

## بررسی چندشکلی ژن میواستاتین و ارتباط آن با صفات رشد در گوسفند کردی خراسان شمالی

Study on the polymorphism in myostatin gene and its association with growth traits in Kordi sheep of Northern Khorasan

سکینه اکبری<sup>۱</sup>، غلامرضا داشاب<sup>\*</sup>، مسعود علی‌پناه<sup>۱</sup>، محمد رکوعی<sup>۱</sup>، داود علی‌ساقی<sup>۲</sup>

۱- به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، استادیار، دانشیار، استادیار، دانشگاه زابل

۲- استادیار پژوهشی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی، مشهد، خراسان رضوی

Akbari S<sup>1</sup>, Dashab GR<sup>\*1</sup>, Alipanah M<sup>1</sup>, Rokouei M<sup>1</sup>, Saghi DA<sup>2</sup>

1. Graduated MSc Student, Assistant professor, Associate professor, Assistant professor,  
University of Zabol, Iran.

2. Assistant Researcher, Agricultural and Natural Resource Center, Mashhad, Iran

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Dashab@uoz.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۷ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۱۷)

### چکیده

ژن میواستاتین یا فاکتور ۸ موثر بر رشد و تمایز (GDF8)، به عنوان یک نظام بازدارنده در رشد و توسعه ماهیچه اسکلتی عمل می‌کند. جهش در ناحیه کد کننده میواستاتین باعث تغییر نقش مهاری آن و افزایش عضله می‌شود. در پژوهش اخیر خوتگیری به طور تصادفی از تعداد ۵۸ راس گوسفند کردی خراسان شمالی انجام و سپس استخراج DNA با استفاده از روش نمکی بهینه یافته صورت گرفت. یک قطعه ۳۳۷ جفت بازی از ناحیه اگزون ۳ ژن میواستاتین با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) تثبیت شد. به منظور رديابی شکل‌های متفاوت آللی در جایگاه میواستاتین از آنزیم محدود‌الاثر *Hae*III با روش PCR-RFLP استفاده شد. از سه الگوی ژنوتیپی ممکن در جایگاه ژن میواستاتین، تنها دو ژنوتیپ Mm و mm با فراوانی به ترتیب ۰/۰۸۵ و ۰/۱۵ مشاهده شد. فراوانی آللی در جایگاه مزبور برای آلل‌های M و m به ترتیب ۰/۰۸ و ۰/۹۲ برآورد شد. تجزیه مدل‌های خطی با اثرات ثابت ژنوتیپ نشان داد که میانگین وزن بره‌ها در ۳ و ۶ ماهگی ژنوتیپ هتروزیگوت بالاتر از ژنوتیپ هموزیگوت می‌باشد.

### واژه‌های کلیدی

چندشکلی  
ژن میواستاتین  
گوسفند کردی خراسان شمالی  
DNA

شیروان، به طور تصادفی انتخاب و خونگیری از سیاه رگ گردنی انجام شد. استخراج DNA از نمونه های خون تازه به روش نمکی بهینه یافته (Miller et al. 1998) انجام گرفت. تکثیر قطعه ۳۳۷ بازی ناحیه اگرون سه ژن میواستاتین توسط آغازگر اختصاصی و با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) انجام شد (جدول ۱). دمای بهینه جهت واکنش تکثیر در دستگاه ترموسایکلر شامل واسرتسته سازی اولیه در دمای ۹۵°C به مدت ۱۰ دقیقه، در ادامه ۴۰ چرخه با واسرتسته سازی ثانویه در دمای ۹۵°C به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال در دمای ۵۸°C به مدت ۴۰ ثانیه و بسط اولیه در دمای ۷۲°C به مدت ۴۵ ثانیه و نهایتاً بسط نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه بود. جهت حصول اطمینان از تکثیر اختصاصی قطعه مورد نظر محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با ولتاژ ۸۰، الکتروفورز و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید برای رویت باندها استفاده شد. هضم آنزیمی محصولات حاصل از واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر در محیط بافری با مقادیر ۶ میکرولیتر محصول PCR، دو میکرولیتر بافر واکنش آنزیمی (۱۰X)، ۰.۵ میکرولیتر آنزیم برشی *HaeIII* (دو واحد) و ۱۱/۵ میکرولیتر آب دیونیزه به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انجام شد. سپس، محصولات هضم آنزیمی بر روی ژل آگارز سه درصد الکتروفورز و با اتیدیویوم بروماید رنگ آمیزی شدنند. الگوهای ژنتیکی با توجه به طول و تعداد قطعات حاصل از هضم تعیین و فراسنجه های ژنتیکی و جمعیتی جایگاه ژن میواستاتین با نرم افزار POPGENE3.2 (Yeh et al. 1999) برآورد شد. جهت بررسی ارتباط الگوهای ژنتیکی جایگاه ژن میواستاتین با صفات مرتبط با رشد شامل وزن تولد، سه ماهگی و ۶ ماهگی از مدل های ثابت خطی با روش GLM نرم افزار SAS (نسخه ۹/۱) استفاده شد، که مدل آماری عبارت است از:

$$Y_{ijkl} = \mu + S_i + BT_j + G_k + BT_j S_i + e_{ijkl} \quad (1)$$

در رابطه بالا،  $Y_{ijkl}$  مقدار فنتویپی هر یک از صفات مورد بررسی (وزن تولد، وزن سه ماهگی و وزن شش ماهگی)،  $\mu$  میانگین کل،  $S_i$  اثرات ثابت جنس،  $BT_j$  اثرات ثابت تیپ تولد،  $G_k$  اثر ثابت ژنتویپ حیوان،  $BT_j S_i$  اثر متقابل تیپ تولد با جنس حیوان و  $e_{ijkl}$  خطای باقی مانده می باشد. مقایسه میانگین گروه های ژنتویپی با روش توکی کرامر انجام شد.

با افزایش روزافزوون جمعیت و کمبود جهانی غذا نیاز به تولیدات دامی سبب شده تا محققان به دنبال راهکارهایی برای افزایش بازدهی محصولات باشند. یکی از مهمترین راهکارها استفاده از برنامه های اصلاح نژاد برای افزایش توان ژنتیکی دام است. در دهه گذشته استفاده از اطلاعات ژنومیک به عنوان یک ابزار در برنامه های اصلاح نژاد استفاده شد (Veerkamp and Bearda 2007) که عمدۀ تلاش ها در جهت شناسایی ژن های عمدۀ تاثیر گذار بر صفات مهم اقتصادی و بررسی میزان تنوع در جایگاه های فوق بوده تا امکان توجیه تنوع ژنتیکی و فنتویپی بین افراد فراهم شود. مطالعات برای یافتن ژن های به وجود آورنده عضله مضاعف در گاو های گوشتی منجر به کشف ژن میواستاتین شد، که به عنوان ژن کاندیدا برای صفت تولید گوشت بررسی و نقش آن در نژادهای مختلف دام و طیور و حتی انسان مشخص شد. ژن میواستاتین که فاکتور ۸ رشد و تمایز (GDF-8<sup>۱</sup>) نامیده می شود، عضوی از خانواده بزرگ تغییر دهنده رشد پستانداران TGF-β می باشد و در توسعه ماهیچه اسکلتی بزرگ سالان نقش دارد (Masumi et al. 2002). در گوسفند ژن میواستاتین بر روی کروموزوم دو واقع شده که دارای سه اگرون، دو ایترون و ناحیه پایین دست ژن می باشد، که ساختار و توالی آن در بانک ژن با شماره دستیابی DQ530260 موجود است (Clop et al. 2006; Kijas et al. 2007). میواستاتین مهارکننده رشد ماهیچه های اسکلتی بوده و جهش در ناحیه کد کننده آن باعث تغییر نقش مهاری آن و افزایش عضله می شود (Johnson et al. 2009). حیواناتی که خصوصیت ماهیچه مضاعف دارند، میزان چربی کمتر داشته و گوشت آن ها برای سلامتی مفیدتر است (DeSmet et al. 2000). گوسفند کردی خراسان شمالی یکی از نژادهای گوسفند دنبه دار ایران است، که هدف اصلی پرورش آن افزایش بازده تولید گوشت است. هدف از انجام تحقیق حاضر تعیین چندشکلی موجود در جایگاه اگرون سه ژن میواستاتین و بررسی ارتباط الگوهای ژنتویپی آن ها با صفات مرتبط با رشد در این نژاد می باشد. جهت انجام تحقیق حاضر، تعداد ۵۸ راس گوسفندان کردی خراسان شمالی ایستگاه اصلاح نژاد گوسفند کردی شهرستان

<sup>۱</sup> Growth differentiation factor -8

جدول ۱- آغازگرهای اختصاصی جهت تکثیر قطعه ۳۳۷ جفت بازی از اگزون ۳ ژن میواستاتین در جمعیت گوسفند کردی

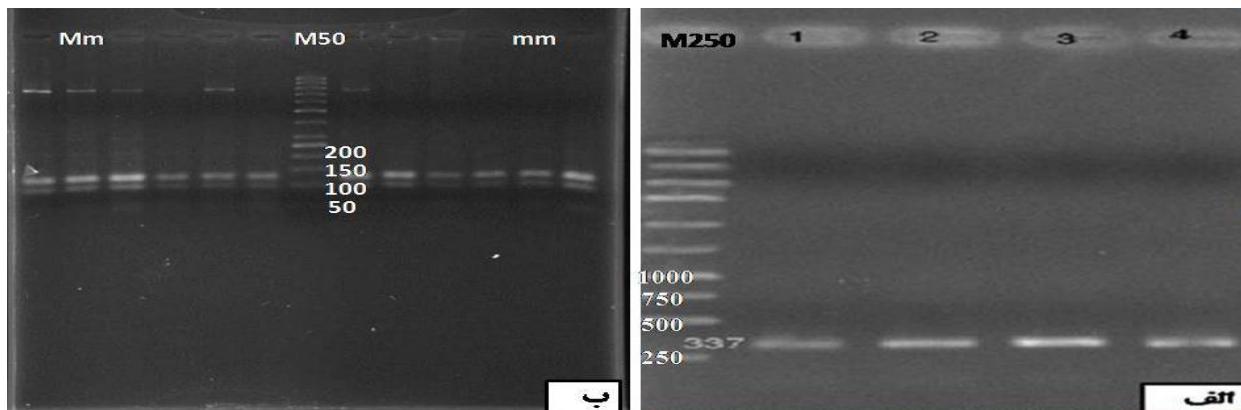
جایگاه ژنی	توالی آغازگر (۳'-۵')	اندازه قطعه (bp)	شماره دستیابی	منبع
اگزون ۳ ژن میواستاتین	F: CCGGAGAGACTTGGGCTTGA R: TCATGAGCACCCACAGCGGTC	۳۳۷	DQ530260	Clop et al. 2006

را نشان داد (Soufy et al. 2009). همچنین، بررسی قطعه ۱۰۰۳ جفت بازی انتهای UTR-3' در سه جمعیت شال، زندی و زل هیچگونه جهشی که منجر به هایپرتروفی در ماهیچه شود، مشاهده نشد (Miar et al. 2011). آزمون مریع کای در مطالعه حاضر نشان داد که جایگاه ژن میواستاتین در جمعیت کردی خارج از تعادل هاردی-وانبرگ است ( $P < 0.05$ ). دلایل احتمالی انحراف از تعادل کوچک بودن اندازه نمونه، عدم تلاقی‌های تصادفی و عدم تبادل ژنتیکی بین زیرجمعیت‌ها می‌باشد. میزان هتروزویگوستی در اگزون سه جایگاه ژن میواستاتین در مطالعه حاضر در گله کردی ۰/۱۵ براورد شد. عدم ارتباط ژنتیکی گله با سایر جمعیت‌های منطقه، آمیزش‌های خویشاوندی می‌تواند سبب کاهش هتروزویگوستی و تثبیت یک آلل در جایگاه میواستاتین شود. سایر معیارهای تنوع در جمعیت شامل شاخص شانون، شاخص نئی، محتوای اطلاعات چندشکلی، تعداد آلل موثر و آماره F به ترتیب برابر ۰/۲۷، ۰/۱۴، ۰/۱۳ و ۰/۸۱ بودند. نتایج مقایسات میانگین اثر الگوهای ژنتیکی مختلف در اگزون سه جایگاه میواستاتین بر صفات مرتبط با رشد، تفاوت معنی‌داری بین الگوهای ژنتیکی Mm و mm در صفات وزن تولد و سه ماهگی نشان نداد ( $P > 0.05$ ), هر چند که دامهای با ژنتیپ Mm وزن تولد کمتری داشتند، اما در ۳ و ۶ ماهگی وزن بالاتری نسبت به ژنتیپ هموزیگوت یافتند، که برای وزن ۶ ماهگی کاملاً معنی‌دار بود ( $P < 0.01$ ). نتایج نشان داد که افراد هتروزویگوت بعد از بلوغ جنسی نسبت به افراد هموزیگوت دارای شایستگی بیشتری برای افزایش وزن هستند. در گوسفند مطالعات کاوش ژنومی (QTL) در قسمتی از کروموزوم دو (OVAR2) که شامل ژن میواستاتین می‌باشد دارای اثر عمده بر رشد و توسعه ماهیچه در نژادهای تکسل بلژیکی<sup>۱</sup> (Johnson et al. 2005)، گوسفند

تکثیر قطعه ۳۳۷ جفت بازی از ناحیه اگزون سه ژن میواستاتین در پژوهش حاضر توسط جفت آغازگر اختصاصی و برنامه دمایی مناسب با موفقیت انجام گرفت (شکل ۱-الف). Timoty (1997) در استفاده از دو جفت آغازگر اختصاصی شامل mg898 et al. در mg1234 منجر به تولید یک قطعه ۳۳۷ جفت بازی از اگزون ۳ مطابق با نتیجه حاصل از تحقیق حاضر می‌باشد. در اثر هضم محصول PCR با آنزیم برشی HaeIII، دو نوع الگوی باندی از دو آلل M و m مشاهده شد (شکل ۱-ب)، که با نتایج (Shariatzadeh 2014) مطابقت داشت.

گوسفندان با الگوی ژنتیکی هتروزویگوت (Mm) دارای قطعات ۸۳ و ۱۲۳ و ۱۳۱ و قطعه برش نخورده ۳۳۷ جفت بازی بودند، که قطعات برش نخورده ۸۳ و ۱۲۳ و ۱۳۱ جفت بازی بیانگر آلل وحشی و سایت برشی آنزیم HaeIII واقع شده است و قطعه برش نخورده ۳۳۷ جفت بازی بیانگر آلل موتانت می‌باشد، که نوکلئوتید G تبدیل به نوکلئوتید A شده لذا از دسترس آنزیم برشی خارج می‌شود. در گوسفندان با ژنتیپ هموزیگوت مغلوب (mm) قطعات ۸۳ و ۱۲۳ جفت بازی مشاهده شد. ژنتیپ هموزیگوت غالب (MM) که فقط شامل قطعه برش نخورده باشد و موجب هایپرتروفی ماهیچه شود در تحقیق حاضر مشاهده نشد. در جمعیت مورد مطالعه فراوانی ژنتیپ‌های Mm و mm در جایگاه ژن میواستاتین به ترتیب ۰/۱۵ و ۰/۸۵ بودند و فراوانی آلل‌های m و M در جایگاه ژن میواستاتین در نژاد کردی Shariatzadeh et al. (2014) به ترتیب ۰/۹۲ و ۰/۰۸ محاسبه شد. در توده جمعیت گوسفند فراهانی در بررسی اگزون ۳ جایگاه ژن میواستاتین هر سه ژنتیپ MM، Mm و mm را گزارش کردند که الگوی ژنتیکی MM فراوانی کمتر از ۵ درصد در جمعیت داشت، اما مرتبط با ماهیچه مضاعف نبود. مطالعه چندشکلی جایگاه ژن میواستاتین در گوسفند سنگابی هر سه الگوی ژنتیکی

<sup>۱</sup> Belgian texel



شکل ۱-۱ الکتروفورز محصولات PCR اگزون سه ژن میوستاتین در نژاد کردی، (الف) بر روی آکارز ۱/۵ درصد از سمت چپ چاهک اول (LadderM250) مارکر غلطی ۲۵۰ جفت باز و سایر چاهک ها مربوط به نمونه های مختلف؛ الکتروفورز محصولات هضم آنزیمی *HaeIII* در اگزون ۳ جایگاه میوستاتین؛ (ب) بر روی آکارز سه درصد از سمت راست چاهک اول (Ladder M50) - مارکر غلطی ۵۰ جفت باز و سایر چاهک ها مربوط به الگوی ژنتیکی حیوانات.

جدول ۲- مقایسه میانگین الگوهای ژنتیکی مختلف مشاهده شده در جایگاه ژن میوستاتین با صفات مرتبط با رشد در جمعیت گوسفند کردی خراسان شمالی

صفات مرتبط با رشد	ژنتیک	Mm	MM
وزن تولد		۴/۱۷±۰/۰۷ <sup>a</sup>	۴/۲۵±۰/۰۱ <sup>a</sup>
وزن سه ماهگی		۲۲/۸۸±۰/۴۲ <sup>a</sup>	۲۲/۷۱±۰/۰۸ <sup>a</sup>
وزن شش ماهگی		۳۴/۰۴±۰/۰۸ <sup>a</sup>	۳۰/۰۶±۰/۱۹ <sup>b</sup>

گروههای با حروف مشابه غیر معنی دار و با حروف غیر مشابه معنی دار می باشند ( $P<0.05$ )

Boman کدکننده با افزایش وزن و ترکیب لشه مرتبط هستند (Boman and Vage 2009 and Vage 2009)، که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد.

### منابع

- Boman IA,Vage DI (2009) An insertion in the coding region of the myostatin (MSTN) gene affects carcass conformation and fatness in the Norwegian Spaelsau (*Ovis aries*). BMC Research Notes 2: 98.  
 Clop A, Marcq F, Takeda H, Pirottin D, Tordoir X, Bibe B, Bouix J, Caiment F, Elsen JM, Eychenne F, Larzul C, Laville E, Meish F, Milenkovic D, Tobin J, Charlier C, Georges M (2006) A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. Nature Genetic 38: 813-818.  
 DeSmet SD, Webb EC, Claeys E, Uytterhaegen L (2000) Effect of dietary energy and protein levels on fatty acid composition of intramuscular fat in double-muscled Belgian Blue bulls. Meat Science 56: 73-90.  
 Hadjipavlou G, Matika O, Clop A, Bishop SC (2008). Two single nucleotide polymorphisms in the myostatin (GDF8) gene have significant association with muscle depth of commercial Charollais sheep. Animal Genetic 39: 346-353.

رامنی<sup>۱</sup> نیوزیلند (2009) (Boman and Vage) و نژاد شاروله<sup>۲</sup> (Hadjipavlou et al. 2008) داشت. در بررسی ایترون یک و دو نژاد بلوجی گزارش شد که الگوهای ژنتیکی مشاهده شده و Soufy et al. (2009). تحقیقات بعدی که با تعیین توالی تمام بخش های کد کننده ژن میوستاتین همراه بوده، نشان داد که اختلافی از نظر توالی نوکلوتیدها با گروه شاهد وجود ندارد (Marcq et al. 2002)، این موضوع نشان داد که چند شکلی موثر بر ایجاد عضله مضاعف ممکن است در بیرون از نواحی کد کننده و در نواحی تنظیم کننده و یا در جایگاه ژئی پیوسته و مجاور با میوستاتین باشد (Johnson et al. 2005; Hadjipavlou et al. 2008). همچنین، در بررسی ژن میوستاتین در دو نژاد گوسفند نروژی صورت گرفت، گزارش شد که دو نوع جهش مختلف در ناحیه

<sup>1</sup> Romny

<sup>2</sup> Charollais

Johnson PL, Dodds KG, Bain WE, Greer GJ, Mc Lean NJ, Mc Laren RJ, Galloway SM, Van Stijn TC, Mc Ewan JC (2009). Investigations into The GDF8 G+ 6723G-A Polymorphism In New Zealand Texel Sheep. *Journal of Animal Science* 87: 1856-1864.

Johnson PL, Mcewant JC, Dodds KG, Purchas RW, 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.

Kijas JM, McCulloch R, Hocking Edwards JE, Oddy VH, Lee SH, Van Der Werf J (2007) Evidence for multiple alleles effecting muscling and fatness at the ovine GDF8 locus. *BMC Genetics* 8: 80.

Marcq F, Larzul C, Marot V, Bouix J, Eychenne F, Laville E, Bibe B, Leroy PL, Georges M, Elsen JM (2002) Preliminary results of a whole-genome scan targeting QTL for carcass traits in a texel romanov intercross. Proceedings of the 7th world congress on applied livestock production. Montpellier pp. 19-23.

Masumi N, Akihiro Y, Shinichirou N, Tsutomu N, Takashi Y, Mitsuo I, Keiji M, Hideyo O, Sumihare N (2002) A missense mutant myostatin causes hyperplasia without hypertrophy in the mouse muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 293: 247-251.

Miar Y, Salehi AR, AleYasin SA, Raoufzadeh S (2011) Study of polymorphism in myostatin gene in Chaal, Zel

and Zandi Iranian sheep Breeds. *Journal of Animal Production* 13: 33-40 (In Farsi).

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

Shariatzadeh SM, Ghazi Khanishad A, Khodaei Motlagh M, Mahdieh M (2014) Evaluation of myostatin gene polymorphism in Farahani sheep by PCR-RFLP method. *Journal of Cell and Tissue* 5: 157-163 (In Farsi).

Soufy B, Mohammad Abadi MR, Shojaeian K, Baghizadeh A, Ferasaty S, Askari N, Dayani O (2009) Evaluation of myostatin gene polymorphism in Sanjabi sheep by PCR-RFLP method. *Animal Science Researches*, Tabriz University 19: 81-89 (In Farsi).

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

Veerkamp RF, Beerda B (2007) Genetics and genomics to improve fertility in high producing dairy cows. *Theriogenology* 68: 266-273.

Yeh FC, Yang RC, Boyle TBJ, Ye ZH, Mao JX (1999) PoPGENE version 3.3, the User-Friendly Shareware for population genetic analysis. *Molecular Biology and Biotechnology Centre*, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada. (<http://www.ualberta.ca/~fye/fyeh>).