

王文君, 王小康, 徐国强, 等. 影响猪精子耐冻性的候选基因分析[J]. 华中农业大学学报, 2020, 40(3): 203-211.

DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2021.03.023

影响猪精子耐冻性的候选基因分析

王文君¹, 王小康¹, 徐国强¹, 周翔^{1,2}, 刘榜^{1,2}

1. 华中农业大学农业动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 武汉 430070;

2. 生猪健康养殖省部共建协同创新中心/湖北省地方猪品种改良工程技术研究中心, 武汉 430070

摘要 在对通城猪精液冷冻保存的过程中, 发现精液冻存质量存在个体差异。根据多次精液冻存后的精子活力检测结果, 结合系谱关系筛选出精子耐冻与不耐冻个体各3头, 并采用“中芯一号”SNP芯片进行群体遗传分化指数(F_{ST})分析, 应用生物信息学方法挖掘影响猪精子耐冻性差异的关键候选基因。结果显示: 22头通城猪精液冻存后的精子活力存在明显差异, 3头精子耐冻个体之间和3头精子不耐冻个体之间分别具有更近的亲缘关系, 表明猪精子耐冻性差异可能受遗传因素影响; 对耐冻性差异个体SNP芯片数据的 F_{ST} 分析结果显示, F_{ST} 平均值为0.1705, 存在较高度度的遗传分化; 进一步选取 F_{ST} 前1% ($F_{ST} > 0.53$)的266个SNP位点, 并在其上下游100 kb区域共注释到了397个候选基因, 富集在细胞形态、肌动蛋白细胞骨架和离子通道等生物学过程; 其中 $KCNG4$ 、 $ARPC1B$ 、 $DNAAF4$ 、 $MNS1$ 、 $LIMK2$ 、 $RPL31$ 和 VIM 等基因可作为猪精子耐冻性差异的关键候选基因。以上结果说明, 猪精子耐冻性受遗传因素影响, 并受到关键基因控制, 值得进一步对其基因功能进行研究。

关键词 猪; 精液冷冻保存; 精子耐冻性; 差异候选基因; SNP芯片; 人工授精

中图分类号 S 828.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2021)03-0203-09

猪精液冷冻保存技术是促进遗传资源保护、提高优良种公畜利用率、减少公猪养殖量和推动优良种畜跨区域交流的有效举措。特别是在当前非洲猪瘟疫情防控压力下, 该技术因其安全、高效等特点而大大降低了种公猪引进和配种造成的疾病传播风险, 具有重要的现实意义和长远的战略意义。然而, 由于猪精子结构的特殊性, 对温度变化特别敏感, 使得猪精液冷冻保存技术一直落后于其他动物(如牛), 严重制约了其产业化利用。

猪冷冻精液的质量受多种因素影响, 主要包括年龄、季节、温度、饲养管理、采精频率、营养水平、冷冻保护剂和精液处理条件等^[1]。近年来已有研究通过改善日粮营养水平^[2]、加强饲养管理、调整冷冻保护剂成分^[3]及优化精液冻存程序^[4]等手段提高猪冷冻精液的质量。此外, 在相同的外部环境和冻存条件下, 不同品种及同一品种的个体之间仍存在精液冻存质量差异, 有些个体的精子易于冻存, 而有些则较难冻存^[5], 这种差异称为精子耐冻性。已有研究表明精子耐冻性可能与质膜中长链多不饱和脂肪酸

的含量^[6]、活性氧的水平^[7]、离子通道^[8-9]以及一些膜蛋白定位^[10]有关。也有从蛋白质^[9,11]、RNA^[12]和表观遗传学^[13]等方面对猪精子耐冻性的差异原因进行的研究, 发现并鉴定了多种耐冻性标记物, 一些耐冻性物质已经在稀释剂中进行了应用, 显著提高了冻存效果^[14]。然而, 这些研究都是从一些基因产物分析对猪精子耐冻性的影响, 而影响猪精子耐冻性的候选基因的研究鲜有报道, 若能鉴定出影响猪精子耐冻性的基因, 将可通过育种的手段对猪精子耐冻性进行遗传改良, 提高猪精液冻存质量。

笔者在对通城猪精液的多次冷冻保存过程中发现, 在相同饲养管理、营养水平和冻存条件下, 不同个体之间的精子耐冻性存在明显差异。为了探究影响猪精液冻存质量的遗传基础, 笔者所在研究团队通过检测不同猪个体精液冷冻前后的精子活力, 发现耐冻性差异个体, 并结合SNP芯片数据进行 F_{ST} 分析, 鉴定猪精子耐冻性差异的关键候选基因, 解析猪遗传差异对精子耐冻性的影响。

收稿日期: 2020-12-23

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(31930104)

王文君, E-mail: wangwenjun@webmail.hzau.edu.cn

通信作者: 刘榜, E-mail: liubang@mail.hzau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材 料

以湖北省咸宁市通城县国营种畜场中 15 个通城猪血统中的 22 头繁殖公猪(3 周岁以内)为试验对象,每个个体在 3 个不同季节(夏季、秋季和冬季)采集多次精液。

1.2 主要试剂和设备

1)主要试剂。十二烷基硫酸钠(Sodium dodecyl sulfate, SDS)、异丙醇、冰醋酸、乙二胺四乙酸二钠(ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, EDTA-2Na)、三羟甲基氨基甲烷(trihydroxymethyl aminomethane, Tris)、蛋白酶 K、Tris 饱和酚、Tris 碱、三氯甲烷、无水乙醇、裂解液(200 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L EDTA (pH = 8.0)、400 mmol/L NaCl、1% SDS 混匀后定容至 1 000 mL)、猪冻精生产套装(北京田园奥瑞公司)、灭菌超纯水。

2)主要设备。采精和精液冻存相关器材:采精保温杯、水浴锅、离心机、程控冷冻仪(IceCube)、精子活力检测显微镜、超净工作台、车载保温箱、精液冷冻箱、液氮罐、封口机。

DNA 提取所用仪器:高速冷冻离心机及台式高速离心机(德国 Eppendorf 公司)、HVE-50 高压灭菌设备(日本 Hirayama 公司)、恒温水浴循环仪(郑州长城科工贸公司)、HYQ-2121A 型涡旋混匀器、DHG-9145A 型电热恒温鼓风干燥箱。

DNA 质量检测所用仪器:ND2000 核酸/蛋白质浓度测定仪(美国 Thermo 公司)、电泳仪和电泳槽、WD-9403C 紫外仪(北京六一仪器厂)、凝胶成像系统(英国 Syngene 公司)、自动双重纯水蒸馏器、电子天平。

1.3 精液的采集

采精前对采精杯和采精袋进行消毒处理。使用发情母猪诱导公猪爬跨,并对公猪阴茎周围进行消毒清洗,使用手握法进行精液采集。采精时弃去射精初段的胶状精液,精液呈乳白色时再经过无菌薄膜滤纸过滤到采精杯。

1.4 精液的稀释

稀释所用烧杯、玻璃棒提前消毒处理,载玻片、盖玻片放置于显微镜加热台 37 ℃ 预热。采集出新鲜精液置于 37 ℃ 水浴锅中,并取少量进行镜检,观察精子密度和活力。若镜检合格,则将 37 ℃ 预热的稀释液经玻璃棒缓慢引流至鲜精中等体积稀释,轻轻混匀后再次进行镜检并记录数据。

1.5 精液的冷冻保存和解冻

稀释后质量合格的精液装入收集袋,并置于 17 ℃ 恒温箱中保存,送往湖北省种公牛站进行精液冷冻保存:新鲜精液充分平衡后摇匀以防止精子假死,并在 17 ℃ 条件下 2 000 r/min 离心 10~15 min 去掉上清液;用 17 ℃ 的乳糖-卵黄稀释剂(卵黄约占 20%)重悬浮精子,使精子密度达到 20 亿/mL,然后置于盛有 17 ℃ 水的烧杯中,于 4 ℃ 低温操作柜中降温平衡,使精液在 2.5~3.0 h 缓慢降温至 4~5 ℃,并平衡 0.5~1.0 h;平衡后,加入等体积的乳糖-卵黄稀释剂(含 4%~5% 甘油),混匀后立即在低温操作柜中进行 0.25 mL 细管灌装操作;随后,按照程控冷冻仪的技术要求,使用系统默认的 0.25 mL 细管冷冻曲线调制参考程序(表 1),启动冷冻仪使腔室降至 4~5 ℃,并将灌装好的细管精液放入后启动冷冻程序,完成冷冻精液制备。

冷冻结束后,每个样本取 3 支细管解冻后进行精子活力检测。细管在 37 ℃ 水浴锅中解冻 30 s,剪去细管两端,将精液转移入 4 mL 离心管中,用预热的解冻液稀释;30 ℃ 恢复 15~20 min 后在显微镜下检测解冻后精子质量。

表 1 程控冷冻仪(IceCube)0.25 mL 细管冷冻曲线调制参考程序

Table 1 Reference program of 0.25 mL tube freezing curve modulation of a computer-controlled rate freezer (IceCube)

步骤 Procedure	温度/℃ Temperature	时间/min Time	速率/(℃/min) Rate
0	4	0	
1	1	1.5	-2
2	-26	2.4	-30
3	-140	6.2	-30
4	-140	21.2	0

1.6 耐冻和不耐冻个体筛选与统计分析

对 22 头通城公猪在不同季节多次采集的精液进行冷冻保存,利用显微镜检测冷冻前和解冻后的精子活力并进行排序,筛选出解冻后平均活力最高的 3 头作为耐冻个体、活力最低的 3 头作为不耐冻个体。采用 SPSS 22.0 软件对精子活力数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA),利用 Student-Newman-Keuls(SNK)法进行差异显著性检验,结果以 $P < 0.05$ 为差异显著。

1.7 DNA 提取及质量检测

采集通城猪精子耐冻和不耐冻个体的耳组织并利用苯酚-氯仿法提取基因组 DNA。利用 ND2000 核酸/蛋白质浓度测定仪和 0.8% 琼脂糖凝胶对提取

的 DNA 质量及浓度进行检测。

1.8 SNP 芯片数据处理

1) 基因型的判定与 SNP 质控。使用“中芯一号”全基因组芯片对 3 头耐冻个体和 3 头不耐冻个体 DNA 进行 SNP 检测。并用 PLINK1.9 软件对所有 SNP 位点进行质控,使用的命令为:plink --file inputfile --mind 0.05 --geno 0.05 --maf 0.01 --hwe 0.000001 --recode --out outputfile。

2) 利用 F_{ST} 方法进行选择信号的检测。本研究采用群体分化指数 F_{ST} 法对耐冻和不耐冻个体的遗传分化程度进行检验。计算 2 组间每 1 个 SNP 位点的 F_{ST} 值。其计算公式如下:

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T} \quad (1)$$

其中, H_T 为组间的分化指数,其计算公式为:

$$H_T = 2 \times (1 - \frac{p_{GFE} + p_{PFE}}{2}) \times (\frac{p_{GFE} + p_{PFE}}{2}) \quad (2)$$

H_S 为组内的分化指数,其计算公式为:

$$H_S = \frac{2 \times p_{GFE} \times (1 - p_{GFE}) + 2 \times p_{PFE} \times (1 - p_{PFE})}{2} \quad (3)$$

其中, p_{GFE} 与 p_{PFE} 分别为耐冻与不耐冻个体的等位基因频率。

所有操作利用 vcftools 软件进行,其命令为 vcftools --vcf inputfile1 --weir-fst-pop inputfile2 --weir-fst-pop inputfile3 --out outputfile。其中,inputfile1 是质控后的 SNP 分型数据文件;inputfile2 是所有耐冻个体号;inputfile3 是所有不耐冻个体号。

3) 基因注释与功能富集分析。选择 F_{ST} 前 1%

的 SNP 位点,利用 UCSC 数据库 (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgLiftOver>) 将 SNP 位点由猪参考基因组 Sscrofa 10.2 转换为 Sscrofa 11.1,并将其上下游各扩展 100 kb 作为选择区段,将位于该选择区段内的基因定义为选择信号的候选基因。利用 Ensembl 网站 (<http://asia.ensembl.org/biomart/martview/5e4dd39e6faded8f257daef5bccbe765>) 进行基因注释,使用 Metascape 在线软件 (<http://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>) 进行基因功能富集分析。用 R3.5.1 进行绘图展示。

2 结果与分析

2.1 猪精子的耐冻性具有个体差异

本研究主要使用精液冻存后的精子活力来评价猪精液冻存质量。采集的通城猪精液通过显微镜检测精子活力并记录,图 1 为 22 头猪的精子冻存前后的活力检测结果(均值±标准差)。所有个体冻存前的精子活力约为 0.6,符合精液冻存前标准。而经精液冻存后,有的个体每次解冻后精子活力均能达到 0.4 左右,冻存成功;有的个体则降至 0.1 以下,导致冻存失败。不同个体间存在明显的精子耐冻性差异。由此,筛选出猪精子耐冻个体(32007、28803 和 29303)和不耐冻个体(32101、27805 和 2283)各 3 头。对这 6 头耐冻性差异个体在冻存前后的精子活力进行统计分析,发现冷冻前(稀释)的精子活力差异不显著,而解冻后的 3 头耐冻个体和 3 头不耐冻个体的精子活力之间存在明显差异,进一步证明猪精子的耐冻性具有个体差异(表 2)。

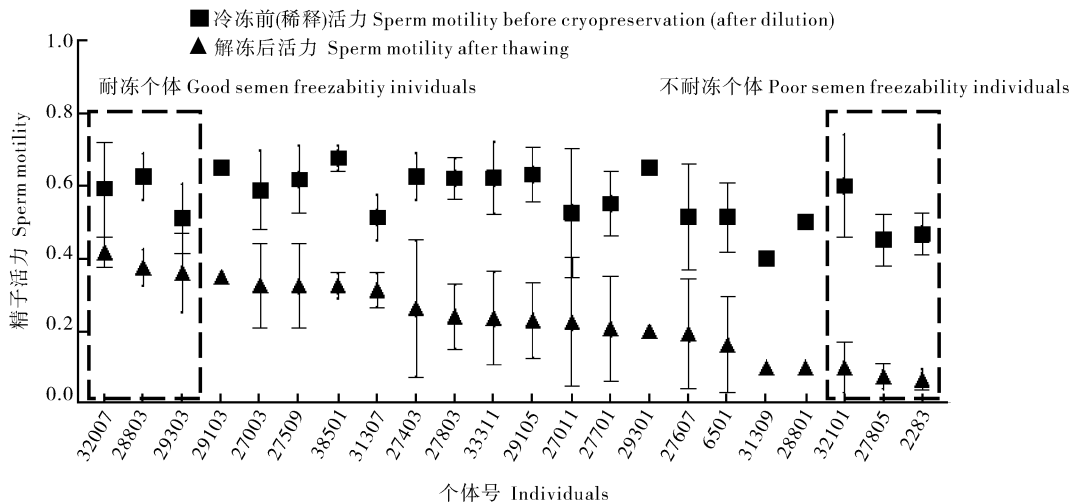


图 1 冻存前后精子活力

Fig.1 Sperm motility before and after cryopreservation

表 2 猪精子耐冻和不耐冻个体在冻存前后的精子活力

Table 2 Sperm motility before and after cryopreservation for good semen freezability and poor semen freezability individuals

组别 Group	耳号 Ear marking	冷冻前(稀释)活力 Sperm motility before cryopreservation (after dilution)	解冻后活力 Sperm motility after thawing
耐冻个体 Individuals with good semen freezability	32007	0.59±0.13a	0.42±0.04a
	28803	0.63±0.07a	0.38±0.05a
	29303	0.51±0.10a	0.36±0.11a
不耐冻个体 Individuals with poor semen freezability	32101	0.60±0.14a	0.10±0.07b
	27805	0.45±0.07a	0.08±0.04b
	2283	0.47±0.06a	0.07±0.03b

注:字母不同表示同列数据差异显著($P<0.05$),字母相同表示同列数据差异不显著($P>0.05$)。Note: Different letter indicates significant difference in the same column data ($P<0.05$); the same letter indicates no significant difference in the same column data ($P>0.05$).

2.2 猪精子耐冻性差异具有遗传基础

绘制上述 6 个精子耐冻性差异个体的系谱关系图(图 2),分析耐冻性差异个体间的亲缘关系。发现 3 个精子耐冻个体集中于一些亲本,而不耐冻的

个体集中于另一些亲本,二者具有明显的聚类差异。说明耐冻个体之间、不耐冻个体之间分别具有较近的亲缘关系,而耐冻和不耐冻个体之间亲缘关系较远,证明猪精子耐冻性差异可能是经由亲本遗传给

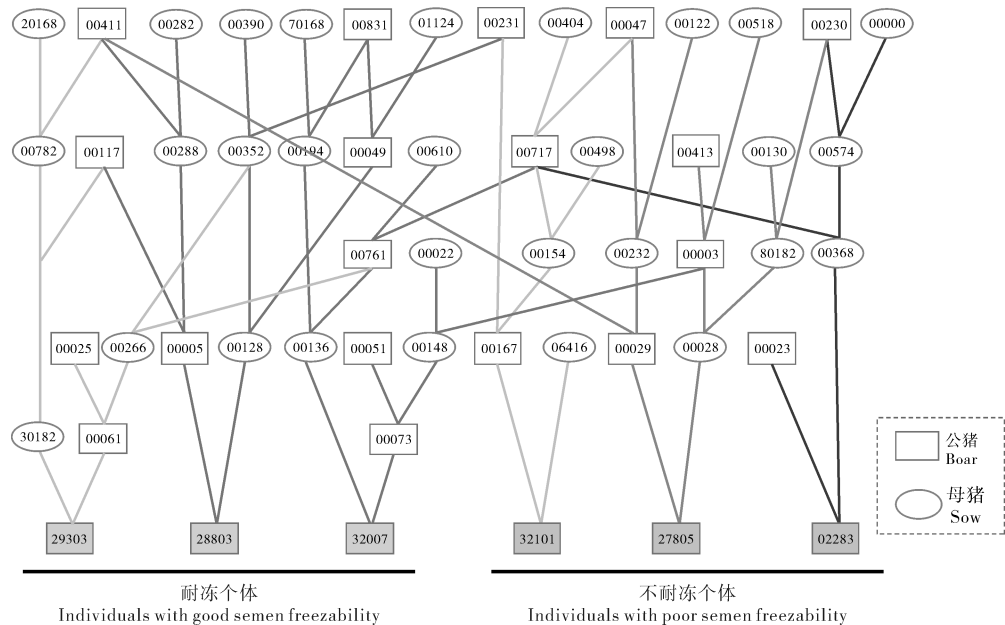


图 2 精子耐冻性差异个体的系谱图

Fig.2 Genetic relationship of individuals with different sperm freezability

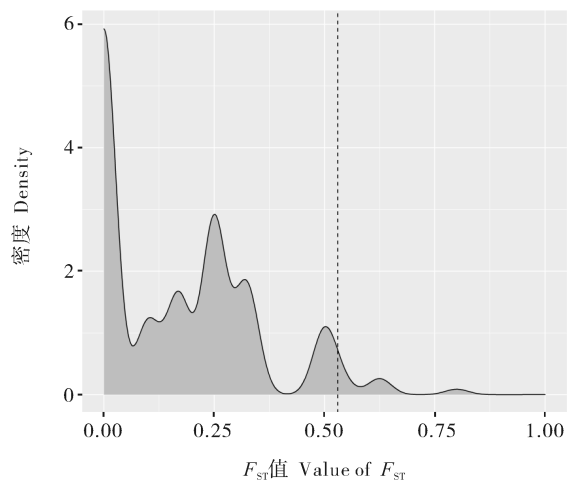
后代的,具有遗传基础。

2.3 猪精子耐冻性差异的候选基因筛选

1) 精子耐冻性差异个体的 SNP 位点分析。精子耐冻性差异个体的全基因组 DNA 通过“中芯一号”芯片共检测到 51 315 个 SNP 位点,基因分型率为 98.3%。对 SNP 分型后的数据进行质控,其中 2 222 个 SNP 位点因在所有个体中缺失率 >0.05 而被剔除,24 116 个 SNP 位点由于最小等位基因频率 <0.01 被过滤,同时剔除 910 个未定位到染色体

上的位点,最终 24 067 个 SNP 位点通过质控。

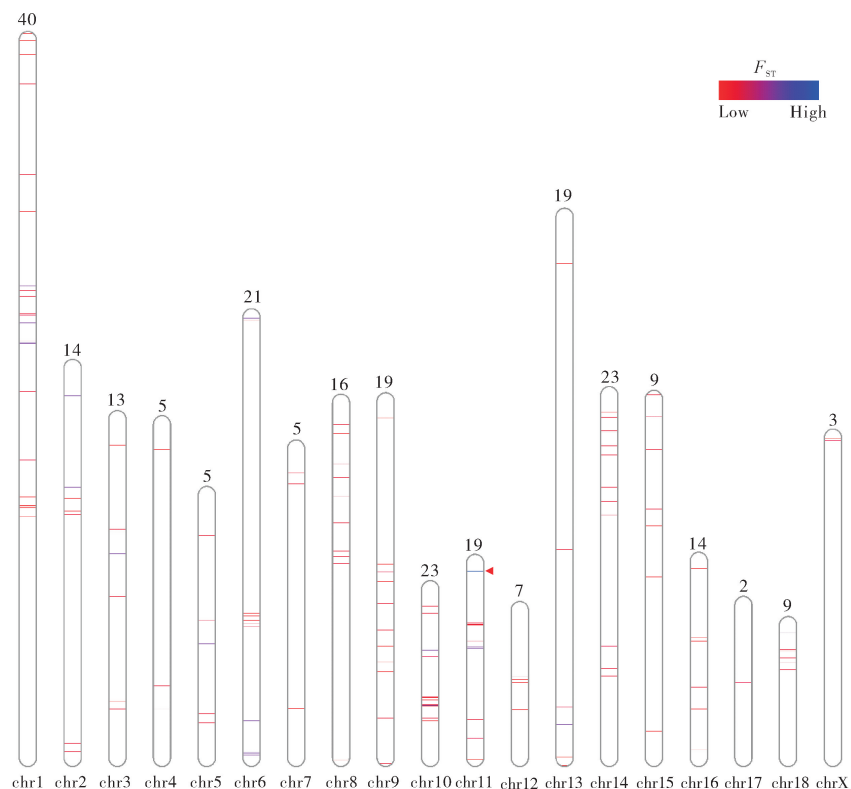
对质控后的 24 067 个 SNP 位点计算得到精子耐冻组和不耐冻组的群体分化指数 F_{ST} 值, F_{ST} 平均值为 0.170 5,表明精子耐冻个体和不耐冻个体间存在较高分化的分化。结合系谱分析结果,推断耐冻个体与不耐冻个体间存在遗传差异。进一步构建 F_{ST} 密度分布图(图 3),并选择前 1% ($F_{ST}>0.53$) 共 266 个位点作为选择信号发生区域的核心 SNP。



图中虚线表示 F_{ST} 值前 1% ($F_{ST}=0.53$) 所对应的分界线的值。
The dotted line in the figure indicates that the value of the boundary line corresponding to the top 1% ($F_{ST}=0.53$).

图3 染色体上的 F_{ST} 密度分布

Fig.3 Distribution of F_{ST} density on chromosome



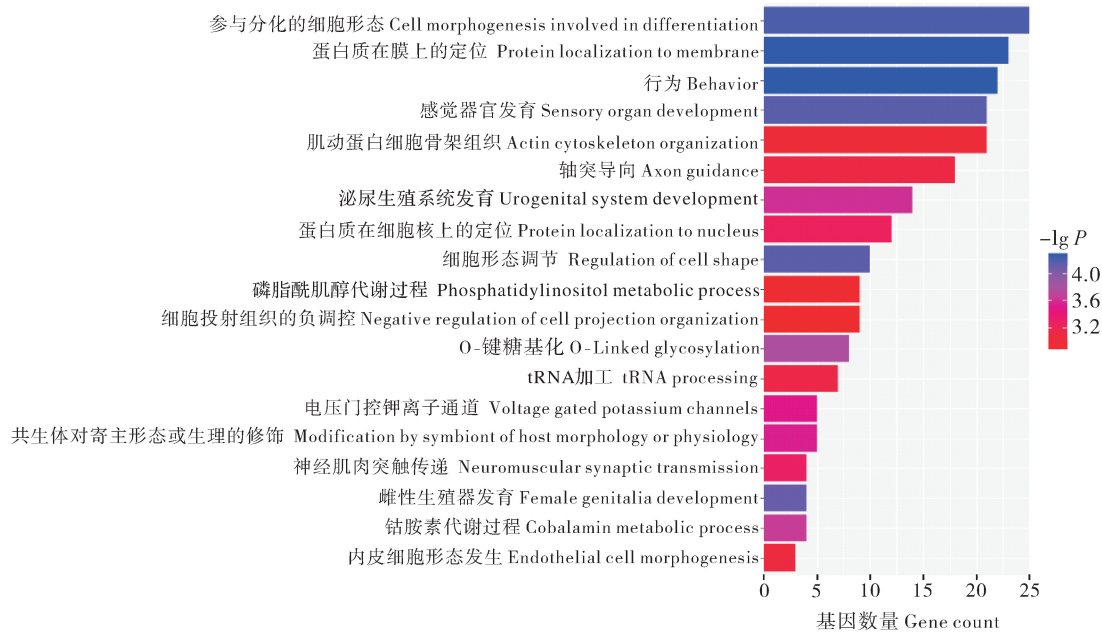
数字表示染色体上的位点数目,横线表示选择信号在染色体上的物理位置,红色三角表示最高的 F_{ST} 值 ($F_{ST}=1$) 所在位置。The number indicates the number of loci on the chromosome, the horizontal line indicates the physical position of the selection signal on the chromosome, and the red triangle indicates the location of the highest F_{ST} value ($F_{ST}=1$).

图4 猪染色体上 266 个选择信号图谱

Fig.4 The map of 266 selection signatures on pig chromosomes

2) 染色体 F_{ST} 值的分布。根据选择信号所在染色体位置和 F_{ST} 值,在图 4 中标注了 266 个核心 SNP 的分布情况。其中 1 号染色体上核心 SNP 数量最多,数目为 40 个,其次是 10 号和 14 号染色体,均为 23 个核心 SNP。但在 10 号染色体上,核心 SNP 的分布密度最大。最高的 F_{ST} 值 ($F_{ST}=1$) 位于 11 号染色体上。从图 4 可以看出,猪精子耐冻性相关选择信号在基因组上的分布存在差异。

3) 精子耐冻性差异候选基因的筛选和功能富集。通过对 266 个核心 SNP 位点上下游各 100 kb 区段的基因注释,共获得了 397 个候选基因。利用 Metascape 在线软件对候选基因进行 GO 富集分析,共富集到了 19 条 GO 条目,主要富集于细胞形态 (MNS1、DNAAF4、NANOS1、ATRN 等)、膜蛋白定位 (CACNB2、RPL31、NDUFA13 等)、肌动蛋白细胞骨架 (CACNB2、KATNAL2、VIM、LIMK2、ARPC1B 等) 和离子通道 (CACNB2、KCNH2、KCNA3、KCNG4、GRIN2B 等) (图 5)。同



纵坐标表示 GO Term,横坐标表示富集到 GO Term 的基因数目。The ordinate represents GO term and abscissa represents the number of genes enriched in GO term.

图 5 候选基因 GO 功能富集分析

Fig.5 Functional enrichment of GO in candidate genes

时,还有一些与胞吐、氧化应激、代谢及顶体结构等相关的基因(如 ANXA6、TSSK6、SOX5、PRDX1、NEU3、CUBN、MEIG1、PATZ1、SLC4A2、CCDC136、ICA1)可能也与精子耐冻性差异相关。

3 讨论

3.1 猪精子耐冻性受遗传因素影响

猪精液冷冻保存技术是利用液氮(-196°C)或干冰(-79°C)等作冷源,通过程序化的降温处理,将去除大部分精浆的猪精液保存在超低温环境中,达到长期保存的目的。但目前猪精液冷冻保存技术在应用中仍存在问题,主要是由于冻融过程会对精子造成一定的冷冻损伤:顶体的完整性受损、质膜的流动性和渗透性被破坏、mRNA 和蛋白质降解、精子核内 DNA 碎片化以及精子运动能力受损等^[15]。本研究通过对通城猪精液冷冻保存前后的精子活力进行检测,观察到精子在冻存后的活力存在明显的个体差异(图 1),这种差异受多种因素影响。

影响猪精液冻存质量的因素主要包括公猪营养水平、圈养方式、饲养环境以及精液采集频率等^[16]。精液处理过程也是影响精液冻存质量的重要环节,主要与稀释比例、稀释液成分及精液冻存程序等相

关^[17]。因此,本研究对所有公猪有针对性的补充饲料、调至同一营养水平,且保持相同的饲养环境、圈养方式和采精频率,同时在精液冷冻前离心重悬浮至同一密度,并采用完全相同的冷冻保护剂和冻存程序,由此确保相同的环境因素,减少环境因素对猪精液冻存质量的影响。此外,精液冻存质量还受猪的品种、年龄以及个体遗传因素的影响^[1]。本研究选用 22 头 3 周岁以内的通城公猪个体作为研究对象,排除了品种和年龄的差异。通过对精液冻存前后的精子活力检测和分析,发现不同个体之间的精子耐冻性仍存在差异(图 1)。这些不同个体精子耐冻性的差异经过多个季节(从炎热的夏季到寒冷的冬季)的多批次精液冻存验证,其差异性确实存在。结合 6 个精子耐冻性差异个体的系谱亲缘关系(图 2)和 F_{ST} 分析结果(图 3),推断该耐冻性差异是受遗传因素影响。目前在长白猪、大白猪、杜洛克等猪品种或群体的研究中也观察到了这种个体间的精子耐冻性差异^[18-19],且通过对 22 头大白猪精子耐冻性差异个体的扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)分析,证明了猪精子耐冻性差异存在遗传基础^[20]。

3.2 猪精子耐冻性与应激反应、运动、离子通道和膜蛋白等生物学过程相关

冷冻保存对猪精液质量影响的潜在机制目前尚不完全清楚。mRNA 和蛋白质表达水平的分析结果发现猪精子耐冻性差异与一些关键生物学过程有关。Fraser 等^[21]比较了不同耐冻性差异公猪的精子转录组数据,鉴定了几个与炎症和凋亡、精子发生以及能量代谢等相关的基因。Mańkowska 等^[22]利用 RNA-Seq 数据研究了猪精子中单核苷酸多态性与解冻后精液质量的关系,发现差异基因主要富集在应激反应、运动、代谢、生殖和胚胎发育等。长非编码 RNA(lncRNA)分析表明,猪精子耐冻性差异表达 lncRNA 的靶基因与信号转导、应激反应、细胞凋亡、运动和胚胎发育等生物学过程有关^[23]。此外,蛋白组学分析发现一些精子膜蛋白^[11]、顶体结合蛋白(ACRBP)、糖酵解相关蛋白(TPI)^[24]、水通道蛋白(AQP3、AQP7、AQP11)^[8]以及热休克蛋白和电压依赖性阴离子通道蛋白^[9,25]等均与猪精子耐冻性有关,可作为预测公猪精子耐冻性的标记。综上,mRNA 和蛋白质水平的研究发现,猪精子耐冻性差异主要与精子的应激反应、运动、离子通道、膜蛋白以及顶体等相关。这与本研究筛选的差异候选基因所富集的生物学过程(膜蛋白定位、肌动蛋白细胞骨架、细胞形态和离子通道等)基本一致(图5),同时也筛选到了一些与胞吐、氧化应激、代谢和顶体结构等相关的基因,这都暗示着一些重要的生物学过程及关键基因可能参与了猪精子对冷刺激的应答反应。

3.3 猪精子耐冻性与基因有关

本研究在膜蛋白定位、肌动蛋白细胞骨架、细胞形态和离子通道等生物学过程鉴定到一些候选基因。其中,*KCNG4*、*ARPC1B*、*DNAAF4*、*MNS1*、*LIMK2*、*RPL31* 和 *VIM* 等基因被报道与精子的生成和发育相关,可能参与了猪精子耐冻性的调控。*KCNG4* 是钾电压门控通道修饰因子亚群 G 成员,参与精子发生的后期调控,该基因功能缺失会导致精子表现出头部较小、尾部较短的异常形态,导致雄性不育^[26]。*ARPC1B* 是一种雌激素反应基因,是精子发生、成熟精子细胞极性、血-睾屏障完整性和细胞分裂的调节因子^[27]。*DNAAF4* 基因在耐冻性个体和不耐冻个体间存在差异,其可以与 *HSP70* 和 *HSP90* 结合,而 *HSP70* 和 *HSP90* 都已被证实与猪精子耐冻性有关^[25,28],*DNAAF4* 基因的突变

会导致原发性睫状体运动障碍,并伴有动力蛋白臂缺失,影响鞭毛运动^[29]。*MNS1* 在精子发生、精子鞭毛的组装和纤毛运动功能中起着重要作用^[30],*MNS1* 突变可导致雄性不育^[31]。*LIMK2* 基因参与抑制精子中肌动蛋白解聚活性,有助于 Rho 诱导的肌动蛋白细胞骨架的重组^[32]。此外,*RPL31* 基因被发现在荷斯坦公牛新鲜和冻融精子转录水平存在显著差异($P<0.05$)^[33];*VIM* 基因则被认为可作为鉴定弱精的标志物^[34]。上述基因在精子耐冻与不耐冻个体间具有显著差异,表明猪精子耐冻性与基因有关,可作为关键候选基因进一步研究其作用机制。

参考文献 References

- [1] YESTE M. Sperm cryopreservation update: cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs[J]. *Theriogenology*, 2016, 85(1): 47-64.
- [2] LIU Q, ZHOU Y F, DUAN R J, et al. Lower dietary n-6:n-3 ratio and high-dose vitamin E supplementation improve sperm morphology and oxidative stress in boars[J]. *Reproduction, fertility, and development*, 2017, 29(5): 940-949.
- [3] 高秀丽, 党燕娜, 翟晓红, 等. 猪精液冷冻保护剂的研究进展[J]. *畜牧兽医杂志*, 2016, 35(2): 62-63. GAO X L, DANG Y N, ZHAI X H, et al. Research progress on boar semen cryoprotectants[J]. *Journal of animal science and veterinary medicine*, 2016, 35(2): 62-63 (in Chinese with English abstract).
- [4] 梁鸿斌, 姚学军, 李维华, 等. 冷冻速率和解冻温度对猪精液冷冻效果的影响[J]. *中国畜牧兽医*, 2012, 39(11): 157-160. LIANG H B, YAO X J, LI W H, et al. Effect of different freezing frequency and thawing temperature on cryopreservation of boar semen[J]. *Chinese animal husbandry and veterinary medicine*, 2012, 39(11): 157-160 (in Chinese with English abstract).
- [5] ROCA J, HERNÁNDEZ M, CARVAJAL G, et al. Factors influencing boar sperm cryosurvival[J]. *Journal of animal science*, 2006, 84(10): 2692-2699.
- [6] WATERHOUSE K E, HOFMOP O, TVERDAL A, et al. Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm[J]. *Society for reproduction and fertility*, 2006, 131(5): 887-894.
- [7] YESTE M, ESTRADA E, ROCHA L G, et al. Cryotolerance of stallion spermatozoa is related to ROS production and mitochondrial membrane potential rather than to the integrity of sperm nucleus[J]. *Andrology*, 2015, 3(2): 395-407.
- [8] PRIETO-MARTÍNEZ N, VILAGRAN I, MORATÓ R, et al. Relationship of aquaporins 3 (AQP3), 7 (AQP7), and 11 (AQP11) with boar sperm resilience to withstand freeze-thawing procedures[J]. *Andrology*, 2017, 5(6): 1153-1164.

- [9] VILAGRAN I, YESTE M, SANCHO S, et al. Relationship of sperm small heat-shock protein 10 and voltage-dependent anion channel 2 with semen freezability in boars[J]. *Theriogenology*, 2014, 82(3): 418-426.
- [10] LLAVANERA M, DELGADO-BERMÚDEZ A, FERNANDEZ-FUERTES B, et al. GSTM3, but not IZUMO1, is a cryo-tolerance marker of boar sperm[J/OL]. *Journal of animal science and biotechnology*, 2019, 10: 61 [2020-12-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31391940>. DOI: 10.1186/s40104-019-0370-5.
- [11] GUIMARÃES D B, BARROS T B, VAN TILBURG M F, et al. Sperm membrane proteins associated with the boar semen cryopreservation[J]. *Animal reproduction science*, 2017, 183: 27-38.
- [12] LI Y, LI R H, RAN M X, et al. High throughput small RNA and transcriptome sequencing reveal capacitation-related microRNAs and mRNA in boar sperm[J]. *BMC genomics*, 2018, 19: 1-12.
- [13] KLÄVER R, BLEIZIFFER A, REDMANN K, et al. Routine cryopreservation of spermatozoa is safe: evidence from the DNA methylation pattern of nine spermatozoa genes[J]. *Journal of assisted reproduction & genetics*, 2012, 29(9): 943-950.
- [14] OLIVEIRA R C, PEDROSO B R, RABELO S S, et al. Addition of insulin-like growth factor I (IGF-I) and reduced glutathione (GSH) to cryopreserved boar semen[J]. *Animal reproduction science*, 2019, 208: 106-130.
- [15] HEZAVEHEI M, SHARAFI M, KOUCHESFAHANI H M, et al. Sperm cryopreservation: a review on current molecular cryobiology and advanced approaches[J]. *Reproductive biomedicine online*, 2018, 37(3): 327-339.
- [16] YESTE M. Recent advances in boar sperm cryopreservation: state of the art and current perspectives[J]. *Reproduction in domestic animals*, 2015, 50(Suppl 2): 71-79.
- [17] MEDRANO A, HOLT W V, WATSON P F. Controlled freezing studies on boar sperm cryopreservation[J]. *Andrologia*, 2009, 41(4): 246-250.
- [18] FRASER L, STRZEŃEK J, KORDAN W. Post-thaw sperm characteristics following long-term storage of boar semen in liquid nitrogen[J]. *Animal reproduction science*, 2014, 147(3/4): 119-127.
- [19] HOLT W V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences[J]. *Theriogenology*, 2000, 53: 47-58.
- [20] THURSTON L M, SIGGINS K, MILEHAM A J, et al. Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation[J]. *Biology of reproduction*, 2002, 66(3): 545-554.
- [21] FRASER L, BRYM P, PAREEK C S, et al. Transcriptome analysis of boar spermatozoa with different freezability using RNA-Seq[J]. *Theriogenology*, 2020, 142: 400-413.
- [22] MAŃKOWSKA A, BRYM P, PAUKSZTO Ł, et al. Gene polymorphisms in boar spermatozoa and their associations with post-thaw semen quality[J/OL]. *International journal of molecular sciences*, 2020, 21(5): 1902 [2020-12-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31391940>. DOI: 10.3390/ijms21051902.
- [23] FRASER L, PAUKSZTO Ł, MAŃKOWSKA A, et al. Regulatory potential of long non-coding RNAs (lncRNAs) in boar spermatozoa with good and poor freezability[J/OL]. *Life*, 2020, 10(11): 300 [2020-12-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33233438>. DOI: 10.3390/life10110300.
- [24] VILAGRAN I, CASTILLO J, BONET S, et al. Acrosin-binding protein (ACRBP) and triosephosphate isomerase (TPI) are good markers to predict boar sperm freezing capacity[J]. *Theriogenology*, 2013, 80(5): 443-450.
- [25] CASAS I, SANCHO S, BALLESTER J, et al. The HSP90AA1 sperm content and the prediction of the boar ejaculate freezability[J]. *Theriogenology*, 2010, 74: 940-950.
- [26] REGNIER G, BOCKSTEINS E, MAREI W F, et al. Targeted deletion of the Kv6.4 subunit causes male sterility due to disturbed spermiogenesis[J]. *Reproduction, fertility, and development*, 2017, 29(8): 1567-1575.
- [27] KUMAR A, DUMASIA K, DESHPANDE S, et al. Actin related protein complex subunit 1b controls sperm release, barrier integrity and cell division during adult rat spermatogenesis[J]. *Biochimica et biophysica acta (BBA)- molecular cell research*, 2016, 1863(8): 1996-2005.
- [28] YESTE M, ESTRADA E, RIVERA DEL ÁLAMO M M, et al. The increase in phosphorylation levels of serine residues of protein HSP70 during holding time at 17 °C is concomitant with a higher cryotolerance of boar spermatozoa[J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e90887 [2020-12-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33233438>. DOI: 10.1371/journal.pone.0090887.
- [29] OLCSE C, PATEL M P, SHOEMARK A, et al. X-linked primary ciliary dyskinesia due to mutations in the cytoplasmic axonemal dynein assembly factor PIH1D3[J/OL]. *Nature communications*, 2017, 8: 14279 [2020-12-23]. <https://doi.org/10.1038/ncomms14279>.
- [30] ZHOU J, YANG F, LEU N A, et al. MNS₁ is essential for spermiogenesis and motile ciliary functions in mice[J/OL]. *PLoS genetics*, 2012, 8(3): e1002516 [2020-12-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22396656>. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002516.
- [31] LESLIE J S, RAWLINS L E, CHIOZA B A, et al. MNS₁ variant associated with situs inversus and male infertility[J]. *European journal of human genetics*, 2020, 28(1): 50-55.
- [32] THARASANIT T, TIPTANAVATTANA N, ORAVETDILOK K, et al. Optimal concentration of Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK) inhibitor improved sperm membrane functionality and fertilizing ability of cryopreserved-thawed feline sperm[J]. *Theriogenology*, 2020, 144: 27-32.

- [33] CHEN X L, WANG Y G, ZHU H B, et al. Comparative transcript profiling of gene expression of fresh and frozen-thawed bull sperm[J]. *Theriogenology*, 2015, 83(4): 504-511.
- [34] FUNKE T, VON BRANDENSTEIN M, PAFFENHOLZ P, et al. Vimentin 3 allows differentiation between normozoospermia and oligoasthenoatozoospermia [J/OL]. *Disease markers*, 2019: 9803498 [2020-12-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31885747>. DOI:10.1155/2019/9803498.

Analysis of candidate genes affecting semen freezability of boar sperm

WANG Wenjun¹, WANG Xiaokang¹, XU Guoqiang¹, ZHOU Xiang^{1,2}, LIU Bang^{1,2}

1. *Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction, Ministry of Education, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;*

2. *The Cooperative Innovation Center for Sustainable Pig Production / The Engineering Technology Research Center of Hubei Province Local Pig Breed Improvement, Wuhan 430070, China*

Abstract In the semen cryopreservation of Tongcheng boars, it was found that there were individual differences in semen quality after cryopreservation. According to the results of sperm motility after repeated semen cryopreservation and the pedigree relationship, three individuals with good semen freezability (GSF) and three individuals with poor semen freezability (PSF) were selected, respectively. Fixation index (F_{ST}) analysis of GSF and PSF was performed by using the "Zhongxin No.1" SNP chip, and the key candidate genes influencing the semen freezability were identified by bioinformatics method. The results showed that there were significant differences in sperm motility of 22 Tongcheng pigs after cryopreservation. The pedigree relationship among three GSF or three PSF was closer than that between them, which indicated that the differences of semen freezability in boar might be affected by genetic factor. After F_{ST} analysis, the mean value of F_{ST} was 0.170 5, which indicated a high degree of genetic differentiation between GSF and PSF. Furthermore, 266 SNPs in the top 1% of F_{ST} ($F_{ST} > 0.53$) were selected. By annotating the 100 kb flank regions of these SNPs, we found 397 candidate genes, which enriched in the gene ontology (GO) terms related to cell morphology, actin cytoskeleton and ion channel, etc. Some highly differentiated genes in these biological processes such as *KCNG4*, *ARPC1B*, *DNAAF4*, *MNS1*, *LIMK2*, *RPL31* and *VIM* were identified as key candidate genes. These results indicate that semen freezability of boar after cryopreservation is affected by genetic factor and controlled by some key genes, which are worthy of further study.

Keywords pig; semen cryopreservation; sperm freezability; difference-candidate gene; SNP chip; artificial insemination

(责任编辑:边书京)