

ارزیابی چندشکلی ژن *GDF9* و ارتباط آن با صفات اسپرم در قوچ سنجابی

Evaluation of *GDF9* gene polymorphism and its relationship with sperm quality in Sanjabi ram

سمیه کیانپور^۱، علیرضا عبدالمحمدی^{۱*}، هادی حجاریان^۱، زهرا نیکوسفات^۲، حسن خمیس آبادی^۳

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار، استادیار، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی،

دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

۲- استادیار، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

۳- استادیار، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی، کرمانشاه، ایران

Kianpoor S¹, Abdolmohammadi AR^{*1}, Hajarian H¹, Nikoosfat Z²,
Khamisabadi H³

1- MSc Student, Associate Professor, Assistant Professor, Department of Animal Science, Campus of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah, Iran.

2- Assistant Professor, College of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran

3- Assistant Professor, Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Kermanshah, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: alirezaam@razi.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۵/۵/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۵/۱۷)

چکیده

این مطالعه جهت شناسایی جهش موجود در ژن *GDF9* با استفاده از روش PCR-RFLP و ارتباط احتمالی آن با صفات کیفیت اسپرم و بیومتری بیضه، انجام گرفت. برای این منظور نمونه‌گیری از خون و اسپرم ۹۶ رأس قوچ نژاد سنجابی به عمل آمد. پس از استخراج DNA، تکثیر قطعه ۴۶۲ جفت‌بازی از اگزون یک ژن *GDF9* با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی صورت گرفت و سپس هضم آنزیمی محصولات PCR با استفاده از آنزیم برشی *HhaI* انجام شد. نتایج حاصل از هضم، عدم وجود جهش از نوع G به A را در جمعیت مورد مطالعه تأیید کرد و تمامی نمونه‌ها در این جایگاه دارای ژنوتیپ وحشی (GG) بود. با توجه به تفاوت‌های مشهود در صفات کیفی اسپرم در قوچ‌های نمونه‌گیری شده و همچنین بروز دوقلو زایی در میش‌های موجود در گله‌های گوسفند نژاد سنجابی، نتایج این تحقیق نشان داد که مطالعات دیگری در جهت شناسایی جهش در نواحی دیگر این ژن و ژن‌های دیگر باروری باید صورت گیرد تا نواحی ژنومی مسئول صفات کیفی اسپرم در قوچ‌ها و نیز دوقلو زایی میش‌های نژاد سنجابی به منظور بهبود باروری در این گله‌ها شناسایی شود.

واژه‌های کلیدی

دوقلو زایی
کیفیت اسپرم
گوسفند سنجابی
PCR-RFLP

هدف از اصلاح نژاد گوسفند سودآوری از طریق بهبود چند صفت اقتصادی در گله‌ها به خصوص صفات تولیدی و تولید مثلی است. این بهبود می‌تواند از طریق انتخاب میش‌ها و قوچ‌های برتر به‌عنوان والدین نسل آینده بر اساس شایستگی ژنتیکی آن‌ها برای صفات مورد نظر صورت گیرد (Yazdi et al. 1997). یکی از ارکان اصلاح نژاد در دام‌ها، استفاده از دام‌های نر خوب و پر بهره برای تولید فرزندان بهتر است. با استفاده از قوچ‌های با توان تولید مثلی بالا و جایگزینی سریع‌تر می‌توان از تعداد آن‌ها در گله کاست که علاوه بر بازگشت سریع‌تر سرمایه و کاهش هزینه‌های نگهداری، پیشرفت ژنتیکی سریع‌تری در گله‌ها حاصل خواهد شد. لازم به ذکر است که انتخاب مستقیم قوچ‌های بارور در گله بر اساس صفات کیفیت اسپرم، از جمله حجم مایع منی در هر انزال، تحرک اسپرم، غلظت اسپرم و غیره بسیار هزینه‌بر و طاقت فرساست. از طرفی این صفات دارای وراثت‌پذیری پایینی هستند (Rothschild et al. 1998). بنابراین، شناخت و انتخاب برای ژن‌های کاندیدایی که بر صفات کیفیت مایع منی تأثیر بگذارند، می‌تواند کمک شایانی به بهبود باروری قوچ‌ها در گله کند. یکی از ژن‌های مهم، ژن *GDF9*¹ بوده که جز ژن‌های اتوزومی است و روی کروموزوم شماره پنج گوسفند شناسایی شده است (Sadighi et al. 2002). این ژن ۲/۵ کیلو باز طول داشته که شامل دو آگزون و یک اینترون به طول ۱۱۲۶ جفت‌باز می‌باشد و کدکننده یک پیش‌پپتید به طول ۴۵۳ اسیدآمینو و پپتید فعال ۱۳۵ اسیدآمینو است (Bodensteiner et al. 1999). جهش در آگزون یک ژن *GDF9* موسوم به G1 منجر به تغییر آرژنین به هیستیدین در ۸۷ امین اسیدآمینو این هورمون می‌شود (Hanrahan et al. 2004). با وجود اهمیت این ژن در باروری، تاکنون الگوهای بیان و عملکرد آن در روند اسپرماتوزن و باروری در قوچ‌ها مورد بررسی قرار نگرفته است. بنابراین مطالعه حاضر به‌منظور شناسایی جهش موجود در آگزون یک ژن *GDF9* (G1) در قوچ نژاد سنجابی و ارتباط احتمالی آن با صفات کیفیت اسپرم و بیومتری بیضه انجام شد. در پژوهش حاضر از ۹۶ رأس قوچ نژاد سنجابی در مناطق ماهیدشت، کوزران و مرکز اصلاح نژاد مهرگان استان کرمانشاه طی دو سال متوالی و در دو فصل پاییز و بهار نمونه-

گیری از خون و اسپرم به‌عمل آمد. هم‌چنین صفات بیومتری بیضه (طول، عرض و محیط) نیز اندازه‌گیری شدند. ارزیابی منی در محل نمونه‌برداری طبق روش (Evans and Maxwell 1987) و برای صفات حجم اسپرم، غلظت اسپرم، حرکت تجمعی و انفرادی اسپرم، درصد زنده‌مانی (درصد اسپرم‌های زنده به مرده)، مورفولوژی اسپرم و تست ^۲HOS انجام شد. پس از استخراج DNA از خون، کمیت و کیفیت DNA روی ژل آگارز یک درصد تعیین شد. به‌منظور تعیین چندشکلی آگزون یک ژن *GDF9*(G1) و شناسایی جهش G به A (G260A)، بر اساس توالی پیشنهادی (Hanrahan 2004) از یک جفت آغازگر اختصاصی FWD: 5'-GAAGACTGGTATGGGGAAATG-3' و REV: 5'-CCAATCTGCTCCTACACACCT-3' استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) در حجم ۲۵ میکرولیتر با غلظت ۱۰۰-۵۰ نانوگرم DNA، هر یک از آغازگرها با غلظت ۰/۲۵ میکرومولار، ۲/۵ میکرومولار بافر 1X، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP، ۲/۵ میلی‌مولار MgCl₂، یک واحد آنزیم تک پلی‌مرز و ۱۴/۵۵ میکرولیتر آب مقطر انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز برای تکثیر قطعه ۴۶۲ جفت‌بازی جایگاه ژنی *GDF9* با دستگاه ترموسایکلر و با برنامه حرارتی زیر انجام شد: دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه برای واسرشت‌سازی اولیه، تعداد ۳۵ چرخه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای واسرشت‌سازی، دمای ۵۸ به مدت ۴۵ ثانیه به‌منظور اتصال آغازگرها، دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه برای گسترش آغازگرها، گسترش نهایی نیز در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. جهت ارزیابی محصولات PCR، الکتروفورز روی ژل آگارز با غلظت یک درصد انجام شد. پس از تکثیر، محصولات PCR تحت تیمار آنزیمی *HhaI* قرار گرفتند. سپس محصولات هضم شده روی ژل آگارز سه درصد تعیین ژنوتیپ شدند. الکتروفورز محصولات PCR نشان داد که قطعه ۴۶۲ جفت‌بازی در نظر گرفته شده از ژن *GDF9* به‌خوبی و بدون هیچ باند غیر اختصاصی تکثیر یافته است (شکل ۱).

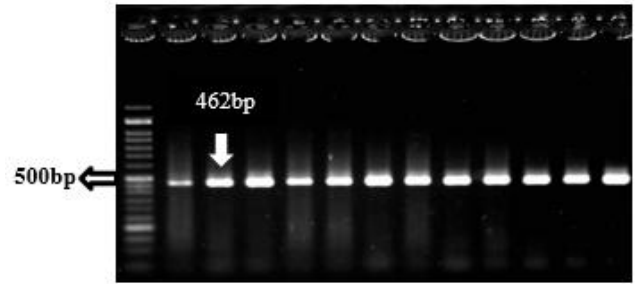
² Hypo Osmotic Swelling Test¹ Growth Differentiation Factor-9

اسپرماتوزن ضروری نیست (Dong et al. 1996). حتی موش نری که *GDF9* آن را مسدود کرده بودند هنوز بارور بود و بیضه وزن نرمال داشت (Zhao et al. 2011). طی مطالعه‌ای جهش در دو جایگاه A485T و A625C ژن *GDF9* بر روی کیفیت منی تازه و منجمد شده در گاوهای نر نژاد هلشتاین مورد بررسی قرار گرفت و هر دو چندشکلی مشاهده شده بر نرخ یکپارچگی آکروزوم^۱ و غلظت و تحرک اسپرم منجمد شده گاو نر نژاد هلشتاین تأثیر بسیار معنی‌داری داشتند (Tang et al. 2013). ژن *GDF9* به‌عنوان یک ژن عمده و کاندیدای مهمی برای نرخ تخمک‌اندازی معرفی شده‌است (Davis 2005). همچنین در گوسفند نژاد توکا^۲ QTL مؤثر بر دوقلوایی روی کروموزوم پنج گوسفند و بسیار نزدیک به *GDF9* مشاهده شده و آن‌ها ژن *GDF9* را به‌عنوان یک ژن کاندیدا با تأثیر عمده بر دوقلوایی معرفی کردند (Nicoll et al. 2009). مطالعات نشان داده که جهش‌های موجود در ژن *GDF9* موجب افزایش باروری در نژادهای کمبریج و بلکلیر می‌شود (Hanrahan et al. 2004)، همچنین در گوسفندان کوچک دنبه هان^۳ در چین جهش در جایگاه G1 ژن *GDF9* گزارش و تأثیر آن بر افزایش دوقلوایی مشاهده شده‌است (Chu et al. 2004). از طرفی در نژاد بلوچی وجود جهش در جایگاه G1 ژن *GDF9* منجر به افزایش دوقلوایی در حیوانات هتروزیگوت در مقایسه با حیوانات دارای ژنوتیپ وحشی شد (Moradband et al. 2011). در پژوهشی که روی چهار نژاد ماکویی، افشاری، مهربان و بلوچی برای بررسی چندشکلی دو جایگاه G1 و B2 به ترتیب در ژن‌های *GDF9* و *BMP15* انجام شد، چند قلوایی به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر هر یک از ژن‌های مذکور بود (Javanmard et al. 2011). در تحقیق حاضر، رکوردهای ثبت شده در قوچ سنجابی تفاوت‌های مشهود در کیفیت اسپرم‌های نمونه‌گیری شده نشان داد به‌عنوان مثال برای حرکت تجمعی اسپرم این تفاوت بین ۵-۰ ارزش‌گذاری شد (جدول ۱)، اما به‌دلیل مونومورف بودن جایگاه G1 در ژن *GDF9* امکان بررسی ارتباط و تأثیر این جایگاه بر صفات بیومتری بیضه و همچنین صفات ارزیابی شده کیفیت اسپرم فراهم نشد.

¹ Acrosome Integrity Rate

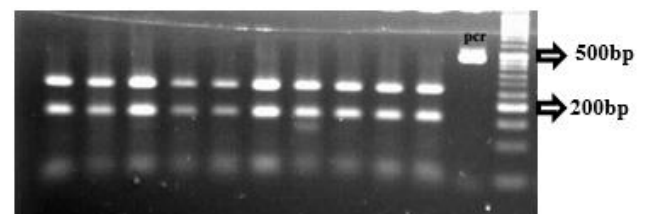
² Thoka

³ Han



شکل ۱- محصولات PCR حاصل از تکثیر قطعه ۴۶۲ جفت‌بازی از آگزون یک ژن *GDF9* (Marker Ladder 50 bp)

در هضم قطعه ۴۶۲ جفت‌بازی تکثیر شده از ژن *GDF9* با آنزیم برشی *HhaI* انتظار بر این بود که در صورت وجود جهش G به A (G1)، فقط یک جایگاه شناسایی مونومورف برای آنزیم *HhaI* وجود داشته باشد و در نتیجه دو قطعه ۴۱۰ و ۵۲ جفت‌بازی برای ژنوتیپ AA حاصل شود. همچنین در صورت عدم وقوع جهش مذکور، دو ناحیه توسط آنزیم برشی شناسایی شده و سه قطعه ۲۵۴، ۱۵۶ و ۵۲ جفت‌بازی برای ژنوتیپ وحشی GG روی ژل آگارز سه درصد رؤیت شود. در تمامی نمونه‌های مورد بررسی در این تحقیق مشاهده قطعات ۲۵۴، ۱۵۶ و ۵۲ جفت‌بازی حاصل از هضم محصولات PCR، به‌خوبی عدم وجود جهش G1 در ناحیه مورد نظر را در قوچ‌های سنجابی تأیید کرد (شکل ۲).



شکل ۲- ژنوتیپ GG مشاهده شده حاصل از هضم آنزیمی قطعه ۴۶۲ جفت‌بازی از ژن *GDF9*

Marker Ladder 50 bp، ژنوتیپ GG (۲۵۴، ۱۵۶ و ۵۲)

مشخص شده که هورمون *GDF9* به‌طور بالقوه فعالیت‌های بیضه را تنظیم می‌کند بعلاوه mRNA ژن *GDF9* در انسان نه تنها در غدد جنسی، بلکه در بسیاری از بافت‌های غیر گنادی هم بیان می‌شود (Fitzpatrick et al. 1998). با این حال با حذف *GDF9* در مردان بارور هیچ نقص فیزیکی یا رفتاری مشاهده نشده و بدین معنی است که عمل آن در بیضه برای شروع و یا نگهداری

جدول ۱- برخی از ویژگی‌های اندازه‌گیری شده روی کیفیت اسپرم در قوچ سنجابی

صفت	میانگین (± خطای استاندارد)	حداقل	حداکثر
حجم اسپرم (ml)	1.29 ± 0.05	0.5	2.5
غلظت اسپرم ($X \times 10^7$)	254.82 ± 13.88	45	540
حرکت توده ای (رتبه)	4.61 ± 0.06	0	5
حرکت انفرادی (%)	85.43 ± 1.69	40	99
یکپارچگی غشای اسپرم (%)	92.76 ± 0.64	71	100
زنده مانی (%)	82 ± 1.50	60	99
مورفولوژی (%)	93.03 ± 0.68	73	100

است در سالیان دور در جمعیت گوسفندان نژاد سنجابی اتفاق افتاده باشد اما به دلیل اینکه طی سالیان اخیر انتخاب برنامه‌ریزی شده‌ای در این نژاد وجود نداشته احتمال حذف آن در طی زمان وجود دارد. اگر چه در جایگاه مورد مطالعه ما تفاوتی بین قوچ-های سنجابی مشاهده نشد اما مطالعات پیش‌تری جهت یافتن ژن-های دیگر و جایگاه‌های مؤثر بر کیفیت اسپرم جهت استفاده در برنامه‌های اصلاح نژادی و دسترسی به پیشرفت ژنتیکی سریع‌تر از طریق انتخاب قوچ‌های برتر بارور ضروری به نظر می‌رسد.

با توجه به اینکه در این مطالعه تمامی قوچ‌های بالغ سه گله بزرگ نژاد سنجابی انتخاب شده بودند عدم وقوع جهش در جایگاه *G1* ژن *GDF9* شاید بتواند حاکی از نبود چندشکلی این جایگاه در میش‌های متولد شده از آن‌ها در این گله‌ها نیز باشد. لذا مشاهده دوقلو زایی در گوسفندان این نژاد می‌تواند احتمالاً به دلایل تغذیه-ای (فلاشینگ) و یا ناشی از اثر جایگاه‌های دیگر این ژن و یا دیگر ژن‌های مرتبط با باروری مثل *BMP15* و *FecB* باشد که تاکنون در این نژاد مورد بررسی قرار نگرفته است. ذکر این نکته ضروری است که جهش مورد مطالعه در این تحقیق، حتی ممکن

منابع

Bodensteiner KJ, Clay CM, Moeller CL, Sawyer HR (1999) Molecular cloning of the ovine growth/differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. *Biology of Reproduction*. 60: 381-386.

Chu MX, Li BX, Wang JY, Ye SC, Fang L (2004) Association between PCR-SSCP of growth differentiation factor 9 gene and high prolificacy in Small Tail Han sheep. *Animal Biotechnology*. 15: 111-120.

Davis GH (2005) Major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genetics, Selection, Evolution* 37: S11-S23.

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*. 383: 531-535.

Evans G, WMC, Maxwell (1987) Collection of semen. In: Salmons Artificial Insemination of Sheep and Goats. Butter worths, Sydney, pp. 85-1.

Fitzpatrick SL, Sindoni DM, Shughrue PJ, Lane MV, et al (1998) Expression of growth differentiation factor-9 messenger ribonucleic acid in ovarian and no ovarian rodent and human tissues. *Endocrinology*. 139: 2571-2578.

Hanrahan JP, Gregan SM, Mulsant P, Mullen M, Davis GH, Powell R, et al (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.

Javanmard A, Azadzadeh N, Emailizadeh AK (2011) mutations in bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 gene are associated with increased litter size in fat-tailed sheep breeds. *Veterinary Research Communications*. 35: 157-167.

Nicol L, Bishop SC, Pong-wong R, Bendixen CH, Holm LE, Rhind S M, Mcneilly A S (2009) Homozygosity for a single base-pair mutation in the oocyte-specific *GDF9* gene results in sterility in Thoka sheep. *Society for Reproduction and Fertility* 138: 921-933.

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-Australasian journal of Animal Sciences*. 24: 1179-1183.

Rothschild MF and Bidanel JP (1998) Biology and Genetics of Reproduction. In: *The Genetics of the Pig* (Rothschild MF, Ed.). CAB International, Wallingford, Oxon, 313-343.

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.

Tang KQ, Yang WC, Zhang XX and Yang LG (2013) Effects of polymorphisms in the bovine growth differentiation factor 9 gene on sperm quality in Holstein bulls. *Genetics and Molecular Research*. 12: 2189-2195.

Yazdi MH, Engstom G, Nasholm A, Jonansson K, Jorjani Hand Liljedahl L E (1997) Genetic parameters for lamb weight at different age and wool production in Baluchi sheep. Journal of Animal Science. 65: 247- 255.

Zhao L, He, Guo Q, Wen X, Zhang X, Dong C (2011) Expression of growth differentiation factor 9 (*GDF9*) and its receptor in adult cat testis. Acta Histochemica. 113: 771-776.