

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^۱، غلامرضا داشاب^{۱*}، مسعود علی پناه^۱، محمد رکوعی^۱، داود علی ساقی^۲

۱- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد، استادیار، دانشیار، استادیار، دانشگاه زابل

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

Akbari S¹, Dashab GR^{*1}, Alipanah M¹, Rokouei M¹, Saghi DA²

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 ناظم بازدارنده در رشد و توسعه ماهیچه اسکلتی عمل می کند. جهش در ناحیه کد کننده میواستاتین باعث تغییر نقش مهارتی آن و افزایش عضله می شود. در پژوهش اخیر خونگیری 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 زنجیره ای پلیمرز (PCR) تکثیر شد. به منظور ردیابی شکل های متفاوت آللی در جایگاه میواستاتین از آنزیم محدود کننده *HaeIII* 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 ۰/۱۵ و ۰/۸۵ مشاهده شد. فراوانی آللی در جایگاه مزبور برای آلل های M و m به ترتیب ۰/۰۸ و ۰/۹۲ برآورد شد. تجزیه مدل های خطی با اثرات ثابت ژنوتیپ نشان داد که میانگین وزن بره ها در ۳ و ۶ ماهگی ژنوتیپ هتروزیگوت بالاتر از ژنوتیپ هموزیگوت می باشد.

واژه های کلیدی

چندشکلی
ژن میواستاتین
گوسفند کردی خراسان شمالی
DNA

با افزایش روزافزون 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 برنامه‌های اصلاح نژاد برای افزایش توان ژنتیکی دام است. در دهه گذشته استفاده از اطلاعات ژنومیک به عنوان یک ابزار در برنامه‌های اصلاح نژاد استفاده شد (Veerkamp and Beerda 2007) که عمده تلاش‌ها در جهت شناسایی ژن‌های عمده تاثیرگذار بر صفات مهم اقتصادی و بررسی میزان تنوع در جایگاه‌های فوق بوده تا امکان توجیه تنوع ژنتیکی و فنوتیپی بین افراد فراهم شود. مطالعات برای یافتن ژن‌های به وجود آورنده عضله مضاعف در گاوهای 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 ($GDF-8^1$) نامیده می‌شود، عضوی از خانواده بزرگ تغییردهنده رشد پستانداران $TGF-\beta$ می‌باشد و در توسعه ماهیچه اسکلتی بزرگسالان نقش دارد (Masumi et al. 2002). در گوسفند ژن میواستاتین بر روی کروموزوم دو واقع شده که دارای سه اگزون، دو اینترون و ناحیه پایین دست ژن می‌باشد، 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 ماهیچه‌های اسکلتی بوده و جهش در ناحیه کدکننده آن باعث تغییر نقش مهاری آن و افزایش عضله می‌شود (Johnson et al. 2009). حیواناتی که خصوصیت ماهیچه مضاعف دارند، میزان چربی کمتر داشته و گوشت آن‌ها برای سلامتی مفیدتر است (DeSmet et al. 2000). گوسفند کردی خراسان شمالی یکی از نژادهای گوسفند دنیهدار ایران است، که هدف اصلی پرورش آن افزایش بازده تولید گوشت است. هدف از انجام تحقیق حاضر تعیین چندشکلی موجود در جایگاه اگزون سه ژن میواستاتین و بررسی ارتباط الگوهای ژنوتیپی آن‌ها با صفات مرتبط با رشد در این نژاد می‌باشد. جهت انجام تحقیق حاضر، تعداد ۵۸ راس گوسفندان کردی خراسان شمالی ایستگاه اصلاح نژاد گوسفند کردی شهرستان

شیروان، به طور تصادفی انتخاب و خونگیری از سیاهرگ گردنی انجام شد. استخراج DNA از نمونه‌های خون تازه به روش نمکی بهینه یافته (Miller et al. 1998) انجام گرفت. تکثیر قطعه ۳۳۷ جفت بازی ناحیه اگزون سه ژن میواستاتین توسط آغازگر اختصاصی و با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) انجام شد (جدول ۱). دمای بهینه جهت واکنش تکثیر در دستگاه ترموسایکلر شامل واسرشته‌سازی اولیه در دمای 95°C به مدت ۱۰ دقیقه، در ادامه 40°C چرخه با واسرشته‌سازی ثانویه در دمای 95°C به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال در دمای 58°C به مدت ۴۰ ثانیه و بسط اولیه در دمای 72°C به مدت ۱۰ دقیقه بود. جهت حصول اطمینان از تکثیر اختصاصی قطعه مورد نظر محصول PCR روی ژل آگارز $1/5$ 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 ($10\times$)، $0/5$ میکرولیتر آنزیم برشی $HaeIII$ (دو واحد) و $11/5$ میکرولیتر آب دیونیزه به مدت ۱۶ ساعت در دمای 37°C درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس، محصولات هضم آنزیمی بر روی ژل آگارز سه درصد الکتروفورز و با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شدند. الگوهای ژنوتیپی با توجه به طول و تعداد قطعات حاصل از هضم تعیین و فراسنجه‌های ژنتیکی و جمعیتی جایگاه ژن میواستاتین با نرم‌افزار POPGENE3.2 (Yeh et al. 1999) برآورد شد. جهت بررسی ارتباط الگوهای ژنوتیپی جایگاه ژن میواستاتین با صفات مرتبط با رشد شامل وزن تولد، سه ماهگی و ۶ ماهگی از مدل‌های ثابت خطی با رویه GLM نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۱) استفاده شد، که مدل آماری عبارتست از:

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

در رابطه بالا، Y_{ijkl} مقدار فنوتیپی هر یک از صفات مورد بررسی (وزن تولد، وزن سه ماهگی و وزن شش ماهگی)، μ میانگین کل، S_i اثرات ثابت جنس، BT_j اثرات ثابت تیپ تولد، G_k اثر ثابت ژنوتیپ حیوان، $BT_j S_i$ اثر متقابل تیپ تولد با جنس حیوان و e_{ijkl} خطای باقی مانده می‌باشد. مقایسه میانگین گروه‌های ژنوتیپی با روش توکی کرامر انجام شد.

¹ Growth differentiation factor -8

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

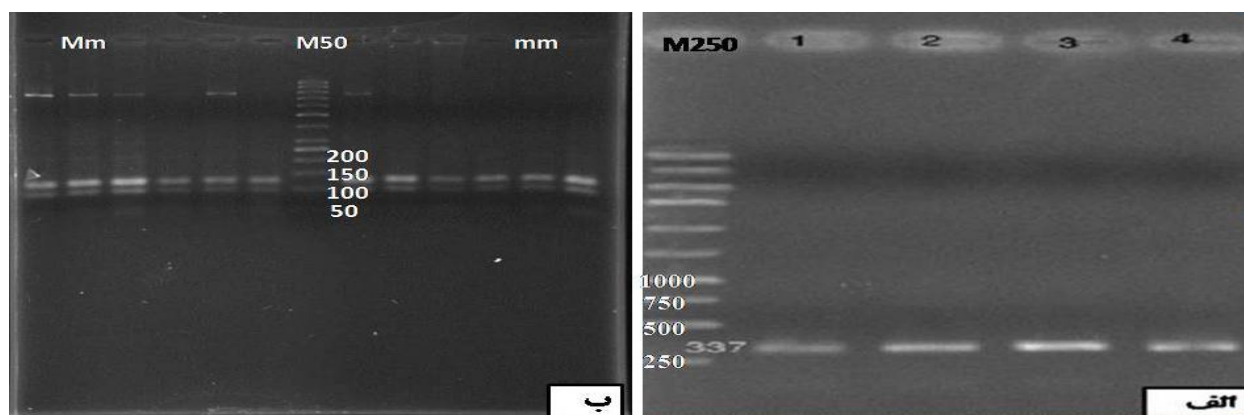
جایگاه ژنی	توالی آغازگر (3' - 5')	اندازه قطعه (bp)	شماره دستیابی	منبع
اگزون ۳ ژن میواستاتین	F: CCGGAGAGACTTTGGGCTTGA R: TCATGAGCACCCACAGCGGTC	۳۳۷	DQ530260	Clop et al. 2006

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) et al. در استفاده از دو جفت آغازگر اختصاصی شامل mg898 و mg1234 منجر به تولید یک قطعه ۳۳۷ جفت باز از اگزون ۳ جایگاه ژن میواستاتین در انسان، گوسفند، خوک و گاو شد که مطابق با نتیجه حاصل از تحقیق حاضر می‌باشد. در اثر هضم محصول PCR با آنزیم برشی *HaeIII*، دو نوع الگوی باندی از دو آل M و m مشاهده شد (شکل ۱-ب)، که با نتایج et al. (2014) Shariatzadeh مطابقت داشت.

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

را نشان داد (Soufy et al. 2009). همچنین، بررسی قطعه ۱۰۰۳ جفت بازی انتهای 3' - UTR در سه جمعیت شال، زندی و زل هیچگونه جهشی که منجر به هایپرتروفی در ماهیچه شود، مشاهده نشد (Miar et al. 2011). آزمون مربع کای در مطالعه حاضر نشان داد که جایگاه ژن میواستاتین در جمعیت کردی خارج از تعادل هاردی-واینبرگ است ($P < 0.05$). دلایل احتمالی انحراف از تعادل کوچک بودن اندازه نمونه، عدم تلاقی‌های تصادفی و عدم تبادل ژنتیکی بین زیرجمعیت‌ها می‌باشند. میزان هتروزیگوسیتی در اگزون سه جایگاه ژن میواستاتین در مطالعه حاضر در گله کردی ۰/۱۵ برآورد شد. عدم ارتباط ژنتیکی گله با سایر جمعیت‌های منطقه، آمیزش‌های خویشاوندی می‌تواند سبب کاهش هتروزیگوسیتی و تثبیت یک آل در جایگاه میواستاتین شود. سایر معیارهای تنوع در جمعیت شامل شاخص شانون، شاخص نئی، محتوای اطلاعات چندشکلی، تعداد آل موثر و آماره F به ترتیب برابر ۰/۲۷، ۰/۱۴، ۰/۱۳، ۰/۶۷ و ۰/۸۱ بودند. نتایج مقایسات میانگین اثر الگوهای ژنوتیپی مختلف در اگزون سه جایگاه میواستاتین بر صفات مرتبط با رشد، تفاوت معنی‌داری بین الگوهای ژنوتیپی Mm و mm در صفات وزن تولد و سه ماهگی نشان نداد ($P > 0.05$)، هر چند که دام‌های با ژنوتیپ Mm وزن تولد کمتری داشتند، اما در ۳ و ۶ ماهگی وزن بالاتری نسبت به ژنوتیپ هموزیگوت یافتند، که برای وزن ۶ ماهگی کاملاً معنی‌دار بود ($P < 0.01$). نتایج نشان داد که افراد هتروزیگوت 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^۱ (Johnson et al. 2005)، گوسفند

^۱ Belgian texel



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

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

ژنوتیپ		صفات مرتبط با رشد
Mm	MM	
۴/۱۷±۰/۰۷ ^a	۴/۲۵±۰/۰۱ ^a	وزن تولد
۲۴/۸۸±۰/۴۲ ^a	۲۲/۷۱±۰/۰۸ ^a	وزن سه ماهگی
۳۴/۰۴±۰/۵۸ ^a	۳۰/۰۶±۰/۱۹ ^b	وزن شش ماهگی

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

کدکننده با افزایش وزن و ترکیب لاشه مرتبط هستند (Boman 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, Eychehen 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-muscle 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^۱ نیوزیلند (Boman and Vage 2009) و نژاد شاروله^۲ (Hadjipavlou et al. 2008) داشت. در بررسی اینترون یک و دو نژاد بلوچی گزارش شد که الگوهای ژنوتیپی مشاهده شده و نواحی چند شکل با وزن تولد مرتبط هستند (Soufy et al. 2009). تحقیقات بعدی که با تعیین توالی تمام بخش های کد کننده ژن میواستاتین همراه بوده، نشان داد که اختلافی از نظر توالی نوکلئوتیدها 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 ژنی پیوسته و مجاور با میواستاتین باشد (Johnson et al. 2005; Hadjipavlou et al. 2008). همچنین، در بررسی ژن میواستاتین در دو نژاد گوسفند نروژی صورت گرفت، گزارش شد که دو نوع جهش مختلف در ناحیه

^۱ Romny

^۲ 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, Mahdih 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/~fyeh/fyeh>).