



韦落落,段云波,田思思,等.岷县及贵德黑裘皮羊遗传多样性和系统进化的研究与保护[J].黑龙江农业科学,2021(10):46-54.

岷县及贵德黑裘皮羊遗传多样性和系统进化的研究与保护

韦落落¹,段云波¹,田思思¹,黄丽芬¹,陈天莹¹,李 铀^{1,2}

(1. 西北民族大学 生命科学与工程学院,甘肃 兰州 730100;2. 西北民族大学 生物医学研究中心/甘肃省动物细胞技术创新中心,甘肃 兰州 730030)

摘要:为加强岷县黑裘皮羊及贵德黑裘皮羊种质资源的合理利用及保护,本研究对 6 个岷县黑裘皮羊样本以及 5 个贵德黑裘皮羊样本线粒体 DNA 的 *Cytb*、*COI*、*ND2*、*ND4* 四对线粒体基因序列进行 PCR 扩增及序列分析。结果表明:岷县黑裘皮羊与贵德黑裘皮羊之间、岷县黑裘皮羊与国内外绵羊品种之间以及贵德黑裘皮羊与国内外绵羊品种之间均存在一定的基因流。其中,岷县黑裘皮羊的样本 M1 与样本 M4 受到外来杂交品种基因的冲击较大。基于上述结果,本研究对于岷县及贵德黑裘皮羊提出了保种建议:一是避免岷县及贵德黑裘皮羊与其他绵羊品种产生基因流;二是加强岷县及贵德黑裘皮羊的品种提纯工作。

关键词:岷县黑裘皮羊;贵德黑裘皮羊;遗传多样性;系统进化

岷县黑裘皮羊,是甘肃省岷县地方品种,属于山谷型藏羊^[1],主要分布于岷县境内洮河两岸、宕昌县、临潭县、临洮县及渭源县部分地区。岷县黑裘皮羊肉质中含有丰富的蛋白质、脂肪、维生素和矿物质,具有极高的营养价值,是人们日常生活中重要的消费品,其肉质细嫩、肥而不腻、香而不腥,深受消费者青睐^[2]。岷县黑裘皮是甘肃省重要的裘皮用绵羊品种,所产的二毛裘皮具有保暖性佳、毛穗美观、毛质细腻、耐脏抗皱等特点^[3],具有极高的经济价值。贵德黑裘皮羊,是青藏高原的一个特殊的经济类型^[4],原产地为青海省贵德县。贵德黑裘皮羊全身被毛多为黑微红色,个别为灰色和纯黑色,主要生产黑紫羔皮,毛色黝黑发亮,有环形、半环形、波浪形卷花,是当地裘皮羊中的珍贵品种^[5]。贵德黑裘皮羊的羊毛所制成衣保暖性强、防潮、外形美观、品质好,深受当地消费者的喜爱,且皮毛价格昂贵,市场前景良好,贵德黑裘皮羊给当地农牧民带来了极大的经济收益^[6]。

线粒体 DNA(mtDNA)因具有结构简单、进

化速度快、严格遵循母系遗传方式的特点,是动物的种间和种内群体间遗传分化关系研究的有力工具^[7]。细胞色素 b 基因(*Cytb*)位于线粒体 DNA 的功能区,该基因属编码蛋白质基因,因此突变相对少且相对稳定,被认为是比较物种进化和了解遗传多样性最可靠的线粒体 DNA 标记之一^[8];线粒体细胞色素氧化酶 I 基因(*COI*)具有长度适宜、进化速率慢、富含生物系统发育信号等优点,被广泛用于动、植物系统进化研究^[9];NADH 脱氢酶亚基 2 基因(*ND2*)具有进化速率相对较快、能较好地反映种内与群体间的遗传变异及系统分类地位等特点,正逐渐应用于系统发育和种群划分研究^[10];NADH 脱氢酶亚基 4 基因(*ND4*)进化速度较快,多态性丰富,是研究群体遗传的极好标记,适用于分析亲缘关系较近群体的系统发育关系和群体遗传结构^[11]。

近年来,由于品种引进、养殖规模小、饲养方式落后、保种工作薄弱等原因,岷县及贵德黑裘皮羊饲养数量下降,产区范围不断缩小;品种及产品品质退化、生产性能及品种特征退化^[12-13]。2014 年新颁布的《中国国家级畜禽遗传资源保护名录》中确定了岷县与贵德黑裘皮羊为国家级畜禽遗传资源保护品种^[14]。因此,岷县与贵德黑裘皮羊的种质资源合理利用及保护问题亟待解决。有不少学者利用 mtDNA 基因对绵羊群体进行研究,但针对多个 mtDNA 基因对绵羊群体进行研究的仍较少。因此,本研究针对我国西北地区的两个地方绵羊品种——岷县黑裘皮羊和贵德黑裘皮羊的

收稿日期:2021-06-05

基金项目:西北民族大学中央高校基本科研业务费项目(31920210143);西北民族大学本科生科研能力训练项目(XBMU21125);甘肃省教育厅高等学校创新能力提升项目(2020B-065);教育部动物医学生物工程专业创新团队(IRT-17R88)。

第一作者:韦落落(2000—),女,在读学士,专业为生物工程。E-mail:1766794463@qq.com。

通信作者:李铀(1984—),女,博士,副教授,硕导,从事分子生态与进化生物学研究。E-mail:284142549@xbmu.edu.cn。

Cytb、*COI*、*ND2*、*ND4* 四对线粒体基因进行测序分析及比较,旨在从分子水平对岷县及贵德黑裘皮羊的遗传多样性和系统进化进行研究,以期为岷县及贵德黑裘皮羊的种质资源合理利用及保护提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验于 2020 年在西北民族大学生命科学与工程学院分子实验室进行,本研究选用的样本均来源于西北民族大学生物医学研究中心的动物细胞保藏库,其中岷县黑裘皮共 6 只,样品来源地为甘肃省岷县,编号分别为 M1、M2、M3、M4、M5 和 M6;贵德黑裘皮羊共 5 只,样品来源地为青海省贵德县,编号分别为 G1、G2、G3、G4 和 G5。利用细胞复苏技术将采集到的细胞样本进行复苏培养。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 复苏后的细胞经传代培养,用通用型基因组 DNA 提取试剂盒方法进行基因组 DNA 的提取。对经过 Qubit4 核酸蛋白荧光定量仪检测浓度合适的 DNA 提取产物进行 PCR 扩增,扩增的基因为 *Cytb*、*COI*、*ND2*、*ND4* 基因。

1.2.2 PCR 扩增 利用 Genbank 中绵羊 mtDNA(序列号为 AF010406)全序列为基础,进行引物设计,扩增引物由宝生物工程(大连)公司合成。4 对分子标记所对应的引物序列及引物信息如表 1 所示。PCR 扩增体系共 25 μ L,其中上下游引物各 0.5 μ L(10 μ mol \cdot L⁻¹)、基因组 DNA 2 μ L、2 \times Pro Taq Master Mix 12.5 μ L、ddH₂O 9.5 μ L。*Cytb*、*ND2* 基因的 PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,(94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,54 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min)35 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min;*ND4*、*COI* 基因的 PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,(94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,58 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min)35 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物采用 1.4% 常规琼脂糖凝胶电泳进行检测,上样量为 4 μ L PCR 产物和 0.5 μ L Loading buffer,136 V 电泳 30 min 后于凝胶成像系统观察电泳条带,对扩增条带合适的产物进行回收并送至兰州天启基因生物科技有限公司进行测序。

1.2.3 数据处理 测序公司所返回的测序结果采用 Geneious11.0.4 (<http://www.geneious.com>)软件分别进行多重序列比对并进行人工校

正,得到 6 个样本的岷县黑裘皮羊 *Cytb*、*COI*、*ND2*、*ND4* 基因序列和 5 个样本的贵德黑裘皮羊的 *Cytb*、*ND2*、*ND4* 基因序列。将样本所得的各基因序列上传至 GanBank 上(表 2)。

表 1 PCR 引物序列信息

基因	引物序列(5'→3')	退火温度/ $^{\circ}$ C	序列长度/bp
<i>Cytb</i>	F: TGATCAACATCCGAAAAACC	54	994
	R: TTCGATGATGCTAGCTACTGG		
<i>COI</i>	F: ACAGTCGGAATAGACGTCGA	58	622
	R: GGTTCCTCAAATGTGTGGTATGG		
<i>ND2</i>	F: AACCCACGAGCCACAGAA	54	204
	R: CTGGGACTCAGAAGTGGAA		
<i>ND4</i>	F: GACTCCACCTCTGACTTCC	58	255
	R: TGAATGAGAATGGCAACA		

表 2 GanBank 上的样本序列信息

样本编号	中文名	基因	序列号
M2	岷县黑裘皮羊	<i>Cytb</i>	MZ388429
M5	岷县黑裘皮羊	<i>Cytb</i>	MZ388430
M6	岷县黑裘皮羊	<i>Cytb</i>	MZ388431
G1	贵德黑裘皮羊	<i>Cytb</i>	MZ388432
G2	贵德黑裘皮羊	<i>Cytb</i>	MZ388433
G3	贵德黑裘皮羊	<i>Cytb</i>	MZ388434
G4	贵德黑裘皮羊	<i>Cytb</i>	MZ388435
G5	贵德黑裘皮羊	<i>Cytb</i>	MZ388436
M2	岷县黑裘皮羊	<i>ND4</i>	MZ388437
M3	岷县黑裘皮羊	<i>ND4</i>	MZ388438
M5	岷县黑裘皮羊	<i>ND4</i>	MZ388439
M6	岷县黑裘皮羊	<i>ND4</i>	MZ388440
G1	贵德黑裘皮羊	<i>ND4</i>	MZ388441
G2	贵德黑裘皮羊	<i>ND4</i>	MZ388442
G3	贵德黑裘皮羊	<i>ND4</i>	MZ388443
G4	贵德黑裘皮羊	<i>ND4</i>	MZ388444
G5	贵德黑裘皮羊	<i>ND4</i>	MZ388445
M1	岷县黑裘皮羊	<i>ND2</i>	MZ388446
M2	岷县黑裘皮羊	<i>ND2</i>	MZ388447
M4	岷县黑裘皮羊	<i>ND2</i>	MZ388448
G1	贵德黑裘皮羊	<i>ND2</i>	MZ388449
G2	贵德黑裘皮羊	<i>ND2</i>	MZ388450
G3	贵德黑裘皮羊	<i>ND2</i>	MZ388451
G4	贵德黑裘皮羊	<i>ND2</i>	MZ388452
G5	贵德黑裘皮羊	<i>ND2</i>	MZ388453
M1	岷县黑裘皮羊	<i>COI</i>	MZ373334
M2	岷县黑裘皮羊	<i>COI</i>	MZ373335
M3	岷县黑裘皮羊	<i>COI</i>	MZ373336
M4	岷县黑裘皮羊	<i>COI</i>	MZ373333
M5	岷县黑裘皮羊	<i>COI</i>	MZ373331
M6	岷县黑裘皮羊	<i>COI</i>	MZ373332

在 GenBank 中下载由黄丽芬等^[15]发表的贵德黑裘皮羊的 *COI* 基因以及其他绵羊品种的 *Cytb*、*ND2*、*ND4*、*COI* 基因全部序列,所下载的绵羊信息如表 3 所示。在 Geneious11.0.4 中将各个基因所对应的样本序列进行裁剪,使其序列长度保持一致,为后续工作做好准备。将最终所得的各绵羊品种的 *Cytb*、*ND2*、*ND4* 以及 *COI* 基因序列应用 MEGA-X^[16] 软件进行系统进化树的

构建。结合各种进化树构建方法的特点,最终确定邻近法^[17] (Neighbor-Joiningmethod,NJ)、最大似然法^[18] (Maximum Likelihood method,ML)两种构建方法。将 11 个岷县及贵德黑裘皮羊样本的测序结果、岷县及贵德黑裘皮羊样本与其他绵羊品种所构建的系统进化树相结合,对岷县及贵德黑裘皮羊进行遗传多样性及系统发育方面的讨论。

表 3 GenBank 上已经发表的绵羊品种信息

中文名	英文名	序列号	中文名	英文名	序列号
奥兰羊	Aland	KF938342.1	兰州大尾羊	Lanzhoularge-tailed	KF938335.1
安迪羊	Andi	KF938340.1	罗布羊	Lop	KF938323.1
拜达拉克羊	Baidarak	KF938339.1	马泽克羊	Mazekh	KF938344.1
巴音布鲁克羊	Bayinbuluke	KF938331.1	山地卡帕提安	Mountain carpathian	KF938357.1
贾隆克羊	Djallonke	KF977845.1	奥帕里诺羊	Oparino	KF938352.1
芬兰绵羊	Finnsheep	KF938355.1	盘羊	Ovisammon	KT781689.1
嘎拉羊	Gala	KF938345.1	牛津羊	Oxford down	KF938359.1
甘肃藏羊	Gansu Tibetan	KP981379.1	普拉门卡羊	Pramenka	KF938347.1
贵德黑裘皮羊	Guide Black Fur	MZ229059.1	青海藏羊	Qinhai Tibetan	KF938325.1
贵德黑裘皮羊	Guide Black Fur	MZ229060.1	策勒黑羊	Qira Black	KF938326.1
贵德黑裘皮羊	Guide Black Fur	MZ229061.1	萨赫勒羊	Sahelian	KF977846.1
贵德黑裘皮羊	Guide Black Fur	MZ229062.1	苏尼特羊	Sunite	KF938317.1
贵德黑裘皮羊	Guide Black Fur	MZ229063.1	斯温亚尔卡羊	Swiniarka	KF938349.1
汉姆海姆达尼绵羊	HamM breed Hamdani	MF004244.1	滩羊	Tan	KF938336.1
汉中羊	Hanzhong	KF938329.1	塔什库尔干羊	Tashkurgan	KF938337.1
卡拉迪绵羊	KarM breed Karadi	MF004246.1	吐鲁番黑羊	Turfan Black	KF938324.1
井中羊	Jingzhong	KF938328.1	图申羊	Tushin	KF938343.1
凯努区格雷羊	Kainuu grey	KF938353.1	乌德穆尔特羊	Udmurtian	KF938341.1
卡拉柴羊	Karachai	KF938351.1	乌珠穆沁羊	Ujimqin	KF938319.1
卡拉库耳羊	Karakul	KF938348.1	维也纳绵羊	Viena	KF938356.1
哈萨克羊	Kazakh	KF938333.1	弗佐索卡羊	Wrzosowka	KF938350.1
吉尔吉斯羊	Kirghiz	KF938334.1	叶城羊	Yecheng	KF938338.1
库伦达羊	Kulunda	KF938358.1			

2 结果与分析

2.1 基因扩增及测序结果

对复苏后经传代培养的细胞进行基因组 DNA 的提取,以此为模板对 *Cytb*、*COI*、*ND2*、*ND4* 四对 mtDNA 基因进行 PCR 的扩增,琼脂糖凝胶电泳所得条带清晰明亮且与预期目标片段大小一致,随即送至兰州天启基因生物科技有限公司进行测序。所得测序数据经 Geneious11.0.4 进行人工拼接及校正,所得的岷县黑裘皮羊及贵德黑裘皮羊的 *Cytb* 基因序列长度为 994 bp 左右,该基因所包括的 9 个样本均未发现变异位点。

所得的岷县黑裘皮羊的 *COI* 基因序列长度为 622 bp 左右,该基因所包括的 6 个样本中,样本 M1 与样本 M4 存在 79 个变异位点,变异位点分布范围为 8~603 bp;样本 M3 在 504 bp 处发生单核苷酸变异,由碱基 G 突变为碱基 C。所得的岷县黑裘皮羊与贵德黑裘皮羊的 *ND2* 基因序列长度为 204 bp 左右,该基因包括的 8 个样本中,样本 M1 与样本 M4 存在 12 个变异位点,变异位点范围为 27~191 bp。所得的岷县黑裘皮羊与贵德黑裘皮羊的 *ND4* 基因序列长度为 255 bp 左右,该基因包含的 9 个样本中,样本 M2、M3、M5、

M6、G5 存在 2 个变异位点,位于 60 bp 处和 70 bp 处,均为碱基 T 突变成碱基 C。

2.2 系统进化分析

分子聚类关系在很大程度上反映了绵羊品种间亲缘关系的远近^[19]。根据各绵羊群体与本研究样本的 *Cytb*、*COI*、*ND2*、*ND4* 基因,以盘羊为外群,运用 MAGE-X 软件分别通过邻近法和最大似然法构建系统进化树。NJ 法与 ML 法构建进化树 Bootstrap 置信值均为重复抽样 1 000 次^[20]。

2.2.1 基于 *Cytb* 基因 利用邻近法基于 P-distance 模式构建 NJ 系统进化树。由图 1 可知,在

本研究所使用的岷县与贵德黑裘皮羊样本中,M2、M5、M6 与 G1、G2、G4、G5 之间的距离较近;G3 与 M2、M5、M6、G1、G2、G4、G5 距离较远,但仍属同一支。从整体来看,本研究所使用的 8 个样本与吉尔吉斯羊、青海藏羊、罗布羊、吐鲁番黑羊、乌珠穆沁羊等 13 个绵羊品种聚为一支;图申羊、井中羊、马泽克羊、卡拉迪绵羊、卡拉库耳羊等 25 个绵羊品种聚为一支,与研究所用样本距离较远;苏尼特羊单独聚为一支;盘羊为外群,与研究所用样本距离最远。

利用最大似然法基于 Hasegawa-Kishino-Yano 模型构建 ML 系统进化树。由图 2 可知,样本 M2、M5、M6 与样本 G1、G2、G3、G4、G5 距离较近,与汉姆海姆达尼绵羊、吉尔吉斯羊、青海藏羊、罗布羊、吐鲁番黑羊等 13 个国内外绵羊品种聚为一支;卡拉迪绵羊、马泽克羊、卡拉库耳羊、凯努区格雷羊、奥帕里诺羊等 25 个绵羊品种聚为一支;苏尼特羊单独聚为一支;盘羊为外群。

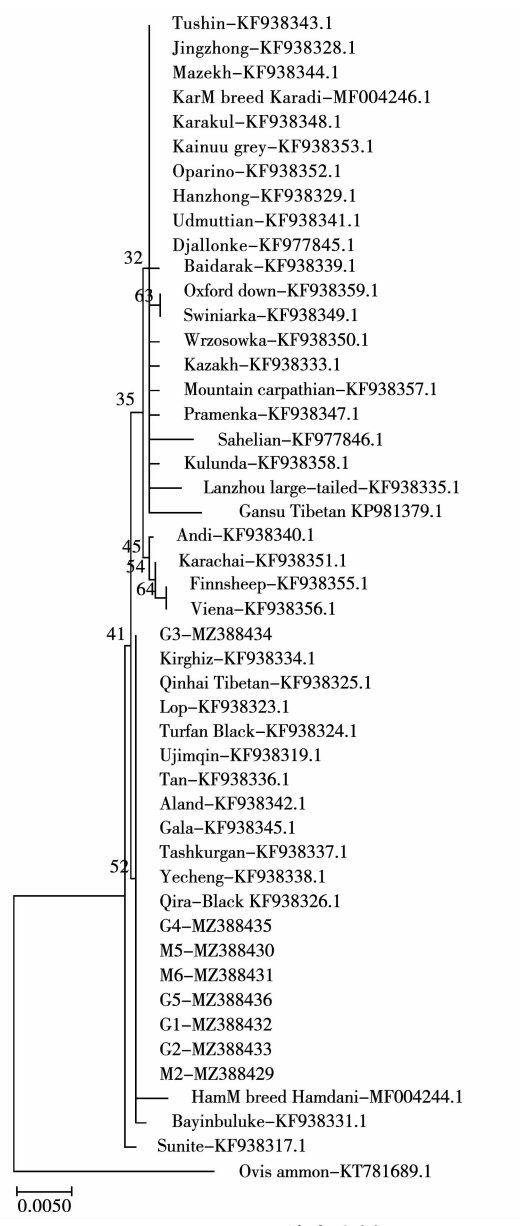


图 1 *Cytb*-NJ 系统发生树

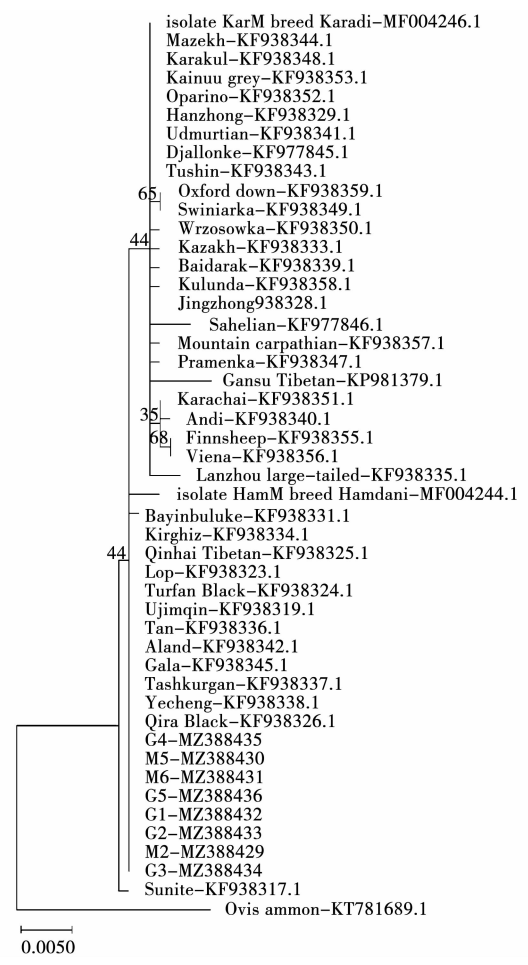


图 2 *Cytb*-ML 系统发生树

2.2.2 基于 COI 基因 利用邻近法基于 P-distance 模式构建 NJ 进化树。由图 3 可知,样本 M1 与样本 M4 距离较近;样本 M2、M3、M5、M6 聚为一支。从整体来看,样本 M1、M4 单独聚为一支;样本 M2、M3、M5、M6 与贵德黑裘皮羊等 5 个样本及汉姆海姆达尼绵羊、叶城羊、乌珠穆沁羊、吐鲁番黑羊、塔什库尔干羊等 14 个国内外绵羊聚为一支;甘肃藏羊、芬兰绵羊、维也纳绵羊、卡拉迪绵羊和安迪羊等 24 个国内外绵羊品种聚为一支;兰州大尾羊单独聚为一支;盘羊为外群。

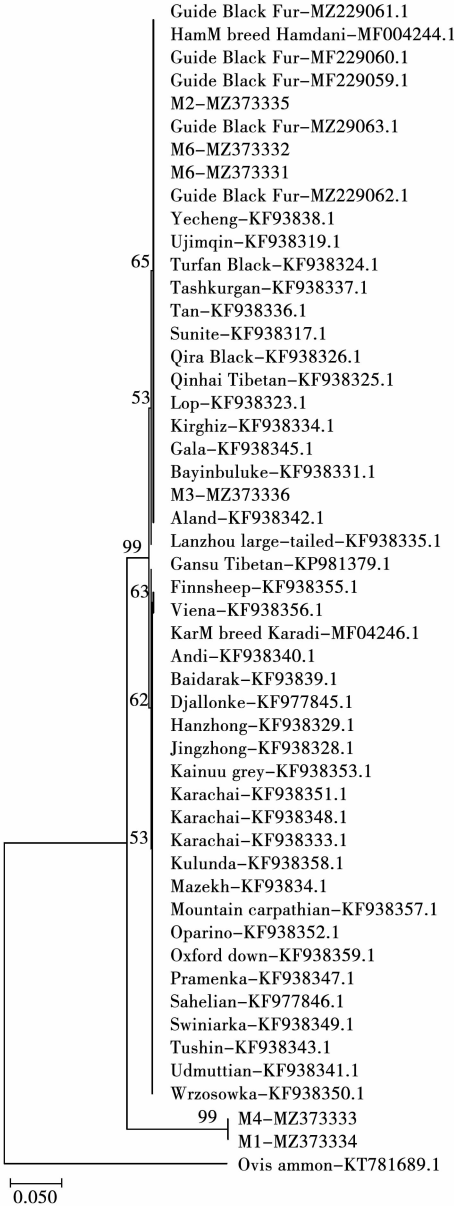


图 3 COI-NJ 系统发生树

利用最大似然法基于 Tamura3-Parameter 模式构建 ML 系统进化树。由图 4 可知,样本 M1 与样本 M4 单独聚为一支;样本 M3 与样本 M2、M5、M6 存在一定距离,但仍属同一支。M2、M3、M5、M6 等 4 个样本与贵德黑裘皮羊等 5 个样本及汉姆海姆达尼绵羊、叶城羊、乌珠穆沁羊、鲁番黑羊、塔什库尔干羊等 14 个国内外绵羊聚为一支;甘肃藏羊、芬兰绵羊、维也纳绵羊、卡拉迪绵羊和安迪羊等 24 个国内外绵羊品种聚为一支;兰州大尾羊仍单独聚为一支;盘羊为外群。

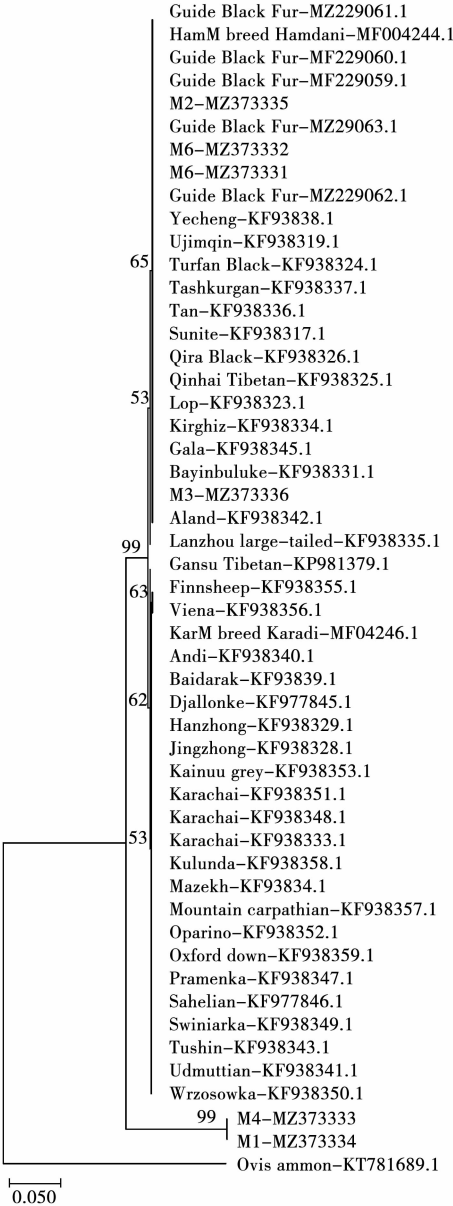


图 4 COI-ML 系统发生树

2.2.3 基于 *ND2* 基因 利用邻近法基于 P-distance 模式构建 NJ 系统进化树。由图 5 可知,样本 M1 与样本 M4 聚为一支。样本 M2、G1、G2、G3、G4、G5 聚在一起,且与滩羊、兰州大尾羊、汉姆海姆达尼绵羊、叶城羊、吐鲁番黑羊等 12 个国内外绵羊品种聚为一支;贾隆克羊、乌德穆尔特羊、库伦达羊、卡拉迪绵羊、普拉门卡羊等 24 个国内外绵羊聚为一支;乌珠穆沁羊、策勒黑羊、青海藏羊聚为一支;盘羊为外群,单独聚为一支,与上述绵羊品种距离最远。

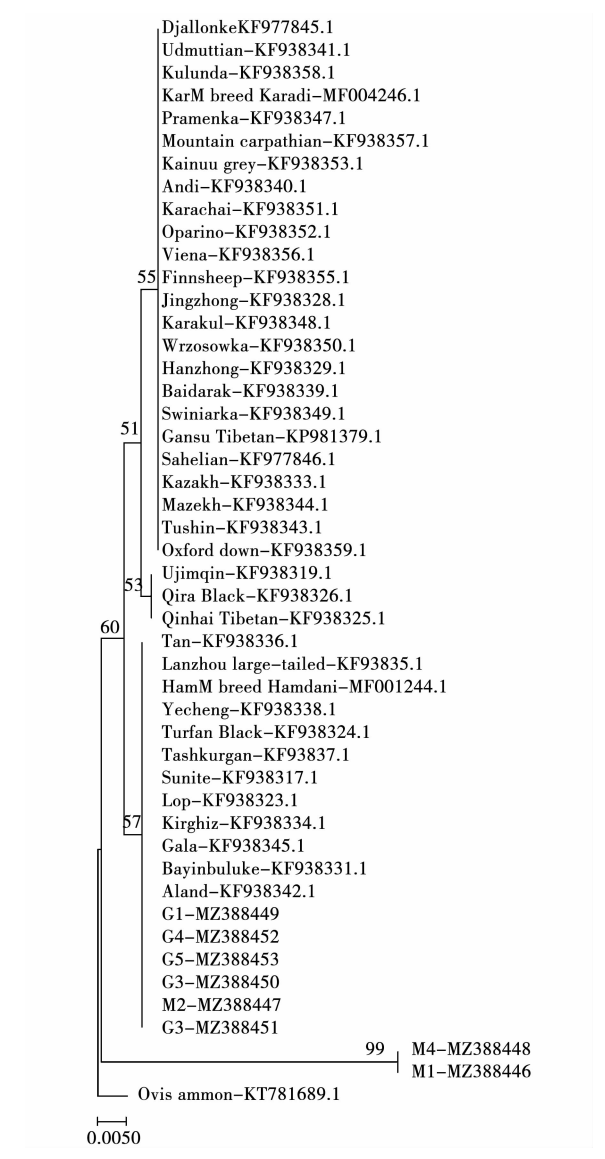


图 5 *ND2*-NJ 系统发生树

利用最大似然法基于 Hasegawa-Kishino-Yano 模式构建 ML 系统进化树。由图 6 可知,样

本 M1 与样本 M4 聚在一起;样本 M2、G2、G3、G4、G5 聚在一起;G1 与样本 M2、G2、G3、G4、G5 距离较远,但仍属同一支;芬兰绵羊、维也纳绵羊、井中羊、卡拉库耳羊、弗佐索卡羊等 27 个国内外绵羊聚为一支;乌珠穆沁羊、策勒黑羊、青海藏羊聚为一支;盘羊为外群。

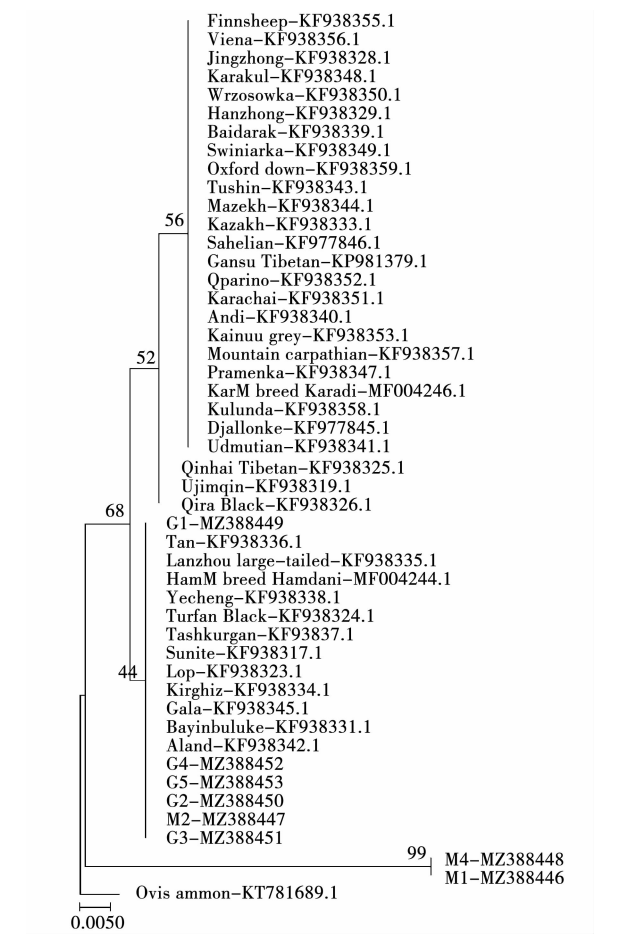


图 6 *ND2*-ML 系统发生树

2.2.4 基于 *ND4* 基因 利用邻近法基于 P-distance 模式构建 NJ 系统进化树。由图 7 可知,样本 M2、M3、M5、M6 与 G5 首先聚在一起;样本 G1、G2、G3 与 G4 聚在一起;样本 M2、M3、M5、M6、G5 与样本 G1、G2、G3、G4 距离较远;上述 9 个样本与吐鲁番黑羊、罗布羊、乌珠穆沁羊、青海藏羊、奥兰羊等 13 个绵羊品种聚为一支;兰州大尾羊、滩羊、哈萨克羊、图申羊、马泽克羊、安迪羊等 24 个绵羊品种聚为一支;乌德穆尔特羊与库伦达羊聚为一支;盘羊为外群,单独聚为一支。

利用最大似然法基于 Kimura 2-parameter 模型构建 ML 系统进化树。由图 8 可知,样本 M2、M3、M5、M6 与 G5 首先聚在一起,且位于进化树的基部;样本 G1、G2、G3、G4 聚在一起,与样本 M2、M3、M5、M6、G5 距离较远,但仍属同一支。整体来说,ND4 基因所包含的 9 个样本与吐鲁番黑羊、罗布羊、乌珠穆沁羊、青海藏羊、奥兰羊等 13 个绵羊品种聚为一支;兰州大尾羊、滩羊、哈萨克羊、图申羊、马泽克羊、安迪羊等 24 个绵羊品种聚为一支;乌德穆尔特羊与库伦达羊聚为一支;盘羊仍为外群,与所有的绵羊品种距离最远。

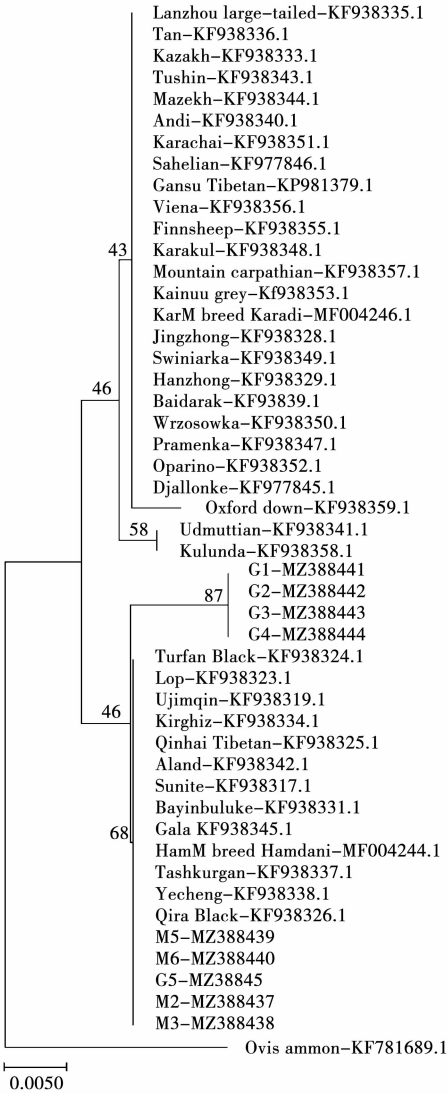


图 7 ND4-NJ 系统发生树

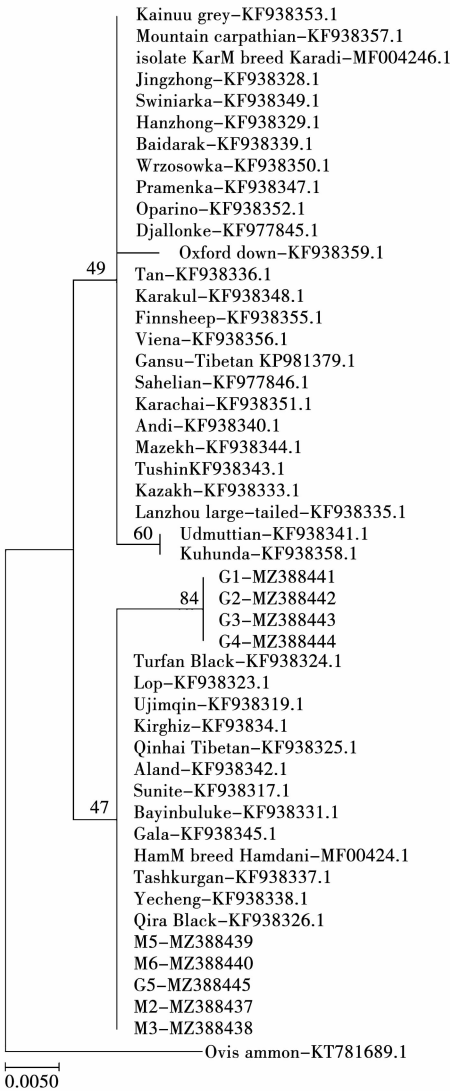


图 8 ND4-ML 系统发生树

3 讨论

本研究基于 4 对基因对 6 个岷县黑裘皮羊样本和 5 个贵德黑裘皮羊样本以及从 GenBank 中下载的 40 个国内外绵羊品种进行系统发育分析。测序结果表明,Cytb 基因序列与 ND4 基因序列在本研究所用样本中相对保守,进化速率慢;COI 基因序列与 ND2 基因序列在本研究所用样本中(以样本 M1、M4 为主)突变位点多,进化速率快、保守性小。除了样本 M1、M4 外,其他样本在各个基因序列中突变情况较少。出现这样的情况,除了 COI 和 ND4 这两对基因本身的进化速率快的原因外,本研究认为是样本 M1 和 M4 受到较大的外来基因流的影响的原因。对于所构建的系统发生树,不论是邻近法还是最大似然法,结

果均存在较高的一致性。*Cytb* 基因:由结果可以初步判断 M2、M5、M6、G1、G2、G3、G4、G5 等 8 个样本之间亲缘关系较近,且与吉尔吉斯羊、青海藏羊、罗布羊、吐鲁番黑羊、乌珠穆沁羊等 13 个国内外绵羊品种聚为一支,表明它们亲缘关系较为密切,可能存在一定基因流。*COI* 基因:由结果可推断,样本 M1 与样本 M4 聚为一支,亲缘关系较为密切,且与其他绵羊品种均较远,推测 M1 与 M4 受到外来基因流的影响较大导致其分化严重;样本 M3 与样本 M2、M5、M6 存在一定距离,亲缘关系较远;样本 M2、M5、M6 之间距离较近,亲缘关系也较近;样本 M2、M3、M5、M6 与贵德黑裘皮羊等 5 个样本及汉姆海姆达尼绵羊、叶城羊、乌珠穆沁羊、吐鲁番黑羊、塔什库尔干羊等 14 个国内外绵羊聚为一支,表明它们距离较近;推测可能的原因是 *COI* 基因所包含的 6 个样本与上述 5 只贵德黑裘皮羊及 14 个国内外绵羊品种存在一定程度的基因流。*ND2* 基因:由结果可以看出,样本 M1 与样本 M4 距离最近,亲缘关系较为密切;样本 M2、G1、G2、G3、G4、G5 聚在一起,其中样本 M2 为岷县黑裘皮羊,说明该样本与贵德黑裘皮羊之间可能存在一定的基因流,使得样本 M2 与贵德黑裘皮羊亲缘关系较为近,而与其他岷县黑裘皮羊样本距离较远;样本 M2、G1、G2、G3、G4、G5 与滩羊、兰州大尾羊、汉姆海姆达尼绵羊、叶城羊、吐鲁番黑羊等 12 个国内外绵羊品种同属一支,表明它们关系较为密切,可能存在基因流。*ND4* 基因:从结果可以看出,样本 M2、M3、M5、M6、G5 的亲缘关系较近,其中样本 M2、M3、M5、M6 为岷县黑裘皮羊,样本 G5 为贵德黑裘皮羊;出现此结果的原因可能是样本 G5 与岷县黑裘皮羊之间存在较为一定的杂交现象。样本 G1、G2、G3、G4 的亲缘关系较近,与样本 M2、M3、M5、M6、G5 的亲缘关系较远;M2、M3、M5、M6 与 G1、G2、G3、G4、G5 等 9 个样本与吐鲁番黑羊、罗布羊、乌珠穆沁羊、青海藏羊、奥兰羊等 13 个绵羊品种之间亲缘关系较为密切,表明它们之间存在一定的基因流。基于 4 对基因所构建的进化树可以看出,研究所用的岷县与贵德黑裘皮羊的部分样本与国内外绵羊品种存在不同程度的基因交流现象;岷县黑裘皮羊与贵德黑裘皮羊之间也存在一定的基因交流。

4 结论

本研究所用样本的测序结果与所构建进化树的结果基本一致。结果表明,岷县黑裘皮羊与贵德黑裘皮羊之间、岷县黑裘皮羊与国内外绵羊品种之间以及贵德黑裘皮羊与国内外绵羊品种之间均存在一定的基因流,且样本 M1 与 M4 受到外来杂交品种基因的冲击较大,导致这两个样本的变异程度较大,与其他样本亲缘关系较远。综上所述,岷县黑裘皮羊与贵德黑裘皮羊保种工作的首要任务便是避免这两个绵羊品种与其他绵羊品种进行杂交;其次,还应加强这两个绵羊品种的提纯工作。本研究利用 *Cytb*、*COI*、*ND2*、*ND4* 四对基因对岷县黑裘皮羊与贵德黑裘皮羊进行遗传多样性与系统进化的研究,但这还不够系统与全面。在未来的研究方向里,可以利用更多基因及方法,从个体形态学水平到 DNA 的各个水平上对这两个绵羊品种的遗传多样性与系统进化关系进行更详细的研究,从而为岷县黑裘皮羊与贵德黑裘皮羊的种质资源保护提出更科学有效的方法。

参考文献:

- [1] 郎侠,吕潇潇.岷县黑裘皮羊群体遗传结构的微卫星 DNA 多态性分析[J].黑龙江畜牧兽医,2010(17):49-52.
- [2] 刘伯河,王成强,张广.岷县黑裘皮羊生产方式调查[J].甘肃畜牧兽医,2018(4):38-39.
- [3] 秦红林,白雅琴,张广,等.岷县黑裘皮羊裘皮品质研究[J].畜牧兽医杂志,2019,38(1):19-21,25.
- [4] 郭春兰.贵德黑裘皮羊品种资源动态调查[J].中国草食动物,2004(3):58-59.
- [5] 孙梅.青海贵德黑裘皮羊生产性能测定[J].青海畜牧兽医杂志,2009,39(2):13-14.
- [6] 孙占青,孙彧,雅文海,等.青海贵德黑藏羊羊毛品质分析[J].青海畜牧兽医杂志,2007(3):4-5.
- [7] 兰蓉,洪琼花,高源汉,等.云南绵羊线粒体 DNA 遗传多态性研究[J].遗传,1998(1):20-23.
- [8] 涂世英,宋娜娜,柴志欣,等.中甸牦牛 mtDNA *Cytb* 基因遗传多样性及系统进化分析[J].中国畜牧兽医,2016,43(10):2680-2687.
- [9] 任晓晓,贺兴江,龚雪阳,等.基于 *COI* 基因序列的蜜蜂属系统发育分析及其舞蹈和筑巢行为进化分析[J].昆虫学报,2018(12):1453-1461.
- [10] 郑德育,郭易佳,杨天燕,等.基于线粒体 *ND2* 基因序列的少鳞鳉遗传多样性研究[J].南方水产科学,2019,15(5):84-91.
- [11] 马丽娜,马吉隆,杨炜迪,等.线粒体 DNA *ND4* 基因在绵羊群体中的多态性研究[J].黑龙江畜牧兽医,2013(15):51-52,193.
- [12] 张瑞.岷县黑裘皮羊微卫星多样性与生产性状的关联分析[D].兰州:甘肃农业大学,2019.
- [13] 张海瑾.贵德黑裘皮羊品种资源保护利用与发展对策[J].

- 养殖与饲料,2018(6):43-46.
- [14] 中国国家级畜禽遗传资源保护名录[J]. 浙江畜牧兽医, 2020(3):30,34.
- [15] 黄丽芬,韦落落,田思思,等. 贵德黑裘皮羊 mtDNA COI 基因系统进化分析[J]. 现代畜牧兽医,2021(3):6-9.
- [16] SUDHIR K, GLEN S, LI M, et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms [J]. Molecular Biology & Evolution, 2018(6):6.
- [17] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4):406-425.
- [18] 吕宝忠. 分子进化树的构建[J]. 动物学研究, 1993(2): 186-193.
- [19] 李祥龙, 张增利, 巩元芳, 等. 我国主要地方绵羊品种遗传亲缘关系[J]. 中国兽医学报, 2004(5):508-511.
- [20] FELSENSTEIN J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap[J]. Evolution, 1985, 39(4): 783-791.

Study and Protection of Genetic Diversity and Phylogeny of Minxian and Guide Black Fur Sheep

WEI Luo-luo¹, DUAN Yun-bo¹, TIAN Si-si¹, HUANG Li-fen¹, CHEN Tian-ying¹, LI You^{1,2}

(1. College of Life Science and Engineering, Northwest University for Nationalities, Lanzhou 730100, China; 2. Biomedical Research Center, Northwest University for Nationalities/Gansu Animal Cell Technology Innovation Center, Lanzhou 730030, China)

Abstract: In order to strengthen the rational utilization and protection of germplasm resources of Minxian black fur sheep and Guide black fur sheep, PCR amplification and sequence analysis of *Cytb*, *COI*, *ND2* and *ND4* mitochondrial gene sequences of mitochondrial DNA of 6 Minxian black fur sheep samples and 5 Guide black fur sheep samples were carried out. The results showed that there were certain gene flows between Minxian black fur sheep and Guide black fur sheep, between Minxian black fur sheep and domestic and foreign sheep breeds, and between Guide black fur sheep and domestic and foreign sheep breeds. Among them, samples M1 and M4 of Minxian black fur sheep were greatly impacted by the genes of foreign hybrids. Based on the above results, the suggestions for the conservation of Minxian and Guide black fur sheep are as follows: first, avoid gene flow between Minxian and Guide black fur sheep and other sheep breeds; Second, strengthen the variety purification of Minxian and Guide black fur sheep.

Keywords: Minxian black fur sheep; Guide black fur sheep; genetic diversity; phylogeny

(上接第 45 页)

Isolation and Identification of Pathogen Causing Passion Fruit Rot in Yulin, Guangxi

MA Wen-juan¹, LIANG Xiang-dong², LIU Yue-lian³

(1. Soil and Fertilizer Station of Yulin, Yulin 537800, China; 2. The Government of Dapingshan Town, Xingye County, Yulin 537800, China; 3. Binhai Agricultural College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: In April 2020, a serious fruit rot occurred in a passion fruit (*Passiflora edulis*) planting area in Yulin, Guangxi, with an incidence of about 20%, which seriously affected the yield and quality of fruit. In order to identify the pathogen of fruit rot, three strains were obtained by tissue isolation and identified by pathogenicity, morphological and molecular biological characteristics. The results of pathogenicity test showed that all the isolated strains could cause fruit rot of *P. edulis*, and the symptoms were similar to those of the field. The characteristics of colony and conidia of the strains were consistent with those of the description of *Alternaria alternata*. The sequences of the ITS showed 100% similarity to the type strain CBS 479.90 (*A. alternata*). Therefore, the pathogen of passion fruit rot was identified as *A. alternata*. This is the first report of *A. alternata* causing passion fruit rot in Yulin, Guangxi.

Keywords: *Passiflora edulis*; *Alternaria alternata*; pathogen identification