مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
ISCعلمی-پژوهشی و

چند شکلی درجایگاه های FSHR و GDF9 وارتباط آنها با تعداد بره در هر زایش گوسفند زل

نورالدین مرادی*[1]، نرگس نظیفی[1]، قدرت رحیمی میانجی[2]، زربخت انصاری پیرسرائی[3]

[1] دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

[2] استاد گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

[3] استاد یار گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: 1391/06/21، تاریخ پذیرش: 1392/12/16

چکیده

گیرنده های دو هورمون محرک فولیکولی (FSHR) و فاکتور مؤثر بر رشد و تمایز (GDF9) از پروتئین های کلیدی و مؤثر در کنترل فرآیند تولید مثلی در پستانداران محسوب می شوند. در این پژوهش چند شکلی در دو جایگاه ژنی مذکور و ارتباط آن ها با صفت چند قلو زایی در 150 راس از میش های نژاد زل بررسی شد. نمونه های خون به صورت تصادفی و از ورید وداج تهیه شد. در بررسی جایگاه ژنی FSHR به کمک تکنیک PCR-RFLP دو آلل A و B با فراوانی هر یک به ترتیب برابر با 93/33 و 6/67 درصد بود. در این جایگاه ژنی، دو ژنوتیپ AA و BB با فراوانی هر یک به ترتیب برابر با 93/33 و 6/67 درصد مشاهده اما ژنوتیپ هتروزایگوت AB در هیچ یک از نمونه‌های مورد بررسی مشاهده نشد. اثر ژنوتیپ های مختلف ژن FSHR بر صفت چند قلوزایی یا تعداد بره در هر زایش معنی داری نبود. جهت ردیابی چند شکلی در جایگاه ژنی GDF9 از دو تکنیک PCR-RFLP وPCR-SSCP استفاده شد. نتایج نشان داد که نمونه‌های مورد بررسی در جایگاه ژنی GDF9 یک شکل بوده و همه افراد ژنوتیپ هموزیگوت وحشی AA را نشان دادند. با توجه به نتایج این تحقیق و نتایج قبلی مرتبط به بررسی ژن های عمده دیگر در گوسفند زل به نظر می‌رسد که ژن های معمول و کاندید بزرگ اثر بره زایی در این نژاد مؤثر نبوده و لذا باید در جستجوی ژن و یا ژن های دیگری در گوسفندان این نژاد بود.

واژه های کلیدی: FSHR، GDF9، SSCP، RFLP، نژاد زل.

* نویسنده مسئول: نورالدین مرادی تلفن: 09111580470 Email: moradi.n1985@gmail.com

مقدمه

صنعت گوسفنداری در اقتصاد ملی کشور نقش قابل ملاحظه ای دارد، بخش زیادی از تولیدات دامی گوشت، شیر و پشم از این صنعت تامین می‌شود. در حال حاضر حدود 300 هزارتن (41٪) از کل گوشت تولیدی کشور توسط بیش از 50 میلیون رأس گوسفند تولید می‌شود که این مقدار گوشت تولید شده پاسخگوی نیاز رو به افزایش جمعیت کشور نمی‌باشد (Khaldari, 2004). لذا افزایش بازدهی در تولید گوشت گوسفند از اهمیت خاصی برخوردار است. از آنجایی که عمده مراتع در ایران از لحاظ پوشش گیاهی دارای وضعیت فقیر یا متوسط می‌باشند، لذا کاهش تعداد واحد دامی در واحد سطح می‌تواند از میزان فشار دام بر مرتع بکاهد (Jalali Zonoz, 2003). یکی از راه حل ها برای رفع این مشکل کاهش تعداد دام مولد، بدون کاهش درآمد دامدار می‌باشد. دست یابی به این هدف با استفاده از دام‌های مولد چند قلوزا به جای دام‌های مولد تک قلوزا میسر خواهد بود. با بکارگیری روشی مناسب می‌توان بازدهی تولید مثل را به طور قابل توجهی افزایش داد (Montgomery *et al*., 1995; Mulsant *et al*., 2001; Wilson *et al*., 2001). چند قلوزایی یکی از مهم ترین صفات اقتصادی است که تحت تاثیر محیط و ژنتیک قرار دارد و به همین دلیل بهبود نرخ تولید مثل در گوسفندان به عنوان یکی از اصلی ترین اهداف در اصلاح نژاد مورد توجه قرار می گیرد (Bougenane *et al*., 1991). اگر-چه اعتقاد بر این است که فعالیت‌های تولید مثلی در گوسفند تحت تاثیر تعداد زیادی ژن قرار دارند.

هورمون محرک فولیکول (FSH) یکی از هورمون‌های اصلی در فرایند تولید مثل به حساب می آید که در رشد و بلوغ سلول‌های جنسی طی گامه باروری ضروری است. هورمون محرک فولیکولی با اتصال به گیرنده‌های اختصاصی خود در تخمدان‌ها، نقش مهمی در تنظیم عملکرد تخمدان در پستانداران ایفا می‌کند. گیرنده هورمون محرک فولیکول متعلق به خانواده پپتید-های پروتئین جی هفت (G7) است که توسط سلول‌های گرانولوزا ترشح می‌شود (Simoni *et al*., 1995; Rannikki *et al*., 1995) در انسان اولین توالی DNA مربوط به ژن FSHR در سال 1989 توسط گروه واسارز[1] به دست آمد هنگامی که ژن TSH انسانی را کلون می‌کردند. گیرنده این ژن در انسان روی کروموزم شماره 21 و در گوسفند و خوک روی کروموزم شماره 3 مکان یابی شده است (Parmentier *et al*., 1989). مطالعات پژوهشگران روی گاو، گوسفند و خوک نشان داد که چند شکلی ژن FSHR عملکرد تولید مثلی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. در این گزارش‌ها آمده است که می توان از این ژن به عنوان یک نشانگر برای افزایش نرخ زایش در حیوانات استفاد کرد (Li *et al*., 2010). بررسی

[1] Vassart's group

این جایگاه ژنی و مطالعه ارتباط آن با صفت بره زایی در گوسفندان ایرانی تنها در نژاد های ایران بلک و بلوچی انجام شده است (Nazifi *et al*., 2011).

از دیگر فاکتورهای رشد کنترل کننده فرایند های تولید مثلی، فاکتور تمایز و رشد فولیکولی (GDF9) می‌باشد که این پروتئین در پستانداران به وسیله اووسیت های فولیکول های در حال رشد ترشح می‌شود (McPherron *et al*., 1993). فاکتورهای رشد توسط تخمدان تولید و به طور مستقیم روی رشد و عملکرد اووسیت ها تاثیر دارند. این ژن در اووسیت ها بیان می‌شود و تصور بر این است که برای تولید فولیکول‌ها در تخمدان مورد نیاز باشد. فاکتور GDF9 عضوی از خانواده بزرگ فاکتور رشد بتا بوده که در رشد وتوسعه فولیکول‌های اولیه در تخمدان (Bondestainer *et al*., 1999)، سلول های گرانولوزا و تکا، نرخ تخمک اندازی Francis *et al*., 1999; Davis *et al*., 2005)، توقف فعالیت تخمدان نارس (Galoway *et al*., 2000) و همچنین در تمایز و بلوغ اووسیت‌ها نقش مهمی به عهده دارد (Davis *et al*., 2005, 2006). خاموش کردن ژن GDF9 در موش منجر به توقف رشد فولیکول‌ها در مرحله فولیکول اولیه گردیده است (Dong *et al*., 1996; Carabatsos *et al*., 1998). در همین راستا پژوهشگران طی تحقیقی گزارش کردند که این ژن برای تولید فولیکول در گوسفندان ضروری است (Hanrahan *et al*., 2004). ژن GDF9 در گوسفند روی کروموزوم 5 قرار دارد (Woods *et al*., 2003; Sadighi *et al*., 2002). از میان 8 جهش کشف شده تا سال 2004 نشان داده شد که جهش G8 با میزان باروری مرتبط است (Hanrahan *et al*., 2004). محققین با استفاده از روش SSCP چند شکلی‌های موجود در ژن‌های BMP15 و GDF9 و ارتباط آنها را با افزایش نرخ تخمک اندازی در گوسفندان نژادهای بلیکر[1] وکمبریج[2] بررسی کردند (Hanrahan *et al*., 2004). آنها جهش‌های جدیدی را در این دو جایگاه ژنی کشف و نشان دادند که این جهش‌ها در حالت هتروزیگوت با افزایش نرخ تخمک اندازی و درحالت هموزیگوت، فنوتیپ عقیمی را نشان می‌دهند (Hanrahan *et al*., 2004). بنابراین این ژن نقش مهم و برجسته ای را در ارتباط با باروری داشته و می‌تواند به عنوان یک ژن با اثر بزرگ مورد ملاحظه قرار گیرد. تاکنون پژوهش های فراوانی در ارتباط با جایگاه ژنی $FecG^H$ در بین نژادهای مختلف گوسفند ایرانی انجام شده است (Ghaderi *et al*., 2010; Ghaffari *et al*., 2009; Akbarpour *et al*., 2008). هدف از انجام پژوهش حاضر شناسایی چند شکلی در این دو جایگاه ژنی و نیز بررسی ارتباط این جایگاه ها با نرخ زایش در گوسفندان نژاد زل بود.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه و استخراج DNA

[1] Belclare
[2] Cambridge

برای انجام این پژوهش از 150 راس گوسفند نژاد زل مازندران استفاده گردید. این نژاد تولید مثل خارج فصلی دارد و میزان دوقلوزایی در آن حدود 15 درصد می باشد. نمونه ها به صورت تصادفی و از جنس ماده به همراه رکورد های زایش های اول، دوم و سوم هر نمونه جمع آوری شد. خون گیری از ورید گردنی و در لوله های حاوی EDTA (1میلی گرم بر میلی لیتر) انجام گرفت. استخراج DNA از 1/5 میلی لیتر خون با استفاده از روش نمکی بهینه یافته انجام شد (Miller *et al*., 1988). جهت تعیین کیفیت وکمیتDNA استخراج شده از روشهای الکتروفورز روی ژل آگارز و طیف سنجی استفاده شد.

واکنش زنجیره پلی‌مراز

در این بررسی یک قطعه 139 جفت بازی از اگزون دو ژن GDF9 جهت تکثیر انتخاب شد. این بخش از ژن با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی با توالی رفت، 5'-ATG GAT GAT GTT CTG CAC CAT GGT GTG AAC CTG A-3' و توالی برگشت 5'-CTT TAG TCA GCT GAA GTG GGA CAA C-3' مورد تکثیر قرار گرفت (Hanrahan *et al*., 2004). همچنین برای تکثیر قطعه ای به طول 304 جفت باز از جایگاه ژن FSHR از یک جفت آغازگر اختصاصی با توالی رفت 5'-CCC ATC TTT GGC ATC AG-3' و توالی برگشت 5'-ACA CAG TGA TGA GGG GCA C-3' استفاده شد (Jiang *et al*; 1998). هر واکنش تکثیر در حجم 25 میکرولیتر شامل 1/5 میکرولیتر DNA (10 نانوگرم بر میکرولیتر)، 3 میلی مولار $MgCl_2$، 0/5 میکرولیتر از هر یک از آغازگرها (10 پیکومول)، 0/5 میکرولیتر dNTPs (200 میکرومولار)، 1 واحد آنزیم Taq DNA polymerase 2/5 میکرولیتر از بافر PCR با غلظت 1X (10 میلی مولار تریس، 50 میلی مولار کلرید پتاسیم، 0/1٪ ژلاتین،pH=8/4) انجام شد. برنامه تکثیر این دو جایگاه شامل 35 چرخه حرارتی به صورت، 95 درجه سانتیگراد به مدت 5 دقیقه برای واسرشته شدن اولیه دو رشته DNA، 94 درجه سانتیگراد به مدت 30 ثانیه برای واسرشته شدن دو رشته DNA در چرخه، 62 درجه سانتیگراد به مدت 40 ثانیه برای اتصال آغازگرهای ژن GDF9 و 72 درجه سانتیگراد به مدت 30 ثانیه برای تکثیر و 72 درجه سانتیگراد به مدت 4 دقیقه برای بسط نهایی انجام گرفت. مشابه برنامه حرارتی فوق برای ژن FSHR نیز بکار رفت تنها با این تفاوت که برای اتصال آغازگرهای این ژن دمای 56 درجه سانتیگراد به مدت 30 ثانیه بکار گرفته شد. سپس صحت تکثیر محصولات PCR توسط ژل آگارز 2 درصد و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید و با استفاده از دستگاه مستند سازی ژل، (بایورد، آمریکا) باندها رویت و مورد آزمون گرفتند.

آزمایش اول: مطالعه جایگاه ژنی GDF9 با روش PCR-RFLP

پس از تکثیر، محصولات PCR ژن GDF9 تحت تیمار آنزیمی DdeI در دمای 37 درجه

سانتی گراد و به مدت 12 ساعت قرار گرفتند. واکنش در حجم 10 میکرولیتر شامل، 1 میکرولیتر بافر هضم (10x)، 5/5 میکرولیتر محصول PCR، 1 واحد آنزیم برشی و 3/3 میکرولیتر آب مقطر دوبارتقطیر انجام گرفت. سپس محصولات هضم شده روی ژل آگارز 3/5 درصد الکتروفورز و بعد از رنگ آمیزی توسط اتیدیوم بروماید، تعیین ژنوتیپ شد.

پس از هضم آنزیمی در این جایگاه، در صورت وقوع جهش آنزیم قادر به شناسایی جایگاه برشی نمی باشد اما در صورت عدم وقوع جهش، آنزیم DdeI با شناسایی یک محل برش، قطعه تکثیر شده را به دو قطعه 31 و 108 جفت بازی تقسیم می‌کند.

آزمایش دوم: مطالعه جایگاه ژنی GDF9 با روش PCR-SSCP

جهت شناسایی آلل‌های مختلف در جایگاه ژنی ژن GDF9 (از نظر ترادف اسیدهای نوکلئیک) از آنالیز SSCP استفاده شد. در آنالیز SSCP مقدار 2 میکرولیتر محصول PCR به همراه 8 میکرولیتر بافر بارگذاری SSCP با هم مخلوط و در دمای 95 درجه سانتی‌گراد واسرشت سازی محصول PCR انجام شد. سپس نمونه‌ها روی ژل پلی اکریل آمید 14 درصد در دمای 4 درجه سانتی گراد به مدت 16 ساعت، با ولتاژ ثابت 400 ولت و با استفاده از بافر TBE 1X الکتروفورز شدند. رویت سازی باندها با استفاده از رنگ آمیزی نیترات نقره (Bassam *et al.*, 1991) انجام و در ادامه ژنوتیپ نمونه ها با مشاهده مستقیم تعیین شدند .

آزمایش سوم: مطالعه جایگاه ژنی FSHR با روش PCR-RFLP

محصولات PCR ژن FSHR پس از تکثیر، تحت تیمار آنزیمی *MSCI* قرار گرفتند. واکنش هضم آنزیمی در حجم 10 میکرولیتر با ترکیباتی شامل 1 میکرولیتر بافر هضم (10x)، 5/5 میکرولیتر محصول PCR، 1 واحد آنزیم برشی و 3/3 میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر و دمای 37 درجه سانتی گراد به مدت 12 ساعت انجام گرفت. سپس محصولات هضم شده روی ژل آگارز 2 درصد الکتروفورز و بعد از رنگ آمیزی توسط اتیدیوم بروماید، تعیین ژنوتیپ شد. آنزیم برشی *MSC*I در صورت عدم وقوع جهش در جایگاه ژنی دو قطعه 90 و 214 جفت بازی تولید می‌کند.

آنالیز آماری

فراوانی ژنی و ژنوتیپی با شمارش مستقیم آلل‌ها و ژنوتیپ‌ها از روی ژل محاسبه شد. اثر ژنوتیپ‌های مختلف در جایگاه ژن‌های مورد مطالعه بر صفت بره‌زایی با استفاده از رویه مدل خطی (GLM[1]) توسط نرم افزار SAS نسخه 9/1 و براساس مدل آماری ذیل انجام گرفت.

$$Y_{ij} = \mu + p_i + G_j + e_{ij}$$

به طوری که Y_{ij} ارزش فنوتیپی صفت مشاهده شده (تعداد بره در هر زایش)، μ میانگین

[1] General Linear Model

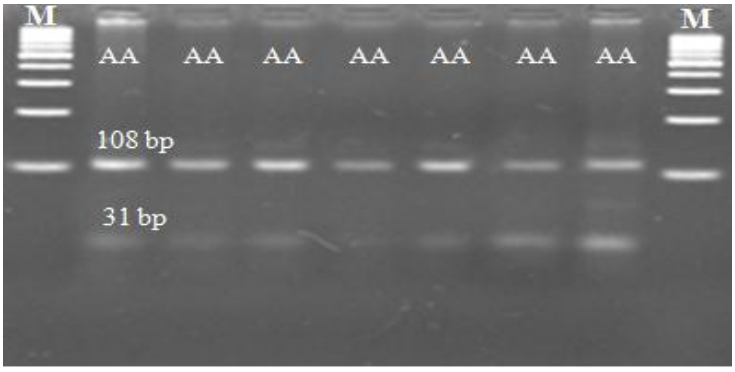
صفت مورد نظر در گله، p_i اثر نوبت زایش (i= 1-3)، G_j اثر ثابت ژنوتیپ (j= 1-2) و e_{ij} اثر عوامل باقی مانده در مدل می باشد.

نتایج

در پژوهش حاضر جایگاه ژنی $FecG^H$ از ژن GDF9 و ژن FSHR به عنوان دو ژن کاندیدای مؤثر برصفت بره زایی و باروری در 150 راس از گوسفندان نژاد زل مورد بررسی قرار گرفتند.

نتیجه مطالعه جایگاه ژنی GDF9 با روش PCR-RFLP

شناسایی چندشکلی موجود در اگزون 2 ژن GDF9 با استفاده از تکنیک RFLP و آنزیم برشی Dde1 انجام شد. تکنیک RFLP زمانی می تواند جهش در یک ژن را شناسایی کند که جایگاه برش برای آنزیم مورد نظر توسط جهش ایجاد و یا جایگاه برشی موجود در ژن از بین رفته باشد. در صورت وقوع جهش در جایگاه اگزون 2 ژن GDF9، پس از هضم آنزیمی، آنزیم DdeIقادر به شناسایی جایگاه برشی نبوده اما در صورت عدم وقوع جهش، آنزیم با شناسایی یک محل برش، قطعه تکثیر شده را به دو قطعه 31 و 108 جفت بازی برش خواهد داد که در شکل 1 مشاهده می گردد. نتایج آزمون RFLP این جایگاه ژنی عدم وجود چندشکلی را نشان داده و همه نمونه ها دارای الگوی باندی مشابه (ژنوتیپ وحشی AA) هستند.



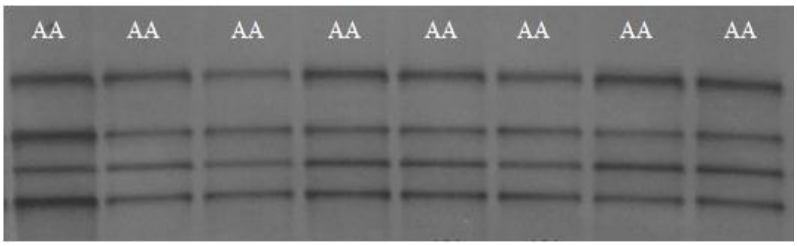
شکل 1- نتیجه تکنیک**PCR-RFLP** حاصل از تیمار آنزیمی***DdeI*** در جایگاه ژنی **GDF9** (**$FecG^H$**) در گوسفند زل ؛ **M**: خط کش مولکولی **SM03321**.

Figure 1- Result of RFLP technique for GDF9 ($FecG^H$) loci by *Ddel* enzyme in Zel sheep; M: size marker SM03321.

نتیجه مطالعه جایگاه ژنی GDF9 با روش PCR-SSCP

در ادامه جهت شناسایی جهش های احتمالی در دیگر موقعیت های قطعه تکثیری از اگزون 2 ژن GDF9 از آنالیز SSCP استفاده شد.

نتیجه این آنالیز که در شکل 2 آورده شده است نیز الگوی باندی مشابهی (ژنوتیپ وحشی AA) را برای تمامی نمونه های مورد بررسی نشان می دهد.

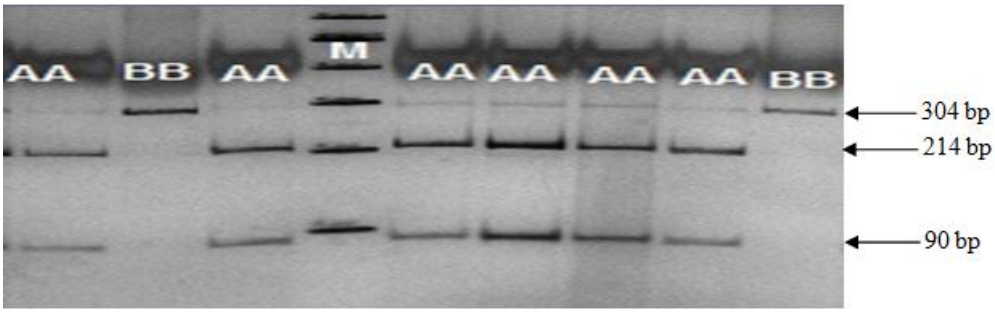


شکل 2 – نتیجه تکنیک **PCR-SSCP** قطعه 139جفت بازی از اگزون 2 ژن **GDF9** در گوسفند زل.

Figure 2- Result of PCR-SSCP technique for GDF9 gene (a fragment of 139 bp from exon 2 of this gene) in Zel sheep.

نتیجه مطالعه جایگاه ژنی FSHR با روش PCR-RFLP

در جایگاه مورد بررسی از ژن FSHR قطعه ای به طول 304 جفت باز تکثیر و صحت اندازه قطعه تکثیر شده با استفاده از سایز مارکر 100 جفت بازی تایید شد. در ادامه شناسایی چندشکلی موجود در اگزون 2 ژن FSHR با-استفاده از تکنیک RFLP و آنزیم برشی MSCI انجام گرفت. در صورت وجود جایگاه برش، در اثر تیمار آنزیمی دو قطعه به طول های 90 و 214 جفت بازی (آلل A) و در صورت عدم وجود جایگاه برش همان قطعه 304 جفت بازی (آلل B) به صورت یک باند روی ژل ایجاد شد (شکل 3).



شکل 3– نتیجه تکنیک **PCR-RFLP** حاصل از تیمار آنزیمی ***MSCI*** در جایگاه ژنی **FSHR** در گوسفند زل.

Figure 3- Result of PCR-RFLP technique of FSHR loci by *MSCI* enzyme in Zel sheep.

آنالیز آماری

فراوانی ژنی و ژنوتیپی

بررسی انجام شده روی جایگاه ژنی GDF9 با استفاده از دو تکنیک RFLP-PCR و SSCP-PCR، نشان دهنده الگوی باندی یکسان در تمامی نمونه‌های مورد بررسی بوده و همه نمونه های مورد مطالعه دارای ژنوتیپ هموزیگوت وحشی AA بودند. در حالی که در

بررسی جایگاه ژنی FSHR با استفاده از تکنیک RFLP-PCR وجود چند شکلی در نمونه های بررسی شده تایید شد و وفور آللی و ژنوتیپی جایگاه ژنی FSHR در جدول 1 ارائه گردیده است. مقایسه کای دو محاسبه شده و کای دو جدول در سطح 0/05نشان می دهد که، تفاوت بین وفور ژنوتیپی مشاهده شده و مورد انتظار از نظر آماری معنی دار است و در نتیجه توزیع ژنوتیپی در تعادل هاردی واینبرگ نمی باشند (جدول 1).

جدول 1- وفور آللی و ژنوتیپی جایگاه ژنی FSHR در گوسفند زل.

Table 1- Allelic and Genotypic frequency of FSHR loci in Zel sheep.

تعداد نمونه Number of samples	توزیع ژنوتیپ Genotype distribution		**فراوانی ژنوتیپی(٪)** Genotype frequency (%)		فراوانی آللی(٪) Allelic frequency (%)		کای دو χ^2
	AA	**BB**	**AA**	**BB**	**A**	**B**	
150	140	10	93.33	6.67	93.33	6.67	157.4*

*: significant

جدول 2- آنالیز اثر ژنوتیپ جایگاه ژنی FSHR برصفت بره زایی در هر نوبت زایش در گوسفند زل.

Table 2- Analysis of genotype effect of FSHR loci on litter size per parity in Zel sheep

ژنوتیپ Genotype	نوبت زایش Parity			میانگین زایش ها Average calving	سطح احتمال Likely level
	زایش اول Third generation	زایش دوم Second generation	زایش سوم Third generation		
AA	1.27±0.45	1.29±0.46	1. 20±0.43	1.25±0.43	0.8
BB	1.00±0.0	1.40±0.52	1.40±0.52	1.26±0.34	

نتایج نشان داد ژنوتیپ های مختلف ژن FSHR برصفت بره زائی تاثیر معنی داری ندارد ($P<0.05$). مقایسه میانگین تعداد بره در هر نوبت زایش بر اساس هر یک از ژنوتیپ ها با استفاده از نرم افزار SAS نسخه 9.1 و آزمون دانکن انجام شد که نتایج در جدول2 ارایه شده است.

بحث

گیرنده هورمون محرک فولیکولی (FSHR) مسئول ارسال سیگنال های محرک رشد و توسعه فولیکولی می باشد. مطالعه ارتباط بین چند شکلی در این جایگاه ژنی و صفات تولید مثلی مانند نرخ زایش یکی از اصلی ترین موضوع تحقیقاتی در ژنتیک و اصلاح نژاد حیوانی به شمار می آید

(Li *et al*; 2010). کافی نبودن ترشح FSHR در حیوانات سبب ناباروری (de Castro *et al*., 2003) و همچنین جهش های غیر فعال کننده در FSHR سبب تاخیر در مراحل آغازین و یا پایانی رشد فولیکول می‌شود (Touraine *et al*., 1999).

در پژوهش حاضر در جایگاه ژنی FSHR دو ژنوتیپ AA و BB با فراوانی 93/33٪ و 6/67٪ مشاهده شد. آزمون کای دو نشان داد که جمعیت حاضر در تعادل هاردی واینبرگ نبوده که می تواند بخاطر کوچک بودن جامعه آماری و همچنین ممکن است انتخاب در روند اصلاح نژاد، این جایگاه را از تعادل خارج کرده باشد. بررسی اثر ژنوتیپ‌های مختلف ژن FSHR بر تعداد بره در هر زایش معنی دار نبود ($P<0.05$). پژوهش های معدودی ارتباط میان تغییرات ژنتیکی این جایگاه ژنی و تعداد بره در هر زایش را مورد بررسی قرار دادند. در مطالعه این جایگاه ژنی در گوسفندان نژاد ایرن بلک، آرمان و بلوچی وجود چند شکلی تایید و سه ژنوتیپ AA، AB و BB به ترتیب با فراوانی های 0/10، 0/60 و 0/30 در نژاد ایران بلک، 20/75، 50/49 و 28/30 در نژاد آرمان و 25/86، 43/01 و 31/03 در نژاد بلوچی گزارش شد (Nazifi *et al*., 2011). پژوهشگران در بررسی اگزون 10 ژنFSHR در بز نژاد هایمن چینی[1] با استفاده از تکنیک PCR-SCCP چند شکلی را ردیابی نکردند (Li *et al*., 2010). همچنین بررسی ناحیه کناری[2] 5' ژن گیرنده هورمون محرک فولیکولی در بزهای نژاد بوئر[3]، گانژونگ[4] و زینونگ سانن[5]، با به کارگیری تکنیک PCR-RFLP نیز هیچ چند شکلی را نشان نداد (Yan *et al*., 2007). در ادامه نیز محققین با بررسی اگزون 10 ژن FSHR در بزهای سفید شانان[6]، گانژونگ[7] و بوئر نتوانستند در این جایگاه ژنی چند شکلی را ردیابی کنند (Lan *et al*., 2006).

مطالعه توالی نوکلئوتیدی و میزان بیان، گروهی از ژن های مرتبط با نرخ تخمک ریزی در بز سیاه یانلینگ[8] که یک نژاد چینی با نرخ باروری پایین است و مقایسه آن با بز بوئر، نشان داد که بز یانلینگ تعداد فولیکول و اووسیت کمتری نسبت به بز بوئر دارد. در این گزارش آمده است که مقدار بیان ژن‌های FSHR، FSHβ و BMP15 در بز یانلینگ کمتر ولی بیان ژن‌های BMPR1B و ESR2 در این نژاد بیشتر است. از طرفی در بز یانلینگ، سطح FSH در سرم خون کمتر ولی میزان استروژن آن بیشتر است. این پژوهشگران استدلال نموده اند که تغییر در توالی و اختلاف در مقدار بیان ژن و تولید پروتئین و mRNA ژن‌های مربوط به نرخ تخمک ریزی و غلظت پایین FSHR و BMP15 سبب کاهش اووسیت و متعاقب آن کاهش تعداد فولیکول‌ها منجر به باروری پایین در بز سیاه یانلینگ شده است (Cui *et al*., 2008).

[1] Chinese Himan goat
[2] 5' flanking region

[3] Boer goat
[4] Ganjong
[5] XinongSaanen
[6] Shannanwhait
[7] Guanzhong
[8] Yunling

بررسی چند شکلی در جایگاه ژنی GDF9 با استفاده از دو مارکر PCR-RFLP و PCR-SSCP نشان داد که این جایگاه در نمونه های مورد بررسی در گوسفند زل تک شکل می باشد. در تحقیقی که روی نژاد های مختلف گوسفند از جمله هو[1]، دورست[2] و سافولک[3] انجام شده عدم وقوع جهش در این جایگاه ژنی را گزارش کرده اند (Li *et al*., 2003). همچنین احتمال ارتباط باروری بالا و افزایش صفت چند قلوزایی در گوسفندان دم کوتاه هان با جهش G^8 از ژن GDF9 رد شده است (Chu *et al*., 2005). با مطالعه در جایگاه ژنی $FecG^H$ در نژاد قزل، عدم وقوع جهش در این جایگاه گزارش گردیده است و نشان داده شد که نرخ باروری بالای این نژاد با چند شکلی جایگاه فوق در ارتباط نیست (Akbarpor *et al*., 2008). مطالعه ای روی گوسفندان نژاد کردی و عربی با استفاده از تکنیک PCR-RFLP صورت گرفت که منجر به گزارش الگوی باندی مشابهی در نمونه‌های مورد بررسی شد (Ghaderi *et al*., 2010). با توجه به در دست داشتن رکوردهای فنوتیپی (نرخ زایش) متفاوت از گوسفندان زل مورد استفاده در پژوهش حاضر ، نتایج به دست آمده با گزارشات Liao *et al*. (2004)، Hanrahan *et al*. (2004)، Juengel *et al*. (2004) و Davis *et al*. (2001, 2005) که نشان دادند حالت هموزیگوت منجر به عقیمی و ناباروری می‌شود، مغایرت دارد.

مشابه این مطالعه که به منظور شناسائی جهش-های موجود در جایگاه $FecG^H$ از ژن GDF9 در گوسفند نژاد شال انجام گرفت نتایج نشان داد که عامل ژنتیکی مسئول دو یا چندقلوزائی در این نژاد مربوط به ژن بزرگ اثر $FecG^H$ نیست (Ghaffari *et al*., 2009). با توجه به اهمیت و وجود چند قلوزایی در نژادهای گوسفندان بومی ایران از جمله نژاد زل و از طرفی عدم مشاهده جهش در ژن های معمول و بزگ اثر در این نژادها به نظر می رسد که احتمالا جایگاه و یا جایگاه های ژنی دیگری این ویژگی را در گوسفندان ایرانی کنترل می‌نمایند. بنابراین انجام پژوهش هایی در آینده به منظور شناسایی این جایگاه های ژنی ضروری به نظر می‌رسد.

[1] Hu
[2] Dorest
[3] Suffolk

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.

Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff PM (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry 196: 80-3.

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

Boujenane I, Bradford G E, Berger Y M, Lahlou-kassi A (1991). Repeatability estimate for liter size and its components in sheep. Animal reproduction science 26: 107-113

Carabatsos MJ, Elvin J, Matzuk MM, Albertini DF (1998). Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor-9-deficient mice. Developmental biology 204: 373-384.

Chu MX, Cheng RH, Fang L, Ye SC (2005). Study on bone morphogenetic protein as a candidate gene for prolificacy of small tailed Han sheep and Hu sheep. journal of anhui agricultural university 32: 278-282

Cui HX, Zhao SM, Cheng ML, Guo L, Ye RQ, Liu WQ, Gao, SZ (2008) .Cloning and expression levels of genes relating to the ovulation of the yunling black goat. Biology of Reproduction 80: 219-226

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

Davis GH, Balakrishnan L, Ross IK, Wilson T, Galloway M, Lumsden BM, Hanaran JP, Mullen MX, Mao Z, Wang GL, Zhao ZS, Robinson JJ, Mavrogenis AP, Papachristoforou, Peter C, Baumung R, Cardyn P, Boujenane I, Cockett NE, Eythorsdotirr E, Arranz JJ, Notter DR (2006). Investigation of the Booroola (FecB) and Inverdale ($FecX^I$) mutations in 21 prolific breeds and strains of sheep sampled in 13 countries. Animal Reproduction Science 7: 92-96

De Castro F, Ruiz R, Montoro L, Hernandez D, Padilla E, Real LM, Ruiz A (2003). Role of follicle-stimulating hormone receptor Ser680Asn polymorphism in the efficacy of folliclestimulating. hormone. Fertiliyy and Sterility 80: 571–576.

Dong JW, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM (1996). Growth differentiation factor 9 is required during early ovarian folliculogenesis. Nature 383, 531-535.

Francis CY, Rong CY, Boyle T (1999). Popgene Version 1.31., Microsoft Windows-based Freeware for Population Genetic Analysis. University of Alberta.

Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MPE, Juengel JL, Jokiranta TS, McLaren RJ, Luiro K, Dodds KG, Montgomery GW, Beattie AE, Davis GH, Ritvos O (2000). Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. Nature Genetic 25: 279-283.

Ghaderi A, BeigiNasiri MT, Mirzadeh KH, Fayazi J, Sadr AS (2010). Identification of the GDF9 mutation in two sheep breeds by using polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique. African Journal of Biotechnology 9: 8020-8022.

Ghaffari M, Nejati-Javaremi A, Rahimi-Mianji G (2009). Lack of polymorphism in the oocyte derived growth factor (GDF9) gene in the Shal breed of sheep. South African Journal of Animal Science 39: 355-360.

Hanrahan JP, Gergan SM, Mulsant P, Mullen M, Davis GH, Powell R, Galloway SM, Powell R, Galloway SM (2004). Mutations in the genes for oocyte derived growth factors GDF 9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare Sheep (Ovisaries). Biology of Reproduction 70: 900-909.

Jalali Zonoz MG (2003). New principle sheep husbandry. Partove vaghe, Tehran, Iran. pp 330-332.

Jiang ZH, Priat C, Galibert F (1998). Traced Orthologous amplified sequence tags (TOASTs) and mammalian comparatives maps. Mammalian Genome l9: 577-587.

Juengel JL, Hudson NL, Whiting L, McNatty K P (2004). Effects of immunization against bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 on pregnancy in ewes. Biology of Reproduction 70: 557-561.

Khaldari M (2004). Sheep and Goat husbandry. Jahad daneshgahi pushers, Tehran, Iran. PP 11-14.

Lan YX, Chen H, Chen CY, Pan CY, Lie CZ, Zhang YD, Yu J (2006). PCR-SSCP detectionand DNA sequence analysis of exon 10 goat follicle-Stimulating Hormone receptor (FSHR) gene. Journal of Agricultural of Biotechnology 14:484-488

Li BX, Chu MX, Wang JY (2003). PCR-SSCP analysis on growth differentiation factor 9 gene in sheep. Yi Chuan Xue Bao 30: 307-310.

Li YJ, Zhang L, Shang LQ, Wang HF, ZOU H, Zhang H, Ji DJ (2010). Genetic polymorphisms at three loci of PRLR and FSHR gene correlate with litter size in Chinese Haimen goat. journal animal and veterinary advances 9:22 2835-2838

Liao WX, Moore RK, Shimasaki S (2004). Functional and molecular characterization of naturally occurring mutations in the oocyte-secreted factors bone morphogenetic protein-15 and growth and differentiation factor-9. Journal of Biological Chemistry 17: 17391-17396.

McPherron, AC, Lee SJ (1993). GDF-3 and GDF-9: two new members of the transforming growth factor b-superfamily containing a novel pattern of cysteines. Journal of Biological Chemistry 268: 3444-3449.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. nucleic acids research 16: 1215

Montgomery GW, Tate ML, Henry HM, Penty JM, Rohan RM (1995). The follicle-stimulating hormone receptor and luteinizing hormone receptor genes are closely linked in sheep and deer. journal of molecular endocrinology 15:259 –265

Mulsant P, Lecerf F, Fabre S, Schibler L, Monget P, Lanneluc I, Pisselet C, Riquet J, Monniaux D, Callebaut I, Cribiu E, Thimonier J, Teyssier J, Bodin L, Cognie Y, Chitour N, Elsen M (2001). Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in Booroola Merino ewes. proceedings of the national academy of sciences 98: 104-109.

Nazifi N, Rahimi-Mianji GH,Ansari-Pirsareii Z, Yousefi V, Leilaii S. Detection of different allelic forms of follicle stimulating hormone receptor gene in Iran black and Baluchi sheep The 7th National Biotechnology Congress of Iran. Tehran, Iran.

Parmentier M, Libert F, Maenhaut C, Lefort A, Gerard C, Perret J, Van Sande J, Dumont J E, Vassart G (1989). Molecular cloning of the thyrotropin receptor. Science 246:1620–1622.

Rannikki A, Zhang F P, Huhtaniemi IT (1995). Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in the rat testis and ovary. Molecular and Cellular Endocrinology 107: 199–208.

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

Simoni M, Nieschlag E (1995). FSH in therapy: physiological basis, new preparations and clinical use. Reproductive Medecine Review 4: 163–177.

Touraine P, Beau I, Gougion S, Mediori G, Desroches A, Pichard C, Doteouf M (1999). New natural inactivating mutation for follicle stimulating hormone receptor: Correlation between receptor function and phenotype. Molecular Endocrinology 13: 1844-1854

Wilson T, Yang WU, Juengel JL, Ross IK, Lumsden JM, Lord EA, Dodds KG, Walling GA, McEwan JC, O`Connell AR, McNatty KP, Montgomery GW (2001). Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the Intracellular Kinase domain of bone morphogenetic protein IB receptor (ALK-6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. Biology of Reproduction 64: 1225-1235.

Woods SC, Clegg DJ (2003). Signals that control central appetite regulation. International Symposium Basel, Karger, 15-30.

Yun T, Bin JI, Yun C (2007). Effect of the 5′ -flanking region of goat follicole-stimulating hormone receptor gene on yean trail. Journal of northwest A & F University 35:9.

Polymorphisms in FSHR and GDF9 loci and their associations with litter size in Zel sheep

Moradi N.*[1], Nazifi N.[1], Rahimi Mianji G.[2], Ansari Piresaraei Z. [3]

[1] M.Sc. Student of genetic and animal breeding, Animal Science Department, Faculty of Animal and Aquatic Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
[2] Professor, Animal Science Department, Faculty of Animal and Aquatic Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
[3] Assistant Professor Animal Science Department, Faculty of Animal and Aquatic Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

Abstract

Follicle stimulating hormone receptor (FSHR) and growth differentiation factor 9 (GDF9) both are the most important proteins that affect reproduction process in mammalian. Polymorphism in these genes and their possible relationship with twining trait in Zel (n=150) sheep are investigated in the present study. Blood samples were collected randomly via vein puncture. PCR-RFLP technique for FSHR marker site showed two A and B alleles with the frequency of 93.33 and 6.67 and two genotypes of AA and BB with the frequency of 93.33 and 6.67, respectively. However, the heterozygote AB genotype was not observed in studied samples. There was no significant association between FSHR marker site and twining (lambing per parity). Detection of genetic variation of GDF9 was carried out by PCR-RFLP and PCR-SSCP technique, respectively. All studied samples had similar banding pattern in both genetic markers and showed wild type homozygote AA genotype. Our finding in Zel breed in the present study along with pervious investigations on other major genes, It can be concluded that the common and major gene affecting reproduction trait are not present in Zel sheep. Therefore, further study is necessary to find a functional gene(s) in this breed.

Key words: FSHR, GDF9, SSCP, RFLP, Zel breed

* Corresponding Author: N. Moradi Tel: 09111580470 Email: Moradi.n1985@gmail.com