نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۰۶، بهار ۱۳۹٤
ص‌ص: ۸۳~۹۰

بررسی چندشکلی ژن‌های کاندیداFecB و BMP15 مرتبط با صفت دوقلوزائی در گله گوسفند

- **سیما ساور سفلی** (نویسنده مسئول)

استادیار بخش پژوهش‌های ژنتیک و اصلاح دام موسسه تحقیقات علوم دامی کشور.

- **حمیدرضا سیدآبادی و علی جوانروح علی آباد**

محققین بخش پژوهش‌های بیوتکنولوژی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور.

تاریخ دریافت : مهر۹۲ تاریخ پذیرش : آبان ۹۳

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۲۶۳۴۴۳۰۰۱۰

Email: simasavar@gmail.com

چکیده

تفاوت‌های اساسی بین نژادهای مختلف گوسفند از لحاظ تنوع ژنتیکی در نرخ تخمک‌گذاری وجود دارد. روش ژن کاندیدا و استفاده از نشانگرهای ژنتیکی، روش‌های جدید برای بهبود صفت چندقلوزائی در گوسفند می‌باشند. مطالعه حاضر به منظور بررسی چندشکلی ژن‌های FecB و BMP15 و ارتباط آنها با صفت چندقلوزائی در گوسفندان نژاد مغانی با استفاده از روش PCR- RFLP انجام گرفت. تعداد ۱۵۰ نمونه خون بطور تصادفی از گوسفندان نژاد مغانی موجود در ایستگاه جعفرآباد استان اردبیل جمع آوری و DNA با استفاده از روش نمکی بهینه شده، استخراج گردید. نواحی جهش‌یافته مرتبط با صفت چندقلوزایی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تکثیر و محصولات PCR با استفاده از آنزیم‌های برشی *AvaII, SpeI, HinfI* هضم شدند. در این تحقیق، هیچ‌یک از جایگاه‌های مورد مطالعه چندشکل نبوده و تمام نمونه‌ها دارای فرم آلل وحشی بودند. از آنجایی که میزان دوقلوزایی نسبتاً بالا(حدود ۲۳ درصد) برای این نژاد گزارش شده، نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که جایگاه‌های مورد مطالعه در این تحقیق با صفت چند قلوزایی مرتبط نبوده و احتمالا برای صفت دوقلوزایی در نژاد مغانی ژن‌های دیگری نقش دارند.

واژه‌های کلیدی: چند قلوزائی ، FecB، BMP15، ژن کاندیدا، گوسفند مغانی.

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 106 pp: 83-90

Detection of polymorphism in FecB and BMP15 candidate genes associated with litter size in Moghani flock

Sima Savar Sofla*[1], Hamidreza Seyedabadi[2], Ali Javanrouh Aliabad[2]
1:Assistant Professor Researcher in Animal Breeding and Genetics department- Animal Science Research Institute, Email: simasavar@gmail.com,Tel:+982634430010
2: Researcher in Biotechnology department- Animal Science Research Institute

Received: October 2013 **Accepted: November 2014**

Genetic variation in ovulation rate in sheep has been widely documented and the evidence shows substantial differences among world sheep breeds. Candidate gene approach and DNA marker strategy are new tools to improve twining or multiple lambing rate traits in sheep population .The present study was carried out to detect of polymorphism in FecB and BMP15 genes and the effect on litter size trait in Moghani sheep breed using RFLP-PCR method. Blood samples were collected randomly from 150 individuals at Moghani Breeding Station of Ardebil province, Iran. DNA of blood samples was extracted by modifying salting out method. Site of mutation was amplified using specific primers and PCR products were determined by agarose gel electrophoresis, and then the PCR product was digested with *AvaII*, *SpeI* and *HinfI* restriction enzymes for FecB, $FecX^H$ and $FecX^G$ loci , respectively. The results did not show any polymorphism for FecB and BMP15 genes. All the samples were showed wild type alleles so mutation of FecB and BMP15 genes were not cause of prolificacy in Moghani sheep. Considering the phenotypes records in this breed, the obtained result indicates that the genetic factor responsible for twining or multiple lambing rate is not related to reported mutated alleles at prolificacy major genes and therefore other prolificacy related genes should be investigated in Moghani sheep.

Key words: Litter size, Fec B, BMP15, Candidate Gene, Moghani Sheep.

مقدمه

با توجه به اهمیت اقتصادی صفت چندقلوزایی در گوسفند، بررسی ژن‌های کاندیدای موثر بر این صفت حائز اهمیت است. به طور کلی در گوسفندان با چند قلوزایی متوسط تا زیاد، وراثت پذیری نرخ تخمک‌ریزی زیادتر از تعداد نتاج در زایش برآورد می‌شود(Malher و Chere ، ۱۹۹۸). به عبارت دیگر، نرخ تخمک‌ریزی معیار مناسب‌تری نسبت به چندقلوزایی برای مشخص کردن ژن‌های عمده است. تحقیقات مختلف نشان داد که چند قلوزایی مشاهده شده در نژاد بورولامرینو به دلیل جهش در ژن گیرنده پروتئین مورفوژنیک استخوان[1] است(Mulsant و همکاران،۲۰۰۱؛ Souza و همکاران، ۲۰۰۱ و Wilson و همکاران،۲۰۰۱). پس از آن وجود جهش در ژن‌های دیگری نظیرBMP15 نیز عامل ایجاد چندقلوزایی در نژاد اینوردیل گزارش شد(Galloway و همکاران، ۲۰۰۲). ژن BMP15 روی کروموزوم جنسی X قرار داشته و پنج آلل مختلف این ژن شامل $FecX^B$ ، $FecX^G$ ، $FecX^H$ ، $FecX^L$ و $FecX^I$ می‌باشند که همگی اثر فنوتیپی یکسانی دارند. عمده‌ترین تأثیرات فیزیولوژیکی لوکوسFecB بر نرخ تخمک‌ریزی، اندازه و تعداد فولیکول‌های تخمک‌ریز در تخمدان‌ها است(Davis و همکاران،۲۰۰۲). در حیوانات با هموزیگوت BB و هتروزیگوت B+ در مقایسه با تیپ وحشی ++ ، فولیکول‌ها در اندازه کوچک‌تر بالغ شده و تخمک‌ریزی می‌کنند(McNatty ، ۲۰۰۵). ژن بورولا (FecB) یک ژن اتوزوم غالب بوده و اثر افزایشی روی میزان تخمک‌ریزی دارد(Piper ، ۱۹۸۵). در سال‌های اخیر با توسعه تکنیک‌های ملکولی، امکان نقشه‌یابی ژن‌های موثر بر صفات اقتصادی فراهم شده و با کمک این روش‌ها می‌توان QTL[2]های موثر بر صفت یا صفات را مشخص و پیشرفت ژنتیکی را سرعت بخشید. Chu و همکاران (۲۰۰۷)، جهش‌های موجود در ژن های FecB و BMP15 و ارتباط آنها

[1]- Bone morphogenetic protein receptor type-1B(BMPR1B)
[2]-Ouantitative Trait Loci

را با صفت دوقلوزایی در گوسفندان چینی مورد مطالعه قرار دادند. نتایج حاصل از تحقیق آنها نشان داد که نرخ بره‌زایی گوسفندان با ژنوتیپ $FecB^{B}$- $FecB^{B}$ و $FecB^{B}$- $FecB^{+}$ به ترتیب ۱/۴ و ۱/۱۱ برابر بیشتر از گوسفندان با ژنوتیپ $FecB^{+}$- $FecB^{+}$ و گوسفندان با ژنوتیپ $FecX^{G}$- $FecX^{+}$، ۰/۵۵ بیشتر از گوسفندان با ژنوتیپ $FecX^{+}$- $FecX^{+}$ می‌باشد. Zare و همکاران (۲۰۰۷)، چند شکلی ژن BMP15 و ارتباط آن با دوقلوزایی و افزایش نرخ تخمک‌گذاری در گوسفند شال را مورد بررسی قرار دادند و هیچ جهشی در ژن مورد مطالعه مشاهده نکردند. Ghaffari و همکاران (۲۰۰۹)، تاثیر ژن GDF9 و FecB را روی گوسفند شال با استفاده از روش PCR-RFLP بررسی نموده و نشان دادند که هیچ جهشی در این ژن ها وجود ندارد. Gursel و همکاران (۲۰۱۱)، جهش‌های موجود در ژن-های BMP15،BMPR-1B و GDF9 را در گوسفندان ترکیه ای با استفاده از روش PCR-RFLP مورد بررسی قرار دادند و هیچ جهشی در ژن‌های مورد مطالعه مشاهده نکردند. Borni و همکاران (۲۰۱۱)، جهش‌های موجود در ژن BMP15 ($FecX^{H}$ و $FecX^{I}$) و ارتباط آنها را با صفت دوقلوزایی در گوسفندان نژاد تونسی مورد مطالعه قرار دادند و هیچ چند شکلی گزارش نکردند. Mulsant و همکاران (۲۰۰۱)، برای اولین بار با استفاده از یک جفت آغازگر، موفق به تکثیر ژن BMPR-1B در میش‌های بورولا مرینو شدند. آن ها در تحقیق خود، یک جهش تک نوکلئوتیدی در موقعیت باز ۷۴۶ این ژن را شناسائی و سه ژنوتیپ ++، +B و BB را برای این ژن در این جمعیت گزارش نمودند. Galloway و همکاران (۲۰۰۲)، برای اولین بار با استفاده از یک جفت آغازگر، تکثیر ژن BMP15 در میش‌های مرینوبورولا را انجام دادند. آن‌ها در تحقیق خود، یک جهش تک نوکلئوتیدی در موقعیت باز ۸۷۱ این ژن را شناسائی و سه ژنوتیپ AB،AA و BB را برای این ژن در این جمعیت گزارش نمودند. با توجه به فرض وجود ارتباط ژن‌های FecB وBMP15 با صفت دوقلوزائی و از آنجا که طبق تحقیقات انجام شده میزان دوقلوزایی در این نژاد نسبتاً بالا(در حدود ۲۳٪) می باشد، تحقیق حاضر به منظور تعیین چندشکلی ژن‌های FecB و BMP15 به عنوان ژن-های کاندیدا در گوسفند نژاد مغانی و بررسی ارتباط بین چندشکلی این ژن‌ها با ارزش‌های اصلاحی صفت دوقلوزائی انجام شد.

مواد و روش ها

به منظور تهیه نمونه، از تعداد ۱۵۰ رأس از گوسفندان نژاد مغانی موجود در ایستگاه جعفرآباد استان اردبیل به صورت تصادفی خونگیری انجام شد و به آزمایشگاه بیوتکنولوژی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور منتقل گردید. جهت استخراج DNA از نمونه‌های خون کامل، از روش بهینه شده Javanrouh و همکاران (۲۰۰۶) استفاده شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری نانودراپ تعیین شد. بر اساس اطلاعات ژنومی از توالی ژن‌های BMP15 و FecB، پرایمرهای مورد نظر انتخاب و صحت اتصال پرایمرهای انتخاب شده از طریق نرم افزار Oligo Version 5 مورد بررسی قرار گرفت. سپس تمامی آغازگرها از شرکت Metabion آلمان به صورت لیوفیلیزه تهیه گردید و طبق دستورالعمل شرکت سازنده جهت بدست آوردن غلظت ۱۰۰pmol/ul از هر آغازگر در مقدار مشخصی آب دیونیزه حل شده و در حد ۲/۵ میکرومولار رقیق گردید و در۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. حجم مخلوط مورد استفاده در PCR، ۱۵ µl بود که شامل: بافر PCR ۱X؛ ۲mM MgCl2 ؛ DNA الگو ۵۰ ng/reaction؛ µM ۲۰۰ dNTPs ؛ هر یک از آغازگرها ۰/۲۵ µM؛ آنزیم تک پلیمراز ۰/۶ unit/reaction؛ dd H2O متغیر بود. در جدول ۱، اطلاعات مربوط به توالی آغازگرهای به کار رفته و طول قطعه تکثیری هر ژن آورده شده است. برنامه حرارتی مناسب برای آغازگرها به صورت واسرشته سازی اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه، واسرشت ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، بسط ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، بسط نهایی ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۸ دقیقه در حالی که برای اتصال آغازگر قطعه-ای از ژن BMPR-1B، ۶۰ درجه سلسیوس؛ برای جایگاه $FecX^{H}$ از ژن BMP15 ، ۵۵ درجه سلسیوس و جایگاه

$FecX^G$ از ژن BMP15 ، ۶۳ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه در نظر گرفته شد. در جدول ۲، اطلاعات مربوط به نوع آنزیم برشی و سایت مربوط به هر ژن آورده شده است. برای هر واکنش هضم آنزیمی، ۶ واحد آنزیم(*AvaII* ، *SpeI* و *HinfI*) غلظت یک برابر (۱X) بافر Tango به غلظت mg/ml ۰/۱ به همراه ۶ میکرولیتر محصول PCR در حجم واکنش ۱۰ میکرولیتر استفاده شد. پس از هضم آنزیمی محصولات PCR، الکتروفورز نمونه ها با استفاده از ژل آگارز ۳ درصد انجام و پس از رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید و عکسبرداری از آن، ژنوتیپ هر فرد مشخص و فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی محاسبه شد. تعداد آلل واقعی و تعداد آلل موثر از روی تعداد ژنوتیپ‌های بدست آمده با استفاده از نرم افزار PopGene Version 1.31 محاسبه شد (Yeh و همکاران، ۱۹۹۹).

جدول ۱- اطلاعات مربوط به توالی آغازگر، طول قطعه تکثیری و شرایط دمایی هر ژن

طول قطعه تکثیری	توالی آغازگر	ژن
۱۹۰ جفت باز	F: 5' CCAGAGGACAATAGCAAAGCAAA 3' R: 5'CAAGATGTTTTCATGCCTCATCAACAGGTC 3'	BMPR-1B
۲۱۸ جفت باز	F: 5' TATTTCAATGACACTCAGAG 3' R: 5' GAGCAATGATCCAGTGATCCCA 3'	جایگاه $FecX^H$ از ژن BMP15
۱۴۱ جفت باز	F: 5' CACTGTCTTCTTGTTACTGTATTTCAATGAGAC 3' R: 5' GATGCAATACTGCCTGCTTG 3'	جایگاه $FecX^G$ از ژن BMP15

جدول۲- نوع آنزیم برشی، سایت برش و شرایط هضم آنزیمی مربوط به هر ژن

سایت برش	آنزیم برشی	ژن
5'…G↓G W CC…3' 3'…CC W G↑G…5'	*AvaII*	BMPR-1B
5'…A↓C TA GT…3' 3'…TG AT C↑A…5'	*SpeI*	جایگاه $FecX^H$ از ژن BMP15
5'… G↓ANTC …3' 3'… CTNA↑G…5'	*HinfI*	اگزون۱ ژن BMP15

نتایج و بحث

جهش متناوب A→G در موقعیت باز ۷۴۶ از اگزون ۶ ژن BMPR-1B، یک جایگاه برش برای آنزیم *AvaII* ایجاد می‌کند. توالی همجوار موقعیت ۷۴۶ به صورت tatatc/ggacggt می‌باشد که وجود باز گوانین (G) در توالی نوکلئوتیدی، امکان برش را برای آنزیم فراهم کرده و وجود باز آدنین (A) مانع از هضم قطعه تکثیر شده توسط آنزیم می‌شود. بنابراین، هضم محصول ۱۹۰ جفت باز تکثیر شده با آنزیم *AvaII* باعث ایجاد یک قطعه برش نیافته (۱۹۰ جفت باز) برای ژنوتیپ ++، دو قطعه برش خورده ۱۶۰ و ۳۰ جفت باز برای ژنوتیپ هتروزیگوت +B و یک قطعه ۱۶۰جفت باز برای ژنوتیپ هموزیگوت BB می‌شود. در این مطالعه هیچ فردی با ژنوتیپ BB و +B مشاهده نشد. این نتایج با نتایج آزمایشات انجام شده در نژادهای سافوک، توکا، لاکان، دورست، بلوچی و شال مطابقت دارد(Javanmard و همکاران ۲۰۱۱، Mulsant و همکاران ۲۰۰۱، Zare و همکاران ۲۰۰۷، Ghaffari و همکاران ۲۰۰۹) ولی با نتایج به دست آمده از نژادهای هوهان و گارول متفاوت می‌باشد. فراوانی ژنی و ژنوتیپی برای جایگاه مورد نظر در جدول ۳ آورده شده است.

جدول ۳- فراوانی های ژنی و ژنوتیپی برای ژن BMPR-1B

	ژنوتیپ			آلل	
	++	*B+*	*BB*	+	*B*
تعداد	۱۵۰	۰	۰	۱۵۰	۰
فراوانی	۱	۰	۰	۱	۰

Chu و همکاران (۲۰۰۷)، فراوانی آلل + را در ژن BMPR-1B در جمعیت میش‌های دنبه کوچک هان ۰/۲۷ و فراوانی آلل B را ۰/۷۳ گزارش نمودند که با نتایج حاصل از این تحقیق متفاوت بود در حالی که Hua Hua و همکاران (۲۰۰۸)، با مطالعه در جمعیت بزهای چینی، فراوانی هر یک از آلل‌های A و FecX+ را یک گزارش کردند و این نتایج با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی داشت. جهش متناوب C→T در موقعیت باز ۸۷۱ ژن *BMP15* یک جایگاه برش برای آنزیم *SpeI* ایجاد می‌کند. وجود باز سیتوزین (T) در توالی نوکلئوتیدی، امکان برش را برای آنزیم فراهم کرده و وجود باز آدنین (C) مانع از هضم قطعه تکثیر شده توسط آنزیم می‌شود. بنابراین، هضم محصول ۲۴۰ جفت باز تکثیر شده با آنزیم *SpeI* باعث ایجاد یک قطعه برش نیافته (۲۴۰ جفت باز) برای ژنوتیپAA، دو قطعه برش خورده ۲۱۸ و ۲۲ جفت باز برای ژنوتیپ هموزیگوت BB و سه قطعه ۲۴۰، ۲۱۸ و ۲۲ جفت باز را برای ژنوتیپ هتروزیگوت AB می‌شود. در این مطالعه هیچ فردی با ژنوتیپ AB و BB مشاهده نشد. فراوانی ژنی و ژنوتیپی برای جایگاه مورد نظر در جدول ۴ آورده شده است. در جمعیت مورد مطالعه، فراوانی آلل A برابر ۱ بود و هیچ فردی با آلل B مشاهده نشد. Kumar و همکاران (۲۰۰۶)، با بررسی نتاج حاصل از تلاقی دو نژاد گوسفند گارول و مالپورا جهت شناسایی چند شکلی ژن FecB، ۶۴ رأس از گوسفندان گارول را تعیین ژنوتیپ کردند که ۵۵ رأس آنها هموزیگوت ($FecB^B$/ $FecB^B$) و ۸ رأس هتروزیگوت ($FecB^+$/ $FecB^B$) و یک رأس ($FecB^+$/ $FecB^+$) بودند. این نتایج نشان می‌دهد که ۹۸ درصد گوسفندان گارول حامل آلل FecB بودند. از ۵۳ رأس گوسفندان آمیخته، ۳۶ رأس هتروزیگوت، ۱۴ رأس غیرحامل و ۳ رأس هموزیگوت بودند. چند شکلی ژن FecB توسط Guan و همکاران(۲۰۰۶)، در ۹ نژاد مطالعه شد. تمام

گوسفندان هو هموزیگوت BB بودند. در گوسفندان مرینوس چینی فراوانی ژنوتیپ های BB،B+ و ++ به ترتیب ۵۱، ۳۰ و ۱۹ درصد بدست آمد. در حالی‌که نژادهای دیگر دارای ژنوتیپ (++) بودند. درگوسفندانی که دارای یک کپی از ژن BMP15 می‌باشند، میزان تخمک‌ریزی افزایش پیدا می‌کند درصورتی که گوسفندان هموزیگوت عقیم بوده و این امر به دلیل ناهنجاری در توسعه فولیکولی تخمدان گزارش شده است. در هیچ کدام از گوسفندان مغانی، عدم باروری مشاهده نشد. از آنجایی که ژنوتیپ‌های مشاهده شده در این نژاد تنها به فرم هموزیگوت بودند؛ بنابراین فرضیه عقیم بودن حیوانات هموزیگوت حامل ژن BMP15در گوسفند نژاد مغانی منتفی به نظر می‌رسد. نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج Zare و همکاران (۲۰۰۷)، مطابقت داشت.

جدول ٤- فراوانی های ژنی و ژنوتیپی برای جایگاه $FecX^H$

	ژنوتیپ			آلل	
	AA	*AB*	*BB*	*A*	*B*
تعداد	۱۵۰	۰	۰	۱۵۰	۰
فراوانی	۱	۰	۰	۱	۰

جهش متناوب C→T در موقعیت باز ۷۱۸ ژن *BMP15* یک جایگاه برش برای آنزیم *Hinf I* ایجاد می‌کند. وجود باز سیتوزین (C) در توالی نوکلئوتیدی، امکان برش را برای آنزیم فراهم کرده و وجود باز تیمین (T) مانع از هضم قطعه تکثیر شده توسط آنزیم می‌شود. بنابراین هضم محصول ۱۴۱ جفت باز تکثیر شده با آنزیم *Hinf I* باعث ایجاد یک قطعه برش نیافته (۱۴۱جفت باز) برای ژنوتیپ $FecX^{GG}$ ، دو قطعه برش خورده ۱۱۱ و ۳۰ جفت باز برای ژنوتیپ هموزیگوت $FecX^{++}$ و سه قطعه ۱۴۱ ، ۱۱۱ و ۳۰ جفت باز برای ژنوتیپ هتروزیگوت $FecX^{G+}$ می‌شود. در این مطالعه هیچ فردی با ژنوتیپ $FecX^{G+}$ و $FecX^{GG}$ مشاهده نشد. فراوانی ژنی و ژنوتیپی محاسبه شده برای جایگاه مورد نظر در جدول ۵ نشان داده شده است. در جمعیت مورد مطالعه، فراوانی آلل $FecX^{+}$ برابر یک بود و هیچ فردی با آلل $FecX^{G}$ مشاهده نشد. این نتایج با تحقیقات انجام شده بر روی گوسفندان بومی ایران مطابقت داشت(Jamshidi و همکاران،۲۰۰۹ و Zare و همکاران، ۲۰۰۷). نتایج آنها نشان داد که این جهش ها در حالت هتروزیگوت با افزایش نرخ تخمک ریزی همراه هستند و در حالت هموزیگوت درهر دو نژاد فنوتیپ عقیمی نشان می دهند.

جدول ٥- فراوانی‌های ژنی و ژنوتیپی برای جایگاه $FecX^G$

	ژنوتیپ			آلل	
	$FecX^{++}$	$FecX^{G+}$	$FecX^{GG}$	$FecX^{+}$	$FecX^{G}$
تعداد	۱۵۰	۰	۰	۱۵۰	۰
فراوانی	۱	۰	۰	۱	۰

اگرچه در این تحقیق چند شکلی‌های آللی برای جایگاه‌های $FecX^G$، $FecX^H$ و ژن BMPR-1B در نژاد مغانی مشاهده نگردید، ولی با توجه به ثبت رکوردهای فنوتیپی دو یا چند قلوزائی در این نژاد که در بین نژادهای موجود در ایران از درصد دوقلوزایی خوبی برخوردار است؛ می توان چنین نتیجه‌گیری نمود که عامل ژنتیکی مسئول دو یا چند قلوزایی در این نژاد مرتبط با جهش‌های گزارش شده در ژن‌های بزرگ اثرBMP15 و FecB نبوده و باید به جستجوی ژن‌های بزرگ اثر دیگر و یا سایر ژن‌های موثر بر این صفت بود که می‌توان با مطالعه دقیق و مناسب و همچنین انتخاب خانواده‌هایی که دوقلوزایی بالایی دارند این ژن‌ها را شناسایی کرد.

منابع

Borni, J ., Bedhiaf, S and Djemali, M., 2011. Study for identification FecXI and FecXH mutations inTunisian Barbarine sheep. roavs, 1(2),pp: 112-115.

Chu, M. X., C. L. Jiao, Y. Q. He, J. Y. Wang, Z. H. Liu and G. H. Chen. 2007. Association between PCR-SSCP of bone morphogenetic protein 15 gene and prolificacy in Jining Grey goats. Anim. Biotechnol. 18, pp:263-274.

Davis, G. H., Susan, M. G., Ross, I. K., Gregan, S. M., Ward, J., Nimbkar, B. v., Ghalsasi, P.M., Nimbkar, C., Gray, G. D., Subandriyo, Inounu, I., Tiesnamurti, B., Martyniuk, E., Eythorsdottir, E., Mulsant, P., Lecerf, E, Hanrahan, J. P., Bradford, G. E., and T. Wilson. 2002. DNA test in prolific sheep from eight countries provide new evidence on origin of the Booroola (FecB) mutation. J. Biology of Reproduction. 66, pp:1869-74.

Galloway, S.M., Gregan, S.M., Wilson, T., McNatty, K.P., Jungel, J.L., Ritvos, O., Daivis, G.H. 2002. BMP15 mutations and ovarian function. Molecular Cell Endocrinology. 191:15-18.

Ghaffari , M., Nejati, A., Rahimi, G. 2009.Detection of Polymorphism in BMPR-IB Gene Associated with Twining in Shal Sheep using PCR-RFLP Method. Int. J. Agric. Biol., 11, pp: 97–99

Gursel , F.E., Akis, I., Durak, H., Mengi, A. 2011. Determination of BMP-15, BMPR1B and GDF-9 Gene Mutations of the Indigenous Sheep Breeds in Turkey. Kafkas univ vet fak derg. 17(5). pp:725-729.

Guan, F., Liu, S., Shi, G.Q., Ai, J.T., Mao, D.G and Yang, L.G. 2006. Polymorphism of FecB gene in nine sheep breeds or strains and its effects on litter size, lamb growth and development. Yi Chuan Xue Bao. 33(2). pp:117-24.

Hua Hua, G., Chen, S.L., Ai , J.T. 2008. None of polymorphism of ovine fecundity major genes FecB and FecX was tested in goat. Animal Reproduction Science. 108, pp: 279–286.

Jamshidi, R., Kasiryan, M.M., Hafezeyan, H. 2009. Application of PCR-RFLP technique to determine BMP15 gene polymorphism in Sangsari sheep bred of Iran.Journal of Animal and Veterinary Advances. 8(10), pp: 1906-1910.

Javanmard, A., Azadzadeh, N., Esmailizadeh, A.K. 2011. Mutations in bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 genes are associated with increased litter size in fat-tailed sheep breeds. Vet Res Commun. 35(3), pp:157-67.

Javanrouh, A., Banabais, M.H., Esmaeilkhanian, S., Amirinia, C., Seyedabadi, H.R.,& Emrani, H. 2006. Optimization onsalting out method for DNA extraction from animal and poultry blood cells. The 57th Annual Meeting of the European Association for Animal Production. Antalya, Turkey.

Kumar, S., Kolte, A.P., Mishra, A.K., Arora, A.L., Singh, V.K. 2006. Identification of the FecB mutation in Garole × Malpura sheep and its effect on litter size. Small Rumin. Res. 64, pp: 305–310.

Malher, X., Chere, A.K.1998. High prolificacy in Belle-Ile sheep (Brittany, France): major effects of a putative single gene and the A wh colour gene on ovulation rate and litter size, Reprod. Nut. Dev. 38, pp:473–484.

McNatty, K.P., Juengel, J.L., Reader, K.L., Lun, S., Myllymaa, S., Lawrence, S.B. 2005. Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 cooperate to regulate granulosa cell function in ruminants. Reproduction. 129, pp:481–487.

Mulsant, P., Lecerf, F., Fabre, S., Schibler, L., Monget, P., Lanneluc, I., Pisselet, C., Riquet, J., Monniaux, D., Callebaut, I., Cribiu, E., Thimonier, J., Teyssier, J., Bodin, L., Cognie, Y., Elsen, J.M. 2001.Mutation in bone morphogenetic protein receptor-1B is associated with increased ovulation rate in Booroola Merino ewes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98,pp: 5104–5109.

Piper, L,R., Bindon, B.M and Davis, G.H. 1985. The single gene inheritance of the high litter size of the Booroola Merino. In Genetics of Reproduction in Sheep, pp :115–125.

Souza, C. J. H., MacDougall, c., Cambell, B. K., McNeilly, A. S., and Baird, D. T. 2001. The Booroola (FecBOphenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type B (BMPR)B) gene. J. Endocri. 69, pp:RI-R6.

Wilson, T., Xiyang W., Juengel, J. L., Ross, I. K., Lumsden, J. M., Lord, E. A., Dodds, K. G., walling, G. A., McEwan, J. C., O'Connell, A. R., McNatty, K. P.,and Montgomery, G. W. 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. J. BioI. of Repro. 64, pp:1225-35.

Yeh, F.C., Yang, R., Boyle T. 1999. POPGENE. Version 1.31. Microsoft Window–based Freeware for Population Genetic Analysis, University of Alberta. Edmonton, AB, Canada.

Zare, Y., Nejati-Javaremi , A., Rahimi, G. 2007. Detection of polymorphisms in two point of gene associated with Twinning (BMP15) in Shal sheep. The 5 th National Biotechnology Congress of Iran. Tehran, Iran. 483.