



تولیات دامی

دوره ۱۸ ■ شماره ۴ ■ زمستان ۱۳۹۵

صفحه‌های ۷۱۱-۷۱۸

ارتباط چندشکلی $g.286G>T$ اگزون سه ژن لپتین ($Rsel$) با کیفیت اسپرم در گوسفندان سنجابی

رویا بختیار^۱، علیرضا عبدالحمیدی^{۲*}، هادی حجاریان^۱، زهرا نیکوصفت^۳، داود کلانتر نیستانی^۳

۱. به ترتیب، دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار، استادیار، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

۲. استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

۳. استادیار گروه میکروب و ویروس شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۰۳/۳۱

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۵/۰۲/۲۳

چکیده

به منظور بررسی چندشکلی ژن لپتین و ارتباط آن با صفات کیفیت اسپرم و ابعاد بیضه، از ۹۶ رأس گوسفند نژاد سنجابی در طی دو سال و در دو فصل پاییز و بهار، اسپرم‌گیری شد. به طور همزمان طول، عرض و محیط بیضه نیز اندازه‌گیری گردید و برای استخراج DNA، از رگ و داج گوسفندان خون‌گیری شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای تکثیر قطعه ۴۶۳ جفت باز اگزون سه ژن لپتین با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی انجام گرفت. پس از هضم قطعات PCR و تفکیک سه ژنوتیپ GG، GT و TT در نمونه‌های مورد مطالعه، رابطه چندشکلی ژن لپتین با حرکت انفرادی اسپرم معنی‌دار بود ($P < 0/05$) و حرکت اسپرماتوزوئید در دام‌های با ژنوتیپ GG بیشترین مقدار بود ($P < 0/05$). میانگین حجم و غلظت اسپرم، کل اسپرم انزال شده، توان غشای پلاسمایی اسپرم، نسبت اسپرم‌های زنده به مرده و شاخص اسپرم در دام‌های با ژنوتیپ GG بیشتر بود ($P > 0/05$). همچنین اثر چندشکلی ژن لپتین بر ابعاد بیضه معنی‌دار نبود، در دام‌های دارای ژنوتیپ TT میانگین طول و محیط بیضه و در دام‌های با ژنوتیپ GT عرض و حجم بیضه نسبت به ژنوتیپ GG بیشتر بود. نتایج نشان داد که برای این جایگاه چندشکل ژن لپتین جهت بهبود باروری در برنامه‌های اصلاح نژادی گوسفند سنجابی است، هتروزیگوسیته زیاد بود و به نظر می‌رسد تحقیقات بیشتر در جمعیت‌های بزرگتر برای درک بهتر رابطه جایگاه‌های چندشکل دیگر این ژن بر باروری قوچ‌ها ضروری است.

کلیدواژه‌ها: باروری، تحرک اسپرم، چندشکلی، قوچ سنجابی، PCR-RFLP

مقدمه

مطالعات مختلف نقش لپتین در عملکرد تولیدمثل جنس نر گزارش کرده‌اند. این هورمون بر محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-بیضه‌ها و خود سلول‌های اسپرم مؤثر می‌باشد و همچنین بر سازوکار که در افزایش تحرک اسپرم و واکنش آکروزوم نقش دارند، تأثیر دارد [۳]. علی‌رغم مطالعات متعددی که به منظور بررسی چندشکلی در ژن لپتین و ارتباط آن با صفات اقتصادی نظیر وزن تولد و صفات رشد [۱] و [۱۲]، رشد و تولید پشم [۲] و کیفیت گوشت [۱۳] در گوسفندان انجام شد، اما پژوهشی برای بررسی چندشکلی در ژن لپتین و ارتباط آن با کیفیت اسپرم و ابعاد بیضه گوسفند انجام نشده است. هدف از انجام پژوهش حاضر، شناسایی چندشکلی اگزون سه ژن لپتین با استفاده از روش PCR-RFLP و ارتباط آن با صفات کیفی اسپرم و ابعاد بیضه در قوچ‌های نژاد سنجابی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر، از ۹۶ رأس قوچ نژاد سنجابی موجود در مرکز اصلاح نژاد مهرگان، ماهیدشت و کوزران استان کرمانشاه، در طی سال‌های ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵ و در دو فصل بهار و پاییز با استفاده از دستگاه واژن مصنوعی اسپرم‌گیری شد. قوچ‌های موردنظر حداقل به مدت ۴۸-۲۴ ساعت قبل از اسپرم‌گیری، به صورت جدا از گله نگه‌داری شدند. به منظور استخراج DNA، از ورید و داجی قوچ‌ها خون‌گیری شد. همچنین ابعاد بیضه (شامل طول، عرض و محیط بیضه) آن‌ها اندازه‌گیری شد.

صفات مربوط به اسپرم از قبیل حجم و رنگ مایع منی، حرکت انفرادی، حرکت تجمعی بلافاصله در محل جمع‌آوری اسپرم ارزیابی شد [۴] و گسترش‌های مربوط به درصد اسپرم‌های ناهنجار، توان غشای پلاسمایی اسپرم (Hypo-osmotic swelling; HOS) در محل نمونه‌گیری تهیه و برای بررسی و شمارش به آزمایشگاه منتقل شد. حجم منی بعد از جمع‌آوری با لوله فالكون مدرج تعیین

گوسفند نژاد سنجابی بعد از نژاد بلوچی دارای بیشترین جمعیت در ایران است و در اکثر مناطق استان کرمانشاه پراکنده است. این حیوان به علت درشتی جثه از نظر تولید گوشت مورد توجه دامداران می‌باشد. دامداران زیادی در استان کرمانشاه به پرورش و نگهداری آن علاقه‌مند هستند. این نژاد در مقابل سرما مقاوم است و از مراتع کوهستانی به خوبی استفاده می‌کند [۱۰]، زیرا توانایی تولیدمثل در دام‌های نر اهمیت زیادی در پرورش، نگهداری و حفظ آن‌ها در گله دارد. ارزیابی منی یک راهکار مناسب برای تشخیص قدرت باروری اسپرم قوچ است و می‌توان با این روش دام‌های بارور، کم‌بارور و نابارور را تشخیص داد.

در سال‌های اخیر، استفاده از نشانگرهای مولکولی برای تعیین تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها و حیوانات حفاظت شده، گسترش یافته است. تحقیقات بر روی ژن‌های کاندیدا که توالی نوکلئوتیدی آنها در DNA و نیز نقش آنها در بدن شناخته شده است، در افزایش سرعت پیشرفت ژنتیکی در حیوانات اهلی مؤثر است. ژن لپتین، یکی از ژن‌های کاندیدا است که نقش آن در تنظیم صفات تولید، تولیدمثل و فعالیت‌های مختلف نظیر مصرف غذا، تعادل انرژی و عملکرد سیستم ایمنی نقش دارد [۱۴].

این ژن در سال ۱۹۹۴ با استفاده از روش کلون کردن کشف شد و روی کروموزوم چهار گوسفند قرار دارد [۱۵]. این ژن دارای سه اگزون و دو اینترون است و محصول آن یک هورمون پروتئینی با وزن مولکولی ۱۶ کیلودالتون می‌باشد [۱۵]. هورمون کامل (یا بالغ) لپتین شامل ۱۴۶ اسیدآمینو می‌باشد که عمدتاً توسط سومین اگزون ژن کد می‌شود [۲]. تعدادی جهش در ناحیه اگزون سه این ژن مشخص شده‌اند که جهش $g>286G>T$ در این ناحیه سبب تغییر اسیدآمینو والین به اسیدآمینو لوسین می‌شود و چندین تحقیق برای تعیین ارتباط این جهش با صفات تولید در دام‌ها انجام شده است [۹]. از طرف دیگر،

تولیدات دامی

درجه قرار گرفت و به وسیله یک لامل از آن گسترش تهیه شد و توسط میکروسکوپ نوری ارزیابی شد و درصد اسپرم‌های دارای قطعه میانی متورم و اسپرم‌های دارای دم پیچ‌خورده به‌عنوان شاخص اسپرم‌های با غشای سالم بیان شد. غلظت اسپرم بعد از رقیق‌سازی نمونه منی با آب دو بار تقطیر (با نسبت ۱ به ۲۰۰) توسط لام هموسایتومتر اندازه‌گیری شد. برای شمارش اسپرم‌ها روی لام ریخته و پس از قرار دادن لامل روی آن و فیکس شدن نمونه زیر میکروسکوپ نوری مشاهده شد. تعداد کل اسپرماتوزئید در هر انزال با فرمول (۱) محاسبه شد [۴]:

(۱)

غلظت اسپرم × حجم اسپرم = کل اسپرماتوزئید انزال شده
شاخص مایع منی به‌عنوان یک شاخص کیفیت منی از رابطه (۲) محاسبه شد:

(۲)

حجم مایع منی × غلظت اسپرم × اسپرم زنده × حرکت انفرادی = شاخص مایع منی

استخراج DNA از خون توسط کیت DNA Prep (ژن فن‌آوران) انجام شد. راندمان مقدار و کیفیت DNA استخراج‌شده با الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد تعیین گردید. برای تعیین وجود چندشکلی جایگاه g.286G>T (دارای تغییر اسیدآمین و والین به لوسین) در ناحیه آگزون سه ژن لپتین، قطعه‌ای به طول ۴۶۳ جفت باز با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی تکثیر شد. این آغازگرها براساس توالی ژنومی ژن لپتین (HE605296.1) و با استفاده از نرم‌افزار Oligo 5 طراحی گردید (جدول ۱).

شد [۴]. حدود ۲۰ میکرولیتر از نمونه منی روی لام گرم (۳۷ درجه سانتی‌گراد) قرار داده و زیر میکروسکوپ با بزرگمایی ۴۰x حرکت توده‌ای نمونه مشاهده شد. امتیازبندی بر مبنای صفر تا ۵ بود [۴]. برای مشاهده حرکت انفرادی اسپرم‌ها، حدود ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه منی با ۱۰۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) مخلوط و زیر میکروسکوپ با بزرگمایی ۴۰۰x قرار گرفت. برای تعیین نسبت اسپرم‌های زنده به مرده ابتدا مایع منی را با محلول رنگ ائوزین-نگروزین به نسبت یک به سه مخلوط کرده، پس از تهیه گستره روی لام گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد و پس از خشک شدن لام، توسط میکروسکوپ با بزرگمایی ۴۰۰x مشاهده شد. اسپرم‌هایی که سر آن‌ها به رنگ بنفش نبود، زنده و بقیه مرده منظور شدند. برای تعیین مورفولوژی اسپرماتوزئید نیز از لام‌های رنگ‌آمیزی شده با محلول رنگی ائوزین - نگروزین استفاده شد و نسبت اسپرم‌های غیرنرمال به نرمال شمارش شد. اسپرم‌های با سر بدون دم، سر خارج از محور، سر ناهنجار، آکروزوم جداشده، دم خم شده از ناحیه قسمت میانی، دم پیچ‌خورده، دم دوتایی و اسپرم دارای قطره‌ی سیتوپلاسمی به‌عنوان ناهنجاری در نظر گرفته شدند. برای ارزیابی یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم از آزمایش تورم اسپرم در محیط با اسمالاریته کم استفاده شد. محلول فروکتوز و سبترات سدیم با اسمالاریته ۱۰۰ میلی‌اسمول برای این آزمایش استفاده شد. حدود ۱۰ میکرولیتر از نمونه منی با ۱۰۰۰ میکرولیتر از محلول موردنظر به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شد. پس از انکوباسیون یک قطره از نمونه بر روی یک لام ۳۷

جدول ۱. توالی آغازگرها و آنزیم مورد استفاده برای هضم آنزیمی ژن لپتین در گوسفند نژاد سنجابی

Accession No.	آنزیم برشی	دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد)	طول قطعه (جفت باز)	آغازگرها	جایگاه
HE605296.1	RseI	۶۳	۴۶۳	FWD: 5'-tggtgtccccttctctctg-3' REV: 5'-cccacataggtctcttctgc-3'	g.286G>T

تولیدات دامی

دوره ۱۸ ■ شماره ۴ ■ زمستان ۱۳۹۵

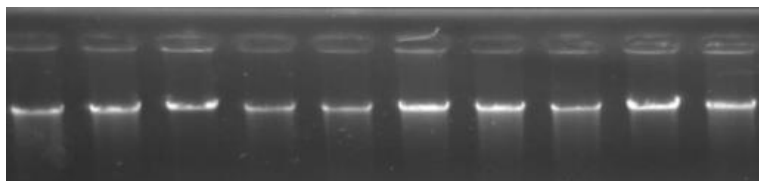
جمعیتی از نرم‌افزار 32 PopGene استفاده شد و برای بررسی رابطه چندشکلی ژن مورد مطالعه با صفات مربوط به کیفیت اسپرم و ابعاد بیضه از رویه GLM نرم‌افزار آماری SAS (نسخه ۹/۲) استفاده شد. برای هر صفت به‌طور جداگانه، اثر فاکتورهای مختلف (به‌جز اثرات جایگاه‌ها) روی صفات مورد مطالعه بررسی شد و در صورت معنی دار بودن در مدل قرار گرفتند (رابطه ۳). بنابراین، مدل‌های متفاوتی از نظر نوع و تعداد عوامل مؤثر، برای صفات مختلف برآزش شد. همچنین، برای صفت ناپیوسته حرکت توده‌ای اسپرم، از رویه Genmod که مبتنی بر آزمون کای اسکور است استفاده شد.

$$y_{ijkl} = \mu + HYS_i + W_j + Age_k + G_l + e_{ijkl} \quad (3)$$

در این رابطه، y_{ijkl} متغیر وابسته (صفت مربوط به کیفیت اسپرم و ابعاد بیضه)، μ میانگین صفت در جامعه، HYS_i اثر i امین گله - سال - فصل ($i=1, 2, \dots, 6$)، G_l اثر l امین ژنوتیپ ($l=1, 2, 3$)، W_j وزن بدن در زمان اسپرم‌گیری به‌عنوان متغیر کمکی، Age_k اثر k امین سن دام ($k=2, 3, 4, 5$) و e_{ijkl} اثر عوامل باقیمانده می‌باشد.

نتایج و بحث

کیفیت DNA استخراج شده روی ژل آگارز یک درصد ارزیابی شد (شکل ۱). اغلب نمونه‌ها دارای باند تیز و بدون کشیدگی بودند. برخی نمونه‌های نامناسب و باکیفیت کم مجدداً استخراج شدند. با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی طراحی شده، بخشی از آگرون سه ژن لپتین به طول ۴۶۳ جفت باز با موفقیت تکثیر شد (شکل ۲).



شکل ۱. نمونه‌ای از DNAهای ژنومی استخراج شده

تولیدات دامی

دوره ۱۸ ■ شماره ۴ ■ زمستان ۱۳۹۵

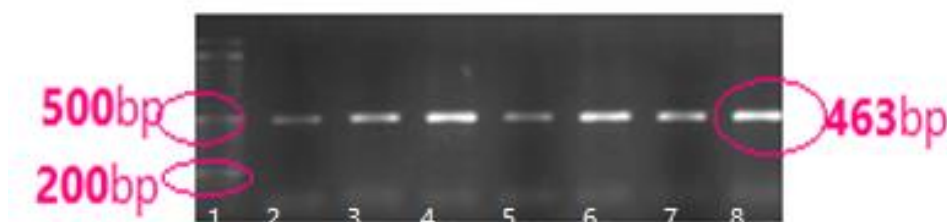
واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) در حجم نهایی ۴۵ میکرولیتر، شامل ۱۸ میکرولیتر مستر میکس (2X PCR Master Mix Red-MgCl₂:1.5mM) و ۰/۲۵ میکرومولار از هر یک از آغازگرها، غلظت ۵۰-۱۰۰ نانوگرم DNA و ۲۲ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه انجام شد. برنامه حرارتی برای تکثیر قطعه موردنظر توسط دستگاه ترموسایکلر به شرح زیر بود:

مرحله ابتدایی واسرشت‌سازی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه، طی ۳۰ چرخه واسرشته‌سازی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، دمای ۶۳ درجه سانتی‌گراد به‌منظور اتصال آغازگرها به مدت یک دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای بسط آغازگرها در یک دقیقه و درنهایت بسط نهایی نیز در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد در مدت پنج دقیقه.

برای مشاهده محصولات PCR از ژل آگارز یک درصد و رنگ‌آمیزی به کمک Green Viewer با رقت یک میکرولیتر از رنگ و ۵ میکرولیتر آب مقطر صورت گرفت. هضم محصولات PCR با استفاده از آنزیم برش‌دهنده RseI (MsiI) (Thermo Scientific) صورت گرفت. واکنش هضم آنزیمی در حجم ۱۵ میکرولیتر شامل پنج واحد آنزیم RseI، ۱/۵ میکرولیتر بافر 1X و ۱/۵ میکرولیتر بافر 1X تانگو، ۸ میکرولیتر محصول PCR و ۳/۵ میکرولیتر آب مقطر، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ساعت صورت گرفت. برای مشاهده قطعات هضم شده از ژل آگارز ۴ درصد استفاده شد. پس از الکتروفورز با ولتاژ ۷۰ و مدت زمان ۷۰ دقیقه، ژل با استفاده از اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد.

برای محاسبه فراوانی آللی، ژنوتیپی و شاخص‌های

ارتباط چندشکلی g.286G>T اگزون سه ژن لپتین (Rsel) با کیفیت اسپرم در گوسفندان سنجابی



شکل ۲. قطعه دارای ۴۶۳ جفت باز حاصل از تکثیر ژن لپتین

چاهک (۱) Marker Ladder 50 bp. چاهک (۲ تا ۸) نمونه‌هایی از PCR انجام شده

قطعه ۴۶۳ bp را برش نمی‌دهد و ژنوتیپ هموزیگوت TT قابل انتظار می‌باشد. در صورت عدم جهش، آنزیم برش‌دهنده، قطعه را برش داده و دو قطعه ۳۰۷ bp و ۱۵۶ bp برای ژنوتیپ GG ایجاد می‌شود و برای ژنوتیپ هتروزیگوت سه قطعه با طول‌های ۴۶۳ bp، ۳۰۷ bp و ۱۵۶ bp قابل مشاهده است (شکل ۳).

هضم آنزیمی محصول PCR ژن لپتین نشان داد که دو آلل G (آلل وحشی) و T (آلل جهش‌یافته) در ناحیه g.286G>T اگزون سه ژن لپتین وجود دارد. جهش موردنظر در موقعیت ۲۸۶ امین نوکلئوتید از اگزون سه ژن لپتین قرار دارد که سبب تغییر اسید آمینه والین به لوسین می‌شود. آنزیم برش‌دهنده دارای یک جایگاه برش در این قطعه بود. اگر جهش وجود داشته باشد آنزیم برش‌دهنده



شکل ۳. ژنوتیپ‌های مختلف ژن لپتین پس از هضم آنزیمی

Marker Ladder 50 bp, ژنوتیپ GT (۴۶۳، ۳۰۷ و ۱۵۶)، ژنوتیپ TT (۴۶۳)، ژنوتیپ GG (۳۰۷ و ۱۵۶)

به ترتیب ۰/۳، ۰/۲۷۵ و ۰/۴۲۵ برآورد گردید [۱]. با استفاده از روش SSCP فراوانی دو الگوی بانندی AA و AC در گوسفندان نژاد نائینی به ترتیب ۰/۷۳ و ۰/۲۷ برآورد شده است [۲]. علت تفاوت فراوانی‌ها را می‌توان به دلیل متفاوت بودن نشانگر مولکولی و جمعیت مورد استفاده در تحقیق ارتباط داد.

در تحقیق حاضر، فراوانی ژنوتیپ‌های GT، GG و TT به ترتیب ۰/۰۶، ۰/۷۷ و ۰/۱۷ و فراوانی آلل G (آلل وحشی) و T (آلل موتان) به ترتیب ۰/۴۵ و ۰/۵۵ برآورد گردید. در تحقیق دیگری روی اگزون سه این ژن با روش SSCP در گوسفند نژاد کردی خراسان شمالی، سه الگوی بانندی AA، AB و BC مشاهده شد که فراوانی‌های آن‌ها

تولیدات دامی

دوره ۱۸ ■ شماره ۴ ■ زمستان ۱۳۹۵

آماره کای اسکور محاسبه شده (۲۹/۴) نشانه عدم تعادل هاردی-واینبرگ در جایگاه مورد مطالعه بود (۰/۰۰۱). $P <$ دلایل عدم تعادل مشاهده شده در این جمعیت را می‌توان غیرتصادفی بودن احتمالی آمیزش‌ها و تعداد نمونه‌های محدود تحقیق دانست. یکی از خصوصیات نشانگر مولکولی، تعداد آلل مؤثر است که با توجه به نتایج حاصل معادل ۱/۹۷ برآورد شد (جدول ۲).

در یک تحقیق، روی ناحیه مشابه تحقیق حاضر در گوسفندان Pomeranian Coarsewool، با استفاده از روش PCR-RFLP و آنزیم برشی *MsII* دو ژنوتیپ GG و GT مشاهده شد که فراوانی ژنوتیپی آن‌ها به ترتیب ۰/۹ و ۰/۱ و فراوانی آللی G (آلل وحشی) و T (آلل موتان) ۰/۹۵ و ۰/۰۵ گزارش گردید [۱۱]. فراوانی بیشتر آلل موتان و نیز مشاهده ژنوتیپ مغلوب TT در تحقیق حاضر می‌تواند حاکی از قدمت بیشتر این جهش در جمعیت گوسفند سنجابی و نیز نشانه وجود هتروزیگوسیتیه بیشتر این جهش باشد.

جدول ۲. شاخص‌های جمعیتی برآورد شده ژن لپتین در گوسفند نژاد سنجابی

جایگاه	هموزیگوت مشاهده شده	هتروزیگوت مشاهده شده	هموزیگوت مورد انتظار	هتروزیگوت مورد انتظار	شاخص	تعداد آلل مؤثر (Ne)	شاخص شانون (I)
اگزون سه (Rsel)	۰/۲۲۹	۰/۷۷	۰/۵۰۲	۰/۴۹۷	۰/۴۹۴	۱/۹۷۸	۰/۶۸۷

همچنین با مقایسه بین هتروزیگوسیتی مشاهده شده و قابل انتظار در جایگاه مورد مطالعه ملاحظه می‌شود که تفاوت بین این دو مقدار و یا به عبارت دیگر، در این جایگاه هتروزیگوسیتی زیاد است. رابطه چندشکلی ژن لپتین با ابعاد بیضه معنی‌دار نبود، ولی میانگین طول و محیط بیضه در ژنوتیپ TT بیشترین بود و ژنوتیپ GT نیز عرض و حجم بیضه نسبت به ژنوتیپ GG بیشتر بود (جدول ۳). رابطه چندشکلی ژن لپتین با صفت حرکت انفرادی اسپرم معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۵$) و حرکت انفرادی دام‌های با ژنوتیپ GG، بیشترین مقدار بود ($P < ۰/۰۵$) (جدول ۴).

نزدیک بودن اندازه مؤثر آللی و تعداد آلل واقعی نشانه کارایی خوب آلل‌ها در ایجاد چندشکلی می‌باشد. برای مشخص کردن بهتر تنوع ژنتیکی از شاخص اطلاعاتی شانون (I) نیز استفاده شد که دامنه تغییرات آن بین صفر و یک قرار دارد. هر قدر این شاخص به صفر نزدیک‌تر باشد، مقدار تنوع کمتر است. مقدار شاخص شانون محاسبه شده برابر ۰/۶۸ بود که نشانه تنوع ژنتیکی، زیاد در جمعیت قوچ‌های سنجابی است (جدول ۲). مقدار هتروزیگوسیتی برآورد شده (۰/۴۹) به وسیله شاخص نئی نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی جمعیت برای ژن لپتین در حد متوسط است.

جدول ۳. مقایسه میانگین حداقل مربعات \pm خطای استاندارد ژنوتیپ‌های اگزون سه ژن لپتین برای ابعاد بیضه در قوچ‌های سنجابی

ژنوتیپ	طول بیضه	عرض بیضه	محیط بیضه	حجم بیضه
GG	۱/۴ \pm ۱۷/۸	۴/۰ \pm ۴/۵	۱/۹ \pm ۳۱/۰	۲۱۶/۹ \pm ۲۷۵/۵
GT	۰/۷ \pm ۱۸/۵	۲/۷ \pm ۷/۰	۱/۰ \pm ۳۱/۹	۱۱۲/۸ \pm ۵۴۵/۰
TT	۱/۱ \pm ۱۸/۹	۳/۷ \pm ۵/۵	۱/۵ \pm ۳۲/۰	۱۶۰/۹ \pm ۴۸۵/۰

تولیدات دامی

دوره ۱۸ ■ شماره ۴ ■ زمستان ۱۳۹۵

جدول ۴. مقایسه میانگین حداقل مربعات \pm خطای استاندارد ژنوتیپ‌های ژن لپتین برای کیفیت اسپرم قوچ‌های سنجابی

ژنوتیپ	حجم اسپرم (ml)	حرکت توده‌ای (۰-۵)	حرکت انفرادی (%)	غلظت اسپرم ($x \times 10^7$)	کل اسپرم در هر انزال ($x \times 10^7$)
GG	0.2 ± 1.5	0.2 ± 4.6	$10.2/6 \pm 7.1^a$	60.4 ± 313.7	129.6 ± 569.7
GT	0.09 ± 1.1	0.1 ± 4.6	84.6 ± 3.6^b	15.6 ± 253.9	53.4 ± 436.6
TT	0.1 ± 1.2	0.1 ± 4.7	84.1 ± 5.6^b	36.4 ± 238	89.0 ± 437.4

a-b: تفاوت میانگین‌ها در هر ستون با حروف غیرمشابه معنی‌دار است ($P < 0.05$).

جدول ۵. مقایسه میانگین حداقل مربعات \pm خطای استاندارد ژنوتیپ‌های مختلف ژن لپتین برای کیفیت اسپرم قوچ‌های نژاد سنجابی

ژنوتیپ	یکپارچگی غشای اسپرم (%)	زنده‌مانی (%)	مورفولوژی (%)	شاخص اسپرم (ml) ⁻¹
GG	2.6 ± 94.59	5.33 ± 90.4	3.29 ± 91.58	1203587.4 ± 3878261.91
GT	1.01 ± 94.06	2.1 ± 83.12	1.47 ± 92.73	555150.9 ± 2231862.27
TT	1.88 ± 93.04	4.05 ± 86.26	2.39 ± 94.96	873858.6 ± 2169045.3

به نظر می‌رسد باتوجه به عدم رابطه این جایگاه بر صفات ابعاد بیضه و تعدادی از صفات کیفیت اسپرم و همچنین تفاوت معنی‌دار ژنوتیپ GG از نظر تحرک اسپرم به عنوان مهمترین شاخص ارزیابی اسپرم، انجام تحقیقات جامع‌تر روی این ژن و دیگر جایگاه‌های چندشکل آن می‌تواند در درک بهتر عمل ژن لپتین روی باروری اسپرم در قوچ کمک کند.

منابع

- شبیخ ع، منتظر تربتی م، فرهنگ‌فره و اشکانی‌فر ر (۱۳۹۳) مطالعه چندشکلی اگزون ۳ ژن لپتین با استفاده از نشانگر PCR-SSCP و ارتباط آن با وزن تولد و صفات رشد در گوسفند نژاد کردی خراسان شمالی. ژنتیک نوین. ۴: ۵۱۶-۵۱۱.
- نجفی م، رحیمی ق، انصاری ز و جیواد ف (۱۳۹۲)

در تحقیقی بر روی غلظت لپتین در منی و ارتباط آن با پارامترهای اسپرم مردان، همبستگی معنی‌داری بین لپتین منی و تحرک اسپرم وجود داشت [۷]. شاید بتوان علت ارتباط معنی‌دار بین چندشکلی ژن لپتین و تحرک را به نتایجی محققین دیگری ارتباط داد که آنها با استفاده از مکان‌یابی میکروسکوپی به کمک رنگ‌آمیزی به روش ایمونوفلورسنت، ایزوفرم ۱۴۵-kDa گیرنده هورمون لپتین را در ناحیه دم اسپرماتوزوای انزالی انسان مشخص کردند [۶ و ۸].

تحرک اسپرم به صورت درصدی از سلول‌های اسپرم که دارای نیروی حرکتی هستند، بیان می‌شود. وراثت‌پذیری صفات کیفیت مایع منی (نظیر تحرک و درصد اسپرم‌های غیرطبیعی) زیاد (نزدیک ۰/۶) است [۵]. حرکت پیش‌رونده اسپرم، معیار آزمایشگاهی مهمی برای ارزیابی توانایی باروری دام نر و عامل تعیین‌کننده در باروری است. اختلال در تولید مایع منی مانند از دست دادن و یا کاهش تحرک اسپرم می‌تواند منجر به باروری ضعیف شود [۵].

تولیدات دامی

10. Mohammadabadi MR (2016) Allelic Diversity of Calpastatin Gene in Sanjabi Sheep. *Journal of Cellular and Molecular Researches. Iranian Journal of Biology*. 28(3): 395-402.
11. Proskura WS and Szewczuk M (2014) The Polymorphism in the IGF1R Gene is Associated with Body Weight and Average Daily Weight Gain in Pomeranian Coarsewool Ewes. *Pakistan Veterinary Journal*. Pp. 14-088.
12. Shojaei M, Mohammad Abadi MR, Asadi Fozzi M, Dayani O, Khezri A and Akhondi M (2010a) Association of growth trait and Leptin gene polymorphism in Kermani sheep. *Journal of Cell and Molecular Research*. 2: 67-73.
13. Soufy B, Mohammadabadi MR, Shojaeyan K, Baghizadeh A, Ferasaty S, Askari N and Dayani O (2009) Evaluation of Myostatin gene polymorphism in Sanjabi sheep by PCR-RFLP method. *Animal Science Reserches*. 19(1): 81.
14. Van der lende T, Te-Pas MF, Veerkamp RF and Liefers SC (2005) Leptin gene polymorphisms and their phenotypic associations. *Vitamins and Hormones*. 71: 373-404.
15. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L and Friedman JM (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 372: 425-432
3. Aquila S, Gentile M, Middea M, Catalano S, Morelli C, Pezzi V and et. al. (2005) Leptin secretion by human ejaculated spermatozoa. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 90: 4753-4761.
4. Evans G, Maxwell WC (1987) Salamouns artificial insenation of sheep and goats. *Butterworths*.
5. Hering DM, Olenski K and Kaminski S (2014) Genome-wide association study for poor sperm motility in Holstein-Friesian bulls. *Animal Reproduction Science*. 146: 8997.
6. Jope, T, LanMert A, Kratzsch J, Paasch U and Glander HJ (2003) Leptin and leptin receptor in human seminal plasma and in human spermatozoa *International Journal of Andrology*. 26: 335-341.
7. Jorsaraei SGA, Hiroaki-Shibahara H, Ayustawati and et. al. (2010) The Leptin concentrations in seminal plasma of men and its relationship to semen parameters. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*. 8: 95-100.
8. Li HW, Chiu PC, Cheung MP and Yeung WSOWS (2008) Effect of leptin on motility, capacitation and acrosome reaction of human spermatozoa. *International Journal of Andrology*. 32: 687-94.
9. Mahmoud AH, Saleh AA, Abou tarboush FM, Shafey TM and Abouheif MA (2014) Nucleotide sequence polymorphism within exon 3 region of leptin and prolactin genes in Herri sheep. *Research Journal of Biotechnology*. 9(10): 69-72.