

Tissue-specific mRNA expression profile of *BMP15* gene in goat

Mohammadreza Mohammadabadi 

Professor of Animal Science Department, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. Email: mrm@uk.ac.ir

Mohammad Soflaei 

Assistant Professor, Kerman Agriculture and Natural Resources and Education Center, AREEO, Kerman, Iran. Email: soflaei_m@yahoo.com

Abstract

Objective

Three fecundity genes have been identified, namely bone morphogenetic protein receptor type 1B (BMPR1B; or activin-like kinase 6, ALK6) known as FecB on chromosome 6, growth differentiation factor 9 (GDF9) known as FecG on chromosome 5, and bone morphogenetic protein 15 (BMP15) known as FecX on chromosome X. Bone morphogenetic protein (BMP) genes are members of the transforming growth factor-beta (TGF- β) super-family which are multifunctional cytokines with a 2-fold function and are expressed in a variety of cells. BMPs were originally identified based on their ability to produce ectopic bone formation when implanted within the soft tissue *in vivo*. They also play roles in embryonic development, homeostasis, repairing of various tissue patterning, cell differentiation, and apoptosis. The BMP15 gene regulates granulosa cell proliferation and differentiation by promoting granulosa cell mitosis, suppressing follicle-stimulating hormone receptor expression, and stimulating the kit ligand expression; hence, this gene plays a pivotal role in female fertility in mammals. The aim of this study was to investigate tissue-specific mRNA expression profile of *BMP15* gene in Raini cashmere goat using Real Time PCR.

Materials and Methods

Tissue samples (3 repetitions of each tissue) were taken from ovary, uterus, uterine horn, oviduct, skeletal muscle, subcutaneous fat, heart, liver, lung, kidney, spleen and adrenal during slaughter at the slaughterhouse from two goats. RNA extraction from tissues and

cDNA synthesis were performed. Relative gene expression of BMP15 was done applying Real Time PCR using SYBR Green method. GAPDH gene was used as housekeeping gene. Pfaffl method was used to analyze achieved data.

Results

BMP15 gene expression in ovary, uterus, uterine horn, oviduct, skeletal muscle, subcutaneous fat, heart, liver, lung, kidney, spleen and adrenal tissues using Real Time PCR in studied goats demonstrated that BMP15 gene is expressed only in the ovary tissue and is not expressed in other studied tissues.

Conclusions

Based on the results of the present study and the results of other researchers, it can be concluded that BMP15 gene plays an important role in ovary and as a result in fertility, because in the present study it was found that BMP15 is expressed only in ovary tissue. Therefore, BMP15 is likely to be essential for female fertility, and the results of this study provide a basis for future research to describe the role of BMP15 gene as a candidate gene for better fertility and normal physiology in domestic animals, especially goats.

Keywords: BMP15 gene, gene expression, Raini cashmere goat, tissue

Citation: Mohammadabadi MR, Soflaei M (2020) Tissue-specific mRNA expression profile of BMP15 gene in goat. *Agricultural Biotechnology Journal* 12 (3), 191-208.

Agricultural Biotechnology Journal 12 (3), 191-208.

DOI: 10.22103/jab.2020.16687.1274

Received: September 11, 2020; Accepted: October 21, 2020

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

پرو فایل بیانی mRNA مختص بافت ژن BMP15 در بز

محمد رضا محمدآبادی

استاد بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران. تلفن: ۰۹۱۳۳۹۸۷۵۳۴، ایمیل:

mrm@uk.ac.ir

محمد سفلائی

استادیار مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی کرمان،

ایران. تلفن: ۰۹۱۳۳۴۳۱۹۸۱، ایمیل: soflaei_m@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۶/۲۱، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۳۰

چکیده

هدف: سه ژن باروری BMPR1B (یا ALK6 معروف به FecB روی کروموزوم ۶)، GDF9 (معروف به FecG روی کروموزوم ۵) و BMP15 (معروف به FecX روی کروموزوم X) شناسایی شده است. ژن های پروتئین مورفوژنتیک استخوان (BMP) اعضای فوق خانواده فاکتور رشد تبدیل کننده بتا ($TGF-\beta$) هستند که سیتوکین های چند منظوره با عملکرد ۲ برابر هستند و در انواع سلول ها بیان می شوند. BMP ها در اصل بر اساس توانایی آنها در تولید استخوان در جای غیر معمول هنگام کاشت در داخل بافت نرم در داخل بدن شناسایی می شوند. آنها همچنین در رشد و توسعه جنین، هموستازی، ترمیم الگوسازی بافت های مختلف، تمایز سلولی و آپوپتوز نقش دارند. ژن BMP15 با افزایش میتوز در سلول گرانولوزا، سرکوب بیان گیرنده هورمون محرک فولیکول و تحریک بیان لیگاند کیت، تکثیر و تمایز سلول گرانولوز را تنظیم می کند. از این رو، این ژن نقش اساسی در باروری پستانداران ماده دارد. هدف این مطالعه پرو فایل بیانی mRNA مختص بافت ژن BMP15 در بز کرکی را اینی با استفاده از Real Time PCR بود.

مواد و روش ها: نمونه های بافتی (از هر بافت ۳ تکرار) از تخمدان، رحم، شاخ رحم، اویداکت، ماهیچه اسکلتی، چربی زیرپوستی، قلب، جگر، شش، کلیه، طحال و غده فوق کلیه در هنگام کشتار در کشتارگاه از دو راس بز تهیه شد. استخراج RNA کل و سنتز cDNA انجام شد. میزان نسبی بیان ژن BMP15 با استفاده از واکنش Real Time PCR به روش SYBR Green به

دست آمد. ژن GAPDH به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از Real Time PCR از روش پی‌فافل استفاده شد.

نتایج: بیان ژن BMP15 در بافت‌های تخمدان، رحم، شاخ رحم، اویداکت، ماهیچه اسکلتی، چربی زیرپوستی، قلب، جگر، شش، کلیه، طحال و غده فوق کلیه بز کرکی راینی با استفاده از روش PCR در زمان واقعی نشان داد که این ژن فقط در تخمدان بیان می‌شود و در بافت‌های مطالعه شده دیگر بیان نمی‌شود.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج پژوهش حاضر و نتایج سایر محققین می‌توان نتیجه گرفت که ژن BMP15 نقش مهمی در تخمدان و در نتیجه در باروری دارد، چرا که در پژوهش حاضر مشخص شد که ژن BMP15 فقط در بافت تخمدان بیان می‌شود. لذا، ژن BMP15 به احتمال زیاد برای باروری ماده‌ها بسیار ضروری است و نتایج این پژوهش اساسی را برای پژوهش‌های آینده جهت توصیف نقش ژن BMP15 به عنوان یک ژن کاندیدا برای باروری بهتر و فیزیولوژی طبیعی در حیوانات اهلی، به ویژه بز فراهم کرده است.

کلمات کلیدی: بافت، بز کرکی راینی، بیان ژن، ژن BMP15

مقدمه

تاکنون سه ژن مرتبط با باروری شناسایی شده که عبارتند از: BMP1-B (یا بورولا^۲ که روی کروموزوم شماره ۶ گوسفند جای دارد و تحت عنوان FecB نام‌گذاری می‌شود، GDF9 که روی کروموزوم شماره ۵ گوسفند قرار دارد و نام دیگر آن FecG و BMP-15^۳ که روی کروموزوم X گوسفند جای دارد و نام دیگر آن FecX است (Toniolo, 2006; Persani et al., 2009; Gilchrist et al., 2008; Alinaghizadeh et al. 2010; Hadizadeh et al. 2014b; Moghadaszadeh et al., 2015a). در نژادهای بلکلار و کمبریج مشخص شده که وجود همزمان جهش در ژن‌های BMP15 و GDF9 برای هر دو جایگاه منجر به عقیمی این میش‌ها نشده، بلکه تاثیر آنها بر یکدیگر افزایشی بوده و منجر به چندقلوایی زیادتر نسبت به حالت جهش منفرد در یک ژن شده است (Hanrahan et al. 2004; Khodabakhshzadeh et al. 2015b) این گزارش تاییدکننده این فرضیه است که مکانیسم فعالیت دو فاکتور BMP15 و GDF9 از یکدیگر مستقل است (Dube et al., 1998; Hanrahan et al. 2004; Hadizadeh et al. 2013; Khodabakhshzadeh et al. 2015b). فولیکولوژنر تخمدان برای باروری ماده‌ها مهم است و توسط یک دیالوگ اندوکرائینی پیچیده بین سیستم عصبی مرکزی، هیپوفیز و تخمدان تنظیم می‌شود (McPherron and Lee, 1993; McGrath et al., 1995; Persani et al. 2014). در این زمینه، پیام‌های پاراکرین

¹ - Bone morphogenetic protein receptor type-1B

² - Booroola (FecB)

³ - Bone Morphogenetic Protein 15

داخل تخمدانی در تعدیل رشد و بلوغ تخمک و فولیکول اساسی هستند و حساسیت کافی به تحریک گنادوتروفین را فراهم می‌کنند (McDonald and Hendrickson, 1993; Alinaghizadeh et al. 2010; Persani et al. 2014). شبکه سیگنال‌های رد و بدل شده بین تخمک و سلول‌های گرانولوزای ۱ محیطی (GC) کاملاً قابل درک نیست، اما در سال‌های اخیر چندین مورد از این سیگنال‌ها کشف شده است. بنابراین، بینش‌های پیش‌بینی نشده قبلی در مورد این فرآیند بیولوژیکی خارق‌العاده را باز می‌کنند. نقطه پایانی فولیکولوژنز تخمدان، ارائه یک گامت ماده شایسته با ترکیب ژنتیکی مناسب است (Otsuka and Shimasaki, 2014; Hadizadeh et al. 2014a; Persani et al. 2014). بنابراین، پیام‌های منشأ شده از سلول تخمک باید محوری و موثر باشد و در واقع تشکیل فولیکول‌های اولیه را تنظیم کند و بلوغ فولیکولی بعدی را کنترل کند. در این زمینه پاراکرینی، اکنون چندین عضو از خانواده تغییر شکل دهنده فاکتور رشد (TGFb) شناخته شده‌اند که نقش اساسی دارند (Persani et al. 2014; Moghadaszadeh et al., 2016). پژوهش‌ها نشان داده که تغییرات در ژن‌های BMP15 و GDF9 با ناهنجاری‌های مختلف فنوتیپی تخمدان در ارتباط است (Persani et al. 2014). بسته به گونه، فنوتیپ‌ها از عقیمی تا افزایش باروری در میش‌ها، کمی ناباروری تا عقیم بودن در موش ماده و نارسایی اولیه تخمدان ۲ (POI) تا سندرم تخمدان پلی کیستیک ۳ (PCOS) در زنان متغیر است (Persani et al. 2014; Khodabakhshzadeh et al. 2015a).

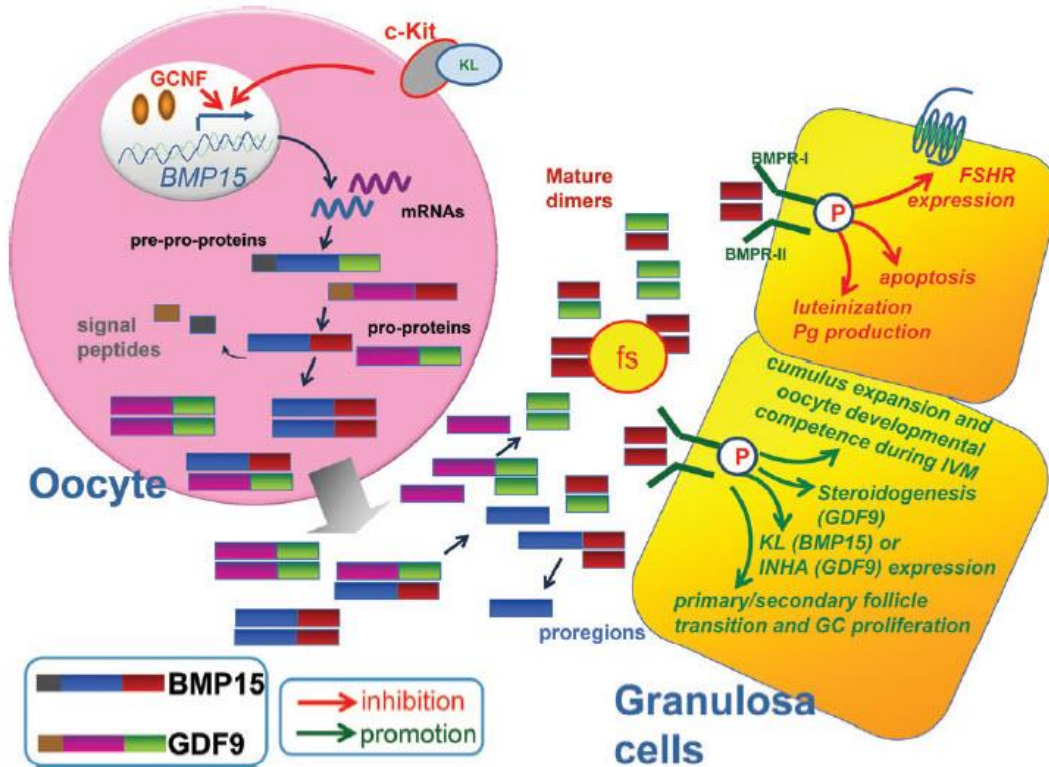
ژن BMP15، همانطور که برای ژن GDF9 مشاهده شده است شامل دو آگزون است و محل اصلی بیان آن در تخمک‌های داخل تخمدان است (Dube et al., 1998). با این حال، cDNA ژن BMP15 که از بیضه کلون شده است بیان آن در هیپوفیز نیز نشان داده شده است (Di Pasquale et al., 2004). تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی اخیر نشان می‌دهد که ژن‌های BMP15 و GDF9 خیلی زود از هم منشعب شده و فاصله گرفته‌اند و در مقایسه با سایر اعضای BMP یک تکامل سریع را نشان می‌دهند (Persani et al. 2014). با این حال، فقط BMP15 تحت فشار انتخاب مثبت قرار گرفته است (Auclair et al., 2013). بیان ژن BMP15 در تخمک‌ها توسط فاکتور هسته‌ای سلول زاینده (معروف به NR6A1) سرکوب می‌شود (Lan et al., 2003). این فاکتور به پروموتور BMP15 و توسط لیگاند کیت (KITLG) از طریق اتصال به گیرنده‌های KIT در غشای تخمک متصل می‌شود (Moore and Shimasaki, 2005) (شکل ۱). بیان BMP15 توسط نوعی لوپ (حلقه) فیدبکی (بازخوردی) بازدارنده که شامل سیگنالینگ Kit Ligand (KITLG) / KIT است و توسط GCNF تنظیم می‌شود. پس از حذف پپتیدهای سیگنال، پرو-پروتئین‌ها همو- یا هترو دایمرهای غیر کووالانسی با محصولات فاکتور تمایز رشد ۹ (GDF9) تشکیل می‌دهند. پس از ترشح در مایع فولیکولی، نواحی اطراف توسط فورین (یا آنزیم‌های فورین مانند) شکافته می‌شوند، در نتیجه لیگاندهای بالغ دایمر آزاد می‌شوند. اثرات BMP15 بر روی سلول‌های هدف می‌تواند بوسیله تشکیل هترو دایمرهای GDF9: BMP15 و پروتئین باند شونده

1- Granulosa cells (GCs)

2 - primary ovarian insufficiency (POI)

3 - polycystic ovary syndrome (PCOS)

فولیستاتین (fs) تعدیل شود. آرایش عملکردهای مثبت یا مهاری BMP15 / GDF9 روی GCها به اتصال گیرنده‌های بالغ همو یا هترو دایمر به گیرنده‌های پروتئینی bonemorphogenetic از نوع غشایی نوع ۱ و نوع ۲ (به ترتیب BMPR1 یا BMPR2) همراه با فسفوریلاسیون پروتئین‌های SMAD در سلول‌های هدف بستگی دارد. بخشی از تنوع در عمل BMP15 / GDF9 ممکن است به دلیل به کارگیری ترکیبات مختلف این گیرنده‌ها و در نتیجه فعال شدن مسیرهای مختلف داخل سلولی باشد (شکل ۱). از طرفی، پژوهشگران معتقدند بز اولین حیوان نشخوارکننده‌ای بوده است که بشر اهلی کرده و تاریخ اهلی شدن آن به ۹-۱۱ هزار سال پیش برمی‌گردد (Mohammadabadi 2019a) و گوسفند کمی بعد از بز و حدود ۸-۱۰ هزار سال پیش اهلی شده است (Mohammadabadi 2020). بعضی پژوهشگران بر اساس کاوش‌های باستان‌شناسی نشان داده‌اند که آثار اولیه مربوط به بز در اطراف مناطق کوهستانی سوئیس در اروپا و با در اطراف رودخانه نیل در آفریقا به دست آمده است، اما بعضی دیگر از پژوهشگران نشان داده‌اند که آریایی‌ها اولین قومی بودند که به اهلی کردن بز پرداخته‌اند و مستندات نشان‌دهنده این واقعیت است که بز ابتدا در آسیا و در منطقه خاورمیانه و به‌ویژه در سرزمینی که امروزه قسمتی از کردستان می‌باشد، اهلی شده است (Moghadaszadeh Molaei Moghbeli et al. 2013; Aminafshar et al. 2014; et al. 2015). جمعیت بز کرکی در کل دنیا حدود ۳۰ میلیون راس گزارش شده است که از این تعداد ۴/۵ تا ۵ میلیون راس از آن‌ها (حدود ۲۰ درصد بزهای جهان) مربوط به ایران است (Baghizadeh et al., 2009; Mohammadinejad et al. 2017). یکی از مهم‌ترین نژادهای بز در ایران بز کرکی رایجی است (Askari et al. 2008) که تولیدکننده کرک با کیفیت بالا و با رنگ‌های سفید، سیاه و یا زرد است (Molaei Moghbeli et al. 2020; Esmaili et al. 2013; et al. 2013). لذا این بزها می‌توانند ارزش اقتصادی بالایی در بازار جهانی داشته باشند (Gooki et al. 2019b; Mohammadabadi 2019b). برآورد می‌شود که در استان کرمان حدود سه میلیون رأس از بز کرکی رایجی وجود دارد که اکثر جمعیت آنها (۶۵۱۵۴۹ رأس برابر با ۲۲ درصد) در شهرستان بافت است و کمترین تعداد آنها (۶۵۹۸۵ رأس) مربوط به شهرستان راور است (Baghizadeh et al. 2009; Gholamhoseini et al. 2018). بز کرکی رایجی در نواحی کوهستانی مرتفع و سرد پرورش داده می‌شود (Khorshidi et al. 2019). هدف از نگهداری این نژاد تولید گوشت و تولید کرک است (Moghadaszadeh et al. 2015). نظر به اینکه وجود یک خزانه ژنی بزرگ برای حفظ پتانسیل پرورش و اصلاح نژاد در آینده برای توسعه و تکامل سیستم تولیدات حیوانی پایدار مهم است، در سال‌های اخیر برای مطالعه و حفاظت از تنوع ژنتیکی این نژاد اقداماتی انجام شده است (Molaei Moghbeli et al. 2013). با توجه به تولیدات مهم و استراتژیک بز در دنیا، صنعت پرورش بز دارای اهمیت است (Mahmoodi et al. 2019). به طوری که بخش اعظمی از تولیدات گوشت قرمز، شیر، کرک از این صنعت تامین می‌شود.



شکل ۱. تصویر شماتیک تنظیم ژن پروتئین مورفوژنتیک استخوان 15 (BMP15) و وظایف آن در تخمک و سلولهای گرانولوزای محیطی (GCs). (Persani et al. 2014).

Figure 1. Schematic illustration of bone morphogenetic protein (BMP)15 gene regulation and actions in the oocyte and surrounding granulosa cells (GCs). (Persani et al. 2014).

محاسن پرورش بز عبارتند از: عدم نیاز به سرمایه‌ی زیاد، تولید گوشت کم چرب، نیاز کم به جایگاه و تجهیزات، تولید مناسب شیر، بالا بودن نسبت دوقلوزایی، مصرف غذای کم، سهل الهضم بودن شیر بز، ایجاد اشتغال و کمک به اقتصاد خانواده (Askari et al. 2010; Mahmoodi et al. 2019). همچنین در کشورهای کمتر توسعه یافته شیر بز از شیر گوسفند از اهمیت بیشتری برخوردار می‌باشد و به ۶۹ درصد از کل عرضه جهان کمک می‌کند (Hassani et al. 2010; Mohammadabadi 2012). به علاوه، دوره‌ی شیردهی بزها طولانی‌تر از گوسفند است (۳۰۰ روز در مقابل ۲۵۰ روز) و تا سه برابر گوسفند می‌تواند شیر تولید کند (Askari et al. 2009; Mohammadabadi 2020). از سوی دیگر، پژوهش‌ها نشان داده است که مکانیسم‌های مولکولی از بارزترین فرایندهای ژنتیکی (دربگیرنده همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن‌ها) هستند (Mohammadabadi and Tohidinejad, 2017). ماده ژنتیکی ۱ یک سلول دارای تعداد زیادی ژن می‌باشد که هیچ‌گاه به طور همزمان بیان نمی‌شوند و در یک زمان خاص فقط تعداد کمی از آنها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید

¹ DNA

می‌نمایند (Tohidi nezhad et al. 2015). عوامل متعددی بیان ژن را کنترل می‌کنند و اگر به محصول ژن نیازی نباشد اجازه بیان به ژن داده نمی‌شود و ژن خاموش و غیرفعال، روشن و فعال نمی‌شود. مکانیسم بیان ژن اولین بار در باکتری E.coli کشف شد. بیان ژن های یوکاریوتی تحت کنترل موقت و چندبعدی می باشد. تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم در هر یک از انواع بافت ها بیان می شود و نیز بیان ژن ها به مرحله نمو بستگی دارد. بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت ها برای هر بافت اختصاصی است. همچنین مقدار محصولات ژن که در همان بافت و نیز در سایر بافت هایی که آن محصول را می سازند، ساخته شده سبب تنظیم بیان آن ژن می شود (Mohammadabadi et al. 2017). مطالعه ژن ها و پروتئین های مرتبط با صفات اقتصادی و مطالعه آنها در سطح سلولی یا کروموزومی یکی از اقدامات اساسی در حیوانات اهلی است (Jafari et al. 2016). از این ژن های مهم می توان به ژن کلیدی BMP15 که نقش مهمی در بافت های تولیدمثلی دارد اشاره کرد. اگر چه پژوهش های زیادی روی بزهای کرکی رایجی انجام شده است، ولی تاکنون بیان ژن BMP15 در این نژاد بررسی نشده است. لذا، هدف این پژوهش مطالعه پروفایل بیانی mRNA مختص بافت ژن BMP15 در بز کرکی را با استفاده از Real Time PCR بود.

مواد و روش ها

نمونه های بافتی (از هر بافت ۳ تکرار) از تخمدان، رحم، شاخ رحم، اویداکت، ماهیچه اسکلتی، چربی زیرپوستی، قلب، جگر، شش، کلیه، طحال و غده فوق کلیه در هنگام کشتار در کشتارگاه از دو راس بز تهیه شد. بلافاصله پس از کشتار دام قطعات کوچکی از اندام های مورد نیاز توسط تیغ استریل جدا گردید و در داخل میکروتیوب های ۱/۵ میلی لیتری قرار داده شدند. سپس هر چند عدد از میکروتیوب ها در داخل یک فویل آلومینیومی قرار داده شد و سریعاً به داخل تانک ازت فرستاده شدند. پس از انجماد، سریع نمونه ها در داخل فریزر -۸۰ نگهداری شدند. استخراج RNA بایستی در محیط عاری از RNase انجام شود. قبل از انجام استخراج RNA تمامی وسایل توسط آب DEPC^۲ (سیناژن، MR8244) از RNase عاری^۱ شدند. استخراج RNA کل از بافت طبق دستورالعمل کیت استخراج One Step RNA Reagent (شرکت بیوبیسیک کانادا) صورت گرفت. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با روش الکتروفورز روی ژل آگارز و UV اسپکتروفتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. RNA استخراج شده تا انجام مراحل بعدی آزمایش به فریزر با دمای -۸۰ درجه سانتی گراد منتقل شد.

از کیت سنتز cDNA شرکت فرمنتاز (RerertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit) برای سنتز cDNA استفاده شد. برای این منظور مقدار ۱ μg از RNA کل مصرف شد. ممکن است حین استخراج مقادیر متفاوتی RNA از هر بافت به دست آید، لذا جهت یکسان کردن RNA به کار رفته در ساخت cDNA، از مقدار ۱ میکروگرم

¹RNase-free environment

²Di Etyhyl Pyro Carbonate water

³RNase-free

از RNA استفاده شد. برای انجام واکنش‌های RT-PCR باید نمونه RNA عاری از آلودگی به DNA باشد، به این منظور RNA با استفاده از DNaseI تیمار شد. محصول واکنش نسخه برداری معکوس در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. توالی آغازگرها برای تکثیر ژن BMP15 عبارت بودند از: 5'-ACCCTGGACTTTCCTCTGAG-3' و 5'-3' CCATGCCACCAGAACTCAAG (Cui et al. 2009) و برای ژن GAPDH هم عبارت بودند از 5'-3' GAGAAACCTGCCAAGTATGA و 5'-3' CGAAGGTAGAAGAGTGAGTG (Pan et al. 2015). طول قطعه تکثیری برای دو ژن BMP15 و GAPDH به ترتیب عبارت بودند از ۳۰۷ جفت باز و ۱۳۹ جفت باز. آغازگرها با واسطه شرکت تکاپوزیست (ایران) توسط شرکت Bioneer (کره جنوبی) ساخته شدند.

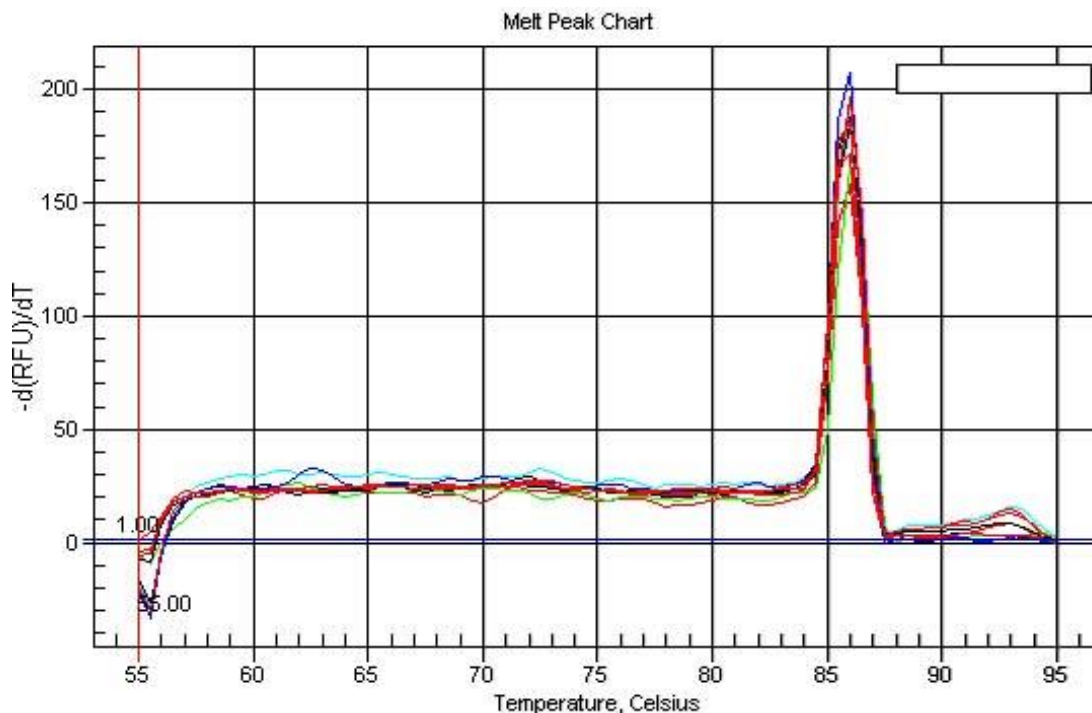
جهت انجام واکنش، ۴/۷ میکرولیتر آب دو بار تقطیر، ۷/۵ میکرولیتر SYBRPermixon Taq II و ۰/۳ میکرولیتر ROX به همراه ۰/۵ میکرولیتر آغازگر رفت، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر برگشت و مقدار ۱/۵ میکرولیتر cDNA الگو در میکروتیوپ ۰/۲ با هم مخلوط شدند. میکروتیوپ‌ها اسپین شدند تا همه مواد در یک نقطه جمع شوند و سپس با شرایط زیر در دستگاه روتور ژن ۳۰۰۰ قرار داده شد. برای ژن‌های BMP15 و GAPDH، واسرشت اولیه ۹۵ درجه سانتیگراد برای ۵ دقیقه (برای فعال‌سازی پلیمرز و واسرشت اولیه)، واسرشت ثانویه ۹۵ درجه سانتیگراد ۲۰ ثانیه، اتصال و سنتز ۶۰ درجه ۶۰ ثانیه، ۴۰ سیکل تکرار مراحل ۲ و ۳ انجام شد. منحنی ذوب در ۱۵ ثانیه برای ۹۵ درجه سانتیگراد، ۱ دقیقه برای ۵۸ درجه سانتیگراد و ۱۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتیگراد تعیین شد. حداکثر درجه حرارت اتصال ۸۵°C±۰/۸ روی منحنی ذوب استفاده شد تا اختصاصیت تکثیر PCR مشخص شود (شکل ۲).

برای تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از Real Time PCR از روش Pfaffl et al. (2002) استفاده شد. در این روش برای بررسی درصد بازده واکنش PCR ابتدا نمودار استاندارد برای ژن‌های BMP15 و GAPDH ترسیم شد. برای ترسیم نمودار استاندارد غلظت‌های مختلف cDNA (۱، ۰/۱، ۰/۰۱، ۰/۰۰۱) برای PCR استفاده شد و بازده واکنش PCR برای ژن‌های BMP15 و GAPDH ۹۷ درصد برآورد شد. در ادامه روی نمونه‌ها واکنش‌های PCR انجام شد و نتایج حاصله برای بررسی میزان نسبی تکثیر بیان با فرمول Pfaffl et al. (2002) محاسبه گردید.

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C T_{\text{target}}(\text{control}-\text{sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C T_{\text{ref}}(\text{control}-\text{sample})}}$$

در این رابطه E_{target} و E_{ref} به ترتیب بازدهی PCR ژن مورد مطالعه و ژن مرجع یا کنترل داخلی می‌باشند. $\Delta C T$ حاصل تفریق C_t (حد آستانه) ژن GAPDH از C_t ژن BMP15 می‌باشد.

1 Threshold cycle

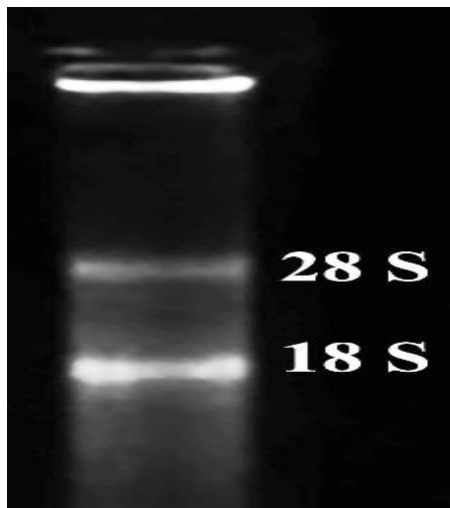


شکل ۲. منحنی ذوب ژن BMP15 در بافت تخمدان بز کرکی راینی

Figure 2. Melting curve of BMP15 gene in ovary tissue of Raini Cashmere goat

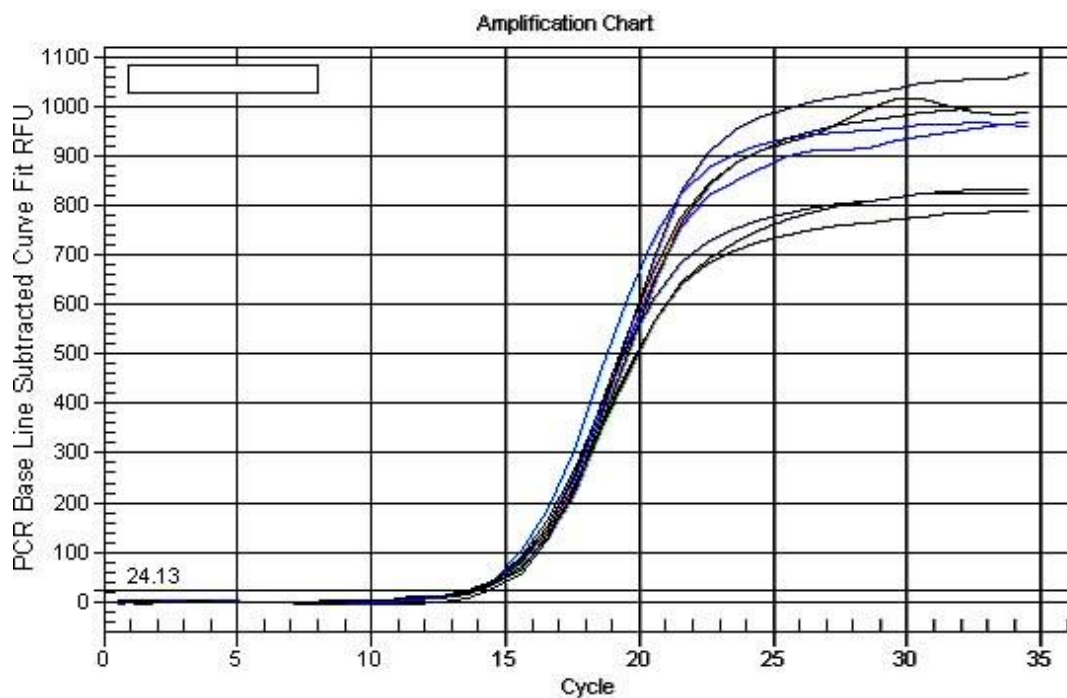
نتایج و بحث

نتایج حاصل از اعداد جذب نمونه‌های استخراج شده در طول موج A260/A280 بین ۱/۸-۱/۹ بود که بیانگر کیفیت مناسب و مطلوب RNAهای استخراج شده بود و وجود دو باند 18S و 28S در RNA نشان دهنده سالم بودن RNA و عدم وجود باند اضافی نشان دهنده خلوص آن بود (شکل ۳). برای یافتن دمای اتصال مناسب آغازگرهای ژن هدف (BMP15) و کنترل (GAPDH)، واکنش PCR شیب دمایی^۱ انجام شد و مناسب ترین دما برای اتصال آغازگرهای اختصاصی (دمای ۶۰°C) انتخاب گردید. نتایج منحنی‌های Real Time PCR (شکل ۴) و محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز (۲ درصد) نشان داد که ژن BMP15 فقط در بافت تخمدان تکثیر شده است. مشاهده تک باند در محدوده ۳۰۷bp برای ژن BMP15 فقط در بافت تخمدان (شکل ۵) و وجود باند در محدوده ۱۳۹bp برای ژن GAPDH در همه نمونه‌ها، بیانگر صحت انجام آزمایش و تکثیر قطعه مورد نظر بود.



شکل ۳. کیفیت RNA استخراج شده از نمونه یک بافت‌های بز کرکی راینی روی ژل آگارز

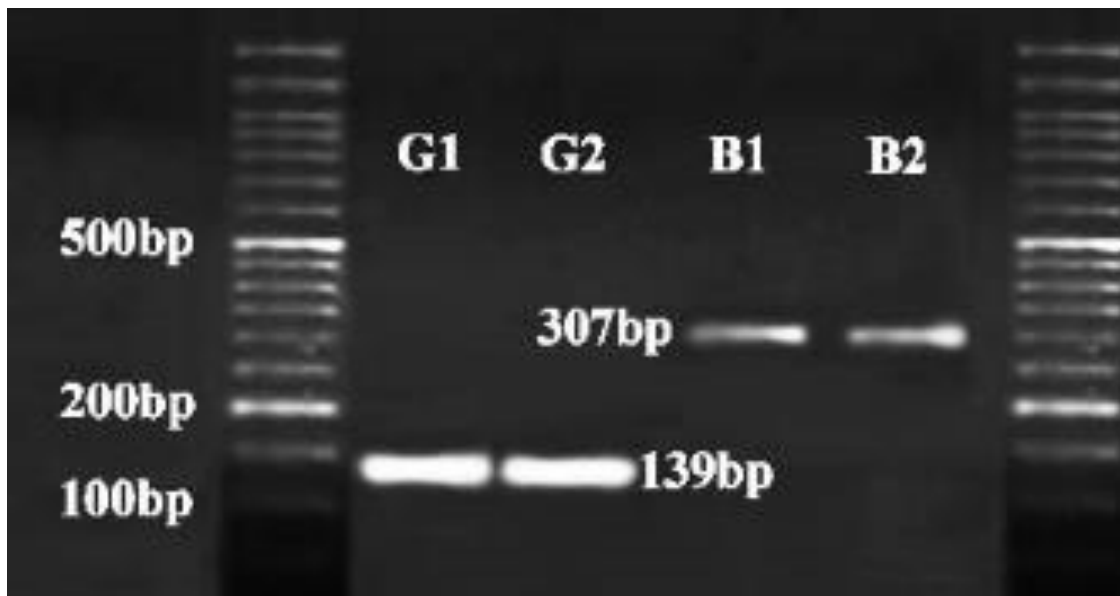
Figure 3. Quality of extracted RNA from one tissue of Raini Cashmere goat on agarose gel



شکل ۴. منحنی تکثیر ژن BMP15 در بافت تخمدان بز کرکی راینی

Figure 4. Amplification curve of BMP15 gene in ovary tissue of Raini Cashmere goat

طی انجام واکنش، دستگاه Real Time PCR میزان تغییرات نور فلورسنت در هر سیکل را به صورت منحنی تکثیر نشان می‌دهد. برای منحنی تکثیر همه نمونه‌ها، یک حد آستانه در فاز نمایی تعریف شد که نشان دهنده سیکلی می‌باشد که در آن شدت نور فلورسنت ساطع شده از تکثیر واکنش به حد آستانه رسیده است.



شکل ۵. مشاهده باندهای مربوط به ژن‌های BMP15 و GAPDH روی ژل آگارز در بز کرکی راینی. نمونه‌های B1 و B2 (جفت باز ۳۰۷) مربوط به ژن BMP15 و نمونه‌های G1 و G2 (جفت باز ۱۳۹) مربوط به ژن GAPDH هستند.

Figure 5. Observed bands relating to BMP15 and GAPDH genes on agarose gel in Raini Cashmere goat. B1 and B2 bands (307 base pair) for BMP15 gene and G1 and G2 bands (139 base pair) for GAPDH gene.

بیان ژن BMP15 در بافت‌های تخمدان، رحم، شاخ رحم، اویداکت، ماهیچه اسکلتی، چربی زیرپوستی، قلب، جگر، شش، کلیه، طحال و غده فوق کلیه بز کرکی راینی با استفاده از روش PCR در زمان واقعی نشان داد که این ژن فقط در تخمدان بیان می‌شود و در بافت‌های مطالعه شده دیگر بیان نمی‌شود. نتایج مشاهده شده با نتایج Pan et al. (2015) همخوانی دارد. این پژوهشگران بیان ژن‌های BMP15، GDF9 و MPR1B را در ۲۰ بافت از بزهای چندقلوزای خاکستری جینینگ و بزهای تک قلوزای کرکی لیائونینگ مورد مطالعه قرار دادند و نشان دادند که دو ژن GDF9 و MPR1B در تمام ۲۰ بافت مطالعه شده به طور گسترده ای بیان می‌شود، در حالی که ژن BMP15 فقط در بافت تخمدان و غده هیپوفیز بیان می‌شود. سطوح بیان دو ژن GDF9 و MPR1B در تخمدان بیشتر از همه بافت‌های دیگر بود. آنها همچنین نشان دادند که سطح بیان ژن BMP15 در تخمدان بزهای چندقلوزای خاکستری جینینگ ۴/۹۶ برابر بالاتر از بزهای تک قلوزای کرکی لیائونینگ است، در صورتی که برای دو ژن

GDF9 و MPR1B تفاوتی بین دو نژاد وجود ندارد. در پژوهشی دیگر Cui et al. (2009) سطوح بیان ژن‌های BMP15، FSHB، FSHR، BMPR1B و ESR2، که مرتبط با میزان تخم‌ریزی هستند را در بزهای سیاه یونلینگ مطالعه نمودند و نشان دادند که سطوح بیان ژن‌های BMP15، FSHB و FSHR کمتر و سطوح بیان ژن‌های BMPR1B و ESR2 بالاتر است. در مطالعات دیگر (Silva et al. 2004) نشان داده شده است که mRNAها و پروتئین‌های ژن‌های GDF9 و BMP15 و mRNA ژن‌های BMPR1A، BMPR1B و BMPR2 در فولیکول‌های تخمدان بز در تمامی مراحل تکاملی‌شان بیان می‌شوند. فولیکول‌های آنترال mRNA برای ژن‌های GDF9 و BMP15 در اووسیت و سلول‌های گرانولوزای‌شان و برای ژن‌های BMPR1A، BMPR1B و BMPR2 در سلول‌های تکای‌شان بیان می‌کنند. یافته‌های پژوهش حاضر و سایر پژوهش‌ها حضور یک سیستم پیچیده تنظیم‌کنندگی درون فولیکولی دربرگیرنده GDF9 و BMP15 و گیرنده‌های BMP را در تخمدان بز نشان می‌دهند. نتایج تحقیق حاضر می‌تواند بازکننده راه تازه‌ای برای مطالعات بعدی برای مشخص نمودن وظایف ژن BMP15 به عنوان یک ژن کاندیدا برای بهبود باروری و فیزیولوژی طبیعی در حیوانات اهلی، به ویژه بز باشد.

منابع

- توحیدی نژاد فاطمه، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، نجمی نوری عذرا (۱۳۹۳) مقایسه سطوح مختلف بیان ژن Rheb در بافت‌های مختلف بز کرکی رایینی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (۴)۶، ۳۵-۵۰.
- جعفری دره در امیر حسین، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، ریاحی مدوار علی (۱۳۹۵) بررسی بیان ژن CIB4 در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از Real Time qPCR. مجله پژوهش در نشخوارکنندگان (۴)۴، ۱۱۹-۱۳۲.
- حسینی محمدنبی، اسدی فوزی مسعود، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، محمدآبادی محمدرضا (۱۳۸۹) آنالیز ژنتیکی صفات رشد در بز کرکی رایینی با استفاده از مدل حیوانی چند متغیره. مجله علوم دامی ایران ۴۱، ۳۲۹-۳۳۳.
- خدابخش زاده رسول، محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۶). چندشکلی نیمه دوم اگزون ۲ ژن GDF9 گوسفند نژاد کرمانی به روش PCR-SSCP و توالی‌یابی. فصلنامه پژوهش‌های علوم دامی (۳)۲۷، ۵۱-۶۰.
- خدابخش زاده رسول، محمدآبادی محمدرضا، اسماعیلی زاده علی و همکاران (۱۳۹۳). مطالعه جهش‌های موجود در نیمه اول اگزون ۲ ژن GDF9 گوسفند آمیخته نژاد رومانوف و نژاد کرمانی. فصلنامه پژوهش‌های علوم دامی ایران، (۴)۶، ۳۹۵-۴۰۳.
- خدابخش زاده رسول، محمدآبادی محمدرضا، مرادی حسین و همکاران (۱۳۹۴). شناسایی جهش‌های نقطه‌ای G—A در موقعیت‌های ۴۷۷ و ۷۲۱ اگزون شماره دو ژن GDF9 گوسفند نژاد کرمانی. ژنتیک نوین (۲)۱۰، ۲۵۹-۲۶۶.

- خدابخش زاده رسول، محمدآبادی محمدرضا، مرادی حسین و همکاران (۱۳۹۴). شناسایی جهش های موجود در نیمه اول (متنهی به ۵) اگزون ۲ ژن GDF ۹ گوسفندان آمیخته حاصل از تلاقی نژادهای رومانوف و لری بختیاری. فصلنامه تحقیقات تولیدات دامی ۴(۴)، ۱۵-۲۶.
- عسکری ناهید، باقی زاده امین، محمدآبادی محمدرضا (۱۳۸۹). مطالعه تنوع ژنتیکی در چهار جمعیت بز کرکی راینی با استفاده از نشانگرهای ISSR. مجله ژنتیک نوین ۵، ۴۹-۵۶.
- عسکری ناهید، محمدآبادی محمدرضا، بیگی نصیری محمدتقی و همکاران (۱۳۷۸). مطالعه تنوع ژنتیکی بز کرکی راینی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره. مجله دانش کشاورزی ۱۸، ۱۶۱-۱۵۵.
- علینقی زاده روح الله، محمدآبادی محمدرضا، زکی زاده سونیا (۱۳۸۹) چند شکلی اگزون ۲ ژن BMP15 در بز قرمز جبال بارز. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۲(۱)، ۸۰-۶۹.
- محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۰) ارتباط چند شکلی ژن IGFBP-3 با صفات کرک در بز کرکی راینی. مجله ژنتیک نوین ۷، ۱۲۰-۱۱۵.
- محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۸) بیان ژن کالپاستاتین در بز کرکی راینی با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۱(۴)، ۲۳۴-۲۱۹.
- محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۸). بیان ژن Dik1 در بز کرکی راینی با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۱(۳)، ۲۰۵-۱۹۱.
- محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۹). بیان ژن ESR1 در بز کرکی راینی با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲ (۱)، ۱۷۷-۱۹۲.
- محمدی نژاد فاطمه، محمدآبادی محمدرضا، برازنده ارسلان (۱۳۹۶). برآورد فراسنجه های ژنتیکی زنده مانی در بزغاله های کرکی راینی با استفاده از دو مدل خطی و ویبیل. علوم دامی ایران (علوم کشاورزی ایران) ۴۸ (۲)، ۲۹۷-۳۰۴.
- محمودی مریم، آیت الهی مهرجردی احمد، محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۸). تنوع ژنتیکی ژن کاپاکازین در جمعیت بزهای کرکی راینی، سانن و وحشی با تکنیک PCR-RFLP. ژنتیک نوین ۱۴(۱)، ۷۳-۷۷.
- هادی زاده مرتضی، محمدآبادی محمدرضا، نیازی علی و همکاران (۱۳۹۲). استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی در مطالعه اگزون شماره ۲ ژن GDF ۹ در بزهای تالی و بیتال. ژنتیک نوین ۸(۳)، ۲۸۸-۲۸۳.
- هادی زاده مرتضی، نیازی علی، محمدآبادی محمدرضا و همکاران (۱۳۹۳). بررسی بیوانفورماتیکی اگزون شماره دو ژن BMP15 در بزهای تالی و بیتال. ژنتیک نوین ۹(۱)، ۱۲۰-۱۱۷.

References

- Alinaghizadeh R, Mohammadabadi MR, Zakizadeh S (2010) Exon 2 of BMP15 gene polymorphism in Jabal Barez Red Goat. *Agric Biotechnol J* 2, 69-80 (In Persian).
- Aminafshar M, Bahrampour V, Baghizadeh A et al. (2014) CD44 gene expression in mature, immature oocytes and fetal kermani, baluchi sheep and rayeni, tali goats. *J cell Anim Biol* 8, 156-160.
- Askari N, Baghizadeh A, Mohammadabadi MR (2008) Analysis of the genetic structure of Iranian indigenous Raeni cashmere goat populations using microsatellite markers. *Biotechnol* 2, 1-4.
- Askari N, Baghizadeh A, Mohammadabadi MR (2010) Study of genetic diversity in four populations of Raeini Cashmere goat using ISSR markers. *Modern Genet J* 5, 49-56 (In Persian).
- Askari N, Mohammadabadi MR, Beygi Nassiry MT et al. (2009) Study of Genetic Diversity of Raeini Cashmere Goat Based on Microsatellite Markers. *Journal of Agricultural Science* 18, 155-161 (In Persian).
- Auclair S, Rossetti R, Meslin C et al. (2013) Positive selection in bone morphogenetic protein 15 targets a natural mutation associated with primary ovarian insufficiency in human. *PLoS One* 8, e78199.
- Baghizadeh A, Bahaaddini M, Mohammadabadi MR, Askari N (2009) Allelic Variations in Exon 2 of Caprine MHC Class II DRB3 Gene in Raeini Cashmere Goat. *Am-Eurasian J Agric Environment Sci* 6, 454-459.
- Cui HX, Zhao SM, Cheng ML et al. (2009) Cloning and Expression Levels of Genes Relating to the Ovulation Rate of the Yunling Black Goat. *Biol Reprod* 80, 219–226.
- Di Pasquale E, Beck-Peccoz P, Persani L (2004) Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. *Am J Hum Genet* 75, 106–111.
- Dube JL, Wang P, Elvin J et al. (1998) The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. *Mol Endocrinol* 12, 1809–1817.
- Esmaili NAV, Esmailizadeh AK, Ayatollahi AM (2020) Genetic diversity of leptin gene intron 2 in wild and native and exotic goat breeds in Iran. *J Microbiol Biotechnol Food Sci* 9, 1110-1113.
- Gholamhoseini GF, Mohammadabadi MR, Asadi Fozzi M (2018) Polymorphism of the growth hormone gene and its effect on production and reproduction traits in goat. *Iran J Appl Anim Sci* 8, 653-659.

- Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG (2008) Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update* 14, 159–177.
- Gooki FG, Mohammadabadi MR, FozioZ MA, Soflaei M (2019) Association of Biometric Traits with Growth Hormone Gene Diversity in Raini Cashmere Goats. *Walailak J Sci Technol* 16, 499-508.
- Hadizadeh M, Mohammadabadi MR, Niazi A, Esmailzadeh AK, Mehdizadeh Y G, Molaei S (2013). Use of bioinformatics tools to study exon 2 of GDF9 gene in Tali and Beetal goats. *Modern Genet J* 8, 283-288 (In Persian).
- Hadizadeh M, Mohammadabadi MR, Niazi A et al. (2014a). Search for polymorphism in growth and differentiation factor 9 (GDF9) gene in prolific beetal and tali goats (*Capra hircus*). *J Biodiver Environ Sci* 4, 186-191.
- Hadizadeh M, Niazi A, Mohammad Abadi M, Esmailzadeh A, Mehdizadeh Gazooei Y (2014b) Bioinformatics analysis of the BMP15 exon 2 in Tali and Beetal goats. *Modern Genet J* 9, 117-120 (In Persian).
- Hanrahan JP, Gregan SM, Mulsant P et al. (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*). *Biol Reprod* 70, 900-909.
- Hassani MN, Asadi Foz M, Esmailzadeh AK, Mohammadabadi MR (2010). A genetic analysis of growth traits in Raieni Cashmere goat using multivariate animal model. *Iran J Anim Sci* 41, 323-329 (In Persian).
- Jafari Darehdor AH, Mohammadabadi MR, Esmailzadeh AK, Riahi Madvar A (2016) Investigating expression of CIB4 gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time qPCR. *J Rumin Res* 4, 119-132 (In Persian).
- Khodabakhshzadeh R, Mohammadabadi MR, Esmailzadeh Koshkoieh A et al. (2015b). Study of mutations available in first-halfexon 2 of GDF9 gene in crossbred sheep born from crossing of Romanov rams with Kermani ewes. *Iran J Anim Sci Res* 6, 395-403 (In Persian).
- Khodabakhshzadeh R, Mohammadabadi MR, Moradi H, Esmailzadeh AK (2016). Identification of available mutations in the first-half (from 5' end) of exon 2 of GDF9 gene in crossbred sheep from crossing of Romanov and Lori-Bakhtiari breeds. *Anim Prod Res* 4, 15-26 (In Persian).
- Khodabakhshzadeh R, Mohammadabadi MR, Moradi H et al. (2015a). Identify of G→A point mutation at positions 477 and 721 in exon 2 of GDF9 gene in Kermani sheep. *Modern Genet J* 10, 261-268 (In Persian).

- Khorshidi M, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK et al. (2019) Comparison of artificial neural network and regression models for prediction of body weight in Raini Cashmere goat. *Iran J Appl Anim Sci* 9, 453-461.
- Lan ZJ, Gu P, Xu X et al. (2003) CNF-dependent repression of BMP-15 and GDF-9 mediates gamete regulation of female fertility. *EMBO J* 22, 4070–4081.
- McDonald NQ, Hendrickson WA (1993) A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell* 73, 421–424.
- McGrath SA, Esquela AF, Lee S (1995) Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Mol Endocrinol* 9, 131–136.
- McPherron AC, Lee SJ (1993) GDF-3 and GDF-9: two new members of the transforming growth factor-beta superfamily containing a novel pattern of cysteines. *J Biol Chem* 268, 3444–3449.
- Mahmoodi M, Ayatollahi Mehrjerdi A, Mohammadabadi MR (2019) Genetic diversity of kappa-casein gene in Raini Cashmere, Saanen and Wild goats using PCR-RFLP. *Modern Genet J* 14, 73-77 (In Persian).
- Moghadaszadeh M, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh Koshkoieh A (2015) Association of Exon 2 of BMP15 Gene with the Litter Size in the Raini Cashmere Goat. *Genet the 3rd Millennium* 13, 4062-4067.
- Mohammadabadi MR (2012) Relationships of IGFBP-3 gene polymorphism with cashmere traits in Raini Cashmere goat. *Modern Genet J* 7, 115-120 (In Persian).
- Mohammadabadi MR (2019a) Dlk1 gene expression in Raini Cashmere goat using Real Time PCR. *Agric Biotechnol J* 11(3), 191-205 (In Persian).
- Mohammadabadi MR (2019b) Expression of calpastatin gene in Raini Cashmere goat using Real Time PCR. *Agricultural Biotechnology Journal* 11 (4), 219-235 (In Persian).
- Mohammadabadi MR (2020) Expression of ESR1 gene in Raini Cashmere goat using Real Time PCR. *Agric Biotechnol J* 12 (1), 177-192 (In Persian).
- Mohammadabadi MR, Jafari AHD, Bordbar F (2017) Molecular analysis of CIB4 gene and protein in Kermani sheep. *Brazil J Medic Biol Res* 5, e6177.
- Mohammadabadi MR, Tohidinejad F (2017) Characteristics determination of Rheb gene and protein in Raini Cashmere goat. *Iran J Appl Anim Sci* 7, 289-295.
- Mohammadinejad F, Mohammadabadi MR, Barazandeh A (2017) Estimating genetic parameters of kid survival in Raini Cashmere goat using linear and Weibul models. *Iran J Anim Sci* 48, 297-304 (In Persian).

- Molaei Moghbeli S, Barazandeh A, Vatankhah M, Mohammadabadi MR (2013) Genetics and non-genetics Parameters of body Weight for Post WEANING Traits in Raini Cashmere goats. *Trop Anim Health Prod* 45, 1519-24.
- Moore RK, Shimasaki S (2005) Molecular biology and physiological role of the oocyte factor, BMP-15. *Mol Cell Endocrinol* 234, 67-73.
- Otsuka F, Shimasaki S (2002) A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand: its role in regulating granulosa cell mitosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 8060-8065.
- Pan ZY, Di R, Tang QQ et al. (2015) Tissue-specific mRNA expression profiles of GDF9, BMP15, and BMPR1B genes in prolific and non-prolific goat breeds. *Czech J Anim Sci* 60, 452-458
- Persani L, Rossetti R, Cacciatore C, Bonomi M (2009) Primary ovarian insufficiency: X chromosome defects and autoimmunity. *J Autoimmun* 33, 35-41.
- Persani L, Rossetti R, Pasquale ED et al. (2014) The fundamental role of bone morphogenetic protein 15 in ovarian function and its involvement in female fertility disorders. *Human Reprod Update* 20, 869-883.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30, e36.
- Silva JRV, Van Der Hurk R, Van Tol HTA et al. (2004) Expression of Growth Differentiation Factor 9 (GDF9), Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15), and BMP Receptors in the Ovaries of Goats. *Mol Reprod Develop* 70, 11-19.
- Tohidi nezhad F, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK, Najmi Noori A (2015) Comparison of different levels of Rheb gene expression in different tissues of Raini Cashmir goat. *Agric Biotechnol J* 6, 35-50 (In Persian).
- Toniolo D (2006) X-linked premature ovarian failure: a complex disease. *Curr Opin Genet Dev* 16, 293-300.