

黑龙江省野猪线粒体 D-Loop 区的生物信息学分析

杨国伟

(黑龙江省农业科学院 草业研究所,黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:对 Genbank 中野猪的线粒体 D-Loop 区的基因序列进行了 SNP 分析及分子进化树构建。结果表明:黑龙江野猪线粒体 DNA 的 D-Loop 区全长 1 145 bp,A+T 含量(61.3%)明显高于 G+C 含量(38.7%);发现了 93 个多态位点,界定了 20 种单倍型,野猪 mtDNA D-Loop 区核苷酸多样性为 0.02553,单倍型多样性为 0.995,平均核苷酸差异数为 15.443;黑龙江野猪与意大利和瑞典野猪亲缘关系最近,与马来西亚野猪的亲缘关系最远,推测黑龙江野猪含有欧洲野猪血统。

关键词:野猪;D-Loop;序列分析;分子进化树

中图分类号:S813.3

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2010)02-0078-02

在线粒体 DNA 上存在一个独特的 D-Loop 环结构,它位于 tRNA-Pro 和 tRNA-Phe 的基因之间,是整个线粒体基因组序列和长度变异最大的区域,其进化速度最快^[1]。近些年来,人们对不同物种的 D-Loop 区的遗传多样性进行了大量的分析,主要用于研究物种的起源和进化以及种内种群间的系统进化分析,同时探讨物种在进化过程中可能发生的变异情况。

野猪(*Sus scrofa*)是家猪的野生原种,杂食、喜爱群居,在分类学上属于动物界、脊索动物门、哺乳纲、偶蹄目、猪科、猪属、野猪种。全球至今已记录的野猪有 11 个亚种,其中 6 个来自欧洲,中国仅存 1 种 7 亚种^[2]。黑龙江省内存在的野猪,按地理位置分应属于东北亚种(*Sus scrofa ussucus*)下的东北白胸野

猪,但目前还没有定论,所以仍被大家称为黑龙江野猪。该研究欲通过对黑龙江野猪线粒体 D-Loop 区序列的生物信息学分析,对其起源、进化及分类提供一定的参考信息。

1 材料与方法

以克隆测序的黑龙江野猪 D-Loop 区序列为源序列(EU333163.1),采用 BLAST 法进行序列比对,从 Genbank 网站中搜索到 65 条相关序列^[3]。逐个验证后,将家猪的序列部分删掉,保留野猪的序列,剩余序列为 21 条(包括源序列),序列信息见表 1。用 DNAMAN、Clustal X、Primer5.0 和 DNAsp 软件进行序列对齐、SNPs 检测及等位基因型分析,最后使用 MEGA 软件构建分子进化树。

表 1 野猪的 D-Loop 序列信息

| 产地 | GenBank 登录号 | 产地 | GenBank 登录号 | 产地 | GenBank 登录号 |
|--------|-------------|--------|-------------|--------|-------------|
| 福建野猪 1 | EF545571 | 韩国野猪 1 | DQ268530 | 韩国野猪 4 | AY429457 |
| 福建野猪 2 | EF545570 | 韩国野猪 2 | DQ207755 | 韩国野猪 5 | DQ207754 |
| 福建野猪 3 | EF545569 | 韩国野猪 3 | DQ207753 | 韩国野猪 6 | DQ274110 |
| 云南野猪 1 | EF545568 | 台湾野猪 | DQ534707 | 江西野猪 | EF545579 |
| 云南野猪 2 | EF545585 | 意大利野猪 | AF304201 | 吉林野猪 | EF545580 |
| 云南野猪 3 | EF545586 | 越南野猪 | EF545584 | 马来西亚野猪 | EF545592 |
| 瑞典野猪 | AF304203 | 黑龙江野猪 | EU333163 | 肯尼亚疣猪 | DQ409327 |

注:1~6 代表了同一产地的不同个体

2 结果与分析

2.1 黑龙江野猪线粒体 D-Loop 区的序列分析结果

黑龙江野猪的线粒体 DNA(mtDNA)总长

16 581 bp,其中 D-Loop 区的全序列长度为 1 145 bp,约占所测核苷酸总长的 8.12%。其中 A、T、G、C 碱基的平均含量分别为 33.6%、27.7%、24.8%和 14.0%,A+T 含量(61.3%)明显高于 G+C 含量(38.7%)。

利用 Clustal X 软件对 21 头野猪的 mtDNA D-Loop 序列进行同源序列比对,界定了 20 种单倍型(Haplotypes),发现了 93 个多态位点,其中转化和颠

收稿日期:2009-10-27

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划重点资助项目(2008BAD-B2B02)

作者简介:杨国伟(1976-),男,黑龙江省佳木斯市人,硕士,助理研究员,从事动物营养与遗传研究。E-mail: ygw800129@163.com。

换发生的比例见表 2。11 个地区的野猪 mtDNA D-Loop 区核苷酸多样性(Nucleotide diversity) π 为:0.02553,单倍型多样性(Haplotype gene diversity) H_d 为:0.995,平均核苷酸差异数(Average number of nucleotide differences) k 为:15.443。

表 2 转换和颠换发生的比例

| 碱基 | A | T | C | G |
|----|--------------|--------------|--------------|-------------|
| A | — | 2.33 | 2.09 | 8.58 |
| T | 2.82 | — | 25.53 | 1.17 |
| C | 2.82 | 28.47 | — | 1.17 |
| G | 20.61 | 2.33 | 2.09 | — |

注:黑体数字为转换发生的比例,其它数字为颠换发生的比例

2.2 基于 D-Loop 区序列构建的分子进化树

使用 MEGA4.0 软件构建了基于野猪 D-Loop 区序列的分子进化树,使用肯尼亚疣猪作为外类群。采用了邻接法(Neighbor Joining, NJ)构建了分子进化树(见图 1)。可以看出,来自同一地区的野猪,基本上都聚在同一分支下,黑龙江野猪与意大利和瑞典野猪的亲缘关系最近,与马来西亚野猪的亲缘关系最远。

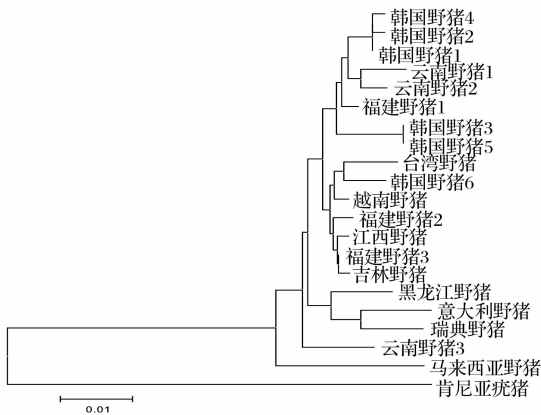


图 1 分子进化树

3 结论与讨论

通过试验分析了 5 个国外野猪种和 6 个中国不同地区野猪种的遗传多样性,同时参考了前人的研究结果,最终发现,该研究中所涉及到的野猪群体内 A、T、C、G 的含量与前人的研究结果基本一致,均是 A+T 的含量明显高于 C+G 的含量,但是所检测到的单倍型和核苷酸多样性均明显高于已有的研究结果^[4]。推测产生这一结果的原因是前人均是在同一猪种内进行研究,而该试验综合了世界各地的野猪种,所以结果中所体现的遗传多样性要明显高于已有的研究结果。

在以肯尼亚疣猪 D-Loop 区基因组作为外类群构建的 NJ 和 ME 树显示,整个猪科动物中,最为古老并靠近外类群的是马来西亚野猪,因此可以将其当作次一级的外类群,可看作是当今猪种中最古老的、目前欧亚大陆猪种的先祖。而黑龙江野猪并没有像预期的那样,与吉林野猪聚在一类,而且同福建和云南等地的野猪亲缘关系也较远,反而是同意大利和瑞典野猪的亲缘关系最近,据此推测,可能是因为黑龙江省与前苏联毗邻而居,而前苏联有部分领土位于欧洲,所以黑龙江野猪很可能存在欧洲野猪的血统。

参考文献:

[1] 宋成义,经荣斌,王学峰,等.猪 mtDNA 多态性的研究与应用[J].家畜生态,2002,23(1):75-77.
[2] 张劲硕.世界猪的种类、分布和现状[J].动物学杂志,2007(1):7.
[3] 李丽,于浩,刘娣.东北野猪线粒体 DNA 序列的测定与分析[J].东北农业大学学报,2008,39(9):62-65.
[4] 韩春梅,高庆华,赵书红,等.新疆野猪 mtDNA 控制区序列遗传多样性分析[J].安徽农业科学,2008,36(8):3142-3143,3245.

Bioinformatic Analysis of Heilongjiang Wild Boar Mitochondria D-Loop

YANG Guo-wei

(Pratacultural Science Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: All of the mitochondrial DNA D-Loop sequences in Genbank currently were analyzed by some tools of bioinformatics. The results showed that, wild boar D-Loop was 1 145 bp, A+T content(61.3%) was higher than (G+C)38.7%, 93 SNP and 20 haplotypes were found. The nucleotide diversity of mtDNA D-Loop was 0.02553, the haplotype gene diversity was 0.995, and the average number of nucleotide differences was 15.443. The phylogenetic tree showed that Heilongjiang wild boar was closest to Italian and Sweden wild boar, but farthest to Malaysia wild boar, presumed that Heilongjiang wild boar including Europe wild boar blood.

Key words: wild boar; D-Loop; sequence analysis; phylogenetic tree