

中国乌骨鸡品种 *BCDO2* 基因多态性和肤色鉴定

贾晓旭, 陆俊贤, 唐修君, 樊艳凤, 马尹鹏, 黄胜海, 葛庆联, 高玉时*

(江苏省家禽科学研究所, 扬州 225125)

摘要: 为分析 β -胡萝卜素脱氢酶 2(β -carotene dioxygenase2, *BCDO2*) 基因在我国乌骨鸡中的变异情况, 采用 PCR 方法分别扩增和测序了我国 5 个乌骨鸡品种(丝羽乌骨鸡、东乡绿壳蛋鸡、金湖乌凤鸡、余干乌骨鸡和新兴竹丝鸡 3 号)、白耳黄鸡(黄肤色)和崇仁麻鸡(白肤色)的 *BCDO2* 基因, 并与 GenBank 数据库中的原鸡序列进行系统发育分析。结果显示: 7 个品种 215 条序列, 总计发现 6 个多态位点, 分别为 6273091(G-A)、6273129(A-G)、6273229(C-T)、6273240(C-T)、6273307(A-G) 和 6273672(A-G)。基于 6 个多态点界定了 3 种单倍型, 定义为 Hap1、Hap2 和 Hap3。其中只有白耳黄鸡、崇仁麻鸡和丝羽乌骨鸡有 1 种单倍型, 东乡绿壳蛋鸡、金湖乌凤鸡、余干乌骨鸡和新兴竹丝鸡 3 号均有 2 种单倍型。系统发育分析显示: Hap1 和 Hap2 只与红色原鸡聚为一类, Hap3 和多个原鸡聚为一类。*BCDO2* 基因多态位点能够很好地区分黄白肤色的品种, 但很难区分乌骨鸡品种。多个原鸡在我国乌骨鸡品种形成过程中都做出了贡献。该研究结果为我国乌骨鸡遗传资源的保护、选育和鉴定工作提供了遗传背景信息。

关键词: 乌骨鸡; *BCDO2* 基因; 多态性; 肤色

中图分类号: S831.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2022)01-0087-05

BCDO2 gene polymorphism and skin color identification in Chinese black-bone chicken

JIA Xiaoxu, LU Junxian, TANG Xiujun, FAN Yanfeng, MA Yinpeng, HUANG Shenghai, GE Qinglian, GAO Yushi
(Jiangsu Institute of Poultry Science, Yangzhou 225125)

Abstract: To test the *BCDO2* gene polymorphism in Chinese black-bone chicken, five black-bone chicken breeds (Silkie, Dongxiang Blue-eggshell, Jinhu Black-bone, Yugan Black-bone and Zhusi), Chongren Partridge chicken with white skin and Baier Yellow chicken with yellow skin were collected, and the sequence of the *BCDO2* gene was PCR amplified, subsequently sequenced and analyzed with the DNA data of jungle fowl annotated in the GenBank. Six polymorphic sites were found in 215 sequences of seven breeds, which were 6273091(G-A), 6273129(A-G), 6273229(C-T), 6273240(C-T), 6273307(A-G) and 6273672(A-G). The 3 haplotypes were observed based on 6 polymorphic sites, which were Hap1, Hap2 and Hap3. Chongren Partridge, Baier Yellow and Silkie only had one haplotype, while Dongxiang Blue-eggshell, Jinhu Black-bone, Yugan Black-bone and Zhusi all had two haplotypes. The phylogenetic analysis showed that Hap1 and Hap2 were only clustered with Red jungle fowl, and Hap3 was clustered with multiple jungle fowl. Our data suggested polymorphisms in the *BCDO2* gene can be regarded as markers for yellow and white skin color of chicken, but it cannot be used in black-bone chicken. There are multiple maternal contributed to the evolution of Chinese black-bone chicken. Our results can be used as a reference for preservation, improvement and identification of Chinese black bone chickens.

Key words: black-bone chicken; *BCDO2* gene; polymorphism; skin color

种业是农业的“芯片”, 开展种质资源挖掘、保护和评价是解决我国畜牧业种源“卡脖子”问题的技术前提。我国各地自然和人文条件的不同, 人们

对鸡培育方向和目的也不尽相同, 形成了丰富多彩的鸡遗传资源。《国家畜禽遗传资源品种名录(2021年版)》公布的我国地方鸡品种种质资源有 115 个。

收稿日期: 2021-04-20

基金项目: 国家自然科学基金(31672382, 31501917, 31702079 和 31372277), 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-41)和江苏省公益类科研院所自主科研项目(BM2018026)共同资助。

作者简介: 贾晓旭, 副研究员。E-mail: 596374801@qq.com

* 通信作者: 高玉时, 研究员。E-mail: gaoyu100@sina.com

鸡按照用途一般分为肉用型和蛋用型,我国一些乌骨鸡品种还有一定的药用价值。早在1300年前的本草纲目就有乌骨鸡的记载:“乌骨鸡,有白毛乌骨者,黑毛乌骨者、斑毛乌骨者,有骨肉皆乌者、肉白乌骨者,但观舌黑者,则骨肉俱乌、入药更良”^[1]。对这些具有优势特色性状的种质资源进行评价也是一项十分重要的工作。

BCDO2 基因是鸡重要色素沉积基因,位于第24条染色体内,编码 β -胡萝卜素双加氧酶2。 β -胡萝卜素双加氧酶2是一种抗氧化应激的关键保护成分,也是线粒体类胡萝卜素的清道夫和内在凋亡通路的看门人^[2]。这种酶可以将有色的类胡萝卜素裂解成为无色的脱脂类胡萝卜素,如果*BCDO2*基因发生突变,可以抑制该基因在皮肤中的表达,正是由于*BCDO2*基因表达量的减少而产生了黄皮肤。除了在鸡上,*BCDO2*基因在其他动物上色素沉积的也有研究。Berry等研究发现牛*BCDO2*基因外显子3上的一处SNP,与牛的黄色脂肪和 β -胡萝卜素产物相关^[3]。Våge等研究表明*BCDO2*基因突变可能会改变羊的皮下脂肪中类胡萝卜素的含量,从而影响羊的屠体性状^[4]。

鸡的*BCDO2*基因存在着大量的SNPs,可能是由共同的祖先遗传下来的。Eriksson等通过对家鸡和原鸡的*BCDO2*序列的系统发育分析,发现黄色皮肤的品种与灰色原鸡(*Gallus sonneratii*)聚集在一起,白色皮肤的品种与红色原鸡(*Gallus Gallus*)聚集在一起,表明黄色皮肤的家鸡其野生祖先可能跟灰色原鸡有着较近的亲缘关系,为鸡驯化的起源和历史提供了新的见解^[5]。Huang等对10个品种黄羽肉鸡地方品种进行全基因组测序,发现*BCDO2*基因作为重要的候选基因被选择^[6]。目前还没有对我国乌骨鸡*BCDO2*基因多态性系统研究的报道,为此,本研究选择我国5个代表性的乌骨鸡品种,通过PCR扩增和直接测序的方法对其*BCDO2*基因进行了研究,以期为我国乌骨鸡遗传资源的保护、选育和鉴定工作提供遗传背景信息。

1 材料与方法

1.1 材料

东乡绿壳蛋鸡和金湖乌凤鸡采自国家级地方鸡种基因库(江苏),丝羽乌骨鸡群体2采自江西丝羽乌骨鸡保种场、余干乌骨鸡采自江西余干乌骨鸡保种场,新兴竹丝鸡3号采自江苏温氏畜牧有限公司。并选择黄肤品种和白肤品种各一个作为对照,黄肤品种选择白耳黄鸡,白肤品种选择崇仁麻鸡,每个

品种内个体间没有直接的亲缘关系(表1)。

在鸡翅静脉采集血液,用常规的酚-氯仿法提取基因组DNA,双蒸水溶解,核酸浓度测定仪测定DNA浓度,-20℃保存备用。

表1 本研究中鸡的品种和性状相关信息

品种及简写	数量	肤色	胫色	喙色
白耳黄 BE	30	黄色	黄色	黄色
崇仁麻 CP	30	白色	黑色	黑色
东乡绿壳 DX	30	黑色	黑色	黑色
丝羽乌骨 SL	30	黑色	黑色	黑色
金湖乌凤 JH	30	黑色	黑色	黑色
余干乌骨 YG	30	黑色	黑色	黑色
竹丝 ZS	35	黑色	黑色	黑色

从美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)数据库中下载已发表13条原鸡序列,红色原鸡(*Gallus Gallus*)(EU334155, EU334157, EU334162, EU334163, EU334164, EU334165, EU334166),黑尾原鸡(*Gallus lafayetii*)(EU334158),灰色原鸡(*Gallus sonneratii*)(EU334149, EU334152, EU334159, EU334160, EU334161)。

1.2 分析方法

选取鸡已知DNA序列(EU334163)作为参考序列,用Primer Premier 5.0和Oligo 6.0软件设计引物扩增*BCDO2*基因,正向:5'-AGTACAGGAAGGG AAGGAT-3';反向:5'-TTTATGTGCTCGCAGAA TG-3',由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR反应体系25 μ L:2 \times PCR Master Mix(南京博尔迪,南京)12.5 μ L,10 μ mol \cdot L⁻¹上下游引物各1 μ L(生工生物公司,上海),模板DNA50ng,最后用灭菌水补齐25 μ L。PCR扩增条件如下:94℃预变性3min;94℃变性30s,55℃复性30s,72℃延伸2min,35个循环;72℃延伸10min;12℃保存。取5 μ L扩增好的PCR产物在1.5%琼脂糖(康为世纪公司,北京)上凝胶电泳检测,选择条带亮并且无非特异性扩增的样本交由上海生工生物公司测序。

1.3 数据处理和分析

所获序列根据峰图进行人工校对后,以.seq格式输出,利用Clustal-X软件进行序列比对^[7]。用DnaSP 5.10.1软件统计变异位点数和单倍型数^[8]。用MEGA 6.0软件采用最大似然法(maximum likelihood, ML)构建系统发育树^[9]。采用Network 10.2.0软件绘制Median-joining单倍型网络图^[10]。

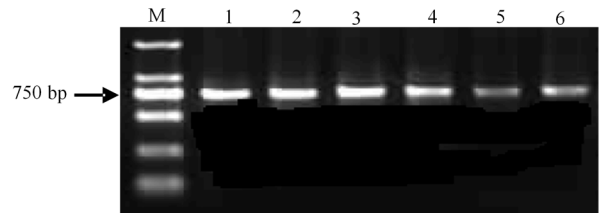
2 结果与分析

2.1 *BCDO2* 基因多态位点和单倍型分布

本研究扩增片段长度为 725 bp, 设计的引物在试验鸡群得到了较好的扩增, PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 特异性良好, 与目的片段大小一致(图 1)。基于 7 个品种 215 条序列, 总计发现 6 个多态位点, 分别为 6273091(G-A)、6273129(A-G)、6273229(C-T)、6273240(C-T)、6273307(A-G) 和 6273672(A-G)(表 2)。

基于本研究发现的 6 个多态位点, 界定了 3 个单倍型 Hap1~Hap3 (表 2)。由表 3 可以看出, Hap1 分布在除白耳黄鸡以外的其他 6 个品种。Hap3 包含分布于 4 个品种, 分别为白耳黄鸡、东乡绿壳蛋鸡、金湖乌凤鸡及和余干乌骨鸡。Hap2 仅少量分布在两个

品种中: 金湖乌凤鸡(2/30)和新兴竹丝鸡 3 号(1/35)。白耳黄鸡、崇仁麻鸡和丝羽乌骨鸡只有 1 种单倍型。同时拥有 2 种单倍型的品种有 3 个, 东乡绿壳蛋鸡(12/18)、新兴竹丝鸡 3 号(34/1)和余干乌骨鸡(23/7)。金湖乌凤有 3 种单倍型, 个体数分别为 20、2 和 8。30 只白肤崇仁麻鸡只检测到 Hap1 一种单倍型, 30 只黄肤白耳黄鸡只检测到 Hap3 一种单倍型。



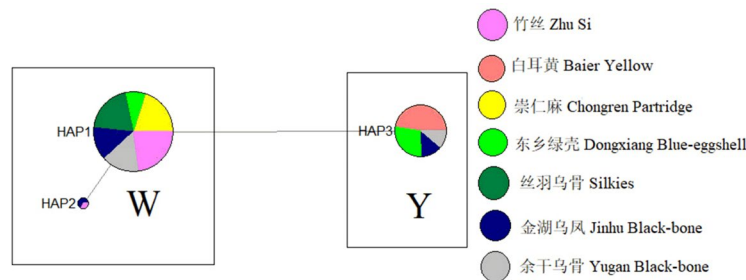
M: DL2000; 1—6: PCR 产物。

图 1 PCR 扩增结果

Figure 1 PCR amplification results

表 2 *BCDO2* 基因多态位点分布
Table 2 Variable nucleotide sequence positions in *BCDO2*

单倍型	多态位点在基因组的位置					
	6273091	6273129	6273229	6273240	6273307	6273672
EU334163	G	A	C	C	A	A
Hap1	G	A	C	C	A	A
Hap2	G	A	C	C	G	A
Hap3	A	G	T	T	A	G



注: 不同颜色表示不同群体, W 和 Y 为单倍型类群。

图 2 基于 *BCDO2* 基因单倍型构建的中介网络图

Figure 2 Median-Joining network profile of the *BCDO2* haplotypes observed in the present study

表 3 *BCDO2* 基因不同单倍型在不同品种间的分布
Table 3 *BCDO2* genetic diversity index of different chicken breeds

品种	单倍型			总计
	Hap1	Hap2	Hap3	
白耳 (BE)			30	30
崇仁麻 (CP)	30			30
东乡绿壳 (DX)	12		18	30
丝羽乌骨 (SL)	30			30
金湖乌凤 (JH)	20	2	8	30
余干乌骨 (YG)	23		7	30
竹丝 (ZS)	34	1		35

2.2 系统发育分析

基于本研究发现的 23 个单倍型, 进行了中介网络图构建(图 2)。结果表明, 3 种单倍型归属于 2 个不同的分支 W 和 Y, 其中 W 分支包括 Hap1 和 Hap2, Y 分支仅包括 Hap3。2 个分支均未呈明显的星状发散分布。利用本研究发现的 3 种单倍型和 13 条原鸡序列构, 我们构建了系统发育树(图 3)。发育树分为 2 个分支, Hap1 和 Hap2 同红色原鸡(*Gallus Gallus*) (EU334155, EU334157, EU334166)聚为一支, Hap3 和红色原鸡(*Gallus Gallus*) (EU334162, EU334163,

EU334164, EU334165)、黑尾原鸡(*Gallus lafayetii*)(EU334158)和灰色原鸡(*Gallus sonneratii*)(EU334149, EU334152, EU334159, EU334160,

EU334161)聚为一支,其中黑尾原鸡(EU334158)明显跟其他原鸡亲缘关系较远。

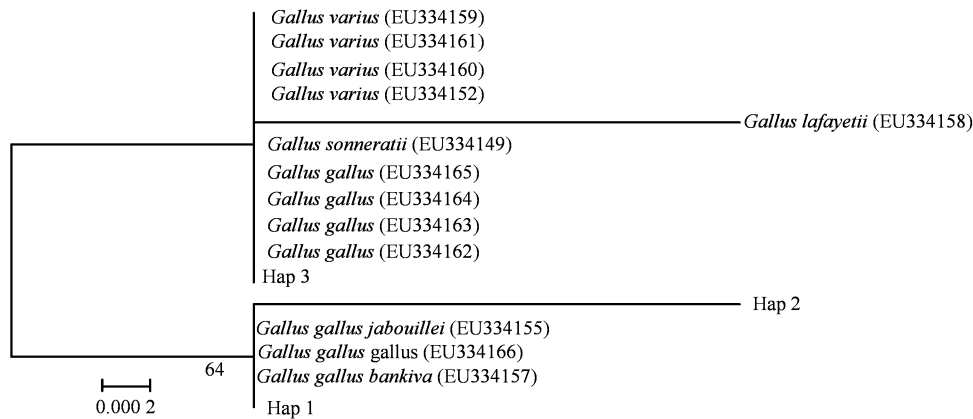


图3 基于 *BCDO2* 基因序列采用 ML 法构建的系统发育树

Figure 3 The maximum likelihood tree based on *BCDO2* gene sequences

3 讨论与结论

随着国家倡导家禽冰鲜上市,屠体外观在鸡肉产品中的影响会越来越大。市场上一般都会要求同一批次的鸡屠体或者分割具有相同的肤色^[11]。我国华南地区人民希望鸡的肤色在可接受的范围内尽可能的黄。研究表明影响鸡肤色的因素十分复杂,包括遗传、饲料和生理状况等^[12]。鸡的黄色肤色主要是由于外源的类胡萝卜素在皮肤中沉积造成的。研究显示正是由于 *BCDO2* 基因分解类胡萝卜素功能的丧失导致了类胡萝卜素在鸡的肤色的沉积^[5]。本研究 *BCDO2* 基因的多态位点能够很好地区分白肤色(崇仁麻鸡)和黄肤色(白耳黄鸡),这与许继国等研究了黄白肤色的鸡 *BCDO2* 基因的多态性分布情况,发现一处变异位点与肤色性状完全连锁的研究结果是一致的^[12]。还有研究发现 *BCDO2* 基因多态位点与鸡的胫色和喙色有连锁关系^[12-14],黄肤色的鸡一般胫色和喙色都偏黄色,而白肤色的鸡,胫色和喙色偏黑色。乌骨鸡一般胫色和喙色都偏黑色。本研究没有发现 *BCDO2* 基因多态位点与乌骨鸡喙色和胫色有连锁关系。

黑色素的合成是从酪氨酸酶氧化酪氨酸开始,然后经过一系列复杂的反应完成的。目前乌骨鸡肤色相关调控基因尚未得到精确定位。Li 等对浙川乌骨鸡进行全基因组扫描,发现了一个包含与黑色素生成相关基因的选择性区域^[15]。Yu 等研究发现酪氨酸酶(tyrosinase, TYR)基因一处变异位点可以作为乌骨鸡皮肤颜色标记辅助选择的遗传标记^[16]。本研究发现丝羽乌骨鸡 *BCDO2* 基因有 1 种单倍型,而

东乡绿壳蛋鸡、金湖乌凤鸡、余干乌骨鸡和新兴竹丝鸡 3 号至少有 2 种单倍型,具体的遗传机理有待进一步深入研究。

BCDO2 基因除了应用于肤色研究,也应用于鸡的起源进化研究。Gao 等基于 *BCDO2* 基因研究结果认为家鸡至少有 2 个起源^[13],Loog 等比较了古代和现代非商业品种,认为 *BCDO2* 基因等位基因频率的显著上升可能归因于亚洲鸡种的基因流动^[17]。Eriksson 等^[5]研究表明白肤色家鸡可能起源于红色原鸡,而黄色皮肤的家鸡其野生祖先可能跟灰色原鸡有着较近的亲缘关系。本研究发现我国乌骨鸡 *BCDO2* 基因 Hap1 和 Hap2 只与红色原鸡聚为一类, Hap3 和多个原鸡聚为一类,这与徐文娟等利用线粒体 *Cytb* 基因研究我国乌骨鸡起源至少起源与 3 个红色原鸡(*Gallus gallus*)亚种,可能还含有少量的灰原鸡(*Gallus sonneratii*)血缘的结果基本一致^[18]。同白肤和黄肤家鸡相比,除新兴竹丝鸡 3 号和金湖乌凤鸡少量个体有特有单倍型(Hap2),其他均与黄白肤色 *BCDO2* 基因序列相同,说明乌骨鸡也是由家鸡选育出来的,这与翁茁先等研究结果一致^[19]。*BCDO2* 基因作为分子标记可以应用于鸡的起源进化研究是可行的。

本研究以黄肤色和白肤色鸡为对照,研究了我国乌骨鸡品种 *BCDO2* 基因的多态性情况。研究结果发现 *BCDO2* 基因多态位点能够很好地区分黄白肤色的品种,但很难区分乌骨鸡。多个原鸡在我国乌骨鸡品种形成过程中,都做出了贡献。该研究结果为我国乌骨鸡遗传资源的保护、选育和鉴定工作提供了遗传背景信息。

参考文献:

- [1] 国家畜禽遗传资源委员会组. 中国畜禽遗传资源志-家禽志[M]. 北京: 中国农业出版社, 2011.
- [2] LOBO G P, ISKEN A, HOFF S, et al. *BCDO2* acts as a carotenoid scavenger and gatekeeper for the mitochondrial apoptotic pathway[J]. *Development*, 2012, 139(16): 2966-2977.
- [3] BERRY S D, DAVIS S R, BEATTIE E M, et al. Mutation in bovine beta-carotene oxygenase 2 affects milk color[J]. *Genetics*, 2009, 182(3): 923-926.
- [4] VÅGE D I, BOMAN I A. A nonsense mutation in the *beta-carotene oxygenase 2 (BCO2)* gene is tightly associated with accumulation of carotenoids in adipose tissue in sheep (*Ovis aries*)[J]. *BMC Genet*, 2010, 11: 10.
- [5] ERIKSSON J, LARSON G, GUNNARSSON U, et al. Identification of the yellow skin gene reveals a hybrid origin of the domestic chicken[J]. *PLoS Genet*, 2008, 4(2): e1000010.
- [6] HUANG X H, OTECKO N O, PENG M S, et al. Genome-wide genetic structure and selection signatures for color in 10 traditional Chinese yellow-feathered chicken breeds[J]. *BMC Genomics*, 2020, 21(1): 316.
- [7] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAC F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [8] ROZAS J, SÁNCHEZ-DELBARRIO J C, MESSEGUER X, et al. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods[J]. *Bioinformatics*, 2003, 19(18): 2496-2497.
- [9] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. *Mol Biol Evol*, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [10] BANDEL T H J, FORSTER P, RÖHL A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies[J]. *Mol Biol Evol*, 1999, 16(1): 37-48.
- [11] SIRRI F, PETRACCI M, BIANCHI M, et al. Survey of skin pigmentation of yellow-skinned broiler chickens[J]. *Poult Sci*, 2010, 89(7): 1556-1561.
- [12] 许继国, 高鑫凤, 李幸, 等. 鸡 *BCDOBCDO2* 基因变异与肤色关系的相关研究[J]. *中国家禽*, 2015, 37(22): 10-13.
- [13] GAO Y S, JIA X X, TANG X J, et al. The genetic diversity of chicken breeds from Jiangxi, assessed with *BCDO2* and the complete mitochondrial DNA D-loop region[J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0173192.
- [14] JIN S, LEE J H, SEO D W, et al. A major locus for quantitatively measured shank skin color traits in Korean native chicken[J]. *Asian-Australas J Anim Sci*, 2016, 29(11): 1555-1561.
- [15] LI D H, SUN G R, ZHANG M, et al. Breeding history and candidate genes responsible for black skin of Xichuan black-bone chicken[J]. *BMC Genomics*, 2020, 21(1): 511.
- [16] YU S, LIAO J, TANG M, et al. A functional single nucleotide polymorphism in the tyrosinase gene promoter affects skin color and transcription activity in the black-boned chicken[J]. *Poult Sci*, 2017, 96(11): 4061-4067.
- [17] LOOG L, THOMAS M G, BARNETT R, et al. Inferring allele frequency trajectories from ancient DNA indicates that selection on a chicken gene coincided with changes in medieval husbandry practices[J]. *Mol Biol Evol*, 2017, 34(8): 1981-1990.
- [18] 徐文娟, 朱文奇, 束婧婷, 等. 我国主要乌骨鸡品种遗传多样性和系统进化研究[J]. *中国畜牧杂志*, 2014, 50(23): 10-14.
- [19] 翁茁先, 黄佳琼, 张仕豪, 等. 利用线粒体 *COI* 基因揭示中国乌骨鸡遗传多样性和群体遗传结构[J]. *生物多样性*, 2019, 27(6): 667-676.