

میزان اثر ژن GDF9 روی دوقلوزایی و صفات وزنی در گوسفند

سنجایی

بیژن سلیمانی^{۱*}، قدرت ا... رحیمی میانجی^۲، برومند چهارآیین^۳

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح دام، مرکز تحقیقات

کشاورزی و منابع طبیعی- بخش تحقیقات دامپزشکی

۲- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه

مازندران

۳- استادیار بخش تحقیقات دامپزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع

طبیعی کرمانشاه

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: solimani80@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۸۷/۱۰/۲۸ - تاریخ پذیرش: ۸۹/۲/۱۹)

چکیده

تحقیق حاضر به منظور بررسی پلی مورفسم ژن GDF9 و تاثیر آن بر میزان دوقلوزایی و صفات رشد از تولد تا ۱۵ ماهگی در گوسفند نژاد سنجایی انجام گرفت. برای انجام این پژوهش از ۱۰۰ راس گوسفند سنجایی (۷۸ راس میش و ۲۲ راس قوچ) ایستگاه اصلاح نژاد مهرگان کرمانشاه به طور تصادفی خون گیری انجام گرفت. برای تعیین ژنوتیپ در جایگاه GDF9 از روش PCR-SSCP استفاده شد. در جایگاه GDF9 چهار ژنوتیپ A1A2، B1B2، C1C2 و DD به ترتیب با فراوانی ۱۷٪، ۲۱٪، ۵۶٪ و ۶٪ به دست آمد. در این تحقیق نشان داده شد که ژن GDF9 دارای اثر معنی داری ($Pvalue < 0.05$) روی دوقلوزایی است. اثرات ثابت فصل و شکم زایش در این تحقیق روی دوقلوزایی معنی دار نبود. برای ژن GDF9 میانگین دوقلوزایی ژنوتیپ های مختلف به ترتیب ۱/۲۲، ۱/۰۰، ۰/۴۱ و ۰/۱ بود. در صفات مختلف وزنی ژن *gdf9* دارای اثر معنی داری ($Pvalue < 0.01$) روی وزن تولد و ۴۵ روزگی بود. میانگین وزن تولد برای ژنوتیپ B1B2 بیشتر از سه ژنوتیپ دیگر بود در صورتی که برای میانگین وزن ۴۵ روزگی اثر این ژنوتیپ کمتر از سه ژنوتیپ دیگر بود.

واژه های کلیدی

گوسفند سنجایی،
GDF9،
PCR-SSCP،
وزن بدن،
دوقلوزایی

مقدمه

از آنجایی که صنعت گوسفندداری در اقتصاد ملی کشور نقش مهمی را دارا می‌باشد و با توجه به اینکه معمولاً میزان باروری در گوسفندان کشور هیچ گاه صد در صد نمی‌باشد بنابراین بایستی به دنبال ژن‌های مهم و بزرگ اثر بر باروری بود. با توجه به اینکه مردم کشور ما علاقه زیادی به مصرف گوشت گوسفندی دارند و نیز نظر به اینکه گوسفند در صنعت قالی‌بافی نقش محوری را بازی می‌کند، بنابراین تحقیقات در ارتباط با گوسفند به ویژه گوسفندان با باروری بالا ضروری به نظر می‌رسد. میزان تخمک‌گذاری در داخل و بین گوسفندان نژادهای مختلف تنوع ژنتیکی زیادی را نشان می‌دهد (۱). در سال‌های اخیر مطالعات زیادی در ارتباط با میزان تخمک‌گذاری انجام گرفته است و مشخص گردیده که افزایش میزان باروری در گوسفند در اثر ژن‌های بزرگ اثر اتفاق می‌افتد که در گوسفندان بورولا مرینوس برای نخستین بار تحقیقات در این زمینه انجام گرفت (۱۱، ۲۳). سپس محققین تحقیقات زیادی روی میزان چندقلوزایی و تخمک‌گذاری در گوسفندان نژادهای اینوردال (۹)، کمبریج (۱۹)، توکا (۲۰)، جاوانز (۴)، اولکوسکا (۲۵)، بلکلیر (۱۷)، لاکان (۳) و وودلند (۸) انجام دادند. ژن بزرگ اثر اینوردال وابسته به کروموزوم جنسی X می‌باشد و گوسفندان هموزیگوس حامل آن عقیم هستند که به دلیل عدم توسعه فولیکولی این امر رخ می‌دهد (۵، ۹، ۱۰). در مقابل ژن بورولا روی کروموزوم ۶ جای دارد (۲۲) و دارای اثر افزایشی روی میزان تخمک‌گذاری می‌باشد (۲۴). در گوسفند مشخص شده است که ژن $GDF9^1$ روی کروموزوم ۵ جای دارد (۲۶). ژن $GDF9$ دو اگزون دارد که توسط یک اینترون که دارای ۱۱۲۶ جفت باز می‌باشد، از هم جدا شده‌اند. پپتید بالغ شده فعال دارای ۱۳۵ اسید آمینه می‌باشد (۲). برای فولیکول‌زایی طبیعی و تخمک‌ریزی در موش $BMP15^2$ نقش کمتری دارد در صورتیکه ژن $GDF9$ برای توسعه فولیکولی و تخمک‌ریزی در موش ضروری است. برعکس در گوسفند، ژن‌های $GDF9$ و $BMP15$ برای باروری ضروری هستند بطوریکه

در گوسفندهای حامل آلل‌های موتاسیون یافته (هموزیگوس) برای این ژن‌ها ناباروری روی می‌دهد. (۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵). محققین نشان دادند که گوسفندان کمبریج و بلکلیر حامل یک موتاسیون در ژن $GDF9$ ($FecG^H$) در اگزون‌های ۱ و ۲ هستند که باعث افزایش میزان تخمک‌گذاری در گوسفندان هتروزیگوت و عدم باروری در گوسفندان هموزیگوت می‌شود. همچنین آنها بیان کردند که یک نسخه از $FecG^H$ باعث افزایش $1/4$ میزان تخمک‌گذاری در گوسفندان کمبریج و بلکلیر شده است. ژن $GDF9$ یکی از اعضای خانواده $TGF-\beta^3$ می‌باشد و حضور آن در گوسفند برای رشد طبیعی فولیکول ضروری است (۱۸). میزان تاثیر ژن $GDF9$ بر افزایش میزان تخمک‌گذاری و باروری بیشتر از تاثیر ژن $BMP15$ می‌باشد، همچنین اثرات آلل‌های جهش در هر دو ژن $BMP15$ و $BMPR1B^4$ بصورت افزایشی است که باعث افزایش میزان تخمک‌گذاری به ترتیب برابر با ۴۴٪ و ۹۰٪ می‌شوند (۷). هدف از انجام این پژوهش شناسایی پلی‌مورفیسم موجود در ژن $GDF9$ ، شناسایی ژنوتیپ‌های با باروری بالا، بررسی تعادل هاردی وینبرگ برای ژن مورد مطالعه در گوسفندان سنجابی و در نهایت میزان تاثیر ژن $GDF9$ بر صفات وزنی می‌باشد. فرضیه‌های موجود نیز عبارتند از: ژن $GDF9$ در نژاد مورد مطالعه دارای پلی‌مورفیسم می‌باشد، جمعیت مورد مطالعه برای ژن $GDF9$ در تعادل هاردی وینبرگ قرار دارد، دوقلوزایی مشاهده شده در گوسفندان سنجابی در ارتباط با ژن $GDF9$ می‌باشد و ژن $GDF9$ صفات وزنی را تحت تاثیر قرار می‌دهد.

مواد و روش‌ها

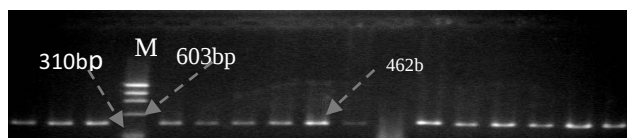
تهیه نمونه‌ها و استخراج DNA

در این آزمایش از تعداد ۱۰۰ راس از گوسفندان (۷۸ راس میش و ۲۲ راس قوچ) نژاد سنجابی ایستگاه تحقیقات دامپروری مهرگان کرمانشاه خون‌گیری به عمل آمد. گوسفندان مورد آزمایش دارای رکوردهای زایش، فصل زایش، شکم زایش و صفات وزنی از تولد تا ۱۵ ماهگی بودند. در آزمایشگاه ژنتیک مولکولی و

³ Transforming Growth Factor β ⁴ Bone Morphogenetic Protein Receptor IB¹ Growth Differentiation Factor 9² Bone Morphogenetic Protein 15

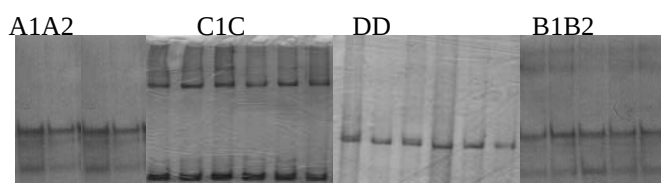
نتایج

با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی، قطعه مورد نظر از اگزون ۱ ژن GDF9 به طول ۴۶۲ جفت باز، تکثیر گردید نمونه‌ای از محصولات PCR تکثیر شده در شکل ۱ آورده شده است. همانطور که در شکل مشاهده می شود نمونه‌های محصولات PCR بدون باندهای غیر اختصاصی تکثیر گردیدند. مارکر استفاده شده در این تحقیق SM0251 بود.



شکل ۱: نمونه‌ای از محصولات PCR

تجزیه حاصل از الکتروفورز با استفاده از روش PCR-SSCP منجر به شناسایی ۴ فرم مختلف از الگوهای بانندی در جمعیت مورد مطالعه شده است که فراوانی الگوهای بانندی برای ژنوتیپ‌های A1A2، B1B2، C1C2 و DD به ترتیب ۰/۱۷، ۰/۲۱، ۰/۵۶ و ۰/۰۶ به دست آمد (شکل ۲).



شکل ۲: تجزیه SSCP قطعه 462 bp ژن GDF9

میزان BV و $^{h^2}$ باروری برای قوچ‌های آزمایشی به ترتیب ۷/۳۶ و ۰/۲۹ برآورد گردید. در جدول ۱ تجزیه واریانس دوقلوزایی برای ژن GDF9 در میش‌های مولد آورده شده است. همانطور که از جدول ۱ بر می‌آید ژن *gdf9* در سطح احتمال ۱٪ ($Pvalue < 0.01$) دارای اثر معنی‌داری روی دوقلوزایی می‌باشد. با توجه به جدول می‌توان دریافت که اثرات ثابت فصل زایش و شکم زایش روی میزان دوقلوزایی اثر معنی‌داری ندارند و میزان باروری گوسفندان در فصل‌های زایش مختلف و همچنین شکم‌های زایش با تعداد نمونه‌های آزمون شده توسط تحقیق

بیوتکنولوژی، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه مازندران به روش بهینه یافته نمکی^۵ استخراج DNA انجام گرفت.

تکثیر قطعه ژن و شرایط انجام PCR^۶

این تحقیق روی اگزون شماره ۱ ژن GDF9 که طول آن ۴۶۲ bp است، انجام گرفت. قطعه ژنی مورد نظر طی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) تکثیر شد. حجم مخلوط مورد استفاده در PCR، ۲۵ μl بود که شامل: ۲.۵ Mm MgCl₂، ۲.۵ μl Buffer 10X PCR، ۰.۲ μl Taq DNA، ۲ μl dNTPs 25Mm، ۱.۵ μl DNA polymerase و ۱۰ پیکو مول از هر یک از آغازگرها استفاده شد. توالی آغازگر اگزون یک ژن GDF9، 5'-GAAGACTGGGTATGGGGAAATG-3' و 3'-CCAATCTGCTCCTACACACCT-3' می‌باشد (۱۸).

شرایط دمایی PCR برای تکثیر قطعه ژنی عبارت است از ۹۴°C به مدت ۳ دقیقه جهت واسرشته شدن DNA الگو، ۳۵ سیکل شامل ۹۴°C واسرشته سازی اولیه ۵۹°C به مدت ۴۵ ثانیه برای اتصال آغازگرها به DNA و ۷۲°C به مدت یک دقیقه برای سنتز DNA و همچنین جهت بسط نهایی ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. بعد از فرایند PCR برای تعیین ژنوتیپ‌ها از روش SSCP^۷ استفاده شد. در این روش بعد از اینکه محصولات PCR به شرایط بهینه تکثیر رسیدند آنها را تک رشته‌ای کردیم. برای تک‌رشته کردن نمونه‌ها از بافر مخصوص SSCP و دمای ۹۷ درجه سانتی گراد به مدت ۶ دقیقه استفاده شد. برای مشاهده ژنوتیپ‌ها از ژل اکریل آمید ۸٪ دناتوره استفاده کردیم. نمونه‌ها ۱۴ ساعت با ولتاژ ۱۳۰ ولت و دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد الکتروفورز شدند. برای تجزیه آماری ژن GDF9 و اثر آن بر صفات باروری و وزنی از نرم افزار آماری SAS و برای بررسی نسبت ژنوتیپ‌های مختلف از نرم افزار Pop Gene نسخه ۱/۳۲ استفاده شد.

^۵ Salting Out

^۶ Polymerase Chain Reaction

^۷ Single Strand Conformation Polymorphism

^۸ Breeding Value

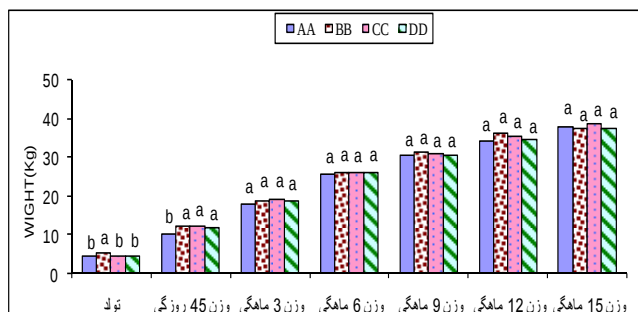
^۹ Heritability

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات وزنی مختلف در تمام حیوانات مورد آزمایش برای ژن *gdf9*

منبع تغییرات صفت	ژن GDF9			
	SS	MS	F	Pr>F
وزن تولد	۶/۰۶	۲/۰۲	۱۰/۷۳	۰/۰۰۰۱**
وزن ۴۵ روزگی	۵۶/۱۰	۱۸/۷۰	۱۴/۵۲	۰/۰۰۰۱**
وزن ۳ ماهگی	۱۵/۳۰	۵/۱۰	۲/۲۵	ns/۰/۸۷۷
وزن ۶ ماهگی	۱/۸۷	۰/۶۲	۰/۰۶	ns/۰/۹۸
وزن ۹ ماهگی	۲/۴۰	۰/۸۰	۰/۱۳	ns/۰/۹۴
وزن ۱۲ ماهگی	۱۸/۵۵	۶/۱۸	۰/۹۳	ns/۰/۴۲
وزن ۱۵ ماهگی	۲۲/۸۷	۷/۶۲	۰/۴۳	ns/۰/۷۳

** معنی داری در سطح ۱٪ ($Pvalue < 0.01$)، * معنی داری در سطح ۵٪ ($Pvalue < 0.05$)، ns عدم تفاوت معنی داری.

در شکل ۴ نمودار آزمون مقایسه میانگین دانکن برای صفات مختلف وزنی در گوسفندان مورد آزمایش برای ژن مورد نظر آورده شده است.



شکل ۴- نمودار مقایسه میانگین صفات مختلف وزنی برای ژن GDF9 با استفاده از آزمون دانکن.

همانطور که از نمودار شکل ۴ بر می آید ژنوتیپ B1B2 اثر بیشتری روی میانگین وزن تولد نسبت به سه ژنوتیپ دیگر دارد. در ۴۵ روزگی اثر ژنوتیپ A1A2 کمتر سایر ژنوتیپ ها است. برای سایر صفات وزن تمام ژنوتیپ ها در یک گروه دانکن قرار می گیرند.

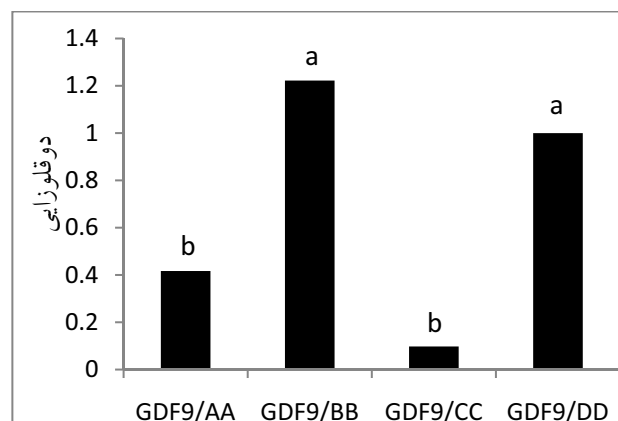
حاضر اختلاف معنی داری روی باروری را نشان نمی دهند و برای صحت این ادعا بایستی تعداد نمونه های بیشتری برای آزمون مورد استفاده قرار گیرند.

جدول ۱- آزمون تجزیه واریانس ژن GDF9 در میش های مولد

منبع تغییرات	DF	SS	MS	F	Pr>F
ژنوتیپ	۳	۱۱/۷۳	۳/۹۱	۱۱/۸۳	۰/۰۰۰۱**
شکم زایش	۴	۱/۱۴	۰/۲۸	۰/۸۶	۰/۴۹ ^{ns}
فصل زایش	۳	۰/۵۰	۰/۱۷	۰/۵۱	۰/۶۷ ^{ns}
خطا	۶۶	۲۱/۸۲	۰/۳۳	-	-

** اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۱، ns عدم تفاوت معنی داری

در این تحقیق برای مقایسه میانگین دوقلوزایی ژنوتیپ های مختلف ژن *gdf9* از آزمون دانکن استفاده شد که در شکل ۳ می توان مشاهده نمود. با توجه به نمودار شکل ۳ می توان گفت که میانگین دوقلوزایی ژنوتیپ های b1b2 و dd، با میانگین دوقلوزایی ژنوتیپ های a1a2 و c1c2 متفاوت است.



شکل ۳- نمودار مقایسه میانگین دوقلوزایی برای ژن *gdf9* با استفاده از آزمون دانکن.

تجزیه واریانس صفات مختلف وزنی برای ژن *gdf9* در جدول ۲ آورده شده است. با توجه به این جدول می توان گفت که اثر این ژن روی وزن تولد و وزن ۴۵ روزگی مهم می باشد ($Pvalue < 0.01$)، اما روی سایر صفات وزنی اثر معنی داری ندارد.

بحث

یکی از کاربردهای بسیار مهم ژنتیک مولکولی در علوم دامی شناسایی حیوانات دارای باروری بالا می‌باشد. ژن GDF9 در باروری و راندمان تولید مثل گوسفند بسیار مهم می‌باشد که اثر آن بر باروری گوسفندان سنجابی مورد بررسی قرار گرفت. در تحقیق حاضر برای ژن GDF9 چهار الگوی باندی مشاهده شد که با نتیجه بدست آمده از مطالعات Hanrahan و همکاران (۲۰۰۴) روی گوسفندان کمبریج و بلکلیر، مطابقت می‌کند. آنها نشان دادند که جهش‌های موجود در این ژن باعث افزایش باروری در گوسفندان کمبریج و بلکلیر می‌شوند (۱۸)، البته بایستی متذکر شد در تحقیق انجام گرفته توسط محققین فوق جهش G8 باعث افزایش باروری در گوسفندان کمبریج و بلکلیر گردید ولی در مطالعه ما پلی‌مورفیسم مشاهده شده در ژن GDF9 موجب افزایش باروری در گوسفندان حامل ژنوتیپ‌های B1B2 و DD گردید. برای بررسی جهش در این ژن تنها تکنیک SSCP-PCR کافی نمی‌باشد و بایستی روش‌های مکمل نیز تست گردند. باتوجه به جدول ۱ می‌توان گفت که این ژن دارای اثر معنی‌داری ($Pvalue < 0/01$) روی دوقلوزایی گوسفند سنجابی است، در تحقیق ما اثرات فصل زایش و شکم زایش روی دوقلوزایی معنی‌دار نبود. از آنجا که تعداد نمونه‌های آزمایشی ما محدود بودند این احتمال وجود دارد که با تعداد بیشتر نمونه ژنوتیپ‌های دیگری از این ژن در نژاد سنجابی مشاهده شود. نتایج ما نشان دادند که ژن GDF9 در گوسفندان سنجابی دارای پلی‌مورفیسم می‌باشد که با نتایج Chu و همکاران (۲۰۰۴) مطابقت می‌کند. آن محققین با استفاده از روش SSCP نشان دادند که اگر ژن ۱ ژن GDF9 در گوسفندان کوچک‌دنبه هان در چین دارای جهش می‌باشد. در آن تحقیق بیان شد که قطعات تکثیر شده اگر ژن یک ژن GDF9 در سطح احتمال ۵٪ دارای اثر معنی‌داری روی دوقلوزایی گوسفندان شکم اول و در سطح ۱٪ روی چندقلوزایی گوسفندان شکم دوم تاثیر دارد (۶)، همانطور که از جدول ۱ بر می‌آید در گوسفندان سنجابی نیز ژن *gdf9* دارای اثر مهمی در سطح احتمال ۱٪ روی باروری بود. در اینجا ژنوتیپ‌های *b1b2* و *dd* اثر بیشتری را نسبت به دو ژنوتیپ *a1a2* و *c1c2* داشتند

(شکل ۳). با انجام تحقیق اخیر مشخص گردید که ژن GDF9 برای باروری و افزایش تخمک‌گذاری در گوسفندان سنجابی ضروری می‌باشد که با نتایج جانگل و همکاران (۲۰۰۲) مطابقت می‌کند، آنها بیان کردند که حیوانات هموزیگوس نابارور هستند درحالی‌که گوسفندان هتروزیگوس افزایش باروری را نشان می‌دهند (۲۱)، البته باید گفت که گفته‌های ما بر اساس چندشکلی مشاهده شده از این ژن در گوسفندان سنجابی می‌باشد و برای بررسی جهش در ژن GDF9 بایستی از روش‌های دیگر کمک گرفت. محققین نشان دادند که ژن‌های BMP15 و GDF9 نقش کلیدی را در باروری و افزایش میزان تخمک‌گذاری و همچنین بلوغ فولیکول‌ها بازی می‌کنند (۱۶، ۲۷) و مطالعات ما نیز این واقعیت را تایید می‌کنند که ژن GDF9 نقش موثری بر باروری و دوقلوزایی گوسفندان سنجابی دارد. طبق مطالعات فنوتیپی انجام شده در گله مورد بررسی و مقایسه آن با گوسفندان معروف دوقلوزا، نرخ بره زایی این گوسفند نسبت به گوسفندان مطالعه شده دوقلوزا پائین است که احتمالاً به دلیل شرایط نامساعد محیطی و منطقه مورد پرورش گوسفند سنجابی باشد. از آنجایی که محیط بر علیه ژن‌های باروری عمل می‌کند بنابراین بایستی محیط مناسب را برای بهبود تولیدمثل و وضعیت باروری فراهم آورد زیرا گوسفندان ایران نیز دارای ژن‌های باروری به صورت چندشکلی می‌باشند. برای بررسی جهش در ژن GDF9 لازم است که سایر تکنیک‌ها مانند روش SNP استفاده شود. ژن *gdf9* دارای اثر معنی‌داری ($Pvalue < 0/01$) روی وزن تولد و وزن ۴۵ روزگی بود در صورتی‌که این ژن روی سایر صفات وزنی اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (جدول ۲). ژنوتیپ B1B2 اثر بیشتری را نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها روی وزن تولد نشان داد، در وزن ۴۵ روزگی اثر ژنوتیپ *a1a2* کمتر از سایر ژنوتیپ‌ها بود. در این ژنوتیپ‌ها روی سایر صفات وزنی بین گروه‌های دانکنی اختلافی مشاهده نشد (شکل ۴). نتایج به دست آمده نشان داد که ژن GDF9 رفتار پلی‌مورف از خود نشان داد، که می‌تواند در برنامه های اصلاح نژادی کشور و بهبود وضعیت تولیدمثلی مورد استفاده قرار گیرد. با توجه به نتایج حاصل می‌توان گفت که این ژن اثر معنی‌داری روی دوقلوزایی در گوسفندان مورد تحقیق

gene (*FecXI*) are devoid of secondary and tertiary follicles but contain many abnormal structures. *Biology of Reproduction*; 49:895-907.

6- Chu M M, Li B X, Wang J I, Ye S C, 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.

7- Davis G H (2004) Fecundity Genes in Sheep. *Animal Reproduction Science*. 82-83: 247-253.

8. Davis G H, Dodds K G, Wheeler R, Jay N P (2001) Evidence that an imprinted gene on the X chromosome increases ovulation rate in sheep. *Biology of Reproduction*; 64:216-221.

9. Davis G H, McEwan J C, Fennessy P F, Dodds K G, Farquhar P A (1991) Evidence for the presence of a major gene influencing ovulation rate on the X-chromosome of sheep. *Biology of Reproduction*; 44:620-624.

10. Davis G H, McEwan J C, Fennessy P F, Dodds K G, McNatty K P, Wai- Sum O (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*; 46:636-640.

11. Davis G H, Montgomery G W, Allison A J, Kelly R W, Bray A R (1982) Segregation of a major gene influencing fecundity in progeny of Booroola sheep. *NZ Journal Agriculture Research*; 25:525-529.

12- Eckery D C, Whale L J, Lawrence S B, Wylde K A, McNatty K P, Juengel J L (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 Cell Endocrinology*. 192, 115-126.

13- Galloway S M, Gregan S M, Wilson T, McNatty K P, Jungel J L, Ritvos O, Daivis GH (2002) BMP15 mutations and ovarian function. *Molecular Cell Endocrinology*. 191:15-18.

14- Glistner C, Richards S L, Knight P G (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.

15- Gilchrist R B, Ritter L J, Armstrong D T (2004) Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Animal Reproduction Science*. 82-83:431-446.

16- Gilchrist R B, Ritter L J, Cranfield M, Jeffery L A, Amato F, Scott S J, Myllymaa S, Kaivo-Oja N, Lankinen H, Mottershead D G, Groome N P & Ritvos O (2004) Immunoneutralization of growth differentiation factor 9 reveals it partially accounts for mouse oocyte mitogenic activity. *Biology of Reproduction*; 71 732-739.

17. Hanrahan J P (1991) Evidence for single gene effects on ovulation rate in the Cambridge and Belclare breeds. In: Elsen JM, Bodin L, Thimonier J (eds.), *Major Genes for Reproduction in Sheep*. Paris: INRA; 93-102.

داشت. در این تحقیق همچنین ژن GDF9 دارای اثر معنی داری روی وزن تولد و وزن ۴۵ روزگی بود. در نهایت می توان چنین بیان کرد که در نژادهای ایرانی نیز این ژن به صورت چندشکلی وجود دارد که فنوتیپ های مختلف آن باعث باروری یا عدم باروری می شوند. با توجه به تاثیر افزایش تعداد بره متولد شده یا دوقلوزایی بر میزان گوشت تولیدی به ازای هر راس میش در هر سال، کاهش تعداد میش های مولد روی مراتع و جلوگیری از تخریب مراتع به نظر می رسد که مطالعه برای پیدا کردن ژن های با اثر عمده بر دوقلوزایی در نژادهای مختلف در کشور لازم باشد. از طرفی می توان با وارد نمودن این ژن ها و برنامه ریزی برای تکثیر و تثبیت جهش های اتفاق افتاده مرتبط با ژن های باروری کمک قابل توجهی به افزایش تولید و درآمد دامداران کشور انجام داد.

سپاسگزاری

از اعضای محترم هیئت علمی گروه علوم دامی دانشکده علوم دامی و شیلات دانشگاه مازندران و مسئولین محترم مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی کرمانشاه به ویژه بخش تحقیقات دامپزشکی و ایستگاه تحقیقات مهرگان که در انجام این تحقیق ما را یاری دادند کمال سپاسگزاری را داریم.

منابع

1. Bindon B M, Piper L R, Hilliard M A (1996) Reproductive physiology and endocrinology of prolific sheep. In: Fahmy MH (ed.), *Prolific Sheep*. Wallingford, UK: CAB International; 453-470.
2. Bodensteiner K J, Clay C M, Moeller C L, Sawyer H R (1999) Molecular cloning of the ovine growth/differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. *Biology of Reproduction* 60:381-386.
3. Bodin L, Elsen J M, Poivey J P, San Cristobal-Gaudy M, Belloc J P, Eychenne F (1998) Hyper-prolificacy in the French Lacaune sheep breed; a possible major gene. *Proceedings of the 6th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*; 27:11-14.
4. Bradford G E, Quirke J F, Sitorius P, Inounu I, Tiesnamurti B, Bell F L, Fletcher I C, Torell D T (1986) Reproduction in Javanese sheep: evidence for a gene with large effect on ovulation rate and litter size. *Journal of Animal Science*; 63:418-431.
5. Braw-Tal R, McNatty K P, Smith P, Heath D A, Hudson N L, Phillips D J, McLeod B J, Davis G H (1993) Ovaries of ewes homozygous for the Xlinked Inverdale

- 18- Hanrahan J P, Gregan S M, Mulsant P, Mullen M, Davis G H, Powell R, Galloway S M (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: 900-909.
19. Hanrahan J P, Owen J B (1985) Variation and repeatability of ovulation rate in Cambridge ewes. *Animal Production* 1985; 40:529.
20. Jonmundsson J V, Adalsteinsson S (1985) Single genes for fecundity in Icelandic sheep. In: Land RB, Robinson DW (eds.), *Genetics of Reproduction in Sheep*. London: Butterworths; 159-168.
21. Juengel J L, Hudson N L, Heath D A, Smith P, Reader K L, Lawrence S B, O'Connell A R, Laitinen M P E, Cranfield M, Groome N P, Ritvos O, McNatty K P (2002) Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. *Biology of Reproduction*; 67:1777-1789.
22. Montgomery G W, Crawford A M, Penty J M, Dodds K G, Ede A J, Henry H M, Pierson C A, Lord E A, Galloway S M, Schmack A E, Sise J A, Swarbrick P A, Hanrahan V, Buchanan F C, Hill D F (1993) The ovine Booroola fecundity gene (FecB) is linked to markers from a region of human chromosome 4q. *Nature Genetic*; 4:410-414.
23. Piper L R, Bindon B M (1982) Genetic segregation for fecundity in Booroola Merino sheep. In: Barton RA, Smith WC (eds.), *Proceedings of the World Congress on Sheep and Beef Cattle Breeding*; Palmerston North, New Zealand; 395-400.
24. Piper L R, Bindon B M, Davis G H (1985) The single gene inheritance of the high litter size of the Booroola merino. In: Land RB, Robinson DW (eds.), *Genetics of Reproduction in Sheep*. London: Butterworths; 115-125.
25. Radomska M J, Martyniuk E, Klewicz J, Knothe A (1988) Inheritance of high prolificacy of the Olkuska sheep (preliminary results). *Journal of Agriculture Science Finland*; 60:597-598.
26. Sadighi M, Bodensteiner K J, Beattie A E, Galloway S M (2002) Genetic mapping of ovine growth differentiation factor 9 (GDF9) to sheep chromosome 5. *Animal Genetics*; 33:244-245.
27. Otsuka F & Shimasaki S (2002) A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand: its role in regulating granulosa cell mitosis. *PNAS* 99: 8060-8065.

