

GDFs 基因家族候选基因对崇仁麻鸡生长性状的影响

魏岳, 谭美芳, 唐维国, 武艳平, 黄江南, 刘林秀, 陈介文, 谢金防*

(江西省农业科学院畜牧兽医研究所, 南昌 330200)

摘要: 利用崇仁麻鸡差异性性状的重测序结果, 将生长分化因子 (GDFs) 基因家族作为候选基因, 筛选与崇仁麻鸡生长性状相关的多态位点。结果发现, GDF-2、GDF-8 和 GDF-10 基因的多态位点对崇仁麻鸡的生长性状有着显著或极显著的影响。单倍型分析结果显示, GDF-2 和 GDF-10 基因的单倍型 H3H3 为劣势单倍型组合可以选择淘汰。研究结果表明, GDFs 基因家族候选基因对崇仁麻鸡的生长性状有一定的影响。

关键词: 崇仁麻鸡; GDFs 基因家族; 生长性状; 分子标记

中图分类号: S831.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2020)03-0368-05

Effects of GDFs gene family on growth traits in Chongren partridge chicken

WEI Yue, TAN Meifang, TANG Weiguo, WU Yanping, HUANG Jiangnan, LIU Linxiu, CHEN Jiewen, XIE Jinfang
(Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Jiangxi Academy of Agriculture Sciences, Nanchang 330200)

Abstract: In this study, the growth differentiation factor (GDFs) gene family was used as candidate genes to screen polymorphic loci related to growth traits of Chongren partridge Chicken based on the results of re-sequencing. The results showed that the SNPs of GDF-2, GDF-8 and GDF-10 genes had significant or extremely significant effects on the growth traits of Chongren partridge Chicken. The haplotype analysis showed that the haplotypes H3H3 of GDF-2 and GDF-10 genes were inferior haplotypes and could be eliminated. The results showed that GDFs gene family had some effects on growth traits in Chongren partridge chicken.

Key words: chongren partridge chicken; GDFs gene family; growth trait; molecular marks

生长分化因子 (GDFs) 是转录生长因子- β (TGF- β) 超家族中一个亚家族, 其家族成员都是先合成前体蛋白, 该蛋白由信号肽、编码前肽的 N-末端区和编码成熟肽的 C-末端区组成, 在 N-末端区和 C-末端区之间有一个蛋白酶加工位点^[1]。GDFs 前体蛋白无活性, 经 TGF- β 激酶 (TAKs) 激活后, 与相应丝氨酸/苏氨酸激酶受体结合形成异聚体而发挥生物学作用, 进而调控目的基因的表达^[2]。GDF 基因家族成员众多, 其生物学功能涉及包括肌细胞的生长和分化、成骨形成、血管形成、糖代谢和脂肪代谢等方面, 对机体的生长发育具有重要的调节作用^[3-5]。

本研究课题组前期利用二代测序技术对崇仁麻鸡的差异性状进行全基因组重测序, 通过基因注释

和通路分析等生物学手段, 初步筛选与生长性状相关的候选基因位点或结构, 本研究从中选取了 GDF 基因家族中的 GDF-2 (骨形态发生蛋白 9, BMP-9) 基因、GDF-8 (肌肉抑制素, MSTN) 和 GDF-10 (骨形态发生蛋白 3b, BMP-3b) 基因这些在前期检测到多态位点且功能有生长发育相关的主要功能基因作为候选基因, 在通过对候选基因 SNP 的大群体分型验证以及与生长性状相关性分析, 以期寻找可以用于崇仁麻鸡生长性状改良的分子标记。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用的崇仁麻鸡来自江西省农科院畜牧所

收稿日期: 2019-10-09

基金项目: 国家自然科学基金 (3170664), 江西省青年科学基金 (20171BAB214017), 江西省农业科学院创新基金博士启动项目 (20152CBS006), 国家肉鸡产业技术体系 (CARS-42-Z10), 江西省重大项目 (20152ACF60019) 和江西省重点研发计划项目 (20161BBF60140) 共同资助。

作者简介: 魏岳, 助理研究员。E-mail: wyv@sina.com

* 通信作者: 谢金防, 研究员。E-mail: xiejf166@163.com

同批饲养的保种群, 选取 350 只母鸡, 记录 4、6、8、10、12、14、16 和 20 周龄体重。

1.2 试验方法

1.2.1 崇仁麻鸡全基因组重测序 根据个体体重和家系信息, 选取极端性状的 70 个个体均分成两组, 采用等量混样测序的方法对崇仁麻鸡进行二代全基因组重测序 (30×) 工作, 由北京百迈克生物科技有限公司完成。

1.2.2 崇仁麻鸡大群体 SNP 分型 利用 Massarray SNP 技术在大群体中进行验证分析, 由上海祥音生物科技有限公司完成, SNP 位点信息见表 1。

表 1 候选基因 SNP 位点信息

SNP 序号	基因	突变位点碱基	基因位置
SNP Number	Gene	Mutation site base	Gene position
G-2	GDF-2	T→C	3' UTR
G-8	GDF-8	G→A	3' UTR
G-10	GDF-10	G→T	5' UTR

1.2.3 数据统计 利用 SPSS 23.0 软件的广义线性模型 (GLM) 对不同基因型与各性状间的关系进行

最小二乘法估计及差异显著性检验, 结果均以平均值±标准误表示。

2 结果与分析

2.1 重测序结果

利用 Hiseq2500 测序系统, 进行数据过滤后, 得到的 Clean reads 与 NCBI 上的鸡基因组数据 (GGA5.0) 进行比对, 同时崇仁麻鸡全基因组样品组内进行比较。结果显示, 样品平均覆盖度 38×, 基因组被覆盖的较均匀, 说明测序随机性较好 (见图 1)。SNP 的检测主要使用 GATK^[6] 软件工具包实现, 根据 Clean Reads 在参考基因组的定位结果, 使用 Picard 进行去重复、GATK 进行局部重比对、碱基质量值校正等处理, 结果显示, SNP 可信性测序深度 35× 以及位点间距离大于 160 bp, 其可信度达到 75% 以上 (见图 2)。

2.2 SNP 检测及测序结果

在 350 只崇仁麻鸡中针对候选的 3 个 SNP 进行基因分型, 其中, G-2 和 G-8 位点成功检测 342 个样品, G-10 位点成功检测 339 个样品 (图 3)。

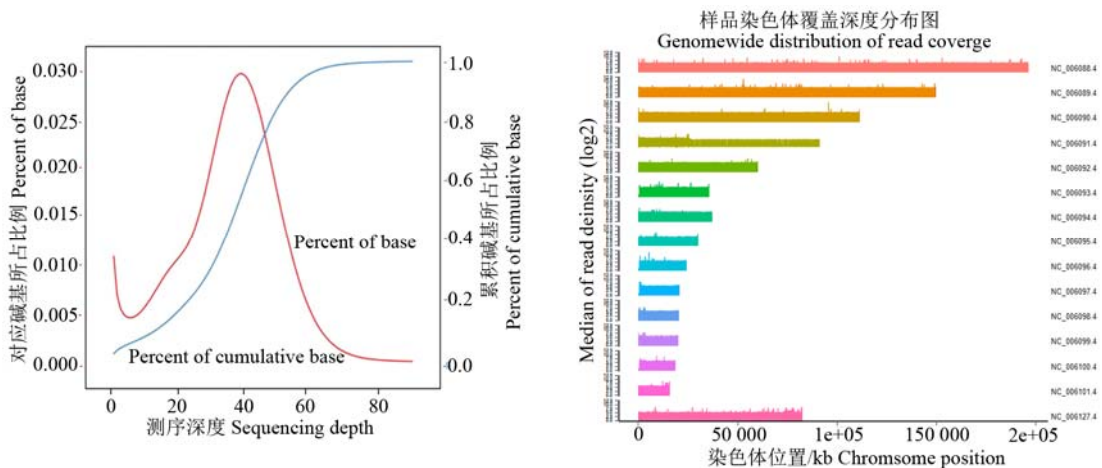


图 1 样品深度和覆盖深度分布图

Figure 1 Sequencing depth and reads coverage map

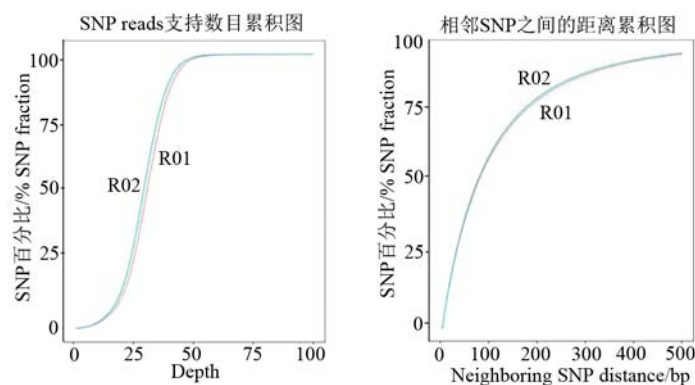


图 2 SNP 质量分布图

Figure 2 SNP quality map

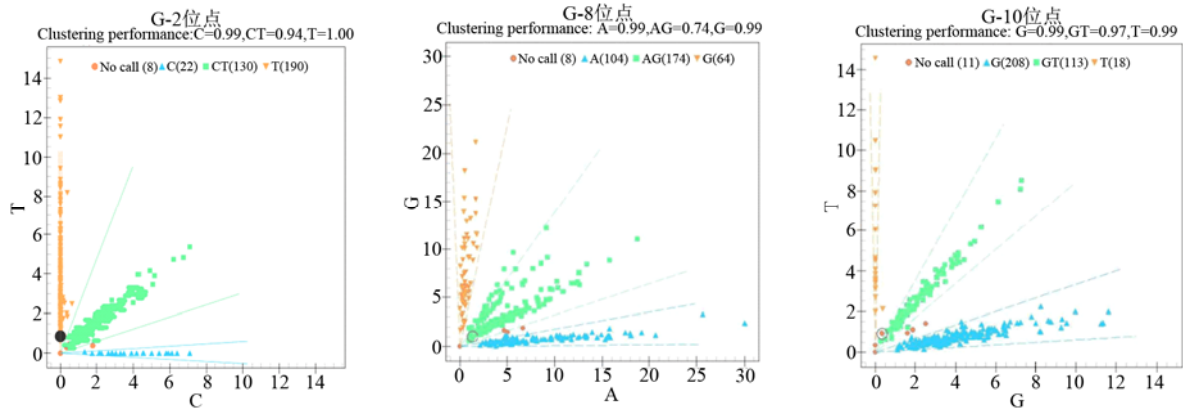


图 3 候选基因 SNP 分型结果

Figure 3 Candidate genes SNP genotyping results

2.3 SNP 位点与生长性状的相关性分析

G-2 位点与崇仁麻鸡生长性状相关性结果显示, G-2 位点 4 和 6 周龄, TT 基因个体体重显著大于 CC 和 CT 基因型个体 ($P<0.05$); 8~10 周龄, TT 基因型个体极显著大于 CC 基因型个体 ($P<0.01$) 并显著大于 CT 基因型个体 ($P<0.05$), 其他基因型个体差

异不显著 ($P>0.05$); 12 周龄, TT 基因型个体极显著大于 CC 基因型个体 ($P<0.01$); 14 和 16 周龄, TT 基因型个体显著大于 CT 和 CC 基因型个体 ($P<0.05$); 20 周龄, TT 基因型个体显著大于 CC 基因型个体 ($P<0.05$), 其他基因型个体差异不显著 ($P>0.05$); 各周龄体重总体表现为 TT>CT>CC (表 2)。

表 2 G-2 位点对崇仁麻鸡各周龄体重的影响

Table 2 Effect of G-2 locus on growth traits in Chongren partridge chickens

基因型 Genotype	4 周龄 4 weeks	6 周龄 6 weeks	8 周龄 8 weeks	10 周龄 10 weeks	12 周龄 12 weeks	14 周龄 14 weeks	16 周龄 16 weeks	20 周龄 20 weeks
CC (22)	172.20± 6.54 ^b	257.80± 9.90 ^b	354.20± 12.08 ^{Bb}	491.20± 18.64 ^{Bb}	580.40± 21.72 ^B	703.20± 23.48 ^b	799.40± 25.76 ^b	935.80± 27.77 ^b
CT (130)	178.64± 2.92 ^b	266.08± 4.43 ^b	372.40± 5.40 ^{ABb}	526.56± 8.34 ^{ABb}	614.52± 9.71 ^{AB}	731.80± 10.50 ^b	830.52± 11.52 ^{ab}	968.48± 12.42 ^{ab}
TT (190)	186.36± 2.39 ^a	276.87± 3.62 ^a	385.48± 4.42 ^{Aa}	546.71± 6.82 ^{Aa}	636.82± 7.94 ^A	761.47± 8.59 ^a	856.10± 9.42 ^a	995.96± 10.15 ^a

注: 同一列不同大写字母表示差异极显著 ($P<0.01$), 不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。下同

Note: In the same line, different capital letters mean extremely significant difference ($P<0.01$); different small letters mean significant difference ($P<0.05$). The same below

表 3 G-8 位点对崇仁麻鸡各周龄体重的影响

Table 3 Effect of G-8 locus on growth traits in Chongren partridge chickens

基因型 Genotype	4 周龄 4 weeks	6 周龄 6 weeks	8 周龄 8 weeks	10 周龄 10 weeks	12 周龄 12 weeks	14 周龄 14 weeks	16 周龄 16 weeks	20 周龄 20 weeks
AA (104)	181.80± 3.22 ^{ab}	271.12± 4.89	373.11± 5.95	527.86± 9.17 ^{ab}	616.55± 10.63	750.15± 11.53 ^{ab}	846.46± 12.65 ^{ab}	984.22± 13.53 ^{ABa}
AG (174)	185.65± 2.45 ^a	274.94± 3.73	384.83± 4.54	545.85± 7.00 ^a	637.01± 8.11	754.75± 8.79 ^a	851.44± 9.65 ^a	996.75± 10.31 ^{Aa}
GG (64)	173.98± 4.08 ^b	262.73± 6.21	372.66± 7.55	521.80± 11.64 ^b	608.36± 13.48	723.44± 14.62 ^b	818.05± 16.05 ^b	940.54± 17.15 ^{Bb}

G-8 位点与崇仁麻鸡生长性状相关性分析结果显示, 4、10、14 和 16 周龄, AG 基因个体体重显著大于 GG 基因型个体 ($P<0.05$), 其他基因型个体间差异不显著 ($P>0.05$); 20 周龄, AG 基因型个体极显著大于 GG 基因型个体 ($P<0.01$), AA 显著大

于 GG 基因型个体 ($P<0.05$); 各周龄体重总体表现为 AG>AA>GG (表 3)。

G-10 位点与崇仁麻鸡生长性状相关性分析结果显示, 4 和 6 周龄, TT 基因个体体重极显著大于 GG 和 GT 基因型个体 ($P<0.01$); 8 和 10 周龄, TT

基因型个体极显著大于 GG 基因型个体 ($P<0.01$), 其他基因型个体间差异不显著 ($P>0.05$); 各周龄体
其他基因型个体间差异不显著 ($P>0.05$); 20 周龄, 重总体表现为 TT>GT>GG (表 4)。
TT 基因型个体显著大于 GG 基因型个体 ($P<0.05$),

表 4 G-10 位点对崇仁麻鸡各周龄体重的影响

Table 4 Effect of G-10 locus on growth traits in Chongren partridge chickens

基因型 Genotype	4 周龄 4 weeks	6 周龄 6 weeks	8 周龄 8 weeks	10 周龄 10 weeks	12 周龄 12 weeks	14 周龄 14 weeks	16 周龄 16 weeks	20 周龄 20 weeks
GG (208)	172.41± 11.39 ^B	250.04± 17.21 ^B	342.25± 21.14 ^B	483.83± 32.44 ^B	560.26± 37.94 ^B	674.38± 41.19	764.31± 45.12	904.47± 48.60 ^b
GT (113)	164.18± 11.54 ^B	253.43± 17.44 ^B	390.61± 21.41 ^{AB}	551.25± 32.87 ^{AB}	634.22± 38.43 ^{AB}	784.36± 41.73	864.64± 45.71	943.27± 49.24 ^{ab}
TT (18)	211.48± 11.78 ^A	323.33± 17.79 ^A	440.08± 21.86 ^A	613.41± 33.55 ^A	707.05± 39.23 ^A	822.77± 42.59	906.52± 46.65	1 076.59± 50.26 ^a

表 5 候选基因单倍型分析结果

Table 5 Candidate gene haplotype analysis

单倍型 Haplotype	H1 (TG)	H2 (TT)	H3 (CG)	H4 (CT)
频率 Frequency	0.55	0.18	0.22	0.05

表 6 单倍型组合对崇仁麻鸡各周龄体重的影响

Table 6 Effect of haplotype combinations on growth traits in Chongren partridge chickens

组合 Haplotype combinations	4 周龄 4 weeks	6 周龄 6 weeks	8 周龄 8 weeks	10 周龄 10 weeks	12 周龄 12 weeks	14 周龄 14 weeks	16 周龄 16 weeks	20 周龄 20 weeks
H1H1 (110)	184.05± 3.12 ^{ab}	274.68± 4.72 ^a	384.27± 5.75 ^a	534.91± 8.88 ^{ab}	626.55± 10.30 ^{ab}	751.77± 11.15 ^{ab}	851.68± 12.23 ^a	987.18± 13.12 ^{abcd}
H1H2 (62)	181.61± 4.16 ^{ab}	270.24± 6.28 ^{ab}	382.74± 7.66 ^{ab}	550.73± 11.84 ^a	642.34± 13.72 ^a	759.68± 14.85 ^a	857.18± 16.29 ^a	1 002.58± 17.48 ^a
H1H3 (80)	176.81± 3.66 ^b	259.69± 5.53 ^b	365.00± 6.75 ^b	519.63± 10.42 ^b	605.81± 12.08 ^b	728.38± 13.07 ^{ab}	824.63± 14.34 ^{ab}	954.25± 15.39 ^c
H2H2 (17)	194.12± 7.96 ^a	283.53± 12.00 ^a	383.82± 14.64 ^{ab}	557.35± 22.61 ^{ab}	642.65± 26.20 ^{ab}	750.59± 28.36 ^{ab}	824.71± 31.11 ^{ab}	981.47± 33.39 ^{abcd}
H2H3 (45)	183.11± 4.89 ^{ab}	279.11± 7.37 ^{ab}	385.78± 9.00 ^{ab}	545.22± 13.89 ^{ab}	636.00± 16.10 ^{ab}	766.44± 17.43 ^{ab}	862.11± 19.12 ^a	1 000.67± 20.52 ^{abcd}
H2H4 (5)	206.00± 14.67 ^a	308.00± 22.12 ^a	417.00± 27.00 ^{ab}	586.00± 41.69 ^{ab}	687.00± 48.32 ^{ab}	813.00± 52.31 ^{ab}	907.00± 57.37 ^{ab}	1 072.00± 61.58 ^{ab}
H3H3 (18)	179.44± 7.73 ^{ab}	267.50± 11.66 ^{ab}	367.78± 14.23 ^{ab}	507.22± 21.97 ^{ab}	593.61± 25.46 ^{ab}	699.17± 27.57 ^b	785.00± 30.24 ^b	930.56± 32.45 ^{cd}
H3H4 (7)	181.43± 12.40 ^{ab}	275.00± 18.70 ^{ab}	372.14± 22.82 ^{ab}	536.43± 35.23 ^{ab}	616.43± 40.84 ^{ab}	741.43± 44.21 ^{ab}	852.14± 48.49 ^{ab}	1 011.43± 52.04 ^{abcd}

2.4 G-2 和 G-10 位点单倍型组合分析

利用 SHEsis 软件分析 G-2 和 G-10 位点的连锁程度, 结果显示两个位点不存在连锁不平衡 ($D'=0.338$, $r^2=0.012$), 利用 PHASE2.1 分析单倍型种类及频率, 共得到 4 种单倍型 (表 5), 单倍型组合与崇仁麻鸡生长性状关联性分析发现, 4 周龄, H1H3 单倍型组合体重显著小于 H2H2 和 H2H4 单倍型组合 ($P<0.05$); 6 周龄, H1H3 单倍型组合体重显著小于 H1H1、H2H2 和 H2H4 单倍型组合 ($P<0.05$); 8 周龄, H1H3 单倍型组合体重显著小于 H1H1 单倍

型组合 ($P<0.05$); 10 和 12 周龄, H1H3 单倍型组合体重显著小于 H1H2 单倍型组合 ($P<0.05$), 其他组合间差异不显著 ($P>0.05$); 14 周龄, H3H3 单倍型组合体重显著小于 H1H2 单倍型组合 ($P<0.05$), 其他组合间差异不显著 ($P>0.05$); 16 周龄, H3H3 单倍型组合体重显著小于 H1H1 和 H1H2 单倍型组合 ($P<0.05$); 20 周龄, H1H3 单倍型组合体重显著小于 H1H2 单倍型组合 ($P<0.05$), H3H3 单倍型组合体重显著小于 H1H2 和 H2H4 单倍型组合 ($P<0.05$), 其他组合间差异不显著 ($P>0.05$)。

3 讨论

GDFs 家族成员众多而且不断有新成员被发现,它们各自或相互作用发挥其生物学功能,涵盖生长、发育和代谢等多种途径,具有极其重要的作用。GDF-2 (BMP9) 基因参与骨骼的发育、生长和创伤的修复,能诱导特定的包括肌肉和血管周围的间充质干细胞分化为软骨和骨组织^[7],有研究认为 GDF-2 是促进间充质干细胞在体内、外成骨作用最强的 BMP 因子^[8]。GDF-8 (MSTN) 基因是骨骼肌生长的负调控因子,通过抑制生肌细胞的繁殖和分化来影响肌肉分化,当其功能不全或者丧失时,肌纤维会发生广泛的增生和肥大,导致骨骼肌肌肉质量显著增加,如皮埃蒙特牛和比利时蓝牛出现的“双肌”性状^[9]。GDF-10 基因功能报道与 GDF-2 基因相似,也具有诱导成骨分化的功能,还具有对神经组织保护功能,也可以作为检测癌细胞的潜在标记^[10-12]。

目前, GDFs 基因家族与畜禽生产性状相关的研究报道成员有 GDF-5、GDF-8、GDF-10 和 GDF-15 等的报道。GDFs 基因家族成员在生物体中发挥的作用提示将其作为畜禽生产性状辅助选择标记的必要性。本研究将 GDF-2、GDF-8 和 GDF-10 基因作为候选基因并与崇仁麻鸡的生长性状进行相关性分析。结果显示,候选基因对崇仁麻鸡的生长性状有显著或极显著的影响,其中 G-2 位点的 TT、G-8 位点的 AG 和 G-10 位点的 TT 基因型为优势基因型。单个 SNP 位点的信息含量较少,可以用单倍型或基因型组合分析的方式进行弥补^[13],因而采用了单倍型或组合分析是候选基因研究的趋势之一。单倍型分析结果显示 G-2 和 G-10 位点不存在连锁不平衡且 H3H3 组合在群体中属于劣势基因型组合可以考虑将其淘汰。值得注意的是, GDF-8 基因是对鸡生长性状有着非常重要影响,张跟喜利用前期在 GDF-8 基因中发现的 G2283A 位点辅助选择组建了快长型和慢长型的边鸡群体,魏岳在此基础上分析了边鸡 GDF-8 基因及其相关信号通路中的基因的影响,确认 GDF-8 基因 G2283A 位点对边鸡的作用^[14-15],而 G2283A 位点对崇仁麻鸡的生长性状的效应与边鸡不同仍需进一步的确认(文中未列出)。文中未将 GDF-8 基因的 G-8 位点与其他两个基因位点进行联合分析,结合本研究实际情况 G-2 位点和 G-10 位点的 CC 和 TT 基因型个体较少,如果采用 3 个基因的联合分析必然会导致有的基因型组合数量过少,影响结果的准确性,但是剔除较少基因型组合的个体后,相关性分析显示与单倍型组合分析

结果类似,候选基因各自优势或劣势基因型组合对崇仁麻鸡的生长性状仍然表现出优势或劣势,本研究中候选基因的位点处于非编码区,推断它们可能与控制崇仁麻鸡生长性状的主效基因紧密连锁,因而需要对候选基因进行更多研究,通过寻找紧密连锁的位点分析其影响崇仁麻鸡生长性状的机制,从而保证这 3 个位点作为分子标记的可靠性。

参考文献:

- [1] DERYNCK R, FENG X H. TGF- β receptor signaling[J]. *Biochim Et Biophys Acta BBA-Rev Cancer*, 1997, 1333(2): F105-F150.
- [2] DERYNCK R, ZHANG YINGE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signaling[J]. *Nature*, 2003, 425(6958): 577-584.
- [3] 吴少波. BMP9 过表达对甘油三酯代谢的影响及其机制研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2017.
- [4] 赵丹. 雌激素和 TGF- β 1 对鸡原始卵泡和生长卵泡发育的调节作用及其机理的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2018.
- [5] DAANS M, LUYTEN F P, LORIES R J U. GDF5 deficiency in mice is associated with instability-driven joint damage, gait and subchondral bone changes[J]. *Ann Rheum Dis*, 2011, 70(1): 208-213.
- [6] MCKENNA A, HANNA M, BANKS E, et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data[J]. *Genome Res*, 2010, 20(9): 1297-1303.
- [7] SHEA C M, EDGAR C M, EINHORN T A, et al. BMP treatment of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells induces both chondrogenesis and osteogenesis[J]. *J Cell Biochem*, 2003, 90(6): 1112-1127.
- [8] DENG Z L. Regulation of osteogenic differentiation during skeletal development[J]. *Front Biosci*, 2008, 13(13): 2001.
- [9] MCPHERON A C, LEE S J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(23): 12457-12461.
- [10] UPADHYAY G, YIN Y, YUAN H, et al. Stem cell antigen-1 enhances tumorigenicity by disruption of growth differentiation factor-10 (GDF10)-dependent TGF-signaling[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(19): 7820-7825.
- [11] HINO J, NISHIMATSU S I, NAGAI T, et al. Coordination of BMP-3b and Cerberus is required for head formation of *Xenopus* embryos[J]. *Dev Biol*, 2003, 260(1): 138-157.
- [12] 江龙. GDF10 在神经病理性疼痛大鼠脊髓中的表达变化及机制研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2017.
- [13] 唐莹, 王玉, 张跟喜, 等. Myf5 基因 8 个 SNPs 位点与京海黄鸡生长和繁殖性状的关联分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2014, 45(6): 863-870.
- [14] 张跟喜. 边鸡遗传多样性及 Myostatin 基因对生长和繁殖性状的遗传效应研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2010.
- [15] 魏岳. 边鸡 MSTN 基因、MyoD 家族部分基因和 Smad3 基因多态性与生长和屠体性状的相关性分析以及表达的研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2014.