

COI 序列应用于羊肉掺伪非定向筛查技术的研究

王维婷¹, 柳尧波¹, 杜鹏飞¹, 胡鹏¹, 汝医¹, 曹洪防², 王守经¹

(1. 山东省农业科学院农产品研究所, 山东省农产品精深加工技术重点实验室, 农业部新食品资源加工重点实验室, 山东济南 250100) (2. 莱芜市畜牧兽医局, 山东莱芜 271000)

摘要: 本项目研究了应用 COI 序列对羊肉中掺入的其他动物源材料进行非定向筛查, 并对山羊肉及绵羊肉进行分辨。利用了 DNA 条形码技术对六个羊品种(系)的线粒体基因组细胞色素酶基因片段进行引物筛选, 并利用筛选出的引物对七种动物源样本的 COI 片段进行扩增, 以确定所筛选出的引物是否能将羊肉与其他动物源样品进行有效区分。以 LCOI490/HCO2198、F1-1/R1-1、ITS3/ITS4 为引物, 通过对 36 份血液样本(山羊 3 个品种, 绵羊 3 个品种)的基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 其中以 F1-1/R1-1 为引物得到的 PCR 产物电泳检测条带清晰, 结果重现性好; 利用 F1-1/R1-1 引物对鸡肉、猪肉、驴肉、牛肉、莱芜黑山羊肉、洼地绵羊肉和鸭肉等七种样本的 COI 片段进行扩增, 并对扩增片段进行测序, 山羊、绵羊之间的序列同源性仅为 36.62%, 其他各品种间的序列差异也很明显。结果表明: 以 F1-1/R1-1 为专用引物可以有效区分羊肉与其他动物源样品, 并能够对山羊肉及绵羊肉样品进行有效区别。

关键词: 羊肉; DNA 条形码技术; 掺伪

文章编号: 1673-9078(2019)02-216-222

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.2.030

The Use of COI Sequence for Non-directional Screening to Detect Adulteration in Mutton

WANG Wei-ting¹, LIU Yao-bo¹, DU Peng-fei¹, HU Peng¹, RU Yi¹, CAO Hong-fang², WANG Shou-jing¹

(1. Institute of Agro-Food Science and Technology Shandong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Agro-Products Processing Technology of Shandong Province, Key Laboratory of Novel Food Resources Processing Ministry of Agriculture, Jinan 250100, China)(2. Laiwu Animal Husbandry and Veterinary Bureau, Laiwu 271000, China)

Abstract: This study investigated non-directional screening of other animal source materials incorporated in mutton by using COI sequence, while distinguishing goat meat and sheep meat. DNA barcoding technology was used to screen the mitochondrial genome cytochrome gene fragment of six sheep breeds (lines), and the selected primers were used to amplify the COI fragments of seven animal source samples to determine whether or not the primer can effectively distinguish the lamb from other animal source samples. Using LCOI490/HCO2198, F1-1/R1-1, and ITS3/ITS4 as primers, PCR amplification was performed on the genomic DNAs of 36 blood samples (3 goat species and 3 sheep species), with the PCR product obtained using F1-1/R1-1 as the primer being clear and reproducible. F1-1/R1-1 was used as the primer in the amplification of the COI fragment of chicken, pork, donkey meat, beef, Laiwu black goat meat, mutton sheep meat and duck meat samples, and then the amplified fragments of the seven kinds of meat samples were sequenced. The sequence homology between goat and sheep was only 36.62%, and the sequence difference among other breeds was also obvious. The results showed that F1-1/R1-1 can be used as a special primer to distinguish effectively between mutton meat and meat from other animal sources, and also between goat meat and sheep meat samples.

Key words: mutton; DNA barcode technology; adulteration

近年来, 羊肉及其制品在人们的日常肉类消费中占有重要的地位, 羊肉因其肉质细嫩鲜美、富含蛋白

收稿日期: 2018-06-25

基金项目: 山东省现代农业技术体系羊创新团队建设项目 (SDAIT-10-10);

国家现代农业(肉羊)产业技术体系建设专项 (GARS-38)

作者简介: 王维婷(1981-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 肉类品质控制技术研究

通讯作者: 王守经(1964-), 男, 研究员, 研究方向: 肉类加工

质和必需氨基酸及微量元素等优点, 被消费者喜爱且具有较高的销售价格。然而, 市场上羊肉及其制品的掺假现象屡见不鲜, 一种现象是以其他低价值动物源材料代替羊肉。据统计, 烤羊肉串掺假率可高达 35.7%, 主要掺假原料为鸭肉^[1]等其他非羊肉的动物源材料, 导致消费者的利益受到损失。另外一种现象是混淆羊肉品种, 我国地方山羊品种较多, 因其肉制品风味、口感优于绵羊肉, 价格略高于绵羊, 但消费者

购买时很难通过肉的形态特征来区别山羊肉和绵羊肉,从而使部分不良商家有机可乘。因此,加强对肉类制品的掺伪鉴别,不仅有利于保证肉类制品的生产加工的品质,而且是对消费者合法权益的保护,有助于国家食品安全目标的实现。

目前,依据现行的国家标准或行业标准可对肉制品和动物源成分进行定性检测^[2-7],包括对羊肉制品中的成分进行一对一的定性检测,但是由于羊肉制品掺假情况的多样性和复杂性,现有的检测方法成本较高且技术复杂,在日常快速鉴定中无法得到广泛的应用。

DNA 条形码 (DNA barcode) 技术是以一段长度约 650 bp 的小片段线粒体基因 COI (或 *cox1*) 作为物种快速鉴定的通用标记,是物种鉴定的分子诊断新技术^[8]。诸多研究者认为, DNA 条形码技术因其易于统一、易于掌握、易于标准化的特点^[9-11],可用于消费品检测方面。钟文涛等将 DNA 条形码技术应用于肉制品掺伪的非定向筛查,发现 DNA 条形码技术能打破传统标准中 PCR 检测目标唯一性的局限,具有良好的应用前景^[1]。Hebert 等对动物界 13320 个物种进行研究,线粒体 COI 基因能够对动物界的大多数物种,包括鱼类、鸟类等进行准确鉴定区分^[12]。陈士林等对动物药材的 DNA 条形码分析鉴定方法进行了详细的阐述,也认为 COI 序列可以作为动物中的包装条形码序列^[13]。生命条码联盟 (Consortium for the Barcode of life, CBOL) 已确立 COI 序列作为通用的动物条形码序列。

DNA 条形码技术广泛的应用于动物的物种鉴定和遗传多样性分析^[14-19],但在动物源食品的鉴定的研究报道很少^[20-22]。在肉类产品中,钟文涛等利用 COI 片段的电泳条带通过基因测序能正确识别猪、牛、羊、马、鸡、鸭、鹅、鼠 8 种动物源成分^[1],其研究结果中羊源性基因的参考序列为山羊线粒体序列,其研究没有考虑山羊与绵羊的种间不同,山羊 (*Capra aegagrus hircus*) 为牛科羊亚科羊族山羊属野山羊种,绵羊 (*Ovis aries*) 为牛科羊亚科羊族绵羊属绵羊种,二者的 COI 序列不同。在肉类产品中,钟文涛等利用 DNA 条形码技术对肉制品掺伪中非定向筛选技术进行探索,认为其电泳条带通过基因测序能正确识别猪、牛、羊、马、鸡、鸭、鹅、鼠 8 种动物源成分^[1],但其研究中没有考虑山羊与绵羊肉的检出效果,因此,利用 DNA 条形码技术建立一种能够鉴别山羊肉和绵羊肉的方法很有必要进行 DNA 条形码技术在山羊肉与绵羊肉鉴定中的应用研究,以提高 DNA 条形码技术在羊肉掺伪中的检出效率。

本研究以高度保守的 COI 基因为目标片段,设计三对引物,通过 36 份羊的血样样本,筛选出通用性高且稳定的引物。以鸡肉、鸭肉、驴肉、山羊肉、绵羊肉、牛肉和猪肉等为试验材料,以高度保守的 COI 基因为目标片段,设计三对引物,对不同试验材料进行区别鉴定,通过本研究工作的开展,能够为羊肉制品的高精度、高通量筛检提供一定的理论依据和技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

波尔山羊、鲁北白山羊、济宁青山羊、敖汉细毛羊、白头萨福克羊和无角陶赛特等品种 (系) 的血液样品由莱芜、青岛、济宁等地的国家级保种场采集。

Pfu DNA Polymerase 高温聚合酶 (SC0014), $MgCl_2$ (25 mM), 10×PCR Buffer [without Mg^{2+} : 100 mM Tris-HCl pH 8.8 at 25°C; 500 mM KCl, 0.8% (V/V) Nonidet], dNTP (10 mM), 6×DNA Loading Dye, DNA marker (SM0331), 10×TAE (400 mM Tris-acetate and 10 mM EDTA, pH 8.0), PCR 产物纯化回收试剂盒 (SK1141), DNA 提取试剂盒 (SK8224) 等生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 所有分离用有机溶剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

PCR 仪 (Verity 96well), 美国 ABI 公司; 凝胶成像仪 (Gene Genius), 英国 Syngene 公司; 冷冻离心机 (HC-2518R), 加拿大 BBI 公司; 台式高速离心机 (TGL-14G), 上海医疗器械有限公司; 电泳仪 (DYY-8C), 北京六一仪器厂; 电泳槽 (H6-1), 上海精益有机玻璃制品仪器厂; 微型旋涡混合仪 (XW-80A), 上海沪西分析仪器厂有限公司; 移液器 (100~1000 μ L、20~200 μ L、0.5~10 μ L、0.1~0.25 μ L), 加拿大 BBI 公司。

测序工作委托生工生物工程 (上海) 股份有限公司, 所用设备为美国 ABI 公司生产的 3730XL。

1.3 方法

1.3.1 基因片段的 PCR 扩增

根据《中药 DNA 条形码分子鉴定》^[13]推荐, 选择 COI 片段的两对引物 LCOI490/HCO2198、F1-1/R1-1, 和 ITS2 序列的一对引物 ITS3/ITS4, 共计三对引物于生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。引物序列及 PCR 反应条件如下:

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物名称	引物序列 (5'→3')	反应条件
LCOI490	GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G	94 °C, 1 min
		94 °C, 1 min
		45 °C, 1.5 min
		72 °C, 1.5 min
HCO2198	TAA ACT TTC AGG GTG ACC AAA AAA TCA	94 °C, 1 min
		50 °C, 1.5 min
		72 °C, 1 min
F1-1	GCA GGA ACA GGC TGA ACC GT	72 °C, 5 min
		94 °C, 3 min
		94 °C, 30 s
R1-1	AAT ATG TGG TGG GCT CAT AC	58 °C, 30 s
		72 °C, 1 min
ITS3	GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC	72 °C, 5 min
		95 °C, 2~3 min
		94 °C, 30 s
ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	50~60 °C, 30 s
		72 °C, 30~120 s
		72 °C, 10 min

1.3.2 引物筛选

提取不同羊品种(系)基因组 DNA, 用不同对引物进行扩增, 利用琼脂糖凝胶电泳对扩增结果进行检验, 以扩增条带的单一性和重现性为检验标准, 选取重现性好, 且仅出现单一扩增产物的引物进行下一步试验。

1.3.3 验证试验

所用样本鸡肉(1)、猪肉(2)、驴肉(3)、牛肉(4)、莱芜黑山羊肉(5)、洼地绵羊肉(6)、鸭肉(7)等七种样本均于宰后一周内采集, 采后立即在-20 °C 条件冻存两周, 用于提取基因组 DNA, 后用筛选得到的引物进行扩增, 并将扩增结果进行测序。

1.3.4 数据统计分析

所得测序结果在 genebank 数据库中利用 BLAST 软件检索, 多重序列比较利用 DNAMAN 软件进行分析。

2 结果与讨论

2.1 引物筛选

以 LCOI490/HCO2198、F1-1/R1-1、ITS3/ITS4 为引物, 对从采集的 36 份血液样本(山羊 3 个品种, 绵羊 3 个品种)中提取的基因组 DNA 进行 PCR 扩增。

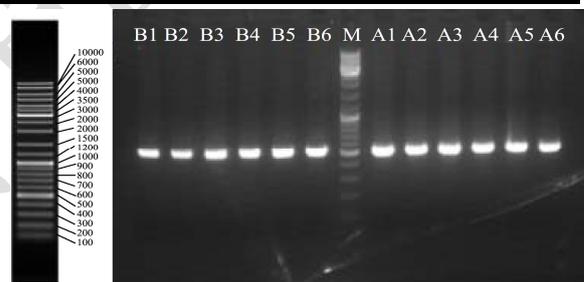


图 1 以 F1-1/R1-1 为引物的 PCR 产物电泳图

Fig.1 The electropherogram of PCR products with primers F1-1/R1-1

注: M 为 marker; B1~B6 为波尔山羊基因组 DNA 扩增片段; A1~A6 为教汉细毛羊基因组 DNA 扩增片段。

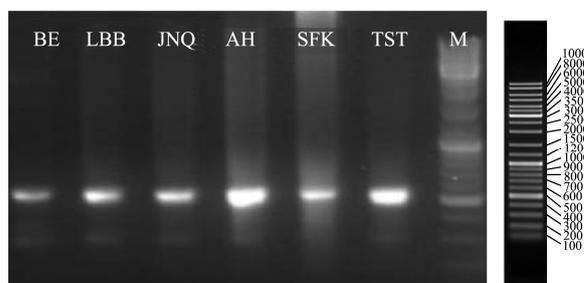


图 2 六个山羊绵羊品种(系)验证试验

Fig.2 Validation test of six goat sheep breeds (lines)

注: BE 为波尔山羊, LBB 为鲁北白山羊, JNQ 为济宁青山羊, AH 为教汉细毛羊, SFK 为白头萨福克, TST 为无角陶赛特。

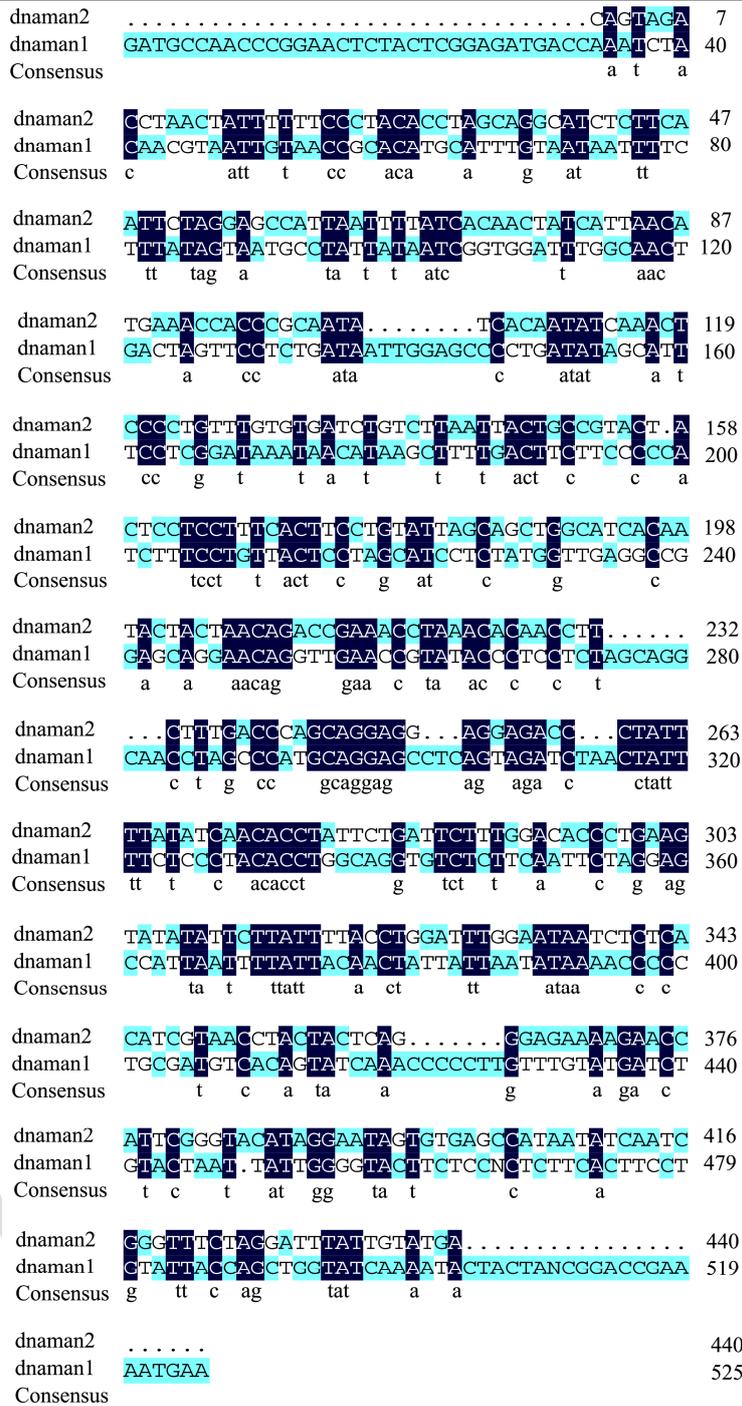


图3 绵羊细胞色素氧化酶基因片段与山羊线粒体基因片段比对

Fig.3 Comparing the sheep cytochrome oxidase gene fragment with goat mitochondrial gene fragment

注: dnaman1 序列为绵羊细胞色素氧化酶基因片段 (gene bank 编号: JQ735465), dnaman2 序列为山羊线粒体基因片段 (gene bank 编号: KR349363.1)。

结果发现,以 LCOI490/HCO2198 为引物的 PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分离检测后,仅个别样本出现条带,且结果重现性差;以 ITS3/ITS4 为引物的 PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分离检测后,无明显条带;以 F1-1/R1-1 为引物的 PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分离检测后,样本条带清晰,重复验证后,检测结果重现性好。以 F1-1/R1-1 为引物,分别选取

六只波尔山羊和敖汉细毛羊提取样本后进行扩增,结果见图 1,以 F1-1/R1-1 为引物,提取波尔山羊、鲁北白山羊、济宁青山羊、敖汉细毛羊、白头萨福克、无角陶赛特等六个品种(系)样本后进行扩增,结果见图 2。

将以 F1-1/R1-1 为引物得到的 PCR 扩增产物回收后,送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

利用筛选得到的 F1-1/R1-1 引物,对从鸡肉(1)、猪肉(2)、驴肉(3)、牛肉(4)、莱芜黑山羊肉(5)、洼地绵羊肉(6)、鸭肉(7)等七种样本中提取的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分离检测,结果见图 4。

由图 4 可以看出,选取的七种样本,以 F1-1/R1-1 引物进行 PCR 扩增后,除鸡肉(1)样本外,六种样本均出现清晰的阳性扩增条带。说明以 F1-1/R1-1 为引物的可以进行有效的 PCR 扩增。

将以 F1-1/R1-1 为引物得到的上述六种样本的 PCR 扩增产物回收后,送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。其中,猪肉(2)和鸭肉(7)的测序信号出现了大量的套叠峰,测序失败。其他样本的测序结果经 BLAST 比对后,见图 4。该片段测序结果能够有效将羊肉与其他肉进行区分,并能够区别山羊肉与绵羊肉。

结果显示:驴肉(3)测序结果与驴 COI 基因片段(gene bank 编号:KT829570.1)同源性 100%;牛肉(4)的测序结果与牛 COI 基因片段(gene bank 编号:FJ971088.1)同源性 99%;莱芜黑山羊肉(5)的测序结果与山羊线粒体基因片段(gene bank 编号:KR349363.1)的同源性 99%;洼地绵羊肉(6)的测序结果与绵羊 COX1 片段(gene bank 编号:DX23964.1)同源性 99%。由测序结果的多重比对(图 5)可以看出:驴肉、牛肉、山羊肉及绵羊肉之间的差异位点共出现了 137 个,占总序列的 28.21%,可以将不同肉品进行有效区分。

3 结论

3.1 DNA 条形码技术是利用一段种间差异明显但是种内相对保守的 DNA 序列来对物种进行鉴定的新兴的技术^[23]。线粒体 COI 基因因其进化速度快于核基因,且与 12SrRNA 和 16SrRNA 相比,很少发生核苷酸的缺失和插入现象,因此被科研工作者们一致推荐为动物物种鉴定的通用条形码^[24-26]。

3.2 本研究利用 DNA 条形码技术,从三对引物中筛选出一对重现性好、扩增产物条带清晰的 F1-1/R1-1 引物用于对羊肉制品的掺伪进行鉴定检测,其 PCR 扩增产物的测序结果不仅能够将羊肉与其他动物源肉进行准确和有效的区分,同时能够有效的将山羊肉与绵羊肉进行区分,且山羊与绵羊的 COI 基因扩增片段的同源性仅为 36.62%。利用 F1-1/R1-1 引物对羊肉制品进行 DNA 条形码检验可以更加快速、准确、有效的提高羊肉制品的检出效率。

参考文献

- [1] 钟文涛,王芳妹,李白玉,等.DNA 条形码在肉制品掺伪中非定向筛查技术的研究[J].食品安全质量检测学报,2018,8(5): 1547-1551
ZHONG Wen-tao, WANG Fang-mei, LI Bai-yu, et al. Research on the non-directional test in meat adulteration based on DNA barcode [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2018, 8(5): 1547-1551
- [2] GB/T 21103-2007,动物源性饲料中哺乳动物源性成分定性检测方法,实时荧光 PCR 方法[S]
GB/T 21103-2007, Identification of Mammal Derived Materials in Animal-Originated Feedstuffs, Real-time PCR Method [S]
- [3] GB/T 20190-2006,饲料中牛羊源性成分的定性检测,定性聚合酶链式反应(PCR)法[S]
GB/T 20190-2006, Detection of Bovine, Sheep and Goat-derived Material in Feeds, Qualitative Polymerase Chain Reaction (PCR) Method [S]
- [4] GB/T 25165-2010,明胶中牛、羊、猪源性成分的定性检测方法,实时荧光 PCR 法[S]
GB/T 25165-2010, Protocol of Identification of Bovine, Caprine, Ovine and Porcine Derived Materials in Gelatin, Real-time PCR Method [S]
- [5] SN/T 2051-2008,食品、化妆品和饲料中牛羊猪源性成分检测方法,实时 PCR 法[S]
SN/T 2051-2008, Determination of Bovine, Ovine, Porcine-derived Materials in Food, Cosmetic and Feed, Real-time PCR Method [S]
- [6] SN/T 2727-2010,饲料中禽源性成分检测方法,实时荧光 PCR 方法[S]
SN/T 2727-2010, Determination of Poultry Derived Materials in Feedstuff, Real-time Fluorescent PCR Method [S]
- [7] GB/T 21104-2007,动物源性饲料中反刍动物源性成分(牛、羊、鹿)定性检测方法-PCR 方法[S]
GB/T 21104-2007, Identification of Ruminantia Derived Materials (Bovidae, Caprinae, Cervus) in Animal-originated Feedstuffs, PCR Method [S]
- [8] Paul dn Herbert, Alina Cywinska, Shelly L Ball, et al. Biological identifications through DNA barcodes [J]. Proc Royal Soc B Biol Sci, 2003, 270(1512): 313-321
- [9] Pedersen Mi. DNA barcode profiling a new platform for the investigation of genome integrity [J]. Genome Biol, 2010,

- 11(1): 30-35
- [10] Ron Ammar, Andrew M. Lawrence E. A comparative analysis of DNA barcode microarray feature size [J]. *BMC Genomics*, 2009, 10(1): 471-477
- [11] Hebert P D, Cywinski A A, BALL S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proc Royal Soc B Biol Sci*, 2003, 270(1512): 313-321
- [12] Hebert Pdn, Ratnasingham S, Dewarrd JR. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species [J]. *Proc Biol Sci*, 2003b, 270: S96-S99
- [13] 陈士林. 中药 DNA 条形码分子鉴定[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012
CHEN Shi-lin. DNA Barcode Molecular Identification of Chinese Medicine [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2012
- [14] Pappalardo A M, Cuttitta A, Sardella A, et al. DNA barcoding and COI sequence variation in Mediterranean lanternfishes larvae [J]. *Hydrobiologia*, 2015, 749: 155-167
- [15] Chan Abigail, Chiang Lee-Pei, Hapuarachchi H C, et al. DNA barcoding: complementing morphological identification of mosquito species in Singapore [J]. *Parasites & Vectors*, 2014, 7: 569-580
- [16] Ahmed I, Huebner H, Mamorri Y I, et al. Identification of newly established *Spodoptera littoralis* cell lines by two DNA barcoding markers [J]. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal*, 2017, 53: 288-292
- [17] 唐修君, 贾晓旭, 樊艳凤, 等. 基于线粒体 D-loop 区四个鸡种 DNA 条形码和品种鉴定[J]. *农业生物技术学报*, 2017, 25(10): 1563-1660
TANG Xiu-jun, JIA Xiao-xu, FAN Yan-feng, et al. DNA barcoding and variety identification of four chicken (*Gallus domesticus*) breeds based on mitochondrial DNA D-loop region [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2017, 25(10): 1563-1660
- [18] 伏建国, 杨晓军, 钱路, 等. 植物 DNA 条形码技术在出入境检验检疫领域的应用[J]. *植物检疫*, 2013, 26(2): 64-69
FU Jian-guo, YANG Xiao-jun, QIAN Lu, et al. Application of plant DNA barcoding in inspection and quarantine [J]. *Plant Quarantine*, 2013, 26(2): 64-69
- [19] 李新光, 王璐, 赵峰, 等. DNA 条形码技术在鱼肉及其制品鉴别中的应用[J]. *食品科学*, 2013, 34(18): 337-342
LI Xin-guang, WANG Lu, ZHAO Feng, et al. Application of DNA barcoding to identify commercial fish and fish products [J]. *Food Science*, 2013, 34(18): 337-342
- [20] 林霖, 陈国培, 何永盛, 等. 基于多重荧光 PCR 检测的肉及其制品中鸭 DNA 成分的鉴别方法[J]. *食品与机械*, 2017, 33(5): 95-98
LIN Lin, CHEN Guo-pei, HE Yong-sheng, et al. A method for dark DNA components detection in meat and productions by multiplex-real-time fluorescence PCR [J]. *Food & Machinery*, 2017, 33(5): 95-98
- [21] 王爽, 李永波, 马超峰, 等. DNA 条形码 COI 序列在常见肉类鉴别中的应用研究[J]. *现代食品科技*, 2016, 32(1): 188-193
WANG Shuang, LI Yong-bo, MA Chao-feng, et al. Cytochrome C oxidase subunit I sequence as a DNA barcode to identify common meat species [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2016, 32(1): 188-193
- [22] 朱秀敏, 王彩君. DNA 条形码技术在牛肉及其制品鉴别中的应用[J]. *邢台学院学报*, 2017, 32(2): 180-182
ZHU Xiu-min, WANG Cai-jun. Application of DNA barcoding to identify commercial beef and beef products [J]. *Journal of Xingtai University*, 2017, 32(2): 180-182
- [23] ZOU Shanmei, LI Qi. Pay attention to the overlooked cryptic diversity in existing barcoding data: The case of mollusca with character-based DNA barcoding [J]. *Mar Biotechnol*, 2016, 18: 327-335
- [24] Asato Y, Oshiro M, Myint C K, et al. Phylogenetic analysis of the genus *Leishmania* by cytochrome b gene sequencing [J]. *Experimental Parasitology*, 2009, 121(4): 352-361
- [25] 梁瑞圆, 陈晓勇, 孙洪新, 等. 绵羊 mtDNA COI 基因作为 DNA 条形码鉴定品种及系统进化可行性分析[J]. *扬州大学学报(农业与生命科学版)*, 2017, 38(3): 57-61, 67
LIANG Rui-yuan, CHEN Xiao-yong, SUN Hong-xin, et al. The feasibility analysis of ovine mtDNA COI gene as DNA barcoding in breed identification and phylogenetic [J]. *Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition)*, 2017, 38(3): 57-61, 67
- [26] MIAO Y W, PENG M S, WU G S, et al. Chicken domestication: An updated perspective based on mitochondrial genomes [J]. *Heredity*, 2013, 110(3): 277-282