



## تولیدات دامی

دوره ۱۹ ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۳۹۶

صفحه‌های ۵۲۳-۵۲۱

# تأثیر چندشکلی ژن BMP15 بر صفات رشد و تولیدمثل گوسفند لری بختیاری

پریسا مهوری<sup>۱</sup>، مصطفی فغانی<sup>۲\*</sup>، عباس دوستی<sup>۳</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۲. استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۳. دانشیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۱۱/۱۳

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۵/۰۶/۲۸

### چکیده

این پژوهش با هدف بررسی چندشکلی ناحیه ایترون ژن BMP-15 و تأثیر آن بر صفات رشد و تولیدمثل در گوسفند نژاد لری بختیاری با استفاده از روش توالی‌یابی انجام شد. برای این منظور تعداد ۱۰۰ نمونه خون (۸۰ رأس میش و ۲۰ رأس قوچ) از ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد گوسفند لری بختیاری شهرکرد جمع‌آوری و DNA آنها استخراج شد. قطعه ۳۵۶ bp از ژن BMP-15 با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) توسط یک جفت آغازگر اختصاصی تکثیر و کیفیت آن توسط الکتروفورز بر روی ژل آگارز یک درصد بررسی شد. سپس توالی محصول PCR تعیین شد. برای شناسایی چندشکلی‌ها، توالی‌های حاصله با توالی ثبت شده در بانک جهانی ژن مقایسه شد. نتایج تنها حاکی از وجود جهش حذفی (D75A) در این ژن بود که در این جهش آدنین با فراوانی ۴۱/۲ درصد در نوکلئوتید شماره ۷۵ حذف شده بود. تأثیر این جهش در هیچ‌کدام از صفات رشد و تولیدمثل معنادار نبود. مطالعه چندشکلی ژنتیکی در سایر بخش‌های این ژن به منظور بررسی بهتر ارتباط آن با صفات رشد و تولیدمثل توصیه می‌شود.

**کلیدواژه‌ها:** پروتئین مورفوژنتیک استخوانی (BMP15)، چندشکلی ژنتیکی، صفات تولیدمثل، صفات رشد، گوسفند لری بختیاری.

## مقدمه

استفاده از ژنتیک ملکولی فواید زیادی دارد که یکی از این فواید تعیین ژنوتیپ افراد برای جایگاه خاصی است [۱۹]. همچنین استفاده از نشانگرهای ژنتیکی در انتخاب و اصلاح نژاد به طور مهبجی پیشرفت ژنتیکی را تسریع می کند. مطالعه تنوع ژنتیکی نژادهای بومی برای حفاظت از منابع ژنتیکی لازم و ضروری است. بالغ بر ۲۶ نژاد گوسفند در ایران وجود دارد که با مناطق مختلف سازگار شده اند. در حال حاضر، تولید گوشت مهمترین دلیل پرورش گوسفند در ایران است و تولیدهای دیگر مانند پشم، شیر و پوست در درجه های بعدی اهمیت قرار دارند.

گوسفند لری بختیاری یکی از نژادهای درشت جثه و دنبه دار ایرانی است و هدف اصلی از پرورش آن تولید گوشت است. این صفت، خود متأثر از صفات تولیدمثلی و میزان رشد است. صفت تولیدمثل صفتی چندژنی و دارای توارث کمی است که تحت تأثیر ژن های با اثر کم و عمده است. از جمله مهمترین صفات تولیدمثلی در گوسفند چندقلو زایی است که در هر زایمان با نرخ تخمک ریزی در هر سیکل ارتباط مستقیم داشته و تحت تأثیر تعداد محدودی هورمون و ژن های ویژه قرار دارد. چندقلو زایی گوسفندان دارای ضریب وراثت پذیری پایین (کمتر از ۰/۱۰) است. با توجه به اهمیت صفت چندقلو زایی گوسفندان از نظر اقتصادی، بررسی ژن های با اثر عمده (ژن های کاندیدا) بر این صفت تمرکز یافته است. سه دسته ژن که در زمینه باروری گوسفند شناسایی شده عبارتند از: گیرنده نوع B پروتئین مورفوژنیک استخوانی (BMP-IB) یا کیناز شبه اکتیوین ۶ (ALK6) تحت عنوان FecB که روی کروموزوم شماره شش واقع است، فاکتور متمایز کننده رشد ۹ (GDF9) به نام FecG که روی کروموزوم شماره پنج قرار دارد و دسته

پروتئین های مورفوژنیک استخوانی (BMPها) که به نام FecX معروفند و روی کروموزوم X قرار دارند [۱۸]. ژن های BMP جزء فوق خانواده TGFβ بوده و توسط تخمک تولید می شوند، و بر تنظیم بیان و ترشح هورمون های مؤثر بر رشد فولیکولی و نرخ تخمک اندازی مؤثرند [۱۷]. BMPها در توسعه جنین، هموستازی، تعمیر و اصلاح الگوهای بافتی مختلف، تمایز سلولی و مرگ برنامه ریزی شده سلول نقش دارند [۱۸]. ژن BMP15 تکثیر و تمایز سلولی گرانولوزا را به وسیله ترویج و توسعه تقسیم میتوزی سلول گرانولوزا، مهار بیان گیرنده هورمون محرک فولیکول و تحریک بیان لیگاند کیت تنظیم می کند، بنابراین نقش محوری در باروری پستانداران ماده دارد [۱۸].

توالی کدکننده این ژن شامل دو آگزون است که توسط ایترونی به طول ۵/۴ کیلوباز از یکدیگر جدا می شوند. محصول رونویسی کامل آنها توالی ۱۱۷۹ نوکلئوتیدی بوده و کد کننده پیش پپتیدی به طول ۳۹۳ اسید آمینه است که پپتید کامل آن ۱۲۵ اسید آمینه طول دارد [۵]. در تحقیقات پنج جهش  $fecX^G$ ,  $fecX^H$ ,  $fecX^B$ , ( $fecX^I$  و  $FecX^I$ ) در ژن BMP15 شناسایی شده است که در باروری برخی نژادها نقش دارند [۷]. جهش  $Fec X^I$  اولین بار در نژاد اینوردال (Inverdale) شناسایی و مکانیسم آن بررسی شد [۱۵].

بررسی جهش ها در این ژن نشان می دهد که حتی جایگزینی اسید آمینه ای که جابجایی زیادی را در توالی محصول ایجاد نکند نیز منجر به ایجاد تأثیر زیاد بر فعالیت محصول و به دنبال آن افزایش نرخ تخمک اندازی در گوسفندان هتروزیگوت و عدم باروری در گوسفندان هموزیگوت حامل این جهش ها می شود [۵، ۱۲]. BMP15 عاملی مؤثر در فاکتورهای ترشح شده از تخمک است که نقش کلیدی در توسعه فولیکولی و تخمک گذاری و

## تولیدات دامی

بختیاری وجود دارد. هدف از انجام این پژوهش، بررسی چندشکلی ناحیه ایترون در جایگاه ژن BMP15 در جمعیت گوسفند نژاد لری بختیاری و ارتباط آن با صفات رشد و تولیدمثل در این نژاد بود.

### مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر در ایستگاه اصلاح نژاد گوسفند لری بختیاری شهرکرد انجام شد. سیستم پرورش در این ایستگاه به روش نیمه‌متحرک و روستایی است. در این تحقیق تعداد ۱۰۰ نمونه خون (۸۰ رأس میش و ۲۰ رأس قوچ دارای رکورد) با استفاده از لوله‌های ونوجکت حاوی EDTA جمع‌آوری و با حفظ زنجیره سرد به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انتقال یافت و در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایش‌ها نگهداری شد. به‌منظور استخراج DNA خون گوسفند، نخست بافی‌کوت نمونه‌ها که شامل گلبول‌های سفید خون و همچنین پلاکت‌ها هستند جداسازی و سپس استخراج DNA با استفاده از کیت ساخت شرکت سیناژن و براساس پروتکل این شرکت بر روی بافی‌کوت انجام شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز یک درصد و رنگ‌آمیزی توسط اتیدیوم بروماید با غلظت ۲μL انجام شد. پس از تأیید کیفیت DNA استخراجی، یک قطعه ۳۵۶ جفت‌بازی از ایترون ژن BMP15 (به شماره ثبت AF236079 در بانک جهانی ژن) با کمک آغازگرها (جدول ۱) و با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز PCR تکثیر یافت [۲۲]. محل تکثیر منطقه مزبور در ژن مورد مطالعه از نوکلئوتید ۲۲ شروع و تا نوکلئوتید ۳۷۷ ادامه داشت.

برای انجام واکنش PCR مقدار ۱۵ ng از DNA الگو، به مخلوط شامل دو میکرولیتر بافر PCR با غلظت ۱۰x،

همچنین در کیفیت اووسیت در تخمدان پستانداران دارد. مطالعات اخیر تأکید بر اهمیت OSFs به‌عنوان تنظیم‌کننده عملکرد سلول‌های کومولوس و کیفیت اووسیت دارد [۶]. یک کپی از جهش  $FecX^I$  یا جهش هانا ( $FecX^H$ )، باعث افزایش تخمک‌ریزی در حدود یک تخمک اضافی و تعداد نتاج کل را ۰/۶ بره در هر زایش افزایش می‌دهد. ولی میش‌های هموزیگوس که از هر دو والد خود این آلل‌ها را دریافت کرده بودند، دارای تخمدان‌های بسیار کوچک، رشد نیافته و عقیم بودند [۴]. تاکنون مطالعات متعددی در رابطه با تأثیر این ژن‌ها بر صفات تولیدمثلی صورت گرفته است؛ اما در رابطه با تأثیر این ژن‌ها بر صفات رشد، مطالعات کمی وجود دارد. در مطالعه‌ای تأثیر  $FecB$  یا  $BMPr-IB$  روی صفات وزن و سایز در چندین نژاد گوسفند مطالعه شد که در نتیجه اثر جهش شناسایی شده این ژن بر وزن بدن در ۹۰ روزگی معنادار بود ولی در صفات وزن تولد و وزن ۱۲۰ روزگی تأثیر معنادار نداشت [۸]. همچنین در مطالعه‌ای تأثیر آلل  $FecX^R$  از ژن BMP15 در صفات رشد و کیفیت لاشه مطالعه شد [۲۱]. اکثر ژن‌ها در موجودات یوکاریوت بزرگ حداقل شامل یک ایترون هستند که معمولاً ایترون‌ها را زائدهایی می‌شناسیم که باید در پروسه تولید mRNA دور ریخته شوند. اما در حقیقت ایترون‌ها نقش حیاتی در تکامل مولکولی ژن داشته و تنظیم‌کننده‌های حیاتی بیان ژن‌ها هستند. به‌علاوه امکان تولید ژن‌های جدید از طریق دو برابر کردن اگزون‌ها را فراهم می‌سازد و نیز امکان تولید چندین پروتئین از یک ژن به‌وسیله تغییر محل برش را ایجاد می‌کند [۲۰].

اگرچه پژوهش‌های بسیاری در گوسفندان و بزهای ایرانی روی ژن‌های مرتبط با باروری، از قبیل GDF9 و BMP15 انجام شده است [۹، ۱۰، ۱۴ و ۲۳]؛ اما مطالعات محدودی در ژن BMP15 در جمعیت گوسفند نژاد لری

### تولیدات دامی

(AF236079) مقایسه و جهش‌های تک‌نوکلئوتیدی (SNP) شناسایی و ثبت شدند. رکوردهای مربوط به صفات رشد (وزن تولد، وزن بره در یک‌ماهگی، وزن شیرگیری، وزن شش‌ماهگی، وزن نه‌ماهگی) و تولیدمثل (تعداد زایش تک‌قلو و دوقلو، نحوه زایش که شامل زایش طبیعی، زایش با کمی کمک و سخت‌زایی است) در هر دام اخذ و ثبت شد. سپس ارتباط بین صفات و جهش شناسایی شده با استفاده از نسخه ۲۱ نرم‌افزار SPSS بررسی شد. در صفات تولیدمثلی با توجه به اینکه نتایج حاصله به صورت داده‌های ناپیوسته بود، از روش جداول متقاطع و آزمون مربع کای برای مقایسه فراوانی‌ها استفاده شد.

مقدار ۵۰۰ میکرومولار از هر کدام از dNTPها، ۱/۷۵ میلی‌مولار از MgCl<sub>2</sub>، مقدار ۱۰ پیکومول از هر کدام از آغازگرهای پیرو و پیشرو، دو واحد آنزیم Taq پلیمرز اضافه و با استفاده از آب دیونیزه به حجم ۲۰ میکرولیتر رسید. سیکل گرمایی به کار گرفته شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل ۳۲ سیکل تکثیر بود (جدول ۲). پس از تکثیر و کنترل محصولات PCR بر روی ژل، توالی نوکلئوتیدها در نمونه‌هایی که به خوبی تکثیر شده بودند توسط شرکت بیونیر کره جنوبی (Bioneer Co.) تعیین شد. سپس توالی‌های حاصله با استفاده از برنامه BLAST (در بانک جهانی ژن) با توالی نوکلئوتیدهای ارائه شده در بانک جهانی ژن براساس شماره ثبت این ژن

جدول ۱. توالی آغازگرهای پیرو و پیشرو در قطعه ۳۵۶ bp اینترون ژن BMP15 و دمای اتصال آنها

نام آغازگر	توالی آغازگر (5'-3')	Tm(°C)	طول آغازگر (جفت باز)	اندازه محصول (جفت باز)
BMP15-F	TTCTCCGTCTAGGGGTATGAGTG	۶۷/۳	۲۳	۳۵۶
BMP15-R	AGGGAACAAGAGCAAAGCGTTAG	۶۹/۶	۲۴	

جدول ۲. سیکل گرمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز PCR

تکرار چرخه	مراحل چرخه PCR	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان (دقیقه)
۱	Initial Denaturation (واسرشت شدن اولیه)	۹۵	۵
۳۲	Denaturation (واسرشت شدن)	۹۵	۱
	Annealing (اتصال)	۵۶	۱
	Extention (تکثیر)	۷۲	۱
۱	Final Extention (تکثیر نهایی)	۷۲	۵

## تولیدات دامی

دوره ۱۹ ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۳۹۶

## تأثیر چندشکلی ژن BMP15 بر صفات رشد و تولیدمثل گوسفند لری بختیاری

اثر جهش شناسایی شده؛  $b$ ، ضریب تابعیت وزن تولد؛  $BW_{ijkl}$ ، وزن تولد دام؛  $\overline{BW}$ ، میانگین وزن تولد دامها و  $e_{ijkl}$ ، اثر خطای آزمایش است.

### نتایج و بحث

با استفاده از جفت پرایمر اختصاصی، قطعه موردنظر از ایترون ژن BMP15 به طول ۳۵۶ جفت باز، تکثیر شد که نمونه‌ای از DNA استخراج شده و الکتروفورز محصولات PCR تکثیر شده به ترتیب در شکل‌های ۱ و ۲ آورده شده است.

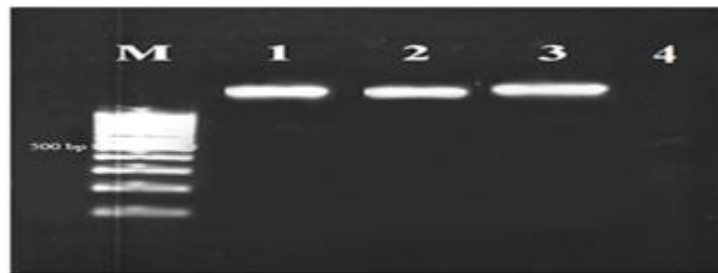
همچنین برای مقایسه صفات رشد از رویه مدل خطی عمومی استفاده شد که در صفت وزن تولد از مدل آماری ۱ استفاده و در سایر وزن‌ها طبق مدل آماری ۲ وزن تولد به‌عنوان عامل کواریت در مدل قرار داده شد. تمامی آزمون‌ها با میزان اطمینان ۹۵٪ انجام شد.

$$Y_{ijkl} = \mu + G_i + Y_j + BMP_k + e_{ijkl} \quad (1)$$

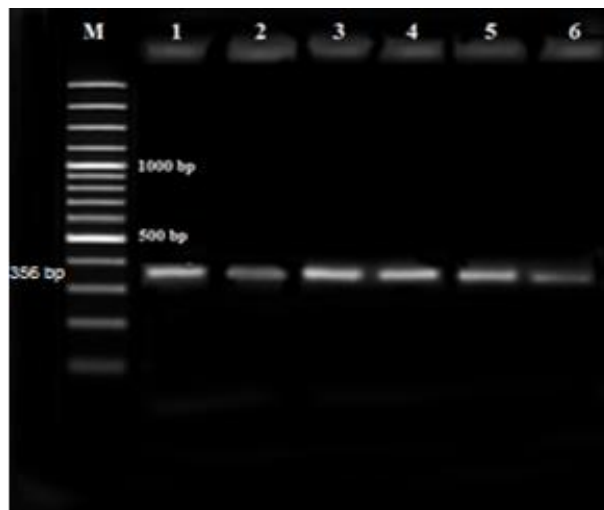
(۲)

$$Y_{ijkl} = \mu + G_i + Y_j + b(BW_{ijkl} - \overline{BW}) + BMP_k + e_{ijkl}$$

که در این روابط،  $Y_{ijkl}$ ، فنوتیپ صفت مورد مطالعه؛  $\mu$ ، میانگین جامعه؛  $Y_j$ ، اثر سال تولد؛  $G_i$ ، اثر جنس؛  $BMP_k$ ،



شکل ۱. کیفیت DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز یک درصد



شکل ۲. الکتروفورز محصولات PCR ایترون ژن BMP15

## تولیدات دامی

دوره ۱۹ ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۳۹۶

جهدش در اگزون دوم این ژن شناسایی شد [۷]. همچنین در بررسی اگزون دوم این ژن در گوسفند سنگسری چندشکلی مشاهده نشد [۱۱]. در بررسی اگزون دوم جمعیت گوسفند سنجابی نیز یک جهش شناسایی شده است [۲۳]. در بررسی اینترون این ژن در جمعیت گوسفند کوریدال و گوسفندان بومی کشمیر یک جهش گزارش شده است [۲۲].

نتایج حاصل از مقایسه توالی‌های حاصله با توالی ثبت شده در بانک جهانی ژن، یک جهش تک‌نوکلئوتیدی که شامل حذف آدنین در نوکلئوتید شماره ۷۶ بود، شناسایی شد (شکل ۳). این جهش با فراوانی ۴۱/۲ درصد در جمعیت تحت مطالعه مشاهده شد (جدول ۳). در بررسی گوسفند افشاری و آمیخته آن با نژاد برولامرینو در پروموتور و اگزون اول جهشی شناسایی نشد؛ اما یک

جدول ۳. فراوانی جهش شناسایی شده در اینترون ژن BMP15

فرآوانی	آلل	نشانهگر
۴۱/۲	N	D76A
۵۸/۸	T	

حرف (D) ارائه شده در سمت چپ نام نشانگر به مفهوم جهش حذفی است. حرف (N) در ستون آلل‌ها به معنی مشاهده نشدن نوکلئوتید در جهش حذفی است.

```

Query 22  TTCTCCGCTCTAGGGGTATGAGTGTCTAAAAATGAGCCACAATTTGTCATCTTAAAGGGAA 81
|||||
Sbjct 1  TTCTCCGCTCTAGGGGTATGAGTGTCTAAAAATGAGCCACAATTTGTCATCTT-AGGGAA 59

Query 82  AAAGACTTGGACTCAAATCTTATTCTAACAAACACTGGCTTGTGTGTCTCTGGCATAG 141
|||||
Sbjct 60  AAAGACTTGGACTCAAATCTTATTCTAACAAACACTGGCTTGTGTGTCTCTGGCATAG 119

Query 142 CTCTCTGAGCTTCAGTTTCCTCCTGCAAAAATGGGAATAGCAACTATCTCATAAAGCT 201
|||||
Sbjct 120 CTCTCTGAGCTTCAGTTTCCTCCTGCAAAAATGGGAATAGCAACTATCTCATAAAGCT 179

Query 202  ATTGTGGATTCAAGAGCAAATGCATGTAAGCATCTAATACATTATATAAGTGTCAATA 261
|||||
Sbjct 180  ATTGTGGATTCAAGAGCAAATGCATGTAAGCATCTAATACATTATATAAGTGTCAATA 239

Query 262  GATCGCTATTATGATCTTAAATCATCTCAAGGCTGCTTGTGAGTTTGTACTGAGCAGGT 321
|||||
Sbjct 240  GATCGCTATTATGATCTTAAATCATCTCAAGGCTGCTTGTGAGTTTGTACTGAGCAGGT 299

Query 322  CTGTTAGAGAGACTAAGGCTAGGATATAAGAAAGCTAACGCTTTGCTCTTGTTCCT 377
|||||
Sbjct 300  CTGTTAGAGAGACTAAGGCTAGGATATAAGAAAGCTAACGCTTTGCTCTTGTTCCT 355
    
```

شکل ۳. BLAST توالی‌های حاصله

## تولیدات دائمی

دوره ۱۹ ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۳۹۶

## تأثیر چندشکلی ژن BMP15 بر صفات رشد و تولیدمثل گوسفند لری بختیاری

معنادار بودن تفاوت فراوانی از جمله تعداد زایش (تکقلو و دوقلو) و زایش غیرطبیعی (طبیعی تا سخت‌زایی) برای نشانگر D75A آزمون شد که نتایج آن در جدول ۴ ارائه شده است. همان‌طور که در جدول مشاهده می‌شود از نظر دوقلوزایی تفاوتی بین دو گروه جهش یافته و فاقد جهش مشاهده نشد و فراوانی برابر داشتند. از نظر زایش غیرطبیعی نیز اگرچه در گروه جهش یافته فراوانی سخت‌زایی بالاتر بود اما تفاوت آماری معناداری مشاهده نشد. به دلیل اینکه ژن BMP15 در باروری و راندمان

تولیدمثل گوسفند بسیار مهم است اثر آن بر باروری گوسفندان لری بختیاری بررسی شد. در گوسفند، نژادهای مختلفی با جهش مختلف در ژن پروتئین مورفوژنتیک استخوان ۱۵ (BMP15) شناسایی شده است که میش‌های هتروزیگوت یک نرخ تخمک‌گذاری عالی را در مقایسه با حیوانات نوع وحشی نشان می‌دهند [۱، ۶، ۱۲ و ۱۶]. در گوسفندانی که دارای یک کپی از ژن BMP15 باشند میزان تخمک‌ریزی افزایش پیدا می‌کند در صورتی که گوسفندان هموزیگوس عقیم می‌شوند و این امر به دلیل ناهنجاری در توسعه فولیکولی تخمدان گزارش شده است [۱، ۴ و ۱۲].

جدول ۴. مقایسه فراوانی صفات تولیدمثلی برای جهش شناسایی شده D75A در ژن BMP15 گوسفند

Pvalue	مقدار X <sup>2</sup>	D75A		حالت‌ها	
		N	T		
۱/۰۰ <sup>ns</sup>	۰	%۸۰	%۸۰	۱ (تک قلو)	نوع تولد
		%۲۰	%۲۰	۲ (دوقلو)	
۰/۵۱ <sup>ns</sup>	۱/۳۳	%۴۰	%۴۰	۱ (زایش طبیعی)	نوع زایش
		%۲۰	%۴۰	۲ (زایمان با کمک کم)	
		%۴۰	%۲۰	۳ (سخت‌زایی)	

ns: تفاوت دو گروه معنادار نیست.

البته این ژن بر روی صفات تولیدمثلی در گوسفند افشاری و آمیخته آن با نژاد برولامینو نیز تأثیر معناداری نداشت [۷]. اما نشانگر شناسایی شده در آگزون دوم این ژن در گوسفند سنجابی در صفت دوقلوزایی تأثیر معنادار داشت [۲۳]. همچنین تأثیر الگوهای ژنوتیپی شناسایی شده در این ژن در صفت چندقلوزایی در بز نجدی معنادار گزارش شده است [۱۳].

طبق مطالعات فنوتیپی انجام شده در گله مورد بررسی و مقایسه آن با گوسفندان معروف دوقلوزا، نرخ بره‌زایی

این گوسفند کمتر از گوسفندان مطالعه شده دوقلوزاست. احتمال می‌رود محیط پرورش گوسفند لری بختیاری به دلیل کوهستانی بودن و شرایط نامساعد محیطی، به‌طور طبیعی از بروز بره‌زایی بالا جلوگیری می‌کند و به همین خاطر مشاهدات فنوتیپی چندقلوزایی در این نژاد بالا نیست. از آنجایی که محیط علیه ژن‌های باروری عمل می‌کند، بنابراین بایستی محیط مناسب را برای بهبود تولیدمثل و وضعیت باروری فراهم آورد. با توجه به اینکه دوقلوزایی هم تحت تأثیر عامل محیط (تغذیه و مدیریت)

## تولیدات دامی

دوره ۱۹ ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۳۹۶

یک کپی از ژن BMP15 هستند، میزان تخمکریزی افزایش پیدا می‌کند، در صورتی که گوسفندان هموزیگوس عقیم می‌شوند. دلیل این امر ناهنجاری در توسعه فولیکولی تخمدان است [۴ و ۱۲].

میانگین صفات رشد برای نشانگر D75A آزمون رشد تفاوت معناداری دارد (جدول ۵). با وجود این که میانگین صفات وزن تولد، وزن یک ماهگی و... در گروه جهش یافته کمی بیشتر بود؛ اما اختلاف معناداری در این صفات مشاهده نشد. مطابق با نتایج این تحقیق، مطالعه‌ای که بر روی جهش FecX<sup>R</sup> انجام شد نیز تأثیر معناداری در صفات وزن تولد و میزان رشد قبل و بعد از شیردهی نداشت [۲۱]. اما بر خلاف نتایج این تحقیق ژنوتیپ‌های شناسایی شده در آگرون دوم این ژن در صفات وزن تولد، ۴۵ روزگی و سه ماهگی گوسفند سنجابی تأثیر معنادار ( $p < 0.05$ ) داشتند [۲۳].

و هم متأثر از ژنتیک حیوان بوده، تغذیه می‌تواند تأثیر بسزایی بر ظهور ژن‌های با اثر عمده مؤثر بر صفت تولیدمثل داشته باشد تا حدی که میزان تخمکریزی در گوسفند جاونز به ازاء یک کپی از جهش FecB نصف این میزان در گوسفندان مرینو است که دلیل آن فاکتورهای محیطی نامناسب از جمله بی‌کیفیتی مواد خوراکی یا ترکیبی از مسائل محیطی برای گوسفند جاونز عنوان شده است. با اینکه جهش یکسانی بین گوسفندان برولا و گارول وجود دارد، ولی میزان تخمکریزی و بهره‌زایی گوسفند برولا از گارول بیشتر است که علت این اختلاف می‌تواند ناشی از تفاوت‌های محیطی باشد [۳]. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۴ با استفاده از روش توالی‌یابی و SSCP مشخص شد که جهش FecX<sup>G</sup> در ارتباط با ژن BMP15 باعث افزایش تخمکریزی گوسفندان نژاد بلکلیر و کمبریج می‌شود [۱۲]. در گوسفندانی که دارای

جدول ۵. میانگین صفات رشد برای جهش شناسایی شده D75A در ژن BMP15

صفات رشد	جهش	انحراف معیار $\pm$ میانگین	Pvalue
وزن تولد	N	$0.48 \pm 0.59$	$0.65^{ns}$
	T	$0.70 \pm 0.49$	
وزن یک‌ماهگی	N	$1.1 \pm 14.20$	$0.92^{ns}$
	T	$1.4 \pm 14.22$	
وزن از شیرگیری	N	$1.3 \pm 30.77$	$0.63^{ns}$
	T	$1.9 \pm 31.06$	
وزن شش ماهگی	N	$1.6 \pm 31.72$	$0.07^{ns}$
	T	$1.5 \pm 32.55$	
وزن نه ماهگی	N	$1.4 \pm 35.0$	$0.14^{ns}$
	T	$1.4 \pm 35.9$	

ns: تفاوت دو گروه معنادار نیست.

## تولیدات دامی

دوره ۱۹ ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۳۹۶



- [2]. Bourdon V, Harvey A and Lonsdale DM (2001) Introns and their positions affect the translational activity of mRNA in plant cells. *EMBO reports* 2(5): 394-398.
- [3]. Davis GH, Galloway SM, Ross IK, Gregan SM, Ward J, Nimbkar BV, Ghalsasi PM, Nimbkar C, Gray GD and Inounu I (2002) DNA Tests in Prolific Sheep from Eight Countries Provide New Evidence on Origin of the Booroola (Fecb) Mutation. *Biology of Reproduction* 66(6): 1869-1874.
- [4]. Davis GH, Mcewan J, Fennessy P, Dodds K and McNatty K (1992) Infertility Due to Bilateral Ovarian Hypoplasia in Sheep Homozygous (Fecxi Fecxi) for the Inverdale Prolificacy Gene Located on the X Chromosome. *Biology of Reproduction* 46(4): 636-640.
- [5]. Galloway S, Gregan S, Wilson T, McNatty KP, Juengel JL, Ritvos O and Davis G (2002) BMP15 Mutations and Ovarian Function. *Molecular and Cellular Endocrinology* 191(1): 15-18.
- [6]. Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MP, Juengel JL, Jokiranta TS, McLaren RJ, Luiro K, Dodds KG and Montgomery GW (2000) Mutations in an Oocyte-Derived Growth Factor Gene (BMP15) Cause Increased Ovulation Rate and Infertility in a Dosage-Sensitive Manner. *Nature Genetics* 25(3): 279-283.
- [7]. Gholipour R, Danesh Moghadam L and Harkinezhad MT (2015) Study of Bmp 15 Gene in Afshari and Afshari × Booroola Merino Cross Sheep. *Iranian Journal of Animal Science Research* 7(4): 498-503. (in Persian)

اگرچه مطالعات نشان داده‌اند که موقعیت و توالی اینترون‌ها می‌تواند بر بیان ژن تأثیر داشته باشد [۲] ولی با توجه به اینکه هیچ‌یک از گوسفندان لری بختیاری مورد مطالعه، ناباروری نشان ندادند، شاید بتوان گفت که در این جمعیت از اینترون ژن BMP15 جهش‌های مؤثر در دوقلو زایی وجود ندارد. اما با توجه به این که صفات کمی توسط برآیند تعداد زیادی ژن با آثار کم و همچنین اثر متقابل بین آنها کنترل می‌شود، لذا نامناسب بودن فراوانی آلل مطلوب در سطح یک لوکوس نمی‌تواند گواهی بر عملکرد نامطلوب یک صفت در یک نژاد باشد و بالطبع نیازمند بررسی وضعیت جایگاه‌های ژنی دیگر است [۲۴]. لذا برای آزمون چنین مسئله‌ای بایستی مطالعات بیشتری بر روی گوسفندان این نژاد انجام گیرد تا بتوان نتیجه‌گیری دقیق و با اطمینانی در این زمینه انجام داد.

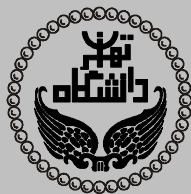
با توجه به مطالعات محدود، در رابطه با تأثیر این ژن در صفات رشد نیز نمی‌توان نظر دقیقی داد و با توجه به اینکه صفاتی مانند چندقلو زایی ممکن است در دوره‌هایی از زندگی بر روی رشد تأثیر داشته باشند، برای اظهار نظر در رابطه با تأثیر این ژن در صفات رشد به مطالعات بیشتر نیاز است. البته برای اعلام نظر نهایی در رابطه با تأثیر این ژن در صفات تولیدمثل و رشد پیشنهاد می‌شود چند شکلی موجود در سایر بخش‌های ژن نیز مطالعه شود.

#### منابع

- [1]. Bodin L, Di Pasquale E, Fabre S, Bontoux M, Monget P, Persani L and Mulsant P (2007) A Novel Mutation in the Bone Morphogenetic Protein 15 Gene Causing Defective Protein Secretion Is Associated with Both Increased Ovulation Rate and Sterility in Lacaune Sheep. *Endocrinology* 148(1): 393-400.

- [8]. Guan F, Liu SR, Shi GQ and Yang LG (2007) Polymorphism of Fecb Gene in Nine Sheep Breeds or Strains and Its Effects on Litter Size, Lamb Growth and Development. *Animal Reproduction Science* 99(1): 44-52.
- [9]. Hadizadeh M, Niazi A, Mohammad AM, Esmailizadeh A and Mehdizadeh GY (2014) Bioinformatics Analysis of the Bmp15 Exon 2 in Tali and Beetal Goats. *Modern Genetics* 9(1): 117-120. (in Persian).
- [10]. Hadizadeh M, Mohammadbadi MR, Niazi A, Esmailizadeh A and Gazooei YM (2014) Search for Polymorphism in Growth and Differentiation Factor 9 (GDF9) Gene in Prolific Beetal and Tali Goats (*Capra Hircus*). *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences* 4(4): 186-191.
- [11]. Hafezian SH (2011) Genetic Polymorphism BMP15 and GDF9 Genes in Sangsari Sheep of Iran. *International Journal of Genetics and Molecular Biology* 3(1): 31-34.
- [12]. Hanrahan JP, Gregan SM, Mulsant P, Mullen M, Davis GH, Powell R and Galloway SM (2004) Mutations in the Genes for Oocyte-Derived Growth Factors GDF9 and BMP15 Are Associated with Both Increased Ovulation Rate and Sterility in Cambridge and Belclare Sheep (*Ovis Aries*). *Biology of Reproduction* 70(4): 900-909.
- [13]. Javdan E, Fayazi J, Tabatabaei S and Baigi Nasiri MT. (2013) Polymorphism of Exon 2 of Bone Morphogenetic Protein 15 Gene (Bmp15) and Its Relationship with Litter Size in Najdi Goat. *Animal Production* 15(2): 101-107. (in Persian)
- [14]. Khodabakhshzadeh R, Mohammadabadi M, Esmailizadeh A, Moradi Shahrehabak H, Bordbar F and Ansari Namin S (2016) Identification of Point Mutations in Exon 2 of GDF9 Gene in Kermani Sheep. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 19(2): 281-289.
- [15]. Liao WX, Moore RK and 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* 279(17): 17391-17396.
- [16]. Martinez-Royo A, Jurado J, Smulders J, Marti J, Alabart J, Roche A, Fantova E, Bodin L, Mulsant P and Serrano M (2008) A Deletion in the Bone Morphogenetic Protein 15 Gene Causes Sterility and Increased Prolificacy in Rasa Aragonesa Sheep. *Animal genetics* 39(3): 294-297.
- [17]. McNatty KP, Galloway SM, Wilson T, Smith P, Hudson NL, O'Connell A, Bibby AH, Heath DA, Davis GH and Hanrahan JP (2005) Physiological Effects of Major Genes Affecting Ovulation Rate in Sheep. *Genetics Selection Evolution* 37(1): 1-14.
- [18]. Moghadaszadeh M, Mohammadabadi MR and AliEsmailizadeh Koshkoieh A. (2015) Association of Exon 2 of Bmp15 Gene with the Litter Size in the Raini Cashmere Goat. *Genetics in the 3rd millennium* 13(3): 4062-4067. (in Persian)
- [19]. Mousavizadeh A, Mohammad Abadi M, Torabi A, Nassiry MR, Ghiasi H and AliEsmailizadeh Koshkoieh A (2009) Genetic Polymorphism at the Growth Hormone Locus in Iranian Tali Goats by Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP). *Iranian Journal of Biotechnology* 7(1): 51-53.

- [20]. Nott A, Meislin SH and Moore MJ (2003) A quantitative analysis of intron effects on mammalian gene expression. *RNA* 9(5): 607-617.
- [21]. Roche A, Ripoll G, Joy M, Folch J, Panea B, Calvo J and Alabart J (2012) Effects of the Fecx R Allele of Bmp15 Gene on the Birth Weight, Growth Rate and Carcass Quality of Rasa Aragonesa Light Lambs. *Small Ruminant Research* 108(1): 45-53.
- [22]. Shabir M and Ganai T (2012) Nucleotide Sequencing and DNA Polymorphism Studies of BMP15 Gene in Corriedale and Local Kashmir Valley Sheep (*Ovis Aries*). *Gene* 499(1): 231-235.
- [23]. Solimani B, Rahimi Mianji GH and Chaharaein B (2011) The Segregation of Exon 2 Bmp15 Gene on Twinning and Traits of Weight in Sanjabi Sheep. *Iran Journal of Biology* 24(4): 487-493. (in Persian).
- Soufy B, Mohammadabadi M R, Shojaeyan K, Baghizadeh A, Ferasaty S, Askari N and Dayani O (2009) Evaluation of Myostatin Gene Polymorphism in Sanjabi Sheep by PCR-RFLP Method. *Journal of Animal Research*, 19(1): 81-89. (in Persian)



Journal of  
**Animal Production**

(College of Abouraihan – University of Tehran)

Vol. 19 ■ No. 3 ■ Autumn 2017

## The effect of BMP15 gene polymorphism on growth and reproduction traits in Lori-Bakhtiari sheep

*Parisa Mahvari<sup>1</sup>, Mostafa Faghani<sup>2\*</sup>, Abbas Doosti<sup>3</sup>*

1. M.Sc. Student, Department of Animal Science, College of Agriculture, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2. Assistant Professor, Department of Animal Science, College of Agriculture, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
3. Associate Professor, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Received: September 18, 2016

Accepted: February 1, 2017

### Abstract

The aim of this research was to recognize genetic polymorphism in intron place of BMP15 gene and its association with growth and reproduction traits in Lori-Bakhtiari sheep breed using sequencing method. Blood samples of 80 ewes and 20 rams of Lori-Bakhtiari sheep from breeding station of Shahrekord were collected. DNA was extracted from whole blood and their quality was evaluated using 1% agarose gel electrophoresis. A fragment with the size of 356 bp from extracted DNA was amplified using polymerase chain reaction (PCR) with a pair of specific primers. The PCR products were sequenced. Sequencing result was compared with the registered gene sequence in NCBI database using Blast program. Results showed only a deletion mutation (D75A) in this gene; Adenine with 41.2% frequency was deleted in 75 nucleotide. This mutation did not effect on reproduction and growth traits. However, it is recommended to study the association of polymorphisms in other segments of this gene with reproduction and growth traits in future studies.

**Keywords:** bone morphogenetic proteins (BMP15), genetic polymorphism, growth traits, Lori-Bakhtiari sheep, reproductive traits.