



## بررسی چند شکلی ژن میوستاتین (MSTN) در اسب های ترکمن ایران

### Study on MSTN Gene Polymorphism in Iranian Turkmen Horses

آریا ساعدی<sup>1\*</sup> - مجتبی آهنی آذری<sup>2</sup> - سعید حسنی<sup>3</sup> - علیرضا حسنی بافرانی<sup>4</sup>

<sup>4</sup> Ariya Saedi<sup>1\*</sup> - Mojtaba Ahani Azari<sup>2</sup> - Saeed Hasani<sup>3</sup> - Alireza Hasani Bafarani

1- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان  
(\* - نویسنده مسئول ( Email: [Hirkanhorse@yahoo.com](mailto:Hirkanhorse@yahoo.com) )

2- دانشیار، دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان [Mojtaba\\_9@yahoo.com](mailto:Mojtaba_9@yahoo.com)

3- دانشیار، دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان [Saeedh\\_2000@yahoo.com](mailto:Saeedh_2000@yahoo.com)

4- استادیار، مؤسسه آموزش عالی علمی و کاربردی جهاد کشاورزی [Ar.hasani@Gmail.com](mailto:Ar.hasani@Gmail.com)

#### چکیده

روش های نوین مولکولی بر تجزیه و تحلیل ژنوم متمرکز است، تا اطلاعات جدیدی را برای ارزیابی صفات مهم اقتصادی در حیوانات مزرعه ای فراهم آورد. یکی از صفات مهم و اقتصادی در اسبها، سرعت دویدن آنهاست. یکی از ژن های تاثیر گذار بر روی صفت دویدن اسبها، ژن میوستاتین است. این ژن برای اولین بار در اسب تارو برد و بر روی کروموزوم 18 شناسایی شد. ژن میوستاتین تنظیم کننده رشد ماهیچه اسکلتی در طیفی از گونه های پستانداران مانند اسب می باشد. این ژن تنظیم کننده هم تعداد و هم رشد فیبرهای عضله می باشد. ژن میوستاتین در حیوانات اهلی به منظور پیش بینی عملکرد، شایستگی و موفقیت در رقابت از نظر تجاری مهم باشد. جهش در ژن میوستاتین باعث افزایش توده عضلانی و همچنین باعث کمک در عملکرد بهتر سرعت در اسبها و سگهای مسابقه ای با ژنوتیپ هتروزیگوت می شود. در این تحقیق پس از تهیه نمونه خون از 103 رأس اسب ترکمن، استخراج DNA با استفاده از کیت تجاری انجام شد. پس از استخراج DNA قطعه 600 جفت بازی در ناحیه پروموتور ژن میوستاتین با روش PCR تکثیر شد. شناسایی ژنوتیپ ها به روش تعیین اندازه قطعات محصول PCR بر روی ژل آگارز 2 در صد انجام گرفت. با توجه به عدم مشاهده چند شکلی و مونوفورف بودن حیوانات بلحاظ این جایگاه، و در نهایت هر چند نتیجه تحقیق حاضر در 103 رأس اسب انجام گردید ولی احتمالاً در تمامی اسب های این نژاد چند شکلی وجود ندارد و برای انتخاب حیوانات برتر لازم است سایر جایگاه های ژنی مرتبط با سرعت مورد مطالعه قرار گیرند.

واژگان کلیدی: اسب ترکمن، ژن میوستاتین، چند شکلی

#### مقدمه

از حدود 5000 تا 6000 سال پیش، انسان برای تامین نیاز خود، آمیزش اسب ها را بر اساس اهداف خود انجام داده است. این امر که به انتخاب مصنوعی معروف است سبب تغییر ژنتیکی در جوامع اسب ها و در نتیجه، تولید حیواناتی با توانایی های مورد انتظار بوده است



(مریدی و همکاران، 1391). امروزه نژادهای مختلفی از اسب در جهان وجود دارد که از نظر نوع فعالیت، تیپ، رنگ، وزن، شکل و غیره با یکدیگر تفاوت‌های زیادی دارند (گلشن و رجبی، 1384). نژادهای بومی در هر کشور به عنوان سرمایه ملی تلقی گشته و حفظ و تکثیر آنها از ارزش و اهمیت زیادی برخوردار است. سرزمین پهناور ایران به علت شرایط خاص جغرافیایی دارای اقلیم‌های متنوعی است، در چنین شرایطی انتخاب‌های طبیعی و مصنوعی موجب شده است که نژادهای حیوانات اهلی با استعداد‌های متنوع در این کشور بوجود آید (بهریزی نیا و همکاران، 1390). ایران دارای حدود 155 هزار رأس اسب می باشد. جمعیت‌های تشکیل دهنده اسب‌های بومی ایران شامل اسب‌های عرب، ترکمن، کرد، و اسپچه خزر می باشد (مریدی و همکاران، 1391). یکی از ارزش‌ترین نژادهای اسب ایران، اسب ترکمن است. این اسب در منطقه شمال شرقی ایران در استان‌های گلستان و خراسان شمالی توسط اقوام ترکمن پرورش می یابد. اندام متناسب، بدن کشیده و با ظرافت، اندام حرکتی مستحکم و در عین حال ظریف، نیم رخ صاف یا برجسته، بخلوق کوتاه، سینه باریک و پشت و کمر کوتاه و مستقیم، گردن طویل و به لحاظ وزنی میان وزن بودن از خصوصیات این نژاد است. اسب ترکمن دارای تیره‌های یموت، گوگلان و آخال تکه می باشد، که هر یک از این تیره‌ها نسبت به سایرین تفاوت‌های جزئی را از خود نشان می دهند ولی اکثراً از نظر کار آبی یکسان هستند (خلیلی، 1387). روش‌های نوین مولکولی بر تجزیه و تحلیل ژنوم متمرکز است، تا عرضه و اطلاعات جدیدی را برای ارزیابی صفات مهم اقتصادی در حیوانات مزرعه‌ای فراهم آورد (Madeja et al, 2004). یکی از صفات اقتصادی و مهم مورد اندازه‌گیری در اسبها سرعت دویدن آنهاست (خلیلی، 1387). یکی از ژن‌های تاثیر گذار بر روی صفت دویدن اسبها، ژن میوستاتین است. این ژن برای اولین بار در اسب تاروبرد و بر روی کروموزوم 18 شناسایی شد (Hill et al, 2010). ژن میوستاتین از 3 اگزون و 2 اینترون ساخته شده است (Dall'Olio et al, 2010). شواهد علمی اخیر اظهار دارند که ژن میوستاتین تنظیم کننده رشد ماهیچه اسکلتی در طیفی از گونه‌های پستانداران مانند اسب می باشد (McPherron, and Lee, 1997). این ژن تنظیم کننده هم تعداد و هم رشد فیبرهای عضله می باشد (HILL et al, 2011). براساس تحقیقات انجام شده آنالیز جایگاه ژن میوستاتین می تواند به شدت برای پیش‌گویی عملکرد حیوانات و تاثیر اصلاح نژاد بسیار سودمند باشد (Hill et al, 2010). پژوهش در مکانیسم عمل میوستاتین نشان داده که میوستاتین به شدت شکل اندام استقامتی، بویژه در فرم غیر فعال آن تحت تأثیر قرار می دهد (Tozaki et al, 2011). مطالعات دانشمندان نشان داده اسپهایی که فاقد آلل‌های وحشی ژن میوستاتین می باشند عضلات بزرگ و قابل توجهی دارند (Cash et al, 2009). جهش در ژن میوستاتین گونه‌های مختلف پستانداران با افزایش ماهیچه‌ها در ارتباط است که این موضوع می تواند قدرت عملکردی را افزایش دهد (Deveaux et al, 2001). جهش‌های طبیعی ژن میوستاتین اسب در اگزون، اینترون و نواحی تنظیمی شناسایی شده است (Hill et al, 2010). بنابراین ژن میوستاتین در حیوانات اهلی به منظور پیش‌بینی عملکرد، شایستگی و موفقیت در رقابت می تواند از نظر تجاری مهم باشد، بدلیل اینکه ژن میوستاتین به افزایش فیبرهای عضلانی در طیف وسیعی از گونه‌های پستانداران کمک می کند. کاهش یا جهش میوستاتین در اطراف توالی کد کننده ژن میوستاتین باعث افزایش توده عضلانی در اسکت، بویژه در شانه‌ها و ران‌ها می شود (Pherron, and Lee, 1997). و از این طریق باعث کمک در عملکرد بهتر سرعت در سگهای مسابقه‌ای با ژنوتیپ هتروزیگوت می شود (Mosher et al, 2007). در پژوهشی در اسبهای تاروبرد ژن میوستاتین در 3 گروه مخصوص سازمان دهی شد (C:C, C:T, T:T). نتیجه گرفته شد که اسبهای دارای ژنوتیپ (T:T) در مسافت‌های متوسط به بالا، اسب‌های دارای ژنوتیپ (C:T) در مسافت‌های متوسط و اسب‌های دارای ژنوتیپ (C:C) در مسافت‌های کوتاه موفق‌تر هستند (Hill et al, 2010).

با توجه به اهمیت و تاثیر ژن میوستاتین بر سرعت اسب و اهمیت استفاده اسب ترکمن در مسابقات اسبدوانی و عدم بررسی ژن مذکور در اسب‌های بومی ایران به ویژه اسب ترکمن، تحقیق حاضر با هدف بررسی وجود چند شکلی ژن میوستاتین در اسب ترکمن صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

خونگیری



در این آزمایش، از 103 رأس اسب ترکمن موجود در استانهای گلستان و خراسان شمالی که ریجستر شده فدراسیون سوارکاری می باشند، به صورت تصادفی خونگیری به عمل آمد. خونگیری پس از مقید کردن اسب با روش های رایج از سمت چپ و با استفاده از نوجکت های ی وکیوم دار حاوی EDTA به میزان 5 سی سی از رگ گردن انجام شد. نمونه های جمع آوری شده در مخزن حاوی یخ نگهداری و به آزمایشگاه ژنتیک دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شدند.

### استخراج DNA و تعیین ژنوتیپ

به منظور افزایش دقت کار و کیفیت مطلوب نمونه های DNA، استخراج DNA با استفاده از کیت DIATOM DNA Prep100 انجام شده و جهت ارزیابی کمیت و کیفیت DNA بدست آمده از ژل آغاز 0/8 درصد استفاده گردید. DNA های ژنومی استخراج شده با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی (جدول-1) مورد استفاده قرار گرفت. واکنش زنجیره ای پلی مرز برای ناحیه پروموتور ژن میوستاتین در حجم 20 میکرولیتر انجام گرفت، به طوری که برای هر واکنش، 9 میکرولیتر master mix، 2 میکرولیتر DNA با غلظت 10-80 نانو گرم در میکرولیتر، 2/5 میکرو لیتر مخلوط آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت 10 پیکومول بر میکرو لیتر و 6 میکرو لیتر آب فاقد یون باهم مخلوط شدند. سپس میکروتیوپ های حاوی نمونه به مدت چند ثانیه با دور 10000rpm سانتریفیوژ شدند. بعد از اتمام سانتریفیوژ، یک قطره روغن معدنی به هر نمونه اضافه شد تا از تبخیر محتویات میکروتیوپ جلوگیری شود. پروفیل حرارتی واکنش زنجیره ای پلیمرز شامل یک مرحله ابتدایی واسرشته سازی در دمای 95 درجه سانتیگراد به مدت 5 دقیقه و 35 چرخه اصلی واکنش (واسرشته سازی در دمای 95 درجه سانتیگراد به مدت 30 ثانیه، اتصال آغازگر به رشته الگو در دمای 58 درجه سانتیگراد به مدت 30 ثانیه و بسط آنزیمی در دمای 72 درجه سانتیگراد به مدت 60 ثانیه) و مرحله بسط آنزیمی نهایی در دمای 72 درجه سانتیگراد به مدت 9 دقیقه اجرا شد.

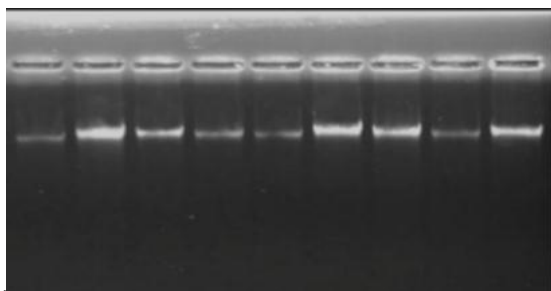
(Hill et al, 2010) و (Dall'Olio et al, 2014). پس از تکثیر، جهت اطمینان از تکثیر ژن مورد نظر، 4 میکرولیتر محصول PCR به همراه 2 میکرولیتر Loading buffer پس از مخلوط شدن، در چاهک مربوطه ژل آغاز 2٪ ریخته شد و برای رؤیت باند و عکس برداری از دستگاه ژل داگ استفاده شد. تعیین ژنوتیپ بر اساس تعیین اندازه محصول PCR انجام شد. اسبهای دارای باند در ناحیه 600 جفت بازی دارای ژنوتیپ (TT)، اسبهای دارای باند در ناحیه 827 جفت بازی دارای ژنوتیپ (CC) و اسبهای دارای باند در هر دو ناحیه 600 و 827 جفت بازی دارای ژنوتیپ (TC) خواهند بود (Hill et al, 2010) (Dall'Olio et al, 2014).

جدول 1- توالی آغازگر های به کار رفته در واکنش زنجیره ای پلیمرز

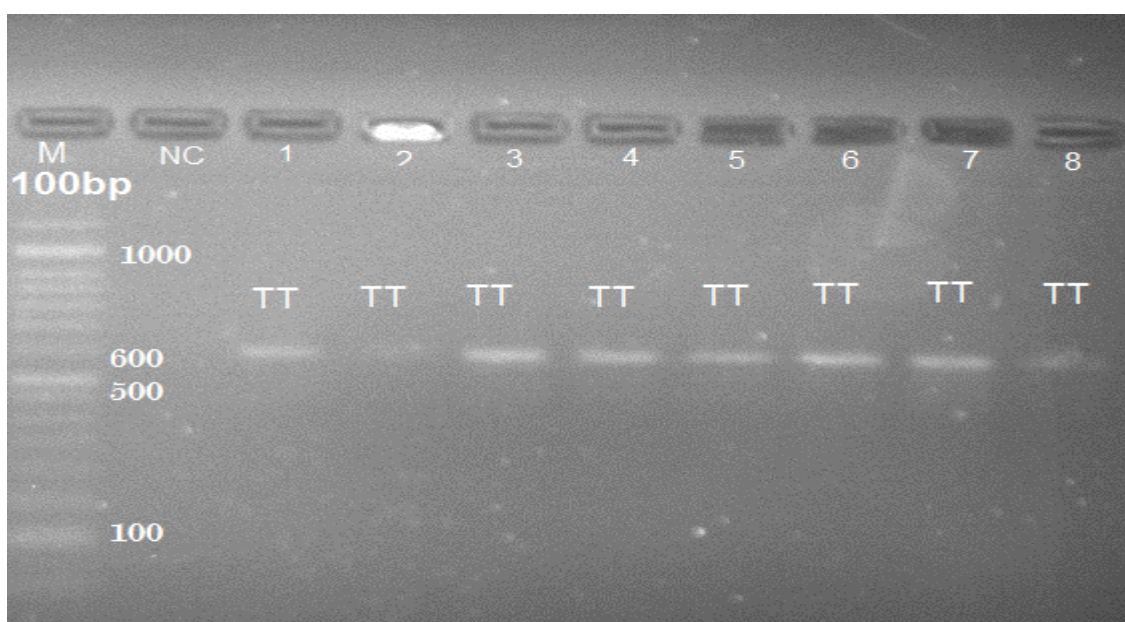
نام ژن	توالی آغازگر	اندازه قطعه	موقعیت	منبع
MSTN	F: 5' - ATC AGC TCA CCC TTG ACT GTAAC -3'	۶۰۰	پروموتور	(Dall'Olio et al, 2014) (Hill et al, 2010)
	R: 5' - TCA TCT CTC TGG ACA TCG TACTG -3'			

### نتایج

نتیجه الکتروفورز محصولات استخراج DNA با ژل آغاز وجود باند با کیفیت مطلوب را نشان داد که مشخص نمود که عمل استخراج DNA به خوبی انجام شده است (شکل 1). مشاهده باند در موقعیت 600 جفت بازی نشان دهنده تکثیر مناسب قطعه انتخاب شده در دمای مذکور و صحت انجام PCR بود. اگر چه سه نوع ژنوتیپ TC، TT و CC قابل انتظار بودند، اما در این تحقیق همه افراد دارای ژنوتیپ TT بودند و هیچ جهشی در این ژن مورد شناسایی قرار نگرفت (شکل 2). به عبارت دیگر در این تحقیق تنها آل T با فراوانی 1 مشاهده گردید.



شکل 1- DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز 0/8 درصد



شکل 2- نتایج الکتروفورز محصولات PCR ژن میوستاتین روی ژل

آگارز 2درصد، M100: نشانگر استاندارد، NC: کنترل آلودگی

#### بحث و نتیجه‌گیری

برخی محققین چند شکلی های ژن میوستاتین را در تعدادی از نژادهای اسب شناسایی و مطالعه کرده اند. در این تحقیق چند شکلی ژن میوستاتین در ناحیه پرموتور، با روش تعیین ژنوتیپ با استفاده از تعیین اندازه قطعات محصول PCR مورد بررسی قرار گرفت. دلیل مطالعه این ناحیه از ژن مورد نظر این بوده است که تحقیقات انجام شده بر روی نژادهای مختلف اسب نشان داده که چند شکلی این ژن اثر زیادی بر صفت دویدن دارد. در این تحقیق ژنوتیپ TT با فراوانی 1 مشاهده گردید، ولی ژنوتیپ های TC و CC دیده نشد. فراوانی آلل T در این تحقیق بیشتر از فراوانی آلل C بود که با نتایج اکثر محققین مطابقت دارد. به عنوان مثال فراوانی آلل T در اسبهای ترکمن روسیه و ترکمنستان 1 (Bower et al, 2012)، در نژادهای Rapid Heavy، Lipizzan، Spanish Purebred و Italian Trotter 1 (Dall'Olio et al, 2014)، در نژاد Standardbred 1، در نژاد French Trotter 0/99، در نژاد Connemara 0/91، در نژاد Egyptian Arabian 0/92 و در نژاد Draught Irish 0/80 (Bower et al, 2012)، در نژاد Murgese 0/92 و در نژاد Ventasso 0/94 (Dall'Olio et al, 2010) گزارش شده است. نتایج فوق با نتایج Dall'Olio et al, 2014 برای اسبهای Quarter Horse (0/20)، Hill et al, 2010 برای اسبهای Thoroughbred (0/30) و Bower et al,



2012 برای اسپه‌ای Shetland (0/50) مطابقت نداشت. علت این شباهت ها و تفاوت ها را می توان در اختلافات جزئی نوع نژادها و جهش های جایگاه فوق جستجو کرد.

بر اساس نتایج به دست آمده، فراوانی آلل های T و C در ژن میوستاتین در نژاد ترکمن به ترتیب 1 و 0 به دست آمد. احتمالا عوامل متعددی مانند کم بودن جمعیت مورد مطالعه، تلاقی های نزدیک، تشکیل ساختار ژنتیکی ناشی از اتخاذ استراتژی های متفاوت انتخاب محلی و سنتی، کم بودن تنوع ژنتیکی در جمعیت مورد مطالعه ( بهروزی نیا و همکاران، 1390 ) و یا انتخاب علیه حیوانات ناخالص، باعث به دست آمدن این نتیجه باشد. در نهایت با توجه به اهمیت حفظ نژادها ی بومی به ویژه اسب ترکمن و نقش مهم ژن میوستاتین در صفت دویدن اسبها بهتر است مطالعات بیشتری با افزایش تعداد حیوان صورت پذیرد تا فراوانی های آللی و ژنوتیپی به طور دقیق تری برآورد شود و بتوان در خصوص مونوفورف بودن تمامی اسب های نژاد ترکمن با قاطعیت اظهار نظر نمود. با توجه به اقتصادی بودن عملکردهای سرعت و پرش در اسب ها، پیشنهاد می گردد سایر ژن هایی که می توانند بر روی این صفات مؤثر باشند مورد مطالعه قرار گیرند.

#### منابع

- 1- بهروزی نیا، س.، میرحسینی، س.، ض.، افراز، ف.، سهرابی، ع.، محمدی، س.، ا.، شهبازی، ص.، و دلیرصفت، س. ب. 1390. توصیف ژنتیکی دو جمعیت اسب ترکمن ایرانی مناطق ترکمن صحرا و جرگلان با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره. نشریه پژوهش های علوم دامی ایران. جلد 3. شماره 1. ص 66 – 63.
- 2- خلیلی، م. 1387. اسب و آنچه من می دانم. انتشارات ذره. 690 صفحه.
- 3- گلشن، ع.، و رجبی، س. 1384. معرفی اسب ترکمن در ایران. انتشارات پژوهاک کیوان. 208 صفحه.
- 4- مریدی، م.، مسعودی، ع.، ا.، و واعظ ترشیزی، ر. 1391. مطالعه ساختار ژنتیکی اسب های بومی ایران با استفاده از توالی D-loop ژنوم میتوکندری. نشریه پژوهش های علوم دامی ایران. جلد 43. شماره 2. ص 182 – 173.

- 5- Bower, A., Sulimova, G., Lindgren, G., Barrett, E. And Hill, E. 2010. The genetic origin and history of speed in the Thoroughbred racehorse. *Veterinary Medical Science*. 12: 1617-1624.
- 6- Cash, J.N., Rejon, C.A., McPherron, A.C., Barnard, D. J. and Thompson, T.B. 2009. The structure of myostatin. (2009). 1662-1676.
- 7- Dall'Olio, S., Fontanesi, L., Costa, L., Tassinari, N., Minieri, M., and Falaschini, A. 2010. Analysis of horse myostatin gene and identification of single nucleotide polymorphism in breeds of different morphological types. *J. Biomedical Technology*. 10: 1155-1165.
- 8- Dall'Olio, Stefania, Scotti, Emilio. Fontanesi, Luca. AND Tassinari, Marco. (2014). Analysis of the 227 bp short interspersed nuclear element (SINE) insertion of the promoter of the myostatin (MSTN) gene in different horse breed. *Veterinaria Italiana*. VOL 50. NO 3. 193-197.
- 9- Deveaux, V. Cassar-Malek, I. and Picard, B. 2001. Comparison of contractile characteristics of muscle from Holstein and double-musclé Belgian Blue fetuses. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 131 (2001). 21-29.
- 10- Hill, E. W., Gu, J., and Eivers, S. S. 2010. A sequence polymorphism in MSTN predicts sprinting ability and racing stamina in thoroughbred horses. *PLoS ONE*. 5: 1371.
- 11- Hill, E. W., Fonseca, R. G., McGivney, B. A., Gu, J., Machugh, D.E., and Katz, L. M. 2011. MSTN genotype (g.66493737C/T) association with speed indices in Thoroughbred racehorses. *J. Applied Physiology*. 1: 86-90.

# GLOBAL CONFERENCE ON

## New Approaches in Agriculture and Environment

With the focus on Sustainable Development and Safe Production



- 12- Madeja, Z. Adamowicz, T. Chmurzynska, A. Jankowski, T. J. Melonek, J. Switonski, M. And Strabel, T. 2004. Effect of leptin gene polymorphisms on breeding value for milk production traits. *Journal of Dairy Science*, 87(11) 3925-3927.
- 13- McPherron, A. C., and Lee, S. J. 1997. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc. Natl. Academy of Science*. 23: 12457-12461.
- 14- Mosher, D.S., Ouignon, P., Bustamante, C.D., Sutter, N.B., and Mellersh, C.S. 2007. A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. *PLoS Genetics*. 3: 79.
- 15- Tozaki, T., Sato, F., Kurosawa, M., Hill, E. W., Miyake, T., Endo, Y., Kakoi, H., Gawahara, H., Hirota, K., Nakano, Y., and Nambo, Y. 2011. Sequence variants at the myostatin gene locus influence the body composition of Thoroughbred horses. *J. Veterinary Medical Science*. 12: 1617-1624.