



ارتباط چند شکلی ژن GDF9 با صفات کیفی اسپرم در گاوهای نر هلشتاین ایران

ابوالفضل قربانی¹ و مصطفی به پای²

1- گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شبستر، ایران، (نویسنده مسوول: abolfazlgorbani@gmail.com)

2- گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شبستر، ایران

تاریخ دریافت: 1398/04/17 تاریخ پذیرش: 1398/10/28

صفحه: 95 تا 100

چکیده

به منظور بررسی ارتباط جایگاه‌های ژن کاندیدا GDF9 با صفات کیفی و کمی اسپرم در گاوهای نر هلشتاین ایران، از تعداد 108 نمونه خون و اسپرم گاوهای نر موجود در مرکز تلقیح مصنوعی که بین سال‌های 1368-1395 متولد شده بودند، استفاده شد. برای تعیین SNP جایگاه‌های A625T و A489T با روش PCR-RFLP به ترتیب از آنزیم‌های *DraI* و *NsiI* استفاده شد. در جایگاه A625T دو آلل A با طول قطعات 351 و 25 جفت باز و الل T با طول 376 جفت باز و در جایگاه A489T دو آلل A با طول قطعات 184 و 24 جفت باز و الل T با طول 208 جفت باز به دست آمد. بررسی نتایج فراوانی نشان داد که در هر دو جایگاه الل T و ژنوتیپ TT گاوهای نر هلشتاین ایران فراوان تر بود. بررسی نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر هر دو جایگاه بر کلیه صفات کیفیت اسپرم در گاوهای نر هلشتاین ایران معنی دار بود. مقایسات بین میانگین ژنوتیپ‌ها نشان داد که در هر دو جایگاه گاوهای با ژنوتیپ AT به طور معنی داری در صفات حجم انزال، جمعیت اسپرم، تعداد کل اسپرم و تعداد دز اسپرم تولیدی نسبت به بقیه ژنوتیپ‌ها دارای مقادیر بالاتری هستند. در صفات جنبندگی بعد از انزال و جنبندگی بعد از یخ‌گشایی ژنوتیپ TT دارای مقادیر بالاتر معنی دار را نشان داد. نتایج نشان داد که می‌توان از این جایگاه‌های نشانگری در انتخاب ژنومی سود برد.

واژه‌های کلیدی: GDF9، پلی مورفیسم، کیفیت اسپرم، گاوهای نر هلشتاین ایران

مقدمه

سیگنال‌های دریافتی از لیگاند‌های TGFβ در تمایز و مهاجرت سلول‌های زایا، تکثیر سلولی سرتولی، تمایز و رشد اسپرماتوگونی و اسپرماتوزن نقش دارد. همچنین فیتزپاتریک و همکاران (5) و پنیتر و همکاران (12) پیشنهاد دادند که GDF9 به طور بالقوه می‌تواند عملکرد بیضه را تنظیم کند، این نظریه توسط ایتمان و همکاران (6,5) نیز مورد تایید قرار گرفت. نیکولز و همکاران در سال (11) گزارش دادند که GDF9 عامل خاص سلول‌های زایا در بیضه است و نشان دادند که GDF9 می‌تواند با تأثیر بر عملکرد اتصالات محکم و اینهمین β نقش مهمی در سلول‌های سرتولی داشته باشد. تانگ و همکاران ارتباط دو جهش نقطه‌ای در این ژن را با صفات کمی و کیفی اسپرم در گاوهای چینی مورد بررسی قرار داده و ارتباط آن را معنی دار گزارش کردند. با توجه به مطالب فوق و اینکه تا کنون در گاوهای نر هلشتاین ایران این ژن و ارتباط آن با صفات مرتبط با اسپرم بررسی نشده، این تحقیق با اهداف زیر تعریف و اجرا شد. (1) شناسایی چند شکلی تک نوکلئوتیدی SNPs در GDF9 در گاوهای نر هلشتاین ایرانی با استفاده از زنجیره پلیمرز و روش هضم آنزیمی و (2) بررسی ارتباط بین SNP‌های GDF9 و تغییرات صفات کمی و کیفی اسپرم است.

مواد و روش‌ها
اطلاعات فنوتیپی

در مجموع 108 راس از گاوهای نر مورد استفاده در تلقیح مصنوعی که بین سال‌های 1364 تا 1395 متولد شده و در دو ایستگاه مرکز اصلاح نژاد شمال غرب (تبریز) و مرکز تستاژ شرکت جاهد (کرج) نگهداری می‌شدند، برای ژن کاندیدای مورد نظر به وسیله روش PCR-RFLP برای روشن شدن ارتباط آن‌ها با صفات حجم اسپرم، جمعیت اسپرم، کل جمعیت

تلقیح مصنوعی یکی از اولین روش‌های فناوری زیستی است که برای افزایش بهره‌وری تولید مثلی و اصلاح نژاد حیوانات مزارع به کار گرفته شده و تأثیر به‌سزایی در بهبود بسیاری از گونه‌ها به خصوص گاوهای شیری داشت. به‌هرحال یکی از موانع استفاده از آن، پایین بودن کیفیت اسپرم دام‌های نر مورد استفاده است که برای حصول نتیجه مطلوب بایستی رکوردگیری و پیش‌بینی انجام گیرد (6). علاوه بر این انتخاب مستقیم صفات مرتبط با کیفیت منی به دلیل وراثت پذیری پایین مشکل است (13)، در سال‌های اخیر استفاده از رویکرد ژن کاندیدا برای شناسایی ژن‌های موثر بر صفات کیفیت مایع منی خصوصاً ژن‌های محوری بیضه - هیپوفیز - هیپوتالاموس به طور گسترده‌ای در اصلاح صفات کیفی اسپرم گاو نر مورد بررسی قرار گرفته است (3,18)، یکی از ژن‌های این مسیر که توجه اندکی به آن شده است، عامل تمایز رشد فاکتور 9 یا GDF9 است. عامل تمایز رشد فاکتور 9 که متعلق به خانواده رشد فاکتور β (TGFβ) و اعضای خانواده‌ای با عنوان FeCG است که روی کروموزوم 7 قرار دارد (14) و نقش مهمی در رشد فولیکولی تخمدان و نرخ تخمک‌گذاری ماده‌ها دارد (8,1). اندازه GDF9 گاو حدوداً 9/2kb است و حاوی دو اگزون و یک اینترون است که اندازه اگزون 1 و 2 و اینترون به ترتیب برابر با 431، 1360 و 956 جفت باز است (17) مطالعات و بررسی‌های قبلی نشان دادند که GDF9 در همکاری نزدیک با BMP15 برای تخمک‌گذاری طبیعی، لقاح و تولید مثل ماده‌ها ضروری است (4,18). و بر نرخ دوقلوژی در گوسفند تأثیر بسزایی دارد (9,1)، در نرها عامل تمایز رشد فاکتور 9 (GDF9) در بیضه‌ها شناسایی شده است ولی نقش آن در بیضه‌ها به خوبی مشخص نشده است (5,11,12). ایتمان و همکاران (6) گزارش کردند که

هریک از جایگاه‌ها با استفاده از روش RFLP تعیین ژنوتیپ شدند. شرایط انجام هضم، نام آنزیم‌ها به‌همراه نقاط برش در جدول 3 آمده‌است.

برای شناسایی مواد حاصل از هضم آنزیمی الکتروفورز افقی با استفاده از ژل آگارز 3 درصد انجام شد. اندازه باندها با استفاده از ردیفی که در آن سایز مارکر DNA بارگذاری شده بود و از طریق مقایسه به‌دست آمد.

تجزیه و تحلیل آماری

فراوانی‌های ژنوتیپی و اللی و آزمون تعادل هاردی-واینبرگ با استفاده از آزمون کای مربع برای هر ژن به‌طور جداگانه با استفاده از رابطه زیر و نرم‌افزار PopGene.S² انجام گرفت. داده‌های گرفته شده از مراکز اصلاح نژاد برای صفات مختلف و اطلاعات ژنوتیپی حاصل از PCR-RFLP در نرم‌افزار اکسل (2013) ترکیب شد. برای بررسی فراوانی و تعادل هاردی-واینبرگ از نرم‌افزار POPGENE S2 نسخه یک استفاده شد. با در نظر گرفتن حیوان به‌عنوان اثر تصادفی، سال - فصل، ایستگاه و ژنوتیپ به‌عنوان اثر ثابت، مدل خطی تصادفی برای متغیرهای پیوسته و رگرسیون لجستیک برای متغیرهای گسسته، ارتباط عوامل موثر با صفات کمی و کیفی اسپرم با نرم‌افزار آماری SAS نسخه 8/2 (2000) مورد بررسی قرار گرفت. برای مقایسه میانگین از آزمون توکی در سطح احتمال 95 درصد استفاده شد.

اسپرم، جنیندگی اسپرم تازه، جنیندگی اسپرم بعد از یخ‌گشایی، نسبت جنیندگی قبل و بعد از یخ‌گشایی و تعداد پایوت تولیدی در هر انزال تعیین ژنوتیپ شدند. رکوردهای فنوتیپی برای صفات مورد مطالعه به‌همراه سن، سال و فصل تولید اسپرم توسط مرکز اصلاح نژاد دام، شرکت جاهد و مرکز اصلاح نژاد شمال غرب جمع‌آوری شد. برای هر گاو نر اندازه‌گیری‌های تکراری در دسترس بود. تعداد کل داده‌ها 16400 عدد رکورد برای هر صفت بود.

تکثیر قطعات

برای استخراج DNA از نمونه خون استفاده شد. نمونه‌های خون با استفاده از لوله‌های حاوی خلا و EDTA از ورید دمی گرفته و داخل یخ به آزمایشگاه ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد شستر منتقل و تا زمان استخراج در دمای 20- درجه سلسیوس نگهداری شد. استخراج DNA از نمونه‌های خون به روش تغییر یافته فنل-کلروفرم (RGED) انجام شد (15).

جایگاه مورد نظر با استفاده از آغازگرها (جدول 1) و برنامه‌های خاص دمایی (جدول 2) در دستگاه ترموسایکلر تکثیر شده و برای شناسایی نحوه تکثیر الکتروفورز بر روی ژل آگارز 1/3 درصد انجام شد. باندها با استفاده از اتیدیوم بروماید نمایان و به‌وسیله اشعه UV در دستگاه UV DOC مورد عکس‌برداری قرار گرفتند. محصول‌های حاصل از تکثیر

جدول 1- آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر جایگاه‌های مورد بررسی در ژن GDF9 در گاوهای نر هلشتاین ایران

Table 1. Primers used for amplification of studied loci in GDF9 gene in Iranian Holstein bulls

منبع	توالی آغازگر (5' → 3')	طول قطعه	جایگاه
17	F: AGGGAAGAAGAAAAGATCTTATGC R: TCTACCCAGGCTTTAGTCCC	376	GDF9A625T
	F: ATGCCCTCATGGGTTGATGTAGTTTA R: CTCCCATCTCTCATACACACAAG	204	GDF9A489T

جدول 2- برنامه تکثیر هر یک از ژن‌ها در دستگاه ترموسایکلر (تانگ و همکاران 2013)

Table 2. Amplification program for each locus in the Thermocycler (Tang et al. 2013)

تعداد چرخه	زمان	دما (سلسیوس)	مرحله
	5 دقیقه	95	آغازین
35	40 ثانیه	94	دنوتارسیون
	50 ثانیه	53	اتصال پرایمر (GDF9A489T)
	50 ثانیه	57	اتصال پرایمر (GDF9A625T)
	30 ثانیه	72	تطویل
	5 دقیقه	72	تطویل نهایی

جدول 3- شرایط برش قطعات حاصل تکثیر برای تعیین ژنوتیپ

Table 3. Digestion Conditions for Amplified product to determine the genotype

اندازه هر آلل (bp)	دمای برش	آنزیم برشی	جایگاه
T:376 A:351 25	37	DraI	GDF9A625T
T:204 A:184 20	37	NsiI	GDF9A489T

پارامترهای منی، تغییرات زیادی را نشان می‌دهد و تحت تأثیر عوامل زیادی مانند گونه، فصل، حیوان، مدیریت، تغذیه و غیره می‌باشد. ولی مقادیر به‌دست آمده با مقادیر گزارش شده قبلی تقریباً مطابقت دارد.

نتایج و بحث

خلاصه آماری صفات مورد بررسی

خلاصه‌های آماری (میانگین، انحراف معیار، حداقل و حداکثر) صفات کیفیت اسپرم در جدول 4 ارائه شده است.

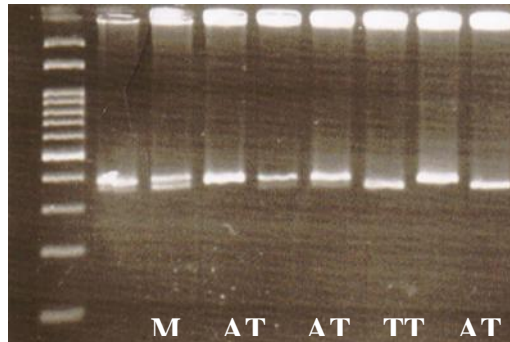
جدول 4- آمار توصیفی برای صفات مورد بررسی

صفات مورد بررسی	تعداد	میانگین	انحراف معیار	حداقل	حداکثر
حجم انزال (میلی لیتر)	16360	5/49	1/91	0/50	13/00
جمعیت اسپرم ($\times 10^9$)	15817	1193/38	364/44	500/00	2518/00
تعداد کل اسپرم ($\times 10^9$)	15761	6440/41	2779/70	510/500	17842/50
جنیندگی بعد از انزال (درصد)	16377	69/40	8/40	50/00	95/00
تعداد کل اسپرم متحرک در منی تازه ($\times 10^9$)	15738	4450/56	1981/11	375/35	12998/63
جنیندگی بعد از یخ‌گشایی (درصد)	16383	41/26	9/64	30/00	90/00
نسبت جنیندگی قبل و بعد از انجماد	16377	1/74	0/34	0/60	3/00
تعداد از اسپرم تولیدی	16328	194/46	105/86	8/00	698/00

جفت باز) مشاهده شد (شکل 1 و 2). فراوانی الی و ژنوتیپی به‌همراه آزمون کای مربع در جدول 5 آمده است. بررسی نتایج فراوانی نشان داد که در جایگاه A625T که ال ال T نسبت به ال ال A (0/6343 در مقابل 0/3657) و ژنوتیپ TT و در جایگاه A489T ال ال T نسبت به ال ال A (0/602) در مقابل (0/398) و ژنوتیپ TT فراوان تر بودند (جدول 5). مقایسه فراوانی‌های مشاهده شده و مورد انتظار در این جایگاه نشان داد که جمعیت در این جایگاه در تعادل می‌باشد ($P > 0/05$).

فراوانی الی و ژنوتیپی

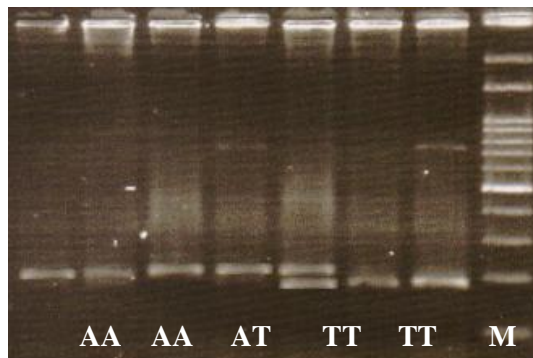
ژن GDF9 با طول 1816 جفت باز، حاوی دو اینترون و دو آگزون بوده و جایگاه آن روی کروموزم شماره 7 قرار دارد. دو جایگاه A625T و A489T روی اینترون یک ژن GDF9 گاو با استفاده از پرایمرهای گزارش شده توسط (تانگ و همکاران، 2013) تکثیر شد. در جایگاه A625T دو ال ال A (351 و 25 جفت باز) و ال ال T (376 جفت باز) و در جایگاه A489T دو ال ال A (184 و 24 جفت باز) و ال ال T (208



شکل 1- ژنوتیپ‌های ژن GDF9 در جایگاه A625T روی ژل آگارز 3 درصد
Figure 1 Genotypes of GDF9 gene at A625T site on 3% agarose gel

گزارش‌های کمی در مورد جایگاه‌های مورد بررسی وجود دارد. گزارش‌ها با نتایج تحقیق حاضر مطابقت ندارد. تانگ و همکاران (17) گزارش کردند فراوانی ال ال A در هر دو جایگاه بالاتر است. در جایگاه A625T فراوانی ژنوتیپ AT و در جایگاه A489T فراوانی ژنوتیپ AA بالاتر بود. در مطالعه دیگری تانگ و همکاران (16) فراوانی جایگاه‌های فوق را در جمعیت گاوهای ماده هلشتاین چینی بررسی کرده و برای

جایگاه‌های A625T و A489T فراوانی ال ال A به‌ترتیب 0/708 0/535 گزارش کردند. شرایط اقلیمی مناطق زیست‌نژادهای مختلف بر فراوانی ال‌های این جایگاه به‌شدت تأثیرگذار است که تأثیر عمده اقلیم بر اساس انتخاب طبیعی است. از طرف دیگر در نتیجه انتخاب طبیعی و هم چنین مصنوعی می‌تواند باعث تفاوت بین نژادهای ایرانی و چینی شده باشد.



شکل 2- ژنوتیپ‌های ژن GDF9 در جایگاه A485T بر روی ژل آگارز 3 درصد
Figure 2. Genotypes of GDF9 gene at A485T site on 3% agarose gel

و تعداد دز اسپرم تولیدی ژنوتیپ AT نسبت به بقیه ژنوتیپ‌ها مقدار بالاتری دارد. در صفت نسبت جنسندگی بعد از انزال و بعد از یخ‌گشایی ژنوتیپ TT بالاتر است. در جایگاه A489T گاوهای با ژنوتیپ AT به‌طور معنی‌داری در صفات حجم انزال، جمعیت اسپرم، تعداد کل اسپرم و تعداد دز اسپرم تولیدی نسبت به بقیه ژنوتیپ‌ها دارای مقادیر بالاتری هستند. در صفات تعداد کل اسپرم متحرک در منی تازه، جنسندگی بعد از انزال و جنسندگی بعد از یخ‌گشایی ژنوتیپ TT مقادیر بالاتر معنی‌دار را نشان داد. ولی در نسبت جنسندگی قبل و بعد از انجماد ژنوتیپ AA به‌طور معنی‌داری بالاتر از بقیه بود. در صفات حجم انزال، جمعیت اسپرم، تعداد کل اسپرم و تعداد کل اسپرم متحرک در منی تازه ژنوتیپ AA دارای کمترین مقدار، در صفات جنسندگی بعد از انزال و جنسندگی بعد از یخ‌گشایی ژنوتیپ AT کمترین مقدار و در صفات نسبت جنسندگی قبل و بعد از انجماد و تعداد در اسپرم تولیدی ژنوتیپ TT پایین‌تر بود.

بررسی ارتباط جایگاه‌ها با صفات مورد بررسی

نتیجه‌ی تجزیه واریانس عوامل مؤثر بر کیفیت اسپرم در گاوهای نر هلشتاین ایران نشان داد که آثار حیوان، ایستگاه، سال، جایگاه‌های A625T و A489T بر تمامی صفات مورد بررسی تأثیر معنی‌دار دارد. اثر فصل بر صفات حجم انزال، جمعیت کل اسپرم، جنسندگی بعد از انزال و تعداد کل اسپرم متحرک بعد از انزال و اثر سن بر تعداد کل اسپرم متحرک بعد از انزال، جنسندگی بعد از یخ‌گشایی و نسبت جنسندگی قبل و بعد از انجماد معنی‌دار بود. برآورد میانگین حداقل مربعات صفات مختلف برای ژنوتیپ‌های هر دو جایگاه در جدول 6 آمده است.

مقایسات میانگین صفات مختلف در ژنوتیپ‌ها جایگاه A625T با استفاده از آزمون توکی نشان داد که گاوهای نر با ژنوتیپ AA نسبت به گاوهای دارای ژنوتیپ‌های TT و AT به‌طور معنی‌داری حجم اسپرم، تعداد کل اسپرم، جنسندگی بعد از انزال، تعداد کل اسپرم متحرک بعد از انزال و جنسندگی بعد از یخ‌گشایی بالاتری دارند. در حالیکه در صفات جمعیت اسپرم

جدول 5- فراوانی الی و ژنوتیپی و آزمون کای مربع برای ژن GDF9

نام جایگاه	ژنوتیپ	تعداد	فراوانی	تعداد مورد انتظار	مقدار کای مربع	فراوانی الی
A625T	AA	19	0/1759	0/1338	3/56ns	A=0/3657 G=0/6343
	AT	41	0/3796	0/4639		
	TT	48	0/4445	0/4023		
A489T	AA	20	0/2041	0/1584	3/56ns	A=0/398 T=0/602
	AT	38	0/3878	0/4792		
	TT	40	0/4082	0/3625		

جدول 6- مقایسه میانگین حداقل مربعات ژنوتیپ‌های مختلف در ژن GDF9 با استفاده از آزمون توکی برای صفات مورد بررسی در گاوهای نر هلشتاین ایران

Table 6. Least squares mean comparison of different genotypes in GDF9 gene with tukey test for studied traits in Iranian Holstein bulls

ارزش P	SEM	ژنوتیپ‌های GDF9A489T			ارزش P	SEM	ژنوتیپ‌های GDF9A625T			صفات مورد بررسی
		TT	AT	AA			TT	AT	AA	
0/0001	0/135	5/63 ^a	5/66 ^a	5/23 ^b	0/0001	0/052	5/50 ^b	5/55 ^b	5/73 ^a	حجم انزال (میلی‌لیتر)
0/0001	23/43	1191/19 ^b	1233/93 ^a	1127/40 ^c	0/0001	25/23	1192/03 ^a	1217/43 ^a	1156/70 ^b	جمعیت اسپرم (×10 ⁶)
0/0001	65/42	6626/94 ^b	6857/08 ^a	5785/08 ^c	0/0001	45/72	6395/58 ^b	6652/70 ^a	6597/01 ^a	تعداد کل اسپرم (×10 ⁶)
0/0001	0/75	71/47 ^a	68/37 ^b	69/28 ^b	0/0001	1/85	69/92 ^b	67/50 ^c	75/19 ^a	جنسندگی بعد از انزال (درصد)
0/0001	32/33	4737/20 ^a	4659/94 ^b	3991/46 ^c	0/0001	70/45	4456/60 ^b	4491/11 ^b	4905/75 ^a	تعداد کل اسپرم متحرک در منی تازه (×10 ⁸)
0/0001	0/85	43/67 ^a	40/49 ^b	40/71 ^b	0/0001	0/42	41/64 ^b	39/87 ^c	46/69 ^a	جنسندگی بعد از یخ‌گشایی (درصد)
0/0001	0/042	1/71 ^b	1/75 ^a	1/76 ^b	0/0001	0/011	1/75 ^a	1/74 ^a	1/70 ^b	نسبت جنسندگی قبل و بعد از انجماد
0/0001	2/922	164/15 ^c	209/32 ^a	200/87 ^b	0/0001	2/78	193/18 ^b	202/87 ^a	191/17 ^b	تعداد دز اسپرم تولیدی

بررسی، در تعدادی از صفات تشابه و در تعداد دیگری از صفات تضادهایی مشاهده می‌شود. همچنین تانگ و همکاران (17) ارتباط جایگاه‌های فوق را با صفات تولید مثلی در گاوهای هلشتاین ماده بررسی کرده و گزارش کردند که در جایگاه A489T ژنوتیپ TT و در جایگاه A625T ژنوتیپ AT مقادیر بالاتری دارد. به‌نظر می‌رسد که در هر دو جنس و هر دو جایگاه در برخی از صفات

تانگ و همکاران (16) گزارش کردند که جایگاه A489T اثر معنی‌داری بر صفت یکپارچگی اکروزم دارد. در حالیکه جایگاه A625T بر صفت جمعیت اسپرم دارای تأثیر معنی‌داری بوده و بر سایر صفات اسپرم غیر معنی‌دار است. نتایج این محققین با تحقیق حاضر و تحقیق تانگ و همکاران (17) در تناقض می‌باشد. در مقایسه میانگین‌های گزارش برای صفات مختلف در ارتباط با ژنوتیپ‌های جایگاه‌ها مورد

اطلاعات کمی و ژنومی مدنظر قرار گیرند. همچنین به دلیل پایین بودن وراثت‌پذیری صفات مرتبط با اسپرم، استفاده از این جایگاه‌ها می‌توانند در اصلاح‌نژاد برای این صفات مدنظر قرار گیرند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود فرض می‌دانند از حمایت‌ها و پشتیبانی‌ها و کمک‌های مرکز اصلاح‌نژاد و دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیبستر تشکر نمایند.

آل A و در برخی دیگر ال T مطلوب است. عامل تمایز رشد فاکتور 9 یا GDF9 یکی از ژن‌هایی است که در مسیر اسپرماتوژنسیز توجه اندکی به آن شده است. در نرها عامل تمایز رشد فاکتور 9 (GDF9) در بیضه‌ها شناسایی شده است ولی نقش آن در بیضه‌ها به خوبی مشخص نشده است (12,11,5). نتایج این بررسی‌ها نشان داد که جایگاه‌های مورد تحقیق تاثیر مثبتی بر صفات کیفی و کمی اسپرم داشته و می‌توانند به‌عنوان ژن‌های کاندیدا در بررسی‌های ژنومی و همچنین انتخاب بر مبنای ترکیب

منابع

1. Aaltonen, J., M.P. Laitinen, K. Vuojolainen, R. Jaatinen, N. Horelli-Kuitunen, L. Seppa, H. Louhio, T. Tuuri, J. Sjoberg, R. Butzow, O. Hovatta, L. Dale and O. Ritvos. 1999. Human growth differentiation factor 9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis. *J. Clin. Endocr. Metab*, 84: 2744-2750.
2. Amiri, F., S.R. Miraei-Ashtiani and M. Sadeghi. Polymorphism in the GDF8 Gene and Their Effects on Carcass Traits in Lori-Bakhtiari and Zel Sheep Breeds. *Rap*, 2011; 2(4): 12-23.
3. Dai, L., Z. Zhao, R. Zhao, S. Xiao, H. Jiang, X. Yue, X. Li, Y. Gao, J. Liu and J. Zhang. 2009. Effects of novel single nucleotide polymorphisms of the FSH beta-subunit gene on semen quality and fertility in bulls. *Anim. Reprod. Sci*, 114: 14-22.
4. Eppig, J.J., F. Chesnel, Y. Hirao, M.J. O'Brien, F.L. Pendola, S. Watanabe and K. Wigglesworth. 1997. Oocyte control of granulosa cell development: how and why. *Hum. Reprod*, 12(3): 127-132.
5. Fitzpatrick, S.L., D.M. Sindoni, P.J. Shughrue, M.V. Lane, I.J. Merchenthaler and D.E. Frail. 1998. Expression of growth differentiation factor-9 messenger ribonucleic acid in ovarian and non ovarian rodent and human tissues. *Endocrinology*, 139(5): 2571-2578.
6. Gadea, J. 2005. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology*, 63(4): 431-444.
7. Itman, C. and K.L. Loveland. 2008. SMAD expression in the testis: an insight into BMP regulation of spermatogenesis. *Dev. Dyn*, 237(5): 97-111.
8. Itman, C., S. Mendis, B. Barakat and K.L. Loveland. 2006. All in the family: TGF- β family action in testis development. *Reproduction*, 132(6): 233-246.
9. Khanahmadi, A., G. RahimiMianji, S. Hassan Hafezian, R. Khataminejad, N. Mamizadeh and S. Makan Mosavi. Effect of Polymorphisms in Some Candidate Genes on Twinning in Cross Breeds of Shall and Romanov. *rap*. 2016, 7(14): 192-186
10. McNatty, K.P., J.L. Juengel, K.L. Reader, S. Lun, S. Myllymaa, S.B. Lawrence, A. Western, M.F. Meerasahib, D.G. Mottershead, N.P. Groome, O. Ritvos and M.P. Laitinen. 2005. Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function in ruminants. *Reproduction*, 129(7): 481-487.
11. Nicol, L., S.C. Bishop, R. Pong-Wong, C. Bendixen, L.E. Holm, S.M. Rhind and A.S. McNeilly. 2009. Homozygosity for a single base-pair mutation in the oocyte-specific GDF9 gene results in sterility in Thoka sheep. *Reproduction*, 138(6): 921-33.
12. Penetier, S., S. Uzbekova, C. Perreau, P. Papillier, P. Mermillod and R. Dalbiès-Tran. 2004. Spatio-temporal expression of the germ cell marker genes MATER, ZAR1, GDF9, BMP15, and VASA in adult bovine tissues, oocytes, and preimplantation embryos. *Biol Reprod*, 71(4): 1359-66.
13. Rothschild, M.F and J.P. Bidanel. 1998. Biology and Genetics of Reproduction. In: *The Genetics of the Pig* (Rothschild MF, ed.). CAB International, Wallingford, Oxon, 8: 313-34.
14. Sadighi, M., K.J. Bodensteiner, A.E. Beattie and S.M. Galloway. 2002. Genetic mapping of ovine growth differentiation factor 9 (GDF9) to sheep chromosome 5. *Animal Genetic*, 33(9): 244-245.
15. Saremi, M., A.M. Saremi and M. Tavallaee. 2008. Rapid genomic DNA extraction (RGDE). *Forensic Science International: Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.* 1: 63-65.
16. Tang, J.N., C.Y. Yu, X.X. Zhang and L.G. Yang. 2011. Effects of MboII and BspMI polymorphisms in the gonadotropin releasing hormone receptor (GnRHR) gene on sperm quality in Holstein bulls. *Mol. Biol. Rep.* 38(10): 3411-3415.
17. Tang, K.Q., W.C. Yang, S.J. Li and L.G. Yang. 2013. Polymorphisms of the bovine growth differentiation factor 9 and their associated with superovulation performance in Chinese Holstein cows. *Genet. Mol. Res.* 12(11): 390-399.

Association of GDF9 Gene Polymorphism with Sperm Quality and Quantity Traits in Iranian Holstein Bulls

Abolfazl Ghorbani¹ and Mostafa Behpai²

1- Animal Science department, Faculty of Agriculture and Veterinary, Shabestar Branch, Islamic Azad university, Shabestar, Iran (Corresponding author: abolfazlgorgani@gmail.com)

2- Animal Science department, Faculty of Agriculture and Veterinary, Shabestar Branch, Islamic Azad University, Shabestar, Iran

Received: July 8, 2019

Accepted: January 18, 2020

Abstract

The use of artificial insemination in dairy cattle industry may improve the results of selection for production traits. This study attempts to evaluate the effect of GDF9A625T and GDF9A489T candidate gene polymorphism on the sperm quality and quantity traits in Iranian bulls. A total of 108 samples of blood and semen were collected from A. I. bulls born between 1989-2016 years. The GDF9A625T and GDF9A489T SNPs were determined by PCR-RFLP with *DraI* and *NsiI* enzymes, respectively. In A625T site, A (351 and 25 bp) and T (376 bp) alleles and in A489T site, A (184 and 24 bp) and T (208bp) alleles were obtained and also three AA, AT and TT genotypes in two marker sites were observed. The frequency results of GDF9A625T site showed that the T allele relative to the A allele was more frequent in Iranian Holstein bulls (0.6343 vs 0.3657) and 44.44, 37.98 and 17.95 percent of bulls had TT, AT and AA genotypes, respectively. In GDF9A489T site, the T allele frequency was more than A allele (0.602 vs 0.398) and 40.82, 38.78 and 20.14 percent of bulls had TT, AT and AA genotypes, respectively. Analysis of variance revealed that the effects of both loci were significant effects on sperm quality in Iranian Holstein bulls. The result of means comparison between genotypes in two marker sites showed that bulls with AT genotype significantly high value in quantitative trait and AA genotype was significantly higher in qualitative trait. Results of this research showed that these marker sites can be beneficial in genomic selection.

Keywords: Gdf9, Polymorphism, Sperm Quality, Iranian Holstein Bulls