

分类号: S813.3
U D C: 636
密 级: 公开

学校代码: 10712
研究生学号: S061275



西北农林科技大学

2009 届攻读硕士学位研究生学位(毕业)论文

**中国家马 mtDNA D-loop 区遗传多样性与
多重母系起源研究**

学 科 专 业 动物遗传育种与繁殖学
研 究 方 向 动物遗传资源学
研 究 生 王 小 斌
指 导 教 师 雷 初 朝 教授
完 成 时 间 2009 年 5 月

中国 陕西 杨凌

Classification code: S813.3
UDC: 636
Confidentiality level: Public

University code: 10712
Postgraduate number: S061275

Thesis for Masters Degree
Northwest A & F University in 2009

**MITOCHONDRIAL DNA D-LOOP GENETIC
DIVERSITY AND MULTIPLE MATERNAL ORIGINS
OF CHINESE MODERN DOMESTIC HORSES**

Major: Animal Breeding and Reproduction
Research field: Animal Genetics
Name of Postgraduate: Wang Xiaobin
Adviser: Prof. Lei Chuzhao
Date of submission: May, 2009

Yangling Shaanxi China

研究生学位论文的独创性声明

本人声明：所呈交的学历硕士学位论文是我个人在导师指导下独立进行的研究工作及取得的研究结果；论文中的研究数据及结果是按学校《关于规范西北农林科技大学研究生学术道德的暂行规定》获得的，如果违反此规定，一切后果与法律责任均由本人承担。

尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究结果，也不包含其他人和自己本人已获得西北农林科技大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文的致谢中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：王小斌 时间：2009年5月30日

导师指导研究生学位论文的承诺

本人承诺：我的学历硕士研究生王小斌所呈交的学历硕士学位论文是在我指导下独立开展研究工作及取得的研究结果，属于我现岗职务工作的结果，并严格按照学校《关于规范西北农林科技大学研究生学术道德的暂行规定》而获得的研究结果。如果违反学校《关于规范西北农林科技大学研究生学术道德的暂行规定》，我必须接受按学校有关规定的处罚处理并承担相应导师连带责任。

导师签名：王小斌 时间：2009年5月30日

关于其他单位与人员对研究生学位论文使用授权的说明

任何收存和保管本论文各种版本的单位和个人未经本论文作者的导师授权，不得有对本论文进行复制、修改、发行、出租、改编等侵犯著作权的行为，否则，按违背《中华人民共和国著作权法》有关规定处理并追究法律责任。

经本论文作者的导师同意，授权西北农林科技大学可向主管上级有关单位送交论文的纸质件和电子文档，允许论文被查阅和借阅，可以采用复印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文；否则，按违背《中华人民共和国著作权法》有关规定处理并追究法律责任。

研究生签名：王小斌 时间：2009年5月30日

导师签名：王小斌 时间：2009年5月30日

本研究由
教育部新世纪优秀人才支持计划(2008-2010)
西北农林科技大学科研专项(07ZR004)

资助完成

This work was supported by Program for New Century Excellent Talents in University of 2007 (NCET) and Research Program of Northwest A&F University (07ZR004)

中国家马 mtDNA D-loop 区遗传多样性与多重母系起源研究

摘要

为了研究中国家马的遗传多样性与母系起源，本研究利用分子生物学方法和生物信息学技术对我国 16 个现代家马品种 556 个个体和古马 35 份样品的线粒体 DNA(mtDNA) D-loop 区 247bp 序列进行分析，联合世界家马、古马和普氏野马数据，得到如下主要结论：

(1) 16 个中国现代家马品种 556 条序列，35 份古马样品序列，共检测到 164 种单倍型，70 个核苷酸多态位点，约占所测核苷酸长度的 28.3%，其中有 60 个转换，13 个颠换，3 个转换与颠换共存。

(2) 16 个中国现代家马品种单倍型多样度和核苷酸多样度的分布，分别为 0.842~0.980 和 0.0201~0.0263，古马单倍型多样度和核苷酸多样度均值分别为 0.978 和 0.0246，表明中国家马具有丰富的遗传多样性，与国内外家马研究结论一致。

(3) 591 条 mtDNA D-loop 序列的系统发育分析表明，中国家马分为 A-I 9 个支系，其中 H、I 支系为首次定义，说明具有多个母系起源，古马与现代家马聚合在一起，推断两者母系起源一致。

(4) 引用 GenBank 中国现代家马、古马和普氏野马数据，联合国内现代家马和古马数据，共 2031 条序列，绘制简约网络图，结果显示，国内家马与世界家马聚合于 A-I 9 个支系中、古马 NJ 系统发育分析也证实古马具有与现代马相近的支系。

关键词：中国现代家马；古马；线粒体 DNA D-loop；遗传多样性；母系起源

MITOCHONDRIAL DNA D-LOOP GENETIC DIVERSITY AND MULTIPLE MATERNAL ORIGINS OF CHINESE DOMESTIC HORSES

ABSTRACT

To obtain more knowledge on the origin and genetic diversity of domestic horses in China, All mtDNA D-loop 247bp sequences of 16 Chinese native modern horse breeds and ancient horse DNA were analyzed by using PCR and bioinformation technology. The main results in this study are as follows:

(1) All 591 sequences defined 164 different haplotypes with 70 variable sites, with 28.3% of 247 bp D-loop region, 60 of these sites are transitions, 13 of them are transversions, 3 of these sites have both transitions and transversions.

(2) There is high level of genetic diversity in Chinese domestic horses. The haplotype diversity and the nucleotide diversity were 0.842~0.980 and 0.0201~0.0263. The mean haplotype diversity and the mean nucleotide diversity in Chinese ancient horses were 0.978 and 0.0246.conspond with other studies.

(3) Phylogenetic analysis in Chinese horse mtDNA suggested that Chinese domestic horse revealed nine maternal origins (A-I), haplogroup H and I were first named, showing multiple maternal origins.Ancient horses clustering together with modern native horses, inferred they come from the same maternal lines.

(4) Collected sequences of foreign modern domestic horses, ancient horses and prz from GenBank, including Chinese horse data, we draw RM network, resulted Chinese horses clustering together with foreign horses in A-I haplogroups.

KEY WORDS: Chinese modern domestic horses; ancient horses; mtDNA D-loop; genetic diversity; maternal origins

目 录

第一章 文献综述	1
1.1 中国家马的种质遗传资源	1
1.1.1 我国家马的分布和生态特点	1
1.1.2 马品种资源的特点 ^[5]	3
1.1.3 马遗传资源管理的现状	4
1.2 家马的起源进化研究进展	4
1.2.1 马属动物起源	4
1.2.2 我国家马的考古学研究进展	5
1.2.3 家马的起源进化研究进展	7
1.3 MtDNA 与分子系统发育	11
1.3.1 MtDNA 的遗传特征	11
1.3.2 MtDNA 在动物起源进化研究中的应用	11
1.4 本研究的目的和意义	12
第二章 试验部分	13
2.1 试验材料	13
2.2 试剂与仪器	13
2.2.1 试剂	13
2.2.2 仪器	16
2.3 试验方法	16
2.3.1 基因组 DNA 的提取与检测	16
2.3.2 线粒体 DNA D-loop 的扩增	17
2.3.3 PCR 产物的纯化与回收	17
2.3.4 线粒体 DNA 的测序	18
2.4 数据处理	18
2.4.1 序列校对与同源序列比对	18
2.4.2 MEGA3.1 软件的应用	18
2.4.3 核苷酸序列多态性分析	19
2.4.4 网络分析与群体结构分析	19
2.5 结果与分析	19
2.5.1 碱基组成比较	19
2.5.2 多态位点分析	19
2.5.3 中国家马 mtDNA 遗传多样性分析	19

2.5.4 中国家马系统发育分析	20
2.5.5 古马系统发育分析	24
2.5.6 群体扩张分析	27
2.6 讨论：	27
2.6.1 世界家马起源	27
2.6.2 中国现代家马品种起源	28
第三章 小 结	30
参考文献	31
致 谢	35
作者简介	36

第一章 文献综述

马属动物 6000 万年前始源于北美洲^[1]，现代马由真马分化形成，真马分化出野驴、野马和斑马，现代家马由野马驯化而来，家马驯化历史了解不详，一直存在着一元论和多元论的争鸣^[1]。

考古发现证实，我国马生存历史久远，从马属动物最早起源的始马，到现代家马的化石几乎没有中断，商代以来家马养殖繁盛^[2,3]，分布范围大，品种多样，在历史上与人类生产生活关系密切。但近几十年来，随着现代化的进程，家马在国内严重衰落，存栏数量在 1977 年为 1144 万匹，2005 年降为 740 万匹^[4]，一些品种濒临灭绝，如宁强马、德保矮马等西南马系品种。现今世界几大优秀赛马品种风靡全球，各地原有地方品种逐步衰落，家马遗传多样性流失严重，家马研究和保护工作刻不容缓。保护家马遗传多样性任务艰巨、意义重大。

1.1 中国家马的种质遗传资源

1.1.1 我国家马的分布和生态特点

我国养马历史悠久，至今已有 4000 多年。我国地处亚洲大陆，有广大农牧地区，养马条件优越，马种资源丰富，其中 3/4 的马集聚在我国黄河以北的内蒙古、华北北部、兰州以西的新疆、青海以南的四川山地、云贵高原。马喜高寒干燥的气候环境，温度较低，海拔较高的地方自古多出良马。中国马的品种资源十分丰富，列入《中国马驴品种志》的品种就达 33 种之多。按品种来源、育种程度及历史情况，我国马匹品种可分为地方品种、培育品种和引入品种三大类^[1]。

根据《中国马驴品种志》把中国马种按历史来源、生态环境及体尺类型等综合因素分为五大独立的类型：蒙古马、西南马、河曲马、哈萨克马、藏马^[1]。

1.1.1.1 蒙古马

蒙古马产于内蒙古自治区及邻近省区。蒙古马因自然条件的不同形成了一些适应草原、山地和沙漠条件的优良类群，比较著名的有乌珠穆沁马、百岔马和乌审马。蒙古马适应性强，能适应恶劣气候和粗放饲养条件，上膘快、抗病力强、合群性好，广泛使役于我国各地，蒙古马系主要包括：

(1) 蒙古马：分布在中国东北、西北、华北。蒙古人民共和国、俄罗斯东部。国内分布广，数目大，北方草原为主产区，大批流入周边农业区。是中国的主体马种，占总数的 60% 以上。内部又分品种及类群。短程速力不快，长程持久力好。

(2) 锡尼河马：产于内蒙古东部呼盟鄂温克族的锡尼河流域，以当地马为基础，引入过多个外种与之杂交，育种方法近似三河马，但质量较差，习惯上列入原有马种当中。

(3) 鄂伦春马：产于内蒙古东部鄂伦春自治旗及邻近的黑龙江省数县。品种分类属于蒙古马系统，但别具特点。是擅长登山又具雪地滑坡特殊行为的狩猎用马。可供骑乘、运输，缺少草料时可以以肉食充饥。

(4) 大通马：产于青海省大通、门源等县，产区是 2500m 海拔的高原牧场。农业因霜冻不能保收，草原良好，种青稞等早熟作物。大通马中多走马，有“十马九走”之说。优良个体高达 135cm 以上。大通马与河曲马杂交得一种实用型马，体形较大，适合高原。大通马可作为藏马及西南山地马的改良用种马。

(5) 岷口驿马：产于甘肃省天祝等县，为古丝绸之路上的驿站快速信用马，多走马，速力较快，持久力强。该马同大通马有血统交换关系。

(6) 焉耆马：产于新疆的焉耆和硕等县。属蒙古马系统，但体形较大，有外血导入。据传一支蒙古族部落，集体带马西移到俄罗斯欧洲部分，受到沙皇压迫又万里跋涉连人带马返回祖国，成为民族爱国佳话，受到清朝皇帝表彰。移行中同欧洲马杂交。近年又引入奥尔洛夫、卡巴金马杂交。产地属天山，放牧条件好。多年在不同条件下养育，品种内部又两个明显地方型：山地马、盆地马。

(7) 巴里坤马：该马分布于新疆北部的巴里坤、伊吾、哈密各县，属蒙古马系统。本品种选育的同时，部分引入阿尔泰马、哈萨克马杂交。高原适应性良好，骑乘及驮用均好。产地草原广阔，建有马场。

1.1.1.2 西南马

西南马主要产于云贵高原，属山地马种，其特点为：体型小（成年公马平均体高在116cm 以下），躯干较短、颈高昂，鬃、尾、鬣毛丰长，皮薄而被毛绢美纤细，身体结构良好，肌腱发达、蹄质坚实、性格机敏、行动灵活、善于爬山越岭，主要包括：

(1) 建昌马：产于四川西昌盆地，云贵高原在此急骤下降，成为盆地小气候区，海拔为 2000m 左右，农业发达，适合养马。建昌马，体高 114—120cm ，为西南山地马的代表。有轻、重两型。

(2) 云南马：云南野马化石及云南马半化石的发现，说明云南是野马家化地点。云南马分布在云南西北部、东北部、南部，类型较多。云南马内部类型变异明显。

(3) 贵州马：贵州马比前几种马体形更大，类型较重。分布在安顺等县。农业区的马体略大，适合挽车用。东南部产山地马，体形较小。

(4) 百色马：产于广西百色及河池两地区。云贵高原延伸部，海拔高、多山。有石山区、土山区，二区地理差异明显，产石山马及土山马。到无山地势平坦的地区很少有马匹分布。

(5) 利川马：湖北省西南山地、利川等 12 个县产利川马。体型略大于其他西南马，亦属于西南马系。

1.1.1.3 河曲马

河曲马产于甘肃、四川和青海三省交界处的黄河第一弯曲部。自然环境使其形成了适应性强，体驱比较高大的品种特征。

1.1.1.4 哈萨克马

哈萨克马产于新疆天山北麓，准噶尔盆地以西和阿尔泰山脉西段一带。产区草原辽阔，牧草饲料资源丰富，历来以牧业为主，为我国重要的产马区之一。海拔 600~6900 m，河流纵横，属温和、半湿润和温凉干旱气候，年降水量 94~513 mm，本地区自古产良马。哈萨克马是草原马种，对大陆干旱、寒冷气候和草原生活环境很能适应，它的形成与当地良好的草原有着密切关系，同时也是哈萨克族人民为了生产和生活的需要，长期选育的结果。

1.1.1.5 藏马

产于青藏高原，包括西藏、青海的玉树、果洛，四川的甘孜和阿坝，以及云南的中甸等。其中以日喀则马、昌都马、玉树马、果洛马、甘孜马、中甸马较为著名。藏马体尺大于云南马而接近于蒙古马。藏马对当地高原有较好的适应性。

此外，中国矮马，是世界除英国设特兰（Shreeland）矮马外，另一个最大的原始矮马资源库，主要在西南马产区，呈散状分布。我国矮马平均体高在 1 米以下，体小，外形匀称，适合山地骑乘、驮运、拉车。按产地划分，主要的品种有：

（1）广西德保矮马：德保矮马是我国稀有的良种马，也是世界最矮的一种马。主要产于广西德保、靖西等县。其高度在 106 厘米以下，最矮的仅有 85 厘米，比世界著名的英国逐马还要矮。德保矮马还有体型秀美、性情温驯、灵巧耐驮、健壮等特征。矮马既可当坐骑，又能拉车和负重，在山路上行走敏捷稳健，是山区人民交通和运输的重要工具，也是动物园中的观赏动物，是世界上稀有的优良马种。

（2）贵州矮马：贵州矮马是中国矮马中一支优秀的古老山地自然矮马品种，主要产于贵州紫云县，终年生活于自然环境之中，受人的影响较少，所以保留着原始马匹的许多特点，力大耐寒，性情温和，善于爬山。

（3）云南矮马：分布面广，昆明、红河、曲靖、楚雄等县均有分布，主产区位于文山州，云南矮马资源在全国最为丰富。

（4）四川矮马：分布于四川南部的凉山彝族自治州金阳、盐源等县，数量较少。

（5）陕西宁强矮马：主要分布在四川及陕西的嘉陵江及汉水流域，宁强马的中心产区位于陕西省西南部陕、甘、川省交界的宁强县境内。以体质紧凑结实，耐艰苦，体型轻小，适应山区自然条件等为特征。

1.1.2 马品种资源的特点^[5]

（1）多元的起源系统。五大系统马不仅起源不同，而且还包含着众多的各有特点的不同种系、类型，它们与欧美马种关系疏远，携带着多种多样的非特异性免疫基因。

(2) 广阔的地域来源，我国从西到东，从南到北，古今都有马种的分布，只是近世南方马种数量趋减。

(3) 丰富多样的生态类型。由于自然地理和生态类型不同，因此形成了不同生态类型的马种。如草原型的蒙古马、哈萨克马，山地型的西南马，高原型的藏马等。

(4) 类型多样的生产力。地方马种乘、挽、奶、肉皆宜，多种用途。培育马种挽驮为主，肉、乳生产性能较好。

(5) 多元的文化特征。蒙古民族和马密不可分，马头琴、崇尚白马，饮马奶吃马肉等。

1.1.3 马遗传资源管理的现状

现今我国马种资源管理的现状较差。在 26 个固有马种中，9 个品种正在衰亡。在本世纪初、我们失去了广东、海南的矮马，以及江浙的马种。近 20 年人们又无不忧虑地看到大兴安岭的鄂伦春马，内蒙百岔马、乌审马，福建晋江马和湖北利川马均到了濒危边缘。一些近代培育的马种，东北马，渤海马、河南轻挽马乃至关中马等，由于有效群体规模过小或无专门的保种场，马种资源更是难以为继。同样，欧美一些发达国家也面临马种单一、来源狭小的境地。历史上，中国古代的任何马种，一般不外以供骑乘和驾车为主，也用于农耕，并向其他方面发展。而现代养马所包括的种马业、役马业、产品用马业、观赏游乐用马业、竞技用马业的产业内涵，但在向现代养马业转化中，因推崇竞技用马，而普遍忽略挽用品种的改造和利用，其结果不仅使地方马种大量消亡，而且也造成培育马种中的挽用品种和速度相对较低的乘用马种的群体规模不能被有效利用，而逐渐缩小乃至消失。

1.2 家马的起源进化研究进展

1.2.1 马属动物起源

马属于奇蹄目、马科、马属，马属动物起源于距今 7500 万年以前第二纪（中生代）的爬行动物，原始祖先为 6000 万年以前的第三纪（新生代）初期的躁节目（Zondylarthra）动物，原蹄兽（Phenacodus）为其直接古老祖先。马属动物从森林动物进化为草原动物的 6000 万年中，曾产生过 18 个属。

研究推断，马属动物存在多种进化路线，其中以始马、中马、原马、上新马、真马为进化主干：

(1) 始祖马（Eohippus）：距今 6000 万年前的始新世，在北美洲的潮湿地带出现了一种个体很小的马，体形似现代的小狐狸，前足有 4 趾，后足有 3 趾，身体主要重量靠肉垫支撑，尺冠低。

(2) 渐新马（Mesohippus）：距今 4000 万年前的渐新世，地球上气候渐渐变凉变干，部分森林开始变为草原，为适应环境变化始祖马逐步进化为渐新马，个体略有增大，前后足都为 3 趾，中趾较发达。

(3) 中新马 (*Merychippus*)：距今 2500 万年的中新世，北美洲森林面积变少，草原面积进一步扩大。在北美洲的中西部地区出现了中新马，其个体较大，四肢运动增强，侧趾已离开地面。体重靠中趾支撑，牙齿的冠齿高，适于磨草。

(4) 上新马 (*Pliohippus*)：距今 200 万年的上新世，出现了现代马的直系祖先。个体更大，接近于现代马，四肢都演变成只有一个较发达的趾，牙齿更为进化，表现出了奔跑于空旷草原，嚼食硬质干草的高度适应。

(5) 现代马 (*Equus*)：到上新世后期，地球上的森林面积大大缩小，草原和荒漠面积变得更大，上新马发展成为了现代马。现代马比上新马更加高大，臼齿变得长而坚固，可以食草原上各种草类。可见，马随着地球气候和植被环境的变迁，在体形、足趾、牙齿和食性等方面逐渐发生了一系列的变化，体形越变越高大，足趾由 5 趾变为单趾，牙齿变得粗大耐磨，食性由吃树叶变为吃草，这些变化是马的生活环境由森林变为草原的结果。

其中前四种形成于第三纪，真马出现于第四纪更新世（距今 100 万），大约在 2.5 万年前，真马分化为斑马、野驴和野马。近代马的品种是从冰期存活下来的 4 种原始马类动物繁衍出来的，它们是欧洲野马、冻原马、森林马和普氏野马。传递到近代的野马只有欧洲野马和普氏野马。

1.2.2 我国家马的考古学研究进展

马属动物虽被公认始源于北美洲^[5]，但古生物学家对中国发现的化石资料却证明，我国可能也是世界马驴起源最早的国家之一。山东、湖南始新世地层发掘出中华原古马和衡阳原古马；内蒙古通古尔地区中新世地层发掘出戈壁安琪马；第四纪更新世地层发掘了奥尔良安琪马；华北多数地区在更新世地层发掘了贺风三趾马；云南马（第四纪早期的代表动物）化石在早更新世大量出土，分布范围广。旧石器时期，野马化石在北方普遍存在，华南地区到晚更新世，野马逐渐衰落与灭绝。

考古学普遍支持家马驯化于新石器时期，最早于 5000 多年前，在乌克兰南部驯^[6,7]。新石器时期初期，我国家马化石发现地区较少。

我国家马的发现，最早在黄河上游的西北地区齐家文化遗址（2000 BC）^[8-10]，在黄河中下游地区，家马出现于商代晚期（3000 BP），在河南安阳殷墟、陕西西安老牛坡、山东滕州前掌大等遗址，发现很多用于殉葬和祭祀的马坑和车马坑、墓室中的马骨，没有发现两者间的联系^[9,11,12]。西周以后（1045-771 BC），家马用于战争^[13]，东亚地区，骑马的证据最早在内蒙古夏家店上层文化遗址发现（2800 BP）^[14]。西南地区，云南西北剑川县西湖遗址发现距今 3100 年的家马骨骼，距今 2900 年前的滇西北、川西北的石板墓中发现大量铜泡马饰。

中国矮马有悠久的历史，从2000多年前的汉代起就有记载，当时称为“果下马”，指马非常矮小，可以在果树下行走，但直到上世纪80年代，才被学者发现。

秦汉以来，我国历代非常注重养马业的发展，历史上主要产马区与近代相同，主要养马区有^[1]：

(1) 西北产马区：这一地区包括古代西域，草原丰美，各族人民历来以畜牧为生，盛产良马。2000 多年来即为中国主要的良马资源地。陕西、甘肃地区养马也有悠久历史。公元前约 900 年，非子在渭之野为周孝王养马有功受封，成为秦国的始祖，秦马也因此有名。以后汉、唐时的大型国营养马场，即主要分布在这一地区。唐代安史之乱后，陇右陷于吐蕃，畜牧仍然发达。宋、明两代行茶马制度，每年从西北地区向内地输入马匹数以万计，其中也包括了唐马遗种。明代在陕、甘二省屯垦繁殖军马，又建养马场，直至河西走廊远处。清乾隆年间，设马场于西宁至嘉峪关外，伊犁、巴里坤两地马场规模尤大，还牧养由内蒙古和玉门运去的种马。

(2) 塞北产马区：长城以北广大的草原是蒙古马种的古老产地。战国以后匈奴、突厥、蒙古等游牧民族在此相继兴起，拥有庞大马群。通过民族间的贸易、战争和迁移，这一地区的大量马匹自周、秦以来不断传入中原。如唐代在北边设马市，贡马有的甚至来自贝加尔湖一带。明、清宣化、大同等边塞重镇每年向塞外市马定额达 3.4 万匹，并听任民间在边塞自由贩马。从辽、金、元到清代，察哈尔草原都是主要养马地。元代统治期间牧马地从西伯利亚东南部，经察哈尔至黄河下游，共划分为 12 个大牧区。清代在察哈尔全境组织蒙族发展养马，全国军马大多取给于此。

(3) 西南产马区：西南包括西藏地区养马可追溯到春秋战国时期。汉代巴蜀商贾已在这里进行马匹和其它畜产贸易。东汉曾在四川、云南设置马苑。到宋代，西南马匹资源更受到重视。北宋到明末的茶马贸易，蜀马和以大理马为代表的滇、黔马是主要对象。西南马适于山区生态环境，不乏名贵良马，但作军用多不及北方马。据《桂海虞衡志·兽志》记载，南方所产“果下马”，高不逾三尺，以广东德庆所产最佳。

(4) 关东产马区：东北地区也是中国历史上的重要产马地。春秋、战国时的东胡及继起的鲜卑、乌桓，都是骑猎部族。鲜卑东面嫩江、松花江流域的扶余人以营农为主，也产名马。契丹、女真族先后建立辽、金后，曾设有宏大的群牧组织。辽国养马达百余万匹，金世宗时仅 7 处群牧所养马达 47 万匹。明永乐年间设马市于辽东等地，收购来自松花江至黑龙江一带的马，并设立辽东苑马寺主持养马。清代早期也在东北设立马场，但养马业显着衰退。后因大量移民关外垦殖，迫切需要畜力，养马业又有发展，东北三省成为近百年来全国马数最多的地区。

(5) 中原产马区：中原自古车骑驰逐，养马颇盛。春秋、战国时期养马成风，后曾一度衰落。草原民族南迁，又使中原畜牧复盛。但因引入大量蒙古马种，使原有马种逐渐消失。山西雁门关为塞北马种入口地，唐代在河东（今山西）设有牧监，马产甚蕃。北宋牧监主要分布中原地区，全盛时多达 14 处。但有些牧监已和种植业发生矛盾，经营又欠善，以致有衰落趋势；但从辽、金、元各代在侵入这一地区后长期征掠马匹数量之多看来，民间养马仍很可观。北宋王安石的保马法，明代的官马民牧，

主要都在这里推行。直到清代禁止民间养马，加之人口日繁、牧地不足，中原养马业才一蹶不振。

(6) 东南产马区：中国素有“南船北马”之说，东南地区养马业不发达，但也并非绝对不宜养马。如春秋末期长江下游的吴国因战车需要，马匹一度发展很快。自唐至宋代，都曾在南方浙江、福建、江西、湖北等地建立养马场。明初在江淮之间和苏南地区兴办牧监达 14 处，在中国南方历史上是空前的。

1.2.3 家马的起源进化研究进展

马的驯化，一直存在着一元论和多元论的争鸣。传统的一元论认为：驯化后的马在乌克兰南部逐渐增多，开始向外扩散，并逐渐波及到中东和除北欧以外的几乎整个欧洲地区。分子遗传学证据更多支持多元论：家马是起源于几个不同地区驯化了的品种。家马的起源进化研究，最初以形态学标记为主。

1.2.3.1 形态学标记

形态学标记是指生物特定的肉眼可见的外部特征，如动物的毛色、植物的株高、叶形等。由于简单直观，容易观察记载，长期以来对物种的分类及资源鉴定都是以形态标记为主或初步的指标。根据表型性状上的差异来反映基因型上的差异是用形态学方法检测遗传变异的关键。通常利用的表型性状有两类：一类是符合孟德尔遗传规律的单基因性状（如质量性状、稀有突变等），另一类是根据多基因决定的数量性状（如大多数形态性状，生活史状）。毛色、毛型、耳型、背型等形态学标记被普遍应用，在考古学研究中形态标记应用更多。

形态学标记有诸多不足，如：标记数量少，遗传表达有时不太稳定，易受环境条件及基因显、隐性的影响等。

近几十年来，家马起源进化的研究集中在分子标记方面，上世纪中叶，随着生化、遗传分子标记等技术的兴起，遗传学和生物化学结合更为紧密，生化标记，染色体标记、分子标记等广泛应用于动物起源进化研究，且取得了较大成果。

1.2.3.2 生化标记

生化遗传主要是以蛋白质为研究对象，其中主要为血液蛋白质和乳蛋白质，通过电泳分析寻找多态性标记，并研究其遗传规律的一门学科。它的出现与蛋白电泳技术相伴而生，是从基因产物认识基因的存在及表达，由生化表现型反映基因型，将宏观的遗传现象结合到微观的分子水平的一门交叉学科。

有关马的生化遗传学方面的研究国外始于上个世纪的六十年代前后，Ashtong 等^[15]在 1958 年就研究了马的血清蛋白变异。接着，Braend 等^[16]分析了马的运铁蛋白基因型。之后许多学者分别对马血液运铁蛋白（Tf）、白蛋白（ALb）、前白蛋白（Pr）、血清酯酶（ES）、维生素D结合蛋白（GC）、碳酸酐酶（CA）、磷酸葡萄糖酸脱氢酶（PGD）、 α 1-B糖蛋白（A1B）、磷酸葡萄糖异构酶（GPI）等位点的遗传多态

性进行了研究。

1.2.3.3 染色体标记

上世纪六十年代中期, Benirschke 等^[17]报道了家马与普氏野马染色体的差异。之后, 采用 G 带、C 带技术研究了家马的染色体核型及染色体核仁组织区的多态性, 广泛应用于家马和野马的研究, 发现家马的一对中部着丝点染色体是由野马的两对端部着丝点染色体发生罗伯逊易位演化而来, 推断了家马与野马之间的杂种是完全可育。

1.2.3.4 DNA 分子标记

上述标记都是基因表型的标记, 可利用的多态位点较少, 易受环境影响, 不能满足物种中资源鉴定的需要。DNA 限制性酶切片断长度多态性 (RFLP) 可作为遗传标记的提出, 开创了直接应用 DNA 多态性发展遗传标记的新阶段。80 年代 DNA 多聚酶链式反应 (PCR) 技术的出现, 又推动产生了许多新型的分子标记如RAPD标记, SSR 标记等。利用 RFLP 技术研究马的mtDNA多态型频率远多于鸡、猪、牛。George 等^[18]曾运用 RFLP 技术研究过家马和蒙古马的遗传分化。Xu 等^[19]对马和驴及其他四种哺乳类动物的线粒体 DNA (mtDNA) 完整序列进行了比较研究, 由马和驴之间的差异推断出这两个种至少在 900 万年前就已分开。Myka 等^[20]采用FISH作图比较法明确了马和驴之间染色体的同源区域, 并找到马的 11 条近端着丝粒染色体与驴染色体之间的相关性, 同时检测到马、驴染色体之间的重排现象, 至少有 20 条染色体重排导致两物种染色体核型产生分化。Jansen 等^[21]通过mtDNA序列的比较研究, 探讨了家马的起源问题。通过测定 318 匹马的序列, 加之已发表的相关数据, 共收集 652 条序列, 建立马的系统进化树, 分析得出家马是由多个祖先群体平行进化而来, 而非单一祖先群体单独进化而来。Ishida^[22]和Marklund^[23]对马 mtDNA 的 Cytb 基因进行了 PCR—RFLP 研究, 探讨了核外基因与马遗传分化的相关性。

近年来, 作为父系起源标记的Y染色体多态也逐步用于研究家马的起源进化, Wallner 等^[24]通过 Y 染色体上两个特定的核苷酸差异研究中国蒙古马和蒙古野马的遗传多样性和分子系统进化, 研究证实蒙古野马和家马在分类学上属于一个姐妹群, 且这个位置由于和斑马、驴同源, 表明蒙古野马的单倍型是祖先状态。Lindgren 等^[25]研究分析了来自 15 个类型的 52 匹公马 Y 染色体非编码区 14.3kb 序列的单核苷酸多态性, 结果未发现分离位点, 说明在家马驯化过程中公马的数量是有限的。

此外, 研究马的起源时也应用了古 DNA 方法, Jung 等^[26]于2002 年报道了从公元 700~800 年前的马肱部骨上提取 mtDNA 来进一步研究车居马的起源分化问题。Bernardo 等^[34]于 2004 年从意大利庞培市古墓中 2000 年的古马mtDNA中探讨马的起源问题。

综上所述, 研究马的起源进化问题的方法较多, 对国外的一些不同类型马研究的也较为全面, 大多数研究都证实现代马是由多个母系祖先经过多次驯化而来的。但总体来说, 无论是利用古 DNA, 还是现代马为研究对象, 研究的手段多是集中在 mtDNA

D-loop 区上。

1.2.3.5 马线粒体DNA遗传多样性研究进展

线粒体DNA在母系遗传的特点，使其在动物起源进化中被广泛应用，近年来家马线粒体DNA广泛用于家马起源进化的分析，取得了较大成果。关于 mtDNA 的研究最早是Nass^[27]于 1962 年首次用电子显微镜观察到的，从此有关 mtDNA 的遗传结构、复制、转录、基因表达与调控等方面已做了许多工作。Higuchi 等^[28,29]分别通过检测 mtDNA 的COX1 基因和 ND1 基因的多态性来研究马属动物的进化问题。Ishida 等^[30]对3匹纯血马的 D-loop 区进行了比较细致的研究，并测出了它们的碱基数（1114bp, 1115bp, 1146bp）。Ishida 等^[31]用16种限制性酶分析了几个马属动物的 mtDNA，发现蒙古野马和 4 个家马类型的mtDNA仅在Hinc II, Kpn I, Acc I 和BstE II 的消化物上存在多态性。Ishida 等^[32]又首先用 D-loop 区序列的多态性确定蒙古野马与其他家马的系统进化关系，估测马的碱基突变率是每百万年 2%~4%。构建的进化树显示蒙古野马和家马分支不明显，因此说明蒙古野马染色体数目的增加发生在最近。Kim 等^[33]在分析比较了7匹车居马，4 匹蒙古马，1 匹蒙古野马，1 匹瑞典马及3 匹纯血马的 D-loop 区序列之后，通过距离法和简约法构建进化树分析了这些马的进化关系，结果推测生活在车居岛上的马是来源于多个母系，并且蒙古马在 1276 年被引入之前这些车居马就已经存在，证实了 Oh 等^[34]在1994年研究车居马系统发育关系的结论，这对韩国马的起源提供了有益的启示。Bowling 等^[35]对 62 匹进入良种登记簿的阿拉伯马 D-loop 高变区的变异进行了研究，从而对“同一品系源于共同母系祖先”的观点提出了质疑。Vila 等^[36]通过对10个类型 191 匹家马的 355 bp D-loop 区序列，及与 GenBank 中 38 匹马的单倍型构建进化树，发现这些马至少存在 6 个母系起源。因此，他认为家马具有广泛的母系起源。Hill 等^[37]用 381 bp D-loop 区序列对 19 个母系家族的 100 匹纯血马进行了研究，以重新构建其母系马创立者。结果发现 17 种单倍型形成了 19 个母系家族。Vila 等^[36]和 Jansen 等^[21]分别研究证实现代马是经过多次驯化形成的。Mirol 等^[38]通过 mtDNA序列推断阿根廷的克里奥尔马和其他南美、西班牙的部分品种马系统发育关系，结果虽然很难确定所研究样品之间的进化关系，但却支持了马的多个母系起源的说法。Hironaga Kakoi 等^[39]的研究揭示日本家马的蒙古马起源。

1.2.3.6 国内家马的起源进化研究

国内马的起源研究方面相对滞后，早期多集中在生化遗传标记方面，上个世纪八、九十年代，王铁权等^[40]测定了 32 匹广西德保矮马的运铁蛋白基因型，发现 5 个等位基因，即Tf A (0.0469)、Tf B (0.5781)、Tf C (0.1049)、Tf D (0.1250) 和Tf E (0.1406)。接着侯文通等^[41]对宁强矮马和中型马血液蛋白质多态位点进行了检测，黄怀昭^[42]、侯文通等^[43]、解德文等^[44]分别对安宁果下马（中国矮马）、东南亚小型马来源、云南马关矮马和普通马血清蛋白进行研究；之后，张才骏^[45]研究了湟中马血清酯酶多态性，侯文通等^[46]对南亚小型马近缘关系的研究，宿兵等^[47]对云南普通马矮马蛋白质多态性及其品

种分化关系研究，侯文通^[48]对陕西马遗传标记研究，王振山等^[49]对玉树藏马运铁蛋白的遗传多态性研究，郭永新等^[50]对山丹马运铁蛋白遗传多态性的初步研究。综上所述，生化遗传标记研究家马的起源多问题，多集中在少地方品种或者有地域联系的家马品种间，他们的研究为揭示我国不同品种马的起源、进化、遗传差异奠定了必要的基础。

家马与野马的亲缘关系及矮马与普通马的关系是早期国内家马研究的热点。国内有关马染色体研究起步较晚，晁玉庆等^[51]分析了蒙古马的染色体核型，再次明确家马染色体普通核型为 $2n=64$ ，公马核型为 64，XY，母马核型为 64，XX。王墨清等^[52]对普氏野马染色体核型及其多态性进行了研究，发现家马与野马之间染色体数目相差一对，野马为 $2n=66$ ，家马为 $2n=64$ ，其演变关系与Ryder等的分析一致。进一步对家马与野马之间染色体的臂比值和相对长度进行比较，发现家马与野马的常染色体总臂数相同，二者之间的最大差别在于家马有一对中部着丝点染色体，它由野马的 2 对端着丝粒染色体融合而来；此外，经观察还发现，野马第一对染色体短臂端有随体结构存在。刘爱华等^[53]对云南矮马和普通马进行了比较细胞遗传学观察，发现二者 G 带带型无明显差异，Ag-NoRs 差异也不明显，仅有 C- 带差异，主要表现在 1 号染色体的异染色质区，矮马比普通马大，这在一定程度上反映了矮马与普通马之间遗传进化关系上的差异。

马的分子遗传方面，最近几年才有一些研究。史宪伟等^[54]对云南四个马品种进行了 RAPD 分析，认为 RAPD 是研究家马品种遗传结构的理想 DNA 标记，实验同时显示，所检测的几个品种马有较高的遗传多样性，因而赋予这些地方马种较强的环境适应力和进化潜力，表明云南省蕴含有丰富的马种遗传资源。Wang 等^[55]在 1994 年利用 16 种限制性内切酶对云南省麻栗坡县 15km^2 境内的矮马和普通马进行了多态性研究，结果发现该小群体的平均群体内核苷酸多样度 (π) 为 0.72%，与猪 (0.12%)、禽 (0.22%) 相比，其遗传多样性要丰富得多。所选马的 mtDNA 各有其自己的单倍型，说明这个群体表现了高度 mtDNA 多态性，并推测矮马和普通马不是从两个母系祖先遗传下来的，很可能来源于多个野生祖先，也可能由于交配关系复杂导致的母系血统相互融合。谢德文等^[56]则利用限制性内切酶分析了来自云南省马关县不同地区的矮马和普通马的酶切多态性，结果表明，其中的 1 匹矮马用 Hpa I 消化时发现了 1 个特殊酶切位点，初步认为可能是由于不同地理群体的马存在 mtDNA 多态性所致。陈宏等^[57]通过 5 种限制性内切酶获得了 13 匹德国骑乘马 mtDNA 的切割图谱。结果德国骑乘马 EcoR I 的切割图谱不同于蒙古野马和其他 4 个家马类型，表现为另一种新的分子类型；用 BamH I 检测到了多态性，分析原因是 B 型 mtDNA 是由 A 型通过突变产生 1 个新的切割位点进化而来的。赵春江等^[58]应用核基因 Protamine P1 和 mtDNA Cytb 基因多态性联合分析法鉴定了马和驴及其杂种后代的亲缘关系，证实这一方法是正确可行的。李金莲等和孟青龙等^[59,60]在 2004 年分别对纯血马和中国蒙古马进行 D-loop 高变区序列分析，同时，芒来等^[61]对中国蒙古马和纯血马的 mtDNA 高变区序列进行了比较研究，发现无论是蒙古马还是纯血马，其 mtDNA 高变区均存在有丰富的多态性。苏锐等^[62]研究证实关

中马遗传多样性丰富，具有多个母系起源。蔡大伟等^[63-65]在藏马和古马研究中得出一致的结论，另提出藏马与中亚和欧洲家马亲缘近于蒙古马。

分子遗传学的证据，证实了我国家马品种有着丰富的遗传多态性，不同的地理位置及家马品种间存在差异，可能存在不同时间的起源，驯化或者迁移。国内家马品种起源问题的更多细节，尤其家马品种间的亲缘关系，与世界家马品种的联系等，还有待进一步深入研究。

1.3 MtDNA 与分子系统发育

1.3.1 MtDNA 的遗传特征

动物的 mtDNA 的是一种共价闭合的环状 DNA，分子结构简单，基因排列紧密，除与复制和转录有关的一小段区域外，其它序列无内含子和转座子，也没有基因间隔序列。从测出的动物 mtDNA 全序列来看，mtDNA 分子量小，一般在 16.0~16.5 kb。遗传特征主要有：

(1) Mt DNA 的母系遗传

动物 mtDNA 通过卵母细胞细胞质传递给下一代，属于典型的母性遗传。目前，普遍认为高等动物的 mtDNA 是母性遗传，一个个体就可以代表一个母系集团。

(2) MtDNA 的突变与进化

虽然 mtDNA 基因组的长度及组织结构十分稳定，但一级结构上的进化都很快，是单拷贝核 DNA 的 5~10 倍，哺乳动物 mtDNA 的突变方式主要是碱基替换，包括转换和颠换，很少有基因重排。造成 mtDNA 进化速度快的原因主要是：第一，mtDNA 复制酶不具备校对能力，线粒体缺乏修复机制；第二，mtDNA 增殖较快，为碱基的突变提供了更多的机会，并使突变不断地传递下去；第三，mtDNA 不同于核 DNA，几乎没有与其结合的组蛋白，处于“裸露”形态，故易受到自由基和一些代谢中间物攻击。同时，mtDNA 一级结构中的分歧现象不仅存在于不同种的动物之间，也存在于同一种内的不同遗传群之间。mtDNA 核苷酸序列的分歧程度能反映物种亲缘关系的远近，这一特点在种群遗传学和进化分类学上得到了广泛的应用。

(3) MtDNA 无组织特异性

不同组织细胞的 mtDNA 具有高度的均一性，无组织特异性。这有利于 mtDNA 的取材和遗传多样性分析研究。

(4) 没有重组

MtDNA 在世代传递过程中没有重组，驯化了的家畜一般能保持其野生祖先 mtDNA 类型。

因此，mtDNA 作为一个可靠的母性遗传标记将广泛用于家畜种及品种的起源、演化和分类的研究。

1.3.2 MtDNA 在动物起源进化研究中的应用

MtDNA 在动物的母系起源中取得了重要进展，首先被应用于人类，证实了现代人类的非洲起源，相继在家畜起源研究中取得重要突破，研究得知现代家驴的非洲起源，黄牛的中东起源等。

1.4 本研究的目的和意义

利用分子生物学和生物信息学方法对我国16个现代家马品种 556 个个体和古马35 份样品共 591 个个体 mtDNA D-1 oop 区进行系统研究，通过同源序列比对，从分子水平上揭示中国家马的mtDNA遗传多样性；通过构建分子系统发育分析，并结合形态学，生态学及有关考古资料等探讨我国家马的母系起源，并分析品种间的遗传结构，从而为我国地方马品种的遗传资源保护、开发与利用提供科学依据。

第二章 试验部分

我国的养马历史悠久，商代后期以来，家马大量存在于不同的地区，表现出丰富的种质多样性，是世界家马遗传资源库的重要组成部分。随着时代的发展，家马利用价值的降低，近年来，国内家马数量大幅下降，种质资源流失严重，国内家马的研究和保护工作亟待加强。

近 20 年来，国家家马的研究多集中在形态、染色体、血液蛋白型方面，证实了我国家马具有丰富的遗传多样性，家马的起源、驯化及现代家马品种的形成还了解较少。最近，随着分子生物学技术，生物信息学的快速发展，家马分子系统发育的研究在世界家马大量开展，取得了重要进展，国内家马分子遗传研究也取得可喜成果，但目前的研究局限于少数组种，相对于国内丰富的家马遗传资源，仍然存在许多有价值的知识有待研究。

MtDNA 分子标记，广泛应用于现代动物的起源与进化分析，具有较好的科学性和有效性，此外，更有助于与国外数据统一进行联合分析。。

本文应用 mtDNA D-loop 区部分序列，对国内 5 大类型 16 个现代家马品种，此外包括 35 份内蒙古、河南地区古马样品（推算到 2000-4000 BP）进行分析，研究中国家马的起源进化与遗传多样性，为我国家马遗传资源保护与利用提供科学依据。

2.1 试验材料

本试验共采集了 10 个国家马品种 408 个样本，采样时尽可能地避开个体之间的血缘关系。颈静脉采血，ACD 抗凝，低温保存，并尽快运至实验室于 -80 °C 冰箱保存。各家马品种名称、采样地点及测序数目见图表 2-1。此外引用国内家马本实验数据和 GenBank 数据，另包括 35 份古马 DNA 样品，总体收集 591 条中国马 mtDNA D-loop 区部分序列（引用序列 GenBank 登录号见表 2-2）。引用国外家马、古马和普氏野马数据进行联合分析。

2.2 试剂与仪器

2.2.1 试剂

2.2.1.1 主要试剂

Taq DNA 聚合酶，dNTPs，蛋白酶K，DNA Marker，DNA 回收试剂盒，肝素钠，柠檬酸，柠檬酸钠，葡萄糖，Tris，EDTA，NaCl，NaOH，KCl，Na₂HPO₄，KH₂PO₄，Tris 饱和酚，氯仿，异戊醇，无水乙醇，醋酸钠，十二烷基硫酸钠（SDS），溴化乙锭（EB），溴酚蓝，二甲基苯氯FF，乙酸，蔗糖，硼酸，琼脂糖。

表 2-1 中国家马的样品来源
Table 2-1 Source of the domestic horse samples

品种名称 Breed	代号 Abbreviation	样本数 Sample size	采样地点 Locality	类型 Type
哈萨克马 Kazakh horses	KK	60	新疆昌吉、伊犁 Changji, Yili county, XinjiangAutumous Region	哈萨克 Kazahkan
焉耆马 Yanji horses	YJ	54	新疆和静县 Hejing city, XinjiangAutumous Region	蒙古 Mongolian
巴里坤马 Balikun horses	BL	33	新疆巴里坤县 Balikun Country, XinjiangAutumous Region	蒙古 Mongolian
蒙古马 Mongolian horses	MG	64 (21)	内蒙古自治区 Inn Mongolia Autumous Region	蒙古 Mongolian
岔口驿马 Chakouyi horses	CK	12	甘肃省天祝县 Tianzhu county, Gansu Province	蒙古 Mongolian
宁强马 Ningqiang horses	NQ	27	陕西省宁强 Ningqiang county, Shaanxi Province	西南 Southwestern
关中马 Guanzhong horses	GU	27	陕西省扶风县 Fufeng county, Shaanxi Province	蒙古 Mongolian
关山马 Guanshan horses	GS	10	陕西省陇县 Long county, Shaanxi Province	蒙古 Mongolian
河曲马 Hequ horses	HQ	30	甘肃玛曲县 Maqu county, Gansu Province	河曲 Hequ
玉树马 Yushu horses	YS	30	青海省玉树 Yushu county, QinhaiProvince	藏马 Tibetan
柴达木马 Chaidamu horses	CD	37	青海柴达木市 Chaidamu city, QinhaiProvince	——
大通马 Datong horses	DT	18	青海省大通 Wuwei city, QinhaiProvince	蒙古 Mongolian
藏马 Tibetan horses	TB	19	西藏自治区 Tibet Autumous Region	藏马 Tibetan
利川马 Lichuan horses	LC	34	湖北省利川市 Lichuan city Hubei province	西南马 Southwestern
贵州马 Guizhou horses	GZ	62	贵州省贵阳市 Guiyang city, Guizhou Province	西南马 Southwestern
德保矮马 Debao horses	DEB	20	广西自治区 Guangxi Autumous Region	西南马 Southwestern
中国古马 Chinese ancient horses	CA-MG/HX/YJ LS/LB	35	内蒙古、河南 Huabei city, Anhui Province	——

表2-2 引用的中国马GenBank 序列
Table2-2 Chinese horses sequences collected from GenBank

品种 Breed	数量 Num	GenBank 登录号 GenBank accession numbers
关山 Guan Mountain	10	DQ327838-DQ327847
德保矮马 DeBao horses	20	FJ392562-FJ392580, DQ297634
藏马 Tibetan horses	19	DQ986464-DQ986479, EF597512-EF597514
蒙古马 Mongolian horses	43	DQ297622-DQ297633, DQ297637-DQ297638, DQ327986-DQ328001, AF014413-AF014415, AF072996, AB329587, AB329592, AB329604, AB329606, AB329618, AB329622-AB329623, AB329625, AB329628
古马 Ancient horses	35	DQ900922-DQ900930, EU931584-931609

2.2.1.2 主要溶液与缓冲液

所有溶液与缓冲液均采用去离子超纯水配制。

(1) 0.2% 肝素钠：称取 0.2 g 肝素钠溶解于 100 mL 生理盐水中，-20℃保存。使用时按新鲜血液容积的 2%~3% 添加。

(2) ACD 抗凝剂：0.48% (m/V) 柠檬酸，1.32% (m/V) 柠檬酸钠，1.47% (m/V) 葡萄糖。使用时，每 6mL 新鲜血液中加 1mL 的 ACD 溶液。

(3) PBS-缓冲液：NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄ 1.44 g, KH₂PO₄ 0.24 g, 加超纯水定容至 1 L，调 pH 至 7.4，高压灭菌。

(4) 0.5 mol/L EDTA：EDTA 186.1 g，溶于 800 mL 的超纯水中，用 NaOH 调 pH 至 8.0，定容至 1 L，高压灭菌，4℃保存。

(5) 1 mol/L Tris·Cl：121.14 g Tris 碱，溶于 800 mL 超纯水中，HCl 调节 pH 至 8.0，定容至 1 L。高压灭菌，4℃保存。

(6) 5 mol/L NaCl：NaCl 292.2 g 溶于 1 L 超纯水中。

(7) 10% SDS：10g SDS 溶解于 90 mL 的超纯水中，68℃水浴溶解，用 HCl 调 pH 至 7.2，定容至 100 mL。

(8) DNA 抽提缓冲液：取 0.5 mol/L EDTA 40 mL, 1 mol/L Tris·Cl 10 mL, 5 mol/L NaCl 4 mL, 10% SDS 10 mL, 定容至 100 mL, 高压灭菌。(实际浓度为 0.2 mol/L EDTA, pH 8.0; 0.1 mmol/L Tris·HCl, pH 8.0; 0.2 mmol/L NaCl, 1% SDS)。使用前放至 37℃水浴中，使之完全溶解。(或称取 EDTA 36.32 g, Tris·Cl 6.057 g, NaCl 5.844 g, SDS 5 g, 定容至 500mL。)

(9) 蛋白酶 K：用超纯水配成 20 mg/mL, -20℃保存。

(10) NaAc 缓冲液：NaAc·3H₂O 20.4 g, 超纯水 40 mL, 稀 HAc 调至 7.4; 定容至 50 mL。

(11) TE 缓冲液: Tris·Cl 缓冲液 10 mmol/L, EDTA 缓冲液 0.1 mol/L, pH 调至 8.0, 高压灭菌, 4℃保存。

(12) 10×TBE-缓冲液: (0.9 mol/L Tris, 0.9 mol/L 硼酸, 0.1 mol/L EDTA, pH 8.0) 54.495 g Tris, 27.81 g 硼酸, 14.615 g EDTA, pH 调至 8.0~8.2, 定容至 500mL, 高压灭菌, 4℃或室温保存。

(13) 1×TBE 缓冲液: 取 10×TBE 100 mL, 定容至 1 L。

(14) 上样缓冲液: 0.25% 溴酚蓝, 0.25% 二甲苯青 FF, 40.0% (w/v) 蔗糖水溶液。

(15) EB 染色液: 10 mg 溴化乙锭溶于 1 mL 灭菌纯水, 避光保存。

2.2.2 仪器

试验中用的主要仪器设备见表 2-3。

表 2-3 主要仪器设备
Table 2-3 Apparatus in present study.

仪器名称 Apparatus	型号 Model	生产厂家或地址 Company or Address
PCR仪	GeneAmp® PCR System 9700	美国应用生物系统公司 (ABI)
PCR仪	PTC-150	美国 MJ 公司
紫外分光光度计	Cintra	GBC 公司
高速冷冻离心机	3-18K	SIGMA 公司
台式高速离心机	1-13	SIGMA 公司
凝胶成像仪	Kodak120	美国
Eppendorf 移液器系列	1000 μL, 200 μL, 100 μL, 20 μL, 10 μL, 2.5 μL	德国
电泳仪	DYY-12 型	北京六一
三恒电泳仪	DYY-10 型	北京六一
电泳槽	DYCP-31A	北京六一
电泳槽	DYCP-31C	北京六一
电泳槽	DYCZ-24D	北京六一
电泳槽	Mini-PROTEAN	美国 Bio-Rad
超低温冰箱	MDF-382E	日本三洋
普通冰箱	BCD-257SL	海尔
超纯水仪	Millipore-academic	美国密理博
电子天平	Adventurer™	OHAUS 公司
自动三重纯水蒸馏器	SZ-97	上海亚荣生化仪器厂
紫外分析仪	WD-9403F	北京六一
电热恒温水浴锅	21-6	江苏常熟
格兰仕微波炉	WD700	佛山格兰仕公司

2.3 试验方法

2.3.1 基因组 DNA 的提取与检测

采用酚-氯仿法提取 DNA。取 2 μ L DNA，在含有 EB(终浓度为 0.5 μ g/mL) 的 1.0% 的琼脂糖中，55 V 电泳 1 h，经荧光扫描仪检测并照相。

2.3.2 线粒体 DNA D-loop 的扩增

特异性引物引用克罗地亚 Ivankovic 与斯洛文尼亚 Dove^[66]设计的位于线粒体 15494-15740 区域(参考序列 X79547^[67]) D-loop 引物。正链引物为 P28: 5' -AGT CTC ACC ATC AAC ACC CAA AGC-3' ,反链引物为 HF: 5' -CCT GAA GTA GGA ACC AGA TG-3' 。

总的反应体系为 50 μ L，通过多次优化，总结得出如下反应体系和反应条件。

反应体系	H ₂ O	26.7 μ L
	10×buffer	5.0 μ L
	dNTP (0.25 mmol/L)	4.0 μ L
	正向引物 (10pmol/ μ L)	2.0 μ L
	反向引物 (10pmol/ μ L)	2.0 μ L
	Taq DNA聚合酶 (5U/ μ L)	0.3 μ L
	MgCl ₂ (1.5 mmol/L)	5.0 μ L
反应条件	模板DNA	5.0 μ L
	94 °C 预变性4 min	
	94 °C 变性30 s	
	55 °C 退火60 s	
	72 °C 延伸90 s	
	72 °C 再延伸10 min	35 cycles

2.3.3 PCR 产物的纯化与回收

PCR 产物用 1.0 % 的琼脂糖凝胶电泳检测其大小、纯度及亮度。每个样品取 2 μ L 用于检测(见图 2-1)，对于扩增效果良好且足量的样品，则将每个样品中余下的 48 μ L PCR 产物用柱式 PCR 回收试剂盒进行纯化与回收。

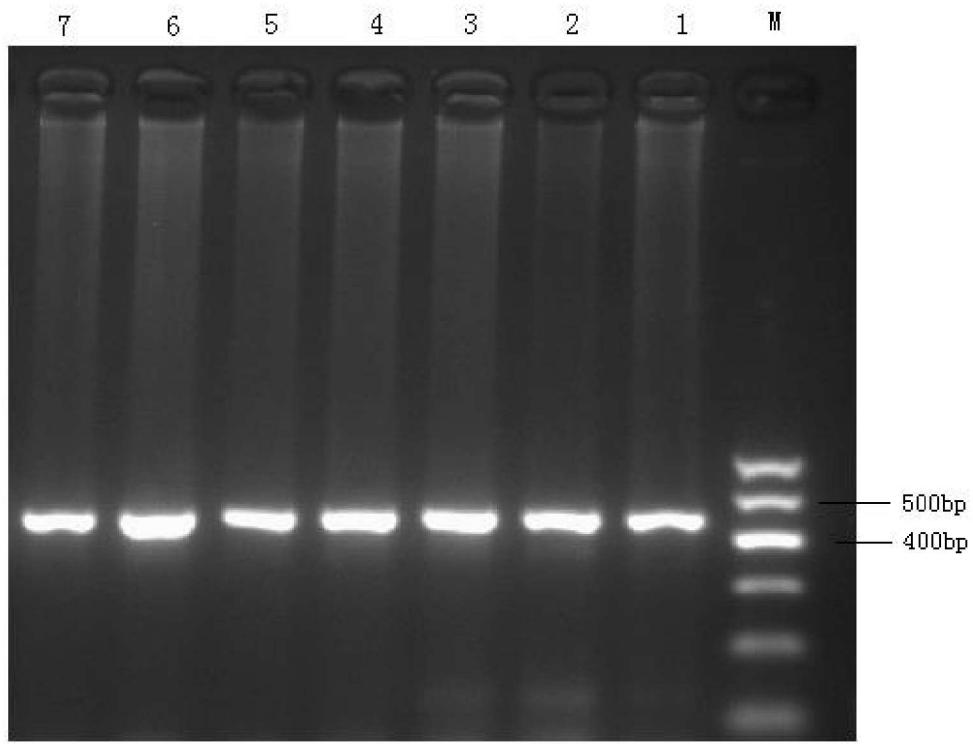


图 2-1 PCR 扩增电泳图
Fig.2-1 PCR products for mtDNA D-loop region in horses

2.3.4 线粒体 DNA 的测序

纯化与回收后的 PCR 产物送上海捷瑞生物有限公司测序，序列测定仪为 ABI PRISMTM377XL DNA Sequencer。

2.4 数据处理

2.4.1 序列校对与同源序列比对

测序仪做出的分析结果可能存在碱基的错读、漏读和多读等错误，为保证 DNA 测序仪所测得的序列绝对正确，因此本研究所测得的 408 条序列分别先用 DNASTar 软件包中的 SeqMan 进行序列与胶图的人工一一校正，结合网上已发表的 183 条中国家马和古马的 mtDNA D-loop 序列共 591 条序列，最后根据 GenBank 中的家马线粒体 D-loop 区序列保存成一致性序列，然后用 BioEdit 7.0 软件编辑成一个文件，再用 CLUSTAL 程序进行同源序列比对，最后保存成 MEGA 等分子生物学软件能识别的文件格式^[68-69]。

2.4.2 MEGA3.1 软件的应用

用分子进化遗传分析软件 MEGA3.1^[70]构建分子系统发育树，确定单倍型数目与多态位点，再用 Kimura 双参数数法构建单倍型 NJ 系统树，并对拓扑图中各个分支的支持率进行 1000 次自展法重抽样检验。

2.4.3 核苷酸序列多态性分析

计算碱基组成、单倍型多样度（Haplotype diversity, h ）、核苷酸多样度（Nucleotide diversity, π ）和 Fst 值应用 Arlequin3.1 软件^[71,72]进行统计。

2.4.4 网络分析与群体结构分析

用 NETWORK5.1 软件绘制网络图和群体扩张图。

利用 Arlequin3.1 对类群进行分子方差分析（AMOVA）。

2.5 结果与分析

2.5.1 碱基组成比较

全部个体 D-loop 区 247bp 碱基组成中，T、C、A、G 4 种核苷酸的平均比例分别为 29.7%、26.6%、31.8%、11.9%。A+T 含量为 61.5%，G+C 含量为 38.5%，A+T 含量明显高于 G+C 含量，符合哺乳动物线粒体 DNA 碱基组成的基本特点。由于各品种个体间序列的变异，因此品种间序列的碱基组成都不完全一致，但差异不显著。

2.5.2 多态位点分析

分析 591 条序列，发现 70 个多态位点，其中 13 个颠换，3 个转换与颠换共存，60 个为转换，显示出碱基的替换有明显的偏倚，这与动物线粒体 DNA 碱基的变异特点是相一致的。而且多态位点均为两碱基间变异，由此可以看出动物线粒体 DNA 碱基变异是相当一致的。

2.5.3 中国家马 mtDNA 遗传多样性分析

本试验所研究的中国家马品种和古马的群体遗传多样性参数见表2-4，可以看出，单倍型数目在每个品种中分布不同，最小为 8，最大为 39，整体与样品含量大小相关；单倍型多样度和核苷酸多样度均以关中马最小，为 0.842 ± 0.041 、 0.0219 ± 0.0076 ；大通马最大，为 0.980 ± 0.024 、 0.0263 ± 0.0111 ，表明中国家马具有较丰富的遗传多样性。

分析 591 个样本遗传多样性，发现 164 种单倍型，整体单倍型频率为 0.976 ± 0.002 ，核苷酸频率为 0.0257 ± 0.0088 ，各品种间差异较小，大通马最高，关中马最低（表 2-4），各单倍型出现频率相差较大，单倍型出现最高频率为 44 次，在各现代家马品种和古马中都有分布。大于 5 次频率的共有 22 种单倍型，有 95 种单倍型出现一次，69 种单倍型与国外家马共享，在首次命名的 7 个支系 17 个亚支系中，中国家马共享 14 个单倍型，中国家马独立单倍型 95 种，占所有中国家马单倍型的 58%，分布于 A-F 支系，其中 F 支系发现最多，此外一些单倍型表现出独特的变异特征。

表 2-4 中国家马遗传多样性分析
Table2-4 Genetic diversity indices in Chinese horses

品种 Breeds	n	k	单倍型组 Haplogroups	单倍型多样度 Haplotype diversity (SE)	核苷酸多样度 Nucleotide diversity (SE)	来源 Rourses
KK	60	36	A,B,C,D,F,G,H	0.975±0.009	0.0266±0.0085	本文
YJ	54	29	A,C,D,E,F,G,H	0.955±0.014	0.0257±0.0088	本文
BL	33	23	A,B,C,D,F,G,H	0.975±0.013	0.0264±0.0095	本文
MG	64	39	A,B,C,D,E,F,H	0.979±0.007	0.0276±0.0097	本文, GenBank
		43				
HQ	30	21	A,B,C,D,F,G,H	0.963±0.021	0.0269±0.0086	本文
NQ	27	16	A,D,F,H	0.943±0.027	0.0236±0.0096	本实验室
CD	37	13	A,B,D,F,H	0.917±0.020	0.0201±0.0070	本文
YS	31	8	A,C,D,E,F,H	0.956±0.059	0.0244±0.0118	本文
DT	18	15	A,B,D,E,F,H	0.980±0.024	0.0263±0.0111	本文
CK	31	22	A,D,E,F,H	0.972±0.016	0.0233±0.0088	本文
TB	19	15	A,C,D,E,F,H	0.971±0.027	0.0259±0.0104	GenBank
GS	10	8	A,D,F,G,H	0.956±0.059	0.0244±0.0118	GenBank
GU	27	9	A,C,D,F,G	0.842±0.041	0.0219±0.0076	本实验室.
LC	34	19	A-I	0.906±0.037	0.0227±0.0102	本文
GZ	62	26	A-I	0.926±0.019	0.0229±0.0087	本实验室
DB	20	15	A,D,F,G,H,I	0.968±0.025	0.0271±0.0125	GenBank
CA-	35	25	A-I	0.978±0.012	0.0246±0.0113	GenBank
ALL	591	164	A-I	0.976±0.002	0.0257±0.0088	——

注: n 代表单倍型数目; k 代表多态位点数目。

Note: n stands for Number of haplotypes;K stands for Polymorphic nucleotide sites.

中国家马品种间存在广泛的单倍型共享，这说明中国家马不同品种可能广泛存在多起源，或说明各家马品种间存在着广泛的基因交流。

2.5.4 中国家马系统发育分析

应用中国家马和古马 164 种单倍型构建 NJ 树，加入 Jansen 等^[21] 的 17 个分支单倍型作标准，可以看出中国家马和古马分布于 A-G 支系，发现新的支系 H。

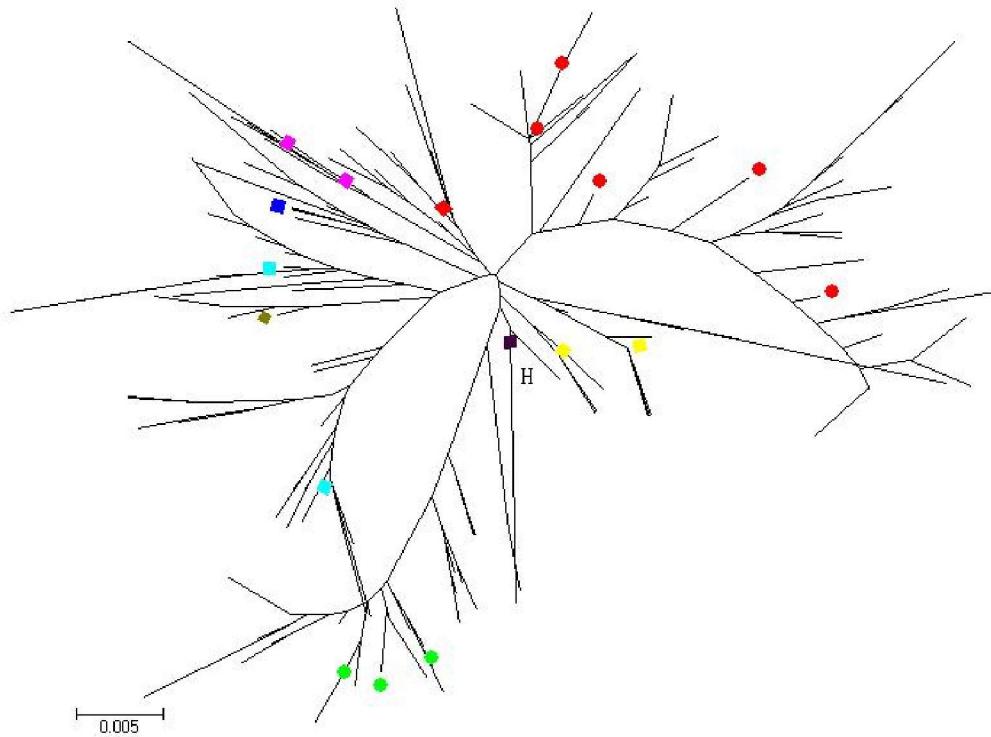


图 2-2 中国家马与古马 164 单倍型与 Jansen 所命名 17 个单倍型构建 NJ 树

注：红色为 A 支系，粉色为 B 支系，黄色为 C 支系，浅绿色为 D 支系，深蓝为 E 支系，浅蓝为 F 支系，棕色为 G 支系，紫色为 H 支系。

Figure 2-2 NJ phylogenetic tree of 164 mtDNA D-loop haplotypes in Chinese native and ancient horses types with 17 subhaplogroups as standard.

Note: The colour indicates the eight haplogroups each sample roots to with red A, pink B, yellow C, light green D, dark blue E, liangt blue F, brown G, dark blue H.

用中国家马和古马 591 份遗传数据进行Network 网络分析，绘制中介网络图（见图2-3），从结果可以看出，中国家马和古马至少存在 9 个分支 (A-I)，支系 A、D 和 F 所占比例较大，其次 B 和 C 支系也存在多个样本，E、G 和 I 支系所含个体较少（见表2-5）。上述支系单倍型与 Vila ,Jansen 等^[21,36]研究结果中 A-G 吻合，H 和 I 支系结构域见表 2-6。H 国外少品种的一些个体中存在，I 支系单倍型在世界家马中存在较多。暗示中国家马和古马与国外家马起源一致，部分支系表现出地域特征。

AMOVA 分析差异主要来自品种内，Fst 检测中国家马和古马显著相关，F 和 H 支系、E' 和 G' 亚支系与中国家马和古马显著相关。

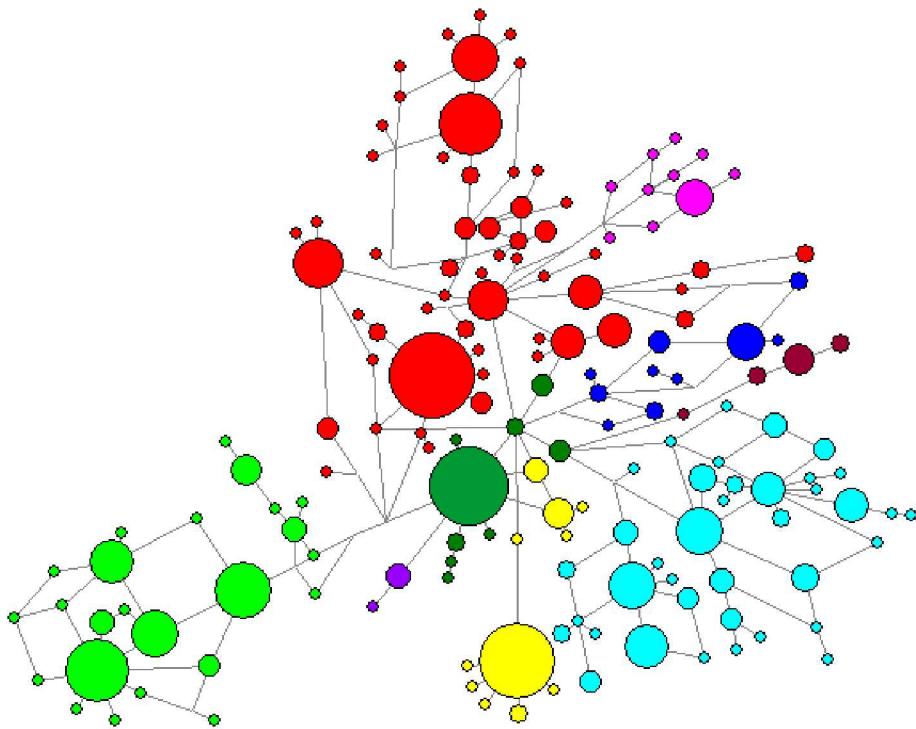


图 2-3 中国家马与古马 591 条序列 mtDNA D-loop 区 247bp 构建中介网络图,分出 A-I 9 个分支, 不同的颜色代表各个分支: 红色 A, 粉色 B, 黄色 C, 浅绿色 D, 深蓝色 E, 浅蓝色 F, 棕色 G, 深绿色 H, 浅棕色 I。

Figure2-2 A median joining phylogenetic network constructed for 591 horse mitochondrial DNA sequences using 247 bp of the control region to show the relationships within Eurasian horse populations of the main haplogroups, A–I. The colour indicates which of the nine haplogroups each sample roots to with red A, pink B, yellow C, light green D, dark blue E, liangt blue F, brown G, dark blue H and light brown I.

表 2-5 中国家马和古马支系分布频率表
Table 2-5 Haplogroups frequency of the Chinese modern and ancient horse samples

Haplotype groups	Number of haplotypes	Frequency of haplogroups1	Number of samples	Frequency of haplogroups2
A	56	34.4%	203	34.3%
B	10	6.1%	19	3.2%
C	15	9.2%	59	10.0%
D	23	14.1%	110	18.6%
E	10	6.1%	23	3.9%
F	38	22.7%	114	19.3%
G	4	2.5%	15	2.5%
H	6	3.7%	43	7.3%
I	2	1.2%	5	0.9%

注: 1, 总单倍型; 2, 总样本。

Note: 1, number of haplotypes/total haplotypes; 2, number of samples/total samples.

表 2-6 MtDNA D-loop 序列新支系的结构域
 Figure 2-6 Sequence motifs of the new mtDNA D-loop haplogroups

支系 Haplogroup	结构域 Sequence motif
H	495 C, 585 A, 602 T, 720 A
I	495 C, 526 C, 540 G, 585 T, 602 T, 649 G, 720 A

各品种分布于各支系的种类和比例见图 2-4，所有研究群体中都有 A、D 和 F 分布，现代家马各品种分布支系种类为 4-9 个，贵州马，利川马及古马中存在所有支系，宁强马分布支系最少为 4 个。

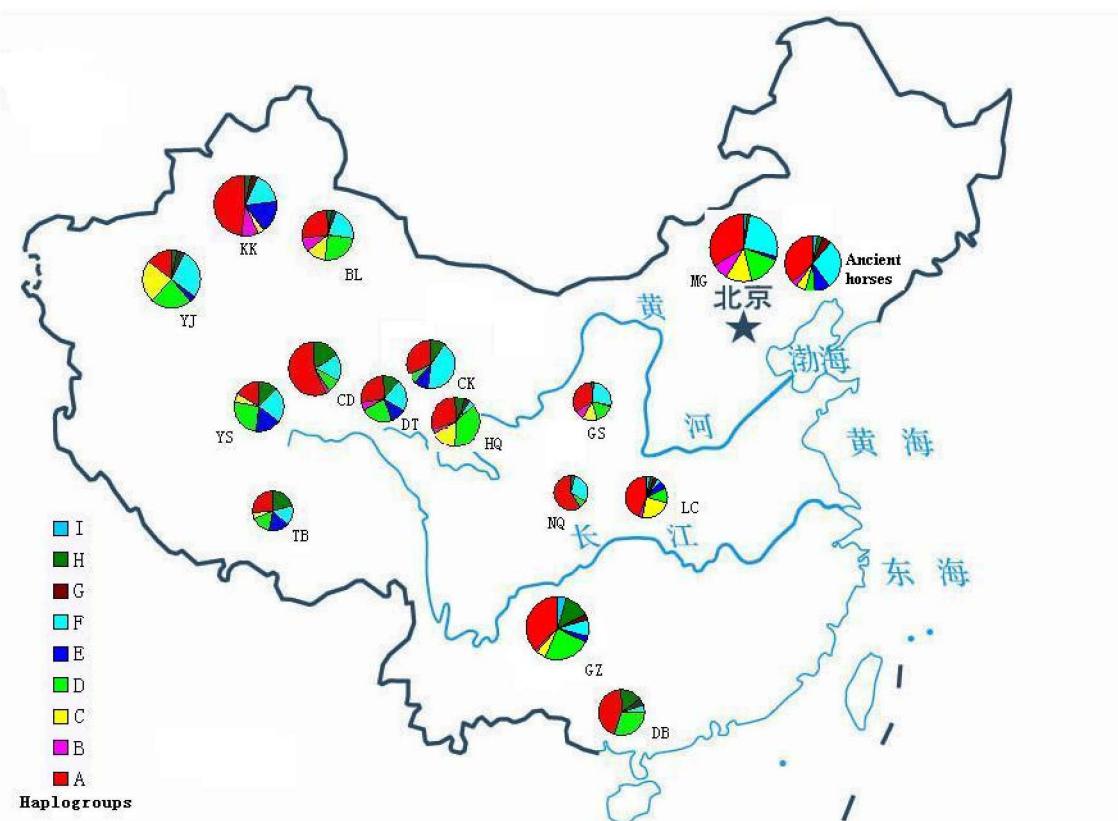


图 2-4 中国家马与古马地理及支系分布
 Figure 2-4 Geographical and mitochondrial DNA haplogroup distributions in the Chinese horses.

引用 GenBank 世家马、古马和普氏野马 mtDNA 序列共 1440 条，联合中国家马和古马数据，用 D-loop 区 247 bp 构建简约网络图，以 Jansen 等^[21]的研究结论为

分支标准，分出 A-G 支系，新命名 H 和 I 支系，空白显示中国家马和古马分布（见图2-5），可以看出中国家马分布于所有 9 个支系中，与中国家马与古马的独立分析结果一致，F、E、G 和 H 支系所占比例较大，E'、G' 和 A' 亚支系中国家马单独聚合，推测其可能为中国起源。

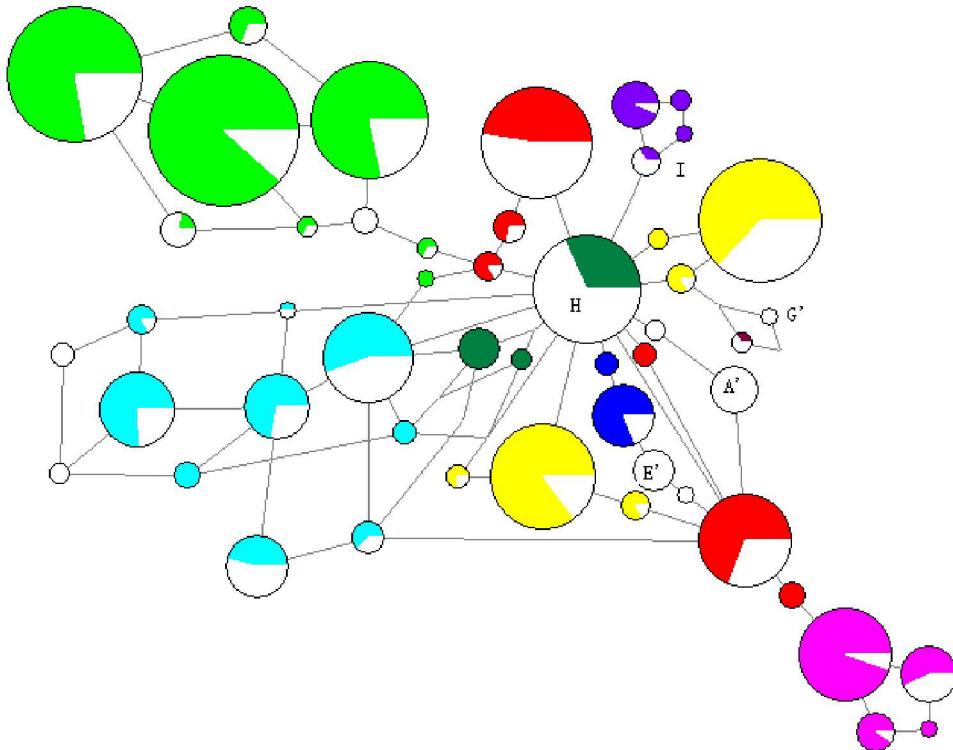


图 2-5 世界马 2031 条序列 mtDNA D-loop 区 247bp 构建简约中介网络图，出现 A-I 9 个分支，不同的颜色代表各个分支：红色 A，粉色 B，黄色 C，浅绿色 D，深蓝色 E，浅蓝色 F，棕色 G，深绿色 H，浅棕色 I；白色为中国马分布。

Figure 2-5 Reduced median phylogenetic networks constructed for horse mitochondrial DNA sequences using 247 bp of the control region. Showed the Relationships of the nine main haplogroups, A–I, The colour indicates which of the nine haplogroups each sample roots to with red A, pink B, yellow C, light green D, dark blue E, liangt blue F, brown G, dark blue H and light brown I. The positions of the Chinese horse mtDNA sequences are shown as white pie slices.

2.5.5 古马系统发育分析

中国古马遗传多样性丰富，独立单倍型 11 个，占所研究中国古马总单倍型的 44%，单倍型流失严重，所以分析古马更有利追溯家马源流。

引用国内 9 个遗址出土的马骨遗骸 aDNA 数据，其中 5 个遗址位于内蒙古自治区境内：凉城县板城墓地和凉城县小双古城墓地、和林格尔新店子墓地、赤峰市大山前遗址、赤峰市井沟子墓地；2 个位于河南省：新郑市郑韩故城毛园民宅二号车马坑、安阳殷墟；此外还有山东滕州前掌大遗址以及宁夏回族自治区固原县彭堡于家庄遗址。基于考古发掘资料分析，这 9 个遗址的年代不尽相同，跨度从距今 4000 千年的夏家店下

层时期到 2200 年前的战国晚期，结合世界其它地区的古马序列进行分析，世界古马主要引用为：不列颠群岛几个遗址（1000 BP）；俄罗斯 Yakutsk 遗址（300~200 BP）；韩国 Jeju 遗址（1300~1200 BP）；美国 Alaska 遗址（28 000~12 000 aBP）及瑞典南部几个考古遗址（2000~1000 BP），此外包括了匈牙利（1200 BP）、西班牙（3000 BP）等遗址（见表2-7）。

表2-7 引用的古马 GenBank 序列
Table2-7 Ancient horse sequences collected from GenBank

地区 Region/Country	缩写 Abbreviation	数量 Num	登录号 GenBank accession numbers
中国 China	CA-	35	DQ327986-8001,AF056071,AF014413-15 AF072996,DQ297622-33
西班牙 Spain	ATA	20	DQ683525-EU683544
匈牙利 Hungary	AV	8	FJ624157-624150
匈牙利 Hungary	PAE	26	EU559575-EU559585, EU093030-EU093044
匈牙利 Hungary	PME	29	EU093045-EU093073
阿拉斯加 Alaska	Pleit	8	AF326668-AF326675
瑞典 Sweden	Anc	4	AF326676- AF326679
爱尔兰 Ireland	ANCH	3	DQ327848, DQ327850-DQ327851
韩国 Korea	KAA	9	AJ876883-AJ876890
俄罗斯 Russia	RUA	1	AJ876891

共引用 143 条序列进行分析，检测到 70 种单倍型，NJ 系统发育分析（见图2-6）显示，古马同样至少包括全部 9 个支系（A-I），美国阿拉斯加样品中部分古马独立聚合，定义为 J 支系，A 和 A' 支系分别为几不同A支亚支系（Jansen等^[21]）的聚集。

在 D 支系中显示出明显的中东匈牙利古马分布特征，H 的一个亚支中利比亚半岛西班牙古马独立聚合，暗示这些支系的驯化地域。我国古马分布于全部 9 个支系，在 G 和 F 支系表现出与匈牙利古马相近的特征，I 支系及 H、C 支系的亚支系，表现出明显的地域特征。

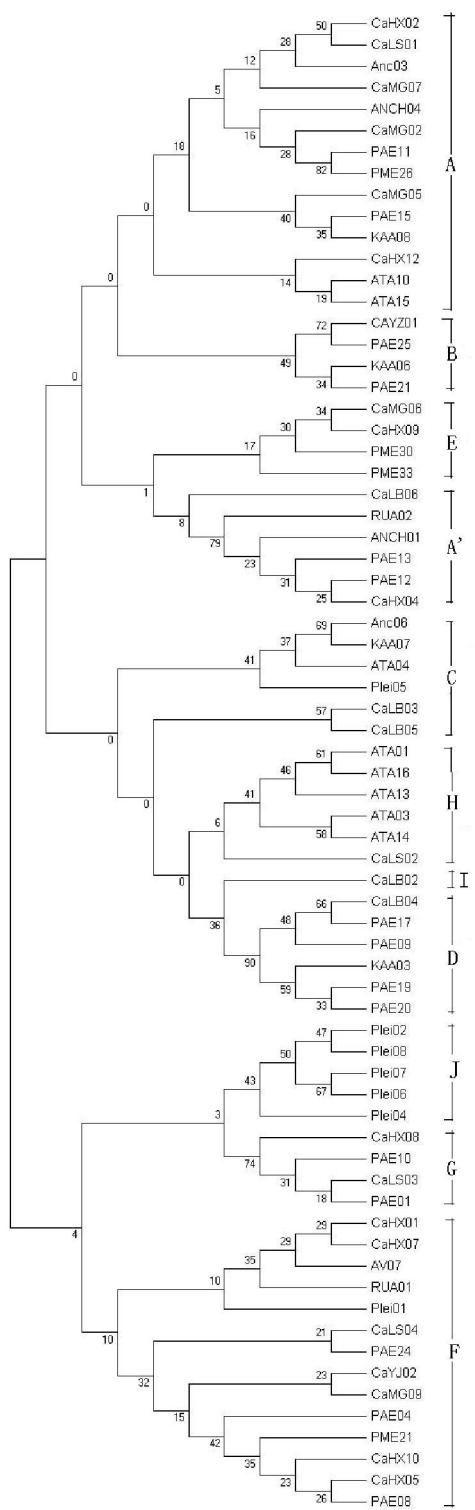


图 2-6 古马 mtDNA D-loop 70 种单倍型 NJ 系统树
Figure 2-6 NJ phylogenetic tree of 70 mtDNA D-loop haplotypes in ancient horses.

2.5.6 中国家马群体扩张分析

对于估测群体在过去是否发生扩张或经受了多重瓶颈效应，主要采用核苷酸不配对分析^[73,74]和 Fs 中性检验^[75]两种手段进行分析。如果核苷酸不配对分布曲线呈现单峰（unimodal）泊松分布，同时Fs中性检验显著偏离中性突变，那么群体就曾经发生了扩张；如果核苷酸不配对分布曲线呈现多峰（multimodal）泊松分布，同时Fs检验不显著，那么说明群体大小保持相对稳定或者经受多重瓶颈效应。稳定的群体呈现多峰分布，而扩张群体则呈现光滑的单峰分布。应用 Network 5.1 软件对中国家马与古马的591个体进行不配对分析（见图2-7），结果呈单峰分布。

Fs 值为 -5.67，P 值小于 0.01，显著偏离中性，表明曾经历了群体扩张。

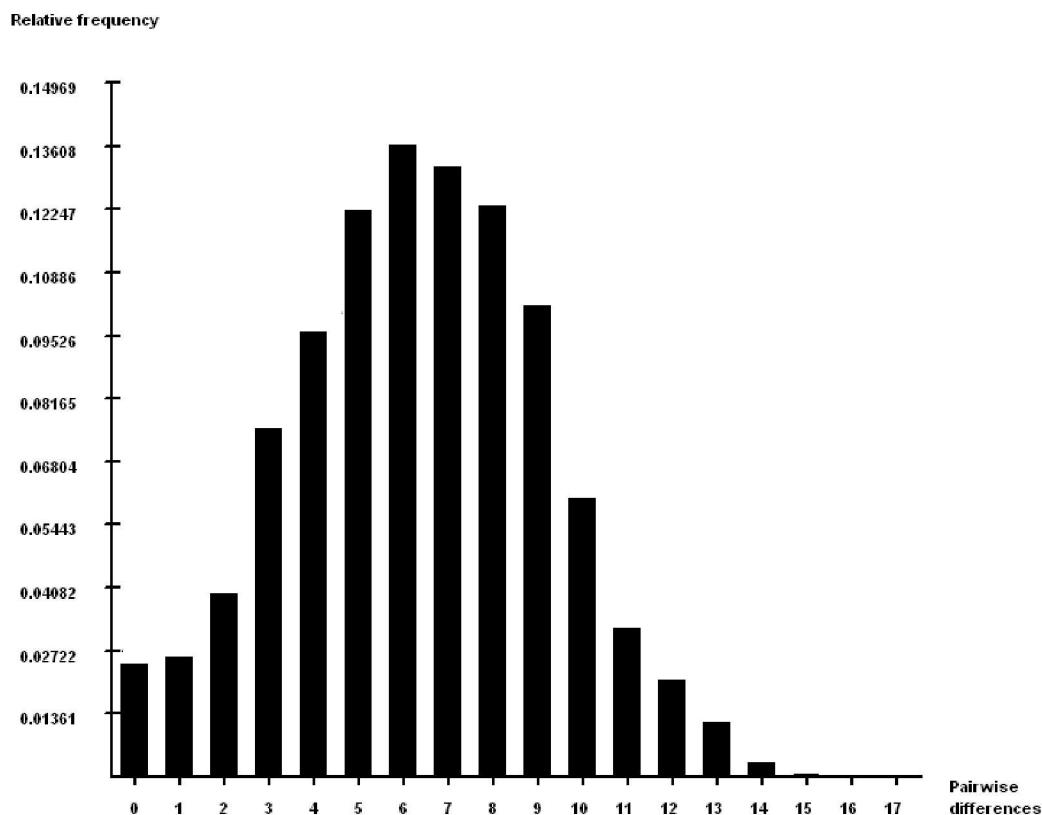


图 2-7 中国现代家马与古马 591 个个体不配对分布曲线
Figure 2-7 Mismatch distribution of mtDNA sequences in Chinese horses.

2.6 讨论：

2.6.1 世界家马起源

考古学和遗传学证据支持野马的驯化发生在 5000 BC.^[9,10]，分子系统发育研究证实美洲家马的利比亚半岛起源，与考古学证据 1600 年传入相一致^[76]，亚洲的日本、韩国家马广泛受到的蒙古马的影响^[40,46]，考古学证据支持中国家马从中亚地区传入^[10,12]。

本研究中，世界家马 2031 样本简约中介网络图显示，新的 H 支系主要来自中国，且处于网络的中心，暗示其在现代家马起源中具有重要地位，整体与 Vila、Jansen、Hill 等^[21,36,37]的结论吻合，除了 A-G 和 H 支系外，新命名的 I 支系主要分布于欧洲家马品种。亚支系 G' 和 E' 中都显示出清晰的中国家马特征，暗示中国存在家马的独立驯化事件。

驯化的动物来源、驯化时间和地点，是研究家马驯化问题的核心，分子遗传学证据支持家马的多起源，即存在多个驯化中心^[21,36]，Jansen 等^[21]分析了部分家马的地理品种特征，A2 亚支系只对应于普氏野马，C1 亚支系和 E 支系对应于北欧小型马，聚簇 D1 则对应于伊比利亚和西北非的家马品种，G 支系的德国品种马特征，McGahern 等^[77]分析了 F 支系的东亚家马特征。根据分子进化理论分析，依据变异速率推断，家马的支系之间的分离早在野马阶段已经存在，野马必然发生过融合，原因可能来自于环境和人类活动的影响。野马共分出 18 个类型^[1]，历史上主要存在过有森林、高原、草原和沙漠四大类，传到近代的只有欧洲野马和普氏野马。

中国的古马数据证实，2200 多年前，中国家马已经存在所有 9 个支系，中亚和欧洲瑞典、西班牙的古马数据证实多支系在 2000 年前已经广泛存在于不同的地区。一些地域特征的支系或亚支系，暗示着驯化发生的地区，匈牙利古马的 D 支系特征，匈牙利和中国古马中的 F、G 支系特征，存在同源流马，可能为野马或家马时期融合。

美国阿拉斯加古马样品（12,000-28,000 BP）的研究结果显示，其存在 C 和 F 两个支系参与了现代家马形成，说明至少 1 万年前的野马已经融合了部分支系，暗示野马时期发生了融合，如果这样的假设成立，现代家马驯化的时间和地点，及其野马来源，需要更多证据，如果考古学在马迁移方面提供更多支持，将更易于得出结论；而如果不同地点野马的驯化后融合，必然存在起源地特征，单倍型多样度和各支系分布比例。例如 1600 年传入美洲的家马，到现在美洲只有 D 和 A 支系^[80]，现在分析两个方面，都可能存在。

综合分析得出，现代家马由多种野马驯化而来，驯化可能发生在多个地区、多个时间段，中国存在家马的独立驯化事件。

2.6.2 中国现代家马品种起源

化石证据和文献记录显示，中国养马历史悠久，数量较多，分布地域广泛，种质资源丰富，历史上存在多个养马中心，包括蒙古草原，黄河中下游，新疆伊犁青藏高原地区及西南地区^[1]。

本研究证实，中国家马和古马具有丰富的遗传多样性，各品种间广泛存在着共享单倍型；分子系统发育分析显示，中国家马存在所有 9 个支系，且在 H 和 F 支系分布明显高于其它地区，A、D 和 F 支系广泛存在于所有品种，贵州和利川品种及古马（2000-4000BP）分布于所有支系，F、H、A'、E' 和 G' 等具有中国特征的支系和

亚支系中，没有显示出明显的地域和品种分布特征。从各现代家马品种的支系分布情况看，宁强马最少，存在 4 个支系中，可能与其近年来数量急剧减少相关，关中马为近年来培育的品种，支系较少，说明来自有限的母系祖先。B 支系在青海地区大通马、玉树马、柴达木马及藏马，另外西南的德保矮马中没有分布，暗示其相近的血缘关系，德保矮马遗传多样性丰富，独立单倍型较多，占 50.0%，支系分布中 A、D 和 H 比例较大，推断其与国内家马起源一致，长期相对封闭的生存环境，形成多种独立单倍型。G 支系主要分布于新疆哈萨克马，巴里坤马、焉耆马、及蒙古马中，与历史进程中的两地间文化联系相一致，说明我国家马间存在广泛的基因融合，各大养马区没有显示出明显的支系特征，更多国内家马的起源的细节有待进一步深入研究。

第三章 小 结

通过对 16 个中国现代家马品种 556 个个体 35 份古马样品，共 591 条 mtDNA D-loop 区 247bp 序列进行研究，得到以下结果：

1. 中国现代家马和古马 mtDNA D-loop 序列由 A、C、T、G 组成，A+T 的平均含量为 61.5%，G+C 的平均含量为 38.5%，A+T 含量明显高于 G+C 含量，表现出碱基的偏倚性，符合哺乳动物线粒体 DNA 碱基组成的基本比例。
2. 所研究中国家马 591 条 mtDNA D-loop 序列检测到 164 个单倍型，含有 70 个变异位点，60 个转换，13 个颠换，3 个转换与颠换共存，显示出碱基的替换有明显的偏倚。
3. 中国现代家马各品种间、现代家马与古马间存在广泛的单倍型共享，说明中国家马不同品种间及古马可能有共同的起源，各品种间存在着广泛的基因交流。
4. 中国现代家马的单倍型多样度和核苷酸多样度分别为 0.976 ± 0.002 和 0.0257 ± 0.0088 ，古马的为 0.978 ± 0.012 和 0.0246 ± 0.0113 ，表明中国家马具有丰富的遗传多样性。
5. 中国现代家马和古马系统发育分析显示，存在 A-I (A-G 符合 Jansen 标准^[31]) 9 个支系，表明具有多个母系起源。
6. 引用 GenBank 世界家马、古马、普氏野马 mtDNA D-loop 序列与中国家马、古马数据联合分析，构建简约中介网络图，证实中国家马与世界家马在 9 个支系内存在广泛的融合，与 H、E、G 和 F 支系显著相关，在 E'、G' 和 A' 亚支系中，中国马单独聚合。
7. 不同地区、不同年代古马 NJ 系统发育分析显示，古马与现代家马有相近的支系分布，一些支系具有地域特征。
8. 群体扩张分析和 Fs 分析证实中国家马经历群体扩张。

参考文献

- [1] 中国家畜家禽品种志编委会.《中国马驴品种志》[M]. 上海科学技术出版社,1986.
- [2] 王志俊, 宋澎. 中国北方家马起源问题的探讨[J]. 考古与文物, 2001, (2):26-30.
- [3] 宋涛. 我国古代的养马业[J]. 甘肃社会科学, 1994, (05).
- [4] 芒来. 蒙古马遗传多样性研究进展[J]. 遗传(Hereditas), 2008, (3):269-276.
- [5] 候文通. 试论马种遗传资源的管理[R]. 第四界全国马匹育种委员会学术讨论会材料, 1997.
- [6] Levine, Marsha, Renfrew, et al. Prehistoric Steppe Adaptation and the Horse[M]. McDonald Institute for Archaeological Research, Cambridge,2003.
- [7] Mashkour M, Equids in Time and Space: Papers in Honour of Véra Eisenmann [C].Oxbow, Oxford.
- [8] Flad, Rowan, Yuan, Jing, Li, Shuicheng. Zooarchaeological evidence of animal domestication in northwest China. Elsevier, Amsterdam, 2006.
- [9] Linduff, Katheryn M. A walk on the wild side: late Shang appropriation of horses in China[M]. McDonald Institute Monographs, Cambridge. 2003:139-162.
- [10] Yuan, Jing, and Flad, Rowan. Two issues concerning ancient domesticated horses in China[C]. Bulletin of the Museum of Far Eastern Antiquities. 2003, (75): 110-126.
- [11] Yuan, Jing, and Flad, Rowan. New zooarchaeological evidence for changes in Shang dynasty animal sacrifice[J]. Journal of Anthropological Archaeology .2005, (24):252-270.
- [12] Yuan, Jing, and Flad, Rowan. Research on early horse domestication in China[M]. Oxbow Books, Oxford. 2006.
- [13] Hsu, Cho-yun, Linduff, Katheryn. Western Chou Civilization[M]. Yale University Press, 1988.
- [14] Inner Mongolia Team, Institute of Archaeology CASS. Ningcheng Nanshangen yizhi fajue baogao (Report of excavation at Nanshengen in Ningcheng) [J]. Kaogu Xuebao, 1975.
- [15] Ashtong. Serum protein variations in horse[J]. Nature, 1958, (182): 1028-1030.
- [16] Braend. Studies on hemoglobin and tranferrins types of horse[J]. Nord Vet Med, 1964, (16):31-37.
- [17] K Benirschke, N Malouf, R J Low, Chromosome Complement: Differences between *Equus caballus* and *Equus przewalskii*, Poliakoff[J]. Science 1965, (148):382 - 383
- [18] X. Xu, A. Gullberg, U Arnason. The complete mitochondrial DNA (mtDNA) of the donkey and mtDNA comparisons among four closely related mammalian species-pairs[J]. J Mol Evol, 1996 (43): 438-446
- [19] George M, and Ryder. Mitochondrial DNA evolution in the Genus *Equlls*[J]. Mol.Bio.Evol, 1986,(3):25-35.
- [20] Myka J L,Lear T L, Houck M L, et al. FISH analysis comparing genome organization in the domestic horse(*Equus caballus*)to that of the Mongolian wild horse [J]. Cytogenet Genome Res, 2003, 102 (14): 222-225.
- [21] Thomas Jansen, Peter Forster. Mitochondrial DNA and the origions of the domestic horse[J]. Population Biology, 2002,(99):10905-10910.
- [22] Ishida N, Hasegawa T, et al. Polymorphic sequence in the D-loop region of equine mitochondrial DNA

- [J]. Animal Genet, 1994, 25(4):215-221.
- [23] Marklund S, Chaudhary R, Marklund L, et al. Extensive mtDNA diversity in horses revealed by PCR-RFLP analysis [J]. Animal Genet, 1995, 26(3):193-196.
- [24] Wallner B, Brem G, Muller M, et al. Fixed nucleotide differences on the Y chromosome indicate clear divergence between *Equus przewalskii* and *Equus caballus* [J]. Animal Genetics, 2003, 34(6):453-456.
- [25] Lindgren G, Backstrom N, Swinburne J, et al. Limited number of patrilines in horse domestication[J]. Nat Genet, 2004, (36): 335-336.
- [26] Jung Y H, Han S H, Shin T, et al. Genetic characterization of horse bone excavated from the Kwakji archaeological site, Jeju, Korea [J]. Mol.Cells, 2002, 14(2):224-230.
- [27] Di Bernardo G, Del Gaudio S, Galderisi U, et al. 2000 Year-old ancient equids:an ancient-DNA lesson from pompeii remains [J]. J Exp Zool B Mol Dev Evol, 2004, 302(6):550-556.
- [28] Nass M M K. Fibrous structures within the matrix of developing chick embryo mitochondria[J]. Expcell Res, 1962,(26):424-437.
- [29] Higuchi R C, Bowman B, Freiberger M, et al. DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family[J]. Nature, 1984,(321):282-284.
- [30] Higuchi R C, Wrischnik L A , Oake E, et al. Mitochondrial DNA of the extinct quagga: relatedness and extent of postmortem change[J]. J Mol Evo, 1987, (25): 283-287.
- [31] Ishida N, Hasegawa T, Takeda K, et al. Polymorphic sequence in the D-loop region of equine mitochondrial DNA [J]. Animal Genetics, 1994, 25(4): 215-221.
- [32] Ishida N, Oyunsuren T, Mashima S, et al. Mitochondrial DNA sequences of various species of the genus *Equus* with special reference to the phylogenetic relationship between Przewalskii's wild horse and domestic horse[J]. J Mol Evol, 1995, 41(2): 180-188.
- [33] Kim K I, Yang Y H, Lee S S, et al. Lewin H.A. Phylogenetic relationships of Cheju horses to other horse breeds as determined by mtDNA D-loop sequence polymorphism [J]. Animal Genetics, 1999, 30(2):102-108.
- [34] Oh M Y , Ko M H, Kim G O, et al. Phylogenetic relationship of Cheju native horses by mitochondrial DNA analysis[J]. Mol.Cells, 1994, (4): 13-20.
- [35] Bowling A T, Del Valle A, Bowling M A. pedigree-based study of mitochondrial D-loop DNA sequence variation among Arabian horses[J]. Animal Genetics, 2000, 31(1): 1-7.
- [36] Vila C, Leonard J A, Gothenstrom A, et al. Widespread origins of domestic horse lineages [J]. Science, 2001, (29): 474-477.
- [37] Hill E W, Bradley D G, Al-Barody M , et al. History and integrity of thoroughbred dam lines revealed in equine mtDNA variation [J]. Animal Genetics, 2002, 33(4): 287-294.
- [38] Mirol P M, Peral Garcia P, Vega-Pla J L, Dulout F N. Phylogenetic relationships of Argentinean Creole horses and other South American and Spanish breeds inferred from mitochondrial DNA sequences[J]. Animal Genetics, 2002, (33): 356-363.
- [39] Hironaga Kakoi, Teruaki Tozaki, Hitoshi Gawahara, et al. Molecular Analysis Using Mitochondrial

- DNA and Microsatellites to Infer the Formation Process of Japanese Native Polulations [J]. Biochemical Genetics, 2007, 4 (45): 375-395.
- [40] 王铁权, 王端云, 张元珏. 广西矮马血清蛋白型变异的研究[J]. 畜牧兽医学报, 1989 年(1).
- [41] 侯文通, 李相运. 宁强矮马和中型马血液蛋白质多态位点遗传检测[J]. 养马学, 1992,(2): 2-6.
- [42] 黄怀昭, 张学舜, 肖开进. 安宁果下马(中国矮马)血液蛋白质多态性及与其它马品种遗传距离的研究[J]. 中国畜牧杂志, 1992, 28(2): 7-10.
- [43] 侯文通. 东南亚小型马来源的遗传学和历史学研究[J]. 西北农业大学学报.1994,(1): 7-11.
- [44] 解德文, 刘爱华. 云南马关矮马和普通马血清蛋白多态性与类缘关系的研究[J]. 云南畜牧兽医[J].1995,(2): 43-44.
- [45] 张才骏, 陈福. 湟中马血清酯酶多态性的研究[J].青海畜牧兽医杂.1995,(25): 5-8.
- [46] 侯文通, 李相运. 宁强矮马和中型马血液蛋白质多态位点遗传检测[J]. 养马学: 1992,(2): 2-6.
- [47] 宿兵, 刘爱华. 云南普通马矮马蛋白质多态性及其品种分化关系[J]. 动物学研究.1995,16 (2): 126-131.
- [48] 侯文通. 陕西马种血液蛋白遗传标记特征及聚类分析[J]. 畜牧兽医杂.1996,(15):4-8.
- [49] 王振山, 宋仁德, 代代. 玉树藏马运铁蛋白的遗传多态性[J]. 内蒙古畜牧科学.2000,(7): 5-7.
- [50] 郭永新, 王振山. 山丹马运铁蛋白遗传多态性的初步研究[J]. 畜牧与饲料科学,2004,(1): 9-11.
- [51] 晁玉庆, 国向东, 赖双英. 蒙古马染色体核型初步分析.[J] 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 1992 (01).
- [52] 王墨清. 普氏野马染色体核型分析[J]. 畜牧与兽医,1995, (2): 12-2.
- [53] 刘爱华, 林世英. 云南矮马和普通马的比较细胞遗传学观察[J]. 云南畜牧兽医, 1995, 30-32.
- [54] 史伟伟. 云南四个马品种的随机扩增多态 DNA(RAPD)分析[J]. 牧兽医学报, 1998, 29(3): 193-203.
- [55] Wang W, Liu A H, Lin S Y, et al. Multiple genotypes of mitochondrial DNA with a horse population from a small region in Yunnan province of China [J]. Biochemical Genetics, 1994, (32): 371-378
- [56] 谢德文, 刘爱华, 林世英. 云南马关县矮马线粒体 DNA 的限制性片段长度多态性分析[J]. 云南畜牧兽医, 1995(增刊): 37-38.
- [57] 陈宏, Leibenguth, 丘怀. 德国骑乘马线粒体 DNA 的限制性酶分析[J]. 西北农业大学学报, 1999, 27(4): 23-27.
- [58] 赵春江, 韩国才, 秦应和, 等. 应用核基因和线粒体基因多态性联合分析法鉴定马和驴及其杂种后代[C]. 中国马业论文集,中国农业科学技术出版社,2005, (1): 133-139.
- [59] 李金莲, 芒来. 纯血马 mtDNA D-Loop 高变区序列分析(英)[J].内蒙古农业大学学报, 2004, 25(4): 5-8.
- [60] 孟青龙, 李金莲, 芒来, 张物种. 中国蒙古马 mtDNA D-Loop 高变区序列分析[J]. 畜牧与饲料科学, 2004: 5: 35-37.
- [61] 芒来, 李金莲, 石有斐. 中国蒙古马与国外纯血马 mtDNA D-Loop 高变区序列比较[J]. 遗传, 2005, 27(1): 91-94.
- [62] 苏锐, 谢文美, 张云生, 等. 关中马 mtDNA D-loop 区遗传多态性分析[J]. 西北农业学报, 2008, 17 (6): 17-20.

- [63] 蔡大伟, 韩璐, 李胜男, 等. 西藏马线粒体 DNA D-loop 区的遗传多样性[J]. 吉林大学学报(理学版), 2007, 45(5): 873-878.
- [64] 蔡大伟, 韩璐, 谢承志, 等. 内蒙古赤峰地区青铜时代古马线粒体 DNA 分析[J]. 自然科学进展, 2007, 17(3):107-112
- [65] Dawei Cai, Zhuowei Tang, Lu Han, et al. Ancient DNA provides new insights into the origin of the Chinese domestic horse [J]. Journal of Archaeological Science, 2009, 36 (3): 835-842
- [66] Ivankovic A, Kavar T, Caput P, et al. Genetic diversity of three donkey populations in the Croatian region [J]. Anim. Genet, 2002, (33): 169-177.
- [67] Xu X, Arnason U. The complete mitochondrial DNA sequence of the horse, *Equus caballus*: extensive heteroplasmy of the control region[J]. Gene, 1994, (148): 357-362.
- [68] Thompson J D, Gibson T j, Plewniak F, et al. The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Res, 1997, (25): 2682-2690.
- [69] Thompson J D, Plewniak F, Poch O A. Comprehensive comparison of multiple sequence alignment programs[J]. Nucleic Acids Res. 1999, (27): 2682-2690.
- [70] Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software[J]. Arizona State University, 2001, 17(12): 1244-1245.
- [71] Rozas J, Sánchez-DelBarrio J C, Messegger X, et al. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods[J]. Bioinformatics, 2003, 19(18): 2496-2497.
- [72] Schneider S, Roessli D, Excoffier L:ARLEQUIN 2.0: A software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland, 2002.
- [73] Rogers A R, Harpending H. Population growth curves in the distribution of pairwise genetic differences[J]. Mol Biol.Evol, 1992, (9): 552-569.
- [74] Rogers A R. Genetic evidence for a Pleistocene population expansion[J]. Evolution, 1995,(49): 608-615.
- [75] Fu Y X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection[J]. Genetics, 1997, (147): 915-925.
- [76] Luís C, Bastos-Silveira C, Cothran E.G, et al. Iberian origins of New World horse breeds. Journal of Heredity, 2006, (97) : 107-13.
- [77] McGahern A, Bower M.A.M, Edwards C.J, et al. Evidence for biogeographic patterning of mitochondrial DNA sequences in Eastern horse populations. Animal Genetics, 2006, (37) : 494-497.

致 谢

在论文完成之际，谨向在学业上给与指导和帮助的各位老师、学长，在生活中给与帮助和关怀的家人、导师、同学和朋友，致以诚挚的感谢。

衷心感谢导师雷初朝教授，三年来在学习生活中对我的精心培养。导师不仅在论文的选题、试验设计和样本采集上付出了很大的心血，而且在整个研究过程中的试验、数据处理和论文写作的各个环节都给予了精心指导。在这三年的学习生活中，导师对我的学习、工作和生活各方面给予细致的引导、热情的鼓励和无私的帮助，是我更加懂得了如何面对困难，乐观向前，积极进取的人生观。恩师严谨务实的治学态度和教书育人的思想理念和对研究生培养工作高度负责的精神是我终身值得学习的楷模。

衷心感谢陈宏教授，他广博的学识、严谨的治学态度、教书育人的崇高风范、高尚的道德情操和对学生无微不至的关怀，激励我向前。

衷心感谢曹斌云教授、张英汉教授、刘小林教授、陈宏教授、雷初朝教授、郁枫副教授、宋新华副教授、蓝贤勇讲师在选题、开题论证和结果分析中提出许多宝贵意见，为试验的顺利完成奠定了基础。

衷心感谢胡沈荣老师在实验和生活上给予的真诚帮助。

衷心感谢师姐谢文美、苏锐在试验和生活中给予的帮助，感谢师妹邓婵娟和师弟乐祥鹏、张晓明在血样采样和实验过程中所给予的帮助，感谢硕士生张春梅、张云生、马荣暖，秦芳、李密杰、任刚、魏天保、靖永杰、王鑫磊、王谋、赖新生、于辉和王柯忆在试验过程中的帮助和生活上的鼓励。

衷心感谢无私支持和付出的父母、哥哥、嫂子，是他们的鼓励和支持使我能顺利完成实验研究，是他们无私的爱使我在学业上更上层楼！

王小斌

2009 年 5 月

作者简介

王小斌，男，1982年10月生，山西吕梁人，2006年9月考入西北农林科技大学动物科技学院动物遗传育种与繁殖专业，攻读农学硕士学位。在硕士实验研究阶段，发表的论文主要有：

1. 王小斌, 秦芳, 张云生, 张春梅, 陈宏, 雷初朝. 蒙古马 mtDNA D-loop 区遗传多样性与多重起源. 西北农林科技大学学报（自然科学版），已录用.
2. C Z Lei, R Su, W M Xie, S Weinig, **X B Wang**, F Li, R Y Liu, Y S Zhang, C M Zhang, H Chen. Multiple maternal origins of Chinese modern horse and ancient horse. Animal Genetics (accepted).
3. Yun-Sheng Zhang, **Xiao-Bin Wang**, Chun-mei Zhang, Chu-Zhao Lei. Cytb gene genetic diversity and maternal origin of Chinese domestic donkey. (submitted to Biochemical Genetics).
4. 苏锐, 谢文美, 张云生, 王小斌, 张春梅, 雷初朝. 关中马 mtDNA D-loop 区遗传多态性分析. 西北农业学报.2008, 7(6):17-20.