دراسة علاقة التشكل الوراثي لجين الترانسفيرين بالاداء الانتاجي في أبقار الهولشتاين لأغراض الانتخاب

جعفر رمضان احمد نصر نوري الانباري

جامعة بغداد / كلية الزراعة / قسم الثروة الحيوانية

المستخلص

أجري 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 2014/11/7، بهدف تحديد التراكيب الوراثية لجين الترانسفيرين Transfferine (Tf) وعلاقتها ببعض الصفات الانتاجية لـ54 بقرة هولشتاين ومواليدها البالغة 39 مولوداً. بلغت نسب توزيع التراكيب الوراثية لجين الترانسفيرين في عينة الابقار التي درست 25.93 و 55.55 و 18.52 % لكل من التراكيب الوراثية TT و TC و CC بالتتابع، وكان التباين بين هذه النسب عالي المعنوية، كما كان تأثير التركيب الوراثي لجين الترانسفيرين في انتاج الحليب الكلي وطول موسم الحليب معنويا ($P<0.05$)، إذ حققت الابقار ذات التركيب الوراثي الهجين TC أقصى انتاج للحليب(2149.03 ± 295.05 كغم/موسم) وبطول موسم بلغ 170.92 ± 18.59 يوما. وأظهرت نتائج الدراسة الحالية أن غالبية نسب مكونات الحليب التي درست (الدهن واللاكتوز والمواد الصلبة اللادهنية) تأثرت جميعها معنويا ($P<0.05$) باختلاف التراكيب الوراثية لجين الترانسفيرين في حين لم تتأثر نسب البروتين والرماد في الحليب، واتضح ان التباين في وزن الجسم عند الميلاد معنويا باختلاف التركيب الوراثي على وفق جين الترانسفيرين وكان التكرار الاليلي للأليل T هو 0.54 في حين كان التكرار للأليل C هو 0.46 على وفق تحليل جين التترانسفيرين (Tf) في هذه الدراسة. نستنتج من دراسة التراكيب الوراثية لجين الترانسفيرين أمكانية اعتماده في وضع استراتيجيات التحسين الوراثي، لدى الابقار لتعظيم العائد الاقتصادي من مشاريع تربيتها بانتخاب وتضريب التراكيب الوراثية التي حققت افضل اداء، كما أن تطبيق الدراسة على عينة أكبر ولعدة مواسم إنتاجية من شأنه أعطاء نتائج أكثر دقة لتطبيق إستراتيجية الاستبعاد والاستبدال.

البحث مستل من اطروحة دكتوراه للباحث الاول.

Study the Relationship of Genetic Polymorphism of Transfferin Gene with Productive Performance in Holstein Cows for Selection

Abstract

This study is conducted in Dairy Cattle Farm and the Physiology Laboratory, College of Agriculture, Department of Animals Resources, Abu-Ghraib and also in a Laboratory dealing with the analysis of molecular genetic for the period 1/11/2013 to 7/11/2014. The objective to this study is to identify the genotypes for transferrin gene (Tf) and the relationship among these genotypes with some growth and production of 54 Holstein cows and 39 progeny. The percentage of genotype distribution for the

transferring gene in sample of studied cows is 25.93 , 55.55 and 18.52 % for the genotypes TT, TC and CC respectively and the differences between these percentages are highly significant and the effect of the genotypes of the transferrin gene on the total milk production and the lactation period is significant (P<0.05) while the cows with TC genotype give the highest total milk production (2149.03 ± 295.05 kg/season) with a lactation period of 170.92 ± 18.59 days. The results of the current also study show that the components of the studied milk (fat, lactose, non-fatty soluble solids) are influenced significantly (P<0.05) by the differences between the genotype of the transferrin gene, while the percentage of the protein and ash in the milk is not influenced by the genotype. The body weight at birth is significantly influenced by the genotypes of the transferring gene and alleles frequencies for alleles (T) is 0.54 while the alleles frequencies for alleles (C) is 0.46 according to the analysis of transferrin gene (Tf) in this study. The application of this study in bigger samples of animals for many productivity seasons may be gave more accurate results for applying replacement and culling strategies.

المقدمة

يتأثر التباين الوراثي في أداء الحيوان باختلاف تتابع النيوكليوتيدات المكونة للجين المسؤول عن أداء وفعالية الحيوان ومن بين التقنيات المستعملة في الكشف عن هذا التباين تقنية الهجرة الكهربائية

(PAGE– Polyacrylamide Gel Electrophoresis) للبروتينات في الحليب والدم وتقنية التفاعل السلسلي للبوليمريز(PCR–Polymerase Chain Reaction) والتشكل الوراثي للنيوكليوتيد المفرد(Single SNP–Nucleotide Polymorphism) وهذه التقنية تعتمد على الحامض النووي الوراثي (DNA) في عدد من الأنواع الحيوانية [1 و 2]، وأعطت هذه التقنية مجالات عمل واسعة، إذ استخدمت بروتينات الدم والحليب لتوصيف عشائر الحيوانات لان معظم هذه البروتينات تتشكل وراثيا وتتبع قوانين الوراثة البسيطة لذلك درست بروتينات الدم والحليب في عدد من الأنواع الحيوانية باستخدام تقنيات مختلفة من الترحيل الكهربائي وكانت لمعظم هذه الدراسات قيمة ولاسيما فيما يتعلق بالوراثة العامة ووراثة العشائر والتشخيص السريري والخرائط الجينية [3 و 4 و 5 و 6]، وكذلك يمكن الاستفادة من هذه التقنيات في تحليل الواسمات الجزيئية وهي ذات وظيفة ضرورية ولاسيما عند تقييم السلالات [7]. ان تضمين معلومات مواقع الصفات الكمية (Quantitative Traits Loci– QTL) في التقييم الجيني يعطي امكانات كبيرة في دقة الانتخاب مما يعجل برامج التحسين الوراثي للحيوان [8]، وافاد الباحث نفسه انه من خلال تحديد مواقع الصفات الكمية (QTL) وتحديد الواسمات المرتبطة بها يمكن التنبؤ بالتباين المظهري للصفات المراد تحسينها في وقت مبكر وبناء برامج الانتخاب على أساسها، وهذه الواسمات عبارة عن طفرات وظيفية في الجينات المؤثرة في الصفات، ومن أقدم الواسمات الوراثية التي استخدمت في برامج التربية هي الواسمات الشكلية (Morphological markers) وتلتها الواسمات الكروموسومية ثم الواسمات الكيموحيوية وأخيرا الواسمات الوراثية (Genetic markers) التي تعتمد على المادة

الوراثية (DNA). تفيد هذه التقنيات كذلك في الانتخاب وفي التربية الخارجية ودرجة التماثل الوراثي في داخل السلالة ودراسة الارتباطات بين الجينات ذات التشكل الوراثي المتعدد وقابليتها الإنتاجية [9]، ومن ثم فأنه من الممكن استخدام هذه الواسمات الجزيئية في الانتخاب والتحسين الوراثي [10]. ان الترانسفيرين هو بروتين سكري مسؤول عن نقل الحديد من مواضع امتصاص وتحلل الحديد الى المواضع الخازنة والمستفيدة عن طريق الارتباط بايونين من الحديديك Fe^{+3} ومترافقة بالارتباط مع ايون سالب يكون عادة الكاربونات. ونظرا لقلة الدراسات الجارية في العراق بهذا الخصوص فان الدراسة الحالية تهدف الى تحديد التشكل الوراثي او تعدد المظاهر لجين الترانسفيرين (نسب توزيع التراكيب الوراثية) لدى عينة من ابقار الهولشتاين، وحساب التكرار الأليلي، وعلاقة التشكل الوراثي لجين الترانسفيرين بانتاج الحليب وتركيبه فضلا عن صفات النمو لعينة الابقار.

المواد و طرائق العمل

نفذ البحث في الحقل الحيواني التابع لقسم الثروة الحيوانية/ كلية الزراعة/ جامعة بغداد، للمدة من 2013/11/1 حتى2014/11/7، على عينة مكونة من 54 بقرة هولشتاين ومواليدها البالغة 39 مولودا، وتم خلالها تسجيل انتاج الحليب اليومي الصباحي والمسائي للابقار الوالدة طيلة مدة الانتاج ولحد التجفيف، كذلك سجلت اوزان وقياسات الجسم للعجول والعجلات عند الميلاد. اوخذت نماذج من الحليب المنتج من الابقار الحلوبة من الحلبة الصباحية شهريا لغرض تحليل مكونات الحليب بوساطة جهاز كهربائي يسمى juily-Z-7 (في محطة بحوث المجترات في عكركوف التابعة لدائرة البحوث الزراعية) لتقدير بعض مكونات الحليب، كذلك سحبت عينات الدم من الابقار هذا فيما يخص الجزء الحقلي، في حين أجريت التحاليل الوراثية (الجزء المختبري) لعينات الدم في مختبرات كلية الزراعة/جامعة بغداد ومختبر التقدم العلمي في الحارثية للمدة من 2014/3/1 حتى 2014/11/15 بهدف فصل المادة الوراثية وتحديد التراكيب الوراثية (Genotype) لجين الترانسفيرين (Tf gene) وحساب التكرار الاليلي ونسب توزيع التراكيب الوراثية المتحصل عليها.

التحليل الجزيئي لجين الترانسفيرين Tf

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

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

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

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

الترحيل الكهربائي (Gel Electrophoresis) للتأكد من وجود DNA في العينات المستخلصة: لغرض التأكد من وجود DNA فقد تم اجراء عملية الترحيل الكهربائي.

المواد المستعملة في الترحيل الكهربائي

1-أكاروز (Agarose) ، 2-محلول بفر المنظم (10 X TBE buffer solution) ، 3-صبغة التحميل Loading Dye،

4- صبغة بروميد الاثيديوم (Ethidium Bromide Stain)

خطوات عملية الترحيل الكهربائي

1- وزن 0.5 غم من مادة الاكاروز بميزان حساس واضيفت الى 50 مل من محلول TPE(1X) والموضوع في بيكر زجاجي لغرض اذابتها.

2- وضع المحلول في فرن كهربائي (Microwave) لغرض الاذابة عن طريق التسخين مع التأكد من اختفاء مادة الاكاروز وعدم غليان المحلول.

3- برد المحلول لعدة دقائق بحيث يكون دافئ، ووضعت قطرة صغيرة من صبغة بروميد الاثيديوم في المحلول.

4- صب المحلول في صفيحة الاسناد وغمس المشط (comb) قرب احدى نهايتي الصفيحة اليمنى لعمل عدة حفر في مادة الجل بعد سحب المشط لوضع مادة الـDNA المستخلصة من العينات، وهناك عدة انواع من الامشاط يعتمد على عدد العينات المستعملة.

5-ترك المزيج ليتصلب في درجة حرارة الغرفة وازالة المشط بهدوء وكذلك مساند الصفيحة.

6- وضعت عدة قطرات من صبغة التحميل (Loading-Dye) مقدار كل قطرة 2 مايكروليتر لعدة عينات على سطح نظيف من المنضدة ووضعت فوق كل قطرة 10 مايكروليتر من مستخلص الدنا وخلطت معها بالطرف المدبب من التب وسحب المزيج بوساطة الالة الماصة (Micropipette) ووضع في حفر الجل المعدة بعد سحب المشط من الجل.

7-وضع الصفيحة في مسندها في وحدة الترحيل الكهربائي (Tank) وغطيت بمحلول منظم الترحيل 1X TBE لغرض تغطية الجل [11].

تحميل الـ DNA والترحيل الكهربائي :

بعد تحميل العينات في الحفر الموجودة في الجل بواسطة الالة الماصة وغمر الجل بمحلول 1X TBE تم ترحيل العينات بتشغيل جهاز الترحيل الكهربائي (Gel Electrophoresis) على طاقة كهربائية مقدارها 70 فولت وبتيار مقداره 40 ملي امبير ولمدة ساعة. حملت طبقة الجل المتكونة بعد انتهاء المدة المقررة باداة خاصة الى جهاز مطياف الاشعة فوق البنفسجية (UV Light Transillminator) لغرض الاناره. ويمكن مشاهدة حزم DNA المتحركة من القطب السالب باتجاه القطب الموجب بوساطة العين، وصورت هذه الحزم بتثبيت كاميرا خاصة فوق جهاز المطياف تسمى جهاز التوثيق الفوتوغرفي (Photo Documentation System)، وظهرت الحزم ملونة بصبغة بروميد الاثيديوم (Ethidium Bromide) بلون برتقالي او وردي متألق مما يدل على وجود DNA.

التوصيف الجزيئي لجين الترانسفيرين Tf

أ- اختيار البوادئ

يوجد عدد من البوادئ (Primers) المستخدمة لتضخيم القطع المستهدفة (Targets) مختلفة الاحجام من جين الترانسفيرين [12], كل زوج من هذه البوادئ يرتبط مع حجم القطعة المطلوبة بوساطة طريقة بلمرة التفاعل السلسلي عن طريق جهاز PCR الاعتيادي وجهاز Real Time PCR حسب حجم القطع ونوع البوادي المستخدمة ، ولكن في تجربتنا اختيرت 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، 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 [12].

تسلسل البرايمرات المستخدمة والتي جهزت من شركة Alpha DNA الكندية

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

المرحلة الثانية: تفاعل أنزيم البلمره المتسلسل PCR لجين الترانسفيرين Tf

لغرض اجراء الكشف الجزيئي لجين الترانسفيرين استخدمت عملية تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل (PCR) لعينات الدنا المستخلصة بوساطة جهازPCR، اذ استخدمت الكميات المذكورة ادناه لاجراء عملية استخلاص وتضخيم القطعة المطلوبة Target من جين الترانسفيرين والتي حجمها 882bp .

تحميل ناتج تفاعل البلمرة المتسلسل والترحيل الكهربائي

لغرض التاكد من حصول تضخيم (تفاعل البلمرة التسلسلي) للقطعة المطلوبة اي وجود منتج الدنا حملت 3 مايكروليتر من DNA Ladder بوساطة الة ماصة ووضعها في الحفرة الاولى من الجل المعمول بتركيز 2.5 % مع تحميل 10 مايكروليتر من نواتج PCR للعينات المدروسة في جل الأكاروز في الحفر التي تلي الحفرة الاولى والمغمور بمحلول(1X TBE Buffer، إذ تم الترحيل بفرق جهد مقداره 70 فولت وتيار 40 ملي امبير ولمدة ساعة ونصف بعدها تم مشاهدة الحزم بوساطة جهازUV trans illuminator، وتم تصويرها باستخدام جهاز التوثيق الفوتوغرافي (Photo documentation system)، مما يؤكد نجاح عملية التضخيم PCR لقطعة الجين والحصول على منتج للدنا.

المرحلة الثالثة: معرفة التعدد المظهري لجين Tf باستعمال تقنية (PCR–RFLP)عن طريق انزيم القطع *Dra1* (Distraction Enzyme)

بعد انتهاء تفاعل البلمرة السلسلي تم التعرف على التراكيب الوراثية لجين الترانسفيرين في عينات الدم المسحوبة من الأبقار بعد الحصول على منتج الدنا(DNA Product)، إذ اجريت عملية التقطيع للقطعة المكثرة المطلوبة 882bp بالانزيم المحدد (*Dra I*) الذي 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.

حللت البيانات احصائيا باستعمال البرنامج SAS– Statistical Analysis System [13] لدراسة تأثير تعدد المظاهر الوراثية لجين الترانسفيرين (Tf) – (الانموذجين الرياضيين الاول والثاني) في الصفات الانتاجية (انتاج الحليب ومكونات الحليب) وصفات النمو (وزن الجسم وإبعاده)، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باستخدام اختبار متوسط المربعات الصغرى (Least square means).

الانموذج الرياضي الأول: للتحري عن علاقة تعدد المظاهر الوراثية لجين Tf في انتاج الحليب وتركيب الحليب.

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

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 $\sigma^2 e$.

الانموذج الرياضي الثاني: للتحري عن علاقة تعدد المظاهر الوراثية لجين Tf في صفات النمو التي تم دراستها.

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

إذ ان: Yijklm: قيمة المشاهدة m العائدة للتركيب الوراثي i وتسلسل الدورة الانتاجية j وموسم الولادة k وجنس المولود l.

E_l: تأثير جنس المولود (ذكر ، أنثى). أما باقي الرموز فهي كما وردت في الانموذج الرياضي الاول(المذكور آنفا).

كما استعمل اختبار مربع كاي (χ^2 –Chi–square) للمقارنة بين النسب المئوية لوجود كل جين في عينة الابقار المدروسة.

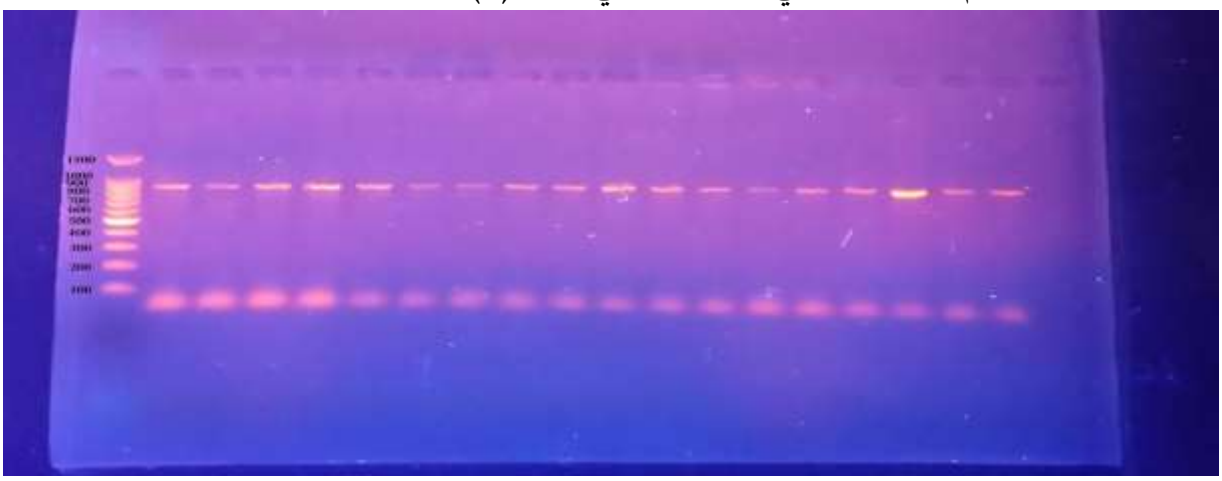
النتائج والمناقشة

استخلاص الدنا DNA Extraction

استخلص الـ DNA كخطوة اولى لعزل القطعة المستهدفة لجين الترانسفيرين بعد ذلك ضمن تقانة PCR وباستعمال العدة (Kit) وطريقة العمل المشار اليهما في فصل المواد وطرائق العمل ورحلت عينات بمقدار 10 مايكروليتر من عينة الـ DNA الممزوجة مع 2 مايكروليتر من صبغة التحميل في حفر هلام الاكاروز تركيز 1% وضبط الفولتية والتيار والزمن وتصوير ناتج الترحيل للتأكد من نجاح عملية استخلاص DNA.

استخلاص جين الترانسفيرين (Tf gene)

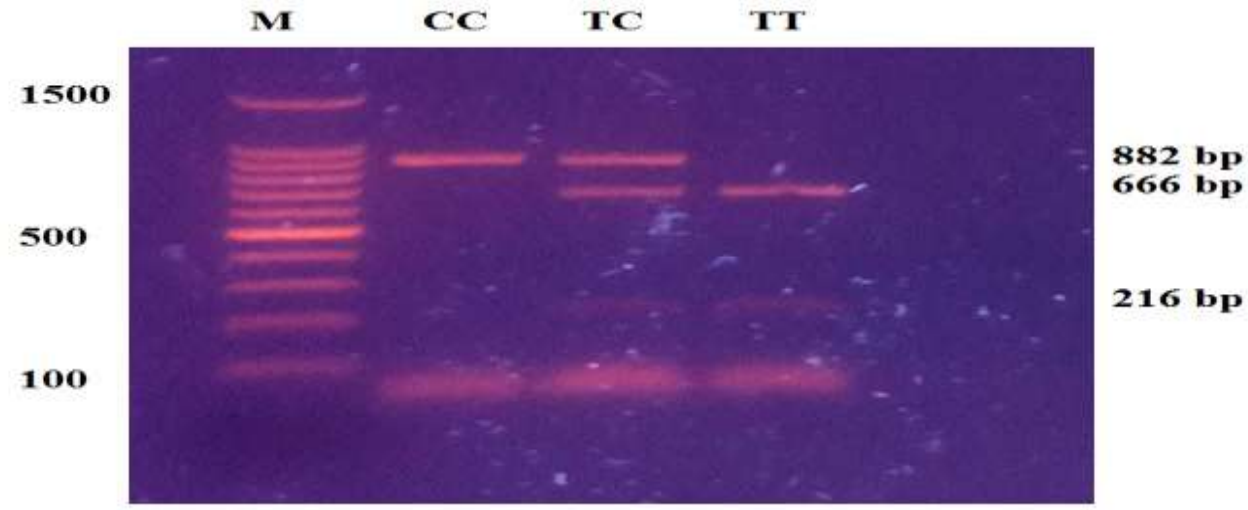
استخلصت القطعة المطلوبة 882bp من جين الترانسفيرين وتكثيرها(تضخيمها) بتقانة بلمرة التفاعل السلسلي (PCR) للحصول على منتج الدنا باستخدام عدة الPCR والبادئات (Primers) وعينات الDNA المستخلصة وضبط جهاز الدورات الحرارية حسب ما مذكور في فصل مواد وطرائق العمل، ورحلت عينة مقدارها 10 مايكروليتر من كل أنموذج في 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

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 امبير 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 الجل، وكما تظهر الحزم كما في الشكل (2) .



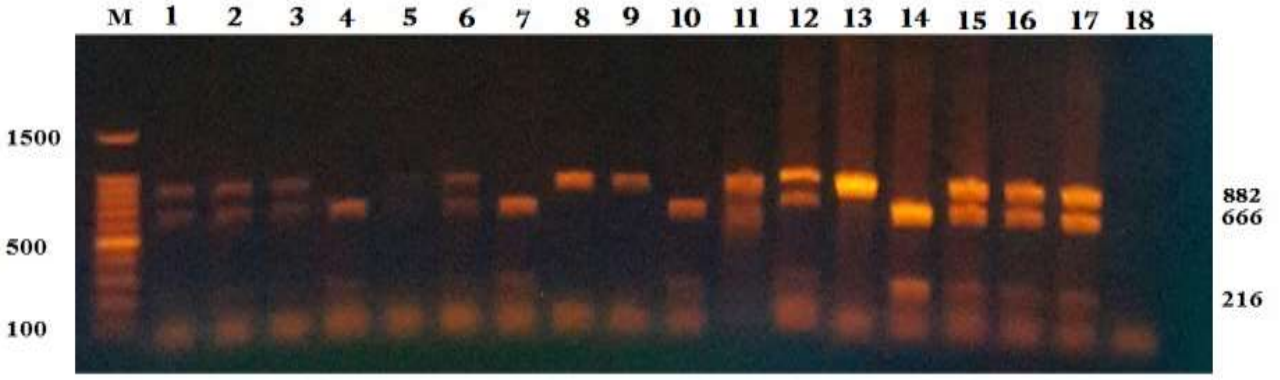
الشكل 2: تحديد التراكيب الوراثية الثلاثة لجين Tf حسب عدد وحجم الحزم المتكونة

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 4-3 : الحزم المتكونة بعد عملية تقطيع انزيم التقييد *Dra1* لتحديد التراكيب الوراثية لجين الترانسفيرين.

التركيب الوراثي TT يظهر في الاعمدة 4 و7 و10 و 14 ، التركيب الوراثي TC يظهر في الاعمدة 1 و2 و3 و5 و6 و11 و12 و15 و16 و17، التركيب الوراثي CC يظهر في العمود 8 و9 و13 .

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 [12 و 14]. ويمكن شرح او تفسير كيفية حصول عملية التقطيع بالانزيم، إذ ان الانزيم سوف يتعرف على الموضع المعين ضمن التتابع المتمثل بـ TTTTTAAA والموضع هو القاعدة النيتروجينية الرابعة T او C بعد القواعد الثلاثة TTT الذي تم معرفته عن طريق عملية تتابع القواعد النيتروجينية(Sequencing) التي اجريت فيما بعد، اما موقع القطع فهو تتابع الزوج القاعدي 216bp، فإذا كانت القاعدة الرابعة T في احد او كلا الشريطين فسوف يحصل التقطيع من قبل الانزيم بين القاعدة الرابعة والخامسة اي بين T و T في التتابع المذكور آنفاً، لذا سوف ينقسم الشريط الواحد من القطعة 882bp الى قطعتين هما216bp والاخرى 666bp تظهرعلى شكل حزمتين، وإذا كانت القاعدة الرابعة C فلا يحصل التقطيع.

توزيع التراكيب الوراثية لجين الترانسفيرين في عينة الابقار المدروسة

يتبين من الجدول (1) العدد والنسبة المئوية للتراكيب الوراثية لجين الترانسفيرين في العينة المدروسة، إذ يظهر وجود فروق عالية المعنوية ($P<0.01$) بين نسب التراكيب الوراثية المختلفة للابقار والتي بلغت 25.93 و 55.55 و 18.52 % للتراكيب TT و TC و CC بالتتابع، أي ان هنالك شيوعا واضحا للإفراد الهجينة TC مع تدني نسب التركيب الوراثي السائد (TT) والمتنحي (CC) في العينة. وقد اقتربت هذه النتائج مع عدد من الدراسات السابقة على المنطقة نفسها من جين الترانسفيرين، إذ اشار Ju وزملاؤه (2011) في دراسته إلى ان نسبة التراكيب الوراثية لجين Tf في ابقار الهولشتاين الصيني كانت 46 و 41.5 و 12.5 % للتراكيب TC و TT و CC على التوالي والتي جاءت متوافقة مع ما جاء في دراسة Liu وزملاءه (2012) إذ كانت النسبة هي 42.20 و 40.06 و 17.74 % للتراكيب TC و TT و CC بالتتابع في قطيع ثيران الهولشتاين الصيني .أما اختلاف النسب عن بعض الدراسات على الابقار في هذا المجال فقد يعود الى اختلاف السلالة وملاءمتها للظروف البيئة وكذلك الى حجم العينة المدروسة.

الجدول (1) العدد والنسبة المئوية لجين الترانسفيرين في الابقار التي تم دراستها

التركيب الوراثي	العدد	النسبة المئوية (%)
TT	14	25.93
TC	30	55.55
CC	10	18.52
المجموع	54	% 100
قيمة مربع كاي (χ^2)	---	** 12.435
** (P<0.01).		

تأثير تعدد المظاهر لجين الترانسفيرين للابقار في انتاج الحليب الكلي وطول موسم الحليب

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن التباين في انتاج الحليب الكلي وطول موسم الحليب بأختلاف التركيب الوراثي لجين الترانسفيرين معنويا (P<0.05)، إذ حققت الابقار ذات التركيب الوراثي الهجين TC أقصى معدل انتاج حليب كلي (2149.03 ± 295.05 كغم) في حين بلغ معدل الانتاج لدى التركيب الوراثي TT أدنى معدل (1441.19 ± 186.28 كغم)، بينما كانت الابقار ذات التركيب النقي CC وسط بين التركيبين TC و TT وبمعدل انتاج كلي بلغ 1809.73 ± 364.89 كغم في الموسم ،اما Ju وزملاؤه (2011) فوجد ان انتاج الحليب الكلي لابقار الهولشتاين الصينية كان لصالح التركيب الوراثي TT اكثر من التركيبين TC و CC لجين Tf أما معدلات طول موسم الحليب فقد بلغت 141.69 ± 17.51 و 170.92 ± 18.59 و 154.50 ± 19.09 يوما للتراكيب الوراثية TT و TC و CC بالتتابع (جدول2).

جدول (2) تأثير تعدد المظاهر لجين الترانسفيرين في انتاج الحليب الكلي وطول موسم الحليب ء

الصفة	التركيب الوراثي			مستوى المعنوية
	(13) TT	(26) TC	(10) CC	
انتاج الحليب الكلي (كغم)	1441.19B ± 186.28	2149.03A ± 295.05	1809.73AB ± 364.89	*
طول موسم الحليب (يوم)	17.51 ± 141.69B	18.59 ± 170.92A	19.09 ± 154.50AB	*
المتوسطات التي تحمل حروف مختلفة ضمن الصف الواحد تختلف معنويا فيما بينها.* (P<0.05).				

تأثير تعدد المظاهر لجين الترانسفيرين للابقار في تركيب الحليب

يتضح من الجدول (2) أن نسبة الدهن تأثرت معنويا(P<0.05) بأختلاف المظاهر المتعدد لجين الترانسفيرين، إذ بلغت هذه النسبة اقصاها (3.08 ± 0.15 %) لدى الابقار ذات التركيب الوراثي TT، بينما

كانت ادنى من ذلك في التركيبين الوراثيين TC و CC وبواقع 2.98 ± 0.13 و 2.55 ± 0.19 على التوالي. أن ارتفاع نسبة الدهن لدى الابقار ذات التركيب النقي TT جاء متناغما مع انخفاض معدل انتاج الحليب الكلي لدى الابقار من هذا التركيب الوراثي كما ذكر انفا (الجدول 2)، إذ ان زيادة كمية الحليب المنتجة عادة ما يرافقها انخفاض في نسبة الدهن. بلغت نسب اللاكتور 4.43 ± 0.06 و 4.46 ± 0.02 و 4.32 ± 0.03 % في حليب الابقار ذات التراكيب الوراثية TT و TC و CC بالتتابع، وان الفروق في هذه النسب كانت معنوية (P<0.05). اما نسبة البروتين فلم تتأثر معنويا بأختلاف المظاهر المتعددة لجين الترانسفيرين وقد بلغت نسبها 2.96 ± 0.04 و 2.98 ± 0.02 و 2.89 ± 0.02 % بالتتابع (الجدول 3)، في حين ان [12] وجدوا ان نسبة البروتين في التركيب الوراثي TT كانت اقل مما عليه في التركيبين TC وCC. يتبين من الجدول (3) أن نسبة المواد الصلبة اللادهنية تأثرت معنويا (P<0.05) بأختلاف التركيب الوراثي لجين الترانسفرين، إذ تفوق التركيبان TT و TC على التركيب الوراثي CC في هذه النسبة والتي بلغت للتراكيب الوراثية الثلاث 8.07 ± 0.11 و 8.12 ± 0.04 و 7.87 ± 0.06% بالتتابع. لم تتأثر نسبة الرماد في الحليب معنويا (P<0.05) بأختلاف المظاهر المتعدد لجين الترانسفيرين.

الجدول (3) تأثير تعدد المظاهر لجين الترانسفيرين في تركيب الحليب (متوسط المربعات الصغرى ± الخطأ القياسي)

الصفة (%)	التركيب الوراثي			مستوى المعنوية
	TT (13)	TC (26)	CC (10)	
نسبة الدهن	0.15 ± 3.08A	0.13 ± 2.98AB	0.19 ± 2.55B	*
نسبة اللاكتوز	0.06 ± 4.43A	0.02 ± 4.46A	0.03 ± 4.32B	*
نسبة البروتين	0.04 ± 2.96A	0.02 ± 2.98A	0.02 ± 2.89A	NS
نسبة المواد الصلبة اللادهنية	0.11 ± 8.07A	0.04 ± 8.12A	0.06 ± 7.87B	*
نسبة الرماد	± 0.665A 0.009	± 0.668A 0.004	± 0.648A 0.005	NS
المتوسطات التي تحمل حروفا مختلفة ضمن الصف الواحد تختلف معنويا فيما بينها.* (P<0.05).				

تأثير تعدد المظاهر لجين الترانسفيرين للابقار في وزن وابعاد الجسم للمواليد عند الميلاد

أظهرت نتائج الدراسة الحالية ان هنالك فروقا معنوية (P<0.05) في الوزن عند الميلاد للمواليد باختلاف التركيب الوراثي لجين الترانسفيرين في الامهات، إذ بلغ معدل الوزن اقصاه لدى التركيب الوراثي TC (33.71 ± 1.37 كغم) في حين كان معدل الوزن للتركيب CC أقل من ذلك (32.90 ± 1.06 كغم) وكان ادناه عند التركيب الوراثي TT وبواقع 30.75 ± 1.63 كغم (الجدول 4)، إذ تفوق كل من التركيبين الحاملين

للاليل C على حساب التركيب الوراثي النقي TT ، وهذا ما جاء متوافقا مع ما وجده [15] ان التركيب الوراثي الخليط GC أعطى وزن ميلاد ووزن فطام لدى العجول اعلى معنويا ($P<0.01$) من مثيلاتها ذات التراكيب النقية GG و CC على وفق جين الترانسفيرين، وقد يعود ذلك الى تأثير الجين على النمو في المرحلة الجنينية وعلى تنظيم الهرمونات الجنسية وهذا ما اشار اليه [16] من ان جين الترانسفيرين يؤدي دورا مهما في تمايز الخلايا والتطور الجنيني والنمو والتنظيم للايض وتحفيز انتاج البروجستيرون في الخلايا الحبيبية مما يشير الى افضلية للتركيبين الاخرين على التركيب الوراثي النقي TT في وزن الميلاد، يستدل من هذه النتيجة أمكانية تحسين صفة الوزن عند الميلاد لدى ابقار الهولشتاين من خلال الانتخاب للأمهات الحاملة للاليل C في شكله الهجين أولا ومن ثم التركيب النقي CC. يتضح من نتائج ابعاد الجسم (طول الجسم ومحيط الصدر والارتفاع عند المقدمة) التي تمت دراستها عند الميلاد أنها جميعا لم تتباين معنويا بأختلاف التراكيب الوراثية لجين الترانسفيرين (جدول 4).

الجدول (4) تأثير تعدد المظاهر لجين الترانسفيرين في وزن وابعاد الجسم عند الميلاد

الصفة	التركيب الوراثي			مستوى المعنوية
	(10) TT	(19) TC	(10) CC	
الوزن عند الميلاد (كغم)	1.63 ± 30.75B	A 1.37 ± 33.71A	1.06 ± 32.90AB	*
طول الجسم(سم)	1.00 ± 76.00A	0.59 ± 77.90 A A	1.51 ± 78.00 A	NS
محيط الصدر(سم)	1.69 ± 66.30A	1.30 ± 70.47 A A	1.79 ± 66.60 A	NS
الارتفاع عند المقدمة(سم)	1.79 ± 98.78A	1.30 ± 101.70 A A	107 ± 101.38 A	NS

* ($P<0.05$)، NS: غير معنوي.

المصادر

1-Soulier, S., Mercier, J.C., Vilotte, J.L., Anderson, J., Clark, A.J. and Provot, C. 1989. The bovine and ovine genomes contain multiple sequences homologous to the α-La-encoding gene. Gene. 83: 331-338.

2-Soumi, S., Tarun, K.B., Venkatachalaphthy, R.T., Pushpendra, K. and Sharma, A. 2006. Cloning and characterization of αS_2-casein gene of Reve rine buffalo DNA Seq. 17: 458-64.

3-Balakrishnan,C.R. and Goswami,S.L. 1991. Biochemistry polymorphism in river buffalo in :tulloh, N.M(Ed),buffalo and goats in Asia , genetic diversity and

its application proceeding of a workshop,Kualo lumepur, Malaysia, 10-14 February.

4-Mark.S. 2001. Single nucleotide polymorphism: From the evolutionary past. Nature. 409: 821-822.

5-Ramesha, K.P. 2002. Single nucleotide polymorphism in α-lactalbumin gene in cattle J.N.C. visiting fellow report submitted to Jawaharlal Nehru Center for Advanced Scientific, Bangalore, India.

6-Gudmundur, A., Thorission, A. and Lincoln, D.S. 2003. The SNP consortium web site: past present and future. Nucleic Acids Research, 31: 124-127.

7-Igarashi, M.I.S.P., Machado, T.M., Ferro, J.A. and Contel, E.P.B. 2000. Structure and genetic relationship among Brazilian and imported goat breeds. Biochemical Genetics. 38: 353-365.

8-Williams, J.L. 2005. The use of Marker-assisted selection in animal breeding and biotechnology. Rev.SCI.Tech.off.int.epiz), 1(1):24-29.

9-Rafay, J. 2001. Hybridization of broiler rabbit breeding: Habilitacna, Nitra: Spu., 255.

10-Rafay, J., Bezova, K. and Trakovicka, A. 2001. Evaluation of broiler rabbit reproduction traits on the busies of blood protein genetic polymorphism. J. Farm Animal Sci., 34, 125-135.

11-Sambrook, J. and Russell, D.W.2001. Molecular cloning .In: "A Laboratory Manual ".Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

12-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.

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

14-Liu, Xi., Zhihua, W. , Zhang, Y., Huang, Q., Chao, L., Jinbian, J. and Wang, C. 2012. Effects of Dra1,Sty1,and Msp1 Polymorphisms and haplotypic combinations of the transferrin (Tf) gene on the sperm quality of Chinese Holstein bulls. African Journal of Microbiology Research Vol. 6(3),pp.594-602.

15-Cole, J.B., Waurich, B., Wensch-Dorendorf, M.' Bickhart, D.M. and Swalve, H.H.2014. A genome-wide association study of calf birth weight in Holstein cattle using single nucleotide polymorphisms and phenotypes predicted from auxiliary traits. J Dairy Sci. May;97(5):3156-72.

16-Gutiérrez, J.P., Goyache, F., Fernández, I., Alvarez, I. and Royo L.J.2007. Genetic relationships among calving ease, calving interval, birth weight, and weaning weight in the Asturiana de los Valles beef cattle breed. J Anim Sci. Jan;85(1):69-75.