

# 江西地方鸡的系统进化 及遗传多样性研究

武艳平<sup>1</sup>, 霍俊宏<sup>1</sup>, 刘林秀<sup>1</sup>, 康昭凤<sup>1</sup>, 谢明贵<sup>1</sup>, 季华员<sup>1</sup>, 马月辉<sup>2</sup>, 谢金防<sup>1\*</sup>

(1. 江西省农业科学院 畜牧兽医研究所 江西 南昌 330200; 2. 中国农业科学院 北京畜牧兽医研究所 北京 100142)

**摘要:** 试验对 7 个江西地方鸡 134 个个体进行 D-loop 第一高变区测序, 获得 360 bp 序列进行分析, 系统建树显示 7 个鸡品种很明显地分成了 5 个支系 A、B、C、E 和 G。对所有样本进行分子差异等级分析 (AMOVA), 品种内的方差组分占 96.24% 表明 7 个鸡品种间在这个位点上没有出现显著的遗传分化, 品种间表现弱的遗传结构。对 134 条序列进行网络关系分析表明, 整个鸡群体曾经历了群体扩张事件。

**关键词:** 鸡; 线粒体 DNA; D-loop; 遗传多态性

中图分类号: S831.2 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2011)06-1160-04

## Diversity and Phylogenetic Relationships of Jiangxi Chicken Breeds

WU Yan-ping<sup>1</sup>, HUO Jun-hong<sup>1</sup>, LIU Lin-xiu<sup>1</sup>, KANG Zhao-feng<sup>1</sup>,  
XIE Ming-gui<sup>1</sup>, JI Hua-yuan<sup>1</sup>, MA Yue-hui<sup>2</sup>, XIE Jin-fang<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Academy of Agricultural Sciences, Jiangxi Province, Nanchang 330200, China; 2. Beijing Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100142, China)

**Abstract:** D-loop was used to analyze the mitochondrial DNA (mtDNA) variation of 134 individuals of 7 native chicken (*Gallus gallus*) breeds from Jiangxi. The mitochondrial hypervariable region 1 (HVR1) of 135 individuals was sequenced. The analysis of these sequences revealed that the chicken breeds were classified into five distinct lineages A, B, C, E and G. The variation (96.24%) within breeds suggested that most of the total genetic variation was due to variation within populations and revealed a weak phylogeographical structure among the breeds. Network analysis showed that population expansion happened among populations.

**Key words:** chicken; mitochondrial DNA; D-loop; genetic diversity

江西省位于中国的东南部, 在长江中下游的南岸, 有很丰富的地方鸡品种, 而且都各具特色, 如泰和的乌骨鸡(丝毛乌骨鸡)、东乡绿壳蛋鸡以及安义瓦灰鸡等, 泰和的乌骨鸡是中国特有的药用珍禽, 其肉质乌黑细嫩, 营养丰富, 是高级营养滋补品; 东乡绿壳蛋鸡所产天然绿壳鸡蛋被我国营养学家于若木教授誉为“华夏明珠”和“东方神蛋”; 安义瓦灰鸡具有灰羽、灰皮、灰脚、灰喙、灰冠等“五灰”特征, 并有类似于乌骨鸡的药用价值。随着人们消费水平和饮食习惯的改变, 为适应市场需求, 育种学家们培养出有

收稿日期: 2011-07-25 修回日期: 2011-11-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(31060296)、国家(863)高技术研究发展计划项目(2011AA100305)和国家肉鸡产业技术体系项目(nycyt-42-Z09)

作者简介: 武艳平(1976—), 女, 助理研究员, 博士, 主要从事家禽遗传育种研究, E-mail: wyp\_0902@126.com; \* 通讯作者: 谢金防, 研究员。

很高经济价值的优良品种,从而造成品种的单一化,导致许多抗性基因资源的丧失。外来品种的不断引进以及杂交改良等工作的深入展开,也加快了丧失的速度。江西省优良的地方家鸡品种也受到严酷的竞争和排挤,以至造成地方品种的群体数量急剧下降,有的甚至处于濒临灭绝的境地<sup>[1]</sup>。因此,迫切需提高江西家鸡遗传多样性的研究水平和完整性,从而为家鸡遗传资源的保护以及起源进化提供科学依据和理论基础。目前,对不同畜种遗传多样性及起源进化的研究已有不少报道,所采用的标记也多种多样,包括 RFLP、RAPD、小卫星、微卫星(microsatellite)及线粒体(mitochondrial DNA, mtDNA)等<sup>[2-6]</sup>。在遗传过程中 mtDNA 通过卵细胞质传递给后代,不受外来公畜杂交改良的影响,一般能保持其野生祖先的 mtDNA 类型。这种遗传方式便于进行群体分析,一个个体就能代表一个母性集团,因此只需少量个体样本便能反映一个群体的遗传结构,使得研究者可以从复杂的遗传背景中分辨不连续的母系血统,即使经过几千年的杂交繁育,系统关系依然明晰。最近,已有不少报道利用线粒体来研究家鸡的系统进化及多样性<sup>[7-8]</sup>, Liu Z G 等<sup>[9]</sup>分析了中国 12 个家鸡品种的线粒体高变区,得到 16 个单倍型,分别属于 5 个支系,只有江西的泰和乌鸡和云南的茶花鸡与红色原鸡的 2 个亚种 *G. gallus* and *G. spadiceus* 有共享单倍型,单倍型的系统进化分析也表明红色原鸡可能是中国家鸡的野生祖先。另外,中国不同省份内家鸡多样性的研究也已有报道,包括四川、山东等<sup>[10-11]</sup>,以及对江西的部分家鸡品种<sup>[12]</sup>。线粒体标记得出的遗传多样性及系统进化信息对于中国家鸡保存、利用以及监督管理中起着非常重要的作用。本研究利用线粒体 DNA 的 D-loop 区来分析江西地方鸡品种的群体结构、网络关系及系统进化情况,对江西家鸡品种的起源进化及遗传多样性作出比较完整和合理评价。

## 1 材料与方法

### 1.1 样本采集及 DNA 提取

采集了分布于江西省 7 个县 7 个地方鸡品种共 510 个个体血样,采集地见表 1,每个鸡只翅静脉采血,采用常规的饱和酚/氯仿抽提鸡血 DNA,紫外分光光度法测定纯度后,取部分样稀释至 100 ng/mL, -20 °C 保存备用<sup>[13]</sup>。

### 1.2 引物设计与 PCR 扩增

利用线粒体 D-loop 高变区引物<sup>[14]</sup>进行 PCR 扩增,引物由 Invitrogen 公司合成(引物序列:5' - ACCCATTATATGTATACGGGCATTAA - 3' 和 5' - AGTTATGCATGGGATGTGCCTGACCGAG - 3'), PCR 扩增体系为 25  $\mu$ L,其中包括 10  $\times$  Buffer 2.5  $\mu$ L、dNTPs 1  $\mu$ L(0.2 mmol/L)、引物 1  $\mu$ L(0.5  $\mu$ mol/L)、TaqDNA 聚合酶 0.25  $\mu$ L(2.5 U/ $\mu$ L)、DNA 模板 1  $\mu$ L,最后用水补齐 25  $\mu$ L。扩增条件:95 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,经 33 个循环,72 °C 延伸 10 min,4 °C 保存。引物不同,退火温度略有差异。

### 1.3 统计分析

BioEdit7.0 软件进行多重比对<sup>[15]</sup>, MEGA3.0 软件用于碱基变异位点、系统进化分析<sup>[16]</sup>。群体多态信息调查用 DnaSP4.0,分子差异等级分析(analysis of molecular variance, AMOVA)、歧点分布(mismatch distribution)分析<sup>[17]</sup>、无限突变位点模型的中性检验值 Tajima's D 以及种群遗传分化的 *F* 统计量(*F*-statistics, *F*<sub>st</sub>)的计算在 ARLEQUIN 3.0 统计软件计算获得<sup>[18]</sup>。

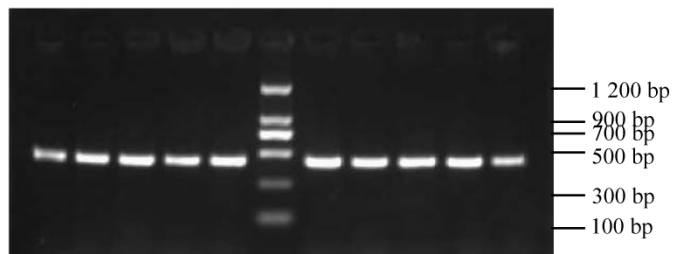


图1 PCR 扩增产物

Fig. 1 The results of PCR amplification fragment

## 2 结果分析

### 2.1 PCR 扩增结果

用设计的引物对试验鸡群的 DNA 进行扩增,PCR 产物经  $\rho = 2\%$  琼脂糖凝胶电泳检测,扩增片段与目的片段大小一致,特异性良好(图 1)。

2.2 利用 D-loop 高变区序列进行系统进化及群体结构分析

用 134 条序列构建了系统进化树 7 个地方鸡品种分成 5 个支系 A、B、C、E 和 G, B 支系所占比例最大, 存在于所有品种中, G 支系只存在于安义瓦灰鸡中。对所有样本进行分子差异等级分析( AMOVA) ,由 Arlequin3.0 软件计算得出, 品种间的方差组分只占线粒体 DNA 的 D-loop 高变区序列总变异的 3.76%, 品种内的方差组分占 96.24%,  $F_{ST} = 0.15$ , 经检验差异不显著 ( $P < 0.001$ ) ,品种内方差明显大于种间方差, 表明这些地方鸡品种间还没有出现显著的遗传分化, 品种间表现弱的遗传结构。

2.3 线粒体 D-loop 高变区序列多态性分析

对 7 个地方鸡品种 135 条高变区序列 360 bp 进行了多态性分析, 从表 1 可见, 单倍型总数为 37 个, 变异位点 45 个, 用 Mega 软件对各个品种的碱基含量进行了分析, 平均碱基含量  $C > A > T > G$ , 各品种碱基含量差异很小。转换与颠换的比率 33:1 表示转换的频率远高于颠换, 是由于颠换要求磷脂的亲水头从一侧穿过脂溶性的磷脂分子层到另一侧, 这样比较困难, 而转换只是亲水头在一侧进行运动。单倍型多样性值从万载黄鸡的 ( $0.348 \pm 0.128$ ) 到安义瓦灰鸡的 ( $0.929 \pm 0.039$ ) , 碱基多样性从万载黄鸡的 ( $0.0024 \pm 0.0062$ ) 到安义瓦灰鸡的 ( $0.0195 \pm 0.0239$ ) (表 1)。

表 1 地方鸡品种多样性分析

Tab.1 Location of goat breeds and their diversity

品种 Breed	地区 Location	样本量 Sample size	单倍型多样性 Haplotype diversity( SE)	碱基多样性 Nucleotide diversity ( SE)
安义瓦灰鸡 Anyi tile liked gray	安义县	21	0.929 ± 0.039	0.019 5 ± 0.023 9
崇仁麻鸡 Chongren ma	崇仁县	15	0.857 ± 0.065	0.018 8 ± 0.014 5
东乡绿壳蛋鸡 Dongxiang green shelled egg	东乡县	21	0.705 ± 0.094	0.011 3 ± 0.010 8
宁都黄鸡 Ningdu yellow	宁都县	17	0.706 ± 0.106	0.007 2 ± 0.014 0
丝羽乌骨鸡 Taihe black bone	泰和县	19	0.906 ± 0.040	0.013 5 ± 0.008 7
万载黄鸡 Wanzai yellow	万载县	21	0.348 ± 0.128	0.002 4 ± 0.006 2
余干黑鸡 Yugan black	余干县	20	0.853 ± 0.049	0.015 9 ± 0.012 5

2.4 高变区序列歧点分布及网络分析

对 134 条序列利用 Network 软件进行网络关系分析, 星状发散结构(图 2) 表明群体经历过群体扩张。为了进一步验证群体扩张, 本实验对所有序列进行了无限突变位点模型的中性检验值 Tajima's D 和  $F_{ST}$  检验, 结果在  $P < 0.01$ , Tajima's  $D = -0.975$ ,  $F_{ST} = -13.439$ , 都是负值, 验证了这些地方鸡品种曾经过群体扩张事件。

3 讨论

目前, 对鸡的起源研究大都集中于线粒体, 通过对鸡线粒体 DNA 的研究, 把鸡分成 9 个大的支系( A、B、C、D、E、F、G、H 和 I) , 在中国中部、西北和北部沿海地区 A 和 B 支系是最普遍的支系, 在南部沿海地区 B 和 C 支系为主, 江西位于中国的中部地区, 品种的多样性比较丰富, 本试验 5 个支系存在于江西地方鸡种( A、B、C、E 和 G) , 以 A、B 和 E 为主导支系, 其中 E 支系主要存在于乌骨鸡中, 及泰和乌鸡和余干黑鸡。

本试验所有品种均表现出弱的遗传结构, 各个支系参透到不同的品种中, 这和以前报道的家禽品种弱的地理结构是一致的。Khaliq I 等<sup>[19]</sup>对巴基斯坦东西部 4 个地区灰鹌鹑 29 个个体的 D 环高变区进

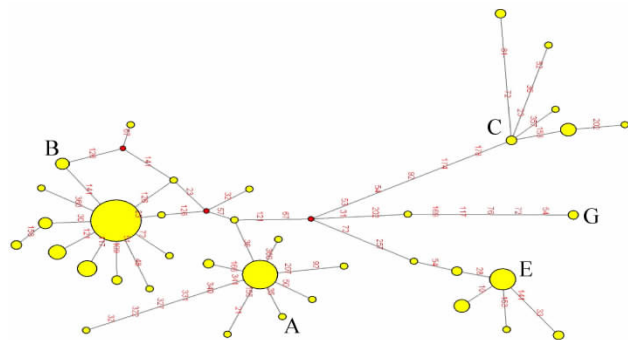


图 2 江西地方鸡序列的网络关系

Fig.2 Median-joining (MJ) network showing genetic relationships among Jiangxi domestic chicken haplotypes for mtDNA HVR

行了序列进行分子差异性 (AMOVA) 分析得出 种内所占方差 99.48% ( $P < 0.001$ ) 远远大于种间所占方差 0.52% ( $P < 0.001$ ), 也表明各品种间的弱的地理结构。推测造成这种现象的可能是古代鸡品种经过不同区间的大量运输, 导致基因交流频繁, 从而表现出不明显的地理分化。也可能是线粒体 DNA 变异在分析品种水平上的群体遗传结构上比较弱, 需要结合其它分子标记如微卫星或 Y 染色体来证实。

由线粒体 D-loop 高变区序列测得江西地方鸡的单倍型多样性值较高, 碱基多样性值较低。有研究表明在传统鸡群单倍型多样性较相似, 大群体可能有较高水平的单倍型多样性<sup>[19-20]</sup>。本试验中安义瓦灰鸡单倍型多样达到 ( $0.929 \pm 0.039$ ), 而经历了群体缩减的群体单倍型多样性相对较低, 例如濒危物种白头鸭其野生型单倍型多样性从 ( $0.286 \pm 0.196$ ) 到 ( $0.530 \pm 0.054$ )<sup>[21]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] 马月辉, 冯维祺. 畜禽种质资源评价 [J]. 家畜生态, 2002, 8: 1-5.
- [2] Zhang X, Leung F C, Chan D K et al. Genetic diversity of Chinese native chicken breeds based on protein polymorphism, randomly amplified polymorphic DNA, and microsatellite polymorphism [J]. Poultry Science, 2002, 81(10): 1463-1472.
- [3] Dubey J P, Velmurugan G V, Chockalingam A, et al. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil [J]. Veterinary Parasitology, 2008, 157(3/4): 299-305.
- [4] Berthouly C, Leroy G, Van T N, et al. Genetic analysis of local vietnamese chickens provides evidence of gene flow from wild to domestic populations [J]. BMC Genetic, 2009, 10: 1.
- [5] Silva P, Guan X, Ho Shing O, et al. Mitochondrial DNA based analysis of genetic variation and relatedness among Sri Lankan indigenous chickens and the Ceylon junglefowl (*Gallus lafayetti*) [J]. Animal Genetic, 2009, 40(1): 1-9.
- [6] Wu Y P, Guan W J, Zhao Q J et al. A fine map for maternal lineage analysis by mitochondrial hypervariable region in 12 Chinese goat breeds [J]. Animal Science Journal, 2009, 8(4): 372-380.
- [7] Kelsey Needham Dancause, Miguel G Vilar, Rlene Steffy, et al. Characterizing genetic diversity of contemporary Pacific chickens using mitochondrial DNA analyses [J]. PLoS ONE, 2011, 6(2): 1-6.
- [8] Berthouly Salazar C, Rognon X, Nhu Van T, et al. Rviseeartcnh aartmicleese chickens: A gate towards Asian genetic diversity [J]. BMC Genetics, 2010, 11: 53, 1-11.
- [9] Liu Z G, Lei C Z, Luo J et al. Genetic variability of mtDNA sequences in Chinese native chicken breeds [J]. Asian - Australasian journal of animal sciences, 2004, 17(7): 903-909.
- [10] Cheng H J, Yue Y S, Fan X Z et al. Analysis of genetic diversity of Shandong indigenous chicken breeds using microsatellite marker [J]. Yi Chuan Xue Bao, 2003, 30(9): 855-860.
- [11] Tu Y J, Chen K W, Shen J C, et al. Analysis of genetic diversity of Sichuan indigenous chicken breeds using microsatellite markers [J]. Yi Chuan Xue Bao, 2005, 27(5): 724-728.
- [12] 李慧芳, 陈宽维, 汤青萍, 等. 江西 7 个地方鸡品种遗传多样性的微卫星分析 [J]. 中国兽医学报, 2005, 25(6): 664-667.
- [13] Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Lab Press, 2000.
- [14] Dancause K N, Vilar M G, Steffy R, et al. Characterizing genetic diversity of contemporary Pacific chickens using mitochondrial DNA analyses [J]. PLoS ONE, 2011, 6(2): 16843.
- [15] Hall T A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT [J]. Nucleic Acids Symposium Series, 1999, 41: 95-98.
- [16] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. Briefings of Bioinformatics, 2004, 5: 150-163.
- [17] Rogers A R, Harpending H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences [J]. Molecular Biology and Evolution, 1992, 9: 552-569.
- [18] Excoffier L G L, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis [J]. Evolutionary Bioinformatics Online, 2005(1): 47-50.
- [19] Khaliq I, Tejedor M T, Monteagudo L V et al. Mitochondrial DNA diversity in *Francolinus pondicerianus interpositus* (grey francolin, Galliformes) from Pakistan [J]. Hereditas, 2011(1): 001-007.
- [20] Muchadeyi F C, Eding H, Simianer H et al. Mitochondrial DNAD-loop sequences suggest a Southeast Asian and Indian origin of Zimbabwean village chickens. Anim [J]. Genet, 2008, 39: 615-622.
- [21] Munoz Fuentes V, Green A J, Sorenson M D. Comparing the genetics of wild and captive populations of white headed ducks *Oxyura leucocephala*: Consequences for recovery programmes [J]. Ibis, 2008, 150: 807-815.