

## Investigation on single nucleotide polymorphism of *BMPR1B* and *GDF9* genes in Mughani, Afshari and Baluchi ewes

Reza Tohidi<sup>1\*</sup>, Ali Javadmanesh<sup>2</sup>, Elyas Ebrahimi Khoramabadi<sup>1</sup>,  
Kamal Ghasemi Bezdi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Assistant Professor, Dept. of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Torbat-e Jam, Iran,  
Email: r.tohidi@tjamcaas.ac.ir

<sup>2</sup>Associated Professor, Dept. of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

<sup>3</sup>Associated Professor, Dept. of Agricultural and Horticultural Research, Agricultural and Natural Resources Research and Education Center of Khorasan Razavi, Mashhad, Iran

### Article Info

**Article type:**  
Research Full Paper

**Article history:**  
Received: 07/03/2023  
Revised: 11/20/2023  
Accepted: 11/21/2023

**Keywords:**  
Candidate gene  
Fecundity  
Polymorphism  
Sheep

### Abstract

**Background and objectives:** Sheep are used as a genetic model to study the relationship between genetic diversity and ovulation rate. Previous studies have shown that ovulation rate and litter size can be controlled by a set of genes called fecundity genes (Fec). Three fertility genes have been identified in sheep called *BMPR1B* or *FecB*, *GDF9* or *FecG* and *BMP15* or *FecX*. Tetra-ARMS-PCR is a suitable alternative method in the context of expensive methods such as sequencing and PCR-RFLP to identify SNPs whose sequences are known. The entry of the Booroola allele into the Afshari breed increased the frequency of litter size. The aim of this study was to investigate the polymorphism of two fertility genes including *FecB* and *FecG* in Mughani, Afshari and Baluchi sheep in Khorasan Razavi province.

**Materials and methods:** Blood samples were taken from 95 Afshari, Baluchi and Mughani sheep. The samples were then stored at -20 °C until DNA extraction. Two pairs of control (outer) and specific (inner) primers were used to amplify *FecB* and *FecG* gene fragments by the Tetra-ARMS PCR method. Temperature cycling of PCR amplification for *FecB* started at 94°C for 4 minutes, followed by 35 cycles consisting of 94°C for 25 seconds, annealing temperature at 54°C for 35 seconds, extension at 72°C for 20 seconds and a final extension at 72°C for 5 minutes. For amplification of the G1 point mutation on the *FecG* gene, the annealing temperature was 54°C for 35 s, extension was 70°C for 40 s, and final extension was 70°C for 5 minutes. The PCR products were electrophoresed on a 2% agarose gel.

**Results:** Three genotypes have been observed for the *FecB* gene in Afshari sheep; wild homozygous (++), heterozygous (B+) and homozygous mutant (BB). All Mughani and Baluchi sheep were homozygous for this gene. A 108 bp band was detected for mutant homozygotes. A band of 213 bp was observed in wild homozygotes. The frequency of wild homozygotes was high in the three breeds, but the frequency of heterozygous animals in the Afshari breed was more than homozygous animals. The frequency of the wild allele in

---

this breed was 0.39 and that of the mutant allele 0.61, the overall frequencies for the three breeds being 0.8 and 0.2, respectively. The result of Tetra-ARMS-PCR for the G1 point mutation of the *GDF9* gene showed polymorphism in all three breeds, however, the frequency of wild homozygotes was high. In the Balochi breed, only two animals (4%) were heterozygous and 96% of the animals showed the wild homozygous genotype. In the Mughani breed, 16% were heterozygous and only one animal was homozygous mutant. In addition, only one heterozygote was observed in the Afshari breed. Several studies have shown the association of the *FecB*, *FecG* and *FecX* genes with litter size in sheep. Due to the high frequency of wild homozygotes and the fact that Mughani and Baluchi ewes mostly gave birth to single lambs, the role of *FecB* mutation in litter size of Afshari ewes was observed. The ram used in this herd was heterozygous for *FecB*. In general, it can be concluded that the mutant *FecB* allele has a correlation with litter size in Iranian sheep. However, the statistical confirmation of this issue requires a dedicated study with a detailed record of reproductive traits.

**Conclusion:** The results of this study demonstrated the presence of a Booroola mutation in the Afshari ewes that were offspring of heterozygous rams. In addition, all of these ewes had litter size in at least one of the two pregnancies. Hence, the Booroola mutation may potentially increase the litter size of ewes. However, a more comprehensive study measuring biological indicators such as sex hormone levels, ovulation rate and follicle size is needed to demonstrate the effect of these types of mutations on increasing fertility.

---

**Cite this article:** Tohidi, R., Javadmanesh, A., Ebrahimi Khoramabadi, E., Ghasemi Bezdi, K. (2023). Investigation on single nucleotide polymorphism of *BMPRI1B* and *GDF9* genes in Mughani, Afshari and Baluchi ewes. *Journal of Ruminant Research*, 12 (1), 69-84.



© The Author(s).

DOI: 10.22069/ejrr.2023.21516.1908

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

---

## بررسی چند شکلی تک نوکلئوتیدی واقع در ژن‌های کانیدیا *GDF9* و *BMP1B* و بلوچی میش‌های مغانی، افشاری و بلوچی

رضا توحیدی<sup>۱\*</sup>، علی جوادمش<sup>۲</sup>، الیاس ابراهیمی خرم‌آبادی<sup>۱</sup>، کمال قاسمی بزدی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup>استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و دامپروری، مجتمع آموزش عالی تربت جام  
<sup>۲</sup>دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

<sup>۳</sup>دانشیار بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، مشهد، رایانامه: [r.tohidi@tjamcaas.ac.ir](mailto:r.tohidi@tjamcaas.ac.ir)

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله:	سابقه و هدف: گوسفند، به‌عنوان یک مدل ژنتیکی برای مطالعه ارتباط بین تنوع ژنتیکی و میزان تخمک‌گذاری در تحقیقات پیشین مورد استفاده قرار گرفته است. مطالعات اخیر نشان داده است که تنوع در میزان تخمک‌گذاری و صفت چندقلوزایی می‌توانند توسط مجموعه ژن‌هایی به نام ژن‌های کنترل‌کننده باروری کنترل شوند. در این راستا، سه ژن عملکرد باروری به نام‌های <i>BMP1B</i> یا <i>Tetra</i> ، <i>GDF9</i> ، <i>FecB</i> یا <i>FecG</i> و <i>BMP15</i> یا <i>FecX</i> در گوسفند شناسایی شده‌اند. روش مولکولی -PCR ARMS یک جایگزین مناسب برای روش‌های پرهزینه مانند توالی‌یابی و PCR-RFLP در شناسایی اسنپ‌هایی است که توالی آن‌ها شناخته شده هستند. ورود آلل برولا به نژاد گوسفند افشاری کشور موارد چند تخمک‌گذاری را افزایش داد. هدف از مطالعه حاضر، بررسی چند شکلی دو ژن باروری شامل <i>FecB</i> و <i>FecG</i> در گوسفندان نژاد مغانی، افشاری و بلوچی خراسان رضوی و ارتباط آن‌ها با صفت چندقلوزایی بود.
مقاله کامل علمی - پژوهشی	
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۴/۱۲	
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۲/۸/۲۹	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۸/۳۰	
واژه‌های کلیدی:	
ژن کانیدیا	مواد و روش‌ها: نمونه‌های خون از مجموع، تعداد ۹۵ رأس گوسفند افشاری، بلوچی و مغانی از طریق ورید وداجی اخذ شد. سپس، نمونه‌های خون تا زمان استخراج DNA در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. دو جفت آغازگر کنترل (خارجی) و اختصاصی (داخلی) برای تکثیر قطعات ژن‌های <i>FecB</i> و <i>FecG</i> در روش Tetra-ARMS PCR مورد استفاده قرار گرفتند. برنامه دمایی برای تکثیر قطعات ژن <i>FecB</i> به صورت واسرشت سازی اولیه در ۹۴ °C به مدت ۴ دقیقه، سپس، ۳۵ چرخه دمایی به ترتیب ۹۴ °C به مدت ۲۵ ثانیه، دمای اتصال در ۵۴ °C به مدت ۳۵ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ °C به مدت ۲۰ ثانیه و بسط نهایی در ۷۲ °C به مدت ۵ دقیقه انجام شد. برای تکثیر قطعات ژن <i>FecG</i> از دمای اتصال ۵۴ °C به مدت ۳۵ ثانیه، بسط در دمای ۷۰ °C به مدت ۴۰ ثانیه و دمای بسط نهایی ۷۰ °C به مدت ۵ دقیقه استفاده شد. محصولات PCR با ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شدند.
باروری	
چندشکلی	
گوسفند	
یافته‌ها:	
	در بررسی نتایج به‌دست آمده، سه ژنوتیپ برای ژن <i>FecB</i> در گوسفند افشاری شامل هموزیگوت وحشی، هتروزیگوت و هموزیگوت جهش‌یافته مشاهده شدند. همه گوسفندان بلوچی و گوسفند مغانی برای این ژن هموزیگوت وحشی بودند. یک بانده ۱۰۸ جفت بازی

برای هموزیگوت جهش یافته و یک باندها ۲۱۳ جفت بازی برای هموزیگوت وحشی مشاهده شد. فراوانی ژنوتیپ هموزیگوت وحشی برای سه نژاد گوسفند فوق الذکر بالا بود اما، فراوانی ژنوتیپ هتروزیگوتها در نژاد افشاری زیاد بود. فراوانی آلل وحشی در این نژاد ۰/۳۹ و فراوانی آلل جهش یافته ۰/۶۱ بود، در مجموع، برای سه نژاد به ترتیب ۰/۸ و ۰/۲ اندازه گیری شد. نتیجه PCR Tetra-ARMS برای جهش نقطه ای G1 در جایگاه *GDF9* برای همه نژادها چندشکلی نشان داد. هرچند، فراوانی هموزیگوت وحشی بالا بود. برای نژاد گوسفند بلوچی فقط چهار درصد از حیوانات ژنوتیپ هتروزیگوت داشتند و ۹۶ درصد حیوانات ژنوتیپ وحشی را نشان دادند. برای نژاد گوسفند مغانی ۱۶ درصد ژنوتیپ هتروزیگوت را نشان دادند و فقط چهار درصد از حیوانات ژنوتیپ هموزیگوت جهش یافته داشتند. همچنین، تنها یک ژنوتیپ هتروزیگوت در نژاد افشاری مشاهده شد. مطالعات متعددی ارتباط بین ژنهای *FecB*، *FecX* و *FecG* را با چندقلوزایی در گوسفند نشان داده است. به دلیل فراوانی بالای هموزیگوت وحشی و این حقیقت که میش های بلوچی و مغانی عمدتاً، تک قلوزا بودند، نقش جهش *FecB* در چندقلوزایی گوسفند افشاری می تواند قابل توجه باشد. قوچ مورد استفاده در این گله هتروزیگوت بود. به طور کلی، می توان نتیجه گرفت که آلل جهش یافته *FecB* با چندقلوزایی گوسفندان ایرانی ارتباط دارد. هرچند، تأیید آماری این موضوع نیاز به یک مطالعه اختصاصی همراه با ثبت دقیق رکورد صفات تولیدمثلی دارد.

**نتیجه گیری:** نتایج این مطالعه چندشکلی آلل برولا در میش های افشاری که فرزندان یک قوچ ژنوتیپ هتروزیگوت بودند را نشان داد. همچنین، کل این میش ها در شکم اول و ۵۰ درصد آنها در شکم دوم چند قلوزا بودند. بنابراین، جهش برولا ممکن است باعث چندقلوزایی در میش ها شود. هرچند، تأیید ارتباط چندشکلی های ژنی مرتبط با افزایش باروری و چندقلوزایی نیاز به مطالعه جامع تری به همراه اندازه گیری شاخص هایی مانند غلظت هورمون های جنسی، میزان تخمک گذاری و اندازه فولیکولها دارد.

استناد: توحیدی، ر.، جوادمنش، ع.، ابراهیمی خرم آبادی، ا.، قاسمی بزدی، ک. (۱۴۰۳). بررسی چندشکلی تک نوکلئوتیدی واقع در ژنهای کاندیدا *BMPRI1* و *GDF9* میش های مغانی، افشاری و بلوچی. پژوهش در نشخوارکنندگان، ۱۲(۱)، ۸۴-۶۹.

DOI: 10.22069/ejrr.2023.21516.1908



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

## مقدمه

جمعیت جهان رشد زیادی داشته است و بر اساس پیش‌بینی سازمان ملل تا سال ۲۰۵۰ به ۹/۷ میلیارد می‌رسد (UN, 2019). به دنبال رشد جمعیت، نیازهای غذایی و پروتئینی آن نیز افزایش می‌یابد. گوسفند، یکی از منابع اصلی تأمین گوشت دنیاست. توانایی گوسفند برای زندگی در آب‌وهوای مختلف و تنوع علوفه مصرفی با کیفیت متفاوت و همچنین، چرا در مراتع و استفاده از پس چر مزارع باعث شده که این‌گونه پراکنش جغرافیایی زیادی داشته باشد (Najafabadi, 2019). افزایش بازدهی اقتصادی پرورش گوسفند وابسته به افزایش بازدهی تولیدمثلی است (Pourtahmasebian Ahrabi و همکاران، ۲۰۲۰). مهم‌ترین منبع درآمد پرورش‌دهندگان گوسفند از فروش بره‌های از شیر گرفته شده است که تابعی از میزان آبستنی گله، چندقلوزایی و زنده‌مانی بره‌هاست (Farrell و همکاران، ۲۰۲۲).

جهش‌های ژنی در جایگاه‌های ژنی بزرگ اثر مرتبط با باروری و تولیدمثل، از عوامل مؤثر بر چندقلوزایی گوسفندان هستند (Li و همکاران، ۲۰۲۱). از گوسفند به‌عنوان، مدل ژنتیکی مطالعه ارتباط تنوع ژنتیکی با تخمک‌گذاری استفاده می‌شود (Montgomery و همکاران، ۲۰۰۱). در سال ۱۹۸۰ ژن برولا<sup>۱</sup> به‌عنوان، اولین ژنی شناسایی شد که با باروری گوسفندان ارتباط داشت. پس‌از آن مطالعات نشان دادند که میزان تخمک‌گذاری و چندقلوزایی می‌تواند توسط مجموعه‌ای از ژن‌ها تحت عنوان، ژن‌های باروری کنترل شود (Polley و همکاران، ۲۰۱۰؛ Gholizadeh و Esmaeili-Fard، ۲۰۲۲). سه ژن مرتبط با باروری بانام‌های *BMP1B* یا *FecB* روی کروموزوم ۶، *GDF9* یا *FecG* روی کروموزوم ۵ و *BMP15* یا *FecX* روی کروموزوم جنسی X در

گوسفند شناسایی شده‌اند (Galloway و همکاران، ۲۰۰۰؛ Souza و همکاران، ۲۰۰۱؛ Hanrahan و همکاران، ۲۰۰۴). برای ژن *FecB* سه ژنوتیپ هموزیگوت وحشی، هتروزیگوت و هموزیگوت موتانت گزارش شده است (Davis و همکاران، ۱۹۸۲). آلل جهش‌یافته برولا، روی میزان تخمک‌گذاری اثر افزایشی داشت (Souza و همکاران، ۲۰۰۱). هرچند، جهش‌های ژن *FecX* و *FecG* در حالت هتروزیگوت باعث افزایش تخمک‌گذاری شده‌اند ولی حیوانات حاوی ژنوتیپ هموزیگوت ناقل عقیم بودند (Hanrahan و همکاران، ۲۰۰۴؛ Bodin و همکاران، ۲۰۰۷). میش‌های اینوردیل<sup>۲</sup> که برای دو ژن *BMP15* و *FecB* هتروزیگوت بودند به‌طور متوسط ۲۶٪ میزان تخمک‌گذاری بالاتری نسبت به ژنوتیپ هموزیگوت وحشی نشان دادند (Davis و همکاران، ۱۹۹۹). همه ژن‌های باروری جزو خانواده ژنی *TGFβ* هستند (Fabre و همکاران، ۲۰۰۶؛ Chong و همکاران، ۲۰۱۹). علاوه بر این جهش‌ها، جهش وابسته به کروموزوم X در میش‌های وودلندز<sup>۳</sup> شناسایی شده است. میزان تخمک‌گذاری و چندقلوزایی در حیوانات ژنوتیپ هتروزیگوت و ژنوتیپ هموزیگوت موتانت بیشتر از هموزیگوت وحشی بوده است (Davis و همکاران، ۲۰۰۱ و ۲۰۰۵). گوسفندانی که برای چند ژن هتروزیگوت می‌شوند ممکن است اثرات افزایشی زیادی در میزان تخمک‌گذاری نشان دهند.

بررسی وجود چندشکلی نوکلئوتیدی ژن‌های باروری در گوسفندان ایران با روش‌های مختلفی شامل PCR-RFLP، PCR-SSCP، توالی‌یابی و PCR Tetra-ARMS انجام شده است (Qanbarii و همکاران، ۲۰۰۹؛ Eghbal Saeid و همکاران، ۲۰۱۰؛

<sup>2</sup> Inverdale

<sup>3</sup> Woodlands

<sup>1</sup> Booroola

تخمک‌گذاری شد (Eghbalsaid و همکاران، ۲۰۱۲؛ Gholipour و همکاران، ۲۰۱۶). در حال حاضر، این نژاد در استان خراسان رضوی پرورش داده می‌شود و تحت عنوان افشاری با ژنوتیپ هترو یا همو در میان دامداران معروف است. هدف از این مطالعه بررسی چندشکلی ژن‌های باروری شامل *FecB* و *FecG* در گوسفندان نژاد مغانی، افشاری و بلوچی استان خراسان رضوی بود.

### مواد و روش‌ها

نمونه خون از مجموع تعداد ۹۵ رأس گوسفند نژاد افشاری، بلوچی و مغانی (به ترتیب، ۲۰، ۵۰ و ۲۵ رأس) شامل تنها یک قوچ در نژاد افشاری به دست آمد. میش‌های بلوچی به‌طور تصادفی از ایستگاه دام‌پروری دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد انتخاب شدند. میش‌های انتخاب‌شده دارای حداکثر سن پنج سال و چهار شکم زایش بودند. گوسفندان نژاد افشاری و مغانی از دامداری‌های روستایی شهرستان تربت‌جام انتخاب شدند. سن میش‌ها حداکثر چهار سال و سه شکم زایش بودند. دامداران در جلوگیری از آمیخته شدن گله‌ها مراقبت داشتند و خصوصیات فنوتیپی گوسفندان را کنترل می‌کردند. حدود ۱۰ میلی‌لیتر خون از سیاهرگ و داج درون تیوب خلأ حاوی EDTA اخذ شد و نمونه‌ها تا زمان استخراج DNA در ۲۰ °C - نگهداری شدند. استخراج DNA با استفاده از کیت تجاری سیناکلون® مطابق دستور سازنده انجام شد. جهت تعیین کمیت و کیفیت DNA از ژل آگارز ۰/۸٪ استفاده شد.

جهت تکثیر قطعات ژن‌های *FecB* و *FecG* با روش Tetra-ARMS PCR دو جفت آغازگر کنترل و اختصاصی مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱). آغازگرها توسط شرکت سیناکلون تهیه شدند. در روش Tetra-ARMS PCR هر دو آل وحشی و موتانت و

Gholipour و همکاران، ۲۰۱۶؛ Khanahmadi و همکاران، ۲۰۱۶؛ Mohammadi و همکاران، ۲۰۲۲). مطالعه ۷۴ میش افشاری دانشگاه زنجان با روش PCR-RFLP وجود آلل موتانت در *FecB* را نشان داد (Qanbarii و همکاران، ۲۰۰۹). هرچند، وجود جهش نقطه‌ای در اگزون ۲ ژن *GDF9* آمیخته‌های لری بختیاری با روش PCR-SSCP گزارش شد (Khodabakhshzadeh و همکاران، ۲۰۱۴). روش PCR Tetra-ARMS جایگزین مناسبی برای روش‌های پرهزینه توالی‌یابی و PCR-RFLP در شناسایی SNP‌هایی است که نوع آن‌ها شناخته‌شده باشد. در این روش دو جفت پرایمر در یک تیوب PCR به‌طور هم‌زمان یک قطعه کنترل داخلی و قطعه شامل آلل جهش‌یافته و یا نرمال را تکثیر می‌کنند؛ بنابراین، نیازی به استفاده از آنزیم و یا توالی‌یابی قطعه تکثیرشده نیست (Ahlawat و همکاران، ۲۰۱۴). شناسایی چندشکلی ژن *FecB* در گوسفندان افشاری خراسان رضوی با استفاده از این روش وجود آلل موتانت را نشان داد (Mohammadi و همکاران، ۲۰۲۲). با توجه به ارزان بودن این روش می‌توان از آن برای شناسایی آلل برولا در گوسفندان ایرانی استفاده کرد.

در سالهای اخیر، دام‌پروران استان خراسان رضوی، نژادهای مختلف گوسفند را مانند عربی، بلوچی، افشاری و مغانی نگهداری می‌کنند. با توجه به سیستم پرورش سنتی و عشایری و هم‌جواری با افغانستان، عمده گوسفندان منطقه خالص نیستند. نژاد بلوچی از دوقلوهای مناسبی برخوردار است و همچنین پراکندگی زیادی در شرق کشور دارد (Esmail, 2007). گوسفند نژاد افشاری از نژادهای سنگین در استان زنجان است که تولید شیر مناسب و درصد دوقلوهای پایینی دارد (Qanbarii و همکاران، ۲۰۰۹). ورود آلل برولا به این نژاد باعث افزایش چند

قطعات حاوی آلل وحشی یا جهش یافته به دلیل ایجاد عمدی یک باز برای ایجاد عدم انطباق آغازگر در موقعیت ۲- از انتهای ۳' است. به این صورت اگر انتهای پرایمر اختصاصی با نقطه جهش منطبق نباشد، به دلیل وجود دو باز غیر منطبق کنار هم، تکثیر صورت نخواهد گرفت (Mohammadi و همکاران، ۲۰۲۲).

یک قطعه کنترل با هم در یک واکنش می‌توانند تکثیر شوند. ناحیه‌ای که در کنار منطقه وقوع جهش قرار گرفته است توسط دو آغازگر مشترک یا خارجی تکثیر می‌شود. دو آغازگر آللی خاص به‌طور هم‌زمان آلل‌های وحشی و یا جهش یافته را تکثیر می‌کنند. دو قطعه حاوی جهش اندازه‌های متفاوت دارند (Polley و همکاران، ۲۰۱۰). تکثیر اختصاصی و قابل اعتماد

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورداستفاده در تکثیر آلل‌های *FecB* و *FecG*

Table 1- Oligonucleotide sequences for allele specific amplification of *FecB* and *FecG* genes

نام ژن	نام آغازگر	توالی آغازگر	شماره دسترسی
Gene	Primer name	Primer sequence	Accession No.
<i>FecB</i>	Outer-F	ACGCACTAACAGTGTGTTGG	AY242067
	Outer-R	GAGAGGAAAGCTAGGAAACCCTG	
	Inner-F	GGTTCCGAGAGACAGAAATATATGG	
	Inner-R	CATGCCTCATCAACACCGTTT	
<i>FecG</i>	Outer-F	GCCTGGCTCTGTTTTCCTATTAGCCTTG	AF078545
	Outer-R	TCTTCTTCCCTCCACCCATTAACCAATC	
	Inner-F	CTGCAGCCAGATGACAGAGCTTTTCA	
	Inner-R	CGTATGCCTTATAGAGCCTTTCATGTCGC	

Outer: کنترل، Inner: اختصاصی

RFLP نیز استفاده شد. آغازگر مورداستفاده در جدول ۲ نشان داده شده است. برنامه دمایی مورداستفاده برای تکثیر ژن *FecB* شش بیه روش Tetra-ARMS PCR بود و فقط دمای اتصال  $58^{\circ}\text{C}$  در نظر گرفته شد. آنزیم مورداستفاده برای هضم محصول PCR، *AvaII* بود. محصول PCR به مدت ۴ ساعت و دمای  $37^{\circ}\text{C}$  در معرض آنزیم بود. محصولات هضم آنزیمی با ژل آگارز ۳ درصد الکتروفورز شدند. اگر آلل جهش یافته وجود داشته باشد قطعه ۱۹۰ جفت بازی محصول PCR به قطعات ۱۳۰ و ۶۰ جفت بازی شکسته می‌شود. پارامترهای ژنتیکی جمعیت با برنامه GenAIEx v. 6.503 برآورد شدند. همچنین، اختلاف بین فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده و مورد انتظار با روش کای مربع آزمون شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، در یک حجم ۱۰ میکرولیتر حاوی ۵۰ تا ۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۱۰ پیکومول از هر آغازگر، ۵ میکرولیتر PCR مستر میکس (سیناکلون) و آب مقطر انجام گرفت. برنامه دمایی برای تکثیر قطعات ژن *FecB* به صورت واسرشت سازی اولیه در  $94^{\circ}\text{C}$  به مدت ۴ دقیقه، سپس، ۳۵ چرخه دمایی به ترتیب  $94^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲۵ ثانیه، دمای اتصال در  $54^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳۵ ثانیه، بسط در دمای  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲۰ ثانیه و بسط نهایی در  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ۵ دقیقه انجام شد. برای تکثیر قطعات ژن *FecG* از دمای اتصال  $54^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳۵ ثانیه، بسط در دمای  $70^{\circ}\text{C}$  به مدت ۴۰ ثانیه و دمای بسط نهایی  $70^{\circ}\text{C}$  به مدت ۵ دقیقه استفاده شد. برای تایید چندشکلی ژن *FecB* از روش PCR-

جدول ۲- آغازگرهای مورد استفاده در واکنش PCR-RFLP برای ژن *FecB*

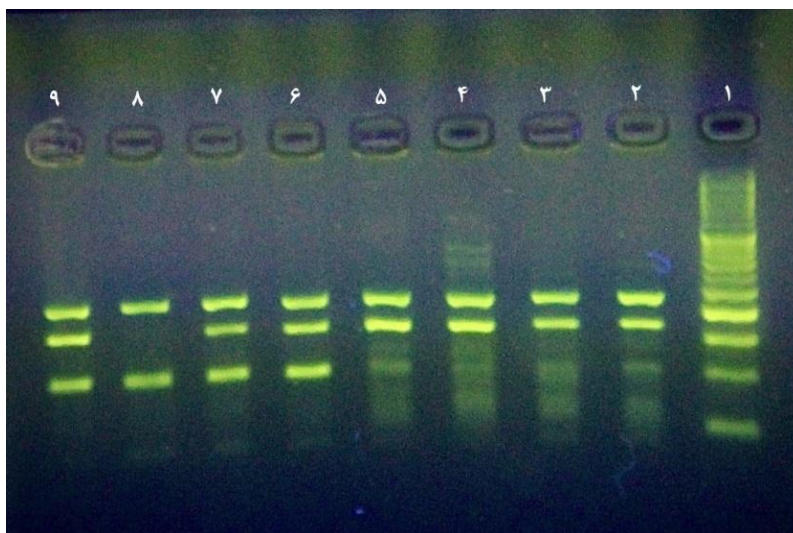
Table 2- Primers used in PCR-RFLP for *FecB*

نام پرایمرها Primer name	توالی Sequence	طول قطعه Product size
<i>FecB</i> -F	CCAGAGGACAATAGCAAAGCAAA	190 bp
<i>FecB</i> -R	CAAGATGTTTTTCATGCCTCATGAACACGGTC	

### نتایج و بحث

هر دو ژن مورد مطالعه با موفقیت تکثیر و باندهای مورد انتظار آشکار شدند (شکل ۱ و ۲). برای ژن *FecB* در گوسفند افشاری، سه ژنوتیپ هموزیگوت وحشی (۴۰٪)، هتروزیگوت (۵۰٪) و ژنوتیپ هموزیگوت موتانت (۱۰٪) مشاهده شد. تمام گوسفندان مغانی و بلوچی برای این ژن هموزیگوت وحشی بودند. هموزیگوت‌های موتانت دارای یک باند ۱۰۸ جفت بازی بودند. یک باند ۲۱۳ جفت بازی برای هموزیگوت‌های وحشی مشاهده شد. فراوانی آلی و

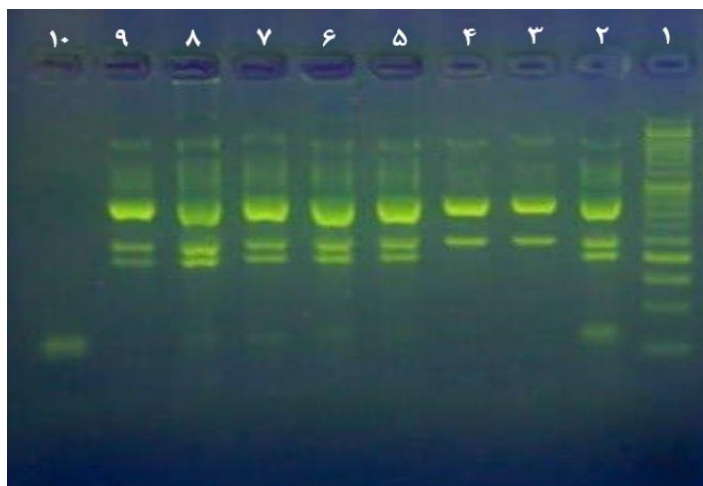
ژنوتیپی ژن *FecB* در جدول ۳ نشان داده شده است. فراوانی هموزیگوت وحشی برای سه نژاد مورد مطالعه زیاد بود ولی، در نژاد افشاری فراوانی هتروزیگوت‌ها نیز قابل توجه بود. فراوانی آل وحشی در این نژاد ۰/۳۹ و آل موتانت ۰/۶۱ و در مجموع برای سه نژاد به ترتیب ۰/۸ و ۰/۲ بود. نتیجه هضم آنزیمی محصولات PCR ژن *FecB* وجود جهش ژنی را تأیید کرد (شکل ۳). اندازه قطعه فاقد آل موتانت ۱۹۰ جفت باز بود در حالی که وجود جهش باعث هضم قطعه PCR به دو قطعه ۱۶۰ و ۳۰ جفت بازی شد.



شکل ۱- الکتروفورز آگارز (۲٪) محصولات PCR ژن *FecB* با روش Tetra-ARMS (شماره ۱: لدر ۵۰ bp، شماره‌های ۲، ۳، ۴ و ۵ شامل آل وحشی، شماره‌های ۶ و ۷ و ۹ هتروزیگوت و شماره ۸ هموزیگوت موتانت هستند)

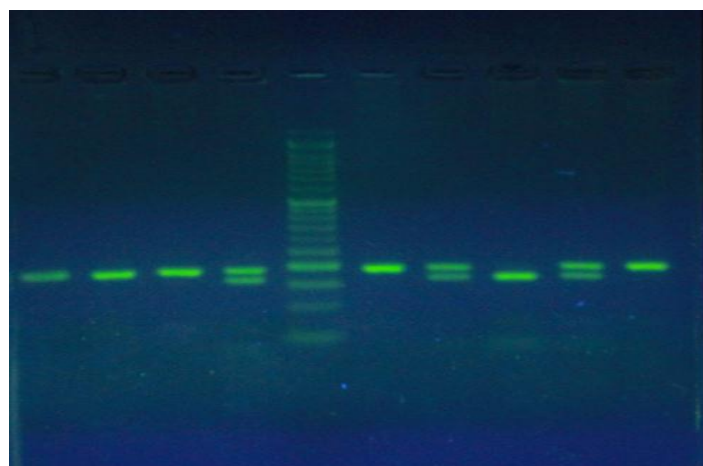
Figure 1- Agarose gel electrophoresis (2%) of polymerase chain reaction (PCR) product of tetra-arms method for *FecB* gene (No. 1 is a 50 bp ladder; No. 2, 3, 4 and 5 include wild allele and No. 6, 7 and 9 are heterozygote, and No. 8 is homozygote mutant)





شکل ۲- الکتروفورز آگارز محصولات PCR ژن *FecG* در ناحیه G1 با روش Tetra-ARMS (شماره ۱: لدر ۵۰ bp، شماره‌های ۳ و ۴ شامل آلل موتانت و باقی نمونه‌ها هتروزیگوت هستند)

Figure 2- Agarose gel electrophoresis (2%) of polymerase chain reaction (PCR) product of tetra-Arms method for G1 locus of *FecG* gene (No. 1 is 50 bp ladder, No. 3 and 4 include mutant allele and the rest samples are heterozygote)



شکل ۳- الکتروفورز آگارز هضم آنزیمی محصولات PCR ژن *FecB* (از چپ به راست نمونه‌های شماره ۱، ۲، ۳، ۴ و ۱۰ فاقد ژن وحشی)، نمونه‌های ۴، ۷ و ۹ هتروزیگوت، شماره ۸ هموزایگوت و شماره ۵ لدر ۵۰bp می‌باشد)

Figure 3- Agarose gel electrophoresis (2%) of PCR-RFLP products for *FecB* gene (from left to right lanes 1, 2, 3, 4 and 10 include wild allele; lanes 4, 7 and 9 are heterozygote; lane 8 is homozygote mutant and the lane 5 is 50 bp ladder)

فقط یک حیوان ژنوتیپ هموزیگوت موتانت را نشان داد. همچنین، تنها یک هتروزیگوت برای این ژن در نژاد گوسفند افشاری مشاهده شد. تجزیه و تحلیل آماری نتایج نشان داد که فراوانی ژنوتیپ‌ها بین نژادها تفاوت معنی‌دار ( $P < 0.01$ ) داشتند. هرچند، اختلاف معنی‌داری بین فراوانی مشاهده‌شده و مورد انتظار ژنوتیپ‌ها برای جایگاه *FecB* درون گله افشاری مشاهده نشد.

نتیجه PCR Tetra-ARMS برای ژن *GDF9* در هر سه نژاد چندشکلی نشان داد هرچند، فراوانی ژنوتیپ هموزیگوت وحشی زیاد بود (جدول ۳). طول قطعات شامل آلل وحشی و موتانت به ترتیب، ۲۵۴ و ۱۵۶ جفت باز بود. برای نژاد گوسفند بلوچی تنها دو حیوان (۴٪) هتروزیگوت بودند و ۹۶٪ حیوانات ژنوتیپ هموزیگوت وحشی را نشان دادند. در نژاد گوسفند مغانی نیز ۱۶٪ هتروزیگوت بودند و

جدول ۳- فراوانی آلی و ژنوتیپی در گوسفندان مورد مطالعه

Table 3- Allelic and genotypic frequency in the sheep populations

جمعیت (تعداد) Population (size)	ژن Gene	فراوانی آلی Allele frequency		فراوانی ژنوتیپی Genotypic frequency		
		+	B	++	B+	BB
مغانی (۲۵) Moghani (25)	<i>FecB</i>	1	0	1	0	0
افشاری (۲۰) Afshari (20)		0.65	0.35	0.4	0.5	0.1
بلوچی (۵۰) Balouchi (50)		1	0	1	0	0
کل (۹۵) Total (95)		0.93	0.07	0.87	0.11	0.02
		+	G	++	G+	GG
مغانی (۲۵) Moghani (25)	<i>FecG</i>	0.88	0.12	0.8	0.16	0.04
افشاری (۲۰) Afshari (20)		0.975	0.025	0.95	0.05	0
بلوچی (۵۰) Balouchi (50)		0.98	0.02	0.96	0.04	0
کل (۹۵) Total (95)		0.95	0.05	0.92	0.07	0.01

آل موتات G و B؛ آل وحشی +

گزارش شد (Vajed Ebrahimi و همکاران، ۲۰۱۷). این شاخص‌ها برای جایگاه ژنی *BMP15* در آمیخته‌های گوسفند کرمانی با رومانوف به ترتیب ۲/۷۸، ۰/۶۴ و ۱/۲۸ بود (Rajaei Nejad و همکاران، ۲۰۲۰). مقایسه این نتایج نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی در گوسفندان ایرانی نسبتاً زیاد است هرچند، تنوع ژنتیکی جایگاه‌های ژنی صفت باروری پایین است مگر آن که آل‌های موتات در اثر آمیخته‌گری به گله وارد شده باشند.

جدول ۴ شاخص‌های تنوع ژنتیکی را نشان می‌دهد. تعداد آل مؤثر، مقدار هتروزیگوسیتی مورد انتظار و شاخص تنوع ژنتیکی شانون برای هر دو جایگاه ژنی مورد مطالعه در کل جمعیت به ترتیب ۱/۲۰، ۰/۱۳ و ۰/۲۱ بود. این مقادیر برای ژن *FecB* در نژاد افشاری به ترتیب ۱/۸۴، ۰/۴۶ و ۰/۶۵ محاسبه شد. شاخص‌های تنوع ژنتیکی فوق برای ۱۴ نژاد گوسفند ایرانی بر اساس مارکرهای ریزماهوره به ترتیب ۱۰/۳ - ۳/۲۶، ۰/۸۸ - ۰/۷۵ و ۲/۴۷ - ۱/۵۸

جدول ۴- شاخص‌های تنوع ژنتیکی در گوسفندان مورد مطالعه

Table 4- Genetic diversity indices in the sheep populations

جمعیت Population	جایگاه ژنی Locus	اندازه مؤثر آلی Ne	شاخص تنوع شانون I	هتروزیگوسیت مشاهده شده Ho	هتروزیگوسیت مورد انتظار He
مغانی Moghani	<i>FecB</i>	1	0	0	0
	<i>FecG</i>	1.268	0.367	0.16	0.211
افشاری Afshari	<i>FecB</i>	1.835	0.647	0.5	0.455
	<i>FecG</i>	1.051	0.117	0.05	0.049
بلوچی Balouchi	<i>FecB</i>	1	0	0	0
	<i>FecG</i>	1.041	0.098	0.04	0.039
کل Total		1.199	0.205	0.125	0.126

این امکان وجود دارد که انتقال این آلل به گله‌های با چندقلوزایی پایین باعث بهبود چندقلوزایی در گوسفندان شود. هرچند، نتیجه‌گیری صحیح‌تر نیاز به مطالعه در سطح هورمونی و تخمدانی دارد و این مطالعات حداقل در دو نسل متوالی ادامه یابد. قابلیت چندقلوزایی گوسفندان حاوی جهش برولا در نژاد گوسفندان نژاد هو<sup>۱</sup> در چین گزارش شده است (Guan و همکاران، ۲۰۰۷). گوسفندان این نژاد شدیداً، چندقلوزا هستند و برای ژن *FecB* هموزیگوت موتانت گزارش شده‌اند. چندشکلی تک نوکلئوتیدی در ناحیه ایترونی و اگزونی *GDF9* بهمایی و لک قشقای با استفاده از توالی یابی سنجر گزارش شده است. هرچند، ارتباطی بین اسنیپ‌ها و چندقلوزایی میش‌ها در آن مطالعه مشاهده نشد. جایگزینی باز نوکلئوتیدی آدینین با باز گوانین در ناحیه ایترونی ژن *GDF9* گوسفند بهمایی برای اولین بار گزارش شده بود (Muhaghegh و Dolatabady، ۲۰۱۹). همچنین، جهش مشاهده‌شده در ناحیه اگزون ۲ با گزارش Hanrahan و همکاران (۲۰۰۴) مطابقت داشت. در مطالعه حاضر نیز چندشکلی مشاهده‌شده در ژن *FecG* مشابه گزارشات مذکور بود. جهش ژن *FecB* در گوسفندان رامنی باعث افزایش میزان تخمک‌گذاری میش‌ها شد. هرچند، وجود جهش‌های دیگری در ژن *GDF9* و جهش وابسته به *X* تأثیر افزایشی در میزان تخمک‌گذاری نشان دادند (McNatty و همکاران، ۲۰۱۷).

وجود جهش G/A در ژن *FecB* باعث هضم آنزیمی قطعه تکثیر یافته توسط آنزیم *AvaII* شد که قطعه ۱۹۰ جفت بازی به دو قطعه ۱۶۰ و ۳۰ جفت بازی شکسته شد. هرچند، فراوانی جهش‌ها زیاد نبود. در مطالعه Savar sofla و همکاران (۲۰۱۵) روی گوسفند مغانی نیز جهش برولا مشاهده نشد که با

روش‌های مختلفی برای شناسایی چندشکلی‌های ژنتیکی وجود دارند. بعضی از این روش‌ها مانند تکنیک RAPD نیازی به اطلاعات اولیه توالی نوکلئوتیدی ندارند ولی روش‌هایی مانند PCR-RFLP نیاز به اطلاعات اولیه توالی مورد مطالعه دارند (Polley و همکاران، ۲۰۱۰). روش Tetra-ARMS PCR (Newton و همکاران، ۱۹۸۹) یک روش ساده و ارزان برای شناسایی هم‌زمان آلل‌های وحشی و موتانت بدون نیاز به آنزیم یا توالی‌یابی است. در مطالعه حاضر استفاده از این روش برای شناسایی آلل موتانت *FecB* و *FecG* در گوسفندان مورد مطالعه موفق بود. مطالعات متعددی ارتباط ژن‌های *FecB*، *FecG* و *FecX* را با چندقلوزایی در گوسفند نشان داده است (Polley و همکاران، ۲۰۱۰؛ Kumar و همکاران، ۲۰۱۷). افزایش چندقلوزایی و میزان تخمک‌گذاری با افزایش تعداد جهش‌ها در ژن *FecB* همبستگی دارد (Fabre و همکاران، ۲۰۰۶). گوسفندان مورد استفاده در مطالعه حاضر به‌طور کلی دارای ژنوتیپ وحشی بودند و به‌جز میش‌های افشاری، میش‌های دو نژاد دیگر عمدتاً، تک‌قلوزا بودند. کل میش‌های مغانی و ۸۴ درصد از میش‌های بلوچی تک‌قلوزا بودند. همچنین، میش‌های بلوچی که چندقلوزایی داشتند برای ژن‌های مورد مطالعه دارای ژنوتیپ هموزیگوت وحشی بودند. کل میش‌های افشاری نیز در شکم اول و ۵۰ درصد آن‌ها در شکم دوم، چند قلوزا بودند. فوج مورد استفاده در گله افشاری برای *FecB* از نوع ژنوتیپ هتروزیگوت بود که با نتیجه Tetra-ARMS PCR مطابقت داشت. فراوانی ژنوتیپ‌های هتروزیگوت و هموزیگوت موتانت زیاد بود. در حالی که ژن *FecG* در هیچ‌یک از نژادها چندشکلی زیادی نشان نداد. به‌طور کلی، می‌توان چنین نتیجه گرفت که آلل موتانت *FecB* می‌تواند با چندقلوزایی در گوسفندان ایرانی ارتباط داشته باشد.

<sup>1</sup> Hu

۲۰۱۳؛ Khanahmadi و همکاران، ۲۰۱۶)؛ بنابراین، مطالعات جامع‌تری برای تأیید اثر جهش‌ها بر چندقلوزایی موردنیاز است.

### نتیجه‌گیری کلی

نتایج این مطالعه، چندشکلی ژن برولا را در میش‌های افشاری نشان داد. همچنین، در میش‌های مذکور دوقلوزایی مشاهده شد. هرچند، برای ژن *GDF9* هموزیگوت وحشی بودند. دو نژاد دیگر نیز برای ژن *FecB* جهش نداشتند و فقط تعداد چهار رأس از میش‌های مغانی برای ژن *FecG* ژنوتیپ هتروزیگوت و یک رأس ژنوتیپ هموزیگوت موتانت بود. نتایج مشابهی نیز برای نژادهای دیگر گوسفندان ایران وجود داشت. جهش‌های ژنی در جایگاه‌های مرتبط با باروری ممکن است باعث افزایش چند تخمک‌گذاری و چندقلوزایی شوند. هرچند، دو نکته قابل توجه است. اول آن‌که بیشتر مطالعات در گله‌های مردمی انجام شده است و رکوردها قابل اعتماد نیستند و نکته دوم این‌که انتقال آلل برولا به نژاد افشاری موجب افزایش چندقلوزایی شده است؛ بنابراین، مطالعه جامع‌تری با اندازه‌گیری شاخص‌های بیولوژیکی مانند غلظت هورمون‌های جنسی، میزان تخمک‌گذاری و اندازه فولیکول‌ها برای اثبات تأثیر این نوع جهش‌ها در افزایش باروری ضرورت دارد. در مطالعات آینده پیشنهاد می‌شود نژادهای عمدتاً تک قلوزا به‌عنوان مدل حیوانی مورداستفاده قرار گیرند و با انتقال آلل برولا و همچنین سایر آلل‌های جهش‌یافته به آن نژاد مقایسه اثرات بیولوژیکی جهش‌ها انجام پذیرد.

### تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی مجتمع آموزش عالی تربت‌جام با کد TP140010 انجام شده است.

نتایج تحقیقات Ghaffari و همکاران (۲۰۰۹) روی گوسفندان شال مطابقت داشت.

بررسی وضعیت چندشکلی ژن *FecG* در نقطه جهش G1 گوسفندان مصری هر سه نوع ژنوتیپ را نشان داد درحالی‌که فراوانی آلل موتانت بسیار پایین و حدود ۰/۰۱۵ بود (Aboelhassan و همکاران، ۲۰۲۱). در مطالعه مذکور میش‌های هتروزیگوت نسبت به هموزیگوت وحشی کاهش باروری نشان دادند. هرچند، میش‌های هتروزیگوت برای جهش G4 دارای میانگین بره‌زایی و چندقلوزایی بالایی نسبت به هموزیگوت وحشی بودند. میش‌های هتروزیگوت نژاد بلکلر<sup>۱</sup> و کمبریج در نقطه جهش G8 باروری بیشتری نسبت به هموزیگوت‌های وحشی نشان دادند (Hanrahan و همکاران، ۲۰۰۴). مطالعه چندشکلی نقطه جهش G1 در گوسفندان مغانی و قزل نشان داد که میش‌های هتروزیگوت باروری بیشتری نسبت به هموزیگوت وحشی داشتند. هرچند، پنج میش از ۷۹ میش مورد مطالعه هموزیگوت وحشی و چندقلوزا بودند (Barzegari و همکاران، ۲۰۰۹). بررسی Moradband و همکاران (۲۰۱۱) روی گوسفند بلوچی وجود جهش در جایگاه *FecB* را نشان نداد ولی چندشکلی در نقطه جهش G1 ژن *FecG* وجود داشت. در آن مطالعه میزان دوقلوزایی میش‌های هتروزیگوت و هموزیگوت وحشی تفاوت معنی‌داری نداشت ولی چندقلوزایی هر دو گروه ژنوتیپی از میش‌های هموزیگوت موتانت بیشتر بود. هرچند، فراوانی هموزیگوت‌های موتانت ۰/۰۸ بود. جهش برولا و یا جهش در جایگاه *FecG* می‌تواند باعث افزایش چندقلوزایی باشد. هرچند، در برخی گوسفندان ایرانی چندقلوزایی مشاهده شده است درحالی‌که برای جایگاه‌های ژنی مورد بررسی هموزیگوت وحشی بودند (Shafieiyan و همکاران،

<sup>1</sup> Belclare

### منابع

- Aboelhassan, D.M., Darwish, A.M., Ali, N.I., Ghaly, I.S. & Farag, I.M. (2021). A study on mutation points of GDF9 gene and their association with prolificacy in Egyptian small ruminants. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19: 85.
- Ahlawat, S., Sharma, R., Maitra, A., Roy, M. & Tantia, M.S. (2014). Designing, optimization and validation of tetra-primer ARMS PCR protocol for genotyping mutations in caprine Fec genes. *Meta Gene*, 2: 439–49.
- Barzegari, A., Atashpaz, S., Ghabili, K., Nemati, Z., Mohseniazar, M. & Azarbaijani, R. (2009). Polymorphisms in GDF9 and BMP15 associated with fertility and ovulation rate in Moghani and Ghezel sheep in Iran. *Reproduction in Domestic Animals*, 45: 666–669.
- Bodin, L., Di Pasquale, E., Fabre, S.P., Bontoux, M., Monget, P., Persani, L. & Mulsant, P. (2007). A novel mutation in the bone morphogenetic protein 15 gene causing defective protein secretion is associated with both increased ovulation rate and sterility in Lacaune sheep. *Endocrinology*, 148: 393–400.
- Chong, Y., Liu, G. & Jiang, X. (2019). Effect of BMP1B gene on litter size of sheep in China: A meta-analysis. *Animal Reproduction Science*, 210: 106175.
- 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: 525–529.
- Davis, G.H., Dodds, K.G. & Bruce, G.D. (1999). Combined effect of the Inverdale and Booroola prolificacy genes on ovulation rate in sheep. *Proceedings of the Association for the Advancement of Animal Breeding Genetics*, 13: 1374–77.
- 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.
- Davis G.H. (2005). Major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genetics Selection Evolution*, 37: (Suppl 1), S11–S23.
- Eghbal Saeid, Sh., Toghyani, M., Ghaedi, K. & Nasr Esfehiani, M.H. (2010). Investigating major genes affecting ovulation and multiple birth in sheep. *Genetics in the 3<sup>rd</sup> Millennium*, 8: 2169–2189. <https://www.sid.ir/paper/117204/fa>. (In Persian).
- Eghbalsaied S, Ghaedi K, Shahmoradi S, Pirestani A, Amini H, Saiedi T, Nicol L & McNeilly A. (2012). Presence of SNPs in GDF9 mRNA of Iranian Afshari sheep. *International Journal of Fertility and Sterility*, 5: 225–30.
- Esmail Khanian, S., Negati Javaremi, A., Afraz, F., Daneshyar, P. & Ghanbari, S. (2007). Genetic variation among Baluchi sheep population using microsatellite markers. *Journal of Water and Soil Science*, 11: 373–380. (In Persian).
- Fabre, S., Pierre, A., Mulsant, P., Bodin, L., Di Pasquale, E., Persani, L., Monget, P. & Monniaux, D. (2006). Regulation of ovulation rate in mammals: contribution of sheep genetic models. *Reproductive Biology and Endocrinology*4: 20.
- Farrell, L., Creighton, P., Bohan, A., McGovern, F. & McHugh, N. (2022). Bio-economic modelling of sheep meat production systems with varying flock litter size using field data. *Animal*, 16: 100640.
- Ghaffari, M., Nejati Javaremi, A. & Rahimi-Mianji, G. (2009). Detection of polymorphism in BMP1B gene associated with twinning in Shal sheep using PCR-RFLP method. *International Journal of Agriculture and Biology*, 11: 97–99.
- Galloway, S.M., McNatty, K.P., Cambridge, L.M., Laitinen, M.P., Juengel, J.L., Jokiranta, T.S., McLaren, R.J., Luro, K., Dodds, K.G., Montgomery, G.W., Beattie, A.E., Davis, G.H. & Ritvos, O. (2000). Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nature Genetics*, 25: 279–283.
- Gholipour, R., Danesh, L., Mohammad, M. & Harkinezhad, T. (2016). Study of BMP 15 gene in Afshari and Afshari × Booroola Merino cross sheep. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 7: 498–503. (In Persian).

- Gholizadeh, M. & Esmaeili-Fard, S.M. (2022). Meta-analysis of genome-wide association studies for litter size in sheep. *Theriogenology*, 180: 103–112.
- 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: 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 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.
- Khanahmadi, A., Rahimi Mianji, Gh., Hafezian, S.H., Khataminejad, R., Mamizadeh, N. & Mosavi, S. M. (2016). Effect of polymorphisms in some candidate genes on twinning in cross breeds of Shall and Romanov. *Research on Animal Production*, 7: 192–186. (In Persian).
- Khodabakhshzadeh, R., Mohammad Abadi, M., Esmaili zadeh kashkuei, A., Moradi Shahrehabak, H. & Ansari Namin, S. (2014). Study of mutations available in first-halfexon 2 of GDF9 gene in crossbred sheep born from crossing of Romanov rams with Kermani ewes. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 6: 395–403.
- Kumar, S., Dahiya, S., Magotra, A. & Kumar, S. (2017). Genetic markers associated with fecundity in sheep. *International Journal of Science, Environment and Technology*, 6: 3064–3074.
- Li, H., Xu, H., Akhatayeva, Z., Liu, H., Lin, C., Han, X., Lu, X., Lan, X., Zhang, Q. & Pan, C. (2021). Novel indel variations of the sheep FecB gene and their effects on litter size. *Gene*, 767: 145176.
- McNatty, K.P., Heath, D.A., Clark, Z., Reader, K., Juengel, J.L. & Pitman, J.L. (2017). Ovarian characteristics in sheep with multiple fecundity genes. *Reproduction*, 153: 233–240.
- Mohammadi, F., Saghi, D.A. and Simaie Soltani, L. (2022). Detection of FecB gene polymorphisms in sheep using rapid and low-cost tetra-ARMS PCR. *Animal Sciences Journal*, 34: 147–156. (In Persian).
- Montgomery, G.W., Galloway, S.M., Davis, G.H. & McNatty, K.P. (2001). Genes controlling ovulation rate in sheep. *Reproduction*, 121: 843–52.
- Moradband, F., Rahimi-Mianji, G. & Gholizadeh, M. (2011). Association of polymorphisms in fecundity genes of GDF9, BMP15 and BMP15-1B with litter size in Iranian Baluchi sheep. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 24: 1179–1183.
- Muhagheh Dolatabady, M. & Habibizad, J. (2019). Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of GDF9 gene in Bahmaei and Lak Ghashghaei sheep breeds and its association with litter size. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 9: 427–432.
- Najafabadi, H.A. (2019). Investigation of variation in genes influencing fertility in New Zealand sheep. A thesis submitted in partial fulfilment of the requirements for the Degree of Doctor of Philosophy at Lincoln University.
- Newton, C.R., Graham, A., Heptinstall, L.E., Powell, S.J., Summers, C., Kalsheker, N., Smith, J.C. & Markham, A.F. (1989). Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Research*, 17: 2503–16.
- Polley, S., De, S., Brahma, B., Mukherjee, A., Vinesh, P.V., Batabyal, S., Arora, J.S., Pan, S., Samanta, A. K., Datta, T.K. & Goswami, S.L. (2010). Polymorphism of BMPR1B, BMP15 and GDF9 fecundity genes in prolific Garole sheep. *Tropical Animal Health and Production*, 42: 985–993.
- Pourtahmasebian Ahrabi, M., Eskandarinasab, M.P. & Zandi Baghcheh Maryam, M.B. (2020). Estimation of genetic parameters and genetic trend of litter size in under selection flock of Afshari sheep. *Animal Production Research*, 9: 23–35. (In Persian).
- Qanbarii, S., Osfoori, R. & Eskandari Nasab, M.P. (2009). Introgression of FecB major gene into elite breeding flock of Afshari sheep: preliminary evaluation of polymorphism content and applicability of marker data. *Iranian Journal of Animal Science*, 39: 39–47. (In Persian).

- Rajaei Nejad, M., Ayatollahi Mehrgardi, A., Vahideh, R. & Ali, E. (2020). Allelic polymorphism of exon 2 in BMP15 gene in F1 crossbred sheep from crossing Romanov rams with Kermani ewes. *Journal of Livestock Science and Technologies*, 8: 37–44.
- Savar sofla, S., Seyedabadi, H.R. & Javanrouh Aliabad, A. (2015). Detection of polymorphism in FecB and BMP15 candidate genes associated with litter size in Moghani flock. *Animal Sciences Journal*, 28, 83–90. (In Persian).
- Shafieiyan, Z., Mohammadi, G., Jolodarzadeh, A. & Amiri, S. (2013). No mutations of FecB and FecG(H) in Iranian Lory sheep. *Veterinary Research Forum*, 4: 265–268.
- 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 (BMPRII) gene. *The Journal of Endocrinology*, 169: R1–R6.
- UN. (2019). World Population Prospects. United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (custom data acquired via website).

