

بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت گوسفند بلوچی با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره

سعید اسماعیل خانیان^۱، اردشیر نجاتی جوارمی^۲، فضل‌ا... افراز^۳، پیمان دانشیار^۳ و صابر قنبری^۴

چکیده

در این مطالعه به منظور تعیین سطح تنوع ژنتیکی در جمعیت گوسفند بلوچی از ۱۹ جایگاه ریز ماهواره‌ای استفاده شد. نمونه‌های خون کامل از تعداد ۱۵۶ راس گوسفند بلوچی در ایستگاه اصلاح دام شمال شرق کشور (عباس‌آباد- مشهد) تهیه و استخراج DNA به روش استخراج نمکی بهینه شده انجام شد. تمام نشانگرهای مورد استفاده به غیر از نشانگر UNC5C جایگاه‌های مربوطه را تکثیر کردند. محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید واسرشته ساز ۸٪ تفکیک و رنگ آمیزی به روش نترات نقره سریع انجام شد. فراوانی‌های آلی و ژنوتیپی به روش شمارش مستقیم به دست آمد و برآورد معیارهای مختلف تنوع درون جمعیتی و معیارهای چندشکلی برای هر نشانگر برآورد شد. آزمون تعادل هاردی-واینبرگ نشان داد که این جمعیت به جز در جایگاه OarAE101، در سایر جایگاه‌ها انحراف معنی‌داری از حالت تعادل داشت ($P < 0.005$). دامنه هتروزیگوسیتی (تنوع ژنی) برای این جایگاه‌ها بین ۰/۱ تا ۰/۹۳ متفاوت بود. هم‌چنین دو جایگاه BM1329 و BULG5E یک شکل بودند. در مجموع نتایج حاکی از چند شکل بودن اکثر نشانگرهای مورد مطالعه بود که امکان استفاده از آنها را در مطالعات بعدی در این جمعیت تأیید می‌کند.

واژه‌های کلیدی: گوسفند بلوچی، چند شکلی، نشانگرهای ریز ماهواره، هتروزیگوسیتی

مقدمه

بخش عمده ای از استان خراسان پراکنده بوده و در استان‌های کرمان، اصفهان و یزد نیز پرورش داده می‌شود. بدین ترتیب ضرورت انجام مطالعات ژنتیکی جدید در این جمعیت به کمک نشانگرهای مولکولی مناسب از جمله ریز ماهواره‌ها به علل ذکر شده و به منظور شناسایی منابع ژنتیکی گوسفندان ایران و هم‌چنین جهت بالا بردن راندمان تولید مثل از طریق انتخاب

گوسفند بلوچی به سبب ویژگی‌های ژنتیکی خاص از جمله دوقلو زایی بالا و نیز به سبب پراکندگی گسترده در منطقه شرق کشور، عمده ترین نژاد گوسفند منطقه شرق کشور به شمار می‌آید. ۲۹٪ از گوسفندان ایران را این نژاد تشکیل می‌دهد (۲). این نژاد در کلیه شهرستان‌های استان سیستان و بلوچستان و

۱. استادیار بیوتکنولوژی، مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور، کرج

۲. استادیار ژنتیک و اصلاح نژاد دام، مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور، کرج

۳. کارشناس ارشد علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل

۴. کارشناس ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

BM1329 را گزارش نمودند (۱۳). مولسانت و همکاران جایگاه‌های BMS2508، LSCU43U، Bulge5، 471U و 300U را گزارش کردند (۱۶).

مواد و روش‌ها

گله مورد مطالعه، گله شماره دو مرکز اصلاح نژاد شمال شرق کشور (عباس آباد) می‌باشد که در مجموع شامل حدود ۵۰۰ راس گوسفند بلوچی است.

نمونه‌های خون کامل به میزان ۱۰ میلی‌لیتر از ورید وداج و با استفاده از لوله خلاء دار ۵ میلی‌لیتری حاوی ماده ضد انعقاد Na₂EDTA از تعداد ۸۵ رأس میش و ۱۵ راس قوچ و ۵۶ راس بره تهیه گردید. نمونه‌گیری به طور تصادفی صورت گرفت.

استخراج DNA به روش استخراج نمکی میلر و همکاران (۱۴) انجام شد. برای این منظور دیواره سلولی توسط بافر جدا کننده (5mM MgCl₂، 0.32 M Sucrose، 1% Trinton 100X، 10mM Tris-HCL، 400mM NaCl2) و محتویات هسته توسط بافر لیز کننده هسته آزاد شد (PH=7.5، 10mM Tris-HCL، 10mM Tris-HCL، 400mM NaCl2). پروتئین‌های کروموزوم با استفاده از آنزیم پروتئیناز K جدا شده و DNA خالص به دست آمد. کمیّت و کیفیت DNA استخراج شده با دو روش ژل آگارز ۰/۸٪ و اسپکتروفتومتر بررسی شد. در انتخاب نشانگرها سعی شد جایگاه‌های ژنی میکروساتلایت‌ها با توجه به نتایج مطالعات دیگران انتخاب گردند. با توجه به حضور یک ژن بزرگ اثر مؤثر بر صفت دو قلو زایی بر روی کروموزوم شماره شش، تقریباً نیمی از جایگاه‌ها (۱۰ جایگاه) روی این کروموزوم در نظر گرفته شدند. جایگاه‌های مذکور در فاصله ۰/۱ تا ۲۰ سانتی مورگانی در دو طرف مکان احتمالی ژن مزبور انتخاب گردیدند. مشخصات جایگاه‌های مورد مطالعه در جدول ۱ آورده شده است. توالی آغاز گرهای لازم برای تکثیر جایگاه‌های انتخاب شده براساس مطالعات دیگران تهیه و به شرکت‌های TIB، MWG آلمان سفارش داده شد. واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) برطبق روش استاندارد

به‌وسیله مارکرها کاملاً محسوس می‌باشد. مطالعات در ایران کارآمدی نشانگرهای ریزماهورای را برای انجام مطالعات ژنتیک جمعیت در گوسفند به اثبات رسانده است (۱، ۴، ۵، ۶ و ۷). این نشانگرها به سبب چند شکلی بالا، گستردگی در سرتاسر ژنوم، کم هزینه بودن، ژنوتیپ‌یابی آسان و مهم‌تر از همه توارث همباز امکان انجام انواع مطالعات ژنتیکی ساده، سریع و دقیق‌تر را فراهم آورده‌اند. در این مطالعه سعی گردیده است تا با تعیین ویژگی‌ها و خصوصیات ژنتیکی این گوسفندان در ۱۹ جایگاه ریزماهوره چندشکل‌ترین این جایگاه‌ها شناسایی و با برآورد معیارهای مختلف، تنوع درون جمعیتی (تنوع ژنی) و نیز میزان چندشکلی جایگاه‌های مذکور در جمعیت گوسفند بلوچی مورد مطالعه تعیین گردد و با معرفی جایگاه‌های چند شکل مناسب زمینه برای مطالعات ژنتیکی بعدی فراهم شود. این مطالعه روی جمعیت گوسفند بلوچی ایستگاه اصلاح نژاد شمال شرق کشور (عباس‌آباد-مشهد) به سبب داشتن شجره قابل اطمینان و وجود رکوردهای متفاوت برای صفات تولیدی انجام شد.

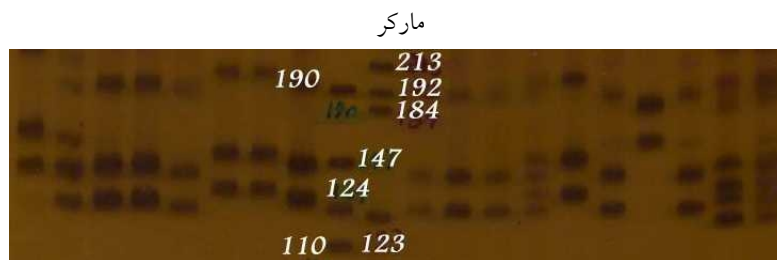
مونت گومری و همکاران تفرق ژن Fec B را در ۱۲ خانواده برولا- مرینو شامل ۳۷۹ نجاج ماده بررسی کردند (۱۵). در این تحقیق دو نشانگر ریزماهوره OarAE101 و OarHHO55 پیوسته با این ژن معرفی شدند. یکی از محققین جایگاه OarFCB304 را گزارش نمود (۷). استون و همکاران جایگاه BMS460 را ۹ آلی گزارش نمودند و محل آن را نیز کروموزوم شماره ۳ تعیین کردند (۲۰). یکی دیگر از محققین فراوانی نشانگرهای میکروساتلایت OarAE101 و BM1329 را پیوسته با ژن FecB در گوسفند برولا- مرینوی گوسفندان مرینوی مجارستان تعیین نمود که به ترتیب دارای ۵ آلل و ۴ آلل بودند (۵). فرید و همکاران تنوع ژنتیکی ۲۷۵ گوسفند از ۱۰ نژاد را با استفاده از ۱۰ جایگاه ریزماهوره ارزیابی نمودند (۱۱). نتایج نشان داد در نژادهایی که تحت انتخاب شدید قرار داشته‌اند کاهش مؤثری در تنوع ژنتیکی جایگاه‌های مورد مطالعه وجود ندارد. مادوکس و همکاران جایگاه‌های MAF64، OarC26، MCMA2، MCMA26، OarHHO55، BMO143،

جدول ۱. مشخصات پرایمرها و جایگاه‌های ژنی مورد مطالعه

نام جایگاه	توالی آغازگرها (5'-3')	کروموزوم	واحد تکرار شونده	مأخذ
300U	GGG GGT TCC TTG TAG GTT TGT G GGA AGT GCA GAG AGT CCC ATA C	6	-	17
LSCV0043	CCA GAA TAT AGA GTT TTG TCA AG GCC TGA TTT GTA TTT GTA TGA G	6	-	17
OarHH55	GTT ATT CCA TAT TCT TTC CTC CAT CAT AAG C CCA CAC AGA GCA ACT AAA ACC CAG C	6	-	16
BMS2508	TTT CTG GGA TTA CAA AAT GCT C TTT CTT AGG GGA GTG TTG ATT C	6	(TG)14	17
BM143	ACC TGG GAA GCC TCC ATA TC CTG CAG GCA GAT TCT TTA TCG	6	(TG)16	6
471U	CTA CAA TAA ATA ATG AGG TGA AA TGA GTA GAG ACA AAG CTA TAA A	6	-	17
OarAE101	TAA GAA ATA TAT TTG AAA AAA CTG TAT CTC CC TTC TTA TAG ATG CAC TCA AGC TAG G	6	(CA)12	16
BM1329	TTG TTT AGG CAA GTC CAA AGT C AAC ACC GCA GCT TCA TCC	6	(AC)18	6
BULGE5E	CAC AAA CAT TCG GAC ATG ACC TGA GGA GGG CAC ATC CAT TG	6	-	17
BM6438	TTG AGC ACA GAC ACA GAC TGG ACT GAA TGC CTC CTT TGT GC	1	(GT)14	6
BM6444	CTC TGG GTA CAA CAC TGA GTC C TAG AGA GTT TCC CTG TCC ATC C	2	(GT)16	6
BMS460	TGC CCC ATA GTG TAG TGC TC GCC AGC AGA GAA TTG TAG CA	3	(AC)20	21
BMS678	ACC ATC TAC TGT GCT ATG GCT T GCA GAA ACA CAA TAC TCA GTG C	2	(GT)16	21
MAF64	AAT AGA CCA TTC AGA GAA ACG TTG AC CTC ATG GAA TCA GAC AAA AGG TAG C	1	(TG)13	22
McMA2	TCA CCC AAC AAT CAT GAA AC TTA AAT CGA GTG TGA ATG GG	13	(AC)28	14
McMA26	TCT CTG CTT TCC AGC CTT ATT C AGA GCT TTT AGG ACA GCC ACC	18	(GT)31	14
OarFCB304	CCC TAG GAG CTT TCA ATA AAG AAT CGG CGC TGC TGT CAA CTG GGT CAG GG	7	(TC)6GC [(TC)4GC]2 (TC)11(AC)15	7
OarCP26	GGC CTA ACA GAA TTC AGA TGA TGT TGC GTC ACC ATA CTG ACG GCT GGT TCC	4	(CA)11CG(CA) 15	11
UNC5C	ATC CTC ACC CTT CAA ACA G CTG GGG AGT TTT CTC TGA C	6	-	17



شکل ۱. الگوی باندها برای جایگاه MCMA2



شکل ۲. الگوی باندها برای جایگاه BMS460

با استفاده از نرم افزار POPGENE و محتوای اطلاعات چندشکلی یا PIC (Polymorphic Information Content) با استفاده از نرم افزار Het برآورد گردید.

نتایج و بحث

تکثیر در تمامی جایگاه‌ها به جز جایگاه UNC5C موفقیت آمیز بود. شکل ۱ و ۲ الگوی باندهای تکثیر جایگاه‌های MCMA2 و BMS460 را نشان می‌دهد. علل احتمالی عدم تکثیر در جایگاه UNC5C را می‌توان به وجود جهش در یک یا هر دو مکان اتصال آغازگرها در جمعیت مورد مطالعه ذکر کرد. مولسنت و همکاران (۲۰۰۱) تعداد ال‌این جایگاه را ۷ آلل گزارش نمود (۱۶). به جز جایگاه OarAE101، سایر جایگاه‌ها با هر دو آزمون مربع کای و نسبت درست نمایی انحراف معنی داری از تعادل هاردی واینبرگ نشان دادند ($P < 0.05$). این وضعیت برای گله تحت انتخاب کاملاً منطقی به نظر می‌رسد. مهمان نواز و همکاران همخونی در این گله را بسیار پائین گزارش نمودند و علت آن را وجود انتخاب و جفت‌گیری کنترل شده عنوان کرده‌اند (۳). جدول ۲ نتایج حاصل از هر جایگاه شامل دامنه اندازه

در دستگاه ترموسایکلر Biometra انجام گردید. غلظت اجزای واکنش به شرح زیر می‌باشد:

۵۰ نانوگرم از DNA ژنومی گوسفند، ۲۰۰ میکرومولار از مخلوط dNTPs، ۰/۲۵ میکرومولار از هر آغازگر، بافر PCR با غلظت 1X و یک واحد از آنزیم Taq پلیمرز (ساخت شرکت Fermentase). فرآورده‌های PCR با استفاده از ژل آکریل آمید واسرشته‌ساز ۸٪ تفکیک شد. ژل‌ها به روش رنگ آمیزی نترات نقره سریع رنگ آمیزی شد (۱۹). اندازه باندهای به دست آمده از روی نشانگرهای اندازه (نشانگرهای شماره ۷ و VIII ساخت شرکت Roche آلمان) تعیین و ژنوتیپ هر فرد در هر جایگاه مستقیماً از روی ژل به دست آمد. فراوانی‌های ژنوتیپی و آلی به روش شمارش مستقیم تعیین گردید. جایگاه‌های مختلف از نظر تعادل هاردی - واینبرگ با دو آزمون مربع کای و نسبت درست نمایی (۱۲) و با استفاده از نرم افزار POPGENE، (۲۱) مورد آزمون قرار گرفتند ($P < 0.05$). هتروزیگوسیتی مورد انتظار نارایب، (۱۷) به عنوان معیار تنوع درون جمعیتی با استفاده از نرم‌افزار Het برآورد گردید (۱۷ و ۱۸). هم‌چنین معیارهای مختلف چند شکلی مانند تعداد آلل واقعی (n)، تعداد آلل موثر

جدول ۲. تعداد الل، معیارهای چند شکلی و تعداد الل واقعی و موثر در جایگاه‌های مورد مطالعه

تعداد آلل موثر (ne)	تعداد آلل واقعی (n)	محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC)	هتروزیگوسیتی مورد انتظار ناریب Nei (He)	دامنه اندازه آللی (bp)	جایگاه
۶/۸۹	۹	۰/۸۴	۰/۸۵	۱۲۶-۱۵۹	300U
۳/۵۶	۶	۰/۶۸	۰/۷۲	۱۱۳-۱۴۲	LSCV0043
۳/۶۸	۷	۰/۶۸	۰/۷۳	۹۷-۱۱۸	QarHH55
۳/۴۸	۶	۰/۶۶	۰/۷۱	۱۵۳-۱۹۴	BMS2508
۳/۶۸	۶	۰/۶۹	۰/۷۳	۱۰۵-۱۱۹	BM143
۱/۹۹	۲	۰/۳۷	۰/۵۰	۱۹۲-۱۹۴	471U
۱/۱۱	۲	۰/۱۰	۰/۱۰	۱۰۲-۱۱۲	OarAE101
۱	۱	-	-	۱۷۰	BM1329
۱	۱	-	-	۱۳۳	BULGE5E
۸/۸۵	۱۲	۰/۸۸	۰/۸۹	۲۷۱-۳۲۳	BM6438
۱۴	۱۵	۰/۹۲	۰/۹۳	۱۲۰-۱۷۸	BM6444
۱۱/۴	۱۸	۰/۹۱	۰/۹۱	۱۲۴-۱۸۹	BMS460
۶/۴	۱۰	۰/۸۳	۰/۸۵	۹۷-۱۸۱	BMS678
۸/۷	۱۲	۰/۸۷	۰/۸۸	۱۰۹-۱۵۱	MAF64
۱۰	۱۲	۰/۹۰	۰/۹۰	۱۵۹-۱۹۹	McMA2
۱۰	۱۲	۰/۹۰	۰/۹۱	۱۸۴-۲۱۸	McMA26
۶/۶	۱۰	۰/۸۳	۰/۸۵	۱۱۶-۱۷۶	OarFCB304
۱۰/۳	۱۳	۰/۹۰	۰/۹۱	۱۵۴-۱۹۶	OarCP26
-	-	-	-	-	UNC5C

آللی، تعداد آلل واقعی (n) و موثر (ne)، میزان اطلاعات چند شکلی (PIC) و هتروزیگوسیتی مورد انتظار ناریب Nei (He) را نشان می‌دهد. دامنه اندازه آللی برخی از جایگاه‌های مورد مطالعه همچون BM1329 خارج از محدوده‌های گزارش شده در مطالعات قبلی بود. و این امر احتمالاً به خاطر تفاوت جمعیت حاضر از جمعیت‌های مورد مطالعه دیگران است مادوکس و همکاران دامنه اللی جایگاه BM1329 را ۱۷۰-۱۵۶ bp و Chu and Wang (۲۰۰۲) دامنه اللی همین جایگاه را ۱۸۰-۱۶۰ bp گزارش نموده‌اند (۱۳).

مولسانت و همکاران این جایگاه را چند شکل گزارش نمودند. جایگاه‌های Buge5E و BM1329 یک شکل بودند آللی، تعداد آلل واقعی (n) و موثر (ne)، میزان اطلاعات چند شکلی (PIC) و هتروزیگوسیتی مورد انتظار ناریب Nei (He) را نشان می‌دهد. دامنه اندازه آللی برخی از جایگاه‌های مورد مطالعه همچون BM1329 خارج از محدوده‌های گزارش شده در مطالعات قبلی بود. و این امر احتمالاً به خاطر تفاوت جمعیت حاضر از جمعیت‌های مورد مطالعه دیگران است مادوکس و همکاران دامنه اللی جایگاه BM1329 را ۱۷۰-۱۵۶ bp و Chu and Wang (۲۰۰۲) دامنه اللی همین جایگاه را ۱۸۰-۱۶۰ bp گزارش نموده‌اند (۱۳).

جایگاه‌های OarAE101 و BM6444 به ترتیب بیشترین و کمترین هتروزیگوسیتی مورد انتظار (۰/۱ و ۰/۹۳) و تعداد آلل موثر (۱/۱ و ۱۴) را داشتند (جدول ۲). اما از نظر تعداد آلل واقعی جایگاه BMS460 با ۱۸ آلل و جایگاه‌های OarAE101 و 471U با دو آلل به ترتیب بیشترین و کمترین تعداد آلل واقعی را دارا بودند (بدون در نظر گرفتن جایگاه‌های تک شکل).

این جمعیت و سایر جمعیت‌های گوسفند ایرانی را دارا می‌باشند و می‌توان از آنها در مطالعاتی مانند مکان‌یابی ژن‌های مهم اقتصادی مانند ژن دوقلوزایی در همین جمعیت استفاده نمود. لازم به ذکر است این مطالعه با به‌کارگیری ۱۹ جایگاه ریز ماهواره‌ای و ۱۵۶ نمونه اشکال عمده در سایر مطالعات جمعیتی با استفاده از نشانگرهای DNA، یعنی کم بودن تعداد جایگاه و نمونه‌های مورد مطالعه را برطرف نموده و بنابراین می‌توان با اطمینان بالاتری به نتایج حاصل از آن استناد نمود و با اضافه نمودن جایگاه‌های جدید به این مطالعه بر اعتبار نتایج آن افزود. در نهایت می‌توان گفت این مطالعه بار دیگر کارآمدی ریز ماهواره‌ها را به عنوان نشانگر برگزیده برای مطالعات جمعیتی تأیید می‌نماید.

سپاسگزاری

این تحقیق در آزمایشگاه ژنتیک مولکولی بخش بیوتکنولوژی مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور انجام شد. از همراهی و همکاری تمامی دوستان و همکاران در آزمایشگاه بخش بیوتکنولوژی مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور تشکر می‌نمائیم.

بیشترین و کمترین PIC نیز به ترتیب مربوط به جایگاه‌های BM6444 (۰/۹۲) و OarAE101 (۰/۱۰) بود. مادوکس و همکاران مقدار PIC را برای جایگاه‌های BM6444 به میزان ۰/۸۸ گزارش نمودند (۱۳).

متوسط هتروزیگوسیتی مورد انتظار ناریب Nei و متوسط PIC در تمام جایگاه‌های مورد مطالعه با و بدون احتساب جایگاه‌های تک شکل بالا می‌باشد (۰/۶۹، ۰/۶۶ و ۰/۷۷، ۰/۷۵). در اکثر مطالعات این مقادیر برای جایگاه‌های ریز ماهواره‌ای معمولاً بیش از ۰/۸ ذکر گردیده است، مادوکس (۱، ۸، ۱۰ و ۱۳) که نشان دهنده وجود چند شکلی بالا در این نشانگرها در مقایسه با سایر نشانگرهاست.

هتروزیگوسیتی بالای جایگاه‌های مورد مطالعه در جمعیت گوسفند بلوچی حاکی از حفظ تنوع بالای درون جمعیتی علی‌رغم انجام کارهای اصلاح نژادی بر روی این گله به‌علل شیوه‌های مدیریتی و اصلاحی برنامه ریزی شده می‌باشد که توانسته است میزان همخونی را کاهش و تنوع را در سطح قابل قبولی حفظ نماید (۳).

مطالعه حاضر نشان داد که اکثر ریزماهواره‌های مورد مطالعه با چند شکلی بالا و مناسب شرایط استفاده در مطالعات آتی در

منابع مورد استفاده

۱. بنابازی، م. ح. ۱۳۸۱. بررسی تنوع ژنتیکی در درون و بین پنج جمعیت گوسفند ایرانی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره. پایان‌نامه کارشناسی ارشد علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران.
۲. توکلیان، ج. ۱۳۷۸. نگرشی بر ذخایر ژنتیکی دام و طیور بومی ایران. مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور، کرج.
۳. مهمان‌نواز، ی.، ر. واعظ ترشیزی، ع. صالحی و ع. شوریده. ۱۳۸۰. همخونی و اثر آن بر صفات تولیدی در گوسفند نژاد بلوچی. اولین سمینار ژنتیک و اصلاح نژاد دام، طیور و آبزیان کشور. ۱-۲ اسفندماه ۱۳۸۰. دانشگاه تهران.
4. Arranz, J.J., Y. Bayon and F. San Primitivo. 2001. Differentiation among spanish sheep breeds using microsatellites. *Genet. Selection and Evol.* 33: 529-542.
5. Arnyasi, M., A. Zsolnai, L. Fesus and A. Javor. 1999. The frequency of alleles of the OarAE101 and BM1329 microsatellite markers linked to the FecB gene in the Hungarian prolific Merino sheep. *Scientific conference at the Hungarian Acad. of Sci.* 48:708-710.
6. Buchanan, F.C., L.J. Adams, R.P. Littlejohn, J.F. Maddox and A.M. Crawford. 1994. Determination of evolutionary relationships among sheep breeds using microsatellites. *Genom.* 22: 397-403.
7. Buchanan F.C. and A.M. Crawford. 1993. Ovine microsatellites at the OarFCB11, OarFCB128, OarFCB193, OarFCB266 and OarFCB304 loci. *Anim. Gene.* 24:145.
8. Buchanan F.C. and T.D. Thue. 1998. Intrabreed polymorphic information content of microsatellites in cattle and sheep. *Can. J. Anim. Sci.* 78:425-428.

9. Chu, Mx, J.Z.Wang and A.G. Wang. 2002. Genetic polymorphisms of five microsatellite loci in small Tail Han sheep. *Chines J. Anim. Sci.* 29:502-506
10. Ede, A.J., C.A. Pierson and A.M. Crawford. 1995. Ovine microsatellites at the OarCP9, OarCP16, OarCP20, OarCP21, OarCP23 and OarCP26 loci. *Anim. Genet.* 26:129-131.
11. Farid, A., E. O'Reilly, C. Dollard and Jr. C.R. Kelsey. 2000. Genetic analysis of ten sheep breeds using microsatellite markers. *Can. J. Anim. Sci.* 80: 9-17.
12. Hedrick, P. W. 1999. *Genetic of Populations*. Second ed., Jones and Bartlett Pub., Sudbury, MA, USA.
13. Maddox, J.F., K.P. Davis, A.M. Crawford, D.J. Hulme, D.V. Viaman, E.O. Cribiu, B.A. Ferking, K.J. Beh, N. Kang, C.D. Riffkin. S.S. Moore. K.G.Dodds. J.M. Lumsden. 2001. An enhanced linkage map of the sheep genome comprising more than 1000 loci. *Genome Res.* 11:1275-1289.
14. Miller, S.A., D.D. Dykes and H.F. Polesky. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16:1215.
15. Montgomery, G.W., A.M.Crawford, J.M.Penty, A.J. Ede, H.M.Henry, C.A.Pierson, E.A. Lord and S.M. Galloway. 1993. The ovine booroola fecundity gene (FecB) is linked to markers from a region of human chromosome 4q. *Nature Gene.* 4:410-414.
16. Mulsant, P., F.Lecerf, S. Fabre, L.Schibler, P.Monget, I.Lannebic, C.Pisselet, J.Riquet, D.Monniaux, I. callebaut, E. Cribiu, J.Thimonier, J.Teyssier, L.Bodin, Y.Cognie, N. Chitour and E. Jean-Michel. 2001. Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in booroola merino ewes. *PNAS* 98:5104-5109.
17. Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Gene.* 89:583-590.
18. Ott, J. 1989. Program HET. Version 1.10, Utility programs for analysis of genetic linkage. Rockefeller University. New York.
19. Sanguinetti, C.J., E.D. Neto and A.J.G. Simpson. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR product separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 17:915-919.
20. Stone, R.T., J.C. Pulido, G.M. Duyk, S.M. Kappes, J.W. Keele and C.W. Beatti. 1995. A small-insert bovine genomic library highly enriched for microsatellite repeat sequences. *Mammalian Genome* 6:714-724.
21. Yeh, F.C., R. Yang and C.W. Boyle. 1999. POPGENE. Version 1.31, Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis, University of Alberta, Edmonton, Canada.