ژنتیک نوین
دوره دوازدهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۶
صفحه ۳۱۵ - ۳۱۱

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 نیکوصفت[۲]، حسن خمیس‌آبادی[۳]

۱- به‌ترتیب 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 S[1], Abdolmohammadi AR[*1], Hajarian H[1], Nikoosefat Z[2], Khamisabadi H[3]

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 روشPCR-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 به‌عمل 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 دوقلوزایی 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 دوقلوزایی میش‌های نژاد سنجابی به‌منظور بهبود باروری در این گله-ها شناسایی شود.

واژه‌های کلیدی

دوقلوزایی
کیفیت اسپرم
گوسفند سنجابی
PCR-RFLP

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-09-21]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.15.7]

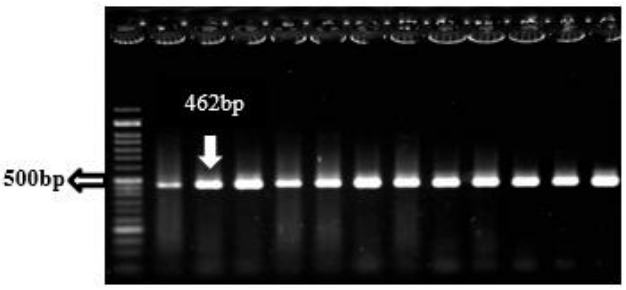
هدف از اصلاح نژاد گوسفند سودآوری از طریق بهبود چند صفت اقتصادی در گله‌ها به‌خصوص صفات تولیدی و تولید مثلی است. این بهبود می‌تواند از طریق انتخاب میش‌ها و قوچ‌های برتر به‌عنوان والدین نسل آینده بر اساس شایستگی ژنتیکی آن‌ها برای صفات مورد نظر صورت گیرد (Yazdi et al. 1997). یکی از ارکان اصلاح نژاد در دام‌ها، 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 براساس 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 شده‌است (Sadighi et al. 2002). این ژن ۲/۵ کیلو باز طول داشته که شامل دو اگزون و یک اینترون به طول ۱۱۲۶ جفت‌باز می‌باشد و کدکننده یک پیش پپتید به طول ٤٥٣ اسیدآمینه و پپتید فعال ۱۳۵ اسیدآمینه‌ای است (Bodensteiner et al. 1999). جهش در اگزون یک ژن *GDF9* موسوم به G1 منجر به تغییر آرژنین به هیستیدین در ۸۷ امین اسیدآمینه این هورمون می‌شود (Hanrahan et al. 2004). با وجود اهمیت این ژن در باروری، تاکنون الگوهای بیان و عملکرد آن در روند اسپرماتوژنز و باروری در قوچ‌ها مورد بررسی قرار نگرفته است. بنابراین مطالعه حاضر به‌منظور شناسایی جهش موجود در اگزون 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 ۹٦ 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 نمونه‌گیری 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 HOS[2] انجام شد. پس از استخراج DNA از خون، کمیت و کیفیت DNA روی ژل آگارز یک درصد تعیین شد. به‌منظور تعیین چندشکلی اگزون یک ژن *GDF9*(G1) و شناسایی جهش G به A (G260A)، براساس توالی پیشنهادی Hanrahan (2004) از یک جفت آغازگر اختصاصی FWD: 5'-GAAGACTGGTATGGGGAAATG-3' و REV: 5'-CCAATCTGCTCCTACACACCT-3' استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (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 $MgCl_2$، یک واحد آنزیم تک پلی‌مراز و ١٤/٥٥میکرولیتر آب‌مقطر انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای تکثیر قطعه ٤٦٢ جفت‌بازی جایگاه ژنی *GDF9* با دستگاه ترموسایکلر و با برنامه حرارتی زیر انجام شد: دمای ٩٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٥ دقیقه برای وا سرشت‌سازی اولیه، تعداد ۳۵ چرخه در دمای ٩٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای واسرشت‌سازی، دمای ٥٨ به مدت ٤٥ 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 ۱۰دقیقه 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 ٤٦٢ جفت‌بازی در نظر گرفته شده از ژن *GDF9* به‌خوبی و بدون هیچ باند غیر اختصاصی تکثیر یافته است (شکل ۱).

[1] Growth Differentiation Factor-9

[2] Hypo Osmotic Swelling Test

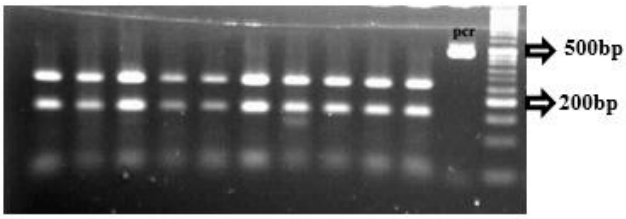
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-09-21]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.15.7]



شکل۱- محصولات PCR حاصل از تکثیر قطعه٤٦٢ جفت‌بازی از اگزون یک ژن *GDF9* (Marker Ladder 50 bp)

در هضم قطعه ٤٦٢ جفت‌بازی تکثیر شده از ژن *GDF9* با آنزیم برشی *HhaI* انتظار بر این بود که درصورت وجود جهش G به A (G1)، فقط یک جایگاه شناسایی مونومورف برای آنزیم *HhaI* وجود داشته باشد و در نتیجه دو قطعه ٤١٠ و٥٢ جفت‌بازی برای ژنوتیپ AA حاصل شود. هم‌چنین در صورت عدم وقوع جهش مذکور، دو ناحیه توسط آنزیم برشی شناسایی شده و سه قطعه ٢٥٤، ١٥٦ و ٥٢ جفت‌بازی برای ژنوتیپ وحشی GG روی ژل آگارز سه درصد رؤیت شود. در تمامی نمونه‌های مورد بررسی در این تحقیق مشاهده قطعات ٢٥٤، ١٥٦ و ٥٢ جفت‌بازی حاصل از هضم محصولات PCR، به‌خوبی عدم وجود جهش G1 در ناحیه مورد نظر را در قوچ‌های سنجابی تأیید کرد (شکل۲).



شکل۲- ژنوتیپ GG مشاهده شده حاصل از هضم آنزیمی قطعه ٤٦٢ جفت بازی اگزون یک از ژن*GDF9*
Marker Ladder 50 bp، ژنوتیپ GG (٢٥٤، ١٥٦ و ٥٢)

مشخص شده که هورمون *GDF9* به طور 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 اسپرماتوژنز 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[1] 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[2] QTL مؤثر بر دوقلوزایی روی کروموزوم پنج گوسفند و بسیار نزدیک به *GDF9* مشاهده شده و آن‌ها ژن *GDF9* را به‌عنوان یک ژن کاندیدا با تأثیر عمده بر دوقلوزایی 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[3] در چین جهش در جایگاه G1 ژن *GDF9* گزارش و تأثیر آن بر افزایش دوقلوزایی مشاهده شده‌است (Chu et al.2004). از طرفی در نژاد بلوچی وجود جهش در جایگاه G1 ژن*GDF9* منجر به افزایش دوقلوزایی 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 به‌ترتیب در ژن‌های *GDF9* و *BMP15* انجام شد، چند قلوزایی 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 ٥-٠ ارزش‌گذاری شد (جدول ١)، 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

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-09-21]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.15.7]

جدول۱- 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

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 دوقلوزایی 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 است در سالیان دور در جمعیت گوسفندان نژاد سنجابی اتفاق افتاده باشد اما به‌دلیل 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 بیش‌تری 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 به‌نظر می‌رسد.

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-9in 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, Evolution37: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: Salamons Artifical 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 sterlilty 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.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-09-21]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.15.7]

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.

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

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-09-21]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.15.7]