

The effect of Cannabis seed on *DLK1* gene expression in heart tissue of Kermani lambs

Seyed Ali Asghar Jafari Ahmadabadi

MSc Student, Animal Science Department, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. E-mail address: salijafari6774@gmail.com

Heshmatollah Askari-Hemmat

Assistant professor, Animal Science Department, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. E-mail address: h.askari@uk.ac.ir

Mohammadreza Mohammadabadi 

*Corresponding Author: Professor, Animal Science Department, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. E-mail address: mrm@uk.ac.ir

Masood Asadi Fozi

Professor, Animal Science Department, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. E-mail address: masadi@uk.ac.ir

Mehdi Mansouri

Assistant professor, Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. E-mail address: m.mansouri@uk.ac.ir

Abstract

Objective

Cannabis seeds have high amounts of crude protein and energy, so they can better resist the microbial digestion of the rumen and pass through the intact rumen to a greater extent and be digested and absorbed in the intestine. This means they can improve livestock performance. Therefore, they can be used for this purpose. On the other hand, *DLK1* gene plays an important role in controlling cell differentiation processes, including muscle and nerve differentiation, adipogenesis, hematopoiesis, and bone differentiation throughout fetal and adult life. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of cannabis seeds on *DLK1* gene expression in the heart tissue of Kermani lambs.

Materials and Methods

To carry out this research, 12 six-month-old Kermani lambs of equal weight were used in a completely randomized design in three experimental groups. After slaughter, sampling of heart

tissue (with 3 repeats) was done from both groups. The samples were quickly placed in liquid nitrogen and then stored in a -80 freezer. Total RNA was extracted using a standard kit. The quality and quantity of extracted RNA was evaluated. cDNA synthesis kit of Fermentase Company was used for cDNA synthesis. Real time PCR reaction using Syber Green method was used to check the relative level of gene expression. To analyze the data obtained from real time PCR, the method of Pfaffl et al. was used.

Results

The ratio of A260/A280 for the extracted RNAs was equal to 1.9-1.8, which indicates their appropriate and desirable quality. The results of real time PCR curves and electrophoresis of PCR products on agarose gel showed that *DLK1* gene is expressed in heart tissue. The results of the present study also showed that feeding cannabis at the level of 1% significantly ($P<0.05$) increases the expression of *DLK1* gene in the heart tissue by 4.74 times compared to the control group.

Conclusions

Based on the results of the present study, it can be concluded that cannabis can be used in the diet of sheep to improve the structure of the heart through positive effects on the expression of the *DLK1* gene. In addition, the interesting results of the present study in response to the use of Cannabis seeds in the diet of sheep open a new path for wider research in this field.

Keywords: Cannabis, heart tissue, *DLK1* gene, Kermani lamb

Paper Type: Research Paper.

Citation: Jafari Ahmadabadi SAA, Askari-Hemmat H, Mohammadabadi M, Asadi Fozi M, Mansouri Babhootki M (2023) The effect of Cannabis seed on *DLK1* gene expression in heart tissue of Kermani lambs. *Agricultural Biotechnology Journal* 15 (1), 217-234.

Agricultural Biotechnology Journal 15 (1), 217-234. DOI: 10.22103/jab.2023.21265.1471

Received: January 18, 2023.

Received in revised form: February 27, 2023.

Accepted: February 28, 2023.

Published online: February 30, 2023.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors

تاثیر شاهدانه بر بیان ژن *DLKI* در بافت قلب بره‌های کرمانی

سید علی اصغر جعفری احمدآبادی

دانشجوی کارشناسی ارشد بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران. تلفن: ۰۹۱۳۹۳۴۲۵۹، ایمیل:

salijafari6774@gmail.com

حشمت‌اله عسکری همت

استادیار بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران. تلفن: ۰۹۱۱۷۰۵۸۶۵۹، ایمیل:

h.askari@uk.ac.ir

محمد رضا محمدآبادی 

*نویسنده مسئول: استاد بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران. تلفن: ۰۹۱۳۳۹۸۷۵۳۴، ایمیل:

mrm@uk.ac.ir

مسعود اسدی فوزی

استاد بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران. تلفن: ۰۹۱۳۲۴۱۰۷۷۴، ایمیل:

masadi@uk.ac.ir

مهدی منصوری

استادیار بخش مهندسی بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران. تلفن: ۰۹۱۳۱۹۸۷۳۰۷، ایمیل:

m.mansouri@uk.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۲۸ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۱/۱۲/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۰۹

چکیده

هدف: دانه شاهدانه دارای مقادیر بالایی از پروتئین خام و انرژی است، لذا در مقابل هضم میکروبی شکمبه بهتر می‌تواند مقاومت کند و به میزان بیشتری از شکمبه دست نخورده عبور کند و در روده مورد هضم و جذب قرار گیرد. این بدان معنی است که می‌تواند عملکرد دام را بهبود بخشد، لذا برای این منظور می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند. از سوی دیگر، ژن *DLKI* نقش مهمی در کنترل فرآیندهای تمایز سلولی از جمله تمایز عضلانی و عصبی، آدیپوژنز، خون‌سازی و تمایز استخوانی در سرتاسر دوران جنینی و بزرگسالی دارد. بنابراین، هدف این مطالعه، بررسی تاثیر شاهدانه بر بیان ژن *DLKI* در بافت قلب گوسفند کرمانی بود.

مواد و روش‌ها: برای انجام این تحقیق از ۱۲ راس بره نر نژاد کرمانی شش ماهه و وزن برابر در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه گروه آزمایشی استفاده شد. پس از کشتار، نمونه برداری از بافت قلب (با ۳ تکرار) از هر دو گروه ۶ تایی انجام شد. نمونه‌ها به سرعت در ازت مایع قرار گرفتند و سپس در فریزر ۸۰- ذخیره شدند. RNA کل با استفاده از کیت استاندارد استخراج شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده مورد ارزیابی قرار گرفت. برای سنتز cdNA از کیت سنتز cdNA شرکت فرمنتاز استفاده شد. برای بررسی میزان نسبی بیان ژن‌ها از واکنش real time PCR به روش Syber Green استفاده شد و داده‌های حاصل از real time PCR به روش Pfaffl et al. مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج: نسبت A260/A280 برای RNAهای استخراج شده برابر ۱/۸-۱/۹ بود که نشان دهنده کیفیت مناسب و مطلوب آن‌ها است. نتایج منحنی‌های real time PCR و الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز نشان داد که ژن *DLKI* در بافت قلب بیان شده است. نتایج مطالعه حاضر همچنین نشان داد که تغذیه شاهدانه در سطح ۱ درصد به طور معنی داری ($P < 0.05$) بیان ژن *DLKI* را در بافت قلب نسبت به گروه شاهد به میزان ۴/۷۴ برابر افزایش داد.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان داد، دانه شاهدانه می‌تواند در رژیم غذایی گوسفند برای بهبود ساختار قلب از طریق اثرات مثبت بر بیان ژن *DLKI* استفاده شود. علاوه بر این، نتایج مطالعه حاضر در پاسخ به استفاده از شاهدانه در جیره غذایی گوسفند، مسیر جدیدی را برای تحقیقات گسترده‌تر در این زمینه باز می‌کند.

واژه‌های کلیدی: شاهدانه، بافت قلب، ژن *DLKI*، بره کرمانی

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: جعفری احمدآبادی سید علی اصغر، عسکری‌همت حشمت‌اله، محمدآبادی محمدرضا، اسدی فوزی مسعود، منصورى باهوتکی مهدی (۱۴۰۲) تاثیر شاهدانه بر بیان ژن *DLKI* در بافت قلب بره‌های کرمانی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۵(۱)، ۲۳۴-۲۱۷.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors

ژن *DLK1* یا Delta-like homologue 1 یک ژن ایمپرینت شده پدری^۱ است که کد کننده یک پروتئین غشایی متعلق به خانواده شبه فاکتور رشد اپیدرمی^۲ (EGF) است و حاوی گیرنده‌های Notch و لیگاندهای آنها است (Masoudzadeh et al. 2020b). نسخه برداری و ویرایش این ژن به طور متناوب انجام می‌شود و ترنسکرپت‌های آن دو ایزوفرم را کد می‌کند. ایزوفرم اول بزرگ و محلول و حاوی محل برش آنزیم تبدیل کننده فاکتور نکروز تومور (TACE) است و ایزوفرم دوم متصل به غشاء و فاقد ناحیه برش پروتئازی است (Mohammadabadi 2019). ژن *DLK1* نقش مهمی در کنترل فرآیندهای تمایز سلولی از جمله تمایز عضلانی و عصبی، آدیپوژنز، خون‌سازی و تمایز استخوانی در سرتاسر دوران جنینی و بزرگسالی دارد. نقش‌های بیولوژیکی مختلفی برای انواع *DLK1* گزارش شده است. برای نمونه، *DLK1* محلول، تمایز سلول‌های چربی را مهار می‌کند، در حالی که *DLK1* متصل به غشاء، تعداد سلول‌های بنیادی عصبی را از طریق مکانیسمی که به *DLK1* محلول نیاز دارد، تنظیم می‌کند (Mohammadabadi et al. 2021). این ژن در سلول‌های جنینی، قشر آدرنال بالغ، تومورهای غده فوق کلیوی، بافت‌های غدد درون ریز، به سختی در تومورهای باقی مانده آدرنال بیضه، سلول‌های لیدیگ جنینی، قلب و در زیر مجموعه ای از سلول‌های لیدیگ بالغ بیان می‌شود (Lottrup et al. 2015; Mohammadabadi et al. 2022). در پژوهشی (Lottrup et al. 2015) گزارش کرده‌اند که *DLK1* در بافت‌های مختلف یک عملکرد تنظیمی مربوط به تمایز نهایی و تصمیم‌گیری سرنوشت سلولی سلول‌های پیش ساز دارد. همچنین الگوهای بیان متفاوتی در سلول‌های لیدیگ در طول رشد دارد و الگوهای آن نشان می‌دهد که این ژن به عنوان نشانگر سلول‌های پیش ساز یا نابالغ لیدیگ عمل می‌کند. به علاوه، ثابت شده *DLK1* وظیفه مهمی در توسعه کبد انجام می‌دهد و از دو شکل گذرنده از غشا (transmembrane) و محلول تشکیل شده است (Tanimizu et al. 2003). در پژوهشی دیگر بیان *DLK1* در کبد با سطوح پایین تری نسبت به آل مادر مشاهده شده است (Rocha et al. 2007). الگوهای بیان *DLK1* در بافت کبد و ماهیچه مشابه گزارش شده است (Oczkowicz et al. 2010). همچنین مشخص شده که *DLK1* در هیپاتوسیت‌های کبد جنین در روز جنینی ۱۲/۵ بسیار بیان می‌شود و در روز جنینی ۱۶/۵ کاهش می‌یابد. این ژن در کپسول بافت همبند کبد نیز بیان می‌شود، اما در سلول‌های خون‌ساز کبد بیان نمی‌شود، اگرچه این سلول‌ها بیش از ۵۰ درصد کبد را تشکیل می‌دهند (Yevtodiyyenko and Schmidt 2006). در مطالعه‌ای (Mohammadabadi et al. 2022) نشان دادند که ژن *DLK1* در بافت قلب گوسفند بیان می‌شود و افزودن رازیانه به جیره باعث تغییر معنی‌دار وزن قلب و چربی اطراف قلب نسبت به جیره شاهد نشد، اما نتایج آن‌ها نشان داد که تغذیه رازیانه در سطوح ۱٪ و ۲٪ به طور معنی‌داری ($P < 0.05$) بیان ژن *DLK1* را در بافت قلب افزایش می‌دهد. در پژوهشی (Rodriguez et al. 2019) نقش *DLK1* در تمایز فیبروبلاست قلبی به میوفیبروبلاست و تنظیم فیبروز میوکارد را بررسی کردند. همچنین مکانیسم مولکولی که زیربنای این اثرات در این فرآیند است را نیز مورد پژوهش

^۱ paternally imprinted gene^۲ epidermal growth factor (EGF)-like family

قرار دادند. آنها دریافتند که *DLKI* یک عامل تعیین کننده حیاتی در تمایز فیبروبلاست به میوفیبروبلاست است. زیرا حذف *DLKI* منجر به تنظیم پایین *miR-370* و افزایش فعالیت پروفیبروتیک *TGFb/Smad3* می شود که منجر به نفوذ میوفیبروبلاست و افزایش رسوب ماتریکس خارج سلولی (ECM) و اختلال عملکرد قلب می شود. بازیابی و تجدید بیان *DLKI* یا میکرو RNA-370 (*miR-370*) فعالسازی فاکتور رشد تغییردهنده بتا/همساخت ۳ مادران ضد دکپتاپلجیک (*TGFb/Smad-3*) را سرکوب می کند. این یافته ها اولین موردی هستند که نقش مهمی *DLKI* را در فرآیند تبدیل فیبروبلاست قلبی به میوفیبروبلاست با تداخل در سیگنال دهی *TGFb/Smad-3* در میوکارد نشان می دهند. فیروز قلبی که با رسوب بیش از حد ماتریکس خارج سلولی (ECM) و تجمع میوفیبروبلاست مشخص می شود، یکی از ویژگی های جدایی ناپذیر بازسازی قلب نارساست. فیبروبلاست های قلبی، که به طور دقیق تخمین زده می شود کمتر از ۲۰٪ از کل جمعیت سلولی در قلب موش بالغ را تشکیل می دهند، نقش مهمی در ترمیم و بازسازی قلب دارند که پس از انفارکتوس میوکارد (MI)، به خاطر انعطاف پذیری استثنایی آنها برای تبدیل به میوفیبروبلاست ها رخ می دهد (Mohammadabadi et al. 2022). میوفیبروبلاست ها که معمولاً در قلب سالم وجود ندارند، سلول های بسیار تخصصی هستند که گردش ECM را تنظیم کرده و بافت را به دلیل ظرفیت انقباضی خود بازسازی می کنند. پس از حمله انفارکتوس، میوفیبروبلاست ها در ابتدا باعث تشکیل اسکار فیبروتیک محافظ (protective fibrotic scar) می شوند که از پارگی دیواره جلوگیری می کند. با این حال، حضور مداوم آنها در قلب می تواند منجر به فیروز مزمن قلبی و اختلال عملکرد بعدی شود. فاکتور رشد تغییردهنده بتا ۱ (*TGF-b1*) ترشح شده و فعال شدن مسیر متعارف وابسته به همساخت ۳ مادران مخالف دکپتاپلجیک (*Smad*) در هنگام آسیب، محرک اصلی تولید ECM و تبدیل فیبروبلاست به میوفیبروبلاست است. شواهد نشان می دهد که فعال شدن آبشار *Smad2/3*، به ویژه *Smad-3*، برای ایجاد فیروز قلبی ضروری است. به این ترتیب، سیگنالینگ فاکتور رشد تغییردهنده بتا/همساخت ۳ مادران ضد دکپتاپلجیک (*TGFb/Smad-3*) در ناحیه مرزی انفارکتوس های بهبودی فعال می شود که منجر به بازسازی فیبروتیک بطن انفارکتوس شده می شود (Rodriguez et al. 2019).

منابع پروتئینی که سطوح انرژی بالایی داشته باشند در مقابل هضم میکروبی شکمبه بهتر می توانند مقاومت کنند و به میزان بیشتری به صورت دست نخورده از شکمبه عبور کنند و در روده مورد هضم و جذب قرار گیرند. وقتی چنین اتفاقی روی دهد عملکرد دام بهبود پیدا می کند (Karamshahi Amjazi et al. 2019). دانه های شاهدانه دارای مقادیر بالایی از پروتئین خام و انرژی هستند، لذا برای این منظور می توانند مورد استفاده قرار گیرند. شاهدانه (*Cannabis sativa L.*) گیاهی یک ساله با برگ های قطره ای است. میوه این گیاه ریز و روغنی بوده و به دلیل اثرات آرامش بخشی که دارد برای درمان بیماری ها مانند افسردگی استفاده می شود. دانه شاهدانه به طور متوسط دارای ۲۵ تا ۳۵ درصد روغن، ۲۰ تا ۲۵ درصد پروتئین خام، ۲۰ تا ۳۰ درصد کربوهیدرات و ۱۰ تا ۱۵ درصد فیبر نامحلول می باشد (Jamalpour et al. 2018). پروتئین عمده آن ادستین ۳ است که مشابه آلبومین تخم مرغ با

³. Edistin

قابلیت هضم آسان است. دانه شاهدانه دارای هشت اسید آمینه ضروری می‌باشد (Small et al. 1976; Wang et al. 2008). علاوه بر پروتئین و چربی، شاهدانه محتوی مقدار کمی از کربوهیدرات‌های قابل هضم و ویتامین‌های گروه B، ویتامین C، ویتامین E و ویتامین D است (Hendriks et al. 1975). شاهدانه به دلیل خوش خوراکی می‌تواند به راحتی در جیره گوسفند مورد استفاده قرار گیرد و اثرات ناشی از آن را بررسی نمود.

امرار معاش بخش بزرگی از جمعیت مناطق گرم، خشک و بیابانی توسط نژادهای بومی نشخوارکنندگان کوچک به ویژه گوسفند تامین می‌شود (Amiri Roudbar et al. 2017). لذا، پژوهشگران و دامداران سعی می‌کنند برای بهبود تولید این حیوانات از طریق بهبود کمی و کیفی و بهبود رشد ژنتیکی گام بردارند (Mohammadifar and Mohammadabadi 2011; Amiri Roudbar et al. 2018). نتایج بررسی‌ها نشان می‌دهد که بهبود عملکرد در گله‌های گوسفند معمولاً از طریق بهبود تولید و تولید مثل حاصل می‌شود (Mohammadabadi 2017). حدود بیست و هفت نژاد و اکوتیپ گوسفند در ایران وجود دارد که در مجموع بیش از ۵۰ میلیون رأس دارند (Mohammadabadi 2016; Mohamadipoor Saadatabadi et al. 2021). یکی از مهم‌ترین و معروف‌ترین گوسفندان ایرانی، گوسفند کرمانی است (Aminafshar et al. 2014; Mohammadabadi et al. 2017). این جانور کاملاً با شرایط گرم، خشک و نامساعد منطقه جنوب شرقی ایران که زیستگاه اصلی آن است و دارای پوشش گیاهی و مرتعی ضعیف و ناپایدار است، سازگاری دارد (Mahmoodi et al. 2018; Masoudzadeh et al. 2020b). این گوسفند از نژاد دو منظوره (گوشتی و پشمی) و دم چاق است که دارای پشم سفید و جثه متوسط است و بیشترین نیازهای زندگی عشایر و دامداران را تامین می‌کند (Bahrapour et al. 2008). بنابراین توجه به پرورش این گوسفند برای توسعه و بهبود صفات فنوتیپی و ژنتیکی آن اثرات مثبتی بر نیازهای این نژاد خواهد داشت (Shahsavari et al. 2021). در پژوهش‌های گونه‌های اهلی شناسایی ژن‌های موثر بر صفات تولیدی مهم یکی از حوزه‌های ضروری است (Safaei et al. 2022). مطالعات و بررسی‌های به عمل آمده در اواخر دهه ۸۰ میلادی روشن نمود که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی (مشمول بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن‌ها) هستند (Mohammadabadi et al. 2021). ماده ژنتیکی^۴ یک سلول از تعداد زیادی ژن تشکیل شده است که هیچ‌گاه همه به طور همزمان بیان نمی‌شوند و در هر لحظه فقط تعداد کمی از آنها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می‌نمایند (Mohammadabadi 2020). محیطی که موجود در آن رشد می‌کند مشخص می‌کند که آیا ژن بیان شود و یا این که نیازی به فرآورده آن نیست و باید غیرفعال و یا خاموش شود. ساز و کار بیان ژن اولین بار در باکتری *E. coli* کشف شد. ژن‌های یوکاریوتی بیان‌شان تحت کنترل موقت و چندبعدی است. در هر یک از انواع بافت‌ها تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم بیان می‌شود و نیز بیان ژن‌ها به مرحله نمو بستگی دارد. بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت‌ها برای هر بافت اختصاصی است. همچنین مقدار محصولات ژن که در همان بافت و نیز در سایر بافت‌هایی که آن

^۴ DNA

محصول را می‌سازند، ساخته شده سبب تنظیم بیان آن ژن می‌شود (Tohidi nezhad et al. 2015). یکی از اقدامات اساسی در حیوانات اهلی مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات اقتصادی و مطالعه آنها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Mohammadabadi and Soflaei 2020). تا کنون اثر شاهدانه بر بیان ژن *DLKI* در قلب حیوانات اهلی، به ویژه گوسفند مطالعه نشده است، لذا هدف این مطالعه بررسی اثر شاهدانه بر بیان ژن *DLKI* در قلب گوسفند کرمانی با استفاده از *real time PCR* بود.

مواد و روش‌ها

برای انجام این پروژه از ۱۲ راس بره نر نژاد کرمانی شش ماهه و وزن برابر ($27/5 \pm 0/45$ کیلوگرم) در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه گروه آزمایشی (۶ راس در هر گروه) در ایستگاه آموزشی و تحقیقاتی علوم دامی دانشگاه شهید باهنر کرمان استفاده شد. بره‌ها در قفس‌های جداگانه با ابعاد $1/2 \times 1/5$ متر با کاه بستر، در جایگاهی با کف سیمانی، روباز، با تهویه مناسب و دسترسی آزاد به خوراک و آب قرار گرفتند. در این مدت ۲۰ روز برای سازگاری و ۹۰ روز برای جمع آوری داده‌ها در نظر گرفته شد. قبل از شروع دوره آزمایش، تمام حیوانات پشم چینی شدند، از داروهای ضد انگل استفاده شد و واکسن آنروتوکسمی نیز انجام شد. حیوانات آزمایشی به مدت سه ماه (۹۰ روز) با دو سطح شاهدانه (۰ و ۱ درصد) به صورت آزاد و جداگانه تغذیه شدند. خوراک به طور کامل مخلوط شد و بره‌ها دو بار در روز در ساعت ۸:۰۰ و ۱۶:۰۰ تغذیه می‌شدند تا حدود ۵٪ از *ORT*ها (ضایعات یا باقیمانده غذا از یک وعده غذایی) استفاده شود. تمام جیره‌های آزمایشی دارای انرژی و پروتئین خام یکسان بودند. آب به صورت آزاد در دسترس بود و روزی دو بار تعویض می‌شد.

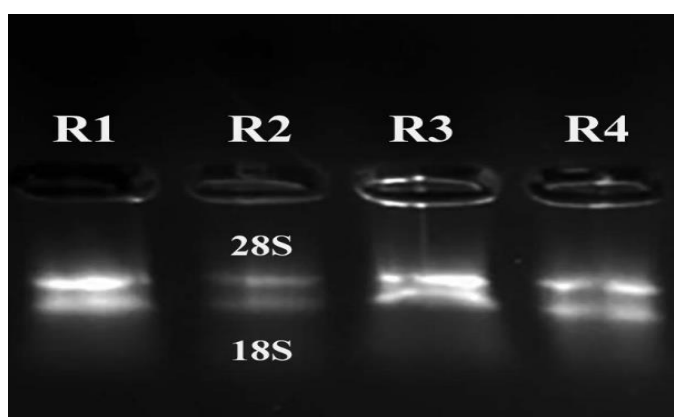
پس از کشتار، نمونه برداری از بافت قلب (با ۳ تکرار) از هر دو گروه انجام شد. نمونه‌ها به سرعت در ازت مایع قرار گرفتند و سپس در فریزر ۸۰- ذخیره شدند. کیت *One Step RNA Reagent* (شرکت بیوباسیک، ایران) برای استخراج *RNA* کل از بافت استفاده شد و سپس وجود و کیفیت *RNA* و عدم وجود *DNA* ژنومی با الکتروفورز روی ژل آگارز و بررسی وجود دو باند 28S و 18S و مقایسه با نشانگر اندازه مورد آزمون قرار گرفت. *cDNA* با استفاده از کیت استاندارد (*#K1631, Fermentase*) (Co., Iran) و پرایمرهای مربوطه از روی *RNA* سنتز شد. غلظت *RNA* کل در هر واکنش ۱ میکروگرم بود. تکنیک *RT-PCR* با استفاده از پرایمرهای رو به جلو $5'-CGTCTTCTCAACAAGTGCGA-3'$ و معکوس $5'-TCCTCCCCGCTGTTGTAGTG-3'$ (شماره دسترسی NM-174037، $Tm=57$ درجه سانتی گراد و اندازه محصول ۱۰۲ جفت باز) برای ژن *DLKI* و پرایمرهای رو به جلو $5'-CCTGGCACCCAGCACAAT-3'$ و معکوس $5'-GGGCCGGACTCGTCATAC-3'$ (شماره دسترسی NM_001101.3، $Tm=57$ درجه سانتی گراد و اندازه محصول ۲۰۷ جفت باز) برای ژن بتا اکتین (به عنوان ژن مرجع) استفاده شدند. واکنش‌ها در حجم ۱۵ میکرولیتر شامل: ۷/۵ میکرولیتر 2X

SYBR Green PCR Master Mix (شرکت فرمنتاز، تهران، ایران)، ۱/۵ میکرولیتر cDNA الگو، ۱ میکرولیتر پرایمرهای ۱۰ میکرومولار رو به جلو و معکوس، ۰/۳ میکرولیتر ROX و ۴/۷ میکرولیتر ddH₂O در دستگاه Rotor-Gene Q MDx (QIAGEN Hilden, Germany) انجام شد.

شرایط دمایی واکنش PCR عبارت بود از: دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه، سپس ۳۵ سیکل ۹۴ درجه سانتیگراد برای ۶۰ ثانیه، ۵۷ درجه سانتیگراد برای ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد برای ۶۰ ثانیه و سپس منحنی ذوب ۵۵ درجه سانتیگراد تا ۹۵ درجه سانتیگراد با افزایش ۰/۵ درجه سانتیگراد در هر ۵ ثانیه انجام شد. تک پیک‌های تیز منحنی‌های ذوب و وجود منحنی‌های تکثیر محصولات *DLKI* و بتا‌کتین حاکی از عدم تشکیل پرایمر-دایمر و همچنین تایید ویژگی پرایمرها، مطابق با عدم تولید محصولات تکثیر منفی است. برای تجزیه و تحلیل داده‌های Real Time PCR از روش Pfaffl et al. (2002) استفاده شد. برای تعیین کارایی واکنش PCR، یک منحنی استاندارد برای *DLKI* و بتا‌کتین با سریال رقت cDNA مجموعه‌ای از نمونه‌ها (۱، ۰/۱، ۰/۰۱، ۰/۰۰۱) ترسیم شد. راندمان PCR ژن‌های *DLKI* و بتا‌کتین به ترتیب ۹۸ و ۹۹ درصد بود. نرم افزار REST (Pfaffl et al., 2002) برای تجزیه و تحلیل نتایج Real-Time PCR به دست آمده با استفاده از فرمول Pfaffl et al. (2002) استفاده شد.

نتایج و بحث

نسبت A260/A280 برای RNAهای استخراج شده برابر ۱/۸-۱/۹ بود که نشان دهنده کیفیت مناسب و مطلوب آن‌ها است. همچنین در روی ژل آگارز دو باند 18S و 28S در RNA مشاهده شد که نشان دهنده سالم بودن RNAهای استخراج و عدم وجود باند اضافی نشان دهنده خلوص آن‌ها بود (شکل ۱).

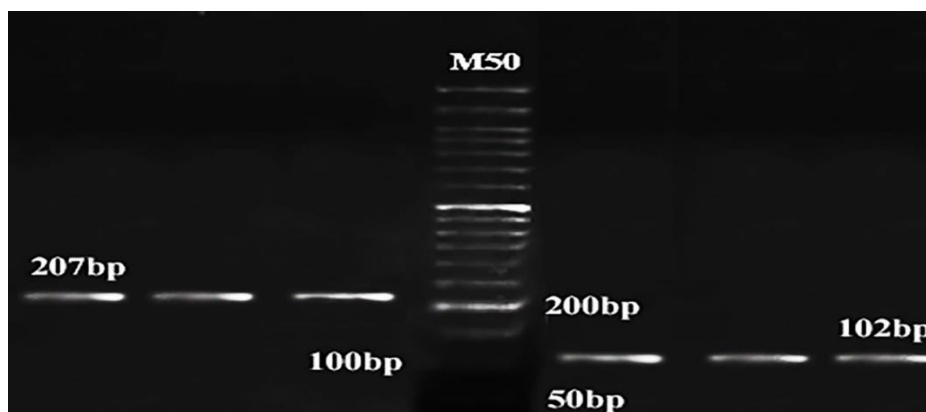


شکل ۱. چهار نمونه از RNA استخراج شده از چهار بافت بره کرمانی روی ژل آگارز

Figure 1. Four samples of extracted RNA from four tissues of Kermani lambs on agarose gel

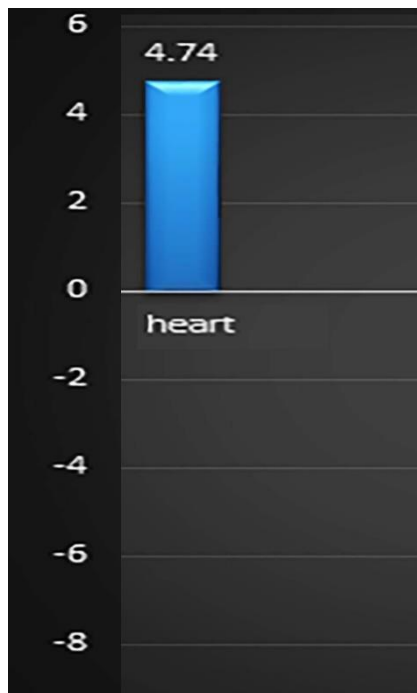
نتایج منحنی‌های real time PCR و الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز نشان داد که ژن *DLK1* در بافت قلب بیان شده است. مشاهده تک باند در محدوده ۱۰۲bp برای ژن *DLK1* و وجود باند در محدوده ۲۰۷bp برای ژن بتاآکتین در بافت قلب (شکل ۲)، بیانگر صحت انجام آزمایش و تکثیر قطعه مورد نظر بود. دستگاه real time PCR طی انجام واکنش میزان تغییرات نور فلورسنت در هر سیکل را به صورت منحنی تکثیر نشان می‌دهد. برای منحنی تکثیر همه نمونه‌ها، یک حد آستانه در فاز نمایی تعریف شد که نشان دهنده سیکلی می‌باشد که در آن شدت نور فلورسنت ساطع شده از تکثیر واکنش به حد آستانه رسیده است. منحنی ذوب ژن *DLK1* و بتاآکتین، اختصاصی بودن و دمای T_m محصول (دمایی است که در آن نیمی از محصول از حالت دو رشته‌ای خارج شده است) واکنش real time PCR این دو ژن را نشان می‌دهد. در پژوهش حاضر بیان ژن *DLK1* در بافت قلب گوسفند کرمانی با استفاده از روش PCR در زمان واقعی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که این ژن در بافت قلب این حیوانات بیان می‌شود.

در پژوهشی Mohammadabadi et al. (2022) گزارش کردند که ژن *DLK1* در بافت قلب بره کرمانی بیان می‌شود. همچنین بیان ژن *DLK1* در بافت‌های مختلف (کبد، سردست، ران، مغز، چربی، بیضه و شکمبه) گوسفند توسط Masoudzadeh Oczkiewicz et al. (2020a and b) et al. و Mohammadabadi et al. (2021) گزارش شده است. در پژوهشی دیگر Oczkiewicz et al. (2010) نشان دادند که ژن *DLK1* در بافت قلب خوک بیان می‌شود. همچنین بیان این ژن در بافت قلب موش نیز توسط Rodriguez et al. (2019) و Lui et al. (2008) گزارش شده است که تایید کننده نتایج پژوهش ما است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تغذیه شاهدانه در سطح ۱٪ به طور معنی داری ($P < 0.05$) بیان ژن *DLK1* را در بافت قلب نسبت به گروه شاهد ۴/۷۴ برابر افزایش می‌دهد (شکل ۳).



شکل ۲. سه نمونه از الکتروفورز محصول تکثیر ژن‌های *DLK1* (۱۰۲ جفت باز) و بتاآکتین (۲۰۷ جفت باز) در بافت قلب گوسفند کرمانی روی ژل آگارز

Figure 2. Electrophoresis of amplified products for *DLKI* (102bp) and Beta actin (207bp) genes in heart tissue of Kermani sheep on agarose gel for three samples



شکل ۳. تأثیر تغذیه شاهدانه بر بیان ژن *DLKI* در بافت قلب گوسفند کرمانی با استفاده از real-time PCR

Figure 3. The effect of Cannabis feeding on expression of *DLKI* gene in heart tissue of Kermani sheep using real-time PCR

شواهد فزاینده ای نقش *DLKI* را در مهار تمایز بسیاری از سلول‌ها، از جمله چربی (Laborda 2000)، استئوبلاست (Abdallah et al. 2004)، غضروف (Chen et al. 2011)، سلول‌های خونساز (Sakajiri et al. 2005)، و سلول‌های عصبی (Ferron et al. 2011) نشان داده است. در راستای این گزارش‌ها، Rodriguez et al. (2019) این موضوع را بررسی کردند که آیا *DLKI* ممکن است در تمایز فیبروبلاست به میوفیبروبلاست قلبی؛ فرآیندی که پس از انفارکتوس میوکارد آغاز شده و برای بازسازی قلب آسیب دیده حیاتی است (Bujak and Frangogiannis 2007; Travers et al. 2016) نیز نقش داشته باشد؟ پس از این مطالعه آنها برای اولین بار گزارش کردند که میوسیت‌ها و فیبروبلاست‌های قلبی، ایزوفرم‌های مختلف *DLKI* را بیان می‌کنند و عدم وجود آن در فیبروبلاست‌ها، روند تمایز به میوفیبروبلاست‌ها را تسریع می‌کند. آنها نشان دادند که میوکارد موشی که *DLKI* آن حذف شده است فعال‌سازی مسیر پروفیبروتیک فاکتور رشد تغییردهنده بتا ۱/۳ (TGFb1/Smad-3) و القای واریانت فیبرونکتین ماتریکس خارج سلولی - دامین A خارجی (ECM EDA) را نشان می‌دهد، که منجر به نفوذ/انباشتگی میوفیبروبلاست‌ها و تشکیل نواحی فیبروتیک می‌شود. این امر به دلیل افزایش بیان فاکتور رشد تغییردهنده بتا ۱ (TGF-b1) در میوکارد در بیماری‌های قلبی حیوانات آزمایشگاهی و انسان جالب است (Li et al. 1997). به طور خاص،

فعال شدن سیگنال‌دهی فاکتور رشد تغییردهنده بتا ۱/هم‌ساخت ۳ مادران مخالف دکپنتاپلجیک (TGFb1/Smad-3) در مرز انفارکتوس در پاتوژنز بازسازی فیبروتیک قلب حیاتی است و به اختلال عملکرد قلب کمک می‌کند. آنها همچنین نشان دادند که کاردیومیوسیت‌های موش فاقد *DLKI* ناهنجاری‌هایی را در تعداد و ترتیب میوفیبریل‌ها و کاهش کلی عملکرد قلب نشان می‌دهند. علاوه بر این، نتایج آنها نشان داد که بیان *DLKI* در بافت قلبی بیماران ایسکمیک انسانی در مقایسه با اهداکنندگان سالم و در بافت‌های نواحی مرزی و اسکار در یک مدل خوکی انفارکتوس میوکارد (MI) به میزان قابل توجهی کاهش یافته است. این مشاهدات آنها این فرضیه را تقویت کرد که *DLKI* ممکن است برای جلوگیری از مرگ بافت قلبی و کاهش عملکرد قلب مورد نیاز باشد.

نتایج Rodriguez et al. (2019) نشان می‌دهد که انتقال ژن *DLKI* از تمایز فیبروبلاست به میوفیبروبلاست جلوگیری می‌کند، لذا این فرضیه را تایید می‌کند که *DLKI* یک واسطه منفی این فرآیند است. با این حال، فیبروبلاست‌های فاقد *DLKI* تا حدودی کمتر به بیان بیش از حد *DLKI* پاسخ می‌دهند. این اختلاف ممکن است به دلیل شتاب قابل توجه در رسیدن به حالت پایدار از میوفیبروبلاست‌های کاملاً متمایز شده باشد که آنها را نسبت به تغییرات عوامل خارجی غیر حساس می‌کند (Driesen et al. 2014). علاوه بر این، موش‌های فاقد *DLKI* رسوب بالایی از دامین A خارجی فیبرونکتین (EDA-FN) در اطراف میوسیت‌ها داشتند و در واقع، میوفیبروبلاست‌ها در این ماتریکس خارج سلولی (ECM) جاسازی شده بودند. مشخص شده است که فاکتور رشد تغییردهنده بتا ۱ (TGF-b1) فیبرونکتین کل را با افزایش تجمع واریانت دامین A خارجی (EDA) افزایش می‌دهد (Kocher et al. 1990) و وجود واریانت دامین A خارجی (EDA) به فاکتور رشد تغییردهنده بتا ۱ (TGF-b1) اجازه می‌دهد تا تمایز فیبروبلاست را القا کند (Serini et al. 1998).

در پژوهشی Masoudzadeh et al. (2020a) نشان دادند که با توجه به تاثیر قابل توجه رازیانه بر افزایش بیان ژن *DLKI* و نقش این ژن در افزایش سایز عضلانی به ویژه در سنین پایین، می‌توان نتیجه گرفت که رازیانه (به ویژه در سطح ۲ درصد) می‌تواند در جیره گوسفند به عنوان یک محرک رشد طبیعی مناسب و مفید در صنعت تولید گوسفند استفاده شود. آنها همچنین پیشنهاد کردند که تغذیه رازیانه از فنوتیپ کالیپیج^۵ تقلید می‌کند. نتایج آن‌ها نشان داد که تغذیه رازیانه بر بیان ژن *DLKI* در بافت عضلانی تأثیر فزاینده‌ای دارد و وزن گوشت بدون چربی^۶ برای حیواناتی که با ۲ درصد رازیانه تغذیه شده بودند، در مقایسه با سطح ۰ درصد بیشتر بود. در همین راستا Mohammadabadi et al. (2021) نشان دادند که استفاده از رازیانه در جیره گوسفند بر بیان ژن *DLKI* در بافت عضله سردست تأثیر مثبت دارد و باعث رشد و بهبود ماهیچه گوسفند می‌شود. با توجه به ساختار عضلانی قلب و شباهت آن به ماهیچه سردست و ران گوسفند، می‌توان نتیجه گرفت که رازیانه می‌تواند در رژیم غذایی گوسفند، از طریق افزایش

⁵ callipyge phenotype

⁶ lean meat

بیان ژن *DLKI* در بافت عضله برای بهبود ساختار ماهیچه قلب استفاده شود. در پژوهشی Karamshahi Amjazi et al. (2019) نشان دادند که افزودن ۱۰ درصد شاهدانه به جیره گوسفند در مقایسه با گروه شاهد باعث افزایش ماده خشک مصرفی، افزایش وزن روزانه، و بهبود قابلیت عضم ماده خشک و پروتئین خام می‌شود. دانه شاهدانه دارای مقادیر قابل توجهی چربی‌های غیراشباع با چند پیوند دوگانه^۵ (PUFA) است (Callaway 2004)، بسیار مغزی بوده، قابلیت هضم بالایی دارد (Leeson et al. 2001) و غلظت کل لیپیدهای سرم و لیپوپروتئین‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Barani et al. 2017). در جوجه‌های گوشتی گزارش شده است که با افزودن شاهدانه به جیره، میزان لیپوپروتئین دارای چگالی بالا^۸ (HDL) در سرم به‌طور معنی‌داری افزایش یافته و از میزان لیپوپروتئین با چگالی پایین^۹ (LDL)، لیپوپروتئین با چگالی خیلی پایین^{۱۰} (VLDL) و تری‌گلیسرید^{۱۱} (TG) به‌طور معنی‌داری کاسته می‌شود (Mahmoudi et al. 2012). به دلیل اینکه HDL وظیفه دارد کلسترول را از سایر بافت‌ها برای دفع به کبد و کیسه صفرا منتقل کند می‌تواند موجب افزایش فعالیت کبد گردد.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج مطالعه حاضر، می‌توان نتیجه گرفت که شاهدانه می‌تواند در رژیم غذایی گوسفند برای بهبود ساختار قلب از طریق اثرات مثبت بر بیان ژن *DLKI* استفاده شود. از آنجایی که شاهدانه سطح بیان ژن *DLKI* را در بافت قلب افزایش داده است، می‌توان آن را برای بهبود عملکرد قلب که در صنعت گوسفند اهمیت دارد، در نظر گرفت. بر اساس نتایج تحقیق حاضر و سایر تحقیقات می‌توان نتیجه گرفت که شاهدانه می‌تواند برای مصارف مختلفی در دام استفاده شود، اما برای هر اثر در هر بافت، تحقیقات بیشتری با در نظر گرفتن شرایط مختلف ژنتیکی، اپی ژنتیکی و فیزیولوژیکی انجام شود تا به نتیجه نهایی برسیم. علاوه بر این، نتایج جالب مطالعه حاضر در پاسخ به استفاده از شاهدانه در جیره غذایی گوسفند، مسیر جدیدی را برای تحقیقات گسترده‌تر در این زمینه باز می‌کند.

منابع

بارانی مهدی، افضل‌ی نظر، حسینی و اشان سید جواد (۲۰۱۷) اثر تغذیه دانه شاهدانه (*cannabis sativa L*) اکسترود شده بر عملکرد، اجزای لاشه، پاسخ ایمنی همورال و الگوی لیپیدی پلاسما در جوجه‌های گوشتی. تحقیقات تولیدات دامی، ۲۶(۲)، ۳۹-۴۹.

توحیدی نژاد فاطمه، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، نجمی نوری عذرا (۱۳۹۳). مقایسه سطوح مختلف بیان ژن *Rheb* در بافت‌های مختلف بز کرکی رایینی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۴(۴)، ۳۵-۵۰.

⁵. Poly unsaturated Fatty Acid

⁶. High Density Lipoprotein

^۹. Low Density Lipoprotein

^{۱۰}. Very Low Density Lipoprotein

⁹. Triglyceride

جمال پور مهرنسا، دادپسند محمد، آتشی هادی و همکاران (۱۳۹۷) واکاوی بیوانفورماتیکی و فیلوژنی ناحیه ۵ UTR ژن نوروپتید وای (Neuropeptide Y) و ارتباط آن با صفات تولیدی در مرغ بومی فارس. نشریه علوم دامی ایران، (۳)۴۹، ۴۵۸-۴۵۳.

کرماشاهی امجری خدیجه، جلیلود قاسم، دینانی امید، دهقان بنادکی مهدی (۱۳۹۸) اثرات تغذیه شاهدانه در جیره‌های با پروتئین خام متفاوت بر عملکرد، قابلیت هضم، فراسنجه‌های شکمبه‌ای و سنتز پروتئین میکروبی در بره‌های پرواری بلوچی. پژوهش در نشخوارکنندگان، (۲)۷، ۵۸-۳۳.

محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۸) بیان ژن *DLK1* در بز کرکی راینی با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۱(۳)۲۰۵-۱۹۱.

محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۹) بیان ژن *ESR1* در بز کرکی راینی با استفاده از real time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۱)۱۷۷-۱۹۲.

محمدآبادی محمدرضا، خیرالدین حمید، لطیفی آیین، بانکو اولنا ایوانیونا (۱۴۰۱) پروفایل بیانی ژن *DNAH1* در بافت بیضه بز کرکی راینی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، (۳)۱۴، ۲۴۳-۲۵۶.

محمدآبادی محمدرضا، سفلاهی محمد (۱۳۹۹). پروفایل بیانی mRNA مختص بافت ژن *BMP15* در بز. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۳)۲۰۸-۱۹۱.

محمدآبادی محمدرضا، شبان جرجندی دیانا، عرب پور رق آبادی زهرا، ابارقی فاطمه، ساسان حسینعلی، بردبار فرهاد (۱۴۰۱) نقش رازیانه بر بیان ژن *DLK1* در بافت قلب گوسفند. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، (۲)۱۴، ۱۵۵-۱۳۳.

محمدی فر آمنه، محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۰) کاربرد نشانگرهای ریزماهواره برای مطالعه ژنوم گوسفند کرمانی. مجله علوم دامی ایران (۴)۴۲، ۳۳۷-۳۴۴.

محمودی محمد، فرهومند پرویز، آذرفر آرش (۲۰۱۲) اثر سطوح مختلف جیره‌ای شاهدانه (*Cannabis sativa L*) بر عملکرد، وزن اندام‌های داخلی و میزان کلسترول سرم جوجه‌های گوشتی. فصلنامه علمی پژوهشی گیاهان دارویی، (۲)۴۲، ۱۲۱-۱۲۹.

محمودی مریم، آیت‌اللهی مهرجودی احمد، محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۶) بررسی اگزون چهارم ژن کاپاکازین گوسفند کرمانی با تکنیک PCR-RFLP. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، (۳)۹، ۱۱۹-۱۲۸.

References

Abdallah BM, Jensen CH, Gutierrez G, et al. (2004) Regulation of human skeletal stem cells differentiation by *DLK1/Pref-1*. J Bone Miner Res 19, 841-852.

- Aminafshar M, Bahrapour V, Baghizadeh A, et al. (2014) CD44 gene expression in mature, immature oocytes and fetal kermani, baluchi sheep and rayeni, tali goats. *J cell Anim Biol* 8 (8), 156-160.
- Amiri Roudbar M, Mohammadabadi MR, Mehrgardi AA, Abdollahi-Arpanahi A (2017) Estimates of variance components due to parent-of-origin effects for body weight in Iran-Black sheep. *Small Rum Res* 149, 1-5.
- Amiri Roudbar M., Abdollahi-Arpanahi R., Ayatollahi Mehrgardi A., et al. (2018) Estimation of the variance due to parent-of-origin effects for productive and reproductive traits in Lori-Bakhtiari sheep. *Small Rumin Res* 160, 95-102.
- Bahrapour V, Mohammadabadi MR, Mirzaei HR, et al. (2008) Molecular analysis of Calpastatin gene in Kermani sheep herds. *J Agric Sci Nat Resource* 15 (4), 124-131.
- Barani M, Afzali N, Hosseini-Vashan SJ (2017) Effects of dietary inclusion of extruded hempseed (*Cannabis sativa* L.) on performance, carcass components, humoral immune response and plasma lipid profile of broiler chickens. *Anim Produc Res* 6(2) 39-49 (In Persian).
- Bujak M, Frangogiannis NG (2007) The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc Res* 74, 184–195.
- Callaway JC (2004) Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica* 140(1-2), 65-72.
- Chen L, Qanie D, Jafari A, et al. (2011) Delta-like 1/fetal antigen-1 (DLK1/FA1) is a novel regulator of chondrogenic cell differentiation via inhibition of the Akt kinase-dependent pathway. *J Biol Chem* 286, 32140–32149.
- Driesen RB, Nagaraju CK, Abi-Char J, et al. (2014) Reversible and irreversible differentiation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 101, 411–422.
- Ferron SR, Charalambous M, Radford E, et al. (2011) Postnatal loss of DLK1 imprinting in stem cells and niche astrocytes regulates neurogenesis. *Nature* 475, 381–385.
- Hendriks H, Malingré TM, Batterman S, Bos R (1975) Mono-and sesqui-terpene hydrocarbons of the essential oil of *Cannabis sativa*. *Phytochem* 14, 814-815.
- Jamalpour M, Dadpasand M, Atashi H, et al. (2018) Bioinformatics and phylogenetic analysis for 5' UTR region of neuropeptide Y gene and its association with body weight and egg production traits in Fars native chickens. *Iran J Anim Sci* 49(3), 453-458 (In Persian).
- Karamshahi Amjazi Kh, Jalilvand Gh, Dayani O, Dehghan Banadak M (2019) Effects of feeding hemp seeds in diets with different levels of crude protein on Performance,

- Digestibility, Ruminant metabolites and Synthesis of Microbial Protein in Baluchi fattening lambs. *J Rumin Res* 7(2), 33-58 (In Persian).
- Kocher O, Kennedy SP, Madri JA (1990) Alternative splicing of endothelial cell fibronectin mRNA in the IIICS region. Functional significance. *Am J Pathol* 137, 1509–1524.
- Laborda J (2000) The role of the epidermal growth factor-like protein dlk in cell differentiation. *Histol Histopathol* 15, 119–129.
- Leeson S, Summers JD, Caston LJ (2001) Response of layers to low nutrient density diets. *J Appl Poult Res* 10(1), 46-52.
- Li RK, Li G, Mickle DA, et al. (1997) Overexpression of transforming growth factor-beta1 and insulinlike growth factor-I in patients with idiopathic hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 96, 874–881.
- Lottrup G, Nielsen JE, Skakkebæk NE, et al. (2015) Abundance of *DLK1*, differential expression of *CYP11B1*, *CYP21A2* and *MC2R*, and lack of *INSL3* distinguish testicular adrenal rest tumours from leydig cell tumours. *Eur J Endocrinol* 172, 491–499.
- Lui JC, Finkielstain GP, Barnes KM, Baron J (2008) An imprinted gene network that controls mammalian somatic growth is down-regulated during postnatal growth deceleration in multiple organs. *Am J Physiol – Regul Integr Comp Physiol* 295, R189-196.
- Mahmoodi M, Ayatollahi A, Mohammadabadi MR (2018) Studying exon 4 of kappa-casein gene in Kermani sheep using PCR-RFLP. *Agric Biotechol J* 9 (3), 119-128 (In Persian).
- Mahmoudi M, Farhoomand P, Azarfar A (2012). Effect of graded levels of hemp seed (*Cannabis Sativa L.*) on performance, organ, weight and serum cholesterol levels on broilers. *J Med Plants* 11(9) 121-129 (In Persian).
- Masoudzadeh SH, Mohammadabadi M, Khezri A, et al. (2020a) Effects of diets with different levels of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed powder on *DLK1* gene expression in brain, adipose tissue, femur muscle and rumen of Kermani lambs. *Small Rumin Res* 193, e106276.
- Masoudzadeh SH, Mohammadabadi MR, Khezri A, et al. (2020b) *DLK1* Gene Expression in Different Tissues of Lamb. *Iran J Appl Anim Sci* 10 (4), 669-677.
- Mohamadipoor Saadatabadi L, Mohammadabadi M, Amiri Z, et al. (2021) Signature selection analysis reveals candidate genes associated with production traits in Iranian sheep breeds. *BMC Vet Res* 17 (1), 1-9
- Mohammadabadi M, Masoudzadeh SH, Khezri A, et al. (2021) Fennel (*Foeniculum vulgare*) seed powder increases Delta-Like Non-Canonical Notch Ligand 1 gene expression in testis, liver, and humeral muscle tissues of growing lambs. *Heliyon* 7 (12), e08542.
- Mohammadabadi M, Shaban Jorjandy D, Arabpoor Raghavadi Z, et al. (2022) The role of fennel

- on *DLK1* gene expression in sheep heart tissue. *Agric Biotechnol J* 14 (2), 155-170 (In Persian)
- Mohammadabadi M, Soflaei M (2020) Tissue-specific mRNA expression profile of BMP15 gene in goat. *Agric Biotechnol J* 12, 191-208 (In Persian).
- Mohammadabadi MR (2016) Role of clostridium perfringens in pathogenicity of some domestic animals. *J Adv Agric* 7 (3), 1117-1121.
- Mohammadabadi MR (2017) Inter-Simple Sequence Repeat loci Associations with Predicted Breeding Values of Body Weight in Kermani Sheep. *Genet 3rd Millen* 14 (4), 4383-4390.
- Mohammadabadi MR (2019) *Dlk1* gene expression in Raini Cashmere goat using Real Time PCR. *Agric Biotechnol J* 11 (3), 191-205 (In Persian).
- Mohammadabadi MR (2020) Expression of ESR1 gene in Raini Cashmere goat using real time PCR. *Agric Biotechnol J* 12 (1), 177-192 (In Persian).
- Mohammadabadi MR, Esfandyarpoor E, Mousapour A (2017) Using Inter Simple Sequence Repeat Multi-Loci Markers for Studying Genetic Diversity in Kermani Sheep. *J Res Dev* 5 (2), e154.
- Mohammadabadi MR, Kheyrodin H, Latifi A, Babenko OI (2022) mRNA expression profile of DNAH1 gene in testis tissue of Raini Cashmere goat. *Agric Biotechnol J* 14 (3), 243-256.
- Mohammadifar A, Mohammadabadi MR (2011) Application of Microsatellite Markers for a Study of Kermani Sheep Genome. *Iran J Anim Sci* 42 (4), 337-344 (In Persian).
- Oczkowicz M, Piestrzyska-Kajtoch A, Piórkowska K, et al. (2010) Expression of *DLK1* and *MEG3* genes in porcine tissues during postnatal development. *Genet Mol Biol* 33, 790-794.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30, e36.
- Rocha ST, Tevendale M, Knowles E, et al. (2007) Restricted co-expression of *DLK1* and the reciprocally imprinted non-coding RNA, *Gtl2*: Implications for cis-acting control. *Dev Biol*, 306, 810–823.
- Rodriguez P, Sassi Y, Troncone L, et al. (2019) Deletion of delta-like 1 homologue accelerates fibroblast–myofibroblast differentiation and induces myocardial fibrosis. *Eur Heart J* 40, 967–978.
- Safaei SMH, Dadpasand M, Mohammadabadi M, et al. (2022) An *Origanum majorana* Leaf Diet Influences Myogenin Gene Expression, Performance, and Carcass Characteristics in Lambs. *Animals* 13 (1), e14.
- Sakajiri S, O’Kelly J, Yin D, et al. (2005) DLK1 in normal and abnormal hematopoiesis. *Leukemia* 19, 1404–1410.

- Serini G, Bochaton-Piallat ML, Ropraz P, et al. (1998) The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta1. *J Cell Biol* 142, 873–881.
- Shahsavari M, Mohammadabadi M, Khezri A, et al. (2021) Correlation between insulin-like growth factor 1 gene expression and fennel (*Foeniculum vulgare*) seed powder consumption in muscle of sheep. *Animal Biotechnology* 33, 1-11.
- Small E, Cronquist A (1976) A practical and natural taxonomy for *Cannabis*. *Taxon*, 405-435.
- Tanimizu N, Nishikawa M, Saito H, et al. (2003) Isolation of hepatoblasts based on the expression of *dlk/pref-1*. *J Cell Sci* 116, 1775-1786.
- Tohidi nezhad F, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK, Najmi Noori A (2015) Comparison of different levels of Rheb gene expression in different tissues of Raini Cashmir goat. *Agric Biotechnol J* 6, 35-50 (In Persian).
- Travers JG, Kamal FA, Robbins J, et al. (2016) Cardiac fibrosis: the fibroblast awakens. *Circ Res* 118, 1021–1040.
- Wang XS, Tang CH, Yang XQ, Gao WR (2008) Characterization, amino acid composition and in vitro digestibility of hemp (*Cannabis sativa* L.) proteins. *Food Chem* 107(1), 11-18.
- Yevtodiyenko A, Schmidt JV (2006) *DLK1* expression marks developing endothelium and sites of branching morphogenesis in the mouse embryo and placenta. *Dev Dyn* 235, 1115–1123.