



ارتباط چندشکلی ژن‌های GDF9 و BMP15 با صفت چندقلوزایی در بز مرخز

اعظم خسروی زرندی^۱، غلامرضا داشاب^۲، محمد رکوعی^۳ و مهدی وفای واله^۴

۱- ۳ و ۴- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار، دانشگاه زابل

۲- استادیار، دانشگاه زابل، (نویسنده مسوول: dashab@uoz.ac.ir)

تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۴ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۰/۲۰

چکیده

چندقلوزایی یکی از مهم‌ترین صفات اقتصادی در پرورش بز است، که علاوه بر تأثیرپذیری از ژن‌های کوچک اثر، تحت تأثیر ژن‌های با اثر بزرگ نیز می‌باشد. در دهه‌های اخیر مشخص شد که دو عضو متعلق به خانواده فاکتورهای رشد با منشأ اووسیتی به نام‌های GDF9 و BMP15 برای رشد فولیکولی و تخمک‌ریزی ضروری هستند. هدف از پژوهش حاضر مطالعه‌ی چند شکلی در جایگاه‌های ژنی GDF9 و BMP15 و ارتباط الگوهای ژنوتیپی شناسایی شده در جایگاه‌های مذکور با میزان چندقلوزایی است. نمونه خون از تعداد ۵۰ رأس بز مرخز به‌طور تصادفی گرفته شد و استخراج DNA با روش بهینه یافته نمکی انجام گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای تکثیر قطعه ۸۶۲ جفت بازی از آگزون ۲ ژن BMP15 و قطعه ۹۹۵ جفت بازی از آگزون ۲ ژن GDF9 انجام گرفت. محصولات PCR پس از هضم توسط آنزیم HinfI بر روی ژل آگارز ۳ درصد الکتروفورز و بر اساس الگوی باندهی مشاهده شده ژنوتیپ دام‌ها تعیین شد. در جایگاه BMP15 دو ال B و b با فراوانی‌های به ترتیب ۰/۹۶ و ۰/۰۴ و ژنوتیپ‌های BB، Bb و bb به ترتیب با فراوانی‌های ۰/۹۴، ۰/۰۴ و ۰/۰۲ مشاهده شد. همچنین، در جایگاه GDF9 فراوانی آل‌های A و a به ترتیب ۰/۶۸ و ۰/۳۲ و فراوانی ژنوتیپ‌های AA، Aa و aa به ترتیب ۰/۶۰، ۰/۱۶ و ۰/۲۴ برآورد شد. شاخص نئی، PIC و هتروزیگوسیتی مورد انتظار در ژن BMP15 به ترتیب ۰/۴۷، ۰/۰۷۷ و ۰/۰۸ و در ژن GDF9 به ترتیب ۰/۳۴، ۰/۴ و ۰/۴۳ محاسبه شد. همچنین، نتایج بررسی ارتباط الگوهای ژنوتیپی جایگاه‌های ژنی GDF9 و BMP15 و اثرات متقابل آنها بر صفت دوقلوزایی معنی‌دار بودند، بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت هر چند دو جایگاه ژنی GDF9 و BMP15 تنوع متوسط و پایین دارند، اما نقش مهمی در دوقلوزایی ایفا می‌نمایند. لذا اطلاعات موجود می‌تواند در برنامه‌های انتخاب برای افزایش دوقلوزایی در بز نژاد مرخز سودمند باشد.

واژه‌های کلیدی: بز مرخز، TGF- β ، چند شکلی، مطالعات پیوستگی

مقدمه

۱۳۵ اسید آمینه طول دارد (۱۴). ژن BMP15 شامل دو آگزون است، که از طریق یک اینترون به طول ۵/۴ کیلو باز از همدیگر جدا می‌گردد. محصول رونویسی کامل آن‌ها یک توالی ۱۱۷۹ نوکلئوتیدی بوده، که کدکننده یک پیش‌پپتید به طول ۳۹۳ اسید آمینه است و پپتید کامل آن ۱۲۵ اسید آمینه طول دارد (۱۰).

ژن‌های GDF9 و BMP15 برای پیشرفت مراحل اولیه فولیکول‌سازی و سپس در تکامل پایانی فولیکول بسیار حیاتی هستند (۱۱،۶). پروتئین‌های ترشح شده در سلول‌های هدف ژن‌های مذکور یعنی سلول‌های اووسیت در تمایز گرانولوزاهای مختلف (۱۶،۷) و در تنظیم اعمال کلیدی سلول‌های گرانولوزا نقش مهمی دارند (۲۳،۱۵،۹). جهش در نواحی کد کننده و پروموتور ژن‌های GDF9 و BMP15 باعث تغییر مکانیسم الگوی بیان ژن در سلول‌های سوماتیک فولیکولی در تخمدان‌ها شده و در نتیجه باعث تغییر در تمایز سلول‌های اووسیت و عمل سلول‌های گرانولوزا می‌شود (۲۸،۲۱).

تولید مثل یکی از مهم‌ترین صفات اقتصادی در بز می‌باشد. دو یا چندقلوزایی از جمله صفات اقتصادی است که تحت تأثیر محیط و ژنتیک بوده و از شاخص‌های مهم راندمان تولید در توده‌های جمعیتی بز به شمار می‌رود. اگرچه این صفت جزء صفات پلی‌ژنیک است، اما اخیراً ژن‌هایی شناسایی شده‌اند، که روی این صفت دارای اثرات عمده هستند. تاکنون، سه دسته ژن به‌طور مؤثر بر رشد فولیکول‌ها و نرخ تخمک‌ریزی شناسایی شده است، که عبارتند از: $ALK6^1$ ، $GDF9^2$ و دسته BMP^3 که معروف‌ترین آن‌ها BMP15 است. تمامی این ژن‌ها جزو خانواده بزرگ TGF- β^4 بوده، که بر تنظیم بیان و ترشح هورمون‌های مؤثر بر رشد فولیکولی و نرخ تخمک‌اندازی مؤثرند (۱۸). ژن GDF9 طولی معادل ۲/۵ کیلو باز داشته، که شامل دو آگزون است و از راه یک اینترون به طول ۱۱۲۶ جفت باز از هم جدا شده‌اند، که کدکننده یک پیش‌پپتید به طول ۴۵۳ اسید آمینه بوده و پپتید فعال آن

1- Activin receptor-Like Kinase 6

3- Bone Morphogenetic Proteins

2- Growth and Differentiation Factor- 9

4- Transforming Growth Factor B

جهش‌های دو جایگاه BMP15 و GDF9 بر میزان چندقلوژی در بزها به ویژه در توده‌های بومی کشور وجود ندارد. لذا، هدف از مطالعه اخیر بررسی چندشکلی احتمالی در اگزون دوم ژن‌های BMP15 و GDF9 و ارتباط آن‌ها با صفت چندقلوژی در بز مرخز بوده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های مورد استفاده در تحقیق حاضر شامل ۵۰ رأس بز مرخز ماده دو ساله ایستگاه تحقیقاتی بز مرخز سمنج بوده است، که به طور تصادفی انتخاب شدند. خون‌گیری از ورید گردنی در لوله‌های خلأ ۵ میلی‌لیتری حاوی ماده ضد انعقاد EDTA انجام گرفت و تا قبل از استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد در داخل فریزر نگهداری شدند. استخراج DNA از نمونه‌های خون به روش نمکی بهینه یافته (۱۹) انجام شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به دو روش اسپکتروفتومتری (نانو دراپ) و ژل الکتروفورز تعیین شد. تکثیر قطعه ۸۶۲ جفت بازی ناحیه اگزون ۲ ژن BMP15 و نیز قطعه ۹۹۵ جفت بازی ناحیه اگزون ۲ ژن GDF9 از راه آغازگرهای اختصاصی (۲۹) و با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) انجام گرفت. واکنش تکثیر PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام گرفت، که غلظت نهایی مواد مورد استفاده مطابق جدول (۱) است و توالی آغازگرهای اگزون ۲ ژن‌های BMP15 و GDF9 در مطالعه حاضر در جدول (۲) ارائه شده است.

مطالعات در زمینه بررسی ژن‌های عمده مؤثر بر تولید مثل در بز بسیار محدود بوده و عمده تلاش‌های در بررسی اثرات ژن‌های GDF9 و BMP15 بر رفتار تولید مثلی در نژادهای مختلف گوسفند بررسی شده، لذا به دلیل رفتار نزدیک دو گونه در تحقیق حاضر از مطالعات انجام گرفته در گوسفند استفاده شد. تحقیقات در گوسفند و بز نشان داد دام‌هایی که حاوی یک آلل جهش یافته در نواحی کدکننده جایگاه‌های ژنی BMP15 و GDF9 باشند، نرخ تخم‌ریزی افزایش می‌یابد؛ بنابراین، هتروزیگوتی باعث افزایش میزان تخم‌ریزی و افزایش چندقلوژی می‌گردد، اما هموزیگوت مغلوب که دارای دو آلل جهش یافته می‌باشند، نقص در تکامل فولیکولی نشان می‌دهد که باعث ناباروری در بعضی نژادهای گوسفند شده است (۲۱، ۱۴، ۱۱). پژوهشگران چهار آلل موتانت از ژن BMP15 ($Fecx^B$, $Fecx^H$, $Fecx^I$, $Fecx^G$) را شناسایی کرده‌اند. تمام این آلل‌ها باعث افزایش میزان تخم‌گذاری در گوسفندان هتروزیگوت و ناباروری در گوسفندان هموزیگوت مغلوب حامل این موتاسیون‌ها می‌شود (۱۴، ۱۰، ۱).

محققین نشان دادند گوسفندان کمبریج و بلکلیر که حامل یک موتاسیون در ژن GDF9 ($FecG^H$) در اگزون‌های ۱ و ۲ هستند، باعث افزایش میزان تخم‌گذاری در گوسفندان هتروزیگوت و عدم باروری در گوسفندان هموزیگوت مغلوب می‌گردد. هم‌چنین، گزارش شده است، که یک نسخه از ژن $FecG^H$ باعث افزایش ۱/۴ برابری میزان تخم‌گذاری در گوسفندان کمبریج و بلکلیر می‌گردد (۱۳، ۱۲، ۱۰، ۸). مطالعات در ارتباط با تأثیر

جدول ۱- غلظت‌های مورد استفاده از مواد برای انجام واکنش PCR

نام ماده	غلظت ذخیره اصلی	مقدار مورد استفاده	غلظت نهایی
Mgcl2	25 Mm/μL	1 μL	1.25 Mm/μL
PCR buffer	10 X	2 μL	1 X
dNTPs	10 Mm/μL	1 μL	0.5 Mm/μL
Primer (Forward)	10 pm/μL	1 μL	0.5 pm/μL
Primer (Reverse)	10 pm/μL	1 μL	0.5 pm/μL
Taq DNA Polymerase	5 unit/ μL	0.5 μL	0.125 unit/ μL
DNA Template	50 pm/μL	3 μL	7.5 pm/μL
dH2o	-	10.5 μL	-
Final volume	-	20 μL	-

جدول ۲- پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر بخش اگزون ۲ ژن‌های BMP15 و GDF9 (۲۹)

جایگاه ژنی	توالی آغازگر	اندازه قطعه (bp)
BMP15	F: 5' - TGCAGGCTCCTGGCACATACAGAC - 3' R: 5' - TCACCTGCATGTGCAGGACTGGG - 3'	862
GDF9	F: 5' - AACCTTTCATCAGTTCTCTCAG - 3' R: 5' - GTTTTACTTGACAGGAGTCTGTTAACGAC - 3'	950

تعیین کمی DNA به منظور تأیید تکثیر قطعه مورد نظر، محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند. مشاهده تنها یک باند ۸۶۲ جفت بازی برای جفت آغازگر اول (BMP15) و یک باند ۹۹۵ جفت بازی برای جفت آغازگر دوم (GDF9)، نشان‌دهنده تکثیر درست قطعات انتخاب شده ژن‌ها و صحت انجام PCR بود، که با نتایج به‌دست آمده از پژوهش ژنوکوئین و همکاران (۲۹) مطابقت داشت. عدم وجود کشیدگی و شفاف بودن باندها نشان‌دهنده عدم وجود آلودگی‌های پروتئینی و نمکی می‌باشد و مشاهده تنها یک باند، عدم وجود باندهای کاذب را مورد تأیید قرار داد (شکل ۱).

پس از هضم محصولات PCR از راه آنزیم *HinfI* محصولات هضم روی ژل آگارز ۳ درصد الکتروفورز و بر اساس تعداد باندها و اندازه آن‌ها الگوی ژنوتیپی دام‌ها تعیین شدند. تعداد باندهای تشخیص داده شده روی ژل آگارز در نمونه‌های هضم شده در جایگاه ژن BMP15 بیانگر سه الگوی ژنوتیپی شامل ژنوتیپ BB (دو باند ۲۷۰bp و ۵۶۶bp، ژنوتیپ Bb (سه باند ۲۷۰bp و ۲۶bp و ژنوتیپ bb (فاقد جایگاه برش آنزیم و تنها با یک باند ۸۶۲bp بودند (شکل ۲). در جایگاه فوق دو آلل مشاهده شد، که آلل B دارای بیشترین فراوانی (۰/۹۶) و آلل b دارای کمترین فراوانی (۰/۰۴) بودند. ژنوتیپ‌های مشاهده شده برای ژنوتیپ BB بیشترین فراوانی (۰/۹۴) و ژنوتیپ bb دارای کمترین فراوانی (۰/۰۲) و فراوانی ژنوتیپ هتروزیگوت در حد واسط هموزایگوت‌ها قرار داشت (جدول ۳). نتایج پژوهش اخیر با یافته‌های تحقیق ژنوکوئین و همکاران (۲۹) مطابقت داشت، که چندشکلی در ژن BMP15 را در بزهای سفید نژاد چینی گزارش کردند. سلیمانی و همکاران (۲۶) در مطالعه آگزون ۲ ژن BMP15 و ارتباط آن‌ها با دوقلوزایی در گوسفند سنجابی، چندشکلی در جایگاه فوق را گزارش نمودند، که مرتبط با دوقلوزایی بودند. بنابراین، این مطالعه می‌تواند در برنامه‌های اصلاح نژادی کشور و بهبود وضعیت تولیدمثلی مورد استفاده قرار گیرد.

تعداد و اندازه باندهای حاصل از هضم آنزیمی در جایگاه آگزون ۲ ژن GDF9 بیانگر سه الگوی ژنوتیپی شامل ژنوتیپ AA (باندهای ۱۴۰، ۱۶۵، ۲۲۰ و ۴۷۰ جفت بازی)، ژنوتیپ aa (باندهای ۱۴۰، ۱۶۵، ۴۵۸ و ۱۲ جفت بازی) و ژنوتیپ هتروزیگوت Aa (باندهای ۴۷۰، ۴۵۸، ۲۲۰، ۱۶۵، ۱۴۰ و ۱۲ جفت بازی) بوده است (شکل ۳)، که فراوانی آن‌ها در جمعیت بز مرخز به ترتیب ۰/۱۶، ۰/۲۴ و فراوانی آلل‌های موجود در جایگاه مذکور شامل آلل A و a به ترتیب برابر ۰/۶۸ و ۰/۳۲ محاسبه شد

شرایط واکنش PCR شامل مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ده دقیقه، به همراه ۳۸ چرخه با واسرشته‌سازی ثانویه DNA در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگرها به DNA در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد برای جایگاه ژن GDF9 و ۶۱/۵ درجه سانتی‌گراد برای جایگاه ژن BMP15 به مدت ۵۵ ثانیه و بسط اولیه آغازگرها در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و در نهایت مرحله بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ده دقیقه در دستگاه ترموسیکلر (مدل اپندورف) انجام شد. کیفیت تکثیر قطعه‌های مورد نظر در واکنش PCR با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

برای هضم آنزیمی محصولات حاصل از واکنش PCR برای دو جایگاه ژنی مورد مطالعه از ۶ میکرولیتر محصول PCR، ۲ میکرولیتر بافر واکنش آنزیمی (۱۰X)، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم برشی *HinfI* (۲/۵ واحد) و ۱۱/۵ میکرولیتر آب دی‌یونیزه استفاده شد. قطعات حاصل از هضم روی ژل آگارز ۳ درصد الکتروفورز شد. بر اساس اندازه و تعداد باندها حاصل از هضم آنزیمی در دو جایگاه BMP15 (دو سایت برشی برای آنزیم) و GDF9 (۴ سایت برشی برای آنزیم) الگوی ژنوتیپی دام‌ها تعیین شد. فراوانی ژنی و ژنوتیپی، هتروزیگوسیتی یا تنوع ژنتیکی، تعادل هاردی-واینبرگ، شاخص شانون، شاخص نئی، محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)، تعداد آلل‌های مؤثر و تعداد آلل واقعی^۵ برای جایگاه‌های مورد نظر با استفاده از نرم‌افزار POPGENE 3.2 محاسبه شد (۳۰). همچنین، برای بررسی ارتباط الگوهای ژنوتیپی دو جایگاه GDF9 و BMP15 و اثرات متقابل آن‌ها بر میزان چندقلوزایی در جمعیت بز مرخز کردستان از مدل غیرخطی دو جمله‌ای لجستیک^۶ نرم‌افزار ASReml (نسخه ۳/۹) استفاده شد، که مدل آماری عبارتند از:

$$Y_{ijk} = \mu + GDF9_i + BMP15_j + GDF9_i * BMP15_j + e_{ijk}$$

در معادله فوق Y_{ijk} مقدار فنوتیپی رکورد چندقلوزایی (تک و دوقلو)، μ میانگین کل، $GDF9_i$ اثر ثابت الگوهای ژنوتیپی جایگاه GDF9، $BMP15_j$ اثر ثابت الگوهای ژنوتیپی جایگاه BMP15، $GDF9_i * BMP15_j$ اثرات متقابل الگوهای ژنوتیپی دو جایگاه GDF9 و BMP15، e_{ijk} عوامل تصادفی باقی‌مانده است.

نتایج و بحث

DNA استخراج شده با روش نمکی از کیفیت مطلوبی برخوردار بوده، از آلودگی پروتئین نیز عاری بود. پس از

1- Shanon index

2- Nei index

3- Polymorphism information content

4- Effective allele number

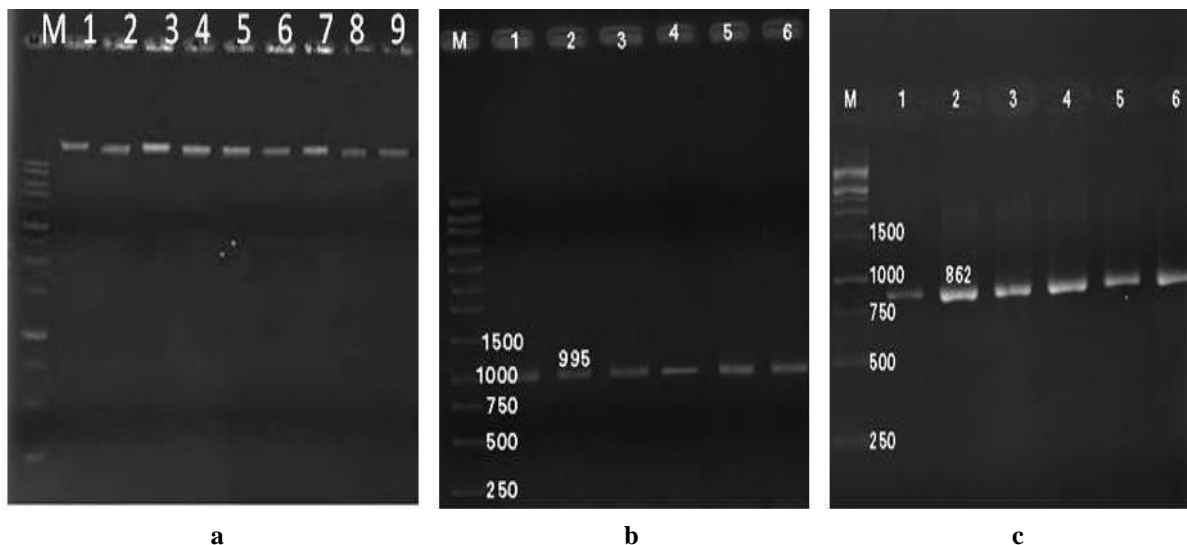
5- Observed allele number

6- Logistic model

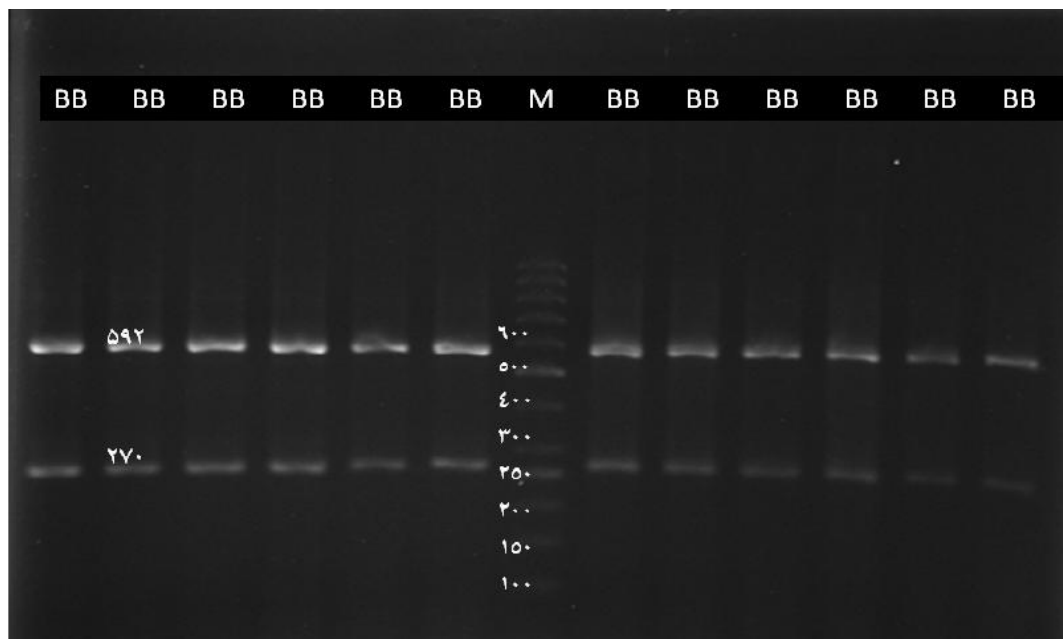
ارتباط چندشکلی ژن های GDF9 و BMP15 با صفت چندقلوزایی در بز مرخز ۲۰۲

مشاهده شده در جدول ۳ ارائه شده است. میزان هتروزایگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار جایگاه BMP15 به ترتیب ۰/۰۴ و ۰/۰۸ برآورد شد. به نظر می رسد کوچک بودن اندازه جمعیت و افزایش هم خونی از دلایل احتمالی پایین بودن میزان تنوع ژنتیکی محسوب می شود.

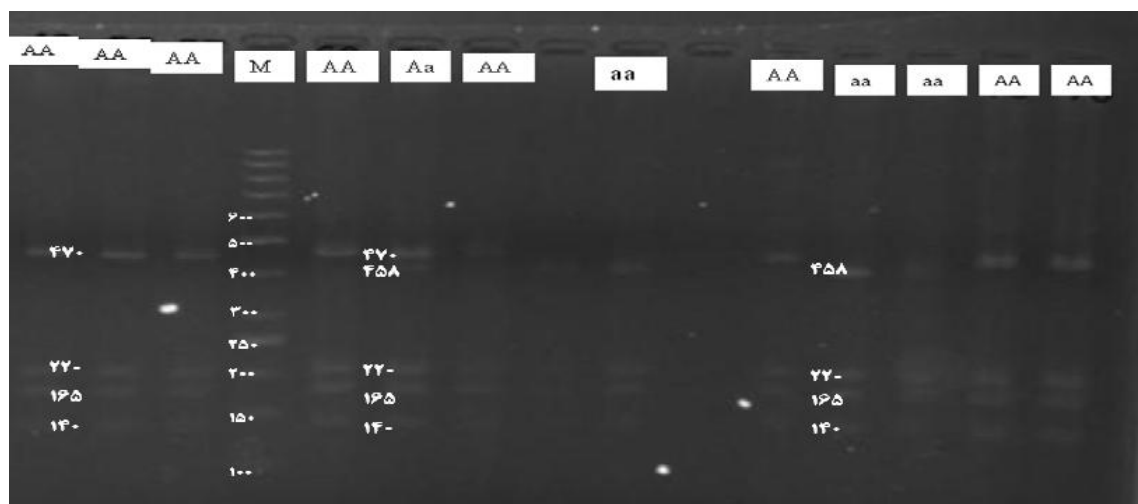
(جدول ۳). سلیمانی و همکاران (۲۶) گزارش کردند که ژن GDF9 در گوسفندان سنجابی چندشکل می باشد. همچنین، ژن GDF9 در مطالعه چو و همکاران (۴) در گوسفند هان دنبه کوچک^۱ رفتار پلی مورف از خود نشان داد، که منطبق با نتایج مطالعه اخیر است. شاخص های تنوع ژنتیکی شامل هتروزایگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده، هموزایگوسیتی مورد انتظار و



شکل ۱- a کیفیت DNA استخراج شده به روش نمکی بهینه یافته از خون کامل در بز مرخز، b- الکتروفورز محصولات PCR اگزون ۲ ژن BMP15 در بز مرخز، c- الکتروفورز محصولات PCR اگزون ۲ ژن GDF9 در بز مرخز (M: مارکر وزنی ۲۵۰ جفت باز).



شکل ۲- الکتروفورز محصولات هضم از طریق آنزیم HindfI در اگزون ۲ جایگاه BMP15 (M - مارکر وزنی ۵۰ جفت بازی).



شکل ۳- الکتروفورز محصولات هضم از راه آنزیم *HinfI* در اگزون ۲ جایگاه *GDF9* و انواع الگوهای ژنوتیپی (M- مارکر وزنی ۵۰ جفت بازی).

جدول ۳- فراوانی الگوهای ژنوتیپی مشاهده شده محصولات حاصل از هضم با آنزیم *HinfI* در دو جایگاه ژنی *BMP15* و *GDF9* در جمعیت بز مرخز

جایگاه ژنی	تعداد مشاهده شده	تعداد مورد انتظار	فراوانی ژنوتیپی
BMP15			
BB	۴۷	۴۶/۰۶	۰/۹۴
Bb	۲	۳/۸۷	۰/۰۴
bb	۱	۰/۰۶	۰/۰۲
GDF9			
AA	۳۰	۲۳/۰۱	۰/۶۰
Aa	۸	۲۱/۹۸	۰/۱۶
aa	۱۲	۵/۰۱	۰/۲۴

مقدسزاده و همکاران (۲۰) میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در جایگاه ژنی *GDF9* را به ترتیب ۰/۵۱ و ۰/۴۲ گزارش کردند، که نشان دهنده تنوع ژنتیکی بالا در این جایگاه است. در مطالعه حاضر هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در جایگاه *GDF9* به ترتیب ۰/۱۶ و ۰/۴۳ محاسبه شد. قادری و همکاران (۲۴) در قطعه ۴۶۲ جفت بازی اگزون یک ژن *GDF9*، مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار را به ترتیب ۰/۱۹ و ۰/۱۷ گزارش کردند. همان طور که ملاحظه می شود، هتروزیگوسیتی مشاهده شده در اگزون یک جایگاه ژن *GDF9* پایین گزارش شده است، که نشان دهنده تنوع ژنتیکی پایین جایگاه مورد مطالعه می باشد. به منظور بررسی تعادل هاردی- واینبرگ در جایگاه های مورد مطالعه در این جمعیت از آزمون کای مربع (2) استفاده شد. نتایج مطالعه اخیر نشان داد، که جمعیت در جایگاه *BMP15* در تعادل قرار ندارد ($P < 0.01$). مقدسزاده و همکاران (۲۰) در مطالعه جایگاه *BMP15* در جمعیت بز کرکی رائینی تعادل هاردی- واینبرگ را گزارش کردند، که با نتایج به دست آمده از پژوهش اخیر مطابقت نداشت. هم چنین، آزمون آماری نشان داد، که جمعیت بزهای مرخز برای جایگاه *GDF9* در تعادل هاردی- واینبرگ قرار ندارد ($P < 0.01$). قادری و همکاران (۲۴) گزارش کردند، که اگزون ۱ و ۲ جایگاه ژن *GDF9* در نژاد کردی در تعادل هاردی- واینبرگ قرار دارند، که با نتایج حاصل از پژوهش اخیر مطابقت نداشت. سایر شاخص های تنوع ژنتیکی و جمعیتی در دو جایگاه مورد مطالعه در جدول ۴ ارائه شده است، که نتایج حاصل بیانگر پایین بودن تنوع ژنتیکی در جمعیت مورد مطالعه برای ژن *BMP15* و بالا بودن تنوع ژنتیکی در ژن *GDF9* دارد. بسته بودن گله های اصلاحی و فقدان کنترل آمیزش

مقدسزاده و همکاران (۲۰) میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در جایگاه ژنی *GDF9* را به ترتیب ۰/۵۱ و ۰/۴۲ گزارش کردند، که نشان دهنده تنوع ژنتیکی بالا در این جایگاه است. در مطالعه حاضر هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در جایگاه *GDF9* به ترتیب ۰/۱۶ و ۰/۴۳ محاسبه شد. قادری و همکاران (۲۴) در قطعه ۴۶۲ جفت بازی اگزون یک ژن *GDF9*، مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار را به ترتیب ۰/۱۹ و ۰/۱۷ گزارش کردند. همان طور که ملاحظه می شود، هتروزیگوسیتی مشاهده شده در اگزون یک جایگاه ژن *GDF9* پایین گزارش شده است، که نشان دهنده تنوع ژنتیکی پایین جایگاه مورد مطالعه می باشد. به منظور بررسی تعادل هاردی- واینبرگ در جایگاه های مورد مطالعه در این جمعیت از آزمون کای مربع (2) استفاده شد. نتایج مطالعه اخیر نشان داد، که

تنوع ژنتیکی می‌شود. بررسی ارتباط الگوهای ژنوتیپی جایگاه‌های ژنی بر صفت دوقلوزایی نشان داد که ژنوتیپ‌های جایگاه GDF9 و BMP15 و هم‌چنین، اثر متقابل BMP15 و GDF9 اثر معنی‌دار بر میزان دوقلوزایی دارند (جدول ۵).

افراد خویشاوند به افزایش هم‌خونی و کاهش ژنتیکی در جایگاه‌های ژنتیکی منجر شده است. لذا با افزایش تعداد مؤثر دام‌های مولد، کنترل آمیزش‌ها برای ایجاد حداقل هم‌خونی در هر گله و نیز ایجاد جمعیت‌های جداگانه با تعداد اولیه بیشتر موجب جلوگیری از کاهش

جدول ۴- شاخص‌های تنوع در جایگاه ژن BMP15 و GDF9 در جمعیت مرخز

GDF9	BMP15	شاخص‌های جمعیت
۲	۲	آل‌های مشاهده شده
۱/۶۷	۱/۰۸	آل‌های مؤثر
۰/۵۹	۰/۱۷	شاخص شانن
۰/۳۴	۰/۰۷	محتوای اطلاعات چند شکلی
۰/۴۰	۰/۰۸	شاخص ننی
۰/۵۶	۰/۹۲	هموزیگوسیتی مورد انتظار
۰/۸۴	۰/۹۶	هموزیگوسیتی مشاهده شده
۰/۴۳	۰/۰۸	هتروزیگوسیتی مورد انتظار
۰/۱۶	۰/۰۴	هتروزیگوسیتی مشاهده شده

ژن‌های GDF9 و BMP15 نقشی کلیدی در باروری و افزایش میزان تخمک‌گذاری و نیز، بلوغ فولیکول‌ها دارند (۲۳، ۲۲، ۱۲). در مطالعه اخیر در جایگاه BMP15 علیرغم تثبیت وفور آلی، ژنوتیپ هتروزیگوت نقش مؤثری بر باروری و دوقلوزایی در جمعیت بز مرخز داشت.

سلیمانی و همکاران (۲۶) اثر الگوهای ژنوتیپی جایگاه GDF9 را بر میزان دوقلوزایی در گوسفند نژاد سنجابی را معنی‌دار گزارش کردند. هم‌چنین، اثر الگوهای ژنوتیپی جایگاه BMP15 بر میزان دوقلوزایی در نژاد سنجابی معنی‌دار گزارش شد (۲۷)، که با نتایج حاصله از تحقیق حاضر مطابقت داشت. محققین مختلف گزارش کردند که

جدول ۵- تجزیه واریانس اثرات الگوهای ژنوتیپی دو جایگاه GDF9 و BMP15 بر صفت چندقلوزایی در جمعیت بز مرخز

جایگاه ژنی	درجه آزادی	میانگین مربعات	سطح معنی‌داری
GDF9	۲	۰/۵۳۸	۰/۰۲*
BMP15	۲	۰/۶۹۱	۰/۰۳*
GDF9*BMP15	۴	۰/۸۵۶	۰/۰۰۷**
Residual	۴۱	۰/۱۳۸	

* و **: به ترتیب در سطح احتمال ۰/۰۵ و ۰/۰۱ معنی‌دار هستند.

گوسفندان دارای یک کپی از ژن BMP15 میزان تخمک‌گذاری بالاتری دارند، در صورتی که گوسفندان هموزایگوت مغلوب که حاوی دو آل موتانت باشند، عقیم هستند و این امر به دلیل ناهنجاری در توسعه فولیکولی تخمدان گزارش شده است (۵، ۲). هم‌چنین، در جایگاه GDF9 ژنوتیپ هتروزیگوت Aa نسبت به هر دو ژنوتیپ هموزایگوت بیشترین تأثیر بر میزان چند قلوزایی داشت، که ممکن است به واسطه روابط ژنتیکی غیرافزایشی از جمله رابطه فوق غلبه در این جایگاه باشد. تحقیقات روی گوسفندان لاکان فرانسه نشان داد، که افزایش باروری به دلیل جهش در جایگاه GDF9 می‌باشد (۲)، که با نتایج به‌دست آمده از تحقیق حاضر برای جایگاه GDF9 مطابقت دارد.

میانگین و خطای استاندارد برآوردهای اثر ژنوتیپ‌های مختلف دو جایگاه GDF9 و BMP15 بر میزان چند قلوزایی در جمعیت بز مرخز در جدول (۶) ارائه شده است. نتایج نشان داد که در جایگاه BMP15 ژنوتیپ bb بیشترین تأثیر را بر افزایش میزان چند قلوزایی ایفا نمود، اما تفاوت معنی‌داری با افراد دارای ژنوتیپ هتروزیگوت نداشت. میانگین اثر ژنوتیپ‌های هتروزیگوت نسبت به افراد هموزایگوت غالب (BB) معنی‌دار بود ($P < 0.05$)، که مطابق با نتایج به دست آمده در جایگاه مذکور در نژادهای مختلف گوسفند است (۲۰، ۱۷). نتایج به‌دست آمده از تحقیق حاضر با تحقیقات انجام گرفته در جایگاه BMP15 روی نژادهای کوچک دنبه هان و هو مطابقت نداشت (۱۷، ۳). زیرا جایگاه BMP15 در گوسفندان کوچک دنبه هان و هو چند شکلی نشان نداد.

جدول ۶- میانگین و انحراف استاندارد اثر ژنوتیپ‌های مختلف جایگاه‌های GDF9 و BMP15 بر میزان دوقلو زایی بز مرخز

دوقلو زایی	ژنوتیپ	جایگاه ژنی
میانگین ± انحراف استاندارد		BMP15
۱/۰۲۸±۰/۰۰۱ ^b	BB	
۱/۰۶۲±۰/۱۶۴ ^a	Bb	
۱/۰۷۳±۰/۲۲۵ ^a	bb	
		GDF9
۱/۰۸±۰/۱۰۹ ^D	AA	
۱/۰۲۸±۰/۰۰۱ ^a	Aa	
۰/۸۵±۰/۱۵۲ ^c	aa	

گروه‌های دارای حروف مشترک غیر معنی‌دار ($P > 0.05$) و گروه‌های با حروف غیر مشترک معنی‌دار هستند ($P < 0.01$).

نرخ تخمک‌اندازی شناسایی شده است که عبارتند از: GDF9، ALK6 و دسته BMP که معروف‌ترین آن‌ها BMP15 است. تمامی این ژن‌ها جزء خانواده بزرگ TGF- بوده که بر تنظیم بیان و ترشح هورمون‌های مؤثر بر رشد فولیکولی و نرخ تخمک‌اندازی مؤثر هستند. جهش‌های اتفاق افتاده در نواحی پروموتور و کد کننده نقش عمده‌ای در میزان تنوع افراد در میزان باروری و چندقلو زایی دارند. در مطالعه حاضر با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت، هر چند دو جایگاه ژنی GDF9 و BMP15 در بز مرخز چندشکلی متوسط به پایین دارند، که نشان از مناطق حفاظت شده در ژنوم بز محسوب می‌شود، اما الگوهای ژنوتیپی دو جایگاه هم به صورت انفرادی و هم ترکیبی آن‌ها یا هاپلوتیپ‌های مختلف دو جایگاه میزان دوقلو زایی را تحت تأثیر قرار داد. لذا برنامه ریزی برای تثبیت جهش‌های اتفاق افتاده مرتبط با ژن‌های باروری کمک قابل توجهی به افزایش تولید و درآمد دامداران خواهد داشت و می‌تواند در استراتژی‌های اصلاح نژادی برای بهبود راندمان تولید مثل مورد استفاده قرار گیرد.

وجود هم‌زمان جهش در ژن‌های GDF9 و BMP15 در نژادهای بلکلیبر و کمبریج به افزایش چندقلو زایی منجر شده به طوری که اثرات جهش‌ها افزایشی و چندقلو زایی بالاتری نسبت به جهش منفرد در یک ژن را نشان داده است (۱۴). این گزارش تأییدکننده این فرضیه است که مکانیسم فعالیت دو فاکتور GDF9 و BMP15 مستقل از یکدیگر نمی‌باشد (۲۵). در مطالعه حاضر نیز اثر متقابل دو جایگاه GDF9 و BMP15 بر باروری معنی‌دار بود. لذا جهش‌ها در ژن‌های باروری BMP15 و GDF9 نقش اقتصادی مهمی در گوسفند و بز و احتمالاً در تولیدمثل نشخوارکنندگان دارند (۱۱، ۱۴، ۱۸). با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت، هر دو جایگاه GDF9 و BMP15 در نژاد بز مرخز نقش مهمی در میزان دوقلو زایی دارند. هم‌چنین، هاپلوتیپ‌های دو جایگاه نیز نقش بارزی در میزان دوقلو زایی دارد. لذا اطلاعات آن در برنامه‌های انتخاب سودمند بوده و می‌تواند در صورت انتخاب جهش‌های مفید در طی سال‌های آینده تأثیر زیادی در افزایش دوقلو زایی در بز مرخز داشته باشد. تاکنون، سه دسته ژن به‌طور مؤثر بر رشد فولیکول‌ها و

منابع

1. Bodin, L., F. Lecerf, C. Pisselet, M. San Cristobal, B. Bibe and P. Mulsant. 2003. How many mutations are associated with increased ovulation rate and litter size in progeny of Lacunae meat sheep. In: Proceedings of the International Workshop on Major Genes and QTL in Sheep and Goats. Toulouse France CDROM communication, 4: 2-11.
2. Bodin, L., E.D. Pasquale, S. Fabre, M. Bontoux, P. Monget, L. Persani and P. Mulsant. 2006. Anovel mutation in the BMP15 gene causing defective protein secretion is associated with both increased ovulation rate and sterility in Lacunae sheep. *Endocrinology*, 10: 1210.
3. Chu, M.X., G.H. Cheng, L. Fang and S.C. Ye. 2005. Study on morphogenetic protein receptor IB as a candidate gene for prolificacy of Small Tailed Han sheep and Hu sheep. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 13: 66-71.
4. Chu, M.X., B.X. Li, J.Y. Wang, S.C. Ye and L. Fang. 2004. Association between PCR-SSCP of growth differentiation factor 9 genes and high prolificacy in small tail Han sheep. *Animal Biotechnology*, 15: 111-120.
5. Davis, G.H., J.C. McEwan, P.F. Fennessy, K.G. Dodds, K.P. McNatty and O. Wai Sum. 1992. Infertility due to bilateral ovarian hypoplasia in sheep homozygous (FecXI FecXI) for the Inverdale prolificacy gene located on the X chromosome. *Biology Reproduction*, 46: 636-640.

6. Dong, J., D.F. Alvertini, K. Nishimori, T. Rajendra Kumar and M.M. Matzuk. 1996. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*, 383: 531-535.
7. Eppig, J.J. 2000. Control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, 122: 829-838.
8. Eckery, D.C., L.J. Whale, S.B. Lawrence, K.A. Wylde, K.P. McNatty and J.L. Juengel. 2002. Expression of mRNA encoding growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 during follicular formation and growth in a marsupial, the brush tail possum (*Trichosurus vulpecula*). *Molecular Cellular Endocrinology*, 192: 115-126.
9. Elvin, J.A., A.T. Clark, P. Wang, N.M. Wolfman and M.M. Matsuk. 1999. Paracrine action of growth differentiation factor-9 in mammalian ovary. *Molecular Endocrinology*, 13: 1035-1048.
10. Galloway, S.M., S.M. Gregan, T. Wilson, K.P. McNatty, J. Juengel, O. Ritvos and G.H. Davis. 2002. BMP15 mutations and ovarian function. *Molecular Cellular Endocrinology*, 191: 15-18.
11. Galloway, S.M., K.P. McNatty, L.M. Cambridge, M.P.E. Laitinen, J.L. Juengel, T.S. Jokiranta, R.J. McLaren, K. Lairo, K.G. Dodds, G.W. Montgomery, A.E. Beattie, G.H. Davis and O. Ritvos. 2000. Mutations in an oocyte-derived growth factor (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nature Genetic*, 25: 279-283.
12. Gilchrist, R.B., L.J. Ritter and D.T. Armstrong. 2004. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Animal Reproduction Science*, 82-83: 431-446.
13. Glister, C., S.L. Richards and P.G. Knight. 2005. Bone morphogenetic proteins (BMP)-4-6 and -7 potently suppress basal and luteinizing hormone-induced androgen production by bovine theca internal cells in primary culture: could ovarian hyper androgenic dysfunction be caused by a defect in thecal BMP signaling. *Endocrinology*, 146: 1883-1892.
14. Hanrahan, J.P., S.M. Gregan, P. Mulsant, M. Mullen, G.H. Davis, R. Powell and S.M. Galloway. 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*). *Biological Reproduction*, 70: 900-909.
15. Joyce, I.M., A.T. Clark, F.L. Pendola and J.J. Eppig. 2000. Comparison of recombinant growth differentiation factor-9 and oocyte regulation of KIT ligand messenger ribonucleic acid expression in mouse ovarian follicles. *Biology Reproduction*, 63: 1669-1675.
16. Li, R., R.J. Norman, D.T. Armstrong and R.B. Gilchrist. 2000. Oocyte secreted factor (s) determine functional differences between bovine mural granulosa cell and cumulus cell. *Biological Reproduction*, 63: 839-845.
17. Liu, S.F., Y.L. Jiang and L.X. Du. 2003. Study of BMPR-IB and BMP15 as candidate gene for fecundity in Little Tailed Han sheep. *Acta Genetic Science*, 8: 755-760.
18. McNatty, K.P., P. Smith, L.G. Moore, K. Reader, S. Luna, J.P. Hanrahan, N.P. Groome, M. Laitinen, O. Ritvos and J.L. Juengel. 2005. Oocyte-expressed genes affecting ovulation rate. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 234: 57-66.
19. Miller, S.A., D.D. Dykes and H.F. Polesky. 1998. A simple salting out procedure for extraction DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16: 12-55.
20. Moghaddaszadeh, M., M.R. Mohammad Abadi, A. Esmailizadeh, H. Domari, E. Sadeghizadeh and S. Shamsedini. 2011. The segregation of Exon 2 GDF9 gene polymorphism in korki raeini goat. 12th Iranian Genetic Congress, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran (In Persian).
21. Nicholas, F.W. 1996. Introduction to veterinary genetics, First edition. Clarendon Press Sydney Australia, pp: 44-78.
22. Otsuka, F. and S. Shimasaki. 2002. A novel function of bone morphogenetic protein-15 in the pituitary selective synthesis and secretion of FSH by Gonadotropes. *Endocrinology*, 143: 4938-4941.
23. Otsuka, F., S. Yamamoto, G.F. Erickson and S. Shimasaki. 2001. Bone morphogenetic protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression. *Journal of Biology and Chemistry*, 276: 11387-11392.
24. Qadri, A., K.H. Mirzadeh, G. Fayyazi, M. Ali Mahmoudi and A.S. Sadr. 2009. The investigation of GDF9 gene Polymorphism in the Kordi Sheep using PCR-RFLP method. *Journal of Agricultural Biotechnology*, pp: 498-502 (In Persian).
25. Shimasaki, S., R.K. Moore, G.F. Erickson and F. Otsuka. 2000. The role of bone morphogenetic proteins in ovarian function. *Reproduction*, 61 (suppl): 323-337.
26. Solimani, B., G.H. Rahimi Mianji and B. Chaharaein. 2010. The effect of GDF9 gene on twinning and traits of weight in Sanjabi sheep. *Modern genetics*, 5: 53-59 (In Persian).
27. Solimani, B., G.H. Rahimi Mianji and B. Chaharaein. 2011. The segregation of exon 2 BMP15 gene on twinning and traits of weight in Sanjabi sheep. *Iranian Journal of Biology*, 24: 487-493 (In Persian).
28. Sugiura, K. and J.J. Eppig. 2005. Control of metabolic cooperativity between oocyte and their companion granulosa cells by mouse oocyte. *Reproduction Fertility Development*, 17: 667-674.
29. Xue-qin, R., L. Jian-bin, D. Zhi-yong, Q. Cheng and W. Jia-fu. 2009. Diversity of Bmp15 and Gdf9 Genes in White Goat of Guizhou Province and Evolution of the Encoded Proteins. *Zoological*, 30: 593-602.
30. Yeh, F.C., R.C. Yang, T.B.J. Boyle, Z.H. Ye and J.X. Mao. 1999. POPGENE version 3.3, the User-Friendly Shareware for population genetic analysis. *Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada.* (<http://www.ualberta.ca/~fyeh/fyeh>).

Association of GDF9 and BMP15 Genes Polymorphism with Twinning in Markhoz Goat

Azam Khosravi¹, Gholam Reza Dashab², Mohammad Rokouei³ and Mehdi Vafaei Valeh⁴

1, 3 and 4- Graduated M.Sc., Associate Professor and Assistant Professor, University of Zabol

2- Assistant Professor, University of Zabol (Corresponding Author: dashab@uoz.ac.ir)

Received: June 25, 2014

Accepted: January 10, 2015

Abstract

Twinning is one of the most important economic traits in goat production, which is influenced by either small or major gene effects. In recent decades, it has been recognized that two members of growth factors originated from oocytes namely GDF9 and BMP15 are essential for follicular development and ovulation. The aim of the current study was to survey the polymorphism of two GDF9 and BMP15 genes and their genotype patterns association with twinning rate in Markhoz goat. Blood samples were randomly taken from 50 Markhoz goats and DNA extraction was performed by a salting-out modified method. Polymerase chain reactions (PCR) were employed to amplify a fragment with 862 base pairs from exon 2 of BMP15 gene and 995 base pairs fragment from exon 2 of GDF9 gene. The PCR products after digestion by *HinfI* enzyme were electrophoresed on 3% agarose gel and the animals' genotypes were determined by banding patterns. In the BMP15 gene, the frequencies of B and b alleles were 0.96 and 0.04, respectively; and the frequencies of BB, Bb and bb genotypes were 0.94, 0.04 and 0.02, respectively. Also, the frequencies of A and a alleles in GDF9 gene were 0.68 and 0.32, respectively; and the frequencies of AA, Aa and aa genotypes were 0.60, 0.16 and 0.24, respectively. The Nei's index, Polymorphism information content and expected heterozygosity in the BMP15 gene were 0.47, 0.077 and 0.08, respectively; and corresponding values in the GDF9 gene were 0.34, 0.4 and 0.43, respectively. The results showed that the effects of BMP15, GDF9 and interaction of two loci genotypes on twinning trait were significant indicating that although the GDF9 and BMP15 genes in Markhoz goats have low to moderate polymorphism, they play an important role in twinning rate. The present information may be useful in breeding programs of Markhoz goats and could be used in selection strategies.

Keywords: Linkage study, Markhoz goats, Polymorphism, TGF-