Agricultural Biotechnology Journal
Shahid Bahonar University of Kerman
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Feasibility study of genetic refinement of litter size in sheep to reduce possible fraud - A provincial study

Mehdi Derakhshan

MSc Student, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran. E-mail address: mder7happy@gmail.com

Karim Hasanpur

*Corresponding author. Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran. E-mail address: karimhasanpur@yahoo.com

Arash Javanmard

Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran. E-mail address: arash_707@yahoo.com

Jalil Shodja

Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran. E-mail address: shodja@tabrizu.ac.ir

Abstract

Objective

Recently, in East Azerbaijan province, marketing of top sheep carrying fertility genes became suspected, because some farmers complained about the claim of the seller due to the low performance of such ewes on the farm. With this research motivation, the aim of the present study in the first step is to combine PCR-RFLP and subsequent PCR-Sequencing methods for genetic refinement of the FecB gene locus associated with litter size in the Booroola-Afshari sheep breed.

Materials and methods

In this study, overall 62 ewes and rams of Booroola-Afshari sheep and 30 ewes of Ghezel-Romanov hybrids were obtained from different sheep farms around Tabriz. Then, two-separate phases were designed, after amplification of the 190 bp region of the BMPR15 gene by PCR, two molecular PCR- RFLP methods and direct sequencing were performed according to routine laboratory instructions. Genotype results were recorded and subsequently, using different software such as POPGENE, FinchTV, and MAFFT, the genotypic, allelic, and alignment frequencies of the amplified sequences were performed to confirm the mutation, respectively.

Results

The results of the present report demonstrated that the source of discrepancy between the identified genotype and the actual genotype can be due to the error of reading the genotype or the seller's fraud and false claim. Also, the combination and both outputs of both molecular techniques, PCR- RFLP and direct sequencing, can minimize the technical error caused by the genotype. In addition, high reproducibility observations confirmed the presence of 8/06% fraud in the FecB gene locus genotype.

Conclusions

The combination of two molecular methods, PCR- RFLP and PCR-sequencing direct sequencing to detect FecB mutations, has shown acceptable efficiencies, and the establishment of government-affiliated genotyping centers for fraud detection can assist regulators in genotyping sheep with fertility genes and may reduce the number of frauds.

Keywords: Twinning gene, Fraud, Genotype, Molecular test, FecB gene

Paper Type: Research Paper.

Citation: Derakhshan M, Hasanpur K, Javanmard A, Shodja J (2022) Feasibility study of genetic refinement of litter size in sheep to reduce possible fraud - A provincial study. *Agricultural Biotechnology Journal* 14 (3), 83-100.

Agricultural Biotechnology Journal 14 (3), 83-100. DOI: 10.22103/jab.2022.19151.1391

Received: May 15, 2022. Received in revised form: June 28, 2022.

Accepted: June 29, 2022. Published online: August 10, 2022

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸

امکان سنجی پالایش ژنتیکی صفت دوقلوزایی در گوسفندان با هدف کاهش تقلبات احتمالی- یک مطالعه‌ی استانی

مهدی درخشان

کارشناس ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. رایانامه: mder7happy@gmail.com

کریم حسن پور

*نویسنده مسئول: استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. رایانامه: karimhasanpur@yahoo.com

آرش جوانمرد

استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. رایانامه: arash_707@yahoo.com

جلیل شجاع

استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. رایانامه: shodja@tabrizu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۲۵ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۱/۰۴/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۰۸

چکیده

هدف: اخیراً، در استان آذربایجان شرقی، حین خرید و فروش قوچ متعلق به نژاد گوسفندان برتر حامل ژن باروری، شماری از شکایات دامداران در خصوص عدم تطبیق ادعای فروشنده با عملکرد میش در مزرعه مشاهده شده است. با این انگیزه‌ی تحقیقاتی، هدف از پژوهش حاضر در گام اول، تلفیق دو تکنیک PCR-RFLP و PCR-Sequencing و متعاقب آن، برای پالایش ژنتیکی جایگاه ژنی FecB مرتبط با صفت چندقلوزایی در گوسفندان نژاد بورولا- افشاری و گوسفندان دورگ قزل-رومانوف می‌باشد و در گام دوم و اصلی، اقدام به بررسی ریسک عدم صداقت احتمالی و همچنین امکان‌سنجی شناسایی تقلبات احتمالی، حین داد و ستد دام در سطح استان آذربایجان شرقی می باشد.

مواد و روش‌ها: در پژوهش حاضر، نمونه‌های خون از مجموع تعداد ۶۲ رأس میش و قوچ نژاد بورولا- افشاری از واحدهای گوسفندداری اطراف تبریز و ۳۰ رأس میش دورگ قزل- رومانوف اخذ گردید. سپس، در یک گام دو مرحله‌ای مجزا، بعد از تکثیر ناحیه‌ای ۱۹۰ جفت بازی از ژن BMPR1B توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، دو روش مولکولی PCR-RFLP و توالی‌یابی مستقیم سانگر، بر اساس دستورالعمل آزمایشگاهی روتین، انجام و نتایج ژنوتیپ ثبت گردید و متعاقباً، با استفاده از نرم افزارهای

مختلف همچون پاپ ژن و FinchTV و MAFFT به ترتیب، فراوانی ژنوتیپی و اللی و همردیفی توالی‌های مورد تکثیر برای تایید مجدد جهش انجام شد.

نتایج: در انجام بخش مولکولی این تحقیق با استفاده از آغازگرهای پیشنهاد شده (Wilson et al. 2001)، ناحیه‌ی اگزون شماره‌ی ۸ ژن BMPR1B که یک قطعه‌ی ۱۹۰ جفت بازی است به وسیله‌ی PCR تکثیر شد. سپس با استفاده از آنزیم اندونوکلئاز AvaII که آنزیم برشی برای جایگاه FecB بوده و دارای جایگاه شناسایی و برش (G/GWCC) می‌باشد، قطعات تکثیر شده توسط PCR، مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند. جایگاه ذکر شده در گوسفندان حامل جهش، باعث برش قطعه‌ی ۱۹۰ جفت بازی به دو قطعه‌ی۳۰ و ۱۶۰ جفت بازی می‌گردد. در صورتی که در گوسفندان دارای ژنوتیپ وحشی، آنزیم قادر به شناسایی و برش این جایگاه نیست. در این مطالعه، در مجموع، از ۶۲ رأس گوسفند بورولا- افشاری، ۱۱ رأس دارای ژنوتیپ هموزیگوت برای جهش FecB بودند یعنی دارای دو نسخه از جهش بودند و ۵۱ رأس دارای ژنوتیپ هتروزیگوت بوده و فقط یک نسخه از جهش را دارا بودند. در تمامی ۳۰ رأس گوسفند دورگ قزل-رومانوف نیز هیچ جهشی مشاهده نشد. این نتایج با انجام فناوری توالی‌یابی سانگر در کنار روش PCR-RFLP تایید شد و انجام همزمان دو روش، باعث افزایش صحت و دقت نتایج تحقیق شد.

نتیجه‌گیری: نتایج تحقیق حاضر، نشان داد که یکی از علل عدم تطبیق ژنوتیپ پیش اظهار شده فرو شندگان با ژنوتیپ واقعی، خطای قرائت ژنوتیپ و یا تقلبات و ادعای کذب فروشنده می‌تواند باشد. همچنین، تلفیق و کاربری همزمان دو تکنیک مولکولی PCR-RFLP و توالی‌یابی مستقیم می‌تواند خطای فنی ناشی از ژنوتیپ را تا حد امکان به حداقل خود برساند. علاوه بر این، با اعمال تکرارپذیری بالای مشاهدات، متاسفانه وجود ۸/۰۶ درصد (۵ از ۶۲ حیوان) عدم صداقت و ناسازگاری در ژنوتیپ جایگاه ژنی FecB، به اثبات رسید. ایجاد مراکز پالایش و تعیین ژنوتیپ وابسته به دولت در خصوص تشخیص تقلبات، می تواند به نهادهای نظارتی در خصوص خدمات تعیین ژنوتیپ گوسفندان حاوی ژن باروری کمک کند و این، خود به خود آمار تقلبات را کاهش خواهد داد.

کلیدواژه‌ها: ژن دوقلوزایی، تقلب، ژنوتیپ، تست مولکولی، ژن FecB

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: درخشان مهدی، حسن پور کریم، جوانمرد آرش، شجاع جلیل (۱۴۰۱) امکان سنجی پالایش ژنتیکی صفت دوقلوزایی در گوسفندان با هدف کاهش تقلبات احتمالی- یک مطالعه استانی. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی* ۱۴(۳)، ۱۰۰-۸۳.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مقدمه

نشـخوارکنندگان کوچک، به ویژه انواع نژادهای بومی، از جنبه های اقتصـادی-اجتماعی در معیشـت قسـمت قابل توجهی از جمع یت انســـانی در م ناطق گرم نقش‌آفرینی بســـزایی دار ند (Mohammadifar and Mohammadabadi 2011; Mohammadabadi et al. 2021). بنابراین، اجرای آزمایشـــات ترکیبی با تأکید بر مدیریت و پیشـــرفت ژنتیکی برای بهبود تولیدات حیوانی از اهمیت تعیین کننده‌ای برخوردار هســـتند (Ahsani et al. 2011; Mohammadabadi 2016). کارآیی اقتصـــادی و بیولوژیکی صـــنایع پرورش گوســـفند به طور کلی با افزایش بهره‌وری و عملکرد تولیدمثلی میش‌ها بهبود می یابد (Mohammadabadi et al. 2017; Shahsavari et al. 2021). حدود ۲۸ نژاد گوسـفند در ایران پرورش داده می‌شـوند (Mohammadabadi et al. 2018; Ghotbaldini et al. 2019) کـه شـــامـل بیش از ۵۰ میلیون رأس هســـتنـد (Masoudzadeh et al. 2020a) و هر کدام از آن‌ها با بخش خاصـی از کشـور سـازگار شـده‌اند (Masoudzadeh et al. 2020b). گوسـفند به عنوان نشـخوارکننده کوچک نقش مهمی در تولیدات کشـاورزی و گذران زندگی مردم دارد و در این میان، صـفت باروری، یکی از مهمترین صـفات اقتصـادی گوسـفند برای پرورش دهندگان گوسـفند اسـت (AmiriRoudbar et al. 2017). مطالعات مربوطه پیشـــین نشـــان داده‌اند که ژن‌های عمده باروری می‌توانند به طور قابل توجهی تعداد زایمان‌های میش منجر به بروز چندقلوزایی را افزایش دهند و در نتیجه بهره‌وری تولیدمثلی پرورش گوسفند و وضعیت اقتصادی گوسفندداران را بهبود بخشند (Amiri Roudbar et al. 2018). با این حال، اکثریت قریب به اتفاق نژادهای گو سفند بومی کشور، بره‌های تک قلو و بره‌های دوقلوی کمی تولید می کنند. این امر، بر شاخص تعداد نتاج در هر زایش میش که مهمترین شاخص تولیدمثلی برای تولید گو سفند ا ست تأثیر زیادی می‌گذارد. ک شور ایران دارای حدود ۲۸ نژاد گو سفند ا ست که از نظر ظرفیت ژنتیکی برای تولید شیر، گوشـت و پشـم، مقاومت به بیماری و باروری، پتانسـیل‌های متفاوت را نشـان دادند (Tavakolian 2000). جمعیت گوسـفند در ایران، عمدتاً از نژادهای بومی دنبه دار و پشم ضخیم تشکیل شده ا ست. بهره‌وری پایین در همه‌ی روش‌های پرورش گو سفند در ایران مشـــهود اســـت که عمدتاً به دلیل عملکرد تولیدمثلی پایین میش‌ها اســـت (Esmailizadeh et al. 2009). به طور کلی، گوسفندانی که تحت سیستم عشایری و کوچ پرورش داده می شوند، در مقایسه با گوسفندانی که تحت سیستم‌های متمرکز یا نیمه متمرکز پرورش می‌یابند، کمتر بارور و چندقلوزا هســـتند (Osman 1987). به طور کلی، اکثر گوسـفندان نژاد ایرانی در هر زایمان یک بره به دنیا می‌آورند. گوسفند نژاد افشاری یکی از مهم‌ترین نژادهای گوسفند در ایران برای تولید گوشت است که در تولید شیر نیز عملکرد خوبی دارد. اما، این نژاد از نظر باروری، کمتر از ۱۰ درصـــد دوقلوزایی دارد. از آنجایی که تولید بره منبع درآمدی مهمی در همه‌ی گله‌ها است، افزایش باروری گوسفند افشاری، همواره یکی از اهداف مهم اصلاح نژادی بوده است (Karamiyanfili 2014). ناحیه‌ی پراکنش و جمعیت بسیاری از گوسفندان افشاری در استان زنجان قرار دارد. این نژاد، در بین سایر نژادهای گوسفند بومی چندقلوزایی بالایی دارد. وارد کردن ژن از طریق آمیخته‌گری می‌تواند یک راهبردی مناسب برای معرفی و ورود آلل‌های جدید مرتبط با باروری و افزایش پیشـرفت ژنتیکی باشـد (Hospital et al. 1992; Latifi et al. 2018). وارد کردن ژن مبتنی بر

آمیخته‌گری، شامل مجموعه‌ای از تلاقی‌های برگشتی بین یک نژاد ممتاز حاوی آلل‌های مورد نظر با یک نژاد بومی است که منجر به افزایش گوسفندان هتروزیگوت می شود و در نهایت، تلاقی بین افراد هتروزیگوت منجر به ایجاد گوسفندان هموزیگوت برای ایجاد آلل‌های مطلوب می‌شود (Koudande et al. 2000; Valipour-Koutanaee et al. 2019). از مهمترین عوامل برای بهره‌وری برنامه‌ی پرورشی در بهبود صفات باروری، گزینش در بین جمعیت و آمیخته‌گری است (Latifi et al. 2019). آمیخته‌گری، در واقع شامل تولید نژاد و انتقال ژن است. تولید نژاد، حاصل آمیخته‌گری بین دو یا چند نژاد و تلاقی داخل نژادی می باشد. به طور کلی، اهداف تولید نژاد شامل ایجاد نژادهای (گوسفند) با طول عمر بالا، افزایش بره‌زایی، افزایش سرعت رشد و بهبود کیفیت لاشه است (Petrovic et al. 2013; Mirzamohammadi et al. 2014). به منظور بهبود عملکرد صفاتی خاص در دامپروری، استفاده از آمیخته‌گری در نژادهای اصیل، دارای معایبی از جمله از دست دادن سازگاری و مقاومت محیطی بومی شده و همچنین افزایش حساسیت به بیماری‌ها می باشد. البته در مواردی این معایب به صورت کاهش عملکرد کمی و کیفی در سایر صفات اقتصادی مشاهده شده است. با توجه به مسئله‌ی مهم حفظ ذخایر ژنتیکی و تنوع زیستی گونه‌های دامی و جلوگیری از ترکیب ژنتیکی در کل دنیا، در مباحث اصلاح نژادی، آمیخته‌گری به عنوان یک چالش در صنعت دامپروری بروز یافته و برای حل مشکلات مربوط به این چالش، وارد نمودن ژن‌های بزرگ اثر مطرح شده است. در همین راستا، اولین طرح نظام‌مند وارد کردن ژن در گوسفند نژاد افشاری با زایش میش های حامل، در سال ۱۳۸۶ در دانشگاه زنجان با همکاری سازمان جهادکشاورزی استان زنجان آغاز شد (Qanbarii et al. 2009). طرح اصلاح نژادی با واردات اسپرم بورولا مرینو از نیوزلند آغاز شد. گفته‌های محققین و متولیان این طرح حاکی از آن است که این نژاد، ترکیبی از ۷۵ درصد نژاد رامنی و ۲۵ درصد نژاد مرینو است که حاوی ژن FecB مرتبط با چندقلوزایی است و در کروموزوم ۶ گوسفند قرار دارد (Karamiyanfili 2014). یادآور می شود که ضریب وراثت‌پذیری پایین صفات تولیدمثلی و تمایل به تولید بره‌های بیشتر در هر میش برای گوشت، منجر به برنامه‌های آمیخته‌گری بسیاری شده است که به دنبال کسب مزایای ژن بورولا هستند (Fogarty 2009; Sepehri 2016). گوسفند بورولا مرینو حامل یک جهش اتوزومی ژن بزرگ اثر FecB است که تأثیر قابل توجهی بر تعداد نتاج در هر زایش دارد (Ekiz et al. 2015). این یک اثر ژنی افزایشی است، بنابراین یک نسخه از ژن باعث ایجاد یک بره‌ی اضافی در هر میش و دو نسخه‌ی به ارث رسیده از هر دو والد به معنای ۱/۵ بره‌ی اضافی متولد شده در هر میش است. راهبردهای ژنتیکی مبتنی بر بهبود سودآوری نژاد گوسفند افشاری، عموماً بر ویژگی‌های تولیدمثلی متمرکز بوده است (Ghaffari et al. 2009). ژن باروری بورولا (FecB) همبستگی خاصی با تعداد نتاج در هر زایش در گوسفند دارد. ژن باروری بورولا (FecB) یک ژن بزرگ اثر است که در اصل در گوسفند مرینوس استرالیایی به نام Booroola در دهه‌ی ۱۹۸۰ یافت شد که می تواند تخمک‌گذاری و تعداد نتاج در هر زایش را افزایش دهد. این اولین ژن بزرگ اثر باروری بود که در گوسفند شناسایی شد. تحقیقات قبلی نشان داده است که تعداد نتاج در هر زایش با تعداد نسخه‌ی ژن FecB همبستگی مثبت دارد، یعنی با ژنوتیپ همبستگی دارد. در نژادها و سویه‌های مختلف گوسفند، توزیع ژن FecB نابرابر است. با این حال، ژن FecB با عملکرد بالای گوسفند مرتبط است. گزارش شده است که باروری بالای گوسفند حامل FecB نتیجه‌ی جهش

FecB است. تحقیقات بیشتر نشان داده است که ژنوتیپ هتروزیگوت (+B)، ۰/۹۳ بره، بیشتر از نوع وحشی (++) در گوسفند ایجاد می‌کند و همچنین، ژنوتیپ هتروزیگوت (+B)، ۶۵/۶ درصد، چندقلوزایی بالاتری نسبت به ژنوتیپ وحشی (++) دارد. مطالعات بیشتر نشان داده است که گوسفندان با ژنوتیپ هموزیگوت (BB) یا ژنوتیپ هتروزیگوت (+B) به طور قابل توجهی چندقلوزایی بالایی نسبت به ژنوتیپ (++) داشتند. جهش FecB دارای یک پلی‌مورفیسم تک‌نوکلئوتیدی (SNP) است که در ژن گیرنده‌ی پروتئین مورفوژنتیک استخوان (BMPR-IB) قرار دارد. محل جهش آن در موقعیت ۷۴۶ ناحیه‌ی کد کننده با تغییر A → G قرار دارد که باعث می‌شود ۲۴۹امین اسید آمینه از گلوتامین به آرژنین (Q249R) تغییر کند. Q249R بین دامنه‌ی GS (یک دامنه‌ی غنی از سرین و غنی از گلایسین) و حلقه‌ی L45 ژن BMPR-IB قرار دارد که یک منطقه‌ی سیگنال کیناز درون سلولی بسیار حفاظت شده‌ی BMPR-IB است، نشان می‌دهد که R۲۴۹، آلل FecB است، یعنی جهش FecB در واقع ژن BMPR-IB است (Souza et al. 2001). در حال حاضر، روش‌های زیادی برای تشخیص جهش FecB وجود دارد. به عنوان مثال روش PCR-RFLP به طور گسترده در تجزیه و تحلیل جهش FecB استفاده می شود که به یک سری مراحل، مانند بسط PCR، هضم آنزیم، الکتروفورز و غیره نیاز دارد. علاوه بر این، یک آغازگر از PCR-RFLP دارای یک محل آنزیم محدود کننده است که برای هضم محصول PCR به یک آنزیم محدود کننده (AvaII) نیاز دارد. در سال‌های اخیر، احتمال وقوع تقلب در بخش کشاورزی و دامپروری از دیدگاه حقوقی، امری ناممکن نیست و حدوث جرم محسوب می شود، فلذا، نهادهای نظارتی و مسئول، نیازمند روش‌هایی نوین مبتنی بر زیست‌فناوری برای شناسایی و اعمال قانون عدم صداقت مشاهده شده در این زمینه هستند. اخیراً، در استان آذربایجان شرقی، حین خرید و فروش قوچ نژاد گوسفندان برتر حامل ژن باروری، شماری از شکایات دامداران در خصوص عدم تطبیق ادعا با عملکرد میش در مزرعه مشاهده شده است. شواهد موجود حاکی از آن است که مصرف‌کنندگان در خرید و فروش‌های محلی گوسفندان برتر حامل ژن باروری بالا (FecB)، هدف روش‌های متقلبانه‌ی پیچیده‌تر قرار می‌گیرند. تعریف کلاهبرداری همان‌طور که در محاکم تعریف شده است عبارت است از نقض آگاهانه استاندارد حسن نیت و رفتار منصفانه همان‌طور که در جامعه درک می شود، شامل فریب یا نقض اعتماد برای پول یا آسیب رساندن به فردی دیگر. به عنوان مثال، جعل عمدی یا جعل داده‌های تحقیقاتی و گزارش گمراه کننده‌ی نتایج. داده‌های شکایات مصرف‌کنندگان حاکی از تقلب در گمراه‌کردن ژنوتیپ همو و هترو FecB در گوسفند بورولا– افشاری است. با این انگیزه‌ی تحقیقاتی، هدف از پژوهش حاضر، در گام اول، تلفیق دو روش PCR-RFLP و PCR-Sequencing و متعاقب آن، برای پالایش ژنتیکی جایگاه ژنی FecB مرتبط با صفت چندقلوزایی در گوسفند نژاد بورولا–افشاری می‌باشد و در گام دوم و اصلی، اقدام به بررسی ریسک عدم صداقت احتمالی و همچنین امکان‌سنجی شناسایی تقلبات احتمالی، حین داد و ستد دام در سطح استان آذربایجان شرقی می باشد.

مواد و روش‌ها

ماده‌ی آزمایشی و حیوانات مورد استفاده: در تحقیق حاضر، یک نمونه‌گیری تصادفی از مجموع ۶۲ رأس گوسفند بوروالا- افشاری (۳۰ رأس میش، ۳۲ رأس قوچ) موجود در گله‌های دامداری‌های اطراف شهر تبریز و شهرستان‌های اهر، گوگان و خسروشهر و ۳۰ رأس میش دورگ قزل- رومانوف از محل دامداری ایستگاه تحقیقاتی خلعت پوشان دانشگاه تبریز انجام شد. در ادامه قبل از شروع فاز مولکولی، از دامداران مشارکت کننده به صورت داوطلبانه، اطلاعات ژنوتیپ حیوان در حین خرید از فروشنده، به دقت ثبت گردید.

روش تلفیقی PCR-RFLP و PCR-Sequencing: تهیه‌ی نمونه‌های خون با استفاده از لوله‌های خلاء حاوی EDTAاز محل سیاهرگ وداجی انجام شد و تا زمان استخراجDNA ، نمونه‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. استخراج DNA، هم به روش فنل-کلروفرم (Chan et al. 2001) و هم با استفاده از کیت استخراج DNA انجام شد. DNA استخراج شده، هم با استفاده از روش بارگیری روی ژل آگارز ۰/۸ درصد و همچنین، با استفاده از روش اسپکتروفتومتری با دستگاه نانودراپ مورد ارزیابی قرار گرفت. در این تحقیق با استفاده از آغازگرهای پیشنهاد شده (Wilson et al. 2001)، ناحیه‌ی اگزون شماره‌ی ۸ ژن FecB به وسیله‌ی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر گردید. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم ۵۰ میکرولیتر بر اساس ۱۰۰ تا ۲۰۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۱ میکرومولار از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت با توالی‌های زیر (Wilson et al. 2001)؛

5`-CAGAGGACAATAGCAAAGCAAA-3`

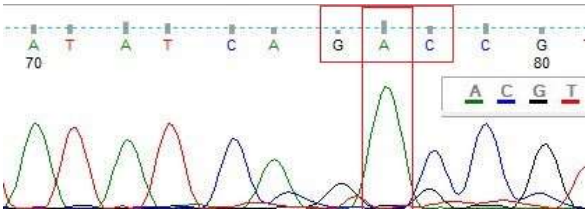
5`-AAGATGTTTTCATGCCTCATCAACAGGTC-3`

مسترمیکس شامل بافر PCR، dNTP، MgCl2 و آنزیم Taq DNA Polymerase با غلظت X۱ تنظیم گردید. چرخه‌های دمایی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز شامل واسرشت سازی اولیه DNA به مدت ۸ دقیقه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتیگراد، واسرشت سازی ثانویه به مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتیگراد، اتصال آغازگرها به مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتیگراد به تعداد ۳۴ چرخه و بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتیگراد بود. برای آزمون صحت تکثیر ناحیه‌ی مورد مطالعه و همچنین تعیین کیفیت محصول PCR، از روش بارگیری بر روی ژل آگارز ۳ درصد و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید به همراه نشانگر ۱۰۰ جفت‌بازی شرکت بیوفکت کره جنوبی استفاده شد. واکنش PCR-RFLP به منظور شناسایی الگوی چند-شکلی احتمالی در نمونه‌های تحقیق در حجم ۳۰ میکرولیتر، بر اساس ۱۵ واحد آنزیم برشی AvaII، بافر آنزیم به مقدار ۳ میکرولیتر و ۲۰ میکرولیتر محصول PCR در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد به مدت ۱۲ ساعت انجام شد. برای بررسی نتایج واکنشPCR-RFLP، محصول هضم آنزیمی بر روی ژل آگارز ۳ درصد و در کنار نشانگر اندازه‌گیری ۱۰۰ جفت‌بازی ساخته شده در کشور لیتوانی شرکت ترموفیشر آمریکا بارگذاری شد. محصولات هضم شده در افراد هموزیگوت با ژنوتیپ وحشی که هیچگونه برشی در جایگاه برش توسط آنزیم انجام نشده، دارای باند ۱۹۰ جفت بازی بوده و در هتروزیگوت ها که فقط در یکی از

کروموزوم‌های همولوگ برش انجام شده، باندهای ۳۰، ۱۶۰ و ۱۹۰ جفت بازی مشاهده شدند و در هموزیگوت‌های جهش یافته که برش در هر دو کروموزوم همولوگ انجام شده، باندهای ۳۰ و ۱۶۰ جفت بازی قابل مشاهده بودند. البته به علت استفاده از نشانگر اندازه‌ی ۱۰۰ جفت بازی، باندهای ۳۰ جفت بازی بر روی ژل آگارز قابل مشاهده نمی‌باشند. الل جهش یافته با (B) نشان داده شده و الل وحشی با (+) نمایش داده می شود. روش توالی‌یابی خاتمه‌ی زنجیره که به روش سانگر نیز معروف است، امروزه از دقیق‌ترین و مطمئن‌ترین روش‌های مستقیم مولکولی برای تعیین جهش‌های بیماریزای ژنتیکی می باشد. این روش می تواند ژن مورد نظر را به طور کامل توالی‌یابی کند، همچنین می‌تواند تغییر، حذف یا اضافه شدن حتی یک نوکلئوتید را مشخص کند. نمونه‌ها برای انجام توالی‌یابی به شرکت بیومجیک ژن واقع در استان البرز، شهر کرج ثبت سفارش شدند.

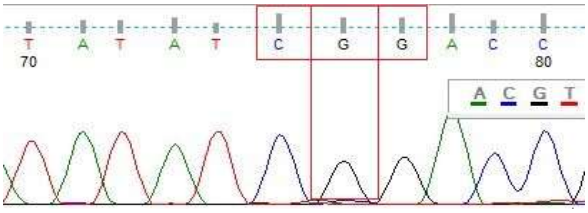
اساس این روش این گونه است که، ابتدا با انجام PCR، قطعه‌ی مورد نظر در ژنوم تکثیر می‌شود. سپس محصول PCR، به کمک Cycle-Sequencing که در حقیقت یک PCR اختصاصی با ایجاد رشته‌هایی با انتهای بسته می باشد، تکثیر می‌گردد. روش قدیمی خاتمه‌ی زنجیره‌ی DNA، نیاز به یک DNA تک رشته‌ای، یک آغازگر DNA، DNA پلی‌مراز، دی‌اکسی نوکلئوسید تری فسفات (dNTP) و دی- دی اکسی نوکلئوسید تری فسفات (ddNTP) تغییر یافته دارد که دومی باعث می شود رشته‌ی DNA طولانی نشود. این نوکلئوتیدهای خاتمه بخش، یک گروه `OH-3 که برای تشکیل پیوند فسفو دی استری بین دو نوکلئوتید مورد نیاز است را کم دارند که سبب می‌شود DNA پلی‌مراز پس از استفاده از ddNTP، تکثیر را متوقف کند. این ddNTPها ممکن است به صورت رادیواکتیو یا فلئورسنت برای تشخیص، در دستگاه‌های خودکار برچسب‌گذاری شده باشند. نمونه‌ی DNA، به چهار واکنش مجزا تقسیم می‌شود که هر چهار دئوکسی نوکلئوتید نرمال (dATP، dGTP، dCTP، dTTP) و DNA پلی‌مراز را دارد. در هر واکنش، تنها یکی از دی- دئوکسی نوکلئوتیدها (ddATP، ddGTP، ddCTP، ddTTP)، باقی از نوکلئوتیدهای عادی افزوده می‌شود. دی- دئوکسی نوکلئوتید افزوده شده باید ۰/۱ غلظت دئوکسی نوکلئوتید متناظر را داشته باشد تا تعداد بخش‌های مناسبی از تمامی رشته تولید شود. به بیان دیگر ۴ واکنش برای آزمون هر چهار ddNTP نیاز است. سپس بخش‌های DNA حاصل، توسط حرارت واسرشت می‌شوند و براساس اندازه، توسط ژل پلی آکریل آمید- اوره جدا می‌شوند. در نهایت، قطعات تکثیر شده، توسط دستگاه Genetic-Analyzer موجود در آزمایشگاه، خوانده می شوند. به این ترتیب توالی مورد نظر برای تجزیه و تحلیل آماده می‌باشد. هرگاه داخل توالی، در محل جهش (FecB)، نوکلئوتید آدنین (A) مشاهده شود، جهش صورت نگرفته (شکل ۴-۷) و اگر نوکلئوتید گوانین (G) یا سیتوزین (C) مشاهده شود، نشانگر وجود جهش می‌باشد. برای تشخیص ژنوتیپ هتروزیگوت و هموزیگوت برای این جهش از روی نمودار، اگر کیفیت نوکلئوتید جهش یافته شناسایی شده توسط دستگاه در محل جهش، بالا باشد قطعاً ژنوتیپ هموزیگوت می‌باشد (شکل ۴-۸). بدین معنی که آنزیم برشی در هر دو کروموزوم همولوگ، محل برش را بریده است و فقط یک نوکلئوتید با کیفیت بالا شناسایی شده است. اگر کیفیت نوکلئوتید شناسایی شده به همراه نوکلئوتیدهای مجاور آن محل پایین باشد، مشخص می‌شود که فقط در یک کروموزوم، محل برش بریده شده و ژنوتیپ

حاصل، هتروزیگوت می‌باشد (شکل ۴-۹). در نمودار ژنوتیپ هتروزیگوت تعداد خطوط منحنی ها دو یا بیشتر است و علت آن بریده شدن محل برش فقط در یکی از کروموزوم‌ها است که دستگاه با قاطعیت نمی‌تواند یکی از نوکلئوتیدها را معرفی نماید.



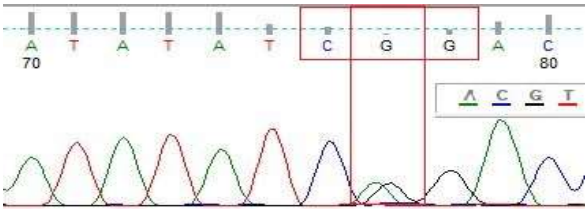
شکل۱. نمودار منحنی‌های ژنوتیپ وحشی یا غیر حامل جهش FecB

Figure 1. Diagram of wild or non-FecB genotype



شکل۲. نمودار منحنی‌های ژنوتیپ هموزیگوت برای جهشFecB

Figure 2. Diagram of homozygous genotype for FecB mutation



شکل۳. نمودار منحنی‌های ژنوتیپ هتروزیگوت برای جهش FecB

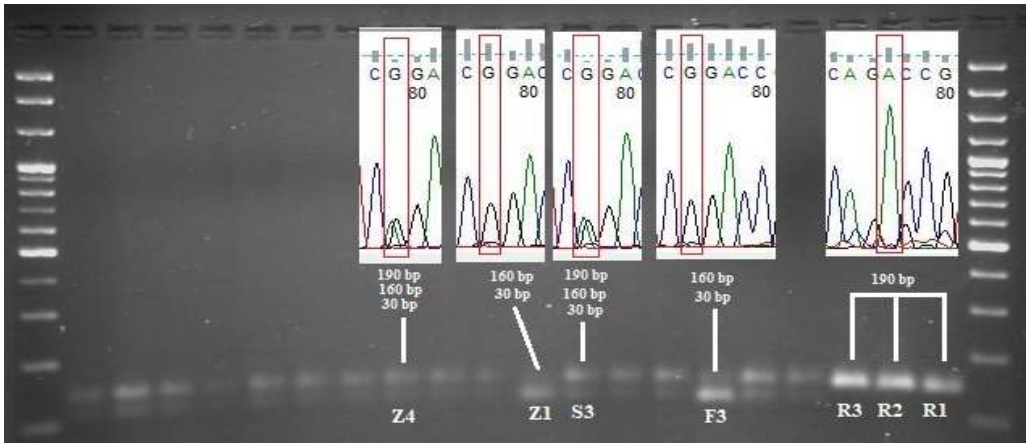
Figure 3. Diagram of heterozygous genotype for FecB mutation

نتایج و بحث

تلفیق PCR-RFLP و PCR-Sequencing: در تحقیق حاضر که ناحیه‌ی ۱۹۰ جفت بازی اگزون شماره‌ی ۸ ژن BMPR-1B (FecB) طبق مطالعات پیشین مشاهده گردید. در الکتروفورز، قطعه‌ی تکثیر شده‌ی ژن بورولا بر روی ژل ۳ درصد، نشان می‌دهد که قطعه‌ی ۱۹۰ جفت بازی در نظر گرفته شده برای تکثیر، به خوبی تکثیر یافته است و نشانگر اندازه‌ی مورد استفاده در کنار محصولات PCR، نشان می‌دهد که قطعه‌ی تکثیر شده، ۱۹۰ جفت باز طول دارد. با عکس برداری از ژل، صحت تکثیر قطعه‌ی مورد نظر تایید شد. با مشاهده‌ی این که تمام نمونه‌های تکثیر شده مشابه هم هستند و فقط یک باند به اندازه‌ی ۱۹۰ جفت باز برای هر نمونه تشکیل شده، نشان دهنده‌ی آن است که آغازگرهای مورد استفاده فقط قطعه‌ی هدف را بر روی DNA شناسایی کرده و شباهت توالی دیگری بر روی DNA وجود نداشته است.

شکل٤. همردیفی نتایج توالی‌یابی توسط نرم‌افزار آنلاین MAFFT

Figure 4. Alignment of sequencing results using MAFFT online software



شکل۵. مطابقت نمودارهای توالی‌یابی با الگوهای ژنوتیپی بارگذاری شده بر روی ژل آگارز ۳ درصد

Figure 5. Correspondence of sequencing diagrams with genotypic patterns loaded on 3% agarose gel

امکان‌سنجی شناسایی تقلبات احتمالی حین داد و ستد دام: پس از هضم محصولات PCR توسط آنزیم AvaII، مشخص شد که تمام ۳۰ رأس گوسفند دورگ قزل- رومانوف دارای ژنوتیپ وحشی (FecB+ / FecB+) بودند و از ۶۲ رأس گوسفند دورگ بورولا- افشاری، ۱۱ رأس ژنوتیپ هموزیگوت (FecBB / FecBB) داشته یعنی دو نسخه از ژن بورولا را داشتند و بقیه، ژنوتیپ هتروزیگوت (FecBB / FecB+) را داشتند یعنی دارای یک نسخه از این ژن بودند. بعد از اخذ نتایج توالی‌یابی، با استفاده از داده‌های خام توالی‌یابی که توسط نرم‌افزار آنلاین MAFFT همردیف شده‌اند، جایگاه جهش FecB قابل مشاهده می باشد (شکل ۴). همچنین مطابقت این نتایج با محصولات PCR که توسط آنزیم هضم شده بودند و بر روی ژل به نمایش درآمدند تائید شد و مشخص شد روش PCR-RFLP به درستی انجام شده است (شکل ۵). از کل ۶۲ رأس گوسفند بورولا-افشاری، ۱۲ نمونه مربوط به یک دامداری بود که با ادعای داشتن ژنوتیپ هموزیگوت (FecBB / FecBB)، خریداری شده بودند. از این ۱۲ نمونه ۳ نمونه ژنوتیپ هتروزیگوت (FecB+ / FecBB) را نشان دادند. بروز عدم تطابق بین ادعای برخی فروشندگان محلی دام و نتایج آزمایشات تعیین ژنوتیپ، بیانگر عدم صداقت و احتمال فریب خریداران دام می باشد. این مطلب، اهمیت تشکیل یک مرکز مورد اعتماد برای پایش و پالایش ژنتیکی در منطقه‌ی شمال غرب کشور را دوچندان می نماید. با انجام این پژوهش در جهت تعیین

ژنوتیپ گوسفندان، وجود یا عدم وجود جهش FecB مشخص می‌شود. و این که یک یا دو نسخه از جهش FecB در نمونه وجود دارد. انجام هر یک از روش‌های PCR-RFLP و توالی‌یابی، مزایا و معایبی نیز دارد. از معایب انجام این روش‌ها به هزینه‌ی نسبتاً بالای آن‌ها اشاره می شود که البته می‌توان با انجام کارهای ساده، آن هزینه‌ها را کاهش داد. قابل ذکر است که انجام روش‌هایی مانند توالی‌یابی در کنار روش PCR-RFLP، مؤید صحت و دقت بالای نتایج حاصله می‌باشد. چنان‌که از نتایج تحقیق حاضر بر می‌آید، نتایج توالی‌یابی صحت انجام روش PCR-RFLP را تائید می‌نمایند. برای شناسایی جهش FecB در گوسفندان نژادهای مختلف، مطالعاتی مشابه تحقیق حاضر انجام گرفته است، از جمله گوسفندان لری-بختیاری، شال، افشاری و قزل (Eghbalsaied et al. 2016)، شال (Ghaffari et al. 2009)، بلوچی (Moradband et al. 2011)، زندی (Taherkhani 2016)، لری (Shafieiyan et al. 2013)، افشاری (Qanbarii et al. 2009) و دورگ‌های رومانوف، مثل شال-رومانوف (Zamani et al. 2015)، عدم وجود جهش مسئول فنوتیپ چند قلوزایی (FecB) تائید می‌شود. البته جهش FecB با فراوانی ژنوتیپی هموزیگوت برای این جهش به میزان (۰/۱۳) و هتروزیگوت به میزان (۰/۴۴۶) در گوسفندان کلکوهی (Mahdavi et al. 2014) مشاهده شده است. در تحقیقی دیگر که بر روی ۱۱ نژاد گوسفند ایرانی انجام شده (Potki et al. 2020)، فقط در گوسفند کلکوهی این جهش مشاهده شده و فراوانی ژنوتیپ هموزیگوت برای این جهش (۰/۰۲۱) و هتروزیگوت (۰/۱۷) به دست آمده است. در یک مطالعه‌ی دیگر که برای شناسایی جهش FecB روی گوسفندان زل انجام شد، فقط ژنوتیپ هتروزیگوت با فراوانی (۰/۰۱۴) مشاهده شد (Asadpour et al. 2012). مطالعاتی برای شناسایی جهش FecB در گوسفندان خارجی نیز انجام شده است که به برخی از آن‌ها اشاره می‌شود. بررسی‌های انجام گرفته بر روی ۲۱ نژاد گوسفند با باروری بالا از ۱۳ کشور جهان نشان داده است که فقط نژادهای هو و هان چینی دارای جهش ژن بورولا بودند. همه‌ی گوسفندان نژاد هو حامل جهش ژن FecB بوده و ژنوتیپ BB داشتند. در گوسفندان نژاد هان، هر سه نوع ژنوتیپ هموزیگوت مغلوب با فراوانی ۰/۳۳، هتروزیگوت با فراوانی ۰/۵۸ و نوع وحشی با فراوانی ۰/۰۹ مشاهده شدند (Davis et al. 2006). در یک مطالعه در کشور مالزی که بر روی نژادهای مالین و دورپر انجام شد هیچ چندشکلی در این گوسفندان مشاهده نشد (Wan Somarny et al. 2013). درکشور مصر نیز یک مطالعه بر روی ۵ نژاد مصری انجام شد که جهش بورولا در آن‌ها هم مشاهده نشد (El-Hanafy & El-Saadani 2009). در تحقیقی دیگر که بر روی گوسفندان گارول و دورگ‌های گارول با مالپورا انجام شد (Kolte et al. 2005)، در گوسفند گارول، فراوانی هموزیگوت برای جهش FecB، (۰/۸)، هتروزیگوت (۰/۱۷۱) و هموزیگوت تیپ وحشی (۰/۰۲) مشاهده شد. همچنین فراوانی‌های ژنوتیپی در دورگ‌های گارول مالپورا بدین ترتیب به دست آمد؛ فراوانی ژنوتیپ هموزیگوت (۰/۶۱۲)، هتروزیگوت (۰/۷۳۴) و هموزیگوت تیپ وحشی (۰/۲). در گوسفندان هندی چوتاناگپوری نیز جهش FecB با فراوانی بالایی مشاهده شده است (Oraon et al. 2016). در یک مطالعه‌ی دیگر بر روی گوسفندان کندراپادا در هند نیز فراوانی بالایی برای ژنوتیپ‌های هموزیگوت و هتروزیگوت برای این جهش مشاهده شده است (Dash et al. 2017).

در مورد روش‌های به کار گرفته شده در این تحقیق، شایان ذکر است، سیستم RFLP سادرن دارای مزایایی همچون بالا بودن فراوانی این روش، تکرارپذیری، دقت و قابلیت اعتماد فوق‌العاده بالای این روش است و این که این روش تحت تأثیر عوامل محیطی داخلی و خارجی نبوده و صد در صد ژنتیکی می‌باشد. همچنین این روش همبارز بوده و امکان تشخیص افراد خالص از هر یک از انواع افراد ناخالص وجود دارد. البته این روش معایبی نیز دارد؛ این روش دشوار بوده و علاوه بر وقت‌گیر بودن دارای پیچیدگی هایی است. هزینه‌ی اولیه و هزینه‌ی نگهداری کاوشگرها و کاربرد آنها نیز نسبتاً زیاد بوده و نیاز به کاربرد مواد رادیواکتیو و یا روش‌های پیچیده و مواد گران‌قیمت شیمیایی دارد. در این روش نیاز به نگهداری میکروارگانیسم‌ها جهت تهیه‌ی کاوشگر بوده که دارای پیچیدگی‌هایی است. با پیشرفت فناوری و اختراع PCR، روش‌های مبتنی بر PCR به تدریج بجای RFLP به کار گرفته شدند. امروزه روش PCR-RFLP با تکیه بر مزایای RFLP و رفع معایب آن به طور وسیعی در فناوری DNA به کار گرفته می شود. درPCR- RFLP، جهش‌هایی از نوع نقطه‌ای و حذف و اضافه که باعث تغییر در سطح قطعه‌ی آنزیمی می‌گردند قابل تشخیص است. تفاوت روش RFLP سادرن و PCR-RFLP این است که در RFLP سادرن، تنوع DNA در داخل یک منطقه‌ی Kb ۳۰ محصور، توسط کاوشگر تعیین می‌گردد در حالی که در PCR-RFLP تنوع در داخل منطقه‌ای که از دو طرف به آغازگر ختم شده، تعیین می‌شود. این ناحیه معمولاً Kb ۵-۰/۲ است. روش PCR-RFLP موجب افزایش نمایان‌سازی چند شکلی موجود در بین نمونه‌های مختلف می گردد. PCR-RFLP، کلیه‌ی مزایای روش RFLP را داشته و چون این روش ترکیبی از RFLP و PCR است به این دلیل، دقت و حساسیت بالای RFLP با سرعت و سادگی PCR در یک جا جمع شده و باعث رفع معایب ناشی از RFLP و کاربرد وسیع گردیده است. در روش PCR-Sequencing امکان بررسی کامل تمامی قسمت‌های مورد نظر از یک ژن (معمولاً کلیه‌ی اگزون‌های ژن) و اطراف آن‌ها، مورد بررسی و تعیین توالی می‌شوند. این روش نیز دقت بالایی داشته و امکان تشخیص جهش‌های جدید وجود دارد. یکسان بودن روش کار برای بیماری‌های مختلف و عدم نیاز ار سال نمونه به خارج از کشور نیز از محاسن این روش می‌باشد. از این رو استفاده از این دو روش در کنار هم با داشتن مزایای بسیار هر دو روش در اخذ نتایج، بسیار کاربردی، سریع و دقیق خواهد بود. شاخص‌های آماری مورد اندازه‌گیری در ارزیابی نتایج حاصل از تعیین جهش FecB بر اساس هر دو روش نشان داده شده است (جدول ۱).

نتیجه‌گیری: در مجموع، از ۶۲ رأس گوسفند بورولا- افشاری، ۱۱ رأس دارای ژنوتیپ هموزیگوت برای جهش FecB بودند یعنی دارای دو نسخه از جهش بودند و ۵۱ رأس دارای ژنوتیپ هتروزیگوت بوده و فقط یک نسخه از جهش را دارا بودند. در تمامی ۳۰ رأس گوسفند دورگ قزل- رومانوف نیز هیچ جهشی مشاهده نشد. این نتایج با انجام فناوری توالی یابی سانگر در کنار روش PCR-RFLP تایید شد و انجام همزمان دو روش، باعث افزایش صحت و دقت نتایج تحقیق شد. در مورد عدم صداقت فروشندگان دام سبک و نوعی تقلب و کلاه برداری در فروش قوچ و میش با ژنوتیپ‌های کاذب و نه حقیقی، برخی از دامداران و خریداران این دام‌ها که به حساب ادعای کذب بعضی واسطه‌ها و افراد سودجو برای آینده‌ی شغلی و زندگی خود برنامه‌ریزی می‌کنند

و دچار ضرر و زیان می شوند. با توجه به اهمیت موضوع، انتظار می‌رود قانون‌گذاران برای جلوگیری از این تقلبات، مصوبات قانونی تصویب کرده و حتی برای متخلفان جرائمی در نظر بگیرند.

جدول ۱. خلاصه شاخص‌های آماری مورد اندازه‌گیری برای ارزیابی نتایج حاصل از تعیین جهش FecB بر اساس تکنیک‌های انفرادی و تلفیقی

Table 1. Summary of statistical indices for assessment of suitability of FecB determination based PCR method

دامنه‌ی اطمینان Confidence interval(%)	درصد Percent	فرمول Equation	شاخص‌های اندازه‌گیری Measurement indicators	
93.96 – 99.97	98.89	a/(a+b)	حساسیت Sensitivity	تکنیک PCR-RFLP
24.29 - 100	100	d(c+d)	ویژگی Specificity	
	92.98	(a+d)/(a+b+c+d)	صحت Accuracy	
	100	a/(a+c)	میزان پیش‌بینی مثبت Positive Predictive value	
	75	d/(b+d)	میران پیش‌بینی منفی Negative Predictive value	
95.94 - 100	100	a/(a+b)	حساسیت Sensitivity	تکنیک توالی یابی Sequencing
24.29 - 100	100	d(c+d)	ویژگی Specificity	
	98.92	(a+d)/(a+b+c+d)	صحت Accuracy	
	98.89	a/(a+c)	میزان پیش‌بینی مثبت Positive Predictive value	
	87	d/(b+d)	میران پیش‌بینی منفی Negative Predictive value	
95.94 - 100	100	a/(a+b)	حساسیت Sensitivity	تلفیق دو تکنیک PCR-RFLP and Sequencing
24.29 - 100	100	d(c+d)	ویژگی Specificity	
	100	(a+d)/(a+b+c+d)	صحت Accuracy	
	100	a/(a+c)	میزان پیش‌بینی مثبت Positive Predictive value	
	100	d/(b+d)	میران پیش‌بینی منفی Negative Predictive value	

a: مثبت حقیقی، b: منفی کاذب، c: مثبت کادب، d: منفی حقیقی

انجام این تحقیق و نتایج حاصل از آن نشان می‌دهد که دامداران می‌توانند با پرداخت هزینه‌ای ناچیز در قبال انجام آزمایش برای تعیین ژنوتیپ جهت شناسایی فنوتیپ چندقلوزایی در مقابل صرف وقت و انرژی و البته هزینه‌های گزاف خرید دام‌های برتر از نظر چندقلوزایی، اطمینان خاطر داشته و در آینده دچار خسران نشوند. با توجه به نتایج و مباحث ارائه شده، لزوم ایجاد مراکزی مطمئن که با لوازم و امکانات کافی تجهیز شده‌اند و همچنین از نیروهای جوان متعهد و متخصص بهره می‌گیرند برای تائید یا رد ادعاها و تشخیص آزمایشگاهی ژنوتیپ‌هایی که منجر به بروز فنوتیپ چندقلوزایی در دام‌های سبک می‌شوند پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری: بدینوسیله، از اساتید و مسئولین محترم دانشگاه تبریز و از مسئولین پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمالغرب و غرب کشور به دلیل حمایت‌ها و همکاری در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می شود. همچنین از داوران محترم و اساتید ارجمند مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، به خاطر بازبینی متن مقاله و ارائه نظرهای ساختاری و علمی تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

محمدآبادی محمدرضا، کرد محبوبه، نظری محمود (۱۳۹۷) مطالعه بیان ژن لپتین در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۰(۳)، ۱۲۳-۱۱۱.

References

Ahsani MR, Bafti MS, Esmailizadeh AK, Mohammadabadi MR (2011) Genotyping of isolates of Clostridium perfringens from vaccinated and unvaccinated sheep. Small Rumin Res 95, 65-69.

Amiri Roudbar M, Mohammadabadi MR, Mehrgardi AA, Abdollahi-Arpanahi A (2017) Estimates of variance components due to parent-of-origin effects for body weight in Iran-Black sheep. Small Rum Res 149, 1-5

Amiri Roudbar M, Abdollahi-Arpanahi R, Ayatollahi Mehrgardi A, et al. (2018) Estimation of the variance due to parent-of-origin effects for productive and reproductive traits in Lori-Bakhtiari sheep. Small Rumin Res 160, 95-102.

Asadpour R, Alijani S, Mahmodi H (2012) Detection of polymorphism in booroola gene (FecB) and its association with litter size in zel sheep breed in Iran. Slovak J Anim Sci 2012(2), 63–66.

Chan PK, Chan DP, To KF, et al. (2001) Evaluation of extraction methods from paraffin wax embedded tissues for PCR amplification of human and viral DNA. J Clin Pathol 54(5), 401–403.

Dash S, Maity A, Bisoi PC, et al. (2017) Coexistence of polymorphism in fecundity genes BMPR1B and GDF9 of Indian Kendrapada sheep. Explor Anim Med Res 7(7), 33–38.

Davis GH, Balakrishnan L, Ross IK, et al. (2006) Investigation of the Booroola (FecB) and Inverdale (FecXI) mutations in 21 prolific breeds and strains of sheep sampled in 13 countries. Anim Reprod Sci 92(1–2), 87–96.

Eghbalsaied S, Amini HR, Rashidi F, et al. (2016) Detection of new mutations in exon 8 of BMPR1B gene in Iranian Lori-Bakhtyari, Shal, Ghezel and Afshari sheep breeds. Biocatal Agric Biotechnol 8(3), 1–14.

Ekiz B, Ozcan M, Yilmaz A, Ceyhan A (2005) Estimates of phenotypic and genetic parameters for ewe productivity traits of Turkish Merino (Karacabey Merino) sheep. Turkish J Vet Anim Sci 29, 557-564.

El-Hanafy AA, El-Saadani MA (2009) Fingerprinting of FecB gene in five Egyptian sheep breeds. Biotechnol. Anim Husb 25(4), 205–212.

Esmailizadeh A, Dayani O, Sattaei Mokhtari M (2009) Lambing season and fertility of fat-tailed ewes under an extensive production system are associated with liveweight and body condition around mating. Anim. Reprod Sci 49, e9064.

Fogarty NM (2009) A review of the effects of the Booroola gene (FecB) on sheep production. Small Rumin Res 85, 75-84.

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 Afr J Anim Sci 39, 335-360.

Ghotbaldini H, Mohammadabadi MR, Nezamabadi-pour H, et al. (2019) Predicting breeding value of body weight at 6-month age using Artificial Neural Networks in Kermani sheep breed. Acta Scientiarum. Anim Sci 41, e45282.

Hospital F, Chevalet C, Mulsant P (1992) Using markers in gene introgression breeding programs. Genetics 132, 1199-1210.

Karamiyanfili M (2014) Study genetic trend of growth and reproductive traits of afshari sheep of zanjan university. MS Thesis. University of Zanjan, Zanjan, Iran.

Kolte AP, Mishra AK, Kumar S, et al. (2005) A study on effect of carrying FecB gene on body weight in Garole and Garole× Malpura sheep. Asian-Aust J Anim Sci 18(10), 1379–1382.

Koudande OD, Iraqi F, Thompson PC, et al. (2000) Strategies to optimize marker assisted introgression of multiple QTL. Mamm Genome 11, 145-150.

Latifi M, Rashidi A, Abdolahi Arpanahi R, Razmkabir M (2019) Comparison of introgression and synthetic breed strategies for litter size trait in sheep using computer simulation. Anim Prod Res 10, 112-119.

Latifi M, Rashidi A, Abdolahi Arpanahi R, Razmkabir M (2018) Assessment of classical and genomic selection methods for introgression a major gene in sheep using simulation. Anim Sci J 124, 171-182.

Mahdavi M, Nanekarani S, Hosseini SD (2014) Mutation in BMPR-IB gene is associated with litter size in Iranian Kalehkoohi sheep. Anim Reprod Sci 147(3–4), 93–98.

Masoudzadeh SH, Mohammadabadi M, Khezri A, et al. (2020a) Effects of diets with different levels of fennel (Foeniculum vulgare) seed powder on DLK1 gene expression in brain, adipose tissue, femur muscle and rumen of Kermani lambs. Small Rumin Res 193, e106276.

Masoudzadeh SH, Mohammadabadi MR, Khezri A, et al. (2020b) Dlk1 Gene Expression in Different Tissues of Lamb. Iran J Appl Anim Sci 10 (4), 669-677.

Mirzamohammadi E, Rashidi A, Vatankhah M, Jafari M (2014) Evaluation of inbreeding effects on pre -weaning growth traits and lamb survival in Iran-Black sheep. Anim Sci J 101, 62-70.

Mohammadabadi M, Bordbar F, Jensen J, et al. (2021) Key genes regulating skeletal muscle development and growth in farm animals. Animals 11 (3), e8.35.

Mohammadabadi MR (2016) Inter-Simple Sequence Repeat Loci associations with predicted breeding values of body weight in Kermani sheep. Genet 3rd Millennium 14, 4383-4390.

Mohammadabadi MR, Esfandyarpoor E, Mousapour A (2017) Using Inter Simple Sequence Repeat Multi-Loci Markers for Studying Genetic Diversity in Kermani Sheep. J Res Develop 5 (2), e154.

Mohammadabadi MR, Kord M, Nazari M (2018) Studying expression of leptin gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time PCR. Agric Biotechnol J 10 (3), 111-122 (In Persian).

Mohammadifar A, Mohammadabadi MR (2011) Application of Microsatellite Markers for a Study of Kermani Sheep Genome. Iran J Anim Sci 42 (4), 337-344.

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. In Asian-australas. J Anim Sci 24(9), 1179–1183.

Oraon T, Singh DK, Ghosh M, et al. (2016) Allelic and genotypic frequencies in polymorphic Booroola fecundity gene and their association with multiple birth and postnatal growth in Chhotanagpuri sheep. Vet World 9(11), 1294–1299.

Osman AH (1987) Small Ruminants Research and Development in the Near East, FAO, Animal Production 111th, Paper 55, 39-52.

Petrovic MP, Petrovic VC, Ilic ZZ, et al. (2013) Features of the new breed of sheep in Serbia called miss sheep. Reproductive characteristics and body development. J Zoo Wildl Med 64, 70-75.

Potki P, Mirhoseini SZ, Afraz F, Vahidi SMF (2020) A Profile of Single Nucleotide Polymorphisms in Fecundity Genes among Iranian Sheep Breeds by Using Polymerase Chain Reaction–Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) Method. Iran J Appl Anim Sci 10(2), 265–285.

Qanbarii S, Osfoori R, Eskandari nasab MP (2009) Introgression of FecB Major Gene into Elite Breeding Flock of Afshari Sheep: Preliminary Evaluation of Polymorphism Content and Applicability of Marker Data. Iran J Appl Anim Sci 39(1), 20-31.

Sepehri R (2016) Identification of nucleotide polymorphism of some genes associated with fat and their relationship with traits carcasses in Afshari lambs and Brolaramino crossbreds using the Bayesian Method. Ph D. Thesis. University of Tabriz, Tabriz, Iran.

Shafieiyan Z, Mohammadi G, Jolodarzadeh A, et al. (2013) No mutations of FecB and FecG H in Iranian Lory sheep. Vet Res Forum 4(4), 34-43.

Shahsavari M, Mohammadabadi M, Khezri A, et al. (2021) Correlation between insulin-like growth factor 1 gene expression and fennel (Foeniculum vulgare) seed powder consumption in muscle of sheep. Anim Biotechnol 33, 1-11.

Souza C, MacDougall C, Campbell B, et al. (2001) The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 B (BMPR1B) gene. J Endocrinol 169(2), R1-R6.

Taherkhani L (2016) The Study of Booroola Gene Polymorphism in Zandi Breed Sheep by PCR-RFLP. Iran J Appl Anim Sci (19), 12-31.

Tavakolian J (2000) An Introduction to Genetic Resources of Native Farm Animals in Iran. Animal Science Genetic Research Institute Press, Tehran, Iran.

Valipour-Koutanaee O, Farhadi A, Hafezian SH, Gholizadeh M (2019) Molecular and bioinformatics analysis of allelic diversity in IGFBP2 gene promoter in indigenous Makuee and Lori-Bakhtiari sheep breeds. Iran J Appl Anim Sci 9, 283-289.

Wan Somarny W, Roziatul Erin A, Suhaimi A, et al. (2013) A study of major prolificacy genes in Malin and Dorper sheep in Malaysia (Kajian gen kebiakan utama pada biri-biri Malin dan Dorper di Malaysia). J Trop Agric 41(2), 85-99.

Wilson T, Wu XY, Juengel JL, et al. (2001) Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein IB receptor (ALK-6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. Biol Reprod 64(4), 1225-1235.

Zamani P, Nadri S, Saffaripour R, et al. (2015) A new mutation in exon 2 of the bone morphogenetic protein 15 gene is associated with increase in prolificacy of Mehraban and Lori sheep. Trop Anim Health Prod 47(5), 855–860.