مقاله کامل

دوره هفدهم ـ شماره ۴ ـ زمستان ۱۴۰۰

DOI: 10.22055/IVJ.2020.200562.2182
DOR: 20.1001.1.17356873.1400.17.4.6.3

ارتباط چند شکلی اگزون ۶ ژن BMPR1B با صفت چند قلوزایی در گوسفندان سنجابی، قزل و ماکویی با استفاده از تکنیکPCR-SSCP

کیوان عبدالهی[۱]، علی هاشمی[۲*]، مختار غفاری[۳] و روناک صالحی[۴]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

[۲] دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

[۳] استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

[۴] دانشجوی دکترای تخصصی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

دریافت:۱۳۹۸/۶/۲۳ پذیرش: ۱۳۹۹/۱/۲۴

چکیده

ژن گیرنده‌ی پروتئین مورفوژنتیک استخوان (BMPR1B) یکی از ژن‌های بزرگ اثر است که نقش مهمی در افزایش میزان تخمک‌گذاری در گوسفندان دارد. در مطالعه‌ی حاضر از تعداد ۱۰۰ راس گوسفند نژاد سنجابی ایستگاه پرورش مهرگان استان کرمانشاه، ۶۰ راس گوسفند نژاد قزل و ۴۰ رأس از گوسفندان نژاد ماکویی ایستگاه پرورش گوسفند دانشگاه ارومیه خون‌گیری به عمل آمد. استخراج DNA از نمونه‌های خون به روش کیت استخراج شرکت سیناژن و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) جهت تکثیر یک قطعه ۱۹۰جفت بازی از اگزون ۶ ژن BMPR1B با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی انجام گرفت. چند شکلی فضایی تک‌رشته‌ای SSCP محصولات PCR با استفاده از ژل پلی‌آکریل‌آمید و رنگ‌آمیزی نیترات نقره به دست آمد. نتایج نشان داد که ناحیه‌ی مورد بررسی از ژن BMPR1B در دو نژاد سنجابی و قزل دارای چندشکلی بوده و در نژاد ماکویی بدون هیچ جهشی مشاهده گردید. در نمونه‌های مورد مطالعه سه الگوی باندی مختلف ۱، ۲ و۳ برای نژاد سنجابی به ترتیب با فروانی ۴۹/۲۷، ۳۶/۲۳ و ۱۴/۴۹ و سه الگوی باندی مختلف ۱، ۲ و ۳ برای نژاد قزل به ترتیب با فراوانی ۵۵/۵۵، ۳۳/۳۳ و ۱۱/۱۱مشاهده شد. ارتباط الگوهای مشاهده شده در نژاد سنجابی و قزل روی صفت چندقلوزایی معنی‌دار بود. نتایج نشان داد که این چندشکلی در گوسفند نژاد سنجابی و قزل می‌تواند به عنوان یک نشانگر برای صفت دوقلوزایی مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: چندقلوزایی، ژن BMPR1B ، گوسفند، PCR- SSCP

مقدمه

حدود یک قرن است که اصلاح نژاد نوین براساس اصول ژنتیکی مشخصی طراحی شده که دنباله‌ی کار چندین هزار ساله اهلی کردن حیوانات است، که حاصل انتخاب طبیعی و مصنوعی می‌باشد. امروزه اصلاح نژاد در حیوانات

*نویسنده مسئول : علی هاشمی، دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

E-mail: a.hashemi50@gmail.com

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

مزرعه‌ای به منظور بهبود بازده‌ی اقتصادی حیوانات با استفاده از نژادهای تجاری موجود انجام می‌شود. در سال-های اخیر بهبود صفات تولیدمثلی در گوسفند توسط تولیدکنندگان مورد توجه زیادی قرار گرفته است. از جمله این صفات تعداد نتاج در هر زایش است که سودمندی مزارع پرورش گوسفند به طور عمده‌ای تحت تاثیر تعداد فرزندان قرار می‌گیرد. علاوه بر دامپروران، متخصصین اصلاح نژاد نیز استفاده از حیوانات چندقلوزا را نسبت به حیوانات تک قلوزا ترجیح می‌دهند. همچنین امکان تکثیر ژن خارجی هدف در حیوانات تراریخته چندقلوزا نسبت به تک قلوزاها زیادتر بوده و به همین دلیل استفاده از حیوانات چندقلوزا به خصوص دام‌های اهلی مورد توجه متخصصین اصلاح نژاد است (Eghbalsaied et al, 2009). میانگین میزان دوقلوزایی در جمعیت گوسفندان ایران کمتر از ۱۰درصد می‌باشد. بنابراین یکی از مشکلات موجود در صنعت گوسفندداری ایران پایین بودن نرخ بره‌گیری در هر زایش است، که نیاز به تحقیقات بیشتری دارد. افزایش تعداد بره در هر زایش، با استفاده از روش‌های کلاسیک مانند انتخاب در داخل یک نژاد، پیشرفت کندی دارد، زیرا وراثت‌پذیری این صفت در هر زایش پایین است. اگر چه صفت تولیدمثل از جمله صفات کمی و از نظر توارث جزء صفات چندژنی می‌باشد، اما در سال‌های اخیر نشان داده شده که کنترل تولیدمثل در گوسفند توسط ژن‌هایی با اثرات عمده نیز صورت می‌گیرد. از این رو کشف ژن-هایی با اثرات عمده بر نرخ تخمک‌ریزی و در نتیجه تعداد بره در هر زایش، توجه بسیاری از دانشمندان را به خود جلب کرده است و این ژن‌ها از جمله ژن‌های کاندیدا برای صفت تعداد بره در هر زایش هستند و جهش‌های شناسایی شده در سطح این ژن‌ها به طور معنی‌داری باعث کاهش یا افزایش میزان تخمک‌گذاری می‌گردد (Hanrahan et al. 2004) ژن BMPR1B یک ژن اتوزوم غالب است که بر روی تخمک‌گذاری اثر افزایشی دارد. این ژن اولین بار در گوسفندان نژاد بورولا مرینو گزارش شد (Davis et al, 1982). همچنین گزارش شده است که جهش‌هایی که در خانواده‌ی ژن‌های باروری رخ می‌دهند در ارتباط با صفات گوناگون تولیدمثلی از جمله میزان تخمک‌گذاری، چندقلوزایی، باروری و غیره می‌باشند این ژن بر روی کروموزوم ۶ گوسفند قرار دارد و با نام FecB[1] هم شناخته می‌شود (Souza et al, 2001). Eghbal saied و همکاران در سال ۲۰۱۶، چندشکلی در ناحیه‌ی اگزون ۸ ژن BMPR1B و ارتباط آن با صفت دوقلوزایی در گوسفندان ایرانی نژاد لری بختیاری، شال، قزل و افشاری با استفاده از تکنیک PCR-SSCP را بررسی ، نتایج چندشکلی و ارتباط معنی‌داری ژنوتیپ‌های ژن BMPR1B را با صفت دو قلوزایی نشان داد. Kazemi Barzelabad و همکاران در سال ۲۰۱۶، چند شکلی ژن BMPR1B در گوسفندان نژاد کردی شیروان را مورد بررسی قرار دادند، آن‌ها گزارش کردند که نتایج حاکی از عدم وقوع جهش بود. Ghafari و همکاران در سال ۲۰۰۶، چندشکلی ژنتیکی ژن BMPR1B در گوسفند نژاد شال با تکنیک PCR-RFLP را مطالعه کردند که در جایگاه مورد بررسی چندشکلی مشاهده نشد. Guan و همکاران در سال ۲۰۰۷، به بررسی چندشکلی ژن BMPR1B در ۹ نژاد ساکوف، دورست، چارولایس، مرینو گوشتی چینی، هیلز رامنی، هو، آمیخته ساکوف و مرینو چینی، آمیخته دورست و مرینو چینی، با تکنیک PCR-RFLP پرداختند. نتایج حاصل از این بررسی نشان دهنده‌ی وجود چند شکلی در دو نژاد هو و مرینوچینی بود. Mohamadi و همکاران در سال ۲۰۱۱، چندشکلی ژن BMPR1B را در بزهای نجدی و بومی استان خوزستان با تکنیک PCR-RFLP را مورد مطالعه قرار دادند. در این نژادها چندشکلی مشاهده نگردید. شناسایی چندشکلی‌های موجود در ژن‌های مرتبط با چندقلوزایی می‌تواند در بهبود اصلاح نژاد این نژادها و افزایش چندقلوزایی تأثیر بسزایی داشته باشد و از آن جهت که تحقیقات صورت گرفته روی این ژن و سه نژاد گوسفند کمتر می‌باشد ضرورت دارد که مطالعات مولکولی در زمینه-ی ژن‌های تأثیرگذار روی صفت چندقلوزایی انجام شود. لذا هدف از انجام پژوهش حاضر، شناسایی چندشکلی

ناحیه‌ی اگزون ۶ ؛ ژنBMPR1B در گوسفندان نژاد قزل، سنجابی و ماکویی با استفاده از روش چندشکلی فضایی رشته‌های منفرد مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR-SSCP) همچنین شناسایی و تعیین الگوهای ژنوتیپی و ارتباط آن‌ها با صفت چند قلوزایی می‌باشد.

مواد و روش کار

در این مطالعه از ۲۰۰ رأس نژادهای ایرانی گوسفند شامل ۱۰۰ راس گوسفند نژاد سنجابی ایستگاه پرورش مهرگان استان کرمانشاه، ۴۰ راس از گوسفند نژاد ماکویی و ۶۰ راس گوسفند نژاد قزل ایستگاه پرورش گوسفند دانشگاه ارومیه به صورت تصادفی و در سنین مختلف؛ با استفاده از ونوجکت های 5ml حاوی ماده ضد انعقاد EDTA از سیاهرگ وداجی به مقدار ۵ میکرولیتر از هریک از گوسفندان نمونه خون اخذ گردید و سپس نمونه‌های خون بعد از شماره‌گذاری در مجاورت با یخ به آزمایشگاه ژنتیک گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه منتقل و تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. . استخراج DNA از خون کامل با استفاده از کیت شرکت سیناژن ایران (DNTTM Kit) طبق دستورالعمل کیت مذکور انجام شد. جهت ارزیابی DNA استخراج شده از روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز با غلظت ۱ درصد استفاده شد. توالی آغازگرها با استفاده از سایت primer 3plus طراحی گردید و صحت اتصال آغازگرها انتخاب شده از طریق نرم‌افزار Oligo Version5 مورد بررسی قرار گرفت (Weiss et al, 1999). تمامی آغازگرها از شرکت سیناژن (ایران) به صورت لیوفیوزه تهیه گردید. جهت تکثیر قطعه‌ی ۱۹۰جفت بازی اگزون ۶ ژن BMPR1B از آغازگرهای توصیف شده که ترتیب توالی آن‌ها در جدول ۱ آمده است استفاده شد.

Table 1. BMPR1B gene specific primers for amplification of exons 6

Primer name	Sequence
Forward primer	5- CCAGAGGACAATAGCAAAGCAAA -3
Reverse primer	5- CAAGATGTTTTCATGCCTCATCAACAGGT -3

مواد مورد نیاز برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و غلظت آن ها در جدول ۲ آمده است. جهت انجام PCR ؛ یک میکرولیتر از هر نمونه DNA ژنومی داخل میکروتیوب‌های مخصوص PCR ریخته شد. سپس با توجه به تعداد نمونه-ها اقدام به تهیه‌ی مخلوطی از مواد مورد نیاز برای همه‌ی نمونه‌ها گردید. جهت بهینه‌سازی واکنش PCR برنامه‌های گوناگون حرارتی مورد استفاده قرار گرفت ولی در پایان برنامه‌ی دمایی و زمانی موجود در جدول ۳ مناسب‌ترین شرایط برای تکثیر قطعه ۱۹۰ جفت بازی اگزون ۶ ژنBMPR1B توسط دستگاه ترموسایکلر(T Gradient) ساخت کشور آمریکا در نظر گرفته شد که برنامه در جدول ۳ آورده شده است.

Table 2: Reaction Ingredients PCR

The amount used(µL)	Concentration used	material
12.5	–	Industrial Mastermix
1	10 PM/µL	primer(Forward)
1	10 PM/µL	primer(Reverse)
3	50 –100 ng	DNA
7.5	–	Distilled water
25	–	total

Table 3: Thermal cycle program for polymerase chain reaction

Cycle 1	Primary mastering	94°C	5min
Cycle 35	Mastering Primer conection expansion	94°C 60°C 72°C	1min 45second 1min
Cycle 1	Final expansion	72°C	5 min

برای مشاهده‌ی محصولات PCR با استفاده از روش الکتروفورز ژل آگارز، مقدار ۴ میکرولیتر از هریک از محصولات PCR به همراه ۱/۵ میکرولیتر از بافر بارگذاری، روی ژل آگارز ۲ درصد با ولتاژ ۱۰۰ ولت و به مدت ۲۰ الی ۳۰ دقیقه بارگذاری گردید. این عمل برای تمامی نمونه‌ها انجام گرفت و در پایان در یکی از چاهک‌ها مقدار مشخصی از نشانگر مولکولی استاندارد (50 bp شرکت سیناژن) جهت تعیین اندازه‌ی تقریبی محصولات PCR بارگذاری شده ریخته شد و با کمک دستگاه ژل داک؛ زیر نور ماورای بنفش مشاهده گردیدند. امروزه PCR-SSCP به عنوان روشی توانمند و قابل اطمینان جهت آزمایش چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی (SNP) در تعیین ژنوتیپ به شمار می‌رود. تکنیک SSCP روش مؤثری در شناسایی تنوع توالی تکثیر شده می‌باشد (Orita et al, 1989). اساس این تکنیک مهاجرت DNA دناتوره شده از میان ژل پلی آکریل آمید غیردناتوره براساس اندازه و توالی آن می‌باشد. بنابراین وجود حتی یک جهش نقطه‌ای، با تفاوت حرکت در روی ژل قابل مشاهده می‌باشد. تعیین الگوی ژنوتیپی نمونه‌ها به روش PCR-SSCP با استفاده از دستگاه الکتروفورز عمودی مدل (PRO-21*22CM) (پایا پژوهش پارس) روی ژل پلی آکریل آمید(۱۰ درصد) و رنگ‌آمیزی با نیترات نقره انجام گرفت. بدین منظور ۱۰ میکرولیتر بافر بارگذاری مخصوص SCCP (شامل برم فنل بلو ۰/۰۵ درصد؛ گزیلن سیانول ۰/۰۵ درصد؛ فرمامید ۹۵ درصد و EDTA ۲۰ میلی‌مولار) با ۵ میکرولیتر محصول PCR مخلوط شد و سپس در دستگاه ترموسایکلر به مدت ۱۲دقیقه در دمای ۹۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد تا رشته‌های DNA واسرشت شوند. نمونه‌های واسرشت شده به مدت ۵ دقیقه روی یخ قرار گرفتند تا از پیوند دوباره رشته‌های مکمل جلوگیری شود به این ترتیب که مخلوط محصول PCR و بافر بارگذاری مخصوص SSCP درون چاهک‌های ژل بارگذاری شدند. سپس الکتروفورز نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت و با اختلاف پتانسیل ۲۵۰ ولت در دمای ۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و با بافر TBE 1X انجام گرفت. در نهایت رنگ‌آمیزی ژل با استفاده از نیترات نقره طی سه مرحله تثبیت، لکه‌گذاری و ظهور صورت گرفت. پس از اتمام کارهای آزمایشگاهی، تعیین فراوانی الگوهای ژنوتیپی با استفاده از شمارش مستقیم مورد بررسی قرار گرفت.

مدل مورد استفاده برای بررسی ارتباط الگوهای حاصل از ژن تحت بررسی با صفت مورد نظر در زیر آورده شده است. تجزیه و تحلیل داده‌ها برای صفت چندقلوزایی با استفاده از نرم‌افزار SAS ورژن ۹,۲ و رویه GLM و با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون مقایسه‌ای دانکن صورت گرفت (SAS.2004). معادله مدل به شکل زیر بود.

$$Yij=\mu+Gi+Eij$$

که در رابطه بالا Yij مشاهدات مربوط به صفت چند قلوزایی، μ میانگین صفت در جامعه، Gi اثر i امین الگوی ژنوتیپی در جایگاه ژنی، Eij اثر باقی مانده می‌باشد.

نتایج

نتایج حاصل از الکتروفورز DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد در شکل ۱ نمایش داده شد. استخراج DNA با روش کیت DNP Kit (شرکت سینا ژن) کیفیت مناسب و قابل قبولی برای DNA جهت ادامه‌ی مراحل پژوهش را نشان می‌دهد.

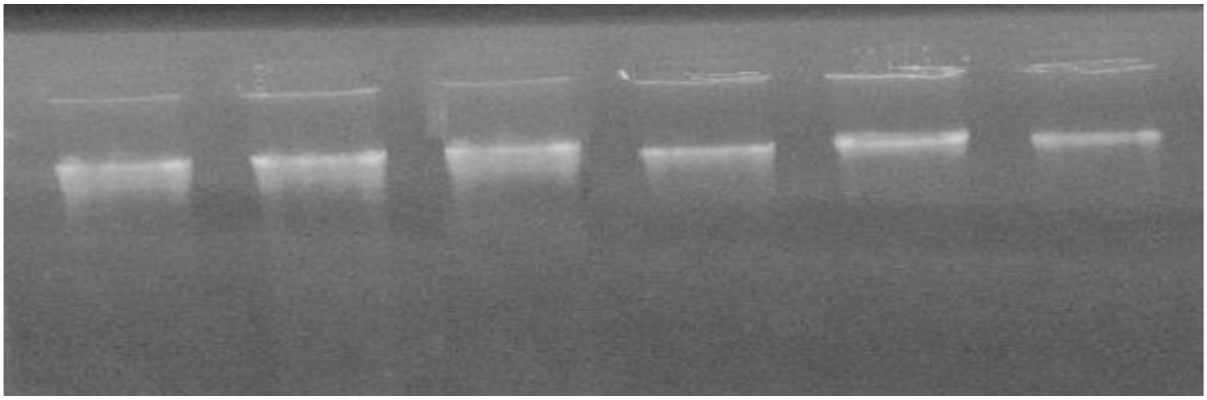

Figure 1: DNA samples extracted from sheep blood and were determined quality on the 1 percent agarose gel.

اکثر DNAهای استخراج شده عاری از هیچ گونه کشیدگی و آلودگی بودند. در نمونه‌های فاقد باند و همچنین نمونه‌های با باند ضعیف مجددا استخراج DNA صورت گرفت. پژوهش‌های ژنتیک مولکولی با هدف خاص در صورتی موفق خواهند بود که آغازگر خوب و با کیفیت طراحی شود. بنابراین صرف وقت و دقت در انتخاب و طراحی آغازگر کیفیت کار مولکولی را افزایش می‌دهد. الکتروفورز محصولات تکثیر شده روی ژل آگارز ۱/۵ درصد از جایگاه ژن BMPR1B نشان داد که قطعه ۱۹۰ جفت بازی در نظر گرفته شده به خوبی و بدون هیچ باند غیر اختصاصی تکثیر یافته است (شکل ۲).

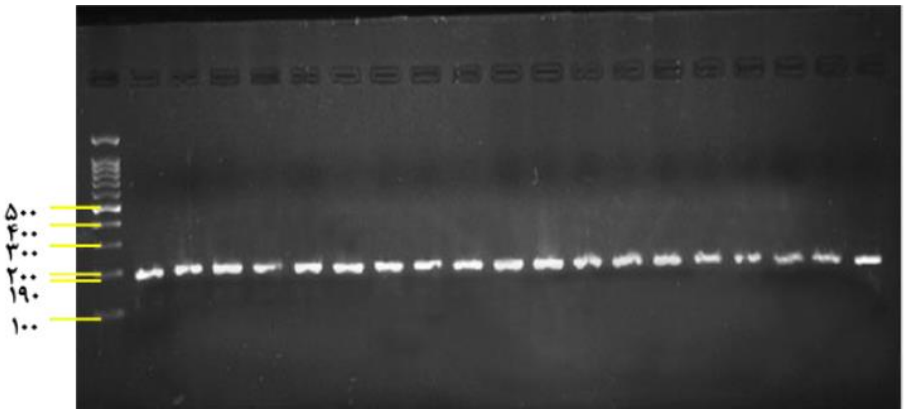

Figure 2: PCR products were loaded on 1.5 percent agarose gel

در این مطالعه نشانگر مولکولی مورد استفاده ۱۰۰۰ جفت بازی و متعلق به شرکت الیم طب بود. نتایج حاصل از SSCP و رنگ‌آمیزی پلی اکریل آمید بیانگر ۳ الگوی باندی متفاوت در نژاد سنجابی، قزل و الگوی باندی یکسان در نژاد ماکویی بود که در شکل ۳، ۴ و ۵ مشاهده می‌شود.

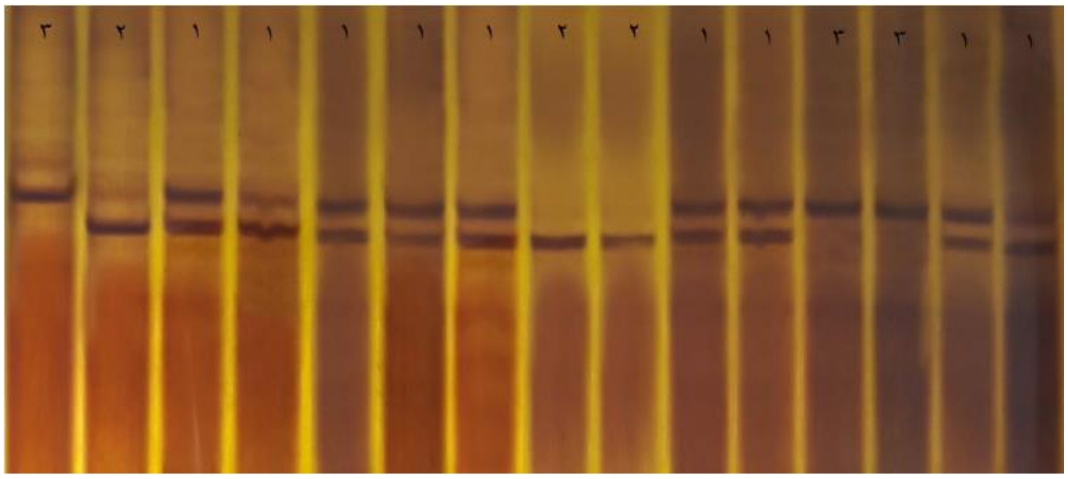

Figure 3: SSCP patterns observed for BMPR1B in sanjabi breed sheep

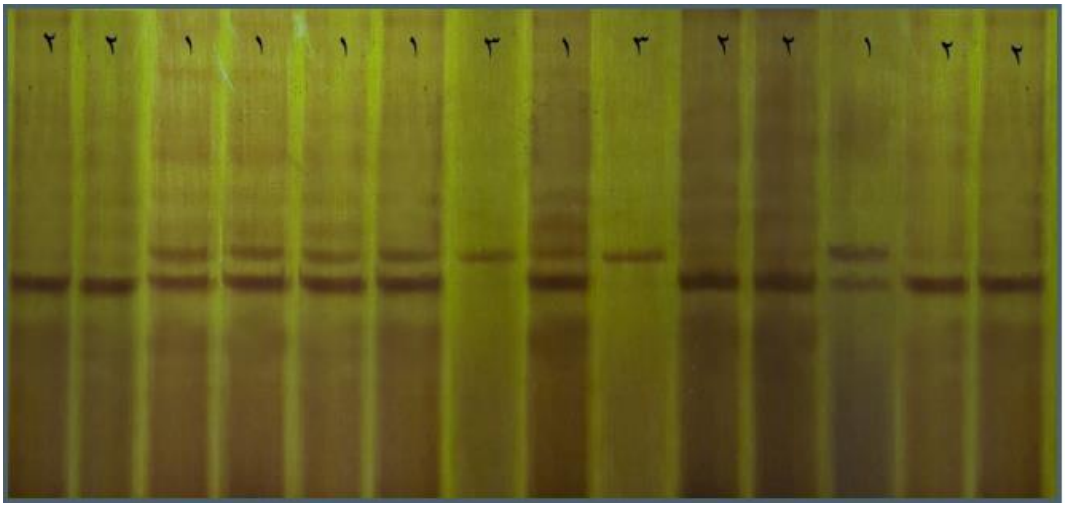

Figure 4: SSCP patterns observed for BMPR1B in Ghezel breed sheep

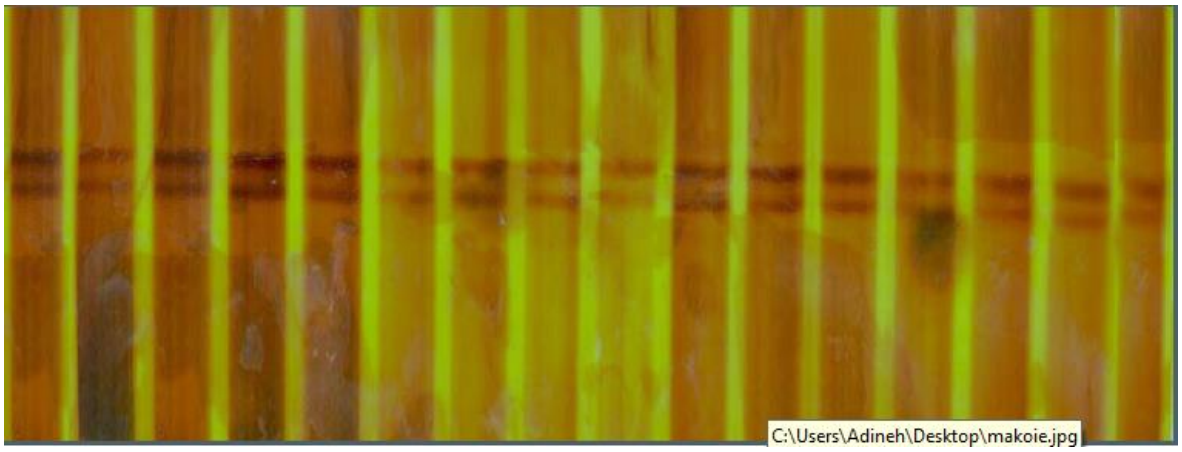

Figure 5: SSCP patterns observed for BMPR1B in Makui breed sheep

بنابراین الگوهای باندی متفاوت حاکی از وجود تنوع بالا در قطعه تکثیر شده اگزون ۶ ژن BMPR1B در نژاد سنجابی و قزل بود.

با مشخص کردن الگوهای ژنوتیپی و همچنین تهیه رکوردهای ثبت شده صفت دوقلوزایی برای گوسفندان نژاد قزل و سنجابی، ارتباط الگوهای ژنوتیپی با صفت مذکور مورد بررسی قرار گرفت. نتایج صفت مورد بررسی در جدول ۳ و ۴ مشاهده می‌شود.

Table 3: Average minimum squares for twin traits in sanjabi sheep

1	2	3
1.000[b]	1.480[a]	1.235[ab]

با توجه به جدول ۳ میانگین حداقل مربعات برای صفت دوقلوزایی در گوسفندان اکوتیپ سنجابی تفاوت الگوی ۱ با ۲ ۰/۴۸۰ و ۱ با ۳ ۰/۲۳۵ محاسبه شد.

Table 4: Average minimum squares for twin traits in Ghezel sheep

1	2	3
1.80[a]	1.38[ab]	1.16[a]

با توجه به جدول ۴ میانگین حداقل مربعات برای صفت دوقلوزایی در گوسفندان اکوتیپ قزل تفاوت الگوی ۱ با ۲ ۰/۴۱۶و ۱ با ۳ ۰/۱۳۴محاسبه شد.

نتایج الگوهای SSCP در نژاد قزل و سنجابی که در جدول ۵ و ۶ ارائه شده است نشان می‌دهد که برای ژن BMPR1B الگوی ۱و ۳ به ترتیب بیشترین و کمترین فراوانی را داشتند.

Table 5: Frequency distribution in the three btained SSCP patterns for BMPR1B gene in sanjabi sheep

Number of patterns Viewed	Frequency of pattern Viewed (percentage)	SSCP pattern
34	49.27	1
25	36.23	2
10	14.49	3

Table 6: Frequency distribution in the three obtained SSCP patterns for BMPR1B gene in Ghezel sheep

Number of patterns Viewed	Frequency of pattern Viewed (percentage)	SSCP pattern
20	55.55	1
12	33.33	2
4	11.11	3

همان طور که در جدول ۵ و ۶ مشاهده می‌گردد در این مطالعه برای ژن BMPR1B از بین ۳ الگوی شناسایی شده در جمعیت گوسفندان نژاد سنجابی و قزل الگوی ۱ بیشترین فراوانی و الگوی ۳ کمترین فراوانی را داشت.

بحث

الگوهای ژنوتیپی متفاوت بین افراد درون این نژادها، ناشی از جهش‌های تک نوکلئوتیدی بین افراد می‌باشد. در مطالعات گذشته هم تعداد قابل توجهی چند شکلی در این ژن توسط محققان مختلف گزارش شده است.Mahmoodi و همکاران در سال ۲۰۱۱ در مطالعه‌ای که برای بررسی چندشکلی ژن BMPR1B در گوسفندان نژاد زل استان مازندران با استفاده از تکنیک PCR-SSCP انجام دادند، نتایج چند شکلی در نمونه‌های خون را نشان داد که با تحقیق حاضر در گوسفندان نژاد سنجابی و قزل همخوانی داشت. در مطالعه‌ای دیگر Mohamadi و همکاران در سال ۲۰۰۶ در گوسفندان لری بختیاری و عربی، چندشکلی این ژن را با استفاده از تکنیک PCR-RFLP را مورد بررسی، و جایگاه مورد مطالعه مونومورف بود که با نتایج تحقیق ما در نژاد سنجابی و قزل که چندشکلی مشاهده گردیده است مطابقت نداشت ولی در نژاد ماکویی همخوانی داشت عدم تطابق به نظر می‌رسد به دلیل تفاوت در نژاد مورد بررسی و تکنیک استفاده شده باشد. در مطالعاتی که توسط Amiri و همکاران (۲۰۰۷)، Ghafari و همکاران (۲۰۰۷) و Eiragiyan و همکاران (۲۰۰۹) با استفاده از تکنیک PCR-SSCP برای بررسی چندشکلی ژن BMPR1B در گوسفندان نژادهای بختیاری، شال و سنگسری، انجام گرفته

بود نتایج حاکی از عدم وجود چندشکلی در نژادهای مورد بررسی بود که با نتایج مطالعه‌ی حاضر در نژاد ماکویی همخوانی داشت. Davis و همکاران در سال ۲۰۰۲، چندشکلی جایگاه ژنی BMPR1B در گوسفندان نژاد Hu و Han چینی وارتباط آن‌ها با صفت دوقلوزایی با استفاده از تکنیک PCR-RFLP را بررسی کردند نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل RFLP ،در گوسفندان نژاد Hu تنها ژنوتیپ BB را شناسایی نمود و جایگاه مورد مطالعه مونومورف بود که با تحقیق حاضر در نژاد ماکویی همخوانی داشت در حالی که نمونه‌های خون گوسفندان نژاد Han سه نوع الگوی ژنوتیپی ۱، ۲ و ۳ را با فراوانی های۳۳ /۰، ۰/۵۸، و ۰,۰۸ نشان دادند که ژنوتیپ‌ها ارتباط معنی‌داری با صفت دوقلوزایی نشان دادند که از لحاظ معنی‌داری با تحقیق حاضر همخوانی ولی با فراوانی‌های مشاهده شده مطابقت نداشت چون فراوانی‌های آللی یک ژن بر اساس استراتژی-ها و برنامه‌ی اصلاحی به کار گرفته شده در نژادها و گله-های مختلف متفاوت است که به نوبه‌ی خود با ذائقه و عادات غذایی هر منطقه از جهان در ارتباط است.

در مطالعه‌ای که Gun و همکاران در سال ۲۰۰۷ بر روی ۹ نژاد ساکوف، دورست، چارولایس، مرینوس، هیلز رامنی، هو، آمیخته ساکوف و مرینو چینی، آمیخته دورست و مرینو چینی و ارتباط آن با صفت دوقلوزایی با استفاده از تکنیک PCR-RFLP انجام دادند در بین نژادهای مورد بررسی تنها نژادهای هو و مرینوی چینی حامل این ژن بودند و ژنوتیپ-ها ارتباط معنی‌داری را با صفت دوقلوزایی نشان دادند که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی داشت و این نتایج نشان می‌دهد که ژن BMPR1B می‌تواند به عنوان مارکر مولکولی بالقوه برای صفت دو قلوزایی مطرح باشد. Kasiriyan و همکاران در سال ۲۰۰۶، چند شکلی در جایگاه ژنی BMPR1B و ارتباط آن با دوقلوزایی را در گوسفندان نژاد سنگسری با استفاده از تکنیک PCR-RFLP را مورد بررسی و جایگاه مورد مطالعه مونومورف بود که با نتایج ما در گوسفندان نژاد سنجابی و قزل مطابقت نداشت و عدم تطابق به نظر می‌رسد که مربوط به تعداد نمونه‌های اخذ شده از گوسفند نژاد سنگسری باشد که در این نمونه‌های ۶۰ تایی جهش ژنی لازم به منظور چندشکلی انجام نگرفته باشد که این جهش در نمونه ۲۰۰ تایی تحقیق حاضر مشاهده شده است. البته بدیهی است استفاده از تعداد نمونه‌ها و آنزیم-های بیشتر و نیز سایر نواحی ژنی می‌تواند نتایج دقیق‌تری را در مطالعه‌ی Kasiriyan و همکاران در سال ۱۳۸۶ نشان دهد. در مطالعه‌ی دیگری که Mahdavi و همکاران در سال ۲۰۱۴، چندشکلی ژن BMPR1B و ارتباط آن با صفت چندقلوزایی در گوسفندان نژاد کله کوهی را گزارش کردند چند شکلی این ژن را تایید کردند و با نتایج تحقیق ما مطابقت داشت ولی هیچ گونه تفاوت معنی‌داری با صفت مورد نظر یافت نشد و یکی از دلایل عدم مغایرت می‌تواند تفاوت در نژادهای مورد بررسی و تکنیک استفاده شده باشد. طبق مطالعات مولسانت و همکاران (۲۰۰۱) که بر روی گوسفندان نژاد مرینو بورولای استرالیایی با استفاده از تکنیک PCR-RELP انجام دادند مطالعات حاکی از وجود چندشکلی در جایگاه مورد بررسی بود همچنین آنالیزهای انجام گرفته بیانگر ارتباط معنی‌داری ژن BMPR1B با صفت دوقلوزایی در این ناحیه را گزارش کردند که نتایج این محققین با تحقیق حاضر همخوانی داشت. لذا می‌توان گفت با توجه به این که در برخی موارد گوسفندان مجموعه‌ای از جهش‌های کم اثر را در ژن‌های مؤثر بر باروری دارند، تجمع این اثرات می‌تواند منجر به افزایش بازده تولیدمثلی گردد. با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش روی قطعه اگزون ۶ ژن BMPR1B در نژادهای سنجابی، قزل می‌توان نتیجه گرفت که با انجام عمل توالی یابی و مشخص نمودن جهش‌های موجود در این منطقه، می‌توان احتمال تأثیر معنی‌دار این جهش‌ها بر روی باروری در این نژادها را داد. با در نظر گرفتن نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان چنین برداشت نمود که عامل ژنتیکی مسئول بر میزان باروری در این نژادها می‌تواند مربوط به قسمت اگزون ۶ از ژن BMPR1B باشد. لذا با در نظر گرفتن تاثیر افزایش تعداد بره متولد شده و میزان بره‌زایی بر میزان گوشت تولیدی به ازای هر رأس میش در هر سال، کاهش

تعداد میش‌های مولد روی مراتع و جلوگیری از تخریب مراتع به نظر می‌رسد که مطالعه برای پیدا کردن جهش در سایر ژن‌های با اثر عمده بر چندقلوزایی در نژاد سنجابی و قزل و سایر نژادهای کشور لازم باشد. از طرفی می‌توان با کشف و وارد کردن این ژن‌ها و برنامه‌ریزی برای تکثیر و تثبیت جهش‌های اتفاق افتاده مرتبط با ژن‌های باروری کمک قابل توجهی به افزایش تولید و درآمد دامداران کشور انجام داد. تحقیق حاضر وجود چندشکلی ژنتیکی برای ژن BMPR1B را در گوسفندان نژاد سنجابی و قزل به خوبی نشان داد. با توجه به اهمیت این ژن در صفات تولیدمثلی و شناسایی چندشکلی‌های مرتبط با این صفت، پیشنهاد می‌گردد، ارتباط ژنوتیپ‌های مختلف این ژن با صفات تولیدمثلی در مطالعات دیگر با تعداد بیشتری نمونه، جهت دستیابی به نتایج قابل اعتمادتری در خصوص معرفی این جایگاه به عنوان کاندیدای ژنتیکی برای صفات تولیدمثلی، صورت بگیرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از پرسنل ایستگاه پرورش مهرگان استان کرمانشاه و ایستگاه پرورش دانشگاه ارومیه برای نمونه‌گیری این پژوهش، قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

تعارض منافع وجود ندارد.

منابع مالی

این مقاله با استفاده از پژوهانه که از سوی معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه تأمین گردید، انجام شده است.

منابع

Amiri, A., Rahimi Mianji, G.H., & Vatankhah , M. (2009). Non detection polymorphism in FecB and FecXI Genes in Lori-Bakhtiyari sheep. *Modern Genetics*, 3(1): 57-63.

Davis, G.H., Galloway, S.M., Ross, I.K., Gregan Scott, M., Ward, J., Bon, N., Pradip G.M., Nimbkar, C., Gray , D., Subandriyo, G., Inounu, I., Tiesnamurti , B., Martyniuk, E., Eythordottir, E., Mulsant, P., Lecerf, F., Hanrahan, J.P., Bradford, E.G., & Wilson, T. (2002). DNA Test in Prolific Sheep from Eight Countries Provide New Evidence on Origin of the Booroola (FecB) Mutation. *Biology of Reproduction*, *66*(3), 1869-1874.

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. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 25(4), 525-529.

Eghbalsaied , S., Amini , H., Rashidi, F., Velayati, D. & Pour ali , SH. (2016). Identification of new mutations in exon 8 of the BMPR1B gene in Iranian sheep of Lori-Bakhtiari, Shal, Ghezel and Afshari breeds. *Journal of Agricultural Biotechnology, 8(*3*), 1-14* . (In Persian).

Ghafari, M. (2007). Identification of Polymorphisms in Borula Genes BMPR-1B and GDF9 Related to twinning in shawl sheep. Master thesis. Campus of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, 5(2),1-6, (In Persian).

Guan, F., Liu, S.R., Shi, G.Q., & Yang, L.G. (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*(2), 44-52.

Hanrahan, J.P., Gregan, S.M., Mulsant, P., Mullen, M., Davis, G.H., Powell, R., & Galloway , S.M. (2004). Mutations in the genes for oocytes-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*(1), 900-909.

Mahdavi, M., Nanekarani, S., & Hosseini, S.D. (2014). Mutation in BMPR-IB gene is associated with litter size in Iranian Kalehkoohi sheep. *Animal reproduction science*, 147(4), 93-98.

Mohamadi, GH., & Mahmodi, M. (2011). Investegation of Polymorphism of FecB Gene in Najdi and Native Goats of Khuzestan Province by Method PCR-RFLP. *Journal of Veterinary and Laboratory*, 3(1), 13-20. (In Persian).

Mulsant, P., Lecerf, F., Fabre, S., Schibler, L., Monget, P., Lanneluc, I., Pisselet, C., Riquet, J., Monniaux, D., Callebaut, I., & Cribiu, E. (2001). Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in Booroola Merino ewes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(9), 5104-5109.

Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., & Hayashi, K. (1989). Rapid and sensitive detection of point mutations.journal of Genomics , 5(4),874-9.

SAS Institute Inc .(2004). SAS/STAT User's Guide, Version 9.1. Cary, NC: SAS Institute Inc.

Souza, C.J., MacDougall, C., Campbell, B.K., McNeilly, A.S., & Baird, D.T. (2001). The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 B (BMPR1B) gene. *Journal of Endocrinology*, 169(2), R1-R6.

Weiss, B., Davidkova, G., & Zhou, L.W. (1999). Antisense RNA gene therapy for studing and modulating biological processes.*journal of Cell Molecular life science*, *55*(2), 334-358.

Received: 14.9.2019
Accepted: 12.04.2020

Vol. 17, No. 4, Winter, 2022 **Original Article**

DOI: 10.22055/IVJ.2020.200562.2182
DOR: 20.1001.1.17356873.1400.17.4.6.3

Association of the Polymorphism BMPR1B gene exon 6 with litter size in Sanjabi, Ghezel and Makui sheep by PCR –SSCP technique

Keyvan Abdollahi[1], Ali Hashemi[2*], Mokhtar Ghafari[3] and Ronak salehi[4]

[1] DVM Student from Animal Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
[2] Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
[3] Assistant Professor Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
[4] PHD Student, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran

Received: 14.9.2019 Accepted: 12.04.2020

Abstract

The bone morphogenetic protein receptor gene (BMPR1B) is one of the major affect genes that plays an important role in increasing the rate of ovulation in sheep. In this study, Blood samples were collected from 100 sheep of Sanjabi in Mehregan breeding station in Kermanshah province, 60 sheep Ghezel and 40 Makui breeding station of Urmia University. DNA was extracted, using extraction kit of Sinnagen co. After DNA extraction specific primers used for amplification of 190 bp fragment of Exon 6 BMPR1B gene. Then single strand conformation polymorphism (SSCP) of PCR products was performed and genotypic patterns were obtained using acrylamid gel and silver staining. The results showed that the strips appearing on the acrylamide gel in two Sanjabi and Ghezel breeds were polymorphic and in the Makavi breed in a shape. Three different banding patterns in samples 1, 2 and 3 for Sanjabi breed 49.27% ,36.23% and 14.49% respectively, Three different band pattern The frequency were 1, 2 and 3 for Ghezel breed 55.55% ,33.33%. and 11.11% respectively, The association of observed patterns on the multiplicity trait was significant in Sanjabi and Ghezel breed ($P < 0.05$).The results showed that this polymorphism in Sanjabi and Ghezel sheep could be used as a marker for twin traits.

Key words: Twin traits, BMPR1B gene, Sheep, PCR- SSCP

* **Corresponding Author**: Ali Hashemi, Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Urmia University
E-mail: a.hashemi50@gmail.com

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).