

陶志云, 朱春红, 刘宏祥, 等. 鸭蛋质量相关遗传变异及功能基因筛选与鉴定[J]. 江苏农业学报, 2023, 39(2): 461-470.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.20223.02.019

鸭蛋质量相关遗传变异及功能基因筛选与鉴定

陶志云¹, 朱春红¹, 刘宏祥¹, 施祖灏², 章双杰¹, 徐文娟¹, 宋卫涛¹, 王志成¹, 李慧芳¹

(1. 江苏省家禽科学研究所, 江苏 扬州 225125; 2. 谱尼测试集团江苏有限公司, 江苏 苏州 215123)

摘要: 本研究根据金定鸭个体蛋质量情况, 选择 2 种极端表型, 分为高蛋白质量组 (WH) 和低蛋质量组 (WL)。基于混池全基因组重测序和选择清除分析技术筛选组间差异显著基因组区域内的单核苷酸多态性 (SNP) 位点及相关功能基因, 并通过单个样本重测序对筛选的蛋质量相关 SNP 进行验证, 分析各 SNP 位点不同基因型之间的蛋质量大小差异。研究发现, 在低蛋质量组和高蛋质量组获得的高质量 reads 数量分别为 194 115 424 和 228 089 084, 共定位到 SNP 差异显著区间 178 个, 共富集到受选择候选基因 40 个, 而且这些区间和基因均位于 Z 号染色体。鉴定出候选基因 *ARSB* 上 Z-22908831、Z-22966695 突变位点显著影响 300 d、450 d 蛋质量, *RORB* 上 Z-35251072、Z-35256947 突变位点显著影响 450 d 蛋质量, *RORB* 上 Z-35278196 突变位点显著影响 300 d、450 d 蛋质量, *RASEF* 上 Z-39588570 突变位点显著影响 450 d 蛋质量。本研究结果为通过分子育种技术提高蛋鸭产蛋性能选育提供了依据, 加快了选育进程。

关键词: 鸭; 蛋质量; 遗传变异; 功能基因

中图分类号: S834

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2023)02-0461-10

Screening and identification of genetic variation and functional genes related to egg weight in ducks

TAO Zhi-yun¹, ZHU Chun-hong¹, LIU Hong-xiang¹, SHI Zu-hao², ZHANG Shuang-jie¹, XU Wen-juan¹, SONG Wei-tao¹, WANG Zhi-cheng¹, LI Hui-fang¹

(1. Jiangsu Institute of Poultry Sciences, Yangzhou 225125, China; 2. Pony Testing Group Jiangsu Co., Ltd., Suzhou 215123, China)

Abstract: In the study, two extreme phenotypes of Jinding ducks were selected according to individual egg weight: a high-egg-weight group (WH) and a low-egg-weight group (WL). Single nucleotide polymorphism (SNP) sites and related functional genes that located in regions with significant genomic differences between the groups were screened based on mixed pool whole-genome re-sequencing and selective clearance analysis technology. The screened SNPs related to egg weight were verified by re-sequencing of each sample, and differences in egg weight between different genotypes of each SNP site were analyzed. Totals of 194 115 424 and 228 089 084 high-quality reads were obtained in the WL and WH groups, respectively. There were 178 significantly different SNP fragment regions, and 40 candidate genes were selected.

These intervals and genes were located on chromosome Z. Z-22908831 and Z-22966695 mutation sites in the candidate gene *ARSB* significantly affected the egg weight of 300-day-old and 450-day-old ducks. Z-35251072 and Z-35256947 mutation sites in *RORB* significantly affected the egg weight of 450-day-old ducks. Z-35278196 mutation site in *RORB* significantly affected the egg weight of 300-

收稿日期: 2022-06-14

基金项目: 畜禽种质资源精准鉴定项目——表型鉴定专题; 重大品种创制项目子课题 (PZCZ201736); 江苏省现代农业 (水禽) 产业技术体系建设项目 [JATS (2022) 404]

作者简介: 陶志云 (1979-), 女, 安徽滁州人, 博士, 副研究员, 主要从事家禽免疫及遗传育种研究。 (E-mail) zhiyun2@126.com

通讯作者: 李慧芳, (E-mail) 349019093@qq.com

day-old and 450-day-old ducks, and Z-39588570 mutation site in *RASEF* significantly affected the egg weight of 450-day-old ducks. These results provide a molecular basis for improving egg-laying performance and accelerating the breeding process in ducks.

Key words: duck; egg weight; genetic variation; functional gene

蛋鸭的产蛋性能,包括开产日龄、平均蛋质量、产蛋数、蛋品质等,是衡量其经济价值的主要指标^[1-2]。通过生物学方法,筛选影响蛋鸭产蛋性能的候选基因,将分子育种相关技术用于蛋鸭育种,是提高蛋鸭产蛋性能的有效手段^[1-2]。全基因组重测序技术是对基因组序列已知的个体进行全基因组测序,并在个体或群体水平上进行差异性分析的方法,可挖掘出大量的遗传变异位点^[3],进而对挖掘的变异位点进行定位和鉴定,发现影响性状的重要基因及其功能,从而阐释性状差异的原因^[4]。随着测序成本的不断降低,该技术已成为育种研究领域中最快捷、有效的方法之一,在畜禽育种研究中也得到了广泛应用^[5]。目前,利用全基因组重测序技术对鸡产蛋性能进行研究已获得较大进展^[6]。如, Liu 等^[7]发现 13 号染色体 *ODZ2* 基因上 1 个单核苷酸多态性(SNP)与开产日龄显著相关,7 号染色体 *GRB14* 基因上 1 个 SNP 与产蛋数相关; Shen 等^[8]发现 5 号染色体 *GARNLI* 基因上 5 个 SNP 与开产日龄相关。Fan 等^[9]发现 9 个与开产日龄及体质量显著相关的 SNP,4 个与产蛋数显著相关的 SNP,5 个与蛋质量相关的 SNP。全基因组重测序技术用于监测鸭产蛋性能的相关研究较少,在绍兴鸭中发现了 10 个与产蛋性能显著关联的 SNP,其中 4 个位于 2 号染色体的 SNP 与开产日龄相关,4 个位于 2 号染色体和 2 个位于 29 号染色体的 SNP 与 66 周龄产蛋数显著关联^[1]。蛋质量相关 SNP 的研究更是非常有限。本研究拟利用全基因组混池重测序和选择清除分析技术,分析蛋质量差异大的鸭群体,以期筛选、鉴定出鸭蛋质量相关差异基因组区域内的遗传变异位点和功能基因,为通过分子育种技术提高蛋鸭产蛋性能提供依据,加快育种进程。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验鸭为金定鸭,来源于国家家养动物种质资源库,共 500 只,按照蛋鸭饲养标准饲养,育成期结束后上笼饲养,在 299 d、300 d、301 d、449 d、450 d

和 451 d 时分别称量蛋质量,统计个体 300 d 和 450 d 的平均蛋质量。

1.2 个体选择和样品采集

根据个体 300 日龄时蛋质量情况分别选取蛋质量高、蛋质量低 2 种极端表型个体各 30 只,经统计,高蛋质量组(WH)的平均蛋质量为 (86.09 ± 2.22) g,低蛋质量组(WL)的平均蛋质量为 (64.43 ± 1.68) g,差异极显著($P < 0.01$)。分别采集 2 组个体的抗凝血,置于 -20°C 冰箱,用于 DNA 提取。

1.3 DNA 提取、文库构建及测序

基因组 DNA 的提取采用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法,提取后用 NanoDrop2000 分光光度计检测其纯度和质量浓度。采用 NEB 建库试剂盒进行建库,再用仪器 qPCR-ABI7500、Agilent2100 对文库进行定量和检测。库检合格后,在 Hiseq X10 PE150 平台进行双末端(PE)测序。最后去除片段低于 10 bp 的低质量 reads 以及一些接头被污染的 reads,获得 clean reads。

1.4 序列比对、基因变异的检测

利用比对软件 BWA 将获得的 clean reads 数据比对到参考基因组,利用软件 Picard 对结果进行排序并标记重复序列。用 Samtools 软件将比对结果转换成 Mpileup 格式,转换过程中,将碱基质量值小于 20 和质量值小于 20 的碱基去除。转换成 Mpileup 格式后,为避免插入/缺失(InDel)引起的 SNP 簇对计算结果的影响,将 InDel 及 InDel 附近 5 bp 内的变异位点去除。

1.5 选择清除分析

基于过滤后的 Mpileup 文件,使用 Popoolation 软件计算单个混池内的 π 值,将 2 个池的 π 值相除,获得 π -ratio 指标(π Ratio)。将 2 个混池的 Mpileup 格式转换为 Sync 格式(Popoolation2 专用格式)后,用 Popoolation2 软件进行混池间的固定指数(F_{st})计算。

1.6 SNP 准确性检验

基于 Illumina X-10 测序平台对筛选获得的遗传变异进行单样本的个体测序验证。在差异显著的基

因组区间内随机选择 12 个差异显著的 SNP,扩增出 2 个混池中 60 个个体的目标位点片段,统计每个个体 12 个位点的基因分型情况。

1.7 不同基因型鸭蛋质量差异分析

采用 SPSS20.0 软件对在 WH、WL 组间基因组差异显著区域内随机选择的 12 个多态位点基因型鸭 300 d、450 d 时蛋质量进行 One-way ANOVA 分析,比较各位点不同基因型间的蛋质量差异。

2 结果与分析

2.1 测序结果概述

2.1.1 全基因重测序和组装 表 1 显示,WL、WH 2 个混池得到的 reads 数分别为 195 579 134 和 229 696 180,过滤后得到的高质量 reads 数分别为 194 115 424和228 089 084,过滤率均超过 99%。2 个池比对到基因组上的 reads 数分别为186 063 404和218 730 593,比对率超过 95%,2 个池分别产生 6 652 356个和6 731 941个 SNP。

表 1 鸭蛋质量相关全基因重测序和组装

Table 1 Whole-genome re-sequencing and assembly related to duck egg weight

项目	低蛋质量组	高蛋质量组
总碱基数	29 336 870 100	34 454 427 000
GC(%)	43.14	42.96
Q30(%)	94.19	94.30
原始测序 reads 数	195 579 134	229 696 180
过滤后 reads 数	194 115 424	228 089 084
过滤率(%)	99.25	99.30
比对上的 reads 数	186 063 404	218 730 593
比对率(%)	95.85	95.90
测序深度	24.73	29.04
SNP 总数	6 652 356	6 731 941
纯合子数	542 210	6 214 253
杂合子数	517 688	6 109 046

GC(%)表示在 DNA 4 种碱基中,鸟嘌呤和胞嘧啶所占的比率;Q30(%)表示质量值≥30 的碱基所占的百分比;SNP 表示单核苷酸多态性。

2.1.2 SNP 在基因组中的分布 表 2 显示,在 WH 和 WL 中均获得了大量的 SNP,其中在外显子区的 SNP 数量分别为 124 776 和 123 833,内含子区的 SNP 数量分别为3 431 865和3 394 802。

2.1.3 SNP 编码信息统计 对 WH 和 WL 的鸭进行

DNA 测序,统计分析比对后获得的 SNP 编码信息情况,结果(表 3)表明,2 组获得的非同义突变数分别为29 237 和 29 089,同义突变数分别为 87 178 和 86 418。

表 2 高蛋质量组和低蛋质量组有效 SNP 在基因组分布的数量统计

Table 2 Genomic distribution of effective single nucleotide polymorphism (SNP) number in high and low egg weight group of ducks

基因组位置	SNP 数量	
	高蛋质量组	低蛋质量组
转录终止位点下游 1 kb 以内	83 423	82 497
外显子区	124 776	123 833
某些转录本的外显子区,另一些转录本的可变剪切区	31	28
基因间	2 812 083	2 774 644
内含子区	3 431 865	3 394 802
可变剪切位点 2 bp 以内	276	275
转录起始位点上游 1 kb 区域内	85 913	85 005
某些转录本的上游区,另一些转录本的下游区	7 949	7 803
3'UTR 区	135 385	133 694
5'UTR 区	50 132	49 670
某些转录本的 5'UTR 区,另一些转录本的 3'UTR 区	108	105

SNP 表示单核苷酸多态性;UTR:非翻译区。

表 3 鸭高蛋质量组和低蛋质量组 SNP 编码信息统计

Table 3 Statistics of SNP coding information in high and low egg weight group of ducks

突变类型	SNP 数量	
	高蛋质量组	低蛋质量组
非同义突变	29 237	29 089
终止密码子获得	203	193
终止密码子缺失	38	40
同义突变	87 178	86 418
未知功能	8 151	8 121

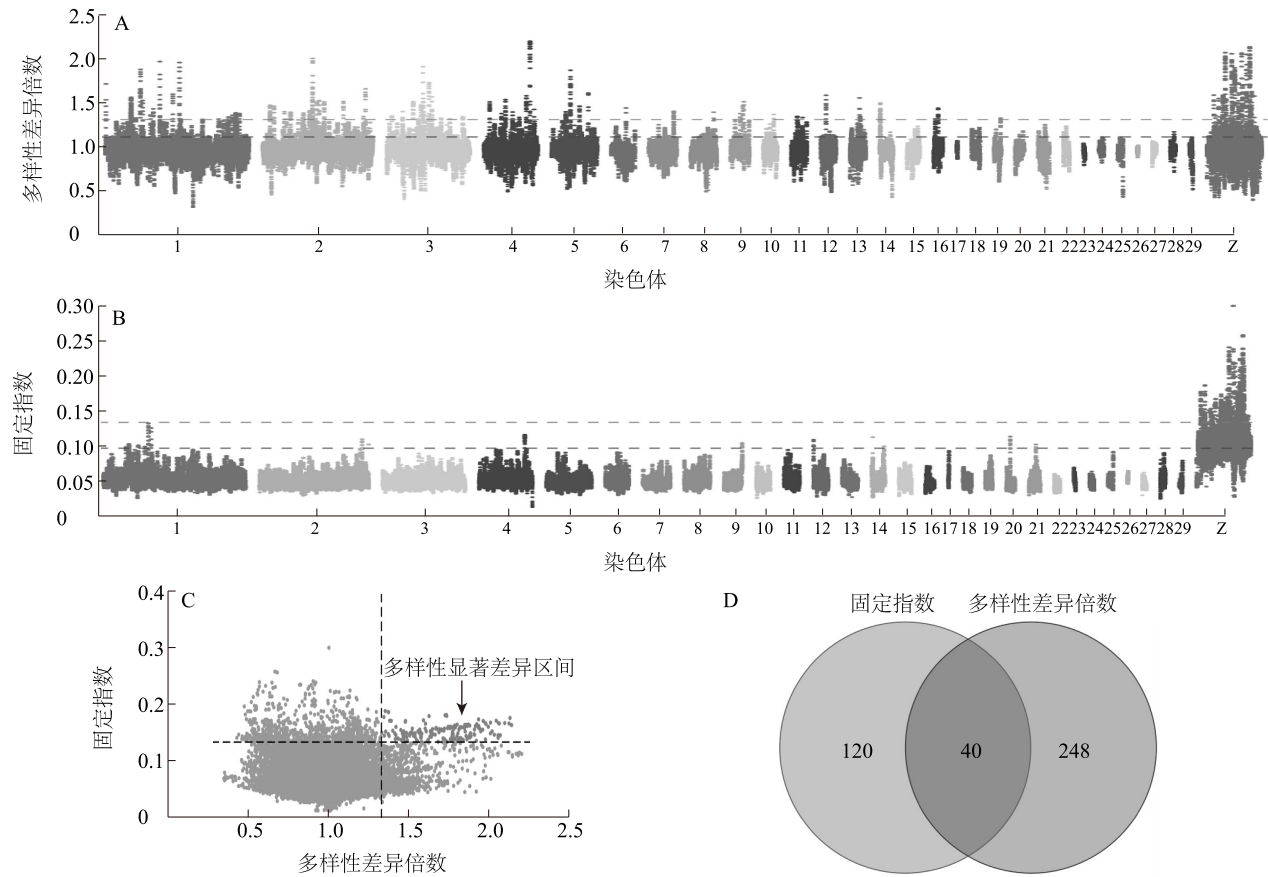
SNP 表示单核苷酸多态性。

2.2 鸭高蛋质量组和低蛋质量组的选择清除分析

通过群体多样性差异指标分析 WL 和 WH 2 个群体 SNP 在染色体上的多样性差异情况,2 个群体多样性差异主要分布在 1 号、2 号、3 号、4 号、5 号及 Z 号染色体(图 1A)。由 WL 和 WH 2 个群体固定指数值分布的曼哈顿图(图 1B)可知,2 个群体遗传分化相对严重的区域集中位于 Z 号染色体。

结合固定指数、多样性差异倍数的结果,各自按 0.01 水平筛选显著区域,交集部分为可靠的候选区间,共定位到 178 个 SNP 显著差异区间(图 1C),这些区间均位于 Z 号染色体,对 2 个指标筛选出的显

著区间,提取出各自区间的基因,并用韦恩图将 2 个区间基因的交集和并集情况进行展示,共富集到 40 个受选择候选基因(图 1D)。



A:群体多样性差异倍数分布图;B:固定指数分布图;C:由固定指数和群体多样性差异倍数确定的选择信号示意图;D:由固定指数和群体多样性差异倍数确定的受选择基因 Venn 图。

图 1 鸭高蛋白质量组和低蛋质量组选择清除分析

Fig.1 Selective clearance analysis of high-egg-weight group and low-egg-weight group of ducks

2.3 鸭高蛋白质量组和低蛋质量组的受选择基因

通过 F_{st} 和 π -Ratio 指标确定的 40 个受选择基因情况见表 4,其中包括与跨膜转运、物质转运和代谢相关的 *Slc49a3*、*TRPM6*、*Sema4d*、*RASEF*;与发育相关的 *NIPBL*、*ZFAND5* 等,有多个基因功能未知。

2.4 测序结果准确性验证

使用 Illumina X-10 测序平台对 60 个样本 12 个 SNP 位点进行单样本的个体重测序,以验证等位基因频率准确性,结果(表 5)表明,全基因组混池重测序和单个样本重测序所得等位基因频率的一致性为 0.833。

2.5 候选基因 GO 富集分析

将获得的差异基因向 GO 数据库的各条目映射,计算每个条目的基因数并分类统计,图 2 显示,在 0.01 水平,这些差异基因在生物过程、细胞组分、分子功能中均有涉及。在生物过程方面,以细胞过程、单生物体过程、生物过程调节、生物调节、代谢过程几个条目中涉及基因较多,数量分别为 14、13、12、12、11;在细胞组分方面,以细胞器、细胞、细胞部分几个条目中涉及基因较多,数量分别为 12、11、11;在分子功能方面,以结合、催化活性 2 个条目中涉及基因较多,数量分别为 14 和 4。

表 4 鸭高蛋白质量组和低蛋质量组的受选择基因情况

Table 4 List of selected genes in high-egg-weight group and low-egg-weight group of ducks

序列号	基因	基因描述	基因功能
ncbi_101794138	<i>Slc49a3</i>	溶质载体家族 49 成员 3	激活跨膜转运蛋白活性
ncbi_106015943	<i>GADD45G</i>	生长停滞和 DNA 损伤可诱导蛋白 γ	DNA 损伤修复
ncbi_113840083	<i>CZH9orf40</i>	染色体 Z 上 9 号染色体开放阅读框 40 同源物	未知
ncbi_113840207 ncbi_101800294 ncbi_110351192	<i>TRPM6</i>	转化受体电位阳离子通道亚家族 M 成员	维持稳态,在上皮镁转运及肠道、肾脏镁的主动吸收中具有重要作用
ncbi_101803536	<i>LHFPL2</i>	脂肪瘤高迁移率蛋白 IC 融合辅基样 2	未知
ncbi_113840112	<i>NMRK1</i>	烟酰胺核糖激酶 1	与尿镁钙排泄相关
ncbi_101791347	<i>Gda</i>	鸟嘌呤脱氨酶	催化鸟嘌呤转变为黄嘌呤
ncbi_113840380	<i>LOC113840380</i>	未知	未知
ncbi_101789567	<i>DDX58</i>	DEXD/H 盒解旋酶 58	RNA 识别
ncbi_101791527	<i>ABHD17B</i>	含 α/β 水解酶结构域蛋白 17B	参与蛋白质去棕榈酰化
ncbi_101793841	<i>CHRNA7</i>	神经元乙酰胆碱受体亚单位 α -7	启动乙酰胆碱门控阳离子选择性通道
ncbi_113840379	<i>LOC113840379</i>	未知	未知
ncbi_101796218	<i>LPL</i>	脂蛋白脂肪酶	具有甘油三酯水解酶和受体介导的脂蛋白摄取的配体/桥接因子的双重功能
ncbi_101789751	<i>ACO1</i>	乌头酸酶 1	三羧酸循环中重要的酶,控制细胞内铁水平
ncbi_113840274	<i>LOC113840274</i>	未知	未知
ncbi_101802407	<i>Bhmt</i>	甜菜碱-同型半胱氨酸 S-甲基转移酶 1	催化甜菜碱和同型半胱氨酸转化为二甲基甘氨酸和蛋氨酸
ncbi_101802956	<i>NIPBL</i>	Nipped B 样蛋白质	发育调节
ncbi_113840221	<i>MAP1B</i>	微管相关蛋白 1B	参与微管组装,在神经系统的发育和功能中起重要作用;具有激活肌动蛋白结合、微管结合、磷脂结合活性的作用
ncbi_101802594	<i>DMGDH</i>	二甲基甘氨酸脱氢酶	催化二甲基甘氨酸氧化脱甲基形成肌氨酸
ncbi_101792601	<i>RORB</i>	维甲酸相关孤儿受体	DNA 结合蛋白,可参与器官发生和分化;参与调节昼夜节律有关基因的表达
ncbi_113840381	<i>LOC113840381</i>	未知	未知
ncbi_101792112	<i>Sema4d</i>	信号素 4D	参与磷脂腺苷醇 3-激酶信号的正向调节、传递神经元发育的调控、磷酸盐代谢过程等
ncbi_101796794	<i>CARNMT1</i>	肌肽 N-甲基转移酶 1	将骨骼肌中的肌肽转化为鹅肌肽
ncbi_101803543	<i>RASEF</i>	含 RAS 和 EF 域的蛋白质	调节膜转运,具有肿瘤抑制作用
ncbi_101804361	<i>FRMD3</i>	含四叶苜蓿形蛋白结构域蛋白 3	为一种单通道膜蛋白,主要存在于卵巢中,但其功能尚未确定
ncbi_113840376	<i>LOC113840376</i>	未知	未知
ncbi_113840269	<i>LOC113840269</i>	未知	未知
ncbi_113840227	<i>LOC113840227</i>	未知	未知
ncbi_101794806	<i>TPPP2</i>	促微管蛋白聚合蛋白家族成员 2	具有微管蛋白结合活性,位于细胞质中,参与鞭毛虫精子运动
ncbi_101796636	<i>PRR16</i>	富含脯氨酸 16	参与孔眼大小和翻译的正向调节
ncbi_101799698	<i>Diras2</i>	DIRAS 家族成员 2	未知
ncbi_101792614	<i>MAN2A1</i>	甘露糖苷酶 α 类 2A 成员 1	一种定位于高尔基体的糖基水解酶,在天冬酰胺连接的低聚糖(N-聚糖)成熟途径的最终水解步骤中发挥催化作用
ncbi_101795007	<i>LOC101795007</i>	脾酪氨酸蛋白激酶	未知
ncbi_101804376	<i>PCGF3</i>	多疏族环指蛋白 3	未知
ncbi_101802978	<i>ARSB</i>	芳基硫酸酯酶 B	水解 N-乙酰-D-半乳糖胺、硫酸软骨蛋白和硫酸皮肤素的硫酸盐基团
ncbi_110352029	<i>CZH9orf85</i>	染色体 Z 上 9 号染色体开放阅读框 C9orf85 同源物	未知
ncbi_101801981	<i>ZFAND5</i>	AN1 型锌指蛋白 5	与细胞生长、分化等过程有关
ncbi_101800485	<i>OSTF1</i>	破骨细胞刺激因子 1	间接诱导破骨细胞的形成和骨质吸收

表 5 鸭高质量组和低质量组全基因组混池重测序与单样本重测序等位基因频率一致性比较

Table 5 Comparison of consistency of allele frequency between whole genome mixed pool re-sequencing and single sample re-sequencing in high-egg-weight group and low-egg-weight group of ducks

突变位点	突变碱基	混池重测序		单样本重测序	
		低蛋质量组	高蛋质量组	低蛋质量组	高蛋质量组
Z-11910206	T	0.280	0.880	0.110	1.000
	C	0.720	0.120	0.890	0
Z-12017083	A	0.280	0.850	0.125	0.830
	C	0.720	0.150	0.875	0.170
Z-12017097	A	0.720	0.850	0	0.860
	G	0.280	0.150	1.000	0.140
Z-22908831	G	0.690	0.080	0.670	0.110
	A	0.310	0.920	0.330	0.890
Z-22966695	A	0.640	0.080	0.800	0.140
	G	0.360	0.920	0.200	0.860
Z-35251072	C	0.690	0.150	0.830	0
	T	0.310	0.850	0.170	1.000
Z-35256947	T	0.870	0.120	0.750	0
	C	0.130	0.880	0.250	1.000
Z-39588570	A	0.810	0.960	0.750	0.920
	G	0.190	0.040	0.250	0.080
Z-50789683	C	0.560	0.800	0.170	1.000
	T	0.440	0.200	0.830	0
Z-50817061	C	0.310	0.080	0.125	0.670
	T	0.690	0.920	0.875	0.330
Z-56163925	A	0.100	0.960	0.250	0.920
	T	0.900	0.040	0.750	0.080
Z-35278196	T	0.370	0.150	0.750	0
	C	0.730	0.850	0.250	1.000

2.6 候选基因 KEGG 分析

进行通路显著性富集分析,前 20 个显著富集的 KEGG 通路见图 3,其中代谢通路信号转导途径中富集的基因最多,甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢途径次之,富集到代谢通路的基因包括 *Gda*、*ACO1*、*Bhmt*、*DMGDH*、*MAN2A1*、*ARSB*。

2.7 12 个突变位点不同基因型鸭蛋质量差异分析

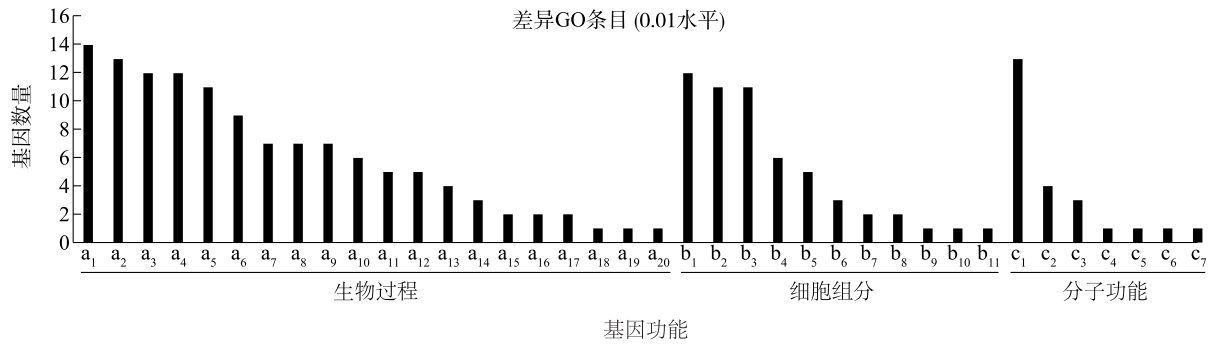
将筛选获得的 12 个突变位点不同基因型鸭个体蛋质量数据进行差异分析,结果(表 6)表明,*ARSB* 基因上突变位点 Z-22908831 的 G→A 的突变引起 300 d、450 d 蛋质量显著下降($P<0.05$);*ARSB* 基因上突变位点 Z-22966695 的 A→G 的突变和 *RORB*

基因上突变位点 Z-35278196 的 T→C 的突变引起鸭 300 d 和 450 d 蛋质量显著增加($P<0.05$);*RORB* 基因上突变位点 Z-35251072 的 C→T 突变以及 Z-35256947 的 T→C 的突变引起鸭 450 d 蛋质量显著增加;*RASEF* 基因上突变位点 Z-39588570 的 A→G 突变引起 450 d 蛋质量显著增加($P<0.05$)。

3 讨论

全基因组关联(GWAS)技术被广泛用于遗传变异的发现和新基因的挖掘,且取得了较大进展。本研究利用全基因组重测序技术对金定鸭 WL 和 WH 2 个不同蛋质量组进行混池重测序,获得的高质量 reads 数分别为 194 115 424 和 228 089 084,比对到基因组的比对率均高于 95%,获得的 SNP 数量分别为 6 652 356 和 6 731 941,说明本研究的测序质量较高,可用于后续差异分析。采用选择清除分析共定位到 SNP 差异显著的基因组区间为 178 个,受选择候选基因为 40 个,这些差异基因组区间和基因均位于 Z 号染色体,说明 Z 号染色体与鸭蛋质量密切相关。在受选择区间内选择 12 个突变位点进行个体测序验证,结果与全基因组混池重测序的一致性为 83.33%,说明全基因组混池结果可靠,可用于进一步数据分析。

有研究结果表明,影响蛋质量的因素很多,其中遗传因素是重要的影响因素之一^[10],蛋质量的遗传力较高,可达到 0.450~0.550^[11],山麻鸭的 300 日龄蛋质量遗传力高达 0.614^[12],因此,可通过选育改变蛋质量。蛋质量大小受到多个基因控制^[11],禽类中与蛋质量相关的基因有 *PRL*^[13]、*PRLR*^[14]、*GHR*^[15]、*GnIH*^[16]、*OVR*^[17]、*VIPR-1*^[18] 等。最近在鸡的研究中发现了一些新的候选基因,包括 *PRKAR2B*、*HMGA2*、*LEMD3*、*GRIPI*、*EHBP1*、*MAP3K7* 和 *MYH*^[19],在鸭的研究中也陆续发现一些新的与蛋质量相关的基因,如 *COLX*^[20]、*PNRC*^[21]、*CA2*^[22]。本研究在鸭蛋质量差异较大的 2 个群体中,发现 40 个与 300 d、450 d 蛋质量相关的受选择基因,主要包括参与跨膜转运的 *Slc49a3*、*RASEF*、*TRPM6*,参与 DNA 损伤修复的 *GADD45G*,尿镁钙排泄相关的 *NMRK1*,具有催化活性的 *Gda*、*Bhmt* 和 *DMGDH*,具有水解作用的 *MAN2A1*、*LPL*、*ARSB*,与发育调节相关的 *NIPBL*、*ZFAND5*,与微管蛋白结合活性相关的 *MAP1B*、*TP-PP2*,以及与昼夜节律相关的 *RORB* 等,这些基因均是在鸭上新发现的与蛋质量相关的候选基因。



a₁~a₂₀属于生物过程;b₁~b₁₁属于细胞组分;c₁~c₇属于分子功能。a₁:细胞过程;a₂:单生物体过程;a₃:生物过程调节;a₄:生物调节;a₅:代谢过程;a₆:对刺激的反应;a₇:信号;a₈:定位;a₉:多细胞生物过程;a₁₀:运动(力);a₁₁:生物过程的正调节;a₁₂:细胞成分组织或生物发生;a₁₃:发展过程;a₁₄:生物过程的负调节;a₁₅:生物黏附;a₁₆:多生物过程;a₁₇:免疫系统过程;a₁₈:生殖过程;a₁₉:生殖;a₂₀:发育;b₁:细胞器;b₂:细胞;b₃:细胞部分;b₄:细胞膜;b₅:细胞膜部分;b₆:高分子复合物;b₇:细胞器部分;b₈:细胞连结;b₉:膜封闭腔;b₁₀:突触部分;b₁₁:突触;c₁:结合;c₂:催化活性;c₃:分子传感器活性;c₄:转录因子活性、蛋白质结合;c₅:分子功能调节器;c₆:核酸结合转录因子活性;c₇:信号传感器活性。

图2 鸭高质量组和低蛋质量组差异基因富集分析 GO 聚类图(0.01 水平)

Fig.2 GO enrichment analysis of differential genes between high-egg-weight group ducks and low-egg-weight group ducks at 0.01 level

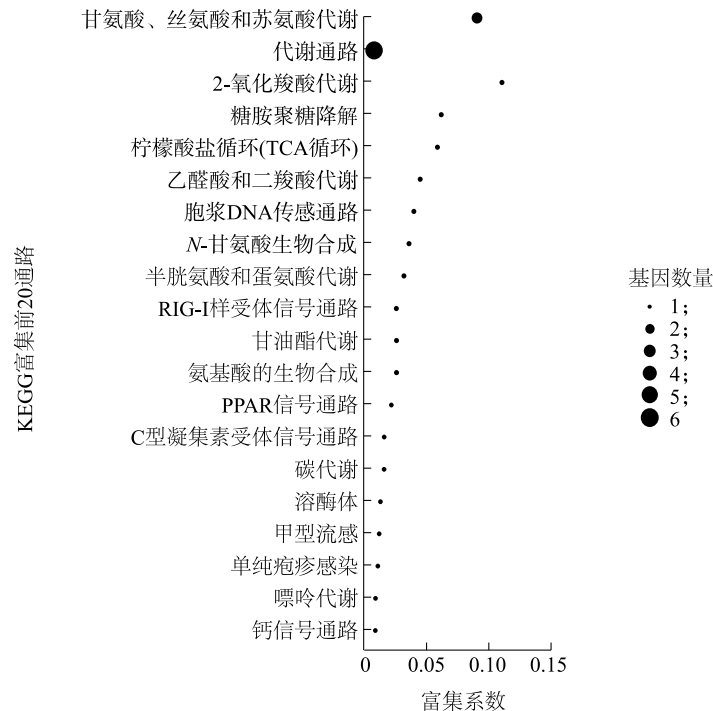


图3 鸭高质量组和低蛋质量组差异基因富集分析 KEGG 聚类图(0.01 水平)

Fig.3 KEGG enrichment analysis of differential genes between high-egg-weight group ducks and low-egg-weight group ducks at 0.01 level

对获得的受选择基因进行 GO 富集分析和 KEGG 分析,GO 分析结果表明,在生物进程分类中,受选择基因主要涉及单生物体过程、细胞过程、生物调节、生物过程调节;细胞组分分类中,受选择基因主要涉及细胞、细胞部分和细胞器;在分子功能分类

中,受选择基因主要涉及结合、催化活性。KEGG 分析结果表明,受选择基因以代谢通路信号途径中参与的基因最多,包括 *Gda*、*ACO1*、*Bhmt*、*DMGDH*、*MAN2A1* 和 *ARSB*,推测这些基因可能是通过参与物质代谢过程调节蛋质量大小。

表 6 各突变位点不同基因型鸭蛋质量差异分析

Table 6 Analysis of differences in egg weight of ducks with different genotypes at each mutation site

突变位点	基因	基因型	300 d 蛋质量 (g)	450 d 蛋质量 (g)
Z-11910206	NIPBL	T	75.81±8.77a	73.02±7.65a
		C	73.21±8.03a	71.13±5.57a
Z-12017083		A	75.81±8.77a	73.02±7.65a
		C	73.21±8.03a	71.13±5.57a
Z-12017097		A	75.81±8.77a	73.02±7.65a
		G	73.21±8.03a	71.13±5.57a
Z-35251072	RORB	C	72.35±8.99a	69.12±6.72a
		T	75.87±8.49a	73.87±7.10b
Z-35256947		T	71.98±9.76a	68.70±7.12a
		C	75.62±8.43a	73.55±7.07b
Z-35278196		T	71.45±8.95a	68.06±6.04a
		C	76.21±8.41b	74.20±7.02b
Z-22908831	ARSB	G	76.17±8.65b	74.06±8.57b
		A	71.57±7.96a	66.56±5.24a
Z-22966695		A	71.30±7.83a	68.99±5.73a
		G	76.55±8.54b	74.00±7.30b
Z-39588570	RASEF	A	71.98±9.76a	68.70±7.12a
		G	75.80±8.36a	73.55±7.07b
Z-50789683	PCGF3	C	76.25±8.92a	73.25±7.34a
		T	72.86±8.06a	71.70±7.24a
Z-50817061		C	72.38±7.23a	71.15±5.60a
		T	76.04±9.07a	73.32±7.68a
Z-56163925	MAN2A1	A	76.03±8.85a	73.00±7.44a
		T	74.18±6.22a	73.73±6.54a

同列数据后不同小写字母表示同一基因同一突变位点不同基因型间蛋质量差异显著 ($P < 0.05$)。

RORB 是一种孤儿核受体,与维甲酸、甲状腺激素受体相关,主要在大脑皮质、丘脑中表达,在视交叉上核、松果体和视网膜中也有表达,而且在松果体和视网膜中 mRNA 的丰度随昼夜节律振荡,在夜间达到峰值^[23]。*RORB*^{-/-}小鼠表现出鸭子般的步态、视网膜发育缺陷、雄性生育能力延迟等^[24]。小鼠 *RORB* 缺乏,还表现出昼夜节律异常^[25],研究结果表明,*RORs* 可被 *BMAL1*、*CLOCK* 和 *CRY1* 等几个时钟基因识别,从而调节昼夜节律^[26-29]。除此之外,*RORs* 还调节下游靶基因的节律表达,因此,*RORs* 可作为耦合昼夜节律振荡与各种生理过程的循环控制的中间产物,包括能量平衡、脂质代谢等^[30-31]。本研究发现,*RORB* 基因上 3 个位点突变显著影响 300 d 或 450 d 的鸭蛋质量,推测鸭 *RORB* 可能是通

过调控鸭昼夜节律基因的表达而影响其能量代谢过程,从而引起蛋质量的变化。

ARSB 的 2 个位点 Z-22908831、Z-22966695 突变显著影响 300 d、450 d 蛋质量。*ARSB* 是一种溶酶体酶,这种酶活性的缺乏会导致未降解底物的积累和溶酶体储存障碍,即粘多糖病 VI 型。已经发现 *ARSB* 的多个突变均与人的 VI 型粘多糖病相关^[32-34],尚未见 *ARSB* 在禽类中的相关报道,本研究首次发现 *ARSB* 的位点突变与蛋质量相关,提示鸭的 *ARSB* 基因可能通过影响机体代谢参与鸭产蛋过程。

RASEF (含 RAS 和 EF 域的蛋白质)属 Rab GT-Pase 蛋白家族成员,在 C 端区域包含 1 个 Rab GT-Pase 结构域,内部区域包含 1 个卷曲的线圈基序和 2 个 EF 结构域,它们对结合 N 端的钙离子非常重要^[35-36]。研究结果表明,*Rab45/RASEF* 可在人的心、肝、肺、肾脏、前列腺和睾丸等中检测到^[35],而且与结直肠癌^[37-38]、肺癌^[35]、葡萄膜黑色素瘤^[39]、乳腺癌^[40-42]等肿瘤相关,*RASEF* 在肿瘤中的作用机制可能是通过抑制肿瘤细胞的生长从而抑制肿瘤^[38-39]。本研究首次发现 *RASEF* 点突变与鸭蛋质量相关,但具体调节机制有待进一步挖掘。

4 结 论

本研究通过高通量混池重测序结合选择清除分析技术筛选鸭蛋高质量组、低质量组组间基因组差异显著区域内的 SNP 和功能基因,筛选到 178 个定位于 Z 号染色体与鸭蛋质量相关的 SNP 显著差异区间及 40 个受选择候选基因。KEGG 分析结果表明,这些受选择 SNP 位点和基因主要涉及代谢通路。通过比较 12 个突变位点不同基因型间鸭 300 d、450 d 蛋质量差异,鉴定出一些蛋质量相关候选突变位点及基因,这些基因可作为目标候选基因做进一步研究。本研究结果可为通过分子育种技术提高蛋鸭产蛋性能选育提供依据。

参考文献:

- [1] 王珍珍. 不同蛋鸭品种产蛋性能的比较分析及绍兴鸭产蛋性能的全基因组关联分析[D]. 金华:浙江师范大学,2020.
- [2] 刘 杰. 利用高通量测序技术挖掘影响鸡剩余采食量的遗传变异和功能基因[D]. 北京:中国农业科学院,2017.
- [3] BENTLEY D R. Whole-genome re-sequencing[J]. Current Opinion in Genetics & Development, 2006, 16(6):545-552.

- [4] 岳桂东,高 强,罗龙海,等.高通量测序技术在动植物研究领域中的应用[J].中国科学,2012,42(2):107-124.
- [5] 杨德智,侯冠斌,施力光,等.全基因组测序在畜禽中应用的研究进展[J].中国畜牧兽医,2021,48(9):3403-3414.
- [6] 杜彦丽,王 坤,葛长荣.鸡产蛋性能遗传因子的研究进展[J].中国畜牧杂志,2020,56(8):32-38.
- [7] LIU W B, LI D F, LIU J F, et al. A genome-wide SNP scan reveals novel loci for egg production and quality traits in white leghorn and brown-egg dwarf[J]. PLoS One, 2011, 6(12):e28600.
- [8] SHEN X, ZENG H, XIE L, et al. The *GTPase activating Rap/Ran GAP domain-like 1* gene is associated with chicken reproductive traits[J]. PLoS One, 2012, 7(4):e33851.
- [9] FAN Q C, WU P F, DAI G J, et al. Identification of 19 loci for reproductive traits in a local Chinese chicken by genome-wide study[J]. Genetics and Molecular Research, 2017, 16(1):1-8.
- [10] 张海林.蛋鸡蛋重的影响因素和控制措施[J].现代畜牧科技,2020(5):29-30.
- [11] 陆 本,译.蛋重的遗传[J].国外畜牧学(猪与禽),1992(4):38-39.
- [12] 林如龙.山麻鸭体重、产蛋量和蛋重的遗传参数研究[J].中国家禽,2016,38(11):62-64.
- [13] CHANG M T, CHENG Y S, HUANG M C. Association of prolactin haplotypes with reproductive traits in Tsaiya ducks[J]. Animal Reproduction Science, 2012, 135(1/4):91-96.
- [14] 李凤宁,徐桂云,张俊楠,等.广西麻鸡产蛋相关基因的 SNPs 检测及其与蛋用性能关联分析[J].中国畜牧杂志,2020,56(5):78-82.
- [15] 李丛艳.鸡 *PRL-R* 基因多态性与就巢和产蛋性状的关联研究[D].成都:四川农业大学,2009.
- [16] FENG X P, KUHNLEIN U, AGGREY S E, et al. Trait association of genetic markers in the growth hormone and the growth hormone receptor gene in a White Leghorn strain[J]. Poultry Science, 1997, 76(12):1770-1775.
- [17] 詹慧琴.鸡产蛋相关基因的 SNPs 检测及其与蛋用性能关系的研究[D].武汉:华中农业大学,2006.
- [18] PU Y J, WU Y, XU X J, et al. Association of *VIPR-1* gene polymorphisms and haplotypes with egg production in laying quails[J]. Journal of Zhejiang University-Science B (Biomedicine & Biotechnology), 2016, 17(8):591-596.
- [19] KHALTABADI FARAHANI A H, MOHAMMADI H, MORADI M H, et al. Identification of potential genomic regions for egg weight by a haplotype-based genome-wide association study using Bayesian methods[J]. British Poultry Science, 2020, 61(3):251-257.
- [20] CHANG M T, CHENG Y S, HUANG M C. A novel non-synonymous SNP of the *COLX* gene and its association with duck reproductive traits[J]. Molecular and Cellular Probes, 2012, 26(5):204-207.
- [21] CHANG M T, CHENG Y S, HUANG M C. A novel SNP of the *PNRC1* gene and its association with reproductive traits in Tsaiya ducks[J]. Theriogenology, 2012, 78(1):140-146.
- [22] CHANG M T, CHENG Y S, HUANG M C. Novel genetic markers of the carbonic anhydrase II gene associated with egg production and reproduction traits in Tsaiya ducks[J]. Reproduction in Domestic Animals, 2013, 48(1):98-104.
- [23] SCHAEEREN-WIEMERS N, ANDRE E, KAPFHAMMER J P, et al. The ExDression pattern of the orphan nuclear receptor ROR β in the developing and adult rat nervous system suggests a role in the processing of sensory information and in circadian rhythm[J]. European Journal of Neuroscience, 1997, 9(12):2687-2701.
- [24] ANDRÉ E, CONQUET F, STEINMAYR M, et al. Disruption of retinoid-related orphan receptor beta changes circadian behavior, causes retinal degeneration and leads to *vacillans* phenotype in mice[J].The EMBO Journal, 1998, 17(14):3867-3877.
- [25] MASANA M I, SUMAYA I C, BECKER-ANDRE M, et al. Behavioral characterization and modulation of circadian rhythms by light and melatonin in C3H/HeN mice homozygous for the ROR β knockout[J]. American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2007, 292(6):R2357-R2367.
- [26] GUILLAUMOND F, DARDENTE H, GIGUÈRE V, et al. Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors[J]. Journal of Biological Rhythms, 2005, 20(5):391-403.
- [27] KUMAKI Y, UKAI-TADENUMA M, UNO K D, et al. Analysis and synthesis of high-amplitude *Cis*-elements in the mammalian circadian clock[J]. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(39):14946-14951.
- [28] PREITNER N, DAMIOLA F, LOPEZ-MOLINA L, et al. The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator[J]. Cell, 2002, 110(2):251-260.
- [29] SATO T K, PANDA S, MIRAGLIA L J, et al. A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock[J]. Neuron, 2004, 43(4):527-537.
- [30] KANG H S, ANGERS M, BEAK J Y, et al. Gene expression profiling reveals a regulatory role for *ROR α* and *ROR γ* in phase I and phase II metabolism[J]. Physiological Genomics, 2007, 31(2):281-294.
- [31] JETTEN A M. Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism[J]. Nuclear Receptor Signaling, 2009, 7:e003.
- [32] UTTARILLI A, RANGANATH P, JAIN S J, et al. Novel mutations of the arylsulphatase B (*ARSB*) gene in Indian patients with mucopolysaccharidosis type VI[J]. Indian Journal of Medical Research, 2015, 142(4):414-425.
- [33] WANG P, MARGOLIS C, LIN G, et al. Mucopolysaccharidosis type VI in a great Dane caused by a nonsense mutation in the *ARSB* gene[J]. Veterinary Pathology, 2017, 55(2):286-293.
- [34] MALEKPOUR N, VAKILI R, HAMZEHLOIE T. Mutational analysis of *ARSB* gene in mucopolysaccharidosis type VI: identification

- of three novel mutations in Iranian patients[J]. Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 2018, 21(9): 950-956.
- [35] OSHITA H, NISHINO R, TAKANO A, et al. RASEF is a novel diagnostic biomarker and a therapeutic target for lung cancer[J]. Molecular Cancer Research, 2013, 11(8): 937-951.
- [36] MITRA S, FEDERICO L, ZHAO W, et al. *Rab25* acts as an oncogene in luminal B breast cancer and is causally associated with Snail driven EMT[J]. Oncotarget, 2016, 7(26): 40252-40265.
- [37] YU X, FANG Z, LI G, et al. High *RASEF* expression is associated with a significantly better prognosis in colorectal cancer[J]. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2018, 11(9): 4276-4282.
- [38] YU X, FANG Z, LI G, et al. High *RASEF* expression is associated with a significantly better prognosis in colorectal cancer[J]. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2018, 11(9): 4276-4282.
- [39] MAAT W, BEIBOER S H, JAGER M J, et al. Epigenetic regulation identifies *RASEF* as a tumor-suppressor gene in uveal melanoma[J]. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2008, 49(4): 1291-1298.
- [40] SHIBATA M, KANDA M, SHIMIZU D, et al. *RASEF* expression correlates with hormone receptor status in breast cancer[J]. Oncology Letters, 2018, 16(6): 7223-7230.
- [41] XIAO B, HANG J, LEI T, et al. Identification of key genes relevant to the prognosis of ER-positive and ER-negative breast cancer based on a prognostic prediction system[J]. Molecular Biology Reports, 2019, 46(2): 2111-2119.
- [42] CAI M J, LIANG X, SUN X, et al. Nuclear receptor coactivator 2 promotes human breast cancer cell growth by positively regulating the MAPK/ERK pathway[J]. Frontiers in Oncology, 2019, 9: 164.

(责任编辑:王 妮)