

مطالعه جهش‌های موجود در نیمه اول اگزون ۲ ژن GDF9 گوسفند آمیخته نژاد رومانوف و نژاد کرمانی

رسول خدابخش‌زاده^۱ - محمدرضا محمدآبادی^{۲*} - علی اسمعیلی‌زاده کشکونیه^۲ - حسین مرادی شهربابک^۳ - سپیده انصاری نمین^۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۴/۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۹/۱۶

چکیده

برای کاهش تعداد میش‌های مولد روی مراتع و جلوگیری از تخریب مراتع به نظر می‌رسد که برنامه‌های اصلاح‌نژادی روی ژن‌های با اثر عمده بر چندقلوزایی در نژادهای کشور برای شناسایی ژن‌های کاندیدای مؤثر بر این صفات اقتصادی لازم باشند. ژن GDF9 از مهم‌ترین ژن‌های مؤثر بر صفت چندقلوزایی در گوسفندان می‌باشد. هدف از انجام این تحقیق شناسایی جهش‌های موجود در جایگاه نیمه اول (منتهی به ۵ رشته پیشرو) اگزون ۲ ژن فاکتور رشد و تمایز شماره ۹ (GDF9) در گوسفندان آمیخته حاصل از تلاقی بین قوچ‌های نژاد رومانوف با میش‌های نژاد کرمانی به روش PCR-SSCP بود. به این منظور، از سیاه‌رگ‌گوداج تعداد ۱۲۱ رأس گوسفند آمیخته خونگیری شد. پس از استخراج DNA به روش نمکی از خون کامل، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای تکثیر قطعه ۶۳۳ جفت بازی توسط آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای اگزون ۲ این ژن انجام شد. پس از تعیین چند شکلی فضایی تک رشته‌ای محصولات PCR، الگوهای باندهای مربوط به ژن GDF9 روی ژل پلی‌اکریل‌امید و رنگ آمیزی با نیترات نقره، قابل مشاهده شد. در نمونه مورد مطالعه، ۵ الگوی باندهای مختلف ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ به ترتیب با فراوانی ۰/۳۱۴، ۰/۰۲۴، ۰/۲۸۹، ۰/۲۳۲ و ۰/۱۴۱ بدست آمد. همچنین نتایج توالی‌یابی منجر به شناسایی ۵ جهش در این گوسفندان شد.

کلمات کلیدی: برنامه اصلاح‌نژادی، چندقلوزایی، ژن GDF9، گوسفندان آمیخته، PCR-SSCP.

مقدمه

عمل می‌کنند که توفیق این برنامه‌ها به مقدار تنوع ژنتیکی موجود در گله‌ها بستگی دارد (۱۳ و ۱۷). با در نظر گرفتن پایین بودن راندمان تولیدمثل گوسفندان بومی و تأثیر افزایش تعداد بره متولد شده بر میزان گوشت تولیدی به ازای هر رأس میش در هر سال، برای کاهش تعداد میش‌های مولد روی مراتع و جلوگیری از تخریب مراتع به نظر می‌رسد که برنامه‌های اصلاح‌نژادی با ورود اسپرم‌های روز دنیا به کشور و وارد کردن ژن‌های با اثر عمده برای چندقلوزایی در نژادهای بومی کشور لازم باشد.

اخیراً سه ژن مرتبط با باروری در گوسفند شناسایی شده‌اند که عبارتند از: BMP1-B یا بورولا که روی کروموزوم شماره ۶ جای دارد و تحت عنوان FecB نام‌گذاری می‌شود (۱۰ و ۱۵)، GDF9 که بر روی کروموزوم شماره ۵ قرار دارد و نام دیگر آن FecG می‌باشد (۱۸) و BMP15 که بر روی کروموزوم X جای دارد و نام دیگر آن FecX می‌باشد (۵ و ۶).

به طور کلی در بیشتر کشورهای جهان هدف از اصلاح نژاد گوسفند سودآوری از طریق بهبود یک یا چند صفت اقتصادی در جامعه است. این بهبود می‌تواند از طریق انتخاب گوسفندان برتر به عنوان والدین نسل آینده بر اساس شایستگی ژنتیکی آنها برای صفات مورد نظر صورت گیرد (۲۰). همگام با افزایش پیشرفت‌های ژنتیکی، حفظ تنوع ژنتیکی یک جمعیت برای اطمینان از پاسخ به انتخاب بلند مدت، یک وظیفه مهم برنامه‌های اصلاح‌نژادی است (۳). برنامه‌های اصلاح‌نژادی بیشتر در جهت بهبود وضعیت تولیدی حیوانات اهلی

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشگاه شهید باهنر کرمان،

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

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

*-نویسنده مسئول: (Email:mmohammadabadi@yahoo.ca)

جدول ۱- جهش‌های گزارش شده در ژن GDF9 توسط هانراهان و همکاران (۲۰۰۴)

نام جهش	موقعیت SNP	تغییر باز	شماره اسید آمینه	شماره اسید آمینه در پپتید بالغ	تغییر اسید آمینه
G1	۲۶۰	A ← G	۸۷		آرژنین به هیستیدین
G2	۴۷۱	T ← C	۱۵۷		والین به والین
G3	۴۷۷	A ← G	۱۵۹		لوسین به لوسین
G4	۷۲۱	A ← G	۲۴۱		گلوتامین به لیزین
G5	۹۷۸	G ← A	۳۲۶	۸	گلوتامین به گلوتامین
G6	۹۹۴	A ← G	۳۳۲	۱۴	والین به ایزولوسین
G7	۱۱۱۱	A ← G	۳۷۱	۵۳	والین به متیونین
G8	۱۱۸۴	T ← C	۳۵۹	۷۷	سرین به فنیل آلانین

افزایش می‌یابد (۱۱).

گوسفندان آمیخته مورد بررسی در این مطالعه حاصل تلاقی بین قوچ‌های نژاد رومانوف از کشور روسیه با میش‌های نژاد کرمانی است، که به منظور بهبود راندمان تولیدمثلی و با تأکید بر حفظ صفات پشمی و مقاومت محیطی نژاد کرمانی پرورش می‌یابند. این تلاقی با بهره‌گیری از شیوه‌های اصولی اصلاح نژاد برای دستیابی به یک‌سری صفات با ارزش چون رشد مناسب، چندقلوزایی بالا و کمیت شیردهی خوب و کاهش چربی (دنبه) در گوسفندان آمیخته حاصل گردیده است. با توجه به رکوردهای زایش و تفاوت‌های فنوتیپی تولیدمثلی که در میان گوسفندان رومانف با گوسفندان کرمانی وجود دارد، وجود جهش‌های نقطه‌ای در ژن‌های کنترل‌کننده عملکرد تخمدان (GDF9، BMP15 و بورولا) در آمیخته‌های حاصل از این تلاقی دور از ذهن نیست، در نتیجه احتمال می‌رود که جهش یا جهش‌هایی در این ژن‌های بزرگ در جمعیت آمیخته وجود داشته باشد که باعث افزایش نرخ بره‌زایی و باروری در این گوسفندان شود. بنابراین، هدف از تحقیق حاضر شناسایی جهش‌های موجود در نیمه اول (منتهی به 5' رشته پیشرو) آگزون ۲ ژن فاکتور رشد و تمایز ۹ (GDF9) در گوسفندان آمیخته حاصل از تلاقی بین قوچ‌های نژاد رومانوف با میش‌های نژاد کرمانی با استفاده از روش PCR-SSCP و توالی‌یابی آنها بود.

مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر، تعداد ۱۲۱ رأس گوسفند آمیخته حاصل از تلاقی بین قوچ‌های نژاد رومانوف با میش‌های نژاد کرمانی، که در حوالی شهر کرمان پرورش داده می‌شدند، مورد مطالعه قرار گرفتند. خونگیری با استفاده از لوله‌های ونوژکت حاوی ۵۰ میلی‌مولماده ضد انعقاد EDTA صورت گرفت و نمونه‌ها در مجاورت یخ به آزمایشگاه تحقیقاتی ژنتیک و اصلاح نژاد حیوانات اهلی بخش علوم دامی

هشت جهش در ژن GDF9 شناسایی شده (جدول ۱) که تأثیر هر آلل جهش‌یافته از ۰/۳ تا ۱/۲ بره در هر زایش گزارش شده است (۸). اندازه ژن GDF9 ۲/۵ کیلوباز است که شامل دو آگزون و یک اینترون می‌باشد، آگزون یک شامل ۳۹۷ جفت باز است که اسیدهای آمینه ۱ تا ۱۳۴ را کد می‌کند. آگزون دو شامل ۹۶۸ جفت باز است که اسیدهای آمینه ۱۳۵ تا ۴۵۶ را کد می‌کند و اینترون آن شامل ۱۱۲۶ جفت باز می‌باشد. پروتئین اولیه آن دارای ۴۵۳ اسید آمینه است، در صورتی که پروتئین بالغ آن شامل ۱۳۵ اسید آمینه می‌باشد.

غیرفعال سازی بخشی از فاکتورهای موجود در خون از طریق ایمنی‌سازی GDF9 و BMP15 در گوسفندان نژاد رامنی منجر به افزایش نرخ تخمک‌اندازی و چندقلوزایی گردید (۹). در یک نژاد گوسفند در ایسلند بنام توکا متوسط چندقلوزایی ۱/۸۳ گزارش شده و میزان اثر ژن جهش یافته ۰/۶ بره در هر زایش بود. بررسی توالی ژن GDF9 در گوسفندان این نژاد نسبت به گروه کنترل از نژاد شویت نشان داد که تمامی گوسفندان عقیم از نژاد توکا دارای یک جهش منفرد (جایگزینی A با C) در باز شماره ۱۲۷۹ بودند که منجر به تغییر اسید آمینه ۴۲۷ در mRNA کامل و یا اسید آمینه ۱۰۹ از توالی بالغ شد، به طوری که اسید آمینه خنثی سرین با اسید آمینه بازی آرژنین جایگزین می‌شود (۱۴). 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. طی این بررسی از هر سه نوع تخمدان کوچک، بزرگ و متوسط استفاده گردید و از روش RT-PCR برای تکثیر قطعه مورد نظر استفاده شد، سپس محصولات مورد نظر توالی‌یابی شدند. نتایج توالی‌یابی آنها وجود سه جهش G2، G3 و G4 را در میش‌های نژاد افشاری نشان داد (۷). به طور کلی، چندقلوزایی در زایش اول کمتر از زایش‌های دوم و سوم گزارش شده است (۴ و ۱۱). در پژوهشی بر روی گوسفندان نژاد بورولا نشان داده شد که با افزایش تعداد دفعات زایش تا سن ۴ سالگی تعداد گوسفندان چندقلوزا

استفاده از روش PCR-SSCP جهت تعیین ژنوتیپ حیوانات بارگذاری و الکتروفورز محصولات SSCP

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 (IX) TBE و ژل در دمای ۵-۴ درجه سانتیگراد ثابت نگه داشته شد. قبل از آماده‌سازی ژل اکریل‌آمید برای تک‌رشته‌ای شدن محصولات PCR میکروتیوب‌ها در دستگاه ترموسایکلر در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه گذاشته شدند و بعد از اتمام زمان میکروتیوب‌ها بلافاصله به فریزر در دمای ۲۰- برای ۵ دقیقه انتقال داده شدند. جهت انجام SSCP، مقدار ۱۲ میکرولیتر از بافر بارگذاری با ۶ میکرولیتر از محصولات PCR مخلوط و با استفاده از الکتروفورز عمودی روی ژل اکریل‌آمید ۸ درصد بارگذاری و الکتروفورز شدند.

توالی‌یابی محصولات PCR

یکی از مهم‌ترین فناوری‌های در دسترس زیست‌شناسان مولکولی، توالی‌یابی DNA است که به وسیله آن ترتیب دقیق نوکلئوتیدها را در قطعه‌ای از DNA می‌توان تعیین نمود، برای اینکه جهش مشخصاً معلوم گردد بایستی آزمایش تعیین توالی صورت پذیرد. در این مطالعه بر اساس الگوهای باندهای متفاوت، از هر الگو یک نمونه انتخاب و از محصولات PCR به صورت مستقیم برای توالی‌یابی ارسال شد.

پس از دریافت نتایج توالی‌یابی و شناسایی و اعمال جهش‌ها در توالی هر هاپلوتایپ با استفاده از کدهای نوکلئوتیدی پیشنهادی^۱ IUPAC، توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار DNAMAN و Bioedit 7.0 جهت تعیین جهش‌های تک‌نوکلئوتیدی به همراه توالی‌های گزارش شده در NCBI هم‌تراز شده و مقایسه شدند. با بررسی و ارتباط شکل الگوهای باندهای در ژل اکریل‌آمید و سپس مراجعه به توالی ژنوتیپ‌های مشاهده شده، توالی هاپلوتایپ‌های تشکیل دهنده هر ژنوتیپ با استفاده از نرم‌افزار R پیش‌بینی شد.

شاخص‌های ژنتیک جمعیت در محل هر SNP

شاخص تنوع ژنتیکی شانون و تعادل هاردی-واینبرگ در محل هر SNP با استفاده از نرم‌افزار GenAlex 6.41 محاسبه شد.

نتایج و بحث

الکتروفورز محصولات تکثیر شده روی ژل آگارز ۱ درصد، از جایگاه

دانشگاه شهید باهنر منتقل گردید و سپس در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

استخراج DNA

استخراج DNA از ۵۰۰ میلی‌لیتر خون با استفاده از روش نمکی بهینه یافته انجام گرفت. جهت ارزیابی DNA استخراج شده از روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز با غلظت ۰/۸٪ استفاده شد.

تکثیر ژن GDF9 با استفاده از PCR

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 استخراج شد. آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر قطعه‌ای بطول ۶۳۴ جفت باز از آگزون ۲ ژن GDF9 گوسفند با استفاده از سایت‌های primer 3plus و oligo Analyzer و oligo calculator طراحی شدند. توالی آغازگرها عبارت بودند از:

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

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر از DNA، ۱۶/۷ میکرولیتر آب، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Tag پلی‌مراز، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای رفت و برگشتی، ۰/۵ میکرولیتر از dNTP، ۲/۵ میکرولیتر از PCR buffer و ۱ میکرولیتر از MgCl₂ با برنامه حرارتی زیر به تعداد ۳۳ سیکل در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. به منظور دستیابی به دمای اتصال بهینه جهت واکنش PCR برای جفت آغازگرهای مورد بررسی، از روش گرادین دمای 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. 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 سانتی‌گراد 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) پایان چرخه‌ها، (۴) ۸ دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد با یک چرخه تکرار برای بسط نهایی.

پس از تکمیل چرخه‌های دستگاه، نمونه‌ها بلافاصله از دستگاه خارج شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت ارزیابی محصولات PCR از روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز با غلظت ۱٪ استفاده شد.

۸٪ با ولتاژ ۱۷۰-۱۸۰ ولت به مدت ۷-۸ ساعت جهت ران کردن قطعات ۶۵۰ جفت بازی بسیار مناسب می‌باشد. در مطالعه‌ی حاضر این نتیجه حاصل شد که غلظت DNA و نمونه‌های مورد استفاده در PCR در الگوهای بانندی حاصل از SSCP دخالتی ندارد، همچنین از نسبت ۱۰ میکرولیتر رنگ بارگذاری به ۳ میکرولیتر محصول PCR استفاده شد و باندهای خوبی بدست آمد. قراردادن محصولات PCR بعد از

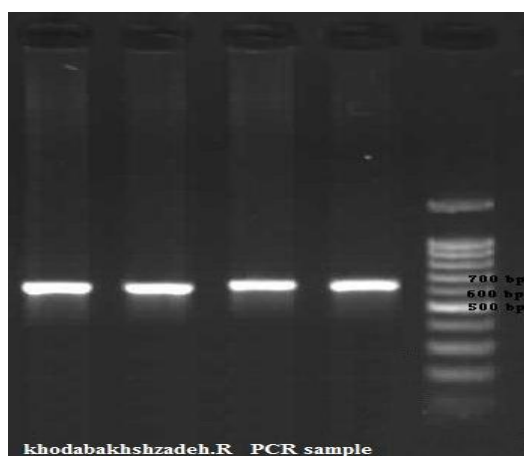
واسرشت سازی روی یخ لازم و ضروری می‌باشد. کروماتوگرام و هم‌ردیف کردن نتایج حاصل از توالی‌یابی برای SNP‌های شناسایی شده جایگاه نیمه اول اگزون ۲ ژن GDF9 برای ارزیابی وجود جهش‌های موجود در جایگاه نیمه اول اگزون ۲ ژن GDF9، نتایج حاصل از توالی‌یابی این قطعه از ژن GDF9 با استفاده از نرم‌افزار Bioedit 7.0 و DNA MAN مقایسه و مورد بررسی قرار گرفت که منجر به شناسایی پنج SNP در موقعیت‌های ۴۷۱، ۴۴۳، ۴۷۷، ۵۲۱ و ۷۲۱ شد.

ژن GDF9 نشان داد که قطعه ۶۳۴ جفت بازی در نظر گرفته شده به خوبی و بدون هیچ باند غیر اختصاصی تکثیر یافته است. وجود یک نوار مشخص بر روی ژلاگاز مؤید این است که آغازگرهای طراحی شده در این مطالعه تنها دارای یک قطعه هدف روی DNA بودند و شباهت توالی در مکان‌های دیگری از DNA وجود نداشت.

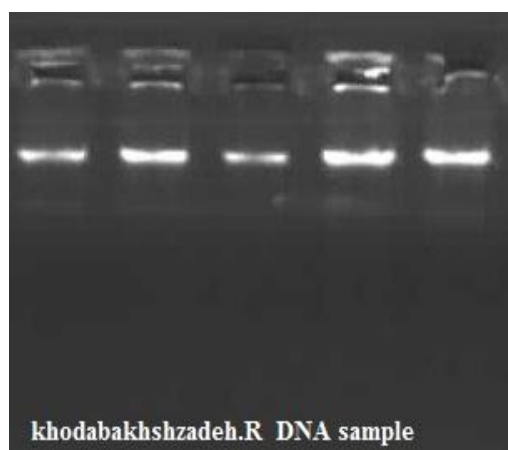
نتیجه الکتروفورز DNA استخراج شده و قطعه ۶۳۴ جفت بازی تکثیر شده از ژن GDF9 به ترتیب در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است.

تعیین فراوانی الگوها

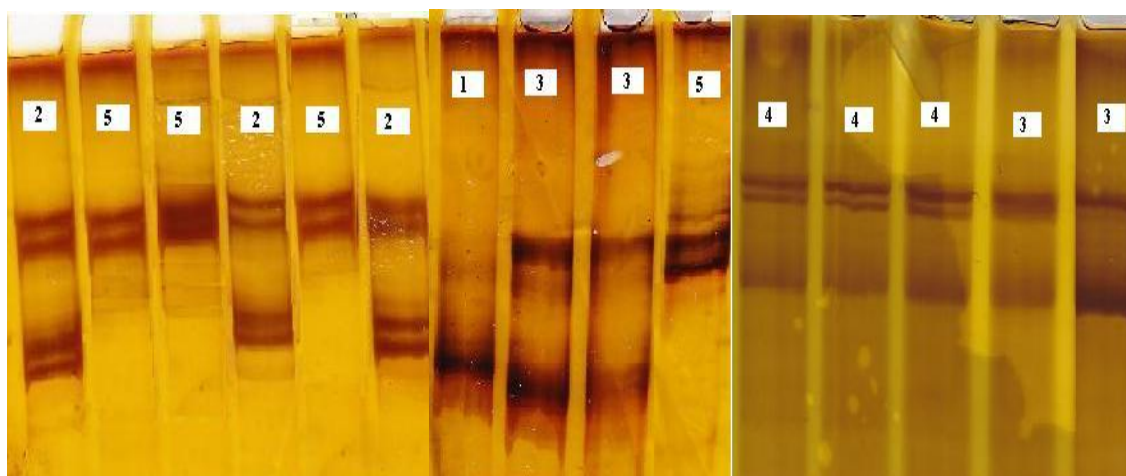
با تجزیه عکس‌های حاصل از الکتروفورز عمودی با استفاده از روش PCR-SSCP، ۵ فرم مختلف از الگوهای بانندی در جمعیت مورد مطالعه مشاهده شد. فراوانی الگوهای بانندی برای الگوهای ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ به ترتیب ۰/۳۱۴، ۰/۰۲۴، ۰/۲۸۹، ۰/۲۳۲ و ۰/۱۴۱ بود. نتایج این تحقیق نشان داد که الکتروفورز عمودی ژل اکریل‌آمید



شکل ۲- نمونه‌ای از الکتروفورز محصولات PCR



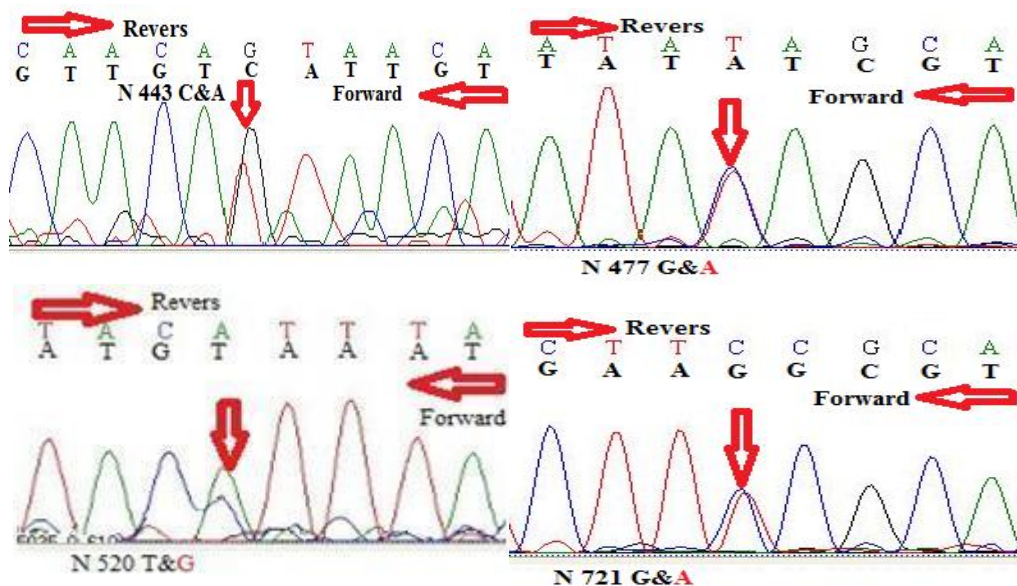
شکل ۱- نمونه‌ای از DNA استخراج شده



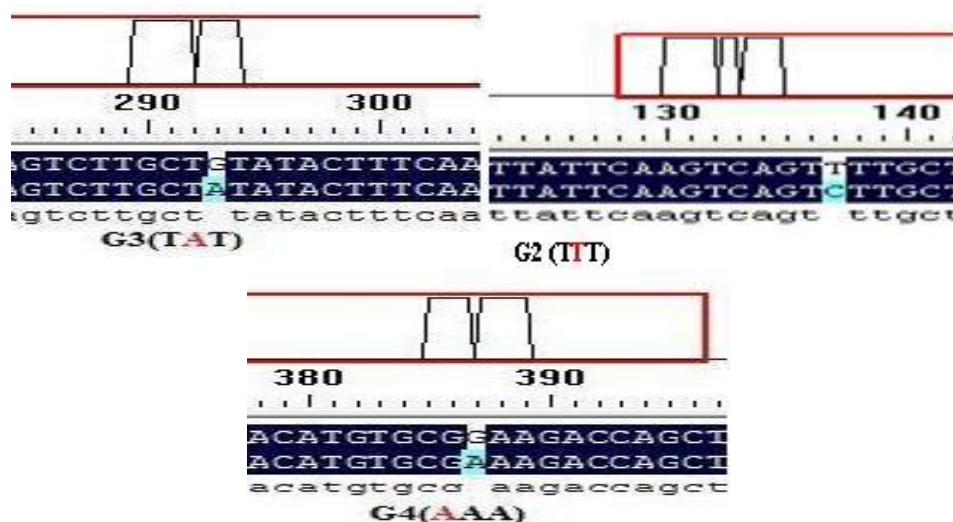
شکل ۳- الگوهای بانندی مشاهده شده حاصل از PCR-SSCP. اعداد روی ژل (از ۱ تا ۵) نشان دهنده شماره الگوهای بانندی هستند.

جهت تعیین صحت وجود جهش‌های تکنوکلوتیدی، گراف‌های حاصل از نتایج توالی‌یابی همه نمونه‌های این جایگاه به دقت مورد بررسی قرار گرفت.

همچنین SNP‌های موقعیت ۴۴۳ و ۵۲۰ فقط به صورت هتروزایگوت و SNP موقعیت ۴۷۱ فقط به صورت هموزایگوت مشاهده شدند. برای شناسایی هتروزایگوت‌های موجود در توالی‌ها و



شکل ۴- کروماتوگرام حاصل از نتایج توالی‌یابی برای SNP‌های هتروزایگوت شناسایی شده جایگاه نیمه اول اگزون ۲ ژن GDF9



شکل ۵- عکس‌های خروجی از نرم‌افزار DNAMAN برای هم‌ردیف کردن نتایج حاصل از توالی‌یابی و SNP‌های هموزایگوت شناسایی شده در نیمه اول اگزون ۲ ژن GDF9

جدول ۲- SNP‌های شناسایی شده در این مطالعه برای نیمه اول اگزون ۲ ژن GDF9 و مقایسه آن‌ها با SNP‌های گزارش شده توسط هانراهان و همکاران (۲۰۰۴)

۴۴۳	۴۷۱	۴۷۷	۵۲۰	۷۲۱	GDF9 موقعیت نوکلئوتید در توالی ژن
C/C	C/T	G/A	T/T	G/A	نوکلئوتید گزارش شده توسط هانراهان و همکاران
C/A	C/T	G/A	T/G	G/A	جهش‌های شناسایی شده در این مطالعه

SNP‌های موقعیت ۴۴۳ و ۵۲۰ در این مطالعه برای اولین بار مشاهده شده‌اند.

جدول ۳- هاپلوتایپ‌های شناسایی شده در جایگاه نیمه اول اگزون ۲ ژن GDF9

شماره هاپلوتایپ	شماره نوکلئوتید در توالی گزارش شده در NCBI				
	۴۴۳SNP	۴۷۱SNP	۴۷۷SNP	۵۲۰SNP	۷۲۱SNP
۱	C	C	G	T	G
۲	C	C	A	T	G
۳	C	C	A	T	A
۴	C	T	G	T	A
۵	C	T	G	G	A
۶	A	C	A	T	G
۷	A	C	G	T	G
۸	C	C	G	T	A

الگوی باندی مربوط به هر ژنوتیپ نیز در شکل ۳ آورده شده است.

نتایج ژنتیک جمعیت

پس از مشخص شدن ژنوتیپ‌های جایگاه ناحیه اول اگزون ۲ ژن GDF9، با توجه به در دسترس بودن تعداد حیوانات هر ژنوتیپ در جمعیت و تعداد کل افراد جمعیت، فراوانی ژنوتیپ‌ها در جمعیت مورد بررسی به روش شمارش مستقیم محاسبه شد (جدول ۵). نتایج آنالیز تعادل هاردی-واینبرگ برای همه SNP‌ها در جمعیت مورد بررسی در جدول ۶ آورده شده است.

جهش‌های شناسایی شده در این جایگاه با توالی هاپلوتایپ گزارش شده توسط هانراهان و همکاران (۲۰۰۴) در موقعیت جهش-های مربوطه در جدول ۲ آورده شده است. لازم به ذکر است که SNP‌های موقعیت ۴۴۳ و ۵۲۰ در این مطالعه برای اولین بار مشاهده شده‌اند. هاپلوتایپ‌های شناسایی شده جایگاه نیمه اول اگزون ۲ ژن GDF9 در جدول ۳ آورده شده است.

ژنوتیپ‌های شناسایی شده جایگاه نیمه اول اگزون ۲ ژن GDF9

در این مطالعه پنج ژنوتیپ متفاوت شناسایی شد که مربوط به هشت ترکیب هاپلوتایپی حاصل از پنج SNP مختلف در طول توالی جایگاه تکثیر شده از نیمه اول اگزون ۲ ژن GDF9 هستند. تصویر

جدول ۴- ژنوتیپ‌های شناسایی شده نیمه اول اگزون ۲ ژن GDF9 در این مطالعه

شماره ژنوتیپ (الگو)	شماره نوکلئوتید در توالی گزارش شده در NCBI				
	۴۴۳	۴۷۱	۴۷۷	۵۲۰	۷۲۱
۱	CC	CC	GG	TT	GG
۲	CA	CC	GA	TT	GG
۳	CC	CC	AA	TT	GG
۴	CC	CC	GA	TT	GA
۵	CC	TT	GG	TG	AA

ژنوتیپ‌های ۲ و ۵ در این مطالعه برای اولین بار مشاهده شده‌اند.

جدول ۵- تعداد و فراوانی ژنوتیپ‌های جایگاه نیمه اول اگزون ۲ ژن GDF9 در جمعیت‌های مورد مطالعه

ژنوتیپ	۱	۲	۳	۴	۵	کل
	تعداد فراوانی	۳۸	۳	۳۵	۲۸	۱۷
	۰/۳۱۵	۰/۰۲۴	۰/۲۸۹	۰/۲۳۲	۰/۱۴۰	۱

بررسی تعادل هاردی-واینبرگ برای SNP‌های شناسایی شده در جمعیت مورد بررسی

جدول ۶-آزمون کای اسکور برای هر SNP در جمعیت مورد مطالعه

سطح معنی داری	درجه آزادی	کای اسکور	SNPهای شناسایی شده
۰/۸۹۰	۱	۰/۰۱۹	SNP موقعیت ns۴۴۳
۰/۰۰۰	۱	۱۲۱/۰۰۰	SNP موقعیت ***۴۷۱
۰/۰۰۰	۱	۲۷/۰۹۵	SNP موقعیت ***۴۷۷
۰/۴۰۶	۱	۰/۶۹۱	SNP موقعیت ns۵۲۰
۰/۰۰۰	۱	۱۸/۶۷۲	SNP موقعیت ***۷۲۱

***: عدم وجود تعدل هاردی-واینبرگ در سطح معنی داری یک هزارم ($P < 0.001$): ns: وجود تعادل هاردی واینبرگ

نتایج تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مورد بررسی برای SNPهای نیمه اول اگزون ۲ ژن GDF9 با شاخص شانون در جدول ۷ آورده شده است.

جدول ۷- میانگین شاخص شانون در هر جمعیت برای پنج SNP مشاهده شده در نیمه اول اگزون ۲ ژن GDF9

SNPهای شناسایی شده	موقعیت ۴۴۳	موقعیت ۴۷۱	موقعیت ۴۷۷	موقعیت ۵۲۰	موقعیت ۷۲۱
	۰/۰۶۷	۰/۴۰۶	۰/۶۷۹	۰/۲۵۴	۰/۵۶۹

نرخ دو قلو زایی در این گوسفندان آمیخته باشد البته برای این جهش ارتباط معنی داری با صفات باروری در مطالعه هانراهان و همکاران (۸) گزارش نشده است.

شاخص شانون نشان دهنده میزان هتروزیگوسیتی جمعیت‌ها می‌باشد. از این شاخص برای بیان میزان تنوع زیستی استفاده می‌شود. شاخص شانون هر قدر بزرگتر باشد، میزان هتروزیگوسیتی بیشتر است. با توجه به نتایج مشاهده شده از شاخص شانون می‌توان بیان کرد که میزان هتروزیگوسیتی و تنوع ژن GDF9 در این جمعیت بالا است و این مطلب که دورگ‌گیری میزان هتروزیگوسیتی را افزایش می‌دهد با این نتایج اثبات شده است. SNPهای موقعیت ۴۴۳ و ۵۲۰ در تعادل هاردی-واینبرگ قرار داشتند، با توجه به آمیخته‌گری که انجام شده، می‌دانیم که مهاجرت ژنی رخ داده است اما جمعیت در این SNPها در تعادل است. احتمالاً عوامل دیگر بر هم زنده تعادل در کار بوده اند و عکس عامل بالا عمل نموده اند و باعث شده اند که تعادل بر هم نخورد. می‌توان گفت به دلیل اینکه تعداد افراد بعضی از ژنوتیپ‌ها خیلی کم بوده تعادل هاردی-واینبرگ در آنها تحت تأثیر قرار گرفته است. پس از تطبیق توالی نیمه اول اگزون ۲ ژن GDF9 در سایت NCBI برای بدست آوردن ORF آن برای شروع صحیح ترجمه این توالی به پروتئین، فرم +۱ برای این جایگاه بدست آمد. برای این توالی از پنج SNP مشاهده شده در جایگاه نیمه اول، سه SNP با تغییر اسید آمینه همراه بودند. SNP موقعیت نوکلئوتید ۴۴۳ منجر به تغییر اسید آمینه تره‌اونین (Thr) به آسپارژین (Asn)، SNP موقعیت نوکلئوتید ۵۲۰ منجر به تغییر اسید آمینه سیستئین (Cys) به گلوتامین (Glu) و SNP موقعیت نوکلئوتید ۷۲۱ منجر به تغییر اسید آمینه گلوتامین (Glu) به لیزین (Lys) می‌شود. همچنین SNP موقعیت نوکلئوتید ۴۷۱ برای اسید آمینه والین (Val) و SNP موقعیت

نیکول و همکاران (۱۴) در یک نژاد گوسفند در ایسلند بنام توکا وجود جهش‌های G3، G4، G5 و G6 را در این نژاد گزارش کردند که با نتایج این پژوهش مطابقت می‌کند. هانراهان و همکاران (۸) نشان دادند که جهش‌های موجود در ژن GDF9 تاثیر قابل توجهی بر نرخ تخم‌ریزی در گوسفندان زیادی دارد و جهش G8 را موثرترین جهش بر نرخ تخم‌ریزی نام بردند. مرادبنند و همکاران (۱۲) در پژوهشی بر روی گوسفندان نژاد بلوچی به روش PCR-RFLP نشان دادند که ژنوتیپ هتروزیگوت ژن GDF9 اثر معنی داری بر باروری دارد. همچنین نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر با نتایج رحیمی و همکاران (۱۶) که با روش SSCP اگزون ۲ ژن GDF9 در دو نژاد گوسفند بهمنی و لک قشقایی را مطالعه کرده بودند مطابقت دارد. آن‌ها در نژاد بهمنی سه الگوی متفاوت A، B و C را گزارش کردند و در نژاد لک قشقایی دو الگوی A و B را مشاهده نمودند. همچنین با نتایج بادبرین و همکاران (۱) که با روش RFLP برای ژن GDF9 در گوسفند نژاد قره‌گل سه الگوی AA، BB و AB مشاهده کردند و با سلیمانی و همکاران (۱۹) که در گوسفند سنجابی در ناحیه کدکنده ژن GDF9 جهش مشاهده کردند مطابقت دارد. بهمنی و همکاران (۲) در ژن GDF9 روی گوسفند قره‌گل با روش PCR-SSCP چهار الگوی باندی مختلف مشاهده کردند که با این تحقیق مطابقت دارد. اقبال سعید و همکاران (۷) در پژوهشی بر روی گوسفندان افشاری مشاهده کردند که جهش G4 در گوسفندانی که میزان تخم‌ریزی بالاتری نسبت به بقیه داشتند رخ داده که نشان می‌دهد این جهش می‌تواند یکی از دلایل افزایش میزان تخم‌ریزی در برخی گوسفندان باشد. با توجه به شناسایی جهش‌های G2، G3 و G4 در توالی یابی این پژوهش و نتایج حاصل از پژوهش‌های قبلی (۷) این نتیجه حاصل می‌شود که جهش G4 می‌تواند یکی از عوامل موثر بر

تعیین می‌کند و صفات ممکن است همبستگی ژنتیکی منفی نیز داشته باشند. با کشف و وارد نمودن این ژن‌ها و برنامه‌ریزی برای تکثیر و تثبیت جهش‌های اتفاق افتاده مرتبط با ژن‌های باروری می‌توان کمک قابل توجهی به افزایش تولید و حفظ ذخایر ملی و درآمد دامداران کشور انجام داد. همچنین با توجه به اینکه تلقیح مصنوعی در ایران نسبت به برخی کشورها مدت زمان کمتری استفاده شده است تنوع ژنتیکی در گوسفندان ایران بالا است، اما به علت افزایش روند هم‌خونی، بخصوص در سالهای اخیر و ورود اسپرم‌های روز دنیا به کشور سرعت کاهش تنوع ژنتیکی بالا رفته است. بنابراین، بایستی نسبت به کنترل آن و ارائه روش‌های مناسب تلاقی بررسی و پیشنهادات لازم ارائه گردد. همچنین استفاده از نشانگرهای ملکولی به منظور شناسایی فنوتیپ‌ها و ژنوتیپ‌های جدید می‌تواند کمک زیادی در شناسایی و معرفی نژادهای برتر ایفا کند، بنابراین اجرای کامل و دقیق اینگونه پژوهش‌ها کمک زیادی به برنامه‌های اصلاحی در مجامع علمی جهان خواهد نمود.

۴۷۷ برای اسید آمینه لوسین (Leu) بدون تغییر اسید آمینه همراه بود. از آنجایی که محیط بر علیه ژن‌های باروری عمل می‌کند، بنابراین بایستی محیطی مناسب را برای بهبود تولید مثل و وضعیت باروری گوسفندان فراهم آورد. با توجه به اینکه این ژن از خانواده فاکتورهای رشد نیز است می‌توان جهش‌های این ژن را موثر بر صفت رشد خواند. لذا، در صورت ارتباط این جهش‌ها با صفت رشد می‌توان از آن برای کارهای اصلاح نژاد مربوط به رشد گوسفندان نیز بهره برد. در سیستم آمیزشی دورگ‌گیری اغلب امکان حصول ایجاد پیشرفت در یک نسل، نیاز به گزینش در نسل‌های مختلف دارد. بنابراین، پرورش-دهندگان این گوسفندان آمیخته رومانوف و کرمانی باید نسل‌ها انتخاب انجام بدهند تا به طور اساسی صفت چند قلو زایی در گله‌شان افزایش یابد. همچنین آنها باید در برنامه دورگ‌گیری از ماده‌های دورگ برای جایگزینی استفاده کنند تا از مزیت‌های هر نوع هتروزیس مرتبط با تولید مثل، بقاء و قابلیت مادری فراهم آید. البته باید توجه کرد که با گزینش برای یک صفت سایر صفات اقتصادی فراموش نشوند، چرا که معمولاً بیش از یک صفت ارزش اقتصادی کل دام را

منابع

- 1- Badbarin, N., S.Z.A. Mirhoseini., A. Bahmani., and R. seidsharifi. 2013. Study polymorphism the Growth Differentiation Factor 9(GDF9) gene and correlation it with weight quality in gharehghol sheep. Animal and birds congress,north Iran,1073-1076. (In Persian)
- 2- Bahmani, A., S.Z.A. Mirhoseini., B. Dliisafat., z.Ansari. 2010. Study polymorphism the Growth Differentiation Factor 9 (GDF9) gene in gharehgholsheep using PCR-SSCP. In: Proceedings of 4th Animal science congress,Iran3590-3593. (InPersian)
- 3- Barker, J. S. F. 2001. Conservation and management of genetic diversity: a domestic animal perspective .Canadian Journal of Forest Research. 31:588-595.
- 4- Barzegari, A., S. Atashpaz., K. Ghabili., Z. Nemati., M. Rustaei., and R. Azarbaijani. 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.
- 5- Chu, M. X., G.H. Cheng., L. Chen, Fang., and S.C. Ye. 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.
- 6- Dong, J., D.F. Altertini, K. Nishimori, T. Rajendra Kumar, N. Lu and M.M. Matzuk. 1996. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. Nature Genetics, 383:531-535.
- 7- Eghbalsaid, S.h., K. Ghaedi., S. Shahmoradi., A. Pirestani., T. saeidi., H. Amini., L. Nicol., and A. McNielly. 2012. Presence of SNPs in GDF9 mRNA of Iranian Afshari sheep. International Journal fertilization Sterility. 5: 225-230.
- 8- Hanrahan, J.P., S.M. Gregan., P. Mulsant., M. Mullen., G.H. Davis., R. Powell., and S.M. Galloway. 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 (Ovaries). Biology of Reproduction. 70: 900-909.
- 9- Juengel, J.L., N.L.Hudson., L. Whiting., and K.P. McNatty. 2004. Effects of immunization against bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 on pregnancy in Ewes. Biology of Reproduction. 70: 557-561.
- 10- Luis, V., P. Ricardo., M.T. Tejedor., L. Adolfo., and S. Isidro. 2009. A 17 bp deletion in the BoneMorphogenetic Protein 15 (BMP15) gene is associated to increased prolificacy in the Rasa Arago-nesa sheep breed. Animal Reproduction Science. 110: 139-146.
- 11- Mishra, A.K., A.L. Arora, S. Kumar, L.L.Prince. 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.
- 12- Moradband, F., G. Rahimi., and M. Gholizadeh. 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.
- 13- Msoffe, P.L.M., M.M.A. Mtambo., U.M. Minga., H.R. Juul-Madsen., P.S. Gwakisa. 2005. Genetic structure among the local chicken ecotypes of Tanzania based on microsatellite DNA typing. *African Journal of biotechnology*. 4: 768-771.
 - 14- Nicol, L., S.C. Bishop., R. Pong-Wong., C.h. Bendixen., L.E. Holm., S.M. Rhind., and A.S. McNeilly. 2009. Homozygosity for a single base-pair mutation in the oocytespecific GDF9 gene results in sterility in Thoka sheep. *Science Reproduction Fertilization*. 138:921–933.
 - 15- Otsuka, F., Z. Yao., T.H. Lee., S. Yamamoto., G.F. Erickson., and S. Shimasaki. 2000 Bone morphogenetic Protein-15. Identification of target cells and biological functions. *Journal Biology Chemistry*. 50: 39523–39528.
 - 16- Rahimi, A., M. mohagheghdolatabadi. 2013. Identification of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in exon 2 the Growth Differentiation Factor 9 (GDF9) gene in Bahmani and ghashghai sheep. *Animal and birds congress, north Iran*,1454-1458. (In Persian)
 - 17- Rajaei, M.A. 2005. Study of Genetic diversity for Japan quail population using microsatellite Markers.MSc Thesis of Animal science.Faculty of Agriculture. Tarbiat Modares University.
 - 18- Sadighi, M., K.J. Bodensteiner., A.E. Beattie., and S.M. Galloway. 2002 Genetic mapping of ovine growth differentiation factor 9 (GDF9) to sheep chromosome 5. *Animal Genetics*. 33: 244–245.
 - 19- Soleimani, B and G.h. Rahimi. 2010.Studyof effect GDF9 gene in litter size and weight quality in sheep sanjabi. *Modern Genetics Journal*. 5:53-59 (In Persian)
 - 20- Yazdi, M. H., Engstom., G., Nasholm., A. Jonansson., K., Jorjani., H. and Liljedahl. L. E. 1997. Genetic parameters for lamb weight at different age and wool productioninBaluchi sheep. *Journal of Animal science*. 65(2): 247- 255.