

•研究报告•

# 华东地区地方鸡品种mtDNA 控制区遗传多样性

贾晓旭 唐修君 樊艳凤 陆俊贤 黄胜海  
葛庆联 高玉时\* 韩 威

(江苏省家禽科学研究所, 江苏扬州 225125)

**摘要:** 为了探明我国华东地区地方鸡品种的遗传多样性和群体遗传结构, 追溯其母系起源和进化过程, 利用PCR技术扩增了11个地方鸡品种的线粒体DNA (mtDNA)控制区(D-loop)序列, 并结合NCBI数据库中已发表的红色原鸡(*Gallus gallus*) D-loop区全序列, 分析了它们的遗传多样性与亲缘关系, 构建了11个品种与红色原鸡系统发生邻接树。结果表明: 11个地方品种mtDNA D-loop区全长为1,231或1,232 bp, 其中1,231 bp的序列有196条, 1,232 bp的序列有123条, 经过比对发现, 两者在859 bp处存在单碱基缺失。11个地方品种319个个体共计检测到变异位点37个, 总体单倍型多样性核苷酸多样性和平均核苷酸差异分别为 $0.901 \pm 0.009$ 、 $0.00573 \pm 0.000001$ 和6.833。按照鸡mtDNA单倍型分类通用标准, 共包含35种单倍型, 可以分为A、B、C和E共4个分支(单倍型群), 分别包括11、10、9和5个单倍型。中介网络图中11个鸡品种也很明显地分成了4个支系, 分别含有100、118、47和54条序列。系统发育树分为4个大枝, 海南亚种(*G. gallus jabouillei*)自成一枝; C单倍型群与4个亚种的红色原鸡聚为一枝; E单倍型群与2个亚种红色原鸡聚为一枝; A和B单倍型群只与滇南亚种(*G. gallus spadiceus*)聚为一枝。11个品种中, 除了狼山和丝羽乌骨鸡2个标准化品种外, 都有很高的遗传多样性, 可开发选择潜力很大。没有发现线粒体品种特异性DNA序列。华东地区地方品种至少有4个母系起源, 部分品种可能受到了欧美高产品系的渗入。

**关键词:** 系统发育; 红色原鸡; 控制区; 地方品种

## Genetic diversity of local chicken breeds in East China based on mitochondrial DNA D-loop region

Xiaoxu Jia, Xiujun Tang, Yanfeng Fan, Junxian Lu, Shenghai Huang, Qinglian Ge, Yushi Gao\*, Wei Han  
Jiangsu Institute of Poultry Science, Yangzhou, Jiangsu 225125

**Abstract:** The objective of this study was to determine the origin and evolution of chickens in Eastern China by assessing the genetic diversities and structures of 11 local chicken breeds. The complete D-loop region of mitochondrial DNA (mtDNA) of 319 chickens from 11 local breeds were sequenced and analyzed together with published data for the red junglefowl. These sequences were then used in a neighbor-joining method to construct the phylogenetic tree of these breeds and the red junglefowl. The D-loop regions of the local breeds were characterized by 1,231 and 1,232 bp; the 1,231 bp haplotype had 196 sequences, while the 1,232 bp haplotype had 123 sequences, with a base C deficiency from the 859 bp site in the 1,231 bp haplotype. A total of 37 mutation sites were detected in the 319 individuals. The average haplotype diversity, nucleotide diversity, and nucleotide difference were  $0.901 \pm 0.009$ ,  $0.00573 \pm 0.000001$  and 6.833, respectively. A total of 35 haplotypes were identified which belonged to four previously published clades, i.e. Clades A, B, C, and E, which contained 11, 10, 9, and 5 haplotypes, respectively. Median-joining network profiles of the haplotype indicated the 11 local breeds were divided into four maternal clades containing 100, 118, 47, and 54 sequences. The cluster of five subspecies of the red junglefowl and 11 local breeds were di-

收稿日期: 2017-01-08; 接受日期: 2017-04-10

基金项目: 国家自然科学基金(31372277、31501917 和 31672382)

\* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: gaoy100@sina.com

vided into four distinct groups. *Gallus gallus jabouillei* was grouped alone. Haplotype C and four subspecies of junglefowl were clustered in one group. Haplotype E and two subspecies of junglefowl were clustered in another group. Haplotypes A, B, and *Gallus gallus spadiceus* were clustered in another group. Chickens from eastern China revealed abundant genetic diversity in the mtDNA D-loop region, except for the Langshan and Silky breeds. No breed-specific matrilineal clade was observed. We conclude that chicken breeds from eastern China likely share four common maternal lineages, and that some chicken populations may have been mixed with exotic lineage chickens.

**Key words:** phylogeny; red junglefowl; D-loop region; local breed

我国各地自然生态条件及社会、经济和文化的差异,形成了体型外貌和用途各异的鸡品种(国家畜禽遗传资源委员会, 2011)。华东地区气候温和、农业发达、物产丰富,形成了很多具有地方特色的鸡品种。如以产蛋性能见长的白耳黄鸡和仙居鸡,中国特有的药用珍禽丝羽乌骨鸡和金湖乌凤鸡,有“五灰”特征的安义瓦灰鸡,产绿壳蛋的东乡绿壳蛋鸡等。然而,由于华东地区自古以来经济发达、交通便利,受到外来鸡种的冲击更大(陈宽维等, 2006),保护品种资源的遗传多样性显得更为重要。

评价物种遗传多样性的方法中,应用较多的为微卫星和线粒体标记。微卫星标记虽然具有高度的多态性、广泛而又随机地分布于整个基因组以及共显性遗传等优点(包文斌等, 2007),但是无法利用网上已有的序列资源,在当今大数据时代,具有很大的局限性;线粒体标记则可以利用网上上万条序列进行比对和聚类分析。mtDNA由于结构简单、缺乏重组、进化快速和严格的母系遗传等特点,已成为研究家禽的起源与进化、群体遗传结构、品种间的系统发育关系等的重要工具(陆俊贤等, 2016)。线粒体D-loop区由于不编码基因,产生的突变对线粒体的功能不产生影响并且可以不断地得到积累,因此具有更大的进化速率,其变异速率约为其他区段的5–10倍,因此相关研究最多。Liu等(2006)通过对中国及周边地区部分鸡种线粒体D-loop区高变区的研究,总计检测到169种单倍型,分为A–I共9个单倍型群。Miao等(2013)研究了4,938份家鸡和红色原鸡样本的D-loop区片段,在Liu等(2006)9个单倍型群的基础上又增加了W–Z共4个单倍型群。Mwacharo等(2011)在东非地方品种中发现5个单倍型群,其中D单倍型群占绝大多数。此外,黄勋和等(2016)认为线粒体细胞色素C氧化酶I (COI)特定区域可作为研究鸡品种遗传多样性的候选分子标记,虽然无法有

效区分外形差异较小的地方鸡种,但对外形差异较大的地方鸡品种鉴定具有可行性和有效性(高玉时等, 2011)。Xiang等(2014)通过对中国北方不同地区39个鸡骨残骸古DNA COI基因和D-loop区的研究认为,家鸡驯化从距今大约10,000年的新石器时代早期就已经开始。目前,有关中国地方鸡品种线粒体的研究大都利用D-loop区部分片段(Liu et al, 2006);有些没有采用鸡线粒体单倍型分类通用标准,数据无法参考和对照(包文斌等, 2008);有的采样个体数目过少,代表性不强(Zhu et al, 2014)。有研究表明鸡D-loop区序列全长1,231–1,232 bp (高玉时等, 2015),但还没有利用D-loop区全长对我国地方鸡种进行系统的研究。

本研究以华东地区11个代表性地方鸡品种为实验材料,对其线粒体D-loop区序列全长进行了测序和生物信息学分析,以了解其自然群体在线粒体水平上的遗传多样性状况,以及红色原鸡在华东地区鸡种起源进化中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

本研究11个地方鸡种材料均来自国家级地方鸡种基因库(江苏),每个鸡种的相关信息见表1。翅静脉采血,用标准的酚–氯仿法提取基因组DNA。

从NCBI数据库中(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/>)下载已发表的红色原鸡印度尼西亚种(*Gallus gallus bankiva*)、指名亚种(*G. gallus gallus*)、印度亚种(*G. gallus murghi*)、海南亚种(*G. gallus jabouillei*)、滇南亚种(*G. gallus spadiceus*)的D-loop区全序列。

### 1.2 实验方法

PCR扩增引物参考Jia等(2016)。PCR扩增体系25  $\mu$ L: 2 $\times$ PCR Master Mix (大连宝生物公司) 12.5  $\mu$ L, 10  $\mu$ M上下游引物各0.6  $\mu$ L (上海生工生物工程公

表1 本研究11个地方鸡品种相关信息。M: 肉用型; E: 蛋用型; Med: 药用型。  
Table 1 Sampling information about the 11 local chicken breeds. M, Meat; E, Egg; Med, Medical.

品种及代号 Breed and code	原产地 Origin	现有种群规模及采样 Population (sample size)	经济用途 Economic use
安义瓦灰 Anyi Gray (AY)	江西安义 Anyi, Jiangxi	600,000 (30)	肉蛋兼用 E & M
白耳黄 Baier Yellow (BE)	江西广丰 Guangfeng, Jiangxi	20,000,000 (30)	蛋用 E
崇仁麻 Chongren Partridge (CP)	江西崇仁 Chongren, Jiangxi	52,000,000 (30)	肉蛋兼用 E & M
东乡绿壳 Dongxiang Blue-eggshell (DX)	江西东乡 Dongxiang, Jiangxi	200,000 (30)	肉蛋兼用 E & M
丝羽乌骨 Silkies (SL)	江西泰和 Taihe, Jiangxi	16,500,000 (30)	肉药兼用 Med & M
金湖乌凤 Jinhu Black-bone (JH)	福建泰宁 Taining, Fujian	160,000 (29)	肉药兼用 Med & M
仙居 Xianju (XJ)	浙江仙居 Xianju, Zhejiang	1,484,000 (30)	蛋用 E
琅琊 Langya (LY)	山东日照 Rizhao, Shandong	110,000 (30)	肉蛋兼用 E & M
寿光 Shouguang (SG)	山东寿光 Shouguang, Shandong	201,000 (30)	肉蛋兼用 E & M
狼山 Langshan (LS)	江苏如东 Rudong, Jiangsu	10,000 (20)	肉蛋兼用 E & M
鹿苑 Luyuan (LU)	江苏张家港 Zhangjiagang, Jiangsu	20,000 (30)	肉蛋兼用 E & M

司), 模板 DNA 50 ng, 最后用灭菌水补齐 20  $\mu$ L。PCR 扩增条件如下: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 4 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。取 3  $\mu$ L PCR 扩增产物在 1.2% 琼脂糖(美国 Invitrogen 公司)上凝胶电泳检测, 对于扩增效果好的样本交由华大基因(上海分公司)进行双向测序。

1.3 数据处理和分析

用 Clustal-X 软件(Thompsons et al, 1997)对测定的 11 个地方鸡品种样本的 D-loop 区全序列进行序列同源性比对分析。用 DnaSP 5.10.1 (Rozas et al, 2003) 软件统计单倍型数、多态位点数、简约信息位点数、核苷酸多样性(nucleotide diversity,  $P_i$ )、单倍型多样性(haplotype diversity,  $H_d$ )和核苷酸平均差异数( $K$ )。用 MEGA 6.0 (Tamura et al, 2013)统计平均碱基组成、转换与颠换数目、品种间和品种内的遗传距离等, 系统发育树用 MEGA 6.0 软件邻接法(neighbor-joining, NJ)构建。用 Network 5.0.0.1 (<http://www.fluxus-technology.com/>)构建中介网络图(median-joining)分析单倍型间的进化关系。

2 结果

2.1 地方鸡品种 mtDNA D-loop 区全序列组成及变异

设计的引物在实验鸡群得到了较好的扩增, 经过纯化、测序、拼接和校对编辑, 共获得 319 条完整的线粒体 D-loop 区序列, 其中 1,231 bp 的序列有 196 条, 1,232 bp 的序列有 123 条, 经过比对发现, 两者在 859 bp 处单碱基缺失。11 个鸡品种共检测到

37 个变异位点, 占分析位点的 3.0%, 其中单一位点突变 6 个(133, 219, 222, 270, 372, 711), 简约信息位点 31 个(167, 199, 207, 210, 212, 217, 225, 239, 240, 241, 242, 243, 246, 256, 261, 281, 310, 315, 330, 342, 358, 361, 363, 367, 396, 446, 686, 792, 1,214, 1,215, 1,225), 所有突变位点均为两核苷酸间的差异。变异区在 167–1,225 bp 之间, 除 361(A-T)颠换外, 其余全部为转换, 其中 T-C 转换 21 处, A-G 转换 15 处。其中 1,225 bp 处 A-G 转换, 为首次发现的变异位点, 并且经过多次测序验证, 此变异位点只在 2 只崇仁麻鸡中发现。碱基含量统计显示, 11 个品种的 T、C、A 和 G 碱基差异非常接近, 平均含量分别为 33.53%、26.52%、26.62% 和 13.33%, A+T 平均含量为 60.15%, C+G 平均含量为 39.85%, A、T 含量明显高于 C、G。

2.2 地方鸡品种单倍型分析

11 个地方品种的 319 个个体共检测到 35 种单倍型, 按照鸡 mtDNA 单倍型分类通用标准, 可以分为 A、B、C 和 E 共 4 个单倍型群(分支), 分别包括 11、10、9 和 5 个单倍型。各单倍型数量及在品种间的分布见表 2。其中单倍型 A1 出现频率最高, 共在 6 个品种的 69 个个体中出现; 其次是单倍型 B1, 为 53 次(7 个品种); 第三是单倍型 C1, 为 29 次(5 个品种); 单倍型 E1 出现 28 次, 4 个品种共有。

每个品种单倍型数及单倍型对应个体数见表 3。琅琊鸡单倍型数量最多, 有 13 种; 狼山鸡单倍型最少, 只有 1 种。4 个分支(A、B、C 和 E)都有分布的包括崇仁麻鸡、东乡绿壳蛋鸡、金湖乌凤鸡、琅琊

**表2 11个地方鸡品种不同单倍型分布和序列变异信息。**圆点表示与单倍型NC007235具有相同的碱基, 品种代号同表1。  
Table 2 Variable information and haplotype distribution of the 11 local chicken breeds. Dots (.) denote identity with the reference sequence (NC007235). Breed codes are the same as in Table 1.

单倍型 Haplotype	变异位点 Variable sites	单倍型在品种的分布(频率) Breeds (frequency)	总计 Total
	0000000000 0000000000 0000000000 0000111 1112222222 2222222222 3333333333 4677222 3690111122 3444445678 1134566679 4819112 3797027925 9012366101 0502813726 6612455		
NC007235	TTTACATCAC ACAGTTTCTA CTCAAACTAT CGGGCAA		
A1	.C..G..T ....C....C..... ..G.	BE8, DX13, SL21, XJ8, LU17, LY2	69
A2	.C.G.G...T ....C....C..... ..G.	SG8	8
A3	.C..G..T ....C....C...T.... ..G.	LU6	6
A4	.C..G..T ....C...G.C.....C ....GG	CP2	2
A5	.C..G..T ....C....C.....C ....G.	SG5	5
A6	.C..G..T G...C....C..... ..G.	JH1	1
A7	.CC..G...T ....C....C....G. ....G.	LY1	1
A8	.C..G..T ....CC...C..... ..G.	SL2	2
A9	.C..G..T ....C....C.....A..G.	AY3	3
A10	.C..TG...T ....C....C.....A..G.	JH2	2
A11	.C.....T ....C....C..... ..G.	LY1	1
B1	.....	XJ1, AY7, CP10, DX4, LY2, SG9, LS20	53
B2	C.....	CP1	1
B3	.....T.....	SL7	7
B4	...T.....	LY2	2
B5	.....T.....T.....	LY1	1
B6	.....A...	XJ1, AY5, BE1, SG1, LY1	9
B7	.....C.....A...	BE4	4
B8	.....A.A...	JH11, XJ2, BE1	14
B9	.....G.....G.....A.A...	BE15	15
B10	.....T.....A.....	CP12	12
C1	....G....ACCC..G TC.G..TC.. ....G.	XJ18, AY6, DX2, JH1, SG2	29
C2	....G....ACCCT.G TC.G..TC.. ....G.	LY3	3
C3	....G....T.ACCC..G TC.G..TC.. ....G.	LY1	1
C4	....G....T.ACC..G TC.G..TC.. ..A..G.	LU1	1
C5	....G....ACCCT.G TC....TC.. ....G.	AY2, LY1	3
C6	....G....ACCCTCG TC....TC.. ....G.	CP1	1
C7	....G....ACCC...TC.G..TC.. ....G.	BE1	1
C8	.....T..GACCC..G TC....TC.. ....G.	AY7	7
C9	.....ACCC..G TC....TC.. ....G.	LY1	1
E1	....GC...CCCT..TC.....T...TG.	JH13, CP3, LY6, LU6	28
E2	....GC.G...CCCT..TCT.....T...TG.	CP1	1
E3	....GC...CCCT..TC.G.....TA..TG.	LY8	8
E4	.C..GC...CC.T..TC.....T...TG.	DX11	11
E5	.C..GC...CCCT..TC.....T...TG.	JH1, SG5	6

鸡和寿光鸡等5个品种; 3个(A、B和C) 分支的包括安义瓦灰鸡、白耳黄鸡和仙居鸡; 2个分支(A和B/E)

的为丝羽乌骨鸡和鹿苑鸡, 狼山鸡只有1个B分支。  
从总体来看, A和B为优势分支, 占总样本的

68.3% (218/319)。各个品种优势分支也存在差异,其中丝羽乌骨鸡和鹿苑鸡以A为优势分支,白耳黄鸡、狼山鸡和崇仁麻鸡以B为优势分支,仙居鸡以C为优势分支,琅琊鸡以E为优势分支。安义瓦灰鸡以B和C为优势分支,东乡绿壳蛋鸡以A和E为优势分支,金湖乌凤鸡以B和E为优势分支,寿光鸡以A和B为优势分支。

2.3 11个地方品种的遗传多样性和遗传距离

11个地方品种遗传多样性见表3。总体单倍型多样性为 $0.901 \pm 0.009$ ,分布在0–0.887之间。琅琊鸡、安义瓦灰鸡和寿光鸡较高,单倍型多样性均在0.8以上,丝羽乌骨鸡和狼山鸡较低,在0.5以下。总体核苷酸多样性为 $0.00573 \pm 0.000001$ ,值在0–0.00647之间。琅琊鸡核苷酸多样性最高,狼山鸡最低。可见,不同地方品种之间的单倍型多样性与核苷酸多样性分布趋势基本上是相吻合的。

基于Kimura双参数模型计算的11个地方鸡种遗传距离见表4,可以看出11个群体品种内遗传距离范围为0–0.0065,品种间遗传距离范围为0.0028–0.0088。琅琊鸡与白耳黄鸡之间的遗传距离最远,双参数距离值为0.0088;狼山鸡与崇仁麻鸡之间的遗传距离最近,双参数距离值为0.0028。各个品种间遗传距离没有表现出形态学的相关性,如同为蛋用品种并且外形也相似的白耳黄鸡和仙居鸡,遗传

距离较远,双参数距离值为0.0084;而白耳黄鸡与体型外貌差异较大的狼山鸡遗传距离则较近,双参数距离值为0.0035。这可能与线粒体的遗传呈现严格的母系遗传方式有关。

2.4 系统进化树和中介网络图的构建

由构建的NJ系统进化树(图1)看出,11个地方品种很明显地分成了4个支系A、B、C和E,分别含有100、118、47和54条序列。用Network 5.0.0.1进行网络关系分析也证实了这一点(图2),中介网络图主要分为4个进化枝,分别以A1、B1、C1和E1为中心节点,而4个单倍型在各自单倍型群里出现的频率最多,可能是各自的祖先单倍型,其他单倍型则是由其祖先单倍型衍生出来的。

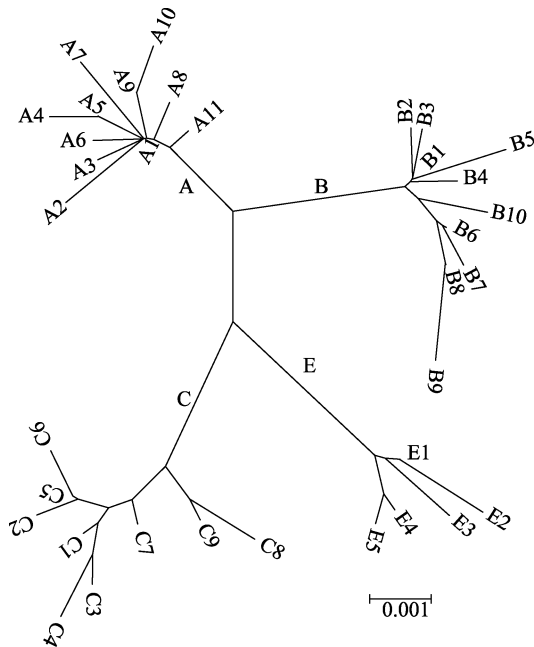
同样采用K2P模型构建本研究发现的单倍型(11个品种所有的单倍型,共35条序列)和从NCBI下载红色原鸡D-loop区全长序列(共19条)的系统发育树(图3)。发育树分为4个大枝,海南亚种的2个个体自成一枝;C单倍型群与红色原鸡4个亚种的6条序列为一枝,但不存在个体交叉现象;E单倍型群与2个亚种红色原鸡的8条序列聚为一枝,与3条印度亚种序列存在个体交叉现象;A和B单倍型群只与滇南亚种聚为一枝,其中B单倍型群都与滇南亚种2条序列交叉聚为一枝;A单倍型群都与滇南亚种1条序列交叉聚为一枝。

表3 11个鸡品种线粒体D-loop区单倍型数、平均核苷酸差异、核苷酸多样性和单倍型多样性。品种代号同表1。  
Table 3 Haplotype diversity (*Hd*), average number of differences (*K*) and nucleotide diversity (*Pi*) of the D-loop of mtDNA in 11 domestic chicken breeds. Breed codes are the same as in Table 1.

品种名 Breed	样本量 sample size	单倍型数 No. of haplotypes	单倍型群(对应个体数) Haplogroup (number of individuals observed)	单倍型多样性 (SD) Haplotype diversity (SD)	核苷酸多样性 (SD) Nucleotide diversity (SD)	平均核苷酸差异 Average number of nucleotide differences
安义瓦灰 AY	30	6(A = 1; B = 2; C = 3)	A(3); B(12); C(15)	0.837(0.027)	0.00613(0.00140)	7.540
白耳黄 BE	30	6(A = 1; B = 4; C = 1)	A(8); B(21); C(1)	0.680(0.066)	0.00424(0.00133)	5.218
崇仁麻 CP	30	7(A = 1; B = 3; C = 1; E = 2)	A(2); B(23); C(1); E(4)	0.736(0.054)	0.00425(0.00178)	5.232
东乡绿壳 DX	30	4(A = 1; B = 1; C = 1; E = 1)	A(13); B(4); C(2); E(11)	0.678(0.049)	0.00457(0.00138)	5.444
金湖乌凤 JH	29	6(A = 2; B = 1; C = 1; E = 2)	A(3); B(11); C(1); E(14)	0.670(0.057)	0.00615(0.00174)	7.571
丝羽乌骨 SL	30	3(A = 2; B = 1)	A(23); B(7)	0.467(0.087)	0.00221(0.00075)	2.720
仙居 XJ	30	5(A = 1; B = 3; C = 1)	A(8); B(4); C(18)	0.582(0.079)	0.00492(0.00127)	6.053
琅琊 LY	30	13(A = 3; B = 4; C = 4; E = 2)	A(4); B(6); C(6); E(14)	0.887(0.038)	0.00647(0.00184)	7.968
寿光 SG	30	6(A = 2; B = 2; C = 1; E = 1)	A(13); B(10); C(2); E(5)	0.805(0.035)	0.00553(0.00165)	6.805
狼山 LS	20	1(B = 1)	B(20)	0	0	0.000
鹿苑 LU	30	3(A = 2; E = 1)	A(25); E(5)	0.549(0.081)	0.00237(0.00088)	2.917
总计 All	319	35(A = 11; B = 10; C = 9; E = 5)	(A = 100; B = 118; C = 47; E = 54)	0.901(0.009)	0.00573(0.000001)	6.833

**表4 基于Kimura双参数模型计算的11个地方鸡品种内和品种间平均遗传距离。品种代号同表1。**  
Table 4 The interspecies and intraspecies mean genetic distance of the 11 chicken breeds calculated by Kimura-2-parameter model. Breed codes are the same as in Table 1.

品种名 Breed	品种内 Within breeds	安义瓦灰 AY	白耳黄 BE	崇仁麻 CP	东乡绿壳 DX	金湖乌凤 JH	丝羽乌骨 SL	仙居 XJ	琅琊 LY	寿光 SG	狼山 LS	鹿苑 LU
安义瓦灰 AY	0.0062											
白耳黄 BE	0.0043	0.0073										
崇仁麻 CP	0.0044	0.0066	0.0053									
东乡绿壳 DX	0.0050	0.0073	0.0074	0.0066								
金湖乌凤 JH	0.0062	0.0077	0.0072	0.0063	0.0064							
丝羽乌骨 SL	0.0022	0.0063	0.0053	0.0055	0.0046	0.0066						
仙居 XJ	0.0050	0.0060	0.0084	0.0077	0.0069	0.0079	0.0063					
琅琊 LY	0.0065	0.0077	0.0088	0.0074	0.0065	0.0066	0.0072	0.0071				
寿光 SG	0.0056	0.0069	0.0065	0.0060	0.0056	0.0068	0.0043	0.0070	0.0072			
狼山 LS	0.0000	0.0056	0.0035	0.0028	0.0061	0.0060	0.0040	0.0073	0.0075	0.0046		
鹿苑 LU	0.0032	0.0069	0.0068	0.0067	0.0046	0.0065	0.0031	0.0063	0.0066	0.0049	0.0061	



**图1 基于mtDNA D-loop区全序列采用NJ法构建的11个地方品种的系统发育树**  
Fig. 1 Neighbor-joining tree among 11 domestic chicken breeds based on the net distance calculated from mitochondrial complete D-loop sequence

3 讨论

3.1 地方品种mtDNA D-loop序列结构

一般亲缘关系相近的物种的核基因序列长度相同或者相近, 编码的氨基酸差异较小。与核基因相比, mtDNA D-loop区表现出较快的进化速率。本研究的 11 个地方品种 mtDNA D-loop 区全长 1,231–1,232 bp, 与鸡亲缘关系较近的物种, 如鸭

(1,050 bp, KJ833587)、鹅(1,179 bp, KU211647)、鹌鹑(1,150 bp, AP003195)、鸽(1,656 bp, KP168712)等, 存在高度的长度变异。前人对鸡线粒体D-loop区的研究一般集中在高变区(Liu et al, 2006; Mwacharo et al, 2011), 因为基因序列较快的进化速率能积累更多的突变变异, 这是研究者乐于见到的; 但是, 突变速率过高, 可能会干扰系统发育关系的构建(Miao et al, 2013)。因此, 笔者认为用mtDNA D-loop区全序列或者线粒体基因组全序列构建系统发育树可能更为准确。

本研究在测序过程中发现, 鸡D-loop区后端测序难度高, 分析认为是由于GC含量高并且包含大量的重复序列。随着研究的深入, 越来越多的鸡的mtDNA序列特别是D-loop区序列被提交到GenBank数据库中, 研究者在利用公共数据库中已发表的序列时, 一定要仔细甄别, 特别是早期提交的序列, 限于当时的测序技术以及线粒体本身复杂的序列结构, 产生错误在所难免(Shi et al, 2014)。根据本研究的319条序列, 并结合数据库中上千条序列, 发现1214T为E分支所有单倍型所独有, 1215A为B分支所有单倍型独有, 可以根据变异位点用酶切或者其他SNP检测方法区分单倍型, 省去测序的步骤, 也更为经济且易于操作。

3.2 地方品种的遗传多样性

单倍型多样度和核苷酸多样性是衡量群体遗传变异程度的重要指标, 数值高则遗传变异大, 反之则变异小; 而遗传变异越大, 群体选择潜力也越

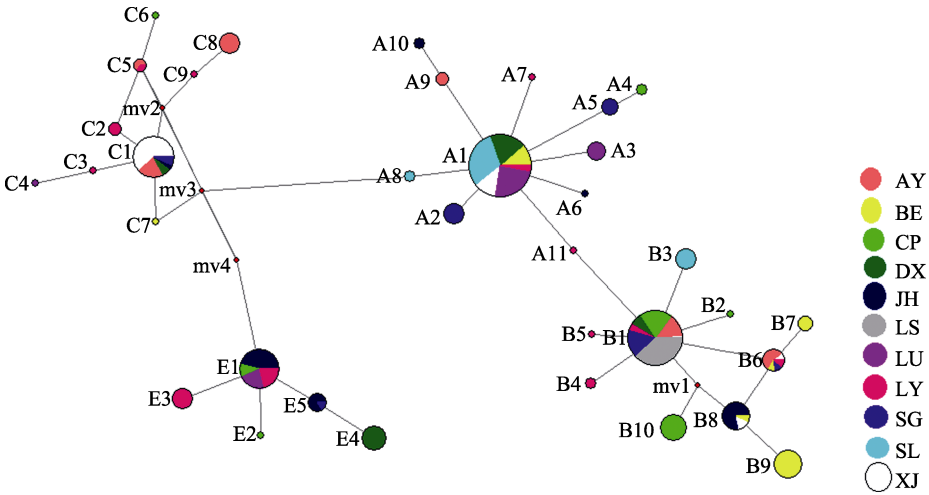


图2 基于mtDNA D-loop单倍型构建的中介网络图。圆的大小对应于单倍型频率，不同品种用不同颜色标注(品种代号同表1)。  
Fig. 2 Median network profile of the mtDNA D-loop haplotypes observed in the present study. The circle sizes are proportional of the haplotype frequencies. Different shades of the circles correspond to distinct populations. Breed codes are the same as in Table 1.

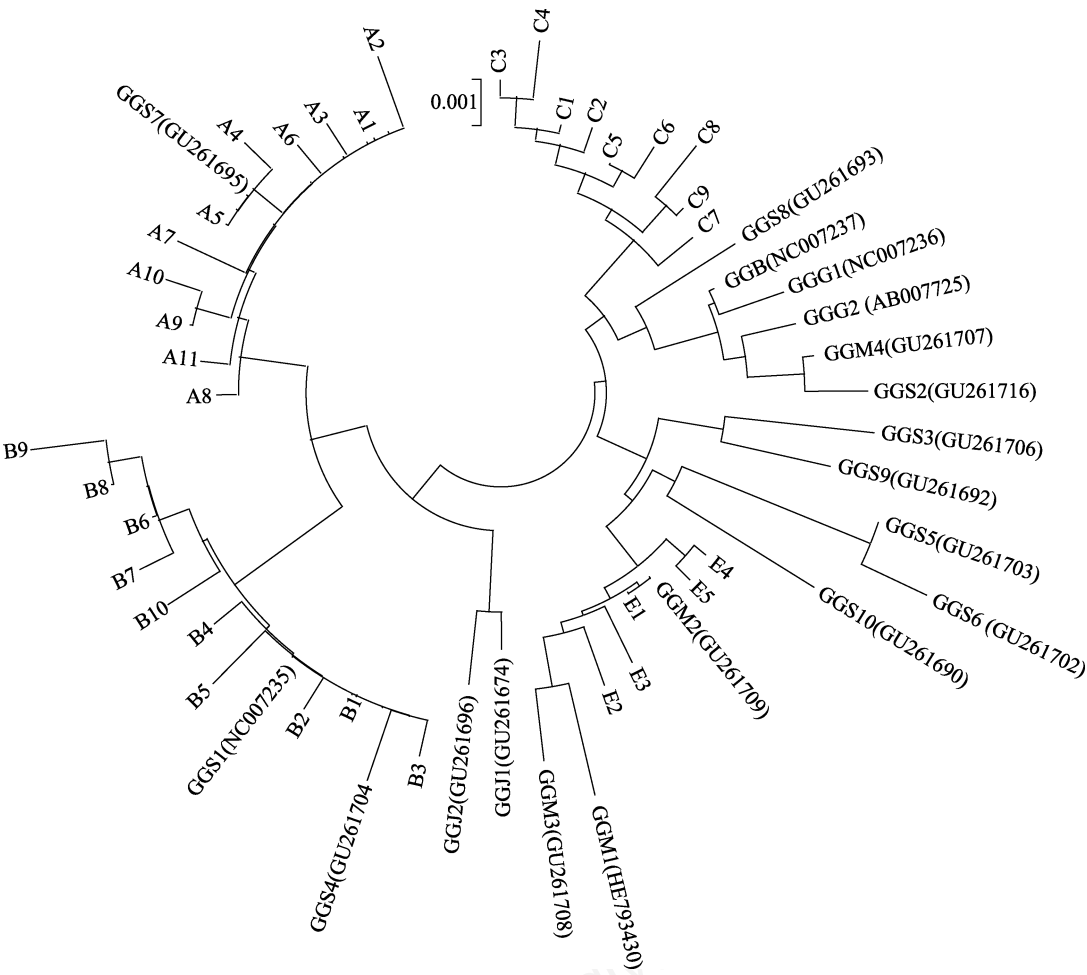


图3 基于mtDNA D-loop区序列采用NJ法构建的系统发育树。GGS: 滇南亚种; GGJ: 海南亚种; GGG: 指名亚种; GGB: 印尼亚种; GGM: 印度亚种。  
Fig. 3 Neighbor-joining tree based on mtDNA D-loop sequences. GGS, *Gallus gallus spadiceus*; GGJ, *G. gallus jabouillei*; GGG, *G. gallus gallus*; GGB, *G. gallus bankiva*; GGM, *G. gallus murghi*.

大。琅琊鸡、安义瓦灰和寿光鸡遗传多样性较高, 单倍型多样性均在0.8以上; 而丝羽乌骨鸡和狼山鸡遗传多样性较低, 单倍型多样性在0.5以下, 可能与它们为标准化品种, 长期闭锁选育有关。

我国地方鸡品种虽然有100个以上, 但是仅有狼山和丝羽乌骨鸡被编入《美国家禽标准化品种志》, 被承认为标准品种。狼山鸡19世纪70年代被引种到英国, 后来又引进到美国、德国和澳大利亚等地, 当代著名鸡种奥品顿、澳洲黑和海波罗均含有狼山鸡血缘(杨宁, 2002)。陈宽维等(2006)用微卫星方法也发现狼山鸡群体遗传多样性较低, 与本研究结果一致。丝羽乌骨鸡除了药用功能以外, 还是重要的观赏品种, 选种标准为桑葚冠、樱头、绿耳、胡须、丝羽、五爪、毛脚、乌皮、乌骨和乌肉等“十全”特征。几百年来, 经过高强度选择, 多个质量性状遗传趋于稳定, 品种的遗传多样性也相对下降。

### 3.3 11个地方品种的母系起源

虽然达尔文提出的红色原鸡作为家鸡(*G. gallus domesticus*)祖先的假说已被人们普遍接受, 但是红色原鸡有5个亚种, 究竟起源于哪个亚种, 学术界还没有定论。

早期Fumihito等(1994)提出生活在泰国及其周边地区红色原鸡指名亚种是家鸡的唯一祖先。Kanginakudru等(2008)的研究结果表明, 生活在印度及其周边地区的滇南亚种和印度亚种对家鸡进化也同样做出了贡献。本研究发现红色原鸡既与地方鸡品种存在个体交叉, 又存在独立分支。其中滇南亚种与A和B单倍型群存在交叉, 印度亚种与E单倍型群存在交叉, 推测可能是因为家鸡的驯化时间较近, 并且在驯化过程中与红色原鸡不断杂交。

各个品种都没有表现出显著的线粒体序列特异性, 如丝羽乌骨鸡、东乡绿壳蛋鸡和鹿苑鸡虽然体型外貌差异很大, 却共享单倍型A1, 并且A1为3个品种的优势单倍型。其原因可能是其个体较小, 便于运输, 在人类迁徙和贸易过程中, 不同地区和品种之间基因交流频繁。本研究的11个地方鸡品种分为A、B、C和E分支, 没有发现D和F-I等分支, 这与Liao等(2016) (广西地方品种)和Chang等(2012) (台湾地方品种)的研究结果一致。原因可能是人们根据需求对个体进行了选择, D和F-I等分支的个体被选择掉了, 而在鸡的起源地云南, 由于地理环境较为封闭, 这些分支的个体可能保存了下来。

前人研究结果揭示, E分支为南亚和欧美商品鸡中普遍存在的分支(Osman et al, 2016), 琅琊鸡、东乡绿壳蛋鸡和金湖乌凤鸡优势单倍型都位于E分支内, 琅琊鸡存在与外来肉用品种杂交的历史(庄桂玉和龚玉波, 2015), 东乡绿壳蛋鸡为了提高产蛋率也渗入了高产蛋鸡血缘(官发荣, 2011), 金湖乌凤鸡母系是来自南亚还是渗入了欧美商品鸡血缘, 还有待进一步深入研究。对于这些品种应该加强品种资源的收集和整理, 在保护品种遗传多样性的前提下进行提纯复壮。

综上, 11个品种中, 除了狼山鸡和丝羽乌骨鸡2个标准化品种外, 都有很高的遗传多样性, 开发潜力很大。没有发现线粒体品种特异性DNA序列。华东地区地方品种至少有4个母系起源, 部分品种可能受到了欧美高产品系的渗入。

### 参考文献

- Bao WB, Chen GH, Wu XS, Xu Q, Wu SL, Shu JT, Weigend S (2007) Genetic diversity of red junglefowl in China (*Gallus gallus spadiceus*) and red junglefowl (*Gallus gallus gallus*) in Thailand. *Hereditas* (Beijing), 29, 587–592. (in Chinese with English abstract) [包文斌, 陈国宏, 吴信生, 徐琪, 吴圣龙, 束婧婷, Steffen Weigend (2007) 中国红原鸡和泰国红原鸡遗传多样性分析. *遗传*, 29, 587–592.]
- Bao WB, Shu JT, Wang CB, Zhang HX, Weigend S, Chen GH (2008) Investigation on genetic diversity and systematic evolution in Chinese domestic fowls and red jungle fowls by analyzing the mtDNA control region. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 39, 1449–1459. (in Chinese with English abstract) [包文斌, 束婧婷, 王存波, 张红霞, Steffen Weigend, 陈国宏 (2008) 中国家鸡和红色原鸡mtDNA控制区遗传多态性及系统进化分析. *畜牧兽医学报*, 39, 1449–1459.]
- Chang CS, Chen CF, Berthouly-Salazar C, Chazara O, Lee YP, Chang CM, Chang KH, Bed'Hom B, Tixier-Boichard M (2012) A global analysis of molecular markers and phenotypic traits in local chicken breeds in Taiwan. *Animal Genetics*, 43, 172–182.
- Chen KW, Li HF, Wang JY, Tang QP, Shen JC, Zhang SJ (2006) Study on genetic diversity of 27 indigenous chicken breeds or strains in East China. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 37, 7–11. (in Chinese with English abstract) [陈宽维, 李慧芳, 王金玉, 汤青萍, 沈见成, 章双杰 (2006) 华东27个地方鸡品种(品系)的遗传变异. *畜牧兽医学报*, 37, 7–11.]
- China National Commission of Animal Genetic Resources (2011) *Animal Genetic Resources in China: Poultry*. China Agriculture Press, Beijing. (in Chinese) [国家畜禽遗传资



- 源委员会 (2011) 中国畜禽遗传资源志: 家禽志. 中国农业出版社, 北京.]
- Fumihito A, Miyake T, Sumi S, Takada M, Ohno S, Kondo N (1994) One subspecies of the red junglefowl (*Gallus gallus gallus*) suffices as the matriarchic ancestor of all domestic breeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 91, 12505–12509.
- Gao YS, Tang XJ, Tu YJ, Lu JX, Xue MY, Shi ZH, Zhang XY (2011) Studies on the DNA barcoding of fifteen chicken breeds by mtDNA COI gene. *Scientia Agricultura Sinica*, 44, 587–594. (in Chinese with English abstract) [高玉时, 唐修君, 屠云洁, 陆俊贤, 薛茂云, 施祖灏, 张小燕 (2011) 基于线粒体COI基因15个鸡种的DNA编码研究. *中国农业科学*, 44, 587–594.]
- Gao YS, Jia XX, Tang XJ, Tang MJ, Fan YF, Lu JX, Gu R, Ge QL, Su YJ (2015) The genetic diversity and origin analysis of Anyi Tile-like chickens (*Gallus gallus domestica*) based on mitochondrial DNA D-loop sequence. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 23, 940–944. (in Chinese with English abstract) [高玉时, 贾晓旭, 唐修君, 唐梦君, 樊艳凤, 陆俊贤, 顾荣, 葛庆联, 苏一军 (2015) 基于线粒体基因组D-loop区全序列分析安义瓦灰鸡遗传多样性及其起源进化关系. *农业生物技术学报*, 23, 940–944.]
- Guan FR (2001) A review of Dongxiang blue egg chicken. *Livestock and Poultry Industry*, (7), 22–23. (in Chinese) [官发荣 (2001) 东乡黑羽绿壳蛋鸡综述. *畜禽业*, (7), 22–23.]
- Huang XH, Chen JB, He DL, Zhang XQ, Zhong FS (2016) DNA barcoding of indigenous chickens in China: a reevaluation. *Scientia Agricultura Sinica*, 49, 2622–2633. (in Chinese with English abstract) [黄勋和, 陈洁波, 何丹林, 张细权, 钟福生 (2016) DNA条形码技术鉴定中国地方鸡品种的重新评估. *中国农业科学*, 49, 2622–2633.]
- Jia XX, Tang XJ, Lu JX, Fan YF, Chen DW, Tang MJ, Gu R, Gao YS (2016) The investigation of genetic diversity and evolution of Daweishan Mini chicken based on the complete mitochondrial (mt)DNA D-loop region sequence. *Mitochondrial DNA*, 27, 3001–3004.
- Kanginakudru S, Metta M, Jakati RD, Nagaraju J (2008) Genetic evidence from Indian red jungle fowl corroborates multiple domestication of modern day chicken. *BMC Evolutionary Biology*, 8, 174.
- Liao Y, Mo G, Sun J, Wei F, Liao DJ (2016) Genetic diversity of Guangxi chicken breeds assessed with microsatellites and the mitochondrial DNA D-loop region. *Molecular Biology Reports*, 43, 1–11.
- Liu YP, Wu GS, Yao YG, Miao YW, Luikart G, Baig M, Beja-Pereira A, Ding ZL, Palanichamy MG, Zhang YP (2006) Multiple maternal origins of chickens: out of the Asian jungles. *Molecular Phylogenetics & Evolution*, 38, 12–19.
- Lu JX, Jia XX, Tang XJ, Fan YF, Tang MJ, Gao YS, Su YJ (2016) Genetic diversity of two local Yunnan chicken breeds and their relationships with red junglefowl. *Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences)*, 42, 385–390. (in Chinese with English abstract) [陆俊贤, 贾晓旭, 唐修君, 樊艳凤, 唐梦君, 高玉时, 苏一军 (2016) 2个云南原始鸡种遗传多样性及其与红色原鸡的亲缘关系. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 42, 385–390.]
- Miao YW, Peng MS, Wu GS, Ouyang YN, Yang ZY, Yu N, Liang JP, Piangchou G, Beja-Pereira A, Mitra B, Palanichamy MG, Baig M, Chaudhuri TK, Shen YY, Kong QP, Murphy RW, Yao YG, Zhang YP (2013) Chicken domestication: an updated perspective based on mitochondrial genomes. *Heredity*, 110, 277–282.
- Mwacharo JM, Bjørnstad G, Mobegi V, Nomura K, Hanada H, Amano T (2011) Mitochondrial DNA reveals multiple introductions of domestic chicken in East Africa. *Molecular Phylogenetics & Evolution*, 58, 374–382.
- Osman SAM, Yonezawa T, Nishibori M (2016) Origin and genetic diversity of Egyptian native chickens based on complete sequence of mitochondrial DNA D-loop region. *Poultry Science*, 95, 1248–1256.
- Rozas J, Sanchezelbarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19, 2496–2497.
- Shi NN, Fan L, Yao YG, Peng MS, Zhang YP (2014) Mitochondrial genomes of domestic animals need scrutiny. *Molecular Ecology*, 23, 5393–5397.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725–2729.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The Clustal-X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25, 4876–4882.
- Xiang H, Gao JQ, Yu BQ, Zhou H, Cai DW, Zhang YW, Chen XY, Wang XI, Hofreiter M, Zhao XB (2014) Early Holocene chicken domestication in northern China. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 111, 17564–17569.
- Yang N (2002) *Poultry Production*. China Agriculture Press, Beijing. (in Chinese) [杨宁 (2002) 家禽生产学. 中国农业出版社, 北京.]
- Zhu WQ, Li HF, Wang JY, Shu JT, Zhu CH, Song WT, Song C, Ji GG, Liu HX (2014) Molecular genetic diversity and maternal origin of Chinese black-bone chicken breeds. *Genetics & Molecular Research*, 13, 3275–3282.
- Zhuang GY, Gong YB (2015) Investigation and utilization of Langya chicken. *Poultry Science*, (9), 45–50. (in Chinese) [庄桂玉, 龚玉波 (2015) 琅琊鸡品种资源调查与保种利用. *家禽科学*, (9), 45–50.]

(责任编辑: 曲鲁江 责任编辑: 时意专)