

山南市藏鸡群体遗传多样性与进化关系分析

黄涛¹, 王润锦¹, 单增桑珠², 陈羲³, 高铭馨²,
巴桑³, 张昊¹, 张宏林⁴, 皮劲松¹, 王士欣²

(1.湖北省农业科学院畜牧兽医研究所,湖北 武汉 430064;2.西藏自治区山南市藏鸡产业研究院,西藏 山南 856000;3.西藏自治区山南市畜牧兽医总站,西藏 山南 856000;4.西藏宏农农业发展有限公司,西藏 山南 856000)

摘要:以在山南市搜集的 25 只藏鸡和保种场 25 只藏鸡为研究素材,围绕线粒体细胞色素 C 氧化酶(COX)基因家族序列分析藏鸡群体遗传多样性情况及进化关系。通过对 COX1、COX2、COX3 基因编码区筛查,发现了 12 个碱基突变,其中 2 个非同义突变,可能对氧化磷酸化调控具有潜在影响。对包含部分 COX 基因家族 1 782 bp DNA 片段遗传多样性进行分析,结果显示:50 只山南藏鸡的核苷酸多样性(P_i)为 0.002 3,核苷酸平均差异数(K)为 4.11,单倍型多样性(H_d)为 0.69。此外,边境县收集藏鸡遗传信息高于保种藏鸡群体,表明了搜集藏鸡资源的价值,有效补充和提升了保种藏鸡群体的规模和质量。构建包含红色原鸡亚种系统进化树,显示山南藏鸡与红色原鸡亚种间相互独立又相互交叉,部分藏鸡保留着一些古老的遗传信息,本研究可为藏鸡资源保护与评价提供一定参考。

关键词:藏鸡;资源;细胞色素 C 氧化酶;山南

中图分类号:S831.2

文献标识码:A

Analysis of Genetic Diversity and Evolutionary Relationship of Lhoka Xizang Chicken Population Based on Mitochondrial COX Gene Family Sequence

HUANG Tao¹, WANG Runjin¹, Danzengsangzhu², CHEN Xi³, GAO Mingxin²,
Basang³, ZHANG Hao¹, ZHANG Honglin⁴, PI Jinsong¹, WANG Shixin²

(1. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Hubei Academy of Agricultural Science, Wuhan Hubei 430064, China; 2. Lhoka Xizang Chicken Industry Research Institute, Lhoka Xizang 856000, China; 3. Lhoka animal husbandry and veterinary station, Lhoka, Xizang 856000, China; 4. Xizang Hongnong Agricultural Development Co. Ltd., Lhoka Xizang 856000, China)

Abstract: This study took 25 Xizang chickens collected in the countrysides of Lhoka City and 25 Xizang chickens from the breeding farm as research materials. Focusing on the sequences of the mitochondrial cytochrome C oxidase (COX) gene family, the genetic diversity and evolutionary relationship of the Xizang chicken population were analyzed. Through the screening of the coding regions of the COX1, COX2, and COX3 genes, 12 base mutations were discovered, including 2 non-synonymous mutations, which may have potential effects on the regulation of oxidative phosphorylation. Through the analysis of the genetic diversity of the 1 782 bp DNA fragment containing partial COX gene family, the results showed that the P_i value of 50 Lhoka Xizang chickens was 0.002 3, the K value was 4.11, and the H_d value was 0.69. In addition, the genetic information of Xizang chickens collected in countrysides was higher than that from breeding farm, indicating the resource value of the collected Xizang chickens, and effectively supplementing and improving the scale and quality of the breeding Xizang chicken population.

收稿日期:2024-08-13

基金项目:国家重点研发计划项目(2022YFD1600901);湖北省援疆援藏项目(2018-916-000-008);山南市科技计划项目(2022-02BJKJJHXM-01)。

作者简介:黄涛(1989—),男,博士,副研究员,主要从事家禽育种,E-mail:huangtao214@126.com。

通信作者:王士欣(1986—),男,本科,兽医师,主要从事藏鸡健康养殖与推广,E-mail:huorenanhai@126.com。

The construction of a phylogenetic tree including subspecies of the red junglefowl showed that the Lhoka Xizang chickens were independent and intersected with the subspecies of the red junglefowl. Some Xizang chickens retained some ancient genetic information. In conclusion, this study provides a certain reference for the protection and evaluation of Xizang chicken resources.

Key words: Xizang chickens; resource; COX; Lhoka

线粒体 DNA 属于高等动物体内核外遗传物质,具有母系遗传、进化速率快、拷贝数量多、没有重组发生等特征。鸡线粒体 DNA 长度约为 1.67 kb,编码包括细胞色素 C 氧化酶(COX)在内的 37 个基因^[1]。由于 D-LOOP 区部分片段的进化速度快,具有丰富的遗传变异,于是成为地方鸡线粒体相关研究的首选,截至目前研究文献较多^[2-4]。黄勋和等^[5]认为 COX1 特定区域也可作为研究鸡品种遗传多样性的候选分子标记。除此之外,地方鸡线粒体 Cytb 基因、ND6 基因^[6]也有相关研究报道。

线粒体通过消耗氧气和产生三磷酸腺苷来提供 95% 以上的真核细胞能量,这对高原缺氧的适应尤为重要^[7]。细胞色素 C 氧化酶是一种位于线粒体内膜的寡聚蛋白质,作为线粒体呼吸链的终端催化酶参与氧化磷酸化调控,促使氧分子向水分子的转化和能量质子转移^[8]。细胞色素 C 氧化酶有 3 种同工酶形式,分别为 COX1、COX2、COX3,这 3 个基因在鸡线粒体 DNA 均存在较高的变异。有研究报道,COX1 基因是研究物种起源分化有效的 DNA 条形码^[9],COX3 基因变异与藏鸡缺氧适应性有关^[10]。

藏鸡是世代栖息在我国青藏高原地区的宝贵遗传资源,由于藏区特殊地形地貌,藏鸡群体在长期封闭环境下,不可避免发生遗传漂变。本研究利用 DNA 测序技术分析山南市边境县藏鸡搜集群体和保种场藏鸡群体线粒体 COX 基因家族多态性,以期对藏鸡遗传资源保护和品种选育提供遗传学评价资料。

1 材料与方法

1.1 材料

采用的 2 个资源素材(保种场原有群体,藏鸡搜集群体)来源于山南市畜禽良种繁育中心(山南市藏鸡产业研究院),保种场原有群体为其

持续自繁保种群。2023 年,为了加强山南市藏鸡资源保护,在隆子、措美、措那、洛扎等县农户家里搜集藏鸡 200 余只进行单独分类保种,每个藏鸡群体随机抽取成年个体各 25 只。腋下采血之后,使用血液基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司)提取冷冻鸡血样 DNA 于 -20℃ 冰箱冷冻保存。红原鸡线粒体序列从 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) 下载。

1.2 方法

1.2.1 SNP 筛查与鉴定

使用 Oligo7 软件设计引物,首先,采用混池测序方法筛查 SNPs,设计引物扩增包含线粒体 COX1、COX2、COX3 DNA 片段。01f: ACTA-CAGCCTAACGCTTCAA; 01r: TTCTTCGAAG-GTGTGGTATGG; 02f: CCGAATTAAGTCCAC-TAAT; 02r: GATAAGTGAGGTGAGTAGGA; 03f: TCCAAGTCTGATTCACCCAC; 03r: AGT-TAGTGCAGCGCTTAGTA。其次,设计引物对 50 只藏鸡已筛查 SNPs 进行个体检测,COX1-2_f: AACATAAGCTTCTGACTCCTC; COX1-2_r: ATTTAGTCGTCCAGGGATTG; COX3_f: CAT-AGTTGACCCAAGCCCAT; COX3_r: GTGGTTT-GGTGTGAAGTGGA; PCR 试剂购自东洋纺(上海)生物科技有限公司,反应体系 15.00 μ L: KOD one Mix 7.50 μ L, DNA 模板 1.00 μ L, 上、下游引物各 0.50 μ L, 加 ddH₂O 补足至 15.00 μ L。扩增程序: 98℃ 10 s, 60℃ 5 s, 68℃ 2 s, 进行 35 个循环。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定后,送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.2.2 数据处理和分析

获取测序结果后查看峰图,对于只出现 1 次突变的位点按照假阳性处理。利用 Seqman 软件拼接序列,产生 fas 文件后导入到 Dnasp6 软件中分析计算 P_i 、 $H_d \pm sd$ 、 K 、单倍型数量等,构

建 ped 和 map 文件导入到 Haploview4.1 软件分析 16 个 SNPs 连锁不平衡关系。藏鸡与红色原鸡亚种线粒体序列合并到一个 fas 文件后,导入到 Mega11 软件中,采用邻接算法构建系统发生树。

2 结果与分析

2.1 筛查 COX 基因家族编码区 SNPs

以 COX 基因家族 3 个成员为研究对象,完成 COX1、COX2、COX3 的扩增测序。通过峰图分析,鉴定了 16 个碱基变异(表 1),在 COX 家族编码区中发现了 12 个碱基变异,其中,COX1 基因中发现 7 个 SNPs,COX2 基因中发现了 4 个

SNPs,COX3 基因中发现了 1 个 SNP。这 11 个碱基中 2 个非同义碱基突变造成氨基酸的改变,分别位于 COX1、COX2 基因中,造成苯丙氨酸(F)突变成亮氨酸(L),异亮氨酸(I)突变成苏氨酸(T)。

2.2 单倍型分布及连锁不平衡分析

位于藏鸡线粒体基因间区和 COX 基因家族编码区 16 个 SNPs 形成了 8 个单倍型(表 2),根据藏鸡单倍型频率分布,占比前两位的单倍型 Hap_1 和 Hap_2 达 68%,在山南市藏鸡群体中呈现出优势地位。根据连锁不平衡分析结果,显示存在 2 个强连锁区间(图 1),位于 COX3 基因中的 SNP16 未出现在强连锁区间内。

表 1 位于 COX 家族编码区 12 个 SNPs 信息

基因	碱基位置	氨基酸位置	参考碱基	突变碱基	参考氨基酸	突变氨基酸	突变个数
COX1	7 022	124	C	T	G	G	7
COX1	7 031	127	G	A	W	W	4
COX1	7 364	238	C	T	F	F	7
COX1	7 769	373	C	T	Y	Y	4
COX1	7 979	443	T	C	D	D	8
COX1	8 079	477	T	C	F	L	12
COX1	8 192	514	G	A	V	V	8
COX2	8 444	35	C	T	C	C	8
COX2	8 473	45	T	C	I	T	12
COX2	8 618	93	T	C	D	D	11
COX2	8 792	151	A	T	V	V	3
COX3	10 081	50	A	G	M	M	11

表 2 藏鸡线粒体基因间区和 COX 基因家族编码区 16 个 SNPs 组成单倍型

单倍型	SNP1	SNP2	SNP3	SNP4	SNP5	SNP6	SNP7	SNP8	SNP9	SNP10	SNP11	SNP12	SNP13	SNP14	SNP15	SNP16	频率 /%
	7 022	7 031	7 156	7 364	7 475	7 769	7 979	8 079	8 141	8 192	8 339	8 444	8 473	8 618	8 792	10 081	
Hap_1	C	G	T	C	C	T	T	T	T	G	T	C	T	T	A	A	52
Hap_2	T	G	T	T	C	C	C	T	C	A	T	T	T	T	A	A	16
Hap_3	C	G	T	C	C	T	T	C	T	G	C	C	C	C	T	A	8
Hap_4	C	A	T	C	T	T	T	T	T	G	T	C	T	C	A	G	8
Hap_5	C	G	T	C	C	T	T	C	T	G	C	C	C	C	A	G	6
Hap_6	C	G	T	C	C	T	T	C	T	G	C	C	C	C	T	G	4
Hap_7	C	G	C	C	C	T	T	C	T	G	C	C	C	C	A	G	4
Hap_8	C	G	C	C	C	T	T	C	T	G	C	C	C	C	A	G	2

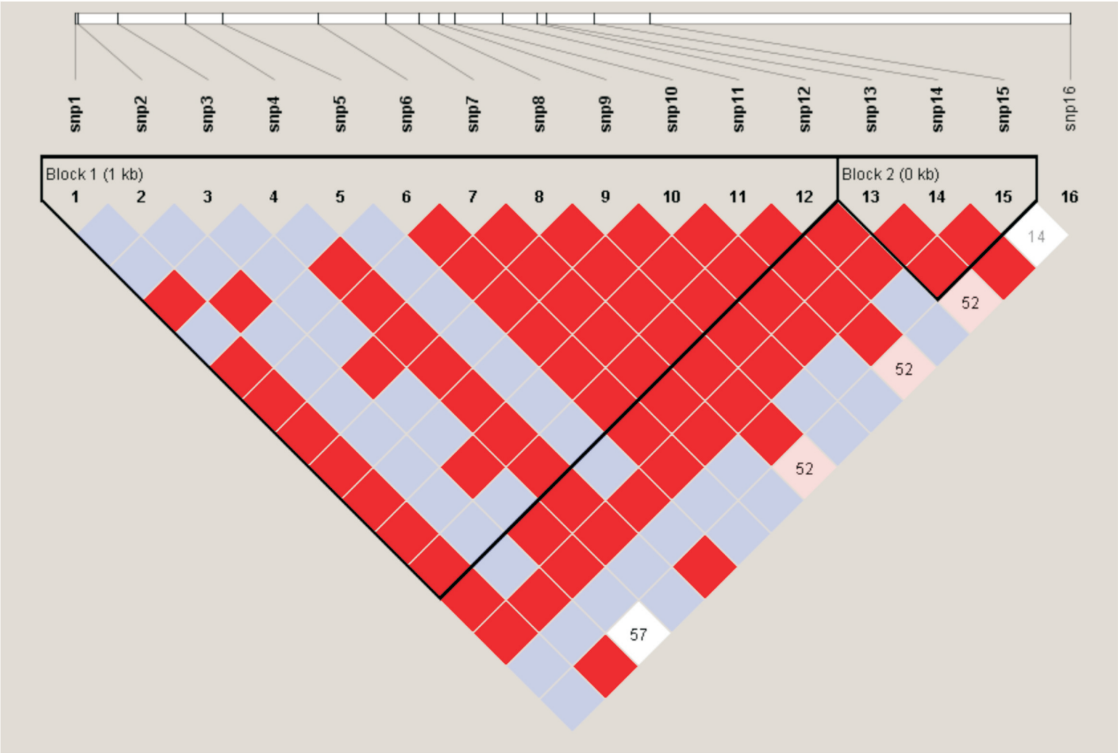


图 1 16 个 SNPs 连锁不平衡关系

2.3 藏鸡群体遗传多样性分析

以单次扩增 DNA 片段、涵盖 COX1 和 COX2 基因突变碱基的 1 782 bp 序列为研究对象。在 50 只山南藏鸡群体中共检测到 15 个 SNPs,其中, P_i 为 0.002 3, K 为 4.11, 共形成 6 个单倍型, H_d 为 0.69。对 25 只边境县收集藏鸡分析发

现, P_i 为 0.002 8, K 为 4.99, 共形成 5 个单倍型, H_d 为 0.71, 有效信息含量高于山南市保种藏鸡群体。结果表明(表 3), 收集藏鸡的遗传多样性丰富, 资源价值较高, 可以有效补充和提升保种藏鸡群体规模和质量。

表 3 山南市藏鸡 COX1 和 COX2 基因序列遗传多样性分析

群体	有效位点	P_i	K	单倍型数量	H_d	sd
搜集藏鸡	13	0.002 8	4.99	5	0.71	0.060
保种场藏鸡	7	0.001 4	2.53	4	0.60	0.088
藏鸡	15	0.002 3	4.11	6	0.69	0.059

2.4 藏鸡与红色原鸡系统发育分析

根据下载红色原鸡 4 个亚种线粒体基因组全序列, 结合 50 只藏鸡线粒体 1 782 bp, 包含 COX 基因家族的 DNA 序列, 比对后构建系统发生树(图 2)。结果显示: 藏鸡群体中, Z4、Z7、Z8、Z12、Z14、Z22、Z23、Z24 单独聚为一支, 与其他藏鸡及红色原鸡亚种具有相对较远的遗传关系, 其他藏鸡与红色原鸡亚种之间表现出既相互独立又相互交叉的进化关系。具体表现在红色原鸡亚种(GGS3、GGJ1)与藏鸡 Z21、Z17 等单独聚类, 红色原鸡亚种(GGS2、GGM4、GGS4)与藏鸡 Z18、Z10 等单独聚类, 红色原鸡亚种(GGS3、

GGS9、GGS5、GGS6、GGS10)与藏鸡 B12、B13 等单独聚类, 红色原鸡亚种(GGJ12)与藏鸡 Z13 等单独聚类, 红色原鸡亚种(GGM2)与藏鸡 Z2、Z20、Z25 等单独聚类。

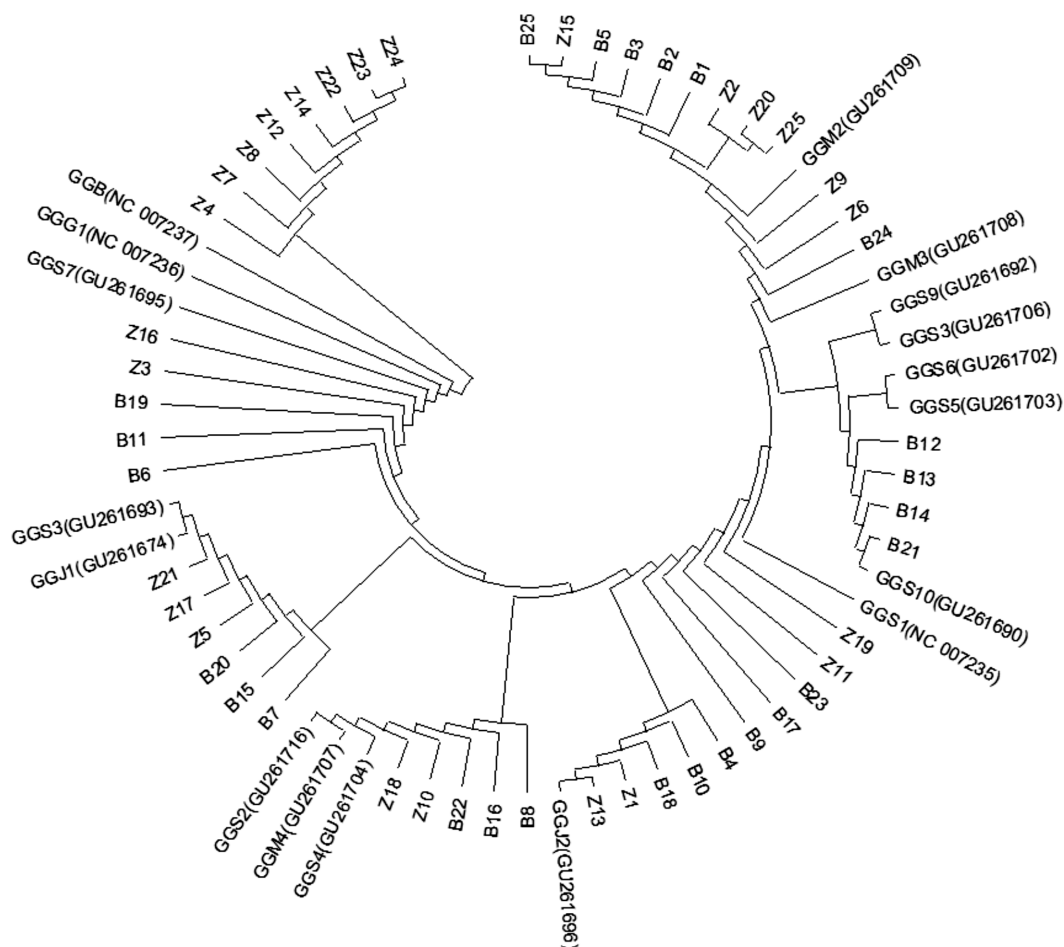
3 讨论与结论

3.1 讨论

本研究通过对山南藏鸡 COX 基因家族碱基突变的筛查, 在编码区中共发现了 12 个 SNPs, 据 Bao 等^[11]报道, 在藏鸡等 5 个群体 COX 基因家族中共鉴定了 14 个 SNPs, 其中, 位于 7 022、7 364、8 079、8 141、8 444、8 473、10 081 位点

SNPs 与本研究发现结果一致。8 079 和 8 473 位点 SNPs 均为非同义突变,其余均为非同义突变。由于线粒体中密码子规则与核染色体密码子规则有所区别,有 2 个 SNPs 造成 COX 基因

家族的苯丙氨酸(F)突变成亮氨酸(L),异亮氨酸(I)突变成苏氨酸(T),其改变是否涉及氧化磷酸化调控过程的影响,还需要进一步研究。



注: GGS 表示滇南亚种; GGJ 表示海南亚种; GGG 表示指名亚种; GGB 表示印尼亚种; GGM 表示印度亚种; Z 类表示搜集藏鸡; B 类表示保种场藏鸡。

图 2 基于部分 COX 基因家族序列构建的 NJ 系统发生树

Sun 等^[10]在 125 只甘孜州藏鸡 COX3 中,检测到 8 个 SNPs,10 081 位点 SNPs 与本研究发现结果一致。Bao 等^[11]和 Sun 等^[10]报道结果显示,10 081 位点 SNP 在藏鸡与低海拔内地地方鸡之间的多态频率分布存在显著差异。虽然同义突变不改变编码序列,不能排除其通过间接参与,包括 mRNA 二级结构、mRNA 稳定性与转运、可变剪切、密码子使用频率等,在藏鸡高原适应中扮演特定功能。

本研究以山南市边境县农户家中购买的藏鸡和保种场藏鸡为研究素材,针对包含 COX1 和 COX2 基因的 1 782 bp DNA 片段,分别计算搜集藏鸡和保种场藏鸡的 P_i 、 K 、 H_d ,结果反映出

搜集藏鸡的遗传多样性高于保种场藏鸡,暗示仍有部分山南市藏鸡的遗传变异未能纳入到保种场得到科学保护。此次藏鸡资源的搜集,将有效补充和提升保种藏鸡群体规模和质量,建议后续还要加强藏鸡资源的搜集和保护。

藏鸡外貌和性质与红色丛林鸡非常相似,具有体型小、好斗、觅食能力突出等特点^[12],为了探究其红色原鸡亚种与进化的关系,我们认为基于包括 COX1 和 COX2 基因 1 782bp 序列分析,藏鸡与大部分红色原鸡亚种之间表现出既相互独立又相互交叉的进化关系。藏鸡形成过程中,几个亚种都参与了遗传贡献,基本与前期报道结果相符^[13]。然而,本研究也发现有一支藏鸡单独聚

类,我们认为这些藏鸡还保留着古老的遗传信息,与红色原鸡亚种存在明显遗传分化的关系。

3.2 结论

本研究以山南市搜集的 25 只藏鸡和保种场 25 只藏鸡为研究素材,通过对包含部分 COX 基因家族 1 782 bp DNA 片段遗传多样性进行分析,结果显示:50 只山南藏鸡的核苷酸多样性(Pi)为 0.002 3,核苷酸平均差异数(K)为 4.11,单倍型多样性(Hd)为 0.69。边境县收集藏鸡遗传信息高于保种藏鸡群体,表明了搜集藏鸡的资源价值,能有效补充和提升保种藏鸡群体的规模和质量。

参考文献:

- [1] LI M, ZHAO C J. Study on Tibetan chicken embryonic adaptability to chronic hypoxia by revealing differential gene expression in heart tissue [J]. Science in China Series C: Life Sciences, 2009, 52(3): 284-295.
- [2] 李威娜,郭美慧,温锦添,等. 基于线粒体 DNA D-loop 全序列的麒麟鸡遗传多样性研究 [J]. 广东农业科学, 2023, 50(4): 100-107.
- [3] 陈基,王水兴,孔佰祥,等. 崇仁麻鸡 mtDNA D-loop 区遗传结构与遗传多样性分析 [J]. 中国家禽, 2023, 45(12): 108-112.
- [4] OSMAN S A, YONEZAWA T, NISHIBORI M. Origin and genetic diversity of egyptian native chickens based on complete sequence of mitochondrial DNA D-Loop region 1 [J]. Poultry Science, 2016, 95(6): 1248-1256.
- [5] 黄勋和,陈洁波,何丹林,等. DNA 条形码技术鉴定中国地方鸡品种的重新评估 [J]. 中国农业科学, 2016, 49(13): 2622-2633.
- [6] 贾晓旭,陈皖强,唐修君,等. 江西地方鸡品种线粒体 DNAND6 基因的遗传多样性 [J]. 农业生物技术学报, 2023, 31(10): 2132-2139.
- [7] SCOTT G R, SCHULTE P M, EGGINTON S, et al. Molecular evolution of cytochrome C oxidase underlies high-altitude adaptation in the bar-headed goose [J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(1): 351-363.
- [8] KADENBACH B. Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2003, 1604(2): 77-94.
- [9] RODRIGUES M S, MORELLI K A, JANSEN A M. Cytochrome c oxidase subunit 1 gene as a DNA barcode for discriminating trypanosoma cruzi DTUs and closely related species [J]. Parasites & Vectors, 2017, 10(1): 488.
- [10] SUN J, ZHONG H, CHEN S Y, et al. Association between MT-CO₃ haplotypes and high-altitude adaptation in Tibetan chicken [J]. Gene, 2013, 529(1): 131-137.
- [11] BAO H G, ZHAO C J, ZHANG L F, et al. Single-nucleotide polymorphisms of mitochondrially coded subunit genes of cytochrome C oxidase in five chicken breeds [J]. Mitochondrial DNA, 2008, 19(5): 461-464.
- [12] JIA X X, LU J X, TANG X J, et al. Characterization and phylogenetic evolution of mitochondrial genome in Tibetan chicken [J]. Animal Biotechnology, 2022, 33(6): 1371-1377.
- [13] 贾晓旭,陆俊贤,唐修君,等. 藏鸡线粒体基因组特征及系统发育进化 [J]. 农业生物技术学报, 2021, 29(2): 307-315.