مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (دوره 2، شماره 1، بهار 1389)

# چند شکلی اگزون 2 ژن *BMP15* در بز سرخ جبال بارز

روح الله علی نقی زاده[1]، محمدرضا محمدآبادی[2*]، سونیا زکی زاده[3]

[1] دانشجوی کارشناسی ارشد علوم دامی دانشگاه آزاد واحد کاشمر

[2] دانشیار بخش علوم دامی دانشگاه شهید باهنر کرمان

[3] استادیار مرکز آموزش عالی جهاد کشاورزی مشهد

## چکیده

پروتئین مورفوژنتیک استخوان شماره 15 (BMP-15) عضو فوق خانواده فاکتور رشد تغییر شکل دهنده بتا (TGF-β) می باشد که نقش تعیین کننده ای در باروری گوسفند و بز دارد. پژوهش های قبلی تأیید کرده که جهش های باروری گوسفند در بز نیز وجود دارند. جهش های مختلفی در ژن BMP-15 نرخ تخمک ریزی و ناباروری در گوسفند را افزایش می دهند. برای تعیین چند شکلی ژن BMP-15، ناحیه کد کننده BMP-15 مطالعه شد. دو اگزون (1 و 2) پرپروپپتید 394 آمینو اسیدی در BMP-15 را کد می کنند. نمونه ها از 100بز از بزهای سرخ جبال بارز از 10 گله به طور تصادفی انتخاب شدند و DNA ژنومی با استفاده از کیت استاندارد استخراج DNA انجام شد و محصولات PCR روی ژل آگارز الکتروفورز شدند. محصولات PCR با الکتروفورز و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید قابل مشاهده شدند. نتایج نشان داد که محصولات تکثیر شده کاملا" تخصصی و مستقیما" قابل آنالیز بودند. چند شکلی تک نوکلئوتیدی جایگاه های $FecX^B$ و $FecX^G$ ژن BMP-15 با استفاده از تکنیک PCR-RFLP بررسی شد. در این مطالعه جهشی در جایگاه های $FecX^B$ و $FecX^G$ ژن BMP-15 در این بزها یافت نشد و تمام حیوانات برای اگزون 2 ژن جایگاه های $FecX^B$ و $FecX^G$ ژن BMP-15 یک شکل بودند. مطالعات بیشتری در جایگاه های $FecX^B$ و $FecX^G$ ژن BMP-15 یا ژن های دیگر با استفاده از نمونه های بزرگتر نیاز است در این نژاد انجام شود تا بتوان نتیجه گیری قطعی نمود.

**واژه های کلیدی**: *بز سرخ جبال بارز، ژن BMP-15، چند شکلی، PCR-RFLP، باروری.*

[*] نویسنده مسئول: محمدرضا محمدآبادی تلفن: 0341-3202689 Email: mmohammadabadi@yahoo.ca

**مقدمه**

در حوزه ژنتیک و اصلاح، اطلاع از ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها می‌تواند کمک بزرگی برای برنامه ریزی برای طرح های اصلاح نژادی و از همه مهمتر، حفظ ذخایر ژنتیکی باشد. روش‌های مولکولی[1] و استفاده از نشانگرهای مولکولی[2] در این زمینه یکی از بهترین گزینه ها به حساب می-آید زیرا با توجه به اطلاعات زیادی که به دست می دهد می تواند نتایجی که از تجزیه و تحلیل رکوردها با روش های آماری به دست آمده است را تأیید و تکمیل نموده و حتی ممکن است که آنها را رد کند (Daneshyar, 2003). از بدو تشکیل معاونت امور دام سازمان جهاد کشاورزی پژوهش و مطالعه روی بز سرخ جبال بارز شروع و پس از بررسی ها و مطالعات لازم مرکز تحقیقات علوم دامی کشور (کرج) تعداد 300 رأس از این دام را تحت پوشش طرح ملی اصلاح نژاد دام قرار داد که هر ساله نسبت به همزمان سازی فحلی و تلقیح مصنوعی آنها اقدام می شود و اطلاعاتی نظیر زمان تلقیح- وضعیت زایش- وزن تولد- وزن سه ماهگی- شش ماهگی- دوازده ماهگی و وزن الیاف اندازه گیری و برای آنالیز به مرکز اصلاح نژاد دام ارسال می شود. جمعیت این دام در شهرستانهای جیرفت و کهنوج قریب 150 هزار رأس تخمین زده شده که زیستگاه اصلی آن در ارتفاعات جبال بارز بوده و در یک طیف رنگی قرمز تا قهوه ای دیده می شوند که رنگ غالب قرمز است. از لحاظ ظاهری بز سرخ جبال بارز از بز کرکی رائینی جثه کوچکتری دارد و سطح بدن از کرک و مو پوشیده شده است. این حیوان در برابر شرایط بد آب و هوایی و تغذیه نامناسب مقاوم است و به سبب ماهیت سیستم پرورش که عمدتاً سیستم باز می باشد از قدرت راهپیمایی خوبی برخوردار است (Mohammad Abadi *et al*., 2011). برنامه‌های اصلاح‌نژادی بیشتر در جهت بهبود وضعیت تولیدی حیوانات اهلی عمل می‌کنند که توفیق این برنامه‌ها به مقدار تنوع ژنتیکی موجود در گله بستگی دارد (Msoffe *et al*., 2005; Rejaei, 2005). تنوع ژنتیکی در داخل و یا بین جمعیت‌ها بدون در نظر گرفتن تعداد آلل در هر جایگاه ژنی، جهش، انتخاب، مهاجرت و روش‌های تولیدمثلی محاسبه می‌شود و به عنوان یک ابزار ارزشمند در برنامه‌های اصلاح نژادی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Nagamine and Higuchi, 2001). متأسفانه تاکنون پژوهش های مولکولی روی بز سرخ جبال بارز بسیار انگشت شمار بوده است (Mohammad Abadi *et al*., 2011). امید است نتایج حاصل از این پژوهش در بررسی تنوع ژنتیکی بز سرخ جبال بارز در آینده مورد استفاده قرار گیرد. چرا که بررسی‌های انجام شده در سطح DNA دقیق‌تر بوده و شرایط محیطی و تغذیه روی آنها اثر نمی‌گذارد و اطمینان حاصل از نتایج، بیشتر از زمانی است که از اطلاعات حاصل از رکوردهای تولیدی استفاده می‌شود. مطالعات ژنتیکی در چند نژاد اروپایی نشان داده اند که نرخ تخمک ریزی و

[2] Molecular methods
[3] Molecular markers

چندقلوزایی به وسیله عمل ژن های منفرد بزرگ اثر تعیین می شود. بنابراین، دو فاکتور کلیدی شناخته شده فاکتور تمایز رشد شماره 9 (GDF-9) و پروتئین مورفوژنتیک استخوان شماره 15 (BMP-15) (نام دیگر آن GDF-9B می باشد) می باشند که دو عضو فوق خانواده فاکتور رشد تغییر شکل دهنده بتا (TGF-β) هستند (Galloway *et al*., 2000; Hanrahan *et al*., 2004). این فاکتورهای رشد اووسیتی برای پیشرفت مراحل اولیه فولیکول سازی و سپس در تکامل پایانی فولیکول بسیار حیاتی هستند (Dong *et al*., 1996; Galloway *et al*., 2000). این فاکتورهای ترشح شده اووسیت نقش مهمی در تمایز گرانولوزای مختلف (Eppig, 2000; Li *et al*., 2000) و در تنظیم اعمال کلیدی سلول های گرانولوزا دارند (Elvin *et al*., 1999; Joyce *et al*., 2000; Otsuka *et al*., 2001). لذا، اووسیت تمایز و عمل سلول های گرانولوزا را کنترل می کند و اثرشان روی الگوهای بیان ژن در سلول های سوماتیک فولیکولی یک مکانیسم برای این امر است (Sugiura and Eppig, 2005). جهش های مختلف در ژن های BMP-15 و GDF-9 نرخ تخمک ریزی و ناباروری در گوسفند را افزایش می دهند. این جهش ها در هتروزیگوت ها باعث افزایش میزان تخمک ریزی و دوقلوزایی و سه قلو زایی و در هموزیگوت ها باعث نقص در فولیکول های کامل شده و در نتیجه باعث ناباروری در بعضی نژادهای بارور گوسفند می شوند (Galloway *et al*., 2000; Hanrahan *et al*., 2004). پنج جهش به طور طبیعی در ژن BMP-15 شناسایی شده اند. یکی از این جهش ها در ژن BMP-15 در نژاد گوسفند بلکلار در ایرلند یافت شد و $FecX^B$ نام گذاری شد که نرخ تخمک ریزی خیلی زیادی را نشان داد (Davis, 2005). موش های ماده فاقد GDF-9 (Dong *et al*., 1996) و میش های فاقد BMP-15 (Galloway *et al*., 2000) به خاطر توقف کامل فولیکول سازی در مراحل اولیه رشد فولیکول نابارور هستند. این حیوانات به طور قابل توجهی مشابه حیوانات دارای فنوتیپ streak ovaries، که شامل چندین فولیکول اولیه و قدیمی و همچنین شامل لانه های سلولی گرانولوزایی عاری از اووسیت شبیه تومور[1] رفتار می کنند (Dong *et al*., 1996; Juengel *et al*., 2002). به علاوه، یافته های اخیر در گوسفند، انسان و جوندگان نشان داده که ژن های BMP-15 و GDF-9 می توانند به عنوان اهداف جدید برای تنظیم باروری در پستانداران مورد توجه قرار گیرند (McNatty *et al*., 2005). ژن BMP-15 روی کروموزوم X قرار گرفته و در جوندگان mRNA و پروتئین آن در اووسیت ها از مراحل اولیه تخمک ریزی بیان می شوند (Dube *et al*., 1998; Otsuka *et al*., 2001). Silva *et al*. (2004) گزارش کردند که mRNAها و پروتئین های BMP-15 و GDF-9 در فولیکول های تخمدان بز در مراحل تکامل آنها بیان می شوند. بزها از اولین گونه های پستانداران هستند که

[1] tumor-like, oocyte-free granulosa cell nests

اهلی شده اند. آن ها به خاطر تولید شیر، گوشت و کرک شان از نظر اقتصادی بسیار مهم هستند و یک منبع مهم پروتئین در مناطق گرم می باشند. جمعیت بز در ایران حدود 25/8 میلیون برآورد شده است که در مناطق خشک و نیمه خشک پراکنده شده اند (FAO STST, 2007). اطلاعات در مورد ژن های موثر بر صفات تولید مثلی بزهای ایران اندک است. آنالیز ملکولی ژن *BMP-15* در بزهای مرغز (Arefnezhad, 2007) و چند نژاد بز دیگر ایران واقع در استان تهران (Deldar-Tajangookeh *et al*., 2009) انجام شده است. هدف این پژوهش بررسی چند شکلی ژن *BMP-15* در بز سرخ جبال بارز بود.

**مواد و روشها**

در این طرح از 100 رأس بز سرخ جبال بارز موجود در 10 گله از شهرستان جیرفت نمونه برداری شد. نمونه‌های خون کامل از سیاهرگ وداج گردن و با استفاده از لوله خلاء دار 5 میلی لیتری حاوی ماده ضد انعقاد EDTA تهیه شد و در داخل یخ به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه شهید باهنر کرمان منتقل شد. طی مدت استخراج DNA، نمونه‌ها در دمای 20- درجه سانتیگراد در آزمایشگاه نگهداری شدند. استخراج DNA با استفاده از کیت DIATOM DNA PREP (شرکت سینا ژن) انجام شد. برای تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز روی ژل آگارز استفاده شد. در این مطالعه، دو ناحیه $FecX^B$ و $FecX^G$ در اگزون 2 ژن *BMP-15* مورد استفاده قرار گرفت. که مشخصات آنها در جدول 1 آورده شده است. آغازگرها از شرکت سیناژن ایران و به صورت لیوفیلیزه[1] (غیرحساس به دما) دریافت و طبق دستورالعمل کارخانه سازنده با آب دوبار تقطیر رقیق شدند. پس از حل کردن و رقیق ساختن طبق دستورالعمل مربوطه در دمای 20̊c- نگهداری شدند. از مجموعه کیت PCR Master Kit شرکت سینا ژن برای انجام واکنش PCR استفاده شد. برای انجام PCR از برنامه توصیف شده در جدول 2 استفاده شد. پس از اطمینان از انجام PCR به مقدار 20 میکرولیتر از محصولات PCR ژن $\boldsymbol{FecX^B}$ که اندازه آنها 153 جفت باز بود با یک واحد از آنزیم *DdeI* درون میکروتیوب مخلوط شد و به مدت یک شب در دمای 37 درجه قرار داده شدند تا هضم آنزیمی انجام شود. برای محصولات PCR ژن $\boldsymbol{FecX^G}$ که اندازه آنها 141 جفت باز بود با 10 واحد از آنزیم *HinfI* درون میکروتیوب مخلوط شد و به مدت یک شب در دمای 37 درجه قرار داده شدند تا هضم آنزیمی انجام شود.

پس از افزودن آنزیم محصولات PCR، روی ژل آکریل آمید 8 درصد الکتروفورز شدند. پس از اتمام این زمان ژل به دستگاه Gel documentation منتقل و از آن عکس گرفته شد. پس از اتمام کارهای آزمایشگاهی و تعیین ژنوتیپ تمام نمونه ها، شمارش ژنوتیپ ها و تعیین فراوانی آللی، بررسی تعادل هاردی-

[6] Lyophilization

واینبرگ، هتروزایگوتی و هموزایگوتی مشاهده شده مورد بررسی قرار گرفت که این کار توسط نرم افزار Pop Gene32 صورت گرفت.

**جدول 1- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده.**

| آنزیم برشی مورد استفاده Used restriction enzyme | توالی آغازگرهای رو به جلو و برگشتی (5' به 3') Sequence of forward and backward primers | دمای اتصال Anealing temperature (°C) | اندازه قطعه تکثیر شده Size of amplified fragment (bp) | ژن gene |
|---|---|---|---|---|
| DdeI | GCCTTCCTGTGTCCCTTATAAGTATGTTCCCCTTA TTCTTGGGAAACCTGAGCTAGC | 57/5 | 153 | $FecX^B$ |
| HinfI | CACTGTCTTCTTGTTACTGTATTTCAATGAGAC GATGCAATACTGCCTGCTTG | 63 | 141 | $FecX^G$ |

**Table 1- Characteristics of used primers.**

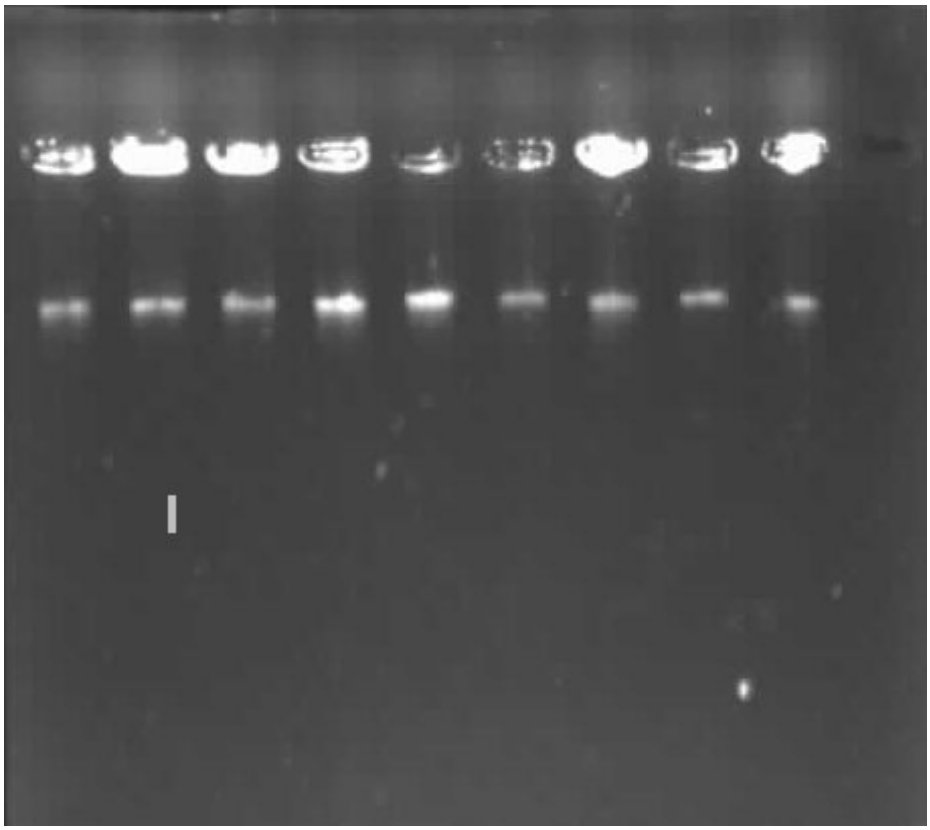
**جدول 2- شرایط انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز**

| | | |
|---|---|---|
| | | ***$FecX^B$*** |
| 1-T= 94 ℃ | 4 min | 1- دناتوراسیون اولیه Primary denaturation |
| 2- T= 94 ℃ | 45 Sec | 2- دناتوراسیون denaturation |
| 3- T= 57.5 ℃ | 30 Sec | 3- اتصال Anealing |
| 4- T= 72 ℃ | 30 Sec | 4- سنتز Synthesis |
| | | 32 چرخه 32 cycles |
| 5- T= 72 ℃ | 4 min | 5- سنتز پایانی Final synthesis |
| | | ***$FecX^G$*** |
| 1-T= 94 ℃ | 4 min | 1- دناتوراسیون اولیه Primary denaturation |
| 2- T= 94 ℃ | 45 Sec | 2- دناتوراسیون denaturation |
| 3- T= 63 ℃ | 30 Sec | 3- اتصال Anealing |
| 4- T= 72 ℃ | 30 Sec | 4- سنتز Synthesis |
| | | 32 چرخه 32 cycles |
| 5- T= 72 ℃ | 4 min | 5- سنتز پایانی Final synthesis |

**Table 2- Conditions of Polymerase Chain Reaction.**

**نتایج و بحث**

محصولات به دست آمده از استخراج، برای تأیید وجود و ارزیابی DNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و الکتروفورز با ژل آگارز و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید مورد امتحان قرار گرفتند. نسبت بین دو جذب $A_{260}/A_{280}$ بین 1/8 تا 2 بود و نیز وجود باندهای پررنگ و بدون کشیدگی و با کیفیت زیاد مشخص کرد که عمل استخراج DNA به خوبی انجام شده است. نبود هیچ کشیدگی در فاصله بین چاهک و باند حاکی از عدم آلودگی پروتئین ها در نمونه ها و عدم وجود باند اضافی در پایین ژل و در فاصله ای زیاد از باند اصلی نشان دهنده عدم وجود ناخالصی مربوط به اسیدهای نوکلئیک دیگر در نمونه ها بود (شکل 1).

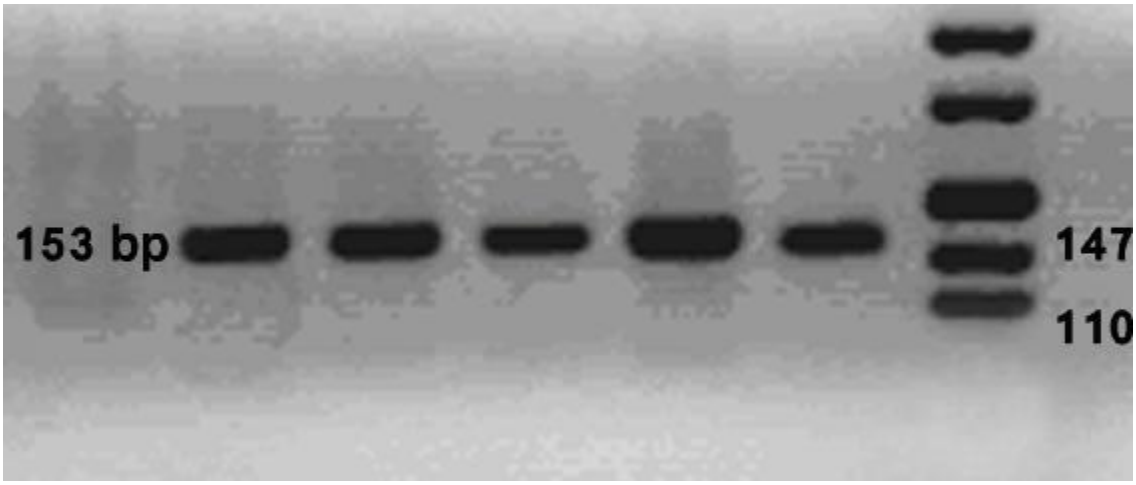


**شکل 1- نمونه ای از DNA استخراج شده از چند بز سرخ جبال بارز.**

**Figure 1- Samples of extracted DNA from some Jabal Barez Red Goats.**

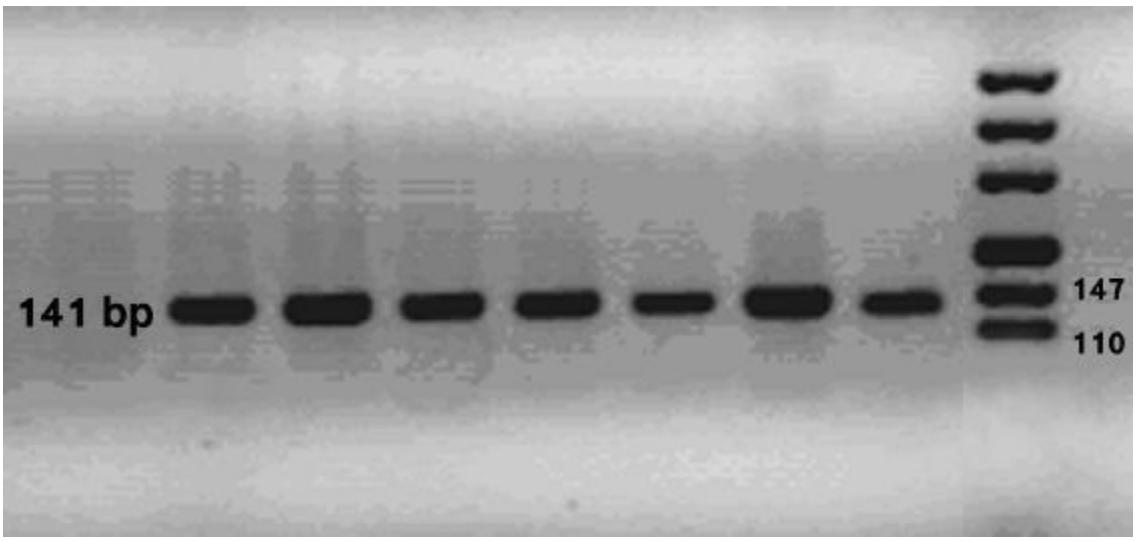
به منظور تایید تکثیر قطعه مورد نظر، محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز با ژل آگارز مورد ارزیابی قرار گرفتند. مشاهده تنها یک باند 153 جفت بازی برای جفت آغازگر اول ($FecX^B$) و یک باند 141 جفت بازی برای جفت آغازگر دوم ($FecX^G$) نشان دهنده تکثیر درست قطعات انتخاب شده ژن BMP-15 و صحت انجام PCR بود که با نتایج بدست آمده از پژوهش Deldar-Tajangookeh *et al.*, (2009) مطابقت داشت. عدم وجود کشیدگی و شفاف

بودن باندها نشان دهنده عدم وجود آلودگی های پروتئینی و نمکی بود و مشاهده تنها یک باند، عدم وجود باند های کاذب را مورد تأیید قرار داد (شکل های 2 و 3).




**شکل 2- الکتروفورز محصولات PCR ژن $FecX^B$ روی ژل آگارز.**

**Figure 2- Agarose gel electrophoresis of PCR products for $FecX^B$ gene.**



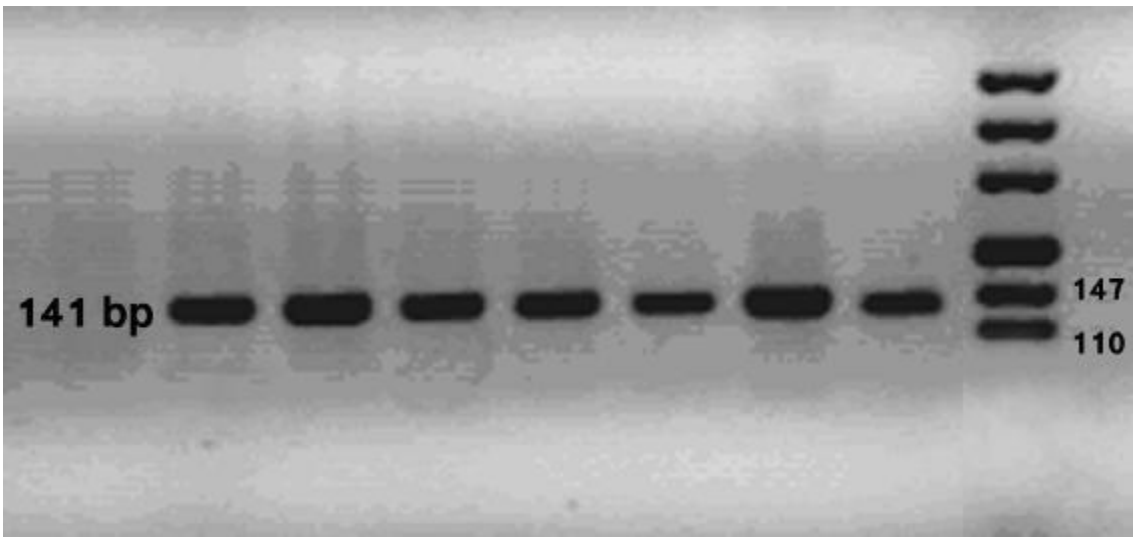

**شکل 3- الکتروفورز محصولات PCR ژن $FecX^G$ روی ژل آگارز.**

**Figure 3- Agarose gel electrophoresis of PCR products for $FecX^G$ gene.**

نتیجه هضم محصولات PCR ژن BMP-15 توسط آنزیم های برشی *Dde* I و *Hinf* I به ترتیب در شکل های 4 و 5 نشان داده شده است. آنزیم برشی *Dde* I آلل نوع وحشی را برش می دهد (122+31=153) و آلل موتانت برش نمی خورد (البته باند 31 جفت بازی در شکل دیده نمی شود). آنزیم برشی *Hinf* I آلل نوع وحشی را برش می دهد (112+29=141) و آلل موتانت برش نمی خورد (البته باند 29 جفت بازی در شکل دیده نمی شود). بر اساس

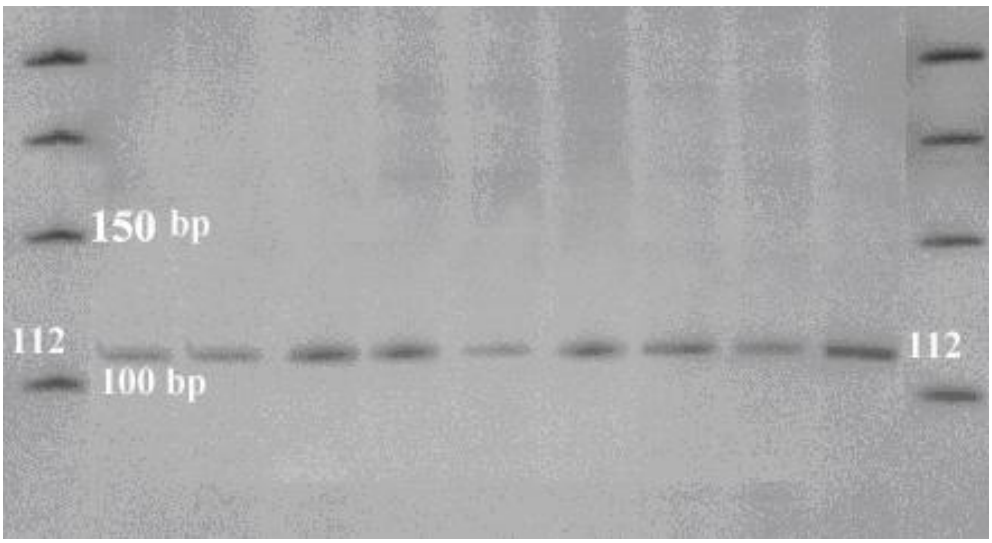
یافته های این پژوهش تمام حیوانات برای اگزون 2 ژن *BMP-15* یک شکل بودند و همه آلل وحشی را داشتند و هیچ جهشی یافت نشد (عدم مشاهده چند شکلی). جهش های هتروزیگوت در ژن *BMP-15* در گوسفند باعث افزایش نرخ تخمک ریزی و باروری می شود، در حالی که جهش های هموزیگوت باعث تولید حیوانات نابارور می شود (Galloway *et al*., 2000; Hanrahan *et al*., 2004). تاکنون جهشی در ژن *BMP-15* در بز گزارش نشده است. یافته های این پژوهش با یافته های پژوهش Deldar-Tajangookeh *et al*.(2009) مطابقت داشت. یافته های این پژوهش با یافته های سایرین (Hua *et al*., 2007) در بزهای چینی نیز مطابقت دارد. آنها نیز هیچ چند شکلی در 550 بز از 6 نژاد (یا گله) برای ژن های اصلی *FecB* و *FecX* گزارش نکردند. در بزهای مرغز ایران نیز هیچ چند شکلی در ناحیه کد کننده ژن *BMP-15* با روش PCR-SSCP با سه جفت پرایمر و با توالی یابی DNA و PCR-RFLP با آنزیم برشی *Dde* I یافت نشد (Arefnezhad, 2007). Guan *et al*. (2006) در گوسفند Hu چینی با باروری زیاد چند شکلی پیدا نکردند. در پژوهش He *et al*. (2006) جهشی در ژن *BMP-15* شش نژاد بز چینی گزارش نشد. دلیلی بر وجود جهش در ژن *FecB* در گوسفند شال، یک نژاد بومی از گوسفندان ایران (Ghaffari *et al*., 2007a, b) یافت نشد. Zare *et al*. (2007) نیز در ژن *BMP-15* (*برای FecXG* و *FecXL*) در 240 میش شال با روش PCR-RFLP و PCR-SSCP جهشی نیافتند. Nejati-Javaremi *et al*. (2007) با روش PCR-SSCP هیچ جهشی در گوسفندان لری-بختیاری نیافتند. Farajzadeh *et al*. (2007) در گوسفند آرخا مرینوس در ژن *GDF-9* *با روش PCR-RFLP جهشی پیدا نکردند*. در گوسفند لری بختیاری ایران نیز هیچ آلل جهش یافته ای یافت نشد و همه یک شکل بودند (Amiri *et al*., 2007). جهش ها در 5 ناحیه از اگزون 2 ژن *BMP-15* *با* باروری در چند نژاد گوسفند همبستگی نشان داده اند (Montgomery *et al*., 2001). جهش ها در ژن های باروری *BMP-15* و *GDF-9* نقش اقتصادی مهمی در گوسفند و احتمالا" در تولید مثل نشخوارکنندگان دارند (Galloway *et al*., 2000; Hanrahan *et al*., 2004; McNatty *et al*., 2005). عمل یک ژن اصلی منفرد مسوول نرخ تخمک ریزی زیاد در گوسفند مرینوس برولا، Inverdale، Belclare و کمبریج است، اما دلیلی بر وجود یک ژن اصلی مسئول چند قلوزایی در گوسفندان بارور دیگر، از جمله Finish Landrace و Romanov وجود ندارد (Gordon, 2004) این یافته ها نشان می دهد که حداقل دو مکانیسم کنترل ژنتیکی در باروری بالای گوسفند نقش دارند. اثر بیولوژیک جهش ها در بین گونه های پستانداران متغییر است (Yan *et al*., 2001). فزون بر آن، Hashimoto *et al*. (2005) پیشنهاد کرده اند که تفاوت های مختص گونه در پردازش *BMP-15* ممکن است با تفاوت های موجود در میزان

باروری در بین گونه ها همبسته باشد. نتایج این پژوهش نشان داد که در جایگاه های $FecX^B$ و $FecX^G$ ژن *BMP-15* در بز سرخ جبال بارز چند شکلی وجود ندارد. پژوهش های بیشتری باید در جایگاه های دیگر ژن *BMP-15* یا ژن های دیگر با استفاده از نمونه های بزرگتر انجام شود.




**شکل 4- الکتروفورز محصولات حاصل از هضم برای ژن BMP-15 توسط آنزیم *Dde*I.**

**Figure 4- Acryl amide gel electrophoresis of PCR products for BMP-15 gene digested by *Dde*I restriction enzyme.**




**شکل 5- الکتروفورز محصولات حاصل از هضم برای ژن BMP-15 توسط آنزیم *Hinf*I.**

**Figure 5- Acryl amide gel electrophoresis of PCR products for BMP-15 gene digested by *Hinf*I restriction enzyme.**

فراوانی های ژنوتیپ وحشی (+/+) برای هر دو جایگاه 1 و برای ژنوتیپ موتانت و هتروزیگوت صفر بود، چون همه حیوانات ژنوتیپ یکسانی داشتند. فراوانی آلل وحشی یک

و آلل موتانت هم برای هر دو جایگاه صفر بود. لازم به ذکر است که یکی از اهداف پژوهش بررسی ارتباط ژنوتیپ ها با چند قلوزایی بود، ولی چون هیچ چند شکلی مشاهده نشد، بنابراین ارتباطی را هم نمی توان بررسی کرد. با توجه به این که ژن BMP-15 بر نرخ باروری و دوقلوزایی نقش دارد، پژوهش های بیشتری باید در جایگاه های دیگر ژن *BMP-15* با استفاده از نمونه های بزرگتر انجام شود تا بتوان با قاطعیت نتیجه گیری نمود و ارتباط آن را با صفات مختلف در این نژاد و نژادهای دیگر بز به دست آورد.

## منابع


Amiri S, Rahimi G, Vatankhah M (2007). No incidence of allelic mutation in Booroola (*FecB*) and Inverdale (*FecXI*) genes in Lori-Bakhtiari sheep breed. The 5th National Biotechnology Congress of Iran. Tehran, Iran. p. 495.

Arefnezhad B (2007). Molecular analysis of *BMP-15* (Bone Morphogenetic Protein-15) gene in Markhoz goats. M.Sc. Thesis, Department of Animal Science, Shiraz University, Shiraz, Iran. p. 133.

Daneshyar P (2003). Polymorphism determination of 9 microsatellite markers in Balouchi sheep breed of Abasabad station of Mashhad. MSc Thesis of Animal science. Zabol University.

Deldar-Tajangookeh H, Zare Shahneh A, Zamiri MJ, Daliri M, Kohram H, Nejati-Javaremi A (2009). Study of *BMP-15* gene polymorphism in Iranian goats. African Journal of Biotechnology 8: 2929-2932

Dong J, Altertini DF, Nishimori K, Rajendra Kumar T, Lu N, Matzuk MM (1996). Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. Nature 383: 531-535.

Dube JL, Wang P, Elvin J, Lyons KM, Celeste AJ, Matzuk MM (1998). The bone morphogenetic protein 15 gene is x-linked and expressed in oocytes. Molecular Endocrinology 12: 1809-1817.

Elvin JA, Clark AT, Wang P, Wolfman NM, Matsuk MM (1999). Paracrine action of growth differentiation factor-9 in mammalian ovary. Molecular Endocrinology 13: 1035-1048.

Eppig JJ (2000). Control of ovarian follicular development and function in mammals. Reproduction 122: 829-838.

Farajzadeh M, Dehnad A, Rahimi G, Amiri A (2007). Genetic polymorphisms in oocyte-derived growth factor (*GDF-9*) gene in Arkha Merino sheep using RFLP-PCR. The 5th National Biotechnology Congress of Iran. Tehran, Iran. p. 503.

Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MPE, Juengel JL, Jokiranta TS, McLaren RJ, Luiro K, Dodds KG, Montgomery GW, Beattie AE, Davis GH, Rit O (2000). Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (*BMP-15*) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. Nature Genetics 25: 279-283.

Ghaffari M, Nejati-Javaremi A, Rahimi G (2007a). Detection of polymorphism in Booroola gene (*FecB*) associated with twining in Shal sheep breed using PCR-RFLP method. The 5th National Biotechnology Congress of Iran. Tehran, Iran. p. 442.

Ghaffari M, Nejati-Javaremi A, Rahimi G (2007b). Detection of polymorphism in oocyte derived growth factor (*GDF-9*) gene associated with twining in Shal sheep breed. The 5th National Biotechnology Congress of Iran. Tehran, Iran. p. 475.

Gordon I (2004). Controlled reproduction in sheep and goats. Wallingford, Oxon, UK, NY., CAB International, p. 407.

Guan F, Liu SR, Shi GQ, Ai JT, Mao DG, Yang LG (2006). Polymorphism of *FecB* gene in nine sheep breeds or strains and its effects on litter size, lamb growth and development. Acta Genetica Sinica 33: 117-124.

Hanrahan JP, Gregan SM, Mulsant P, Mullen M, Davis GH, Powell R, Galloway SM (2004). Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF-9 and BMP-15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). Biology Reproduction 70: 900-909.

Hashimoto O, Moore RK, Shimasaki S (2005). Posttranslational processing of mouse and human BMP-15: potential implication in the determination of ovulation quota. Proceedings of National Academy of Sciences of USA 102: 5426-5431.

He YQ, Chu MX, Wang JY, Fang L, Ye SC (2006). Polymorphism on BMP-15 as a candidate gene for prolificacy in six goat breeds Chinese. Journal of Anhui Agricultural University 33: 61-64.

Hua GH, Chen SL, Ai JT, Yang LG (2007). None of polymorphism of ovine fecundity major genes FecB and FecX was tested in goat. Animal Reproduction Science, doi:10.1016/j.anireprosci.2007.08.013.

Joyce IM, Clark AT, Pendola FL, Eppig JJ (2000). Comparison of recombinant growth differentiation factor-9 and oocyte regulation of KIT ligand messenger ribonucleic acid expression in mouse ovarian follicles. Biology Reproduction 63: 1669-1675.

Juengel JL, Hudson NL, Heath DA, Smith P, Reader KL, Lawrence SB, O'Connell AR, Laitinen MPE, Cranfield M, Groome NP, Ritvos O, McNatty KP (2002). Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. Biology Reproduction 67: 1777-1789.

Li R, Norman RJ, Armstrong DT, Gilchrist RB (2000). Oocyte secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulose cell and cumulus cell. Biology Reproduction 63: 839-845.

McNatty KP, Smith P, Moore LG, Reader K, Lun S, Hanrahan JP, Groome NP, Laitinen M, Ritvos O, Juengel JL (2005). Oocyteexpressed genes affecting ovulation rate. Molecular and Cellular Endocrinology 234: 57-66.

Mohammad Abadi MR, Shahabi A, Noshari AR, Askari N, Dayani N, Khezri A, Sattai Mokhtari M, Soflaei M, Ayatollahi A (2011). Genetic Variation within Jabal Barez Red Goat Population Using Microsatellite Markers. Iranian Jornal of Animal Science (Tehran University) 42: (In press. In Farsi).

Montgomery GW, Galloway SM, George H, Davis GH, McNatty KP (2001). Genes controlling ovulation rate in sheep. Reproduction 121: 843-852.

Msoffe PLM, Mtambo MMA, Minga UM, Juul-Madsen HR, Gwakisa PS (2005). Genetic structure among the local chicken ecotypes of Tanzania based on microsatellite DNA typing. African Journal of biotechnology 4: 768-771.

Nagamine Y, Higuchi M (2001) Genetic distance and classification of domestic animals using genetic markers. Journal of Animal Breeding and Genetic 118: 101-109.

Nejati-Javaremi A, Rahimi G, Amiri A (2007). Detection of polymorphism in *FecXL* gene associated with Twinning in Lori-Bakhtiari sheep breed using PCR-SSCP. The 5th NationalBiotechnology Congress of Iran. Tehran, Iran. p. 520.

Otsuka F, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S (2001). Bone morphogenetic protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression. Journal of Biological Chemistry 276: 11387-11392.

Rajaei MA (2005). Study of Genetic diversity for Japan quil population using microsatellite Markers. MSc Thesis of Animal science. Faculty of Agriculture. Tarbiat Modares University.

Silva, JRV, van den Hurk R, van Tol HTA, Roelen BAJ, Figueiredo JR (2004). Experssion of growth differentiation factor 9 (GDF-9) and bone morphogenetic protein 15 (BMP-15) and BMP receptors in the ovaries of goats. Molecular Reproduction Development 70: 11-19.

Sugiura K, Eppig JJ (2005). Control of metabolic cooperativity between oocyte and their companion granulosa cells by mouse oocyte. Reproduction Fertility Development 17: 667-674.

Yan C, Wang P, DeMayo J, DeMayo FJ, Elvin JA, Carino C, Prasad SV, Skinner SS, Dunbar BS, Dube JL, Celeste AJ, Matzuk MM (2001). Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. Molecular Endocrinology 15: 854-866.

## Exon 2 of *BMP15* gene polymorphism in Jabal Barez Red Goat

**Alinaghizadeh H.[1], Mohammad Abadi M.R.[*2], Zakizadeh S.[3]**

[1]MSc Student, Animal Science Department, Islamic Azad University, Kashmar Branch
[2]Associate Professor, Animal Science Department, Shahid Bahonar University of Kerman
[3]Assistant Professor, High Educational Centre of Jahad-e-Keshavarzi Mashahad

**Abstract**

Bone morphogenetic protein 15 (BMP15) is member of the transforming growth factor-beta superfamily that has crucial roles in fecundity of goat and sheep. Previous investigations confirmed that the fecundity mutations of sheep presented in goat. Different mutations in the bone morphogenetic protein-15 (*BMP-15*) gene has increased ovulation rate and infertility in sheep. To illuminate polymorphisms in BMP15 gene, was characterized the coding region of *BMP15*. Two exons (1 and 2) encoded prepropeptide of 394 amino acids in BMP15. Blood sample collected randomly from 100 goats from Red Jabalbarez goat from 10 farms and genomic DNA was isolated using the DNA kit. Two primer pairs were used to amplify genomic DNA of *Bmp15* gene, and the PCR products were separated on agarose gels. The PCR products were electrophoresed and visualized by Ethidim Bromide staining. The results showed that amplication products had good specificity, which could be directly analyzed. Single nucleotide polymorphism of $FecX^B$ and $FecX^G$ loci in *BMP-15* gene were determined using PCR-RFLP technique. In this study, there was no evidence of mutation in $FecX^B$ and $FecX^G$ in these goats, all of which were monomorph for exon 2 of *BMP-15* gene. Further investigation should be directed at other loci of *BMP-15* gene or other genes, using larger sample sizes.

**Key words:** *Jabal Barez Red goat, BMP-15 gene, Polymorphism, PCR-RFLP, Fecundity.*

[*] Corresponding Author: M. R. Mohammad Abadi Tel: 03413202689 Email: mmohammadabadi@yahoo.ca