مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران) جلد ۳۷، شماره ۳، ۱۴۰۳
DOR: 10.22034/CMR.2023.2337 مقاله پژوهشی، صفحات ۲۵۳-۲۳۸

شناسایی واریانتهای اللی ژن گیرنده ملاتونین(MTNR1A) در جمعیتی از میش‌های نژاد افشاری

ندا صبا، رحیمه سپهری* و محمدطاهر هرکی نژاد

ایران، زنجان، دانشگاه زنجان، دانشکده کشاورزی، گروه علوم دامی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۰۶

چکیده

در اکثر نژادهای گوسفند به‌ویژه نژادهای داخل ایران، تولیدمثل فصلی است. هورمون ملاتونین نقش مهمی در تولیدمثل فصلی دارد در پژوهش حاضر، چندشکلی(های) موجود در اگزون شماره دو ژن MTNR1A در گوسفند افشاری در دو گروه نمونه-های تصادفی (۳۵ راس) و غیرفصلی (۴۴ راس) بررسی شد. پس از استخراج DNA از نمونه خون دام‌ها و طراحی پرایمرهای اختصاصی جهت تکثیر قطعه مورد نظر (بخش انتهایی اینترون یک، کل اگزون شماره دو و بخش ابتدایی اینترون دو)، تکثیر این قطعه با دستگاه PCR انجام و شناسایی چندشکلی(های) موجود به کمک توالی‌یابی تعدادی از نمونه‌ها صورت گرفت. توالی‌ها در نرم‌افزارهای Chromas lite و ClC Main Workbench 5 بررسی شدند. یک چندشکلی در نوکلئوتید ۴۰۸ از قطعه تکثیر شده (منطبق بر چندشکلیC519C>T از توالی cDNA) شناسایی شد. با تعیین ژنوتیپ محصولات توالی یابی نشده به کمک RFLP، سه ژنوتیپ CC، CT و TT به ترتیب فراوانی‌های ۰/۷۸، ۰/۱، ۰/۱۱ شناسایی شدند. براساس نتایج حاصله، در کل داده‌ها، فراوانی آلل C وآلل T به‌ترتیب، ۰/۸۳۵ و ۰/۱۶۵ بود. ولی در گروهی که آبستنی غیرفصلی داشتند، آلل T فراوانی بیشتری داشت. همچنین، همبستگی مثبت و معنی‌داری بین ژنوتیپ و تولیدمثل غیرفصلی مشاهده شد (r=0.36, p=0.0001). بررسی نسبت Odds نیز نشان داد که احتمال وجود آلل T در این گروه ۱۹ برابر بیشتر از گروه تصادفی می‌باشد. لذا، احتمالا آلل T با غیرفصلی بودن تولیدمثل این گوسفندان مرتبط است. با توجه به نتایج بدست‌آمده و در صورت تأیید نتایج فوق در مطالعات تکمیلی، از چندشکلی فوق می‌توان در جهت بهبود وضعیت تولیدمثلی گوسفند استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: گوسفند افشاری، تولیدمثل غیرفصلی، ملاتونین، اگزون دو، چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: sepehri_r@znu.ac.ir

مقدمه

رفتار دوره‌ای حاکم بر طبیعت بر فیزیولوژی موجودات، اثر تعیین کننده‌ای دارد. مهمترین دوره زمانی درونی، دوره شبانه‌روزی است که بسیاری از فرآیندها از جمله ترشح هورمون‌ها تحت تأثیر نوسانات طول شبانه‌روز قرار می-گیرد. در کنار نوسانات زمانی روز، یک دوره‌ی تابع فصل نیز وجود دارد (۱). نژادهای گوسفند که در مناطق معتدل زندگی می‌کنند تولیدمثل فصلی دارند که توسط دوره‌های نوری تنظیم شده است. این صفت در دوره خاصی از سال منجر به زاد و ولد می‌شود (۱۰ به نقل از ۵). تولیدمثلی فصلی با طول دوره روشنایی روز تنظیم می‌شود و هنگامی‌که ساعات تاریک در حال افزایش است و با کوتاه شدن طول روز (از تابستان تا زمستان)میش‌ها فعالیت تولید مثلی بیشتری نشان می‌دهند (۱۰). یک پیام سلولی شیمیایی برای دوره‌های نوری در پستانداران هورمون ملاتونین می-باشد که نقش کلیدی در تولیدمثل فصلی بازی می‌کند (۲) و این هورمون، بصورت مشخصی در بروز، کنترل و رفتار جنسی گوسفندان اثر گذار است (۱۹).

DOR: 10.22034/CMR.2023.2337 مقاله پژوهشی، صفحات ۲۵۳-۲۳۸

با توجه به اینکه اغلب نژادهای گوسفند دارای تولیدمثل فصلی هستند، این خصوصیت گوسفند در بسیاری از مناطق دنیا منجر به محدود شدن رفتار تولیدمثلی شده و تنها یک بار زایش انجام می‌پذیرد (۱۰). در نتیجه، در یک سیستم تولید گوشت، بازده تولید به ازای هر حیوان را می-توان با زیاد کردن عملکرد تولیدمثل از طریق افزایش باروری و چندقلوزایی و کاهش طول چرخه‌ی تولیدمثل (چندبارزایی) افزایش داد (۲۰،۹). از جمله راهکارهایی که جایگزین مناسبی برای حیوانات پلی‌استروس (Polyestrous) باشد تا بتوانند بدون در نظر گرفتن دوره سال و یا اجتناب از ترفند هورمون تراپی به فعالیت تولید-مثلی برگردند، شناسایی ژنوتیپ‌هایی است که به تولیدمثل فصلی کمتر حساس هستند (۲).

بدین منظور، ژن گیرنده ملاتونین (Melatonin receptor MTNR1A=1A) به طور مکرر در مطالعات پیشین بعنوان ژن کاندیدا پیشنهاد شده‌است و بنظر می‌رسد در کنترل دوره‌های نوری که در آن غلظت ملاتونین با تغییرات طول روز تحت تأثیر قرار می‌گیرد، نقش کلیدی دارد. در مطالعات پیشین متعددی ارتباط آماری چند شکلی های نوکلئوتیدی در این ژن در گونه‌های مختلف با تولیدمثل فصلی گزارش شده است. بویژه ساختار و پلی‌مورفیسم اگزون شماره دو از این ژن در چند نژاد گوسفند بررسی شده و ژنوتیپ‌های خاصی با فعالیت‌های تولیدمثلی مرتبط بوده‌اند (۳،۱۵،۱۶).

در این راستا، مسر (Messer) و همکاران (۱۲) برای اولین بار با استفاده از توالی ژن MTNR1A گوسفند (ثبت شده با کد u14109 در بانک اطلاعاتیNCBI) یک جفت پرایمر جهت تکثیرقطعه ۸۲۴ جفت‌بازی از اگزون شماره دو را طراحی نمودند. دو جهش در نواحی ژنی ۶۰۶ و ۶۱۲ شناسایی شد. جهش ناحیه ۶۰۶ در اثر جابجایی نوکلئوتید T با C و در جهش ناحیه۶۱۲ نوکلئوتید A جایگزین باز نوکلئوتیدی G شده بود. در پژوهشی که به منظور بررسی چندشکلی ژن MTNR1A در گوسفندان نژاد قزل انجام شد، داده‌های حاصل از فناوری توالی‌یابی نمونه‌ها، نتایج مسر و همکاران (۱۲) را تأیید کرد (۱۳). نتایج آماری بدست آمده از بررسی ارتباط بین ساختار ژن MTNR1A و فعالیت تولید مثلی در نژاد ساردا، ارتباط معنی داری بین ژنوتیپ Rr و فعالیت تولیدمثلی نشان دادند که به شدت تحت تأثیر دوره نوری قرار می‌گیرد (۲).

مرادی و همکاران (۱۴) از تعداد ۱۲۴ رأس میش از نژاد زل و نائینی با استفاده از روش PCR-RFLP یک چند شکلی تک نوکلئوتیدی در ناحیه ۶۰۵ جفت بازی اگزون دوم شناسایی کردند. آن‌ها پیشنهاد دادند که می‌توان از این نتایج در مطالعات همبستگی بین ژنوتیپ و صفات مرتبط به تولیدمثل گوسفند بهره جست. ارتباط بین فصلی بودن تولیدمثل و ژن MTNR1A در گوسفند راسا (Rassa) در پژوهشی مورد بررسی قرار گرفت و ۱۷ چندشکلی در ناحیه پروموتر و ۱۱ چندشکلی در ناحیه اگزون دوم شناسایی شد. همچنین، سه ژنوتیپ برای SNPهای ۶۰۶ و ۶۱۲ در نظر گرفته شده بود و نتایج آن‌ها نشان داد که آلل جهش یافته T در ارتباط با تولیدمثل غیرفصلی می‌باشد (۱۱). در گوسفندان ساردا (Sarda) بمنظور بررسی تأثیر پلی‌مورفیسم ژن MTNR1A بر آغاز تولیدمثل و ارزیابی تأثیر سن و نمره وضعیت بدن بر آن، مطالعه‌ای انجام شد. داده‌ها نشان داد که پلی‌مورفیسم ژن MTNR1A بر از سر-گیری تولیدمثل در فصل بهار در این نژاد تأثیر مثبت داشته و علاوه بر این، نشان داده شد که در حیطه‌ای که این آزمایش انجام شده نمره وضعیت بدنی و سن تأثیر معنی-داری بر فعالیت‌های تولیدمثلی نداشته است (۴ و۱۶). بمنظور مطالعه و بررسی پلی‌مورفیسم ژن MTNR1A و ارتباط آن با فصلی بودن تولیدمثل، پژوهشی در یک مرکز اصلاح نژاد گوسفندان بومی یونان انجام شد. در این آزمایش، ساختار ژن MTNR1A برای اولین بار در گوسفند بومی یونان آنالیز شد. تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که همبستگی مثبت بین ژنوتیپ و فصلی بودن تولیدمثل وجود دارد و ژنوتیپ C/C نقش مهمی در فعالیت تولیدمثل خارج

DOR: 10.22034/CMR.2023.2337 مقاله پژوهشی، صفحات ۲۵۳-۲۳۸

فصلی بازی می‌کند(۷). بررسی پلی‌مورفیسم گیرنده ژن ملاتونین (MTNR1A) در جمعیت بزهای کاسانگ (Kacang) و پراناکان اتاوا (Peranakan Ottawa) در منطقه جنوب اندونزی نیز با انتخاب تصادفی ۲۵۳ رأس بز انجام و برای تعیین ژنوتیپ‌ها از روش PCR-RFLP توسط آنزیم RsaI استفاده شد. مشاهده دو آلل R و r در نتایج نشان داد که تنوع ژنتیکی در ژن MTNR1A بزهای کاسانگ و پراناکان وجود دارد. با توجه به نتایج آزمون هاردی واینبرگ، این جمعیت برای ژن MTNR1A در تعادل بود (۶). با توجه به اهمیت مساله‌ی تولید مثل گوسفندان و ارتباط عوامل پیرامونی و هورمونی با این مقوله و در راستای برنامه ریزی کاربردی در این بخش، این تحقیق با هدف شناسایی تنوع آللی در ناحیه ای از ژن گیرنده ملاتونین در گوسفندان افشاری انجام شد (۵).

مواد و روشها

انتخاب دام ها و تهیه نمونه‌های خون: جهت اجرای تحقیق حاضر، از گوسفندان نژاد افشاری استفاده شد. نژاد افشاری، نژادی سنگین وزن است و از پتانسیل مناسبی برای تولید گوشت برخوردار است (۱۷). با توجه به بالا بودن میزان دوقلوزایی در این نژاد، می‌توان آن را از نژادهای گوشتی گوسفندان ایرانی محسوب نمود (۱۸). دام‌های مورد استفاده در دو گروه قرار گرفتند. گروه یک در مجموع، ۳۵ رأس میش که به طور تصادفی از گله‌های مختلف انتخاب شدند و گروه دو در مجموع، ۴۴ رأس میش بودند که در فصل غیر تولیدمثل آبستن شده بودند. خون‌گیری با کمک ونوجکت خلأدار ۶ سی‌سی حاوی ماده ضد انعقاد EDTA از سیاهرگ وداج انجام شد. نمونه-های خون تا زمان استخراج DNA در فریزر با دمای منهای ۲۰ درجه سانتیگراد نگه‌داری شد.

آزمایشات مولکولی: استخراج DNA از نمونه‌های خون به روش فنل-کلروفرم انجام شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده نیز با استفاده از دستگاه نانودراپ مشخص گردید. بمنظور تکثیر قطعه مورد نظر، آغازگر اختصاصی توسط نرم‌افزار آنلاین (http://bioinfo.ut.ee/primer 3-0.4.0/) Primer 3 (v.0.4.0) طراحی شد. آغازگرهای پیشنهاد شده توسط نرم‌افزار تحت آزمون‌های Primer Blast، Fast Pcr و Mfold جهت انتخاب بهترین آغازگر که بتواند کاملاً، اختصاصی ناحیه مورد نظر را تکثیر دهد، قرار گرفت و بهترین آغازگرهای پیشرو و پس‌رو انتخاب شدند.

مواد لازم برای انجام واکنش PCR عبارت بودند از، بافر واکنش PCR ، کلرید منیزیم، dNTPs و آنزیم تک پلیمراز که همگی به صورت مخلوط در red master mix خریداری شده موجود بودند و آغازگرها و DNA حاصل از نمونه‌های استخراج شده، به عنوان الگو در واکنش‌های PCR استفاده شد. هر مخلوط واکنش (۲۵ میکرولیتر) شامل ۱۲/۵ میکرولیتر از Red Master Mix، ۰/۱ میکرولیتر از هر آغازگر و ۱ میکرولیتر از DNA ژنومیک به ازای هر واکنش استفاده شد. برنامه زمانی مورد استفاده برای اگزون شماره دو به صورت: واسرشته سازی اولیه: دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و ۳۰ سیکل شامل؛ ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه بود که در انتها با دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه پایان می یافت.

جهت بررسی وجود SNP(های) احتمالی موجود در قطعه تکثیر شده از ژن مورد بررسی، از روش ترکیبی توالی‌یابی مستقیم و RFLP استفاده شد. بدین صورت که، در ابتدا، تعداد ۱۰ نمونه از محصولات حاصل از تکثیر به‌طور تصادفی انتخاب و جهت توالی‌یابی به شرکت زیست فناوری کوثر ارسال شد. توالی‌های بدست آمده توسط بررسی کروماس (منحنی مربوط به توالی) آنها در نرم‌افزار Chromas lite و نیز نرم‌افزار ClC Main Workbench 5 از نظر وجود چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی مورد بررسی و

DOR: 10.22034/CMR.2023.2337 مقاله پژوهشی، صفحات ۲۵۳-۲۳۸

آنالیز قرار گرفت. پس از مشاهده چندشکلی در نمونه‌های توالی‌یابی‌شده تعیین ژنوتیپ سایر محصولات توالی یابی نشده به کمک RFLP انجام شد. شناسایی آنزیم محدودکننده مناسب برای تشخیص ژنوتیپ‌ها نیز به کمک نرم‌افزار ClC Main Workbench 5 انجام شد.

جدول ۱ - آغازگرهای اختصاصی طراحی شده جهت تکثیر اگزون شماره دو ژن MTNR1A

پرایمر	جهت	توالی ('3→'5)	طول قطعه‌ی تکثیر شده	TM	ناحیه‌ی تکثیر
MTNR1A	پیشرو	GCTTGAATACCCAGGAAAGG	۱۰۲۶	۵۸	اگزون دوم
	پیرو	GCATCTACCAACAGGGAATGA			

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

بررسی فراوانی های ژنوتیپی و آللی و وجود تعادل هاردی واینبرگ بکمک نرم‌افزار Popgene (۲۱) انجام شد. از آنجایی‌که متغیرهای مورد بررسی در مطالعه حاضر، متغیرهای پیوسته نبوده و طبقه‌بندی شده می‌باشند؛ لذا، از روش‌های آماری ناپارامتری برای آنالیز این داده‌ها استفاده شد. بدین‌منظور، از نرم افزار آنلاین Medcalc (https://www.medcalc.net/statisticaltests/odds_ratio.php) برای محاسبه odd ratio (نسبت شانس)و همچنین از روش اسپیرمن (Spearman) برای محاسبه ضریب همبستگی بین دو متغیر استفاده شد.

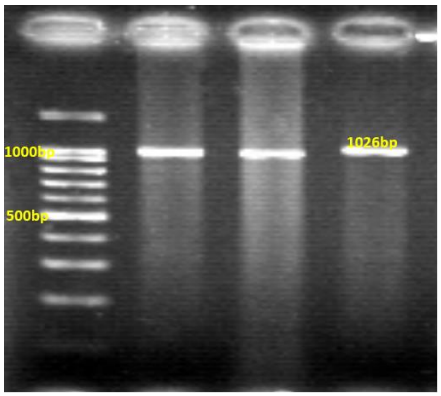
نتایج و بحث

تکثیر قطعه ۱۰۲۶ جفت بازی شامل کل ناحیه اگزون شماره دو ژن MTNR1A و بخش‌هایی از اینترون یک و دو با استفاده از پرایمرهای طراحی شده در این پژوهش با موفقیت انجام شد. برای تعیین موقعیت باندهای حاصل از تکثیر از یک شاخص مولکولی ۱۰۰جفت بازی (Ladder) استفاده شد (شکل ۱). براساس نتایج حاصل از آنالیز محصولات توالی‌یابی‌شده، مطابقت توالی‌ها با توالی رفرنس ثبت‌شده (NM_001009725.1) تأیید و یک چندشکلی در نوکلئوتید ۴۰۸ از قطعه تکثیر شده (منطبق با نوکلئوتید ۳۲۶ از اگزون شماره ۲) شناسایی شد. در این چندشکلی نوکلئوتید C با نوکلئوتید T جایگزین شده است. صحت قطعه تکثیر شده با استفاده از تعیین توالی محصولات PCR حاصله نیز مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۲).

برای شناسایی چندشکلی ذکر شده در نمونه‌های توالی‌یابی نشده از روش RFLP با استفاده از آنزیم محدود کننده RsaI با جایگاه اتصال و برش GTAC استفاده شد.

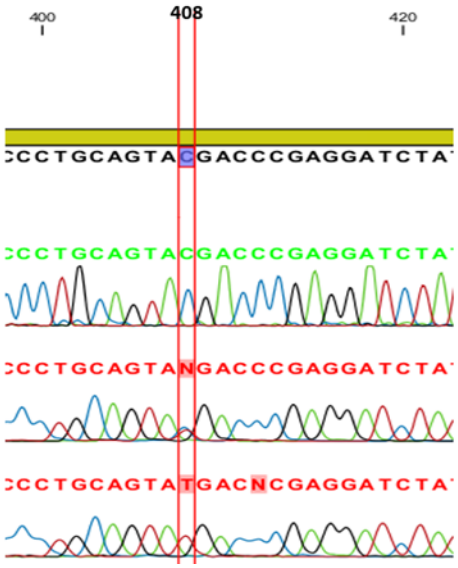
بر اساس نتایج ارائه شده در جدول شماره ۲، این آنزیم قطعه تکثیر شده را در حالت مرجع در چهار جایگاه برش می‌دهد و پنج قطعه‌ی ۴۱۱، ۲۶۷، ۱۸۶، ۱۳۹،۲۳ جفت بازی را تولید می‌کند. درحالی‌که در نمونه‌هایی که در منطقه مورد نظر، آلل T (جهش یافته) را دارند یکی از جایگاه‌های برش حذف و در نتیجه چهار قطعه به طول های ۴۱۱، ۲۹۰، ۱۸۶، ۱۳۹ جفت بازی را تولید می‌شوند. اگرچه، قطعه ۲۳ جفت بازی تولیدشده در حالت رفرنس در انتهای ژل قرار گرفته یا خارج شده و قابل تشخیص نخواهد بود. لذا در هر دوحالت هموزیگوت رفرنس (CC) و هموزیگوت جهش یافته (TT) چهارقطعه قابل مشاهده خواهد بود ولی یکی از قطعه‌ها در این‌دو هموزیگوت متفاوت (۲۶۷ جفت باز در حالت رفرنس و۲۹۰ جفت باز در حالت جهش-یافته) خواهد بود. در ژنوتیپ هتروزیگوت، یکی از کروموزوم‌ها در محل چندشکلی موردنظر تحت تأثیر برش آنزیمی قرار می‌گیرد ولی در کروموزوم دیگر (همتا) برش آنزیمی اتفاق نمی‌افتد به همین دلیل هر دو قطعه ۲۹۰ و ۲۶۷ جفت بازی مشاهده می‌شود.

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۵۳-۲۳۸
DOR: 10.22034/CMR.2023.2337



شکل ۱- باندهای حاصل از الکتروفورز محصولات PCR شامل بخش انتهایی اینترون یک، کل اگزون شماره دو و بخش ابتدایی اینترون دو ژن MTNR1A روی ژل آگارز یک و نیم درصد (۱۰۲۶bp). چاهک اول از سمت چپ مربوط به نشانگر مولکولی DNA (100bp) و بقیه چاهک‌ها قطعه تکثیر شده نمونه‌های مختلف می‌باشند.نتایج تکثیر قطعه ۱۰۲۶ جفت باز از توالی اگزون شماره ۲ ژن با استفاده از الکتروفورز محصولات.

با بررسی تغییرات نوکلئوتیدی شناسایی شده و ثبت شده در اگزون‌های این ژن بخصوص اگزون شماره دو و مطابقت چندشکلی شناسایی شده در پژوهش حاضر با موارد ثبت شده در پژوهشهای سایر محققین مشخص شد که SNP شناسایی شده در پژوهش حاضر قبلاً، شناسایی و با کد rs406779174 در NCBI ثبت شده است. شماره‌ی این SNP در توالی cDNA این ژن (C519C>T) می‌باشد. SNP شناسایی شده در پژوهش حاضر، از نوع هم‌معنی (Synonymous) می‌باشد و در نتیجه منجر به تغییر اسیدآمینه نمی‌شود. اگرچه تغییرات هم‌معنی در کدون‌ها منجر به تغییر اسیدهای آمینه پروتئین‌های مربوطه نمی‌شوند، اما، می‌توانند میزان بیان ژن مربوطه را به دلیل موضوع بهینه بودن یا نبودن کدون برای یک موجود زنده بخصوص تحت تأثیر قرار دهند. این موضوع بویژه در بحث انتقال ژن مورد توجه ویژه قرار می‌گیرد.

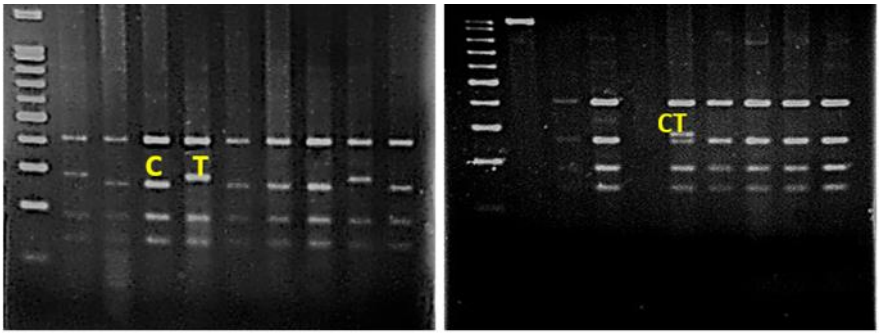


شکل ۲ - بررسی توالی محصولات PCR: ردیف فوقانی که با فاصله بیشتری از سه ردیف بعدی قرار گرفته، توالی مرجع و توالی‌های بعدی توالی نمونه‌های تکثیر شده هستند که به ترتیب ژنوتیپ CC، ژنوتیپ CT و توالی ردیف آخر ژنوتیپ TT را نشان می‌دهند. خطهای قرمز عمودی چندشکلی مشاهده شده در توالی نوکلئوتیدی نمونه‌ها را نشان می دهد

جدول ۲-جزئیات تعیین ژنوتیپ چندشکلی شناسایی شده در اگزون شماره دو ژن MTNR1A به‌روش RFLP

نام ژن	روش تعیین ژنوتیپ	چندشکلی شناسایی شده	آنزیم محدود کننده	قطعات حاصل از هضم
MTNR1A	PCR-RFLP	(C408T) از قطعه تکثیر شده	RsaI	CC (۴۱۱، ۲۶۷، ۱۸۶، ۱۳۹، ۲۳جفت بازی) CT (۴۱۱، ۲۹۰، ۲۶۷، ۱۸۶، ۱۳۹ جفت بازی) TT (۴۱۱، ۲۹۰، ۱۸۶، ۱۳۹ جفت بازی)

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۵۳-۲۳۸ DOR: 10.22034/CMR.2023.2337



شکل ۳- باندهای حاصل از الکتروفورز محصولات هضم آنزیمی با آنزیم RSaI بر روی ژل آگارز دو و نیم درصد. در هر دو شکل، اولین ستون از سمت چپ مربوط به نشانگر مولکولی ۱۰۰bp و باقی ستون‌ها، باندهای مربوط به تعدادی از نمونه‌های مورد بررسی را نشان می‌دهد. شکل چپ: ستون‌های ۹و ۵، ۲ ژنوتیپ TT و ستون‌های ۱۰ و۸، ۷، ۶، ۴، ۳ ژنوتیپ CC را نشان می‌دهد. شکل راست: ستون دوم محصول PCR (شاهد منفی)، ستون‌های ۴و۳ ژنوتیپ TT ، ستون۶ ژنوتیپ CT و ستون‌های ۱۰ و۹، ۸، ۷ ژنوتیپ CC را نشان می‌دهند.

جدول ۳، فراوانی ژنوتیپی و آللی این SNP را در کل داده-ها و همچنین به تفکیک گروه نشان می‌دهد. براساس نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها با نرم‌افزار POPGENE (۲۱)، ژنوتیپ TT تنها در گوسفندان گروه ۲ (گروه آبستن شده در فصل غیرتولیدمثلی گوسفند) با فراوانی نسبی ۰/۲۱مشاهده شد و در دام‌های گروه یک هیچ مشاهده‌ای برای این ژنوتیپ نبود. فراوانی نسبی ژنوتیپ CC برای هر دو گروه و کل داده‌ها بیشتر از سایر ژنوتیپ‌ها بود؛ اگرچه فراوانی نسبی این ژنوتیپ در گروه دوم کمتر از گروه اول (۰/۶۸ در مقابل ۰/۹۱) بود. فراوانی نسبی ژنوتیپ هتروزیگوت نیز در گروه دوم بیشتر از گروه اول (۰/۱۱ در مقابل ۰/۰۸) بود. بررسی فراوانی آللی در دو گروه مورد مطالعه نشان داد که در گروهی که آبستنی غیرفصلی داشتند، آلل T فراوانی بیشتری داشت.

آلل‌های گروه یک یعنی میش‌هایی که به صورت تصادفی از چند گله مختلف انتخاب شده بودند، در حالت تعادل هاردی ـ واینبرگ قرار داشتند در حالیکه، گروه دو، در اینجا غیر فصلی، در شرایط عدم تعادل قرار داشت. دلیل این موضوع می‌تواند انتخاب تعداد محدودی از دام‌ها (که تولیدمثل غیر فصلی داشتند) به عبارتی عامل انتخاب و اندازه نمونه باشد. در مطالعه حاضر، فراوانی آلل مرجع (C) بیشتر از آلل جهش یافته T می‌باشد. فراوانی این دو آلل در نژادهای مختلف گوسفند دنیا متفاوت است.

جدول ۳- فراوانی ژنوتیپی و آللی و بررسی وجود تعادل هاردی-واینبرگ در SNP شناسایی شده

نام ژن	موقعیت چندشکلی	نوع چندشکلی	گروه	فراوانی ژنوتیپی			فراوانی آللی		کای اسکوئر	مقدار P
				CC	CT	TT	C	T		
MTNR1A	C519C>T	هم‌معنی (Synonymous)	یک	۰/۹۱ (۳۲)	۰/۰۸ (۳)	۰ ۰	۰/۹۶	۰/۰۴	۰/۴۶۱	۰/۸۲۹
			دو	۰/۶۸ (۳۰)	۰/۱۱ (۵)	۰/۲۱ (۹)	۰/۷۴	۰/۲۶	۲۲/۹۵	۰/۰۰۰۰
			کل	۰/۷۸ (۶۲)	۰/۱ (۸)	۰/۱۱ (۹)	۰/۸۳۵	۰/۱۶۵	۳۲/۸۵	۰/۰۰۰

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۵۳-۲۳۸ DOR: 10.22034/CMR.2023.2337

بررسی بخشی از اگزون دو توسط کارکانگیو و همکاران (۲)، بر روی نژاد ساردا با روش PCR-RFLP و به‌کمک آنزیم برشی RsaI انجام و دو ژنوتیپ با فراوانی ۹۶ درصد و ۴ درصد شناسایی شد. آنها فراوانی دو آلل شناسایی شده را در این نژاد به ترتیب ۰/۹۸ و ۰/۰۲ برآورد نمودند که بسیار نزدیک به نتایج پژوهش حاضر در گروه یک است. در این پژوهش، نیز ژنوتیپ سوم (ژنوتیپ جهش-یافته) مشاهده نشد (همانند نمونه‌های گروه یک پژوهش حاضر). در مطالعه‌ی مشابه دیگری از همین محققان (۳) روی همین ژن، پس از هضم قطعه تکثیر شده با آنزیم MnlI، فراوانی آللی برای آلل +، (جایگزین شدن نوکلئوتید A به جای G) ۰/۷۸ و برای آلل-، ۰/۲۲ می‌باشد. فراوانی ژنوتیپ-ها نیز ۶۸، ۲۰/۵ و ۱۱/۵ درصد بترتیب برای ژنوتیپ‌های + +، - + و - - به دست آمد. همچنین هضم با آنزیم RsaI فراوانی آللی ۰/۶۶ برای آلل C (آلل رفرنس) و ۰/۳۴ برای آلل T (آلل جهش یافته) را نشان داد. فراوانی برای ژنوتیپ‌های CC، CT و TT به ترتیب۵۳/۵، ۲۶ و ۲۰/۵ بدست آمد. آنها گزارش نمودند که هر دوی این چند-شکلی‌ها فاقد تعادل هاردی-واینبرگ می‌باشند. چندشکلی دوم گزارش شده در پژوهش مذکور با پژوهش حاضر مطابقت دارد.

مورا و همکاران (۱۳ و ۱۴) دو چندشکلی تک نوکلئوتیدی را در ناحیه ۶۰۶ و ۶۱۲ قطعه تکثیر شده از اگزون دوی نژاد ساردا شناسایی کردند. در پژوهش آنها نیز فراوانی آلل رفرنس (C) بیشتر از آلل جهش یافته بود نتایج این گزارش نیز با نتایج ما همخوانی دارد.

برای اولین بار جیانتسیس و همکاران (۷) اگزون شماره دوی گوسفندان بومی یونان را به منظور بررسی ارتباط تولیدمثل فصلی با ژن MTNR1A مورد بررسی قرار دادند و در ناحیه ۶۰۶ و ۶۱۲ دو چندشکلی شناسایی کردند. در هر دو گروه مورد بررسی در این پژوهش نیز فراوانی ژنوتیپ CC و آلل C بیشتر بود. مارتینز و همکاران (۱۱) ارتباط بین فصلی بودن باروری و ساختار ژن MTNR1A را در گوسفند نژاد راسا آرگونسا بررسی کردند. جهش‌های خاموش که در ارتباط با تولیدمثل فصلی در سایر نژادها گزارش شده بود در نژاد راسا نیز مشاهده شد. آلل جهش یافته T در نوکلئوتید ۶۰۶ اگزون دو در ارتباط با چرخه آبستنی میش‌های راسا بود. در این پژوهش سه ژنوتیپ برای اسنیپ‌های ۶۰۶ و ۶۱۲ در نظر گرفته شد و نتایج نشان داد که آلل جهش یافته T در ارتباط با تولیدمثل فصلی بوده و باعث افزایش چرخه فحلی در دام‌های دارای ژنوتیپ TT شد. نتایج حاصل از مطالعه حاضر در مورد شناسایی چندشکلی، با چندشکلی گزارش شده در مطالعات قبل در جایگاه ۶۰۶ اگزون شماره دو مطابقت دارد که با رنگ قرمز در شکل ۴ نشان داده شده است.

شکل ۴- نمای شماتیک از ژن MTNR1A گوسفند، که جعبه‌ها اگزون را نمایش می‌دهند (توالی‌های کدکننده و غیر کدکننده به ترتیب سیاه و خاکستری نشان داده شده است). پلی‌مورفیسم شناسایی شده در پژوهش حاضر با فلش قرمز رنگ نشان داده شده است. موقعیت پلی‌مورفیسم با توجه به توالی GenBank AY525665 و u14109 نشان داده شده است. برای SNPهای اگزون دو موقعیت اسیدآمینه و تغییر آن در پرانتز نشان داده شده است.

DOR: 10.22034/CMR.2023.2337 مقاله پژوهشی، صفحات ۲۵۳-۲۳۸

در کنسرسیوم بین‌المللی ژنوم گوسفند (International Sheep Genome Consortium(ISGC)) نتایج پژوهش-هایی که بر روی نژادهای مختلف در این باره انجام شده ثبت گردیده است. در برخی از نژادها فقط آلل C، برخی فقط آلل T و در برخی نیز هر دو آلل وجود داشته‌است. (https://asia.ensembl.org/Ovis_aries/Variation/Population) . فراوانی آللی که در این مطالعات گزارش شده است به-دلیل کوچک بودن اندازه نمونه، قابل اعتماد کامل نیست. برای نمونه در اطلاعات این کنسرسیوم، برای گوسفند افشاری نیز تنها ژنوتیپ CC ثبت شده است (براساس ژنوتایپینگ ۲ نمونه). در حالی‌که در مطالعه حاضر آلل T با فراوانی نسبتاً مناسبی مشاهده شد. البته در این مطالعه به دلیل اینکه از گله هایی که از کار تلاقی با ترکیب ژنتیکی چندقلوزا به دور بوده‌اند نمونه برداری نشد بنابراین دقیقاً نمی‌توان گفت که فراوانی آللی T در نژاد افشاری در چه وضعیتی است. اما به هرحال هدف اولیه این پژوهش شناسایی آلل‌هایی در این ژن بود که با غیرفصلی بودن مرتبط باشد و منشأ آلل در ابتدا اهمیت چندانی نداشت. مطالعات تکمیلی می‌تواند به روشن‌تر شدن موضوع کمک نماید.

در خصوص ارتباط گروه های تولیدمثلی مورد بررسی با آللهای شناسایی شده در پژوهش حاضر، تجزیه و تحلیل آماری بر اساس نسبت شانس (Odds ratio) نشان داد که فراوانی الل T در دو گروه دام‌های انتخاب شده به صورت تصادفی و گروه غیرفصلی معنی‌دار است. با بررسی وضعیت نسبت شانس آلل T در دو حالت فرضی غالب و مغلوب و با فرض اینکه آلل T سبب غیرفصلی بودن تولیدمثل شود، در حالت مغلوب بودن این آلل، احتمال وجود الل T در گروه غیر فصلی ۱۹ برابر بیشتر از گروه تصادفی است (P-value = 0.04) و در حالت غالب بودن این آلل، احتمال آلل T در گروه غیرفصلی ۵ برابر بیشتر از گروه تصادفی است (P = 0.019). لذا بنظر می‌رسد آلل T با غیرفصلی بودن تولیدمثل این گوسفندان مرتبط باشد.

همانطور که در منابع مختلف اشاره شده است، موضوع فصلی بودن تولیدمثل در اغلب نژادهای گوسفند باعث می‌شود در فصول غیر تولید مثلی بهره‌وری گله کاهش پیدا کند. در این خصوص دام‌هایی که وضعیت غیرفصلی بودن تولیدمثل را دارند از ارزش ویژه‌ای برخوردار هستند. تحقیق حاضر هم از لحاظ نوع ارتباط با صفت تولید مثل و هم به نوعی از نظر فراوانی آللی با برخی از پژوهش‌های انجام شده به ویژه حاتمی و همکاران (۸) و جیانتسیس و همکاران (۷) همخوانی دارد. همانند پژوهش‌های کارکانگیو و همکاران (۲) و مارتینز و همکاران (۱۱) پژوهش حاضر نیز نشان می‌دهد که در گوسفند افشاری احتمالاً چندشکلی یافت شده با غیر فصلی بودن تولید مثل میتواند در ارتباط باشد.

بر اساس نتایج حاصل از آنالیز همبستگی اسپیرمن نیز، بین گروه تولیدمثلی و ژنوتیپ همبستگی مثبت و معنی داری (r=۰/۳۶۵ ، p-value=۰/۰۰۰۱) مشاهده شد؛ بطوری‌که با تغییر گروه تولیدمثلی از تصادفی به غیرفصلی، فراوانی ژنوتیپ TT بیشتر شد. همین ارتباط در مورد آلل‌های شناسایی شده نیز مشاهده شد (p-value=۰/۰۱۲ ، r=۰/۲۸۱).

صفات مرتبط با تولید مثل دام از پیچیدگی‌های خاصی برخوردار است. گاهی با وجود تمام انتخاب‌های که برای تولید دام‌های پرتولید انجام می‌گیرد، پاسخ چندانی بدست نمی‌آید؛ در حالیکه در مواردی هم ممکن است یک ژن بزرگ‌اثر (مانند FecB) تحول بزرگی را ایجاد نماید. با توجه به نتایج بدست‌آمده و در صورتی که مطالعات تکمیلی نتایج فوق را دوباره تائید نمایند، از چندشکلی ذکر شده می‌توان در کارهای اصلاح نژادی در جهت بهبود وضعیت تولیدمثلی در گوسفند استفاده نمود. اما بهر حال لازم است که تحقیق در سطح وسیع‌تری، بویژه در گله‌های گوسفند افشاری که در سال‌های اخیر تحت پوشش ورود ژن FecB نبوده اند انجام و براساس آن استنتاج بهتری

DOR: 10.22034/CMR.2023.2337 مقاله پژوهشی، صفحات ۲۵۳-۲۳۸

صورت پذیرد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از کارشناس محترم آزمایشگاه ژنتیک مولکولی گروه علوم دامی دانشگاه زنجان، سرکار خانم مهندس سیامکی، که نهایت همکاری را در اجرای این پژوهش داشتند تقدیر و تشکر بعمل می آید.

منابع

1- Bubenik, G. A. 2008. Thirty four years since the discovery. Journal of physiology and pharmacology 59.2: 33-51.

2- Carcangiu, V., M.C. Mura, G.M. Vacca, M. Pazzola, M.L. Dettori, S.Luridiana and P.P. Bini. 2009a. Polymorphism of the melatonin receptor MT1 gene and its relationship with seasonal reproductive activity in the Sarda sheep breed. Animal Reproduction Science. 116(1-2):65-72.

3- Carcangiu, V., G.M. Vacca, M.C. Mura, M.L. Dettori, M. Pazzola, S. Luridiana and P. P. Bini. 2009b. Relationship between MTNR1A melatonin receptor gene polymorphism and seasonal reproduction in different goat breeds. Animal Reproduction Science. 110(1-2):71-78.

4- Carcangiu, V., S. Luridiana, G. M. Vacca, C. Daga and M. C. Mura. 2011. A polymorphism at the melatonin receptor 1A (MTNR1A) gene in Sarda ewes affects fertility after AI in the spring. Reproduction, Fertility and Development. 23(2): 376-380.

5- Chemineau, P., Daveau, A., Pelletier, J., Malpaux, B., Karsch, F. J., & Viguié, C. (2003). Changes in the 5-HT2Areceptor system in the pre-mammillary hypothalamus of the ewe are related to regulation of LH pulsatile secretion by an endogenous circannual rhythm. *BMC neuroscience*, *4*(1), 1-14.

6- Dagong, M. I. A., R. R. S. R. A. Bugiwati and N. PurnomoBugiwati. 2019. Melatonin receptor 1A (MTNR1A) gene polymorphisms in the local goat population in South Sulawesi region of Indonesia. The 1st Biennial Conference on Tropical Biodiversity In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science.270(1): 012009. Makassar, Indonesia.

7- Giantsis, I. A., G. P. Laliotis, O. Stoupa and M. Avdi. 2016. Polymorphism of the melatonin receptor 1A (MNTR1A) gene and association with seasonality of reproductive activity in a local Greek sheep breed. Journal of Biological Research-Thessaloniki, 23(1): 9.

8- Hatami, M., G. Rahimi_ Mianji and A. Farhadi. 2014. Association of melatonin receptor 1A gene polymorphisms with production and reproduction traits in Zandi sheep. Iranian Journal Of Applied Animal Science. 4(1): 75-78.

9- Hernandez, X., L. Bodin, D. Chesneau, D. Guillaume, P. Chemineau, B. Malpaux and M. Migaud. 2005. Relationship between MT1 melatonin receptor gene polymorphism and seasonal physiological responses in Ile-de-France ewes. Reproduction Nutrition Development, 45(2): 151-162.

10- Luridiana, S., M. C. Mura, C. Daga, M. L. Diaz, P. P. Bini, G. Cosso and V. Carcangiu, 2015. The relationship between melatonin receptor 1A gene (MTNR1A) polymorphism and reproductive performance in Sarda breed sheep. Livestock Science, 171, 78-83.

11- Martínez-Royo, A., B. Lahoz, J. L. Alabart, J. Folchand J. H. Calvo. 2012. Characterisation of the melatonin receptor 1A (MTNR1A) gene in the Rasa Aragonesa sheep breed: association with reproductive seasonality. Animal reproduction science, 133(3-4): 169-175.

12- Messer, L., L. Wang, C. Tuggle, M. Yerle, P. Chardon, D. Pomp, J. Womack, W. Barendse, A. Crawford, D. Notter and M. Rothschild. 1997. Mapping of the melatonin receptor la (MTNR1A) gene in pigs, sheep, and cattle. Mammalian Genome 8(5):368-370.

13- Mirabzadeh Ardakani. A., A. Nejati-Javaremi, M. Sadeghi and N. Zare-Shahneh. 2010. Detection of Genetic Polymorphism in Melatonin Receptor 1 (Locus MTNR1A) gene in Ghezel sheep by PCR-RFLP. The 4th Congress on Animal Science. pp:3419-3422. Karadj. Iran.(In Persian)

14- Moradi N., GH. Rahimi_Miyaneji, H. Deldar and M.B. Kaamjoo. 2012. Detection of Genetic Polymorphism in Melatonin Receptor 1 (Locus MTNR1A) gene in Zel and Naeini sheep. The 7th Biotechnology Conference of the Islamic Republic.Tehran. Iran. (In Persian) https://civilica.com/doc/376052.

15- Mura, M. C., S. Luridiana, G. M. Vacca, P. P. Bini and V. Carcangiu, 2010. Effect of genotype

DOR: 10.22034/CMR.2023.2337 مقاله پژوهشی، صفحات ۲۵۳-۲۳۸

at the MTNR1A locus and melatonin treatment on first conception in Sarda ewe lambs. Theriogenology. 74(9): 1579-1586.

16- Mura, M. C., S. Luridiana, S. Bodano, C. Daga, G. Cosso, M. L. Diaz and V. Carcangiu. 2014. Influence of melatonin receptor 1A gene polymorphisms on seasonal reproduction in Sarda ewes with different body condition scores and ages. Animal reproduction science. 149(3-4): 173-177.

17- Salmani V., Harkinezhad T. and Salimi D. 2018. .Evaluation of the Association of Polymorphism in FTO Gene with Carcass Traits and Blood Parameters in Afshari× Booroola Merino cross lambs. Cellular and Mulecular Research (Iranian Journal of Biology). 31(1): 46-57. (In Persian)

18- Sepehri R., Harkinezhad T., Alijani S., Shoja Ghias J. and Raafat S.A. 2018. Single Nucleotide Polymorphism in part of GH Gene and Its Association with Carcass Traits in Afshari and Afshari-Booroola Merino sheep. Cellular and Mulecular Research (Iranian Journal of Biology). 31(2): 222-232. (In Persian)

19- Song, Y., H. Wu, X. Wang, A. Haire, X. Zhang, J. Zhang and A. Wusiman. 2019. Melatonin improves the efficiency of super-ovulation and timed artificial insemination in sheep. PeerJ. 7, e6750.

20- Vatankhah, M., M. Moradi-Shahrbabak, A. Nejati-Javaremi, S. R. Miraei-Ashttiani and R. Vaez-Torshizi. 2004. A review of sheep breeding in Iran.591-597pp. Proceeding of the 1st congress of animal& aquatic science. Tehran. Iran. (In Persian)

21- Yeh, F., Yang, R., Boyle, T., Ye, Z. and Mao, J.X., 1997. Pop Gene, the user-friendly computer freeware for the analysis of genetic variation among and within populations using co-dominant and dominant markers. Molecular Biology and Biotechnology Center. University of Alberta.

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۵۳-۲۳۸ DOR: 10.22034/CMR.2023.2337

Identification of allelic variants of melatonin receptor (MTNR1A) in a population of Afshari ewes

Sabaa N., Sepehri R.* and Harkinezhad M.T.

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

Abstract

The reproduction of most breeds of sheep, especially the Iranian breeds, is seasonal. The hormone melatonin plays an important role in seasonal reproduction. The purpose of this research was to examine the polymorphism(s) in exon two of the MTNR1A gene in Afshari sheep in two groups of random and non-seasonal samples (35 randomly selected ewes and 44 spring calving ewes). After extracting DNA from blood samples and designing specific primers, the target DNA was amplified by the PCR method. Based on the results of the sequence analysis in some samples, a polymorphism at nucleotide 408 of the amplified fragment was identified (corresponding to the C519C>T polymorphism of the cDNA sequence). Genotype identification of non-sequenced samples was performed by PCR-RFLP. All three genotypes of this SNP: CC, CT and TT with frequencies of 0.78, 0.1 and 0.06, respectively, were observed. The frequency of the C allele (0.835) was higher than that of the mutant allele. However T allele had a higher frequency in the non-seasonal group. In addition, a positive and significant correlation between genotype and seasonal reproduction was observed (r=0.36, p-value=0.0001). Analysis of the odd ratios also showed that the T allele was 19 times more likely to occur in the non-seasonal group than in the random group. In general, it appears that the T allele in this position correlates with non-seasonal reproduction in sheep. If this results can be confirmed in further studies, the mentioned polymorphism can be used in breeding schemes to improve the reproductive status of sheep.

Key words: Afshari sheep, melatonin, Exon2, non-seasonal reproduction, SNP.