ارتباط جایگاه‌های T340C و G286A ژن GnRHR با صفات کیفی و کمی اسپرم گاوهای هلشتاین ایران

- **محمدتقی زرین‌نیا:** گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و دامپزشکی، واحد شبستر، دانشگاه آزاد اسلامی، شبستر، ایران
- **ابوالفضل قربانی*:** گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و دامپزشکی، واحد شبستر، دانشگاه آزاد اسلامی، شبستر، ایران

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۸

چکیده

این پژوهش به‌منظور بررسی ارتباط جایگاه‌های G286A و T340C ژن گیرنده هورمون آزادکننده گنادوتروپین (GnRHR) و صفات مرتبط با کیفیت اسپرم درجمعیت گاوهای نر هلشتاین انجام گرفت. اطلاعات فنوتیپی و نمونه‌های خون از ۱۵۰ راس گاو نر موجود در دومرکز اصلاح نژاد شیخ حسن تبریز و جاهد کرج بین سال‌های ۱۳۹۵-۱۳۶۸ جمع‌آوری شدند. جهت شناسایی چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی(SNP) ژن GnRHR از روش PCR-RFLP و آنزیم‌های برشی MboII و BspMI به‌ترتیب برای جایگاه‌های G286A و T340C استفاده گردید. در جایگاه T340C دو آلل T وC و در جایگاه G286A دو آلل A و G به‌دست آمد. آلل‌های G (۰/۶۷۹) و T (۰/۶۷۶) و ژنوتیپ‌های TC (۰/۴۶) وGA (۰/۴۵) بیش‌ترین فراوانی را داشتند. نتایج تجزیه واریانس، ارتباط معنی‌دار جایگاه‌های کاندیدای فوق را با اکثر صفات اسپرم نشان داد. نتایج مقایسه میانگین حاکی از برتری ژنوتیپ‌های هتروزیگوت GA و TC در جایگاه‌های مورد بررسی داشت. این مطالعه برای اولین بار ارتباط معنی‌دار ژن GnRHR را با صفات مرتبط با اسپرم در جمعیت گاوهای هلشتاین ایران بررسی نمود و نتایج حاکی از آن است که GnRHR در فرآیندهای مختلف تولید اسپرم نقش دارد. با این‌حال، تحقیقات بیش‌تر ضروری است.

کلمات کلیدی: GnRHR، صفات اسپرم، هلشتاین، چندشکلی، گاونر

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: abolfazlgorbani@gmail.com

مقدمه

انتخاب گاوهای نر با کیفیت تولیدمثلی مناسب در مراکز تستاژ، پیش شرط لازم برای تولید اقتصادی اسپرم منجمد و موفقیت تلقیح مصنوعی است (Mathevon و همکاران، ۱۹۹۸). اما انتخاب مستقیم برای صفات مرتبط با کیفیت اسپرم به‌دلیل پائین بودن وراثت‌پذیری مشکل می‌باشد (Brito و همکاران، ۲۰۰۲؛ Gadea، ۲۰۰۵). شناسایی و استفاده از چندشکلی ژن‌های احتمالی موثر، ممکن سبب تغییر در روند انتخاب‌صفات تولیدمثلی گردد با وجود پیشرفت‌وتوسعه‌روش‌های ژنتیک مولکولی، گزارش‌های اندکی از تاثیر ژن‌های کاندیدا در صفات کیفی اسپرم و باروری در گاو و سایر دام‌ها وجود دارد (Dai و همکاران، ۲۰۰۹؛ Gorbani و همکاران، ۲۰۰۹؛ Huang و همکاران، ۲۰۰۲؛ Liron و همکاران، ۲۰۱۲؛ Rothschild و همکاران، ۱۹۹۸). هورمون‌ها و گیرنده‌های آن‌ها، آنزیم‌ها و سایر پروتئین‌های زیستی که در هر یک از مراحل اسپرماتوژنسیز و اسپرمیوژنسیز دخیل هستند، می‌توانند به‌عنوان ژن کاندیدا برای صفات اسپرم مدنظر قرار گیرند. هورمون‌های محور هیپوتالاموس، هیپوفیز و غدد جنسی نقش کلیدی در بلوغ جنسی و عمل‌کرد تولیدمثلی دام‌ها دارند (Li و همکاران، ۲۰۰۸). هورمون آزادکننده گنادوتروپین (GnRH= Gonadotropin releasing hormone) با تاثیر بر هیپوفیز و رهاسازی گنادوتروپین‌ها و تنظیم و تولید هورمون‌های جنسی (استروژن‌ها، پروژسترون‌ها و تستوسترون) نقش اساسی در تمایز جنسی، تولیدمثل و گاماتوژنسیز بازی می‌نماید (Cheng و همکاران، ۲۰۰۵ و Li و همکاران، ۲۰۰۸). پاسخ به GnRH به‌طور مستقیم با تراکم گیرنده‌اش (GnRHR= Gonadotropin releasing hormone receptor) بر سطح سلول مرتبط است (Liron و همکاران، ۲۰۱۲). بنابراین GnRHR می‌تواند به‌عنوان یک ژن کاندیدا برای صفات باروری در حیوانات نر و ماده مدنظر قرار گیرد. ژن GnRHR در گاو و بز به طول ۱۷۶۸۸ جفت باز، روی کروزوم شش قرار داشته و دارای سه اگزون و هشت اینترون می‌باشد. نتایج نشان دادند که ژن GnRHR کاندیدایی موثر برای تعداد زایش و باروری در بزها (Li و همکاران، ۲۰۱۱؛ Yang و همکاران، ۲۰۱۱)، باروری در گاوهای شیری (Fortes و همکاران، ۲۰۱۱) و سن بلوغ در انسان و موش است (Milazzotto و همکاران، ۲۰۰۸). جهش در این ژن ارتباط معنی‌دار با حجم اسپرم به‌ازای هر انزال، تحرک قبل و بعد از یخ‌گشایی اسپرم و تعداد اسپرم‌های غیرطبیعی در جمعیت گاومیش و هلشتاین دو رگ چینی دارد (Weinbauer و همکاران، ۲۰۱۰؛ Lin و همکاران، ۲۰۰۶). با توجه به مطالب فوق برای اولین‌بار این پژوهش با هدف بررسی چندشکلی ژن GnRHR در گاوهای نر هلشتاین ایران و ارتباط آن با صفات کیفی و کمی اسپرم طراحی و اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

در مجموع ۱۵۰ راس از گاوهای نر مورد استفاده در تلقیح مصنوعی که بین سال‌های ۱۳۶۴ تا ۱۳۹۵ متولد شده و در دو ایستگاه مرکز اصلاح نژاد شمال‌غرب (تبریز) و مرکز تستاژ شرکت جاهد (کرج) نگه‌داری می‌شدند، برای ژن کاندیدای مورد نظر به‌وسیله روش PCR_RFLP برای روشن شدن ارتباط آن‌ها با صفات حجم اسپرم، جمعیت اسپرم، کل جمعیت اسپرم، تحرک اسپرم تازه، تحرک اسپرم بعد از یخ‌گشایی، نسبت تحرک قبل و بعد از یخ‌گشایی و تعداد پایت تولیدی در هر انزال تعیین ژنوتیپ شدند. رکوردهای فنوتیپی برای صفات مورد مطالعه به همراه سن، سال و فصل تولید اسپرم توسط مرکز اصلاح نژاد دام، شرکت جاهد و مرکز اصلاح نژاد شمال‌غرب جمع‌آوری شد. برای هر گاو نر اندازه‌گیری‌های تکراری و تعداد کل داده‌ها ۱۶۴۰۰ عدد رکورد برای هر صفت بود. نمونه‌های خون با استفاده از لوله‌های خلا و حاوی EDTA از ورید دمی گرفته و داخل یخ به آزمایشگاه ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر منتقل و تا زمان استخراج در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید. برای برخی از دام‌ها از نمونه‌های اسپرم استفاده گردید. استخراج DNA از نمونه‌ها به‌روش تغییر یافته فنل- کلروفرم (RGED) (با پیش شتشو برای حذف رقیق‌کننده‌ها نمونه‌های اسپرم) انجام شد (Saremi و همکاران، ۲۰۰۸). دو جایگاه G286A (GU222218) و T340C (GU222219) از اگزون یک ژن GnRHR مورد بررسی قرار گرفت. برای تکثیر از آغازگرها و شرایط دمایی پیشنهادی Yang و همکاران (۲۰۱۱) استفاده شد (جدول ۱). بعد از اطمینان از صحت تکثیر دو قطعه از ژن GnRHR با استفاده از تکنیک PCR-RFLP، قطعات حاصل از تکثیر برای تعیین ژنوتیپ قطعه G286A ژن *GnRHR* با آنزیم *MboII* (فرمانتاز-آمریکا) و قطعه T340C با آنزیم *BspMI* (فرمانتاز-آمریکا) موردهضم قرارگرفتند. برای‌شناسایی قطعات حاصل از هضم آنزیمی، الکتروفورز افقی با استفاده از ژل آگارز ۳ درصد انجام شد و اندازه باندها با استفاده از ستون سایز مارکر DNA به‌دست آمد.

تجزیه و تحلیل آماری: فراوانی‌های ژنوتیپی و آللی و آزمون تعادل هاردی- واینبرگ با استفاده از آزمون کای مربع برای هر جایگاه به‌طور جداگانه با استفاده از نرم‌افزار PopGene.S2 محاسبه گردید. داده‌های گرفته‌شده از مراکز اصلاح‌نژاد برای صفات مختلف و اطلاعات ژنوتیپی حاصل از PCR-RFLP در نرم‌افزار اکسل (۲۰۱۳) ترکیب شد. با درنظر گرفتن حیوان به‌عنوان اثر تصادفی، سال-فصل، ایستگاه و ژنوتیپ به‌عنوان اثر ثابت، مدل خطی تصادفی برای صفات با توزیع پیوسته (حجم اسپرم، جمعیت اسپرم، کل جمعیت اسپرم، تعداد کل اسپرم متحرک در منی تازه، نسبت تحرک قبل و بعد از یخ‌گشایی و

تعداد پایت تولیدی) و رگرسیون لجستیک برای متغییرهای گسسته (تحرک اسپرم تازه و تحرک اسپرم بعد از یخ‌گشایی) ارتباط عوامل موثر با صفات کمی و کیفی اسپرم با نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۸/۲ (SAS، ۲۰۰۰) مورد بررسی قرار گرفت. برای آزمون تفاوت بین میانگین‌های حداقل مربعات از آزمون توکی تصحیح شده برای مقایسه چندگانه میانگین‌ها در سطح احتمال ۹۵ درصد استفاده شد.

جدول ۱: برنامه ترموسایکلر و آغازگرهای (پیشرو و برگشتی) این پژوهش

مراحل PCR	دما بر حسب سانتی‌گراد	زمان	تعداد چرخه تکثیر
مرحله آغاز	۹۵	۵ دقیقه	۳۴
مرحله دناتوراسیون	۹۴	۵۰ ثانیه	
مرحله اتصال	۶۱	۵۰ ثانیه	
مرحله گسترش	۷۲	۴۵ ثانیه	
مرحله طویل شدن	۷۲	۱۰ دقیقه	
مرحله نگه‌داری نهایی	۱۰	۱۰ دقیقه	

آغازگرها	طول قطعه	نام جایگاه
F: TATCAGAAGTGCCAGAAACACGAGTC R: GCTCTCCAGCATACCATTGAACAGT	۳۸۴bp	GnRHR340
F: GAAACTTCAGAATTGGACTCAAAGG R: GCTCTCCAGCATACCATTGAACAGT	۱۶۱bp	GnRHR286

مدل آماری برای صفات با توزیع پیوسته:

$$y_{ijklm} = \mu + a_i + YS_j + S_k + G_l + \sum_m b_m x_m + \varepsilon_{ijklm}$$

y_{ijhlm} مشاهده هرصفات، μ میانگین کلی صفت، a_i اثر تصادفی i امین حیوان، PY_j اثر ثابت j امین سال-فصل (j=۱-۶۸)، S_k اثر ثابت k امین ایستگاه (k=۱-۲)، G_l اثر ثابت l امین ژنوتیپ (l=۱-۳)، b_m ضریب تابعیت m امین متغیر کمکی (مثل سن)، x_m اثر ثابت m امین متغیر کمکی، ε_{ijklm} اثرتصادفی باقی‌مانده

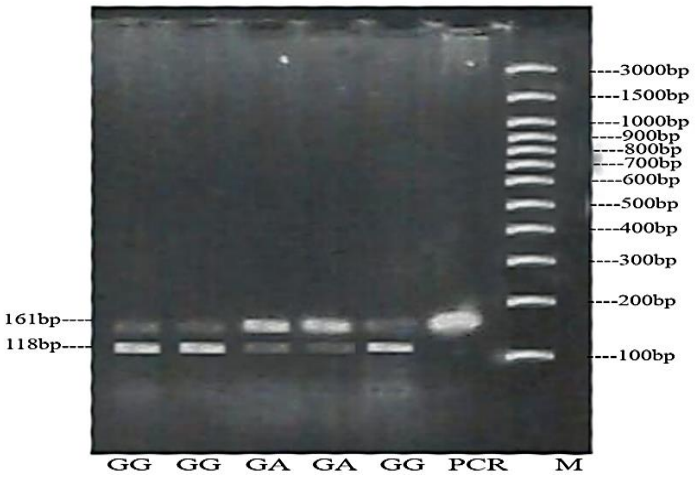
مدل آماری برای صفات با توزیع گسسته:

$$\eta_{iklm} = \log[p_i/(1-p_i)] = m + a_i + S_k + G_l + \sum_m b_m x_m + \varepsilon_{ijklm}$$

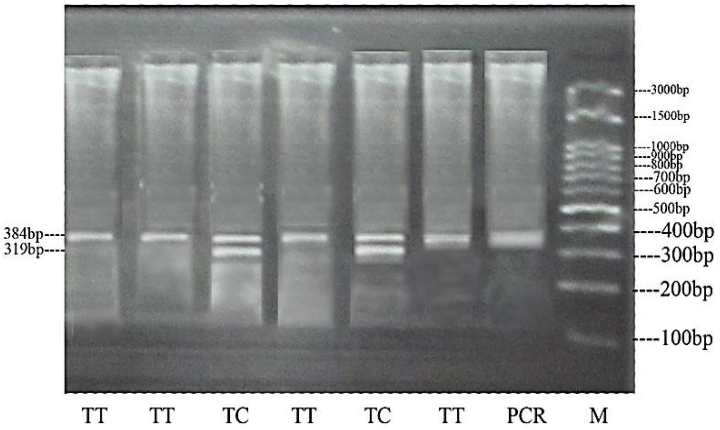
η_{ijklm} مشاهده‌هرصفات، m میانگین کلی‌صفت، a_i اثر تصادفی i امین حیوان (i=۱-۱۸۳)، PY_j اثر ثابت j امین سال-فصل (j=۱-۶۸)، S_k اثر ثابت k امین ایستگاه(k=۱-۲)، G_l اثر ثابت l امین ژنوتیپ (l=۱-۳)، b_m ضریب تابعیت m امین متغیر کمکی (مثل سن)، x_m اثر ثابت m امین متغیر کمکی، ε_{ijklm} اثرتصادفی باقی‌مانده

نتایج

برای ژن GnRHR دو جایگاه G286A و T340C به‌ترتیب با طول ۱۶۱ و ۳۸۴ جفت باز تکثیر گردید. در جایگاه G286A دو آلل A (۱۶۱ جفت باز) و آلل T (۱۱۸ و ۴۳ جفت باز) و در جایگاه T340C دو آلل T (۳۱۹ و ۶۵ جفت باز) و آلل C (۳۸۶ جفت باز) مشاهده شد (شکل ۱ و ۲). فراوانی آللی و ژنوتیپی به‌همراه آزمون



شکل۱: ژنوتیپ‌های ژن GnRHR در جایگاه MboII در ژل آگاروز ۳ درصد



شکل۲: ژنوتیپ‌های ژن GnRHR در جایگاه BspMI در ژل آگاروز ۳ درصد

کای مربع در جدول۲ آمده است. بررسی نتایج فراوانی نشان داد که در جایگاه G286A آلل G نسبت به آلل A فراوان‌تر بوده (۶۷/۹۳ در مقابل۳۲/۰۷درصد) و هم‌چنین ۶۴/۱۵ درصد گاوهای نر دارای ژنوتیپ AG و۳۵/۸۵ درصد دارای ژنوتیپ GG بودند. در جایگاه T340C آلل T به آلل C (۶۴/۴۷ در مقابل ۳۵/۵۳) و ژنوتیپ TT نسبت به TC (۶۷/۷۶ در مقابل ۳۲/۲۶) فراوان‌تر بودند. آزمون Chi-Square در این جایگاه نشان‌دهنده عدم وجود تعادل هاردی واینبرگ دارد این شاید ناشی از کوچک بودن جمعیت مورد تحقیق و یا اثر عوامل دخالت‌کننده بر روی فراوانی آللی باشد (p<۰/۰۵).

بررسی ارتباط جایگاه‌ها با صفات مورد بررسی: نتیجه تجزیه واریانس عوامل مؤثّر بر کیفیت اسپرم در گاوهای نر هلشتاین ایران نشان داد که آثار حیوان، ایستگاه، سال-فصل بر همه صفات، جایگاه G286A بر همه صفات اسپرم به‌جز تعداد پایوت تولیدی در هر انزال اسپرم و در جایگاه T340C بر همه صفات به‌جز صفات درصد تحرک بعد از یخ‌گشایی و نسبت تحرک اسپرم تازه به تحرک بعد از یخ‌گشایی‌معنی‌دار می‌باشد (p<۰/۰۵). برآورد میانگین حداقل مربعات صفات مختلف برای ژنوتیپ‌های هر دو جایگاه در جدول ۳ آمده است. نتایج نشان داد که در جایگاه G286A گاوهای نر با ژنوتیپAG نسبت به ژنوتیپ GG به‌طور معنی‌دار میانگین حجم اسپرم، جمعیت اسپرم در هر انزال، کل جمعیت اسپرم زنده و تعداد پایوت بالاتری داشتند. درحالی‌که درصفات جمعیت کل اسپرم، تحرک اسپرم و تحرک اسپرم بعداز یخ‌گشایی ژنوتیپ GG میانگین معنی‌دار بالاتری دارد. در جایگاه T340C، میانگین ژنوتیپ TT در صفات حجم اسپرم، جمعیت اسپرم، کل جمعیت اسپرم در هر انزال و دز تولیدی اسپرم و ژنوتیپ TC در صفات تحرک اسپرم تازه و تحرک بعد از یخ‌گشایی به‌طور معنی‌داری بیش‌تربود (p<۰/۰۵). اما در صفات نسبت تحرک اسپرم تازه به تحرک بعد از یخ‌گشایی تفاوتی مشاهده نشد (P<۰/۰۵).

جدول ۲: فراوانی آللی و ژنوتیپی و آزمون χ^2 برای جایگاه‌های GnRHR درگاوهای نرهلشتاین ایران

جایگاه	ژنوتیپ	تعداد	فراوانی مشاهده شده	فراوانی مورد انتظار	فراوانی آللی	مقدار χ^2
G286A	GG	۵۲	۰/۳۵۸۵	۰/۴۶۱۴	G=۰/۶۷۹۳	۲۳/۶۳ **
	AG	۹۸	۰/۶۴۱۵	۰/۴۳۵۷	A=۰/۳۲۰۷	
T340C	TT	۵۳	۰/۳۵۵۳	۰/۴۵۹۲	T=۰/۶۷۷۶	۱۷/۲ **
	TC	۹۷	۰/۶۴۴۷	۰/۴۳۶۹	C=۰/۳۲۲۶	

جدول ۳: برآورد میانگین حداقل مربعات ژنوتیپ‌های مختلف در جایگاه GnRHR-MboII و ارزش مقایسه میانگین با استفاده از آزمون توکی برای صفات اسپرم مورد بررسی در گاوهای نر هلشتاین ایران

صفات مورد بررسی	جایگاه G286A				جایگاه T340C			
	زنوتیپ‌ها		SEM	ارزش P	زنوتیپ‌ها		SEM	ارزش P
	GA	GG			TT	TC		
حجم اسپرم (میلی‌لیتر)	۵/۸۵۲	۵/۲۱۹	۰/۰۲۸	< ۰/۰۰۰۱	۵/۷۸۴	۵/۴۰۴	۰/۰۲۷	<۰/۰۰۰۱
جمعیت اسپرم ($\times 10^8$)	۱۱۷۱/۱۱۴	۱۲۲۴/۸۷۷	۵/۴۹۲	< ۰/۰۰۰۱	۱۱۹۲/۶۳۵	۱۱۷۷/۸۹۹	۵/۳۷۸	۰/۰۲۲۵
کل جمعیت اسپرم در هر انزال ($\times 10^8$)	۶۷۳۰/۱۶	۶۲۸۲/۷۳	۳۱/۲۸۳	< ۰/۰۰۰۱	۶۷۸۵/۴۵	۶۲۰۹/۱۰	۳۰/۶۳۵	۰/۰۰۶۲
کل جمعیت اسپرم زنده در هر انزال ($\times 10^8$)	۴۶۱۴/۹۰	۴۳۴۹/۳۵	۲۳/۰۱۲	< ۰/۰۰۰۱	۲۶۴۶/۴۹	۴۳۴۶/۶۰	۲۲/۵۳۷	۰/۰۴۰۴
تحرک اسپرم تازه (درصد)	۶۸/۷۲۴	۶۹/۲۶۳	۰/۵۱	< ۰/۰۰۰۱	۶۸/۰۲	۶۹/۷۴	۰/۴۹۸	<۰/۰۰۰۱
تحرک بعد از یخ‌گشایی (درصد)	۴۰/۵۳۱	۴۲/۰۵۳	۰/۱۵	< ۰/۰۰۰۱	۴۰/۴۲	۴۱/۵۹	۰/۶۸۵	۰/۱۵۱۳
نسبت تحرک قبل و بعد از انجماد	۱/۷۵۵	۱/۷۰۵	۰/۰۰۵	< ۰/۰۰۰۱	۱/۷۳۴	۱/۷۴۸	۰/۰۰۵	۰/۰۶۲۳
تعداد پایوت تولیدی اسپرم	۲۰۸/۶۳۵	۱۸۸/۳۳۰	۱/۲۷۴	۰/۵۰۲۳	۲۰۸/۸۹۷	۱۸۹/۵۰۸	۱/۲۴۶	<۰/۰۰۰۱

بحث

گزارش‌های کمی در مورد جایگاه‌های مورد بررسی وجود دارد. و نتایج متناقضی نسبت به تحقیق حاضر گزارش شده است. طبق گزارش Yang و همکاران (۲۰۱۱) فراوانی آلل‌های G و C و ژنوتیپ‌های GG و GC را فراوان‌تر گزارش نمودند که با نتایج تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد. هم‌چنین نتایج با Kumar و همکاران (۲۰۱۵) و Iyer و همکاران (۲۰۱۹) تا حدودی مطابقت دارد.

اما فراوانی‌های به‌دست آمده در این بررسی پایین‌تر بود که ممکن است به‌دلیل استراتژی‌های اصلاحی، شاخص‌های متفاوت انتخاب و تفاوت در حجم نمونه باشد.

Yang و همکاران (۲۰۱۱) در بررسی خود در جمعیت هلشتاین چین گزارش کردند که در جایگاه G286A ژنوتیپ GG در صفات تحرک اسپرم منجمد و سلامت اکروزم و ژنوتیپ GA در صفات اسپرم، جمعیت اسپرم، تحرک و نرخ اسپرم غیرطبیعی میانگین بالاتری دارند و در جایگاه T340C ژنوتیپ TT غلظت اسپرم، تحرک اسپرم منجمد، نرخ اسپرماتوزئید غیرطبیعی و سلامت اکروزوم و ژنوتیپ TC حجم اسپرم و تحرک اسپرم بالاتری دارد. دلیل عدم انطباق شاید برنامه‌های اصلاح نژادی، اقلیم متفاوت آب و هوایی و یا روش‌های گوناگون مدیریتی در پرورش باشد. جهش‌ها می‌توانند با تاثیر بر بیان ژن و ساختار پروتئین باعث تغییر فنوتیپ شوند (Weinbauer و همکاران، ۲۰۱۰).

هرچند در مورد جایگاه‌های مورد بررسی، تغییر اسیدهای آمینه در ساختار پروتئین دیده نشده است ولی ممکن است با تاثیر بر چگالی ژن GnRHR و هم‌چنین میزان پایداری آن روی میزان ترشح و غلظت گنادوتروپین‌ها موثر باشد (Liron و همکاران، ۲۰۱۲). در این تحقیق ژنوتیپ‌های هتروزیگوت عملکرد مطلوبی در صفات کمی و کیفی اسپرم ایجاد نموده‌اند (Huang و همکاران، ۲۰۰۲) که ممکن است به دلیل تاثیر غالبیت در این دام‌ها باشد بنابراین می‌توان از این اثر برای افزایش کمی و کیفی در صفات اسپرم استفاده نمود.

نتایج این بررسی نشان داد که جایگاه‌های مورد تحقیق تاثیر مثبتی بر صفات کیفی و کمی اسپرم داشته و می‌توانند در کنار سایر ژن‌های دخیل در فرآیند اسپرماتوژنز، به‌عنوان یکی از ژن‌ها در بررسی‌های ژنومی و هم‌چنین انتخاب برمبنای ترکیب اطلاعات کمی و ژنومی برای صفات مرتبط با اسپرم مدنظر قرار گیرد. اما جهت استفاده کاربردی نیاز به تحقیقات بیش‌تر با حجم‌نمونه بالاتر و ژن‌های بیش‌تر احساس می‌شود.

تشکر و قدردانی

با سپاس وافر از مدیر گروه، اساتید محترم دانشکده علوم دامی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر و قدردانی از همکاری و مساعدت ریاست ارجمند و مسئول اسپرم‌گیری محترم مرکز اصلاح نژاد شمال‌غرب کشور (شیخ حسن- تبریز).

منابع

۱. **Brito, L.F.; Silva, A.E.; Rodrigues, L.H.; Vieira, F.V.; Deragon, L.A. and Kastelic, J.P., 2002.** Effects of environmental factors, age and genotype on sperm production and semen quality in Bus indicts and Bus Taurus AI bulls in Brazil. Animal Reproduction Science. Vol. 70, No. 3-4, pp: 181-190.

۲. **Cheng, C.K. and Leung, P.C.K., 2005.** Molecular biology of gonadotropin- releasing hormone (GnRH)-1 and GnRH-11 and their receptors in humans. Endocrine Reviews. Vol. 25, No. 11, pp: 1-108.

۳. **Dai, L.; Zhao, Z.; Zhao, R.; Xiao, S.; Jiang, H.; Yue, X.; Li, X.; Gao, Y.; Liu, J. and Zhang, J., 2009.** Effects of novel single nucleotide polymorphisms of the FSH beta-subunit gene on semen quality and fertility in bulls. Animal Reproduction Science. Vol. 114, No. 1-3, pp: 14-22.

۴. **Fortes, M.R.; Reverter, A.; Nagaraj, SH.; Zhang, Y.; Jonsson, NN.; Barris, W.; Lehnert, S.; BoeHansen, G.H. and Hawken, J., 2011.** A single nucleotide polymorphism derived regulatory gene network underlying puberty in 2 tropical breeds of beef cattle. Journal of Animal Science. Vol. 89, No. 6, pp: 1669-1683.

۵. **Gadea, J., 2005.** Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. Theriogenology. Vol. 63, No. 2, pp: 431-444.

۶. **Gorbani, A.; Vaez Torshizi, R.; Bonyadi, M. and Amirinia, S., 2009.** A MPs PCR-RFLP within bovine growth hormone gene and its association with sperm quality traits in Iranian Holstein bulls. African journal of Biotechnology. Vol. 8. No. 19, pp: 4811-4816.

۷. **Huang, S.Y.; Chen, M.Y.; Lin, E.C.; Tsou, H.L.; Kuo, H.Y.; Ju, C.C. and Lee, W.C., 2002.** Effects of single nucleotide polymorphisms in the 5′-flanking region of heat shock protein 70.2 gene on semen quality in boars. Animal Reproduction Science. Vol. 70, pp: 99-109.

۸. **Huhtaniemi, I. and Alevizaki M., 2007.** Mutations along the hypothalamic-pituitary–gonadal axis affecting male reproduction. Reproductive BioMedicine Online. Vol. 15, No. 6, pp: 622-632.

۹. **Li, G.; Wu, H.P.; Fu, M.Z. and Zhou, Z.Q., 2011.** Novel single nucleotide polymorphisms of GnRHR gene and their association with litter size in goats. Archive Tierzucht. Vol. 54, No. 6, pp: 618-624.

۱۰. **Lin, C.L.; Ponsuksili, S.; Tholen, E.; Jennen, D.I.G.; Schellander, K. and Wimmers, K., 2006.** Candidate gene markers for sperm quality and fertility of boar. Animal Reproduction Science. Vol. 92, pp: 349-363.

۱۱. **Liron, J.P.; Prando, A.J.; Fernandez, M.E.; Ripoli, M.V.; Rogberg-Munoz, A.; Goszczynski, D.E.; Posik, D.M.; Peral-Garcia, P.; Balbo, A. and Giovambattista, G., 2012.** Association between GnRHR, LHR and IGF1 polymorphisms and timing of puberty in male Angus cattle. BMC Genetics. Vol. 2156, pp: 13-26.

۱۲. **Iyer, K.B.; Ingawale, M.V.; Kuralkar, S.V.; Bankar, P.S.; Sajid Ali, S.; Ingole, R.S.; Hajare S.W. and Pawshe, C.H., 2019.** Association of GnRH receptor gene polymorphism on testicular parameters and semen quality in HF crossbred bulls. Indian Journal of Animal Research. Vol. 53, No. 9, pp: 1140-1143.

۱۳. **Kumar, S.; Ganguly, I.; DEB, R.; Singh, U.; Mandal, D.; Mann, S.; Singh, R.; Kumar, M. and Sharma, A., 2015.** Elucidating the role of bovine GnRHR on semen quality traits among crossbred bull. The Indian journal of animal sciences. Vol. 85, No. 12, pp: 1314-1317.

۱۴. **Mathevon, M.; Buhr, M.M. and Dekkers, J.C.M., 1998.** Environmental, management and genetic factors affecting semen production in Holstein bulls. Journal of dairy Science. Vol. 81, pp: 3321-3330.

۱۵. **Milazzotto, M.P.; Rahal, P.; Nichi, M.; Miranda-Neto, T.; Teixeira, L.A.; Ferraz, J.B.S.; Eler, J.P.; Campagnari, F. and Garcia, J.E., 2008.** New molecular variants of hypothalamus-pituitary-gonad axis genes and their association with early puberty phenotype in Bos Taurus indicts (Nellore). Livestock Science. Vol. 114, pp: 274-279.

۱۶. **Nazi, R. and Sellamuthu, R., 2006.** Receptors in Spermatozoa: Are they real? Journal of Andragogy. Vol. 27: pp: 627-636.

۱۷. **Rothschild, M.F. and Bidanel, J.P., 1998.** Biology and genetics of reproduction. In: Rothschild, M.F., (Ed) The genetics of the pig. CAB International, Wallingford. pp: 313-343.

۱۸. **Saremi, M.; Saremi, A.M. and Tavallaei, M., 2008.** Rapid genomic DNA extraction (RGDE). Forensic Science International: Genetics Supplement Series. Vol. 1, pp: 63-65.

۱۹. **Weinbauer, G.F.; Luetjens, C.M.; Simoni, M.; Nieschlag, E.; Ni-eschlag, E.; Behre, H.M. and Nieschlag, S., 2010.** Physiology of testicular function in Andragogy Springer. Berlin. Vol. 10, pp: 11-59.

۲۰. **Wimmers, K.; Lin, C.L.; Tholen, E.; Jennen, D.G.; Schellander, K. and Ponsuksili, S., 2005.** Polymorphisms in candidate genes as markers for sperm quality and boar fertility. Animal Genetic. Vol. 36, pp: 152-155.

۲۱. **Yang, W.C.; Tang, K.Q.; Yu, J.N.; Zhang, C.Y.; Zhang, X.X. and Yang, L.G., 2011.** Effects of MboII and BspMI polymorphisms in the gonadotropin releasing hormone receptor (GnRHR) gene on sperm quality in Holstein bulls. Molecular Biology Reports. Vol. 38, No. 5, pp: 3411-3415.

۲۲. **Yang, W.U.; Tang, K.Q.; Zhang, C.H.; Deqing, X.U.; Wen, Q.U. and Yang, L.I.I., 2011.** Polymorphism of the GnRHR gene and its association with litter size in Boer goats. South African Journal of Animal Science. Vol. 4, pp: 41-49.