ژنتیک نوین
دوره دهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۴
صفحه ۲۶۶-۲۵۹

شناسایی جهش‌های نقطه‌ای G—›A در موقعیت‌های ۴۷۷ و ۷۲۱ اگزون شماره دو ژن *GDF9* گوسفند نژاد کرمانی

Identify of G—›A point mutation at positions 477 and 721 in exon 2 of *GDF9* gene in Kermani sheep

رسول خدابخش‌زاده[۱]، محمدرضا محمدآبادی*[۱]، حسین مرادی شهربابک[۲]، علی اسمعیلی‌زاده کشکوئیه[۱]، سپیده انصاری نمین[۱]

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیاران، دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه شهید باهنر کرمان
۲- استادیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج ، دانشگاه تهران.

Khodabakhshzadeh R[1], Mohammadabadi MR*[1], Moradi Shahrebabak H[2], Esmailizadeh Koshkoieh A[1], Ansari Namin S[1]

1. MSc Student, Associate Professors, MSc Student, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
2. Assistant Professor, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:mmohammadabadi@yahoo.ca

(تاریخ دریافت: ۹۳/۳/۱۷- تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۱۵)

چکیده

از جمله مهم‌ترین عوامل مؤثر بر چندقلوزایی گوسفندان ژن‌های خانواده *TGFβ* می‌باشد. ژن فاکتور رشد و تمایز شماره ۹ (*GDF9*) از اعضای مهم این فوق خانواده می‌باشد. هدف از انجام این تحقیق شناسایی جهش‌های G2، G3 و G4 موجود در اگزون شماره دو ژن *GDF9* در گوسفند نژاد کرمانی با استفاده از روش PCR-SSCP بود. به این منظور، از سیاهرگ وداج تعداد ۱۰۲ رأس گوسفند نژاد کرمانی خونگیری شد. پس از استخراج DNA به روش نمکی، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر قطعه ۶۳۴ جفت بازی توسط آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای این اگزون انجام شد. پس از تعیین شکل فضایی تک رشته‌ای محصولات PCR، الگوهای باندی مربوط به ژن *GDF9* روی ژل پلی آکریل‌آمید و رنگ آمیزی با نیترات نقره، به دست آمد. در نمونه مورد مطالعه، سه الگوی باندی مختلف ۱، ۲ و ۳ به ترتیب با فراوانی ۰/۱۸۷، ۰/۳۳۳ و ۰/۴۸ بدست آمد. همچنین نتایج توالی‌یابی نشان داد که دو جهش در موقعیت‌های ۴۷۷ و ۷۲۱ (G3 و G4) در این گوسفندان وجود دارد و جهش موقعیت ۴۷۱ (G2) در این توالی‌یابی مشاهده نشد.

واژه‌های کلیدی

چند قلوزایی
چندشکلی
ژن *GDF9*
PCR-SSCP

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-04]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.12.0]

مقدمه

حدود یک قرن است که اصلاح نژاد نوین بر اساس اصول ژنتیکی مشخصی طراحی شده که دنباله کار چندین هزار ساله اهلی کردن حیوانات است، که حاصل انتخاب طبیعی و مصنوعی می‌باشد. امروزه اصلاح نژاد در حیوانات مزرعه‌ای به منظور بهبود بازده اقتصادی حیوانات با استفاده از نژادهای تجاری موجود انجام می شود. در سال‌های اخیر بهبود صفات تولیدمثلی در گوسفند توسط تولیدکنندگان مورد توجه زیادی قرار گرفته است. از جمله این صفات تعداد نتاج در هر زایش است که سودمندی مزارع پرورش گوسفند به طور عمده‌ای تحت‌تاثیر تعداد فرزندان قرار می‌گیرد. علاوه بر دامپروران، متخصصین اصلاح نژاد نیز استفاده از حیوانات چندقلوزا را نسبت به حیوانات تک‌قلوزا ترجیح می‌دهند. همچنین امکان تکثیر ژن خارجی هدف در حیوانات تراریخته چندقلوزا نسبت به تک‌قلوزاها زیادتر بوده و به همین دلیل استفاده از حیوانات چندقلوزا به خصوص دام‌های اهلی مورد توجه متخصصین اصلاح نژاد است (Eghbalsaied et al. 2012). اگرچه صفت تولید مثل از جمله صفات کمی و از نظر توارث پلی‌ژنیک می‌باشد، اما در سال‌های اخیر نشان داده شده که کنترل تولید مثل در گوسفند توسط ژن‌های با اثرات عمده نیز صورت می‌گیرد، از این رو کشف ژن‌های با اثرات عمده بر میزان تخمک‌ریزی و در نتیجه تعداد بره در هر زایش، توجه بسیاری از متخصصین اصلاح نژاد در دام را به خود جلب کرده است. سه ژن مرتبط با باروری در گوسفند شناسایی شده که عبارتند از *BMPR1-B* یا بورولا که روی کروموزوم شماره ۶ قرار دارد و تحت عنوان FecB نام گذاری می‌شود (Otsuka et al. 2000; Luis et al. 2009)؛ ژن *GDF9* مستقر در کروموزوم شماره ۵ که نام دیگر آن *FecG* می باشد (Sadighi et al. 2002) و ژن *BMP15* که روی کروموزوم X قرار دارد و نام دیگر آن *FecX* می‌باشد (Dong et al. 1996; Chu et al. 2005). فاکتور متمایزکننده رشد و تمایز شماره ۹ (GDF-9) و پروتئین مورفوژنتیک استخوانی (BMP-15) در گوسفند، دو عضو از خانواده بزرگ فاکتور رشد تبدیل کننده (TGFβ) هستند. این فاکتورهای رشد اووسیتی برای پیشرفت مراحل اولیه فولیکول سازی و سپس در تکامل پایانی فولیکول بسیار حیاتی هستند (Dong et al. 1996; Galloway et al. 2000). به علاوه، یافته‌های اخیر در گوسفند، انسان و جوندگان نشان داده که ژن‌های *BMP-15* و *GDF9* می‌توانند به عنوان اهداف جدید برای تنظیم باروری در پستانداران مورد توجه قرار گیرند (McNatty et al. 2005). میزان تاثیر ژن *GDF9* بر افزایش میزان تخمک‌گذاری و باروری بیشتر از تاثیر ژن *BMP15* می‌باشد، همچنین اثر آلل‌های جهش-یافته در هر دوی ژن‌های *BMP15* و *GDF9* به صورت افزایشی بوده که باعث افزایش میزان تخمک‌گذاری به ترتیب برابر با ۴۴ درصد و ۹۰ درصد می‌شوند (Davis 2004). ژن *GDF9* با ۲/۵ کیلوباز شامل دو اگزون و یک اینترون می‌باشد. اگزون یک شامل۳۹۷ جفت باز است که اسیدهای آمینه یک تا ۱۳۴ را کد می‌کند. اگزون دو شامل ۹۶۸ جفت باز که اسیدهای آمینه ۱۳۵ تا ۴۵۶ را کد می‌کند و اینترون آن شامل ۱۱۲۶ جفت باز می‌باشد. پروتئین اولیه آن دارای ۴۵۳ اسیدآمینه است، در صورتی که پروتئین بالغ آن شامل ۱۳۵ اسیدآمینه می‌باشد. ژن *GDF9* دارای ۸ جهش می‌باشد که از ۳ جهش مورد مطالعه در این تحقیق جهش‌های G2 در موقعیت ۴۷۱ و G3 در موقعیت ۴۷۷ دارای تغییرات نوکلئوتیدی هستند که تاثیری در تغییر اسید آمینه ندارند، اما جهش G4 در موقعیت ۷۲۱ منجر به تغییر اسید آمینه‌ای (تغییر گلوتامیک‌اسید به لیزین) می‌شود (Hanrahan et al. 2004). این ژن روی کروموزوم ۵ گوسفند مکان‌یابی شده است (Sadighi et al. 2002). در میان ۸ جهش کشف شده تا سال ۲۰۰۴ جهش G8 با میزان باروری در ارتباط بوده اما (Hanrahan et al. (2004 با روش PCR-SSCP چندشکلی‌های موجود در ژن‌های *BMP15* و *GDF9* و ارتباط آنها را با افزایش نرخ تخمک‌ریزی در نژادهای بلکلیر و کمبریج بررسی کردند. آنها جهش‌های جدیدی را در این دو ژن کشف کردند و بیان کردند که این جهش‌ها در حالت هتروزیگوت با افزایش نرخ تخمک‌ریزی همراه هستند و در حالت هموزیگوت، فنوتیپ عقیمی را نشان می‌دهند و همچنین بیان کردند که تاثیر این جهش‌ها روی باروری با افزایش شکم زایش به صورت افزایشی است (Hanrahan et al. 2004). محققین با بررسی ژن‌های *GDF9* و *BMP15* در دو نژاد یونانی کاراگونیک و چویس ارتباط معنی‌دار زیادی بین جهش‌های G1 وG8 با باروری در نژاد چویس مشاهده کردند اما آنها در این مطالعه ارتباط معنی‌داری بین پلی‌مورفیسم مشاهده شده با

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-04]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.12.0]

چندقلوزایی در نژاد کاراگونیک مشاهده نکردند. همچنین محققین نشان دادند که دو ژن مذکور به عنوان نشانگرهای مناسب در افزایش نسبت اوولاسیون در میش‌ها محسوب می‌شوند (Juengel et al. 2004). با توجه با این که تاکنون این جهش‌ها در نژادهای ایرانی، به ویژه نژاد کرمانی مورد مطالعه قرار نگرفته‌اند، لذا هدف این پژوهش بررسی چند شکلی آللی برای جهش‌های G2،G3،G4 موجود در اگزون شماره ۲ ژن *GDF9* در گوسفندان نژاد کرمانی با استفاده از روش PCR-SSCP و توالی‌یابی آنها بود.

مواد و روش‌ها

برای انجام این تحقیق از تعداد ۱۰۲ رأس گوسفند نژاد کرمانی که در دو منطقه از استان کرمان (حوالی شهر کرمان و مزرعه دانشگاه شهید باهنر) پرورش داده می‌شدند، استفاده شد. 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 منتقل شد و سپس در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج DNA

استخراج DNA از ۵۰۰ میکرولیتر 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 درصد استفاده شد.

تکثیر ژن *GDF9* با استفاده از PCR

با توجه به ژن و ناحیه مورد نظر، ابتدا توالی ژن و mRNA آن از ژنوم گوسفندان مختلف در بانک اطلاعاتی مرکز ملی اطلاعات زیست فناوری ایالات متحده (NCBI)[1] با شماره دستیابی *AF078545* استحصال شد.

آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر قطعه‌ای به طول ۶۳۴ جفت باز از اگزون شماره دو ژن *GDF9* گوسفند با استفاده از سایت‌های primer 3plus و oligo Analyzer وoligo calculator طراحی شد. توالی آغازگرها در این مطالعه شامل توالی رفت F: 5'-GATTCCTTGATTTGACTTCCTGTT-3' و توالی برگشت R: 5'-TGGCACTCTCCTGGTCTCTG-3' بود. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل دو میکرولیتر از DNA، ۱۶/۷ میکرولیتر آب، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمراز، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشتی، ۰/۵ میکرولیتر از dNTP، ۲/۵ میکرولیتر از PCR buffer و یک میکرولیتر از $MgCl_2$ با برنامه حرارتی زیر به تعداد ۳۳ چرخه در دستگاه ترموسایکلر CLEMENS مدل 22501-02V 00096 ساخت کشور آلمان انجام شد. به‌منظور 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. برنامه حرارتی به صورت تجربی بهینه‌سازی شد و شامل ۱) ۵ دقیقه دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به منظور واسرشت سازی اولیه DNA؛ ۲) انجام سه مرحله 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 و ۴) ۸ دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد با یک چرخه تکرار برای بسط نهایی.

جهت ارزیابی محصولات PCR از روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز با غلظت یک درصد استفاده شد.

جهت الکتروفورز محصولاتSSCP از سیستم الکتروفورز عمودی دارای سیستم خنک کننده با آب استفاده شد. جهت انجام SSCP، از محلول اکریل‌آمید ۳۸/۵ درصد استفاده شد که در آن نسبت اکریل‌آمید به بیس اکریل‌آمید ۳۷/۵ به یک بود. مقدار ۱۰-۷ میکرولیتر از بافر بارگذاری با محصولات PCR مخلوط و بعد از گذشت ۵ دقیقه مقدار ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه با استفاده از الکتروفورز عمودی روی ژل اکریل‌آمید ۸ درصد بارگذاری و الکتروفورز شدند. جهت تهیه ۲۰ میلی‌لیتر بافر بارگذاری، ۰/۰۱ گرم برموفنل بلو و زایلن سیانول و ۱۹ میلی‌لیتر فورمالید استفاده شد که با محلول سود سه درصد به حجم رسانده شد (Sohrabi

[1] National center for biotechnology information

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.12.0]

(2011. برای مشاهده الگوهای باندی از رنگ‌آمیزی نیترات نقره استفاده شد (Bassam et al. 1991).

توالی‌یابی محصولات PCR

در این مطالعه بر اساس الگوهای باندی متفاوت، از هر الگو یک نمونه انتخاب و از محصولات PCR به صورت مستقیم برای توالی‌یابی ارسال شد.

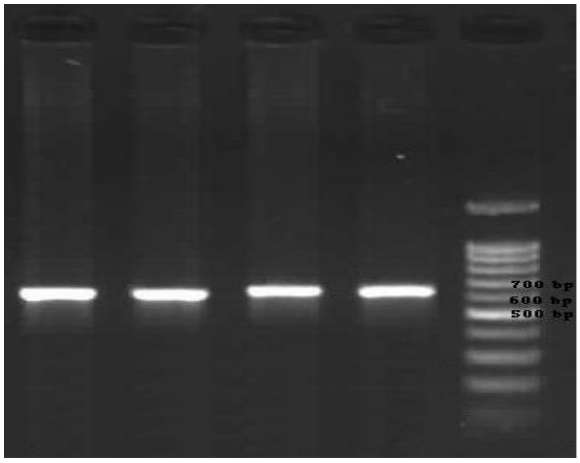
پس از دریافت نتایج توالی‌یابی و شناسایی و اعمال جهش‌ها در توالی هر هاپلوتایپ با استفاده از کدهای نوکلئوتیدی پیشنهادی IUPAC[1]، توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار DNAMAN و Bioedit 7.0 جهت تعیین جهش‌های تک‌نوکلئوتیدی به همراه توالی‌های گزارش شده در NCBI هم‌تراز شده و مقایسه شدند. با بررسی و ارتباط شکل الگوهای باندی در ژل اکریل‌آمید و سپس مراجعه به توالی ژنوتیپ‌های مشاهده شده، توالی هاپلوتایپ‌های تشکیل دهنده هر ژنوتیپ با استفاده از نرم‌افزار R پیش‌بینی شد.

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

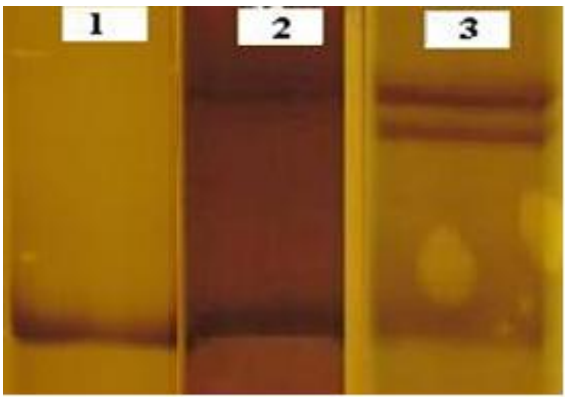
نتایج و بحث

پژوهش‌های ژنتیک مولکولی با هدف خاص در صورتی موفق خواهند بود که آغازگر خوب و با کیفیت طراحی شود. بنابراین صرف وقت و دقت در انتخاب و طراحی آغازگر کیفیت کار مولکولی را افزایش می‌دهد. الکتروفورز محصولات تکثیر شده روی ژل آگارز یک درصد، 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. در این مطالعه نشانگر مولکولی مورد استفاده ۱۰۰ جفت بازی و متعلق به شرکت سینا کلون بود. نتیجه الکتروفورز DNA استخراج شده و قطعه ۶۳۴ جفت بازی تکثیر شده از ژن *GDF9* در شکل ۱ نشان داده شده است.

با تجزیه عکس‌های حاصل از الکتروفورز عمودی با استفاده از روش PCR-SSCP، سه فرم مختلف از الگوهای باندی در جمعیت مورد مطالعه مشاهده شد که فراوانی الگوهای باندی برای



شکل۱- نمونه‌ای از الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز یک درصد. نشانگر اندازه M100 (شرکت سینا ژن، ایران).



شکل۲ – الگوهای باندی مشاهده شده حاصل از PCR-SSCP روی ژل پلی اکریل‌آمید

الگوهای ۱، ۲ و ۳ به ترتیب ۰/۱۸۷، ۰/۳۳۳و ۰/۴۸۰ بدست آمد (شکل۲).

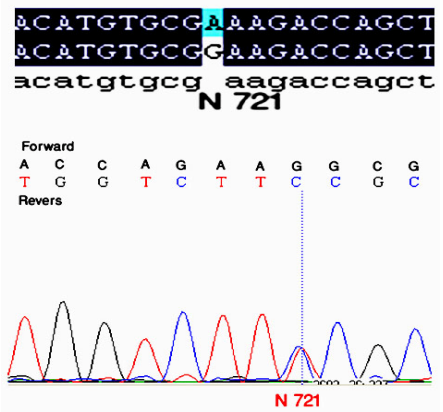
نتایج توالی‌یابی نشان داد که دو جهش G3 و G4 در این گوسفندان وجود دارند (شکل های ۳ و۴)، ولی جهش G2 در این توالی‌یابی مشاهده نشد. هاپلوتایپ‌های شناسایی شده این جایگاه در اگزون دو ژن *GDF9* در جدول ۱ آورده شده است.

جدول۱- هاپلوتایپ‌های شناسایی شده در جایگاه نیمه اول اگزون شماره دو ژن *GDF9*

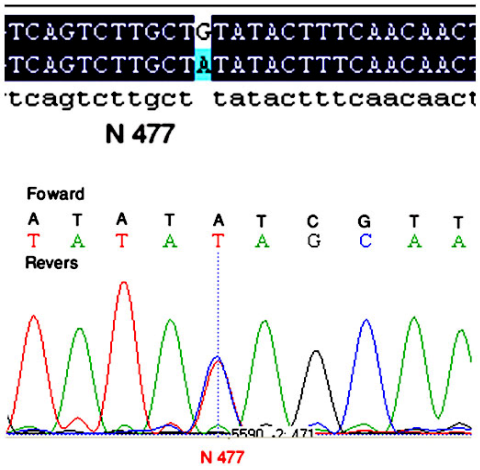
شماره نوکلئوتید در توالی گزارش شده در NCBI		
شماره هاپلوتایپ	۴۷۷SNP	۷۲۱SNP
۱	G	G
۲	A	G
۳	G	A

[1] International union of pure and applied chemistry

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.12.0]



شکل ۳- قسمتی از توالی نوکلئوتیدی خروجی نرم‌افزار DNAMAN و 7.0 Bioedit برای جهش G4



شکل۴- قسمتی از توالی نوکلئوتیدی خروجی نرم افزار DNAMAN و 7.0 Bioedit برای جهش G3

در این مطالعه سه ژنوتیپ متفاوت شناسایی شد که مربوط به سه ترکیب هاپلوتایپی حاصل از دو SNP مختلف در طول توالی جایگاه تکثیر شده از اگزون شماره دو ژن *GDF9* هستند (جدول ۲). تصویر الگوی باندی مربوط به هر ژنوتیپ نیز در شکل ۲ آورده شده است.

جدول۲- ژنوتیپ‌های شناسایی شده جایگاه موردنظر در جمعیت مورد مطالعه

شماره نوکلئوتید در توالی گزارش شده در NCBI		
شماره ژنوتیپ	۴۷۷	۷۲۱
۱	GG	GG
۲	AA	GG
۳	GA	GA

همان طور که ذکر شد در این مطالعه پنج SNP برای جایگاه نیمه اول اگزون شماره دو ژن *GDF9* شناسایی شد که همگی دو حالتی بودند. بنابراین هر SNP دو آلل و سه ژنوتیپ خواهد داشت که با توجه به مشخص شدن توالی هاپلوتایپ‌ها و SNPهای موجود در هر هاپلوتایپ و تعداد افراد دارای هر هاپلوتایپ و تعداد کل افراد جمعیت‌های مورد مطالعه، فراوانی آلل‌ها و ژنوتیپ‌های مربوط به هر SNP در هرجمعیت و در کل جمعیت‌ها با استفاده از نرم‌افزار GenAlex محاسبه شد (جدول۳) پس از تعیین ژنوتیپ‌های این جایگاه از اگزون شماره دو 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 ۴).

تعادل هاردی- واینبرگ برای همه SNPها در جمعیت مورد بررسی با آزمون کای‌اسکور و با استفاده از نرم‌افزار GenAlex 6.41 مورد بررسی قرار گرفت که در جدول ۵ آورده شده است.

جدول۳- فراوانی آلل‌ها و ژنوتیپ‌های SNPهای موقعیت ۴۷۷ و ۷۲۱ جایگاه ژن *GDF9* در جمعیت مورد مطالعه

SNP	فراوانی آللی		فراوانی ژنوتیپی		
۴۷۷	**G**	A	GG	GA	AA
	۰/۴۲۶	۰/۵۷۴	۰/۱۸۶	۰/۴۸۲	۰/۳۳۲
۷۲۱	**G**	A	GG	GA	AA
	۰/۷۶	۰/۲۴	۰/۵۱۹	۰/۴۸۱	۰/۰

جدول ۴- تعداد و فراوانی ژنوتیپ‌های شناسایی شده این جایگاه از اگزون شماره دو ژن *GDF9*

ژنوتیپ	۱	۲	۳	کل
تعداد	۱۹	۳۴	۴۹	۱۰۲
فراوانی	۰/۱۸۷	۰/۳۳۳	۰/۴۸۰	۱

جدول ۵- آزمون کای‌اسکور برای هر SNP در جمعیت مورد مطالعه

SNPهای شناسایی شده	کای‌اسکور	درجه آزادی	سطح معنی‌داری
موقعیت ۴۷۷ ns	۰/۰۳۳	۱	۰/۸۵۶
موقعیت ۷۲۱ **	۱۰/۱۹۴	۱	۰/۰۰۱

** تفاوت در سطح یک صدم (P <۰/۰۱) معنی‌دار است یعنی عدم وجود تعادل هاردی-واینبرگ؛ ns تفاوت معنی دار نیست و تعادل هاردی واینبرگ وجود دارد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.12.0]

تنوع ژنتیکی جمعیت مورد بررسی برای SNPهای شناسایی شده با شاخص شانون و نرم‌افزار GenAlex 6.41 بررسی شد. نتایج در جدول ۶ آورده شده است.

جدول ۶- میانگین شاخص شانون در جمعیت برای دو SNP مشاهده شده در این جایگاه از اگزون شماره دو ژن *GDF9*

SNPهای شناسایی شده	موقعیت ۴۷۷	موقعیت ۷۲۱
میانگین شاخص شانون	۰/۶۸۲	۰/۵۵۱

ژن *GDF9* از جمله ژن‌های کاندیدای موثر بر صفت چند قلوزایی گوسفند می‌باشد به همین دلیل اثر آن بر باروری گوسفندان کرمانی مورد بررسی قرار گرفت. شارپ بودن باندهای حاصل از الکتروفورز نمونه DNAهای استخراج شده روی ژل آگارز ۰/۸ درصد، به علت غلظت و خلوص بالای DNA استخراجی بود. مشاهده تنها یک باند ۶۳۴ جفت‌بازی برای محصولات PCR، نشان‌دهنده تکثیر درست قطعه انتخاب شده از اگزون شماره دو ژن *GDF9* و صحت انجام PCR بود. عدم وجود اسمیر و شارپ بودن باندها نشان دهنده عدم وجود آلودگی‌های پروتئینی و نمکی بود و مشاهده تنها یک باند، عدم وجود باندهای کاذب را مورد تأیید قرار داد. وجود یک نوار مشخص بر روی آگارز 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.

مقصود از تواتر یک ژن یا ژنوتیپ بخصوص، فراوانی نسبی آنها در جمعیت بوده و در حقیقت احتمال وقوع آنها را تعیین می‌کند. سه نوع ژنوتیپ یک، دو و سه در جمعیت مورد مطالعه مشاهده شدند که در رابطه با ژنوتیپ‌ها بیشترین و کمترین فراوانی‌ها به ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های سه و یک بود.

الگوهای باندی تشکیل شده در ژل اکریل‌آمید برای این جایگاه (شکل۲) نشان داد که برخی الگوها، هتروزایگوت دو الگوی دیگر هستند. به عنوان مثال، در شکل ۲ الگوی سه باندهای هر دو الگوی یک و دو را دارد که این نشان می‌دهد این الگو بایستی هتروزایگوت دو الگوی یک و دو باشد که وقتی به توالی ژنوتیپی این الگوها مراجعه شد (جدول۲) این فرض به اثبات رسید به طوری که در موقعیت نوکلئوتید ۴۷۷ حیوانات دارای الگوی یک ژنوتیپ هموزایگوت GG، حیوانات دارای الگوی دو ژنوتیپ هموزایگوت AA و حیوانات دارای الگوی سه ژنوتیپ هتروزایگوت GA را دارند. همچنین در موقعیت نوکلئوتید ۷۲۱ حیوانات دارای الگوی یک و دو ژنوتیپ هموزایگوت GG و حیوانات دارای الگوی سه ژنوتیپ هتروزایگوت GA را دارند. حال در جدول ۱ مشاهده می‌شود که هاپلوتایپ شماره یک، همانگونه که حدس زده می‌شد در هر دو نقطه جهش شناسایی شده هموزایگوت است (هموزایگوت برای هاپلوتایپ CTGTAT….CGGAA)، همچنین ژنوتیپ دو در موقعیت ۴۷۷ هموزایگوت برای آلل جهش‌یافته و در موقعیت ۷۲۱ هموزایگوت برای آلل وحشی است (هموزایگوت برای هاپلوتایپ CTATAT….CGGAA). ژنوتیپ سه در هر دو موقعیت، همانگونه که حدس زده می‌شد هتروزایگوت هاپلوتایپ یک و دو با هاپلوتایپ CTATAT….CGAAA است. بنابراین الگوی شماره سه در هر دو موقعیت جهش هتروزایگوت بوده و الگوی یک و دو هموزایگوت برای هاپلوتایپ تشکیل دهنده الگوی سه می‌باشند.

با وجود اینکه جهش G4 (تغییرگلوتامیک اسید به لیزین) در اسیدآمینه ۲۴۱ پروتئین نابالغ رخ می‌دهد و در پپتید بالغ وجود ندارد، اما محققین نشان دادند که این جهش تاثیر قابل‌توجهی بر نرخ تخمک‌ریزی در گوسفندان زیادی دارد (Hanrahan et al. 2004). در پژوهشی دیگر برای بررسی وجود جهش در mRNA ژن *GDF9* در میش‌های نژاد افشاری، محققین نشان دادند که سه جهش G2، G3 و G4 در بیش از ۱۲ میش وجود دارد. 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 (Eghbalsaied et al. 2012).

نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر با نتایج محققینی که با روش SSCP اگزون شماره دو ژن *GDF9* در دو نژاد گوسفند بهمئی و لک قشقایی را مطالعه کردند مطابقت داشت. در نژاد بهمئی سه الگوی متفاوت A، B و C و در نژاد لک قشقایی دو الگوی A و B را مشاهده شد (Rahimi et al. 2013). در پژوهشی بر روی گوسفندان نژاد بلوچی به روش PCR-RFLP محققین نشان دادند

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.12.0]

که ژنوتیپ هتروزیگوت ژن *GDF9* اثر معنی‌داری بر باروری دارد (Moradband et al. 2011). نتایج این پژوهش به خوبی نشان داد که چندشکلی ژنتیکی در جایگاه ژنی *GDF9* در گوسفند نژاد کرمانی وجود دارد که با نتایج Chu et al. (2004) و همچنین با نتایج محققین دیگری که با روش RFLP برای ژن *GDF9* در گوسفند نژاد قره گل سه الگوی AA، BB و AB مشاهده کردند (Badbarin et al. 2013) و با نتایج محققان دیگری که در گوسفند سنجابی در ناحیه کد کننده ژن *GDF9* جهش مشاهده کردند (Soleimani et al. 2010) مطابقت داشت. در ژن *GDF9* روی گوسفند قره‌گل با روش PCR-SSCP چهار الگوی باندی مختلف مشاهده شد که با نتایج این تحقیق مطابقت داشت (Bahmani et al. 2010). با توجه به شناسایی جهشG4 در این پژوهش و نتایج حاصل از پژوهش‌های قبلی (Eghbalsaied et al. 2004; Hanrahan et al. 2012) این نتیجه حاصل می‌شود که این جهش می‌تواند یکی از عوامل موثر بر نرخ دو قلوزایی درگوسفندان نژاد کرمانی باشد. باتوجه به الگوهای باندی و نتایج توالی‌یابی، جهش G4 در بیش از ۳۳ درصد گوسفندان مورد مطالعه وجود داشت. اگرچه SNPهای شناسایی شده در این جایگاه اگزون دو ژن *GDF9* در پپتید بالغ وجود ندارند، اما به نظر می‌رسد نقش مهمی در تنظیم بازده ترجمه mRNA به پروتئین و پایداری mRNA داشتند. بنابراین، SNPهای شناسایی شده در این ناحیه می‌توانند در تولید محصول پروتئین نهایی ژن و لذا افزایش نرخ تخمک اندازی در تخمدان گوسفندان، نقش مهمی را ایفا کنند.

از آنجا که این ژن از خانواده فاکتورهای رشد نیز است و با توجه به نتایج تحقیق Soleimani et al. (2010)، که نشان دادند جهش G8 بر روی صفات وزن ۴۵ روزگی و سه ماهگی گوسفندان سنجابی معنی‌دار بوده، می‌توان جهش‌های این ژن را موثر بر صفت رشد نیز خواند. لذا، در صورت ارتباط این جهش‌ها با صفت رشد می‌توان از آن برای برنامه‌های اصلاح نژاد مربوط به رشد گوسفندان بهره برد. تنوع، منشا تغییر ژنتیکی است، اگر تنوع ژنتیکی، خصوصاً تنوع ارزش اصلاحی صفتی پایین باشد به این علت است که هیچ حیوانی نسبت به حیوانات دیگر برتر نبوده و والدین برتر از لحاظ ژنتیکی وجود ندارد، لذا فرآیند انتخاب مشکل خواهد بود. در صفات کمی، تنوع زیادی بین افراد جمعیت وجود دارد. علت وجود تنوع زیاد در صفات کمی، زیاد بودن ژن‌های موثر بر آنهاست، بنابراین انواع گامت‌ها و ژنوتیپ‌های موجود در هر جمعیت زیاد خواهد بود. شاخص شانون نشان‌دهنده میزان هتروزیگوسیتی جمعیت‌ها می‌باشد. 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. وجود یا عدم وجود تعادل هاردی–واینبرگ بر اساس آزمون کای‌اسکور بررسی می‌شود که در این آزمون، در صورتی که تفاوت فراوانی‌های مطلق ژنوتیپی مورد انتظار (در حالت تعادل هاردی–واینبرگ) و فراوانی مطلق ژنوتیپی مشاهده شده معنی‌دار نباشد نشان می‌دهد که جمعیت مربوطه در جایگاه مورد نظر در تعادل است و در غیر این صورت عدم تعادل برقرار است. SNP موقعیت ۴۷۷ در تعادل هاردی–واینبرگ قرار داشت در حالی‌که SNP موقعیت ۷۲۱ در عدم تعادل هاردی–واینبرگ قرار داشت. عدم تعادل جایگاه‌ها می‌تواند نشان دهنده حضور بعضی عوامل بر هم زننده تعادل باشد که دو مورد اصلی آنها یکی مهاجرت در مورد نرهایی که از خارج گله وارد می‌شوند که جریان ژنی ایجاد می‌کنند و دیگری احتمالا انتخاب است. البته نحوه نمونه‌گیری نیز می‌تواند در این رابطه دخیل باشد. پس از تطبیق توالی این ناحیه از اگزون دو 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 دو SNP مشاهده شده در این جایگاه، SNP موقعیت نوکلئوتید ۷۲۱ منجر به تغییر اسیدآمینه گلوتامین به لیزین می‌شود که به نظر می‌رسد این جهش ساختار واکنش پروتئین را تغییر دهد. تغییر تک نوکلئوتیدی ایجاد شده در موقعیت ۴۷۷ در کدون‌های از نوع مترادف[1] روی داده که تغییری در توالی پپتیدی ایجاد نمی‌کند، در واقع اسید آمینه مد نظر در جایگاه یاد شده برای اسیدآمینه لوسین بدون تغییر اسیدآمینه همراه بود.

با در نظر گرفتن تاثیر افزایش تعداد بره متولد شده و میزان بره زایی بر میزان گوشت تولیدی به ازای هر رأس میش در هر سال،

[1] Synonym

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.12.0]

کاهش تعداد میش‌های مولد روی مراتع و جلوگیری از تخریب مراتع به نظر می‌رسد که مطالعه برای پیدا کردن جهش در سایر ژن‌های با اثر عمده بر چندقلوزایی در نژاد کرمانی و سایر نژادهای کشور لازم باشد. از طرفی می‌توان با کشف و وارد کردن این ژنها و برنامه‌ریزی برای تکثیر و تثبیت جهش‌های اتفاق افتاده مرتبط با ژن‌های باروری کمک قابل توجهی به افزایش تولید و درآمد دامداران کشور انجام داد. تحقیق حاضر وجود چندشکلی ژنتیکی برای ژن *GDF9* را در گوسفندان نژاد کرمانی به خوبی نشان داد. می‌توان از وجود این چندشکلی‌ها در جهت بررسی ارتباط بین چندشکلی ژنی با صفات تولیدمثلی و رشد به عنوان مارکرهای ژنتیکی در برنامه‌های اصلاح‌نژادی کشور و بهبود وضعیت تولیدمثلی گله‌های موجود در کشور استفاده کرد.

منابع

Badbarin N, Mirhoseini SZA, Bahmani A, seid sharifi R (2013) study polymorphism the Growth Differentiation Factor 9 (*GDF9*) gene and correlation it with weight quality in ghareh ghol sheep. Animal and Birds Congress. North of Iran, 1073-1076 (In Farsi).

Bahmani A, Mirhoseini SZA, Dlir safat B, Ansari Z (2010) study polymorp- hism the Growth Differentiation Factor 9 (*GDF9*) gene in ghareh ghol sheep using PCR-SSCP. In: Proceedings of 4th Animal Science Congress. Iran, 3590 -3593 (In Farsi).

Bassam BJ, Anolles GC, Gresshoff PM (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry 196: 80-83.

Chu MM, Li BX, Wang JI, Ye SC, Fang L (2004) Association between PCR-SSCP of growth differentiation factor 9 genes and high prolificacy in small tail Han sheep. Animal Biotechnology 15: 111-120.

Chu MX, Cheng GH, Chen L, Fang SC (2005) Study on morphog-enetic protein 15 as a candidate gene for prolificacy of Small Tailed Han sheep and Hu sheep. Journal of Anhui Agricultural University 32: 278-282.

Davis G H (2004) Fecundity Genes in Sheep. Animal Reproduction Science 82-83: 247-253.

Dong J, Altertini DF, Nishimori K, Rajendra Kumar T, Lu N, Matzuk MM (1996) Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. Nature Genetics 383: 531-535.

Eghbalsaied Sh, Ghaedi k, Shahmoradi S, Pirestani A, saeidi T, Amini H, Nicol L, McNielly A (2012) Presence of SNPs in *GDF9* mRNA of Iranian Afshari sheep. International Journal of Fertility and Sterility 5: 225-230.

Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MPE, Juengel JL, Jokiranta TS,McLaren RJ, Luiro K, Dodds KG, Montgomery GW, Beattie AE, Davis GH, Rit O (2000) Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP-15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. Nature Genetics 25: 279-283.

Hanrahan JP, Gregan SM, Mulsant P, Mullen M, Davis GH, Powell R, Galloway SM (2004) Mutations in the genes for oocytederived 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.

Juengel JL, Hudson NL, Whiting L, Mc Natty KP (2004) Effects of immunization against bone morphoge-netic protein 15 and growth differentia-tion factor 9 on pregnancy in Ewes. Biology of Reproduction 70:557-561.

Luis V, Ricardo P, Tejedor MT, Adolfo L, Isidro S (2009) A 17 bp deletion in the Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15) gene is associated to increased prolificacy in the Rasa Aragonesa sheep breed. Animal Reproduction Science 110:139-146.

McNatty KP, Smith P, Moore LG, Reader K, Lun S, Hanrahan JP, Groome NP, Laitinen M, Ritvos O, Juengel JL (2005) Oocyteexpressed genes affecting ovulation rate. Molecular and Cellular Endocrinology 234: 57-66.

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 Animal Science 9:1179-1183.

Otsuka F, Yao Z, Lee TH, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S (2000) Bone morphogenetic Protein-15. Identification of target cells and biological functions. Journal of Biological Chemistry 50: 39523-39528.

Rahimi A, mohaghegh dolatabadi M (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 of Iran, 1454-1458 (In Farsi).

Sadighi M, Bodensteiner KJ, Beattie AE, Galloway SM (2002) Genetic mapping of ovine growth differentiation factor 9 (*GDF9*) to sheep chromosome 5. Animal Genetics 33: 244-245.

Sohrabi S (2011) QTL mapping of loci depending on growth traits located in chromosome 1 of Japan quail. MSc thesis, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran (In Farsi).

Soleimani B, Rahimi Gh (2010) Study of effect *GDF9* gene in litter size and weight quality in sheep sanjabi. Modern Genetics Journal 5:53-59 (In Farsi).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.12.0]