



گزارش علمی

شناسایی جهش‌های موجود در نیمه اول (منتهی به 5') اگزون ۲ ژن GDF9 گوسفندان آمیخته حاصل از تلاقی نژادهای رومانوف و لری بختیاری

رسول خدا بخش زاده^۱، محمدرضا محمدآبادی^{۲*}، حسین مرادی شهر بابک^۳، علی اسمعیلی زاده کشکوئیه^۲

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

۲- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

۳- استادیار گروه علوم دامی دانشکده مهندسی علوم دامی و زراعی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۲۰ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۷/۲۶)

چکیده

برای کاهش تعداد میش‌های مولد روی مراتع و جلوگیری از تخریب مراتع به نظر می‌رسد که برنامه‌های اصلاح‌نژادی جهت شناسایی ژن‌های کاندیدای موثر بر صفت چندقلوزایی در نژادهای بومی کشور و استفاده از آنها مفید هستند. از جمله مهم‌ترین عوامل مؤثر بر چندقلوزایی گوسفندان ژن‌های خانواده TGF β هستند. ژن فاکتور رشد و تمایز شماره ۹ (GDF9) از اعضای مهم این خانواده است. هدف از انجام این تحقیق شناسایی چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی موجود در نیمه اول (منتهی به ۵' رشته پیشرو) اگزون ۲ ژن GDF9 در گوسفندان آمیخته حاصل از تلاقی بین قوچ‌های نژاد رومانوف با میش‌های نژاد لری بختیاری به روش PCR-SSCP بود. در تحقیق حاضر پس از استخراج DNA به روش نمکی از ۳۶ نمونه خون گوسفندان آمیخته نر و ماده ۳-۶ ماهه (۱۷ نر و ۱۹ ماده)، از واکنش زنجیرهای پلیمرز برای تکثیر قطعه ۶۳۴ جفت بازی DNA استفاده شد. سپس بررسی چندشکلی فرم فضایی رشته‌های منفرد (SSCP) محصولات PCR به وسیله ژل پلی‌اکریل‌امید ۸ درصد و رنگ‌آمیزی نیترات نقره انجام و سپس از هر الگو یک نمونه تعیین توالی شد. در نمونه‌های مورد مطالعه، سه الگوی باندی ۱، ۲ و ۳ به ترتیب با فراوانی ۰/۳۰۵، ۰/۵۸۴ و ۰/۱۱۱ برای قطعه تکثیر شده به دست آمد. همچنین نتایج توالی‌یابی منجر به شناسایی چهار جهش در موقعیت‌های نوکلئوتیدی ۴۷۱، ۴۷۷، ۵۲۰ و ۷۲۱ ژن GDF9 در جمعیت مورد مطالعه شد.

واژه‌های کلیدی: چندقلوزایی، ژن GDF9، گوسفندان آمیخته، PCR-SSCP

مقدمه

با توجه به رشد روز افزون جمعیت جهان استفاده از روش‌های نوین برای تأمین نیازهای مختلف این جمعیت عظیم ضروری به نظر می‌رسد (توحیدی نژاد و همکاران، ۱۳۹۳). با توجه به این رشد و نیاز غذایی، تولیدات دامی باید متناسب با جمعیت کشور افزایش یابد تا برای هر فرد پروتئین حیوانی مورد نیاز تأمین شود. در کشور ما علی‌رغم جمعیت زیاد گوسفند و با وجود امکانات بالقوه از لحاظ شرایط اقلیمی و تنوع آب و هوایی، به دلیل از بین رفتن مراتع و عدم به کارگیری روش‌های علمی در گله‌داری و پروراندی و استفاده نامطلوب از منابع خوراکی موجود در کشور، راندمان تولید گوشت از سطح مورد انتظار پایین‌تر بوده و هنوز نیازمند واردات است. با توجه به محدود بودن منابع غذایی دام و عدم امکان افزایش تعداد دام در کشور برای افزایش تولیدات دامی و رسیدن به خودکفایی، علم ژنتیک و اصلاح نژاد به‌عنوان ابزاری مهم برای بالا بردن بازده در هر واحد تولیدی، نقش مهمی را برعهده خواهد داشت و استفاده از ژنتیک ملکولی فواید زیادی دارد که یکی از آنها تعیین ژنوتیپ افراد برای جایگاه‌های خاص است (Mousavizadeh et al., 2009). با توجه به این که گوشت گوسفند به عنوان یک منبع رایج پروتئین در کشور به شمار می‌آید، ولی به علت این که مقدار گوشت تولید شده پاسخ‌گوی نیاز جمعیت رو به افزایش کشور نیست، لذا افزایش بازدهی در تولید گوشت گوسفند از اهمیت خاصی برخوردار است. یکی از برنامه‌های اصلاح نژادی برای کاهش میش‌های مولد روی مراتع در حال تخریب کشور و از طرفی افزایش تولید در سطح گله‌های کشور طرح آمیخته‌گری و استفاده از نژادهای تجاری برتر برای افزایش صفت چندقلوزایی در میش‌های مولد است.

از سال ۱۹۸۰ پژوهش‌های گوناگونی در زمینه الگوهای وراثتی و آزمون DNA ژن‌های عمده برای فزون‌زایی انجام شده است. این پژوهش‌ها نشان داده‌اند که ژن‌های عمده عملکرد تولیدمثلی گله‌های گوسفند را به گونه معنی‌داری افزایش می‌دهند. تاکنون سه ژن مرتبط با باروری در گوسفند شناسایی شده که عبارتند از: ^۱ BMP1-B یا بورولا^۲ که روی کروموزوم شماره ۶ جای دارد و تحت

عنوان FecB نام‌گذاری می‌شود (Otsuka et al., 2000; Luis et al., 2009). GDF9 که روی کروموزوم شماره ۵ قرار دارد و نام دیگر آن FecG (Sadighi et al., 2002) است و ^۳ BMP-15 که روی کروموزوم X قرار دارد و نام دیگر آن FecX است (Chu et al., 2005; Dong et al., 1996). در نژادهای بلکلار و کمبریج مشخص شده که وجود همزمان جهش در ژن‌های BMP15 و GDF9 برای هر دو جایگاه منجر به عقیمی این میش‌ها نشده، بلکه تأثیر آنها بر یکدیگر افزایشی بوده و منجر به چندقلوزایی زیادتر نسبت به حالت جهش منفرد در یک ژن شده است (Hanrahan et al., 2004). این گزارش تأییدکننده این فرضیه است که مکانیسم فعالیت دو فاکتور BMP15 و GDF9 از یکدیگر مستقل است (Shimasaki et al., 2000).

طول ژن GDF9 برابر ۲/۵ کیلو باز است که دارای دو اگزون و یک اینترون است. اگزون یک شامل ۳۹۷ جفت باز است و اسیدهای آمینه ۱ تا ۱۳۴ را رمز می‌کند. اگزون دو شامل ۹۶۸ جفت باز است که اسیدهای آمینه ۱۳۵ تا ۴۵۶ را رمز می‌کند و اینترون آن شامل ۱۱۲۶ جفت باز است. پروتئین اولیه آن دارای ۴۵۳ اسیدآمینه است، در صورتی که پروتئین بالغ آن شامل ۱۳۵ اسیدآمینه است. (Hanrahan et al., 2004) وجود هشت جهش را در ژن GDF9 در گوسفندان نژاد کمبریج و بلکلار گزارش کردند. ژن GDF9 برای تکامل فولیکولی تخمدان و تخم‌ریزی طبیعی و تشکیل جسم زرد در گوسفند ضروری است. تحقیقات نشان داده است که موش‌های فاقد ژن GDF9 نابارور هستند و توسعه فولیکولی در مراحل اولیه متوقف می‌شود. از طرفی کشف یک جهش غیر فعال‌کننده ژن GDF9 و نیز عقیم‌کننده در نژادهای کمبریج و بلکلار، اهمیت اساسی این ژن را در روند رشد فولیکولی ثابت کرده است (Hanrahan et al., 2004). بر خلاف ژن بورولا که دارای اثر افزایشی بر نرخ تخم‌اندازی است، ژن GDF9 فقط در حالت هتروزیگوتی منجر به افزایش تخم‌اندازی شده و ژنوتیپ‌های هوموزیگوت برای این آلل عقیم هستند. به طور کلی، چندقلوزایی در زایش اول کمتر از زایش‌های دوم و سوم گزارش شده است (Barzegari et al., 2010; Mishra et al., 2009). در گوسفندان نژاد بورولا با افزایش

1. Bone morphogenetic protein receptor type-1B
2. Booroola (FecB)

تمایز ۹ (GDF9) موثر بر صفت چندقلوایی را در گله اصلاحی حاصل از تلاقی بین قوچ‌های نژاد رومانوف با میش‌های نژاد لری بختیاری با توجه به چندشکلی بدست آمده از روش PCR-SSCP و توالی‌یابی محصولات PCR شناسایی کند.

مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر، تعداد ۳۶ راس گوسفند آمیخته حاصل از تلاقی بین قوچ‌های نژاد رومانوف با میش‌های نژاد لری-بختیاری ۳-۶ ماهه (۱۷ نر و ۱۹ ماده)، که در مزرعه دانشکده مهندسی علوم دامی و زراعی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران پرورش داده می‌شدند، مورد مطالعه قرار گرفتند. خونگیری با استفاده از لوله‌های ونوجکت حاوی ۵۰ میلی‌مول ماده ضد انعقاد EDTA صورت گرفت و نمونه‌ها در مجاورت یخ به آزمایشگاه تحقیقاتی ژنتیک و اصلاح‌نژاد حیوانات اهلی بخش علوم دامی دانشگاه شهید باهنر کرمان منتقل و سپس در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

استخراج DNA از ۵۰۰ میلی‌لیتر خون با استفاده از روش بهینه شستشوی نمکی تغییر یافته (Abadi et al., 2009) انجام گرفت. جهت ارزیابی کیفی و کمی DNA استخراج شده به ترتیب از روش الکتروفورز روی ژل آگارز با غلظت ۰/۸ درصد و روش اسپکتروفتومتری با دستگاه نانودراپ استفاده شد.

با توجه به ژن انتخاب شده، ابتدا توالی ژن و mRNA آن از ژنوم گوسفندان مختلف در بانک اطلاعاتی مرکز ملی اطلاعات زیست فناوری ایالات متحده (NCBI) با شماره دستیابی AF078545 استحصال شد. آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر قطعه‌ای به طول ۶۳۴ جفت باز از اگزون ۲ (۶۰ نوکلئوتید انتهایی اینترون تا نوکلئوتید ۵۷۴ اگزون ۲ ژن GDF9 پوشش داده شده) ژن GDF9 گوسفند با استفاده از نرم‌افزارهای برخط در سایت‌های primer 3plus و oligo Analyzer و oligo calculator طراحی شدند. توالی آغازگرها عبارت بودند از:

F: 5'-GATTCCTTGATTTGACTTCCTGTT-3'
R: 5'-TGGCACTCTCCTGGTCTCTG-3'

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر از DNA (غلظت ۵۰ ng / μ l)، ۱۶/۷ میکرولیتر آب، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq پلی مراز (غلظت ۵ Unit/ μ l)، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای رفت و برگشتی (غلظت

تعداد دفعات زایش تا سن چهار سالگی تعداد گوسفندان چندقلوزا افزایش یافته است (Mishra et al., 2009). افزایش چندقلوایی در این گوسفندان ممکن است ناشی از افزایش ظرفیت تولیدمثلی شامل افزایش گنجایش غدد و مجاری تناسلی باشد. همچنین ممکن است در زایش اول برخی از ژن‌های مرتبط با ژن بورولا به خوبی بیان نشوند، با این وجود، با افزایش چندقلوایی، میزان بقای بره‌ها کاهش می‌یابد (Barzegari et al., 2010). Eghbalsaiet al. (2012) طی انجام تحقیقی برای بررسی وجود جهش در mRNA ژن GDF9 در میش‌های نژاد افشاری، از تخمدان‌های میش‌های کشتار شده برای بررسی وجود فولیکول‌ها و استخراج RNA استفاده کردند. آنها وجود سه جهش G2، G3 و G4 را در این میش‌ها گزارش کردند، همچنین جهش G4 در گوسفندانی که میزان تخم‌کریزی بالاتری نسبت به بقیه داشتند مشاهده شد که نشان می‌دهد این جهش می‌تواند یکی از دلایل افزایش میزان تخم‌کریزی در برخی گوسفندان باشد. Moradband et al. (2011) ارتباط چندشکلی‌های موجود در ژن‌های GDF9، BMP15 و BMPR-IB با دوقلوایی در گوسفند بلوچی را بررسی کردند و نتایج تحقیقات آنها تاثیر ژن بزرگ اثر FecG1 بر چندقلوایی را تایید کرد. Liandris et al. (2012) با بررسی ژن‌های GDF9 و BMP15 در نژادهای کاراگونیک و چوپس ارتباط معنی‌دار زیادی بین جهش‌های G1 و G8 با باروری در نژاد چوپس مشاهده کردند، اما آنها ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی مشاهده شده با چندقلوایی در نژاد کاراگونیک مشاهده نکردند.

در حوزه ژنتیک و اصلاح دام، اطلاع از ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها می‌تواند کمک بزرگی به برنامه‌ریزی برای طرح‌های اصلاح‌نژادی و از همه مهمتر، حفظ ذخایر ژنتیکی نماید. استفاده از روش‌های ژنتیک مولکولی همچون نشانگرهای DNA برای انجام سریع‌تر و صحیح‌تر برنامه‌های اصلاح‌نژادی از بهترین گزینه‌ها به حساب می‌آید، زیرا با توجه به اطلاعات زیادی که به دست می‌دهند می‌توان نتایجی که از تجزیه و تحلیل رکوردها با روش‌های آماری به دست آمده است را تأیید و تکمیل نموده و حتی ممکن است آنها را رد کنند. بنابراین، تحقیق حاضر سعی بر آن داشت تا وجود جهش‌های موجود در نیمه اول (منتهی به ۵ رشته پیشرو) اگزون ۲ ژن فاکتور رشد و

در این مطالعه بر اساس الگوهای باندی متفاوت، از هر الگو یک نمونه انتخاب و محصولات PCR به صورت مستقیم برای توالی‌یابی به شرکت ماهان ژن فرستاده شد و از آنجا به کشور کانادا ارسال گردید. پس از دریافت نتایج توالی-یابی و شناسایی و اعمال جهش‌ها در توالی هر هاپلوتا پ با استفاده از کدهای نوکلئوتیدی پیشنهادی^۱ IUPAC، توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار DNAMAN و Bioedit 7.0 جهت تعیین جهش‌های تک‌نوکلئوتیدی به همراه توالی-های گزارش شده در NCBI هم‌تراز شده و مقایسه شدند. با بررسی و ارتباط شکل الگوهای باندی در ژل اکریل‌آمید و سپس مراجعه به توالی ژنوتیپ‌های مشاهده شده، توالی هاپلوتا پ‌های تشکیل دهنده هر ژنوتیپ با استفاده از نرم‌افزار R پکیج ۲ PopGenome پیش‌بینی شد. شاخص تنوع ژنتیکی شانون و تعادل هاردی-وینبرگ در محل هر SNP با استفاده از نرم‌افزار GenAlex 6.41 محاسبه شد.

نتایج

الکتروفورز محصولات تکثیر شده روی ژل آگارز ۱ درصد این قطعه از جایگاه ژن GDF9 نشان داد که قطعه ۶۳۴ جفت بازی در نظر گرفته شده به خوبی و بدون هیچ باند غیر اختصاصی تکثیر یافته است (شکل ۱).
 قطعه تکثیر شده ۶۳۴ جفت بازی حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مربوط به نیمه اول اگزون ۲ ژن GDF9 مورد آزمون SSCP قرار گرفت. پس از انجام SSCP، سه الگوی باندی متفاوت برای این جایگاه (شکل ۲) مشاهده شد.

۰/۵ pM، ۱۰ mM dNTP غلظت ۲/۵ میکرولیتر از ۱۰ pM، ۱ میکرولیتر از ۱۰X PCR buffer و ۱ میکرولیتر از Mgcl2 (غلظت ۱/۵Mm) در دستگاه ترموسایکلر CLEMENS مدل 22501-02V 00096 ساخت کشور آلمان انجام شد. به منظور دستیابی به دمای اتصال بهینه جهت واکنش PCR برای جفت آغازگرهای مورد بررسی، از روش گرادیان دمایی استفاده شد. با توجه به کیفیت باندهای حاصل از دماهای در نظر گرفته شده، دمای بهینه اتصال برای آغازگرها ۶۲/۵ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. سپس واکنش PCR انجام شد. برنامه حرارتی عبارت بود از: (۱) ۵ دقیقه دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به منظور واسرشت سازی اولیه DNA، (۲) انجام سه گامه زیر با ۳۳ چرخه تکرار: الف- ۳۰ ثانیه دمای ۹۴ درجه سانتی-گراد به منظور تک رشته‌ای شدن DNA، ب- ۵۰ ثانیه دمای ۶۲/۵ درجه سانتی‌گراد به منظور اتصال آغازگر به DNA تک رشته‌ای، پ- ۵۰ ثانیه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به منظور بسط آغازگر، (۳) ۸ دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای بسط نهایی. پس از تکمیل چرخه-های دستگاه، نمونه‌ها بلافاصله از دستگاه خارج و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت ارزیابی محصولات PCR از روش الکتروفورز روی ژل آگارز با غلظت ۱ درصد استفاده شد.

جهت الکتروفورز محصولات SSCP از سیستم الکتروفورز عمودی دارای سیستم خنک کننده با آب استفاده شد که با اتصال آن به این سیستم، جهت به جریان انداختن آب با دمای ۴ تا ۵ درجه سانتی‌گراد، دمای بافر (1X) TBE و ژل در دمای ۴-۵ درجه سانتی‌گراد ثابت نگه داشته شد. قبل از آماده‌سازی ژل اکریل‌آمید برای تک‌رشته‌ای شدن محصولات PCR میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترموسایکلر گذاشته شدند و بعد از اتمام زمان، میکروتیوب‌ها بلافاصله برای ۵ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به فریزر انتقال داده شدند. جهت انجام SSCP، به ۶ میکرولیتر از هر نمونه مقدار ۱۲ میکرولیتر بافر بارگذاری (جدول ۱) اضافه شد و به وسیله مینی سانتریفیوژ با هم مخلوط شدند و مقدار ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه با استفاده از الکتروفورز عمودی روی ژل اکریل‌آمید ۸ درصد بارگذاری و به مدت ۸ ساعت الکتروفورز شدند. برای مشاهده الگوهای SSCP از رنگ-آمیزی نیترا ت نقره استفاده شد.

1. International Union of Pure and Applied chemistry
 2. Package 'PopGenome'

جدول ۱- مواد مورد نیاز برای ساختن بافر بارگذاری

Table 1. Necessary materials for making buffer

Material	Amount for 20 ml
Bromophenol blue	0.01 gram
Xylene cyanol	0.01 gram
Formamide	19 ml
Sodium hydroxide 3%	to 20 ml

مورد بررسی برای SNPهای نیمه اول اگزون ۲ ژن GDF9 در جدول ۵ ارائه شده است. پس از تطبیق توالی نیمه اول اگزون ۲ ژن GDF9 در سایت NCBI برای بدست آوردن ¹ORF آن برای شروع صحیح ترجمه این توالی به پروتئین، فرم +۱ برای این جایگاه بدست آمد. برای این توالی از چهار SNP مشاهده شده در نیمه اول، دو SNP با تغییر اسید آمینه همراه بودند. SNP موقعیت نوکلئوتید ۵۲۰ منجر به تغییر اسیدآمینه سیستئین (Cys) به گلوتامین (Glu) و SNP موقعیت نوکلئوتید ۷۲۱ منجر به تغییر اسیدآمینه گلوتامین (Glu) به لیزین (Lys) شد. همچنین SNP موقعیت نوکلئوتید ۴۷۱ برای اسیدآمینه والین (Val) و SNP موقعیت ۴۷۷ برای اسیدآمینه لوسین (Leu) بدون تغییر اسیدآمینه همراه بود.

چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی شناسایی شده در نیمه اول اگزون ۲ ژن GDF9 با توالی هاپلوتایپ گزارش شده به وسیله Hanrahan et al. (2004) در موقعیت جهش‌های مربوطه در جدول ۲ ارائه شده است. پس از پیش‌بینی و مشخص نمودن توالی هاپلوتایپ‌های تشکیل دهنده هر ژنوتیپ از طریق بررسی و ارتباط ژنوتیپ‌های (توالی‌های) هتروزایگوت و هموزایگوت و شکل الگوهای باندی تشکیل شده، با توجه به در دسترس بودن تعداد هاپلوتایپ‌های موجود در جمعیت و تعداد کل افراد جمعیت، فراوانی‌های هاپلوتایپی در جمعیت مورد مطالعه محاسبه شد. هاپلوتایپ‌های شناسایی شده نیمه اول اگزون ۲ ژن GDF9 در جدول ۳ ارائه شده است.

در این مطالعه سه ژنوتیپ متفاوت شناسایی شد که مربوط به چهار ترکیب هاپلوتایپی حاصل از چهار SNP مختلف در طول توالی جایگاه تکثیر شده از نیمه اول اگزون ۲ ژن GDF9 هستند. پس از مشخص شدن ژنوتیپ‌های جایگاه ناحیه اول اگزون ۲ ژن GDF9، با توجه به در دسترس بودن تعداد کل افراد جمعیت، فراوانی ژنوتیپ‌ها در جمعیت به روش شمارش مستقیم محاسبه شد (جدول ۴).

در این تحقیق از واژه هاپلوتایپ برای ترکیب آللی در مجموع چهار SNP و از واژه آلل برای دو حالت مختلف در هر نقطه جهش استفاده شد. بنابراین، در مباحث ژنتیک جمعیت این مطالعه که با استفاده از نرم افزار 6.41 GenAlex برای هر SNP انجام شد (شامل فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی در هر SNP، تعادل هاردی-واینبرگ، تنوع ژنتیکی با استفاده از شاخص شانون) از واژه آلل برای حالت‌های مختلف در هر نقطه جهش استفاده شد. فراوانی آلل‌ها و ژنوتیپ‌های مربوط به هر SNP در جمعیت، تعادل هاردی-واینبرگ، همچنین تنوع ژنتیکی جمعیت‌های

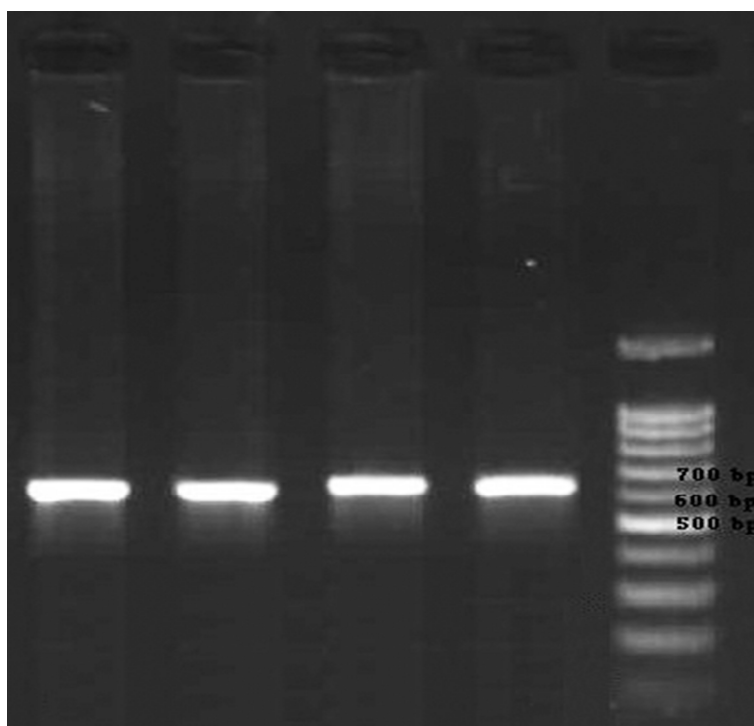


Fig. 1. Electrophoresis of PCR products using 100bp size marker. From left to right: columns 1 and 2 are PCR products of 2 males; columns 3 and 4 are PCR products of 2 females and column 5 is size marker M100

شکل ۱- الکتروفورز محصولات PCR با استفاده از نشانگر اندازه ۱۰۰ bp. از چپ به راست: ستون‌های ۱ و ۲ محصولات PCR دو حیوان نر؛ ستون‌های ۳ و ۴ محصولات PCR دو حیوان ماده و ستون ۵ نشانگر اندازه M100

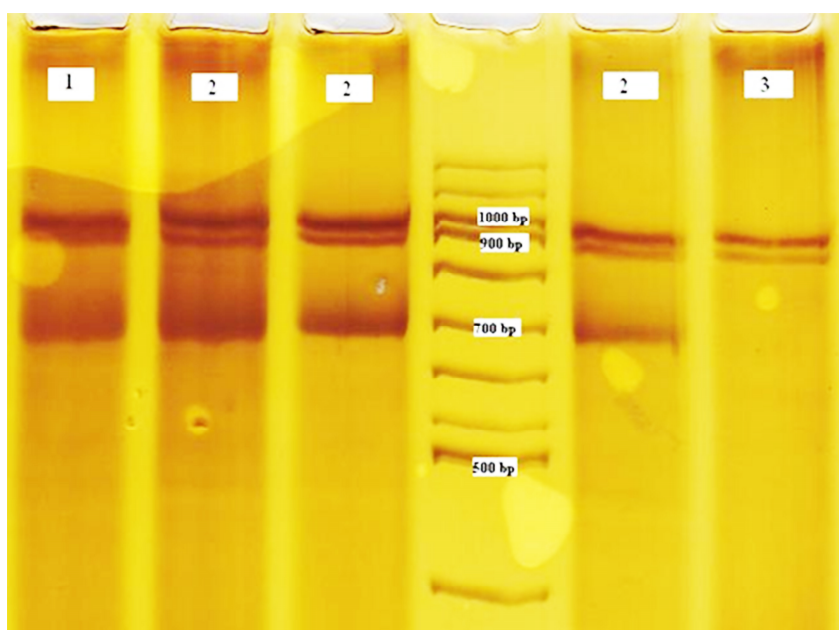


Fig. 2. SSCP patterns of first-half exon 2 of GDF9 gene. From left to right: column 1 is pattern number 1; columns 2, 3 and 5 are pattern number 2; column 6 is pattern number 3 and column 4 is size marker M100

شکل ۲- الگوهای SSCP نیمه اول اگزون ۲ ژن GDF9. از چپ به راست: ستون ۱ الگوی شماره ۱؛ ستون ۲، ۳ و ۵ الگوی شماره ۲، ستون ۶ الگوی شماره ۳ و ستون ۴ نشانگر اندازه M100

جدول ۲- چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی شناسایی شده در جمعیت گوسفندان آمیخته قوچ‌های رومانوف و میش‌های لری-بختیاری برای نیمه اول اگزون ۲ ژن GDF9 و مقایسه آن با نتایج Hanrahan *et al.* (2004).

Table 2. Detected SNPs in crossbred sheep obtained from crossing of Romanov rams with Lori-Bakhtiari ewes for the first-half of exon 2 for GDF9 gene and comparison with results of Hanrahan *et al.* (2004).

SNP position in GDF9 gene sequence	471	477	520*	721
Reported SNPs by Hanrahan <i>et al.</i> (2004)	C/T	G/A	T/T	G/A
Detected SNPs in this study	C/T	G/A	T/G	G/A

*SNP position of 520 was observed for the first time

جدول ۳- هاپلوتایپ‌های شناسایی شده در نیمه اول اگزون ۲ ژن GDF9 در جمعیت گوسفندان آمیخته قوچ‌های رومانوف و میش‌های لری-بختیاری

Table 3. Detected haplotypes in the first-half of exon 2 for GDF9 gene in crossbred sheep obtained from crossing of Romanov rams with Lori-Bakhtiari ewes

Haplotype number	SNP Position in GDF9 gene sequence				Frequency
	471	477	520	721	
1	C	A	T	G	0.579
2	T	G	T	A	0.056
3	T	G	G	A	0.056
4	C	G	T	A	0.291

جدول ۴- ژنوتیپ‌های شناسایی شده در نیمه اول اگزون ۲ ژن GDF9 برای جمعیت گوسفندان آمیخته قوچ‌های رومانوف و میش‌های لری-بختیاری

Table 4. Detected genotypes for the first-half of exon 2 for GDF9 gene for crossbred sheep obtained from crossing of Romanov rams with Lori-Bakhtiari ewes

Genotype number	SNP Position in sequence GDF9 gene				Frequency
	471	477	520	721	
1	CC	AA	TT	GG	0.305
2	CC	GA	TT	GA	0.584
3*	TT	GG	TG	AA	0.111

* Genotype number 3 was observed for the first time

بحث

با توجه به شکل‌های واضح الگوهای باندی حاصل از ژل اکریل‌آمید در این مطالعه این نتیجه حاصل می‌شود که روش آماده کردن ژل و رنگ‌آمیزی آن برای آشکارسازی و تعیین ژنوتیپ قطعات حدود ۶۵۰ جفت‌بازی بسیار مناسب بود. ۳ نوع ژنوتیپ ۱، ۲ و ۳ در جمعیت مورد مطالعه مشاهده شدند که در رابطه با ژنوتیپ‌ها بیشترین و کمترین فراوانی‌ها به ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های ۲ و ۳ بود.

تعداد زیادی از الگوهای باندی مشاهده شده اگزون ۲ ژن GDF9 در این مطالعه با نتایج الگوهای باندی Chu *et al.* (2005) روی نژاد چینی هان دم کوتاه که به روش SSCP شش الگوی باندی مشاهده کردند، الگوهای باندی نتایج Hongcai *et al.* (2010) روی نژاد چینی سل بلک و

ژن GDF9 از جمله ژن‌های کاندیدای مؤثر بر باروری و راندمان تولید مثلی گوسفند است، به همین دلیل اثر آن بر باروری گوسفندان آمیخته نژاد رومانوف و نژاد لری-بختیاری مورد بررسی قرار گرفت. مشاهده تنها یک باند ۶۳۴ جفت-بازی برای محصولات PCR، نشان‌دهنده تکثیر درست قطعه انتخاب شده از اگزون ۲ ژن GDF9 و صحت انجام PCR بود. عدم وجود اسمیر و شارپ بودن باندها نشان‌دهنده عدم وجود آلودگی‌های پروتئینی و نمکی بود و مشاهده تنها یک باند، مؤید این است که آغازگرهای طراحی شده در این مطالعه تنها دارای یک قطعه هدف روی DNA الگو بودند و شباهت توالی در مکان‌های دیگری از DNA وجود نداشت.

گوسفند سنجابی در ناحیه کد کننده ژن GDF9 جهش مشاهده کردند مطابقت دارد. بهمنی و همکاران (۱۳۸۹) در ژن GDF9 روی گوسفند قره‌گل با روش PCR-SSCP چهار الگوی باندی مختلف مشاهده کردند که با الگوهای باندی این تحقیق مطابقت دارد. همانطور که ملاحظه شد جمعیت مورد مطالعه در این پژوهش برای نیمه اول اگزون دو ژن GDF9 دارای چندشکلی است که با نتایج Hanrahan *et al.* (2004) مطابقت داشت.

الگوهای باندی نتایج Yefen *et al.* (2010) روی نژاد چینی هو مطابقت دارد. همچنین الگوهای باندی به دست آمده از تحقیق حاضر با نتایج رحیمی و همکاران (۱۳۹۲) که با روش SSCP برای اگزون ۲ ژن GDF9 در دو نژاد گوسفند بهمنی و لک قشقایی، در نژاد بهمنی سه الگوی متفاوت A، B و C گزارش کردند و در نژاد لک قشقایی دو الگوی A و B مشاهده کردند مطابقت دارد. همچنین با نتایج بادیرین و همکاران (۱۳۹۲) که با روش RFLP برای ژن GDF9 در گوسفند نژاد قره‌گل سه الگوی AA، BB و AB مشاهده کردند و با یافته‌های سلیمانی و همکاران (۱۳۸۹) که در

جدول ۵- فراوانی آلل‌ها و ژنوتیپ‌های چهار SNP و شاخص اطلاعاتی شانون در جمعیت گوسفندان آمیخته حاصل از تلاقی

قوچ‌های رومانوف و میش‌های لری‌بختیاری برای نیمه اول اگزون ۲ ژن GDF9

Table 5. Allele and genotype frequency of four SNPs in crossbred sheep born from crossing of Romanov rams with Lori-Bakhtiari ewes for the first-half of exon 2 for GDF9 gene

Shannon information index	Significance level	Allele frequency		Genotype frequency			SNP position
0.349	0.000	<u>C</u>	T	CC	CT	TT	471 ^{***}
		0.889	0.111	0.889	0.0	0.111	
0.674	0.202	<u>G</u>	A	GG	GA	AA	477 ^{ns}
		0.403	0.597	0.111	0.584	0.305	
0.215	0.724	T	G	TT	TG	GG	520 ^{ns}
		0.944	0.056	0.888	0.112	0.0	
0.674	0.202	<u>G</u>	A	GG	GA	AA	721 ^{ns}
		0.597	0.403	0.305	0.583	0.112	

***: Lack of Hardy-Weinberg equilibrium at $P < 0.001$; ^{ns}: Non-significant (Hardy-Weinberg equilibrium). Alleles with black, bold and underlined letters are wild type allele (allele related to haplotype 1).

بوده که این مطلب می‌تواند نشان‌دهنده توان تولیدمثلی بالاتر این گله آمیخته نسبت به گله‌های بومی باشد. با توجه به نتایج مشاهده شده از شاخص شانون می‌توان بیان کرد که میزان هتروزایگوتی و تنوع ژن GDF9 در این جمعیت بالا است و این مطلب که دورگ‌گیری میزان هتروزایگوتی را افزایش می‌دهد با این نتایج اثبات شد. با بررسی که قادری و همکاران (۱۳۸۸) روی گوسفندان نژاد کردی انجام دادند نشان دادند که هتروزایگوتی مشاهده شده در جایگاه اگزون یک ژن GDF9 این نژاد بسیار پایین است. برای جایگاه اگزون دو این ژن هیچ‌گونه هتروزایگوسیتی دیده نشد، بدین‌معنی که کل جمعیت

نتایج SSCP و توالی‌یابی این پژوهش وجود چهار SNP را در این ناحیه از اگزون ۲ ژن GDF9 مشخص کرد که SNP موقعیت ۵۲۰ برای اولین بار در این مقاله به صورت هتروزایگوت مشاهده شد. در این پژوهش ۳ ژنوتیپ متفاوت در جمعیت مورد مطالعه مشاهده شد که ژنوتیپ دوم با توجه به وجود هتروزایگوت جهش موقعیت ۷۲۱ (G4) و تاثیر این جهش بر چندقلوزایی از اهمیت بیشتری برخوردار بوده و می‌توان از این ژنوتیپ برای تحقیقات اصلاح نژادی استفاده کرد. همچنین این ژنوتیپ حدود ۵۰ درصد از کل جمعیت مورد مطالعه را به خود اختصاص داده و در مطالعات قبلی که روی گوسفندان بومی صورت گرفته فراوانی این جهش به مقدار خیلی کم

شماره ۸۱۸ اگزون ۲ ژن GDF9 یک بز بیتال ایرانی که بالاترین رکورد چندقلوزایی را در پنج زایش متوالی (۱، ۵، ۴، ۴ و ۴) داشت شناسایی کردند که باعث تغییر اسید-آمیننه محافظت شده می‌شود. این تغییر نوکلئوتیدی باعث جایگزینی آلانین با والین در اسیدآمیننه شماره ۲۷۳ می‌شود که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد و تایید کننده نقش ژن GDF9 به عنوان یکی از عوامل چندقلوزایی است. با توجه به این که در گوسفندان اروپایی، نظیر سافولک و یا رومانوف معمولاً سه‌قلوزایی و بالاتر رخ می‌دهد و جهش G8 که بسیار مهم است در آنها وجود دارد، تاثیر جهش G4 نسبتاً در آنها کمتر است. ولی، در نژادهایی که جهش G8 وجود ندارد، جهش‌های کم اثر مانند G4 به نوبه خود مهم تلقی می‌شوند و می‌توانند منجر به ایجاد دوقلوزایی شوند. از سوی دیگر، دوقلوزایی در گوسفندان ایرانی در هر فصل رخ نمی‌دهد که این خود دلیل بر این است که جهش مذکور به خودی خود دارای قدرت کافی در ایجاد چندقلوزایی نیست و عوامل محیطی به عنوان عوامل کمکی به این پدیده کمک می‌کنند. از آنجا که این ژن از خانواده عوامل رشد نیز محسوب می‌شود، می‌توان جهش‌های این ژن را بر صفت رشد موثر خواند. لذا، در صورت ارتباط این جهش‌ها با صفت رشد می‌توان از آن برای کارهای اصلاح نژاد مربوط به رشد گوسفندان بهره برد.

با توجه به اینکه اکثر گله‌های موجود در کشور به صورت بسته پرورش می‌یابند و سطح همخونی بالا است، در نتیجه تنوع ژنتیکی پایین خواهد آمد. بنابراین، با توجه به تنوع ژنتیکی پایین گله‌ها می‌توان با افزایش تعداد موثر، کنترل آمیزش‌ها برای ایجاد حداقل همخونی در هر گله و نیز ایجاد جمعیت‌های جداگانه با تعداد اولیه بیشتر موجب جلوگیری از کاهش تنوع ژنتیکی شد. همچنین با کشف و وارد نمودن این ژن‌ها و برنامه‌ریزی برای تکثیر و تثبیت جهش‌های اتفاق افتاده مرتبط با ژن‌های باروری می‌توان به افزایش تولید و حفظ ذخایر ملی و درآمد دامداران کشور کمک قابل توجهی کرد.

مورد مطالعه هموزیگوت غالب بود. بنابراین، میزان تنوع این جایگاه در جمعیت نژاد کردی صفر است. با توجه به بالا بودن میزان هتروزیگوتی در این مطالعه انتظار می‌رود این آمیخته‌ها باروری بالاتری نسبت به گوسفندان بومی، بخصوص نژاد لری‌بختیاری داشته و صفت چندقلوزایی گوسفندان رومانوف را به ارث برده باشند. برخی SNP‌های مشاهده شده در تعادل هاردی-وینبرگ قرار داشتند. با توجه به آمیخته‌گری که انجام شده، می‌دانیم که مهاجرت ژنی رخ داده است، اما جمعیت در این SNP‌ها در تعادل است. یقیناً به دلیل اینکه تعداد افراد بعضی از ژنوتیپ‌ها خیلی کم بوده محاسبه تعادل هاردی-وینبرگ در آنها تحت تاثیر قرار گرفته است. بنابراین، این آزمون در برخی SNP‌ها تحت تاثیر اثر نمونه‌گیری قرار گرفته است یا این که نیروهای دیگر بر هم زننده تعادل اثر مهاجرت را خنثی کرده‌اند.

(Eghbalsaeid et al. (2012 در پژوهشی روی گوسفندان نژاد افشاری مشاهده کردند که جهش G4 در گوسفندانی که میزان تخمک‌ریزی بالاتری نسبت به بقیه داشتند رخ داده که نشان می‌دهد این جهش می‌تواند یکی از دلایل افزایش میزان تخمک‌ریزی در برخی گوسفندان باشد. آنها بیان کردند هر چند جهش G4 در بخش بالغ mRNA نیست، ولی تاثیر زیادی در ایجاد شکل فضایی زنجیره پلی‌پپتید و به دنبال آن ایجاد RNA بالغ خواهد داشت. علاوه براین، جهش G4 نیز در برخی از گوسفندان مشاهده شد که در اولین باز اسید آمینه رخ داده و تغییر گلوتامیک اسید به لیزین را سبب می‌شود. این تغییر باعث تبدیل یک اسیدآمیننه اسیدی به یک اسیدآمیننه بازی شده و بار الکترونی و به دنبال آن شکل فضایی زنجیره پلی‌پپتید را تغییر می‌دهد. بنابراین، برخی SNP‌های شناسایی شده در این مطالعه می‌توانند در تولید محصول پروتئین نهایی ژن و لذا افزایش نرخ تخمک-اندازی در تخمدان گوسفندان آمیخته، نقش مهمی را ایفا کنند.

(Hadizadeh et al. (2014 با استفاده از تکنیک PCR-RFLP و تعیین توالی، یک جهش را در باز کدکننده

فهرست منابع

- بادبرین ن.، میرحسینی س. ض.، بهمنی ا. و سیدشریفی ر. ۱۳۹۲. بررسی چند شکلی ژن GDF9 و همبستگی آن با صفات وزن بدن در گوسفند نژاد قره گل. همایش دام و طیور شمال کشور، ۱: ۱۰۷۳-۱۰۷۶.
- بهمنی ا.، میرحسینی ض.، دلیرصفت ب. و انصاری ز. ۱۳۸۹. بررسی چند شکلی ژن FecG در گوسفند نژاد قره گل با استفاده از روش SSCP. چهارمین کنگره علوم دامی ایران، ۱: ۳۵۹۰-۳۵۹۳.
- توحیدی نژاد ف.، محمدآبادی م. ر.، اسمعیلی زاده ع. ک. و نجمی نوری ع. ۱۳۹۳. مقایسه سطوح مختلف بیان ژن Rheb در بافت های مختلف بز کرکی راینی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۶(۴): ۳۷-۵۰.
- سلیمانی ب.، رحیمی میانجی ق. و برومند چ. آ. ۱۳۸۹. میزان اثر ژن GDF9 روی دوقلو زایی و صفات وزنی در گوسفند سنجابی. ژنتیک نوین، ۵(۱): ۵۳-۵۹.
- رحیمی ا. و محقق دولت آبادی م. ۱۳۹۲. تفاوت فرم فضایی رشته های منفرد ناحیه پیش برنده و اگزون ۲ ژن GDF9 در گوسفندان نژادهای بهمنی و لک چشایی. همایش دام و طیور شمال کشور، ۱: ۱۴۵۴-۱۴۵۸.
- قادری آ.، میرزاده خ.، فیاضی ج.، محمودی م. و صدر آ. ۱۳۸۸. بررسی چند شکلی ژن GDF9 در گوسفند نژاد کردی با استفاده از روش PCR-RFLP. دومین همایش بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱: ۴۹۸-۵۰۴.
- Abadi M. R. M., Askari N., Baghizadeh A. and Esmailizadeh A. K. 2009. A directed search around caprine candidate loci provided evidence for microsatellites linkage to growth and cashmere yield in Rayini goats. *Small Ruminant Research*, 81: 146-151.
- Barzegari A., Atashpaz S., Ghabili K., Nemati Z., Rustaei M. and Azarbaijani R. 2010. Polymorphisms in GDF9 and BMP15 associated with fertility and ovulation rate in Moghani and Ghezel sheep in Iran. *Reproduction in Domestic Animals*, 45: 666-669.
- Chu M. X., Cheng G. H., Chen L., Fang Y. and Ye S. C. 2005. Study on morphogenetic protein 15 as a candidate gene for prolificacy of Small Tailed Han sheep and Hu sheep. *Journal Anhui Agriculture University*, 32: 278-282.
- Dong J., Alvertini D. F., Nishimori K., Rajendra Kumar T., Lu N. and Matzuk M. M. 1996. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature Genetics*, 383: 531-535.
- Eghbalsaiied S.h., Ghaedi k., Shahmoradi S., Pirestani A., saeidi T., Amini H., Nicol L. and McNielly A. 2012. Presence of SNPs in GDF9 mRNA of Iranian Afshari sheep. *International Journal of Fertilization Sterility*, 5: 225-230.
- Hadizadeh M., Mohammadabadi M. R., Niazi A., Esmailizadeh A. K. and Mahdizadeh Gazooei Y. 2014. Search for polymorphism in growth and differentiation factor 9 (GDF9) gene in prolific beetal and tali goats (*Capra hircus*). *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*, 4: 186-191.
- Hanrahan J. P., Gregan S. M., Mulsant P., Mullen M., Davis G. H., Powell R. and Galloway S. M. 2004. Mutations in the genes for oocyte derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biology of Reproduction*, 70: 900-909.
- Hongcai S., Jie B., Zhigang N., Muniresha M., Lijun F. and Bin J. 2010. Study on candidate gene for fecundity traits in Xingjiang Cele black sheep. *African Journal of Biotechnology*, 8498-8505.
- Liandris E., Kominakisb A., Andreadoua M., Kapeoldassia K., Chadioa S., Tsiligianni Th., Gazoulid M. and Ikonomopoulou I. 2012. Associations between single nucleotide polymorphisms of GDF9 and BMP15 genes and litter size in two dairy sheep breeds of Greece. *Small Ruminant Research*, 107: 16-21.
- Luis V., Ricardo P., Tejedor M. T., Adolfo L. and Isidro S. 2009. A 17 bp deletion in the Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15) gene is associated to increased prolificacy in the Rasa Arago-nesa sheep breed. *Animal Reproduction Science*, 110: 139-146.
- Mishra A. K., Arora A. L., Kumar S. and Prince L. L. 2009. Studies on effect of Booroola (FecB) genotype on lifetime ewes' productivity efficiency, litter size and number of weaned lambs in Garole×Malpura sheep. *Animal Reproduction Science*, 113: 293-298.
- Moradband F., Rahimi G. and Gholizadeh M. 2011. Association of polymorphisms in Fecundity Genes of GDF9, BMP15 and BMP15-1B with Litter Size in Iranian Baluchi Sheep. *Asian-Australian Journal Animal Science*, 9: 1179-1183.
- Mousavizadeh A., Mohammad Abadi M. R., Torabi A., Nassiry M. R., Ghiasi H. and Esmailizadeh A. K. 2009. Genetic polymorphism at the growth hormone locus in Iranian Tali goats by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). *Iranian Journal of Biotechnology*, 7(1): 51-53.
- Otsuka, F., Yao Z., Lee T. H., Yamamoto S., Erickson G. F. and Shimasaki S. 2000. Bone morphogenetic Protein-15. Identification of target cells and biological functions. *Journal of Biology and Chemistry*, 50: 39523-39528.

- Sadighi, M., Bodensteiner K. J., Beattie A. E. and Galloway S. M. 2002. Genetic mapping of ovine growth differentiation factor 9 (GDF9) to sheep chromosome 5. *Animal Genetics*, 33: 244-245.
- Shimasaki S., Moore R. K., Erickson G. F. and Otsuka F. 2000. The role of bone morphogenetic proteins in ovarian function. *Reproduction*, 61: 323-337.
- Yefen X., Erlin L., Yedong H., Ling C. and Zhuang X. 2010. Differential expression of mRNAs encoding BMP/Smad pathway molecules in antral follicles of high and low fecundity Hu sheep. *Animal Reproduction Science*, 120: 47-55.

Scientific report

Identification of available mutations in the first-half (from 5' end) of exon 2 of GDF9 gene in crossbred sheep from crossing of Romanov and Lori-Bakhtiari breeds

R. Khodabakhshzadeh¹, M. R. Mohammadabadi^{2*}, H. Moradi-Shahrehabak³, A. Esmailzadeh Koshkoieh²

1. MSc Student, Department of Animal Science, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

2. Associate Professor, Department of Animal Science, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

3. Assistant Professor, Department of Animal Science, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran

(Received: 10-1-2015 – Accepted: 18-10-2015)

Abstract

For decreasing the number of breeding ewes on pastures and prevention of demolition pastures, it seems that animal breeding programs are benefit for identifying effective candidate genes on litter size in Iranian sheep breeds and using those. The TGF β family genes are one of the most important effective factors on litter size in sheep. The GDF9 gene is one of the most important members from this family. The aim of the present study was to identify available mutations in exon 2 of GDF9 gene in crossbred sheep (Romanov rams $\times$ Lori-Bakhtiari ewes) using PCR-SSCP. In this study, after extraction genomic DNA from blood samples of 36 crossbred animals with 3-6 months old (17 males and 19 females), the first region (from 5' end) of exon 2 (634bp segments) of GDF9 gene was amplified using PCR. The single stranded conformation polymorphism (SSCP) patterns of PCR products were studied using acrylamide gel electrophoresis and silver staining method and then from any pattern one sample sequenced. In the studied population, 3 banding patterns 1, 2, and 3 obtained with frequencies of 0.305, 0.584 and 0.111, respectively. The sequencing results showed presence of 4 mutations (471, 477, 520 and 721 situations) in the studied population.

Keywords: Litter Size, GDF9 gene, Crossbred sheep, PCR-SSCP

*Corresponding author: mmohammadabadi@yahoo.ca or mrm@uk.ac.ir