نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۶، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۳، ص. ۳۸۷-۳۸۱

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 6, No. 4, Winter 2015, p. 381-387

چندشکلی اگزون ۲ ژن BMP15 در گوسفند سنگسری ایران

زانا پیرخضرانیان[۱]- آرزو محمدهاشمی[۲]- مجتبی طهمورث پور*[۳]- نصرالله پیرانی[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۸/۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۳/۴

چکیده

نرخ باروری یکی از صفات مهم اقتصادی در گوسفند است، که تحت تأثیر محیط و ژنتیک می‌باشد. تاکنون سه دسته ژن مؤثر بر این صفت شناخته شده است، یکی از آنها خانواده BMP ها می‌باشد که معروفترین آن BMP15 است. جهش‌های مختلف در ژن BMP15 راندمان صفات تولید مثلی و رشد در گوسفند را افزایش می‌دهد. هدف از این مطالعه بررسی ژنتیکی و فیلوژنتیکی توالی نوکلئوتیدی این ژن در گوسفند نژاد سنگسری ایران می‌باشد. نمونه های خون از تعداد ۲۰ رأس گوسفند نژاد سنگسری ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد دامغان جمع‌آوری شد. پس از استخراج DNA، تکثیر قطعه ۲۲۲ جفت بازی اگزون شماره ۲ ژن BMP15 با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام شد و سپس نمونه ها توالی یابی شدند. نتایج آنالیز توالی‌ها حاکی از وجود چهار هاپلوتایپ و سه جهش معنی دار در ژن مذکور بود. که یکی از این جهش‌ها، برای اولین بار در ژن BMP15 گوسفند گزارش می‌شود. همچنین به منظور تعیین فاصله ژنتیکی حدود ۱۰۳ توالی از ژن مذکور حیوانات مختلف و نژادهای مختلف گوسفند گرداوری شد. سپس درخت فیلوژنتیکی رسم و فواصل ژنتیکی و میزان اختلاف نوکلئوتیدی محاسبه گردید. نتایج آزمون فیلوژنتیکی نشان داد که بز، گاو و گاومیش کمترین فاصله ژنتیکی و میمون، انسان و موش بیشترین فاصله را با گوسفند سنگسری دارا می‌باشند. همچنین آنالیز فیلوژنتیکی بین نژادهای گوسفند حاکی از عدم اختلاف ژنتیکی بین نژادهای بومی هندی و کشمیری با نژاد سنگسری ایران بود.

کلمات کلیدی: گوسفند سنگسری، ژنBMP15، درخت فیلوژنتیکی، فاصله ژنتیکی.

مقدمه

صنعت گوسفندداری در اقتصاد ملی کشور نقش قابل ملاحظه‌ای را دارد، به طوری که بخش اعظمی از تولیدات گوشت قرمز، شیر و پشم از این صنعت تأمین می‌شود. در ایران حدود ۲۱ نوع از نژادهای مختلف گوسفند وجود دارد. ازجمله گوسفندان نژاد گوشتی می توان به گوسفند سنگسری اشاره کرد که در مناطق سمنان، سنگسر و گرمسار زیست می‌کند. این گوسفند ریز جثه و نسبت به جثه خود دارای دنبه تقریبا سنگینی می‌باشد (۳). از جمله صفات مهم اقتصادی در پرورش گوسفند، می‌توان به رشد، ویژگی‌های لاشه، کیفیت پشم و صفات تولید مثلی از جمله نرخ باروری و صفات وزنی اشاره کرد. نرخ باروری یکی از صفات مهم اقتصادی در گوسفند می باشد که تحت تأثیر محیط و ژنتیک بوده و افزایش آن با سودمندی اقتصادی همراه است؛ البته لازم به ذکر است افزایش باروری تنها در شرایطی مقرون به صرفه می‌باشد که محیطی مناسب برای بهبود تولید مثل و وضعیت باروری فراهم باشد، که از جمله این شرایط محیطی می‌توان به وجود مرتع، بارندگی زیاد و سایر عوامل محیطی اشاره نمود. سه دسته ژن مؤثر بر رشد فولیکول ها و نرخ تخمک اندازی شناسایی شده است، که عبارتند از ALK6[۵]، GDF9[۶] و دسته BMP[۷] که معروف‌ترین آنها BMP15 است. تمامی این ژن ها جزو خانواده بزرگ TGF β[۸] بوده که بر تنظیم بیان و ترشح هورمون‌های مؤثر بر رشد فولیکولی و نرخ

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد،
۲- دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد،
۳- استاد ژنتیک و اصلاح نژاد، گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد،
۴- دانشیار ژنتیک و اصلاح نژاد، گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهرکرد.
(*-نویسنده مسئول: Email: m_tahmoorespur@yahoo.com)

۵ -Activin Receptor-Like Kinase 6
۶ -Growth and Differentiation Factor-9
۷- Bone Morphogenetic Proteins
۸- Transforming Growth Factor β

تخمک ریزی مؤثرند. ژن BMP15 (نام دیگر آن GDF-9B می باشد) در سال ۱۹۹۸ کشف شد. این ژن وابسته به جنس بوده و بسیار مشابه ژن GDF9 عمل می‌کند. وجود همزمان آلل های جهش یافته از BMP15 و GDF9 و همچنین BMP15 و BMPR-1B منجر به افزایش چندقلوزایی نسبت به حالت جهش های منفرد آنها می‌شود (۶، ۱۳، ۱۴).

این ژن (BMP15) شامل دو اگزون است که توسط یک اینترون به طول ۵/۴ کیلو باز از همدیگر جدا می شوند. محصول رونویسی کامل آنها یک توالی ۱۱۷۹ نوکلئوتیدی بوده که کدکننده یک پیش پپتید به طول ۳۹۳ اسیدآمینه است و پپتید کامل آن ۱۲۵ اسیدآمینه طول دارد (۸). ژن BMP15 بر روی کروموزوم X واقع شده و در جوندگان mRNA و پروتئین آن در اووسیت ها از مراحل اولیه تخمک ریزی بیان می‌شوند (۶ و ۱۷). فاکتورهای رشد اووسیتی (GDF9 و BMP15) برای پیشرفت مراحل اولیه فولیکول سازی و سپس در تکامل پایانی فولیکول بسیار حیاتی هستند. همچنین این فاکتورهای ترشح شده اووسیت نقش مهمی در تمایز گرانولوزای مختلف و در تنظیم اعمال کلیدی سلول های گرانولوزا دارند. مطالعات اوتوسکا و همکاران در سال ۲۰۰۰ نشان داده است که اعضای خانواده بزرگ TGF-β (به عنوان مثال BMP15 و BMP6) باعث مهار شدن FSH (تحریک تولید پروژسترون)، بدون تغییر در تولید استرادیول در سلولهای گرانولوزای موش می‌گردد. مهار عمل FSH توسط BMP15 به وسیله سرکوب کردن حساسیت سلولهای گرانولوزا به تحریک FSH می‌باشد (۱۷). مهم تر از همه این که BMP15 در انتخاب فولیکول غالب و همچنین در بلوغ تخمک به وسیله همکاری با FSH نقش دارد (۴). علاوه بر این BMP15 ممکن است در کاهش وقوع apoptosis در سلول های کومولوس با ایجاد یک گرادیان موضعی شرکت داشته باشد (۱۱) و باعث گسترش سلول‌های کومولوس با افزایش بیان اپیدرمی فاکتورهای رشد مثل فاکتور رشد (GF) گردد (۲۰). هانراهان و همکاران (۱۰) و گالووی و همکاران (۷) بیان داشتند که جهش‌های مختلف در ژن BMP15 و GDF9 نرخ تخمک ریزی و ناباروری در گوسفند را افزایش می‌دهند. این جهش‌ها در هتروزیگوت‌ها باعث افزایش میزان تخمک ریزی و دوقلوزایی و سه قلوزایی و در هموزیگوت‌ها باعث نقص در فولیکول‌های کامل شده و در نتیجه باعث ناباروری در بعضی نژادهای بارور گوسفند می-شوند (۷،۱۰). همچنین دیویس در سال ۲۰۰۵، پنج جهش مجزا در ناحیه کد کننده ژن BMP15 گوسفند گزارش کرده است (۵).

سلیمانی و همکاران (۱) گزارش کردند که ژن BMP15 دارای اثر معنی داری روی وزن تولد، وزن ۴۵ روزگی و وزن ۳ ماهگی در گوسفند سنجابی است؛ ولی روی سایر صفات وزنی اختلاف معنی داری مشاهده نکردند (۱).

به طور کلی افزایش صفات باروری در اصلاح نژاد زمانی توجیه دارد که محیط مساعد برای پرورش گوسفندان فراهم باشد. در نتیجه با توجه به شرایط اقلیمی و میزان مراتع کشورمان افزایش چند قلو زایی به عنوان یک صفت تعیین کننده زیاد مد نظر نمی‌باشد اما با توجه به زیستگاه اصلی گوسفند سنگسری و اقلیم بومی منطقه به نظر می‌رسد توجه به این صفت ارزشمند باشد. هدف از انجام این تحقیق مطالعه چندشکلی اگزون ۲ ژن BMP15 در گوسفندان سنگسری ایران بود.

مواد و روش ها

میزان ۱۰ میلی لیتر خون به طور تصادفی از ۲۰ راس گوسفند نژاد سنگسری موجود در ایستگاه تحقیقاتی پرورش و اصلاح نژاد دامغان از شریان زیر گلویی با استفاده از سرنگ ونوجکت حاوی۳ میلی لیتر ماده EDTA جمع‌آوری شد، نمونه ها روی یخ به آزمایشگاه منتقل و تا هنگام استخراج DNAدر دمای ۲۰- نگهداری شد. استخراج DNA به روش استاندارد فنل-کلروفرم انجام شد. پس از استخراج DNA به منظور مشاهده کیفیت استخراج از ژل ۰/۸٪ آگارز و جهت تعیین کمیت آنها از روش طیف سنجی و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ مدل ND-200 شرکت THERMO آمریکا استفاده شد.

جهت تکثیر اختصاصی ناحیه اگزون ۲ ژن BMP15 به طول ۲۲۲ جفت باز یک جفت پرایمر اختصاصی با استفاده از نرم‌افزار ۵ Primer Premier طراحی شد (جدول۱).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز توسط دستگاه ترموسایکلر Biometra مدل T.personal و در ۳۴ چرخه حرارتی به صورت زیر انجام شد.

واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد برای ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۶ درجه و به مدت ۳۰ ثانیه، تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه؛ یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه و یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه برای ۱۰ دقیقه نیز انجام شد.

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده

نام پرایمر	توالی پرایمر	طول قطعه
Sence	5’CTACTGTAAGGGAGTATGTCCTCG3’	222
Anti-sence	5’CTGCATGTGCAGGACTGGGCAA 3’	

حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر و اجزای آن شامل ۵۰ نانوگرم DNA، ۵ پیکومول از مخلوط پرایمر ، یک واحد آنزیم *Taq* پلیمراز، ۲ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی‌مولار، ۱/۵میکرولیتر MgCl2 ۵۰ میلی-مولار، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X و ۱۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر بود. همچنین به منظور تأیید تکثیر ناحیه مورد نظر طی واکنش PCR، الکتروفورز محصولات این واکنش روی ژل آگارز ۱/۵ درصد تهیه شده با بافر TBE 1X، و با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید در ولتاژ ۱۰۰ ولت و به مدت ۲۰ دقیقه انجام پذیرفت و برای تعیین حدود اندازه آن از DNA Ladder 100bp استفاده شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محصولات PCR پس از برش از ژل خالص سازی شد و به همراه ۵۰ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ پیکومول به منظور تعیین توالی به شرکت بایونیر کره جنوبی ارسال شدند. این نمونه ها به روش اتوماتیک و با استفاده از دستگاه AB1 3130 توالی یابی گردیدند. آنالیز توالی یابی ژن BMP15 برای ۲۰ نمونه انجام گرفت. که جهت تجزیه و تحلیل توالی های به دست آمده در این پژوهش از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی CLC Main workebench 5.5، chromas، MEGA 5 و Bio Edit استفاده شد. ابتدا توالیهای نوکلئوتیدی به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Chromas Lite 2.01 ویرایش شدند، بعد از تبدیل کردن توالی ها به فرمت FASTA از ابزار BLAST و رویه BLASTN در پایگاه NCBI و نرم‌افزار CLC Main workebench5.5 جهت تعیین هموlوژی توالی به‌دست آمده با توالی های ثبت شده از همین ژن در NCBI و همچنین خود توالی ها با هم استفاده شد. همچنین نسبت به مشخص کردن ORF[1] با استفاده از توالی معیار[2] در NCBI با شماره دسترسی NM_001114767.1 و استفاده از نرم‌افزار CLC اقدام شد و موقعیت جهش‌های نوکلئوتیدی و همچنین موقعیت تغییرات اسیدآمینه مشخص شد. توالی های ژن BMP15 حیوانات مختلف و نژادهای مختلف گوسفند موجود در پایگاه اطلاعاتی بانک ژن NCBI جمع‌آوری و توالی های مورد توافق[3]، با استفاده از نرم‌افزار Bio Edit و ابزار clustral W به طور جداگانه و براساس معیار اکثریت برای هر کدام از حیوانات و همچنین هر کدام از نژادهای مختلف گوسفند تعیین شد. همچنین به منظور رسم درخت فیلوژنی بین حیوانات مختلف و نژادهای مختلف گوسفند با ۱۰۰۰ تکرار، از رویه Neighbor-Joining و جهت تعیین فاصله ژنتیکی از رویه create pairwise comparison نرم‌افزار CLC Main workebench 5.5 استفاده شدلازم به ذکر است که توالی مورد توافق بر حسب IUPAC برای NCBI تعریف نشده است، درنتیجه از توالی مورد توافق براساس معیار اکثریت استفاده شد.

نتایج و بحث

استخراج DNA از تمام نمونه‌ها با موفقیت انجام شد. نتایج طیف سنجی نشان داد که DNA استخراج شده از کیفیت مناسبی برخوردار است. بعد از بهینه سازی PCR الکتروفورز آنها روی ژل ۱/۵ درصد نشان داد که قطعه اختصاصی برای ژن BMP15 به طول ۲۲۲ جفت باز به خوبی تکثیر شده است (شکل ۱).

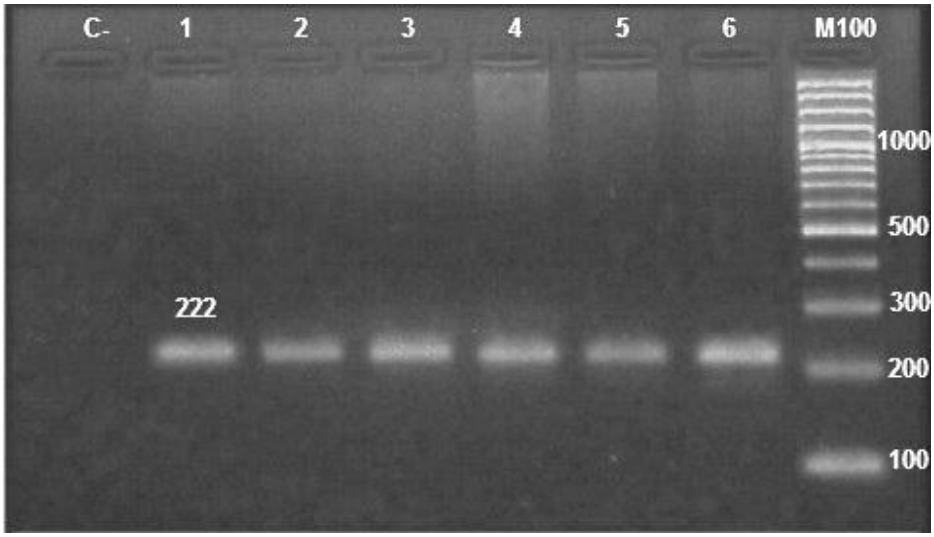
با تجزیه و تحلیل توالی‌ها وجود ۴ هاپلوتایپ در جمعیت مورد مطالعه ثابت شد (شکل۲). که محتوای توالی مورد توافق به دست امده از هاپلوتایپ‌ها شامل، ۲۳/۴٪ آدنین، ۲۴/۳٪ سیتوزین، ۲۳٪ گوانوزین و ۲۹/۳٪ تیمیدین بود.

با تعیین موقعیت جهش‌های نوکلئوتیدی مشخص شد که هر کدام از هاپلوتایپ‌ها فقط در یک نوکلئوتید با بقیه فرق دارند. از جایگاه‌های چند شکل به دست آمده تعداد ۲ عدد حاصل از تغییرات درون بازهای پورینی و پیریمیدینی یا جانشینی[4] و یکی هم حاصل تبدیل به هر نوکلئوتید دیگر یا جایگزینی[5] بود (جدول۱). همچنین یکی از هاپلوتایپ‌ها هیچ نوع تفاوتی باتوالی فرم وحشی نداشت. یکی از جهش‌های ارائه شده در این تحقیق (C T) برای اولین بار در گوسفند نژاد سنگسری گزارش می‌شود و بقیه جهش های ارائه شده (A C و G A) با جهش های منتشر شده توسط شبیر و همکاران (۱۸) در گوسفند بومی کشمیر مشابه ولی با جهش‌های ارائه شده توسط دیویس و همکاران (۵) در گوسفند رومانی تفاوت داشت که اختلاف نژادی و شرایط اقلیمی می تواند دلیل تحقق این تفاوت در جهش‌ها باشد. همچنین در ایران نیز گزارش‌هایی از این ژن ارائه شده که از جمله آنها می‌توان به مقاله زارع و همکاران (۲۱) و غفاری و همکاران (۹) روی میش‌های نژاد شال و نجاتی و همکاران (۱۵) در گوسفند لری‌بختیاری اشاره کرد که در مطالعات فوق هیچ جهشی گزارش نشده است.

در ادامه به منظور تعیین هموlوژی توالی مورد توافق با توالی‌هایی که تاکنون از ژن BMP15 در NCBI ثبت شده بود حدود ۹۳ توالی از حیوانات مختلف و همچنین۱۰ توالی از نژادهای مختلف گوسفند تهیه شد (شکل۳) که با استفاده از توالی های به دست آمده برای حیوانات مختلف و نژادهای مختلف گوسفند، درخت فیلوژنتیکی رسم (شکل ۴ و ۵)، فواصل ژنتیکی و میزان اختلاف نوکلئوتیدی (جدول ۲

۱ -Open Reading Frame
۲ -Reference Sequence
۳ -Consensus
۴- Transition
۵ - Transversion

و ۳) نیز محاسبه شد.



شکل ۱- الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره ای پلیمراز به طول ۲۲۲ جفت باز روی ژل آگارز۱/۵درصد

```
                                                  20                                                  40
sheep,1,7,14,15,18  CTACTGTAAG GGAGTATGTC CTCGGGTACT ACACTATGGT CTCAATTCTC 50
sheep,2, 3, 9, 20   .......... .......... .......... .......... ....C..... 50
sheep,5,8,13,16,19  .......... .......... .......... .T........ .......... 50
sheep,4,6,10,11,12,17 .......... .......... .......... .......... .......... 50
                            60                                                  80                                                 100
sheep,1,7,14,15,18  CCAATCATGC CATCATCCAG AACCTTGTCA GTGAGCTGGT GGATCAGAAT 100
sheep,2, 3, 9, 20   .......... .......... .......... .......... .......... 100
sheep,5,8,13,16,19  .......... .......... .......... .......... .......... 100
sheep,4,6,10,11,12,17 .......... .......... .......... .......... .......... 100
                                                 120                                                 140
sheep,1,7,14,15,18  GTCCCTCAGC CTTCCTGTGT CCCTTATAAG TATGTTCCCA TTAGCATCCT 150
sheep,2, 3, 9, 20   .......... .......... .......... .......... .......... 150
sheep,5,8,13,16,19  .......... .......... .......... .......... .......... 150
sheep,4,6,10,11,12,17 .......... .......... .......... .......... .......... 150
                           160                                                 180                                                 200
sheep,1,7,14,15,18  TCTGATTGAG GCAAATGGGA GTATCTTGTA CAAGGAGTAT GAGGGTATGA 200
sheep,2, 3, 9, 20   .......... .......... .......... .......... .......... 200
sheep,5,8,13,16,19  .......... .......... .......... .......... .......... 200
sheep,4,6,10,11,12,17 .......... .......... .......... .......... .........A. 200
                                                 220
sheep,1,7,14,15,18  TTGCCCAGTC CTGCACATGC AG 222
sheep,2, 3, 9, 20   .......... .......... .. 222
sheep,5,8,13,16,19  .......... .......... .. 222
sheep,4,6,10,11,12,17 .......... .......... .. 222
```

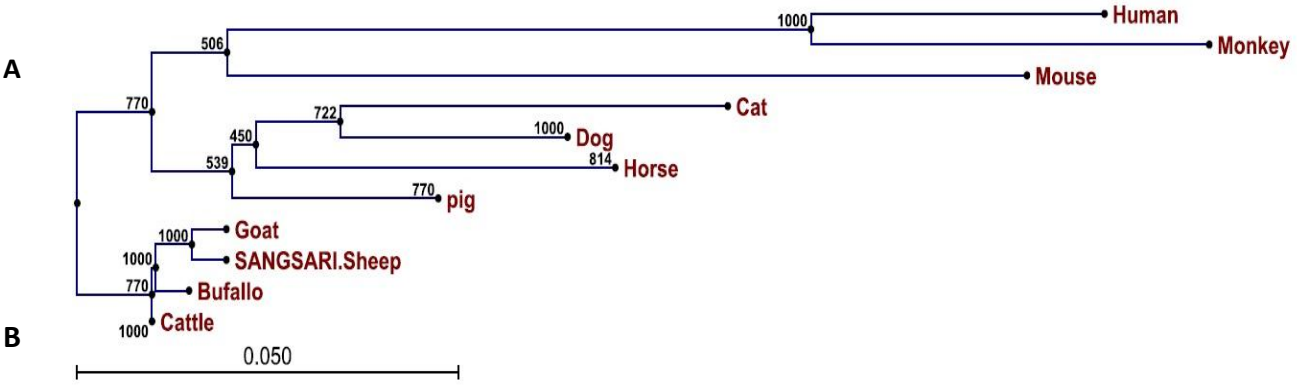
شکل ۲- توالی نوکلئوتیدی قسمتی از اگزون ۲ ژن BMP15 در گوسفندان سنگسری ایران و هاپلوتایپ‌های مشاهده شده

جدول ۱- جهش های مشاهده شده در ژن BMP15 و موقیت‌های نوکلئوتیدی و اسیدآمینه‌ای هر یک از جهش‌ها

Variant	Base change	Coding base (bp)	Coding residue (aa)	Amino acid change
I	C → T	988	330	His(H) → Tyr(Y)
II	A → C	1001	334	Asn(N) → Thr(T)
III	G → A	1155	385	Met(M) → Ile(I)

گونه Specie	Lohi	Balochi	Dog	Horse	Cat	Monkey	Local Keshmir	Local Indian	Bufallo	Cattle	Human	Mouse	Pig	Goat
تعداد Number	۱	۱	۱	۲	۳	۳	۴	۴	۴	۶	۹	۱۵	۱۵	۳۵

شکل ۳- تعداد گونه ها و نژادهای مورد استفاده برای رسم درخت فیلوژنتیک ژن BMP15 گوسفند سنگسری



شکل ٤- درخت فیلوژنتیک ژن BMP15 گوسفند سنگسری با گونه‌های مختلف حیوانی

جدول ۲- فواصل ژنتیکی و اختلاف نوکلئوتیدی، بین گونه‌های مورد بررسی که با مقایسه توالی‌های گونه‌های مختلف با هم به‌دست آمده است. هر عدد در ردیف نشان‌دهنده اختلاف نوکلئوتیدی و اعداد موجود در ستون بیانگر میزان فاصله ژنتیکی گونه‌ها با یکدیگر است.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
SANGSARI.Sheep	1		2	2	2	13	19	18	22	33	32	29
Goat	2	0.01		2	2	13	19	18	22	33	32	29
Bufallo	3	0.01	0.01		0	11	17	16	20	31	30	27
Cattle	4	0.01	0.01	0.00		11	17	16	20	31	30	27
Pig	5	0.06	0.06	0.05	0.05		16	14	17	37	31	29
Horse	6	0.09	0.09	0.08	0.08	0.08		18	23	37	32	37
Dog	7	0.09	0.09	0.08	0.08	0.07	0.09		17	38	31	35
Cat	8	0.11	0.11	0.10	0.10	0.08	0.11	0.08		39	36	40
Monkey	9	0.17	0.17	0.15	0.15	0.19	0.19	0.19	0.20		19	42
Human	10	0.16	0.16	0.15	0.15	0.15	0.16	0.15	0.18	0.09		45
Mouse	11	0.14	0.14	0.13	0.13	0.14	0.19	0.18	0.21	0.22	0.24	

همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌گردد، بررسی فیلوژنتیکی گونه‌های مختلف نشان داد که همه حیوانات در دو خوشه کاملا مشخص A وB قرار گرفته‌اند. خوشه A دارای تنوع بیشتری است و خود شامل دو زیرخوشه می‌شود. در زیرخوشه بالایی موش انسان و میمون قرار دارند. در صورتی که زیر خوشه پایینی شامل دو زیر شاخه می‌باشد که گربه، سگ و اسب در یک گروه و خوک در گروهی جداگانه قرار گرفته است. خوشه B دارای تنوع کمتری است که در یک زیرخوشه آن به فاصله خیلی کم گوسفند و بز هستند و زیر خوشه دیگر آن شامل گاو و گاومیش می‌باشد. با توجه به درخت فیلوژنتیکی رسم شده، گوسفند سنگسری بیشترین قرابت را با بز و پس از آن با گاو و گاومیش و کمترین قرابت را با انسان و میمون دارد. این امر با یافته های شبیر و همکاران (۱۸) روی گوسفند بومی کشمیر مشابه بود.

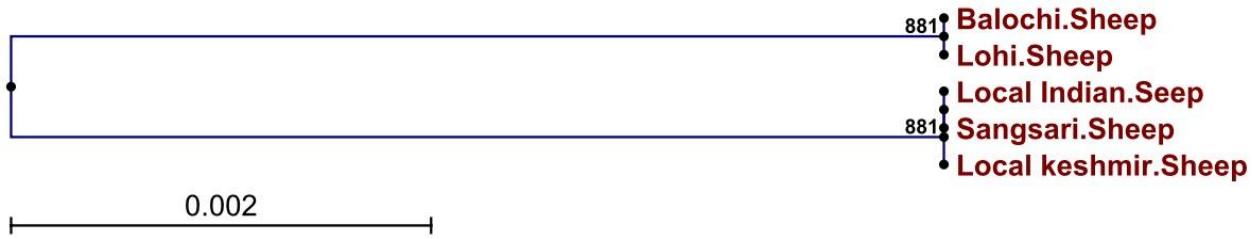
از آنجایی که فواصل ژنتیکی بین حیوانات مختلف به صورت دو-به‌دو است، اعداد حاصله نماینگر جانشینی نوکلئوتیدها بین توالی‌های مورد بررسی می‌باشند. فاصله ژنتیکی بین دو حیوان، با همبستگی فیلوژنتیکی بین حیوانات مرتبط خواهد بود؛ در نتیجه از این شاخص هم می توان برای دوری و نزدیکی ژنتیکی حیوانات مختلف استفاده کرد. همانطور که در شکل مشاهده می‌شود گوسفند سنگسری کمترین فاصله ژنتیکی را ، با بز، گاو و گاومیش به ترتیب با صفر، ۰/۰۱ و ۰/۰۱ و بیشترین فاصله را با میمون، انسان و موش به ترتیب با ۰/۱۷ ، ۰/۱۶ و ۰/۱۴ دارا می‌باشد، که در درخت فیلوژنتیکی هم این امر قابل مشاهده است. یکی دیگر از پارامترهایی که در جدول (۲) مورد بررسی قرار گرفت میزان اختلاف نوکلئوتیدی موجود بین ژن-های BMP15 حیوانات مختلف بود. همانطور که مشاهده می‌شود گوسفند سنگسری کمترین اختلاف نوکلئوتیدی را با بز،گاومیش و گاو به‌ترتیب با ۲، ۲ و ۳ نوکلئوتید اختلاف و بیشترین اختلاف نوکلئوتیدی را با میمون، انسان و موش به‌ترتیب با ۳۳، ۳۲ و ۲۹ نوکلئوتید اختلاف دارا می‌باشد.همچنین نتایج حاصل از جدول فواصل ژنتیکی و میزان اختلاف نوکلئوتیدی نیز نتایج حاصل از درخت فیلوژنتیک را تأیید می‌کند.

نتایج حاصل از آنالیز فیلوژنتیک نژادهای مختلف گوسفند در شکل ۵ آورده شده است. نتایج حاکی از ان است که گوسفندان نژاد سنگسری، بومی هندی و بومی کشمیری در یک خوشه و گوسفندان نژاد لوهی و بلوچی در خوشه‌ای دیگر قرار می‌گیرند که نشان از قرابت زیاد گوسفندان بلوچی و لوهی با هم و گوسفندان بومی هندی و کشمیری با نژاد سنگسری ایران دارد.

همچنین آنالیز حاصل از فواصل ژنتیکی و اختلاف نوکلئوتیدی در جدول ۳ نیز نشان از این دارد که گوسفندان نژاد سنگسری، بومی هندی و بومی کشمیری دارای فاصله ژنتیکی صفر و در واقع اختلاف نوکلئوتیدی با هم ندارند.که به نوعی تایید کننده نتایج حاصل از درخت فیلوژنتیکی است.

نتیجه‌گیری

تجزیه و تحلیل نمونه های مورد استفاده از گوسفند نژاد سنگسری حاصل از توالی ژن BMP15 حاکی از وجود ۴ نوع تنوع نوکلئوتیدی بود که با استفاده از توالی های مشابه در سایر گونه ها و نژادهای گوسفند BMP15 توانست بخوبی جایگاه گوسفند نژاد سنگسری را نه تنها در بین انواع گونه های مختلف حیوانات بلکه در بین نژادهای مختلف گوسفند نشان دهد.



شکل ۵- درخت فیلوژنتیک ژن BMP15 نژادهای مختلف گوسفند

جدول ۳- فواصل ژنتیکی و اختلاف نوکلئوتیدی، بین نژادهای مختلف گوسفند هر عدد در ردیف نشان‌دهنده اختلاف نوکلئوتیدی و اعداد موجود در ستون بیانگر میزان فاصله ژنتیکی گونه‌ها با یکدیگر است.

		1	2	3	4	5
Sangsari.Sheep	1		2	2	0	0
Lohi.Sheep	2	0.01		0	2	2
Balochi.Sheep	3	0.01	0.00		2	2
Local Indian.Sheep	4	0.00	0.01	0.01		0
Local Keshmir.Sheep	5	0.00	0.01	0.01	0.00	

سپاسگذاری

بدینوسیله از مسئولین و دست اندرکاران ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد دامغان بخاط در اختیار گذاشتن نمونه های مورد نیاز، آقای دکتر محمد رضا نصیری و همچنین سرکار خانم مهندس مرجان ازغندی به خاطر کمکهای ارزنده شان تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

۱- سلیمانی، ب.، ق.ا. رحیمی میانجی.، و ب. چهار آیین. ۱۳۹۰. بررسی اثر پلی مورفیسم در اگزون ۲ ژن BMP15 روی دوقلو زایی و صفات وزنی در گوسفند سنجابی. مجله زیست شناسی ایران. جلد ۲۴، شماره ۴. ۴۹۳-۴۸۷.

۲- نصیری، م. ر.، و م. مهدوی. ۱۳۹۰. تجزیه و تحلیل ژنتیکی و فیلوژنتیکی ناحیه سیتوکرم b در جبیر ایران. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی. دوره ۳، شماره ۱. ۱۰۴- ۹۱.

۳-ولی زاده، ر. ۱۳۹۰. پرورش گوسفند و بز. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد. صفحه ۵۶۹.

4- Choi, D., S. S. Hwang., E. Y. Lee., C. E. Park., B. K. Yoon., J. H. Lee., and D. S. Bae. 2003. Recombinant FSH and pregnancy-associated plasma protein. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 109:171–176.

5- Davis, G. H. 2005. Major genes affecting ovulation rate in sheep. Genet. Sel. Evol. 37 (Suppl. 1) S11–S23.

6- Dube, J. L., P. Wang., J. Elvin., K. M. Lyons., A. J. Celeste., and M. M. Matzuk. 1998. The Bone Morphogenetic Protein15 Gene Is X-Linked and Expressed in Oocytes. Mol. Endocrinol. 12: 1809–1817.

7- Galloway, S.M., S.M. Gregan., T. Wilson., P. McNattyK., J.L. Jungel., O. Ritvos., and G.H. Daivis. 2002. BMP15 mutations and ovarian function. Mol.Cell Endocrinol. 191:15-18.

8- Galloway, S.M., K.P. McNatty., L.M. Cambridge., M.P.E. Laitinen., J.L. Juengel., T.S. Jokiranta., and et al. 2002. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. Nat Genet. 25:279–283.

9- Ghaffari, M., A. Nejati-Javaremi., and G. Rahimi. 2009. Detection of polymorphism in BMPR-IB Gene associated with Twinning in Shal sheep using PCR-RFLP method. Int J Agric Biol. 11:97-99.

10- 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-derivedgrowth factors GDF9 and BMP15 are associatedwith bothincreased ovulation rate and sterilityin Cambridge and Belclare sheep (Ovis Aries). Biol Reprod. 70: 900-909

11- Hussein, T.S., D.A. Froiland., F. Amato., J.G. Thompson., and R.B. Gilchrist. 2005. Oocytes prevent cumulus cell

apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. J Cell Sci 118:5257–5268.

12-Juengel, J.L., N.L. Hudson., D.A. Heath., P. Smith., K.L. Reader., S.B. Lawrence., and et al. 2002. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. Biol Reprod. 67:1777–1789.

13- Laitinen, M., Vuojolainen, K., Jaatinen, R., Ketola, I., Aaltonen, J., Lehtonen, E., Heikinheimo, M., and Ritvos, O. 1998. A novel growth differentiation factor-9 (GDF-9) related factor is co-expressed with GDF-9 in mouse oocytes during folliculogenesis. Mech. Dev. 78, 135–140.

14- McNatty, K.P., S.M. Galloway., T. Wilson., P. Smith., N.L. Hudson., A. O'Connell., and et al. 2005. Physiological effects of major genes affecting ovulation rate in sheep. Genet Sel Evol. 37: S25–S38.

15- Nejati-Javaremi, M., G. Rahimi., and A. Amiri. 2007. Detection of polymorphism in *FecXL* gene associated with Twinning in Lori-Bakhtiari sheep breed using PCR-SSCP. The 5th National Biotechnology Congress of Iran. Tehran, Iran. P. 520

16- Otsuka, F., K.J. McTavish., and S. Shimasaki. 2011. Integral role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian function. Mol Reprod Dev. 78:9–21.

17- 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. J Biol Chem. 276:11387–11392.

18- Shabir, M., T.A.S. Ganai., S.S. Misra., and et al. 2013. Polymorphism study of growth differention factor 9B (GDF9) gene and its association with reproductive traits in sheep. Gene 515:432-438

19- Sugiura, K., Y.Q. Su., F.J. Diaz., S.A. Pangas., S. Sharma., K. Wigglesworth., M.J. O'Brien., M.M. Matzuk., S. Shimasaki., and J.J. Eppig. 2007. Oocyte-derived BMP15 and FGFs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells. Development. 134:2593–2603.

20- Yoshino, O., H.E. McMahon., S. Sharma., and S. Shimasaki. 2006. A unique preovulatory expression pattern plays a key role in the physiological functions of BMP-15 in the mouse. Proc Natl Acad Sci USA. 103:10678–10683.

21- Zare, Y., A. Nejati-Javaremi., and G. Rahimi. 2007. Detection of polymorphisms in two point of gene associated with Twinning (BMP15) in Shal sheep. The 5th National Biotechnology Congress of Iran. Tehran, Iran. P. 483