مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC

مطالعه ساختار ژنتیکی جایگاه ژن کالپاستاتین به روش PCR-SSCP و ارتباط آن با صفات رشد در گوسفند نژاد لری‌بختیاری

محسن عالی*[1]، محمد مرادی شهربابک[2]، حسین مرادی شهربابک[3]، مصطفی صادقی[3]

[1] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران
[2] استاد، گروه علوم دامی، دانشکده علوم زراعی و دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران
[3] استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده علوم زراعی و دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: 1391/07/03، تاریخ پذیرش: 1391/12/20

چکیده

در این مطالعه، یک قطعه 254 جفت بازی شامل بخشی از اینترون‌های 5 و 6 و تمام اگزون 6 ژن کالپاستاتین در تعداد 169 رأس گوسفندِ شجره‌دار لری‌بختیاری مربوط به ایستگاه اصلاح نژاد گوسفند لری-بختیاری (شولی) توسط واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر شد. جهت تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها، از روش PCR-SSCP و الکتروفورز عمودی نمونه‌ها روی ژل اکریل‌آمید 12% در دمای 4 درجه سانتیگراد و رنگ-آمیزی ژل به روش نیترات‌نقره استفاده شد. تعداد 10 الگوی ژنوتیپی شامل AA، BB، AB، AC، AD، BE، AF، AG، AH و AJ به‌ترتیب با فراوانی 0/029، 0/195، 0/065، 0/166، 0/024، 0/089، 0/325، 0/053، 0/012 و 0/042 مشاهده شد. اثر جایگاه ژن کالپاستاتین بر وزن تولد، وزن از شیرگیری و افزایش وزن روزانه از تولد تا از شیرگیری معنی‌دار بود ($P<0/05$). برای وزن تولد ژنوتیپ‌های AB و AC و برای وزن از شیرگیری و افزایش وزن روزانه ژنوتیپ‌های AJ و AB، ژنوتیپ‌های مطلوب بودند. به‌نظر می‌رسد در صورت تعیین توالی این ناحیه ژنی و شناسایی SNPهای احتمالی در پژوهش‌های بعدی و نیز انجام مطالعات ارتباطی روی تعداد بیشتری حیوان، می‌توان آلل‌ها و ژنوتیپ‌های مطلوب این ناحیه ژنی را برای صفات رشد با دقت بسیار زیادی تعیین و در انتخاب به کمک نشانگر استفاده نمود.

کلمات کلیدی: *چندشکلی-ژن کالپاستاتین-گوسفند لری‌بختیاری-صفات رشد - PCR-SSCP.*

* نویسنده مسئول: محسن عالی تلفن: 09374252708 Email: Mohsen.ali@ut.ac.ir

مقدمه

اکثر صفات اقتصادی از جمله صفات رشد تحت کنترل تعداد زیادی ژن قرار دارند. از طرف دیگر محیط نیز در بروز فنوتیپی این صفات نقش مهمی ایفا می‌کند. از این‌رو به هنگام انتخاب بر اساس رکوردهای فنوتیپی، این اثرات محیطی مانع شناسایی و انتخاب بهترین ژنوتیپ در مجموع ژن‌های مؤثر شده که نتیجه آن کاهش صحت انتخاب و در نهایت کاهش پیشرفت ژنتیکی است (Falconer & Mackay, 1996). بنابراین تعیین چندشکلیِ ژن‌های کاندیدای مؤثر بر صفات تولیدی و شناسایی آلل‌ها و ژنوتیپ‌های مطلوب برای صفات مورد نظر می‌تواند زمینه را برای انتخاب به کمک نشانگر (MAS[1]) فراهم کند (Mara Carrijo *et al.*, 2008). نتیجه این نوع انتخاب افزایش پیشرفت ژنتیکی به دلیل افزایش صحت انتخاب و نیز کاهش قابل توجه فاصله نسل به دلیل فراهم شدن امکان انتخاب در مراحل اولیه زندگی (دوران جنینی) است. علاوه بر این با انتخاب ژنومیک امکان تعیین ژنوتیپ در هر زمان از زندگی فراهم می‌شود و لذا نیاز به نگهداری حیوان تا سن رکوردگیری خودش یا دخترانش نخواهد بود که این خود باعث کاهش هزینه‌های اصلاح نژادی خواهد شد. کالپاستاتین (CAST) به عنوان یک ژن کاندیدا مورد توجّه است و بر صفات تولیدیِ مختلفی از جمله صفات رشد، لاشه و تردی گوشت در دام‌های مختلف تأثیرگذار است (Byun *et al.*, 2008; Goll *et al.*, 2003; Koohmaraie, 1992). کالپاستاتین پروتئین مهارکننده کالپاین‌ها (پروتئازهای وابسته به کلسیم) درون سلول ماهیچه است که با مهار کالپاین‌ها و جلوگیری از تجزیه میوفیبریل‌های ماهیچه نقش مهمّی در افزایش سرعت رشد در دوران حیات و کاهش تردی گوشت پس از کشتار ایفا می‌کند (Bickerstaffe *et al.*, 2006). گوشت گوسفند در ایران به عنوان یک منبع تأمین پروتئین رایج بوده و در مقایسه با گوشت گاو و بز مصرف آن بیشتر است. گوسفند لری‌بختیاری، نژادی درشت‌جثه و دارای قدرت پرواری مناسب است ولی از معایب اصلی آن داشتن دنبه‌ای بسیار بزرگ می‌باشد (Khaldari, 2008). در حال حاضر این نژاد به دلیل فنوتیپ منحصر به فرد، مورد توجه محققین اصلاح نژاد دام کشور می‌باشد. چندشکلی ژن کالپاستاتین در گوسفند اولین بار توسط Robert *et al.* (1996) در یک قطعه 622 جفت‌بازی شامل بخشی از اگزون و اینترون 1 به روش PCR-SSCP در نژادهای دورست‌داون و کوپ‌ورس مورد بررسی قرار گرفت. آن‌ها سه آلل A، B و C را به‌ترتیب با فراوانیِ 0/69، 0/18 و 0/13 در نژاد دورست‌دون و 0/46، 0/27 و 0/27 در نژاد کوپ‌ورس مشاهده کردند. بررسی چندشکلی قطعه مذکور این‌بار به روش PCR-RFLP در گوسفند نژاد دورست‌دون منجر به شناسایی دو آلل M (که توسّط آنزیم هضم نشده)

[1] Marker Assisted Selection

و N (که توسّط آنزیم هضم شده) به‌ترتیب با فراوانی 0/77 و 0/23 گردید (Palmer *et al.*, 1998). در ایران نیز تنوع ژنتیکی این جایگاه به روش PCR-RFLP در نژادهای قره‌گل (Eftekhari Shahroudi *et al.*, 2007)، کردی (Nassiry *et al.*, 2006)، قزل، آرخارمرینو و آمیخته‌های قزل × آرخارمرینو (Elyasi-Zaringhabaee *et al.*, 2005)، عرب (Mohamadi *et al.*, 2008) و لری‌بختیاری، زل و ماکوئی (Moradi Shahrbabak, 2009) مورد بررسی قرار گرفته است. طی مطالعه‌ای که ارتباط چندشکلی جایگاه اگزون و اینترون 1 ژن کالپاستاتین به روش PCR-SSCP با افزایش وزن روزانه از تولد تا از شیرگیری در گوسفند نژاد بلوچی مورد بررسی قرار گرفت، سه ژنوتیپ AA، AB و AC به‌ترتیب با فراوانی 0/7، 0/08 و 0/22 مشاهده گردید. در این تحقیق ژنوتیپ AB دارای افزایش وزن روزانه از تولد تا از شیرگیریِ بیشتر نسبت به ژنوتیپ‌های AA و AC ($P<0/05$) بود (Tahmoorespour *et al.*, 2005). بررسی چندشکلی یک قطعه 254 جفت‌بازی در برگیرنده تمام اگزون 6 و بخشی از اینترون‌های 5 و 6 ژن کالپاستاتین به روش PCR-SSCP روی نژادهای بی‌دنبه مرینوس، رامنی، کوریدال، پول دورست و آمیخته‌های NZ منجر به شناسایی 9 الگوی SSCP متفاوت حاصل از پنج آلل مختلف گردید که الگوهای 1، 2 و 3 و آلل‌های 1 و 2 دارای بیشترین فراوانی بودند (Zhou *et al.*, 2007). مطالعه ارتباط چندشکلی جایگاه اگزون 6 و اگزون و اینترون 1 (هر دو به روش SSCP) با تردی گوشت و صفات لاشه در 150 رأس گوسفند بومی نیوزلند منجر به مشاهده آلل‌های a، b، c و d در اگزون 6 و آلل‌های A، B، C و D در اگزون و اینترون 1 گردید. یک ارتباط معنی‌دار بین آلل a در اگزون 6 و آلل‌های A و B در اگزون و اینترون 1 با وزن گوشت راسته ($P<0/05$) مشاهده شد (Bickerstaffe *et al.*, 2006). هدف از مطالعه حاضر بررسی چندشکلی در جایگاه 254 جفت‌بازی شامل بخشی از اینترون‌های 5 و 6 و تمام اگزون 6 ژن کالپاستاتین و نیز بررسی ارتباط این جایگاه با صفات رشد و شناسایی ژنوتیپ‌های مرتبط با صفات مورد مطالعه در گوسفند لری‌بختیاری بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

در این مطالعه از تعداد 169رأس گوسفند خالص و شجره‌دار لری‌بختیاری شامل 63 رأس بره نر و 106 رأس بره ماده از ایستگاه اصلاح نژاد گوسفند لری‌بختیاری (شولی) واقع در شهرستان شهرکرد با استفاده از ونوجکت‌های حاوی EDTA از سیاهرگ وداج خون‌گیری به عمل آمد. ضمناً اطلاعات مربوط به صفات وزن تولّد و وزن از شیرگیریِ برّه‌های خون‌گیری شده از این ایستگاه نیز جهت بررسی ارتباط آماری بین ژنوتیپ ژن کالپاستاتین با فنوتیپ و ارزش اصلاحی (BV[1]) صفات رشدِ بره‌های لری-

[1] Breeding Value

بختیاری مورد استفاده قرار گرفت. صفات افزایش وزن روزانه از تولد تا از شیرگیری و نسبت کلیبر[1] نیز به‌ترتیب طبق دو فرمول: "سن هنگام از شیرگیری/(وزن تولد - وزن از شیرگیری)" و "وزن متابولیکی پایان دوره/اضافه وزن روزانه" محاسبه شده و جهت ارتباط با ژن کالپاستاتین مورد استفاده قرار گرفتند. وزن متابولیکی پایان دوره (هنگام از شیرگیری) برابر با $^{0/75}$(وزن پایان دوره) است.

استخراج DNA از 250 میکرولیتر خون کامل به روش بهینه‌یافته نمکی انجام گرفت (Miller *et al.*, 1998). کمیت و کیفیت DNA استخراج‌شده با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز 1% و نیز روش اسپکتروفتومتری با دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت تکثیر قطعه 254 جفت‌بازی شامل تمام اگزون 6 و بخشی از اینترون‌های 5 و 6 ژن کالپاستاتین انجام گرفت. آغازگرهای اختصاصی رفت 5'-GTTATGAATTGCTTTCTACTC-3' و برگشت 5'-ATACGATTGAGAGACTTCAC-3' جهت تکثیر قطعه مورد نظر در ژن کالپاستاتین (Zhou et al., 2007) مورد استفاده قرار گرفتند. برنامه دمایی و زمانی ذکر شده در جدول 1 ایده‌آل‌ترین شرایط برای تکثیر قطعه ژن کالپاستاتین بود. واکنش PCR در حجم نهایی 20 میکرولیتر شامل 50 نانوگرم DNA ژنومی، بافر 1X، 0/5 میکرومولار از هر پرایمر، 0/2 میلی‌مولار از هر dNTP، 2/5 میلی‌مولار $MgCl_2$، یک واحد آنزیم تک‌پلیمراز و آب دیونیزه انجام شد.

تعیین ژنوتیپ محصولات PCR به روش چندشکلی ساختاری رشته‌های منفرد (SSCP)

تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها به روش PCR-SSCP با استفاده از الکتروفورز عمودی روی ژل اکریل‌آمید و رنگ‌آمیزی با نیترات نقره انجام گرفت. بدین منظور 15 میکرولیتر بافر بارگذاری مخصوص SSCP (شامل 99% فرمامید، 0/9% EDTA 6 مولار، 0/05% برموفنل و 0/05% زینول‌سیانید) با 5 میکرولیتر محصول PCR مخلوط و ورتکس شد و سپس در دستگاه ترموسایکلر به مدت 10 دقیقه در دمای 96 درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد تا رشته‌های DNA واسرشت شوند. نمونه‌های واسرشت‌شده به مدت 10 دقیقه روی یخ قرار گرفتند تا از اتصال مجدد رشته‌های مکمل جلوگیری شود. پس از آن مخلوط محصول PCR و بافر بارگذاریِ مخصوص SSCP درون چاهک‌های ژل اکریل-آمید 12% بارگذاری شدند. سپس الکتروفورز نمونه‌ها به مدت 20 ساعت و با اختلاف پتانسیل 300 ولت در دمای 4 درجه سانتیگراد و با بافر TBE (0/5X) انجام گرفت. در ادامه رنگ‌آمیزی ژل جهت مشاهده الگوهای باندی به روش نیترات‌نقره انجام گرفت (Bassam *et al.*, 1991).

[1] Kleiber Ratio

جدول 1- برنامه‌ی دمایی-زمانی مورد استفاده برای تکثیر جایگاه ژن کالپاستاتین.

Table 1- Temperature-time program used for amplification of CAST gene locus.

تعداد چرخه No. cycle	دما (سانتی‌گراد) Temperature (C°)	زمان Time	نوع عمل Function
1	94	5 min	واسرشت‌سازی اولیه Primary Denaturation
35	94	30 s	واسرشت‌سازی Denaturation
35	57	30 s	اتصال آغازگر Annealing
35	72	30 s	بسط Extention
1	72	5 min	بسط نهایی Finally Extention

آنالیز آماری

شاخص‌های ژنتیک جمعیت شامل فراوانی‌های هاپلوتایپی و ژنوتیپی، هتروزیگوسیتی و تعادل هاردی‌واینبرگ با استفاده از نرم‌افزار GenAlex 6.41 محاسبه شد. هتروزیگوسیتی مورد انتظار با استفاده از فرمول $1-\sum P_i^2$ محاسبه شد که P_i فراوانی هاپلوتایپ i در جمعیت مورد نظر است. نرمال بودن توزیع باقیمانده‌های مربوط به هر صفت در جمعیت مورد بررسی با استفاده از برنامه SAS 9.1 با رویه Univariate و آماره شاپیرو-ویلک[1] بررسی شد. ارتباط جایگاه ژن کالپاستاتین هم با فنوتیپ و هم با ارزش اصلاحیِ صفات رشد با استفاده از مدل‌های 1، 2 و 3 در برنامه SAS 9.1 و با رویه GLM و MIXED مورد بررسی قرار گرفت. رویه GLM برای تجزیه داده‌ها به هنگام ارتباط جایگاه ژن کالپاستاتین با ارزش اصلاحی صفات رشد و رویه MIXED برای تجزیه داده‌ها به هنگام ارتباط جایگاه ژن کالپاستاتین با فنوتیپ که در آن اثر حیوان به عنوان اثری تصادفی در معادله مدل قرار گرفت، استفاده شد. ارزش‌های اصلاحیِ برآوردشده از نتایج مطالعه Aali (2012) اخذ و مورد استفاده قرار گرفت.

ارتباط جایگاه ژن کالپاستاتین با فنوتیپ صفات رشد

اثر جایگاه ژن کالپاستاتین، جنس، وضعیت تولد (چندقلو بودن)، ماه تولد و سن مادر هنگام تولد به عنوان عوامل ثابت قابل دسته‌بندی و هم-

[1] Shapiro-Wilk

خونی به عنوان متغیر همبسته در معادله مدل بکار رفت. همچنین برای وزن از شیرگیری، سن دام (بر پایه‌ی روز) در هنگام از شیرگیری و وزن تولد به عنوان متغیرهای همبسته استفاده شدند. اثر حیوان نیز به عنوان عامل تصادفی وارد معادله مدل شد. در نهایت مدل‌های 1 و 2 جهت ارتباط چندشکلی ژن کالپاستاتین با صفات رشد به صورت زیر بود:

مدل (1): مربوط به وزن تولد، اضافه وزن روزانه و نسبت کلیبر:

$$y1_{ijklmn} = \mu + M_i + S_j + T_k + GC_l + Ad_m + b_1(I_{ijklmn} - \bar{I}) + Animal_n + e_{ijklmn}$$

مدل (2): مربوط به وزن از شیرگیری:

$$y2_{ijklmn} = \mu + M_i + S_j + T_k + GC_l + Ad_m + b_1(I_{ijklmn} - \bar{I}) + b_2(Aw_{ijklmn} - \bar{A}_{W1}) + b_3(Wb_{ijklmn} - \bar{w}_b) + Animal_n + e_{ijklmn}$$

$y1_{ijklmn}$: هر یک از مشاهدات مربوط به صفات وزن تولد، اضافه وزن روزانه و نسبت کلیبر، $y2_{ijklmn}$: هر یک از مشاهدات مربوط به صفت وزن از شیرگیری، μ: میانگین صفت در جمعیت، M_i: اثر i اُمین ماه تولد حیوان (12 و i= 11)، S_j: اثر j اُمین جنس حیوان (2 و j= 1)، T_k: اثر k اُمین تیپ تولد حیوان (3 و 2 و k= 1)، GC_l: اثر l اُمین الگوی ژنوتیپی قطعه تکثیر شده از ژن کالپاستاتین (...2 و l= 1)، Ad_m: اثر m اُمین سن مادر هنگام تولد بر اساس ماه (107 و 95 و 84 و 72 و 59 و 48 و 36 و 24 و m= 17)، b_1: ضریب تابعیّت Y روی I (ضریب هم‌خونی)، I_{ijklmn}: ضریب هم‌خونی n اُمین حیوان، $\bar{I}$: میانگین ضریب هم‌خونی حیوانات، b_2: ضریب تابعیّت Y روی A_W (سن حیوان هنگام از شیرگیری)، $A_{Wijklmn}$: سن از شیرگیری n اُمین حیوان، $\bar{A}_{W1}$: میانگین سن حیوانات هنگام از شیرگیری، b_3: ضریب تابعیّت Y روی Wb (وزن تولد حیوان)، Wb_{ijklmn}: وزن تولد n اُمین حیوان، $\bar{w}_b$: میانگین وزن تولد حیوانات، $Animal_n$: اثر تصادفی n اُمین حیوان، e_{ijklmn}: اثر تصادفی باقیمانده.

ارتباط جایگاه ژن کالپاستاتین با ارزش اصلاحی صفات رشد

در ارتباط جایگاه مورد مطالعه با ارزش اصلاحی صفات رشد فقط اثر جایگاه ژن کالپاستاتین به عنوان تنها عامل مؤثر بر ارزش اصلاحی صفات وارد مدل شد. مدل 3 جهت ارتباط ژن کالپاستاتین با ارزش اصلاحی صفات مورد استفاده قرار گرفت.

مدل (3):

$$BV_i = \mu + GC_i + e_i$$

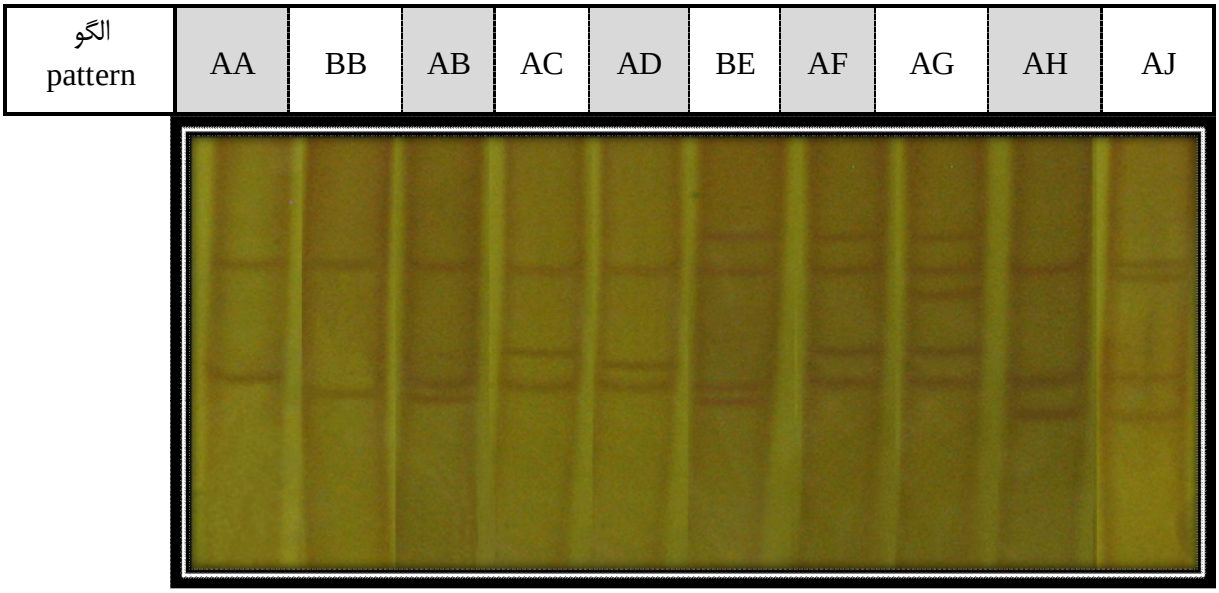
BV_i: ارزش اصلاحی هر حیوان، GC_i: اثر i اُمین الگوی ژنوتیپیِ قطعه تکثیر شده، e_i: اثر تصادفی باقیمانده.

پس از آنالیز واریانس ابتدا معنی‌داری یا عدم معنی‌داریِ اثر مدل بر هر صفت مشخص شد، سپس معنی‌داریِ اثر ژن کالپاستاتین بر آن صفت مورد توجه قرار گرفت. درصورت معنی‌دار بودن اثر ژن کالپاستاتین بر صفت مربوطه، آزمون مقایسه میانگین حداقل مربعات (Lsmeans) جهت مقایسه بین الگوهای ژنوتیپیِ قطعه تکثیر شده از ژن کالپاستاتین انجام گرفت.

نتایج و بحث

SSCP ناحیه تکثیر شده ژن کالپاستاتین

نتایج حاصل از الکتروفورز عمودی محصولات PCR روی ژل اکریل‌آمید نشان داد که جایگاه ژن کالپاستاتین در گوسفندان لری‌بختیاری دارای چندشکلی بالایی است بطوری که در تعداد 169 رأس بره مورد بررسی 10 الگوی باندیِ متفاوت حاصل از 9 هاپلوتایپ مختلف شناسایی شد (شکل 1).



شکل 1- الگوهای SSCP ژن CAST و هاپلوتایپ‌های تشکیل‌دهنده آن‌ها.

Figure 2- SSCP patterns of CAST gene and their constitutive haplotypes.

تعداد زیاد الگوهای باندیِ این جایگاه ژن کالپاستاتین در گوسفندان دنبه‌دار بومی ایران (لری‌بختیاری) در مطالعه حاضر با نتیجه Zhou *et al.* (2007) که 9 الگوی باندیِ متفاوت حاصل از پنج هاپلوتایپ مختلف را در این جایگاه در گوسفندان بی‌دنبه‌ی پنج نژاد مرینوس، رامنی، کوریدال، پول دورست و آمیخته‌های NZ گزارش نمودند، مطابقت دارد. هاپلوتایپ‌های A و B و ژنوتیپ‌های AA، BB و AB در مطالعه Zhou *et al* (2007) روی گوسفندان بی‌دنبه بومی نیوزلند نیز مشاهده شدند درحالی که سایر هاپلوتایپ‌ها و ژنوتیپ‌ها برای اولین بار در مطالعه حاضر در گوسفندان دنبه‌دار بومی ایران (گوسفند لری-بختیاری) شناسایی شدند. نکته جالب توجه در این تحقیق هتروزایگوت بودن اکثر هاپلوتایپ‌ها در جمعیت مورد مطالعه بوده بطوری که هشت ژنوتیپ از 10 ژنوتیپ شناسایی‌شده هتروزایگوت بودند و در بین 9 هاپلوتایپ شناسایی‌شده فقط ژنوتیپ هموزایگوتِ دو هاپلوتایپ A و B مشاهده شد و مهم‌تر آن‌که هفت هاپلوتایپ، هتروزایگوت با هاپلوتایپ A بودند. در مطالعه Zhou *et al.* (2007) ژنوتیپ هموزایگوتِ هر

پنج هاپلوتایپِ شناسایی‌شده در جمعیت گوسفندان بی‌دنبه نیوزلندی مشاهده شد.

فراوانی‌های هاپلوتایپی و ژنوتیپی

فراوانی‌های هاپلوتایپی و ژنوتیپیِ جایگاه ژن کالپاستاتین در جمعیت گوسفندان لری-بختیاری در جدول 2 ارائه شد. همان‌طور که در جدول 2 مشخص است هاپلوتایپ‌های A، B و F به‌ترتیب با فراوانی 0/373، 0/272 و 0/163 دارای بیشترین فراوانی و هاپلوتایپ‌های H و D به‌ترتیب با فراوانی 0/006 و 0/012 دارای کمترین فراوانی بودند. اگرچه فراوانی ژنوتیپ هموزایگوت هاپلوتایپ A کم بود ولی این هاپلوتایپ به دلیل این‌که در همه ژنوتیپ‌های هتروزایگوت به‌جز یک ژنوتیپ ظهور پیدا کرده بیشترین فراوانی را در جمعیت گوسفندان لری-بختیاری به خود اختصاص داده است. فراوانی بالای دو هاپلوتایپ A و B در مطالعه حاضر در گوسفندان دنبه‌دار بومی ایران (گوسفند لری-بختیاری) با نتیجه مطالعه Zhou *et al.* (2007) روی گوسفندان بی‌دنبه بومی نیوزلند مطابقت دارد بطوری که در آن مطالعه هاپلوتایپ‌های A و B به‌ترتیب با فراوانی 0/35 و 0/47 دارای بیشترین فراوانی بودند. البته در جمعیت گوسفندان لری-بختیاری هاپلوتایپ A با فراوانی بیشتری نسبت به هاپلوتایپ B ظاهر شد درحالی که در جمعیت گوسفندان مرینوس، رامنی، کوریدال، پول دورست و آمیخته‌های NZ برعکس بود. نکته جالب توجه فراوانی بالای هاپلوتایپ F به عنوان هاپلوتایپی جدید است که برای اولین بار در مطالعه حاضر در جمعیت گوسفندان دنبه‌دار لری-بختیاری شناسایی شد (جدول 2). همان‌طور که در جدول 2 مشاهده می‌شود ژنوتیپ‌های AF، BB و AC به‌ترتیب با فراوانی 0/325، 0/195 و 0/166 دارای بیشترین فراوانی و ژنوتیپ‌های AH، AD و AA به‌ترتیب با فراوانی 0/012، 0/024 و 0/029 دارای کمترین فراوانی بودند. نتایج مطالعه حاضر با نتیجه مطالعه Zhou *et al.* (2007) که بیشترین فراوانی مربوط به ژنوتیپ-های BB و AA بود مغایرت دارد، در مطالعه حاضر ژنوتیپ AA جزء ژنوتیپ‌های دارای فراوانی کم به حساب می‌آید و بیشترین فراوانی مربوط به ژنوتیپ AF است که ژنوتیپی جدید بوده و برای اولین بار در گوسفندان بومی ایران شناسایی شده است. این تفاوت‌ها می‌تواند ناشی از تفاوت نژاد مورد مطالعه و تعداد دام مورد بررسی باشد. تفاوت در نحوه متابولیسم چربی نیز می‌تواند منشأ تفاوت در ژنوتیپ‌های ظاهرشده و فراوانیِ آن‌ها باشد، گوسفند لری‌بختیاری نژادی دنبه‌دار درحالی‌که گوسفندان مرینوس، رامنی، کوریدال و پول دورست نژادهایی بی‌دنبه هستند. همچنین شرایط آب و هواییِ متفاوت می‌تواند به عنوان ابزار مهم انتخاب طبیعی سبب ظهور هاپلوتایپ‌های خاص در هر جمعیت شود یا این-که باعث شود هاپلوتایپ‌ها با فراوانی متفاوتی در جمعیت‌های مختلف ظاهر شوند. گوسفندان لری‌بختیاری در شرایط آب و هوای سرد و خشکِ استان چهار محال و بختیاری درحالی که

گوسفندان بی‌دنبه بومی نیوزلند در شرایط معتدل و مرطوب این کشور پرورش داده می‌شوند.

جدول 2- فراوانی‌های هاپلوتایپی و ژنوتیپی جایگاه ژن کالپاستاتین در جمعیت گوسفندان لری‌بختیاری.

Table 2- Haplotype and genotype frequencies of CAST gene locus in Lori-Bakhtiari sheep population.

	هاپلوتایپ haplotype									
	A	B	C	D	E	F	G	H	J	
فراوانی هاپلوتایپی haplotype frequency	0.373	0.272	0.083	0.012	0.044	0.163	0.027	0.006	0.021	
	ژنوتیپ genotype									
	AA	BB	AB	AC	AD	BE	AF	AG	AH	AJ
فراوانی ژنوتیپی genotype frequency	0.029	0.195	0.065	0.166	0.024	0.089	0.325	0.053	0.012	0.042

تعادل هاردی‌واینبرگ و هتروزیگوسیتی

نتایج بدست‌آمده نشان می‌دهد که جمعیت مورد مطالعه برای گوسفند لری‌بختیاری در جایگاه ژن کالپاستاتین در تعادل هاردی‌واینبرگ قرار ندارد (جدول 3). با توجه به این‌که تعداد کل ژنوتیپ‌های ممکن 45 ژنوتیپ است و ارائه تعداد مشاهده‌شده و مورد انتظار برای همه ژنوتیپ‌ها حجم زیادی را به خود اختصاص می‌داد از آوردن این مقادیر چشم‌پوشی شد و فقط مقدار χ^2 و درجه آزادی در جدول 3 ذکر شد.

ایستگاه اصلاح نژاد گوسفند لری‌بختیاری (شولی) به عنوان یکی از بهترین و موفق‌ترین ایستگاه‌های اصلاح نژادی گوسفندان بومی ایران علاوه بر هدف حفظ ذخایر ژنتیکی کشور تلاش زیادی در جهت اصلاح نژاد گوسفند لری‌بختیاری برای صفات عملکردی و اقتصادی از جمله صفات رشد انجام داده است. یکی از مهم‌ترین پیامدهای انتخاب (به عنوان ابزار اصلی متخصصین اصلاح نژاد) بر هم خوردن تعادل هاردی‌واینبرگ در جایگاه‌های ژنیِ مؤثر بر صفاتی است که انتخاب برای آن‌ها انجام گرفته است. بنابراین انتظار می‌رود ژن کالپاستاتین از جمله ژن‌هایی باشد که مورد هدف انتخاب قرار گرفته و یکی از نتایج آن بر هم خوردن تعادل هاردی‌واینبرگ در جایگاه این ژن است.

جدول 3- هتروزیگوسیتی در جایگاه ژن کالپاستاتین و نتایج آزمون کای مربع در جمعیت گوسفندان لری‌بختیاری.

Table 3- Heterozygosity in CAST gene locus and the results of chi-squared test in Lori-Bakhtiari sheep population.

هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده Observed heterozygosity	هتروزیگوسیتی موردانتظار Expected heterozygosity	χ^2	درجه آزادی (df)
0.775	0.750	25.344^{***}	36

***:اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال کمتر از 0/001

همان‌طور که در جدول 3 مشاهده می‌شود جمعیت گوسفند لری‌بختیاری مورد مطالعه در تحقیق حاضر در جایگاه 254 جفت‌بازی واقع در اگزون 6 و اینترون‌های 5 و 6 ژن کالپاستاتین دارای سطح هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده و مورد انتظار بالایی است (به‌ترتیب 0/775 و 0/75). مطالعاتی که روی چندشکلی جایگاه 622 جفت-بازی واقع در اگزون و اینترون 1 ژن کالپاستاتین در گوسفندان بومی ایران انجام شده است حاکی از سطح هتروزیگوسیتی پایین‌تر این جایگاه نسبت به جایگاه اگزون 6 و اینترون‌های 5 و 6 ژن کالپاستاتین مورد مطالعه در تحقیق حاضر است به این ترتیب که مقدار هتروزیگوسیتی برای جایگاه اگزون و اینترون 1 ژن کالپاستاتین در گوسفند نژاد بلوچی 0/48 (Tahmoorespour *et al.*, 2005)، در گوسفند نژاد مغانی 0/49 (Torabi *et al.*, 2008) و در گوسفند نژاد قزل 0/49 (Mahdavi *et al.*, 2008) گزارش شده است. بنابراین می‌توان اظهار کرد که جایگاه اگزون 6 و اینترون‌های 5 و 6 ژن کالپاستاتین دارای تنوع ژنتیکی بالایی در جمعیت گوسفندان تحت اصلاح و انتخاب ایستگاه اصلاح نژاد گوسفند لری‌بختیاری (شولی) است. اگرچه انتظار می‌رود در جمعیتی که در آن، طی نسل‌های متوالی انتخاب انجام گرفته است تنوع ژنتیکی کاهش یابد ولی همان‌طور که می‌دانیم در اصلاح نژاد علاوه بر انتخاب ابزار مهم دیگری به نام آمیخته‌گری وجود دارد که می‌تواند اثرات منفیِ کاهش تنوع ژنتیکیِ ناشی از اِعمال انتخاب در گله را جبران کند. در واقع با بکارگیری روش-های صحیح، اصولی و برنامه‌ریزی‌شده مبتنی بر علم اصلاح نژاد برای سیستم آمیزشی گله، می-توان ضمن انتخاب نه تنها تنوع ژنتیکی را در گله حفظ کرد بلکه باعث افزایش آن نیز شد. به عنوان مثال استفاده از تعداد بیشتری قوچ برای آمیزش با حیوانات ماده گله در ایستگاه اصلاح نژاد لری-بختیاری می‌تواند یکی از دلایل کاهش خویشاوندی و افزایش تنوع باشد. وجود تنوع ژنتیکی بالا در یک گله برای اصلاح نژاد بسیار مطلوب است زیرا تنوع، ماده اولیه انتخاب جهت اصلاح نژاد محسوب شده و در گله دست اصلاح‌گران را برای انتخاب باز می‌کند.

اثر ژن کالپاستاتین بر فنوتیپ و ارزش اصلاحی صفات رشد

آماره شاپیرو-ویلک نشان داد که هر چهار صفت مورد بررسی در جمعیت گوسفندان لری-بختیاری دارای توزیع نرمال هستند. مقایسات میانگین حداقل مربعات در جمعیت لری‌بختیاری نشان داد که اثر جایگاه ژن کالپاستاتین بر وزن تولد، وزن از شیرگیری و افزایش وزن روزانه از تولد تا از شیرگیری معنی‌دار ($P<0/05$) است (جدول 4). لازم به ذکر است که فراوانی ژنوتیپ‌های AA، AD و AH بقدری کم بود (جدول 2) که نتایج حاصل از ارتباط این ژنوتیپ‌ها با صفات رشد نمی‌تواند خیلی قطعی و قابل اطمینان باشد بنابراین از آوردن این ژنوتیپ-ها در تجزیه واریانس صرفنظر شد.

تفاوت معنی‌داری بین میانگین حداقل مربعاتِ وزن تولدِ گوسفندان دارای ژنوتیپ AC با گوسفندان دارای ژنوتیپ‌های BB، BE و AJ و نیز بین گوسفندان دارای ژنوتیپ AB با گوسفندان دارای ژنوتیپ BE وجود داشت ($P<0/05$) بطوری که ژنوتیپ AC و پس از آن ژنوتیپ AB بیشترین وزن تولد و ژنوتیپ‌های BE و AJ کمترین وزن تولد را دارا بودند (جدول 4). همچنین تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ AJ با ژنوتیپ‌های BB، BE و AF و نیز بین ژنوتیپ-های AB و AC با ژنوتیپ BE برای وزن از شیرگیری مشاهده شد ($P<0/05$) بطوری که حیوانات دارای ژنوتیپ AJ جایگاه ژن کالپاستاتین در جمعیت لری‌بختیاری بیشترین وزن از شیرگیری و حیوانات دارای ژنوتیپ BE کمترین وزن از شیرگیری را نشان دادند (جدول 4). مقایسه میانگین حداقل مربعات جایگاه ژن کالپاستاتین برای صفت افزایش وزن روزانه از تولد تا از شیرگیری نیز تفاوت معنی‌داری را بین ژنوتیپ AJ با سایر ژنوتیپ‌ها به جز ژنوتیپ AB نشان داد ($P<0/05$). ژنوتیپ AB نیز تفاوت معنی‌داری با ژنوتیپ BE آشکار کرد. در اینجا نیز ژنوتیپ AJ بیشترین افزایش وزن روزانه و ژنوتیپ BE کمترین مقدار را نشان داد.

نکته جالب توجه این‌است که گوسفندان دارای ژنوتیپ AJ که بعد از ژنوتیپ BE کمترین وزن تولد را داشتند دارای بیشترین افزایش وزن روزانه و وزن از شیرگیری بودند (جدول 4). این مسئله می‌تواند به دلیل وراثت‌پذیری پایین وزن تولد نسبت به وزن از شیرگیری (Duguma et al, 2002; Hanford et al, 2006; Matika et al, 2003) و به طور کلی روند صعودی وراثت-پذیری وزن بدن با افزایش سن (Moradian et al, 2007) باشد. وراثت‌پذیری پایین وزن تولد می‌تواند بدلیل تنوع زیاد اثرات مادری روی جنین باشد. رشد و تکامل جنین تحت تأثیر عوامل ژنتیکی و محیطی از قبیل محیط رحم، جفت، تغذیه جنین بوسیله مادر و غیره قرار دارد. بنابراین عوامل محیطی مؤثر در رشد مادر مخصوصاً کمیت و کیفیت مواد خوراکی و ذخیره غذایی مادر و نیز شماره زایش (زایش اول، دوم و ...) می‌تواند رشد جنین را تحت تأثیر قرار دهد. روند صعودی وراثت‌پذیری مستقیم صفات رشد می‌تواند به دلیل افزایش بروز تأثیر ژن‌هایی با

منشأ ژنتیکی افزایشی مستقیم بر رشد دام و کاهش اثرات مادری باشد (Sadeghi, 2010 & Mohammadi).

جدول 4- مقایسه میانگین حداقل مربعات (±SE) اثر ژنوتیپ‌های مختلف ژن کالپاستاتین بر فنوتیپ و ارزش اصلاحی(BV) صفات رشد در جمعیت لری‌بختیاری.

Table 4- Least Square Mean Comparison (±SE) of the CAST gene effect on phenotype and breeding value of growth traits in Lori-Bakhtiari sheep population.

ژنوتیپ genotype							صفت trait
AJ (7)	AG (10)	AF (55)	BE (15)	AC (28)	AB (11)	BB (33)	
4.36^{bc} 0.28±	4.70^{abc} 0.26±	4.64^{abc} 0.24±	4.38^{c} 0.24±	4.85^{a} 0.24±	4.72^{ab} 0.23±	4.45^{bc} 0.24±	وزن تولد(kg)* birth weight(kg)*
38.69^{a} 1.36±	35.75^{bc} 1.33±	35.53^{bc} 1.12±	34.42^{c} 1.21±	35.72^{ab} 1.14±	36.59^{ab} 1.07±	35.75^{bc} 1.15±	وزن از شیرگیری(kg)* weaning weight(kg)*
359.4^{a} 16.3±	332.4^{bc} 15.8±	328.4^{bc} 13.4±	315.2^{c} 13.9±	328.3^{bc} 13.7±	339.9^{ab} 13.2±	325.6^{bc} 13.9±	افزایش وزن روزانه(g)* daily gain(g)*
23.10 0.5±	23.00 0.5±	22.90 0.4±	23.00 0.4±	23.10 0.4±	23.10 0.4±	23.10 0.4±	نسبت کلیبر^{ns} Kleiber Ratio^{ns}
0.22 0.06±	0.22 0.06±	0.20 0.04±	0.18 0.05±	0.25 0.04±	0.27 0.05±	0.25 0.04±	BV وزن تولد(kg)^{ns} BV of birth weight(kg)^{ns}
0.48 0.12±	0.47 0.10±	0.45 0.07±	0.49 0.09±	0.40 0.08±	0.53 0.09±	0.51 0.08±	BV وزن از شیرگیری(kg)^{ns} BV of weaning weight(kg)^{ns}
7.10 1.43±	6.84 1.28±	6.22 0.75±	5.78 1.18±	6.12 0.93±	8.59 1.06±	7.31 0.86±	BV افزایش وزن روزانه(g)^{ns} BV of daily gain(g)^{ns}
0.17 0.047±	0.16 0.045±	0.15 0.023±	0.19 0.042±	0.16 0.031±	0.20 0.030±	0.18 0.025±	BV نسبت‌کلیبر^{ns} BV of Kleiber Ratio^{ns}

^{ns} و *: به ترتیب اثر غیر معنی‌دار و معنی‌دار ژن بر صفت در سطح احتمال پنج درصد BV: ارزش اصلاحی

❖ میانگین‌های دارای حروف مشابه با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارند.

در بررسی ارتباط چندشکلی جایگاه اگزون 6 و اینترون‌های 5 و 6 ژن کالپاستاتینِ گوسفندی با صفات وزن تولد و افزایش وزن روزانه، اثر جایگاه ژن کالپاستاتین بر وزن تولد گوسفندان بومی نیوزلند معنی‌دار شد که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های A و C برای وزن تولد مشاهده شد (Byun *et al.*, 2008). ارتباط چندشکلی ژن کالپاستاتین در اگزون‌های 24-28 به روش

RFLP با صفات رشد در 359 رأس گوسفند نژاد پُلی‌پِی، تارقی و آمیخته‌های این دو نژاد، مورد بررسی قرار گرفت. اثر این جایگاه ژن کالپاستاتین بر صفات وزن تولد ($P<0/007$) و افزایش وزن روزانه ($P<0/006$) معنی‌دار شد. ژنوتیپ AA بطور معنی‌داری وزن تولد و افزایش وزن روزانه بیشتر نسبت به ژنوتیپ BB داشت (Chung & Davis, 2012). طی مطالعه‌ای که ارتباط چندشکلی جایگاه 622 bp در اگزون و اینترون 1 ژن کالپاستاتین به روش PCR-SSCP را با صفات رشد در گوسفندان دورست داون و دورگ‌های دورست داون×کوپ‌وُرس مورد بررسی قرار داد، ژنوتیپ ac بهترین ژنوتیپ برای افزایش وزن روزانه ($P<0/05$) بود (Palmer *et al.*, 1999) در حالی که در مطالعه دیگر روی 84 رأس گوسفند کردی شیروان نتایج متفاوتی به دست آمد به این ترتیب که ژنوتیپ ab منجر به افزایش وزن روزانه بیشتر نسبت به دو ژنوتیپ aa و ac ($P<0/05$) گردید (Nassiry *et al.*, 2006).

نتایج تجزیه واریانس هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری بین میانگین حداقل مربعات ژنوتیپ-های جایگاه ژن کالپاستاتین برای ارزش اصلاحیِ صفات رشد نشان نداد (جدول 4). سؤال این است که چرا اثر ژن کالپاستاتین بر فنوتیپ صفت در جمعیت معنی‌دار است ولی بر ارزش اصلاحی همان صفت در همان جمعیت معنی‌دار نیست؟ دلایلی که می‌توان برای توجیه این مسئله ذکر کرد این است که اولاً ممکن است دقت ارزش‌های اصلاحیِ برآوردشده (EBV[1]) به دلایلی همچون تعداد کم رکوردهای مورد استفاده (6539 رکورد) و یا ناقص بودن اطلاعات شجره پایین باشد. در این‌صورت اگر دقت برآوردها خیلی پایین باشد تفاوت زیادی بین مقادیر برآوردشده و واقعیِ ارزش‌های اصلاحی وجود خواهد داشت (Bourdon, 1999). بنابراین وقتی ارتباط ژن کاندیدا با ارزش‌های اصلاحیِ برآوردشده برقرار می‌شود نتایج کاملاً متفاوتی نسبت به برقراری این ارتباط با ارزش‌های اصلاحیِ واقعی به‌دست خواهد آمد. دلیل دیگری که می‌توان ذکر کرد این‌است که فنوتیپ یک صفت تحت تأثیر ژنتیک حیوان و محیط قرار دارد که بخش ژنتیکی آن شامل مجموع دو اثر ژنتیکی افزایشی یا همان ارزش اصلاحی و اثر ترکیبی ژنی شامل اثرات غالبیت و اپیستاتیک می‌باشد. صفاتی مانند صفات رشد، کمّی و پلی‌ژن هستند و بنابراین منظور از اثر ژنتیکی افزایشی بر روی این‌گونه صفات مجموع اثرات ژنتیکی افزایشی کل جایگاه‌های ژنی مؤثر بر صفت مورد مطالعه از جمله جایگاه ژن کالپاستاتین به عنوان ژن کاندیدای مؤثر بر صفات رشد است. در مورد اثر ترکیب ژنی بر روی این صفات نیز می‌توان چنین تفسیری داشت (Bourdon, 1999). به هنگام ارتباط ژن کالپاستاتین با فنوتیپ یک صفت در واقع کل اثر ژنتیکی این ژن (اثر ژنتیکی افزایشی و اثر ترکیبی ژنی) روی صفت مربوطه مورد بررسی قرار می-گیرد. از این‌رو می‌توان گفت مجموع دو اثر

[1] Estimated Breeding Value

ژنتیکی افزایشی و اثر ترکیبی ژنی باعث شده که ژن کالپاستاتین اثر معنی‌داری روی فنوتیپ صفت داشته باشد درحالی که به هنگام ارتباط ژن کالپاستاتین با ارزش اصلاحی صفت، تنها اثر این ژن، که مرتبط با ارزش اصلاحی صفت است، اثر ژنتیکی افزایشی این ژن می‌باشد. ممکن است سهم ژنتیک افزایشی در بروز فنوتیپی صفت بیشتر از اثر ترکیبی ژن باشد و بالعکس و شاید هم اثر مساوی روی فنوتیپ صفت داشته باشند. حال این که در مطالعه حاضر اثر ژن کالپاستاتین روی فنوتیپ صفت معنی‌دارشده ولی بر ارزش اصلاحی آن معنی‌دار نشده می‌تواند بدلیل سهم بیشتر اثر ترکیبی ژن کالپاستاتین نسبت به اثر ژنتیکی افزایشی آن در بروز فنوتیپی صفات رشد باشد. تفاوت اجزای مدل نیز می‌تواند دلیل دیگری برای نتایج متفاوت ارتباط ژن کالپاستاتین با فنوتیپ و BV صفات رشد باشد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که جایگاه اگزون 6 و اینترون‌های 5 و 6 ژن کالپاستاتین بین نژاد دنبه‌دار بومی ایران (گوسفند لری‌بختیاری) و نژادهای بی‌دنبه بومی نیوزلند، دارای تعدادی چندشکلی با فراونی متفاوت است. همچنین نتایج نشان داد که این جایگاه ژن کالپاستاتین دارای تنوع ژنتیکیِ بالایی در جمعیت گوسفند لری-بختیاری است بطوری که چندین ژنوتیپ با تفاوت فنوتیپی معنی‌دار در جمعیت شناسایی شد. همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ژنوتیپ‌های AJ، AB و AC در جایگاه ژن کالپاستاتین ژنوتیپ‌های مطلوب برای صفات رشد قبل از شیرگیری و از طرفی ژنوتیپ BE ژنوتیپی نامطلوب برای این صفات هستند. به‌نظر می‌رسد در صورت تعیین توالی این ناحیه ژنی و شناسایی SNPهای احتمالی در پژوهش‌های بعدی و نیز انجام مطالعات ارتباطی روی تعداد بیشتری حیوان، می‌توان آلل‌ها و ژنوتیپ‌های مطلوبِ این ناحیه ژنی را برای صفات رشد با دقت بسیار زیادی تعیین و در انتخاب به کمک نشانگر (MAS) استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پروژه پژوهشی مصوب در قطب علمی بهبود کمی و کیفی لاشه گوسفند دانشگاه تهران می‌باشد و حمایت مالی آن نیز از محل اعتبارات قطب انجام گرفته است. لذا، بدین‌وسیله از ریاست محترم قطب علمی بهبود کمی و کیفی لاشه گوسفند دانشگاه تهران تشکر و قدردانی می‌گردد. عملیات آزمایشگاهیِ پروژه در آزمایشگاه بیوتکنولوژیِ گروه علوم دامی پردیس کشاورزیِ و منابع طبیعی دانشگاه تهران انجام شده لذا مراتب تقدیر و تشکر را از مسئولین مربوطه داریم. همچنین از مساعدت و همکاری‌های مدیریت محترم ایستگاه اصلاح نژاد گوسفند لری‌بختیاری (شولی) در تهیه نمونه‌های این تحقیق، ریاست محترم مرکز تحقیقات کشاورزی شهرستان شهرکرد جهت اسکان در این شهرستان و استفاده از امکانات آزمایشگاهی، گروه علوم دامی دانشگاه شهرکرد جهت استفاده از امکانات آزمایشگاهی و نیز ریاست محترم

مرکز اصلاح نژاد کل کشور در ارائه فایل اطلاعات و شجره گوسفندان ایستگاه اصلاح نژاد لری‌بختیاری صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

Aali M (2012). Association of polymorphic variations in the ovine Calpastatin (CAST) and Stearoyl-CoA desaturase (SCD) genes with performance and meat FA profile traits in Lori-Bakhtiari, Zel and Shal breeds by PCR-SSCP method and DNA sequencing. M.Sc. Thesis. University of Tehran, Karaj, Alborz., Iran.

Bassam BJ, Anolles CG, Gresshoff PA (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamid gels. Analytical Biochemistry 19: 680-830.

Bickerstaffe R, Hickford JGH, Gately K, Zhou H (2006). Association of polymorphic variations in calpastatin with meat tenderness and yield of retail meat cuts in lambs. Agriculture and Life Sciences Division, Lincoln University, Canterbury, New Zealand.

Bourdon RM (1999). Understanding Animal Breeding. 2nd edition. Pearson Higher Ed USA. Chapter: 7 and 10.

Byun SO, Zhou H, Forrest RH, Frampton CM, Hickford JGH (2008). Association of the ovine calpastatin gene with birth weight and growth rate to weaning. Animal Genetics 39: 572-573.

Chung HY, Davis M (2012). PCR-RFLP of the ovine calpastatin gene and its association with growth. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances 7: 641-652.

Duguma G, Schoeman SJ, Cloete SWP, Jordan GF (2002). Genetic parameter estimates of early growth traits in the Tygerhoek Merino flock. South African Journal of Animal Science 32: 66-75.

Eftekhari Shahroudi F, Nassiry MR, Valizadh R, Heravi Moussavi A, Tahmoorespour M, Ghiasi H (2007). Genetic polymorphism at MTR1A, CAST and CAPN loci in Iranian Karakul sheep. Iranian Journal of Biotechnology 4: 117-122.

Elyasi-zaringhabaee GH, Shodja J, Nassiry MR (2005). Determination of ovine Calpastatin gene polymorphism using PCR-RFLP. Proc. Of 4th Iranian National Biotechnology Congress. August. 15-17, 2005. Kerman, Iran. pp. 110.

Falconer DS, Mackay TFC (1996). Introduction to quantitative genetics. 4 ed. Edinburgh: Longman. pp. 464.

Goll DE. Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J (2003). The calpain system. Physiological Reviews 83: 731–801.

Hanford KJ, Van Vleck LD, Snowder GD (2006). Estimates of genetic parameter and genetic trend for reproduction, weight, and wool characteristics of Polypay sheep. Livestock Science 102: 72–82.

Khaldari M (2008). Principles of sheep and goat production. Jahad University Publications, Tehran. Iran.

Koohmaraie M (1992). The role of Ca(2+)-dependent proteases (calpains) in post mortem proteolysis and meat tenderness. Biochimie 74: 239–245.

Mahdavi A، Shodja J، Pirany N, Sheikhloo M (2008). Study on polymorphism of calpastatin gene and its association with daily gain in ghezel sheep. Journal of Agricultural knowledge 18: 163-170.

Mara Carrijo S, Mello de Alencar M, Luiz Buranelo Toral F, Correia de Almeida Regitano L (2008). Association of PIT1 genotypes with growth traits in canchim cattle. Journal of Agricultual Science 65: 116-121.

Matika O, van Wyk JB, Erasmus GJ, Baker RL (2003). Genetic parameter estimates in Sabi sheep. Livestock Production Science 79: 17–28.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1998) A simple salting out procedure for extraction of DNA from human nucleated cells. Nucleic Acid Research 16: 1215.

Mohammadi H, Sadeghi M (2010). Estimation of generic parameters of growth and reproductive traits and genetic trend of growth traits in Zel sheep breed under rural system. Iranian Journal of Animal Science 41: 231-241.

Mohamadi M, Beigi Nasiri MT, Alami-Saeid Kh, Fayazi J, Mamoee M, Sadr AS (2008). Polymorphism of calpastatin gene in Arabic sheep using PCR- RFLP. African Journal of Biotechnology 15: 2682-2684.

Moradian H, Vatankhah M, Mirzaei R (2007). Estimation of generic parameters of body weight traits in Lori-Bakhtiari lambs using random regression model. Journal of Modern Genetics, 2th year 4: 23-30.

Moradi Shahrbabak H (2009). Association polymorphism of the genes Calpastatin, mioststin, leptin and potassium with economic traits, blood metabolites and carcass traits in makoei and zel sheep. Ph.D. Thesis. University of Tehran, Karaj, Alborz., Iran.

Nassiry MR, Tahmoorespour M, Javadmanesh A, Soltani M, Foroutani Far S (2006). Calpastatin polymorphism and its association with daily gain in Kurdi sheep. Iranian Journal of Biotechnology 4: 188-192.

Palmer BR, Morton JD, Roberts N, Ilian MA (1999). Marker-assisted selection for meatquality and the ovine calpastatin gene. Proc. New Zealand Society Animal Production 59: 266–268.

Palmer BR, Roberts N, Hickford JGH, Bickerstaffe R (1998). PCR-RFLP for MspI and NcoI in the ovine calpastatin gene. Journal of Animal Science 76: 1499-1500.

Robert N, Palmer BR, Hickford JG, Bickerstaffe R (1996). PCR-SSCP in the ovine CAST gene. Animal Genetics 27: 211- 222.

Tahmoorespour M, Valizadeh R, Eftekhari Shahroudi F, Nassiry MR (2005). Study on polymorphism of calpastatin gene and its association with daily gain in baluchi sheep. Journal of Agricultural Sciences and Industries 20: 47-53.

Torabi A**,** Shoja J, Pirani N, Elyasi-zaringhabaee GH, Valizadeh M (2008). Study on polymorphism of calpastatin gene in moghani sheep by PCR-RFLP method. Journal of Agricultural knowledge 18: 119-127.

Zhou H, Hickford JGH, Gong H (2007). Polymorphism of the ovine calpastatin gene. Molecular and Cellular Probes 21: 242–244.

Study on genetic structure of CAST gene by PCR- SSCP method and its association with growth traits in lori-Bakhtiari sheep breed

Aali M.[*1], Moradi-Shahrbabak M.[2], Moradi-Shahrbabak H.[3], Sadeghi M.[3]

[1] M.Sc., Animal Science Department, University of Tehran, Karaj, Iran.
[2] Professor, Animal Science Department, University of Tehran, Karaj, Iran.
[3] Assistant Professor, Animal Science Department, University of Tehran, Karaj, Iran.

Abstract

In this study, a 254 bp fragment containing exon 6 and a part of introns 5 and 6 of ovine CAST gene were amplified in 169 Lori-Bakhtiari lamb from Lori-Bakhtiari sheep breeding station by polymerase chain reactions. The PCR-SSCP method and vertical electrophoresis of PCR products on 12% acrylamide gel at 4 C˚ and silver-staining were used for genotyping of amplified fragments. Ten genotypic patterns containing AA, BB, AB, AC, AD, BE, AF, AG, AH and AJ were identified with frequencies of 0.029, 0.195, 0.065, 0.166, 0.024, 0.089, 0.325, 0.053, 0.012 and 0.042, respectively. Association analysis with growth traits demonstrated different genotypes significantly associated with birth weight, weaning weight and daily gain from birth to weaning (P<0.05). The best genotypes for birth weight were AB and AC and for weaning weight and daily gain were AJ and AB. It seems that sequencing of this gene and identification of probable SNPs in the next projects and also association studies at larger population, can determine favorable alleles and genotypes of CAST gene for growth traits with very high accuracy and use them in Marker Assisted Selection (MAS).

Keywords: *polymorphism, calpastatin, Lori-Bakhtiari sheep, growth traits, PCR-SSCP.*

[*] Corresponding Author: Aali M. Tel: 09374252708 Email: Mohsen.ali@ut.ac.ir