

ارزیابی ارتباط چندشکلی ژن FTO با صفات لاشه و فراسنجه‌های خونی در بره‌های آمیخته افشاری-برولا مرینو

وحید سلمانی^۱، محمد طاهر هرکی نژاد^{۲*}، معصومه صالح^۳، مرادپاشا اسکندری نسب^۴ و داریوش سلیمی^۴

^۱ زنجان، دانشگاه زنجان، پژوهشکده فناوریهای نوین زیستی

^۲ زنجان، دانشگاه زنجان، گروه علوم دامی

^۳ ساری، دانشگاه ساری، گروه ژنتیک و اصلاح دام

^۴ تهران، دانشگاه تهران، گروه بیوانفورماتیک

تاریخ دریافت: ۹۵/۵/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۱

چکیده

ژن FTO یک عامل رونویسی را کد می‌کند که در بیان ژنهای مرتبط با سنتز چربی دخالت دارد. در مطالعه حاضر ارتباط چند شکلی در نواحی اگزون چهار و اگزون نه ژن FTO با صفات لاشه مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور ۹۷ راس بره نر آمیخته افشاری × برولا مرینو با سن تقریباً یکسان مورد استفاده قرار گرفتند. از تمام دامها نمونه خون جهت استخراج DNA و اندازه-گیری فراسنجه‌های خون گرفته شد. آغازگرهای لازم برای نواحی اگزون چهار و اگزون نه که به ترتیب، قطعاتی به طول ۵۱۸ bp و ۴۶۸ bp را تکثیر می‌کردند، طراحی گردیدند. جهت بررسی چند شکلی در نواحی یاد شده، ابتدا نواحی مورد نظر توسط PCR تکثیر و سپس محصولات به دست آمده پس از واسرشته‌سازی با استفاده از تکنیک SSCP و بارگذاری بر روی ژل اکریل آمید ۱۰ درصد مورد ارزیابی قرار گرفتند. پس از تعیین ژنوتیپ در ناحیه اگزون چهار، سه ژنوتیپ AA، AB و AC و در ناحیه اگزون نه نیز دو گروه ژنوتیپی DD و DE مشاهده شدند که بین ژنوتیپهای این نواحی از لحاظ صفات لاشه و فراسنجه‌های خونی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. برخلاف مطالعات پیشین، در مورد گوسفند، در پژوهش حاضر ارتباطی بین نواحی مورد مطالعه در ژن FTO و صفات چربی، وزن تولد و پیش از کشتار مشاهده نشد با توجه به اینکه این پژوهش بر اساس گزارشاتی در مورد سایر موجودات بر روی اگزون چهار انجام شد، برای ارزیابی جامع‌تر ارتباط این ژن با صفات مربوط به چربی لاشه در گوسفند تحقیقات بیشتری که در آن بخشهای دیگر این ژن مورد بررسی قرار گیرد، لازم به نظر می‌رسد.

واژه‌های کلیدی: گوسفند افشاری، ژن FTO صفات لاشه، چندشکلی، SSCP

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۴۳۳۰۵۲۲۳۰، پست الکترونیکی: Taher.harkinezhad@znu.ac.ir

مقدمه

که نژادی سنگین وزن است از پتانسیل مناسبی برای تولید گوشت برخوردار است و نقش مهمی را در تأمین گوشت قرمز منطقه می‌تواند ایفاء کند. با این وجود نژاد مورد بحث علی‌رغم همه محاسن خود همانند اغلب نژادهای سنگین وزن ایران دارای دنبه‌ای بزرگ بوده که با کاهش تقاضای مصرف کنندگان و افزایش ضریب تبدیل مواد غذایی در

بر طبق گزارش FAO (Food and Agriculture Organization) تولید سالیانه گوشت گوسفند در ایران حدود ۳۰۰ هزار تن است که این مقدار ۲/۱ درصد گوشت گوسفند کل جهان را دارا می‌باشد (۹). با وجود این سطح تولید گوشت گوسفند، همچنان نیاز مصرف کنندگان داخلی تأمین نمی‌شود. استان زنجان با داشتن نژاد افشاری

در بافت آدیپوز سفید نیز در مطالعات دیگری گزارش شده است از جمله مطالعه‌ای که بر روی موش‌های تغذیه‌شده با جیره‌های دارای چربی بالا انجام گرفته است (۲۷). مباحث فوق نشان می‌دهد یک ارتباط مهم بین FTO و چاقی و چربی وجود دارد. با این حال تا کنون گزارشی مبنی بر ارتباط این ژن با میزان چربی در گوسفند گزارش نشده است. با توجه به گزارش‌هایی از جمله فوتانتزی و همکاران (۲۰۰۹) (۱۰) که جهشی (AM931150) را در ناحیه آگزون چهار خوک یافتند که با صفات چاقی ارتباط معنی‌داری داشته است در این تحقیق نیز این ناحیه و همچنین آگزون نه به عنوان ناحیه‌ای که مطالعه‌ای روی آن انجام نشده در گوسفند مورد بررسی قرار گرفت (۱۲). جهت شناسایی جهش‌های احتمالی در نواحی مورد مطالعه در این تحقیق از تکنیک PCR-SSCP استفاده شد به دلیل اینکه این تکنیک نسبت به روش‌های دیگر تعیین جهش، ساده، سریع و کم-هزینه است و در مطالعات بسیاری مورد استفاده قرار گرفته است (۵، ۲۶ و ۲۹).

نمونه‌های موجود در این پژوهش از بره‌های آمیخته افشاری × برولامرینو اخذ گردید که در سال ۱۳۸۶ با انتقال ژن چند قلوژی از گوسفند نژاد برولامرینو به نژاد افشاری ایجاد شده است. هدف کلی از این مطالعه بررسی چندشکلی ژن FTO در گوسفند آمیخته افشاری-برولامرینو و تأثیر آن بر صفات مرتبط با چربی می‌باشد.

مواد و روشها

رکوردها و نمونه‌های مختلف از تعداد ۹۷ رأس بره نر آمیخته افشاری × برولامرینوس با سن (۱۱ ماهگی) و همچنین شرایط یکسان از گله تحقیقاتی-آموزشی دانشگاه زنجان در سال ۱۳۹۴ جهت اجرای این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. داده‌های جمع‌آوری شده در این پژوهش به دو بخش قبل و بعد از کشتار تقسیم می‌شوند. از گوسفندان مورد نظر خونگیری به عمل آمده و سپس از روش فنل کلروفرم جهت استخراج DNA استفاده شد.

لاشه روبرو شده که در نتیجه باعث کاهش درآمد و صرفه اقتصادی می‌شود. ژنهای زیادی از جمله DGAT1، Leptin، FABP4 و... میزان چربی لاشه در گوسفند را کنترل می‌کنند (۱، ۳، ۲۴ و ۲۸).

FTO یک ژن با طول بیش از ۴۰۰ kb و ده آگزون است که در گوسفند بر روی کروموزوم ۱۴ (Accession number: NC_019471.1) و در گاو بر روی کروموزوم ۱۸ قرار گرفته است (۳۵). آنزیم FTO یک عضو از خانواده دی-اکسیژنازهای بدون آهن و وابسته به ۲-اکسوگلوکوتارات است که هومولوگ DNA دمتیلاز AlkB و ABH (هومولوگ AlkB پستانداران) است که این ژنها در بازسازی نوکلئوتیدهای آلکیله شده در DNA و RNA نقش دارند (۱۸). این ژن برای اولین بار از یک موش جهش یافته با انگشتان ترکیب شده کلون شد (۲۳). بررسیها نشان داده است که ژن FTO در انسان با چاقی مرتبط است. در مطالعه‌ای بر روی یک جمعیت از اروپای شرقی رابطه rs17817449 (G>C) ژن FTO با چاقی و شاخص توده بدن (DMI) مورد تأیید قرار گرفته است (۱۷).

مطالعات ژنتیکی که روی موش و انسان انجام شده، وجود جهش‌هایی در FTO را نشان داده که با چاقی در ارتباط است (۱۷، ۱۸ و ۱۹). از مطالعات آزمایشگاهی چنین بر می‌آید که احتمالاً FTO به عنوان یک دمتیلاز DNA تک رشته‌ای عمل می‌کند. علاوه بر این خاموش کردن هومولوگ نوترکیب FTO در موش منجر به عقب ماندگی رشد، از دست دادن بافت چربی سفید و افزایش متابولیسم انرژی گردیده است. علی‌رغم بررسیهای زیاد عملکرد حقیقی ژن FTO هنوز ناشناخته است. در پژوهشی نشان داده شده است که بیان ژن FTO در بافت چربی و ماهیچه بیان بالاتری نسبت به بافتهای دیگر داشته و همچنین بیان این ژن در خوکهای با چربی بالا نسبت به خوکهای با چربی پایین، بالاتر بوده است و پیشنهاد شده که FTO اثر مثبتی بر ذخیره چربی دارا می‌باشد (۸ و ۱۳). نقش FTO

مربوطه به صورت degenerate طراحی گردید. و BLAST برای بررسی اختصاصی بودن آغازگرها در گونه‌ها مورد استفاده برای طراحی پرایمر استفاده شد. آغازگرها جهت سنتز به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال گردید. مشخصات این آغازگرها در جدول (۱) آورده شده‌اند.

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای طراحی شده

نام آغازگر	توالی آغازگر	طول قطعه	ناحیه مورد تکثیر*	دمای ذوب (TM)
FT4	F: AGGCCCTGAAGAGGAAAGYG R: GCTGTTCTGGMARGAAAC	۵۱۸bp	اگزون چهار و بخشی از اینترون چهار	۶۳ °C
FT9	F: CCTCTGCCRTTTGAYCTC R: GAAAGAGCAAAGTAGGTTAGG	۴۶۸bp	بخشی از اگزون نه	۶۲ °C

F: آغازگر پیشرو و R: آغازگر پیرو. *: در متن عبارات FT4 و FT9 به ترتیب برای نواحی اگزون چهار (به همراه بخشی از اینترون چهار) و بخشی از اگزون نه به کار می‌روند.

تا از اتصال مجدد رشته‌های مکمل جلوگیری شود. برای مشاهده ژنوتیپها از دستگاه الکتروفورز عمودی و از ژل اکریل آمید ۱۰ درصد استفاده شد. برای این منظور ۱۳ میکرولیتر از مخلوط محصول PCR و بافر بارگذاری در هر چاهک ریخته شد و با ولتاژ ۱۵۰ به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق و با بافر TBE 1X الکتروفورز گردید. در نهایت برای مشاهده ژنوتیپها از روش رنگ آمیزی نیترات نقره استفاده شد.

روشهای آماری مورد استفاده در تجزیه و تحلیل داده‌ها:
در این تحقیق، احتمال برقراری تعادل هاردی-واینبرگ جمعیت‌های مورد مطالعه بر اساس ژنوتیپهای به دست آمده با آزمون معمول مربع کای و توسط نرم‌افزار Popgene آزمایش شد. تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 19 انجام شد. ابتدا کلیه داده‌های به دست آمده از صفات مربوطه و همچنین ژنوتیپهای تعیین شده در نرم-افزار اکسل وارد شد. با استفاده از نرم‌افزار SQL Server داده‌ها مرتب و جهت آنالیز در SPSS فراخوانی شد. به دلیل نامساوی بودن تعداد مشاهدات در زیر گروه‌های مختلف، آنالیز داده‌ها با رویه GLM و میانگینها با آزمون

همچنین تعیین کمیت و کیفیت DNA توسط دستگاه نانودراپ انجام گرفت.

طراحی آغازگر: توالی ژن FTO گوسفند در سایتهای بیولوژیکی موجود نمی‌باشد. بنابراین برای طراحی آغازگر، از توالی موجود برای این ژن در پستانداران دیگر استفاده گردید. به وسیله نرم افزار CLC Workbench آغازگرهای

واکنش زنجیره‌ای PCR: هر مخلوط واکنش (۲۵ μ l) شامل ۸ پیکو مول از هر آغازگر، ۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومیک، ۰/۸ IU تک‌پلیمرز (شرکت سیناژن)، ۰/۱ μ l تک بافر PCR، ۲۰۰ μ M dNTP (شرکت سیناژن)، ۲ mM $MgCl_2$ و ۵۰ mM KCl می‌باشد. چرخه‌های دمایی برای آغازگر FT4، واسرشته‌سازی اولیه به مدت پنج دقیقه و در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ سیکل به صورت یک دقیقه، یک دقیقه و ۳۲ ثانیه به ترتیب در دماهای ۹۵ درجه، ۵۸ درجه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد با یک بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت پنج دقیقه انجام گردید. برای آغازگر FT9 شرایط همانند شرایط فوق بوده با این تفاوت که دمای اتصال برای این آغازگر ۵۷ درجه سانتی‌گراد بود. سپس نمونه‌ها جهت اطمینان از تکثیر باند مورد نظر بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند.

تکنیک SSCP: برای انجام روش SSCP ۸ میکرولیتر از محصولات PCR با ۸ میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط گردید. برای واسرشته کردن رشته‌ها، نمونه‌ها به مدت ۱۳ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد در دستگاه PCR قرار داده شدند. سپس بلافاصله نمونه‌ها در داخل یخ قرار گرفتند

نتایج و بحث

پس از انجام PCR و انجام الکتروفورز، همان‌طور که انتظار می‌رفت در واکنش انجام شده با آغازگر FT4، قطعه ۵۸۱ و با آغازگر FT9 قطعه ۴۶۸ تکثیر گردید (شکل ۱). همان‌طور که در شکل (۲) مشاهده می‌کنید باندها با اندازه و الگوهای متفاوتی بر روی ژلها قابل مشاهده بود. با بررسی کامل ژلها در مورد ناحیه FT4 همه دامها در سه گروه ژنوتیپی AA، AB و AC قرار گرفتند (شکل ۲ الف)). در مورد ناحیه FT9 دامها در دو گروه ژنوتیپی، DD و DE قرار گرفتند (شکل ۲ ب)). نتایج حاصل از تحلیل آماری جمعیت مورد بررسی و هتروزیگوسیتی ژنوتیپها در جدول ۲ آورده شده است.

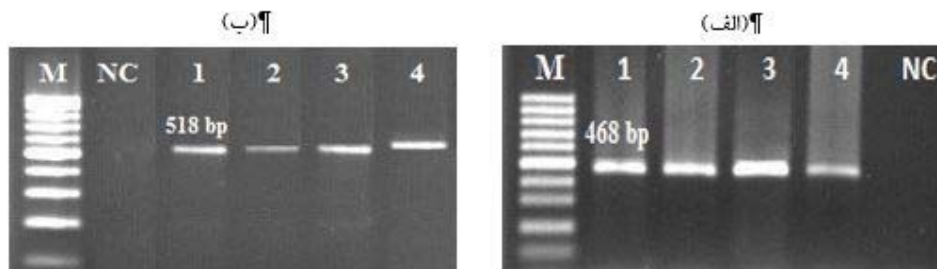
دانکن مورد مقایسه قرار گرفتند. از وزن بره‌ها به عنوان کواریت در تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد. که به دلیل معنی‌دارنشدن از مدل حذف گردیدند. برای تجزیه آماری پارامترهای خونی و سایر صفات از مدل‌های زیر استفاده شد.

$$y_{ij} = \mu + G_i + e_{ij}$$

معادله مدل آماری برای سایر صفات:

$$y_{ijk} = \mu + G_i + K_j + D_k + e_{ijk}$$

در این مدلها y صفت اندازه‌گیری شده، G اثر ژنوتیپ، K اثر تیپ تولد، D اثر سن مادر و e خطای آزمایشی می‌باشد.



شکل ۱- (الف) باندهای مربوط به تکثیر ژن FTO با استفاده از آغازگر FT9 بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. M: نشانگر DNA با فواصل ۱۰۰ جفت باز، نمونه‌های ۱، ۲، ۳ و ۴: باندهای تکثیر شده با این آغازگر به طول ۴۶۸ جفت باز. (ب) باندهای مربوط به تکثیر ژن FTO با استفاده از آغازگر FT4 بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. M: نشانگر DNA با فواصل ۱۰۰ جفت باز، نمونه‌های ۱، ۲، ۳ و ۴: باندهای تکثیر شده با این آغازگر به طول ۵۱۸ جفت باز و NC: کنترل منفی (به جای DNA از آب استفاده گردید).



شکل ۲- (الف) نتایج حاصل از انجام SSCP بر روی فرآورده‌های PCR ناحیه FT4. (ب) نتایج حاصل از انجام SSCP بر روی فرآورده‌های PCR ناحیه FT9

جدول ۲- فراوانی ژنوتیپی و هتروزیگوسیتی مشاهده شده در بره‌های آمیخته

ژن	نواحی ژن	تعداد نمونه	ژنوتیپ	فراوانی ژنوتیپی	مشاهده شده	مورد انتظار	(O-E) ² /E
FTO	FT4	۹۷	AA	۰/۳۳	۳۲	۴۴/۷۷	۲/۷۱
			AB	۰/۵۳	۵۱	۳۴/۰۸	۸/۳۹
			AC	۰/۱۳	۱۴	۹/۳۵	۲/۳
FT9	۹۷	DD	۰/۴۵	۴۴	۵۱/۱۳	۰/۹۹	
		DE	۰/۵۴	۵۳	۳۸/۷۲	۵/۲۶	

اثر ژنوتیپ‌های FTO (FT4 و FT9) بر صفات مختلف تجزیه واریانس وزن تولد و وزن زنده در زمان کشتار در بره‌های آمیخته: وزن تولد و وزن زنده: نتایج حاصل از جدول ۳ آمده است.

جدول ۳- تجزیه واریانس صفات وزن تولد و وزن زنده در بره‌های آمیخته

نواحی ژن	صفت	منبع تغییرات	درجه آزادی	P value	S.E
FT4	وزن تولد	ژنوتیپ	۲	۰/۸۳ ns	۰/۱۸
	وزن زنده	ژنوتیپ	۲	۰/۴۸ ns	۲/۲
FT9	وزن تولد	ژنوتیپ	۱	۰/۹۷ ns	۰/۱۴
	وزن زنده	ژنوتیپ	۱	۰/۰۶ ns	۱/۵۲

ns: تفاوت غیر معنی‌دار، ($P < 0.05$)

ارتفاع جدوگاه، دور سینه، طول پشت، فاصله دویا می‌باشد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس صفات بیومتری مربوط به گروه ژنوتیپی FT4 و FT9 در جدول ۴ آورده شده است. در همه صفات اثر ژنوتیپ، سن مادر و نوع تولد به عنوان اثر ثابت در نظر گرفته شد. همان گونه که در جدول (۴) نشان داده شده است در مورد نواحی FT4 و FT9 اثر ژنوتیپ بر روی صفات بیومتری معنی‌دار نبود. البته این موضوع با توجه به اینکه این ژنوتیپها ارتباطی با وزن نداشتند نیز قابل پیش بینی بود و این مشاهدات همدیگر را تأیید می‌کنند.

در هیچ تحقیقی ارتباط بین ژن FTO با صفات بیومتری در حیوانات اهلی مورد بررسی قرار نگرفته است ولی در پژوهشهای متعدد بر روی حیوانات مزرع‌ای و جوامع انسانی ارتباط این ژن با خوراک مصرفی، هموستاز انرژی و بازده انرژی مشخص شده است، مطالعات زیر این مطلب را تأیید می‌کنند.

بر طبق این نتایج اثر هیچ یک از ژنوتیپها بر این دو صفت در هر دو ناحیه معنی‌دار نشد. به عبارت دیگر اللهای این ناحیه از این ژن تأثیری بر وزن در گوسفند افشاری ندارند. در پژوهشی که بر روی گاوهای سیمنتال در کشور اسلوواکی انجام شد، جهش در آگزون دو ژن FTO، با وزن قبل کشتار، وزن لاشه و وزن گوشت در ارتباط بوده است (۳۰) اما در مقابل ژانگ و همکاران در پژوهشی که بر روی خوکهای بومی چین انجام دادند، ارتباط معنی‌داری بین SNP (1191 A>G) و افزایش وزن روزانه مشاهده نکردند (۳۶). لازم به ذکر است که در آگزون ۲ این ژن در گوسفند تا کنون تنها یک SNP گزارش شده است که آن هم معنی‌دار نمی‌باشد لذا در پژوهش حاضر این ناحیه از ژن مورد بررسی قرار نگرفت.

صفات بیومتری بره‌های آمیخته: تعدادی از صفات بیومتری ظرفیت دام برای تولید گوشت را نشان می‌دهند. صفات بیومتری اندازه‌گیری شده در این پژوهش شامل

جدول ۴- تجزیه واریانس صفات بیومتری نواحی FT9 و FT4

نواحی ژن	صفات بیومتری	منبع تغییرات	درجه آزادی	P value	S.E
FT4	ارتفاع جدوگاه	ژنوتیپ	۲	۰/۲۷ ^{ns}	۰/۷۳
	دور سینه	ژنوتیپ	۲	۰/۸۵ ^{ns}	۱/۸
	پشت	ژنوتیپ	۲	۰/۸۶ ^{ns}	۰/۸۳
FT9	فاصله دو پا	ژنوتیپ	۲	۰/۹۵ ^{ns}	۰/۵۸
	ارتفاع جدوگاه	ژنوتیپ	۱	۰/۴۳ ^{ns}	۰/۶
	دور سینه	ژنوتیپ	۱	۰/۱۵ ^{ns}	۱/۴۴
	طول پشت	ژنوتیپ	۱	۰/۹۱ ^{ns}	۰/۶۴
	فاصله دو پا	ژنوتیپ	۱	۰/۶۸ ^{ns}	۰/۴۷

ns: تفاوت غیر معنی‌دار، ($P < 0/05$)

باشد. آنچه در اینجا به دست آمده است نشان می‌دهد چنین ارتباطی در نواحی بررسی شده با صفات اندازه گیری شده وجود ندارد. اما برای پاسخ گفتن مناسب در مورد این موضوع ضروری است که سایر قسمتهای این ژن در گوسفند مورد بررسی قرار گیرد.

پارامترهای خونی بره‌های آمیخته: نتایج حاصل از تجزیه واریانس پارامترهای خونی مربوط به گروه ژنوتیپی نواحی FT4 و FT9 در جدول (۵) آورده شده‌اند. در هیچ یک از نواحی مورد بررسی ارتباط معنی داری بین ژنوتیپها مشاهده نشد.

در تحقیقی که توسط فان و همکاران (۲۰۰۹) بر روی خوک انجام شد، نشان داده شده است که SNP (p.Ala. SNP) در ژن FTO با مصرف خوراک ارتباط دارد (۷). ارتباط SNP در ایترون یک و اگزون سه در ژن FTO با افزایش وزن روزانه در خوکهای آمیخته برکشایر × یورکشایر ثابت شده است. در پژوهشی بر روی موش نشان داده شده است که افزایش بیان ژن FTO باعث افزایش مصرف خوراک می‌شود (۶). بر طبق تحقیقات انجام شده در اروپا، ارتباط جهشهای این ژن با مصرف غذا به اثبات رسیده است (۴ و ۳۱). بنابراین انتظار می‌رود این ژن با رشد حیوانات و در نتیجه صفات بیومتری در ارتباط

جدول ۵- تجزیه واریانس پارامترهای خونی نواحی FT9 و FT4

نواحی ژن	پارامترهای خونی	منبع تغییرات	درجه آزادی	p value	S.E
FT4	تری گلیسرید	ژنوتیپ	۲	۰/۳۷ ^{ns}	۱/۵۲
	کلسترول	ژنوتیپ	۲	۰/۲۴ ^{ns}	۲/۵۳
	HDL	ژنوتیپ	۲	۰/۶۲ ^{ns}	۱/۲
	LDL	ژنوتیپ	۲	۰/۱۷ ^{ns}	۳/۰۵
	VLDL	ژنوتیپ	۲	۰/۳۷ ^{ns}	۰/۳
FT9	تری گلیسرید	ژنوتیپ	۱	۰/۸۹ ^{ns}	۱/۲۲
	کلسترول	ژنوتیپ	۱	۰/۸۹ ^{ns}	۱/۹۹
	HDL	ژنوتیپ	۱	۰/۹۳ ^{ns}	۰/۹۵
	LDL	ژنوتیپ	۱	۰/۹۱ ^{ns}	۱/۲۶
	VLDL	ژنوتیپ	۱	۰/۸۹ ^{ns}	۰/۲۴

ns: تفاوت غیر معنی‌دار، ($P < 0/05$)

چربی لاشه یک صفت کمی می‌باشد و تحت تأثیر ژنهایی مانند FAS، DGAT1، LPL و بسیاری از ژنهای دیگر قرار می‌گیرد (۲۵ و ۳۲) همچنین هورمونهای زیادی مانند لپتین، گلوکوکورتیکوئیدها، انسولین و فاکتور رشد شبه انسولین بر روی چربیها مؤثر هستند (۱۶ و ۲۱)، هر عاملی که بر بیان ژنهای درگیر در سنتز چربیها و ژنهای کدکننده هورمونهای مؤثر بر چربی اثر بگذارد، می‌تواند چربی لاشه در حیوانات مزرعه‌ای را تحت تأثیر قرار دهد. برخلاف این بررسی در تحقیق وی و همکاران (۲۰۱۱) بر روی ارتباط ژن FTO با صفات کیفی گوشت در گاوهای بومی چینی یک SNP (C1071T) بر روی آگزون پنج این گاوها گزارش شده است و ژنوتیپ CT دارای میانگین بالاتری برای ضخامت چربی پشت نسبت به ژنوتیپهای CC و TT بوده است (۳۴). در گوسفند تا کنون SNP در این آگزون گزارش نشده است. همچنین فوتانازی و همکاران (۲۰۰۸ و ۲۰۰۹) نشان دادند که در خوک جهش در ژن FTO ($c.594C>G$ SNP) با ضخامت چربی پشت، چربی مرمی و درصد کل چربی در ماهیچه در ارتباط است (۱۱ و ۱۲). اسکوک و همکاران (۲۰۱۱) نیز نشان دادند که SNP ($T>C$) واقع در آگزون دو ژن FTO با چربی لاشه در ارتباط است (۳۰). در مقابل ژانگ و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که $A>G$ SNP 1191 در ژن FTO با چربی داخل ماهیچه‌ای (ماربلینگ) در ارتباط است، ولی با چربی پشت و افزایش وزن روزانه در ارتباط نیست (۳۷). البته در پژوهش دیگری ارتباط چندشکلی ژن تیروگلوبولین با ضخامت چربی پشت در نژاد مورد مطالعه گزارش شده است (۲). با توجه به این که چاقی یکی از مهم‌ترین عواملی است که بر روی سلامت انسان اثر می‌گذارد، تحقیقات زیادی بر روی ژن FTO انجام شده است. در اکثر این پژوهشها، جهشها در نواحی مختلف این ژن با صفات چاقی مانند شاخص توده بدن، محیط کمر، وزن و چربی احشایی در ارتباط بوده است (۱۴، ۱۵، ۱۹، ۲۰ و ۳۶).

با توجه به این که ژن FTO یک فاکتور رونویسی در ژنهای مرتبط با سنتز چربی می‌باشد و پروتئین کد شده توسط این ژن یک آگزوگلوکوتارات وابسته به دمیلاز است که در فرآیند دمیلاسیون در داخل هسته سلول نقش دارد، این ژن با تأثیر بر بیان ژنهای درگیر در سنتز چربی، می‌تواند بر پارامترهای خونی مؤثر باشد. به طور مثال در تحقیقی که بر روی ۴۸۹۷ نفر مبتلا به دیابت نوع دو در اسکاتلند انجام شده است نشان داده شده که ژنوتیپهای ژن FTO مربوط به SNP (rs9939609) با پارامترهای خونی ارتباط دارند. الل A با LDL، HDL، تری‌گلسیرید بالا، شاخص آتروژنیک پلاسما (مقدار چربی ذخیره شده در دیواره سرخرگ) و شاخص توده بدن مرتبط است (۱۵). اما به هر حال، در تحقیق دیگری که بر روی کودکان چاق در آلمان انجام شده است ارتباط معنی‌داری بین SNP (rs9939609) با پارامترهای خونی مشاهده نشده است (۲۲). کرینگ و همکاران (۲۰۰۸) نیز با بررسی چاقی در ۷۲۸ مرد جوان در دانمارک ارتباط ژنوتیپ AA با کاهش سطح HDL را گزارش کردند، ولی آنها با دیگر متابولیت‌های مانند سطح کلسترول، تری‌گلسیرید، اسیدهای چرب آزاد ارتباط معنی‌داری مشاهده نکردند (۲۰). همان‌طور که در بالا مشاهده می‌شود نتایج گزارش شده ضد و نقیض است و این موضوع می‌تواند به دلیل ارتباط این ژن با مکانیسمهای اپی ژنتیک باشد و چون تغییرات اپی ژنتیکی تحت تأثیر محیط هستند در نتیجه از محیطی به محیط دیگر تأثیر الهای این ژن می‌تواند متفاوت باشد. به هر حال برای نشان دادن بهتر ارتباط این ژن با پروفیل چربی خون در حیوانات مزرعه تحقیقات بیشتری لازم است انجام گیرد.

اثر ژنوتیپهای FTO بر صفات مختلف لاشه: نتایج حاصل از تجزیه واریانس اثر ژنوتیپهای نواحی FT4 و FT9 بر روی وزن لاشه، ضخامت چربی و ضخامت عضله لاشه در جدول (۶) و برای صفات تفکیک لاشه در جدول (۷) آورده شده است. با توجه به جداول ذیل تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپها و صفات لاشه مشاهده نشد.

جدول ۶- تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده در کشتارگاه برای بره‌های آمیخته

نواحی ژن	صفت	منبع تغییرات	درجه آزادی	F value	S.E
FT4	ضخامت چربی لاشه	ژنوتیپ	۲	۰/۶۵ ^{ns}	۰/۱
	ضخامت عضله لاشه	ژنوتیپ	۲	۰/۶۸ ^{ns}	۰/۰۹
	وزن لاشه	ژنوتیپ	۲	۰/۱۶ ^{ns}	۱/۰۰۶
FT9	ضخامت چربی لاشه	ژنوتیپ	۱	۰/۴۳ ^{ns}	۰/۰۹۵
	ضخامت عضله لاشه	ژنوتیپ	۱	۰/۳۶ ^{ns}	۰/۰۷۵
	وزن لاشه	ژنوتیپ	۱	۰/۱۳ ^{ns}	۰/۷۴

ns: تفاوت غیر معنی‌دار، ($P < 0.05$)

جدول ۷- نتایج تجزیه واریانس تفکیک لاشه نواحی FT9 و FT4

نواحی ژن	صفت	منبع تغییرات	درجه آزادی	p value	S.E
FT4	ران	ژنوتیپ	۲	۰/۱۴ ^{ns}	۰/۳۲
	سردست	ژنوتیپ	۲	۰/۰۹ ^{ns}	۰/۲۴
	گردن	ژنوتیپ	۲	۰/۱۲ ^{ns}	۰/۱۱
	قلوه‌گاه	ژنوتیپ	۲	۰/۲۲ ^{ns}	۰/۲۱
	راسته	ژنوتیپ	۲	۰/۷۴ ^{ns}	۰/۱۹
	دنبه	ژنوتیپ	۲	۰/۴۹ ^{ns}	۰/۱۴
	ضایعات	ژنوتیپ	۲	۰/۲ ^{ns}	۰/۰۷
	ران	ژنوتیپ	۱	۰/۰۵۴ ^{ns}	۰/۲۴
FT9	سردست	ژنوتیپ	۱	۰/۱۶ ^{ns}	۰/۱۹
	گردن	ژنوتیپ	۱	۰/۸۷ ^{ns}	۰/۰۸
	قلوه‌گاه	ژنوتیپ	۱	۰/۱۲ ^{ns}	۰/۱۷
	راسته	ژنوتیپ	۱	۰/۴۵ ^{ns}	۰/۱۵
	دنبه	ژنوتیپ	۱	۰/۴۱ ^{ns}	۰/۱
	ضایعات	ژنوتیپ	۱	۰/۶۱ ^{ns}	۰/۰۶

ns: تفاوت غیر معنی‌دار، ($P < 0.05$)

راسته بیشتری از ژنوتیپ TT داشتند (۳۴). تیواری و همکاران (۲۰۱۲) اظهار داشتند که بیان ژن FTO در کبد و ماهیچه اسکلتی جوجه‌های گوشتی در هفته هشتم نسبت به هفته چهارم بیشتر است و همچنین پیشنهاد کردند که این ژن با متابولیسم انرژی در جوجه‌های گوشتی مرتبط است (۳۳). در تحقیقات مختلفی که در کشورهای پیشرفته بر روی جوامع انسانی انجام شده نشان می‌دهد که جهشهای مختلف در ژن FTO با صفاتی مانند توده بدن، محیط بازو، کمر و ران در ارتباط است (۲۰). برخلاف تحقیق حاضر این پژوهشها نشان می‌دهد که این ژن می-

با توجه به تحقیقات ذکر شده و نقش ژن FTO در سنتز بافت چربی، هر گونه جهش بر روی توالی DNA این ژن، ممکن است بر فعالیت این ژن مؤثر باشد و در نتیجه سنتز بافت چربی را تحت تأثیر قرار دهد. بنابراین انرژی دریافت شده توسط دام ممکن است در جهت سنتز دیگر ترکیبات لاشه مانند پروتئین مورد استفاده قرار گیرد. وی و همکاران (۲۰۱۰) در بررسی که بر روی پنج نژاد گاو بومی چینی انجام دادند، سه ژنوتیپ در SNP (C1071T) بر روی اگزون پنج گاو به روش SSCP-PCR، شناسایی نموده و گزارش کردند که دامهای با ژنوتیپ CC یا CT ماهیچه

آگزونها نیز مورد بررسی قرار گیرد و نیز داده‌های مربوط به بیان ژن و نیز اطلاعات اپی‌ژنتیکی نیز بررسی گردد تا در مورد این ژن در گوسفند و به ویژه در این نژاد بتوان اظهار نظر بهتری داشت. با توجه به پژوهش‌های صورت گرفته در رابطه با این ژن که نشان‌دهنده ارتباط ژن FTO با صفات چاقی در انسان و صفات لاشه در حیوانات مزرعه-ای غیر از گوسفند است. برای مشخص شدن بهتر ارتباط این ژن با صفات لاشه و پارامترهای خونی در گوسفند لازم است تحقیقات بیشتری در مورد سایر قسمت‌های این ژن با تعداد نمونه بیشتر انجام گیرد.

تواند با صفاتی مانند وزن ران، سردست، راسته، دنبه، ضایعات و دیگر صفات لاشه در ارتباط باشد.

نتیجه‌گیری کلی

الکتروفورز محصولات تک رشته‌ای PCR بر روی ژل اکریل آمید، در ناحیه تکثیر شده با آغازگر FT4 سه الگوی بانندی و با آغازگر FT9 دو الگوی بانندی را نشان دادند. آنالیز کلیه صفات اندازه‌گیری شده نشان داد بر خلاف گزارشات مربوط به این ژن در سایر موجودات چند شکلی در محصولات آغازگرهای FT4 و FT9 ژن FTO با هیچ یک از صفات اندازه‌گیری شده در این نژاد از گوسفند در ارتباط نمی‌باشد. البته در این مورد لازم است سایر

منابع

- ۱- سلیمانپور، ا. حجتی، ز. و نصر اصفهانی، م. ح. ۱۳۹۳. شناسایی موتاسیون در آگزون‌های ۱۳ و ۲۳ و بخشی از اینترون ۱۲ از ژن *jhdm2a* در انسان و ارتباط آن با ناباروری مردان. مجله‌ی پژوهش‌های سلولی و مولکولی. ص ۲۴۲ تا ۲۵۱. ۲: ۲۷.
- ۲- نظام‌آبادی، م. هرکی‌نژاد، ط. شهیر، م. ح. خرمتایی، ر. اسکندری-نسب، م. پ. دانش‌مقدم، ل. رستم‌خانی، ر. ۱۳۹۴. ارتباط پلی-مورفیسم 5UTR ژن تیروگلوبولین با خصوصیات لاشه در بره-های آمیخته افشاری × برولا مرینو. مجله‌ی پژوهش‌های سلولی و مولکولی. ص ۴۲۰ تا ۴۲۹. ۳: ۲۸.
- 3- AlaNoshahr, F. Rafat. A. 2014. Polymorphism of DGAT1 Gene and Its Relationship with Carcass Weight and Dressing Percentage in Moghani Sheep Breed. Iranian Journal of Applied Animal Science 4(2), 331-334
- 4- Cecil, J. E. Tavendale, R. Watt, P. Hetherington, M. M. and Palmer, C. N. A. 2008. An Obesity-Associated FTO Gene Variant and Increased Energy Intake in Children. The new england Journal of Medicine. 359: 2558-2566.
- 5- Chu M. X., Xiao L., C. T. Fu Y., Fang L. and Ye S. C. 2007. PCR-SSCP Polymorphism of Inhibin β A Gene in Some Sheep Breeds. Journal of Animal Science. Vol. 20, No. 7 : 1023 – 1029
- 6- Church, C. Moir, L. McMurray, F. Girard, C. Banks, G. T. Teboul, L. Wells, S. Bruning, J. C. Nolan, P. M. Ashcroft, F. M. and Cox, R. D. 2010. Overexpression of Fto leads to increased food intake and results in obesity. Journal of Nature Genetics. 42: 1086–1092.
- 7- Fan, B. Du, Z. Q. and Rothschild, M. F. 2008. The fat mass and obesity-associated (FTO) gene is associated with intramuscular fat content and growth rate in the pig. Journal of Animal biotechnology. 20: 58-70.
- 8- Fan, B. Lkhagvador, S. Cai, W. Young, J. Smith, R. M. Dekkers, C. M. Huff-Lonergan, E. Lonergan, S. M. and Rothschild, M. F. 2009. Identification of genetic markers associated with residual feed intake and meat quality traits in the pig. Journal of Meat Science. 84: 645–650.
- 9- FAO.org. Food Outlook 2014, biannual report on global food markets.
- 10- Fontanesi, L. Scotti, E. Buttazzoni, L. Dall'Olio, S. Bagnato, A. Pietro, D. Fiego, L. Davoli, R. and Russo, V. 2009. Confirmed association between a single nucleotide polymorphism in the FTO gene and obesity-related traits in heavy pigs. Journal of Springer Science + Business Media. 37: 461–466.
- 11- Fontanesi, L. Scotti, E. Buttazzoni, L. Davoli, R. and Russo, V. 2008. The porcine fat mass and obesity associated (FTO) gene is associated with fat deposition in Italian Duroc pigs. Journal of Animal Genetics. 10: 1365-2052.
- 12- Fontanesi, L. Scotti, E. Buttazzoni, L. Davoli, R. and Russo, V. 2009. The porcine fat mass and obesity associated (FTO) gene is associated with fat deposition in Italian Duroc pig. Journal of Animal Genetics. 40: 90–93.

- 13- Fu, Y. Li, L and Ren, S. 2013. Effect of FTO Expression and Polymorphism on Fat Deposition in Suzhong Pigs. *Journal of Animal Science*. Vol. 26, No. 10 : 1365-1373.
- 14- González-Sánchez, J. L. Zabena, C. Martínez-Larrad, M. T. Martínez-Calatrava, M. J. Pérez-Barba, M. and Serrano-Rios, M. 2009. Variant rs9939609 in the FTO gene is associated with obesity in an adult population from Spain. *Journal of Clinical Endocrinology*. 70: 390-393.
- 15- Haupt, A. Thamer, C. Machann, J. Kirchhoff, K. Stefan, N. Tschritter, O. Machicao, F. Schick, F. Häring, H and Fritsche, A. 2008. Impact of Variation in the FTO Gene on Whole Body Fat Distribution, Ectopic Fat, and Weight Loss. *Journal of Obesity*. 16: 1969-1972.
- 16- Holzenberger, M. Hamard, G. Zaoui, R. Leneuve, P. Ducos, B. Beccavin, C. Perin, L. and LeBouc, Y. 2001. Experimental IGF-I receptor deficiency generates a sexually dimorphic pattern of organ-specific growth deficits in mice, affecting fat tissue in particular. *Journal of Endocrinology*. 142: 4469-4478.
- 17- Hubacek, J. A. Bohuslavova, R. Kuthanova, L. Kubinova, R. Peasey, A. Pikhart, H. Marmot, M. G. and Bobak, M. 2008. The FTO Gene and Obesity in a Large Eastern European Population Sample: The HAPIEE Study. *Journal of Obesity*. 16: 2764-2766.
- 18- Jiaa, G. Yanga, C. Yanga, S. Jiana, X. Yia, C. Zhou, Z. and Hea, C. 2008. Oxidative demethylation of 3-methylthymine and 3-methyluracil in single-stranded DNA and RNA by mouse and human FTO. *Journal of Federation of European Biochemical Societies*. 582: 3313-3319.
- 19- Kaakinen, M. Läärä, E. Pouta, A. Hartikainen, A. Laitinen, J. Tammelin, T. H. Herzig, K. Sovio, U. Bennett, A. J. Peltonen, L. McCarthy, M. I. Elliott, P. De Stavola, B. and Jarvelin, M. 2010. Life-Course Analysis of a Fat Mass and Obesity-Associated (FTO) Gene Variant and Body Mass Index in the Northern Finland Birth Cohort 1966 Using Structural Equation Modeling. *American Journal of Epidemiology*. 172: 653-665.
- 20- Kring, S. I. I. Holst, C. Zimmermann, E. Jess, T. Berentzen, T. Toubro, S. Hansen, T. Astrup, A. Pedersen, O. Sørensen, T. I. A. 2008. FTO Gene Associated Fatness in Relation to Body Fat Distribution and Metabolic Traits throughout a Broad Range of Fatness. *Journal of PLoS ONE*. 3: 1-7.
- 21- Macfarlane, D. P. Forbes, S. and Walker, B. R. 2008. Glucocorticoids and fatty acid metabolism in humans: fuelling fat redistribution in the metabolic syndrome. *Journal of Endocrinology*. 197: 189-204.
- 22- Müller, T. D. Hinney, A. Scherag, A. Nguyen, T. T. Schreiner, F. Schäfer, H. Hebebrand, J. Roth, C. L. and Reinehr, T. 2008. Fat mass and obesity associated' gene (FTO): no significant association of variant rs9939609 with weight loss in a lifestyle intervention and lipid metabolism markers in German obese children and adolescents. *Journal of BMC Medical Genetics*. 9: 85-91.
- 23- Peters T, Ausmeier K, Ruther U (1999) Cloning of Fatso (Fto), a novel gene deleted by the Fused toes (Ft) mouse mutation. *Mamm Genome* 10: 983-986.
- 24- Q.L. Xu, G.W. Tang, Q.L. Zhang, Y.K. Huang, Y.X. Liu, K. Quan, K.Y. Zhu, C.X. Zhang. 2011. The FABP4 gene polymorphism is associated with meat tenderness in three Chinese native sheep breeds. *Czech J. Anim. Sci.*, 56, (1): 1-6
- 25- Ranganathan, G. Unal, R. Pokrovskaya, I. Yao-Borengasser, A. Phanavanh, B. Lecka-Czernik, B. Rasouli, N and Kern, P. A. 2006. The lipogenic enzymes DGAT1, FAS, and LPL in adipose tissue: effects of obesity, insulin resistance, and TZD treatment. *Journal of Lipid Research*. 47: 2444-2450.
- 26- Ranjbari M., Hashemi A., Mardani K., and Darvishzadeh R. 2012. Allelic Polymorphism of Makoei Sheep Calpastatin Gene Identified by Polymerase Chain Reaction and Single Strand Conformation Polymorphism. *Journal of Agriculture Science Technology*. Vol. 14: 533-538.
- 27- Ronkainen J, Tuija J. Huusko, Raija Soinen, Eleonora Mondini, Francesca Cinti, Kari A. Ma`kela`et al. 2015. Fat mass- and obesity-associated gene Fto affects the dietary response in mouse white adipose tissue. *Journal of Scientific Reports*. 5:9233.
- 28- Shojaei, m. Mohammad Abadi*, mr. Asadi Fozi, m. Dayani, o. Khezri, a and Masoumeh, a. 2010. Association of growth trait and Leptin gene polymorphism in Kermani sheep. *Journal of Cell and Molecular Research* 2 (1), 67-73
- 29- Simsek S., Ozcetin C., and Balkaya I. 2012. Detection of polymorphism in AgB1 gene from sheep, cattle and human isolates of *Echinococcus granulosus* by SSCP. *Journal of Veterinary Parasitology* 184 (2012) 352- 355.

- 30- Skok, D. J. Kunej, T. Rencelj, A. Razpet, A. Dovc, P. Žgur, S. Petric, N. Planinc, M. Malovrh, S. Kovac, M. and Horvat, S. 2011. Use of SNP Markers Within the Fat Mass and Obesity-associated (FTO) Gene to Verify Pedigrees and Determine Haplotypes in Paternal Half-sib Families of Slovenian Simmental Cattle. *Journal of Agriculturae Conspectus Scientificus*. 4: 333-336.
- 31- Speakman, J. R. Rance, K. A. and Johnstone, A. M. Polymorphisms of the FTO Gene Are Associated With Variation in Energy Intake, but not Energy Expenditure. *Journal of Obesity*. 8: 1961-1965.
- 32- Tania, M. Vijn, R. Mishra, B. Mishra, B. Kumar, S. T. and Sodhi, M. 2006. DGAT1 and ABCG2 polymorphism in Indian cattle (*Bos indicus*) and buffalo (*Bubalus bubalis*) breeds. *Journal of BMC Veterinary Research*. 2: 1-5.
- 33- Tiwari, A. Krzysik-Walker, S. M. and Ramachandran, R. 2012. Cloning and characterization of chicken fat mass and obesity associated (Fto) gene: fasting affects Fto expression. *Journal of Domestic Animal Endocrinology*. 42: 1-10.
- 34- Wei, S. Zan, L. Javed Ahmed Ujan, J. A. Wang, H. Yang, Y. and Adoligbe, C. 2011. Novel polymorphism of the bovine fat mass and obesity-associated (FTO) gene are related to backfat thickness and longissimus muscle area in five Chinese native cattle breeds. *African Journal of Biotechnology*. 10(15): 2820-2824.
- 35- Zhang, B. Zhang, Y. Zhang, L. Wang, J. Li, Z. and Chen, H. 2011. Allelic Polymorphism Detected in the Bovine FTO Gene. *Journal of Molecular Biotechnology*. 49: 257-262.
- 36- Zhang, G. Karns, R. Nina Smolej Narancic, N. S. Guangyun Sun, G. Cheng, H. Sasa Missoni, S. Durakovic, Z. Rudan, P. Chakraborty, R. Deka, R. 2010. Common SNPs in FTO Gene Are Associated with Obesity Related Anthropometric Traits in an Island Population from the Eastern Adriatic Coast of Croatia. *Journal of PLoS ONE*. 5: 1-9.
- 37- Zhang, L. Miao, X. Hua, X. Jiang, X. Lu, Y. and Xu, N. 2009. Polymorphism in 5' Regulatory Region of the Porcine Fat Mass and Obesity Associated (FTO) Gene is Associated with Intramuscular Fat Content in a Jinhua x Pietrain F(2) Reference Population. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 11: 2329-2334.

Evaluation of the Association of Polymorphism in FTO Gene with Carcass Traits and Blood Parameters in Afshari× Booroola Merino cross lambs

Salmani V.¹, Harkinezhad T.², Saleh M.³, Eskandarinasab M.P.² and Salimi D.⁴

¹ Research Institute of Modern Biological Techniques, University of Zanjan, Zanjan, I.R. of Iran

² Animal Science Dept., Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, I.R. of Iran

³ Genetic and Animal Breeding Dept., University of Sari, Sari, I.R. of Iran

⁴ Bioinformatics Dept., University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

FTO gene is a transcription factor in genes associated with synthesise of lipids. In the present study, we investigated the relationship between polymorphism in fourth and ninth exons of FTO gene with carcass traits. To do that, 97 male cross lambs (Afshari × Booroola Merino) of almost the same age were used. Blood samples were taken from all animals for DNA extraction and blood parameters were measured. Primers pairs for fourth exon and ninth exon were designed based on DNA sequences available for cow; the lengths of the target DNA were 518 and 468 bp respectively. Polymorphism in this area was identified using amplification of target DNA by PCR. Conformational differences were studied by denaturation and monitoring of the PCR products using SSCP technique and loading on 10 % acrylamide gel. In the fourth exon, three genotypes namely AB, AA and AC and in the ninth exon area two genotypes, DD and DE were observed. There was no significance difference observed between these genotypes in terms of carcass traits and blood parameters. Although in other species except sheep there is a relationship between allele of this gene and fat and obesity traits but was not found any relationship in studied area of this gene with fat traits, birth weight and weight before slaughter in sheep. However, to have a better conclusion about this gene and it's relation with fat content of carcass in sheep further study with large number of samples and on other parts of this gene is necessary.

Key words: *Afshari× Booroola Merino cross lambs, FTO, carcass traits, polymorphism, SSCP*