

Expression analysis of candidate genes in white and black spots of skin tissue in Lori Bakhtiari sheep

Khadijeh Moradi¹, Mustafa Muhaghegh Dolatabady^{2*}, Javad Habibizad³

1-MSc graduate of Genetics and Animal Breeding, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Yasouj, Yasouj, Iran

2- Associate Professor of Animal Science Department, Faculty of Agriculture Science, University of Yasouj, Yasouj, Iran

3- Assistance Professor of the Animal Science Department, Faculty of Agriculture Science, University of Yasouj, Yasouj, Iran

*Corresponding author: mmuhaghegh@yu.ac.ir

Doi: 10.22067/ijasr.2023.83699.1166

Introduction

Sheep are the main source of wool and its fiber characteristics, such as diameter, length, and color, which are determined by genetics and environmental factors, are key features in the economic value of sheep wool. In sheep, white wool has the highest economic value due to its dyeability, thus, the identification of mechanisms responsible for coating color determination is very important from an economic point of view. In general, the coat color is determined based on the amounts and types of melanin produced and released by the melanocytes in the skin tissue (Ito et al., 2000). The genetic basis and genes involved in coat color are well understood in rodents, although many of these genes are incorporated in coat color regulation in other species; including Sheep also have a common role. In Iran, the Lori Bakhtiari sheep is one of the most important breeds of sheep in terms of the use of its wool in the textile and carpet industries. In his breed, the dominant coat of the wool is white, although sometimes a percentage of dark brown and pale brown is also observed (Saadat Nouri, M. & Siah Mansour, 1368). However, in this breed, some animals have black spots on their coat, which leads to a decrease in wool quality. Since MC1R, ASIP, KLF4 and MITF genes play an important role in controlling and determining coat color in mammals, the purpose of this study was to investigate the expression of these genes in two phenotypes of white and black spots in the skin tissue of Lori Bakhtiari sheep.

Material and methods

Skin samples were obtained from both white and dark parts of 14 white-coated sheep with black spots and total RNA was extracted. The quality and quantity of extracted RNAs were evaluated by agarose gel electrophoresis and spectrophotometer. Extracted RNA samples were exposed to DNaseI enzyme digestion to remove the possible contamination of genomic DNA. Also, the quality of synthesized cDNA was evaluated using 1% agarose gel. In this research, in order to amplify a fragment of the studied genes, using the mRNA sequence of these genes in the

GenBank database, appropriate primers were designed by Primer3plus software. To evaluate the relative expression of the target genes, β -actin and GAPDH genes were used as reference genes to normalize the data. Finally, BestKeeper and REST 2009 V2.0.13 software were used for the analysis of gene expression data.

Results and discussion

Based on the descriptive results of Ct values, MC1R and MITF genes revealed minimum and maximum expression stability among the target genes in skin samples with standard deviations of 1.34 and 3.62, respectively. In addition, the reference genes (β -actin and GAPDH) showed the highest stability among all the studied genes. No significant differences were observed in mRNA levels of MC1R, ASIP, KLF4, and MITF genes in the spotted skin tissue compared to the white part of the skin ($p>0.05$). However, the expression of the ASIP gene was more than 2 times in the spotted part compared to the white skin, but this difference was not significant ($p=0.21$). In addition, the MC1R gene showed minimum expression differences in black spots and white parts of the skin tissue. In addition, the MITF and MC1R genes showed the highest and lowest levels of expression in skin samples of Lori Bakhtiari breed sheep with average Ct of 25.86 and 30.42, respectively. However, among all the studied genes, the lowest mRNA level was observed for the GAPDH gene with an average Ct of 35.96.

Conclusion

Mammalian coat color results from various factors such as the degree and distribution of melanin pigment and the interaction between genotype and environment (B. Li et al., 2018). In addition, melanogenesis is a complex process that includes melanocyte growth, melanosome formation, melanin synthesis, melanin transport, and melanosome release (Ito & Wakamatsu, 2011). According to the conducted studies, a large number of genes are involved in the mechanism of coat color determination, but two genes, MC1R and ASIP, play an essential role in the regulation and control of coat color (Searle, 1968). In our study, no significant difference was observed in the expression of MC1R, ASIP, KLF4, and MITF genes in the spotted compared to the white part of the skin tissue in Lori Bakhtiari sheep. These results showed that the development of skin spots is not under the control of the studied genes in Lori Bakhtiari sheep, and genes or other factors can play roles in the creation of dark spots in this breed.

Keywords: Gene expression, coat color, sheep, black spot

تجزیه و تحلیل بیان ژن‌های کاندیدا در بخش‌های سفید و تیره بافت پوست در گوسفند لری بختیاری

خدیدجه مرادی^۱، مصطفی محقق دولت آبادی^{۲*} و جواد حبیب زاد^۳

۱- کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران

۲- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران

۳- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران

* نویسنده مسئول: mmuhaghegh@yu.ac.ir

Doi: 10.22067/ijasr.2023.83699.1166

چکیده

در گوسفندان نژاد لری بختیاری وجود لکه‌های سیاه بر روی پوست منجر به کاهش کیفیت پشم استحصال می‌شود. اساس مولکولی و ژن‌های دخیل در رنگ پوشش برخی از دام‌های از جمله گوسفندان تا حدودی شناسایی شده است. از این رو، هدف از انجام این مطالعه بررسی بیان ژن‌های گیرنده ملانوکورتین-۱ (MC1R)، پروتیین سیگنال‌دهی آگوتی (ASIP)، فاکتور شبه‌کروپل ۴ (KLF4)، و فاکتور رونویسی القاکننده ملانوسیت (MITF) در بخش‌های سفید و تیره بافت پوست در گوسفندان نژاد لری بختیاری بود. برای این منظور، از تعداد ۱۴ رأس گوسفند با رنگ پوشش سفید دارای لکه‌های تیره (سیاه)، نمونه پوست از هر دو بخش سفید و تیره تهیه و RNA کل استخراج گردید. برای ارزیابی بیان نسبی ژن‌های مورد نظر، از ژنهای و GAPDH به عنوان ژن مرجع جهت نرمال کردن داده‌ها استفاده گردید. همچنین، جهت تکثیر قطعه‌ای از ژن‌های مورد مطالعه، با استفاده از توالی mRNA موجود برای این ژن‌ها در بانک اطلاعاتی (GenBank)، آغازگرهای مناسب توسط نرم افزار Primer3plus طراحی شدند. در نهایت از نرم افزارهای BestKeeper و REST 2009 V2.0.13 برای تجزیه و تحلیل داده‌های بیان ژن استفاده شد. بر اساس نتایج توصیفی، ژن‌های MC1R و MITF با میانگین ۳۰/۴۲ و ۲۵/۸۶ برای مقادیر Ct، به ترتیب کمترین و بیشترین مقدار بیان را در بین ژن‌های هدف در نمونه‌های پوستی داشتند. علاوه بر این، ژن‌های مرجع (β -actin و GAPDH) بیشترین پایداری بیان را در بین تمام ژن‌های مورد مطالعه داشتند. تفاوت معنی‌داری در سطوح mRNA ژن‌های ASIP، MC1R، KLF4 و MITF در بافت تیره پوست نسبت به بخش سفید پوست مشاهده نشد. اگرچه بیان ژن ASIP در قسمت تیره نسبت به بخش سفید پوست بیش از ۲ برابر بود، اما این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود. علاوه بر این، ژن MC1R کمترین تفاوت بیان را در بخش‌های سیاه و سفید بافت پوست از خود نشان داد. این نتایج می‌تواند بیانگر این موضوع است که سطح بیان این چهار ژن مورد مطالعه نقشی در ایجاد لکه‌های پوستی سیاه رنگ در گوسفند نژاد لری بختیاری نداشته باشد.

کلمات کلیدی: بیان ژن، رنگ پوشش، گوسفند، لکه سیاه پوست

گوسفندان مهمترین حیوانات تولید کننده الیاف در سراسر جهان هستند. قطر، طول و رنگ الیاف از ویژگی‌های کلیدی در ارزش اقتصادی گوسفندان است که توسط ژنتیک و محیط تعیین می‌شود. بطور کلی، فاکتورهای تعیین کننده رنگ پوشش از نظر اقتصادی از اهمیت بسزایی برخوردار هستند. در ایران، یکی از نژادهای مهم گوسفند از نظر کاربرد پشم آن در صنایع نساجی و قالیبافی، گوسفند نژاد لری بختیاری می‌باشد. پوشش غالب پشم این نژاد رنگ سفید می‌باشد البته گاهی درصدی قهوه‌ای تیره (قنقر) و قهوه‌ای کم‌رنگ نیز مشاهده می‌شود. علاوه بر این، برخی از گوسفندان این نژاد دارای لکه‌هایی بر روی پوشش خود هستند که از نظر رنگ می‌تواند قهوه‌ای تیره و یا روشن، و در مواردی کم لکه سیاه باشد (Saadat Nouri & Siah Mansour, 1368)، که وجود این لکه‌ها منجر به کاهش کیفیت پشم استحصالی می‌شود. بطور کلی، در گوسفند، پشم سفید به دلیل توانایی رنگ پذیری دارای بالاترین ارزش اقتصادی بوده، در حالی که علاقه به رنگ‌های طبیعی به دلیل انقلاب سبز و ترجیح مصرف کننده به محصولات طبیعی در حال افزایش است. رنگ پوشش بر اساس مقادیر و انواع ملانین تولید شده و آزاد شده توسط ملانوسیت‌های موجود در پوست تعیین می‌شود (Ito & Wakamatsu, 2000; Ito et al., 2008). اساس ژنتیکی و ژن‌های دخیل در رنگ پوشش چونندگان به خوبی شناسایی شده است (Slominski et al., 2004; Steingrímsson et al., 2006)، البته بسیاری از این ژن‌ها در تنظیم رنگ پوشش در گونه‌های دیگر، از جمله گوسفندان نیز نقش مشترکی دارند. به عنوان مثال، ژن‌های ژن‌های گیرنده ملانوکورتین-۱^۱ (MC1R)، پروتیین سیگنال‌دهی آگوتی^۲ (ASIP)، به عنوان تنظیم کننده‌های اصلی رنگ پوشش در موش‌ها شناخته می‌شوند و در گوسفند نیز، ژنوتیپ‌های این ژن‌ها از نظر عملکرد با فنوتیپ‌های متفاوت رنگ پوشش در ارتباط هستند (Gratten et al., 2007; Norris & Whan, 2008; Våge et al., 1999). با وجود دانش قابل توجه در مورد تنظیم ژنتیکی رنگ پوشش در موش‌ها و شناسایی ژن‌های دخیل در تنظیم رنگ پوشش در گونه‌های تولید کننده الیاف، تاکنون سازوکارهای مولکولی در سطح بیان ژن، مرتبط با تفاوت‌ها در فنوتیپ رنگ پوشش به خوبی شناخته نشده است. این اطلاعات نه تنها به منظور افزایش درک اساسی از تنظیم ملانوزن، بلکه برای شناسایی رویکردهای جدید دارویی و روش‌های ژنتیک مولکولی جهت تنظیم یا انتخاب رنگ پوشش در گونه‌های تولید کننده الیاف ضروری می‌باشد. از این رو، پروفایل رونویسی یک رویکرد قدرتمند برای شناسایی ژن‌های بیان شده در سطح کلی و عملکردی در بافت‌های مختلف از جمله پوست محسوب می‌شود (Kim et al., 2006). در مطالعات اولیه در گوسفند، به منظور درک سازوکارهای مولکولی دخیل در تشکیل رنگ پوشش، از تولید برچسب‌های توالی بیان شده^۳ (EST) پوست گوسفند و تکنیک تعیین توالی استفاده می‌شد (Fan et al., 2011; Hu et al., 2009). سپس، با استفاده از فناوری ریزآرایه، تفاوت بیان ژن‌های مرتبط با لکه‌های سیاه پوست در گوسفندان از جمله نژاد کوریدال بررسی شدند (Peñagaricano et al., 2012). امروزه، معمولاً جهت بررسی ژن‌های موثر در رنگ پوشش گوسفند، به ویژه در الیاف و رنگدانه‌های پوشش، از تکنیک RNA-seq استفاده می‌شود. در حال حاضر اطلاعات محدودی در مورد تفاوت در پروفایل رونویسی پوست مرتبط با رنگ پوشش در گونه‌های مختلف پستانداران در دسترس است. برای بررسی ژن‌هایی که ممکن است نقش مهمی در تنظیم رنگ پوشش در پوست

^۱ Melanocortin 1 receptor (MC1R)

^۲ Agouti signaling protein (ASIP)

^۳ Expressed sequence tag (EST)

گوسفندان داشته و همچنین افزایش اطلاعات در مورد سازوکارهای مولکولی مسئول بیوشیمی پوست و ایف (از جمله رنگدانه سازی) در حیوانات تولیدکننده پشم مانند گوسفند، بررسی پروفایل رونویسی در پوست گوسفندان با رنگ پوشش سیاه و سفید می‌تواند اطلاعات بسیار مهمی فراهم کند. نتایج این مطالعات، بینش جدیدی را در مورد تفاوت بیان ژن‌های مرتبط با رنگ پوشش، از جمله ژن‌های کلیدی دخیل در مسیر ملانوژنز را در دسترس قرار می‌دهد. در مطالعه‌ای بر اساس روش RNA-seq، تعداد ۳۷۷۶۸ ژن بیان شده در پوست گوسفند شناسایی شدند که از این بین، میزان بیان تعداد ۲۲۳۵ ژن در بخش‌های سیاه و سفید گوسفند متفاوت بودند. از این تعداد ژن شناسایی شده با بیان متفاوت، MC1R، ASIP، DCT، TYR، TYRP1 و MATP مهمترین ژن‌هایی بودند که بیان آنها در بخش‌های سیاه و سفید پوست گوسفند از نظر آماری تفاوت معنی‌داری داشتند (Fan et al., 2013). از آنجایی که ژن‌های MC1R، ASIP، KLF4 و MITF نقش مهمی در کنترل و تعیین رنگ پوشش در پستانداران بعهده دارند، هدف از انجام این مطالعه بررسی بیان این ژن‌ها در بخش‌های سفید و تیره پوست در گوسفندان نژاد لری بختیاری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق نمونه‌های پوست از کشتارگاه دام شهر یاسوج و از حیوانات بالغ نژاد لری بختیاری تهیه گردید تا تغییرات مربوط به سن کاهش یابد. تعداد ۱۴ راس گوسفند نژاد لری بختیاری قبل از کشتار علامت گذاری شدند تا بلافاصله پس از کشتار فرآیند نمونه برداری بر روی آنها صورت گیرد بطوری که از هر گوسفند، یک نمونه از قسمت سفید پوست و یک نمونه از قسمت لکه‌های موجود برداشته شد. پس از نمونه‌گیری، نمونه‌ها با سرم فیزیولوژی شستشو داده شدند و بلافاصله به تانک ازت منتقل گردیدند. استخراج RNA از ۵۰ میکروگرم بافت پوست طبق دستورالعمل کیت استخراج Total RNA (شرکت آزما ژن) انجام شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با روش الکتروفورز ژل آگارز و دستگاه اسپکتروفوتومتر ارزیابی گردید. برای حذف آلودگی احتمالی DNA ژنومی، نمونه‌های RNA استخراجی در معرض هضم آنزیم DNase1 قرار گرفتند. برای سنتز cDNA از کیت شرکت یکتا تجهیز آزما استفاده شد. همچنین، کیفیت cDNA سنتز شده با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد ارزیابی شدند. در این تحقیق، جهت تکثیر قطعه‌ای از ژن‌های مورد مطالعه، با استفاده از توالی mRNA این ژن‌ها در بانک اطلاعاتی GenBank، آغازگرهای مناسب توسط نرم افزار Primer3plus طراحی شدند (جدول ۱-). در روش تعیین کمی بیان ژن، تصحیح تغییرات آزمایشی ضروری است. برای این منظور از دو ژن کنترل داخلی β -actin و GAPDH به عنوان ژن‌های مرجع جهت نرمالیزه کردن داده‌ها استفاده شد. اندازه‌گیری بیان ژن‌ها طی واکنش Real Time PCR در دستگاه Bio Rad مدل CFX 96 و با استفاده از رنگ فلورسنت سایبرگرین بر پایه روش استاندارد نسبی صورت گرفت. برای واکنش Real Time PCR از مستر میکس سایبرگرین امپلیکون فراهم شده توسط شرکت آزماژن استفاده شد. برای این منظور، برای هر نمونه در هر میکروتیوب مقدار ۵ میکرولیتر مسترمیکس سایبرگرین، ۱ میکرولیتر آغازگر رفت با غلظت ۵ پیکومول، ۱ میکرولیتر آغازگر برگشت با غلظت ۵ پیکومول، ۱ میکرولیتر cDNA سنتز شده (۵۰ نانوگرم) و ۲ میکرولیتر آب عاری از DNase اضافه شد که در کل حجم نهایی هر واکنش به ۱۰ میکرولیتر رسید. همچنین، برای کاهش خطا برای هر نمونه ۳ تکرار در نظر گرفته شد. برنامه حرارتی مورد استفاده در واکنش Real Time PCR برای ژن‌های مورد مطالعه شامل ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی-گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه بود که دو مرحله‌ی آخر ۴۰ بار تکرار شدند. همچنین، بلافاصله پس از آخرین چرخه تکثیر، تجزیه و تحلیل منحنی ذوب شروع شد که این فرآیند شامل افزایش دما از ۶۵ درجه

سانتیگراد به ۹۵ درجه سانتیگراد با افزایش ۰/۵ درجه سانتیگراد در هر مرحله بود. در روش Real Time PCR، تکثیر قطعه مورد نظر با تجمع یک سیگنال فلورسنت تشخیص داده می شود. مقدار Ct یا چرخه آستانه به عنوان تعداد چرخه‌های مورد نیاز برای عبور سیگنال فلورسنت از آستانه (یعنی فراتر از سطح پس زمینه) تعریف می‌شود. در انتهای واکنش RT-PCR، نرم افزار دستگاه به طور خودکار خط آستانه را رسم و نتایج را به صورت چرخه آستانه (Ct) گزارش می‌کند. آمار توصیفی داده‌ها با استفاده از Ct های بدست آمده برای هر ژن سیتوکین توسط برنامه BestKeeper بررسی شدند. نتایج Real-time PCR با برنامه REST,2009,V2.0.13 برای مقایسه تفاوت بیان ژن ها در دو بخش سفید و تیره پوست مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نرم افزار REST یک نرم افزاری است که قادر است ۲ گروه با بیش از ۱۶ نقطه‌ی اطلاعاتی در یک نمونه و ۱۶ نقطه در یک گروه کنترل برای ژن مرجع را مقایسه کند (Pfaffl et al., 2002).

جدول ۱- ویژگی های آغازگرهای ژن های هدف و مرجع

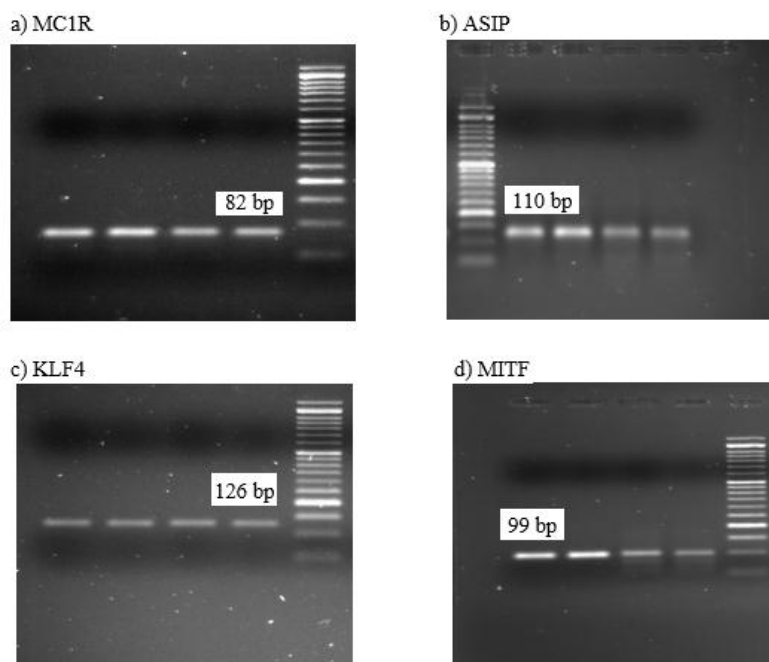
Table 1- Primers characteristics of target and references genes

ژن	توالی	طول قطعه (جفت باز)	شماره دسترسی
Gene	Sequence	Length (bp)	Accession number
MC1R	F: 5'-CAATCGGACAGGGCCCCAGTGC-3' R: 5'-TGAGGGCCAGGAAGAGGTTGAAGT-3'	82	NM_001282528.1
ASIP	F: 5'-GATTTCCCTTCTGTCTCTATCGTGG-3' R: 5'-TTCTTCATCGGAGCCTTTCTCTTG-3'	110	NM_001134303.1
KLF4	F: 5'-CGACCTGGAGAGTGGAGGAG-3' R: 5'-GACAGCGAGTTGGAGAGGATAAAG-3'	126	NM_001164219
MITF	F: 5'-ATGGACGATACCCTTTCTCTCTGTTG-3' R: 5'-GCTCATACTGCTCCTTCGGCT-3'	99	JN208147.1
β -actin	F: 5'-CAATGTGGCCGAGGACTTTGAC-3' R: 5'-CTTAGAGAGAAGGAGGGTGGCTTT-3'	125	NM_001009784.3
GAPDH	F: 5'-AGGAGCACGAGAGGAAGAGAGAG-3' R: 5'-GATGGAAATGTATGGAGGTCGGGAG-3'	96	NM_001190390.1

نتایج و بحث

جهت تایید اندازه قطعات تکثیر شده، محصولات روی ژل آگارز ۱ درصد همراه با نشانگر ۵۰ جفت باز الکتروفورز شدند (شکل ۱). اندازه قطعات تکثیر شده برای ژن های MC1R، ASIP، KLF4 و MITF به ترتیب ۸۲، ۱۱۰، ۱۲۶ و ۹۹ جفت باز بود که بیانگر صحت قطعات تکثیر یافته برای هر ژن است. داده‌های توصیفی حاصل از نرم افزار BestKeeper برای مقادیر Ct ژن های هدف و مرجع در جدول ۲- آمده است. یکی از مهمترین اطلاعات این جدول مقادیر انحراف معیار برای داده‌های Ct هر ژن است بطوری که در بین ژن‌های هدف دو ژن MC1R و MITF به ترتیب با انحراف معیارهای ۱/۳۴

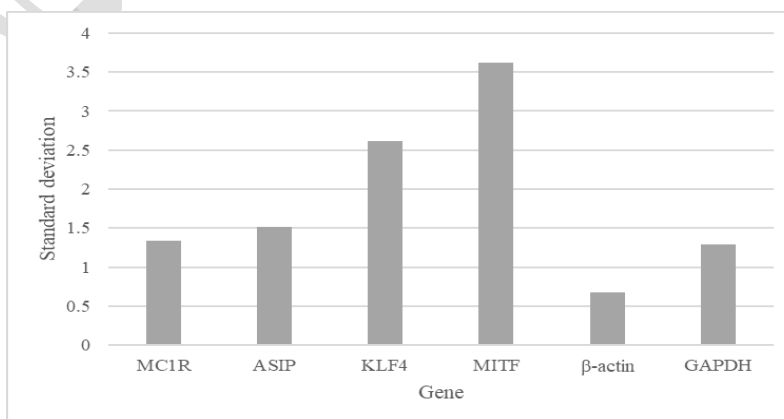
و ۳/۶۲ دارای حداقل و حداکثر پراکندگی بیان در نمونه‌های پوست بودند. از آنجایی که در ژن‌های مرجع، هر چه پایداری ژن در نمونه‌های کنترل و تیمار بیشتر باشد، ژن مناسب‌تری برای نرمال کردن مقادیر Ct محسوب می‌شود، بر اساس نتایج بدست آمده در این مطالعه، هردو ژن β -actin و GAPDH دارای بالاترین پایداری در بین همه ژن‌های مورد بودند (شکل ۲).



شکل ۱- قطعات تکثیر شده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به همراه نشانگر ۵۰ جفت باز

Figure 1- Amplified fragments using specific primers along with 50 bp ladder

از آنجایی که مقدار چرخه آستانه (Ct) رابطه معکوسی با سطح بیان نسبی ژن در بافت مورد نظر دارد ژن‌های MITF و MC1R به ترتیب با میانگین چرخه آستانه ۲۵/۸۶ و ۳۰/۴۲ دارای بیشترین و کمترین میزان بیان در نمونه‌های پوست گوسفند نژاد لری بختیاری بودند.



شکل ۲- میزان پراکندگی بیان ژن‌های مورد مطالعه در نمونه‌های پوستی بر اساس انحراف معیار

Figure 2- The expression distribution of the studied genes in skin samples based on standard deviation (SD)

البته، در بین تمام ژن‌های مورد مطالعه، ژن GAPDH با میانگین چرخه آستانه ۳۵/۹۶ کمترین میزان بیان در نمونه‌های پوست را نشان داد. میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه در بخش‌های تیره و سفید پوست در شکل ۳ آمده است. همانطور که در شکل مشخص شده ژن‌های ASIP و MC1R به ترتیب دارای حداکثر و حداقل تفاوت بیان در بخش سیاه نسبت به بخش سفید پوست را دارا می‌باشند. البته از نظر آماری تفاوت بیان ژن‌های مورد مطالعه در بافت تیره نسبت به بافت سفید پوست در گوسفندان نژاد لری بختیاری معنی‌دار نبود ($p > 0.05$) بطوری که مقادیر p برای مقایسه بیان ژن‌های MC1R، ASIP، KLF4 و MITF در قسمت تیره نسبت به بخش سفید پوست به ترتیب ۰/۸۳، ۰/۲۱، ۰/۷۶ و ۰/۶۰ بودند.

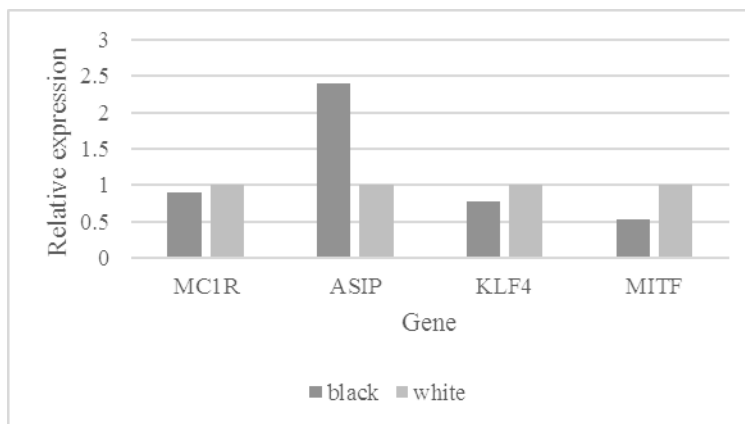
جدول ۲ - آمار توصیفی مقادیر Ct برای ژن‌های مورد مطالعه

Table 2- Descriptive statistics of Ct values for the studied genes

	MC1R	ASIP	KLF4	MITF	β -actin	GAPDH
تعداد						
n	28	28	28	28	28	28
میانگین جغرافیایی [Ct]						
geo Mean [Ct]	30.35	27.76	28.80	25.52	29.81	35.92
میانگین حسابی [Ct]						
ar Mean [Ct]	30.42	27.85	28.97	25.86	29.82	35.96
حداقل [Ct]						
min [Ct]	24.66	20.07	22.32	19.13	27.18	32.17
حداکثر [Ct]						
max [Ct]	32.06	30.95	34.82	30.99	31.01	39.63
انحراف معیار [± Ct]						
std dev [± Ct]	1.34	1.52	2.61	3.62	0.67	1.29
ضریب تغییر [Ct %]						
CV [Ct %]	4.41	5.47	9.02	14.00	2.24	3.59

رنگ پوشش پستانداران محصول چندین عامل از جمله درجه و توزیع رنگدانه ملانین و همچنین برهمکنش بین ژنوتیپ و محیط است (B. Li et al., 2018). علاوه بر این، ملانوزن فرآیندی پیچیده بوده که شامل رشد ملانوسیت، تشکیل ملانوزوم، سنتز ملانین، انتقال ملانین و آزادسازی ملانوزوم می‌باشد (Ito & Wakamatsu, 2011). بر اساس مطالعات انجام شده، تعداد زیادی ژن در سازوکار تعیین رنگ پوشش دخالت دارند، ولی دو ژن MC1R و ASIP نقش اساسی در تنظیم و کنترل رنگ پوشش به عهده دارند (Searle, 1968). علاوه بر این دو ژن، ژن‌های دیگری مانند فاکتور رونویسی

الفا کننده ملانوسیت (MITF) و فاکتور شبه کروپل ۴ (KLF4)، در تعیین رنگ پوشش نقش موثری دارند (Bellei et al., 2012). بطور کلی در پستانداران، نوع رنگدانه تولید شده و رنگ پوشش توسط سیگنال رسانی MC1R کنترل می‌شود. در این فرآیند MC1R به دو لیگاند α -MSH و ASIP پاسخ می‌دهد. α -MSH به عنوان آگونیست MC1R با افزایش سطح cAMP داخل سلولی و فعال کردن فاکتورهای رونویسی مختلف از جمله فاکتور رونویسی MITF، منجر به تشکیل یوملانین می‌شود (Levy et al., 2006).



شکل ۳- بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه در بخش لکه دار و سفید پوست

Figure 3- The relative expression of the studied genes in the spotted and white part of the skin

از طرف دیگر تعامل MC1R با ASIP با کاهش سطح cAMP باعث تولید فوملانین در سلول خواهد شد. در ملانوزوم‌ها نیز، بیان ژن‌های مرتبط با رنگدانه به طور خاص پروتئین‌های ۱ و ۲ مرتبط به تیروزیناز (TRP1 و TRP2) توسط فاکتور رونویسی MITF تنظیم می‌شوند (Bellei et al., 2012). همچنین، فاکتور شبه کروپل ۴ (KLF4) یک فاکتور رونویسی می‌باشد که در سلول‌های تمایز یافته نهایی روده و پوست بیان می‌شود (Segre et al., 1999). این فاکتور در تمایز سلول‌های اپیتلیال (Chen et al., 2020)، برنامه‌ریزی مجدد فیبروبلاست‌ها (Takahashi et al., 2007) و ملانوسیت‌ها نقش اساسی دارد (Utikal et al., 2009).

در این مطالعه، بیان ۴ ژن (MC1R، ASIP، KLF4 و MITF) دخیل در تعیین رنگ پوشش، در بخش تیره پوست نسبت به بافت سفید پوست در گوسفند نژاد لری بختیاری تفاوت معنی‌داری از خود نشان نداد. مطالعات متعددی ارتباط بیان ژن‌های مرتبط با رنگ پوشش در دام‌های متفاوت اهلی بررسی و گزارش کرده‌اند. برای مثال، در مطالعه‌ای در گوسفند قزاقستانی، سطح بیان MC1R در پوست سیاه به طور قابل توجهی با موهای سفید و موهای قهوه‌ای متفاوت بود، در حالی که بیان ژن ASIP با موهای با رنگ مختلف ارتباطی نداشت (Li et al., 2013)، در مطالعه‌ی دیگری بر روی گوسفند زالدا، نتایج متناقضی در بررسی تفاوت بیان ژن ASIP در گوسفندان با پوشش سیاه رنگ و سفید مشاهده شد بطوری که سطح بیان ASIP در گوسفند نژاد زالدا با رنگ پوشش سیاه به طور قابل توجهی کمتر از سطوح ارزیابی شده در پوشش سفید رنگ بود (Royo et al., 2008). در مطالعه‌ای بر روی گوسفند مرینوس، تغییر در سطح بیان ژن ASIP منجر به ایجاد فنوتیپ‌های سفید غالب و یا سیاه مغلوب می‌شود (Norris & Whan, 2008). در تحقیق انجام شده بر روی

گوسفند تبتی، هر دو سطح mRNA و پروتئین MITF در هر دو بافت پوست سیاه و بافت لکه سیاه در مقایسه با بافت سفید رنگ پوست به طور قابل توجهی بالاتر بود. علاوه بر این، بیان mRNA و پروتئین KIT بین بافت پوست سفید و سیاه متفاوت بود (Han et al., 2015). تفاوت معنی‌داری در بیان ژن‌های ASIP، MC1R، C-KIT، بین بخش سفید و تیره پوست در گوسفند کوریدال مشاهده نشد. البته، ژن‌های C-FOS، KLF4 و UFC1، بیان متفاوتی را در بخش سیاه از خود نشان دادند که بیانگر نقش احتمالی آن‌ها در ایجاد لکه‌های سیاه در پوست گوسفند کوریدال باشد (Peñagaricano et al., 2012). با استفاده از فناوری تراشه ژنی مشخص گردید که سطوح بیانی ژن KLF4 در پوست تیره به‌طور قابل توجهی بالاتر از پوست روشن در گوسفند نژاد کوریدال است (Peñagaricano et al., 2012) که نشان می‌دهد این ژن با تشکیل رنگدانه مرتبط بوده ولی عملکرد آن ناشناخته است. همچنین بیان متفاوت KLF4 در سطوح RNA و پروتئین در رنگ‌های مختلف پوشش گوسفند گزارش شد (Qin et al., 2022). در این مطالعه با تیره شدن رنگ پوشش، بیان mRNA ژن KLF4 افزایش یافت و سطح پروتئین KLF4 نیز روند مشابهی را نشان داد بطوری که نمونه‌های پوست گوسفند با پوشش سیاه حاوی بالاترین سطح KLF4 بودند (Qin et al., 2022). بیان متفاوتی از ژن‌های SLC45A2 و GPR143 در پوست گوسفند با رنگ‌های مختلف پوشش گزارش شده است (Chen et al., 2016; Wang et al., 2016). ژن GPR143 یک گیرنده جفت شده با پروتئین G اختصاصی، رنگدانه GPCR را کد می‌کند که به صورت درون سلولی در ملانوزوم‌ها قرار دارد، جایی که بیوژنز ملانوزوم و اندازه اندامک‌ها را در سلول‌های رنگدانه تنظیم می‌کند (De Filippo et al., 2017). ژن SLC45A2 پروتئین ناقل مرتبط با غشاء (MATP) را کد می‌کند که سنتز ملانین را از طریق انتقال تیروزیناز و انتقال پروتئون به ملانوزوم‌ها تعدیل می‌کند (de Aguiar et al., 2017). در مطالعه‌ی رنگ پوشش در بزهای پشمینا، افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های ASIP، KIT، KITLG و MITF در بخش سفید پوست گزارش گردید. همچنین، بیان ژن ASIP در رنگ پوشش سفید و قهوه‌ای بزهای پشمینا در مقایسه با رنگ پوشش سیاه به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. از طرف دیگر در این مطالعه، بیان α -MSH و MC1R در رنگ‌های مختلف پوشش از نظر آماری تفاوت معنی‌دار نداشتند (Bhat et al., 2019). علاوه بر تفاوت در میزان بیان ژن‌های دخیل در تعیین رنگ پوشش، جهش در این ژن‌ها نیز می‌تواند مکانیسمی در تفاوت رنگ پوشش قلمداد گردد. برای مثال، جهش‌های عملکردی ژن MC1R که باعث ایجاد تنوع در رنگ پوشش می‌شود در حیوانات اهلی، مانند گوسفند (Fontanesi et al., 1999; Våge et al., 2011) و بز (Fontanesi et al., 2009) توصیف شده است. در مطالعه‌ای بر روی چندین گوسفند نژاد غرب آفریقا، برای چگونگی انتقال لکه‌های تیره به نسل آینده، میزان مشارکت آلل‌های ژن‌های MC1R و ASIP در هر فنوتیپ مشخص شد و چنین نتیجه‌گیری شد که آلل E^D ژن MC1R عامل رنگ تیره بوده و در حیوانات با رنگ سفید آلل وحشی این ژن وجود دارد. به همین دلیل لکه‌داری این نژاد به‌طور جزئی به ژن MC1R نسبت داده می‌شود (Traoré et al., 2012). در نژاد گوسفند پرامنکا مشخص شده است که فقدان آلل غالب ژن ASIP منجر به ایجاد یک فنوتیپ کاملاً سیاه می‌شود در حالی که در حضور یک نسخه آلل از این ژن فنوتیپ سفید مشاهده خواهد شد (Fontanesi et al., 2011).

نتیجه گیری

بطور کلی، شناسایی ژن‌های دخیل در ایجاد لکه‌های تیره پوست در گوسفند امکان تشخیص مکانیسم‌های مولکولی دخیل در این فرآیند را فراهم کرده و از این رو، درک بیولوژی ملانوسیت و رنگدانه‌های پوست افزایش می‌یابد. در گوسفند، درک این پدیده اولین قدم به سمت توسعه و استفاده از ابزارهای مولکولی برای کمک به انتخاب در برابر حضور الیاف رنگی در

پشم سفید است. در مطالعه حاضر، مقایسه بیان ژن‌های *MITF* و *KFL4*، *ASIP*، *MC1R* در بخش تیره پوست گوسفندان لری بختیاری نسبت به بخش سفید پوست تفاوت معنی داری مشاهده نشد. اگرچه ژن *ASIP* در بخش تیره در مقایسه با بخش سفید پوست، بیانی بیش از ۲ برابری داشت ولی این اختلاف معنی دار نبود ($p=0.21$). این نتایج نشان می‌دهد که ایجاد لکه‌های پوست در گوسفند لری بختیاری در کنترل ژن‌های مورد مطالعه نبوده و ژن‌ها و یا عوامل دیگری می‌توانند در ایجاد این لکه‌ها نقش داشته باشند که شناسایی آنها نیازمند مطالعات بیشتری است.

References

- Bellei, B., Pitisci, A., Izzo, E., & Picardo, M. (2012). Inhibition of melanogenesis by the pyridinyl imidazole class of compounds: possible involvement of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *PLoS One*, 7(3), e33021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033021>
- Bhat, B., Singh, A., Iqbal, Z., Kaushik, J. K., Rao, A., Ahmad, S. M., Bhat, H., Ayaz, A., Sheikh, F.D., Kalra, S., & Kalra, S. (2019). Comparative transcriptome analysis reveals the genetic basis of coat color variation in Pashmina goat. *Scientific Reports*, 9(1), 6361. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42676-y>
- Chen, T., Zhao, B., Liu, Y., Zhao, Y., Wang, H., Fan, R., Wang, P., & Dong, C. (2016). Expression and localization of GPR143 in sheep skin. *Yi Chuan= Hereditas*, 38(7), 658-665. <https://doi.org/10.16288/j.ycz.16-068>
- Chen, Z., Gao, Y., Gao, S., Song, D., & Feng, Y. (2020). MiR-135b-5p promotes viability, proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells by targeting Krüppel-like factor 4 (KLF4). *Archives of Medical Science*, 16(1), 167-176. <https://doi.org/10.5114/aoms.2019.87761>
- de Aguiar Fracasso, N. C., de Andrade, E. S., Wiesel, C. E. V., Andrade, C. C. F., Zanao, L. R., da Silva, M. S., Marano, L.A., Donadi, E.A., Castelli, E.C., Simoes, A.L., & Simoes, A. L. (2017). Haplotypes from the SLC45A2 gene are associated with the presence of freckles and eye, hair and skin pigmentation in Brazil. *Legal medicine*, 25, 43-51. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2016.12.013>
- De Filippo, E., Manga, P., & Schiedel, A. C. (2017). Identification of novel G protein-coupled receptor 143 ligands as pharmacologic tools for investigating X-linked ocular albinism. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 58(7), 3118-3126. <https://doi.org/10.1167/iops.16-21128>
- Fan, R., Dong, Y., Cao, J., Bai, R., Zhu, Z., Li, P., Zhang, J., He, X., Lü, L., Yao, J., & Yao, J. (2011). Gene expression profile in white alpaca (*Vicugna pacos*) skin. *animal*, 5(8), 1157-1161. <https://doi.org/10.1017/S1751731111000280>
- Fan, R., Xie, J., Bai, J., Wang, H., Tian, X., Bai, R., Jia, X., Yang, L., Song, Y., Herrid, M., & Herrid, M. (2013). Skin transcriptome profiles associated with coat color in sheep. *BMC genomics*, 14(1), 1-12. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/14/389>
- Fontanesi, L., Beretti, F., Riggio, V., Dall'Olio, S., González, E. G., Finocchiaro, R., Davoli, R., Russo, V., & Portolano, B. (2009). Missense and nonsense mutations in melanocortin 1 receptor (MC1R) gene of different goat breeds: association with red and black coat colour phenotypes but with unexpected evidences. *BMC genetics*, 10(1), 1-12. <https://bmcbgenomdata.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2156-10-47>
- Fontanesi, L., Dall'Olio, S., Beretti, F., Portolano, B., & Russo, V. (2011). Coat colours in the Massese sheep breed are associated with mutations in the agouti signalling protein (ASIP) and melanocortin 1 receptor (MC1R) genes. *animal*, 5(1), 8-17. <https://doi.org/10.1017/S1751731110001382>
- Gratten, J., Beraldi, D., Lowder, B., McRae, A., Visscher, P., Pemberton, J., & Slate, J. (2007). Compelling evidence that a single nucleotide substitution in TYRP1 is responsible for coat-colour polymorphism in a free-living population of Soay sheep. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1610), 619-626. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3762>
- Han, J.L., Min, Y., Guo, T.T., Yue, Y.J., Liu, J.B., Niu, C.E., Wang, C.F., & Yang, B.H. (2015). Molecular characterization of two candidate genes associated with coat color in Tibetan sheep (*Ovis arise*). *Journal of integrative agriculture*, 14(7), 1390-1397. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(14\)60928-X](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(14)60928-X)

- Hu, X., Gao, Y., Feng, C., Liu, Q., Wang, X., Du, Z., Wang, Q., & Li, N. (2009). Advanced technologies for genomic analysis in farm animals and its application for QTL mapping. *Genetica*, *136*(2), 371-386. <https://doi.org/10.1007/s10709-008-9338-7>
- Ito, S., & Wakamatsu, K. (2008). Chemistry of mixed melanogenesis—pivotal roles of dopaquinone. *Photochemistry and photobiology*, *84*(3), 582-592. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2007.00238.x>
- Ito, S., & Wakamatsu, K. (2011). Human hair melanins: what we have learned and have not learned from mouse coat color pigmentation. *Pigment cell & melanoma research*, *24*(1), 63-74. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2010.00755.x>
- Ito, S., Wakamatsu, K., & Ozeki, H. (2000). Chemical analysis of melanins and its application to the study of the regulation of melanogenesis. *Pigment Cell Research*, *13*, 103-109. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.13.s8.19.x>
- Kim, T.H., Kim, N.S., Lim, D., Lee, K.T., Oh, J.H., Park, H.S., Jang, G.W., Kim, H.Y., Jeon, M., Choi, B.H., & Choi, B.H. (2006). Generation and analysis of large-scale expressed sequence tags (ESTs) from a full-length enriched cDNA library of porcine backfat tissue. *BMC genomics*, *7*(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-36>
- Levy, C., Khaled, M., & Fisher, D. E. (2006). MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends in molecular medicine*, *12*(9), 406-414. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2006.07.008>
- Li, B., He, X., Zhao, Y., Bai, D., Shiraigo, W., Zhao, Q., & Manglai, D. (2018). Regulatory pathway analysis of coat color genes in Mongolian horses. *Hereditas*, *155*, 1-10. <https://doi.org/10.1186/s41065-017-0048-y>
- Li, H., Zeng, X., Zhang, W., Zhao, H., Hui, W., Liu, G., Luo, Y., Ban, Q., Zhao, Z.S., & Jia, B. (2013). Analysis of the relationship between polymorphism/mRNA expression levels of MC1R and ASIP and coat color phenotype in Kazakh sheep. *Acta Vet Et Zootech Sin*, *44*(3), 366-375. <http://www.xmsyxb.com/EN/Y2013/V44/I3/366>
- Norris, B. J., & Whan, V. A. (2008). A gene duplication affecting expression of the ovine ASIP gene is responsible for white and black sheep. *Genome research*, *18*(8), 1282-1293. <https://doi.org/10.1101/gr.072090.107>
- Peñagaricano, F., Zorrilla, P., Naya, H., Robello, C., & Urioste, J. I. (2012a). Gene expression analysis identifies new candidate genes associated with the development of black skin spots in Corriedale sheep. *Journal of applied genetics*, *53*, 99-106. <https://doi.org/10.1997/s13353-011-0066-9>
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., & 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 research*, *30*(9), e36-e36. <https://doi.org/10.1093/nar/30.9.e36>
- Qin, H., Chen, Y., Wang, S., Ge, S., & Pang, Q. (2022). The role of KLF4 in melanogenesis and homeostasis in sheep melanocytes. *Acta Histochemica*, *124*(1), 151839. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2021.151839>
- Royo, L. J., Alvarez, I., Arranz, J., Fernández, I., Rodríguez, A., Pérez-Pardal, L., & Goyache, F. (2008). Differences in the expression of the ASIP gene are involved in the recessive black coat colour pattern in sheep: evidence from the rare Xalda sheep breed. *Animal genetics*, *39*(3), 290-293. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2008.01712.x>
- Saadat Nouri, M. & Siah Mansour, P. (1368). Principles of maintenance and raising sheep. Fourth edition, Tehran, Farhang Publications. (In Persian)
- Searle, A. G. (1968). Comparative genetics of coat colour in mammals. *Comparative genetics of coat colour in mammals*. London, Logos Press Ltd.
- Segre, J. A., Bauer, C., & Fuchs, E. (1999). Klf4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin. *Nature genetics*, *22*(4), 356-360.

- Slominski, A., Tobin, D. J., Shibahara, S., & Wortsman, J. (2004). Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiological reviews*, 84(4), 1155-1228. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2003>
- Steingrímsson, E., Copeland, N. G., & Jenkins, N. A. (2006). Mouse coat color mutations: from fancy mice to functional genomics. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 235(9), 2401-2411. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20840>
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *cell*, 131(5), 861-872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
- Traoré, A., Royo, L., Kaboré, A., Pérez-Pardal, L., Álvarez, I., Fernández, I., Sawadogo, L., Tamboura, H.H., & Goyache, F. (2012). Allelic and genotypic frequencies of ASIP and MC1R genes in four West African sheep populations. *African Journal of Biotechnology*, 11(78), 14287-14291. <https://doi.org/10.5897/AJB11.4031>
- Utikal, J., Maherali, N., Kulalert, W., & Hochedlinger, K. (2009). Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells. *Journal of cell science*, 122(19), 3502-3510. <https://doi.org/10.1242/jcs.054783>
- Våge, D. I., Klungland, H., Lu, D., & Cone, R. D. (1999). Molecular and pharmacological characterization of dominant black coat color in sheep. *Mammalian Genome*, 10(1), 39-43. <https://doi.org/10.1007/s003359900939>
- Wang, H., Xue, L., Li, Y., Zhao, B., Chen, T., Liu, Y., Chang, L., & Wang, J. (2016). Distribution and expression of SLC45A2 in the skin of sheep with different coat colors. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 54(3), 143-150. <https://doi.org/10.5603/FHC.a2016.0015>