مقاله علمی پژوهشی/نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۳۰ شماره ۱/ سال۱۳۹۹/ صفحات ۱۷ تا ۲۷

DOI: 10.22034/AS.2020.11000

تخمین پارامترهای ژنتیکی برخی صفات کیفیت منی با استفاده از مدلهای حیوانی حاوی اطلاعات ژنوتیپی ژنهای کاندیدا در گاوهای نر مولد هلشتاین

مهسا عسگری[۱]، صادق علیجانی[۲*] و آرش جوانمرد[۲]

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۱/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۸/۸/۲۲

[۱] دانشجوی سابق کارشناس ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

[۲] به ترتیب دانشیار و استادیار گروه علوم دامی دانشگاه تبریز

[*]مسئول مکاتبه: Email: sad-ali@tabrizu.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: برای طراحی برنامه اصلاح نژادی موفق، آگاهی از صفات کیفیت منی، دارای اهمیت زیادی میباشد. **هدف**: هدف از پژوهش حاضر، برآورد پارامترهای ژنتیکی، برخی صفات کیفیت منی، با استفاده از مدلهای حیوانی حاوی اطلاعات ژنوتیپی ژنهای کاندیدا در گاوهای نر مولد هلشتاین بود. **روش کار**: بدین منظور، مجموعاً، تعداد ۶۷ گاو نر از دو ایستگاه اصلاح نژاد شمالغرب کشور (۴۱ گاو نر) و مرکز بهبود شیر کشور (۲۶ گاو نر) که بین سالهای ۱۳۸۲ تا ۱۳۹۲ در خط تولید اسپرم بودند، انتخاب شد. در این راستا، چهار صفت مربوط به کیفیت منی، شامل: حجم انزال، غلظت اسپرم، درصد اسپرم زنده قبل انجماد و درصد اسپرم زنده بعد ذوب انتخاب شد. ارزیابی چندشکلیهای نوکلئوتیدی موجود در دو جایگاه ژن لپتین (ناحیه اگزون ۲ و اینترون ۲) به روش PCR-RFLP و در ژن گیرنده هورمون رشد (ناحیه پروموتور) با روش PCR-SSR انجام شد. نهایتا، با استفاده توام اطلاعات فنوتیپی و مولکولی، پارامترهای ژنتیکی با روش آمار بیزی و نمونه‌برداری گیبس برآورد گردید. **نتایج**: در خصوص نتایج مولکولی، در کلیه جایگاههای ژنهای مورد بررسی در گاوهای نر مورد مطالعه، چندشکلی نوکلئوتیدی مشاهده گردید. همچنین، نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل تک‌صفته مدل حیوانی جهت برآورد وراثت‌پذیری برای صفات حجم منی، جمعیت اسپرم، درصد اسپرم زنده قبل انجماد و بعد ذوب بترتیب ۰/۲۲، ۰/۱۴، ۰/۲۰، ۱۰/ و در آنالیز چندصفته، به ترتیب ۰/۱۱، ۰/۱۹، ۰/۲۴، ۰/۲۳ بدست آمد. متعاقباً، بیشترین همبستگی های فنوتیپی و ژنتیکی بترتیب مربوط به صفات درصد اسپرم زنده قبل انجماد با درصد اسپرم زنده بعد ذوب به مقادیر ۱۱/۰۳۱ ±۰/۹۱۲، و درصد اسپرم زنده قبل انجماد با جمعیت اسپرم، ۰/۱۷۰ (P<۰/۰۵) بود. **نتیجه گیری نهایی**: نتایج مطالعه حاضر، نشان داد که مقادیر وراثت‌پذیری برای صفات مختلف کیفیت منی مقدار کم تا متوسط است لذا، روند پیشرفت ژنتیکی برای بهبود خصوصیات منی کند بوده و شاید بتوان با بهبود شرایط محیطی بهبود نسبی خصوصیات منی را بدست آورد.

واژگان کلیدی: پارامترهای ژنتیکی، همبستگی، هلشتاین، خصوصیات منی

مقدمه

صفات تولید مثلی یکی از مهمترین صفات اقتصادی در پرورش گاوهای شیرده می باشد که در این میان گاو نر، نقش مهمی را در بهبود ژنتیکی این صفات ایفاء می-نماید. در برنامه های بهنژادی، موفقیت فناوری تلقیح مصنوعی به طور مستقیم بر روی خصوصیات مایع منی نرها و ابقاء کیفیت اسپرمها در طول انجماد، بستگی دارد (گاسیتوآ و آراو ۲۰۰۵). پژوهشهای مولکولی متعددی روی صفات تولیدمثلی صورت گرفته از جمله چندریختی در اگزون ۸ ژن DGAT1 و اگزون ۴ ژن IGF-I با عملکرد تولیدی و تولید مثلی در یک نمونه از گاو هلشتاین ایران بررسی شد و نشان داد که آلل A از اگزون ۸ ژن DGAT1 تولید شیر را افزایش و دوقلوزایی را کاهش می دهد(اورنگی و همکاران ۲۰۱۵). نتایج حاصل از آزمونهای ارزیابی کیفیت منی به طور مؤثری، میزان باروری گله را تعیین می‌کند. به منظور بهبود ژنتیکی عملکرد تولیدی و تولید مثلی گله های گاوهای شیرده، توزیع ژن‌های گاوهای نر پروف شده وقتی موثر خواهد بود که، کیفیت اسپرم این گاوهای نر مولد (قبل و بعد انجماد) مناسب باشد (پوردی ۲۰۰۶). شایان ذکر است که برای صفات مختلف کیفیت منی مقادیر وراثت‌پذیری کم تا متوسط است (انگلند و همکاران ۲۰۱۰ و ولف ۲۰۱۰) که خود این فرضیه را تقویت می‌کند که بهبود خصوصیات منی بر مبنای ارزیابی مورفولوژیک، میزان پیشرفت ژنتیکی پایینی را در برخواهد داشت. در این راستا، برای پیش‌بینی صفات کیفی منی گاوهای نر، توسعه فناوریهای بیولوژی مولکولی و کاربرد نشانگرهای ژنتیکی منجر به شناسایی چندشکلیهای نوکلئوتیدی در ژنهای کاندیدا برای تولید و تولید مثل حیوانات اهلی شده است (یانگ و همکاران ۲۰۱۱؛ سانگ و همکاران ۲۰۱۱ و سان و همکاران ۲۰۱۲). فرآیند اسپرماتوژنز، توسط هورمونهای تولیدمثلی مسئول در محور گنادوتروپین تنظیم می‌شود و تعداد زیادی از ژنهای کاندید کنترل مسیرهای بیولوژیکی در تولید مثل را برعهده دارند. بنابراین، بسیاری از هورمونها و گیرنده‌های آنها که مسئول مسیرهای تولیدمثلی هستند می توانند کاندیدای خوبی برای مطالعات ژنتیک مولکولی باشند(وینست و همکاران ۱۹۹۸a). با توجه به پایین بودن وراثت‌پذیری صفات تولیدمثلی استفاده از اطلاعات مستقیم فنوتیپی، بدلیل سهم زیاد اثرات محیطی، نمی‌تواند میزان پیشرفت ژنتیکی مورد انتظار بالایی را داشته باشد، فلذا، استفاده توام و همزمان از فنوتیپ و اطلاعات مربوط به چندشکلیهای نوکلئوتیدی شناسایی شده در ژن‌های کاندیدا و نشانگرهای DNA می‌تواند به طور معنی-داری، معماری ژنتیکی صفات تولیدمثلی را آشکار کند (ویرکامپ و بیردا ۲۰۰۷). از جمله ژنهای کاندیدای موثر بر فرآیند تولید اسپرم و باروری، دو ژن لپتین و گیرنده هورمون رشد است. لپتینف هورمونی پروتئینی با اثرات مهم در تنظیم وزن بدن، متابولیسم انرژی و اعمال تولیدمثلی می‌باشد که به واسطه وقوع جهش در ژن چاقی (ob /ob) کد می شود (هاوسنچ و همکاران ۱۹۹۸ و توکودا و همکاران ۲۰۰۱). ژن لپتین روی کروموزوم شماره ۴ واقع شده و دارای ساختاری حاوی ۳ اگزون و ۲ اینترون است (کلمسون و همکاران ۲۰۱۱). دومین ژن مورد مطالعه در پژوهش حاضر، ژن گیرنده هورمون رشد می باشد. چیس و همکاران (۱۹۹۸) نشان دادند که هورمون رشد و گیرنده آن و IGF-1 نقش اساسی در عملکرد طبیعی تولیدمثل و رشد فولیکولهای تخمدانی دارند. ساختار ژن گیرنده هورمون گاوی متشکل از ۱۰ اگزون و ۹ اینترون به گستردگی ۳۶۵،۱۸۶ جفت‌باز از توالی DNA است. ATG سایت شروع رونویسی در اگزون ۲ این ژن است. قسمتی از پروموتور که توسط گاررت و همکاران (۲۰۰۸) بیان شده شامل نه نوع SNP و یک ریزماهواره است. سه مورد از این SNP ها در مطالعات قبلی توسط هیل و همکاران (۲۰۰۰) و یک SNP نیز توسط شرمن و همکاران (۲۰۰۸) گزارش شده است. با اینکه، مطالعات متعددی، روی ژن‌های کاندیدا و ارتباط آنها با برخی صفات تولیدی و تولیدمثلی انجام شده ولی در ایران روی این صفات پارامترهای ژنتیکی همراه اثر ژن‌های مربوطه انجام نگرفته و با توجه به اهمیت برآورد

پارامترهای ژنتیکی در تخمین ارزش‌های اصلاحی و همچنین اهمیت زیاد ژن‌ها در بروز تنوع در این صفات (ویرکامپ و بیردا ۲۰۰۷)، هدف پژوهش حاضر، برآورد پارامترهای ژنتیکی برخی صفات کیفی منی همراه با اطلاعات توام فنوتیپی و چندشکلیهای نوکلئوتیدی ژن-های کاندیدای لپتین (اگزون ۲ و اینترون ۲) و گیرنده‌ی هورمون رشد (پروموتور) بر این صفات بود.

مواد و روش‌ها

حیوانات و صفات مورد مطالعه

در مطالعه حاضر، از پایت های اسپرم، مجموع ۶۷ گاو نر (۴۱ نمونه از ایستگاه شمالغرب و ۲۶ نمونه از مرکز بهبود شیر کشور) که در بین سالهای ۱۳۸۲ - ۱۳۹۲ اسپرم‌گیری شده بودند، استفاده شد در مورد اطلاعات شجره سعی شد تا جایی که امکان دارد، ارتباط خویشاوندی بین دو ایستگاه برقرار گردد تا پیش شرط لازم برای ادغام اطلاعات دو ایستگاه برای برآورد پارامترهای ژنتیکی برقرار باشد.

صفات مورد مطالعه در این تحقیق حاضر، شامل حجم منی (سی‌سی)، جمعیت اسپرم (میلیون در سی‌سی)، درصد اسپرم زنده قبل از انجماد (درصد) و درصد اسپرم زنده بعد از ذوب (درصد) است که با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شد.

آزمایشات مولکولی

استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های اسپرم، با استفاده از دستورالعمل آزمایشگاهی بافر نمکی تغییر یافته، انجام شد. پس از انجام الکتروفورز و اطمینان از کیفیت DNA های استخراج شده، واکنش زنجیره پلی مراز برای هر دو ژن با استفاده از آغازگرهای اختصاصی انجام شد. متعاقباً، محصولات حاصل از تکثیر PCR جایگاههای اگزون ۲ و اینترون ۲ در شرایط ولتاژ ۸۵ طی مدت ۴۵ دقیقه در ژل آگارز ۲/۵ درصد الکتروفورز شد و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید زیر نور لامپ UV عکسبرداری گردید. برای ژن گیرنده هورمون رشد نیز، این مراحل انجام شد با این تفاوت که از ژل متافور آگاروز ۶ درصد برای الکتروفورز استفاده شد. در خصوص محصولات تکثیر شده ژن لپتین، برای هر نمونه ازدو جایگاه لپتین، ۱۰ واحد از آنزیم برشی مناسب به ترتیب (آنزیمهای محدودگر claI برای جایگاه اگزون ۲ و Sau3I برای جایگاه اینترون ۲) استفاده شد و سپس در شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت حداقل ۱۲ ساعت در ژل هضم گردید. محصولات هضم شده در ژلهای آگارز ۲٪ و ۳٪ به مدت ۱ ساعت در ۷۳ ولت تفکیک شدندو مجدد ژلهای محصولات هضم شده با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد. در خصوص جایگاه گیرنده هورمون رشد در ناحیه پروموتور (۱۶۵+ تا ۱۵۹-) ریزماهواره با موتیف (TG)۱۷-۲۱ اندازه باندی متفاوت و الگوهای هتروزیگوت و هموزیگوت ایجاد کرد. لذا دیگر به هضم آنزیمی نیاز نداشت. این جایگاه محصولات تکثیری بین ۳۲۴-۳۲۸ جفت بازی را تولید می‌کرد.

تجزیه و تحلیل آماری

در خصوص داده های مولکولی، محاسبه فراوانی ژنوتیپها و فراوانی آللها و محاسبه هتروزیگوتی مشاهده شده و مورد انتظار با استفاده از نرم افزار POPGENE نسخه ۱/۳ (یه و همکاران ۱۹۹۷) انجام گردید. رکوردهای فنوتیپی، توسط نرم‌افزارهای Excel نسخه ۲۰۱۰ و SAS نسخه ۹/۱ (۲۰۰۳) ویرایش شد. همچنین، بررسی معنی‌داری ارتباط بین جایگاه‌های ژنهای کاندیدا نیز با استفاده از رویه آماری GLM در نرم‌افزار SAS انجام شد. مدل حیوانی تکرارپذیری که جهت تجزیه و تحلیل واریانس و برآورد مؤلفه‌ها استفاده شد بصورت زیر بود:

$$Y_{ijKlmn} = \mu + YM_i + Le2_j + Li2_k + Gp_l + bull_m + pe_m + e_{ijKlmn}$$

در این مدل: Y_{ijklmn} برابر با صفات کیفی منی، YM_iترکیب سال و ماه اسپرم گیری، و $Le2_j$ اثر جایگاه اگزون ۲ ژن لپتین، $Li2_k$ اثر جایگاه اینترون ژن لپتین، Gp_l اثر پروموتور ژن گیرنده هورمون رشد، $bull_m$، pe_m، e_{ijKlmn} اثر باقیمانده است. برای برآورد پارامترهای ژنتیکی از روش آماری بیزی و نمونه‌گیری گیبس به ترتیب با ۲۰۰۰۰۰ کل سیکل و ۱۰۰۰۰ دوره قلق‌گیری و فاصله بین نمونه‌گیری ۱۰۰، استفاده گردید. تخمین مؤلفه‌ها از طریق تجزیه و تحلیل تک‌صفته و

چندصفته، توسط نرم‌افزار gibbs3f90 و renumf90میستال ۲۰۱۰) انجام شد.

نتایج و بحث

طبق جدول شماره یک، نتایج بررسی آمار توصیفی مربوط به خصوصیات کیفیت منی در کل نمونه های دو ایستگاه نشان داده شده است.

همانطور که مشاهده می شود که ضریب تغییرات صفت جمعیت اسپرم ۳۵/۱۲ درصد است و از بقیه صفات بیشتر است و می‌تواند حاکی از این باشد که، این صفت دارای پراکندگی بیشتری در مقایسه با سایر صفات هست.

Table 1-The results of the descriptive statistics related to semen characteristics by merging data of two stations

Traits	N	Mean	Standard deviation	Minimum	Maximum	Coefficient of variance
Volume of semen (cc)	5047	5.27	1.77	1	11.12	33.58
Sperm concentration (million per cc)	5024	1211.8	425.60	300	2499	35.12
Live sperm before freezing (%)	5018	79.60	6.33	60	97	7.95
Live sperm after thawing (%)	3614	52.83	11.78	35	98	22.29

بررسی چندشکلی نوکلئوتیدی جایگاه‌های ژن‌های کاندیدا

در جدول ۲، شاخصهای مولکولی برای کل جمعیتهای دو ایستگاه مورد مطالعه شده، آورده شده است. همانطور که مشاهده می شود، بیشترین فراوانی‌های ژنوتیپی برای جایگاه‌های اگزون ۲، اینترون ۲ و پروموتور بترتیب متعلق به ژنوتیپهای TT، AA و TG_{21}/TG_{17} با درصدهای بترتیب ۰/۵۲، ۰/۶۷ و ۰/۴۶ می باشد.

بررسی‌ها نشان داد که جایگاه‌های ژنی مورد مطالعه حاوی چند شکلیهای نوکلئوتیدی بودند. همچنین، با انجام آزمون آماری معنی‌داری مشخص شد که بجز برای صفت درصد اسپرم زنده بعد ذوب برای جایگاه اینترون ۲ ژن لپتین، سه جایگاه ژن کاندیدا تاثیر معنی داری روی صفات مورد مطالعه دارد($P<0.01$) .

Table 2- Molecular indices of both the leptin and growth hormone receptor genes in two combined population

Loci	Genotype	N	Genotyp frequency	Allele frequency	Observation hetrozigosity	Expected hetrozigosity	test χ^2
	TT	35	0.52	0.63 ± 0.041 (T)			

Exone 2	AT	14	0.21		0.21	0.47	21.12
	AA	18	0.27	0.37 ± 0.041 (A)			
Intron 2	AA	45	0.67	0.84 ± 0.031 (A)	0.33	0.28	2.45
	AB	22	0.33				
	BB	0	0	0 0.16 ± .031 (B)			
Promoter	TG_{21}/TG_{21}	17	0.26	0.49 ± 0.043 TG_{21}	0.46	0.50	0.44
	TG_{21}/TG_{17}	31	0.46				
	TG_{17}/TG_{17}	19	0.28	0.51 ± 0.043 TG_{17}			

برآورد پارامترهای ژنتیکی

جدول ۳ نتایج حاصل از برآورد پارامترهای ژنتیکی صفات مورد بررسی را از طریق مدل تک‌صفته همراه اثر ژن‌های کاندیدا و جدول ۴ نتایج حاصل از برآورد پارامترها را از طریق مدل چندصفته نشان می‌دهد.

Table 3- The results of genetic parameters obtained from single trait analysis along with the impact of three loci

Traits	Additive genetic variance	Permanent environment variance	Residual variance	Heritability	Repeatability
Volume of semen (cc)	0.91 ±0 .58	0.96 ± 0.61	2.24 ± 0.044	0.22	0.36
Sperm concentration (million per cc)	25796 ± 16695	26056 ± 16521	131700 ± 2739.0	0.14	0.28
Live sperm before (freezing %)	9.40 ± 6	7.86 ± 5.90	29.15 ± 0.58	0.20	0.37
Live sperm after thawing (%)	12.89 ± 8.54	12 ± 8.14	101.6 ± 2.50	0.10	0.19

Table 4- The results of genetic parameters obtained from multiple trait analysis along with the impact of three candidate genes

Traits	Additive genetic variance	Permanent environment variance	Residual variance	Heritability	Repeatability
Volume of semen (cc)	0.68 ± 0.77	2.17 ± 0.92	2.24 ± 0.55	0.11	0.55
Sperm concentration	38116 ± 20337	34323 ± 19125	126270 ± 3056.7	0.19	0.36

(million per cc)					
Live sperm before (freezing %)	13.11 ± 6.77	14.12 ± 6.79	27.56 ± 0.68	0.24	0.49
Live sperm after thawing (%)	44.66 ± 21.22	43.43 ± 20.55	101.77 ± 2.48	0.23	0.46

طبق جداول فوق، مشاهده می‌شود، بیشترین وراثت-پذیری در مدل تک صفته و چند صفته بترتیب، مربوط به صفات درصد اسپرم زنده قبل از انجماد و حجم منی است و وراثت‌پذیری صفات درصد اسپرم زنده قبل و بعد انجماد در مدل تک صفته تفاوت زیادی دارند در در حالیکه، در تجزیه و تحلیل چند صفته تفاوت چندانی ندارند. مطالعات قبلی برآورد وراثت‌پذیری صفات منی به مقدار کم (۰/۰۸۶) تا زیاد (۰/۶۵) گزارش شده (دوکروک و هامبلوت ۱۹۹۵؛ فوت و همکاران ۱۹۷۷)، و تکرارپذیری این صفات از متوسط (۰/۲۴) (تیلور و همکاران،۱۹۸۵) تا زیاد (۰/۷۱) (گوروبتز و همکاران، ۱۹۸۷) است. ماتوون و همکاران وراثت پذیری را برای صفات حجم، غلظت، تحرک اسپرم، تعداد اسپرم و تعداد اسپرم متحرک بعد از انزال برای گاوهای نر جوان هلشتاین بترتیب ۰/۲۴، ۰/۵۲، ۰/۳۱، ۰/۳۸ و ۰/۴۹ و ۰/۴۴، ۰/۳۶، ۰/۰۱، ۰/۵۴ و ۰/۶۴ برای گاو نر بالغ این نژاد بدست آوردند. تکرارپذیری صفات کیفی منی، از ۰/۴۱ -۰/۶۴ دامنه تنوع داشت (ماتوون و همکاران ۱۹۹۸ و گردلر و همکاران(۲۰۰۵) وراثت پذیری برای حجم، غلظت، درصد زنده مانی اسپرماتوزوا، اسپرماتوزوای کل و تحرک اسپرم گاو سیمنتال را بترتیب ۰/۱۸، ۰/۱۴، ۰/۱۰، ۰/۲۲ و ۰/۰۴ را بیان کردند. در حالیکه در مطالعه، کیلی و همکاران (۲۰۰۶) مقدار وراثت پذیری حجم انزال، غلظت اسپرم و تحرک اسپرم برای گاو هرفورد بترتیب ۰/۰۹، ۰/۱۶ و ۰/۲۲ بدست آوردند. همچنین، دروئت و همکاران (۲۰۰۸) وراثت-پذیری صفات حجم منی، غاظت اسپرم و درصد زنده-مانی بعد از ذوب را بترتیب ۰/۲۲، ۰/۱۹ و ۰/۲۱ برای گاو هلشتاین بدست آوردند. که برای صفات حجم و غلظت مشابه نتایج این تحقیق است. در مورد صفت درصد اسپرم زنده بعد ذوب، نتایج مشابه و برای غلظت اسپرم نتایج عین برآورد وراثت‌پذیری، از طریق مدل چندصفته است. این نتایج نشان می‌دهد که، وراثت پذیری حجم انزال در گاو هلشتاین بیشتر از نژادهای سمینتال و هرفورد است و در مورد غلظت یا جمعیت اسپرم نتایج، تقریباً مشابه است. در مطالعات توارث پذیری یک صفت مختلف، ممکن است بدلیل متفاوت بودن نوع و اندازه جمعیت مورد بررسی، نوع محیط و گله متفاوت و نیز نوع مدل و روش تخمین وراثت‌پذیری مختلف، متفاوت باشد. همانطور که مشاهده می‌شود، مقدار وراثت‌پذیری از طریق مدل چندصفته برای تمام صفات بجز حجم منی، بیشتر از مقدار آن در آنالیز تک صفته است. تکرارپذیری یک اندازه از میزان استحکام یا قوی بودن روابط بین رکوردهای تکرار شده یا اندازه های فنوتیپی تکرار شده برای یک صفت را در یک جمعیت نشان می‌دهد. در آنالیز تک‌صفته، تکرارپذیری صفت درصد زنده قبل انجماد بیشتر از صفات دیگر و کمترین تکرارپذیری مربوط به صفت درصد اسپرم زنده بعد ذوب است. در مطالعات قبلی تکرارپذیری برای صفت حجم منی از ۰/۲۳(تیلور و همکاران ۱۹۸۵) تا ۰/۷۱(گوروبتز و همکاران ۱۹۸۷)، برای غلظت اسپرم از ۰/۴۲ (تیلور و همکاران ۱۹۸۵) تا ۰/۶۸ (گوروبتز و همکاران ۱۹۸۷) متنوع بود.

Table 5- Genetic correlation (above of diagonal), phenotypic correlation (below of diagonal)

Traits	Volume of semen	Sperm concentration	Live sperm before freezing	Live sperm after thawing
Volume of semen	-	-0.280 ± 86.80	-0.509 ± 1.41	-0.540 ± 2.86

Sperm concentration	**-0.149(<0.0001)**	-	0.359 ± 290.04	0.381 ± 531.14
Live sperm before freezing	-0.014(0.37)	**0.170(<.0001)**	-	0.912 ± 11.031
Live sperm after thawing	0.002(0.90)	**-0.038(0.021)**	0.086	-

Bold nombers are significant at 5%

Table 6- Environment correlation (above of diagonal), residual correlation (below of diagonal)

Traits	Volume of semen	Sperm concentration	Live sperm before freezing	Live sperm after thawing
Volume of semen	-	-0.792 ± -215.76	-0.718 ± -3.96	-0.605 ± -5.86
Sperm concentration	-0.047 ± 9.27	-	0.578 ± 402.72	0.479 ± 585.45
Live sperm before freezing	-0.009 ± 0.13	0.094 ± 32.04	-	0.904 ± 22.40
Live sperm after thawing	-0.020 ± 0.25	-0.94 ± 63.87	0.027 ± 0.91	-

همانطور که در جدول ۵، مشاهده می‌شود، همبستگی منفی‌ای بین حجم منی، با بقیه صفات وجود دارد و این همبستگی با صفت درصد اسپرم زنده بعد ذوب بیشتر از همبستگی این صفت با بقیه صفات و به مقدار ۲/۸۶ ± ۰/۵۴۰- است. همبستگی ژنتیکی غلظت اسپرم با درصد اسپرم زنده بعد ذوب بیشتر از همبستگی این صفت با بقیه صفات و به مقدار۵۳۱/۱۴±۰/۳۸۱ است. در کل همبستگی ژنتیکی صفات درصد اسپرم زنده قبل انجماد و بعد از ذوب به مقدار۱۱/۰۳۱±۰/۹۱۲و بیشتر از بقیه صفات با یکدیگر است. دروئت و همکاران (۲۰۰۸) در بین سه صفت از بین صفات مورد بررسی، همبستگی ژنتیکی بین صفات غلظت اسپرم با حجم منی را به اندازه ۰/۵۵- و بیشتر از مقدار برآورد شده در این تحقیق بدست آوردند. همبستگی ژنتیکی بین صفات حجم منی با درصد اسپرم زنده بعد از ذوب و بین صفات غلظت اسپرم با درصد اسپرم زنده بعد از ذوب را بترتیب به اندازه‌های ۰/۴۷- و ۰/۲۹ و کمتر از مقدار برآورد شده در این تحقیق بدست آوردند. همبستگی فنوتیپی بین صفات غلظت اسپرم با درصد اسپرم زنده قبل انجماد ۰/۱۷ و بیشتر از بقیه است و کمترین مقدار مربوط به حجم منی و درصد اسپرم زنده بعد از ذوب به مقدار ۰/۰۰۲ است در حالیکه، طبق تحقیقات دروئت و همکاران (۲۰۰۹) همبستگی فنوتیپی بین صفات حجم منی با درصد اسپرم زنده بعد ذوب بیشتر از بقیه و به اندازه ۰/۱۰- و کمترین مقدار بین حجم منی با غلظت اسپرم و به اندازه ۰/۰۲- برآورد کردند. طبق جدول شماره ۶، بیشترین مقدار همبستگی محیطی بین صفات درصد اسپرم زنده قبل انجماد و بعد ذوب و به مقدار ۲۲/۴۰۳±۰/۹۰۴ و کمترین مقدار مربوط به صفات غلظت اسپرم و درصد اسپرم زنده بعد ذوب به مقدار ۵۸۵/۴۵±۰/۴۷۹ است. از آنجا که میزان دقت ارزیابی پیش‌بینی نااریب خطی آنالیز چند صفته به قدر مطلق تفاوت همبستگی‌های ژنتیکی و محیطی بستگی دارد هر قدر این تفاوت بیشتر باشد، دقت ارزیابی نیز بیشتر خواهد بود (اسدی خشویی و همکاران ۲۰۰۰) در این تحقیق، مقادیر این تفاوت‌ها متوسط و بالاترین عدد مربوط به صفات جمعیت اسپرم با درصد اسپرم زنده بعد ذوب به مقدار ۱/۳۲ می‌باشد. در نتیجه آنالیز چند-صفته این دو صفت از مزایای تجزیه و تحلیل چندصفته به میزان بیشتری بهره‌مند شدند.

پیشنهادات

بطور کلی از نتایج حاصل از پژوهش حاضر می توان نتیجه گیری کرد که اولاً، ژنهای کاندیدای مورد مطالعه در گاوهای نر، دارای چند شکلی و پلی مورفیسم می باشد. همچنین، نتایج بدست آمده از تجزیه و تحلیل تک¬صفته مدل حیوانی جهت برآورد وراثت¬پذیری

برای صفات حجم منی، جمعیت اسپرم، درصد اسپرم زنده قبل انجماد و بعد ذوب و در آنالیز چند-صفته به روشنی نشان داد که صفات کیفیت اسپرم دارای دامنه وراثت پذیری متوسط تا پایین می باشد که حاکی از وجود سهم ژنتیک غیر افزایشی ژنها و اثرات محیطی تاثیرگذار عمده می باشد. این اطلاعات برای اصلاحگران این مفهوم را دارد که روند پیشرفت ژنتیکی برای بهبود خصوصیات منی کند بوده فلذا باید در گام اول با بهبود شرایط محیطی بهبود نسبی خصوصیات منی گاوهای تحت اسپرم گیری را منجر شد.

سپاسگزاری

از آقایان مهندس ایرج غفاری، مسئول محترم مرکز اصلاح‌نژاد شیخ حسن و مهندس ایرج باغبان حقی، معاونت محترم امور دام استان آذربایجان شرقی بدلیل مساعدتهایشان تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

Asadi-Khoshoei E, Miraei-Ashtiani SR, Turkmenzehi A, Rahimi SH and Vaez Torshizi R, 2000. Evaluation of Kleiber ratio as one of criterion for selecting ram in Lori Bakhtiari sheep. Iranian Journal of Agriculture Science 30: 649-655.

Chase CC Jr, Kirby CJ, Hammond AC, Olson TA and Lucy MC, 1998. Patterns of ovarian growth and development in cattle with a growth hormone receptor deficiency. Journal of Animal Science 76: 212-219.

Clempson AM, Pollott GE, Brickell JS, Bourne NE, Munce N and Wathes DC, 2011. Evidence that leptin genotype is associated with fertility, growth, and milk production in Holstein cows. Journal of Dairy Science 94: 3618-3628.

Druet T, Fritz S, Sellem E, Basso B, Gerard O, Salas-Cortes L and Eggen A, 2009. Estimation of genetic parameters and genome scan for 15 semen characteristics traits of Holstein bulls. Journal of Animal Breeding and Genetics 126: 269-277.

Ducrocq V, and P Humblot, 1995. Genetic characteristics and evolution of semen production of young Normande bulls. Livestock Production Science 41:1–10.

England GC, Phillips L and Freeman SL, 2010. Heritability of semen characteristics in dogs. Theriogenology 74: 1136- 1140.

Foote RH, GE Seidel Jr, J Hahn, WE Berndtson and GH Coulter, 1977. Seminal quality, spermatozoal output, and testicular changes in growing Holstein bulls. Journal Dairy Science 60: 85–88.

Gacitua H and Arav A, 2005. Successful pregnancies with directional freezing of large volume buck semen. Theriogenology 63: 931-938.

Garrett AJ, Rincon G, Medrano JF, Elzo MA, Silver GA and Thomas MG, 2008. Promoter region of the bovine growth hormone receptor gene: Single nucleotide polymorphism discovery in cattle and association with performance in Brangus bulls. Journal of Animal Science 86: 3315-3323.

Gorobets GG, 1987. Heritability and variability of reproductive ability of stud bulls. Byull. Vses. Nauchno Issled. Inst. Razvedeniya Genetetic Selection' Skokhozyaistvennykh Zhivotnykh 95: 12–13.

Gredler B, Fuerst C, Fuerst-Waltl B, Schwarzenbacher H and Sölkner, 2005. Genetic and environmental effects on semen quality of Austrian Simmental bulls. In: 56th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, pp 5-8.

Hale CS, WO Herring, H Shibuya, MC Lucy, DB Lubahn, DH Keisler and GS Johnson, 2000. Decreased growth in Angus steers with a short TG-microsatellite allele in the P1 promoter of the growth hormone receptor gene. Journal Animal Science 78:2099–2104.

Houseknecht KL, AB Clifton, LM Robert and ME Spurlock, 1998. The biology of leptin. A Review Journal Animal Science 76: 1405-1420.

Kealey CG, MacNeil MD, Tess MW, Geary TW and Bellows RA, 2006. Genetic parameter estimates for scrotal circumference and semen characteristics of Line 1 Hereford bulls. Journal of Animal Science 84: 283-290.

Mathevon M, Buhr MM and Dekkers JCM, 1998. Environmental, management, and genetic factors affecting semen production in Holstein bulls. Journal of Dairy Science 81: 3321-3330.

Orangi S, Ektefaie M, Atashi H, Zamiri MJ, Dadpasand M and Derakhshande A, 2015. Association of polymorphism in DGAT1 and IGF-I with productive and reproductive performance in Holstein cows. Journal of Animal Science Researches 26: 23-32

Purdy PH, 2006. A review on goat sperm cryopreservation. Small Ruminant Research 63(3): 215-225.

Sang L, Du QZ, Yang WC and Tang KQ, 2011. Polymorphisms in follicle stimulation hormone receptor, inhibin alpha, inhibin beta A, and prolactin genes, and their association with sperm quality in Chinese Holstein bulls. Animal Reproduction Science 126: 151-156.

SAS Guide, SAS. 2003. Version 9.1. SAS Institute Inc, Cary NC.

Sherman EL, Nkrumah JD, Murdoch BM, Wang CZ and Moore SS, 2008. Polymorphisms and haplotypesin the bovine neuropeptide Y, growth hormone receptor, ghrelin, insulin-like growth factor 2, and uncoupling proteins 2 and 3 genes and their associations with measures of growth, performance, feed efficiency, and carcass merit in beef cattle. Journal Animal Science 86:1–16.

Sun LP, Du, QZ, Song YP, Yu JN, Wang SJ, Sang L and Yang LG, 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: 7117-7123.

Taylor JF, Bean B, Marshall CE and Sullivan JJ, 1985. Genetic and environmental components of semen production traits of artificial insemination Holstein bulls. Journal Dairy Science 68: 2703–2722.

Tokuda T, Kimura D and Fujihara T, 2001. The relationship between leptin and insulin in blood plasma of growing lambs. Journal Animal Science 73: 71-76.

Veerkamp RF, Oldenbroek JK, Van Der Gaast HJ and Van Der Werf JHJ, 2000. Genetic correlation between days until start of luteal activity and milk yield, energy balance, and live weights. Journal of Dairy Science 83: 577-583.

Vincent AL, Tuggle CK, Rothschild MF, Evans G, Short TH, Southwood OI and Plastow GS, 1998. The prolactin receptor gene is associated with increased litter size in pigs. Proc. 6th World Congress Genetic Applied Livestock Production; Armidale, NSW, Australia 15–18.

Wolf J, 2010. Heritabilities and genetic correlations for litter size and semen traits in Czech Large White and Landrace pigs. Journal Animal Science 88: 2893-2903.

Yeh FC, and Boyle TJB 1997. Population Genetic Analysis of Co-dominant and dominant markers and Quantitative Traits. Belgian Journal of Botany 129: 157-163.

Yang WC, Tang KQ, Yu JN and Zhang CY, 2011. Effects of *Mbo*II and *Bsp*MI polymorphisms in the gonadotropin releasing hormone receptor (GnRHR) gene on sperm quality in Holstein bulls. Molecular Biology Reports 38: 3411-3415.

Estimation of the genetic parameters for some of semen quality characteristics using animal models with combined phenotype and genotype data of Holstein bulls

M Asgari[1], S Alijani*[2] and A Javanmard[2]

Received: February 16, 2018 Accepted: November 13, 2019
[1]Former MSc Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
[2]Assistant Professor and Professor, respectively, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
*Corresponding Author: Email: sad-ali@tabrizu.ac.ir

پژوهش‌های علوم دامی Animal Science Researches
Journal of Animal Science/vol.30 No.1/ 2020/pp 17-27
https://animalscience.tabrizu.ac.ir
OPEN ACCESS

© 2009 Copyright by Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
This is an open access article under the CC BY NC license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/)
DOI: 10.22034/AS.2020.11000

Introduction: For the design of any successful breeding program, knowledge about semen quality traits is greatly important and per-required. Due to the critical role of bulls through artificial insemination in the genetic improvement of the dairy cattle herds, knowledge about semen characteristics and genetic factors which affect semen parameters is essential. In addition, semen with poor fertility requires more units of semen to establish a successful pregnancy and produce a live offspring. Nonetheless, both impacts are economically important factors, which are considered by the producers leading to rejection of bulls with poor semen quality, and investing mainly on highly fertile sires. Summary of previous literatures is highlighted semen traits and their key roles in upcoming fertility and pregnancy of cows within herds (Gacitua et al. 2005). Furthermore, some reports pointed DNA markers can identify the genetic background mechanism of resistance and susceptibility of sperm after freezing and thawing (Purdy *et al.*, 2005). Additionally, previous reports supported low hereditability scenario of semen characteristics in livestock species (England *et al.*, 2010). Leptin is a globular protein with a tertiary structure similar to a haemopoietic cytokine synthesized by adipose tissue. It is involved in the regulation of feed intake, fetal growth, energy balance, fertility, and immune functions. The leptin molecule (16 kDa) is made up of 167 amino acids with an N-terminal secrotary signal sequence of 21 amino acids. In cattle, the leptin gene is located on the fourth chromosome. It consists of three exons and two introns. Only two exons are translated into the protein. The coding region of the leptin gene (501 nucleotides in length) is in exons 2 and 3, which are separated by an intron of approximately 2 kb. The leptin gene promoter region spans approximately 3 kb. Leptin is necessary for normal reproductive function, but when present in excess, it have detrimental effects on the male reproductive system. Human and animal studies pointed to leptin as a link between infertility and obesity, a suggestion that was corroborated by findings of low sperm count, increased sperm abnormalities, oxidative stress, and increased leptin levels in obese men. In addition, daily leptin administration to normal-weight rats has been shown to result in similar abnormalities in sperm parameters. The bovine growth hormone (bGH) is a 22 KDa single-chain polypeptide hormone, which is produced in the anterior pituitary gland. The encoding gene is approximately 1800 base pair (bp) and consists of five exons separated by four intervening sequences (Harvey et al. 2000). Recently, several studies have investigated the association between bGH locus and reproduction traits. A substitution of cytosine (C) for guanine

(G) at the position of 2141 causes an amino acid change from leucine (leu) to valine (val) at residue 127. This transversion enables the genotyping of this particular locus using the endonuclease AluI, since in the mutant bull, this enzyme does not recognize its target sequence. Several point mutations in the bovine growth hormone (GH) gene have been described, and as such, the Leu127Val polymorphism described by Lucy *et al.* (1993) has been extensively investigated based on production and reproduction traits. In addition, Lechniak et al. (1999) have reported the relationship between individual semen quality traits and fertility. The purpose of the present study was to estimate the genetic parameters of some semen quality traits using animal models containing genotype of candidate gene data on Holstein bulls.

Material and methods: For this reason, 67 bulls were selected from two breeding stations in the Northwest of Iran (41 bulls) and the National Livestock Improvement Center (26 bulls), which were in the sperm production stage between 2003- 2013. In this regard, four related traits of semen quality were considered, including: volume of ejaculation, sperm concentration, live sperm percentage before freezing, and live sperm percentage after thawing. The DNA extraction was done from semen according to commercial DNA kit and quality and quantity tests were done using spectrophotometry and gel monitoring. The nucleotide polymorphisms were evaluated in two loci of the leptin gene (Exon 2 and intron 2) by the PCR-RFLP method and in the growth promoter receptor gene (promoter region) using PCR-SSR technique. Finally, using combined phenotypic and molecular information, genetic parameters were estimated through Bayesian statistics and Gibbs sampling. POPGENE software was used for molecular data and descriptive statistics (genotype frequencies, allele frequencies, and hetrozygosity index calculation). Univariate and multi variate analysis for semen characteristics was done using gibbs3f90 and renumf90 softwares.

Results and discussion: According to the molecular outputs, in all investigate genes nucleotide variation and polymorphism was observed. The results of univariate analysis of animal model for estimating heritability for traits of semen volume, sperm count, live sperm percentage before freezing, and thawing point were 0.22, 0.14, 0.20, and 0.10, respectively**.** Reproductive performance is controlled by the genetic make-up of dam, sire, and offspring, but it is largely affectedby environment. Thus, the reproductive efficiency of the breeding herd depends on the fertility of the bulls(Gredler *et al.,* 2005). Bull's fertility is also essential, since bull's DNA is the primary mechanism through which genetic improvements can efficiently be accomplished. Implementation of artificial insemination (AI) in dairy cattle production allowed improving selection of bulls for production traits. Also, frequent freezing and thawing process of bull semens significantly affected quality index and consequent evaluation of fertilization potential of a semen sample for AI in Holstein breeding stations (Mathevon *et al.,* 1998).However, the preselection of the samples, the high number of sperm per doses, and the high quality of the semen used in the AI programs can reduce the variability, thereby giving a low probability of detecting fertility differences associated with seminal parameters. Spermatogenesis is a complex process that involves stem-cell renewal, genome reorganization, and genome repackaging; so, it culminates in the production of motile gametes (Kealey *et al.,* 2006). The process of spermatogenesis is regulated by reproductive hormones in gonadotropin axis and is controlled by a large number of genes(Sun *et al.,* 2012). Therefore, hormone and their receptors are presumed to be good candidate genes for reproductive traits.

Conclusion: The results of this study indicated that the range of heritability values for the different semen quality characteristics are low to moderate, which may indicate that improvement of environmental factors is more effective than genetics basis.

Key words: Correlation, Genetic parameters, Holstein, Semen