



بررسی اثر چند شکلی برخی از ژن‌های کاندید بر چند قلوزایی در گوسفندان آمیخته حاصل از تلاقی نژادهای شال ایرانی و رومانوف روسی

علیرضا خان احمدی^۱، قدرت رحیمی میانچی^۲، سید حسن حافظیان^۳، رسول خاتمی نژاد^۴،
نوربیبی مامی‌زاده^۴ و سید ماکان موسوی^۴

۱- دانشجوی دکتری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، عضو هیات علمی دانشگاه گنبدکاووس،
(نویسنده مسئول: ali.khanahmadi@gmail.com)

۲، ۳ و ۵- استاد، دانشیار و دانشجوی دکتری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۴- کارشناس ارشد آزمایشگاه ژنتیک مولکولی گروه علوم دامی دانشگاه گنبدکاووس

تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۰/۲۰

تاریخ دریافت: ۹۳/۱/۲۱

چکیده

این تحقیق به منظور بررسی چند شکلی آلی ژن‌های BMP15 (واریانت FecxG و FecxB)، GDF9 (واریانت G8 و G1) و BMPR-IB (FecB) در آمیخته‌های شال و رومانف انجام شد. برای این منظور ۷۹ نمونه خون از گله موجود در سطح شهرستان گنبد کاووس جمع‌آوری و استخراج DNA به روش بهینه یافته نمکی انجام شد. با استفاده از پرایمرهای اختصاصی قطعات ۱۴۱ و ۱۵۳ جفت بازی از آگزون ۲ ژن BMP15 به ترتیب برای شناسایی جهش‌های Fecx^G و Fecx^B قطعات ۴۶۲ و ۱۳۹ جفت بازی به ترتیب از آگزون‌های ۱ و ۲ ژن GDF9 برای شناسایی واریانت‌های G1 و G8 و یک قطعه ۱۹۰ جفت بازی از ژن BMPR-IB برای شناسایی جهش FecB با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تکثیر شدند. نتایج حاصل از هضم محصولات PCR وجود جهش در جایگاه BMP15.BMPR-IB و آگزون ۲ ژن GDF9 را تأیید نکرد. در حالی که در آگزون ۱ جایگاه GDF9 چندشکلی مشاهده شد، و فراوانی ژنوتیپ هتروزایگوت در این جمعیت به مقدار ۰/۱۱ برآورد شد.

واژه‌های کلیدی: گوسفند آمیخته شال و رومانف، GDF9، BMP15، BMPR-IB، دو قلوزایی

مقدمه

تولید مثل مهم‌ترین صفت اقتصادی در گوسفند است و اصلاح این صفت از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. امروزه مطالعات ژنتیکی در گوسفند مشخص نموده است که به طور ژنتیکی، میزان تخمک‌گذاری و تعداد بزه‌زایی می‌تواند کنترل شود (۹، ۶).

از سال ۱۹۸۰ تاکنون، فعالیت‌های قابل توجهی برای شناسایی و به کارگیری ژن‌های عمده مرتبط با چند قلوزایی در گوسفند نشان داده‌است، ژن‌های بزرگ اثر قابلیت افزایش معنی‌داری بر عملکرد تولیدمثلی گله‌های گوسفند دارند (۱۰). مطالعه در سطح DNA راهی برای استفاده از این ژن‌ها در صنعت دام‌پروری و یک ابزار کارآمد برای افزایش باروری بالا به طور ژنتیکی در گوسفند و بز می‌باشد (۹). بسیاری از مولکول‌هایی که در این فرآیند عمل سیگنال‌دهنده داخل سلولی را دارند، متعلق به خانواده بزرگ GF- می‌باشند (۲۱).

یکی از ژن‌های مؤثر بر چند قلوزایی ژن GDF9 می‌باشد. این ژن یکی از اعضای خانواده TGF بوده و روی کروموزوم شماره ۵ مکان‌یابی شده‌است. این ژن در حدود ۲/۵ کیلو باز طول دارد و شامل دو آگزون و یک اینترون ۱۲۶ جفت بازی می‌باشد (۱۸، ۷، ۱۰). حضور این ژن برای رشد طبیعی فولیکول‌ها در گوسفند ضروری می‌باشد و با اثر بر سلول‌های گرانولوزا برای رشد و تمایز فولیکول‌های تخمدانی ضروری است (۲۷، ۶). هانراهان و همکاران (۱۸) وجود هشت جهش نقطه‌ای در این ژن را در گوسفند کمبریج و بلکلیر شناسایی کردند. یکی از این جهش‌ها در آگزون ۱،

یکی در اینترون و بقیه در آگزون ۲ مشاهده شدند. بررسی‌های انجام شده نشان داد ۳ جهش از این جهش‌ها سبب تغییر نوکلئوتیدی شده ولی تغییری در اسیدآمینه ایجاد نمی‌شود (G2، G3 و G5). در بقیه این جهش‌ها علاوه بر تغییر نوکلئوتیدی تغییر در اسیدآمینه نیز مشاهده شده است. در بین جهش‌های بررسی شده فقط جهش FecG^H (واریانت G8)، جهش تأثیرگذار بر دو قلوزایی معرفی شده است. در این جایگاه ژنی میش‌های هوموزیگوت نابارور و میش‌های هتروزایگوت دارای نرخ تخمک‌گذاری بالایی می‌باشند. اثر این ژن بر خلاف BMP15 بر میزان تخمک‌گذاری بیشتر است به گونه‌ای که هریک کپی از این ژن تخمک‌گذاری را به میزان ۱/۴ در نژادهای کمبریج و بلکلیر افزایش می‌دهد (۱۸، ۷، ۶).

ژن دیگر از خانواده TGF- که بر چند قلوزایی مؤثر است، ژن BMP15 است. این ژن روی کروموزوم X مکان‌یابی شده‌است و شامل ۲ آگزون می‌باشد. همه آلل‌های مربوط به این ژن (FecX^H، FecX^G، FecX^B) همگی FecX^L، FecX^L فنوتیپ مشابهی را نشان می‌دهند، به نحوی که میش‌های هوموزیگوت جهش‌یافته عقیم هستند و هتروزایگوت‌ها، تخمک‌گذاری بیشتری نسبت به افراد هوموزیگوت تیپ وحشی نشان می‌دهند (۱۹، ۱۸).

جهش دیگری که بر چند قلوزایی مؤثر است، جهش در بخشی از کروموزوم ۶ است که شامل گیرنده پروتئین مورفوژنیک استخوان و به نام FecB می‌باشد که با تغییر نوکلئوتید A به G در موقعیت باز ۷۴۶ منجر به تغییر آمینو اسید گلوتامین به آرژنین می‌شود (۳۷).

گرفتند. هدف از آمیخته‌گری افزایش صفت چند قلوژی در نژاد شال می‌باشد. نمونه‌های خون از طریق ورید وداچ گرفته شده، سپس به لوله‌های ونوجکت حاوی ماده ضد انعقاد EDTA منتقل و تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای استخراج DNA از روش نمکی بهینه یافته استفاده شد (۲۹).
ارزیابی کمی و کیفی DNA با استفاده از اسپکتروفتومتر مدل Biochrom و الکتروفورز ژل آگارز انجام شد.

به‌منظور تکثیر دو قطعه ۴۶۲ و ۱۳۹ جفت بازی به‌ترتیب از اگزون ۱ و ۲ ژن GDF9، یک قطعه ۱۵۳ جفت بازی از اگزون دو ژن BMP15 و یک قطعه ۱۹۰ جفت بازی از ژن BMPR-IB از آغازگرهای اختصاصی استفاده شد. مشخصات پرایمرها و جایگاه‌های مورد بررسی در جدول ۱ ارائه شده است. آنالیزهای مربوطه به فراوانی ژنی و ژنوتیپی به کمک نرم‌افزار PopGene version 1.3 انجام شد (۳۹).

رومانوف از جمله نژادهایی است که میزان دوقلوژی در آن بالاست و گزارش شده است که به لحاظ ژنتیکی تحت تأثیر مجموعه‌ای از جایگاه‌های ژنی است (۳۶).

تاکنون گزارشی در خصوص بررسی چند شکلی این جایگاه‌ها در گوسفند رومانف و آمیخته‌های آن مشاهده نشده است. از آن جایی که این نژاد دارای چند قلوژی بالا می‌باشد، ممکن است این ژن‌ها در این نژاد بر چند قلوژی مؤثر باشند.

بنابراین هدف از این تحقیق بررسی چندشکلی ژن‌های BMP15، BMPR-IB و GDF9 مؤثر بر چند قلوژی در آمیخته شال و رومانف بوده است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، ۷۹ راس گوسفند آمیخته شال و رومانف از گله‌ای در منطقه شهرستان گنبد کاووس مورد بررسی قرار

جدول ۱- ویژگی‌های پرایمرها و ناحیه‌های ژنی تکثیر شده

ژن مورد مطالعه	ناحیه تکثیری	آلل	تغییرات بازی	موقعیت باز در توالی	توالی آغازگرها	تغییرات اسید آمینه	آنزیم برشی	محصول PCR
DF9	اگزون ۱	G1	A به G	(۳۵۹)	G1:F5'-GAAGACTGGTATGGGGAATG-3' G1:R5'-CCAATCTGCTCTACACACCT-3'	Arg (R)-His (H)	HhaI	bp462
	اگزون ۲	G8	T به C	(۷۸۸)	B4:S'-ATGGATGATGTTCTGCACCATGGTGTGAACCTGA-3' B4:5'-CTTAGTCAGCTGAAGTGGGACAAC-3'	Ser(S)-Phe	Ddel	bp۱۳۹
BMP15	اگزون ۲	Fecx ^B	T به G	(۱۱۰۰)	GCCTTCTGTGTCCCTTATAAGTATGTTCCCTTA-3' B:5'-TTCTTGGGAAACCTGAGCTAGC-3'	Ser (S)-Ile (I)	Ddel	bp۱۵۲
	اگزون ۲	Fecx ^G	T به C	(۷۱۸)	5'-CACTGTCTTCTGTACTGTATTCAATGAGAC-3' 5'-GATGCAATACTGCTCTGCTG-3'	Gln (Q)-STOP	HinII	141bp
BMPR-IB	اگزون ۲	FecB	A به G	(۷۴۶)	Test F1:5'-CCAGAGGACAATAGCAAGCAAA-3' Test R1:5'-CAAGATGTTTTCATGCCTCATGAACACGGTC-3'	Gln (Q)-Arg	AavII	190bp

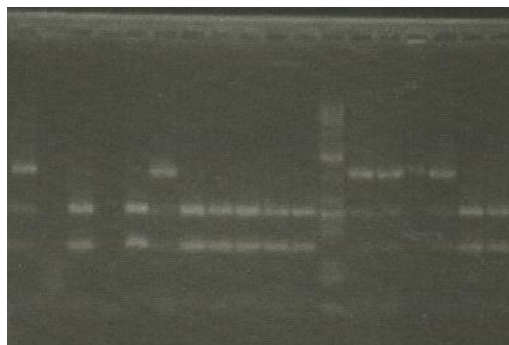
تیمار شد. محصولات حاصل از هضم، در ژل آگارز ۲/۵ درصد و با ولتاژ ۷۵ و به مدت ۹۰ دقیقه الکتروفورز و سپس با استفاده از اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شدند.

نتایج و بحث

قطعه تکثیر شده از اگزون ۱ ژن GDF9 با اندازه باند ۴۶۲ جفت باز بود که با نتایج به دست آمده از هانراهان و همکاران مطابقت داشت (۱۹).
با الکتروفورز محصولات PCR و مشاهده قطعات هضم شده وقوع جهش در این جایگاه تأیید شد، به‌طوری‌که ۱۱٪ از نمونه‌های تعیین ژنوتیپ شده دارای آلل جهش‌یافته به‌صورت هتروزیگوت بودند (شکل ۱).
همچنین این جمعیت برای این جایگاه در تعادل هاردی-واینبرگ نبود.

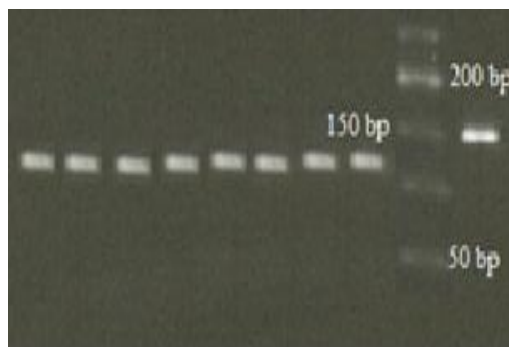
به منظور تکثیر قطعات مورد نظر، مقدار ۱۰۰ نانوگرم از DNA استخراج شده به همراه PCR Master Kit (شرکت سینا کلون)، ۱ میکرومول از هر یک از آغازگرها (شرکت Bioneer) و با حجم کل واکنش ۱۲/۵ میکرولیتر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر شرکت Biorad و به شرح زیر انجام شد:

۳۵ سیکل که در طی آن واسرشت سازی در ۹۴°C و به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال ۶۱°C و به مدت ۱ دقیقه و تکثیر به مدت ۱ دقیقه و در دمای ۷۳°C انجام شد. برای هضم قطعات مورد نظر، ۵ میکرولیتر از محصول واکنش به همراه ۵ میکرولیتر آنزیم و بافر مربوطه (۵/۰ واحد از آنزیم‌های اختصاصی (شرکت Fermentas، 2 میکرولیتر بافر و ۲/۹ میکرولیتر آب) برای هریک از جایگاه‌ها، به مدت ۸ تا ۱۲ ساعت در حمام آب گرم و در دمای ۳۷°C



شکل ۱- الگوهای باندهای مربوط به واریانت G1 از جایگاه GDF9- نمونه‌های ۱۴، ۱۳، ۱۲، ۱۱ و ۱۵ دارای ژنوتیپ هتروزیگوس (۴۱۰، ۲۵۶، ۱۵۶، ۵۲ جفت باز) و بقیه نمونه‌ها دارای ژنوتیپ وحشی (۲۵۶، ۱۵۶، ۵۲ جفت باز) می‌باشند.
Figure 1. Banding patterns from variants G1 of the GDF9 samples 14,13,12,6,1, and 15 have Heterozygous genotype (52,156,256,410 bp) and others were Wild type (52,156,256 bp)

از طرفی نتایج حاصل از هضم محصولات PCR مربوط به جایگاه BMP15 بیان‌گر این بود وقوع جهش در جایگاه مذکور وجود نداشت (شکل ۲) و کلیه افراد برای جایگاه فوق تک شکل و از تیپ وحشی بودند (جدول ۲).



شکل ۲- باندهای مربوط به واریانت B4 از جایگاه BMP15: کلیه نمونه‌ها دارای ژنوتیپ وحشی (۱۲۲ و ۳۱ جفت باز) می‌باشند.
Figure 2. Banding patterns from variants B4 of the BMP15, total samples are wild type (122 and 31 bp)

جدول ۲- فراوانی ژنی و ژنوتیپی GDF9، BMP15 و BMPR-IB در آمیخته‌های شال و رومانف
Table 2. Gene and genotype frequency of GDF9, BMP15 and BMPR-IB in cross breed of Shall and Romanoff

ژن	اگزون	وفاور الی	وفاور ژنوتیپی
GDF9	۱	M(۰/۰۶)	MM(٪۰)
		N(۰/۹۴)	MN(۰/۱۱)
			NN(۰/۸۹)
GDF9	۲	M(٪۰)	MM(٪۰)
		N(٪۱۰۰)	MN(٪۰)
			NN(٪۱۰۰)
BMP15		M(٪۰)	MM(٪۰)
		N(٪۱۰۰)	MN(٪۰)
			NN(٪۱۰۰)
BMPR-IB		M(٪۰)	MM(٪۰)
		N(٪۱۰۰)	MN(٪۰)
			NN(٪۱۰۰)

با وجود این، نتایج چو و همکاران (۶) اثر واریانت G1 را روی دوقلوزایی تایید کردند که اثر آن در زایشهای انتهایی بیشتر بود.

نتایج حاصل از این بررسی با نتایج محققان زیر مطابقت دارد:

فرج‌زاده (۱۲) در نژاد زل مازندران، امیری و همکاران (۲) در نژاد لری- بختیاری، قادری و همکاران (۱۵) نژاد عربی، جمشیدی و همکاران (۲۰) نژاد سنگسری و خان‌احمدی و همکاران (۲۵) راجع به نژاد دالاق استان گلستان که با همین روش به بررسی چندشکلی در این نژادها پرداختند.

جوانمرد و همکاران در مطالعه‌ای همزمان در ۴ نژاد ماکویی، افشاری، مهربان و بلوچی بیشترین و کمترین و فور آللی واریانت G1 و B2 را ۰/۲۴ و ۰/۱۸ برای افشاری و مهربانی و ۰/۲۷ و ۰/۱ به ترتیب در ماکویی و افشاری گزارش نمودند. به طوری که هتروزیگوت‌ها برای هر یک از دو جایگاه نتاج بیشتری تولید کردند (۲۱).

مرادبند و همکاران (۳۴) درباره‌ی گوسفندان بلوچی و فور آل‌های موتانت واریانت G1 را ۰/۱۸ گزارش کردند. هم چنین نتایج حاصل از تجزیه اماری نشان دهنده اثر معنی‌دار نوبت زایش و واریانت G1 روی دوقلوزایی بود. همچنین افراد موتانت هوموزیگوت بررسی شده در این تحقیق بارور بودند.

برزگری و همکاران (۴) با مطالعه واریانت G1 و B2 در نژادهای مغانی و قزل نشان دادند که ژن‌های مذکور بر نرخ تخمک گذاری و چندقلوزایی مؤثر و واریانت B2 ممکن است به تنهایی برای عقیمی کافی نباشد و عقیمی می‌تواند صرفاً با هوموزیگوسیته برای هر دو جایگاه G1 و B2 مرتبط باشد. از طرفی در این گزارش واریانت G1 اثر معنی‌داری در باروری در این نژادها داشته است.

با توجه به نتایج فوق مشخص شده است که این جهش در گوسفندان بومی ایران وجود دارد. البته تعداد کمی از گزارش‌ها نشان داد که این جهش بر چندقلوزایی مؤثر است. بنابراین با توجه به برخی از گزارش‌ها مبنی بر مؤثر بودن این واریانت بر چندقلوزایی، می‌توان حیوانات حامل این واریانت را، حیوانات چند قلوزا نامید.

در جایگاه GDF9 پس از تکثیر و هضم آنزیمی مشخص شده است که کلیه گوسفندان برای این جایگاه تک شکل بوده و همه حامل واریانت G8 می‌باشند. این داده‌ها با نتایج پژوهش گران زیر مطابقت دارد:

غفاری و همکاران (۱۶) گوسفندان نژاد شال، قادری و همکاران (۱۵) درباره‌ی گوسفندان نژاد عربی، میراب‌زاده (۳۰) گوسفندان نژاد قزل، خان‌احمدی و همکاران (۲۴) در نژاد گوسفندان دالاق، پولی و همکاران (۳۵) گوسفندان نژاد گارول از هند و واکا و همکاران (۳۸) در خصوص ۵ نژاد از گوسفندان آفریقای شمالی.

این جهش در گوسفند از جمله جهش‌هایی با اثر بالا بر نرخ تخمک‌گذاری و دوقلوزایی معرفی شده است، از آنجایی که چنین جهشی در اکثر نژادهای گوسفند ایرانی وجود ندارد، شاید بتوان چنین نتیجه گرفت که نرخ پایین

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که جهش در باز موقعیت ۷۴۶ ژن BMPR-1B باعث جایگزینی اسیدآمینه گلوتامین با آرژنین می‌شود، در جمعیت مطالعه شده رخ نداده است و در نتیجه کلیه حیوانات برای این جایگاه ژنوتیپ نوع وحشی داشته‌اند. بنابراین احتمالاً این جایگاه به لحاظ میزان تخمک‌گذاری و دوقلوزایی در گوسفندان فوق بی‌تاثیر است.

بررسی‌های انجام گرفته روی ۲۱ نژاد گوسفند با باروری بالا از ۱۳ کشور جهان نشان داد، فقط نژادهای هو و هان چینی دارای جهش ژن بورولا بودند. به طوری که همه گوسفندان نژاد هو حامل جهش ژن FecB بوده و ژنوتیپ BB داشتند. در حالی که نمونه‌های گوسفند هان هر سه ژنوتیپ هوموزیگوت مغلوب، هتروزیگوت و نوع وحشی را به ترتیب با فراوانی‌های ۰/۳۳، ۰/۵۸ و ۰/۰۹ نشان دادند. در سایر نژادها تنها ژنوتیپ تیپ وحشی از این ژن مشاهده شد (۸).

نتایج حاصل از این مطالعه با نتایج حاصل از بررسی‌هایی که پژوهش‌گران دیگر انجام دادند، مطابقت دارد برای مثال: امیری و همکاران (۲) گوسفندان نژاد لری-بختیاری، فروتنی‌فر و همکاران (۱۳) گوسفندان نژادهای قره‌گل، بلوچی و ایرانلیک، محمدی (۳۱) نژاد قزل، قنبری و همکاران (۱۷) گوسفندان نژاد افشاری، غفاری و همکاران (۱۶) گوسفندان نژاد شال، کثیریان و همکاران (۲۲) در نژاد سنگسری، عالی‌محمودی و همکاران (۱) نژادهای لری- بختیاری و عربی (دارای بالاترین نرخ چندقلوزایی)، محمدی و همکاران (۳۳) گوسفندان نژاد ماکوئی، محمدی و همکاران (۳۲) گوسفندان با سابقه چندقلوزایی بالا (۸۰ راس لری- بختیاری و ۴۵ راس عربی از استان خوزستان)، اسکندری و همکاران (۱۱) نژاد گوسفندان لری- بختیاری و خان‌احمدی و همکاران (۲۴)، خدرزاده و همکاران (۲۶) گوسفندان نژاد دالاق از استان گلستان.

با توجه به بررسی‌های انجام شده مشخص شده است که فراوانی این جهش در گوسفندان نژادهای مختلف دنیا کم بوده و نیز این جهش در گوسفندان بومی ایران وجود ندارد. در نتیجه ممکن است ژن‌های دیگری در جایگاه‌های ژنی دیگر مسئول بروز این صفت باشند. ژن‌های BMP15 و GDF9 از جمله ژن‌هایی هستند که در اووسیت بیان شده و بر چند قلوزایی مؤثر می‌باشند.

هانراهان و همکاران (۱۹) با بررسی چند شکلی در جایگاه GDF9 و BMP15 دریافتند در میان ۱۲ واریانت مورد مطالعه تنها ۳ واریانت G8، B2 و B4 در حالت هوموزیگوت با فنوتیپ عقیمی و در حالت هتروزیگوت با چندقلوزایی ارتباط دارد. از طرف دیگر واریانت G1 که حاصل تغییر اسید آمینه گلوتامیک به جای اسید آمینه لیزین در توالی ۲۴۱ از باقی مانده اسید آمینه در مولکول نابالغ است، با توجه به این که تغییر قبل از ناحیه عملکردی فورین رخ داده است، اثر آن را روی مولکول بالغ بعید دانستند. بنابراین جهش در ناحیه G1 احتمالاً نمی‌تواند به فنوتیپ دوقلوزایی در هتروزیگوت‌ها و عقیمی در هوموزیگوت‌ها منجر شود.

همکاران (۲۵) درباره‌ی گوسفند نژاد دالاق مطابقت دارد. امیری و همکاران (۳) به مطالعه چندشکلی واریانت $FecX^B$ در نژاد گوسفندان لری- بختیاری پرداختند. نتایج نشان داد که ۱۲ درصد از نمونه‌های تعیین ژنوتیپ شده، حامل این واریانت بودند که با نتایج حاصل از بررسی حاضر مغایرت دارد (۳،۲). بنابراین به نظر می‌رسد که تنها این ژن‌ها در گوسفندان ایرانی بر چند قلوزایی مؤثر نیست و ممکن است ژن‌های دیگری در جایگاه‌های دیگر بر این صفت مؤثر باشند که نیاز به تحقیقات بیشتر در این زمینه می‌باشد.

چندقلوزایی در گوسفندان ایرانی ناشی از این است که حضور این جهش در این نژادها وجود ندارد. بررسی نتایج مربوط به تکثیر و هضم آنزیمی دو واریانت $FecX^B$ و $FecX^G$ از جایگاه BMP15 نشان داد که کلیه افراد برای این جایگاه تک شکل بودند. این نتایج برای واریانت $FecX^G$ با نتایج حاصل از بررسی‌های انجام شده از سوی امیری و همکاران (۳) گوسفندان نژاد لری-بختیاری و خان احمدی و همکاران (۲۵) در خصوص گوسفندان دالاق مطابقت دارد. نتایج حاصل برای واریانت $FecX^B$ با نتایج خان احمدی و

منابع

1. Alimahmoodi, M., M.T. Nassiri, G.H. Mohammadi, K.H. Mirzadeh and G. Fayazi. 2009. Polymorphisms in *FecB* gene in Lori-Bakhtiyari and Arabi sheep with PCR-RFLP method. First Animal Science Congress in Golestan. Gorgan. Iran.
2. Amiri, A., G.H. Rahimi Mianji and M. Vatankhah. 2008. Detection allelic polymorphisms in BMP15 and GDF9 Genes and important oocyte growth factor in Lori-Bakhtiyari sheep. 5th Iranian Biotechnology Congress. Tehran. Iran.
3. Amiri, A., G.H. Rahimi Mianji and M. Vatankhah. 2009. Non detection polymorphisms in *FecB* and *FecXI* Genes in Lori-Bakhtiyari sheep. Modern Genetics, 3: 57-63.
4. Barzegari, A., S. Atashpaz, K. Ghabili, Z. Nemati, M. Rustaein and R. Azarbaijani. 2010. Polymorphisms in GDF9 and BMP15 associated with fertility and ovulation rate in Moghani and Ghezel sheep in Iran. Reprod Domest Animal, 45: 666-669.
5. Bodin, L., E. Di Pasquale, S. Fabre, M. Bontoux, P. Monget, L. Ersani and P. Mulsant. 2006. A novel mutation in the bone morphogenetic protein 15 gene causing defective protein secretion is associated with both increased ovulation rate and sterility in Lacau sheep. Endocrinology, 148: 393-400.
6. 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. Anim. Biotechnology, 15: 111-120.
7. Davis, G.H., J.C. McEwan, P.F. Fennessy, K.G. Dodds and P.A. Farquhar. 1991. Evidence for the presence of a major gene influencing ovulation rate on the X-chromosome of sheep. Biology of Reproduction, 44: 620-624.
8. Davis, G.H., L. Balakrishnan, I.K. Ross, T. Wilson, S.M. Galloway, B.M. Lumsden, J.P. Hanrahan, M. Mullen, X.Z. Mao, G.L. Wang, Z.S. Zhao, Y.Q. Zeng, J.J. Robinson, A.P. Mavrogenis, C. Papachristoforou, C. Peter, R. Baumung, P. Cardyn, I. Boujenane, N.E. Cockett, E. Eythorsdottir, J.J. Arranz and D.R. Nott. 2006. Investigation of the Booroola (*FecB*) and Inverdale (*FecXI*) mutations in 21 prolific breeds and strains of sheep sampled in 13 countries. Animal Reproduction Science, 92: 87-96.
9. Davis, G.H. 2004. Fecundity genes in sheep. Journal of Animal Reproduction Science, 82: 247-253.
10. Davis, G.H., J.C. McEwan, P.F. Fennessy, K.G. Dodds and K.P. McNatty. 1992. Infertility due to bilateral ovarian hypoplasia in sheep homozygous (*FecX/FecX*) for the inverdale prolificacy gene located on the X chromosome. Biology of Reproduction, 46: 636-640.
11. Escandari, G.H. and E. Ayaran. 2011. Polymorphisms in *FecB* in Lori-Bakhtiyari sheep with PCR-RFLP. 4th Animal Science Congress. Tehran. Iran.
12. Farajzadeh, M. 2006. Polymorphisms in BMP15 and GDF9 genes in Zel sheep and relationship with reproduction. M.Sc. Thesis. University of Mazandaran.
13. Forotani, S., M.R. Nassiri, F. Eftekhari Shahrodi, A. Samei and M. Soltani. 2007. Non detection polymorphisms in *FecB* Gene in Ghare gol, Balochi and Iran black sheep. First Agricultural Biotechnology Congress. Kermanshah. Iran.
14. Galloway, S.M., K.P. McNatty, L.M. Cambridge, M.P.E. Laitinen, J.L. Juengel, T.S. Jokiranta, R.J. McLaren, K. Luiro, K.G. Dodds, G.W. Montgomery, A.E. Beattie, G.H. Davis and O. Ritvos. 2000. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. Journal of Natural Genetics, 25: 279-283.
15. Ghaderi, A., M.T. Nassiribeyg, K.H. Mirzadeh, J. Fayazi, G.H. Mohammadi and A. Sadatsadr. 2009. Polymorphisms in GDF9 gene in Arabian sheep with PCR-RFLP method. First Animal Science congress in Golestan. Gorgan. Iran.
16. Ghafari, M., A. Nejati Javaremi and G.H. Rahimi Miyanji. 2008. Detection Allelic Polymorphisms in GDF9 Gene and important oocyte growth factor in Shall sheep with PCR-RFLP. 5th Iranian Biotechnology Congress. Tehran. Iran.
17. Ghanbari, S., R. Osfori, M. Escandari Nasab, R. Rostamkhani and R. Saeid Mohammadi. 2008. Polymorphisms in *FecB* gene in Afshari sheep with Molecular method. Second Iranian Animal and Fishery Science. Karaj. Iran.

18. 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 oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biol Reprod* 70: 900-909.
19. Hanrahan, J.P. and J.B. Owen. 1985. Variation and repeatability of ovulation rate in Cambridge ewes. *Animal Production*, 40: 529.
20. Jamshidi, A., M. Kasiriyani, G.H. Rahimi Miyajani and M.R. Banaeiyan. 2011. Polymorphisms in GDF9 gene in Sangsari sheep with PCR-RFLP. 11th Iranian Genetics Congress. Tehran. Iran.
21. Javanmard, A., N. Azadzadeh and A.K. Esmailzadeh. 2011. Mutations in bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 genes are associated with increased litter size in fat-tailed sheep breeds. *Vet Res Commun*, 35: 157-167.
22. Kasiriyani, M., G.H. Rahimi Miyajani and A. Jamshidi. 2009. Polymorphisms in genes Related to Reproduction in Sangsari sheep with PCR-RFLP method. 10th Iranian Genetics Congress.
23. Khanahmadi, A.R., R. Khatami Nejad, M. Ahani Azari, S. Zereh Daran and A. Jalil. 2011. Polymorphisms in GDF9 gene in Dalagh sheep with PCR-RFLP. 11th Iranian Genetics Congress. Tehran. Iran.
24. Khanahmadi, A.R., R. Khatami Nejad, S.H. Ghareh Veysi and A. Jalil. 2011. Polymorphisms in FecB gene in Dalagh sheep with PBR method. 4th Iranian Animal Science Congress. Tehran. Iran.
25. Khanahmadi, A.R., R. Khatami Nejad, S.H. Ghareh Veysi and M. Khodadadi Sorkhi. 2011. Polymorphisms in FecB gene in Dalagh sheep with PCR-RFLP method and relationship with reproduction. 4th Iranian Animal Science Congress. Tehran. Iran.
26. Khederzadeh, S., A. Yazdanpanah, A. Mohammadi Kaftarkari and A. Salari. 2011. Polymorphisms in FecB gene in Dalagh sheep with PBR method and relationship with reproduction. 11th Iranian Genetics Congress. Tehran. Iran.
27. Knight, P.G. and C. Glister. 2006. TFG -beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*, 132: 191-206.
28. Laitinen M.P.E., M. Cranfield, N.P. Groome, O. Ritvos and K.P. McNatty. 2002. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. *Biol Reprod*, 67: 1777-1789.
29. Miller, S.A., D.D. Dyckes and H.F. Polesky. 1988. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16: 1215.
30. Mirabzadeh Ardakani, A. 2010. Detection of polymorphisms and allelic frequency MTNR1A and GDF9 genes in Ghezel sheep. M.Sc. Thesis. University of Tehran.
31. Mohammadi, G.H. 2007. Polymorphisms in FecB gene in Ghezel sheep and relationship with reproduction. PhD. Thesis. University of Oromiyeh.
32. Mohammadi, G.H., M.T. Beygi Nassiri, M. Ali Mahmodi, K.H. Mirzadeh and J. Fayazi. 2010. Detection of Polymorphisms in FecB gene in Arabian and Lori-Bakhtiyari sheep in Khuzestan province with PCR-RFLP method. *Iranian Journal of Veterinary*, 5: 54-59.
33. Mohammadi, G.H., A. Saberivand and F. Barati. 2009. Polymorphisms in FecB gene in Macoei sheep. 10th Iranian Genetic Congress. Tehran. Iran.
34. Moradband, M., G. Rahimi and M. Gholizadeh. 2011. Association of Polymorphisms in Fecundity Genes of GDF9, BMP15 and BMP15-1B with Litter Size in Iranian Baluchi Sheep. *Asian-Aust. Journal Animal Science*, 24: 1179 -1183.
35. Polly, S., B. Brahma, A. Mukherjee, P.V. Vinesh, S. Batabyal, J.S. Arora, S. Pan, A. Kumar Samanta, T. Kumar Datta and S. Lal Goswami. 2010. Polymorphism of BMP1B, BMP15 and GDF9 fecundity genes in prolific Garole sheep. *Tropical Animal Health and Production*, 42: 985-993.
36. Ricordeau, G., J. Thimonier, I.P. Polvey, M.A. Driancourt, M.T. Hochereau-de-Reviere and L. Tchamitchian, INRA. Research on the Romanov sheep breed in France: a review. *Livestock Production Science*, 24: 305-332.
37. Souza, C.J.H., C. MacDougall, B.K. Campbell, A.S. McNeilly and D.T. Baird. 2001. The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1B (BMPR-1B) gene. *Endocrinology*. 169: 1-6.
38. Vacca, G.M., A. Dhaouadi, M. Rekik, V. Carcangiu, M. Pazzola and M.L. Dettori. 2010. Prolificacy genotype at BMPR-1B, BMP15 and GDF9 genes in North African sheep breeds. *Small Ruminant Research*, 88: 67-71.
39. Yeh, F.C., R.C. Yang, T.B.j. Boyle, Z.H. Ye and J.X. Mao. 1997. PopGene, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.

Effect of Polymorphisms in Some Candidate Genes on Twinning in Cross Breeds of Shall and Romanov

Alireza Khanahmadi¹, Ghodrat Rahimi Mianji², Seyyed Hassan Hafezian³, Rasul Khataminejad⁴, Noorbibi Mamizadeh⁴ and Seyyed Makan Mosavi⁵

1-PhD Student, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University and Scientific staff University of Gonbab Kavus (Corresponding author: ali.khanahmadi@gmail.com)

2, 3 and 5- Professor and Assistant Professor and PhD Student, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

4- M.Sc. Molecular Genetic Laboratory of University of Gonbab Kavus

Received: March 15, 2014

Accepted: January 11, 2015

Abstract

This study was carried out to identify polymorphisms of BMP15, GDF9 and BMP1B genes in cross-bred of Romanov×shall sheep. For this reason 79 blood samples were collected from a flock in Gonbad kavous city in Golestan province. DNA was extracted using modified salting out method. Polymerase chain reaction was done by specific primers for amplification of two fragments with 141 and 153 bp from exon 2 of BMP15, one fragment with 190 bp from BMP1B gene and two fragments with 462 bp, 139bp from exon 1 and 2 of GDF9 genes, respectively. The results obtained from digested PCR products did not confirm the existence of mutation in BMP15, BMP1B and in exon 2 of GDF9 marker site. While, polymorphism was observed in exon 1 of GDF9 marker site and the heterozygotes were estimated as 0.11 in this population.

Keywords: BMP15, BMP1B, Cross-bred, GDF9, Litter size, Romanov ×shall sheep