



利用微卫星和线粒体标记分析北京鸭的起源与驯化

曲鲁江[†], 刘伟[†], 侯卓成, 郑江霞, 徐桂云*, 杨宁*

中国农业大学动物科技学院, 农业生物技术国家重点实验室, 北京 100193

[†] 同等贡献

* 联系人, E-mail: nyang@cau.edu.cn; ncpt@cau.edu.cn

收稿日期: 2008-03-12; 接受日期: 2008-11-26

国家杰出青年科学基金(批准号: 30225032)、农业部畜禽种质资源保护计划、国家高技术研究发展计划(批准号: 2006AA10A121)和国家重点基础研究发展计划(批准号: 2006CB100)资助项目

摘要 北京鸭是我国最著名的家鸭品种. 为分析北京鸭的起源与驯化, 本实验采集了包括北京鸭在内的 6 个中国地方鸭种共 190 只个体, 及来自辽宁省的 14 只野生绿头鸭(*Anas platyrhynchos*)血样. 利用 15 个微卫星标记对这 6 个家鸭品种的 186 只个体进行遗传关系分析. 并对其中 88 只家鸭个体及 14 只野鸭个体线粒体的 DNA 控制区(mtDNA D-loop)的部分序列进行了扩增和测序. 利用微卫星标记计算出的遗传距离(D_S)及 F_{ST} 分析结果表明, 北京鸭与其他中国地方鸭种的遗传分化程度较高. 聚类结果显示巢湖鸭、高邮鸭、绍兴鸭和金定鸭聚为一类, 建昌鸭、北京鸭聚为另一类. 线粒体 DNA D-loop 区序列分析结果表明, 虽然北京鸭群体含有所有鸭种所共有的单倍型 H01, 但北京鸭的单倍型与其他家鸭仍有较大差异, 北京鸭群体具有 12 个独特的家鸭单倍型, 其中 H02, H04, H08 及 H22 等 4 个单倍型比较相近并形成单倍群 A, 且 H02 和 H22 单倍型与中国绿头野鸭共有, 说明北京鸭起源于绿头鸭, 其驯化过程也基本独立于其他家鸭品种.

关键词

北京鸭
中国地方鸭
微卫星
线粒体
遗传关系

中国是世界上最早开始对野鸭进行驯化饲养的国家之一. 相传伏羲氏发明网捕鱼捉鸟, 绿头鸭(*Anas platyrhynchos*)就是捕来的众多野鸟中的一种, 经过长期驯化成为家鸭. 在江苏句容、河北平泉和河南郑州二里岗的古迹中发掘出公元前 2500 年前新石器时代造型别致、工艺精细的铜鸭尊和彩陶鸭以及鸭蛋, 表明我国驯化鸭的历史至少可以追溯到公元前 2500 年以前^[1].

在长期的驯化饲养过程中, 各地形成了具有不同特性的地方鸭品种资源, 其中比较有代表性的是著名的肉用鸭品种——北京鸭. 北京鸭的育成有着悠久的历史, 但对于其驯化历史也颇有争议. 早在公元前 1 世纪中国就有饲养鸭的记载, 东周时期(公元前

514~495 年)已经出现较大规模的养鸭业. 北魏贾思勰曾在《齐民要术》中介绍过“填噉”的饲养方法, 与目前生产北京鸭所采用的“填鸭”技术很相似, 这可能会对北京鸭的育成影响深远^[2,3]. 对于北京鸭的驯化起源问题主要有两种不同的观点: 一种认为北京鸭是由北京当地的白色野鸭被捕获后驯化饲养、培育而成的专门品种, 即北京鸭是单独驯化起源的; 另一种认为是明清两朝定都北京, 运河沟通南北, 南方大量的物产运至北京, 江苏金陵一带麻鸭的白色变种也随船北上, 并以运河中散落的粮食为食, 同时北京西郊玉泉山一带水网交错, 食物丰富, 为白羽鸭的生存提供了良好的环境. 后来这些白鸭作为“御用品”被精心培育, 形成了著名的北京鸭品系^[4].

分子生物学技术的发展为了解各种家养动物的起源和驯化提供了可靠的技术手段, 目前已经被广泛应用于鸡、鸭、牦牛及牛家畜或家禽的起源、驯化及遗传关系研究中^[5-14]. 根据北京鸭的驯化起源假说, 本研究选取了京杭大运河流域的江苏、浙江等省及附近省份安徽、福建的地方鸭品种各一个, 另外选取地域关系较远的四川省鸭品种 1 个以及北京鸭共计 6 个地方鸭品种, 同时野外采集辽宁省盘锦市自然保护区的绿头野鸭血样, 利用微卫星标记及线粒体控制区序列变异, 分析了北京鸭的驯化起源以及与其他中国地方鸭种间的遗传关系.

1 材料和方法

1.1 样本采集及基因组 DNA 的提取

本研究共采集了北京鸭、建昌鸭、高邮鸭、绍兴鸭、巢湖鸭、金定鸭 6 个中国地方鸭品种共 190 个个体, 所有样本均采自该品种的源产地. 此外在辽宁省盘锦市自然保护区采集了 14 只绿头野鸭的个体. 品种的名称、采样地点及样本数目见表 1. 每只个体翅下静脉采血 3~5 mL, 置于盛有 1 mL ACD 抗凝剂(0.48% 柠檬酸、1.32% 柠檬酸钠、1.47% 葡萄糖)的离心管中, 用常规酚/氯仿抽提法^[15]提取基因组 DNA 后溶于 300 μ L 的 TE 缓冲液中.

表 1 7 个鸭群体的名称、产地及样本数量

群体	产地	样本含量*
北京鸭	北京市北京鸭育种中心	31/35
巢湖鸭	安徽省巢湖市	31/11
高邮鸭	江苏省高邮种鸭场	31/6
建昌鸭	四川省建昌种鸭场	31/9
金定鸭	福建省石狮市金定鸭原种场	31/10
绍兴鸭	浙江省绍兴市绍鸭原种场	31/17
绿头野鸭	辽宁省盘锦市自然保护区	0/14

* 样本含量中“/”前为微卫星标记分析使用的样本量, 后为线粒体测序使用的样本量

1.2 微卫星分型及线粒体 DNA D-loop 区测序

本实验分别用微卫星分型和线粒体 DNA D-loop 测序这两种手段分析这 6 个家鸭及 14 个野鸭群体的遗传变异及遗传关系, 样本使用情况见表 1.

本研究根据 GenBank 中已提交的鸭微卫星标记

选用了 15 个微卫星位点并设计特异性引物, 在上游引物 5' 端标记 6-FAM 或 HEX 荧光基团. 微卫星 PCR 反应体系为 15 μ L, DNA 模板为 20~50 ng, Mg^{2+} 浓度为 2.0 μ mol/L, dNTPs 为 200 μ mol/L, DNA 聚合酶 0.5 U, 上、下游引物各 5 pmol; PCR 反应在 Gene Amp PCR System 9700 上进行, 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 50~64 $^{\circ}$ C, 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min. PCR 产物经稀释 10~20 倍后取 1 μ L 与 1 μ L 的分子量内标 GeneScan-350/ GeneScan-500 ROX(ABI)混匀, 94 $^{\circ}$ C 变性 3 min 后在 ABI-PRISM 377 DNA 测序仪上用 4.5% 的变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳, 电泳收集到的图像利用软件 GeneScan(v.3.1.2)(Applied Biosystems)处理, 然后利用软件 Genotyper(v.2.0)(Applied Biosystems)确定扩增片段的长度, 从而确定微卫星标记的基因型.

线粒体 DNA D-loop 引物根据 GenBank 中鸭的序列(L16770)设计, 上、下游引物分别为: F: 5' -CCCTATG GTCCCGTAATAAACA-3' 和 R: 5' -GATAACGCA GGTGTGTCCAG-3'; 该引物可扩增线粒体 DNA D-loop 区长约 560 bp 的序列. PCR 反应体系为 50 μ L, 其中 DNA 模板量 30~50 ng, Mg^{2+} 浓度 2.0 μ mol/L, dNTPs 200 μ mol/L, 正、反向引物各 0.3 μ mol/L, 3 U Taq DNA 聚合酶. PCR 扩增在 Gene Amp PCR System 9700 PCR 扩增仪器上进行, 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 64 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min 完成, PCR 扩增产物送优博生物技术公司在 ABI3730 测序仪上进行双向测序.

1.3 统计分析

(1) 不同鸭群体内遗传变异分析. 将各个鸭群体的 15 个微卫星数据进行整理, 利用 Cervus version 2.0^[16]计算多态信息含量(PIC). 观察杂合度(H_O)、期望杂合度(H_E)、平均等位基因数(MNA), 并使用 POPGENE Version 1.32^[17]软件计算有效等位基因数(N_e).

同时以 DnaSP4.10.9 软件^[18]分析 6 个家鸭和 1 个野鸭群体在线粒体 D-loop 区的分子变异, 分别以各个群体内的核苷酸多态性(π 值)、单倍型多态性(H_d 值)、突变变异位点数等指标反映群体内的变异.

(2) 不同鸭群体间遗传变异及遗传关系分析. 对获得的微卫星标记的基因型数据利用软件FSTAT (<http://www.unil.ch/izea/software/fstat.htm>) 计算 F 统计量 (F_{ST}); 通过软件Genepop(<http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop>), Dispan(<http://mep.bio.psu.edu/databases.html>)计算 6 个群体间的Nei氏遗传距离^[19,20], 构建 6 个群体的分子聚类树; 并根据公式 $D = 2\alpha t$ 计算群体分化时间(D_s : 标准遗传距离; α : 微卫星突变率, 微卫星每代的突变率一般认为大约是在 $10^{-3} \sim 10^{-4}$ 之间^[21], 取其平均值 5.5×10^{-4} ; t 为代数, 并假定鸭品种的世代间隔为 1 年).

测序获得的线粒体DNA序列, 利用Sequencher软件(version 4.7)查看测序结果文件中碱基峰图的质量, 并在Chromas软件中进行人工校正, 通过与GenBank中的Anas属线粒体DNA D-loop序列(L16770)比较, 确定所测鸭mtDNA D-loop序列长度及位置. 将校正确认后的序列首先用Clustal X 1.81 软件进行完全比对后, 分析不同单倍型间的进化关系, 利用Network version 4.2.0.1 构建单倍型间的media-joining network 网络关系^[22].

2 结果

2.1 微卫星分析结果

(1) 6 个家鸭群体内微卫星标记的遗传变异. 利用 15 个微卫星标记, 对本研究的 6 个家鸭群体进行

了群体内遗传变异分析. 多态信息含量的结果表明金定鸭的微卫星多态性最高($PIC=0.6297$), 建昌鸭的多态性息含量最低($PIC=0.4844$), 北京鸭的多态信息含量为中等水平. 表 2 是 6 个家鸭群体内微卫星遗传变异分析结果.

(2) 群体间的遗传分化、Nei氏遗传距离及遗传分化时间. 6 个家鸭群体间的遗传分化程度(F_{ST})见表 3. 北京鸭与金定鸭的遗传分化程度最高, 达到了 0.3415. 6 个群体间的Nei氏遗传距离(D_s)及分化时间见表 4. 北京鸭与金定鸭间的遗传距离最大, 达到了 0.7638, 两个品种的分化时间也最早, 达到了 694 年.

(3) 群体间的聚类结果. 对 6 个鸭群体进行NJ法(D_s)聚类分析(图 1), 可以看出 6 个群体聚为两大类, 北京鸭与建昌鸭聚为一类, 巢湖鸭、高邮鸭、绍兴鸭和金定鸭聚为一类. 绍兴鸭与金定鸭聚为一支 而后又与高邮鸭聚为一类. 聚类结果可以看出北京鸭与建昌鸭的遗传关系较近, 而与其他群体差异较大, 虽然北京鸭与建昌鸭在NJ聚类树聚为一类, 但二者之间的遗传距离仍达到了 0.3173, 表明二者在遗传背景上有较大的区别.

2.2 线粒体 DNA 序列分析结果

(1) 不同鸭群体内线粒体 D-loop 区的遗传变异. 通过正、反双向测序得到了所检测个体的线粒体

表 2 6 个家鸭群体内微卫星遗传变异结果

品名	平均等位基因数(MNA)	期望杂合度(H_E)	观察杂合度(H_O)	多态信息含量(PIC)
北京鸭	5.73	0.5085	0.4334	0.5733
巢湖鸭	7.33	0.6387	0.4294	0.6282
高邮鸭	4.93	0.5894	0.4873	0.5752
建昌鸭	4.73	0.4986	0.4012	0.4844
金定鸭	6.20	0.5745	0.5525	0.6297
绍兴鸭	5.93	0.5609	0.4691	0.5540

表 3 家鸭群体间的 F_{ST} 值

品名	北京鸭	巢湖鸭	高邮鸭	建昌鸭	金定鸭
巢湖鸭	0.1663				
高邮鸭	0.2345	0.0818			
建昌鸭	0.1861	0.1434	0.1018		
金定鸭	0.3415	0.1807	0.1768	0.1975	
绍兴鸭	0.2777	0.1784	0.1462	0.1861	0.1907

表 4 根据微卫星数据计算的家鸭群体间遗传距离及分化时间^{a)}

品名	北京鸭	巢湖鸭	高邮鸭	建昌鸭	金定鸭	绍兴鸭
北京鸭		281.5	429.6	288.5	694.4	538.6
巢湖鸭	0.3097		144.5	272.5	306.2	362.4
高邮鸭	0.4726	0.1589		159.0	269.7	244.3
建昌鸭	0.3173	0.2998	0.1749		304.7	326.7
金定鸭	0.7638	0.3368	0.2967	0.3352		282.7
绍兴鸭	0.5925	0.3986	0.2687	0.3594	0.3110	

a) 对角线以下是遗传距离, 对角线上是分化时间(年)

D-loop 区 521 bp 的核苷酸序列, 对序列进行比对整理后, 分析了本研究中 6 个家鸭群体和 1 个野鸭群体的群体内遗传变异. 结果表明, 金定鸭的多态性最为丰富($\pi = 0.01100$), 而高邮鸭的多态性最低($\pi = 0.00087$), 北京鸭的多态性则处于中间($\pi = 0.00512$)水平. 鸭群体内线粒体 DNA D-loop 区遗传变异分析结果见表 5.

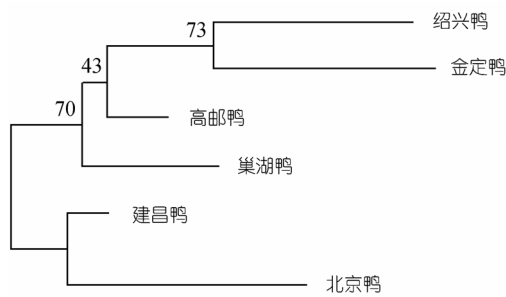


图 1 利用微卫星数据构建的 6 个群体NJ(D_s)聚类图

(2) 家鸭与野鸭群体间线粒体 D-loop 区序列遗传网络关系分析. 对 6 个中国地方鸭种及 1 个野鸭种

进行系统发育网络分析, 结果显示大多数单倍型以单倍型 H01 为中心呈放射状星形排列(图 2). 中国地方鸭种及中国绿头野鸭群体共形成 44 个单倍型. 其中北京鸭形成 10 个独特的单倍型(H02, H03, H04, H05, H06, H07, H08, H09, H10, H22, H43 及 H44), 其中 H02, H04, H08 及 H22 等 4 个单倍型比较相近形成单倍群 A, 且 H02 和 H22 单倍型与中国绿头野鸭共有. 单倍型 H01 包含了所有群体中的个体. 由图 2 可知, 绍兴鸭、高邮鸭、金定鸭和巢湖鸭的遗传关系较密切, 这 4 个群体有一半以上的个体都归于单倍型 H01. 相对于其他地方鸭种而言, 北京鸭单倍型较为独特, 35 只个体共包含了 14 个单倍型, 其中 8 只北京鸭个体与其他家鸭品种共有单倍型 H01, 北京鸭的 1 只个体与 1 只建昌鸭个体形成单倍型 H33, 其余 26 只个体形成了北京鸭所特有的 12 个家鸭单倍型, 而北京鸭的 5 只个体与 2 只中国绿头野鸭个体形成北京鸭与野鸭特有的单倍型 H02. 此外 1 只北京鸭与 2 只中国绿头野鸭个体形成了单倍型 H22. 表明北京鸭独特的起源和驯化历史.

表 5 鸭群体内线粒体 DNA D-loop 区遗传变异分析

品名	核苷酸多态性(π 值)	单倍型多态性(Hd 值)	多态性位点数
北京鸭	0.00512	0.913	10
巢湖鸭	0.01054	0.964	19
高邮鸭	0.00064	0.333	1
建昌鸭	0.00087	0.342	2
金定鸭	0.01100	1.000	21
绍兴鸭	0.00087	0/324	2
中国绿头野鸭	0.00960	0.978	16

3 讨论

随着分子遗传标记技术的发展和大规模测序方法的普及, 使家畜禽的起源驯化以及品种间的遗传关系研究取得了许多成果^[23-27]. 但对北京鸭的驯化历史及其与一些地方鸭品种的遗传关系研究则鲜见报道, 因此本研究利用微卫星标记和线粒体D-loop区序列对北京鸭与几个鸭群体间的遗传关系进行了研究, 同时采集了我国的绿头野鸭样本, 对其线粒体的相应区段进行测序后, 对北京鸭的驯化历史进行探讨.

尽管微卫星标记和线粒体标记的遗传变异和分子聚类结果有微小的差异, 但两种分子标记在分析 6 个中国地方鸭种遗传变异结果上有较高的一致性(根据微卫星数据计算的多元信息含量 PIC 与根据线粒

体数据计算的核苷酸多态性 π 值的相关系数 $r^2=0.82$). 此外, 两种分子标记的研究结果都说明北京鸭与其他中国地方鸭种的遗传分化程度较高(图 1 和 2). 虽然北京鸭和建昌鸭在微卫星的聚类结果中聚为一类, 但是二者 F_{ST} 及遗传距离值(分别为 0.1861 和 0.3173)都比较大, 表明建昌鸭和北京鸭的遗传背景差异也较大, 北京鸭的驯化历史和起源可能与南方的地方鸭品种有所不同.

北京鸭与其他 5 个地方鸭种有明显的区别, 这显示了北京鸭与京杭大运河附近省份的地方鸭品种的遗传关系并不如人们想象中的那样的接近. 从网络进化图(图 2)中也可以看出北京鸭的绝大多数个体(26/35)与绍兴鸭、巢湖鸭、高邮鸭、金定鸭及建昌鸭在线粒体 D-loop 区单倍型的分布上有较大差异, 说

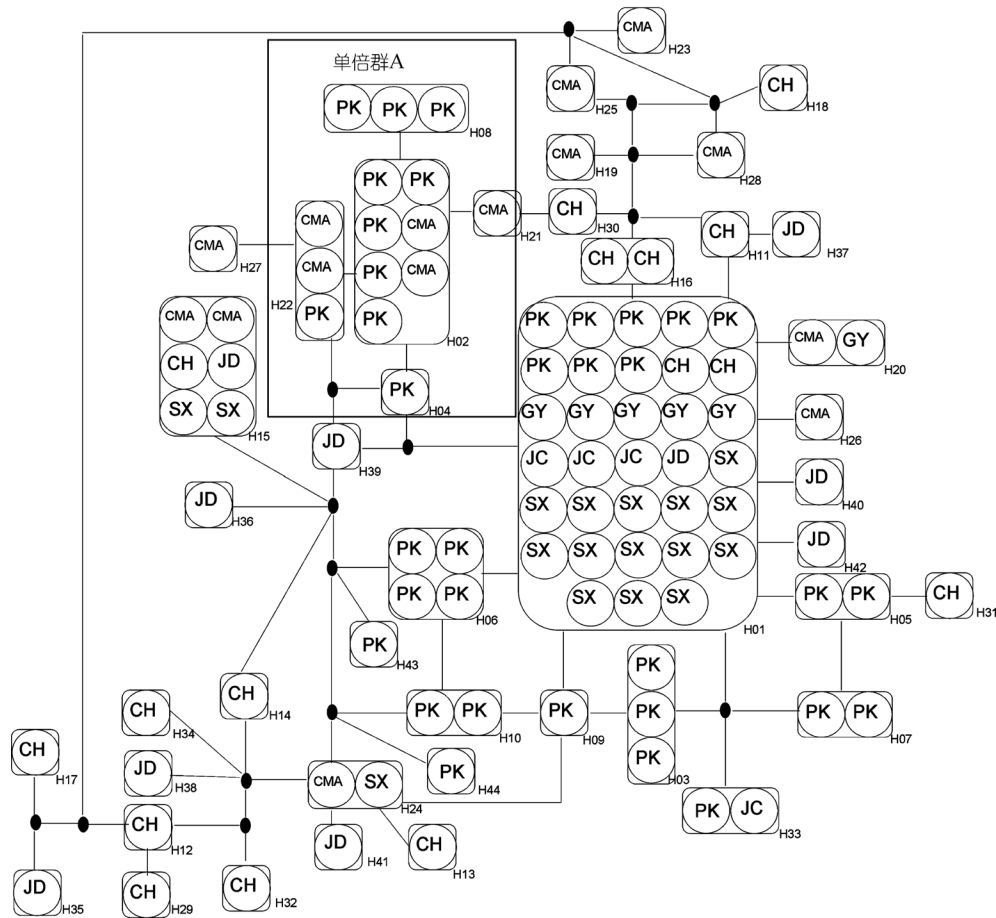


图 2 中国地方鸭种及绿头野鸭线粒体 DNA D-loop 单倍型网络关系图

PK: 北京鸭; JC: 建昌鸭; CH: 巢湖鸭; JD: 金定鸭; GY: 高邮鸭; SX: 绍兴鸭; MA: 野鸭. 方框及方框的代码示单倍型及单倍型的名称, 圆圈示单倍型中所包含的地方鸭种个体, 单个圆点示单个核苷酸的突变

明北京鸭与这几个地方鸭品种在很久以前就出现了分化, 因此不可能是单独由南方鸭种选育而来. 在引入了绿头野鸭的个体进行遗传网络分析时发现, 在所分析的群体中, 尽管在绿头野鸭和所有家鸭共有的单倍型 H01 包括了 8 个北京鸭个体, 但北京鸭有 12 个独特的家鸭单倍型, 此外北京鸭的 5 只体与 2 只

中国绿头野鸭个体形成北京鸭与绿头野鸭特有的单倍型 H02, 1 只北京鸭与 2 只中国绿头野鸭个体形成了单倍型 H22. 表明北京鸭独特的起源和驯化历史(图 2). 本研究表明, 虽然北京鸭和其他家鸭品种都起源于绿头野鸭, 但北京鸭的驯化过程基本独立于其他家鸭品种.

参考文献

- 1 陈国宏, 王克华, 王金玉, 等. 中国禽类遗传资源. 上海: 上海科学技术出版社, 2004. 1—5
- 2 张仲葛, 朱先煌. 中国畜牧史料集. 北京: 中国科学技术出版社, 1986. 271—273
- 3 陈明益. 北京鸭的饲养与繁育. 北京: 科学技术文献出版社, 1986. 1—5
- 4 张芳. 试论北京鸭在世界养鸭业中的地位. 中国畜牧杂志, 1989, 25(2): 56—57
- 5 Larson G, Dobney K, Albarella U, et al. Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication. *Science*, 2005, 307: 1618—1621 [\[DOI\]](#)
- 6 Liu Y P, Wu G S, Yao Y G, et al. Multiple maternal origins of chickens: out of the Asian jungles. *Mol Phylogenet Evol*, 2006, 38: 12—19 [\[DOI\]](#)
- 7 曲鲁江, 李显耀, 徐桂芳, 等. 利用微卫星标记分析中国地方鸡种的遗传多样性. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2006, 36(1): 1—10
- 8 Liu W, Hou Z C, Qu L J, et al. Population structure and biodiversity of Chinese indigenous duck breeds revealed by 15 microsatellite markers. *Asian Australas J Anim Sci*, 2008, 21(3): 314—319
- 9 Maak S, Neumann K, Gatermann R. First seven microsatellites developed for the Peking duck (*Anas platyrhynchos*). *Anim Genet*, 2000, 31: 228—241 [\[DOI\]](#)
- 10 Maak S, Wimmers K, Weigend S. Isolation and characterization of 18 microsatellites in the Peking duck (*Anas platyrhynchos*) and their application in other waterfowl species. *Mol Ecol Notes*, 2003, 3: 224—227 [\[DOI\]](#)
- 11 Li H, Yang N, Chen K, et al. Study on molecular genetic diversity of native duck breeds in China. *World's Poultry Sci J*, 2006, 62 (4): 603—607 [\[DOI\]](#)
- 12 Lai S J, Liu Y P, Liu Y X, et al. Genetic diversity and origin of Chinese cattle revealed by mtDNA D-loop sequence variation. *Mol Phylogenet Evol*, 2006, 38: 146—154 [\[DOI\]](#)
- 13 Lai S J, Chen S Y, Liu Y P, et al. Mitochondrial DNA sequence diversity and origin of Chinese domestic yak. *Anim Genet*, 2007, 38: 77—80 [\[DOI\]](#)
- 14 Liu Y P, Wu G S, Yao Y G, et al. Multiple maternal origins of chickens: out of Asian jungles. *Mol Phylogenet Evol*, 2006, 38: 12—19 [\[DOI\]](#)
- 15 萨姆不鲁克 J, 费里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1999. 43—370
- 16 Marshall T C, Slate J, Kruuk L E, et al. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol Ecol*, 1998, 7(5): 639—655 [\[DOI\]](#)
- 17 Yeh F C, Yang R C, Boyle T, et al. POPGENE, the user-friendly software for population genetic analysis. Edmonton: University of Alberta, 1997
- 18 Rozas J, Sanchez-DelBarrio J C, Messeguer X, et al. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 2003, 19: 2496—2497 [\[DOI\]](#)
- 19 Nei M. Genetic distance between populations. *Am Nat*, 1972, 106: 283—293 [\[DOI\]](#)
- 20 Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 1978, 89: 583—590
- 21 Brohede J, Møller A P, Ellegren H. Individual variation in microsatellite mutation rate in barn swallows. *Mutat Res*, 2004, 545: 73—80
- 22 Bandelt H J, Forster P, Rohl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol*, 1999, 16(1): 37—48
- 23 张毅. 中国水牛分子遗传多样性及其起源分化的研究. 北京: 中国农业大学, 2006
- 24 张汤杰, 李慧芳, 陈宽维, 等. 利用线粒体 D-loop 区分家鸭品种遗传多态性与系统进化. 畜牧兽医学报, 2007, 38 (11): 1168—1175
- 25 Bruford M W, Bradley D G, Luikart G. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nat Rev Genet*, 2003, 4: 900—910 [\[DOI\]](#)
- 26 Komiyama T, Ikeo K, Gojobori T. Where is the origin of the Japanese gamecocks? *Gene*, 2003, 317: 195—202 [\[DOI\]](#)
- 27 Komiyama T, Ikeo K, Gojobori T. The evolutionary origin of long-crowing chicken: its evolutionary relationship with fighting cocks disclosed by the mtDNA sequence analysis. *Gene*, 2004, 333: 91—99 [\[DOI\]](#)