تولیدات دامی

دوره ۱۸ ■ شماره ۴ ■ زمستان ۱۳۹۵

صفحه‌های ۷۱۸-۷۱۱

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

رویا بختیار[۱]، علیرضا عبدالمحمدی[۱*]، هادی حجاریان[۱]، زهرا نیکوصفت[۲]، داود کلانتر نیستانکی[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 ویروس‌شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان

تاریخ وصول مقاله:۱۳۹۵/۰۲/۲۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۰۳/۳۱

چکیده

به‌منظور 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. به‌طور همزمان طول، عرض و محیط بیضه نیز اندازه‌گیری گردید و برای استخراج DNA، از رگ وداج 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 موردمطالعه، رابطه چندشکلی ژن لپتین با حرکت انفرادی اسپرم معنی‌دار بود (P<۰/۰۵) و حرکت اسپرماتوزوئید در دام‌های با ژنوتیپ GG بیشترین مقدار بود (P<۰/۰۵). 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> ۰/۰۵). 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

* نویسنده مسئول Email: alirezaam@razi.ac.ir

مقدمه

گوسفند نژاد سنجابی بعد از نـژاد بلـوچی دارای بیشـترین جمعیت در ایران است و در اکثر منـاطق اسـتان کرمانشـاه پراکنده است. این حیوان به علت درشتی جثه از نظر تولیـد گوشت مورد توجه دامداران می‌باشد. دامـداران زیـادی در استان کرمانشاه به پرورش و نگهداری آن علاقه‌مند هستند. این نژاد در مقابل سرما مقاوم است و از مراتـع کوهسـتانی به خوبی استفاده می‌کند [۱۰]، زیـرا توانـایی تولیـدمثل در دام‌های نر اهمیت زیـادی در پـرورش، نگهـداری و حفـظ آن‌ها در گله دارد. ارزیابی منی یک راهکـار مناسـب بـرای 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 جمعیـت‌هـا و حیوانـات حفاظـت شـده، گسـترش یافتـه اسـت. تحقیقـات بـر روی ژن‌هـای کاندیدا که توالی نوکلئوتیدی آنها در DNA و نیز نقش آنها در بدن شناخته شده است، در افـزایش سـرعت پیشـرفت ژنتیکی در حیوانات اهلی مؤثر است. ژن لپتین، یکی از ژن-های کاندیدا است کـه نقـش آن در تنظـیم صـفات تولیـد، تولیدمثل و فعالیت‌های مختلف نظیر مصـرف غـذا، تعـادل انرژی و عملکرد سیستم ایمنی نقش دارد [۱۴].

این ژن در سال ۱۹۹۴ با استفاده از روش کلـون کـردن کشف شد و روی کرومـوزوم چهـار گوسـفند قـرار دارد [۱۵]. ایـن ژن دارای سـه اگـزون و دو اینتـرون اسـت و محصول آن یک هورمـون پروتئینـی بـا وزن مولکـولی ۱۶ کیلودالتون می‌باشد [۱۵]. هورمـون کامـل (یـا بـالغ) لپتـین شامل ۱۴۶ اسیدآمینه می‌باشـد کـه عمـدتاً توسـط سـومین اگزون ژن کد می‌شود [۲]. تعدادی جهش در ناحیه اگـزون سه این ژن مشخص شده‌اند که جهش g.286G>T در ایـن ناحیه سبب تغییـر اسـیدآمینه والـین بـه اسـیدآمینه لوسـین می‌شود و چندین تحقیق برای تعیین ارتباط این جهـش بـا صفات تولید در دام‌ها انجام شده است [۹]. از طرف دیگر، مطالعات مختلف نقش لپتین در عملکرد تولیـدمثل جـنس نر گزارش کرده‌اند. این هورمون بر محـور هیپوتـالاموس-هیپوفیز- بیضه‌ها و خود سلول‌های اسپرم مؤثر مـی‌باشـد و همچنین بر سازوکار که در افزایش تحرک اسپرم و واکـنش آکروزوم نقش دارند، تـأثیر دارد [۳]. علـی‌رغـم مطالعـات متعددی که به منظـور بررسـی چندشـکلی در ژن لپتـین 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 چندشـکلی در ژن لپتین و ارتباط آن بـا کیفیـت اسـپرم و ابعـاد بیضـه گوسفند انجام نشده است. هدف از انجام پژوهش حاضـر، شناسایی چندشـکلی اگـزون سـه ژن لپتـین بـا اسـتفاده از روشPCR- RFLP و ارتباط آن با صـفات کیفـی اسـپرم و ابعاد بیضه در قوچ‌های نژاد سنجابی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر، از ۹۶ رأس قوچ نژاد سـنجابی موجـود در مرکز اصلاح نژاد مهرگان، ماهیدشـت و کـوزران اسـتان کرمانشاه، در طی سال‌هـای ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵ و در دو فصـل بهار و پاییز با استفاده از دستگاه واژن مصنوعی اسپرم‌گیری شد. قوچ‌های موردنظر حداقل به مدت ۴۸-۲۴ ساعت قبل از اسپرم‌گیری، به‌صورت جدا از گله نگـه‌داری شـدند. بـه منظور استخراج DNA، از ورید وداجی قوچ‌ها خون‌گیـری شد. همچنین ابعاد بیضـه (شـامل طـول، عـرض و محـیط بیضه) آن‌ها اندازه‌گیری شد.

صفات مربوط به اسپرم از قبیل حجم و رنگ مایع منی، حرکـت انفـرادی، حرکـت تجمعـی بلافاصـله در محـل جمع‌آوری اسپرم ارزیابی شد [۴] و گسـترش‌هـای مربـوط به درصد اسپرم‌های ناهنجار، توان غشای پلاسمایی اسـپرم (Hypo-osmotic swelling; HOS) در محـل نمونـه‌گیـری تهیه و برای بررسی و شمارش بـه آزمایشـگاه منتقـل شـد. حجم منی بعد از جمع‌آوری با لوله فـالکون مـدرج تعیـین

شد [۴]. حدود ۲۰ میکرولیتر از نمونه منی روی لام گرم (۳۷ درجه سانتی‌گراد) قرار داده و زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی 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 بزرگ‌نمایی ۴۰۰x قرار گرفت. برای تعیین نسبت اسپرم‌های زنده به مرده ابتدا مایع منی را با محلول رنگ ائوزین‌نگروزین 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 بزرگ‌نمایی ۴۰۰x مشاهده شد. اسپرم‌هایی که سر آن‌ها به رنگ بنفش نبود، زنده و بقیه مرده منظور شدند. برای تعیین مورفولوژی اسپرماتوزوئید 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 خم‌شده از ناحیه قسمت میانی، دم پیچ‌خورده، دم دوتایی و اسپرم دارای قطره‌ی سیتوپلاسمی به‌عنوان ناهنجاری درنظر گرفته شدند. برای ارزیابی یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم از آزمایش تورم اسپرم در محیط با اسملاریته کم استفاده شد. محلول فروکتوز و سیترات سدیم با اسملاریته 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 درجه قرار گرفت و به‌وسیله 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 اسپرماتوزوئید 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 DNAاستخراج‌شده با الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد تعیین گردید. برای تعیین وجود چندشکلی جایگاه g.286G>T (دارای تغییر اسیدآمینه والین به لوسین) در ناحیه اگزون 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).

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

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

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) در حجم نهایی ۴۵ میکرولیتر، شامل ۱۸ میکرولیتر مستر میکس (2X PCR Master Mix Red-$MgCl_2$:1.5mM) و۰/۲۵ 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 Rsel (Msll) (Thermo Scientific) صورت گرفت. واکنش هضم آنزیمی در حجم ۱۵ میکرولیتر شامل پنج واحد آنزیم Rsel، 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 مدت‌زمان ۷۰ دقیقه، ژل با استفاده از اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد.

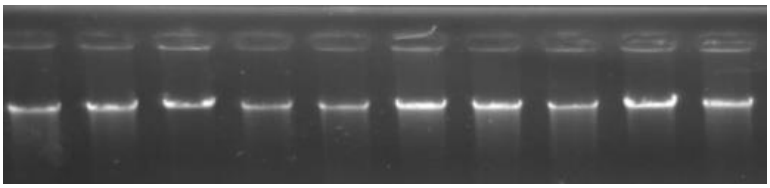
برای محاسبه فراوانی آللی، ژنوتیپی و شاخص‌های جمعیتی از نرم‌افزار PopGene 32 استفاده شد و برای بررسی رابطه چندشکلی ژن موردمطالعه با صفات مربوط به کیفیت اسپرم و ابعاد بیضه از رویه GLM نرم‌افزار آماری SAS (نسخه ۹/۲) استفاده شد. برای هر صفت به‌طور جداگانه، اثر فاکتورهای مختلف (به‌جز اثرات جایگاه‌ها) روی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

$$y_{ijkl} = \mu + HYS_i + W_j + Age_k + G_l + e_{ijkl} \qquad (۳)$$

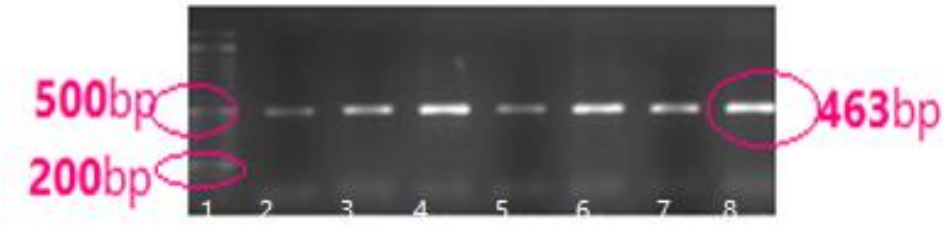
در این رابطه، y_{ijkl} متغیر وابسته (صفت مربوط به کیفیت اسپرم و ابعاد بیضه)،μ میانگین صفت در جامعه، HYS_i اثر i امین گله - سال - فصل (i= ۱، ۲، ... و ۶)، G_l اثر l امین ژنوتیپ (i = ۱، ۲ و ۳)، W_j وزن بدن در زمان اسپرم‌گیری به‌عنوان متغیر کمکی، Age_k اثر k امین سن دام (k =۲، ۳، ۴ و ۵) و e_{ijkl} اثر عوامل باقیمانده می‌باشد.

نتایج و بحث

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



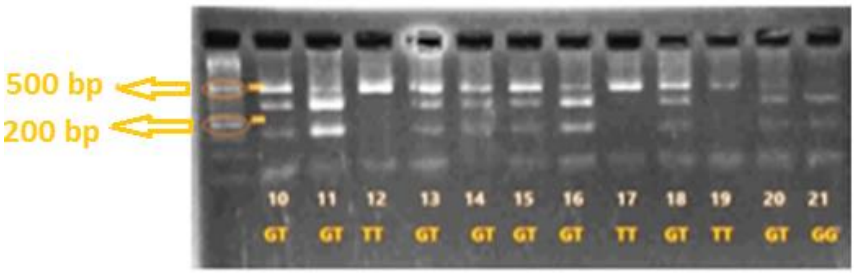
شکل ۱ . نمونه‌ای از DNAهای ژنومی استخراج شده



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

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

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 نوکلوئوتید از اگزون سه ژن لپتین قرار دارد که سبب تغییر اسیدآمینه والین به لوسین می‌شود. آنزیم برش‌دهنده دارای یک جایگاه برش در این قطعه بود. اگر جهش وجود داشته باشد آنزیم برش‌دهنده قطعه ۴۶۳ bp را برش نمی‌دهد و ژنوتیپ هموزیگوت TT قابل‌انتظار 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 ۱۵۶bp قابل مشاهده است (شکل ۳).



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)**

در تحقیق حاضر، فراوانی ژنوتیپ‌های GG،GT و TT به‌ترتیب ۰/۰۶، ۰/۷۷ و ۰/۱۷ و فراوانی آلل G (آلل وحشی) و T (آلل موتان) به‌ترتیب 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 باندی AA، AB و BC مشاهده شد که فراوانی‌های آن‌ها به‌ترتیب ۰/۳، ۰/۲۷۵ و ۰/۴۲۵ برآورد گردید [۱]. با استفاده از روش SSCP فراوانی دو الگوی باندی AA و AC در گوسفندان نژاد نائینی به‌ترتیب 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 یک تحقیق، روی ناحیه مشابه تحقیق حاضر در گوسفندان Pomeranian Coarsewool، با استفاده از روش PCR-RFLP و آنزیم برشی *Msl*I دو ژنوتیپ GG و GTمشاهده شد که فراوانی ژنوتیپی آن‌ها به‌ترتیب 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 هتروزیگوسیته بیشتر این جهش باشد.

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).

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 نئی	تعداد آلل مؤثر (Ne)	شاخص شانون (I)
اگزون سه (Rsel)	۰/۲۲۹	۰/۷۷	۰/۵۰۲	۰/۴۹۷	۰/۴۹۴	۱/۹۷۸	۰/۶۸۷

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. هرقدر 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) به‌وسیله شاخص نئی نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی جمعیت برای ژن لپتین در حد متوسط است.

همچنین با مقایسه بین هتروزایگوسیتی 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).

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

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

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

ژنوتیپ	حجم اسپرم (ml)	حرکت توده‌ای (۰-۵)	حرکت انفرادی (٪)	غلظت اسپرم ($x \times ۱۰^{۷}$)	کل اسپرم در هر انزال ($x \times ۱۰^{۷}$)
GG	۱/۵ ± ۰/۲	۴/۶ ± ۰/۲	۱۰۲/۶ ± ۷/۱[a*]	۳۱۳/۷ ± ۶۰/۴	۵۶۹/۷ ± ۱۲۹/۶
GT	۱/۱ ± ۰/۰۹	۴/۶ ± ۰/۱	۸۴/۶ ± ۳/۶[b]	۲۵۳/۹ ± ۱۵/۶	۴۳۶/۶ ± ۵۳/۴
TT	۱/۲ ± ۰/۱	۴/۷ ± ۰/۱	۸۴/۱ ± ۵/۶[b]	۲۳۸ ± ۳۶/۴	۴۳۷/۴ ± ۸۹/۰

a-b: تفاوت میانگین‌ها در هر ستون با حروف غیرمشابه معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

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

ژنوتیپ	یکپارچگی غشای اسپرم (٪)	زنده‌مانی (٪)	مورفولوژی (٪)	شاخص اسپرم ($ml^{-۱}$)
GG	۹۴/۵۹ ± ۲/۶	۹۰/۴ ± ۵/۳۳	۹۱/۵۸ ± ۳/۲۹	۳۸۷۸۲۶۱/۹۱ ± ۱۲۰۳۵۸۷/۴
GT	۹۴/۰۶ ± ۱/۰۱	۸۳/۱۲ ± ۲/۱	۹۲/۷۳ ± ۱/۴۷	۲۲۳۱۸۶۲/۲۷ ± ۵۵۵۱۵۰/۹
TT	۹۳/۰۴ ± ۱/۸۸	۸۶/۲۶ ± ۴/۰۵	۹۴/۹۶ ± ۲/۳۹	۲۱۶۹۰۴۵/۳ ± ۸۷۳۸۵۸/۶

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 ایمنوفلورسنت، ایزوفرم ۱۴۵-kDa گیرنده هورمون لپتین را در ناحیه دم اسپرماتوزوای انزالی انسان مشخص کردند [۶ و ۸].

تحرک اسپرم به‌صورت 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 منی‌مانند از دست دادن و یا کاهش تحرک اسپرم می‌تواند منجر به باروری ضعیف شود [۵].

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

۱. شیبک ع، منتظرتربتی م، فرهنگ‌فر ه 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.

۲. نجفی م، رحیمی ق، انصاری ز و جیواد ف (۱۳۹۲)

اثر چندشکلی آللی در اگزون ۳ ژن لپتین بـر صـفات رشد و تولیدمثل در گوسفند نژاد نائینی. علـوم دامـی ایران. ۲: ۱۳۹-۱۳۱.

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 insenenation 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.

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 Fozi 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