



چند شکلی در ژن GDF8 و اثرات آن بر صفات لاشه در گوسفندان نژاد زل و لری بختیاری

ف. امیری^۱، س. ر. میرائی آشتیانی^۲ و م. صادقی^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد و استاد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

۳- استادیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران (نویسنده مسوول)

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۱/۲/۲۳

چکیده

میواستاتین (MSTN) یا فاکتور رشد و تمایز ۸ (GDF8)، یکی از اعضای خانواده تغییر دهنده رشد $TGF-\beta$ می باشد که به عنوان تنظیم کننده منفی رشد عضله در پستانداران عمل می نماید. در این مطالعه بخشی از انتهای ۵، اگزون ۱ و اینترون ۱ و ارتباط چند شکلی در این جایگاهها با صفات لاشه از طریق تکنیک PCR-SSCP بررسی شد. در جایگاه ۱ (انتهای ۵ و اگزون ۱) تفاوت معنی داری میان ژنوتیپهای AB و AC، AB و AA با ضخامت چربی پشت، AB و BB با بازده لاشه بدون دنبه، AA و AC با تری گلیسرید خون، AA و BB با کلسترول خون بدست آمد. در نژاد لری بختیاری تفاوت بین ژنوتیپهای AA و AC با وزن دنبه، AB و BB با بازده لاشه معنی دار بود. ولی تفاوت معنی داری بین ژنوتیپهای جایگاه ۱ با وزن لاشه بدون دنبه و وزن لاشه با دنبه وجود نداشت. در جایگاه ۲ (اینترون ۱) تفاوت معنی داری میان ژنوتیپهای BD و CC با ضخامت چربی پشت، AA و BB با کلسترول خون وجود داشت. علاوه بر این در نژاد لری بختیاری تفاوت معنی داری بین ژنوتیپهای BB و BD در جایگاه ۲ برای صفت وزن لاشه با دنبه وجود داشت.

واژه های کلیدی: ژن میواستاتین، گوسفند زل، گوسفند لری - بختیاری، صفات لاشه، چندشکلی

مقدمه

کامپیوتری (فن تشخیص امراض از روی عکسبرداری با اشعه) انجام می گیرد. اگرچه استفاده از این اطلاعات فنوتیپی و شجره ای بهبود قابل توجهی را در ارزیابی ژنتیکی حیوانات اهلی و برنامه های انتخاب به وجود آورده است (۴)، ولی این روش زمان بر و پرهزینه بوده و در

بافت نرم گوشت و چربی پشت به عنوان یک صفت معیار برای انتخاب در گوسفند مورد استفاده قرار می گیرد. اندازه گیری معمول این صفت و مشخصات ترکیبی لاشه در حیوان زنده از راه اولتراسونیک (ماوراء صوت) و توموگرافی

تحقیقات حاکی از آن است که اثر فیزیولوژیکی میواستاتین بیشتر به رشد ماهیچه پیش از تولد یعنی زمانی که میوبلاست‌ها در حال تکثیر و تمایز در مسیر بوجود آوردن فیبرهای عضلانی هستند، مرتبط است. همچنین غلظت بالای از پروتئین میواستاتین در مردان مبتلا به HIV در مقایسه با افراد سالم دیده می‌شود که با تحلیل رفتن قوای عضلانی در اینگونه افراد ارتباط دارد (۱۴). جدای از ماهیچه اسکلتی، GDF_8 بعد از تولد در بافت چربی گاو و موش و غده پستانی خوک بیان می‌شود. از آنجایی که پروتئین میواستاتین در پلاسمای خون یافت شده است، به احتمال بسیار زیاد گیرنده‌های آن در بافت‌های مختلف قرار می‌گیرند. ساختار مولکولی پروتئین میواستاتین در بین مهره‌داران حفظ شده است، بطوریکه توالی اسیدهای آمینه میواستاتین در اکثر موجودات (موش، موش صحرائی، انسان، خوک و جوجه) دارای شباهت ۱۰۰٪ در ناحیه C انتهایی (انتهای کربوکسیلی) هستند (۲). هیچ تفاوتی در توالی کدکننده GDF_8 گوسفندان نژاد تکسل بلژیکی با ماهیچه مضاعف و گروه شاهد نژاد رومانف معمولی پیدا نشد. این مسئله موید آن است که چند شکلی مسئول ماهیچه مضاعف در بیرون از نواحی کدکننده GDF_8 مستقر شده و یا ممکن است در ژنی پیوسته و بسیار نزدیک به میواستاتین باشد (۴، ۷ و ۱۰).

هدف از انجام این تحقیق تعیین چند شکلی موجود در جایگاه‌های اینترون ۱ و اگزون ۱ ژن میواستاتین و بررسی فراوانی آلی و ژنوتیپی آن و ارتباط آنها با صفات لاشه در گوسفندان زل و لری بختیاری بود.

مورد برخی صفات نیازمند کشتار دام می‌باشد. از اینرو پیشنهاد شده است که همراه این اطلاعات فنوتیپی از اطلاعات مولکولی نیز در ارزیابی حیوانات جهت تسریع پیشرفت ژنتیکی و افزایش صحت برآوردها استفاده شود. بنابراین در زمینه صفات لاشه در گوسفند نیز نیازمند بررسی در سطح DNA و پروتئین هستیم. این مسئله توسط ردیابی و توصیف ژن‌های با اثرات عمده و نوکلئوتیدهای صفات کمی^۱ موثر بر عضله و چربی در گوسفند امکان پذیر است (۴).

با استفاده از نقشه فیزیکی مشخص شده است که ژن میواستاتین گاو نزدیک سانترومر کروموزوم شماره ۲ قرار دارد و جایگاه آن در گونه‌های مطالعه شده از جمله خوک، گاو میش، مرغ و موش خانگی مشخص شده است (۹). ژن میواستاتین گوسفندی دارای ۳ اگزون، ۲ اینترون و ناحیه پایین دست ژن می‌باشد که ساختار و توالی آن در بانک ژن با شماره دستیابی AB076403 موجود است (۱۷). همچنین این ژن در خوک و گاو نیز دارای ۳ اگزون، ۲ اینترون و ناحیه پایین دست ژن می‌باشد (۵). مطالعات نشان داده است که گاوهای با ماهیچه مضاعف، ۲۰٪ حجم ماهیچه بیشتر به همراه چربی و استخوان کمتر دارند (۱۵).

میواستاتین از طریق هایپرپلازی و هایپرتروفی بر حجم ماهیچه اسکلتی تاثیر گذار است. هایپرپلازی عضلانی به افزایش در تعداد فیبرهای ماهیچه‌ای اطلاق می‌شود در حالیکه هایپرتروفی عضلانی به افزایش در حجم فیبرهای عضلانی مربوط می‌شود (۱۶). نتایج مجموعه

مواد و روشها

بود. مقدار کلسترول و تری گلیسیرید خون نیز با استفاده از کیت تجاری اندازه‌گیری شد. تکثیر جایگاههای مورد مطالعه در حجم کلی ۱۵ میکرو لیتر، شامل ۳ میکرو لیتر از DNA الگو، یک واحد آنزیم Taq پلی‌مرز، ۱ پیکومولار از هر پرایمر، ۰/۲ میلی مولار dNTPs، ۸ میلی مولار $MgCl_2$ و غلظت 1x از بافر PCR انجام شد. همچنین دو جفت پرایمر برای تکثیر جایگاه ۱ و جایگاه ۲ بکار رفت (جدول ۱).

جهت انجام این آزمایش، نمونه‌های خون از ۱۱۰ راس گوسفند زل و ۱۱۰ راس گوسفند لری بختیاری به ترتیب از کشتارگاه‌های صنعتی ساری و قم جمع آوری شد. استخراج DNA با استفاده از روش بهینه یافته نمکی انجام و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره شدند (۱۲). صفات اندازه‌گیری شده شامل وزن زنده قبل از کشتار، وزن لاشه گرم، ضخامت چربی در بین دنده دوازدهم و سیزدهم، وزن دنبه، سن، جنس و نژاد حیوان

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر بخشی از انتهای ۵' اگزون ۱ (جایگاه ۱) و بخشی از اینترون ۱ (جایگاه ۲) ژن GDF_8

جایگاه پرایمر	توالی پرایمر	اندازه قطعه (bp)
5' UTR, Exon 1	5'-AGGAAGCAGTAAGAGCAAG-3' 5'-ACACTAGAACAGCAGTCAG-3'	۴۷۳
Exon1 & Intron 1	5'-GAAACGGTCATTACCATGC-3' 5'-CATATTTTCAGGCAACCAAATG-3'	۴۱۴

آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید انجام گرفت.

تعیین ژنوتیپ

در ابتدا برای انجام بهینه‌ی SSCP^۱ از ژل‌های ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۴ درصد تحت دماهای مختلف استفاده شد و در نهایت برای مشاهده الگوهای بانندی این آزمایش با ژل ۱۴ درصد و دمای ۵ درجه سانتی‌گراد بهینه گردید. سپس ۱۲ میکرولیتر از محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز به همراه ۵ میکرولیتر بافر SSCP شامل (۹۸ درصد فرمامید، ۱۰ میلی مولار EDTA، ۰/۰۲۵ درصد بروموفنل بلو و ۰/۰۲۵ درصد زایلن سیانول) در دمای ۹۵

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با برنامه حرارتی زیر در دستگاه ترموسایکلر انجام شد: واسرشت سازی اولیه DNA به مدت ۵ دقیقه و ۹۴ درجه سانتی‌گراد و انجام ۳۵ چرخه با مرحله واسرشت سازی ۱ دقیقه و ۹۴ درجه سانتی‌گراد، مرحله اتصال آغازگرها طی ۱ دقیقه و ۵۴ درجه سانتی‌گراد و مرحله بسط آغازگر طی ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد و بسط انتهایی ۵ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد جهت مشاهده محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، از ژل آگارز ۱/۵ درصد و ولتاژ ۶۰ ولت به مدت نیم ساعت استفاده شد و رنگ

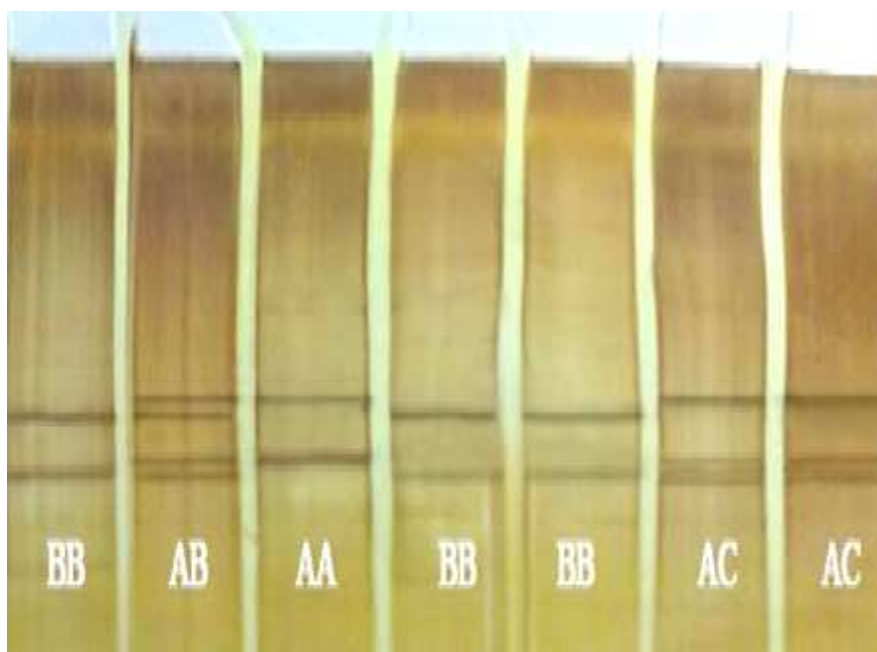
1- Single Strand Conformation Polymorphism

۴۷۳ جفت بازی در نظر گرفته شده برای تکثیر بخوبی و بدون هیچ گونه باند غیر اختصاصی و محصولات ناخواسته تکثیر یافته است. سپس محصولات PCR حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در ژل ۱۴ درصد آکریل امید SSCP شدند (اشکال ۱ و ۲). ژنوتیپ‌های نشان داده شده بر اساس نوع الگوهای بانندی بود. لذا به دلیل مشاهده نشدن الگوی بانندی برای سایر ژنوتیپ‌ها گزارشی نیز انجام نشد. همچنین ژنوتیپ‌های مشاهده شده در هر دو نژاد گوسفند مشابه می‌باشند.

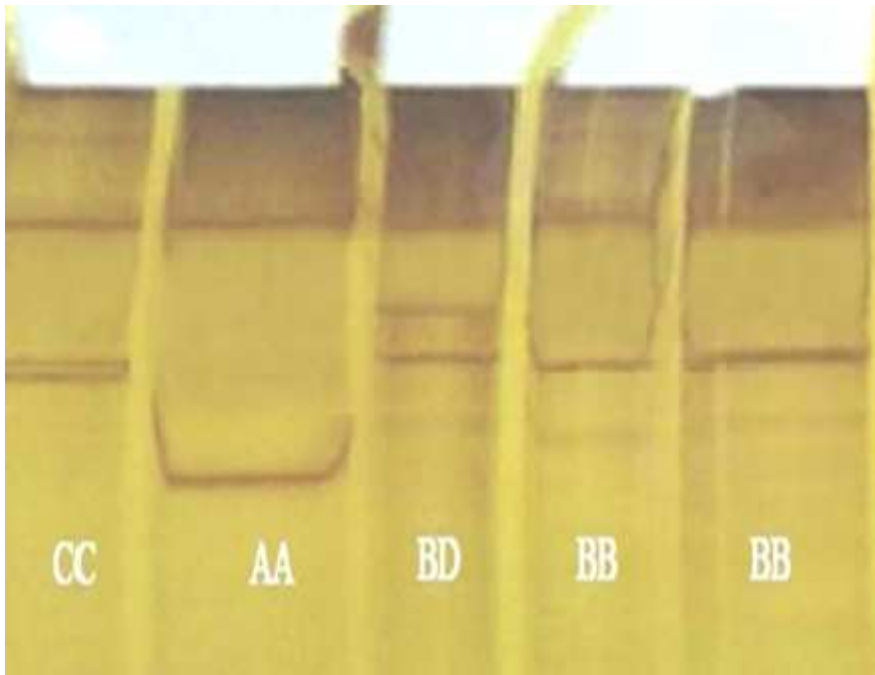
درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه واسرشته و پس از آن به مدت ۵ دقیقه روی یخ قرار داده شد و در نهایت نمونه‌ها روی ژل آکریلامید با ولتاژ ۲۲۰ ولت و به مدت ۲۰ ساعت بارگذاری گردیدند. در نهایت پس از بارگذاری، برای ظهور باندهای DNA از روش رنگ‌آمیزی نیترات نقره (اسیدی) در ژل آکریل‌امید ۱۴ درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

الکتروفورز محصولات تکثیر شده روی ژل آگارز ۱/۵ درصد نشان داد که قطعه ۴۱۴ و



شکل ۱- الگوی بانندی قطعات تکثیر شده جایگاه ۱ (بخشی از انتهای ۵، آگزون ۱). چهار الگوی متفاوت بانندی دیده شد که ژنوتیپ‌های AA و BB دو باند و ژنوتیپ‌های AC و AB چهار باند داشتند.



شکل ۲- الگوی بانندی قطعات تکثیر شده جایگاه ۲ (اینترون ۱). در این جایگاه چهار الگوی بانندی مشاهده شد که ژنوتیپ‌های AA و BB دو باند و ژنوتیپ‌های BD و CC دارای سه باند هستند.

تجزیه و تحلیل آماری

پس از شناسائی آلل‌ها و ژنوتیپ‌ها این اطلاعات به همراه داده‌های مرتبط با صفات لاشه توسط Proc GLM نرم‌افزار SAS 9.1 (۱۳) تجزیه و تحلیل شدند. مدل آماری استفاده شده جهت بررسی اثر ژنوتیپ به صورت زیر بود:

$$Y_{ijklm} = \mu + b(W_{ijkl} - \bar{W}) + A_i + S_j + \beta_k + G_l + G_m + G_l \times G_m + e_{ijklm}$$

که Y_{ijklm} رکورد هر یک از صفات مورد بررسی (وزن دنبه، وزن لاشه بدون دنبه، ضخامت چربی پشت، وزن لاشه بدون دنبه، بازده لاشه بدون دنبه، بازده لاشه و نهایتاً کلسترول و تری‌گلیسرید بعنوان فاکتورهای خونی) هستند و i, j, k, l, m به ترتیب سطوح سن، جنس، نژاد و ژنوتیپ‌ها در دو جایگاه می‌باشند. μ :

میانگین جامعه برای هر صفت است. W_{ijkl} : وزن دامها در هنگام خونگیری و \bar{W} : میانگین وزن دامها در هنگام خونگیری هستند که به عنوان عامل کواریت در معادله مدل در نظر گرفته شده‌اند. b : ضریب تابعیت Y بر وزن زنده در نظر گرفته شده است. $G_l, G_m, G_l \times G_m$ به ترتیب مربوط به اثر ژنوتیپ جایگاه ۱، جایگاه ۲ و اثر متقابل بین دو جایگاه هستند. همچنین e_{ijklm} اثرات باقی مانده است.

فراوانی آللی و ژنوتیپی در گوسفندان زل و لری بختیاری

بررسی PCR-SSCP از مجموع ۲۲۰ گوسفند در هر دو نژاد زل و لری بختیاری، در هر جایگاه (۴ الگوی SSCP) را مشخص نمود، بطوریکه در جایگاه ۱، ۳ آلل (A, B و C) و در جایگاه ۲، ۴ آلل (A, B, C و D) مشاهده شد.

در نمونه‌های مورد مطالعه از گوسفندان لری بختیاری ژنوتیپ‌های AA (۳۸/۸۴٪)، AB (۱۲/۶۲٪)، BB (۳۳/۰۱٪) و AC (۱۵/۵۳٪) با فراوانی‌های آلی ۰/۵۲، ۰/۴۰ و ۰/۰۸ به ترتیب برای آل‌های A، B و C در جایگاه ۱ مشاهده شد. همین‌طور در نمونه‌های مورد بررسی از گوسفندان زل نیز ژنوتیپ‌های AA (۵۴/۸۴٪)، AB (۲/۱۵٪)، BB (۳۲/۲۶٪) و AC (۱۰/۷۵٪) با فراوانی‌های آلی ۰/۶۱، ۰/۳۴ و ۰/۰۵ به ترتیب برای آل‌های A، B و C برای جایگاه ۱ وجود داشت.

در جایگاه ۲ آل‌های A، B، C و D در گوسفندان زل و لری بختیاری مشاهده شد. در گوسفندان لری بختیاری فراوانی ژنوتیپ‌های AA (۳۰٪)، BB (۴۰٪)، CC (۱۲٪) و BD (۱۸٪) با فراوانی‌های آلی ۰/۳، ۰/۴۹، ۰/۱۲ و ۰/۰۹ به ترتیب برای آل‌های A، B، C و D مشاهده شد. در گوسفندان زل نیز فراوانی ژنوتیپ‌های AA (۳۶/۵۴٪)، BB (۲۵/۹۶٪)، CC (۲۵/۹۶٪) و BD (۱۱/۵۴٪) با فراوانی‌های آلی ۰/۳۷، ۰/۳۲، ۰/۲۶ و ۰/۰۵ به ترتیب برای آل‌های A، B، C و D وجود داشت. ژنوتیپ‌ها براساس نوع الگوی بان‌دی تعیین شدند و برای سایر ژنوتیپ‌های ممکن الگوی بان‌دی مشاهده نشد.

آزمون مربع کا (x^2) بین دو نژاد توسط نرم افزار SAS 9.1 نشان داد که تفاوت بین دو نژاد از نظر توزیع ژنوتیپ‌ها معنی‌دار است

($P < 0.05$). در جایگاه ۱ تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها در صفات ضخامت چربی پشت ($P < 0.05$)، بازده لاشه بدون دنبه ($P < 0.07$)، تری‌گلیسرید ($P < 0.05$) و کلسترول ($P < 0.09$) وجود داشت (جدول ۲). به طوریکه تفاوت بین ژنوتیپ‌های AB با AC و AA در ضخامت چربی پشت، AB با BB در بازده لاشه بدون دنبه، AA با AC در فاکتور خونی تری‌گلیسرید، AA و BB با کلسترول خون معنی‌دار بود. از طرفی در نژاد لری بختیاری تفاوت بین ژنوتیپ‌ها در وزن دنبه ($P < 0.06$) و بازده لاشه ($P < 0.02$) معنی‌دار شد و ژنوتیپ AC و AB به ترتیب بالاترین وزن دنبه و بازده لاشه را داشتند (جدول ۴). تفاوت معنی‌داری میان ژنوتیپ‌های جایگاه ۱ ژن MSTN با وزن لاشه دارای دنبه و وزن لاشه بدون دنبه وجود نداشت ($P > 0.10$). هیگفورد و همکاران (۵) گزارش کردند که آل A بر تولید گوشت راسته و گوشت لخم کل تاثیر مثبت و معنی‌دار دارد ولی هیچ آلی بر وزن تولد، وزن از شیرگیری و وزن لاشه گرم تاثیری ندارند.

تفاوت حداقل میانگین مربعات ژنوتیپ‌های BD و CC در جایگاه ۲ با ضخامت چربی پشت ($P < 0.09$) و AA و BD با کلسترول ($P < 0.09$) معنی‌دار است (جدول ۳). علاوه بر این در نژاد لری بختیاری تفاوت ژنوتیپ‌های BD و BB با صفت وزن لاشه دارای دنبه در جایگاه دوم معنی‌دار شد ($P < 0.07$) (جدول ۵).

در جایگاه ۱ مشاهده شد. همین‌طور در نمونه‌های مورد بررسی از گوسفندان زل نیز ژنوتیپ‌های AA (۵۴/۸۴٪)، AB (۲/۱۵٪)، BB (۳۲/۲۶٪) و AC (۱۰/۷۵٪) با فراوانی‌های آلی ۰/۶۱، ۰/۳۴ و ۰/۰۵ به ترتیب برای آل‌های A، B و C برای جایگاه ۱ وجود داشت.

در جایگاه ۲ آل‌های A، B، C و D در گوسفندان زل و لری بختیاری مشاهده شد. در گوسفندان لری بختیاری فراوانی ژنوتیپ‌های AA (۳۰٪)، BB (۴۰٪)، CC (۱۲٪) و BD (۱۸٪) با فراوانی‌های آلی ۰/۳، ۰/۴۹، ۰/۱۲ و ۰/۰۹ به ترتیب برای آل‌های A، B، C و D مشاهده شد. در گوسفندان زل نیز فراوانی ژنوتیپ‌های AA (۳۶/۵۴٪)، BB (۲۵/۹۶٪)، CC (۲۵/۹۶٪) و BD (۱۱/۵۴٪) با فراوانی‌های آلی ۰/۳۷، ۰/۳۲، ۰/۲۶ و ۰/۰۵ به ترتیب برای آل‌های A، B، C و D وجود داشت. ژنوتیپ‌ها براساس نوع الگوی بان‌دی تعیین شدند و برای سایر ژنوتیپ‌های ممکن الگوی بان‌دی مشاهده نشد.

آزمون مربع کا (x^2) بین دو نژاد توسط نرم افزار SAS 9.1 نشان داد که تفاوت بین دو نژاد از نظر توزیع ژنوتیپ‌ها معنی‌دار است

جدول ۲- مقایسه میانگین حداقل مربعات بین صفات لاشه و گروه های ژنوتیپی در نژادهای زل و لری بختیاری مربوط به جایگاه ۱ (اعداد داخل پرانتز نشان دهنده انحرافات استاندارد می باشند).

P-Value	جایگاه ۱				صفت
	AA	AB	AC	BB	
۰/۰۵	۴/۷۳(۰/۱۷) ^a	۳/۷۰(۰/۴۰) ^b	۴/۷۳(۰/۲۸) ^a	۴/۱۲(۰/۲۰) ^{ab}	ضخامت چربی پشت (میلی متر)
۰/۱۲	۱۶/۴۶(۰/۳۸)	۱۷/۴۳(۰/۸۹)	۱۶/۲۷(۰/۶۲)	۱۶/۱۴(۰/۴۵)	وزن لاشه بدون دنبه (کیلوگرم)
۰/۰۷	۴۴/۳۶(۱/۳۱) ^{ab}	۴۹/۳۸(۳/۰۴) ^a	۴۵/۶۵(۲/۱۳) ^{ab}	۴۳/۴۵(۱/۵۴) ^b	بازده لاشه بدون دنبه (درصد)
۰/۰۵	۲۴/۰۱(۰/۹۴) ^b	۲۴/۲۷(۲/۱۸) ^{ab}	۲۷/۳۱(۱/۵۲) ^a	۲۵/۲۰(۱/۱۰) ^{ab}	تری گلیسرید (میلی گرم در دسی لیتر خون)
۰/۰۹	۸۶/۹۵(۱/۸۵) ^b	۸۹/۱۷(۴/۳۰) ^{ab}	۸۸/۱۶(۳/۰۰) ^{ab}	۹۳/۹۳(۲/۱۸) ^a	کلسترول (میلی گرم در دسی لیتر خون)

در هر ردیف میانگین حداقل مربعاتی که دارای علامت مشابه هستند با یکدیگر تفاوت معنی داری ندارند (P<۰/۱۰).

جدول ۳- مقایسه میانگین حداقل مربعات بین صفات لاشه و گروه های ژنوتیپی در نژادهای زل و لری بختیاری مربوط به جایگاه ۲ (اعداد داخل پرانتز نشان دهنده انحرافات استاندارد می باشند)

P-Value	جایگاه ۲				صفت
	AA	BB	BD	CC	
۰/۰۹	۴/۱۵(۰/۲۲) ^{ab}	۴/۲۶(۰/۲۱) ^{ab}	۴/۵۹(۰/۲۷) ^a	۳/۹۴(۰/۲۸) ^b	ضخامت چربی پشت (میلی متر)
۰/۱۱	۱۶/۷۰(۰/۴۸)	۱۶/۵۰(۰/۴۶)	۱۶/۱۴(۰/۶۱)	۱۶/۹۷(۰/۶۲)	وزن لاشه بدون دنبه (کیلوگرم)
۰/۱۶	۴۷/۲۸(۱/۶۵)	۴۵/۴۵(۱/۵۹)	۴۴/۶۲(۲/۰۹)	۴۵/۴۱(۲/۱۵)	بازده لاشه بدون دنبه (درصد)
۰/۳	۲۶/۰۰(۱/۱۸)	۲۵/۸۶(۱/۱۴)	۲۵/۲۷(۱/۵۰)	۲۳/۶۷(۱/۵۴)	تری گلیسرید (میلی گرم در دسی لیتر خون)
۰/۰۹	۹۲/۸۲(۳/۳۲) ^a	۸۹/۰۰(۲/۲۴) ^{ab}	۸۶/۸۰(۲/۹۵) ^b	۸۹/۶۱(۳/۰۲) ^{ab}	کلسترول (میلی گرم در دسی لیتر خون)

در هر ردیف میانگین حداقل مربعاتی که دارای علامت مشابه هستند با یکدیگر تفاوت معنی داری ندارند (P<۰/۱۰).

جدول ۴- مقایسه میانگین حداقل مربعات بین صفات لاشه و گروه های ژنوتیپی در نژاد لری بختیاری مربوط به جایگاه ۱ (اعداد داخل پرانتز نشان دهنده انحرافات استاندارد می باشند)

P-Value	جایگاه ۱				صفت
	AA	AB	AC	BB	
۰/۰۶	۳/۹۴(۰/۲۴) ^b	۴/۰۰(۰/۳۸) ^{ab}	۴/۷۰(۰/۳۰) ^a	۴/۲۵(۰/۲۶) ^{ab}	وزن دنبه (کیلوگرم)
۰/۱۵	۲۴/۰۷(۰/۵۴)	۲۴/۷۸(۰/۸۶)	۲۳/۶۴(۰/۸۰)	۲۳/۳۴(۰/۵۸)	وزن لاشه با دنبه (کیلوگرم)
۰/۰۲	۴۹/۰۵(۱/۹۷) ^{ab}	۵۵/۲۳(۳/۱۴) ^b	۵۰/۷۶(۲/۹۵) ^{ab}	۴۶/۱۰(۲/۱۳) ^a	بازده لاشه (درصد)

در هر ردیف میانگین حداقل مربعاتی که دارای علامت مشابه هستند با یکدیگر تفاوت معنی داری ندارند (P<۰/۱۰).

جدول ۵- مقایسه میانگین حداقل مربعات بین صفات لاشه و گروه های ژنوتیپی در نژاد لری بختیاری مربوط به جایگاه ۲ (اعداد داخل پرانتز نشان دهنده انحرافات استاندارد می باشند)

P-Value	جایگاه ۲				صفت
	AA	BB	BD	CC	
۰/۲۱	۴/۳۹(۰/۲۷)	۴/۳۸(۰/۲۳)	۴/۰۷(۰/۳۳)	۴/۰۷(۰/۴۰)	وزن دنبه (کیلوگرم)
۰/۰۷	۲۳/۷۵(۰/۶۱) ^{ab}	۲۳/۹۸(۰/۵۲) ^a	۲۲/۹۹(۰/۷۴) ^b	۲۵/۱۰(۰/۹۱) ^a	وزن لاشه با دنبه (کیلوگرم)
۰/۳۵	۵۱/۸۶(۲/۲۱)	۵۰/۳۲(۱/۸۹)	۴۷/۲۲(۲/۷۲)	۵۲/۶۴(۳/۳۳)	بازده لاشه (درصد)

در هر ردیف میانگین حداقل مربعاتی که دارای علامت مشابه هستند با یکدیگر تفاوت معنی داری ندارند (P<۰/۱۰).

جایگاه ژنوتیپ CC پائین‌ترین ضخامت چربی پشت و بیشترین بازده لاشه را داشت و به نظر می‌رسد می‌تواند در برنامه‌های انتخاب مورد توجه قرار گیرد. برآورد وراثت پذیری‌های متوسط (۰/۲۴ تا ۰/۲۹) برای صفت ضخامت چربی پشت دلیلی بر وجود پتانسیل انتخاب برای کاهش این صفت بین دنده دوازدهم و سیزدهم است و این امر می‌تواند منجر به کاهش چربی لاشه شود (۳) و نیز بدلیل فراوانی‌های بسیار پایین ژنوتیپ‌های AB و CC شاید بتوان با انتخاب این ژنوتیپ‌ها ضخامت چربی پشت را کاهش و در نتیجه بازده لاشه بدون دنبه را افزایش داد.

جانسون و همکاران (۶) با مطالعه جهش در جایگاه اینترون یک در گوسفندان تکسل نیوزلند نشان دادند که آلل A بر وزن بدن تاثیر معنی‌داری ندارد ولی با افزایش ماهیچه و کاهش چربی بین ماهیچه‌ای ارتباط دارد. در این جایگاه جایگزینی نوکلئوتید G با A گزارش شد. همین جایگاه در سه نژاد ایرانی، زل، شال و زندی مطالعه شد ولی چندشکلی در این نژادها مشاهده نشد و فقط آلل G در جمعیت وجود داشت (۱۱). در تحقیق دیگر روی نژادهای بز خالص و آمیخته چینی با استفاده از تکنیک PCR-SSCP مشاهده شد که ژنوتیپ AA وزن بدن بالاتر و قد جدوگاه بالاتری نسبت به ژنوتیپ‌های دیگر دارند (۱). در ارتباط با اثر عوامل ثابت بر صفات لاشه در هر دو نژاد لری بختیاری و زل نتایج نشان می‌دهد که اثر سن بر ضخامت چربی پشت ($P < 0/01$)، وزن لاشه بدون دنبه ($P < 0/05$)،

همان‌طور که در جدول ۲ نشان داده شد در جایگاه ۱ ژنوتیپ AB بالاترین میزان بازده لاشه بدون دنبه با میانگین حداقل مربعات (۳/۰۴) و ۴۹/۳۸ و پایین‌ترین میزان ضخامت چربی پشت با میانگین حداقل مربعات (۰/۴۰) ۳/۷۰ را در مقایسه با بقیه ژنوتیپ‌ها نشان می‌دهد. از طرفی ژنوتیپ BB پایین‌ترین مقادیر میانگین حداقل مربعات بازده لاشه بدون دنبه و بازده لاشه به ترتیب (۱/۵۴) و ۴۳/۴۵ و (۲/۱۳) و ۴۶/۱۰ و بالاترین میانگین حداقل مربعات کلسترول خون (۲/۱۸) را نشان داده است. متعاقباً در جایگاه ۱ ژنوتیپ AC نیز ضخامت چربی پشت، تری‌گلیسرید و وزن دنبه بالاتری را در بین بقیه ژنوتیپ‌ها نشان می‌دهد. به این ترتیب می‌توان نتیجه گرفت که ژنوتیپ AB دارای بازده لاشه بالا با ضخامت چربی پائین و وزن دنبه پائین می‌باشد و از این نظر در برنامه‌های انتخاب می‌تواند مد نظر قرار گیرد. در جایگاه ۲ میانگین حداقل مربعات ضخامت چربی پشت در مورد ژنوتیپ BD با (۰/۲۷) و ۴/۵۹ میلی‌متر نسبت به ژنوتیپ CC با میانگین حداقل مربعات (۰/۲۸) و ۳/۹۴ بالاتر است. از طرفی میانگین حداقل مربعات کلسترول خون در مورد ژنوتیپ BD (۲/۹۵) و ۸۶/۸۰ پایین‌تر از میانگین حداقل مربعات کلسترول خون در مورد ژنوتیپ AA (۲/۳۲) و ۹۲/۸۲ است. همچنین در جایگاه ۲ ژنوتیپ BD پایین‌ترین میانگین حداقل مربعات وزن لاشه با دنبه (۰/۷۴) و ۲۲/۹۹ را در بین دیگر ژنوتیپ‌ها نشان می‌دهد. در این

زنده، بازده لاشه و بازده لاشه بدون دنبه افزایش می‌یابد، اما بافت دنبه با سرعت بیشتری ذخیره می‌گردد.

آزمون مربع کا (X^2) در جمعیت مورد مطالعه نشان داد که تعادل هاردی وینبرگ در این جمعیت برای جایگاه ژن میواستاتین برقرار نیست ($P < 0.05$). عدم تعادل جایگاه‌ها احتمالاً می‌تواند نشان دهنده حضور بعضی عوامل برهم زننده تعادل، از جمله انتخاب و رانش ژنتیکی باشد.

در جایگاه ۱ ژنوتیپ AB پایین‌ترین میانگین حداقل مربعات ضخامت چربی پشت و بالاترین میانگین حداقل مربعات بازده لاشه و بازده لاشه بدون دنبه را نشان می‌دهد. همچنین در جایگاه ۲ ژنوتیپ CC میانگین حداقل مربعات ضخامت چربی پشت پایین‌ترین تری را در بین بقیه ژنوتیپ‌ها دارد. لذا دلیل آنکه جهش در ژن میواستاتین منجر به افزایش گوشت تولیدی و کاهش ضخامت چربی پشت می‌شود، با کنترل فراوانی این ژنوتیپ‌ها می‌توان ضخامت چربی پشت را در بین نژادهای زل و لری بختیاری مورد تغییر قرار داد.

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

نتایج این تحقیق نشان داد که چند شکلی

بازده لاشه بدون دنبه ($P < 0.05$) و فاکتورهای تری گلیسرید ($P < 0.05$) و کلسترول خون ($P < 0.01$) معنی‌دار است.

اثر جنس نیز بر وزن لاشه بدون دنبه ($P < 0.01$) و بازده لاشه بدون دنبه ($P < 0.01$) معنی‌دار است. اختلاف میان دو نژاد زل و لری بختیاری بر صفات ضخامت چربی پشت ($P < 0.09$) و فاکتور کلسترول خون ($P < 0.01$) کاملاً معنی‌دار است به طوری‌که میانگین حداقل مربعات ضخامت چربی پشت در نژاد لری بختیاری (0.22) $4/54$ بالاتر از زل و میانگین حداقل مربعات کلسترول خون در نژاد زل ($2/700$) $98/49$ بالاتر از لری بختیاری است. متوسط ضخامت چربی پشت تعیین شده به وسیله اولتراسوند و سر سوزن و بافت نرم حقیقی روی دنده دوازدهم و سیزدهم در نژاد مغانی به ترتیب $5/10$ ، $5/40$ و $3/50$ میلی‌متر و در گوسفند ماکویی به ترتیب $4/18$ ، $4/14$ و $2/66$ میلی‌متر گزارش شده است. در مطالعه دیگری ضخامت چربی پشت حاصل از اولتراسوند و سر سوزن در بره‌های مغانی به ترتیب 12 و $11/7$ میلی‌متر گزارش شده است. مقادیر متفاوت در نژادهای داخلی ناشی از تفاوت در تعداد، گروه‌های سنی و جنسی، نژاد و وزن بدن در زمان کشتار است (۸). در نژاد لری بختیاری اثر جنس بر وزن لاشه با دنبه ($P < 0.01$) و بازده لاشه ($P < 0.03$) کاملاً معنی‌دار است. از طرفی دامنه تغییرات بازده لاشه با سن بیشتر از بازده لاشه بدون دنبه با سن است. این مسئله نشان می‌دهد که علاوه بر اینکه با افزایش سن، وزن

ژنتیکی در جایگاه ژنی GDF8 وجود دارد. با توجه به اینکه اثر ژنوتیپها بر اکثر صفات مورد مطالعه به جز وزن لاشه با دنبه و وزن لاشه بدون دنبه معنی دار بود و از طرفی میانگین ژنوتیپها با هم تفاوت معنی دار دارند ممکن است بتوان از این جایگاه به عنوان یک شاخص در انتخاب گوسفندان زل و لری بختیاری استفاده نمود.

منابع

1. An, X.P., J.G. Wang, J.X. Hou, H.B. Zhao, L. Bai, G. Li, L.X. Wang, X.Q. Liu, W.P. Xiao, Y.X. Song and B.Y. Cao. 2011. Polymorphism identification in the goat MSTN gene and association analysis with growth traits. *Czech J. Anim. Sci.*, 56: 529-535.
2. Cieslak, D., T. Blicharski, W. Kapelanski and M. Pierzchala. 2003. Investigation of polymorphisms in the porcine myostatin (GDF8; MSTN) gene. *J. Anim. Sci.*, 2: 69-75.
3. Gilmour, A.R., A.F. Luff, N.M. Fogarty and R. Banks. 1994. Genetic parameter for ultrasound fat depth and eye muscle measurements in live poll Dorset sheep. *Austri. J. Agri. Res.*, 45: 1281-1292.
4. Hadjipavlou, G., O. Matika, A. Clop and S.C. Bishop. 2008. Two single nucleotide polymorphisms in the myostatin (GDF8) gene have significant association with muscle depth of commercial Charollais sheep. *Anim. Genet.*, 39: 346-353.
5. Hickford, J.G. H., R.H. Forrest, H. Zhou, Q. Fang, J. Han, C.M. Frampton and A.L. Horrell. 2009. Polymorphisms in the ovine myostatin gene (MSTN) and their association with growth and carcass traits in New Zealand Romney sheep. *Anim. Genet.*, 10: 1-7.
6. Johnson, P.L., K.G. Dodds, W.E. Bain, G.J. Greer, N.J. McLean, R.J. McLaren, S.M. Galloway, T.C. Van Stijn and J.C. McEwan. 2009. Investigations into the GDF8 g+6723G-A polymorphism in New Zealand Texel sheep. *J. Anim. Sci.*, 87: 1856-1864.
7. Johnson, P.L., J.C. McEwan, K.G. Dodds, R.W. Purchas and H.T. Blair. 2005. A directed search in the region of GDF8 for quantitative trait loci affecting carcass traits in Texel sheep. *J. Anim. Sci.*, 83: 1988-2000.
8. Kianzad, M.R. 2004. Estimation of physical and chemical composition of Moghani and Makoei sheep breeds in breeding flocks. *J. Agri. Res.*, 65: 2-11.
9. Kobolak, J. and E. Gocza. 2002. The role of the myostatin protein in meat quality. A review. *Arch. Anim. Breed.* 45: 159-170.
10. Marcq, F., C. Larzul, V. Marot, J. Bouix, F. Eychenne, E. Laville, B. Bibe, P.L. Leroy, M. Georges and J.M. Elsen. 2002. Preliminary results of a whole-genome scan targeting QTL for carcass traits in a Texel × Romanov intercross. *Proc. 7th World Cong Appl. Livest. Prod. Montpellier*, 19-23 August, France. 02-14. (Abst)
11. Miari, Y., A.R. Salehi, S.A. AleYasin and S. Raoufzadeh. 2011. Study of polymorphism in myostatin gene in Chaal, Zel and Zandi Iranian sheep Breeds. *J. Anim. Prod.*, 13: 33-34.
12. Miller, S.A., D.D. Dykes and H.F. Polesky. 1998. A simple salting out procedure for extraction DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16: 1255.

13. SAS (Statistical Analysis Systems). 2004. User's Guide. Version 9.1. SAS Institute Inc., Cary.
14. Sharma, M., J.K. Martyn, F. Jeanplong, M. Thomas, M.P. Spiller, J.J. Bass and R. Kambadur. 2000. Cloning and characterization of the bovine myostatin promoter: *proc. New Zland Soc. Anim. Prod.* Vol. 60: 90-93.
15. Tay, G.K., S.P.A. Iaschi, R.H.S. Bellinge, F.N. Chong and J. Hui. 2004. The development of sequence-based-typing of myostatin (GDF-8) to identify the double muscling phenotype in the goat. *Small Rum. Res.*, 52: 1-12.
16. Weiner, G. 2009. The Myostatin gene. *Mol. Genet.* Vol. 5: 91-94.
17. Zhou, H., J.G.H. Hickford and Q. Fang. 2008. Variation in the coding region of the myostatin (GDF8) gene in sheep. *Mol and Cell.* 22: 67-68.

Polymorphism in the GDF8 Gene and Their Effects on Carcass Traits in Lori-Bakhtiari and Zel Sheep Breeds

F. Amiri¹, S.R. Miraei-Ashtiani² and M. Sadeghi³

1 and 2- M.Sc. Student and Professor, Agriculture and Natural Resources, University of Tehran
3- Assistant Professor, Agriculture and Natural Resources, University of Tehran (Corresponding author)

Abstract

Myostatin (MSTN), known as growth and differentiation factor-8 (GDF8), is a member of the transforming growth factor beta (TGF- β) superfamily that acts as a negative regulator of muscle growth in mammals. The objective of this study was to check a part of the 5'UTR, the first coding domain and part of intron-1 of MSTN gene, and the relationship among these segments with carcass traits via PCR-SSCP analysis. In marker site 1 (part of the 5'UTR and exone 1), relationship between AB and AC, AB and AA genotypes with back fat thickness, AB and BB with dressing percentage without fat tail, AA and AC with blood triglyceride, AA and BB with blood cholesterol were significant. In Lori-Bakhtiari breed, relationship between AA and AC genotypes with fat tail weight, AB and BB genotypes with dressing percentage were significant. However, there was no relationship between genotypes of MSTN gene at marker site 1 with carcass weight with fat tail and carcass weight without fat tail. In intron-1 (marker site 2) Relationship between BD and CC genotypes with back fat thickness, AA and BD genotypes with cholesterol were significant.

Keywords: PCR-SSCP, MSTN Gene, Zel sheep, Lori-bakhtiari sheep, Carcass Traits