

我国部分地方鸡种 CO I 基因多态性及其分子系统进化研究

屠云洁^{1,2}, 高玉时^{1*}, 苏一军^{1,2}, 王克华¹, 童海兵¹

(1. 中国农业科学院家禽研究所, 扬州 225003; 2. 国家地方禽种资源基因库, 扬州 225003)

摘要: 以我国 7 个地方鸡种为研究对象, 利用 DNA 测序技术测定线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I (cytochrome c oxidase I, CO I) 基因序列, 分析地方鸡种 CO I 多态性及其分子系统进化关系。研究表明, 选择的这段 CO I 基因序列有 24 个突变位点, 为 13 个单倍型, 其中 11 个单倍型为各品种所特有, 可以作为各品种鉴定的依据; 各鸡种在不同位点突变频率不同, 7 个鸡种均有其特异位点, 根据这些特异位点, 可以对其进行品种鉴定。7 个品种间 Kimura 双参数遗传距离为 0.001 81 ~ 0.008 48。7 个品种的 DNA 分类和形态学分类基本一致, 该基因可以用于探讨地方鸡种分类问题。

关键词: 地方鸡种; 多态性; CO I 基因; 系统进化

中图分类号: S831.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2011)01-0039-04

Genetic diversity and phylogenetic analysis of CO I gene in some indigenous chicken breeds

TU Yun-jie^{1, 2}, GAO Yu-shi¹, SU Yi-jun^{1, 2}, WANG Ke-hua¹, TONG Hai-bing¹

(1. Institute of Poultry, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Yangzhou 225003;

2. National Poultry Genetic Resources, Yangzhou, 225003)

Abstract: The CO I gene in seven indigenous chicken breeds was amplified using PCR and sequencing. The sequences were analyzed to explore utility as DNA Barcoding for identifying these chicken breeds. The study revealed that there were 24 polymorphic sites and 13 haplotypes in the CO I gene, of which, 11 were special to seven chicken breeds. The special sites were found in each chicken breed which was the bases to identify chicken breeds. Kimura 2-parameter distance between the 7 chicken breeds was 0.001 81—0.008 48. DNA taxonomy is consistent with morphological taxonomy among the seven chicken breeds. The phylogenetic relationships of the breeds can be well resolved by CO I gene sequences.

Key words: indigenous chicken breeds; diversity; CO I gene; phylogenetic

在动物分类学上, 根据对同一个目标基因 DNA 序列的分析来完成物种鉴定的过程被称为 DNA 条形码编码过程^[1]。Tautz 等提出利用 DNA 序列作为生物分类的平台, 即 DNA 分类^[2-3]。加拿大生物学家 Paul Hebert 首先倡导将条形码编码技术应用到比零售业更复杂的生物物种鉴定之中, 提出利用线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I (cytochrome c oxidase I, CO I) 这一特定基因的特定区段来做 DNA 条形码编码的基础, 给所有生物物种进行编码^[4-7]。

由 Hebert 对北美 260 种鸟类进行了 DNA 条形

编码的序列分析, 结果表明, 发现其中 4 种鸟分别出现了 2 种不同的 CO I 基因序列, 这证明北美鸟类中发现了 4 个新种; Kress 等^[8]研究发现, 利用 CO I 基因可对 97.9% 的 531 多种热带蝴蝶进行分类。Smith 等^[9]利用 CO I 基因研究发现, 胡蜂品种内的变异平均为 0.43%, 而品种间的变异平均为 3.887%。

在国内, 许多科学家也做过类似的研究, 研究对象大多为无脊椎动物。董云伟等^[10]对轮虫 CO I 部分基因进行测序, 分析其基因序列变异及种群遗

收稿日期: 2009-12-17

基金项目: 江苏省自然科学基金项目 (BK2008204, BK2010298) 和国家科技支撑计划 (2006BDA01A09) 共同资助。

作者简介: 屠云洁, 女, 博士。E-mail: tyj3030@126.com

* 通讯作者: 高玉时, 男, 研究员。E-mail: gaoy100@sina.com

传结构。褚栋等利用 CO I 基因片段对国内外 12 个地理种群烟粉虱的生物型进行了鉴定, 并对其来源进行了分析^[11]。孔晓瑜等^[12]、林元烧等^[13]、杨学明等^[14]做过类似的研究。潘程莹等^[15]测定了 CO I 基因序列, 探讨 CO I 基因作为 DNA 条形码在识别蝗虫物种方面的可行性。本研究主要分析 7 个差异较大的地方鸡种 CO I 基因多态性及其分子系统进化关系, 以探讨 DNA 条形码在家禽品种鉴定的可行性和有效性。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试鸡种 从 78 个地方鸡中选择 7 个差异比较大的地方鸡种: 大骨鸡 (9 只), 金湖乌凤鸡 (9 只), 鹿苑鸡 (9 只), 狼山鸡 (5 只), 瓦灰鸡 (12 只), 北京油鸡 (10 只), 藏鸡 (11 只)。这 7 个鸡品种均从国家地方禽种资源基因库抽取。

1.1.2 试剂 试验所用 *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、 $MgCl_2$ 、100+1.5 kb DNA Ladder Markers 均购自上海生物工程有限公司。

1.2 总 DNA 提取

总 DNA 提取按照分子克隆的方法^[16]。

1.3 鸡 CO I 基因的 PCR 扩增

1.3.1 引物的设计与合成 所用引物是按照 GenBank 上发表的中国红色原鸡 *Cox1* (AP003322) 中的 CO I 基因序列设计引物

F: GCACAGGATGGACAGTTTAC

R: ATAGCATAGGGGGGTCTCAT

引物由上海生物工程公司合成。PCR 产物长度为 651 bp。

1.3.2 PCR 扩增 PCR 反应体积 50 μ L, 含有基因组 DNA 约 1 000 ng, 引物 2 μ L, dNTPs 2 μ L、 $MgCl_2$ 5 μ L 终浓度分别为 0.50 μ mol·L⁻¹、200 μ mol·L⁻¹、

2.0 mmol·L⁻¹、*Taq*DNA 酶(上海生物工程公司) 0.2 μ L (1.0 U)。扩增条件为: 预变性 94℃ 5 min; 变性 94℃ 45 s, 退火 55℃ 1 min, 延伸 72℃ 1 min, 共 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 5 min。

1.4 鸡 CO I 基因序列测定

PCR 产物用 20 或 30 g·L⁻¹ 的琼脂糖凝胶电泳分析。将 PCR 扩增产物进行回收和在 ABI 3730 测序仪上进行双向测序, 由上海生物工程有限公司完成。

1.5 鸡 CO I 基因序列分析

测序的序列通过 Chromas 软件读取, 对每个序列进行人工逐碱基读取和反复校对, 并通过双向重复测序进行校正。所获序列用 CLUSTALW 软件进行比对^[5-8], 并与 GenBank 鸡 (*Gallus Gallus*) 线粒体 CO I 基因序列进行比较。用 MEGA3.0 软件^[8]计算品种间核苷酸分歧度^[6-9,18]。应用邻接法(NJ)构建进化系统树。应用 DNAsp 4.10^[17]统计单倍型, 序列相同视为同一单倍型 (haplotype), 忽略插入与缺失位点。运用 Network4.1 软件做出单倍型网络图。

2 结果与分析

2.1 7 个鸡品种间与品种内 CO I 基因序列多态性

7 个地方鸡种的 22 个变异位点, 其中单一位点突变 16 个, 简约信息 6 个。单一多态位点在 47、70、80、81、93、113、141、188、360、403、408、429、531、580、584、595, 约占 2.46%; 简约信息位点在 114、194、551、554、555、587, 约占 0.92%。7 个鸡品种间核苷酸多样性见表 1。

2.2 7 个地方鸡种品种内与品种间遗传距离

7 个鸡品种间核苷酸分歧度 (见表 2)。从表 2 可见 7 个鸡种种遗传距离范围为 0.017~0.389, 鹿苑鸡品种内的遗传距离最大, 为 0.472, 藏鸡品种内遗传距离为 0。

表 1 7 个地方鸡种 CO I 基因序列变异位点数、平均核苷酸差异和核苷酸多样性

Table 1 The haplotype diversity K and Pi of CO I gene in 7 indigenous chicken breeds

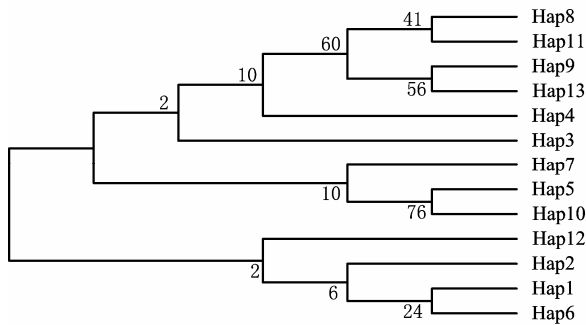
品种 Breeds	样本数 No.	变异位点数 No. of variable sites	平均核苷酸差异 Nucleotide difference (K)	核苷酸多样性 Nucleotide diversity (Pi)
大骨鸡 Dagu	9	1	0.222 2	0.000 34
瓦灰鸡 Wahui	12	2	0.575 8	0.000 88
金湖乌凤鸡 Jinhu silky	9	2	0.444 4	0.000 68
狼山鸡 Langshan	5	6	2.400 0	0.003 69
鹿苑鸡 Luyuan	12	13	3.055 6	0.004 69
北京油鸡 Beijing fatty	10	6	1.200 0	0.001 84
藏鸡 Zang	11	0	0	0
总 Total	65	22	0.994 2	0.001 53

表 2 7 个地方鸡种间 Kiumura 双参数距离和净遗传距离
Table 2 Kiumura 2-parameter distance and Net distance(Da) among 7 indigenous chicken populations

品种 Breeds	品种内 Interpopulation	大骨鸡 Dagu	藏鸡 Zang	瓦灰鸡 Wahui	金湖乌凤鸡 Jinhu silky	北京油鸡 Beijing fatty	狼山鸡 Langshan	鹿苑鸡 Luyuan
大骨鸡 Dagu	0.038		0.000	-0.002	-0.004	0.000	0.000	0.000
藏鸡 Zang	0.000	0.017		0.007	0.000	0.000	0.000	0.004
瓦灰鸡 Wahui	0.089	0.060	0.051		-0.002	0.007	0.007	0.003
金湖乌凤鸡 Jinhu silky	0.068	0.047	0.034	0.077		0.000	0.000	0.000
北京油鸡 Beijing fatty	0.185	0.109	0.092	0.143	0.126		0.000	0.001
狼山鸡 langshan	0.370	0.201	0.184	0.236	0.218	0.276		-0.030
鹿苑鸡 Luyuan	0.472	0.252	0.239	0.282	0.269	0.328	0.389	

注: 上三角为净遗传距离 Da, 下三角为 Kiumura 双参数距离; 以上值均扩大了 100 倍。

Note: Above dialogue was Net distance(Da), down diagonal was Kiumura 2-parameter distance of CO I gene among 7 chicken breeds; all of the value was enlarged 100 times

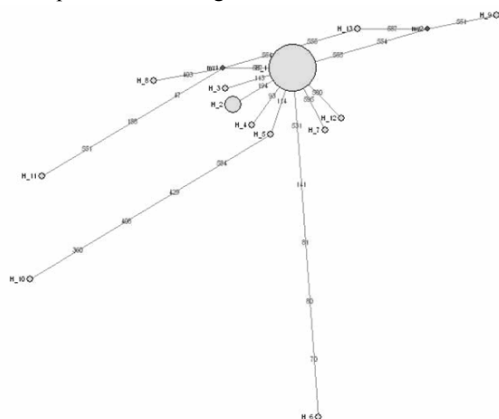


树枝上的数字为自展分析自展值 (1 000 重复)

The number above the branches show the percentage bootstrap support from 1 000 replications

图 1 基于 CO I 基因单倍型构建 7 个地方鸡种的 NJ 树

Figure 1 NJ tree based on haplotype for CO I DNA sequences in 7 indigenous chicken breeds



每个圆圈代表一种单倍型, 其大小与该种单倍型出现的频率成正比, 线上的数字代表变异位点, 红点上代表可能存在于地变异位点

A cycle means a haplotype; the area means the frequency in a haplotype; the number on line means the mutation site; the red point means potential means the potential site

图 2 7 个鸡群体 CO I 基因的网络中介图

Figure 2 The median-joining networks of the 7 chicken populations in CO I gene

2.3 7 个鸡品种 COI 基因序列单倍型分子系统树

从图 1 可见, 7 个群体的 13 种单倍型明显得分为 3 支, 在此将 3 个类群定义为单倍型类群 A, 单倍型类群 B, 单倍型类群 C。单倍型类群 A 中包含 6 种单倍型, 单倍型类群 B 包含 3 种单倍型, 两个类群又合并为 1 个大群, 占总单倍型数的 69.23%; 单倍型类群 C 包含 4 种单倍型, 占总单倍型数的 30.77%。

由图 2 可知, 7 个品种 13 种单倍型在单倍型网络图中, H1 和 H2 为共享单倍型, H1 共享频率最高, H2 次之, 简约信息位点较少, 单一位点突变较多。

3 讨论

3.1 7 个鸡品种 CO I 基因序列的遗传多态性

CO I 基因位于动物 mtDNA 的重链(H 链)的 tRNA-Lyr 基因与 tRNA-Leu 基因之间, 长度约为 1.6 kbp, CO I 与细胞色素氧化酶亚基 2(CO II)和亚基 3(CO III)共同构成参与级联反应的细胞色素氧化酶的核心结构, 是线粒体 DNA(mtDNA)13 个蛋白质编码基因之一。CO I 基因为中度保守序列且碱基替换率较高, 因而可作为优良的分子遗传标记被广泛地用于动物的种及种以上阶元的分类及系统进化的研究中。

本研究测定了 7 个地方鸡品种共 65 个个体线粒体 DNA CO I 基因 5' 序列长 651 bp 的多变区, 变异类型有转换、颠换, 以颠换为主。在 7 个鸡群体中共发现 22 个突变位点, 其中单一位点突变 16 个, 简约信息 6 个, 没有观测到插入与缺失。本研究位点的品种间多态性为 3.38%, 这比 Hebert 报道的鳞翅目同属各种 CO I 序列的多态性为 11.3% 低; 比其报道的鸟类品种间的多态性为 7.93% 低。这可能是由于鸟类和鳞翅目类是野生型的, 经自然选

择,而本研究的地方鸡种,主要是经过人工选择的。品种内多态性均低于2%,这与其他学者研究结果一致^[6-7,9]。

7个鸡群体中,鹿苑鸡COI基因序列变异位点数最多,为13个,平均核苷酸差异最大为0.3056,平均核苷酸多样性也最大,为0.00469;狼山鸡单倍型多样性最大,为 0.9 ± 0.161 。藏鸡COI基因序列没有任何变异,变异位点数、平均核苷酸差异和核苷酸多样性均为0,这可能由于藏鸡产于高山深谷,历史上交通阻塞,形成天然隔离屏障,与其它群体之间基因交流的机会极少,可能在进化过程中处于相对隔绝的状态,且COI基因为编码基因,相对比较保守,所以藏鸡群体COI基因序列没有任何变异,这也反映所研究藏鸡品种内群体纯度非常高。

7个地方鸡品种线粒体DNA COI基因序列,共发现24个突变位点,为13种单倍型。13种单倍型中只有H1和H2为共享单倍型,其余11个单倍型均为各品种所特有,可用于品种鉴定。藏鸡品种只有H1单倍型,可以作为藏鸡的分子评估依据。

3.2 7个鸡品种 mtDNA COI 基因系统发生关系

动物mtDNA是母系遗传和非重组的,分子的各部分均共享同一祖先的相同历史模式。mtDNA这一特殊的基因系统发育关系不仅可以在一定层次上了解群体的遗传多样性,还可以探讨形成特定遗传结构的历史原因。7个鸡种间Kimura双参数遗传距离范围为0.017~0.389,净遗传距离(Da)范围为-0.030~0.007,所有群体间均处于很低的水准,表现出很近的亲缘关系。7个群体单倍型聚类图与单倍型网络中介图均很好地体现他们的亲缘关系。

参考文献:

- [1] 肖金花,肖晖,黄大卫. 生物分类学的新动向—DNA条形码编码[J]. 动物学报, 2004, 50(5): 852-855.
- [2] Tautz D, Arctander P, Minelli A, et al. DNA points the way ahead in taxonomy[J]. Nature, 2002: 478-479.
- [3] Tautz D, Arctander P, Minelli A, et al. A plea for DNA taxonomy [J]. Trends in Ecology and Evolution, 2003, 18(2): 70-74.
- [4] Brooks E M, Reinhard J S, Alice F B, et al. Molecular barcodes detect redundancy and contamination in hair pin-bisulfite PCR [J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32(17): 1-4.
- [5] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 2003, 270(1): 313-321.
- [6] Hebert P D N, Ratnasingham S, Waard J R, Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 2003, 270: 96-99.
- [7] Hebert P D N, Penton E H, Burns J M, et al. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 2004, 101(41): 14812-14817.
- [8] Kress W J, Wurdack K J, Zimmer E A, et al. Use of DNA barcodes to identify flowering plants[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 2005, 102(23): 8369-8374.
- [9] Smith M, Woodley A N E, Janzen D H, et al. DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 2006, 103(10): 3657-3662.
- [10] 董云伟,牛翠娟. COI基因在轮虫分子系统重建中的意义[J]. 海洋湖沼通报, 2004(3): 33-40.
- [11] 褚栋,刘国霞,范仲学,等. 烟粉虱复合种不同地理种群的遗传分化[J]. 中国农业科学, 2006, 39(8): 1571-1580.
- [12] 孔晓瑜,喻子牛,刘亚军,等. 中华绒螯蟹与日本绒螯蟹线粒体COI基因片段的序列比较研究[J]. 青岛海洋大学学报, 2001, 31(6): 861-866.
- [13] 林元烧,方旅平,曹文清,等. 中华哲水蚤线粒体DNA COI基因序列分析[J]. 厦门大学学报, 2005, 44(1): 90-93.
- [14] 杨学明,郭亚芬,蒋钦杨,等. 三个群体罗氏沼虾线粒体COI基因的遗传多样性分析[J]. 上海水产大学学报, 2006, 15(2): 144-149.
- [15] 潘程莹,胡婧,张霞,等. 斑腿蝗科七种蝗虫线粒体COI基因的DNA条形码研究[J]. 昆虫分类学报, 2006, 28(2): 103-110.
- [16] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E.F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 2版. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 北京: 科学出版社, 1992: 477-479.
- [17] Rozas J, Sánchez-DelBarrio J C, Messeguer X. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods [J]. Bioinformatics, 2003, 19: 2496-2497.
- [18] Kumar S, Tamura K and Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. Briefings in Bioinformatics, 2004, 5: 150-163.