فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۳۹، جلد ۱۰، شماره ۴،پائیز ۹۶، صفحه ۲۳ تا ۲۹

بررسی چند شکلی ژن GDF9 در گوسفند قره گل و ارتباط آن با چند قلوزایی

رضا سید شریفی[۱]، نجات بادبرین[۲]، امجد بهمنی[۳]، علی مجتهدین[۱]
۱–استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل. تهران.**jseifdavati@uma.ac.ir**
۲– دانش آموخته دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان. گیلان. ایران.
۳– دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان. گیلان. ایران.
تاریخ دریافت: ۹۵/۶/۶ تاریخ پذیرش:۹۶/۸/۱

چکیده

زمینه و هدف: یکی از صفات بسیار مهم و اقتصادی در پرورش گوسفند چند قلوزایی است. مطالعات ژنتیکی مشخص نموده است که چند قلوزایی تحت تاثیر مجموعه‌ای از ژن‌ها معروف به ژن‌های باروری قرار دارد. از جمله این ژن ها، ژن GDF9 است که بر روی کروموزوم شماره ۵ گوسفند شناسایی گردید. پژوهش حاضر با هدف بررسی چند شکلی ژن GDF9 و رابطه آن با صفت چندقلوزایی در گوسفند قره گل انجام گرفت.

روش کار: برای این منظور از ۱۰۰ راس گوسفند ماده قره گل در ایستگاه اصلاح نژاد قره گل سرخس به صورت تصادفی نمونه خون تهیه و اطلاعات زایش آن ها ثبت گردید. پس از استخراج DNA با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی یک قطعه ۱۵۰۳ جفت بازی از ژن GDF9 تکثیر شد. قطعه تکثیر شده با استفاده از آنزیم Rsa I هضم گردید. با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 ارتباط بین ژنوتیپ‌های شناسایی شده و صفت چند قلوزایی بررسی شد.

یافته ها: نتایج حاصل از هضم آنزیمی وجود جهش را در این جایگاه ژنی تایید نمود و رابطه معنی‌دار($P\leq ۰/۰۵$) بین ژنوتیپ‌های مشاهده شده و صفت چند قلوزایی نشان داد، به طوری که حیوانات هتروزیگوت نسبت به هموزیگوت‌ها میزان چند قلوزایی بالاتری داشتند.

نتیجه گیری: جهش ایجاد شده در ژن GDF9 جهش مفیدی بوده و اقدام برای تثبیت این جهش در طی سال‌های آینده به احتمال زیاد موجب افزایش چند قلوزایی، افزایش راندمان تولید مثلی و در نهایت افزایش درآمد دامداران خواهد شد.

واژه های کلیدی: گوسفند قره گل، چندقلوزایی، GDF9، PCR-RFLP.

مقدمه

صنعت گوسفند داری نقش موثری در اقتصاد ملی کشور دارد، به طوری که بخش قابل توجهی از تولیدات گوشت قرمز، شیر، پشم و پوست از این صنعت تامین می‌گردد. از صفات مهم اقتصادی در پرورش گوسفند نرخ باروری، صفات رشد، کیفیت پشم و چند قلوزایی است. از این میان چند قلوزایی یکی از مهم ترین صفات اقتصادی در پرورش گوسفند است که می‌توان با استفاده از روش‌های مناسب بازده آن را به طور قابل توجهی افزایش داد(۱۶). گوسفند قره گل در منطقه قره گل(ناحیه‌ای در نزدیکی بخارا) پرورش داده شده و به این نام شهرت یافته است. مهم ترین ویژگی آن تشکیل طرح گل در طول مدت آبستنی روی پوست جنین می-باشد که تا زمان تولد بره کامل می‌شود. به همین دلیل پوست بره قره گل از مرغوبیت زیادی برخوردار است(۱). در روش‌های اصلاح نژاد کلاسیک با استفاده از رکوردهای مختلف ارزش اصلاحی دام‌های برتر تعیین شده و به عنوان والدین نسل بعد انتخاب می‌شوند. فرض اصلی برای محاسبه ارزش اصلاحی، کنترل صفات کمی به وسیله تعداد ژن‌های زیاد و اثر کم بود(۶). امروزه مشخص شده است که همه ژن‌های موثر بر صفات،

کوچک اثر نیستند و بعضی از ژن‌ها تاثیر بیشتری بر تنوع صفات دارند. یکی از روش‌های اصلاح نژاد، انتخاب دام‌های برتر به کمک نشانگرهای مولکولی است که با اختصاص دادن وزن بیشتری به ژن‌های با اثر بیشتر، می-تواند موجب افزایش صحت پیش بینی ارزش اصلاحی شود(۱۵). با توجه به وراثت پذیری پایین صفات تولید مثلی، استفاده از اطلاعات ژن‌های بزرگ اثر به عنوان یک ابزار کمکی در بهبود صحت محاسبه ارزش‌های اصلاحی و انتخاب صحیح دام‌های با پتانسیل ژنتیکی بالاتر می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. در گوسفند تنوع زیادی از پدیده چند قلوزایی در بین نژادهای مختلف مشاهده شده است. در بعضی از نژادها چند قلوزایی و میزان تخمک گذاری می‌تواند تحت تاثیر ژن‌های با اثر عمده باشد(۵). تاکنون تاثیر خانواده‌های ژنی GDF9، ALK6 و BMP بر میزان تخمک گذاری و چند قلوزایی ثابت شده است(۱۷، ۶). یکی از ژن‌های باروری که تاثیر زیادی بر چند قلوزایی گوسفند دارد، ژن GDF9 است که بر روی کروموزوم شماره ۵ قرار دارد(۹). این ژن دارای دو اگزون ۳۹۷ و ۹۶۵ جفت بازی و یک اینترون ۱۱۲۶ جفت بازی است که تولید یک پروتئین فعال به طول ۱۳۵ اسید آمینه را کد می‌کند. وجود این ژن برای رشد فولیکول طبیعی در گوسفند ضروری است(۱۲). برخلاف ژن بورولا که دارای اثر افزایشی بر نرخ تخمک گذاری می باشد، ژن GDF9 فقط در حالت هتروزیگوت منجر به افزایش تخمک گذاری شده و ژنوتیپ‌های هموزیگوت موجب افزایش تخمک گذاری نمی شوند(۵). وجود جهش در این ژن منجر به جایگزینی فنیل آلانین به جای سرین در موقعیت اسید آمینه شماره ۷۷ در زنجیره پلی پپتید بالغ GDF9 می‌گردد. گوسفندانی که دو کپی از ژن GDF9 دارند چند قلوزایی نرمالی دارند اما غیر فعال شدن تنها یک کپی از آن(افراد هتروزیگوت) موجب افزایش نرخ تخمک گذاری شده و باروری افزایش پیدا می‌کند(۹، ۶). در بعضی از نژادهای مانند کمبریج و بلکلیر جهش‌هایی در این ژن رخ داده و ثابت شده است که گوسفندان با ژنوتیپ هتروزیگوت دارای باروری و میزان تخمک گذاری بالایی هستند(۱۲). با توجه به تاثیر افزایش چند قلوزایی بر میزان گوشت تولیدی به ازای هر رأس دام در هر سال، به نظر می‌رسد که مطالعه برای پیدا کردن ژن‌های با اثر عمده بر چند قلوزایی در نژادهای مختلف کشور ضروری باشد. بنابراین تلاش برای انتخاب و تثبیت این جهش‌های مفید در طی نسل‌های آینده کمک زیادی به افزایش چند قلوزایی و درآمد دامداران خواهد نمود. در ایران تحقیقات متعددی به منظور شناسایی چند شکلی ژن GDF9 و ارتباط آن با صفات باروری و تولیدی صورت گرفته است که از آن جمله می‌توان به تحقیقات صورت گرفته در گوسفند نژاد دالاق(۱۴)، کردی و عربی(۱۰) و شال (۱۱) اشاره کرد. به کارگیری فناوری‌های مولکولی، منجر به کشف جهش‌های با اثر عمده بر بازدهی تولید مثل در گوسفند شده است. لذا هدف از انجام پژوهش حاضر شناسایی چند شکلی ژن GDF9 و تاثیر آن بر صفت چند قلوزایی گوسفند قره گل می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از ۱۰۰ راس گوسفند ماده قره‌گل واقع در ایستگاه اصلاح نژاد سرخس نمونه خون به صورت تصادفی از سیاهرگ وداج گردن با استفاده از لوله‌های خلاء دار حاوی ماده ضد انعقاد EDTA تهیه گردید و در فلاسک یخ به آزمایشگاه منتقل شد. سپس داده‌های مرتبط به نوع زایش(تک قلو، دوقلو و چندقلوزایی) تهیه تا ارتباط آن با ژنوتیپ‌های مختلف ژن GDF9 بررسی شود. برای استخراج DNA ژنومی از روش بهینه یافته خون لخته استفاده و کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به روش الکتروفورز ژل آگارز تعیین شد. با استفاده از آغازگرهای پیشنهاد شده یک

قطعه ۱۵۰۳ جفت بازی از اگزون ۱ ژن مورد نظر به وسیله واکنش PCR تکثیر گردید(۱۲). توالی این آغازگرها به صورت زیر می باشد:

G1:5´–GAAGACTGGTATGGGGAAATG-3´
G4:5´–CCAATCTGCTCCTACACACCT-3´

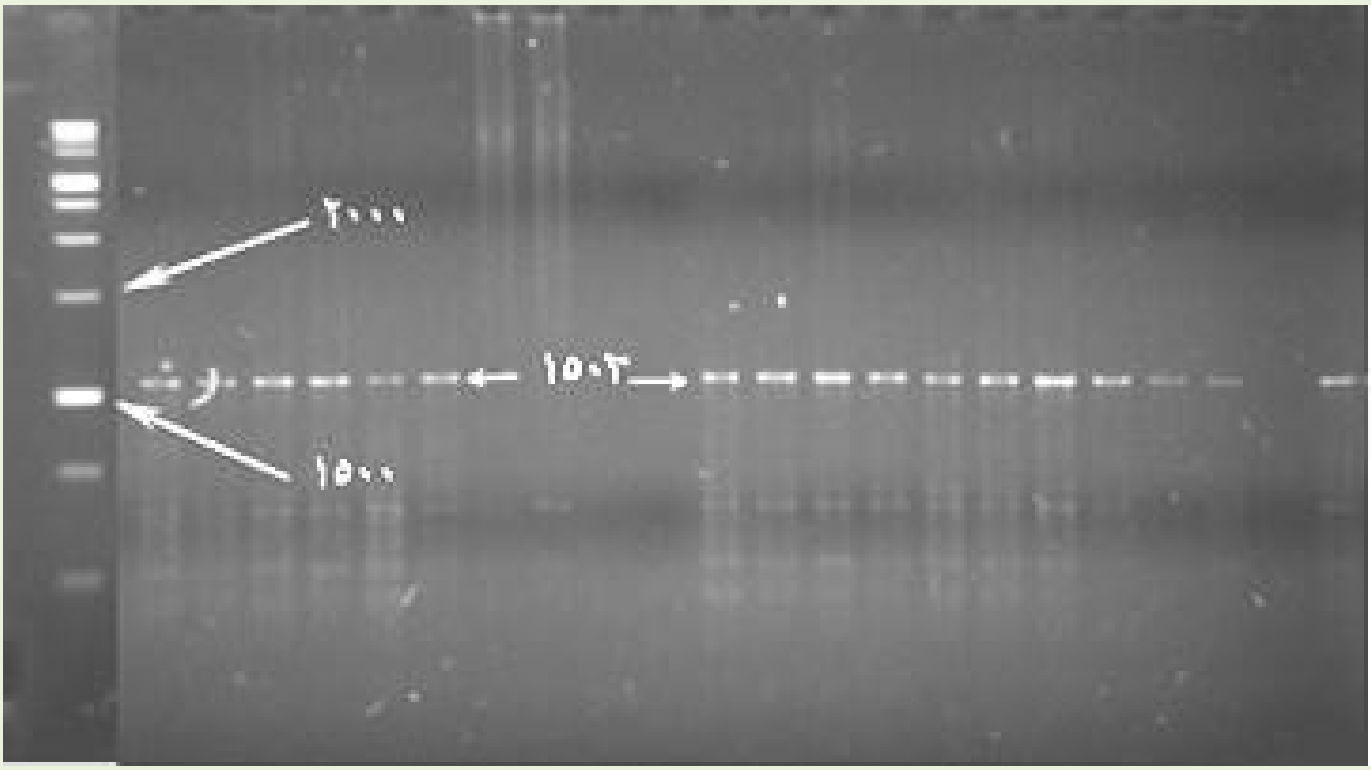
واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، شامل ۵۰ نانوگرم DNA الگو، ۲/۵ میکرومول بافر PCR10X، ۲/۵ میلی مول $MgCL_2$، ۰/۲ مول dNTP، یک واحد آنزیم Taq پلی مراز و ۱۰ پیکومول از هر کدام از آغازگرها بود. تکثیر قطعه مورد نظر با استفاده از یک مرحله واسرشته سازی ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه و ۳۰ چرخه شامل واسرشته سازی در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگرها ۵۳ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و یک دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد. واکنش هضم آنزیمی محصولات PCR درحجم ۱۵ میکرولیتر، حاوی یک واحدآنزیم RsaI، دو میکرولیتر بافر هضم و ۱۷ میکرولیتر محصول PCR و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت دو ساعت انجام گرفت. در نهایت برای مشاهده باندها از ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم برماید استفاده شد. اطلاعات حاصل از تعیین ژنوتیپ دام‌ها همراه با داده‌های مربوط به چندقلوزایی با استفاده از مدل آماری زیر که توسط چو و همکاران مورد استفاده قرار گرفت با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 تجزیه گردید(۴). در این پژوهش اثر ژنوتیپ-ها، سال تولد و جنس بره به عنوان عوامل ثابت و تعداد بره متولد شده در هر زایش به عنوان عامل تصادفی در مدل منظور شد.

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + S_j + e_{ijk}$$

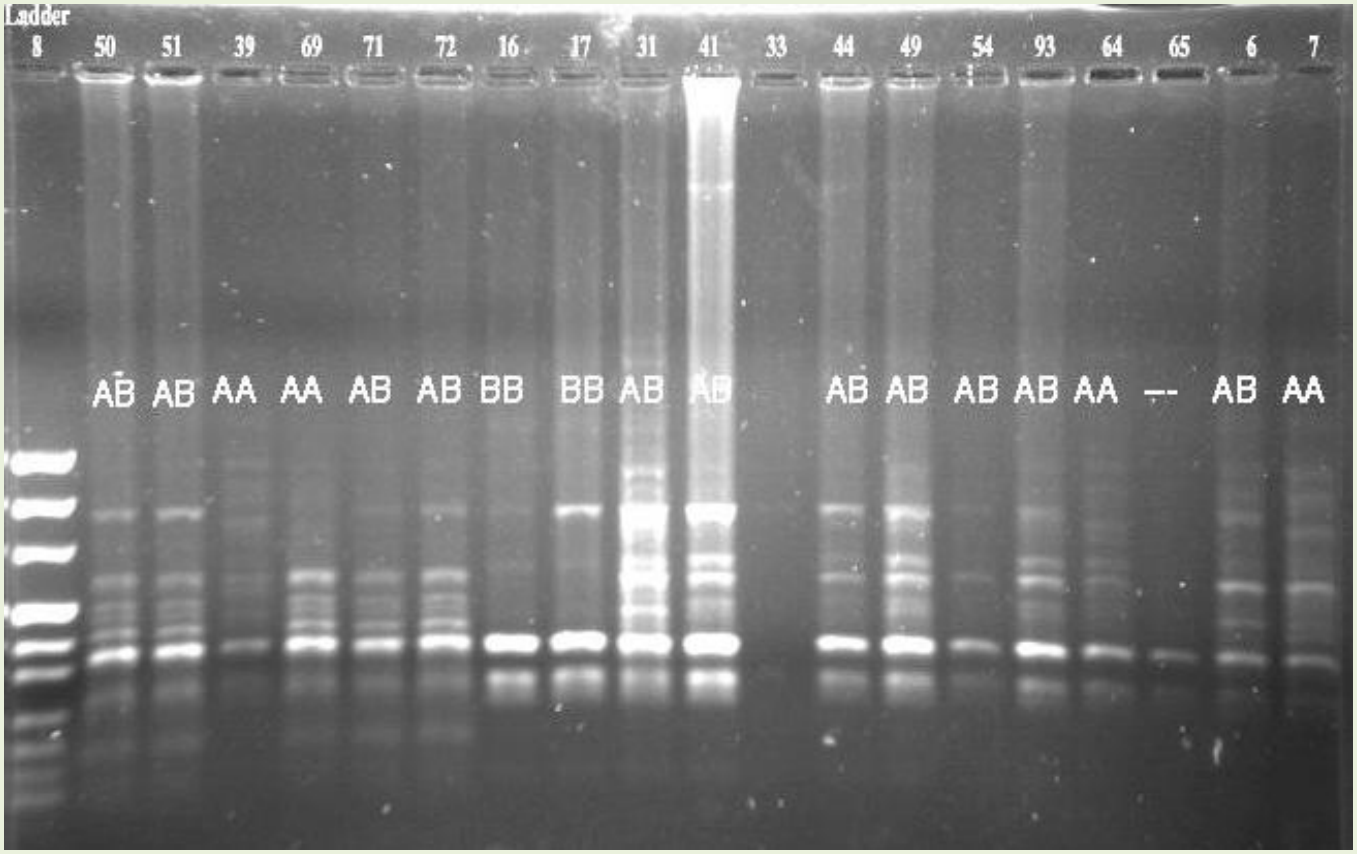
در این رابطه Y_{ijk} میانگین اثر فنوتیپی تیپ تولد، μ اثر میانگین جامعه برای صفت موردنظر، G_i اثر ثابت ژنوتیپ GDF9، S_j اثر ثابت جنسیت بره و e_{ijk} اثرتصادفی خطای آزمایش در نظرگرفته شد. هم چنین برای برآورد هتروزیگوسیتی کل و درصد چند شکلی از نرم افزار PopGene 1.32 استفاده گردید.

نتایج

الکتروفورز محصولات تکثیر شده نشان داد که قطعه مورد نظر از ژن GDF9 به خوبی تکثیر یافته است(شکل ۱). این قطعه ۱۵۰۳ جفت بازی توسط آنزیم Rsa I که دارای جایگاه برش اختصاصی(GT/AC) روی قطعه ژنی تکثیر شده است، هضم گردید(شکل ۲).می‌توان وجود و یا عدم وجود جهش در منطقه برش را از طریق ایجاد ژنوتیپ‌های مختلف تشخیص داد. در اثر هضم محصولات تکثیر شده با این آنزیم سه نوع ژنوتیپ شناسایی شد. افرادی که دو قطعه ۶۰۷ و ۳۵۰ جفت بازی ایجاد کردند، در گروه یک(ژنوتیپ هموزیگوت AA)، افرادی که سه قطعه ۸۵۲، ۶۰۷ و ۳۵۰ جفت بازی ایجاد کردند در گروه دو(ژنوتیپ هتروزیگوت AB) و افرادی که دو قطعه ۸۵۲ و ۳۵۰ جفت بازی ایجاد کردند در گروه سه(ژنوتیپ هموزیگوت BB) قرار گرفتند. شاخص‌های ژنتیک جمعیت برای نشانگر مورد استفاده نشان داد که میزان چندشکلی ژن GDF9 بالا می‌باشد به طوری که ژنوتیپ BB کمترین فراوانی و ژنوتیپ AB بیشترین فراوانی را داشتند(جدول ۱). هم چنین وجود ارتباط بین ژنوتیپ‌ها با صفت چند قلوزایی با استفاده از روش تجزیه واریانس بررسی شد(جدول ۲).



شکل ۱- قطعه تکثیر شده از ژن GDF9. ستون سمت چپ نشانگر اندازه و ستون‌های سمت راست محصولات PCR (۱۵۰۳ جفت باز) قبل از هضم آنزیمی است.



شکل ۲- محصولات هضم شده توسط آنزیم Rsa I. ستون اول از سمت چپ نشانگر اندازه PUC8 و ستون‌های سمت راست قطعه تکثیر شده پس از هضم آنزیمی است.

جدول ۱- فراوانی ژنوتیپی ژن GDF9

ژنوتیپ	تعداد مشاهده شده	تعداد مورد انتظار	$(O-E)^2/E$
AA	۴۵	۴۹/۶۲	۰/۴۳
AB	۵۱	۴۱/۶۳	۲/۱۱
BB	۴	۸/۷۵	۲/۵۸

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر جایگاه GDF9 روی صفت چند قلوزایی

صفت	درجه آزادی	آماره Wald
جنسیت	۱	۰/۸۵۹ $^{n.s}$
ژنوتیپ	۲	۹/۶۵۰ **

** معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

بحث ونتیجه گیری

چند شکلی ژن GDF9 حاصل از پژوهش حاضر با نتایج پژوهش‌های انجام شده روی گوسفندان زل(۲) بلوچی (۳) و سنگسری (۱۳) مطابقت، اما با نتایج پژوهش‌های انجام شده روی گوسفندان شال که فاقد چند شکلی بود مغایرت داشت(۱۱). وجود ارتباط بین ژنوتیپ‌ها با صفت چند قلوزایی با استفاده از روش تجزیه واریانس و روش Wald بررسی شد.از آن جا که آزمون F نسبت به آزمون Wald اریبی بیشتری داشت، بنابراین نتایج بر اساس اطلاعات به دست آمده از آزمون Wald اعلام و بررسی شد. هر چند اثر ژنوتیپ روی چند قلوزایی در هر دو روش معنی دار بوده و اختلافی از این نظر وجود نداشت. نتایج به دست آمده نشان داد که ژن GDF9 اثر معنی-داری روی تخمک گذاری و افزایش نرخ چند قلوزایی در گوسفندان قره‌گل دارد، به طوری که میش‌های با ژنوتیپ هتروزیگوت در هر زایش تعداد بره بیشتری نسبت به میش‌های با ژنوتیپ‌های هموزیگوت تولید می-کردند. نتایج حاضر با تحقیقات صورت گرفته روی گوسفندان بلوچی مطابقت دارد(۱۶). با درک ساز و کارهای مولکولی موثر بر تکامل اووسیت می‌توان تکنولوژی تکامل اووسیت را بهبود بخشید و جای بیشتری برای دستکاری فاکتورهای اختصاصی تاثیرگذار برفرآیندهای تقسیم میوز در اووسیت باز کرد و شرایطی را فراهم آورد که موجب افزایش رشد و نمو اووسیت و در نتیجه افزایش نرخ تخمک گذاری شد. با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق ژن GDF9 در گوسفندان قره گل دارای چند شکلی بوده و رابطه معنی-داری با چند قلوزایی دارد. با توجه به شرایط محیطی و تغذیه‌ای نامناسب گله‌های بومی کشور، باز هم دو یا چند قلوزایی در گوسفندان ایرانی و به خصوص گوسفند قره گل دیده می‌شود. بنابراین پیشنهاد می‌گردد با توجه به نقش ژن GDF9 در افزایش نرخ تخمک گذاری، می-توان از چند شکلی‌های آن به عنوان نشانگر برای بهبود نرخ چند قلوزایی استفاده کرد.

منابع

۱-حبیب زاده، س. ۱۳۸۲. تاریخچه گوسفند قره گل. اولین همایش علمی تخصصی گوسفند قره گل. سازمان جهاد کشاورزی خراسان رضوی. ص ۲-۱.

۲- فرج زاده، م. ۱۳۸۴. بررسی چند شکلی‌های دو ژن GDF9 و BMP15 درگوسفند نژاد زل. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی ساری، دانشگاه مازندران. ۱۰۵.

۳-مرادبند، ف.، رحیمی، ق. ا.، نصیری، م. ر. ۱۳۸۸. شناسایی چند شکلی های موجود در ژن GDF9 و ارتباط آن با دو

قلوزایی در گوسفند بلوچی با استفاده از روش PCR-RFLP. پژوهش و سازندگی. دوره ۸۳: ص ۴۲-۳۷.

4.Chu, M. X., Liu, Z. H., Jiao, C. L., Hey, Q., Fang, L., Ye, S. C.(2007). Mutation in BMPR1B and BMP15 genes are associated with litter size in Small Tailed Han sheep(Ovis Aries). J. Anim. Sci, 85; 2527.

5.Davis, G. H., Mcewan, J. C., Fennessy, P. F., Dodds, K. G., Farquhar, P. A. (1991). Evidence for the presence of a major gene influencing ovulation rate on the X chromosome of sheep. Biological Report, 44; 620-624.

6.Davis, G. H. (2005). Major genes affecting ovulation rate in sheep. Genetic Selection Evolution, 37; 11–23.

7.Falconer, D.S., Mackay, T. F. (1996). Introduction to quantitative genetics. Longman. UK, 1999.

8.Galloway, S.M., Mcnatty, K. P., Cambridge, L. M., Laitinen, M. P. E., Juengel, J. L., Jokiranta, S. (2000). Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. Nature Genetics, 25; 279-283.

9.Galloway, S. M., Gregan, S. M., Wilson, T., McNatty, K. P., Jungel, J. L., Ritvos, O. (2002). BMP15 mutations and ovarian function. Molecular Cell Endocrinal, 191; 15-18.

10. Ghaderi, A., Nasiri, M. T., Mirzadeh, K. H., Fayazi, J., Sadr, A. S. (2010). Identification of the GDF9 mutation in two sheep breeds by using polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique. African Journal of Biotechnology, 9; 8020-8022.

11. Ghaffari, M., Nejati-Javaremi, A., Rahimi, G. (2009). Lack of polymorphism in the oocyte derived growth factor (GDF9) gene in the Shal breed of sheep. South African Journal of Animal Science, 39; 355-360.

12. Hanrahan, J. P., Gregan, S. M., Mulsant, P., Mullen, M., Davis, G. H., Powell, R. (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 (Ovisaries). Biological Reproduction, 70; 900-909.

13. Kasiriyan, M. M., Hafezian, S. H., Hassani, N. (2011). Genetic polymorphism BMP15 and GDF9 genes in Sangsari sheep of Iran. International Journal of Genetics and Molecular Biology, 3; 31-34.

14. Khatam-Nejhad, R., Khan-Ahmadi, A. R. (2012). Genetic polymorphism in GDF9 and FecB genes in Dalagh sheep breed of Iran. Journal of animal and veterinary advances, 11(6); 766-768.

15. Meuwissen, T. H. E., Goddard, M. E. (1996). The use of marker haplotypes in animal breeding schemes. Genetic Selection Evolution, 28; 161-176.

16. Moradband, F., Rahimi, G., 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 of Animal Science, 24; 1179-1183.

17. Vacca, G. M., Dhaouadi, A., Rekik, M., Carcangiu, V., Pazzol, M., Dettori, M. L. (2010). Prolificacy genotypes at BMPR 1B, BMP15 and GDF9 genes in North African sheep breeds. Small Ruminant Research, 88; 67-71.

.

Study of GDF9 Gene Polymorphisms and its Association with Twining Rate in Karakul Sheep Breed

R. Seyedsharifi[1], N. Badbarin[2], A. Bahmani[3], A. Mojtahedin[1]

1. Assistant Professor Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabili. Iran. **reza_seyedsharifi@yahoo.com**

2. PhD of Animal Breeding, University of Guilan, Guilan. Iran.

3. MSc of Animal Breeding, University of Guilan, Guilan. Iran.

Received:2017.24. 8 **Accepted: 2017.23. 10**

Abstract

Inroduction & Objective: One of the most important economic traits in sheep is twining. Genetic studies have identified a set of genes that affect twining with major effects called fertility genes. One of them is GDF9 gene that have been identifying on sheep chromosome 5. This study conducted to investigate the GDF9 gene polymorphism and its relationship with prolificacy trait in Karakul sheep breed.

Material and Methods : Blood samples and birth data collected from 100 Karakul sheep at the Karakul breeding station of Sarakhs-Iran. After DNA extraction one pair of specific primer selected to amplify a 1503 bp fragment of the gene and Rsa I enzyme was used to digest the amplified fragment. The results showed a mutation at GDF9 locus in Karakul sheep. The relationship between genotypes and twining rate investigated using SAS 9.1 software.

Results: The results showed a significant relationship (P<0.05) between genotypes polymorphisms and twining traits and heterozygous animals showed higher twinning rate than homozygotes.

Conclusion: Therefore, the mutation in GDF9 gene is a useful mutation and fix it will increase twining rate and will ultimately increase revenue.

Keywords: Karakul sheep, GDF9 Polymorphism, PCR-RFLP.