مجله علوم دامی ایران
دوره ۴۴، شماره ۲، ۱۳۹۲ (۱۳۰-۱۲۱)

بررسی چندشکلی اگزون ۶ ژن کالپاستاتین به روش PCR-SSCP و ارتباط آن با صفات لاشه در گوسفندان لری-بختیاری و زل-آتابای

محسن عالی[1*]، حسین مرادی شهر بابک[2]، محمد مرادی شهر بابک[3] و مصطفی صادقی[4]
۱، دانش آموخته کارشناسی ارشد، ۲، ۴، استادیاران و ۳، استاد گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران- قطب علمی بهبود کیفیت و کمیت لاشه گوسفندان بومی
(تاریخ دریافت: ۹۱/۸/۸ - تاریخ تصویب:۹۲/۴/۳۰)

چکیده

کالپاستاتین به عنوان ژن کاندیدای مؤثر بر بازده رشد و صفات کیفی گوشت مطرح است.در مطالعه حاضر از تعداد ۷۴ رأس گوسفند نژاد لری-بختیاری و ۴۰ رأس آمیخته زل-آتابای به ترتیب از کشتارگاه های صنعتی شهرستان های شهرکرد و گرگان خون گیری و اندازه گیری صفات لاشه به عمل آمد.پس از استخراج DNA، واکنش های زنجیره ای پلیمرازجهت تکثیر قطعه ۲۵۴ جفت بازی دربرگیرنده تمام اگزون ۶ ژن کالپاستاتین انجام گرفت. برای تعیین ژنوتیپ محصولات PCR، از روش SSCP و رنگ آمیزی با نیترات نقره استفاده شد که طی آن، ۱۴ الگوی ژنوتیپی AA، BB، AB، AC، AD، BE، AF، AG، AH، AI، JJ، AJ، BK و AL به ترتیب با فراوانی ۰/۰۳۵، ۰/۱۲۳، ۰/۱۰۵، ۰/۱۱۴، ۰/۰۰۹، ۰/۰۵۳، ۰/۳۱۶، ۰/۰۲۷، ۰/۰۱۷، ۰/۰۱۷، ۰/۰۰۹، ۰/۱۰۵، ۰/۰۱۷ و ۰/۰۵۳ در دو نژاد مشاهده شد. ژن کالپاستاتین اثر معنی‌داری بر صفات وزن زنده قبل از کشتار(P<۰/۰۰۱)، وزن دنبه(P<۰/۰۰۱)، وزن لاشه با دنبه(P<۰/۰۵) و درصد وزن دنبه به وزن لاشه (P<۰/۰۱) داشت. ژنوتیپ AB ژنوتیپی مطلوب برای مجموع صفات مورد بررسی، ژنوتیپ AJ مطلوب برای صفات رشدو ژنوتیپ BE اگرچه به لحاظ دنبه ژنوتیپی مطلوب بود (حیوانات با ژنوتیپ BE دارای دنبه کوچک بودند) ولی به همراه ژنوتیپ BB، ژنوتیپ‌هایی نامطلوب برای صفات رشدبودند.

واژه های کلیدی: اگزون ۶، دنبه، چربی درون شکمی، وزن زنده

مقدمه

کالپاستاتین یک مهارکننده آندوژنوس است که نقش مهمّی در تنظیم فعّالیت کالپاین ها در داخل سلول ایفا می-کند(Forsberg et al., 1989).

افزایش فعّالیّت کالپاستاتین منجر به مهار فعّالیّت کالپاین ها و کاهش تجزیه پروتئین های گوشت و لذا افزایش سرعت رشد بدن می گردد(Goll et al., 1998). همچنین کالپاستاتین با مهار فعّالیت کالپاین ها پس از کشتار نقش مهمّی در تردی گوشت ایفا می کند(Koohmaraie, 1992). گوسفند لری-بختیاری، نژادی درشت جثه با دنبه‌ای بسیار بزرگ بوده و محل اصلی پرورش آن استان چهار محال و بختیاری است(Khaldari,2008). آمیخته های زل-آتابای که از آمیخته گری بین قوچ آتابای(متوسط جثه و دنبه دار) و میش زل (کوچک جثه و بی دنبه) حاصل شده اند متوسط جثه و نیم دنبه بوده و محل اصلی پرورش آن ها استان گلستان است. بررسی چندشکلی یک قطعه ۶۲۲ جفت بازی شامل بخشی از اگزون و اینترون ۱ ژن کالپاستاتین به روش PCR-RFLP و توسط آنزیم MspI در گوسفند نژاد دورست داون منجر به شناسایی دو آلل M (عدم هضم توسط آنزیم) و N (هضم توسط آنزیم) به ترتیب با فراوانی ۰/۷۷ و ۰/۲۳ شد(Palmer et al., 1998).

* نویسنده مسئول: محسن عالی تلفن: ۰۹۳۷۴۲۵۲۷۰۸ mohsen.ali@ut.ac.ir E-mail:

در ایران نیز تنوع ژنتیکی این جایگاه به روش RFLP در نژادهای مختلف مورد بررسی قرار گرفته است.

فراوانی آللهای M و N در نژاد قره گل ۰/۸۵ و ۰/۱۵ (Eftekhari Shahroudi et al., 2007)، در نژاد کردی شیروان ۰/۸۸ و ۰/۱۲(Nassiry et al., 2007)، در نژاد عربی ۰/۸۵ و ۰/۱۵(Mohamadi et al., 2008)، در نژادهای لری- بختیاری، زل و ماکوئی به ترتیب۰/۷۳ و ۰/۲۷، ۰/۵۶ و ۰/۴۴ و ۰/۶۱ و ۰/۳۷ (Moradi Shahrbabak, 2009) و در نژاد آتابای ۰/۸۱ و ۰/۱۹ (Nanekarani et al., 2011) گزارش شد. در بررسی ارتباط چندشکلی جایگاهِ ۶۲۲ جفت بازی درون اگزون و اینترون ۱ ژن کالپاستاتین روی آمیخته های دورست داون × کاپ ورث به روش PCR-SSCP مشخص شد گوسفندان دارای ژنوتیپ ac در مقایسه با گوسفندان دارای ژنوتیپ aa وزن زنده بیشتر به میزان ۱۷-۱۲ درصد(P<۰/۰۵) و وزن لاشه بیشتر به میزان ۱۸-۱۵ درصد(P<۰/۰۵) دارند (Palmer et al., 1999). بررسی چندشکلی یک قطعه ۲۵۴ جفت بازی در برگیرنده تمام اگزون ۶ و بخشی از اینترون های ۵ و ۶ ژن کالپاستاتین به روش PCR-SSCP روی نژادهای بی دنبه مرینوس، رامنی، کوریدال، پول دورست و آمیخته های NZ (بومی نیوزلند) منجر به شناسایی۹ الگوی SSCP متفاوت حاصل از پنج آلل مختلف گردید که آلل های ۱ و ۲ مجموعاً با فراوانیِ ۸۲٪ بیشترین فراوانی را داشتند (Zhou et al., 2007).

مطالعه ارتباط چندشکلی جایگاه اگزون ۶ و اگزون و اینترون ۱ با صفات لاشه در گوسفندان بومی نیوزلند منجر به مشاهده آلل های a، b، c و d در اگزون ۶ و آلل های A، B، C و D در اگزون و اینترون۱ گردید. یک ارتباط معنی دار (P<۰/۰۵) بین آلل های a، A و B با وزن گوشت راسته مشاهده شد (Bickerstaffe et al., 2006).

هدف از تحقیق حاضر، بررسی چندشکلی جایگاه ۲۵۴ جفت بازی شامل کلاگزون ۶ و بخشی از اینترون های ۵ و ۶ ژن کالپاستاتین در دو نژاد گوسفند لری- بختیاری و آمیخته زل-آتابای و ارتباط این جایگاه با صفات لاشه و تعیین ژنوتیپ های مطلوب برای این صفات در گوسفندان مورد مطالعه بود.

مواد و روش ها

نمونه برداری

در این مطالعه از تعداد ۷۴ رأس گوسفند نژاد لری- بختیاری هم سن(۱۱ ماهه) و ۴۰ رأس آمیخته زل-آتابای در سنین مختلف و از هر دو جنس به ترتیب از کشتارگاه های صنعتی جونقان (واقع در ۴۵ کیلومتری شهرستان شهرکرد) و گرگان خون گیری از سیاهرگ وداج بااستفاده از ونوجکت های آغشته به EDTA به عمل آمده و رکورد صفات لاشه شامل وزن زنده، وزن لاشه با دنبه و وزن چربی درون شکمی نیز ثبت گردید.با توجه به اینکه در کشتارگاه های مذکور دنبه از لاشه تفکیک نمی شد بنابراین وزن دنبه، با استفاده از فرمول ارائه شده توسط (Vatankhah et al. 2006) جهت برآورد وزن دنبه بر اساس ابعاد ظاهری آن در گوسفند نژاد لری- بختیاری، محاسبه شد. از طرفی چون، تاکنون مطالعه ای جهت برآورد وزن دنبه بر اساس ابعاد ظاهری آن در آمیخته های زل-آتابای انجام نشده است بنابراین، این صفت فقط برای جمعیت لری- بختیاری، جهت ارتباط با ژن کالپاستاتین مورد بررسی قرار گرفت. همچنین صفات درصد لاشه، درصد چربی درون شکمی و درصد وزن دنبهبه ترتیب طبق سه فرمول:

"۱۰۰× (وزن زنده/وزن لاشه)"، "۱۰۰×(وزن لاشه/وزن چربی درون‌شکمی)" و "۱۰۰×(وزن لاشه/وزن دنبه)"

محاسبه شده و جهت ارتباط با چندشکلیِ ژن کالپاستاتین مورد استفاده قرار گرفتند.

استخراج DNA

استخراج DNA از ۲۵۰ میکرولیتر خون کامل به روش بهینه یافته نمکی انجام گرفت (Miller et al., 1998). کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز ۱٪ و نیزبا روش اسپکتروفتومتری اندازه گیری شد.

واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR)

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت تکثیر قطعه ۲۵۴ جفت‌بازی با تهیه آغازگرهای اختصاصی رفت 5'-GTTATGAATTGCTTTCTACTC-3' و برگشت 5'-ATACGATTGAGAGACTTCAC-3' (Zhou et al., 2007) از شرکت متابیون انجام شد. واکنش PCR

برای جایگاه فوق، در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی، بافر X1، 5/0 میکرومولار از هر پرایمر، ۰/۲ میلی مولار از هر dNTP، 5/2 میلی مولار MgCl2، یک واحد آنزیم تک پلیمراز و آب دیونیزه انجام شد.

برنامه دمایی و زمانی شامل ۳۵ چرخه با دمای واسرشت اولیه ۹۴ درجه سانتی-گراد به مدت ۵ دقیقه، دمای واسرشت ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۵۷ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه بود. پس از انجام واکنش PCR، محصولات PCR روی ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شدند.

تعیین ژنوتیپ حیوانات در ناحیه تکثیر شده ژن کالپاستاتین به روش PCR-SSCP

تعیین ژنوتیپ نمونه ها به روش PCR-SSCP با استفاده از الکتروفورز عمودی روی ژل اکریل آمید و رنگ آمیزی با نیترات نقره انجام گرفت. بدین منظور ۱۵ میکرولیتر بافر بارگذاری مخصوص SSCP(شامل ۹۹٪ فرمامید، ۰/۹٪ EDTA 6 مولار، ۰/۰۵٪ برموفنل بلو و ۰/۰۵٪ زایلن سیانول) با ۵ میکرولیتر محصول PCR مخلوط و ورتکس شد و سپس در دستگاه ترموسایکلر به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۶ درجه ی سانتی گراد قرار داده شد تا رشته های DNA واسرشت شوند.

نمونه های واسرشت شده به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ قرار گرفتند تا از اتصال مجدد رشته های مکمل جلوگیری شود. برای مشاهده الگوهای باندی از تانک الکتروفورز عمودی شرکت Bio Rad با صفحات شیشه ای به ابعاد ۰/۱ × ۲۰ × ۱۸ سانتی متر و ژل اکریل آمید ۱۲٪ استفاده شد. به این ترتیب که مخلوط محصول PCR و بافر بارگذاریِ مخصوص SSCP درون چاهک های ژل بارگذاری شدند. سپس الکتروفورز نمونه ها به مدت ۲۰ ساعت و با اختلاف پتانسیل ۳۰۰ ولت در دمای ۴ درجه سانتیگراد و با بافر (X5/0)TBE انجام گرفت.

درنهایت رنگ آمیزی ژل جهت مشاهده الگوهای باندی به روش نیترات نقره انجام گرفت (Bassam et al., 1991).

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل ژنتیک جمعیت

شاخص های ژنتیک جمعیت شامل فراوانی های آللی و ژنوتیپی، هتروزیگوسیتی و تعادل هاردی واینبرگ در هر جمعیت، شاخص فاصله ژنتیکیِ نِئی بین دو جمعیت و هتروزیگوسیتی در مجموع دو جمعیت با استفاده از نرم افزار GenAlex۶.۴۱ محاسبه شد. لازم به ذکر است که فراوانی های آللی و ژنوتیپی در مجموع دو جمعیت با شمارش مستقیم تعداد هر آلل و ژنوتیپ در مجموع دو جمعیت و سپس تقسیم عدد حاصل بر تعداد کل آلل ها و ژنوتیپ ها در مجموع دو جمعیت محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل ژنتیک کمی

ارتباط جایگاه ژن کالپاستاتین با صفات مورد مطالعه با استفاده از مدل های ۱، ۲ و ۳ در برنامه SAS9,1 و با رویه MIXED مورد بررسی قرار گرفت. علت استفاده از رویه MIXED وارد نمودن اثر حیوان به عنوان اثری تصادفی در معادله مدل بود. با توجه به اینکه وزن زنده با وزن لاشه دارای همبستگی بالای ۸۰٪ بود بنابراین صفت وزن زنده قبل از کشتار به عنوان متغیر همبسته برای وزن لاشه در معادله مدل قرار گرفت.

مدل ۱: برای وزن لاشه

$$y1_{ijklm} = \mu + Ai + Sj + Bk + Gcl + b\,(W_{ijklm} - \bar{W}) + Animalm + e_{ijklm}$$

مدل ۲: برای وزن و درصد دنبه

$$y2_{ijk} = \mu + Si + Gcj + Animalk + eijk$$

مدل ۳: برای صفات وزن زنده، وزن چربی درون شکمی، بازده لاشه و درصد چربی درون شکمی

$$y3_{ijklm} = \mu + A_i + S_j + Bk + Gcl + Animalm + eijklm$$

که، $y1_{ijklm}$: هر یک از مشاهدات مربوط به صفت وزن لاشه، $y2_{ijk}$: هر یک از مشاهدات مربوط به صفات وزن و درصد دنبه، $y3_{ijklm}$: هر یک از مشاهدات مربوط به صفات وزن زنده، وزن چربی درون شکمی، بازده لاشه و درصد چربی درون شکمی، μ: میانگین صفت در جمعیت، Ai: اثرعامل ثابت سن حیوان در هنگام کشتار(۱۸ و ۱۱ و ۱۰ و ۵ Sji: اثر عامل ثابت جنس حیوان (۲ و ۱(=j، Bk: اثر عامل ثابت نژاد حیوان(۲ و

Gcl=۱: اثر عامل ثابت ژنوتیپ ژن کالپاستاتین (۷ و ...۲ و ۱= (l) ,b: ضریب تابعیّت YبرW(وزن دام ها قبل از کشتار)، Wijklm: وزن دامها قبل از کشتار، :میانگین وزن دامها قبل از کشتار، Animalm: اثر تصادفی حیوان،eijklm: اثر تصادفی باقیمانده است.

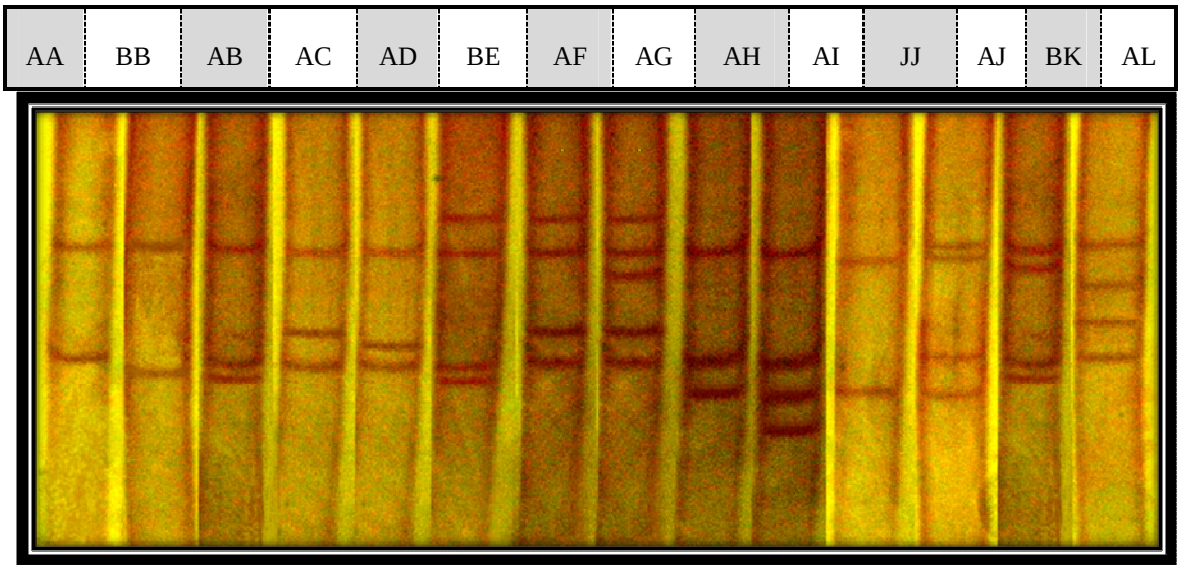
لازم به ذکر است که اگرچه تعداد سطوح ژنوتیپ های ژن کالپاستاتین ۱۴ ژنوتیپ بود ولی فقط هفت ژنوتیپBB، AB، AC، BE، AF، AJ و AL دارای فراوانی کافی یا تقریباً کافی بـرای تجزیـه آمـاری بودند بنابـرایـن از آوردن سـایـر ژنوتیپ ها در تجزیه واریانس چشم پوشی شد. همانطورکه گفته شد وزن دنبه فقط در جمعیت لری -بختیاری برآورد گردید و با توجه به اینکه حیوانات مورد مطالعـه برای این جمعیـت در مطالعـه حاضر همگـی هم سن و هـم نژاد بودنـد بنابراین اثر سن و نـژاد در مدل مورد استفاده برای این صفت وارد نشد.

همچنین با توجه به اینکه در جمعیت لری-بختیاری فراوانی ژنوتیپ های AJ و AL نیز کافی نبود لذا علاوه بـر ژنوتیـپ های ذکـر شده در بـالا از آوردن ایـن دو ژنوتیپ نیز در تجزیه واریانس برای وزن دنبه صرف نظر شد. پس از آنالیز واریانس، آزمون مقایسه میانگین حداقل مربعـات (Lsmeans) جهـت مقـایسه ژنوتیپ هـای ژن کالپاستاتین و تعیین ژنوتیپ های مطلوب برای صفات مورد مطالعه انجام گرفت.

نتایج و بحث

تعیین ژنوتیپ حیوانات در ناحیه تکثیر شده ژن کالپاستاتین به روش PCR-SSCP

در مجموعِ دو جمعیت ۱۴ الگوی ژنوتیپیِ AA، BB، AB، AC، AD، BE، AF، AG، AH، AI، JJ، AJ، BK و ALحاصل از ۱۲ آلل مختلفِA، B، C، D، E، F، G، H، I، J، K و L شناسایی شد(شکل ۱).



شکل ۱- الگوهای SSCPِ ژن کالپاستاتین و آلل های تشکیل دهنده آن ها.

در جمعیت گوسفندان لری بختیاری همه الگوها به جز الگوی ژنوتیپیِ nJJ و درجمعیت آمیخته های زل-آتابای فقط هفت الگوی ژنوتیپیِ BB، AC، AF، JJ، AJ، BK و AL مشاهده شدند.

بنابراین همان طور که مشخص است جایگاه مطالعه شده در ژن کالپاستاتین در هر دو جمعیت دارای چندشکلی قابل توجهی است که البته مقدار این چندشکلی در جمعیت لری بختیاری نسبت به آمیخته-های زل-آتابای بیشتر است.

(Zhou et al., 2007) الگوی ژنوتیپی متفاوت حاصل از پنج آلل مختلف را در این جایگاه در گوسفندان بی دنبه ی پنج نژاد مرینوس، رامنی، کوریدال، پول دورست و آمیخته های NZ (بومی نیوزلند) گزارش نمودند که با نتایج مطالعه حاضـر مبنـی بر چنـدشکلـی بـالای ایـن

جایگـاه ژن کالپاستاتین دردو نژاد گوسفند دنبه دارو نیم دنبه بومی ایران مطابقت دارد.

آلـــل هـــای A و B و ژنوتیـــپ هـــای AA، BB و AB روی گوسفندان بی دنبه بومی نیوزلند نیز مشاهده شده بودند (Zhou et al., 2007)، درحالیکه سایر آلل ها و ژنوتیپ ها برای اولین بار در مطالعه حاضر در گوسفندان دنبه دار و نیم دنبه بومی ایران شناسایی شدند. نکته جالب توجه این است که اکثر آلل ها به صورت هتروزایگوت در هر دو جمعیت ظاهر شده-اند بطوریکه ۱۱ ژنوتیپ از ۱۴ ژنوتیپ شناسایی شده هتروزایگوت بودند و در بین ۱۲ آلل شناسایی شده فقط ژنوتیـپ هموزایگـوتِ سه آلل A، B و J مشـاهده شد و مهـم تـر آن که به جز دو آلل E و K که هتروزایگوت با آلل B بودند سایر آلل ها (۹ آلل) هتروزایگوت با آلل A بودند که این نشان از فراوانی بالای آلل A و پس از آن آلل B در جمعیت گوسفندان بومی ایران دارد. اینکه بعضی آلل ها فقط در قالب افراد هتروزایگوت در جمعیت ظهور پیدا کرده اند شاید به علت کشنده بودن این آلل هاست بطوریکه فنوتیپ های هموزایگوت برای این آلل ها قبل از تولد و شاید هم در سنین پایین و بلافاصله بعد از تولد از بین می روند (Fatehi, 2007). همچنین ممکن است جهش های جدید و غیرکشنده و شاید هم مطلوب برای صفات تحت انتخاب، در سطح ژنوم از جمله در توالی ژن کالپاستاتین ایجاد شده باشد که با آمیزش بین حیوانات، این جهش ها نیز در جمعیت تکثیر یافته اند ولی هنوز فرصت حضورِ هموزایگوت در جمعیت را پیدا نکرده اند و شاید هم تعداد بسیار معدودی حیوان با ژنوتیپ هموزایگوت برای این آلل ها در جمعیت گوسفندان بومی ایران حضور داشته باشند ولی در نمونه مورد بررسی در مطالعه حاضر مشاهده نشده است درحالیکه اگر نمونه بزرگتری مورد مطالعه قرار می گرفت ممکن بود این ژنوتیپ ها نیز در جمعیت مشاهده شوند، لذا این یافته زمینه را برای انجام تحقیقات بعدی روی نژادهای دیگر و تعداد بیشتری حیوان فراهم می نماید.

فراوانی های آللی و ژنوتیپی

فراوانی های آللی و ژنوتیپیِ جایگاه ژن کالپاستاتین در جمعیت گوسفندان لری-بختیاری و زل-آتابای به ترتیب در جداول ۱و ۲ ارائه شده است. همان طور که در جدول ۱ مشخص است در جمعیت لری بختیاری آلل های A،B و F به-ترتیب با فراوانی ۰/۴۳۸، ۰/۲۰۸ و ۰/۲۰۳ دارای بیشترین فراوانی و آلل های D، K و L هر کدام با فراوانی ۰/۰۰۷ دارای کمترین فراوانی بودند. در جمعیت زل-آتابای، آلل های D، E، G، H و I شناسایی نشدند و در بین آلل های ظاهرشده نیز آلل های A و B با فراوانی ۰/۳۷۴ و ۰/۲۱۲ کمترین فراوانی را داشتند. نکته جالب توجه این است که ژنوتیپ هموزایگوت آلل A در جمعیت لری-بختیاری با فراوانی کم(۰/۰۵۴) و در جمعیت زل-آتابای هیچ حیوانی با این ژنوتیپ شناسایی نشد ولی این آلل به دلیل اینکه در اکثر ژنوتیپ های هتروزایگوت ظهور پیدا کرده بیشترین فراوانی را در هر دو جمعیت به خود اختصاص داده است.

در مطالعه روی گوسفندان بی دنبه بومی نیوزلند دو آلل A و B به ترتیب با فراوانی ۰/۳۵ و ۰/۴۷ دارای بیشترین فراوانی بودند (Zhou et al., 2007) که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد(جدول ۱).

جدول ۱- فراوانی آلل‌های جایگاه ژن کالپاستاتین در جمعیت گوسفندان لری-بختیاری و زل-آتابای

جمعیت	آلل											
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
لری-بختیاری	۰/۴۳۸	۰/۲۰۸	۰/۰۲۷	۰/۰۰۷	۰/۰۴۱	۰/۲۰۳	۰/۰۲	۰/۰۱۴	۰/۰۱۴	۰/۰۱۴	۰/۰۰۷	۰/۰۰۷
زل-آتابای	۰/۳۷۴	۰/۲۱۲	۰/۱۱۳	-	-	۰/۰۷۵	-	-	-	۰/۱۵	۰/۰۱۳	۰/۰۶۳
مجموع	۰/۴۱۷	۰/۲۱۱	۰/۰۵۷	۰/۰۰۴	۰/۰۲۶	۰/۱۵۸	۰/۰۱۳	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹	۰/۰۶۱	۰/۰۰۹	۰/۰۲۶

همان طور که در جدول ۲ مشاهده می شود در جمعیت لری-بختیاری ژنوتیپ JJ شناسایی نشد و در بین ژنوتیپ های ظاهرشده نیز ژنوتیپ هایAF و AB به ترتیب با فراوانی ۰/۴۰۵و ۰/۱۶۲ دارای بیشترین فراوانی

و ژنوتیپ های AD، BK و AL هر کدام با فراوانی ۰/۰۱۴ دارای کمترین فراوانی بودند. در جمعیت زل-آتابای نیز ژنوتیپ های AA، AB، AD، BE، AG، AH و AI شناسایی نشدند و در بین ژنوتیپ های مشاهده شده، ژنوتیپ های AJ و AC به ترتیب با فراوانی ۰/۲۵ و ۰/۲۲۵ بیشترین و ژنوتیپ های JJ و BK هر کدام با فراوانی ۰/۰۲۵ کمترین فراوانی را داشتند. در مطالعه روی۴۲۰ رأس بره از پنج جمعیت گوسفند بی دنبه بومی نیوزلند بیشترین فراوانی مربوط به ژنوتیپ های BB و AA بود (Zhou et al., 2007) که با نتایج مطالعه حاضر مغایرت دارد، در مطالعه حاضر در مجموع دو جمعیت گوسفند دنبه دار و نیم دنبه بومی ایران ژنوتیپ AA جزء ژنوتیپ های دارای فراوانی کم به حساب می آید و بیشترین فراوانی مربوط به ژنوتیپ AF است که ژنوتیپی جدید بوده و برای اولین بار در گوسفندان بومی ایران شناسایی شد.

جدول ۲- فراوانی ژنوتیپ‌های ژن کالپاستاتین در جمعیت گوسفندان لری-بختیاری و زل-آتابای.

جمعیت	ژنوتیپ													
	AA	BB	AB	AC	AD	BE	AF	AG	AH	AI	JJ	AJ	BK	AL
لری-بختیاری	۰/۰۵۴	۰/۰۸۱	۰/۱۶۲	۰/۰۵۴	۰/۰۱۴	۰/۰۸۱	۰/۴۰۵	۰/۰۴	۰/۰۲۷	۰/۰۲۷	-	۰/۰۲۷	۰/۰۱۴	۰/۰۱۴
زل-آتابای	-	۰/۲	-	۰/۲۲۵	-	-	۰/۱۵	-	-	-	۰/۰۲۵	۰/۲۵	۰/۰۲۵	۰/۱۲۵
مجموع	۰/۰۳۵	۰/۱۲۳	۰/۱۰۵	۰/۱۱۴	۰/۰۰۹	۰/۰۵۳	۰/۳۱۶	۰/۰۲۶	۰/۰۱۷	۰/۰۱۷	۰/۰۰۹	۰/۱۰۵	۰/۰۱۸	۰/۰۵۳

تفاوت های مشاهده شده در بروز یا عدم بروز آلل ها و ژنوتیپ ها و نیز تفاوت فراوانی آللی و ژنوتیپی در بین جمعیت گوسفندان بومی ایران و بومی نیوزلند و نیز بین دو جمعیت بومی ایران می تواند ناشی از تفاوت نژاد، تعداد دام مورد بررسی، تفاوت در نحوه متابولیسم چربی (دنبه دار، نیم دنبه و بی دنبه) و نیز شرایط آب و هواییِ پرورش به عنوان ابزار مهم انتخاب طبیعی باشد.

تعادل هاردی واینبرگ، هتروزیگوسیتی و فاصله ژنتیکی نِئی

نتایج بدست آمده نشان می دهد که جمعیت مورد مطالعه برای گوسفند لری-بختیاری در جایگاه ژن کالپاستاتین در تعادل هاردی واینبرگ قرار دارد درحالیکه در جمعیت زل-آتابای تعادل هاردی واینبرگ برقرار نیست(جدول ۳). شاید مهمترین دلیلی که بتوان برای عدم وجود تعادل در جایگاه ژن کالپاستاتین در جمعیت آمیخته های زل-آتابای ذکر کرد مهاجرت ژنی باشد زیرا در هر گله زل، گله داران به منظور افزایش وزن بره ها، قوچ آتابای را به عنوان یک منبع ژنتیکیِ جدید و کاملاً متمایز جهت آمیزش با میش های زل وارد گله نموده و به این ترتیب باعث تغییر فراوانی آللی و در نتیجه برهم خوردن تعادل هاردی واینبرگ در جمعیت می شوند.

جدول ۳- هتروزیگوسیتی، نتایج آزمون کای مربع و فاصله ژنتیکی نِئی بین دو جمعیت لری-بختیاری و زل-آتابای در جایگاه ژن کالپاستاتین

جمعیت	شاخص‌های جمعیتی					
	Ho	He	HW Test		Nei I	Nei D
			χ^2	DF		
لری-بختیاری	۰/۸۶۵	۰/۷۱۹	۸۴/۶۶^{ns}	۶۶	-	-
زل-آتابای	۰/۷۷۵	۰/۷۶۹	۷۶/۸۰***	۲۱	-	-
مجموع دو جمعیت	۰/۸۳۳	۰/۷۴۸	-	-	-	-
بین دو جمعیت	-	-	-	-	۰/۹۰۳	۰/۱۰۲

- Ho:هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده. - He: هتروزیگوسیتی مورد انتظار. -HW Test: آزمون تعادل هاردی‌واینبرگ. -ns و ***:به‌ترتیب اختلاف غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال کمتر از ۰/۰۰۱. -DF: درجه آزادی. -Nei I: شباهت ژنتیکی نِئی.-Nei D: فاصله ژنتیکی نِئی.

هتروزایگوسیتی شاخص تنوع ژنتیکی در جمعیت است. هر چه سطح هتروزایگوسیتی بیشتر باشد تنوع ژنتیکی جمعیت بیشتر است. جمعیت لری-بختیاریِ مورد مطالعه در تحقیق حاضر در جایگاه ۲۵۴ جفت

بازی واقع در اگزون ۶ و اینترون های ۵ و ۶ ژن کالپاستاتین دارای سطح هتروزایگوسیتیِ مشاهده شده بالاتر(جدول ۳) و چندشکلیِ بیشتری نسبت به جمعیت زل-آتابای است. انتظار این است که آمیخته های زل-آتابای که نسل F1 حاصل از آمیخته-گری دو نژاد خالصِ زل و آتابای با تفاوت های ظاهری و متابولیسمی کاملاً متفاوت هستند (به عنوان مثال تفاوت در متابولیسم چربی که باعث حضور دنبه در نژاد آتابای و عدم حضور آن در نژاد زل شده است)، دارای چندشکلی و هتروزایگوسیتیِ بیشتری نسبت به نژاد خالص لری-بختیاری باشند. با این حال از جمله دلایلی که می توان برای توجیح این نتیجه داشت اولاً تعداد بیشتر حیوانات مورد بررسی برای نژاد لری- بختیاری است که باعث شده آلل ها و ژنوتیپ های بیشتری در جمعیت مشاهده شوند. ثانیاً در هنگام نمونه برداری برای جمعیت زل-آتابای تعداد ۱۸ نمونه از ۴۰ نمونه اندازه گیری شده (تقریباً نیمی از نمونه ها) مربوط به یک گله بود درحالیکه برای جمعیت لری-بختیاری از تعداد گله بیشتری نمونه برداری شد بطوریکه بیشترین تعداد حیوان نمونه برداری شده از یک گله خاص، هشت حیوان بود. جمعیت های مختلفِ هر نژاد، منابع تنوع داخل نژاد به حساب می آیند بنابراین می توان انتظار داشت چندشکلی و هتروزایگوسیتیِ بیشتری در نمونه مورد بررسی برای نژاد لری-بختیاری نسبت به آمیخته های زل-آتابای مشاهده شود که نتایج نیز اینگونه بود.

دو جمعیت گوسفند لری-بختیاری (دنبه دار و بزرگ جثه) و زل-آتابای (نیم دنبه و متوسط جثه) دارای ۹۰٪ شباهت ژنتیکی و به عبارت دیگر ۱۰٪ فاصله ژنتیکی در جایگاه ژن کالپاستاتین بر اساس شاخص نِئی بودند (جدول ۳) که نشان دهنده اختلاف ژنتیکی قابل ملاحظه بین دو جمعیت مورد مطالعه در جایگاه ژن کالپاستاتین بود. این اختلاف با توجه به تفاوت نژاد، تفاوت در صفات رشد و متابولیسم چربی بدن و نیز تفاوت شرایط محیطی و آب و هوای پرورشِ این دو جمعیت (Khaldari., 2008)، کاملاً قابل توجیه است.

اثر ژن کالپاستاتین بر صفات لاشه

نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد که اثر ژن کالپاستاتین بر وزن زنده(P<۰/۰۰۱)، وزن دنبه(P<۰/۰۰۱)، وزن لاشه(P<۰/۰۵) و درصد وزن دنبه به وزن لاشه(P<۰/۰۱) در جمعیت گوسفندان نژاد لری-بختیاری و زل-آتابای معنی دار است(جدول ۴).

مقایسه میانگین حداقل مربعات ژنوتیپ های مختلف جایگاه ژن کالپاستاتین برای صفت وزن زنده قبل از کشتار تفاوت معنی داری را بین ژنوتیپ AB با ژنوتیپ های BB(P<۰/۰۰۱) ، BE(P<۰/۰۱) ، AF و AL(P<۰/۰۵) و نیز بین ژنوتیپ های AJ و AC با ژنوتیپ های BB و BE نشان داد (P<۰/۰۱) بطوریکه گوسفندان دارای ژنوتیپ های AB، AJ و AC جایگاه ژن کالپاستاتین بیشترین، ژنوتیپ های AL و AF مقادیر متوسط و ژنوتیپ های BB و BE کمترین مقادیر وزن زنده را داشتند. در مورد وزن لاشه نیز تفاوت معنی داری بین میانگین حداقل مربعاتِ وزن لاشه گوسفندان دارای ژنوتیپAB با گوسفندان دارای ژنوتیپ های ، BB BE (P<0/01) و AF(P<0/05)، بین گوسفندان دارای ژنوتیپ AJبا گوسفندان دارای ژنوتیپ های BB و BE (P<0/05) و نیز بین گوسفندان دارای ژنوتیپ AF با ژنوتیپ BE(P<0/05) وجود د اشت بطوریکه در مورد وزن لاشه نیز گوسفندان دارای ژنوتیپ های AB و AJ جایگاه ژن کالپاستاتین بیشترین، گوسفندان دارای ژنوتیپ های AC، AL و AF مقادیر متوسط و ژنوتیپ های BB و BE کمترین مقادیر را داشتند.

مقایسه میانگین حداقل مربعات جایگاه ژن کالپاستاتینبرای صفت وزن دنبه در جمعیت لری-بختیاری نیز تفاوت معنی داری را بین گوسفندان دارای ژنوتیپ AC با گوسفندان دارای ژنوتیپ های BB و BE و نیز بین گوسفندان دارای ژنوتیپ های BB، AB و AF با ژنوتیپ BE نشان داد (P<۰/۰۵) بطوریکه حیوانات دارای ژنوتیپ های AC و BE به ترتیب بیشترین و کمترین وزن دنبه و سایر ژنوتیپ ها نیز مقادیر متوسط را داشتند. برای درصد وزن دنبه به وزن لاشه نیز تفاوت معنی داری بین گوسفندان ژنوتیپ BE با سایر ژنوتیپ ها (با ژنوتیپ های BB، AC و AF(P<۰/۰۰۱) و با ژنوتیپ AB(P<۰/۰۵) مشاهده شد بطوریکه حیوانات دارای این ژنوتیپ کمترین درصد وزن دنبه را داشتند. ارتباط ژن کالپاستاتین با وزن و درصد دنبه را می توان بدلیل اثرات پلیوتروپیک ژن

کالپاستاتین و همبستگی این ژن با ژن های مؤثر بر متابولیسم چربی بدن دانست. لازم به ذکر است که با توجه به فراوانی کم دو ژنوتیپ AL و BE (جدول ۲)، نتایج در مورد این دو ژنوتیپ به لحاظ آماری خیلی مورد اطمینان نیست. جایگاه ژن کالپاستاتین اثر معنی داری روی صفات وزن چربی درون شکمی، درصد چربی درون شکمی و بازده لاشه در جمعیت گوسفندان نژاد لری-بختیاری و آمیخته های زل-آتابای نداشت(جدول ۴).

جدول ۴- مقایسه میانگین حداقل مربعات (±SE) اثر ژنوتیپ های مختلف ژن کالپاستاتین بر صفات لاشه در جمعیت گوسفندان لری-بختیاری و زل-آتابای.

صفت	ژنوتیپ (تعداد)						
	BB (۱۴)	AB (۱۲)	AC (۱۳)	BE (۶)	AF (۳۶)	AJ (۱۲)	AL (۶)
وزن زنده(kg)***	۳۸/۹۷^{c} ±۲/۷۷	۵۰/۹۶^{a} ±۳/۰۹	۴۸/۴۰^{ab} ±۲/۷۲	۳۵/۹۹^{c} ±۳/۵۰	۴۵/۴۸^{b} ±۲/۶۴	۴۹/۱۱^{ab} ±۳/۰۰	۴۱/۵۸^{bc} ±۳/۶۶
وزن لاشه(kg)*	۲۳/۱۷^{cd} ±۰/۷۴	۲۵/۴۶^{a} ±۰/۷۴	۲۴/۳۸^{abc} ±۰/۶۶	۲۲/۵۳^{d} ±۰/۹۳	۲۴/۱۹^{bc} ±۰/۶۶	۲۵/۳۱^{ab} ±۰/۷۲	۲۴/۲۳^{abcd} ±۰/۹۵
بازده لاشه(%)^{ns}	۴۶/۹۲ ±۱/۲۵	۴۸/۹۰ ±۱/۴۰	۴۷/۸۴ ±۱/۲۹	۴۶/۵۹ ±۱/۶۰	۴۷/۸۱ ±۱/۲۰	۴۹/۵۲ ±۱/۴۵	۴۸/۷۴ ±۱/۷۴
وزن‌چربی‌درون‌شکمی(g)^{ns}	۳۳۸/۹۴ ±۱۰۳/۴	۴۰۸/۲۲ ±۱۱۸/۸	۵۴۷/۰۰ ±۱۰۷/۰	۲۷۵/۰۱ ±۱۴۲/۴	۳۱۵/۲۹ ±۱۰۰/۵	۴۹۹/۹۸ ±۱۲۲/۸	۵۸۸/۶۲ ±۱۵۸/۷
درصدچربی‌درون‌شکمی(%)^{ns}	۱/۹۶ ±۰/۳۷	۱/۸۶ ±۰/۴۳	۲/۴۶ ±۰/۳۹	۱/۷۵ ±۰/۵۲	۱/۷۸ ±۰/۳۶	۲/۳۱ ±۰/۴۵	۲/۹۹ ±۰/۵۸
وزن دنبه(kg)***	۴/۰۴^{b} ±۰/۴۹	۵/۱۰^{ab} ±۰/۴۱	۵/۵۹^{a} ±۰/۴۶	۲/۶۷^{c} ±۰/۴۱	۴/۹۳^{ab} ±۰/۳۱	-	-
درصد دنبه(%)**	۱۸/۰۶^{a} ±۱/۳۵	۱۵/۹۵^{a} ±۱/۱۳	۱۸/۳۸^{a} ±۱/۲۸	۱۱/۷۴^{b} ±۱/۱۳	۱۷/۱۱^{a} ±۰/۸۸	-	-

در بررسی ارتباط پلی مورفیسم ژن کالپاستاتین در دو جایگاه اگزون ۶ و اگزون و اینترون ۱ (هر دو به روش SSCP) با وزن لاشه و وزن اجزاء لاشه در ۱۵۰ رأس گوسفند بومی نیوزلند، یک ارتباط معنی دار بین سه آلل a، A و B باوزن گوشت راسته مشاهده شد(P<۰/۰۵)، بطوریکه یکی از این آلل ها منجر به افزایش ۱۵ درصدی در وزن گوشت راسته گردید.

همچنین ارتباط ضعیفی(P<۰/۰۸) بین آلل های a، d، D، B و C با وزن سینه، ران و ناحیه کمر وجود داشت (Bickerstaffe et al., 2006). طی مطالعه ای که در آن ارتباط چندشکلی جایگاه اینترون ۱۲ ژن کالپاستاتین به روش PCR-RFLP و توسط سه آنزیم MspI، NcoI و HinfI در دو نژاد گوسفند سنتزی SCP و BCP با صفات ماهیچه (عمق ماهیچه و ضخامت چربی پشت) مورد بررسی قرار گرفت، حیوانات دارای ژنوتیپ ac نسبت به حیوانات دارای ژنوتیپ ae و aa و آلل c نسبت به آلل های a و e دارای ضخامت چربی پشت بیشتری در ۱۲۰ روزگی (P<۰/۰۱) بودند. (Greguła-Kania et al., 2012) در بررسی اثر چندشکلی جایگاه ۶۲۲ جفت بازی اگزون ۱ ژن کالپاستاتین به روش PCR-RFLP بر صفات لاشه در جمعیت گوسفندان ماکویی مشخص شد که ارتباط چندشکلی این جایگاه با وزن لاشه معنی دار است (P<۰/۰۵) اما ارتباط معنی داری با وزن دنبه مشاهده نشد (Moradi Shahrbabak, 2009).

طی مطالعه دیگری که در آن اثر ژنوتیپ های ژن کالپاستاتین بر خصوصیات لاشه گله های گاو بومی مورد بررسی قرار گرفت، مشخص شد ژنوتیپ های CAST28 بر ضخامت چربی پشت اثر می گذارند. اما ژنوتیپ های CAST67 اثری بر وزن لاشه و دیگر خصوصیات آن نداشت و ژنوتیپ BB بیشترین ضخامت چربی پشت را داشت (Chung et al., 2002).

همچنین در مطالعه ارتباط پلی مورفیسم ژن کالپاستاتین در جایگاه هایCAST28 و CAST67 با صفات لاشه در گاوهای نر آنگوس با روش های PCR-SSCPو PCR-RFLP یک اختلاف معنی دار بین ژنوتیپ های CAST67 با چربی اطراف قلب، لگن، مثانه و فعالیت کالپاستاتین مشاهده شد. فعالیت کالپاستاتین همبستگی بالایی با ضخامت چربی و میزان ماربلینگ داشت (Chung et al., 2001).

نتیجه گیری کلی

بطور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که جایگاه اگزون ۶ و اینترون های ۵ و ۶ ژن کالپاستاتین دارای تنوع ژنتیکیِ بالایی در هر دو جمعیت گوسفند مورد مطالعه بویژه در جمعیت لری- بختیاری است. با توجه به اینکه، تنوع به عنوان ماده اولیه انتخاب، مهم ترین ویژگی یک جمعیت جهت انجام عملیات اصلاح نژادی است بنابراین به نظر می رسد این جایگاه، کاندیدای مناسبی جهت انتخاب و اصلاح نژاد گوسفندان دو نژاد مورد مطالعه برای صفات رشد و چربی لاشه (بدلیل تفاوت قابل ملاحظه چندشکلی این جایگاه بین نژادهای دنبه دار و بی دنبه) باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ژنوتیپ های AB وAJ جایگاه ژن کالپاستاتین به لحاظ صفات رشد و ژنوتیپ های BE و AB به لحاظ صفت وزن و درصد وزن دنبه (به عنوان صفتی نامطلوب از نظر مصرف کننده و متخصصین اصلاح نژاد)، ژنوتیپ های برتربودند و در مجموع ژنوتیپ AB هم به لحاظ صفات رشد و هم به لحاظ صفت وزن دنبه ژنوتیپ مطلوبی است. از طرفی ژنوتیپ BE اگرچه به لحاظ دنبه ژنوتیپ مطلوبی است ولی از نظر صفات رشد ژنوتیپی نامطلوب است. البته با توجه به فراوانی کم این ژنوتیپ در دو جمعیت مورد مطالعه در تحقیق حاضر، نتایج در مورد این ژنوتیپ خیلی مورد اطمینان نیست.

سپاسگزاری

حمایت مالی این تحقیق از محل اعتبارات قطب علمی بهبود کمی و کیفی لاشه گوسفندواقع در گروه علوم دامی پردیس کشاورزیِ و منابع طبیعی دانشگاه تهران انجام گرفته است. لذا، بدین وسیله از ریاست محترم قطب علمی بهبود کمی و کیفی لاشه گوسفندتشکر و قدردانی می گردد. 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 همکاری های مدیریت محترم کشتارگاه های صنعتی شهرستان های جونقان (استان چهار محال و بختیاری) و گرگان (استان گلستان) در تهیه نمونه های این تحقیق، معاونت کل امور دام استان چهار محال و بختیاری و ریاست سازمان دامپزشکی کل استان گلستان و ریاست اداره دامپزشکی شهرستان گرگان جهت صدور مجوز به منظور خون گیری و اندازه گیری صفات لاشه در کشتارگاه های مذکور وریاست محترم مراکز تحقیقات کشاورزی شهرستان های شهرکرد و گرگان جهت اسکان در این شهرستان ها و استفاده از امکانات آزمایشگاهی صمیمانه تشکر و قدردانی می شود.

REFERENCES

1. Bassam B. J., Anolles C. G. & Gresshoff P. A. (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA inpolyacrylamid gels.*Analytical Biochemistry*, 19, 680-830.
2. Bickerstaffe R., Hickford J. G. H., Gately K. & Zhou H. (2006). Association of polymorphicvariations in calpastatin with meat tenderness and yield of retail meat cuts in lambs. Agriculture & Life Sciences Division, Lincoln University, Canterbury, New Zealand.
3. Chung H. Y., Davis M. E. & Hines H. C. (2001). Effects of calpain and calpastatin genotypes on growth of Angus bulls. Ohio State University Extension Research Bulletin: Special Circular, 181–201.
4. Chung H. Y., Kirn C. D., Cho C. Y., Yeon S. H., Jin H. J., Jeon K., Kirn H. C., Lee H. J., Hines H. C. & Davis M. E. (2002). Effects of calpastatin gene polymorphism on growth and carcass traits of korean native cattle: *Proceedings of the 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*,2, 143-147.
5. Eftekhari Shahroudi F., Nassiry M. R., Valizadh R., Heravi Moussavi A., Tahmoorespour M. & Ghiasi H. (2006). Genetic polymorphism at MTR1A, CAST and CAPN loci in Iranian Karakul sheep. *Iranian Journal of Biotechnology*, 4, 117-122.
6. Fatehi F. (2007). *Animal genetics and breeding* (1nded.). Iran.: Dibagaran of Tehran. (In Farsi).
7. Forsberg N. E., Ilian M. A., Ali-Bar A., Cheeke P. R. & Wehr N. B. (1989). Effects of cimaterol on rabbit growth and myofibrillar protein degradationand on calcium dependent proteinase and calpastatin activities inskeletal muscle.*Journal of Animal Science*, 67, 3313-3321.
8. Greguła-Kania M. (2012). Effect of calpastatin gene polymorphism on lamb growth and muscling.*Annals of Animal Science*, 12(1), 63–72.
9. Goll D. E., Thompson V. F., Taylor R. G. and Ouali A. (1998). The calpain system and skeletal muscle growth. *Canadian Journal of Animal Science*, 78, 503-512.

10. Khaldari M. (2008). *Principles of sheep & goat production* (2nd ed.). Iran.:Jahad University Publications. (In Farsi).
11. Koohmaraie M. (1992). The role of Ca(2+)-dependent proteases (calpains) in post mortem proteolysis and meat tenderness. *Biochimie*, 74, 239–245.
12. Miller S. A., Dykes D. D. & Polesky, H. F. (1998). A simple salting out procedure for extraction of DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Research*,16, 1215.
13. Mohamadi M., Beigi Nasiri M. T., Alami-Saeid K. h., Fayazi J., Mamoee M. & Sadr A. S. (2008). Polymorphism of calpastatin gene in Arabic sheep using PCR- RFLP. *African Journal of Biotechnology*, 15, 2682-2684.
14. 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. dissertation, University of Tehran, Karaj, Alborz, Iran.
15. Nanekarani S., Khederzadeh S. & Kaftarkari A. M. (2011). Genotypic frequency of calpastatin gene inAtabi sheep by PBR Method. *Inter. Conf. Food Engineering.Biotech*, Singapoore, 9, 189-192.
16. Nassiry M. R., Eftekhari Shahroudi F., Tahmoorespur M. & Javadmanesh A. (2007). Genetic variabilityand population structure in beta-lactoglobulin, calpastatin and calpain loci in Iranian Kurdisheep. *PakistanJournal of Biological Science*, 10(7), 1062-1067.
17. Palmer B. R., Morton J. D. & Roberts N. (1999). Marker–assisted selection for meat quality and the ovine calpastatin gene. *Proc NZ Society Anim Prod*, 59, 266-268.
18. Palmer B. R., Roberts N., Hickford J. G. H., Bickerstaffe R. (1998). PCR-RFLP for MspI and NcoI in the ovine calpastatin gene. *Jornal of Animal Science*, 76, 1499-1500.
19. Vatankhah M., Moradi Shahrbabak M., Nejati Javaremi A., Miraei Ashtiani S. R. & Vaez torshizi R. (2006). Study on exterior dimensions of fat-tail and their association with fat-tail weight in Lori-Bakhtiari sheep breed. *Sciences and Technologies of Agriculture and Natural Resources*, 10th year, 3(B), 445-455.(In Farsi).
20. Zhou H., Hickford J. G. H. & Gong H. (2007). Polymorphism of the ovine calpastatin gene.*Molecular and Cellular Probes*, 21, 242–244.
21. Zicong L., Binghai C., Baoping Z., Xiaojian Y., Ming Z. F., Jinzeng Y. (2009). Decreased expression of calpain and calpastatin mRNA during development is highly correlated with muscle protein accumulation in neonatal pigs. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part A, 152, 498–503.