Relationship of transferrin gene genotype with the reproductive performance in Holstein cows

علاقة التراكيب الوراثية لجين الترانسفيرين في الاداء التناسلي لابقار الهولشتاين

جعفر رمضان احمد / قسم الثروة الحيوانية-كلية الزراعة/ جامعة بغداد
Email:*alzmani@yahoo.com*

الخلاصة:
أُجري البحث في حقل الابقار التابع لكلية الزراعة/ قسم الثروة الحيوانية في ابي غريب، فضلا عن مختبر الفسلجة/ كلية الزراعة / جامعة بغداد والاستعانة بمختبرات مختصة بتحاليل الوراثة الجزيئية للمدة من 2013/11/1 حتى 2014/11/1، بهدف دراسة العلاقة بين التراكيب الوراثية لجين الترانسفيرين (Tf) بعدد من الصفات التناسلية لـ40 بقرة هولشتاين وهلاكات مواليدها لغاية الفطام. كان تأثير التركيب الوراثي لجين الترانسفيرين في عدد التلقيحات اللازمة للاخصاب وفي المدة بين الولادة والتلقيح المثمر عالي المعنوية ($P<0.01$)، إذ حققت الابقار ذات التركيب الوراثي TT افضل اداء تناسلي. كما ان التباين في نسبة عدم العودة للصراف والفترة بين ولادتين كان معنويا ($P<0.05$). تبين ان نسبة هلاك المواليد عند الولادة انعدمت لدى الابقار ذات التركيب الوراثيTT في حين كانت اقصاها لدى مواليد الابقار ذات التركيب CC (10.00 ± 0.05 %) وان الفروق كانت معنوية ($P<0.05$)، بينما لم تتأثر نسبة هلاك المواليد بعد الولادة لغاية الفطام بأختلاف مظاهر جين الترانسفيرين. ويمكن أن نستنتج من دراسة المظاهر المتعددة لجين الترانسفيرين أمكانية اعتماده في تحسين الاداء التناسلي للابقار ويكون الانتخاب للابقار ذات التركيب TT لتعظيم العائد الاقتصادي من مشاريع تربيتها.
الكلمات المفتاحية: ابقار الهولشتاين- جين الترانسفيرين- الاداء التناسلي.

Abstract

This study was conducted in Dairy Cattle Farm, the Physiology laboratory, college, Abu-Ghraib and in a laboratory dealing with the analysis of molecular genetic from the period of 1/11/2013 to 1/11/2014. The objective of this study is to investigate the relationship of genotypes for transferrin gene (Tf) with the reproductive traits of 40 Holstein cows and their birth calves mortality until the weaning age.The effect of genotype of Tf gene was highly significant ($P<0.01$) with the services per conception and days open, being cows with TT genotype gave the better reproductive performance.The variation in non return rate and calving interval was significant ($P<0.05$) towords the genotype of TT .The results shows that the percentage of birth calves mortality in cows of TT genotype lacked significance,while it the highest ($P<0.05$) in the cows with CC genotype ($10.00 \pm 0.05\%$), The percentage of birth calves mortality until weaning was not affected with the genotype differences.In conclusion polymorphism of Tf gene can adopted for the improvement is the reproductive performance of Holestein cows.Moreover,the selection of TT cows can be done to maximize the economic gain of their breeding projects.
Key words: Holstein cows, Transferrin gene, Reproductive performance.

المقدمة

تعد الابقار ثروة وطنية لها مردود اقتصادي مهم، اذ توفر مواد غذائية مهمة هي الحليب ومن ثم منتجات الالبان ومادة اللحم من خلال تربية وتسمين العجول، فضلا عن مساهمة الابقار في توفير الجلود والعظام ومخلفاتها الاخرى، لذا يجب الاهتمام بزيادة اعداد الابقار وتحسين ادائها من خلال توفير البيئة المناسبة والاعلاف الجيدة والرعاية الصحية والتناسلية لرفع الكفاءة التناسلية لغرض الاستفادة من هذه الحيوانات ولعدة مواسم انتاجية. الترانسفيرين Transferrin(Tf) يعد البروتين الرئيس لتمثيل الحديد في الفقريات الراقية، وان نقل ايونات الحديديك يتم عن طريق السوائل الحيوية(1). وفي دراسة اخرى اعتبر ان الترانسفيرين هو بروتين سكري مسؤول عن نقل الحديد من مواضع امتصاص وتحلل الهيم الى المواضع الخازنة والمستفيدة عن طريق الارتباط بايونين من الحديديك Fe^{+3} ومترافقة بالارتباط مع ايون سالب يكون عادة الكاربونات(2). تعرف الخصوبة بانها قابلية القطيع على التكاثر، وان الكفاءة التناسلية او الاداء التناسلي في الابقار فلها مؤشرات يعبر عنها بالمدة من الولادة الى التلقيح المثمر او الايام المفتوحة (Days open-DO) او العمر عند الولادة الاولى (Age at first calving-AFC) أو عدد التلقيحات اللازمة للاخصاب (Services per conception-SPC) او طول الفترة بين الولادتين (Calving interval-CI) او نسبة عدم العودة الى الصراف (Non returne rate-NRR) (3 و 4 و 5). وتتاثر مؤشرات الكفاءة التناسلية المشار اليها انفا بالعديد من العوامل

اهمها السلالة وتسلسل الولادة وسنة وموسم الولادة فضلا عن الظروف البيئية المحيطة وفي مقدمتها التغذية والحرارة والرطوبة والرعاية الصحية والبيطرية، ومن المعروف ان الخصوبة يشترك فيها كل من الذكر والانثى، فالثور السافد له دور مهم في الاداء التناسلي(6). ان الواسمات الوراثية (Genetic markers) يمكن استخدامها لتحديد مناطق محددة على الكروموسومات والتي هي مواقع للجينات تؤثر في الصفات الكمية QTL (7)، هذه التقانات يمكن من خلالها التأكد المباشر من امكانية انتقال الجينات ذات العلاقة بالصفة المدروسة من الاباء الى الابناء . تعد تقانة التباين في اطوال قطع التقييد (Restriction fragment length polymorphism-RFLP) من اول التقانات التي استخدمت لتحليل الجينوم ورسم الخرائط الوراثية(8)، اذ بهذه الطريقة يتم هضم قطع مستهدفة من الـDNA بوساطة انزيمات التقييد (Restriction enzymes) التي تتعرف على تتابعات معينة من القواعد النتروجينية وتقطعها في مواقع محددة لتنتج حزم طولية محددة مختلفة الاحجام وحسب ترتيب القواعد الداخلة في تكوينها، لذا استفاد العديد من الباحثين من هذه التقانة في دراسة تعدد المظاهر (Polymorphisms) لعدد من الجينات المسؤولة عن الصفات الاقتصادية او الحالات المرضية لدى الكائنات الحية للتعرف على افضل التراكيب الوراثية لهذه الجينات. ويهدف البحث الحالي تسليط الضوء على تأثير التراكيب الوراثية لجين الترانسفيرين(Tf) في بعض مؤشرات الكفاءة التناسلية لعينة من ابقار الهولشتاين.

المواد وطرائق العمل

نفذ البحث في الحقل الحيواني التابع لقسم الثروة الحيوانية/ كلية الزراعة/ جامعة بغداد، للمدة من 2013/11/1 ولغاية 2014/11/1، بالاستعانة بالسجلات التناسلية للابقار على عينة مكونة من40 بقرة هولشتاين، وذلك لدراسة تأثير التراكيب الوراثية لجين الترانسفيرين (*Tf* gene) في الاداء التناسلي للابقار. ربيت الابقار في حظائر مفتوحة مخصصة لإيوائها والمتمثلة بحظائر الابقار الحلوب والابقار الجافة والابقار الحوامل وحظائر العجول والعجلات وقاعات مغلقة خاصة بالولادة مفروشة بالتبن تبقى فيها الامهات مع مواليدها لمدة ثلاثة ايام بعد الولادة لغرض الرضاعة واخرى مغلقة لتربية المواليد وتتوفر فيها التهوية والاضاءة ولها مسرح وبقيت فيها الى عمر الفطام، إذ يتم فصل الذكور عن الاناث، وتم إدارة القطيع وفق برنامج يتضمن التغذية والتحضير لموسم السفاد والإعداد لمرحلتي الحمل والولادة فضلا عن الرعاية الصحية والبيطرية.

تتباين كمية العلف ونوعيته باختلاف الموسم وتبعا لتوافرها، وتم زراعة الاراضي المتوفرة بالجت او البرسيم والذرة الصفراء، إذ يقدم العلف الاخضر من الجت او البرسيم او سيقان الذرة الصفراء أو العلف الخشن المتمثل بمادة التبن على شكل بالات اشتريت من الاسواق المحلية على وجبتين صباحية ومسائية، كما قدم العلف المركز بمقدار 2 كغم/وجبة/ حيوان حسب توفرها وتزداد هذه الكمية قبل الموسم التناسلي وفي اثنائه لتصل الى 3 كغم لكل حيوان في الوجبة الواحدة بالنسبة للابقار الوالدة والحلوبة اثناء الحلب ولايوجد رعي لهذه الحيوانات، إذ ان القطيع ربي في الحظائر. أما بالنسبة لتغذية المواليد فإنها تركت مع أمهاتها للرضاعة لمدة ثلاثة ايام ثم عزلت لوحدها في الحظائر المغلقة انفة الذكر، إذ قدم لها حليب الرضاعة والماء النظيف وفي الاسبوع الثاني قدم لها العلف الاخضر بكميات قليلة لغرض استساغته من قبل الحيوانات وبعدها بدأت الحيوانات بتناول كميات قليلة من العلف الاخضر مع تخصيص كميات قليلة من العلف المركز بحدود 200غم/ يوم/ حيوان.

خلال مدة الدراسة تم تغير نظام تسفيد القطيع، إذ ان الابقار وزعت في حظائر كبيرة باعداد من 15-18 بقرة واطلقت مع كل حظيرة ثور لغرض تسفيد الاناث في (وقت الصراف), وفي هذه الحالة لايمكن معرفة الاناث المسفدة او الحاملة او الفارغة، إذ حضر الى الحقل الحيواني طبيب بيطري متخصص في التوليد من كلية الطب البيطري بين وقت واخر لغرض فحص الابقار عن طريق الجس عبر المستقيم (Rectal palpation) وثبتت المعلومات عن كل بقرة. هذا وتم عزل الابقار المتاخرة في الحمل 7-8 شهر الى حظائر صغيرة لحين موعد الولادة للمحافظة عليها من ازدحام الابقار على العلف لتجنب حالة الاجهاض. تم سحب عينات الدم من الابقار لغرض اجراء التحاليل عن طريق سحب دم بمقدار 10–15 مل من الوريد الوداجي(Jugular vein) من كل بقرة بوساطة سرنجات معقمة حجم 20 مل.

التحليل الجزيئي لجين الترانسفيرين Tf

لغرض اجراء التحليل الجزيئي للجين المدروس Transferrin(Tf)على عينات الدم المسحوبة من الابقار تحت الدراسة والتي حفظت بالتجميد, لحين اجرء التحاليل المختبرية لمعرفة التراكيب الوراثية لجين الترانسفيرين، إذ تمت التحاليل بثلاث مراحل هي:

1- المرحلة الاولى: استخلاص الحامض النووي الدنا DNA Extraction.

2- المرحلة الثانية: استخلاص القطعة المطلوبة Target من جين الترانسفيرين وتضخيمها (منتج الدنا DNA Product).

3- المرحلة الثالثة: تقطيع القطعة المطلوبة بانزيم التقييد لتحديد التراكيب الوراثية.

المرحلة الاولى: مرحلة استخلاص الـ DNA من عينات الدم: اذ اجريت على وفق الخطوات الاتية والمرفقة مع العدة (Kit) الخاص بشركة بروميكا PROMEGA الامريكية:

أ- اخراج عينات الدم المجمدة والانتظار لمدة قصيرة لحين اذابتها ثم تدفئة الانابيب براحتي اليدين لتحويله الى دم سائل ويفضل استخدام الرجاج(Vortex) لغرض مزج مكونات الدم لمدة 10 دقائق.

ب- سحب 20 مايكروليتر من محلول Proteinase K Solution (PK) ووضعه في كل انبوبة (ابندروف) ذات حجم 1.5 مل والتي تسمى Microcentrifuge tube حسب عدد العينات المدروسة.

ت- اضافة 200 مايكروليتر من الدم الممزوج الى الانابيب الحاوية على محلولProteinase K Solution ومزجه لمدة قصيرة.

ث- اضافة 200 مايكروليتر من محلول Cell Lysis Buffer (CLD) الى الانابيب المذكورة وغلق الفوهة ومزج الخليط بوساطة الرجاج لمدة 10 ثواني لكل عينة.

ج- حضن الانابيب في حمام مائي على درجة حرارة 56 درجة مئوية لمدة عشر دقائق باستخدام ساعة وقتية Timer.
ح- اخراج الانابيب من الحمام المائي واضافة 250 مايكروليتر من محلولBinding Buffer مع استخدام الرجاج لمدة 10 ثواني يلاحظ ان لون المزيج اصبح مخضرا.
خ- تم نقل المزيج الى انابيب صغيرة تسمى Reliaprep Binding Columns والتي توضع بدورها داخل انابيب اكبر تسمى انابيب الجمع (Collection Tubes) بعدها وضعت في جهاز الطرد المركزي Microcentrifuge على اقصى سرعة وقدرها 3500 دورة في الدقيقة لمدة 1.5 دقيقة.
د- تم اهمال المحلول في انابيب الجمع ووضعت انابيب Reliaprep Binding Columns في انابيب جمع جديدة لغرض عملية الغسل.
ذ- اضافة 500 مايكروليتر من Column Wash Solution (CWD) الى انابيب Reliaprep Binding column وغلق الفوهة ثم وضعت في جهاز الطرد المركزي على اقصى سرعة لمدة ثلاث دقائق وكررت هذه العملية مرتين لغرض الحصول على نقاوة عالية من DNA.
ر- تم التخلص من انابيب الجمع الحاوية على Column Wash Solution ووضعت انابيب Reliaprep Binding Columns الحاوية على الـ DNA في انابيب جمع جديدة لغرض جمع الدناDNA المذاب.
ز- اضافة 100 مايكروليتر من الماء الذري (Nuclease Free Water) الى انابيب Binding Columns وتترك لمدة 5 دقائق لاذابة DNA في العمود ومن ثم وضعت في جهاز الطرد المركزي باقصى سرعة لمدة دقيقة ونصف ثم حفظ الدنا المستخلص بالتجميد بـدرجة -20 م في المجمدة .

التوصيف الجزيئي لجين الترانسفيرين Tf

أ- اختيار البوادئ

يوجد عدد من البوادئ (Primers) المستخدمة لتضخيم القطع المستهدفة (Targets) مختلفة الاحجام من جين الترانسفيرين (9), كل زوج من هذه البوادئ يرتبط مع حجم القطعة المطلوبة بوساطة طريقة كوثرة التفاعل خارج الانظمة الحية عن طريق جهاز PCR الاعتيادي وجهاز Real Time PCR حسب حجم القطع ونوع البوادي المستخدمة ، ولكن في تجربتنا تم اختيار البوادئ (Forword و Reverse) التي ترتبط مع شريطي القطعة التي حجمها 882bp زوجا قاعديا لان حجمها مناسب ويمكن رؤيتها بوضوح عند استخدام السلم (Ladder), لذلك استعملت هذه البوادئ في التجربة حسب التسلسل الموضح في الجدول(1)، فضلا عن استخدام جهاز PCR الاعتيادي الموجود في المختبر لغرض تضخيم القطعة المطلوبة (882bp) وذلك لاكمال أجراء الكشف الجزيئي ومعرفة التعدد المظهري (Polymorphisms) لجين الترانسفيرين(9).

جدول1 : تسلسل البرايمرات المستخدمة والتي جهزت من شركة Alpha DNA الكندية

اسم الجين ومختصره	التسلسل	
Tf gene	Exon 8	F : 5'-GGTCTGACTGCCCTCTCTC -3'
		R : 3'- GTTCAAACACACCTCTAATG-5'

ب - تخفيف البوادئ Primers Dilution

تم تجهيز البوادئ (Primers) من شركة Alpha DNA الكندية وكانت على شكل مسحوق، ولغرض اذابته تم استخدام الماء الذري (Nucleic free water) ليصبح تركيز المحلول 100 بيكومول/مايكروليتر وهذا المحلول يسمى المحلول الرئيس او المحلول الخزين (Stock solution) الذي يؤخذ منه 10 مايكروليتر لتخفيفه بإضافة الماء الذري اليه بمقدار90 مايكروليتر ليصبح تركيز المحلول 10 بيكومول/مايكروليتر وهذا المحلول الجديد يسمى محلول العمل (Working solution) الذي يؤخذ منه واحد مايكروليتر من كلا البادئين (F , R) لغرض اجراء عملية كوثرة التفاعل (PCR) مع مجموعة من المواد الموجودة في محلول Master Mix وتشمل هذه المواد القواعد النتروجينية الاربعة وايونات البوتاسيوم وانزيم Taq Polymerase Enzyme ومواد اخرى.

المرحلة الثانية: كوثرة التفاعل خارج الانظمة الحية PCR لجين الترانسفيرين Tf

لغرض اجراء الكشف الجزيئي لجين الترانسفيرين تم استخدام عملية كوثرة التفاعل خارج الانظمة الحية (PCR) لعينات الدنا المستخلصة بوساطة جهازPCR، اذ استخدمت الكميات المذكورة ادناه لاجراء عملية استخلاص وتضخيم القطعة المطلوبة Target من جين الترانسفيرين والتي حجمها 882bp وكما موضحة في الجدول(2):

جدول (2): المواد المستخدمة في تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل

Reagent	Volume (µl)
Profi taq PCR premix kit	12.5
P_F	1
P_R	1
H_2o	8.5
Template DNA	2
Final Volume	25

بعد ذلك تم مزج المواد أعلاه بوساطة جهاز الرجاج (Vortex) ثم نُقلت الأنابيب إلى جهاز تفاعل البلمرة PCR وتم ضبط ظروف التفاعل الخاصة بتضخيم القطعة المطلوبة على وفق برنامج خاص بالجين.

البرامج المستخدمة في الدراسة الجزيئية للجين

الجدول 3- البرامج المستخدمة في الكشف الجزيئي باستخدام تقنية بلمرة التفاعل السلسلي بوساطة جهاز PCR (برنامج تضاعف جين Tf).

No.	Stages	Temperature	Time	No.of cycles
1-	Initial Denaturation	94 C°	5 min.	1
2-	Denaturation	94 C°	0.5-1 min.	30-35
3-	Annealing	55 C°	0.5-1 min.	
4-	Extension	72 C°	0.5-1 min.	
5-	Final Extension	72 C°	5 min	1
6-	Final incubation	4 C°	-	-

المصدر: (9) .

تحميل ناتج كوثرة التفاعل خارج الانظمة الحية والترحيل الكهربائي

لغرض التاكد من حصول تضخيم (كوثرة التفاعل خارج الانظمة الحية) للقطعة المطلوبة اي وجود منتج الدنا (Product DNA) تم تحميل 3 مايكروليتر من DNA Ladder بوساطة الة ماصة (Micropipette) ووضعها في الحفرة الاولى من الهلام المعمول بتركيز 2.5 % مع تحميل 10 مايكروليتر من نواتج PCR للعينات المدروسة في الهلام الأكاروز في الحفر التي تلي الحفرة الاولى والمغمور بمحلول(1X TBE Buffer، إذ تم الترحيل بفرق جهد مقداره 70 فولت وتيار40 ملي امبير ولمدة

ساعة ونصف بعدها تم مشاهدة الحزم بوساطة جهازUV trans illuminator، وتم تصويرها باستخدام جهاز التوثيق الفوتوغرافي (Photo documentation system).

المرحلة الثالثة: معرفة التعدد المظهري لجين TF باستعمال تقنية (PCR-RFLP)عن طريق انزيم القطع *Dra1* (Ristraction Enzyme)

بعد انتهاء كوثرة التفاعل تم التعرف على التراكيب الوراثية لجين الترانسفيرين في عينات الدم المسحوبة من الأبقار بعد الحصول على منتج الدنا(DNA Product)، تم اجراء عملية التقطيع للقطعة المكثرة المطلوبة 882bp بالانزيم المحدد (*Dra 1*) الذي تم استخلاصه من البكتريا Deinococcus radiophilus إذ يقوم بالتعرف على موضع معين ضمن تتابع معين من القواعد النتروجينية من قطعة DNA المتضاعفة(الهدف) فيقطعها الى قطعتين حجم احدهما 216bp وحجم الاخرى666bp. تم الحصول على هذا الانزيم القاطع من شركة PROMEGA الامريكية بتركيز 20000 وحده لكل مول، وتم اجراء عملية التقطيع على وفق الخطوات الاتية:

1- بعد تدفئة الانزيم القاطع تم سحب 5 مايكروليتر منه بوساطة اله ماصة (Micropipette) واضيفت الى 20 مايكروليتر من منتج الدنا DNA product في انابيب خاصة ثم تحريك المحلول بالرجاج Vortex قليلا.
2- تم حضن المزيج بدرجة حرارة 37 درجة مئوية وهي الدرجة الملائمة لعمل الانزيم لمدة 3 ساعات بجهاز الـ PCR.
3- تم تحميل 3µl من الـ DNA ladder في الحفرة الاولى من هلام الاكاروز تركيز2.5% و 10 مايكروليتر من نواتج PCR-RFLP في الحفر الاخرى التي تلي الحفرة الاولى حسب حجم المشط المستعمل ثم يغطى الهلام بمحلول المنظم بتركيز (1X TBE Buffer)، بعدها تم تركيب غطاء جهاز الترحيل الكهربائي وتشغيله لمدة ساعة ونصف بفرق جهد 70 فولت وبتيار 40 ملي أمبير.
4- بعدها تم حمل مادة الهلام ووضعها في جهاز الانارة فوق البنفسجية UV trans illuminator .

استخدام الة تصوير (Photo Documentation System) تركب في اعلى جهاز الإنارة الوارد ذكره اعلاه لغرض تصوير الحزم المتكونة بحصول او عدم حصول التقطيع لمعرفة التراكيب الوراثية لجين Tf للعينات المدروسة .

التحليل الاحصائي

تم تحليل البيانات احصائيا باستعمال البرنامج SAS–Statistical Analysis System (10) لدراسة تأثير تعدد المظاهر الوراثية لجين الترانسفيرين (Tf) في الصفات التناسلية، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختبار Duncan(11) متعدد المديات وذلك بتطبيق طريقة متوسط المربعات الصغرى (Least square means).

الانموذج الرياضي.

$$Y_{ijkl} = \mu + G_i + P_j + S_k + e_{ijkl}$$

إذ ان:

Yijkl: قيمة المشاهدة l العائدة للتركيب الوراثي i وتسلسل الدورة الانتاجية j وموسم الولادة k.

µ: المتوسط العام للصفة.

Gi: تأثير تعدد المظاهر الوراثية للجين (TT و TC و CC).

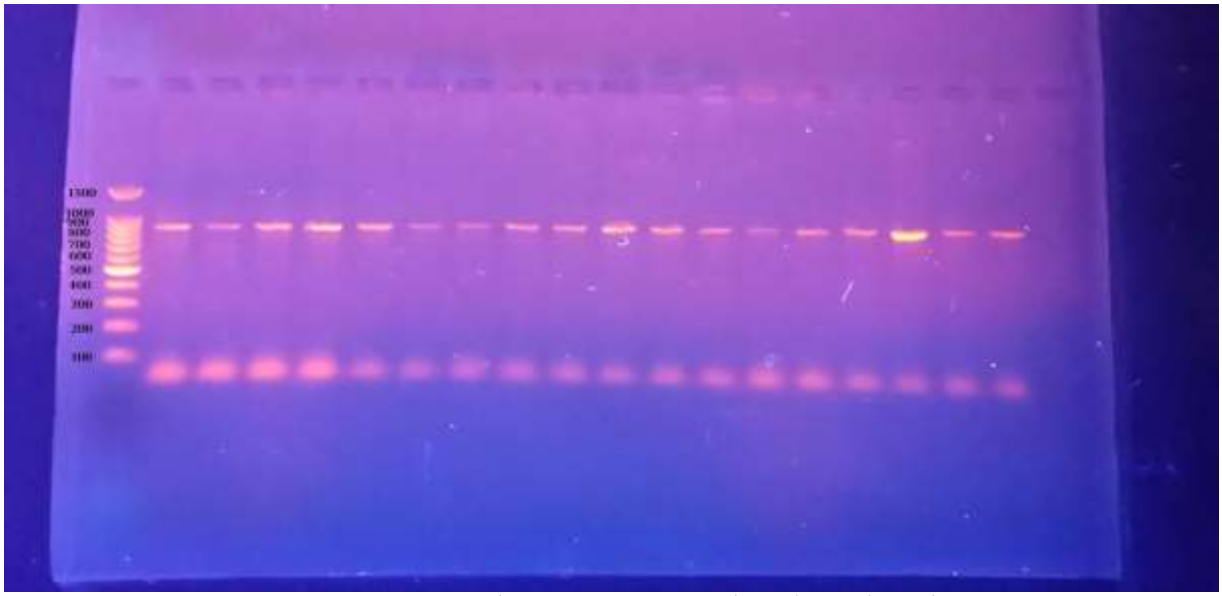
Pj: تأثير تسلسل الدورة الانتاجية (من الثانية الى الرابعة).

Sk: تأثير موسم الولادة (الشتاء –الربيع-الصيف -الخريف).

eijkl: الخطأ العشوائي الذي يتوزع طبيعيا بمتوسط يساوي صفر وتباين قدره $\sigma^2 e$.

النتائج والمناقشة

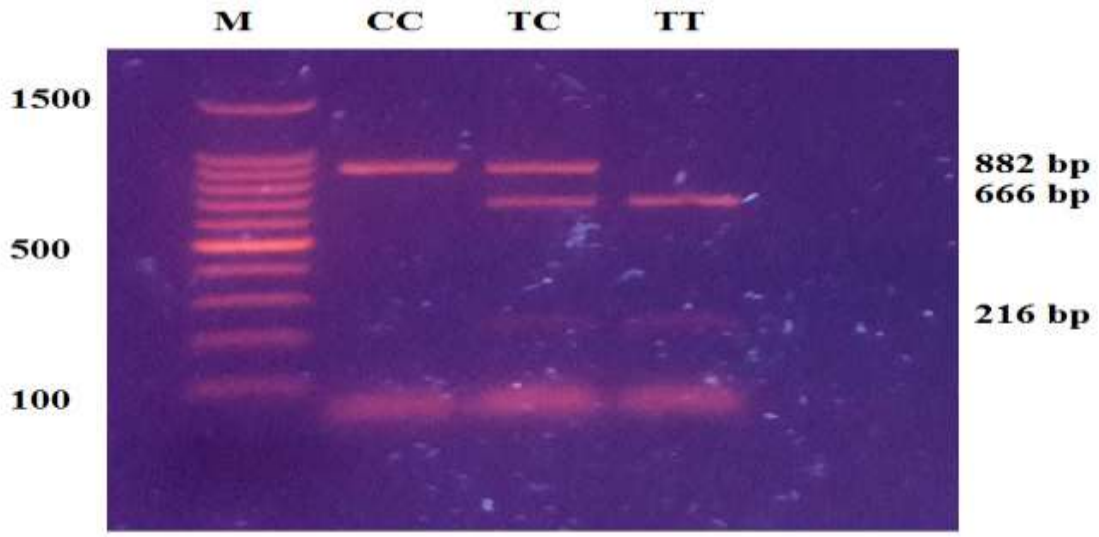
1- تم استخلاص القطعة المطلوبة 882bp من جين الترانسفيرين وتكثيرها(تضخيمها) بتقانة كوثرة التفاعل خارج الانظمة الحية (PCR) للحصول على منتج الدنا (DNA Product) باستخدام عدة الـPCR والبادئات (Primers) وعينات الـDNA المستخلصة وضبط جهاز الدورات الحرارية حسب ما مذكور في فصل مواد وطرائق العمل، ثم بعد ذلك تم ترحيل عينة مقدارها 10 مايكروليتر من كل أنموذج في حفر هلام الاكاروز بتركيز 2.5% واستعمال قطع DNA معلومة الحجوم Ladder (100-1500 bp) في الحفرة الاولى من الجل بعد غمر الجل بالمحلول المنظم 1X TBE وضبط الفولتية والتيار والزمن وتصوير ناتج الترحيل للتأكد من نجاح عملية التضخيم والحصول على القطعة المطلوبة بحجم 882bp والتي ظهرت كما في الشكل (1) .



شكل 1 القطعة المستخلصة 882bp من جين الترانسفيرين بتقانة PCR

2- استخدام تقانة RFLP بانزيم التقييد *Dra1* لتحديد التراكيب الوراثية

حددت التراكيب الوراثية لحيوانات التجربة لجين الترانسفيرين بتطبيق تقانة *RFLP* وانزيم التقييد *Dra1* وحسب الطريقة المذكورة في مواد وطرائق العمل وترحيل 10 مايكروليتر في هلام الاكاروز تركيز 2.5 % وضبط الفولتية على 70 فولت وبتيار 40 ملي أمبير لمدة ساعة ونصف وتصوير ناتج الترحيل للتعرف على توزيع التراكيب الوراثية للحيوانات المدروسة حسب عدد وحجم الحزم المتكونة، إذ تم استخدام قطع DNA معلومة الحجوم (DNA Ladder 100-1500bp) في الحفرة الاولى من الهلام، وكما تظهر الحزم كما في الشكل (2) .



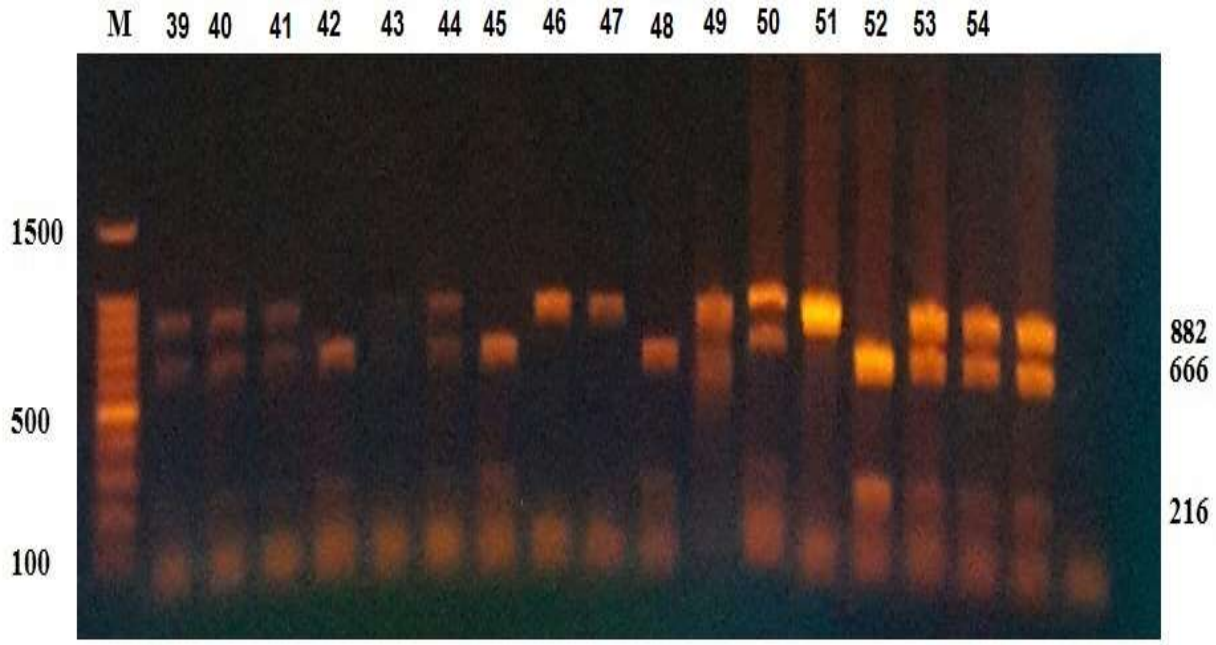
الشكل 2 : تحديد التراكيب الوراثية الثلاثة لجين Tf حسب عدد وحجم الحزم المتكونة

تمت عملية التقطيع بالانزيم القاطع *Dra1* بعد التعرف على الموضع الحساس ضمن التتابع المعين من موقع القطع من قطعة الجين، لذا تشكلت من عملية التقطيع اما حزمة واحدة او حزمتين او ثلاث حزم من كل أنموذج يمكن مقارنتها مع حزم Ladder الدليل او السلم، ذلك لان الانزيم القاطع يقوم بعمله (التقطيع) في موقع تتابع الزوج القاعدي 216bp من القطعة المطلوبة من الجين عند وجود الموضع المعين كما اوضحنا آنفاً، فقد تم التعرف على التراكيب الوراثية (Genotype) لجين الترانسفيرين في العينات المدروسة بهذه الطريقة وكما يلي:

1- إذا حصل التقطيع بالانزيم القاطع في المكان السابق تتابع الزوج القاعدي 216bp في كلا الشريطين من القطعة فسوف تتكون قطعتين من كل شريط تظهر كحزمتين، حجم الحزمة الاولى 216bp والاخرى 666bp وذلك لحصول تداخل كل حزمتين من الحجم نفسه من كلا الشريطين بحزمة واحدة، فان التركيب الوراثي لهذا الأنموذج يكون متماثلا (Homozygous) وهو يمثل التركيب الوراثي البري Wild (TT).

2- إذا حصل التقطيع في احد الشريطين دون الشريط الاخر فسوف تتكون ثلاث قطع اي ثلاث حزم، حزمة بحجم 882bp من احد الشريطين وحزمتين الاولى بحجم 666bp والاخرى بحجم 216bp من الشريط الاخر يعني ان التركيب الوراثي لهذا الأنموذج هو التركيب الهجين (TC-Heterozygous) اي حصول طفرة في احد الشريطين اي تغير القاعدة T الى القاعدة C في شريط دون الشريط الاخر.

3- إذا لم يحصل التقطيع في كلا الشريطين فسوف تتكون حزمة واحدة بحجم 882bp وذلك لتداخل الحزمتين معا بحزمة واحدة فهذا يعني ان التركيب الوراثي لهذا الانموذج هو التركيب الوراثي النقي (CC) أي حدوث طفرة في كلا الشريطين (تغير القاعدة T الى C)، كما في الشكل(4-3) الذي يوضح الحزم المتكونة في 17 أنموذجا من عينات الابقار المدروسة لتحديد تركيبها الوراثي.



الشكل 3 : الحزم المتكونة بعد عملية تقطيع انزيم التقييد *Dra1* لتحديد التراكيب الوراثية لجين الترانسفيرين.

التركيب الوراثي TT يظهر في الاعمدة 42 و45 و48 و 52.
التركيب الوراثي TC يظهر في الاعمدة 39 و40 و41 و43 و44 و49 و50 و53 و54 .
التركيب الوراثي CC يظهر في العمود 46 و47 و51 .
تبين وجود الطفرة نفسها المسجلة عالميا في منطقة Exon 8 وهي تغير القاعدة T الى C في الموقع 216bp من طول القطعة المطلوبة 882bp من جين الترانسفيرين (9).

3- عدد التلقيحات اللازمة للاخصاب والمدة من الولادة الى التلقيح المثمر

يتضح من الجدول (4) علاقة تعدد المظاهر لجين الترانسفيرين في الابقار مع عدد التلقيحات اللازمة للاخصاب والمدة من الولادة الى التلقيح المثمر، وقد كان هنالك تأثير عالي المعنوية لمظاهر جين الترانسفيرين في كلا الصفتين، وجاءت افضل النتائج في عدد التلقيحات اللازمة للاخصاب والمدة من الولادة الى التلقيح المثمر في حالة الابقار ذات التركيب الوراثي البري (Wild) TT وبواقع 1.97 ± 0.25 و 87.13 ± 5.26 على التوالي، في حين كانت الصفتين غير مرغوبة لدى الابقار ذات التركيب الهجين (TC) إذ بلغت معدلات الصفتين وبنفس الترتيب 3.07 ± 0.31 و 142.91 ± 9.57. من المعروف عموما ان هناك علاقة عكسية بين انتاج الحليب والصفات التناسلية(5) واوضحت بدراستها بوجود ارتباط وراثي سالب بين خصوبة الابقار وانتاج الحليب، توجد علاقات وراثية بين صفات انتاج الحليب والاداء التناسلي للابقار(12)، وجاءت النتائج لتؤكد ذلك، إذ حققت الابقار ذات التركيب الوراثي TT والتي كانت اقل الابقار انتاجا للحليب واقصرها في طول موسم الحليب المدروس أفضل اداء تناسلي في هاتين الصفتين مقارنة بالابقار ذات التراكيب الوراثية الاخرى TC ، CC والتي كان لها انتاج حليب اعلى وموسم حليب أطول(13).

الجدول 4. تاثير تعدد المظاهر لجين الترانسفيرين في عدد التلقيحات اللازمة للاخصاب والمدة من الولادة الى التلقيح المثمر

التركيب الوراثي لجين الترانسفيرين	العدد	متوسط المربعات الصغرى ± الخطأ القياسي	
		عدد التلقيحات اللازمة للاخصاب	المدة من الولادة الى التلقيح المثمر
TT	13	a 0.25 ± 1.97	a 5.26 ± 87.13
TC	21	b 0.31 ± 3.07	b 9.57 ± 142.91
CC	6	b 0.19 ± 2.66	b 8.33 ± 128.63
مستوى المعنوية	---	**	**
** (P<0.01).			

4- نسبة عدم العودة للصراف والفترة بين ولادتين

اظهرت نتائج الدراسة الحالية، ان نسبة عدم العودة للصراف تتباين معنويا (P<0.05) بأختلاف التركيب الوراثي لجين الترانسفيرين، وبلغت معدلاتها 92.45 ± 4.13 و 81.19 ± 6.07 و 79.55 ± 4.75 % للتراكيب TT و TC و CC بالتتابع (الجدول 5).

يتبين من الجدول (5) أن تعدد المظاهر لجين الترانسفيرين قد اثر تأثيرا معنويا (P<0.05) في الفترة بين ولادتين، وقد بلغت اقل مدة لهذه الصفة التناسلية في الابقار ذات التركيب الوراثي TT (369.59 ± 12.97 يوم) وهي تعد الافضل اذا ما قورنت بالتركيبين الوراثيين TC و CC والتي بلغت فيها 418.63 ± 19.75 و 408.35 ± 16.83 يوم على التوالي، وهذه النتائج جاءت مطابقة لما توصلت اليه (5) من ان هناك ارتباط موجب وعالي المعنوية وبلغ معامله 0.567 بين انتاج الحليب والمدة بين الولادتين في قطيع ابقار الهولشتاين السلوفاكية اي ان المدة بين الولادتين تزداد مع زيادة انتاج الحليب لدى الابقار المدروسة.

الجدول 5. تاثير تعدد المظاهر لجين الترانسفيرين في نسب عدم العودة للصراف والفترة بين ولادتين

التركيب الوراثي لجين الترانسفيرين	العدد	متوسط المربعات الصغرى ± الخطأ القياسي	
		نسب عدم العودة للصراف (%)	الفترة بين ولادتين(يوم)
TT	13	a 4.13 ± 92.45	a 12.97 ± 369.59
TC	21	b 6.07 ± 81.19	b 19.75 ± 418.63
CC	6	b 4.75 ± 79.55	b 16.83 ± 408.35
مستوى المعنوية	---	*	*
* (P<0.05).			

5- نسبة هلاك المولود عند الولادة ونسبة الهلاك لغاية الفطام

يجب الاشارة في بحثنا الحالي ان احتساب هلاك المواليد عند الولادة حقيقة قد تم حتى اليوم الثاني بعد الولادة. ان التباين المعنوي في نسبة هلاك المواليد عند الولادة في الابقار قد يعزى الى التباين في حجم المواليد وحيويتها ومناعتها فضلا عن تأثير السلالة والعوامل البيئية المختلفة(13)، اما العوامل المؤثرة على نسبة هلاك المواليد عند الولادة (Still birth) في قطيع ابقار الهولشتاين في اصفهان فهي سنة الولادة ، تسلسل الولادة فضلا عن عسر الولادة(14)، وفي دراسة لبعض العوامل الوراثية والبيئية المؤثرة في معدل هلاك العجول من الولادة وحتى الفطام، وجد ان 37.16% من نسبة الهلاكات تعود الى الاصابة بالالتهابات الرئوية والامراض التنفسية، وان 32.02% من نسبة الهلاكات كانت بسبب حالات الاسهال والتهاب الامعاء،اما النسبة الباقية 30.82% فهي لاسباب اخرى منها التخمة والنفاخ(15) . يتضح من نتائج الدراسة الحالية (الجدول 6) ان نسبة هلاك المواليد عند الولادة انعدمت لدى الابقار ذات التركيب الوراثي TT في حين بلغت نسبة الهلاك 3.85 ± 0.02 % لدى مثيلاتها ذات التركيب الوراثي الهجين TC واعلى من ذلك لدى الابقار ذات التركيب CC (10.00 ± 0.05 %) وان الفروق كانت معنوية (P<0.05). بينما لم تتأثر نسبة الهلاك للمواليد من الولادة لغاية الفطام معنويا باختلاف التركيب الوراثي لجين الترانسفيرين وبلغت معدلاتها 7.69 ± 0.03 و 7.69 ± 0.03 و 10.00 ± 0.05 % للتراكيب TT و TC و CC لدى امهاتها بالتتابع. نستنتج من هذه البيانات ان الحيوانات ذات التركيب الوراثي البري لجين الترانسفيرين TT قد تكيفت لمدة طويلة لتحمل الظروف البيئية الصعبة مما جعلها تتميز بالكثير من المؤشرات الجيدة للكفاءة التناسلية.

الجدول 6. تاثير تعدد المظاهر لجين الترانسفيرين في نسبة هلاك المولود عند الولادة ونسبة الهلاك لغاية الفطام

التركيب الوراثي لجين الترانسفيرين	العدد	متوسط المربعات الصغرى ± الخطأ القياسي	
		نسبة هلاك المولود عند الولادة	ونسبة الهلاك لغاية الفطام
TT	13	a 0.00 ± 0.00	a 0.03 ± 7.69
TC	21	a 0.02 ± 3.85	a 0.03 ± 7.69
CC	6	b 0.05 ± 10.00	a 0.05 ± 10.00
مستوى المعنوية	---	*	NS
* (P<0.05)، NS: غير معنوي.			

المصادر

1-Lambert, L.A., Perri, H., Halbrooks, P.J. and Mason, A.B . 2005. Evolution of the transferrin family: conservation of residues associated with iron and anion binding. Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 142: 129-141.

2-Lukač, D., Vitomir , V. and Nemeš, Z. 2013. Association of transferrin genotypes and production traits of Holstein-Friesian cows in Vojvodina**.** Production traits of Holstein-Friesian cows, *Mljekarstvo 64* (2), 79-85.

3-Bayram, B., Yanar, M., Akbulut, O., 2009. The effect of average daily gain and age at first calving on reproductive and milk production traits of Brown Swiss and Holstein Friesina cattle, Bulgarian journal of agricultural science, 15, 5 453-462 12. Gara, A. B., Bouraoui, R., Rekik,

4-Ulutaş, Z., Sezer, M. 2009. Genetic study of milk production and reproduction traits of local born Simmental cattle in Turkey, Ziraat Fakültesi Dergisi, 2009, 26, 1, 53-59.

5-Zuzana,Riecka.,Juraj,Candrák.2011. Analysis of Relationship between Production and Reproduction Traits of Holstein Cattle Population in the Slovak Republic *Slovak Agricultural University in Nitra, 949 76, Tr. A. Hlinku 2, Slovak Republic.*

6-الدوري, ظافر شاكر عبد الله .2002. تأثير الإجهاد الحراري ولون الفروة الأسود والأحمر على بعض مظاهر أداء أبقار الهولشتاين فريزيان في العراق. أطروحة دكتوراه/ كلية الزراعة- جامعة بغداد.

7-Ge, W., Davis, M.E., Hines, H.C., Irvin, K.M. and Simmen, R.C .2001. Association of a genetic marker with blood serum insulin-like growth factor-I concentration and growth traits in Angus cattle. J. Anim Sci., 79: 1757-1762.

8-Botstien, D. R., White , M., Skolnick, M. and Davis , R. 1980. Construction if a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism . Am. J. Gent. (32) : 314-331.

9- Ju, Z.H., Li, Q.L., Huang, G.M., Hou, M.H., Li, R.L., Li, J.B., Zhong J.F and Wang, C.F .2011. Three novel SNPs of the bovine Tf gene in Chinese native cattle and their associations with milk production traits.online journal Genitics and Molecular Research 10(1):340-352.

10-SAS. 2012. Statistical Analysis System, User's Guide. Statistical. Version 9.1th ed. SAS. Inst. Inc. Cary. N.C. USA.

11-Duncan, D.B. 1955. Multiple Range and Multiple F-test. Biometrics. 11: 4-42.

12-Sajjad, Toghiani. 2012. Genetic relationships between production traits and reproductive performance in Holstein dairy cows Young Researchers Club, Islamic Azad University, Khorasgan Branch, Isfahan, Iran.

13- الجيلاوي، جعفر رمضان والانباري، نصر نوري .2016. دراسة التشكل الوراثي لبروتين ناقل الحديد (الترانسفيرين) في اداء ابقار الهولشتاين لاغراض الانتخاب. مجلة كربلاء للعلوم الزراعية . المجلد الثالث، العدد الاول(قيد النشر).

14-Rqed, K.H. 1987. Transfenin variation and body size in reindeer. *angifer tarandus* L. - *Heredita.s 106:*67-71. Lund, Sweden.

15-Atashi,H.2011. Factors affecting stillbirth and effects of stillbirth on subsequent lactation performance in a Holstein dairy herd in Isfahan Department of Animal Sciences,College of Agriculture,Iranian Journal of Veterinary Research,Shiraz University,Vol.12,No.1, Ser. No. 34.

16- حسن عبد اللطيف، فلاح وناصر طاهر، كريم و محمد جبر، حيدر.2006. بعض العوامل الوراثية والبيئية المؤثرة في معدل هلاك العجول. مجلة القادسية لعلوم الطب البيطري. المجلد 5 .العدد1.