مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (دوره 4، شماره 1، بهار و تابستان 1391)

اثرات همخونی و آمیخته گری بر تکوین رویان آزمایشگاهی در شرایط معمول و استرس حرارتی

مهدی وفای واله[1*]، مجتبی طهمورث پور[2]، مرتضی دلیری جوپاری[3]، محمدرضا نصیری[2]، آیدین رحیم طایفه[4]

[1] دانشجوی مقطع دکتری، گروه علوم دامی، دانشگاه فردوسی مشهد

[2] دانشیار، گروه علوم دامی، دانشگاه فردوسی مشهد

[3] استادیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

[4] تکنسین، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

تاریخ دریافت: 1390/11/24، تاریخ پذیرش: 1391/02/18

چکیده

همخونی و استرس حرارتی روی بازدهی صفات تولید مثلی در گاو شیری اثر منفی دارند. دو راهکار پیشنهادی برای غلبه بر این عوامل به ترتیب: آمیخته گری و آمیخته گری با نژادهای مقاوم به گرما است. هدف از این مطالعه ارزیابی تاثیر همخونی و آمیخته گری بر روی نرخ تسهیم و قابلیت تکوین رویان های آزمایشگاهی همخون (هلشتاین) و آمیخته (سیستانی- هلشتاین) در شرایط معمول و استرس حرارتی بود. پس از انجام بلوغ، تخمک های بالغ گاو هلشتاین (تعداد=623) با هر یک از دو اسپرم هلشتاین و سیستانی تلقیح و پس از طی دوره انکوباسیون، زیگوتهای احتمالی جمع آوری و به محیط های کشت با شرایط معمول (38/5°C) و یا استرس حرارتی در زمان 96 ساعت پس از تلقیح (41°C برای مدت 12 ساعت) منتقل شدند. زیگوتهای احتمالی برای مدت 8 روز کشت و برای نرخ تسهیم و تولید بلاستوسیست به ازای رویان های تسهیم شده ارزیابی شدند. اطلاعات به دست آمده با استفاده از رویه رگرسیون لجستیک تجزیه و تحلیل شدند. نتایج نشان داد نرخ تسهیم در زمان 48 ساعت پس از لقاح تحت تاثیر ژنوتیپ اسپرم (رویان) است، بطوری که تخمک های هلشتاین تلقیح شده با اسپرم هلشتاین در مقایسه با تخمک های هلشتاین بارور شده با اسپرم سیستانی نرخ تسهیم بالاتری داشتند (207/314; 66 درصد در مقابل 130/309; 42 درصد)، ($P \leq 0/05$). علاوه بر این نرخ تولید بلاستوسیست در شرایط استرس حرارتی تحت تاثیر آمیخته گری قرارگرفت، بطوری که تخمکهای هلشتاین تلقیح شده با اسپرم سیستانی قابلیت تکوین بالاتری در مقایسه با رویانهای همخون هلشتاین در شرایط استرس حرارتی داشتند (4/49; 8.1 درصد در مقابل 1/84; 1.1 درصد)، ($P \leq 0/05$). در مجموع نتایج این مطالعه نشان داد که رویان های آمیخته سیستانی- هلشتاین، قابلیت تکوین بالاتری در شرایط استرس حرارتی در مقایسه با رویانهای خالص و همخون هلشتاین در مراحل اولیه تکوین دارند. براساس نتایج حاصله ممکن است که آمیخته گری با اسپرم سیستانی در بهبود بازدهی نرخ آبستنی گاوهای هلشتاین در شرایط استرس حرارتی مؤثر باشد.

کلمات کلیدی: *رویان، همخونی، آمیخته گری، استرس حرارتی، هلشتاین، سیستانی.*

* نویسنده مسئول: مهدی وفای واله تلفن: 09358237550 Email: Me_va84@yahoo.com

مقدمه

مطالعات نشان می دهد که طی 50 سال اخیر بازدهی صفات تولید مثلی در گاوهای شیری به شدت کاهش یافته است (Lucy, 2001). در بین عوامل زیادی که روی بازدهی صفات تولید مثلی اثر منفی می گذارند، همخونی و حساسیت به استرس حرارتی دارای اهمیت بالائی هستند (Hansen, 2007; Schaeffer *et al.*, 2011). گزارش شده است که گاوهایی که تحت شرایط استرس حرارتی هستند؛ نرخ باروری پائین تری دارند. از طرفی نشان داده شده است که افزایش تولید شیر در گاوهای شیری روی بازدهی مکانیسمهای تنظیمی دمای بدن در شرایط استرس حرارتی اثری منفی داشته و اثرات منفی استرس حرارتی را روی نرخ باروری تشدید می کند (Jousan*et al.*, 2005; Hansen, 2007). بنابراین افزایش میزان حساسیت به استرسهای حرارتی احتمالا یکی از فاکتورهایی است که توجیه کننده کاهش بازدهی تولید مثل گاوهای شیری در اثر افزایش میزان تولید شیر است. از آنجائی که حساسیت رویان به استرس حرارتی طی روزهای اولیه آبستنی بالاتر است، تولید و انتقال رویان دارای ژنوتیپ مقاوم به استرس حرارتی، استفاده از اسپرم نژادهای مقاوم به گرما در برنامه های تلقیح مصنوعی و یا آمیخته گری به عنوان راهکارهایی برای تعدیل اثرات منفی استرس حرارتی بر روی قابلیت زنده مانی رویان و نیز بهبود بازده صفات تولید مثلی پیشنهاد شده اند (Hansen, 2007). به طور مشابه نشان داده شده است که افزایش نرخ همخونی روی نرخ باروری و زنده مانی رویان تاثیر منفی می گذارد (Lazzari*et al.*, 2011). گزارش شده است که یک درصد افزایش همخونی به طور متوسط منجر به افزایش تعداد سرویس مورد نیاز به ازای آبستنی (0/17 سرویس به ازای یک درصد همخونی)، افزایش تعداد روزهای باز (2روز) و کاهش 3/3 درصدی نرخ آبستنی می شود (Hermas *et al.*, 1987). پیشنهاد شده است که آمیخته گری بعنوان راهکاری برای غلبه بر این معضل می تواند سبب بهبود بازدهی صفات تولید مثلی و تولیدی شود (McAllister, 2002). از این رو، اهداف این پژوهش عبارت بودند از: ارزیابی اثرات همخونی و آمیخته گری بر روی قابلیت باروری و تکوین رویان و نیز ارزیابی اثر آمیخته گری با اسپرم نژاد مقاوم به گرما بر روی قابلیت تکوین رویان در شرایط استرس گرمائی.

مواد و روش‌ها

تمام مواد شیمیایی و نیز محیط های کشت به جز موارد ذکر شده از شرکت سیگما تهیه شد (Sigma Louis, MO, USA). تولید رویان در محیط آزمایشگاهی از تخمک های استحصال شده از گاوهای هلشتاین کشتار شده در کشتارگاه محلی (کرج راک– کرج) و اسپرمهای نژادهای سیستانی و هلشتاین تهیه شده از مرکز اصلاح نژاد کشور طبق روش ذیل انجام گرفت.

بلافاصله بعد از کشتار، تخمدان های گاو از کشتارگاه جمع آوری و در دمای 33-29 درجه

سانتیگراد در محلول فسفات بافر سالین حاوی پنی سیلین (*100 IU/ml*) به آزمایشگاه انتقال داده شد. استحصال تخمک[1] از فولیکولهای 2 تا 10 میلی متری سطح تخمدان که ظاهری شفاف داشتند، با استفاده از سوزن شماره 18 متصل به سرنگ 10 میلی لیتری انجام شد. تخمک های با کیفیت دارای چند لایه سلول‌های کومولوس و سیتوپلاسم یکنواخت در زیراستریو میکروسکپ انتخاب و پس از پنج بار شستشو در محیط TCM-HEPES (Sigma, USA)، در دسته های 10تایی به داخل قطره های 50 میکرولیتری محیط کشت بلوغ TCM199 (Sigma, USA) تکمیل شده با PMSG (10 IU/ml, Intervet,Holland)، HCG (5 IU/ml)، FBS (10%) و فاکتور رشد اپیدرمال EGF (50 ng/ml) که با روغن معدنی پوشیده شده بودند، منتقل و برای مدت 24 ساعت داخل انکوباتور با شرایط حداکثر رطوبت، دمای 38,5 درجه سانتیگراد و 5% CO_2 کشت داده شدند.

در این مطالعه از پایوت های اسپرم منجمد گاو هلشتاین و سیستانی برای باروری تخمک ها استفاده شد. پایوتهای اسپرم از مرکز اصلاح نژاد کرج تهیه گردید. اسپرمهای متحرک با روش شناور سازی در محیط تجاری شستشوی اسپرم HAM,S F10 (Gibco, USA) جدا سازی شدند (Gordon, 2004). برای انجام IVF تخمک های بالغ در گروههای 35-30 تائی پس از سه بار شستشو در محیط TCM-HEPES و نیز یکبار شستشو در محیط بارورسازی IVF-TALP که شامل اجزا و ترکیبات ذیل:

NaCl (114 mM), KCL (3.2 mM), $NaHCO_3$ (25 mM), Na-Lactate (10 mM), NaH_2PO_4 (0.4 mM), $CaCl_2$ (2 mM), Phenol Red (5 µg/ml), $MgCl_2$ (0.5 mM), Na-Pyruvate (0.25 mM), gentamycin (50 µg/ml), Heparin (30µg/ml), Penicillamine (20 µM), Hypotaurine (10 µM), Epinephrine (1 µM) BSA, fraction V (6 mg/ml) بود، به صورت تصادفی به قطره های 400 میکرولیتری محیط لقاح (بارورسازی) پوشیده شده با روغن معدنی منتقل شدند. غلظت اسپرمهای متحرک جداسازی شده در هر یک از دو ساختار ژنتیکی با استفاده از لام هموسایتومتر اندازه گیری و با غلظت نهائی 2×10^6 به میزان 10 میکرولیتر به قطره های محیط لقاح افزوده شدند. کمپلکس های اسپرم– تخمک برای مدت 24-22 ساعت در داخل انکوباتور با شرایط حداکثر رطوبت، دمای 38,5 درجه سانتی گراد و 5% CO_2 انکوبه شدند. در زمان 24-22 ساعت پس از لقاح، زیگوتهای احتمالی[2] در محیط TCM-HEPES برای جداسازی سلولهای کومولوس و اسپرمهای چسبیده به دیواره زیگوت های احتمالی به مدت 2 دقیقه در دور بالا ورتکس؛ و پس از شستشوی مجدد در محیط TCM-HEPES (دو بار) در گروههای 35 تایی به محیط کشت IVC-SOF که شامل ترکیبات

NaCl (108 mM), KCL (7.2 mM), $NaHCO_3$ (25 mM), Na-Lactate (4.2 mM), KH_2PO_4 (1.2 mM), $CaCl_2$ (1.8 mM), $MgSo_4$ (1.5 mM), Phenol Red (10µg/ml), Na-Pyruvate (0.3 mM), Sodium-citrate (0.3m M), Myo-insitol (2.8mM), Glutamin (0.2 mM), Gen--tamycin (50 µg/ml), MEM (10 µl/ml),

[1]Follicle aspiration

[2]Presumptive zygote

BME (20 µl/ml), BSA-FAF (4 mg/ml) بود، منتقل و در شرایط حداکثر رطوبت و دمای 38,5 درجه سانتیگراد و 5% CO_2 داخل انکوباتور، انکوبه شدند.

طراحی آزمایش

آزمایش 1: ارزیابی اثر همخونی و آمیخته گری روی نرخ باروری و تکوین رویان: در چهار تکرار، زیگوتهای احتمالی حاصل از تلاقی اسپرم های سیستانی و هلشتاین با تخمک های هلشتاین برای ارزیابی اثر احتمالی همخونی و آمیخته گری روی نرخ باروری و قابلیت تکوین، در دمای 38,5 درجه سانتیگراد در محیط کشت SOF برای مدت 8 روز کشت داده شدند.

آزمایش 2: ارزیابی اثر همخونی و آمیخته گری روی نرخ تکوین رویان در شرایط استرس گرمائی: در سه تکرار، زیگوتهای احتمالی حاصل از تلاقی اسپرم های سیستانی و هلشتاین با تخمک های هلشتاین برای ارزیابی اثرات احتمالی همخونی و آمیخته گری با اسپرم نژاد مقاوم به استرس حرارتی برروی قابلیت تکوین رویان در شرایط استرس حرارتی، در مقطع اولیه کشت، به مدت 72 ساعت در دمای 38,5 درجه سانتیگراد کشت شده (96 ساعت پس از لقاح)، سپس برای مدت 12 ساعت به دمای 41 درجه سانتیگراد و مجدداً به انکوباتور 38,5 درجه سانتیگراد برای ادامه دوره کشت منتقل شدند. پس از گذشت 48 ساعت از لقاح، زیگوت های احتمالی برای نرخ تسهیم ارزیابی (نسبتی از زیگوت های احتمالی که تقسیم شده بودند) و بلافاصله به داخل انکوباتور منتقل شدند. پس از گذشت 168 ساعت از آغاز کشت، مجدداً رویانها در زیر میکروسکپ (Nikon-Japan) برای پارامتر نرخ تکوین رویان (نسبتی از زیگوتها که به مرحله بلاستوسیست می رسند) ارزیابی شدند.

مقایسه آماری برای ارزیابی نرخ تسهیم[1] و نرخ تکوین زیگوتهای فرضی کشت شده بر اساس رویه رگرسیون لجستیک[2] و تست مربع کای انجام شد (Khatib *et al.*, 2009). کلیه آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار آماری JMP نسخه 7 انجام شد.

نتایج و بحث

در مجموع 623 تخمک با کیفیت استحصال شد. در آزمایش اول تعداد 366 تخمک بالغ به طور تصادفی در چهار تکرار به وسیله اسپرم های سیستانی و هلشتاین بارور و در دمای 38,5 درجه سانتیگراد برای مدت 168 ساعت کشت و برای نرخ تسهیم، تکوین و شکوفائی ارزیابی شدند (شکل های 1 و2). نتایج نشان داد که ساختار ژنتیکی اسپرم (رویان) اثر معنی داری روی نرخ تسهیم تخمک های بارور شده داشت، بطوریکه تخمک های بارور شده با اسپرم هلشتاین نرخ تسهیم بالاتری در مقایسه با تخمک های بارور شده با اسپرم سیستانی نشان دادند (بطور میانگین 66 درصد در مقابل42 درصد، $P \leq 0/05$) ، اما نرخ تکوین و شکوفائی تخمک

[1] Cleavage
[2] logistic regression

های بارور تسهیم یافته در شرایط معمولی، بین دو گروه آزمایشی (همخون و آمیخته) تفاوت معنی داری نشان نداد (جدول 1) (به ترتیب 16درصد در مقابل 12 درصد و 24 درصد در مقابل 45 درصد، P>0/05).

جدول1- نرخ تسهیم و تکوین تخمک های هلشتاین بارور شده با اسپرمهای سیستانی و هلشتاین کشت شده در شرایط نرمال حرارتی(38,5 درجه سانتی گراد) وشرایط استرس حرارتی (96 ساعت پس از باروری به مدت 12 ساعت در دمای 41).

Table 1- Cleavage and blastocyst rates of oocytes from Holstein fertilized with semen from Sistani and Holstein bulls and maintained at 38.5°C or subjected to a heat shock of 41°C for 12 h at 96 h post-insemination (hpi).

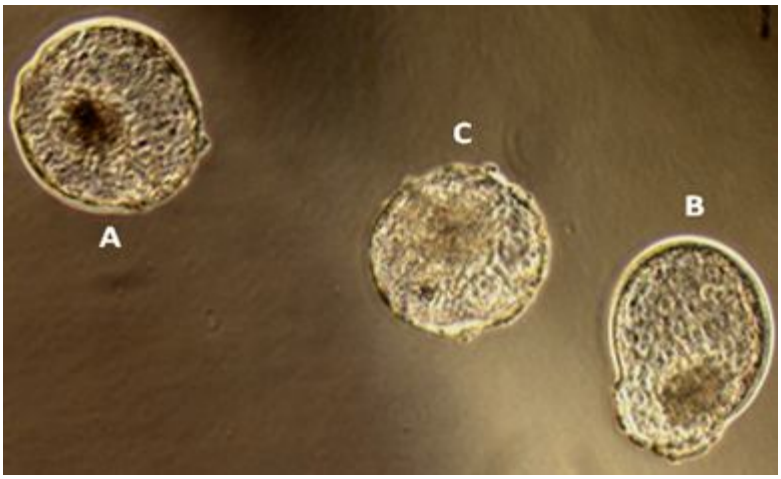
متغیرها Variables	38,5 درجه سانتی گراد (طبیعی) 38.5°C (normal)		41 درجه سانتی گراد (استرس حرارتی) 41°C (heat stress)	
نژاد پدر(اسپرم) breed of bull	هلشتاین Holstein	سیستانی Sistani	هلشتاین Holstein	سیستانی Sistani
نژاد مادر(تخمک) breed of cow	هلشتاین Holstein	هلشتاین Holstein	هلشتاین Holstein	هلشتاین Holstein
تعداد تخمک Oocyte (n)	189	177	125	132
تسهیم (درصد از تخمک ± خطای استاندارد) Cleavage (% of Oocytes ± SEM)	$123(66\pm4^{a})$	$81(45\pm4^{b})$	$84(69\pm4^{y})$	$49(38\pm2^{z})$
بلاستوسیست (درصد از تسهیم ± خطای استاندارد) Blastocyst (% of Cleavage ± SEM)	$19(16\pm3^{a*})$	$10(12\pm3^{a})$	$1(1\pm1^{y})$	$4(8\pm1^{z})$
شکوفائی (درصد از بلاستوسیست ± خطای استاندارد) Hatch (% of Blastocyst ± SEM)	$5(24\pm10^{a})$	$4(45\pm20^{a})$	0	0

در هر گروه تفاوتهای داده های با حروف مشترک از نظر آماری معنی دار نیست ($P\leq0.05$).

(*) تفاوت معنی دار بین شرایط معمولی و استرس حرارتی در بین ترکیب ساختارهای ژنتیکی($P\leq0.05$).

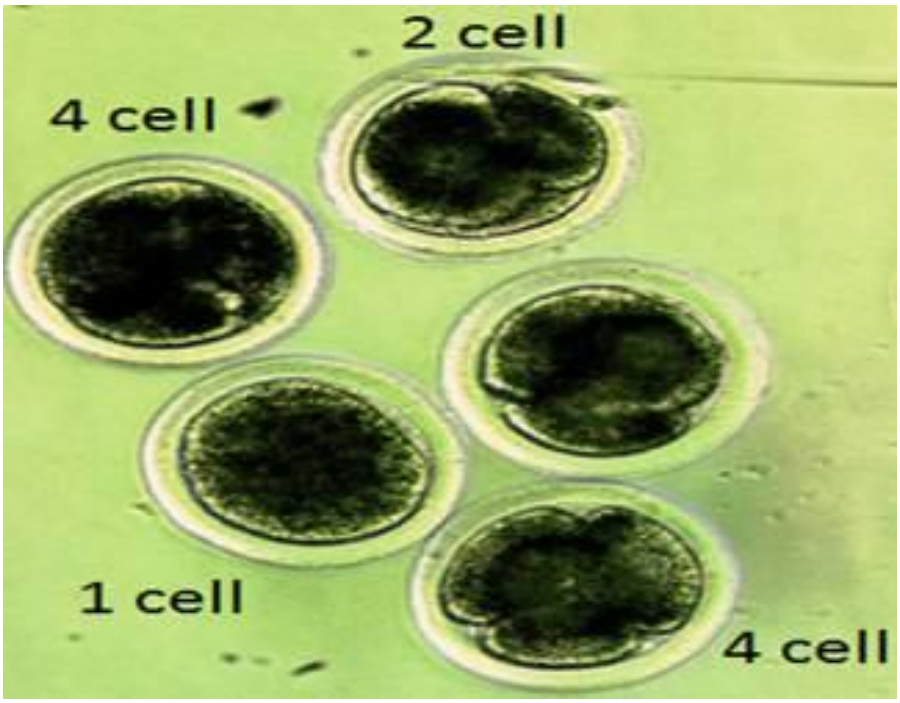
Means with different superscripts represent significant differences ($P\leq0.05$)

(*) significantly different between control and heat shock groups among the same breed combination.



شکل 1- رویانهای تکامل یافته گاو در روز هشتم کشت. A : بلاستوسیست، B: بلاستوسیست در حال شکوفائی وC: شکوفا.

Figure 1-Embryo development to the Blastocyst (A), Expanded Blastocyst (B) and Hatch Blastocyst (C) stages.



شکل2- تسهیم زیگوتهای احتمالی (48 ساعت پس از آغاز کشت).

Figure 2-Cleavage of Presumptive zygote (48 hour after culture)

در آزمایش دوم تعداد 257 تخمک بالغ به طور تصادفی در سه تکرار به وسیله اسپرم های سیستانی و هلشتاین بارور و به ترتیب برای مدت 72 ساعت در دمای 38,5 درجه سانتیگراد، 12 ساعت در دمای 41 درجه سانتیگراد و مجددا برای 84 ساعت در دمای 38,5 سانتیگراد درجه

کشت شدند. نتایج مقایسات[1] نشان داد استرس حرارتی در مقایسه با شرایط معمولی به شدت روی نرخ تکوین رویانهای تسهیم یافته همخون هلشتاین اثر منفی داشت (16درصد در مقابل 1 درصد، P ≤0/001)، در حالیکه اثر معنی داری روی توان تکوین رویانهای تسهیم یافته آمیخته سیستانی- هلشتاین نداشت (12درصد در مقابل 8 درصد، P >0/05) بعبارتی در شرایط استرس حرارتی آمیخته های سیستانی- هلشتاین قابلیت تکوین بالاتری در مقایسه با رویانهای همخون هلشتاین داشتند (جدول 1) (8 درصد در مقابل 1 درصد، P ≤0/05).

در رابطه با تاثیر ساختار ژنتیکی اسپرمهای مورد استفاده در طرحهای آمیخته گری بر روی نرخ باروری و نیز قابلیت تکوین رویان نتایج متناقضی گزارش شده است. در این راستا نتایج برخی از گزارشات دلالت بر عدم تاثیر ساختار ژنتیکی اسپرم برروی نرخ باروری تخمک دارند (Zi *et al*., 2009; Eberhardt *et al*., 2009)، در حالی که نتایج برخی دیگر از مطالعات، دلالت بر تاثیر معنی دار ساختار ژنتیکی اسپرم مورد استفاده در طرح آمیخته گری بر روی نرخ باروری دارند (Barros *et al*., 2006; Lazzari *et al*., 2011). صرف نظر از قابلیت ساختار ژنتیکی اسپرم بر روی باروری تخمک، نتایج آزمایشات زیادی حاکی از وجود اثرات چشمگیر آمیخته گری بر روی نرخ تکوین رویان دارند. در این خصوص نتایج برخی از مطالعات دلالت بر وجود اثرات مثبت آمیخته گری بر روی قابلیت تکوین رویان (Eberhardt *et al*., 2009;Lazzari *et al*., 2011) در مقایسه با ژنوتیپ های خالص و همخون دارند، در حالیکه گزارشاتی در خصوص اثرات منفی آمیخته گری بر روی نرخ تکوین رویان نیز ارائه شده است (Fischer *et al*., 2000). به نظر می رسد که تاثیر آمیخته گری در مقایسه با همخونی و خلوص بر روی نرخ تکوین رویان بستگی به ترکیب و ترتیب سویه های اسپرم و تخمک مورد استفاده (قابلیت ترکیب پذیری) دارد (Renard & Babinet, 1986; Scott, 1996). در این رابطه نشان داده شده است که تفاوت هایی در ساختار سویه های مختلف اسپرم وجود دارد که می تواند بر روی فراگمانتاسیون سیتوپلاسم و نیز کنتیک تکوین زیگوتهای احتمالی تاثیر بگذارد (Renard & Babinet, 1986). گزارش شده که تاخیر در باروری تخمک به دلیل خصوصیات اسپرماتوزوآ، که منجر به افزایش سن تخمک لقاح نیافته می شود، می تواند روی نرخ تکوین رویان تاثیر بگذارد. افزایش طول عمر تخمک لقاح نیافته می تواند سبب عدم همزمانی تشکیل پرونوکلئوس های نر و ماده در رویان انسان، تغییرات الگوهای ایمپرینت مادری[2] در رویان موش و نیز کاهش احتمال قابلیت تکوین تخمک های لقاح یافته گاو به مرحله بلاستوسیست شود (Hansen *et al*., 2010). از طرفی اثرات سویه های مختلف تخمک (Gao *et al*., 2004)؛ و نیز اثرات ترکیبی ساختارهای ژنتیکی اسپرم و تخمک بر روی کنتیک تکوین رویان گزارش شده است،

[1] Contrast

[2] Methylation patterns of maternally imprinted genes

اما هنوز مکانیسمهای مولکولی دخیل به درستی شناسائی نشده اند (Zi *et al*., 2009). لذا، پیشنهاد شده است که احتمالا مکانیمسهای اپی ژنتیکی مسئول این تفاوتها باشند (Han *et al*., 2008).

نتایج این مطالعه نشان داد که آمیخته های هلشتاین- سیستانی قابلیت تکوین بالاتری در شرایط استرس حرارتی در مقایسه با همخون های هلشتاین دارند ($P\leq0.05$) . در رابطه با تاثیر ساختار ژنتیکی اسپرم بر روی قابلیت تکوین در شرایط استرس حرارتی نیز نتایج ضد و نقیض است. این نتایج با نتایج تحقیقات دیگر مبنی بر اثر مثبت ساختار ژنتیکی اسپرم نژادهای مقاوم به گرما (بوس ایندیکوس[1]) (Barros *et al*., 2006, Pegorer *et al*., 2007, Eberhardt *et al*., 2009) روی قابلیت تکوین رویان مطابقت دارد. با این حال تفسیر دیگری از بالاتر بودن نرخ آبستنی دورگ های هلشتاین- جیر[2] در مقایسه با همخون های هلشتاین در شرایط استرس حرارتی تابستان مبتنی بر احتمال اثر مثبت هتروزیس ناشی از تلاقی ماده های هلشتاین (بوس تائروس[3]) و نرهای نژاد جیر (بوس ایندیکوس) روی بازدهی آبستنی نیز ارائه شده است که می بایست مد نظر قرار گیرد (Eberhardt *et al*., 2009)؛ در مقابل، نتایجی هم در ارتباط با عدم تاثیر و یا اهمیت کمتر ساختار ژنتیکی اسپرم در مقایسه با ساختار ژنتیکی تخمک روی قابلیت تکوین رویان در شرایط استرس حرارتی گزارش شده است (Block *et al*., 2002, Satrapa *et al*., 2011).

در مجموع نتایج این مطالعه نشان داد که اسپرم سیستانی(بوس ایندیکوس) قابلیت بارور کردن تخمک های هلشتاین(بوس تائروس) را داراست و رویان های آمیخته سیستانی- هلشتاین قابلیت تکوین بالاتری در مقایسه با رویان های خالص و همخون هلشتاین در وضعیت استرس حرارتی در شرایط آزمایشگاه دارند. استفاده از اسپرم سیستانی در برنامه های تلقیح مصنوعی ممکن است تاثیر مثبتی روی بازدهی صفات تولید مثلی در شرایط استرس حرارتی داشته باشد. با این حال برای تصمیم گیری در مورد بازدهی آمیخته گری در شرایط طبیعی مطالعات بیشتری مورد نیاز است.

سپاسگزاری

بدین وسیله نویسندگان بر خود واجب می دانند که از همکاری بی دریغ مسئولین مرکز اصلاح نژاد کشور آقایان مهندس صیاد نژاد و دکتر میرترابی بابت مساعدت در تهیه اسپرم های بومی و مسئولین کشتارگاه صنعتی کرج راک تشکر و قدردانی نمایند.

[1] Bos Taurus indicus (B. t. indicus)
[2] Gyr (B. t. indicus)
[3] Bos Taurus Taurus (B. t. taurus)

منابع

Barros CM, Pegorer MF, Vasconcelos JL, Eberhardt BG, Monteiro FM (2006). Importance of sperm genotype (indicus versus taurus) for fertility and embryonic development at elevated temperatures. Theriogenology 65: 210-218.

Block J, Chase CC, Jr., Hansen PJ (2002). Inheritance of resistance of bovine preimplantation embryos to heat shock: relative importance of the maternal versus paternal contribution. Molecular Reproduction Development 63: 32-37.

Eberhardt BG, Satrapa RA, Capinzaiki CRL, Trinca LA, Barros CM (2009). Influence of the breed of bull (Bostaurusindicus vs. Bostaurustaurus) and the breed of cow (Bostaurusindicus, Bostaurustaurus and crossbred) on the resistance of bovine embryos to heat. Animal Reproduction Science 114: 54-61.

Fischer AE, Bernal DP, Gutierrez-Robayo C, Rutledge JJ (2000). Estimates of heterosis for in vitro embryo production using reciprocal crosses in cattle. Theriogenology 1: 1433-1442.

Gao S, Czirr E, Chung YG, Han Z, Latham KE (2004). Genetic variation in oocyte phenotype revealed through parthenogenesis and cloning: correlation with differences in pronuclear epigenetic modification. Biology of Reproduction 70: 1162-1170.

Gordon IR (2004). Laboratory Production of Cattle Embryos, CABI publishers, INC. UK.

Han ZM, Mtango NR, Patel BG, Sapienza C, Latham KE (2008). Hybrid vigor and transgenerational epigenetic effects on early mouse embryo phenotype. Biology of Reproduction 79: 638-648.

Hansen PJ (2007). Exploitation of genetic and physiological determinants of embryonic resistance to elevated temperature to improve embryonic survival in dairy cattle during heat stress. Theriogenology 68: S242-S249.

Hermas SA, Young CW, Rust JW (1987). Effects of mild inbreeding on productive and reproductive performance of Guernsey cattle. Journal Dairy Science 70: 712-715.

Jousan FD, Drost M, Hansen PJ (2005). Factors associated with early and mid-to-late fetal loss in lactating and nonlactating Holstein cattle in a hot climate. Journal Animal Science 83: 1017-1022.

Khatib H, Huang W, Wang X, Tran AH, Bindrim AB, Schutzkus V, Monson RL, Yandell BS (2009). Single gene and gene interaction effects on fertilization and embryonic survival rates in cattle.Journal Dairy Science 92: 2238-2247.

Lazzari G, Colleoni S, Duchi R, Galli A, Houghton FD, Galli C (2011). Embryonic genotype and inbreeding affect preimplantation development in cattle. Reproduction 141: 625-632.

Lucy MC (2001). Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? Journal Dairy Science 84: 1277-1293.

McAllister AJ (2002). is crossbreeding the answer to questions of dairy breed utilization? Journal Dairy Science 85: 2352-2357.

Pegorer MF, Vasconcelos JL, Trinca LA, Hansen PJ, Barros CM (2007). Influence of sire and sire breed (Gyr versus Holstein) on establishment of pregnancy and embryonic loss in lactating Holstein cows during sumMer heat stress. Theriogenology 67: 692-697.

Renard JP, Babinet C (1986). Identification of a paternal developmental effect on the cytoplasm of one-cell-stage mouse embryos. Development biology 83: 6883-6886.

Satrapa RA, Nabhan T, Silva CF, Simoes RA, Razza EM, Puelker RZ, Trinca LA, Barros CM (2011). Influence of sire breed (Bosindicus versus Bostaurus) and interval from slaughter to oocyte aspiration on heat stress tolerance of in vitro-produced bovine embryos. Theriogenology 76: 1162-1167.

Schaeffer LR, Burnside EB, Glover P, Fatehi J (2011). Crossbreeding Results in Canadian Dairy Cattle for Production, Reproduction and Conformation. The Open Agriculture Journal 5: 63-72.

Zi XD, Yin RH, Chen SW, Liang GN, Zhang DW, Guo CH (2009). Developmental Competence of Embryos Derived from Reciprocal In Vitro Fertilization between Yak (Bosgrunniens) and Cattle (Bostaurus). Journal of Reproduction and Development 55: 480-483.

Influence of inbreeding and crossbreeding on the in vitro embryo development during normal and heat stress condition

Vafaye Valleh M.[1*], Tahmoorespour M.[2], Daliri Jopary M.[3], Nassiri M.R.[2]**, Rahim-Tayefeh A.[4]**

[1] PhD candidate, Department of Animal Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
[2] Associate professors, Department of Animal Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
[3] Assistant professor, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.
[4] Lab technician, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.

Abstract

Inbreeding and Heat stress have negative effects on reproductive performance of dairy cattle. Two suggested strategies to overcome to these factors are to use crossbreeding and crossbreeding with thermo tolerant genotype, respectively. The aims of present study were to determine the effects of inbreeding and crossbreeding on cleavage and blastocyst rates at early stages of in vitro development in inbreed (Holstein) and crossbreds (Sistani-Holstein) embryos during normal and heat shock stress. In vitro-matured (IVM) Holstein oocytes (n=623) were inseminated with either Holstein or Sistani spermatozoa, and after incubation period, presumptive embryos were collected and assigned to control (38.5°C) or heat shock at 96 h post insemination (hpi; 41°C for 12 h) treatments. The presumptive embryos were cultured in vitro for 8 days and evaluated for cleavage and blastocyst formation rates per cleaved embryo. Data were analyzed using logistic regression. The results indicated a cleavage at 48 hpi was influenced by the species of the sperm (embryo) genotypes, where percentage of Holstein oocytes cleaving after insemination with Holstein spermatozoa were significantly higher than Holstein oocytes inseminated with Sistani spermatozoa (207/314; 66% vs. 130/309; 42%), ($P \leq 0.05$); respectively. moreover, the overall blastocyst production rate during heat shock stress was clearly affected by the crossbreeding, with Holstein oocytes were inseminated with Sistani spermatozoa having a greater blastocyst yield in comparison with Holstein inbreed embryos during heat shock stress (4/49; 8.1% vs. 1/84; 1.1%), ($P \leq 0.05$) respectively. In conclusion, the present results indicate that Sistani-Holstein crossbreed embryos are more resistant to heat shock than purebred Holstein at early stages of in vitro development. Moreover, according to this criterion, crossbreeding with Sistani spermatozoa may result in higher pregnancy rates in Holstein cows during heat stress condition.

Keywords: *Embryo; Inbreeding; Cross Breeding; Heat Stress; Holstein; Sistani.*

[*] Corresponding Author: Vafaye Valleh M. Tel: 09358237550 Email: Me_va84@yahoo.com