

研究报告

Research Report

近交系小型猪线粒体基因组分析和家猪系统进化关系分析

高也凡 陈笑寒 邹辉 郭亚芬 黄艳娜 蒋钦杨*

广西大学动物科学技术学院, 南宁, 530004

* 通信作者, jiangqinyang@126.com

摘要 广西巴马小型猪是长期近交培育而成的实验小型猪, 遗传稳定。本研究拟通过线粒体基因组 (mitochondrial DNA, mtDNA) 分析来了解近交系的遗传背景, 并从 mtDNA 角度进一步认识中国本土猪种的系统进化关系。实验设计 29 对特异性引物, PCR 扩增和产物测序, 拼接出广西巴马小型猪近交系 7 个世代猪的 mtDNA 序列; 用 42 个品种猪的 mtDNA D-loop 区和基因编码区序列分布构建系统进化树。结果表明, 广西巴马小型猪的 mtDNA 大小为 16 761 bp, 碱基组成、基因结构与其他猪种相似; 近交系 7 个世代个体 mtDNA 发现有 46 个碱基差异位点, 变异率为 0.28%, mtDNA 序列同源性在 99.9% 以上, 表明该近交系母源单一; 基于 mtDNA 序列构建的系统进化树不能清晰地区分地方品种猪之间的遗传关系。研究结果进一步表明广西巴马小型猪近交系的遗传背景单一, 中国本土品种猪的母系关系复杂。

关键词 广西巴马小型猪近交系; 线粒体基因组; 系统进化

Analysis of Inbred Miniature Pig Mitochondrial Genome and Phylogenetic Study of Domestic Pigs

Gao Yefan Chen Xiaohan Zou Hui Guo Yafen Huang Yanna Jiang Qinyang*

College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning, 530004

* Corresponding author, jiangqinyang@126.com

DOI: 10.13417/j.gab.040.000531

Abstract Guangxi Bama miniature pig is a kind of experimental miniature pig cultivated by long-term inbreeding and is genetically stable. This study intends to understand the genetic background of inbred line through mitochondrial genome (mitochondrial DNA, mtDNA) analysis, and further understand the phylogenetic relationship of local pig breeds from mtDNA. This experiment designed 29 pairs of specific primers, and used PCR amplification and product sequencing to splice out mtDNA sequences of 7 generations of Bama miniature pig inbred lines; the phylogenetic trees were constructed with the mtDNA D-loop region and gene coding region sequence of 42 breeds pigs. The results showed that the mtDNA size of Bama miniature pig was 16 761 bp, its base composition and gene structure were similar to those of other pig breeds. There were 46 base difference sites found in the mtDNA of seven generations of inbred line, and the base mutation rate was 0.28%. The mtDNA sequence homology was above 99.9%, indicating that the maternal source of the inbred line was single. The phylogenetic tree constructed based on the mtDNA sequence could not clearly distinguish the genetic relationship among the local breed pigs. These results further indicated that the genetic background of Bama miniature pig inbred line was single, and the maternal relationship of the Chinese pigs was complicated.

Keywords Guangxi Bama miniature pig; Mitochondrial genome; Phylogenetic

基金项目: 本研究由广西大学“大学生创新创业计划”项目(201610593253)资助

引用格式: Gao Y.F., Chen X.H., Zou H., Guo Y.F., Huang Y.N., and Jiang Q.Y., 2021, Analysis of inbred miniature pig mitochondrial genome and phylogenetic study of domestic pigs, *Jiyinzuxue yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 40(2): 531-540. (高也凡, 陈笑寒, 邹辉, 郭亚芬, 黄艳娜, 蒋钦杨, 2021, 近交系小型猪线粒体基因组分析和家猪系统进化关系分析, *基因组学与应用生物学*, 40(2): 531-540.)

世界上最早的家猪遗骸挖掘发现在西南亚的“新月地区”，如土耳其东南部的 Cayonu 和 NevaliCori 等古遗址，距今约九千年(李相运, 1998); 中国最早的家猪发现于约 8 200~8 000 年前的内蒙古赤峰兴隆洼遗址、河北省武安磁山遗址以及浙江萧山跨湖桥遗址(Joris et al., 1999; 袁靖, 2006)。基因组DNA序列是研究物种进化关系的重要载体，位于细胞质中的线粒体是细胞的“动力工厂”，合成生物能量物质三磷酸腺苷(ATP)。线粒体DNA(mtDNA)的基因排列紧密，结构相对稳定，编码效率高，具有相对恒定的信息量；严格的母系遗传，具有遗传自主性，突变率相对较高，存在个体序列差异(于萍等, 2014)。有性生殖过程，子代的线粒体通常来源于母系卵母细胞中线粒体，父系精子鞭毛上的线粒体不进入卵母细胞或者发生侵入胚胎后期父源性线粒体的破坏(Sutovsky et al., 1999; Wolff and Gemmell, 2008)。根据这一生物特性，mtDNA 已经被广泛用于研究动物和人类的母系起源，例如家猪、家犬的起源和分化(Vilà et al., 1997; 胡耀武等, 2008)。

广西巴马小型猪是在巴马香猪的基础上，通过纯繁闭锁繁育而形成的实验用小型猪品系，现有两个亚系：(1)封闭群(A系)，主要采用群内随机交配方式；(2)近交系(B系)，在第10世代封闭群的基础上开展连续的全同胞近交交配。广西巴马小型猪的遗传稳定性高，体型相对较小，已经广泛用于生物医学研究(王爱德等, 1991; 1995; 2010)。本实验研究通过测定广西巴马小型猪近交系7个世代个体线粒体基因组序列，研究近交对mtDNA变异的影响以及进一步证明近交系的遗传纯度，并构建中国主要猪品种的系统进化树，以了解猪的起源分化情况，为家猪的遗传育种工作提供基础理论知识。

1 结果与分析

1.1 广西巴马小型猪线粒体基因组组成与结构分析

将PCR产物的测序结果进行序列拼接，结果显示(图1)：广西巴马小型猪线粒体基因组序列全长为16 761 bp，包含22个tRNA基因，2个rRNA基因(12S rRNA和16S rRNA)，13个蛋白质编码基因，1个D-loop控制区和1个L链复制起始区，广西巴马小型猪mtDNA结构与其他哺乳动物的mtDNA相似。广西巴马小型猪mtDNA提交GenBank的登录号为MK688993。

广西巴马小型猪mtDNA的碱基组成为A 34.7%、

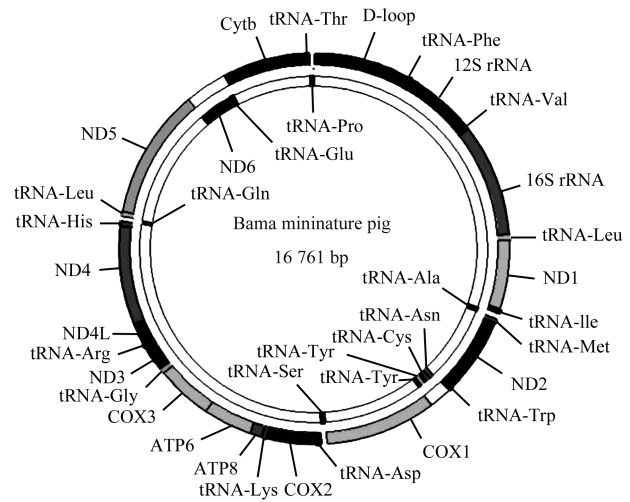


图1 广西巴马小型猪线粒体结构

Figure 1 mtDNA structure of Guangxi Bama miniature pig

G 13.3%、C 26.2%、T 25.8%。广西巴马小型猪mtDNA 13个蛋白质编码基因的AT偏好性为0~0.35，其中ND6最高，COX1最低，GC偏好性均为负值，表明小型猪mtDNA中各基因碱基组成AT含量高于GC含量，这与其他哺乳动物的相似(表1)。广西巴马小型猪的13个蛋白编码基因中存在基因重叠和终止密码子不全的现象，其中ND6基因位于轻链上(表2)。广西巴马小型猪线粒体DNA在基因数目、种类及各基因排列顺序都与其他猪种的一致(图1)。

1.2 广西巴马小型猪近交系7个世代mtDNA序列分析

对广西巴马小型猪近交系7个世代的mtDNA序列进行了比对分析，世代之间的序列同源性和99.9%以上(图2)；共发现了46个多态位点，变异系数为0.3%，其中：10个A/G转换、1个G/A转换、2个A/C颠换、3个A/T颠换、10个T/A颠换、5个C/T转换、4个T/C转换、4个C/G颠换、5个T/G颠换、1个C/A颠换；变异位点主要分布已列出(表3)。mtDNA序列比对分析表明，广西巴马小型猪近交系的母系来源单一，基因纯度高。

1.3 不同品种猪系统进化关系分析

采用42个不同品种猪mtDNA D-loop区和编码基因序列构建系统进化树(图3)。mtDNA D-loop区(Displacement loop region)是线粒体DNA中的一段非编码区，进化速度较快，是线粒体DNA序列和长度变异最大的区域。mtDNA编码区编码2种rRNA(12S和16S)，22种tRNA，13种多肽。基于两种序列构建的系统进化树均显示，3个外来猪种杜洛克猪

表 1 各部分核酸组成比例及密码子偏好性

Table 1 Nucleic acid composition ratios and codon preference for each part

基因 Gene	核酸所占比例(%) Percentage of nucleic acid (%)				AT 偏好性 AT bias	GC 偏好性 GC bias
	A	T	C	G		
	<i>ND1</i>	32.8	25.2	29.5		
<i>ND2</i>	39.1	23.9	27.5	9.5	0.24	-0.49
<i>COX1</i>	29.3	29.2	24.9	16.7	0.00	-0.20
<i>COX2</i>	34.5	27.3	25.0	13.2	0.12	-0.31
<i>ATP8</i>	40.7	27.0	25.0	7.3	0.20	-0.55
<i>ATP6</i>	33.8	27.2	28.5	10.6	0.11	-0.46
<i>COX3</i>	29.5	26.7	29.0	14.9	0.05	-0.32
<i>ND3</i>	35.3	25.4	29.2	10.1	0.16	-0.49
<i>ND4L</i>	31.6	31.0	24.9	12.5	0.01	-0.33
<i>ND4</i>	34.4	26.1	29.6	9.9	0.14	-0.50
<i>ND5</i>	35.2	26.0	28.4	10.4	0.15	-0.46
<i>ND6</i>	44.7	21.6	26.3	7.4	0.35	-0.56
<i>Cytb</i>	31.7	26.0	29.0	13.2	0.10	-0.37
<i>mtDNA</i>	34.7	25.8	26.2	13.4	0.15	-0.32

注: AT 偏好性=(A% T%)/(A%+T%); GC 偏好性=(G% C%)/(G%+C%)

Note: AT bias=(A% T%)/(A%+T%); GC bias=(G% C%)/(G%+C%)

(Duroc)、汉普夏猪(Hampshire)、皮特兰猪(Pietrain)聚为一类,区别于国内地方品种猪;而国内地方品种的进化关系在两种系统进化树中表现得并不一致,且不符合地理种群分布,表明国内猪种之间的血缘关系复杂,各猪种之间存在母源交流。

2 讨论

线粒体是位于细胞质中的细胞器,为细胞活动提供能量。线粒体中含有多拷贝的线粒体 DNA, mtDNA 能自主复制,分子量较小,哺乳动物 mtDNA 大约在 15~17 kb (Yakubovskaya et al., 2005)。本研究获得广西巴马小型猪 mtDNA 大小为 16 761 bp,与已公布的猪 mtDNA 相似(表 5)。动物线粒体为共价闭合双链 DNA,通常由 37 个基因片段组成,包含 13 个编码蛋白质的基因,部分基因之间存在序列重叠、终止密码子不全等特征(Jemt et al., 2011)。广西巴马小型猪 mtDNA 的基因组成、大小及其特征均与其他动物的相似。

近亲繁殖引起遗传多样性的丧失和有害等位基因的积累,降低动物的适应能力(Woolliams et al., 1983; Frankham and Ralls, 1998; Madaule et al., 1998)。适当

的近交能清除有害的等位基因,使得有益基因纯合(Machugh et al., 1994; Manotti-Raymond and O'brien, 1995; Goodman, 1998; Lacy and Ballou, 1998)。例如,高度近交三百多年(67 世代)的 Northumbrian 牛 Chillingham 群体,微卫星表明其基因纯度非常高,但具有很好的繁殖能力,近交使群体累积了大量有益基因,检测发现大于 10%的扩张群体具有相同的 mtDNA。广西巴马小型猪近交系是在巴马香猪基础群封闭繁育 10 代的基础上,通过全同胞近交培育形成,已经近交培育 18 世代。本研究对广西巴马小型猪现存栏的 7 个世代 (F11, F12, F14, F15, F16, F17, F18) 近交系猪的 mtDNA 进行测序和比对分析,发现它们之间有 46 个位点的差异,变异率仅为 0.3%。变异位点主要分布在 *D-loop*、*12S rRNA*、*16S rRNA*、*ND2*、*COX1*、*ATP6*、*ND5*、*ND6*、*Cytb* 等 9 个基因序列上,其中 *COX1*、*D-loop*、*ND5* 的碱基变异数位列前三;各个世代近交系猪的 mtDNA 序列之间的同源性在 99.9%以上,世代之间的差异率不足 0.1%,表明广西巴马小型猪近交系保持了单一的母本遗传,基因纯合度高。研究结果符合线粒体严格的母系遗传这一特性,有性生殖过程中,后代线粒体主要来源于卵母细胞(Anderson, 1992; Delsuc et al., 2003)。

线粒体 DNA 的进化速度高于细胞核 DNA,且遵循严格的母系遗传,是研究动物母系起源的理想载体。家猪主要起源于欧亚大陆,在欧洲和亚洲有多个独立的驯化中心。Larson 等(2005)分析了世界范围内的 686 个野猪和家猪个体的 *D-loop* 区序列,结合野猪的地理分布,认为家猪的起源在欧亚大陆,有多个独立的驯化中心。前人通过对部分欧洲和亚洲猪种 *D-loop* 区序列进行分析,验证了家猪的欧洲和亚洲是两个独立的驯化中心的观点,且在欧洲猪群中发现的亚洲猪的单倍型,认为欧亚猪种经历过数量扩张(Fang and Andersson, 2006)。Luetkemeier 等(2010)通过对欧洲、亚洲的 8 个家猪品种和野猪的 21 个微卫星标记和线粒体 *D-loop* 区进行研究,认为亚洲家猪由多个祖先起源演化而来,而欧洲家猪起源于一个祖先血统。中国本土猪品种资源丰富,分布范围广,早期根据体型外貌和地理分布,将地方猪品种归类于华北型、华南型、华中型、江海型、西南型和高原型共六大类型。近年来的研究发现,采用分子系统进化方法不能有效地区分各地理分布的猪品种或种群(张冬杰等, 2015)。本研究也发现采用 mtDNA *D-loop* 区和编码基因序列构建的系统进化树不一致,由 *D-loop* 区构建而成的进化树显示中国本土品

表2 广西巴马小型猪 mtDNA 基因组成

Table 2 mtDNA gene composition of Guangxi Bama miniature pig

基因 Gene	起始位置(bp) Start position (bp)	终止位置(bp) Terminate position (bp)	长度(bp) Length (bp)	起始密码子 Start codon	终止密码子 Stop codon	所在链 Location chain	间隔(+)/重叠(-) Interval (+)/overlap (-)
D-loop	1	1 325	1 325				/
tRNA-Phe	1 326	1 395	70			H	0
12S rRNA	1 396	2 356	961			H	0
tRNA-Val	2 357	2 424	68			H	0
16S rRNA	2 425	3 994	1 570			H	0
tRNA-Leu	3 995	4 069	75			H	0
ND1	4 072	5 026	955	ATG	T--	H	2
tRNA-Ile	5 027	5 095	69			H	0
tRNA-Gln	5 093	5 165	73			L	-3
tRNA-Met	5 167	5 236	70			H	1
ND2	5 237	6 278	1 042	ATA	T--	H	0
tRNA-Trp	6 279	6 346	68			H	0
tRNA-Ala	6 353	6 420	68			L	6
tRNA-Asn	6 422	6 496	75			L	1
tRNA-Cys	6 529	6 594	66			L	32
tRNA-Tyr	6 594	6 659	66			L	-1
COX1	6 661	8 205	1 545	ATG	TAA	L	1
tRNA-Ser	8 209	8 279	71			H	3
tRNA-Asp	8 285	8 352	68			L	5
COX2	8 353	9 040	688	ATG	T--	H	0
tRNA-Lys	9 041	9 107	67			H	0
ATP8	9 109	9 312	204	ATG	TAA	H	1
ATP6	9 270	9 950	681	ATG	TAA	H	-43
COX3	9 950	10 733	784	ATG	T--	H	-1
tRNA-Gly	10 734	10 802	69			H	0
ND3	10 803	11 148	346	ATA	T--	H	0
tRNA-Arg	11 150	11 218	69			H	1
ND4L	11 219	11 515	297	GTG	TAA	H	0
ND4	11 509	12 886	1 378	ATG	T--	H	-7
tRNA-His	12 887	12 955	69			H	0
tRNA-Ser	12 956	13 014	59			H	0
tRNA-Leu	13 015	13 084	70			H	0
ND5	13 085	14 905	1 821	ATA	TAA	H	0
ND6	14 889	15 416	528	ATG	TAA	L	-17
tRNA-Glu	15 417	15 485	69			L	0
Cytb	15 490	16 629	1 140	ATG	AGA	H	4
tRNA-Thr	16 630	16 697	68			H	0
tRNA-Pro	16 698	16 761	64			L	0

种猪祖先可能为盆周山地猪, 而编码基因序列构建的系统进化树显示中国本土品种猪祖先可能为大围子猪, 表现为对中国本土品种猪的聚类和地理上划分的结果不能统一, 可能原因是, 中国家猪因跟随人类的迁徙, 家猪之间血液交流频繁, 血缘关系复杂。

3 材料与方法

3.1 样品采集

本研究所用的广西巴马小型猪的血样采自广西大学广西巴马小型猪原种场。从近交系 F11、F12、

	1	2	3	4	5	6	7		
差异性 Difference	1	99.9	99.9	99.9	100.0	99.9	100.0	1	F11
	2	0.1	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	2	F12
	3	0.0	0.1	99.9	99.9	99.9	99.9	3	F14
	4	0.1	0.1	0.1	99.9	99.9	99.9	4	F15
	5	0.0	0.1	0.0	0.1	99.9	99.9	5	F16
	6	0.1	0.1	0.1	0.1	99.9	99.9	6	F17
	7	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1	99.9	7	F18
		1	2	3	4	5	6	7	
	同源性 Homology								

图2 广西巴马小型猪7个世代 mtDNA 同源性比对

Figure 2 Comparison of 7 generation mtDNA homology in Guangxi Bama miniature pigs

F14、F15、F16、F17、F18 共 7 个世代中各选 2 头小型猪的前腔静脉采集血液 2.0 mL, 抗凝 4 °C 保存备用。TIANGEN 血液基因组总 DNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司, 2×Taq MasterMix 购自南京诺维赞生物科技有限公司。

3.2 引物设计与合成

参照 GenBank 中公布的巴马香猪线粒体基因组全序列(登录号: KP126939.1)设计 29 对特异性 PCR 引

表3 广西巴马小型猪近交系 7 个世代 mtDNA 碱基突变位点分布情况

Table 3 The distribution of mtDNA base mutation sites in 7 generations of Guangxi Bama miniature pig inbred lines

位点 Position	F11	F12	F14	F15	F16	F17	F18	基因 Gene	位点 Position	F11	F12	F14	F15	F16	F17	F18	基因 Gene
1 067	T	A	T	-	-	-	-	D-loop	6 882	T	G	T	-	-	-	-	COX1
1 068	G	A	G	-	-	-	-	D-loop	6 972	T	-	-	-	-	A	T	COX1
1 167	T	-	-	-	A	T	-	D-loop	6 973	A	-	-	-	-	C	A	COX1
1 168	A	-	-	-	T	A	-	D-loop	6 974	C	-	-	-	-	T	C	COX1
1 169	T	A	T	-	-	-	-	D-loop	6 983	T	-	-	-	-	A	T	COX1
1 170	A	C	A	-	-	-	-	D-loop	7 152	T	-	-	-	-	T	C	COX1
1 172	A	C	A	-	-	-	-	D-loop	7 159	C	-	C	-	-	-	-	COX1
1 173	A	T	A	-	-	-	-	D-loop	7 851	T	-	-	C	T	-	-	COX1
1 174	C	T	C	-	-	-	-	D-loop	9 869	A	C	C	-	-	-	-	ATP6
1 176	C	T	C	-	-	-	-	D-loop	13 325	T	-	-	-	-	A	T	ND5
1 178	T	G	T	-	-	-	-	D-loop	14 096	A	-	-	-	G	A	-	ND5
1 904	T	C	C	-	-	-	-	12S rRNA	14 102	A	-	-	-	G	A	-	ND5
1 905	A	T	T	-	-	-	-	12S rRNA	14 741	A	-	G	A	-	-	-	ND5
3 543	A	-	-	G	A	-	-	16S rRNA	14 742	C	-	G	C	-	-	-	ND5
5 831	A	-	-	G	A	-	-	ND2	14 785	C	-	G	C	-	-	-	ND5
5 935	C	-	-	G	C	-	-	ND2	14 799	A	-	G	A	-	-	-	ND5
5 936	A	-	-	T	A	-	-	ND2	14 907	T	-	-	-	-	C	T	ND6
5 937	T	T	A	-	-	T	T	ND2	14 911	C	-	-	-	-	T	C	ND6
6 837	C	G	C	-	-	-	-	COX1	15 872	T	-	-	-	-	T	A	Cytb
6 838	A	G	A	-	-	-	-	COX1	15 873	T	T	-	-	-	-	A	Cytb
6 879	T	G	T	-	-	-	-	COX1	15 875	A	A	-	-	-	-	G	Cytb
6 880	T	G	T	-	-	-	-	COX1	15 876	T	T	-	-	-	-	G	Cytb
6 881	A	G	A	-	-	-	-	COX1	16 110	A	-	-	-	-	G	A	Cytb

物(表 4), 相邻 PCR 产物片段之间前后重叠 100 bp 以上。引物送上海生工生物工程股份有限公司进行合成。

3.3 DNA 的提取

采用 TIANGEN 血液基因组 DNA 提取试剂盒提取总 DNA, 提取方法参照试剂盒说明书操作。将提取好的 DNA 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, EB 染色后通过紫外凝胶成像仪分析 DNA 的完整性, 将质量合格的 DNA 放置 -40 °C 保存备用。

3.4 PCR 扩增与测序

反应体系: 2×Taq MasterMix 15.0 μL, 上下引物各 1.0 μL, DNA 2.0 μL, 加 ddH₂O 至 50 μL。反应条件为: 94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 退火温度 30 s, 72 °C 90 s, 35 个循环; 72 °C 5 min, 4 °C 保存。取 5.0 μL PCR 产物, 经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 将条带清晰且完整的产物分装两管, 分别送深圳华大基因科技有限公司、生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

3.5 序列拼接、组装

测序结果用 Lasergene 7.0 和 NCBI 中的 Blast

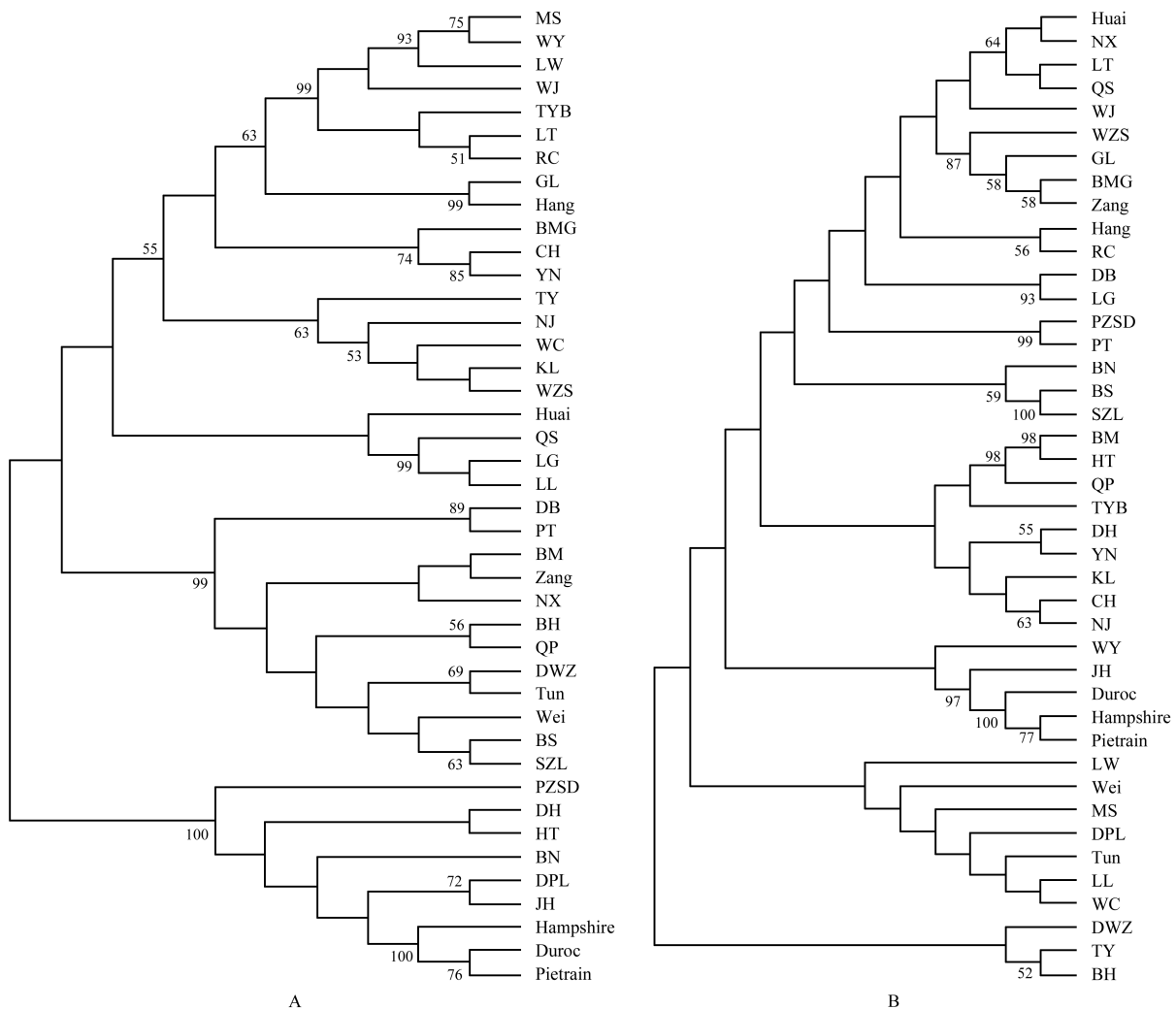


图3 基于猪 mtDNA D-loop 区和编码基因区序列构建的系统进化树

注: A: D-loop 系统进化树; B: 编码基因系统进化树

Figure 3 Phylogenetic tree constructed based on D-loop and coding genes sequence of pig mtDNA

Note: A: The D-loop system evolution tree; B: The coding gene system evolution tree

进行序列拼接。用 MegAlign7.0 进行序列比对,参照巴马香猪线粒体序列确定广西巴马小型猪线粒体全基因组的序列结构及碱基组成。将广西巴马小型猪 mtDNA 序列上传至 GenBank。

3.6 其余猪种 mtDNA 来源

39 个中国本土猪种和 3 个外国品种猪共 42 个完整线粒体基因组序列均来自 NCBI 网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的 GenBank 数据库,将序列下载存为 FASTA 格式文件备用,详细序列信息已列出(表5)。本土猪种类型的划分参考文献,样本来源区域分布在内蒙古、云南、湖南、浙江、广西等 20 个省(自治区)。

3.7 序列分析及系统进化分析

从 GenBank 来源的 42 个猪种和本实验中所用

的 F18 世代广西巴马小型猪的线粒体基因组中分离提取出编码基因序列和 D-loop 序列,应用 MEGA 7.0 软件中的最大似然法(the maximum likelihood method, ML)构建系统进化树,进行 Bootstrap 1 000 次检验分析。

作者贡献

高也凡、陈笑寒、邹辉是本研究的实验设计者和实验研究的执行人,参与实验设计,完成数据分析,论文初稿的写作;陈笑寒是项目的负责人;蒋钦杨、黄艳娜、郭亚芬指导实验设计、数据分析、论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由广西大学“大学生创新创业计划”项目

表 4 mtDNA 序列 PCR 扩增引物

Table 4 The PCR amplification primers of mtDNA sequence

名称 Name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	退火温度(°C) Annealing temperature (°C)	产物位置(bp) Product position (bp)	产物长度(bp) Product length (bp)
1F	TCGTAGAATGAATCTGAGG	59	116~936	821
1R	GGTGATACGCATGTTGACTG			
2F	CAACCAAAACAAGCATTCCATTCG	59	1 045~1 867	823
2R	GCGTTATAGGGTGTGTAGAGCA			
3F	ACGCGCATATAAGCAGGTAAAT	48	1 337~2 214	878
3R	ATGTGAAGCACCGCCAAGTC			
4F	GACTTGGCGGTGCTTCACAT	59	1 933~2 701	769
4R	TTGCCACATAGATGAGTTGGTTC			
5F	CCGTAAGGGAAAGATGAAAG	59	2 617~3 597	981
5R	TATGGTTATTTTACTGGT			
6F	ACATGTATTAGAGGCAATGCCTG	48	3 300~4 186	887
6R	TTGGTGAATAGTTTTTAGGGCATC			
7F	GAGGTTCAACTCCTCTCCCTAAT	51	4 099~4 933	835
7R	GGGCAGGAAGCTTTTTCATAGT			
8F	GATCAGGCTTTAACGTAGA	51	4 746~5 775	1 030
8R	TGGTAATACTGCTGTCATTC			
9F	CACAGAAGCAGCCACAAA	65	5 419~5 919	501
9R	ATGGGATAGGGATAAAGT			
10F	ACATAGGATGAATGACAGC	58	5 842~6 877	1 036
10R	TGGTGGAAAGTAGTCAGAAAC			
11F	CCTATAACACCAGCCCTCTCGT	59	6 278~7 156	879
11R	CAGGGGTGTTTGGTATTGAGAC			
12F	TTCTGACTACTTCCACCATCCT	54	7 024~7 874	851
12R	CAAGTGAATTTTGTCTCATGC			
13F	GGCGCAATATTAATGATCAC	59	7 695~8 556	862
13R	AAGGATTCGTAATGATGGAAGG			
14F	TTCATCTCACTAACAGCAG	59	8 112~8 934	823
14R	TTGAGTTCGGTTGATTCTG			
15F	ACAGCTTCATGCCCATGTACT	59	9 018~9 877	860
15R	AAGCTTGGATCAGAGCTACTGC			
16F	TAGCCCACTTTCTACCACAAGG	59	9 677~10 558	882
16R	AGATAAGATGATTTACGTGCAAG			
17F	CTAAACACCTCAACTCCCTCG	56	10 399~11 265	867
17R	ATATAAGTAACCCTGCAAGGGC			
18F	GAGCATCCCAAACAACAATCT	59	11 082~11 940	859
18R	GGATCCTGCTAGGGTGTAGAAT			
19F	CATGACTCCTCCCCCTTATACT	58	11 772~12 594	823
19R	TCTCCGATTAGATTGATGGATG			
20F	CACAGCTCTCATAATTGCCAC	56	12 470~13 354	885
20R	CATGTGACGAATAGTGCTACGG			
21F	CCTAACTACGTAAAAACCACCG	54	13 227~14 074	848
21R	TATTGCTTTGAAGAAAGCGTGC			
22F	CCTACTCCTAGCTGCAGCAG	56	13 780~14 600	821
22R	ATTATGGAGATTACTCGTGG			

续表 4

Continuing table 4

名称	引物序列(5'-3')	退火温度(°C)	产物位置(bp)	产物长度(bp)
Name	Primer sequence (5'-3')	Annealing temperature (°C)	Product position (bp)	Product length (bp)
23F	TCCGCATCATCATTACTA	54	14 093~15 157	1 065
23R	TTTATGGTGGACTTGGGT			
24F	TAATTACCACGAGTAATCTC	54	14 842~15 324	483
24R	TTCTACGAGGTCTGTCCG			
25F	ACAATACCACAACCAACTCCAC	59	14 982~15 929	948
25R	TGGGTGAAATGGAATTTTGTCT			
26F	GGAGGACAACCCGTAGAACAC	56	15 954~16 143	190
26R	CCTGCTTTCGTAGCACGTAT			
27F	TAAATTATCAAAGCAAGGCACT	51	15 800~16 251	452
27R	GCTTCATGGCCTTATTCAATC			
28F	ATAATAGTGACAATCGGCATC	51	16 160~16 761	602
28R	TTTTGGTTATACTACTGCCATG			
29F	CGAGGCCTATACTACGGATC	56	16 762~17 005	244
29R	GGGGTGTAGTTGTCTGGGTC			

(201610593253)资助。

参考文献

- Anderson C., 1992, Genetic resources. A gene library that goes "moo", *Nature*, 355(6359): 382.
- Delsuc F., Stanhope M.J., and Douzery E.J., 2003, Molecular systematics of armadillos (*Xenarthra*, *Dasypodidae*): contribution of maximum likelihood and Bayesian analyses of mitochondrial and nuclear genes, *Mol. Phylogenet. Evol.*, 28(2): 261-275.
- Fang M.Y., and Andersson L., 2006, Mitochondrial diversity in European and Chinese pigs is consistent with population expansions that occurred prior to domestication, *Proc. Biol. Sci.*, 273(1595): 1803-1810.
- Frankham R., and Ralls K., 1998, Conservation biology: inbreeding leads to extinction, *Nature*, 392(6675): 441-442.
- Goodman S.J., 1998, Patterns of extensive genetic differentiation and variation among European harbor seals (*Phoca vitulina*) revealed using microsatellite DNA polymorphisms, *Mol. Biol. Evol.*, 15(2): 104-118.
- Hu Y.W., Luan F.S., Wang S.G., Wang C.S., and Michael P.R., 2008, A preliminary study on the identification of domestic pig and wild pig by C and N stable isotope analysis, *Zhongguo Kexue (Science in China (Series D: Earth Sciences))*, 38(6): 693-700. (胡耀武, 栾丰实, 王守功, 王昌燧, Michael P.R., 2008, 利用 C, N 稳定同位素分析法鉴别家猪与野猪的初步尝试, *中国科学(D 辑: 地球科学)*: 38(6): 693-700.)
- Jemt E., Farge G., Bäckström S., Holmlund T., Gustafsson C.M., and Falkenberg M., 2011, The mitochondrial DNA helicase TWINKLE can assemble on a closed circular template and support initiation of DNA synthesis, *Nucleic Acids Res.*, 39(21): 9238-9249.
- Joris P., Angela V.D.D., Daniel H., and Maria S.S., 1999, Early animal husbandry in the northern levant, *Paléorient*, 25(2): 27-48.
- Lacy R.C., and Ballou J.D., 1998, Effectiveness of selection in reducing the genetic load in populations of *Peromyscus polionotus* during generations of inbreeding, *Evolution*, 52(3): 900-909.
- Larson G., Dobney K., Albarella U., Fang M., Matisoo-Smith E., Robins J., Lowden S., Finlayson H., Brand T., Willerslev E., Rowley-Conwy P., Andersson L., and Cooper A., 2005, Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication, *Science*, 307(5715): 1618-1621.
- Li X.Y., 1998, The origin and domestication of domestic pig, *Xumu Shouyi Zazhi (Journal of Animal Science and Veterinary Medicine)*, 17(3): 16-18, 39-55. (李相运, 1998, 家猪的起源和驯化, *畜牧兽医杂志*, 17(3): 16-18, 39-55.)
- Luetkemeier E.S., Sodhi M., Schook L.B., and Malhi R.S., 2010, Multiple Asian pig origins revealed through genomic analyses, *Mol. Phylogenet. Evol.*, 54(3): 680-686.
- Machugh D.E., Loftus R.T., Bradley D.G., Sharp P.M., and Cunningham P., 1994, Microsatellite DNA variation within and among European cattle breeds, *Proc. Biol. Sci.*, 256(1345): 25-31.
- Madaule P., Eda M., and Watanabe N., 1998, Role of citron kinase as a target of the small GTPase Rho in cytokinesis, *Nature*, 394(6692): 491-494.

表 5 猪 mtDNA 序列信息

Table 5 mtDNA sequence information of pigs

类型 Type	品种 Breed	GenBank 登录号 GenBank accession No.	序列长度(bp) Sequence length (bp)	类型 Type	品种 Breed	GenBank 登录号 GenBank accession No.	序列长度(bp) Sequence length (bp)
华南型 South China type	隆林猪 LL	KM433673.1	16 699	华北型 North China type	大蒲莲猪 DPL	MG009446.1	16 610
	蓝塘猪 LT	KM101043.1	16 709		河套猪 HT	KX146493.1	16 612
	德保猪 DB	MG250525.1	16 690		八眉猪 BM	EF545583.1	16 690
	五指山猪 WZS	KF767443.1	16 741		梅山猪 MS	JN601071.1	16 770
	文昌猪 WC	KP681244.1	16 729	江海型 Jianghai type	金华猪 JH	KC469586.1	16 610
	临高猪 LG	KP681242.1	16 700		碧湖猪 BH	EF545591.1	16 690
	屯昌猪 Tun	MG250558.1	16 690		圩猪 Wei	EF545577.1	16 690
	桃园猪 TY	DQ534707.2	16 728		槐猪 Huai	KJ737419.1	16 685
	巴马香猪 BMX	KP126939.1	16 761		莆田猪 PT	MG250555.1	16 690
西南型 Southwest type	雅南猪 YN	KC505409.1	16 841	华中型 Central China type	宁乡猪 NX	KF472178.1	16 690
	成华猪 CH	KP765603.1	16 760		清平猪 QP	EF545581.1	16 690
	乌金猪 WJ	KC55408.1	16 700		大围子猪 DWZ	KF472179.1	16 690
	荣昌猪 RC	KM044239.1	16 710		黔绍猪 QS	KF660222.1	16 700
	关岭猪 GL	KM101042.1	16 731		沙子岭猪 SZL	KF472177.1	16 690
	内江猪 NJ	KC505406.1	16 730		桃源黑猪 TYH	KF601700.1	16 710
	盆周山地猪 PZSD	KJ746664.1	16 619		武夷黑猪 WYH	KM259826.1	16 709
	大河猪 DH	GQ220329.1	16 610		杭猪 Hang	KJ737418.1	16 729
	保山猪 BS	KT194217.1	16 690	高原型 Plateau type	藏猪 Zang	EF545576.1	16 690
	版纳猪 BN	GQ220328.1	16 609	外国猪种 Foreign pig breeds	杜洛克猪 Duroc	MF183225.1	16 680
	柯乐猪 KL	MF143597.1	16 828		汉普夏猪 Hampshire	AY574046.1	16 541
	莱芜黑猪 LW	KJ720205.1	16 710		皮特兰猪 Pietrain	KC469587.1	16 612

- Manotti-Raymond M.A., and O'Brien S.J., 1995, Evolutionary conservation of ten microsatellite loci in four species of Felidae, *J. Hered.*, 86(4): 319-322.
- Sutovsky P., Moreno R.D., Ramalho-Santos J., Dominko T., Simerly C., and Schatten G., 1999, Development: Ubiquitin tag for sperm mitochondria, *Nature*, 402(6760): 371-372.
- Vilà C., Savolainen P., Maldonado J.E., Dominko T., Simerly C., and Schatten G., 1997, Multiple and ancient origins of the domestic dog, *Science*, 276(5319): 1687-1689.
- Wang A.D., Lan G.Q., and Guo Y.F., 1995, Breeding of Bama miniature pig, *Zhongguo Shiyan Dongwuxue Zazhi (Chinese Journal of Laboratory Animal Science)*, 5(3): 148-151. (王爱德, 兰干球, 郭亚芬, 1995, 巴马小型猪的选育, *中国实验动物学杂志*, 5(3): 148-151.)
- Wang A.D., Lan G.Q., and Guo Y.F., 2010, Breeding of Guangxi Bama miniature pig, *Shiyan Dongwu Kexue (Laboratory Animal Science)*, 27(1): 60-63. (王爱德, 兰干球, 郭亚芬, 2010, 广西巴马小型猪的培育, *实验动物科学*, 27(1): 60-63.)
- Wang A.D., Qin S.H., Guo Y.F., Lan G.Q., and Li B., 1991, Breeding of Bama miniature pig, *Zhongguo Shiyan Dongwuxue Zazhi (Chinese Journal of Laboratory Animal Science)*, 1(2): 111-112. (王爱德, 覃树华, 郭亚芬, 兰干球, 李柏, 1991, 巴马小型猪的选育, *中国实验动物学杂志*, 1(2): 111-112.)
- Wolff J.N., and Gemmel N.J., 2008, Lost in the zygote: the dilution of paternal mtDNA upon fertilization, *Heredity*, 101(5): 429-434.
- Woolliams J.A., Wiener G., Anderson P.H., and McMurray C.H., 1983, Variation in the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase and in the concentration of copper in the blood in various breed crosses of sheep, *Research in Veterinary Science*, 34(3): 253-256.
- Yakubovskaya E., Chen Z., Carrodegua J.A., Kisker C., and Bogenhagen D.F., 2005, Functional human mitochondrial DNA polymerase γ forms a heterotrimer, *J. Biol. Chem.*, 281(1): 374-382.
- Yuan J., 2006, The origin of pig in ancient China, *Xibu Kaogu (Western Archaeology)*, (1): 43-49. (袁靖, 2006, 中国古代的家猪起源, *西部考古*, (1): 43-49.)
- Yu P., Cao T., Shi L.G., Liu Y.F., Zhang L.L., and Hou G.Y., 2014, Study and application progress of mitochondrial DNA in pig breeds, *Jiachu Shengtai Xuebao (Journal of Domestic Animal Ecology)*, 35(7): 1-6. (于萍, 曹婷, 施力光, 刘雅芳, 张立岭, 侯冠彧, 2014, 猪线粒体 DNA 研究应用进展, *家畜生态学报*, 35(7): 1-6.)
- Zhang D.J., Liu D., He X.M., Wu S.H., Wang W.T., Zhang X., Wang L., and Yang G.W., 2015, Diversity and cluster analysis of China local pig breeds, *Xumu yu Shouyi (Animal Husbandry & Veterinary Medicine)*, 47(10): 1-4. (张冬杰, 刘娣, 何鑫淼, 吴赛辉, 王文涛, 张旭, 汪亮, 杨国伟, 2015, 中国地方猪品种的遗传多样性与聚类分析, *畜牧与兽医*, 47(10): 1-4.)