

李永峰,王克华,窦套存,等. 蛋鸡资源群体的小肠质量全基因组关联分析[J]. 江苏农业科学,2022,50(22):165-170.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.22.024

蛋鸡资源群体的小肠质量全基因组关联分析

李永峰,王克华,窦套存,胡玉萍,郭 军,王星果,马 猛,曲 亮

(江苏省家禽科学研究所,江苏扬州 225125)

摘要:小肠是鸡重要的营养消化吸收器官,在蛋鸡生长和生产发挥重要作用,小肠质量是反映肠道发育情况的重要生理指标,有必要对其遗传结构进行研究。利用白来航鸡与东乡绿壳蛋鸡杂交构建 F_2 代资源群体,采用 600K 鸡 SNP 芯片对 F_2 代 1 512 羽个体进行基因型检测,通过 PLINK 软件对小肠质量性状进行全基因组关联分析(GWAS)。结果显示,十二指肠、空肠和回肠的遗传力分别为 0.32、0.28、0.26,说明小肠质量表现出中等遗传力水平。GWAS 共鉴定出 185、201、36 个 SNP 分别与十二指肠、空肠、回肠质量显著相关(共 422 个 SNP),其中,421 个 SNP 位于 1 号染色体 166.6~173.2 Mb 区域,说明该区域与小肠质量关系密切。共有 28 个 SNP 与 3 段小肠质量均显著相关,其中,6 个 SNP 位于对应 4 个候选基因(*FOXO1*、*CKAP2*、*CAB39L* 和 *MRPS31*)的内含子区,它们可能与小肠质量密切相关。通过 GWAS 分析,初步筛选出与蛋鸡小肠质量性状相关的 6 个 SNP 和 4 个候选基因,可为性状的遗传机制解析和分子育种提供理论依据。

关键词:蛋鸡;小肠质量;GWAS;遗传结构

中图分类号:S831.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)22-0165-06

饲料成本是蛋鸡饲养成本主要组成部分,通过提高饲料效率可有效降低饲养成本,优化饲料配方是提高饲料效率的重要手段。然而,随着生物技术的发展,基因选择成为一种更有效的方法^[1]。肠道发育是家禽饲料效率的重要影响因素之一,与消化酶的活性和营养吸收能力息息相关^[2]。肠道质量是反映肠道发育的重要指标。目前,关于鸡小肠质

量遗传背景的研究很少,有必要对其遗传结构进行解析。GWAS 通过对全基因组中的序列变异、表型和系谱信息进行关联分析,从而筛选出目标性状的调控基因或元件^[3]。与传统 QTL 定位作图方法相比,GWAS 检测变异的效果更好,定位的基因组区域更窄^[4]。在鸡的形态特征、生产性状、抗病等方面已有许多 GWAS 研究成果^[3],但与鸡小肠质量有关的 GWAS 研究鲜有报道。本研究选取 F_2 代资源群体母鸡 1 512 羽,采用 600K 鸡 SNP 芯片进行基因型检测和 GWAS 分析,以期对蛋鸡小肠质量性状的遗传机制解析提供参考,为分子育种提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 资源群体构建

由白来航(WL)纯系和东乡绿壳蛋鸡(DX)纯

Microbiology and Infectious Diseases,2008,33(1):1-14.

[12]Zhang M, Lv X, Wang B, et al. Development of a potential diagnostic monoclonal antibody against capsid spike protein VP27 of the novel goose astrovirus [J]. Poultry Science, 2022, 101(3):101680.

[13]Liu Y, Hao L, Li X, et al. Development and characterization of canine distemper virus monoclonal antibodies [J]. Monoclonal antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy, 2017, 36(3): 119-123.

[14]Huang X, Shi T, Mo K, et al. Monoclonal antibody against

premembrane viral protein of avian tembusu virus [J]. Monoclonal antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy, 2017, 36(2): 57-61.

[15]Jiang M, Guo J Q, Zhang G P, et al. Fine mapping of linear B cell epitopes on capsid protein of porcine circovirus 3 [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(14): 6223-6234.

[16]Xu Q R, Guo J Q, Ma F S, et al. A novel linear epitope at the C-terminal region of the classical swine fever virus E2 protein elicits neutralizing activity [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 189: 837-846.

系杂交生产 F_2 代资源群体,由图 1 可知,最终获得 F_2 代个体母鸡 1 893 羽,从中选择 1 534 羽用于 SNP

基因型检测。试验时间为 2012—2014 年,试验地点为江苏省家禽科学研究所扬州翔龙禽业有限公司。

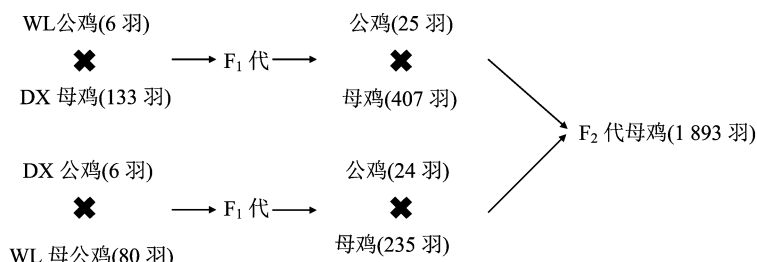


图1 资源群体构建

1.2 表型测定

屠宰 72 周龄 F_2 代鸡,收集十二指肠、空肠和回肠,挤压出内容物后称质量记录。使用 SAS 进行描述性统计分析,所有数据经正态转换后用于 GWAS 和遗传估计等下游分析。

1.3 基因分型、质量控制

鸡翅静脉采血收集 F_2 代母鸡血液,血液 DNA 使用苯酚/氯仿萃取法抽提,选用 600K Affymetrix Axiom 鸡高密度基因芯片进行基因型检测,通过 Affymetrix 工具 v1.16.0 软件执行质量控制(QC),保留 $QC \geq 0.82$ 样品,获得有效样本 1 512 个,有效 SNP 532 299 个。本统计方法对表型和性染色体基因型的关联检测低于常染色体,因此删除性染色体上所有 SNP。使用 PLINK v1.90 软件包做进一步质量控制^[5],剔除次等位基因频率 < 0.05 、偏离哈迪温伯格检验($P < 10^{-6}$)的 SNP。基因型填充分析由 BEAGLE v4.0^[6] 程序执行,保留质量分数($R^2 > 0.5$)的 SNP,最终获得 1 512 羽个体和 435 867 个 SNP。

1.4 全基因组关联分析

为消除虚假关联,首先使用 PLINK 软件包进行主成分分析。利用 simpleM^[7] 法计算全基因组显著性和潜在性关联的阈值。有效独立测试值为 59 308,因此全基因组显著性 P 值为 8.43×10^{-7} ($0.05/59\,308$),潜在性 P 值为 1.69×10^{-5} ($1.00/59\,308$)。使用 GEMMA v0.94 软件^[8] 中的单变量混合模型对小肠质量性状进行 GWAS,模型公式如下:

$$y = w\alpha + x\beta + \mu + \varepsilon;$$

其中: y 是 n 个个体的 $n \times 1$ 表型值向量; w 为固定效应,是 $n \times c$ 协变量矩阵,包括列向量 1; α 是 $c \times 1$ 相应系数向量,包括截距; x 是测试位点的 $n \times 1$ 标记基因型向量; β 表示每个标记中次等位基因的效

应,是标记的效应大小; μ 是 $n \times 1$ 随机效应向量,协方差结构为 $\mu \sim N(0, KVg)$,其中 K 表示 $n \times n$ 遗传相关矩阵,来源于 SNP 标记, Vg 是多基因加性方差; ε 是 $\varepsilon \sim N(0, IVe)$ 的 $n \times 1$ 随机残差的向量, I 是 $n \times n$ 单位矩阵, Ve 是残差方差分量。

使用 R 软件 GAP 包绘制曼哈顿和 quantile - quantile (QQ) 图,GenABEL 包中的 estlambda 函数计算基因组膨胀因素 λ (表示假阳性信号程度)^[9]。

1.5 遗传力估计及对表型方差贡献率

使用 REML 法估计遗传力,由 GCTA v1.24 程序执行^[10]。使用二元混合模型估计各部分肠质量遗传和表型相关^[11]。估计全基因组显著 SNP、表型方差贡献的混合线性模型如下:

$$y = xb + \sum_j^k z_j \alpha_j \varepsilon_j + \varepsilon;$$

其中, y 是表型向量; x 是解释表型固定效应的关联矩阵; b 是固定效应向量; z_j 是基因型协变量 SNP _{j} ($AA = -10, AB = 0, BB = +10$); α_j 是 SNP _{j} 的等位基因替代效应; δ_j 是参数,表示 SNP _{j} 是否包含在马尔可夫链蒙特卡罗 (MCMC) 链; ε 是与分析相关的误差。

1.6 基因鉴定

使用 Biomart 工具 (基于 Ensembl 支持的 Galgal4 组件) 和变异效应预测软件 VEP 鉴定显著位点的候选基因^[12],并检测给定基因组区域中的基因^[13]。

2 结果与分析

2.1 表型和遗传参数

表 1 为十二指肠质量 (DW)、空肠质量 (JW)、回肠质量 (IW) 描述性统计结果。共测量 1 508 羽母鸡,获得十二指肠 1 435 个、空肠 1 436 个、回肠 1 434 个有效数据。3 个性状的变异系数均较大,这可能是由于 F_2 代资源群体的个体差异较大。

表 1 F₂ 代鸡小肠质量的描述性统计

性状	个体 (个)	平均值 (g)	标准差 (g)	最小值 (g)	最大值 (g)	变异系数 (%)
DW	1 435	4.9	1.1	1.5	10.0	22.45
JW	1 436	7.1	1.6	3.1	13.7	22.54
IW	1 434	5.6	1.2	2.7	12.8	21.42

注:DW 表示十二指肠质量;JW 表示空肠质量;IW 表示回肠质量。

通过合格的 GWAS 标记对计算 DW、JW、IW 的加性遗传方差,并统计遗传参数。由表 2 可知,单变量 GCTA 分析显示,3 种肠道质量性状遗传力在中等水平,DW 的遗传力估计值最高,为 0.32。双变量 GCTA 分析表明,3 种肠道质量性状表现出较高的遗传相关,JW 与 IW 的遗传相关最高,为 0.88。表型分析表明,3 种小肠质量也具有中等程度表型相关。

表 2 小肠质量遗传参数

性状	DW	JW	IW
DW	0.32(0.05)	0.75(0.06)	0.55(0.93)
JW	0.62 **	0.28(0.04)	0.88(0.06)
IW	0.57 **	0.54 **	0.26(0.05)

注:对角线:估计的遗传力;下三角:表型相关性,“**”表示极显著;上三角:遗传相关性,括号内为标准误差。缩写:DW = 十二指肠质量;JW = 空肠质量;IW = 回肠质量。

2.2 候选位点 GWAS 鉴定

对 3 种小肠质量分别进行单变量全基因组关联分析,结果由表 3、图 2 可知,分别有 185、201、36 个全基因组显著 SNP 位点与 DW、JW、IW 关联(共 422 个)。几乎所有的显著位点均位于 1 号染色体的 166.6 ~ 173.2 Mb 基因组区域,仅有 1 个显著 SNP 位点位于 4 号染色体的 49.9 Mb 基因组区域。由图 2 可知,共有 28 个显著 SNP 位点与 3 种小肠质量性状均显著相关。根据所有影响 DW、JW、IW 的 SNP 的 *P* 值制作曼哈顿图和 QQ 图(图 3)。

表 3 显著 SNP 位点数量和分布

性状	染色体	显著 SNP 数量	基因组区域 (Mb)
DW	1	184	166.7 ~ 173.2
	4	1	49.9
JW	1	201	166.7 ~ 173.2
IW	1	36	166.6 ~ 170.2

注:DW 表示十二指肠质量;JW 表示空肠质量;IW 表示回肠质量。

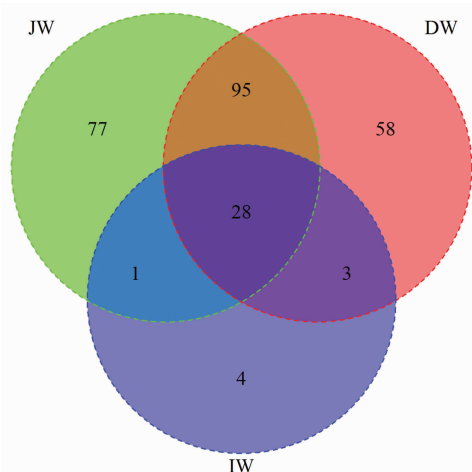


图 2 显著 SNP 位点韦恩图

2.3 显著位点的基因注释

基因内部的 SNP 比基因间区域的更重要。由表 4 可知,通过 VEP 和 Biomart 对 3 种小肠质量性状均显著的 28 个 SNP 周围区域进行扫描,鉴定与 3 种小肠质量相关的基因,发现有 6 个 SNP 位于 4 个基因的内含子区。rs313669574 和 rs313152047 对应基因 *FOXO1*, rs315029039 对应基因 *CKAP2*, rs313765223 对应基因 *CAB39L*, rs312737959 和 rs13972990 对应基因 *MRPS31*。将这 6 个 SNP 位点和 4 个基因作为候选位点和基因。

2.4 估计表型方差贡献率(CPV)

对上述 6 个 SNP 位点进行 CPV 计算,由表 4 可知,位点 rs313669574、rs313152047、rs315029039、rs313765223、rs312737959 和 rs13972990 可分别解释小肠质量表型方差的 2.92% ~ 3.26%、2.84% ~ 4.80%、3.23% ~ 3.71%、3.29% ~ 5.33%、3.26% ~ 4.99% 和 3.29% ~ 4.85%。

3 讨论

肠道作为重要的消化器官,其发育对动物的生长发育和生产性能有重要影响,有必要对肠道质量基因组结构进行。GWAS 是研究动物遗传结构特点的有效手段,广泛应用于多种畜禽,如猪^[14-15]、牛^[16-17]和家禽^[18-19]。因此,本研究对 1 512 羽 F₂ 代蛋鸡资源群体小肠质量进行 GWAS 分析,扩大性状差异化水平,提高差异性状 QTL 识别能力,并使用高密度 SNP 芯片覆盖鸡所有的染色体,从而提高结果的准确性和可靠性。

描述性统计结果可知,小肠质量的变异系数很大,提示个体间性状差异化水平很高。遗传评估的

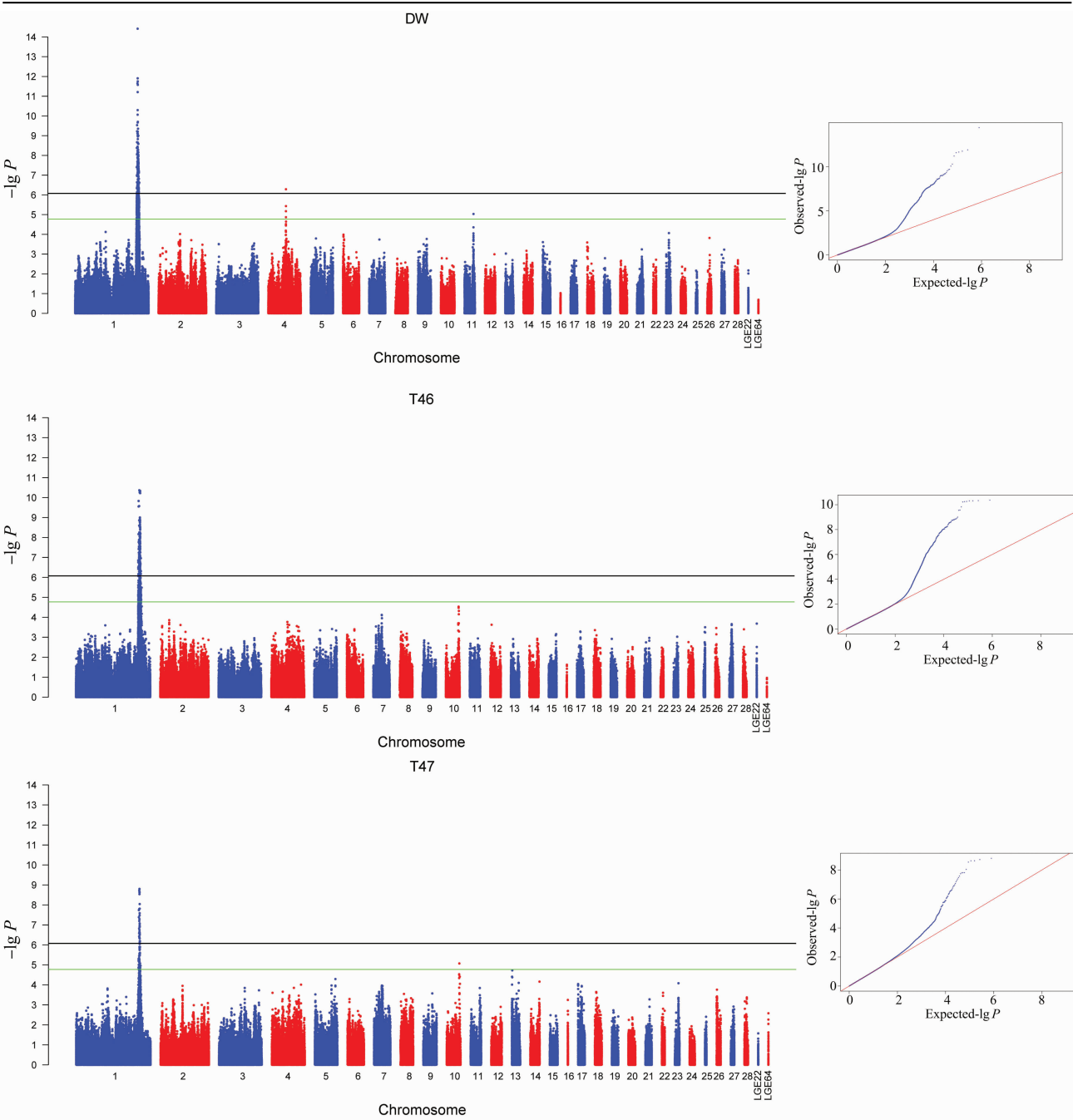


图3 基于鸡 DW、JW、IW 性状 P 值的曼哈顿(左)和 QQ 图(右)

结果表明,DW、JW、IW 均具有中等遗传力。性状相关的分析结果表明,3 个小肠质量性状具有较高的遗传相关性,但表型相关均处于中等水平,说明环境因素对小肠质量性状的影响较大。这与 Li 等关于小肠长度的研究结果^[20]相似,二者的遗传特征相似。

GWAS 的结果表明,DW、JW、IW 的 422 个显著 SNP 位点中,有 421 个位于 1 号染色体的 166.6 ~ 173.2 Mb 区域,表明 3 个小肠质量的遗传控制高度

集中。这与我们在小肠长度的研究结果相似,显著 SNP 位点集中在 1 号染色体的 170 Mb 区域^[20],表明肠道发育的遗传控制主要集中在 1 号染色体的 170 Mb 附近区域。

通过对 DW、JW、IW 均显著的 28 个 SNP 进行分析研究,有 6 个 SNP(rs313669574、rs313152047、rs315029039、 rs313765223、 rs312737959 和 rs13972990)和对应的 4 个基因(*FOXO1*、*CKAP2*、*CAB39L* 和 *MRPS31*)被列为最重要的 SNP 位点和基

表 4 小肠质量性状全基因组关联分析

性状	SNP	染色体	位置	基因	区域	等位基因	MAF	个体 (个)	效应 (s. e. m.)	CPV (%)	P 值
DW	rs313669574	1	168 475 695	FOXO1	intron	A/G	0.222	1 435	−0.286 (0.056)	3.26	3.79 × 10 ^{−7}
JW								1 436		2.92	
IW								1 434		3.00	
DW	rs313152047	1	169 272 726			A/G	0.382	1 435	−0.243 (0.048)	4.80	4.56 × 10 ^{−7}
JW								1 436		2.96	
IW								1 434		2.84	
DW	rs315029039	1	169 899 973	CKAP2	intron	C/T	0.33	1 435	−0.268 (0.050)	3.71	1.25 × 10 ^{−7}
JW								1 436		3.32	
IW								1 434		3.23	
DW	rs313765223	1	169 557 099	CAB39L	intron	A/G	0.253	1 435	−0.313 (0.052)	5.33	2.33 × 10 ^{−9}
JW								1 436		3.29	
IW								1 434		3.74	
DW	rs312737959	1	169 709 920	MRPS31	intron	A/G	0.442	1 435	−0.258 (0.050)	4.99	2.5 × 10 ^{−7}
JW								1 436		3.56	
IW								1 434		3.26	
DW	rs13972990	1	169 562 091			C/T	0.456	1 435	−0.259 (0.050)	4.85	2.76 × 10 ^{−7}
JW								1 436		4.19	
IW								1 434		3.29	

注:MAF 表示次等位基因频率;CPV 表示表型方差贡献率;DW 表示十二指肠质量;JW 表示空肠质量;IW 表示回肠质量。

因,因为这 6 个 SNP 位于相应基因的内含子区。Forkhead 转录因子 FOXO1 (forkhead box O1)可能在肌源性生长和分化中起作用,是调节胰岛素靶组织中葡萄糖代谢和胰岛素反应的关键转录因子^[21-22]。研究表明口服胰岛素可刺激 IUGR 仔猪小肠绒毛的生长和黏膜功能的成熟^[23-24],因此推测它在小肠发育中可能通过调节胰岛素起作用。CKAP2 (cytoskeleton associated protein 2)是细胞骨架相关蛋白 2,参与细胞的有丝分裂过程^[25]。研究表明,CKAP2 在视网膜微血管内皮细胞^[26]和肝癌细胞^[27]的增殖、迁移中发挥作用,并与卵泡发育和选择关系密切^[28],推测其可能与多器官的发育有关。CAB39L (calcium binding protein 39 like)作为 MO25 家族成员,编码钙结合蛋白 39 样。研究表明 CAB39L 能够通过 AMPK 途径调节食物的摄入^[29-30],且鸡体内也存在与哺乳动物相似的 AMPK 途径^[31]。肠道发育也与动物的采食量有关,但其与 CAB39L 的关系还有待进一步研究。MRPS31 (mitochondrial ribosomal protein S31)是线粒体核糖体蛋白 S31,参与线粒体中蛋白质的合成,在各种生命活动中都起重要作用。综上所述,这 4 个基因可能与小肠重量高度相关,而其对应的 6 个 SNP 的

CPV 均较高,进一步说明它们可能是影响鸡小肠质量的重要候选基因。

4 结论

通过 GWAS 共鉴定出 28 个与 DW、JW、IW 均显著相关的 SNP,全部集中在 1 号染色体的 166.6 ~ 173.2 Mb 区域,其中 6 个 SNP 位于相应 4 个基因的内含子区,这些位点和基因可能是影响小肠质量的重要 SNP 位点和基因。

参考文献:

[1] de Verdal H, Narcy A, Bastianelli D, et al. Improving the efficiency of feed utilization in poultry by selection. 1. Genetic parameters of anatomy of the gastro-intestinal tract and digestive efficiency[J]. BMC Genetics, 2011, 12: 59.

[2] 王星果, 曲亮, 卢建, 等. 蛋鸡资源群体的盲肠长度全基因组关联分析[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2018, 40(9): 35-41.

[3] Zhang H, Wang Z P, Wang S Z, et al. Progress of genome wide association study in domestic animals[J]. Journal of Animal Science and Biotechnology, 2012, 3(1): 26.

[4] Hirschhorn J N, Daly M J. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits[J]. Nature Reviews Genetics, 2005, 6(2): 95-108.

- [5] Purcell S, Neale B, Todd – Brown K, et al. PLINK: a tool set for whole – genome association and population – based linkage analyses [J]. American Journal of Human Genetics, 2007, 81 (3): 559 – 575.
- [6] Browning B L, Browning S R. A unified approach to genotype imputation and haplotype – phase inference for large data sets of trios and unrelated individuals [J]. The American Journal of Human Genetics, 2009, 84 (2): 210 – 223.
- [7] Gao X Y, Becker L C, Becker D M, et al. Avoiding the high Bonferroni penalty in genome – wide association studies [J]. Genetic Epidemiology, 2010, 34 (1): 100 – 105.
- [8] Zhou X, Stephens M. Genome – wide efficient mixed – model analysis for association studies [J]. Nature Genetics, 2012, 44 (7): 821 – 824.
- [9] Zhao J H. gap: genetic analysis package [J]. Journal of Statistical Software, 2007, 23 (8): 1 – 18.
- [10] Yang J, Lee S H, Goddard M E, et al. GCTA: a tool for genome – wide complex trait analysis [J]. The American Journal of Human Genetics, 2011, 88 (1): 76 – 82.
- [11] Lee S H, DeCandia T R, Ripke S, et al. Estimating the proportion of variation in susceptibility to schizophrenia captured by common SNPs [J]. Nature Genetics, 2012, 44 (3): 247 – 250.
- [12] McLaren W, Pritchard B, Rios D, et al. Deriving the consequences of genomic variants with the Ensembl API and SNP Effect Predictor [J]. Bioinformatics, 2010, 26 (16): 2069 – 2070.
- [13] Kinsella R J, Kähäri A, Haider S, et al. Ensembl BioMarts: a hub for data retrieval across taxonomic space [J]. Database, 2011, 2011 (10. 1093): database.
- [14] Do D N, Ostensen T, Strathe A B, et al. Genome – wide association and systems genetic analyses of residual feed intake, daily feed consumption, backfat and weight gain in pigs [J]. BMC Genetics, 2014, 15: 27.
- [15] Zhang W C, Bin Y, Zhang J J, et al. Genome – wide association studies for fatty acid metabolic traits in five divergent pig populations [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 24718.
- [16] Sherman E L, Nkrumah J D, Moore S S. Whole genome single nucleotide polymorphism associations with feed intake and feed efficiency in beef cattle [J]. Journal of Animal Science, 2010, 88 (1): 16 – 22.
- [17] Manca E, Cesarani A, Gaspa G, et al. Use of the multivariate discriminant analysis for genome – wide association studies in cattle [J]. Animals, 2020, 10 (8): 1300.
- [18] Tran T S, Narcy A, Carré B, et al. Detection of QTL controlling digestive efficiency and anatomy of the digestive tract in chicken fed a wheat – based diet [J]. Genetics, Selection, Evolution, 2014, 46 (1): 25.
- [19] Yi G Q, Shen M M, Yuan J W, et al. Genome – wide association study dissects genetic architecture underlying longitudinal egg weights in chickens [J]. BMC Genomics, 2015, 16: 746.
- [20] Li S M, Wang X G, Qu L, et al. Genome – wide association studies for small intestine length in an F₂ population of chickens [J]. Italian Journal of Animal Science, 2018, 17 (2): 294 – 300.
- [21] Kim J J, Li P P, Huntley J, et al. FoxO1 haploinsufficiency protects against high – fat diet – induced insulin resistance with enhanced peroxisome proliferator – activated receptor gamma activation in adipose tissue [J]. Diabetes, 2009, 58 (6): 1275 – 1282.
- [22] Pajvani U B, Shawber C J, Samuel V T, et al. Inhibition of Notch signaling ameliorates insulin resistance in a FoxO1 – dependent manner [J]. Nature Medicine, 2011, 17 (8): 961 – 967.
- [23] 赵 念. 酪蛋白酶解物和胰岛素对新生 IUGR 仔猪肠道生长发育的影响 [D]. 南京: 南京农业大学, 2007: 46 – 63.
- [24] 赵 念, 薛 萍, 杜 伟, 等. 添加胰岛素对新生宫内生长迟缓仔猪肠道生长发育的影响 [J]. 畜牧与兽医, 2008, 40 (7): 52 – 55.
- [25] Yoo B H, Park C H, Kim H J, et al. CKAP2 is necessary to ensure the faithful spindle bipolarity in a dividing diploid hepatocyte [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2016, 473 (4): 886 – 893.
- [26] 陈湘婷, 谢 洁, 孟倩丽. CKAP2 对高糖培养的人视网膜血管内皮细胞的作用研究 [J]. 循证医学, 2020, 20 (2): 96 – 102.
- [27] 张昌生, 张学贞, 韩宗明, 等. 沉默细胞骨架相关蛋白 2 抑制肝癌细胞增殖和迁移并促进细胞凋亡 [J]. 中南大学学报 (医学版), 2020, 45 (4): 365 – 371.
- [28] Cui X X, Yang C H, Kang L, et al. Expression pattern and regulation of head – to – head genes *Vps36* and *Ckap2* during chicken follicle development [J]. Frontiers of Agricultural Science and Engineering, 2014, 1 (2): 130.
- [29] Hawley S A, Boudeau J, Reid J L, et al. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP – activated protein kinase cascade [J]. Journal of Biology, 2003, 2 (4): 28.
- [30] Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, et al. AMP – kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus [J]. Nature, 2004, 428 (6982): 569 – 574.
- [31] Proszkowiec – Weglarz M, Richards M P, Ramachandran R, et al. Characterization of the AMP – activated protein kinase pathway in chickens [J]. Comparative Biochemistry and Physiology (Part B: Biochemistry and Molecular Biology), 2006, 143 (1): 92 – 106.