

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

包文斌¹, 束婧婷¹, 王存波¹, 张红霞¹, Steffen Weigend², 陈国宏^{1*}

(1. 扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009;

2. 德国联邦农业研究中心动物育种研究所, Mariensee 31535)

摘要: 通过线粒体 DNA 控制区的结构和多态性来研究中国家鸡和红色原鸡的遗传多态性与系统进化。测定 14 个中国地方鸡种和红色原鸡 2 个亚种的 256 个个体线粒体 DNA 控制区部分序列约 560 bp, 结果表明, A、C、G、T 这 4 种核苷酸的平均比例分别为 25.00%、37.40%、4.40% 和 33.20%。共发现 44 个变异位点, 约占分析位点总数的 7.86%, 没有观测到插入/缺失, 颠换和转换之比为 0.13; 共具有 32 种单倍型, 9 种为共享单倍型; 16 个群体内单倍型多样性从 0 到 0.964, 单倍型变异度总体为 0.909 ± 0.014 , 整体的平均核苷酸差异数为 7.276, 核苷酸多样性为 1.851%。群体间核苷酸分歧度 (D_{xy}) 在 0.747%~3.125% 之间变化, 核苷酸净遗传距离 (Da) 为 0.015%~2.633%。16 个群体表现出较高水平的遗传多态性, 群体间表现出显著的遗传分化。群体遗传多态性和亲缘关系分析表明, 一些中国家鸡的群体(如固始鸡和仙居鸡)起源于泰国红色原鸡 *Gallus gallus gallus* 亚种, 一些中国家鸡的群体(如茶花鸡和藏鸡等)起源于中国红色原鸡 *Gallus gallus spadiceus* 亚种, 在一些中国地方鸡种还同时具有这 2 种红色原鸡的遗传贡献; 认为中国家鸡起源于泰国或单纯起源于中国的观点都是不全面的。

关键词: 红色原鸡; 家鸡; 线粒体 DNA 控制区; 遗传多样性; 起源

中图分类号: Q349⁺.51; Q343.3⁺5

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2008)11-1449-11

Investigation on Genetic Diversity and Systematic Evolution in Chinese Domestic Fowls and Red Jungle Fowls by Analyzing the mtDNA Control Region

BAO Wen-bin¹, SHU Jing-ting¹, WANG Cun-bo¹, ZHANG Hong-xia¹,
Steffen Weigend², CHEN Guo-hong^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University,

Yangzhou 225009, China; 2. Institute for Animal Breeding, Federal Agricultural
Research Centre, Mariensee 31535, Germany)

Abstract: Investigation of the genetic diversity and systematic evolution in Chinese domestic fowls and red jungle fowls was carried out by the structure and polymorphism of mtDNA D-loop region. A 560 bp DNA fragment of control region of mtDNA from 256 individuals of 14 Chinese domestic chicken breeds and two red jungle was determined, the percentage of nucleotide A, C, G and T was 25.00%, 37.40%, 4.40% and 33.20%, respectively. There were 44 polymorphic sites accounting for 7.86% of total analyzed sites. Only transition and transversion but no insertion/deletion were found in this region, the ratio of transition and transversion in this study was 0.13. 32 haplotypes were defined, in which 9 haplotypes were shared among some chicken populations. The diversity of haplotypes was ranged from 0 to 0.964, the average diversity of haplotypes was 0.909 ± 0.014 . The average number of nucleotide divergence (K) and average nucleotide

收稿日期: 2007-12-07

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(2006AA10Z1E7)

作者简介: 包文斌(1974-), 男, 安徽贵池人, 副教授, 博士, 主要从事动物遗传资源评价、保护与利用研究, E-mail: wbbao1974@163.com

* 通讯作者: 陈国宏(1963-), 教授, 博士生导师, E-mail: ghchen@yzu.edu.cn

tid diversity (P_i) were 7.276 and 1.851%, respectively. Inter-population nucleotide divergence (D_{xy}) in 16 chicken populations was ranged from 0.747% to 3.125%, whereas inter-population net nucleotide divergence (D_a) in 16 chicken populations was ranged from 0.015% to 2.633%. The results indicated that the genetic diversity of 14 Chinese domestic chicken breeds and two subspecies of red jungle fowl was very abundant and the genetic divergence was significant among populations. Analysis of genetic diversity and phylogenetic relationships among Chinese domestic fowls and red jungle fowls indicated that some Chinese domestic fowls such as Gushi chickens and Xianju chickens derived from *Gallus gallus gallus*, other Chinese domestic fowls such as Chahua chickens and Tibetan chickens derived from *Gallus gallus spadiceus*. The genetic contribution of these two subspecies of red jungle fowl can be detected in some Chinese chicken populations. The results indicated that the Chinese domestic fowls don't just derive from red jungle fowl in Thailand or just from red jungle fowl in China.

Key words: red jungle fowl; domestic chicken; mtDNA D-loop; genetic diversity; origin

我国是世界上家禽遗传资源最为丰富的国家之一,但由于保存不当以及对外来品种不加区别的引进,造成许多地方鸡品质降低和群体规模急剧下降,很多地方品种的有利基因丢失^[1]。而且关于红色原鸡和中国家鸡的亲缘关系,目前还存在不同看法^[2-6]。因此认识红色原鸡和中国家鸡遗传多态性是保护和利用鸡种质资源的前提,对于中国家鸡的起源进化、种质资源保护以及科学开发利用等研究都有重要的指导意义。

线粒体是细胞中重要的细胞器之一,也是重要的遗传信息载体,mtDNA 作为分子标记具有分子结构简单、严格的母系遗传、无重组、与核基因无共同序列、进化速率快、多拷贝及碱基替换率低等特点,可以从母系起源上确定品种间的遗传关系^[7]。D-loop 区是线粒体基因组的控制区,在线粒体基因组中有着特殊的作用,为具有高度变异性的非编码区。因此,近年来利用 mtDNA 的 D-loop 区遗传多态性来研究动物的起源分化受到更为广泛的关注,成为遗传多态性和起源进化研究的最佳手段之一。

应用 mtDNA D-loop 序列变异对中国家鸡和红色原鸡的遗传多态性进行较全面的研究,并探讨了中国家鸡和红色原鸡的亲缘关系,为中国家鸡的起源进化提供分子生物学证据,并为地方鸡品种遗传多态性提供数据资料,以期能够对这些群体间的遗传分化有更好地了解。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以 14 个中国地方鸡种和红色原鸡 2 个亚种为

研究对象,其中仙居鸡、茶花鸡、鹿苑鸡、白耳鸡、藏鸡、固始鸡、大骨鸡、河南斗鸡、狼山鸡、泰和乌骨鸡、萧山鸡、北京油鸡等 12 个地方鸡品种均来自中国农业科学院家禽研究所国家地方禽种资源基因库,淮南麻黄鸡来自安徽省淮南市农业科学院淮南麻黄鸡保种群,皖南三黄鸡来自于安徽省池州市青阳县皖南黄鸡保种场,中国红色原鸡 *Gallus gallus spadiceus* 亚种采自云南省野生动物救护中心。翅静脉采血 0.4 mL,肝素钠抗凝,加入裂解液后 4 °C 保存备用。常规酚/氯仿法提取血样中 DNA。泰国红色原鸡 *Gallus gallus gallus* 亚种 26 个 DNA 样本由欧洲 AVIANDIV 研究项目组 Steffen Weigend 博士提供。各品种(亚种)的样本数为 16 个。

1.2 引物设计和 PCR 扩增

试验所用 D-loop 引物根据文献[8]报道而合成。引物序列为 L16750: 5'-AGGACTACGGCT-TGAAAAGC-3'; H522: 5'-AATGTGCCTGAC-CGAGGAACCAG -3' (L 和 H 分别代表轻链和重链,数字表示引物的 3'端在 mtDNA 序列中的位置)。

PCR 扩增采用了 50 μ L 的反应体系,反应程序如下:96 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 60 s,63 °C 退火 60 s,72 °C 延伸 60 s,35 个循环;72 °C 延伸 5 min。采用 2%的琼脂糖(美国 FMC 公司)经小量胶回收试剂盒((BBI, Canada))回收目的片段。

1.3 测序

分别取 2.5~5.0 μ L 回收产物用 PCR 引物做测序反应,测序试剂采用 Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (美国 USB 公司),按公司推荐的方法

占分析位点总数的 7.86%，其中单一多态位点 17 个，简约信息位点 27 个。

如表 1 所示，检测到 16 个鸡群体的核苷酸位点有 2 种类型的变异，即转换和颠换，44 个变异位点中，其中转换位点 39 个，占 88.6%，颠换位点 5 个，

占 11.4%，颠换和转换之比为 0.13，没有检测到插入/缺失。试验中仙居鸡、茶花鸡、鹿苑鸡、固始鸡、藏鸡、白耳鸡、萧山鸡和河南斗鸡等 8 个鸡种未检测到颠换现象。

表 1 16 个鸡群体 mtDNA D-loop 核苷酸替代情况

Table 1 Base substitutions of D-loop sequences in 16 chicken populations

群体 Population	样本数 Size	替换数 No. of substitution	转换数 No. of transition	颠换数 No. of transversion	插入/缺失数 No. of in/del
XJ	16	11	11	0	0
CH	16	12	12	0	0
LY	16	13	13	0	0
GS	16	0	0	0	0
TC	16	6	6	0	0
BE	16	8	8	0	0
DG	16	6	5	1	0
HG	16	7	0	0	0
LS	16	14	13	1	0
TS	16	7	6	1	0
XS	16	17	17	0	0
BF	16	13	12	1	0
HP	16	17	16	1	0
WTY	16	18	17	1	0
GGG	16	20	18	2	0
GGG	16	15	14	1	0
合计 Total	256	44	39	5	0

XJ. 仙居鸡;CH. 茶花鸡;LY. 鹿苑鸡;GS. 固始鸡;TC. 藏鸡;BE. 白耳鸡;DG. 大骨鸡;HG. 河南斗鸡;LS. 狼山鸡;TS. 泰和乌骨鸡;XS. 萧山鸡;BF. 北京油鸡;HP. 淮南麻黄鸡;WTY. 皖南三黄鸡;GGG. 泰国红色原鸡;GGG. 中国红色原鸡。下同
XJ. Xianju chicken;CH. Chahua chicken;LY. Luyuan chicken;GS. Gushi chicken;TC. Tibetan chicken;BE. Baier chicken;DG. Dagu chicken;HG. Henan Game;LS. Langshan chicken;TS. Silkies chicken;XS. Xiaoshan chicken;BF. Beijing Fatty chicken;HP. Huainan Partridge;WTY. Wannan Three-yellow chicken;GGG. Red jungle fowl in Thailand;GGG. Red jungle fowl in China. The same as below

各群体单倍型数量及分布见表 2, 32 种单倍型中, H2、H5、H6、H7、H8、H10、H12、H14、H27 等 9 种为共享单倍型, H2 包含的个体数最多, 共出现 50 次, 分布于 11 个中国地方鸡种中, 为试验鸡群体的主体单倍型, 占个体样本的 19.5%。

各群体之间单倍型类型和数目有差异, 试验测定的 256 条序列中, 萧山鸡、淮南麻黄鸡和皖南三黄鸡单倍型类型最多(7 种), 固始鸡单倍型类型最少(1 种)。

2.2 16 个鸡群体 mtDNA D-loop 区部分序列的遗传结构

红色原鸡 2 个亚种和 14 个中国地方鸡种群体内单倍型多样性见表 3, 16 个群体单倍型多样性为 0~0.964, 单倍型变异度总体为 0.909 ± 0.014 , 从总体上单倍型多样性丰富, 但不同群体差异很大, 其中固始鸡只有 1 种单倍型, 多样性为 0; 而萧山鸡、淮南麻黄鸡和皖南三黄鸡单倍型多样性最为丰富, 均为 0.964。

群体内 mtDNA D-loop 区核苷酸多态性见表 4, 中国红色原鸡 *Gallus gallus spadiceus* 亚种核苷酸突变位点数目最高, 达到 20 个, 其他群体由高到低分别为皖南三黄鸡 18 个, 萧山鸡和淮南麻黄鸡

表 2 mtDNA D-loop 单倍型在 16 个鸡群体中的分布
Table 2 Distribution of mtDNA D-loop haplotypes in 16 chicken populations

单倍型 Haplotype	群体 Population															
	XJ	CH	LY	GS	TC	BE	DG	HG	LS	TS	XS	BF	HP	WTY	GGG	GGG
H1						4										
H2	4	2			6	4	4	10	6		2	6	2	4		
H3						2										
H4						2										
H5		2	6		2	4	8			4	4	4				4
H6		8			8											
H7		4	8								2					
H8							2	6								
H9							2									
H10	12			16					4		2					
H11													4			
H12									6			2	2			
H13													2			
H14													2	2		
H15													2			
H16													2			
H17			2								2					
H18																2
H19																14
H20																4
H21																4
H22																4
H23														2		
H24														2		
H25														2		
H26														2		
H27											2			2		
H28										8						
H29										2						
H30										2						
H31											2					
H32												4				

表 3 16 个鸡群体内单倍型多样性

Table 3 Haplotype diversity of mtDNA D-loop in 16 chicken populations

群体 Population	样本数 Size	单倍型数 No. of haplotype	单倍型多样性 Haplotype diversity
XJ	16	2	0.476±0.171
CH	16	4	0.750±0.139
LY	16	3	0.679±0.122
GS	16	1	0
TC	16	3	0.679±0.122
BE	16	5	0.893±0.086
DG	16	4	0.733±0.155
HG	16	2	0.536±0.123
LS	16	3	0.750±0.096
TS	16	4	0.536±0.123
XS	16	7	0.964±0.177
BF	16	4	0.821±0.101
HP	16	7	0.964±0.177
WTY	16	7	0.964±0.177
GGG	16	4	0.695±0.177
GGG	16	2	0.250±0.180
合计 Total	256	32	0.909±0.014

17个。固始鸡没有变异位点,藏鸡、白耳鸡、大骨鸡、河南斗鸡和泰和乌骨鸡均低于10个。群体内个体间平均核苷酸差异数(K)和核苷酸多样性(Pi)均随突变位点数目的增加而增加,呈正比例关系,中国红色原鸡 *Gallus gallus spadiceus* 亚种个体间平均

核苷酸差异数最大,为10.833,核苷酸多样性为2.757%。红色原鸡2个亚种和14个中国地方鸡种整体的平均核苷酸差异数为7.276,核苷酸多样性为1.851%。

表4 16个鸡群体内 mtDNA D-loop 区核苷酸多态性

Table 4 Nucleotide polymorphism of mtDNA D-loop in 16 chicken populations

群体 Population	样本数 Size	变异位点数 No. of variable site	平均核苷酸差异 K	核苷酸多样性 Pi	Tajima's D
XJ	16	11	5.238	0.013 33	0.901 43
CH	16	12	5.250	0.013 36	0.676 10
LY	16	13	5.643	0.014 36	0.635 25
GS	16	0	0.000	0.000 00	NA
TC	16	6	1.832	0.004 63	-0.992 34
BE	16	8	3.500	0.008 91	0.649 82
DG	16	6	3.000	0.007 63	0.810 86
HG	16	7	3.750	0.009 54	1.851 29
LS	16	14	6.643	0.016 90	1.172 57
TS	16	7	3.750	0.009 54	1.851 29
XS	16	17	7.429	0.018 90	0.686 11
BF	16	13	5.929	0.015 09	0.923 91
HP	16	17	7.321	0.018 63	0.601 82
WTY	16	18	7.714	0.019 63	0.575 68
GGS	16	20	10.833	0.027 57	-0.071 19
GGG	16	15	3.750	0.009 54	-1.799 95*
整体 Total	256	44	7.276	0.018 51	-0.341 85

*. $P < 0.05$

红色原鸡2个亚种和14个中国地方鸡种群体内 mtDNA D-loop 区核苷酸多态性见表5,各群体核苷酸分歧度(D_{xy}) 在0.747%~3.125%之间,差异较大。白耳鸡与藏鸡分歧度最小(0.747%);固始鸡与仙居鸡分歧度也很小(0.800%)。泰国红色原鸡 *Gallus gallus gallus* 亚种与河南斗鸡、泰和乌骨鸡间分歧度最大,均为3.125。总体上泰国红色原鸡 *Gallus gallus gallus* 亚种与中国地方鸡种间分歧度要高于中国红色原鸡 *Gallus gallus spadiceus* 亚种。

红色原鸡2个亚种和14个中国地方鸡种群体内核苷酸净遗传距离(D_a)为0.015%~2.633%,差异也较大。固始鸡与藏鸡核苷酸净遗传距离为2.633%,其次为固始鸡与河南斗鸡及泰和乌骨鸡,均为2.417%。总体上固始鸡和泰国红色原鸡 *Gallus gallus gallus* 亚种与其他群体的核苷酸净遗传

距离较高。

16个群体中性检验的 Tajima's D 值见表4,除泰国红色原鸡 *Gallus gallus gallus* 亚种外,各群体中性检验的 Tajima's D 值介于:-0.992 34和1.851 29之间,经检验均不显著($P > 0.05$),符合中性突变。但是泰国红色原鸡 *Gallus gallus gallus* 亚种中性检验的 Tajima's D 值为-1.799 95($P < 0.05$),不符合中性突变。

红色原鸡2个亚种和14个中国地方鸡种间 Kimura 双参数距离见表6,可以看出各群体间遗传距离变异范围为0.007~0.031。藏鸡与白耳鸡之间的遗传距离最近,双参数距离值为0.007;泰国红色原鸡 *Gallus gallus gallus* 亚种与河南斗鸡、泰和乌骨鸡之间的遗传距离最远,双参数距离值均为0.031。14个中国地方鸡种中,固始鸡和仙居鸡与泰国红色原鸡 *Gallus gallus gallus* 亚种间遗传距

表 5 16 个鸡群体间核苷酸分歧度 (D_{xy}) 和净遗传距离 (D_a)
 Table 5 Inter-population nucleotide divergence (D_{xy}), inter-population net nucleotide divergence (D_a) in 16 chicken populations

%

群体 Population	XJ	CH	LY	GS	TC	BE	DG	HG	LS	TS	XS	BF	HP	WTY	GGG	GGG	GGG
XJ		2.176	1.999	0.800	2.149	2.117	2.163	2.258	1.863	2.258	1.527	2.190	1.522	1.808	2.095	2.499	
CH	0.842		1.741	2.704	0.930	1.161	1.283	1.264	1.630	1.264	1.908	1.407	2.195	1.757	2.839	2.226	
LY	0.615	0.356		2.036	1.964	1.773	1.569	1.885	1.821	1.885	1.582	1.566	1.956	1.972	2.417	1.940	
GS	0.133	2.306	1.318		2.894	2.735	2.672	2.894	2.099	2.894	1.645	2.608	1.304	1.972	1.749	2.608	
TC	1.251	0.031	1.014	2.633		0.747	0.965	0.835	1.392	0.835	2.004	1.264	2.163	1.598	3.045	2.290	
BE	1.006	0.048	0.610	2.290	0.070		0.869	0.906	1.352	0.906	1.885	1.225	2.044	1.678	2.974	2.099	
DG	1.115	0.233	0.470	2.290	0.351	0.042		0.922	1.272	0.922	1.781	1.145	1.940	1.813	2.958	1.908	
HG	1.115	0.119	0.690	2.417	0.126	0.016	0.064		1.439	0.835	2.004	1.312	2.163	1.805	3.125	2.226	
LS	0.351	0.117	0.258	1.254	0.315	0.016	0.045	0.117		1.439	1.845	1.559	1.853	2.727	2.226	2.216	
TS	1.115	0.119	0.690	2.417	0.126	0.016	0.064	0.119	0.117		2.004	1.312	2.163	1.805	3.125	2.226	
XS	0.115	0.295	0.081	0.709	0.827	0.494	0.454	0.582	0.055	0.582		1.813	1.892	1.900	2.362	2.147	
BF	0.769	0.015	0.094	1.854	0.278	0.025	0.009	0.081	0.041	0.081	0.114		2.091	1.869	2.823	2.067	
HP	0.067	0.595	0.307	0.373	1.000	0.667	0.627	0.754	0.076	0.754	0.048	0.406		2.012	2.465	2.449	
WTY	0.161	0.108	0.273	0.991	0.385	0.251	0.450	0.346	0.026	0.346	0.026	0.133	0.099		2.521	2.401	
GGG	0.951	1.694	1.222	1.272	2.337	2.052	2.099	2.171	1.405	2.171	0.936	1.591	1.056	1.062		0.847	
GGG	0.454	0.180	0.156	1.230	0.680	0.276	0.148	0.371	0.003	0.371	0.176	0.065	0.139	0.042	0.991		

上三角为核苷酸分歧度(D_{xy}),下三角为净遗传距离(D_a);以上值均扩大了 100 倍

Above diagonal was inter-population nucleotide divergence, down diagonal was inter-population net nucleotide divergence; All the value was enlarged 100 times

表 6 16 个鸡群体间 D-loop Kimura 双参数距离
 Table 6 Kimura 2-parameter distances of D-loop among 16 chicken populations

群体 Population	XJ	CH	LY	GS	TC	BE	DG	HG	LS	TS	XS	BF	HP	WTY	GGG	GGG
XJ																
CH	0.022															
LY	0.020	0.017														
GS	0.008	0.027	0.020													
TC	0.021	0.009	0.020	0.029												
BE	0.021	0.012	0.018	0.027	0.007											
DG	0.022	0.013	0.019	0.027	0.010	0.009										
HG	0.023	0.013	0.019	0.029	0.008	0.009	0.009									
LS	0.019	0.016	0.018	0.021	0.014	0.014	0.013	0.014								
TS	0.023	0.013	0.019	0.029	0.008	0.009	0.009	0.008	0.014							
XS	0.017	0.019	0.010	0.017	0.020	0.019	0.018	0.020	0.018	0.020						
BF	0.022	0.014	0.016	0.026	0.013	0.012	0.011	0.013	0.016	0.013	0.018					
HP	0.015	0.022	0.020	0.023	0.022	0.020	0.019	0.022	0.019	0.022	0.018	0.021				
WTY	0.018	0.018	0.020	0.020	0.016	0.017	0.018	0.018	0.019	0.018	0.019	0.019	0.020			
GGG	0.021	0.028	0.024	0.017	0.030	0.030	0.030	0.031	0.027	0.031	0.024	0.028	0.025	0.025		
GGG	0.025	0.022	0.019	0.026	0.023	0.021	0.019	0.022	0.022	0.022	0.021	0.021	0.021	0.024	0.024	

离比与中国红色原鸡 *Gallus gallus spadiceus* 亚种间的遗传距离近。

对 mtDNA D-loop 序列的变异进行分子方差分析,总方差剖分为群体间的方差 (V_a) 和群体内的方差 (V_b),并进行显著性检验,结果见表 7。本试

验中,红色原鸡 2 个亚种和 14 个中国地方鸡种 mtDNA D-loop 序列群体间的 (V_a) 的方差组分占总变异的 23.83%,群体内的方差组分 (V_b) 占总变异的 76.17%。16 个群体间的固定指数 $F_{st} = 0.38155$,群体间存在显著的遗传分化 ($P < 0.01$)。

表 7 16 个鸡群体 mtDNA D-loop 序列变异的分子方差分析

Table 7 The hierarchical components of mtDNA D-loop variation analysis of molecular variance in chicken populations

变异来源	自由度	平方和	方差组分	方差比率/%	固定系数
Source of variation	df	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	Fixation index F_{st}
群体间	15	147.738	1.209 29 (V_a)	23.83	0.381 55**
Among populations					
群体内	240	436.688	3.865 90 (V_b)	76.17	
Within populations					
总变异 Total	255	584.426	5.075 19		

V_a . 群体间方差组分; V_b . 群体内方差组分。* * . $P < 0.01$

V_a . Variance components among populations; V_b . Variance components with in populations. * * . $P < 0.01$

2.3 mtDNA D-loop 单倍型的分子系统树和单倍型网络图

利用 MEGA3.1 构建红色原鸡 2 个亚种和 14 个中国地方鸡种 mtDNA D-loop 区 32 种单倍型间的 NJ 分子系统树(图 2)。从图 2 可见,16 个群体的 32 种单倍型明显地分为 4 支,在此将这 4 个类群定义为单倍型类群 A、B、C 和 D。单倍型类群 A 中包含了 10 种单倍型,单倍型类群 B 中包含了 7 种单倍型,2 个类群合并为 1 个大群,占总单倍型数的 53.13%;单倍型类群 C 中包含了 5 种单倍型,单倍型类群 D 中包含了 10 种单倍型,2 个类群也合并为一个类群,占总单倍型数的 46.87%。单倍型类群 A 中包含有泰国红色原鸡 *Gallus gallus gallus* 亚种的单倍型 H18,而不含有中国红色原鸡 *Gallus gallus spadiceus* 亚种的单倍型;单倍型类群 B 和 C 中包含有中国红色原鸡 *Gallus gallus spadiceus* 亚种的单倍型 H5、H20 和 H22,但是不包含泰国红色原鸡 *Gallus gallus gallus* 亚种的单倍型。有趣的是,单倍型类群 D 中同时含有这 2 个红色原鸡亚种的单倍型。

根据红色原鸡 2 个亚种和 14 个中国地方鸡品种单倍型序列的变异位点,运用 Network4.1 软件作出单倍型网络关系图(图 3)。从图 3 可知,本次研究的序列明显聚为 4 个聚类簇,聚类簇 A 中包含 10 种单倍型,聚类簇 B 中出现 7 种单倍型,聚类簇

C 中包含 5 种单倍型,而聚类簇 D 中包含 11 种单倍型。与单倍型系统发生树的结果完全一致。

2.4 16 个群体的分子系统树

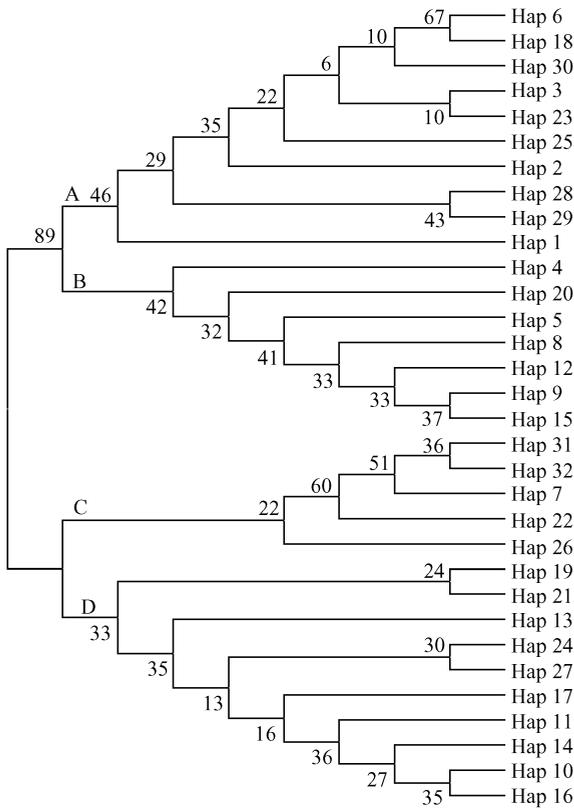
利用 MEGA 3.1 软件选择 Kimura 双参数模型,以日本鹌鹑 (*Coturnix japonica*) 为外群 (D82924),构建 NJ 分子系统树(图 4)。在聚类图中,固始鸡、仙居鸡始与泰国红色原鸡 *Gallus gallus gallus* 亚种聚在一起,可以看作一个起源系统。茶花鸡、藏鸡、泰和乌骨鸡、河南斗鸡和白耳鸡也始终出现在一个类群,也可以看作一个起源系统。

3 讨论

3.1 16 个鸡群体 mtDNA D-loop 区部分序列的遗传多态性

测定了红色原鸡 2 个亚种和 14 个中国地方鸡品种 mtDNA D-loop 部分序列,序列富含 A+T, C 含量也较高,表现出碱基组成的偏倚性。这与其他关于禽类 mtDNA D-loop 区的报道是一致的^[13-14],关于哺乳动物 mtDNA D-loop 区的报道也表明,mtDNA D-loop 区富含 A+T^[15-17]。童晓梅等^[18]对藏鸡线粒体全基因组序列测定的结果还表明,藏鸡线粒体全基因组(H 链)也表现出 A+T 含量较高的现象。

傅衍等^[8]在对浙江省 6 个地方品种的线粒体 DNA D-loop 遗传多样性研究中,包含了本研究的



枝上的数字为自展分析自展值(1 000 重复)
The numbers above the branches show the percentage bootstrap support from 1 000 replications

图 2 使用邻接法(NJ)构建的 32 个单倍型的系统发生树

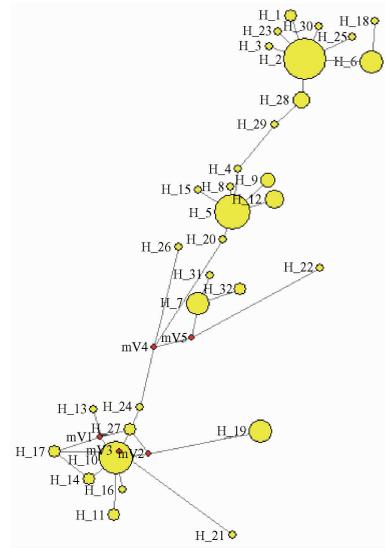
Fig. 2 Neighbor-joining phylogenetic tree constructed from the 32 haplotypes of D-loop identified in 16 chicken populations

仙居鸡和白耳鸡,结果在 24 个变异位点中,23 个位点为转换,只有 1 个是颠换,而且在仙居鸡和白耳鸡中也没有颠换现象,可见 mtDNA 在品种内的进化是很保守的。在线粒体基因组 DNA 进化过程中,通常发生转换的频率远高于颠换,在高突变的 D-loop 区也不例外。研究结果与一些哺乳动物 mtDNA 的报道也相符,这也与 mtDNA 进化的特点一致^[15-17]。

在所有群体中,固始鸡单倍型类型最少,萧山鸡、淮南麻黄鸡和皖南三黄鸡单倍型类型最多,单倍型的类型也反映了群体的来源是否复杂,这也与关于这些群体的微卫星遗传多样性分析的结果是一致的^[19]。

3.2 16 个鸡群体内 mtDNA D-loop 遗传多样性

试验中红色原鸡 2 个亚种和 14 个中国地方鸡品种群体内单倍型多样性差异很大,从总体上单倍



每个圆圈代表一种单倍型,其大小与该种单倍型出现的频率成正比。红点代表可能存在的变异位点

A circle mean a haplotype,the area means the frequency in a haplotype,the red point means the potential mutation site

图 3 16 个鸡群体 D-loop 区的网络中介图

Fig. 3 The median-joining networks of their 16 chicken populations in the control region

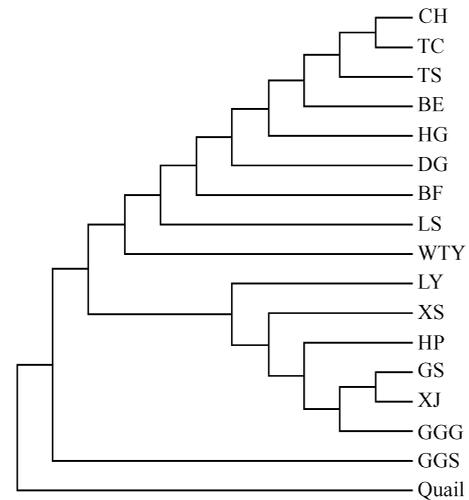


图 4 16 个鸡群体 mtDNA D-loop 序列 NJ 分子系统树

Fig. 4 NJ tree of mtDNA D-loop sequences in 16 chicken populations

型多样性丰富,这与较高的位点变异率是一致的。16 个群体整体的平均核苷酸差异数为 7.276,核苷酸多样性 1.851%。与其他家畜相比^[15-17, 20],这种

核苷酸多样性处于较高的水平,这提示我们,中国家鸡的起源可能不是单一的,而且在其长期的选择与进化过程中,受到多个方向的选择。

3.3 16 个鸡群体间 mtDNA D-loop 遗传多样性

试验中总体上泰国红色原鸡 *Gallus gallus gallus* 亚种与中国地方鸡品种间分歧度要高于中国红色原鸡 *Gallus gallus spadiceus* 亚种,核苷酸分歧度和核苷酸净遗传距离差异均较大。泰国红色原鸡 *Gallus gallus gallus* 亚种与河南斗鸡、泰和乌骨鸡之间 Kimura 双参数遗传距离最远,固始鸡和仙居鸡与泰国红色原鸡 *Gallus gallus gallus* 亚种间的遗传距离比与中国红色原鸡 *Gallus gallus spadiceus* 亚种间的遗传距离近。这也提示中国地方鸡品种的起源并非单一的。对 mtDNA D-loop 序列的变异进行分子方差分析,结果显示 16 个鸡群体间存在显著的遗传分化。

3.4 中国家鸡的起源探讨

关于红色原鸡和中国家鸡的亲缘关系,已有诸多学者从形态学、考古学、蛋白多态、DNA 指纹和线粒体 DNA 的角度进行过分析^[2-5,21-22],但关于红色原鸡 *Gallus gallus spadiceus* 亚种和 *Gallus gallus gallus* 亚种是否实际上是同一亚种,中国家鸡是起源于泰国附近地区的红色原鸡 *Gallus gallus gallus* 亚种还是具有自己独立的起源,目前还存在不同的看法^[2-3,5-6]。要对中国家鸡的起源进行探讨,必须同时对红色原鸡 *Gallus gallus spadiceus* 亚种和 *Gallus gallus gallus* 亚种与中国地方鸡品种的亲缘关系进行全面分析。

Fumihito 等^[2-3]以限制性内切酶片段长度多态性分析并结合线粒体 DNA 控制区(D 环)部分序列分析,认为 *Gallus gallus gallus* 亚种和 *Gallus gallus spadiceus* 亚种应为同一亚种;傅衍等^[5]提出了类似的观点,但是这个观点与其他一些关于家鸡的起源假说不一致^[4,6,22]。迄今关于中国家鸡与红色原鸡的研究中均没有同时获得中国红色原鸡 *Gallus gallus spadiceus* 亚种与泰国红色原鸡 *Gallus gallus gallus* 亚种,试验在同时获得这 2 个亚种样本的基础上,对 mtDNA D-loop 部分序列进行分析的结果也表明,中国红色原鸡 *Gallus gallus spadiceus* 亚种与泰国红色原鸡 *Gallus gallus gallus* 亚种没有共享单倍型,2 个亚种间存在显著的遗传分化,试验的结果不能支持这 2 个亚种实际上是同一个亚种的说法,这与包文斌等^[23]微卫星遗传多样性分析的

结果也是一致的。

关于中国家鸡是起源于泰国附近地区的红色原鸡 *Gallus gallus gallus* 亚种还是具有自己独立的起源,这一问题目前也存在不同的看法。Fumihito 等^[2-3]、傅衍等^[5]认为家鸡是单起源的,并且起源于泰国及其邻近地区的红色原鸡。郑作新^[24]、薄吾成^[4]等人根据一系列考古发现和大量出土文物资料,提出中国家鸡有自己的起源地,而且其驯化时间远较印度的家鸡为早。王文^[25]、程光潮^[21]、Liu^[6]等进一步通过血型蛋白多态、DNA 指纹以及线粒体 DNA 部分序列分析等方法,支持中国家鸡的多起源学说。宋春红等^[26]通过对 mtDNA D-loop 区的测序和比对,探讨了中国 6 个地方鸡品种的母系起源。结果推测,文昌鸡、鲁西斗鸡、寿光鸡、济宁百日鸡和莱芜黑鸡等 6 个地方鸡品种分别来自云南、老挝和越南附近地区的红原鸡大陆亚种。试验构建的单倍型系统发生树与作出的单倍型网络关系图结果完全一致。从结果中可以推断,在本研究的中国地方鸡品种中,有一部分鸡种起源于泰国红色原鸡 *Gallus gallus gallus* 亚种,还有一部分起源于中国红色原鸡 *Gallus gallus spadiceus* 亚种,而且这 2 个起源系统还在一些鸡种中表现出交汇融合的现象,这 2 种红色原鸡对中国家鸡的基因库均有贡献。

对测定的红色原鸡 2 个亚种和 14 个中国地方鸡品种 D-loop 区序列采用 Tajima's D 值进行中性检验也表明,中国红色原鸡 *Gallus gallus spadiceus* 亚种和地方鸡品种符合中性突变。可能是这些群体无论其群体大小,都没有发生过群体扩张。在它们迁移和发展的过程中,群体扩张的印记很可能只在一个小的群体内长期得到维持,另外可能经受了群体数量的减少事件以及这些印记在较为严重的建群效应中丢失了。但是泰国红色原鸡 *Gallus gallus gallus* 亚种不符合中性突变,这表明泰国红色原鸡在被驯化后经历一个瓶颈效应,随之是一个群体的扩张过程,因此初步推测认为,泰国红色原鸡 *Gallus gallus gallus* 亚种被驯化后,有部分群体演化形成了一些中国家鸡的群体,而中国红色原鸡 *Gallus gallus spadiceus* 亚种被驯化后,也演化形成了一些中国家鸡的群体,在泰国红色原鸡 *Gallus gallus gallus* 亚种群体一段时间内的群体扩张过程中,进而对一些在中国本地起源的家鸡群体中的一些亚群产生了影响,因此在中国地方鸡品种同时具有这 2 种红色原鸡的遗传贡献。

试验还利用 Kimura 双参数模型,构建了 16 个群体的 NJ 聚类图。在分子系统树中,固始鸡、仙居鸡与泰国红色原鸡 *Gallus gallus gallus* 亚种聚在一起,茶花鸡、藏鸡、泰和乌骨鸡、河南斗鸡和白耳鸡也出现在一个类群,研究推测在 14 个中国地方鸡品种中,固始鸡和仙居鸡起源于泰国红色原鸡 *Gallus gallus gallus* 亚种,而茶花鸡、藏鸡等鸡种可能起源于中国红色原鸡 *Gallus gallus spadiceus* 亚种。研究结果表明中国家鸡可能具有多个独立的母系,来源于不同遗传分化的群体,因此更倾向于红色原鸡在不同的地点和时间被多次独立驯化的观点,红色原鸡的驯化可能是多次、多地、长期人类活动的结果,认为中国家鸡起源于泰国或单纯起源于中国的观点都是片面的。

参考文献:

- [1] 中国畜禽遗传资源状况编委会. 中国畜禽遗传资源状况[M]. 北京:中国农业出版社,2004.
- [2] FUMIHITO A, MIYAKE T, SUMI S, et al. One subspecies of the red jungle fowl (*Gallus gallus gallus*) suffices as the matriarchic ancestor of all domestic breeds[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(26): 12 505-12 509.
- [3] FUMIHITO A, MIYAKE T, TAKADA M, et al. Monophyletic origin and unique dispersal patterns of domestic fowls [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(13): 6 792-6 795.
- [4] 薄吾成. 中国家畜起源论文集[M]. 陕西:天则出版社,1993:45-61.
- [5] 傅 衍,牛 冬,罗 静,等. 中国家鸡的起源探讨[J]. 遗传学报,2001,28(5):411-417.
- [6] LIU Y P, WU G S, YAO Y G, et al. Multiple maternal origins of chickens: Out of the Asian jungles [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2006, 38(1): 12-19.
- [7] DAVID O F, SKLBINSKL, ZOUROS S E, et al. Mitochondrial DNA inheritance [J]. Nature, 1994, 368(6 474): 817-818.
- [8] 傅 衍,牛 冬,阮 晖,等. 浙江省地方鸡种的遗传多样性研究[J]. 遗传学报,2001,28(7):606-613.
- [9] ROZAS J, SANCHEZ-DeLBARRIO J C, MESSEGUER X. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods [J]. Bioinformatics, 2003, 19(18): 2 496-2 497.
- [10] KUMAR S, TAMURA K, NEI M. MEGA3: Integrated Software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. Briefings in Bioinformatics, 2004, 5(2): 150-163.
- [11] EXCOFFIER L G, SCHNEIDER S. Arlequin ver. 3. 0: An integrated software package for population genetics data analysis[J]. Evolutionary Bioinformatics Online, 2005, 1: 47-50.
- [12] TOBIAS P, SIAVASH V. Network4. 1. 0. 8 [M]. Fluxus Technology Ltd., 2004.
- [13] 史宪伟,曾凡同,邱祥聘,等. 中国主要鹅品种的线粒体 DNA 多态性与起源分化研究[J]. 遗传学报,1998,25(6):499-507.
- [14] 张汤杰,李慧芳,陈宽维,等. 利用线粒体 D-loop 区分析家鸭品种遗传多态性与系统进化[J]. 畜牧兽医学报,2007,38(11):1 168-1 175.
- [15] GROSSI S F, LUI J F, GARCIA J E, et al. Genetic diversity in wild (*Sus scrofa scrofa*) and domestic (*Sus scrofa domestica*) pigs and their hybrids based on polymorphism of a fragment of the D-loop region in the mitochondrial DNA[J]. Genet Mol Res, 2006, 5(4): 564-568.
- [16] LEI C Z, CHEN H, ZHANG H C, et al. Origin and phylogeographical structure of Chinese cattle [J]. Anim Genet, 2006, 37(6): 579-582.
- [17] LIU R Y, YANG G S, LEI C Z. The genetic diversity of mtDNA D-loop and the origin of Chinese goats [J]. Acta Genetica Sinica, 2006, 33(5):420-428.
- [18] 童晓梅,梁 羽,王 威,等. 藏鸡线粒体全基因组序列的测定和分析[J]. 遗传,2006,28(7):769-777.
- [19] 陈国宏,季从亮,王敏强,等. 12 个地方鸡种群遗传结构及遗传多样性分析[J]. 畜牧兽医学报,2006,37(2):105-111.
- [20] 张红平,李 利,李学伟. 4 个引进山羊品种 mtDNA 控制区序列变异和系统发生关系研究[J]. 中国畜牧杂志,2006,42(9):1-4.
- [21] 程光潮,刘坤凡,张 琦,等. 红色原鸡与家鸡的亲缘关系研究[J]. 遗传学报,1996,23(2):96-104.
- [22] 刘益平,朱 庆,曾凡同,等. 原鸡线粒体 DNA 部分序列多态性分析[J]. 畜牧兽医学报,2000,35(2):134-140.
- [23] 包文斌,陈国宏,李碧春,等. 中国红色原鸡和泰国红色原鸡遗传多样性分析[J]. 遗传,2007,29(5):587-592.
- [24] 郑作新. 中国动物志,鸟纲(第四卷:鸡形目) [M]. 北京:科学出版社,1978.
- [25] 王 文,兰 宏,刘爱华,等. 家鸡和原鸡的线粒体 DNA 多态性比较[J]. 动物学研究,1994,15(4):45-61.
- [26] 宋春红,陈红菊,马月辉,等. 中国 6 个地方鸡品种的母系起源[J]. 畜牧兽医学报,2007,38(7):735-740.