



## شناسایی چندشکلی پروموتر ژن میوستاتین با تکنیک PCR-RFLP و ارتباط آن با برخی صفات ریخت‌شناسی در برخی نژادهای اسب

علیرضا نوشری<sup>۱\*</sup>، ابوالقاسم لواف<sup>۲</sup>

۱- استادیار گروه علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

۲- دانشیار گروه علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۵/۶/۲۰ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۱۱)

### چکیده

صفات ریخت‌شناسی جزء صفات چندژنی محسوب می‌شوند که بروز نهایی آنها تحت تاثیر همزمان محیط و اثر پلی‌ژنها قرار دارد. در این تحقیق به منظور بررسی چندشکلی ناحیه پروموتر ژن میوستاتین (MSTN) و رابطه آن با برخی از صفات ریخت‌شناسی از تعداد ۱۲۰ راس اسب از نژادهای الدنبرگ، ترکمن، اسب کاسپین و تروبرد که در یک نمونه‌گیری تصادفی انتخاب شده بودند، استفاده شد. پس از استخراج DNA واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای تکثیر قطعه ۲۰۴ جفت بازی از پروموتر ژن MSTN انجام شد. محصول PCR تحت تاثیر آنزیم برشی *SspI* در واکنش PCR-RFLP برای تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق حضور دو ژنوتیپ TT و CT و آلل T و C را برای جایگاه پروموتر ژن MSTN در نمونه‌ها نشان داد. نتایج این تحقیق نشان داد برای هیچ یک از صفات عرض سینه، ارتفاع قد از جدوگاه، عرض کپل و طول گردن، بین ژنوتیپ‌های شناسایی شده ژن MSTN در هیچ یک از نژادهای مورد مطالعه، تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. محیط گردن در دو نژاد تروبرد و اسب کاسپین برای ژنوتیپ TT به ترتیب برابر ۱۱۴/۲۶، ۸۷/۵۹ سانتی‌متر و برای ژنوتیپ CT برابر ۱۰۹/۸۷ و ۸۱/۳۸ سانتی‌متر و تفاوت‌ها معنی‌دار بوده است. در دو نژاد الدنبرگ و ترکمن نیز برای ژنوتیپ TT محیط گردن بیشتر ولی تفاوتها غیرمعنی‌دار بوده است. تحقیق حاضر نشان می‌دهد در جایگاه پروموتر ژن مورد مطالعه و در همه نژادها چندشکلی وجود دارد. همچنین می‌توان از چندشکلی‌های ژن MSTN به عنوان یک ژن کاندیدا در شناسایی تفاوت‌های موجود در پتانسیل ژنتیکی نژادهای اسب استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: اسب کاسپین، الدنبرگ، ترکمن، تروبرد، میوستاتین

## مقدمه

حجم عضلات، بدنی قدرتمند و جمع و جور دارند. این اسبها معمولاً برای تفریح و سوارکاری مورد استفاده قرار می‌گیرند. همچنین تیپ‌هایی وجود دارند که خصوصیات حدواسطی از انواع گفته شده را دارند و تیپ‌های میانی نامیده می‌شوند (Dall'Olio et al., 2010). تجزیه و تحلیل ژنوم اسب بیش از یک دهه پیش آغاز شد که اخیراً منجر به تعیین توالی کامل ژنوم اسب گردید (Bowling, 2000). در دسترس بودن توالی کل ژنوم اسب نشان دهنده موفقیت آمیز بودن دوره‌ی مهمی از تجزیه و تحلیل ژنوم اسب است. آغاز یک دوره‌ی جدید که در آن با توسعه ابزارهای جدید اطلاعات، توالی ژنوم بسیاری از موجودات در دسترس است سبب شده که با مطالعه طیف وسیعی از صفات که از لحاظ اقتصادی مهم هستند مانند سلامت، عملکرد و رفاه اسب برای اینگونه ژن‌ها انتخاب انجام داد (Bowling, 2000). ژن‌های اسب اصیل کشور (عرب، ترکمن، تروبرد، اسب کاسپین) با وجود پایه‌های نژادی و تنوع گسترده‌ی تیره‌ها، دارای ویژگی‌های منحصر به فردی مانند قدرت بقاء، توان زیست و ماندگاری می‌باشند. یکی از راه‌های حمایت و پشتیبانی از آنها برنامه‌ریزی جهت حفظ و دستیابی به جایگاه واقعی آنها با شناسایی ساختار ژنتیکی جمعیت است. با اجرای عملیات شناسایی ژنتیکی به ویژه برای جایگاه‌هایی که با عملکرد صفات مهم کمی در ارتباط هستند، ابزارهای اجرایی اصلاح نژادی به منظور انتخاب، ایجاد شده، بطوریکه با انجام انتخاب و بهره‌گیری از سیستم‌های تلاقی‌های هدف‌دار می‌توان نسبت به تولید کره‌های با ارزش ژنتیکی بالا و قابل صادرات به بازارهای داخلی و جهانی اقدام نمود. در مرحله بعد، با انتخاب سیلمی‌های دارای ارزش ژنتیکی بالا و توزیع آن در بین اسب‌داران علاقمند در هر نژاد، گام موثری در راه توسعه نژادها در سطح کشور و ایجاد قدرت رقابت در سطح جهانی ایجاد نمود

تحقیق حاضر به بررسی تنوع ژنتیکی ژن میوستاتین به عنوان یکی از ژن‌های کاندیدای موثر بر صفات تیپ در اسب می‌پردازد. این تحقیق بر روی چهار نژاد اسب کشور انجام گرفته است. پراکنش اسب ترکمن عمدتاً در استان گلستان و شمال خراسان و اسب کاسپین در سواحل دریای خزر است. همچنین نژادهای الدنبرگ و تروبرد در

اسب‌ها برای اهداف مختلفی پرورش می‌یابند و توانایی هر کدام از آنها در انجام وظیفه‌ای خاص است (امانلو، ۱۳۸۴). امروزه بیش از ۱۷ رشته مربوط به صنعت اسب و سوارکاری وجود دارد که در هر یک از این رشته‌ها به اسب مخصوص آن رشته نیاز است، از این رو اصلاح نژاد در صنعت پرورش اسب امری ضروری است (خلیلی، ۱۳۸۷).

نژادهای مختلف اسب، از نظر ریخت‌شناسی فنوتیپ‌های مختلفی را نشان می‌دهند که برای گروه‌بندی این نژادها آنها را به گروه‌های مختلفی تقسیم می‌کنند. اگرچه هیچ سیستمی برای طبقه‌بندی تنومندی هیکل اسب‌ها وجود ندارد که بتوان آنها را به طور مشخصی تعیین کرد ولی بر اساس ویژگی اندازه و ساختار ظاهری اسب‌ها، نژادها به ۳ گروه سنگین، سبک و پونی تقسیم‌بندی می‌شوند (Dall'Olio et al., 2010). در یک تقسیم‌بندی با توجه به ساختار اسکلتی، نسبت‌ها، حجم عضلات و شاخص‌های زومتریک (وابسته به اندازه‌های جانورشناسی) که برای انتخاب هدف و مصارف نژادهای اسب تاثیر گذار است اسب‌ها به گروه‌های براشی‌مورفیک<sup>۱۳</sup>، مزومورفیک<sup>۱۴</sup>، دولیکومورفیک<sup>۱۵</sup> و تیپ‌های میانی قابل تقسیم بندی می‌باشند (Dall'Olio et al., 2010).

اسب‌های براشی‌مورفیک که به صورت قدیمی، اسب‌های خونسرد نامیده می‌شوند، دارای خلق و خوی ساکت و آرام هستند. این اسب‌ها دارای قامتی بلند، استخوان‌بندی درشت، ماهیچه‌های کوتاه و ضخیم هستند که قابلیت کشش‌پذیری آرامی را که منجر به انقباضات عضلانی آرام در این اسب‌ها می‌شوند، ممکن می‌سازند. اسب‌های براشی‌مورفیک از نیروی مناسبی برخوردارند و ترکیب بدنی آنها مناسب برای حمل کالسکه و تولید گوشت است. اسب‌های دولیکومورفیک دارای بدنی طویل و کشیده و ماهیچه‌هایی بلند و باریک هستند. این اسب‌ها به منظور اهداف ورزشی، حرکت سریع و سرعت بالا مورد استفاده قرار می‌گیرند. انواع مزومورفیک دارای ساختار فیزیکی سبک‌تری نسبت به براشی‌مورفیک هستند، اما به دلیل

<sup>13</sup> Brachymorphic<sup>14</sup> Mesomorphic<sup>15</sup> Dolichomorphic

در تحقیقی که بر روی اینترون ژن میوستاتین اسب نژاد تروبرد صورت گرفت، دو آلل C و T شناسایی شد و مشخص شد که اسب‌هایی با ژنوتیپ CC, CT, TT به ترتیب اسب‌هایی مناسب برای مسافت‌های کوتاه، متوسط و زیاد می‌باشند (Hill *et al.*, 2010). بین فنوتیپ‌های فیزیکی اسب‌های مختلف از لحاظ ژنتیکی به طور گسترده‌ای تفاوت وجود دارد. تحقیقات نشان داده است اسب‌هایی که ژنوتیپ CC دارند در سن دو سالگی نسبت به اسب‌هایی با ژنوتیپ TT حدوداً دارای ۷ درصد توده عضلانی بیشتری می‌باشند. اسب‌هایی که ژنوتیپ CC دارند در سن دو سالگی نسبت به اسب‌هایی با ژنوتیپ TT، ۱۳ برابر جایزه آورتر هستند و این به این خاطر است که این اسب‌ها تا سن دو سالگی بیشتر از مسافت ۸ فرلانگ (۱۶۰۰ متر) مسابقه نمی‌دهند (Tozaki *et al.*, 2011). در مطالعه‌ای رابطه‌ی بین دو چندشکلی تک نوکلئوتیدی (SNP) ناحیه پروموتور ژن MSTN با صفات ریخت‌شناسی شامل ۱۴ صفت خطی تیپ در دو نژاد سنگین و سبک اسب گزارش گردیده است (Dall'Olio *et al.*, 2014). هدف از تحقیق حاضر شناسایی چندشکلی‌های موجود در جایگاه پروموتور ژن میوستاتین در چهار نژاد اسب کشور شامل الدنبرگ<sup>۱۶</sup>، تروبرد<sup>۱۷</sup>، ترکمن<sup>۱۸</sup> و اسب کاسپین و مطالعه ارتباط این چند شکلی‌ها با برخی صفات ریخت‌شناسی در نژادهای فوق است.

### مواد و روش‌ها

تهیه نمونه‌های تحقیق و اطلاعات آماری: در پژوهش حاضر از تعداد ۱۲۰ راس اسب از نژادهای الدنبرگ، تروبرد، ترکمن و اسب کاسپین (از هر نژاد ۳۰ راس) از ۱۳ مرکز پرورش اسب در استان‌های البرز و تهران با استفاده از لوله‌های خلاءدار شش میلی‌لیتری حاوی EDTA از سیاهرگ و داج خونگیری انجام شد. از هر راس از اسب‌ها، اطلاعات آماری شامل جنس (نر، ماده و اخته)، سن و اطلاعات نژادی ثبت شده و اطلاعات ریخت‌شناسی شامل ارتفاع قد از جدوگاه، عرض کپل، عرض سینه،

اروپا، استرالیا، آفریقای جنوبی و آمریکا و آسیا دارای پراکنش می‌باشند.

میوستاتین (MSTN) که عامل رشد و تمایز شماره ۸ (GDF8) نیز نامیده می‌شود از گروه عوامل تغییر رشد بتا (TGFβ) است که در میزان رشد در پستانداران نقش دارد (صوفی و همکاران، ۱۳۸۸؛ McGivney *et al.*, 2012). این ژن در اسب در ناحیه‌ی سانترومری کروموزوم شماره ۱۸ قرار دارد و دارای ۳ اگزون و ۲ اینترون است (Dall'Olio *et al.*, 2010). ژن میوستاتین به عنوان عامل ایجاد رشد و یا عامل ایجاد کننده ماهیچه مضاعف شناخته شده است و تا کنون در این ژن، مجموعه‌ای از جهش‌های گوناگون گزارش شده است (Binns *et al.*, 2010). میوستاتین عضو جدید خانواده بزرگ فاکتور رشد، تغییر شکل دهنده‌ی بتا (TGFβ) است. بیان آن به طور منفی رشد عضله اسکلتی را تنظیم می‌کند. میوستاتین پس از سنتز در عضله اسکلتی به خون ترشح می‌شود و در سطح سلول عضلانی از طریق اتصال به گیرنده سرین-ترونین کینازی اکتین، به افزایش بیان P21 (مهار کننده سایکلین‌های چرخه سلولی)، کاهش فاکتورهای تنظیمی میوژنیک از جمله میوزین، مهار، تکثیر و تمایز سلول‌های اقماری یا همان سلول‌های تنظیم کننده رشد عضله بعد از تولد شده و باعث آتروفی عضله می‌شود (Baron *et al.*, 2011).

در بین نژادهای اسب تفاوت‌هایی از لحاظ فیزیکی و اندام‌شناسی وجود دارد که ژنتیکی بوده و نحوه استفاده از این نژادها را چه برای مسابقه‌ی اسب دوانی و یا فنوتیپ عضلانی تحت تاثیر قرار می‌دهد. نژادهای پر سرعت مسابقه‌ای نسبت به اسب‌هایی که برای مسابقات در مسافت بالا مناسب هستند، توده و تراکم عضلانی بیشتری دارند (Stefanuk *et al.*, 2014). فدراسیون جهانی اسب‌دوانی، اسب‌های مسابقه‌ای را در ۳ گروه سرعتی یا مسافت کوتاه (sprinter)، مسافت متوسط (middle distance) و استقامت بالا یا مسافت بالا (stayers) دسته‌بندی کرده است و مشخص گردیده که بین این گروه‌ها از نظر چند شکلی‌های ژن میوستاتین تفاوت‌هایی وجود دارد و می‌توان ژنوتیپ‌های متفاوتی را شناسایی نمود (Chowdhary, 2013).

<sup>16</sup> Oldenburg

<sup>17</sup> Thoroughbred

<sup>18</sup> Turkmen

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و *PCR-RFLP* در این تحقیق با استفاده از آغازگرهای پیشنهاد شده توسط Dall'Olio و همکاران (۲۰۱۰) ناحیه پروموتور ژن *MSTN* به طول ۲۰۴ جفت باز به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تکثیر گردید. جایگاه مورد مطالعه در این تحقیق دارای کد دسترسی GQ183900 در بانک ژن سایت NCBI است.

محیط گردن و طول گردن اندازه‌گیری به عمل آمد (Dall'Olio et al., 2014). جدول ۱ اطلاعات آماره‌های توصیفی صفات مورد مطالعه را نشان می‌دهد.

نمونه‌های خون به صورت کامل تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. استخراج DNA با استفاده از کیت شرکت RBC انجام شد. DNA استخراج شده با استفاده از بارگذاری بر روی ژل آگارز ۰/۷۵ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت.

جدول ۱- آماره‌های توصیفی صفات مورد مطالعه در تحقیق (cm)

Table 1. Descriptive statistics for studied traits (cm)

Breed		Chest width	Height	Hip width	Neck circuit	Neck length
Oldenburg	Mean	42.53	153.90	58.17	119.43	60.87
	SD	3.98	38.61	39.01	6.22	4.81
	Min	36	37	40	109	51
	Max	52	175	180	136	72
Thoroughbred	Mean	37.50	159.95	40.73	111.97	56.93
	SD	2.60	4.35	3.69	7.45	4.39
	Min	32	150	33	100	49
	Max	43	169	48	124	66
Turkmen	Mean	35.50	152.70	37.33	112.77	53.63
	SD	2.78	3.87	2.09	5.15	3.93
	Min	31	144	33	102	44
	Max	43	160	41	123	59
Caspian pony	Mean	27.37	119.17	32.03	86.67	39.87
	SD	2.20	6.51	3.58	7.11	3.61
	Min	25	109	25	67	35
	Max	34	136	40	96	51

$$Y_{ijk} = \mu + \text{Sex}_i + G_j + B_k + G * B_{jk} + b X_i + e_{ijk}$$

که  $Y_{ijk}$  مقدار مشاهدات مربوط به هر یک از صفات،  $\mu$  اثر میانگین جامعه،  $\text{Sex}_i$  اثر ثابت  $i$  امین جنس (۱، ۲، ۳) به ترتیب توصیف کننده نر، ماده و اخته،  $G_j$  اثر  $j$  زمین ژنوتیپ ژن میوستاتین شناسایی شده،  $B_k$  اثر  $k$  امین گروه نژادی (۱، ۲، ۳، ۴)،  $X_i$  اثر متغیر کمکی سن دام،  $b$  ضریب تابعیت هر یک از صفات مورد مطالعه بر متغیر کمکی و  $e_{ijk}$  مقادیر خطای تصادفی است. مقایسات مربوط به میانگین‌های حداقل مربعات به روش آزمون مقایسات چند دامنه‌ای دانکن در سطح خطای آماری ۵ درصد انجام شد.

### نتایج و بحث

تکثیر ژن *MSTN* و تعیین ژنوتیپ نمونه‌های تحقیق: در این تحقیق الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز روی ژل آگارز ۲/۵ درصد نشان داد که قطعه ۲۰۴ جفت بازی ناحیه پروموتور ژن *MSTN*، به خوبی و بدون هیچ گونه قطعه غیر اختصاصی تکثیر شده است. شکل ۱ محصول PCR را در تعداد ۸ نمونه در کنار نشانگر اندازه‌گیری ۵۰ bp نشان می‌دهد. در این تحقیق تکنیک PCR-RFLP برای تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. در هنگام فعالیت آنزیم برشی در صورتی که در توالی تشخیص آنزیم تغییری ایجاد شود هضم محصول PCR به وسیله آنزیم در آن منطقه صورت نمی‌گیرد. بنابراین وجود و یا عدم وجود جهش در جایگاه تشخیص آنزیم را می‌توان از طریق ایجاد الگوهای قطعات مختلف تشخیص داد. قطعه‌ی ۲۰۴ bp حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در صورت وقوع جهش، بطور کامل توسط آنزیم *SspI* برش خورده و قطعات ۱۷۹ bp و ۲۵bp را حاصل می‌کند که نشان دهنده‌ی آلل T است. در صورت عدم وقوع جهش تنها یک قطعه‌ی ۲۰۴ bp روی ژل ظاهر خواهد گردید که نشان دهنده‌ی آلل C خواهد بود. با مشاهده تعداد قطعات در هر ستون از ژل آگارز، ژنوتیپ افراد قابل تشخیص است. از ۱۲۰ راس اسب

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۱۵ میکرولیتر بر اساس ۸۰ نانو گرم DNA ژنومی، ۱۰ پیکومول از هر یک از آغازگرهای رفت با توالی:

5'-TCAGGGAAACAAGTTTCTCAAAT-3'

و برگشت با توالی:

5'-ACTTCCTCAGAAATTAAGATTTAAT-3'

بافر PCR با غلظت ۱X، ۲۰۰ میکرومولار از هر dNTP، ۵ MgCl<sub>2</sub> میلی‌مولار و ۱ واحد Taq DNA Polymerase انجام شد. چرخه‌های برنامه‌ی دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل ۹۵ درجه‌ی سلسیوس جهت واسرشت سازی اولیه به مدت ۱۲۰ ثانیه، واسرشت سازی ثانویه در ۹۵ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه، دمای ۵۷ درجه‌ی سلسیوس جهت اتصال آغازگرها به مدت ۶۰ ثانیه، دمای ۷۲ درجه‌ی سلسیوس جهت بسط آغازگرها به مدت ۶۰ ثانیه به تعداد ۳۵ سیکل و بسط نهایی به مدت ۶۰ ثانیه در ۷۲ درجه‌ی سلسیوس انجام شد. برای آزمون صحت قطعه به دست آمده و هم چنین تعیین کیفیت محصول PCR از ژل آگارز ۱/۵ درصد و رنگ آمیزی DNA Safe Stain به همراه نشانگر اندازه‌گیری ۵۰ جفت بازی شرکت ترمو<sup>۱۹</sup> استفاده شد.

واکنش هضم آنزیمی این تحقیق در حجم ۱۵ میکرولیتر بر اساس ۱۰ واحد آنزیم *SspI*، غلظت 1X از هر یک از بافرهای Tango و G آنزیم و ۷ میکرولیتر محصول PCR در ۳۷ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۱۲ ساعت انجام شد. برای بررسی نتیجه‌ی واکنش PCR-RFLP، از بارگذاری محصول هضم روی ژل آگارز ۲/۵ درصد در کنار نشانگر اندازه‌گیری ۵۰ جفت بازی شرکت ترمو و رنگ آمیزی DNA Safe Stain استفاده شد.

مدل آماری: به منظور مطالعه‌ی خصوصیات ژنتیک جمعیت نمونه‌های مورد پژوهش، از نرم افزار PopGene32 استفاده شد. همچنین برای بررسی رابطه‌ی بین ژنوتیپ‌های شناسایی شده ژن میوستاتین با صفات عرض سینه، عرض کپل، ارتفاع قد از جدوگاه، طول گردن و محیط گردن از نرم افزار SAS 9.2 و رویه GLM برای محاسبه میانگین حداقل مربعات (LSM) صفات مورد ارزیابی، استفاده شد. داده‌های این تحقیق بر اساس مدل آماری ثابت زیر مورد تجزیه قرار گرفت.

<sup>19</sup> Thermo Fisher Scientific, 168 Third Avenue, Waltham, MA USA 02451

مختلف شناسایی شده را در تعداد ۸ نمونه از نمونه‌های  
این تحقیق نشان می‌دهد.

مورد بررسی در این تحقیق، در ۸۹ نمونه ژنوتیپ TT و در  
۳۱ نمونه ژنوتیپ CT شناسایی گردید. همچنین هیچ  
نمونه‌ای با ژنوتیپ CC مشاهده نشد. شکل ۲ ژنوتیپ‌های

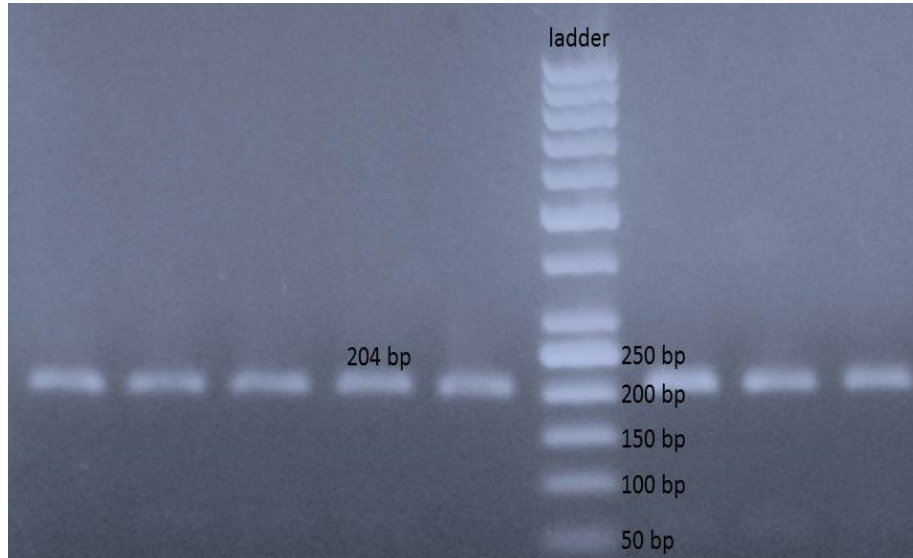


Fig 1. The PCR Product for promoter region of MSTN and 50 bp DNA Ladder

شکل ۱- محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز جایگاه پرموتر ژن MSTN در کنار نشانگر اندازه‌گیری ۵۰ bp

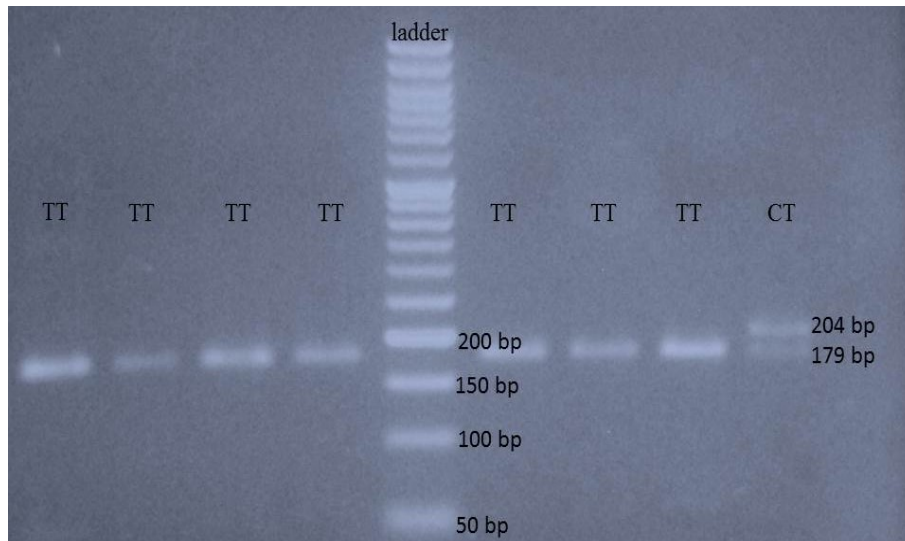


Fig 2. PCR-RFLP results for genotyping by restricted enzyme *SspI* and 50 bp DNA ladder

شکل ۲- نتایج واکنش PCR-RFLP برای شناسایی ژنوتیپ‌های مختلف بر اساس آنزیم برشی *SspI* در کنار نشانگر  
اندازه‌گیری ۵۰ bp

یا برنامه‌های اصلاحی در مناطق جغرافیایی مورد نظر باشد (Bower *et al.*, 2012). در تحقیق حاضر بیشترین فراوانی آلل T مربوط به نژاد ترکمن و کمترین آن مربوط به نژاد ترابرد بوده است.

در تحقیقی که توسط Dall'Olio و همکاران (۲۰۱۰) بر روی جایگاه پروموتور ژن میوستاتین در نژاد ترابرد صورت گرفت، فراوانی‌های ژنوتیپ CT و TT به ترتیب ۰/۰۵ و ۰/۹۵ بوده است که با بیشتر بودن فراوانی هموزیگوت TT برای این نژاد از اسب‌ها در تحقیق حاضر مطابقت دارد.

برای اولین بار در تحقیقی که توسط Stefanuk و همکاران (۲۰۱۴) بر روی همین جایگاه در اسب‌های سنگین لهستانی صورت گرفت، در حدود ۲ درصد از افراد مورد بررسی دارای ژنوتیپ CC بوده‌اند و همچنین در آن تحقیق، فراوانی‌های ژنوتیپ CT و TT در ۸۶ راس از اسب‌های نژاد ترابرد به ترتیب برابر ۰/۰۱۷ و ۰/۹۸۳ گزارش گردید که این نتایج به نتایج Dall'Olio و همکاران (۲۰۱۰) در اسب‌های ترابرد نزدیکتر است. در هر صورت میزان هتروزیگوتی اسب‌های نژاد ترابرد مورد بررسی در تحقیق حاضر نسبت به نتایج حاصل از تحقیقات Dall'Olio و همکاران (۲۰۱۰) و Stefanuk و همکاران (۲۰۱۴) بیشتر است که می‌تواند به دلیل تفاوت در نمونه‌گیری و تعداد نمونه‌های انتخاب شده باشد.

در پژوهشی که Bower و همکاران (۲۰۱۲) به منظور بررسی چندشکلی‌های ممکن ژن MSTN در اسب‌هایی از مناطق جغرافیایی مختلف انجام دادند، فراوانی آلل C این ژن را بسیار کمیاب گزارش کردند. این محققین ضمن معرفی هاپلوتیپ‌هایی از این ژن در ناحیه ای به طول Mb ۱/۹، فراوانی آلل C را در نمونه‌های کشورهای انگلستان، چک و ترکمنستان برابر صفر، و در روسیه، ترکیه، مصر و کامرون به ترتیب ۰/۰۶، ۰/۰۵، ۰/۰۸ و ۰/۳۳ گزارش کردند که نشان دهنده کمیاب بودن این آلل در مقابل آلل T است و با مطالعات تحقیق حاضر مطابقت دارد.

ساختار ژنتیکی جمعیت در نژادهای مورد مطالعه: در این تحقیق فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی برای مجموع تعداد ۱۲۰ راس اسب از نژادهای الدنبرگ، ترابرد، ترکمن و اسب کاسپین مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن مطابق جدول ۲ است. همچنین در این جدول فراوانی‌های ژنوتیپی مورد انتظار بر اساس روابط تعادلی و سطح احتمال مربوط به آزمون تعادل هاردی-واینبرگ بر اساس نرم افزار PopGene32 گزارش گردیده است. نتایج جدول ۲ نشان می‌دهد در تمام نژادهای مورد پژوهش از نظر جایگاه ژنی مورد نظر در این تحقیق تعادل هاردی واینبرگ برقرار است. این امر نشان می‌دهد عوامل برهم زننده تعادل لاکل در نمونه‌های تحقیق حاضر فاقد تاثیر بوده است و دلیل این امر می‌تواند کوچک بودن اندازه نمونه انتخاب شده باشد.

مطابق جدول ۲ ژنوتیپ TT در تمام نژادها دارای فراوانی بیشتری از ژنوتیپ‌های CT و CC بوده است. همچنین بر اساس نتایج جدول ۲ جمعیت مطالعه شده دارای فراوانی هموزیگوتی بیشتری نسبت به هتروزیگوتی است. در نژادهای الدنبرگ و ترابرد فراوانی هتروزیگوتی آنها نسبت به نژادهای ترکمن و اسب کاسپین بیشتر است. همچنین اسب کاسپین و ترکمن که نژادهایی بومی و خالص هستند از نظر میزان هتروزیگوتی ژن میوستاتین به هم نزدیکتر هستند. خواستگاه اصلی نژاد اسب کاسپین و ترکمن در شمال کشور ایران است. این نزدیکی جغرافیایی می‌تواند علت مشابهت بیشتر فراوانی‌های ژنتیکی این نژادها باشد.

در پژوهشی بر روی چندشکلی‌های ممکن ژن MSTN در نژاد ترابرد در نمونه‌هایی متعلق به مناطق جغرافیایی مختلف نشان داده شد بین فراوانی‌های آللی در نمونه‌هایی متعلق به یک منطقه خاص از نظر آلل کمیاب (C) تشابه وجود دارد که می‌تواند دلیل خواستگاه نژادی و

جدول ۲- فراوانی ژنوتیپی (مشاهده شده و مورد انتظار) و آلی مشاهده شده در چهار نژاد مورد مطالعه بر اساس جایگاه پروموتور ژن MSTN و سطح احتمال مربوط به آزمون برقراری تعادل هاردی واینبرگ

Table 2. Genotype (observed and expected) and observed allele frequency in four studied breeds for Promoter region of MSTN gene and the probability level for Hardy-Weinberg Equilibrium test.

Breed	Frequency	Genotype (Observed)			Genotype (Expected)			Allele		Probability
		TT	CT	CC	TT	CT	CC	T	C	
Oldenburg		0.63	0.37	0	0.67	0.30	0.03	0.82	0.18	0.24
Thoroughbred		0.60	0.40	0	0.64	0.32	0.04	0.80	0.20	0.19
Turkmen		0.93	0.07	0	0.94	0.05	0.01	0.97	0.03	0.89
Caspian pony		0.80	0.20	0	0.81	0.18	0.01	0.90	0.10	0.58

وزن کشور ایتالیا رابطه بین دو چندشکلی ناحیه پروموتور ژن MSTN را با سه صفت اندازه بدنی و ۱۴ صفت خطی تیپ معنی‌دار گزارش کردند.

یافته‌های تحقیق حاضر در خصوص عرض سینه نشان می‌دهد در هیچ یک از نژادهای مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های مختلف ژن MSTN وجود نداشت (جدول ۳). در عین حال می‌توان گفت غیر از نژاد تروبرد، در دیگر نژادها ژنوتیپ CT از عرض سینه بیشتری نسبت به ژنوتیپ TT برخوردار بود، ولی این تفاوت‌ها غیر معنی‌دار است. اسب‌هایی که از عرض سینه‌ی بیشتری برخوردارند، دارای شش‌های حجیم‌تری بوده و هرچه شش‌ها حجیم‌تر باشد حجم اکسیژن بیشتری توسط حیوان دریافت می‌شود. این عامل باعث بالا رفتن استقامت حیوان می‌گردد (Sabbioni *et al.*, 2005). با توجه به جدول ۳ نژاد الدنبرگ نسبت به دیگر نژادها از اندازه‌ی عرض سینه‌ی بیشتری برخوردار بوده که همین عامل باعث بالا رفتن استقامت این نژاد می‌شود. در تحقیقی که توسط Hill و همکاران (۲۰۱۰) بر روی جایگاه اینترون ۱ ژن میوستاتین در اسب‌های تروبرد انجام شد، به این نتیجه رسیدند که اسب‌هایی که دارای ژنوتیپ TT هستند، در مسابقات، بهترین اسب‌ها برای مسافت‌های کوتاه هستند و در واقع این اسب‌ها از استقامت بیشتری نسبت به دیگر اسب‌ها برخوردارند و همانطور که بیان شد، یکی از صفاتی که در بالا رفتن استقامت در اسب تاثیر گذار است ابعاد سینه است و این نتیجه با یافته‌های تحقیق حاضر که در آن افراد TT نژاد

ارتباط چندشکلی ژن میوستاتین با صفات ریخت‌شناسی: جدول ۳ مقادیر میانگین‌های حداقل مربعات و اشتباه معیار را برای صفات ریخت‌شناسی مطالعه شده بین دو ژنوتیپ شناسایی شده ژن MSTN به صورت مجزا در ۴ نژاد اسب مورد تحقیق، نشان می‌دهد. اگر چه صفات ریخت‌شناسی اندازه‌گیری شده بین نژادهای مورد مطالعه به دلیل تفاوت‌های بین نژادی از تفاوت‌های معنی‌داری برخوردار است، ولی هدف تحقیق حاضر مقایسه بین ژنوتیپ‌ها در هر نژاد به صورت مجزا بوده است. نتایج جدول ۳ نشان می‌دهد با وجود برقراری تفاوت بین میانگین ژنوتیپ‌های هر نژاد، در بیشتر موارد تفاوت بین ژنوتیپ‌ها غیر معنی‌دار بوده است.

در پژوهشی که با استفاده از تکنیک توالی یابی مستقیم منجر به شناسایی SNP در لوکوس g.66493737C/T ژن MSTN گردید، نشان داده شد نوع آلل C یا T می‌تواند بر روی توانایی اسب‌های نژاد تروبرد در مسابقات موثر باشد. این تحقیق نشان داد اسب‌هایی با ژنوتیپ CC برای این لوکوس، عموماً در سرعت بالا برای مسافت‌های کوتاه (۱۰۰۰ تا ۱۶۰۰ متر)، اسب‌هایی با ژنوتیپ CT برای مسافت‌های متوسط (۱۴۰۰ تا ۲۴۰۰ متر) و اسب‌هایی با ژنوتیپ TT برای مسافت‌های زیاد (بالای ۲۰۰۰ متر) مناسب هستند (Bower *et al.*, 2012). در تحقیق دیگر Dall'Olio و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعات خود روی ۲۰۲ راس از اسب‌های سنگین



تروبرد از عرض سینه‌ی بیشتری برخوردار هستند، مطابقت دارد.

همانطور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود نژاد تروبرد نسبت به دیگر نژادها از ارتفاع قد بالاتری برخوردار است.

نتایج جدول ۳ در خصوص صفت ارتفاع از جدوگاه نشان می‌دهد، تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های شناسایی شده‌ی ژن میوستاتین با این صفت در هیچ یک از نژادها وجود ندارد. این در حالی است که به دلیل تفاوت‌های نژادی، بین نژادها تفاوت زیادی از نظر صفت ارتفاع جدوگاه برقرار است. در اسب کاسپین به دلیل اندازه کوچک جثه این مقدار کمترین و برای نژاد تروبرد بیشترین است. ارتفاع قد از جدوگاه در اسب‌های مسابقه‌ای و پرشی از اهمیت بالایی برخوردار است. هرچه ارتفاع قد از جدوگاه در این اسب‌ها بیشتر باشد، حیوان مسافت‌ها را در زمان کوتاه‌تری طی می‌کند و همین عامل باعث بهبود عملکرد در اسب‌های مسابقه‌ای می‌شود.

در تحقیقی که توسط Hasler و همکاران (۲۰۱۲) بر روی ژن LOCRL صورت گرفت، ۲ آلل C و T شناسایی شد و مشخص شد که آلل C باعث بالا رفتن ارتفاع قد در اسب‌ها می‌شود، همچنین ارزش اصلاحی آلل C در آن تحقیق حدود یک سانتیمتر محاسبه شد. در تحقیق حاضر در سه نژاد الدنبرگ، تروبرد و ترکمن ژنوتیپ CT از ارتفاع بیشتری نسبت به TT برخوردار بوده است، ولی این تفاوتها غیر معنی‌دار است.

در تحقیقی که توسط Hill و همکاران (۲۰۱۰) بر روی اینترون ۱ ژن میوستاتین در اسب‌های نژاد تروبرد صورت گرفت، مشخص شد که اسب‌های دارای ژنوتیپ CC، اسب‌هایی سرعتی هستند. بالا بودن ارتفاع قد از جدوگاه یکی از عواملی است که می‌تواند باعث بالا رفتن سرعت در این اسب‌ها شود. طول اندام‌های حرکتی یکی از عواملی است که در ارتفاع بدن از جدوگاه موثر است، به همین دلیل در اسب‌هایی با ارتفاع بیشتر به دلیل طول بیشتر اندام‌های حرکتی، امکان بالاتر بودن سرعت فراهم خواهد بود. در اسب‌های پرشی هرچه ارتفاع قد از جدوگاه بیشتر باشد اسب‌ها به راحتی از موانع عبور می‌کنند.

نتایج جدول ۳ در خصوص صفت عرض کپل نشان می‌دهد بین افراد با ژنوتیپ CT و TT از نظر این صفت تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. در عین حال غیر از ترکمن در سایر نژادها ژنوتیپ TT از عرض کپل بیشتری از افراد با ژنوتیپ CT برخوردار است. نژاد الدنبرگ با توجه به اینکه سنگین ترین نژاد خون‌گرم آلمان است، همانطور که قابل انتظار است، از اندازه‌ی عرض کپل بیشتری نسبت به دیگر نژادهای مورد مطالعه در این تحقیق برخوردار بوده است. صفت عرض کپل در اسب‌های مسابقه علاوه بر اینکه تحت تاثیر عواملی مانند نوع خوراک و دیگر شرایط محیطی است تحت تاثیر تمرینات بدن سازی اسب‌ها نیز است. کپل عامل اصلی حرکت حیوان است. این صفت در اسب‌های مسابقه‌ای از اهمیت بالایی برخوردار است و همچنین در اسب‌های بارکش هرچه کپل عضلانی‌تر باشد، مطلوب‌تر است (خلیلی، ۱۳۸۷).

جدول ۳- میانگین حداقل مربعات و انحراف معیار صفات ریخت‌شناسی (cm) در نژادهای مورد مطالعه

Table 3. The Least Square means (LSM) and standard errors (SE) for morphological traits (cm) in studied breeds

Breed	Genotype	Chest width	Height	Hip width	Neck circuit	Neck length
Oldenburge	TT	42.33±0.7	153.82±4.79	58.28±4.76	119.99±1.50	61.09±0.98
	CT	42.47±0.94	155.30±6.40	56.53±6.37	119.34±2.01	61.37±1.31
Thoroughbred	TT	38.28±0.75	160.40±5.13	41.65±5.10	114.26±1.61 <sup>a</sup>	58.01±1.05
	CT	36.89±0.93	161.09±6.34	39.20±6.30	109.87±1.99 <sup>b</sup>	57.81±1.29
Turkmen	TT	35.66±0.58	152.69±3.98	37.44±3.96	112.91±1.25	53.89±0.82
	CT	35.73±2.20	156.09±15.02	38.87±14.93	112.54±4.71	57.54±3.08
Caspian pony	TT	27.54±0.7	119.13±4.76	33.78±4.73	87.59±1.49 <sup>a</sup>	41.03±0.98
	CT	28.40±1.26	119.05±8.58	30.15±8.53	81.38±2.69 <sup>b</sup>	39.91±1.76

<sup>ab</sup> means with significant difference in each breed group ( $P<0.05$ ).

حاضر نشان می‌دهد که می‌توان از چندشکلی‌های ژن MSTN به عنوان یک ژن کاندیدا در شناسایی تفاوت‌های موجود در پتانسیل ژنتیکی نژادهای اسب استفاده نمود. با این حال مطالعه در خصوص سایر ژن‌های مرتبط و در یک نمونه‌ی بزرگتری از جامعه می‌تواند از نظر نتایج، سودمندتر باشد.

### نتیجه گیری کلی

این تحقیق اولین پژوهش بین چندشکلی‌های ژن MSTN با صفات ریخت‌شناسی در چهار نژاد اسب در کشور است. نتایج نشان داد در جایگاه پروموتور ژن مورد مطالعه و در همه نژادها چندشکلی وجود دارد. در هیچ یک از نژادها آلل C شناسایی نگردید و جامعه در تعادل هاردی واینبرگ بوده است. همه صفات ریخت‌شناسی مورد مطالعه در این تحقیق در برنامه‌های انتخاب اسبها برای مسابقات موثر هستند و نهایتاً طول عمر اقتصادی اسبها را تحت تاثیر قرار می‌دهند. در این تحقیق غیر از صفت محیط گردن در نژاد تروبرد و اسب کاسپین، تفاوت معنی‌داری حاصل نگردید با این حال تلاش برای یافتن آلل موثر و مطلوب برای صفات ریخت‌شناسی نیازمند انجام تحقیق در نمونه بزرگتر و تکنیک‌های مولکولی موثر تر نظیر SNP و مطالعات بیان ژن خواهد داشت.

مقایسه‌ی بین ژنوتیپ‌های شناسایی شده ژن میوستاتین برای صفت محیط گردن مطابق جدول ۳ نشان می‌دهد برای دو نژاد تروبرد و اسب کاسپین، ژنوتیپ TT از برتری معنی‌دار نسبت به ژنوتیپ CT برخوردار است ( $P < 0.05$ ). در دو نژاد الدنبرگ و ترکمن نیز برای ژنوتیپ TT محیط گردن بیشتر ولی تفاوت‌ها غیر معنی‌دار بوده است. نژاد الدنبرگ نسبت به سایر نژادها از محیط گردن بیشتری برخوردار است که با سنگین وزن بودن این نژاد در ارتباط است. همچنین طول گردن نیز در این نژاد بیشتر از سایر نژادها است. طول گردن، محیط گردن، شکل گردن و نحوه‌ی اتصال آن به بدن از جمله شاخص‌های مهم در ارزیابی این عضو محسوب می‌شود. معمولاً در اسب‌های مسابقه‌ای اندازه‌ی بزرگتر طول و محیط دور گردن ترجیح داده می‌شود. این خصوصیت نیز به شدت تحت تاثیر نوع نژاد قرار می‌گیرد (Dario et al., 2006).

صفات ریخت‌شناسی جزء صفات چند ژنی محسوب می‌شوند که بروز نهایی آنها تحت تاثیر همزمان محیط و اثر پلی‌ژن‌ها قرار دارد. این صفات شکل و خصوصیات ظاهری حیوانات و نهایتاً توانایی او را تحت تاثیر قرار می‌دهند. توانایی‌های حرکتی و خصوصیات فیزیولوژیکی نیز تحت تاثیر این مجموعه صفات قرار دارد. شناسایی اسب‌هایی که از نظر مجموعه این صفات کامل باشند یکی از اهداف مهم اصلاح نژاد اسب محسوب می‌شود. تحقیق

### فهرست منابع

- امانلو و. ۱۳۸۴. ژنتیک اصلاح دام. ترجمه، انتشارات دانشگاه زنجان. ص ۵۸۴-۵۹۵.
- خلیلی م. ۱۳۸۷. اسب و آنچه من می‌دانم. نشر ذره. ص ۸-۲۹۰.
- صوفی ب.، محمد آبادی م.، شجاعیان ک.، باقی زاده ا.، فراستی س.، عسکری ن. و دیانی ا. ۱۳۸۸. ارزیابی چندشکلی ژن میوستاتین در گوسفند نژاد سنجابی با استفاده از روش PCR-RFLP. مجله پژوهش‌های علوم دامی. جلد ۱۹ شماره ۱. ص ۸۲.
- Baron E. E., Lopes M. S., Mendonca D. and da Ca^mara Machado A. 2011. SNP identification and polymorphism analysis in exon 2 of the horse myostatin gene. *Animal Genetics*. 256-259.
- Binns M. M., Boehler D. A. and Lambert D. H. 2010. Identification of the myostatin locus (MSTN) as having a major effect on optimum racing distance in the Thoroughbred horse in the USA. *Animal Genetics*. 154-158.
- Bower M.A., McGivney B. A., Campana M.G., Gu J., Andersson L. S., Barrett E., Davis C.R., Mikko S., Stock F., Voronkova V., Bradley D. G., Fahey A. G., Lindgren G., MacHugh D. E., Sulimova G. and Hill E. W. 2012. The genetic origin and history of speed in the Thoroughbred racehorse. *Nature*. 3:643. DOI: 10.1038
- Bowling A.T. and Ruvinsky A. 2000. Genetic aspect of domestication, breeds and their origins in *The Genetics of the Horse*. CAB International, Oxfordshire, UK.
- Chowdhary B. P. 2013. *Equine genomics*. wiley-blackwell. 272-275

- Dall'Olio S., Fontanesi L., Costa L. N., Tassinari M., Minieri L. and Falaschini A. 2010. Analysis of Horse Myostatin Gene and Identification of Single Nucleotide Polymorphisms in Breeds of Different Morphological Types. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. doi:10.1155/2010/542945
- Dall'Olio S., Wang Y., Sartori C., Fontanesi L. and Mantovani R. 2014. Association of myostatin (MSTN) gene polymorphisms with morphological traits in the Italian Heavy Draft Horse breed. *Livestock Science*. 160: 29-36.
- Dario C., Carnicella D., Dario M. and Bufano G. 2006. Morphological evolution and heritability estimates for some biometric traits in the Murgesse horse breed. *Genetics and Molecular Research*. vol. 5, no. 2, pp. 309-314.
- Hasler H., Flury C., Haase B., Burger D., Simianer H., Leeb T. and Rieder S.A. 2012. Genome-Wide Association Study Reveals Loci Influencing Height and Other Conformation Traits in Horses. *PLOS ONE*. Volume 7. e37282.42
- Hill E.W., Gu J., Eivers S.S., Fonseca R.G., McGivney B.A., Govindarajan P., Orr N., Katz L.M. and MacHugh D. 2010. A sequence polymorphism in MSTN predicts sprinting ability and racing stamina in thoroughbred horses. *PLOS ONE*. 5, e8645.
- McGivney B. A., Browne J. A., Fonseca R.G., Katz L.M., MacHugh D. E., Whiston R. and Hill E.W. 2012. MSTN genotypes in Thoroughbred horses influence skeletal muscle gene expression and racetrack performance. *Animal Genetics*. 82-87.
- Sabbioni A., Beretti V. and Zanon A. 2005. Morphological evolution of Bardigiano horse. *Italian Journal of Animal Science*. vol. 4, no. 2, pp. 412-414.
- SAS Institute Inc. 2004. SAS Propriety Software Release 9.1 of the SAS® System for Microsoft Windows. SAS Institute Inc., Cary. USA.
- Stefanuk M., Kaczor U., Augustyn R., Gurgul A., Kulisa M. and Podstawski Z. 2014. Identification of a New Haplotype with in the Promoter Region of the MSTN Gene in Horses from five of the most Common Breeds in Poland. *Folia Biologica*. vol.62. No3.43.
- Tozaki T., Hill E.W., Hirota K., Kakoi H., Gawahara H., Miyake T., Sugita S., Hasegawa T., Ishida N., Nakano Y. and Kurosawa M. 2011. A cohort study of racing performance in Japanese Thoroughbred racehorses using genome information on ECA18. *Animal Genetics*. 42-52.



## Identification of Myostatin gene polymorphism by PCR-RFLP and its association with some morphological traits in some horse breeds

A. Noshary<sup>1\*</sup>, A. Lavvaf<sup>2</sup>

1. Assistant Professor, Animal Science Group, Agriculture Faculty, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, IRAN

2. Associate Professor, Animal Science Group, Agriculture Faculty, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, IRAN

(Received: 8-10-2016 – Accepted: 1-30-2017)

### Abstract

The morphological traits are polygenic and are affected by environment and polygenes, at the sametime. In this study, the Myostatin gene polymorphism in promoter region (MSTN) and its association with some morphological traits were studied in 120 random selected horses of Oldenburg, Turkmen, Thoroughbred and Caspian pony. After extraction of genomic DNA, PCR was done for 204 bp region of MSTN. The PCR-RFLP method according by *Ssepl* was done for sample genotyping. The results showed that there are two TT and CT genotypes and T and C alleles for MSTN promoter locus in research samples. The MSTN genotypes had no significant effect on none of the chest width, height, hip and neck length traits across all studied breeds. The neck circuit for Thoroughbred and Caspian pony were 114.26 and 87.59 cm in TT genotype and 109.87 and 81.38 cm in CT genotype, respectively and differences were significant. In Oldenburg and Turkmen the TT genotype showed better performances for neck circuit however differences were no significant. In conclusion, there was polymorphism in the studied promoter region in all studied breeds and the MSTN polymorphism, as a candidate gene, can be used to identify the gentic potential differences in horse breeds.

**Keywords:** Caspian pony, Oldenburg, Turkmen, Thoroughbred, Myostatin

\*Corresponding author: alireza.noshary@kiaou.ac.ir