

Генетичен полиморфизъм на мелатонин-рецепторния (MTNR1A) ген в популации на местни породи овце

Деяна Генчева

Тракийски университет – Стара Загора

E-mail: dhristova@uni-sz.bg

Резюме

В настоящото проучване е изследван единичният нуклеотиден полиморфизъм (SNP) в екзон II на мелатонин-рецепторния ген (MTNR1A) при общо 177 индивида от четири автохтонни породи овце: Медночервена шуменска, Каракачанска, Черноглава плевенска и Софийска (Елинпелинска). На базата на PCR-RFLP анализ са идентифицирани двата алела на този ген (С и Т) и съответният генотип (СС, СТ и ТТ) на индивидите. Установена е противоположна тенденция в разпределението на честотите на двата алела при овцете от породата Черноглава плевенска (0,694 за алел С и 0,306 за алел Т) и съответно при Медночервена шуменска порода (0,267 за алел С и 0,733 за алел Т). Сходни стойности за алелните честоти по проучвания ген са отчетени за породите Каракачанска (0,589 и 0,411) и Софийска (0,605 и 0,395). Нивото на генетично разнообразие по отношение на гена MTNR1A е най-високо при Софийската популация овце ($H_o = 0,512$ и $H_e = 0,483$), за която е отчетен нисък коефициент на инбридинг ($F_{is} = -0,070$) и съответствие с равновесието по Харди-Вайнберг ($P = 0,701$). Установено е средно ниво на генетичното разнообразие при овцете от породите Медночервена шуменска, Каракачанска и Черноглава плевенска ($H_e = 0,391, 0,489$ и $0,428$), както и висок коефициент на инбридинг ($F_{is} = 0,432, 0,495$ и $0,258$) и отклонение от HWE ($P = 0,002, 0,006$ и $0,049$). Най-високи стойности на генетичните дистанции по Ней са отчетени между породите Медночервена шуменска и Черноглава плевенска ($D_A = 0,369$), а най-ниски – между Каракачанска и Софийска ($D_A = 0,005$). Резултатите, представени в това изследване, ясно показват наличие на полиморфизъм в екзон II на гена MTNR1A при българските автохтонни породи овце и потвърждават значението на този полиморфизъм като потенциален ДНК маркер в маркерната селекция в областта на овцевъдството и съхраняването на генетичното разнообразие в изследваните популации овце.

Ключови думи: *Ovis aries*, мелатонин-рецепторен ген (MTNR1A), PCR-RFLP анализ, единичен нуклеотиден полиморфизъм

Genetic Polymorphism of Melatonin Receptor (MTNR1A) Gene in Populations of Local Sheep Breeds

Deana Gencheva

Trakia University – Stara Zagora

E-mail: hristova@uni-sz.bg

Abstract

Citation: Gencheva, D. (2019). Genetic polymorphism of melatonin receptor (MTNR1A) gene in populations of local sheep breeds. *Zhivotnovadni Nauki*, 56(1), 21-32 (Bg).

In the present study the single nucleotide polymorphism in exon II of the melatonin receptor (MTNR1A) gene was investigated on a total of 177 individuals representing four local (autochthonous)

Bulgarian sheep breeds: Copper-red Shumen, Karakachan, Pleven Blackhead and Sofia (Elin-Pelin). Two genetic variants of MTNR1A gene (C and T) and three genotypes (CC, CT and TT) have been identified using PCR-RFLP analysis. The obtained gene frequencies of MTNR1A C and T in two investigated sheep breeds, were contrary: 0.694 and 0.306 in Pleven Blackhead sheep, versus 0.267 and 0.733 in Copper-red Shumen sheep, respectively. Similar allele C/T frequencies were found in the other sheep breed: 0.589 for and 0.411 in Karakachan and 0.605 and 0.395 in Sofia sheep, respectively. The genetic diversity at MTNR1A gene was with the highest value in Sofia sheep population ($H_o = 0.512$ и $H_e = 0.489$), low coefficient of inbreeding ($F_{is} = -0.070$) and in correspondence with HWE equilibrium ($P = 0.701$). An average level of genetic diversity was established in the populations Copper-red Shumen, Karakachan and Pleven Blackhead ($H_e = 0.391, 0.489$ and 0.428), high coefficient of inbreeding ($F_{is} = 0.432, 0.495, 0.258$) and HWE deviation ($P = 0.002, 0.006$ and 0.049). The highest Nei's genetic distance ($D_A = 0.369$) was established between Copper-red Shumen and Pleven Blackhead sheep populations, whereas the lowest ($D_A = 0.005$) – between Karakachan and Sofia sheep. The results presented in this study showed clearly polymorphism in exon II of the ovine MTNR1A gene with respect to Bulgarian local sheep breeds and therefore would be confirm the importance of this polymorphism as a potential DNA marker in marker – assisted selection (MAS), as well as for preservation genetic diversity of the examined sheep populations.

Key words: *Ovis aries*, Melatonin receptor gene (MTNR1A), PCR-RFLP analysis, Single nucleotide polymorphism (SNP)

Проучването на ДНК полиморфизми на ниво секвенция по отношение на локуси, асоциирани с важни продуктивни и репродуктивни признаци в областта на животновъдството, в това число и овцевъдството, е във фокуса на вниманието на редица учени от гледна точка на усъвършенстване на прилаганите понастоящем стратегии за развъждане и селекция на генетичните ресурси, както и за развитие на модерна геномна селекция, базирана на използването на ДНК маркери (Marker Assisted Selection, MAS) (Христова et al., 2012; 2014; Христова, 2015). Възможността за генетично усъвършенстване по отношение на локуси за количествени признаци (Quantitative trait loci, QTL), асоциирани със сезонната репродуктивност при овцете, е обстойно дискутирана в обзора на Notter (2005), в който се посочва ключовата роля на т. нар. „сигнални гени“ (*clock genes*), един от които е генът, кодиращ мелатониновия рецептор.

Досега са клонирани и характеризирани три специфични мелатонинови рецептора (Mella, Mellb и Mellc) от ML2 подтипа при някои нисши гръбначни животни (Dubocovich, 1995; Reppert, 1997). От тях при бозайници-

те са представени само Mella (MT1) и Mellb (MT2) със сходна фармакология, от които е установено, че само MT1 рецепторът е включен в регулацията на сезонната репродуктивна активност при овце (Weaver et al., 1996; Dubocovich et al., 2003; Hernandez et al., 2005). Този протеинов рецептор е кодиран от гена MTNR1A, който е ситуиран на хромозома 26 от генома на овцете (Crawford et al., 1995). В структурно отношение MTNR1A е с обща дължина 8 kb (kb – килобази (1kb=1000bp); bp – базови двойки) и се състои от 2 екзона, разделени от 1 интрон (Reppert et al., 1994). Екзон I на MTNR1A кодира първата трансмембранна област и първата вътрешноклетъчна примка на мелатониновия рецептор. Най-добре е проучен екзон II, тъй като именно той е отговорен за основната част от рецептора. Депозиранията в генната банка ДНК секвенция на MTNR1A с идентификационен номер U14109 показва общо 8 нуклеотидни замени, от които шест са скрити („*silent*”), тъй като не са свързани със замяна на аминокиселини в пептидната верига на протеиновия рецептор. Установено е, че генетичният полиморфизъм в MTNR1A се дължи на замяна на

цитозин с тимин (С/Т транзиция) в позиция 606 от екзон II на този ген, което води до експресия на две алтернативни форми на проявление на гена (алели), означени съответно с С и Т (Barret et al., 1997).

В областта на овцевъдството са проведени многобройни изследвания, свързани с проучване на генетичното вариране в мелатонин-рецепторния ген. При генотипиране на овцете от породата Сарда, Carcangiu et al. (2009) установяват по-висока честота на представеност на хомозиготния по алел С генотип (0,660) по този ген. Резултатите, представени от Chu et al. (2003) и от Chu et al. (2006) за Късоопашатата порода овце Small Tail Nan и породата Ну, показват преобладаване на индивидите с хетерозиготен генотип по гена MTNR1A в сравнение с хомозиготните. Сходна тенденция по отношение на честотата на представеност на хомозиготния СС генотип е докладвана също и от Kaszor et al. (2006) за овцете от породите Prolific Olkuska (0,529), Polish Mountain (0,474) и Suffolk (0,600).

Редица са изследванията, посветени на установяване на асоциация между генетичното вариране в мелатонин-рецепторния ген и извънсезонното заплождане и агнене на овцете. Някои автори установяват положителен ефект на хомозиготните генотипове върху анестралната заплодяемост при овцете (Pelletier et al., 2000; Avanus and Altinel, 2016), а други автори докладват за липса на подобна асоциация (Notter et al., 2003; Ghiasi et al., 2006; Javor et al., 2007; Mura et al., 2010; Varanlou et al., 2017). Обобщавайки публикуваните резултати по тази тема за различни породи овце, установяваме, че са налице противоречиви данни относно влиянието на мелатониновия рецептор върху извънсезонното заплождане и агнене на овцете, както и върху плодовитостта и броя на родените агнета.

В България понастоящем подобен род изследвания все още са ограничени и изискват значителни човешки и материални ресурси. Потенциалната възможност за прилагане на генетичния полиморфизъм в мелатонин-рецепторния ген в маркерната селекция при овце е проучена от Hristova et al. (2012)

при четири местни породи овце (Софийска, Брезнишка, Старозагорска и Местна карнобатска), като генотипирането на животните е извършено чрез PCR-RFLP анализ. В това изследване е установен SNP полиморфизъм в този ген, свидетелство за което са идентифицираните три рестрикционни фрагмента в проучвания район – екзон II. Сравнително висока честота на хетерозиготния генотип е установена в популациите на местната Карнобатска и Брезнишката порода овце (съответно 0,532 и 0,440).

Във връзка с това, целта на настоящото изследване е да се установи нуклеотидният полиморфизъм в екзон II на гена MTNR1A в популациите на местни породи овце, с оглед сравнителен анализ на тяхната генетична структура, оценка нивото на генетично разнообразие в този локус, степен на инбридинг, както и генетичните дистанции между тях.

Материал и методи

Изследването обхваща общо 177 овцемайки на 3- 4-годишна възраст от следните местни породи: Медночервена шуменска (45 бр. от частно стопанство в с. Черенча, обл. Шумен, Каракачанска (45 бр. от частно стопанство в с. Зимница, обл. Стара Загора и частно стопанство в с. Черенча, обл. Шумен), Черноглава плевенска (44 бр. от частни стопанства в с. Загорци и с. Димовци, обл. Сливен), Софийска (Елинпелинска) (43 бр. от частни стопанства в с. Панчарево, с. Нови Хан и с. Литаково, обл. Софийска). За провеждане на анализа от селектираните неродствени животни са взети кръвни проби в количество по 3 ml от *vena jugularis* с помощта на затворена вакуум-система GD[®], съдържаща антикоагулант EDTA. При получаването на кръвните проби са спазени всички разпоредби за благополучие на животните. Изолирането на геномната ДНК от кръвни проби и анализът на полиморфизма в екзон II гена MTNR1A са извършени в Лабораторията по ДНК анализ към катедра „Генетика, развъждане и репродукция” на АФ при ТУ – Стара Загора. За ек-

стракция на геномна ДНК от пробите кръв е използван кит *Illustra Blood GenomicPrep DNA Purification Kit* (GE Healthcare, UK), като е следвана процедурата, предоставена в съпътстващия протокол. Концентрацията и качеството на изолираната геномна ДНК са определени посредством NanoVue Plus спектрофотометър (GE Healthcare) при дължина на вълната 260–280 nm. До реализиране на анализа пробите с изолираната геномна ДНК са съхранявани при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

За анализ на полиморфизма в екзон II на гена MTNR1A е приложена методиката, описана от Messer et al. (1997), като условията за PCR амплификация на полиморфния район, включващ MTNR1A гена и последващия рестрикционен анализ са допълнително оптимизирани. PCR амплификацията на пробите е проведена в реакционна смес с общ обем 20 μl при следния състав: 100 ng ДНК, Red Taq DNA Polymerase Master mix (VWR, Белгия), ddH₂O и 20 μM от всеки праймер (NZYtech, Lda, Португалия) със следната секвенция: Прав (Forward): 5' – TGT GTT TGT GGT GAG CCT GG – 3' и Обратен (Reverse): 5' – ATG GAG AGG GTT TGC GTT TA – 3'. PCR реакциите са проведени в термосайклер GeneAmp 9700 (Applied Biosystems) при следните условия: начална денатурация при $94\text{ }^{\circ}\text{C}/5\text{ min}$, последвана от 35 цикъла същинска денатурация при $94\text{ }^{\circ}\text{C}/30\text{ s}$, хибридизация (анилинг) на праймерите за $62\text{ }^{\circ}\text{C}/45\text{ s}$, елонгация (синтез) за $72\text{ }^{\circ}\text{C}/60\text{ s}$, финална елонгация за $72\text{ }^{\circ}\text{C}/10\text{ min}$ и инкубиране (съхранение) за $4\text{ }^{\circ}\text{C}/\infty$. За идентифициране на съответните генотипове на изследваните овце по гена MTNR1A е приложена CAPS технология. Рестрикция на получените PCR продукти е осъществена с помощта на ендонуклеазен ензим RsaI (Fermentas), който разрязва нуклеотидната секвенция на полиморфния район на гена MTNR1A в следния специфичен сайт: 5'...GT↓AC...3'. Използваната реакционна смес включва следните компоненти: 10 μl PCR продукт, 10 U/ μl RsaI, 1 μl Buffer Tango и ddH₂O до краен обем 20 μl . Процесът на рестрикция е проведен в термостат при $37\text{ }^{\circ}\text{C}/120\text{ min}$ с последваща инактивация на ен-

зима при $80\text{ }^{\circ}\text{C}/20\text{ min}$. Получените рестрикционни фрагменти са разделени чрез електрофореза на 2% агарозен гел, разтворен в $1 \times$ TBE буфер при 90V/60 min. Агарозните гелове с инкорпорирани продукти са наблюдавани на фотодокументационна система MiniBis под UV-светлина, посредством Транслюминатор (ECX-15M Bio-Imaging Systems), след оцветяване с 10000 \times GelRed™ Nucleic Acid Stain (Biotium Inc, USA). Получените продукти са отчетени с програмата GelCaptute, като генотиповете са идентифицирани въз основа на броя и дължините на получените рестрикционни фрагменти. За точното отчитане на дължините на получените фрагменти е използван ДНК еталон (DNA Ladder), 50 bp. (GeneRuler™, Fermentas).

Статистическа обработка на получените резултати е проведена с помощта на софтуера POPGENE v.1.31 (Yeh and Yong, 1999; Labate 2000). Чрез тази програма са изчислени следните параметри за изследваните популации овце по отношение на локуса MTNR1A: честота на алелите и съответните генотипове; ниво на хетерозиготност – очаквана (H_e) и изследвана (H_o); очаквана хетерозиготност по Nei, 1973; коефициент на инбридинг (F_{is}) и отклонение от равновесието на Харди-Вайнберг – HWE /Chi-square (χ^2) (Guo and Thompson, 1992) при съответните степен на свобода (df) и степен на вероятност (P). За конвертиране на данните от генотипирането на животните по изследвания SNP локус от „txt” във входен формат на софтуера POPGENE е използвана програмата CONVERT v1.31 (Glaubitz, 2004). Определени са също и генетичните дистанции (D_A) между изследваните популации овце по Nei (1972) и на тази база е построена дендрограма по метода на Средно аритметично на „непретеглените” двойки групи (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean, UPGMA).

Резултати и обсъждане

Въз основа на приложения PCR-RFLP анализ (CAPS технология) в съответствие с

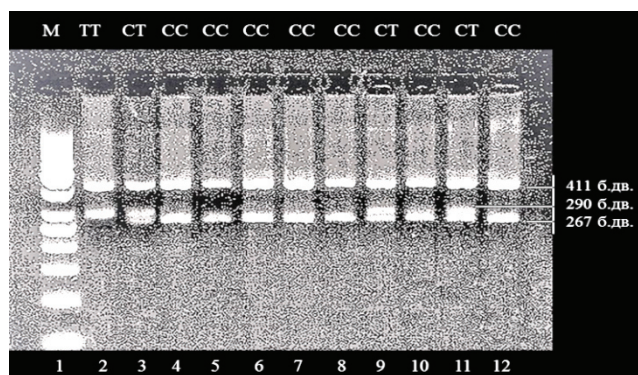
методика на Messer et al. (1997) е амплифициран успешно проучваният полиморфен локус (екзон II) на гена *MTNR1A*, кодиращ мелатониновия рецептор, в резултат на което са получени PCR продукти с очаквана дължина 824 bp (базови двойки). След проведения рестрикционен анализ посредством ендонуклеазния ензим *RsaI* е установен генетичният профил на изследваните индивиди по този локус, който съответства на генотиповете, представени на Фиг. 1. Както е видно индивиди с генотип, хомозиготен по алел С (СС) продуцират 2 фрагмента с дължини, съответно 411 и 267 bp. Индивиди с хомозиготен по алел Т генотип (ТТ) са представени с два фрагмента с дължини, съответно 411 и 290 bp. Хетерозиготните индивиди (АС) са идентифицирани въз основа на наличието на трите електрофоретични ивици (411, 290 и 267 bp).

При изследване на полиморфизма на гена *MTNR1A* бяха идентифицирани и двата алела, с които той е представен в проучваните популации овце, което свидетелства, че из-

следваният SNP полиморфизъм е резултат от мутация в позиция 606 от екзон II на гена, протекла през ранната еволюция на вида *Ovis aries*, а също така, че провежданият отбор не е елиминирал нито една от алтернативните форми (алели) на този ген.

Честотата на алелите и съответните генотипове за всяка от изследваните популации овце по отношение на гена *MTNR1A* е представена в Табл. 1.

Получените данни показват, че в три от изследваните популации овце се наблюдава преобладаване на алел С, от които с най-висока честота (0,694) се открояват индивидите от Черноглавата плевенска порода, респективно, честотата на другия алел (Т) на гена в тази популация е 0,306. Отчетените стойности в тази популация са в съответствие с докладваните от Chu et al. (2006) при Късопашата китайската порода Хан (Small Tail Han), при която честотите са съответно 0,710 за алел С и 0,290 за алел Т, също от Ghiasi et al. (2006) за иранската порода Шал (Shall) (0,790 и 0,210), както и от Carcangiu et al.



Фиг. 1. Електрофореграма с рестрикционни фрагменти от PCR продукти на гена *MTNR1A* при изследваните популации овце

- 2 – хомозиготен по алел Т генотип (ТТ)
- 3, 9 и 11 – хетерозиготен генотип (СТ)
- 4, 5, 6, 7, 8, 10 и 12 – хомозиготни по алел С генотип (СС)
- 1 – ДНК маркер, 50 bp

Fig. 1. Electrophoregram with restriction fragments of the PCR products corresponding to the *MTNR1A* gene in the studied sheep populations

- 2 – homozygous genotype TT
- 3, 9 и 11 – heterozygous genotype CT
- 4, 5, 6, 7, 8, 10 и 12 – homozygous genotype CC
- 1 – DNA Ladder, 50 bp.

Таблица 1. Честота на установени алели и генотипове за гена MTNR1A при изследваните популации овце

Table 1. Allele and genotype frequencies at MTNR1A gene in the examined sheep populations

Популации овце	Брой n	Честота на алели Allele frequency		Честота на генотипове Genotype frequency		
		C	T	CC	CT	TT
Медночервена шуменска	45	0,267	0,733	0,156 (7) ¹	0,222 (10)	0,622 (28)
Каракачанска	45	0,589	0,411	0,467 (21)	0,244 (11)	0,289 (13)
Черноглава плевенска	44	0,694	0,306	0,545 (24)	0,273 (12)	0,182 (8)
Софийска (Елинпелинска)	43	0,605	0,395	0,349 (15)	0,512 (22)	0,139 (6)

¹Брой индивиди със съответния генотип

(2009) при овцете от породата Сарда (Sarda) (0,660 и 0,340).

Противоположна тенденция в разпределението на честотите, с които са представени двата алела на мелатонин-рецепторния ген, се наблюдава при овцете от Медночервена шуменска. В тази популация алел Т е представен със стойности 0,733 и съответно значително по-ниска честота (0,267) е отчетена за алел С. Посочените стойности са близки до докладваните от Mateescu et al. (2009) за породата Дорсет (Dorset), при която съотношението между алелите Т/С е 0,650/0,350. Значително преобладаване на алел Т над алел С е установено от Notter and Cockett (2005) в проучването по отношение на породата Суфолк (Suffolk) (С 0,920 за алел Т и 0,080 за алел С) и Аваси (Awassi) (0,800/0,200).

В това изследване при две от популациите овце – Каракачанска и Софийска, се наблюдава значително сходство по отношение на разпределението на алелните честоти в локуса на мелатонин-рецепторния ген. Близки стойности на честотите на двата алела са отчетени при овцете от Каракачанската порода, съответно 0,589 за алел С и 0,411 за алел Т, както и при Софийската (0,605 за алел С и 0,395 за алел Т). Посочените данни са в съответствие с тези, докладвани за овцете от породата Хан (Han) (0,520 и 0,480) и Хемп-

шир (Hampshire) (0,570 и 0,430) от Notter and Cockett (2005), както и за породите Суфолк (Suffolk) (0,420 и 0,580), Дорсет (Dorset) (0,480 и 0,520) и немската Мутон Мерино (Mutton Merino) (0,480 и 0,520) от Chu et al. (2006). В проучването на Şeker et al. (2011) се докладва за висока честота на представеност (0,84 – 0,90) на единия от алелите на мелатонин-рецепторния ген при породите овце Хиос (Chios), Бял караман (White Karaman) и Аваси (Awassi) при използване на ензима MnlI за провеждане на рестрикционния анализ и съответно липса на полиморфизъм в този локус при прилагане на ензима RsaI за рестрикция.

Въз основа на резултатите, получени за алелните честоти в MTNR1A локуса при популациите обект на настоящото изследване, както и в резултат на съпоставянето им с данните от литературата, касаещи други породи овце, може да се приеме, че е налице породно вариране в този локус. В изследваните популации се наблюдава тенденция към преобладаване на алел С, който според много автори се счита за „благоприятен” („favourable”) алел от гледна точка на потенциалната му асоциация с извънсезонната (анестрална) заплодяемост при овцете.

Резултатите представени в таблица 1 по отношение разпределението на честотата на

различните генотипове по проучвания полиморфен локус, съответстват на честотата на представеност на двата алела в отделните популации, обект на изследването. При 62% от овцете на Медночервена шуменска популация, в която преобладаващият алел е Т, е отчетен хомозиготен (ТТ) по този алел генотип (честота 0,622). Тази тенденция е видна и при овцете от Черноглава плевенска порода, но с преобладаване на индивидите с хомозиготен по алел С генотип (СС), с честота съответно 0,545. Въпреки сходното разпределение в честотата на алел С при другите две популации (Каракачанска и Софийска) при около 46% от каракачанските овце е налице преобладаване на хомозиготния генотип СС (честота 0,467) и съответно около 51% (честота 0,512) от индивидите от Софийската популация са хетерозиготни (генотип СТ). При анализиране и съпоставяне на резултатите относно разпределението на генотипните честоти в изследваните популации овце с тези за други породи се наблюдава значително вари-

ране по този параметър. Така в изследването на Mura et al. (2010) се докладва за превъзходство на индивидите (53%) с хомозиготен по алел С генотип над тези с хомозиготен по алел Т (17%) при овцете от порода Сарда. При същата порода Carcangiu et al. (2009) докладва за балансирано съотношение в разпределението на овцете от двата хомозиготни генотипа, съответно 32% по отношение на алел С и 28% по алел Т, докато Chu et al. (2006) съобщава за преобладаване на хетерозиготния генотип в популациите на редица породи овце като късопашатата Хан (49,63%), Ху (48,15%), Суфолк 75%, Дорсет (70%) и Мутон Мерино (47,62%). В изследванията на други автори като Ghiasi et al. (2006) за породите овце Шал и Каракул и Shahroudi et al. (2006) за Ирански каракул не се съобщава за индивиди с хомозиготен по алел Т генотип.

Стойностите на очакваната (H_e) и наблюдаваната (H_o) хетерозиготност при изследваните популации овце по отношение на гена MTNR1A са представени в табл. 2.

Таблица 2. Стойности на хетерозиготност – наблюдавана (H_o) и очаквана (H_e) и коефициент на инбридинг (F_{is}), критерий хи-квадрат (χ^2) и степен на вероятност (P) в изследваните популации овце по отношение на гена MTNR1A

Table 2. Observed (H_o) and Expected (H_e) heterozygosity, coefficient of inbreeding (F_{is}), chi-square test for HWE (χ^2) and P-value at MTNR1A gene in the examined sheep populations

Популации овце Sheep populations	Хетерозиготност Heterozygosity		Nei*	Fis	χ^2	P
	Наблюдавана Observed (H_o)	Очаквана Expected (H_e)				
Медночервена шуменска Copper-red Shumen	0,222	0,391	0,395	0,432	8,949	0,002
Каракачанска Karakachan	0,244	0,489	0,484	0,495	11,558	0,006
Черноглава плевенска Pleven Blackhead	0,273	0,428	0,427	0,258	3,892	0,049
Софийска (Елинпелинска) Sofia (Elin-Pelin)	0,512	0,483	0,478	-0,070	0,147	0,701

* Очаквана хетерозиготност изчислена по метода на Nei (1973)

Стойностите представени в табл. 2, показват, че в три от изследваните извадки овце (Медночервена шуменска, Каракачанска и Черноглава плевенска) нивото на наблюдаваната хетерозиготност (съответно 0,222, 0,244 и 0,273) е по-ниско от това на очакваната хетерозиготност (съответно 0,391, 0,489 и 0,428), респ. хетерозиготността изчислена по метода на Nei (1973) е (0,395, 0,484 и 0,427), което е индикация за дефицит на хетерозиготи в тези популации. Противоположна тенденция по тези параметри бе установена за индивидите от Софийската порода, при която стойностите са съответно: $H_o = 0,512$, $H_e = 0,483$ и $H_{Nei} = 0,478$. Отчетените стойности за очакваната хетерозиготност (H_e) са показател за средно ниво на генетичното разнообразие за породите Медночервена шуменска, Каракачанска и Черноглава плевенска и високо ниво за Софийската популация овце. По-високи стойности на очакваната хетерозиготност ($H_e = 0,500$) спрямо наблюдаваната ($H_o = 0,330$) са докладвани също от Shahroudi et al. (2006) за овцете от породата Каракул в Иран.

При сравняване на стойностите на наблюдаваната и очакваната хетерозиготност между популациите на три от изследваните породи – Медночервена шуменска, Каракачанска и Черноглава плевенска не се откриват особени различия, тъй като при тях стойностите за H_o са по-ниски в сравнение с тези за H_e . Тази тенденция може да бъде обяснена с влиянието на различни фактори, които Kumar (2006) обобщава главно в два основни – допускането на инбридинг в популацията и раздробяването на дадена популация на отделни по-малки субпопулации или т. нар. „Wahlund effect”. Според автора посочените фактори най-силно може да повлияят баланса между очакваната и наблюдаваната хетерозиготност в случаите, когато извадката е формирана на базата на малки по численост стада в рамките на съответната популация.

Съгласно Wright (1978), въз основа на изчисляване на коефициента на инбридинг (F_{is}) като показател за степента на родствено съешаване между индивидите в една популация, може да се установи дефицит или уве-

личение на хетерозиготи в нейния генофонд. В малките популации, каквито са и тези на местните породи овце, е необходимо да се установи нивото на инбридинг от гледна точка на оценка негативното му влияние върху техните популации и свързаната с него т. нар. инбредна депресия, Tanchev (2016).

В настоящото изследване коефициентът на инбридинг за съответните популации овце е изчислен на базата на стойностите за H_o и H_e . За овцете от трите популации Медночервена шуменска, Каракачанска и Черноглава плевенска стойностите за F_{is} са съответно 0,432, 0,495 и 0,427, докато при Софийската е отчетена ниска, отрицателна стойност ($F_{is} = -0,070$) по този параметър. Отчетените високи стойности за F_{is} в три от изследваните популации овце може да се обяснят с факта, че вероятно са използвани ограничен брой кочове за разплод. Получените в настоящото изследване стойности за хетерозиготност по отношение на гена отговорен за синтеза на мелатонин-рецептора, са индикация за това, че допуснатият инбридинг при три от изследваните породи овце е повлиял в значителна степен нивото на генетичното разнообразие в техните популации. Запазването на нивото на генетичната изменчивост по определени ДНК локуси асоциирани с различни продуктивни и репродуктивни признаци при овцете е гаранция за тяхната екологична устойчивост. Това от своя страна създава необходимост от съхраняване на генофонда и генетичните ресурси в популациите на местните, автохтонни породи овце и особено на тези със статут на застрашени от изчезване.

С цел да се установи вероятното отклонение на изследваните популации от равновесието на Харди-Вайнберг (HWE) по отношение на гена MTNR1A са изчислени стойностите на критерия χ^2 при съответните степен на вероятност (P) и степен на свобода ($df = 1$). Получените стойности на χ^2 за изследваните популации овце са представени в табл. 2. Резултатите показват, че Софийската популация овце се намира в съответствие с HWE ($P = 0,701$), докато при останалите три популации – Медночервена шуменска, Карака-

чанска и Черноглава плевенска се наблюдава отклонение от равновесието $P \leq 0,05$). Вероятно основната причина за отклонението от равновесието на Харди-Вайнберг при тези популации е отчетения при тях по-висок хетерозиготен дефицит. Посочената тенденция е в съответствие с мнението на Dies-Tascon et al. (2000), според което в основата на отклонението HWE стои хетерозиготният дефицит в резултат на допуснатия в популациите инбридинг. Освен това авторите аргументират подобно несъответствие със закона на Харди-Вайнберг с естествените процеси като мутации, миграции, генетичен дрейф, както и с влиянието на естествения и провеждания изкуствен отбор.

Въз основа на анализа на нуклеотидния полиморфизъм в гена MTNR1A и установените алелни честоти са изчислени генетичните дистанции (D_A) между изследваните популации овце по метода на Nei (1972) (Табл. 3).

От резултатите, представени в табл. 3 се вижда, че най-висока стойност (0,369) на генетичните дистанции е установена между породите Медночервена шуменска и Черноглава плевенска. Посочените дистанции може да бъдат обяснени с различията в разпределението на алелните честоти в тези две популации овце, по отношение на проучвания полиморфен локус на гена MTNR1A. Изчис-

лената стойност на генетичните дистанции значително надвишава посочената от Hartl (1980) минимална стойност (0,05), което е показател за генетична диференциация между тези две породи по отношение на SNP полиморфизма в гена MTNR1A.

Минимална стойност на генетичните дистанции е установена между популациите на Каракачанската и Софийската породи овце (0,005), както и между овцете от породите Черноглава плевенска и Софийска (0,014). Сходството между тези двойки породи може да се обясни с близките стойности на алелните честоти, установени при проучване на генетичния полиморфизъм в гена на мелатонин-рецептора.

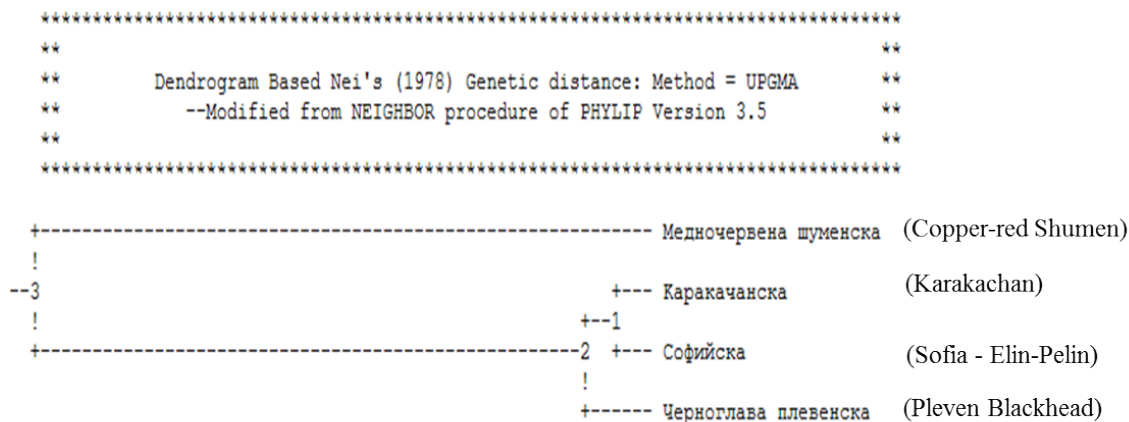
На базата на изчислените генетични дистанции между изследваните породи овце е построена дендрограма по метода на Nei, отразяваща генетичните връзки между тях (Фиг. 2).

Дендрограмата се състои от два основни клъстера: първи – малък, включващ овцете от породата Медночервена шуменска и втори – по-голям, обединяващ останалите три породи включени в изследването – Каракачанска, Софийска и Черноглава плевенска. Във втория клъстер се наблюдава диференциране на Черноглава плевенска порода от останалите в този клъстер породи.

Таблица 3. Генетични дистанции на Nei (D_A) между изследваните породи овце по отношение на гена MTNR1A

Table 3. Nei's genetic distances (D_A) between the examined sheep breeds corresponding to the MTNR1A gene

Популации овце Sheep populations	Медночервена шуменска Copper-red Shumen	Каракачанска Karakachan	Черноглава плевенска Pleven Blackhead	Софийска Sofia
Медночервена шуменска Copper-red Shumen	0,000			
Каракачанска Karakachan	0,201	0,000		
Черноглава плевенска Pleven Blackhead	0,369	0,019	0,000	
Софийска (Елинпелинска) Sofia (Elin-Pelin)	0,223	0,005	0,014	0,000



Фиг. 2. UPGMA дендрограма на изследваните породи овце, базирана на нуклеотидния полиморфизъм в гена MTNR1A

Fig. 2. UPGMA dendrogram generated from Nei's genetic distances of the examined sheep breeds

В заключение, от проведения анализ за установяване на генетичния полиморфизъм в гена MTNR1A и вземайки под внимание факта, че продуктивността на овцете е лимитирана от сезонното размножаване, установихме, че идентифицирането на главни гени или QTL може съществено да повлияе този неврофизиологичен процес, както и да повиши ефективността на репродуктивния процес в овцевъдството. В този аспект изследване като настоящото, свързано с проучване на генетичното разнообразие при местните породи овце по гени асоциирани с репродуктивността, един от които е и мелатонин-рецепторният, би могло да допринесе за използването му като ДНК маркер при разработване и прилагане на стратегии за редуциране на сезонността в този важен за животновъдството сектор.

Изводи

Въз основа на проведения PCR-RFLP анализ е установен SNP полиморфизъм в екзон II на гена кодиращ мелатониновия рецептор в генома на вида *Ovis aries*. В рамките на изследваните популации овце са идентифицирани и двата алела на гена с преобладаване

на алел С, като с най-висока честота (0,694) се отличават овцете от Черноглавата плевенска порода. Противоположна тенденция се наблюдава в популацията на Медночервената шуменска порода овце, в която 73% от индивидите са носители на алел Т.

Установено е сравнително високо ниво на генетичното разнообразие в популацията на Софийската порода овце, което кореспондира с висока степен на хетерозиготност ($H_o = 0,512$ и $H_e = 0,489$), нисък коефициент на инбридинг ($F_{is} = -0,070$) и съответствие с равновесието по Харди-Вайнберг ($P = 0,701$). При останалите популации овце – Медночервената шуменска, Каракачанска и Черноглава плевенска се наблюдава средно ниво на генетичното разнообразие ($H_e = 0,391, 0,489$ и $0,428$), висок коефициент на инбридинг ($F_{is} = 0,432, 0,495, 0,258$) и отклонение от HWE ($P = 0,002, 0,006$ и $0,049$).

От изследваните популации овце най-висока стойност на генетичните дистанции (0,369) е установена между породите Медночервена шуменска и Черноглава плевенска, което потвърждава генетичната отдалеченост между тях по отношение на гена MTNR1A. Въз основа на близките стойности на алелните честоти в рамките на проведеното изследване на полиморфизма в гена на ме-

латонин-рецептора е установена минимална стойност на генетичните дистанции между популациите на Каракачанската и Софийската порода овце (0,005), както и между овцете от породите Черноглава плевенска и Софийска (0,014).

Литература

- Христова, Д., Яблански, Ц., & Тодоровска, Е.** (2012). ДНК маркери и тяхното приложение в животновъдството. *Животновъдни науки*, 49(6), 69-85.
- Христова, Д., Танчев, С., Георгиева, Ц., Яблански.** (2014). Генетично разнообразие и генетична ерозия при породите селскостопански животни. *Животновъдни науки*, 51(3), 86-95.
- Христова, Д.** (2015). ДНК технологии за детекция на единични нуклеотидни полиморфизми в животинския геном. *Животновъдни науки*, 52 (2), 86-97.
- Avanus, K., & Altinel, A.** (2016). Identification of Genetic Variation of Melatonin Receptor 1A (MTNR1A) Gene in Kivircik Breed Ewes by MnlI and RsaI Restriction Enzymes. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 22(4), 571-576.
- Barrett, P., Conway, S., Jockers, R., Strosberg, A. D., Guardiola-Lemaitre, B., Delagrangue, P., & Morgan, P. J.** (1997). Cloning and functional analysis of a polymorphic variant of the ovine Mel 1a melatonin receptor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1356(3), 299-307.
- Carcangiu, V., Mura, M. C., Vacca, G. M., Pazzola, M., Dettori, M. L., Luridiana, S., & Bini, P. P.** (2009). 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
- Chu, M. X., Cheng, D. X., Liu, W. Z., Fang, L., & Ye, S. C.** (2006). Association between melatonin receptor 1A gene and expression of reproductive seasonality in sheep. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 19(8), 1079
- Chu, M. X., Ji, C. L., & Chen, G. H.** (2003). Association between PCR-RFLP of melatonin receptor 1a gene and high prolificacy in Small Tail Han sheep. *Asian Australasian journal of Animal Sciences*, 16(12), 1701-1704.
- Crawford, A. M., Dodds, K. G., Ede, A. J., Pierson, C. A., Montgomery, G. W., Garmonsway, H. G., ... & Kappes, S. W.** (1995). An autosomal genetic linkage map of the sheep genome. *Genetics*, 140(2), 703-724.
- Davari Varanlou, Z., Hassani, S., Ahani Azari, M., Samadi, F., Zakizadeh, S., & Khan Ahmadi, A. R.** (2017). Association between MTNR1A and CYP19 Genes Polymorphisms and Economic Traits in Kurdi Sheep. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 7(1), 69-74.
- Diez-Tascón, C., Littlejohn, R. P., Almeida, P. A. R., & Crawford, A. M.** (2000). Genetic variation within the Merino sheep breed: analysis of closely related populations using microsatellites. *Animal genetics*, 31(4), 243-251.
- Dubocovich, M. L.** (1995). Melatonin receptors: are there multiple subtypes?. *Trends in pharmacological sciences*, 16(2), 50-56.
- Dubocovich, M. L., Rivera-Bermudez, M. A., Gerdin, M. J., & Masana, M. I.** (2003). Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Front Biosci*, 8(10), 1093-108.
- Eftekhari Shahroudi, F., Nassiri, M., Valizadeh, R., Heravi Moussavi, A., Tahmoorespur, M., & Ghiasi, H.** (2006). Genetic polymorphism at MTNR1A, CAST and CAPN loci in Iranian Kurakul sheep. *Iranian Journal of Biotechnology*, 4(2), 117-122.
- Eftekhari Shahroudi, F., Nassiri, M., Valizadeh, R., Heravi Moussavi, A., Tahmoorespur, M., & Ghiasi, H.** (2006). Genetic polymorphism at MTNR1A, CAST and CAPN loci in Iranian Kurakul sheep. *Iranian Journal of Biotechnology*, 4 (2), 117-122.
- Ghiasi, H., Nassiri, M., Heravi Moussavi, A., Mousavizadeh, A. A., & Javadmanesh, A.** (2006). Genetic polymorphism of the melatonin receptor 1A locus in Iranian Shall and Karakul sheep. *Iranian Journal of Biotechnology*, 4(3) 201-203.
- Glaubitz, J. C.** (2004). Convert: a user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. *Molecular Ecology Notes*, 4(2), 309-310.
- Guo, S. W., & Thompson, E. A.** (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 361-372.
- Hartl, D. L.** (1980). Principles of Population Genetics. *Sinauer Press*, Sunderland, 499.
- Hernandez, X., Bodin, L., Chesneau, D., Guillaume, D., Chemineau, P., Malpoux, B., & Migaud, M.** (2005). Relationship between MT1 melatonin receptor gene polymorphism and seasonal physiological responses in Ile-de-France ewes. *Reproduction Nutrition Development*, 45(2), 151-162.
- Hristova, D., Georgieva, S., Yablanski, T., Tanchev, S., Slavov, R., & Bonev, G.** (2012). Genetic polymorphism of the melatonin receptor MT1 gene in four Bulgarian sheep breeds. *Agricultural Science & Technology (1313-8820)*, 4(3).
- Jávor, A., Huszenicza, G., Czeglédi, L., Árnýasi, M., Oláh, J., Szabó, S., ... & Kusza, S.** (2007). Molecular genetics methods, as tool of sheep breeding. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, 40(1), 117-130.

- Kaczor, Urszula, Kmiecik, Monika, Molik, Edyta, & Rychlik, Tadeusz.** (2006). Polymorphism in the melatonin receptor gene MT1 (locus MTNR1A) in sheep. *Arch Tierz*, 49, 257-262.
- Kumar, S., Gupta, J., Kumar, N., Dikshit, K., Navani, N., Jain, P., & Nagarajan, M.** (2006). Genetic variation and relationships among eight Indian riverine buffalo breeds. *Molecular ecology*, 15(3), 593-600.
- Labate, J. A.** (2000). Software for population genetic analyses of molecular marker data. *Crop Science*, 40(6), 1521-1528.
- Mateescu, R. G., Lunsford, A. K., & Thonney, M. L.** (2009). Association between melatonin receptor 1A gene polymorphism and reproductive performance in Dorset ewes. *Journal of animal science*, 87(8), 2485-2488.
- Messer, L. A., Wang, L., Tuggle, C. K., Yerle, M., Chardon, P., Pomp, D., Womack, J., Barendse, W., Crawford, A., Notter, D., & Rothschild, M. F.** (1997). Mapping of the melatonin receptor 1a (MTNR1A) gene in pigs, sheep, and cattle. *Mammalian genome*, 8(5), 368-370.
- Mura, M. C., Luridiana, S., Vacca, G. M., Bini, P., & Carcangiu, V.** (2010). Effect of genotype at the MTNR1A locus and melatonin treatment on first conception in Sarda ewe lambs. *Theriogenology*, 74(9), 1579-1586.
- Nei, M.** (1972). Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, 106(949), 283-292.
- Nei, M.** (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(12), 3321-3323.
- Nei, M., Tajima, F., & Tatenno, Y.** (1983). Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of molecular evolution*, 19(2), 153-170.
- Notter, D. R., & Cockett, N. E.** (2005, December). Opportunities for detection and use of QTL influencing seasonal reproduction in sheep: a review. In *Genetics Selection Evolution* (Vol. 37, No. 1, p. S39). BioMed Central.
- Notter, D. R., Cockett, N. E., & Hadfield, T. S.** (2003). Evaluation of melatonin receptor 1a as a candidate gene influencing reproduction in an autumn-lambing sheep flock. *Journal of animal science*, 81(4), 912-917.
- Pelletier, J., Bodin, L., Hanocq, E., Malpoux, B., Teyssier, J., Thimonier, J., & Chemineau, P.** (2000). Association between expression of reproductive seasonality and alleles of the gene for Mel1a receptor in the ewe. *Biology of Reproduction*, 62(4), 1096-1101.
- Reppert, S. M.** (1997). Melatonin receptors: molecular biology of a new family of G protein-coupled receptors. *Journal of Biological Rhythms*, 12(6), 528-531.
- Reppert, S. M., Weaver, D. R., & Ebisawa, T.** (1994). Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron*, 13(5), 1177-1185.
- Şeker, İ., Özmen, Ö., Kul, B. Çinar., & ERTUĞRUL, O.** (2011). Polymorphism in melatonin receptor 1A (MTRN1A) gene in Chios, White Karaman and Awassi sheep breeds. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 17(5), 865-868.
- Tanchev, S.** (2016). Classical and modern concepts of inbreeding and effects of inbreeding depression in animals. *Agricultural Science and Technology*, 8(1), 3-13.
- Weaver, D. R., Liu, C., & Reppert, S. M.** (1996). Nature's knockout: the Mel1b receptor is not necessary for reproductive and circadian responses to melatonin in Siberian hamsters. *Molecular Endocrinology*, 10(11), 1478-1487.
- Wright, S.** (1978). *Evolution and the genetics of populations. Variability within and among natural populations*. University of Chicago Press, Chicago, USA, 4.
- Yeh, F. and Yong, R.** (1999). *Popgene Ver. 1. 31*. (02.04.2011). Microsoft based Freeware for Population Genetic Analysis. University of Alberta, Edmonton, Canada, <http://www.ualberta.ca/~fyeh/fyeh>.