



دانشگاه گیلان

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 هلستاین

مهسا عسگری^۱، *صادق علیجانی^۲، آرش جوانمرد^۳ و حسین دقیق کیا^۲

^۱دانشجوی کارشناسی ارشد، ^۲دانشیار و ^۳استادیار 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 هلستاین بود.

مواد و روش‌ها: به این منظور مجموعاً ۶۹ گاو نر از دو ایستگاه اصلاح نژاد شمالغرب کشور (۴۱ گاو نر) و مرکز اصلاح نژاد 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 AT، TT و AA به ترتیب ۰/۲۸، ۰/۲۰ و ۰/۵۲ و فراوانی آلل T و آلل A به ترتیب ۰/۴۱±۰/۶۲ و ۰/۴۱±۰/۳۸ برآورد شد. به‌علاوه در جایگاه اینترون ۲ ژن لپتین، فراوانی ژنوتیپ‌های AA، AB، BB، به ترتیب ۰، ۰/۶۸ و ۰/۳۲ و فراوانی آلل A و B، به ترتیب ۰/۳۱± و ۰/۸۴ و ۰/۱۶±۰/۳۱ برآورد شد. در جایگاه پروموتور ژن گیرنده هورمون رشد سه ژنوتیپ TG_{۱۷}/TG_{۱۷}،

*مسئول مکاتبه: sad-ali@tabrizu.ac.ir

مهسا عسگری و همکاران

به ترتیب با TG_{21}/TG_{21} و TG_{17}/TG_{21} و TG_{21}/TG_{21} با فراوانی ۰/۲۷، ۰/۴۸ و ۰/۲۵ و دو آلل TG_{21} و TG_{17} به ترتیب با فراوانی $0/042 \pm 0/049$ و $0/042 \pm 0/051$ مشاهده شد. در جایگاه‌های پروموتور گیرنده هورمون رشد ($P < 0/67$) و اینترون ۲ لپتین ($P < 0/12$) تعادل‌های واینبرگ برقرار بود، در حالی که برای جایگاه اگزون ۲ ژن لپتین ($P < 0/01$) تعادل‌های واینبرگ برقرار نبود.

نتیجه‌گیری: به‌طور کلی بررسی‌ها نشان داد که ارتباط معنی‌داری ($P < 0/01$) 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 اسپرم زنده قبل از انجماد و ژنوتیپ TT این جایگاه برای صفات جمعیت اسپرم و درصد زنده مانده 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_{17}/TG_{17} برای تمام صفات، به جز صفت حجم منی، مناسب تشخیص داده شد و نوع TG_{21}/TG_{21} نیز برای صفت حجم منی مناسب بود. همچنین نتایج این 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 هلستاین و تبادلات ژنتیکی در مزارع پرورش در تلقیح مصنوعی نهفته است. در حال حاضر تلقیح مصنوعی (AI) از قدیمی‌ترین و رایج‌ترین فناوری‌های کمک‌کننده 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 پیش‌بینی 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 می‌شود و متعاقباً این خصوصیت منفی، فاصله روزهای باز و زمان دستیابی به زایمان بعدی را افزایش می‌دهد (۱۹). به منظور ایجاد یک آبستنی موفق و تولید نتایج 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 می‌باشند. ژنهای کدکننده 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 وراثت‌پذیری 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 کاندیدا برای پیش‌بینی 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 تنظیم‌کننده مهمی در عملکرد تولید مثلی است و تأثیرات مستقیمی روی هیپوتالاموس، هیپوفیز و تخمدان دارد. این اثرات از توانایی لپتین در افزایش هورمون آزادکننده گنادوتروپین‌ها (GnRH) از هیپوتالاموس، هورمون لوتئینه‌کننده (LH) و هورمون تحریک‌کننده 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 مجموعاً 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.

نشریه پژوهش در نشخوارکنندگان (۳)، شماره (۳) ۱۳۹۴

قبل از مرحله استخراج، پس از تخلیه پایوت در تیوپ، محتوای آن با بافر PBS چند بار شستشو داده شد تا مواد افزودنی مانند گلیسرول، بافر، رقیق کننده و آنتی بیوتیک 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 آغازگرهای رفت و برگشت 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 | | | |
|--|--|---|---|
| گیرنده هورمون رشد (GHR) | لپتین (Leptin) | لپتین (Leptin) | مشخصات (specification) |
| پروموتور (promoter) | ایترون 2 (intron 2) | اکزون 2 (exone 2) | جایگاه (Place) |
| 5`GCAATGCGTTGTGTGCT CTA-3` 5`TGGTTCCTCCAGGCTTTA TG-3` | 5`TGGAGTGGCTTGTATTTCCT CT-3` 5`GTCCCCGCTTCTGGCTACCTA ACT-3` | 5`GATTCCGCCCGCACCT CTC-3` 5`CCTGTGCAAGGCTGC ACAGC-3` | توالی آغازگر (Primer sequences) |
| --- | <i>Sau3I</i> | <i>ClaI</i> | آنزیم (Enzyme) |
| --- | 5`...▼GATC...3` 3`...CTAG▲...5` | 5`...AT▼CGAT...3` 3`...TAGC▲TA...5` | پالیندروم (Palindrome) |
| 324-328 | 422 | 467 | اندازه مورد تکثیر (bp)(PCR size) |
| 324 bp (TG _{۱۷}) 328 bp (TG _{۲۱}) | (AA=390,32 BB=302, 88, 32, AB=390,302,88,32) | (AA=467, TT=252,215, AT=467,252,215) | اندازه ژنوتیپ (genotype size) (bp) |
| --- | C/T | A/T | تغییر نوکلئوتیدی (nucleotide) (change) |
| هیل و همکاران (2000)؛ کوری و همکاران (2005) | لیفرس و همکاران (2002) | شین و همکاران (2007) | منبع (source) |

در جدول فوق، ناحیه میکروساتلایت ژن گیرنده هورمون رشد در منطقه پروموتور و داخل ژن هست. کیت (پی سی ار آمپلیکون (Ampliqon PCR Kit) دانمارک) حاوی مواد مورد نیاز واکنش PCR شامل بافر PCR، $MgCl_2$ ، دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات‌ها (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، واسرشت سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال دوباره برای جایگاه‌های اگزون ۲، ایترون ۲ و پروموتور GHR به ترتیب 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 ایترون 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 سانتی گراد به مدت حداقل ۱۲ ساعت هضم گردید. محصولات هضم شده در ژل آگارز ۳ درصد به مدت 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 تعادل هاردی واینبرگ با استفاده از نرم‌افزار Popgene نسخه ۱.۳ (۳۳) انجام گردید مدل آماری که جهت آنالیز واریانس و به دست آوردن میانگین حداقل مربعات توسط نرم‌افزار SAS نسخه ۹.۱ (۲۶) محاسبه شد، به صورت 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

نشریه پژوهش در نشخوارکنندگان (۳)، شماره (۳) ۱۳۹۴

معنی دار 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

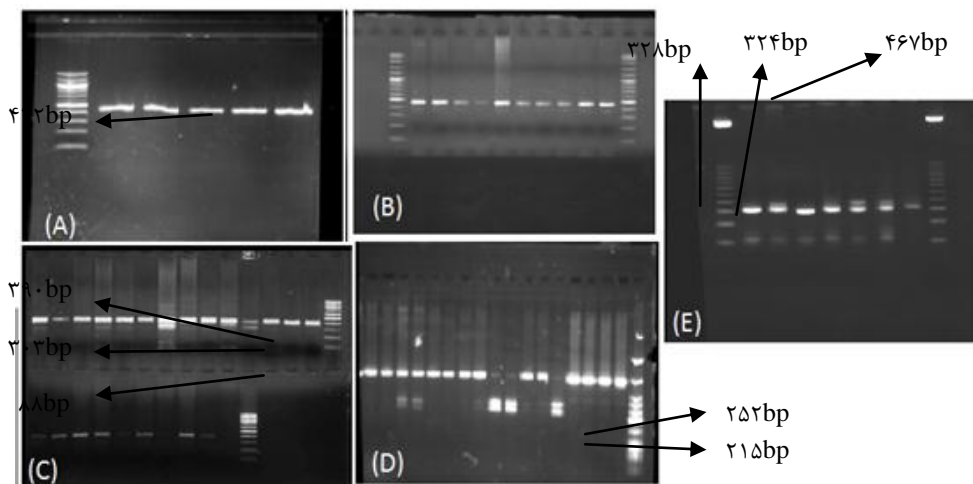
نتایج مربوط به آمار توصیفی: جدول ۲، آمار توصیفی خصوصیات منی در کل نمونه‌های ادغام شده دو ایستگاه را نشان می‌دهد که با توجه به اینکه تمام برنامه‌های اجرایی و مدیریتی - تغذیه ای هر دو ایستگاه یکسان می باشد و به دلیل تعداد کم داده‌ها و دستیابی به نتیجه کلی تر داده‌های دو ایستگاه ادغام شده‌اند.

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 (میلی لیتر) volume of semen (ml) |
| 35.12 | 2499 | 300 | 425.60 | 1211.82 | 5024 | جمعیت اسپرم (میلیون در میلی لیتر) 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 چندشکلی های تک نوکلئوتیدی: ارزیابی چندشکلی در دو جایگاه لپتین به روش PCR-RFLP و در ژن گیرنده هورمون رشد با کمک یک نشانگر ریزوماهواره 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 ۱۰۰ bp (شرکت فرمتناز روسیه) و شکل E محصولات تکثیر جایگاه ریزماهواره درگیرنده هورمون رشد همراه سایز مارکر ۲۵ bp (شرکت فرمتناز 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 به صورت 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 F₁ 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 (۰/۲۹، ۰/۳)

نشریه پژوهش در نشخوارکنندگان (۳)، شماره (۳) ۱۳۹۴

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 به ترتیب 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

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

مهسا عسگری و همکاران

جدول ۴- شاخص‌های مولکولی بدست آمده برای دو جایگاه ژن لپتین و جایگاه ژن گیرنده هورمون رشد در ادغام جمعیت‌ها

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

| ژنگاه | ژنوتیپ | تعداد | فراوانی ژنوتیپی | فراوانی آلی | هتروزیگوتی مشاهده شده | هتروزیگوتی مورد انتظار | آزمون χ^2 |
|--------------------------|------------------------------------|--------|--------------------|----------------------------------|----------------------------|-------------------------|------------------|
| locus | genotype | number | genotype frequency | Allele frequency | observation heterozygosity | expected heterozygosity | test of χ^2 |
| لپتین اگزون ۲ (LE2) | TT | 36 | 0.52 | (T) 0.62 ± 0.041 | 0.20 | 0.47 | 22.8 (0.01) |
| | AT | 14 | 0.20 | (A) 0.38 ± 0.041 | 0.20 | | |
| | AA | 19 | 0.28 | (A) 0.84 ± 0.031 | 0.20 | | |
| لپتین اینترون ۲ (LI2) | AA | 47 | 0.68 | (A) 0.84 ± 0.031 | 0.32 | 0.27 | 2.35 (0.12) |
| | AB | 22 | 0.32 | (B) 0.16 ± 0.031 | 0.32 | | |
| | BB | 0 | 0 | (B) 0.16 ± 0.031 | 0.32 | | |
| گیرنده هورمون رشد GHR | TG ₂₁ /TG ₂₁ | 17 | 0.25 | (TG ₂₁) 0.49 ± 0.042 | 0.48 | 0.50 | 0.17(0.67) |
| | TG ₂₁ /TG ₁₇ | 33 | 0.48 | (TG ₂₁) 0.49 ± 0.042 | 0.48 | | |
| | TG ₁₇ /TG ₁₇ | 19 | 0.27 | (TG ₁₇) 0.51 ± 0.042 | 0.48 | | |

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 | ژنوتیپ | حجم منی | جمعیت اسپرم | زنده قبل انجماد | زنده بعد انجماد |
|------------------------------------|------------------------------------|--------------------------|------------------------------|---------------------------|--|
| locus | genotype | semen volume | population of sperm | live before freezing | live after freezing |
| لپتین اگزون ۲ 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 ± 0.33 ^c | 51.71 ± 0.76 ^b |
| | AA | 5.59 ± 0.05 ^a | 1184.58 ± 12.29 ^b | 80.59 ± 0.17 ^a | 0.38 ^b ± 52.94 ^b |
| لپتین اینترون ۲ 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 پروموتور GHR promoter | TG ₂₁ /TG ₂₁ | 5.60 ± 0.05 ^a | 1154.92 ± 12.93 ^c | 79.89 ± 0.18 ^b | 52.99 ± 0.40 ^b |
| | 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 میلی لیتر)، زنده قبل و بعد انجماد (درصد)

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

نشریه پژوهش در نشخوارکنندگان (۳)، شماره (۳) ۱۳۹۴

برای هر ژنگاه در هر ستون حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار ($P < 0/05$) بین مقادیر میانگین حداقل مربعات مربوط به ژنوتیپ‌های هر جایگاه در هر یک از صفات مورد نظر است. بررسی‌های آنالیز واریانس نشان داد که ارتباط معنی داری ($P < 0/01$) بین جایگاه‌های مورد نظر با صفات کیفی منی وجود دارد همچنین جدول ۵ نشان دهنده این است که ژنوتیپ AA برای آگزون ۲ ژن لپتین برای صفات حجم منی و درصد زنده قبل انجماد و TT برای جمعیت اسپرم و زنده بعد 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 آگزون دو بر روی صفات تولید مثلی گاو هلشتاین اثر ندارد (۱۵). لایفرز و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند که تلیسه‌هایی با ژنوتیپ ۱/۳۲ کیلوگرم در روز شیر بیشتری نسبت به ژنوتیپ AA تولید کردند همچنین نشان دادند که آلل B باعث افزایش تولید شیر بدون ایجاد توازن منفی انرژی و کاهش بیش از حد باروری در گاوهای هلشتاین می‌شود و ژنوتیپ AB را با مقدار تولید شیر بیشتر مرتبط دانسته‌اند و تولید شیر در ژنوتیپ 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) نشان دادند که نریان با کیفیت منی ضعیف دچار کاهش در بیان mRNA ژن GHR شده بودند، به‌طور مشابه معلوم شد که 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 نمی‌تواند 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 معنی داری ($P < 0/01$) بین چند شکلی جایگاه‌های مورد نظر با صفات کیفی منی وجود دارد. ژنوتیپ AA جایگاه آگزون 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 ایترون ۲ این ژن، ژنوتیپ AA برای تمام صفات مطلوب بوده و در جایگاه پروموتور ژن گیرنده هورمون رشد نیز ژنوتیپ TG₁₇/TG₁₇ برای تمام صفات، بجز صفت حجم منی، مناسب تشخیص داده شد. با توجه به نتایج این تحقیق، ژنوتیپ AA جایگاه ایترون 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 Zarringabayi, G., Gharahedaghi, A.A., Nassiry, M.R., Javadmanesh, A. and Asadzadeh, N. 2008. Polymorphism within the intron region of the 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 somatotrophic 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 associated with 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 Ryniewicz, 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. Asgari¹, *S. Alijani², A. Javanmard³ and H. Daghigh Kia²

¹M.Sc student, ²Associate 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 (41 bulls) 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 TG₁₇/TG₁₇, TG₁₇/TG₂₁ and TG₂₁/TG₂₁ had frequencies of 0.27, 0.48 and 0.25 and two alleles of TG₂₁ and TG₁₇ 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