

بررسی ژن BMP 15 در گوسفندان افشاری و آمیخته افشاری × برولامرینو

رقیه قلی پور¹ - لیلا دانش مقدم¹ - طاهر هرکی نژاد^{2*}

تاریخ دریافت: 1393/07/07

تاریخ پذیرش: 1394/06/18

چکیده

افزایش تعداد بزه به ازای هر میش به عنوان راهکاری برای افزایش بهره‌وری در پرورش گوسفند مورد توجه زیادی قرار گرفته است. صفات تولید مثلی از وراثت پذیری پائینی برخوردار هستند اما امروزه جهش‌هایی در برخی ژنها از جمله BMP15 یافت شده است که با چند قلوژی در ارتباط است. هدف از مطالعه حاضر شناسایی چند شکلی و بررسی بیان ژن BMP15 در تخمدان میش‌های آبستن و غیر آبستن افشاری بود. در این مطالعه از تعداد 35 راس میش افشاری و 45 راس میش آمیخته افشاری × برولامرینو خون‌گیری و استخراج DNA به عمل آمد. سه قطعه از ژن BMP 15 به طول‌های 581، 325 و 857 جفت باز به ترتیب برای ناحیه پروموتور، اگزون یک و دو برای وجود چند شکلی از طریق تعیین توالی محصولات PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در پروموتور و اگزون یک هیچ گونه تغییر توالی وجود ندارد اما در اگزون دو، نوکلئوتید 134 دچار تغییر شده و دو ژنوتیپ هموزیگوت CC و هتروزیگوت CA مشاهده گردید. پس از کشتار از 22 راس میش آبستن و 8 راس میش غیر آبستن بافت تخمدان تهیه شد. از نمونه‌ها RNA کامل استخراج و سپس به cDNA تبدیل شد. نتایج بررسی اختلاف معنی‌داری از لحاظ بیان ژن BMP15 بین دو گروه آبستن و غیر آبستن و آلل‌ها نشان نداد. احتمالاً این ژن در ارتباط با سایر ژنها و از جمله گیرنده‌های مربوطه‌اش در ارتباط با تولید مثل ایفای نقش می‌کند و به همین دلیل ممکن است بیان آن در مراحل مختلف تولید مثلی مورد نیاز باشد.

واژه‌های کلیدی: پلی مورفیسم، چند قلوژی، ژن BMP15، گوسفند افشاری.

مقدمه

کدکننده یک پیش پپتید به طول 393 اسیدآمینه می‌باشد و پپتید کامل آن 125 اسیدآمینه طول دارد. گزارش‌های منتشر شده در خصوص این ژن نشان می‌دهد که حتی جایگزینی یک اسیدآمینه که جایجایی زیادی را در توالی محصول ایجاد نکند نیز منجر به ایجاد تاثیر زیاد بر فعالیت محصول و به دنبال آن نرخ تخم‌اندازی می‌گردد. پنج آلل موتانت از ژن BMP15 توسط تحقیقات هانراهان و همکاران (7) و دیویس (4 و 5) شناسایی شده‌اند که عبارتند از: ($fecX^1$ و $fecX^G$, $fecX^H$, $fecX^B$, $FecX^L$). تمامی این آلل‌ها باعث افزایش تخم‌گذاری در گوسفندان هتروزیگوت و عدم باروری در گوسفندان هموزیگوت حامل این موتاسیون‌ها می‌شوند (4، 5 و 7). اما لازم به ذکر است که هر نوع تغییر نوکلئوتیدی در این ژن نیز منجر به افزایش چند قلوژی نمی‌شود. برای نمونه در نژاد راسا آرگونزا در کشور اسپانیا با متوسط تعداد 1/2 تا 1/5 بزه در هر زایش با وجود یک SNP در اگزون شماره یک این ژن، افزایشی در چندقلوژی نشان داده نشد. در حالیکه وجود جهش در اگزون دوم این ژن که شامل حذف یک قطعه 17 جفت باز از باز 525 تا 542 بود، منجر به ایجاد چندقلوژی گردید، منته‌گودو و همکاران (11) این جهش در

با توجه به اهمیت صفت چندقلوژی در گوسفند، از نظر اقتصادی و افزایش بهره‌وری بررسی ژن‌های موثر بر این صفت حائز اهمیت است. تا کنون سه ژن که اثر قابل توجهی در پستانداران مختلف بر رشد فولیکول‌ها و نرخ تخم‌ریزی دارند، شناسایی شده‌اند که عبارتند از: BMP15، GDF9 و BMPR IB که معروفترین آن‌ها BMP15 است. تمامی این ژن‌ها جزو خانواده بزرگ TGFβ هستند و بر تنظیم بیان و ترشح هورمون‌های موثر بر رشد فولیکول و نرخ تخم‌ریزی موثرند. BMP15 بر روی کروموزوم X قرار دارد و دارای دو اگزون است که توسط یک اینترون از هم جدا می‌شوند. محصول رونویسی کامل آنها یک توالی 1179 نوکلئوتیدی است که

1- دانش آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح دام، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان،

2- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان،

نویسنده اول و دوم به نسبت مساوی در انجام این پژوهش مشارکت داشته‌اند.

(* نویسنده مسئول: taher.harkinezhad@znu.ac.ir)

ونوجکت خلاء دار 6 میلی لیتر حاوی ماده ضد انعقاد EDTA از سیاهرگ وداجی انجام شد. استخراج DNA به روش فنل-کلروفرم انجام گرفت. DNA استخراج شده تا زمان استفاده در منهای 20 درجه سانتیگراد نگهداری شد. ترکیب ژنتیکی افشاری × برولامرینو جهت افزایش چند قلوزایی بوجود آمده است.

بررسی نواحی مختلف ژن BMP 15

برای بررسی این ژن نواحی مهم آن، یعنی پروموتور و هر دو اگزون ژن در نظر گرفته شد و آغازگرهای اختصاصی برای هر یک از نواحی طراحی گردید. توالی نواحی هدف پروموتور، اگزون یک و دو به ترتیب دارای طول 581، 325 و 857 جفت باز بود. آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر قطعات مورد نظر از روی توالی موجود برای گوسفند در NCBI با شماره دسترسی 1.NM_001114767 طراحی و برای سنتز سفارش داده شد (جدول 1). قطعات ژنی مورد نظر طی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) تکثیر شدند.

ژن BMP15 را FecX^R نامیدند (11). تا کنون در کشور چند شکلی اگزون 2 ژن BMP 15 در نژاد سنگسری (12)، سنجابی (14) و دالاق (9) مورد بررسی قرار گرفته است. در این میان در نژاد سنجابی چندشکلی در اگزون 2 این ژن با دو قلوزایی مرتبط بوده است. با توجه به اینکه اثر آل‌های موثر این ژن در حالت هتروزیگوت و هموزیگوت بسیار متفاوت است به نظر می‌رسد بیان آل‌های مختلف این ژن متفاوت باشد. هدف پژوهش حاضر بررسی وجود چند شکلی در توالی نواحی مهم و موثر و نیز میزان بیان ژن BMP15 در میش‌های آبستن و غیرآبستن و همچنین تفاوت بیان آن در تخمدان‌های با تعداد فولیکول متفاوت بود.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه‌ها و استخراج DNA

برای این منظور از تعداد 35 رأس گوسفندان افشاری و 45 رأس آمیخته افشاری × برولامرینو دانشگاه زنجان خون‌گیری با استفاده از

جدول 1- توالی آغازگرها برای سه ناحیه از ژن BMP 15 و بیان آن

Table 1- Primer sequences of promoter, exon 1 and 2 of BMP 15 gene and for its expression

| نام آغازگر ¹ Primer ¹ | نوع آغازگر type | توالی آغازگر Primer sequences | Tm (°C) | شماره دسترسی Access No. | مکان اتصال آغازگر |
|--|--------------------|----------------------------------|------------|----------------------------|-------------------|
| BMPp | Sense | TTTCTGGCACTTATGCTCAG | 58.4 | NM_001114767 | 17 597 |
| | Antisense | GAAAAGCTTGGTGTTCAGCA | 56.4 | | |
| BMPex1 | sense | ATGGTCCTCCTGAGCATCCT | 58.4 | promoter NM_001114767.1 | 1 325 |
| | Antisense | CTCTGAGAGGCCCTTGCTACA | 60.5 | | |
| BMPex2 | sense | GCTCCTGGGACATACAGACC | 62.5 | " | 326 1182 |
| | Antisense | TCACCTGCATGTACAGGACT | 58.4 | | |
| BMPexp | sense | AGCTGACGCAAGTGGACACC | 54.1 | " | 228 377 |
| | Antisense | GCTACCCGTTTTGGTCTCAG | 55.5 | | |
| GAPDH | sense | CACTGCCACCCAGAAGACTG | 64 | NM_001190390.1 | 576 771 |
| | Antisense | GGTCAGATCCACAACGGACA | 62 | | |

¹آغازگر BMPp برای تکثیر ناحیه پروموتور، آغازگرهای BMPex1 و BMPex2 به ترتیب برای تکثیر اگزون یک و دو، آغازگر BMPexp برای بررسی بیان این ژن و آغازگر GAPDH به عنوان کنترل داخلی در بررسی بیان ژن طراحی شدند.

¹BMPp primers used for amplification of the promoter, BMPex1 and BMPex2 for exon 1 and 2 respectively, BMPexp for assessing expression of the gene and GAPDH as internal control in gene expression experiment.

شرایط دمایی PCR برای تکثیر قطعات مورد نظر عبارت بود از: برای ناحیه پروموتور، مرحله واسرشتگی اولیه به مدت 5 دقیقه با

از آغازگرها و مقدار کمتر از 300 نانوگرم از DNA الگو بود که با آب عاری از نوکلئاز به حجم 25 میکرولیتر رسانده شد. برنامه زمانی و دمایی مورد استفاده در واکنش PCR شامل: تیمار اولیه فعال سازی 95 درجه سانتیگراد به مدت 15 دقیقه بود، و چرخه های حرارتی شامل 95 درجه سانتیگراد واسرشته سازی به مدت 30 ثانیه، 60 درجه سانتیگراد به مدت 30 ثانیه جهت اتصال آغازگرها و 72 درجه سانتیگراد به مدت 30 ثانیه جهت گسترش قطعه مورد نظر انجام شد. جهت بررسی بیان ژن از اندازه‌های Ct و جهت مقایسه داده ها و نیز حذف اثر خطاهای احتمالی از ژن خانه دار³ GAPDH (جدول 1) استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها به روش لیواک و اشمیتنگن (2001) انجام شد (10).

نتایج و بحث

انجام PCR با آغازگرهای طراحی شده برای ناحیه پروموتور باعث تکثیر قطعه‌ای بین باند 500 و 600 نشانگر DNA شد (شکل 2) که پس از تعیین توالی قطعه ذکر شده، مشخص گردید که همان توالی مورد نظر از ژن BMP15 می باشد. نتایج توالی‌یابی نشان داد که در دامهای مورد بررسی در پروموتور این ژن تغییر نوکلئوتیدی وجود ندارد.

نتایج الکتروفورز محصولات PCR اگزون اول و دوم ژن BMP15 به همراه تعیین توالی این محصولات نشان دهنده تکثیر قطعاتی به ترتیب به طول 325 و 857 جفت باز بود (شکل 2) که همان نواحی مورد نظر بود. پس انجام مطابقت توالی نمونه‌ها با هم، تغییری در اگزون اول مشاهده نگردید.

اما در نوکلوتید 134 اگزون دوم بین دامها تفاوت وجود دارد و در دو مورد از کل نمونه‌ها ژنوتیپ CC به CA تغییر یافته است (شکل 1 و 3). بعد از ترجمه توالی DNA مربوط به اگزون دوم به توالی پروتئینی و هم ردیف سازی توالی پروتئینی با توالی موجود در پایگاه داده‌های زیستی مشخص شد که در جایگاه یاد شده تغییر در توالی اسید آمینه‌ها رخ نداده است. در نهایت با مقایسه توالی پروتئینی موجود مشخص گردید جهش در نوکلئوتید 5767 در کدون 153 رخ داده است و همانطور که در شکل زیر دیده می‌شود این جهش یک جهش مترادف بوده و کدون CCC را به CCA تغییر می‌دهد که هر دو کدون اسید آمینه پرولین را کددهی می‌کنند (شکل 3 و 4). لازم به ذکر است که جهش مشاهده شده در گوسفندان آمیخته افشاری[×] برولامرینو رخ داده بود. با توجه به عدم دسترسی به والدین این دامها و نیز پایین بودن فراوانی این جهش ردیابی آن و شناسایی نژادی که منشاء این جهش بوده است امکان پذیر نبود. چنین جهشی در

دمای °C 96، 30 چرخه شامل سه مرحله: °C 96 به مدت یک دقیقه، دمای اتصال °C 56 به مدت 1 دقیقه و °C 72 به مدت 1/5 دقیقه و یک چرخه گسترش نهایی °C 72 به مدت 5 دقیقه اعمال گردید. برای اگزون 1، 96 درجه سانتیگراد به مدت 6 دقیقه جهت واسرشته شدن DNA الگو، 30 سیکل شامل 96 درجه سانتیگراد واسرشته سازی اولیه به مدت 40 ثانیه 58 درجه سانتیگراد به مدت 40 ثانیه برای اتصال آغازگرها به DNA و 72 درجه سانتیگراد به مدت 40 ثانیه برای سنتز DNA و همچنین جهت بسط نهایی 72 درجه سانتیگراد به مدت 6 دقیقه انجام گرفت. برای اگزون 2، 96 درجه سانتیگراد به مدت 6 دقیقه جهت واسرشته شدن DNA الگو، 30 سیکل شامل 96 درجه سانتیگراد واسرشته سازی اولیه به مدت 1 دقیقه 60 درجه سانتیگراد به مدت 40 ثانیه برای اتصال آغازگرها به DNA و 72 درجه سانتیگراد به مدت 80 ثانیه برای سنتز DNA و همچنین جهت بسط نهایی 72 درجه سانتیگراد به مدت 6 دقیقه انجام شد.

جهت بررسی تغییرات احتمالی در توالی نواحی مختلف ژن BMP 15 پس از انجام PCR و مشاهده باندهای واضح بر روی ژل آگارز محصولات PCR جهت تعیین توالی ارسال شدند. توالیهای بدست آمده با استفاده از نرم افزار CLC Main Workbench 5 و Vector NTI مورد ارزیابی قرار گرفتند. همچنین توالی‌ها به منظور تطابق با سایر توالی‌های موجود در پایگاه داده های بیولوژیک مورد بررسی قرار گرفتند.

بررسی بیان ژن BMP 15

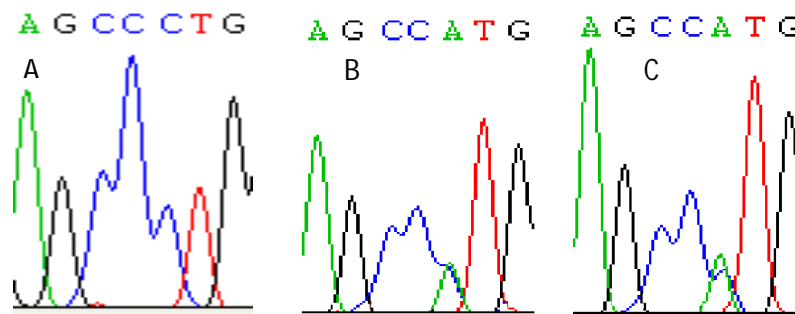
تعداد 30 نمونه از بافت تخمدان گوسفندان کشتار شده در کشتارگاه زنجان از لاشه جدا گردید و داخل یخ بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شد و تا زمان استفاده در منهای 80 درجه سانتی گراد نگهداری شدند. آغازگرهای اختصاصی برای ژن BMP15 به عنوان ژن هدف و GAPDH¹ به عنوان کنترل داخلی طراحی شدند. استخراج RNA کل توسط کیت CinnPure RNA و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. برای تعیین کیفیت و کمیت RNA استخراج شده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز 1,5 درصد و نیز سنجش های لازم توسط نانودراپ انجام شد. تهیه cDNA از RNA کل توسط واکنش رونویسی معکوس (RT-PCR²) با استفاده از کیت steps RT--2 (Vivantis PCR، سیناکلون) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. برای بررسی بیان ژن از واکنش PCR Real Time استفاده شد. ترکیبات واکنش به همراه غلظت آن شامل: SYBR Green PCR Master Mix 12/5 میکرولیتر، 0/3 μM از هر کدام

1- Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

2- Reverse transcription

بیان ژن BMP15 بین گروه آبستن و غیرآبستن تفاوت معنی داری وجود ندارد (شکل 5). عدم وجود تفاوت بیان این ژن ممکن است به این علت باشد که این ژن در تخمدان می‌ش‌ها بطور مداوم بیان می‌شود و این عمل برای سایر اثرات ژن مورد نیاز است اما در مورد تخمک ریزی تنها زمانی اثر می‌گذارد که گیرنده آن بیان شود.

هیچکدام از نژادهای افشاری و برولامرینو گزارش نشده است. به طور کلی اسیدآمینو پرولین چند رمز دارد که در اثر جهش جانشینی ایجاد شده یک رمز به رمز دیگر همان آمینواسید (CCC به CCA) تبدیل شده که در این صورت هیچ تغییری در ساختار و عملکرد پروتئین نخواهد داشت. همچنین نتایج حاصل از Real time PCR نشان داد که از لحاظ

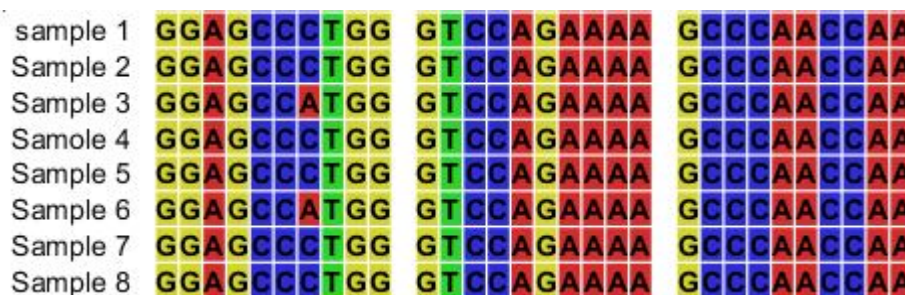


شکل 1- تصویر دونمونه هتروزایگوت AC (B و C) جهش یافته و نمونه بدون جهش CC (A).
Figure 1- Graph of two heterozygote samples AC (B and C) with point mutation and the sample without mutation CC (A)



شکل 2- الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز 1/5%: A- قطعه ای به طول 325 جفت باز را نشان می‌دهد که اگزون شماره یک می‌باشد. B- تکرر قطعه ای به طول 857 جفت باز مربوط به اگزون دو را نشان می‌دهد. C- جفت آغازگر BMPP قطعه ای به طول 581 جفت باز مربوط به ناحیه پرموتور را تکثیر کرده است. نشانگر DNA بکار رفته در تصاویر فوق 100 bp است

Figure 2- Electrophoresis of PCR products on 1.5% agarose gel; A: The three bands are 325 bp PCR product of the first exon of BMP 15 gene. B: It shows a 857 bp band of the second exon of this gene. C: BMPp primers have amplified a segment of 581 bp of BMP 15 promoter. The DNA marker that was used here is 100 bp.

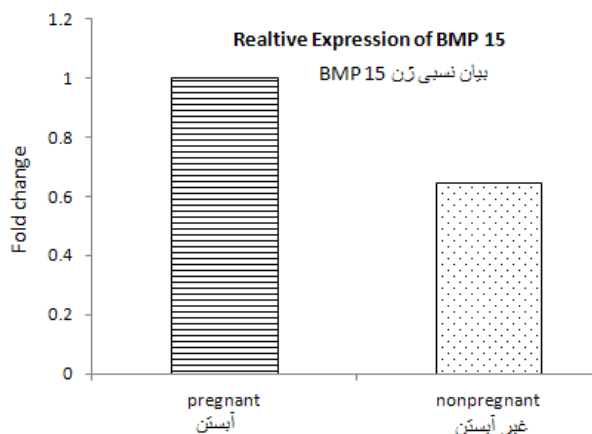


شکل 3- نتیجه تطابق توالی نمونه های جهش یافته (3 و 6) و معمول (1، 2، 4، 5، 7 و 8).
Figure 3- The result of alignment for sequence with mutant (3 and 6) and those of wild type samples (1, 2, 4, 5, 7 and 8).

..... ابتدا 152 153 154 155 انتها
 ابتدا GAG CCC TGG GTG انتها
 ابتدا GAG CCA TGG GTG انتها
 ابتدا E P W V Q انتها

شکل 4- از بالا به پایین (مشخص شده) عبارتند از شماره کدون جهش یافته ، کدون سه حرفی موجود در توالی، تغییر باز C/A و تغییر رمز سه حرفی ، هر دو کدون متعلق به اسید آمینه پرولین می‌باشند.

Figure 4- From top to below (highlighted) are: the codon in which the mutation occurred, the codon of wild type and the codon with mutation; both codons code the prolin amino acid.



شکل 5- نمودار بیان ژن در دو گروه میش آیستن و غیر آیستن. تفاوت بین دو گروه به صورت fold change نشان داده شده است. بین دو گروه تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.

Figure 5- Graph of gene expression in two groups of pregnant and non-pregnant ewes. The difference between two groups presented as fold change of the gene expression. There was no difference between two groups.

تاثیر ژن

کشف شده در نژاد کمبریج توسط هانراهان و همکاران در 2004 بود که منجر به تغییر باز سیتوزین به تیمین و در نتیجه تبدیل کدون اسید آمینه گلوتامیک به کدون پایانی می‌شود. سلیمانی و همکاران (14) نیز در بررسی اثر پلی مورفیسم اگزون 2 ژن BMP15 بر روی دوقلو زایی و صفات وزنی در گوسفند سنجابی نشان دادند که ژن BMP15 اثر معنی داری روی وزن تولد، وزن 45 روزگی و وزن 3 ماهگی و هم چنین دوقلو زایی داشته است (14). اما در تحقیق دیگری که بروی گوسفندان سنگسری صورت گرفته بود هیچ گونه پلی مورفیسمی در ژن BMP15 در این گوسفندان مشاهده نشد (8). در مطالعه ی دیگری که بر روی 4 نژاد چینی توسط ژانگ و همکاران (15) برای بررسی جهش‌های $FecX^G$ ، $FecG$ و $FecB$ انجام شده بود از بین 4 نژاد فقط در نژاد دنبه کوتاه Han، جهش برای ژن BMP15 شناسایی شد (15). در نهایت می‌توان گفت که در نژادهای ایرانی نیز این ژن دارای چند شکلی بوده و برای بررسی باروری یا عدم باروری، لازم است پژوهش‌های بیشتری با استفاده از نمونه‌های بیشتر انجام شود تا بتوان با قاطعیت نتیجه‌گیری نمود و ارتباط آن را با صفات مختلف هم‌چون دوقلو زایی بدست آورد. با توجه به اینکه تعدادی از گوسفندان مورد استفاده در این مطالعه از ترکیب ژنتیکی

BMP15 بر بیان برخی ژن‌ها در تخمدان و نیز برخی اثرات آن مشخص شده است (3 و 4) اما ممکن است این ژن عملکردهای دیگری نیز داشته باشد که هنوز ناشناخته است. در مطالعه‌ای که توسط بسا و همکاران (1) گزارش شده است در مراحل مختلف فولیکولی در گاو تفاوت معنی‌داری در بیان ژن BMP15 مشاهده نشده است. در حالیکه در مطالعه‌ای که توسط پرامود و همکاران (13) بر روی بزهای نژاد سیاه بنگال و سیروهی انجام شده است نشان می‌دهد که بیان این ژن در فولیکول‌های کوچک بیشتر از فولیکول‌های بزرگ بوده است. همچنین مطالعات نشان داده که این ژن بر بیان سایر ژن‌های مرتبط با تولید مثل تاثیر دارد (3 و 6). این نتایج و گزارش‌های مطالعات دیگران نشان می‌دهد که برای روشن شدن نقش ژن BMP15 مطالعات بیشتری همراه با بررسی بیان سایر ژن‌ها در تخمدان لازم است تا نقش کامل آن در تولید مثل مشخص گردد. در مطالعه‌ای که توسط برزگری و همکاران (2) بر روی گوسفندان معانی و قزل انجام شد وجود جهش $FecX^G$ و در ژن GDF9 جهش G_1 را نشان داد (2)، جهش $FecX^G$ همان جهش

سیاسگزاری

از سازمان جهاد کشاورزی استان زنجان بویژه معاونت بهبود تولیدات دامی کمال تشکر و قدردانی را داریم.

افشاری × برولامرینو بوده و چند قلوزا بودند، اما نه در بیان ژن و نه از لحاظ توالی ژن BMP15 این گوسفندان تفاوتی با نژاد افشاری خالص نداشتند. بنابراین نتایج این پژوهش نشان می دهد که در چند قلوزا بودن این گوسفندان این ژن نقشی ندارد.

منابع

- 1- Bessa, I. R., R. C. Nishimura., M. M. Franco., and M. H. Dode. 2013. Transcription profile of candidate genes for the acquisition of competence during oocyte growth in cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, 48: 781-789.
- 2- Barzegari, A., S. Atashpaz., K. Ghabili., Z. Nemati., M. Rustaei., and R. Azarbaijani. 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.
- 3- Chang, H. M., J. C. Cheng., E. Taylor., and P. C. Leung. 2014. Oocyte-derived BMP15 butnotGDF9 down-regulates connexin43 expression and decreases gap junction intercellular communication activity in immortalized human granulosa cells. *Molecular Human Reproduction*, 20 (5): 373-383.
- 4- Davis, G. H 2005. Major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genetics Selection Evolution*, 37:S11–S23.
- 5- Davis, G. H. 2004. Fecundity genes in sheep. *Animal Reproduction Science*, 82: 247-253.
- 6- Fenwick, M. A., J. M. Mora., Y. T. Mansour., C. Baithun., S. Franks., and K. Hardy. 2013. Investigations of TGF-beta signaling in preantral follicles of female mice reveal differential roles for bone morphogenetic protein 15. *Journal of Endocrinology*, 154: 3423-3436.
- 7- Hanrahan, J. P., S. M. Gregan., P. Mulsant., M. Mullen., G. H. Davis., R. Powell., and S. M. Galloway. 2004. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep *Ovis aries*. *Biology of Reproduction*, 70: 900-909.
- 8- Kasiriyani, M. M., H. Hafezian., and N. Hassani. 2011. Genetic polymorphism BMP15 and GDF9 genes in Sangsari sheep of Iran. *International Journal of Genetics and Molecular Biology*, 3:31-34.
- 9- Khanahmadi, A., Sh. Gharehveysi., R. Khataminejad., and J. Arab. 2014. Polymorphic Variants of G1 and B4 from GDF9 of Dalagh Sheep. *Research on Animal Production*, 10: 148-155. (In Persian).
- 10- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *METHODS*, 25: 402–408.
- 11- Monteagudo, L., R. Ponz., M. Teresa Tejedor., A. Lavina., and I. Sierra. 2009. A 17 bp deletion in the bone morphogenetic protein 15 gene is associated to increased prolificacy in the Rasa Aragonesa sheep breed. *Animal Reproduction Science*, 110: 139-146.
- 12- Pirkhezranian, Z., A. Mohammad Hashemi, M. Tahmorthpour and N. Pirani. 2015. Polymorphhism in second exon of BMP 15 gene in Sangsari sheep of Iran. *Iranian Journal of Animal Science research*, 6 (4): 381-387. (In Persian).
- 13- Pramod, R. K., S. K. Sharma., A. Singhi., S. Pan., and A. Mitra. 2013. Differential ovarian morphometry and follicular expression of BMP15, GDF9 and BMPR1B influencetheprolificacy in goat. *Reproduction in Domestic Animals*, 48: 803-809.
- 14- Solimani, B., M. G. Rahimi., and B. Chaharaein. 2011. The segregation of exon 2 BMP15 gene on twining and traits of weight in Sanjabi sheep. *Iranian Jurnal of Biology*, 24 (4):487-493. (In Persian).
- 15- Zhang, C. S., L. Geng., L. Du., Z. Liu., Z. Fu., M. S. Feng., and Y. F. Gong. 2011. Polymorphism study of FecXG , FecXH and FecXB Mutations in four Domestic sheep breeds in the lower yellow River valley of China. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10:2198-2201.