نشریه پژوهش در نشخوارکنندگان
جلد سوم، شماره سوم، ۱۳۹۴
http://ejrr.gau.ac.ir

بررسی ارتباط چند شکلی ژنهای لپتین و گیرنده هورمون رشد با کیفیت منی گاو هلشتاین

مهسا عسگری[۱]، *صادق علیجانی[۲]، آرش جوانمرد[۳] و حسین دقیق کیا[۲]
[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد، [۲]دانشیار و [۳]استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
تاریخ دریافت: ۹۴/۶/۳۰؛ تاریخ پذیرش: ۹۴/۹/۲۰

چکیده

سابقه و هدف: هدف از مطالعه حاضر بررسی ارتباط چند شکلی دو ژن کاندیدای لپتین (شامل دو جایگاه اگزون ۲ و اینترون ۲) و گیرنده هورمون رشد (قسمتی از پروموتور) با صفات کیفی منی گاوهای نر هلشتاین بود.

مواد و روش‌ها: به این منظور مجموعا ۶۹ گاو نر از دو ایستگاه اصلاح نژاد شمالغرب کشور (۴۱ گاو نر) و مرکز اصلاح‌نژاد و بهبود تولیدات دامی کشور (۲۸ گاو نر) انتخاب شد که در بین سالهای ۱۳۹۲ – ۱۳۸۲ اسپرم گیری شده بودند. چهار صفت مورد مطالعه‌ی مربوط به کیفیت منی شامل حجم انزال (سی‌سی)، جمعیت اسپرم (میلیون/سی‌سی)، درصد اسپرم زنده قبل از انجماد (درصد) و درصد اسپرم زنده بعد از ذوب (درصد) بودند. استخراج DNA با استفاده از روش نمکی با کمی تغییرات انجام شد، سپس ارزیابی چندشکلی در دو جایگاه ژن لپتین (اگزون ۲ و اینترون ۲) به روش PCR-RFLP و در ژن گیرنده هورمون رشد (پروموتور) با روش ریز ماهواره انجام شد.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که تمام جایگاههای مورد بررسی چند شکل بوده‌اند. با ادغام دو جمعیت به یک جمعیت، در جایگاه اگزون ۲ ژن لپتین، فراوانی ژنوتیپ‌های TT، AT وAA به‌ترتیب ۰/۲۸، ۰/۲۰و ۰/۵۲ و فراوانی آلل T و آلل A به‌ترتیب ۰/۶۲±۰/۰۴۱ و ۰/۳۸ ±۰/۰۴۱ برآورد شد. به‌علاوه در جایگاه اینترون ۲ ژن لپتین، فراوانی ژنوتیپ‌های BB, AB, AA، به‌ترتیب ۰ ، ۰/۶۸ و ۰/۳۲ و فراوانی آلل A و B، به‌ترتیب ۰/۰۳۱ ± ۰/۸۴ و ۰/۱۶±۰/۰۳۱ برآورد شد. در جایگاه پروموتور ژن گیرنده هورمون رشد سه ژنوتیپ TG_{17}/TG_{17}،

*مسئول مکاتبه: sad-ali@tabrizu.ac.ir

$TG_{۱۷}$/ $TG_{۲۱}$ و $TG_{۲۱}$/ $TG_{۲۱}$ به‌ترتیب با فراوانی ۰/۲۷، ۰/۴۸ و ۰/۲۵ و دو آلل $TG_{۲۱}$ و $TG_{۱۷}$ بـه ترتیـب بـا فراوانـی ۰/۰۴۲ ± ۰/۴۹ و ۰/۰۴۲ ± ۰/۵۱ مشـاهده شـد. در جایگـاه‌هـای پروموتـور گیرنـده هورمـون رشـد (P<۰/۶۷) و اینترون ۲ ژن لپتین (P<۰/۱۲) تعادل‌هاردی واینبرگ برقرار بود، در حالی که برای جایگاه اگزون ۲ ژن لپتین (P<۰/۰۱) تعادل‌هاردی- واینبرگ برقرار نبود.

نتیجه‌گیری: به‌طورکلی بررسی‌ها نشان داد که ارتباط معنی‌داری (P<۰/۰۱) بین چند شکلی جایگـاه‌هـای مـورد نظر با صفات کیفی منی وجود دارد. ژنوتیپ AA جایگاه اگزون ۲ ژن لپتین برای صفات حجم منـی و درصـد اسپرم زنده قبل از انجماد و ژنوتیپ TT این جایگاه برای صفات جمعیت اسـپرم و درصـد زنـده مـانی بعـد از انجماد، ژنوتیپهای مطلوب بودند. در جایگاه اینترون ۲ این ژن، ژنوتیپ AA برای تمام صفات مطلـوب بـوده و در جایگاه پروموتور ژن گیرنده هورمون رشد نیز ژنوتیپ $TG_{۱۷}$/ $TG_{۱۷}$ برای تمام صفات، به جز صفت حجـم منی، مناسب تشخیص داده شد و نوع $TG_{۲۱}$/$TG_{۲۱}$ نیز برای صفت حجم منی مناسب بود. همچنـین نتـایج ایـن مطالعه، در برنامه انتخاب به کمک نشانگرها در جهت بهبود صفات بیان شده، می‌تواند مورد بررسی قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: منی، هلشتاین، لپتین، گیرنده هورمون رشد، چند شکلی

مقدمه

کلیدی‌ترین رمز پیشرفت صنعت پرورش گاوهای هلشتاین و تبادلات ژنتیکی در مزارع پرورش در تلقیح مصنوعی نهفته است. در حال حاضر تلقیح مصنوعی (AI) از قدیمی‌ترین و رایج ترین فناوری‌های کمک کننده به تکنولوژی باروری و یک ابزار مهم در تولید نتایج با پتانسیل ژنتیکی بالا است (۳۰). برای حصول به بازده بالای اقتصادی در اصلاح نژاد گاوهای شیری به پیش بینی دقیق باروری اسپرم گاوهای نر تأکید می‌شود (۲۳). کیفیت منی، عامل مهمی در ارزیابی گاو نر است، چرا که جهت بدست آوردن گاو ماده آبستن، مایع منی با باروری کم به تلقیح چندین باره منجر می شود و متعاقباً این خصوصیت منفی، فاصله روزهای باز و زمان دستیابی به زایمان بعدی را افزایش می دهد (۱۹). به منظور ایجاد یک آبستنی موفق و تولید نتاج با استفاده از مایع منی با شاخصه باروری ضعیف نیاز به واحد بیشتری از مایع منی است. اگرچه آزمونهای زیادی برای ارزیابی کیفیت اسپرم وجود دارد، این آزمون‌ها اغلب سلیقه‌ای هستند، تکرارپذیری کمی دارند، و همچنین وقت‌گیر می باشند. ژنهای کد کننده تولید هورمون و گیرنده‌های آنها ژنهای کاندیدا خوبی برای بررسی و ارزیابی صفت تولید مثل می‌باشند. زیرا آنها در بسیاری از مسیرهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیک باروری نقش ایفا می‌کنند (۲۹). قابل ذکر است که مقدار وراثت پذیری صفات مختلف کیفیت منی کم تا متوسط است (۹ و ۳۱) که خود این فرضیه را تقویت می‌کند که بهبود خصوصیات منی بر مبنای ارزیابی مورفولوژیک، پیشرفت ژنتیکی پایینی را به ارمغان خواهد داشت. نشانگرهای ژنتیکی و توسعه روشهای بیولوژیکی مولکولی منجر به استفاده بسیاری از محققان از ژنهای کاندید برای پیش بینی صفات کیفی منی گاوهای نر شده است (۳۲ و ۲۵ و ۲۷). لپتین با متابولیسم انرژی و تولیدمثل مرتبط است و نشان داده شده است که چندشکلی لپتین تأثیر معنی‌داری روی فاصله زایش و وزن اولین زایش در گاوهای گوشتی دارد (۱). لپتین عامل تنظیم کننده‌ی مهمی در عملکرد تولید مثلی است و تأثیرات مستقیمی روی هیپوتالاموس، هیپوفیز و تخمدان دارد. این اثرات از توانایی لپتین در افزایش هورمون آزاد کننده گنادوتروپین‌ها (GnRH) از هیپوتالاموس، هورمون لوتئینه کننده (LH) و هورمون تحریک کننده فولیکول (FSH) از هیپوفیز پیشین ناشی می‌شود. غلظت بالای لپتین، رهاسازی هورمون‌ها را کاهش می‌دهد (۲۲ و ۲۸). لپتین یک پروتئین ۱۶ کیلو دالتونی می‌باشد که از بافتهای آدیپوز به خصوص آدیپوز سفید ترشح می‌شود. این پروتئین برای اولین بار در موش کشف شد (۱۳ و ۳۵) و در تنظیم مصرف خوراک (۱۳)، تعادل انرژی، باروری و عملکرد ایمنی (۱۴) نقش دارد. ژن لپتین دارای ۳

اگزون و ۲ اینترون بوده و در کل ۵۰۱۰ نوکلئوتید طول داشته و اینترون ۲ آن ۲ کیلو باز می‌باشد. ناحیه پروموتور این ژن ۳ کیلو باز می‌باشد که تنها ۲۱۷ جفت باز آن برای تظاهر ژن لپتین در بافتهای چربی مورد نیاز است (۲۴). هورمون رشد (GH) در چندین پروسه‌ی متابولیک و فیزیولوژیک درگیر است (۱۰ و ۵) از جمله آنکه این هورمون غلظت اسپرم، مورفولوژی و تحرک آن را در نسبت‌های پایین هورمون رشد، ترمیم می‌کند (۷). برای اعمال اثرات آن، GH باید به گیرنده‌اش (GHR) متصل باشد (۸ و ۳۴). بنابراین، ممکن است تنوع توالی DNA در GHR مفید باشد. گیرنده هورمون رشد (GHR) در سلولهای لایدیگ و سرتولی بیضه کشف شده است (۱۶) این هورمون به عنوان میانجی بیولوژیکی هورمون رشد با انتقال سیگنال هورمون رشد از غشاء سلولی و القاء رونویسی ژن‌های بسیاری مانند فاکتور رشد مشابه انسولین-۱ (IGF-1) روی سلول‌های هدف عمل می‌کند (۲). چیس و همکاران (۱۹۹۸) نشان دادند که هورمون رشد و گیرنده آن و IGF-1 نقش اساسی در عملکرد طبیعی تولید مثل و رشد فولیکول دارند (۶). هدف از این تحقیق بررسی ارتباط چند شکلی دو ژن کاندیدای لپتین جایگاه‌های اگزون ۲ (LE2) و اینترون ۲ (LI2) و گیرنده هورمون رشد (GHR) جایگاه پروموتور (GHRP) با صفات مربوط به کیفیت منی گاوهای نر هلشتاین پروف شده دو ایستگاه اصلاح نژاد شمال غرب کشور و مرکز بهبود شیر کشور می‌باشد.

مواد و روش‌ها

حیوانات و صفات مربوط به کیفیت منی: در مطالعه حاضر از نمونه‌های منی مجموعا ۶۹ گاو نر (۴۱ نمونه از ایستگاه شمال غرب و ۲۸ نمونه از مرکز بهبود شیر کشور) که در بین سال‌های ۸۲ – ۹۲ اسپرم‌گیری شده بودند انتخاب شد. این گاوها تحت شرایط مشابه تغذیه و مدیریت بودند. صفات کیفی منی شامل حجم منی (میلی‌لیتر)، جمعیت اسپرم (میلیون در میلی‌لیتر)، میزان اسپرم زنده قبل از انجماد (درصد) و میزان اسپرم زنده بعد از انجماد (درصد) با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شد (۱۸).

انجام آزمایشات مولکولی: پایوت‌های اسپرم که در روی آن اطلاعات مربوط به گاو نر ثبت شده بود انتخاب و در فلاسک یخ به آزمایشگاه ژنومیکس پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمالغرب کشور منتقل و در فریزر (۸۰- درجه سانتی‌گراد) تا موعد استخراج نگهداری شد. در زمان آغاز استخراج DNA ابتدا نمونه‌ها از فریزر به یخچال انتقال داده شد تا مرحله ذوب با شوک سلولی مواجه نشود.

قبل از مرحله استخراج، پس از تخلیه پایوت در تیوپ، محتوای آن با بافر PBS چند بـار شستشـو داده شد تا مواد افزودنی مانند گلیسرول، بافر، رقیق کننده و آنتی‌بیوتیک از سلول‌ها خارج شود و در نهایت از روش شستشوی نمکی با کمی تغییرات برای استخراج استفاده شد (۲۰).

جزئیات کامل جایگاه‌های مورد ارزیابی و ژن‌های کاندیدا و توالی آغازگرهـای رفـت و برگشـت برای بسط ژنهای گیرنده هورمون رشد و لپتین در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱- ویژگی‌های جایگاه‌های مورد ارزیابی

Table 1. Characteristics for the studied loci

مشخصات (specification)	لپتین (Leptin)	لپتین (Leptin)	گیرنده هورمون رشد (GHR)
جایگاه (Place)	اگزون 2(exone 2)	اینترون 2(intron 2)	پروموتور(promoter)
توالی آغازگر (Primer sequences)	5`GATTCCGCCGCACCTCTC-3` 5`CCTGTGCAAGGCTGCACAGC-3`	5`TGGAGTGGCTTGTTATTTTCTTCT-3` 5`GTCCCCGCTTCTGGCTACCTAACT-3`	5`GCAATGCGTTGTGTGCTCTA-3` 5`TGGTTCCTCCAGGCTTTATG-3`
آنزیم(Enzyme)	*Cla*I	*Sau*3I	---
پالیندروم (Palindrome)	5`…AT▼CGAT…3` 3`…TAGC▲TA… 5`	5`…▼GATC…3` 3`…CTAG▲… 5`	---
اندازه مورد تکثیر (PCR size)(bp)	467	422	324-328
اندازه ژنوتیپ (genotype size) (bp)	(AA=467, TT=252,215, AT=467,252,215)	(AA=390,32 BB=302, 88, 32, AB=390,302,88,32)	324 bp ($TG_{۱۷}$) 328 bp ($TG_{۲۱}$)
تغییر نوکلئوتیدی (nucleotide change)	A/T	C/T	---
منبع (source)	شین و همکاران (2007)	لیفرس و همکاران (2002)	هیل و همکاران (2000)؛ کوری و همکاران (2005)

در جدول فوق، ناحیه میکروساتلایت ژن گیرنده هورمون رشد در منطقه پروموتور و داخل ژن هست. کیت (پی‌سی ار آمپلیکون (Ampliqon PCR Kit) دانمارک) حاوی مواد مورد نیاز واکنش PCR شامل بافر PCR، $MgCl_2$، دزوکسی نوکلئوتید تری‌فسفات‌ها (dNTPs) و آنزیم DNA پلیمراز بود که با آغازگرهای رفت و برگشت و DNA استخراج شده مخلوط شد. مراحل PCR هر سه جایگاه به جز در دمای اتصال یکسان است و در مجموع ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی اولیه در ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه، واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال دوباره برای جایگاه‌های اگزون ۲، اینترون ۲ و پروموتور GHR به‌ترتیب ۶۰، ۵۵ و ۵۵ درجه سلسیوس، هر سه به مدت ۱ دقیقه و تکثیر یا پلیمریزاسیون در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه بود. محصولات PCR جایگاه‌های اگزون ۲ و اینترون ۲ در ۸۵ ولت طی مدت ۴۵ دقیقه در ۵ ژل آگارز ۲/۵ درصد الکتروفورز شد و زیر نور لامپ UV مشاهده گردید. برای PCR ژن گیرنده هورمون رشد نیز این مراحل انجام شد ولی در ژل متافور آگارز شش درصد الکتروفورز شد برای هر نمونه از محصولات PCR دو جایگاه لپتین ، ۱۰ واحد از آنزیم برشی مناسب طبق جدول شماره یک استفاده شد و سپس در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت حداقل ۱۲ ساعت هضم گردید. محصولات هضم شده در ژل آگارز ۳ درصد به‌مدت ۱ ساعت در ۷۳ ولت تفکیک شدند. و ژل با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد. در خصوص جایگاه گیرنده هورمون رشد در ناحیه پروموتور (۱۶۵+ تا ۱۵۹-) ریزماهواره با موتیف ۲۱-۱۷ (TG) پس از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و الکتروفورز در ژل متافور آگارز شش درصد دو قطعه ۳۲۴ و ۳۲۸ جفت بازی از هم تفکیک شده و تعیین ژنوتیپ شد لذا دیگر به هضم آنزیمی نیاز نداشت.

تجزیه و تحلیل آماری

برآورد فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌ها و محاسبه هتروزیگوتی مشاهده شده و مورد انتظار و وجود یا عدم وجود تعادل‌هاردی واینبرگ با استفاده از نرم‌افزار Popgene نسخه ۱.۳ (۳۳) انجام گردید مدل آماری که جهت آنالیز واریانس و به‌دست آوردن میانگین حداقل مربعات توسط نرم‌افزار SAS نسخه ۹.۱ (۲۶) محاسبه شد، به‌صورت زیر بود:

$$y_{ijk}= YM_i + G_j + e_{ijk}$$

در این مدل، y_{ijk} برابر با صفات کیفی منی، YM_i ترکیب سال و ماه اسپرم‌گیری (به دلیل اینکه اثرات سال، ماه، سن گاو نر هنگام اسپرم‌گیری و همچنین اثر متقابل آنها به روش مقایسه میانگین

معنی‌دار شد، ترکیب سال و ماه اسپرم‌گیری در مدل قرار داده شد)، G_j ژنوتیپ گاو نر و e_{ijk} اثر باقیمانده است.

نتایج و بحث

نتایج مربوط به آمار توصیفی: جدول ۲، آمار توصیفی خصوصیات منی در کل نمونه‌های ادغام شده دو ایستگاه را نشان می‌دهد که با توجه به اینکه تمام برنامه‌های اجرایی و مدیریتی- تغذیه ای هر دو ایستگاه یکسان می باشد و به‌دلیل تعداد کم داده‌ها و دست‌یابی به نتیجه کلی‌تر داده‌های دو ایستگاه ادغام شده‌اند.

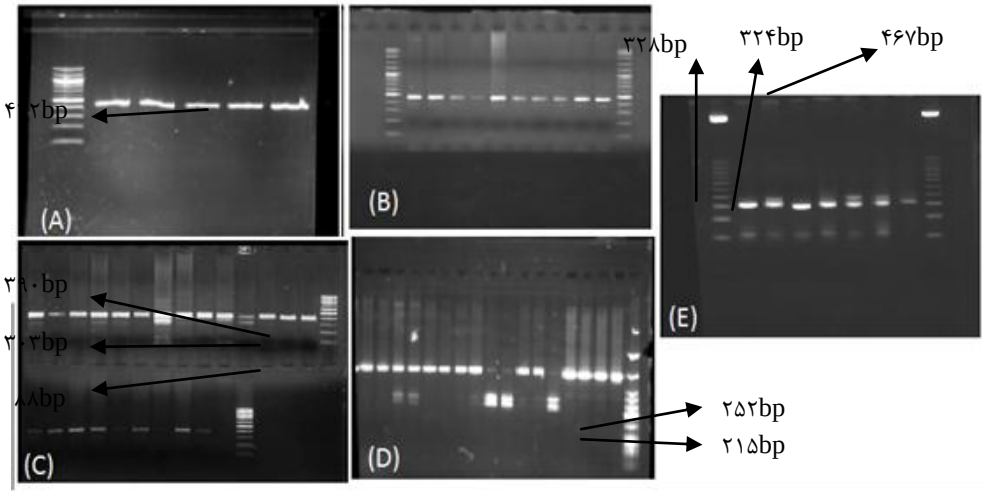
جدول ۲- آمار توصیفی خصوصیات منی با ادغام دو ایستگاه

Table 2. Descriptive statistics of semen characteristics by merging two stations

ضریب تغییرات (درصد) coefficient of variance	حداکثر maximum	حداقل minimum	انحراف معیار standard deviation	میانگین mean	تعداد رکورد number of records	صفات traits
33.58	11.12	1	1.77	5.27	5047	حجم منی (میلی‌لیتر) volume of semen (ml)
35.12	2499	300	425.60	1211.82	5024	جمعیت اسپرم(میلیون در میلی‌لیتر) population of sperm(million per ml)
7.95	97	60	6.33	79.60	5018	اسپرم زنده قبل انجماد(درصد) live sperm before freezing (%)
22.29	98	35	11.78	52.83	3614	اسپرم زنده بعد انجماد(درصد) live sperm after freezing(%)

تعداد رکورد در جدول فوق نشان دهنده تعداد رکورد مربوط به اسپرم‌گیری است. همانطور که مشاهده می شود که ضریب تغییرات صفت جمعیت اسپرم ۳۵/۱۲ درصد و از بقیه صفات بیشتر است و می تواند نشانگر این باشد که این صفت دارای پراکندگی بیشتری در مقایسه با سایر صفات هست.

نتایج مربوط به چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی: ارزیابی چندشکلی در دو جایگاه لپتین به روش PCR-RFLP و در ژن گیرنده هورمون رشد با کمک یک نشانگرریزماهواره مورد بررسی قرار گرفت. شکل یک الگوهای محصولات حاصل از تکثیر و هضم آنزیمی (در مورد جایگاه‌های مورد بررسی لپتین) و ژنوتیپ‌های حاصل از تکثیر ناحیه پروموتور گیرنده هورمون رشد را نشان می‌دهد.



شکل ۱- شکل A و B، بترتیب محصولات حاصل از تکثیر جایگاه اینترون ۲ و اگزون ۲ و شکل C و D، بترتیب محصول هضم آنزیمی جایگاه‌های اینترون ۲ و اگزون ۲ در کنار سایز مارکر bp ۱۰۰ (شرکت فرمنتاز روسیه) و شکل E محصولات تکثیر جایگاه ریزماهواره درگیرنده هورمون رشد همراه سایز مارکر bp ۲۵ (شرکت فرمنتاز روسیه)

Figure 1. A and B products resulting from the proliferation of intron 2 and exons 2 respectively and Figure C and D, the product of digestion of introns 2 and exon 2 and Figure E genotypes of the Growth hormone receptor promoter region

در جدول‌های ۳ و ۴ شاخص‌های مولکولی که توسط نرم‌افزار Popgene نسخه ۱/۳ برآورد شده، آورده شده است که جدول ۳ به تفکیک جمعیت‌ها و جدول ۴ به‌صورت ادغام شده دو جمعیت است.

بوچانان و همکاران (۲۰۰۳) فراوانی آلل T را در نژادهای مختلف گاو شیری که شامل هلشتاین، ایرشایر، براون سوئیس، کاندینا، گرنزی و جرسی به ترتیب (۰/۴۶، ۰/۶۲، ۰/۴۵، ۰/۱۱، ۰/۰۶ و ۰/۵۳) بدست آوردند (۳) که در این میان فراوانی این آلل در نژاد ایرشایر مشابه نتیجه بدست آمده این تحقیق است. مادجا و همکاران (۲۰۰۴) فراوانی آلل T را در گاو پولیش بلک ۰/۴۶ بدست آوردند (۱۷) که کمتر از مقادیر بدست آمده در این مطالعه (به تفکیک ایستگاه‌ها و ادغام آنها) بود. چودهاری و همکاران در سال (۲۰۰۴) در نژاد هلشتاین، جرسی و افراد F_1 ناشی از تلاقی هلشتاین و جرسی باهاریانا به ترتیب (۰/۰۴، ۰/۵۶ و ۰/۱۸) بدست آوردند (۷). نصیری و همکاران (۲۰۰۷) فراوانی آلل T را که مطلوب است در نژادهای بومی ایران مانند سرابی، گلپایگانی و تالشی را بترتیب (۰/۳، ۰/۲۹

و ۰/۴۵۴) بدست آوردند (۲۱) که با نتایج این تحقیق مطابقت ندارد. جوانمرد و همکاران (۲۰۰۸) فراوانی آلل B را در دو جمعیت از گاو سرابی که در شهرستان‌های سراب و شبستر نگهداری می‌شدند به‌ترتیب ۰/۵۸ و ۰/۳۷ برآورد کردند (۱۲) که متفاوت از نتایج این مطالعه است.

جدول ۳- شاخص‌های ساختاری جمعیت بدست آمده برای دو جایگاه ژن لپتین و یک جایگاه ژن گیرنده هورمون رشد

Table 3. Population structure parameters obtained for leptin and growth hormone receptor genes

ایستگاه station	ژنگاه locus	ژنوتیپ genotype	تعداد number	فراوانی آلل allele frequency	هتروزیگوتی مشاهده شده observation hetrozigosity	هتروزیگوتی مورد انتظار expected hetrozigosity	آزمون χ^2 test of χ^2
	لپتین اگزون2	TT	27	(T)0.71 ± 0.037			
	(LE2)	AT	4		0.20	0.42	25(0.0)
		AA	10	(A)0.29 ± 0.037			
ایستگاه	لپتین اینترن2	AA	33	(A) 0.90 ± 0.025			
شمالغرب	(LI2)	AB	8		0.20	0.18	0.41(0.51)
		BB	0	(B) 0.10 ± 0.025			
	گیرنده	TG_{21}/TG_{21}	12	TG_{21} 0.56±0.041			
	هورمون رشد	TG_{21}/TG_{17}	22		0.54	0.50	0.24(0.62)
	(GHRP)	TG_{17}/TG_{17}	7	TG_{17} 0.44±0.041			
	لپتین اگزو2	TT	9	(T) 0.50 ± 0.042			
	(LE2)	AT	10		0.36	0.51	2.58(0.10)
		AA	9	(A) 0.50 ± 0.042			
	لپتین اینترن2	AA	14	(A) 0.75 ± 0.036			
مرکز اصلاح‌نژاد کشور	(LI2)	AB	14		0.50	0.38	2.85(0.09)
		BB	0	(B)0. 25±0.036			
	گیرنده	TG_{21}/TG_{21}	5	TG_{21} 0.38 ± 0.04			
	هورمون رشد	TG_{21}/TG_{17}	11		0.39	0.48	0.91(0.33)
	(GHRP)	TG_{17}/TG_{17}	12	TG_{17} 0.62 ± 0.04			

جدول۴- شاخص‌های مولکولی بدست آمده برای دو جایگاه ژن لپتین وجایگاه ژن گیرنده هورمون رشد در ادغام جمعیت‌ها

Table 4. Molecular properties of leptin and growth hormone receptor genes by merging two populations

ژنگاه locus	ژنوتیپ genotype	تعداد number	فراوانی ژنوتیپی genotype frequency	فراوانی آللی Allele frequency	هتروزیگوتی مشاهده شده observation hetrozigosity	هتروزیگوتی مورد انتظار expected hetrozigosity	آزمون χ^2 test of χ^2
لپتین اگزون۲ (LE2)	TT	36	0.52	(T) 0.62 ± 0.041	0.20	0.47	22.8 (0.01)
	AT	14	0.20				
	AA	19	0.28	(A) 0.38 ± 0.041			
لپتین اینترن۲ (LI2)	AA	47	0.68	(A) 0.84 ± 0.031	0.32	0.27	2.35 (0.12)
	AB	22	0.32				
	BB	0	0	(B) 0.16 ± 0.031			
گیرنده هورمون رشد GHR	TG_{21}/TG_{21}	17	0.25	0.49± 0.042 (TG_{21})	0.48	0.50	0.17(0.67)
	TG_{21}/TG_{17}	33	0.48				
	TG_{17}/TG_{17}	19	0.27	0.51± 0.042 (TG_{17})			

در توجیه وجود تفاوت‌های موجود در نتایج این تحقیق با مطالعات مشابه می‌توان عللی همچون تفاوت در نژاد مورد بررسی، تعداد نمونه، روش تعیین ژنوتیپ، متفاوت بودن جایگاه‌های تکثیر در ژن و تفاوت در اسنیپ مورد بررسی را اشاره کرد با این حال در کلیات نتایج این تحقیق در شاخصهای همچون الگوی حاصل از هضم یا اندازه محصول حاصل از تکثیر با تحقیقات پیشین همخوانی داشت. **بررسی ارتباط ژنوتیپ با صفات کیفیت منی:** جدول ۵ مقایسه میانگین‌های حداقل مربعات را نشان می‌دهد.

جدول ۵- ارتباط ژن‌های کاندیدا با صفات کیفی منی

Table 5. Association between candidate genes and semen quality traits

ژنگاه locus	ژنوتیپ genotype	حجم منی semen volume	جمعیت اسپرم population of sperm	زنده قبل انجماد live before freezing	زنده بعد انجماد live after freezing
لپتین اگزون۲ Leptin Exon 2	TT	5.29 ± 0.03^b	1233.79 ± 8.02^a	80.14 ± 0.11^b	53.80 ± 0.25^a
	AT	5.12 ± 0.09^b	1172.63 ± 23.45^b	79.45±0.33c	51.71 ± 0.76^b
	AA	5.59 ± 0.05^a	1184.58 ± 12.29^b	80.59 ± 0.17^a	$0.38^b\pm52.94b$
لپتین‌اینترون۲ Leptin Intron 2	AA	5.40 ± 0.03^a	1229.41 ± 7.46^a	80.40 ± 0.10^a	53.50 ± 0.24^a
	AB	5.16 ± 0.06^b	1161.12 ± 14.77^b	79.29 ± 0.20^b	53.26 ± 0.47^a
	BB	-	-	-	-
GHR	TG_{21}/TG_{21}	5.60 ± 0.05^a	1154.92 ± 12.93^c	79.89 ± 0.18^b	52.99 ± 0.40^b
پروموتور promoter	TG_{21}/TG_{17}	5.39 ± 0.03^b	1201.70 ± 8.55^b	80.02 ± 0.12^b	53.18 ± 0.27^b
	TG_{17}/TG_{17}	4.93 ± 0.06^c	1346.29 ± 14.68^a	81.17 ± 0.20^a	54.81 ± 0.45^a

حجم منی (میلی لیتر)، جمعیت اسپرم (میلیون در میلی‌لیتر)، زنده قبل و بعد انجماد (درصد)

Semen volume (ml), population of sperm ((million per ml), live sperms before and after freezing (%)

برای هر ژنگاه در هر ستون حروف متفاوت نشان دهنده تفـاوت معنـی‌دار (P<۰/۰۵) بـین مقـادیر میانگین حداقل مربعات مربوط به ژنوتیپ‌های هر جایگاه در هر یک از صفات مورد نظر است.

بررسی‌های آنالیز واریانس نشان داد که ارتباط معنی‌داری (P<۰/۰۱) بین جایگاه‌های مورد نظـر بـا صفات کیفی منی وجود دارد همچنین جدول ۵ نشان دهنده این است که ژنوتیپ AA بـرای اگـزون ۲ ژن لپتین برای صفات حجم منی و درصد زنده قبل انجماد و TT بـرای جمعیـت اسـپرم و زنـده بعـد انجماد مطلوب است و در اینترون ۲ این ژن ژنوتیپ AA برای تمام صفات مطلوب است در حالی که لایفرز و همکاران (۲۰۰۵) اعلام کرده بودند که چند شکلی اگزون دو بر روی صفات تولید مثلی گـاو هلشتاین اثر ندارد (۱۵). لایفرز و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند کـه تلیسـه‌هـایی بـا ژنوتیـپ ۱/۳۲ کیلوگرم در روز شیر بیشتری نسبت به ژنوتیپ AA تولید کردند همچنین نشان دادند که آلل B باعـث افزایش تولید شیر بدون ایجاد توازن منفی انرژی و کاهش بیش از حد بـاروری در گاوهـای هلشـتاین می شود و ژنوتیپ AB را با مقدار تولید شیر بیشتر مرتبط دانسته‌اند و تولیـد شـیر در ژنوتیـپ AB را بیشتر از ژنوتیپ AA معرفی کردند (۱۴). همچنین در گیرنده هورمون رشد ژنوتیپ $TG_{۱۷}$/ $TG_{۱۷}$ برای تمام صفات بجز حجم منی مناسب است. چاندراشکار و همکاران (۱۹۹۹) نشـان دادنـد کـه نریـان بـا کیفیت منی ضعیف دچار کاهش در بیان mRNA ژن GHR شده بودند، به‌طور مشابه معلوم شد کـه در موش‌هایی که GHR حذف شده بود باروری کاهش یافت (۴)

از محدودیت‌های این مطالعه اندازه جمعیت نمونه‌گیری کوچک است. جهت بدست آوردن نتایج بهتر باید از جمعیت با تکرار بالای صد استفاده کرد و همچنین بهتر است به دلیل اینکه صفات منی تحت تاثیر شدید محیط است تمامی عوامل ثابت و شجره کامل در دست باشد و همچنین تعیین ژنوتیپ یک یا دو ژن نمی تواند مبین پراکندگی موجود در خصوصیات منی در گاوهای هلشتاین باشد و نیاز به تعیین ژنوتیپ ژنهای بیشتر یا در یک افق جدید استفاده از اطلاعات کل ژنوم و دیدگاه ژنومیک است.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این مطالعه نشان داد که ارتباط معنی‌داری (P<۰/۰۱) بین چند شکلی جایگاه‌های مورد نظر با صفات کیفی منی وجود دارد. ژنوتیپ AA جایگاه اگزون ۲ ژن لپتین برای صفات حجم منی و درصد زنده قبل از انجماد، و ژنوتیپ TT این جایگاه برای صفات جمعیت اسپرم و درصد زنده مانی بعد از

انجماد، ژنوتیپهای مطلوب بودند. در جایگاه اینترون ۲ این ژن، ژنوتیپ AA برای تمام صفات مطلوب بوده و در جایگاه پروموتور ژن گیرنده هورمون رشد نیز ژنوتیپ $TG_{۱۷}$/ $TG_{۱۷}$ برای تمام صفات، بجز صفت حجم منی، مناسب تشخیص داده شد.با توجه به نتایج این تحقیق، ژنوتیپ AA جایگاه اینترون ۲ لپتین مؤثرتر از بقیه جایگاه‌های کاندیدا تشخیص داده شد.

سپاسگزاری

از آقایان مهندس ایرج باغبان حقی، معاونت محترم امور دام آذربایجان شرقی و مهندس غفاری و مهندس ایرج اشرفی کارشناسان محترم ایستگاه اصلاح نژاد شمالغرب کشور بدلیل مساعدتهای شان تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Almeida, S.E.M., Almeida, E.A., Moraes, J.C.F., and Weimer, T.A. 2003. Molecular markers in the LEP gene and reproductive performance of beef cattle. Journal of Animal Breeding and Genetics, 120(2): 106-113.
2. Argetsinger L.S., and Carter-Su C. 1996. Mechanism of signaling by growth hormone receptor. Physiological Review. 76: 1089-1107.
3. Buchanan, F.C., Van Kessel, A. G., Waldner, C., Christensen, D.A., Laarveld, B., and Schmutz, S.M. 2003. Hot topic: an association between a leptin single nucleotide polymorphism and milk and protein yield. Journal of Dairy Science.86(10), 3164-3166.
4. Chandrashekar, V., Bartke, A., Coschigano, K.T. and Kopchick, J.J. 1999. Pituitary and testicular function in growth hormone receptor gene knockout mice. Endocrinology. 140: 1082-1088.
5. Chagas, L.M., Bass, J.J., Blache, D., Burke, C.R., Kay, J.K., Lindsay, D.R., and Webb, R. 2007. Invited review: New perspectives on the roles of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows. Journal of Dairy Science, 90(9): 4022-4032.
6. Chase, C.C., Kirby, C.J., Hammond, A.C., Olson, T.A., and Lucy, M.C. 1998. Patterns of ovarian growth and development in cattle with a growth hormone receptor deficiency. Journal of animal science, 76(1): 212-219.
7. Choudhary, V., Kumar, P., Bhattacharya, T.K., Bhushan, B., and Sharma, A. 2005. DNA polymorphism of leptin gene in Bos indicus and Bos taurus cattle. Genetics and Molecular Biology, 28(4): 740-742.
8. Edens, A., and Talamantes, F. 1998. Alternative processing of growth hormone receptor transcripts. Endocrine Rev. 19(5): 559-582 P.
9. England G.C., Phillips L., and Freeman S.L. 2010. Heritability of semen characteristics in dogs. Theriogenology. 74: 1136-1140.

10. Etherton, T.D. 2004. Somatotropic function: The somatomedin hypothesis revisited. J. Anim. Sci. 82(E. Suppl.): E239–E244.
11. Gravance, C.G., Breier, B.H., Vickers, M.H., and Casey, P.J. 1997. Impaired sperm characteristics in postpubertal growth-hormone-deficient dwarf (dwdw) rats. Animal reproduction science, 49(1): 71-76.
12. Javanmard, A., Mohammadabadi, M.R., Elyasi Zarringhabayi, G., Gharahedaghi, A.A., Nassiry, M.R., Javadmanesh, A. and Asadzadeh, N. 2008. Polymorphism within the intron region ofthe bovine Leptin gene in Iranian Sarabi cattle (Iranian Bos taurus). Russian Journal of Genetics, 44(4): 495-497.
13. Lagonigro, R., Wiener, P., Pilla, F., Woolliams, J.A., and Williams, J.L. 2003. A new mutation in the coding region of the bovine leptin gene associated with feed intake. Animal Genetics, 34(5): 371-374.
14. Liefers, S.C., Te Pas, M.F.W., Veerkamp, R.F., and Van Der Lende, T. 2002. Associations between leptin gene polymorphisms and production, live weight, energy balance, feed intake, and fertility in Holstein heifers. Journal of Dairy Science, 85(6): 1633-1638.
15. Liefers, S.C., Veerkamp, R.F., Te Pas, M.F.W., Chilliard, Y., and Van der Lende, T. 2005. Genetics and physiology of leptin in periparturient dairy cows. Domestic Animal Endocrinology, 29(1): 227-238.
16. Lobie, P.E., Breipohl, W., Aragon, J.G. and Waters, M.J. 1990. Cellular localization of the growth hormone receptor/binding protein in the male and female reproductive systems. Endocrinology. 126: 2214-2221.
17. Madeja, Z., Adamowicz, T., Chmurzynska, A., Jankowski, T., Melonek, J., Switonski, M., and Strabel, T. 2004. Short communication: effect of leptin gene polymorphisms on breeding value for milk production traits. Journal of Dairy Science. 87(11): 3925-3927.
18. Maina, V.A., Chaudhari, S.U.R., Mshelia, G.D., and Williams, A. 2006. Influence of season on semen characteristics of Sahel bucks in Borno state. Journal of Applied Sciences, 6: 353-356.
19. Mathevon M., Buhr M.M., and Dekkers J.C. 1998. Environmental, management, and genetic factors affecting semen production in Holstein bulls. J. Dairy Sci. 81: 3321-3330.
20. Miller, S.A. Dykes, D.D., and Polesky, H.F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res., 16: 1215-1219.
21. Nassiri, M.R., Heravi Moussavi, A., Alshawkany, A., and Ghovvati Roudsari, S. 2007. Leptin gene polymorphism in Iranian native Golpayegani and Taleshi cows. Pakistan Journal of Biological Sciences, 10: 3738-3741.
22. Niasarti, N. 1995. Control of follicle growth hormone before super ovulation and subsequent size and number of recruited follicles in Brahman and Holstein heifers. Australian Society of Reproduction Biology, 27: 83-90.

23. Parmentier, I., Portetelle, D., Gengler, N., Prandi, A., Bertozzi, C., Vleurick, L., Gilson, R., and Renaville, R. 1999. Candidate gene markers associated with somatotropic axis and milk selection. Domest. Anim. Endocrinol. 17: 139-148.
24. Pomp, D., Clutter, A.C., and Barendse, W. 1997. Mapping of Leptin to bovine chromosome 1 by linkage analysis of a PCR- based polymorphism. Journal of Animal Science, 75: 1427-1434.
25. Sang, L., Du, Q.Z., Yang, W.C., Tang, K.Q., Yu, J.N., Hua, G.H., and Yang, L. G. 2011. Polymorphisms in follicle stimulation hormone receptor, inhibin alpha, inhibin bata A, and prolactin genes, and their association with sperm quality in Chinese Holstein bulls. Animal Reproduction Science, 126(3), 151-156.
26. SAS, 2003. SAS, and STAT User'S. Guide. "Version 9.1." SAS Institute Inc., Cary, NC.
27. Sun, L.P., Du, Q.Z., Song, Y.P., Yu, J.N., Wang, S.J., Sang, L., and Yang, L.G. 2012. Polymorphisms in luteinizing hormone receptor and hypothalamic gonadotropin-releasing hormone genes and their effects on sperm quality traits in Chinese Holstein bulls. Molecular Biology Reports, 39(6): 7117-7123.
28. Veerkamp, R.F., Oldenbroek, J.K., Van Der Gaast, H.J., and Van Der Werf, J. H.J. 2000. Genetic correlation between days until start of luteal activity and milk yield, energy balance, and live weights. Journal of Dairy Science, 83(3): 577-583.
29. Vincent, A.L., Evans, G., Short, T.H., Southwood, O.I., Plastow, G.S., Tuggle, C.K., and Rothschild, M.F. 1998. The prolactin receptor gene is associatedwith increased litter size in pigs. In: Proceedings of the 6th WCGALP, 27: 15–18.
30. Vishwanath, R. 2003. Artificial insemination: the state of the art. Theriogenology, 59: 571-584.
31. Wolf, J. 2010. Heritabilities and genetic correlations for litter size and semen traits in Czech Large White and Landrace pigs. J. Anim. Sci. 88: 2893-2903.
32. Yang, W.C., Tang, K.Q., Yu, J.N., Zhang, C.Y. et al. 2011. Effects of MboII and BspMI polymorphisms in the gonadotropin releasing hormone receptor (GnRHR) gene on sperm quality in Holstein bulls. Mol. Biol. Rep. 38: 3411-3415.
33. Yeh, F.C., Yang, R.C., Boyle, T.B., Ye, Z.H., and Mao, J.X. 1997. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular biology and biotechnology centre, University of Alberta, Canada, 10.
34. Zhu, T., Goh, E.L., Graichen, R., Ling, L., and Lobie, P.E. 2001. Signal transduction via the growth hormone receptor. Cellular signalling, 13(9): 599-616.
35. Zwierzchowski L., Krzyzewski, J., Strzalkowska, N., Siadkowska, E. and Rynieweaz, Z. 2002 .Effects of polymorphism of growth hormone, Pit-1, Leptin gene, cow age, lactation stage and somatic cell count on milk yield and composition of Polish black- white cows. Animal Science Papers and Reports, 20 (4): 213-227.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Ruminant Research, Vol. 3(3), 2015
http://ejrr.gau.ac.ir

Study on association of leptin and growth hormone receptor genes polymorphisms with semen quality of Holstein bulls

M. Asgari[1], *S. Alijani[2], A. Javanmard[3] and H. Daghigh Kia[2]
[1]M.Sc student, [2]Associapte Prof., and Assistant Prof., Dept. of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tabriz University
Received: 09/20/2014; Accepted: 12/10/2015

Abstract

Object and Background: The purpose of this study was to evaluate the polymorphism of two candidate genes including Leptin (exon 2 and intron 2) and growth hormone receptor (promoter) genes and their effects on semen quality of Holstein bulls.

Materials and Methods: For this purpose information from two breeding stations including the Animal Breeding Center of Northwest (41bulls) and the National Animal Breeding Center and Promotion of Animal Products (28 bulls) were used. Information of 69 bulls, which were sampled between 2003-2013 years was used. Four qualitative sperm traits including volume of ejaculation (mL), sperm population (million/mL), and percentages of live sperm before and after freezing (%) were measured. Polymorphism of leptin gene was evaluated by PCR-RFLP and the variation in the growth hormone receptor gene was evaluated by PCR-SSR.

Results: The results of this study showed that all investigated loci were polymorphic and the frequency of TT, AT, AA genotypes in exon 2 were 0.28, 0.20 and 0.52, and frequency of T and A alleles, were 0.62±0.041 and 0.38±0.041, respectively. Additionally, genotype frequencies for AA, AB, and BB genotypes in the intron 2 were estimated 0.68, 0.32 and 0.16 and estimated A and B allele frequency were 0.84±0.031 and 0.16±0.031 respectively. For promoter of growth hormone receptor, results indicated that three genotypes of TG_{17}/TG_{17}, TG_{17}/TG_{21} and TG_{21}/TG_{21} had frequencies of 0.27, 0.48 and 0.25 and two alleles of TG_{21} and TG_{17} had frequencies of 0.49±0.042 and 0.51±0.042, respectively. There was Hardy-Weinberg equilibrium for the promoter of growth hormone receptor

*Corresponding author; sad-ali@tabrizu.ac.ir

(P<0.67) and intron 2 of leptin (P<0.12), while there was no Hardy-Weinberg equilibrium for the variation of exon 2 of leptin (P<0.01).

Conclusion: Generally, there was a significant association (P<0.01) between polymorphisms in all loci and semen quality traits. Specially, in exon 2 of leptin, the AA genotype was the favorable genotype for semen volume and percentage of live sperm before freezing and the TT genotype was the favorable genotype for sperm population and percentage of live sperm after freezing. For intron 2 of Leptin, the AA genotype was the best genotype for all traits. In promoter of growth hormone receptor, the genotype of TG_{17}/TG_{17} was the favorable for all traits except for semen volume and TG_{21}/TG_{21} was the best genotype for semen volume. Also the result of this study can be used in marker-assisted selection to improve expressed traits.

Keywords: Semen, Holsteins, Leptin, Growth Hormone Receptor, Polymorphism