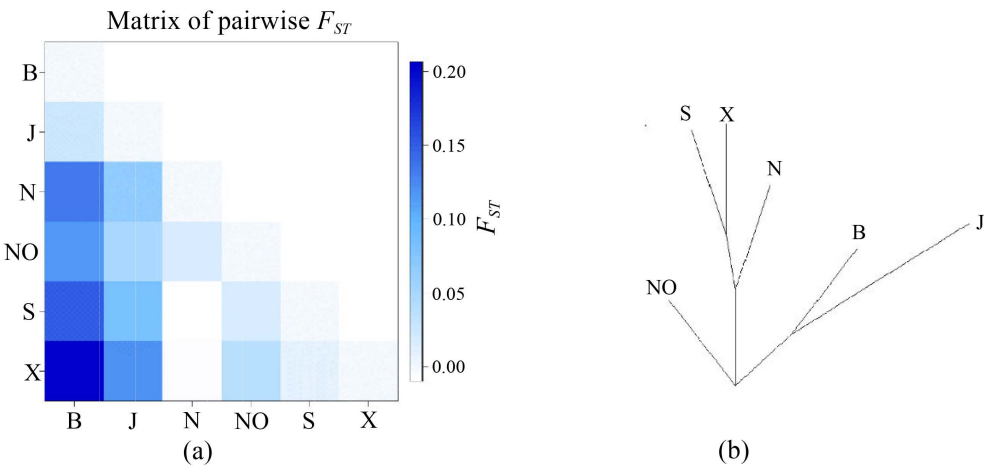
依据基因组 SSR 标记分别计算的那曲不同地区的牦牛群体间 F_{ST} 值(表 5, 图 1(a)), 群体系统进化树建树以及 STRUCTURE 群体结构。结果显示 F_{ST} 值的范围从 0.00651 到 0.20663。群体间遗传分化指数共有 5 对表现为差异不显著(N 和 NO、N 和 S、N 和 X、NO 和 S、S 和 X), B 和 J 群体均与其他的群体表现出显著差异。六个牦牛群体的系统进化树结果如图所示, NO 群体与其他 5 个群体的距离最远, B 和 J

群体为一支，S、X 和 N 三个群体为一支(图 1(b))。STRUCTURE 群体结构结果(图 2)与系统进化树的结果相同，最佳 K 值为 3，当 $K = 3$ 时，B 和 J 群体相似，S、X 和 N 三个群体相似，NO 群体最远。群体间遗传分化指数和系统进化树的结果表现出来些许不同的结果，这可能是由于两个软件的算法不同而导致的。

Table 5. Genetic differentiation index (F_{ST}) between groups
表 5. 群间遗传分化指数(F_{ST})

品种	B	J	N	NO	S	X
B	0.00000					
J	0.02612*	0.00000				
N	0.13496*	0.06508*	0.00000			
NO	0.11828*	0.0502*	0.01994	0.00000		
S	0.15106*	0.08413*	-0.01016	0.01964	0.00000	
X	0.20663*	0.12188*	-0.00651	0.03735*	0.00876	0.00000

*代表遗传分歧显著，即 $P < 0.05$ 。



注：(a)为六个牦牛群体遗传分歧(F_{ST})；(b)为六个群体系统进化分析网络

Figure 1. Analysis of phylogeny and genetic differences of six yak cattle in Tibet
图 1. 西藏六个牦牛系统发育及遗传分歧分析

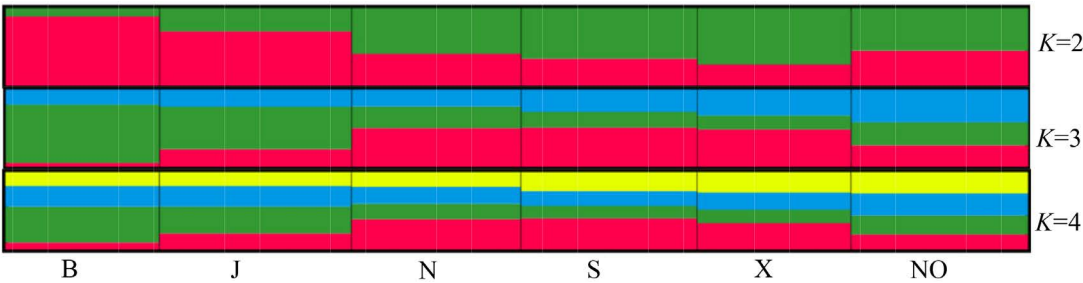


Figure 2. Genetic structure of six yak STRUCTION populations in Tibet
图 2. 西藏六个牦牛 STRUCTION 群体遗传结构

S、X 和 N 三个群体在三种算法的结果中都表现为同一类，建议这三个群体可以统一做育种计划。B

和 J 两个群体在进化树和 STRUCTER 中都表现为同一类, 但是这两个群体之间的 F_{ST} 值却表现为差异显著, 建议将 B、J 和 NO 三个群体分别育种。

基金项目

国家肉牛牦牛产业技术体系(CARS-37); 国家科技部“高海拔边境地区农牧业关键技术与示范”子课题“牦牛高效繁殖与半舍饲养殖技术与集成示范”。

参考文献

- [1] 曾玉峰. 甘肃境内 6 个牦牛群体 mtDNA D-环序列和微卫星遗传多样性与聚类分析[D]: [博士学位论文]. 兰州: 甘肃农业大学, 2013.
- [2] 罗辉, 赵芳芳, 孙磊, 伍仕鑫, 徐传飞, 蔡欣. 麦洼牦牛基因组三碱基重复微卫星的挖掘及其遗传多态性分析[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(5): 1438-1445.
- [3] 蔡欣, 泽让东科, 赵芳芳, 孙磊. 麦洼牦牛群体 4 个新微卫星位点遗传多态性分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2014, 42(5): 29-32.
- [4] 钟金城, 赵素君, 陈智华, 马志杰. 牦牛品种的遗传多样性及其分类研究[J]. 中国农业科学, 2006, 39(2): 389-397.
- [5] 毛永江, 常洪, 杨章平, 张柳, 宋光明, 王小龙. 青海高原牦牛遗传多样性研究[J]. 家畜生态学报, 2008, 29(1): 25-30+57.
- [6] 毛永江. 中国牛亚科家畜六个群体遗传多样性与遗传分化及其统计方法的研究[D]: [博士学位论文]. 扬州: 扬州大学, 2006.
- [7] 张浩. 五个天祝白牦牛群体近交程度分析[J]. 湖北畜牧兽医, 2014, 35(5): 7-9.
- [8] 李铎, 柴志欣, 姬秋梅, 张成福, 信金伟, 钟金城. 西藏牦牛微卫星 DNA 的遗传多样性[J]. 遗传, 2013, 35(2): 175-184.
- [9] 廖信军, 常洪, 张桂香, 王冬蕾, 宋卫涛, 韩旭, 张自富. 中国 5 个地方牦牛品种遗传多样性的微卫星分析[J]. 生物多样性, 2008, 16(2): 156-165.
- [10] 田应华, 钱林东, 凌军, 刘丽仙, 霍金龙, 祁宏, 苗永旺. 云南中甸牦牛的遗传多样性研究[J]. 西南农业学报, 2009, 22(3): 794-797.
- [11] Park, S.D.E. (2001) Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection. PhD Thesis, University of Dublin, Dublin.
- [12] Excoffier, L. and Lischer, H.E.L. (2010) Arlequin Suite ver 3.5: A New Series of Programs to Perform Population Genetics Analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, **10**, 564-567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- [13] Raymond, M. and Rousset, F. (1995) GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**, 248-249. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a111573>
- [14] Goudet, J. (1995) FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *Journal of Heredity*, **86**, 485-486. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a111627>
- [15] Falush, D., Stephens, M. and Pritchard, J.K. (2003) Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. *Genetics*, **164**, 1567-1587.
- [16] Earl, D.A. and von Holdt, B.M. (2012) Structure Harvester: A Website and Program for Visualizing Structure Output and Implementing the Evanno Method. *Conservation Genetics Resources*, **4**, 359-361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- [17] Jakobsson, M. and Rosenberg, N.A. (2007) CLUMPP: A Cluster Matching and Permutation Program for Deal with Label Switching and Multimodality in Analysis of Population Structure. *Bioinformatics*, **23**, 1801-1806. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm233>
- [18] Rosenberg, N.A. (2004) Distruct: A Program for the Graphical Display of Population Structure. Online Library. *Molecular Ecology Notes*. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00566.x>
- [19] Felsenstein, J. (1993) Phylip-Phylogenetic Inference Package, Version 3.5c. University of Washington, Seattle.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2324-7967, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: ije@hanspub.org