التنوع الوراثي لأغنام العواس السورية في محطة بحوث ازرع (أكساد) باستخدام تقنية ISSR

Genetic Variation of Awas Sheep In Izraa Research Station (ACSAD) Using ISSR Technique

د. سلام لاوند[1] د. علي أبو عفيفة[1] م. غادة سلام[1] د. عدنان الأسعد[1]

د. عبد المنعم الياسين[1] د. المعتصم بالله الدقر[2] د. شهيناز عباس[2] م. طوني سلوم[2]

Dr. S. Lawand[1] Dr. A.A.Afifeh[1] Eng. G. Salam[1] Dr. A. Al-assad[1]

Dr. A.ul. Al- Yasin[1] Dr. A. B. Aldaker[2] Dr. S. Abbas[2] Eng. T. Slloom[2]

salamlawand@yahoo.com or eng.adnan.2010@gmail.com or ali-abuafifeh123@hotmail.com

tonysloomofficial@gmail.com or shahinaz_a@gotmail.com or ghagasalam.g@gmail.com or sams-22@windowslive.com

(1) المركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة/ أكساد، دمشق، سورية.

(1) The Arab Center for the Studies of Arid Zones and Dry Lands (ACSAD).

(2) الهيئة العاملة للبحوث العلمية الزراعية، دمشق، سورية.

(2) General Commission for Scientific Agricultural Researchers (GCSAR), Damascusm, syria.

الملخص

نفذت الدراسة خلال الفترة 2018-2020 في مخبر البيولوجيا الجزيئية التابع لقسم التقانات الحيوية والمخابر في منظمة المركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة (أكساد) في الصبورة، بهدف دراسة التنوع الوراثي بين أغنام العواس السورية باستخدام تقنية ISSR. استخدم لهذا الغرض 50 بادئةً، أثبتت 23 منها فعّاليتها في إعطاء تعددية شكلية بين العينات المدروسة، ونجم عن استعمالها 118 حزمةً، تراوح عدد الحزم لكل بادئة بين حزمتين كأقل عدد مع البادئة (P3)، و8 حزم كأعلى عدد مع البادئة (P37)، بمتوسط بلغ 5.13 حزمة لكل بادئة. وكانت النسبة المئوية للتعددية الشكلية 100 % مع جميع البادئات المدروسة. وتراوحت قيم معامل التعددية الشكلية (PIC) من 0.97 عند البادئة (P4) كأعلى قيمة، إلى 0.16 عند البادئة P40 كأقل قيمة، وبلغ المتوسط العام 0.505.

سجلت أعلى قيمة عند النعاج لمصفوفة النسب المئوية للتوافق PAV (86 %) بين العينتين 43 و44، بينما بلغت أقل قيمة للتوافق 11 % بين العينتين 34 و38، أما عند الكباش فقد بلغت أعلى قيمة للمصفوفة 63 % بين العينتين 64 و65، بينما كانت أقل قيمة للتوافق هي 17 % بين العينتين 61 و67. وعند تحليل النتائج الكلية للنعاج والكباش معاً تبين أن أعلى قيمة للتوافق بلغت 68 % بين العينتين 43 و44، في حين بلغت القيمة الأدنى للتوافق 0.09 % بين العينتين 38 و63. كما استطاعت شجرة القرابة الوراثية الناتجة عن تقنية ISSR فصل الكباش عن النعاج.

الكلمات المفتاحيّة: الأغنام العواس، التنوع الوراثي، ISSR.

©2021 The Arab Center for the Studies of Arid Zones and Dry Lands, All rights reserved.

ISSN:2305 - 5243 ; AIF-023 (p:80 -91)

Abstract

The present study was conducted in Molecular Biology Lab - ACSAD, Damascus - Syria, and were studded molecular variation among Syrian Awas Sheep using ISSR technique.

In this study used 50 primers, 23 primers were succeeded to give amplification in studded samples, it gave in total 118 bands, between 2 bands minimum in primer (P3) and 8 bands maximum in primer (P37), on average 5.13 band each primer. The percentage of polymorphism were 100% in all used primers. The polymorphism Information Content (PIC) was between 0.97 in primer (P4) as maximum value, 0.16 in primer (P40) as minimum value, and 0.505 in average.

The genetic similarity among female genotypes ranged from 0.68 between samples 43 and 44 to 0.11 between samples 34 and 38. On another hand the genetic similarity among male genotypes ranged from 63% between samples 64 and 65 to 0.17 between samples 61 and 67. In otherwise the total analysis among all studded samples showed genetic similarity range from 68% between samples 43 and 44 to 0.09 between samples 38 and 63.

The cluster analysis using ISSR technique was succeed to separate female and male samples.

Keywords: Awas sheep, Genetic variation, Inter Simple Sequence Repeats (ISSR).

المقدمة

تعد الثروة الحيوانية في الجمهورية العربية السورية إحدى الدعامات الأساسية للاقتصاد الوطني، إذ يشكل اسهام الإنتاج الحيواني نحو 37 % من مجموع واردات القطاع الزراعي، فضلاً عن كونها المصدر الرئيس للبروتين الحيواني، والذي يُعد ما يستهلكه الفرد منه أحد المعايير لقياس مدى تطور ذلك المجتمع، واعتنائه بتغذيته دليلاً على تقدمه ووعيه (طه، 2017). وهناك اهتمام متزايد لتنمية هذه الثروة، وضرورة النهوض بها، لغرض زيادة إنتاجها وتطويرها باستخدام التقانات الحديثة لتحسين ورفع كفاءتها الإنتاجية، واعتماد البحث العلمي للوصول للغاية المنشودة.

تعد الأغنام من أهم أنواع الثروة الحيوانية في الجمهورية العربية السورية، وتنتمي إلى سلالة واحدة هي سلالة أغنام العواس الشهيرة واسعة الانتشار، وذات الصوف الخشن، والتي تتميز بقدرتها على تحمل الحرارة والجفاف والترحال الطويل. تعد أغنام العواس Awassi sheep إحدى أهم سلالات الأغنام المستأنسة *Ovis aries* التي تنتمي إلى تحت عائلة الأغنام والماعز *Caprinea*، وعائلة الماشية ذات القرون *Cavicornia* وتحت رتبة المجترات *Ruminanta* ولرتبة ثنائية الظلف *Artiodactyla*، والعواس باللغة العربية هو اسم لقبيلة عربية عاشت بين نهري دجلة والفرات وأخذ عنها اسم سلالة أغنام العواس (الطباع، 1997).

وتمتلك هذه السلالة طاقات وراثية جيدة للإنتاج تحت الظروف البيئية القاسية المميزة لمناطق انتشارها، إذ تتحمل درجات الحرارة العالية والمنخفضة، وإن تحمل هذه الظروف مع إنتاج حليب بكفاءة جيدة جعل من أغنام العواس الأفضل لهذه البيئة. تربى معظم أغنام العواس في المنطقة بالطرائق التقليدية (نظام الرعاية السرحي)، كما هو الحال في مناطق البادية السورية، إلا أن قسماً منها يربى في المناطق الهامشية بإتباع نظام الرعاية شبة المكثف، إذ تستفيد من المراعي الطبيعية في البادية لفترة معينة من السنة، وبعدها تتنقل لتتغذى على المحاصيل الزراعية ومخلفاتها في المناطق الزراعية، وهناك أيضاً نسبة محدودة من الأغنام تربى تحت نظام الرعاية المكثفة (المجموعة الإحصائية الزراعية السنوية، 2018).

تتميز أغنام العواس بوجود الإلية Fat tail والرأس الطويل الضيق، والأذن المتدلية التي يبلغ طولها من 13 - 16 سم، وعرضها من 8 - 10 سم، وللذكور على الأغلب قرون مفتولة ذات أخاديد مثلثية بأشكال واتجاهات متنوعة، ويتراوح طولها ما بين 35 - 60 سم، ونادراً ما تكون بغير قرون. أما الإلية فهي قصيرة على الأغلب تصل إلى نقطة اتصال الفخذ بالساق، والضرع في النعاج شديد التنوع بالشكل والحجم، والحلمات مختلفة الأحجام والاتجاهات والتموضع على الضرع. وتمتلك أغنام العواس جسماً نشيطاً قوياً متوسط الحجم تختلف أبعاده باختلاف الجنس والعمر.

إنَ الدراسة على أغنام العواس في سورية ما زالت تنحصر في عمليات التربية التقليدية المعتمدة على الصفات الإنتاجية والتوصيف الشكلي كمقارنات شكلية بين أغنام العواس ذات الرأس الأشقر والأسود (النجرس، 2000)، أو دراسة العوامل التي تؤثر في الصفات الإنتاجية والكفاءة الإخصابية تحت ظروف مختلفة كظروف التربية السرحية (الحمود، 2002)، وظروف استخدام التلقيح الطبيعي والصناعي (العاصي، 1999)، أو التقييم الوراثي لبعض الصفات الإنتاجية بالاعتماد على النمط الشكلي (العباس، 2009)، ودراسة الارتباطات بين النمط الظاهري والنمط الوراثي، وحساب معامل القيمة التوريثية Heritability للصفات المختلفة، لذلك تعد أغنام العواس السورية مادة خام لدراسة التنوع الوراثي ومعرفة القرابة الوراثية بين أفراد هذه السلالة المهمة عالمياً.

وبناء عليه ستكون هذه الدراسة هي اللبنة الأساس لدراسات وراثية مهمة مستقبلاً من أجل تحديد المورثات الفريدة الموجودة في أغنام العواس السورية، ووضع استراتيجيات لتطوير استخدامها في أنظمة الإدارة والإنتاج والتسويق. كما أنها ستسهم في تجميع كل المعلومات الوراثية التي يمكن استغلالها في العمليات التربوية، وذلك بمعرفة المخزون الوراثي قبل البدء بالعملية التربوية، يضاف إليها إمكانية متابعة الصفات المهمة، والوصول مستقبلاً إلى مؤشرات وراثية يمكنها أن تسهم في تحسين الصفات الإنتاجية المهمة.

تقدم المؤشرات الجزيئية معلومات مفيدةً عن تركيب الجماعة وعلاقات القرابة بالإضافة إلى التحقق من الأنساب (Feral، 2002) وتساعد على تطبيق الانتخاب (Bünger، 2008) من خلال مقدرتها على توصيف مواقع الصفات الكمية المرتبطة بالمؤشر Quantitative Trait Loci (QTL)، كما أنها تسمح بدراسة التكوين الوراثي للأفراد على مستوى الـ DNA (Naqvi، 2007)، وتقدم معلومات عن تنوع القرائن لموقع وراثي معين، وبالتالي تحدد التنوع الوراثي، وتكشف عن المورثات التي تؤثر في الصفات المهمة اقتصادياً (Weimann وErhardt، 2007)، يضاف إلى ذلك أهميتها في تحديد مواقع الصفات الكمية Quantitative trait Loci (Simianer، 2005)، ورسم خرائط الارتباط الوراثية (Diez-Tascon وزملاؤه، 2000؛ Moazami-Goudarzi وزملاؤه، 1997).

من أهم التقانات المتبعة في هذا المجال هي تقنية RSSI (Repeats Sequence Simple Inter) تكرارات التسلسل البسيط الداخلي. وتعتمد هذه التقنية على تضخيم المواقع (100 - 3000 bp) بين التوابع الدقيقة المتقاربة Microsatellites، والمتوضعة بشكل متعاكس، باستعمال بادئات وحيدة طولها (18 - 24 bp)، ومؤلفة من نيكليوتيدات متكررة، ومحاطة في أغلب الأحيان بـ 2 - 4 نيكليوتيدات إمّا في المنطقة 5 أو 3، وعادةً ما يكون عدد الحزم المنتجة مرتبطاً بشكل عكسي مع عدد النيكليوتيدات في البادئ (Godwin وزملاؤه، 1997).

إن الفائدة الرئيسة لهذه التقنية هي أنّها لا تتطلب وقتاً طويلاً لبناء المكتبة الوراثية، وعلى الرغم من حقيقة أنّ ISSR تورث كمعلمات سائدة وأحياناً غير سائدة، إلّا أنّها معلمات ذات طبيعة عشوائية، فهي مناسبة بشكلٍ خاص لدراسات علم الوراثة العرقي، وتقييم التنوع الوراثي، وتحديد الأصناف، كما أن بساطة معلمات ISSR تزيد من إمكانية استعمالها في الوسم المجيني (Gupta وزملاؤه، 1994).

توصف تقنية ISSR بأن نتائجها أكثر ثباتية عند تكرار التجربة من تقنية RAPD بسبب طول البادئ المستعمل، كما تتميز بوفرتها، ولا تحتاج إلى معلومات عن التسلسل المجيني المدروس، كما أنّها تتطلب كمية قليلة من الحمض النووي DNA، ويمكن أتمتتها Automation، إذ يمكن نشر البادئات وتبادلها بسهولة بين المخابر بمجرد معرفة التسلسل النيكليوتيدي لها. وتكشف نسب متوسطة من التعددية الشكلية Polymorphism، واستخدمت لدراسة التنوع الوراثي في أغلب الكائنات الحية حقيقة النوى (Zietkiewicz وزملاؤه، 1994).

بين Zamani وزملاؤه (2011) أثناء دراسة التنوع الوراثي عند الأغنام الإيرانية باستخدام بادئتين من بادئات ISSR على 210 حيوانات، إذ ضخمت البادئتان (AG)9C و(GA)9C 28 و36 حزمة على التوالي، وتراوحت أطوالها بين 100- 3100 bp، وبلغت النسبة المئوية للتعددية الشكلية 77 %.

قام Abadi Mohammad وزملاؤه (2017) عند دراسة التنوع الوراثي للأغنام باستخدام تقنية ISSR على 100 حيوان من 5 مجموعات، وطبق الـ PCR باستخدام بادئتين (GA)9C و(AG)9C)، وكانت طول القطع الناتجة بين 100- 3100 bp ، وكان معامل التنوع Wie بين 0.57 و0.55 للبادئتين (GA)9C و(AG)9C على التوالي، في حين كان معامل Shannon's مع البادئة (AG)9C 0.91 أعلى من البادئة (AG)9C 0.89، وهذا يدل على تنوع وراثي كبير.

قام Askavi وزملاؤه (2011) بدراسة على الأغنام والماعز والماشية، وذلك باستخدام تقنية ISSR على 275 حيوان، إذ كان معامل التعددية الشكلية PIC والتنوع الوراثي أعلى عند الأغنام.

قام Nesteruk وزملاؤه (2016) بدراسة التنوع الوراثي باستخدام تقنية ISSR على أغنام بين 9 مجموعات تربية، ووجدوا أن التنوع الوراثي داخل المجموعة الواحدة 15.8 وكان التنوع الوراثي بين المجموعات بشكل عام 31.4 %. وبين الأفراد 52.8 بشكل عام.

بين Robles- Přez وزملاؤه (2014) أثناء دراسة التنوع الوراثي لأغنام وماشية مجموعة من إسبانيا وبريطانيا وإيرلندا والمكسيك باستخدام تقنية ISSR حيث استخدم 25 بادئة من بادئات ISSR، وحصل على 39 حزمة وبنسبة مئوية للتعددية الشكية بلغت 71.79 %.

أشار Bekmanov وزملاؤه (2015) عند دراسة التنوع الوراثي لدى الأغنام باستخدام تقنية ISSR على 140 حيواناً اختيرت لهذه الدراسة. تم العمل على بادئتين من بادئات ISSR وهي (GA)9C و(AG)9C، إذ أعطى البادئ (GA)9C 20 قطعة من الـ DNA تراوح طولها بين 220 - 1520 bp، في حين أعطى البادئ (AG)9C 19 قطعة DNA تراوح طولها بين 47 bp و1935 bp.

هدف البحث

يتجلى الهدف الرئيس لهذا البحث في استخدام تقنية ISSR من أجل تحديد درجة القرابة الوراثية بين أغنام العواس، والاستفادة من هذا التنوع لوضع قاعدة بيانات وراثية يعتمد عليها في برامج التحسين الوراثي لهذا الحيوان الاستراتيجي في المنطقة.

مواد البحث وطرائقه

مكان وزمان تنفيذ البحث:

نفذت الدراسة بين عامي 2018 - 2020 في مخبر التقانات الحيوية التابع لقسم التقانات الحيوية والمخابر في منظمة المركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة/ أكساد (دمشق - سورية).

المادة الوراثية:

تم الحصول على عينات الدم من أغنام العواس النقي (غير الخليط) من محطة بحوث إزرع التابعة لمنظمة المركز العربي (أكساد) في محافظة درعا ذات سجلات موثّقة. إذ تم الحصول على 18 عينة دم من أغنام العواس الخالي من الأمراض بواقع 3 مكررات لكل حيوان، منها 11 عينة من النعاج رُمزت كما يلي (45-44-43-42-40-39-38-37-35-34-33) و7 عينات من الكباش رُمزت كما يلي (61-62-63-64-65-66-67)، إذ تم سحب عينة الدم من الوريد الوداجي ضمن أنابيب مفرغة تحوي مانع تخثر anti-coagulant EDTA (Ethylenediaminetetra-acetic acid) مع مراعاة أنه لا يوجد أي علاقة قرابة بين هذه الأغنام، وذلك بالاعتماد على سجلات النسب الموثقة في المحطة المذكورة لضمان الحصول على التنوع الوراثي.

وتم استخلاص الحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين DNA وذلك باستخدام كيت الاستخلاص: G- Spin -Total DNA (Blood) Extraction Kit من شركة Intron كالآتي: يؤخذ 1.5 µl من عينة الدم في أنبوب ابندروف، يضاف اليها 20 µl بروتيناز k و5 µl RNAs وتمزج بالرج بوساطة (Vortex)، يضاف 200 µl من المحلول BL ويمزج بلطف، ويترك بحرارة الغرفة لمدة دقيقتين، تنقل الأنابيب إلى الحمام المائي لمدة عشرة دقائق مع التحريك عدة مرات، يضاف 200 µl من ايثانول، وتمزج بوساطة الرج Vortex، ينقل المحلول إلى أنبوب الفلترة، يضاف 700 µl من المحلول WB إلى الأنبوب، ويثقل على 13000 rpm لمدة 1 دقيقة، ثم يستبعد المحلول والقسم السفلي، وتترك الأنابيب لتجف من الكحول، ثم يضاف 100 µl من محلول CE تترك لمدة دقيقة في درجة حرارة الغرفة وتحفظ بدرجة حرارة -20 °م لحين الاستخدام.

ولتقدير كمية ونوعية الحمض النووي منقوص الأوكسجين DNA في العينات بشكل دقيق تم استخدام جهاز النانودروب -Nanodrop Spectrophotometer Thermo C2000 الذي يعتمد في عمله على قياس كمية الحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين المستخلصة عن طريق امتصاصها للأشعة فوق البنفسجية Ultra Violet.

تم تمديد محاليل الحمض النووي الريبي المستخلص DNA للوصول إلى تركيز 40 ng/µl.

2-3 تطبيق تقنية ISSR:

استخدمت 50 بادئة من بادئات الـ ISSR، ويبين الجدول 1 البادئات المستخدمة وتسلسلها النيكليوتيدي.

الجدول 1. البادئات المستخدمة في تقنية ISSR وتسلسلها النيكلوتيدي، ودرجة حرارة الإلتحام.

درجة حرارة الإلتحام C°	التسلسل النيكلوتيدي للبادئة	اسم البادئة	درجة حرارة الالتحام C°	التسلسل النيكلوتيدي للبادئة	اسم البادئة
61.4	(GACAC)4	**P23**	50.4	(TC)8A	**P1**
51.4	(AG)8TT	**P24**	52.8	(GT)8C	**P2**
54.5	(AC)9T	**P25**	49.2	(GACA)4	**P3**
54.5	(CA)9T	**P26**	53.7	(AC)8TC	**P4**
56.0	(AC)8GG	**P27**	56.0	CCAG(GT)7	**P5**
56.0	CCAG(GT)7	**P28**	53.7	(TC)8AG	**P6**
53.7	(GT)4(GA)5	**P29**	53.7	(TC)8GA	**P7**
51.1	(AC)7(AT)3	**P30**	56.0	(GA)8CG	**P8**
52.8	(CT)8G	**P31**	50.4	(AC)8T	**P9**
44.0	(GGAC)3T	**P32**	50.4	(CA)8A	**P10**
52.8	(AC)8C	**P33**	49.2	(AACC)4	**P11**
44.0	(GA)6CC	**P34**	54.8	GA(8)YC	**P12**
42.0	(GA)7	**P35**	44.0	(GGAC)3A	**P13**
54.5	(CT)8CAT	**P36**	42.0	(GGAC)4	**P14**
46.9	(GAA)6	**P37**	52.8	(AC)8C	**P15**
49.2	(ACTG)4	**P38**	38.9	(GATA)4	**P16**
52.8	(TC)8G	**P39**	46.9	(ATG)6	**P17**
52.8	G(TC)8	**P40**	50.4	(AG)8T	**P18**
52.8	(GA)8C	**P41**	52.8	(CA)8G	**P19**
54.8	CT(8)RG	**P42**	46.0	(GGAC)3C	**P20**
52.5	AG(8)YT	**P43**	56.7	AG(8)CTG	**P21**
59.4	(GA)9GC	**P44**	56.7	(AG)9C	**P22**
56	(AG)9GG	**A2**	56.7	(GA)9C	**A1**
56.7	CAG(CA)8	**A4**	56	(CA)8GC	**A3**
46	(AGC)4GT	**A6**	42.0	(ACG)4T	**A5**

وتمَ تحضير المزيج لتضخيم قطع DNA في محلول نهائي 25 µl، المكون من: Master mix 12.5 µl من شركة INTRON 2X PCR Master Mix Solution، 2 µl من البادئ بتركيز 10 بيكومول، و 2 µl من المادة الوراثية DNA بتركيز 40 ng/ µl، وتم إكمال الحجم بالماء المقطر والمعقم.

تم تضخيم DNA في جهاز التدوير الحراري PCR من شركة Eppendorf وفق البرنامج الآتي:

1 - الانفصال: عند درجة حرارة 94ْم، مدّة 5 دقائق ليتم انفصال سلسلتي الـحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين (DNA).

2 - عمل 40 دورة تتضمن كل منها المراحل الآتية:

- مرحلة التمسخ Denaturation: تمّ في هذه المرحلة رفع درجة الحرارة حتى 94ْم ليتم انفصال سلسلتي الحمض النووي (DNA) عن بعضهما البعض، لتُصبحا في حالة سلسلة مفردة.

- مرحلة الالتحام Annealing: تمّ خفض درجة الحرارة إلى درجة تتراوح بين 38.9 - 61.4 مْ، وذلك تبعاً لطول البادئة، وعدد النيكليوتيدات المكونة لها، ليتم التحام البادئة بالقطعة المكملة لها من الـحمض النووي الريبي منقوص الاوكسجين الريبي منقوص الاوكسجين (DNA)، وتُعد هذه المرحلة الأهم خلال التفاعل لكي تتم مضاعفة سلسلة (DNA) بشكلٍ صحيح.

- مرحلة الاستطالة Extension: تمّ رفع درجة الحرارة لتصل إلى 72°م، ليتم إكمال تكوين السلاسل الجديدة بوجود أنزيم *Taq-Polymerase*، والنيكليوزيدات ثلاثية الفوسفات، وبعد انتهاء هذا التفاعل تمّ الحصول على عدد كبير من سلاسل الحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين DNA بدءاً من قطعة واحدة.

3 - اكتمال التفاعل عند حرارة 72°م لمدّة عشر دقائق.

ثمّ حُفظت العينات عند درجة حرارة 4°م، لتفصل الحزم بعدها بالترحيل على هلامة الآغاروز.

الرحلان الكهربائي والتصوير:

تم الترحيل على هلامة الآغاروز 2 % المكونة من المحلول الموقي TBE buffer 1X:

(10.8g Tris borate +g5.5 Boric acid + 0.92g EDTA) ويُضبط درجة الحموضة عند pH=8، ثم يُضاف اليه صبغة الإيثيديوم برومايد (10 ميكروغرام/ميكروليتر) بنسبة 5µl/100ml.

كما تم حقن مؤشر Marker من الحمض النووي 100pb (DNA) من شركة (Intron)، لتحديد أطوال الحزم الناتجة، ليتم بعد ذلك الترحيل بوساطة حقل كهربائي قدره 80 فولط، لفصل حزم DNA الناتجة عن عملية التضخيم، وصُورت الهلامة بجهاز تصوير هلامة الآغاروز Image Analyze (Agle Eye II staratagene) (Serwer، 1983).

التحليل الإحصائي:

أُستخدمت في الدراسة الوراثية البرامج الإحصائية الخاصة بالمعلوماتية الحيوية Bioinformatics لتحليل النتائج، فجُمعت نتائج عملية الرحلان الكهربائي في جداول مخصصة، اعتماداً على مقارنة وجود أو غياب حزم الحمض النووي الريبي منقوص الاوكسجين DNA بين العينات، إذ أُعطي الرقم (1) عند وجود حزمة DNA، والرقم (0) عند غيابها، ونُظِّمت الجداول لكل بادئة على حده. حُدِّدت مصفوفة درجة القرابة الوراثية بين العينات المدروسة Percent agreement Values (PAV)، ورُسمت شجرة القرابة الوراثية Dendrogram بتطبيق طريقة التحليل العنقودي Cluster analysis، باستخدام برنامج الإحصائي Ntsys حسب Rohll(a 1998)، كما حددت المجموعات، الزوجية غير المزانة Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averaging (UPGMA) Rohll(a,b 1998)، إذ يسمح التحليل العنقودي بتقسيم العينات المدروسة إلى مجموعات تعكس درجة القرابة الوراثية فيما بينها، فمن الممكن أن تتجمع العينات ضمن مجموعة واحدة بناءً على موطنها الأصلي، أو بناءً على أصلها ونسبها، وحُسبت قيم معامل التعددية الشكلية Polymorphisms Information Content (PIC) للبادئات المستخدمة وفق المعادلة:

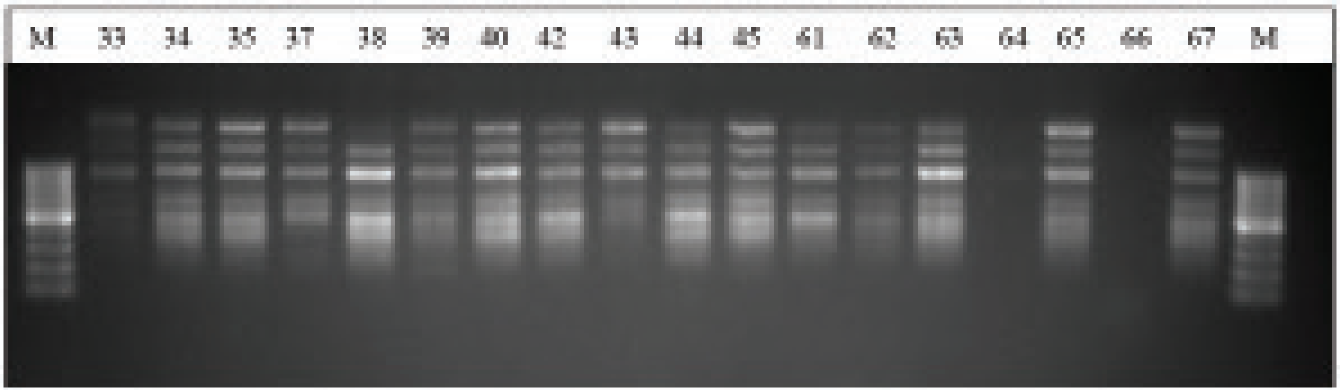
$$PIC = \{\Sigma\ 2Pi\ (1\text{-}Pi)\}$$

حيث Pi تكرارية الحزم ith الناتجة عن استخدام البادئ من جميع العينات المدروسة (Botstein وزملاؤه، 1980).

النتائج والمناقشة

1- التعددية الشكلية الناتجة عن تطبيق تقنية ISSR في عينات العواس:

تضمنت الدراسة اختبار 50 بادئة، لم تعط 27 بادئة منها نتائج تضخيم، في حين أثبتت 23 بادئة منها فعاليتها في إعطاء تعددية شكلية بين العينات المدروسة وذلك بوساطة التفاعل التسلسلي للبوليميراز، ونجم عن استخدام هذه البادئات ما مجموعه 118 حزمة، تراوح عدد الحزم لكل بادئة من 2 حزم كأقل عدد مع البادئة (P3)، و8 حزم كأعلى عدد مع البادئة (P37)، بمتوسط بلغ 5.13 حزمة لكل بادئة، وكانت النسبة المئوية للتعددية الشكلية 100 % مع جميع البادئات المدروسة (الجدول 2)، ويوضح الشكل 1 شكل هلامة الأغاروز للبادئة (42) على العينات المدروسة.



الشكل 1. صورة هلامة الآغاروز 2 % تبين التعددية الشكلية الناتجة عن استخدام البادئة (42) في العينات المدروسة من أغنام العواس، M يمثل المؤشر لتحديد أطوال حزم الحمض النووي DNA.

تخالفت هذه النتائج مع ما توصل إليه Zamani وزملاؤه (2011) من حيث عدد البادئات والتي بلغت إثنتان والنسبة المئوية للتعددية الشكلية، إذ بلغت 77 % على الأغنام الإيرانية، وتخالفت النتائج أيضاً مع Robles- Ṕrez وزملاؤه (2014) من حيث عدد البادئات (25 بادئة)، والنسبة المئوية للتعددية الشكلية، إذ بلغت 71.79 % وعدد الحزم الكلية، إذ بلغت 39، ويعود ذلك لاختلاف العينات والبادئات.

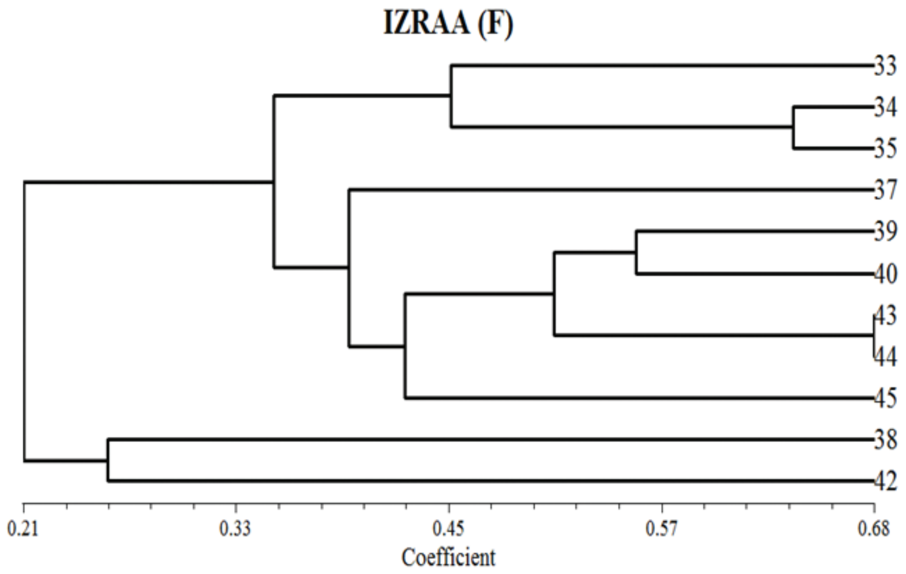
حُسب معامل التعددية الشكلية PIC لكل بادئة على حده، وهو يُعد معياراً يدل على قدرة وكفاءة البادئة في تمييز التباينات الوراثية وإظهارها بين العينات المختلفة، إذ كلما اقتربت قيمة PIC من (1) كانت المقدرة على تمييز التباينات الوراثية وإظهارها أكبر، ويمكن أن يعطي PIC قيمة (0) عندما تُظهر البادئة حزمة وحيدة ثابتة عند العينات كلها، لذلك يمكن عد هذه البادئة غير ذات أهمية في تمييز العينات المدروسة عن بعضها، إذ بلغت أنها لم تُظهر أي تعددية شكلية. وتراوحت قيم معامل التعددية الشكلية (PIC) من 0.97 عند البادئة (P4) كأعلى قيمة، إلى 0.16 عند البادئة P40 كأقل قيمة، وبلغ المتوسط العام 0.505، مما يشير إلى قدرة البادئات المستخدمة على التمييز بين العينات المدروسة (الجدول 2).

الجدول 2. اسم البادئة، وعدد الحزم الكلية، وعدد الحزم المتباينة شكلياً، والنسبة المئوية للتعددية الشكلية، ومعامل التعددية الشكلية PIC.

اسم البادئة	عدد الحزم الكلية	عدد الحزم المتباينة شكلياً	النسبة المئوية للتعددية الشكلية%	PIC
P1	5	5	100	0.69
P2	3	3	100	0.72
P3	2	2	100	0.96
P4	7	7	100	**0.97**
P5	3	3	100	0.83
P11	6	6	100	0.62
P18	5	5	100	0.40
P21	5	5	100	0.80
P23	5	5	100	0.92
P24	7	7	100	0.84
P26	4	4	100	0.24
P27	7	7	100	0.25
P28	4	4	100	0.35
P29	6	6	100	0.18
P31	5	5	100	0.59
P32	4	4	100	0.28
P34	4	4	100	0.58
P36	7	7	100	0.60
P37	8	8	100	0.61
P40	4	4	100	**0.16**
P42	6	6	100	0.52
A5	5	5	100	0.20
A6	6	6	100	0.23
المجموع	118	118	100	11.63
المتوسط	**5.13**	**5.13**	**100**	**0.505**

- التحليل العنقودي Cluster Analysis للعينات المدروسة من نعاج أغنام العواس.

أُجري التحليل العنقودي للنتائج التي تم الحصول عليها وذلك لإنشاء شجرة القرابة الوراثية Dendrogram بين العينات المدروسة، ويلاحظ من الشكل 2 أن العينات المدروسة توزعت في عنقودين رئيسين.



الشكل 2. التحليل العنقودي للعينات المدروسة من أناث أغنام العواس باستخدام تقنية ISSR.

ضم العنقود الأول 33-34-35 – 37-39 -40 -43 -44، وكانت العينتان 43 - 44 قد أعطت أعلى قيمة لمصفوفة النسب المئوية للتوافق PAV (الجدول 3) هي 68 % مما يدل على وجود تقارب بينهما، وبالرجوع إلى المواصفات الشكلية والإنتاجية تبين أن كلا العينتين منخفضة الإنتاجية من الحليب، وذات لون بني غامق، وعديمة القرون، وشكل الإلية عادي، ولها العمر نفسه. تلاه بين العينات (34 - 35) بنسبة 64 %، إذ لوحظ من بيانات الحيوانات المدروسة أن كلا العينتين ذات إنتاجية عالية من الحليب.

في حين ضم العنقود الثاني العينتين 38 - 42 في تحت عنقود مستقل، وبلغت درجة القرابة الوراثية بينهما 26 %، وبالرجوع إلى المواصفات الشكلية والإنتاجية تبين أن هناك اختلاف في اللون، والإنتاجية من الحليب، إذ وُجد أن العينة 38 كانت ذات إنتاجية عالية من الحليب، كما تميزت بصفة ولادة التوائم، وهذه الصفات غابت في العينة 42.

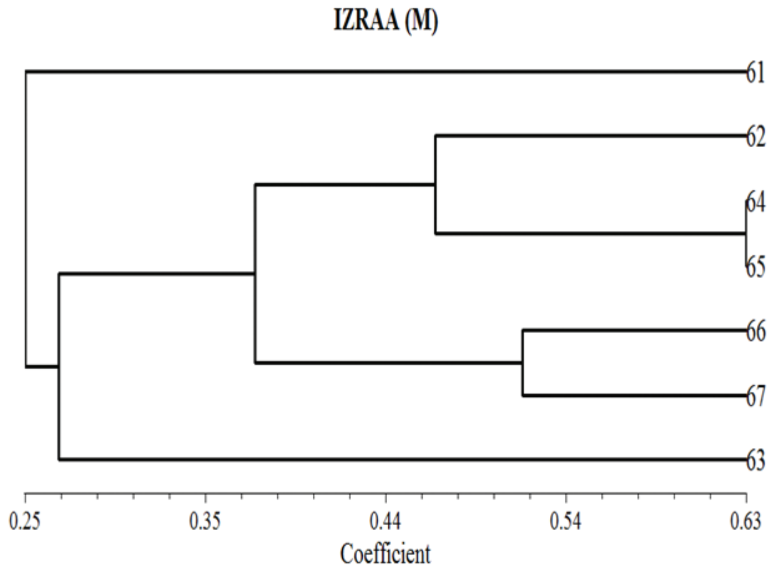
الجدول 3. مصفوفة المتوسط العام لنسب التوافق (PAV) بين العينات المدروسة لإناث أغنام العواس الناتجة عن تطبيق متوسطات المجموعات الزوجية غير المزانة UPGMA بتطبيق تقنية ISSR.

	33	34	35	37	38	39	40	42	43	44	45
33	1.00										
34	0.50	1.00									
35	0.40	0.64	1.00								
37	0.30	0.39	0.42	1.00							
38	0.24	**0.11**	0.13	0.15	1.00						
39	0.42	0.47	0.36	0.43	0.36	1.00					
40	0.26	0.37	0.30	0.36	0.18	0.55	1.00				
42	0.17	0.21	0.17	0.14	0.26	0.13	0.32	1.00			
43	0.49	0.39	0.34	0.49	0.27	0.53	0.45	0.36	1.00		
44	0.32	0.40	0.29	0.39	0.20	0.51	0.53	0.26	**0.68**	1.00	
45	0.25	0.32	0.26	0.29	0.29	0.45	0.39	0.18	0.35	0.50	1.00

بينما كانت أقل قيمة لـ PAV هي 11 % بين العينتين (34-38) مما يدل على وجود تباين وراثي بينهما، وتبين أن سبب الإختلاف يعود الى التباين في عدد المواليد التوائم، رغم أنها عالية الإنتاجية من الحليب، إذ تميزت العينة 38 بإعطاء عدة ولادات توأمية ولعدة مواسم، وغابت هذه الصفة عن العينة 34، وفي هذه الحالة يعتبر المربي العينة 38 ثنائية الغرض (مواليد + حليب)، وهي من الصفات المهمة لدى المربي عند الانتخاب في برامج التربية والتحسين الوراثي.

- التحليل العنقودي cluster analysis للعينات المدروسة من كباش أغنام العواس.

أجري التحليل العنقودي للنتائج التي تم الحصول عليها وذلك لإنشاء شجرة القرابة الوراثية Dendrogram بين العينات المدروسة ويلاحظ من الشكل 3 أن العينات المدروسة توزعت في عنقودين رئيسين.



الشكل 3. التحليل العنقودي للعينات المدروسة من كباش أغنام العواس باستخدام تقنية ISSR.

ضم العنقود الأول العينات (62-63-64-65-66-67)، وكانت العينتان (64 - 65) قد أعطت أعلى قيمة لمصفوفة النسب المئوية للتوافق PAV 63 % بين العينات (الجدول 4)، مما يدل على وجود تقارب بينهما، وبالرجوع إلى المواصفات الشكلية والإنتاجية تبين أن كلا العينتين ذات لون بني غامق، وكلاهما تملكان شكل القرون نفسه، إلا أن الكبش 64 يُستخدم في برامج التربية كأب لإنتاج مواليد ثنائية الغرض (حليب + مواليد) أما الكبش (65) فيُستخدم كأب لإنتاج مواليد عالية الإنتاجية من الحليب.

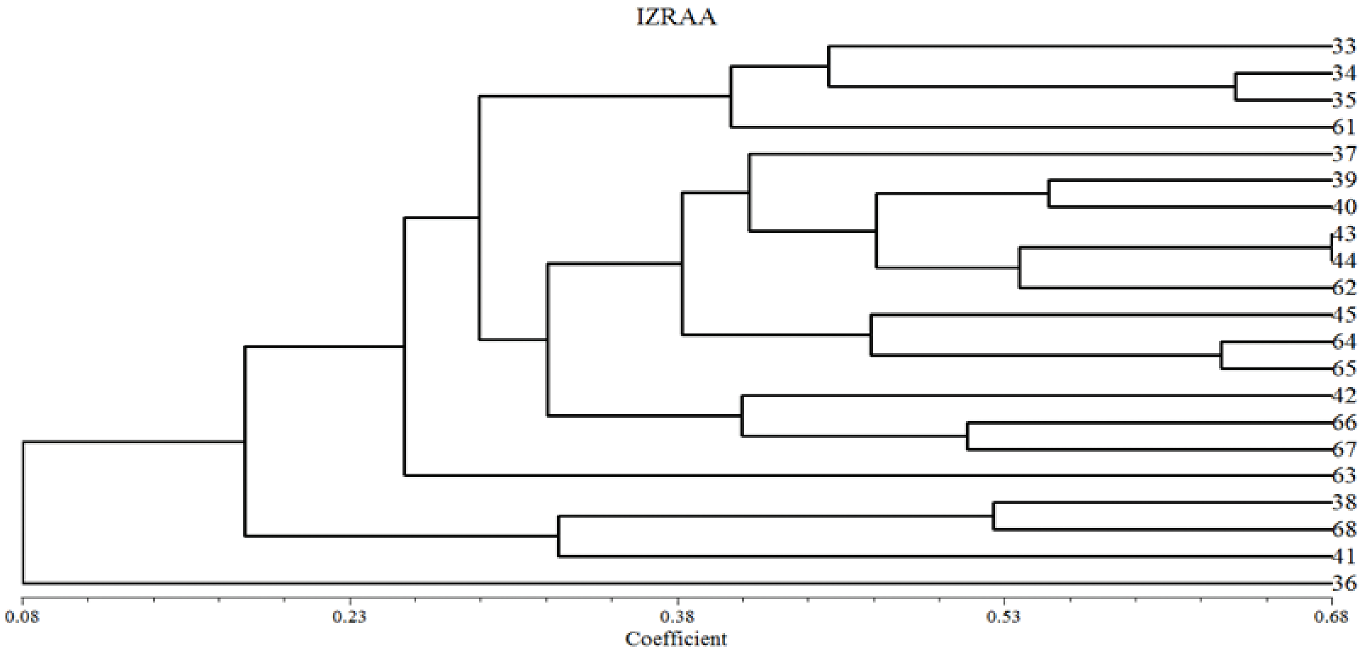
الجدول 4. مصفوفة المتوسط العام لنسب التوافق (PAV) بين العينات المدروسة لكباش أغنام العواس الناتجة عن تطبيق تقنية ISSR.

	61	62	63	64	65	66	67
61	1.00						
62	0.20	1.00					
63	0.22	0.26	1.00				
64	0.30	0.51	0.27	1.00			
65	0.36	0.43	0.24	**0.63**	1.00		
66	0.26	0.41	0.28	0.50	0.36	1.00	
67	0.17	0.32	0.32	0.41	0.24	0.51	1.00

في حين ضم العنقود الثاني الكبش61 في عنقود مستقل، إذ كان الأبعد وراثياً عن العينة 67 بنسبة قرابة وراثية 17 %، ويعود السبب لأنه لا يوجد أي علاقة قرابة بينها من ناحية الأب أو الأم، إلا أنه يستخدم كأب لإنتاج إناث عالية المواليد.

- التحليل العنقودي Cluster Analysis للعينات المدروسة من كباش ونعاج أغنام العواس:

أجري تحليل عنقودي شامل للكباش والنعاج من النتائج التي تم الحصول عليها وذلك لإنشاء شجرة القرابة الوراثية Dendrogram بين العينات المدروسة، ويلاحظ من الشكل 4 أن العينات المدروسة توزعت في عنقودين رئيسين، ضم الأول العينة 38، وانفصلت في عنقود مستقل، في حين ضم العنقود الثاني جميع العينات الأخرى المدروسة.



الشكل 4. التحليل العنقودي للعينات المدروسة من كباش ونعاج أغنام العواس باستخدام تقنية ISSR.

إلا أن شجرة القرابة الوراثية فصلت الكباش عن النعاج في تحت عناقيد باستثناء العينة 61 (كبش)، إذ كانت درجة القرابة الوراثية مع العينات النعاج 33-34-35 (49،29،43%) على التوالي (الجدول 5).

كذلك ظهرت العينة 42 (نعجة) ضمن تحت عنقود الكباش (66،67)، إذ كانت درجة القرابة الوراثية (50 و32 %) على التوالي.

الجدول 5. مصفوفة المتوسط العام لنسب التوافق (PAV) بين العينات المدروسة لنعاج وكباش أغنام العواس

	33	34	35	37	38	39	40	42	43	44	45	61	62	63	64	65	66	67
33	**1.00**																	
34	**0.50**	**1.00**																
35	**0.40**	**0.64**	**1.00**															
37	0.30	0.39	0.42	1.00														
38	0.24	0.11	0.13	0.15	1.00													
39	0.42	0.47	0.36	0.43	0.36	1.00												
40	0.26	0.37	0.30	0.36	0.18	0.55	1.00											
42	0.17	0.21	0.17	0.14	0.26	0.13	0.32	1.00										
43	0.49	0.39	0.34	0.49	0.27	0.53	0.45	0.36	1.00									
44	0.32	0.40	0.29	0.39	0.20	0.51	0.53	0.26	0.68	1.00								
45	0.25	0.32	0.26	0.29	0.29	0.45	0.39	0.18	0.35	0.50	1.00							
61	0.43	0.29	0.49	0.37	0.24	0.21	0.30	0.17	0.31	0.19	0.33	1.00						
62	0.29	0.27	0.13	0.39	0.17	0.37	0.44	0.26	0.47	0.61	0.28	0.20	1.00					
63	0.17	0.26	0.29	0.36	0.09	0.26	0.16	0.15	0.22	0.30	0.31	0.22	0.26	1.00				
64	0.15	0.33	0.31	0.33	0.37	0.35	0.44	0.33	0.37	0.46	0.45	0.30	0.51	0.27	1.00			
65	0.27	0.30	0.33	0.27	0.32	0.36	0.36	0.24	0.32	0.43	0.49	0.36	0.43	0.24	0.63	1.00		
66	0.26	0.38	0.36	0.30	0.18	0.32	0.51	0.50	0.46	0.51	0.36	0.26	0.41	0.28	0.50	0.36	1.00	
67	0.06	0.11	0.24	0.28	0.18	0.17	0.33	0.32	0.26	0.31	0.36	0.17	0.32	0.32	0.41	0.24	0.51	1.00

الاستنتاجات والتوصيات

- استطاعت تقنية ISSR-PCR إظهار التعددية الشكلية والتباينات بين عينات الأغنام، إذ بلغت التعددية الشكلية 100 % باستخدام 23 بادئة من بادئات ISSR.
- استطاعت تقنية ISSR الفصل بين عينات الكباش والنعاج.
- استطاعت تقنية ISSR الربط الوراثي للصفات الشكلية والإنتاجية للعينات المدروسة.

وعليه يوصى بالآتي:

- إجراء دراسات مستفيضة تتناول أعداد من الأغنام في كل مناطق وجوده في سورية.
- إجراء دراسات عن المعادلات والعلاقات الارتباطية بيت الصفات الإنتاجية والشكلية والوراثية في أغنام العواس.
- العمل على تحديد مواقع المورثات المسؤولة عن الصفات المهمة، كالإنتاج للاستفادة منها في برنامج التربية والتحسين الوراثي لاستخدامها آباءً في عمليات التهجين.

المراجع

- الحمود، أسامة يوسف .2002. دراسة بعض العوامل المؤثرة في كمية الحليب والكفاءة الإخصابية لدى أغنام العواسي تحت ظروف التربية السرحية، رسالة ماجستير، كلية الزراعة الثانية، جامعة حلب.
- العاصي، هائل عبد الوهاب .1999. دراسة تأثير بعض العوامل المؤثرة على الكفاءة الإخصابية عند أغنام العواسي تحت ظروف استخدام التلقيح الطبيعي والاصطناعي، رسالة ماجستير، كلية الزراعة الثانية، جامعة حلب.
- العباس، غياث إبراهيم .2009. التقويم الوراثي لبعض الصفات الإنتاجية في قطيع أغنام العواس في محطة بحوث جدرين – حماة، رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة حلب.
- النجرس، غربي. 2000. مقارنة بين أغنام العواس ذات الرأس الأشقر وذات الرأس الأسود في بعض الصفات الإنتاجية والخصائص الوراثية، رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة حلب.
- الطباع، دارم .1997. الإدارة الصحية لقطعان الأغنام ، كتاب أمراض الأغنام، منشورات جامعة البعث، كلية الطب البيطري: 495-485.
- طه، سوسن. 2017. تحليل سلسلة القيمة للحوم الأبقار، المركز الوطني للسياسات الزراعية، وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي، الجمهورية العربية السورية، 74 (2).
- المجموعة الإحصائية الزراعية السنوية .2018.
- Askavi, N., M. Mohammad Abadi., A, Baghizadeh .2011.. ISSR Marker for assessing DNA polymorphism and genetic characterization of cattle, goat and sheep populations. *Iranian journal of Biotechnology*. vol 9, N3.
- Bekmanov,B.O., A. S. Amirgaliva., A. S. Massayeva., N. d. Tulekei., Dosibayer, K. Zh., orasimbetova, Z. S., Khussain ova, E.M., Zhapbusov, R. Zh., Zhonartov, A. M. 2015. Molecule Genetic Analysis of edilbay sheep Breeds series of Biological and medical.vol3.N 309.
- Botstein, D. R. L., White, M. Skolinck, and R.W. Davis. 1980. Constriction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet*., 32: 314- 331.
- Bünger L. 2008. New technologies in sheep breeding from molecular genetic tools to computed tomography and video image analysis, Conference on The Animal Wealth in Syria Current Status and prospects for Future Development,1720- November, Aleppo, Syria.
- Diez-Tascon C., Littlejohn R. P., Almeida P. A. R., Crawford A. M., .2000. Genetic Variation within the Merino sheep breed: analysis of closely related populations using microsatellites, *Animal Genetics,* Vol. (31), pp.243- 251.
- Erhardet G., Weimann C. 2007. Use of molecular markers for evaluation of genetic diversity and in animal production, Arch. Latinoam. *Prod. Anim*, Vol. 15(1), pp:63- 66.

- Feral J. P.2002. How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 268:121- 145.
- Godwin, I.D., Aitken, E.A.B. and Smith, L.W. 1997. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant, *genetics Electrophoresis,* 18: 1524- 1528.
- Gupta, M., Y-S. Chyi, J. Romero-Severson and J.L. Owen. 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theor Appl Genet* 89: 998- 1006.
- Moazami-Goudarzi K., Laloë D., Furet J. P., Grosclaude F. 1997. Analysis of genetic relationships between 10 cattle breeds with 17 microsatellites. *Anim. Genet.* 28:338- 345.
- Mohammadabadi M., Esfandyarpoor E. and Mousapour A.2017. Using Inter Simple Sequence Repeat Multi-Loci Markers for Studying Genetic Diversity in Kermani Sheep *Journal of Research and Development*, 5:2.
- Nagvi A. N. 2007. Application of Molecular Genetic Technologies in Livestock Production: Potentials for Developing Countries, *Advances in Biological Research* ,1(3-4) :72- 84.
- Nesteruk L. V., Makarova N. N., Evsyukov A. N., Svishcheva G. R., Lhasaranov B. B. Stolpovsky Yu. A.2016. Comparative Estimate of the sheep breed gene pools using ISSR-analysis *Russian Journal of Genetics,* volume 52, pages304- 313.
- Nesteruk, L. V, Makarova, N. N., Svishchra, G. R., stolrovsky yu. A. 2015.
- estimation of Genetic diversity of Romanov sheep by the coefficient of Genetic originality based on ISSR linger printing data -*Russian Journal of Genetics*.51,725- 729.
- Robles-Pérez. D,. García- García P., Martínez-Pérez. J. M., Rojo-Vázquez F. A., Martínez-Valladares M. 2015. Analysis of Genetic Variability of Fasciola Hepatica Populations from Different Geographical Locations By ISSR-PCR. Vol 142, issue4.
- Rohlf F. J. 1998 a. NTSYSpc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.02. *Exeter Publications, New York. USA*.
- Rohlf F. J. 1998 b. NTSYSpc-Numerical taxonomy and multivariate analysis system (Version 2.0). *User Guide. Applied Biostatistics INC. New Yor*k.
- Simianer H. 2005. Use of molecular markers and other information for sampling germplasm to create an animal gene bank, The Role of Biotechnology: 377-5 ,42- March,Villa Gualino, Turin, Italy.
- Weising K., H., Nybon k., Wolff and W. Meyeu. 1995. DNA lingerprinting in plants and fungi,*CRC press,* Inc.,London.
- Zamani P., Akhondi M., Mohammadabadi M. R., Saki A. A., Ershadi A., Banabazi M. H., Abdolmohammadi A. R. 2011. Genetic variation of Mehraban sheep using two inter simple sequence repeat (ISSR) markers *African Journal of Biotechnology,* Vol. 10(10): 1812- 1817
- Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176- 183.

N° Ref: 1023