مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
جلد پانزدهم، شماره چهارم، ۱۳۸۷
www.jasnr.info
www.sid.ir
www.magiran.com/jasnr

آنالیز ملکولی ژن کالپاستاتین در گله‌های گوسفند کرمانی

*وحید بهرامپور[۱]، محمدرضا محمدآبادی[۲]، حمیدرضا میرزایی[۳]، امین باقی‌زاده[۴]، غلامرضا داشاب[۵]، اکرم محمدی[۱]، روح‌الله علی‌نقی‌زاده[۶]، محمد سفلایی[۷] و احد خصالی[۷]

[۱]دانشجوی دوره کارشناسی‌ارشد گروه علوم دامی، دانشگاه زابل، [۲]استادیار گروه علوم دامی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، [۳]استادیار گروه علوم دامی، دانشگاه زابل، [۴]استادیار گروه بیوتکنولوژی، مرکز بین‌المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی کرمان، [۵]مربی گروه علوم دامی، دانشگاه زابل، [۶]دانشجوی دوره کارشناسی‌ارشد گروه علوم دامی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، [۷]کارشناس‌ارشد جهاد کشاورزی، کرمان

تاریخ دریافت: ۸۷/۱/۲۱ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۷/۶/۲

چکیده

کالپاستاتین، مهارکننده اختصاصی آنزیم‌های تجزیه‌کننده پروتئینی وابسته به کلسیم یعنی m و μ کالپاین موجود در بافت‌های پستانداران است. سطح اجزای موجود در سامانه کالپاین-کالپاستاتین، سرعت ترد شدن گوشت بعد از کشتار را تعیین می‌کند. کالپاستاتین هم سرعت، هم مقدار تجزیه پروتئین را پس از کشتار، مهار می‌کند و در افزایش کمیت و کیفیت گوشت نقش اساسی دارد. گوسفند کرمانی از ذخایر ژنتیکی استان کرمان است و برای تولید گوشت و پشم مناسب می‌باشد که با نشانگرهای مولکولی، به‌ویژه از نظر ژن کالپاستاتین مورد مطالعه قرار نگرفته است. بنابراین، هدف این تحقیق عبارت است از تعیین تنوع ژنتیکی گله‌های گوسفند کرمانی از نظر ژن کالپاستاتین و مقایسه این نژاد با سایر نژادهایی که از نظر این ژن مطالعه شده اند. قطعه ۶۲۲ جفت بازی از این ژن از روی صد نمونه DNA گوسفند کرمانی با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) تکثیر شد. محصولات PCR با روش RFLP و با استفاده از دو آنزیم هضم شدند و هر سه ژنوتیپ MM، MN و NN یافت شدند. نتایج این آزمایش نشان داد که این جمعیت چند شکلی بالایی دارد، به‌علاوه در بیشتر *MspI* و *NcoI* نژادهای گوسفند ایرانی مطالعه شده، هر سه ژنوتیپ مشاهده نشدند، اما در این نژاد، هر سه ژنوتیپ وجود دارد، بنابراین محققان باید توجه خود را به کیفیت و کمیت گوشت در برنامه‌های اصلاح نژادی این حیوان افزایش دهند. از آنجا که چند شکلی در این نژاد بالا است و هر سه ژنوتیپ نیز در جمعیت آنها موجود است، به راحتی می‌توانیم در مطالعات بعدی با ثبت اطلاعات و تعیین ژنوتیپ، اثر هر ژنوتیپ را در افزایش کمیت و کیفیت گوشت به‌دست آوریم و در برنامه‌های اصلاح نژادی بهترین ژنوتیپ‌ها را انتخاب کنیم.

واژه‌های کلیدی: کالپاستاتین، گوسفند کرمانی، PCR-RFLP، کیفیت، کمیت و تردی گوشت

*- مسئول مکاتبه: mmohammadabadi@yahoo.ca

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

ایران با تمامی امکانات بالقوه‌ای که از لحاظ شرایط اقلیمی و تنوع آب و هوایی دارد، متأسفانه، هنوز به واردات انواع مواد غذایی، اعم از حیوانی و گیاهی وابسته است. با توجه به محدود بودن منابع غذایی دام و امکان‌ناپذیر بودن افزایش تعداد دام در کشور، برای افزایش کیفیت و کمیت تولیدات دامی و خودکفایی، علم ژنتیک و اصلاح نژاد، برای بالا بردن راندمان در هر واحد تولیدی، نقش مهمی را برعهده خواهد داشت. شکل گونه‌ها همواره به دلیل وجود تغییرات محیطی، تغییر در بیماری‌ها و انگل‌ها و پیدایش رقیبان جدید تغییر می‌کند (میرحسینی، ۱۹۹۸). برای غلبه بر چنین تغییراتی، گونه‌ها یا باید تکامل یابند، یا منقرض شوند، بنابراین بررسی خصوصیات ملکولی در نژادهای گوسفند برای جلوگیری از انقراض این گونه، مهم و ضروری می‌باشد. تنوع ژنتیکی در یک جمعیت نشان دهنده توانایی تکامل آن جمعیت است، بنابراین دامپروران از تنوع ژنتیکی، برای دستیابی به حیوانات اهلی، منطبق با اهدافشان بهره می‌گیرند. روش‌های اصلاحی معمول در حیوانات مبتنی بر معیارهای فنوتیپی می‌باشد که با توجه به اطلاعات دقیق از ژنتیک مندلی، ژنتیک جمعیت و ژنتیک کمی همراه با روش‌های پیچیده تجزیه و تحلیل آماری گسترش یافته‌اند. این روش‌ها هر چند در ایجاد پیشرفت ژنتیکی برای صفات گوناگون موفق بوده اند، معایبی را در دراز مدت به دنبال دارند که از آن جمله می‌توان کاهش تنوع ژنتیکی، تثبیت آلل‌های معیوب و همچنین افزایش همخونی را نام برد. انتخاب براساس اطلاعات ژنتیکی حیوان، این خطرات را کاهش می دهد. پیشرفت‌های زیادی در ژنتیک ملکولی و فناوری زیستی صورت گرفته است و ابزارهای قدرتمند و جدیدی را برای اصلاح ژنتیکی حیوانات فراهم کرده است. یکی از مفیدترین این ابزارها، نشانگرهای DNA[1] است که قابل توارث بوده، تفاوت‌های ژنتیکی (ردیف‌های بازی DNA) موجود بین افراد در داخل و بین جمعیت‌ها را نشان می‌دهد (میرحسینی، ۱۹۹۸). استفاده از نشانگرها در اصلاح دام باعث افزایش دقت و سرعت در تعیین ارزش‌های اصلاحی دام می‌شود. انتخاب براساس نشانگرها در مورد صفات دارای وراثت‌پذیری پایین، صفات مشکل از نظر اندازه‌گیری، صفات محدود به جنس و همچنین صفاتی که در ابتدای زندگی بروز نمی‌کنند، موفق بوده است (لندی و تامسون، ۱۹۹۰). از آنجا که گوشت گوسفند یکی از مهم‌ترین منابع تامین پروتئین برای بشر است و علاوه بر این، برای ایرانیان طعم بسیار لذیذی دارد، باید تحقیقاتی در زمینه کمیت و کیفیت این گوشت، انجام گیرد. مصرف‌کنندگان، تردی گوشت را از مهم‌ترین خصوصیات کیفیت گوشت می‌دانند (ساول و همکاران، ۱۹۹۱) و ترد نبودن آن را از مهم‌ترین مشکلات کیفیت آن می‌دانند (مورگان و همکاران، ۱۹۹۱). از آنجا که مصرف‌کنندگان برای گوشت ترد پول بیشتری می‌پردازند، لازم است تا روشهای برآورد تردی گوشت توسعه یابد و درجه‌بندی کیفیت گوشت تکمیل گردد تا پرورش دام‌های گوشتی اقتصادی‌تر و با کیفیت بالاتری باشد (ولف و همکاران، ۱۹۹٦). اگر علت‌های تغییر در تردی گوشت شناسایی شوند، می‌توان با اصلاح ساز و کار موثر در فرآیند تردی، به اهداف مورد نظر رسید. اگر چه بافت گوشت، به‌ویژه تردی آن در حیوانات مختلف، بسیار متغیر است، ساختارهای مشابه و خصوصیات شیمیایی یکسانی در کلیه مهرداران دیده می‌شود. همه مهره‌داران از ۷۵ درصد آب و ۲۵ درصد پروتئین، لیپید، کربوهیدرات و اجزا آلی محلول تشکیل شده‌اند. از چند دهه گذشته تحقیقاتی درباره سازوکارهای بهبود کیفیت گوشت و به‌ویژه در مورد دام‌های گوناگون و نژادهای مختلف انجام شده است. به‌طورکلی نتایج این تحقیقات نشان داده است که تغییرات کوچک، ولی قابل توجهی در ماهیچه رخ می‌دهد تا گوشت ترد گردد (کوهمرایی و همکاران، ۱۹۸۸ و کوهمرایی، ۱۹۹٤). برای نمونه، کوهمرایی و همکاران (۱۹۸۷) مهم‌ترین عامل در تنوع تردی گوشت را تفاوت

1- Deoxyribonucleic Acid

Archive of SID

www.SID.ir

در میزان و مقدار تجزیه پروتئین‌های فیبرهای عضلانی اصلی پس از کشتار دام می‌دانند. نتایج این مطالعات نشان می‌دهد که از بین تمام سامانه‌های پروتئولیزکننده داخلی ماهیچه اسکلتی، فقط سامانه آنزیمی کالپاین[1] در تردی گوشت دخالت دارد. سیستم کالپاین، به‌طور کلی، شامل سه ملکول است: دو پروتئاز وابسته به کلسیم با نام های m- کالپاین و μ- کالپاین و یک پلی‌پپتید به نام کالپاستاتین[2] که فعالیت پروتئازهای ذکر شده را مهار می‌کنند. اولین بار سوری ماشی و همکاران (۱۹۸۹) واژه m- کالپاین و μ- کالپاین را به پروتئازهایی از خانواده کالپین‌ها اختصاص داد. کالپاین A یا *μ-Calpain* به غلظت‌های میکرومولار کلسیم و کالپاین B یا *m-Calpain* به غلظت‌های میلی‌مولار کلسیم برای فعالیت، نیاز دارد. m- کالپاین و μ- کالپاین هر دو در حالت غیرفعال، به‌صورت هترو دایمر هستند (شاکلفورد و همکاران، ۱۹۹٤). اکثر محققان معتقدند که با روش ژنتیکی می‌توان مشکل تردی گوشت را تا حدودی از بین برد و در این میان، سامانه آنزیمی کالپاین مهم‌ترین نقش را دارد (کوهمرایی، ۱۹۹۲)، بنابراین بهترین شیوه پیش‌بینی تردی گوشت باید بر اساس شناسایی شاخصی باشد که توانایی این سامانه را اندازه‌گیری کند. مهم‌ترین تنظیم‌کننده سامانه آنزیمی کالپاین در ماهیچه، پس از کشتار، کالپاستاتین است که بازدارنده اختصاصی و داخلی[3] است، از این‌رو یکی از روش‌های برآورد تردی گوشت تعیین میزان فعالیت کالپاین و کالپاستاتین می‌باشد. نتایج تحقیقات، نشان می‌دهد که انتخاب حیوانات دارای فعالیت کالپاستاتین کمتر، می‌تواند منجر به افزایش تردی گوشت گردد (ویپل و همکاران،۱۹۹۰، شاکلفورد و همکاران ۱۹۹۱a و ۱۹۹٤b). ژن کالپاستاتین روی کروموزوم شماره ۵ گوسفند واقع است و ۱۰۰ کیلو باز طول دارد و شامل ٤ اگزون می‌باشد. اهمیت مطالعه ژن کالپاستاتین این است که ایجادکننده یک سامانه آنزیمی است که اگر تغییری در نسبت آنزیم‌های این سامانه ایجاد شود بیماری‌های گوناگونی بروز می‌کند (هانگ و همکاران، ۱۹۹٤). سامانه کالپاین- کالپاستاتین فرآیندهای گوناگونی را تحت تأثیر قرار می‌دهد، برای نمونه این سامانه در ماهیچه‌های مخطط در تنظیم فرآیند تجزیه و دوباره‌سازی پروتئین، رشد، توسعه و تجزیه ماهیچه، اندام‌زایی، چرخه سلولی، تشکیل آب مروارید، حرکت فیبرهای ماهیچه‌ای و مرگ سلولی نقش موثری دارد (ویسیت و همکاران، ۲۰۰٤). نتایج تحقیقات مختلف نشان می‌دهد که بین تردی، آبداری و نرمی گوشت و ژنوتیپ کالپاستاتین ارتباط معنی‌داری وجود دارد (سیوبانو وهمکاران، ۲۰۰٤). تحقیقات انجام شده، این حقیقت را بیان می دارند که شناخت ساز و کارهای غیرفعال‌سازی کالپاستاتین در ماهیچه‌های اسکلتی بعد از کشتار بسیار مهم است. چندشکلی در این ژن برای اولین بار در گوسفند توسط پالمر و همکاران (۱۹۹۸) و با روش *PCR-RFLP* انجام شد که دو آلل M و N را به‌ترتیب با فراوانی ۰/۷۷ و ۰/۲۳ در گوسفند نژاد دورست هورن[4] بدست آوردند. در ایران نیز تنوع ژنتیکی این ژن برای نژادهای قره‌گل، کردی و آرخارمرینو (افتخار شاهرودی و همکاران، ۲۰۰٤، نصیری و همکاران، ۲۰۰۷ و الیاسی و همکاران، ۲۰۰۵) انجام شده است. گوسفند کرمانی سفید رنگ است و وزن متوسط دارد و با شرایط استان کرمان به‌خوبی تطبیق یافته و پرورش داده می‌شود. این نژاد کمتر با روش‌های ملکولی مورد تحقیق قرار گرفته است و از نظر ژن کالپاستاتین نیز تاکنون بررسی و مطالعه‌ای روی این نژاد انجام نشده است. هدف این مطالعه که نخستین تحقیق در این‌باره است بررسی چندشکلی ژن کالپاستاتین و تعیین فراوانی ژنی و ژنوتیپی در ٤ گله از گوسفندان کرمانی و مقایسه این نتایج با نتایج به‌دست آمده در نژادهای قره‌گل، کردی و آرخامرینو است.

1- Calpain
2- Calpastatin
3- Endogenous
4- Dorset Horn

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از ۱۰۰ گوسفند کرمانی در قالب ٤ گله در استان کرمان به‌صورت کاملاً تصادفی خون‌گیری شد و نمونه‌های ۵ میلی‌لیتری خون در لوله‌های ونوژکت[1] حاوی EDTA[2] جمع‌آوری گردید و بلافاصله به درون یخ منتقل شد. سپس استخراج اسیدهای نوکلئک با استفاده از روش گوانیدین تیو سیانات[3] انجام گرفت، در این روش به ۱۵۰۰ میکرولیتر خون ٤۰۰ میکرولیتر عامل لیزکننده اضافه و در درجه حرارت ٦۵ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۵ دقیقه انکوباسیون شد، سپس ۲۰ میکرولیتر ماده جاذب به نام نوکلئوز افزوده شد و بعد از انجام سانتریفیوژ رسوب را نگه داشته، باقی‌مانده، بیرون ریخته شد. آنگاه ٤۰۰ میکرولیتر بافر نمکی به رسوب اضافه و به‌خوبی مخلوط شد. پس از سانتریفیوژ، رسوب نگه داشته، بقیه بیرون ریخته شد. مرحله قبل مجدداً تکرار شد. رسوب خشک شد و به آن ۱۰۰ میکرولیتر اکستراژن[4] اضافه و به‌مدت ۱۰ دقیقه، در دمای ٦۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شد. محلول باقی مانده سانتریفیوژ شد و محلول بالایی که حاوی DNA است در لوله تمیز دیگری ریخته و باقی‌مانده دور ریخته شد. راندمان استخراج DNA خالص با دستگاه اسپکتروفتومتر آزمون گردید. برای انجام PCR از کیت‌های آماده استفاده شد. الیگونوکلئوتیدهای مورد استفاده در این تحقیق، چرخه‌های PCR و عمل هضم براساس اطلاعات پالمر و همکاران (۱۹۹۸) بود. از دو پرایمر 5'-TGG GGC CCA ATG ACG CCA TCG ATG -3' و 5'- GGT GGA GCA GCA CTT CTG ATC ACC-3' به‌منظور تکثیر قطعه موردنظر استفاده شد. محصولات هضم آنزیمی روی ژل آگارز ۲ درصد بارگذاری و سپس از ژل عکس‌برداری شد و با نرم‌افزار وان‌دی‌اسکن[5] اندازه قطعات محاسبه گردید. در نهایت با نرم افزار ویژه جمعیت‌ها پاپ ژن[6] فراوانی‌های ژنوتیپی و آللی، شاخص شانون، شاخص هتروزیگوسیتی نئی[7] (۱۹۸۷)، محتوای چندشکلی و تعادل هاردی-وینبرگ محاسبه و درخت فیلوژنی نیز برای ٤ گله رسم شد.

نتایج

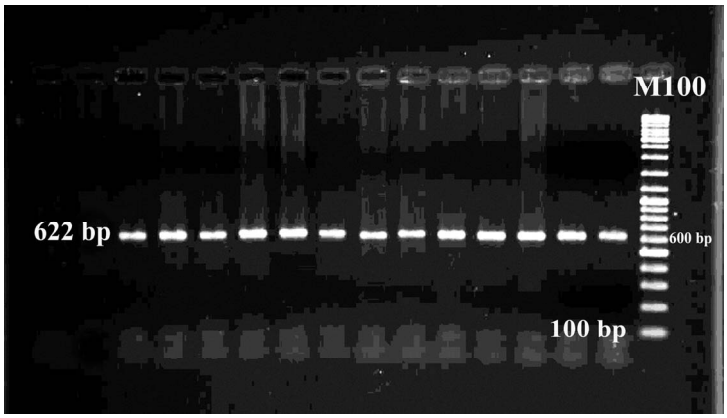
DNA استخراج شده کمیت و کیفیت بسیار خوبی داشت و تقریباً عاری از آلودگی بود و آن را برای کارهای ملکولی از جمله PCR بسیار مناسب می‌ساخت. تصویری که از محصولات PCR برای ژن کالپاستاتین در شکل ۱ نشان داده شده است، پس از انجام PCR با نیمرخ حرارتی متعادل شده، فقط یک نوار تولید کرد که محصول تکثیر DNA الگو با پرایمرهای مورد استفاده می باشد که نشان‌دهنده اختصاصی عمل کردن پرایمرها است.

نتیجه هضم محصولات PCR ژن کالپاستاتین توسط آنزیم‌های برشی *MspI* و *NcoI* و ژنوتیپ‌های ممکن در شکل ۲ نشان داده شده است. مقایسه نوارهای موجود در نمونه‌های هضم شده توسط این آنزیم با نشانگرهای اندازه DNA نشان داد که قطعات موجود در روی ژل با آنچه که از روی توالی DNA ژن کالپاستاتین پیش‌بینی می‌شد، یکسان می‌باشد.

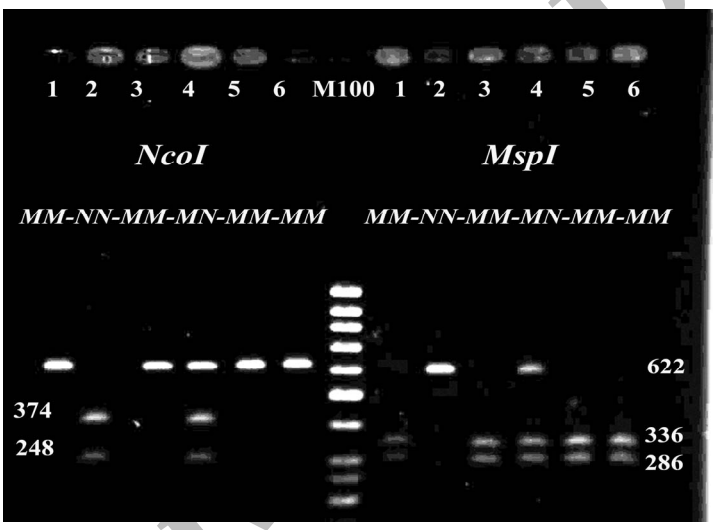
1- Venoject
2- Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
۳- استفاده از کیت Purification Kit DNA
4- Extera Gene
5- Onedscan
6- PopGen 32
7- Heterozygosity Nei

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- قطعه ٦٢٢ جفت بازی حاصل از تکثیر ژن کالپاستاتین.



شکل ۲- الکتروفورز محصولات حاصل از هضم دو آنزیم *MspI* و *NcoI* برای ژن کالپاستاتین در ٦ حیوان (از ۱ تا ٦). M100، نشانگر وزنی استفاده شده است.

فراوانی‌های ژنی و ژنوتیپی برای ٤ گله به‌طور مجزا و برای کل جمعیت در جدول ۱ نشان داده شده است. میزان هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار و متوسط هتروزیگوسیتی برای ٤ گله و کل جمعیت در جدول ۲ آمده است. تعادل هاردی وینبرگ با دو تست کای اسکور[1] و جی اسکور[2] برای این ژن مورد آزمون قرار گرفت و هر دو نشان داد این جایگاه دارای عدم تعادل است.

فاصله ژنتیکی ژن کالپاستاتین براساس شاخص Nei بین ٤ جمعیت گوسفند کرمانی براساس نشانگر RFLP بررسی شد که بین ۰/۰۰۰٤ و ۰/۹۹۹٦ متغیر بود. درخت فیلوژنی این نشانگر با استفاده از فاصله ژنتیکی Nei در تجزیه کلاستر رسم گردید (شکل ۳).

1- Chi-Square
2- G_Square

Archive of SID

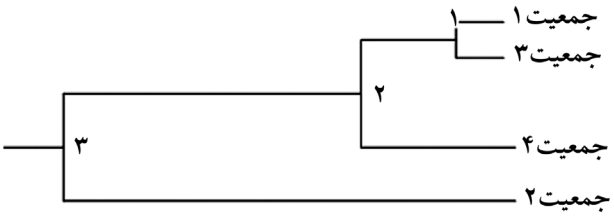
www.SID.ir

جدول ۱- فراوانی‌های ژنی و ژنوتیپی، میانگین شاخص شانون و شاخص هتروزیگوسیتی نئی ژن کالپاستاتین برای ٤ گله گوسفند کرمانی به‌طور مجزا و کل جمعیت.

گله	تعداد	فراوانی ژنوتیپی			فراوانی آللی		میانگین شاخص شانون	شاخص هتروزیگوسیتی نئی
		MM	MN	NN	M	N		
۱	۲۵	۰/۷٦	۰/۱٦	۰/۰۸	۰/۸٤	۰/۱٦	۰/٤۳۹۷	۰/۲٦۸۸
۲	۲۵	۰/٦۰	۰/۲٤	۰/۱٦	۰/۷۲	۰/۲۸	۰/۵۹۳۰	۰/٤۰۳۲
۳	۲۵	۰/۷۲	۰/۲۰	۰/۰۸	۰/۸۲	۰/۱۸	۰/٤۷۱٤	۰/۲۹۵۲
٤	۲۵	۰/٦۸	۰/۲۰	۰/۱۲	۰/۷۸	۰/۲۲	۰/۵۲٦۹	۰/۳٤۳۲
کل	۱۰۰	۰/٦۹	۰/۲۰	۰/۱۱	۰/۷۹	۰/۲۱	۰/۵۱٤۹	۰/۳۳۱۸

جدول ۲- میزان هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار و متوسط هتروزیگوسیتی ژن کالپاستاتین برای ٤ گله و کل جمعیت گوسفند کرمانی.

گله	هموزیگوسیتی مشاهده شده	هتروزیگوسیتی مشاهده شده	هموزیگوسیتی مورد انتظار	هتروزیگوسیتی مورد انتظار	متوسط هتروزیگوسیتی
۱	۰/۸٤	۰/۱٦	۰/۷۲۵۷	۰/۲۷٤۳	۰/۳۲۷٦
۲	۰/۷٦	۰/۲٤	۰/۵۸۸٦	۰/٤۱۱٤	۰/۳۲۷٦
۳	۰/۸۰	۰/۲۰	۰/٦۹۸۸	۰/۳۰۱۲	۰/۳۲۷٦
٤	۰/۸۰	۰/۲۰	۰/٦٤۹۸	۰/۳۵۰۲	۰/۳۲۷٦
کل	۰/۸۰	۰/۲۰	۰/٦٦٦۵	۰/۳۳۳۵	۰/۳۲۷٦



شکل ۳- درخت فیلوژنی ژن کالپاستاتین در چهار گله گوسفند کرمانی

بحث و نتیجه‌گیری

دو آنزیم استفاده شده در این تحقیق، براساس جایگاه‌های برشی آنها مکمل یکدیگر بودند و نتایج هم را تکمیل می‌کردند، بنابراین این دو آنزیم برای بررسی تنوع ژنتیکی این ژن و تعیین نقشه ژنی گوسفند با استفاده از داده‌های جایگاه‌های صفات کمی[1] (QTL) مناسبند. با توجه به این که این ژن در گوسفندان کرمانی چندشکلی است و چون ژن کالپاستاتین به‌عنوان یک ژن موثر در رابطه با تردی گوشت و صفات رشد دام‌ها ارائه شده است (سیو بانو و همکاران، ۲۰۰٤) باید برای صفات مربوط به تردی گوشت اطلاعات لازم را جمع آوری نمود و با کمک آنها پیوستگی آلل‌های مربوط را با تردی گوشت محاسبه کرد. در این نژاد، فراوانی ژن M و N به‌ترتیب ۰/۷۹ و ۰/۲۱ بود که با نتایج افتخار شاهرودی و همکاران (۲۰۰٤) برای گوسفندان قره‌گل (۰/۷۹ و ۰/۲۱ به‌ترتیب برای آلل‌های M و N) کاملاً مطابقت دارد. فراوانی‌های به‌دست آمده در این تحقیق به نتایج نصیری و همکاران (۲۰۰۷) برای نژاد کردی خراسان، که به‌ترتیب

1- QTL Mapping

Archive of SID

www.SID.ir

۰/۸۸ و ۰/۱۲ بود نیز نزدیک هستند، البته آنها ژنوتیپ NN را مشاهده نکردند. این نتایج نشان می‌دهد که از نظر صفات مربوط به تولید و تردی گوشت به هم شبیه هستند. از طرف دیگر، مقایسه نتایج این تحقیق با نتایج الیاسی و همکاران (۲۰۰۵)، که فراوانی دو آلل M و N برای گوسفندان نژاد آرخارمرینو، قزل و دورگ‌های حاصل از قزل و آرخارمرینو به‌ترتیب ۰/٤۸ و ۰/۵۲، ۰/٦۹ و ۰/۳۱، و ۰/۵۰ و ۰/۵۰ را گزارش نمودند، نزدیک نیست و نشان‌دهنده این است که از نظر جایگاه کالپاستاتین، این نژادها تفاوت دارند. بنابراین، باید نمونه بزرگتری را از این نژادها انتخاب کرد و با ثبت اطلاعات دقیق مربوط به صفات تولید و تردی گوشت در این مورد اظهار نظر کرد و به تجزیه و تحلیل نتایج QTL پرداخت و با بررسی ژنوم این نژادها از نظر تکاملی با اطمینان قضاوت کرد که از نظر منشأ چه شباهت‌ها و تفاوت‌هایی دارند و کدام نژاد یا نژادها بهترین کیفیت و تردی گوشت را دارند. شاخص هتروزیگوسیتی نئی[1] برای گوسفندان کرمانی برابر ۰/۳۳ شد که این مقدار برای این جایگاه دو آللی بالا است و بیانگر تنوع ژنتیکی خوبی است، چرا که شاخص هتروزیگوسیتی یکی از شاخص‌های مهم در تعیین تنوع ژنتیکی است و همیشه مورد توجه اصلاح‌کنندگان دام می‌باشد. لازم به ذکر است که این شاخص برای گوسفندان کردی خراسان ۰/۲۱ به‌دست آمده است (نصیری و همکاران، ۲۰۰۷). جمعیت مورد مطالعه گوسفندان کرمانی در تعادل هاردی- وینبرگ نیست، که این امر به دلیل وجود انتخاب، مهاجرت، جهش و خطای نمونه‌برداری می‌باشد، چون در جمعیت گوسفندان مورد مطالعه کارهای اصلاح نژادی انجام می‌شود و همواره امکان مهاجرت یا جهش وجود دارد که باعث بر هم زدن تعادل می شود. از طرفی نمونه مورد مطالعه، نسبت به کل جمعیت گوسفندان کرمانی کوچک است که باعث می‌شود برآورد ما اریب باشد و تعادل به‌هم بخورد. در بررسی تعادل تک‌تک گله‌ها نشان می‌دهد که فقط گله C تعادل دارد و سه گله دیگر تعادل ندارند. از بررسی این ژن مشخص می‌شود که تنها گله B دارای تنوع ژنتیکی بیشتری نسبت به بقیه گله‌ها است.درخت فیلوژنی نشانگر RFLP برای ٤ گله گوسفند کرمانی با استفاده از شاخص ژنتیکی نئی نشان می‌دهد که دو گله ۱ و ۳ در یک گروه طبقه‌بندی می شوند و ٤ نیز فاصله ژنتیکی نزدیکی با این دو گله دارد، ولی فاصله ژنتیکی گله ۲ از سه گله دیگر زیاد است و باید در تحقیقات بعدی مورد توجه قرار گیرد تا دلایل این شباهت‌ها و تفاوت‌ها به‌طور دقیق و با ثبت اطلاعات و رسم شجره مشخص شود. به‌طورکلی، نتایج این تحقیق بیانگر این حقیقت است که نخست روش PCR-RFLP برای مطالعه ژن کالپاستاتین و بررسی ارتباط آن با صفات تولید و تردی گوشت مناسب است و دوم اینکه این نژاد تنوع بسیار خوبی دارد و با توجه به دو منظوره بودن این گوسفند، در منطقه، باید، مورد توجه خاص قرار گیرد تا از انقراض آن جلوگیری شود و بتوان با روش‌های نوین، این دام را به‌طورکامل مورد بررسی قرار داد و رابطه بین میزان تولید گوشت و کیفیت پشم را بررسی کرد و با حفظ کیفیت پشم آن، که منبع اصلی قالی کرمانی است کیفیت گوشت و تردی آن را افزایش داد.

منابع

1.Ciobanu, D.C., Bastiaansen, J.W., Longergan, S.M., Thomsen, H., Dekkers, J.C., Plastow, G.S., and Rothschild, M.F. 2004. New alleles in calpastatin gene are associated with meat quality traits in pigs. Journal of Animal Science, 82: 2829-2839.

2.Eftekhar Shahroudi, F., Nassiry, M.R., Valizadeh, R., Nosrati, M., Javadmanesh, A., and Tahmoorespur, M. 2004. Study of genetic polymorphism of Calpastatin gene in Gharehgol sheep breed. Journal of Agricultural Sciences and Natural management of Khazar, Pp:1-10. (In Persian)

1- Nei

Archive of SID

www.SID.ir

3.Elyasi, Z.G., Shodja, J., and Nassiry, M.R. 2005. Determination of ovine Calpastatin gene polymorphism using PCR-RFLP. PP-110, Proceeding of 4th National Biotechnology Congress, Kerman, Iran. (In Persian)
4.Hong, M.R., Hong, Q.Y., Tanko, E., Hatanaka, M., and Maki, M. 1994. Amino terminal conserved region in proteinase inhibitor domain of calpastatin is calpain inhibitory activitiy by interaction with calmadolin like domain of the proteinase. Animal Genetics. 269: 2440-2443.
5.Koohmaraie, M. 1994. Muscle proteinases and meat aging. Meat Science. 36: 93-104.
6.Koohmaraie, M. 1992. The role of Ca-dependent proteases (calpain) in postmortem proteolysis and meat tenderness. Biochemistry. 74: 239-245.
7.Koohmaraie, M., Babiker, A.S., Schroeder, A.L., Merkel, R.A., and Dutson, T.R., 1988. Acceleration of postmortem tenderization in ovine carcasses through activation of $Ca2^{+}$-dependent proteases. Journal of Food Science. 53: 1638-1641.
8.Koohmaraie, M., Seideman, S.C., Schollmeyer, J.E., Dutson, T.R., and Crouse, J.D. 1987. Effect of post-mortem stage on Ca^{+2}-dependent proteases, their inhibitor and myofibril fragmentation. Meat Science. 19: 187-196.
9.Lande, R., and Thampson, F. 1990. Efficiency of marker assisted selection in the improvement of quantitative traits. Genetics. 124: 743-756.
10.Mirhosseini, Z. 1998. Study of genetic diversity in silk worm using protein markers of DNA. Ph.D. Dissertation of animal science, Faculty of agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran. (In Persian)
11.Morgan, J.B., Savell, J.W., Hale, D.S., Miller, R.K., Griffin, D.B., Cross, H.R., and Shackelford, S.D. 1991. National beef tenderness survey. Journal of Animal Science. 69:3274-3283.
12. Nassiry, M.R., Eftekhar Shahroudi, F., Tahmoorespur, M., and Javadmanesh, A. 2007. Genetic variability and population structure in Beta-lactoglobin, Calpastatin and Calpain loci in Iranian Kurdi sheep. Pakistan Journal of Biological Science. 10:1062-1067.
13.Nei, M. 1987. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics. 89: 583-590.
14.Palmer, B.R., Roberts, N., Hickford, G.G., and Bickerstaffe, R. 1998. PCR-RFLP for *MspI* and *NcoI* in the ovine calpastatin gene. Journal of Animal Science. 76: 1499-1500.
15.Savell, I.W., Harris, J.J., Cross, H.R., Hale, D.S., and Beasley, L. 1991. National Beef Market Basket Survey. Journal of Animal Science. 69:2883-2893.
16.Shackelford, S.D., Koohmaraie, M., Cundiff, L.V., Gregory, K.E., Rohrer, G.A., and Savell, J.W. 1994. Heritabilities and phenotypic and genetic correlations for bovine postrigor calpastatin activity, intramuscular fat content, Warner Bratzlewr Shear force, retail product yield, and growth rate. Journal of Animal Science. 72: 857-863.
17.Shackelford, S.D., Koohmaraie, M., Miller, M.F., Crouse, J.D., and Reagan, J.O. 1991a. An evaluation of tenderness of the longissimus muscle of Angus by Hereford versus Brahman crossbred heifers. Journal of Animal Science. 69:171-177.
18.Shackelford, S.D., Koohmaraie, M., Waipple, G., Wheeler, T.L., Miller, M.F., Crouse, J.D., and Reagan, J.O. 1991b. Predictors of beef tenderness: Development and verification. Journal of Food Science. 56:1130-1135.
19.Sorimmachi, H., Imajoh-Ohmi, S., Emori, Y., Kawaskai, H., Ohno, S., Minami, Y., and Suzuki, K. 1989. Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct from both m- and μ-types: Specific expression of the mRNA in skeletal muscle. Journal of Biological Chemistry. 264: 20106-20111.
20.Veiseth, E., Shakelford, S.D., Wheeler, T.L., and Koohmaraie, M. 2004. Factors regulating lamb longissimus tenderness are affected by age at slaughter. Meat Science. 68: 635-640.
21.Whipple, G., Koohmaraie, M., Dikeman, M.E., Crouse, J.D., Hunt, M.C., and Klemm, R.D. 1990. Evaluation of attributes that affect longissimus muscle tenderness in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. Journal of Animal Science. 68:2716-2728.
22.Wulf, D.M., Tatum, J.D., Green, R.D., Morgan, J.B., Golden, B.L., and Smith, G.C. 1996. Genetic influences on beef longissimus palatabitlity in Charolais and Limousine steers and heifers. Journal of Animal Science. 74: 2394-2405.

Archive of SID

www.SID.ir

J. Agric. Sci. Natur. Resour., Vol. 15(4), 2008
www.jasnr.info
www.sid.ir
www.magiran.com/jasnr

Molecular analysis of Calpastatin gene in Kermani sheep herds

V. Bahrampoor[1], *M.R. Mohammadabadi[2], H. Mirzaei[3], A. Baghizadeh[4], Gh. Dashab[5] A. Mohammadi [1], R. Alinaghizadeh [6], M. Soflaei [7] and A. Khesali[7]

[1]M.Sc. Student, Dept. of Animal Science, University of Zabol, [2]Assistant Prof., Dept. of Animal Science, Shahid Bahonar University of Kerman, [3]Assistant Prof., Dept of animal Science, University of Zabol, [4]Assistant Prof., Dept. of Biotechnology, International centre for sciences and high technology and environmental sciences, Kerman, [5]Instructor, Dept. of Animal Science, University of Zabol, [6]MSc. Student, Dept. of Animal Science, Shahid Bahonar University of Kerman, [7]MSC, Dept. Animal science, Jehad-e-Keshavarzi of Kerman

Abstract

Calpastatin (CAST) is a specific inhibitor of the ubiquitous calcium-dependent proteases – μ-calpain and m-calpain, found in mammalian tissues. The level of components included into the calpain-calpastatin system determines the rate of postmortem tenderization of meat. Calpastatin inhibits both the rate and extent of postmortem proteolysis and plays a role in muscle growth and meat quality. Kermani sheep is gene pool reservation in Kerman province and suitable for meat and wool production that until now has not been studied using molecular markers, especially with the view of calpastatin gene. Therefore, the present study was conducted to determine the genetic diversity of calpastatin gene in Kermani sheep herds and to compare this breed with other sheep breeds that were determined for this trait. The 622 bp fragment of this gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) from DNA samples of 100 Kermani sheep. Polymerase chain reaction products were characterized by the restriction fragment length polymorphism (RFLP) technique using two restriction enzymes, *MspI*, and *NcoI*, yielding all 3 genotypes, MM, MN and NN. The results of this experiment indicated that this population is highly polymorphic, furthermore in the most studied Iranian sheep breeds, all 3 genotypes of this gene have not been detected whereas we detected all 3 genotypes, and hence researchers must increase attention to meat quality and quantity in breeding programs of this breed. Because, polymorphism in this breed is high and there are all three genotypes in their population, we can simply achieve effect of any genotype in increasing of meat quantity and quality with information recording and genotyping in next studies and select the best genotypes in breeding programs.

***Keywords*:** Calpastatin; Kermani Sheep; PCR-RFLP; Meat quality; quantity and tenderization

*- Corresponding Author; E-mail: mmohammadabadi@yahoo.ca

Archive of SID

www.SID.ir