بررسی چند شکلی ژنتیکی ژنهای کاندیدا در گوسفند قره گل

علی اصغر اسلمی نژاد- محمدرضا نصیری- فریدون افتخاری شاهرودی- رضا ولی زاده- علی جوادمنش- امیر نوروزی- علی سامعی- حیدر قیاسی[1]

تاریخ دریافت: ۸۳/۱۲/۱۶

چکیده

انتخاب حیوانات برتر بر اساس نشانگرهای مولکولی یکی از جدیدترین روشهای اصلاحی است که می تواند باعث بهبود صحت پیش بینی و پاسخ به انتخاب شود. در این آزمایش ژنهای کاندیدای کالپاستاتین، بتالاکتوگلوبولین و FecB که کنترل کننده صفات مهم اقتصادی نظیر تولید شیر، کیفیت و کمیت گوشت و دوقلوزایی می باشند در گوسفند قره گل بررسی شد. از ۱۰۰ گوسفند نژاد قره گل از ایستگاه اصلاح نژاد گوسفند قره گل واقع در سرخس بطور تصادفی خونگیری بعمل آمد. استخراج DNA از خون و واکنش زنجیره پلی مراز (PCR) جهت تکثیر ناحیه چند شکل ژنهای کالپاستاتین، بتا لاکتوگلوبولین و FecB انجام گرفت. واکنش های هضم آنزیمی قطعات تکثیر شده ژنهای کالپاستاتین، بتا لاکتوگلوبولین و FecB بترتیب بوسیله آنزیمهای محدودگر NcoI ، RsaI و AvaII انجام گردید. فراوانی آللهای M و N ژن کالپاستاتین در این نژاد بترتیب ۰/۹۴ و ۰/۰۶ و برای آللهای A و B بترتیب ۰/۸۹ و ۰/۱۱ در ژن بتا لاکتوگلوبولین بدست آمد. برای جایگاه ژنی FecB هیچ چند شکلی مشاهده نشد. آزمون χ^2 و G تعادل هاردی - واینبرگ را برای این دو جایگاه ژنی چند شکل در جمعیت مورد مطالعه نشان داد. هتروزیگوسیتی مشاهده شده، هتروزیگوسیتی مورد انتظار نی و متوسط هتروزیگوسیتی بترتیب ۰/۱۲ ، ۰/۱۱ و ۰/۱۱ محاسبه گردید. این نتایج تنوع ژنتیکی پایین ژنهای کالپاستاتین و بتالاکتوگلوبولین و عدم وجود تنوع را در ژن FecB نشان دادند.

واژه های کلیدی: گوسفند قره گل، کالپاستاتین، بتا لاکتوگلوبولین، FecB، چند شکلی، DNA.

مقدمه

اغلب مدلهای استفاده شده در ژنتیک کمی به بررسی اثر تجمعی ژنهایی می پردازند که مسؤل ایجاد تنوع در صفات می باشند و فرض اصلی ، تفکیک همزمان بسیاری از ژنهای کوچک اثر می باشد. این موضوع که همه ژنهای مؤثر بر صفات کمی اثرات جزئی داشته باشند مورد تردید است و ممکن است برخی از این ژنها سهم عمده ای از تنوع صفات را به خود اختصاص دهند. متخصصین ژنتیک مولکولی با تعیین ژنوتیپ دامها قادرند به طور مستقیم نشان دهند که چگونه تنوع فنوتیپی از تنوع ژنتیکی موجود در ژنوم موجود ناشی می شود. امروزه تکنیک های مولکولی و ژنتیک کمی بصورت مکمل یکدیگر استفاده می گردند (۲).

در سالهای اخیر توجه به افزایش و بهبود کیفیت گوشت بیشتر شده است. از نظر مصرف کنندگان تردی گوشت مهمترین فاکتور کیفی است (۲۳). تردی گوشت بعد از کشتار در لاشه بسیار متغیر است (۷). بنابراین شناخت مکانیزم های بیو شیمیایی تجزیه عضلات در سطح ملکولی ضروری به نظر می رسد. گزارشات متعددی، وجود ارتباط بین سطح کالپاستاتین در عضله و تردی گوشت را تأیید می کند (۸ و ۲۲). بنظر می رسد کالپاستاتین در تجزیه میوفیبریل ها مؤثر است (۲۰). هر چند تحقیقات بسیاری رابطه بین چند شکلی این ژن و صفات کیفیت لاشه را نشان داده اند، در عین حال در برخی از گزارشات رابطه بین چند شکلی این ژن و صفات رشد در گوسفند نیز مورد بررسی قرار گرفته است. طهمورث پور و همکاران (۳) و پالمر و همکاران (۱۹) بهترین ژنوتیپ برای افزایش وزن را در گوسفند AC معرفی کردند. ژنوتیپ AC بمیزان ۱۸٪ (۱۲۳ گرم در روز) افزایش وزن بیشتری نسبت به ژنوتیپ AA در گوسفند آمیخته دورست و کوپ ورث از خود نشان داده است. بنابراین وجود چند شکلی در ژن کالپاستاتین در گوسفند می تواند بعنوان یک نشانگر تولیدی و مرتبط با افزایش وزن و کیفیت گوشت مورد مطالعه قرار گیرد. ژن کالپاستاتین، روی کروموزوم شماره ۵ گوسفند قرار دارد

۱- به ترتیب استادیاران، استادان و دانشجویان سابق کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد.

(۲۰). بنظر می رسد استفاده از این نشانگر در انتخاب می تواند، دقت انتخاب ژنتیکی را برای تردی گوشت و همچنین افزایش وزن افزایش دهد.

چند شکلی های موجود در پروتئین های شیر نیز می تواند به عنوان نشانگر ژنتیکی بکار برده شود. بتالاکتوگلوبولین پروتئین اصلی آب پنیر شیر نشخوارکنندگان است. تحقیقات نشان داده که این پروتئین در بسیاری از نژادها دارای چندشکلی است. الل B ژن بتالاکتوگلوبولین با تولید بالای شیر در ارتباط است (۵) و در عوض الل A راندمان تولید پنیر را افزایش می دهد. به نظر می رسد که ژنوتیپ BB بتالاکتوگلوبولین با تولید بالای شیر و ژنوتیپهای AA و AB با میزان بالای کازئین و پروتئین در شیر همراه هستند (۱۲). آلل A و B در اسیدآمینه شماره ۲۰ با همدیگر اختلاف دارند (۱۳). این ویژگی در نتیجه جانشینی ساده یک باز در ژن بتالاکتوگلوبولین می باشد. نصیری و همکاران (۱۷) به بررسی چند شکلی ژن بتالاکتوگلوبولین در چند نژاد از گوسفندان روسیه و ایران پرداختند.

گوسفندانی که از نژاد برولا مشتق شده اند حامل جهشی اتوزومی بنام FecB (Booroola Fecundity) می باشند. بیش از دو دهه از شناسایی این ژن می گذرد و علیرغم تحقیقات بسیار هنوز هویت آن مشخص نشده است (۲۴). ژن برولا بین ژنهای SPP1 و الکل دهیدروژناز۲ بر روی کروموزوم شماره ۶ قرار دارد (۱۴). یافته های جدید نشان می دهد که چند قلوزایی در گوسفندانی که دارای ژن برولا(FecB) می باشند در نتیجه جهشی در بخشی از کروموزوم ۶ می باشد (۱۵) و حاوی ژن گیرنده پروتئین مورفوژنتیک استخوان IB[1] (BMPR-1B) می باشد. ژن BMPR-1B یکی از اعضای خانواده گیرنده فاکتور رشد B ترا ریختی را رمز می کند.

هدف از این آزمایش بررسی چند شکلی ژنتیکی ژنهای کاندیدای کالپاستاتین، بتالاکتوگلوبولین و FecB که کنترل کننده صفات مهم اقتصادی نظیر تولید شیر، کیفیت و کمیت گوشت و دوقلوزایی می باشند، در گوسفند قره گل بود.

مواد و روشها

نمونه گیری و استخراج DNA

تعداد ۱۰۰ نمونه خون از گوسفندان قره گل ایستگاه اصلاح نژاد قره گل واقع در شهرستان سرخس تهیه گردید. برای خون گیری از لوله های حاوی EDTA - ماده ضد انعقاد خون- استفاده گردید و دمای نمونه ها بلافاصله به ۴ درجه سانتیگراد رسانده شد. استخراج DNA از ۱۰۰ میکرولیتر خون مبتنی بر روش بوم و همکاران (۶) و استفاده از گوانیدین تیوسیانات - سیلیکاژل انجام گرفت. جهت تعیین کیفیت و کمیت DNA از روشهای الکتروفورزمقایسه ای و اسپکتروفتومتری استفاده گردید.

واکنش PCR

تکثیر ژن کالپاستاتین: باآغازگرهای اختصاصی زیر یک قطعه ۶۲۲ جفت بازی از اگزون وقسمتی از اینترون۱ ناحیه L ژن مربوطه در واکنش PCR تکثیر شدند.

Ovine1C:5´ TGGGGCCCAATGACGCCATCGATG 3

Ovine1D:5´GGTGGAGCAGCACTTCTGATCACC3

تکثیر ژن بتا لاکتوگلوبولین: برای تکثیر ژن بتالاکتوگلوبولین از آغازگرهای BLG1 و BLG2 با توالی زیر استفاده گردید.

BLG1(5´-CTCTTTGGGTTCAGTGTGAGTCTGG-3´)

BLG2(5´-CACCATTTCTGCAGCAGGATCTC-3´)

طراحی آغازگرهای فوق با استفاده از نرم افزار Primer Premier 5.0 و با توجه به توالی تعیین شده ژن که در بانک ژنی با کد X12817 ثبت شده است، انجام گرفت. این آغازگرهای برای تکثیر یک قطعه ۳۰۱ جفت بازی از اگزون دو ژن بتالاکتوگلوبولین گوسفند طراحی شده بودند.

تکثیر ژنFecB: جهت تکثیر قطعه پلی مورف ژن از آغازگرهایی که توسط دیویس و همکاران (۹) طراحی شده بود استفاده گردید. توالی آغازگرها عبارت بودند از:

TestR15:(5´-CAA GAT GTT TTC ATG CCT CAT GAA CAC GGT C-3´)

TestF2:(5´-CCA GAG GAC AAT AGC AAA GCA AA-3´)

واکنش زنجیره ای پلیمراز برای تکثیر نواحی چند شکل جایگاه ژنی کالپاستاتین، بتا لاکتوگلوبولین و FecB با ۳۵ چرخه (۹۴°C به مدت ۵۰ ثانیه برای واسرشته کردن، ۶۲°C به مدت ۳۰ ثانیه برای اتصال آغازگرها و ۷۲°C به مدت ۴۵ ثانیه برای امتداد زنجیره

1) Bone Morphogenetic Protein Recceptor IB

DNA) در دستگاه ترموسایکلر مدل T-personal شرکت بیومترا انجام گرفت. این واکنش در حجم ۲۰ میکرولیتر با محتویات (۲/۵میکرولیتر بافر PCR 10X، ۲/۵میلی مول MgCl2، ۲۰۰ میکرو مول مخلوط نوکلئوتیدها، ۴ میکرولیتر مخلوط آغازگرها (۱۰ پیکومول از هر آغازگر)، ۱ واحد از آنزیم Taq پلیمراز، ۱ میکرولیتر DNA استخراج شده با غلظت ۵۰ نانوگرم (باقیمانده تا حجم ۲۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر) صورت گرفت.

واکنش زنجیره ای پلیمراز برای تکثیر ژن FecB مطابق با برنامه قبلی انجام گرفت و طول قطعه تکثیر شده ۱۹۰ جفت باز می باشد.

پس از انجام واکنشهای تکثیر، صحت قطعات تکثیر شده مربوط به هر سه ژن، توسط الکترفورز ژل آگارز ۲ درصد و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید تائید شد.

واکنش هضم آنزیمی

هضم آنزیمی ژن کالپاستاتین: جهت تشخیص چند شکلی در ژن کالپاستاتین از آنزیم NcoI شرکت Sibenzyme استفاده گردید. واکنش به حجم ۲۰ میکرولیتر و در دمای ۳۷°C و بمدت ۳ ساعت انجام گرفت. واکنشگرها شامل ۵ میکرولیتر محصول PCR، ۲ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۵ واحد آنزیم برشی و ۱۲ میکرولیتر آب مقطر بودند. الگوی هضمی ژنوتیپهای مختلف به این صورت است که ژنوتیپ MM یک قطعه ۶۲۲ جفت بازی، MN دارای سه قطعه ۶۲۲، ۳۷۴ و ۲۴۸ جفت باز و ژنوتیپ NN دارای قطعات ۳۷۴ و ۲۴۸ جفت بازی بود.

هضم آنزیمی ژن بتالاکتوگلوبولین: برای تعیین ژنوتیپ های ژن بتالاکتوگلوبولین، برش آنزیمی محصولات PCR با استفاده از آنزیم محدودگر RsaI شرکت Sibenzyme به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷°C انجام گرفت که در تیوبهای واکنش مقدار ۵ میکرولیتر محصول PCR، ۲ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۴ واحد آنزیم برشی و ۱۲ میکرولیتر آب مقطر افزوده شد. الگوی هضمی شامل ژنوتیپ AA دارای قطعات ۲۴۱، ۶۶ و ۶۰ جفت باز، AB دارای قطعات ۶۰، ۲۴۱، ۶۶ و ۱۷۵ جفت بازی و ژنوتیپ BB دارای قطعات ۱۷۵ و ۶۶ بود.

هضم آنزیمی ژن FecB: جهت تشخیص جهش در ژن FecB نیز از آنزیم AvaII شرکت Sibenzyme استفاده گردید. واکنش بمدت ۵ ساعت و در دمای ۳۷°C انجام شد. مقدار ۵ میکرولیتر محصول PCR، ۲ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۳ واحد آنزیم برشی و ۱۲ میکرولیتر آب مقطر در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر، واکنشگرهای واکنش را تشکیل دادند. الگوی باندها شامل ژنوتیپ BB دارای قطعات ۱۶۰ و ۳۰ جفت باز، B^+ دارای قطعات ۱۹۰، ۱۶۰ و ۳۰ جفت باز و ژنوتیپ $^{++}$ نیز دارای همان قطعه ۱۹۰ جفت باز می باشد.

جدول(۱) اندازه قطعات حاصل از هضم آنزیمی ژنوتیپهای مختلف (جفت باز)

بتالاکتوگلوبولین			FecB			کالپاستاتین		
BB	AB	AA	++	B^+	BB	NN	MN	MM
۱۷۵	۲۴۱	۲۴۱	۱۹۰	۱۹۰	۱۶۰	۳۷۴	۶۲۲	۶۲۲
۶۰	۱۷۵	۶۶		۱۶۰	۳۰	۲۴۸	۳۷۴	
	۶۶	۶۰		۳۰			۲۴۸	
	۶۰							

پس از هضم آنزیمی، محصولات هضم با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۲ درصد و اکریل آمید ۸ درصد و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید و نیترات نقره مشاهده و تائید شدند.

در انتها فراوانی آللی، ژنوتیپی، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار توسط نرم افزار Popgene32 نسخه ۱/۳۲ محاسبه گردید (۱۸).

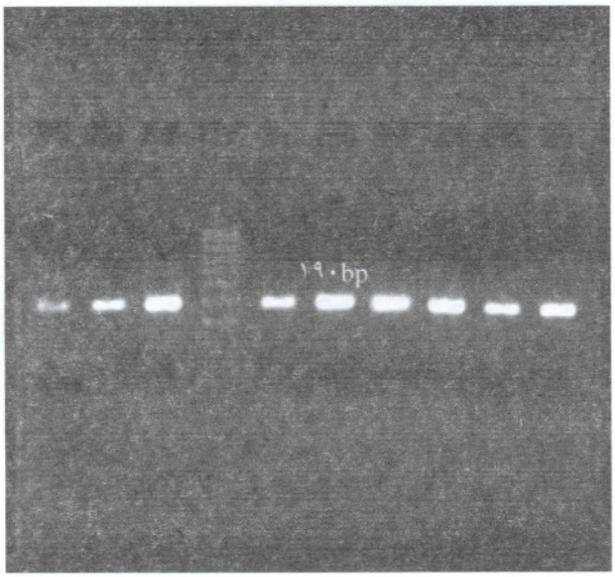
نتایج و بحث

کالپاستاتین: نتیجه واکنش زنجیره ای پلیمراز در شکل ۱ نشان داده شده است. همانطور که انتظار می رفت قطعه ۶۲۲ جفت بازی از ژن CAST شامل قسمتهای از اگزون و اینترون ۱ ناحیه L تکثیر شد. جهت تایید صحت قطعه حاصله از نشانگر وزنی M۱۰۰ استفاده شد (شکل ۱). قطعه ۶۲۲ جفت بازی تکثیر شده از جایگاه ژنی CASTI توسط آنزیم برشی NcoI هضم شده و دو ژنوتیپ MM و MN شناسایی شدند (شکل۲). در بررسی مولکولی ژن کالپاستاتین، هیچگونه ژنوتیپ NN مشاهده نگردید. از طرفی بیشترین ژنوتیپ مشاهده شده مربوط به MM و با فراوانی ۰/۸۸ بود. بنابراین بیشترین فراوانی مربوط به آلل M به میزان ۰/۹۴ مشاهده شد (جدول ۲). نتایج مشابهی در گوسفند نژاد دورست توسط پالمر و همکاران (۲۰) گزارش شد. این محققین فراوانی آللهای M و N را بترتیب ۰/۷۷ و ۰/۲۳ گزارش

دادند(جدول ۲).

ژن FecB: قطعه ۱۹۰ جفت بازی مربوط به ناحیه چند شکل ژن FecB نیز با موفقیت تکثیر شد (شکل۵). الگوی هضمی بدست آمده نشان داد که هیچ جهشی در نمونه های مورد آزمایش وجود ندارد و قطعه ۱۹۰ جفت بازی، بعد از هضم آنزیمی کاملا دست نخورده باقی ماند. مشخص شده که یک جایگزینی (Q249R) در توالی رمز کننده BMPR-1B همبستگی کاملی با فنوتیپ چند قلوزا در گوسفندان برولا دارد(۱۶). این جهش نقطه ای در حوزه گیرنده کیناز اتفاق افتاده (۲۶) و باعث تغییر در نوکلئوتید ۷۴۶ در ناحیه رمز گردان گردیده (A به G) که در نتیجه آن گلوتامین به آرژنین تبدیل گردیده است (۲۴). علامت F برای این ژن چندقلوزایی و + برای نوع وحشی آن درنظر گرفته شد. مهمترین اثرات فیزیولوژیکی جایگاه ژنی FecB بر روی نرخ تخمکریزی و اندازه و تعداد فولیکول های آماده تخمکریزی در تخمدان می باشد. در میش های هموزیگوت (BB) و هتروزیگوت ناقل(+B) در مقایسه با هموزیگوتهای نوع وحشی (++) فولیکول ها بطور معنی داری در اندازه کوچکتر بالغ شده و آزاد می شوند. فولیکول های کوچک تر آماده تخمکریزی در میش های BB، حاوی تعداد کمتری سلول گرانولوزا در مقایسه با فولیکول های آماده تخمکریزی در میش های ++ می باشند (۱۵). جهش ژن FecB بر روی تخمدان اثر گذاشته و سبب افزایش حساسیت سلول های فولیکولی به تحریک گنادوتروپینی می شود(۸). FecB برای نرخ تخمکریزی دارای اثر افزایشی بصورت ۱/۶ افزایش در نرخ تخمکریزی به ازای هر نسخه می باشد. در این آزمایش سه ژن کاندیدای کالپاستاتین، بتا لاکتوگلوبولین و FecB که کنترل کننده صفات مهم اقتصادی می باشند، در نژاد قره گل مورد بررسی قرار گرفت. از آنجا که نمونه های این تحقیق از گوسفندان دارای بالاترین نرخ زایش انتخاب شده بودند و جهش FecB در هیچکدام از نمونه ها یافت نشد و می توان نتیجه گرفت که احتمالاً جهش FecB در گوسفندان قره گل مورد آزمایش وجود ندارد. تفاوت های موجود در نرخ تخمکریزی در بین نژادهای مختلف علاوه بر زمینه ژنتیکی تحت تأثیر سن، فصل و تغذیه است.

تحقیق حاضر وجود چند شکلی ژنتیکی برای ژنهای



شکل(۵) محصول PCR ژن FecB مارکر مولکولی مورد استفاده M50 می باشد.

کالپاستاتین و بتالاکتوگلوبولین را بخوبی در نژاد گوسفند قره گل ایران نشان داد. از وجود این چند شکلی ها در جهت بررسی ارتباط بین چند شکلی ژنی با صفات تولیدی از قبیل تولید شیر، گوشت و کیفیت گوشت بعنوان مارکرهای ژنتیکی می توان استفاده کرد. عدم برقراری تعادل هاردی-واینبرگ در جمعیت مورد مطالعه برای ژنهای کالپاستاتین و بتالاکتوگلوبولین نشان می دهد که در این جمعیت به نفع یا ضرر ژنوتیپ خاصی انتخاب صورت نگرفته است.

پایین بودن سطح هتروزیگوسیتی برای دو جایگاه ژنی در گوسفندان ایستگاه قره گل نشان می دهد که احتمالا به دلیل سیستم بسته پرورش در این ایستگاه و عدم استفاده از قوچهای اصلاحی از سایر گله ها، سطح همخونی افزایش یافته است و بنابراین کاهش هتروزیگوسیتی را مشاهده می کنیم. بنابراین توصیه می گردد که جهت افزایش هتروزیگوسیتی و سطح تنوع ژنتیکی، نسبت به وارد کردن خون جدید (مثلا وارد کردن قوچ) اقدام گردد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از قطب علمی علوم دامی دانشگاه فردوسی به خاطر تخصیص اعتبار و در اختیار گذاشتن امکانات آزمایشگاهی تشکر و قدردانی می شود.

منابع

۱. الیاسی زرین قبایی، ق. ۱۳۸۱. بررسی چند شکلی ژن بتاگلوبولین در گوسفند بروش PCR-RFLP. پایان نامه کاشناسی ارشد. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

۲. نصیری، م. ر. ۱۳۸۳. شناسایی ژنهای بتا- لاکتوگلوبولین، کالپاستاتین و کالپین در گوسفندان نژاد کردی با استفاده از تکنیکPCR. . گزارش نهایی طرح پژوهشی. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

۳. طهمورث پور، مجتبی. ۱۳۸۴. بررسی چند شکلی ژن کالپین و کالپاستاتین و ارتباط آن با افزایش وزن روزانه در گوسفند بلوچی. پایان نامه دکتری. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

4. Ali, S., McGlenaghan, M., Simons, J. P. and Clark, A. J. 1990. Characterization of the alleles encoding ovine Beta-Lactoglobulin A and B. J. of Gene. 91: 202-207.
5. Bolla, P., Caroli, A., Mezzelani, A., Rizzi, R., Pagnacco, G., Fraghi, A. & Casu, S. 1989. Milk protein markers and production in sheep. Anim. Gen., 20: (Suppl. 1) - 78.
6. Boom, R., Sol, C. J. A., Salimans, M. M. M., Jansen, C. L., Wertheim-Van Dillen, P. M. E. & Van Der Noordaa, J. 1989. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J. Clinical Microbiology. 28: 495-503.
7. Bor-Rung, R., Howard, H. M., and Forsberg, N. E. 1991. "Effects of age and castration on activities of calpains and calpastatin in sheep skeletal muscle. J. Anim. Sci. 69:1919-1924.
8. Cambell, B. K., Baird, D. T., Souza, C. J. H., and R. Webb. 2003. The FecB (Booroola) gene acts at ovary: in vivo evidence. J. Reproduction.126:101-11.
9. Casas, E., S. N. White, T. L. Wheeler, S. D. Shackelford, M. Koohmaraie, D. G. Riley, C. C. Chase Jr, D. D. Johnson and T. P. L. Smith. 2006. Effects of calpastatin and μ-calpain markers in beef cattle on tenderness traits. J. Anim. Sci. 84: 520-525.
10. Davis, G. H., Susan, M. G., Ross, I. K., Gregan, S. M., Ward, J., Nimbkar, B. V., Ghalsasi, P. M., Nimbkar, C., Gray, G. D., Subandriyo, Inounu, I., Tiesnamurti, B., Martyniuk, E., Eythorsdottir, E., Mulsant, P., Lecerf, F., Hanrahan, J. P., Bradford, G. E., and T. Wilson. 2002. DNA test in prolific sheep from eight countries provide new evidence on origin of the Booroola (FecB) mutation. J. Biology of Reproduction. 66:1869-74.
11. Di Stasio, I., Portolano, B., Todaro, M., Fiandra, P., Giaccone, P., Finocchiaro, R., & Alicata, M.L. 1997. Effect of ovine β-lactoglobulin phenotype on cheese yield and composition. In milk protein polymorphism. Brussels, Belgium: International Dairy Federation. pp. 324-327.
12. Garzon, A. I. and Martinez, J. 1992. Beta-Lactoglobulin in Manchega sheep breed: Relationship with milk technological index in handcraft manufacture of manchego cheese. XXIII. Int. Conf. Anim. Genet. Interlaken.
13. Kolde, H. J. and Braunitzer, G. 1983. The primary structure of ovine Beta-Lactoglobulin. Milckwissenschaft. Vol. 38: 70-72.

14. Montgomery, G. W., Penty, J. M, Lord, E. A. and M. F. Broom. 1995. The search for the Booroola (FecB) mutation. J. Repord. Fertil. Suppl. 49:113-21.
15. Montgomery, G. W., Susan, M. G., Davis, G. H., and K. P. McNatty. 2001. Genes controlling ovulation rate in sheep. Reproduction.121: 843-52.
16. Mulsant, P., Lecerf, F., Fabre, S., Schibler, L., Monget, P., Lanneluc, I., Pisselet, C., Riquet, J., Monniaux, D., Callebaut, I., Cribiu, E., Thimonier, J., Teyssier, J., Bodin, L., Cognie, Y., Chitour, N., and J. M. Elsen. 2001. Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associatedwith increased ovulation rate in Booroola Merino ewes. Proc. Natl. acad. Sci. USA. 98(9):5104-5109.
17. Nassiry, M. R., Shodja, J., Elyasi, G. The determination of Beta-Lactoglobulin gene polymorphism in some Iranian and Russian Sheep. 2002. Proc. of the 3rd International Iran and Russia Conference "Agriculture and Natural Resources", Moscow, 18 – 20 September. 117.
18. Nei, M., and Li, W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of the restriction endonucleases. Proceeding of the National Academy of Science. USA. 76: 5269-5273.
19. Palmer, B. R., Hickford, J. G. H. and R. Bickerstaffe .1997. A candidate gene approach to animal quality traits. Proc. of the New Zealand Society of Animal Production. 57: 294-296.
20. Palmer, B. R., Morton, J. D., Roberts, N., Ilian, M.A., and Bickerstaffe, R. 1999. Marker – assisted selection for meat quality and the ovine calpastatin gene. Proc. of the New Zealand Society of Anim. Prod. 59: 266-268.
21. Recio, I., Fernandez-Fournier, A., Martin-Alvarez, P.J., Ramos, M. 1997. Beta-lactoglobulin polymorphism in ovine breeds: Influence of cheese making properties and milk composition. Lait. 77: 259-265.
22. Schenkel, F. S., Miller, S. P., Z. Jiang, I. B. Mandell, X. Ye, H. Li, and J. W. Wilton. 2006. Association of a single nucleotide polymorphim in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. J. Anim. Sci. 84: 291-299.
23. Sensky, P. L., Parr, T., Bardsley, P. Y., and Buttery, P.Y. Meat tenderization-the role of calpains. www.bsas.org.uk/meetings/annlproc/Pdf2001/239.
24. Souza, C. J. H., MacDougall, C., Cambell, B. K., McNeilly, A. S., and Baird, D. T. 2001. The Booroola (FecB0 phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1B (BMPR1B) gene. J. Endocri. 169:R1-R6.
25. Vlatka, M., Feligini, J., Lukac-Havranek, I., Curik and Guiseppe, E. 2002. Genetic polymorphism of β-Lactoglobulin in native sheep from the Island of Pag. Food Technol. Biotechnol. 40: 75-78.
26. Wilson, T., Xi-Yang Wu, Juengel, J. L., Ross, I. K., Lumsden, J. M., Lord, E. A., Dodds, K. G., walling, G. A., McEwan, J. C., O'Connell, A. R., McNatty, K. P., and Montgomery, G. W. 2001. Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein IB receptor (ALK-6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. J. Biol. of Repro. 64:1225-35.

Study on the genetic polymorphisms of candidate genes in Karakul

A. A. Aslaminejad- M. R. Nassiry- F. Eftekhari Shahroudi- R. Valizadeh- A. Javadmanesh- A. Norouzy- A. Samei-H. Ghiasi[1]

Abstract

Selection based on molecular markers is one of the new methods that may improve progress and accuracy of selection in animal breeding projects. Candidate genes of calpastatin, beta-lactoglobulin and FecB which have direct correlation with quality and quantity of meat, milk production and fecundity were studied. Blood samples were taken from 100 purebred Karakul sheep in Karakul Sheep Breeding Station at Sarakhs, city of Khorasan. Extraction of genomic DNA and PCR reaction were done. Amplicons were digested with restriction enzymes NcoI, RsaI and AvaII for calpastatin, beta-lactoglobulin and FecB genes, respectively. Allelic frequencies were M=0.79 and N=0.21, A=0.89 and B=0.11, and ++=1.00 and BB=0.00 for calpastatin, beta-lactoglobulin and FecB, respectively. G and χ^2 test confirmed the Hardy-Weinberg equilibrium in this population.

Key words: Karakul Sheep, Calpastatin, Beta-lactoglobulin, FecB, Polymorphism, DNA.

1- Contribution from College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad.