

## ارزیابی چندشکلی ژن میوستاتین در گوسفند نژاد سنجابی با استفاده از روش PCR-RFLP

بهاره صوفی<sup>۱</sup>، محمدرضا محمدآبادی<sup>۲\*</sup>، کمال شجاعیان<sup>۳</sup>، امین باقی زاده<sup>۴</sup>، سیروس فراستی<sup>۵</sup>، ناهید عسکری<sup>۱</sup> و امید دبانی<sup>۲</sup>

تاریخ پذیرش: 88/3/10

- 1- دانشجویان کارشناسی ارشد علوم دامی، دانشگاه زابل
- 2- بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان
- 3- بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل
- 4- مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی کرمان
- 5- کارشناس ارشد مرکز تحقیقات علوم کشاورزی و دامی کرمانشاه

\*مسئول مکاتبه [mmohammadabadi@yahoo.ca](mailto:mmohammadabadi@yahoo.ca)

### چکیده

ژن میوستاتین یا عامل ۸ رشد و تمایز (GDF8) به عنوان عامل ایجاد کننده ماهیچه مضاعف شناخته شده است، که در آن مجموعه ای از جهش های غیر فعال کننده ژن رخ می دهند. در گاو، جهش های غیر فعال کننده در این ژن منجر به تولید فنوتیپ ماهیچه مضاعف می شود. چند شکلی ژن میوستاتین در گوسفند نیز بررسی شده است. گوسفند سنجابی یکی از نژادهای اصلی گوسفند در ایران، به ویژه در استان کرمانشاه است که تا کنون برای این جایگاه به وسیله نشانگرهای مولکولی مطالعه نشده است. هدف از انجام این مطالعه آنالیز ناحیه کد کننده دربرگیرنده جهش هایی که به طور بالقوه بیان ژن میوستاتین را تغییر می دهند بود. از صد و پنجاه رأس گوسفند سنجابی نمونه های خون گرفته شد و DNA استخراج شده برای تکثیر قطعه ۳۲۷ جفت بازی استفاده شد. چند شکلی طول قطعات برشی محصولات PCR با افزودن آنزیم برشی *HaeIII* به واکنش PCR کامل اجرا شد. ژنوتیپ های PCR-RFLP آنالیز شدند. فراوانی ژنوتیپ های Mm، MM، mm به ترتیب ۲٪، ۱/۳۳٪ و ۹۶/۷۶٪ تشخیص داده شدند. فراوانی آللی نیز برای آلل های M و m به ترتیب ۰/۰۳ و ۰/۹۷ برآورد گردید. مقایسه فراوانی آلل M (آلل مطلوب) محاسبه شده در گوسفندهای سنجابی با تحقیقات مشابه در نژادهای مختلف دنیا نشان داد که فراوانی این آلل در گوسفند سنجابی در سطح مناسبی نمی باشد. علاوه بر این، مشخص گردید که تعادل هاردی- واینبرگ در جمعیت مورد مطالعه در رابطه با این جایگاه برقرار نمی باشد.

واژه‌های کلیدی: چندشکلی، ژن میوستاتین، گوسفند سنجابی، PCR-RFLP

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

B Soufy<sup>1</sup>, MR Mohammadabadi<sup>2</sup>, K Shojaeyan<sup>3</sup>, A Baghizadeh<sup>4</sup>, S Ferasaty<sup>5</sup>, N Askari<sup>1</sup> and O Dayani<sup>2</sup>

<sup>1</sup>MSc student of animal science, Faculty of Agriculture, Zabol University

<sup>2</sup>Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman

<sup>3</sup>Department Animal Science, Faculty of Agriculture, Zabol University

<sup>4</sup>International centre for science & high technology & environmental sciences

<sup>5</sup>MSc, Agriculture and Animal Science Research Centre of Kermanshah

\*Corresponding author: E-mail: [mmohammadabadi@yahoo.ca](mailto:mmohammadabadi@yahoo.ca)

### Abstract

Myostatin or growth and differentiation factor 8 (GDF8) has been identified as the factor causing a phenotype known as double muscling in which a series of mutations render the gene inactive, and therefore, unable to regulate muscle fibre deposition. Dysfunction of myostatin gene has been reported in mammals. In bovine the loss of this gene activity has been associated to double-muscle phenotype observed in some European cattle breeds. Myostatin gene polymorphism has also been studied in sheep. Sanjabi sheep breed is one of the major sheep breeds in Iran, especially in Kermanshah province that until now has not been studied at this locus by molecular markers. Due to the role of myostatin gene in muscle development, the objective of this study was to analyze a coding region containing mutations which potentially altering the myostatin gene expression. DNA from blood samples of one hundred fifty Sanjabi 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 *Hae*III enzyme to the completed PCR reaction. PCR-RFLP genotypes were analyzed. Genotype frequencies of MM, Mm and mm were detected as 2.00%, 1.33% and 96.70%, respectively. Allele frequencies were estimated for M and m alleles as 3.00% and 97.00%, respectively. The data from this study indicated that the Sanjabi sheep was polymorphic for myostatin gene though it was not at Hardy–Weinberg equilibrium.

**Keyword:** PCR-RFLP, Polymorphism, Myostatin gene, Sanjabi sheep

## مقدمه

شناخت جنبه‌های ژنتیکی و ژن‌های عمده تأثیرگذار بر تولید گوشت اخیراً مورد توجه محققان ژنتیک و اصلاح نژاد قرار گرفته است. مطالعات برای یافتن ژن‌های بوجود آورنده عضله مضاعف در گاوهای گوشتی منجر به کشف ژن میوستاتین شد که به عنوان ژن کاندیدا برای صفت تولید گوشت بررسی و نقش آن در نژاد های مختلف دام و طیور و حتی انسان شناخته شده است. مطالعات ملکولی ژن میوستاتین نشان داده که این ژن چند شکل می باشد (مسعودی و همکاران ۱۳۸۴؛ بلینگ و همکاران ۲۰۰۵ و کاساس و همکاران ۲۰۰۰). میوستاتین مهارکننده رشد ماهیچه های اسکلتی می باشد و اگر جهشی در ژن کد کننده میوستاتین اتفاق افتد، باعث تغییر نقش مهارتی آن و افزایش عضله می شود (مسعودی و همکاران ۱۳۸۴؛ فهرانکروگ و همکاران ۱۹۹۹ و جانسون و همکاران ۲۰۰۵). با استفاده از تعیین نقشه فیزیکی کلون های یاک<sup>۱</sup> مشخص شد که ژن میوستاتین گاو نزدیک سانترومر کروموزوم شماره ۲ قرار دارد و جایگاه آن در گونه های مطالعه شده از جمله خوک، گاو میش، مرغ و موش خانگی مشخص شده است (کابولاک و گزا ۲۰۰۲). ژن میوستاتین گاوی دارای ۳ اگزون و ۲ اینترون می باشد. میوستاتین باعث میانجیگری بیان ژن در کنترل شکل فیبری ماهیچه است و با جلوگیری از تکثیر میوبلاستها، عملاً رشد عضلانی را متوقف می کند. این عمل میوستاتین بطور عمده به رشد ماهیچه ها پیش از تولد، یعنی زمان تکثیر و تمایز میوبلاستها برمی گردد و انتظار می رود چنانچه جهشی بتواند باعث کاهش mRNA میوستاتین گردد، رشد عضلانی بیشتری در حیوان مشاهده شود (مسعودی و همکاران ۱۳۸۴). علائم مختلفی برای تشخیص بین حیوانات با فنوتیپ ماهیچه مضاعف و حیوانات طبیعی مورد استفاده قرار گرفته است، از جمله، DM یا N، یا D یا

DM، یا DM، یا C، یا N، یا c، یا n، یا A، یا a و mh یا +. فنوتیپ DM با هایپرتروفی ماهیچه ها مشخص شده است. در این حیوانات اندام های خلفی به صورت گرد و برجسته هستند و ماهیچه ها حالت بیرون زدگی دارند و خطوط آشکاری در زیر پوست قابل دیدن است. از دیگر مشخصه های فیزیکی آشکار می توان به استخوان های ظریف، دستگاه تناسلی نابالغ و زبان بزرگ در گوساله های تازه متولد شده اشاره کرد. حیوانات با فنوتیپ ماهیچه مضاعف دارای استخوان و چربی کمتر و ماهیچه بیشتری هستند و نسبت قسمت های ارزشمند گوشت بیشتر است. از معایب ماهیچه مضاعف می توان به کاهش باروری، کاهش بقای گوساله ها، افزایش حساسیت به استرس و بیماریهای تنفسی اشاره نمود (آرتور و همکاران ۱۹۸۸). علی رغم آنچه گفته شد ماهیچه مضاعف ارتباطی با دو برابر شدن ماهیچه ها ندارد، اما به نسبت، یک افزایش در تعداد فیبر های ماهیچه ای (هیپر پلازی)<sup>۲</sup> و طول شدن فیبر ها (هایپر تروفی)<sup>۳</sup> را ایجاد می کند. در گاوهای ماهیچه مضاعف تعداد فیبر های ماهیچه ای در زمان تولد دو برابر گاوهای عادی است. گاوهای ماهیچه مضاعف دارای درصد بیشتری از فیبر های ماهیچه ای سفید هستند، و مقدار کلاژن کمتری دارند. همچنین گزارش شده که گاوهای با ماهیچه مضاعف دارای بافت های همبند کمتری هستند که می تواند 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 می دهند (جرارد و همکاران ۱۹۹۱). حیوانات ماهیچه مضاعف گوشت ظریف تر و ترد تری تولید می کنند. همچنین گوشت حیوانات ماهیچه مضاعف به طور معنی داری حاوی مقدار چربی کمتری است. این ویژگی ها به طور زیادی منطبق با استانداردهای سلامتی است (سمت

<sup>۲</sup>Hyperplasia<sup>۳</sup>Hypertrophy<sup>۱</sup>Yak

نژاد بعد از گوسفند بلوچی دارای بیشترین تعداد در بین گوسفندان ایران است و در اکثر نقاط استان کرمانشاه پراکنده است. کل جمعیت این نژاد بر اساس سرشماری سال ۱۳۸۶ حدود ۶۰۰۰۰۰ راس می باشد (مولائیان، ۱۳۷۸). با توجه به اهمیت این نژاد در تولید گوشت و پشم استان و عدم انجام تحقیقات مولکولی، به ویژه روی ژن میوستاتین و نقش این ژن در تولید گوشت، هدف از انجام تحقیق حاضر شناسایی ژنوتیپ های ژن میوستاتین و فراوانی آلل های آن برای اولین بار در گوسفند نژاد سنجابی به کمک روش PCR-RFLP و تعیین میزان چندشکلی در جمعیت گوسفندان سنجابی بود.

#### مواد و روش‌ها

جهت انجام تحقیق، نمونه های خون از ۱۵۰ راس گوسفند سنجابی در سطح استان کرمانشاه بدست آمد. استخراج DNA پس از تغییر و بهینه سازی روش استخراج نمکی (میلر و همکاران ۱۹۹۸) به شرح زیر انجام شد: ۴ سی سی خون کامل داخل لوله ای پلاستیکی موسوم به فالکون ریخته شد. دو برابر حجم خون، بافر جدا کننده (5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.32M Sucrose, Triton) اضافه (X-100 1%, 10mM Tris-HCl pH=7.5, گردید و سپس ورتکس شد. محلول فوق به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی به آرامی جدا و رسوب حاصله نگه داشته شد. ۳ میلی لیتر بافر جدا کننده به رسوب حاصله اضافه و عمل سانتریفیوژ و جداسازی رسوب تکرار شد تا زمانیکه یک رسوب کاملاً سفید حاصل شد. ۳ میلی لیتر بافر لیز کننده (400mM NaCl, 2mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH=8.2 - 10mM Tris-HCl) به رسوب اضافه و به خوبی ورتکس شد. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر SDS<sup>۱</sup> ده درصد و ۳۵۰ میکرولیتر آنزیم پروتئیناز-K<sup>۲</sup> (با غلظت ۵۰

و همکاران ۲۰۰۰). ژن میوستاتین بیشتر در گاو مورد مطالعه قرار گرفته است و در گوسفند کمتر مورد بررسی قرار گرفته است. تحقیقی توسط جانسون و همکاران (۲۰۰۵) 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 داده ها صورت گرفت. نشانه ای از ژن کاندیدا برای سرعت رشد یا صفات لاشه به دست نیامد. اما، در مورد صفت چربی و ماهیچه ران وجود ژن کاندیدا برای افراد هتروزیگوت واقع بین نشانگرهای BM81124 و BULGE20 ثابت شد ولی در مورد افراد هموزیگوت چنین چیزی مشاهده نشد. مسعودی و همکاران (۱۳۸۴) بر روی گوسفندان بلوچی ایستگاه عباس آباد مشهد با استفاده از تکنیک PCR-SSCP چندشکلی ژن میوستاتین را بررسی کردند. 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 تقریباً تمامی طول ژن میوستاتین گوسفند را پوشش می دادند. نتایج حاصل از تکثیر ۶ آغازگر نشان داد که توالی ژن میوستاتین در این جمعیت بسیار حفاظت شده می باشد، در مورد ۲ آغازگر دیگر و دقت در الگوی باندهای آنها به این نکته اشاره شد که جهشی تک نوکلئوتیدی و یا حذف و اضافه در یک محدوده معین ژن اتفاق افتاده است. در این پژوهش حداقل مربعات ارزش اصلاحی وزن تولد تفاوت معنی داری از لحاظ آماری با ژنوتیپهای مختلف حاصل از تکثیر یک آغازگر چند شکل نشان داد، ولی با دیگر صفات ارتباط معنی داری نداشت.

گوسفند سنجابی، دنبه دار با جثه ای بزرگ و دست و پایی بلند می باشد. این نژاد از نظر تولید گوشت از گوسفندان سنگین وزن ایران است (مولائیان ۱۳۷۸). این

<sup>۱</sup>Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)

<sup>۲</sup>Proteinase-K

حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و یک جفت پرایمر با توالی زیر استفاده گردید (تیموتی و همکاران، ۱۹۹۷).

5'-CCGGAGAGACTTTGG GCTTGA-3'  
5'-TCATGAGCACCCACAGCGGTC-3'

واکنش زنجیره ای پلیمرز با برنامه حرارتی زیر در دستگاه ترموسایکلر انجام شد: واسرشت سازی اولیه DNA به مدت 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 انتهای ۲ دقیقه و ۷۲ درجه سانتیگراد. جهت مشاهده محصولات واکنش زنجیره ای پلیمرز، از ژل آگارز ۱٪ و ولتاژ ۸۰ ولت به مدت ۱ ساعت استفاده شد و رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید انجام گرفت. سپس محصولات واکنش زنجیره ای پلیمرز به کمک آنزیم برشی HaeIII مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند.

برای مشاهده قطعات هضم شده از ژل آکرلامید ۸٪ و ولتاژ ۲۰۰ به مدت ۲ ساعت استفاده شد و بعد از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، ژل اسکن شد و خواندن آلل با استفاده از نرم افزار Uvidoc صورت گرفت که نمونه ای از آن در شکل ۳ نشان داده شده است. برای برآورد فراوانی آلل ها، محاسبه هتروزیگوسیتی و آزمون مربع کا ( $\chi^2$ ) از نرم افزار POP Gene3.2 استفاده گردید.

### نتایج و بحث

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. تکثیر قطعه ۳۳۷ جفت بازی از ژن میوستاتین به کمک واکنش زنجیره ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی به خوبی صورت گرفت و در نتیجه استفاده از برنامه حرارتی مناسب، آغازگرهای اختصاصی و شرایط خوب آزمایشگاهی که فراهم شد قطعه ۳۳۷ جفت

میکروگرم بر میلی لیتر) به محلول حاصله اضافه شد و در طول شب در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در حمام آب گرم قرار داده شد تا هضم محتویات هسته گلبول های سفید کامل گردد. یک میلی لیتر محلول NaCl اشباع (حدود ۶ مولار) به محلول اضافه گردید و سپس محلول به مدت ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد. محلول مزبور به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی به یک لوله پلاستیکی استریل دیگر انتقال داده شد. در این مرحله پروتئین های اتصال به اسیدهای نوکلئیک همراه با نمک در انتهای لوله رسوب سفید رنگی تشکیل دادند. هم حجم محلول، کلروفورم اضافه شد و با تکان دادن با محلول مخلوط شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. آلودگی ها 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 متراکم تر نمودن رشته های DNA، به اندازه ۰/۱ حجم محلول استات سدیم ۳ مولار (PH=۵/۲) اضافه شد. دو برابر حجم محلول بدست آمده، اتانول مطلق اضافه شد و لوله به آهستگی چند بار وارونه شد تا رشته های DNA ظاهر شدند. کلاف DNA با میله شیشه ای که دارای بار مثبت می باشد جمع آوری شد و به مدت حدود ۵ تا ۱۰ دقیقه در مجاورت هوا خشک شد. DNA حاصله دو بار با اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شد و نهایتاً در ۱۰۰ تا ۲۰۰ میکرولیتر از بافر TE (10mM Tris HCl, 0.2mM ) حل گردید. تیوب های حاوی DNA، به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شدند تا DNA به خوبی حل شود. سپس در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نخیره شدند. تعیین کیفیت و کمیت DNA با استفاده از روش الکتروفورز مقایسه ای بر روی ژل آگارز با استفاده از مقادیر مشخصی DNA فاژ لامبدا انجام شد. جهت انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز از کیت PCR Master kit (شرکت سینا ژن) در

نشان دهنده حضور بعضی عوامل بر هم زننده تعادل، از جمله مهاجرت و انتخاب است، که مهاجرت خصوصاً در مورد نرهایی که از خارج گله وارد می شوند و یک جریان ژنی ایجاد می کنند صدق می کند. البته اندازه نمونه مورد بررسی هم در این امر می تواند موثر باشد.

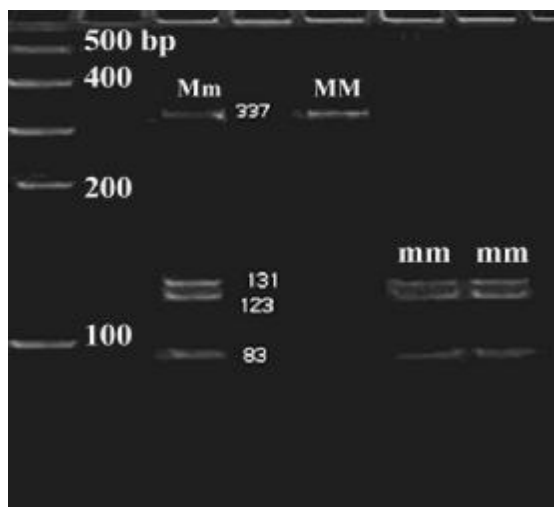
میزان هتروزیگوسیتی برآورد شده بوسیله شاخص نئی<sup>۳</sup> در جمعیت ۰/۵۱۹ برآورد گردید. که این پارامتر حاکی از تنوع ژنتیکی پایین این جمعیت از نظر ژن میوستاتین است. منابع مختلف، آلل M را به عنوان آلل مطلوب جهت اصلاح نژاد و بهبود کیفیت و کمیت گوشت معرفی کرده اند. درست است که فراوانی این آلل در جمعیت بسیار پایین است، ولی باید توجه داشت که ما فقط یک جهش که باعث ماهیچه مضاعف می شود را بررسی کردیم، در حالی که جهش های متفاوتی باعث ماهیچه مضاعف می شوند. برای نمونه، الکساندر و همکاران (۱۹۹۷) با مطالعه ملکولی ژن میوستاتین نشان دادند که یک جهش در گاو مسئول صفت ماهیچه مضاعف می باشد. آنها با مقایسه ملکولی 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 C به A و بالطبع لوسین به فنیل آلانین و در اگزون شماره ۲ جهش G به A و بالطبع سیسیتن به تیروزین تبدیل می شود و آرتور و همکاران (۱۹۸۸) نیز نشان دادند که حذف ۱۱ نوکلئوتید در اگزون شماره ۳ نژاد بلژین بلو رخ داده است. بنابراین، برای اطمینان از نتیجه گیری باید تمامی جهش ها را بررسی نمود.

نظر به این که صفات کمی توسط برآیند تعداد زیادی ژن با اثرات کم و همچنین اثر متقابل بین آنها کنترل می شود، لذا نامناسب بودن فراوانی آلل مطلوب در سطح یک لوکوس نمی تواند گواهی بر عملکرد نامطلوب یک

بازی بدون قطعات غیر اختصاصی بدست آمد (شکل ۲) که با نتایج تیموتی و همکاران (۱۹۹۷) بر روی انسان، گاو، گوسفند و بز مطابقت داشت.

گوسفندان با ژنوتیپ هتروزیگوت (Mm) دارای قطعات ۸۳، ۱۲۳، ۱۳۱ و قطعه برش نخورده ۳۳۷ جفت بازی بودند. در هموزیگوت غالب (MM) قطعه ۳۳۷ جفت بازی بدون برش باقی ماند. در هموزیگوت مغلوب (mm) نیز قطعات ۸۳، ۱۲۳ و ۱۳۱ جفت بازی مشاهده شد. بعد از برآورد فراوانی آلل ها، محاسبه هتروزیگوسیتی و آزمون مربع کا ( $\chi^2$ ) با استفاده از نرم افزار PopGene مشخص گردید که آلل m دارای بیشترین فراوانی (۰/۹۷) و آلل M دارای کمترین فراوانی (۰/۰۳) بودند (جدول ۱). این نتایج با نتایج پژوهش دوراک و همکاران (۲۰۰۲) بر روی گاوهای نژاد کارولیناس<sup>۱</sup> مطابقت داشت ولی با نتایج لور و همکاران (۲۰۰۱) در نژادهای گاو پیدمانتس<sup>۲</sup> مغایرت داشت. دلیل این امر به وقوع بالای فنوتیپ ماهیچه مضاعف در گاوهای پیدمانتس مربوط می شود. همچنین نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج به دست آمده در نژاد گاو بلژین بلو، که فنوتیپ ماهیچه مضاعف در آن به وفور مشاهده می شود مغایرت دارد (الکساندر و همکاران، ۱۹۹۷؛ کاساس و همکاران، ۲۰۰۰). از آن جایی که هیچ گونه تحقیقی در گوسفند به شکل فوق گزارش نشده است نمی توان مقایسات جالب توجهی را در این خصوص بیان کرد. از طرفی، نمی توان گفت که ژن میوستاتین و یا جایگاهی نزدیک به آن در ماهیچه دار شدن گوسفند موثر نمی باشد. برای اطمینان کامل باید مطالعات تکمیلی انجام شود و ارتباط آن در تعامل با جایگاه های دیگر ژنی بررسی شود. آزمون مربع کا نشان داد که تعادل هاردی وینبرگ در این جمعیت برای جایگاه ژن میوستاتین برقرار نیست ( $P < 0/05$ ). عدم تعادل جایگاه ها احتمالاً

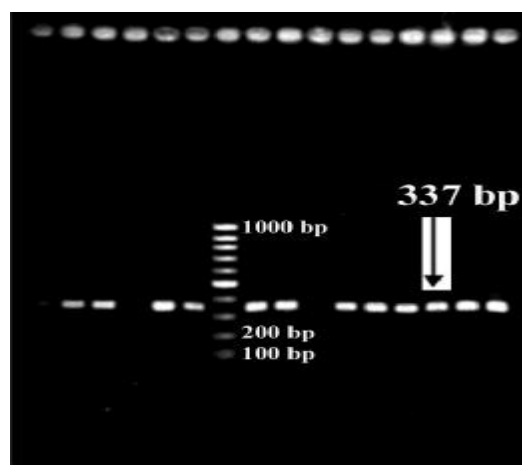
<sup>1</sup>Charolias<sup>2</sup>Piedmontese<sup>3</sup>Nei



شکل 3- نمونه ای از محصول هضم آنزیمی بر روی ژل آکریل آمید 8%

صفت در یک نژاد باشد و بالطبع بررسی وضعیت جایگاه های ژنی دیگر نیز مورد نیاز است.

در کل جمعیت، مقدار شاخص شانون (I) برابر ۰/۱۲۳ و میانگین هتروزیگوتی پایین و برابر ۰/۰۵ بود، که نشان دهنده وجود چند شکلی در این نژاد است. این امر نشان دهنده این است که می توان فراوانی افراد هتروزیگوت را در جمعیت بالا برد.



شکل 2- نمونه ای از محصولات PCR بر روی ژل آگارز

### تشکر و قدردانی

از ریاست محترم و کارکنان مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی کرمان جهت تخصیص اعتبار و در اختیار قرار دادن امکانات آزمایشگاهی تشکر و قدردانی می شود.

جدول 1- فراوانی های ژنی و ژنوتیپی و تعادل هاردی-وینبرگ

ژنوتیپ	تعداد مشاهده شده	تعداد مورد انتظار	فراوانی ژنوتیپی
MM	3	0/0936	0/02
Mm	2	7/8128	0/01
mm	145	142/0936	0/97
فراوانی ژن M		0/0267	
فراوانی ژن m		0/9733	
آزمون مربع کا ( $\chi^2$ ) با درجه آزادی 1		94/5849	

### منابع مورد استفاده

سعادت نوری م. و سیاه منصور ص، ۱۳۷۵. اصول نگهداری و پرورش گوسفند. انتشارات اشرفی تهران.  
 مسعودی ع، عمرانی ح، عباسی ع، نجاتی جوارمی الف، فرهنگ خ، اسماعیل خانیان س و ضیایی ف، ۱۳۸۴. استفاده از تکنیک PCR-SSCP جهت بررسی چند شکلی های ژن میوستاتین و ارتباط آن با صفات تولیدی در گوسفند بلوچی. چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران.

مولائیان ح، ۱۳۷۸. گزارش گوسفند سنجابی در بخش تحقیقات دامپروری استان کرمانشاه. انتشارات جهاد سازندگی استان کرمانشاه. ص ۳۸.

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

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

Belling RHS, Liberles DA, Laschi SPA, Brien PAO and Tay GH, 2005. Myostatin and its implications on animal breeding: a review. *Animal genetics* 36:1-6.

Casas E, Shackerford S, W Keele J, Stone RT, Kappes SM and Koohmareie M, 2000. Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate from of myostatin. *Journal of Animal Science* 78:560-569.

Dvorak J, Filistowicz A, Hruska D, Horak P, Vrtkova I, Kubek A, Szulc T and Pomichal S, 2002. The Polymorphism of MSTN, PRNP and CSN3 genes in Charolais cattle. *Animal science papers and reports.* 20:19-23.

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

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

Hanset R, 1991. Breeding for disease resistance in farm animals: a review. In: CAB international (Ed. By JB Owen & RFE Axford), Oxford, Wallingford, UK. 467-478.

Jahnsen PL, Mcewant JC, Dodds KG, Purchas RW and Blari HT, 2005. A directed search in the region of GDF8 for quantitative trait loci affecting carcass trait in Texel sheep. *Journal of Animal Science.* 83:1988-2000.

Jahnsen PL, Mcewant JC, Dodds KG, Purchas RW and Blari HT, 2005. Meat quality traits were unaffected by a quantitative trait locus affecting leg composition traits in Texel sheep. *Journal of Animal Science* 83: 2729-2735.

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

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

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



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

Wheeler TL, Shackelford SD, Casas E, Cundiff LV and Koohmavaie M, 2001. The effects of piedmontese inheritance and myostatine genotype on the palatability of longissimus thoracis, gluteus medius semimem branosus, and biceps femoris. *Journal of animal science* 79:3096- 3074.