

## شناسایی چند شکلی تک نوکلئوتیدی بخشی از ژن LEP و ارتباط آن با صفات لاشه در گوسفندان افشاری و افشاری × برولامرینو

رحیمه سپهری<sup>1</sup> - صادق علیجانی<sup>2</sup> - جلیل شجاع غیاث<sup>3</sup> - طاهر هرکی نژاد<sup>4</sup> - سید عباس رأفت<sup>2</sup>

تاریخ دریافت: 1395/05/05

تاریخ پذیرش: 1395/09/06

### چکیده

لپتین یک پروتئین 16 کیلو دالتونی است که در کنترل اشتها، تعادل انرژی و توزیع ذخیره چربی در بدن نقش دارد. هدف مطالعه حاضر، شناسایی آل‌های احتمالی این ژن در ناحیه اگزون 3 بود. برای این منظور تعداد 133 رأس بره از یک گله و در سن تقریباً یکسان در سه گروه افشاری خالص و نسل B<sub>1</sub> و B<sub>4</sub> آمیخته افشاری × برولامرینو مورد استفاده قرار گرفتند. پس از خون‌گیری و انجام اندازه‌گیری‌های فنوتیپی بر روی دام زنده، تعداد 85 رأس از آن‌ها کشتار شدند. وزن لاشه بعد از کشتار و وزن ران، سردست، قلوه گاه و دنبه بعد از 24 ساعت ماندن لاشه در سردخانه بدست آمد. تعداد 30 نمونه از محصولات PCR جهت شناسایی SNP (های) احتمالی، مستقیماً توالی‌یابی و دو SNP شناسایی شدند. تعیین ژنوتیپ نمونه‌های توالی‌یابی نشده به روش RFLP و به کمک دو آنزیم برشی *Hpa* II و *Alw* I که به ترتیب قطعاتی به طول 295، 147، 132 و 463 و 111 ایجاد می‌کنند، انجام شد. در چندشکلی اول سه ژنوتیپ GA، GG و AA مشاهده شد. این چند شکلی طول (Glu>Arg Codon:142) بر میزان چربی پشت تأثیر معنی‌دار و بر ارتفاع جدوگاه تأثیر نزدیک به سطح معنی‌داری داشت. چند شکلی بعدی (Codon:196 Glu>Arg) در میان نمونه‌ها، دارای دو ژنوتیپ GG و GA بود و با اندازه طول بدن ارتباط نشان داد. بر اساس نتایج بدست آمده، مطالعات گذشته و نیز در صورتی که ارتباط این تغییرات با صفات ذکر شده در سطحی وسیع‌تر مورد تأیید قرار گیرد، چند شکلی اول می‌تواند در برنامه انتخاب دام به کمک نشانگرها مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: چند قلو زایی، کیفیت لاشه، گوسفند افشاری، هورمون لپتین، SNP.

### مقدمه

که این هورمون در تنظیم میزان ذخیره چربی دخالت دارد (14). بررسی‌های اولیه روی این ژن نشان داد که نشانگر ریزماهوره BM1500 واقع در کروموزوم چهار گاو، در فاصله 3/6 کیلوباز پایین‌تر از ژن لپتین قرار گرفته است (16). این نشانگر با اندازه‌های چربی لاشه در یک جامعه 154 رأسی گاو نر گوشتی غیرخویشاوند ارتباط معنی‌داری نشان داد (6). جهش‌هایی در ژن LEP مشاهده شده است که باعث می‌شود تا گاو گوشتی زودتر به سن کشتار رسیده و ماربلینگ بیشتری در لاشه توسعه یابد (5). مطالعات متعددی به منظور شناسایی چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی موجود در این ژن در نژادهای مختلف گاو (4 و 6) و گوسفند (1، 2، 4، 8، 9، 12، 13 و 17) انجام شده است و ارتباط برخی از چندشکلی‌ها با صفات مختلف بررسی شده است (1، 2، 3، 8، 9 و 16).

ژن LEP در گوسفند (NC\_019461)، به طول 16275 جفت باز و دارای 3 اگزون و 2 اینترون است. پروتئین حاصله دارای 193 اسید آمینه (طول ناحیه کد کننده 579 جفت باز) است. تاکنون در این ژن، 17 چند شکلی تک نوکلئوتیدی<sup>5</sup> در ناحیه‌ی کد کننده گزارش شده

ژن لپتین (LEP) در کروموزوم چهار گاو و گوسفند و کروموزوم هفت انسان واقع شده است (17). این ژن پروتئینی را کد می‌کند که وزن مولکولی آن 16 کیلودالتون است و در سلول‌های بافت چربی بیان می‌شود. این پروتئین، در کنترل اشتها، تعادل انرژی، راندمان تولید و نیز توزیع و چگونگی ذخیره چربی در بدن نقش دارد (7) و لذا نقش مهمی را در تنظیم وزن بدن و رشد در پستانداران ایفا می‌کند (4). خاموش بودن ژن لپتین در بدن و عدم ترشح آن سبب بروز چاقی می‌شود.

لپتین در نشخوارکنندگان هورمون رشد (GH) را افزایش می‌دهد

1- دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز،

2- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز،

3- استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز،

4- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان.

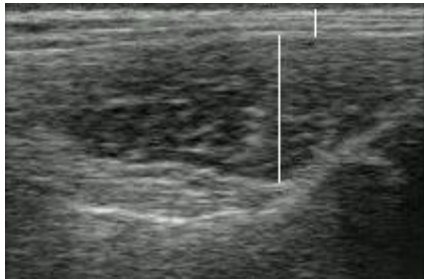
\* - نویسنده مسئول: (Email: Taher.harkinezhad@znu.ac.ir)

DOI: 10.22067/ijasr.v4i1.57781

نحوه اندازه‌گیری صفات: در بخش صفات بیومتری، اندازه‌های مربوط به صفات طول بدن (حداصل بین آخرین مهره گردن و آخرین مهره پشت) و دور سینه (محیط دور سینه در ناحیه قدامی سینه پشت دست‌ها) به وسیله متر پارچهای؛ و ارتفاع جدوگاه (فاصله بین سطح موازی با ستون فقرات تا کف زمین در محل شانه و چسبیده به دست سمت راست) با استفاده از کولیس فلزی بزرگ اندازه‌گیری شد (10).

صفات ضخامت چربی پشت و عمق عضله راسته بین دنده 12 و 13 توسط دستگاه اولتراسوند Sonovet 600 (Medison, USA) که دارای پروب 5 مگاهرتز بود، به دست آمد. برای تهیه تصویری صاف و شفاف باید ناحیه مورد بررسی فاقد مو و پشم باشد. به این منظور پشم چینی بره‌ها انجام شد و سپس پشم‌های باقیمانده در ناحیه بین دنده 12 و 13 توسط تیغ تراشیده شد. برای حرکت بهتر پروب بر روی ناحیه مورد نظر، از ژل مخصوص سونوگرافی استفاده شد. سپس تمامی بره‌ها سونوگرافی شده و تصاویر مربوطه ضبط گردید. با استفاده از نرم افزار Scion Image (15) عکس‌های مناسبی از تصاویر برای اندازه‌گیری نواحی موردنظر تهیه شد (شکل 1).

برای اندازه‌گیری صفات لاشه شامل: وزن لاشه، سردست، ران، قلوه‌گاه و دنبه در مورد بره‌های نسل B<sub>1</sub>: بره‌ها پس از تحمل 24 ساعت گرسنگی توزین و 85 راس از آنها کشتار شدند. لاشه‌ها پس از کشتار توزین و به یک شرکت بسته‌بندی گوشت منتقل و به مدت 24 ساعت در سردخانه نگهداری شدند. سپس لاشه‌ها از سردخانه خارج و با دقت از طول به دو نیمه چپ و راست تقسیم گردیدند و نیم لاشه راست جهت تعیین اندازه‌های لاشه استفاده گردید. نیم لاشه مذکور به قطعات گردن، ران، سردست، قلوه‌گاه، راسته و دنبه تقسیم و اندازه‌گیری شد. در مورد بره‌های خالص افشاری و نسل B<sub>4</sub> که امکان کشتار بره‌ها وجود نداشت، برای برآورد مقادیر مربوط به این صفات از روابط رگرسیونی بین صفات سونوگرافی عمق عضله راسته و صفات لاشه استفاده شد. این روابط رگرسیونی توسط خرم‌تایی و همکاران (11) و با استفاده از داده‌های بره‌های B<sub>1</sub> پژوهش حاضر محاسبه شده و گزارش شده است.



شکل 1- اندازه‌گیری ضخامت چربی پشت و عمق عضله راسته به کمک دستگاه اولترا سونوگرافی

Figure 1- Measurement of UBF and ULMD with ultrasound

است که هفت مورد از نوع هم معنی<sup>1</sup> و ده مورد بعدی از نوع دگر معنی<sup>2</sup> است. طول کل ناحیه اگزون 3، 2731 جفت باز (17275-13547) و طول ناحیه کد کننده این اگزون، 360 جفت باز (در ایزوفرم دیگر 357 جفت باز) است که از نوکلئوتید 13544 شروع و تا نوکلئوتید 13903 ادامه دارد. در این اگزون که از 119 (یا 118) کدون تشکیل شده است، هفت SNP از نوع دگر معنی و یک SNP از نوع هم معنی معنایی گزارش شده است (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/443534>).

گوسفند افشاری جزء گوسفندان سنگین وزن ایران بوده که از لحاظ تولید گوشت اهمیت زیادی دارد. میزان دو قلوژی در این نژاد قابل توجه بوده و وزن تولد، سرعت رشد و وزن از شیرگیری در این نژاد در مقایسه با سایر نژادهای ایران قابل توجه است. با توجه به پتانسیل مناسب برای تولید گوشت، نژاد مذکور می‌تواند نقش مهمی را در تأمین گوشت قرمز ایفا کند. برای افزایش بهره‌وری در سال 1386 در دانشگاه زنجان اقدام به انتقال ژن چندقلوژی به این نژاد گردید. به دنبال اجرای طرح انتقال ژن چندقلوژی (FecB) از گوسفند نژاد برولامرینو به نژاد افشاری و ایجاد آمیخته‌های افشاری × برولامرینو، در واقع ترکیب ژنتیکی جدیدی ایجاد شد. تحقیق حاضر، با هدف شناسایی چند شکلی تک نوکلئوتیدی در ناحیه اگزون 3 ژن LEP در بره‌های این ترکیب ژنتیکی جدید (آمیخته‌های افشاری × برولامرینو) و نیز بره‌های خالص افشاری و تأثیر آن بر برخی صفات لاشه انجام شد.

## مواد و روش‌ها

جمعیت مورد بررسی: در این تحقیق از 133 راس بره تقریباً هم سن (11 ماهه) شامل 96 راس بره آمیخته افشاری (نسل اول تلاقی برگشتی نژاد افشاری با آمیخته‌های افشاری × برولامرینو)، 11 راس بره‌های نسل چهارم تلاقی برگشتی نژاد افشاری با آمیخته‌های افشاری × برولامرینو و 26 راس بره خالص افشاری متعلق به گله اصلاح نژادی گوسفند افشاری گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان استفاده شد. این سه گروه ژنتیکی در ادامه این نوشتار به ترتیب تحت عناوین نسل B<sub>1</sub>، نسل B<sub>4</sub> و افشاری نام برده می‌شوند.

صفات فنوتیپی مورد مطالعه: صفات بیومتری (مرتبط با رشد) شامل: ارتفاع جدوگاه، طول بدن و دور سینه؛ داده‌های سونوگرافی ضخامت چربی پشت<sup>3</sup> و عمق عضله راسته<sup>4</sup> بین دنده 12 و 13 و صفات لاشه شامل: وزن لاشه، ران، سردست، قلوه‌گاه و دنبه.

1- Synonymous

2- Missence

3- UBF (Ultrasonography Back Fat)

4- ULMD (Ultrasonography Loin Muscle Depth)

**جدول 1-** روابط رگرسیونی بین صفات سونوگرافی شده و برخی صفات لاشه به همراه MSE و R<sup>2</sup> گزارش شده توسط خرمتایی و همکاران (2012) جهت مدل‌های پیش‌بینی صفات لاشه<sup>1</sup>

**Table 1-** Regression relations between ultrasound traits and some carcass traits along with MSE and R<sup>2</sup> reported by Khorramtaie et al. (2012) for predicting carcass traits<sup>1</sup>

صفت Trait	UBF				ULMD				ULMA			
	ثابت	b ضریب	R <sup>2</sup>	MSE	ثابت	b ضریب	R <sup>2</sup>	MSE	ثابت	b ضریب	R <sup>2</sup>	MSE
ران Femur	5.36	6.21	0.29	1.63	1.8	2.5	0.34	1.5	2.31	0.52	0.55	1
قلوه‌گاه Flank area	2.61	4.03	0.3	0.64	-0.25	1.87	0.48	0.47	0.55	0.35	0.61	0.35
سردست Shoulder	2.4	4.9	0.34	0.8	-0.74	2.12	0.47	0.64	0.01	0.41	0.64	0.44
وزن لاشه Carcass weight	16.5	22.37	0.37	14.5	2.39	9.6	0.5	11.4	5.55	1.87	0.71	6.9

<sup>1</sup>فاکتورهای وارد شده در سطح 1% معنی‌دار می‌باشند (P<0.01).

<sup>1</sup> Imported factors are significant at 1% level (P<0.01).

توالی‌های به دست آمده نمونه‌ها، به کمک نرم افزار CLC Main و Workbench 5 بررسی و چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی شناسایی شدند. برای تعیین ژنوتیپ محصولات توالی‌یابی نشده از روش RFLP<sup>1</sup> استفاده شد. برای این کار آنزیم‌های برش دهنده مناطق مورد نظر به کمک نرم افزار مذکور شناسایی شدند و به این ترتیب آنزیم‌های *Hpa* II و *Aiw*VI مورد استفاده قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: محاسبه فراوانی‌های ژنی، ژنوتیپی و بررسی وجود تعادل هاردی-واینبرگ به کمک نرم افزار Popgene V=1.32 انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌های فنوتیپی و ژنوتیپی و ارتباط بین آنها توسط نرم افزار SAS V=9.2 و رویه GLMSELECT انجام شد. آزمون نرمال بودن باقی‌مانده‌ها براساس شاخص شاپیرو-ویلک نیز برای هر یک از صفات انجام شد. به جز دو صفت ضخامت چربی پشت و وزن دنبه که نرمال نبودند، بقیه صفات نرمال بودند. در مورد این دو صفت تبدیل لگاریتمی انجام و از داده‌های تبدیل شده (نرمال) در تجزیه و تحلیل استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون توکی - کرامر انجام شد.

مدل آماری مورد استفاده عبارت است از:

$$Y_{ijklmno} = \mu + group_i + age_j + type_k + genus_l + g1_m + g2_n + (g1 * g2)_{mn} + \beta_1(X_{ijklmno} - \bar{X}_{...}) + \beta_2(Z_{ijklmno} - \bar{Z}_{...}) + e_{ijklmno}$$

که در آن  $Y_{ijklmno}$  مشاهدات مربوط به هر یک از صفات،  $\mu$  میانگین جامعه،  $group_i$  اثر  $i$  امین گروه ژنتیکی (افشاری، نسل  $B_1$  و نسل  $B_4$ )،  $age_j$  اثر  $j$  امین سن مادر ( $j=2, 3, 4, 5, 6, 7, 8$ )،  $type_k$  اثر  $k$  امین تیپ تولد حیوان ( $k=1, 2, 3$ )،  $genus_l$  اثر  $l$  امین جنس حیوان دارای دو سطح نر و ماده ( $l=1, 2$ )، اثر  $m$  امین ژنوتیپ در SNP شماره 1 (297G>A) دارای سه سطح  $g2_n$  اثر  $n$

استخراج DNA از نمونه‌های خون: جهت تهیه نمونه‌های خون از ونوجکت خلاءدار 5 سی‌سی حاوی ماده ضد انعقاد EDTA استفاده شد. خونگیری از سیاهرگ و داج صورت گرفت و نمونه‌ها در ظرف محتوی یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌های خون تا زمان استخراج DNA، در دمای منهای 20 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخراج DNA از تمام نمونه‌های خون به روش فنول - کلروفرم تعدیل شده انجام شد. برای تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از دستگاه نانودراپ (Thermo Scientific<sup>®</sup>, UK) استفاده شد.

تعیین چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی در ژن مورد بررسی: به منظور شناسایی چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی ژن مورد نظر در توده مورد بررسی ابتدا آغازگر اختصاصی برای تکثیر ناحیه مورد نظر (ناحیه کد کننده اگزون 3) به کمک نرم افزار آنلاین Primer3 (v. 0.4.0) طراحی شد. توالی این آغازگرها به شرح زیر بود: آغازگر فرادست " 3' AGGAAGGATGGTGTGGAA 5'" و فرودست " 3' AAAGGATGCCCCACATAGG 5' ". هر مخلوط واکنش (25  $\mu$ l) شامل 20 پیکومول از هر پرایمر، 50 نانوگرم DNA ژنومیک، 12/5  $\mu$ l Master Mix آماده و 0/05  $\mu$ l  $MgCl_2$  بود. برنامه زمانی به ترتیب، مرحله واسرشتگی اولیه به مدت 5 دقیقه با دمای 95°C، چرخه شامل سه مرحله: 95°C به مدت 40 ثانیه، دمای اتصال 58°C به مدت 30 ثانیه و 72°C به مدت 40 ثانیه و یک چرخه گسترش نهایی 72°C به مدت 5 دقیقه برای انجام PCR در نظر گرفته شد.

شناسایی SNP (های) احتمالی موجود در ناحیه مورد تکثیر از ژن مورد نظر، با تعیین توالی 30 نمونه از محصولات PCR انجام شد. این کار به وسیله شرکت ماکروژن کره جنوبی انجام شد. مجموعه

پس از بررسی نتایج حاصل از توالی‌یابی تعدادی از نمونه‌ها، دو مورد چندشکلی تک نوکلئوتیدی شناسایی شد (شکل 3). این چند شکلی‌ها در نوکلئوتیدهای شماره 297 و 459 قطعه تکثیر شده (نوکلئوتید 13714 و 13866 توالی LEP در NCBI) قرار داشتند (شکل 2). هر دوی این چند شکلی‌ها در ناحیه کد کننده اگزون 3 قرار داشته و هر دو سبب تغییر اسید آمینه آرژنین (CGG) به گلوتامین (CAG) در کدون‌های 142 و 196 (شکل 3) می‌شوند (ENSOART0000002607.1). هر دوی این SNPها قبلا در سایت NCBI<sup>2</sup> ثبت شده‌اند.

تعیین ژنوتیپ نمونه‌های توالی‌یابی نشده به کمک روش RFLP و دو آنزیم برشی *Hpa* II<sup>3</sup> و *A*IwN I انجام شد (شکل 4 و 5). آنزیم *A*IwN I برای شناسایی ژنوتیپ‌های حاصل از SNP13875G>A استفاده شد به طوری که قطعه تکثیر شده را در محل نوکلئوتید شماره 463 (در حالت وجود جهش) برش می‌دهد. شکل 4 تصویر مربوط به باندهای حاصل از الکتروفورز محصولات این هضم آنزیمی را نشان می‌دهد. ستون شماره 5، که برش آنزیمی در یکی از کروموزوم‌ها صورت گرفته، ژنوتیپ هتروزیگوت (GA) و سایرستون‌ها، که برشی اتفاق نیفتاده است، ژنوتیپ توالی مرجع (GG) را نشان می‌دهد. ژنوتیپ AA در نمونه‌های مورد بررسی مشاهده نشد.

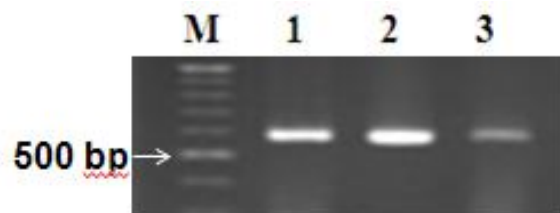
شکل 5، باندهای حاصل از الکتروفورز محصولات هضم آنزیمی با آنزیم *Hpa*II را نشان می‌دهد. این آنزیم، قطعه تکثیر شده را در حالت مشابه مرجع در دو ناحیه (یکی در محل نوکلئوتید شماره 295 و دیگری در محل نوکلئوتید شماره 427) برش می‌دهد ولی در حالت جهشی در یک ناحیه (در محل نوکلئوتید شماره 427)، لذا محصولاتی که ژنوتیپ مشابه مرجع (GG) داشته باشند یک قطعه 295 جفت بازی، یک قطعه 132 جفت بازی و یک قطعه 147 جفت بازی را تولید می‌کنند. دو قطعه آخر قابل تشخیص از هم نخواهند بود. بصورت یک قطعه حدود 150 جفت بازی مشاهده خواهند شد. محصولات مربوط به ستون شماره 1، 2، 3، 4 و 5 این طور هستند و ژنوتیپ GG دارند. در ژنوتیپ هتروزیگوت، در یکی از کروموزوم‌ها هر دو برش آنزیمی و در دیگری تنها برش ناحیه 427 انجام می‌شود. لذا یک قطعه 427 جفت بازی، یک قطعه 295 جفت بازی و یک قطعه 147 جفت بازی مشاهده می‌شود. ستون شماره 4 ژنوتیپ GA را دارد و سرانجام ستون شماره 6 ژنوتیپ AA را نشان می‌دهد که برش آنزیمی تنها در ناحیه 427 روی داده است.

امین ژنوتیپ در SNP شماره 2 (459G>A) دارای دو سطح  $n=1,2$  اثر متقابل  $g1 \times g2$  SNPهای شناسایی شده برهم،  $\beta$  ضریب تابعیت صفت مورد بررسی (Y) از متغیر هم بسته‌ی X (وزن تولد)،  $X_{ijklmno}$  مقدار متغیر هم بسته در هر یک از حیوانات،  $\bar{X}_{ijklmno}$  میانگین مشاهدات متغیر هم بسته‌ی X،  $\gamma$  ضریب تابعیت صفت مورد بررسی (Y) از متغیر هم بسته Z (سن بره‌ها در زمان رکوردگیری)،  $Z_{ijklmno}$  مقدار متغیر هم بسته Z در هر یک از حیوانات،  $\bar{Z}_{ijklmno}$  میانگین مشاهدات متغیر هم بسته‌ی Z،  $e_{ijklmno}$  اثر اشتباه آزمایشی می‌باشد. لازم به ذکر است که همان‌گونه که در مدل آماری نشان داده شده است، از وزن تولد و سن بره در زمان رکوردگیری به‌عنوان متغیر کمکی<sup>1</sup> در تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد.

## نتایج و بحث

در پژوهش حاضر، تکثیر قطعه‌ای از ژن لپتین شامل بخشی از اینترون 2 (توالی نوکلئوتیدی 13546-13417 از توالی ژن LEP)، کل ناحیه کد کننده اگزون 3 (توالی نوکلئوتیدی 13903-13547) و بخشی از ناحیه غیر کد کننده اگزون 3 (توالی نوکلئوتیدی 13990-13904) با موفقیت انجام شد. به عبارت دیگر، قطعه تکثیر شده بین نوکلئوتید 13417 تا 13990 از این ژن قرار دارد (574 جفت باز) و ناحیه کد کننده اگزون 3 در قطعه تکثیر شده در این پژوهش از نوکلئوتید 130 تا 487 است.

شکل 2، باندهای حاصل از الکتروفورز محصولات PCR را در تعدادی از نمونه‌ها نشان می‌دهد. با توجه به طول قطعه تکثیر شده (574 جفت باز)، باند به دست آمده بین دو باند 500 و 600 نشانگر مولکولی 100 bp قرار گرفت (شکل 2).



شکل 2- باندهای حاصل از الکتروفورز محصولات PCR شامل بخشی از اینترون 2، کل اگزون 3 و بخشی از ناحیه 3' UTR (574 bp) بر روی ژل آگارز یک و نیم درصد. چاهک اول از سمت چپ (ستون M) نشانگر 100 (100 bp) DNA و بقیه چاهک‌ها (1، 2، 3) باند مربوط به تعدادی از نمونه‌های مورد بررسی

**Figure 2-** Banding of electrophoresis of PCR products containing part of intron 2, exon 3 and part of the 3' UTR region (bp574) on agarose gel (1.5%). The first well on the left (lane M) is DNA marker 100 (100 bp) and the rest of the wells (1, 2, 3, 4, 5 and 6) are corresponding numbers of analyzed samples

2- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA179263>)

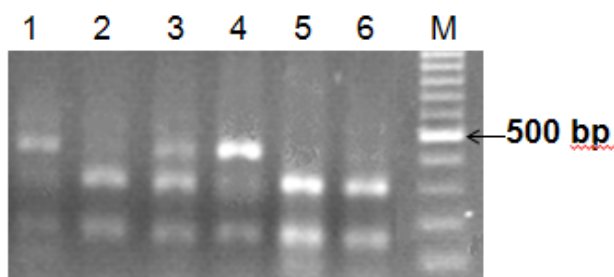
3- Restriction enzyme

1- Covariate





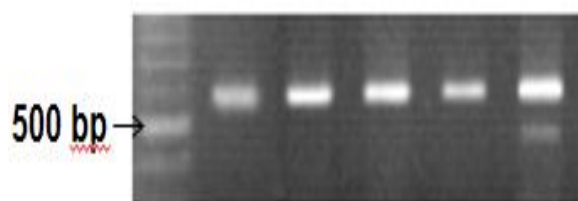
GA و GG شناسایی شد ولی ژنوتیپ AA مشاهده نشد.



**شکل 5-** باندهای حاصل از الکتروفورز محصولات هضم آنزیمی با *HpaII* بر روی ژل آگارز یک و نیم درصد. چاهک اول از سمت راست (ستون M) نشانگر 100 (100 bp) DNA و بقیه ستون‌ها (1، 2، 3، 4، 5 و 6) باندهای مربوط به تعدادی از نمونه‌های مورد بررسی را نشان می‌دهد. چاهک‌های شماره 2، 5 و 6 ژنوتیپ GG، چاهک شماره 1 و 4 ژنوتیپ AA و چاهک شماره 3 ژنوتیپ GA هستند.

**Figure 5-** Bands of digested PCR products by *HpaII* enzyme on 1.5 % agarose gel. The first well on the right (column M) is DNA marker 100 (100 bp) and the rest of the wells (1, 2, 3, 4, 5 and 6) are analyzed samples. Well 2, 5 and 6 are the GG genotype, well 3 is GA and 1 and 4 are AA genotype.

M 1 2 3 4 5



**شکل 4-** باندهای حاصل از الکتروفورز محصولات هضم آنزیمی با *AiwMI* بر روی ژل آگارز یک و نیم درصد. چاهک اول از سمت چپ (ستون M) نشانگر 100 (100 bp) DNA و بقیه چاهک‌ها (1، 2، 3، 4 و 5) باند مربوط به تعدادی از نمونه‌های مورد بررسی را نشان می‌دهد. چاهک شماره 5 ژنوتیپ GA و چاهک‌های قبلی ژنوتیپ GG

**Figure 4-** Bands of digested PCR products by *AiwMI* enzyme on 1.5 % agarose gel. The first well on the left (column M) is DNA marker 100 (100 bp) and the rest of the wells (1, 2, 3, 4 and 5) are analyzed samples. Well 5 is the GA genotype and rests of the wells are GG.

جدول 2 فراوانی ژنوتیپی و آلی این SNPها را در کل داده‌ها و جدول 3 این فراوانی‌ها را به تفکیک گروه ژنتیکی نشان می‌دهد. در جایگاه نوکلئوتیدی 13713 این ژن، هر سه ژنوتیپ GA، GG و AA مشاهده شد ولی در جایگاه نوکلئوتیدی 13875، دو ژنوتیپ

**جدول 3-** فراوانی ژنوتیپی، آلی و بررسی تعادل هاردی- واینبرگ SNPهای شناسایی شده به تفکیک گروه ژنتیکی

**Table 3-** Genotypic Frequency, Allelic Frequency and Hardy-Wienberg Eq. in different groups

موقعیت SNP SNP Positon	نوع Specification	گروه ژنتیکی Genetic group	فراوانی آلی Allelic frequency			فراوانی ژنوتیپی Genotypic frequency		سطح معنی‌داری P-value	کای اسکور $\chi^2$
			GG	GA	AA	G	A		
13713G>A	Missence	B <sub>1</sub>	0.7	0.22	0.08	0.81	0.19	7.003	0.008
		B <sub>4</sub>	0.54	0.18	0.27	0.64	0.36	4.8077	0.02
		افشاری	0.81	0.08	0.11	0.85	0.15	14.747	0.0001
		B <sub>1</sub>	0.88	0.12	0.0	0.94	0.06	0.349	0.554
13875G>A	Missence	B <sub>4</sub>	0.82	0.18	0.0	0.91	0.09	0.053	0.818
		افشاری	0.76	0.24	0.0	0.88	0.12	0.38	0.537

متفاوت بود. در جایگاه 13713، بیشترین فراوانی آلل جهشی (A) در گروه ژنتیکی B<sub>4</sub> و کمترین فراوانی این آلل در گروه افشاری مشاهده شد. در جایگاه 13875، گروه افشاری بیشترین فراوانی آلل جهشی و گروه B<sub>1</sub> کمترین فراوانی را داشت. از نظر محتوای ژنتیکی، گروه B<sub>4</sub> حدود 96 درصد تشابه ژنتیکی با گروه افشاری دارد. این تشابه در مورد گروه B<sub>1</sub>، 75 درصد است. بر این اساس منطقی‌تر بود که فراوانی‌های آلی در دو گروه افشاری و B<sub>4</sub> مشابهت بیشتری با هم داشتند. به نظر می‌رسد یکی از دلایل عدم مشاهده این تشابه فراوانی آلی در این دو گروه می‌تواند اندازه نمونه باشد. به عبارت دیگر، به دلیل تعداد کم دام‌ها در دو گروه B<sub>4</sub> و افشاری، فراوانی آلی در این گروه‌ها را نمی‌توان به نمونه‌های بزرگتر تعمیم داد.

فراوانی ژنوتیپ GG در هر دو SNP بیشتر از ژنوتیپ‌های دیگر بود. این ژنوتیپ همان ژنوتیپ توالی مرجع است. ژنوتیپ‌های جایگاه ژنی 13713 در جمعیت مورد بررسی، در تعادل هاردی- واینبرگ نبودند. با توجه به اینکه ژنوم نژاد خارجی وارد این جمعیت شده است، لذا این امر می‌تواند تعادل فراوانی‌های ژنوتیپی را به هم زده باشد. اما ژنوتیپ‌های جایگاه ژنی 13875 در جمعیت مورد بررسی، در تعادل هاردی- واینبرگ بودند. با توجه به اینکه تا زمان پژوهش حاضر، موضوع چربی پشت و لاشه در برنامه‌های انتخاب و اصلاح نژادی این گله مورد توجه نبود، لذا تفاوت تعادل و عدم تعادل این آلل‌ها می‌تواند بیشتر به دلیل تعداد نمونه و یا تصادفی بوده باشد. فراوانی آلل‌ها در هر یک از SNPها در گروه‌های ژنتیکی مختلف

عربستان سعودی شناسایی نمودند. از این پنج SNP، چهار مورد قبلا در نژادهای دیگر شناسایی شده بود ولی یک مورد برای اولین بار گزارش شد. محمود و همکاران (12) در بررسی دیگری، SNP 6 (4) مورد از نوع دگر معنی و دو مورد از نوع هم معنی) در اگزون 3 گوسفندان نژاد هری<sup>5</sup> همین کشور شناسایی کردند. یونس و همکاران (9) در بررسی چند شکلی تک نوکلئوتیدی بخش‌هایی از کل این ژن (4883 جفت باز) در گوسفندان آمیخته آواسی - مرینو یک SNP در اگزون 2 (C11T) و دو SNP در اگزون 3 (A476G) و (A314G) شناسایی نمودند. دو SNP شناسایی شده در اگزون 3 این تحقیق سبب تغییر اسید آمینه در کدون 105 و 159 شد. چندشکلی‌های شناسایی شده در پژوهش حاضر، اگرچه در ناحیه اگزونی مشابه پژوهش‌های مذکور قرار داشتند ولی هیچ یک از آنها مشابه موارد مذکور نبود.

در گاو گوشتی نیز بوچانان و همکاران (3) در بررسی چند شکلی تک نوکلئوتیدی اگزون 2 ژن لپتین که جایگزینی باز سیتوزین (C) با تیمین (T) را مشاهده کردند که سبب تغییر اسید آمینه آرژنین به سیستئین شد. بررسی فراوانی آللی بین نژادها نشان داد که در نژادهای انگلیسی فراوانی آلل T بیشتر است در حالی که در نژادهای Continental آلل C بیشتر مشاهده می‌شود.

پژوهش حاضر و بررسی‌های قبلی ذکر شده نشان می‌دهد که ژن LEP بخصوص در ناحیه اگزون 3، دارای چند شکلی بالایی است.

#### ارتباط چندشکلی‌های مشاهده شده با صفات مورد بررسی

در جدول 4 صفات مورد بررسی و آماره‌های توصیفی مربوط به هر یک نشان داده شده است.

تجزیه واریانس مورد استفاده برای بررسی معنی‌داری اثرات ثابت به کار رفته در مدل نشان داد که اثر گروه ژنتیکی بر صفات بیومتری و سونوگرافی شده مورد بررسی معنی‌دار ( $P < 0/05$ ) ولی بر صفات لاشه غیر معنی‌دار (نزدیک به معنی‌داری ( $P \leq 0/12$ )) می‌باشد. اثرات ثابت معنی‌دار و یا نزدیک به معنی‌داری برای هر یک از صفات در جدول 5 نشان داده شده است. مقدار p-value در مواردی که نزدیک به معنی‌داری بوده، جلو اثرات و در داخل پراتنز آورده شده است.

اثر متغیرهای هم بسته وزن تولد و سن بره در زمان رکوردگیری نیز که به صورت متغیر کمکی در مدل وارد شده بودند بر صفت سونوگرافی چربی پشت اثر معنی‌داری نداشت. برای صفت طول بدن تنها یکی از این متغیرها (سن بره در زمان رکوردگیری) اثر معنی‌داری داشت. اثر این متغیرها بر سایر صفات مورد بررسی معنی‌دار بود. لذا به

پژوهش‌های متعددی با هدف شناسایی چند شکلی در نواحی مختلف این ژن در نژادهای مختلف گوسفند انجام شده است. بوشه و همکاران (2) اولین گزارش تنوع آللی را در گوسفند ارائه کردند. آنها چند شکلی نوکلئوتیدی نواحی اگزون 2، اینترون 2، اگزون 3 و بخشی از ناحیه 3'UTR ژن لپتین را در گوسفندان نژاد سافوک (69 رأس) و دورست (70 رأس) به روش توالی‌یابی مستقیم انجام دادند و سه SNP، دو مورد در اینترون 2 (A103G, C154T) و یکی در ناحیه 3'UTR (C617G) مشاهده کردند. برزگر و همکاران (1) موفق به شناسایی دو چند شکلی A113G و T165C در اینترون 2 این ژن در سه نژاد گوسفند بومی ایران (نژادهای شال، زندگی و زل) شدند. همان‌گونه که ذکر شد، هیچ یک از SNP‌های شناسایی شده در پژوهش مذکور در ناحیه اگزون سه (ناحیه مورد بررسی پژوهش حاضر) قرار نداشتند.

در مطالعات متعددی به بررسی و شناسایی چند شکلی تک نوکلئوتیدی در ناحیه اگزون سه پرداخته شده است. در پژوهش ژاوو و همکاران (17) که با هدف شناسایی SNP‌های اگزون 3ی ژن LEP در شش نژاد گوسفند نیوزیلندی (رامنی، مرینو، کوپ ورس، کوریدال، دورست و سافوک)<sup>1</sup> و به روش PCR-SSCP و توالی‌یابی انجام شد، در مجموع پنج الگوی ژنوتیپی مختلف و چهار SNP مشاهده شد. که سه مورد از این SNP‌ها دگر معنی بوده و سبب تغییر در اسید آمینه شدند. این SNP‌ها در کدون‌های 105، 120 و 144 قرار دارند. هوانگ و همکاران (8) نیز در بررسی چند شکلی نواحی اگزون دو، اینترون دو و اگزون سه در چهار نژاد گوسفند سافوک، تکسل، دورست و تن، چهار SNP در اینترون دو (A99G, G115A, C150T, C171T) و سه SNP در اگزون سه (G271A, C316T, G387T) شناسایی نمودند که هر سه SNP سبب تغییر اسید آمینه شدند. در تحقیق دیگری با هدف بررسی چند شکلی کل ناحیه اگزون 3 این ژن (شامل بخش کد کننده و غیر کد کننده) به طول 2731 جفت باز در گوسفند Nilagiri، دو چند شکلی  $16973G > A$  و  $17476C > T$  مشاهده شد که هر دو از نوع هم معنی بودند. این SNP‌ها جدید بوده و در مطالعات قبلی مشاهده نشده بودند. در مطالعه مذکور که روی 60 دام انجام شد، ابتدا محصولات حاصل از PCR مربوط به 12 دام توالی‌یابی شده و پس از آنالیز توالی‌ها و شناسایی SNP‌های موجود، تعیین ژنوتیپ سایر دام‌ها (برای SNP‌های شناسایی شده) به کمک روش RFLP انجام شده است (4). محمود و همکاران (13) سه SNP از نوع دگر معنی در ناحیه کد کننده و دو SNP از نوع In/Del<sup>2</sup> در ناحیه 3'UTR اگزون 3 ژن LEP در گوسفند نژاد نجدی<sup>3</sup> و نعیمی<sup>4</sup>

1- Romney, Merino, Coopworth, Corriedale, Poll, Dorset and Suffolk

2- Insertion/Deletion

3- Najdi

4- Naeimi

5- Herri

نداشت. همچنین در صفت ارتفاع جدوگاه، ژنوتیپ GG و GA به ترتیب کمترین و بیشترین مقدار را داشتند و تفاوتشان نزدیک به معنی‌داری قرار داشت ( $P=0/09$ ). به عبارت دیگر بره‌های با بیشترین ارتفاع جدوگاه چربی پشت کمتری داشتند و برعکس بره‌های با ارتفاع جدوگاه کمتر، چربی پشت بیشتری را داشتند. البته بره‌های با ظرفیت جثه کوچکتر معمولاً بعد از اینکه ظرفیت رشدشان تکمیل شد یا با نزدیک شدن به حداکثر رشد از انباشت چربی بیشتری نسبت به بره‌های درشت جثه برخوردار می‌باشند.

منظور مقایسه میانگین‌های صفات برای ژنوتیپ‌های مختلف از میانگین‌های حداقل مربعات (یا تصحیح شده) و روش توکی - کرامر استفاده شد (جدول 6). همان‌گونه که در جدول 6 مشاهده می‌شود، در ژنوتیپ‌های مختلف مربوط به SNP (13714G>A): در صفت میزان چربی پشت تفاوت معنی‌داری مشاهده شد؛ به طوری که ژنوتیپ AA بیشترین و ژنوتیپ GA کمترین میزان چربی پشت را به خود اختصاص دادند که از لحاظ آماری نیز معنی‌دار بود ( $P=0/01$ ). میزان چربی پشت در ژنوتیپ GG، در بین دو ژنوتیپ دیگر (کمتر از ژنوتیپ AA و بیشتر از ژنوتیپ GA) قرار داشت ولی تفاوت معنی‌داری با آنها

جدول 4- آماره‌های توصیفی صفات مورد بررسی  
Table 4- Descriptive statistics of traits

صفت Trait	تعداد مشاهده N	میانگین $\pm$ خطای معیار Mean $\pm$ SE	ضریب تغییرات C.V	دامنه Range
سونوگرافی چربی پشت (سانتی‌متر) UBF (cm)	122	3.51 $\pm$ 0.115	36.10	1.00-7.43
سونوگرافی ضخامت عضله (سانتی‌متر) ULMD (cm)	122	23.33 $\pm$ 0.321	15.18	13-31.25
ارتفاع جدوگاه (سانتی‌متر) Withers height (cm)	123	71.29 $\pm$ 0.393	6.11	44-81
طول بدن (سانتی‌متر) Body length (cm)	123	48.71 $\pm$ 0.389	8.86	38-64
دور سینه (سانتی‌متر) Chest perimeter (cm)	123	99.34 $\pm$ 0.754	8.42	80-124
وزن لاشه (کیلوگرم) Carcass weight (kg)	123	24.78 $\pm$ 0.396	17.71	13.1-37.2
وزن ران (کیلوگرم) Femur weight (kg)	122	7.66 $\pm$ 0.122	17.55	3.2-12
وزن سردست (کیلوگرم) Shoulder weight (kg)	122	4.21 $\pm$ 0.091	23.82	2.3-7.1
وزن قلوه گاه (کیلوگرم) Flank area weight (kg)	122	4.11 $\pm$ 0.079	21.25	2.15-6.9
وزن دنبه (کیلوگرم) Fattail weight (kg)	122	1.36 $\pm$ 0.044	35.69	0.4-2.6
وزن تولد (کیلوگرم) Birth weight (kg)	129	5.31 $\pm$ 0.080	17.23	3.24-7.7
سن بره در زمان رکوردگیری (روز) Age of recording lamb (day)	129	326.53 $\pm$ 1.464	5.09	255-380

لاشه‌های چرب‌تر مرتبط بود و آلل C با لاشه‌های با چربی کمتر (لخم‌تر). حیوانات هموزیگوت T سطوح mRNA لپتین بالاتری داشتند، لذا می‌توان نتیجه گرفت که آلل T که سیستمین بیشتری به پروتئین اضافه می‌کند، فقدان جزئی عملکرد بیولوژیکی را توجیه می‌کند و بنابراین می‌تواند موتاسیون سببی به شمار آید (3). کونونوف و همکاران (15) نیز در بررسی تأثیر SNP مذکور بر صفات کیفیت گوشت در گاو گوشتی، سه ژنوتیپ CC و TC و TT شناسایی کردند. مشاهدات آنها نشان داد که حیوانات با ژنوتیپ TT نسبت به دو

ژنوتیپ‌های مربوط به SNP(13866G>A) تنها در صفت طول بدن تفاوتی نزدیک به معنی‌داری داشتند ( $P=0/077$ )؛ به طوری که ژنوتیپ GG طول بدن کمتر و ژنوتیپ GA طول بدن بیشتری را داشت.

بوچانان و همکاران (3) در بررسی چند شکلی نوکلئوتیدی ژن لپتین مشاهده کردند که جایگزینی باز سیتوزین (C) با تیمین (T) (تغییر اسید آمینه آرژنین به سیستمین) در اگزون 2 ژن لپتین در گاو با میزان چربی لاشه در 4 نژاد گاو گوشتی مرتبط است. آلل T با



و در پژوهش حاضر نیز این ناحیه از ژن مورد بررسی قرار نگرفت.

ژنوتیپ دیگر (TC و CC) کیفیت لاشه بهتری داشتند ( $P=0/16$ ). آنها نتیجه گیری کردند که پلی مورفیسم ژن LEP می تواند با سطح چربی لاشه مرتبط باشد. چنین نتایجی در گوسفند گزارش نشده است

جدول 5- تجزیه کواریانس صفات  
Table 5- Covariance analysis of traits

صفات Traits	اثرات ثابت معنی دار Significant fixed effects	Root MSE	ضریب تبیین $R^2$
سونوگرافی چربی پشت UBF (cm)	گروه ژنتیکی، SNP1	0.14	0.19
سونوگرافی ضخامت عضله ULMD (cm)	گروه ژنتیکی، جنس بره ( $P=0.054$ )	3.14	0.23
ارتفاع جدوگاه (سانتی متر) Withers height (cm)	گروه ژنتیکی، سن مادر، جنس بره، SNP1 ( $P=0.116$ )	2.83	0.48
دورسینه (سانتی متر) Chest perimeter (cm)	گروه ژنتیکی، جنس بره	6.99	0.38
طول بدن (سانتی متر) Body length (cm)	گروه ژنتیکی، جنس بره ( $P=0.052$ )	3.5	0.31
وزن لاشه (کیلوگرم) Carcass weight (kg)	گروه ژنتیکی ( $P=0.053$ )، جنس بره ( $P=0.1$ )	3.72	0.36
وزن ران (کیلوگرم) Femur weight (kg)	گروه ژنتیکی ( $P=0.1205$ )	1.17	0.29
وزن سردست (کیلوگرم) Shoulder weight(kg)	گروه ژنتیکی ( $P=0.08$ )	0.92	0.24
وزن قله گاه (کیلوگرم) Flank area weight (kg)	گروه ژنتیکی ( $P=0.07$ )، تیپ تولد ( $P=0.1$ )	0.78	0.27
وزن دنبه (کیلوگرم) Fattail weight (kg)	گروه ژنتیکی ( $P=0.07$ )	0.15	0.20

SNPA99G بود ( $P=0/05$ )؛ در حالی که مقادیر دور سینه و عرض کپل در ژنوتیپ Aa به طور بسیار معنی داری بیشتر از AA بود ( $P=0/05$ ). میانگین افزایش وزن روزانه، ارتفاع جدوگاه، طول بدن، دور سینه و عرض کپل در ژنوتیپ جهش یافته به طور معنی داری بالاتر از تیپ وحشی در SNP C150T بود ( $P=0/05$ ). در این مطالعه بررسی ارتباط SNPهای ناحیه اگزون سه با صفات رشد انجام نشده است.

در بررسی اگزون دو و بخشی از اینترون دو در سه نژاد گوسفند بومی ایران (نژادهای شال، زندی و زل) توسط برزگر و همکاران (1) دو SNP (A113G) و (T165C) در اینترون 2 این ژن شناسایی شدند. در این تحقیق، چند شکلی A113G با چربی لاشه در دو نژاد شال و زل مرتبط بوده و بره های با آلل G، چربی لاشه بالاتری داشته اند. اما چنین ارتباطی در نژاد زندی مشاهده نشد بلکه سبب کاهش معنی دار وزن از شیرگیری شد. در مطالعه حاضر چند شکلی در اگزون 2 مورد بررسی قرار نگرفت. به هر حال، در بررسی این ناحیه از ژن لپتین گزارشات متفاوت است و به نظر می رسد برای نتیجه گیری

بوشه ی و همکاران (2) در گوسفندان نژاد سافوک (69 رأس) و دورست (70 رأس) سه SNP (دو مورد در اینترون 2 و یکی در ناحیه 3'UTR) مشاهده کردند که یکی از SNPهای واقع در اینترون 2 (A103G)، ارتباط منفی معنی داری با ضخامت عضله پشت و فیله و ارتباط مثبت معنی داری با تردی گوشت، PH و تعداد رشته های عضله در واحد سطح در نژاد سافوک و ارتباط مثبتی با فعالیت آنزیم سیتراز سنتاز در عضله فیله و در چربی زیر پوستی در نژاد دورست نشان داد. بررسی چند شکلی نواحی اگزون 2، اینترون 2 و اگزون 3 این ژن در چهار نژاد گوسفند سافوک، تکسل، دورست و تن توسط هوانگ و همکاران (8) نیز مورد بررسی قرار گرفته است، آنها چهار SNP در اینترون 2 (A99G، G115A، C150T و C171T)، و سه SNP در اگزون سه (G271A، C316A و G387T) شناسایی نمودند که هر سه SNP سبب تغییر اسید آمینه شدند. بررسی ارتباط این SNPها با صفات رشد نشان داد که میانگین وزن تولد، افزایش وزن روزانه و ارتفاع جدوگاه در ژنوتیپ Aa به طور معنی داری بیشتر از AA در

1- A103G, C154T and C617G

مطالعات بیشتری لازم است.

چند شکلی مشاهده شده در این پژوهش در نژادهای آسیایی گزارش نشده است. در میش‌های آمیخته آواسی×مرینو وجود یک SNP در اگزون 2 (C11T) و دو SNP در اگزون 3 (A314G) و (A476G) گزارش شده است (9). دو SNP شناسایی شده در اگزون 3 سبب تغییر اسید آمینه آرژنین به گلوتامین در کدون 105 و 159 شد. در این بررسی، یونس و همکاران (9) تعیین ژنوتیپ یکی از دو SNP شناسایی شده (A314G) را به روش RFLP انجام داده و ارتباط

ژنوتیپ‌ها را با صفات مورد نظر (وزن بدن، خوراک مصرفی، تولید شیر و ترکیبات شیر) بررسی نمودند. نتایج آنها ارتباط معنی‌داری بین SNP مورد بررسی و غلظت لپتین در جریان خون و نیز میزان مصرف خوراک در واحد تولید شیر نشان داد ( $P<0/05$ ). ژنوتیپ‌های این SNP ارتباط معنی‌داری با سایر صفات مورد بررسی (وزن بدن، تولید شیر و ترکیبات شیر) نداشتند. در مطالعه حاضر این تغییرات نوکلئوتیدی مشاهده نشد.

جدول 6- مقایسه میانگین‌های حداقل مربعات صفات در ژنوتیپ‌های مختلف<sup>1</sup>

Table 6- Comparison of least square means in different genotypes<sup>1</sup>

صفات Traits	SNP1 ( 13713G>A)			SNP2 ( 13875G>A)	
	AA	GA	GG	GA	GG
سونوگرافی چربی پشت (سانتی‌متر) UBF (cm)	3.81±1.122 <sup>a</sup>	2.24±1.095 <sup>b</sup>	2.83±1.10 <sup>ab</sup>	2.74±1.113	3.2±1.082
سونوگرافی ضخامت عضله ULMD (cm)	22.99±1.094	22.17±0.889	21.96±0.967	22.16±1.078	22.58±0.764
ارتفاع جدوگاه (سانتی‌متر) Withers height (cm)	70.59±1.016 <sup>ab</sup>	71.74±0.892 <sup>b*</sup>	69.81±0.956 <sup>a*</sup>	70.17±1.065	71.26±0.740
دور سینه (سانتی‌متر) Chest perimeter (cm)	97.2±2.412	94.2±1.975	95.92±2.148	96.67±2.379	94.87±1.712
طول بدن (سانتی‌متر) Body length (cm)	44.53±1.288	47.68±1.021	48.43±1.093	48.45±1.197 <sup>b*</sup>	45.31±0.907 <sup>a*</sup>
وزن لاشه (کیلوگرم) Carcass weight (kg)	25.45±1.319	23.28±1.073	23.18±1.166	23.6±1.30	24.35±0.922
وزن ران (کیلوگرم) Femur weight (kg)	7.83±0.440	7.58±0.333	7.85±0.337	7.9±0.399	7.6±0.292
وزن سردهست (کیلوگرم) Shoulder weight (kg)	4.33±0.318	3.86±0.257	3.9±0.277	3.95±0.310	4.11±0.222
وزن قلوه گاه (کیلوگرم) Flank area weight (kg)	4.41±0.395	4.06±0.341	4.07±0.344	4.18±0.372	4.17±0.344
وزن دنبه (کیلوگرم) Fattail weight (cm)	1.4±1.124	1.14±1.10	1.13±1.108	1.17±1.121	1.26±1.085

<sup>1</sup> میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشند ( $P<0.05$ ). ژنوتیپ‌هایی که تفاوت میانگین صفات در آنها در سطح یک درصد معنی‌دار بود ( $P<0.01$ ) با علامت \* نشان داده شده‌اند.

<sup>1</sup> Means within same row with different superscripts differ significantly ( $P<0.05$ ). The genotypes that traits mean difference was significant at 1% level ( $P<0.01$ ) were indicated by \*.

شد و همان تغییر اسید آمینه‌ای قبلی را داشت. این چند شکلی با طول بدن دام از لحاظ آماری، ارتباطی نزدیک به سطح معنی‌داری داشت. با توجه به نتایج به دست آمده، به نظر می‌رسد پس از بررسی چند شکلی در کدون 142 در سطحی وسیع‌تر و در صورتی که نتایج این پژوهش در آن سطح نیز تأیید گردد، بتوان از این چند شکلی به عنوان نشانگر مولکولی در انتخاب به کمک نشانگرها استفاده کرد.

به طور کلی، در مطالعه حاضر دو مورد چند شکلی در اگزون 3 ژن لپتین مشاهده گردید که این چند شکلی‌ها در پروژه تهیه SNP گوسفند قبلا در پایگاه‌های داده زیستی گزارش شده‌اند. یکی از این چند شکلی‌ها که سبب تغییر اسید آمینه آرژنین به گلوتامین در کدون شماره 142 می‌شود بر میزان چربی پشت و ارتفاع جدوگاه تأثیر معنی‌داری داشت. چند شکلی بعدی در کدون 196 این ژن مشاهده

- 1- Barzehkar, R., A. Salehi, and F. Mahjoubi. 2009. Polymorphisms of the Ovine Leptin Gene and its Association with Growth and Carcass Traits in Three Iranian Sheep Breeds. *Iranian Journal of Biotechnology*, 7: 241-6. (In Persian).
- 2- Boucher, D., M. Palin., F. Castonguay., C. Garipey, and F. Pothier. 2006. Detection of polymorphisms in the ovine leptin (LEP) gene: Association of a single nucleotide polymorphism with muscle growth and meat quality traits. *Canadian Journal of Animal Science*, 86: 31-5.
- 3- Buchanan, F. C., C. J. Fitzsimmons., A. G. Van Kessel., T. D. Thue., D. C. Winkelman-Sim, and S. M. Schmutz. 2002. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. *Genetics Selection Evolution*, 34: 105-16.
- 4- Cauveri, D., S. Sivaselvam., S. Karthickeyan., K. Tirumurugaan, and K. Kumanan. 2014. Allelic polymorphism of exon3 of leptin gene in nilagiri sheep identified by sequencing and PCR-RFLP. *International Journal of Science, Environment and Technology*, 3: 951- 5.
- 5- De, S., M. MacNeil., X. Wu., J. Michal., Q. Xiao., M. Garcia., K. Griffin., C. Gaskins., J. Reeves, and J. Busboom. 2004. Detection of quantitative trait loci for marbling and backfat in Wagyu x Limousin B1 crosses using a candidate gene approach. *Journal of Animal Science Supplement*, 82(2): 111-114.
- 6- Fitzsimmons, C.J., S. M. Schmutz., R. D. Bergen, and J. J. McKinnon. 1998. A potential association between the BM 1500 microsatellite and fat deposition in beef cattle. *Mammalian Genome*, 9: 432-434.
- 7- Houseknecht, K. L., C. A. Baile., R. L. Matteri, and M. E. Spurlock. 1998. The biology of leptin: a review. *Journal of Animal Science*, 76: 1405-1420.
- 8- Huang, D. I., R. J. Chen., Z. P. Yang., Y. J. Mao., Y. L. Li., D. J. Tian., L. Chen, and X. Y. Zhao. 2008. Analysis on associations of SNPs of leptin gene with growth traits in four sheep breeds. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 12: 002 (Abstract).
- 9- Jonas, E., G. Martin., P. Celi., L. Li., M. Soattin., P. Thomson, and H. Raadsma. 2016. Association of polymorphisms in leptin and leptin receptor genes with circulating leptin concentrations, production and efficiency traits in sheep. *Small Ruminant Research*, 136: 78-86.
- 10- Khaldari, M. 2014. The basic of sheep and goat farming (Osoole parvareh goosfand va boaz). Tehran Jihaad daneshgahi, Tehran, Iran. (In Persian).
- 11- Khorramtaie, R., M. Nezamabadi., T. Harkinezhad., M. P. Eskandari nasab., M. H. Shahir, and D. Salimi. 2012. Evaluation of directly and ultrasound measurements of muscle and back fat for prediction of Carcass traits of live animals in Afshari sheep. *Iranian Journal of Animal Science Research*. 22(2): 161-171. (In Persian).
- 12- Mahmoud, A., A. Saleh., F. Abou-Tarboush., T. Shafey, and M. Abouheif. 2014c. Nucleotide sequence polymorphism within exon 3 region of leptin and prolactin genes in Herri sheep. *Research Journal of Biotechnology*, 9: 69-72.
- 13- Mahmoud, A., A. Saleh., N. Almealah., F. Abou-tarboush., R. Aljumaah., T. Shafey, and M. Abouheif. 2014. Molecular Characterization of Leptin Exon 3 gene in sheep of Saudi Arabia. *Research Journal of Biotechnology*, 9: 32-35.
- 14- Roh, S. G., D. Hishikawa., Y. H. Hong, and S. Sasaki. 2006. Control of adipogenesis in ruminants. *Animal Science Journal*, 77: 472-477.
- 15- Smithz, M., H. Dolezal., R. Gill, and B. Behrens. 1992. Evaluation of Ultrasound for Prediction of Carcass Fat Thickness and Longissimus Muscle Area in Feedlot Steers1. *Journal of Animal Science*, 70(1): 29-37.
- 16- Stone, R., S. Kappes, and C. Beattie. 1996. The bovine homolog of the obese gene maps to chromosome 4. *Mammalian Genome*, 7: 399-400.
- 17- Zhou, H., J. G. Hickford, and H. Gong. 2009. Identification of allelic polymorphism in the ovine leptin gene. *Molecular Biotechnology*, 41: 22-25.

## Identification of Single Nucleotide Polymorphism(s) in Part of LEP Gene and Investigation of their Effects on Carcass Traits in Afshari and Afshari×Booroola Merino Sheep

R. Sepehri<sup>1</sup>, S. Alijani<sup>2</sup>, J. Shodja Ghias<sup>3</sup>, T. Harkinezhad<sup>4\*</sup>, S. A. Rafat<sup>2</sup>

Received: 26-07-2016

Accepted: 26-11-2016

**Introduction** Leptin is a 16 kDa protein produced by adipocytes. This protein controls appetite, energy balance, efficiency of production and distribution of fat storage in the body and therefore plays an important role in regulating body weight and growth in mammals. LEP gene in sheep (NC\_019461) located on 4<sup>th</sup> chromosomes and has 16275 bp in length and contains 3 exons and 2 introns. The resulting protein contains 193 amino acids (the length of coding region is 579 bp). So far in this gene, 17 single nucleotide polymorphisms in the coding region were reported that seven of them are synonyms and the rest are missense. The entire exon 3 is containing 357 bp in length that starts from nucleotide 13544 till nucleotide 13903. This exon comprise 119 (or 118) codons, seven missense and a synonymous SNPs from this area of the gene is reported till now. Different alleles of this gene may lead to different phenotypic effects.

**Material and Methods** The aim of this study was to identify alleles of the gene in exon 3. For this purpose, 133 lambs from a flock at almost the same age in three groups of Afshari pure breed and B1 and B4 of Afshari × Booroola Merino male lambs were used. Afshari sheep is one of the heavy weight sheep in Iran, which is important breed in terms of meat production. It has notable twinning rate and birth weight, growth rate and weaning weight is remarkable compared with other breeds of sheep in this country. Given the potential of this breed suitable for the production of meat, it can play an important role in production of red meat in the area. To increase productivity of this breed, FecB gene from Booroola Merino sheep was introgressed to this breed of sheep in University of Zanjan in 2007. Following the introgression of the gene (FecB) to Afshari breed Afshari-Booroola Merino crosses as a new genetic combinations was developed. This study aimed to identify single nucleotide polymorphisms (SNP) in exon 3 of Leptin gene and its association with carcass traits in male Afshari and cross lambs. First, blood samples of all the animals were taken and phenotypic measurements on live animals were done and then 85 lambs were slaughtered. After slaughter, carcass weight was measured and after 24 hours maintaining in cold, weight of carcass, thigh, shoulder, lion muscle, back fat and waste (tail, back and visceral fat) were measured. Estimation of the carcass traits in non-slaughtered lambs, were accomplished using regression coefficients achieved before. DNA was extracted using phenol-chloroform procedure from all the samples. Then, using designed primers, the target DNA was amplified and PCR products of a number of samples were directly sequenced to identify potential SNP(s). The sequencing data were analyzed and two SNPs were detected in samples. Thereafter, all the samples were genotyped by RFLP using two restriction enzymes *Hpa* II and *Aiw*NI. The association of genotypes with phenotypic and carcass traits were studied.

**Result and Discussion** According to this study results, one of the polymorphism was identified in nucleotide position 13713. All three genotypes of this; GG, GA and AA were observed in studied samples. This missense polymorphism led to amino acid arginine/glutamine change at codon 142 and had a significant effect on the back fat thickness and withers height. The second polymorphism observed in the nucleotide (G> A13875) and two GG and GA genotypes were found in the samples. This polymorphism also had the same amino acid changes at codon 196 and associated with body length (with probability close to significant level). The frequency of GG genotype in both SNP was higher than other genotypes. This genotype is the genotype of the reference sequence in biological data bases. The alleles locating in 13713 bp in the studied population were not in Hardy-Weinberg equilibrium. But alleles of the 13875 location were in Hardy-Weinberg equilibrium. The allele frequency of each SNP was significantly different in genetic groups. In location of 13713, the most frequent mutation allele (A) and the lowest frequency of this allele was observed in genetic group B4 and Afshari group respectively. In location 13875, Afshari group had the highest frequency of the mutant allele and B1 had the lowest frequency.

1- PhD Student of Animal Science Department, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran,

2- Associate Professor of Animal Science Department, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran,

3- Professor of Animal Science Department, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran,

4- Associate Professor of Animal Science Department, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Iran.

(\*- Corresponding Author Email: Taher.harkinezhad@znu.ac.ir

**Conclusion** In general, in this study polymorphisms were found out in exon 3 of the leptin gene which has been found in previous studies and sheep SNP projects and have been reported previously in biological databases. Based on the results obtained and the variations observed in some previous studies, if the changes associated with these traits be confirmed in next studies, these polymorphisms could be used in marker-assisted selection in breeding programs.

**Key words:** Afshari sheep, Carcass quality, Leptin, Multiple births, SNP.