

王钱保,姜润深,黎寿丰,等.光照调控优质肉鸡性成熟的转录组分析[J].江苏农业科学,2022,50(3):16-21.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.03.003

光照调控优质肉鸡性成熟的转录组分析

王钱保¹,姜润深²,黎寿丰¹,黄华云¹,李春苗¹,黄正洋¹,郭兴²,赵振华¹

(1. 中国农业科学院家禽研究所,江苏扬州 225003;2. 安徽农业大学,安徽合肥 230000)

摘要:为探明不同光照模式调控下优质肉鸡性成熟的分子调控机制,以期为提高优质肉鸡生产性能提供理论依据。选用了 0 日龄 F 系母鸡,分别于 3 间密闭式鸡舍内设计不同类型的光照模式。12 周龄时每组各选取 3 羽采集下丘脑,利用 Illumina HiseqTm2000 进行高通量测序,通过生物信息学方法进行差异表达基因筛选及功能分析。结果表明,9 个样品均获得了 54×10^6 条以上的 reads,总碱基数约 6 Gb,共发掘新基因 684 个;对照组与试验组 T2 的基因差异表达较显著,其中,有 111 个基因上调表达、78 个基因下调表达;对照组和试验组 T1、T2 分别富集到 36、45 个显著 GO 条目,共发现 5 条显著 KEGG 信号通路,其中,富集较多的是信号传导、新陈代谢和细胞过程,均与优质肉鸡生长和性成熟发育相关。

关键词:优质肉鸡;光照;性成熟;转录组测序;信号传导;代谢

中图分类号:S831.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)03-0016-06

近年来,为分析密闭式鸡舍多环境因子对鸡生产性能的影响,专家们纷纷提出了基于鸡舍环境因子与生产性能相互影响的参数回归模型^[1],其中,对于光照因素影响鸡性成熟的研究成为时下热点。光周期的变化衍生不同的内在生物节律,两者同步性对鸡性成熟产生影响^[2-3]。有研究指出,随光照模式的正向适度增加,鸡群生长和性器官发育均正上升^[4]。潘栋研究表明,鸡体性成熟启动受光照时间和强度影响的同时,还与其是否符合鸡某一特定生长周期的昼夜生理节律相关^[5]。优质肉鸡的性成熟是一个体内多循环多通路协同合作的过程,目前对于参与触发性成熟启动的物质和相关机制仍处于不断完善之中,经验证可能有多种物质和信号通路参与其中^[6]。近年,随着鸡基因组测序的不断深化及高通量测序、分析技术快速发展,RNA-seq 分析优质肉鸡在不同光照模式下性成熟期差异

基因 mRNA 表达水平变化及其调控机制成为可能。因此,本研究在前期研究基础上^[7-8],拟通过 RNA-seq 技术方法,揭示光照对优质肉鸡性成熟的分子调控机理,从而改善优质肉鸡生产繁殖性能,全面推动优质肉鸡产业优化升级。

1 材料与方法

1.1 试验材料及分组

2019 年 4 月 2 日,挑选健康的来自江苏省家禽科学研究所自主培育的品系 F 系 0 日龄母鸡 540 羽,该品系群体生长整齐度高、性能优良。按每组 180 羽鸡随机分成 3 组(对照组 CK、试验组 T1 和 T2),放于江苏省家禽科学研究所邵伯基地试验禽场内的 3 间密闭式鸡舍地面平养。各组鸡均在同一饲养条件统一执行优质肉鸡营养需求和一般免疫程序,全期自由采食和饮水。

1.2 试验方法

3 组鸡试验在 0~84 日龄设计 3 种不同的光照模式,光照方案详见表 1。由表 1 可知,试验周期为 12 周。于 12 周龄末时,每组采集 3 羽平均体质量鸡下丘脑组织样本放入无酶冻存管,编号后迅速放入液氮中保存,用于提取组织 RNA 进行 RNA-Seq 分析。I 组样品编号为 CK-1、CK-2、CK-3,II 组样品编号为 T1-1、T1-2、T1-3,III 组样品编号为 T2-1、T2-2、T2-3。

收稿日期:2021-04-15

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项(编号:CARS-41-Z05);江苏省扬州市现代农业项目(编号:YZ2019040);江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(20)2012];江苏省家禽遗传育种重点实验室资助项目(编号:JQLAB-ZZ-202008);江苏省科技成果转化项目(编号:BA2019049)。

作者简介:王钱保(1987—),男,安徽池州人,硕士,副研究员,研究方向为家禽遗传育种。E-mail:wqb15855142436@163.com。

通信作者:赵振华,博士,副研究员,研究方向为家禽遗传育种。E-mail:zzh0514@163.com。

表 1 3 组优质肉鸡光照方案

日龄 (d)	光照方案[(光照度(lx)/光照时间(h)]		
	CK	T1	T2
0 ~ 3	20/24	20/24	20/24
4 ~ 7	10/23	10/23	10/23
7 ~ 21	10/16	10/16	10/16
22 ~ 84	10/16	10/15	10/14

1.3 转录组测序

1.3.1 RNA 样本制备 采用 Trizol 法分别提取 9 个样品的下丘脑组织 RNA, 分别采用 Nanodrop、Qubit2.0、Aglient 2100 方法检测 RNA 样品的纯度、浓度和完整性等, 以保证使用合格的样品进行转录组测序。通过常规试剂盒去除 rRNA, 将 mRNA 富集。进一步将富集得到的 mRNA 反转录形成双链 cDNA, 修复 cDNA 双末端后加上接头, PCR 扩增构建上机文库。

1.3.2 文库制备 通过带有 Oligo(dT) 的磁珠富集具有 polyA 尾巴的真核 mRNA 后, 采用超声波把 mRNA 打断, 以片段化的 mRNA 为模版, 随机寡核苷酸为引物, 在 M - MuLV 逆转录酶体系中合成 cDNA 第一条链, 随后用 RNaseH 降解 RNA 链, 并在 DNA polymerase I 体系下, 以 dNTPs 为原料合成 cDNA 第二条链。纯化后的双链 cDNA 经过末端修复, 加 A 尾并连接测序接头, 采用 AMPure XP beads 筛选 200 bp 左右的 cDNA, 进行 PCR 扩增并再次使用 AMPure XP beads 纯化 PCR 产物, 最终获得文库。

1.3.3 文库质检和 Illumina 测序 为保证测序质量利用琼脂糖凝胶电泳分析样品 RNA 完整性及是否存在 DNA 污染; 利用 Nano Photometer spectrophotometer 检测 RNA 纯度; 利用 Qubit2. 0 Fluorometer 进行 RNA 浓度精确定量利用 Agilent

2100 bioanalyzer 精确检测 RNA 完整性。为保证数据质量, 要在信息分析前对原始数据进行数据过滤, 过滤低质量数据以减少无效数据所带来的分析干扰^[9], 得到 clean reads。文库质检合格后, 交由基迪奥生物公司使用 HiSeq™ 2000 测序仪(Illumina) 进行转录组测序。

1.4 数据处理和统计分析

利用 DESeq 2 软件^[10]对基因表达水平进行分析, 得到 reads count 数据, 进行数据标准化(normalization), 根据模型进行假设检验概率(pvalue)计算, 最后进行多重假设检验校正, 得到 FDR 值(错误发现率), 最终得到组间的差异分析结果。使用 R 语言中的 goseq 包(12)将 mRNA 差异表达基因序列与 GO(gene ontology) 数据库进行比对分析, 获得 GO 功能注释; 将 mRNA 差异表达基因与 KEGG(kyotoencyclopedia of genes and genomes) 数据库进行 BLASTX 比对获得 mRNA 差异表达基因相对应的 Pathway 注释信息。

2 结果与分析

2.1 质控与数据总体分析

本研究对 3 组鸡下丘脑转录组测序, 由表 2 可知, 测序数据统计与序列比对分析结果, 9 个样品均获得了 54 × 10⁶ 条 reads 以上, 总碱基数 5 Gb 左右, Q20 在 98% 以上, Q30 在 95% 以上, 说明 RNA - seq 测序结果可靠, 可用于后续分析。样品比对到参考基因组上的 reads 均达总 reads 数约 90%, 比对率均较高。由表 3 可知, 与所选鸡的参考基因组序列比较, 共发掘新基因 684 个, 其中, 10 个基因得到功能注释。

表 2 3 组测序数据统计与序列比对分析

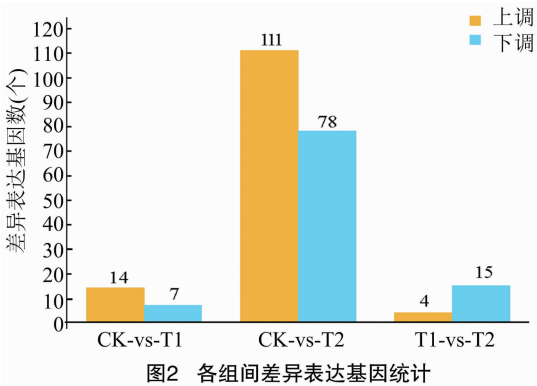
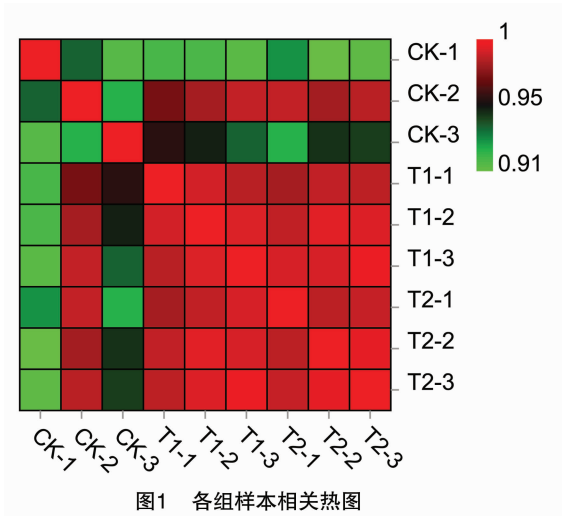
样品	总读段数 (× 10 ⁶)	总比对数 (%)	多次比对数 (%)	唯一比对数 (%)	总碱基数 (Gbp)	Q20 (%)	Q30 (%)
CK - 1	70. 82	91. 42	2. 04	89. 38	6. 81	98. 35	95. 28
CK - 2	74. 58	92. 58	1. 99	90. 59	7. 26	98. 45	95. 46
CK - 3	56. 83	90. 83	2. 16	88. 67	5. 51	98. 52	95. 69
T1 - 1	77. 14	92. 14	2. 06	90. 07	7. 56	98. 45	95. 50
T1 - 2	61. 81	92. 03	1. 99	90. 04	6. 03	98. 44	95. 46
T1 - 3	59. 03	92. 11	1. 97	90. 14	5. 75	98. 44	95. 45
T2 - 1	54. 15	92. 03	1. 86	90. 17	5. 25	98. 45	95. 50
T2 - 2	80. 13	91. 81	1. 99	89. 82	7. 78	98. 36	95. 28
T2 - 3	66. 81	91. 45	1. 99	89. 46	6. 45	98. 32	95. 15

表 3 3 组基因检测情况

样品	参考基因数 (个)	测序数(个)和占比率(%)	项目新基因数 (个)	测序基因数(个)和占比率(%)	总基因数 (个)
CK-1	17 464	15 690(89.84)	684	638(93.27)	18 148
CK-2	17 464	15 706(89.93)	684	642(93.86)	18 148
CK-3	17 464	15 421(88.30)	684	628(91.81)	18 148
T1-1	17 464	15 682(89.80)	684	625(91.37)	18 148
T1-2	17 464	15 627(89.48)	684	618(90.35)	18 148
T1-3	17 464	15 630(89.50)	684	624(91.23)	18 148
T2-1	17 464	15 434(88.38)	684	630(92.11)	18 148
T2-2	17 464	15 756(90.22)	684	639(93.42)	18 148
T2-3	17 464	15 607(89.37)	684	624(91.23)	18 148

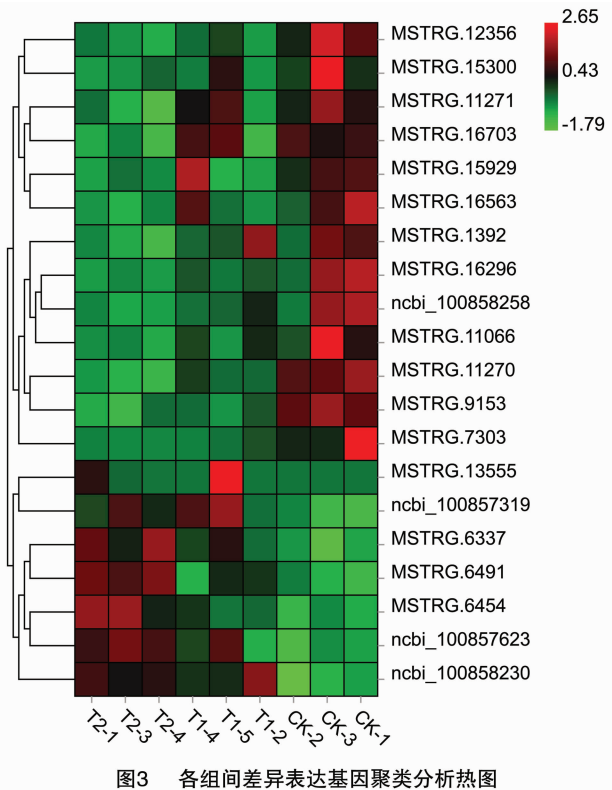
2.2 样本关系分析

使用皮尔逊相关系数对样品进行相关性分析,由图 1 可知,试验组组间 3 个生物学重复的决定系数(r^2)均大于 0.95,对照组组间的决定系数(r^2)均在 0.91 以上,表明样品组成相似性高,分析结果相关性较强。



2.3 差异基因整体分析

基于差异分析结果,筛选 $FDR < 0.05$ 且 $\log_2|FC| > 1$ 的基因为显著差异基因,由图 2 可知,各比较组显著差异基因整体统计,对照组与试验组 T1、T2 及试验组 T1 与 T2 间的 mRNA 显著差异表达基因数量均不超过 21 个,但对照组与试验组 T2 的 mRNA 显著差异表达基因数量超过 189 个,相比于对照组,试验 T2 组有 111 个基因上调表达,78 个基因下调表达。差异表达基因聚类分析结果见图 3。由图 3 可知,大多数基因聚集在同一大类上,提示这些差异表达的基因具有特定的功能相关性。



2.4 差异基因 GO 功能富集分析和 KEGG 信号通路富集分析

分别对 3 组鸡组织的上调差异基因、下调差异基因进行 GO 分析和 KEGG 信号通路富集分析,对对照组和试验组 T1、T2 分别富集到 36 个和 45 个显著 GO 条目。由图 4 可知,其中,富集较多的 GO 功能是正负调控的生物过程、信号传递、细胞分解过程、

新陈代谢过程、脂质代谢相关过程和免疫相关过程。其中,信号传导、机体新陈代谢及细胞过程在机体性成熟过程富集到了多个上调或下调基因,由表 4 可知,其中表达最为显著的有抑制性神经递质的褪黑素受体基因 (*MELR*)、兴奋性神经递质瘦素受体基因 (*Lepr*)、影响中枢神经系统中最主要的神经递质多巴胺受体基因 (*DRD*) 等。

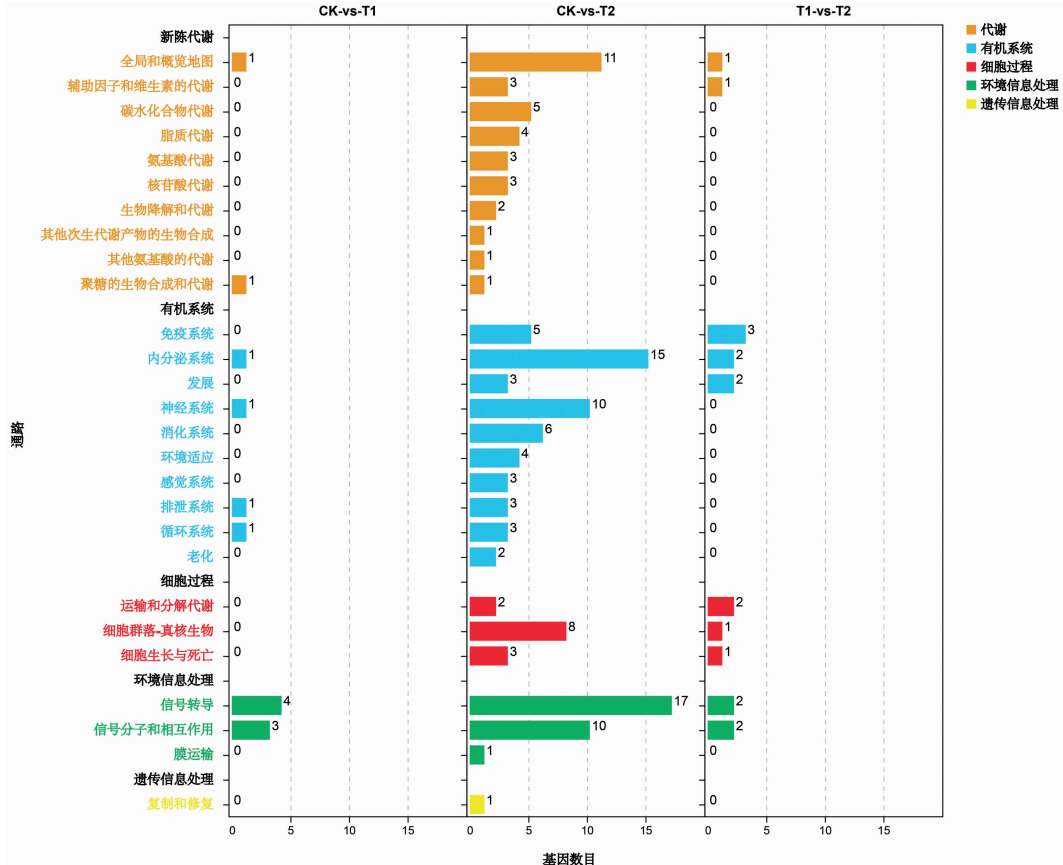


图4 各组间差异基因GO功能分类

表 4 优质肉鸡差异基因 GO 功能富集情况

GO 功能	上调基因	下调基因	P 值
信号传导	<i>Lepr</i> 、 <i>SLC6A13</i> 、 <i>ITIH2</i> 、 <i>TRPC5</i> 、 <i>SHISA3</i> 等	<i>MELR</i> 、 <i>COL2A1</i> 、 <i>SPP1</i> 、 <i>NPY</i> 、 <i>WYF1</i> 等	<0.01
新陈代谢	<i>IGFNI</i> 、 <i>SHISA3</i> 、 <i>KCNS3</i> 、 <i>TFAP2D</i> 、 <i>FZD10</i> 等	<i>DRD</i> 、 <i>SP9</i> 、 <i>NPO</i> 、 <i>P2RY2</i> 、 <i>MPO</i> 等	<0.01
细胞过程	<i>FBLN1</i> 、 <i>PRDM6</i> 、 <i>CAMKK1</i> 、 <i>EVX2</i> 、 <i>KCNK2</i>	<i>BEST2</i> 、 <i>DLX5</i> 、 <i>PAX6</i> 、 <i>RPRML</i> 、 <i>BLBI</i> 等	<0.01

由图 5 可知,KEGG 信号通路富集分析发现有 5 条显著富集的 KEGG 信号通路,分别为机体新陈代谢、组织代谢、细胞分解过程、内环境信息表达、基因表达过程通路。这些通路相互作用、相互影响,共同参与了机体的生长发育、性成熟等生命周期活动。

3 讨论

近年,转录组测序技术不断深化,家禽测序体

量和质量都有巨大提升^[11]。本研究测序获得的原始序列均超过 54×10^6 条,总碱基数 6 Gb 左右,Q20 碱基在 98% 以上,Q30 碱基在 95% 以上,测序数据质量较高。与所选鸡的参考基因组序列进行对比,共发掘新基因 684 个,其中,10 个基因得到功能注释。试验组组别间的 3 个生物学重复的决定系数 (r^2) 均大于 0.95,对照组组别间的决定系数 (r^2) 均在 0.91 以上,表明样品组成相似性高,后续分析结果相关性较强。

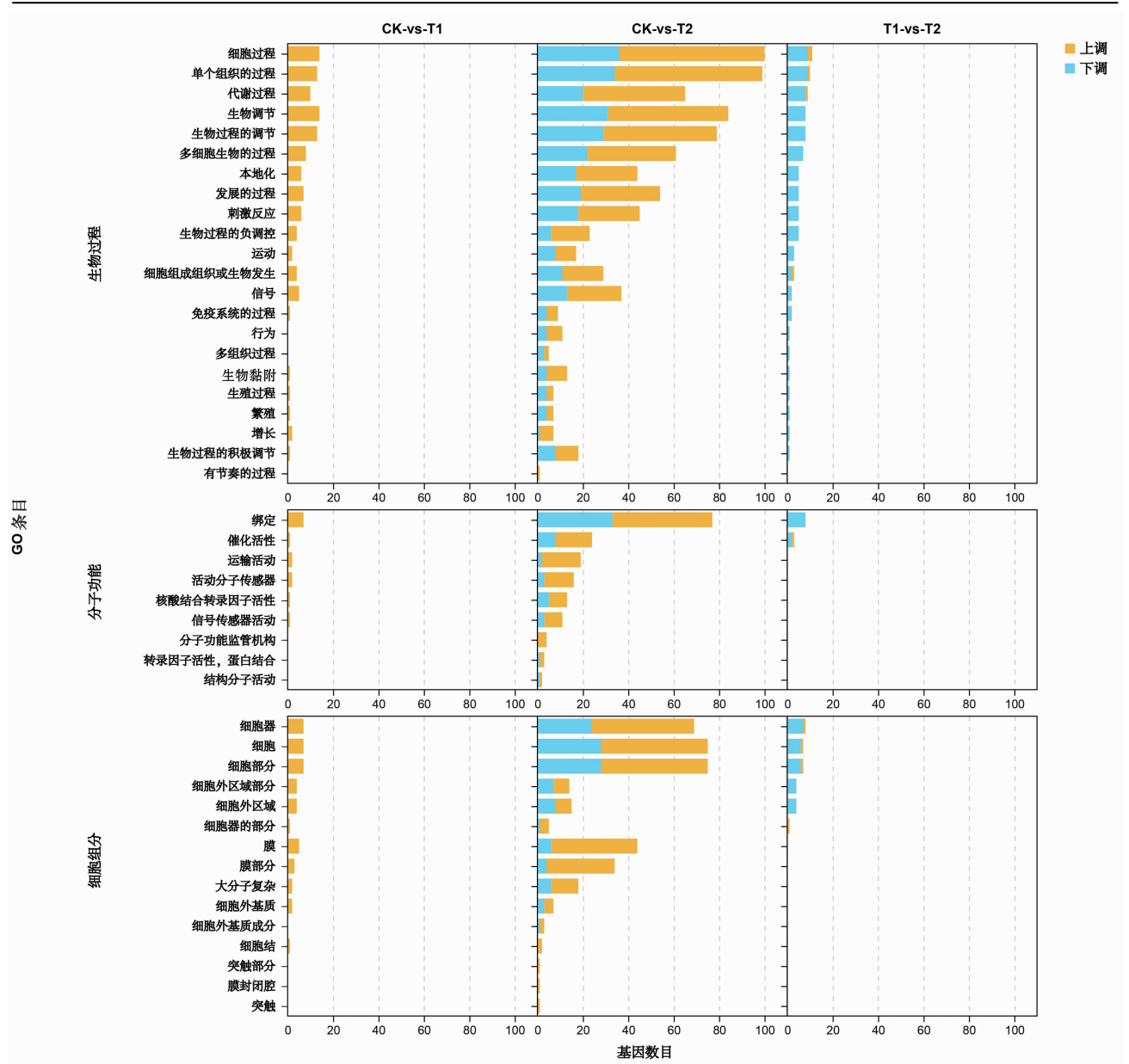


图5 各组间差异基因KEGG信号通路

光照作为调节家禽行为活动中性成熟的一项重要节律模式,其是通过视网膜双感受器共同感知以达到对光周期的控制,促进机体形成特定的生物节律,从而平稳有序地调控家禽性成熟活动^[12-13]。研究报道,家禽视网膜感受光照的刺激后,产生光信号经“视网膜-下丘脑神经束”传递至视交叉上核转化为神经冲动,此过程通过来自性腺轴调控的神经内分泌调节,引起家禽体内促黄体素(LH)和促卵泡素(FSH)等一批性腺激素产生变化,最后影响家禽的性成熟等行为活动^[14]。家禽生产中,养殖者重点关注光照变化致使优质肉鸡体质量和脂肪沉积等是否合格,而易忽视其对性腺发育的影响,现

有研究已经表明,优质肉鸡不同生长阶段的生理特点差异较大,对光照时间长短反应不同,须在不同的生长阶段采用不同的光照节律,否则便会引起优质肉鸡性早熟或开产延迟等情况。

本研究差异表达基因对比分析结果表明,对照组与试验组 T2 的 mRNA 显著差异表达基因数量超过 189 个,表明了对照组与试验组 T2 由于不同的光照模式影响,导致了机体的生长发育在基因层面差异较大。在表达差异最显著的基因中,与内外环境的节律调动过程和体内信号转导有关的基因表达最为活跃。近年来,有研究发现褪黑素在动物性成熟、激素分泌等过程中发挥着重要作用^[15]。褪黑素

作为一种内分泌胺类激素,其分泌受光照影响呈现出昼低夜高的节律性,能够抑制性激素分泌,如可以抑制 HPG 轴的水平,通过抑制促性腺激素释放激素(GnRH)的释放来调节机体的生殖功能,而下丘脑是促性腺激素释放激素(GnRH)分泌的整合单位,是促黄体生成素和促卵泡生成素适时释放的信号^[16]。此外作为抗性腺作用的主要靶器官,在性成熟过程中同样发挥着巨大作用^[17]。因此,在肉种鸡生产中,可以考虑通过补充外源性褪黑素适宜地延迟不同品种、不同育种目标肉种鸡性成熟时机,以达到最大化生产目的。瘦素作为影响家禽生殖系统的一个重要信号,待性器官发育到一定阶段后,在体内释放随后进入血液的含量不断增加,促进了促性腺激素的分泌,导致了性腺类固醇激素的持续上升,进而影响开启性成熟的启动周期^[18]。多巴胺通过兴奋多巴胺受体抑制垂体中血管活性肠肽(VIP)和催乳素(PRL)等多种相关激素的分泌,具有强烈抑制促性腺激素释放以及刺激促生长激素分泌的作用,从而对鸡的性成熟启动起到积极的调控作用^[19]。GO 和 KEGG 功能测序分析结果表明,3 组鸡富集到了多条显著 GO 条目,KEGG 信号通路富集分析提示,信号传递、新陈代谢和细胞过程等在机体性成熟过程中发挥了重要作用。量多而繁复的复杂通路多与机体生长发育、性成熟启动密切相关,连接通路的这些上调或下调基因和多种性腺激素相互协作、相互制约^[20],所产生的多种生理、药理反应可作用于鸡体内多个循环系统,其中,包括内分泌系统、免疫系统和神经系统,进而也会影响鸡的昼夜节律、性成熟启动以及生殖行为,呈现后续的一系列机体应答反应。

4 结论

优质肉鸡不同生长阶段的光照模式对其性成熟的影响较大,主要是通过上调或下调与信号传递和机体新陈代谢等信号通路相关基因的表达,从而影响优质肉鸡性成熟发育,最终实现生产性能的综合调控。

参考文献:

[1] 刘先旺,李华龙,李 森,等. 基于 CS 和 BP 的鸡舍环境与产蛋性能关系模型研究[J]. 江苏农业科学,2019,47(11):267-270.

[2] 杜惜明,刘 波,杨维太. 鸡脑催乳素免疫反应神经元的分布[J]. 中国兽医学报,1999,19(1):65-69.

[3] 柯玉山,沈霞芬,贾维珍,等. 鸡间脑及毗邻端脑区促黄体素释放激素样物质定位[J]. 中国兽医科技,1994,24(2):11-13.

[4] Robison F E. Effect of photo stimulatory light intensity on ovarian morphology and carcass trait at sexual maturity in modern and antique egg-type pullets[J]. Poultry Science,2001,80:47-56.

[5] 潘 栋. 光照周期对蛋鸡卵巢输卵管形态、生产性能及血液生化指标的影响[D]. 保定:河北农业大学,2008.

[6] 谢 亮,罗 婷,胡妍钰,等. 光照因素对褪黑素分泌及性早熟形成影响的研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘,2016,16(55):26-27.

[7] 王钱保,赵振华,黎寿丰,等. 肉鸡不同生长时期光照模式研究[J]. 家畜生态学报,2020,41(5):40-45.

[8] 王钱保,赵振华,黎寿丰,等. 光照对优质肉鸡性成熟启动前生长和性器官发育的影响[J]. 福建农林大学学报(自然科学版),2018,47(5):574-579.

[9] Chen S,Zhou Y,Chen Y,et al. fastp:an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor[J]. bioRxiv,2018:274100.

[10] Love M I,Huber W,Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. Genome Biology,2014,15(12):550.

[11] 刘天飞,罗成龙,王 艳,等. 基于简化基因组测序技术和基因芯片技术比较研究黄羽肉鸡基因组选择[J]. 畜牧兽医学报,2020,51(10):2378-2386.

[12] 陈思愚,钱近春,刘 畅. 代谢生物钟研究进展[J]. 生命科学,2015(11):1409-1417.

[13] 石 雷,李云雷,孙研研,等. 光照节律调控鸡繁殖性能机制研究进展[J]. 中国农业科学,2018,51(16):3191-3200.

[14] 陈耀星,王子旭,内藤顺平. 鸡投射视顶盖视网膜节细胞的形态学分类[J]. 解剖学报,2002,33(1):47-50.

[15] 白欣洁,刘莎莎,乔立东,等. 褪黑素在雄性动物繁殖中的功能[J]. 中国兽药杂志,2020,56(3):75-78.

[16] Roy D,Belsham D D. Melatonin receptor activation regulates *GnRH* gene expression and secretion in GT1-7GnRH neurons. Signal transduction mechanisms[J]. J Biol Chem,2002,277(1):251-258.

[17] Song Y,Poon A M,Lee E R,et al. Putative melatonin receptors in the male guinea pig kidney[J]. J Pineal Res,1993,15(3):153-160.

[18] Frisch,R.E,and R. Revelle. Height and weight at menarche and a hypothesis of critical body weights and adolescent events[J]. Science,1970,169(3943):397-399.

[19] Youngren O M,Pins G R,Phillips R E,et al. Dopaminergic control of prolactin secretion in the turkey[J]. Gen Comp Endocrinol,1996,104(2):225-230.

[20] 苑志宇,董杨云逸,李 锰,等. 不同光照周期对鸡睾酮合成的影响[J]. 中国畜牧杂志,2019,55(3):99-102.