العلاقة بين المظاهر المتعددة لجين DRB1 وانتاج وتركيب الحليب في الاغنام العواسي التركي

ميساء احمد ناصر نصر نوري الانباري

قسم الانتاج الحيواني/كلية الزراعة/جامعة بغداد

المستخلص

أجري البحث في محطة بحوث المجترات التابعة للهيئة العامة للبحوث الزراعية/ وزارة الزراعة (20 كم غرب مدينة بغداد)، فضلا عن مختبر الفسلجة/كلية الزراعة/جامعة بغداد ومختبر جسر المسيب المتخصص بالتقانة الاحيائية وتحاليل الوراثة الجزيئية من 2015/03/1 ولغاية 2016/01/15، بهدف دراسة العلاقة بين المظاهر الوراثية لجين DRB1 بأنتاج الحليب ومكوناته الرئيسة لدى الاغنام العواسي التركي. تأثر انتاج الحليب اليومي والكلي ونسبة الدهن في الحليب معنويا ($P\leq0.05$) باختلاف المظهر الوراثي لجين DRB1، إذ تفوقت النعاج ذات المظهر الوراثي A على مثيلاتها ذات المظهر الوراثي (C) في انتاج الحليب اليومي والكلي والمظهر الوراثي B كان الافضل بالنسبة لنسبة الدهن. أما طول موسم الحليب وباقي مكونات الحليب فلم تتأثر معنويا باختلاف المظهر الوراثي للجين. يستنتج من خلال دراسة المظاهر المتعددة لجين DRB1 أمكانية اعتماده في وضع استراتيجيات التحسين الوراثي، لدى الأغنام لتعظيم العائد الاقتصادي من مشاريع تربيتها بانتخاب وتضريب التراكيب او المظاهر الوراثية التي حققت افضل معدل لانتاج الحليب اليومي والكلي، كما أن تطبيق الدراسة على عينة أكبر ولعدة مواسم إنتاجية من شأنه أعطاء نتائج أكثر دقة لتطبيق إستراتيجية الاستبعاد والاستبدال. وان التباين الواسع في القيم التربوية لصفة عدد الخلايا المصابة يعكس مدى واسع في تطبيق برامج الانتخاب.

البحث مستل من اطروحة دكتوراه للباحث الاول.

Associated between polymorphism of DRB1 gene with production and composition of milk in Turkish Awassi sheep

Animal Res./College of Agric/ Univ. of Baghdad.

Nasr_noori@yahoo.com

Abstract

This study was undertaken at the Ruminants Researches Station (20 km west of Baghdad) pertaining to the Directorate for Agricultural Researches / Ministry of Agriculture, Reproductive laboratory at the College of Agriculture/University of Baghdad as well as Laboratory Bridge Musayyib specialist to technology and bio-analysis and molecular genetics, and analysis of molecular genetics from 01/03/2015 to 15 / 01/2016 .The aim of this study was Relationship of DRB1 polymorphism with production and composition of milk. Affected Daily and total milk production and the percentage of fat in milk was significant ($P\leq0.05$) depending on the different phenotype DRB1 gene, but the length of milk season and other milk components were not

significantly affected by different phenotype appearance of the gene . It can be concluded through the study of polymorphism of the gene DRB1 revealed possibility of adopted them in sheep improvement strategy to increased the milk production in the breeding schemes, by selecting and crossing the highly growth lambs genotypes or phenotypes. the best growth of the lambs and attention also to study the application of a larger sample and for several seasons productivity would give more accurate results for the application of exclusion and replacement strategy.

المقدمة

اكدت منظمة الأغذية والزراعة للأمم المتحدة أن الثروة الحيوانية في العراق تدهورت بشكل ملحوظ خلال العشرين عاما الماضية، واعزت السبب في ذلك الى توقف برامج التربية والتحسين وانعدام الإدارة الحديثة. هنالك طريقان لتحسين السلالات الحيوانية، الأول يتمثل بالتحسين الوراثي بالطرق التقليدية مثل الانتخاب في الحيوانات على أساس القيمة التربوية لاسيما على أساس الكفاءة الانتاجية والتناسلية والمقاومة للإمراض والخلط بين السلالات، أما الطريق الثاني لتحسين السلالات يكون بوساطة ايجاد التفوق الوراثي بوسائل التكنولوجيا الحيوية مثل تكنولوجيا التعديل الوراثي لتكوين افراد ذات تراكيب وراثية مطلوبة لتكوين قطعان النواة لنشر تلك التراكيب الوراثية المتميزة على نطاق واسع. جين DRB1 هو احد جينات المعقد النسيجي الرئيس، من جينات Class II DR β1 والذي يعود الى عائلة الكلوبيولينات المناعية (Immunoglobulin super family) وهذه الجينات عبارة عن كلايكوبروتينات ومن اكثر جينات معقد التوافق النسيجي (Major histocompatibility complex–MHC) متعدد المظاهر [1]، ومؤلفة من 9 اواصر تساهمية نوع α وβ (11)، وصنفت الى خمسة مجاميع من الجينات تمثلت بكل من MHC و DQ و DO و DM و DP [10]، ويقع على الكروموسوم 20 الـ Exon 2 والذي يشفر مواقع ارتباط المستضد [4] وتم تحديد اكثر من 1,000 من اليلات OLA–DRB1 و160 اليل من HLA–DRB1 وبهذا اعتبرت من اكثر الاليلات تحديداً [8 و 11] وقد تخصصت وظيفياً لتقديم المستضدات لانتاج البتييدات بشكل رئيس من البروتينات الخارجية (Extracellular proteins) والطفيليات لـ TCR على CD4+ helper T–cells ، وبذلك لعبت دوراً كبيرا في المقاومة والاستجابة المناعية ضد الامراض [3]. والهدف من الدراسة الحالية هو تحديد علاقة المظاهر الوراثية لجين DRB1 بأنتاج الحليب ومكوناته الرئيسة في عينة من الاغنام العواسي التركي.

المواد وطرائق العمل

اجري البحث في محطة بحوث المجترات التابعة للهيئة العامة للبحوث الزراعية/ وزارة الزراعة، للمدة من 2015/03/1 ولغاية 2015/06/15، على عينة مكونة من94 نعجة (عواسي تركي) ومواليدها هذا فيما يخص الجزء الحقلي، في حين تم أجراء التحاليل الوراثي (الجزء المختبري) جزءاً منها في مختبرات كلية الزراعة/جامعة بغداد والجزء الاخر في مختبر شركة جسر المسيب للتحليلات الوراثية للمدة من 2015/11/15 لغاية 2016/1/15 بهدف دراسة علاقة المظاهر المتعددة لجين DRB1 لأنتاج وتركيب الحليب

تم جمع 5 مل من الدم من الوريد الوداجي (Jugular vein) من كل حيوان في انبوبة جمع مضاف لها مانع تخثر من نوع K2 EDTA من انتاج شركة AFCO الاردنية، ونقلت بصندوق مبرد الى المختبر لحفظها بالتجميد على درجة 18° م لحين وقت الاستخلاص. تم استخلاص الحامض النووي DNA من عينات الدم للنعاج (الامهات) لغرض اجراء الفحص الجزيئي للجين المدروس (DRB1). وتم استخلاص DNA من الدم حسب تعليمات العدة (Kit) المجهزة من شركة Geneaid. بعد استخلاص الـ DNA اعتمدت طريقة Sambrook وزملاؤه [15] للتأكد من وجود إلـ DNA المستخلص من الدم. تم مزج 8 مايكروليتر من الـ DNA مع 2 مايكروليتر من loading dye (صبغة البروموفينول الزرقاء Bromophenol Blue) إذ حملت العينات في الحفر المفردة من الجل. تم ترحيل العينات على طاقة كهربائية مقدارها (70 فولت) وبتيار مقداره 40 ملي أمبير ولمدة ساعة. استخدم جهاز مطياف الأشعة فوق البنفسجية (UV light transillminator) لغرض مشاهدة حزم الـ DNA، ان الحزم الملونة بصبغة بروماید الاثيديوم (Ethidium bromide fluorescence) صورت باستخدام جهاز التوثيق الفوتوعرافي (Photo documentation system).

تم اختيار البادئ (Primers) لغرض أجراء الكشف الجزيئي ومعرفة التعدد المظهري للجينات والطفرات الموجودة للجينDRB1 : Exon 2 [7]، وذلك من الشركة الالمانية ALFA.

F : 5'-ATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCC -3'
R : 5'-TTTAAATTCGCGCTCACCTCGCCGCT -3'

بعد انتهاء تفاعل البلمرة تم الكشف عن وجود الطفرة وعدم وجودها عن طريق استعمال إنزيم القطع (*RSAI*) من شركه Biolabs وبتركيز 1000 وحده لكل مول وتم حضن مزيج التفاعل في درجة حرارة 37 مئوي ولمدة 4 ساعات وخلالها يتعرف الانزيم على موقع معين ضمن القطعة المتضاعفة وتقطع بالإنزيم القاطع وتم اجراء الترحيل الكهربائي للعينات المقطوعة للكشف عن مواقع القطع ومن خلال التقانة اعلاه تم التعرف على التعدد المظهري للمنطقة الجينية المضاعفة من الجين DRB1 . تم تحميل 4 µl من الـ DNA ladder مع 7 µl من نواتج PCR–RFLP في جل الأكاروز وبتركيز3% (1X TBE Buffer) ثم غمر الجل بصبغة بروميد ألاثيديوم السائلة وبتركيز2.5% وتم الترحيل بفرق جهد مقداره 50 فولت/سم وبتيار 40 ملي فولت ولمدة نصف ساعة بعدها ترفع الفولطية الى 100 ولمدة ساعة ونصف وتم مشاهدة الحزم بوساطة UV transiluminater، وتم تصويرها باستخدام جهاز التوثيق الفوتوغرافي (Photo documentation system).

تم تحليل البيانات احصائيا باستعمال البرنامج SAS– Statistical Analysis System [16] لدراسة تأثير جين DRB1 في انتاج الحليب ومكوناته، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باستخدام اختبار Duncan [6] متعدد الحدود من خلال تطبيق طريقة متوسطات المربعات الصغرى (Least square means).

الانموذج الرياضي.

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + P_j + e_{ijk}$$

Y_{ijkl}: قيمة المشاهدة لكل صفة. G_i: تأثير اليلات جين DRB1 (A و B و C). P_j: تأثير تسلسل الدورة الانتاجية (من الاولى الى الرابعة). e_{ijkl} : الخطا العشوائي الذي يتوزع طبيعيا بمتوسط يساوي صفر وتباين قدره $\sigma^2 e$.

النتائج والمناقشة

علاقة المظاهر الوراثية لجين DRB1 في انتاج الحليب وطول موسم الانتاج

أظهرت نتائج الدراسة الحالية ان هنالك فروق معنوية ($P\leq0.05$) في انتاج الحليب اليومي باختلاف التركيب الوراثي لجين DRB1، إذ بلغ المعدل لليومي لإنتاج الحليب اقصاه لدى النعاج ذات المظهر الوراثي A (1.152± 0.14 كغم) في حين كان ادناه عند المظهر الوراثي B وبواقع 0.992 ± 0.13 كغم (الجدول 1). من خلال هذه النتيجة بالإمكان تحسين صفة انتاج الحليب اليومي لدى الاغنام العواسي التركي من خلال الانتخاب للإفراد الحاملة للمظهر A ويعد انتاج الحليب اليومي من الصفات الاقتصادية المهمة ذات الارتباط الموجب والمعنوي مع الانتاج الكلي ولدورها الضروري في نمو المواليد أثناء مدة الرضاعة. وبذات الاتجاه بلغ معدل انتاج الحليب الكلي في المظاهر الوراثية الثلاثة A و B و C المتحصل عليها لهذا الجين في العينة المدروسة 135.93± 21.64 و 130.12 ± 13.65و 123.42 ± 15.69كغم بالتتابع وان التباين بينها معنويا ($P\leq0.05$). لم تكن الفروق معنوية بين المظاهر الوراثية للأثر المتعدد لجين DRB1 في طول موسم الحليب، إذ بلغت معدلات 118.00 ± 14.14و 125.00± 7.09و 124.42± 4.15 يوم للمظاهر الوراثية الثلاثة A و B و C بالتتابع. أن هذه النتيجة تتفق مع ما أشارت اليه دراسات أخرى من حيث معنوية تأثير المظاهر الوراثية لجين DRB1 في أنتاج الحليب [1] ومخالفة مع البعض الاخر [2 و 13]. أن التباين في نتائج الدراسات تشير الى وجود تداخلات بين أليلات DRB1 وحدوث طفرات وراثية، فضلا عن الاختلاف في عدد المشاهدات بأختلاف المظاهر الوراثية لهذا الجين، وان زيادة عدد العينات ولقطعان مختلفة ودراسة اكثر من قطعة لنفس الجين من شأنه اعطاء نتائج اكثر دقة نظراً لوجود اختلافات في التنويع الوراثي بين السلالات المحلية والاجنبية وكذلك الاختلافات في انظمة الادارة والانتاج ادت الى حصول انحدار وراثي في صفات انتاج الحليب في كافة حيوانات المزرعة ، لذلك ركز العديد من الباحثيين والدراسات على اهمية الوراثة وايجاد طرق حديثة وتطوريها من اجل عمليات التحسين الوراثي من خلال معرفة تاثيرات الجينات والمعلمات الوراثية والمظاهر الوراثية [18 و19] ودورها الفعال في انتاج الحليب ومكوناته من البروتين والدهن لاسيما تعدد المظاهر الوراثية لبروتينات الحليب مثل الكازينات واللاكتوكلوبيولين فاكدت عدة دول اوربية على اهمية هذا الموضوع مما ادى الى تحسين نسبة انتاج الحليب من 1–2% سنويا للاغنام والماعز مقارنة بالسنيين الماضية [14].

الجدول (1) علاقة المظاهر الوراثية (Polymorphism) لجين DRB1 في انتاج الحليب وطول موسم الانتاج لدى العواسي التركي.

المظهر الوراثي (Polymorphism)	العدد	المتوسط ± الخطأ القياسي		
		انتاج الحليب اليومي (كغم)	انتاج الحليب الكلي (كغم)	طول موسم الحليب (يوم)
A	9	0.14 ± 1.152 a	21.64 a ±135.93	14.14± 118.00 A
B	17	0.10 ±1.041 ab	13.65 ab ±130.12	7.09 ±125.00 a
C	14	0.13 ±0.992 b	b 15.69 ±123.42	4.15 ±124.42 a
مستوى المعنوية	العدد الكلي40	*	*	Ns

المتوسطات التي تحمل حروف مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنويا فيما بينها.

* ($P\leq0.05$)، NS: غير معنوي.

علاقة المظاهر الوراثية لجين DRB1 في مكونات الحليب

يظهر من الجدول (2) أن الفروق في نسبة البروتين في الحليب باختلاف المظهر الوراثي لجين DRB1 لم تكن معنوية، وبلغت نسبها 3.57± 0.05 و 3.65 ± 0.03 و 3.67 ± 0.05 % للنعاج العواسي التركي ذات المظهر الوراثي A و B و C بالتتابع. أن هذه النتيجة مماثلة الى ما توصل اليه [5 و 12] من حيث عدم وجود تباين معنوية في نسبة البروتين بأختلاف المظهر الوراثي لجين DRB1 في الاغنام.

من خلال متابعتنا للنتائج في الجدول (2) تتضح معنوية ($P\leq0.05$) تأثير جين DRB1 في نسبة الدهن في الحليب، إذ بلغت النسبة أقصاها (6.83± 0.57%) في حليب الامهات ذات المظهر الوراثي B في حين كانت ادناها (6.46 ± 0.99%) في مثيلاتها ذات المظهر الوراثي A، وهذا يتوافق مع ما توصلت اليه بعض الدراسات [7 و 12]، ولوحظ وجود ارتباط وراثي بين التباين الوراثي لبروتينات β–lactoglobulin ومحتوى الحليب من البروتين والدهن في اغنام العواسيه واغنام الموركرمان Morkaraman ولم توجد اي علاقة مع مكونات الحليب الصلبة وحموضة وتخثر الحليب [4]. ان نسبة الدهن واحدة من اهم صفات التركيبية للحليب التي تحدد جودة الحليب وسعره ونوع المنتج الذي يصنع منه وبالتالي فأن اعتماد التعبير الجيني في تحسين هذه الصفة يبدوا مجديا من خلال نتائج هذه الدراسة، وخصوصا فقد لوحظ ان وجود بعض الاليلات في جينوم الحيوان يمكن ان يؤثر سلباً على نسبة دهن الحليب فهناك اليلات تزيد واخرى تقلل من النسبة وايضا تؤثر على مكونات الحليب وصحة الضرع.

جدول (2) علاقة المظاهر الوراثية (Polymorphism) لجين DRB1 في مكونات الحليب لدى العواسي التركي.

المظهر الوراثي (Polymorphism)	العدد	المتوسط ± الخطأ القياسي			
		نسبة البروتين (%)	نسبة الدهن (%)	نسبة اللاكتوز (%)	نسبة المواد الصلبة غير الدهنية (%)
A	9	0.05 ± 3.57 A	0.99±6.46 A	a 0.09 ±5.37	0.15 ± 9.62 a
B	17	0.03 ±3.65 a	0.57±6.83 B	0.09 ±5.54 a	a 0.10 ±9.89
C	14	0.05 ±3.67 A	0.42±6.52 A	a 0.08 ±5.46	a 0.16± 9.96
مستوى المعنوية	العدد الكلي40	Ns	*	ns	Ns

المتوسطات التي تحمل حروف مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنويا فيما بينها.

*** (P≤0.05)، ns: غير معنوي.**

المصادر

1-Ballingall KT, Fardoe K, McKeever D.J. 2008. Genomic organisation and allelic diversity within coding and non-coding regions of the Ovar-DRB1 locus. Immunogenetics . 60: 95–103**.**

2- Boichard, D. Grohs, C. Bourgeois, F. Cerqueira, F. Faugeras, R. Neau, A. Rupp, R. Amigues, M. Boscher, Y. Levéziel, H.2003. Detection of genes in sequencing economic traits in three French dairy cattle breeds. Genet. Sel. Evol., 35, 77101.

3- Buitkamp, J., Filmether, P., & Stear, M. J. 1996. Class I and Class II Major Histocompatibility Complex Alleles Are Associated with Faecal Egg Counts Following Natural, Predominantly Ostertagia Circumcincta Infection. Parasitol. Res. 82 (8): 693-6.

4- Celuk, Ş. & Zdemur, S. 2006. β-Lactoglobulin variants in Awassi and Morkaraman sheep and their association with the composition and rennet clotting time of the milk.Turk. J. Vet. Anim. Sci., Vol. 30, pp. 539-544.

5- Corrala, J.M. Padillab, J.A. & Izquierdo, M.2010. Associations between milk protein genetic polymorphisms and milk production traits in Merino sheep breed. Livestock Science Volume 129, Issues 1–3. 73–79.

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

7- Gras, M. A., Pistol, G. C., Pelmus, R. S., Lazar, C., Grosu, H. & Ghita, E. 2016. Relationship between gene polymorphism and milk production traits in Telegram Black Head sheep breed. Revista MVZ Córdoba . jan-apr2016, Vol. 21 Issue 1, p5124-5136. 13p.

8- Herrmann-Hoesing, L. M., White, S. N., Mousel, M. R., Lewis, G. S., & Knowles, D. P. 2008. Ovine Progressive Pneumonia Provirus Levels Associate with Breed and Ovar-DRB1. Immunogenetics 60: 749-58.

9- Klein J, Sato A & O'hUigin C.1998 . Evolution by gene duplication in the major histocompatibility complex. Cytogenet. Cell Genet. 80: 123-127**.**

10-Konnai, S., Nagaoka Y., Takeshima S., Onuma M., Aida Y. 2003. Sequences and diversity of 17 new Ovar-DRB1 alleles from three breeds of sheep, Eur. J. Immunogenet. 30: 275–282.

11- Mroczkowski, S. Korman, K. Erhard, G. Piwczyński, D. & Borys, B. 2004. Sheep milk protein polymorphism and its effect on milk performance of Polish Merino. Arch. Tierz‹.Vol. 47, pp. 114-121.

12- Naqvi, A. N. 2007. Application of Molecular Genetic Technologies in Livestock Production: Potentials for Developing Countries. Adv. Biol. Res., 13-47284.

13- Petrovic ,M.P. Mekic, C., Dragana, R. & Zujovic, M. 2005.Genetics principles relating to improvement of milk yield in sheep and goats.biotechnology in animal husbandry.21(5-6),p:73-78.

14- **Sambrook, J. Maniatis, T. & Fritsch, E.F.1989.** Molecular cloning: A labrotrayManual.cold spring harbor labrotray press, Cold Spring Harbor, N.Y.

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

16- Scott, P. C. Maddox, J. F. Gogolin-Ewens, K. J. & Brandon, M. R. 1991. "The nucleotide sequence and evolution of ovine MHC class II B genes: DQB and DRB," Immunogenetics, vol. 34, no. 2, pp. 80–87**.**

17- Teneva, A. E. Todorovska, N. Tyufekchiev, A. Stella, P.Boettcher, I. Dimitrova. 2007. Molecular characterization of Bulgarian livestock genetic resources. II. Microsate llite variation within and among Bulgarian cattle breeds. Biotechnology in Animal Husbandry, 23, 5-6, 227-242.

18- Teneva, A.E., Dimitrova, I., Georgiev, G., Polihronoval, G. & Ivanova, K. 2009. Molecular characterization of Bulgarian livestock genetic resources and their optimized utilization for animal production. FAO/IAEA International Symposium on Sustainable Improvement of animal Production and Health, 8-11 June 2009, Vienna, Austria, Synopses -126-127.