مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC

شناسایی جهش های جدید در اگزون ۸ ژن BMPR1B در گوسفندان ایرانی نژاد لری-بختیاری، شال، قزل و افشاری

شاهین اقبال سعید[۱و۲]*، حمیدرضا امینی[۳]، فرزاد رشیدی[۲]، داود ولایتی[۲]، شیلا پورعلی[۲]

[۱]قطب علمی ترانسژنزیز دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان، ایران

[۲] گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران

[۳] گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۶/۲۳، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۸/۲۳

چکیده

ژن گیرنده پروتئین مورفوژنتیک استخوان (BMPR1B) یکی از ژن‌های بزرگ اثر است که نقش مهمی در افزایش میزان تخمک‌گذاری در گوسفندان دارد. بر این اساس، هدف از این مطالعه بررسی و مقایسه چندشکلی‌های موجود در اگزون ۸ ژنBMPR1B و ارتباط آن با صفت چندقلوزایی در جمعیت گوسفندان نژاد لری‌بختیاری، شال، قزل و افشاری بود. لذا، نمونه خون از قوچ‌ها و میش‌های تک قلو و چندقلوزا اخذ و پس از تکثیر این جایگاه،جهت تعیین الگوی ژنوتیپی نمونه‌ها از روش PCR-SSCP استفاده شد. نتایج SSCP حضور سه الگوی ژنوتیپی را در این ٤ جمعیت گوسفندان نژاد ایرانی نشان داد که بیشترین فراوانی مربوط به الگوی ژنوتیپی ۱ (۷۳٪) و کمترین آن مربوط به الگوی ژنوتیپی ۲ (۸٪) بود. همچنین نتایج نشان داد که در رابطه با اثر الگوهای ژنوتیپی اگزون ۸ ژن BMPR1B بر میانگین تعداد نتاج در هر زایش، بین سه الگوی ژنوتیپی اختلاف معنی داری وجود داشت. گوسفندان دارای الگوی ۲ با ۱/۷ بره در هر زایش و گوسفندان دارای الگوی ۳ با ۱/٤ بره در هر زایش به ترتیب بیشترین و کمترین تعداد بره در هر زایش را داشتند. سپس، توالی یابی این قطعه تکثیر شده از اگزون ۸ انجام شد. نتایج توالی یابی نشان دهنده وجود چهار جهش در توالی mRNA بود. جایگزینی باز C در موقعیت ۸۵۵ که موجب ایجاد یک کدون توقف در موقعیت ۲٦٦ (I266*) می‌شود. همچنین جهش تبدیلی تک نوکلئوتیدی در موقعیت‌های G812T، T854A و C855A نیز مشاهده گردید که به موجب آن‌ها به ترتیب اسیدآمینه تریپتوفان به لیزین در موقعیت ۲۱۹ (W219L)، فنیل آلانین به تیروزین در موقعیت ۲۳۳ (F233Y) و فنیل آلانین به لیزین در موقعیت ۲۳۳ (F233L) تبدیل گردید. به طور کلی، نتایج این تحقیق نشان داد که در اگزون ۸ ژن BMPR1B در گوسفندان ایرانی نژادهای مختلف جهش های مهمی وجود دارد که میتوانند بر صفات مرتبط با تعداد نتاج در هر زایش موثر باشند.

کلمات کلیدی: *چند قلوزایی، تعداد نتاج تولیدی کل، ژن BMPR1B، PCR-SSCP، گوسفند، ایران.*

*نویسنده مسئول: شاهین اقبال سعید تلفن: ۰۳۱-۳۵۳۵٤۰۸٤ Email: shahin.eghbal@khuisf.ac.ir

مقدمه

استفاده از ژنتیک ملکولی فواید زیادی دارد که یکی از این فواید معنی دار تعیین ژنوتیپ افراد برای جایگاه خاصی است (Mousavizadeh *et al.*, 2009) همچنین استفاده از نشانگرهای ژنتیکی در انتخاب و اصلاح نژاد به طور مهیجی پیشرفت ژنتیکی را تسریع می‌کند (Javanmard *et al.*, 2008). مطالعه تنوع ژنتیکی نژادهای بومی برای حفاظت از منابع ژنتیکی لازم و ضروری است (Mohammadi *et al.*, 2009). بالغ بر ۲۶ نژاد گوسفند در ایران وجود دارد که با مناطق مختلف سازگار شده اند. در حال حاضر، تولید گوشت مهمترین دلیل پرورش گوسفند در ایران است و تولیدات دیگر مانند پشم، شیر و پوست در درجات بعدی اهمیت قرار دارند (SattaiMokhtari *et al.*, 2009).

دامنه بزرگی از چند قلوزایی در بین و داخل نژادهای مختلف در گوسفندانمشاهده شده است. در بعضی از مطالعات ژنتیکی نشان داده شده که چندقلوزایی و میزان تخمک‌ریزی می-توانند تحت تاثیر چند ژن بزرگ اثر باشند (Davis *et al.*, 1991). سه ژن از اعضای خانواده Transforming Growth Factor β(TGF-β) که از لحاظ بیولوژیکی دارای سیستم فعالی می-باشندکه روی هم رفته بخش قابل توجهی از واریانس صفت چندقلوزایی را در گوسفند تشکیل می‌دهند.

این سه دسته ژن باروری که اخیرا در گوسفند شناسایی شده عبارتند از: گیرنده نوعB پروتئین مورفوژنتیک استخوانی[1] (BMPR-IB) یا کیناز شبه اکتیوین شماره ٦ (ALK6) تحت عنوان FecB که روی کروموزوم شماره ٦ واقع است (Moghadaszadeh *et al.*, 2015)، فاکتور متمایز کننده رشد[2] GDF9 به نام FecG که روی کروموزم شماره ۵ قرار دارد (Moghadaszadeh *et al.*, 2015) و دسته پروتئین‌های مورفوژنیک استخوانی[3](BMP ها) که به نام FecX معروفند و روی کروموزوم X قرار دارند(Moghadaszadeh *et al.*, 2015). ژن‌های BMP جزءفوق خانواده TGFβ بوده، بر تنظیم بیان و ترشح هورمون‌های موثر بر رشد فولیکولی و نرخ تخمکاندازی موثرند و توسط تخمک تولید می‌شوند. BMP ها در توسعه جنین، هموستازی، تعمیر و اصلاح الگوهای بافتی مختلف، تمایز سلولی و مرگ برنامه ریزی شده سلول نقش دارند (Moghadaszadeh *et al.*, 2015).

ژن BMPR1B یا بورولا (Boroola) نخستین ژن بزرگ اثری بود که در مورد افزایش میزان باروری گزارش داده شد (Davis, 2005). مهمترین جهش شناخته شده در این ژن که همان جهش بورولاست در اگزون ۸ گزارش شده است که منجر به جایگزینی آدنین با گوانین در باز ۷٤٦ و به دنبال آن تبدیل گلوتامین به آرژنین می گردد

[1]Bone Morphogenetic Protein Receptor type IB
[2]Growth Differentiation Factor
[3]Bon Morphogenetic Protein

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

(Souza *et al*., 2001).سپس محققین توانستند با روشPCR-RFLP وجود این جهش را در نژادهای مختلف تایید نمایند به طوری که گوسفندانی که دارای آلل هموزیگوس $FecB^B/FecB^B$، هتروزیگوس $FecB^B/FecB+$ و تیپ وحشی FecB+/FecB+ از ژن بورولا هستند به ترتیب میزان تخمک‌گذاریدر این گوسفندانبه طور متوسط ۵، ۳-٤ و ۱-۲می باشد (Davis *et al*., 2005). افزایش میزان باروری در گوسفندان حامل FecB در ارتباط با افزایش تعداد فولیکول-های آنترال و پیش آنترال می‌باشد که دارای اندازه کوچکتری نسبت به فولیکول‌های گوسفندان غیر حامل می‌باشد (Davis *et al*., 2001). بررسی‌های بیشتر نشان داد که علیرغم اندازه کوچک‌تر فولیکول‌های آنترال و بالغ در گوسفندان حامل ژن بورولا نسبت به گوسفندان تیپ وحشی، در مراحل اولیه رشد فولیکولی تا مرحله تیپ ۳ فولیکولی دارای اندازه تخمک بزرگتری نسبت به گوسفندان حامل تیپ وحشی برای این ژن می-باشند (Reader *et al*., 2012). بررسی تعداد نتاج در هر زایش در گوسفندان حامل این ژن نشان دهنده این است که وجود یک کپی از این ژن می‌تواند منجر به افزایش تعداد نتاج در هر زایش به اندازه ۰/۵- ۱/۵ بره گردد(Nimbkar *et al*., 2002; Polley *et al*., 2010). در پژوهشی که با استفاده از روش PCR-RFLP روی ۹ نژاد از گوسفندان چینی و اروپایی برای بررسی چندشکلی‌های موجود در ژن FecB انجام شد، نشان داد که تمام گوسفندان نژاد هو[1] حامل ژنوتیپ هموزیگوس FecB بودندو در سایر نژادها تنها ژنوتیپ وحشی برای این ژن مشاهده شد (Guan *et al*., 2006).همچنین، در مطالعه ای بر روی ۲۱ نژاد و سویه گوسفندان چند قلوزا در ۱۳ کشور جهش FecB را تنها در دو نژاد هو و هانکشور چین که دارای متوسط ۲/۹-۳/۰ بره در هر زایش بودند، مشاهده کردند و سایر نژادها شامل توکا، وودلندز، اولکاسو، لاکان، بلکلیر و کمبریج با متوسط ۱/۵-٤/۵ بره در هر زایش این جهش را نشان ندادند. آنهانتیجه گیری کردند که ژن بورولا از نژادهای گرول بنگال منشا گرفته است و احتمالا نژادهای چینی هم دارای اجداد مشترکی با نژاد گرول می باشند (Davis *et al*., 2006).

در کشور ماطی دهه‌های اخیر مطالعات گسترده‌ای برای افزایش میزان بهره‌وری صفات تولیدمثلی گوسفندان در کشور انجام گرفته است. مطالعه ژن‌های GDF9 و BMP15 در گوسفندان ایرانی نشان دهنده عدم وجود جهش‌های بزرگ اثر که در حالت هوموزیگوت منجر به عقیمی می‌گردد، می‌باشد (Ghafari *et al*., 2009; Moradband *et al*., 2011; Eghbalsaied ea al., 2012; Moradi *et al*. 2004). با این وجود، وجود جهش‌های کوچک اثر در این ژن‌ها در گوسفندان ایرانی تایید شده است (Barzegari *et al*., 2010; Eghbalsaied *et al*., 2012; Zamani *et al*.,

[1]Hu sheep breed

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

2015a; Zamani *et al*., 2015b, Eghbalsaied *et al*. 2014).

اگر چه پژوهش‌های زیادی در گوسفندان و بزهای ایرانی روی ژن‌های مرتبط با باروری، از قبیل GDF9 و BMP15 انجام شده است (Alinaghizadeh *et al*., 2010; Hadizadeh *et al*., 2014; Khodabakhshzadeh *et al*., 2015; Moghadaszadeh *et al*., 2015; Hadizadeh *et al*., 2014; Khodabakhshzadeh *et al*., 2016a; Hadizadeh *et al*., 2013; Khodabakhshzadeh *et al*., 2015b; Khodabakhshzadeh *et al*., 2016b; Soufy *et al*., 2009)، ولی نتایج بررسی‌ها بر روی ژن BMPR1B در گوسفندان ایرانی نشان دهنده این است که جهش بورولا در گوسفندان کرکوهی و زل با فراوانی بسیار اندک شناسایی شده است (Asadpour *et al*., 2012; Mahdavi *et al*., 2014)و در سایر نژادها مشاهده نشده است (Moradband *et al*., 2011). با این وجود، اندازه جمعیت و نیز تنوع نژادی مورد استفاده دراین مطالعات محدود بوده و نیاز به یک مطالعه گسترده در این خصوص می‌باشد.لذا این مطالعه به منظور شناسایی چندشکلی‌های موجود در اگزون ۸ ژنBMPR1Bدر گوسفندان نژاد لری‌بختیاری، شال، قزل و افشاری انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های خون با استفاده از سرنگ ۵ میلی‌لیتریاز رگ گردن گرفته شد و با ۰/۵ میلی‌لیتر از EDTA ۰/۵ مولار در لوله‌های فالکون ۱۵سی سی ریخته شد و سپسبرروی یخ به آزمایشگاه منتقل شد. برایخونگیری از گوسفندان نژاد شال از یک گله گوسفند مردمی معرفی شده توسط جهاد کشاورزی بوئین زهرا در استان قزوین، برای گوسفندان قزل از گوسفندان موجود در مرکز اصلاح دام میاندواب، گوسفندان نژاد لری بختیاری واقع در گله های مردمی استان چهارمحال و بختیاری و گوسفندان افشاریاز گوسفندان افشاری موجود در مزرعه دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان استفاده شد. همچنین دسته‌بندی گوسفندان برای صفت دوقلوزایی با کمک صاحب گله و در مرکز اصلاح دام بر اساس اطلاعات ثبت شده گوسفندان انجام گرفت. دراین بخش از مطالعه، نمونه خون از ۱۳۰رأس میش دو قلوزا (۲۰ رأس افشاری ، ۳۰ رأس شال، ۳۰ رأس قزل و ۵۰ رأس لری بختیاری)، ۷۲ رأس میش تک قلوزا (۱٤ رأس افشاری،۱۰ رأس شال، ۱۰ رأس قزل و ۳۸ رأس لری بختیاری) و ۳۳ رأس قوچ (۳ رأس افشاری،۱٤ رأس شال، ۸ رأس قزل و ۸ رأس لری بختیاری) جمع آوری و به آزمایشگاه بیوتکنولوژی مستقر در دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان منتقل شد. پس از سانتریفوژ در دور۱۰۰۰۰rpmبه مدت ۵ دقیقه و جداسازی بخش حاوی گلبول‌های سفید، استخراج DNA از ۲۵۰ میکرولیتر خون با استفاده از روش استاندارد فنل-کلروفورم انجام و جهت تعیین کیفیتDNA استخراج شده از ژل آگارز ۱ درصد و جهت تعیین کمیت آن از دستگاه نانودراپ استفاده شد.

برای تکثیر قطعه ۱٤۰ جفت بازی (شکل۱) ژن BMPR1B (شماره دسترسی در NCBI؛ GQ863578) از آغازگر رفت و برگشت

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

استفاده گردید که توالی آغازگر رفت بـه صـورت 5’-GTCGCTATGGGGAAGTTTGG-3’ و تـــوالی آغـــازگر برگشـــت بـــه صـــورت 5’-CAAGATGTTTTCATGCCTCATC-3’ بود (Abdoli *et al*., 2013). جهت بهینـه سـازی واکـنش PCR از برنامـه‌هـای حرارتـی مختلفـی استفاده شد و در نهایت برنامه‌ی حرارتـی زیـر بـا ۳۵ سیکل، ایده آل ترین شرایط برای تکثیر اگزون ۸ ژن BMPR1B تشـخیص داده شـد. واسرشـت سازی اولیه DNA به مدت ۵ دقیقـه در دمـای ۹۵ درجه سـانتی گـراد، واسرشـت سـازیDNA بـه مدت ٤٠ ثانیه در دمای ۹۵ درجـه سـانتی گـراد، اتصال آغـازگر بـه DNA بـه مـدت ۳۰ ثانیـه در دمای٦٠ درجه سانتی گراد، بسط DNA به مـدت ٤٠ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سـانتی گـراد و بسـط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد در حجـم نهـایی ۲۵ میکرولیتـر انجـام شـد. حجم PCR انجام شـده الکتروفـورز محصـولات PCR جهت بررسی قطعـه تکثیـر یافتـه روی ژل آگارز ۲ درصد، با ولتـاژ ۸۰ ولـت، بـه مـدت ۲۰ دقیقه صورت گرفت.

به منظور تعیین الگوهای ژنـوتیپی از روش چندشکلی ساختاری رشـته‌هـای منفـرد (SSCP) استفاده گردید که به طور خلاصه، ۵ میکرولیتـر از DNA تکثیـر شـده بـا ۱۵ میکرولیتـر از بـافر مخصوص SSCP (۹۹٪ فرمامید، ۰/۹٪ EDTA ٦ مولار، ۰/۰۵٪ برموفنل و ۰/۰۵٪ زاینـول سـیانید) ترکیب و بـه مـدت زمـان ۱۰ دقیقـه در دمـای٩٦ درجه انکوبه و تـک رشـته‌ای شـدند و بلافاصـله پس از این مرحله در داخل یـخ قـرار گرفتنـد. در مرحله بعد الکتروفورز محصـولات تـک رشـته‌ای شده، روی ژل اکریل آمید۱۲ درصد، با ولتاژ ۲۵۰ به مدت ۱۸ ساعت جهت بررسی چند شـکلی‌هـا انجام و رنگ آمیزی ژل اکریل آمید بـا اسـتفاده از نیترات نقره طی سه مرحله تثبیت، لکه گـذاری و ظهـور انجـام گرفـت (Bassam *et al*., 1991). محصـولات PCR حاصـل از الگوهـای مختلـف ژنتیکی توالی یابی شدند.

آنـالیز آمـاری داده‌هـا براسـاس الگوهـای ژنـوتیپی موجـود در اگـزون ۸ ژنBMPR1B بـا استفاده از نرم افزار SAS9.2 و با استفاده از رویـه GENMOD انجام و مقایسه میانگین‌ها با اسـتفاده از میانگین حداقل مربعات انجام و سطح احتمـال ۵٪ به عنـوان سـطح اخـتلاف معنـی دار در نظـر گرفته شد.

نتایج و بحث

در این تحقیق جهت بررسـی جهـش‌هـای موجود در اگزون ۸ ژن BMPR1B، پرایمر جهت تکثیر این قطعه به گونه‌ای بود که علاوه بر جهش گزارش شده موثر بر چندقلوزایی موجود در ایـن ناحیه،دیگر چند شکلی‌هـای احتمـالی موجـود در این ناحیه را نیز بتوان بـا اسـتفاده تکنیـک SSCP شناسایی کرد. همردیفی توالی پرایمر با توالی ایـن ژن در بانکNCBI (شکل۱) نشـان داد کـه قطعـه تکثیری در PCR برای این پرایمر باید دارای طول ۱٤٠ جفت باز باشد.بر همین اساس PCR مربوط به نمونه DNA تمـامی گوسـفندان نمونـه گیـری

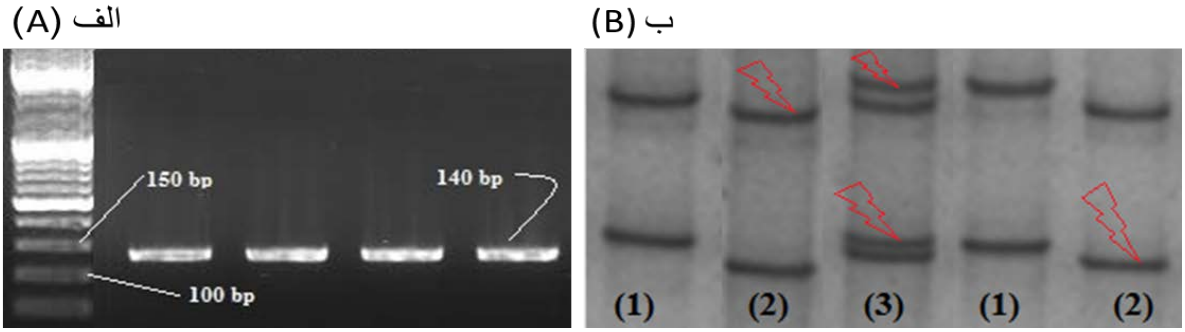
Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

شده لری‌بختیاری، افشاری، شال و قزل گذاشته شد. لازم به ذکر است که در تمام نمونه‌های مورد بررسی روی ژل آگارز ۲ درصد، محصولات PCR مشابه هم بودند. وجود یک نوار مشخص بر روی ژل آگارز موید این است که پرایمر بکار رفته تنها دارای یک قطعه هدف رویDNA بودند و شباهت توالی در مکان‌های دیگری از DNA وجود نداشت. نتایج حاصل از SSCP و رنگ آمیزی ژل اکریل آمید بیانگر سه الگو باندی متفاوت برای این چهار جمعیت بودند. فراوانی-های الگوهای ژنوتیپی در جدول ۱ برای هر دو جنس از چهار نژاد مورد بررسی آورده شده است. همانطور که در جدول مشاهده می‌شود بیشترین فراوانی الگوی ژنوتیپی مربوط به الگوی ۱ و به ترتیب با فراوانی‌های۰/۹۰، ۰/۸۰، ۰/٦٥ و ۰/٦٤ متعلق به گوسفندان شال، قزل، افشاری و لری-بختیاری بود. همچنین کمترین فراوانی الگوهای ژنتوتیپی مربوط به الگوی ژنتوتیپی ۲ و به ترتیب با فراوانی‌های۰/۱۲، ۰/۱۰، ۰/۰۵ و ۰/۰۰ متعلق به گوسفندان لری-بختیاری، قزل، شال و افشاری بود، به عبارتی الگوی ژنوتیپی ۲ در جمعیت گوسفندان افشاری مشاهده نگردید. نتایج بدست آمده در این بخش از مطالعه نشان داد که تنوع قابل ملاحظه‌ای در صفت چندقلوزایی در ناحیه اگزون ۸ ژن BMPR1B در جمعیت گوسفندان نژاد ایرانی وجود دارد.

همچنین نتایج ارتباط بین الگوهای ژنوتیپی حاصل با تعداد نتاج در هر زایش (جدول ۲) نشان داد که بین الگوهای ژنوتیپی بدست آمده از ناحیه اگزون ۸ژن BMPR1B و تعداد نتاج در هر زایش تفاوت معنی داری وجود دارد (P<۰/۰۵). به طوری که بالاترین میانگین تعداد نتاج در هر زایش متعلق به الگوی ژنوتیپی ۲ و برابر با ۱/۷۰ و کمترین آن مربوط به الگوی ژنوتیپی ۳ و برابر با ۱/٤۰ بود (P<۰/۰۵). محققین توصیف کردند که اثرات آلل‌های موتانت در ژن BMPR1B به-صورت افزایشی است که باعث افزایش میزان تخمک‌گذاری می‌شوند (Davis *et al*., 2004). بنابراین، با توجه به این که در مطالعه حاضر الگوهای ژنوتیپی متفاوتی در اگزون ۸ ژن BMPR1B در هر چهار جمعیت گوسفندان نژاد لری-بختیاری، شال، قزل و افشاری مشاهده شد، لذا جهش‌های موجود در این ناحیه می‌تواند علاوه بر سایر جهش‌های موجود در ژن‌های عمده موثر بر چند قلوزایی، بر میزان تعداد نتاج در هر زایش در گوسفندان ایرانی موثر باشد.

نتایج توالی یابی اگزون ۸ ژن BMPR1B از سه گروه الگوی ژنتیکی نشان دهنده چهار جهش در توالی DNA این ژن است (جدول٤) که شامل یک جهش جایگزینی باز C منطبق با موقعیت ۸۵۵ توالی CDs است (شکل۲-B) که موجب ایجاد یک کدون خاتمه زود هنگام در موقعیت ۲٦٦ رشته پلی پپتیدی (I266*) شده است.

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500



شکل ۱- (A)جهش G812Tدر اگزون ۸ ژن BMPR1B گوسفندان ایرانی، (B) مقایسه توالی پلی پپتیدی حاصل از این جهش در ژنوتیپ جهش یافته و وحشی.

Figure 1- (A) Detected mutations, G812T in exon 8 of BMPR1B gene of Iranian sheep breeds, (B) Comparison of polypeptide sequences in mutant and wild type sheep.

جدول ۱- فراوانی الگوهای ژنوتیپی در اگزون ۸ ژن BMPR1B گوسفندان نژاد لری بختیاری، قزل، شال و افشاری

Table 1: The frequency of genotypic patterns in exon 8 of BMPR1B gene in four breeds including Lori-Bakhtiari, Shal, Ghezel and Afshari

نژاد Breed	جنس Sex	فراوانی الگوی ژنوتیپی Frequency of Genotypic patterns		
		1	2	3
افشاری Afshari	میش Ewe	(%79)	(%15)	(%6)
	قوچ Ram	(%67)	(%33)	–
شال Shal	میش Ewe	(%70)	(%12.5)	(%17.5)
	قوچ Ram	(%71.5)	(%21.5)	(%7)
قزل Ghezel	میش Ewe	(%92.5)	(%5)	(%2.5)
	قوچ Ram	(%87.5)	(%12.5)	–
لری بختیاری Lori-Bakhtiari	میش Ewe	(%61)	(%6)	(%33)
	قوچ Ram	(%50)	(%12.5)	(%37.5)
کل	میش Ewe	(%72)	(%9)	(%19)
	قوچ Ram	(%70)	(%18)	(%12)

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

جدول ۲- اثر الگوهای ژنوتیپی در اگزون ۸ ژن BMPR1B بر میانگین تعداد نتاج در هر زایش.

Table 2- The effects of genotypic patterns in exon 8 of BMPR1B gene on mean of litter size.

Breed نژاد	Genotype Patterns الگوهای ژنوتیپی		
	1	2	3
افشاریAfshari	^{ab}1.33±0.10	^{a}1.50±0.09	^{b}1.15±0.11
شال Shal	^{ab}1.66±0.11	^{a}1.78±0.10	^{b}1.45±0.12
قزل Ghezel	1.59±0.09	1.60±0.06	1.45±0.10
لری بختیاری Lori-Bakhtiari	^{b}1.60±0.07	^{a}2±0.08	^{b}1.45±0.09
کلTotal	^{ab}1.55±0.09	^{a}1.72±0.05	^{b}1.40±0.09

a,b: در هر ردیف میانگین‌های دارای حروف متفاوت اختلاف معنی داری در سطح ۵٪ با یکدیگر دارند.

جدول ۳- هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار و تعادل هاری-وینبرگ با استفاده از آماره کای اسکور

Table 3- Expected and observed heterozygosity and Hardy-Weinberg equilibrium by chi-square statistic.

نژاد Breed	هتروزیگوسیتی مشاهده شده Observed Heterozygosity	هتروزیگوسیتی مورد انتظار Expected Heterozygosity	درجه آزادی Freedom	کای مربع (χ^2) Chi Square
افشاریAfshari	0.79	0.49	1	12.3***
شال Shal	0.94	0.50	1	36.7***
قزل Ghezel	0.62	0.47	1	8.77***
لری بختیاری Lori-Bakhtiari	0.70	0.50	1	8.96***

***: اختلاف معنی دار در سطح کمتر از ۰/۰۰۱

بنابراین، این جهش منجر به ایجاد کدون خاتمه زود هنگام و کوتاه شدن طول رشته پلی پپتیدی از ۵۰۳ به ۲۵۵ اسید آمینه می گردد. هرچند این جهش متفاوت از جهش گزارش شده در نژاد بورولا مرینو بود ولی نتیجه ای مشابه با جهش بورولا (FecB) ایجاد خواهد کرد (Souza *et al.*, 2001). همچنین، جهش T854A نیز مشاهده شد (شکل۲-C)، که به موجب آن

اسیدآمینه فنیل آلانین به تیروزین در موقعیت ۲۳۳ (F233Y) تبدیل می شود. به علاوه، جهش C855A مشاهده شد (شکل٤-C) که موجب تبدیل اسیدآمینه فنیل آلانین به لیزین در موقعیت ۲۳۳ (F233L) گردید. همچنین، توالی یابی این قطعه تکثیر شده از اگزون ۸ نشان دهنده وجود جهش G812T بود (شکل۲-D) که موجب این تبدیل اسیدآمینه تریپتوفان به لیزین در موقعیت ۲۱۹ (W219L) گردید. از آنجایی که تبدیل های نوکلئوتیدی ذکرشده درتوالی زنجیره پلی پپتید منجر به تبدیل اسید های آمینه تریپتوفان و لیزین، و همچنین فنیل آلانین، تیروزین و لیزین می گردد که از نظر سیستم طبقه بندی استاندارد اسید های آمینه، در خانواده های مشابه دسته بندی قرار دارند. بنابراین، به احتمال زیاد جهش های تبدیلی شناسایی شده در گوسفندان ایرانی موجب ایجاد تغییرات اساسی در ساختار پروتئین و به دنبال آن عملکرد پروتئین بالغ نمی گردد. درحالیکه جهش شناسایی شده ورود تک نوکلئوتیدی که منجر به تغییر خوانش اسیدهای آمینه و چارچوب رمز می گردد، میتواند تاثیر به سزایی در ساختار و عملکرد گیرنده پروتئین مورفوژنتیک استخوانی (BMPR1B) داشته باشد (Souza *et al*., 2001). بررسی بیان ژن BMPR1B در گوسفندان ایرانی دارای تخمدان پرفولیکول انترال نسبت به گوسفندان کم فولیکول نشان داد که میزان بیان این ژن اختلاف معنی داری نداشت، ولی همبستگی بسیار بالای این ژن با GDF9 و BMP15 نشان دهنده اهمیت آن در مکانیسم کنترل تعداد فولیکول های انترال از طریق لیگاندهای BMP می باشد (Foroughinia *et al.* 2016).

جدول ٤- وجود پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی در ژن BMPR1B و توالی پلی پپتید فرضی آن در گوسفندان ایرانی.

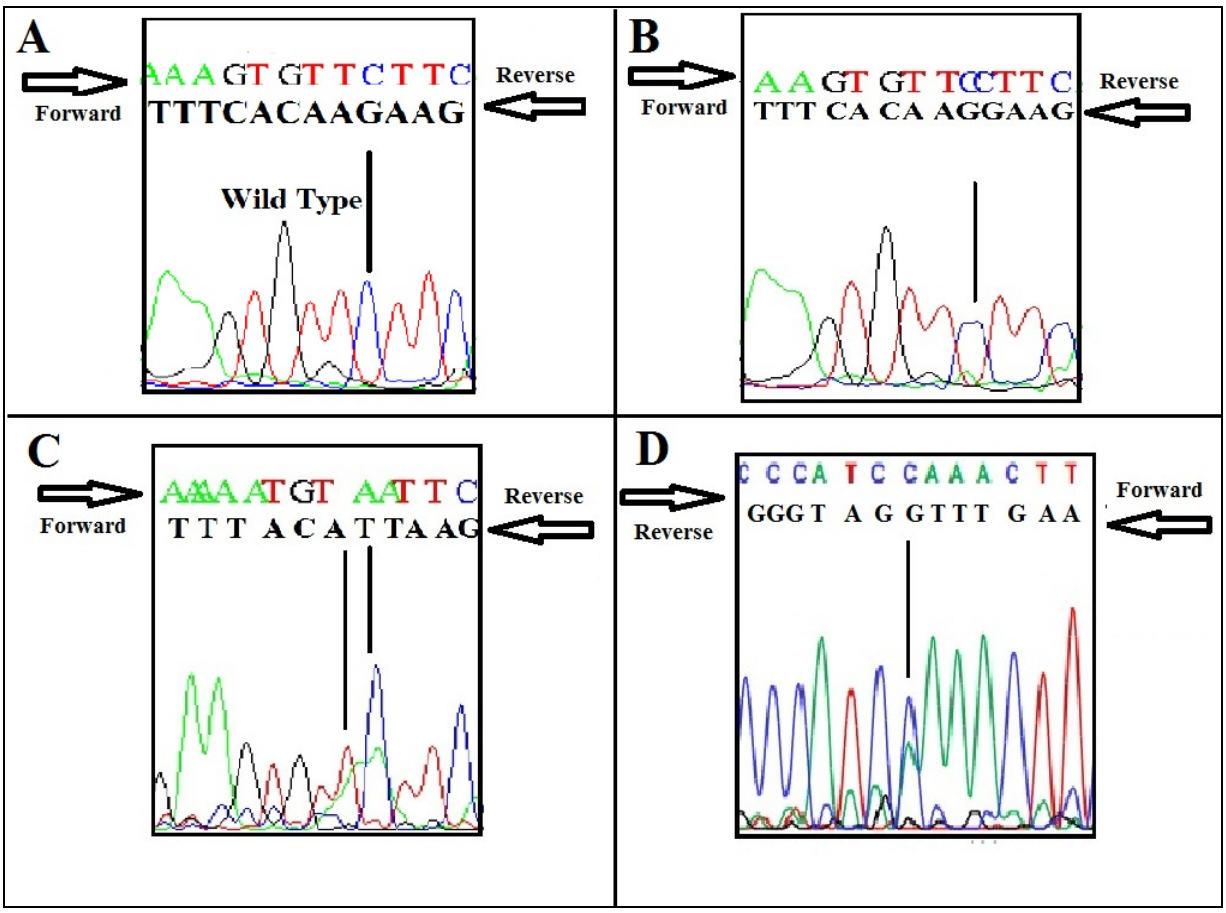
Table 4- Presence of SNPs in BMPR1B and the presumptive polypeptide changes in Iranian ewes.

Nucleotide conversion	Amino acid conversion
855C insertion	Isoleucine to Stop codon (I266*)
G812T	Tryptophan to Lysine (W219L)
T854A	Phenylalanine to Tyrosine (F233Y)
C855A	Phenylalanine to Lysine (F233L)

به طور کلی، نتایج این تحقیق نشان داد که در اگزون ۸ ژن BMPR1B در گوسفندان نژادهای مختلف ایرانی جهش های مهمی وجود دارد که می‌تواند بر صفات مرتبط با تعداد نتاج در هر زایش موثر باشد. پیشنهاد می‌شود که سایر اگزون های ژن BMPR1B نیز در نژادهای مختلف گوسفندان ایرانی مورد مطالعه قرار گیرد.

سپاسگزاری

این پروژه با حمایت معنوی و مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان) انجام گردید.



شکل۲- جهش های مشاهده شده در اگزون ۸ ژن BMPR1B گوسفندان ایرانی. نمونه تیپ وحشی فاقد جهش (A)، جهش تک نوکلئوتیدی 855 C Insertion (B)، جهش‌های تک نوکلئوتیدی T854A و C855A (C) و جهش‌های تک نوکلئوتیدی G812T (D).

Figure 4- Detected mutations in exon 8 of BMPR1B gene of Iranian sheep breeds: Wild type genotype (A), insertion of C nucleotide in the 855 position (B), simultaneous presence of single nucleotide polymorphisms of T854A and C855A (C), and single nucleotide polymorphism G812T (D).

منابع

Abdoli R, Zamani P, Deljou A, Rezvan H (2013). Association of BMPR-1B and GDF9 genes polymorphisms and secondary protein structure changes with reproduction traits in Mehraban ewes. Gene 524: 296-303.

Alinaghizadeh R, Mohammad Abadi MR, Zakizadeh S (2010). Exon 2 of BMP15 gene polymorphisminJabalBarez Red Goat. Journal of Agricultural Biotechnology 2: 69-80 (In Farsi).

Asadpour R, Jafari-Joozani R, Alijani S, Mahmod H (2012). Detection of polymorphism in booroola gene (FecB) and its association with litter size in Zel sheep breed in Iran. Slovak Journal of Animal Science 45: 63-66.

Barzegari A, Atashpaz S, Ghabili K, Nemati Z, Rustaei M, Azarbaijani R (2010). Polymorphisms in GDF9 and BMP15 associated with fertility and ovulation rate in Moghani and Ghezel sheep in Iran. Reproduction in Domestic Animals 45: 666-669.

Bassam BJ, Caetano-Anollés G, Gresshoff PM (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry 196: 80-83.

Davis G (2004). Fecundity genes in sheep. Animal Reproduction Science 82: 247-253.

Davis GH (2005). Major genes affecting ovulation rate in sheep. Genetics Selection Evolution 37: S11.

Davis G, Balakrishnan L, Ross I, Wilson T, Galloway S, Lumsden B, Hanrahan J, Mullen M, Mao X, Wang G (2006). Investigation of the Booroola (FecB) and Inverdale (FecX I) mutations in 21 prolific breeds and strains of sheep sampled in 13 countries. Animal Reproduction Science 92: 87-96.

Davis G, Galloway SM, Ross I, Gregan, SM, Ward J, Nimbkar BV, Ghalsasi PM, Nimbkar C, Gray GD, Inounu I (2002). DNA tests in prolific sheep from eight countries provide new evidence on origin of the Booroola (FecB) mutation. Biology of Reproduction 66: 1869-1874.

Davis G, McEwan J, Fennessy P, Dodds K, Farquhar P (1991). Evidence for the presence of a major gene influencing ovulation rate on the X chromosome of sheep. Biology of Reproduction 44: 620-624.

Eghbalsaied S, Amini H, Shahmoradi S, and Farahi M (2014). Simultaneous Presence o=f G1 and G4 Mutations in Growth Differentiation Factor 9 Gene of Iranian Sheep. Iranian Journal of Applied Animal Research 4: 781-785.

Eghbalsaied S, Ghaedi K, Shahmoradi S, Pirestani A, Amini H, Saiedi T, Nicol L, McNeilly A (2012). Presence of SNPs in GDF9 mRNA of Iranian Afshari sheep. International Journal of Fertility and Sterility 5: 225–230 (In Farsi).

Foroughinia G, Fazileh A, Eghbalsaied S (2016). Expression of genes involved in BMP and estrogen signaling and AMPK production can be important factors affecting total number of antral follicles in ewes. Theriogenology DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.12.023

Ghaffari M, Nejati-Javaremi A, Rahimi-Mianji G (2009). Lack of polymorphism in the oocyte derived growth factor (GDF9) gene in the Shal breed of sheep. South African Journal of Animal Science 39: 355-360.

Guan F, Liu SR, Shi GQ, Yang LG (2007). Polymorphism of FecB gene in nine sheep breeds or strains and its effects on litter size, lamb growth and development. Animal Reproduction Science 99: 44-52.

Hadizadeh M, Mohammadabadi MR, Niazi A, Esmailizadeh AK, Mehdizadeh Y G, Molaei S (2013). Use of bioinformatics tools to study exon 2 of GDF9 gene in Tali and Beetalgoats. Modern Genetics Journal 8: 283-288 (In Farsi).

Hadizadeh M, Mohammadbadi MR, Niazi A, Esmailizadeh A, Gazooei YM (2014). Search for polymorphism in growth and differentiation factor 9 (GDF9) gene in prolific beetal and tali goats (Capra hircus). Journal of Biodiversity and Environmental Sciences 4: 186-191.

Hadizadeh M, Niazi A, MohammadAbadi MR, Esmailizadeh AK, Mehdizadeh Gazooei Y (2014). Bioinformatics analysis of the BMP15 exon 2 in Tali and Beetal goats. Modern Genetics 9: 117-120 (In Farsi).

Javanmard A, Mohammadabadi MR, Zarrigabayi GE, Gharahedaghi AA, Nassiry MR, Javadmansh A, Asadzadeh N (2008). Polymorphism within the intron region of the bovine leptin gene in Iranian Sarabi cattle (Iranian Bostaurus) Russian Journal of Genetics 44 (4), 495-497.

Khodabakhshzadeh R, Mohamadabadi MR, Esmailizadeh AK, MoradiShahrebabak H, Bordbar F, Ansari Namin S (2016a). Identification of point mutations in exon 2 of GDF9 gene in Kermani sheep. Polish Journal of Veterinary Sciences 19: 281–289.

Khodabakhshzadeh R, Mohammadabadi MR, Moradi H, Esmailizadeh AK (2016b). Identification of available mutations in the first-half (from 5’ end) of exon 2 of GDF9 gene in crossbred sheep from crossing of Romanov and Lori-Bakhtiari breeds. Animal Production Research 4: 15-26 (In Farsi).

Khodabakhshzadeh R, Mohammadabadi MR, Moradi H, Esmailizadeh AK, Ansari NS (2015a). Identify of G—›A point mutation at positions 477 and 721 in exon 2 of GDF9 gene in Kermani sheep. Modern Genetics 10: 261-268 (In Farsi).

Khodabakhshzadeh R, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK, Moradi-Shahrebabak H, Ansari Namin S (2015b). Study of mutations available in first-halfexon 2 of GDF9 gene in crossbred sheep born from crossing of Romanov rams with Kermani ewes. Iranian Journal of Animal Science Research 6: 395-403 (In Farsi).

Mahdavi M, Nanekarani S, Hosseini S D (2014). Mutation in BMPR-IB gene is associated with litter size in Iranian Kalehkoohi sheep. Animal Reproduction Science 147: 93-98.

Moghadaszadeh M, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK. 2015. Association of Exon 2 of BMP15 Gene with the Litter Size in the Raini Cashmere Goat. Genetics in the 3rd Millennium 13: 4062-4067.

Mohammadabadi MR, Sattayimokhtari R (2013). Estimation of (co) variance components of ewe productivity traits in kermani sheep. Slovak Journal of Animal Science 46: 45-51.

Mohammadi A, Nassiry MR, Mosafer J, Mohammadabadi MR, Sulimova GE (2009). Distribution of BoLA-DRB3 allelic frequencies and identification of a new allele in the Iranian cattle breed Sistani (Bos indicus). Russian Journal of Genetics 45: 198-202.

Moradband F, Rahimi G, Gholizadeh M (2011). Association of polymorphisms in fecundity genes of GDF9, BMP15 and BMP15-1B with litter size in Iranian Baluchi sheep. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 24: 1179-1183.

Moradi N, Nazifi N, Rahimi Mianji G, Ansari Piresaraei Z (2014). Polymorphisms in FSHR and GDF9 loci and their associations with litter size in Zel sheep. 14: 163-176 (In Farsi).

Mousavizadeh A, Mohammad Abadi MR, Torabi A, Nassiry MR, Ghiasi, Esmailizadeh AK (2009). Genetic polymorphism at the growth hormone locus in Iranian Talli goats by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). Iranian Journal of Biotechnology 7: 51-53.

Mulsant P, Lecerf F, Fabre S, Schibler L, Monget P, Lanneluc I, Pisselet C, Riquet J, Monniaux D, Callebaut I (2001). Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in Booroola Merino ewes. Proceedings of the National Academy of Sciences 98: 5104-5109.

Nimbkar C, Ghalsasi P, Walkden-Brown S, Kahn L (2002). Breeding program for the genetic improvement of Deccani sheep of Maharashtra, India. In: Proceedings of the Seventh World Congress on Genetics Applied to Livestock Production pp. 349-352.

Polley S De S, Brahma B, Mukherjee A, Vinesh P, Batabyal S, Arora JS, Pan S, Samanta A K, Datta T K (2010). Polymorphism of BMPR1B, BMP15 and GDF9 fecundity genes in prolific Garole sheep. Tropical Aanimal Health and Production 42: 985-993.

Sattai Mokhtari M, Rashidi A, Mohammadabadi MR, MoradishahrbabakH (2009). Estimation of Genetic, Phenotypic and Environmental Trends of Growth Traits in Kermani Sheep. Iranian Journal of Animal Science 4: 51-58 (In Farsi).

Soufy B, Mohammadabadi MR, Shojaeyan K, Baghizadeh A, Ferasaty S, Askari N, Dayani O (2009). Evaluation of Myostatin gene polymorphism in Sanjabi sheep by PCR-RFLP method. Animal Science Reserches 19: 81-89 (In Farsi).

Souza C, MacDougall C, Campbell B, McNeilly A, Baird D (2001). The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 B (BMPR1B) gene. Journal of Endocrinology 169: R1-R6.

Zamani P, Abdoli R., Deljou A, Rezvan H (2015a). Polymorphism and bioinformatics analysis of growth differentiation factor 9 gene in lori sheep. Annals of Animal Science 15: 337-348.

Zamani P, Nadri S, Saffaripour R, Ahmadi A, Dashti F, Abdoli R (2015b). A new mutation in exon 2 of the bone morphogenetic protein 15 gene is associated with increase in prolificacy of Mehraban and Lori sheep. Tropical Animal Health and Production 47: 855-860.

Detection of new mutations in exon 8 of BMPR1B gene in Iranian Lori-Bakhtyari, Shal, Ghezel and Afshari sheep breeds

Eghbalsaied S.[1,2*], Amini H.R.[3], Rashidi F.[2], Velayati D.[2], Pourali S.[2]

[1]Transgenesis Center of Excellence, Isfahan (Khorasgan) branch, Islamic Azad University, Iran; [2]Department of Animal Science, Isfahan (Khorasgan) branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran; [3]Department of Animal Science, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

Abstract

Bone morphogenetic protein receptor-1B is one of the major genes significantly affect ewe ovulation rate. The aim of this study was to screen exon 8 of BMPR1B in single- and twin-birth ewes of Iranian Lori-Bakhtyari, Shal, Ghezel, and Afshari breeds. DNA was extracted from blood of ewes and rams from numerous sheep flocks and the genotype patterns were screened by PCR-SSCP approach. Results of SSCP analysis showed that there are three genotypic patterns in the four above-mentioned breeds. The highest abundant pattern and the lowest pattern were pattern 1 (73 %) and pattern 2 (8 %), respectively, in the whole flocks. There was a significant difference between these three genotypic patterns in terms of litter size attribute, so that ewes harboring Pattern 2 had the highest litter size average (1.7 lamb per parturition) while ewes carrying Pattern 3 had the lowest litter size average (1.4 lamb per parturition). Furthermore, the PCR amplicon from exon 8, containing these genotypic patterns, were sequenced. The sequencing results of candidate samples from different classes of SSCP showed that there were four new mutations in BMPR1B of Iranian sheep. Three of these mutations were nucleotide conversions, including G812T, T854A, and C855A mutations which caused to tryptophan to lysine (W219L), phenyl alanine to tyrosine (F233Y), and phenyl alanine to lysine (F233L) conversions, respectively. More importantly a C nucleotide insertion mutation corresponding to 855 nt of BMPR1B CDs was also observed which can cause to producing a stop codon at 266 amino acid position and consequently a dysfunctional polypeptide. In conclusion, these results clearly indicate the presence of important mutation in BMPR1B in Iranian sheep breeds which can significantly affect ewe fecundity attributes.

Keywords: *BMPR1B, Fecundity, Iran, Litter size, PCR-SSCP, Sheep.*

* Corresponding Author: Eghbalsaied S. Tel: 031-35354001 Email: shahin.eghbal@khuisf.ac.ir