تحقیقات تولیدات دامی

سال پنجم/شماره دوم/تابستان ۱۳۹۵ (۵۹-۴۷)

بررسی چندشکلی ژن‌های گیرنده لپتین و گیرنده ملانوکورتین۴ با استفاده از نشانگر PCR-SSCP در گاوهای بومی استان گیلان

عباس شیبک[۱]، سید ضیاالدین میرحسینی[۲*]، محمدباقر منتظر تربتی[۳]، محمود حسیندخت[۴]

۱- کارشناس آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

۲- استاد گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

۳- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

۴- دانش آموخته ارشد کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

(تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۳)

چکیده

تحقیق حاضر جهت بررسی چندشکلی ژن‌های گیرنده لپتین (LEPR) و گیرنده ملانوکورتین ۴ (MC4R) در گاوهای بومی استان گیلان انجام شد. بدین منظور از ۹۶ رأس گاو بومی استان گیلان به طور تصادفی خونگیری به عمل آمد. پس از استخراج DNA با استفاده از روش نمکی بهینه یافته، واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) برای تکثیر قطعه ۲۶۹ جفت بازی اگزون ۲ ژن LEPR و قطعه ۲۱۳ جفت بازی از اگزون ۱ ژن MC4R انجام شد. چندشکلی فضایی تک‌رشته‌ای (SCCP) محصولات RCR با استفاده از ژل اکریل آمید و رنگ‌آمیزی نیترات نقره به دست آمد. برای ژن LEPR در نمونه مورد مطالعه ۳ الگوی باندی AA، AB و AC و برای ژن MC4R، ۶ الگوی باندی AA، AB، AC، AD، AE، AF و AG مشاهده شد. فراوانی-های ژنوتیپی برای ژن LEPR به ترتیب ۰/۰۶۲، ۰/۶۱۵ و ۰/۳۲۳ و برای ژنوتیپ های ژن MC4R، ۰/۰۷۴، ۰/۲۱، ۰/۲۵۳، ۰/۱۵۸، ۰/۱۰۵، ۰/۱۰۵ و ۰/۰۹۵ بود. تجزیه و تحلیل ژنتیک جمعیت نشان داد که ژن‌های LEPR و MC4R در تعادل هاردی-وینبرگ نبودند، اما هر دو ژن از تنوع ژنتیکی و چندشکلی بالایی برخوردار بودند.

واژه‌های کلیدی: چندشکلی، ژن گیرنده لپتین، ژن گیرنده ملانوکورتین ۴، گاو بومی استان گیلان

* نویسندهٔ مسئول: szmirhoseini@gmail.com

مقدمه

لپتین یک پروتئین ۱۶ کیلو دالتونی، متشکل از ۱۷۶ اسیدآمینه است که اساساً به وسیله بافت چربی و در سطوح کمتر از بافت هایی مثل معده، عضلات اسکلتی و جفت تولید می‌شود (Zhang *et al*., 1994). این هورمون در تنظیم خوراک مصرفی، توازن انرژی، رشد و ترکیبات بدن، عملکرد سیستم ایمنی و تولیدمثلی نقش قابل ملاحظه ای دارد (Houseknecht *et al*., 1998; Liefers *et al*., 2002). فعالیت لپتین از راه اتصال آن به گیرنده-های خود انجام می شود و زمانی که لپتین به گیرنده‌های خود متصل می شود نتیجه آن کاهش مصرف خوراک و افزایش تجمع انرژی است (Liefers *et al*., 2004). هورمون گیرنده ژن لپتین دارای پنج ایزوفرم مختلف (Ob-Ra، Ob-Rb، Ob-Rc، Ob-Rd، Ob-Rf) است که همه اشکال آن به وسیله ژن گیرنده لپتین (db) تولید می‌شود (Tartaglia *et al*., 1995). طولانی‌ترین ایزوفرم یعنی ObRb، نقش مهمی در انتقال پیام در هیپوتالاموس، که مرکز اصلی هومئوستاز انرژی است، دارد (Vaisse *et al*., 1996). همچنین این گیرنده توانایی کامل دریافت پیام‌های داخل سلولی و اِعمال وظایف فیزیولوژیکی هورمون لپتین را در سایر بافت های بدن دارا است (Tartaglia, 1997). ObRb به وفور در هیپوتالاموس بیان و چندشکلی آن باعث تاثیر در افزایش وزن و چاقی می شود (Delavaud *et al*., 2002). باند شدن لپتین با ObRb، ایجاد یک کمپلکس گیرنده می‌کند که سبب فسفوریلاسیون و فعال‌سازی آنزیم JAK2 می‌شود که این آنزیم با تنوع وسیعی از فعالیت های زیستی در بافت‌های مختلف بدن در ارتباط است (White *et al*., 1997). ژن گیرنده لپتین (db) دارای ۲۰ اگزون و در انسان روی کروموزوم ۱ (1p31) (Tartaglia *et al*., 1995)، در موش روی کروموزوم ۴ (446.96 cM) (Chua *et al*., 1996)، در گاو روی کروموزوم ۳ (3q33) (Pefister-Genskow *et al*., 1997)، در خوک روی کروموزوم ۶ (q3.3-3.5) (Ernst *et al*., 1997) و در گوسفند روی کروموزوم ۱ (International Sheep Genomics Consortium) قرار دارد.

ژن MC4R درای یک اگزون است که در انسان و موش روی کروموزوم 18q22 (MacKenzie, 2006) و در گاو روی کروموزوم 24q27 قرار گرفته که طول اگزون آن bp ۱۸۰۸ است (Haegeman *et al*., 2001). این ژن رمزکننده پروتئینی با همین نام است که از ۳۲۰ اسید-آمینه تشکیل شده است (Tao *et al*., 2003). گیرنده ملانوکورتین۴ (MC4R) یک گیرنده مزدوج با پروتئین G است که به میزان زیادی در هیپوتالاموس، بیان می شود (Yeo *et al*., 1998). ثابت شده است که ژن MC4R در هومئوستاز انرژی و تنظیم وزن بدن نقش دارد (Benoit *et al*., 2000). در واقع، فعالیت ژن MC4R موجب ممانعت از مصرف خوراک می شود، اما اختلال در این ژن به وسیله جهش، موجب چاقی همراه با پرخوری شدید، فزونی انسولین و فزونی گلوکز خون می‌شود (Huszar *et al*., 1997; Ste Marie *et al*., 2000). مرکز اصلی اشتها در هیپوتالاموس قرار دارد و به وسیله سیستم مرکزی ملانوکورتین تنظیم می‌شود (Strader *et al*., 2003). مسیرهای ملانوکورتین دارای فعالیت‌های ممانعت‌کنندگی از مصرف خوراک، افزایش هزینه انرژی و کاهش هموئستاز انرژی می‌باشند (Baskin *et al*., 1999; Mizuno and Mobbs, 1999). سیگنال MC4R به عنوان واسطه برای اثر لپتین بر خوراک مصرفی، وزن بدن و هومئوستاز انرژی مهم است (Seeley *et al*., 1997).

گیرنده‌های ژن لپتین در چرخش خون جنینی بسیاری از گونه‌های حیوانی از جمله گوسفند و همچنین در بافت - های جنینی خصوصاً در توسعه غضروف و استخوان شناسایی شده است. این نتایج منجر به این فرضیه شده است که لپتین و گیرنده‌های آن در کنترل رشد جنین، برحسب مواد مغذی موجود در رحم درگیر هستند (Forhead *et al*., 2008). زمانی که حیوان در توازن مثبت انرژی قرار داشته باشد، ترشح هورمون لپتین و انسولین افزایش می‌یابد و با اثر منفی بر نروپپتیدهای AgRP و Y (نروپپتیدهای افزایش‌دهنده اشتها) و اثر مثبت بر نروپپتیدهای POMC و Cart (نروپپتیدهای کاهش‌دهنده اشتها) واقع در هسته آرکوات هیپوتالاموس، موجب بیان شدن هورمون گیرنده ملانوکورتین ۴ در هسته پاراونتریکولار هیپوتالاموس می‌شود که نتیجه آن مهار اشتها و کاهش مصرف خوراک است (Liefers, 2004). اما عکس این عمل در زمان گرسنگی با ترشح گرلین از معده و مهار لپتین و انسولین رخ می‌دهد. این امر موجب افزایش بیان نروپپتیدهای AgRP و Y شده که متعاقب آن باعث کاهش بیان MC4R و در نتیجه افزایش اشتها و

مصرف خوراک را موجب می‌شود (Li and Li, 2006). علاوه بر مکانیسم فوق، هورمون محرک آلفا-ملانوسایت (α-MSH)، که محصول ژن POMC است، با تحریک MC4R موجب کاهش مصرف خوراک و کاهش وزن می-شود (Marsh *et al*., 1999)، در حالیکه AgRP با ممانعت از MC4R و MC3R موجب افزایش مصرف خوراک و افزایش وزن می شود (Haskell-Luevano *et al*., 1999).

در تحقیقی که به منظور بررسی چندشکلی گیرندهٔ ObRb ژن لپتین روی انسان انجام شد، ارتباط معناداری بین چندشکلی این گیرنده و اوزان بدن مشاهده شد (Iserentant *et al*., 2005). همچنین جهش Q223R در ژن گیرنده لپتین ارتباط معنی‌داری با چاقی، افزایش وزن، افزایش چربی بدن و افزایش چربی محوطه بطنی شکم در انسان دارد (van Rossum *et al*., 2003; Yiannakouris *et al*., 2001; Wauters *et al*., 2001).

همبستگی معنی‌داری بین چندشکلی مشاهده شده در گیرنده‌های ژن لپتین با میزان گوشت لخم، چربی پشتی و نسبت گوشت لُخم در خوک گزارش شده است (Hardge *et al*., 2003). در تحقیقی تعیین توالی اگزون‌های ۱۱، ۱۶ و ۲۰ ژن گیرنده لپتین در ۲۰ گاو نژاد هلشتاین انجام شد که در اگزون‌های ۱۱ و ۱۶ چندشکلی مشاهده نشد، اما یک چندشکلی در موقعیت ۱۱۵ اگزون ۲۰ گیرنده لپتین گزارش شد. این جهش به T945M معروف می - باشد که ارتباط معنی‌دار با غلظت لپتین در مرحله آخر آبستنی داشته ولی با مرحله تولید شیر بعد از زایمان رابطه ندارد (Liefers *et al*., 2004). در مطالعه‌ای نیز جهش T945M در سه نژاد برزیلی برنجس، چورلیس و برانگوس بررسی شده و فقط یک هموزیگوت جهش یافته مشاهده شد (Almeida *et al*., 2008). در پژوهشی دیگر تعدادی از چندشکلی‌ها از جمله اگزون ۲۰ ژن گیرنده لپتین در گاوهای نژاد هلشتاین اسکاتلند را بررسی کردند و فراوانی ژنوتیپی هموزیگوت جهش یافته را ۱ درصد گزارش کردند (Banos *et al*., 2008).

در تحقیقی نشان داده شد که حذف MC4R موش علائمی چون پرخوری، چاقی و افزایش ترشح انسولین را در پی دارد (Huszar *et al*., 1997). در انسان SNP های ژن MC4R با چاقی، هومئوستاز انرژی و کنترل رفتار مصرف خوراک ارتباط معنی‌داری دارند (Rosmond *et al*., 2001; MacKenzie, 2006). همچنین ارتباط چندشکلی‌های مشاهده شده ژن MC4R در دام‌های مزرعه‌ای نیز به طور گسترده مطالعه شده است. گزارشات ارتباط معنی‌داری را بین جایگاه ژنی Asp298Asn و صفات میزان رشد و مقدار خوراک مصرفی در خوک نشان داده است (Kim *et al*., 1999). همچنین ژن MC4R با عمق چربی پشت و ضریب تبدیل غذا در خوک ارتباط دارد (Houston *et al*., 2004). تاکنون پنج SNP، در موقعیت‌های (C/A) ۱۹، (A/T) ۲۰ ، (T/C) ۸۳، (G/A) ۱۲۸، و (G/C) ۱۰۶۹ ژن MC4R در هشت نژاد گاو کشف شده است که فقط جایگاه C۱۰۶۹G به طور معنی-داری با ضخامت چربی پشت بدن ارتباط داشته است (Huang *et al*., 2010). چهار SNP در ناحیه 3'-UTR دارای ارتباط معنی‌داری با وزن تولد و وزن از شیرگیری در گوسفند بودند (Song *et al*., 2012). همچنین ارتباط معنی‌داری بین جهش MC4R-C1069G با چربی پشت بدن، وزن زنده و وزن لاشه در گاوهای چینی گزارش شده است (Liu *et al*.,2009).

تحقیق روی جهش‌ها در ژن‌های مفید (ژن‌های کاندید) و ارتباط آن‌ها با صفات اقتصادی برای تعیین مبنای ژنتیکی صفات تولیدی و برای توسعه آزمون DNA به عنوان یک ابزار انتخاب در طرح های اصلاح نژاد دام، انجام می‌شود (De Vries *et al*., 1998). بسیاری از این کشف‌ها در ترکیب با اطلاعات عملکردی برای بهبود تولید دام گزارش و استفاده شده است (Gan *et al*., 2008).

به گزارش سازمان خواربار جهانی، منابع ژنتیکی بومی به علت آمیخته‌گری زیاد با نژادهای تجاری در خطر هستند. از این رو حفظ نژادها و ذخیره ژنی دام‌های بومی کشور با تشکیل بانک ژنی به عنوان یک سرمایه ملی از ضروریات دامپروی کشور است (شجایی و همکاران، ۱۳۸۹). گاوهای بومی (کوهان‌دار) استان گیلان یکی از نژادهای بومی دومنظوره ایران است که به منظور تولید گوشت و شیر پرورش داده می‌شود. این نژاد جزء یکی از ذخائر ژنتیکی مهم کشور محسوب می‌شود که طی سالیان متمادی از لحاظ فنوتیپی و ژنتیکی با شرایط بخصوص آب و هوای منطقه شمال کشور تطابق یافته است. اما با توجه به ظرفیت تولیدی این نژاد و وجود مراتع مناسب در استان گیلان، تحقیقات اندکی به منظور افزایش توان تولیدی این دام صورت گرفته است. بنابراین با توجه به ظرفیت ژنتیکی بالای نژادهای بومی کشور و نیاز روزافزون به

افزایش تولید محصولات دامی باید مطالعات بیشتری در این زمینه انجام شود.

دانش ما در مورد عوامل ژنتیکی موثر بر چاقی افزایش یافته است، اما اطلاعات مربوط به اثرات انفرادی ژن در انسان و همین طور در حیوانات مدل محدود باقی مانده است (Kim *et al*., 1999). چاقی در انسان یک وضعیت نامطلوب بوده و به موضوع سلامتی مهمی در کل دنیا تبدیل شده است (Doak *et al*., 2012) اما در حیواناتی که به منظور تولید گوشت نگهداری و پرورش داده می شوند به عنوان یک صفت مطلوب حائز اهمیت است. تاکنون ژن‌های زیادی شناخته شده‌اند که با صفات مربوط به تولید گوشت و افزایش وزن در ارتباط هستند. برخی از این ژن‌ها به عنوان ژن‌های کاندید در اصلاح نژاد دام مدنظر هستند. در بین این ژن‌ها، ژن‌های LEPR و MC4R نیز در دسته ژن‌های بزرگ اثر بر صفات تولید گوشت قرار دارند. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی چندشکلی این دو ژن به روش SSCP-PCR در گاوهای بومی استان گیلان بود.

مواد و روش ها

در پژوهش حاضر، از ۹۶ راس گاو که در مرکز پرورش گاوهای بومی استان گیلان واقع در شهرستان تالش پرورش داده می‌شدند، به وسیله ونوجکت‌های حاوی EDTA خون‌گیری به عمل آمد و تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

استخراج DNA با استفاده از روش نمکی بهینه‌یافته انجام شد (Salting Out Extraction) (Iranpur and Esmailizadeh, 2010). برای ارزیابی کمیّت و کیفیّت DNA نمونه‌های استخراج شده، از روش مبتنی بر اسپکتوفتومتری استفاده شد. نمونه‌های DNA برای انجام واکنش PCR به غلظت ۱۵۰-۱۰۰ ng/µl رسانیده و در ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

برای تکثیر قطعه ۲۶۹ جفت بازی اگزون شماره ۲ ژن LEPR و تکثیر قطعه ۲۱۳ جفت بازی اگزون شماره ۱ که تنها اگزون ژن *MC4R* است، از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) استفاده شد (Eppendorf mastercycler gradient 5331) و توالی هر یک از آغازگرهای اختصاصی کهبه وسیله نرم‌افزار Primer 3 طراحی و استفاده شده بود در بخش زیر ارائه شده است:

LEPRF: 5'- TGGCATATCCAATTACTCCCTG -3'
LEPRR: 5'-ATGCCTTCCCTTCAATGTCATC -3'
MC4RF: 5'- ACTCTCCGCCGCCTAACTTTCG -3'
MC4RR: 5'- AGTAGCCTTTTGCCGGGGACTCA -3'

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر ($Mgcl_2$، ۲/۵ میلی-مولار، dNTPs نیم میلی‌مولار، هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت ۰/۴ پیکومول، ۱ واحد از Taq DNA پلیمراز، PCR Buffer 10X ۲ میکرولیتر، ۱ میکرولیتر DNA با غلظت ۱۵۰-۱۰۰ ng/µl) بود. برنامه حرارتی برای ژن LEPR، ۹۵ درجه سانتی‌گراد جهت واسرشت‌سازی اولیه DNA به مدت ۲۴۰ ثانیه، واسرشت‌سازی ثانویه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد جهت اتصال آغازگرها به مدت ۴۰ ثانیه، دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد جهت بسط آغازگرها به مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای بسط نهائی به مدت ۶۰۰ ثانیه و به تعداد ۳۸ چرخه انجام شد. همچنین برنامه حرارتی برای ژن MC4R، ۹۵ درجه سانتی‌گراد جهت واسرشت‌سازی اولیه DNA به مدت ۳۰۰ ثانیه، واسرشت-سازی ثانویه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد جهت اتصال آغازگرها به مدت ۳۰ ثانیه، دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد جهت بسط آغازگرها به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۰ درجه سانتی‌گراد برای بسط نهائی به مدت۶۰۰ ثانیه و به تعداد ۳۵ چرخه انجام شد. صحت طول قطعه‌های بدست آمده از محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد صورت گرفت (شکل ۱).

جهت انجام SSCP، ۴ میکرولیتر از محصولات تکثیر شده با ۸ میکرولیتر بافر بارگذاری (SSCP loading dye) مخلوط شد و میکروتیوب‌ها برای مدت ۱۰ دقیقه درون ترموسایکلر با دمای ۹۵ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. سپس، بلافاصله پس از خارج کردن، میکروتیوب‌ها روی یخ قرار گرفتند تا از تشکیل مجدد DNA دو رشته‌ای جلوگیری شود. بعد از گذشت ۷-۵ دقیقه ۱۲ میکرولیتر از مخلوط محصولات PCR و بافر بارگذاری SSCP، با استفاده از سیستم الکتروفورز عمودی حاوی بافر TBE (1X)، با ولتاژ ۱۵۰ برای ژن LEPR و ولتاژ ۱۲۰ برای ژن MC4R، به مدت ۱۰-۸ ساعت روی ژل آکریل آمید غیرواسرشته ساز ۱۰ درصد در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد الکتروفورز شد. برای مشاهده ژنوتیپ‌ها از رنگ‌آمیزی نیترات نقره استفاده شد (Bassam *et al*., 1991).

نتایج و بحث

تکثیر قطعه‌های مربوط به ژن های LEPR و MC4R، به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، به خوبی صورت گرفت و صحت طول قطعات تکثیر شده با ژل آگارز ۱ درصد تایید شد (شکل ۱ و ۲). چندشکلی فضائی تک‌رشته‌ای (SSCP) در گاو بومی استان گیلان، بطور موفقیت‌آمیزی انجام شد. برای جمعیت مورد مطالعه، بر اساس الگوهای باندی رویت شده در ژن LEPR (۳ الگو) در ژل پلی‌اکریلامید، سه نوع ژنوتیپ AA، AB و AC به ترتیب با فراوانی ۰/۰۶۲، ۰/۶۱۵ و ۰/۳۲۳ مشاهده و برآورد شد (شکل ۳)، اما برای ژن MC4R، بر اساس الگوها (۷ الگو)، هفت نوع ژنوتیپ AA، AB، AC، AD ، AE ، AF و AG به ترتیب با فراوانی ۰/۰۷۴، ۰/۲۱، ۰/۲۵۳، ۰/۱۵۸، ۰/۱۰۵، ۰/۱۰۵ و ۰/۰۹۵ مشاهده و برآورد شد (شکل ۴).

پارامترهای مربوط به ژنتیک جمعیت و معیارهای مربوط به چندشکلی با استفاده از نرم‌افزارهای Pop GENE 32 و Power Marker 3.25 محاسبه شد که در جدول‌های ۱ و ۲ ارائه شده است. آزمون کای مربع نشان داد که جمعیت مورد مطالعه برای هر دو جایگاه ژنی در تعادل هاردی-وینبرگ نبود (LEPR X^2 = 73.86) (MC4R X^2 = 147.61) که این امر می‌تواند به دلیل کوچک بودن جمعیت گاوهای بومی و کاهش سالیانه تعداد آن‌ها باشد.

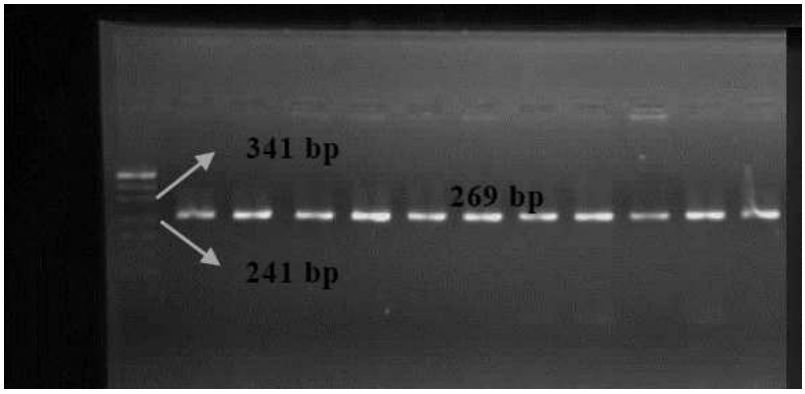

Fig. 1. PCR results for exon 2 of LEPR gene with marker SM 0221on the left

شکل ۱- نتایج انجام PCR برای اگزون شماره ۲ ژن LEPR به همراه نشانگر SM 0221 در سمت چپ

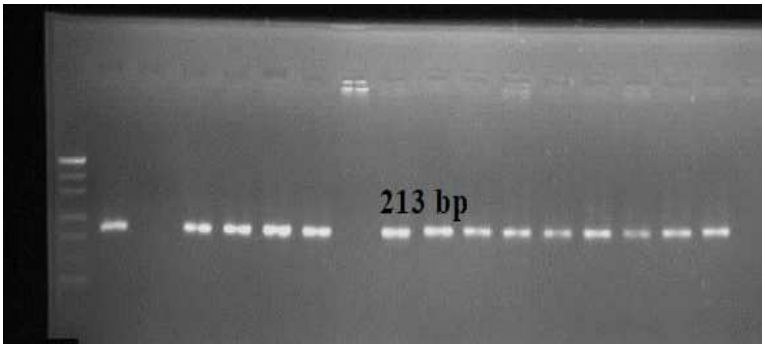

Fig. 2. PCR results for exon 2 of MC4R gene with marker SM 0221on the left

شکل ۲- نتایج انجام PCR برای اگزون شماره ۲ ژن MC4R به همراه نشانگر SM 0221 در سمت چپ

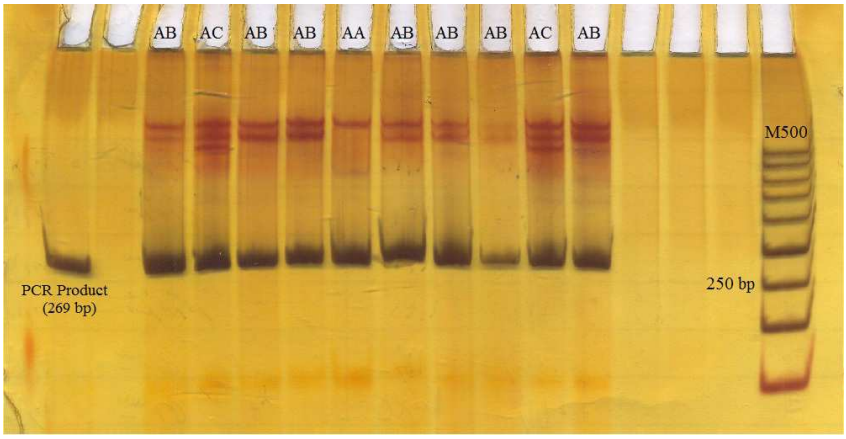

Fig. 3. Band patterns of LEPR gene obtained acrylamide gel and stained with silver nitrate

شکل ۳- الگوهای باندی ژن LEPR حاصل از ژل آکریل آمید و رنگ آمیزی با نیترات نقره

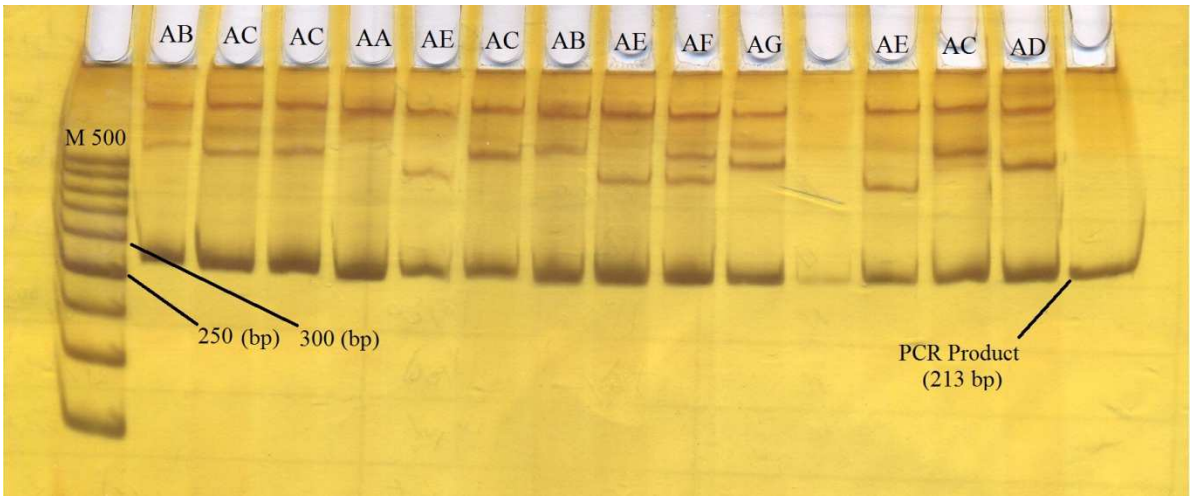

Fig. 4. Band patterns of MC4R gene obtained acrylamide gel and stained with silver nitrate

شکل ۴- الگوهای باندی MC4R حاصل از ژل آکریل آمید و رنگ آمیزی با نیترات نقره

جدول ۱- فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی مربوط به ژن‌های LEPR و MC4R

Table 1. Allele and genotype frequencies of LEPR and MC4R genes

	Genotype							Allele							
Loci	AA	AB	AC	AD	AE	AF	AG	A	B	C	D	E	F	G	Total
LEPR	0.062	0.615	0.323	--	--	--	--	0.531	0.307	0.161	--	--	--	--	1
MC4R	0.074	0.21	0.253	0.158	0.105	0.105	0.095	0.490	0.105	0.126	0.079	0.100	0.053	0.047	1

جدول ۲- پارامترهای تنوع ژنتیکی ژن‌های LEPR و MC4R

Table 2. Parameters of genetic variation LEPR and MC4R genes

Parameters	LEPR	MC4R
Number of actual alleles (Na)	3	7
Number of affective alleles (N_e)	2.48	3.474
Observed hetrozygosity	0.9375	0.926
Observed homozygosty	0.0605	0.074
Expected heterozygosity	0.6004	0.716
Expected homozygosty	0.3996	0.284
Means of heterozygosity	0.5973	0.712
Nei´s Index	0.597	0.712
Shannon´s Information Index (I)	0.993	1.578
Polymorphic Information content (PIC)	0.523	0.646

میانگین شاخص شانون (I) و نئی (Nei) برای ژن LEPR به ترتیب ۰/۹۹۳ و ۰/۵۹۷ و برای ژن MC4R به ترتیب ۱/۵۷۸ و ۰/۷۱۲ برآورد شد که نشان‌دهنده تنوع بالای این دو ژن در جمعیت است. هتروزیگوتی مشاهده شده برای هر دو ژن نیز بالاتر از مقدار مورد انتظار بود که نشان‌دهنده عدم وجود همخونی در جمعیت تحت مطالعه است. بر اساس طبقه‌بندی محتوای اطلاعات چندشکلی (چندشکلی پایین PIC < 0.25، چندشکلی متوسط 0.25 < PIC < 0.5، چندشکلی بالا PIC > 0.5) (Botstein *et al.*, 1980) محتوای اطلاعات چندشکلی نیز عبارت بودند از LEPR =۰/۵۲۳ و MC4R =۰/۶۴۶ که نشان-دهنده چندشکلی بالا در جمعیت بود.

در بررسی چندشکلی اگزون ۴ ژن گیرنده لپتین روی سه نژاد از گاوهای گوشتی چین سه ژنوتیپ MM، MN و NN مشاهده شد. در طول این اگزون پنج SNP شناسایی شد که اثرات معناداری بر ارتفاع بدن، طول بدن، وزن بدن، دور سینه و افزایش وزن روزانه در سنین ۶ و ۱۲ ماهگی داشت (Guo *et al*., 2008).

در پژوهشی با بررسی SNP، T945M در اگزون ۲۰ ژن گیرنده لپتین گاوهای هلشتاین هلندی، گزارش شد که به نظر می رسد این چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی (T/C) با سن اولین تلقیح مصنوعی ارتباط دارد (Komisarek, 2010).

جهش T945M در گاوهای جرزی نیز بررسی شده است که منجر به کشف دو آلل T و C به ترتیب با فراوانی ۰/۲۱ و ۰/۷۹ شد. در آنایز بین گروهی بین این SNP و صفات مربوط به تولید شیر هیچ ارتباطی معنی‌داری مشاهده نشد و حیواناتی که دارای ژنوتیپ TT بودند کمترین ارزش اصلاحی را برای چربی و پروتئین شیر داشتند (Komisarek and Dorynek, 2006).

در مطالعه روی کلیه اگزون‌های ژن گیرنده لپتین در گاوهای هلشتاین کشور ایتالیا نشان داده شد که جهش نقطه‌ای واقع در اگزون ۲ این ژن باعث تبدیل اسید آمینه لوسین به والین شده که این تغییر ارتباط معنی‌داری با درصد چربی شیر و برخی صفات تیپ داشته است (Giovanna De Matteis *et al*., 2012).

در پژوهشی که روی اگزون ۲۰ ژن *LEPR* گاوهای شیری اسلواکی انجام شد دو نوع ژنوتیپ CC و CT مشاهده شد که در تعداد ژنوتیپ مشاهده شده با تحقیق حاضر مغایرت داشت. همچنین جمعیت تحت مطالعه برای این ژن در تعادل هاردی- وینبرگ بود که با تحقیق حاضر مطابقت نداشت. در این پژوهش ژنوتیپ CT روی طول فاصله گوساله‌زایی اثر معنادار داشت (Trakovicka *et al.*, 2013).

چندشکلی یک قطعه ۱۹۷ جفت بازی از اگزون ۲۰ ژن گیرنده لپتین روی نژادهای گاو سیستانی، گلپایگانی، نجدی و سرابی به روش RFLP بررسی شده است. برای این ناحیه ۲ اُلگوی باندی در هر نژاد مشاهده شد که با نتایج تحقیق حاضر در الگوهای مشاهده شده در ژن LEPR مغایرت داشت. فراوانی‌های ژنوتیپی CC و TC

برای نژادهای ذکر شده به ترتیب برابر با ۰/۸۱۱ و ۰/۱۸۹، ۰/۸۳۳ و ۰/۱۶۷، ۰/۸۱۰ و ۰/۱۹۰، ۰/۵۵۰ و ۰/۴۵۰ بودند. در این پژوهش، تعادل هاردی- وینبرگ در نژادهای سیستانی، گلپایگانی، نجدی برقرار بود، اما در نژاد سرابی برقرار نبود که با نتایج این تحقیق مطابقت داشت (اسلمی نژاد و همکاران ۱۳۹۰).

در گاوهای هلشتاین ایران نیز چندشکلی ژن گیرنده لپتین و ارتباط آن‌ها با صفات تولیدی مورد مطالعه قرار گرفته است. قنبری باغنویی و همکاران (۱۳۹۱) سه ژنوتیپ BB، PB و PP را برای یک قطعه ۴۰۰ جفت بازی این ژن گزارش نمودند که با نتایج تحقیق حاضر در تعداد الگوی مشاهده شده مطابقت داشت. در این تحقیق ارتباط معناداری بین اثر ژنوتیپ و صفات تولید شیر مشاهده نشد.

تاکنون برای ژن MC4R گاو ۱۷ مکان چندشکل شناسایی شده است که در بین آن‌ها، ۱۳ مورد از نوع جهش‌های خاموش و ۴ مورد آن از نوع جایگزینی‌های دگر معنی (جایگزینی که موجب تغییر اسیدآمینه در پروتئین می‌شود) می‌باشد. این جهش‌ها در مکان‌های -129A>G ،-192 T>G ،-193 A>T ،293 C>G (Zhang et *al.*, 2009) -84 T>C (Liu *et al.*, 2010) 19 C>A، 20 A>T، 83 T>C، 128 G>A (Huang *et al.*, 2010) 709 G>A (Val166Met) (Seong *et al.*, 2012)، 747 G>A (Valle *et al.*, 2004) 927 C>T، 1069 C>G (Leu286Val) (Thue *et al.*, 2001)، 1343 C>A، 1786 C>T (Seong *et al.*, 2012)، 145Val>Ala و 172Ala>Thr (Haegeman *et al.*, 2001) شناسایی شدند. نتایج این تحقیقات مطابق با نتایج تحقیق حاضر در تعداد الگوهای مشاهده در ژن MC4R (۷ الگو) نشان‌دهنده میزان بالای چندشکلی در این ژن است.

بهبود در عملکرد صفات تولیدی در دام می‌تواند از راه بهبود در مدیریت، تغذیه و بهبود ژنتیکی حاصل شود که از این موارد، استفاده از حیواناتی که از نظر ژنتیکی برتر هستند، به لحاظ تجمعی بودن ژن‌ها، بهترین راه برای افزایش بازدهی در تولید حیوانات است. انتخاب بر اساس ژنوم حیوانات نیاز به آزمون DNA دارد که پرهزینه و زمان‌بر است. بنابراین افزایش دانش ما درباره چندشکلی‌های ژن‌های بزرگ اثر و بررسی ارتباط آنها با صفات مهم اقتصادی باعث شناسایی آلل‌های موثر و کاربرد آنها به عنوان نشانگر مولکولی در برنامه‌های انتخاب می‌شود. از این رو مطالعه همه‌جانبه این‌گونه ژن‌ها و بررسی تاثیر آنها بر صفات مهم تولیدی می‌تواند به عنوان روشی سریع و کارآمد در برنامه‌های اصلاح نژادی به کار گرفته شود. به هر حال قبل از اینکه یک SNP برای MAS استفاده شود، مطالعات بیشتری از قبیل افزایش تعداد جمعیت مورد مطالعه یا استفاده از چند نژاد به طور همزمان، در نظر گرفتن شرایط نگهداری برابر و تغذیه یکسان برای به دست آوردن اطاعات کافی و مناسب مورد نیاز خواهد بود (Du *et al.*, 2013).

با توجه به اثرات گسترده لپتین و اعمال آن با اتصال به گیرنده های خود، همچنین با وجود گیرنده های لپتین در بسیاری از بافت‌های بدن (Silva *et al.*, 2002) خصوصاً هیپوتالاموس که مرکز اصلی کنترل اشتهاست (Liefers *et al.*, 2002)، ژن گیرنده لپتین می‌تواند به عنوان یک ژن کاندید و بزرگ اثر بر صفات تولیدی در برنامه های اصلاح نژاد دام مدنظر قرار گیرد (Trakovicka *et al.*, 2011). ژن MC4R به عنوان یک نشانگر ژنتیکی مطلوب برای صفات لاشه و کیفیت گوشت معرفی شده است زیرا ارتباط جهش‌های مشاهده شده در طول این ژن را با صفات وزن زنده، وزن لاشه، ضخامت چربی پشت بدن و نمره تردی گوشت در گاوهای گوشتی معنی‌دار است (Liu *et al.*, 2009).

از آن جایی‌که مطالعات اندکی در مورد ژن‌های گیرنده لپتین و گیرنده ملانوکورتین ۴ در دام‌های ایران، به خصوص گاو، صورت گرفته و با توجه به تاثیر مسقیم فعالیت این ژن‌ها بر کنترل اشتها و وزن بدن (Liefers *et al.*, 2004; Li and Li, 2006)، مطالعه در سطح وسیع‌تر و بررسی ارتباط جهش‌های احتمالی آن‌ها با سایر صفات تولیدی می‌تواند منجر به کسب اطلاعات مفید و کاربرد آن در جهت افزایش تولید و بیشینه کردن سود اقتصادی در صنعت دامپروری شود. ضمن اینکه جهت پیشرفت ژنتیکی از راه انتخاب به کمک نشانگر انجام این گونه تحقیقات اجتناب ناپذیر است.

نتیجه‌گیری کلی

در اصلاح نژاد دام، تنوع عامل اصلی انتخاب و پیشرفت ژنتیکی است. چندشکلی در سطح DNA نقش کلیدی در تنوع ژنتیک حیوانات دارد. اغلب تحقیقات مربوط به

نشانگرهای ژنتیکی به کار رفته در اصلاح نژاد دام، روی تجزیه چندشکلی‌ها یا جهش‌های ژنتیکی واقع در ژن‌های ساختاری مهم و پیوستگی این ژن‌ها با جایگاه صفت کمّی (QTL) صورت گرفته است. در دهه گذشته، تعدادی از ژن‌های کاندید بالقوه برای خصوصیات کمّی و کیفی گوشت شناسایی شده است. بررسی چندشکلی این ژن‌ها و مطالعه ارتباط آن با صفات تولیدی مهم می تواند کمک زیادی در امر انتخاب و پیشرفت ژنتیکی در کوتاه‌ترین فاصله ممکن شود. در این تحقیق، ژن‌های LEPR و MC4R، چندشکلی بالایی را نشان دادند (PIC > 0.5) که نشان‌دهنده تنوع آللی بالایی است. به هرحال، در انتخاب به کمک نشانگرهای ژنتیکی، باید پویش ژنتیکی وسیع-تری در سطح DNA حیوانات مزرعه انجام شود تا با شناسایی جهش‌های احتمالی و بررسی ارتباط آن‌ها با صفات تولیدی مهم، SNPهای مهم را تعیین و در برنامه-های اصلاح نژاد دام گنجاند. از طرفی ضمن حفظ توده-های ژنتیکی بومی کشور که با محیط و بیماری‌های منطقه تطابق کاملی یافته‌اند، لزوم رکوردبرداری دقیق از صفات کمّی بیش از پیش حائز اهمیت می باشد تا در جهت افزایش توان تولیدی این دام‌ها مطالعات بیشتری صورت پذیرد.

فهرست منابع

اسلمی نژاد ع. ا.، طهمورث پور م. و الشوکانی ع.۱۳۹۰. بررسی چندشکلی اگزون ۲۰ ژن گیرنده لپتین در نژادهای گاو بومی سیستانی، گلپایگانی، نجدی و سرابی. نشریه علوم دامی (پژوهش و سازندگی)، شماره ۹۱.

شجاعی م.، محمد آبادی م. ر.، اسدی فوزی م.، اسمعیلی زاده کشکوئیه ع.، فردوسی م. ح.، ترابی ا.، طیارزاده م. و میرزاخانی ح. ۱۳۸۹. چگونگی استفاده از روش PCR-SSCP برای بررسی چندشکلی ژن لپتین گوسفند کرمانی. مجله پژوهش های علوم دامی (دانش کشاورزی)، ۲۰(۲).

قنبری باغنویی س.، انصاری مهیاری س.، ادریس م. ع.، دادپسند م.، سید طباطبایی ب. ا. ۱۳۹۱. بررسی ارتباط چندشکلی ژن گیرنده لپتین با صفات تولیدی در گاوهای هلشتاین استان اصفهان. دوازدهمین کنگره ژنتیک ایران.

Almeida S. M., Santos L. B. S., Passos D. T., Corbellini A. O., Lopes B. M. T., Kirst C. Terra, G., Neves J. P., Goncalves P. B. D., Moraes J. C. F. and Weimer T. A. 2008. Genetic polymorphism at the leptin receptor gene in three beef cattle breeds. Genetics and Molecular Biology, 31: 680-685.

Banos G., Woolliams J. A., Woodward B. W., Forbes A. B. and Coffey M. P. 2008. Impact of Single Nucleotide Polymorphisms in Leptin, Leptin Receptor, Growth Hormone Receptor, and Diacylglycerol Acyltransferase (DGAT) Gene Loci on Milk Production, Feed, and Body Energy Traits of UK Dairy Cows. Journal of Dairy Science, 91: 3190-3200.

Baskin D. G., Hahn T. M. and Schwartz M. W. 1999. Leptin sensitive neurons in the hypothalamus. Hormone and Metabolic Research, 31: 345-350.

Bassam B. J., Anolles G. C. and Gresshoff P. M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry, 196: 80-83.

Benoit S., Schwartz M., Baskin D., Woods S. C. and Seeley R. J. 2000. CNS melanocortin system involvement in the regulation of food intake. Hormones and Behaviour, 37: 299-305.

Botstein D., White R. L., Skolnik M. and Davis R. W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. American Journal of Human Genetics, 32: 314-331.

Chua S. C., Chung W. K., Wu-Peng X. S., Zhang Y., Liu S. M. and Leibel R. L. 1996. Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. Science, 271: 994-996.

De Matteis G., Carmela Scatà M., Grandoni F., Petrera F., Abeni F., Catillo G., Napolitano F. and Moioli B. 2012. Association analyses of single nucleotide polymorphisms in the leptin and leptin receptor genes on milk and morphological traits in Holstein cows. Journal of Animal Science, 2(3): 174-182.

De Vries A. G., Sosnicki A., Garnier J. P. and Plastow G. S. 1998. The role of major genes and DNA technology in selection for meat quality in pigs. Meat Science, 49(1): 245-255.

Delavaud C., Ferlay A., Faulconnier Y., Bocquier F., Kann G. and Chilliard Y. 2002. Plasma leptin concentration in adult cattle: Effects of breed, adiposity, feeding level, and meal intake. Journal of Animal Science, 80: 1317-1328.

Doak C. M., Wijnhoven T. M., Schokker D. F., Visscher T. L. and Seidell J. C. 2012. Age standardization in mapping adult overweight and obesity trends in the WHO European Region. Obesity Reviews, 13: 174-191.

Du X., Chen C., Yuan Z., Zhang L., Chen X., ui Wang Y., Gao X., Zhang L., Gao H., Li J. and Xu, Sh. 2013. Genetic Polymorphisms of *Mc4R* and *IGF2* Gene Association with Feed Conversion Efficiency Traits in Beef Cattle. Pakistan Veterinary Journal, ISSN: 0253-8318.

Ernst C. W., Kapke P. A., Yerle M. and Rothschild M. F. 1997. The leptin receptor gene (*LEPR*) maps to porcine chromosome 6. Mammalian Genome, 8: 266-272.

Forhead A., Christopher M., Lamb J., Franko A., Kathryn L., Connor O., Deirdre M., Wooding F., Cripps B. and Roselle L. 2008. Role of leptin in the regulation of growth and carbohydrate metabolism in the ovine fetus during late gestation. Journal of Physiology, 586(9): 2393-2403.

Gan Q., Zhang L., Xu S., Li H., Li J., Gao X., Ren H. and Chen J. 2008. Association of LXRA gene variants with carcass and meat quality traits in beef cattle. African Journal of Biotechnology, 7: 3546-3549.

Guo Y., Chen H., Lan X., Zhang B., Pan C., Zhang L., Zhang C. and Zhao M. 2008. Novel SNPs of the bovine LEPR gene and their association with growth traits. Biochemical Genetics, 46: 828-834.

Haegeman A., Coopman F., Jacobs K., Mattheeuws M., Van Zeveren A. and Peelman L. 2001. Bovine melanocortin receptor 4: cDNA sequence, polymorphisms and mapping. Animal Genetics, 32: 189-192.

Hardge T., Siebel K., Koepke K. and Wimmers K. 2003. Association between Leptin (LEP) / Leptin receptor (LEPR) polymorphisms and fatness related traits in a porcine resource family, In: Proceeding of 27th International Conference on Animal Genetics, C027.

Haegeman A., Coopman F., Jacobs K., Mattheeuws M., Van Zeveren A. and Peelman L. 2001. Bovine melanocortin receptor 4: cDNA sequence polymorphisms and mapping. Animal Genetics, 32: 189-192.

Haskell-Luevano C., Chen P., Li C., Chang K., Smith M. S., Cameron J. L. and Cone R. D. 1999. Characterization of the neuroanatomical distribution of agouti-related protein immunoreactivity in the rhesus monkey and the rat. Endocrinology, 140: 1408-1415.

Hauseknecht 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.

Houston R. D., Cameron N. D. and Rance K. A. 2004. A melanocortin-4 receptor (MC4R) polymorphism is associated with performance traits in divergently selected large white pig populations. Animal Genetics, 35: 386-390.

Huang M., Gao X., Li J. Y., Ren H. Y., Chen J. B. and Xu S. Z. 2010. Polymorphisms in MC4R gene and correlations with economic traits in cattle. Molecular Biology Reports, 37: 3941-3944.

Huszar D, Lynch C. A., Fairchild-Huntress V., Dunmore J. H., Fang Q., Berkemeier L. R., Gu W., Kesterson R. A., Boston B. A., Cone R. D., Smith F. J., Campfield L. A., Burn P. and Lee F. 1997. Targeted disruption of the melanocortin- 4 receptor results in obesity in mice. Cell, 88: 131-141.

International Sheep Genomics Consortium, Archibald A. L., Cockett N. E., Dalrymple B. P., Faraut T., Kijas J. W., Maddox J. F., McEwan J. C., Hutton Oddy V., Raadsma H. W., Wade C., Wang J., Wang W. and Xun X. 2010. The sheep genome reference sequence: a work in progress. Animal Genetics, 41(5): 449-453.

Iranpur V. and Esmailizadeh M. A. K. 2010. Rapid extraction of high quality DNA from whole blood stored at 4ºC for long period. Online Protocol.

Iserentant H., Peelman F., Defeau D., Vandekerckhove J., Zabeau L. and Tavernier J. 2005. Mapping of the interface between leptin and the leptin receptor CRH2 domain. Journal of Cell Science, 118: 2519-2527.

Kim K. S., Larsen N., Short T., Plastow G. and Rothschild M. F. 1999. A missense variant of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene is associated with fatness, growth, and feed intake traits. Mammalian Genome, 11: 131-135.

Komisarek J. 2010. Impact of LEP and LEPR gene polymorphisms on functional traits in Polish Holstein-Friesian cattle. Animal Science Papers and Reports, 28: 133-141.

Komisarek J. and Dorynek Z. 2006. The relationship between the T945M single nucleotide polymorphism in the leptin receptor gene (*LEPR*) and milk production traits in Jersey cows. Animal Science Papers and Reports, 24(4): 271-277.

Li C. Y. and Li H. 2006. Association of MC4R gene polymorphisms with growth and body composition traits in chicken. Asian-Australasian Journal of Animal Science, 19(6): 763-768.

Liefers S. C., Veerkamp R. F., TePas M. F. W., Chilliard Y. and Van der Lende T. 2004. A missense mutation in the bovine leptin receptor gene is associated with leptin concentrations during late pregnancy. Animal Genetics, 35: 138-141.

Liefers S. C., Te Pas M. F., Veerkamp R. F. and Van der Lende T. 2002. Associations between leptin gene polymorphisms and production, live weight, energy balance, feed intake and fertility in Holstein heifers. Journal of Dairy Science, 85(6): 1633-1638.

Liefers S. C. 2004. Physiology and genetics of leptin in periparturient dairy cows. Ph.D thesis. Wageningen University.

MacKenzie R. G. 2006. Obesity-associated mutations in the human melanocortin-4 receptor gene. Peptides, 27: 395-403.

Liu H., Tian W., Zan L., Wang H. and Cui H. 2009. Association of *MC4R* gene variants with carcass and meat quality traits in Qinchuan cattle. African Journal of Biotechnology, 8(15): 3666-3671.

Liu H., Tian W., Zan L., Wang H. and Cui H. 2010. Mutations of MC4R gene and its association with economic traits in Qinchuan cattle. Molecular Biology Reports, 37: 535-540.

Marsh D. J., Hollopeter G., Huszar D., Laufer R., Yagaloff K. A., Fisher S. L., Burn P. and Palmiter R. D. 1999. Response of melanocortin- 4 receptor-deficient mice to anorectic and orexigenic peptides. Nature Genetics, 21: 119-122.

Pefister-Genskow M., Hayes H., Eggen A. and Bishop M. D. 1997. The leptin receptor (LEPR) gene maps to bovine chromosome 3q33. Mammalian Genome, 8(3): 227.

Mizuno T. M. and Mobbs C. V. 1999. Hypothalamic agoutirelated protein messenger ribonucleic acid is inhibited by leptin and stimulated by fasting. Endocrinology, 140: 814-817.

Rosmond R., Chagnon M., Bouchard C. and Bjorntorp P. 2001. A missense mutation in the human melanocortin-4 receptor gene in relation to abdominal obesity and salivary cortisol. Diabetologia, 44: 1335-1338.

Seeley R. J., Yagaloff K. A., Fisher S. L., Burn P., Thiele T. E., van Dijk G., Baskin D. G. and Schwartz M. W. 1997. Melanocortin receptors in leptin effects. Nature, 390: 349-353.

Seong J., Suh D. S., Park K. D., Lee H. K and Kong H. S. 2012. Identification and analysis of MC4R polymorphisms and their association with economic traits of Korean cattle (Hanwoo). Molecular Biology Reports, 39: 3597-3601.

Silva L. F. P., Vanderhaar M. J., Weber Nielsen M. S. and Smith G. W. 2002. Evidence for a local effect of leptin in bovine mammary gland. Journal of Dairy Science, 85: 3277- 3286.

Ste Marie L., Miura G. I., Marsh D. J., Yagaloff K. and Palmiter R. D. 2000. A metabolic defect promotes obesity in mice lacking melanocortin-4 receptors. In: Proceeding of 1th National Academic Science, U S A. 97: 12339-12344.

Strader, A. D., Schiöth H. B. and Buntin J. D. 2003. The role of the melanocortin system and the melanocortin-4 receptor in ring dove (Streptopelia risoria) feeding behavior. Brain Researches, 960: 112-121.

Switonski M., Mankowska M. and Salamon S. 2013. Family of melanocortin receptor (MCR) genes in mammals mutations, polymorphisms and phenotypic effects. Animal Genetics Review, 54: 461-472.

Tao Y. X., Segaloff D. L. 2003. Functional characterization of melanocortin-4 receptor mutations associated with childhood obesity. Endocrinology, 144: 4544-4551.

Tartaglia L. A. 1997. The leptin receptor. Journal of Biological Chemistry, 272: 6093-6096.

Tartaglia L. A., Dembski M., Weng X., Deng N., Culpepper J. and Devos R. 1995. Identification and expression cloning of a leptin receptor OB-R. Cell, 83: 1263-1271.

Thue T. D., Schmutz S. M. and Buchanan F. C. 2001. A SNP in the cattle MC4R gene is used to map MC4R to BTA 24. Animal Genetics, 32: 390-391.

Trakovicka A., Moravcikova N. and Miluchova M. 2011. The T945M Single Nucleotide Polymorphism of the Bovine Leptin Receptor Gene in Population of Slovak Spotted Bulls. Agriculturae Conspectus Scientificus, 76(3): 161-164.

Trakovicka A., Moravcikova N. and Kasarda R. 2013. Genetic polymorphisms of leptin and leptin receptor genes in relation with production and reproduction traits in cattle. 2013. Acta Biochimica Polonica, 60(4): 783-787.

Vaisse C., Halaas J. L., Horvath C. M., Darnell J. E. Jr., Stoffel M. and Friedman J. M. 1996. Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. Nature Genetics, 14: 95-97.

Valle E., Habermann F. A., Moore S. S., Crews D. H. and Benkel B. F. 2004. Genomic localization and SNP discovery in the bovine melanocortin receptor 4 gene (MC4R). Animal Genetics, 35: 351-352.

Van Rossum C. T., Hoebee B., van Baak M. A., Mars M., Saris S. W. and Seidell J. C. 2003. Genetic variation in the leptin receptor gene, leptin, and weight gain in young Dutch adults. Obesity Research, 11: 377-386.

White D. W., Kuropatwinski K. K., Devos R., Baumann H. and Tartaglia L. A. 1997. Leptin receptor (OB-R) signalling. Cytoplasmic domain mutational analysis and evidence for receptor homo-oligomerization. Journal of Biological Chemistry, 272: 4065-4071.

Yeo G. S., Farooqi I. S., Aminian S., Halsall D. J., Stanhope R. G. and O'Rahilly S. 1998. A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. Nature Genetics, 20: 111-112.

Yiannakouris N., Yannakoulia M., Melistas L., Chan J. L., Klimis-Zacas D. and Mantzoros C. S. 2001. The Q223R polymorphism of the leptin receptor gene is significantly associated with obesity and predicts a small percentage of body weight and body composition variability. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 86: 4434-4439.

Zhang C. L., Wang Y. H., Chen H., Lan X. Y., Lei C. Z. and Fang X. T. 2009. Association between variants in the 5′-untranslated region of the bovine MC4R gene and two growth traits in Nanyang cattle. Molecular Biology Reports, 36: 1839-1843.

Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopoid L. and Friedman J. M. 1994. Positional cloning of mouse obese geneand its human homologue. Nature, 372: 425-432.

Animal Production Research

Vol. 5, No. 2, 2016 (45-59)

University of Guilan

Investigation of genetic polymorphism in leptin receptor and Melanocortin 4 receptor genes in native cattle of Guilan province (*Bos indicus*)

A. Shibak[1], S. Z. Mirhosseini[2*], M. B. Montazaretorbati[3], M. Hoseyndokht[4]

1. Expert of Biotechnology Laboratory in the Faculty of Agriculture, University of Birjand
2. Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan
3. Assistant professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Birjand
4. MS.c graduated student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Guilan

(Received: 7-1-2014 – Accepted: 23-1-2016)

Abstract

The experiment was concluded to study the genetic polymorphisms for Exon 2 leptinreceptor (LEPR) and Exon 1 Melanocortin4 receptor (MC4R) genes in native cattle in Guilan province. In order to blood samples were collected randomly from 96 native cattle in Guilan province. After extracting DNA by salting out method, PCR-SSCP was used to amplify a fragment of 261 bp from exon 2 LEPR gene and a fragment of 213 bp from exon 1 MC4R gene. In the sample of study, three patterns AA, AB and AC for LEPR gene and six patterns AA, AC, AD, AE, AF and AG for MC4R gene were observed. Frequencies of genotype were 0.062, 0.615 and 0.323 for LEPR gene and 0.074, 0.21, 0.253, 0.158, 0.105, 0.105 and 0.095 for MC4R gene respectively. Population genetic analysis showed that LEPR and MC4R genes were out of Hardy-Weinberg equilibrium but both genes were highly polymorphic and had great genetic diversity.

Keywords: Polymorphism, Leptin receptor gene, Melanocortin 4 receptor gene, Native cattle of Guilan

*Corresponding author: szmirhoseini@gmail.com