Basrah Journal of Veterinary Research,Vol.17, No.3,2018
Proceeding of 6th International Scientific Conference,College of Veterinary Medicine
University of Basrah,Iraq

تطبيق تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل لتحديد التشابه الوراثي في بعض انواع الدجاج المحلي البياض في محافظة نينوى

حكمت سعدون حسن , رعد عبد الغني السنجري

فرع الصحة العامة البيطرية ، كلية الطب البيطري ، جامعة الموصل ، موصل ، العراق

Corresponding Author: alsanjary61@yahoo.com

الخلاصة

اجريت هذه الدراسة على ستة انواع من الدجاج البياض المحلي المتواجد في الاسواق المحلية في محافظة نينوى للفترة من شهر كانون الثاني الى نيسان 2014 لغرض تحديد التشابهه الوراثي فيما بينها بواسطة استخدام التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا المعتمدة على تقنية التفاعل البلمرة المتسلسل ، تم استخدام تسعة بادئات عشوائية على الدنا المعزول من دم الدجاج البياض المحلي ، وأظهرت نتائج التفاعلات حزم مختلفة الاوزان الجزيئية وقد تم توزيعها إلى مجموعتين ، المجموعة الأولى من البادئات وهي البادئات التي لم تعط أية نتيجة وعددها ثلاثة بادئات وقد شكلت نسبة 33.34 % أما المجموعة الثانية من البادئات فإنها أظهرت نواتج تضاعف على هلام الأكاروز وعلى شكل حزم نتيجة وجود المواقع المكملة لتتابعاتها في مجين الأنواع المختلفة من الدجاج وشملت ستة بادئات وبنسبة 66.66 % . أظهرت هذه البادئات ما مجموعه 233 حزمة أي بمعدل حوالي 39 حزمة لكل بادئ . سجل البادئ OPA-13 اعلى نسبة من حيث الكفاءة و القدرة التميزية مقارنة مع باقي البادئات فقد تراوحت اعداد الحزم التي اعطاها هذا البادئ من من 7-11 اما البادئ OPB-04 فقد اعطى حزم اقل من باقي البادئات وايضا تميز باقل كفاءة بحدود 10.3 . تم التعبير عن وجود الحزمة بعلامة (+) و غياب الحزمة بعلامة (-) لغرض تحليل النتائج وتطبيق المعادلات الخاصة بايجاد البعد والتشابهه الوراثي بين الدجاج البياض المحلي المشمول بالدراسة لايجاد العلاقة الوراثية بينهما .

المقدمة

يعد الدجاج وبعض أنواع الطيور الداجنة الأخرى مثل الرومي والبط والإوز والسمان و الفزانت ذو قيمة مهمة للإنسان في جميع أنحاء العالم ، إذ تعد مصدراً غذائياً مهماً ذا كلفة منخفضة نسبياً لتوفير البروتين الحيواني (1) و بعود الدجاج الى جنس Gallus حيث يوجد هناك اربعة عروق من الدجاج البري هي طير الغابة الاحمر وطير الغاب السيلاني وطير الغابة الرمادي وطير الغاب الجاوي (2) أما فيما يخص الدجاج العراقي و منشؤه ، ففي العراق يوجد نوعان من الدجاج هما الدجاج المحلي و الدجاج الاجنبي و هذا الاخير من الاصناف العالمية القياسية المعروفة ، فالدجاج العراقي المحلي يعتبر خليط من عروق مختلفة غير معلوم اكثرها (3) وكان

يعتمد سابقا في تمييز انواع الطيور الداجنة ومنها الدجاج على الشكل و الصفات المظهرية المشتركة بين الانواع المتشابهه لغرض تميزها عن باقي الانواع (4) ، حيث يتم الاعتماد على الصفات المظهرية الخارجية بصورة اساسية الى ان تم اكتشاف التركيب الجيني او الوراثي لهذه الانواع والذي احدث ثورة بيولوجية جديدة في علم الوراثة (5 ، 6) ، فقد ساهمت هذه التقنيات الحديثة في التحسين الوراثي للدواجن من خلال الكشف عن التباينات الوراثية وبالتالي بناء الخرائط الجينية والبصمة الوراثية للدواجن والتي تضمنت تحديد أبعاد الكروموسومات والمواقع الجينية لدعم طرق الانتخاب التقليدية والإسراع في الوصول إلى الأهداف الانتخابية بسبب دقتها ومرونتها في معرفة الحامض النووي (7 ، 8 ، 9) .

ان مؤشرات DNA Markers هي عبارة عن تتابعات من الدنا يمكن من خلالها التعرف على موقع معين على المجين و يختلف المجين من فرد الى اخر و يرتبط بمواقع جينية ذات علاقة بصفات محددة (10). فمنها ما يوجد ضمن الجينات وتعرف بالمؤشرات المباشرة ويمكن استخدامها في دراسة التباين الوراثي وتحديد المواقع الوراثية ومنها ما يوجد قريباً من الجينات بحيث يكون مرتبطاً بها وينتقل معها من الآباء إلى الأبناء إذ يمكن الاعتماد عليها في قياس التباين الوراثي وتحديد المواقع الجينية وهناك مؤشرات أخرى تستخدم في تحديد البصمة الوراثية مثل مؤشر التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال للدنا (Random Amplified Polymorphic DNA) (11 ، 12) . ويعتبر مؤشر التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال للدنا (RAPD)من أهم المؤشرات التي حضيت باهتمام كبير من قبل الباحثين حيث كان لها مجال واسع في بحوث الوراثة الجزيئية والبايولوجي الجزيئي وذلك لاستخدامها البادئات العشوائية وعدم الحاجة إلى معرفة تسلسل الدنا وفي الحيوانات فقد تم تحديد البصمة الوراثية لبعض أنواع الطيور ، وطائر النعامة (13) وكذلك استخدمت في تحديد البعد الوراثي في دجاج اللحم ، والدجاج البياض (14) . ولعدم وجود دراسة سابقة حول البصمة الوراثية لأنواع الدجاج المحلي لإنتاج البيض مع بعض الأنواع الأخرى من الدجاج الذي دخل إلى القطر ارتأينا القيام بهذه الدراسة لمعرفة التشابه والتنوع الوراثي بين بعض اصناف الدجاج البياض في الاسواق المحلية لمحافظة نينوى باستخدام تقنية التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا المعتمدة على تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل .

المواد وطرائق العمل

تم جمع 2 مل من دم الوريد الجناحي لستة انواع من الدجاج البياض المحلي (شكل رقم 1) بواسطة سرنجات معقمة ، حيث وضعت في أنابيب بلاستيكية معقمة وحاوية على مادة مانعة للتخثر (EDTA) وبعد جمع الدم وضع في الانبوبة وتم رجها لمزج الدم مع المادة المانعة للتخثر . وضعت الأنابيب في حاوية مبردة لنقلها بعد ذلك إلى المختبر لحفظها بدرجة - ٢٠ °م لحين البدء بعملية استخلاص الدنا .

شكل 1 يوضح انواع الدجاج البياض المحلي بالدراسة

تم استخلاص ألدنا من عينات دم الدجاج المشمول بالدراسة اعتمادا على طريقة (15) و باستخدام طقم خاص لاستخلاص الدنا DNA extraction kit من شركة (Sacace Biotechnologies Srl, Italy) ، ولتحضير تفاعلات مؤشر الRAPD تم إعداد التفاعلات بالاعتماد على ما ورد في (16) من المحاليل المجهزة من شركة Germany promega وهي 2.5 مايكروليتر لكل من محلول منظم 10 XPCR Buffer و القواعد النتروجينية ثلاثية الفوسفات منقوصة الأوكسجين d NTPS و 0.2 مايكروليتر من إنزيم *Taq* polymerase و 2 مايكروليتر من البادئات العشوائية المجهزة من شركة Operon Technologies, USA كما موضح في جدول رقم (1) ويضاف 15.8 مايكروليتر ماء مقطر غير مؤين و 2 مايكروليتر من ألدنا الخاص بالعينات المدروسة .

جدول (1) يوضح اسماء وتسلسلات البادئاتت المستخدمة في الدراسة

No.	Name of primer	Sequence of primer
1	OPA-03	AGT CAG CCA C
2	OPA-13	CAG GCC CTT C
3	OPA-20	GTT GCG ATC C
4	OPB-04	GGA CTG GAG T
5	OPC-11	AAA GCT GCG G
6	OPD-02	GGA CCC AAC C
7	OPG-03	GAG CCC TCC A
8	OPQ-16	CCA AGC TGC C
9	OPU-01	ACG GAC GTC A

وتم وضع الأنابيب في جهاز المبلمر الحراري الحلقي بعد أن بُرمِجَ الجهاز على البرنامج الخاص بتفاعل الـ RAPD وهو دورة واحدة على 94 °م لمدة 2 دقيقة و أربعون دورة (92 و 36 و 72° م لكل واحدة منها دقيقة) ودورة واحدة على درجة 72 ° م لمدة 10 دقيقة . ترحل العينات على هلام الأكاروز 1.2 % مع محلول التحميل ومن ثم صبغ الهلام ببروميد الايثيديوم وبعدها صور باستخدام كاميرا رقمية. (17) .

ولقياس البعد الوراثي تم الاعتماد في هذه الطريقة على وجود او غياب المؤشرات الموجودة في الحزم لقياس التشابه الوراثي بين حزم الخطوط و يتم ذلك من خلال المعادلة التالية :

$$Mab = 2(Nab)/(Na+Nb)$$

حيث ان Mab التشابه الوراثي بين حزمتي b و a

التشابه المشترك بين حزمتي أو هي (b و a)

٢= رقم ثابت

Nab هي عدد الحزم (غير المشتركة) الموجودة في ab

Na = عدد الحزم الكلي في حزمة a

Nb = عدد الحزم الكلي في حزمة b

ثم بعد ان نجد التشابه الوراثي او المشترك بين حزم هذه الانواع يتم عمل معادلة مشابه بين باقي الحزم لغرض حساب معدل الاختلاف الوراثي بين جميع الحزم . $P = 1- m$

ثم استخدم برنامج Nt sys في ايجاد العلاقة مابين الانواع المدروسة Dendrogram

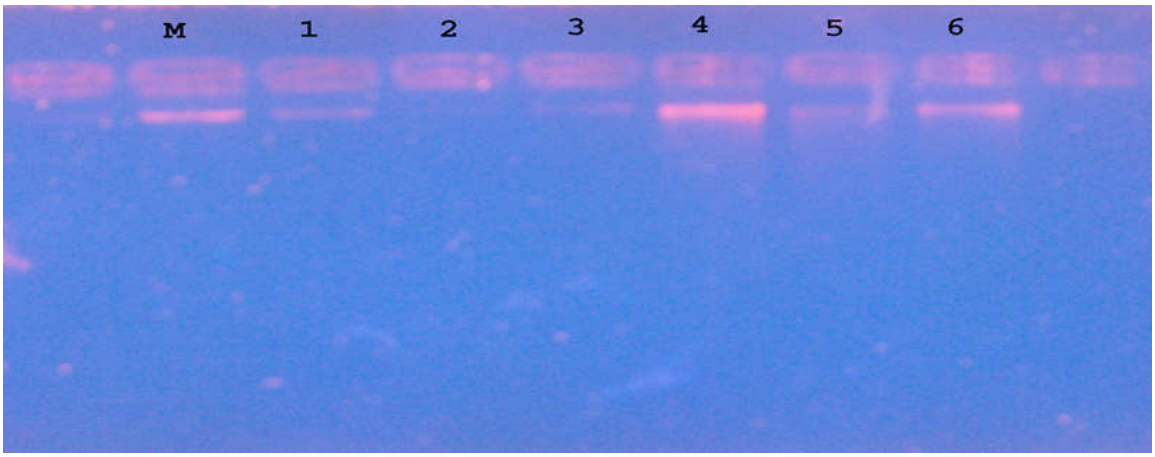
النتائج

أظهر مؤشر الـRAPD نتائج مختلفة مع هذه البادئات وقد تم توزيعها إلى مجموعتين ، المجموعة الأولى من البادئات وهي التي لم تعط أية نتيجة رغم تكرار التجربة وإعادتها لأكثر من مرة ، وعددها ثلاثة بادئات وقد شكلت نسبة 33.34 % من مجموع البادئات المستخدمة أما المجموعة الثانية من البادئات فإنها أظهرت نواتج تضاعف على هلام الأكاروز وعلى شكل حزم نتيجة وجود المواقع المكملة لتتابعاتها في مجين الأنواع المختلفة من الدجاج وشملت 6 بادئات وبنسبة 66.66 % من مجموع البادئات المشمولة بالدراسة ، وقد أظهرت هذه البادئات ما مجموعه 233 حزمة أي بمعدل حوالي 39 حزمة لكل بادئ ، فضلا عن عدد الحزم الكلية والمتباينة مع كفاءة والقدرة التمييزية للبادئات التي أعطت حزم بهذه التقنية لأنواع الدجاج المشمول بالدراسة (جدول رقم 2) .

جدول رقم 2 : يوضح عدد الحزم وعدد الحزم المختلفة مع الكفاءة والقدرة التمييزية للبادئات المستخدمة في الدراسة .

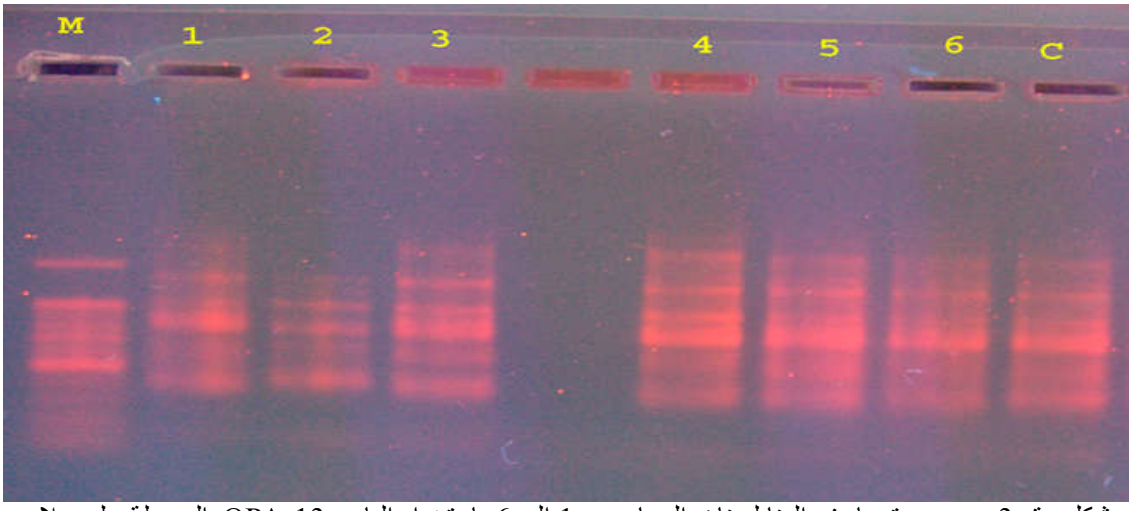
name of primers	No. of bands عدد الحزم الكلية للبادئات	No. of polymorphic bands عدد الانماط المختلفة	Primer efficiency كفاءة البادئ	Discriminatory value % القدرة التمييزية
OPA-13	47	11	20.17	19.29
OPA-20	35	9	15.02	15.78
OPB-04	24	9	10.30	15.78
OPC-11	44	9	18.88	15.78
OPG-03	38	10	16.30	17.54
OPU-01	43	9	18.45	15.78
Total	233	57		

كما وأظهرت الدراسة كفاءة عملية استخلاص الدنا من خلال ظهور الحزم التي تمثل الجينوم الكلي لعينات الدجاج المشمولة بالدراسة شكل رقم 2 .

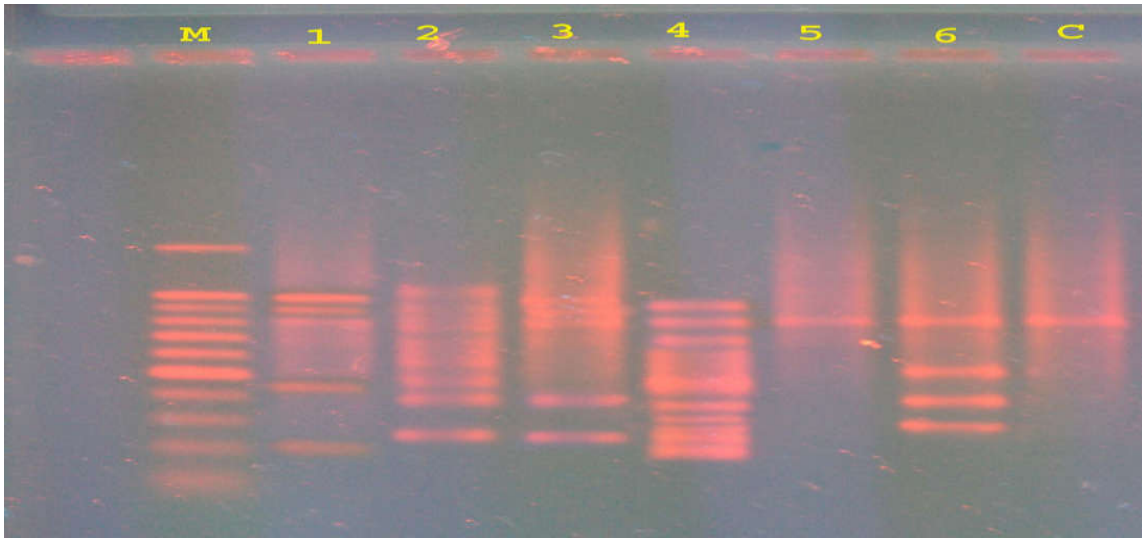


شكل رقم 2 : يوضح الدنا المعزول من عينات دم الدجاج المحلي البياض المشمول بالدراسة(1 ،2 ، 3 ، 4 ، 5 ، 6) والمرحل على هلام الاكاروز 1 % مع M الذي يمثل دنا لامبدا كمؤشر قياسي.

بعد استخلاص عينات الدنا والتأكد من وجود الدنا ، استخدمت تفاعلات التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا باستخدام البادئات العشوائية التي اعطت حزم في دنا الدجاج المدروس وتم ترحيل نتاجات التضاعف لكل تفاعل على هلام الاكاروز تركيز 1.2 % مع المؤشر القياسي (دنا لامبدا) المعروف الوزن الجزيئي ، كما موضح في الاشكال (3 ، 4) .

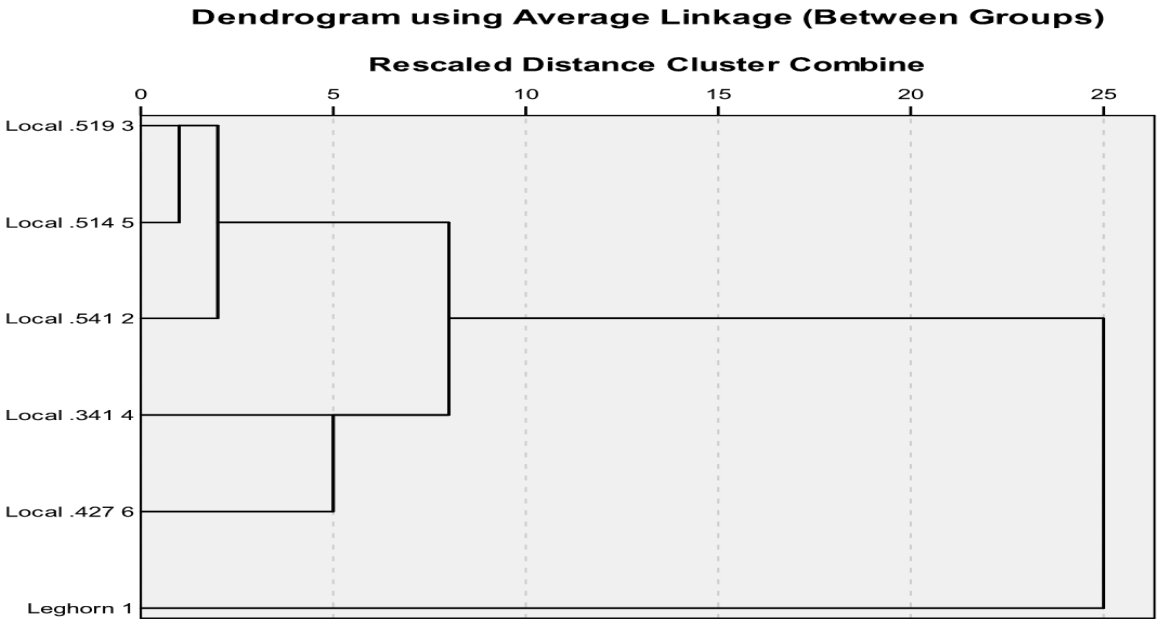


شكل رقم 3 : يوضح تضاعف الدنا لعينات الدجاج من 1 الى 6 باستخدام البادئ OPA-13والمرحلة على هلام الاكاروز 2 % مع السيطرة C والمؤشر القياسي M ،



شكل رقم 4 : يوضح تضاعف الدنا لعينات الدجاج من 1 الى 6 باستخدام البادئ OPB-04
والمرحلة على هلام الاكاروز 2 % مع السيطرة C والمؤشر القياسي M

لاجل تحليل النتائج التي حصلنا عليها في الصور اعلاه ، حيث تم التعبير عن وجود الحزمة بعلامة (+) و غياب الحزمة بعلامة (-) لغرض تطبيق المعادلات الخاصة بايجاد البعد الوراثي والتشابه الوراثي بين الدجاج البياض المحلي المشمول بالدراسة ثم تم تطبيق البيانات في البرنامج الخاص بايجاد العلاقة الوراثية بينهما كما موضح في شكل رقم 5 .



شكل 5 : يوضح العلاقة الوراثية بين انواع الدجاج المحلي البياض ، حيث النوع الخامس و الثالث ارتبط بعنقود مع النوع الثاني ، بينما ارتبطا مع النوع الرابع و السادس بعنقود اخر ليرتبطا جميعهما مع النوع الاول بعلاقة وراثية .

المناقشة

إن الاعتماد على الوراثة الجزيئية يعطي نتائج أفضل من الاعتماد على المظهر الخارجي في برامج الانتخاب وذلك لان التركيب الوراثي لايتأثر بالعوامل البيئية وتوفر المعلومات الوراثة الجزيئية في الأعمار المبكرة مما يسمح بالانتخاب المبكر(18) . استخدمت في هذه الدراسة تسعة بادئات عشوائية لعملية تضاعف الدنا لستة انواع من الدجاج المحلي البياض ، ستة بادئات اعطت حزم وثلاثة بادئات لم تعط حزم و قد اعتبر ان ظهور الحزم يعني وجود تتابع مكمل للبادئ على الدنا المجيني للعينة المدروسة و تم التعبير عنه بعلامة (+) ، بينما عدم ظهور الحزم يدل على عدم وجود موقع مكمل للبادئ على الدنا المجيني للعينة و تم التعبير عنه بعلامة (-) (16) ، سجلت البادئات السته انماطا وراثية متشابهه بين الانواع المدروسه و تم التعرف على علاقة وراثية بين الانواع ،فقد وجد ان النوعين المدروسين الخامس و الثالث يرتبطان بعلاقة وراثية بين بعضهما البعض ، ايضا النوعين الرابع و السادس يرتبطان بعلاقة وراثية بين بعضمها البعض ، في حين انه النوعين الخامس و الثالث اقرب وراثيا للنوع الثاني من باقي النوعيين الرابع و السادس ، و قد اعتبر عدم و جود المواقع المكملة للبادئ

على الدنا المجيني لأي نوع لايقل اهميه عن وجود تلك المواقع على الدنا و المتمثلة بالحزم عند ظهورها على هلام الاكاروز (19).

تراوح عدد الانماط المختلفة بين الانواع المدروسة من 9-11 و هو ما ساعد في التميز بين الانواع المدروسة وراثيا عن بعضها البعض ، لقد سجل البادئ OPA-13 اعلى نسبة من حيث الكفاءة و القدرة التميزية عن باقي البادئات فقد بلغت 20.17 وقد تراوحت اعداد الحزم التي اعطاها هذا البادئ من من 7-11 وكان متفوقا عن باقي البادئات الخمسة المستخدمة على نفس العينات ، و هذا ما يجعله اكثر البادئات المرغوبة في التعامل مع عينات دم الدجاج المحلي البياض الذي اعتمد في هذه الدراسه ، ايضا تميز هذا البادئ بشدة و تألق حزم عينات الدنا التي تم مضاعفتها باستخدامه ، فقد تم اعتبار ذلك مقياسا للتباين ايضا و هو ناتج عن الزيادة في عدد نسخ الحزم المتضاعفة في الموقع نفسه لأمتلاكها الوزن الجزيئي نفسه ، فتظهر على شكل حزم سميكة واحدة ، او قد تكون ناتجة عن تضاعف الموقع نفسه على الاليل الاخر لأنهما بالوزن الجزيئي نفسه (20) ، اما البادئ OPB-04 فقد اعطى حزم اقل من باقي البادئات وايضا تميز باقل كفاءة بحدود 10.3 و تشيرالمسافة الجينية الى الاختلاف الجيني بين أنواع الحيوانات أوضمن الأنواع ، يتم قياس ذلك عن طريق مجموعة متنوعة من مؤشرات DNA Markers ،المسافات الجينية الصغيرة تشير الى وجود علاقة وراثية قريبة في حين المسافات الجينية الكبيرة بين المؤشرات تشير الى علاقة وراثية اكثر بعدا ،المسافة الوراثية يمكن استخدامها لمقارنة التشابه الجيني بين الأنواع المختلفة (14).

ومن خلال ادخال بيانات الجداول في برنامج احصائي تم التوصل الى قيم دلت على العلاقة الوراثية بين انواع الطيور المشمولة بالدراسة ، كانت قيمة البعد الوراثي للنوع الثالث 519 و النوع الخامس 514 و هو ما يجعلهما اقرب وراثيا لبعضهما البعض عن باقي الانواع الاخرى ، بينما قيمة البعد الوراثي للنوع الرابع كانت 341 و هو ما جعل هذا النوع اقرب بالعلاقة الوراثية الى النوع السادس ذو القيمة 427 ، بينما اعتبر النوع الثاني ذو القيمة 541 اقرب وراثيا للنوعين الثالث و الخامس عن باقي الانواع الاخرى ، بالتالي تم عمل مخطط يشير الى مدى العلاقة الوراثية بين الانواع الستة المشمولة بهذه الدراسة .

Basrah Journal of Veterinary Research,Vol.17, No.3,2018
Proceeding of 6th International Scientific Conference,College of Veterinary Medicine
University of Basrah,Iraq

APPLICATION OF RAPD-PCR TECHNIQUE FOR DETECTION OF GENETIC SIMILARITY IN SOME LOCAL LAYER HENS IN NINEVEH GOVERNORATE

Hikmat S. Hassan and Raad A. Alsanjary

Department of Veterinary Public Health ,College of Veterinary Medicine ,University of Mosul ,Mosul ,Iraq

ABSTRACT

The study conducted on six types of local hens which present in local market of Nineveh governorate at the period from January to April 2014 to detect the genetic similarity between them by using Random Amplified Polymorphism DNA depended on Polymerase Chain Reaction technique , nine arbitrary primers used on DNA which extracted from blood of local hens, the result of this study revealed bands with different molecular weight and distributed into two groups .The first group involved three primers (33.34 %),while the other group involved six primers (66.66 %) revealed bands on agarose gel due to present complementary sites in their genomic DNA . These primers produce 233 bands , in average approximately 39 bands per primer . OPA-13 primer recoded high efficiency and discriminated compared with other primers which produced 7-11 bands , while OPB-04 revealed lower number of bands and low efficiency value approximately 10.3 . The bands expressed as (+) mean present band , while (-) mean absent of band which used for data analysis to detect the genetic distance and similarity between these local hens .

المصادر

١- الكسار ، علي محمودعامر (٢٠١٠) . انتاج الطيور الداجنة ، الطبعة الاولى ، مكتبة الذاكرة الاعظمية بجانب السفارة الهندية بغداد- العراق .

٢- أحمد ، محمد خير عبد الله و يحيى ، نيكا صالح (١٩٩٧) . وراثة الدواجن و تربيتها . الطبعة الاولى . مكتبة جامعة عمر المختار . الجمهورية العربية الليبية ص ٢٢٩٧-٢٢٩٩ .

٣- العزاوي ، اسماعيل ابراهيم العزاوي والزجاجب ، رضا اسماعيل (١٩٧٨). تربية الدواجن الطبعة الثالثة . المكتبة الوطنية ببغداد . الجمهورية العراقية ص ٧ – ٤٧ .

٤- المراني ، وليد خضرغافل(١٩٨٦). المدخل الى الوراثة . دار الكتب للطباعة والنشر. تأليف د.س. فالكونر (مترجم) . المكتبة الوطنية ببغداد . الجمهورية العراقية ص ٨٦- ٩٠ .

5- Newton, C. R. and Graham, A. (1997). PCR. 2nd edition. springer-Verlag. New York, USA.

6- Fairfull, RW., L. M. Millan and W. M. Miur.(1999) Poultry breeding; progress and prospects for genetic improvement of egg and meat production. J. Anim. Sci. 87: 663-680.

7- Jubrael, J. M . S. and Al-Asie, A. H. (2002). Polymerase Chain Reaction. Iraqi J. Biotech. 1(1): 13-33.

8- Khan SA , Hussain D, Askari E ,Stewart J M ,Malik KA and Zafar Y 2000. Molecular phylogeny of Gossypium species by DNA fingerprinting .Theor. Appl.Genet. 101:931-938.

9- Hans H. Cheng (1997) Mapping the chicken genome. Poult. Sci.76:1101-1107.

10- Feero WG, Guttmacher AE, Collins FS (2010). "Genomic medicine--an updated primer". *N. Engl. J. Med.* **362** (21): 2001–11.

11 Emara M. G. and H. Kim (2003) . Genetic Markers and there Application in Poultry Breeding. Poult. Sci. 82: 952-957.

١٢ - الخطيب ، تمارا عدنان (٢٠٠٠) استخدام مؤشرات التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال لسلسلة الدنا في التمييز لجنس واصناف ذكور نخيل التمر Phoenix dactylifera في العراق . رسالة ماجستير –كلية العلوم –جامعة بغداد .

13 Huang, M. C.; Horng1, Y. M.; Huang, H. L.; Sin1, Y. and Chene, M. J. (2003). RAPD Fingerprinting for species identification of animals.Asian-Aust. J. Anim. Sci. 16(10): 1406-1410.

14 Ivgin, R. and Bilbeg,G. (2002). Estimation of genetic distance in meat and layer pure lines using randomly amplified polymorphic DNA .Turk .J. Vet. Anim. Sci. 26 :1117-1120.

15 Sharma, D., K.B.C.A. Rao, and S.M. Totey, (2001) Genetic diversity among some important poultry species by using randomly amplified polymorphic DNA markers. Indian Journal of Animal Sciences 71: 784–788.

16 Williams , J.G.K. ; A.R.; Lirak , K.J. ; Rafalski, J . A. and Tingey , S.V (1990). DNA Polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers Nucleic Acid Res 18 : 6531- 6535

17 Sambrook, J.; Fritch, E. F. and maniatis, J. (1989). Molecular cloning, a Laboratory manual. 2nd ed. Cold spring Harbor Laboratory press, New York.

18 StellaA., F. Panzetta andG. Gandini(2007) Use of Linked Loci asindividual or Haplotype for Marker AssistedBreedAssignment.Animal Genetic.39: 8-14

19 Borovkova , I.G. ; Jin , y ; Steffenson , B. J. ; Kilian , A. ; Blake , T. K. and Kleinhofs , A. (1997) .

20- Caetano-Anolles, G.; Bassa, B. J. and Gresshof, P. M. (1991). DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. Biotech. 9: 553-557.