Archive of SID

تنوع آللی ژن کالپاستاتین در گوسفند سنجابی

محمدرضا محمدآبادی

کرمان، دانشگاه شهید باهنر، دانشکده کشاورزی، گروه علوم دامی، ژنتیک و بیوتکنولوژی

تاریخ دریافت: ۹۱/۱/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۲/۷/۲۹

چکیده

تولید گوشت ترد که مطلوب مصرف کنندگان باشد یکی از مسائل مهم در صنعت پرورش گوسفند است. لذا، مطالعه سازکارهای بیوشیمیایی تجزیه ماهیچه در سطح مولکولی ضروری است. کالپاستاتین یک مهار کننده داخلی است و نقش اصلی را در تنظیم فعالیت کالپاین در سلولها ایفاء می کند. گوسفند سنجابی یک حیوان مهم تولید کننده گوشت در استان کرمانشاه است که با نشانگرهای مولکولی، به ویژه از نظر ژن کالپاستاتین مورد مطالعه قرار نگرفته است. بنابراین، هدف این تحقیق تعیین تنوع ژنتیکی گوسفندان سنجابی از نظر ژن کالپاستاتین و مقایسه این نژاد با نژادهای دیگر بود. برای انجام این مطالعه یک قطعه ۶۲۲ جفت بازی از این ژن از روی ۱۴۲ نمونه DNA گوسفند سنجابی با واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) تکثیر شد. محصولات PCR با روش RFLP و با استفاده از دو آنزیم *Msp*I و *Nco*I هضم و سه ژنوتیپ MM، MN و NN مشاهده شدند. فراوانی ژنوتیپهای MM، MN و NN به ترتیب ۰/۶۷، ۰/۲۵ و ۰/۰۸، فراوانی ژنهای M و N به ترتیب ۰/۷۹ و ۰/۲۱ و میانگین شاخصهای شانون و نئی به ترتیب ۰/۵۱ و ۰/۳۳ به دست آمد و جمعیت برای این جایگاه در تعادل هاردی–وینبرگ قرار نداشت. نتایج این آزمایش نشان داد که این جمعیت چند شکلی بالایی دارد، به علاوه در بیشتر نژادهای گوسفند ایرانی مطالعه شده هر سه ژنوتیپ مشاهده نشدند ولی در این نژاد هر سه ژنوتیپ وجود داشت.

واژه های کلیدی: کالپاستاتین، گوسفند سنجابی، PCR-RFLP، تردی گوشت

نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۴۱-۳۲۳۱۲۰۴۳ پست الکترونیکی: mmohammadabadi@yahoo.ca

مقدمه

پرورش گوسفند در ایران بیشتر به منظور تولید گوشت، پشم و پوست صورت می گیرد که در بین آنها تولید گوشت از اهمیت بیشتری برخوردار است. گوسفند به علت داشتن خصوصیاتی از جمله کم توقع بودن از نظر غذایی نسبت به دامهای بزرگ، سازگاری با شرایط آب وهوایی گوناگون، تنوع محصولات تولیدی و بی آزار بودن سابقه پرورش در ایران را داشته و نیز به خاطر سازگاری با ذائقه و سنتهای مذهبی مردم ایران از اهمیت خاصی برخوردار است (۳). اکثر گوسفند داران کشور تنها راه افزایش تولیدات گوسفند را افزایش تعداد حیوانات می دانند در حالی که مراتع موجود که بزرگترین تأمین کننده غذای گوسفند است به هیچ وجه ظرفیت پذیرش تعداد بیشتر دام را ندارد. بنابراین ضروری است با ارائه راهکارهایی مناسب راندمان تولید مربوط به هر دام را افزایش داد (۲).

در حال حاضر اصلاح ژنتیکی صفات در حیوانات اهلی کشورمان عمدتاً متکی به روشهای ژنتیک کمی است. این روشها بسیار مفید و کارآمد بوده و هنوز هم در تمام دنیا از آنها استفاده می شود، اما اگر در کنار آنها از روشهای مولکولی استفاده گردد با دقت و سرعت بیشتری می توان به اهداف مورد نظر رسید.

در ایران منابع غنی حیوانی، به خصوص گوسفند وجود دارد که جهت شناسایی ژنهای کنترل کننده صفات آنها از

www.SID.ir

Archive of SID

طریق ژنتیک مولکولی کارهای جامع وکاملی صورت نگرفته است. شناسایی ژنهای کاندیدا در نژادهای بومی گوسفند می تواند به اصلاح نژاد گوسفندان بومی کمک نماید (۷). پیشرفتهای تحسین برانگیزی اخیراً در ژنتیک مولکولی 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 می باشند که وراثت پذیر بوده و نشان دهنده تفاوتهای اطلاعات ژنتیکی (ردیفهای بازی DNA) موجود بین افراد در داخل و بین جمعیتها می باشند (۵). استفاده از نشانگرها در اصلاح دام جایگاه خاصی را به خود اختصاص داده است و استفاده مناسب از آنها باعث افزایش دقت و سرعت در میزان بهبود ژنتیکی دام می شود. انتخاب براساس نشانگرها در مورد صفات دارای وراثت پذیری پایین، مشکل اندازه گیری، محدود به جنس و همچنین آنهایی که در ابتدای زندگی بروز نمی کنند، موفق بوده است (۱۳)، لذا یکی از ابتدایی‌ترین گامها در مطالعات مولکولی محاسبه تنوع ژنتیکی می باشد. تنوع ژنتیکی در یک جایگاه را می توان با معیارهایی همچون هتروزیگوسیتی مورد انتظار، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و تنوع آللی مشخص نمود. میزان هتروزیگوسیتی معمول ترین معیار تنوع ژنتیکی در یک جمعیت می باشد که به دو صورت هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_0) وهتروزیگوسیتی مورد انتظار (H_E) یا تنوع ژنی (D) گزارش می شود (۲۰). از آنجا که گوشت گوسفند یکی از مهم ترین منابع تأمین پروتئین برای بشر است و علاوه بر این طعم بسیار لذیذی دارد، بنابراین تحقیقاتی در زمینه کمیت و کیفیت این گوشت باید انجام گیرد. مصرف کنندگان تردی گوشت را از مهم ترین خصوصیات کیفیت گوشت می دانند (۱۸) و عدم تردی گوشت را از مهم ترین مشکلات کیفیت بیان می‌دارند (۱۴). از آنجا که مصرف کنندگان برای گوشت ترد پول بیشتری پرداخت می کنند، لازم است تا روشهایی برای برآورد تردی گوشت توسعه یابد و درجه بندی کیفیت گوشت تکمیل گردد تا پرورش دامهای گوشتی اقتصادی تر باشد (۲۵). اگر علتهای تغییر در تردی گوشت شناسایی شوند، می توان مکانیسم مؤثر در فرآیند تردی را دستکاری نمود تا به اهداف مورد نظر رسید. اگر چه بافت گوشت، بخصوص تردی آن در حیوانات مختلف بسیار متغیر است اما دارای ساختارهای مشابه و خصوصیات شیمیایی یکسانی در کلیه مهره داران است. اکثر محققان معتقدند که با کنترل ژنتیکی می توان مشکل تردی گوشت را تا حدودی بهبود بخشید و در این میان سیستم آنزیمی کالپاین مهم ترین نقش را دارد (۹، ۱۰، ۱۱، ۱۹ و ۲۲)، لذا بهترین شیوه پیش بینی تردی گوشت باید بر اساس شناسایی شاخصی باشد که توانایی این سیستم را اندازه گیری کند. مهم ترین تنظیم کننده سیستم آنزیمی کالپاین در ماهیچه، پس از مرگ کالپاستاتین است که یک بازدارنده اختصاصی و داخلی (اندوژنوس) است، از این رو یکی از روشهای برآورد تردی گوشت تعیین میزان فعالیت کالپاین و کالپاستاتین می باشد. نتایج تحقیقات انجام شده نشان می دهد که انتخاب حیوانات دارای فعالیت کالپاستاتین کمتر می تواند منجر به بهبود تردی گوشت گردد (۱۲، ۱۹، ۲۰، ۲۱ و ۲۴). ژن کالپاستاتین روی کروموزوم شماره ۵ گوسفند واقع است و ۱۰۰ کیلو باز طول دارد و شامل ۴ اگزون می باشد. اهمیت مطالعه ژن کالپاستاتین این است که ایجاد کننده یک سیستم آنزیمی است که اگر تغییری در نسبت آنزیمهای این سیستم ایجاد شود بیماریهای گوناگونی بروز می کند (۸). فرآیندهای گوناگونی توسط سیستم کالپاین-کالپاستاتین تحت تأثیر قرار می گیرند (۲۳). نتایج تحقیقات مختلف نشان می دهد که بین تردی، آب داری و نرمی گوشت و ژنوتیپ کالپاستاتین ارتباط معنی داری وجود دارد و بعضی ژنوتیپهای کالپاستاتین (CAST28) بر ضخامت چربی پشت اثر می گذارند، اما ژنوتیپهای دیگر (CAST67) اثری بر وزن یا خصوصیات لاشه ندارد (۶). همه تحقیقات این حقیقت را بیان می دارند که شناخت مکانیسمهای غیر فعال

www.SID.ir

Archive of SID

سازی کالپاستاتین در ماهیچه های اسکلتی بعد از مرگ بسیار مهم می باشد. چند شکلی 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 به ترتیب با فراوانی ۰/۷۷ و ۰/۲۳ در گوسفند نژاد دورست هورن به دست آوردند (۱۷). در ایران نیز تنوع ژنتیکی این ژن برای نژادهای قره گل و کردی (۱و ۱۵) انجام شده است. گوسفند سنجابی بعد از گوسفند بلوچی دارای بیشترین تعداد در بین گوسفندان ایران است و در اکثر نقاط استان کرمانشاه پراکنده است. این حیوان به علت درشتی جثه از نظر تولید گوشت مورد توجه دامداران می باشد (۳). دامداران زیادی در استان کرمانشاه به پرورش و نگهداری آن علاقه‌مند هستند. این گوسفند در مقابل سرما نسبتاً مقاوم است و از مراتع کوهستانی به خوبی استفاده می کند (۴). این نژاد تا کنون با روشهای مولکولی بسیار کم مورد تحقیق قرار گرفته و از نظر ژن کالپاستاتین نیز تا کنون بررسی و مطالعه نشده است. هدف این تحقیق بررسی چند شکلی ژن کالپاستاتین و تعیین فراوانی ژنی و ژنوتیپی در گوسفند سنجابی و مقایسه این نتایج با نژادهای دیگر می باشد.

مواد و روشها

این تحقیق از ۱۴۲ رأس گوسفند سنجابی در ۳۳ گله استان کرمانشاه، که تحت پوشش امور دام این استان بودند و سنجابی بودن آنها به تأیید این سازمان رسیده بود به صورت کاملاً تصادفی خون گیری و نمونه های ۵ میلی لیتری خون در لوله های خلاء دار حاوی EDTA جمع آوری گردید و بلافاصله به درون یخ منتقل شد. سپس استخراج DNA با استفاده از کیت Diatom DNA Prep به روش گوانیدین–سیلیکاژل انجام و مولکولهای بزرگی به طول تقریبی ۵۰–۶۰ هزار جفت باز حاصل شد (۱۹). در این مطالعه از یک جفت آغازگر با توالیهای زیر استفاده شده:

5'TGG GGC CCA ATG ACG CCA TCG ATG-3'

5'GGT GGA GCA GCA CTT CTG ATC ACC-3'

واکنش PCR با استفاده از کیت PCR یونیورسال (PCR Universal) (شرکت سینا ژن) انجام شد. شرایط واکنش PCR عبارت بودند از: واسرشت سازی اولیه DNA به مدت ۱ دقیقه و ۹۵ درجه سانتی گراد، انجام ۳۵ سیکل با واسرشت سازی DNA طی۴۰ ثانیه و ۹۵ درجه سانتی گراد، اتصال آغازگر به DNA طی ۶۰ ثانیه و ۶۲ درجه سانتی گراد و بسط آغازگر طی ۲ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی گراد و بسط انتهایی ۱۰ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی گراد. پس از عمل تکثیر، ۵ میکرولیتر از محصولات PCR در ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز گردید تا از انجام آن اطمینان حاصل شود. باقیمانده محصولات تکثیر با استفاده از آنزیمهای برشی *Msp*I و *Nco*I در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت هضم گردید (۱۷). محصولات هضم آنزیمی نیز روی ژل آگارز ۲ درصد بارگذاری و سپس از ژل عکسبرداری شد و با نرم افزار Onedscan اندازه قطعات محاسبه گردید. در نهایت با نرم افزار PopGen 32 فراوانیهای ژنوتیپی و آللی، شاخص شانون، شاخص هتروزیگوسیتی نئی (Nei) (۱۹۸۷) (۱۶) و تعادل هاردی–وینبرگ محاسبه شد.

نتایج

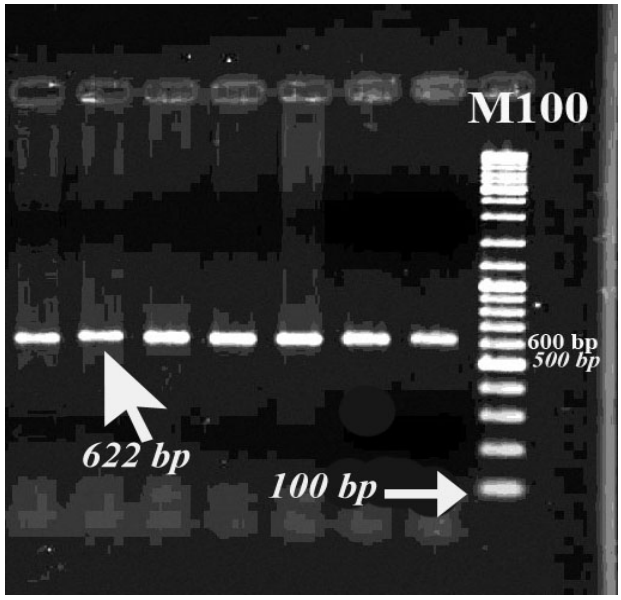
با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز و اسپکتروفتومتری مشخص شد که DNA استخراج شده کمیت و کیفیت بسیار خوبی دارد و نسبت A_{260}/A_{280} آن در دستگاه اسپکتروفتومتر ۱/۹ بود. این کیفیت نشان می دهد که DNA تقریباً عاری از آلودگی است و برای کارهای مولکولی، از جمله PCR بسیار مناسب می باشد. تصویری از محصولات PCR برای ژن کالپاستاتین در شکل ۱ نشان داده شده است. پس از انجام PCR با برنامه حرارتی بهینه شده فقط یک باند با اندازه ۶۲۲ جفت باز تولید کرد که محصول تکثیر DNA الگو با آغازگرهای مورد استفاده

www.SID.ir

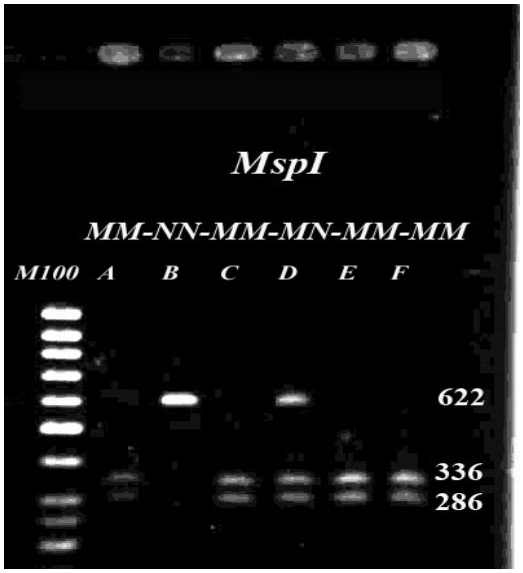
Archive of SID

می باشد و نشان دهنده اختصاصی عمل کردن آغازگرها می باشد.

نتیجه هضم محصولات PCR ژن کالپاستاتین توسط آنزیمهای برشی *Msp*I و *Nco*I و ژنوتیپهای ممکن در شکل های ۲ و ۳ نشان داده شده است. مقایسه باندهای موجود در نمونه های هضم شده توسط این آنزیم با نشانگر وزنی DNA نشان داد که قطعات موجود در روی ژل با آنچه که از روی توالی DNA ژن کالپاستاتین پیش بینی می شد، یکسان می باشد.



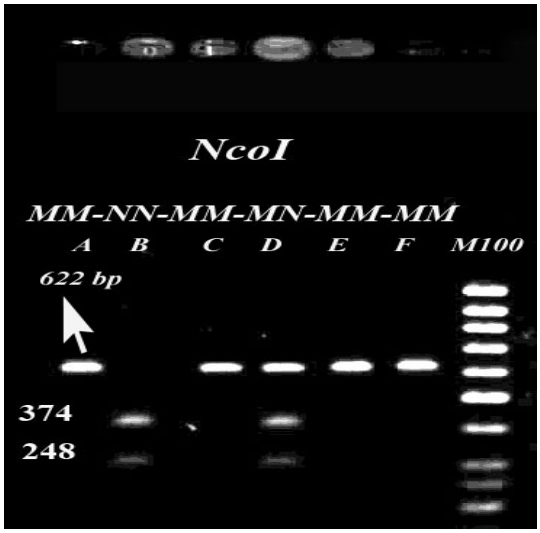
شکل ۱- قطعه ۶۲۲ جفت بازی حاصل از تکثیر ژن کالپاستاتین



شکل ۲- الکتروفورز محصولات حاصل از هضم آنزیم *Msp*I برای ژن کالپاستاتین. از M100 به عنوان نشانگر وزنی استفاده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳- الکتروفورز محصولات حاصل از هضم آنزیم *NcoI* برای ژن کالپاستاتین. از M100 به عنوان نشانگر وزنی استفاده شده است.

فراوانیهای ژنی و ژنوتیپی، میانگین شاخص شانون و شاخص هتروزیگوسیتی نئی در جدول ۱ آمده است. میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده، هتروزیگوسیتی مورد انتظار، هموزیگوسیتی مشاهده شده و هموزیگوسیتی مورد انتظار نیز به ترتیب ۰/۲۵، ۰/۳۳، ۰/۷۵ و ۰/۶۷ به دست آمد. تعادل هاردی وینبرگ با دو آزمون مربع کا و مربع جی برای این ژن مورد آزمایش قرار گرفت. برای محاسبه مربع کا از رابطه زیر استفاده می شود:

$$\chi^{2}_{(1-\alpha,\ df)} = \sum_{i=1}^{n} (o_i - e_i)^2 / e_i$$

که در آن، o_i= تعداد مشاهده شده، e_i= تعداد مورد انتظار، df =n−۱= درجه آزادی، α−۱= درجه اطمینان و n= تعداد نمونه های مورد مقایسه. آماره مربع جی نیز با استفاده از فرمول زیر محاسبه می گردد:

$$G^2 = -2(\ln L_0 - \ln L_1)$$

که در آن L_0 و L_1 به ترتیب برآوردهای حداکثر درست نمایی برای فرضهای صفر (برقراری تعادل) و یک (عدم تعادل) می باشند. هر دو آزمون نشان داد که این جایگاه در جمعیت مورد مطالعه دارای تعادل نیست.

جدول ۱- فراوانیهای ژنی و ژنوتیپی، میانگین شاخص شانون و شاخص هتروزیگوسیتی نئی ژن کالپاستاتین برای جمعیت گوسفند سنجابی

فراوانی ژنوتیپی			فراوانی آللی		میانگین شاخص شانون	شاخص هتروزیگوسیتی نئی
MM	MN	NN	M	N		
۰/۶۷	۰/۲۵	۰/۰۸	۰/۷۹	۰/۲۱	۰/۵۱	۰/۳۳

بحث و نتیجه گیری

دو آنزیم استفاده شده در این تحقیق، بر اساس جایگاههای برشی آنها مکمل یکدیگر بودند و نتایج همدیگر را تکمیل می کنند، لذا این دو آنزیم برای بررسی تنوع ژنتیکی این ژن و تعیین نقشه ژنی گوسفند با استفاده از داده های جایگاههای صفات کمی (QTL mapping) مناسب می باشند. با توجه به اینکه این ژن در گوسفندان سنجابی

www.SID.ir

Archive of SID

دارای چند شکلی است و چون ژن کالپاستاتین به عنوان یک ژن کاندیدا در رابطه با تردی گوشت و صفات رشد دامها ارائه شده است (۶) باید برای صفات مربوط به تردی گوشت اطلاعات لازم را جمع آوری نمود و با کمک آنها پیوستگی آللهای مربوطه را با تردی گوشت محاسبه کرد. در این نژاد فراوانی ژن M و N به ترتیب ۰/۷۹ و ۰/۲۱ بود که با نتایج افتخار شاهرودی و همکاران (۱۳۸۳) برای گوسفندان قره گل (۰/۷۹ و ۰/۲۱ برای آلل های M و N به ترتیب) کاملاً مطابقت دارد (۱). فراوانیهای به دست آمده در این تحقیق به نتایج نصیری و همکاران (۲۰۰۷) برای نژاد کردی خراسان، که به ترتیب ۰/۸۸ و ۰/۱۲ بود نیز نزدیک هستند (۱۵). البته آنها ژنوتیپ NN را مشاهده نکردند. این نتایج نشان می دهد که از نظر فراوانیهای آللی به هم شبیه هستند، اما از نظر صفات مربوط به تولید و تردی گوشت باید مورد مطالعه قرار گیرند و علت یابی شوند. از طرف دیگر، مقایسه نتایج این تحقیق با فراوانی دو آلل M و N برای گوسفندان نژاد آرخارمرینو، قزل و دورگهای حاصل از قزل و آرخارمرینو که به ترتیب ۰/۴۸ و ۰/۵۲، ۰/۶۹ و ۰/۳۱، و ۰/۵۰ و ۰/۵۰ بودند نزدیک نیست و نشان دهنده این است که از نظر جایگاه کالپاستاتین این نژادها تفاوت دارند (۲). بنابراین، باید نمونه بزرگتری را از این نژادها انتخاب نمود و با ثبت رکوردهای دقیق مربوط به صفات تولیدی و تردی گوشت در این مورد اظهار نظر نمود و به تجزیه و تحلیل نتایج QTL پرداخت و با بررسی ژنوم این نژادها از نظر تکاملی با اطمینان قضاوت نمود که از نظر منشأ چه شباهتها و تفاوتهایی دارند و کدام نژاد یا نژادها بهترین کیفیت و تردی گوشت را دارند. شاخص هتروزیگوسیتی نئی برای گوسفندان سنجابی 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 اصلاح گران دام می باشد. لازم به ذکر است که این شاخص برای گوسفندان کردی خراسان ۰/۲۱ به دست آمده است (۱۵). جمعیت مورد مطالعه گوسفندان سنجابی در تعادل هاردی-وینبرگ نبود. شرایط برقراری تعادل در جمعیتها شامل بزرگ بودن جمعیت، عدم وجود جهش، انجام نشدن مهاجرت، در کار نبودن انتخاب و انجام آمیزشها به صورت تصادفی است. از آنجا که جمعیت در تعادل نیست باید یک یا چند شرط از شرایط برقراری تعادل برقرار نباشد. در جمعیت گوسفندان مورد مطالعه کارهای گزینش یا انتخاب و اصلاح نژادی انجام می شود و آمیزشها هم آن چنان کنترل شده نیستند و در بعضی گله ها آمیزشهای خویشاوندی ممکن است انجام شده باشد، از طرفی نمونه مورد مطالعه نسبت به کل جمعیت گوسفندان سنجابی کوچک است که می تواند باعث بر هم زدن تعادل شود. به طور کلی، نتایج این تحقیق بیانگر این حقیقت است که روش PCR-RFLP برای مطالعه ژن کالپاستاتین و بررسی ارتباط آن با صفات تولید و تردی گوشت مناسب است و این که این نژاد تنوع بسیار خوبی دارد و با توجه به اهمیت این گوسفند در استان کرمانشاه باید مورد توجه خاص قرار گیرد تا حیوانات از هر سه ژنوتیپ حفظ شوند و هیچیک از سه ژنوتیپ از دست نرود. از آنجا که هنوز مشخص نشده کدام ژنوتیپ باعث بهبود کیفیت و تردی گوشت می شود و رابطه آللی این دو آلل از چه نوعی است نمی توان قضاوت کرد که کدام ژنوتیپ ارزش بهتری دارد، لذا باید با روشهای نوین این دام را کامل مورد بررسی قرار داد و رابطه آللی این جایگاه و چگونگی اثر هر آلل را بر کیفیت گوشت و تردی آن کشف کرد تا بتوان کیفیت و تردی گوشت را افزایش داد بدون اینکه بر کیفیت صفات دیگر آن تأثیر منفی داشته باشد.

منابع

www.SID.ir

Archive of SID

۱. افتخار شاهرودی، ف. نصیری، م.ر. ولی زاده، ر. نصرتی، م. جوادمنش، ع و م. طهمورث پور. ۱۳۸۳. بررسی چند شکلی ژنتیکی ژن کالپاستاتین در گوسفندان نژاد قره گل. پژوهشنامه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خزر، سال دوم، ص۱۰-۱.

۲. الیاسی زرین قبایی، ق. شجاع، ج. نصیری م.ر. پیراهری، ا. جوانمرد ا. ۱۳۸۷. فراوانی آللی و ژنوتیپی ژن کالپاستاتین در گوسفندان قزل، آرخامرینو و آمیخته های آنها. *www.SID.ir*.

۳. سعادت نوری، م و ص. سیاه منصور. ۱۳۷۵. اصول نگهداری و پرورش گوسفند. انتشارات اشرفی. تهران.

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

۵. میر حسینی، ض. ۱۳۷۷. بررسی تنوع ژنتیکی کرم ابریشم با استفاده از نشانگرهای پروتئینی DNA. پایان نامه دکتری علوم دامی. دانشکده کشاورزی. دانشگاه تربیت مدرس. تهران.

6. Ciobanu, D.C., J.W. Bastiaansen, S.M. Longergan, H. Thomsen, J.C. Dekkers, G.S. Plastow and M.F. Rothschild. 2004. New allaeles in calpastatin gene are associated with meat quality traits in pigs. G. Anim. Sci. 82: 2829-2839.

7. Fahrenkrug, S.C., E. Casas, J.W. Keele and T.P. Smith. 1999. Technical note: direct genotyping of the double-muscling locus (mh) in Piedmontese and Belgian Blue cattle by fluorescence PCR. J. Anim. Sci., 77: 2028-2030.

8. Hong, M.R., Q.Y. Hong, E. Tanko, M. Hatanaka and M. Maki. 1994. Amino terminal conserved region in proteinase inhibitor domain of calpastatin is calpain inhibitory activitiy by intevaction with calmadolin like domain of the proteinase. Anim. Genet. 269: 2440-2443.

9. Koohmaraie, M. 1992. The role of Ca-dependent proteases (calpain) in postmortem proteolysis and meat tenderness. Biochimie. 74: 239-245.

10. Koohmaraie, M. 1994. Muscle proteinases and meat aging. J. Meat Sci. 36: 93-104.

11. Koohmaraie, M., A.S. Babiker, A.L. Schroeder, R.A. Merkel and T.R. Dutson. 1988. Acceleration of postmortem tenderization in ovine carcasses through activation of $Ca2^{+}$-dependent proteases. J. Food Sci. 53: 1638-1641.

12. Koohmaraie, M., S.C. Seideman, J.E. Schollmeyer, T.R. Dutson and J.D. Crouse. 1987. Effect of post-mortem stage on Ca^{+2}-dependent proteases, their inhibitor and myofibril fragmentation. J. Meat Sci., 19: 187-196.

13. Lande, R. and F. Thampson. 1990. Efficiency of marker assisted selection in the improvement of quantitative traits. Genetics.124: 743-756.

14. Morgan, J.B., J.W. Savell, D.S. Hale, R.K. Miller, D.B. Griffin, H.R. Cross and S.D. Shackelford. 1991. National Beef Tenderness Survey. J. Anim. Sci. 69: 3274-3283.

15. Nassiry, M.R., F. Eftekhar Shahroudi, M. Tahmoorespur and A. Javadmanesh. 2007. Genetic variability and population structure in Beta-lactoglobin, Calpastatin and Calpain loci in Iranian Kurdi sheep. Pak. J. Biol. Sci., 10:1062-1067.

16. Nei, M. 1987. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genet. 89: 583-590.

17. Palmer, B.R., N. Roberts, G.G. Hickford and R. Bickerstaffe. 1998. PCR-RFLP for *MspI* and *NcoI* in the ovine calpastatin gene. J. Anim. Sci. 76: 1499-1500.

18. Savell, I.W., J.J. Harris, H.R. Cross, D.S. Hale and L. Beasley. 1991. National Beef Market Basket Survey. J. Anim. Sci. 69: 2883-2893.

19. Shackelford, S.D., M. Koohmaraie, L.V. Cundiff, K.E. Gregory, G.A. Rohrer and J.W. Savell. 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. J. Anim. Sci. 72: 857-863.

20. Shackelford, S.D., M. Koohmaraie, M.F. Miller, J.D. Crouse and J.O. Reagan. 1991a. An evaluation of tenderness of the longissimus muscle of Angus by Hereford versus Brahman crossbred heifers. J. Anim. Sci. 69:171-177.

21. Shackelford, S.D., M. Koohmaraie, G. Waipple, T.L. Wheeler, M.F. Miller, J.D. Crouse and J.O. Reagan. 1991b. Predictors of beef tenderness: Development and verification. J. Food Sci. 56:1130-1135.

22. Sorimmachi, H., S. Imajoh-Ohmi, Y. Emori, H. Kawaskai, S. Ohno, Y. Minami and K. Suzuki. 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. J. Biol. Chem. 264: 20106-20111.

www.SID.ir

Archive of SID

23. Veiseth, E., S.D. Shakelford, T.L. Wheeler, M. Koohmaraie. 2004. Factors regulating lamb longissimus tenderness are affected by age at slaughter. Meat Sci. 68: 635-640.

24. Whipple, G., M. Koohmaraie, M.E. Dikeman, J.D. Crouse, M.C. Hunt and R.D. Klemm. 1990. Evaluation of attributes that affect longissimus muscle tenderness in *Bos taurus* and *Bos inddicus* cattle. J. Anim. Sci. 68: 2716-2728.

25. Wulf, D.M., J.D. Tatum, R.D. Green, J.B. Morgan, B.L. Golden, and G.C. Smith. 1996. Genetic influences on beef longissimus palatability in Charolais and Limousine steers and heifers. J. Anim. Sci. 74: 2394-2405.

Allelic Diversity of Calpastatin Gene in Sanjabi Sheep

Mohammadabadi M.R.

Animal Science Dept., Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University, Kerman, I.R. of Iran

Abstract

Producing tender meat that consumer's desire is one of the major problems facing the sheep industry. Therefore, study of the biochemical mechanisms for muscle degradation is essential at the molecular level. Calpastatin is an endogenous inhibitor and plays an essential role in regulation of calpain activity in cells. Sanjabi sheep is an important animal producing meat in Kermanshah province that until now has not been studied by DNA markers, especially in the case of calpastatin gene. Therefore, present study was conducted to determine the genetic diversity of calpastatin gene in Sanjabi sheep and to compare this breed with other sheep breeds. A 622 bp fragment from this gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) from DNA samples of 142 Sanjabi sheep. PCR products were characterized by the restriction fragment length polymorphism (RFLP) method using two restriction enzymes, *Msp*I, and *Nco*I, yielding 3 genotypes, MM, MN and NN. Genotype frequencies of MM, MN and NN were 0.67, 0.25 and 0.08, respectively. Gene frequencies of M and N were 0.79 and 0.21, respectively and mean of Nei's and Shanon's indexes were 0.51 and 0.33, respectively. Population was not in Hardy-Weinberg equilibrium for this locus. 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 in this breed all 3 genotypes were observed.

Key words: Calpastatin; Sanjabi Sheep; PCR-RFLP; Meat tenderness

www.SID.ir