Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Ruminant Research

Print ISSN: 2345 - 4261
Online ISSN: 2345 - 4253

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

Reza Tohidi[1*], Ali Javadmanesh[2], Elyas Ebrahimi Khoramabadi[1], Kamal Ghasemi Bezdi[3]

[1]Assistant Professor, Dept. of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Torbat-e Jam, Iran, Email: r.tohidi@tjamcaas.ac.ir
[2]Associated Professor, Dept. of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
[3]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:
Revised:
Accepted:

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 *BMPR1B* and *GDF9* genes in Mughani, Afshari and Baluchi ewes. *Journal of Ruminant Research*, 12 (1), 1-14.

© The Author(s).
DOI:
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

پژوهش در نشخوارکنندگان
شاپا چاپی: ۴۲۶۱-۲۳۴۵
شاپا الکترونیکی: ۴۲۵۳-۲۳۴۵

بررسی چند شکلی تک نوکلئوتیدی واقع در ژن‌های کاندیدا *BMPR1B* و *GDF9* میش‌های مغانی، افشاری و بلوچی

رضا توحیدی[1*]، علی جوادمنش[2]، الیاس ابراهیمی خرم‌آبادی[1]، کمال قاسمی بزدی[3]

[1]استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و دامپروری، مجتمع آموزش عالی تربت جام
[2]دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
[3]دانشیار بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، مشهد، رایانامه: r.tohidi@tjamcaas.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت:
تاریخ ویرایش:
تاریخ پذیرش:

واژه‌های کلیدی:
ژن کاندید
باروری
چندشکلی
گوسفند

چکیده

سابقه و هدف: گوسفند، به عنوان 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 کنترل کننده باروری کنترل شوند. در این راستا، سه ژن عملکرد باروری به نام‌های *BMPR1B* یا *FecB*، *GDF9* یا *FecG* و *BMP15* یا *FecX* در گوسفند شناسایی شده‌اند. روش مولکولی Tetra-ARMS PCR یک جایگزین مناسب برای روش‌های پرهزینه مانند توالی‌یابی و PCR-RFLP در شناسایی اسنیپ‌هایی است که توالی آنها شناخته شده هستند. در سالهای اخیر، 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 *FecB* و *FecG* در گوسفندان نژاد مغانی، افشاری و بلوچی خراسان رضوی و ارتباط آن‌ها با صفت چندقلوزایی بود.

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 *FecB* و *FecG* در روش Tetra-ARMS PCR مورد استفاده قرار گرفتند. برنامه دمایی برای تکثیر قطعات ژن *FecB* به صورت واسرشت سازی اولیه در ۹۴ °C به مدت ۴ دقیقه، سپس، ۳۵ چرخه دمایی به‌ترتیب ۹۴ °C به مدت ۲۵ ثانیه، دمای اتصال در ۵۴ °C به مدت ۳۵ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ °C به‌مدت ۲۰ ثانیه و بسط نهایی در ۷۲ °C به‌مدت ۵ دقیقه انجام شد. برای تکثیر قطعات ژن *FecG* از دمای اتصال ۵۴ °C به مدت ۳۵ ثانیه، بسط در دمای ۷۰ °C به‌مدت ۴۰ ثانیه و دمای بسط نهایی ۷۰ °C به‌مدت ۵ دقیقه استفاده شد. محصولات PCR با ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شدند.

یافته‌ها: در بررسی نتایج بدست آمده، سه ژنوتیپ برای ژن *FecB* در گوسفند افشاری شامل هموزیگوت وحشی، هتروزیگوت و هموزیگوت جهش یافته مشاهده شدند. همه گوسفندان بلوچی و گوسفند مغانی برای این ژن هموزیگوت وحشی بودند. یک باند ۱۰۸ جفت بازی

برای هموزیگوت جهش یافته و یک باند ۲۱۳ جفت بازی برای هموزیگـوت وحشـی مشـاهده شد. فراوانی ژنوتیپ هموزیگوت وحشی برای سه نژاد گوسفند فوق الذکر بالا بود اما، فراوانـی ژنوتیپ هتروزیگوت‌ها در نژاد افشاری زیاد بـود. فراوانـی آلـل وحشـی در ایـن نـژاد ۰/۳۹ و فراوانی آلل جهش یافته ۰/۶۱ بود، در مجموع، برای سه نژاد به‌ترتیب ۰/۸ و ۰/۲ انـدازه گیـری شد. نتیجه Tetra-ARMS PCR برای جهش نقطه‌ای G1 درجایگـاه *GDF9* بـرای همـه نژادهـا چندشکلی نشان داد. هرچند، فراوانی هموزیگوت وحشی بالا بود. برای نـژاد گوسـفند بلـوچی فقط چهار درصد از حیوانات ژنوتیـپ هتروزیگـوت داشـتند و ۹۶ درصـد حیوانـات ژنوتیـپ وحشی را نشان دادند. برای نژاد گوسفند مغانی ۱۶ درصد ژنوتیپ هتروزیگوت را نشان دادند و فقط چهار درصد از حیوانات ژنوتیپ هموزیگوت جهـش یافتـه داشـتند. همچنـین، تنهـا یـک ژنوتیپ هتروزیگوت در نژاد افشاری مشاهده شد. مطالعات متعددی ارتباط بین ژن‌هـای *FecB*، *FecG* و *FecX* را بـا چنـد قلـوزایی در گوسـفند نشـان داده اسـت. بـه دلیـل فراوانـی بـالای هموزیگوت وحشی و این حقیقت که میش‌های بلوچی و مغانی عمدتاً، تک قلوزا بودند، نقـش جهش *FecB* در چند قلوزایی گوسفند افشاری می‌تواند قابل توجه باشد. قوچ مورد اسـتفاده در این گله هتروزیگوت بود. به طور کلی، می‌توان نتیجه گرفت کـه آلـل جهـش یافتـه *FecB* بـا چندقلوزایی گوسفندان ایرانی ارتباط دارد. هرچند، تایید آماری این موضوع نیاز به یک مطالعـه اختصاصی همرا با ثبت دقیق رکورد صفات تولید مثلی دارد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه چندشکلی آلل بروﻻ در میش‌های افشاری که فرزندان یـک قـوچ ژنوتیپ هتروزیگوت بودند را نشان داد. همچنین، کل این میش‌هـا در شـکم اول و ۵۰ درصـد آن‌ها در شکم دوم چند قلوزا بودند. بنابراین، جهش بروﻻ ممکن است باعث چنـد قلـوزایی در میش‌ها شود. هرچند، تایید ارتباط چندشکلی‌های ژنی مرتبط با افزایش باروری و چنـدقلوزایی نیاز به مطالعه جامع‌تری به همراه اندازه‌گیری شاخص‌هایی مانند غلظت هورمـون‌هـای جنسـی، میزان تخمک‌گذاری و اندازه فولیکول‌ها دارد.

استناد: توحیدی، ر.، جوادمنش، ع.، ابراهیمی خرم‌آبادی، ا.، قاسمی بزدی، ک. (۱۴۰۳). بررسی چند شکلی تک نوکلئوتیدی واقع در ژن‌های کاندیـدا *BMPR1B* و *GDF9* میش‌های مغانی، افشاری و بلوچی. *پژوهش در نشخوارکنندگان*، ۱۲(۱)، ۱۴-۱

DOI:

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

جمعیت جهان رشد زیادی داشته است و بر اساس پیش بینی 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 تامین گوشت دنیاست. توانایی گوسفند برای زندگی در آب و هوای مختلف و تنوع علوفه مصرفی با کیفیت متفاوت و همچنین، چرا در مراتع و استفاده از پس چر مزارع باعث شده که این گونه پراکنش جغرافیایی زیادی داشته باشد (Najafabadi, 2019). افزایش بازدهی اقتصادی پروش گوسفند وابسته به افزایش بازدهی تولید مثلی 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 تولید مثل، از عوامل مؤثر بر چندقلوزایی گوسفندان هستند (Li و همکاران، ۲۰۲۱). از گوسفند به عنوان، مدل ژنتیکی مطالعه ارتباط تنوع ژنتیکی با تخمک‌گذاری استفاده می‌شود (Montgomery و همکاران، ۲۰۰۱). در سال ۱۹۸۰ ژن بروﻻ[1] به عنوان، اولین ژنی شناسایی شد که با باروری گوسفندان ارتباط داشت. پس از آن مطالعات نشان دادند که میزان تخمک‌گذاری و چند قلوزایی 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 با نام‌های *BMPR1B* یا *FecB* روی کروموزوم ۶، *GDF9* یا *FecG* روی کروموزوم ۵ و *BMP15* یا *FecX* روی کرموزوم 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 جهش یافته بروﻻ، روی میزان تخمک‌گذاری اثر افزایشی داشت (Souza و همکاران، ۲۰۰۱). هرچند، جهش‌های ژن *FecG* و *FecX* 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[2] که برای دو ژن *BMP15* و *FecB* هتروزیگوت بودند به طور متوسط ۲۶۷٪ 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[3] 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-SSCP، PCR-RFLP، توالی یابی و Tetra-ARMS PCR انجام شده است (Qanbarii و همکاران، ۲۰۰۹؛ Eghbal Saeid و همکاران، ۲۰۱۰؛

[1] Booroola

[2] Inverdale

[3] Woodlands

Gholipour و همکـــــاران، ۲۰۱۶؛ Khanahmadi و همکـاران، ۲۰۱۶؛ Mohammadi و همکـاران، ۲۰۲۲). مطالعـه ۷۴ مـیش افشـاری دانشـگاه زنجـان بـا روش PCR-RFLP وجـود آلـل موتانـت در *FecB* را نشـان نداد (Qanbarii و همکـاران، ۲۰۰۹). هرچنـد، وجـود جهش نقطـه‌ای در اگـزون ۲ ژن *GDF9* آمیختـه‌هـای لـری بختیـاری بـا روش PCR-SSCP گـزارش شـد (Khodabakhshzadeh و همکـــــاران، ۲۰۱۴). روش Tetra-ARMS PCR جـــایگزین مناســـبی بـــرای روش‌هـای پـر هزینـه تـوالی‌یـابی و PCR-RFLP در شناسایی SNPهایی است که نوع آن‌هـا شـناخته شـده باشد. در این روش دو جفـت پرایمـر در یـک تیـوب PCR به طور همزمان یک قطعه کنترل داخلی و قطعـه شامل آلل جهش یافته و یا نرمـال را تکثیـر مـی‌کننـد. بنابراین، نیازی به اسـتفاده از آنـزیم و یـا تـوالی یـابی قطعـه تکثیـر شـده نیسـت (Ahlawat و همکـاران، ۲۰۱۴). شناسایی چندشکلی ژن *FecB* در گوسـفندان افشاری خراسان رضوی با استفاده از این روش وجود آلل موتانت را نشـان داد (Mohammadi و همکـاران، ۲۰۲۲). با توجه به ارزان بودن این روش مـی‌تـوان از آن بـرای شناسـایی آلـل بـرولا در گوسـفندان ایرانـی استفاده کرد.

در سالهای اخیر، دامپروران استان خراسان رضوی، نژادهـای مختلـف گوسـفند را ماننـد عربـی، بلـوچی، افشاری و مغانی نگهداری می‌کنند. با توجه به سیسـتم پرورش سنتی و عشایری و همجـواری بـا افغانسـتان، عمده گوسفندان منطقه خالص نیستند. نژاد بلـوچی از دوقلـوزایی مناسـبی برخـوردار اسـت و همچنـین پراکنـدگی زیـادی در شـرق کشـور دارد (Esmail khanian, 2007). گوسفند نـژاد افشـاری از نژادهـای سنگین در استان زنجان است که تولید شیر مناسـب و درصد دوقلوزایی پایینی دارد (Qanbarii و همکـاران، ۲۰۰۹). ورود آلل برولا بـه ایـن نـژاد باعـث افـزایش چنـدتخمک‌گـذاری شـد (Eghbalsaied و همکـاران، ۲۰۱۲؛ Gholipour و همکـــاران، ۲۰۱۶). در حـــال حاضر، این نژاد در اسـتان خراسـان رضـوی پـرورش داده می‌شود و تحت عنوان افشاری با ژنوتیپ هترو یا همو در میان دامداران معـروف اسـت. هـدف از ایـن مطالعه بررسی چنـد شـکلی ژن‌هـای بـاروری شـامل *FecB* و *FecG* در گوسفندان نژاد مغـانی، افشـاری و بلوچی استان خراسان رضوی بود.

مواد و روش‌ها

نمونه خـون از مجمـوع تعـداد ۹۵ رأس گوسـفند نژاد افشاری، بلوچی و مغـانی (بـه ترتیـب، ۲۰، ۵۰ و ۲۵ رأس) شامل تنها یک قوچ در نژاد افشاری بدسـت آمد. میش‌های بلـوچی بـه طـور تصـادفی از ایسـتگاه دامپروری دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد انتخاب شدند. میش‌های انتخاب شـده دارای حـداکثر سن پنج سال و چهار شکم زایـش بودنـد. گوسـفندان نـژاد افشـاری و مغـانی از دامـداری‌هـای روسـتایی شهرستان تربت جـام انتخـاب شـدند. سـن مـیش‌هـا حداکثر چهار سال و سه شکم زایش بودنـد. دامـداران در جلوگیری از آمیخته شدن گله‌ها مراقبت داشـتند و خصوصیات فنوتیپی گوسـفندان را کنتـرل مـی‌کردنـد. حـدود ۱۰ میلـی لیتـر خـون از سـیاهرگ وداج درون تیوب خلا حاوی EDTA اخذ شد و نمونه‌ها تا زمـان استخراج DNA در ۲۰ °C- نگهداری شدند. استخراج DNA با استفاده از کیت تجـاری سـیناکلون® مطـابق دستور سازنده انجام شد. جهت تعیین کمیت و کیفیت DNA از ژل آگارز ٪ ۰/۸ استفاده شد.

جهت تکثیـر قطعـات ژن‌هـای *FecB* و *FecG* بـا روش Tetra-ARMS PCR دو جفت آغازگر کنتـرل و اختصاصـی مـورد اسـتفاده قـرار گرفتنـد (جـدول ۱). آغازگرها توسـط شـرکت سـیناکلون تهیـه شـدند. در روش Tetra-ARMS PCR هـر دو آلـل وحشـی و

موتانت و 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 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).

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

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

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

اختصاصی :Inner ، کنترل: Outer

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، 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 ۹۴ °C به مدت ۴ دقیقه، سپس، ۳۵ چرخه دمایی به‌ترتیب 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 *FecG* 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.

برای تایید چندشکلی ژن *FecB* از روش PCR-RFLP نیز استفاده شد. آغازگر مورد استفاده در جدول ۲ نشان داده شده است. برنامه دمایی مورد استفاده برای تکثیر ژن *FecB* شبیه روش Tetra-ARMS PCR بود و فقط دمای اتصال ۵۸ °C در نظر گرفته شد. آنزیم مورد استفاده برای هضم محصول PCR، *Ava*II بود. محصول PCR به مدت ۴ ساعت و دمای ۳۷ °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 GenAlEx v. 6.503 برآورد شدند. همچنین، اختلاف بین فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده و مورد انتظار با روش کای مربع آزمون شد.

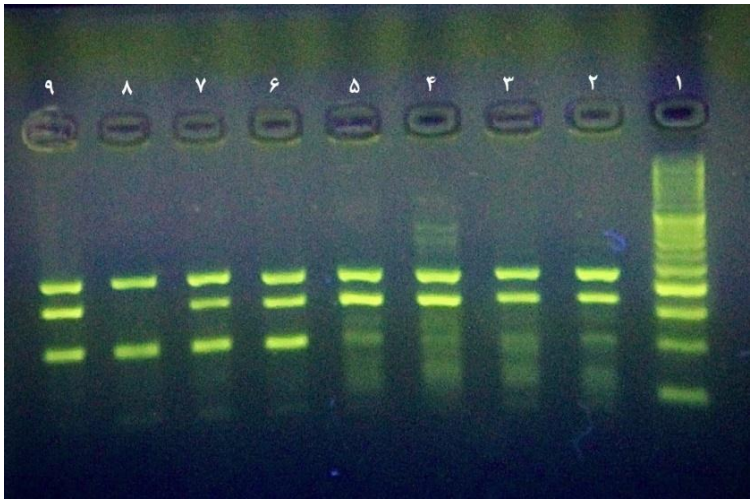
جدول ۲-آغازگرهای مورد استفاده در واکنش PCR- RFLP برای ژن *FecB*

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

نام پرایمرها Primer name	توالی Sequence	طول قطعه Product size
FecB -F	CCAGAGGACAATAGCAAAGCAAA	190 bp
FecB -R	CAAGATGTTTTCATGCCTCATGAACACGGTC	

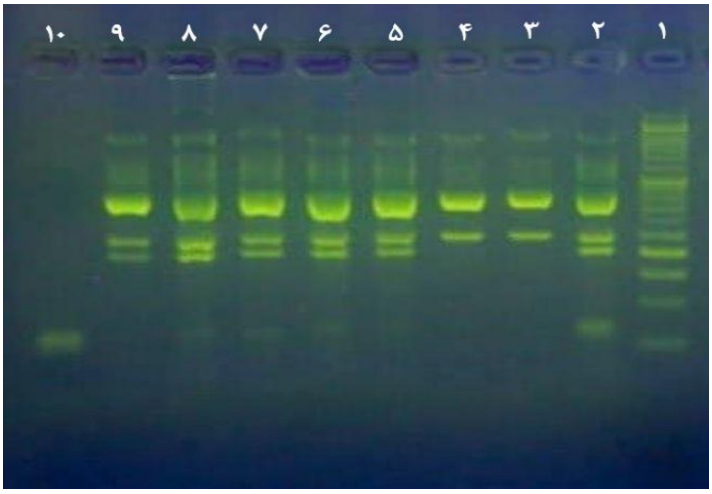
نتایج و بحث

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 آللی 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 آلل وحشی در این نژاد ۰/۳۹ و آلل موتانت ۰/۶۱و در مجموع برای سه نژاد به ترتیب ۰/۸ و ۰/۲ بود. نتیجه هضم آنزیمی محصولات PCR ژن *FecB* وجود جهش ژنی را تایید کرد (شکل ۳). اندازه قطعه فاقد آلل موتانت ۱۹۰ جفت باز بود در حالی که وجود جهش باعث هضم قطعه PCR به دو قطعه ۱۶۰ و ۳۰ جفت بازی شد.



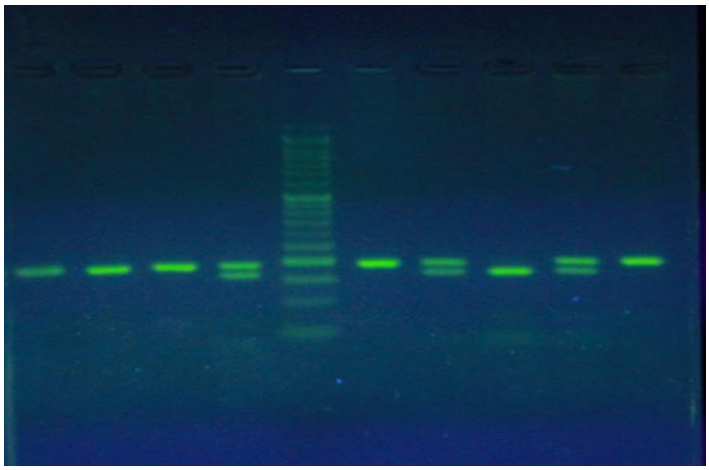
شکل۱- الکتروفورز آگارز (۲٪) محصولات PCR ژن *FecB* با روش Tetra-ARMS (شماره ۱: لدر bp ۵۰، شماره‌های ۲، ۳، ۴ و ۵ شامل آلل وحشی، شماره‌های ۶ و ۷ و ۹ هتروزیگوت و شماره ۸ هموزیگوت موتانت هستند)

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)



شکل۲- الکتروفورز آگارز محصولات PCR ژن *FecG* در ناحیه G1 با روش Tetra-ARMS (شماره ۱: لدر bp ۵۰، 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، ۶ و ۱۰ فاقد ژن (وحشی)، نمونه‌های ۴، ۷ و ۹ هتروزایگوت، 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

نتیجه Tetra-ARMS PCR 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 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 مشاهده شده و مورد انتظار ژنوتیپ‌ها برای جایگاه *FecB* درون گله افشاری مشاهده نشد.

جدول ۳- فراوانی آللی و ژنوتیپی در گوسفندان مورد مطالعه

Table 3-Allelic and genotypic frequency in the sheep populations

جمعیت (تعداد) Population (size)	ژن Gene	فراوانی آللی Allele frequency		فراوانی ژنوتیپی Genotypic frequency		
		+	B	++	B+	BB
مغانی (۲۵) Moghani (25)	*FecB*	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)	*FecG*	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

آلل موتانت G و B ;آلل وحشی ,+

جدول ۴ شاخص‌های تنوع ژنتیکی را نشان می‌دهد. تعداد آلل 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 ریزماهواره به ترتیب ۱۰/۳ – ۳/۲۶، ۰/۸۸ – ۰/۷۵ و ۲/۴۷ – ۱/۵۸ 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 آلل‌های موتانت در اثر آمیخته‌گری به گله وارد شده باشند.

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 آللی Ne	شاخص تنوع شانون I	هتروزیگوسیته مشاهده شده Ho	هتروزیگوسیته مورد انتظار He
مغانی Moghani	*FecB*	1	0	0	0
	FecG	1.268	0.367	0.16	0.211
افشاری Afshari	*FecB*	1.835	0.647	0.5	0.455
	FecG	1.051	0.117	0.05	0.049
بلوچی Balouchi	*FecB*	1	0	0	0
	FecG	1.041	0.098	0.04	0.039
کل Total		1.199	0.205	0.125	0.126

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 و 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 به طور کلی دارای ژنوتیپ وحشی بودند و به جز میش‌های افشاری، میش‌های دو نژاد دیگر عمدتاً، تک‌قلوزا بودند. کل میش‌های مغانی و ۸۴ درصد از میش‌های بلوچی تک قلوزا 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. قوچ 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 هیچ یک از نژادها چندشکلی زیادی نشان نداد. بطور کلی، می‌توان چنین نتیجه گرفت که آلل موتانت *FecB* می‌تواند با چندقلوزایی در گوسفندان ایرانی ارتباط داشته باشد. 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[1] 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 اینترونی و اگزونی *GDF9* بهمایی و لک قشقایی با استفاده از توالی یابی سنجر گزارش شده است. هرچند، ارتباطی بین اسنیپ‌ها و چندقلوزایی میش‌ها در آن مطالعه مشاهده نشد. جایگزینی باز نوکلئوتیدی آدنین با باز گوانین در ناحیه اینترونی ژن *GDF9* گوسفند بهمایی برای اولین بار گزارش شده بود (Muhaghegh Dolatabady و Habibizad، ۲۰۱۹). همچنین، جهش مشاهده شده در ناحیه اگزون ۲ با گزارش Hanrahan و همکاران (۲۰۰۴) مطابقت داشت. در مطالعه حاضر نیز چندشکلی مشاهده شده 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 *Ava*II 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

[1] Hu

نتـایج تحقیقـات Ghaffari و همکـاران (۲۰۰۹) روی گوسفندان شال مطابقت داشت.

بررسی وضـعیت چندشـکلی ژن *FecG* در نقطـه جهش G1 گوسفندان مصری هر سه نـوع ژنوتیـپ را نشان داد در حالی که فراوانی آلل موتانت بسیار پـایین و حـدود ۰/۰۱۵ بـود (Aboelhassan و همکـاران، ۲۰۲۱). در مطالعـه مـذکور مـیش‌هـای هتروزیگـوت نسبت به هموزیگوت وحشی کـاهش بـاروری نشـان دادند. هرچند، میش‌های هتروزیگوت برای جهش G4 دارای میانگین بره‌زایی و چندقلوزایی بالایی نسبت بـه هموزیگوت وحشی بودنـد. مـیش‌هـای هتروزیگـوت نژاد بلکلـر[1] و کمبـریج در نقطـه جهـش G8 بـاروری بیشتری نسبت به هموزیگوت‌های وحشی نشان دادند (Hanrahan و همکـاران، ۲۰۰۴). مطالعـه چندشـکلی نقطه جهش G1 در گوسفندان مغانی و قزل نشـان داد که میش‌های هتروزیگوت باروری بیشتری نسـبت بـه هموزیگوت وحشی داشتند. هرچند، پنج مـیش از ۷۹ میش مورد مطالعه هموزیگـوت وحشـی و چنـدقلوزا بودنـد (Barzegari و همکـاران، ۲۰۰۹). بررسـی Moradband و همکـاران (۲۰۱۱) روی گوسـفند بلوچی وجود جهش در جایگـاه *FecB* را نشـان نـداد ولی، چند شکلی در نقطه جهش G1 ژن *FecG* وجود داشـت. در آن مطالعـه میـزان دوقلـوزایی مـیش‌هـای هتروزیگوت و هموزیگوت وحشی تفاوت معنی‌داری نداشت ولـی، چنـدقلوزایی هـر دو گـروه ژنـوتیپی از میش‌های هموزیگـوت موتانـت بیشـتر بـود. هرچنـد، فراوانی هموزیگوت‌هـای موتانـت ۰/۰۸ بـود. جهـش برولا و یا جهش در جایگـاه *FecG* مـی‌توانـد باعـث افـزایش چنـدقلوزایی باشـد. هرچنـد، در برخـی گوسفندان ایرانی چندقلوزایی مشاهده شـده اسـت در حـالی کـه بـرای جایگـاه‌هـای ژنـی مـورد بررسـی هموزیگوت وحشی بودنـد (Shafieiyan و همکـاران، ۲۰۱۳؛ Khanahmadi و همکـاران، ۲۰۱۶). بنـابراین، مطالعـات جـامع‌تـری بـرای تاییـد اثـر جهـش‌هـا بـر چندقلوزایی مورد نیاز است.

نتیجه‌گیری کلی

نتـایج ایـن مطالعـه، چندشـکلی ژن بـرولا را در میش‌های افشاری نشان داد. همچنـین، در مـیش‌هـای مـذکور دوقلـوزایی مشـاهده شـد. هرچنـد، بـرای ژن *GDF9* هموزیگوت وحشی بودند. دو نژاد دیگـر نیـز برای ژن *FecB* جهش نداشـتند و فقـط تعـداد چهـار رأس از مـیش‌هـای مغـانی بـرای ژن *FecG* ژنوتیـپ هتروزیگوت و یک رأس ژنوتیپ هموزیگوت موتانت بود. نتایج مشابهی نیز برای نژادهای دیگـر گوسـفندان ایران وجود داشت. جهش‌هـای ژنـی در جایگـاه‌هـای مـرتبط بـا بـاروری ممکـن اسـت باعـث افـزایش چندتخمک‌گذاری و چندقلوزایی شـوند. هرچنـد، دو نکته قابل توجه است. اول آن که بیشـتر مطالعـات در گله‌های مردمـی انجـام شـده اسـت و رکوردهـا قابـل اعتماد نیستند، و نکته دوم این که انتقال آلل بـرولا بـه نژاد افشاری موجب افزایش چندقلوزایی شـده اسـت. بنابراین، مطالعه جامع‌تری با اندازه‌گیری شاخص‌هـای بیولوژیکی مانند غلظت هورمون‌هـای جنسـی، میـزان تخمک‌گذاری و اندازه فولیکول‌ها بـرای اثبـات تـأثیر این نوع جهش‌ها در افـزایش بـاروری ضـرورت دارد. در مطالعات آینده پیشنهاد می‌شود نژادهای عمدتاً تک قلوزا به عنوان مدل حیوانی مورد استفاده قرار گیرند و با انتقال آلل برولا و همچنین سـایر آلـل‌هـای جهـش یافته به آن نژاد مقایسـه اثـرات بیولـوژیکی جهـش‌هـا انجام پذیرد.

تشکر و قدردانی

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

[1] Belclare

منابع

Aboelhassan, D.M., Darwish, A.M., Ali, N.I., Ghaly, I.S., and 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., and 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., and 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., and 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., and Jiang, X. 2019. Effect of BMPRIB 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., and 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., and 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., and 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., and Nasr Esfehani, M.H. 2010. Investigating major genes affecting ovulation and multiple birth in sheep. Genetics in the 3rd 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, and 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., and 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., and Monniaux, D. 2006. Regulation of ovulation rate in mammals: contribution of sheep genetic models. Reproductive Biology and Endocrinology, RB&E, 4: 20.

Farrell, L., Creighton, P., Bohan, A., McGovern, F., and 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., and Rahimi-Mianji, G. 2009. Detection of polymorphism in BMPR-IB gene associated with twining 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., Luiro, K., Dodds, K.G., Montgomery, G.W., Beattie, A.E., Davis, G.H., and 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., and 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., and 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., and 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., and 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., and 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 Shahrebabak, H., and 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., and 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., and 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., and 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., and McNatty, K.P. 2001. Genes controlling ovulation rate in sheep. Reproduction, 121: 843–52.

Moradband, F., Rahimi-Mianji, G., and 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.

Muhaghegh Dolatabady, M., and 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. and 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., and 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., and 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., and 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., and 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., and 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., and 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., and Baird, D.T. 2001. The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 B (BMPR1B) gene. The Journal of Endocrinology, 169: R1–R6.

UN. (2019). World Population Prospects 2019. United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (custom data acquired via website).