

屈子啸, 杨帅朋, 朱向星, 唐冬生. 基于全基因组重测序挖掘大白-长白二元母猪产仔数性状候选基因[J]. 广东农业科学, 2023, 50 (3): 120-128.

基于全基因组重测序挖掘大白-长白二元母猪产仔数性状候选基因

屈子啸, 杨帅朋, 朱向星, 唐冬生

(佛山科学技术学院生命科学与工程学院 / 广东省动物分子设计育种与精准育种重点实验室, 广东 佛山 528000)

摘要:【目的】产仔数是种用母猪的重要经济指标, 挖掘调控母猪产仔数性状相关的候选基因, 探索调控二元母猪为代表的商品猪繁殖力遗传机制, 为进一步应用分子选育奠定基础。【方法】采用全基因组重测序对极端高产与极端低产的两组大长二元母猪进行比较分析, 并利用选择消除分析方法取 F_{ST} 和 θ_{π} 信号交集为高选择区域, 进行基因注释和候选基因筛选。【结果】在两组样本中共发现 8 040 367 个 SNP, 50.6% 的 SNP 位于基因间区域, 45.2% 的 SNP 位于内含子区域, 在外显子区域、非编码区 3' 端、5' 端的 SNP 分别仅占 1.0%、1.1%、0.6%, 其中位于基因组外显子区域的 SNP 中, 有 28 879 个为非同义变异, 占比 35.0%。提取位于外显子区域、内含子区域、非编码区 3' 端和 5' 端的 SNP 位点进行基因注释, 共筛选到两组样本间的差异基因有 1 136 个。对差异基因进行 KEGG 与 GO 富集分析, 筛选得到可能影响生殖性能和产仔数性状相关的候选基因共 10 个, 包括 *EPHA4*、*SMAD7*、*GLI2*、*LRP1B*、*WT1*、*BAX*、*BCAT2*、*IL1B*、*FAF1*, 基因功能主要涉及胚胎发育、细胞凋亡等。【结论】大长二元母猪在产仔数性状上经历了显著的人工选择, 初步挖掘出影响二元母猪产仔数性状的候选基因, 这些基因在猪繁殖性能相关的生理活动中发挥作用, 主要在母猪卵细胞成熟凋亡时期及妊娠初期参与调控。

关键词: 大白-长白二元母猪; 产仔数; 基因组重测序; 候选基因; 遗传选育

中图分类号: S813.3

文献标志码: A

文章编号: 1004-874X (2023) 03-0120-09

Mining Candidate Genes for Litter Size Traits in Large White – Landrace Crossbred Sows Based on Whole Genome Resequencing

QU Zixiao, YANG Shuaipeng, ZHU Xiangxing, TANG Dongsheng

(School of Life Science and Engineering, Foshan University / Guangdong Key Laboratory of Animal Molecular Design Breeding and Precision Breeding, Foshan 528000, China)

Abstract:【Objective】The litter size is an important economic index for breeding sows. The candidate genes related to the regulation of litter size traits in sows were explored, and the genetic mechanism of commercial pig fertility represented by binary hybrid sows was investigated, in order to lay a foundation for further application of molecular breeding.【Method】

收稿日期: 2023-01-11

基金项目: 广东省重点领域研发计划-重大科技专项 (2022B0202110002, 2018B020203003); 广东省动物分子设计与精准育种重点实验室开放课题 (2018A05)

作者简介: 屈子啸 (1998—), 男, 在读硕士生, 研究方向为动物分子遗传育种, E-mail: 1031516598@qq.com

通信作者: 唐冬生 (1962—), 男, 博士, 教授, 研究方向为动物分子遗传育种与基因编辑, E-mail: tangdsh@163.com

致谢: 湖南省张家界康茜生态农业公司为本研究提供研究样本, 谨此致谢。

Comparative analysis was conducted on two groups of extremely high and extremely low yielding Large White – Landrace sows by using whole genome resequencing, and selection elimination analysis was used to obtain F_{st} and θ_{π} signal intersection as a high selection region for gene annotation and candidate gene screening. 【Result】 A total of 8 040 367 SNPs were found in two groups of samples, 50.6% of which were located in the intergenic region, 45.2% in the intron region, and only 1.0%, 1.1%, and 0.6% in the exon region, non-coding region 3' end, and 5' end, respectively. Among the SNP located in the exon region of the genome, 28 879 were non-synonymous variants, accounting for 35.0%. Extracting SNP loci located in the exon region, intron region, and non-coding regions at the 3' and 5' ends for gene annotation, a total of 1 136 differentially expressed genes were screened between the two groups of samples. KEGG and GO enrichment analysis on differential genes were conducted, and a total of 10 candidate genes that may affect reproductive performance and litter size traits were screened out, including *EPHA4*, *SMAD7*, *GLI2*, *LRP1B*, *WT1*, *BAX*, *BCAT2*, *IL1B* and *FAF1*. The gene functions mainly involved embryonic development, cell apoptosis, and etc 【Conclusion】 The Large White – Landrace binary sows have experienced significant artificial selection on the litter size trait, and the candidate genes affecting the litter size trait of binary sows have been preliminarily excavated. These genes play a role in the physiological activities related to pig reproductive performance, and mainly in the period of apoptosis of sow egg cells and the beginning of pregnancy to participate in regulation.

Key words: Large White – Landrace binary sows; litter size; genome resequencing; candidate gene; genetic selection

【研究意义】我国是生猪养殖和猪肉消费大国，猪肉总产量和人均猪肉消费量多年来一直居于世界首位。经过数十年的选育和实践，以“杜长大”为代表的三元杂交猪（父本为杜洛克猪，母本通常是由大白公猪与长白母猪杂交所产出的二元母猪）展现出生长速度快、饲料转化率和瘦肉率高等诸多优势，逐渐在生猪生产上占据主导地位。影响母猪经济价值的生产性状很多，其中产仔数是重要指标，也是衡量猪场效益的重要因素。传统杂交改良技术及候选基因挖掘在母猪产仔数性状改良中起重要作用，目前国内外已经开展了大量对猪繁殖性状进行基因组遗传评估和鉴定关键 QTL 或基因的研究，发现问题主要集中在繁殖性状基因组育种值准确性低，受微效多基因影响导致被鉴定的关键 QTL 效应值小，造成繁殖性状遗传改良速度慢^[1-2]。此外，传统 QTL 遗传图谱和 QTL 鉴定分析存在耗时长、成本高等不足，利用创新技术进一步挖掘种用母猪的遗传改良潜力具有重要的研究意义。

【前人研究进展】母猪产仔数性状的影响因素包括遗传、品种、胎次、分娩季节和营养水平等^[3-4]，其中遗传因素占据重要地位。目前国内外育种工作者已在母猪产仔数性状选育方面取得较多进展，特别是随着分子生物学技术的进步，分子辅助选育技术在母猪产仔数性状选育方面发挥了重要作用，相继发现了多个潜在控制该性状的候选基因。例如，赵要风等^[5]发现促卵泡素基因（*FSH β* ）与母猪产仔数密切相关，经 PCR 扩

增检测发现存在 AA、AB、BB 共 3 种基因型。柳淑芳等^[6]在莱芜黑猪群体中通过对 *FSH β* 基因多态性与产仔数进行关联分析，结果表明，AA 基因型为优势基因型，且与高产仔数连锁显著，确定该基因为猪产仔数的主效基因。此外，*ESR*^[7]、*RBP4*、*PRLR*^[8-9] 和 *DIS3L2*^[10] 等基因也与母猪产仔数性状存在关联。这些母猪产仔数性状候选基因有效推进了母猪遗传选育的工作进程，提高了经济产出。但传统性状候选基因的挖掘耗时长、花费大、效率低，已严重阻碍母猪产仔数性状的进一步提升，亟需利用新技术快速高效地挖掘候选基因以进一步提高育种效率。

【本研究切入点】全基因组重测序是对已知参考序列的物种进行不同个体间的基因组测序，并在此基础上对个体或群体进行差异性分析，通过全基因组重测序以及序列比对，实现遗传进化分析和重要性状候选基因预测^[11-12]。随着测序成本降低和拥有参考基因组序列物种的增多，全基因组重测序已成为生猪遗传选育研究的有效方法^[13]。【拟解决的关键问题】本研究采用全基因组重测序，对极端高产与极端低产的两组大白—长白（大长）二元母猪进行比较分析，在高选择信号区域内筛选候选基因，以期探索高产仔数种猪的选育奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2021 年 6 月从湖南省张家界康茜生态农业

公司三岔湾生猪扩繁基地获取 124 头大长二元母猪的初次产仔数据。选取极端高产与极端低产母猪各 10 头，分别使用耳标钳采集约 100 mg 耳组织样本，样本保存于装有 95% 酒精的 EP 管中，采用干冰运输带回实验室，保存在 -20 ℃ 冰箱中备用。

1.2 试验方法

1.2.1 样品基因组 DNA 提取与重测序 采用组织基因组 DNA 提取试剂盒 (TIAN GEN DP304) 对高产与低产母猪的耳组织样本提取基因组 DNA，并委托北京诺禾致源公司进行文库构建，并基于 Illumina PE150 测序平台完成全基因组重测序。

对 20 个样本数据进行统计，包括测序数据产量、测序错误率、Q20 含量、Q30 含量、GC 含量等。质控后的高质量数据通过 BWA 软件^[11] 比对到参考基因组 (参数: mem-t 4-k 32-M)，比对结果经 SAMTOOLS 软件^[12] 去除重复 (参数: rmdup)。

1.2.2 SNP 检测与注释 采用 SAMTOOLS 等软件进行群体 SNP 检测。利用贝叶斯模型检测群体中的多态性位点，通过过滤和筛选得到高质量的 SNP，然后使用 ANNOVAR 软件^[13] 对上述过滤后的 SNP 进行注释。

1.2.3 选择消除分析及候选基因筛选 使用 VCFtools (V0.1.16) 软件计算群体分化指数 (F_{st}) 以及群体多态性 (θ_π)。将 F_{st} 与 θ_π 信号区域进行交集以确定较强的选择信号，获得候选信号窗口并根据参考基因组信息进行基因注释。其中， $0 \leq F_{st} \leq 1$ ， F_{st} 越接近 1 表示亚种群间的种群分化越明显； θ_π 分析按照 100 kb 为 1 个窗口，在基因组上滑动并对滑动窗口中群体遗传信息的差异进行分析。以 F_{st} 、 θ_π 的 Top 5% 作为信号较强的区域，对此区域进行候选基因筛选。

1.2.4 GO 分析与 KEGG 分析 利用 DAVID 在线数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 对筛选出的区域进行 GO/KEGG 富集分析，根据富集结果过滤筛选高产仔数候选基因。

2 结果与分析

2.1 样本选择与数据统计

本研究共采集 124 头大长二元母猪的初次产仔数据，并选择极端高产和极端低产母猪各 10 头

作比较，使用 SPSS 7.16 的 T 检验计算两组数据的差异显著性，结果 (表 1) 显示，两组间的总产仔数差异显著 ($P < 0.05$)，健仔数差异极显著 ($P < 0.01$)。

表 1 测序样本组的产仔数性状比较
Table 1 Comparison of litter size traits in the sequenced sample groupss

组别 Group	总产仔数 Total litter size	弱仔数 Number of weak offspring	健仔数 Number of healthy offspring	死胎数 Number of stillbirth
高产仔数组 High litter size group	16.2 ± 0.83a	0.5 ± 0.85a	15 ± 1.33A	0.8 ± 1.32a
低产仔数组 Low litter size group	8.1 ± 1.1b	0 ± 0a	8.4 ± 1.5B	0.2 ± 0.42a

注：同列数据后小写英文字母不同者表示差异显著 ($P < 0.05$)，大写英文字母不同者表示差异极显著 ($P < 0.01$)。
Note: Different lowercase letters after data in the same column represent significant differences ($P < 0.05$), and different capital letters represent extremely significant differences ($P < 0.01$)

2.2 测序数据统计及质控结果

本研究基于全基因组重测序技术对 20 头高产母猪和低产母猪进行分析，获得高质量数据 1 551 069 Gb，测序质量较高 ($Q20 \geq 95\%$ ， $Q30 \geq 90\%$)，GC 比例为 43.19%~44.14%，GC 分布正常，且参考基因的比对率平均大于 98% (表 2)，表明建库测序成功。

2.3 SNP 检测与注释结果

采用 SAMTOOLS 等软件对供试的两组猪进行 SNP 检测。利用贝叶斯模型检测群体中的多态性位点，通过 Dp4-miss0.3-maf0.05 过滤和筛选得到高质量的 SNP，并使用 ANNOVA 软件对样本中的高质量 SNP 进行注释。由表 3 可知，在两组样本中共发现 8 040 367 个 SNP，50.6% 的 SNP 位于基因间区域，45.2% 的 SNP 位于内含子区域，在外显子区域、非编码区 3' 端、5' 端的 SNP 分别仅占 1.0%、1.1%、0.6%。其中位于基因组外显子区域的 SNP 中，有 53 307 个为同义变异，占比 64.6%；有 28 879 个为非同义变异，占比 35.0%；此外，还有 304 个 SNP 出现在终止密码子区域。

2.4 选择消除分析及差异基因筛选

通过 R 语言软件包计算每个 SNP 位点的 F_{st} 值，以 100 kb 为窗口滑动计算 F_{st} 总值，除以每个窗口的 SNP 数，得到平均 F_{st} 值 (图 1)；采用滑动窗口法对每个群体分别计算 θ_π 值 (图 2)，

表 2 高产仔数组与低产仔数组母猪全基因组重测序数据
Table 2 Resequencing data of whole genome of sows in high litter size group and low litter size group

样本号 Sample No.	质控后有效测序段数 Number of effective sequencing segments after quality control	比对数 Comparison quantity	比对率 Comparison rate (%)	平均测序深度 Mean sequencing depth	Q20 (%)	Q30 (%)	GC 比例 Proportion of GC (%)
2554	166918251	169182654	98.66	8.38 ×	97.08	92.75	43.19
2473	162487771	164631374	98.70	8.22 ×	97.15	92.92	43.30
2567	170007803	172138818	98.76	8.56 ×	97.06	92.72	43.33
2558	169226897	171681484	98.57	8.60 ×	97.14	92.84	43.33
2555	179328880	182304722	98.37	8.58 ×	96.86	92.72	43.36
2552	166169956	169682230	97.93	8.43 ×	97.06	92.72	43.40
2537	178379338	181170096	98.46	8.71 ×	96.64	91.80	43.39
2510	163173460	165310764	98.71	8.18 ×	97.13	92.87	43.41
2553	167843096	170022890	98.72	8.32 ×	97.10	92.80	43.45
2508	166926245	169164744	98.68	8.38 ×	97.14	92.90	43.54
2491	170748347	173062688	98.66	8.65 ×	97.00	92.55	43.56
2470	167744148	170125152	98.60	8.62 ×	96.83	92.17	43.59
2530	178786403	181127094	98.71	8.81 ×	97.19	93.03	43.69
2511	170384115	172836564	98.58	8.67 ×	97.00	92.62	43.73
2518	172203578	174505432	98.68	8.57 ×	96.93	92.43	43.73
2495	166887158	169430660	98.50	8.43 ×	96.98	92.57	43.84
2493	166446645	168900828	98.55	8.38 ×	97.14	92.90	43.88
2301	178809330	181337854	98.61	8.65 ×	97.09	92.85	44.14
2534	161257001	163547772	98.60	8.33 ×	97.19	93.03	44.25
2196	173984583	176655504	98.49	8.67 ×	97.15	92.92	44.38

注：以欧亚野猪（*Sus scrofa* 11.1）作为参考基因组（<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=sus+scrofa>）进行比对。
Note: Eurasian wild boar (*Sus scrofa* 11.1) is used as the reference genome (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=sus+scrofa>) for comparison.

表 3 SNP 检测统计信息及注释结果
Table 3 SNP detection statistics and annotation results

序号 No.	分类 Category	SNP 数量 Number of SNP
1	位于基因间区	4070577
2	位于基因上游 1 kb 区域	51136
3	位于基因下游 1 kb 区域	55981
4	位于基因上游 1 kb 区域， 同时也在另一基因的下游 1 kb 区域	1667
5	位于 5' UTR	49436
6	位于 3' UTR	90265
7	位于剪切位点	236
8	位于内含子区域	3630760
9	外显子非同义变异	28879
10	外显子同义变异	53307
11	外显子获得终止密码子变异	259
12	外显子失去终止密码子变异	45
13	同类核苷酸变异 (ts)	5785860
14	不同类核苷酸变异 (tv)	2254507
15	总数	8040367

以及群体间的 θ_{π} 比率。以 F_{st} 的 Top5% 和 θ_{π} 比率的 Top5% 作为选择阈值，得到较强的选择信号（图

3），初步选择差异基因。根据来自于两者交集的选择信号窗口所对应的参考基因组位置信息，提取位于 外显子区、内含子区、非编码区 3' 端和 5' 端的 SNP 位点进行基因注释，共筛选到两组样本间的差异基因 1 136 个。

2.5 GO 条目与 KEGG 通路富集分析

对高选择信号区域内的基因进行 GO 分析，图 4 展示了 P 值最低的前 20 条 GO 条目，其中 DNA 物质合成过程正向调控、磷酸化调控和下丘脑发育的 P 值分别为 0.00174、0.00274 和 0.00312，可能与二元母猪的繁殖性能相关，这些条目所富集到的基因包括 *EPHA4*、*SMAD7*、*GLI2*、*WT1*、*LRP1B*、*BAX* 等，其与猪繁殖性能和总产仔数性状的相关注释见表 4。

对高选择信号区域内的基因进行 KEGG 分析，图 5 展示了 P 值最低的前 20 条 KEGG 通路，在显著富集的通路中筛选出 *SMAD7*、*DCN*、*BCAT2*、*IL1B*、*FAF1* 等基因，其具有参与生殖激素调控、

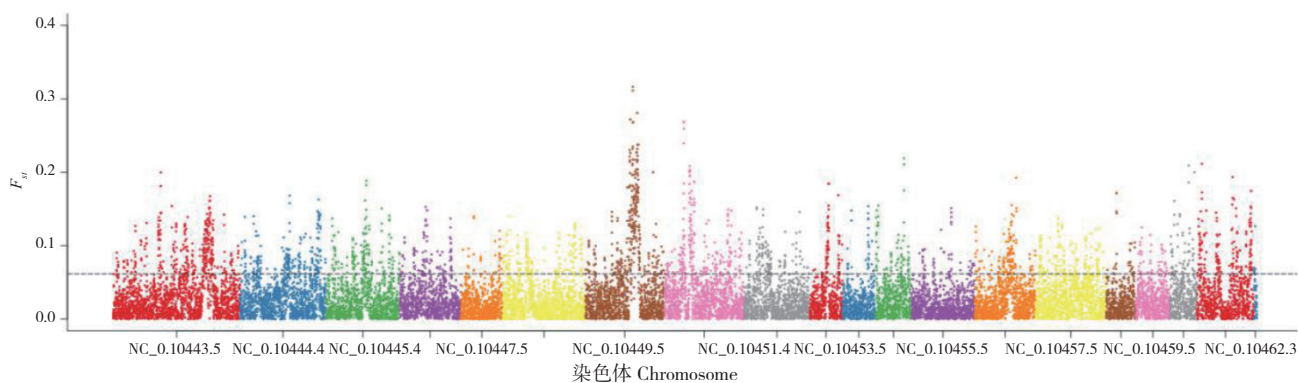


图 1 群体分化 F_{st} 分布
Fig. 1 Population differentiation distribution map of F_{st}

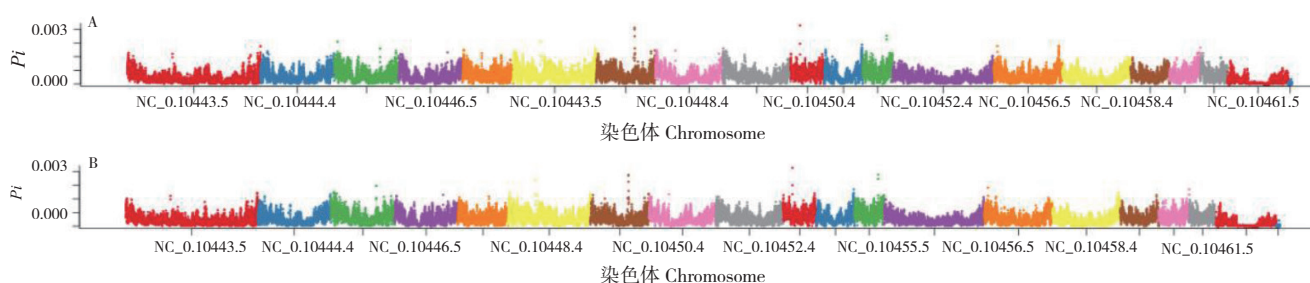
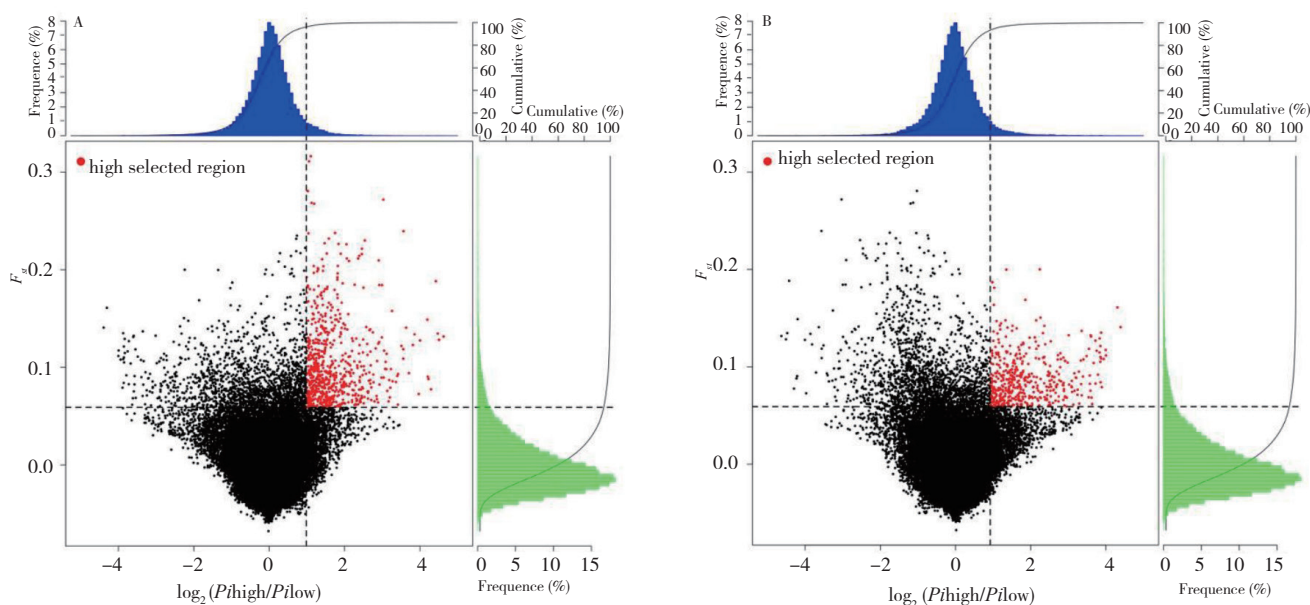


图 2 高产仔数 (A) 与低产仔数 (B) 母猪群体 θ_{π} 分析
Fig. 2 Analysis of θ_{π} between high litter size group and low litter size group of sow population



A: 低产仔数母猪群体的信号选择区域; B: 高产仔数母猪群体的信号选择区域
点图横坐标为 θ_{π} 比率, 纵坐标为 F_{st} 值, 分别对应上面的频率分布图和右侧的频率分布图; 蓝色和绿色区域为 θ_{π} 比率的 Top 5% 区域, 红色区域为 F_{st} 的 Top 5% 区域

A: Signal selection regions of low litter size sow population; B: Signal selection regions of high litter size sow population
The abscissa of the point graph is θ_{π} ratio, with the vertical axis representing the F_{st} value, corresponding to the frequency distribution map above and the frequency distribution map on the right. The blue and green regions are the Top 5% region of the θ_{π} ratio, and the red region represents the Top 5% region of F_{st}

图 3 F_{st} 、 θ_{π} 选择消除分析结果
Fig. 3 Selection elimination analysis results of F_{st} and θ_{π}

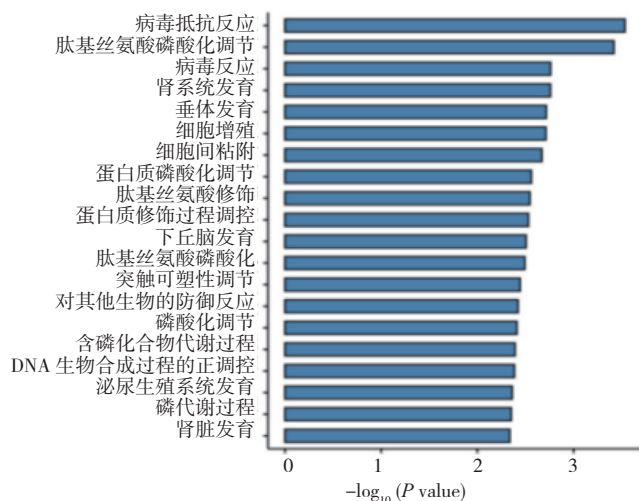


图4 差异基因的 GO 富集条目 (Top20)

Fig. 4 GO enrichment entries of differential genes (Top20)

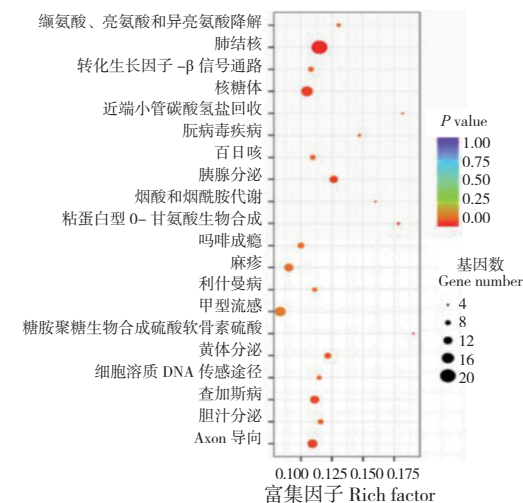


图5 差异基因的 KEGG 富集通路 (Top 20)

Fig. 5 KEGG enrichment pathways of differential genes (Top 20)

表4 候选基因的 SNP 变异注释及 GO、KEGG 富集分析

Table 4 SNP variation annotation of candidate genes and enrichment analysis of GO and KEGG

基因 Gene	变异所在染色体起始位点 Chromosome starting site of SNP variation	基因功能 Gene function	基因注释 Gene annotation	通路名称 Path name
<i>EPHA4</i>	Chr15123600106	胚胎植入附着	轴突生成调控	轴突导向
<i>GLI2</i>	Chr1530750333	胎儿发育与疾病发生	细胞质	Hedgehog 信号通路
<i>LRP1B</i>	Chr1511101792	信号转导及胚胎发育	细胞外空间	结核
<i>SMAD7</i>	Chr198550574	调控卵巢颗粒细胞凋亡	细胞质	胞吞作用
<i>DCN</i>	Chr590818940	调控卵巢颗粒细胞凋亡	细胞外空间	转化生长因子-β 信号通路
<i>BCAT2</i>	Chr654100137	卵母细胞与胚胎发育	转录负调控, DNA 模板	缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解
<i>IL1B</i>	Chr343628972	调控前列腺素合成	端粒酶活性阳性调节	结核
<i>BAX</i>	Chr654224423	参与卵泡发育及颗粒细胞凋亡	配体缺失时外源性凋亡信号通路正调控	结核
<i>FAF1</i>	Chr6161168229	胚胎发育	蛋白酶体介导的泛素依赖性蛋白质分解代谢过程	核糖体
<i>WT1</i>	Chr228284071	卵母细胞成熟及胚胎发育	RNA 聚合酶 II 启动子转录	转录调控异常

生成、转运以及胚胎发育和卵细胞凋亡等生理功能,可能与二元母猪的繁殖性能相关,其与猪繁殖性能和总产仔数性状的相关注释见表4。

3 讨论

本研究采用全基因组重测序以及 GO 分析初步筛选到 *EPHA4*、*SMAD7*、*GLI2*、*WT1*、*LRP1B*、*BAX* 等基因与二元母猪的繁殖性能和总产仔数性状密切相关,KEGG 富集通路分析结果显示 *SMAD7*、*DCN*、*BCAT2*、*IL1B*、*FAF1* 等基因与各类生殖激素的调控、生成、转运以及胚胎发育和卵细胞凋亡等各项生理活动密切相关,提示可能为产仔数性状的候选基因。

胚胎植入是建立妊娠的重要环节,猪胚胎在

妊娠的第 13~14 天开始附着于子宫,在第 18~24 天完成附着,已有研究报道 Eph-Ephrin 系统在人和小鼠的胚胎植入中发挥关键作用^[14]。*EPHA4* 基因是 Eph-Ephrin 家族的重要成员,负责编码多效细胞因子^[15]。在有关猪产仔数性状的研究中,Fu 等^[16]对长白、杜洛克、大白猪种群进行 *EPHA4* 基因多态性与总产仔数和出生活仔数进行关联分析,结果表明 *EPHA4* 基因与总产仔数显著相关,AGTC、AGCC 和 GCC 为优势基因型。本研究的发现与该研究结论相吻合,提示 *EPHA4* 基因在猪产仔数性状方面存在潜在作用。

TGF-β 通路对雌性哺乳动物主要起调节卵巢功能和卵泡发育的作用,是影响类固醇合成、黄体生成和排卵的重要通路^[17]。*SMAD7* 在哺乳

动物卵巢颗粒细胞凋亡中起关键作用,其能够拮抗和微调转化生长因子 β (TGF β) 信号^[18]。此外, SMAD7 与一些微 RNA (miRNA) 通过中断 TGFBR1 和 TGF- β 信号通路来增强猪卵巢颗粒细胞凋亡,进而影响其繁殖生育,提示其对猪产仔数性状具有潜在作用^[19-20]。

GLI2 基因位于猪 15 号染色体 (NC_010457.5), 本研究发现在该基因座存在大量 SNP 变异。前人研究表明猪的第 15 号染色体存在肛门闭锁的易感基因, *GLI2* 对远端结肠正常发育至关重要^[21]。此外, *GLI2* 是 Shh (Sonic hedgehog) 信号通路的响应转录因子, Shh 通路在胚胎模式、细胞增殖和细胞分化中发挥重要作用^[22], 由此推测先天性肛门闭锁可引发胎儿死亡, 从而导致产仔数降低。

LRP1B 基因编码低密度脂蛋白受体相关蛋白 1B, 介导细胞胆固醇摄取^[23]。胆固醇是一种在胎儿发育过程中起重要作用的脂质。Dietrich 等^[24] 研究发现, 小鼠 *LRP1B* 的敲除会导致早期胚胎致死性; Wang 等^[25] 发现 *LRP1B* 与仔猪的出生体重显著相关, 而仔猪的出生体重与子宫容积在很大程度上影响总产仔数。由此推测 *LRP1B* 可能在猪产仔数性状方面存在潜在作用。

卵泡发育离不开颗粒细胞参与, 颗粒细胞主要参与卵泡的物质交换、信号传导等功能。99% 以上的卵泡在发育和生长过程中发生“闭锁”, 而滤泡闭锁主要受颗粒细胞凋亡的调控^[20]。Sai 等^[26] 证明了猪卵巢颗粒细胞是一种线粒体依赖的 II 型凋亡细胞, 促凋亡蛋白 BAX 在细胞内信号转导中起重要作用, 并参与颗粒细胞凋亡, 后者是猪卵巢卵泡发育的一个关键因素。多项研究指明了 BAX 在猪卵巢卵泡发育中的重要性, 并将其作为卵巢颗粒细胞的凋亡标志物^[27-28], 表明 BAX 与母猪产仔数性状存在关联。

多项研究指出, 线粒体 DNA (mtDNA) 的稳定性对于卵母细胞成熟和胚胎发育具有重要意义^[29-30]。对携带 mtDNA 与缺陷 mtDNA 的猪卵母细胞进行线粒体基因差异表达分析, 结果发现其中关键基因支链氨基酸转氨酶 2 (BCAT2) 存在显著差异^[31]。BCAT2 在氨基酸代谢上发挥重要作用, 提示其与 mtDNA 稳态存在关联, 并可能影响卵母细胞质量以及产仔数性状。

前列腺素是参与母猪黄体溶解和妊娠识别的重要激素之一。Seo 等^[32] 通过测定母猪子宫内

前列腺素关键受体的表达水平变化, 确定了 IL1B 是调控前列腺素合成的关键酶。另有研究表明, IL1B 通过调节多形核嗜中性粒细胞的迁移, 可加速牛输卵管上皮细胞的炎性细胞因子产生, 导致慢性输卵管炎症以及生育能力减退^[33]。由此可见, IL1B 也可间接影响母猪的产仔数性状。

Fas 为肿瘤坏死因子受体家族的成员, Fas 配体 (TNFSF6) 与 Fas 抗原 (TNFRSF6) 的相互作用介导许多器官系统的程序性细胞死亡, Fas 相关因子 1 (FAF1) 参与细胞凋亡过程^[34-35]。已有研究发现核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 2 (*NLRP2*) 是卵子发生过程中转录的重要母体效应基因, 而 FAF1 蛋白可与 *NLRP2* 蛋白共同形成 FAF1-*NLRP2* 蛋白复合物, 对卵母细胞功能和胚胎植入前发挥重要作用^[36]。此外, 敲低小鼠 *NLRP2* 或 *FAF1* 都将导致小鼠胚胎发育异常甚至停滞^[35,37]。可见, FAF1 也可能影响猪产仔数性状, 与本研究的发现相吻合。

虽然本研究通过全基因组重测序分析初步挖掘了与大长二元母猪产仔数性状密切相关的基因, 但鉴于样本量偏少, 后续我们将进一步扩大样本量, 并在更大的群体中进行基因功能鉴定。由于繁殖性状的复杂性以及微效多基因调控等因素, 有必要开展更加全面的信号分析, 后续研究可考虑加入 CNV 或 Indel 选择信号交集, 使其数据更加全面。

4 结论

本研究发现大长二元母猪在产仔数性状上经历了显著的人工选择, 通过全基因组重测序分析初步挖掘出与大长二元母猪产仔数性状密切相关的基因, 包括 *EPHA4*、*SMAD7*、*GLI2*、*LRP1B*、*WT1*、*BAX*、*BCAT2*、*IL1B*、*FAF1* 等, 这些基因功能主要涉及胚胎发育、细胞凋亡等, 在猪繁殖性能相关的生理活动中发挥作用, 且调控主要发生在母猪卵细胞成熟凋亡时期及妊娠初期, 可能是决定大长二元母猪产仔数性状的候选基因, 其作用机制还有待进一步通过基因功能分析来确定。

参考文献 (References):

- [1] 傅衍. 猪的育种技术及其应用[J]. 猪业科学, 2021, 38(12): 39-41.
FU Y. Pig breeding technology and its application [J]. *Swine Industry Science*, 2021, 38(12): 39-41

- [2] 任慧波, 朱吉, 崔清明, 邓缘, 刘莹莹, 胡雄贵, 李华丽, 陈晨. 猪育种技术研究进展[J]. 养猪, 2020, 171(4):61–64. DOI:10.13257/j.cnki.21-1104/s.2020.04.023.
- REN H B, ZHU J, CUI Q M, DENG Y, HU X G, LI H L, CHEN C. Research progress in pig breeding technology [J]. *Swine Production*, 2020, 171(4): 61–64. DOI:10.13257/j.cnki.21-1104/s.2020.04.023.
- [3] 刘伟明, 朱泳斯, 张健. 猪产仔数候选基因研究进展[J]. 湖南畜牧兽医, 2021(2):48–50. DOI:10.3969/j.issn.1006-4907.2021.02.019.
- LIU W M, ZHU Y S, ZHANG J. Research progress on candidate genes of pig litter size [J]. *Hunan Journal of Animal Science & Veterinary Medicine*, 2021(2): 48–50 DOI:10.3969/j.issn.1006-4907.2021.02.019.
- [4] 王丽, 叶翔杨, 温晓鹿, 等. 猪营养调控技术研究进展[J]. 广东农业科学, 2020, 47(11):114–124. DOI:10.16768/j.issn.1004-874X.2020.11.013.
- WANG L, YE X Y, WEN X L, YANG X F, GAO K G, JIANG Z Y. Research progress in pig nutrition regulation technology [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2020, 47(11):114–124. DOI:10.16768/j.issn.1004-874X.2020.11.013.
- [5] 赵要风, 李宁, 肖璐, 曹更生, 陈怡真, 张顺, 陈永福, 吴常信, 张建新, 孙士铨, 徐学清. 猪 *FSH β* 亚基基因结构区逆转座子插入突变及其与猪产仔数关系的研究[J]. 中国科学: C 辑, 1999, 29(1):81–86.
- ZHAO Y F, LI N, XIAO L, CAO G S, CHEN Y Z, ZHANG S, CHEN Y F, WU C X, ZHANG J S, SUN S Q, XU X Q. Pig FSH β study on the reverse transposon insertion mutation in the structural region of Pig *FSH β* subunit gene and its relationship with the litter size of pigs [J]. *Science in China (Series C)*, 1999, 29(1):81–86.
- [6] 柳淑芳, 闫艳春, 杜立新. 莱芜黑猪 *FSH β* 亚基基因的多态性分析[J]. 山东农业大学学报: 自然科学版, 2002, 33(4):403–408. DOI:10.3969/j.issn.1000-2324.2002.04.002.
- LIU S F, YAN Y C, DU L X. Analysis on isomorphism at *FSH β* subunit gene in LAIWU pigs [J]. *Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2002, 33(4):403–408. DOI:10.3969/j.issn.1000-2324.2002.04.002.
- [7] 刘乙, 胡九英, 赵玉强, 汪德明, 刘小军, 黄涛. *ESR* 和 *FSH- β* 基因多态性对大白猪繁殖性能的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2017, 53(4):44–48. DOI: 10.19556/j.0258-7033.2017-04-044.
- LIU Y, HU J Y, ZHAO Y Q, WANG D M, LIU X J, HUANG T. *ESR* and *FSH- β* effect of gene polymorphism on reproductive performance of large white pigs [J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2017, 53(4):44–48. DOI: 10.19556/j.0258-7033.2017-04-044.
- [8] 孙延晓, 曾勇庆, 唐辉, 樊新忠, 陈其美, 李华, 钱源, 宋一萍. 猪 *PRLR* 和 *RBP4* 基因多态性与产仔数性能的关系[J]. 遗传, 2009, 31(1):63–68. DOI:10.3724/SP.J.1005.2009.00063.
- SUN Y X, ZENG Y Q, TANG H, FAN X Z, CHEN Q M, LI H, QIAN Y, SONG Y P. The relationship between *PRLR* and *RBP4* gene polymorphisms and litter performance in pigs [J]. *Hereditas (Beijing)*, 2009, 31(1):63–68. DOI:10.3724/SP.J.1005.2009.00063.
- [9] 刘璐, 梁永晔, 吴正常, 苏先敏, 郑先瑞, 王瑾, 吴圣龙, 包文斌. 大白猪、长白猪和杜洛克猪 *RBP4* 基因多态性及其与繁殖性能的相关分析[J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(10):169–172.
- LIU L, LIANG Y Y, WU Z C, SU X M, ZHENG X R, WANG J, WU S L, BAO W B. Association analysis on polymorphism of the *RBP4* gene with reproductive performance in Yorkshire, Landrace and Duroc pigs [J]. *Chinese Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2012, 39(10): 169–172.
- [10] 苏先敏, 赵乔辉, 朱世平, 霍永久, 梁永晔, 包文斌, 吴圣龙. 大白猪、长白猪和杜洛克猪催乳素受体基因多态性及其与繁殖性能的关系[J]. 中国畜牧兽医, 2013, 40(8):146–150.
- SU X M, ZHAO Q H, ZHU S P, HUO Y Y, LIANG Y Y, BAO W B, WU S L. The polymorphism of prolactin receptor gene and its relationship with reproductive performance in large white pigs, landrace pigs and Duroc pigs [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2013, 40(8): 146–150.
- [11] LI H, DURBIN R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(14):1754–1760. DOI:10.1093/bioinformatics/btp324.
- [12] LI H, HANDSAKER B, WYSOKER A. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(16):207 8–2079. DOI:10.1093/bioinformatics/btp352.
- [13] WANG K, LI M, HAKONARSON H. Annovar: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data [J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(16):E164. DOI:10.1093/NAR/GKQ603.
- [14] FUJII H, TATSUMI K, KOSAKA K, YOSHIOKA S, FUJIWARA H, FUJII S. Eph-ephrin a system regulates murine blastocyst attachment and spreading [J]. *Developmental Dynamics*, 2006, 235(12):3250–3258. DOI:10.1002/dvdy.20977.
- [15] ZHAO J, STEVENS C H, BOYD A W, OOI L, BARTLETT P F. Role of EphA4 in mediating motor neuron death in MND [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(17):9430. DOI: 10.3390/ijms22179430.
- [16] FU Y, FU J, WANG A. Association of EphA4 polymorphism with swine reproductive traits and mRNA expression of EphA4 during embryo implantation [J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(3):2689–2696. DOI:10.1007/s11033-011-1023-8.
- [17] DU X, WANG L, LI Q, WU W, SHANG P, CHAMBA Y, PAN Z, LI Q. miR-130a/TGF- β 1 axis is involved in sow fertility by controlling granulosa cell apoptosis [J]. *Theriogenology*, 2020, 157:407–417. DOI:10.1016/j.theriogenology.2020.08.015.
- [18] LI Q. Inhibitory SMADs: potential regulators of ovarian function [J]. *Biology of Reproduction*, 2015, 92(2):50. DOI: 10.1095/biolreprod.114.125203.
- [19] ZHANG X, CHEN Y, YANG M, SHANG J, XU Y, ZHANG L, WU X, DING Y, LIU Y, CHU M, YIN Z. MiR-21-5p actions at the Smad7 gene during pig ovarian granulosa cell apoptosis [J]. *Animal Reproduction Science*, 2020, 223:106645. DOI:10.1016/j.anireprosci.2020.106645.
- [20] YAO W, PAN Z, DU X, ZHANG J, LI Q. miR-181b-induced SMAD7 downregulation controls granulosa cell apoptosis through TGF- β signaling by interacting with the TGFBR1 promoter [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2018, 233(9):6807–6821. DOI:10.1002/jcp.26431.
- [21] CASSINI P, MONTIRONI A, BOTTI S, HORI T, OKHAWA H, STELLA A, ANDERSSON L, GIUFFRÀ E. Genetic analysis of anal atresia in pigs: evidence for segregation at two main loci [J]. *Mammalian Genome*, 2005, 16(3):164–170. DOI:10.1007/s00335-004-3024-6.

- [22] BAI C B, AUERBACH W, LEE J S, STEPHEN D, JOYNER A L. Gli2, but not Gli1, is required for initial Shh signaling and *ecTopic* activation of the Shh pathway [J]. *Development*, 2002, 129(20):4753–4761. DOI:10.1242/dev.129.20.4753.
- [23] HAAS J, BEER A G, WIDSCHWENDTER P, OBERDANNER J, SALZMANN K, SARG B, LINDNER H, HERZ J, PATSCH J R, MARSCHANG P. LRP1b shows restricted expression in human tissues and binds to several extracellular ligands, including fibrinogen and apoE-carrying lipoproteins [J]. *Atherosclerosis*, 2011, 216(2):342–347. DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2011.02.030.
- [24] DIETRICH M F, VAN DER WEYDEN L, PROSSER H M, BRADLEY A, HERZ J, ADAMS D J. Ectodomains of the LDL receptor-related proteins LRP1b and LRP4 have anchorage independent functions in vivo [J]. *PLoS One*, 2010, 5(4):e9960. DOI:10.1371/journal.pone.0009960.
- [25] WANG X, LIU X, DENG D, YU M, LI X. Genetic determinants of pig birth weight variability [J]. *BMC Genetics*, 2016, 17(S11):15. DOI: 10.1186/s12863-015-0309-6.
- [26] SAI T, GOTO Y, YOSHIOKA R, MAEDA A, MATSUDA F, SUGIMOTO M, WONGPANIT K, JIN H Z, LI J Y, MANABE N. Bid and Bax are involved in granulosa cell apoptosis during follicular atresia in porcine ovaries [J]. *Journal of Reproduction and Development*, 2011, 57(3):421–427. DOI:10.1262/jrd.11-007h.
- [27] FABOVÁ Z, SIROTKIN A V. Interrelationships between kisspeptin and FSH in control of porcine ovarian cell functions [J]. *Domestic Animal Endocrinology*, 2021, 74:106520. DOI:10.1016/j.domaniend.2020.106520.
- [28] VINING L M, ZAK L J, HARVEY S C, HARVEY K E. The role of apoptosis in cryopreserved animal oocytes and embryos [J]. *Theriogenology*, 2021, 173:93–101. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2021.07.017.
- [29] CAGNONE G L, TSAI T S, MAKANJI Y, MATTHEWS P, GOULD J, BONKOWSKI M S, ELGASS K D, WONG A S, WU L E, MCKENZIE M, SINCLAIR D A, ST JOHN J C. Restoration of normal embryogenesis by mitochondrial supplementation in pig oocytes exhibiting mitochondrial DNA deficiency [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6:23229. DOI:10.1038/srep23229.
- [30] KIRILLOVA A, SMITZ J E J, SUKHIKH G T, MAZUNIN I. The role of mitochondria in oocyte maturation [J]. *Cells*, 2021, 10(9):2484. DOI: 10.3390/cells10092484.
- [31] TSAI T S, TYAGI S, ST JOHN J C. The molecular characterisation of mitochondrial DNA deficient oocytes using a pig model [J]. *Human Reproduction*, 2018, 33(5):942–953. DOI:10.1093/humrep/dey052.
- [32] SEO H, CHOI Y, SHIM J, CHOI Y, KA H. Regulatory mechanism for expression of IL1B receptors in the uterine endometrium and effects of IL1B on prostaglandin synthetic enzymes during the implantation period in pigs [J]. *Biology of Reproduction*, 2012, 87(2):31. DOI:10.1095/biolreprod.112.099051.
- [33] NAKAMURA Y, AIHARA R, IWATA H, KUWAYAMA T, SHIRASUNA K. IL1B triggers inflammatory cytokine production in bovine oviduct epithelial cells and induces neutrophil accumulation via CCL2 [J]. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2021, 85(5):e13365. DOI:10.1111/aji.13365.
- [34] MENGES C W, ALTOMARE D A, TESTA J R. FAS-associated factor 1 (FAF1): diverse functions and implications for oncogenesis [J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(16):2528–34. DOI: 10.4161/cc.8.16.9280.
- [35] PENG H, HUO J, GAO Y, CHEN J, YU X, XIAO T. Fas-associated protein factor 1 is involved in meiotic resumption in mouse oocytes [J]. *Journal of Reproduction and Development*, 2018, 64(2):173–177. DOI: 10.1262/jrd.2017-081.
- [36] OHSUGI M, ZHENG P, BAIBAKOV B, LI L, DEAN J. Maternally derived FILIA-MATER complex localizes asymmetrically in cleavage-stage mouse embryos [J]. *Development*, 2008, 135(2):259–269. DOI:10.1242/dev.011445.
- [37] PENG H, LIU H, LIU F, GAO Y, CHEN J, HUO J, HAN J, XIAO T, ZHANG W. NLRP2 and FAF1 deficiency blocks early embryogenesis in the mouse [J]. *Reproduction*, 2017, 154(3):245–251. DOI:10.1530/REP-16-0629.

(责任编辑 崔建勋)