



<http://doi.org/10.3658/j.kunu.2021.03.08>

كلية الكونز الجامعة

Journal homepage: <http://journals.kunoozu.edu.iq/1/archive>



تعدد الأشكال الوراثية لجين اللبتين في اغنام العربي

نور ماجد عواد^أ، اسعد يحيى عايد^ب

^أ قسم تقنيات المختبرات الطبية، كلية الكونز الجامعة، البصرة، العراق

^ب قسم الانتاج الحيواني، كلية الزراعة، جامعة البصرة، العراق

الخلاصة :

أجريت الدراسة الحالية على ثلاث مجاميع من الأغنام العربية منها 54 في الحقل الحيواني التابع لكلية الزراعة/جامعة البصرة في موقع كرمة علي، و40 من مجزرة البصرة و15 حملاً من محافظة ميسان، (بمتوسط عمر 5 أشهر ووزن $20 \pm 3,4$ كغم). للكشف عن التشكل الوراثي لجين اللبتين بتقنية التفاعل السلسلي للبوليميريز - تشكل الخيط المفرد الموافق للحامض النووي. اذ وجد تشكل وراثي لجين اللبتين في الأغنام العربية وظهور تركيبين وراثيين هما AA و AB. وأوضحت النتائج عدم إتران المجاميع المدروسة ضمن سلالة العربي عدا المجموعة المشتركة من ميسان.

الكلمات المفتاحية: هرمون اللبتين، تقنية SSCP، التشكل الوراثي لجين اللبتين
البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الاوّل

1. المقدمة Introduction

تعد عملية إنتخاب الحيوانات الزراعية ذات الكفاءة الوراثية العالية من الأمور الأساسية في تربية الحيوان التي تطورت خلال السنوات الماضية باستخدام القيم المظهرية المصححة ومقارنة الأفراد المستخدمة في تقدير القيم التربوية للصفات ذات الأهمية الإقتصادية، ونتيجة لتطور علم الوراثة الجزيئية أصبح بالإمكان تحديد الواسمات الوراثية ذات الإرتباط العالي بجزء أو أكثر من تركيب الحامض النووي DNA للجينات ذات التأثير الرئيسي في الصفات الإقتصادية [1]. إزداد الإهتمام في الآونة الأخيرة بهرمون وجين اللبتين كمفتاح للسيطرة الأحيائية التي ترتبط بالصفات المهمة في تربية الحيوان، مثل العلف المتناول ومحتوى الدهن في اللحم ونوعية اللحوم [2]. ومن ناحية أخرى، إعتبر التشكل الوراثي لهذا الجين دليلاً إلى الإختلافات النسبية بين الأفراد للصفات أعلاه، وأصبحت واسمات هذا الجين جزءاً من خطط تحديد التراكيب الوراثية تجارياً لتصميم ما يسمى بالواسمات الداعمة للإنتخاب Marker Assisted Selection في أنواع عديدة من الحيوانات الزراعية [3,4]. وإختير جين اللبتين leptin في هذه الدراسة لأنه أوضح إشتراكه في تنظيم الشهية والأبيض والنمو وصفات الذبائح وأوضحت الدراسات السابقة تأثيره على التعبير الجيني في مستويات الترجمة أو الاستنساخ ومحصلة هذا التأثير تطراً على الصفات الإقتصادية للحيوان بشكل ملحوظ [5]. إرتبطت النتائج والإستنتاجات الخاصة بواسمات جين اللبتين مع العوامل البيئية مثل التغذية وطبيعة نشأة التكوين الوراثي للحيوانات الذي يعد مصدراً مهماً للتداخل الوراثي- البيئي، إذ إعتد نظام الإنتاج بصورة كبيرة على مستوى التغذية من الناحية

*المؤلف الرئيسي.. البريد الإلكتروني: noor.m.a@kunoozu.edu.iq

مراجعة الأقران تحت مسؤولية © KSJ كلية الكونز الجامعة - مجلة الكونز العلمية. استضافته مجلة الكونز العلمية. كل الحقوق محفوظة.

الكمية والنوعية. في حالة إعتقاد الأصول الوراثية للحيوانات، فيمكن إعتبار إن الحيوانات الزراعية المحلية والمتمثلة بالأغنام والأبقار والجاموس وغيرها غير معروفة الأصول والتكوين الوراثي، أي بإعتبارها حيوانات لم يجر عليها أي عمليات تحسين وراثي ممنهج من خلال الإنتخاب أو التضريب. وإنما تركت إلى الظروف البيئية لتتأقلم معها، وأدى ذلك إلى الإنعكاس السلبي على العديد من الصفات الإنتاجية والفسلجية وغيرها. ومن جهة أخرى، إزداد الإهتمام مؤخرًا بالواسمات الوراثية للحيوانات الزراعية العراقية المحلية من أجل تحسين أداؤها واختيار التراكيب الوراثية الملائمة للظروف المحلية وإمكانية تحسين إنتاجها [6,7,8]. لذلك تركزت أهداف هذه الدراسة في كشف التشكل الوراثي لجين اللبتين في الأغنام العربية.

2. طرائق العمل:

أجري العمل المختبري في مختبر الوراثة الجزيئية في قسم الثروة الحيوانية في كلية الزراعة في جامعة البصرة.

حيوانات التجربة:

تم شراء 15 حملاً "ذكرباً" من محافظة ميسان بمتوسط عمر 5 أشهر و بمتوسط وزن $3,4 \pm 20$ كغم. كذلك جمعت 54 من عينات الدم عشوائياً من الأغنام العربية التابعة للحقل الحيواني في كلية الزراعة وتم إكمال عدد عينات الدم من مجزرة البصرة لتصبح 109 عينة.

استخلاص وتنقية DNA من الدم

إستخلص الحامض النووي منقوص الأوكسجين من الدم بأستعمال العدة المجهزة من قبل شركة Promega الأمريكية وحسب الخطوات الموضحة بالعدة المجهزة مع إجراء بعض التعديلات اللازمة. بعدها كشف عن وجود الـ DNA بتقنية الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز 1% باستخدام صبغة بروميد الاثيديوم [9].

تصميم البادئ

إختبرت تتابعات بادئ جين اللبتين إستناداً إلى التسلسل الجيني المتوفر للأغنام بواسطة شركة Bio near الكورية. (Gene Bank accession numbers: U84247 and AY831682) تسلسل بادئ جين اللبتين كالتالي للشريط العلوي
 5'-CGCAAGGTCCAGGATGACACC-3' والشريط السفلي
 5'-GTCTGGGAGGGAGGAGAGTGA-3'.
 طول القطعة المضخمة amplicons كانت 260 bp غطت الإكسون الثاني exon2 وجزء من الإنترون الثاني intron2 من جين LEP الضائي .

التفاعل السلسلي للبوليميريز PCR – Polymerase Chain Reaction:

ضخمت نسخ جين اللبتين بإستخدام تقنية التفاعل السلسلي للبوليميريز Polymerase chain reaction بواسطة جهاز المبلر الحراري . وإستخدمت تقنية الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز (Agaros) بتركيز 2% لتحديد نجاح عملية تضخيم الحامض النووي الرايبوزي منقوص الأوكسجين بعدها استخدمت تقنية SSCP لتحديد الأشكال الوراثية لموقع اللبتين وطبقت الطريقة على ناتج PCR وفقاً ل [10,11] مع إجراء بعض التعديلات اللازمة.

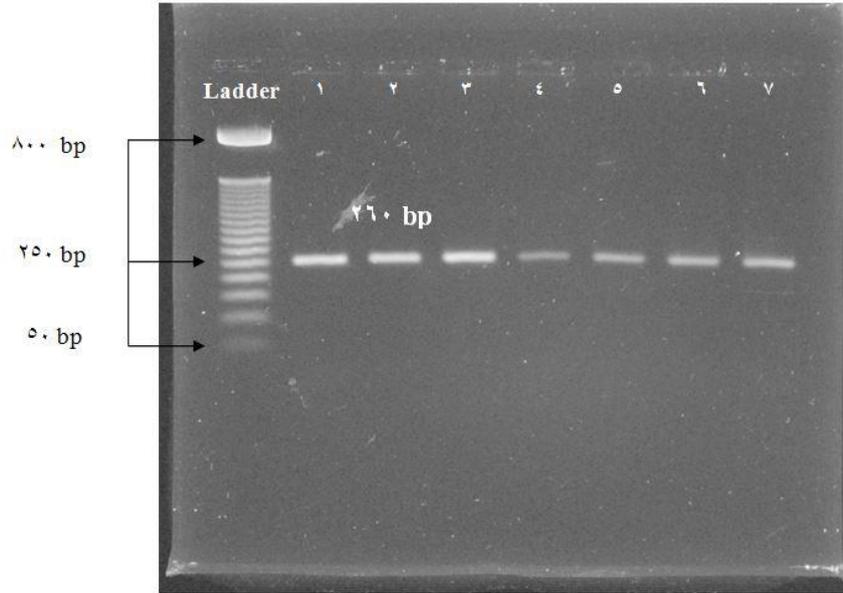
التحليل الإحصائي

إستخدم البرنامج pop gene [12]

النتائج Results

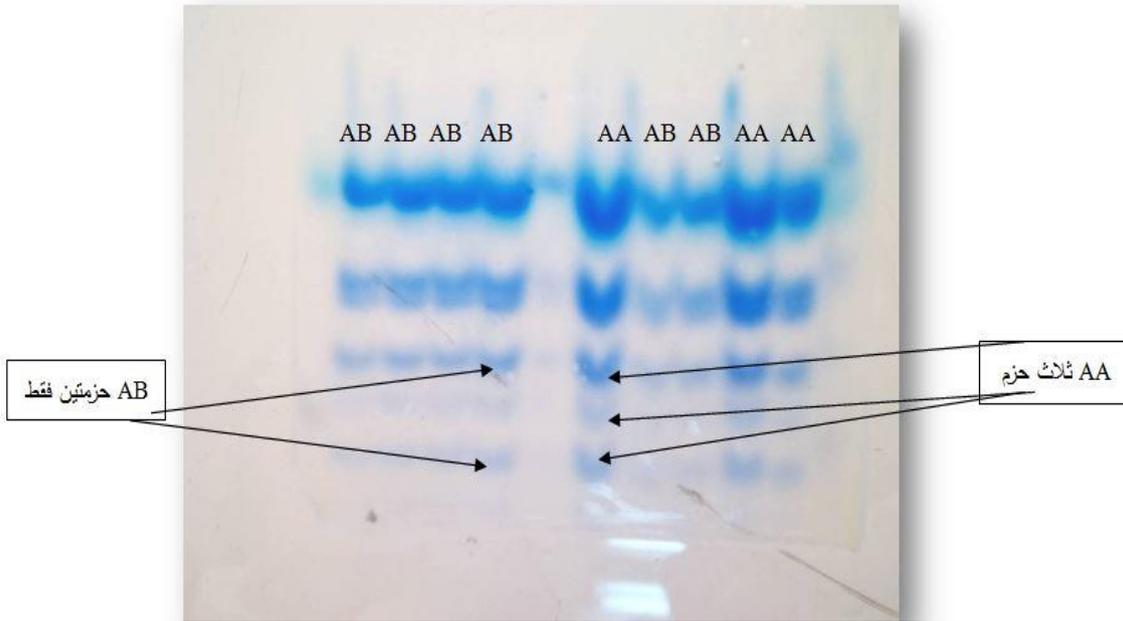
منتج التضخيم

يوضح الشكل (1) منتج التضخيم لبادئ جين اللبتين على هلام الأكاروز بحجم 260 زوج قاعدي باستخدام المعلم DNA Marker (50bp) Ladder، إذ أظهرت جميع عينات DNA المستخلصة من دم الأغنام حزمة مفردة خاصة من دون أي حزم غير محددة.



الشكل 1. صورة لمنتج التضخيم PCR لبادئ جين اللبتين على هلام الأكاروز
التشكل الوراثي باستخدام تقنية PCR – SSCP

استخدمت نماذج PCR في تحليل تقنية SSCP، إذ وجد تباين للإنترون الثاني لجين اللبتين في الأغنام العراقية بتقنية PCR – SSCP. إذ يلاحظ من الشكل 2 تركيبين وراثيين هما AA و AB ومسؤول عنهما أليلين (A و B) قد تم تحديدهما في بادئ جين اللبتين المستخدم في الدراسة لعينات محافظتي البصرة وميسان، كما يلاحظ إن التركيب الوراثي AA يتكون من 3 حزم أما التركيب الوراثي AB فيتكون من حزمتين فقط.



الشكل 2 . صورة للتشكل الوراثي لبادئ جين اللبتين بتقنية PCR – SSCP على هلام الأكريلاميد الوصف الوراثي للتراكيب الوراثية لحيوانات التجربة مجموعة حيوانات المجزرة

بلغت أعداد الحيوانات ذات التركيب الوراثي AB المشاهدة 28 والمتوقعة 18,43 وهي أعلى من أعداد الحيوانات ذات التركيب الوراثي AA (12 و16,78) المشاهدة والمتوقعة على التوالي، في حين لم يظهر التركيب الوراثي BB في عينة الدراسة، كذلك نلاحظ من الجدول (1) إن قيم مربع كاي أو ما يطلق عليه إختبار التتابع الأمثل X^2 وقيمة مربع الإحتمالية G^2 likelihood عالية جداً (11,12) و (15,37) على التوالي، وهي أكبر من X^2 الجدولية (3,84) والذي يوضح عدم إتزان العشيرة لاسيما مع إنعدام التركيب الوراثي BB.

الجدول 1- التراكيب الوراثية لحيوانات مجموعة المجزرة وأعدادها المشاهدة (O) والمتوقعة (E) وقيمة مربع كاي X^2 وقيمة مربع الإحتمالية G^2 likelihood

G^2	X^2	Exp. (E)	Obs. (O)	التراكيب الوراثية
8,05-	1,36	16,78	12,00	AA
23,42	4,97	18,43	28,00	AB
0,00	4,78	4,78	0,00	BB
15,37	11,12	40,00	40,00	المجموع 78

مجموعة حيوانات الحقل الحيواني

نلاحظ من الجدول (2) إن أعداد الحيوانات ذات التركيب الوراثي AB المشاهدة 42 والمتوقعة 25,91 أعلى من أعداد الحيوانات المشاهدة والمتوقعة ذات التركيب الوراثي AA (12 و 20,04) على التوالي. في حين لم يظهر التركيب الوراثي BB في عينة الدراسة، وكذلك نلاحظ من الجدول (8) إن قيم مربع كاي أو ما يطلق عليه إختبار التوافق الأمثل X^2 وقيمة مربع الإحتمالية G^2 likelihood عالية جدا" (21,27) و (28,27) على التوالي، وهي أكبر من X^2 الجدولية (3,84). نلاحظ عدم إتزان هذه العشيرة حسب إتزان هاردي واينبرغ.

جدول 2- التراكيب الوراثية للحيوانات لمجموعة الحقل الحيواني وأعدادها المشاهدة (Obs. (O) والمتوقعة (Exp. (E) وقيمة مربع كاي X^2 وقيمة مربع الإحتمالية G^2 likelihood

التراكيب الوراثية	Obs. (O)	Exp. (E)	X^2	G^2
AA	12	20,04	3,23	12,32-
AB	42	25,91	10,00	40,59
BB	صفر	8,05	8,05	0,00
المجموع	54	54,00	21,27	28,27

مجموعة حيوانات ميسان

نلاحظ من الجدول (3) إن أعداد الحيوانات ذات التركيب الوراثي AB المشاهدة 10 والمتوقعة 6,90 أعلى من أعداد الحيوانات المشاهدة والمتوقعة ذات التركيب الوراثي AA (5 و 6,55) على التوالي. في حين لم يتشكل التركيب الوراثي BB في عينة الدراسة، وقيم مربع كاي أو ما يطلق عليه إختبار التوافق الأمثل X^2 و G^2 منخفضة (3,32) و (4,73) على التوالي. ويتبين أيضا" من الجدول أن قيم X^2 المحسوبة (3,32) أصغر من X^2 الجدولية (3,84).

الجدول 3- التراكيب الوراثية للحيوانات لمجموعة ميسان وأعدادها المشاهدة (Obs. (O) والمتوقعة (Exp. (E) وقيمة مربع كاي X^2 وقيمة مربع الإحتمالية G^2 likelihood

التراكيب الوراثية	Obs. (O)	Exp. (E)	X^2	G^2
AA	5	6,55	0,37	2,70-
AB	10	6,90	1,40	7,43
BB	0,00	1,56	1,55	0,00
المجموع	15,0	15,0	3,32	4,73

تضخيم البادئ

أظهرت نتائج الدراسة نجاح تضخيم البادئ primer لموقع جين اللبتين للأغنام العراقية وقد كان منتج التضخيم بحجم 260 زوجاً "قاعدياً" من الإكسون الثاني وجزء من الإنترون الثاني لجين اللبتين وقد إتفقت هذه النتائج مع [13] إذ درس الباحث على البادئ نفسه المستخدم في دراستنا لسلاسل مختلفة من الأغنام ومن مناطق مختلفة مثل سلالاتي السفولك والدورست في كندا. مما تجدر الإشارة إليه أن هاتين الدراستين هما الوحيدتان اللتان درستا على البادئ المستخدم في هذه الدراسة. وهذا يدل على أن بادئ جين اللبتين المستخدم في الدراسة موجود فعلاً" في جينوم الأغنام العراقية بغض النظر عن المنطقة الجغرافية. من ناحية أخرى، هناك وجه تشابه بين الأغنام العراقية والسلاسل الإيرانية المذكورة أعلاه هو إنها ذات آلية.

التشكل الوراثي

استخدمت تقنية تشكل الخيط المفرد الموافق Single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) لغرض تحليل الأشكال الوراثية لبادئ جين اللبتين المتمثل بالإكسون الثاني وجزء من الإنترون الثاني. من النتائج المستحصل عليها من هذه الدراسة يتبين لنا إن هناك تركيبان وراثيان لموقع جين اللبتين في الأغنام العراقية متمثل بالتركيب الوراثي السائد AA متكون من ثلاثة حزم والتركيب الوراثي الخليط AB متكون من حزمتين فقط.

بين تحليل هذه التقنية مستوى منخفض من التشكل لجين اللبتين في الأغنام العراقية وقد يعود ذلك إلى إنعدام التضريب أو الانتخاب والتباين الوراثي الواسع للأغنام العراقية وقد يعزى ضعف التشكل الوراثي أو انخفاض أعداد الأليلات إلى العدد القليل من الحيوانات، ولا تتفق النتائج مع [14] إذ وجدوا عشرة تشكيلات وراثية في سلالة كيرمان الإيرانية ويرجع السبب إلى إختلاف نوع السلالة وقطعة البادئ المستخدمة في الدراسة. يتضح لنا أن هناك أليلين مسؤولين عن موقع بادئ جين اللبتين المستخدم في هذه الدراسة هما الأليل A والأليل B ونتيجة لعدم تحديد مواقع القواعد النيروجينية التي حدثت فيها الطفرات ونتج عنها التشكل الوراثي لذا سميت التركيب الوراثية بهذه الطريقة التي تطابق التشكل الوراثي في دراسات أخرى. درس [15] أيضاً على الإكسون الثالث لجين اللبتين الضائي للسلالة النيوزلندية وإكتشف خمسة أنماط أو تراكيب وراثية مبنكرة من SSCP تمثل خمس تتابعات مختلفة وإقترح إن هذه التتابعات تمثل أليلات لهذا الجين واكتشف أربعة من (SNPs) ثلاثة منها نتجت بفعل تغيرات في الحوامض الأمينية وأكدوا أن هذا التباين ربما يؤثر على نشاط وظيفة اللبتين. أغلب المصادر التي تتعلق بالتشكل الوراثي لجين اللبتين محصورة بالماشية [16، 17، 18، 19] والدراسات على الأغنام قليلة.

مُيزت عدة SNPs في جين *leptin* البقري تتضمن هذه أربعة SNPs على الإكسون الثاني [20]. تمكن [21] من إكتشاف إثنان SNPs في الإكسون الثالث للأغنام في الموقع SNP G(170)A و SNP (332)A و SNP G وحللت بتقنية PCR-RFLP باستخدام الأنزيم القاطع MspI وأشار الباحث إلى أن كلا التشكلين حدد طفرات نقطية عديمة المعنى في موقع القطع (Arg>Gly) أي لا تؤثر في التعبير الجيني. في الدراسة الحالية وجد إثنان من تشكيلات النيوكليوتيدات المفردة SNP التي تختلف عن الدراسات الأخرى وقد يعود السبب في إختلاف النتائج إلى إختلاف السلالة المدروسة وإحتمال حدوث طفرات أدت إلى تغيير في التركيب الوراثي للحامض النووي الرايبوزي منقوص الأوكسجين في بعض التجمعات الأوربية.

الوصف الوراثي للتركيب الوراثية لمجموعة حيوانات المجزرة والحقل الحيواني وميسان

كانت قيم مربع كاي أو ما يطلق عليه إختبار التطابق الأمثل (G^2 و X^2) عالية جداً" لمجموعتي المجزرة والحقل الحيواني بسبب عدم تشكل التركيب الوراثي BB وإحتمالية عدم وجود تربية داخلية ويعززها قيمة Fis السالبة. يتبين أيضاً ان العشيرة غير متزنة وذلك لان قيم X^2 المحسوبة اكبر من X^2 الجدولية وقد يخرج سبب عدم إتزان هذه المجموعة حسب إتزان هاردي واينبرغ إلى عدم تشكل التركيب الوراثي BB وقد يرجع السبب إلى وجود أليل ملغي غير ملحوظ (الأليل غير مضخم) أو قد يكون نتيجة التزاوج غير العشوائي ولعدة سنوات في عشائر الأغنام العراقية وهذه النتيجة لا تتفق مع [22] إذ كانت قيم مربع كاي لديهم 1,38

و0,62 و0,63 لسلاسل الأغنام الإيرانية شال وزاندي وزيل على التوالي مما يدل على إن عشائهم متزنة. يمكن أن يوضح غياب توازن هاردي في العشيرة بالأخذ بالحسبان التزاوج غير العشوائي وتأثير الانتخاب إضافة الى عامل الهجرة والطفرات، وانه من الواضح لا يمكن أن يكون هذا التفسير هو الإعتبار النهائي لأن الحيوانات الأخرى وعلى الأقل التي لديها أكثر من SNP واحد من الضروري أن تحلل لإعطاء تفسير معقول حول قلة التركيب الوراثي AA. أما مجموعة حيوانات ميسان فكانت فيها قيم مربع كاي أو ما يطلق عليه إختبار التوافق الأمتل X^2 و G^2 منخفضة بسبب عدم تشكل التركيب الوراثي BB. يتبين أيضا إن العشيرة متزنة وذلك لأن قيم X^2 المحسوبة اصغر من X^2 الجدولية وهذه النتيجة تتفق مع اعلاه إذ كانت قيم مربع كاي لديهم 1,38 و0,62 و0,63 لسلاسل الأغنام الإيرانية شال وزاندي وزيل على التوالي مما يدل على إن عشائهم متزنة. أورد [23] إنه لا يوجد إنحراف معنوي ($P>0.05$) لإختبار مربع كاي لتوازن هاردي واينبرغ لموقع جين اللبتين في عشيرة أغنام Makoei الإيرانية.

4. الإستنتاجات

وجد تركيبان وراثيان AA و AB لبداي الأوسون الثاني وجزء من الإنترون الثاني لجين اللبتين في الأغنام العربية. كما يلاحظ عدم إتزان المجاميع ضمن العشيرة الكلية لسلالة العربي عدا مجموعة محافظة ميسان.

5. شكر وتقدير:

أود ان اشكر كل من قدم يد المساعدة لإنجاز هذا البحث ولاسيما الكادر التدريسي في قسم الانتاج الحيواني وكادر الحقل الحيواني لما قدموه من مساعدة في جمع العينات واجراء التحاليل المطلوبة.

6. المصادر

1. Field, TG. Beef Production and Management Decisions. 5th Ed. Prentice Hall (2007).
2. Geary TW, McFadin EL, MacNeil MD, Grings EF, Short RR, Funston RN and Keisler DH. Leptin as a predictor of carcass composition in beef cattle. J Anim Sci.2003;81: 18.
3. Schenkel FS, Miller SP, YeX, Moore SS, Nkrumah JD, Li C, Yu J, Mandell IB, Wilton JW and Williams JL. Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. J Anim Sci 2005; 83: 2009-2020.
4. Nkrumah JD, LiC, Yu J, Hansen C, Keisler DH, Moore SS. Polymorphisms in the bovine leptin promoter associated with serum leptin concentration, growth, feed intake, feeding behavior, and measures of carcass 1 81 J Anim Sci.2005; 83: 20-28.
5. Chilliard Y, Delavaud C and Bonnet M. Leptin expression in ruminants: nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. In: Domest Anim Endocrinol 2005; 29: 3-22.
6. الحمد, بشار فالح زغير , دراسة العلاقة بين التراكيب الوراثية لبروتينات الحليب وإنتاج الحليب ومكوناته في الأغنام العربية. رسالة ماجستير, كلية الزراعة, جامعة البصرة 2009.

7. المياح, فالح حسن حمد , دراسة بعض العوامل الوراثية لبروتينات حليب ودم الجاموس العراقي وعلاقتها ببعض الصفات الإنتاجية. رسالة ماجستير, كلية الزراعة, جامعة البصرة. 2010 .
8. دراغ, ميثم عبد الكاظم , التنوع الوراثي في الجاموس العراقي بإستخدام تقنية التفاعل السلسلي للبوليمريز والتتابعات الدقيقة. رسالة ماجستير, كلية الزراعة, جامعة البصرة. 2011.
9. Williams JGK, Kubelik AR, Liak KJ, Rafalski J and Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as enatic marker Nucleic Acids Research 1990; 18: 6531-6535.
 10. Vega FT, Iniesta P, Calde T, Sanchez A, Lopez JA, Juan CD, Rubio DE, Torres A, Bali bred JL and Benito M . P53 exon5 mutations as a prognostic indicator for lung cancer. Br J Cancer 1997; 53: 44-51.
 11. Al-Badran A E. Studies on the molecular genetics of urinary bladder cancer . Panjab University. Ph.D. Thesis 2003.
 12. Yeh FC, Yang R and Boyle T. POPGENE, Version 1.31. Microsoft Windows- based Freeware for Population Genetics Analysis. Molecular Biology and Technology Center, University of Alberta, Canada.1999.
 13. Shojae M, Abadi MM, Fozzi MA, Dayani O, Khezri A and Akhondi M. Association of growth trait and *Leptin* gene polymorphism in Kermani sheep. J Cell Mol Med 1999; 2 : 67-73.
 14. BoucherD, Palin MF, Castonguay F, Gariépy C and Pothier F. Detection of polymorphisms in the ovine leptin (*LEP*) gene: Association of a single nucleotide polymorphism with muscle growth and meat quality traits. Can J Anim Sci 2006 ;86: 31-35.
 15. Zhou H, Hickford JGH and Gong H. Identification of allelic polymorphism in the ovine leptin gene. Mol, Biotech 2009;41: 22-25.
 16. Fitzsimmons CJ, Schmutz SM, Bergen RD and McKinnon JJ. A potential association between the BM 1500 microsatellite and fat deposition in beef cattle. Mamm Genome 1998 ; 9: 432- 434.
 17. Buchanan FC, Fitzsimmons CJ, van Kessel AG, Thue, TD, Winkelman-Sim, DC. and Schmutz SM. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. ⁸² Sel Evol, 2002; 34: 105-116.
 18. Liefers SC, Veerkamp R, Tepas MF, Chilliard Y and Van Der Lend T .Genetics and physiology of leptin in periparturient dairy cow. Domest Anim Endocrinol 2005;29: 227-328.
 19. Nassiry MR, Eftekhari Shahroud F, Heravi Mousavi A, Sadeghi B and Javadmanesh A. The diversity of *leptin* gene in Iranian native, Holstein and Brown Swiss cattle. Afr J Biotechnol 2008;7: 2685-2687.
 20. Haegeman A, van Zeveren A and Peelman LJ. New mutation in exon 2 of the bovine leptin gene. Anim Genet 2000;31: 79.

21. Soattin M. The use of molecular markers for analyzing genes and genomes of livestock Discovering of novel leptin gene-based SNPs and sequencetagged site genotyping of dairy sheep (*Ovis aries* L.) populations. Universita' Degli Studi Di Padova. Ph.D. Thesis 2008.
22. Barzehka R, Salehi A and Mahjoubi F. Polymorphisms of the ovine *leptin* gene and its association with growth and carcass traits in three Iranian sheep breeds. J Biotechnol 2009 ;7 : 241-246
23. Hashemi A, Karim M, Farhadian M, Ashrafi I and Ranjbari M, (Allelic polymorphism of Makoei sheep leptin gene identified by Polymerase Chain Reaction and Single Strand Conformation Polymorphism. Afr J Biotechnol 2011; 10:17903-17906 .