

## بررسی ارتباط بین چندشکلی ژن میوستاتین و صفات کمی ماهی قزل آلاهی رنگین-

### کمان پرورشی (*Oncorhynchus mykiss*) با روش PCR-SSCP

سجاد نظری<sup>۱\*</sup>، ولی اله جعفری<sup>۱</sup>، محمد پورکاظمی<sup>۲</sup>، حامد کلنگی میاندره<sup>۱</sup>، حسین علی عبدالحی<sup>۳</sup>

\*sajadnazari13@gmail.com

- ۱- دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، دانشکده شیلات، گلستان، ایران  
 ۲- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، صندوق پستی ۱۴۹/۱۴۹۶۵، تهران، ایران  
 ۳- سازمان شیلات ایران، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۵

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۵

#### چکیده

در مطالعه حاضر توالی ژن میوستاتین قزل آلاهی رنگین کمان بررسی و ارتباط بین چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی (SNPs) این ژن با صفات کمی رشد با استفاده از روش‌های توالی‌یابی و PCR-SSCP مورد آنالیز قرار گرفت. به همین منظور تعداد ۲۰ عدد قزل آلاهی رنگین کمان مولد موجود در مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی یاسوج انتخاب و علامت‌گذاری (به روش دستی) و سپس بچه ماهیان حاصل از تکثیر آنها در شرایط پرورشی مناسب و یکسان در یک دوره پنج ماهه نگهداری شدند. در ادامه برای آزمایشات مولکولی استخراج ژنوم طبق روش استاندارد از نمونه‌های بچه ماهی به صورت تصادفی صورت پذیرفت. تعداد دو جهش تک نوکلئوتیدی ( $g.1904C>A$  و  $g.660T>C$ ) در نواحی اینترون ۱ و ۲ ژن میوستاتین با استفاده از روش توالی‌یابی DNA و PCR-SSCP شناسایی شد. در مجموع تعداد ۶ هاپلوتیپ در بین نمونه‌های بچه ماهی این مرکز بدست آمدند. آزمون پیوستگی هاپلوتیپ و صفات کمی وزن و طول از شاخص‌های رشد نشان داد بین ژنوتیپ‌های TC و CC در نقطه  $g.1904C>A$  ارتباط معنی‌داری با طول و وزن در زمان ۹۰ و ۱۵۰ روزگی بچه ماهیان وجود دارد ( $p<0/05$ ) ولی ارتباط معنی‌داری بین هاپلوتیپ‌های SNP  $g.660T>C$  و صفات کمی مشاهده نگردید. نتایج این تحقیق نشان داد که وزن و طول بچه ماهیان انگشت قد قزل آلاهی رنگین کمان با ژن میوستاتین مرتبط بوده و این ژن می‌تواند به عنوان ژن کاندید سودمند در برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر<sup>۱</sup> (MAS) گونه قزل آلاهی رنگین کمان مورد استفاده قرار گیرد.

**لغات کلیدی:** قزل آلاهی رنگین کمان، ژن میوستاتین، صفات کمی، چندشکلی تک نوکلئوتیدی (SNP)، انتخاب به کمک نشانگر

\*نویسنده مسئول

<sup>۲</sup> Marker-Assisted Selection

## مقدمه

در دهه اخیر، کاربرد تئوری ژنتیک کمی برای بهبود رشد گونه‌های آبی برای ۱۹ گونه مهم آبی پروری در حال پرورش در برنامه‌های اصلاح نژادی توسعه نموده و این مسئله تمرکز محققین را بر درک مفاهیم ژنتیکی صفات (مانند وراثت پذیری و همبستگی ژنتیکی) بیشتر نموده است (Glover *et al.*, 2009; Gjedrem *et al.*, 2012). امروزه برنامه‌های اصلاح نژادی از تئوری ژنتیک کمی نوین برای برآورد واریانس فنوتیپی صفات بهره می‌گیرد. تئوری ژنتیک کمی فرض می‌دارد که اثرات انفرادی ژن‌ها ناشناخته و معمولا کوچک هستند (مدل بسیار کوچک واریانس صفت). تحت تاثیر این مدل چیزی که از سهم ژن‌های انفرادی مهم‌تر است، اثرات افزایشی همه ژن‌ها در تظاهر صفات می‌باشد و این اثرات ترکیبی معمولا به عنوان برآوردی از شاخص اصلاح نژادی در نظر گرفته می‌شوند (Gjedrem *et al.*, 2012).

امروزه پیشرفت‌های قابل توجهی در روش‌های آماری و ژنتیک مولکولی جهت شناسایی ژن‌ها یا نواحی ژنومی موثر بر صفات مهم اقتصادی حاصل شده است. بصورت یک اصل، انتخاب به کمک نشانگر (MAS) استفاده از نشانگرهای ژنتیکی مرتبط با QTL ها در برنامه اصلاح نژاد می‌باشد (Hale *et al.*, 2014; Sawayama & Takagi, 2015). شناسایی نشانگرها و یا ژنهای موثر بر صفات کمی و سپس انتخاب ماهیان به کمک این نشانگرها یا ژن‌ها استراتژی ارزشمندی است که برای صفاتی حائز اهمیت است که وراثت پذیری پایین داشته و یا اندازه گیری آنها مشکل است. در این صفات انتخاب به کمک نشانگر می‌تواند سبب افزایش صحت و دقت برآورد معیارها شود. همچنین این استراتژی در انتخاب ماهیان برای صفاتی که فقط بعد از بلوغ قابل اندازه گیری هستند، می‌تواند از طریق کاهش قابل توجه فاصله بین نسل‌هایی، بسیار کارآمد و مفید باشد (Doerge, 2002; Thomas *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2016).

با توجه به تحقیقات انجام شده، استفاده از گونه قزل-آلای رنگین‌کمان در مطالعات ژنتیک و اصلاح نژاد روز به روز در حال توسعه بوده، به طوری که در سال‌های اخیر

دو کشور فرانسه و آمریکا بصورت مشترک فعالیت‌هایی را برای ایجاد بانک ژن قزل‌آلای رنگین‌کمان بر اساس فن-آوری توالی‌یابی آغاز نموده اند (Palti *et al.*, 2012). اگرچه ژنوم قزل‌آلای رنگین‌کمان مشابه اندازه ژنوم پستانداران (نظیر انسان و گاو) است، اما ساختار و سازمان پیچیده‌ای دارد. همه ماهیان شعاع باله در مقایسه با ژنوم پستانداران و پرندگان، یک ژنوم اجدادی اضافه دارند ولی آزاد ماهیان یک ژنوم اضافه تر دارند (Allendorf & Thorgaard, 1984) و لوکوس‌های زیادی در حال دوبرابر شدن هستند که بین ۲۵ تا ۵۰ درصد برآورد می‌شوند (Palti *et al.*, 2004). علاوه بر این، تخمین زده می‌شود ۵۰ درصد ژنوم قزل‌آلای رنگین‌کمان از توالی‌های تکراری تشکیل یافته‌اند (Genet *et al.*, 2011).

امروزه ارتباط بین چند شکلی تک نوکلئوتیدی (SNP) و صفات به منظور مشخص نمودن ژنهای عمده موثر در صفات کمی، صورت می‌پذیرد. همچنین آنالیز پیوستگی بین الل‌های یک ژن کاندید و صفت خاص به عنوان شاهدهی برای کنترل ژنتیکی آن صفت می‌باشد (Lynch & Walsh, 1997; Yang *et al.*, 2016). چند شکلی تک نوکلئوتیدی از روش‌هایی است که اخیرا در بررسی تنوع در توالی DNA و شناسایی تنوع بین آبزیان مختلف مورد استفاده قرار گرفته است (Vera *et al.*, 2013; Meng *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015). از مزایای چند شکلی تک نوکلئوتیدی می‌توان به هم بارز بودن، نمره‌دهی آسان و مناسب بودن آن برای فعالیت‌های شناخت تنوع ژنتیکی اشاره نمود (Wang *et al.*, 2008; Vandeputte & Haffray, 2014).

ژن‌های کاندید بر اساس نقش آنها در تنظیم مسیرهای متابولیکی خاص که بر یک صفت کمی بخصوصی اثر می‌گذارند، ردیابی می‌شوند. در مطالعات ژن‌های کاندید، ژن‌های مفروض بر اساس میزان چند شکلی مطالعه می‌شوند و ارتباط آماری بین الل‌های بخصوص و بروز فنوتیپی یک صفت مورد بررسی قرار می‌گیرد. اگر ارتباط معنی داری مشاهده شد، مشخص می‌گردد که ژن مورد نظر به صورت مستقیم در ارتباط با کنترل ژنتیکی صفت می‌باشد (Wallis & Devlin, 1993; Vong *et al.*, 2011; Kocour & Kohlmann, 2003) و این

### مواد و روش کار

در ابتدا تعداد ۲۰ مولد قزل‌آلای رنگین‌کمان موجود در مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی یاسوج معاینه و برای تکثیر انتخاب و علامت‌گذاری و سپس ماهیان در شرایط پرورشی مناسب نگهداری شدند. در ادامه تکثیر مولدین در شرایط بهینه و پس از انجام روش-های بیهوشی و ضدعفونی انجام پذیرفت. بعد از انجام تکثیر تخم‌های حاصله تحت شرایط یکسان انکوباسیون قرار گرفته و بچه ماهیان حاصل به مدت ۵ ماه پرورش یافتند (Sun *et al.*, 2012). در طول دوره، پارامترهای مختلف پرورشی نظیر دما و ورودی آب کنترل و شرایط یکسانی برای گروه‌های مختلف در یک دوره پرورشی فراهم گردید. همچنین غذادهی با استفاده از غذاهای مرغوب تجاری (کیمیگران) و بصورت روزانه و در زمان-های مشخص صورت گرفت. صفات کمی نظیر وزن بدن (BW)، طول کل (TL) در فواصل ۳۰، ۹۰ و ۱۵۰ روز اندازه‌گیری شدند. بعد از جمع‌آوری نمونه‌ها به منظور انجام آزمایشات مولکولی اقدام به ساخت برخی بافر و محلول جهت استخراج DNA و الکتروفورز محصولات DNA و PCR طبق روش‌های استاندارد گردید (Sambrook & Russell, 2001; Pourkazemi *et al.*, 2012). برای سنجیدن کیفیت DNA استخراج شده از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد و رنگ آمیزی برمید اتیدیم ۰/۵ درصد استفاده شد. همچنین برای بررسی کمی DNA استخراج شده از روش جذب نوری ۲۸۰/۲۶۰ نانومتر استفاده گردید.

### انتخاب پرایمر

در بررسی حاضر، توالی ژن میوستاتین از بانک ژن (NCBI) استخراج و با استفاده از نرم افزار Oligo 7.0 پرایمرهای پیشرو و معکوس طراحی شدند. تعداد ۳۰ بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به طور تصادفی انتخاب و ژن میوستاتین آنها توالی یابی و اینترون و اگزون آنها مورد آنالیز قرار گرفت. ژنوتایپینگ SNP نیز با استفاده از توالی یابی مستقیم صورت پذیرفت.

مسئله مهم است که مشخص شود ژن کاندید به صورت مستقیم بر تنوع صفات اثر می‌گذارد (به عنوان یک ژن عمده) یا با ژن‌های عمده بدلیل نزدیکی فاصله بر روی کروموزوم متصل و به عنوان یک نشانگر QTL عمل می‌نماید (Tao & Boulding, 2003).

ژن انتخابی در این بررسی ژن میوستاتین یا GDF-8 است که متعلق به زیر خانواده TGF-B بوده و هیپرتروفی ماهیچه را کنترل می‌کند. پروتئین کدشونده توسط این ژن سبب رشد ماهیچه‌های اسکلتی می‌شود که با جلوگیری از تقسیمات سلولی این عمل را تنظیم می‌کند و جهش در این ژن باعث ایجاد رشد بیش از حد ماهیچه می‌شود (Thomas *et al.*, 2000; Joulia *et al.*, 2003; Lee, 2004). عملکرد این ژن در پستانداران بخوبی شناخته شده است ولی در دیگر مهره داران بخصوص ماهیان کمتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (Rodgers and Garikipati, 2008). ژن میوستاتین از نظر ساختاری و عملکردی در چندین گونه از ماهیان مورد بررسی قرار گرفته است از جمله می‌توان به مطالعه قزل‌آلای رنگین‌کمان (Rescan *et al.*, 2001)، آزاد ماهی اقیانوس اطلس (Salmo salar) Ostbye *et al.*, 2001) و هامور خال قرمز (Epinephelus) (Ko *et al.*, 2007) اشاره نمود. برخلاف پستانداران، این ژن در ماهیان در بیشتر بافت‌ها از جمله ماهیچه‌های اسکلتی، مغز، روده، آبشش، تخمدان و پوست شناسایی شده است و نشان می‌دهد این ژن نه تنها باعث تنظیم رشد ماهیچه‌ها می‌شود، بلکه ممکن است عملکردهای دیگری نظیر رشد گناد و رسیدگی جنسی نیز داشته باشد (Roberts & Goetz, 2003; Peñaloza *et al.*, 2013). هدف از مطالعه حاضر شناسایی چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی (SNPs) موجود در توالی ژن میوستاتین قزل‌آلای رنگین‌کمان و بررسی ارتباط بین ژنوتیپ‌های این ژن با صفات کمی رشد با استفاده از روش توالی‌یابی و PCR-SSCP می‌باشد.

جدول ۱: پرایمرهای طراحی شده ژن میوستاتین قزل‌آلای رنگین‌کمان

ردیف	پرایمر (پیشرو F و معکوس R)	توالی (۳' - ۵')	مکان	طول (جفت باز)
۱.	MSTN1 -F	GGCCTGGATTATTGCTCCGAAA	۴۷۵-۴۹۷	۲۸۶
	MSTN1 -R	GCAGCCCCACCAAGATGTCTC	۷۴۰-۷۶۱	
۲.	MSTN2-F	CTATTATACGACTCACTATAGG	۱۷۲۵-۱۷۴۷	۲۸۴
	MSTN2- R	GTCGTATCAACGCAGAGT	۲۰۹۱-۲۱۰۹	
۳.	MSTN3-F	ATGGTGCCTGACACTGAGGC	۸۲۱-۸۴۱	۲۳۲
	MSTN3- R	GCACTGCGTCAGCATCTGAGC	۱۰۳۲-۱۰۵۳	

### بهینه کردن شرایط PCR و تکثیر ژن

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل: 10.dNTPs میلی مولار، ۰/۵ تا ۰/۹۵ میکرولیتر؛ پرایمر (۱۰ پیکومول)، یک میکرولیتر؛ DNA، 100 نانوگرم، دو میکرولیتر؛ PCR بافر، ۲/۵ میکرولیتر با غلظت 10x؛ کلرید منیزیم ۱ میلی مولار، آب مقطر دیونیزه برای رساندن به حجم مورد نظر در pH : ۸ انجام گرفت. شرایط چرخه دمایی و مشخصات داده شده به دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad, USA) برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز به ترتیب مرحله جداسازی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، مرحله اتصال پرایمرها ۵۸ تا ۶۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، بسط پرایمر در ۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ دقیقه برای ۳۵ چرخه بهینه سازی گردید. برای بررسی کیفیت محصول PCR بدست آمده، بر طبق اندازه قطعه تکثیر شده از ژل آگارز ۱-۱/۵ درصد استفاده شود. از این رو مقدار ۴ میکرولیتر از محصول PCR درون چاهک‌های ژل آگارز در حضور مارکر وزن مولکولی (Fermentas) اضافه شد و به مدت ۴۵ دقیقه با ولتاژ ۸۰ ولت الکتروفورز انجام گرفت. رنگ-آمیزی با استفاده از اتیدیوم برماید در غیاب نور انجام گرفت و با دستگاه مستندسازی ژل ( Vilber lurmat, France) عکس‌برداری شدند.

### بررسی چندشکلی فرم فضایی تک رشته‌ای (SSCP)

با توجه به اینکه عوامل زیادی می‌توانند در بازدهی و دقت روش SSCP دخیل باشند، از این رو مهمترین این عوامل

در مطالعه حاضر بررسی و حالت بهینه انتخاب شد. از جمله این عوامل می‌توان به طول قطعه محصول PCR، درصد اکریل آمید، نسبت اکریل‌آمید: بیس اکریل‌آمید، مقدار گلیسرول، نسبت رقیق‌سازی محصول PCR، مدت زمان عملیات الکتروفورز، دمای الکتروفورز و شدت جریان الکتروفورز قابل اشاره است. آنالیز SSCP شامل چند مرحله متوالی به صورت زیر انجام گرفت:

### تکثیر قطعه مورد نظر طی فرایند PCR

یکی از مهمترین عوامل موثر بر بازدهی آنالیز SSCP استفاده از محصول PCR بهینه و کاهش محصول غیر اختصاصی است. برای انجام واکنش PCR ابتدا محلول اولیه درون تیوب ۱/۵ میلی‌لیتر آماده و سپس بین تیوب-های ۰/۲ میلی‌لیتر تقسیم و به هر کدام از آنها DNA افراد مختلف با غلظت یکسان اضافه شد. بعد از انجام گرفتن واکنش PCR برای حصول اطمینان از حضور و غلظت محصول بدست آمده، ۳ میکرولیتر از محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد در مجاورت نشانگر وزن مولکولی استاندارد مورد بررسی قرار گرفت.

### واسرشته سازی محصول PCR

برای تبدیل DNA دو رشته‌ای به DNA تک‌رشته‌ای، مقدار ۱۰ میکرولیتر محصول بدست آمده از PCR، 10 میکرولیتر محلول واسرشته‌سازی SSCP (شامل ۶ میکرولیتر بافر فرمامید، ۱ میکرولیتر هیدروکسید سدیم ۰/۱ مولار و ۳ میکرولیتر TBE 0.5X) اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

SNPها در توالی‌های همتراز شده بصورت دستی بازبینی و سپس با نرم افزار BioEdit7.2.5 کروماتوگرام هر نمونه ارزیابی شدند (Hall, 1999). همه SNPها در ژن میوستاتین در نمونه‌ها مشاهده و با توالی‌یابی مجدد هر نمونه تایید شدند.

### آنالیز آماری

فراوانی اللی و ژنوتیپی و تعادل هاردی-واینبرگ، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار به کمک نرم افزار Popgene3.2 محاسبه شد (Yeh *et al.*, 1999; Nei, 1973). در تست تعادل هاردی-واینبرگ ضریب تصحیح Bonferroni نیز ( $\alpha=0.05$ ) محاسبه می‌شود (Rice, 1989) و سطح احتمال P با استفاده از این ضریب تعدیل شد. هاپلوتیپ‌های بدست آمده نیز با استفاده از نرم افزارهای (Stephens *et al.*, 2001) و (Dnasp Librado & Rozas, 2009) و شاخص چندشکلی (PIC) نیز بر اساس روش (Botstein *et al.*, 1980) بدست آمدند. ارتباط بین هاپلوتیپ‌های نشانگر ژن میوستاتین و صفات رشد با استفاده از مدل خطی (GLM) زیر به کمک نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ (Holzer & Precht, 1992) انجام شد.

$$Y = u + G + e$$

Y: شاخص فنوتیپی هر صفت؛ u: شاخص میانگین صفات؛ G: ثابت ژنوتیپی هر SNP؛ e: اثر خطای تصادفی

### نتایج

نتایج بررسی شدت وضوح باندهای DNA بر روی ژل آگارز (۰/۸ درصد) نشان داد که نمونه‌های DNA استخراج شده از بافت قزل‌آلای رنگین‌کمان از کیفیت قابل قبولی برای استفاده در آزمایش PCR برخوردار هستند. باندهای DNA قوی و شفاف بودند و نشان دهنده این مسئله بود که DNA استخراج شده فاقد آلودگی پروتئینی و RNA بودند (شکل ۱).

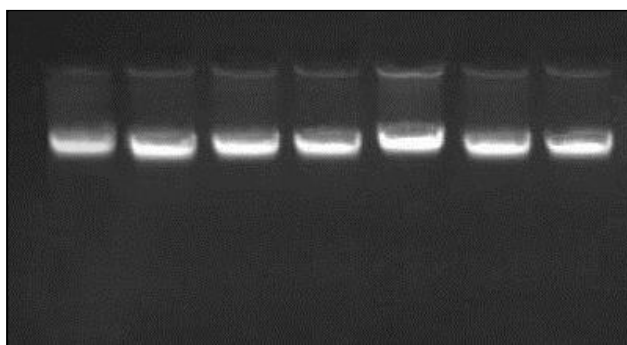
پس از گذشت این مدت زمان بلافاصله نمونه‌ها به روی یخ انتقال داده شد. برای اینکه دمای محلول به سرعت پایین بیاید و ssDNA محصول PCR ساختار سه‌بعدی لازم را پیدا کنند، تیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در درون یخ نگه داشته شدند و بلافاصله برای الکتروفورز (Cleaver, UK) مورد استفاده قرار گرفت.

### الکتروفورز ژل پلی‌اکریل آمید (PAGE) و رنگ-آمیزی

برای ساختن ژل پلی‌اکریل آمید مخصوص روش SSCP از روش (Russell 2001 و Sambrook) استفاده شد. با آماده شدن ژل پلی‌اکریل آمید و انجام گرفتن مراحل پیش‌رانش و ثابت شدن دمای تانک روی ۴ درجه سانتی-گراد، نمونه‌های ssDNA آماده شده روی یخ درون چاهک‌های ژل ریخته شدند و با جریان ۱۲۰ ولت به ازای هر سانتی‌متر و مدت زمان ۱۴-۱۲ ساعت الکتروفورز نمونه‌ها انجام گرفت. برای مرئی نمودن باندها نیز از روش رنگ آمیزی نیترا نقره استفاده شد (Qu *et al.*, 2005).

### شناسایی چند شکلی تک نوکلئوتیدی (SNP)

پس از شناسایی چندشکلی ژن میوستاتین نمونه‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان محصولات PCR آن‌ها جهت توالی‌یابی به شرکت ژن فناوری (نماینده شرکت ABI در آلمان) برای تعیین توالی ارسال گردیدند. به این ترتیب DNA به طور مستقیم در تکه‌های ذوب شده طبق روش استاندارد (Kretz & O'Brein, 1993) با S ۳۵ و با استفاده از کیت توالی‌یابی cyclist Taq DNA و پرایمر پیشرو به عنوان پرایمر توالی‌یابی مورد استفاده قرار گرفتند (ABI, Applied Biosystems). سپس توالی‌های بدست آمده با استفاده از نرم افزارهای BioEdit7.2.5 و CodonCode Aligner6.0.2 آنالیز شدند. چند شکلی تک نوکلئوتیدی بوسیله نرم افزار SNPpipeline (Ewing & Green 1998) و بدنبال آن احتمال صحت هر SNP در جایگاه‌های متغیر از توالی‌های همتراز شده برآورد شدند. همه

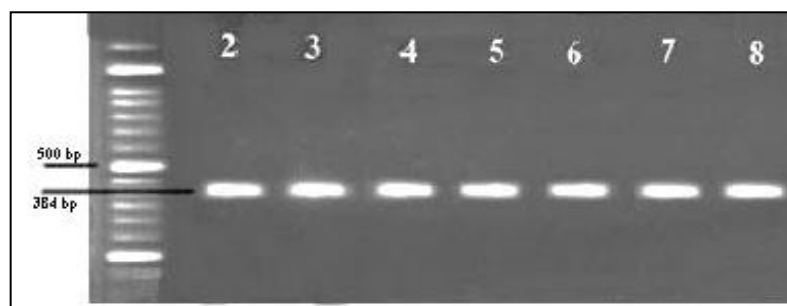


شکل ۱: نمونه‌ای از DNA استخراج شده به روش فنل-کلروفرم بر روی ژل آگارز ۰/۸٪

موفق یک جایگاه علاوه بر انتخاب پرایمر مناسب، به بهینه بودن شرایط دیگری چون غلظت کاتالیزور  $MgCl_2$ ، مقدار DNA الگو، مقدار پرایمر و آنزیم پلی‌مرز بستگی دارد. با تغییر هر کدام از این عوامل همراه با ثابت نگه داشتن سایر متغیرها و مشاهده نتایج روی ژل آگارز، مقدار بهینه هر کدام از این فاکتورها بدست آمد. در این بررسی پرایمرهای شماره یک و دو ایجاد باندهای چندشکلی نمودند ولی پرایمر سه در نمونه‌ها چندشکلی نشان نداد.

### نتایج الکتروفورز محصول PCR

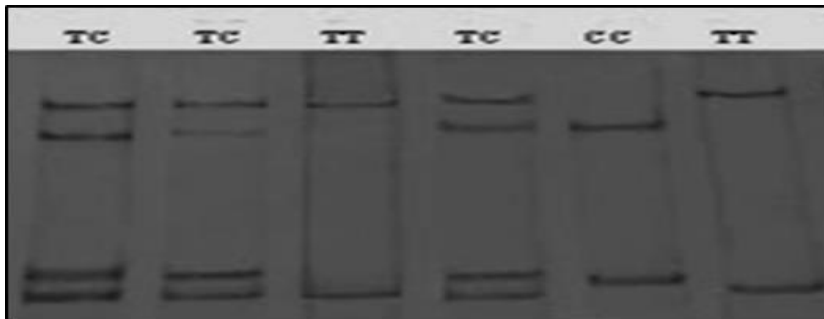
بررسی محصول PCR ژن میوستاتین قزل‌آلای رنگین-کمان، بر روی ژل آگارز ۰/۸٪ به همراه مارکر ۵۰ جفت بازی، نشان دهنده تکثیر قطعه واحدی به طول حدود ۳۸۴ و ۲۸۶ جفت بازی برای پرایمرهای یک و دو ژن میوستاتین می‌باشد (شکل ۲). محصولات PCR ژن میوستاتین که برای توالی‌یابی مورد استفاده قرار گرفتند دارای باندهای قوی و بدون باندهای غیر اختصاصی، باند دایمر- پرایمر و همینطور فاقد باند اسمیر بودند. تکثیر



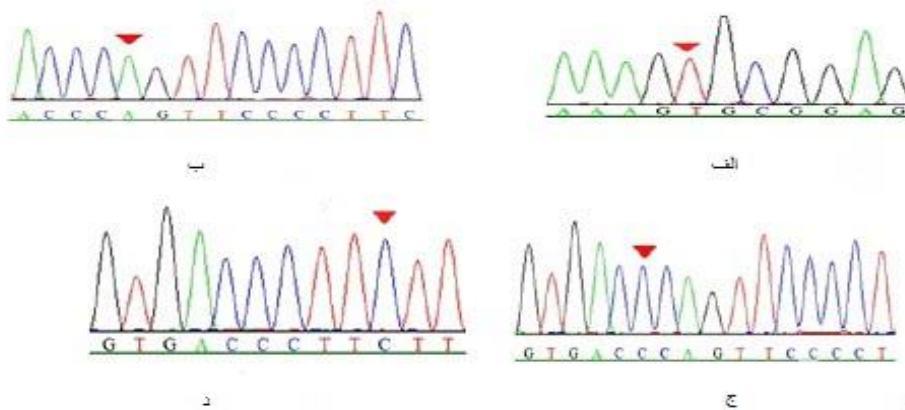
شکل ۲: محصول PCR تکثیر شده بخشی از ژن میوستاتین (ژل آگارز ۱ درصد، ستون سمت چپ محصول PCR با ۳۸۴ جفت باز (bp)، با استفاده از مارکر ۵۰ جفت باز نشان داده شده است).

روش توالی‌یابی DNA و PCR-SSCP شناسایی شدند. در مجموع با شناسایی جهش‌های تک نوکلئوتیدی تعداد ۶ هاپلوتیپ در بین نمونه‌های این مرکز بدست آمدند.

نتایج نشان داد تعداد دو جهش تک نوکلئوتیدی بدون تغییر در نقاط ۶۶۰ (g.660T>C) و ۱۹۰۴ (g.1904C>A) در نواحی اینترون ۱ و ۲ ژن میوستاتین به ترتیب برای پرایمرهای شماره یک و دو با استفاده از



شکل ۳: الگوی بانندی چند شکلی تک نوکلئوتیدی: هاپلوتیپ های TC و CC و TT



شکل ۴: نقشه های توالی یابی قسمتی از SNP های مشاهده شده (علامت پیکان در تصویر) در ژن میوستاتین فزل-آلای رنگین-کمان الف و ب: مربوط به SNP g.660C>A؛ ج و د: مربوط به SNP g.1904T>C

هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) و قابل انتظار (He) به ترتیب ۰/۳۰۲ و ۰/۲۹۰ برای لوکوس g.660T>C بدست آمدند. همچنین میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده و قابل انتظار برای لوکوس g.1904T>C به ترتیب ۰/۴۸۶ و ۰/۵۲۰ محاسبه گردید که در مقایسه با لوکوس g.660T>C بیشتر بود (جدول ۲).

فراوانی هاپلوتیپ و الل های دو SNP بدست آمده در مرکز پرورشی در جدول ۲ آورده شده است. برای پرایمر یک در نقطه g.660C>A سه هاپلوتایپ بدست آمد که بیشترین فراوانی هاپلوتیپی مربوط به هاپلوتیپ AA بود و هاپلوتیپ CC در بین نمونه ها کمترین مقدار را داشت. در مجموع فراوانی الل A در نمونه ها در نقطه g.660C>A بیشتر از فراوانی الل C بود. با توجه به جدول میزان

جدول ۲: فراوانی هاپلوتیپ و الل های دو جهش تک نوکلئوتیدی بدست آمده در فزل-آلای رنگین-کمان

P	PIC	He	Ho	فراوانی اللی		فراوانی ژنوتیپ (%)			لوکوس
				A	C	CC	CA	AA	g.660C>A
۰/۱۳۲	۰/۲۱۶	۰/۲۹۰	۰/۳۰۲	۷۶/۲۵	۲۳/۷۵	۱۵/۱۲	۲۵/۵۵	۴۸/۱۸	
				C	T	TT	TC	CC	g.1904T>C
<۰/۰۵	۰/۳۳۸	۰/۵۲۰	۰/۴۸۶	۴۸/۸۰	۵۱/۲۰	۲۹/۲۳	۴۸/۳۵	۲۲/۴۲	

آنالیز پیوستگی دو جایگاه برای صفات وزن و طول بدن با روش GLM انجام شد. با توجه به نتایج مشخص گردید در نقطه  $g.1904T>C$  نمونه های با هاپلوتیپ CC و TC بطور معنی داری با هاپلوتیپ TT اختلاف نشان دادند ( $p>0.05$ ). همچنین نمونه های با هاپلوتیپ CC و TC در نقطه  $g.1904T>C$  برای وزن و طول بدن ارتباط معنی داری در زمان ۹۰ و ۱۵۰ روزگی بچه ماهیان نسبت به هاپلوتیپ TT داشتند. صفات وزن و طول ماهیان در سن ۳۰ روزگی در هر دو لوکوس

ندادند. برای  $g.1904T>C$  ماهیان با هاپلوتیپ GG شاخص های رشد نسبت به هاپلوتیپ های TT و TG بزرگتر بودند ولی معنی دار نبودند. علاوه بر این ارتباط بین هاپلوتیپ ها و شاخص های رشد در نقطه  $g.660T>C$  انجام و هاپلوتیپ های AA، CA و CC ارتباط معنی داری را با صفات وزن و طول ماهیان نشان داد ( $p<0.05$ ).

جدول ۳: ارتباط بین SNP های شناسایی شده ژن میوستاتین قزل آلابی رنگین کمان با صفات کمی رشد

ژنوتیپ	وزن ۳۰ روزگی (mg)	وزن ۹۰ روزگی (g)	وزن ۱۵۰ روزگی (g)	طول ۳۰ روزگی (mm)	طول ۹۰ روزگی (mm)	طول ۱۵۰ روزگی (cm)
AA	۱۴/۳۷ ± ۵۶۶/۸	۰/۲۵ ± ۱/۷۸	۰/۳۵ ± ۴/۶۲	۰/۴۲ ± ۲۶/۴	۰/۳۰ ± ۴۲/۲	۰/۲۸ ± ۷/۴
CA	۲۲/۰۸ ± ۵۵۴/۲	۰/۱۸ ± ۱/۶۲	۰/۶۲ ± ۴/۸۰	۰/۳۸ ± ۲۵/۳	۰/۲۷ ± ۴۵/۸	۰/۴۱ ± ۷/۴
CC	۲۰/۱۱ ± ۵۷۳/۴	۰/۳۹ ± ۱/۸۴	۰/۴۷ ± ۵/۱۱	۰/۱۹ ± ۲۸/۵	۰/۶۱ ± ۴۸/۷	۰/۴۶ ± ۷/۶
CC	۱۸/۰۹ ± ۵۸۳/۷	۰/۴۶ <sup>a</sup> ± ۱/۵۷	۰/۲۵ <sup>a</sup> ± ۵/۲۰	۰/۲۰ ± ۲۹/۱	۰/۲۴ <sup>a</sup> ± ۵۲/۳	۰/۳۵ <sup>a</sup> ± ۷/۷
TC	۲۱/۱۴ ± ۵۸۹/۵	۰/۴۸ <sup>b</sup> ± ۱/۹۲	۰/۳۶ <sup>b</sup> ± ۵/۷۱	۰/۳۸ ± ۲۸/۸	۰/۵۳ <sup>b</sup> ± ۵۴/۵	۰/۵۵ <sup>b</sup> ± ۸/۳
TT	۱۲/۸۶ ± ۵۶۳/۳	۰/۳۳ ± ۱/۸۲	۰/۶۴ ± ۴/۶۲	۰/۲۷ ± ۲۷/۵	۰/۶۷ ± ۴۸/۲	۰/۳۸ ± ۷/۸

\* حروف a و b معنی دار بودن را در یک ستون نشان می دهند.

## بحث

گونه‌گونی این ژن به عنوان ژن هدف مهم در بهبود رشد ماهیان پرورشی معرفی شده است (Yu et al., 2010; Peñalozza et al., 2013).

در این بررسی دو جهش تک نوکلئوتیدی ( $g.1904T>C$  و  $g.660C>A$ ) در اینترون ژن میوستاتین آزمایش و مشخص گردید لوکوس  $g.1904T>C$  بطور معنی داری با صفات رشد مرتبط بودند و هاپلوتیپ های شناسایی شده بر صفات وزن بدن و طول اثر گذار بودند. علاوه بر این، هاپلوتیپ CC در جهش  $g.660C>A$  اثرات مثبتی بر صفات رشد داشت با اینکه معنی دار نبود. بنابراین جهش های موجود در اینترون های ژن میوستاتین، نقش مهمی در رونویسی، ترجمه و بیان ژن دارد و در نتیجه بر مراحل رشد تاثیر می گذارد. محققین با بررسی ژن میوستاتین قزل آلابی رنگین کمان نشان دادند پروتئین های دو ژن ۱ و ۲ در قزل آلابی رنگین کمان شباهت زیادی داشتند (۹۴ درصد)

روش های ژن کاندید در بررسی ارتباط بین چندشکلی ژن با صفات اقتصادی مهم بسیار کارآمد هستند (Tian et al., 2014; Meng et al., 2015). امروزه منابع ژنومی ماهی قزل آلابی رنگین کمان بخوبی توسعه پیدا نموده و این منابع کمک می نمایند صفات مهم اقتصادی در این ماهی بهبود پیدا کنند. از جمله این منابع می توان به نقشه های ژنتیکی (Sakamoto et al., 2000) و چندشکلی های تک نوکلئوتیدی (Sanchez et al., 2011; Amish et al., 2012; Palti et al., 2014) اشاره نمود. داده های توالی ژنوم ماهی قزل آلابی رنگین کمان (NCBI) فرصت مناسبی برای کشف تنوع توالی در ژن های کاندید مرتبط با صفات رشد و رشد ماهیچه فراهم نموده است. نتایج این بررسی نشان داد که تنوع ژنتیکی مشاهده شده در این ژن ممکن است بطور مستقیم و یا غیر مستقیم بر صفات کمی رشد اثر بگذارد. در مطالعات



ولی بیان متفاوتی را از خود بروز دادند (Roberts & Goetz, 2003). پروتئین کد شونده توسط این ژن رشد ماهیچه‌های اسکلتی را باعث می‌شود که با جلوگیری از تقسیمات سلولی این عمل را تنظیم می‌نماید و جهش در این ژن باعث ایجاد رشد بیش از حد ماهیچه می‌شود (Thomas *et al.*, 2000; Joulia *et al.*, 2003; Lee, 2004). محققین دیگری نیز این مسئله را تایید می‌کنند به عنوان مثال Peñaloza و همکاران (۲۰۱۳) سه جایگاه SNP را در ژن میوستاتین MSTN-1b آزاد ماهی اقیانوس اطلس شناسایی نمود. یکی از این سه جایگاه با صفات کمی وزن بدن، وزن فیله و وزن بدون سر ارتباط معنی داری را نشان داد. دو هاپلوتیپ hap4 و hap5 نیز با وزن بدن ارتباط نشان داد که توسط جانشینی نوکلئوتیدی C با T بدست آمده بودند و در نهایت اعلام نمودند که جایگاه‌های مورد بررسی ژن میوستاتین در تنظیم رشد آزاد ماهی اقیانوس اطلس نقش دارد. همچنین، با بررسی ارتباط بین ژن میوستاتین در ماهی کپور (*Cyprinus carpio*) با استفاده از روش توالی یابی مشخص گردید چند شکلی های بدست آمده در ژن میوستاتین با وزن بدن و ضریب چاقی مرتبط بودند (Sun *et al.*, 2012). در مطالعه ای دیگر Liu و همکاران (۲۰۱۲) ارتباط بین ژن میوستاتین در ماهی کپور سرگنده (*Aristichthys nobilis*) را با رشد بررسی و دو SNP به روش SSCP در ناحیه اینترون ۲ شناسایی نمودند که با طول کل، طول بدن و وزن بدن ارتباط معنی داری را نشان داد و پیشنهاد گردید این ژن برای مطالعات اصلاح نژاد این گونه مناسب می باشد.

در این مطالعه مرتبط نبود. در آزاد ماهیان ساختارهای ژنی در ژن‌های MSTN1 بسیار شبیه هستند بطوری که طول اگزون آنها حفظ شده است، اگرچه ژن‌های MSTN2a تنها یک تا ۳ جفت باز با یکدیگر تفاوت دارند. بیشتر تنوع در بخش اینترون‌ها دیده شده است و این اختلاف‌ها در رده آنها بویژه بین ژن‌های MSTN2a منعکس می‌شود. اندازه اینترون‌ها بطور کلی سلسله مراتبی است مثلاً اینترون‌های MSTN1a بزرگترین می‌باشند و سپس اینترون‌های MSTN1b و ژن‌های MSTN2 هستند (Rescan *et al.*, 2001; Ostbye *et al.*, 2001).

یک هاپلوتیپ آرایش فیزیکی ال‌های SNP در طول یک کروموزوم است. با وجود نشانگرهای SNP با تراکم بالا، هاپلوتیپ‌ها ممکن است نقش مهمی در مطالعات ارتباط بین ژن و صفات کمی داشته باشند. به هر جهت، تمام هاپلوتیپ‌ها ارتباط معنی داری با صفات رشد نداشتند و می‌تواند به این دلیل باشد که آنالیز آماری مشخص نمی‌سازد ژن میوستاتین به طور مستقیم بر صفات رشد اثرگذار باشد، یا ممکن است جایگاه‌های صفات کمی بر بازوی کروموزومی مشابه قرار گرفته باشند (Hansen *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2016).

محققین شاخص چندشکلی را به سه دسته تقسیم می‌کنند: چنانچه شاخص کمتر از ۰/۲۵ باشد چندشکلی پایین، بین ۰/۲۵ و ۰/۵ چندشکلی متوسط و در نهایت اگر مقدار آن از ۰/۵ بیشتر بود، در دسته چندشکلی بالا قرار می‌گیرند (Hu *et al.*, 2013; Meng *et al.*, 2015). بنابراین شاخص چندشکلی نمونه‌های مرکز یاسوج در دو جایگاه g.660C>A و g.1904T>C به ترتیب تنوع پایین و متوسطی را داشتند و موید این مطلب است که جهش شناسایی شده می‌تواند به عنوان یک نشانگر در برنامه‌های اصلاح نژاد مورد استفاده قرار گیرد.

همچنین مشاهده عدم تعادل لینکاژ بین هاپلوتیپ‌های g.660C>A و g.1904T>C نشان دهنده این است که جهش در اینترون‌های ژن میوستاتین ممکن است با یک یا چند لوکوس صفت کمی در عدم تعادل لینکاژ باشد. SNP g.1904T>C بطور معنی داری با صفت طول

پیچیده‌ای است و قبل از اینکه مطالعات اسنیپ در برنامه MAS برای برنامه بهبود ژنتیکی این گونه اجرا شوند، ارزیابی بیشتری برای تایید این گونه اطلاعات لازم است. برای ارزیابی ارتباط بین ژن و صفات، بررسی‌های بیشتری با استفاده از جمعیت‌های مستقل بزرگتر در شرایط محیطی مختلف نیاز است و صفات مختلف دیگر نظیر تولید فیله، کیفیت گوشت و مقاومت به بیماری بایستی در برنامه بهبود ژنتیکی در نظر گرفته شود.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان لازم می‌دانند به جهت حمایت‌های اجرایی و مالی این پژوهش از اعضای محترم گروه تکثیر و پرورش دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، مسئولین محترم موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور و مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی تشکر و قدردانی نمایند. همچنین از کلیه کسانی که در طول انجام این تحقیق کمک نمودند، قدردانی می‌شود.

### منابع

- Allendorf, F.W. and Thorgaard, G.H., 1984. Tetraploidy and the evolution of salmonid fishes. In: Evolutionary Genetics of Fishes (ed. Turner BJ), pp. 1–46. Plenum Press, New York.
- Amish, S.J., Hohenlohe, P.A., Painter, S., Leary, R.F., Muhlfeld, C. and Allendorf, F.W., 2012. Rad sequencing yields a high success rate for west slope cutthroat and rainbow trout species-diagnostics passays. *Molecular Ecology Resources*, 12: 653–660.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M. and Davis, R.W., 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetic*, 32: 314–331.

بدن مرتبط بود و هاپلوتیپ‌های CC و TC بطور موثری بر این صفت اثر گذار بود. این لوکوس یک جهش بدون تغییر در اینترون ژن میوستاتین بود. دو فرضیه برای چگونگی اثرات جهش‌های بدون تغییر بر صفات رشد وجود دارد: اول اینکه جهش‌های بدون تغییر ممکن است عملکرد ژن را تحت تاثیر قرار دهند و این کار از طریق پیوند جایگزین (اتصال اگزون ها به یکدیگر و تشکیل mRNA بالغ)، کارایی پیوند جایگزین، تغییر و تبدیل mRNA از حالت نابالغ به بالغ و بیان ژن صورت می‌گیرد. دوم، جهش‌های بدون تغییر ممکن است با یک یا چند لوکوس صفت کمی مرتبط با صفات رشد در عدم تعادل لینکاژ باشد (Capon *et al.*, 2004; Chen & Manley, 2009).

مطالعات بسیاری در سالیان اخیر به روشنی نشان داده اند که جهش بدون تغییر توالی‌های کدکننده تولید نمی‌کنند و در نتیجه در بیان و عملکرد پروتئین تاثیری نمی‌گذارند (Tian *et al.*, 2014; Sawayama *et al.*, 2015). تحقیقات Capon و همکاران (۲۰۰۴) و Nackley و همکاران (۲۰۰۶) ثابت نمودند جهش‌های بدون تغییر می‌توانند بر بیان و عملکرد پروتئین تاثیر داشته باشند. علاوه بر این Kimchi-Sarfaty و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند چندشکلی‌های غیر فعال نیز می‌توانند فعالیت یا سوبستراهای اختصاصی آن را تغییر دهند و برای نخستین بار ثابت کردند SNP های غیر فعال منتج به سنتز محصولات پروتئین با توالی اسیدهای آمینه مشابه ولی با ساختار و خصوصیات عملکردی متفاوت می‌شوند. بنابراین، در این بررسی فرض می‌شود جهش‌های g.1904T>C و g.660C>A عملکرد زیستی مشابهی از جمله تغییر پایداری mRNA، تعدیل قابلیت رونویسی mRNA و تاثیر بر ساختار پروتئین کد شونده دارند که بطور مستقیم یا غیر مستقیم بر عملکرد رشد ماهیان پرورشی تاثیر می‌گذارند.

این تحقیق به عنوان اولین قدم در پیاده سازی روش انتخاب به کمک نشانگر در برنامه‌های اصلاح نژاد می‌تواند به افزایش تولید قزل‌آلای رنگین‌کمان در برنامه‌های بهبود ژنتیکی کارایی رشد این ماهی در کشور کمک نماید. به هر حال، توسعه لاین های خالص پرورشی فرایند

- Capon, F, Allen, M.H., Ameen, M., Burden, A.D., Tillman, D., Barkerand, J.N. and Trembath, R.C., 2004.** A synonymous SNP of the corneodesmosin gene leads to increased mRNA stability and demonstrates association with psoriasis across diverse ethnic groups. *Human Molecular Genetic*, 13: 2361–2368.
- Chen, M. and Manley, J.L., 2009.** Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nature Review in Molecular Cell Biology*, 10: 741–754 .
- Christensen, K.A., Brunelli, J.P., Lambert, M.J., Dekoning, J., Phillips, R.B. and Thorgaard, G.H., 2013.** Identification of single nucleotide polymorphisms from the transcriptome of an organism with a whole genome duplication. *BMC Bioinformatics* 14(325): 23-34.
- Doerge, R.W., 2002.** Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. . *Nature Review in Genetics*, 3: 43.
- Ewing, B. and Green, P., 1998.** Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities. *Genome Research*, 8:186–194.
- Genet, C., Dehais, P. and Palti, Y., 2011.** Analysis of BAC-end sequences in rainbow trout: content characterization and assessment of synteny between trout and other fish genomes. *BMC Genomics*, 12(314): 48-62.
- Gjedrem, T., 2012.** Genetic improvement for the development of efficient global aquaculture: A personal opinion review. *Aquaculture*, pp. 344–349 .
- Gjedrem, T., Robinson, N. and Rye, M., 2012.** The importance of selective breeding in aquaculture to meet future demands for animal protein: A review. *Aquaculture*, pp. 350-353, 117-129.
- Glover, K.A., Otterå, H., Olsen, R.E., Slinde, E., Taranger G.L. and Skaala, Ø., 2009.** A comparison of farmed, wild and hybrid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) reared under farming conditions. *Aquaculture*, 286: 203-210.
- Guyomard, R., Boussaha, M., Krieg, F., Hervet, C. and Quillet, E., 2012.** A synthetic rainbow trout linkage map provides new insights into the salmonid whole genome duplication and the conservation of synteny among teleosts. *BMC Genetics*, 13:15, 1-12 .
- Hale, M.C., Thrower, F.P., Berntson, E.A., Miller, M.R. and Nichols, K.M., 2014.** Mapping and expression of candidate genes for development rate in rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Heredity*, pp.1-15.
- Hall, T.A., 1999.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98 .
- Hemmer-Hansen, J., Nielsen, E.E., Meldrup, D. and Mittelholzer, C., 2011.** Identification of single nucleotide polymorphisms in candidate genes for growth and reproduction in a nonmodel

- organism; the Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Molecular Ecology Resources*, 11: 71–80.
- Holzer, C. and Precht, M., 1992.** Multiple comparison procedures for normally distributed ANOVA models in SAS, SPSS, BMDP, and MINITAB. *Computer Statistic Data Analysis*, 13: 351–358.
- Hu, X., Li, C. and Shi, L., 2013.** A novel 79-bp insertion/deletion polymorphism in 3'-flanking region of IGF-I gene is associated with growth-related traits in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture Research*, 44: 1632–1638.
- Joulia, D., Bernardi, H., Garandel, V., Rabenoelina, F., Vernus, B. and Cabello, G., 2003.** Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. *Experimental Cell Research*, 286(2): 263–275.
- Kimchi-Sarfaty, C., Oh, J.M., Kim, I.W., Sauna, Z.E., Calcagno, A.M., Ambudkar, S.V. and Gottesman, M.M., 2007.** A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science*, 315: 525- 528.
- Ko, C.F., Chiou, T.T., Chen, T., Wu, J.L., Chen, J.C. and Lu, J.K., 2007.** Molecular cloning of myostatin gene and characterization of tissue-specific and developmental stage-specific expression of the gene in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Marine Biotechnology*, 9: 20–32 .
- Kocour, M. and Kohlmann. K., 2011.** Growth hormone gene polymorphisms in tench, *Tinca tinca* L. *Aquaculture*, 310: 298–304.
- Kretz, K.A. and O'Brien, J. S., 1993.** Direct sequencing of polymerase chain reaction products from low melting temperature agarose. *Methods in Enzymology*, 218: 72–79.
- Lee, S.J., 2004.** Regulation of muscle mass by myostatin. *Annual Review of Cell Development Biology*, 20: 61-86.
- Librado, P. and Rozas, J., 2009.** DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Liu, L., Yu, X. and Tong, J., 2012.** Molecular characterization of myostatin (MSTN) gene and association analysis with growth traits in the bighead carp (*Aristichthys nobilis*). *Molecular Biology Reproduction* 39: 9211–9221.
- Lynch, M., and Walsh, B., 1997.** *Genetics and Analysis of Quantitative Traits*, p. 980. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- Meng, X., Wang, H., Qiu, X., Liu, H. and Wang, X., 2015.** SNPs of myostatin (MSTN) gene and their association with growth traits in three bay scallop (*Argopecten irradians*) populations. *Aquaculture Research*, 10: 1-6.
- Nackley, A.G., Shabalina, S.A., Tchivileva, I.E., Satterfield, K., Korchynskyi, O., Makarov, S.S., Maixner, W. and Diatchenko, L., 2006.** Human catechol O-methyltransferase haplotypes modulate protein expression by altering mRNA secondary structure. *Science*, 314: 1930–1933.
- Nei, M., 1973.** Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceeding*

- National of Academic Science. U. S. A. 70, 3321–3323 .
- Ostbye, T.K., Galloway, T.F., Nielsen, C., Gabestad, I., Bardal, T. and Andersen, O., 2001.** The two myostatin genes of Atlantic salmon (*Salmo salar*) are expressed in a variety of tissues. *European Journal of Biochemistry*, 268: 5249–5257.
- Palti, Y., Gahr, S.A., Hansen, J.D. and Rexroad, C.E., 2004.** Characterization of a new BAC library for rainbow trout: evidence for multi-locus duplication. *Animal Genetics*, 35: 130–133.
- Palti, Y., Genet, C. and Gao, G., 2012.** A second generation integrated map of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) genome: analysis of conserved synteny with model fish genomes. *Marine Biotechnology*, 14: 343–357.
- Palti, Y.G., Gao, M.R., Miller, R.L., Vallejo, P.A., Wheeler, E., Quillet, J., Yao, G.H. Thorgaard, M., Salem, and Rexroad, C.E., 2014.** A resource of single-nucleotide polymorphisms for rainbow trout generated by restriction-site associated DNA sequencing of doubled haploids. *Molecular Ecology Resources*, 14: 588–596.
- Peñaloza, C., Hamilton, A., Guy, D.R., Bishop, S.C. and Houston, R.D., 2013.** A SNP in the 50 flanking region of the myostatin-1b gene is associated with harvest traits in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Genetics*, 14, 112: 1-11 .
- Pourkazemi, M., Nazari, S., Khoshkholgh, M.R. and Azizzadeh, L., 2012.** Genetic Relationships among Populations of the Persian sturgeon, *Acipenser persicus*, in the south Caspian Sea detected by mitochondrial DNA–Restriction Fragment Length Polymorphisms.. *Caspian Journal of Environmental Sciences*, 10(2): 215-226.
- Qu, L.J., Li, X.Y., Wu, G.Q. and Yang, N., 2005.** Efficient and sensitive method of DNA silver staining in polyacrylamide gel. *Electrophoresis*, 26(1): 99–101.
- Rescan, P.Y., Jutel, I. and Ralliere, C., 2001.** Two myostatin genes are differentially expressed in myotomal muscles of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology*, 204: 3523–3529.
- Rice, W.R., 1989.** Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43:223-225.
- Roberts, S.B. and Goetz, F.W., 2003.** Myostatin protein and RNA transcript levels in adult and developing brook trout. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 210: 9–20.
- Rodgers, B.D. and Garikipati, D.K., 2008.** Clinical, agricultural, and evolutionary biology of myostatin: a comparative review. *Endocrinology Review*, 29(5): 513–534.
- Sambrook, J. and Russell, D., 2001.** *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory. Pp. 23-44.
- Sánchez, C.C., Weber, G.M., Gao, G., Cleveland, B.M., Yao, J. and Rexroad, C.E., 2011.** Generation of a reference transcriptome for evaluating rainbow trout responses to various stressors. *BMC Genomics* 12(626): 23-34.

- Sawayama, E. and Takagi, M., 2015.** Parental contribution and growth hormone gene polymorphism associated with growth phenotypes of red sea bream *Pagrus major* in mass production: A case study *Aquaculture Reports*, 2: 144–151.
- Stephens, M., Smith, N. and Donnelly, P., 2001.** A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American Journal of Human Genetic*, 69:978–989.
- Sun, X., Shin, G. and Hedgecock, D., 2015.** Inheritance of high-resolution melting profiles in assays targeting single nucleotide polymorphisms in protein-coding sequences of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Implications for parentage assignment of experimental and commercial broodstocks. *Aquaculture*, pp.127-139.
- Sun, Y., Yu, X. and Tong, J., 2012.** Polymorphisms in Myostatin Gene and Associations with Growth Traits in the Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). *International Journal of Molecular Science*, 13: 14956-14961.
- Tao, W.J. and Boulding, E.G., 2003.** Associations between single nucleotide polymorphisms in candidate genes and growth rate in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.), *Heredity*, 91: 60–69.
- Thomas, M., Langley, B., Berry, C., Sharma, M., Kirk, S., Bass, J. and Kambadur, R., 2000.** Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *Journal of Biology and Chemistry*, 275: 40235-40243.
- Thomas, S.C., Coltman, D.W. and Pemberton, J.M., 2002.** The use of marker-based relationship information to estimate the heritability of body weight in a natural population: a cautionary tale. *Journal of Evolutionary Biology*, 15: 92–99.
- Tian, C., Yang, M.L., Lv, Y., Yuan, X., Liang, W., Guo, Y., Song, and Zhao C., 2014.** Single Nucleotide Polymorphisms in growth hormone gene and their association with growth traits in *Siniperca chuatsi* (Basilewsky). *International Journal of Molecular Sciences*, 15: 7029-7036.
- Vandeputte, M. and Haffray, P., 2014.** Parentage assignment with genomic markers: a major advance for understanding and exploiting genetic variation of quantitative traits in farmed aquatic animals. *Frontiers in Genetics*, 5(432): 1-8.
- Vera, M., Alvarez-Dios, J., Fernandez, C., Bouza, C. and Vilas, R., 2013.** Development and validation of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) markers from two transcriptome 454-runs of turbot (*Scophthalmus maximus*) using high throughput genotyping. *International Journal of Molecular Science*, 14: 5694–5711.
- Vong, Q.P., Chan, K.M., Leung, K. and Cheng, C.H.K., 2003.** Common carp insulin-like growth factor-I gene: complete nucleotide sequence and functional characterization of the 5'-flanking region. *Gene*, 322: 145–156.

- Wallis, A.E. and Devlin, R.H., 1993.** Duplicate insulin-like growth factor-I genes in salmon display alternative splicing pathways. *Molecular Endocrinology*, 7: 409–422.
- Wang, S., Sha, Z., Sonstegard, T.S., Liu, H. and Xu, P., 2008.** Quality assessment parameters for EST-derived SNPs from catfish. *BMC Genomics*, 9(450): 11-23.
- Yang, J., Liu, Z., Shi, H.N., Zhang, J.P., Wang, J.F., Huang, J.Q. and Kang, Y.J., 2016.** Association between MHC II beta chain gene polymorphisms and resistance to infectious haematopoietic necrosis virus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792). *Aquaculture Research*, 47: 570–578.
- Yeh, F.C., Yang, R. and Boyle, T., 1999.** POPGENE Version 3.1, Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. University of Alberta, Edmonton, AB, Canada.
- Yu, J.H., Li, H.X., Tang, Y.K., Li, J.L. and Dong, Z.J., 2010.** Isolation and expression of Myostatin (MSTN) genes, and their polymorphism correlations with body form and average daily gain in *Cyprinus carpio* var. *Journal of Agriculture and Biotechnology*, 18: 1062–1072.
- Zhang, H.W., Yin, S.W., Zhang, L.J., Hou, X.Y. and Wang, Y.Y., 2015.** Development and validation of single nucleotide polymorphism markers in *Odontobutis potamophila* from transcriptomic sequencing. *Genetic Molecular Resources* 14(1): 2080–2085.

## Association between polymorphism in myostatin gene (*MSTN*) with quantitative traits in domesticated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using PCR-SSCP method

Nazari S.<sup>\*1</sup>; Jafari V.<sup>1</sup>; Pourkazemi M.<sup>2</sup>; Kolangi H.<sup>1</sup>; Abdolhay H.A.<sup>3</sup>

\*sajadnazari13@gmail.com

1-Gorgan University of Agriculture Sciences and Natural Resources, Faculty of Fisheries, Golestan, Iran.

2-Iranian Fisheries Sciences Research Institute (IFSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO) P.O. Box 149/14965 Tehran, Iran

3-Iran Fisheries Organization, Tehran, Iran, Tehran, Iran

### Abstract

In this study the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) myostatin gene (*MSTN*) for detecting gene derived SNPs and performing genetic association study between *MSTN* polymorphisms and growth traits were analyzed. Twenty broodstocks of rainbow trout in Genetic and Breeding for coldwater Fishes center in Yasouj for generating full sibling were selected and tagged and then juveniles were raised at the ponds until 5 months post-hatching. DNA extract based on standard method and these individuals selected randomly for molecular analysis. Two single nucleotide polymorphisms (SNPs: *g.660T>C* and *g.1904C>A*) in intron 1 and 2 regions of the *MSTN* gene in rainbow trout by were identified DNA sequencing and polymerase chain reaction single-stranded conformational polymorphism (PCR-SSCP) methods. The assessment results demonstrated that 6 haplotypes were revealed in this center. Moreover, association analysis indicated that the genotypes of SNP *g.1904C>A* are associated with the length and body weight at 90 and 150 days of age ( $p < 0.05$ ), whereas no significant association was found between the SNP *g.660T>C* and growth traits. Our results provided evidence that SNPs in *MSTN* gene may be associated with length and body weight at fingerling age and *MSTN* gene may be used as potential candidate gene for marker-assisted selection (MAS) in rainbow trout breeding program.

**Keywords:** *Oncorhynchus mykiss*, *MSTN* gene (*MSTN*), Quantitative traits, Single nucleotide polymorphism (SNP), Marker assisted selection

---

\*Corresponding author