

Utjecaj polimorfizma MTNR1A gena na sezonsku pojavu janjenja Suffolk pasmine

Valentino Držaić, Ante Kasap, Ivan Širić, Zvonimir Prpić, Boro Mioč

Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Svetošimunska 25, Zagreb, Hrvatska (vdrzaic@agr.hr)

Sažetak

Cilj istraživanja bio je utvrditi utjecaj polimorfizma na lokusu 612 MTNR1A gena na sezonsku pojavu janjenja u populaciji ovaca Suffolk pasmine. U tu svrhu genotipizirano je 35 ovaca s *MnlI* restrikcijskom endonukleazom. Nakon genotipizacije utvrđene su sljedeće frekvencije genotipova: GG (0,26), GA (0,57) i AA (0,17), odnosno frekvencije alela: G (0,54) i A (0,46). Janjenja ovaca su evidentirana u tri sezone (proljeće, jesen i zima), međutim većina ovaca se ojanjila tijekom zime (88%). Tijekom zime janjile su se ovce svih triju genotipova: GG (14%), GA (58%) i AA (16%). Ovce genotipa GG su se janjile u sve tri sezone, dok su se ovce genotipa GA i AA janjile u dvije sezone.

Ključne riječi: lokus 612, MTNR1A, genotip, Suffolk, sezona janjenja

Uvod

Ovčarstvo je važna gospodarska grana, ali je u odnosu na druge stočarske proizvodnje (govedarstvo, svinjogojstvo, peradarstvo) okarakterizirana većom zastupljenosti ekstenzivnih proizvodnih sustava. Slabija zastupljenost ovaca u intenzivnim sustavima proizvodnje, između ostalog, posljedica je sezonske reproduktivne aktivnosti većine pasmina. Pojava sezonske reprodukcije ovaca osobito je izražena u područjima umjerenog klimatskog pojasa što nisu odlike, primjerice, goveda i svinja u kojih se reproduktivna aktivnost odvija tijekom cijele godine. Upravo su navedene sezonske promjene u razdoblju spolne aktivnosti (estrus) i spolne neaktivnosti (anestrus) važan čimbenik koji utječe na učinkovitost ovčarske proizvodnje. Izrazita sezonalnost većine pasmina ovaca uzgajanih u Hrvatskoj uvjetuje neravnomjernu ponudu ovčjeg mesa i mlijeka na tržištu. Najviše ovčjih proizvoda osobito mlade janjetine i svježeg mlijeka dostupno je u razdoblju od ožujka do kolovoza, dok u ostalom dijelu godine navedeni proizvodi nisu dostupni u svježem stanju većini potrošača. U ovaca pojava spolnog ciklusa započinje skraćivanjem dnevnog osvjetljenja, što se u našim područjima događa krajem ljeta, odnosno početkom jeseni. Smanjenjem razine dnevnog svjetla žlijezda epifiza počinje lučiti veće razine hormona melatonina (Karsch i sur., 1984.), što pozitivno djeluju na pulsartornu sekreciju gonadotropin otpuštajućeg hormona (GnRH) te posljedično i luteinizirajućeg hormona (LH; Malpoux i sur., 1999.). Djelovanje melatonina na ciljna tkiva i organe u ovaca je posredovano G-proteinskim MT1 receptorom (Mura i sur., 2010.). Gen za MT1 receptor (MTNRA1) nalazi se u ovaca na 26 kromosomu između mikrosatelita CSSM43 i BM6526 (Messer i sur., 1997.), a sastoji se od dva egzona podijeljena velikim intronom (Reppert i sur., 1994.). Drugi egzon MTNR1A gena koji kodira ovčji MT1 receptor visoko je polimorfan (Barrett i sur., 1997.; Messer i sur., 1997.; Pelletier i sur., 2000.) i posjeduje dva polimorfna mjesta, na pozicijama 606 i 612 (Reppert i sur., 1994.). Povezanost polimorfizma na lokusu 612 MTNR1A gena sa sezonskom pojavom eustrusa u različitim pasmina ovaca utvrdili su mnogi autori (Pelletier i sur., 2000.; Chu i sur., 2006.; Carcangiu i sur., 2009.; Mura i sur., 2010.). Stoga je cilj predmetnog istraživanja bio je utvrditi frekvencije genotipova i alela na lokusu 612 MTNR1A gena te utjecaj polimorfizma na pojavu janjenja u Suffolk pasmine u Hrvatskoj.

Materijal i metode

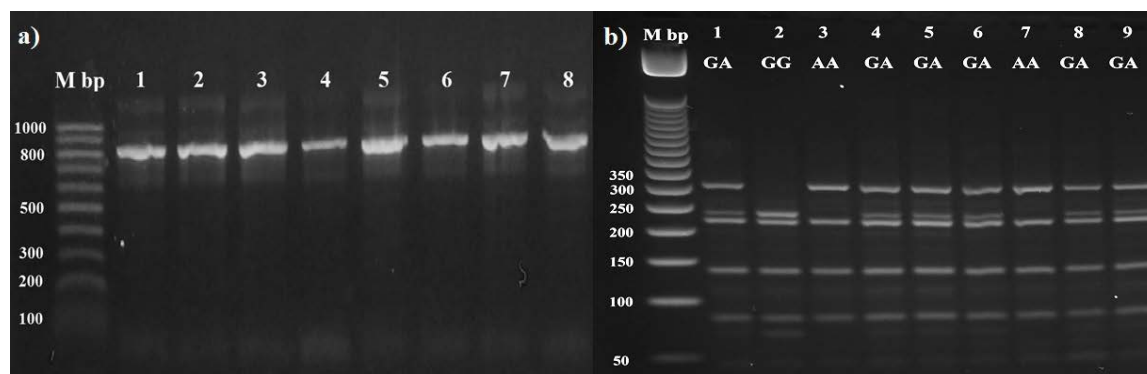
Predmetnim istraživanjem bilo je obuhvaćeno ukupno 35 odraslih ovaca Suffolk pasmine, odabranih iz stada veličine oko 100 rasplodnih ovaca uzgajanih na bjelovarskom području. Jedini kriterij pri odabiru ovaca bio

je da su se najmanje jedanput ojanjile. Od svake ovce, uzet je uzorak dlake s korijenom sa čeonog (*os frontalis*) područja glave, spreman u papirnate kuverte te do izolacije deoksiribonukleniske kiseline (DNK) čuvan na sobnoj temperaturi. Ujedno su od uzgajivača prikupljeni podaci o datumu janjenja ovaca koji su poslužili za izračun sezone janjenja. Sezone su definirane na sljedeći način: proljeće (21.3.-20.6), ljeto (21.6.-20.9.), jesen (21.9.-20.12.) i zima (21.12.-20.3). DNK je izolirana pomoću GenElute® Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit-om (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Lančana reakcija polimeraze (eng. Polymerase Chain Reaction; PCR) provedena je prema protokolu proizvođača Promega sa GoTaq® G2 Hot Start Green Master Mix (Promega Corporation, Madison, WI, USA). PCR u ukupnom volumenu od 25 µL uključivao je 1,0 µL tj. 50 ng genomske DNK, 12,5 µL GoTaq® G2 Hot Start Green Master Mix, 0,75 µL pojedinog začetnog oligonukleotida 10 µM, i 10,0 µL vode slobodne od nukleaza. Oligonukleotidne početnice: prema naprijed (eng. *forward*): 5'-TGTGTTTGTGGTGAGCCTGG-3' i prema natrag (eng. *reverse*): 5'-ATGGAGAGGGTTTGC GTTTA -3' (Sigma-Aldrich) preuzete su od Messer i sur. (1997.). Uvjeti PCR reakcije bili su sljedeći: reakcija aktivacije Taq polimeraze na 94°C/5 min, 35 ciklusa umnažanja ciljne DNK sekvence (94°C/30 s, 55°C/30 s, 72°C/45 s) te krajnje produljenje umnožene željene sekvence DNK na 72°C/5 min. Navedeni uvjeti omogućili su amplifikaciju glavnog dijela drugog egzona MTNR1A gena (GenBank Acc. No. U14109) duljine 824 parova baza (Reppert i sur., 1994.). Provjera uspješnosti PCR reakcije obavljena je pomoću elektroforeze na 1% gelu agaroze (Lonza, Rockland, ME, USA) paralelno s biljegom od 100 parova baza (PCR 100bp Low Ladder; Sigma-Aldrich). Dobiveni PCR produkti podvrgnuti su enzimatskom cijepanju s *MnII* (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) restriksijskom endonukleazom što je omogućilo identifikaciju polimorfizma MTNR1A gena na poziciji 612. Rezultati enzimatskog cijepanja analizirani su elektroforezom na 3% gelu agaroze paralelno s biljegom od 50 parova baza (DNA Step Ladder, Promega Corporation, Madison, WI, USA). Genotipizacija uzoraka bila je sljedeća: GG homozigot, GA heterozigot i AA homozigot.

Brojanjem je utvrđen broj pojedinih genotipova u analiziranoj populaciji pasmine Suffolk, dok su frekvencije alela i genotipova, kao i distribucija janjenja po sezonama s obzirom na genotip izračunati korištenjem statističkog programa R (R Core Team, 2008). Odstupanje genotipova od Hardy-Weinbergove ravnoteže obavljeno je pomoću Chi-Square testa (χ^2) R statističkim programom.

Rezultati i rasprava

Lančanom reakcijom polimeraze sa specifičnim oligonukleotidnim početnicama amplificiran je fragment duljine 824 baznih parova (bp) koji odgovara duljini glavnog dijela drugog egzona MTNR1A gena (Slika 1a). Dobiveni PCR produkti duljine 824 bp podvrgnuti su restriksijskoj razgradnji s *MnII* restriksijskom endonukleazom čime je omogućena identifikacija polimorfizama MTNR1A gena na poziciji 612 referentne sekvence U14109. Enzimatska razgradnja PCR produkta s *MnII* restriksijskom endonukleazom, nakon gel elektroforeze omogućila je identifikaciju dva fragmenta duljine 236 i 67 bp kada je restriksijsko mjesto prisutno (alel G; Slika 1b) i jedan fragment duljine 303 bp kada je restriksijsko mjesto izostalo (alel A). U istraživanoj populaciji utvrđeno je postojanje svih triju genotipova, pri čemu je najviše zastupljen bio heterozigot GA u 20 uzoraka, zatim homozigot GG u devet te homozigot AA u šest uzoraka.



Slika 1. a) Gel elektroforeza drugog egzona MTNR1A gena duljine 824 baznih parova (bp) lančanom reakcijom polimeraze (PCR); b) restriksijska razgradnja PCR produkata MTNR1A gena. Primjer dobivenih genotipova s *MnII* restriksijskom endonukleazom (GG, GA i AA). M – biljeg razmaka 100 i 50 bp, 1-8 amplificirani PCR produkti; 1-9 uzorci podvrgnuti restriksijskoj razgradnji.

Utvrđene frekvencije genotipova na lokusu 612 MTNR1A gena bile su sljedeće: GG (0,27), GA (0,57) i AA (0,16), što je rezultiralo podjednakim frekvencijama alela G i alela A (0,55 i 0,45; Tablica 1). Slične frekvencije genotipova u ovaca Suffolk pasmine navode Chu i sur. (2006.) uz nešto veće frekvencije homozigota (GG 0,33 i AA 0,21), a manje frekvencije heterozigota (GA 0,46). Nadalje, u iste pasmine Kaczor i sur. (2006.) navode još veće frekvencije homozigota (GG 0,60 i AA 0,40) bez prisustva heterozigota. Također, između pojedinih istraživanja postoje razlike u frekvencijama alela na lokusu 612 MTNR1A u Suffolk pasmine pa tako pojedini autori navode sljedeće frekvencije alela G i alela A: 0,67 i 0,33 (Messer i sur., 1997.), 0,56 i 0,44 (Chu i sur., 2006.) te 0,60 i 0,40 (Kaczor i sur., 2006.). U većine dosad genotipiziranih pasmina ovaca na prisutnost polimorfizma MTNR1A gena na lokusu 612 utvrđene su veće frekvencije alela G u odnosu na alel A. Neke od dosad istraživanih pasmina bile su: Small Tail Han, Hu, Dorset i German Mutton Merino (Chu i sur., 2006.), Prolific Olkuska i poljska planinska ovca (Kaczor i sur., 2006.), Sarda (Carcangiu i sur., 2009.), Awassi, bijela Karaman i Chios (Šeker i sur., 2011.), Chokla (Saxena i sur., 2014.), travnička pramenka (Držaić i sur., 2016.) i druge.

Tablica 1. Utvrđene frekvencije genotipova i alela MTNR1A gena te testiranje Hardy-Weinbergove ravnoteže u Suffolk pasmine

| Frekvencija genotipova | | | Frekvencija alela | | HWE |
|------------------------|------|------|-------------------|------|----------|
| GG | GA | AA | G | A | χ^2 |
| 0,26 | 0,57 | 0,17 | 0,54 | 0,46 | 0,801 |

HWE – Hardy-Weinberg equilibrium

Testiranje Hardy-Weinbergove ravnoteže utvrđenih genotipova u istraživanoj populaciji ovaca Suffolk pasmine također je prikazano u tablici 1. Iz rezultata χ^2 -testa vidljivo je da utvrđeni genotipovi MTNR1A gena u populaciji Suffolk pasmine statistički ne odstupaju značajno od Hardy-Weinbergove ravnoteže. Distribuciju genotipova na lokusu 612 MTNR1A gena unutar Hardy-Weinbergove ravnoteže navode Šeker i sur. (2011.) u Awassi, bijele Karaman i Chios pasmine, Saxena i sur. (2014.) u Chokla pasmine te Držaić i sur. (2016.) u ovaca travničke pasmine.

U tablici 2. prikazan su janjenja ovaca po sezonama s obzirom na genotip na lokusu 612 MTNR1A gena. Najveći broj janjenja u ovaca Suffolk pasmine zabilježen je za vrijeme zime (88%), dok je manji broj janjenja evidentiran za vrijeme proljeća (8%) i jeseni (4%), dok tijekom ljeta nisu evidentirana janjenja. Da se najveći broj ovaca Suffolk pasmine u Hrvatskoj janji tijekom zime potvrđuju podaci Hrvatske poljoprivredne agencije (HPA, 2016.) prema kojima se tijekom zime ojanji oko 65% ovaca, dok se preostale ovce janje tijekom proljeća. S obzirom na genotip, najveći broj janjenja su ostvarile jedinke genotipa GA (62%), dok su jedinke genotipa GG i AA imale podjednak broj evidentiranih janjenja (20 i 18%).

Tablica 2. Distribucija janjenja ovaca Suffolk pasmine po sezonama s obzirom na genotip na lokusu 612 MTNR1A gena

| Genotip | Proljeće | | Ljeto | | Jesen | | Zima | | UKUPNO | |
|----------|----------|------|-------|------|-------|------|------|-------|--------|--------|
| | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| GG | 2 | 4,00 | 0 | 0,00 | 1 | 2,00 | 7 | 14,00 | 10 | 20,00 |
| GA | 2 | 4,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 29 | 58,00 | 31 | 62,00 |
| AA | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 1 | 2,00 | 8 | 16,00 | 9 | 18,00 |
| Σ | 4 | 8,00 | 0 | 0,00 | 2 | 4,00 | 44 | 88,00 | 50 | 100,00 |

Tijekom zime evidentirana su janjenja u ovaca svih triju genotipova, dok su tijekom proljeća i jeseni evidentirana janjenja u ovaca genotipa GG i GA, odnosno GG i AA. Tako su se ovce genotipa GG janjile u sve tri sezone, dok su se ovce genotipa GA i AA janjile u dvije sezone. Međutim valja istaknuti da je najfrekventnija sezona po broju janjenja u istraživanoj populaciji za ovce sva tri genotipa bila zima. Povezanost genotipa na lokusu 612 MTNR1A gena sa sezonom janjenja navode Carcangiu i sur. (2009.) u ovaca Sarda pasmine u

koje su jedinke genotipa GG imale veću frekvenciju janjenja u razdoblju rujan-prosinac, u odnosu na razdoblje siječanj-travanj (80% : 20%). S druge strane, jedinke genotipa AA imale su veću frekvenciju janjenja u razdoblju siječanj-travanj u odnosu na razdoblje rujan-prosinac (78% : 22%; Carcangiu i sur., 2009.).

S obzirom da su se gotovo sve istraživane jedinke, svih triju genotipova na lokusu 612 janjile za vrijeme zime utjecaj genotipa na sezonu janjenja nije utvrđen. Međutim postoji mogućnost da je utjecaj polimorfizma MTNR1A gena u istraživanoj populaciji ostao prikriven organizacijom i vremenom pripusta ovaca, odnosno da su se ovce pripuštale sukladno tehnološkom procesu, a ne kada su se eventualno počele tjerati.

Zaključak

Na temelju utvrđenih rezultata može se zaključiti da u Suffolk pasmine u Hrvatskoj na lokusu 612 MTNR1A gena postoje sva tri genotipa i sa nešto većom frekvencijom alela G (0,54). Najveći broj ovaca istraživane pasmine se ojanjio za vrijeme zime bez obzira na genotip na istraživanom lokusu, međutim ovce genotipa GG su se janjile u sve tri sezone. Razlog izostanka utjecaja genotipa na sezonu janjenja ovaca Suffolk pasmine može biti organizacija i provedba pripusta u stadu.

Literatura

- Barrett P., Conway S., Jockers R., Strosberg A.D., Guardiola-Lemaitre B., Delagrangé P., Morgan P.J. (1997): Cloning and functional analysis of a polymorphic variant of the ovine Mel 1a melatonin receptor. *Biochimica et Biophysica Acta* 1356: 229-307.
- Carcangiu V., Mura M.C., Vacca G.M., Pozzola M., Dettori M.L. (2009): Polymorphism of the melatonin receptor MT1 gene and its relationship with seasonal reproductive activity in the Sarda sheep breed. *Animal Reproduction Science* 116: 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 Science* 19(8): 1079-1804.
- Držaić V., Kasap A., Širić I., Mioč B. (2016). Polimorfizmi MTNR1A gena u populaciji travničke pramenke. In: Pospisil M., Vnučec I. (eds) *Proc 51st Croatian and 11th International Symposium on Agriculture, Opatija Croatia*, pp 324-238
- HPA (2016). *Ovčarstvo, kozarstvo i male životinje. U: Godišnje izvješće za 2015. godinu. Hrvatska poljoprivredna agencija, Križevci.*
- Kaczor U., Kmiecik M., Molik E., Rychlik T. (2006). Polymorphism in the melatonin receptor gene MT1 (locus MTNR1A) in sheep. *Archiv Tierzucht* 49: 257-262.
- Karsch F.J., Bittman E.L., Foster D.L., Goodman R.L., Legan S.J., Robinson J.E. (1984): Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Recent Progress in Hormone Research* 40: 185-232.
- Malpoux B., Thiery J.C., Chemineau P. (1999): Melatonin and the seasonal control of reproduction. *Reproduction Nutrition Development* 39: 355-366.
- Messer L.A., Wang L., Tuggle C.K., Yerle M., Chardon P., Pomp D., Womack J.E., Barendse W., Crawford A.M., Notter D.R., Rothschild M.F. (1997): Mapping of the melatonin receptor 1a (MTNR1A) gene in pigs, sheep, and cattle. *Mammalian Genome* 8: 369-370.
- Mura M.C., Luridiana S., Vacca G.M., Bini P.P., Carcangiu V. (2010): Effect of genotype at the MTNR1A locus and melatonin treatment on first conception in Sarda ewe lambs. *Theriogenology* 74: 1579-1586.
- 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: 1096-1101.
- R Development Core Team (2008). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>
- 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: 1177-1185.
- Saxena V.K., Jha B.K., Meena A.S., Naqvi S.M.K. (2014): Sequence analysis and identification of new variation in the coding sequence of melatonin receptor gene (MTNR1A) of Indian Chokla sheep breed. *Meta Gene* 2: 450-458.
- Şeker I., Özmen Ö., Kul B.Ç., Ertuğrul O. (2011): Polymorphism in Melatonin Receptor 1A (MTNR1A) Gene in Chios, White Karaman and Awassi Sheep Breeds. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 17(5): 865-868.

EFFECT OF THE POLYMORPHISM OF MTNR1A GENE ON SEASONAL OCCURRENCE OF LAMBING IN SUFFOLK BREED

Abstract

The aim of this study was to determine effect of the polymorphism on locus 612 of MTNR1A gene on seasonal occurrence of lambing in Suffolk sheep population. For that purpose 35 ewes were genotyped with *MnlI* restriction endonuclease. After genotyping following frequencies of genotypes were determined GG (0.26), GA (0.57) and AA (0.17), and allelic frequency G (0.54) and A (0.46). Ewes lambing were recorded in three seasons (spring, autumn and winter), but majority of ewes lambed during winter (88%). During winter ewes of all three genotypes GG (14%), GA (58%) and AA (16%) were lambed. Ewes of GG genotype were lambed in all three seasons, while ewes of GA and AA genotype were lambed only in two seasons.

Key words: locus 612, MTNR1A, genotype, Suffolk, lambing season