



"مقاله پژوهشی"

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

نعمیه 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 مسؤول: 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 دکتری تخصصی دانشگاه تبریز

تاریخ ارسال: ۹۹/۰۳/۰۱ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۴/۱۸

صفحه: ۱۲۶ تا ۱۳۳

چکیده

ژن *Kiss1* از جمله ژنهای شناخته شده مؤثر بر باروری است که در افزایش تخمک گذاری 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 به عمل آمد. پس از انجام استخراج DNA، واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) جهت تکثیر قطعه ۳۳۱ جفت بازی از اگزون ۱ ژن *Kiss1* با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی انجام گرفت. چندشکلی فضایی تکرار شده ای SSCP محصولات PCR با استفاده از ژل پلی آکریل آمید و رنگ آمیزی ژل به روش نیترات نقره به دست آمد. نتایج بیانگر وجود الگوهای متفاوت بود که می تواند ناشی از وجود چندشکلی در این جایگاه باشد. در نمونه های مورد مطالعه ۵ الگوی ژنوتیپی مختلف ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ برای نژاد سنجابی به ترتیب با فراوانی ۰/۲۳، ۰/۰۳، ۰/۱۷ و ۰/۱۱ و دو الگوی ژنوتیپی مختلف ۱ و ۲ برای نژاد قزل به ترتیب با فراوانی ۰/۲۴ و ۰/۷۶ مشاهده شد. آنالیز آماری نشان داد اثر الگوهای متفاوت ژنتیکی بر صفت چندقلوزایی در نژاد سنجابی معنی دار ($p < 0/05$) ولی در نژاد قزل معنی دار نبود. نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان داد که تنوع موجود در اگزون یک ژن *Kiss1* را می توان برای برنامه های انتخاب به کمک نشانگرها در گوسفندان نژاد سنجابی مورد توجه قرار داد.

واژه های کلیدی: چندقلوزایی، ژن *Kiss1*، گوسفند، PCR-SSCP

مقدمه

بیشترین تعداد در بین گوسفندان ایران است و این گوسفند نژادی دنیهدار است که جثه ای بزرگ دارد. رنگ صورت قهوه ای تا قهوه ای کم رنگ بوده و بدن از پشم بلند و نسبتاً 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 استان های آذربایجان شرقی و غربی بوده این گوسفند دارای سری نسبتاً بزرگتر از نژاد اصلی افشاری است و پشم های ضخیم تر و کم پشت تری دارد (۲۴). اگر چه صفت تولیدمثل از جمله صفات کمی و از نظر توارث جزء صفات چندژنی می باشد، اما در سال های اخیر نشان داده شده که کنترل تولیدمثل در گوسفند توسط ژن هایی با اثرات عمده نیز صورت می گیرد. از این رو کشف ژن هایی با اثرات عمده بر نرخ تخمک ریزی 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) است. نورون های کیس پپتین (KP) در کنش های بازگشتی استروئیدهای تخمدان نقش دارند (۱۱). این ژن روی کروموزوم شماره ۱۲ گوسفند قرار گرفته و دارای ۳ اگزون است (NCBI). مجموعه کیس پپتین ها در ابتدا به عنوان ژن های سرکوب کننده بیماری ها از جمله سرطان شناخته شدند (۱۲). ژن *Kiss1*

امروزه اصلاح نژاد در حیوانات مزرعه ای به منظور بهبود بازده اقتصادی حیوانات با استفاده از نژادهای تجاری موجود انجام می شود. در سال های 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 به طور عمده ای تحت تأثیر تعداد فرزندان قرار می گیرد علاوه بر دامپروران، متخصصین اصلاح نژاد نیز استفاده از حیوانات چندقلوزا را نسبت به حیوانات تکقلوزا ترجیح می دهند. 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 دام های اهلی مورد توجه متخصصین اصلاح نژاد است (۴). میانگین میزان دوقلوزایی در جمعیت گوسفندان ایران کمتر از ۱۰ درصد می باشد (۶). بنابراین یکی از مشکلات موجود در صنعت گوسفندداری ایران پایین بودن نرخ بره گیری در هر زایش است، که نیاز به تحقیقات بیشتری دارد. افزایش تعداد بره در هر زایش، با استفاده از روش های کلاسیک مانند انتخاب در داخل یک نژاد، پیشرفت کمی دارد، زیرا وراثت پذیری این صفت در هر زایش پایین است. گوسفند سنجابی یکی از نژادهای گوسفندان ایرانی می باشد و از نژادهای سنگین وزن کشور بوده و جمعیت آن بعد از گوسفند بلوچی دارای

شناسایی و تعیین الگوهای ژنوتیپی و ارتباط آن‌ها با صفت چندقلو زایی بود.

مواد و روش‌ها

در مطالعه حاضر از تعداد ۱۵۰ رأس 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 به صورت تصادفی و در سنین مختلف، با استفاده از ونوجکت‌های 5ml حاوی ماده ضد انعقاد EDTA از سیاهرگ و داجی 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 استخراج شد. آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر قطعه‌ای به طول ۳۳۱ جفت باز از اگزون شماره یک ژن *Kiss1* گوسفند با استفاده از سایت 3plus primer طراحی شد. که توالی آغازگرهای رفت و برگشت به ترتیب 5'- GTTTCATGCTGTGTCGGTT-3' و 3'- TCCCAACCTTCTTCCCAGAC-5' 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 ۱۰۰-۱۵۰ ng/μl 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 ۳۵ چرخه، ایده‌آل‌ترین شرایط برای تکثیر ژن *Kiss-1* تشخیص داده شد و اسرشته سازی اولیه DNA به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، و اسرشته سازی DNA به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر به DNA به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد، بسط DNA به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، محصولات PCR روی ژل آگارز دو درصد حاوی اتیدیوم برمایید با ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت 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.

پروتئینی ۱۴۵ اسید آمینه‌ای 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 به عنوان ژن‌های سرکوب‌کننده سرطان شناخته می‌شد، آن را متاستین نیز می‌نامند (۱۳). در سال ۲۰۰۳ سه گروه به طور همزمان کشف کردند که Kiss1 (GPR54) آغازکننده بلوغ جنسی در دو گروه مردان و موش‌ها است. به علاوه Kisspeptin یک محرک قوی گنادوتروپین ناشی GnRH است که ممکن است بازخورد استرویدی 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. به علاوه سطوح بالای Kiss1R و Kisspeptin در جفت انسان طی سه ماهه اول بارداری مشاهده شده است (۱۲).

به نظر میرسد که استروئیدهای 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 به طور 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 به نظر می‌رسد مقدار GnRH را کاهش دهد بدون اینکه تداخلی با پالس اصلی GnRH داشته باشد (۲۳). امروزه PCR-SSCP به عنوان روشی توانمند و قابل اطمینان جهت آزمایش چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی (SNP) در تعیین ژنوتیپ به شمار می‌رود. تکنیک SSCP روش مؤثری در شناسایی تنوع توالی تکثیرشده می‌باشد (۱۸). اساس این تکنیک مهاجرت DNA دناتوره شده از میان ژل پلی‌آکریل آمید غیردناتوره^۳ 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 چندقلو زایی می‌تواند در بهبود اصلاح نژاد این نژادها و افزایش چندقلو زایی تأثیر بسزایی داشته باشد، علی‌رغم اینکه سایر ژن‌های موثر بر چندقلو زایی در نژادهای مختلف به وسیله 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 مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR-SSCP) همچنین

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).

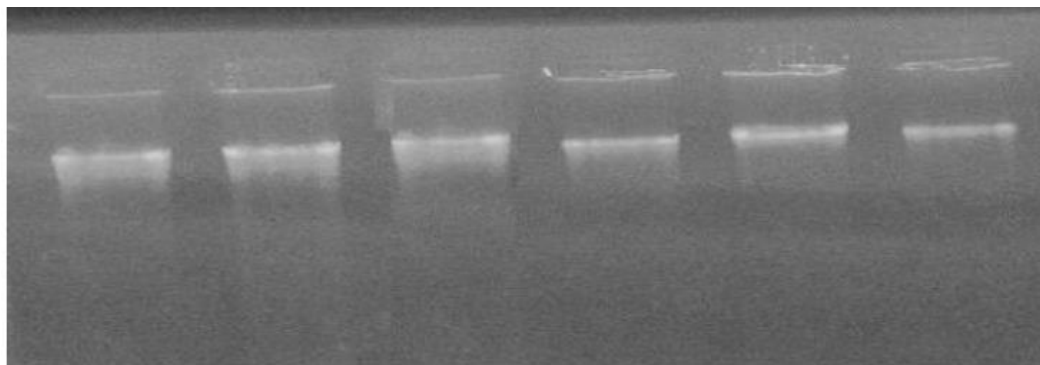
$$Y_{ij} = \mu + G_i + E_{ij}$$

که در رابطه بالا Y_{ij} : مشاهدات مربوط به صفت چندقلو‌زایی، μ : میانگین صفت در جامعه، G_i : اثر تأمین الگوی ژنوتیپی در جایگاه ژنی، E_{ij} : اثر باقی‌مانده می‌باشد.

نتایج و بحث

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

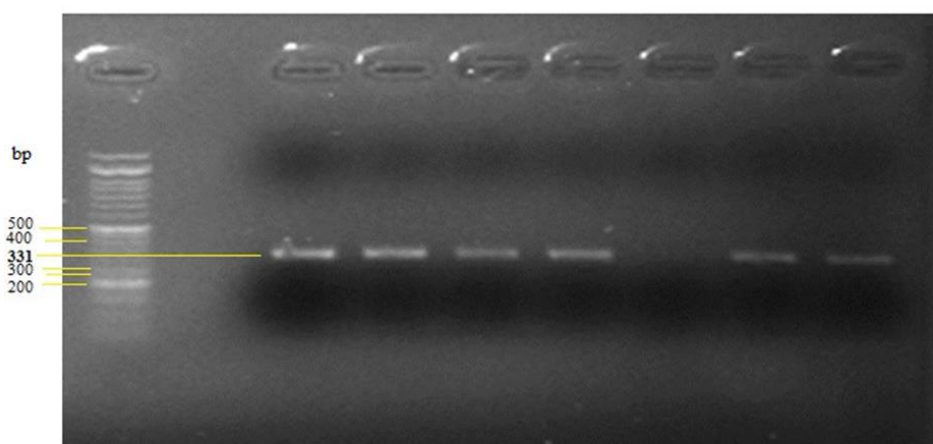
تعیین الگوی ژنوتیپی نمونه‌ها به روش PCR-SSCP با استفاده از دستگاه الکتروفورز عمودی مدل (PRO-21*22CM) (پایا پژوهش پارس) روی ژل پلی‌اکریل‌آمید (۱۰ درصد) و رنگ‌آمیزی با نیترات نقره انجام گرفت. به منظور انجام واکنش SSCP، رشته‌های DNA تکثیرشده، با استفاده از بافر SSCP (شامل برمو فنل بلو ۰/۰۵ درصد، گزین سیانول ۰/۰۵ درصد، فرمامید ۹۵ درصد و EDTA ۲۰ میلی‌مولار) به نسبت ۴ به ۱۶ به مدت زمان ۱۲ دقیقه در دمای ۹۷ درجه 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 به مدت ۲۴ ساعت جهت بررسی چندشکلی انجام شد و رنگ‌آمیزی ژل با استفاده از نیترات نقره طی سه مرحله تثبیت، لکه‌گذاری و ظهور صورت گرفت (۱۰).



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

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 تکثیر یافته است (شکل ۲).

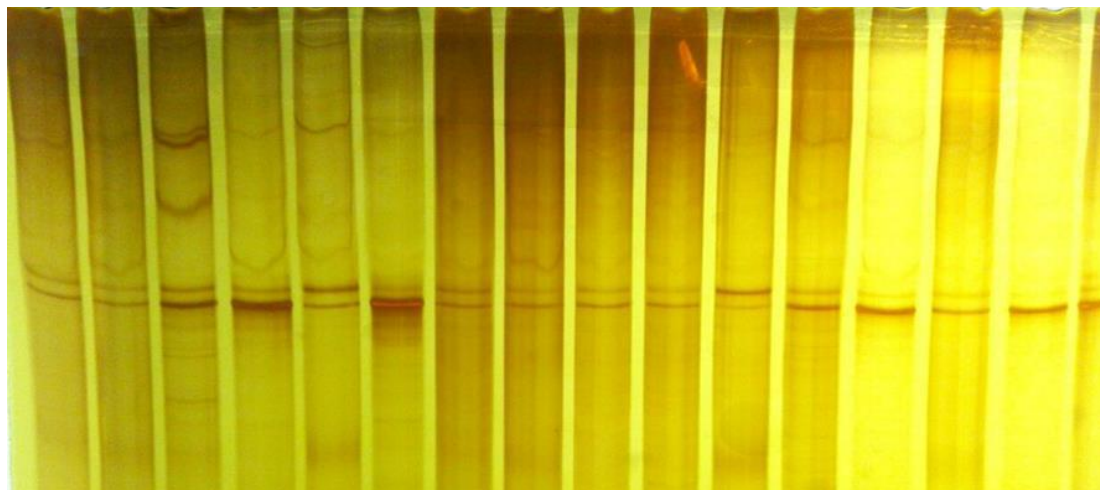
اکثر DNAهای استخراج‌شده عاری از هرگونه کشیدگی و آلودگی بودند. در نمونه‌های فاقد باند و همچنین نمونه‌های با باند ضعیف مجدداً استخراج DNA صورت گرفت. الکتروفورز



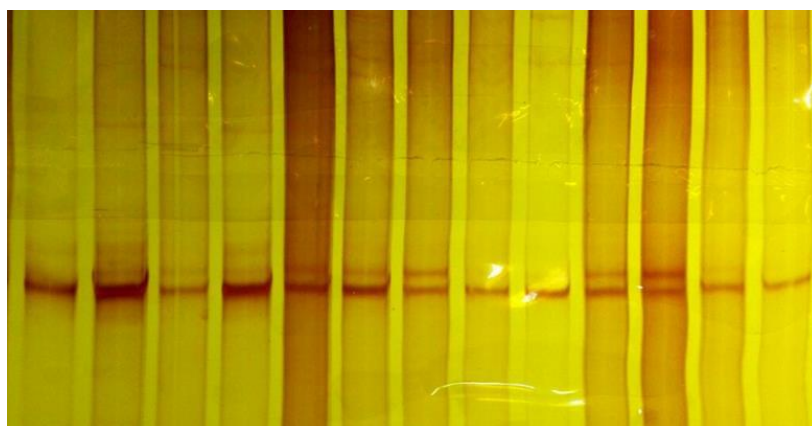
شکل ۲- نمونه ای از محصولات PCR بارگذاری شده بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد
Figure 2 . PCR products were loaded on 1.5 percent agarose gel

متفاوت به ترتیب در نژاد سنجابی و قزل بود که در شکل ۳ و ۴ مشاهده می شود.

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 ۵ و ۲ الگوی بانندی



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 مشاهده شده برای ژن *Kiss1* در گوسفند نژاد قزل
Figure 4. SSCP patterns observed for *Kiss1* in Ghezel breed sheep

سنجابی، قزل محاسبه و در جدول ۱ نشان داده شد (جدول ۱).

بنابراین الگوهای ژنوتیپی متفاوت نشان دهنده وجود چندشکلی بالا در قطعه تکثیر شده اگزون ۱ ژن *Kiss1* می باشد که فراوانی مربوط به الگوهای ژنوتیپی برای جمعیت

جدول ۱- فراوانی های ژنوتیپی مشاهده شده در گوسفندان نژاد سنجابی و قزل

Table 1. Genotypic frequencies observed in sanjabi and Ghezel breed sheep

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

است. الگوهای ژنوتیپی متفاوت بین افراد درون این نژادها، ناشی از جهش های تک نوکلئوتیدی بین افراد می باشد. در مطالعات گذشته هم تعداد قابل توجهی چندشکلی در این

همانطور که در جدول ۱ مشاهده می شود الگوی ۱ با فراوانی ۰/۴۶ درصد بیشترین فراوانی را در نژاد سنجابی و الگوی ۲ با فراوانی ۰/۷۶ در نژاد قزل به خود اختصاص داده

ژن توسط محققان مختلف گزارش شده است. با مشخص کردن الگوهای ژنوتیپی و همچنین تهیه رکوردهای ثبت شده 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			

تعداد بره در هر زایش با تکنیک SSCP انجام شد چندشکلی در اگزون یک ژن *Kiss1* در نژاد شمال تیل با ژنوتیپ‌های (AB, AA, 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 پرورش یافته 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 از ذخایر ژنتیکی ارزشمند که در بین میلیون‌ها سال با شرایط اکولوژیکی کشور سازش یافته تلاش شود و ضمن حفظ خصوصیات مطلوب آن برای تثبیت و بهبود صفات زایشی، طرح‌های اصلاح نژادی به اجرا درآید. با در نظر گرفتن نتایج مهمی گزارش‌های ذکر شده و نتایج این بررسی ژن *Kiss-1* را به‌عنوان ژن کاندیدای مرتبط با چندقلو‌زایی می‌توان معرفی کرد. لذا با در نظر گرفتن تاثیر افزایش تعداد بره متولد شده و میزان بره‌زایی بر میزان گوشت تولیدی به ازای هر رأس میش در هر سال، کاهش تعداد میش‌های مولد روی مراتع و

نتایج تجزیه و تحلیل (GLM) برای صفت دوقلو‌زایی در نژاد قزل و سنجابی که در جدول ۲ و ۳ ارائه شده است نشان می‌دهد که این مدل آماری برای صفت دو قلو‌زایی در سطح ($p < 0.05$) در نژاد سنجابی و قزل به ترتیب 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 مشاهده شده 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 ($p < 0.001$). در بررسی پیوستگی بین ژنوتیپ‌های شناسایی شده با صفت تعداد بره به ازای هر زایش، ارتباط معنی‌داری مشاهده شد ($p < 0.05$). 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 لوریدینا 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 جهش یافته 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

داد. نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان داد که تنوع موجود در اگزون ۱ ژن *KissI* را می توان برای برنامه های انتخاب به کمک نشانگرها در گوسفندان نژاد سنجابی مورد توجه قرار داد. بنابراین لازم است که بخش های مورد بررسی در پژوهش حاضر و بقیه قسمت های ژن *KissI* در مطالعات آینده با تعداد افراد بیشتری و در نژادهای مختلف گوسفند مورد بررسی قرار گیرد.

جلوگیری از تخریب مراتع به نظر می رسد که مطالعه برای پیدا کردن جهش در سایر ژن های با اثر عمده بر چندقلوایی در نژاد سنجابی و قزل و سایر نژادهای کشور لازم باشد. از طرفی می توان با کشف و وارد کردن این ژن ها و برنامه ریزی برای تکثیر و تثبیت جهش های اتفاقی افتاده مرتبط با ژن های باروری کمک قابل توجهی به افزایش تولید و درآمد دامداران کشور انجام داد. تحقیق حاضر وجود چندشکلی ژنتیکی برای ژن *KissI* را در گوسفندان نژاد سنجابی و قزل به خوبی نشان

منابع

- Ahmadi, A., Zh. Rajabi, P. Zamani and A.A. Bahari. 2018. Polymorphism of *KiSS-I* gene and its association with litter size in Mehraban sheep. *Animal Product Research*, 3: 25-34.
- 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-I* and *GPR54* genes and their relationships with litter size in sheep. *Molecular Biology Reports*, 39: 3291-3297.
- Dhillon, 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.
- Eghbalsaiied, 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 (In Persian).
- El-Tarabany, M.S., A.Z. Zagloul, A.A. El-Tarabany and A. Awad. 2017. Association analysis of polymorphism in *KiSSI* gene with reproductive traits in goats. *Animal Reproduction Science*, 180: 92-99.
- Farajzadeh, M., Q. Rahimi, H. Sayyazadeh, A. Dehnad, G.H. Eliasi and A. Javanmard. 2005. Multimodal study of *Candida* gene for twinning (*GDF9*) in Mazandaran sheep population using PCR-RFLP technique. Fourth National Conference on Biotechnology of the Islamic Republic of Iran, Kerman, (In Persian).
- Gottch, M.L., M.J. Cunningham, J.T. Smith, M.S. Pupa, 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Lee, J.H., M.E. Miele, D.J. Hicks, K.K. Phillips, J.M. Trent, B.E. Weissman and D.R. Welch. 1996. *KiSS-I*, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *Journal of the National Cancer Institute*, 88: 1731-1737.
- 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 *KISSI* gene with central precocious puberty in Chinese girls. *Endocrinology*, 157: 113-118.
- 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-I*) gene polymorphisms on first conception in Sarda ewe lambs. *Reproduction, Fertility and Development*, 47: 154-187.
- Maitra, A., R. Sharma, S. Ahlawat, M.S. Tania, M. Roy and V. Prakash. 2014. Association analysis of polymorphisms in caprine *KiSSI* gene with reproductive traits. *Animal Reproduction Science*, 151: 71-77.
- 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 (*KISSI*) gene and its association with litter size in Ethiopian indigenous goat populations. *African Journal of Biotechnology*, 16(22): 1254-1264.
- 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.

18. Orita, M., Y. Suzuki, S. Sekiya 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 Koochi 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. Messenger, 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).

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

Naeimeh Pak Tinat¹, Ali Hashemi², Mokhtar Ghaffari³, Hossein Khameis Abadi⁴ and Ronak Salehi⁵

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 1 and 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