

绵羊 *BMPR2* 基因组织表达及其多态性与产羔数的相关性分析

文禹梁^{1,2}, 郭晓飞³, 马琳¹, 张效生³, 张金龙³, 赵生国^{2*}, 储明星^{1*}

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 农业农村部动物遗传育种与繁殖重点实验室, 北京 100193; 2. 甘肃农业大学动物科学技术学院, 甘肃兰州 730070; 3. 天津市畜牧兽医研究所, 天津 300381)

摘要 [目的] 为探讨骨形态发生蛋白 2 型受体 (bone morphogenetic protein receptor 2, *BMPR2*) 基因在卵泡期和黄体期及单羔和多羔小尾寒羊组织表达特征及其多态性与小尾寒羊产羔数之间的关系。[方法] 采用 qPCR 技术检测 *BMPR2* 基因在小尾寒羊 14 种组织中的表达模式。同时, 使用 Sequenom MassARRAY® SNP 技术对 *BMPR2* 基因 3 个单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 位点在 6 个绵羊品种中的多态性进行检测, 并与小尾寒羊产羔数进行关联。[结果] *BMPR2* 在 14 种组织中呈广谱表达, 其中在肺脏、大脑、肝脏以及下丘脑组织高表达; *BMPR2* 在卵泡期多羔组下丘脑-垂体-卵巢组织中的表达量均高于单羔组。 *BMPR2* 基因 g.203707935A>G 和 g.203708072T>C 位点在单、多羔绵羊品种间的等位基因频率差异显著 ($P<0.05$)。通过相关分析发现, g.203708352A>G 位点与小尾寒羊三胎产羔数显著相关 ($P<0.05$), 野生型产羔数显著高于杂合型。通过对该位点不同基因型与小尾寒羊 *FecB* 基因型复合分析发现, 3 种复合基因型与小尾寒羊三胎产羔数显著关联 ($P<0.05$), AA-GG 基因型产羔数显著高于 AA-AG 和 AA-AA 基因型, 推测该位点突变可能削弱了 *FecB* 基因信号强度, 导致产羔数下降。[结论] *BMPR2* 基因 g.203708352A>G 位点与小尾寒羊产羔数呈显著负相关, 为小尾寒羊产羔性状选育提供了参考依据。

关键词 绵羊; *BMPR2* 基因; 组织表达; 单核苷酸多态性 (SNP)

中图分类号 S826 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)20-0098-07

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2021.20.026

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Tissue Expression of *BMPR2* Gene and Correlation Analysis of Its Polymorphism with Litter Size in *Ovis aries*

WEN Yu-liang^{1,2}, GUO Xiao-fei³, MA Lin¹ et al (1. Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193; 2. College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070; 3. Tianjin Institute of Animal Sciences, Tianjin 300381)

Abstract [Objective] To investigate the expression features of bone morphogenetic protein receptor 2 gene (*BMPR2*) in various tissues of Small Tail Han (STH) ewes during different physiological periods (follicular and luteal phases) and with different fecundity (monotocous and polytocous ewes), and analyze the correlation between its polymorphism with litter size in STH sheep. [Method] qPCR technology was used to detect the expression model of *BMPR2* in 14 kinds tissues of STH sheep. Sequenom MassARRAY® SNP assay was applied to detect three single nucleotide polymorphism (SNPs) of *BMPR2* in six sheep breeds, and then the correlation between *BMPR2* polymorphism and litter size in STH sheep was analyzed. [Result] *BMPR2* gene was expressed in all selected tissues of STH sheep and highly expressed in the lung, brain, liver and hypothalamus tissues, and the expression of *BMPR2* in hypothalamus, pituitary, and ovary of polytocous ewes was higher than that of monotocous ewes at follicular phase. The allele frequencies of g.203707935A>G and g.203708072T>C loci of *BMPR2* were significantly different ($P<0.05$) between monotocous and polytocous sheep breeds. The correlation analysis showed that g.203708352A>G locus of *BMPR2* had significant negative effects on litter size of STH sheep, the litter size of wild type was significantly higher than heterozygote genotype ($P<0.05$). The combination analysis of g.203708352A>G locus of *BMPR2* and *FecB* (A746G) showed that the litter size of AA-GG genotype was significantly higher than that of AA-AG and AA-AA genotypes ($P<0.05$). Therefore, it was speculated that g.203708352A>G locus mutation might weaken the downstream signal intensity of *FecB*, resulting in the decrease of litter size. [Conclusion] The SNP locus of g.203708352A>G in *BMPR2* might have negative significant association with the litter size of STH sheep. The present study provided the reference basis for lambing traits selection of STH sheep.

Key words Sheep; Bone morphogenetic protein receptor 2 gene; Tissue expression; Single nucleotide polymorphism (SNP)

绵羊产羔性状是重要的经济性状之一, 遗传力较低, 受遗传、环境和激素水平等多种因素的调控, 但产羔对遗传进展的经济效益贡献高达 96%, 因此挖掘和鉴定绵羊产羔相关的主效基因和多态位点可给羊产业带来巨大的经济效益^[1-2]。标记辅助选择 (marker assisted selection, MAS) 技术在低遗传力性状的选择上应用广泛, 因此为标记辅助选择筛

选有效的多态位点显得尤为重要。鉴于全基因组重测序技术是挖掘功能基因最有效的方式之一^[3-5]。中国农业科学院北京畜牧兽医研究所肉羊遗传育种团队前期对 10 个绵羊品种共 99 个个体进行全基因组重测序, 并按照单、多羔进行分组, 使用 Fst 方法基于 Oar_3.1 版本筛选获得可能与绵羊产羔数相关的基因 *BMPR2* 及其 g.203707935A>G、g.203708072T>C 和 g.203708352A>G 共 3 个 SNPs 位点^[6]。

BMPR2 是骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic proteins, BMPs) 家族成员之一, 为 70 ku 的膜蛋白受体, 具有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性^[7-8]。其被定位于绵羊 2 号染色体, 编码区全长 3 117 bp, 包含 13 个外显子, 共编码 1 038 个氨基酸。研究发现, *BMPR2* 通过 BMP/SMAD 信号通路发挥生物学作用^[9-11]。该通路被广泛认为与哺乳动物卵巢颗粒细胞增殖、生殖激素的合成与分泌以及卵母细胞成熟和排卵等生理活动息息相关^[12], 其主要通过调节促性腺激素释放激素

基金项目 国家自然科学基金项目 (31772580); 农业农村部动物遗传育种与繁殖 (家禽) 重点实验室开放课题 (poultrylab2019-10); 天津市农业科学院青年科研人员创新研究与实验项目 (201915); 国家肉羊产业技术体系专项 (CARS-38); 中国农业科学院科技创新工程项目 (ASTIP-IAS13); 天津市农业科技成果转化与推广项目 (201704020)。

作者简介 文禹梁 (1993—), 男, 河南新乡人, 博士研究生, 研究方向: 动物分子遗传学研究。* 通信作者, 赵生国, 教授, 博士, 从事动物遗传资源研究; 储明星, 研究员, 博士, 从事羊优异繁殖性状的分子机理研究。

收稿日期 2020-12-16

(gonadotropin-releasing hormone, GnRH) 诱导的垂体中相关促性腺激素基因的表达调控,影响促卵泡素 (follicle-stimulating hormone, FSH)、促黄体素 (luteinizing hormone, LH) 以及雌二醇 (estradiol, E_2) 等生殖激素的合成和分泌,进而调控动物的排卵活动^[13-14]。*BMPR2* 是 BMP 家族 2 型受体,而 BMP 家族中的骨形态发生蛋白 4 (bone morphogenetic protein 4, BMP4) 与小尾寒羊产羔数显著相关^[15]。作为 BMP 家族另外一种受体,骨形态发生蛋白 1 型受体 (bone morphogenetic protein receptor 1B, *BMPR1B*) 基因已被鉴定为调控绵羊多羔性状的主效基因^[16],其增加 1 个拷贝数,布鲁拉美利奴羊的排卵数和产羔数分别增加 1.65 个和 0.67 只^[17]。这说明 BMP 家族在调控绵羊产羔性状上发挥着积极作用。Takeda 等^[18] 对小鼠促性腺激素 $L\beta T2$ 细胞的研究发现 *BMPR2* 参与 BMP 诱导的 FSH 转录调控,并且 *BMP6* 和 *BMP7* 的 mRNA 含量因 *BMPR2* 对 GnRH 诱导的 ERK 信号通路的影响而有所差异。*BMPR2* 基因在人、小鼠、牛以及绵羊卵母细胞和颗粒细胞中表达,并且在卵巢原发性、继发性以及窦状卵泡颗粒细胞发挥积极作用^[19-23]。Costa 等^[24] 在山羊卵巢中研究发现 *BMPR2* 在直径 0.2 mm 的卵泡中 mRNA 表达水平显著高于直径 0.1 mm 的卵泡。综上所述,对参与 BMP 信号通路的 *BMPR2* 基因进行研究将有助于更好地理解绵羊的产羔机制。笔者以单羔、多羔小尾寒羊为试验材料,利用实时荧光定量 PCR (qPCR) 技术检测 *BMPR2* 基因在小尾寒羊 14 种组织中的表达特征,并对筛选的 3 个 SNPs 采用 Sequenom MassARRAY® SNP 技术在 6 个绵羊品种中分型,再与小尾寒羊产羔数进行相关性分析,以探讨 *BMPR2* 基因表达及其多态性与绵羊产羔数之间的关系,为更好地阐释绵羊产羔机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样本采集 试验羊只来自山东省郓城县小尾寒羊种羊场,在经过 *FecB* 分型 (*FecB*++型) 的 3 岁健康小尾寒羊母羊中,根据产羔记录随机挑选单羔和多羔母羊各 6 只,运输到天津市畜牧兽医研究所种羊场饲养。对上述 12 只小尾寒羊母羊放置阴道孕酮栓塞 (controlled internal device release, CIDR) 实施同期发情试验,放栓时长 12 d,撤栓后用腹腔镜观察卵泡发育和排卵情况,并使用公羊试情以确定母羊发情状态和采样时间,分别在撤栓后 45 h (卵泡期) 和 10 d (黄体期) 进行屠宰。采集心、肝、脾、肺、肾、甲状腺、肾上腺、大脑、小脑、下丘脑、垂体、卵巢、子宫和输卵管共 14 种组织样品。将采集的新鲜组织放入 2 mL 的 RNase-Free 冻存管并迅速放入液氮罐中,然后转移至 -80 °C 冰箱中贮存备用。

1.2 血液 DNA 和组织 RNA 的提取和检测 绵羊血液 DNA 和组织 RNA 的提取方法参照 DNA、RNA 提取试剂盒 (北京天根科技有限公司) 说明书。利用 Nanodrop2000 微量分光光度计 (Nano Drop Technologies, 美国) 检测提取 DNA、RNA 样本浓度和 OD 值,利用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳对 DNA、RNA 质量进行检测。

1.3 引物设计及 cDNA 合成 根据 GenBank 提供的绵羊 *BMPR2* 编码区序列,利用 Primer Premier 3.0 软件设计跨外显子引物,由北京天一辉远生物科技有限公司合成。引物信息详见表 1。

利用反转录试剂盒 (PrimeScript™ RT Reagent Kit, TaKaRa, 日本) 合成 cDNA,反转录反应体系 (20 μ L) 参考文献禹梁等^[15],全程操作在冰上进行。反应条件如下: 37 °C 15 min, 85 °C 5 s, 对反转录产物进行鉴定后,将符合标准的 cDNA 保存于 -20 °C 冰箱中备用。

表 1 试验所用引物

Table 1 Primers used in the test

基因 Gene	GenBank 登录号 GenBank ID	引物序列 Primer sequence (5'→3')	产物大小 Product size//bp	退火温度 Annealing temperature//°C	引物用途 Application of primers
<i>BMPR2</i>	NM_001306123.1	F 为 AGAATGAGCGCAACCTGTCA, R 为 TGTGCTGGACATCGAATGCT	149	60	qPCR
<i>RPL19</i>	XM_012186026.1	F 为 AATGCCAATGCCAATCT, R 为 CCCTTTCGCTACCTATACC	151	60	内参基因

1.4 荧光定量 PCR (qPCR) 荧光定量检测利用 Roche Light Cycler® 480 II 型荧光定量 PCR 仪进行。反应体系 (20 μ L) 和反应程序参考文献禹梁等^[15] 相关报道。将备用 cDNA 样本 5 倍稀释后,以 2 倍梯度稀释获得稀释倍数为 1~128 倍共 8 个浓度样品,用于标准曲线的绘制;用上述 cDNA 作为模板,对 *BMPR2* 和 *RPL19* 分别进行 qPCR 分析。

1.5 基因分型 采用 Sequenom MassARRAY® SNP 技术对 *BMPR2* 基因 g. 203707935A > G, g. 203708072T > C 和 g.203708352A>G 位点在不同产羔数的绵羊品种中进行分型。分型样品为 704 个不同品种绵羊血样,包括 83 只湖羊、68 只策勒黑羊、23 只滩羊、70 只苏尼特羊和 80 只草原型藏羊以及有产羔数记录的 380 只小尾寒羊。其中,小尾寒羊、湖羊

和策勒黑羊为多羔品种,其他均为单羔品种。分型的具体步骤参考马晓萌等^[25] 相关报道。分型样品为 DNA,质量浓度为 40~80 ng/ μ L,每个样品用量为 20 μ L。

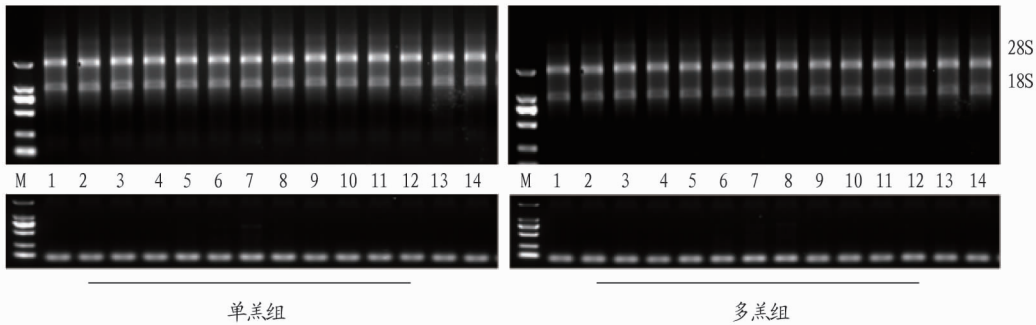
1.6 数据统计与分析 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[26] 计算目的基因相对表达量。利用 SPSS 22.0 (IBM, 美国) 统计软件进行单因素方差分析,并利用最小显著差异 (least significant difference, LSD) 法进行多重比较。应用 Microsoft Excel 2016 (Microsoft Excel, 美国) 软件统计绵羊 *BMPR2* 基因共 3 个 SNPs 位点基因型频率、等位基因频率、多态信息含量 (polymorphism information content, PIC)、杂合度 (heterozygosity, He) 和有效等位基因数 (number of effective alleles, Ne), 计算公式参考 Guo 等^[27] 相关报道,随后进行哈代-温伯格平衡 (Hardy-Weinberg

equilibrium, HWE) 检测。*BMP2* 不同基因型与产羔性状的相关性分析模型参考文禹梁等^[15] 相关报道。

2 结果与分析

2.1 DNA 检测 提取不同品种绵羊血液基因组 DNA, 并进行 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图 1 所示。血液基因组 DNA 条带单一且无杂带, 浓度与纯度均表现良好, 可满足后续试验要求。

2.2 RNA 检测 提取小尾寒羊 14 种组织的总 RNA, 并使用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测其质量。如图 2A 所示, 提取的组织总 RNA 无明显降解, 28S 和 18S 条带清晰可见, 灰度值约 2:1。利用 Nanodrop2000 微量分光光度计检测提取 RNA 样本浓度和 OD 值, OD_{260}/OD_{280} 均在 1.9~2.1, 说明提取的 RNA 纯度较高。以反转录之后的 cDNA 为模板对 *RPL19* 基因进行扩增, 结果如图 2B 所示, 可见 *RPL19* 基因在 14 种组织中扩增效果良好, 满足 qPCR 试验要求。

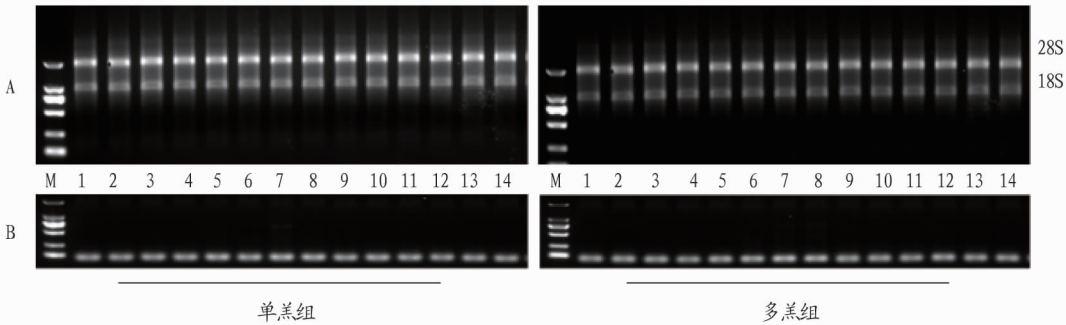


注: M. DL5000 DNA marker; 1. 小尾寒羊; 2. 湖羊; 3. 苏尼特羊; 4. 策勒黑羊; 5. 滩羊; 6. 草原型藏羊

Note: M. DL5000 DNA marker; 1. Small Tail Han sheep; 2. Hu Sheep; 3. Sunite Sheep; 4. Cele black sheep; 5. Tan sheep; 6. Prairie Tibet-an sheep

图 1 不同品种绵羊 DNA 琼脂糖电泳检测

Fig.1 Agarose gel electrophoresis detection of DNA from different sheep breeds



注: M. DL2000 DNA marker; 1. 心脏; 2. 肝脏; 3. 脾脏; 4. 肺脏; 5. 肾脏; 6. 甲状腺; 7. 肾上腺; 8. 大脑; 9. 小脑; 10. 下丘脑; 11. 垂体; 12. 卵巢; 13. 子宫; 14. 输卵管

Note: M. DL2000 DNA marker; 1. Heart; 2. Liver; 3. Spleen; 4. Lung; 5. Kidney; 6. Thyroid; 7. Adrenal gland; 8. Brain; 9. Cerebellum; 10. Hypothalamus; 11. Pituitary; 12. Ovary; 13. Uterus; 14. Oviduct

图 2 小尾寒羊 14 种组织 RNA 电泳 (A) 及 cDNA (B) 检测

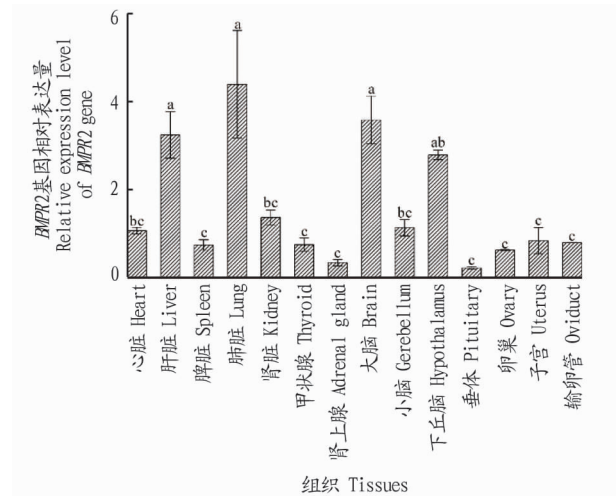
Fig.2 Electrophoresis of RNA (A) and cDNA (B) detection in 14 kinds of tissues of Small Tail Han Sheep

2.3 *BMP2* 基因的组织表达

2.3.1 *BMP2* 基因在卵泡期不同组织间的表达模式。作为 BMP/SMAD 通路唯一的 2 型受体, *BMP2* 在 14 种组织中广谱表达, 无组织特异性 (图 3)。以垂体组织中的 *BMP2* 基因 mRNA 的相对表达量作为参照, 在肺脏、大脑、肝脏以及下丘脑中的相对表达量较高, 分别为垂体组织表达量的 18.71 倍、15.26 倍、13.82 倍和 11.90 倍, 差异均达到极显著水平 ($P < 0.001$)。 *BMP2* 基因在卵巢、子宫和输卵管中的表达量分别为垂体的 2.73 倍 ($P = 0.48$)、3.64 倍 ($P = 0.29$) 和 3.43 倍 ($P = 0.32$)。

2.3.2 *BMP2* 基因在性腺轴组织间的表达模式。对 *BMP2* 在不同生理时期单羔和多羔组的表达模式进行了研究 (图 4)。结果显示, 多羔组 *BMP2* 在卵泡期下丘脑、垂体和卵巢组织中的相对表达量均高于单羔组, 而多羔组 *BMP2* 在黄体期下丘脑组织中的相对表达量低于单羔组, 但差异均未达到显著水平 ($P > 0.05$)。

2.4 *BMP2* 基因多态性 *BMP2* 基因 g. 203707935A>G (a)、g. 203708072T>C (b) 和 g. 203708352A>G (c) 分型结果如图 5 所示。



注: 不同组织间标有不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Note: Different small letters among different tissues indicated significant difference ($P < 0.05$)

图 3 *BMP2* 基因在小尾寒羊卵泡期各组织中的相对表达量
Fig.3 Relative expression levels of *BMP2* gene in various tissues of Small Tail Han Sheep in follicular phase

由表 2 可知, *BMP2* 基因 g. 203707935A > G 和 g.203708072T>C 位点在单、多羔绵羊品种间的等位基因频率存在显著差异($P<0.05$)。

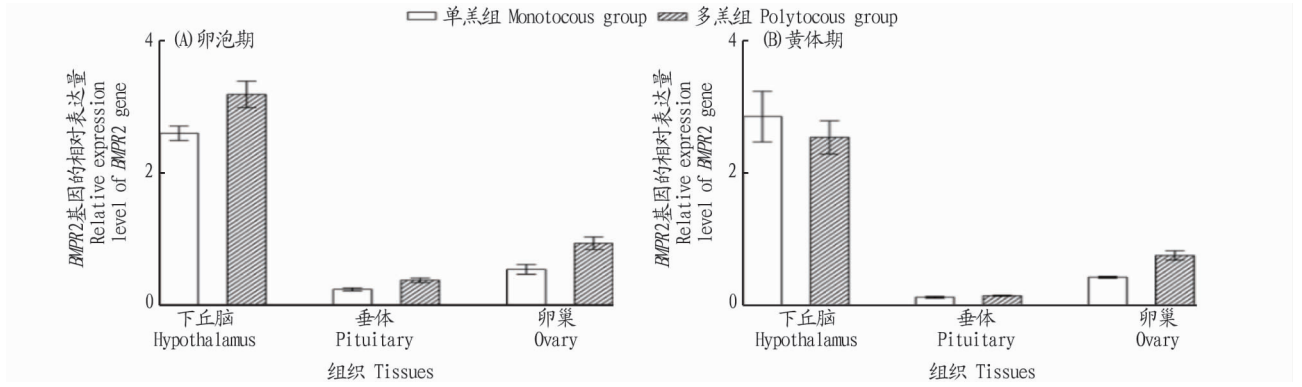


图 4 *BMP2* 基因在小尾寒羊性腺轴组织中的表达

Fig.4 Relative expression levels of *BMP2* gene in gonadal axis tissues of Small Tail Han Sheep

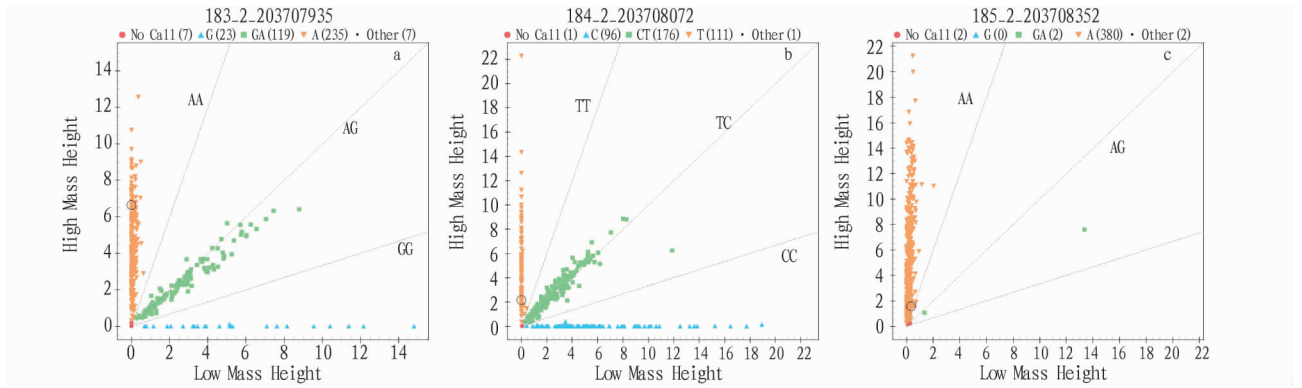


图 5 *BMP2* 基因分型结果

Fig.5 Genotyping results of *BMP2*

表 2 *BMP2* 基因不同 SNP 位点在单、多羔绵羊品种中的基因型频率和等位基因频率

Table 2 Genotype and allele frequencies of different SNPs of *BMP2* gene in monotocous and polytoeous sheep breeds

位点 Locus	基因型 Genotype	单羔基因型频率(样本数) Genotype frequency in monotocous sheep (sample size)	多羔基因型频率(样本数) Genotype frequency in polytoeous sheep (sample size)	卡方检验 χ^2 test (P value)	等位基因 Allele	单羔中基因频率 Allele frequency in monotocous sheep	多羔中基因频率 Allele frequency in polytoeous sheep	卡方检验 χ^2 test (P value)
g.203707935A>G	AA	0.74(129)	0.66(352)	0.07	A	0.86	0.81	0.03
	AG	0.24(41)	0.29(152)		G	0.14	0.19	
	GG	0.02(3)	0.05(24)					
g.203708072T>C	TT	0.16(28)	0.26(141)	0.02	T	0.42	0.49	0.02
	TC	0.51(88)	0.46(244)		C	0.58	0.51	
	CC	0.33(57)	0.28(149)					
g.203708352A>G	AA	0.98(170)	0.98(521)	0.71	A	0.99	0.99	0.75
	AG	0.02(3)	0.02(9)		G	0.01	0.01	
	GG	0.00(0)	0.00(0)					

注: $P<0.05$ 表示差异显著, $P<0.01$ 表示差异极显著

Note: $P<0.05$ indicated significant differences, $P<0.01$ indicated extremely significant differences

由表 3 可知, g.203707935A>G 位点除在小尾寒羊中处于中度多态($0.25<PIC<0.5$)外, 在其他绵羊品种中均处于低度多态($PIC<0.25$); g.203708072T>C 位点在 6 个绵羊品种中均处于中度多态($0.25<PIC<0.5$); g.203708352A>G 位点在 6 个绵羊品种中均处于低度多态($PIC<0.25$)。卡方检验结果表明, g.203707935A>G 位点在 6 个绵羊品种中均处于哈代-温

伯格平衡状态($P>0.05$); g.203708072T>C 位点除了小尾寒羊外在其余绵羊品种中处于哈代-温伯格平衡状态($P>0.05$); g.203708352A>G 位点仅在小尾寒羊和湖羊品种中处于哈代-温伯格平衡状态($P>0.05$)。

2.5 *BMP2* 基因多态性与小尾寒羊产羔数的关系 由表 4 可知, *BMP2* 基因 g.203708352A>G 位点的突变与小尾寒羊

三胎产羔数显著相关($P<0.05$),野生型产羔数显著高于杂合型。对该位点不同基因型与小尾寒羊 *FecB* 基因型进行复合,共产生3种基因型(表5),且与小尾寒羊三胎产羔数显著关联($P<0.05$)。AA-GG 基因型产羔数显著高于 AA-AG 和 AA-AA 基因型。

表3 *BMPR2* 基因不同 SNP 位点在6个绵羊品种中的群体遗传学分析

Table 3 Population genetic analysis of different SNPs of *BMPR2* gene in six sheep breeds

位点 Locus	品种 Breed	基因型频率 Genotype frequency			等位基因频率 Allele frequency		多态信息 含量(PIC) Polymorphism information content	杂合度 Heterozy- gosity(He)	有效等 位基因数 Effective number of alleles (Ne)	卡方 检验 χ^2 test (P 值)
		AA	AG	GG	A	G				
g.203707935A>G	小尾寒羊 Small Tail Han Sheep	0.62	0.32	0.06	0.78	0.22	0.28	0.34	1.52	0.14
	湖羊 Hu Sheep	0.83	0.17	0.00	0.92	0.08	0.14	0.15	1.18	0.40
	策勒黑羊 Cele Black Sheep	0.71	0.28	0.01	0.85	0.15	0.23	0.26	1.35	0.56
	滩羊 Tan Sheep	0.96	0.04	0.00	0.98	0.02	0.04	0.04	1.04	0.92
	苏尼特羊 Sunite Sheep	0.72	0.27	0.01	0.85	0.15	0.22	0.26	1.34	0.59
	草原型藏羊 Prairie Tibetan Sheep	0.71	0.26	0.03	0.84	0.16	0.23	0.26	1.36	0.97
g.203708072T>C		TT	TC	CC	T	C				
	小尾寒羊 Small Tail Han Sheep	0.28	0.44	0.28	0.50	0.50	0.38	0.50	2.00	0.02
	湖羊 Hu Sheep	0.28	0.41	0.31	0.48	0.52	0.37	0.50	2.00	0.10
	策勒黑羊 Cele Black Sheep	0.10	0.50	0.40	0.35	0.65	0.35	0.46	1.84	0.43
	滩羊 Tan Sheep	0.22	0.48	0.30	0.46	0.54	0.37	0.50	1.98	0.86
	苏尼特羊 Sunite Sheep	0.16	0.51	0.33	0.41	0.59	0.37	0.49	1.94	0.62
g.203708352A>G	草原型藏羊 Prairie Tibetan Sheep	0.15	0.51	0.34	0.41	0.59	0.37	0.48	1.93	0.58
		AA	AG	GG	A	G				
	小尾寒羊 Small Tail Han Sheep	0.99	0.01	0.00	1.00	0.00	0.01	0.01	1.01	0.96
	湖羊 Hu Sheep	0.99	0.01	0.00	0.99	0.01	0.01	0.01	1.01	0.96
	策勒黑羊 Cele Black Sheep	1.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	—
	滩羊 Tan Sheep	1.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	—
	苏尼特羊 Sunite Sheep	1.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	—
	草原型藏羊 Prairie Tibetan Sheep	1.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	—

注: $P>0.05$ 表示位点在该品种中处于哈代-温伯格平衡状态

Note: $P>0.05$ indicates that the locus is in Hardy-Weinberg equilibrium

表4 *BMPR2* 不同 SNP 位点各基因型与小尾寒羊产羔数的关联分析

Table 4 Correlation analysis between different SNPs genotypes of *BMPR2* and litter size of STH sheep

位点 Locus	基因型 Genotype	第1胎 First parity		第2胎 Second parity		第3胎 Third parity	
		样本数 Sample size	产羔数 Litter size	样本数 Sample size	产羔数 Litter size	样本数 Sample size	产羔数 Litter size
g.203707935A>G	AA	235	1.86±0.04	148	2.14±0.06	66	2.39±0.09
	AG	119	1.89±0.06	68	2.07±0.09	19	2.58±0.17
	GG	23	1.91±0.06	9	2.01±0.26	5	2.10±0.33
g.203708072T>C	TT	111	1.96±0.06	58	2.09±0.10	22	2.27±0.16
	TC	176	1.82±0.05	111	2.04±0.07	40	2.48±0.12
	CC	96	1.87±0.07	59	2.29±0.26	29	2.45±0.14
g.203708352A>G	AA	371	1.77±0.03 a	228	2.10±0.05 a	90	2.40±0.05 a
	AG	8	1.20±0.33 b	6	1.55±0.38 b	5	1.67±0.07 b

注:同一位点同列不同小写字母代表差异显著($P<0.05$)

Note:Different lowercase letters in the same column represent significant differences at the same locus($P<0.05$)

表5 *BMPR2* 与 *FecB* 复合基因型与小尾寒羊产羔数的相关性分析

Table 5 Correlation analysis between the combined genotypes of *BMPR2* (g.203708352A>G) and *FecB* and litter size in STH sheep

基因型 Genotype	第1胎 First parity		第2胎 Second parity		第3胎 Third parity	
	样本数 Sample size	产羔数 Litter size	样本数 Sample size	产羔数 Litter size	样本数 Sample size	产羔数 Litter size
AA-AA	58	1.03±0.07 c	33	1.15±0.11 c	10	1.25±0.20 c
AA-AG	177	1.87±0.04 b	111	2.08±0.06 b	34	2.28±0.09 b
AA-GG	145	2.21±0.07 a	85	2.53±0.07 a	38	2.71±0.10 a

注:同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

Note:Different lowercase letters in the same column represent significant difference($P<0.05$)

3 讨论

为理解绵羊产多羔的分子机制,育种专家一直致力于寻找影响绵羊产羔数的关键基因。迄今为止,*BMPR1B*、骨形态发生蛋白 15 (bone morphogenetic protein 15, *BMP15*)、生长分化因子 9 (growth differentiation factor 9, *GDF9*) 已被鉴定为影响绵羊产羔数的主效基因^[28-31]。但相对于中国巨大的羊产业来说还相对较少,因此寻找影响绵羊产羔相关主效基因依然是长久且明确的目标^[32]。*BMPR2* 作为 BMP 通路唯一的 2 型受体在哺乳动物卵泡发育和卵巢颗粒细胞增殖等方面均发挥着重要作用^[33-34]。目前其对绵羊产羔数的影响还尚未报道。该研究选择全基因组重测序技术筛选获得的 *BMPR2* 基因,首次对 *BMPR2* 基因在小尾寒羊各组织 mRNA 水平和多态性进行分析,并探讨其与绵羊产羔之间的关系。

3.1 *BMPR2* 基因组织表达对动物繁殖活动的影响 该研究发现 *BMPR2* 基因在卵泡期小尾寒羊 14 种组织呈广谱表达,且在卵泡期多羔组下丘脑-垂体-卵巢组织表达均高于单羔组,表明其对小尾寒羊各项器官正常的生理功能起重要调节作用,特别是在哺乳动物卵巢发育以及性激素分泌方面。FSH、LH 和 E_2 作为衡量卵巢功能的重要激素,对卵巢功能和排卵有着重要调节作用。研究发现,*BMPR2* 在卵泡发育的各个阶段均可以被检测到,并且在性激素的分泌、卵巢的发育、卵泡生长以及颗粒细胞增殖方面有重要促进作用^[18,35]。Liu 等^[30] 研究发现,*BMPR2* 作为受体,对牛卵泡生长和颗粒细胞增殖有促进作用。*BMPR2* 在优势卵泡 ($d > 13$ mm, $E_2 > 180$ ng/mL) 颗粒细胞和卵泡膜细胞中的 mRNA 是其他卵泡类型的 1.5~2.0 倍^[35],在牛卵泡细胞中添加 *BMPR2* 可使卵泡直径显著增加^[36]。Foroughinia 等^[37] 研究发现 *BMPR2* 在母绵羊高繁殖力组卵泡的表达量极显著高于低繁殖力组,且在卵巢组织的表达趋势与在卵泡组织中相似,但差异不显著。这与该研究在卵泡期下丘脑-垂体和卵巢组织中 *BMPR2* 的表达模式相符。Hu 等^[38] 通过对芬兰羊进行高通量转录组学测序发现,*BMPR2* 基因在高繁殖力组表达量显著高于低繁殖力组。由此可见,*BMPR2* 作为配体基因,积极参与哺乳动物的生理生殖活动,在卵巢功能调控特别是激素分泌方面有一定的促进作用。

3.2 *BMPR2* 基因多态性与小尾寒羊产羔数的相关性分析 这 3 个 SNP 位点均位于绵羊 2 号染色体 *BMPR2* 基因第 12 个外显子上,且在 NCBI 网站中已有报道,但与绵羊产羔数关联分析尚未见文献报道。g.203707935A>G 和 g.203708072T>C 位点在单、多羔绵羊品种中的等位基因频率均存在显著差异,初步表明这些位点与绵羊产羔数有关。3 个 SNP 位点在各绵羊品种中的选择潜力不尽相同,这可能是由于某些品种数量相对较少,或某些品种遗传多样性相对较低^[39]。g.203708352A>G 位点与小尾寒羊产羔数显著相关 ($P < 0.05$),野生型产羔数显著高于杂合型,暗示该位点突变可能在一定程度上对绵羊排卵数起抑制作用,这可能是由于该位点的错义突变使得蛋白质序列第 581 位异亮氨酸置换为缬氨酸所导致。*FecB* 基因作为影响绵羊产羔数的主效基

因,是由于 *BMPR1B* 编码区发生了 A746G 突变,导致第 249 位的氨基酸由谷氨酰胺变为精氨酸 (Q249R),从而提高了绵羊排卵数和产羔数^[23,40]。*BMPR1B* 为 BMP 的 1 型受体,其突变后增加了信号转导过程对下游受体的信号强度,导致卵泡早熟、排卵数增加^[40]。据此可推测出 g.203708352A>G 位点的突变可能影响了 *FecB* 基因效应,从而导致产羔数下降。将该位点与 *FecB* 各基因型进行复合分析发现,3 种复合基因型与小尾寒羊三胎产羔数显著关联 ($P < 0.05$),AA-GG 产羔数显著高于 AA-AG 和 AA-AA 基因型。据此可推测出 g.203708352A>G 位点突变拷贝数的增加可能对 *FecB* 基因效应有一定的抑制作用,从而削弱了 BMP 下游信号选择强度,进而影响卵泡发育、成熟以及排卵整个生理过程,最终导致排卵数减少、产羔数降低。

4 结论

该研究发现 *BMPR2* 基因表达与绵羊产羔数存在一定程度的负相关,基因分型发现 g.203708352A>G 位点的突变可显著减少小尾寒羊产羔数,推测该位点对小尾寒羊产羔数的调控可能是通过影响 *FecB* 基因效应来实现的。

参考文献

- [1] BRAVO S, LARAMA G, PAZ E, et al. Polymorphism of the *GDF9* gene associated with litter size in Araucana creole sheep [J]. *Anim Genet*, 2016, 47 (3): 390-391.
- [2] 张军霞, 乐祥鹏, 王维民, 等. 绵羊 *KITLG* 基因的表达及其多态性与产羔性状关联分析 [J]. *农业生物技术学报*, 2017, 25 (6): 893-900.
- [3] 宋娜娜, 钟金城, 柴志欣, 等. 三江黄牛全基因组数据分析 [J]. *中国农业科学*, 2017, 50 (1): 183-194.
- [4] YANO K, YAMAMOTO E, AYA K, et al. Genome-wide association study using whole-genome sequencing rapidly identifies new genes influencing agronomic traits in rice [J]. *Nat Genet*, 2016, 48 (8): 927-934.
- [5] 潘章源, 贺小云, 刘秋月, 等. 全基因组测序 (WGS) 在畜禽群体进化和功能基因挖掘中的应用 [J]. *农业生物技术学报*, 2016, 24 (12): 1945-1954.
- [6] PAN Z Y, LI S D, LIU Q Y, et al. Whole-genome sequences of 89 Chinese sheep suggest role of *RFXP2* in the development of unique horn phenotype as response to semi-feralization [J]. *Gigascience*, 2018, 7 (4): 1-15.
- [7] EMMERSON P J, DUFFIN K L, CHINTHARLAPALLI S, et al. *GDF15* and growth control [J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 1-7.
- [8] WOZNEY J M, ROSEN V, CELESTE A J, et al. Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities [J]. *Science*, 1988, 242 (4885): 1528-1534.
- [9] TAN S, FENG B Y, YIN M Z, et al. Stromal *Senp1* promotes mouse early folliculogenesis by regulating *BMP4* expression [J]. *Cell Biosci*, 2017, 7 (1): 1-12.
- [10] 徐业芬. *Smad* 信号转导通路相关基因表达与湖羊高繁殖力关系的研究 [D]. 南京农业大学, 2010.
- [11] CANTY-LAIRD E, CARRÉ G A, MANDON-PÉPIN B, et al. First evidence of bone morphogenetic protein 1 expression and activity in sheep ovarian follicles [J]. *Biol Reprod*, 2010, 83 (1): 138-146.
- [12] 文禹梁, 马琳, 赵生国, 等. *Bmp/Smad* 信号通路及其在哺乳动物卵巢发育中的作用 [J]. *中国畜牧杂志*, 2019, 55 (8): 13-19.
- [13] REGAN S L, KNIGHT P G, YOVICH J L, et al. Infertility and ovarian follicle reserve depletion are associated with dysregulation of the FSH and LH receptor density in human antral follicles [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2017, 446: 40-51.
- [14] SIRARD M A. Somatic environment and germinal differentiation in antral follicle: The effect of FSH withdrawal and basal LH on oocyte competence acquisition in cattle [J]. *Theriogenology*, 2016, 86 (1): 54-61.
- [15] 文禹梁, 王翔宇, 郭晓飞, 等. 不同产羔数小尾寒羊 *BMP4* 基因表达及其错义突变与产羔数关联分析 [J]. *农业生物技术学报*, 2019, 27 (1): 80-88.
- [16] 陶林, 郭晓飞, 文禹梁, 等. *FecB* 突变对小尾寒羊卵泡发育及 *AMH* 和 *AMHR2* 基因表达的影响 [J]. *农业生物技术学报*, 2019, 27 (4): 684-

- 691.
- [17] FOGARTY N M. A review of the effects of the Booroola gene (FecB) on sheep production[J]. *Small Rumin Res*, 2009, 85(2/3): 75-84.
- [18] TAKEDA M, OTSUKA F, TAKAHASHI H, et al. Interaction between gonadotropin-releasing hormone and bone morphogenetic protein-6 and -7 signaling in L β T2 gonadotrope cells[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2012, 348(1): 147-154.
- [19] SELVARAJU S, FOLGER J K, GUPTA P S, et al. Stage-specific expression and effect of bone morphogenetic protein 2 on bovine granulosa cell estradiol production; regulation by cocaine and amphetamine regulated transcript[J]. *Domest Anim Endocrinol*, 2013, 44(3): 115-120.
- [20] LIMA I M T, BRITO I R, ROSSETTO R, et al. BMPRII and BMPRII mRNA expression levels in goat ovarian follicles and the *in vitro* effects of BMP-15 on preantral follicle development[J]. *Cell Tissue Res*, 2012, 348(1): 225-238.
- [21] ERICKSON G F, SHIMASAKI S. The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2003, 1(1): 1-9.
- [22] KHALAF M, MORERA J, BOURRET A, et al. BMP system expression in GCs from polycystic ovary syndrome women and the *in vitro* effects of BMP4, BMP6, and BMP7 on GC steroidogenesis[J]. *Eur J Endocrinol*, 2013, 168(3): 437-444.
- [23] SOUZA C J, MACDOUGALL C, MACDOUGALL C, et al. The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 B (BMPRI1) gene[J]. *J Endocrinol*, 2001, 169(2): R1-R6.
- [24] COSTA J J, PASSOS M J, LEITÃO C C, et al. Levels of mRNA for bone morphogenetic proteins, their receptors and SMADs in goat ovarian follicles grown *in vivo* and *in vitro*[J]. *Reprod Fertil Dev*, 2012, 24(5): 723-732.
- [25] 马晓萌, 轩俊丽, 王慧华, 等. *TXNRD1* 基因多态性与乌珠穆沁绵羊生长性状的关联分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2016, 47(5): 909-921.
- [26] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta C_t$} method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [27] GUO X F, HU W P, LANG X Z, et al. Two single nucleotide polymorphisms sites in $\alpha 1$ -AT gene and their association with somatic cell score in Chinese Holstein cows[J]. *J Biol Res (Thessalon)*, 2017, 24(1): 1-8.
- [28] ORISAKA M, JIANG J Y, ORISAKA S, et al. Growth differentiation factor 9 promotes rat preantral follicle growth by up-regulating follicular androgen biosynthesis[J]. *Endocrinology*, 2009, 150(6): 2740-2748.
- [29] PAN Z Y, WANG X Y, DI R, et al. A 5-methylcytosine site of growth differentiation factor 9 (GDF9) gene affects its tissue-specific expression in sheep[J]. *Animals*, 2018, 8(11): 1-12.
- [30] LIU C, YUAN B, CHEN H, et al. Effects of MiR-375-BMPRI2 as a key factor downstream of BMP15/GDF9 on the Smad1/5/8 and Smad2/3 signaling pathways[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(1): 213-225.
- [31] SHOKROLLAHI B, MORAMMAZI S. Polymorphism of GDF9 and BMPRI1 genes and their association with litter size in Markhoz goats[J]. *Reprod Domest Anim*, 2018, 53(4): 971-978.
- [32] LIU Q Y, PAN Z Y, WANG X Y, et al. Progress on major genes for high fecundity in ewes[J]. *Front Agr Sci Eng*, 2014, 1(4): 282-290.
- [33] PULKKI M M, MOTTERSHEAD D G, PASTERNAK A H, et al. A covalently dimerized recombinant human bone morphogenetic protein-15 variant identifies bone morphogenetic protein receptor type 1B as a key cell surface receptor on ovarian granulosa cells[J]. *Endocrinology*, 2012, 153(3): 1509-1518.
- [34] HIRSCHHORN T, LEVI-HOFMAN M, DANZIGER O, et al. Differential molecular regulation of processing and membrane expression of Type-I BMP receptors: Implications for signaling[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 348(14): 2645-2662.
- [35] RAJESH G, MISHRA S R, PAUL A, et al. Transcriptional and translational abundance of Bone morphogenetic protein (BMP) 2, 4, 6, 7 and their receptors BMPRI1, 1B and BMPRI2 in buffalo ovarian follicle and the role of BMP4 and BMP7 on estrogen production and survival of cultured granulosa cells[J]. *Res Vet Sci*, 2018, 118: 371-388.
- [36] DA CUNHA E V, MELO L R F, SOUSA G B, et al. Effect of bone morphogenetic proteins 2 and 4 on survival and development of bovine secondary follicles cultured *in vitro*[J]. *Theriogenology*, 2018, 110: 44-51.
- [37] FOROUGHINIA G, FAZILEH A, EGHBALSAIED S. Expression of genes involved in BMP and estrogen signaling and AMPK production can be important factors affecting total number of antral follicles in ewes[J]. *Theriogenology*, 2017, 91: 36-43.
- [38] HU X, POKHAREL K, PEIPPO J, et al. Identification and characterization of miRNAs in the ovaries of a highly prolific sheep breed[J]. *Anim Genet*, 2016, 47(2): 234-239.
- [39] 周梅, 曹晓涵, 贺小云, 等. 绵羊 *FSTL1* 基因组织表达及其多态性与产羔数之间的关系[J]. *农业生物技术学报*, 2018, 26(5): 801-810.
- [40] GUO X F, WANG X Y, DI R, et al. Metabolic effects of FecB gene on follicular fluid and ovarian vein serum in sheep (*Ovis aries*) [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(2): 1-14.

(上接第44页)

- [8] 贺鸿雁, 孙存华, 杜伟, 等. PEG6000 胁迫对花生幼苗渗透调节物质的影响[J]. *中国油料作物学报*, 2006, 28(1): 76-78, 82.
- [9] 胡树平, 高聚林, 马捷, 等. 油菜不同品种抗旱性能比较[J]. *干旱地区农业研究*, 2010, 28(4): 94-101.
- [10] 温蕊, 侯建华, 张艳芳, 等. 干旱胁迫对向日葵种子萌发的影响及其抗旱性鉴定[J]. *干旱地区农业研究*, 2018, 36(2): 186-191.
- [11] 杨旭东, 聂慧, 侯建华, 等. PEG 模拟干旱胁迫对向日葵种子萌发的影响[J]. *种子*, 2016, 35(5): 71-75.
- [12] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中华人民共和国国家标准. 农作物种子检验规程 发芽试验: GB/T 35434—1995[S]. 北京: 中国标准出版社, 1995.
- [13] 张丽英, 张正斌, 徐萍, 等. 黄淮小麦农艺性状进化及对产量性状调控机理的分析[J]. *中国农业科学*, 2014, 47(5): 1013-1028.
- [14] 祁旭升, 王兴荣, 许军, 等. 胡麻种质资源成株期抗旱性评价[J]. *中国农业科学*, 2010, 43(15): 3076-3087.
- [15] 崔良基. 向日葵栽培生理与栽培技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2013.
- [16] 刘富社, 阿兰·博让, 彭克敬. 向日葵研究与开发[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1994.
- [17] 贾秀苹, 陈炳东, 卯旭辉, 等. 甘肃省向日葵产业化发展的思考[J]. *农业科技通讯*, 2011(3): 7-10.
- [18] 卯旭辉, 陈炳东, 葛玉彬, 等. 高产优质油葵杂交种陇葵杂2号选育[J]. *中国种业*, 2012(4): 52-53.
- [19] HAIRMANIS A, KUSTIANTO B, SUWARNO S. Correlation analysis of agronomic characters and grain yield of rice for tidal swamp areas[J]. *Indonesian journal of agricultural science*, 2013, 11(1): 11-15.
- [20] MATHURE S, SHAIKH A, RENUKA N, et al. Characterisation of aromatic rice (*Oryza sativa* L.) germplasm and correlation between their agronomic and quality traits[J]. *Euphytica*, 2011, 179(2): 237-246.
- [21] 金梦阳, 危文亮, 严新初. 我国向日葵育种研究现状及发展对策[J]. *内蒙古农业大学学报(自然科学版)*, 2008, 29(3): 232-236.
- [22] 王赞, 李源, 高洪文, 等. 鸭茅苗期抗旱性综合评价[J]. *干旱地区农业研究*, 2007, 25(6): 31-36.
- [23] 宋殿秀, 崔良基, 王德兴, 等. 食用向日葵杂交种根系形态和生物量对苗期干旱的响应[J]. *辽宁农业科学*, 2020(5): 1-4.
- [24] 马宇. 向日葵苗期抗旱性评价及全基因组关联分析[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018.