

## 云龙矮脚鸡系统进化及遗传多样性的研究

贾晓旭, 唐修君, 陆俊贤, 顾 荣, 葛庆联, 高玉时\*, 苏一军

(江苏省家禽科学研究所, 扬州 225125)

**摘 要:** 通过对云龙矮脚鸡线粒体 DNA(mtDNA) D-loop 区全序列的测序和比对,并结合 GenBank 已经测出 D-loop 区全序列的红色原鸡的序列, 探讨云龙矮脚鸡的遗传多样性和母系起源。结果显示, 云龙矮脚鸡 mtDNA D-loop 区全长 1231~1232 bp, 1231 bp 单倍型在 859 bp 处存在 C 碱基缺失。在 19 个个体中,共发现 25 处单核苷酸多态位点, 8 种单倍型。系统发育分析发现, 云龙矮脚鸡 8 种单倍型可以分为 A、B、C 和 E 4 个分支。A 和 B 与红色原鸡滇南亚种(*Gallus gallus spadiceus*)聚为一类, 推测这 2 个分支可能起源于云南、缅甸的附近地区的红色原鸡滇南亚种。E 分支与红色原鸡(*Gallus gallus murghi*)聚为一类, 推测可能起源于红色原鸡的印度亚种分支。D 分支与 4 个原鸡亚种聚为一类, 可能有多个母系起源。本研究从分子水平上为云龙矮脚鸡的遗传资源保护和开发利用提供了参考。

**关键词:** 云龙矮脚鸡; 线粒体 DNA; D-loop 区; 系统发育关系; 起源

中图分类号: S831.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2015)02-0233-04

## Diversity and phylogenetic relationships of Yunlong Aijiao chicken

JIA Xiaoxu, TANG Xiujun, LU Junxian, GU Rong, GE Qinglian, GAO Yushi, SU Yijun

(Jiangsu Institute of Poultry Science, Yangzhou 225125)

**Abstract:** To determine the origin and genetic diversity of Yunlong Aijiao chicken, we compared its complete mtDNA D-loop sequences with the red jungle fowl sequences in GenBank. The results showed that the D-loop region of Yunlong Aijiao chicken was 1231-1232 bp in length and the 1231 bp haplotype had a nucleotide C deficiency at 859 bp site. In 19 samples, 25 mutation sites and 8 haplotypes were found. Phylogenetic analysis found that 8 haplotypes of Yunlong Aijiao chicken can be classified to four clades. Clade A and clade B were clustered with *Gallus gallus spadiceus*, which indicated that the two clades might originate from the continental subspecies of *Gallus gallus spadiceus*. The clade E was clustered with *Gallus gallus murghi*, indicating that clade E might originate from the continental subspecies of *Gallus gallus murghi*. Clade D was clustered with four subspecies of the red jungle fowl, which may have multiple origins. The results will be a reference for genetic resources conservation, development, and utilization of Yunlong Aijiao chicken.

**Key words:** Yunlong Aijiao chicken; mitochondrial DNA; D-loop region; phylogenetic relationship; origin

矮脚鸡是培育节粮型蛋鸡(农大3号)或种鸡(新兴矮脚黄等)的重要素材,我国现在用的矮脚鸡配套系矮脚素材都是国外引进。我国有丰富的家禽品种资源,矮脚鸡品种有贵州兴义的矮脚鸡和云南云龙矮脚鸡,2个品种都生长速度慢,饲料转化效率低,如何开发利用成为摆在育种者面前的难题。

云龙矮脚鸡形成和饲养的历史大约从元代开始,元代年间傈僳族人民从金沙江流域向怒江、澜

沧江流域迁移并定居于云岭山脉的崇山峻岭之间,境内多天然屏障在一定程度上阻碍了云龙和外界的交往,形成了一个相对闭塞的区域,为矮脚鸡的形成和保存提供了优越的自然环境条件,加之民族习俗和饲养方式的不同,经长期选择形成云龙矮脚鸡对恶劣自然环境和粗放饲养较强的适应能力<sup>[1]</sup>。

对于动物遗传多样性的研究的方法主要有微卫星和线粒体 DNA 等,线粒体 DNA( mitochondrial

收稿日期: 2014-11-05

基金项目: 国家自然科学基金(31372277)资助。

作者简介: 贾晓旭, 助理研究员。E-mail: 596374801@qq.com

\* 通信作者: 高玉时, 研究员。E-mail: gaoyu100@sina.com

DNA, mtDNA)具有母系遗传、遗传过程较少发生DNA重组、进化速率快突变率高,母系迁徙历史能够得到很好的反映。线粒体的研究主要集中在D-loop区,因为这一区域突变率要高于编码区。国内外有关鸡 mtDNAD-loop 区的研究大都集中在D-loop 区的高变区<sup>[2-5]</sup>,区域较小,得到的信息可能不全面。笔者测定了云龙矮脚鸡 mtDNA D-loop 区的全序列,并结合 GenBank 已经测出 D-loop 区全序列的红色原鸡的序列,旨在从分子水平上探讨云龙矮脚鸡的起源和遗传多样性。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物

19 只云龙矮脚鸡采集于来自国家地方禽种资源基因库,随机取样,翅静脉采血,ACD 抗凝,采用常规的酚/氯仿法提取血液基因组 DNA,0.8%琼脂糖凝胶电泳检测。选取红色原鸡 5 个亚种 *Gallus gallus bankiva* (NC007237)、*Gallus gallus gallus* (AB007725、NC007236)、*Gallus gallus murghi* (HE793430、GU261707~ GU261709)、*Gallus gallus jabouillei* (GU261674、GU261696)、*Gallus gallus spadiceus* (NC007235、GU261690、GU261692、GU261693、GU261695、GU261702~GU261704、GU261706、GU261716)等已经测出 mtDNA D-loop 区全序列的 19 条序列,从 GenBank 数据库中下载其序列,与云龙矮脚鸡进行系统发育分析。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 引物合成** 根据红色原鸡线粒体基因组的已知 DNA 序列(GenBank 序列号: NC\_007235)作为参考序列,用 Primer Premier5.0 软件设计 1 对引物扩增云龙矮脚鸡 mtDNA D-loop 区,引物序列分别为: PF: 5'-AAACACCCAAACTCACTAAC-3'; PR: 5'-CACTGGGATGCGGATACTTGC-3'。由上海生工生物有限公司合成。

**1.2.2 PCR 扩增和测序** PCR 扩增体系(50 μL): PCR Mix(南京博尔迪公司)25 μL, 10 μmol·L<sup>-1</sup>引物各 1.5 μL,模板 2 μL,灭菌水 20 μL。反应程序为: 95℃ 5 min, (95℃ 30 s, 53℃ 60 s, 72℃ 60 s) 30 循环, 72℃ 4 min。1.5%低熔点琼脂糖(Promega 公司)凝胶电泳检测 PCR 产物,用试剂盒回收纯化,然后交由上海英骏公司进行测序。所有序列采用双向测序,以便比对核实。

**1.2.3 数据处理和分析** 将得到的序列与 GenBank 中红色原鸡参考序列(NC\_007235)进行比对,剪掉引物及多余的序列,DNA 序列片段用 DNASTar

5.02 软件的 SeqMan 程序进行拼接。用 DnaSP version 5.10 软件统计多态位点数(number of polymorphic sites)和突变位点总数(total number of mutations),单倍型数(number of haplotype),单倍型多样性(haplotype diversity),核苷酸多样性(nucleotide diversity)等<sup>[6]</sup>。用 MEGA 4.0 进行转换与颠换数目的统计和碱基组成分析,并用其采用邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统发育树,发育树选用 Kimura 2 模型,1000 次重复<sup>[7]</sup>。用 Network4.6 构建中介网络图(median-joining)分析单倍型间的进化关系(www.fluxus-technology.com)。

## 2 结果与分析

### 2.1 云龙矮脚鸡线粒体 DNA D-loop 区序列分析

设计的引物在云龙矮脚鸡基因组中得到了较好的扩增,通过测序发现云龙矮脚鸡线粒体 1231~1232 bp,1231 bp 单倍型在 859 bp 处存在 C 碱基缺失,长度为 1231 bp 的有 13 个体,1232 bp 有 6 个个体。T、C、A 和 G 4 种碱基含量分别为 33.5%、26.5%、26.6%和 13.4%,其中 A+T 含量(60.1%)明显高于 G+C 含量(39.9%),线粒体 DNA D-loop 区为非编码区,富集 A/T 碱基,能被 RNA 聚合酶等特异分子识别,从而作为转录的起始序列。

		11		
		1122222222	2222333333	46722
		6911223444	5568113466	48911
		7927259236	2611050237	66245
NC007235		TTATACAGTT	ATCACTCACT	CGGCA N Clade
Hap1		C.G..T...C	.....C....	...G 2 A
Hap2		C.G..TG..C	.....C....	...G 2 A
Hap3		.....	.....	..AA.. 1 B
Hap4		..G...ACC	.C.GTC.GTC	...G 1 C
Hap5		..GC...CC	.CT.TC....	T..TG 6 E
Hap6		..GC...CC	TCT.TC....	T..TG 4 E
Hap7		.CGC...CC	.CT.TC....	T..TG 2 E
Hap8		..GCG...CC	.CT.TCT... T..TG	1 E

图 1 云龙矮脚鸡 mtDNA D-loop 区的多态位点分布  
Figure 1 Alignment of variable nucleotide sequence positions among the five haplotypes observed in Yunlong Aijiao chicken

云龙矮脚鸡 mtDNA D-loop 区核苷酸多样性 (Pi) 为 (0.00477±0.00116),单倍型多样性 (Hd) 为 (0.860±0.054),核苷酸平均差异数 (K) 为 5.871。变异区在第 167 bp 与 1215 bp 之间,共发现 25 处多态位点,其中单一多态位点 13 处,简约信息位点 12 处,除 252 bp 处 A-T 颠换外,其余全部为转换,可能是因为转换只是在亲水头一侧进行运动,相对于颠换磷从亲水头一侧穿过脂溶性的磷脂分子层到

另一侧较为简单。其中 T ↔ C 转换 15 处, A ↔ G 转换 9 处。

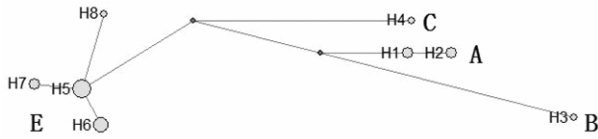


图 2 云龙矮脚鸡 mtDNA D-loop 区 8 种单倍型的网络关系  
Figure 2 Median-joining (MJ) network showing genetic relationships among 8 haplotypes for mtDNA D-loop of Yunlong Aijiao chicken

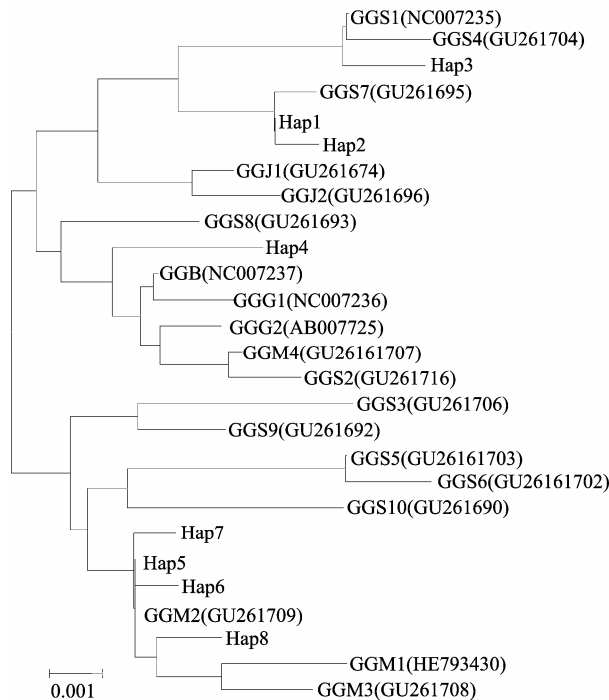


图 3 基于线粒体 DNA D-loop 区序列采用 NJ 法构建的系统发育树

Figure 3 Neighbor-joining trees based on population mtDNA D-loop sequences

## 2.2 云龙矮脚鸡线粒体 DNA D-loop 区单倍型分析

通过 DnaSP5.10 软件进行单倍型统计分析, 云龙矮脚鸡群体 D-loop 区序列中检测到 25 个多态位点, 并由此界定了 8 个单倍型(Hap1~Hap8 图 1)。Hap5 单倍型有 6 个体, 为优势单倍型。参照 Liu 等<sup>[8]</sup>划分标准可以分为 A、B、C 和 E 4 个分支。A 分支有 2 种单倍型, 4 个个体, 占 21.1% (4/19); E 分支有 4 种单倍型, 13 个个体, 占 68.4% (13/19); B 和 C 分支都只有 1 种单倍型, 1 个个体。Hap5 有 4 个体 D-loop 区长度 1232 bp, Hap4 和 Hap8 也为 1232 bp, 其余 13 个体均为 1231 bp。用 Network

软件对 8 种单倍型进行网络关系分析, E 分支群体呈星状发散结构(图 2), 表明 E 分支群体经历过群体扩张。

## 2.3 云龙矮脚鸡与原鸡系统发育分析

根据云龙矮脚鸡 mtDNA D-loop 区全序列分出的 8 种单倍型, 采用 NJ 法构建了云龙矮脚鸡与原鸡的系统发育树(图 3)。Hap1 和 Hap2 与原鸡滇南亚种 GGS7 聚为一类; Hap3 与原鸡滇南亚种 GGS1、GGS4 聚为一类; 然后 Hap1~3 与原鸡海南亚种 (GGJ1、GGJ2) 聚为一类。Hap4 与原鸡指名亚种 (GGG1、GGG2)、滇南亚种(GGS2、GGS8)、印度亚种 (GGM4)、原鸡印尼亚种 (GGB) 聚为一类; Hap5~8 与原鸡印度亚种 GGM1、GGM2、GGM3 聚为一类, Hap5 与 GGM2 序列完全相同。

## 3 小结与讨论

### 3.1 云龙矮脚鸡遗传多样性及开发利用前景

在云龙矮脚鸡 19 只个体中, 共发现 25 处单核苷酸多态位点, 8 种单倍型, 核苷酸多样性 ( $P_i$ ) 为  $(0.00477 \pm 0.00116)$ , 单倍型多样性 ( $H_d$ ) 为  $(0.860 \pm 0.054)$ , 核苷酸平均差异数 ( $K$ ) 为 5.871, 表现出丰富的线粒体遗传多样性, 表明该鸡种没有经过专门化的选育, 开发前景广阔。云龙矮脚鸡包装性状 (羽色、胫色、肤色) 也具有多样性, 羽毛以黄麻为主, 也有白色和灰色, 皮肤和胫呈白色或黑色, 可以根据育种需要组建多个家系。另外云龙矮脚鸡还具有耐粗饲、肉质好、适应性及抗病力强等特点。美中不足的是生产性能偏低, 通过加强选育, 有可能成为我国节粮型蛋鸡和种鸡的优良素材。

### 3.2 云龙矮脚鸡母系起源

本研究结果显示: 云龙矮脚鸡可划分为 A、B、C 和 E 4 个分支, 由于线粒体 DNA 在遗传过程中, 遗传物质通过卵细胞质传递, 较少发生 DNA 重组, 其野生祖先的线粒体 DNA 类型一般能得以保持。一个个体就能代表一个母性集团, 即使经过几千年的杂交繁育, 系统关系依然明晰<sup>[9-11]</sup>, 因此云龙矮脚鸡在遗传组成上可能有 4 个血统来源。

本研究中云龙矮脚鸡 A 分支 (Hap1 和 Hap2) 与原鸡滇南亚种 GGS7(GU261695)聚为一类, B 分支 (Hap3) 分支与原鸡滇南亚种 GGS1 (NC\_007235)、GGS4(GU261704) 为一类。推测 A、B 分支母系可能起源于原鸡滇南亚种。C 分支与原鸡指名亚种 (GGG1、GGG2)、滇南亚种(GGS2、GGS8)、印度亚种 (GGM4)、原鸡印尼亚种 (GGB) 聚为一类。推测 C 分支有多个母系起源。E 分支

(Hap5~8)与 GGM1(HE793430)、GGM2(GU261709)、GGM3(GU261708)聚为一类,并且 Hap5 与 GGM2 序列完全相同。云龙矮脚鸡群体主要分布于分支 E 中,占了群体接 68.4% (13/19),其中 Hap5 单倍型有 6 个体,为优势单倍型,说明原鸡滇南亚种(*Gallus gallus spadiceus*) 在云龙矮脚鸡形成过程贡献最大。进一步佐证了家鸡的野生祖先为红色原鸡,是由多个母系在中国南部,南亚和东南亚经过多次独立驯化形成的<sup>[12-13]</sup>。

### 参考文献:

- [1] 国家畜禽遗传资源委员会. 中国畜禽遗传资源志[M]. 北京: 中国农业出版社, 2012.
- [2] Niu D, Fu Y, Luo J, et al. The origin and genetic diversity of Chinese native chicken breed [J]. *Biochemical Genetics*, 2002, 40(5): 163-174.
- [3] Liu Z G, Lei C Z, Luo J, et al. Genetic variability of mtDNA sequences in Chinese native chicken breeds[J]. *Asian Aust J Anim Sci*, 2004, 17(7): 903-909.
- [4] 傅衍, 牛冬, 阮晖, 等. 浙江省地方鸡种的遗传多样性的研究[J]. *遗传学报*, 2001, 28(7): 606-613.
- [5] 包文斌, 束婧婷, 王存波, 等. 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[J]. *畜牧兽医学报*, 2008, 39(11): 1449-1459.
- [6] Rozas J, Sanchezbarrio J C, Messeguer X, et al. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods[J]. *Bioinformatics*, 2003, 19(18): 2496-2497.
- [7] Tamuiak, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [8] 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.
- [9] 贡潘偏抽, 刘丽仙, 李大林, 等. 基于线粒体 DNA 控制区(mtDNA D-loop)序列分析瓢鸡的遗传多样性[J]. *云南农业大学学报*, 2011, 26(2): 211-214; 223.
- [10] 黄道平, 李大林, 袁峰, 等. 西畴乌骨鸡 mtDNA D-loop 区遗传多样性分析[J]. *云南农业大学学报*, 2010, 25(3): 373-376.
- [11] 武艳平, 霍俊宏, 刘林秀, 等. 江西地方鸡的系统进化及遗传多样性研究[J]. *江西农业大学学报*, 2011, 33(6): 1160-1163.
- [12] 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: 6792-6795.
- [13] Kanginakudru S, Metta M, Jakati R D, et al. Genetic evidence from Indian red jungle fowl corroborates multiple domestication of modern day chicken[J]. *BMC Evol Biol*, 2008, 8: 174.