



"مقاله پژوهشی"

مطالعه پویش کل ژنومی صفات مرتبط با اسپرم بر پایه تجزیه و تحلیل غنی سازی مجموعه های ژنی در گاوهای نر هلشتاین

حسین محمدی^۱، ابوذر نجفی^۲ و آرش جوانمرد^۳

۱- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و محیط زیست، دانشگاه اراک، اراک، ایران، (نویسنده مسوول: H-mohammadi64@araku.ac.ir)

۲- استادیار گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران

۳- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۷/۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۸/۱۶

صفحه: ۱۶۸ تا ۱۷۵

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: برخلاف ارزیابی باروری دامهای نر که براساس رکوردهای فنوتیپی دامهای ماده مانند نرخ آبستنی انجام می شود، صفات اسپرم به طور مستقیم در دامهای نر قابل اندازه گیری می باشند. هدف پژوهش حاضر مطالعه پویش کل ژنوم بر مبنای آنالیز غنی سازی مجموعه ژنی جهت شناسایی مناطق ژنومی مؤثر بر صفات اسپرم گاوهای نر هلشتاین بود.

مواد و روش ها: بدین منظور، از اطلاعات ژنوتیپی ۱۵۰۸ رأس گاو نر و داده های فنوتیپی صفات مرتبط با اسپرم شامل حجم انزال، میزان جنبندگی اسپرم، غلظت اسپرم، تعداد اسپرم و تعداد اسپرم متحرک در هر انزال استفاده گردید. ارزیابی پویش کل ژنومی با نرم افزار PLINK نسخه ۱/۹۰ انجام شد. سپس با استفاده از بسته نرم افزاری biomaRt2 برنامه R ژن های معنی داری که در داخل و یا ۱۵ کیلو باز بالا و پایین دست نشانگرهای معنی دار قرار داشتند، شناسایی گردید. در مرحله بعد تفسیر مجموعه های ژنی با استفاده از بسته نرم افزاری goseq برنامه R و برای شناسایی عملکرد بیولوژیکی ژن های نزدیک در مناطق انتخابی کاندیدا از طریق پایگاه های برخط GO، DAVID و Panther استفاده گردید.

یافته ها: در این پژوهش، تعداد ۱۱ نشانگر تک نوکلئوتیدی واقع روی کروموزوم های ۱، ۲، ۵، ۷، ۸، ۱۵، ۱۸، ۲۰، ۲۱، ۲۵ و ۲۷ شناسایی شدند که ژن های *SPEF2*، *SEPT12*، *SLC24A4*، *BSP3*، *ETNK1*، *ERBB4* (میزان جنبندگی و تعداد اسپرم متحرک در هر انزال)، *DSCAML*، *MYH3*، *RPM1*، *RPM2*، *CAPSL* (تعداد و غلظت اسپرم)، *DMRT1* و *PPARγ* (حجم اسپرم) مرتبط بودند. برخی از این ژن ها در مناطق معنی دار با مطالعات مشابه پیشین هم خوانی داشت. در آنالیز غنی سازی مجموعه ژنی، تعداد ۱۵ مسیر هستی شناسی ژنی با صفات اسپرم مرتبط بودند. از این بین مسیرهای فرایند متابولیسمی نوکلئوتیدهای پورینی، هوموستازی یون کلسیم داخل سلولی و تنظیم باروری نقش مهمی با میزان جنبندگی و تعداد اسپرم متحرک در هر انزال داشتند. همچنین در ارتباط با حجم و غلظت اسپرم مسیرهای فعال کننده های تنظیمی یون کلسیم، مسیر سیگنال دهی PPAR، مسیر سیگنال دهی هورمون های استروئیدی و کانون پسندگی ارتباط معنی داری داشتند.

نتیجه گیری: شناسایی ژن های کاندیدی مؤثر بر صفات اسپرم و انتخاب گاوهای نرها با استفاده از روش های نوین مبتنی بر انتخاب ژنومی، تأثیر قابل ملاحظه ای بر بهبود باروری و سود آوری مراکز اصلاح نژادی و کاهش قیمت های نهایی تولید برای مصرف کنندگان خواهد داشت.

واژه های کلیدی: اسپرم، باروری، پویش ژنومی، ژن کاندیدا، هستی شناسی ژن

مقدمه

از جمله مهمترین خصوصیات فنوتیپی برای ارزیابی توانایی تولید مثلی دام های نر به طور مستقیم، کیفیت مایع منی است. کیفیت مایع منی، معیار مناسبی برای ارزیابی توانایی تولید مثلی گاو نر می باشد (۱). از مهم ترین ویژگی های مربوط به مایع منی می توان به حجم مایع منی، غلظت اسپرم، درصد اسپرم زنده، میزان جنبندگی اسپرم، جنبندگی پیش رونده اسپرم اشاره کرد (۲۶).

برای صفات مختلف کیفیت منی مقادیر وراثت پذیری کم تا متوسط گزارش شده است (۲۶)، که خود این واقعیت، این فرضیه را تقویت می کند که بهبود خصوصیات منی بر مبنای ارزیابی مورفولوژیک، میزان پیشرفت ژنتیکی پائینی را در برخواهد داشت. در این راستا، برای پیش بینی صفات کیفی منی گاوهای نر، توسعه فناوری های بیولوژی مولکولی و کاربرد نشانگرهای ژنتیکی منجر به شناسایی چند شکلی های نوکلئوتیدی در ژن های کاندیدا برای تولید و تولید مثل حیوانات اهلی شده است (۲۰).

با توجه به موارد ذکر شده، از آنجاکه صفات تولید مثلی جزء صفات کمی و چند ژنی هستند، هنوز بسیاری از ژن های عمده مؤثر بر آنها وجود دارند که تاکنون شناسایی نشده و مطالعات

بیشتری برای بررسی اثرات دقیق ژن های کاندیدی مؤثر بر آنها مورد نیاز هستند. از این رو، به کارگیری فناوری های با توان عملیاتی بالا برای یافتن مناطق ژنومی جدید ضروری به نظر می رسد.

در سال های اخیر مطالعه پویش کل ژنومی (GWAS) به عنوان یک ابزار بسیار مؤثر در ژنتیک انسانی و شناسایی معماری ژنتیکی صفات پیچیده مهم اقتصادی در دام های اهلی مطرح شده است (۵). در GWAS هدف شناسایی SNP ها است و ممکن است این SNP ها در نواحی داخل ژنی یا در نواحی بین ژنی باشند. در واقع به طور غیرمستقیم علاوه بر شناسایی SNP ها، QTL ها نیز شناسایی می شود (۲۵).

یکی از چالش های اصلی در مطالعات پویش ژنومی استفاده از آزمون های سختگیرانه و محافظه کارانه برای جلوگیری از بروز خطای نوع اول است. یکی از راه کارهای مناسب برای حل این چالش، انجام مطالعات پویش کل ژنومی بر مبنای آنالیز مسیر است (۱۷). در واقع در این روش به جای انجام تجزیه برای یک SNP یا یک ژن، ارتباط بین صفت مورد مطالعه و مجموعه واریانت های ژنتیکی را در یک دسته یا گروه ژنی که به طور عملکردی با هم مرتبط هستند بررسی می کند (۱۳).

اسپرم که مربوط به گونه گاو بوده و در پایگاه‌های ذخیره‌ای عمومی مختلف داده‌های ژنومی (Figshare, Dryad, Zenodo, Animal Genome, Frontiersin) ذخیره شده بودند، استخراج و بر حسب اطلاعات مفید گروه‌بندی انجام شد.

در نهایت، پس از جمع‌بندی و کنترل داده‌های تعیین ژنوتیپ و رکوردهای فنوتیپی، از اطلاعات صفات تولیدمثلی گاوهای نر هلشتاین کشور چین که با هدف پوشش کل ژنومی براساس مدل تک-مرحله‌ای GBLUP بود، استفاده گردید (۲۶).

برای دستیابی به اطلاعات رکوردهای فنوتیپی و ژنوتیپی از سایت (doi: 10.6084/m9.figshare.12581063.v1) شماره دسترسی (7562510) استفاده گردید. رکوردهای فنوتیپی مربوط به صفات اسپرم شامل حجم انزال در هر میلی لیتر، میزان جنیندگی اسپرم، غلظت اسپرم، تعداد اسپرم در هر انزال (حاصلضرب غلظت و حجم اسپرم) و تعداد اسپرم متحرک در هر انزال (حاصلضرب تعداد و میزان جنیندگی اسپرم) بودند. آمار توصیفی صفات مورد بررسی در مطالعات پوشش کل ژنومی در (جدول ۱) نشان داده شده است. DNA استخراجی حاصل از ۱۵۰۸ رأس گاو نر با استفاده از آرایه‌های Illumina BovineSNP50 BeadChip بر اساس پروتکل استاندارد Illumina برای ۵۴۰۰۱ جایگاه تعیین ژنوتیپ شده بودند.

گزارش شده است که مطالعه پوشش کل ژنوم بر مبنای آنالیز غنی‌سازی مجموعه ژنی، شناسایی مناطق ژنومی مؤثر بر صفت نرخ باروری گاوهای نر را بالا می‌برد، زیرا با استفاده از این روش تمامی نشانگرهای معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ آنالیز می‌شوند و در نتیجه میزان خطای نوع اول و بیش برآوردها کاهش پیدا می‌کند (۱۷).

اخیراً مطالعه‌ی پوشش ژنومی بر مبنای مسیر با استفاده از آنالیز غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی روی صفت چند قلوزایی در گوسفندان مختلف جهان انجام شده است. نتایج به‌دست آمده از آنالیز غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی، منجر به شناسایی ۳۰ طبقه مختلف عملکردی هستی‌شناسی ژن و مسیرهای زیستی KEGG شده بود که مسیرهای TGF- β signaling pathway، Estrogen، Oxytocin signaling pathway، Prolactin signaling pathway، signaling pathway و Insulin signaling pathway نقش مهمی در نرخ تخم‌ریزی و چند قلوزایی داشتند (۹).

بنابراین هدف از انجام پژوهش حاضر، مطالعه پوشش کل ژنومی صفات مرتبط با اسپرم بر پایه تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی جهت شناسایی مناطق ژنومی و ژن‌های کاندیدای نر گاوهای نر هلشتاین بود.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش ابتدا فایل‌های تعیین ژنوتیپ با استفاده از تراشه‌های ژنومی همراه با رکوردهای فنوتیپی مرتبط با صفات

جدول ۱- آمار توصیفی مربوط به پنج صفت اسپرم مورد بررسی در گاوهای نر هلشتاین

Table 1. Descriptive statistics of five studied semen traits in Holstein bulls

صفات	تعداد	میانگین	انحراف معیار	حداقل	حداکثر
حجم انزال (ml)	۵۲۷۲۰۷	۶/۸۷	۳/۰۷	۰/۱	۳۰
غلظت اسپرم (10^6)	۵۲۱۵۱۰	۱۲/۰۷	۴/۶۶	۰/۰۱	۳۷/۸۰
میزان جنیندگی اسپرم (%)	۵۲۷۲۳۱	۰/۶۶	۰/۱۶	۰/۰۰	۰/۹۸
تعداد اسپرم در هر انزال (10^6)	۵۲۱۱۵۰	۸۳/۷۱	۸۴/۹۴	۰/۰۰	۴۶۹/۲۵
تعداد اسپرم متحرک در هر انزال (10^6)	۵۲۲۹۰۶	۵۷/۵۷	۳۹/۹۹	۰/۰۰	۴۶۹/۲۵

آثار تصادفی شامل اثر ژنتیکی افزایشی، محیطی دائمی و باقیمانده بودند، X ، Z و W نیز ماتریس‌های طرح ارتباط دهنده مشاهدات به آثار مربوطه هستند. مدل فوق در نرم‌افزار ASReml (۶) مورد برازش قرار گرفتند. در مرحله دوم، جهت انجام آنالیز پوشش کل ژنومی ارزش‌های اصلاحی برآورد شده به عنوان فنوتیپ صفات در نظر گرفته شد و با استفاده از بسته نرم‌افزاری Plink نسخه ۱/۹ بتا (۱۸) آنالیز پیوستگی انجام گردید.

آنالیز غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی

اساساً، آنالیز غنی‌سازی بر پایه تجزیه و تحلیل مجموعه‌های ژنی در سه مرحله انجام می‌گردد: (۱) تعیین مکان SNPهای معنی‌دار به ژن (۲) ارتباط ژن‌ها به طبقات عملکردی و مسیرهای بیوشیمیایی (۳) پوشش کل ژنومی بر پایه آنالیز مسیر

۱- **تعیین مکان SNPها به ژن‌ها:** نشانگرهایی که مقدار p -value آنها کمتر و یا مساوی ۰/۰۵ بود با استفاده از بسته $biomaRt2$ (۳) در محیط نرم افزار R و با استفاده از مرجع ژنومی گاو نسخه (ARS-UCD1.2) به ژن‌هایی که نشانگر SNP مورد نظر در داخل آن ژن و یا ۱۵ kb بالادست

برای فیلتراسیون داده‌های تعیین ژنوتیپ شده، SNPهایی که حداقل فراوانی آلی در آنها کمتر از ۱ درصد و SNPهایی که در کمتر از ۹۰ درصد افراد تعیین ژنوتیپ شده بودند حذف شدند. و در نهایت SNPهای باقیمانده آنهایی که در تعادل هاردی-واینبرگ (سطح احتمال 10^{-6}) قرار نداشتند به عنوان معیاری از خطای تعیین ژنوتیپ کنار گذاشته شدند. همچنین، SNPهای با موقعیت نامشخص روی کروموزوم، از ادامه آنالیز حذف شدند. در نهایت، بعد از کنترل کیفیت تعداد ۴۴۰۷۴ SNP برای آنالیزهای پوشش کل ژنومی بر پایه تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه ژنی باقی ماندند.

برای بررسی ارتباط نشانگرها با صفات مورد بررسی، ابتدا، ارزش‌های اصلاحی با استفاده از یک مدل تکرارپذیری حیوانی طبق رابطه زیر برآورد شدند:

$$y = Xb + Zu + Wp + e$$

در این مدل، y : بردار مشاهدات فنوتیپی، b : بردار عوامل اثرات ثابت (ترکیب سال و فصل، مرکز اسپرم‌گیری، فاصله بین روزهای جمع‌آوری اسپرم و اثر سن گاوها در زمان اسپرم‌گیری به عنوان کوواریت)، u ، p و e به ترتیب بردارهای

تجزیه GSEA-SNP انتخاب شدند. تعداد مجموعه‌های ژنی حاصل از پایگاه‌های داده‌ای مختلف شامل ۳۴۹ طبقات هستی‌شناسی و مسیر زیستی KEGG مشاهده شد. مسیرهای که بیشتر از سه ژن و کمتر از ۳۰۰ ژن داشتند گزارش شده‌اند. براساس تحلیل هستی‌شناسی ژن (GO)، فرآیندهای زیستی مختلفی برای ژن‌های مؤثر بر صفات اسپرم مشاهده شد که مطابق با نتایج به دست آمده از تحقیقات پیشین بود (۱۹، ۲۰). جزئیات کامل واژه‌های هستی‌شناسی به همراه اسامی ژن‌های کاندیدا در جدول ۲ ارائه شده است. نتایج حاصل از این تحلیل نشان دهنده اینست که ژن‌های *SPEF2* و *SEPT12* با سطح معنی‌داری ۰/۰۰۲۵ با فرآیند purine Nucleotide metabolic process، ژن‌های *SLC24A4* و *BSP3* با سطح معنی‌داری ۰/۰۱۰ با فرآیند cellular Calcium ion homeostasis و ژن‌های *ETNK1* و *ERBB4* با سطح معنی‌داری ۰/۰۲۱۰ در فرآیند زیستی Regulation of fertilization مرتبط با صفات میزان جنیندگی اسپرم و تعداد اسپرم متحرک در هر انزال مشاهده شد.

تشخیص میزان و تعداد اسپرم‌های متحرک در هر انزال مهم‌ترین جنبه آنالیز مایع منی می‌باشد. میزان تحرک اسپرم بیانگر تحمل و چگونگی فعالیت سلول‌های اسپرم در مقاومت به دمای بدن است، به علت اینکه اسپرم تنها با تحرک پیش رونده خود می‌تواند از میان موکوس دهانه رحم عبور کند و به تخمک نفوذ کند. نتایج نشان داده است که سرعت حرکت اسپرم (جنیندگی) و تعداد اسپرم متحرک زمانی که شمار اسپرم‌ها یکسان باشند اصلی‌ترین عامل باروری در گاوهای نر است (۲۰).

ژن کاندیدای *SPEF2* نقش کلیدی در تشکیل تاژک اسپرم و عملکرد اسپرماتوزن دارد (۱۵). گزارش شده است که جهش در اینترون ۳۰ ژن *SPEF2* سبب کوتاه شده دم اسپرم‌ها می‌گردد. این نوع جهش سبب تغییر الگوی اسپلاسینگ شده و باعث توقف زودرس ترجمه و در نتیجه عملکرد ناقص پروتئین *SPEF2* می‌شود (۷).

ژن‌های کاندیدای *SEPT12* متعلق به گروه‌های از خانواده Septin می‌باشد و در فرآیندهای سلولی متنوعی از جمله سیتوکینز نقش دارند. ژن کاندیدای *SEPT12* نقش کلیدی در اتصال گردن به سر اسپرم و شکل‌گیری صحیح ساختار دم اسپرم دارد (۱۱). گزارش شده است که چندشکلی در ژن کاندیدای *SEPT12* سبب ایجاد اختلال تتراتواسپرمیا (کمتر از ۴ درصد اسپرماتوزوئیدها با مورفولوژی نرمال) می‌گردد (۱۰).

مطالعات اخیر نشان‌دهنده اینست که ژن‌های کاندیدای *SLC24A4* و *BSP3* ژن‌های بسیار مهمی هستند که در مکانیسم‌های مرتبط با کیفیت اسپرم نقش دارند. در مطالعه‌ی پویش کل ژنومی در خوک‌های نژاد Duroc با هدف شناسایی ژن‌های کاندیدای مرتبط با صفات اسپرم، ژن کاندیدای *SLC24A4* مرتبط با تحرک اسپرم معنی‌دار گزارش شد (۴). ژن کاندیدای *BSP3* روی کروموزوم ۱۱ گاو قرار داشته و جزیی از خانواده پروتئین‌های پلاسمای مایع منی گاوی بوده و

یا پایین دست آن ژن قرار داشت (۱۷)، ارتباط داده شدند. در این مرحله ژنی که حداقل حاوی یک SNP معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ باشد، ژن معنی‌دار به شمار می‌آید.

۲- ارتباط ژن‌ها به طبقات عملکردی و مسیرهای بیوشیمیایی: پایگاه‌های داده‌های هستی‌شناسی ژن GO (<http://www.geneontology.org>) و مسیرهای بیوشیمیایی DAVID (<http://www.david.org>) و PANTHER (<http://www.pantherdb.org>) جهت تعیین طبقات عملکردی و مسیرهای متابولیکی و تنظیمی ژن‌های معنی‌دار مورد استفاده قرار گرفتند. در این مرحله فرض بر این‌است که ژن‌هایی که در یک طبقه عملکردی قرار می‌گیرند می‌توانند به عنوان یک گروه از ژن‌هایی که برخی از ویژگی‌های خاص و مشترک دارند مانند شرکت در ۳ فرآیند هستی‌شناسی شامل فرآیندهای زیستی، عملکرد مولکولی و اجزای سلولی در نظر گرفته شوند (۱۹).

۳- پویش کل ژنومی بر پایه آنالیز مسیر: روابط معنی‌دار مسیرهای عملکردی با استفاده از توزیع فوق هندسی و آزمون Fisher's exact test مورد آزمون قرار گرفت. p-value مسیرهای عملکردی که تعداد k ژن معنی‌دار در آن قرار دارد از رابطه زیر محاسبه شد (۱۷):

$$P - value = 1 - \sum_{i=1}^{k-1} \frac{\binom{S}{i} \binom{N-S}{m-i}}{\binom{N}{m}}$$

در این رابطه، k: تعداد ژن‌های معنی‌دار در طبقه عملکردی، S: تعداد کل ژن‌های معنی‌دار مرتبط با صفت مورد بررسی، N: کل تعداد ژن‌هایی که در این مطالعه آنالیز شدند و m: تعداد کل ژن‌های موجود در مسیر عملکردی هستند. تجزیه غنی‌سازی مجموعه ژنی با استفاده از بسته *goseq* (۲۷) در محیط نرم‌افزار R انجام گردید. بسته *goseq* از آزمون فوق هندسی استفاده می‌کند. همچنین برای اختلاف طول ژن‌ها نیز تصحیح انجام می‌شود.

نتایج و بحث

یکی از پیش نیازهای برنامه‌های اصلاح نژادی در گاوهای شیری، آگاهی از صفات کیفیت منی گاوهای نر پرور شده ممتاز و ارتباط این صفات با ژن‌های کاندیدا می‌باشد. در این راستا، آنالیز غنی‌سازی مجموعه ژنی، از جمله روش‌های تکمیلی پسا GWAS می‌باشد که به جای نگرش انفرادی به رابطه یک SNP با صفت، برآیند تجمعی مجموعه ژنی را بر روی صفات هدف مورد بررسی قرار می‌دهد.

نتایج حاصل از پویش کل ژنومی برای صفات مورد مطالعه در (شکل ۱) نشان داده شده است. از ۴۴۰۷۴ نشانگر SNP باقیمانده بعد از کنترل کیفی، تعداد ۲۷۰۶۶ نشانگر در داخل یا اطراف ژن‌های حاشیه‌نویسی شده ژنوم گاو قرار گرفتند که این تعداد SNP، ۱۷۱۵۶ ژن را مورد پوشش قرار می‌دادند. تعداد ۸۶۱ ژن معنی‌دار مرتبط با صفات اسپرم به‌دست آمد، یعنی حداقل یک نشانگر با p-value کمتر از ۰/۰۵ در داخل و یا بالا یا پایین دست این ژن تا فاصله ۱۵ kb قرار گرفت. این ژن‌ها به‌عنوان ژن‌های معنی‌دار مرتبط با صفات اسپرم برای

ژن‌های کاندیدای *PRM1* و *PRM2* نقش کلیدی در این جایگزینی ایفاء می‌کنند. تغییر در این ژن‌ها سبب ایجاد آزواسپرمی (فقدان اسپرم در منی) و اولیگواسپرمی (غلظت اندک اسپرم در منی) در جنس نر می‌گردد. در مطالعه‌ای با بررسی چندشکلی در ژن *PRM2* در جمعیت مردان سبب ایجاد تتراتواسپرمیا (کمتر از ۴ درصد اسپرماتوزوئیدها با مورفولوژی نرمال) در آنان شده و سبب ایجاد ناباروری ادیوپاتیک شده است (۲۱). همچنین ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی موجود در ژن *PRM1* با ناباروری آزواسپرمی در انسان گزارش شده است (۸).

DSCAML1 و *CAPSL* دو ژن مهم دیگر مرتبط با غلظت اسپرم می‌باشند که در واژه‌های مختلف هستی‌شناسی مشاهده شدند. در مطالعه‌ای پوشش کل ژنومی با هدف شناسایی ژن‌های کاندیدای مرتبط با صفات اسپرم در گوسفندان نژاد Assaf، ژن کاندیدای *CAPSL* در ارتباط با غلظت اسپرم در هر انزال گزارش شد (۱۹). همچنین در مطالعه‌ای پوشش کل ژنومی در بزغاله‌های نر Shaanbei با هدف شناسایی مناطق ژنومی مرتبط با باروری، ژن کاندیدای *DSCAML1* با غلظت اسپرم گزارش شد (۲۳).

نقش کلیدی در تحرک و زنده‌مانی اسپرم دارند (۲). علاوه بر این، ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی در ژن کاندیدای *BSP3* با صفات مرتبط با باروری، شامل تعداد تلقیح به ازای هر آبستنی در گاوهای هلستاین گزارش گردید (۱۶).

در مطالعه‌ای قبلی پوشش ژنومی صفات مرتبط با اسپرم در گاوهای نر هلستاین که براساس مدل تک-مرحله‌ای GBLUP انجام شده است در ارتباط با جنبندگی اسپرم و تعداد اسپرم متحرک در هر انزال روی کروموزوم ۵ (BTA5) در ناحیه ۸۹/۷۹ مگابازی گزارش شده است (۲۶) که با منطقه شناسایی شده در پژوهش حاضر همخوانی داشت.

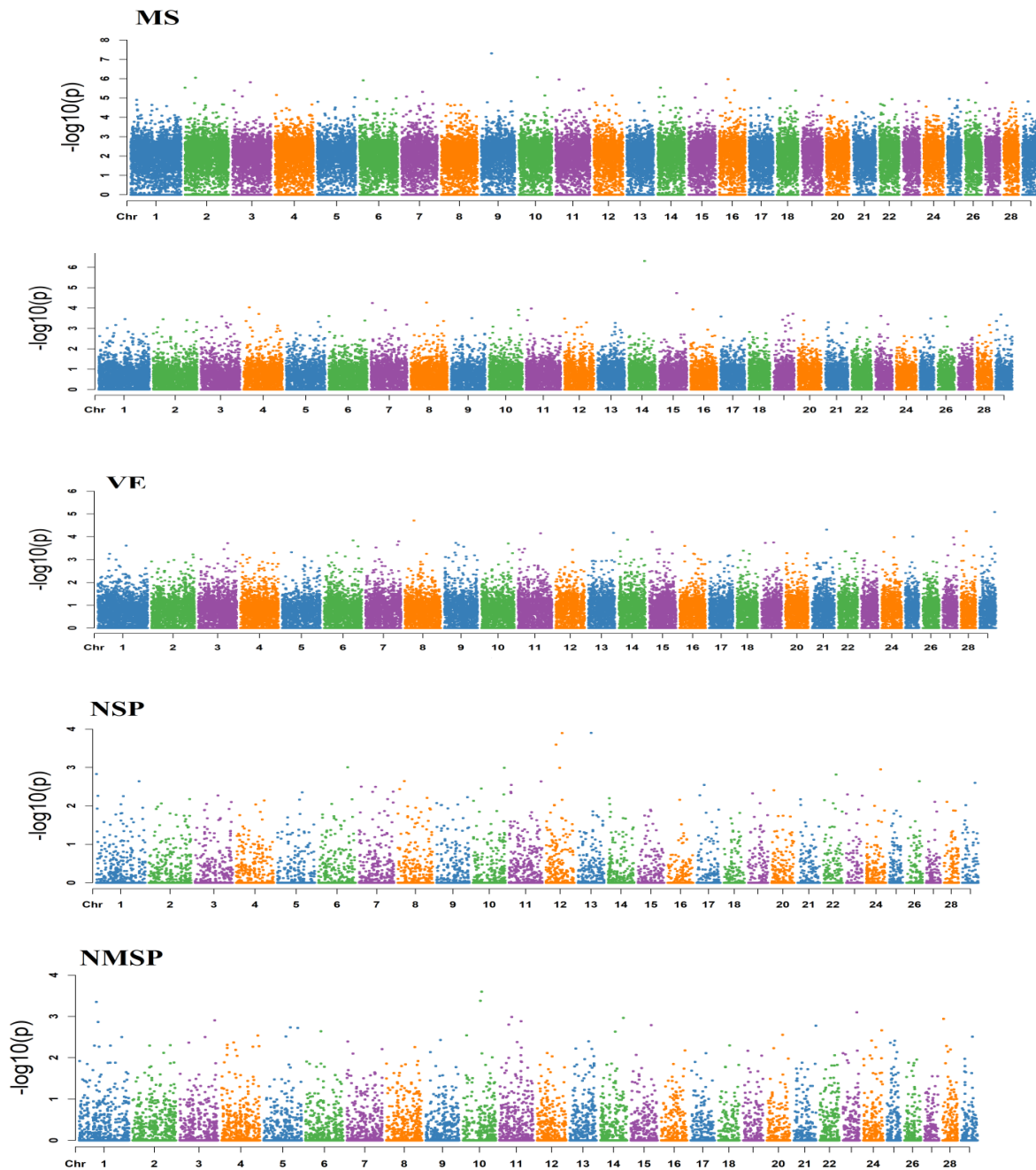
تعیین حجم و غلظت اسپرم در هر انزال بسیار مهم است چون این پارامتر برای تعیین دز صحیح تلقیح مصنوعی و یا محاسبه حجم نمونه‌های اسپرم برای آنالیزهای مختلف به کار می‌رود (۱۹).

فرایندهای زیستی معنی‌دار مشاهده شده در ارتباط با غلظت و تعداد اسپرم شامل ژن‌های *PRM2* و *RPM1* با سطح معنی‌داری ۰/۰۲۸۰ با فرایند Protein phosphorylation، ژن *DSCAML1* با سطح معنی‌داری ۰/۰۴۳۰ با فرایند Biosynthesis of antibiotics و ژن *CAPSL* با سطح معنی‌داری ۰/۰۲۰ با فرایند Calcium channel regulator activity مشاهده شدند.

جدول ۲- تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی معنی‌دار ($p < 0.05$) مرتبط با صفات اسپرم در گاو نر

Table 2. Gene set enrichment analysis significantly ($p < 0.05$) associated with sperm traits in Bull

نام مسیر	ژن‌های معنی دار	کل ژن‌های موجود در Term	ژن‌های کاندیدای مرتبط	p-adjust
فرایند زیستی				
Calcium channel regulator activity (GO:0005246)	۴	۱۱	<i>STX1A, STX1B, PDGFRB, CAPSL</i>	۰/۰۲۰
Sodium channel regulator activity (GO:0017080)	۲	۱۸	<i>AKAP3, NTRK2</i>	۰/۰۱۰
Regulation of fertilization (GO:0009566)	۴	۲۹	<i>ETNK1, BSP5, ERBB4, ZP2</i>	۰/۰۲۱۰
Cellular calcium ion homeostasis (GO:0006874)	۳	۱۵	<i>SLC24A4, SLC01A2, BSP3</i>	۰/۰۱۰
Protein phosphorylation (GO:0048704)	۳	۱۷	<i>PRM1, PRM2, PIK3R4, NEK2, MYH3, PIK3R4</i>	۰/۰۲۸
Protein kinase activity (GO:0004672)	۳	۱۴		۰/۰۴۱
Positive regulation of myeloid cell differentiation (GO:0010811)	۲	۸۶	<i>CSF3, DMRT1</i>	۰/۰۱۷
Steroid hormone mediated signaling pathway (GO:0043401)	۲	۵۲	<i>PPARγ, NR1D1</i>	۰/۰۰۴۵
Purine nucleotide metabolic process (GO:0006163)	۴	۲۴	<i>NME2, SEPT12, ADSL, SPEF2</i>	۰/۰۰۲۵
Nucleoside triphosphate biosynthetic process (GO:0009142)	۲	۱۸	<i>NME2, NME1</i>	۰/۰۳۵۰
Biosynthesis of antibiotics (GO:0044822)	۴	۲۳	<i>NME2, DSCAML1, ADSL, FDFT1</i>	۰/۰۴۳
Transition between slow and fast fiber (GO:0014886)	۲	۳۶	<i>DSCAML1, GTF2IRD1</i>	۰/۰۰۴۰
اجزای سلولی				
Focal adhesion (GO:0005925)	۲	۳۱	<i>CTNBP2NL, CAPSL</i>	۰/۰۱۳۶
Cell-cell junction (GO:0005911)	۱۴	۱۸۷	-	۰/۰۱۳۴
Cell junction (GO:0030054)	۲	۱۹	<i>CKB, SEPT12</i>	۰/۰۰۳۷



شکل ۱- پلات منهن برای صفات حجم انزال (VE)، غلظت اسپرم (SC)، میزان جنبندگی اسپرم (MS)، تعداد اسپرم (NSP) و تعداد اسپرم متحرک (NMSP)

Figure 1. Manhattan plots for ejaculate volume (VE), sperm concentration (SC), progressive sperm motility (MS), number of sperm (NSP), and number of progressive motile sperm (NMSP).

هموستازی انرژی و تنظیم محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-غدد جنسی نقش ایفاء می‌کند (۲۲). ناک اوت کردن $PPAR\gamma$ در هیپوفیز سبب کاهش هورمون FSH می‌شود و سبب نقص در باروری از طریق کاهش حجم اسپرم می‌گردد (۱۴). همچنین در مطالعه پویش کل ژنومی در گاوهای نر هلشتاین چینی،

از مسیرهای مهم و معنی‌دار مرتبط با حجم اسپرم می‌توان به مسیر Steroid hormone mediated signaling pathway اشاره کرد که از بین ژن‌های معنی‌دار در این مسیر، ارتباط معنی‌داری بین ژن کانیدای $PPAR\gamma$ در مطالعات قبلی با صفات مرتبط با اسپرم گزارش شده بود (۱۴). $PPAR\gamma$ به عنوان یکی از مهمترین مولکول‌ها برای تنظیم

شناسایی شده با استفاده از آزمون‌های آزمایشگاهی همچون بررسی چند شکلی‌های موجود در ژن‌های کاندیدای شناسایی شده مختلف می‌تواند در تأیید نتایج بدست آمده در این پژوهش مؤثر باشند. از طرفی در این تحقیق به دلیل عدم دسترسی به رکوردهای فنوتیپی و اطلاعات ژنوتیپی مرتبط با صفات اسپرم در گاوهای هلستاین ایرانی، از اطلاعات فنوتیپی و ژنوتیپی نژاد هلستاین چینی استفاده شد. لذا استفاده از نتایج این تحقیق در گاوهای نر کشور نیاز به تأیید نتایج حاضر دارد، لذا پیشنهاد می‌گردد در گاوهای نر هلستاین ایرانی رکوردهای مرتبط با صفات اسپرم جمع‌آوری شده و پس از تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها، آنالیز پویش کل ژنومی انجام شود. همچنین با بررسی ارتباط چندشکلی موجود در ژن‌های کاندیدای شناسایی شده در مطالعه حاضر با صفات کمی و کیفی اسپرم می‌توان آنها در گاوهای نر هلستاین ایرانی و آنالیزهای آماری جامع‌تر مورد تأیید قرار داد.

ژن کاندیدای *PDGFRB* مرتبط با حجم اسپرم در هر انزال گزارش شده بود (۱۲).

نتیجه‌گیری کلی

بررسی مناطق ژنومی به دست آمده با استفاده از پایگاه داده BioMart، GeneCards و UniProtKB نشان داد که بیشتر این مناطق شناسایی شده روی کروموزوم‌های مختلف با صفات اسپرم مرتبط می‌باشند. با توجه به عملکرد بیولوژیکی مسیرهای شناسایی شده در این پژوهش، به نظر می‌رسد این ژن‌ها در بروز فنوتیپی صفات مرتبط با کمیت و کیفیت اسپرم نقش ایفا می‌کنند، در نتیجه می‌توان کارایی روش تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی برای پویش ژنومی صفات تولیدی اقتصادی به خصوص صفات اسپرم را نیز مورد تأیید قرار داد. به‌طور کلی مسیرهای شناسایی شده در این تحقیق می‌تواند ما را به سمت ژن‌های مؤثر بر صفات هدایت کند و بررسی بیشتر نواحی مهم ژنومی

منابع

- Ashrafi, I., H. Daghighi Kia, G. Moghaddam and A. Saberivand. 2018. New Formulation of Bull Semen Freezing Extender via Egg Yolk and Sodium Dodecyl Sulphate. Research on Animal Production, 18(8): 76-82 (In Persian).
- Cochran, S.D., J.B. Cole, D.J. Null and P.J. Hansen. 2013. Discovery of single nucleotide polymorphisms in candidate genes associated with fertility and production traits in Holstein cattle. BMC Genetics, 14(49): 1-23.
- Durinck, S., P.T. Spellman, E. Birney and W. Huber. 2009. Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/bioconductor package biomaRt. Nature Protocols, 4: 1184-1191.
- Gao, N., Y. Chen, X. Liu, Y. Zhao, L. Zhu, A. Liu, W. Jiang, X. Peng, C. Zhang, Z. Tang and Y. Chen. 2019. Weighted single-step GWAS identified candidate genes associated with semen traits in a Duroc boar population. BMC Genomics, 20(1): 1-10.
- Gholizadeh, M., Gh. Rahimi Mianji and A. Nejati Javaremi. 2014. Linkage disequilibrium estimation and haplotype based genome-wide association to detect QTLs affecting twinning rate in Baluchi sheep. Research on Animal Production, 10(5): 166-178.
- Gilmour, A. R., B.J. Gogel, B.R. Cullis and R. Thompson. 2006. ASReml User Guide Release 2.0 VSN International Ltd, Hemel Hempstead, HP1 1ES, UK.
- Guo, F., B. Yang, Z.H. Ju, X.G. Wang, C. Qi, Y. Zhang, C.F. Wang, H. D. Liu, M.Y. Feng, Y. Chen, Y.X. Xu, J.F. Zhong and J.M. Huang. 2013. Alternative splicing, promoter methylation, and functional SNPs of sperm flagella 2 gene in testis and mature spermatozoa of Holstein bulls. Reproduction, 147(2): 241-252.
- Jiang, W., H. Sun and J. Zhang. 2015. Polymorphisms in Protamine 1 and Protamine 2 predict the risk of male infertility: a meta-analysis. Scientific Reports, 5: 15300.
- Khaltabadi Farahani, A.H., H. Mohammadi and M.H. Moradi. 2020. Gene set enrichment analysis using genome-wide association study to identify genes and pathways associated with litter size in different sheep breeds. Journal of animal production, 22(3): 325-335 (In Persian).
- Lin, Y.H., Y.Y. Wang, H.I. Chen, Y.C. Kuo, Y.W. Chiou, H.H. Lin, Wu, C.M. Hsu and P.L. Kuo. 2012. SEPTIN12 genetic variants confer susceptibility to teratozoospermia. PLoS One, 7(3): e34011.
- Lin, Y.H., Y.C. Kuo, H.S. Chiang and P.L. Kuo. 2011. The role of the septin family in spermiogenesis. Spermatogenesis, 1(4): 298-302.
- Liu, S., H. Yin, C. Li, C. Qin, W. Cai, M. Cao and S. Zhang. 2017. Genetic effects of *PDGFRB* and *MARCH1* identified in GWAS revealing strong associations with semen production traits in Chinese Holstein bulls. BMC Genetics, 18(1): 63.
- Marques, D.B.D., J.W.M. Bastiaansen, M.L.W.J. Broekhuijsse, M.S. Lopes, E.F. Knol, B. Harlizius, S.E.F. Guimarães, F.F. Silva and P.S. Lopes. 2018. Weighted single-step GWAS and gene network analysis reveal new candidate genes for semen traits in pigs. Genetics Selection Evolution, 50(1):1-14.
- Mousavi, M.S., A. Shahverdi, J. Drevet, V. Akbarinejad, V. Esmaili, F.A. Sayahpour, T.R. Topraggaleh, P. Rahimizadeh and A. Alizadeh. 2019. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) levels in spermatozoa of normozoospermic and asthenozoospermic men. Systems Biology in Reproductive Medicine, 65(6): 409-419.

15. Oud, M.S., B.J. Houston, L. Volozonoka, F.K. Mastrorosa, G.S. Holt, B.K.S. Alobaidi, P.F. deVries, G. Astuti, L. Ramos, R.I. Mclachlan, M. K. O'Bryan, J. A. Veltman, H.E. Chemes and H. Sheth. 2021. Exome sequencing reveals variants in known and novel candidate genes for severe sperm motility disorders. *Human Reproduction*, 36(9): 2597-611.
16. Ortega, M.S., A.C. Denicol, J.B. Cole, D.J. Null and J.F. Taylor. 2017. Association of single nucleotide polymorphisms in candidate genes previously related to genetic variation in fertility with phenotypic measurements of reproductive function in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 100(5): 3725-3734.
17. Peñagaricano, F., K.A. Weigel, G.J. Rosa and H. Khatib. 2013. Inferring quantitative trait pathways associated with bull fertility from a genome-wide association study. *Frontiers Genetics*, 3: 307-314.
18. Purcell, S., B. Neale, K. Todd-Brown, L. Thomas, M.A. Ferreira, D. Bender, J. Maller, P. Sklar, P.I. de Bakker, M.J. Daly and P.C. Sham. 2007. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *The American Journal of Human Genetics*, 1(3): 559-75.
19. Serrano, M., M. Ramón, J.H. Calvo, M.Á. Jiménez, F. Freire, J. M. Vázquez and J.J. Arranz. 2021. Genome-wide association studies for sperm traits in Assaf sheep breed. *Animal*, 15(2): 1-9.
20. Sweett, H., P.A.S. Fonseca, A. Suárez-Vega, A. Livernois, F. Miglior and A. Cánovas. 2020. Genome-wide association study to identify genomic regions and positional candidate genes associated with male fertility in beef cattle. *Scientific Reports*, 10(1): 20102.
21. Taylor, J.F., R.D. Schnabel and P. Sutovsky. 2018. Identification of genomic variants causing sperm abnormalities and reduced male fertility, *Animal Reproduction Science*, (194): 57-62.
22. Vitti, M., G. Di Emidio, M. Di Carlo, G. Carta, A. Antonosante, P. G. Artini, A. Cimini, C. Tatone and E. Benedetti. 2016. Peroxisome proliferator-activated receptors in female reproduction and fertility. *PPAR Research*, (3): 1-12.
23. Wang, K., Z. Kang, E. Jiang, H. Yan, H. Zhu, J. Liu, L. Qu, X. Lan and C. Pan. 2020. Genetic effects of DSCAML1 identified in genome-wide association study revealing strong associations with litter size and semen quality in goat (*Capra hircus*). *Theriogenology*, 146: 20-25.
24. Walsh, S.W., E.J. Williams and A.C.O. Evans. 2011. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 123: 127-138.
25. Xiaowei, M. 2016. Population level Genome-Wide Association Studies in Dairy Cattle. Ph.D. Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala.
26. Yin, H., C. Zhou, S. Shi, L. Fang, J. Liu, D. Sun, L. Jiang and S. Zhang. 2019. Weighted Single-Step Genome-Wide Association Study of Semen Traits in Holstein Bulls of China. *Frontiers in Genetics*, 10: 1-12.
27. Young, M.D., M.J. Wakefield, G.K. Smyth and A. Oshlack. 2010. Method gene ontology analysis for RNA-seq: Accounting for selection bias. *Genome Biology*, 11: 14-23.

Genome-wide Association Study Related to Semen Traits Based on Gene-set Enrichment Analysis in Holstein Bulls

Hossein Mohammadi¹, Abozar Najafi² and Arash Javanmard³

1- Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Environmental science, Arak University, Arak, Iran, (Corresponding author: H-mohammadi64@araku.ac.ir)

2- Assistant Professor, Department of Animal and Poultry Science, College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran

3- Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Received: 28 September, 2021

Accepted: 7 November, 2021

Extended Abstract

Introduction and Objective: Unlike evaluation of male fertility which is done based on the phenotype records of females e.g., conception rate, semen traits are directly measured in bulls. The objective of this study was to identify genomic regions associated with sperm traits in Holstein bulls using the genome wide association based on gene set enrichment analysis.

Material and Methods: For this purpose, phenotype records included 1508 genotyped Holstein bulls were used for ejaculate volume, sperm concentration, number of motile sperm, progressive sperm motility, and number of progressive motile sperm in each ejaculation. The evaluation of genome-wide association was carried out PLINK software (v. 1.90). In the next step, using the biomaRt2 R package R the SNP was assigned to genes if they were within the genomic sequence of the gene or within a flanking region of 15 kb up- and downstream of the gene. For the assignment of the genes to functional categories, the GO, KEGG, DAVID and PANTHER databases were used.

Results: In this research, 11 SNP markers on chromosomes 1, 2, 5, 7, 8, 15, 18, 20, 21, 25, and 27 associated with *SPEF2*, *SEPT12*, *SLC24A*, *BSP3*, *ETNK1*, *ERBB4* (sperm motility and number of progressive motile sperm), *DSCAML*, *MYH3*, *RPM1*, *RPM2*, *CAPSL* (number of sperm and sperm concentration), *DMRT1*, and *PPARγ* genes (ejaculate volume) were identified. Some of these genes in the significant regions were consistent with some previous studies. In pathway analysis, 15 pathways from gene ontology were associated with the sperm traits. Among those pathways, the purine nucleotide metabolic process, cellular calcium ion homeostasis and regulation of fertilization biological pathway had an important role in the progressive sperm motility and number of progressive motile sperm. Also, the calcium channel regulator activity, PPAR signaling pathway, steroid hormone mediated signaling pathway and focal adhesion had significant association with ejaculate volume and sperm concentration.

Conclusion: The identification of these candidate genes and selection bulls using genomic selection can considerable to improve male fertility and benefits of animal breeding centers and decrease production prices for consumers.

Keywords: Candidate gene, Fertility, Gene ontology, Genome scan, Sperm