ژنتیک نوین
دوره یازدهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۵
صفحه ۳۱۲ - ۳۰۷

بررسی چندشکلی واریانت‌های G1 و G8 ژن *GDF9* و ارتباط آن‌ها با دوقلوزایی در گوسفند زل

Identification of polymorphism of G1 and G8 variants of GDF9 gene on multiple births Zel sheep

لیلا شاه‌محمدی*[۱]، مجتبی آهنی‌آذری[۱]، النا دهنوی[۲]، سعید زره‌داران[۱]، فیروز صمدی[۱]، محمدرضا نصیری[۳]، رحمت سمیعی[٤]، علیرضا خان‌احمدی[٥]، سهیل یوسفی[٦]

۱- به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، استادیار، دانشیار و استادیار دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۲- دانشجو دکتری، اصلاح نژاد دام دانشگاه صنعتی اصفهان
۳- دانشیار، دانشکده علوم دامی، دانشگاه فردوسی مشهد
٤- کارشناس، جهاد کشاورزی استان گلستان، گرگان
٥- دانشجوی کارشناس ارشد، مجتمع آموزش عالی گنبد
٦- دانشجو دکتری، اصلاح نژاد دام، دانشگاه فردوسی مشهد

Shahmohamadi L*[1], Ahani Azari M[1], Dehnavi E[2] , Zerehdaran S[1], Samadi F[1], Nassiry MR [3], Samiee R[4], Khan Ahmadi AR[5], Yosefi S[6]

1- MSc, Assistant professor, Associate professor, Assistant professor, Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
2- PhD Student, Animal Breeding, Isfahan University of Technology
3- Associate professor, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
4- Lecturer, Agriculture Jihad Organization of Golestan Praince, Gorgan, Iran
5- MSc Student, Department of Animal Science, Faculty of Gonbad, Gonbad, Iran
6- PhD Student, Animal Breeding, Ferdowsi University of Mashhad

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: L.shahmohamadi@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۱۱)

چکیده

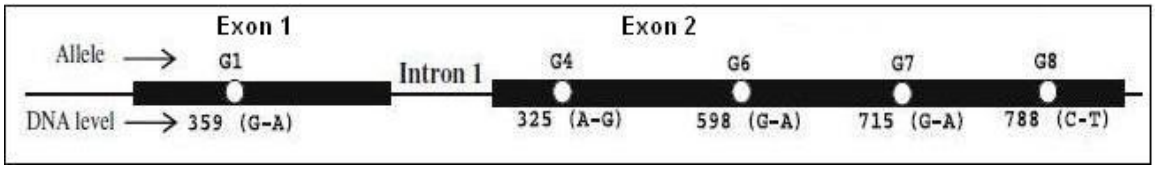
هدف از این تحقیق شناسائی چندشکلی ژن GDF9 موثر بر باروری بالا (دو یا چندقلوزائی) در گوسفند نژاد زل با تکنیک PCR - RFLP و بررسی ارتباط آن با رکوردهای دوقلوزائی بود. بدین منظور DNA ژنومی ۲۰۰ راس گوسفند به روش نمکی بهینه شده برای بررسی جهش در این ژن استخراج شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت تکثیر قطعات ٤٦٢ و ۱۳۹ جفت‌بازی از ژن GDF9 انجام گرفت. قطعات تکثیر شده واریانت‌های G1 و G8 از ژن GDF9 به‌ترتیب توسط آنزیم‌های برشی *Hin6I* و *DdeI* مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند. نتایج حاصل از بررسی حاضر تنها حاکی از چندشکل بودن گله مورد مطالعه برای واریانت G1 ژن GDF9 بود. دو آلل جهش‌یافته و نوع وحشی به‌ترتیب با فراوانی ۰/۰۵ و ۰/۹۵ در حیوانات مورد بررسی برای این جایگاه مشاهده شد. بررسی ارتباط واریانت G1 با دوقلوزائی با استفاده از نرم‌افزار SAS (رویه GLM) حاکی از عدم ارتباط بین ژنوتیپ‌های مشاهده شده و رکوردهای فنوتیپی مربوط به دوقلوزائی بود (P <۰/۰۵).

واژه‌های کلیدی
باروری
چندشکلی
گوسفند
GDF9
RFLP

یکی از دستاوردهای علم ژنتیک مولکولی، شناخت ژن‌هائی با اثر عمده است که در امر انتخاب مورد استفاده قرار می‌گیرند. این ژن‌ها به‌عنوان ژن‌های کاندید نام برده می‌شوند (Davis et al. 2002; Davis 2004). انجام مطالعات ژنتیکی در گوسفند نشان داده است که میزان تخمک‌گذاری و تعداد بره متولد شده توسط یک دسته از ژن‌های متفاوت با اثرات جزئی و همچنین توسط فعالیت ژن‌های منفرد با اثرات عمده به نام ژن‌های موثر در باروری کنترل می‌شوند (Southeyi et al. 2002). تعداد جنین‌ها در هر آبستنی به‌وسیله عوامل ژنتیکی و محیطی کنترل می‌شود. جهش‌هائی که میزان تخمک‌گذاری را افزیش می‌دهند در ژن‌های بورولا، BMP15 و GDF9 شناسائی شده‌اند. اگر چه ژن‌های دیگری نیز کشف شده‌اند، اما هنوز موقعیت جهش‌های آن‌ها مشخص نشده است (Davis 2004).

ژن بورولا (FecB) یک ژن اتوزومی غالب است که بر میزان تخمک‌گذاری اثر افزایشی دارد. یک نسخه از این ژن باعث افزایش میزان تخمک‌گذاری تقریباً به میزان ۱/۵ و دو نسخه از آن باعث افزایشی حدود سه تخمک‌ریزی در هر بار تخمک‌گذاری می‌شود. این افزایش تخمک‌گذاری باعث افزایش تعداد بره‌ها در هر فصل بره‌زائی به‌ترتیب به میزان یک و ۱/۵ می‌شود (Findlay et al. 2002). با این‌حال تاثیر ژن بورولا به‌علت جهش در گیرنده BMPR-1B بوده که این ژن در اووسیت‌ها و سلول‌های گرانولوزا بیان شده و بر روی کروموزوم شش قرار دارد (Davis 2004). BMP15 یک ژن وابسته به جنس است که میزان تخمک-گذاری را افزایش می‌دهد، اما ماده‌های ناقل هموزیگوت عقیم هستند. میش‌های نابارور تخمدان‌های کوچک دوکی شکل رشد نیافته دارند که هیچ وقت تخمک‌گذاری نمی‌کنند (Davis 2004; Galloway et al. 2002). GDF9 بر خلاف BMP15 یک ژن اتوزومی است که بر روی کروموزوم پنج قرار دارد که باعث افزایش تخمک‌گذاری در گوسفندان هتروزیگوت و ناباروری در گوسفندان هموزیگوت می‌شود (Davi 2004; Galloway et al. 2002). دام‌های هموزیگوت برای جهش‌های GDF9 و BMP15 عقیم هستند چون رشد فولیکولی آن‌ها در مرحله اولیه متوقف شده‌است. جهش‌های BMP15 و GDF9 باعث کاهش پروتئین بالغ یا تغییر اتصال گیرنده‌های سطح سلول می‌شود (Wu et al. 2004).

Hanrahan et al. (2004) با کمک تکنیک SSCP به بررسی وجود جهش در ژن GDF9 در نمونه‌هایی از گوسفندان بلکلیر و کمبریج پرداختند. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که واریانت G1 (جهش رخ داده در اگزون ۱) منجر به تغییر نوکلئوتیدی G به A می‌شود که در نتیجه آن اسیدآمینه آرژنین با هیستیدین در موقعیت ۸۷ از زنجیره پروتئین جایگزین می‌شود. واریانت G8 ($FecG^H$) (یکی از جهش‌های رخ داده در اگزون ۲) یک تغییر نوکلئوتیدی (C→T) است که منجر به جایگزینی یک آمینو اسید قطبی (سرین) با یک آمینواسید غیر قطبی در جایگاه ۷۷ پروتئین بالغ خواهد شد که موجب تغییر ساختار فضائی پروتئین GDF9 در ناحیه‌ایی می-شود که با گیرنده برهم کنش دارد (شکل۱). در بین جهش‌های بررسی شده فقط جهش $FecG^H$ (واریانت G8) به‌عنوان جهش تاثیرگذار بر دوقلوزائی معرفی شده‌است. در این مطالعه، واریانت-های G1 و G8 ($FecG^H$) از ژن *GDF9* که جهش ایجاد شده در آن‌ها بوسیله آزمایشات DNA شناسائی شده‌اند و نقش مهمی در میزان تخمک‌گذاری و دوقلوزایی در گوسفند ایفا می‌کنند، مورد بررسی قرار گرفته‌اند.



شکل ۱- جهش‌های نقطه‌ایی شناسایی شده در ژن *GDF9* (Polly et al. 2010).

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده

نام جایگاه	طول قطعه	توالی پرایمر (5′→3′)	منبع
واریانتG1	٤٦٢bp	F:5′-GAAGACTGGTATGGGGAAATG-3′ R:5′-CCAATCTGCTCCTACACACCT-3′	(Hanrahan et al. 2004)
واریانتG8	۱۳۹bp	F:5′-ATGGATGATGTTCTGCACCATGGTGTGAACCTGA-3′ R:5′-CTTTAGTCAGCTGAAGTGGGACAAC-3′	(Hanrahan et al. 2004)

جدول ۲- برنامه حرارتی برای تکثیر واریانت G1 و G8 از ژن GDF9

مرحله	دما (°C)	زمان	تعداد چرخه
واسرشته‌سازی اولیه DNA	۹٤	۵ دقیقه	۱
واسرشته‌سازی DNA	۹٤	٤۵ ثانیه	۳۵
اتصال آغازگرها*	۵۸ یا٦۰	٦۰ ثانیه	
سنتز	۷۲	٦۰ ثانیه	
تکثیر نهایی	۷۲	۱۰ دقیقه	۱

* دمای اتصال آغازگرها برای واریانتG1، ۵۸ درجه سانتی گراد و برای واریانت G8، ٦۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد

در این تحقیق از ۲۰۰ رأس گوسفند (قوچ و میش) زل موجود در ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد گوسفند شیرنگ واقع در شهر فاضل‌آباد خون‌گیری به عمل آمد. استخراج DNA از خون کامل با استفاده از روش دستی استخراج بهینه یافته نمکی[1] انجام گرفت (Miller et al. 1988). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت تکثیر قطعات ٤٦٢ و ۱۳۹ جفت‌بازی از ژن *GDF9* با استفاده از پرایمر-های پیشنهادی Hanrahan et al. (2004) و طبق برنامه حرارتی ذکر شده انجام گرفت (جداول ۱، ۲ و ۳). قطعات تکثیر شده واریانت‌های G1 و G8 از ژن *GDF9* به‌ترتیب توسط آنزیم‌های برشی *Hin6I* و *DdeI* مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند و سپس به-ترتیب بر روی ژل آگارز سه درصد و اکریل آمید ۱۰ درصد بارگذاری شده و با رنگ‌آمیزی اتیدیوم برماید و نیترات نقره آشکار شدند. محاسبه فراوانی‌های ژنی و ژنوتیپی و همچنین آزمون مربع کای با استفاده از نرم‌افزار POP Gene 1.32 انجام شد (Yeh et al. 1997). تجزیه‌های آماری با استفاده از رویه GLM نرم‌افزار SAS (۲۰۰۲) و مقایسه میانگین‌های حداقل مربعات از طریق آزمون توکی- کرامر انجام شد. مدل آماری زیر برای تجزیه داده‌ها استفاده شد:

$$y_{ijkl} = \mu + A_i + B_j + C_k + e_{ijkl}$$

y_{ijkl} = میزان دوقلوزائی هر حیوان، μ = میانگین کل، A_i = اثر ثابت سال زایش (i=۱،....،۳)، B_j = اثر ثابت شکم زایش (j=۱،....،۸)، C_k = اثر ثابت ژنوتیپ (k =۱،۲)، e_{ijkl}= اثر تصادفی عوامل باقی‌مانده.

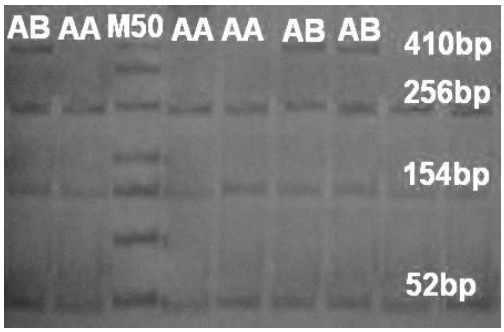
جدول ۳- اندازه قطعات مربوط به ژنوتیپ‌های مورد بررسی

ژنوتیپ	طول قطعات برای G1 (bp)	طول قطعات برای G8 (bp)
هموزیگوت غالب (AA)	۲۵٦،۱۵٤،۵۲	۱۳۹
هتروزیکوت (AB)	٤۱۰،۲۵٦،۱۵٤،۵۲	۱۳۹،۱۰۸،۳۱
هموزیگوت غالب (BB)	٤۱۰،۵۲	۱۰۸،۳۱

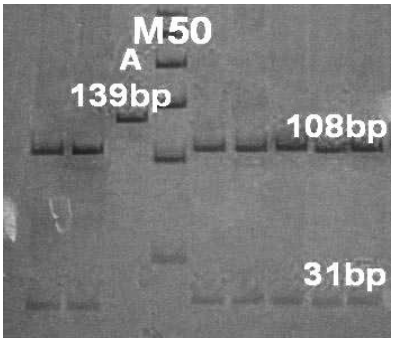
پس از هضم آنزیمی واریانت‌های مورد مطالعه، دو ژنوتیپ AA و AB برای واریانتG1 مشاهده شد در حالی‌که برای واریانت G8 تنها یک ژنوتیپ (aa) قابل تشخیص بود (شکل ۲ و ۳). اندازه قطعات مربوط به ژنوتیپ‌های مختلف این جایگاه‌ها در جدول ۳ نشان داده شده‌است. پس از به‌دست آوردن فراوانی‌های ژنی و ژنوتیپی از آزمون مربع کای جهت تعیین وجود یا عدم وجود تعادل هاردی واینبرگ استفاده شد (جدول ٤). مقایسه فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده و مورد انتظار نشان داد که این جایگاه در تعادل هاردی واینبرگ می‌باشد ($P<0/05$). بررسی ارتباط چند-شکلی واریانت G1 با رکوردهای دو یا چندقلوزایی نشان داد که

[1] Modified Salting out

اثر ژنوتیپ‌های مختلف واریانت مورد بررسی بر دوقلوزایی معنی‌دار نبود (P<۰/۰۵) (جدول ۵).



شکل ۲- نتایج هضم محصولات PCR واریانت G1 از ژن *GDF9* توسط آنزیم *Hin6I* پس از الکتروفورز روی ژل پلی‌اکریلامید ۱۰ درصد. M50: مارکر استاندارد (Generuler™ 50-bp DNA Ladder Plus marker)



شکل ۳- نتایج هضم محصولات PCR واریانت G8 از ژن *GDF9* توسط آنزیم *DdeI* پس از الکتروفورز روی ژل پلی‌اکریلامید ۱۰ درصد. A: محصول PCR (139bp). M5: مارکر استاندارد (Generuler™ 50-bp DNA Ladder Plus marker)

در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای واریانت G1 با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی یک قطعه ٤٦٢ جفت بازی بدون هیچ باند اضافی با موفقیت تکثیر شد. مطالعه الگوی باندی مشاهده شده در الکتروفورز پس از هضم آنزیمی، چندشکلی برای این جایگاه را در گله مورد بررسی نشان داد. به‌طوری که در این بررسی الگوی چهار باندی ٤١٠، ٢٥٦، ١٥٤ و ٥٢ برای حالت هتروزیگوت با فراوانی آللی ۰/۰۵ و سه باند ٢٥٦، ١٥٤ و ٥٢ نشان دهنده هموزیگوت وحشی برای این واریانت از GDF9 با فراوانی ۰/۹۵ مشاهده شد و در بین نمونه‌های بررسی شده ژنوتیپ هموزیگوت جهش‌یافته مشاهده نشد. نتایج حاصل از این بررسی با نتایج پژوهش‌های انجام شده بر روی نژاد زل مازندران (Farajzade 2005)، نژاد آرخامرینوس (Farajzade et al. 2007)، نژاد لری- بختیاری (Amiri et al. 2007)، نژاد عربی (Ghaderi et al. 2008)، نژاد سنگسری (Jamshidi et al. 2009) و نژاد دالاق (Khanahmadi et al. 2009) از استان گلستان که با همین تکنیک به بررسی چندشکلی در این نژادها پرداختند مطابقت دارد. نتایج حاصل از چندشکلی مشاهده شده برای این جایگاه و بررسی ارتباط آن با رکوردهای موجود در نمونه‌هایی از گوسفندان نژاد مغانی و قزل حاکی از تاثیر این جایگاه و جهش موجود در آن به عنوان جهش مؤثر بر دو یا چندقلوزائی در این گوسفندان بود که با نتایج حاصل از ارتباط این جهش با صفت مذکور در گله حاضر مغایرت دارد (Barzegari et al. 2010).

جدول ٤- فراوانی‌های ژنی و ژنوتیپی و نتیجه آزمون مربع کای واریانت G1 از ژن *GDF9* در حیوانات مورد بررسی

ژنوتیپ	فراوانی	تعداد افراد مشاهده شده (O)	تعداد افراد مورد انتظار (E)	$(E-O)^2/E$	X^2
AA	۰/۹۰۵	۱۸۰	۱۸۰/٤٧٦	۰/۰۰۱۳	۰/٥٢٦
AB	۰/۰۹٥	۲۰	۱۹/۰٤٧٦	۰/۰٤٧٦	
BB	۰	۰	۰/٤٧٦	۰/۰٤٧٦	

جدول ٥- مقایسه میانگین‌های حداقل مربعات رکوردهای دو یا چندقلوزائی مربوط به ژنوتیپ‌های واریانت G1 از ژن *GDF9*

ژنوتیپ	خطای استاندارد ± میانگین*
AA	۱/۱٦٧^{a} ± ۰/۰۲٦
AB	۱/۰٧۱^{a} ±۰/۰٦٥

*میانگین‌های حداقل مربعات نشان داده شده با حروف مشترک نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد می‌باشد.

بررسی ارتباط بین جهش مشاهده شده و فنوتیپ‌های موجود از گوسفندان دم‌کوتاه هان حاکی از تاثیر این جایگاه در سطح احتمال ۵ درصد در گوسفندان دم کوتاه هان چینی بر دوقلوزایی گوسفندان شکم اول و در سطح یک درصد بر چندقلوزایی گوسفندان شکم دوم بود (Chu et al. 2004). نتایج حاصل از تحقیق مذکور با نتایج تجزیه‌های آماری بررسی حاضر هم‌خوانی ندارد. Polly et al. (2010) به بررسی چندشکلی در این جایگاه از GDF9 در گوسفندان گارول هندی پرداختند. نتایج حاصل از بررسی مذکور با نتایج حاصل از بررسی حاضر هم‌خوانی داشت. Vacca et al. (2010) نیز به بررسی چندشکلی در این جایگاه ژنی

در پنج گله از گوسفندان از کشورهای تونس، فرانسه، مراکش و ایتالیا پرداختند. نتایج حاصل از این بررسی حاکی از عدم وجود جهش در این واریانت از GDF9 در این گوسفندان بود که با نتایج حاصل از این بررسی هم‌خوانی ندارد. بررسی چندشکلی در این جایگاه ژنی در گوسفندان نژادهای دم کوتاه هان، دورست، تکسل و مرینو آلمانی حاکی از عدم وقوع جهش در این واریانت از ژن *GDF9* در گوسفندان مورد بررسی بود که با نتایج حاصل از این پژوهش هم‌خوانی ندارد (Chu et al. 2005).

قطعه تکثیر شده برای واریانت G8 یک قطعه ۱۳۹ جفت‌بازی بود. برای این جایگاه نیز از روش PCR-RFLP به‌عنوان روشی آسان و سریع در تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها استفاده شد. نتایج الگوی باندی پس از هضم محصولات PCR با آنزیم *DdeI* حاکی از عدم وجود جهش برای این واریانت از ژن *GDF9* در نمونه‌های مورد بررسی بود و گله مورد مطالعه برای این جایگاه ژنی مونومورف معرفی شد که با نتایج پژوهش‌های انجام شده بر روی نژادهای شال (Ghaffari et al. 2007)، عربی (Ghaderi et al. 2008)، قزل (Mirabzade 2009)، دالاق (Khanahmadi et al. 2009)، گارول از هند (Polly et al. 2010) و نتایج بررسی (Vacca et al. 2010) بر روی پنج نژاد از گوسفندان آفریقای شمالی مطابقت دارد ولی با نتایج بررسی‌های انجام شده با تکنیک PCR-SSCP توسط Akbarpour et al. (2008) بر روی گوسفندان نژاد قزل و Bahmani et al. (2010) بر روی گوسفندان نژاد قره‌گل هم‌خوانی ندارد.

در این بررسی چندشکلی در ژن *GDF9* از جمله ژن‌های موثر بر دو یا چندقلوزایی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بررسی حاکی از وقوع جهش در واریانت G1 از ژن *GDF9* بود. بررسی-های انجام شده در خصوص ارتباط این جایگاه با فنوتیپ‌های مشاهده شده حاکی از عدم تاثیر این جایگاه بر این صفت در این گله بود و ارتباط صفت مدنظر (دو یا چندقلوزایی) با ژنوتیپ مشاهده شده معنی‌دار نشد. جهش و در نتیجه SNP از وقایع نادر در طبیعت می‌باشد که انتخاب، تاثیر بسزائی در گسترش آن و در نتیجه تغییر فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی در طبیعت دارد. شاید دلیل فراوانی پائین این SNPها در گوسفندان بومی ایران عدم انتخاب توسط طبیعت و یا بشر برای گسترش این جهش‌ها و در نتیجه بزرگ ژن‌های موثر بر دو یا چندقلوزایی باشد. ادامه بررسی‌ها در خصوص کشف چندشکلی‌های جدید می‌تواند جهت درک عملکرد ژن‌های موثر بر این صفت مفید باشد.

منابع

Akbarpour M, Houshmand M, Ghorashi A, Hayatgheybi H (2008) Screening for FecGH mutation of growth differentiation factor 9 gene in Iranian Ghezel sheep population. International Journal of Fertility and Sterility 2:139-144.

Amiri S, Rahimi G, Vatankha M (2007) Identification of allelic polymorphism in oocyte drived growth factor (GDF9) and BMP15 genes in Luri Bakhtiari sheep breed. The 5th National Biotechnology Congress of Iran, Summit Meeting Hall, Tehran. (In Farsi)

Bahmani A, Mir Hosseini SZ, Dalir Sefat SB, Ansari Z (2010) Identification of polymorphism in FecG gene in Karkul sheep using SSCP method .4th Iranian Congress on Animal Science, Tehran, Karaj, Iran. (In Farsi)

Barzegari A, Atashpaz S, Ghabili K, Nemati Z, Ruataei M, Azarbaijani R (2010) Polymorphism 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 MX, Sang LH, Wang JY, Fang LF, Ye SC (2005) Study on BMP15 and GDF9 as candidate genes for prolificacy of Small Tailed Han sheep. Acta Genetica Sinica 32:38-45.

Chu MM, Li BX, Wang JI, Ye SC, Fang L (2004) Association between PCR-SSCP of growth differentiation factor 9 gene and high prolificacy in Small Tail Han sheep animal .Animal Biotechnology 15:110-120.

Davis GH (2004) Fecundity genes in sheep. Journal of Animal Reproduction Science 82:247-253.

Davis GH, Galloway SM, Ross IK, Gregan S, Ward J, Nimbkar BV, Ghalsasi PM, Nimbkar C, Grary GD, Subandriyo Inounu I, Tiesnamurti B, Martynuik E, Eythorsdottir E, Mulsent P, Lecerf F, Hanrahan JP, Bradford GE, Wilson T (2002) DNA tests in prolific sheep from eight countries provide new evidence on origin of the Booroola (FecB) mutation. Biology of Reproduction 66:1869-1874.

Farajzadeh M (2005) Identification of polymorphism in GDF9 and BMP15 genes associated with twining in Zel sheep using PCR-RFLP method. MSc Thesis University of Sari, Sari College of Agriculture Sciences, Iran. (In Farsi)

Farajzadeh M, Dehnad AR, Rahimi G (2007) Genetic polymorphism in Oocyte-drived growth factor (GDF9) gene in Arkha Merinos Sheep using PCR-RFLP. Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources 6: 37-47. (In Farsi)

Findlay JK, Drummond AE, Dyson ML, Baillie AJ, Robertson DM, Ethier JF (2002) Recruiment and development of the follicle; the roles of the transforming growth factor-beta superfamily. Molecular and Cellular Endocrinology 191:35-43.

Galloway SM, Gregan SM, Wilson T, McNatty KP, Juengel JL, Ritvos O, Davis GH (2002) BMP15 mutations and ovrian function. Molecular and Cellular Endocrinology 191:15-18.

Ghaderi A, Nassiribeyg MT, Mirzade KH, Fayazi J, Mohamadi GH, Sadat Sadr A (2008) The investigation of GDF9 gene polymorphism in the Arabic sheep using PCR-RFLP method. The 1th National Conference on Livestock and Poultry Industry of Golestan Province, Iran, Golestan. (In Farsi)

Ghaffari M, Nejati-Javaremi A, Rahimi G (2007) Detection of polymorphism in oocyte derived growth factor) GDF9 (gene associated with twining in Shal sheep using PCR-RFLP method. The 5th National Biotechnology Congress of Iran, Summit Meeting Hall, Tehran. (In Farsi)

Hanrahan JP, Gregan S, Mulsant P, Mullen M, Davis G H, Powell R, Galloway SM (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.

Jamshidi A, Kasirian MM, Rahimi miyanji GH, Banaeyan M (2010) Identification of polymorphism in GDF9 gene in Sangsari sheep using PCR-RFLP method. 11th Iranian Congress on Genetic, Tehran, Iran. (In Farsi)

KhanAhmadi AR .Khatami Nezhad R, Ahani Azari M, Zerehdaran S, and Jalil A (2009) Identification of polymorphism in GDF9 (G1 and G8) gene in Dalagh sheep using PCR-RFLP method. 11th Iranian Congress on Genetic, Tehran, Iran. (In Farsi)

Miller SA, Dyckes DD, Polesky HF (1988) A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research 16:1215.

Mirabzade Ardekani A (2009) Identification of polymorphism in MTNR1A and GDF9 genes in Ghezel sheep. University of Tehran, Pardis College of Agriculture Sciences, Iran. (In Farsi)

Polly S, De S, Brahma B, Mukherjee A, Vinesh PV, Batabyal S, Arora JS, Pan S, Kumar Samanta A, Kumar Datta T, Lal Goswami S (2010) Polymorphism of BMPR1B, BMP15 and GDF9 fecundity genes in prolific Garole sheep.Tropical Animal Health and Production 42:985-993.

SAS® User's Guide: Statistics, Version 8.2 Edition .2002 . SAS Inst, Inc, Cary, NC.

Southeyi BR, Thomas DL, Gottfredson RG, Zelinsky RD (2002) Ewe productivity of Booroola Merino-Rambouillet crossbred sheep during early stages of the introgression of the FecB allele into a Rambouillet population. Livestock production science 75:33-44.

Vacca GM, Dhaouadi A, Rekik M, Carcangiu V, Pazzola M, Dettori ML (2010) Prolificacy genotype at BMPR-1B, BMP15 and GDF9 genes in North African sheep breeds. Small Ruminant Research 88:67-71.

Wu XL, Moore RK, Shimasaki S (2004) Functional and molecular characterization of naturally ocuring mutations in the oocyte secreted factor bone morphogenetic protein-15 and growth and differentiation factor-9. Biological Chemistry 27917:17391-17396.

Yeh FC, Yang RC, Timothy BJ, Ye Z, Judy M (1997) Pop Gene, the user friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta.

Modern Genetics Journal

Vol 11, Number 2, Summer 2016, Quaternary

Identification of polymorphism of G1 and G8 variants of GDF9 gene on multiple births Zel sheep

Shahmohamadi L[*1], Ahani Azari M[1], Dehnavi E[2] , Zerehdaran S[1], Samadi F[1], Nassiry MR[3], Samiee R[4], Khan Ahmadi AR[5], Yosefi S[6]

1. Graduated MSc, Assistant professor, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
2. PhD Student, Animal Breeding, Isfahan University of Technology
3. Assocaite professor of Genetic and Animal Breeding, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
4. Lecturer, Golestan Agriculture Jahad, Gorgan, Iran
5. Department of Animal Science, Faculty of Gonbad, Gonbad, Iran
6. PhD Student, Animal Breeding, Ferdowsi University of Mashhad

* Corresponding Author, Email: L.shahmohamadi@gmail.com

A B S T R A C T

The aim of this research was to investigate the polymorphism of prolificacy gene, GDF9 in Zel sheep breed using RFLP-PCR method and to study the association of genotypes with multiple birth records. Genomic DNA of 200 sheep was extracted using modified salting out extraction protocol to evaluate the mutations in G1 and G8 variants of GDF9 gene. Polymerase chain reaction was carried out to amplify a 462 and 139 bp fragments of GDF9 gene. The amplified fragments of G1 and G8 variants of GDF9 genes were digested with restriction enzymes *Hin6I* and *DdeI*, respectively. The G1 variant of GDF9 gene was polymorphic. Two mutant (B) and wild (A) type alleles with frequencies of 0.05 and 0.95 were detected in tested animals. Known's point mutation $FecG^H$ was monomorphic in tested animals. For G1 variant of GDF9 gene, a Chi-square test indicated that the population was in equilibrium. GLM procedure of SAS software was used to investigate the association of G1 variant of GDF9 gene with twining. Results indicated that there was no significant association (P>0.05) between polymorphism at this locus and twining.

Key Words

GDF9, Polymorphism, Prolificacy, Sheep, RFLP