

## شناسایی چند شکلی در نشانگرهای ریزماهورهای مرتبط به زیر

### واحدهای $\beta-A$ و $\beta-B$ اینهیبین / اکتیوین روی کروموزومهای

#### ۲ و ۴ در گوسفند سنجابی

ایوب فرهادی\*<sup>۱</sup>، قدرت اله رحیمی<sup>۲</sup>، برومند چهارآیین<sup>۳</sup>، زربخت انصاری<sup>۴</sup>

۱، ۲ و ۴-به ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار و استادیار آزمایشگاه ژنتیک مولکولی و بیوتکنولوژی دام، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران

۳- دانشیار مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی کرمانشاه، کرمانشاه  
\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Ayyoob\_farhadi@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۸۸/۶/۳۰ - تاریخ پذیرش: ۸۹/۳/۳۰)

#### چکیده

هدف از مطالعه حاضر شناسایی میزان چند شکلی در نشانگرهای ریز ماهورهای BMS719، BMS778 و oarCP26 متصل به ژنهای زیر واحدهای  $\beta-A$  و  $\beta-B$  اینهیبین / اکتیوین در گوسفند سنجابی بوده است. تعداد ۱۰۰ نمونه خون به طور تصادفی از گوسفندان سنجابی در ایستگاه اصلاح نژاد مهرگان کرمانشاه جمع آوری و استخراج DNA با روش نمکی بهینه یافته صورت پذیرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)، با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی به منظور تکثیر جایگاه‌های ریزماهورهای انجام و محصولات حاصل از PCR روی ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد الکتروفورز شدند. برای شناسایی ژنوتیپ‌ها در جمعیت از روش رنگ آمیزی نیترا ت نقره استفاده شد و آنالیز ژنتیکی توسط نرم افزارهای POPGENE نسخه ۱/۳۲ و Cervus نسخه ۲/۰ انجام گرفت. برای هر یک از نشانگرهای BMS778، oarCP26 و BMS719 تعداد آلل‌های مشاهده شده (Na) به ترتیب ۷، ۴ و ۳، شاخص چند شکلی (PIC) به ترتیب ۰/۷۹۹، ۰/۶۹۱ و ۰/۶۰۸۸ و تعداد آلل‌های موثر (Ne) به ترتیب ۴/۹۷، ۳/۲۴ و ۲/۵۵ برآورد شدند. نتایج نشان می‌دهند که جایگاه‌های مورد مطالعه به دلیل پلی مورف بودن و اتصال آن‌ها با هورمون‌های گلیکو پروتئینی اینهیبین و یا اکتیوین، می‌توانند به عنوان یک جایگاه QTL موثر در باروری در برنامه‌های اصلاح نژادی گوسفند بیشتر مورد مطالعه قرار گیرد.

#### واژه‌های کلیدی

چند شکلی،  
ریز ماهورها،  
گوسفند سنجابی،  
اینهیبین / اکتیوین

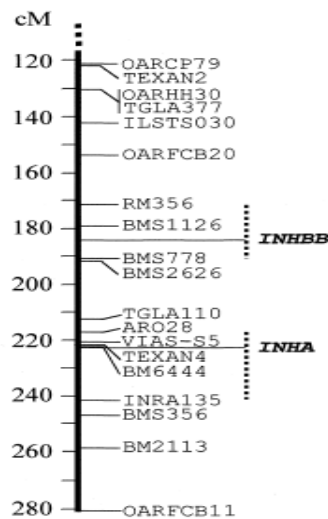
## مقدمه

اینهیبین یک گلیکو پروتئین هتروداایمر متشکل از دو زیر واحد آلفا و بتا است که اینهیبین-A اینهیبین-B نامیده می‌شود. زیر واحد آلفا در هر دو فرم اینهیبین‌ها یکسان اما زیر واحد بتا دارای دو فرم A و B می‌باشد که در ترکیب با زیر واحد آلفا به ترتیب تشکیل اینهیبین-A و اینهیبین-B را می‌دهد. در مقابل، اکتیوین یک گلیکوپروتئین هومو دایمر است که از ترکیب دو زیر واحد بتا به وجود آمده و در سه فرم A، B و AB یافت می‌شود (۱۰، ۱۱، ۲۶). اینهیبین و اکتیوین عضو خانواده بزرگ فاکتورهای رشد تغییر شکل دهنده بتا (TGF $\beta$ ) بوده و دارای اثرات مهمی بر نرخ تخمک ریزی در پستانداران می‌باشند (۵، ۱۴). نقش عمده اندوکراینی اینهیبین کاهش ترشح هورمون محرک فولیکول (FSH) از هیپوفیز پیشین طی مکانیسم فیدبک منفی است (۱۷). نقش اندوکراینی اکتیوین عکس اینهیبین است. مدارک زیادی وجود دارد که اینهیبین و مولکول‌های مرتبط با آن علاوه بر نقش اندوکراینی، ممکن است دارای اثرات پارا و اوتوکراین روی گنادها باشند (۴، ۸). اینهیبین برای اولین بار در سال ۱۹۸۵ از مایع

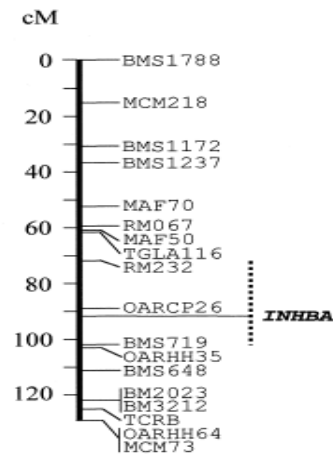
فولیکولی گاو و خوک (۱۵، ۲۲، ۲۳) و در گوسفند در سال ۱۹۸۷ استخراج شد (۱۹). اکتیوین نیز در سال ۱۹۸۶ استخراج شد (۲۴، ۲۸). سلول‌های سرتولی بیضه در نرها مراکز تولید اینهیبین می‌باشند. زیر واحدهای اینهیبین و اکتیوین توسط ژن‌های مجزایی کد می‌شوند. به عنوان مثال در گوسفند همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است ژن‌های کد کننده این زیر واحدها روی کروموزوم ۴ و بازوی کوتاه کروموزوم ۲ قرار دارند (۱۰). اش و همکاران (۱۹۸۷) نشان دادند که زیر واحدهای مختلف اینهیبین / اکتیوین می‌توانند در بین گونه‌ها حفظ شده باشند (۷).

ریزماهوره‌ها یا توالی‌های تکراری ساده (SSR) یا تکرارهای کوتاه پشت سر هم (STR) واحدهای تکراری متشکل از ۶-۱ نوکلئوتید هستند که در ژنوم همه یوکاریوت‌ها و پروکاریوت‌ها یافت می‌شوند. ریزماهوره‌ها در هر دو ناحیه کد شونده و غیر کد شونده وجود دارند که بسیار متنوع و چندشکل بوده و به علت پراکندگی بالا در ژنوم یوکاریوت‌ها تعیین ژنوتیپ آنها بسیار ساده است. این خصوصیات، نشانگرهای ریزماهوره‌ای را برای تهیه نقشه‌های ژنتیکی، مناسب و مطلوب کرده است (۹).

Sheep Chromosome 2q



Sheep Chromosome 4



شکل ۱- جایگاه ژن‌های کد کننده زیرواحدهای اینهیبین / اکتیوین و ریزماهوره‌های مرتبط به آنها در گوسفند سنجابی. INHBA، INHBB به ترتیب زیر واحد بتای-B و بتای-A اینهیبین / اکتیوین و INHA زیر واحد آلفای اینهیبین می‌باشند. فاصله‌ها با مقیاس سانتی مورگان می‌باشند (۱۰).

دنبال آن به ترتیب ژنوتیپ‌های AG و AA قرار دارند. بنابراین در این آزمایش پیشنهاد شد که ممکن است اینهیین-A یک ژن عمده کنترل کننده باروری در بز باشد (۱۲).

در سال‌های اخیر با توجه به استفاده از اینهیین و اکتیوین در باروری انسان و حیوانات اهلی توجه نسبتاً زیادی به اندازه‌گیری تنظیم کننده‌های سنتز آن توسط سلول‌های گرانولوزا، انتقال از فولیکول به پلازما، ویژگی‌ها، وزن مولکولی و اثرات بیولوژیکی این هورمون شده است (۱۳). با توجه به تحقیقات انجام شده مشخص شد که تا کنون در ایران هیچ تحقیقی در مورد رابطه چند شکلی‌های ژن‌های اینهیین و اکتیوین با چند قلوزایی در گوسفند انجام نگرفته است. از طرفی با توجه به تاثیر بسزای این دو هورمون در افزایش نرخ تخم‌ریزی و در نتیجه افزایش بهره‌زایی ضرورت مطالعه این ژن‌ها به عنوان دو ژن مهم و کاندید برای چندقلوزایی در گوسفندان ایرانی مشخص و مبرم است. لذا در این تحقیق از سه نشانگر ریزماهوره‌ای متصل به جایگاه‌های ژن-های اینهیین/ اکتیوین استفاده شد تا رفتار جایگاه‌های مورد نظر را در جمعیت گوسفند سنجابی مورد مطالعه قرار داده تا بتوان از اطلاعات بدست آمده در برنامه‌های اصلاح نژادی آتی در این نژاد استفاده نمود.

### مواد و روش‌ها

#### گوسفند سنجابی

نام این گوسفند از ایل سنجابی گرفته شده که بیشترین تعداد گوسفند استان کرمانشاه را در بر می‌گیرد. جمعیت گوسفند سنجابی بعد از گوسفند بلوچی دارای بیشترین تعداد در بین گوسفندان ایران است که در اکثر نقاط استان کرمانشاه پراکنده می‌باشد. سنجابی گوسفندی دنبه‌دار با جثه‌ای بزرگ و دست و پایی بلند می‌باشد. صورت قهوه‌ای تا قهوه‌ای کم‌رنگ و بدن از پشم بلند و نسبتاً سفید و ضخیمی پوشیده شده و از لحاظ تولید، جزء گوسفندان گوشتی و گوشتی پشمی محسوب می‌شود. دارای تولید شیر مناسب، سرعت رشد، کیفیت و کمیت پشم مطلوب و در مقابل شرایط محیطی نامطلوب نژادی مقاوم به حساب می‌آید. درصد دوقلوزایی در این نژاد ۱۷/۲۸ درصد می‌باشد (۱).

Lord و همکاران (۱۹۹۸) با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره‌ای BM1329 و oarAE101 و سه نشانگر قرار گرفته در بین آنها توارث ناحیه کروموزومی اطراف ژن FecB را در گوسفندان رامنی تست کردند. در این آزمایش ژنوتیپ‌هایی که با استفاده از آنالیز نشانگرها برای ۱۵ قوچ تعیین شده بودند توسط داده‌های حاصل از تست نتایج نیز تایید شدند. این امر شناسایی وضعیت حاملین ژن FecB را در هر یک از افراد شجره حتی بدون نیاز به اطلاعات والدین آنها امکان‌پذیر می‌سازد (۱۶). اسپیلر و همکاران (۲۰۰۴) چند شکلی‌های ریزماهوره‌ای ژن اینهیین را در بزهای نر آنگورا بررسی کردند. آنها با مطالعه ۲۴ راس بز نر بالغ و تعیین ساختار ژنتیکی جمعیت مورد مطالعه، ژنوتیپ‌های هتروزیگوت و هموزایگوت مختلفی را مشاهده کردند. باندهای مرتبط به این ژنوتیپ‌ها در گستره ۲۳۰-۱۸۵ جفت بازی قرار داشتند. برای ۸ راس از بزها هیچ باندهای مشاهده نشد. همچنین جمعیت مورد مطالعه انحراف معنی‌داری را از تعادل هاردی-واینبرگ نشان داد. آنها پیشنهاد کردند که وجود چند شکلی در ژن زیر واحد آلفای اینهیین می‌تواند به عنوان ابزار مفیدی در استراتژی‌های انتخاب استفاده شود (۲۵). رلیواسکیوز و همکاران (۲۰۰۴) چند شکلی-های ریزماهوره‌ای ژن زیر واحد بتا- اینهیین را در بزهای نر اسپانیایی مورد مطالعه قرار دادند. ۲۳ راس از بزها با استفاده از دو آغازگر ریزماهوره‌ای بررسی شدند. برای آغازگرهای اول و دوم به ترتیب باندهایی در گستره بین ۲۸۰-۲۷۸ و ۲۴۸-۲۴۶ مشاهده شدند. همچنین جمعیت مورد مطالعه در تعادل هاردی-واینبرگ قرار نداشت. آنها با مشاهده چند شکلی در این نمونه‌ها پیشنهاد دادند که ژن اینهیین می‌تواند در استراتژی‌های انتخاب برای باروری مورد استفاده قرار گیرد (۲۱). هیو و همکاران (۲۰۰۷) با مطالعه چند شکلی‌های موجود در یک قطعه بین ناحیه کد کننده ژن زیر واحد آلفا- اینهیین با استفاده از روش‌های PCR-SSCP، PCR-RFLP و تعیین توالی نشان دادند که یک جهش جدید (G284A) که با هضم توسط آنزیم HaeII قابل شناسایی است در این ناحیه وجود دارد. آنالیزهای PCR-RFLP نشان دادند که آلل G غالب می‌باشد. مطالعات بیشتر نشان دادند که اثر ژنوتیپ‌های اینهیین-A در بزغالزایی برای ژنوتیپ GG بیشترین بوده و به

## استخراج DNA

۱۰۰ نمونه خون شامل ۲۱ راس دام نر و ۷۹ راس دام ماده به طور تصادفی از گوسفندان سنجابی در ایستگاه اصلاح نژاد مهرگان کرمانشاه از طزیق سیاهرگ وداجی جمع آوری و استخراج DNA با روش نمکی بهینه یافته (۱۸) صورت پذیرفت.

## PCR و تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) به منظور تکثیر جایگاه‌های ریزماهواره‌ای انجام پذیرفت. مخلوط واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل تقریباً ۱۲۰ نانو گرم DNA الگو، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱x PCR، ۳ میلی مولار  $MgCl_2$ ، ۲۰۰ میکرو مول dNTP، ۱ واحد آنزیم Taq-پلیمرز (Takara, Tokyo, Japan) و ۲۵ پیکو مول از هر کدام از آغازگرها (برای نشانگرهای oarCP26 و BMS719) و ۵۰ پیکومول (برای نشانگر BMS778) و ۱۸/۶ میکرولیتر آب مقطر تهیه گردید. سیکل‌های حرارتی PCR به صورت ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴ دقیقه به منظور تک رشته سازی اولیه DNA الگو که با ۳۰ سیکل شامل ۹۴ درجه سانتیگراد در ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتیگراد (برای نشانگرهای BMS778 و BMS719)، ۶۶ درجه سانتیگراد (برای نشانگر oarCP26) در ۳۰ ثانیه به منظور اتصال آغازگرها و ۷۲ درجه سانتیگراد در ۱۲۰-۳۰ ثانیه دنبال شد. بسط نهایی نیز در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه تنظیم گردید. در مرحله بعد محصولات حاصل از تکثیر روی ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد الکتروفورز شدند. شناسایی ژنوتیپ‌ها به کمک رنگ آمیزی نترات نقره و آنالیز ژنتیکی توسط

نرم افزارهای POPGENE نسخه ۱/۳۲ و Cervus نسخه ۲/۰ انجام گرفت. شاخص PIC در جایگاه‌های ریز ماهواره‌ای بر اساس فراوانی‌های آللی مشاهده شده (۱) و با استفاده از رابطه زیر محاسبه می‌شود:

$$PIC_i = 1 - \sum_{j=1}^n P_{ij}^2$$

که در این رابطه  $P_{ij}$  فراوانی ژامین آلل برای  $i$ امین نشانگر است که برای همه آلل‌ها جمع می‌شود. تعداد آلل‌های موثر (که عکس هموزایگوسیتی را تخمین می‌زند) نیز با استفاده از رابطه زیر محاسبه شده است (۲۹):

$$N_e = \frac{1}{H_i} = \frac{1}{\sum_{i=1}^n P_i^2}$$

که در این رابطه  $H_i$  هموزایگوسیتی در هر جایگاه و  $P_i$  فراوانی آلل  $i$  را نشان می‌دهند.

## نتایج و بحث

از تکثیر نشانگر BMS719 باندهایی در محدوده ۷۲ تا ۱۱۸ جفت باز از خط کش مولکولی SM0251 روی ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد حاصل شد. در این نشانگر قطعات تکثیر شده در گوسفند سنجابی در دامنه ۱۰۷-۸۸ جفت باز قرار داشتند. نتایج بدست آمده با نتایج استون و همکاران (۱۹۹۵) که در NCBI برای جنس *Ovis aries* به ثبت رسیده است، مغایرت داشت. آنها اندازه این نشانگر را برای جنس گوسفند ۱۲۵-۱۲۰ جفت باز به ثبت رسانده‌اند (۲۷).

جدول ۱- توالی آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق.

نام نشانگر	(۳'.....۵') توالی آغازگر	شماره کروموزوم
BMS778	F-CTTGGGGAGGCAGAATTTA R-CCTCTCCACATACTCTTCTCCA	۲
oarCP26	F-GCCTAACAGAATTCAGATGATGTT R-GTCACCATACTGACGGCTGGTTCC	۴
BMS719	F- AAGTGCACGCTAACACGTTG R- CCTCCCTCTCCCTCTGTTTC	

جدول ۲- شاخصه‌های ژنتیک جمعیت نشانگرهای BMS719, BMS1126, BMS778 و oarCP26 در گوسفند سنجابی

Ne	PIC	H(E)	HO(E)	H(O)	HO(O)	Na	نشانگر
۲/۵۵	۰/۶۰۸۸	۰/۶۱	۰/۳۸۸	۱	۰	۳	BMS719
۴/۹۷	۰/۷۹۹	۰/۸۰۳	۰/۱۹۷	۱	۰	۷	BMS778
۳/۲۴	۰/۶۹۱	۰/۶۹۴	۰/۳۰۵	۱	۰	۴	oarCP26

Na- تعداد آل‌ها

Ne- تعداد آل‌های موثر

HO(O)- هموزایگوسیتی مشاهده شده

H(O)- هتروزایگوسیتی مشاهده شده

HO(E)- هموزایگوسیتی مورد انتظار

H(E)- هتروزایگوسیتی مورد انتظار

PIC- میزان چند شکلی

از تکثیر نشانگر oarCP26 باندهایی در محدوده ۱۰۰ تا ۲۰۰ جفت باز از خط کش مولکولی SM0321 روی ژل پلی اکریل آمید ۸٪ حاصل شد. قطعات تکثیر شده نشانگر oarCP26 در این تحقیق در دامنه ۱۸۰-۱۵۰ جفت باز قرار داشتند. این نتایج با نتایج یاد و همکاران (۱۹۹۵) که در NCBI برای جنس *Ovis aries* به ثبت رسیده است، سازگاری دارد (۶). در نشانگر oarCP26 ۴ آل (A, B, C و D) به ترتیب با فراوانی‌های ۰/۱۹، ۰/۱۸، ۰/۴۶ و ۰/۱۷ و ۴ ژنوتیپ (AB, BC, CD و AC) به ترتیب با فراوانی‌های ۰/۰۸، ۰/۳، ۰/۲۸ و ۰/۳۴ مشاهده شدند. جمعیت مورد مطالعه در این تحقیق در هیچ یک از جایگاه‌های ریز ماهوره‌ای بررسی شده در تعادل هاردی-واینبرگ قرار نداشت. انحراف از تعادل در جامعه گوسفندان سنجابی مطالعه شده را می‌توان در اثر ایجاد جهش در این جایگاه‌ها، اندازه کوچک نمونه‌های مورد مطالعه، بالا بودن شاخص همخوانی در گله مورد مطالعه و یا وجود آل‌های صفر دانست. در جدول شماره ۲ خلاصه‌ای از شاخصه‌های ژنتیک جمعیت در گوسفند سنجابی در جایگاه‌های مورد مطالعه در این تحقیق نشان داده شده‌اند. در تمامی نشانگرهای بررسی شده در این تحقیق در گوسفندان سنجابی، هتروزایگوسیتی صد در صد بود. بالا بودن هتروزایگوسیتی در این جایگاه‌ها باعث افزایش مقدار چند شکلی یا شاخص PIC در نشانگرها شده است. میزان بالای هتروزایگوسیتی و چند شکلی در این نشانگرها نشان می‌دهد که می‌توان از آنها در استراتژی‌های

لازم به ذکر است که مغایرت در اندازه باندها در افراد و یا در جوامع مختلف یکی از ویژگی‌های بارز سیستم ریز ماهوره‌ها است که معمولاً در اثر پدیده‌هایی مثل جهش، سر خوردن پلیمرز و یا کراسینگ اور نا مساوی بوجود می‌آید (۲). در نشانگر BMS719 در گوسفندان سنجابی مطالعه شده در این تحقیق ۳ آل (A, B و C) به ترتیب با فراوانی‌های ۰/۳۴، ۰/۱۶ و ۰/۵ و دو ژنوتیپ (AC و BC) به ترتیب با فراوانی‌های ۰/۶۸ و ۰/۳۲ مشاهده شد. البته باید اشاره نمود که علت مشاهده فقط دو ژنوتیپ برای این نشانگر در جمعیت گوسفندان سنجابی می‌تواند اندازه کوچک جمعیت مورد مطالعه باشد.

نشانگر BMS778 متنوع‌ترین نشانگر از لحاظ تعداد آل و ژنوتیپ در این تحقیق بود. از تکثیر این نشانگر باندهایی در محدوده ۱۱۸ تا ۱۹۴ جفت باز از خط کش مولکولی SM0251 روی ژل پلی اکریل آمید ۸٪ حاصل شد. قطعات تکثیر شده نشانگر BMS778 در گوسفند سنجابی در دامنه ۱۴۸-۱۹۳ جفت باز قرار داشتند. این نتایج با نتایج تحقیق استون و همکاران (۱۹۹۵) سازگاری داشت (۲۷). در نشانگر BMS778 در گوسفندان سنجابی ۷ آل (A, B, C, D, E, F و G) به ترتیب با فراوانی‌های ۰/۱، ۰/۱۵۵، ۰/۳۴، ۰/۰۴۵، ۰/۲، ۰/۱۱ و ۰/۰۹ و ۶ ژنوتیپ (AD, BE, CE, CF, CG) و (AC و BC) به ترتیب با فراوانی‌های ۰/۱۱، ۰/۰۹، ۰/۲۳، ۰/۱۷، ۰/۲۲ و ۰/۲۸ مشاهده شدند.

سه گونه گوسفند، گاو و بز نشان داد که اکثر نشانگرهای نقشه-یابی شده روی کروموزوم ۴ و بازوی کوچک کروموزوم ۲ گوسفند، در نقشه ژنتیکی مربوط به گاو نیز وجود دارند. در بز یک شبکه متشکل از ۴ و ۷ نشانگر ریز ماهواره‌ای روی کروموزوم ۴ و بازوی کوچک کروموزوم ۲ با نشانگرهای نقشه-یابی شده در گوسفند یکسان هستند (۹).

داده‌های لینکاژ ژنتیکی بیان شده در فوق برای زیر واحدهای مختلف اینهیین/ اکتیوین در گوسفند نشان می‌دهد که نشانگرهای ریز ماهواره‌ای برای مطالعات QTL مرتبط با این ژن‌ها در گونه-های نشخوارکنندگان مفید و مطلوب می‌باشند. بدین ترتیب که با بررسی رابطه این نشانگرها با صفت دو قلوزایی در گوسفند، در صورتی که ژنوتیپ‌های این نشانگرها با دو قلوزایی در افراد معنی‌داری داشته و همچنین بین ژنوتیپ‌های مختلف در افراد مختلف تفاوت‌های قابل ملاحظه‌ای دیده شود، می‌توان از آنها به عنوان ابزار قابل اعتمادی در یافتن QTL مربوط به صفت دو قلوزایی استفاده کرد. البته باید یادآوری شود که در مطالعات مربوط به QTL برای رسیدن به داده‌های قابل اعتماد باید از یک جمعیت بزرگ استفاده شود. با توجه به تحقیقاتی که انجام شد، تا کنون در ایران هیچ تحقیقی مبنی بر بررسی چند شکلی‌های ژن-های اینهیین/ اکتیوین با استفاده از ریز ماهواره‌ها در رابطه با صفات تولید مثلی، خصوصاً دو قلوزایی در گوسفند انجام پذیرفته است و بیشتر تاکید روی ژن‌های BMP-15، GDF9 و FecB بوده که تاکنون نتایج مورد انتظار در این ژن‌ها برای نژادهای مورد مطالعه حاصل نگردیده است. بنابراین این نظریه قوت می‌گیرد که شاید در نژادهای گوسفند ایرانی جهش‌های مرتبط به ژن‌های فوق جود نداشته باشند. لذا به نظر می‌رسد باید برای شناسایی ژن‌های موثر بر دو قلوزایی در جمعیت گوسفندان ایرانی جایگاه‌های دیگری مورد مطالعه و جستجو قرار گیرند. بررسی ژن‌های زیر واحدهای اینهیین/ اکتیوین، یکی از عوامل موثر در فرایند بلوغ فولیکول و تخمک‌ریزی از طریق نشانگرهای ریز ماهواره‌ای متصل به این جایگاه‌ها از مطالعات مقدماتی در این ارتباط می‌باشد.

انتخاب برای صفات مختلف تولید مثلی، خصوصاً دو قلوزایی در گوسفند و سایر پستانداران استفاده کرد. اوپانگ و همکاران (۲۰۰۶) رابطه معنی‌داری را ( $P < 0/05$ ) بین چند شکلی‌های نشانگر ریز ماهواره‌ای oarHH35 و بزغاله‌زایی در چهار نژاد بز نشان دادند. این نشانگر ریز ماهواره‌ای نیز به زیر واحد بتای-B اینهیین/ اکتیوین روی کروموزوم ۴ گوسفند متصل است (۲۰). لازم به ذکر است که در گوسفند، زیر واحد بتای-B اینهیین/ اکتیوین روی بازوی کوچک کروموزوم ۲ توسط دو نشانگر ریز ماهواره‌ای BMS1126 و BMS778 احاطه شده که به این نشانگرها متصل می‌باشد. فاصله نشانگر BMS1126 از ژن کد کننده این زیر واحد تقریباً ۵ سانتی مورگان و فاصله نشانگر BMS778 نیز از زیر واحد نامبرده تقریباً ۶/۶ سانتی مورگان می‌باشد. همچنین زیر واحد بتای-A اینهیین روی کروموزوم ۴ توسط دو ریز ماهواره oarCP26 و BMS719 احاطه شده و به آنها متصل می‌باشد. فاصله این دو نشانگر از زیر واحد بتای-A اینهیین/ اکتیوین به ترتیب ۳/۳ و ۱۱ سانتی مورگان است. ژن کد کننده زیر واحد آلفای اینهیین نیز روی بازوی کوچک کروموزوم ۲ گوسفند و در فاصله ۳۹ سانتی مورگان از ژن کد کننده زیر واحد بتای-B قرار دارد. این زیر واحد نیز به دو نشانگر ریز ماهواره‌ای INRA135 و BM6444 متصل بوده و به ترتیب در فاصله ۱۹/۸ و ۱ سانتی مورگان از این نشانگرها قرار دارد (۱۰). بر اساس مطالعات مطالعات سیتوژنتیکی، ردیف‌های الگوهای بانندی نشانگرهای مورد مطالعه در این تحقیق را در گوسفند، گاو و بز مشخص شده است. براساس این مطالعات، یک ناحیه حفاظت شدگی وسیع از نظر ترتیب و فاصله، بین این نشانگرها در نقشه‌های لینکاژی کروموزوم‌های گوسفند، گاو و بز وجود دارد. مطالعات نشان دادند که کروموزوم ۴ و بازوی کوچک کروموزوم ۲ گوسفند به ترتیب با کروموزوم‌های ۲ و ۴ گاو و بز یکسان است. همچنین هیبریداسیون در محل، موقعیت زیر واحد آلفا و بتای-B اینهیین/ اکتیوین را روی کروموزوم ۲ گاو و خوک و زیر واحد بتای-A اینهیین/ اکتیوین را روی کروموزوم ۴ گاو و خوک، دقیقاً در همان موقعیتی که در کروموزوم‌های ۲ و ۴ گوسفند قرار دارند، تعیین نمود. مطالعات نقشه‌های ژنتیکی هر

## سپاسگزاری

در پایان از زحمات بی شائبه کارکنان و مدیریت ایستگاه اصلاح نژاد مهرگان کرمانشاه در تامین نمونه‌ها کمال تشکر و قدر دانی را داریم.

## منابع

1. مولانیان، ح. (۱۳۷۸). گزارش گوسفند سنجابی در بخش تحقیقات دامپروری، مرکز تحقیقات منابع طبیعی و امور دام کرمانشاه، بخش تحقیقات دامپروری.
2. نقوی، م، قره یاضی، ب، حسینی سالکده. ب. (۱۳۸۶). نشانگرهای مولکولی، چاپ دوم، انتشارات دانشگاه تهران.
3. Botstein, D., R.L. White, M. Skolnick, R.W. Davis. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am. J. Human. Genet.* 32: 314-331.
4. Campbell, B.K., D.T. Baird. (2001). Inhibin A is a follicle stimulating hormone-responsive marker of granulosa cell differentiation, which has both autocrine and paracrine action in sheep. *J. Endocrinol.* 169: 333-345.
5. Chang, M., C.W. Brown, M.M. Matzuk. (2002). Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor- $\beta$  superfamily. *End. Rev.* 23 (6): 787-823.
6. Ede, A.J., C.A. Pierson, A.M. Crawford. (1995). Ovine microsatellites at the OarCP9, OarCP16, OarCP20, OarCP21, OarCP23 and OarCP26 loci. *J. Anim. Genet.* 26 (2): 129-130.
7. Esch, F.S., S. Shimasaki, k. Cooksey, A.J. Mason, S.Y. Ying, N. Ueno, N. Ling. (1987). Complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) cloning and DNA sequence analysis of rabbit ovarian inhibin. *Mol. Endocrinol.* 1: 388-396.
8. Findly, J.K. (1993). An update on the roles of inhibin, activin and follistatin as local regulator of folliculogenesis. *Boil. Reprod.* 48: 15-23.
9. Gholizadeh, M., G.R. Mianji. (2007). Use of microsatellite markers in poultry research. *Inte. J. Poul. Sci.* 6(2):145-153.
10. Hiender, S., K.G. Doods, R. Wassmuth. (2000). Linkage mapping of the ovine  $\alpha$ -inhibin (INHA),  $\beta_A$ -inhibin/activin (INHBA), and  $\beta_B$ -inhibin/activin (INHBB) genes. *Americ. Gen. Associ.* 343-345.
11. Hopko, I.J.L., T.E. Good, P.G. Knight, J.J. Ireland. (1994). Alterations in amounts of different forms of inhibin during follicular atresia. *Biol. Reprod.* 50: 1265-1276.
12. Hua, G.H., C.S. Lin, Y.H. Vei, W.W. Sheng, S. Zhong, C.Q. Kang, C. Lin, W.Q. Ying, Y.L. Guo. (2007). HaeII RFLP of INHA and its relationship to goat litter size. *Hered. (Beijing).* 29 (8): 972-976.
13. Johnson, S.K., M.F. Smith. (1985). Effects of charcoal-extracted, bovine follicular fluid on gonadotropin concentrations, the onset of oestrus and luteal function in heifers. *J. Anim. Sci.* 61: 203-209.
14. Leversha, L.J., D.M. Robertson, F.L. de Vos, F.J. Morgan, M.T.W. Hearn, R.E.H. Wettenhall, J.K. Findly, H.G. Burger, D.M. de Kretser. (1987). Isolation of inhibin from ovine follicular fluid. *J. Endocrinol.* 113: 213-221.
15. Ling, N., S.Y. Ying, N. Ueno, F. Esch, L. Denoray, R. Guillemin. (1985). Isolation and partial characterization of a Mw 32000 protein with inhibin activity from porcine follicular fluid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 7217-7221
16. Lord, E.A., K.G. Dodds, H. Henry, J.M. Lumsden, G.W. Montgomery. (1998). Identification of booroola carrier using microsatellite marker. *Wool. Technol. Sheep. Breed.* 46: 245-249.
17. Medan, M.S., T. Takedomi, Y. Aoyagi, M. Konishi, S. Yazawa, G. Watanabe, K. Taya. (2006). The effect of active immunization against inhibin on gonadotrophin secretion and follicular dynamics during the estrous cycle in cows. *Reprod. Develop.* 52: 107-113.
18. Miller. (1988). The DNA laboratory, Medical school, Malta.
19. Miyamoto, K., Y. Hasegawa, M. Fukuda, M. Nomura, M. Igarashi, K. Kangava, H. Matsuo. (1985). Isolation porcine follicular fluid inhibin of 32KDa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 129: 396-403.
20. Ouyang, X.X., Q.S. Si, S.Q. Huang, Z.F. Deng, H.X. Liu, D.S. He, S.G. Tan, S.G. Hu. (2005). Analysis of microsatellite DNA markers of *OarHH35* and *BMS2508* in four goat breeds. *Chin. J. Agri. Biote.* 3: 217-222
21. Realivasquez, R., S.A. Ericsson, S.F. Spiller, W.T. Campbell, K.L. Sternes, P.H. Purdy, H.D. Blackburn, J.M. Dzakuma. (2004). Spanish buck ss-b inhibin/activin (INHBB) microsatellite polymorphisms. *J. Anim. Sci. Suppl.* 82 (1): 377-378
22. River, J., J. Spiers, R. McClintock, J. Vaughan, W. Vale. (1985). Purification and partian characterization of inhibin from porcine follicular fluid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 133: 120-127.
23. Robrtson, D.M., L.M. Foulds, L. Leveresh, F.J. Morgan, M.T.W. Hearn, H.G. Burger, R.E.H. Wettenhall, D.M. de Kretser. (1985). Isolation of inhibin from bovin follicular fluid. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 126: 220-226.
24. Robrtson, D.M., R. Klein, F.L. de Vose, R.I. McLachlan, R.E.H. Wettenhall, M.T.W. Hearn, H.G. Burger, D.M. de Kretser. (1987). The Isolation of polypeptides with FSH suppressing activity from bovine follicular fluid which are structurally different to inhibin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 149: 744-749.
25. Spiller, S.F., S.A. Ericsson, R. Realivasquez, W.T. Campbell, K.L. Sterns, P.H. Purdy, H.D. Blackburn, J. M. Dzakuma. (2004). INHA microsatellite polymorphisms in angora bucks. *J. Ani. Sci.* 82(1): 378.

26. Stefano, L., F. Pasqual, M.R. Fernando, P. Felice. (2005). Inhibin in female and male reproductive physiology: role in gemetogenesis, conception, implantation and early pregnancy. *Hum. Reprod. Update*. 11 (2): 123-135.
27. Stone, R.T., J.C. Pulido, G.M. Duyk, S.M. Kappes, J.W. Keele, C.W Beattie. (1995). A small-insert bovine genomic library highly enriched for microsatellite repeat sequences. *J. Mamm. Genom.* 6 (10): 714-724.
28. Xhang, Z., J.K. Findly, R.S. Carson, A.C. Herington, H.G. Burger. (1988b). Transforming growth factor  $\beta$  enhances basal and FSH-stimulated inhibin production by rat granulose cells in vitro. *Mol. Cell. Endocrinol.* 58: 161-166.
29. Yeh, Francis, C., R.C. Yang, B.J. Boyle Timothy, Z.H. Ye and Judy X Mao (1999). POPGENE version 1.32, the user-friendly software for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Canada.