مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ۵، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۳، ۱۶۳-۱۵۷

ارزیابی چند شکلی ژن میوستاتین در گوسفند نژاد فراهانی با استفاده از روش PCR-RFLP

سید محمد شریعت زاده .M.Sc[۱]، علی قاضی خانی شاد .Ph.D[۲]، مهدی خدایی مطلق .Ph.D[۳]، مجید مهدیه .Ph.D[۴*]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، دانشکده کشاورزی
۲- دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، دانشکده کشاورزی، بخش علوم دامی
۳- دانشگاه اراک، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه علوم دامی، کدپستی ۸۳۴۹-۸-۳۸۱۵۶
۴- دانشگاه اراک، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، کد پستی ۷۳۴۹-۸-۳۸۱۵۶
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: m-mahdiyeh@araku.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۴/۳۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۹/۲۶

چکیده

هدف: ژن میوستاتین یا عامل ۸ رشد و تمایز (GDF8) به‌عنوان عامل ایجاد کننده ماهیچه مضاعف شناخته شده است، که در آن مجموعه‌ای از جهش‌های غیرفعال کننده ژن رخ می‌دهند. در گاو، جهش‌های غیرفعال کننده در این ژن منجر به تولید فنوتیپ ماهیچه مضاعف می‌شود. هدف از انجام مطالعه حاضر تجزیه و تحلیل ناحیه کدکننده در برگیرنده جهش‌هایی که به‌طور بالقوه بیان ژن میوستاتین را در گوسفند نژاد فراهانی تغییر می‌دهند بود.

مواد و روش‌ها: از ۸۶ راس گوسفند فراهانی نمونه‌های خون گرفته شد و DNA استخراج شده به کمک کیت برای تکثیر قطعه ۳۳۷ جفت بازی ژن میوستاتین استفاده شد. چند شکلی طول قطعات برشی محصولات PCR با افزودن آنزیم برشی *HaeIII* به محصولات واکنش PCR کامل اجرا شد. ژنوتیپ‌های PCR-RFLP آنالیز شدند.

نتایج: فراوانی ژنوتیپ های Mm, MM و mm به ترتیب ۰/۰۴۶، ۰/۱۲۷ و ۰/۸۲۷ تشخیص داده شدند. فراوانی آللی نیز برای آلل های M و m به‌ترتیب ۰/۱۱ و ۰/۸۹ برآورد گردید.

نتیجه گیری: مقایسه فراوانی آلل M (آلل مطلوب) محاسبه شده در گوسفندهای فراهانی با تحقیقات مشابه در نژادهای مختلف دنیا نشان داد که فراوانی این آلل در گوسفند فراهانی در سطح مناسبی نمی‌باشد. یعنی آلل‌های ژن میوستاتین در نژاد فراهانی در مقایسه با نژادهای دیگر کمتر اصلاح و انتخاب شده اند. علاوه بر این، مشخص گردید که تعادل هاردی ـ واینبرگ در جمعیت مورد مطالعه در رابطه با این جایگاه برقرار نمی‌باشد.

واژگان کلیدی: چندشکلی، ژن میوستاتین، گوسفند فراهانی، PCR- RFLP

مقدمه

شناخت جنبه‌های ژنتیکی و ژن‌های عمده تاثیرگذار بر تولید گوشت اخیرا مورد توجه محققان ژنتیک و اصلاح نژاد قرار گرفته است. مطالعات برای یافتن ژن‌های به‌وجود آورنده ماهیچه مضاعف در گاوهای گوشتی منجر به کشف ژن میوستاتین شد که به‌عنوان ژن کاندیدا برای صفت تولید گوشت بررسی و نقش آن در نژادهای مختلف دام و طیور و حتی انسان شناخته شده است.

مطالعات مولکولی ژن میوستاتین نشان داده که این ژن چند شکل می‌باشد (۱و۲و۳). میوستاتین مهار کننده رشد ماهیچه‌های اسکلتی می‌باشد و اگر جهشی در ژن کد کننده میوستاتین اتفاق افتد، باعث تغییر نقش مهاری آن و افزایش عضله می‌شود (۱و۴و۵). با استفاده از تعیین نقشه فیزیکی کلون‌های یاک مشخص شد که ژن میوستاتین گاو نزدیک سانترومر کروموزوم شماره ۲ قرار دارد و جایگاه آن در گونه‌های مطالعه شده از جمله خوک، گاومیش، مرغ و موش خانگی مشخص شده است (۶). ژن میوستاتین گاوی دارای ۳ اگزون و ۲ اینترون می‌باشد. میوستاتین باعث میانجیگری بیان ژن در کنترل شکل فیبری ماهیچه است و با جلوگیری از تکثیر میوبلاست‌ها، عملا رشد عضلانی را متوقف می‌کند. این عمل میوستاتین به‌طور عمده به رشد ماهیچه‌ها پیش از تولد، یعنی زمان تکثیر و تمایز میوبلاست‌ها برمی‌گردد و انتظار می‌رود چنانچه جهشی بتواند باعث کاهش mRNA میوستاتین گردد، رشد عضلانی بیشتری در حیوان مشاهده شود (۱). علائم مختلفی برای تشخیص بین حیوانات با فنوتیپ ماهیچه مضاعف و حیوانات طبیعی مورد استفاده قرار گرفته است، از جمله DM یا N, D یا N, DM. فنوتیپ DM با هایپرتروفی ماهیچه‌ها مشخص شده است. در این حیوانات اندام‌های خلفی به‌صورت گرد و برجسته هستند و ماهیچه‌ها حالت بیرون زدگی دارند و خطوط آشکاری در زیر پوست قابل دیدن است. از دیگر مشخصه‌های فیزیکی آشکار می‌توان به استخوان‌های ظریف، دستگاه تناسلی نابالغ و زبان بزرگ در گوساله‌های تازه متولد شده اشاره کرد. حیوانات با فنوتیپ ماهیچه مضاعف دارای استخوان و چربی کمتر و ماهیچه بیشتری هستند و نسبت قسمت‌های ارزشمند گوشت بیشتری هستند و نسبت قسمت‌های ارزشمند گوشت بیشتر است. از معایب ماهیچه مضاعف می‌توان به کاهش باروری، کاهش بقای گوساله‌ها، افزایش حساسیت به استرس و بیماری‌های تنفسی اشاره نمود (۷). علی‌رغم آنچه گفته شد ماهیچه مضاعف ارتباطی با دو برابر شدن ماهیچه‌ها ندارد، اما به نسبت یک افزایش در تعداد فیبرهای ماهیچه‌ای (هیپرپلازی) و طویل شدن فیبرها (هایپرتروفی) را ایجاد می‌کند. در گاوهای ماهیچه مضاعف تعداد فیبرهای ماهیچه‌ای در زمان تولد دو برابر گاوهای عادی است. گاوهای ماهیچه مضاعف دارای درصد بیشتری از فیبرهای ماهیچه‌ای سفید هستند و مقدار کلاژن کمتری دارند. همچنین گزارش شده که گاوهای با ماهیچه مضاعف دارای بافت‌های همبند کمتری هستند که می‌تواند به افزایش تردی گوشت کمک کند. این نکته را باید متذکر شد که علاوه بر نژاد، تغذیه و جنس نیز فنوتیپ ماهیچه مضاعف را تحت تاثیر قرار می‌دهند (۸). حیوانات ماهیچه مضاعف گوشت ظریف‌تر و ترد تری تولید می‌کنند. همچنین گوشت حیوانات ماهیچه مضاعف به‌طور معنی‌داری حاوی مقدار چربی کمتری است. این ویژگی‌ها به‌طور زیادی منطبق با استانداردهای سلامتی است (۹). ژن میوستاتین بیشتر در گاو مورد مطالعه قرار گرفته است و در گوسفند کمتر مورد بررسی قرار گرفته است. تحقیقی (۱۰) در گوسفند نژاد تکسل انجام شد. در این تحقیق ناحیه ژن میوستاتین بر روی کروموزم شماره ۲ گوسفند جهت شناسایی ژن کاندیدا برای صفات لاشه مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش از ۸ نشانگر میکروساتلایت جهت تعیین ژنوتیپ استفاده شده و در نهایت آنالیز آماری بر روی داده‌ها صورت گرفت. نشانه‌ای از ژن کاندیدا برای سرعت رشد یا صفات لاشه به‌دست نیامد. اما، در مورد صفت چربی و ماهیچه ران وجود ژن کاندیدا برای افراد هتروزیگوت واقع بین نشانگرهای BULGE20 , BM81124 ثابت شد ولی در مورد افراد هموزیگوت چنین چیزی مشاهده نشد. بر روی گوسفندان بلوچی ایستگاه عباس آباد مشهد با استفاده از تکنیک PCR-SSCP چند شکلی ژن میوستاتین را بررسی کردند (۱). ۱۱ جفت آغازگر جهت انجام واکنش‌های PCR با استفاده از توالی ژن میوستاتین گاو و بخشی از آن در گوسفند طراحی شد. این ۱۱ آغازگر تقریبا تمامی طول ژن میوستاتین گوسفند را پوشش می‌دادند. نتایج حاصل از تکثیر ۶ آغازگر نشان داد که توالی ژن میوستاتین در این جمعیت بسیار حفاظت شده می‌باشد، در مورد ۲ آغازگر دیگر و دقت در الگوی باندی آن‌ها به این نکته اشاره شد که جهشی تک نوکلئوتیدی و یا حذف و اضافه در یک محدوده معین ژن اتفاق افتاده است. گوسفند فراهانی یکی از توده‌های دو منظوره تولید پشم و گوشت

می باشد و اکثرا به‌صورت سنتی پرورش داده می شوند. مناطق پرورشی همان‌طوری که از اسم گوسفند فراهانی برمی آید، در اکثر نقاط استان مرکزی و به‌ویژه منطقه فراهان، محلات، خمین، شازند (سربند)، دلیجان و ساوه می‌باشد. به‌طور کلی آمار موجود گوسفندان استان مرکزی در حدود ۲ میلیون راس می باشد که ۳۰ درصد آن‌ها گوسفند فراهانی است (۱۱).

مشخصات نژادی اندازه‌گیری‌ها در سال ۱۳۸۸ توسط معاونت امور دام و با مشارکت بخش خصوصی تعیین و ثبت گردیده است: رنگ بدن این گوسفندان سفید نخودی است، پوزه‌ها و دور چشم ها و ۴ قلم پا دارای لکه سیاه رنگ است، روی بینی در میش صاف و در قوچ دارای انحنا می‌باشد، جنس ماده فاقد شاخ است، دنبه‌ها در انتها گردو دارای شکاف کوچک به‌همراه دنبالچه در راس می باشد. پشم به حالت کوفته و ضخیم و مناسب قالیبافی است. نوع بهره این دام پشم و گوشت است نسبت برهزایی ۹۷ درصد می‌باشد. هدف از انجام تحقیق حاضر شناسایی ژنوتیپ‌های ژن میوستاتین و فراوانی آلل‌های آن برای اولین بار در گوسفند نژاد فراهانی به‌کمک روش PCR- RFLP و تعیین میزان چند شکلی در جمعیت گوسفندان فراهانی بود.

مواد و روش‌ها

جهت انجام تحقیق، نمونه‌های خون از ۸۶ راس گوسفند فراهانی در سطح استان مرکزی به‌دست آمد. پس از ریختن نمونه‌های خون تام در لوله‌های حاوی ضد انعقاد EDTA، لوله‌ها به‌مدت ۳ تا ۴ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند تا دیواره گلبول‌های سفید برای استخراج بهتر DNA نازک گردند. استخراج DNA پس از تغییر و بهینه‌سازی روش استخراج نمکی (۱۲) به‌شرح زیر انجام شد؛ ۴ میلی‌لیتر خون کامل داخل لوله‌ای پلاستیکی موسوم به فالکون ریخته شد. دو برابر حجم خون، بافر جدا کننده(x-100 1%, 10mM Tris-HCI pH = 7.5, 5mM $MgCl_2$, 0.32 M Sucrose, Triton) اضافه گردید و سپس ورتکس شد. محلول فوق به‌مدت ۵ دقیقه با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی به آرامی جدا و رسوب حاصله نگه داشته شد. ۳ میلی‌لیتر بافر جدا کننده به رسوب حاصله اضافه و عمل سانتریفوژ و جداسازی رسوب تکرار شد تا زمانی‌که یک رسوب کاملا سفید حاصل شد. ۳ میلی‌لیتر بافر لیز کننده (pH = 8.2- 400 mM NaCl, 2mM Na_2EDTA, 10mM Tris-Hcl به رسوب اضافه و به‌خوبی ورتکس شد. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) ده درصد و ۳۵۰ میکرولیتر آنزیم پروتئیناز- k (با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به محلول حاصله اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم قرار داده شد تا هضم محتویات هسته گلبول‌های سفید کامل گردد. یک میلی‌لیتر محلول NaCI اشباع (حدود ۶ مولار) به محلول اضافه گردید و سپس محلول به‌مدت ۱۵ ثانیه به‌شدت تکان داده شد. محلول مزبور به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی به یک لوله پلاستیکی استریل دیگر انتقال داده شد. در این مرحله پروتئین‌های اتصالی به اسیدهای نوکلئیک همراه با نمک در انتهای لوله رسوب سفید رنگی تشکیل دادند. هم حجم محلول، کلروفرم اضافه شد. و با تکان دادن با محلول مخلوط شد. سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. آلودگی‌ها و پروتئین اضافی در این مرحله جدا شدند. فاز آبی که در بالا تشکیل شد حاوی DNA بود که با احتیاط جدا و به لوله پلاستیکی جدیدی انتقال داده شد. برای متراکم‌ترنمودن رشته‌های DNA، به اندازه ۰/۱ حجم محلول استات سدیم ۳ مولار (pH = ۵/۲) اضافه شد. دو برابر حجم محلول به‌دست آمده، اتانول مطلق اضافه شد و لوله به آهستگی چند بار وارونه شد تا رشته‌های DNA ظاهر شدند. کلاف DNA با میله شیشه‌ای که دارای بار مثبت می‌باشد جمع آوری شد و به‌مدت حدود ۵ تا ۱۰ دقیقه در مجاورت هوا خشک شد. DNA حاصله دو بار با اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شد و نهایتا در ۱۰۰ تا ۲۰۰ میکرولیتر از بافر TE (pH = 7.5- Na_2EDTA 10 mM TrisHCL, 0.2mM) حل گردید. تیوب‌های حاوی DNA، به‌مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند تا DNA به‌خوبی حل شود. سپس در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند.

تعیین کیفیت و کمیت DNA: با استفاده از روش الکتروفورز مقایسه‌ای بر روی ژل آگارز با استفاده از مقادیر مشخصی DNA فاژ لامبدا انجام شد. جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمر از کیت PCR Master (شرکت سینا ژن) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و یک جفت پرایمر با توالی زیر استفاده گردید (۱۳).

5' – CCGGAGAGACTTTGG GCTTGA-3'

5' – TCATGAGCACCCACAGCGGTC-3'

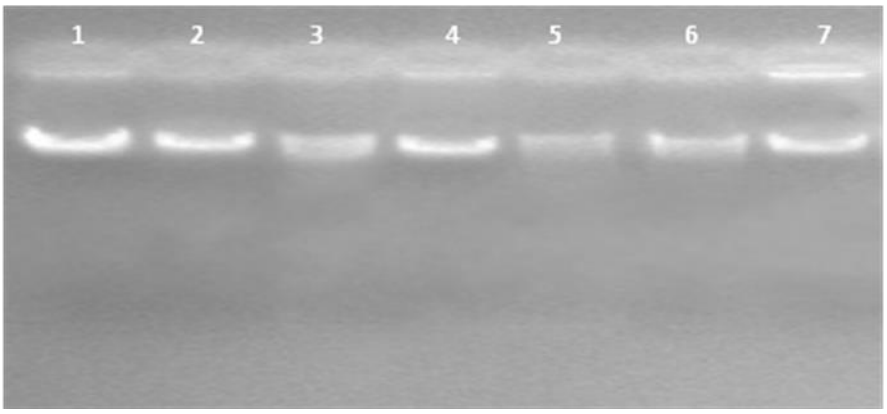
واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با برنامه حرارتی زیر در دستگاه ترموسایکلر انجام شد؛ واسرشت سازی اولیه DNA به‌مدت ۱

دقیقه و ۹۴ درجه سانتی‌گراد، انجام ۳۳ سیکل با واسرشت سازی DNA طی ۳۰ ثانیه و ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر به DNA طی ۶۰ ثانیه و ۵۸ درجه سانتی‌گراد و بسط آغازگر طی ۲ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد و بسط انتهایی ۲ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد. جهت مشاهده محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، از ژل آگارز ۱ درصد ولتاژ ۸۰ ولت به‌مدت ۱ ساعت استفاده شد و رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید انجام گرفت. سپس محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به‌کمک آنزیم برشی HaeIII مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند.

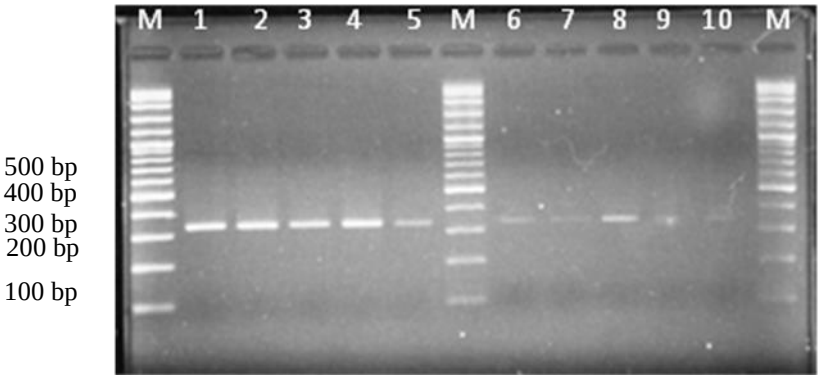
برای مشاهده قطعات هضم شده از ژل آکریل‌آمید ۸ درصد و ولتاژ ۲۰۰ به‌مدت ۲ ساعت استفاده شد و بعد از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، ژل اسکن شد و خواندن آلل با استفاده از نرم افزار Uvdoc صورت گرفت. برای برآورد فراوانی آلل‌ها، محاسبه هتروزیگوسیتی و آزمون مربع کا (X^2) از نرم افزار POP Gene 3.2 استفاده گردید.

نتایج

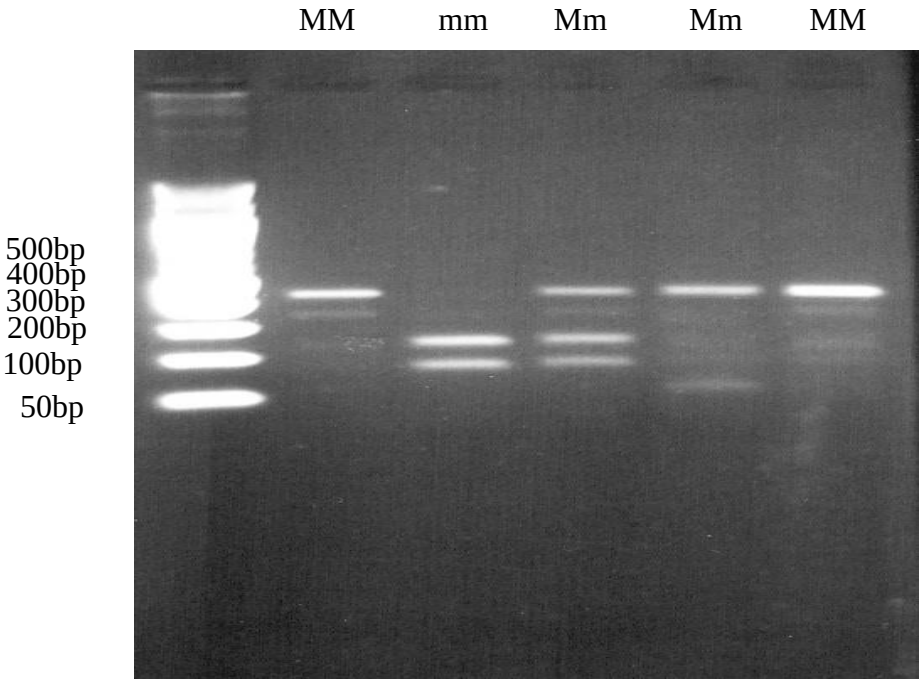
استفاده از روش استخراج نمکی جهت استخراج DNA از نمونه خون برتری خوبی را از لحاظ کمیت و کیفیت و صرف زمان لازم در استحصال DNA نشان داد (شکل ۱). تکثیر قطعه ۳۳۷ جفت بازی از ژن میوستاتین به‌کمک واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی به‌خوبی صورت گرفت و در نتیجه استفاده از برنامه حرارتی مناسب، آغازگرهای اختصاصی و شرایط خوب آزمایشگاهی که فراهم شد قطعه ۳۳۷ جفت بازی بدون قطعات غیراختصاصی به‌دست آمد (شکل۲) که با نتایجی که بر روی انسان، گاو، گوسفند و بز مطابقت داشت (۱۳).



شکل ۱: نمونه‌های تصادفی DNA (چاهک‌های شماره ۱ تا ۷) استخراج شده بر روی ژل آگارز از خون گوسفند نژاد فراهانی



شکل ۲: نمونه‌ای از محصولات PCR بر روی ژل آگارز. M مارکر وزن مولکولی و چاهک‌های شماره ۱ تا ۱۰ محصولات واکنش PCR از ۱۰ نمونه تصادفی است.



شکل۳: نمونه‌ای از محصول هضم آنزیمی بر روی ژل آکریل‌آمید. M الل غالب و m الل مغلوب است. MM معرف فرد هموزیگوت غالب، mm فرد هموزیگوت مغلوب و Mm فرد هتروزیگوت است. چاهک سمت چپ: مارکر وزن مولکولی.

گوسفندان با ژنوتیپ هتروزیگوت (Mm) دارای قطعات ۸۳، ۱۲۳، ۱۳۱ و قطعه برش نخورده ۳۳۷ جفت بازی بودند (شکل ۳). در هموزیگوت غالب (MM) قطعه ۳۳۷ جفت بازی بدون برش باقی ماند. در هموزیگوت مغلوب (mm) نیز قطعات ۸۳، ۱۲۳و ۱۳۱ جفت بازی مشاهده شد (شکل ۳). بعد از برآورد فراوانی آلل‌ها، محاسبه هتروزیگوسیتی و آزمون مربع کا (X^2) با استفاده از نرم افزار PopGene مشخص گردید که آلل m دارای بیشترین فراوانی (۰/۸۹) و آلل M دارای کمترین فراوانی (۰/۱۱) بودند (جدول ۱).

جدول ۱: فراوانی‌های ژنی و ژنوتیپی و تعادل هاردی- وینبرگ. M الل غالب و m الل مغلوب است. MM معرف فرد هموزیگوت غالب، mm فرد هموزیگوت مغلوب و Mm فرد هتروزیگوت.

ژنوتیپ	تعداد مشاهده شده	تعداد مورد انتظار	فراوانی ژنوتیپی
MM	۱۱	۱/۰۴	۰/۰۲
Mm	۴	۱۶/۹۰	۰/۰۱
Mm	۷۱	۶۸/۰۴	۰/۹۷
فراوانی ژن M		۰/۱۱	
فراوانی ژن m		۰/۸۹	
آزمون مربع کا (X^2) با درجه آزادی ۱		۹۴/۵۸۴۹	

بحث

این نتایج با نتایج پژوهشگران (۱۴) بر روی گاوهای نژاد گارولیاس مطابقت داشت ولی با نتایج دیگران (۱۵) در نژادهای گاو پیدمانتس مغایرت داشت. دلیل این امر به وقوع بالای فنوتیپ ماهیچه مضاعف در گاوهای پیدمانتس مربوط می‌شود. همچنین نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج به‌دست آمده در نژاد گاو بلژین بلو، که فنوتیپ ماهیچه مضاعف در آن به وفور مشاهده می‌شود مغایرت دارد (۳و۱۶). از آن‌جایی‌که هیچ‌گونه تحقیقی در گوسفند به شکل فوق گزارش نشده است نمی‌توان مقایسات جالب توجهی را در این خصوص بیان کرد. از طرفی،

نمی‌توان گفت که ژن میوستاتین و یا جایگاهی نزدیک به آن در ماهیچه دار شدن گوسفند موثر نمی‌باشد. برای اطمینان کامل باید مطالعات تکمیلی انجام شود و ارتباط آن در تعامل با جایگاه‌های دیگر ژنی بررسی شود. آزمون مربع کا نشان داد که تعادل هاردی وینبرگ در این جمعیت برای جایگاه ژن میوستاتین برقرار نیست ($P < ۰/۰۵$). عدم تعادل جایگاه‌ها احتمالا نشان دهنده حضور بعضی عوامل بر هم زننده تعادل، از جمله مهاجرت و انتخاب است، که مهاجرت خصوصا در مورد نرهایی که از خارج گله وارد می‌شوند و یک جریان ژنی ایجاد می‌کنند صدق می‌کند. البته اندازه نمونه مورد بررسی هم در این امر می‌تواند موثر باشد.

میزان هتروزیگوسیتی برآورد شده به‌وسیله شاخص نئی در جمعیت ۰/۳۴۹۲ برآورد گردید که این پارامتر حاکی از تنوع ژنتیکی پایین این جمعیت از نظر ژن میوستاتین است. منابع مختلف، آلل M را به‌عنوان آلل مطلوب جهت اصلاح نژاد و بهبود کیفیت و کمیت گوشت معرفی کرده‌اند. اگرچه فراوانی این آلل؛ در جمعیت بسیار پایین است ولی باید توجه داشت که ما فقط یک جهش که باعث ماهیچه مضاعف می‌شود را بررسی کردیم، در حالی‌که جهش‌های متفاوتی باعث ماهیچه مضاعف می شوند. برای نمونه، با مطالعه مولکولی ژن میوستاتین نشان دادند که یک جهش در گاو مسئول صفت ماهیچه مضاعف می باشد (۱۶). آن‌ها با مقایسه مولکولی ژن میوستاتین در گاو نژاد هلشتاین و پیدمانتس، که فراوانی وقوع ماهیچه مضاعف در آن زیاد است دریافتند که در دو نوکلئوتید با هم اختلاف دارند. در اگزون شماره یک تغییر C به A منجر به تغییر لوسین به فنیل آلانین و در اگزون شماره ۳ جهش G به A عامل تغییر سیستین به تیروزین می‌شود و تحقیقات دیگر نیز نشان دادند که حذف ۱۱ نوکلئوتید در اگزون شماره ۳ نژاد بلژین بلو رخ داده است (۷). بنابراین، برای اطمینان از نتیجه گیری باید تمامی جهش‌ها را بررسی نمود.

نتیجه گیری

نظر به این‌که صفات کمی توسط برآیند تعداد زیادی ژن با اثرات کم و همچنین اثر متقابل بین آن‌ها کنترل می‌شود، لذا نامناسب بودن فراوانی آلل مطلوب در سطح یک لوکوس نمی‌تواند گواهی بر عمل‌کرد نامطلوب یک صفت در یک نژاد باشد و بررسی وضعیت جایگاه‌های ژنی دیگر نیز مورد نیاز است.

در کل جمعیت، مقدار شاخص شانون (I) برابر ۰/۳۴۹۲ و میانگین هتروزیگوتی پایین و برابر ۰/۱۹۶۵ بود که نشان‌دهنده وجود چند شکلی در این نژاد است بنابراین می‌توان فراوانی افراد هتروزیگوت را در جمعیت بالا برد.

تشکر و قدردانی

از پرسنل آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه اراک جهت در اختیار قرار دادن امکانات آزمایشگاهی و کلیه سرورانی که در انجام این پژوهش ما را یاری رساندند تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Masoudi A, Hemrani H, Abbasi A, Nejatijavarami A, et al. Using PCR-SSCP technigues to study polymorphism of Myostatin gene, and their associations with yearling weight in Baluchi sheep, Proceedings of the 4th National Biotechnology Congress of Iran, Kerman, Iran. August 2005.

2. Belling RHS, Liberies DA, Laschi SPA, Brien PAO, et al. Myostatin and its implications on animal breeding a rervievv Journal of Animal genetics. 2005; 36:1-6.

3. Casas E, Shackerford S, Keel JW, Stone RT, et al. Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate from of myostatin. Journal of Animal Science. 2000; 78:560-569.

4. Fahrankrug SC, Casas E, Keel JW, Smith TDL. Direct Genotyping of the Double- muscling locus (mh) in piedmotese and Belgain Blue cattle by fluorescent PCR. Journal of Animal Science 77. 1999; 2028-2030.

5. Jahnson PL, Mcewant JC, Dodds KG, Purchas RW, et al. A directed search in the region of GDF8 for quantitative trait loci affecting carcass trait in Texel sheep. Journal of Animal Science. 2005; 83:1988-2000.

6. Kobolak J, Gocza E. The role of the myostatin protein in meat quality. A review. Archives of Animal Breeding. 2002; 45: 159-170

7. Arthur PF, Makarechian M, Price MA. Incidence of dystocia and prenatal calf mortality resulting from reciprocal crossing of double-muscled and normal cattle. Canadian Veterinary Journal.1988; 29: 163-167.

8. Gerrard DE, Thrasher KH, Grant AL, Lemenager RP, et al. 1991. Serum- induced myoblast proliferation and gene expression during development of double muscled and normal cattele. Journal of Animal Science 69: (Suppl. 1)317.

9. Smet SD, Webb EC, Claeys E, Uytterhaegen L, et al. Effect of dietary energy and protein levels on fatty acid composition of intramuscular fat in double- muscled Belgian Blue bulls. Meat Science. 2000; 56: 73-79.

10. Jahnson PL, Mcewant JC, Dodds KG, Purchas RW, et al. Meat quality traits were unaffected by a quantitative trait locus affeet-ingject composition traits in Texel sheep. Journal of Animal Science. 2005; 83: 2729-2735.

11. Khaldari M. [Principl of nourishment sheep and goat, Jahad-e-Daneshghahi of Tehran] press. 340 p, 2003. Persian.

12. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extraction DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research. 1998; 16: 1255.

13. Timoty PL, Lopez- Corrales NL, Kappes SM, Sonstegard TS. Myostatin maps to the interval containing the bovine mh locus. Mammalian Genome. 1997; 8: 742-744.

14. Dvorak J, Filistowicz A, Hruska D, Horak P, et al. The Polymorphism of MSTN, PRNP and CSN3 genes in Charolais cattle. Animal science papers and reports. 2002; 20: 19-23.

15. Wheeler TL, Shackelford SD, Casas E, Cundiff L V, et al. The effects of piedomontese inheritance and myostatine genotype on the palatability of Longissimus Thoracis, gluteus medius semimem branosus, and biceps femoris. Journal of Animal Science. 2001; 79: 3096-3074.

16. Alexandra, C, Pherron Mc, Se-Jin L. Double muscling in cattle due to mutation in the myostatin gene. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA. 1997; 94: 12457-12461.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Summer2014; 5(2): 157-163

Original Article

Evaluation of Myostatin Gene Polymorphism in Farahani Sheep by PCR-RFLP Method

Shariatzadeh SM, M.Sc.[1], Ghazi Khanishad A, Ph.D.[2], Khodaei Motlagh M, Ph.D.[3], Mahdieh M, Ph.D.[4*]

1. M.Sc. Graduated Student in Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural resources, Azad Islamic University, Saveh Branch, Iran
2. Department of Animal Science, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran
3. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, 38156-8-8349, Iran
4. Department of Biology, Faculty of Sciences, Arak University, Arak 38156-8-7349, Iran

* Email corresponding author: m-mahdiyeh@araku.ac.ir

Received: 22 Jul. 2013 Accepted: 17 Dec. 2013

Abstract

Aim: Myostatin gene or growth and differentiation factor 8 (GDF8) which has been identified as the factor causing muscle doubling, undergoes a series of mutations that causes gene inactivation. In bovine the loss of gene activity has been associated with double- muscled phenotype.. Due to the role of myostatin gene in muscle development, the objective of this study was to analyze the coding region containing mutations which potentially altering the myostatin gene expression in Farahani sheep.

Material and methods: DNA from blood samples of eighty six Farahani sheep was extracted and used to amplify a 337-bp fragment in myostatin gene. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) of the PCR product was performed by addition of *HaeIII* enzyme and then PCR-RFLP genotypes were analyzed.

Result: Genotype frequencies of MM, Mm and mm were characterized as 0.046, 0.127 and 0.827, respectively. In addition the allelic frequencies for alleles M and m was estimated as 0.11 and 0.89 respectively.

Conclusion: The results of this study indicated that the Farahani sheep was polymorphic for myostatin, but this population was not at Hardy- Weinberg equilibrium.

Keywords: PCR-RFLP, Polymorphism, Myostatin gene, Farahani sheep