دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

" مقاله پژوهشی"

ارتباط چند شکلی اگزون ٤ ژن GPR54 با صفت چند قلوزایی در گوسفندان سنجابی و قزل با تکنیک PCR-SSCP

ماریه قاسمی[۱]، علی هاشمی[۲]، مهدی مخبر[۳] و روناک صالحی[٤]

۱ و ۳- دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه
۲- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، (نویسنده مسوول: a.hashemi50@gmail.com)
۴- دانشجوی دکترای تخصصی دانشگاه تبریز

تاریخ دریافت: ۹۸/۶/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۸/۸/۱۸
صفحه: ۱۱۶ تا ۱۲۳

چکیده

ژن GPR54 از جمله ژن‌های شناخته‌شده مؤثر بر باروری است. این ژن روی عملکرد تخمک گذاری و چند قلوزایی تأثیر دارد. به‌منظور شناسایی اثر ژن GPR54 روی عملکرد چندقلوزایی گوسفندان سنجابی و قزل، در مجموع از تعداد ۱٦۰ رأس حیوان شامل ۱۰۰ رأس گوسفند نژاد سنجابی و ٦۰ رأس گوسفند نژاد قزل استفاده شد. استخراج DNA از نمونه‌های خون با استفاده از کیت استخراج تجاری صورت گرفت. الگوهای ژنوتیپی مربوط به قطعه ۳۲۱ جفت بازی اگزون ٤ ژن GPR54 با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چند شکلی فضایی تک رشته‌ای (PCR-SSCP) تعیین شدند. در نمونه‌های مورد مطالعه سه الگوی باندی مختلف ۱، ۲ و۳ برای نژاد سنجابی به ترتیب با فراوانی۵٤/۹۳، ۱۷/۵۹و ۲۷/٤۸ و دو الگوی باندی ۱ و ۲ برای نژاد قزل به‌ترتیب با فراوانی ٤۱/۸٦ و ۵۸/۱٤ مشاهده شدند. ارتباط الگوهای مشاهده شده در نژاد سنجابی روی صفت چند قلوزایی معنی‌دار (p<۰/۰۵) بود، اما این ارتباط در گوسفندان نژاد قزل غیر معنی‌دار (p<۰/۰۵) بود. علیرغم اینکه نتایج نشان‌داد چند شکلی موجود در این ژن در گوسفند نژاد سنجابی می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر برای صفت دوقلوزایی مورد استفاده قرار گیرد، اما به‌نظر می‌رسد مطالعات بیشتری با تعداد بیشتر نمونه برای تعیین ارتباط دقیق‌تر واریانت‌های ژن GPR54 با صفت بره گیری نیاز است.

واژه‌های کلیدی: چندقلوزایی، ژن GPR54، گوسفند، PCR- SSCP

مقدمه

حدود یک قرن است که اصلاح نژاد نوین براساس اصول ژنتیکی مشخصی طراحی شده که دنباله کار چندین هزار ساله اهلی کردن حیوانات است، که حاصل انتخاب طبیعی و مصنوعی می‌باشد. امروزه اصلاح نژاد در حیوانات مزرعه‌ای به منظور بهبود بازده اقتصادی حیوانات با استفاده از نژادهای تجاری موجود انجام می‌شود. در سال‌های اخیر بهبود صفات تولید مثلی 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 به‌طور عمده‌ای تحت تأثیر 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 تک‌قلوزاها زیادتر بوده و به همین دلیل استفاده از حیوانات چندقلوزا به خصوص دام‌های اهلی مورد توجه متخصصین اصلاح نژاد است (۷).

میانگین میزان دوقلوزایی در جمعیت گوسفندان ایران کمتر از ۱۰ درصد می‌باشد (۸). 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. گوسفند سنجابی یکی از نژادهای گوسفندان ایرانی می‌باشد و از نژادهای سنگین وزن کشور بوده و جمعیت آن بعد از گوسفند بلوچی دارای بیشترین تعداد در بین گوسفندان ایران است. گوسفند سنجابی گوسفندی دنبه‌دار است که جثه‌ای بزرگ دارد. رنگ صورت قهوه‌ای تا قهوه‌ای کم رنگ بوده و بدن از پشم بلند و نسبتا سفید و ضخیمی تشکیل شده است. از لحاظ تولید جزء گوسفندان گوشتی و گوشتی-پشمی بوده و دارای تولید شیر مناسبی است. گوسفند قزل تیپی از نژاد افشاری است که محل اصلی پراکنش آن استان‌های آذربایجان شرقی و غربی می‌باشد. این گوسفند دارای سری نسبتاً بزرگتر از نژاد اصلی افشاری است و پشم‌های ضخیم‌تر و کم پشت‌تری دارد. رنگ موی صورت و قلم‌های اندام حرکتی قهوه‌ای تیره تا متمایل به سیاه بوده و دارای دنبالچه‌ای است که در ابتدا قلبی شکل بوده و پر از چربی می‌باشد. اگرچه صفت تولید مثل از جمله صفات کمی و از نظر توارث جزء صفات چندژنی می‌باشد، اما در سال‌های اخیر نشان داده شده که کنترل تولید مثل در گوسفند توسط ژن‌هایی با اثرات عمده نیز صورت می‌گیرد. از این رو کشف ژن‌هایی با اثرات عمده بر نرخ تخمک‌ریزی و در نتیجه تعداد بره در هر زایش، توجه بسیاری از دانشمندان را به خود جلب کرده است (۱۰).

ژن GPR54 برای اولین بار در سال ۱۹۹۹ از مغز موش کلون شد (۱۱). این ژن در انسان که R-KISS، hoT7T 175، AXOR 12 نیز نامیده می‌شود، یکی از اعضای خانواده ردوپسین از گیرنده‌های متصل شونده به پروتئین G و گیرنده آندوژنوس کیس‌پپتین گیرنده ۵۴ متصل به پروتئین G (GPR54) می‌باشد (۱۴). یک لیگاند طبیعی برای G پروتئین جفت شونده با رسپتور توسط ژن KISS-1

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-06-09]

[DOI: 10.52547/rap.11.29.116]

(Iq 32) کد می‌شود که پس از تحمل چندین پردازش پپتید فعال بیولوژیکی به‌نام متاستین ایجاد می‌شود و ناحیه C ترمینال متاستین مسئول اتصال به رسپتور GPR54 می‌باشد. ژن GPR54 در بافت‌های محیطی مختلفی از جمله جفت، پانکراس، کلیه‌ها، بیضه‌ها و به‌طور عمده در هیپوتالاموس بیان می‌شود. در سال ۲۰۰۳ گروه‌های مختلفی گزارش کردند که با جهش‌های عمدی و ژنتیکی در GPR54نقص‌های عمده و قابل توجهی در فعالیت‌های تولید مثلی مانند عدم بلوغ، کاهش در سطوح استروئیدهای جنسی، گامتوژنزیس ناقص و عدم فحلی به وجود می‌آید. کیس پپتین و گیرنده‌های آنها (GPR54) یک تنظیم کننده مهم ترشح GnRH و یک کاتالیزور برای بلوغ می‌باشد. کیس‌پپتین به طور مستقیم آزاد شدن هورمون آزاد کننده گونادوتروپین را از طریق GPR54 تحریک می‌کند و سپس با ترشح LH و FSH منجر به بلوغ زودرس می‌شوند (۱۲)

ژن GPR54 روی کروموزوم ۱۹ انسانی قرار داد. این ژن دارای ۵ اگزون و ۴ اینترون است که ناحیه کدکننده کامل ژن bp ۱۲۲۵ است که پروتئینی با ۴۳۱ اسیدآمینه را کد می‌کند. طول کل ژن GPR54، ۴۲۶۲ جفت باز می‌باشد (۱). جهش در GPR54 که متشکل از یک ژن کدکننده پروتئین G متصل به رسپتور[1] می‌باشد به صورت اتوزومال مغلوب سبب هیپوگوناديسم هیپوگونادوتروپی (IHH) در انسان و میمون می شود. براساس نتایج تحقیقات مختلف این گیرنده برای عملکرد طبیعی GnRH و در نتیجه بلوغ، ضروری است (۱۷). امروزه چند شکلی فضایی رشته‌های منفرد مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR-SSCP) به‌عنوان روشی توانمند و قابل اطمینان جهت آزمایش چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی (SNP) در تعیین ژنوتیپ به‌شمار می‌رود. تکنیک SSC روش مؤثری در شناسایی تنوع توالی تکثیر شده می‌باشد. اساس این تکنیک عبور 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 (۱۵). چو و همکاران (۶) چند شکلی ژن KISS-1 و GPR54 در گوسفندان با تکنیک SSCP به منظور شناسایی چندشکلی احتمالی و ارتباط آن با تعداد نتایج در هر زایش را مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه بخشی از اگزون ۲ ژن GPR54 مورد بررسی قرار گرفت که در آن دو چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی T۲۳۶۰C و A۲۴۱۱C شناسایی شدند. مطالعه دیگری توسط چو و همکاران (۴) به منظور جستجوی چندشکلی احتمالی موجود در ژن GPR54 و همچنین وجود ارتباط بین این چندشکلی‌های احتمالی با تعداد نتاج متولد شده در هر زایش انجام شد. تعداد ۳۰۸ رأس گوسفند با ۴ نژاد مختلف با چندقلوزائی متفاوت با استفاده از نشانگرهای مولکولی SSCP و RFLP مورد بررسی قرار گرفت. تعداد دو چند شکلی که به صورت تک نوکلئوتیدی A۱۲۵G و حذف/جایگزینی ۵ نوکلئوتیدی TTCTT در ناحیه ۱۶۳-۱۶۷ منطقه تنظیمی ژن GPR54 شناسایی شد. این دو چند شکلی در هر چهار نژاد گوسفندان مورد مطالعه وجود داشت. مینگینگ و همکاران (۱۳) چندشکلی ژن GPR54 و ارتباط آن با تعداد بره در هر زایش را در نواحی اگزون‌های یک، دو و پنج ژن GPR54 به روش PCR-SSCP مورد مطالعه قرار دادند. در این پژوهش انواع چند شکلی‌ها مشاهده شد، همچنین نتایج حاکی از وجود ارتباط احتمالی ژن GPR54 با صفت چند قلوزایی در گوسفند بود.

با توجه به این که گوسفند نژادهای سنجابی، قزل، از نژادهای مهم غرب کشور می‌باشد، 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 هیچ گونه پژوهشی در رابطه با ژن GPR54 در این نژادها انجام نشده است، لذا هدف از انجام پژوهش حاضر، شناسایی چند شکلی ناحیه‌ی اگزون چهار ژن GPR54 در گوسفندان نژاد قزل و سنجابی با استفاده از روش PCR-SSCP و بررسی ارتباط چندشکلی‌های احتمالی با صفت چندقلوزایی است.

مواد و روش‌ها

جمعیت مورد مطالعه

در مطالعه حاضر از تعداد ۱۶۰ رأس گوسفند از نژادهای ایرانی شامل ۱۰۰ رأس گوسفند نژاد سنجابی ایستگاه پرورش مهرگان استان کرمانشاه و ۶۰ رأس گوسفند نژاد قزل ایستگاه پرورش گوسفند دانشگاه ارومیه، استفاده شد. نمونه‌ها به‌صورت تصادفی تعیین شدند و اطلاعات فنوتیپی هر کدام از نمونه‌ها از ایستگاه مربوطه تهیه شد. خونگیری از سیاهرگ وداجی و با استفاده از ونوجکت‌های 5 میلی‌لیتری حاوی ماده‌ی ضد انعقاد EDTA (۲۰ میلی‌مولار) انجام گرفت. سپس نمونه‌ها در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل گردیدند و تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج و تعیین کمیت و کیفیت DNA

استخراج DNA با استفاده از کیت شرکت سیناژن ایران (DNTTM Kit) مطابق دستور العمل کیت مذکور انجام شد. کمیت و کیفیت DNAهای استخراج شده با استفاده الکتروفورز و روی ژل آگارز ۱ درصد تعیین شدند.

تکثیر ژن GPR54 با استفاده از PCR

با توجه به ژن و ناحیه مورد نظر، ابتدا توالی ژن و mRNA آن از ژنوم گوسفندان مختلف در بانک اطلاعاتی مرکز ملی اطلاعات زیست فناوری ایالات متحده (NCBI) با شماره دستیابی HM135393 استحصال شد. آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر قطعه ای به طول ۳۲۱ جفت باز از اگزون شماره ۴ ژن GPR54 گوسفند با استفاده از سایت primer 3plus طراحی شد. توالی آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش برای اگزون شماره ۴ ژن GPR54 در جدول ۱ ارائه شده است.

1- G- protein coupled receptor gene

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-06-09]

[DOI: 10.52547/rap.11.29.116]

جدول ۱- آغازگرهای اختصاصی جهت تکثیر بخش اگزون ۴ ژن GPR54

Table 1. Specific primers for amplification of exons 4 of GPR54 gene

شماره ژن بانک مورد استفاده	طول قطعه bp	توالی آغازگر	منطقه تنظیمی
HM135393	۳۲۱	(Forward) 5′-GGGTCTTCAACAGGGCTCT-3′ (Reverse) 5′-GTAGATGCGCCTCACTCCC-3′	اگزون ۴ ژن GPR54

اطلاعات مربوط به حجم و غلظت مواد استفاده شده برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در جدول ۲ آورده شده است. نحوه تهیه‌ی محلول PCR به این ترتیب بود که ابتدا میزان یک میکرولیتر از هر نمونه DNA ژنومی داخل میکروتیوب‌های مخصوص PCR ریخته شد. سپس مستر میکس به هر کدام از نمونه‌ها اضافه شده و در مرحله بعد پرایمرهای رفت و برگشت به محلول فوق اضاف شد و در انتها همه نمونه‌ها به حجم ۲۰ میکرولیتر رسیدند و بلافاصله در دستگاه ترموسایکلر بارگذاری شدند. تکثیر قطعه ۳۲۱ جفت بازی اگزون چهار ژن GPR54 با استفاده از ترموسایکلر مدل T Gradient (ساخت کشور آمریکا) انجام شد. اطلاعات مربوط به برنامه دمایی و زمانی مراحل تکثیر در جدول ۳ آورده شده است.

جدول ۲- مواد تشکیل‌دهنده واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

Table 2. Ingredients of polymerase chain reaction

نام ماده	غلظت به کار برده شده	حجم مورد استفاده (میکرولیتر)
مسترمیکس صنعتی	–	۱۰
آغازگر (رفت)	۱۰PM/µL	۱
آغازگر(برگشت)	۱۰PM/µL	۱
DNA	۵۰ –۱۰۰ ng	۱
آب مقطر	–	۷
جمع	–	۲۰

جدول ۳- برنامه دمایی و زمانی و تعداد چرخه واکنش زنچیره‌ای پلیمراز

Table 3. Thermal cycle program for polymerase chain reaction

۵ دقیقه	۹۵°C	واسرشته‌سازی اولیه	۱ چرخه
۱ دقیقه	۹۵°C	واسرشت‌سازی	۳۵ چرخه
۴۵ ثانیه	۶۲°C	اتصال پرایمر	
۱ دقیقه	۷۲°C	توسعه	
۵ دقیقه	۷۲°C	توسعه نهایی	۱چرخه

مشاهده محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

کیفیت و کمیت محصولات PCR با استفاده از روش الکتروفورز ژل آگارز مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور مقدار ۴ میکرولیتر از هریک از محصولات PCR به همراه ۱/۵ میکرولیتر از بافر بارگذاری، روی ژل آگارز ۲٪ با ولتاژ ۱۰۰ ولت و به مدت ۲۰ الی ۳۰ دقیقه بارگذاری شدند. در یکی از چاهک‌ها مقدار مشخصی از نشانگر مولکولی استاندارد (50bp شرکت سیناژن) جهت تعیین اندازه تقریبی محصولات PCR بارگذاری شد. نمونه‌ها بعد از اتمام زمان بارگذاری بلافاصله زیر نور ماورای بنفش با کمک دستگاه ژل داک به‌طور بصری مورد ارزیابی قرار گرفتند.

تعیین الگوی ژنوتیپ‌ها

الگوی‌های ژنوتیپی مربوط به نمونه‌های مورد بررسی به روش PCR-SSCP با استفاده از دستگاه الکتروفورز عمودی مدل PRO-CM 22*21 (ساخت شرکت پایا پژوهش پارس) روی ژل پلی‌آکریل آمید ۱۰ ٪ 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 درجه سانتی گراد 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 درجه سانتی‌گراد و با بافر TBE1X انجام گرفت. در نهایت رنگ آمیزی ژل جهت مشاهده الگوهای باندی به روش نیترات نقره انجام شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

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 آزمون مقایسه‌ای دانکن صورت گرفت (۱۶).

$$Y_{ij}=\mu+G_i+E_{ij}$$

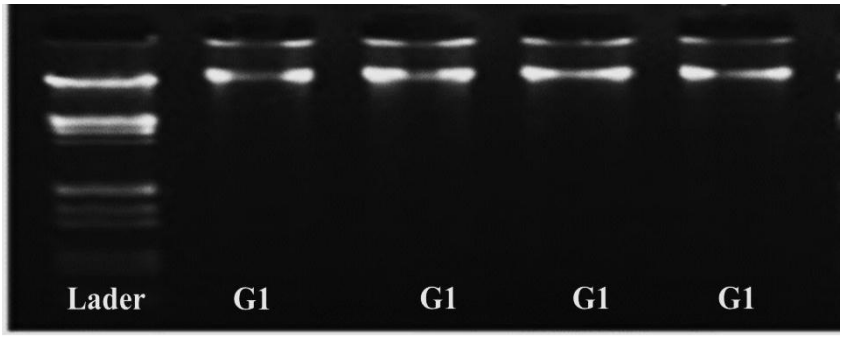
که در رابطه بالا Y_{ij}: مشاهدات مربوط به صفت چند قلوزایی، µ: میانگین صفت در جامعه، G_i: اثر i: امین الگوی ژنوتیپی در جایگاه ژنی، E_{ij}: اثر باقی مانده می‌باشد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از الکتروفورز DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد در شکل ۱ نمایش داده شده است. نتایج حاکی از آن است که DNA استخراج شده کیفیت لازم را برای استفاده در آزمایشات ژنتیک را دارد.

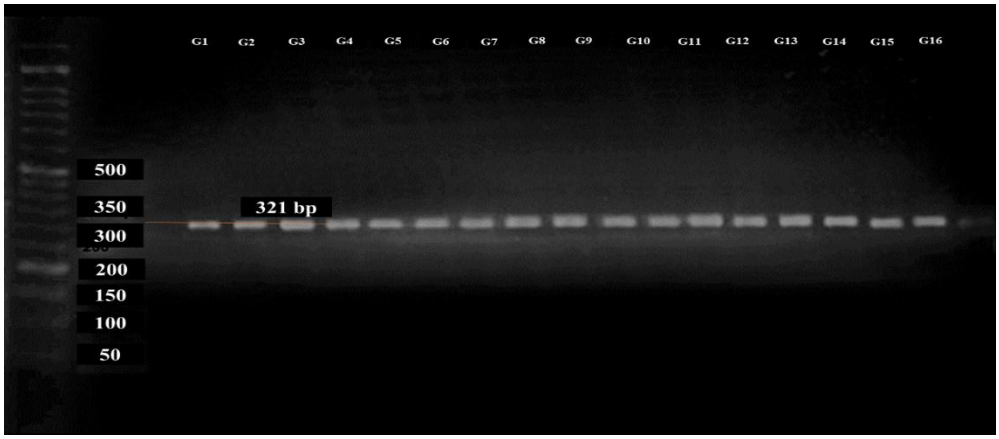
[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-06-09]

[DOI: 10.52547/rap.11.29.116]



شکل ۱- کیفیت DNAهای استخراج شده از خون گوسفند روی ژل آگارز ۱ درصد
Figure 1. The quality of DNA samples extracted from sheep blood on 1 percent agarose gel.

اکثر DNAهای استخراج شده عاری از 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 GPR54 نشان داد که قطعه ۳۲۱ جفت بازی در نظر گرفته شده به خوبی و بدون هیچ باند غیراختصاصی تکثیر یافته است (شکل ۲).

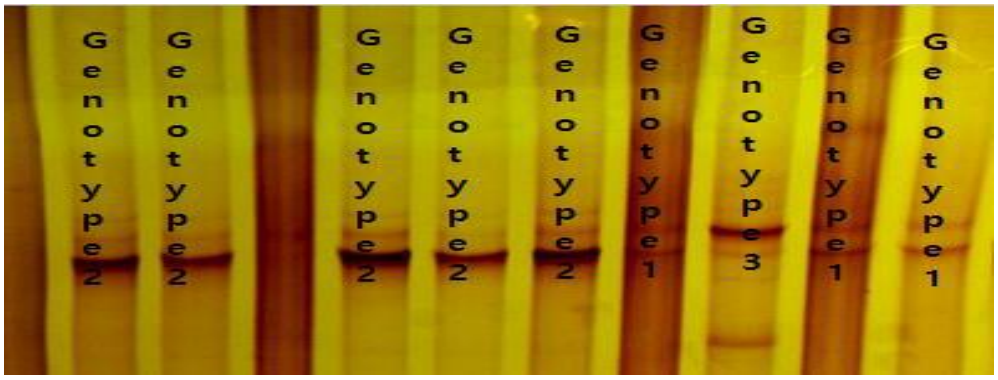


شکل ۲- نمونه‌ای از محصولات PCR لود شده روی ژل آگارز ۱/۵ درصد
Figure 2. PCR products were loaded on 1.5 percent agarose gel

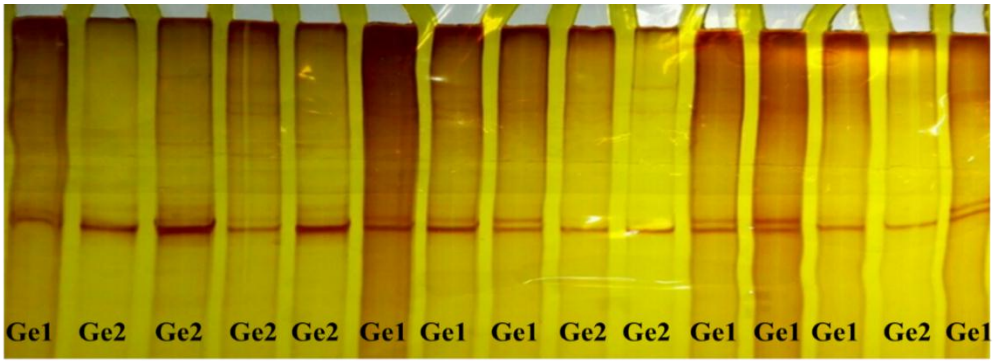
در این مطالعه نشانگر مولکولی مورد استفاده ۱۰۰۰ جفت بازی و متعلق به شرکت الیم طب بود. نتایج حاصل از SSCP و رنگ آمیزی پلی اکریل آمید بیانگر ۳ و ۲ الگوی باندی متفاوت به ترتیب در نژاد سنجابی و قزل بود که در شکل ۳ و ۴ مشاهده می‌شود.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-06-09]

[DOI: 10.52547/rap.11.29.116]



شکل ۳- الگوهای SSCP مشاهده شده برای ژن GPR54 در گوسفند نژاد سنجابی
Figure 3. SSCP patterns observed for GPR54 gene in Sanjabi sheep breed



شکل ۴- الگوهای SSCP مشاهده شده ژن GPR54 در گوسفند نژاد قزل
Figure 4. SSCP patterns observed for GPR54 gene in Ghezel sheep breed

بنابراین الگوهای باندی متفاوت حاکی از وجود تنوع بالا در قطعه تکثیر شده اگزون ۴ ژن GPR54 است. تعداد هر کدام از الگوهای ژنوتیپی مربوط به هر کدام از گروه‌های ژنتیکی شمارش شده و فراوانی هر کدام محاسبه شد. نتایج مربوط به فراوانی‌های ژنوتیپی مربوط به نژادهای سنجابی و قزل در جدول ۴ آورده شده است.

جدول۴- فراوانی‌های ژنوتیپی مشاهده شده در گوسفندان نژاد سنجابی
Table 4. The observed genotypic frequencies in Sanjabi and Ghezel sheep breeds

نژاد	الگوی ژنوتیپی	فراوانی
سنجابی	Ge1	۵۴/۹۳
	Ge2	۱۷/۵۹
	Ge3	۲۷/۴۸
قزل	Ge1	۴۱/۸۶
	Ge2	۵۸/۱۴

همانطور که در جدول ۴ آورده شده است فراوانی‌های مربوط به الگوهای ۱ تا ۳ در نژاد سنجابی به ترتیب برابر ۵۴/۹۳، ۱۷/۵۹ و ۲۷/۴۸ و برای الگوهای ۱ و ۲ به ترتیب در نژاد قزل برابر ۴۱/۸۶ و ۵۸/۱۴ درصد بود. همان‌طور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود در نژاد سنجابی الگوی ۱ با فراوانی ۵۴/۹۳ درصد بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داده است. در مقابل الگوی ۲ با فراوانی ۵۸/۱۴ درصد بیشترین فراوانی را در نژاد قزل دارد. وجود چند شکلی در جمعیت‌های مورد مطالعه می‌تواند ناشی از جهش‌های تک نوکلئوتیدی درون جمعیت‌های مورد مطالعه باشد. بنابراین وجود تنوع بیشتر در نژاد سنجابی نسبت‌به نژاد قزل می‌تواند به منشا ژنتیکی این دو نژاد مربوط باشد. همچنین عدم مشاهده بخشی از چندشکلی (الگوی ژنوتیپی Ge3) در نژاد قزل می‌تواند مربوط به تعداد کم نمونه برای این گروه ژنتیکی باشد. به‌طوری که احتمال دارد با بررسی تعداد افراد بیشتری از این جمعیت یا افراد دیگری از جمعیت‌های دیگر، وضعیت تنوع در جهت افزایش چندشکلی تغییر پیدا کند. با توجه به اهمیت این ژن در عملکرد تولیدمثلی دام‌های اهلی، وجود تنوع ژنتیکی در جایگاه مورد بررسی می‌تواند به شرط ارتباط آن با عملکرد صفات تولیدمثلی نوید بخش انتخاب در جهت مطلوب صنعت دامپروری باشد.

مطالعات متعددی وجود چند شکلی در این ژن را گزارش کرده‌اند. تانگ و همکاران (۱۸) پلیمورفیسم ژن GPR54 در گوسفند نژاد Tail Han را مورد بررسی قرار دادند.در گوسفند Tail Han فرکانس آلل AG، AA و GG به ترتیب ۰/۲۵۰، ۰/۵۰۰ و ۰/۲۵۰ بود.آنها همچنین گزارش کردند که در ارتباط با دوقلوزایی تفاوت معنی داری بین سه ژنوتیپ وجود ندارد که با نتایج تحقیق ما در گوسفند نژاد قزل از نظر عدم معنی‌داری مطابقت داشت. انواری و همکاران (۲) با بررسی اگزون 4 ژن GPR54، وجود چندشکلی را در نژادهای مهربان و شال و

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-06-09]
[DOI: 10.52547/rap.11.29.116]

نیز آمیخته‌های آنها بانژاد رومانوف را گزارش نمودند. ناحیه مذکور دارای چندشکلی بود که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی داشت. نتایج مطالعه‌ی حاضر همچنین با نتایج چو و همکاران (۲۰۱۱) مطابقت داشت. نتایج این پژوهش که در گوسفندان نژادهای Hou، Tail Han و Corriedale با استفاده از تکنیک‌های PCR- RFLP و PCR-SSCP صورت گرفته شده بود، وجود چندشکلی در این نژادها را نشان داد که با نتایج پژوهش حاضر همخوانی دارد. این چند شکلی مربوط به یک جهش جایگزینی تک نوکلئوتیدی A-G در جایگاه ۱۲۵ و جهش دیگر مربوط به حذف یک توالی جفت بازی در جایگاه ۱۶۳ تا ۱۶۷ بود. از این رو به نظر می‌رسد که قطعه منطقه تنظیمی این ژن در نژادهای مختلف دارای تنوع بالایی است و استفاده از تکنیک PCR- SSCP به عنوان روشی با کارایی بالا جهت شناسایی چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی در این ژن می‌تواند مورد ملاحظه قرار گیرد. فنگ و همکاران (۹) طی بررسی اگزون ۵ ژن GPR54 روی بزهای نژاد کشمیری و بوئر دو جهش تک‌نوکلئوتیدی G-A در جایگاه ۸۲۵ جفت بازی و C-T در جایگاه ۹۸۱ جفت بازی شناسایی کردند. نتایج مربوط به بخش بررسی ارتباط چندشکلی‌های شناسایی شده این ژن با بلوغ زودرس نشان داد که بزهای هتروزیگوت نسبت به بزهای هموزیگوت به‌طور معنی‌داری زودتر به بلوغ جنسی می‌رسند.. چو و همکاران (۴) چندشکلی ژن GPR54 ارتباط آنها با تعداد بره در هر زایش را مورد بررسی قرار دادند. در این پژوهش نواحی مربوط به اگزون‌های ۱، ۲ و ۵ از ژن GPR54 به روش PCR -SSCP مورد مطالعه قرار گرفتند. انواع چند شکلی در آنها تشخیص داده شد. وجود چند شکلی تحقیق حاضر با نتایج چو و همکاران (۴) مطابقت داد. همچنین وجود چند شکلی در مطالعه حاضر با نتایج مطالعات کا و همکاران (۳) روی نژاد بز Jining Gery و نیز نتایج Feng و همکاران (۹) روی بزهای نژاد کشمیری و بوئر مطابقت دارد.

جدول ۵- مقایسه میانگین بره گیری بین ژنوتیپ‌های مختلف در گوسفندان نژاد سنجابی و قزل

Table 5. Least square means of lambing between different genotypes ze in Sanjabi and Ghezel sheep breeds

نژاد	وضعیت معنی‌داری اثر الگوی ژنوتیپی	الگوی ژنوتیپی	حداقل میانگین مربعات
سنجابی	*		
		Ge1	۱/۲۹^{ab} ± ۰/۱۱
		Ge2	۱/۰۷^{b} ± ۰/۱۴
		Ge3	۱/۳۷^{a} ± ۰/۱۲
قزل	ns		
		Ge1	۱/۲۵ ± ۰/۱۷
		Ge2	۱/۳۳ ± ۰/۱۲

* و ns: به ترتیب نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد و غیر معنی‌داری هستند و حروف لاتین غیر مشاب بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند.

نتایج بدست آمده از بررسی ارتباط الگوهای ژنوتیپی با صفت چند قلوزایی در نژاد سنجابی نشان داد که الگوی سوم (Ge3) دارای بیشترین تعداد بره به ازای هر زایش است و الگوهای اول و دوم در مراحل بعدی قرار دارند. نتایج همچنین نشان داد که تفاوت عملکرد تولیدمثلی مربوط به الگوی ژنوتیپی در نژاد قزل، غیرمعنی‌دار است (جدول ۵). نتایج مطالعات چو و همکاران (۴) نشان داد که چند شکلی‌های شناسایی شده ژن GPR54 ممکن است با صفت چندقلوزایی در گوسفند ارتباط داشته باشد. وجود ارتباط احتمالی ژنوتیپ‌های شناخته شده با صفت چند قلوزایی با نتایج تحقیق حاضر در ارتباط با نژاد سنجابی مطابقت دارد ولی با نتایج گوسفندان قزل مغایر است. کا و همکاران (۳) چندشکلی ژن GPR54 و ارتباط آن با دوقلوزایی در نژاد بز Jining Gery را مورد بررسی قرار دادند. آنها گزارش کردند ژن GPR54 می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر باعث افزایش تعداد بره در هر زایش در بزهای نژاد Jining Grey باشد. وجود ارتباط احتمالی با صفت چند قلوزایی با نتایج مربوط به گوسفندان نژاد سنجابی مطابقت دارد ولی مغایر با نتایج مربوط به گوسفندان نژاد قزل است. انواری و همکاران (۲) ارتباط معنی‌داری بین چند شکلی شناسایی شده در جمعیت‌های مورد مطالعه گوسفند با عملکرد تولید مثلی مشاهده نکردند. فنگ و همکاران (۹) روی بزهای نژاد کشمیری و بوئر مطابقت دارد. فنگ و همکاران (۹) تاثیر چند شکلی شناخته شده در ناحیه اگزون ۵ ژن GPR54 روی بلوغ زودرس بزهای نژاد کشمیری و بوئر را معنی‌دار گزارش کردند، به‌طوری که بزهای هتروزیگوت برای جایگاه مورد مطالعه نسبت به بزهای موزیگوت زودتر به بلوغ جنسی رسیدند. در هر حال علیرغم وجود نتایج ضد و نقیض برای بررسی ژن GPR54 به نظر می‌رسد که بخشی از این تفاوت‌ها مربوط به زمینه‌ی ژنتیکی دام‌های مربوطه است. در کنار این عامل بخشی از تفاوت‌ها می‌تواند مربوط به بررسی بخش‌های مختلف ژن مربوطه در مطالعات مختلف باشد. به‌طوری که از میان تمام چندشکلی‌های شناسایی شده برای این ژن، فقط برخی از آن‌ها با عملکرد تولید مثلی ارتباط تنگاتنگ خواهند داشت و شانس معرفی شدن به‌عنوان نشانگر ژنتیکی برای صفت عملکرد تولیدمثلی را پیدا خواهند کرد. با توجه به شناسایی تاثیر معنی‌دار الگوهای ژنوتیپی مختلف با صفات عملکرد تولید مثلی در نژاد سنجابی، می‌توان چنین برداشت نمود که عامل ژنتیکی مسئول بر میزان باروری در نژاد سنجابی می‌تواند مربوط به ناحیه اگزون ۴ ژن GPR54باشد. چند شکلی موجود در ژن GPR54 گوسفند نژاد سنجابی می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر برای صفت دوقلوزایی مورد استفاده قرار گیرد. در هرحال نتایج پژوهش حاضر در کنار مطالعات انجام شده دیگر روی این جایگاه ژنی و حتی سایر ژن‌های مرتبط با عملکرد

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-06-09]

[DOI: 10.52547/rap.11.29.116]

تولید مثلی دیگر می‌تواند در شناسایی عملکرد دقیق این ژن روی باروری موثر باشد. حتی در مواردی که عملکرد تولید مثلی مربوط به وجود ژن‌های بخصوصی نیست و مجموعه ژنی حیوان تعیین کننده عملکرد نهایی حیوان است، شناخت عملکرد دقیق‌تر ژن‌هایی از قبیل GPR54 و استفاده از اطلاعات آن در برنامه‌های انتخابی، به دلیل تجمعی بودن اثر ژن‌های مختلف، می‌تواند در افزایش عملکرد تولیدمثلی حیوان نقش داشته باشد. بنابراین با توجه به اهمیت این ژن و نقش اساسی آن در مسیرهای بیولوژیکی صفات تولید مثلی، مطالعات بیشتری با تعداد بیشتر نمونه و توالی‌یابی الگوهای ژنوتیپی مختلف برای تعیین ارتباط دقیق‌تر واریانت‌های ژن GPR54 با صفات تولید مثلی و معرفی این جایگاه به‌عنوان کاندیدای ژنتیکی برای صفات تولید مثلی، ضرورت داد.

منابع

1. Acierno, S.A. 2005. Kisspeptins and GPR54- The new biology of the mammalian GnRH axis. Cell metabolism, 1(5): 293-296.
2. Anvari, S. 2016. Polymorphism of the GPR54 gene and its relationship with mammals in *kind* sheep. Master. Thesis, Bu Ali Sina University, Hamedan, Iran. 108 pp (In Persian).
3. Cao, G.L., M.X. Chu, L. Fang, T. Feng, R. Di and N. Li. 2011. Analysis on DNA sequence of GPR54 gene and its association with litter size in goats. Molecular biology reports, 38(6): 3839-3848.
4. Chu, M., C. Xiao, T. Feng, Y. Fu, G. Cao, L. Fang, R. Di, Q. Tang, D. Huang, K. Li and N. Li. 2015. Polymorphisms of KiSS1 and GPR54 genes and their relationships with litter size in sheep. Molecular biology reports, 39: 3291-3297.
5. Chu, M.X., S. Wang and L. Fang. 2004. Association between PCR-SSCP of growth differentiation factor 9 genes and high prolificacy in small tail han sheep. Animal Biology and Technology, 15: 111-120.
6. Chu, M.X., Z.H. Liu, C.L. Jiao, Y.Q. He, L. Fang, S.C. Ye, G.H. Chen and J.Y. Wang. 2007. Mutations in BMPR-IB and BMP15 genes are associated with litter size in Small Tailed Han Sheep (*Ovis aries*). Journal of Animal Science, 85: 598-603.
7. Eghbalsaied, S., K. Ghaedi, M. Forouzanfar, M. Hajian., S.M. Hosseini and M.H. Nasr-e-Esfahan. 2009. Science and technology of farm animal Transgenesis. Yakhteh Medical Journal, 11(2): 78-87.
8. Farajzadeh, M., A. Rahimi, H. Sayahzade, A. Dehnad, A. Elyasi and A. Javanmard. 2005. Polymorphism of candida gene for twinning (GDF9) in Mazandaran Zel sheep population using PCR-RFLP technique. 4th National Biotechnology Conference of the Islamic Republic of Iran Kerman (In Persian).
9. Feng, G., L. Shou- ren, S. Guo-Qing and Y. Li-Guo. 2009. Polymorphism of FecB gene in nine sheep breeds or strains and its effects on litter size. Lamb growth and development .Animal reproduction science, 70: 98-104.
10. Hanrahan, J.P., S.M. Gregan, P. Mulsant, M. Mullen, G.H. Davis, R .Powell and S.M. Galloway. 2004. "Mutations in the genes for 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: 900-909.
11. Lee, D.K., T. Nguyen, G.P. O'Neill, R. Cheng, Y. Liu, A.D. Howard, N. Coulombe, C.P. Tan, A.T. Tang-Nguyen, S.R. George and B.F. O'Dowd. 1999. Discovery of a receptor related to the galanin receptors. FEBS Lett, 446: 103-107.
12. Messager, S., E.E. Ma, D. Chatzidaki, A.G. Hendrick, D. Zahn, J. Dixon, R.R.Thresher, I. Malinge, D. Lomet, M.B. Carlton, W.H. Colledge, A. Caraty and S.A. Aparicio. 2005. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled.
13. Mingxing, Ch., X. Chaoting, T. Feng and Y. Fu. 2012. Polymorphisms of KISS1 and GPR54 genes and their relationships with litter size in sheep. Springer Science.
14. Muir, A.L., L. Chamberlain, N.A. Elshourbagy, D.J. Michalovich, D.J. Moore and A. Calamari. 2001. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KISS-1. J Biol Chem, 3; 276(31): 28969-75.24.
15. Orita, M., Y. SuzukiSekiya and K. Hayashi. 1989. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. Genomics, 5: 874-879.
16. SAS Institute Inc .2004. SAS/STAT User's Guide. Version 9.1. Cary, NC: SAS Institute Inc.
17. Semple, R.K., J.C. Achermann, J. Ellery, I.S. Farooqi, F.E. Karet, R.G. Stanhope, S. O'Rahilly and S.A. Aparicio .2005. Two novel missense mutations in G protein-coupled receptor 54 in a patient with hypogonadotropic hypogonadism. Journal Clin Endocrinol Metab. 90: 1849-1855.
18. Tang, Q.Q., M.X. Chu, G.L. Cao, L .Fang, R .Di, T. Feng and D.W. Huang .2012. Association between polymorphism of GPR54 gene and litter size in Small Tail Han sheep. Livest. Science, 143: 97-103.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-06-09]

[DOI: 10.52547/rap.11.29.116]

Association of Exon 4 Region of Gpr54 Gene Polymorphisms with Litter Size Trait in Iranian Sanjabi and Ghezel Sheep Breeds by PCR –SSCP

Mariyeh Ghasemi[1], Ali Hashemi[2], Mehdi Mokhber[3] and Ronak salehi[4]

1 and 3- M.Sc. Student and Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Urmia University
2- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Urmia University,
(Corresponding author: a.hashemi50@gmail.com)
4- Ph.D. Student of Tabriz University
Received: September 10, 2019 Accepted: November 9, 2020

Abstract

G-protein-coupled receptor (GPR54) is one of the known gene affecting fecundity. This gene affects the ovulation rate and litter size performance. A total of 160 animals including Sanjabi (n=100) and Ghezel (n=60) were used to identify polymorphisms of GPR54 gene and their influence on litter size. Genomic DNA was extracted by commercial DNA kit. The genotypic patterns were detected using the polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). The genotypic patterns frequencies for three detected patterns in Sanjabi sheep were 54.93, 17.59 and 17.59 percent, and for two detected patterns of Ghezel were 41.86, 58.14 percent, respectively. Significant association (P<0.05) was identified between detected genotypes with litter size in Sanjabi, but no significant association (P>0.05) was found between detected polymorphisms with litter size in Ghezel sheep. Although the results showed that the detected polymorphisms in this gene can be used as a marker for twinning in Sanjabi sheep but, it may be necessary to carry out further studies with larger sample sizes to find an exact correlation between GPR54 gene variants and fecundity trait.

Keywords: Litter Size, GPR54 Gene, Sheep, PCR- SSCP

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-06-09]

[DOI: 10.52547/rap.11.29.116]