

贾晓旭,陆俊贤,唐修君,等. 德化黑鸡线粒体 DNA 控制区全序列测定及起源研究[J]. 江苏农业科学,2015,43(10):31-32.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.10.008

# 德化黑鸡线粒体 DNA 控制区全序列测定及起源研究

贾晓旭,陆俊贤,唐修君,顾 荣,葛庆联,高玉时

(江苏省家禽科学研究所,江苏扬州 225125)

**摘要:**根据红色原鸡基因组 DNA 序列设计引物,获得了德化黑鸡线粒体 DNA D-loop 区全序列,结合 GenBank 已经测出 Dloop 区全序列的红色原鸡序列,探讨了德化黑鸡的母亲系起源。结果表明,德化黑鸡线粒体 DNA D-loop 区全长 1 231 bp,T、C、A、G 平均含量分别为 33.5%、26.5%、26.7%、13.3%。系统发育分析发现,德化黑鸡与红色原鸡滇南亚种(*Gallus gallus spadiceus*)聚为一类,推测德化黑鸡可能起源于云南省或者附近的红色原鸡滇南亚种。

**关键词:**德化黑鸡;线粒体 DNA;D-loop 区;系统发育关系

**中图分类号:**S831.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)10-0031-02

我国乌骨鸡遗传资源丰富。德化黑鸡因原产自福建省德化县而得名,是我国珍稀的乌骨鸡地方品种之一,具有适应性强、肉质细嫩、清香甘润、味道鲜美、营养丰富等优点,以其黑皮、黑肉、黑骨、黑内脏等乌色性状深受当地群众喜爱<sup>[1-2]</sup>。线粒体 Dloop 区序列是亲缘关系较近的群体进行遗传分化研究的理想分子标记,已被广泛用于家禽起源与进化、群体遗传结构、品种间的系统发育关系等研究中<sup>[3]</sup>。线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 是动物核外的遗传物质,具有母系单倍体遗传特性,在世代传递过程中不发生 DNA 重组、较核 DNA 突变率高及进化速率快等优点,根据其序列构建的系统发育树能很好地反映物种的母亲迁徙历史。利用 mtDNA 序列差异研究物种的起源和进化,有助于了解物种的驯化经历<sup>[4-6]</sup>。mtDNA 控制区(D-loop 区)的进化速率较其他区域高 5~10 倍。德化黑鸡饲养历史悠久,了解其自然群体的遗传结构及其遗传多样性状况有助于有效保种并选育利用德化黑鸡。笔者测定了德化黑鸡线粒体 DNA D-loop 区的全序列,并结合 GenBank 已经测出线粒体 D-loop 区全序列的红色原鸡的序列,从分子水平上探讨了德化黑鸡的起源,旨在为开发利用德化黑鸡资源提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物

5 羽德化黑鸡均采集于德化县,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) 等已经测出线粒体 DNA D-loop 区全序列的 19 条序列,从 GenBank 数据库中下载其线粒体 DNA D-loop 区全序列,与德化黑鸡进行系统发育分析。

### 1.2 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,在 D-loop 区上游、下游用 Primer Premier 5.0 软件设计 1 对引物,引物序列分别为:PF:5'-AAACACCCAAACTCACTAAC-3';PR:5'-CACTGGGATGCGGATACTTGC-3'。预计扩增长度 1 600 bp,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2.2 PCR 扩增和测序 PCR 扩增体系(50 μL):25 μL PCRMix(南京博尔迪公司),10 μmol/L 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 个循环;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,交由上海英骏生物技术有限公司进行测序。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进行比对,剪掉引物及多余的序列,DNA 序列片段经 DNASTar 5.02 软件的 SeqMan 程序拼接。用 MEGA 4.0 进行转换与颠换数目的统计和碱基组成分析,采用邻接法(Neighbor-Jointing, NJ)构建系统发育树,发育树选用 Kimura 2 模型,1 000 次重复<sup>[7]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 德化黑鸡 mtDNA D-loop 区 PCR 扩增

对德化黑鸡 DNA 模板进行 PCR 扩增,经琼脂糖凝胶电泳检测,结果表明 1 600 bp 左右有 1 条特异性条带,与预期结果一致(图 1)。

### 2.2 德化黑鸡线粒体 DNA D-loop 区序列分析

设计的引物在德化黑鸡基因组中得到了较好的扩增,将测序结果剪掉引物及多余的序列,发现 5 羽德化黑鸡个体序列相同,没有发现碱基突变,长度为 1 231 bp,T、C、A、G 4 种碱基含量分别为 33.5%、26.5%、26.7%、13.3%,其中 A+T

收稿日期:2014-10-20

基金项目:国家自然科学基金(编号:31372277)。

作者简介:贾晓旭(1982—),男,助理研究员,研究方向为家禽遗传育种与品质评价。E-mail:596374801@qq.com。

通信作者:高玉时,研究员,主要从事家禽遗传育种与品质评价研究。

E-mail:gaoyou100@sina.com。

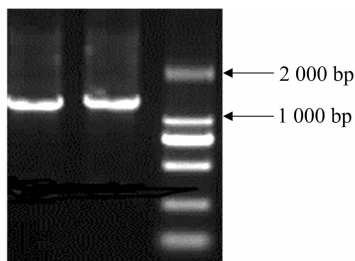


图1 德化黑鸡 DNA 模板 PCR 扩增结果

含量(60.3%)明显高于G+C含量(39.7%),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。与参考序列相NC007235比较(图2),德化黑鸡共发现8处多态位点,变异区在167~215 bp之间,全部为转换,其中T-C转换5处,A-G转换3处。

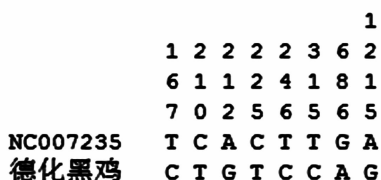


图2 德化黑鸡 mtDNA D-loop 区的多态位点分布

### 2.3 德化黑鸡与原鸡系统发育分析

根据德化黑鸡线粒体 DNA D-loop 区全序列,采用 NJ 法构建了德化黑鸡与原鸡的系统发育树(图 3)。德化黑鸡先与原鸡滇南亚种 GGS7 聚为一类,节点的自举置信度(BP)值为 95%;然后与原鸡滇南亚种 GGS1、GGS4 聚为一类,节点的自举置信度(BP)值为 76%;最后与原鸡海南亚种(GGJ1、GGJ2)聚为一类,节点的自举置信度(BP)值为 51%。根据 GenBank 上的信息, GGS7(GU261695)样本采自云南省, GGS4(GU261704)样本采集于缅甸。

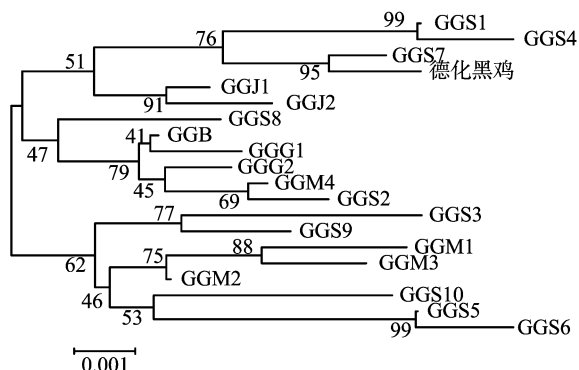


图3 基于线粒体 DNA D-loop 区序列采用 NJ 法构建的系统发育树

### 3 结论与讨论

国内外有关鸡 mtDNA D-loop 区的研究大都集中在高变区<sup>[8-10]</sup>,区域较小,得到的信息可能不全面。德化黑鸡 D-loop 区全序列同参考序列相比,686、1 215 bp 处存在碱基转换。因此笔者认为,用 mtDNA D-loop 区全序列进行遗传多样性、起源进化分析更为准确。本研究发现,5 羽德化黑鸡

个体序列相同,没有发现碱基突变,可能与样本量少有关,也可能因为德化黑鸡是较封闭的原始鸡种,未受其他外来鸡种的侵入,因而变异程度较低。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。这种遗传方式,1 个个体就能代表 1 个母性集团,因此只需少量个体样本便能反映 1 个群体的遗传结构。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<sup>[11]</sup>。德化黑鸡先与原鸡滇南亚种 GGS7 (GU261695) 聚为一类,然后与 GS1 (NC\_007235)、GGS4 (GU261704) 聚为一类,说明原鸡滇南亚种 (*Gallus gallus spadiceus*) 在德化黑鸡形成过程贡献最大,最后与原鸡海南亚种 (GGJ1、GGJ2) 聚为一类,说明原鸡海南亚种与德化黑鸡亲缘关系也较近。参照 Liu 等对线粒体 DNA D-loop 区单倍型划分标准,德化黑鸡应属于 A 分支<sup>[8]</sup>。章学东等研究发现,东乡绿壳蛋鸡也是以 A 分支为主,说明两者关系较近,从形态学上,两者个体多为黑羽、乌肤、乌冠,并且都有红冠个体,也验证了两者亲缘关系较近,在地理位置上,福建省和江西省毗邻,推测可能两者存在基因交流<sup>[12]</sup>。

## 参考文献:

- [1] 郑嫩珠,董晓宁,陈 晖,等. 德化黑鸡黑素皮质素受体 1 (MC1R) 基因单核苷酸多态性分析[J]. 福建农业学报,2008,23(2):132-136.
- [2] 国家畜禽遗传资源委员会. 中国畜禽遗传资源志:家禽志[M]. 北京:中国农业出版社,2011.
- [3] 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.
- [4] 王建英,兰邹然,田夫林,等. 山东省地方黄牛品种的遗传多样性研究[J]. 南京农业大学学报,2010,33(3):115-118.
- [5] 虞德兵,陆应林,徐昊翔,等. 基于线粒体 COI 基因序列分析家鸭系统发育关系[J]. 南京农业大学学报,2011,34(6):109-114.
- [6] 窦新杰,常玉梅,唐 然,等. 几种雅罗鱼亚科鱼类基于 mtDNA 序列的亲缘关系[J]. 江苏农业学报,2014,30(4):826-832.
- [7] Tamura K, 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] 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 Genetics, 2009, 40(1):1-9.
- [10] 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.
- [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] 章学东,李庆海,张成先,等. 东乡绿壳蛋鸡线粒体 DNA 控制区多态性及与 9 种地方乌鸡的进化分析[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版,2014,40(1):103-110.