



ارتباط چند شکلی های آلی اگزون یک و سه ژن *FSHB* با صفت چندقلو زایی در گوسفند بلوچی

محسن قلی زاده^۱ و مجتبی نجفی^۲

۱- استادیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، (نویسنده مسوول: m.gholizadeh@sanru.ac.ir)

۲- دکتری ژنتیک و اصلاح دام، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: ۹۴/۴/۶ تاریخ پذیرش: ۹۴/۷/۱۱

چکیده

هدف از این پژوهش بررسی ارتباط فرم های مختلف آلی در اگزون اول و سوم ژن *FSHB* با صفت چند قلوزایی در گوسفند بلوچی بود. نمونه های خون به طور تصادفی از ۱۴۱ راس گوسفند نژاد بلوچی جمع آوری، DNA به روش نمکی بهینه یافته استخراج و دو قطعه ۲۲۰ جفت بازی از اگزون یک و ۴۲۷ جفت بازی از اگزون سه با استفاده از واکنش های زنجیره ای پلی مرز تکثیر شدند. به منظور تعیین ژنوتیپ از دو روش PCR-SSCP و توالی یابی DNA استفاده شد. بررسی ژل های اکریل آمید نشان داد که اگزون سوم ژن *FSHB* در جمعیت مورد مطالعه یک شکل بود. این مطالعه، منجر به شناسایی هفت الگوی بانندی برای اگزون یک این ژن شد. برای تأیید نتایج SSCP، از هر الگو یک نمونه جهت تعیین توالی استفاده شد. نتایج تعیین توالی سه جهش را در اگزون شماره یک شناسایی نمود که منجر به تشکیل هفت الگوی مختلف بانندی شد. بررسی ارتباط الگوهای شناسایی شده با صفات مورد مطالعه نشان داد که ناحیه مورد مطالعه به طور معنی داری ($P < 0/05$) تعداد کل بره ها و میانگین تعداد بره ها را در طول ۴ شکم تحت تأثیر قرار می دهد. همچنین ارتباط این ناحیه با چند قلوزایی در شکم دوم معنی دار ($P < 0/05$) بود که در مقایسه با الگوی A، الگوی E بیشترین تعداد بره (۱/۸۸) و الگوی B کمترین تعداد بره را در این شکم به خود اختصاص داد. با نتایج این پژوهش و بررسی بیشتر در جمعیت دیگر می توان این جایگاه را به عنوان ژنی کاندیدا در برنامه های اصلاح نژادی در نظر گرفت.

واژه های کلیدی: ژن *FSHB*، گوسفند، چند قلوزایی

مقدمه

چند قلوزایی یکی از مهم ترین صفات اقتصادی در پرورش گوسفند می باشد. یکی از راه های بهبود این صفات، شناسایی و انتخاب حیوانات برتر و مناسب برای صفات مذکور می باشد که امروزه از طریق تکنیک های مختلف مولکولی مبتنی بر DNA، دست یابی به این اهداف امکان پذیر شده است. تا کنون سه ژن موثر بر باروری در گوسفند شناسایی شده که شامل ژن *BMPR-1B* (*ALK6*) با نام بورولا با نشانه آلی *FecB* روی کروموزوم ۶ (*GDF9*(۲۰) یا *FecG* روی کروموزوم شماره ۵ (۱۲) و (*BMP15* (*FecX*) روی کروموزوم X (۸) و (۱۲) هستند. فرهادی و همکاران (۶) در پژوهشی، اولین بار جایگاه دقیق این ژن های بزرگ اثر را روی کروموزوم های گوسفند، بز، بوفالو و گاو نقشه یابی نمودند. از آنجایی که این ژن های کاندیدا می توانند وابسته به نژاد خاصی باشند و از طرفی جهش های موثر در دیگر نقاط ژنومی نیز می توانند وجود داشته باشند، می توان با پویش مناطق دیگر ژنومی، نواحی موثر بر این صفت را شناسایی کرد. قلی زاده و همکاران (۹) با استفاده از ریزآرایه های نانویی ژنوم گوسفند بلوچی را برای شناسایی مناطق ژنومی موثر بر نرخ دوقلوزایی مورد پویش قرار دادند و نشانگرهای معنی دار شناسایی شده را روی کروموزوم ۱۵ و پایین دست ژن *FSHB* گزارش دادند. هورمون محرک فولیکول (*FSH*) یک هورمون گلیکوپروتئینی بوده که در غده هیپوفیز بیان می شود و نقش آن تنظیم تولید مثل در پستانداران می باشد (۱۵، ۱۸). در نرها *FSH* به همراه تستوسترون مهم ترین هورمون تروپیک بوده که عملکرد سلول سرتولی را تنظیم می کند که در حفظ کیفیت و کمیت اسپرم در پروسه اسپرماتوژنز ضروری می باشد. نقش این هورمون در تولید مثل جنس ماده مورد مطالعه قرار گرفته

است. موش های ماده با نقص هورمون، نابارور و دارای تخمدان های کوچک می باشند (۱۴). بیان بیش از حد این هورمون در موش های ماده، خصوصیات تحریک بیش از حد و سندروم پلی سیستیک تخمدانی در انسان را نشان می دهد (۱۴). تمامی هورمون های گلیکوپروتئینی (*FSH*, *LH*) از یک زیر واحد مشابه آلفا و یک زیر واحد اختصاصی بتا تشکیل یافته اند. اگر چه هر دو زیر واحد *FSH* در اتصال به گیرنده *FSH* (*FSHR*) مشارکت دارند، این *FSHB* است که اختصاصی بودن این اتصال را تعیین می نماید (۷، ۵). ژن *FSHB* در گوسفند روی کروموزوم ۱۵ قرار دارد و دارای ۳ اگزون و ۲ اینترون است (۱۱). نظیفی و همکاران (۱۷) اثر چند شکلی در بخشی از اگزون شماره دو زیر واحد بتای ژن هورمون محرک فولیکولی (*FSHB*) را بر نرخ زایش گوسفندان نژادهای ایران بلک، آرمان و بلوچی به روش SSCP مطالعه کردند. آنها گزارش دادند که اثر ژنوتیپ بر صفت چند قلوزایی فقط در نژاد بلوچی معنی دار است، به طوری که ژنوتیپ AC با میانگین بره زایی ۱/۰۷ عملکرد بهتری را نسبت به ژنوتیپ AA میانگین بره زایی ۱/۰۳ نشان داد. ژانگ و همکاران (۲۲) چند شکلی در ژن *FSHB* به روش PCR-SSCP و PCR-RFLP و ارتباط ژنوتیپ ها با چند قلوزایی در ۴ نژاد بز (بوئر، ماتو، سیاه و تلاقی بوئر-ماتو) شامل ۷۸۰ رأس را مورد بررسی قرار دادند در مطالعه آن ها یک جهش جدید در اگزون شماره ۳ در هر ۴ نژاد شناسایی شد که سبب عملکرد بهتر چند قلوزایی در بزهایی با باروری بهتر می شد. هدف از اجرای این طرح شناسایی فرم های مختلف آلی اگزون یک و سه ژن *FSHB* به روش PCR-SSCP و ارتباط آن با صفت چند قلوزایی در گوسفند بلوچی می باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و استخراج دی ان ای

نمونه‌های خون از ۱۴۱ راس میش نژاد بلوچی ایستگاه اصلاح نژاد شمال شرق کشور (عباس آباد) جمع‌آوری شد. نمونه‌ها بلافاصله با حفظ شرایط زنجیره سرد به آزمایشگاه منتقل و تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت استخراج DNA از روش

نمکی بهینه یافته (۱۶) و برای تعیین ویژگی‌های کمی و کیفی DNA از الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد.

واکنش پی سی آر

در این پژوهش از دو جفت آغاز گر اختصاصی برای تکثیر اگزون اول و سوم (به همراه بخشی از اینترون دوم) ژن FSHB استفاده شد. (جدول ۱).

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر اگزون اول و سوم ژن FSHB

آغازگر	DNA توالی	شماره ثبت شده	اندازه قطعه (جفت باز)	ناحیه تکثیری	دمای اتصال سانتی‌گراد
یک	F: 5 - CGTCCAGTTCTGCTTCCTTT-3 R: 5 - GTGGGAATCAATGAAACCTGC-3	Capra AY156689	۲۲۰	اگزون یک	۶۲
دو	F: 5 - GTATTCAATCCCTGTCTCA-3 R: 5 - GTAGGTCTCTCTGGTG-3	Ovisaries S64745	۴۲۷	اگزون سوم اینترون ۲	۵۶/۹

ژنوتیپ‌های به دست آمده، از هر الگو یک نمونه برای تعیین توالی انتخاب شدند. بعد از تکثیر مجدد این قطعات توسط واکنش زنجیره پلیمرز، خالص‌سازی محصول پی سی آر توسط کیت تلخیص DNA از شرکت Roche و بر اساس دستورالعمل این شرکت صورت گرفت و برای تعیین توالی به شرکت بایونیر^۲ کره جنوبی ارسال شد.

آنالیز آماری

از نرم‌افزار SAS نسخه ۱۹/۲ (۱۹) برای تجزیه و تحلیل ارتباط ژنوتیپ‌ها با صفات چند قلوایی (۳ کلاس) در شکم‌های مختلف زایش (رویه لجستیک)، تعداد کل بره‌ها (رویه مختلط) و میانگین تعداد بره در طول چهار شکم زایش (رویه مختلط) استفاده شد. در آنالیز هم ترازوی این توالی‌ها با توالی مرجع که در بانک اطلاعات به ثبت رسیده است از نرم‌افزار BioEdit (۱۰) نسخه ۷ و برای آنالیز توالی پروتئینی از نرم‌افزار ExpASy (۲) استفاده شد.

نتایج و بحث

واکنش پی سی آر و تعیین ژنوتیپ

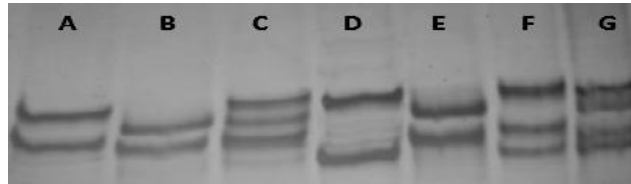
DNA ژنومی گوسفند بلوچی با استفاده از دو جفت آغازگر اختصاصی برای ژن FSHB مورد تکثیر قرار گرفت. محصولات پی سی آر با استفاده از ژل آگارز ۲ درصد شناسایی شدند. محصولات تکثیر شده با قطعات مورد مطالعه سازگار و از جنبه اختصاصی بودن مناسب بودند. بررسی ژل‌های اکریل امید نشان داد که اگزون سوم ژن FSHB در جمعیت مورد مطالعه یک شکل بود. این مطالعه، اما، منجر به شناسایی هفت الگوی باندی برای اگزون اول (A با ۶۵ مشاهده، B با ۸ مشاهده، C با ۵۲ مشاهده، D با ۹ مشاهده، E با ۴ مشاهده، F و G هر کدام با یک مشاهده) این ژن در گوسفند بلوچی شد. برای تأیید نتایج SSCP، از هر الگو یک مورد جهت تعیین توالی استفاده شد. نتایج تعیین توالی سه جهش را در اگزون شماره یک شناسایی نمود که منجر به تشکیل هفت الگوی مختلف باندی می‌شد (جدول ۲ و شکل ۱).

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10x)، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs (10mM)، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم پلیمرز (1 U)، ۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومی و ۱/۵ میکرولیتر (1.6 mM) MgCl₂ و یک میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (10 pM) انجام شد. سپس چرخه‌های حرارتی PCR شامل: ۹۵ درجه سانتی‌گراد جهت واسرشته سازی اولیه DNA به مدت ۵ دقیقه، واسرشته ثانویه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد برای اتصال آغازگرها به مدت ۴۵ ثانیه، دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد جهت بسط آغازگرها به مدت ۴۵ ثانیه به تعداد ۳۵ چرخه و بسط نهائی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. برای تایید اندازه قطعه تکثیر شده و هم چنین تعیین کمیت و کیفیت محصول PCR از ژل آگارز ۲ درصد و رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید به همراه نشانگر وزنی M100 از شرکت فرمنتاز^۱ استفاده شد.

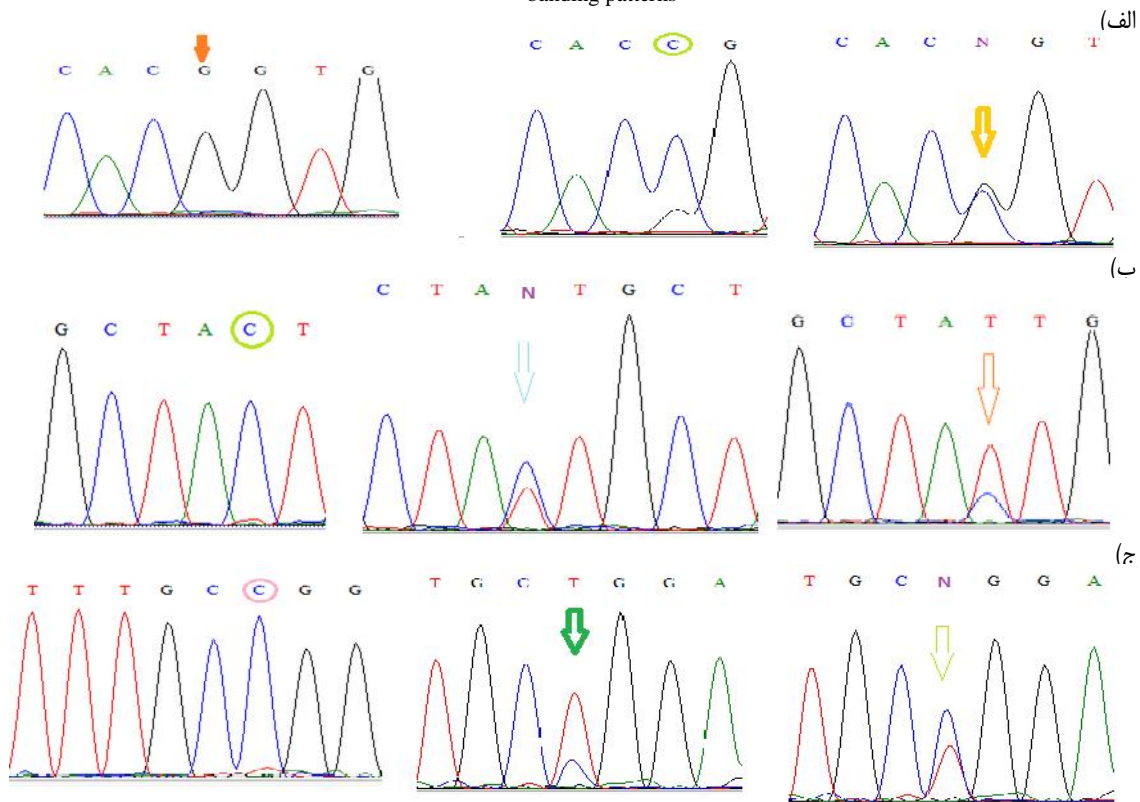
تعیین ژنوتیپ

الف: آنالیز اس اس پی

برای تعیین ژنوتیپ هر حیوان از روش PCR-SSCP و الکتروفورز ژل پلی اکریل امید استفاده شد. در این روش تعیین ژنوتیپ، بر اساس اختلاف حرکت محصول PCR تکثیر شده در میدان الکتروفورز که ناشی از تغییر شکل فضایی DNA تک رشته‌ای است، صورت می‌پذیرد. برای تک رشته سازی، ۷ میکرولیتر از محصول PCR را با ۷ میکرولیتر از بافر بارگذاری مخصوص ژل اکریل امید (10% formamide, 0.025% EDTA, 0.025% bromophenol blue, and 0.025% xylene-cyanol) مخلوط و با استفاده از دستگاه PCR به مدت ۶ دقیقه با دمای ۹۶ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. در این پژوهش از ژل اکریل امید ۱۲٪ استفاده شد. بعد از انجام الکتروفورز محصولات PCR روی ژل اکریل امید، از نیترات نقره برای رنگ‌آمیزی استفاده شد (۴). در این پژوهش تعیین ژنوتیپ مستقیماً از روی ژل انجام و با شمارش مستقیم الگوهای باندی، فراوانی آلی و ژنوتیپی برآورد شد. با توجه به نتایج حاصل از روش PCR-SSCP، جهت تأیید



شکل ۱- آنالیز SSCP قطعات تکثیر شده اگزون ۱ ژن *FSHB* منجر به شناسایی هفت الگوی مختلف باندی
Figure 1. SSCP analysis of amplified fragments from exon 1 of *FSHB* resulting in the identification of seven different banding patterns



شکل ۲- جهش‌های شناسایی شده در اگزون یک. الف: موقعیت ۳۰، ب: موقعیت ۹۰ و ج: موقعیت نوکلئوتید شماره ۱۲۱
Figure 2. Identified mutations from exon 1. A: site 30, B: site 90 and G: site 121

عملکرد آن را تغییر دهد (۱۳). در میان الگوهای شناسایی شده الگوی A با کد شناسایی KP162005 در بانک ژن ثبت شد. همچنین، مقایسه توالی توکلوتیدها با توالی ثبت شده ژن *FSHB* (کد S64745.1) یک الحاق تک نوکلئوتیدی در ناحیه غیرکدکننده (110 A-T ACT) شناسایی نمود (جدول ۲).

در میان جهش‌های شناسایی شده دو جهش در موقعیت‌های ۳۰ و ۹۰ (شکل ۲) در نواحی کدکننده اگزون یک واقع شده بودند. اسید آمینه‌های استنتاج شده از توالی نوکلئوتیدهای الگوهای مختلف یکسان بود که نشان می‌داد این جهش‌ها از نوع خاموش می‌باشند. اگرچه یک جهش خاموش توالی اسید نوکلئیک را تغییر نمی‌دهد، اما می‌تواند

جدول ۲- جهش‌های نوکلئوتیدی بین ۷ الگوی مختلف تکثیر شده با آغازگر یک

Table 2. The nucleotide mutations between seven different amplified banding patterns by primer 1

الگوهای SSCP	توالی‌های نوکلئوتیدی (5' 3')					
	30	90	110	121		
S64745.1	CACCATCACC	TGCAGGCTAT	GGGTAGGCA	TTTGCTTTGC	TGGAAGTGAG	ACT
1	C-----G	T-----C	G-----C	T-----C	C-----G	AC-
2	C-----C	T-----T	G-----C	T-----C	T-----G	AC-
3	C-----N	T-----N	G-----C	T-----C	N-----G	AC-
4	C-----G	T-----N	G-----C	T-----C	T-----G	AC-
5	C-----C	T-----N	G-----C	T-----C	N-----G	AC-
6	C-----G	T-----N	G-----C	T-----C	N-----G	AC-
7	C-----N	T-----T	G-----C	T-----C	T-----G	AC-

شماره‌ها مکان جهش‌ها را نشان می‌دهند

ارتباط ژنوتیپ‌ها با صفات مورد مطالعه

در مرحله تجزیه و تحلیل داده‌ها، دو الگو (F و G) با فراوانی بسیار کم (یک مشاهده) از ادامه آنالیز حذف شدند. بررسی ارتباط الگوهای شناسایی شده با صفات مورد مطالعه نشان داد که ناحیه مورد مطالعه به طور معنی‌داری ($P < 0.05$) تعداد کل بره‌ها و میانگین تعداد بره‌ها را در طول ۴ شکم

تحت تأثیر قرار می‌دهد (جدول ۳). همچنین ارتباط این ناحیه با چند قلوایی در شکم دوم معنی‌دار ($P < 0.05$) بود که در مقایسه با الگوی A، الگوی E بیشترین تعداد بره (۱/۸۸) را نشان داد و الگوی A، الگوی B کمترین تعداد بره را در این شکم به خود اختصاص داد ولی تنها الگوی باندی B اختلاف معنی‌داری با الگوی رفرنس داشت (جدول ۴).

جدول ۳- میانگین حداقل مربعات الگوهای مختلف باندی برای چند قلوایی

Table 3. Least squares means for litter size of different banding patterns

صفت	الگوهای مختلف					Pr>F
	A	B	C	D	E	
میانگین تعداد بره در ۴ شکم	bc ۱/۳۷ ± ۰/۰۸	c ۱/۳۰ ± ۰/۱۱	bc ۱/۳۹ ± ۰/۰۴	ab ۱/۶۰ ± ۰/۱۰	a ۱/۸۰ ± ۰/۱۴	۰/۱۶
تعداد کل بره در ۴ شکم	bc ۴/۴۶ ± ۰/۲۱	c ۳/۸۷ ± ۰/۵۹	bc ۴/۶۹ ± ۰/۲۳	ab ۵/۶۷ ± ۰/۵۵	a ۶/۷۵ ± ۰/۸۳	۰/۰۱

* ($P < 0.05$)

جدول ۴- آنالیز حداکثر درست‌نمایی اثرات الگوهای مختلف باندی برای چند قلوایی

Table 4. Maximum likelihood analysis for litter size of different banding patterns

صفت	الگوهای مختلف (الگوی A به عنوان رفرنس)				Pr>ChiSq
	B	C	D	E	
شکم اول	-۱/۰۴ ± ۰/۸۹	۰/۲۴ ± ۰/۴۱	۰/۶۸ ± ۰/۶۲	-۰/۱۹ ± ۰/۹۶	۰/۷۲
شکم دوم	-۱/۸۳ ± ۰/۹*	-۰/۳۲ ± ۰/۴۱	۰/۶۷ ± ۰/۶۱	۱/۸۸ ± ۰/۹۳	۰/۰۵
شکم سوم	۰/۱۹ ± ۰/۶۰	-۰/۵۹ ± ۰/۳۷	-۰/۲۳ ± ۰/۶۱	۱/۲۸ ± ۰/۹۳	۰/۳۳
شکم چهارم	-۱/۵۳ ± ۰/۹	-۰/۹۷ ± ۰/۴۹	۰/۶۶ ± ۰/۶۷	۱/۱۸ ± ۰/۸۹	۰/۱۲

* ($P < 0.05$)

ژانگ و همکاران (۲۲) گزارش دادند که چند شکلی اگزون سوم FSHB، که در مطالعه ما یک‌نواخت بود، با باروری در بز ارتباط دارد. جهش در این ژن احتمالاً منجر به تغییر بیان ژن و در نتیجه اثر روی غلظت FSH می‌شود که می‌تواند منجر به تغییر نرخ تخم‌ریزی شود (۲۱). همچنین بونت و لیماستر (۳) در یک شبیه‌سازی گزارش دادند که چند قلوایی به‌طور گسترده‌ای وابسته به نرخ تخم‌ریزی و ظرفیت رحم در خوک است. ظرفیت محدود رحم در میش‌های با نرخ تخم‌ریزی بالا منجر به مرگ و میر بیشتر جنین می‌شود. بنابراین نرخ تخم‌ریزی یک عامل کلیدی در نرخ نهایی بره‌زایی نیست (۲۱). در مجموع، نتایج این پژوهش نشان داد که PCR-SSCP، روشی مناسب برای مطالعه ژن FSHB در گوسفند می‌باشد. با نتایج این تحقیق و بررسی بیشتر در جمعیت دیگر می‌توان این جایگاه را به‌عنوان ژنی کاندیدا در برنامه‌های اصلاح نژادی در نظر گرفت.

تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه طرح پژوهشی به شماره ۰۲-۱۳۹۴-۰۳ است که لازم می‌دانیم از مساعدت‌های حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری تشکر نماییم. همچنین، نویسندگان این پژوهش کمال تشکر را از کارکنان و مدیریت ایستگاه اصلاح نژاد گوسفند بلوچی به خاطر در دسترس قرار دادن داده‌های این مطالعه دارند.

نتایج این پژوهش نشان داد، PCR-SSCP روشی کارآمد در تعیین ژنوتیپ جمعیت گوسفند بلوچی برای اگزون اول ژن FSHB است. تاکنون تحقیقی در ارتباط با اگزون اول و سوم این جایگاه و نقش آن در چند قلوایی در گوسفند گزارش نشده است. اگزون سوم این ژن در این جمعیت یک شکل بود. بر خلاف نتایج این تحقیق، در گزارش ژانگ و همکاران (۲۲) اگزون اول این ژن در بز تک شکل گزارش شد در حالیکه اگزون سوم دارای چند شکلی بود. در مجموع هفت الگوی باندی برای اگزون اول شناسایی شد. الگوی باندی A بیشترین فراوانی و الگوهای F و G کمترین مشاهده را به خود اختصاص دادند. ژانگ و همکاران (۲۲) برای این جایگاه در بز، با روش PCR-SSCP، ۳ ژنوتیپ AA، AB و BB مشاهده کردند که ژنوتیپ AA بیشترین اثر را در بزهای با باروری بالا داشت. آن و همکاران (۱) نیز سه ژنوتیپ را برای اگزون دوم این جایگاه مشاهده گزارش کردند. نتایج این پژوهش با نتایج قلی‌زاده و همکاران (۹)، که با استفاده از مطالعه ارتباطی ژنومی (GWAS) گزارش دادند نشانگرهای معنی‌دار برای دوقلوایی گوسفند بلوچی روی کروموزوم شماره ۱۵ جایی که ژن FSHB در آن قرار دارد مطابقت دارد. همچنین نتایج این پژوهش با نظیفی و همکاران (۱۷) که گزارش دادند FSHB (اگزون دوم) چند قلوایی را در گوسفند بلوچی تحت تأثیر قرار می‌دهد مطابقت دارد. ارتباط چند شکلی در ژن FSHB در مطالعات دیگر نیز بررسی شده است.

منابع

1. An, X.P., D. Han, J.X. Hou, G. Li, Y.N. Wang, L. Li, G.Q. Zhu, J.G. Wang, Y.X. Song and B.Y. Cao. 2010. Polymorphism of exon 2 of FSH gene and its relationship with reproduction performance in two goat breeds. *Agricultural Sciences in China*, 9: 880-886.
2. Artimo, P., M.J. Onnalagedda, K. Arnold, D. Baratin, G. Csardi and E. DeCastro. 2012. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Research*, 40: 597-603.
3. Bennett, G.L. and K.A. Leymaster. 1989. Integration of ovulation rate, potential embryonic viability and uterine capacity into a model of litter size in swine. *Journal of Animal Science*, 67: 1230-1241.
4. Byun, S.O., Q. Fang, H. Zhou and J.G.H. Hickford. 2009. An effective method for silver-staining DNA in large numbers of polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 385: 174-175.
5. Fan, Q.R. and W.A. Hendrickson. 2005. Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor. *Nature*, 433: 269-277.
6. Farhadi, A., V. Genualdo, A. Perucatti, S.H. Hafezian, G. Rahimi-Mianji, L. De Lorenzi, P. Parma, L. Iannuzzi and A. Iannuzzi. 2013. Comparative FISH mapping of BMPR1B, BMP15 and GDF9 fecundity genes on cattle, river buffalo, sheep and goat chromosomes. *Journal of Genetics*, 92: 595-597.
7. Fox, K.M., J.A. Dias and P. Van Roey. 2001. Threedimensional structure of human follicle-stimulating hormone. *Molecular Endocrinology*, 15: 378-389.
8. Galloway, S.M., K.P. McNatty, L.M. Cambridge, M.P.E. Laitinen, J.L. Juengel, 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. *Nature Genetics*, 25:279-283.
9. Gholizadeh, M., G. Rahimi-mianji, A. Nejati-javaremi, D.J. De Koning and E. Jonas. 2015. Genomewide association study to detect QTL for twinning rate in Baluchi sheep. *Journal of Genetics*, 93: 489-493.
10. Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.
11. Hediger, R., S.E. Johnson and D.J. Hetzel. 1991. Localization of the beta-subunit of follicle stimulating hormone in cattle and sheep by in situ hybridization. *Animal Genetics*, 22: 237-44.
12. Hanrahan, J.P., S.M. Gregan, P. Mulsant, M. Mullen, G.H. Davis, R. Powell and S. 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 (Ovisaries). *Biology Reproduction*, 70: 900-909.
13. Kimchi-Sarfaty, C., J.M. Oh, I.W. Kim, Z.E. Sauna, A.M. Calcagno, S.V. Ambudkar and M.M. Gottesman. 2007. A 'silent' polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science*, 315: 525-528.
14. Kumar, T.R., Y. Wang, N. Lu and M.M. Matzuk. 1997. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nature Genetics*, 15: 201-204.
15. McLahlan, R.I., N.G. Wreford, D.M. Robertson and D.M. de Kretser. 1995. Hormonal Control of Spermatogenesis. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 6: 95-101.
16. Miller, S.A., D.D. Dykes and H.F. Polesky. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16:1215.
17. Nazifi, N., G. Rahimi-Mianji and Z. Ansari-Pirsaraei. 2011. Association of polymorphism in *FSHB* gene with litter size in Iran Black, Arman and Baluchi sheep. The 12th Iranian Genetics Congress. Tehran-Iran, (In Persian).
18. Ohta, T., H. Miyake, C. Miura, H. Kamei, K. Aid and T. Miura. 2007. Follicle-stimulating hormone induces spermatogenesis mediated by androgen production in Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Biology Reproduction*, 77: 970-977.
19. SAS. 2009. SAS Statistical Analysis Systems 2000. User's Guide. SAS Institute Incorporation, Cary, NC.
20. Souza, C.J.C., B.K. MacDougall, A. Campbell, S. McNeilly and D.T. Baird. 2001. The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 B (BMPR1B) gene. *Journal of Endocrinology*, 169: 1-6.
21. Waldron, D.F. and D.L. Thomas. 1992. Increased litter size in Rambouillet sheep: I. Estimation of genetic parameters. *Journal of Animal Science*, 70: 3333-3344.
22. Zhang, C.Y., C.J. Wu, W.B. Zeng, K.K. Huang, X. Li, J.H. Feng, D. Wang, G.H. Hua, D.Q. Xu, Q.Y. Wen and L.G. Yang. 2011. Polymorphism in exon 3 of follicle stimulating hormone beta (FSHB) subunit gene and its association with litter traits and superovulation in the goat. *Small Ruminant Research*, 96: 53-59.

Association of Genetic Variation in Exon 1 and 3 of *FSHB* Gene with Litter Size in Baluchi Sheep

Mohsen Gholiadeh¹ and Mojtaba Najafi²

1- Assistant Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
(Corresponding author: mh_gholizadeh@yahoo.com)

2- PhD in Animal Breeding and Genetics, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

Received: June 27, 2015 Accepted: October 3, 2015

Abstract

This research was conducted to find association of genetic variation in exon 1 and 3 of the follicle stimulating hormone beta (*FSHB*) subunit gene and litter size in Baluchi sheep. DNA was extracted using modified salting out method and polymerase chain reaction was used to amplify a fragment of 220 bp of exon 1 and a fragment of 427 bp of exon 3 along with a part of intron 2. Two methods of PCR-SSCP and DNA sequencing were used for identification the different genotypes, While no polymorphism was found for exon 3, the present study identified 3 novel nucleotide polymorphisms in exon 1 of ovine *FSHB* gene, resulted 7 banding patterns which significantly influenced total and average number of lams across all parties. Results also showed significant association ($p < 0.05$) of polymorphism in exon 1 with litter size for parity 2 in a way that pattern E had the most phenotype (1.88) compared with pattern A as reference while the less phenotype was detected for pattern B. These results showed the potential usefulness of this gene in marker-assisted selection for sheep breeding.

Keywords: *FSHB* gene, Litter size, Sheep