دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

"مقاله پژوهشی"

ارتباط چندشکلی اگزون یک ژن *Kiss1* با صفت چندقلوزایی در گوسفندان نژاد سنجابی و قزل به‌روش PCR-SSCP

نعیمه پاک طینت[۱]، علی هاشمی[۲]، مختار غفاری[۳]، حسن خمیس آبادی[۴] و روناک صالحی[۵]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه
۲- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه (نویسنده مسوول: a.hashemi50@gmail.com)
۳- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه
۴- استادیار پژوهشی بخش تحقیقات علوم دامی،مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی کرمانشاه
۵- دانشجوی دکترای تخصصی دانشگاه تبریز

تاریخ ارسال: ۹۹/۰۳/۰۱ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۴/۱۸
صفحه: ۱۲۶ تا ۱۳۳

چکیده

ژن *Kiss1* از جمله ژن‌های شناخته‌شده مؤثر بر باروری است که در افزایش تخمک‌گذاری و چندقلوزایی تأثیر دارد. در مطالعه حاضر از تعداد ۱۰۰ راس گوسفند نژاد سنجابی ایستگاه پرورش مهرگان استان کرمانشاه و ۵۰ راس گوسفند نژاد قزل ایستگاه پرورش گوسفند دانشگاه ارومیه خونگیری به‌عمل آمد. پس از انجام استخراج DNA، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) جهت تکثیر قطعه ۳۳۱ جفت بازی از اگزون ۱ ژن *Kiss1* با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی انجام گرفت. چندشکلی فضایی تک‌رشته‌ایSSCP محصولات PCR با استفاده از ژل پلی‌آکریل‌آمید و رنگ‌آمیزی ژل به‌روش نیترات نقره به‌دست آمد. نتایج بیانگر وجود الگوهای متفاوت بود که می‌تواند ناشی از وجود چندشکلی در این جایگاه باشد. در نمونه‌های مورد مطالعه ۵ الگوی ژنوتیپی مختلف ۱، ۲، ۳، ٤ و٥ برای نژاد سنجابی به‌ترتیب با فراوانی ۰/٤٦، ۰/۲۳، ۰/۰۳، ۰/۱۷ و ۰/۱۱ و دو الگوی ژنوتیپی مختلف ۱و ۲ برای نژاد قزل به‌ترتیب با فراوانی ۰/۲٤ و ۰/ ۷٦ مشاهده شد. آنالیز آماری نشان داد اثر الگوهای متفاوت ژنتیکی بر صفت چندقلوزایی در نژاد سنجابی معنی‌دار (p<۰/۰۵) ولی در نژاد قزل معنی‌دار نبود. نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر نشان داد که تنوع موجود در اگزون یک ژن *Kiss1* را می توان برای برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگرها در گوسفندان نژاد سنجابی مورد توجه قرار داد.

واژه‌های کلیدی: چندقلوزایی، ژن *Kiss1*، گوسفند، PCR- SSCP

مقدمه

امروزه اصلاح نژاد در حیوانات مزرعه‌ای به‌منظور بهبود بازده اقتصادی حیوانات با استفاده از نژادهای تجاری موجود انجام می‌شود. در سال‌های اخیر بهبود صفات تولیدمثلی در گوسفند توسط تولیدکنندگان مورد توجه زیادی قرار گرفته است. از جمله این صفات تعداد نتاج در هر زایش است که سودمندی مزارع پرورش گوسفند به‌طور عمده‌ای تحت تاثیر تعداد فرزندان قرار می‌گیرد علاوه‌بر دامپروران، متخصصین اصلاح نژاد نیز استفاده از حیوانات چندقلوزا را نسبت به حیوانات تک‌قلوزا ترجیح می‌دهند. همچنین امکان تکثیر ژن خارجی هدف در حیوانات تراریخته چندقلوزا نسبت به تک‌قلوزاها زیادتر بوده و به‌همین دلیل استفاده از حیوانات چندقلوزا به‌خصوص دام‌های اهلی مورد توجه متخصصین اصلاح نژاد است (۴). میانگین میزان دوقلوزایی در جمعیت گوسفندان ایران کمتر از ۱۰ درصد می‌باشد (۶). بنابراین یکی از مشکلات موجود در صنعت گوسفندداری ایران پایین‌بودن 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 و این گوسفند نژادی 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 بوده این گوسفند دارای سری نسبتاً بزرگتر از نژاد اصلی افشاری است و پشم‌های ضخیم‌تر و کم پشت‌تری دارد (۲۴). اگر چه صفت تولیدمثل از جمله صفات کمی و از نظر توارث جزء صفات چندژنی می‌باشد، اما در سال های اخیر نشان داده شده که کنترل تولیدمثل 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 (۸).

کیس پپتین(kisspeptin) محرکی قوی برای آزادسازی هورمون آزادکننده گنادوتروپینها (GnRH)[1] است. نورون‌های کیس پپتین (KP) در کنش‌های بازگشتی استرویید‌های تخمدان نقش دارند (۱۱). این ژن روی کروموزوم شماره ۱۲ گوسفند قرار گرفته و دارای ۳ اگزون است (NCBI). مجموعه کیس پپتین‌ها در ابتدا به‌عنوان ژن‌های سرکوب‌کننده بیماری‌ها از جمله سرطان شناخته شدند (۱۲). ژن *Kiss1*،

1- Gonadotropin-releasing hormone

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1399.11.30.14.6]
[DOI: 10.52547/rap.11.30.126]

پروتئینی ۱۴۵ اسیدآمینه‌ای را کد می‌کند که به یک پپتید ۵۴ اسید آمینه‌ای شکسته می‌شود کیس پپتین ۵۴ (Kiss54) نیز نامیده می‌شود. از آنجا که ژن *Kiss1* در ابتدا به‌عنوان ژن‌های سرکوب‌کننده سرطان شناخته می‌شد، آن را متاستین نیز می‌نامند (۱۳). در سال ۲۰۰۳ سه گروه به‌طور همزمان کشف کردند که Kiss1(GPR54) آغازکننده بلوغ جنسی در دو گروه مردان و موش‌ها است. به‌علاوه Kisspeptin یک محرک قوی گنادوتروپین ناشی GnRH است که ممکن است بازخورد استرواییدی مثبت و هم منفی در سطح هیپوتالاموس داشته باشد. مطالعات ژنتیکی در انسان از دست‌دادن عملکرد و جهش‌های عملکردی در بیماران مبتلا به هیپوگنادیسم و بلوغ زودرس را نشان داده است (۱۹). اگرچه رابطه بین متاستاز Kisspeptin و نقش عصبی عضلانی آن هنوز مشخص نیست سطوح بالایی از آن در خون محیطی زنان باردار کشف شده است. به‌علاوه سطوح بالای Kiss1R و Kisspeptin در جفت انسان طی سه‌ماهه اول بارداری مشاهده شده است (۱۲).

به‌نظر میرسد که استرواییدهای جنسی نقش مهمی را در بیان Kisspeptin ایجاد می‌کنند. در موش و میمون سطح mRNA Kiss1 در هیپوتالاموس قبل از بلوغ جنسی پایین است اما در زمان رشد جنسی به‌طور چشمگیری افزایش می‌یابد (۹). تزریق Kisspeptin به حیوانات سالم، محرک قدرتمند برای ترشح گنادوتروپین و پپتیدهای Kisspeptin محرک‌های قوی ترشح گنادوتروپین در چندگونه از پستانداران از جمله جوندگان (۷)، گوسفند (۲۲) میمون (۲۱) و انسان (۳) هستند. بنابراین جهش‌های از دست‌دادن عملکرد Kiss1 به‌نظر می‌رسد مقدار GnRH را کاهش دهد بدون اینکه تداخلی با پالس اصلی GnRH داشته باشد (۲۳). امروزه PCR-SSCP به‌عنوان روشی توانمند و قابل اطمینان جهت آزمایش چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی (SNP)[1] در تعیین ژنوتیپ به‌شمار می‌رود. تکنیک SSCP[2] روش مؤثری در شناسایی تنوع توالی تکثیرشده می باشد (۱۸). اساس این تکنیک مهاجرت DNA دناتوره شده از میان ژل پلی‌آکریل‌آمید غیردناتوره[3] براساس اندازه و توالی آن می‌باشد. بنابراین، وجود حتی یک جهش نقطه‌ای، با تفاوت حرکت در روی ژل قابل مشاهده می‌باشد. 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، علی‌رغم اینکه سایر ژن‌های موثر بر چندقلوزایی در نژادهای مختلف به‌وسیله محققین زیادی مورد بحث و بررسی قرار گرفته، اما مطالعات اندکی روی ژن Kiss1 انجام گرفته است. لذا هدف از انجام پژوهش حاضر، شناسایی چندشکلی ناحیه اگزون ۱ ژن Kiss1 در گوسفندان نژاد قزل و سنجابی با استفاده از روش چندشکلی فضایی رشته‌های منفرد مبتنی‌بر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR-SSCP) همچنین شناسایی و تعیین الگوهای ژنوتیپی و ارتباط آن‌ها با صفت چند قلوزایی بود.

مواد و روش‌ها

در مطالعه حاضر از تعداد ۱۵۰رأس از دو نژاد گوسفند شامل ۱۰۰ رأس گوسفند نژاد سنجابی موجود در ایستگاه پرورش مهرگان استان کرمانشاه و ۵۰ رأس گوسفند نژاد قزل موجود در ایستگاه پرورش گوسفند دانشگاه ارومیه به‌صورت تصادفی و در سنین مختلف، با استفاده از ونوجکت‌های 5ml حاوی ماده ضد انعقاد EDTA از سیاهرگ وداجی خون‌گیری انجام شد. و سپس در مجاورت با یخ از ایستگاه پرورش به آزمایشگاه منتقل گردیدند و تا زمان استخراج DNA در فریزر با دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. استخراج DNA با استفاده از کیت شرکت سیناژن ایران (DNTTM Kit) طبق دستورالعمل کیت مذکور انجام شد. جهت ارزیابی DNA استخراج‌شده از روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز با غلظت ۱ درصد استفاده شد. 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 ۳۳۱ جفت باز از اگزون شماره یک ژن *Kiss1* گوسفند با استفاده از سایت primer 3plus طراحی شد.که توالی آغازگرهای رفت و برگشت به‌ترتیب 5′- GTTTCCATGCTGTGTCGGTT-3′ و 5′-TCCCAACCTTCTTCCCAGAC -3′ بود. واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر (مسترمیکس ۱۰ میکرولیتر، ۱ میکرولیتر از هر یک از آغازگرها با غلظت ۱۰ پیکومول، یک میکرولیتر DNA با غلظت ng/µl ۱۰۰-۱۵۰ و ۷ میکرولیتر آب مقطر) انجام شد. جهت انجام PCR، یک میکرولیتر از هر نمونه DNA ژنومی داخل میکروتیوب‌های مخصوص PCR ریخته شد. سپس با توجه به تعداد نمونه‌ها اقدام به تهیه مخلوطی از مواد مورد نیاز برای همه نمونه‌ها گردید. جهت بهینه‌سازی واکنش PCR برنامه‌های حرارتی مختلفی مورد استفاده قرار گرفت ولی نهایت برنامه حرارتی زیر با ۳۵چرخه، ایده‌آل‌ترین شرایط برای تکثیر ژن Kiss-1 تشخیص داده شد واسرشته سازی اولیه DNA به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، واسرشته سازی DNA به‌مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر به DNA به‌مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد، بسط DNA به‌مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و بسط نهایی به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، محصولات PCR روی ژل آگارز دو درصد حاوی اتیدیوم برماید با ولتاژ ۱۰۰ ولت به‌مدت ۲۰ الی ۳۰ دقیقه الکتروفورز شدند. قطعه تکثیرشده با استفاده از دستگاه ژل داک مشاهده و عکس‌برداری شد. برای تشخیص اندازه قطعات تکثیرشده از نشانگر ۵۰ جفت بازی (سیناژن-ایران) استفاده شد.

1- Single-nucleotide polymorphism 2- Single-strand conformation polymorphism 3- Non-denatured

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1399.11.30.14.6]
[DOI: 10.52547/rap.11.30.126]

تعیین الگوی ژنوتیپی نمونه‌ها به‌روش PCR-SSCP با استفاده از دستگاه الکتروفورز عمودی مدل (PRO-21*22CM) (پایا پژوهش پارس) روی ژل پلی‌آکریل‌آمید (۱۰ درصد) و رنگ‌آمیزی با نیترات نقره انجام گرفت. به‌منظور انجام واکنش SSCP، رشته‌های DNA تکثیرشده، با استفاده از بافرSSCP (شامل برمو فنل بلو ۰/۰۵درصد، گزیلن سیانول ۰/۰۵ درصد، فرمامید ۹۵ درصد و EDTA ۲۰ میلی‌مولار) به نسبت ۴ به ۱۶ به‌مدت زمـان ۱۲ دقیقه در دمـای ۹۷ درجـه سلسیوس تک‌رشته‌ای شدند که بلافاصله پس از این مرحله در داخل یخ قرار گرفتند. الکتروفورز محصولات تک‌رشته‌ای‌شده، روی ژل اکریل‌آمید ۱۰ درصد، با ولتاژ ۲۵۰ به‌مدت ۲۴ ساعت جهت بررسی چندشکلی انجام شد و رنگ‌آمیزی ژل با استفـاده از نیترات نقـره طی سه مـرحله تثبیت، لکه‌گذاری و ظهور صورت گرفت (۱۰).

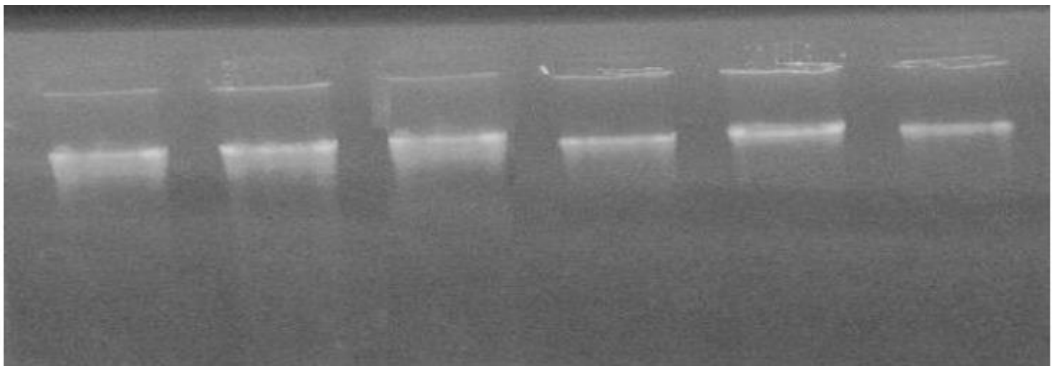
تجزیه آماری مدل مورد استفاده برای بررسی ارتباط الگوهای حاصل از ژن تحت بررسی با صفت مورد نظر در زیر آورده شده است. تجزیه و تحلیل داده‌ها برای صفت چندقلوزایی با استفاده از نرم‌افزار SAS ورژن ۹,۲ و رویه GLM و با استفاده از آزمون مقایسه ای دانکن صورت گرفت (۲۰).

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

که در رابطه بالا Yij: مشاهدات مربوط به صفت چند قلوزایی، μ: میانگین صفت در جامعه، Gi اثر iامین الگوی ژنوتیپی در جایگاه ژنی، Eij: اثر باقی‌مانده می‌باشد.

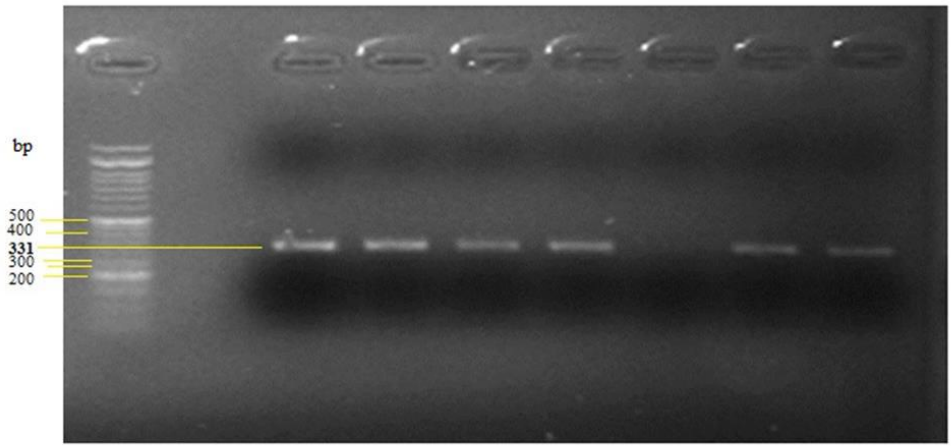
نتایج و بحث

نتایج حاصل از الکتروفورز DNA استخراج‌شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد در شکل ۱ نمایش داده شد.



شکل ۱- نمونه‌های DNA استخراج‌شده از خون گوسفند روی ژل آگارز ۱ درصد
Figure 1. DNA samples extracted from sheep blood on the 1 percent agarose gel

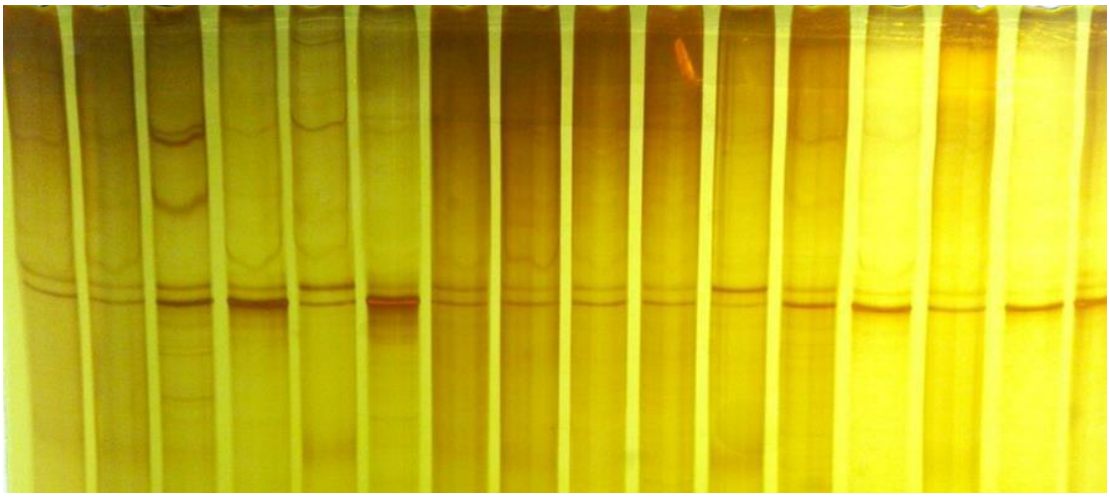
اکثر DNAهای استخراج شده عاری از هرگونه کشیدگی و آلودگی بودند. در نمونه‌های فاقد باند و همچنین نمونه‌های با باند ضعیف مجددا استخراج DNA صورت گرفت. الکتروفورز محصولات تکثیرشده روی ژل آگارز ۱/۵ درصد از جایگاه ژن Kiss1 نشان داد که قطعه ۳۳۱ جفت بازی در نظر گرفته‌شده به‌خوبی و بدون باند غیراختصاصی تکثیریافته است (شکل ۲).



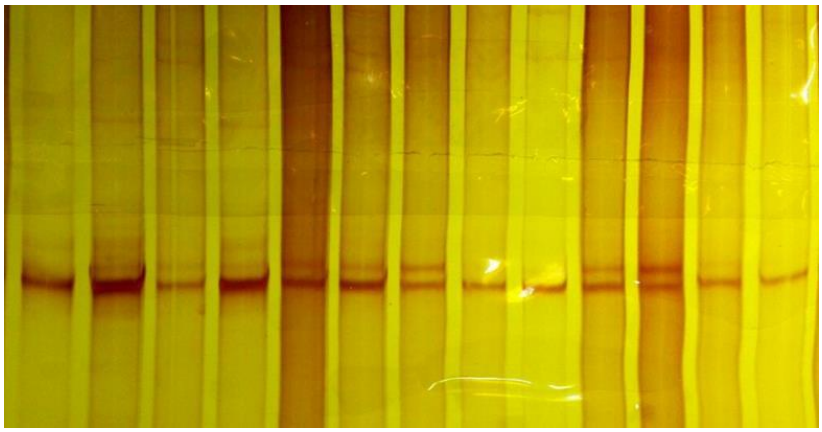
شکل ۲- نمونه ای از محصولاتPCR بارگذاری شده بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد
Figure 2 . PCR products were loaded on 1.5 percent agarose gel

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1399.11.30.14.6]
[DOI: 10.52547/rap.11.30.126]

در این مطالعه نشانگرمولکولی مورد استفاده ۱۰۰۰ جفت بازی و متعلق به شرکت الیم طب بود. نتایج حاصل از SSCP و رنگ‌آمیزی پلی‌اکریل‌آمید بیانگر ۵ و ۲ الگوی باندی متفاوت به‌ترتیب در نژاد سنجابی و قزل بود که در شکل ۳ و۴ مشاهده می‌شود.



شکل ۳- الگوهای SSCP مشاهده شده برای ژن *Kiss1* در گوسفند نژاد سنجابی
Figure 3. SSCP patterns observed for Kiss1 in sanjabi breed sheep



شکل ۴- الگوهای SSCP مشاهده‌شده برای ژن *Kiss1* در گوسفند نژاد قزل
Figure 4. SSCP patterns observed for Kiss1 in Ghezel breed sheep

بنابراین الگوهای ژنوتیپی متفاوت نشان‌دهنده وجود چندشکلی بالا در قطعه تکثیرشده اگزون ۱ ژن *Kiss1* می‌باشد که فراوانی مربوط به الگوهای ژنوتیپی برای جمعیت سنجابی، قزل محاسبه و در جدول ۱ نشان داده شد (جدول ۱).

جدول ۱- فراوانی‌های ژنوتیپی مشاهده‌شده در گوسفندان نژاد سنجابی و قزل
Table 1. Genotypic frequencies observed in sanjabi and Ghezel breed sheep

نژاد	الگوهای باندی	فراوانی
سنجابی	۱	۰/۴۶
	۲	۰/۲۳
	۳	۰/۰۳
	۴	۰/۱۷
	۵	۰/۱۱
قزل	۱	۰/۲۴
	۲	۰/۷۶

همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود الگوی ۱ با فراوانی ۰/۴۶ درصد بیشترین فراوانی را در نژاد سنجابی و الگوی ۲ با فراوانی ۰/۷۶ در نژاد قزل به‌خود اختصاص داده است. الگوهای ژنوتیپی متفاوت بین افراد درون این نژادها، ناشی از جهش‌های تک نوکلئوتیدی بین افراد می‌باشد. درمطالعات گذشته هم تعداد قابل توجهی چندشکلی در این

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1399.11.30.14.6]
[DOI: 10.52547/rap.11.30.126]

ژن توسط محققان مختلف گزارش شده است. با مشخص‌کردن الگوهای ژنوتیپی و همچنین تهیه رکوردهای ثبت‌شده صفت دوقلوزایی برای گوسفندان نژاد قزل و سنجابی، ارتباط الگوهای ژنوتیپی با صفت مذکور مورد بررسی قرار گرفت. نتایج صفت مورد بررسی در جدول ۲ و ۳ مشاهده می‌شود.

جدول ۲ – نتایج تجزیه واریانس اثر ژنوتیپ بر روی صفت دوقلوزایی در گوسفندان نژاد قزل برای ژن *Kiss1*

Table 2. Results of variance analysis of genotype effect on twin traits in Ghezel sheep for Kiss1 gene

منابع	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	P value
ژنوتیپ	۱	۰/۳۶	۰/۳۶	۰/۱۶	۰/۶۹۵
خطا	۲۱	۴/۸۳۳	۰/۲۳۰		
کل	۲۲	۰/۸۷۰			

جدول ۳ – نتایج تجزیه واریانس اثر ژنوتیپ بر روی صفت دو قلوزایی در گوسفندان نژاد سنجابی برای ژن *Kiss1*

Table 3. Results of variance analysis of genotype effect on twin traits in Sanjabi sheep for Kiss1 gene

منابع	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	P value
ژنوتیپ	۴	۲/۳۲	۰/۵۸	۲/۵۲	۰/۰۲۲
خطا	۴۸	۱۱/۵۵	۰/۲۴۰		
کل	۵۲	۱۲/۸۷			

نتایج تجزیه و تحلیل (GLM) برای صفت دوقلوزایی در نژاد قزل و سنجابی که در جدول ۲ و۳ ارائه شده است نشان می‌دهد که این مدل آماری برای صفت دو قلوزایی در سطح ($p<۰/۰۵$) در نژاد سنجابی و قزل به‌ترتیب معنی‌دار و غیرمعنی‌دار شده است.

پژوهشگران گزارش کرده اند که ژن *Kiss1* از ژن‌های موثر بر باروری در بز می‌باشد (۱۵). همچنین احمدی و همکاران (۱) چندشکلی ژن *Kiss1* و ارتباط آن با تعداد بره به ازای هر زایش در گوسفند نژاد مهربان را بررسی کردند نتایج مطالعه این محققین نشان‌دهنده چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی با چهار الگوی متفاوت SSCP در اگزون یک بود. برای اینترون یک تمامی نمونه‌ها دارای الگوی باندی مشابه بودند و هیچ گونه چندشکلی شناسایی نشد. مقایسه فراوانی‌های مشاهده‌شده با مورد انتظار با کمک آزمون کای اسکور نشان داد که فراوانی ژنوتیپ‌ها در اگزون یک به‌طور معنی‌داری متفاوت و در تعادل هاردی واینبرگ نبودند ($p<۰/۰۰۱$). در بررسی پیوستگی بین ژنوتیپ‌های شناسایی‌شده با صفت تعداد بره به ازای هر زایش، ارتباط معنی‌داری مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). که از لحاظ چندشکلی با نتایج تحقیق حاضر و همچنین معنی‌دار بودن نتایج آنالیز بر روی چندقلوزایی در نژاد سنجابی مطابقت داشت. در مطالعه‌ای دیگر توسط چو و همکاران (۲) که در گوسفندان نژادهای اسمال تیل هان، تکسل، دوردست و کوریدال انجام شده است، قطعه ۱۰۶ جفت بازی از اگزون یک این ژن با استفاده از تکنیک PCR-SSCP مورد مطالعه قرار گرفت که شواهد نشان‌دهنده چندشکلی در این جایگاه بود. در تحقیق دیگر توسط لوریدیانا و همکاران (۱۴) در میش‌های نژاد سارادا ایتالیا یک جهش در جایگاه ۱۰۳۵ یافت شده است، و هیچ گونه ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی‌های مشاهده با صفت چندقلوزایی مشاهده نگردید. که یکی از دلایل این امر فراوانی کم آلل A جهش‌یافته و تعداد کم گوسفندان مشاهده شده با ژنوتیپ AA دانسته‌اند. در مطالعه‌ای که توسط مینگ زین و همکاران (۱۷) در گوسفند روی ژن *Kiss1* و ارتباط آن با تعداد بره در هر زایش با تکنیک SSCP انجام شد چندشکلی در اگزون یک ژن Kiss1 در نژاد سمال تیل با ژنوتیپ‌های (AB، AA و BB) و نژاد هو (AA و CC) که از نژادهایی با میزان باروری بالا هستند مشاهده گردید. تاکنون چندشکلی این ژن در ایران تنها در گوسفندان نژادهای مهربان، شال و دورگه‌های آنها با نژاد رومانف توسط رجبی و همکاران (۱۹) بررسی گردیده که ۱۵ الگوی متفاوت برای این نژادها گزارش کرده‌اند که با نتایج تحقیق ما مطابقت داشت. در تحقیق دیگر توسط مایترا و همکاران (۱۵) روی چندشکلی ژن *Kiss1* در ۹ نژاد بز بومی هندی که در صفات بلوغ جنسی و باروری متفاوت بودند، که در اینترون یک و دو این ژن چند شکلی گزارش شد که با صفت دوقلوزایی ارتباط معنی‌داری مشاهده گردید. در تحقیقی دیگر برای بررسی تنوع ژن *Kiss-1* در دو نژاد از بزهای اتیوپی پرورش‌یافته در دو شرایط آب و هوایی و مدیریتی مختلف، با تکثیر دو قطعه ۱۲۱۰ و ۳۲۵ جفت بازی اگزون یک و دو ژن مذکور، ۲۰ تا از جایگاه SNP گزارش کردند که چندشکلی چهار مورد از آن‌ها با صفت چندقلوزایی ارتباط داشته است (۱۶). در مطالعه‌ای دیگر برای تعیین چندشکلی ژن *Kiss1* در سه نژاد بز مصری با روش PCR-RFLP و توالی‌یابی یک قطعه ۳۷۷ بازی یک جهش SNP در هر سه نژاد شناسایی شد که ارتباط چندشکلی جهش فوق با صفت چندقلوزایی در دو نژاد از بزها معنی‌دار گزارش شد (۵). با توجه به ارزش بسیار بالای نژادهای بومی و پایداری نژاد ایرانی باید در حفظ این نژاد به‌عنوان یکی ازذخایر ژنتیکی ارزشمند که در بین میلیون‌ها سال با شرایط اکولوژیکی کشور سازش‌یافته تلاش شود و ضمن حفظ خصوصیات مطلوب آن برای تثبیت و بهبود صفات زایشی، طرح‌های اصلاح نژادی به اجرا درآید. با در نظرگرفتن نتایج همه‌ی گزارش‌های ذکرشده و نتایج این بررسی ژن *Kiss-1* را به‌عنوان ژن کاندیدای مرتبط با چندقلوزایی می‌توان معرفی کرد. لذا با در نظرگرفتن تاثیر افزایش تعداد بره متولدشده و میزان بره‌زایی بر میزان گوشت تولیدی به ازای هر رأس میش در هر سال، کاهش تعداد میش‌های مولد روی مراتع و

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1399.11.30.14.6]
[DOI: 10.52547/rap.11.30.126]

جلوگیری از تخریب مراتع به‌نظر می‌رسد که مطالعه برای پیداکردن جهش در سایر ژن‌های با اثر عمده بر چندقلوزایی در نژاد سنجابی و قزل و سایر نژادهای کشور لازم باشد. از طرفی می‌توان با کشف و واردکردن این ژن‌ها و برنامه‌ریزی برای تکثیر و تثبیت جهش‌های اتفاق‌افتاده مرتبط با ژن‌های باروری کمک قابل توجهی به افزایش تولید و درآمد دامداران کشور انجام داد. تحقیق حاضر وجود چندشکلی ژنتیکی برای ژن *Kiss1* را در گوسفندان نژاد سنجابی و قزل به‌خوبی نشان داد. نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر نشان داد که تنوع موجود در اگزون ۱ ژن *Kiss1* را می توان برای برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگرها در گوسفندان نژاد سنجابی مورد توجه قرار داد. بنابراین لازم است که بخش‌های مورد بررسی در پژوهش حاضر و بقیه قسمت‌های ژن *Kiss1*، در مطالعات آینده با تعداد افراد بیشتری و در نژادهای مختلف گوسفند مورد بررسی قرار گیرد.

منابع

1. Ahmadi, A., Zh. Rajabi, P. Zamani and A.A. Bahari. 2018. Polymorphism of *KiSS-1* gene and its association with litter size in Mehraban sheep. Animal Product Research, 3: 25-34.
2. Chu, M., C. Xiao, T. Feng, Y. Fu, G. Cao, L. Fang, D. Ran, Q. Tang, D. Huang, Y. Ma, K. Li and N. Li. 2012. Polymorphisms of *KiSS-1* and *GPR54* genes and their relationships with litter size in sheep. Molecular Biology Reports, 39: 3291-3297.
3. Dhillo, W.S., O.B. Chaudhri, M. Patterson, E.L. Thompson and K.G. Murphy. 2005. Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. Journal of Clin Endocrinol Metab, 90: 6609-6615.
4. Eghbalsaied, S., K. Ghaedi, M. Forouzanfar, M. H.ajian, S.M. Hosseini and M.H. Nasr-e-Esfahan. 2009. Science and technology of farm animal Transgenesis. Yakhteh Medical Journal, 11(2): 78-87 (In Persian).
5. El-Tarabany, M.S., A.Z. Zaglool, A.A. El-Tarabany and A. Awad. 2017. Association analysis of polymorphism in *KiSS1* gene with reproductive traits in goats. Animal Reproduction Science, 180: 92-99.
6. Farajzadeh, M., Q. Rahimi, H. Sayyahzadeh, A. Dehnad, G.H. Eliasi and A. Javanmard. 2005. Multimodal study of Candida gene for twinning (GDF9) in Mazandaran sheep sheep population using PCR-RFLP technique. Fourth National Conference on Biotechnology of the Islamic Republic of Iran, Kerman, (In Persian).
7. Gottch, M.L., M.J. Cunningham, J.T. Smith, M.S. Popa, B.V. Acohido, W.F. Crowley, S. Seminara, D.K. Clifton and R.A. Stoiner. 2004. A role for Kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. Endocrinology, 145(9): 4073-4077.
8. 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.
9. Han, S.K., M.G. Todman and A.E. Herbison. 2004. Endogenous GABA release inhibits the firing of adult gonadotropin-releasing hormone neurons. Endocrinology, 145: 495-499.
10. Herring, A.J., N.F. Inglis, C. Ojeh, D.R. Snodgrass and J.D. Menzies. 1982. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. Journal of Clinical Microbiology, 16: 473-477.
11. Jafarzadeh Shirazi, M.R. 2008. Role of Kisspeptin in the processes of reproduction of ewes. PhD thesis. Ministry of Science, Research and Technology, University of Tehran.
12. Lee, J.H., M.E. Miele, D.J. Hicks, K.K. Phillips, J.M. Trent, B.E. Weissman and D.R. Welch. 1996. *KiSS-1*, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. Journal of the National Cancer Institute, 88: 1731-1737.
13. Luan, X., Y. Zhou, W. Wang, H. Yu, P. Li, X. Gan, D. Wei and J. Xiao. 2007. Association study of the polymorphisms in the *KISS1* gene with central precocious puberty in Chinese girls. Endocrinology, 157: 113-118.
14. Luridiana, S., M.C. Mura, C. Daga, G. Cosso, S. Bodano, F. Farci and V. Carcangiu. 2014. Influences of melatonin treatment, melatonin receptor 1A (*MTNR1A*) and kisspeptin (*KiSS-1*) gene polymorphisms on first conception in Sarda ewe lambs. Reproduction, Fertility and Development, 47: 154-187.
15. Maitra, A., R. Sharma, S. Ahlawat, M.S. Tantia, M. Roy and V. Prakash. 2014. Association analysis of polymorphisms in caprine *KiSS1* gene with reproductive traits. Animal Reproduction Science, 151: 71-77.
16. Mekuriaw, G., J.M. Mwacharo, D. Dessie, O. Mwai, A. Djikeng, S. Osama, G. Gebreyesus, A. Kidane, S. Abegaz and T. Tesfaye. 2017. Polymorphism analysis of kisspeptin (*KISS1*) gene and its association with litter size in Ethiopian indigenous goat populations. African Journal of Biotechnology, 16(22): 1254-1264.
17. Mingxing, C., X. Chaoting, T. Feng and Y. Fu. 2012. Polymorphisms of KISS1 and GPR54 genes and their relationships with litter size in sheep. Springer Science, 39(3): 3291-7.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1399.11.30.14.6]
[DOI: 10.52547/rap.11.30.126]

18. 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.
19. Rajabi, J., A. Ahmadi, P. Zamani, A. Asghar Bahari, P. Mahmoudi Koohi and R. Abdeli. 2015. Analysis of Polymorphism Kiss1 gene exon 1 in Mehraban sheep and shal and their hybrids with Romanof breed by PCR-SSCP method. The second national conference of livestock and poultry in the country (In Persian).
20. SAS Institute Inc. 2004. SAS/STAT User's Guide. Version 9.1. Cary, NC: SAS Institute Inc.
21. Seminara, S.B., S. Messager, E.E. Chatzidaki, R.R. Thresher and J.S. Acierno. 2003. The GPR54 gene as a regulator of puberty. The New England Journal of Medicine, 349: 1614-1627.
22. Shahab, M., C. Mastronardi, S.B. Seminara, W.F. Crowley and S.R. Ojeda. 2005. Increased hypothalamic GPR54 signaling a potential mechanism for initiation of puberty in primates. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 102: 2129-2134.
23. Smith, J.T., M.J. Cunningham, E.F. Rissman, D.K. Clifton and R.A. Steiner. 2005. Regulation of *Kiss1* gene expression in the brain of the female mouse. Endocrinology, 146: 3686-3692.
24. Saadat Nouri, M. and S. Siah Mansour. 1996. Principles of sheep keeping and breeding. Ashrafi Publications of Tehran (In Persian).

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1399.11.30.14.6]
[DOI: 10.52547/rap.11.30.126]

Association of the Polymorphism *Kiss1* Gene Exon 1 with Twin Traits in Sanjabi, Ghezel Breed Sheep by PCR–SSCP Technique

Naeimeh Pak Tinat[1], Ali Hashemi[2], Mokhtar Ghaffari[3], Hossein Khameis Abadi[4] and Ronak Salehi[5]

1- M.Sc. Student 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)
3- Assistant Professor Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Urmia University
4- Assistant Professor, Animal Science Department, Kermanshah Agricultural and Natural Resources Research and Education Center
5- Ph.D. Student of Tabriz University
Received: May 21, 2020 Accepted: July 8, 2020

Abstract

The *Kiss1* gene is one of the known affective gene in fertility, which affects ovulation and multiplication. In this study, Blood samples were collected from 100 sheep of Sanjabi in Mehregan breeding station in Kermanshah province and 50 sheep Ghezel breeding station of Urmia University. After DNA extraction, the polymerase chain reaction (PCR) was used for specific primers amplification of 331 bp fragment of Exon1 Kiss1 gene. Then single strand conformation polymorphism (SSCP) of PCR products was performed and genotypic patterns were obtained using acrylamid gel and the gel stain was obtained by silver nitrate method. The results showed different patterns that could be due to the presence of polymorphism in this position. Three different genotype patterns in samples 1, 2, 3, 4 and 5 for Sanjabi breed 46% ,23% ,3%, 17% and 11% respectively and two different genotype pattern The frequency were 1and 2 for Ghezel breed 0.24% and 0.76%. The association of observed patterns on the multiplicity trait was significant in Sanjabi breed ($P < 0.05$). But this relationship was not in was significant in Ghezel breeds. The results of this study showed that the variation in exon one of the *Kiss1* gene can be considered in marker assistance selection programs in sanjabi sheep breed.

Keywords: *Kiss1* gene, PCR-SSCP, Sheep, Twin traits

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1399.11.30.14.6]
[DOI: 10.52547/rap.11.30.126]