



融水小型猪线粒体 DNA 结构和系统进化的分析

徐嘉悦¹, 施赫赫^{2,3}, 王绪敏¹, 高翔⁴, 余细勇⁵, 于军¹, 唐小江²

(1. 中国科学院北京基因研究所, 北京 100101; 2. 广东省医学实验动物中心, 广东 佛山 528248;

3. 广东贝格生物科技有限公司, 广东 佛山 528100; 4. 南京大学模式动物研究所, 南京 210061;

5. 广东省医学科学院, 广州 510060)

【摘要】 目的 研究融水小型猪的线粒体 DNA 结构和系统进化关系。**方法** 选取了全基因组鸟枪法的测序策略对融水小型猪的外周血液样本进行测序, 使用 Illumina 基因组分析测序技术构建 paired-end 文库进行末端测序, 最后进行拼接及分析。**结果** 融水小型猪的完整线粒体序列呈环形, 总长为 16888 bp, 由 13 个编码蛋白基因、22 个转运 RNA 和两个核糖体 RNA 构成。线粒体 DNA 的 GC 含量约为 44 %。系统进化分析、遗传多样性分析和中性检验证明了, 在融水小型猪、兰屿猪、海南野猪和滇南 7 号这一类群中, 发生了种群扩张。**结论** 融水小型猪是中国传统猪种中比兰屿猪更为古老的小型猪。

【关键词】 融水小型猪; 线粒体 DNA; 系统进化分析; 遗传多样性

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 03-0028-07

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2015. 003. 06

Genomic and phylogenetic analysis of porcine mitochondrial genomes of Rongshui miniature pig

XU Jia-yue¹, SHI He-he^{2, 3}, WANG Xu-min¹, GAO Xiang⁴, YU Xi-yong⁵, YU Jun¹, TANG Xiao-jiang²

(1. Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

2. Guangdong Medical Laboratory Animal Center, Guangdong Foshan 528248, China;

3. Beige BioTec Co., Ltd., Guangdong Foshan 528100, China; 4. Model Animal Research Center of Nanjing University, Nanjing 210061, China; 5. Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510060, China)

【Abstract】 Objective Assembly whole mitochondrial genome sequence of Rongshui miniature pig (RMP) breed and analysis the structure of mitochondrion based on the next-generation sequencing method. Comparison of phylogenetic relationship and genetic diversity among different pig breeds. **Methods** We collected peripheral venous blood sample from RMP and constructed two paired-end sequencing libraries. A whole-genome shotgun sequencing strategy and Illumina Genome Analyser sequencing technology were used in our study. **Results** The mitochondrial genome of RMP consists of 13 protein coding genes, 2 ribosomal RNA genes, 22 transfer RNA genes and the length of pig is 16888 bp. The GC content of this pig mitochondrial genome is about 44 %. Based on phlogenetic analysis, population genetic analysis, our findings confirmed that the ancestral cluster in East Asia mainly occurred among Diannan 7# pig, Hainan wild boar, Lanyu

【基金项目】 国家重大研究计划项目(2011CB944101); 国家自然科学基金重点项目(81120108003; 81330007)。

【作者简介】 徐嘉悦(1988 -), 女, 博士生, 研究方向: 医用小型猪和小鼠系统组学数据整合, 基因组学, 生物信息学; 施赫赫(1985 -), 男, 硕士, 技术员, 研究方向: 实验用小型猪。两者为共同第一作者。

【通讯作者】 唐小江(1967 -), 男, 博士, 研究方向: 实验动物与疾病动物模型、毒理学。E-mail: river-t@126.com。共同通讯作者: 王绪敏(1977 -), 男, 博士, 研究方向: 猪基因组学, wangxm@big.ac.cn。

and RMP. **Conclusion** RMP, a typical miniature pig breed in China, is an earlier ancestor than Lanyu pig breed.

【Key words】 Rongshui miniature pig (RMP); Mitochondrial genome; Phylogenetic analysis; Genetic diversity

融水小型猪是源自广西苗寨的小黑猪,具有体型微小、性情温驯、产仔力强、母性较好等特点,具备培育成标准化实验用小型猪的有利特点。我们于 2012 年将该猪种源引到广东三水繁育,建立了基础种群和的系谱档案,已繁殖出 F1 代和 F2 代,参照北京市地方标准^[1]初步建立了融水小型猪的质量控制标准。为了进一步掌握其遗传背景,本文对线粒体 DNA 进行了分析。

1 材料和方法

1.1 样本的收集和 DNA 的提取

融水小型猪由广东贝格生物科技有限公司(广东省医学实验动物中心小型猪基地)提供。用无菌肝素钠抗凝采血管取融水小型猪外周静脉血 10 mL,用 Qiagen 公司的 QIAamp DNA 试剂盒按操作说明书提取 DNA。

1.2 序列的测序和组装

采用全基因组鸟枪法的测序策略,使用 Illumina 基因组分析测序技术进行测序研究。为了提高组装的质量,对融水小型猪选取了插入片段大小为 300 bp 和 500 bp 的 paired-end 文库进行末端测序,用基于 Bruijn 图算法^[2]的 SOAPdenovo 软件(<http://soap.genomeics.org.cn>)对测序得到的短片段进行拼接组装^[3-4],得到融水小型猪的完整线粒体 DNA 序列。

1.3 线粒体 DNA 的注释和分析

为了确定融水小型猪的线粒体结构,首先以 *Sus scrofa* 的线粒体序列为参考序列,采用 BLAST 软件^[4]完成了 *Sus scrofa* 与融水小型猪的比对,确定线粒体的编码蛋白基因、rRNA 和 tRNA,用软件 CodonW 对编码蛋白基因的密码子使用情况进行统计。另外用 tRNAscan-SE v. 1.21 软件^[5]对线粒体 tRNA 的二级结构及各个 tRNA 的反义密码子进行预测。用 clustal W^[6]软件将融水小型猪的编码蛋白区序列与 GenBank 中的 15 头国内外的猪线粒体编码蛋白区序列(表 1)进行比对。

用 DnaSP5.10^[7]软件计算实验材料的单倍型、遗传多样性和遗传分化的相关数值^[8]。基于以上的单倍型聚类的分类,采用 Tajima's D^[9]和 Fu's s^[10]两个中性检验模型对 16 个猪的单倍型分布进行中性检验,其中种群遗传格局及变异的检测在

Arkequin3.11^[11]中实施。使用分子变异分析(AMOVA)的方法以 10000 次重复随机抽样单倍型重排后进行显著性检验,以此来评价种群遗传变异水平与种群地理位置的相关性,使用统计量将遗传差异分为 3 个不同层次的地理等级。用 Network 4.6(<http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>)对 16 个猪种进行聚类,并用 MEGA 5.0^[12]的最大似然法和邻接法对 16 个猪种的编码蛋白区进行系统进化分析。

2 结果

2.1 融水小型猪线粒体结构

融水小型猪与其他猪的结构框架相同,都是由 13 个编码蛋白,22 个 tRNA 和 2 个 rRNA 组成(表 2)。线粒体全长为 16888 bp。线粒体 DNA 的核苷酸组成为 A > C > T > G。线粒体的 GC 含量总是低于 AT 含量。

2.2 编码蛋白基因

融水小型猪由 13 个基因构成,除基因 ND6 位于线粒体的轻链上之外,其余 12 个基因包括 ND1、ND2、ND3、ND4、ND4L、ND5、COX1、COX2、COX3、CYTB、ATP6、ATP8 都在线粒体的重链(表 2)。这 13 个基因的总长为 11255 bp,其中基因 ATP6 和基因 ATP8 有 42 bp 的重叠区域,基因 ND4L 和基因 ND4 有 7 bp 的重叠区域,基因 ND5 和基因 ND6 有 17 bp 的重叠区域。位于融水小型猪重链的 12 个编码蛋白基因的碱基组分为 A > C > T > G,其中 ND1、ATP6、COX3、ND3、ND4、ND5、ND2、CYTB 8 个基因的碱基组份是一致的:A > C > T > G,而基因 COX1、COX2、ATP8、ND4L 的碱基组份为 A > T > C > G;另外,位于融水小型猪轻链的 ND6 基因的碱基组份为 C > A > T > G。

2.3 非编码蛋白区域:D-loop 控制区和基因间区

在拼接的融水小型猪线粒体中,D-loop 区的长度为 1254 bp, tRNA-Pro 和 tRNA-Phe 排布于 D-loop 区的两端。在 D-loop 区碱基组份为 A > C > T > G,与线粒体 DNA 一致,AT 的含量高于 GC 含量。此外,融水小型猪线粒体 DNA 中非编码的基因间区长度为 654 bp,这些基因间区的主要原因是线粒体中 tRNA 簇的重排。其中最长的基因间区是位于 ND1 和 tRNA 之间的区域,长为 139 bp。基因间区为高级别的系统进化研究提供了可能。

表 1 15 个猪种线粒体 DNA 的基本信息及其在 NCBI 数据库中的检索号

Tab.1 List of mitochondrial genome sequences of Swine breeds and their accession numbers as retrieved from NCBI database

物种名称 Species	线粒体长度 (bp) Mitochondrial length	物种所在地区 Species area	检索号 Number of retrieval
欧洲伯克希尔猪 (European Berkshire pig)	16,876	英国,伯克希尔	AY574045
杜洛克猪 (Duroc pig)	16,905	英国	AY337045
汉普郡猪 (Hampshire pig)	16,865	英国,约克郡	AY74046
意大利野猪 (Italy wild boar)	16,302	意大利	AF304201
济州 10#猪 (Jeju 10# pig)	17,014	韩国,济州	AY574048
济州 8#猪 (Jeju 8# pig)	17,014	韩国,济州	NC000845
韩国野猪 (South Korean wild boar)	16,973	韩国	DQ334860
长白猪 (Landrace pig)	16,921	英国	DQ334861
兰屿猪 (Lanyu pig)	17,071	中国,台湾地区	AY574047
苏塞克斯家养猪 (Sussex domestic pig)	17,095	欧洲	DQ518915
台湾地区野猪 (Taiwan wild boar)	16,802	中国,台湾地区	NC012095
苏塞克斯猪 (Sussex pig)	16,923	欧洲	NC014692
梅山猪 (Meishan pig)	16,998	中国,江苏	AF486855
海南野猪 (Hainan wild boar)	16,690	中国,海南	EF545572
滇南 7 号 (Diannan 7# pig)	16,690	中国,云南	EF545576

表 2 融水小型猪线粒体 DNA 的结构特征

Tab.2 Location of feature in the mitochondrial DNA of Rongshui miniature pig

基因/区域 Gene/ Region	区域位置 regional location		长度 (bp) Length (bp)	密码子 Codon		反义密码子 Antisense codon	所在链 Chain
	起始位置 Starting location	终止位置 Termination location		起始密码子 Start codon	终止密码子 Termination codon		
tRNA-Pro	746	809	63			ACC	L
tRNA-Thr	810	877	67			ACA	H
CYTB	878	2017	1139	ATG	GAG		H
tRNA-Glu	2022	2090	68			AAC	L
ND6	2091	2618	528	ATG	TAA		L
ND5	2602	4422	1820	ATA	TAA		H
tRNA-Leu2	4423	4492	69			AUU	H
tRNA-Ser	4493	4551	58			UGA	H
tRNA-His	4552	4620	68			CAC	H
ND4	4621	5998	1377	ATG	T –		H
ND4L	5992	6288	296	GTG	TAA		H
tRNA-Arg	6289	6357	68			AAG	H
ND3	6359	6704	345	ATA	TA –		H
tRNA-Gly	6705	6773	68			AGG	H
COX3	6774	7557	783	ATG	TA –		L
ATP6	7557	8237	680	ATG	TAA		H
ATP8	8195	8398	203	ATG	TAA		H
tRNA-Lys	8400	8466	66			AAA	H
COX2	8467	9154	687	ATG	T –		H
tRNA-Asp	9155	9222	67			CAG	H
tRNA-Sec	9228	9298	70			UCN	L
COX1	9302	10846	1544	ATG	TAA		H
tRNA-Tyr	10848	10913	65			CAU	L
tRNA-Cys	10913	10978	65			CGU	L
tRNA-Asn	11011	11085	74			CAA	L
tRNA-Ala	11087	11154	67			ACG	L
tRNA-Trp	11161	11228	67			AGU	H
tRNA-Gln	11227	11297	70			AAC	L
ND2	11348	12267	919	ATT	TAG		H
tRNA-Met	12271	12340	69			GUA	H
ND1	12479	13435	956	ATG	TAG		H
tRNA-Leu	13438	13512	74			AUC	H
16S-rRNA	13513	15025	1512				H
tRNA-Val	15083	15150	67			AUG	H
12s-rRNA	15151	16110	959				H
tRNA-Phe	16111	16180	69			CUU	H

2.4 核糖体 RNA

线粒体中包括两个核糖体 RNA, 分别为 12S rRNA and 16S rRNA(表 1), 12S rRNA 的长度为 959 bp, 16S rRNA 的长度为 1512 bp。16S rRNA 编码于缬氨酸和亮氨酸之间, 其碱基组份为 A > T > C > G; 12S rRNA 编码于丙氨酸和缬氨酸之间, 其碱基组份为 A > C > T > G。12S rRNA 和 16S rRNA 的 GC 含量均在 40 % 左右, 同样保持了 GC 含量低于 AT 含量这一特点。

2.5 转运 RNA

对融水小型猪线粒体, 我们预测了其 22 个转运 RNA 的二级结构, 并确定了各转运 RNA 的反义密码子(如表 2 所示)。这 22 个转运 RNA 的 GC 含量都低于 AT 含量, 其中精氨酸的 GC 含量最低, 约 21 %; 甲硫氨酸的 GC 含量最高, 约 47 %。

融水小型猪线粒体 DNA 的密码子使用情况(表 3)。包括终止密码子在内, 共有 3772 个密码子, 其中使用密码子 CUA 的数目最多, 为 306 个, 而 AGG 和 CGG 两个密码子没有被使用。在密码子的统计中, 密码子第一位核苷酸使用的频率为 A > C > T > G; 而在密码子第二位置, 碱基使用频率为 T > C > A > G; 在密码子的第三个位置, 碱基使用频率为 A > C > U > G。众所周知, 密码子在不同位置使用频率的差异是由于密码子使用的偏好性造成的, 上述的密码子使用情况也为研究线粒体 DNA 的进化提供了有用的信息^[13]。

2.6 同义突变和非同义突变

同义突变和非同义突变之间的比例(Ka/Ks 值)可用于分析不同物种之间的系统进化关系^[14]。通过对 16 个猪 13 个编码蛋白区的所有序列进行比对, 构建了一个参考序列(Ref), 分别计算每头猪的各个编码蛋白基因序列与 Ref 的 Ka/Ks 比值。结果如封 2 图 1 所示, 16 个猪种在编码蛋白区的 Ka/KS 值均小于 1, 说明所有 13 个编码蛋白基因都在承受着正选择, 其中基因 COX1 的选择压力最大, 这意味着该基因正在承受着很强的纯化选择; 而 ND5 的选择压力相对较小, 说明该基因是在进化中舍弃一些较为不利的突变。

2.7 系统进化分析

使用 MEGA 软件中的 Kimura's two-parameter 模型(K2P)计算 16 个猪种的编码蛋白区的遗传距离。融水小型猪与其他猪的遗传距离最远, 碱基的平均遗传距离为 1.141。而对总体的遗传距离统计

中, 物种间以恒定速率进行核苷酸替换的标准差仅为 0.0015。基于上述遗传距离矩阵, 通过 MEGA 软件中的最大似然法和邻接法对 16 头猪的编码蛋白区构建系统进化树(图 2), 从图 2 可以看出, 16 个猪种可以分成四个类群, 即欧洲群(E 群)、亚洲 1 群(A1 群)、亚洲 2 群(A2 群)、亚洲 3 群(A3 群)。其中, E 群主要是由欧洲猪种组成, 其中意大利的野猪是相对古老的猪种; A1 群是由中国、日本、韩国等亚洲猪种及 Berkshire 猪共同组成, 在这一分支中, 也可以证明猪的进化是由亚洲起源后分化到欧洲的^[15]; A2 群是由滇南 7 号、海南野猪和兰屿猪构成, 这一结论也验证了之前的研究, 即云南猪种和台湾地区兰屿猪是古老的猪种^[15]。在系统进化分析中最值得关注的是融水小型猪, 可以看出他比兰屿猪更为古老。

2.8 线粒体序列的单倍型分析及中性检验

系统进化分析是对过去已经发生的进化时间的模拟分析, 为了验证系统进化分析结果的准确性, 用单倍型的方法, 对 16 个猪种的进化关系做了进一步分析。用 Dnasp5.10^[7] 分析 16 个猪种的线粒体 DNA 的编码区序列, 共得到 14 个单倍型, 但单倍型的多样性指数为 0.596。将分析后的单倍型数据利用 Network 软件作图(封 2 图 3)。14 个单倍型可以分成 3 大类: 汉普郡猪、苏塞克斯家养猪、长白猪、苏塞克斯猪、杜洛克猪、意大利野猪、欧洲伯克希尔猪、聚为一类(类群 1); 济州 8#猪、济州 10#猪、韩国野猪、梅山猪和台湾地区野猪聚为一类(类群 2); 兰屿猪、滇南 7 号猪、海南野猪、融水小型猪聚为一类(类群 3; 其中类群 1 主要是欧洲猪种, 类群 2 主要以亚洲的韩国和台湾地区猪种为主, 类群 3 主要是中国 4 头古老的猪种。可以看出 Network 作图结果与系统进化分析的结果大致是一致的, 这也进一步验证了融水小型猪是一个非常古老的猪种。

基于单倍型的分析结果, 分别对 3 个类群进行了中性检验(如表 4)。类群 3 不但具有较高的单倍型多样性($h=0.899$), 也具有较高的核苷酸多样性($Pi=0.03417$), 表明类群 3 中的猪种仍具有丰富的遗传多样性, 存在着较高的进化潜力。对于类群 1 和类群 2, 单倍型多样性较高, 但是核苷酸多样性很低。说明这两个类群的猪种经历过近期扩张或者进化历史很短^[17]。本研究中类群 1 和类群 3 的 Tajima's D 与 F_s 值为负值且差异显著, 这表明类群 1 和类群 3 中的猪种在历史上都发生了种群扩张。

表 3 融水小型猪密码子
Tab.3 Codon usage for Rongshui miniature pig

密码子类型 Codon types	个数 Number	密码子类型 Codon types	个数 Number	密码子类型 Codon types	个数 Number	密码子类型 Codon types	个数 Number
UUU(F)	84	UCU(S)	31	GCA(A)	117	UGU(C)	9
UUC(F)	142	UCC(S)	75	GCG(A)	3	UGC(C)	17
UUA(L)	89	UCA(S)	119	UAU(Y)	62	UGA(W)	99
UUG(L)	15	UCG(S)	1	UAC(Y)	78	UGG(W)	4
CUU(L)	50	AGU(S)	11	CAU(H)	24	CGU(R)	6
CUC(L)	68	AGC(S)	45	CAC(H)	78	CGA(R)	48
CUA(L)	306	CCU(P)	37	CAA(Q)	83	CGC(R)	11
CUG(L)	39	CCC(P)	59	CAG(Q)	2	CGG(R)	0
AUU(I)	153	CCA(P)	94	AAU(N)	48	GGU(G)	32
AUC(I)	182	CCG(P)	2	AAC(N)	111	GGA(G)	107
AUA(M)	218	ACU(T)	54	AAA(K)	90	GGG(G)	20
AUG(M)	40	ACC(T)	88	AAG(K)	8	GGC(G)	50
GUU(V)	30	ACA(T)	172	GAU(D)	20	UAA(*)	7
GUC(V)	20	ACG(T)	6	GAC(D)	46	UAG(*)	1
GUA(V)	111	GCU(A)	45	GAA(E)	86	AGA(*)	1
GUG(V)	13	GCC(A)	91	GAG(E)	14	AGG(*)	0

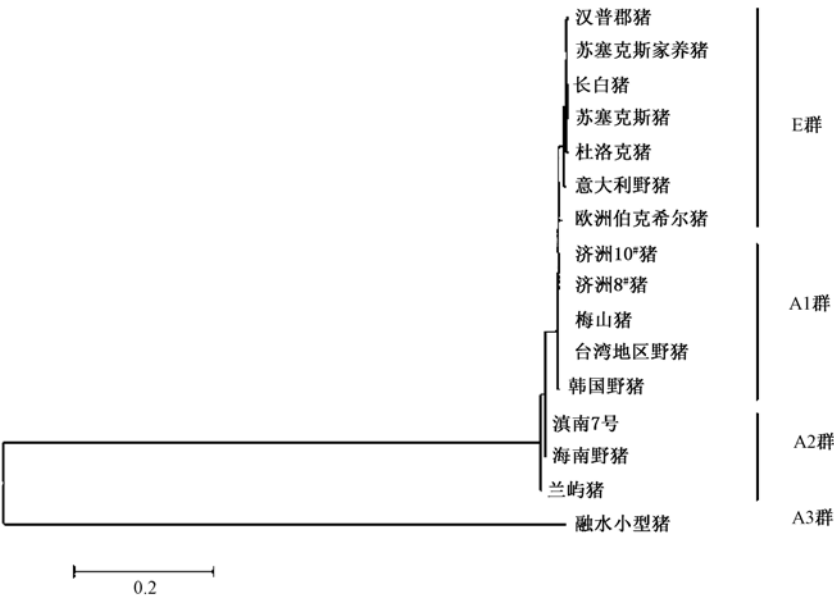


图 2 16 个猪种的系统进化分析(最大似然法和邻接法)
Fig.2 The phylogenetic analysis of 16 pig breeds(NJ, ML analyses)

表 4 对 16 个猪种编码蛋白基因的中性检验和遗传多样性分析

Tab.4 Neutrality test and genetic diversity for main haplogroups in coding region for 16 swine mitochondrial genomes

类群 Group	类群 1 Group 1	类群 2 Group 2	类群 3 Group 3
单倍型数目 Number of Haplotype	7	4	4
样本数目 Number of samples	7	5	4
多态性位点个数(S)Number of polymorphic loci (S)	277	311	192
核苷酸差异均值(k)Nucleotide difference in mean (k)	39.7	62.2	84
单倍型多样性(h)Haplotype diversity (h)	1 ± 0.00251	0.913 ± 0.01287	0.899 ± 0.0002
核苷酸多样性(Pi)Nucleotide diversity (Pi)	0.00273 ± 0.00013	0.00496 ± 0.01481	0.03417 ± 0.0002
Tajima's D 检验值 Tajima's D test value	-0.794	-1.2111	-0.566293
显著性统计 Significant Statistics	*, P < 0.05	Not significant, P>0.1	*, P < 0.05
Fu's Fs 检验值 Fu's Fs test value	-1.6544	2.211	-1.29789
显著性统计 Significant Statistics	*, P < 0.05	Not significant, P>0.1	*, P < 0.05

3 讨论

线粒体 DNA 存在于细胞质线粒体基质中的闭合环状双链超螺旋 DNA 分子,是独立于细胞核染色体外的基因组,具有自我复制、转录和编码功能,是母系遗传,但同时受核 DNA 的控制^[2]。与核 DNA 相比,线粒体 DNA 具有分子结构简单,以母性方式遗传,核苷酸歧义大,进化速度快等特点。因此,使用线粒体研究哺乳动物群体遗传多样性和种内、种间亲缘关系等,一直受到很多学者的关注^[15,18-20]。本研究采用新一代测序技术,对融水小型猪进行测序分析,拼接成完整的线粒体 DNA 序列,从分子遗传学角度评估了融水小型猪的结构质特性、系统进化关系及其遗传多样性。为融水小型猪的实验动物化提供科学依据。

随着新一代测序技术的发展,越来越多的学者对哺乳动物遗传机制的研究不再仅仅停留在核 DNA 水平上,而是更多的综合细胞质 DNA 进行分析。线粒体 DNA 结构简单、稳定,是母系遗传方式,在遗传过程中未曾发生重组。

本文使用新一代测序技术,用 Illumina 测序平台对融水小型猪进行从头测序,使用 SOAPdenovo 拼接成完整线粒体序列并进行注释。融水小型猪的线粒体 DNA 成环形,总长为 16888 bp,由 13 个基因,22 个 tRNA 和 2 个 rRNA 组成。其中 GC 的平均含量约为 44 %。线粒体的 GC 含量总是低于 AT 含量,这一结论与其他物种一致,如人的 GC 含量为 44.4 %^[21],小鼠的 GC 含量为 26.6 %^[22]。本文结合公共数据库发布的 15 个猪种线粒体序列,以线粒体的编码蛋白区为研究对象,对猪种的遗传多样性进行了研究,进而对猪种的起源和进化进行探讨。从系统进化分析中我们可以得出,融水小型猪在系统进化树中成为一个新的独立外群,我们认为融水小型猪是一个古老于兰屿猪的传统中国猪种。为了进一步验证这个结论,我们对系统进化树中的三个类群进行了遗传多样性分析,Network 的结果与系统进化分析的结果是吻合的。由滇南 7 号、海南野猪、兰屿猪和融水小型猪构成的类群 3 中有 4 个单倍型,其具有较高的单倍型多样性和核苷酸多样性显示出类群 3 具有丰富的遗传多样性。

Tajin a's D 与 Fu's Fs 中性检验常用以推测种群扩张的历史事件。如果 Tajin a's D 与 Fs 值呈负值,且在统计学上达到显著标准,则说明序列中含

有比中性进化模型中更多的核苷位点变化,可能预示着该种群曾经有过扩张的历史。融水小型猪的 Tajin a's D 与 Fs 值为负值且差异显著,说明了类群 3 的古老猪种在长期进化过程中还在与其他的猪种还在发生基因交流和种群扩张。

另外,在系统进化分析时,兰屿猪、滇南 7 号猪、海南野猪与融水小型猪分成了不同的分支,而在 Network 分析中成为一个类群,出现这种现象的原因可能是融水小型猪在长期的进化过程中,发生了基因交流。中性检验的结果不但从统计水平上验证了融水小型猪在猪线粒体发展中的祖先地位,而且还解释了融水小型猪作为祖先猪种是如何与其他猪种发生基因流和种群扩张的。遗传多样性分析进一步提示融水小型猪是中国传统猪种中一种古老的小型猪。

本文对融水小型猪 DNA 进行了初步的分析,限于篇幅和 GenBank 的数据,未与哥廷根小型猪、西藏小型猪、巴马小型猪等其他实验用小型猪的线粒体 DNA 进行比较,有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 北京市质量技术监督局. 实验用小型猪:微生物学等级及监测 DB11T 828.1 - 2011 [S]; 寄生虫学等级及监测 DB11T 828.2 - 2011 [S]; 遗传质量控制 DB11T 828.3 - 2011 [S]; 病理学诊断规范 DB11T 828.4 - 2011 [S]; 配合饲料 DB11T 828.5 - 2011 [S]; 环境及设施 DB11T 828.6 - 2011 [S], 2011 - 11 - 10 发布, 2012 - 03 - 01 实施。
- [2] Pevzner, P. A., H. Tang, M. S. Waterman, An Eulerian path approach to DNA fragment assembly [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(17): 74 - 85.
- [3] Angiero and Natalie. , Pigs Prove to Be Smart, if Not Vain. The New York Times, 2009.
- [4] Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., et al., Basic local alignment search tool [J]. J Mol Biol, 1990, 215(3): 403 - 410.
- [5] Lowe, T. M. S. R. Eddy, tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence [J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(5): 95 - 98.
- [6] Thompson, J. D., D. G. Higgins, T. J. Gibson, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. Nucleic Acids Res, 1994, 22(22): 73 - 80.
- [7] Rozas, J., Sanchez-DelBarrio, J. C., Messeguer, X., et al., DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods [J]. Bioinformatics, 2003, 19(18): 49 - 67.
- [8] Kimura, M., Molecular evolutionary clock and the neutral theory [J]. J Mol Evol, 1987, 26(1-2): 24 - 33.

- [9] Tajima, F., Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism [J]. *Genetics*, 1989, 123 (3): 58–63.
- [10] Fu, Y. X., Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection [J]. *Genetics*, 1997, 147(2): 91–105.
- [11] Excoffier L., L. L., Schneider S., Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis [J]. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 2005, 1: 47–50.
- [12] 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.* 28(10): 73–91.
- [13] Dubey, B., Meganathan P. R., Haque I., DNA mini-barcoding: an approach for forensic identification of some endangered Indian snake species [J]. *Forensic Sci Int Genet*, 5 (3): 18–24.
- [14] Yang, Z. R. Nielsen, Estimating synonymous and nonsynonymous substitution rates under realistic evolutionary models [J]. *Mol Biol Evol*, 2000, 17(1): 32–43.
- [15] Chen, Huang, H. L., Yang H. Y., *et al.* Mitochondrial genome of Taiwan pig (*Sus scrofa*) [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2011, 10(13): 2556–2561.
- [16] Wu, G. S., Yao, Y. G., Qu, K. X., *et al.*, Population phylogenomic analysis of mitochondrial DNA in wild boars and domestic pigs revealed multiple domestication events in East Asia [J]. *Genome Biol*, 2007, 8(11): 245–253.
- [17] Fernandez, A. I., Alves, E., Ovilo, C., *et al.*, Divergence time estimates of East Asian and European pigs based on multiple near complete mitochondrial DNA sequences [J]. *Anim Genet*, 42(1): 86–88.
- [18] Kijas, J. M. Andersson L., A phylogenetic study of the origin of the domestic pig estimated from the near-complete mtDNA genome [J]. *J Mol Evol*, 2001, 52(3): 302–8.
- [19] Fernandez, A. I., Alves, E., Ovilo, C., *et al.*, Divergence time estimates of East Asian and European pigs based on multiple near complete mitochondrial DNA sequences [J]. *Anim Genet*, 42(1): 86–89.
- [20] Yang, S., Zhang, H., Mao, H., *et al.*, The local origin of the Tibetan pig and additional insights into the origin of Asian pigs [J]. *PLoS One*, 6(12): 218–215.
- [21] Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., *et al.*, Sequence and organization of the human mitochondrial genome [J]. *Nature*, 1981, 290(5806): 45–65.
- [22] Bibb, M. J., Van Etten, R. A., Wright, C. T., *et al.*, Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA [J]. *Cell*, 1981, 26(2 Pt 2): 67–80.

[修回日期]2015-03-03