تحقیقات تولیدات دامی
سال سوم/ شماره اول/ بهار ۱۳۹۳ (۳۰-۲۱)

بررسی ارتباط چند شکلی ژن لپتین با صفات رشد و تاثیر آن بر ارزش‌های اصلاحی در گوسفندان نژاد مغانی

سعادت صادقی[۱]، عباس حاجی حسینلو[۲]، علی هاشمی[۳*]

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه
۳- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

(تاریخ دریافت: ۹۲/۴/۲۷- تاریخ پذیرش: ۹۲/۸/۲۶)

چکیده

در این پژوهش به منظور بررسی چند شکلی ژن لپتین از ۹۰ راس گوسفند نر و ماده مغانی ایستگاه اصلاح نژاد گوسفند مغانی به طور تصادفی خونگیری شد. پس از استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی، قطعه‌ای به طول ۴۷۱ جفت باز دربرگیرنده اگزون ۳ ژن لپتین با استفاده از روش PCR-SSCP تکثیر شد. نتایج، حاکی از وجود ۵ ژنوتیپ AA، AB، AC، BC و CC به ترتیب با فراوانی‌های ۰/۲، ۰/۲۵، ۰/۳، ۰/۱ و ۰/۱۵ در جمعیت مورد مطالعه بود. فراوانی آلل‌های A، B و C به ترتیب برابر با ۰/۴۷۵، ۰/۱۷۵ و ۰/۳۵ محاسبه شد. نتایج آزمون کای- اسکور نشان داد که تعادل هاردی- واینبرگ در جمعیت مورد مطالعه گوسفندان مغانی برقرار است (P>۰/۰۵). حیوانات با ژنوتیپ AC دارای بیشترین وزن تولد و وزن از شیرگیری، حیوانات با ژنوتیپ BC دارای بیشترین وزن شش ماهگی، میانگین افزایش وزن روزانه از سه الی شش ماهگی، ارزش اصلاحی مستقیم وزن یکسالگی، ارزش اصلاحی مادری وزن سه ماهگی و ارزش اصلاحی مادری وزن شش ماهگی، حیوانات با ژنوتیپ AA دارای بیشترین میانگین افزایش وزن روزانه از شش الی نه ماهگی و حیوانات با ژنوتیپ AB دارای بیشترین ارزش اصلاحی مستقیم وزن تولد بودند. با توجه به همبستگی ژنتیکی افزایشی و فنوتیپی بالا بین وزن از شیرگیری و صفات بعد از شیرگیری، یک انتخاب زود هنگام برای ژن لپتین در گوسفند مغانی می‌تواند صورت گیرد.

واژه‌های کلیدی: چند شکلی، ژن لپتین، صفات رشد، PCR-SSCP

* نویسندهٔ مسئول: a.hashemi@urmia.ac.ir

مقدمه

گوسفند مغانی جز گوسفندان دنبه دار و متوسط وزن بوده و همانند بیشتر نژادهای گوسفندان ایرانی دارای پشمی ضخیم است. این گوسفند بیشتر از لحاظ تولید گوشت اهمیت دارد. گوسفندان مغانی بعد از گوسفندان بلوچی بیشترین جمعیت گوسفندان ایرانی (حدود ۱۰ میلیون راس) را به خود اختصاص می‌دهند (Jangali, 2010). استفاده از نشانگرهای DNA در اصلاح نژاد دام به علت تاثیر نپذیرفتن از شرایط محیطی، زمینه مناسبی جهت بررسی صفات مهم در دام‌ها و شناسایی سریع و دقیق ژن‌های کنترل کننده صفات تولیدی فراهم کرده است (Moores *et al.*, 1991). لپتین یک پروتئین ۱۶ کیلو دالتونی است که در کنترل اشتها، متابولیسم انرژی، بلوغ، سندرم چاقی و افزایش وزن نقش دارد و چند شکلی‌های موجود در آن با صفات اقتصادی و مهم ارتباط دارد (Liefers *et al.*, 2003).

فقدان ژن لپتین در بدن و عدم ترشح هورمون آن باعث بروز چاقی می‌شود (Fruhbeck *et al.*, 1998). لپتین به وسیله ژن مسئول چاقی کد می‌شود و اثرات مهمی در تنظیم وزن بدن، متابولیسم انرژی و اعمال تولیدمثلی دارد. یک شکل از لپتین با وزن ۱۹ کیلو دالتون در عصاره معده شناسایی شده است. لپتین بیشتر به وسیله سلول‌های بافت چربی سفید و در مقادیر کمتر به وسیله سلول‌های اپیتلیوم معده و جفت ترشح می‌شود (Houseknecht *et al.*, 1998). ژن لپتین دارای ۳ اگزون و ۲ اینترون است (Zhou *et al.*, 2009). مکان‌های کنترل کننده صفات کمی (QTL) برای صفات تولید شیر در ۸۲/۸ سانتی مورگان و برای درصد چربی و پروتئین شیر در ۷۵ و ۹۵ سانتی مورگانی این ژن قرار دارند (Liendersoon *et al.*, 1998). در گله گاوهای گوشتی، چند شکلی‌هایی به وسیله تکنیک‌های PCR-RFLP و ریزماهواره مشاهده شده است و ارتباط معنی‌داری بین این چندشکلی‌ها و صفات لاشه گاو و نمره مرمری گزارش شده است (Tessanne *et al.*, 1999). یک موتاسیون جدید نیز در اگزون ۲ ژن لپتین گاو گزارش شده است (Hageman *et al.*, 2000). بررسی فراوانی شکل‌های مختلف آللی ژن لپتین در گاو انجام گرفت که فراوانی آلل‌های A، B و C به ترتیب ۰/۷۹، ۰/۱۱ و ۰/۱۰ گزارش شد (Zwierzchowski *et al.*, 2002). در گزارشی افراد با ژنوتیپ AT حدود ۱۹٪ مصرف خوراک بیشتری نسبت به افراد AA از خود نشان داده‌اند (Lagonigro *et al.*, 2003). در بررسی چند شکلی ناحیه اینترون ژن لپتین به روش PCR-RFLP در گاو نژاد سرابی سه نوع ژنوتیپ AA، AB و BB مشاهده شده است (Javanmard *et al.*, 2008). بررسی چند شکلی اگزون ۳ ژن لپتین در گوسفندان بلوچی برای اولین بار با استفاده از روش PCR-SSCP[1] صورت گرفت و سه الگوی باندی L_1، L_2 و L_3 گزارش شده است (Tahmoorespur *et al.*, 2009). این در حالی است که پنج الگوی باندی برای گوسفندان نیوزیلندی مشاهده شد (Zhou *et al.*, 2009). در مطالعه‌ای از تکنیک PCR-SSCP برای تعیین چندشکلی ناحیه اگزون ۳ ژن لپتین ۱۲۰ راس گوسفند کرمانی استفاده شده است که ۱۰ الگوی A/A، C/C، A/B، A/C، A/B/C، A/B/E، A/C/F، A/B/F، A/B/D/E و A/B/C/F مشاهده شده است (Shojaei *et al.*, 2010).

آگاهی داشتن از ارتباط بین ژن‌های بخصوص و عملکرد حیوانات در استفاده موثر از اطلاعات مربوط به ژن‌های کاندید، نشانگرها و QTLها ضروری است. چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی[2] اغلب برای ارزیابی نواحی از کروموزوم که تصور می‌شود می‌توانند در صفات کمی موثر باشند، استفاده می‌شوند. در این میان به عنوان مثال انتخاب بر اساس چندشکلی ژن لپتین باعث خواهد شد که حیوانات با مصرف خوراک بیشتر به تولید بیشتری برسند. هدف از انجام این پژوهش تعیین ارتباط چند شکلی موجود در ژن لپتین بر صفات مربوط به صفات رشد و ارزش‌های اصلاحی در گوسفند مغانی بود تا بتوان ژنوتیپ‌های مورد نظر را با توجه به اهداف اصلاحی انتخاب نمود و فراوانی آلل مطلوب را در جمعیت افزایش داد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از تعداد ۹۰ راس گوسفند مغانی از مرکز اصلاح نژاد مغانی جعفرآباد خون‌گیری به عمل آمد و خون کامل تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. خون‌گیری از ورید دمی و با لوله‌های حاوی خلا و ماده ضد انعقاد EDTA انجام گرفت. فرایند استخراج DNA از نمونه‌ها، با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی (Fermentas, Cinagen, Iran)

1. Single Strand Conformation Polymorphism
2. Single Nucleotide Polymorphism

صورت گرفت. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و ژل آگارز ۲٪ ارزیابی شد. با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی طراحی شده (Zhou *et al.*, 2009)، قطعه ۴۷۱ جفت بازی از ناحیه اگزون ۳ ژن لپتین به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر شد. بدین منظور از آغازگرهای زیر استفاده شد:

F: 5'-AGGAAGCACCTCTACGCTC-3'
R: 5'-CTTCAAGGCTTCAGCACC-3'

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و با ترکیب ۲ میکرولیتر DNA ژنومی با غلظت ۵۰ نانوگرم، یک میکرو لیتر از هر آغازگر با غلظت ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر، ۱۰ میکرولیتر از کیت مخلوط واکنش 2X و ۱۱ میکرولیتر اب مقطر انجام شد. دراین آزمایش برای تهیه بیس آکریلامید ۳۰٪ ، مقدار ۳۰ گرم آکریل آمید و ۰/۴ گرم بیس آکریل آمید در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شدند و برنامه حرارتی زیر انجام شد:

واسرشت ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، و در چرخه اصلی در طی ۳۵ دور واسرشت در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۵ ثانیه و بسط انتهایی نیز در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه انجام شد. جهت بررسی صحت قطعات به دست آمده از محصول PCR، ۵ میکرولیتر از محصولات با ۱۰ میکرولیتر بافر بارگذاری (6X) (فرمامید ۹۵٪، هیدروکسید سدیم ۱۰۰ میلی مولار، بروموفنیل بلو ۰/۲۵٪ و گزیلین سیانول ۰/۳۵٪) مخلوط شده و به همراه ۱۰۰ bp نشانگر وزنی (نشانگر مولکولی استاندارد) روی ژل آگارز ۱/۵ درصد اجرا شد و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید صورت گرفت (Herring *et al.*, 1982).

برای تعیین چند شکلی قطعات تکثیر شده ژن لپتین، چندشکلی فرم فضایی رشته‌های منفرد (SSCP) محصولات PCR به وسیله ژل پلی آکریلامید ۸٪ و رنگ‌آمیزی نیترات نقره تعیین شد. برای محاسبه فراوانی آلل‌ها، میزان هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار و بررسی تعادل هاردی- واینبرگ از نرم افزار POPGEN32 استفاده شد (Yeh *et al.*, 1999).

صفات رشد مورد بررسی شامل وزن تولد، وزن سه ماهگی، وزن شش ماهگی، وزن یکسالگی، میانگین افزایش وزن روزانه از تولد الی سه ماهگی، میانگین افزایش وزن روزانه از سه الی شش ماهگی، میانگین افزایش وزن روزانه از شش الی نه ماهگی، میانگین افزایش وزن روزانه از نه ماهگی الی یکسالگی و پارامترهای مورد بررسی شامل ارزش اصلاحی مستقیم و مادری وزن تولد، وزن سه ماهگی، وزن شش ماهگی و وزن یکسالگی بودند. از اطلاعات ۲۳۸۶ بره دارای اطلاعات شجره‌ای (۵۰ پدر و ۷۲۰ مادر)، برای برآورد پارامترهای ژنتیکی استفاده شد. برآورد مولفه‌های واریانس و پارامترهای ژنتیکی برای صفات وزن بدن با استفاده از مدل حیوان تک صفتی و با روش حداکثر درست‌نمایی محدود شده بی‌نیاز از مشتق‌گیری و به وسیله نرم افزار DFREML (Meyer, 2000) صورت گرفت. بدین منظور برای مشخص نمودن مدل آماری مناسب جهت برآورد ارزش اصلاحی صفات وزن بدن، آزمون معنی‌داری اثرات مربوط به عوامل سال تولد، تیپ تولد، جنس و سن مادر، با استفاده از رویه GLM در نرم افزار SAS (9.1) انجام شد. برای برآورد ارزش اصلاحی صفات وزن بدن از مدل آماری زیر استفاده شد:

$$\mathbf{y} = \mathbf{Xb} + \mathbf{Z_1a} + \mathbf{Z_2m} + \mathbf{e} \qquad \mathrm{CoV}(\mathbf{a}, \mathbf{m}) \neq 0$$

در این مدل، **y** بردار مشاهدات و **b**، **a** و **m** به ترتیب بردارهای اثرات ثابت، اثرات ژنتیک افزایشی مستقیم، اثرات ژنتیک افزایشی مادری و اثرات محیط دایمی مادری هستند. **A** ماتریس ضرایب خویشاوندی موجود در **a** و **m** و σ_{am} کوواریانس بین اثرات ژنتیک افزایشی مستقیم و اثرات ژنتیک افزایشی مادری است. همبستگی‌های ژنتیکی، فنوتیپی و باقیمانده صفات وزن بدن با استفاده از تجزیه و تحلیل چهار صفتی مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور بررسی ارتباط چندشکلی ژن لپتین با صفات رشد و ارزش‌های اصلاحی از مدل خطی زیر استفاده شده و آنالیز واریانس با رویه GLM [1] و با استفاده از نرم افزار SAS (9.1) انجام شد:

$$y_{ijkl} = \mu + Gen_i + Sex_j + \beta(Age_{ijk} - \overline{Age...}) + e_{ijkl}$$

y_{ijkl}= رکورد l امین حیوان، k امین سن رکوردگیری، j امین جنس و i امین ژنوتیپ، μ= میانگین کل جمعیت، Gen_i = اثر ثابت i امین ژنوتیپ، Sex_j= اثر ثابت j امین جنس، Age_k= اثر k امین سن رکوردگیری (برحسب روز) به عنوان متغییر همراه و e_{ijkl} = اثر تصادفی باقیمانده صفات رشد و ارزش‌های اصلاحی.

1. General Linear Model

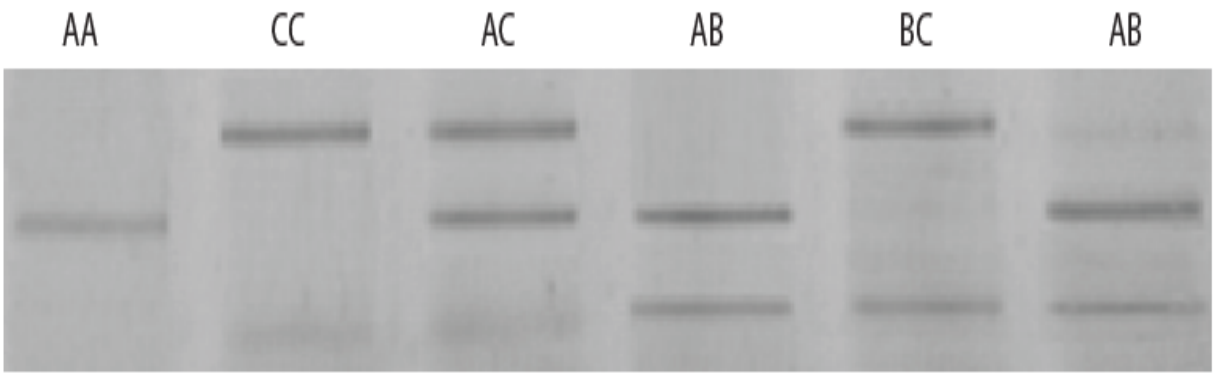

Fig. 1. SSCP polymorphism of Moghani sheep *LEP* gene. Five different PCR-SSCP patterns (genotype) were identified

شکل ۱- چندشکلی SSCP ژن LEP گوسفند مغانی. پنج اگوی مختلف PCR-SSCP (ژنوتیپ) شناسایی شد.

جدول ۱- فراوانی‌های آللی، ژنوتیپی و تعداد موثر آللی و شاخص اطلاعات شانون اگزون ۳ ژن لپتین در گوسفندان مغانی

Table 1. Genotypic and allelic frequencies and effective number of alleles, Shannon's information index of the exon 3 of leptin gene in Moghani sheep

		Allelic frequency (٪)			Genotypic frequency (٪)				
Shannon's Information index	Effective number of alleles	A	B	C	AA	AB	AC	BC	CC
62٪	2.64٪	47.5	17.5	35	20	25	30	10	15

نتایج و بحث

فراوانی آلل‌های A، B و C به ترتیب برابر با ۰/۴۷۵، ۰/۱۷۵ و ۰/۳۵ محاسبه شد. در جمعیت گوسفندان کرمانی (Shojaei *et al.*, 2010) و گوسفندان کردی خراسان شمالی (شیبک و همکاران، ۱۳۹۱) آلل A به ترتیب با فراوانی ۰/۳۸ و ۰/۴۳۷ بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داد. در گوسفندان نژاد ماکویی بیشترین فراوانی مربوط به آلل C و برابر با ۰/۴۸ بود (Hashemi *et al.*, 2011). فراوانی ۵ نوع ژنوتیپ AA، AB، AC، BC و CC مشاهده شده (شکل ۱) در جمعیت به ترتیب برابر با ۰/۲، ۰/۲۵، ۰/۳، ۰/۱ و ۰/۱۵ محاسبه شد (جدول ۱). برای تعیین چند شکلی ناحیه ۳ اگزون لپتین ۱۱۰ گوسفند نیوزیلندی از ۶ نژاد ۵ الگوی باندی مشاهده شد که بیشترین فراوانی ژنوتیپی مربوط به الگوی ۰۱ با فراوانی‌های ۰/۶۷۴ و الگوی ۰۲، ۰۴ و ۰۵ با ۰/۰۵ کمترین فراوانی را داشتند (Zhou *et al.*, 2009) که تفاوت در فراوانی‌های ژنوتیپی گوسفندان مغانی و نیوزیلندی می‌تواند ناشی از وجود تنوع ژنتیکی در آنها باشد. همچنین در مطالعه‌ای دیگر در تعیین چندشکلی ناحیه اگزون ۳ ژن لپتین ۱۲۰ راس گوسفند کرمانی، ۱۰ الگوی A/A، C/C، A/B، A/C، A/B/C، A/B/E، A/C/F، A/B/F، A/B/D/E و A/B/C/F به ترتیب با فراوانی‌های ۲/۵۴٪، ۱/۶۹٪، ۱۰/۱۷٪، ۱۹/۴۹٪، ۲۲/۸۸٪، ۱۱/۰۲٪، ۹/۳۲٪، ۷/۶۳٪، ۸/۴۸٪ و ۶/۷۸٪ مشاهده شده است (Shojaei *et al.*, 2010). در گوسفندان ماکوئی پنج الگوی باندی (ژنوتیپی) و سه فراوانی آللی با فراوانی‌های ۰/۱۵، ۰/۳۷ و ۰/۴۸ برای آلل های A، B و C مشاهده شد (Hajihosseinlo *et al.*, 2012). این تفاوت‌ها ممکن است به دلیل متفاوت بودن نژادها و یا اختلاف در اندازه نمونه باشد.

اندازه موثر آللی و شاخص هتروزیگوتی به ترتیب ۲/۶۴٪ و ۶۲٪ بود. این در حالی است که در بررسی چند شکلی اگزون ۳ ژن لپتین درگوسفندان بلوچی با استفاده از روش PCR-SSCP[1]، سه الگوی باندی L_1، L_2 و L_3 گزارش شده است (Tahmoorespur *et al.*, 2009). میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در جمعیت مورد بررسی به ترتیب ۳۷/۴۸٪ و ۶۲/۵۲٪ بود (جدول ۲). میزان χ^2 محاسبه شده برابر با ۷/۱۲ بود که در سطح احتمال ۰/۰۵ تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد، بنابراین تعادل هاردی- واینبرگ در جمعیت مورد مطالعه برقرار بود. این در حالی است که برای اگزون ۳ ژن CYP19 در گوسفند بلوچی تعادل هاردی واینبرگ برقرار نبود (اسدی و

1. Single Strand Conformation Polymorphism

جدول ۲- خلاصه‌ای از آماره‌های هتروزیگوتی برای تمامی جایگاه‌های ژنی

Table 2. Summary of heterozygosity statistics for all loci

Locus	ObsHom	ObsHet	Nei	AveHet	ExpHet	ExpHom
leptin	0.35	0.3748	0.6213	0.6213	0.6252	0.65

ObsHom: Observed Homozygosity; ObsHet: Observed Heterozygosity; AveHet: Average heterozygosity; ExpHet: Expected heterozygosity; ExpHom: Expected homozygosity

جدول ۳- همبستگی‌های ژنتیکی، فنوتیپی و باقیمانده بین صفات وزن بدن در گوسفند مغانی

Table 3. Genotypic, phenotypic and residual correlations between body weight traits in Moghani sheep

Traits	r_a	r_p	r_e
Birth weight to weaning weight	0.5	0.2	0.15
Birth weight to 6-month weight	0.4	0.81	0.13
Birth weight to yearling weight	0.07	0.13	0.14
Weaning weight to 6-month weight	0.7	0.61	0.60
Weaning weight to yearling weight	0.61	0.39	0.33
6-month weight to yearling weight	0.94	0.54	0.43

r_a: Genetic correlation; r_p: Phenotypic correlation; r_e: Residual correlation

جدول ۴- برآورد مولفه‌های واریانس و ضرایب وراثت پذیری و خطای استاندارد صفات وزن بدن در گوسفند مغانی

Table 4. Variance components and genetic parameters± SE of body weight traits in Moghani sheep

Traits	σ^2_a	σ^2_p	σ^2_e	h^2
Birth weight	0.22±0.04	0.39±0.08	0.16±0.03	0.56±0.08
Weaning weight	10.8±1.1	17.98±3.3	7.18±1.04	0.6±0.08
6-month weight	9.3±0.103	24.9±3.9	15.6±3.3	0.37±0.07
Yearling weight	5.72±0.68	21.42±3.6	15.69±3.3	0.26±0.06

همکاران، ۱۳۹۱). معیارهای تنوع درون جمعیت گوسفندان مغانی برای ژن فاکتور رشد شامل تعداد آلل موثر و شاخص هتروزیگوتی به ترتیب ۲/۳۸ و ۰/۵۸۰۴ بود (پوربایرامان و همکاران، ۱۳۹۱).

نتایج نشان دادند که همبستگی‌های ژنتیکی، فنوتیپی و باقیمانده صفات وزن بدن مثبت و نسبتاً بالا هستند، بنابراین انتخاب برای بهبود یکی از این صفات می‌تواند موجب اصلاح ژنتیکی سایر صفات همبسته به آن نیز شود (جدول ۳). بیشترین همبستگی ژنتیکی بین وزن شش ماهگی و وزن یکسالگی (۰/۹۴) بدست آمد. با توجه به بالا بودن مقادیر همبستگی ژنتیکی افزایشی بین این صفات می‌توان گفت که انتخاب برای وزن‌های بدن در سنین اولیه عمر (زمان تولد، ۳ ماهگی و ۶ ماهگی) سبب افزایش وزن بدن در سنین بالاتر می‌شود. در گوسفند نژاد شال بیشترین همبستگی ژنتیکی (r_a=۰/۹۹۹) بین وزن ۳ تا ۶ ماهگی مشاهده شد (هادی تواتری و همکاران، ۱۳۹۱).

در میان صفات وزن بدن، بیشترین وراثت پذیری مربوط به وزن سه ماهگی بود (h^2 =۰/۶۰). وراثت پذیری وزن تولد نیز نسبتاً بالا و برابر با ۰/۵۶ محاسبه شد (جدول ۴). در گوسفندان نژاد شال بیشترین وراثت پذیری برای وزن ۶ ماهگی مشاهده شد (هادی تواتری و همکاران، ۱۳۹۱) که با نتایج پژوهش حاضر رابطه نزدیکی داشت . مقادیر بالای وراثت پذیری صفات وزن بدن در سنین پایین، انتخاب حیوانات را در سنین اولیه برای بهبود وزن بدن در سنین بالاتر، تسهیل می‌کند. قبل از برآورد مؤلفه‌های واریانس، در بررسی اثر عوامل محیطی (سال تولد، تیپ تولد، جنس و سن مادر) روی هر یک از صفات وزن تولد، وزن سه ماهگی، وزن شش ماهگی و وزن یکسالگی، معلوم شد همه عوامل بر صفات فوق تاثیر معنی‌داری دارند. در این میان تنها سال تولد بر وزن یکسالگی تاثیر معنی‌داری نداشت.

نتایج آنالیز واریانس نشان داد که اثر ژنوتیپ روی صفات وزن تولد، وزن سه ماهگی و وزن شش ماهگی معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). حیوانات با ژنوتیپ AC دارای بیشترین وزن تولد و وزن از شیرگیری (به ترتیب ۴/۴۵۳ و ۲۲/۸ کیلوگرم) و حیوانات با ژنوتیپ BC دارای بیشترین وزن شش ماهگی (۳۰/۳۰۵ کیلوگرم) بودند (جدول ۵). در مطالعه پیشین، در بررسی چندشکلی اگزون ۳ ژن لپتین درگوسفندان بلوچی با استفاده از روش PCR-SSCP، ارتباط بین سه الگوی باندی L۱، L۲ و L۳ با وزن از شیرگیری معنی‌دار شده است (Tahmoorespur *et al.*, 2009). مطالعات روی اگزن ۳ ژن لپتین در نژاد گوسفند

جدول ۵- مقایسه میانگین حداقل مربعات ژنوتیپ‌های مختلف ژن لپتین برای صفات وزن بدن (میانگین ± انحراف معیار) در گوسفند مغانی

Table 5. Least-squares means comparison of different genotypes of leptin gene for body weight traits (mean±SE) in Moghani sheep

	Genotype				
Trait (Kg)	AA	AB	AC	BC	CC
Birth weight	3.474± 0.194[a]	3.936± 0.169[ab]	4.453± 0.211[b]	3.896± 0.149[ab]	3.920± 0.213[ab]
Weaning weight	18.789± 1.100[a]	18.778 ± 0.092[ab]	22.800±1.199[b]	20.401±0.848[ab]	20.631±1.209[ab]
6-month weight	26.332± 1.399[a]	27.480± 1.217[ab]	30.154± 1.525[ab]	30.305± 1.079[b]	27.522± 1.537[ab]
Yearling weight	35.853±1.684	34.974±1.465	36.926±1.835	38.559±1.299	37.843±1.851

The means within the same row with at least one common letter, don't have significantly difference (P>0.05)

جدول ۶- مقایسه میانگین حداقل مربعات ژنوتیپ‌های مختلف ژن لپتین برای صفات میانگین افزایش وزن روزانه (میانگین ± انحراف معیار) در گوسفند مغانی

Table 6. Least-squares means comparison of different genotypes of leptin gene for average daily weight gain traits (mean±SE) in Moghani sheep

Average daily gain (Kg/day)	Genotype				
	AA	AB	AC	BC	CC
Birth to weaning	0.170± 0.011[a]	0.165± 0.009[a]	0.204± 0.012[a]	0.184± 0.008[a]	0.185± 0.012[a]
Weaning to 6 months	0.083± 0.011[ab]	0.096± 0.009[ab]	0.081±0.011[ab]	0.110±0. 008[a]	0.076±0. 011[b]
6-month to 9-month	0.040± 0.014[a]	0.009± 0.013[ab]	0.005± 0.016[ab]	-0.0007± 0. 01[b]	0.038± 0.016[ab]
9-month to yearling	0.065± 0.014[a]	0.073± 0.012[a]	0.069± 0.016[a]	0.092± 0.01[a]	0.076± 0.016[a]

The means within the same row with at least one common letter, don't have significantly difference (P>0.05)

جدول ۷- مقایسه میانگین حداقل مربعات ژنوتیپ‌های مختلف ژن لپتین برای صفات ارزش اصلاحی مستقیم و مادری وزن بدن (میانگین ± انحراف معیار) در گوسفند مغانی

Table 7. Least-squares means comparison of different genotypes of leptin gene for direct and maternal breeding values of body weight (mean± SE) in Moghani sheep

	Genotype				
	AA	AB	AC	BC	CC
Breeding value (Kg)					
Birth weight	-0.226± 0.063[a]	-0.017± 0.055[b]	-0.058± 0.069[ab]	-0.073± 0.049[ab]	-0.070± 0.070[ab]
Weaning weight	1.003± 0.400[a]	0.501± 0.348[a]	1.367±0.436[a]	1.527±0. 309[a]	1.035±0.440[a]
6-month weight	0.846± 0.666[a]	0.371± 0.580[a]	1.501± 0.727[a]	1.593± 0.514[a]	0.328± 0.733[a]
Yearling weight	-0.054±0.416[b]	-0.007±0.362[b]	0.466±0.453[ab]	0.818±0.321[a]	0.786±0.457[ab]
Maternal breeding value (Kg)					
Birth weight	-0.065± 0.033[a]	0.027± 0.029[a]	0.021± 0.036[a]	0.008± 0.026[a]	-0.017± 0.037[a]
Weaning weight	0.455± 0.195[ab]	0.250 ± 0.170[a]	0.642±0.213[ab]	0.801±0. 151[b]	0.466±0.215[ab]
6-month weight	0.560± 0.373[ab]	0.331± 0.324[ab]	0.660± 0.406[ab]	1.185± 0.287[a]	0.057± 0.410[b]
Yearling weight	-0.048±0.166[a]	0.076±0.144[a]	0.215±0.181[a]	0.278±0.128[a]	0.230±0.182[a]

The means within the same row with at least one common letter don't have significantly difference (P>0.05)

لری بختیاری و زل به ترتیب ۳ و ۶ الگوی باندی (عزیزی و همکاران، ۱۳۹۱a) و برای بزهای نژاد مهابادی الگوی باندی برای همه نمونه‌ها یکسان و این جایگاه‌ها تک شکل بودند (عزیزی و همکاران، ۱۳۹۱b).

اثر ژنوتیپ روی صفات میانگین افزایش وزن روزانه از سه الی شش ماهگی و میانگین افزایش وزن روزانه از شش الی نه ماهگی معنی‌دار شد (P<۰/۰۵). حیوانات با ژنوتیپ BC دارای بیشترین میانگین افزایش وزن روزانه از سه الی شش ماهگی (۰/۱۱۰ کیلوگرم) و حیوانات با ژنوتیپ AA دارای بیشترین میانگین افزایش وزن روزانه از شش الی نه ماهگی (۰/۰۴۰ کیلوگرم) بودند (جدول ۶). در مطالعه‌ای، اثر ژنوتیپ‌های ژن لپتین بر افزایش وزن روزانه از تولد تا از شیرگیری معنی‌دار (P<۰/۰۱) گزارش شد (طهمورث پور و همکاران، ۱۳۸۸) که با نتایج این پژوهش مطابقت نداشت. اثر الگوهای باندی (ژنوتیپ) روی صفت افزایش وزن روزانه بره‌های نر بلوچی معنی‌دار بود (P<۰/۰۵) و بیشترین

افزایش وزن روزانه در بره‌های نر با ژنوتیپ L1 مشاهده شد (Tahmoorespur and Ahmadi, 2012). اثـر ژنوتیـپ‌هـای مشـاهده شـده بـه روش PCR–RFLP روی افـزایش وزن روزانه در بزهای نر بوئر[1] معنی‌دار بود (Hua *et al.*, 2009).

اثر ژنوتیـپ روی ارزش اصـلاحی مسـتقیم وزن تولـد و ارزش اصـلاحی مسـتقیم وزن یکسـالگی معنـی‌دار شـد (P<۰/۰۵). حیوانات با ژنوتیـپ AB دارای بیشـترین ارزش اصلاحی مستقیم وزن تولد (۰/۰۱۷- کیلـوگرم) و حیوانـات با ژنوتیپ BC دارای بیشترین ارزش اصلاحی مسـتقیم وزن یکسالگی (۰/۸۱۸ کیلوگرم) بودند (جدول ۷). اثـر ژنوتیـپ روی ارزش اصـلاحی مـادری وزن سـه مـاهگی و ارزش اصلاحی مادری وزن شش ماهگی معنی‌دار شد (P<۰/۰۵). حیوانـات بـا ژنوتیـپ BC دارای بیشـترین ارزش اصـلاحی مادری وزن سه ماهگی و ارزش اصلاحی مـادری وزن شـش ماهگی (به ترتیب ۰/۸۰۱ و ۱/۱۸۵ کیلوگرم) بودند (جدول ۵).

نتیجه گیری کلی

نتایج این پـژوهش نشـان داد کـه چندشـکلی ژنتیکـی درجایگاه ژن لپتین وجود دارد. با توجه بـه معنـی‌دار بـودن رابطه ژنوتیپ‌ها و برخی صفات، می‌توان از ژنوتیـپ AC بـه عنوان یک شاخص در بالا بـودن میـزان وزن تولـد و وزن از شیرگیری، از ژنوتیپ BC به عنوان شاخصـی در بـالا بـودن میزان وزن شش ماهگی، میانگین افزایش وزن روزانه از سه الی شش ماهگی، ارزش اصـلاحی مسـتقیم وزن یکسـالگی، ارزش اصلاحی مـادری وزن سـه مـاهگی و ارزش اصـلاحی مادری وزن شش ماهگی، از ژنوتیپ AA به عنوان شاخصی در بالا بودن میزان میانگین افزایش وزن روزانه از شش الـی نه ماهگی و از ژنوتیپ AB نیز بـه عنـوان شاخصـی در بـالا بودن میزان ارزش اصـلاحی مسـتقیم وزن تولـد در اصـلاح نژاد استفاده کرد. در مجمـوع نتـایج ایـن تحقیـق نشـان از مطلوب بودن آلل AC بر وزن در سنین اولیه در گوسفندان مغانی داشت. همچنـین بـا توجـه بـه همبسـتگی ژنتیکـی افزایشی و فنوتیپی بالا بین وزن از شیرگیری و صـفات بعـد از شیرگیری، یک انتخـاب زود هنگـام مـی توانـد بـرای ژن لپتین در گوسفند مغانی صورت بگیرد.

1. Boer goat

فهرست منابع

اسدی آ.، منتظر تربتی م.، فرهنگ فر ه. و ایزانلو ع. ۱۳۹۱. بررسی چندشکلی ناحیه اگزون ۳ ژن CYP19 در گوسفند بلوچی به روش PCR-SSCP. پنجمین کنگره علوم دامی ایران، ۹- ۸ شهریور، اصفهان، ایران، صفحه ۱۲۱-۱۲۳.

پوربایرامان ف.، هاشمی ع.، مردانی ک.، قادرزاده م.، بیابانی پ.، برومند ج. و نایری ف. ۱۳۹۱. شناسایی چندشکلی ژن فاکتور رشد شبه انسولین (IGF-I) در گوسفند مغانی با روش PCR-SSCP. پنجمین کنگره علوم دامی ایران، ۹- ۸ شهریور، اصفهان، ایران، صفحه ۱۸۷-۱۹۰.

شیبک ع.، منتظر تربتی م.،فرهنگفر ه.، اشکانی فر ر.، و فانی مکی ا. ۱۳۹۱. مطالعه چندشکلی ناحیه اگزون ۳ ژن لپتین در گوسفندان کردی خراسان شمالی. پنجمین کنگره علوم دامی ایران، ۹- ۸ شهریور، اصفهان، ایران، صفحه ۲۴۰-۲۴۴.

طهمورث پور م.، نصیری م.، انصاری م.، موسوی ا.، وفایی م. و افتخاری شهرودی ف. ۱۳۸۷. بررسی اثرات چند شکلی ژنهای GH و IGF-I بر میانگین افزایش وزن روزانه در گوسفند بلوچی. سومین کنگره علوم دامی ایران، ۲-۱ مهر، مشهد، صفحه ۱-۳.

عزیزی پ.، مرادی شهربابک م.، مرادی شهربابک ح. و طالبی م. ۱۳۹۱a. مطالعه چندشکلی‌های اگزن سه ژن لپتین و ارتباط آنها با ویژگی‌های بیومتری و فراسنجه‌های خونی در گوسفند دنبه دار لری- بختیاری و بی‌دنبه زل با روش PCR-SSCP. پنجمین کنگره علوم دامی ایران، ۹- ۸ شهریور، اصفهان، ایران، صفحه ۴۰۷-۴۱۲.

عزیزی ز.، مرادی شهربابک م.، مرادی شهربابک ح. و زالی ا. ۱۳۹۱b. مطالعه چندشکلی‌های اگزن سه ژن لپتین در بز مهابادی با روش PCR-SSCP. پنجمین کنگره علوم دامی ایران، ۹- ۸ شهریور، اصفهان، ایران، صفحه ۶۴۲-۶۴۶.

هادی تواتری م.، عباسی م.، مستشاری م. و مسگر ع. ۱۳۹۱. ارزیابی عملکرد و روند ژنتیکی برخی صفات اقتصادی گوسفند نژاد شال. پنجمین کنگره علوم دامی ایران، ۹- ۸ شهریور، اصفهان، ایران، صفحه ۱۰۶۲-۱۰۶۶.

Fruhbeck G., Jebb S. A. and Prentice A. M. 1998. Leptin: Physiol. Pathophysiol. Clinical Physiology and Functional Imaging, 18: 399-419.

Hageman A., Van Zeveren A. and Peelman L. J. 2000. New mutation in Exon 2 of bovine leptin gene. Animal Genetics, 31: 79.

Hajihosseinlo A., Hashemi A. and Sadeghi S. 2012. Association between polymorphism in exon 3 of leptin gene and growth traits in the Makooei sheep of Iran. Livestock Research for Rural Development, 24: 9.

Hashemi A, Mardani K, Farhadian M, Ashrafi I. and Ranjbari M. 2011. Allelic polymorphism of Makoei sheep leptin gene identified by polymerase chain reaction and single strand conformation polymorphism. African Journal of Biotechnology, 10 (77): 17903-17906.

Houseknecht K. L., Baile C. A., Matteri R. L. and Spurlock M. E. 1998. The biology of leptin: A review. Journal of Animal Science, 76: 1405-1420.

Hua G. H., Chen S. L., Yu J. N., Cai K. L., Wu C. J., Li Q. L., Zhang C. Y., Liang A. X., Han L., Geng L. Y., Shen Z., Xu D. Q. and Yang L. G. 2009. Polymorphism of the growth hormone gene and its association with growth traits in Boer goat bucks. Meat Science. 81 (2): 391–395.

Jangali M. 2010. Moghani sheep. Royana, Retrieved March 10, 2010. From http://maedea.mihanblog.com/post/72.

Javanmard A., Mohammadabadi M. R., Zarrigabayi G. E., Gharahedaghi A. A., Nassiry M. R., Javadmansh A. and Asadzadeh N. 2008. Polymorphism within the intron region of the bovine leptin gene in Iranian Sarabi cattle (Iranian *Bostaurus*). Russian Journal of Genetics. 44(4): 1–4.

Lagonigro R. P., Wiener F., Pilla J. and Woolliams A. 2003. A new mutation in the coding region of the bovine leptin gene associated with feed intake. Animal Genetics, 34(5): 371-374.

Liendersoon M. L., Anderson D. and De Konine J. 1998. Mapping of serum amylase-1 and quantitative trait loci for milk production traits to cattle chromosome. Journal of Dairy Science, 81: 1454-1461.

Liefers S. C., Te Pas M. F., Veerkamp R. F., Chilliard Y., Delavaud C. and Gerritsen R. 2003. Association of leptin gene polymorphisms with serum leptin concentration in dairy cows. Mammalian Genome, 14: 657–663.

Meyer K. 2000. Dfreml User Notes. Version 3.1, New England Univ, Armidal, Australia.

Moores S., Sargeant L. L., King T. J., Mattick J .S., Georges M. and Hatzel D. J. S. 1991. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allow the use of heterologous RCR primer pairs in closely related species. Genomics, 10: 654-660.

SAS Institute. 2002. Statistical analysis system, systems for windows SAS Institute Inc, Cary NC.

Shojaei M., Mohammadabadi M. R., Asadi Fozi M., Esmailizadeh K. A., Ferdowsi M. H., Torabi A., Tayyarzadeh M. and Mirzakhani H. 2010. Using PCR-SSCP technique to investigate polymorphism of leptin gene in Kermani sheep. Animal Science Researches, 20: 115-122.

Tahmoorespur M. and Ahmadi H. 2012. A neural network model to describe weight gain of sheep from genes polymorphism, birth weight and birth type. Livestock Science, 148 (3): 221–226.

Tahmoorespur M., Taheri A.,VafayeValeh M., Nassiry M. R. and Ansary M. 2009. Assessment relationship between leptin and Ghrelin genes polymorphisms and estimated breeding Values (EBVs) of growth traits in Baluchi sheep. Journal of Animal and Veterinary Advances, 919: 2460-2465.

Tessanne K., Hines H. C. and Davis M. E. 1999. Relationships of polymorphism in the bovine leptin gene with differences in beef carcass traits. Department of Animal Science, The Ohio state University.

Yeh F. C., Yang R. and Boyle T. 1999. POPGENE (VERSION 1.31). University of Alberta and Centre for International Forestry Research.

Zhou H., Hickford J. G. H. and Gong H. 2009. Identification of allelic polymorphism in the ovine leptin gene. Molecular Biotechnology, 41: 22–25.

Zwierzchowski L., Krzyzewski J., Strzalkowska N., Siadkowska E. and Ryniewic Z. 2002. Effect of polymorphism of growth hormone (GH), Pit-1 and leptin (Lep) genes, cows age, lactation stage, and somatic cell count on milk yield and composition of polish black-and- white cows. Animal Science Papers and Reports, 20(4): 213-227.

Study on the relationship between leptin gene polymorphism and growth traits and its effect on breeding values in Moghani Sheep

S. Sadeghi[1], A. Hajihosseinloo[2], A. Hashemi[3*]

1. PhD Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran.
2. Former MSc Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Iran

(Received: 18-7-2013- Accepted: 17-11-2013)

Abstract

In this research for identification of polymorphism in leptin gene in sheep population of Moghani breed, 90 heads were randomly blooded. Genomic DNA was extracted from blood samples and a piece including 471 bp from the part of exon 3 leptin gene was amplified with using PCR-SSCP. Five banding patterns AA, AB, AC, BC and CC were obtained with frequencies of 0.2, 0.25, 0.3, 0.1 and 0.15 respectively. The frequencies of A, B and C alleles were calculated as 0.475, 0.175 and 0.35 respectively. The Chi-Square test showed no significant deviation (P>0.05) from Hardy-Weinberg equilibrium for this locus in studied population. AC genotype was associated with highest birth weight and weaning weight. 6 months weight (SW), average daily weight gain from weaning to six month, yearling weight estimated breeding value, weaning weight estimated maternal breeding value and 6 months weight estimated maternal breeding value were highest in the BC genotype. AA genotype was associated with highest average daily weight gain from six to nine month (AGSN). Birth weight estimated breeding value was most in the AB genotype .A selection at lower ages can be performed in Moghani sheep for leptin gene, because high genotypic and phenotypic correlations were observed between weaning weight and body weight at higher ages.

Key words: Growth traits, Leptin gene, PCR-SSCP, Polymorphism

*Corresponding Author: a.hashemi@urmia.ac.ir