Archiv

Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500
Iranian Biotechnology Society

Effects of polymorphism of ATPase6 and ATPase8 genes on in vitro oocyte maturation and embryo culture of Sanjabi sheep

Pejman Mardani

MSc Graduate, Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah, Iran. E-mail: pmardani@yahoo.com

Fereshteh Teymouri

MSc Graduate, Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah, Iran. E-mail: fereshtehteimory1373@gmail.com

Saheb Foroutanifar

*Corresponding author. Assistant Professor, Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah, Iran. E-mail: s.foroutanifar@razi.ac.ir

Alireza Abdolmohammadi

Associate Professor, Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah, Iran. E-mail: alirezaam@razi.ac.ir

Hadi Hajarian

Assistant Professor, Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah, Iran. E-mail: h.hajarian@razi.ac.ir

Abstract

Objective

Mitochondria are an excellent source for explaining cytoplasmic inheritance because of their important roles in cell metabolism and because they are primarily inherited maternaly in animals. In domestic animals, various studies have reported an association between mitochondrial DNA polymorphism and production and reproduction traits. The aim of this study was to investigate the polymorphism of ATPase6 and ATPase8 genes and their effects on the rates of in vitro maturation of oocytes (IVM) and in vitro culture of embryos (IVC) in Sanjabi sheep.

www.SID.ir

Archive of SID

Materials and methods

Blood and ovary samples of adult Sanjabi ewes were collected from Bistoon slaughterhouse located in Kermanshah. In the laboratory, after separating the excess tissue around the ovaries and washing them, a cumulus-oocyte complex with a diameter of more than 3 mm from the follicles was aspirated. 100 samples containing more than two oocytes were transferred to dishes containing in vitro maturation (IVM) medium. After the oocytes matured, fresh Sanjabi ram sperm were used for in vitro fertilization of each sample. For in vitro culture, putative zygotes formed in the previous stage were cultured in synthesized ovarian fluid medium for 48 hours. DNA extraction was performed using the salting out method. A 895 bp fragments of DNA containing ATPase6 and ATPase8 genes were amplified by PCR and the samples were genotyped using a modified SSCP method. The Kruskal-Wallis nonparametric test was used to investigate the relationship between the observed genotype patterns and IVM and IVC rates.

Results

The results of this study showed the existence of polymorphisms in the studied gene regions and five different band patterns A (50%), B (12%), C (9), D (21) and E (8%) were observed. Analysis of the relationship between these patterns and IVM and IVC showed no significant relationship between them ($p>0.05$).

Conclusions

Despite the observation of polymorphisms in ATPase6 and ATPase8 genes using the modified SSCP method, these polymorphisms had no effect on the rate of IVM and IVC.

Keywords: in vitro maturation, in vitro culture, polymorphism, sheep, mitochondria.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Mardani P, Teymouri F, Foroutanifar S, Abdolmohammadi A, Hajarian H (2021) Effects of polymorphism of ATPase6 and ATPase8 genes on in vitro oocyte maturation and embryo culture of Sanjabi sheep. *Agricultural Biotechnology Journal* 13 (3), 155-169.

Agricultural Biotechnology Journal 13 (3), 155-169 DOI: 10.22103/jab.2021.16667.1270

Received: July 23, 2021. Accepted: August 25, 2021.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

www.SID.ir

Archiv

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸
انجمن بیوتکنولوژی ایران
دانشگاه شهید باهنر کرمان

بررسی اثرات چندشکلی‌های ژن‌های ATPase6 و ATPase8 بر بلوغ برون‌تنی تخمک و کشت برون‌تنی جنین در گوسفند سنجابی

پژمان مردانی

دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران. رایانامه: pmardani@yahoo.com

فرشته تیموری

دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران. رایانامه: fereshtehteimory1373@gmail.com

صاحب فروتنی فر

*نویسنده مسئول: استادیار، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران. رایانامه: s.foroutanifar@razi.ac.ir

علیرضا عبدالمحمدی

دانشیار، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران. رایانامه: alirezaam@razi.ac.ir

هادی حجاریان

استادیار، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران. رایانامه: h.hajarian@razi.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۳

چکیده

هدف: میتوکندری به دلیل نقش های مهمی که در متابولیسم سلول دارد و به دلیل اینکه عمدتا از طریق مادر در حیوانات به ارث می رسد، یک منبع عالی برای توضیح وراثت سیتوپلاسمی است. در حیوانات اهلی مطالعات مختلفی ارتباط بین چند شکلی‌های DNA میتوکندری و صفات تولیدی و تولید مثلی را گزارش کرده اند. هدف از این مطالعه بررسی چند شکلی ژن‌های ATPase6 و ATPase8 و اثر آنها بر میزان موفقیت بلوغ برون‌تنی تخمک‌ها (IVM) و کشت برون‌تنی جنین‌ها (IVC) در گوسفندان سنجابی بود.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها: نمونه‌های خون و تخمدان میش‌های بالغ از کشتارگاه بیستون واقع در کرمانشاه جمع آوری شد. در آزمایشگاه پس از جداسازی بافت اضافی پیرامون تخمدان¬ها و شستشوی آنها، مجموعه کومولوس- تخمک¬های با قطر بیشتر از ۳ میلی متر از فولیکول‌ها آسپیراسیون شد. تعداد ۱۰۰ نمونه که تعداد بیش از دو تخمک داشتند، به دیش¬های حاوی محیط بلوغ انتقال داده شدند. بعد از بلوغ تخمک‌ها، برای لقاح برون تنی هر نمونه، از اسپرم تازه قوچ سنجابی استفاده شد. برای کشت برون تنی، زیگوت‌های تشکیل شده در مرحله قبلی در محیط مایع تخمدانی سنتز شده به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شدند. استخراج DNA با استفاده از روش نمکی انجام شد. قطعه ۸۹۵ جفت بازی از DNA میتوکندری که شامل ژن‌های ATPase6 و ATPase8 بود با استفاده از PCR تکثیر شدند و نمونه‌ها با استفاده از یک روش تغییر یافته SSCP ژنوتیپ شدند. برای بررسی ارتباط الگوهای مشاهده شده با نرخ بلوغ و کشت رویان از آزمون ناپارامتری کروسکال-والیس استفاده شد.

نتایج: نتایج این مطالعه وجود چند شکلی‌ها در نواحی ژنی مورد مطالعه را نشان داد و پنج الگوی مختلف باندی A (۵۰ در صد) ، B (۱۲ در صد) ، C (۹)، D (۲۱) و E (۸ در صد) برای ژنها مشاهده شد. تجزیه و تحلیل ارتباط این الگوها با نرخ بلوغ و کشت رویان حاکی از نبود ارتباط معنی دار بین آنها بود ($p>0.05$).

نتیجه‌گیری: با وجود مشاهده چندشکلی در ژن‌های ATPase6 و ATPase8 با استفاده از روش تغییر یافته SSCP، این چندشکلی های تاثیری بر نرخ بلوغ و کشت رویان نداشتند.

کلیدواژه‌ها: بلوغ برون‌تنی، چند شکلی،کشت برون‌تنی، گوسفند، میتوکندری.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: مردانی پژمان، تیموری فرشته، فروتنی فر صاحب، عبدالمحمدی علیرضا، حجاریان هادی (۱۴۰۰) بررسی اثرات چندشکلی‌های ژن‌های ATPase6 و ATPase8 بر بلوغ برون‌تنی تخمک و کشت برون‌تنی جنین در گوسفند سنجابی. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۳(۳)، ۱۶۹-۱۵۵.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مقدمه

نشخوارکنندگان کوچک، به ویژه انواع نژادهای بومی، از جنبه‌های اقتصادی - اجتماعی در معیشت قسمت قابل توجهی از جمعیت انسانی در مناطق گرم نقش بسزایی دارند (Mohammadifar and Mohammadabadi 2011; Jafari Darehdor et al. 2016). بنابراین، آزمایشات ترکیبی با تأکید بر مدیریت و پیشرفت ژنتیکی برای بهبود تولیدات حیوانی از اهمیت تعیین کننده

www.SID.ir

Archive of SID

ای برخوردار هستند (Ahsani et al. 2011; Mohammadabadi 2016). کارآیی اقتصادی و بیولوژیکی صنایع پرورش گوسفند به طور کلی با افزایش بهره وری و عملکرد تولید مثلی میش‌ها بهبود می‌یابد (Vajed Ebrahimi et al. 2016; Mohammadabadi et al., 2017). بیست و شش نژاد گوسفند در ایران پرورش داده می‌شوند (Mohammadabadi et al. 2018; Ghotbaldini et al., 2019) که شامل بیش از ۵۰ میلیون راس هستند (Amiri Roudbar et al., 2017; Masoudzadeh et al. 2020a) که هر کدام از آنها با بخش خاصی از کشور سازگار شده اند (Amiri Roudbar et al., 2017; Masoudzadeh et al. 2020b). از دیر باز وراثت سیتوپلاسمی منبع مهمی در ارزیابی ژنتیکی صفات اقتصادی در حیوانات اهلی بوده است. میتوکندری به دلیل نقش‌های مهمی که در متابولیسم سلول دارد و به دلیل اینکه عمدتا از طریق مادر در حیوانات به ارث می‌رسد، یک منبع عالی برای توضیح وراثت سیتوپلاسمی است (Gibson et al. 1997). میتوکندری اندامکی داخل سلولی است که نقش‌های مهمی در آپوپتوز، هموستاز کلسیم، تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و تولید انرژی ایفا می‌کند. میتوکندری‌ها DNA مخصوص به خود (mtDNA) را دارند که در گوسفند دارای ۱۳ ژن کنترل کننده زیر واحدهای آنزیمی زنجیره انتقال الکترون، ۲۲ ژن برای تولید tRNA و ۲ ژن کنترل کننده rRNA می‌باشند (Chen et al. 2017). در میان کمپلکس‌های آنزیمی زنجیره انتقال الکترون، آنزیم ATP synthase که بخشی از کمپلکس پنج می‌باشد، مستقیماً سنتز ATP را از آدنوزین دی فسفات هدایت می‌کند. از ۱۵ زیر واحد مختلف پروتئین ATPase، زیر واحدهای ۸ و ۶ به ترتیب توسط ژن‌های ATPase 8 و ATPase 6 میتوکندری کد می‌شوند (Detmer & Chan 2007). بنابراین ، تغییرات ژنتیکی آنها می‌تواند منجر به سطوح مختلف متابولیسم انرژی می‌شود، که بیشتر بر عملکردهای بیولوژیکی تأثیر می‌گذارد.

تغییرات توالی مناطق مختلف mtDNA در انسان باعث ایجاد عامل خطر برای بیماری‌های مختلفی مانند دیابت، آلزایمر، پارکینسون و سرطان شده است (Taylor & Turnbul, 2005). در حیوانات اهلی ، ارتباطی بین چندشکلی‌های mtDNA و میزان تولید و کیفیت شیر (Brown et al. 1989)، تولید مثل و چندقلوزایی (Chen et al. 2017; Pradhan et al. 2018) و صفات رشد و کیفیت گوشت وجود داشت (Biase et al. 2007; Zhang et al. 2008). شواهد متعددی برای تاثیر میتوکندری‌ها بر باروری وجود دارد و جهش‌های موجود در mtDNA ممکن است حداقل مسئول بخشی از ناباروری در جنس‌های نر و ماده باشد (Van Blerkom 2011). به نظر میرسد جهش‌های میتوکندریایی نه تنها در گامت، بلکه در روند لقاح و رشد جنین نیز موثر است و ناکافی بودن فعالیت میتوکندری سبب کاهش سطوح ATP و سپس توقف رشد یا مرگ جنین می‌شود (Van Blerkom 2011).

تولید جنین برون تنی (IVEP[1]) یک فرآیند سه مرحله ای است که شامل بلوغ تخمک برون تنی (IVM[2])، لقاح برون تنی (IVF[3]) و کشت برون تنی (IVC[4]) می‌باشد. IVEP ابزاری ارزشمند برای تولید تعداد زیادی از جنین‌ها برای تحقیق جهت کمک

[1] In vitro embryo production
2 In vitro maturation
3 In vitro fertilization
[4] In vitro culture

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500
www.SID.ir

به درک رشد اولیه پستانداران است (Rizos et al. 2008). اگرچه چند مطالعه رابطه بین چندشکلی‌های ژن‌های هسته ای و IVEP را بررسی کرده اند (Cognie et al. 1998; Lechniak et al. 2005)، اما هیچ مطالعه ای برای ارزیابی ارتباط چند شکلی‌های mtDNA و IVEP در حیوانات اهلی وجود ندارد. از سویی، استفاده از تکنیک‌های مولکولی در سال‌های اخیر جهت مطالعه جانوران بومی و حفاظت‌شده، کاربرد گسترده‌ای یافته است (Mahmoodi et al., 2018). میزان اطلاعات به‌دست‌آمده از این تکنیک‌های ژنتیکی، یکی از پارامترهای قابل ارزیابی برای مطالعه جمعیت‌های مختلف و درک تفاوت‌های ژنتیکی بین جمعیت هاست (Mohammadabadi, 2017). همچنین، مطالعه نژادهای بومی با استفاده از تکنیک‌های ملکولی بسیار مهم و برای طبقه‌بندی آن‌ها مفید است (Alinaghizadeh et al. 2007; Moazeni et al., 2016a). حفاظت باید بر اساس دانش عمیقی از منابع ژنتیکی نژادهای خاص باشد، لذا تلاش برای شناسایی و تعیین خصوصیات ژنتیکی نژادهای بومی و محلی بسیار اهمیت دارد (Askari et al. 2010; Moazeni et al., 2016a) تنوع ژنتیکی یک عنصر اساسی برای پیشرفت ژنتیکی، حفظ جمعیت‌ها، تکامل و سازگاری به شرایط محیطی متغییر و مختلف می‌باشد (Mohammadabadi et al. 2017; Ghasemi et al. 2010).

بنابراین ، هدف از این مطالعه بررسی چندشکلی ژن‌های ATPase 8 و ATPase 6 با استفاده از روش PCR-SSCP و اثرات آنها بر نرخ IVF و IVC بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری: در این پژوهش از میش‌های نژاد سنجابی در محل کشتارگاه صنعتی بیستون نمونه خون و تخمدان جمع‌آوری گردیدکه در روند خون‌گیری، ابتدا محل خون‌گیری (ورید وداج) را با پنبه آغشته به الکل ضدعفونی کرده و با استفاده از سرنگ از رگ گردنی خون‌گیری به‌عمل آمد. برای نمونه برداری حیواناتی انتخاب شدند که سنجابی بوده و سن بین دو تا چهار سال داشتند. نمونه خون‌های مربوط به هر دام با شمارهای مربوط به دام مربوطه به داخل لوله‌های وکیوم حاوی اتیلن دی آمین ترا استیک اسید (EDTA)که مانع انعقاد خون می‌شود منتقل شد. بعد از کشتار دام، از دام‌هایی که از پیش خون گرفته شده تخمدان‌ها به‌وسیله قیچی از لاشه جدا و با همان شماره نمونه خون، ثبت و به داخل فلاکس حاوی نرمال سالین (۰/۹٪ کلرید سدیم)، آنتی بیوتیک‌ها و آب که دمای محلول درون فلاکس ۳۴-۳۷ درجه سانتی‌گراد بود، منتقل شد. پس از اتمام نمونه‌گیری نمونه‌ها در کمتر از دو ساعت به آزمایشگاه گروه علوم دامی دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی دانشگاه رازی منتقل شد. در آزمایشگاه پس از بررسی‌های اولیه، بافت اضافی پیرامون تخمدان‌ها جدا و پس از شستشو، درون بشر حاوی نرمال سالین تازه(۰/۹ کلرید سدیم) وآنتی بیوتیک (۱۰۰µg/ml استرپتومایسین و۱۰۰IU/mlپنی سیلین) قرارداده شدند. جهت استخراج کمپلکس کومولوس- تخمک (COC) با قطر بیشتر از ۳ میلی متر با استفاده از سرنگ ۱۰ میلی¬لیتری و سر سرنگ سایز ۲۱، از محیط آسپیراسیون حاوی ۹۰ درصد محیط کشت بافت ۱۹۹ (H-TCM 199) ، ۱۰ درصد سرم جنین گاو (FBS)، هپارین۰/۰۲ درصد، سدیم پیروات ۲/۵ میلی مولار و جنتامایسین

www.SID.ir

سولفات۵۰ میکروگرم در میلی¬لیتر) استفاده شد. بعد از شستشو و استخراج COCهای بزرگتر از ۳ میلی متر ، جهت محاسبه نرخ بلوغ و کشت جنین برای هر نمونه، تعداد ۱۰۰ نمونه که تعداد بیش از ۲ تخمک داشتند ، به دیش‌های مجزای حاوی محیط بلوغ انتقال داده شدند.

تولید برون تنی جنین: برای IVM، COCهای هر نمونه به محیط IVM حاوی TCM-199، ۰/۵ میکروگرم / میلی لیتر FSH، ۵ میکروگرم / میلی لیتر LH، ۱ میکروگرم/میلی لیتر استرادیول ۱۷- β، ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر سولفات جنتامایسین ، ۵۰ نانوگرم در میلی لیتر فاکتور رشد اپیدرم و ۲/۵ میلی مولار پیروات سدیم، استفاده شد. ظروف پتری حاوی تخمک به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۹ درجه سانتیگراد در دستگاه انکوباتور با ۵٪ CO2 و ۹۰-۹۵٪ رطوبت نسبی در هوا انکوبه شدند. تخمک های بالغ با استفاده از مشاهده گستردگی توده کومولوس انتخاب شدند (Hunter and Moor 1987).

بعد از IVM ، تخمک‌های بالغ سه بار با محیط کشت IVF شسته و به محیط کشت IVF مکمل شده با ۶ میلی گرم در میلی لیتر BSA و ۲ میکروگرم در میلی لیتر هپارین منتقل شدند. تلقیح با افزودن منی تازه رقیق شده از یک قوچ بارور و ۲۰ میکرومول در لیتر پنی سیلامین ، ۱۰ میکرومول در لیتر هیپوتورین و ۱ میکرومول در لیتر اپی نفرین) انجام شد. سرانجام ، تخمک‌های تلقیح شده در دمای ۳۹ درجه سانتی گراد در ۵ درصد CO2 به مدت ۱۸ ساعت انکوبه شدند (Zabihi et al. 2019).

برای IVC، زیگوت‌های تشکیل شده در مرحله قبلی در محیط مایع تخمدانی سنتز شده (SOF) همراه با ۱۰٪ FBS، ۱/۵ میلی مولار گلوکز و ۰/۱ میلی مول در لیتر گلوتامین کشت داده شدند. سپس جنین تحت شرایط ۵٪ CO2، ۳۹ درجه سانتیگراد و محیط مرطوب به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد. میزان شکافت جنینی پس از ۴۸ ساعت کشت آزمایشگاهی ثبت شد (Zabihi et al. 2019).

آنالیز DNA : برای استخراج DNA نمونه‌هایی که بیش از دو تخمک داشتند، از روش استخراج نمکی استفاده و برای تعیین کمیت وکیفیت DNA استخراجی از ژل آگارز یک درصد استفاده شد. جهت تکثیر قطعه ۸۹۵ جفت بازی ژن‌های ATPase6 و ATPase8 از یک جفت آغازگر (F:5′- ATTCTCCTTGATGATATGCCAC-3′ و R:5′- CTGGCCTCCAATTCATGTGAG-3′) طراحی شده توسط نرم افزارPrimer3 و بر پایه توالی mtDNA گوسفند (AF010406) استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۰ پیکا مول از هریک از آغازگرها، ۲۵۰ میلی مولار مخلوط dNTP، ۱ واحد از آنزیم Taq DNA polymerase، ۲/۵ میکرولیتر از MgCl2 ۱/۵ میل مولار و ۲ میکرو لیتر از DNA الگو و آب مقطر بود. برنامه حرارتی مورد استفاده شامل واسرشت سازی اولیه در دمای ^{o}C ۹۴ به مدت ۵ دقیقه؛ ۳۵ چرخه شامل ^{o}C ۹۴ به مدت ۴۵ ثانیه، ^{o}C ۵۸ به مدت ۴۰ ثانیه و ^{o}C ۷۲ به مدت ۶۰ ثانیه؛ و یک چرخه بسط نهایی در دمای ^{o}C ۷۲ به مدت ۱۰ دقیقه بود. برای بررسی کیفیت محصول PCR از ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد.

www.SID.ir

برای تعیین ژنوتیپ قطعات تکثیر شده از یک روش تغییر یافته SSCP استفاده شد. بدین منظور ۴ میکرولیتر از هر نمونه محصول PCR با ۶ میکرولیتر بافر لود کننده SSCP شامل: ۸۰ درصد فرمامید ، ۱۸ درصد گلیسرول ، ۱۰ میلی مولار EDTA، ۰/۰۲۵ درصد برومونفول و ۰/۰۲۵ درصد زایلن–سیانول، مخلوط شد. پس از واسرشته شدن رشته‌های دوتایی DNA در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه ، از یک مرحله اضافی در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۵ ثانیه برای اتصال آغازگرها استفاده کردیم و پس از آن نمونه‌ها بلافاصله روی یخ سرد شدند. سپس پنج میکرولیتر از هر نمونه روی ژل‌های ۶ درصد اکریل آمید بارگذاری شد. الکتروفورز در ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۶ ساعت در بافر TBE و در دمای ۴ ردجه سانتیگراد انجام شد و ساختارهای فضایی مختلف رشته‌ها با استفاده از روش رنگ آمیزی نقره مشاهده شدند.

تجزیه و تحلیل آماری: در این تحقیق بررسی ارتباط الگوهای مشاهده شده ژن‌ها با نرخ IVM و IVC در گوسفند سنجابی، با استفاده از نرم افزار R (نسخه ۳،۴،۰) و بسته آماری PMCMR انجام شد. بدلیل این‌که داده‌ها از توزیع نرمال برخوردار نبودند از آزمون ناپارامتری کروسکال– والیس استفاده شد. همچنین برای مقایسه میانگین نرخ بلوغ و کشت رویان از آزمون دان (Dunn) استفاده شد. مدل آماری مورد استفاده بصورت زیر بود:

$$y_{ij}= \mu + G_i+ e_{ij}$$

که در اینجا، y_{ij} متغییر وابسته (نرخ بلوغ آزمایشگاهی و کشت آزمایشگاهی) ، μ میانگین صفت در جامعه، G_i اثر الگوهای مشاهده شده و e_{ij} اثر عوامل باقیمانده بود.

نتایج و بحث

شکل ۱ الکتروفورز محصولات PCR را بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد نشان می‌دهد. از نشانگر وزنی 1kb (از بالا دارای قطعات ۱۵۰۰، ۱۲۰۰، ۱۰۰۰، ۹۰۰ و ۸۰۰) برای تائید تکثیر ناحیه ای از ژنوم که در بر گیرنده ژنهای ATPase6 و ATPase8 استفاده شد. آنچنان که در شکل ۱ دیده می‌شود طول قطعه تکثیر شده برای ژن‌های ATPase6 و ATPase8 895جفت باز است که با اندازه مورد انتظار برابر است.

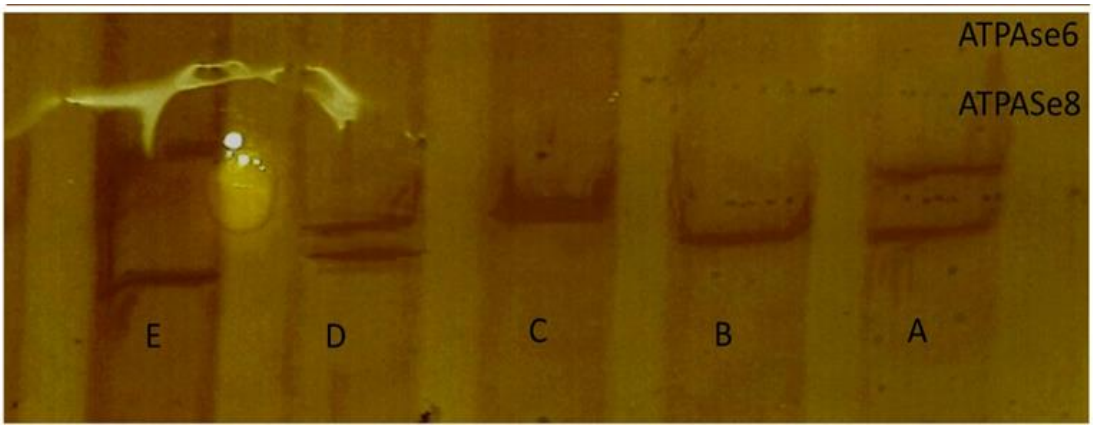
الگوهای مشاهده شده حاصل از SSCP محصولات PCR در شکل ۲ قابل مشاهده است. همانطور که در شکل مشخص است برای ژنهای ATPase6 و ATPase8 پنج الگوی مختلف باندی مشاهده شد که با حروف A تا E نامگذاری شده اند. بر اساس فراوانی های گزارش شده در جدول ۱ در بین پنج الگوی ژنوتیپی در ژن ATPase8 و ATPAse6 ، الگوی A با ۵۰ درصد دارای بیشترین فراوانی و الگوی E با ۸ درصد دارای کمترین فراوانی هستند و الگوهایB ، C و D دارای فراوانی بینابینی (به ترتیب ۱۲، ۹ و ۲۱ درصد) بودند.

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۱. قطعه ۸۹۵ جفت بازی تکثیر شده از ژنهای ATPase6 و ATPase8 در گوسفند نژاد سنجابی (نشانگر وزنی از بالا دارای قطعات ۱۰۰۰، ۹۰۰، ۸۰۰، ۷۰۰ ۶۰۰، ۵۰۰، ۴۰۰، ۳۰۰ و ۲۰۰ جفت بازی است)

Figure 1. The amplified 895 bp fragment of ATPase6 and ATPase8 genes in Sanjabi sheep (weight marker from above has fragments of 1000, 900, 800, 700, 600,500,400,300 and 200 bp)



شکل ۲. الگوهای باندی مشاهده شده با استفاده از روش SSCP برای ژنهای ATPase6 و ATPase8 در گوسفند نژاد سنجابی

Figure 2. The SSCP banding patterns observed for the DNA segment, contained the ATPase6 and ATPase8 genes in Sanjabi sheep

دلیل استفاده از روش SSCP برای شناسایی چندشکلی‌های این ژن‌ها نبود اطلاعات در خصوص چندشکلی‌های این ژنها در این نژاد بود. این روش در تحقیق حاضر به خوبی توانایی تفکیک چند شکلی‌ها را نشان داد و بنابراین می‌تواند روشی مناسب برای شناسایی چند شکلی‌ها در ژن‌های توالی‌های مختلف باشد. در تحقیق دیگری که با استفاده از این روش در ارزیابی ژنتیکی جمعیت بز خلخالی با استفاده از ژن سیتوکروم bانجام گرفت، پنج الگوی متفاوت در این ژن مشاهده شد (Dolati Garedarvishlu 2016). در تحقیقی دیگر Khatami and Ghanei Yakhdan (2014) با استفاده از این روش چندشکلی‌هایی در ژنهای

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500
www.SID.ir

CoxII، سیتوکروم b و tRNAGlu در انسان گزارش کردند. یکی از محدودیت‌های روش SSCP کارایی آن برای قطعات کوچک بود که در این تحقیق با تغییراتی که در آن ایجاد شد توانستیم چندشکلی قطعه ۸۹۵ جفت بازی را هم تشخیص دهیم.

الگوهای متفاوت مشاهده شده برای نواحی مورد بررسی بیانگر وجود چندشکلی‌هایی در این مناطق می باشند. هر چند گزارشی در خصوص چندشکلی‌های این ژنها در گوسفند سنجابی گزارش نشده است، ولی در تحقیقی که بر روی گوسفند نژاد پنجاب پاکستان انجام شد وجود چندشکلی در ژنهای ATPase6 و ATPase8 مشاهده شد (Hussain et al. 2015). در تحقیقی که روی گوسفند دم کوتاه‌هان انجام گرفت در ژن ATPase6 چندشکلی در جایگاه نوکلئوتیدی ۸۰۳۹ دیده شد که نوکلئوتید A با G جایگزین شد (Chen et al. 2017). در مطالعه ای که بر روی گاو در خصوص این ژنها انجام شد تعداد ۱۵ SNP در این ژنها گزارش شده است (Qin et al. 2012).

جدول ۱. میانگین، مجموع امتیازها و میانگین امتیازهای نرخ IVMو IVC و مقدار ارزش p برای الگوهای مختلف مشاهده شده برای ژنهای ATPase6 و ATPase8

Table 1. The Mean, sum of score and mean score of IVM and IVC rates and p-value of different patterns observed for the ATPase6 and ATPase8 genes

	الگو Pattern	فراوانی Frequency (percent)	میانگین Mean	مجموع امتیازها Score of Sum	میانگین امتیازها Mean Score	p-value
IVM	A	50	83.33	2451	49.02	0.95
	B	12	86.11	626	52.17	
	C	9	87.96	486	54	
	D	21	87.5	1172	53.28	
	E	8	86.46	416	52	
IVC	A	50	44.58	2347.50	46.95	0.26
	B	12	48.97	595	49.58	
	C	9	42.96	410	45.56	
	D	21	46.97	1257	57.14	
	E	8	53.29	541.50	67.69	

نتایج بدست آمده از ارتباط الگوهای باندی مشاهده شده با نرخ‌های IVMو IVC در جدول ۱ ارائه شده است. همانطور که مشاهده می‌شود الگوهای مشاهده شده در ژنهای ATPase6 و ATPase8 تاثیر معنی داری بر پارامترهای IVMو IVC

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

www.SID.ir

نداشتند. عوامل زیادی بر کیفیت تخمک برای IVEP تأثیر می‌گذارند. برخی از آنها فاکتورهای داخل تخمکی هستند که تفاوت در رسیدن به بلوغ مناسب و لقاح را ایجاد می‌کنند. به عنوان مثال، علاوه بر ظاهر مورفولوژیکی، اهداکننده تخمک بر کیفیت تخمک‌های مورد استفاده برای تولید IVEP نیز تاثیر می گذارد (Tamassia et al. 2004). همچنین نشان داده شده است که تعداد نسخه‌های میتوکندری در تخمک‌های نابارور به طور قابل توجهی کمتر از تخمک‌های دارای لقاح طبیعی بود (Reicher et al. 2012). میزان ATP کافی در تخمک و جنین برای سنتز اسیدهای نوکلئیک و پروتئین در سلول‌ها ضروری است و مطالعات مختلف ارتباط بین تغییر غلظت ATP و لقاح تخمک و رشد و نمو رویان در انسان (Bavister and Squirrell 2000) ، موش (Perez et al. 2000) و گاو (Tamassia et al. 2004) را نشان داده است. علاوه بر این، از آنجا که ATP جنین‌های اولیه توسط میتوکندری تأمین می‌شود، و این ATPها برای موفقیت IVF و مراحل اولیه رشد جنینی مهم هستند ، تخمکها فاقد mtDNA کافی و بنابراین ظرفیت تولید ATP به طور معمول بارور نمی‌شود (Van Blerkom 2011).

هر چند مطالعه ای در خصوص بررسی چندشکلی ژنهای میتوکندری با نرخ بلوغ و لقاح تخمک و تو لید جنین برون تنی در گوسفند وجود ندارد، اما مطالعات مختلفی ارتباط چندشکلی این ژنها با صفات تولیدمثلی در گونه‌های مختلف حیوانات اهلی را گزارش کرده اند. در گوسفندان ، ارتباط بین چندشکلی‌های mtDNA و تعداد بره در هر زایش در گوسفند گزارش شده است (Reicher et al.al. 2012; Chen et al.al. 2017). در خوک ، ژنوتیپ‌های CYTB تأثیر قابل توجهی بر صفات تولیدمثلی مانند تعداد توله در هر زایش ، سن در اولین زایش و فاصله زایش داشتند (Liu et al. 2019). علاوه بر این ، ارتباط معنی داری بین ژنوتیپ‌های D-loop و ND5 و میزان زایش در گاو مشاهده شد (Sutarno et al. 2002).

نتیجه‌گیری: مطالعه حا ضر نشان داد که روش SSCP تغییر یافته پیشنهادی می‌تواند برای ژنوتیپ کردن قطعات بزرگ DNA هم اســـتفاده شـــود. علاوه بر این، علیرغم گزارش تاثیر ژنوم میتوکندری بر باروری در انســـان و حیوانات اهلی، ارتباطی بین چندشکلی‌های ژن‌های ATPase6 و ATPase8 و نرخ IVF و IVC در گوسفندان سنجابی مشاهده نشد.

سپا سگزاری: نویسـندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از حمایت مالی صـندوق حمایت از پژوهشـگران و فناوران کشـور از این پژوهش در قالب طرح شماره ۹۵۸۴۱۲۶۳ تشکر نمایند. همچنین از خانم دکتر لیلا سلطانی و خانم سارا سامره به جهت راهنمایی در انجام آزمایشات مربوط به تولید برون تنی جنین تقدیر می‌شود.

منابع

جعفری دره در امیر حسین، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، ریاحی مدوار علی (۱۳۹۵) بررسی بیان ژن CIB4 در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از Real Time qPCR. مجله پژوهش در نشخوارکنندگان ۴(۴)، ۱۳۲-۱۱۹.

www.SID.ir

Archive of SID

عسکری ناهید، باقی زاده امین، محمدآبادی محمدرضا (۱۳۸۹) مطالعه تنوع ژنتیکی در چهار جمعیت بز کرکی راینی با استفاده از نشانگرهای ISSR. مجله ژنتیک نوین ۵، ۵۶-۴۹.

محمدآبادی محمدرضا، کرد محبوبه، نظری محمود (۱۳۹۷) مطالعه بیان ژن لپتین در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از Real Time PCR . مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۰(۳)، ۱۲۳-۱۱۱.

محمدی فر آمنه، محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۰) کاربرد نشانگرهای ریزماهواره برای مطالعه ژنوم گوسفند کرمانی. فصلنامه علوم دامی ایران ۴۲(۴)، 344-337.

محمودی مریم، آیت اللهی مهرجردی احمد ، محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۸). تنوع ژنتیکی ژن کاپاکازئین درجمعیت بزهای کرکی راینی، سانن و وحشی با تکنیک PCR-RFLP. ژنتیک نوین ۱۴(۱)، ۷۳-۷۷.

واجدابراهیمی محمدتقی، محمدآبادی محمدرضا، اسماعیلی زاده علی (۱۳۹۴) بررسی تنوع ژنتیکی پنج جمعیت گوسفند ایرانی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره‌ای. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۷(۴)، ۱۵۸-۱۴۳.

References

Ahsani MR, Bafti MS, Esmailizadeh AK, Mohammadabadi MR (2011) Genotyping of isolates of Clostridium perfringens from vaccinated and unvaccinated sheep. Small Rumin Res 95, 65-69.

Alinaghizadeh R, Mohammad Abadi MR, Moradnasab Badrabadi S (2007) Kappa-casein gene study in Iranian Sistani cattle breed (Bos indicus) using PCR-RFLP. Pak J Biol Sci 10 (23), 4291-4294.

Amiri Roudbar M, Mohammadabadi MR, Mehrgardi AA, Abdollahi-Arpanahi R (2017) Estimates of variance components due to parent-of-origin effects for body weight in Iran-Black sheep. Small Rum Res 149, 1-5

Amiri Roudbar M, Abdollahi-Arpanahi R, Ayatollahi Mehrgardi A et al. (2018) Estimation of the variance due to parent-of-origin effects for productive and reproductive traits in Lori-Bakhtiari sheep. Small Rumin Res 160, 95-102.

Askari N, Baghizadeh A, Mohammadabadi MR (2010) Study of genetic diversity in four populations of Raeini cashmere goat using ISSR markers. Modern Genetics Journal 5 (2), 49-56.

Bavister BD, Squirrell JM (2000) Mitochondrial distribution and function in oocytes and early embryos. Hum Reprod 15, 189-198.

Biase FH, Meirelles FV, Gunski R et al. (2007) Mitochondrial DNA single nucleotide polymorphism associated with weight estimated breeding values in Nelore cattle (Bos indicus). Genetics and Mol Biol 30, 1058-1063.

www.SID.ir

Brown D, Koehler C, Lindberg G et al. (1989) Molecular analysis of cytoplasmic genetic variation in Holstein cows. J Anim Sci 67, 1926-1932.

Chen X, Wang D, Xiang H et al. (2017) Mitochondrial DNA T7719G in tRNA-Lys gene affects litter size in Small-tailed Han sheep. J Anim Sci Biotechnol 8, 4-9.

Cognie Y, Benoit F, Poulin N et al. (1998) Effect of follicle size and of the FecB Booroola gene on oocyte function in sheep. J Reprod Fertil 112, 379-386.

Detmer SA, Chan DC (2007) Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. Nature Reviews Molecular Cell Biology 8, 870-879.Garedarvishlu VD (2016) Genetic assement of khakhali goat usins cytb gene and candidate generelatied with production truits. In: Animal science. University of Mohaghegh Ardabili, Ardabili.

Ghasemi M, Baghizadeh A, Abadi MRM (2010) Determination of genetic polymorphism in Kerman Holstein and Jersey cattle population using ISSR markers. Aust J Basic Appl Sci 4 (12), 5758-5760

Ghotbaldini H, Mohammadabadi MR, Nezamabadi-pour H et al. (2019). Predicting breeding value of body weight at 6-month age using Artificial Neural Networks in Kermani sheep breed. Acta Scientiarum. Anim Sci 41, 45282.

Gibson JP, Freeman AE, Boettcher PJ (1997) Cytoplasmic and mitochondrial inheritance of economic traits in cattle. Livest Prod Sci 47, 115-124.

Hunter AG and R M Moor (1987) Stage-dependent effects of inhibiting ribonucleic acids and protein synthesis on meiotic maturation of bovine oocytes in vitro. J Dairy Sci 70(8), 1646-51

Hussain T, Babar M, Musthafa M et al. (2015) mitochondrial atp6 and atp8 genes based molecular diversity and phylogenetic analysis in punjab urial (Ovisvigneipunjabiensis). J Anim Plant Sci 25, 311-318.

Jafari Darehdor AH, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh A, Riahi Madvar A (2016) Inve stigating expression of CIB4 gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time q PCR. J Rumin Res 4 (4), 119-132 (In Persian).

Khatami M, Ghanei Yakhdan Z (2014) Novel Nucleotide Changes in Mitochondrial COXII, Cytochrome B and tRNAGlu Genes in Patients with Brugada Syndrome. The Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences 22, 981-988.

Lechniak D, Szczepankiewicz D, Kauss D et al. (2005) IVM media, oocyte diameter and donor genotype at RYR1 locus in relation to the incidence of porcine diploid oocytes after maturation in vitro. Theriogenology 64, 202-212.

Liu H, Shi W, Wang D et al. (2019) Association analysis of mitochondrial DNA polymorphisms with oocyte number in pigs. Reprod Fertil Dev 31, 805-809.

www.SID.ir

Mahmoodi M, Ayatollahi A, Mohammadabadi MR (2018) Studying exon 4 of kappa-casein gene in Kermani sheep using PCR-RFLP. Agric Biotechnol J 9 (3), 119-128 (In Persian).

Masoudzadeh SH, Mohammadabadi M, Khezri A, et al. (2020a) Effects of diets with different levels of fennel (Foeniculum vulgare) seed powder on DLK1 gene expression in brain, adipose tissue, femur muscle and rumen of Kermani lambs. Small Rumin Res 193, e106276.

Masoudzadeh SH, Mohammadabadi MR, Khezri A, et al. (2020b) Dlk1 Gene Expression in Different Tissues of Lamb. Iran J Appl Anim Sci 10 (4), 669-677.

Moazeni S, Mohammadabadi MR, Sadeghi M et al. (2016a) Association between UCP Gene Polymorphisms and Growth, Brreeding Value of Growth and Reproductive Traits in Mazandaran Indigenous Chicken. Open J Anim Sci 6, 1-8.

Moazeni SM, Mohammadabadi MR, Sadeghi M et al. (2016b) Association of the melanocortin-3(MC3R) receptor gene with growth and reproductive traits in Mazandaran indigenous chicken. J Livest. Sci Technol 4, 51-56.

Mohammadabadi M.R. (2016) Inter-Simple Sequence Repeat Loci associations with predicted breeding values of body weight in Kermani sheep. Genet 3rd Millennium 14, 4383-4390.

Mohammadabadi MR (2017) Role of clostridium perfringens in pathogenicity of some domestic animals. J adv agric 7, 1117-1121.

Mohammadabadi MR, Esfandyarpoor E, Mousapour A (2017) Using Inter Simple Sequence Repeat Multi-Loci Markers for Studying Genetic Diversity in Kermani Sheep. J Res Develop 5 (2), e154.

Mohammadabadi MR, Kord M, Nazari M (2018) Studying expression of leptin gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time PCR. Agric Biotechnol J 10 (3), 111-122 (In Persian).

Mohammadifar A, Mohammadabadi MR (2011) Application of Microsatellite Markers for a Study of Kermani Sheep Genome. Iran J Anim Sci 42 (4), 337-344.

Perez GI, Trbovich AM, Gosden RG et al. (2000) Mitochondria and the death of oocytes. Nature 403, 500-501.

Pradhan M, Pal A, Samanta A et al. (2018) Mutations in cytochrome B gene effects female reproduction of Ghungroo pig. Theriogenology 119, 121-130.

Qin YH, Chen SY, Lai SJ (2012) Polymorphisms of mitochondrial ATPASE 8/6 genes and association with milk production traits in holstein cows. Anim Biotechnol 23, 204-212.

www.SID.ir

Reicher S, Seroussi E, Weller J et al. (2012) Ovine mitochondrial DNA sequence variation and its association with production and reproduction traits within an Afec-Assaf flock. J anim sci 90, 2084-2091.

Rizos D, Clemente M, Bermejo-Alvarez P et al. (2008) Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality. Reprod Domest Anim 43, 44-50.

Sutarno, Cummins JM, Greeff J et al. (2002) Mitochondrial DNA polymorphisms and fertility in beef cattle. Theriogenology 57, 1603-1610.

Tamassia M, Nuttinck F, May-Panloup P et al. (2004) In Vitro Embryo Production Efficiency in Cattle and Its Association with Oocyte Adenosine Triphosphate Content, Quantity of Mitochondrial DNA, and Mitochondrial DNA Haplogroup. Biol Reprod 71, 697-704.

Taylor RW, Turnbull DM (2005) Mitochondrial DNA mutations in human disease. Nat Rev Genet 6, 389-402.

Vajed Ebrahimi MT, Mohammad Abadi MR, Esmailizadeh AK (2016) Analysis of genetic diversity in five Iranian sheep population using microsatellites markers. Agric Biotechnol J 7, 143-158 (In Persian).

Van Blerkom J (2011) Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence. Mitochondrion 11, 797-813.

Zabihi A, Karami Shabankareh H, Hajarian H, Foroutanifar S (2019) Resveratrol addition to in vitro maturation and in vitro culture media enhances developmental competence of sheep embryos. Domest Anim Endocrinol 68, 25–31.

Zhang B, Chen H, Hua L et al. (2008) Novel SNPs of the mtDNA ND5 gene and their associations with several growth traits in the Nanyang cattle breed. Biochem genet 46, 362-368.

www.SID.ir