مجلة اتحاد الجامعات العربية
للعلـــــوم الزراعيـــــة
جامعة عين شمس ، القاهـــرة
مجلد(٢٠)، عدد (١)، ٧٥-٨٥، ٢٠١٢

دراسة التنوع الوراثي لدى الماعز الجبلي السوري بإستخدام تقنية (SNPs)

[٦]

أيهم العلي[١]- بسام عيسى[١] - سلام لاوند[٢]
١- قسم الإنتاج الحيواني (مجترات) - كلية الزراعة - جامعة دمشق - سوريا
٢- التقانـــة الحيويـــة - كليـــة الزراعـــة - جـــامعة دمشق - سوريـــا

الكلمات الدالة: الماعز الجبلـــي الـــسوري، التنـــوع الوراثي، النيوكليوتيد المفرد ذو الأشـــكال المتعـــددة (SNPs).

الموجـــز

يعد الماعز الجبلي في سوريا من الحيوانات الزراعية المحلية المهمة، لما يملكه من مزايا ومواصفات تمكنه من الإنتاج والتناسل تحت الظروف البيئية القاسية, هذا وقد استخدم في برامج التربية بالتهجين مع الماعز الشامي كمانح لمورثات صفات التأقلم ومقاومة الأمراض.

رغم ذلك مازال هذا الحيوان بعيداً عن ساحة البحث العلمي, فضلاً عن تعرضه من مربي الماعز لعملية خلط عشوائي مع الماعز الشامي, مما أدى وعلى المدى الطويل إلى ضياع مصدر وراثي حيواني محلي مهم لم تكتشف كل مزاياه.

تم في هذا البحث استخدام تقانة (SNPs) لدراسة التنوع الوراثي عند مجموعات من الماعز الجبلي النقي الموجودة في محطة بحوث عرى في محافظة السويداء وأشارت النتائج إلى نجاح هذه التقانة في تحديد أوجه التشابه و الاختلاف الوراثي بين عينات الماعز المدروسة، فضلاً عن كشف مواقع بعض المورثات الهامة، الأمر الذي يساعد في بدء وضع خريطة وراثية لهذا الحيوان الزراعي.

(سلم البحث فى ١١ يوليو ٢٠١١)
(ووفق على البحث فى ٢٨ أغسطس ٢٠١١)

المقدمة

ينتشر هذا الماعز في مناطق الجليل وسوريا والأردن ولبنان ويعرف بأسماء مختلفة في كل بلد. ومن المعروف أن الماعز الذي ينتشر بين العراق ومصر ينتمي إلى نموذج الماعز ذو الشعر الطويل الأسود، و يسمى في تركيا بالأناضولي الأسود وفي العراق بالعراقي، وفي مصر بالبلدي، وفي فلسطين المحتلة وسوريا بالماعز الجبلي، ويعتقد أن هذا النموذج قد نشأ في غرب آسيا، وربما آسيا الصغرى.

الصفات الشكلية

يشكل الماعز الجبلي حوالي (92.3%) من الماعز الموجود في سوريا. يتميز بأنه أصغر حجماً من الماعز الشامي، يصل ارتفاع الأنثى إلى (70-73)سم، و تزن حوالي (30-35)كجم، بينما يصل ارتفاع الذكر إلى (85)سم، و يزن حوالي(60-70)كجم.

الرأس متوسط الحجم ومقطعه الجانبي مستوي أو محدب قليلاً، يتميز بأنف مستقيم، والأذان بندولية يتراوح طولها بين (25-32) وعرضها (11)سم، كلا الجنسين له لحية يصحبها أحياناً زوائد لحمية صغيرة، له قرون تكون مائلة إلى الخلف وبطول (27)سم في الإناث, أما في الذكور فهي طويلة وغليظة مائلة إلى الخلف والأمام بشكل حلزوني ويصل طولها إلى (80)سم.

الرقبة متوسطة الطول والسماكة، والصدر عميق واسع، والظهر مستوي ذو نهاية منحدرة قليلا إلى الخلف، والأرجل قوية عضلية تنتهي بأظلاف جيدة التكوين.

يغطي الجسم شعر طويل خشن وأشعث، بينما يكون الشعر قصير وناعم على الوجه وأسفل الأرجل، أما اللون السائد فهو الأسود مع بعض البقع البيضاء أحياناً على مقدمة الرأس و أسفل الأرجل، في حين أن اللونين البني و الرمادي قليلي التواجد.

أهمية الماعز الجبلي

إن صيانة وتطوير الموارد الوراثية هي من أولويات مهام المؤسسات العلمية لأنها من ثروات الدولة الحيوية والاقتصادية والثقافية. ومن هذه الثروات الحيوانية المحلية يبرز الماعز الجبلي السوري الذي يملك قدرات وكفاءات عالية في تكوينه تمكنه من الرعي بالمناطق الجبلية الوعرة لحد لا ينافسه أي من الحيوانات الزراعية على ذلك, حيث يمكن الاستفادة من هذه الميزة من أجل تنظيف الأراضي الوعرة التي يصعب دخول الآلة إليها مما يؤدي إلى تخفيض التكاليف بشكل كبير إضافة إلى تسميد الأرض، وتقليل كمية المبيدات المستخدمة التي تضر بالبيئة والإنسان، هذا و إن بعض الدول مثل الولايات المتحدة الأمريكية-كاليفورنيا تستخدم الماعز الجبلي في رعي الحراج والحشائش الجبلية مما يخفف من حدوث الحرائق التي تنشب نتيجة احتكاك الحشائش اليابسة ببعضها بالإضافة للشرارة الكهربائية التي تنتج عن النباتات الخضراء.

كذلك فإن انخفاض تكاليف إنتاجه من الحليب واللحم مقارنة ببقية الحيوانات الزراعية أدى لتسميته بقرة الفقير. حيث يعد الماعز الجبلي من الحيوانات ثنائية الغرض فهو يربى للحليب واللحم ويستعمل شعره في صناعة الخيام.

أهمية البحث و مبرراته

إن الماعز الجبلي السوري كثروة حيوانية محلية (كبقية الثروات الأحيائية) تحتاج إلى متابعة علمية توفر لها استمرار البقاء والتطور، لاسيما أن بعض النتائج الأولية لبرامج التحسين الوراثي أشارت إلى امتلاكه لإمكانيات وراثية يمكن أن تستغل لتطويره.

وهنا تبرز تقنية الوراثة الجزيئية كأسلوب حيوي يساهم في التعرف على هذه الحيوانات بطريقة غير تقليدية لأنه يكشف عن أحد أهم مواقع تطويرها وهو موروثها الجزيئي. فمع تقدم طرق البحث العلمي وتطور تقنيات التجارب انتقلت الدراسة من المستوى الشكلي والخلوي والفسيولوجي والكيمياحيوي إلى المستوى الجزيئي الذي يدرس الحمض النووي بشكل رئيسي.

وعلى ذلك فقد تم في هذا البحث استخدام تقنية (SNPs) من أجل تحليل التنوع الوراثي في مجتمع الماعز الجبلي السوري والاستفادة من هذا التنوع لوضع لبنة يعتمد عليها في برامج التحسين الوراثي لهذا الحيوان وعدم الاستهتار بهذه المادة الوراثية وحفظها من الضياع.

وتساهم هذه الدراسة من خلال هدفها الذي يتركز على اكتشاف العديد من العلامات الوراثية (SNPs) في الماعز الجبلي في سوريا بوضع حجر زاوية من أجل صيانة وتطوير هذه الثروة الوراثية الحيوانية المحلية.

الدراسة المرجعية

النكليوتيد المفرد ذو الأشكال المتعددة

Single Nucleotide polymorphisms

تنشأ هذه الواسمة في النكليوتيدات من ما يسمى بالطفرات الموضعية التي تؤدي إلى استبدال أحد نيوكليوتيدات الجين (على سبيل المثال: الثيامين T مقابل السيتوزين C).

فعندما تظهر الطفرة الموضعية في الجزء المشفر من الجين (المادة الوراثية) الذي يسمى إكسون (EXON) فإن ذلك يؤدي إلى حالة بسيطة من الخلل التوريثي فقط (تغير في حمض أميني واحد وأحياناً لا يحدث تغير بل يبقى نفس الحمض)، ولا يؤدي إلى تغيير في تسلسل الأحماض الأمينية, حيث في النهاية تبقى الثلاثيات تشفر لنفس الأحماض الأمينية.

إن هذه الواسمة تظهر أيضاً في الجزء غير المشفر - من المادة الوراثية والتي تسمى إنترون

(Intron) وهي تستبعد في عملية ترجمة (RNA الرسول)، لذلك لا تترجم إلى أحماض أمينية أو بروتينات، وبالتالي لا تملك أي تأثير مباشر على النموذج المظهري (**Yahyaoui 2003**).

استخدمت الواسمات الوراثية (SNPs) أي النكليوتيدات المفردة المتعددة الأشكال (Single Nucleotide Polymorphisms) في دراسات مختلفة ولغايات مختلفة، فقد بين **(Vignal *et al* 2002)** في دراسة له عن أهمية الواسمات الوراثية الجزيئية واستخداماتها في الوراثة الحيوانية عن أهمية (SNPs) كنموذج جديد من الواسمات، واكتسب شعبية واسعة.

أما تحاليل (NPsS) عند الماعز وهو مادة الدراسة الحالية فقد كانت كثيرة ومتنوعة ومتعددة المجالات أيضاً, ففي المجال الوراثي ودراسة التنوع والحفاظ على المصادر الوراثية. أشار **(Moddoox *et al* 2007)** أن عدداً كبيراً من تجارب وضع خرائط للصفات قد تمت أو تتم حالياً بمساعدة تحاليل (SNPs)، وبالاعتماد على هذه التحاليل أوضح أنه يوجد درجة عالية لوقاية وحفظ الصبغيات والمادة الوراثية بين الأغنام والماعز والأبقار.

وذكر **(Pariset *et al* 2006)** أن تحاليل (SNPs) قد تستخدم في دراسات التنوع الحيوي ومهام تجارية أخرى مثل : اقتفاء الأثر، واختبار الأبوة، واختيار النموذج الوراثي المناسب.

وفي دراسات أخرى تشير إلى التأثير المتعدد للعلامة (SNP). درس الباحث **(Lan *et al* 2008)** (SNP) لمورثة (PRL) المسؤولة عن هرمون البرولاكتين لاحظ تأثير نكليوتيد مفرد جديد على صفة نمو الصوف. ويؤكد هذا التأثير المتعدد الباحث **(Lan *et al* 2007)** في دراسة كان يصف فيها الجزء النشط وغير النشط لمورثة (IGFBP3) المسؤولة عن إنتاج مركب يسب الأنسولين في سلالة ماعز صيني حين وجد أن (SNP) في هذه المورثة يؤثر أيضاً على حجم المولود مما دعاه لإستخدام هذه العلامة كعلامة لتحسين صفة الوزن عند الولادة أيضاً. وفي هذا السياق أيضاً وجد الباحث **(Lan *et al* 2008)** في دراسته للعلامات الوراثية في مورثة الألفالاكتوألبومين (LALBA) تأثير هذه المورثة على بعض الصفات الإقتصادية مثل:(كمية الحليب وصفة الطول والوزن...) وذلك في ماعز الكشمير الأبيض في منغوليا. مثل هذه التأثيرات أكدها كل من **(Lan *et al* 2008)** و **(Bai *et al* 2011)**.

وفي سياق آخر ساعد وجود علامات (SNPs) في الجزء النشط من (DNA) في تحديد العديد من المورثات المسؤولة عن العديد من العمليات الحيوية الهامة. فالباحث **(Badaoui *et al* 2007)** حدد موقع الجين (LPL) (ليبوبروتين لياز) المرتبط مع صفة محتوى الحليب من الدسم في الماعز الإسباني، كما تم تحديد جين (SCD) المسؤول عن تخليق حمض اللينوليك عند الماعز من خلال معرفة موقع البعض من علامات (SNPs).

كما يمكن استخدام علامات (SNPs) كمؤشرات انتخابية لتحسين العديد من الصفات كما يؤكد ذلك كل من **(Lan *et al* 2007)** **(Pariset *et al* 2006)** **(Lan *et al* 2008)**

مع كل ما تقدم يبقى عدد هذه العلامات المكتشفة من الماعز غير كافٍ لإجراء تحسينات جذرية **(Bai *et al* 2011)** و **(Lan *et al* 2007)** لكن مع تطور الأبحاث والدراسات في هذا المجال يمكن تنفيذ تغطية شاملة للخريطة الوراثية عند الماعز.

مواد وطرق البحث

١- مكان تنفيذ البحث

نفذ البحث في قسم الإنتاج الحيواني، وأجريت تحاليل التوصيف الجزيئي في مخبر البيولوجيا الجزيئية Molecular Biology في كلية الزراعة- جامعة دمشق. وطبقت تقنية النكليوتيدات المفردة المتعددة الأشكال SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) والتي تعتمد على تفاعل PCR.

٢- المادة الحيوانية المدروسة

تم الحصول على عينات من دم الماعز الجبلي النقي الموجود في محطة بحوث عرى (محافظة السويداء) التابع لهيئة البحوث العلمية الزراعية باستخدام أنابيب مخلاة من الهواء وتحوي مانع تخثر

(EDTA), حيث تم اختبار (13) عينة من الماعز الجبلي الخالي من الأمراض و الإصابات و الأفات.

٣-استخلاص الحمض النووي DNA

تم استخلاص الحمض النووي منقوص الأوكسجين (DNA) حيث جمعت عينات الدم الكامل في أنابيب تحوي (EDTA) وخزنت في درجة حرارة أقل من (4 C^O). ثم وضع (1 ml) من الدم الكامل في أنبوب, وتم إضافة (1 ml) من محلول معلق للخلايا(0.32 مم سكروز، 10مم Tris-HCl، PH=7.6، 5مم MgCl2، 1%(Triton^R x-100)) إلى الأنبوب، وطرد مركزي بسرعة (4000 rpm) لمدة 5 دقائق. ثم أعيدت هذه المرحلة مرة ثانية. يضاف بعد ذلك (500 µl) من محلول هضم البروتين(10مم Tris-HCl ، PH=8 ، 10مم NaCl ، 10مم EDTA) إلى الأنبوب.

ثم طرد مركزي بسرعة (4000 rpm). وبعدها نضيف (225 µl) من محلول هضم البروتين، و(25µl) من محلول البروتيناز (k) (10 mg/ml) إلى الأنبوب من أجل التخلص من البروتينات. بعد ذلك نضع الأنبوب في درجة حرارة (65 C) في حمام حراري, ثم وضع الأنبوب لمدة ساعتين. بعدها طرد مركزي لمدة (2) دقيقة بسرعة (10000 rpm).

يتم ترسيب DNA باستخدام 0.6 من الحجم الكلي بالإيزوبروبانول، ويترك الأنبوب لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة (20- C^O) ثم طرد مركزي لمدة 5 دقائق بسرعة (10000 rpm) ليضاف بعد ذلك الكحول 70% لغسل الحمض النووي DNA ويترك ليجف ويضاف بعد ذلك الماء المقطر والمعقم، ويحفظ بدرجة حرارة (20- C^O) حتى الاستخدام.

تحفظ عينات الحمض النوويDNA وتوضع بدرجة حرارة أقل من(20- C) حتى الإستخدام.

٤- التقدير الكمي والنوعي للحمض الريبي النووي (DNA)

يتم استخدام جهاز مقياس الطيف الضوئي UV Spectrophotometer لتقدير كمية الحمض النووي في العينات ويعتمد مبدأ عمله على قياس كمية الحمض النووي الموجودة في العينات وذلك عن طريق امتصاصه للأشعة فوق البنفسجية بأطوال موجات (260-280) نانومتر وأيضاً لتحديد نقاوة الحمض النووي. حيث تحمل كمية قليلة من الحمض النووي المستخلص في جيل الأجاروز (0.8%) المضاف إليها إيثيديوم بروماید لتحديد نوعيتها والتأكد من عدم تقطعها **الشكل (1)**. حيث تراوحت النقاوة بين (1.85 , 1.94). والتركيز بين (0.45 , 0.26 mg/ml).

الشكل ١. جيل الآجاروز بتركيز 0.8% لتحديد نوعية الحمض النووي DNA

٥- تضخيم الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين (DNA)

تمت عملية حل الحمض الريبي النووي (DNA) في الماء المقطر والمعقم للوصول إلى التركيز (40 mg/ml). ثم أجري تضخيم (DNA) باستخدام (23 بادئة) من بادئات (SNPs) تم استخدامها من قبل **(Cappuccio *et al* 2006)**، حيث تم الحصول عليها من الهيئة العامة للطاقة الذرية السورية. وهذه البادئات موضحة **بالجدول رقم (1)**.

أما بالنسبة **لعملية التضخيم باستخدام تقنية (SNP- PCR)** فقد كان يحوي الأنبوب الواحد على (27 µl) متضمنة: 12.5 µl (Master Mix)، و(8.5 µl) ماء مقطر معقم، و (2 µl) من محلول النصف الأول للبادئ المستخدم، و (2 µl) من محلول النصف الثاني للبادئ المستخدم (ذو التركيز 10 ميكرومولر لكل منهما)، و (2 µl) من محلول الحمض الريبي النووي DNA ذو التركيز (40 ng/µl). وأجريت عملية التضخيم ضمن جهاز التضخيم الحراري (جهاز Techne TC-512) علما أن درجة حرارة

جدول ١. الرموز والتسلسل النيكليوتيدي لبادئات SNPs المستخدمة

رمز البادئة	التسلسل النكليوتيدي 5
2-1	GCCTTCTGGATGTTACCGAC/ TCCTTTCTGTCACTCTGGGC
4-3	AAAGAAGAAGGGATCGCAGG/ ATCAGAAGTGCTGCTGCTCCA
6-5	TCCGAGCTCCAATAATCTTC/ TCCTTGACACGTAAGCATGG
8-7	TTCTAAAAGTCTCAGAGGCAG/ GGGTTGATAGCCTTGTATGT
10-9	GGGAAAATACCCTGCAGAAG/ AAATGGAATGGCATTGTTCTA
12-11	GGTATCCTAGTTATGGACTCAAT/ GTTGAAGTAACTTGGGCTGTGT
14-13	TCTCACGGTTCTACTGCTGCC/ ACTGGCCATGAACCACTTGG
22-21	GGGGCTTCTGGACAGATACTT/ CGCTGCACAGTGAAACTCTC
26-25	CTGAACCCGGTAACGAAG/ CTCTGGGAATCTTCTCTGT
28-27	ACTCCGCTTCGTGTGTCAGC/ TACTCCCATTTGCCTCAATC
30-29	TATGCCCAGGTAAGCGACAT/ ATTGAGTACGAGGCCCTGTG
32-31	CTTCCTGTTTAATCAACAAATCT/ AACCTTGGGCATGTAGAAGT
34-33	CACCTCATCTGAGGAGAAGAA/ CCAGCCACTATCTGAGTACTT
36-35	TCACATTGTCAGTGCAAATAGAG/ TTTGGGGCAGCAAAGACGT
38-37	GTCTGCTACAGGCAGCTC/ CGGTGTAGTTAGGGTTGCACT
40-39	ACTCTTGTGGGGTGACCTGT/ CCTCCCTGGTTCCTGAAAGT
42-41	CGTTCCTGCAGACCATCT/ CCTCAATCTCGGTGATATTCC
44-43	AGCTGTATAGCGGCACGAAT/ CCTGCCTGAAATTTTGGTTC
46-45	CCCTCCCTTTACTGTCATCC/ ATCAAGCCCAAAATCTCTCC
48-47	T GGCCATGTGGAGTGACGT/ CTGGGCTTGTTCCACTGACTG
50-49	ATGATCTCAGCACCTACCTTG/ ATAAGAGGCGTGCTCATGGCA
52-51	TTCAAGGGTTGCTGTTCTCA/ CAGCACCTGAAGGCTAGAGAG
54-53	AGTATCTTTTCTTGCATTTGTTTCC/ CACAGGGGTTTCTGGTTGG

الالتحام حددت بتخفيض نصف درجة في كل دورة (Touch down).

تتألف عملية التضخيم من (40 دورة) وكل دورة مؤلفة من ثلاث مراحل:

مرحلة التفكيك الحراري Denaturation: ويتم في هذه المرحلة انفصال سلسلتي الحمض النووي DNA عن بعضهما بسبب تعريض DNA لدرجة حرارة مرتفعة ($94\ C^{O}$) ويجب ألا تقل الحرارة عن هذا الحد لأن ذلك يؤدي إلى عدم اكتمال عملية الفصل بالشكل الأمثل بالتفكيك على درجة حرارة ($94\ C^{O}$) مدة ثلاثين ثانية.

مرحلة الالتحام Annealing: ويتم فيها التحام البادئة (Primer)مع الجزء المكمل لها على سلسلة الحمض النووي DNA ويتم ذلك بخفض درجة الحرارة تبعاً لطول البادئة وتركيبها من الأسس الآزوتية.

مرحلة الاستطالة Extension: تصل درجة الحرارة في هذه المرحلة إلى ($72\ C^{O}$) حيث يبدأ انزيم (Taq Polymerase) بتركيب السلاسل الجديدة وبوجود نكليوتيدات ثلاثية الفوسفات المختلفة dCTP , dATP dGTP, dTTP, ثم يترك لمدة 5 دقائق عند درجة حرارة ($72\ C^{O}$) لإنهاء جميع التفاعلات.

٦- التفريد الكهربائي Electrophoresis

تم تحديد نجاح عملية تضخيم DNA الناتج من بادئات SNPs باستخدام جهاز التفريد الكهربائي ومحلول TBE (1X) (Tris Borate EDTA) _ يتم تحضير محلول TBE (10X) الذي يتكون من ليتر من الماء المقطرمضافاً إليه Tris 108g +Acid 55g Borique EDTA 9.3g+ ثم يخفف هذا المحلول عشرة أمثال للحصول على محلول TBE (1X).

حيث ينفصل الحمض النووي DNA الناتج عن التضخيم باستخدام بادئات SNPs وذلك خلال جيل الأجاروز (4%) ، التي تتميز بقدرة كبيرة على الفصل و ذلك بسبب صغر مساماتها، حيث أن هذه الميزة تمكنها من فصل جزيئات DNA التي تختلف عن بعضها بنيكليوتيد واحد، ويضاف للجيل صبغة

الإيثيديوم بروميد ETBr ذات التركيز (50 mg/ml) بمقدار (7 µl) لكل (100 ml) من جيل الاجاروز.

وعلى ذلك فإنه يتم فصل نواتج التضخيم اعتماداً على الوزن الجزيئي إذ ترحل القطع الكبيرة ببطء أكثر من القطع الصغيرة ثم يتم كشف الحمض النووي DNA باستخدام صبغة ETBr الإثيديوم بروميد ليظهر الحمض النووي DNA على شكل حزم على الهلامة عند التعريض للأشعة فوق البنفسجية (UV)، ولابد من إضافة سلم جزيئي يعبر عن الطول الجزيئي (DNA ladder) إلى الجيل.

نتائج التحليل الجزيئي لتقنية SNPs

تم استخدام (23 زوج من البادئات) في تقنية SNPs لثلاثة عشر عينة DNA. (20) زوج منها أعطت نتائج تضخيم وهي الأزواج (52,51) (54,53) (38,37) (40,39) (42,41) (46,45) (48,47) (50,49) (14,13) (26,25) (30,29) (32,31) (34,33) (36,35) (2,1) (4,3) (6,5) (8,7) (10,9) (12,11)، في حين أن ثلاثة أزواج من البادئات لم تعطِ أي نتائج تضخيم وهي (44,43) (28,27) (22,21). ويمكن تلخيص النتائج بالحالات التالية

الحالة الأولى: لم تعطِ البادئات التالية أي نتائج تضخيم في تقنية (PCR) وبالتالي غياب المواقع المسؤولة عن هذه المورثات في العينات المدروسة. وهذه البادئات هي:

- (22,21) وهو بادئ موجود على الإكسون 2 لمورثة HLA-DRB. و تشفر هذه المورثة بروتين DRB لمعقدات التوافق النسيجي من النمط الثاني (MHC class II DRB). إن أنتيجينات الكريات البيض الإنسانية النمط الثاني (HLA- class II) تلعب دور مركزي في الجهاز المناعي بتحضير الببتيدات المشتقة من بروتينات خارج خلوية في الخلايا المقدمة للمستضد Antigen Presenting Cell (APC) مثل الخلايا اللمفاوية B، والخلايا البالعة.
- (28,27) وهو بادئ موجود على الإكسون2 لمورثة GDF9، التي تشفر بروتين عامل النمو المحول رقم 9. إن عوامل النمو هذه تخلق من قبل خلايا المبيض الجسمية وتؤثر مباشرة في نمو ووظيفة الخلية البيضية (Oocyte). ولهذا البروتين (GDF9) دور في تصنع الجريبات (Folliculogenesis) حيث يلعب دور في تطور الجريبات البدئية (Primary) في المبيض وله دور حدي في نمو الخلايا الحبيبية (Granulasa cells) والخلايا القرابية (Theca cells)، بالإضافة لدوره في تمايز ونضج الخلية البيضية (Oocyte)، لذا له دور ملحوظ في الخصوبة (fertility).
- (44,43) وهو بادئ موجود على الإكسون2 لمورثة MTNR1A، التي تشفر بروتين الميلاتونين (Melatonin) الذي يلعب دوراً هاماً بتنظيم الدورة اليومية للجسم و بشكل خاص تنظيم النوم، ويفرز في الجسم بشكل أساسي ليلاً.

الحالة الثانية: أعطت نواتج بعض البادئات تضخيم في تقنية (PCR) بعد تفريدها على جيل الاجاروز (4%) نتائج متماثلة عند جميع العينات، و يدل ذلك على وجود المواقع المسؤولة عن هذه المورثات في جميع العينات. وهذه البادئات هي:

- (32,31) وهو بادئ موجود على (5 flanking) لمورثة IL2، وهي مورثة تشفر بروتين Interleukin-2 الذي يملك تأثيراً فعالاً في تنظيم المناعة الخلوية بما فيها الخلايا القاتلة بطبيعتها (Natural killer)، والخلايا التائية السامة للخلايا التي تتمكن من تدمير الخلايا المصابة بالفيروسات أو الخلايا السرطانية. إن هذا الإنترلوكين يحفز انقسام و تكاثر الخلايا المناعية السابقة عند الخلايا الهدف. **الشكل رقم (2).**

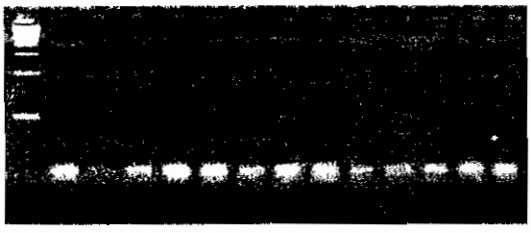
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 M

الشكل٢. نتيجة ترحيل البادئ (32,31) على جيل الاجاروز

- (50,49) وهو بادئ موجود على الإنترون 2 لمورثة PRNP_2 التي تشفر بروتين Prionprotein.
- (2,1) وهو بادئ موجود على الإكسون3 لمورثة ACVR2B، وتشفر هذه المورثة البروتين المفعل (المنشط) للمستقبل نمط B2 (Activin receptor) IIB. هذه البروتينات المفعلة (Activins) هي عوامل للنمو والتمايز مثنوية التركيب تعود إلى عائلة العوامل المنمية (المغذية) للتحول، وهي تعمل على مستقبلات بروتينية عبر الغشاء.
- (6,5) وهو بادئ موجود على 3UTRt لمورثة MEG3، التي تشفر بروتين Callipyge الذي بدوره يتحكم بنمو العضلات ونوعية اللحم.
- (10,9) وهو بادئ موجود على 5UTR لمورثة CSN1S1_2، التي تشفر بروتين -IIS1 casein.
- (14,13) يوجد هذا البادئ على الإنترون2 لمورثة CTSK وهي مورثة تشفر بروتين CathepsinK الذي يتحكم بتعويض بروتين العظام.
- (26,25) وهو بادئ موجود على الإنترون15 لمورثة FN1، التي تشفر بروتين Fibronectin وهو برونين يربط بين الخلايا و الأنسجة وهو هام لتطور الأجنة.
- (52,51) يوجد هذا البادئ على الإكسون3 لمورثة TLR4 وهي مورثة تشفر بروتين Toll-like receptor 4 نظام دفاع فطري، يتبع لمجموعة من المستقبلات PRRs، يستخدم في التعرف على الأنماط الجزيئية للأسباب المرضية (وهي التشكيلات التي تتوفر فقط عند مثيرات المرض) إذا هي ضمن نظام المناعة.

الحالة الثالثة: أظهرت، بعض البادئات تغير على مستوى نيكليوتيد واحد (SNPs) في عينات محددة وهذا يشير إلى وجود تنوع وراثي داخل الماعز الجبلي الذي قد يعود إلى إضافة أو حذف أو تبديل في النكليوتيدات ويمكن استغلال هذا التنوع كدلائل انتخابية للمواقع الوراثية المسؤولة عن الصفات الخاصة بها. وهذه المواقع هي

(46,45) وهو بادئ موجود الإكسون3 لمورثة GDF8، التي تشفر بروتين Myostatin وهو بروتين يتشكل في جسم الإنسان أو الحيوان يحد من نمو العضلات، لذلك فإن عدم نشاط هذا البروتين سوف يؤدي إلى نمو عضلات غير محدود، وأظهرت نتيجة الترحيل أن الموقع الخاص بهذه المورثة متواجد في العينات (10) (11)، وغائب في باقي العينات **الشكل رقم (٣)**.



الشكل٣. نتيجة تفريد البادئ (46,45) على جيل الأجاروز

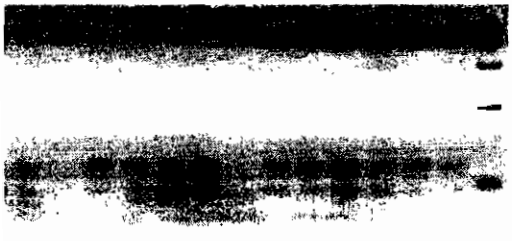
- (4,3) يوجد هذا البادئ على الإنترون14 لمورثة CAST، وهي مورثة تشفر بروتين Calpastatin الذي يؤثر على طراوة اللحم وصفات استساغته، وأظهرت نتيجة الترحيل أن الموقع الخاص بهذه المورثة متواجد في العينات (1) (4) (8)، وغائب في باقي العينات.
- (8,7) وهو بادئ موجود على الإكسون9 لمورثة CSN1S1_1، التي تشفر بروتين IIS1-casein، وأظهرت نتيجة الترحيل أن الموقع الخاص بهذه المورثة متواجد في العينة (13) فقط، وغائب في باقي العينات.
- (12,11) يوجد هذا البادئ على الإكسون4 لمورثة CSN3، التي تشفر بروتين (K-Casein) وهو بروتين موجود في الحليب من عائلة الكازين، وتشكل هذه العائلة حوالي 80% من بروتينات الماعز، التي تكون بشكل تجمع قابل للانحلال بسبب جزيئات (K-Casein) التي تثبت البنية الذوابة لهذه العائلة من البروتينات، وأظهرت نتيجة الترحيل أن الموقع الخاص بهذه المورثة

متواجد في العينات (9) (11)، وغائب في باقي العينات.

- (30,29) وهو بادئ موجود على الإكسون10 لمورثة (GHR)، التي تشفر مستقبل هرمون النمو، وهو مستقبل عبر الغشاء لهرمون النمو حيث يؤدي ارتباط هرمون النمو به إلى تفعيل إشارة داخل خلوية و عبر الخلية مما يقود إلى النمو. والجدير ذكره أن وجود طفرة في هذه المورثة يؤدي لمتلازمة لارون التي تعرف بزوال التحسس لهرمون النمو وتتميز بقصر القامة أو القزامة المتناسبة (Dwarfism)، وأظهرت نتيجة التفريد الكهربي أن الموقع الخاص بهذه المورثة متواجد في العينات (1) (2) (4) (5) (7) (8) (9) (11) (13)، وغائب في باقي العينات.
- (34,33) يوجد هذا البادئ على الإنترون2 لمورثة IL2_2، التي تشفر بروتين Interleukin-2، وأظهرت نتيجة الترحيل أن الموقع الخاص بهذه المورثة متواجد في العينات (1) (2) (3) (4) (5) (6) (9) (11) (12) (13)، وغائب في باقي العينات.
- (40,39) وهو بادئ موجود على الإكسون 7 لمورثةLGB، التي تشفر بروتين β-lactoglobulin وهو أهم البروتينات الموجودة في الحليب، وأظهرت نتيجة الترحيل أن الموقع الخاص بهذه المورثه متواجد في العينات (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11)، وغائب في باقي العينات.
- (42,41) يوجد هذا البادئ في الإنترون3 لمورثة LIPE، التي تشفر بروتين Lipase، وهو أنزيم لهضم الدهون وجعل الدهن المختزن في جسم الحيوان تحت التصرف عند الحاجة إليه، وأظهرت نتيجة التفريد أن الموقع الخاص بهذه المورثه متواجد في جميع العينات، وغائب في العينة (5) فقط.
- (48,47) وهو بادئ موجود على الإكسون 3 لمورثة PRNP_1، التي تشفر بروتينات البريون Prionprotein، وهي بروتينات تتواجد بشكل خاص على سطح الخلايا العصبية (العصبونات)، حيث أن دور هذه البروتينات بالحالة الطبيعية غير معروف ولكن التشكل الشاذ لهذا البروتين هو المكون الرئيسي لمرض جنون البقر (كروتزفيلدجاكوب)، وأظهرت نتيجة الترحيل أن الموقع الخاص بهذه المورثة متواجد في العينات (3) (4) (7)، وغائب في باقي العينات.
- (54,53) Capra hircus microsatellite وهي دليل المواقع الوراثية وتستخدم في دراسة التنوع الوراثي، وأظهرت نتيجة الترحيل أن الموقع الخاص بهذه المورثة متواجد في العينات (5) (6) (7)(10) (11) (12) (13)، وغائب في باقي العينات.

الحالة الرابعة: أحدثت بعض البادئات تغير على مستوى نيكليوتيد واحد (SNPs)، وتجلى ذلك من خلال غياب (SNPs) في عدة عينات ويمكن أن يعود ذلك إلى وجود إحدى شفرات التوقف التي أدت إلى إحباط عملية الترجمة في بعض العينات مما أدى إلى غياب بعض المواقع الوراثية وفي مايلي نشير إلى بعض المورثات التي لوحظت مواقعها في الجزء الاخر من العينات:

- (36,35) يوجد هذا البادئ على الإكسون2 لمورثة IL-4، التي تشفر بروتين Interleukin-4 وهو سايتوكين (من مجموعة الكينات الخلوية) التي تحرض تمايز الخلايا الليمفاوية T المساعدة إلى خلايا مساعدة T من النمط الثاني (Th2)، وهذه الخلايا لاحقاً تفرز المزيد من الإنترلوكين 4، وأظهرت نتيجة التفريد أن الموقع الخاص بهذه المورثة غائب في العينتين (2) (7) نتيجة وجود إشارة توقف **الشكل رقم (٤)**.



الشكل ٤. نتيجة تفريد البادئ (36,35) على جيل الأجاروز.

- (30,29) وهو بادئ يوجد على الإكسون10 لمورثة (GHR)، المشفرة لمستقبل هرمون النمو، وهو مستقبل عبر الغشاء لهرمون النمو حيث يؤدي ارتباط هرمون النمو به إلى تفعيل إشارة داخل خلوية وعبر الخلية مما يقود إلى النمو. والجدير ذكره أن وجود طفرة في هذه المورثة يؤدي لمتلازمة لارون التي تعرف بزوال التحسس لهرمون النمو وتتظاهر بقصر القامة أو القزامة المتناسبة (Dwarfism)، وأظهرت نتيجة الترحيل أن الموقع الخاص بهذه المورثة غائب في العينة (3) نتيجة وجود إشارة توقف.
- (38,37) يوجد هذا البادئ على الإنترون8 لمورثة ITGB1، التي تشفر بروتين Integrin B1 وهو جزيء بروتيني يتواجد في بروتين الخلايا وهو يتبع للبروتينات الناقلة عبر أغشية الخلايا مثل النقل الموجه لخلايا الدم البيضاء باتجاه الالتهابات، وأظهرت نتيجة الترحيل أن الموقع الخاص بهذه المورثة غائب في العينات (7) (9) (10) (11) (12) نتيجة وجود إشارة توقف.
- (46,45) وهو بادئ يوجد على الإكسون3 لمورثة GDF8، المشفرة لبروتين Myostatin وهو بروتين يتشكل في جسم الإنسان أو الحيوان يحد من نمو العضلات، لذلك فإن عدم نشاط هذا البروتين سوف يؤدي إلى نمو عضلات غير محدود. وأظهرت نتيجة التفريد أن الموقع الخاص بهذه المورثة غائب في العينات (1) (2) (3) (4) (5) (6) (9) نتيجة وجود إشارة توقف.

الاستنتاجات والتوصيات

أكدت هذه الدراسة فعالية التقنية الحيوية والوراثة الجزيئية (SNP-PCR) في دراسة التحاليل الوراثية بين أفراد الماعز الجبلي السوري، حيث أشارت نتائج هذه الدراسة إلى وجود تشابه واختلاف وراثي بين أفراد العينات المدروسة من الماعز الجبلي السوري. و بناءً على ذلك يوصى بما يلي:

١- اعتماد طرائق التقانة الحيوية لصيانة وتطوير الماعز الجبلي السوري جانب الطرائق التقليدية الأخرى في عملية صيانة وتطوير هذا الحيوان الزراعي الهام.
٢- اعتماد نتائج هذه الدراسة لبدء وضع هوية وراثية أولية للماعز الجبلي في سورية.
٣- يمكن استخدام الاختلافات في القواعد الوراثية كدلائل انتخابية للصفات المرتبطة بها.
٤- التوسع في استخدام مثل هذه التقانات على كافة الحيونات الزراعية.

المراجع

المراجع الأجنبية

Badaoui B.; Serradilla J.M.; Tomas A; Urrutia B.; Ares J.L.; Carizosa J.; Canchez A.; Jordana A. and Amills A. (2007). Identification of two polymorphisms in the goat Lilpoprotein lipase gene and their association with milk production traits. **Journal of Diary Science, 90: 3012-3017.**

Bai W.L.; Zhou C.Y.; Ren Y.; Yin R.H.; Jiang W.Q.; Zhao S.J.; Zhang S.C.; Zhang B.L.; Luo G.B and Zhao Z.H. (2011). Characterization of the GHR gene genetic variation in Chinese indigenous goat breeds. **Molecular Biology Reports, 38 (1): 471-479.**

Cappuccio I.; Pariset L.; Ajmone-Marsan P.; Dunner S.; Cortes O.; Erhardt G.; L-hken G.; Gutscher K.; Joost S.; Nijman I.J.; Lenstra J.A.; England P.R.; Zundel S.; Obexer-ruff G.; Beja-Pereira A and Valentini A. (2006). Allele frequencies and diversity parameters of 27 single nucleotide polymorphisms within and across goat breeds. **Molecular Ecology Notes. 6: 992–997.**

Lan X.Y.; Chen H.; Tian Z.Q.; Liu S.Q.; Zhang Y.B.; Wang X and Fang X.T. (2008). Correlations between SNP of LALBA gene and economic traits in Inner Mongolian white cashmere goat. **NCBI. 30 (2): 169-174.**

Lan X.Y.; Pan C.Y.; Chen H.; Zhao M.; Li J.Y.; Yu J.; Zhang C.L.; Lei C.Z.; Hua L.S and Yang X.B. (2007). The novel SNPs of the IGFBP3 gene and their associations with litter size and weight traits in goat. **Arch. Tierz. 50 (2): 223-224.**

Lan X.Y.; Pan C.Y.; Chen H.; Lei C.Z; Li F.Y.; Zhang H.Y and Ni Y.S. (2008). Novel SNP of the goat prolactin gene (PRL) associated with cashmere traits. **Journal of Applied Genetics. (50) 1: 51-54.**

Maddoox J . F. and Cockett N. E. (2007), An update on sheep and goat linkage maps and other genomic resources. **Science Direct. 70: 4-20.**

Pariset L.; Cappuccio I.; Marsan P.; Dunner S.; Luikart G.; England P.R.; Obexer – Ruff G.; Peter C.; Marletta D.; Pilla F and Valentini A. (2006) Assessment of population structure by single nucleotide polymorphisms (SNPs) in goat breeds. **Science Direct. 833(1): 117-120.**

Vignal A.; Milan D.; Sancristobal M. and Eggen A. (2002). A review on (SNP) and other type of molecular markers and their use in animal genetics. **Genitics Selection Evolution, 34: 275-305 .**

Yahyaoui M.H. (2003). Study of kappa casein, beta lactoglobulin, and stearoyl coenzyme A desaturase genes. **Universidad Autonoma de Barcelona. 148: (1-13).**

85
Arab Univ.
J. Agric. Sci.,
Ain Shams Univ.,
Cairo, 20(1), 75 - 85, 2012

STUDY OF GENETIC DIVERSITY IN SYRIAN MOUNTAIN GOAT BY USING (SNPs)

[6]

AL-ali A[1]. B. Issa[1] and S. Lawand[2]

1- Department of Animal Production, Faculty of Agriculture, University of Damascus, Syria, P.O. Box 30621.

2- Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Damascus, Syria, P.O. Box 30621.

Keywords: Syrian Mountain Goat, Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), Genetic Diversity

ABSTRACT

Mountain goat in Syria is one of important domestic animals, because its characters can produce and reproduce under the hard environmental conditions, it was used in crossbreeding with Syrian goat as a donor to acclimatization and resistance of diseases traits.

In spite of that, this animal is still faraway from the scientific search, Moreover, it was exposed to random crossbreeding with Shami Goat by goat breeders, of which will lead in a long time to loss an important domestic animal genetic source, some of it's characterizes were not detected.

In this search, the genetic diversity among samples of pure mountain goat that exist in Era Station Search in AL-Sowidaa by using (SNP-PCR) was studied.

The results indicated that this technique is successful for defining the genetic similarity and variance among samples of goats that under study, Moreover, the locations of some important genes were discovered, and that will help us in starting of genetic mapping for this economic animal.

(Received July 11, 2011)
(Accepted August 28, 2011)

تحكيم أ.د سمير عبد العزيز إبراهيم: أستاذ الوراثة ، كلية الزراعة، جامعة عين شمس، شبرا الخيمة ، القاهرة
أ.د أحمد سيد شرف: كلية الزراعة ، جامعة القاهرة ، الجيزة ، مصر