جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جـــــامعة ديـــالى

دراســـة المظاهر الوراثية لجين IGFBP-3 والموقع الجغرافي في بعض مظاهر أداء الحملان العواسية

رسالة مقدمة

إلى مجلس كلية الزراعة في جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في العلوم الزراعية

(علوم الأنتاج الحيواني)

من قبل

مـــــائدة خلـــدون حـــميد

جامعة ديالى - بكالوريوس علوم زراعية

بإشراف

أ.م.د. احمد علي عذاب
كلية الزراعة / جامعة ديالى

أ.م.د. رياض حمد صنكال
كلية الزراعة / جامعة بغداد

1440 هـ

2018 م

الخلاصة

أجريت الدراسة في محافظتي ديالى(حقل تابع لأحد مربي الاغنام / كنعان) و المثنى(محطة البحوث الاولى التابعة لقسم الانتاج الحيواني/ كلية الزراعة/ جامعة المثنى) في حين أجريت التحاليل الوراثية (الجزء المختبري) في مختبر كلية العلوم – جامعة ديالى من 2017/10/1 الى 2018/2/1 ، بهدف دراسة بعض المظاهر الوراثية لجين IGFBP-3 فضلاً عن تأثير الموقع الجغرافي ، عمر الام وجنس المولود في عدد من الصفات الانتاجية للحملان العواسي ، تبين من نتائج الدراسة أن جميع حيوانات التجربة ذات تركيب وراثي واحد (AA) وهو التركيب البري (Wild) لـ جين IGFBP-3 ، كما أثر الموقع الجغرافي عالي المعنوية ($P\leq0.01$) في صفتي الوزن ، الزيادة الوزنية ، الارتفاع عند المؤخرة ، محيط الصدر ومحيط البطن للشهر الثالث . كان تأثير عمر الأم على المواليد ($P\leq0.01$) في صفتي الوزن للشهر الثالث والخامس والزيادة الوزنية للشهر الثالث ، في حين لم يكن هناك تأثير معنوي في باقي أشهر الدراسة . وكذلك أثر عمر الام ($P\leq0.01$) في الارتفاع عند المؤخرة ، العرض عند المقدمة ، محيط الصدر ومحيط البطن للشهر الثالث وذات تأثير معنوي ($P\leq0.01$) لطول الجسم للشهر الخامس والسادس . بينما لم يؤثر جنس المولود معنويا في صفتي الوزن والزيادة الوزنية في جميع الاعمار .

ارتبط الوزن الأبتدائي ، الوزن النهائي ، الزيادة الوزنية والارتفاع عند المقدمة ارتباطا عالي المعنوية ($P\leq0.01$) ، كما ارتبط الوزن الأبتدائي معنويا ($P\leq0.05$) مع محيط الصدر ومحيط البطن . وأرتبطت قياسات طول الجسم ، العرض عند المقدمة والعرض عند المؤخرة ارتباط عالي المعنوية مع الوزن النهائي .

فهرست المحتويات

الموضوع		الصفحة
الخلاصة العربية		أ
فهرست المحتويات		ب- د
قائمة الجداول		ح
قائمة الأشكال		خ
قائمة الصور		خ
قائمة مصطلحات		د-ذ
الخلاصة الانكليزية		a
الفصل الأول	**المقدمة**	**1-2**
الفصل الثاني	**استعراض المراجع**	**28-3**
1-2	جين IGFBP- 3 (Insulin-like Growth Factor Binding Protein)	3
2-2	تصنيع وميكانيكية عمل بروتين IGFBP-3	4-3
3-2	الوظائف البيولوجية للـ IGFBP-3	4
4-2	تصنيف IGFBPs	5
5-2	بروتين IGFBP- 3 (Insulin-like Growth Factor Binding Protein	6-5
6-2	التقانات الحديثة	7-6
7-2	مفهوم التقنية الحيوية	7
8-2	استخدام التقانات الحديثة في وصف مظاهر الجينات	8
9-2	انواع الواسمات وعلاقتها بتعدد المظاهر الوراثية	9-8
1-9-2	الواسمات الظاهرية Morphological markers	8
2-9-2	الواسمات الكيموحيوية Biochemical markers	9
3-9-2	الواسمات الوراثية Genetic markers	9

10-2	الواسمات الوراثية والتحسين الوراثي للأغنام	10-9
11 -2	تفاعل البلمرة المتسلسل (Polymerase Chain Reaction) PCR	12-10
12-2	خطوات تقانة PCR	12-11
1-12-2	مرحلة التفكيك(الدنترة) Denature	11
2-12 -2	مرحلة الربط Primers Annealing	12
3-12-2	مرحلة الأستطالة Anneal Primers Extension	12
13-2	أهمية تفاعل الـPCR	13
14-2	تقانة الـRFLP (Restriction fragment length polymorphism)	13
15-2	تقانة تسلسل القواعد النتروجينية DNA sequencing	14
16-2	بعض التطبيقات المهمة في تقانة تسلسل القواعد النتروجينية	15-14
17-2	طرائق التعرف على تسلسل القواعد النتروجينية	16-15
1-17-2	طريقة سنجر او طريقة انهاء السلسلة Sanger and Coulson (chain termination)	15
2-17-2	طريقة التحمل الكيمياوي (ماكسام وجمبرت) Chemical (Endurance (Maxam and Gambert	15
3-17-2	طريقة انهاء وتعليم السلسلة Dye-terminator sequencing	16
18-2	الطرائق الحديثة لقراءة تابع القواعد النتروجينية New sequencing methods	17
19 -2	الترحيل الكهربائي عبر الهلام Gel Electrophoresis	19-17
20-2	علاقة الجين IGFBP-3 بحيوانات المزرعة	21-19
21-2	علاقة جين IGFBP-3 بالأداء الانتاجي للأغنام	22-21
22-2	سلالات الأغنام الرئيسية في العراق	23-22
23-2	الأغنام العواسية	24-23
24-2	الوزن والزيادة الوزنية	25-24

25-2	قياسات الجسم Body Mesurements	28-26
الفصل الثالث	**مواد وطرائق العمل Materials and Methods**	**29**
1-3	ادارة القطيع	29
2-3	التغذية	30-29
3-3	الرعاية البيطرية	30
4-3	سحب عينات الدم Blood Samples	30
5-3	الأجهزة والمعدات والمواد المستخدمة في الدراسة	32-31
6-3	مخطط التجربة	33
7-3	أستخلاص المادة الوراثية (DNA)	34
8-3	طريقة عمل استخلاص الدنا Protocol of DNA Isolation	35-34
9-3	تقدير نقاوة المادة الوراثية	36
10-3	عملية الترحيل الكهربائي	36
11-3	المواد المستعملة في الترحيل الكهربائي في هلام ألاكروز	38-37
12-3	حفظ DNA	39
13-3	التوصيف الجزيئي للجينات المدروسة	41-39
14-3	تحضير عينة الـ PCR	41-40
15-3	تحميل ناتج تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) والترحيل الكهربائي	42
16-3	التوصيف الجزيئي لمعرفة التعدد المظهري لجين IGFBP3بأستعمال تقنية (PCR-RFLP) بأنزيم القطع HeaII	42
17-3	ناتج ترحيل الهضم الأنزيمي PCR-RFLP	43
18-3	الوزن والزيادة الوزنية	43
19-3	قياسات الجسم	44
20-3	التحليل الاحصائي	46-45

الفصل الرابع	**النتائج والمناقشة : Results and Discussion**	**47**
1-4	جين IGFBP-3	48-47
2-4	أستخدام تقانة PCR-RFLP لتحديد التراكيب الوراثية لجين IGFBP-3	49
3-4	علاقة التركيب الوراثي بالصفات المدروسة	53
4-4	تأثير الموقع الجغرافي على الوزن والزيادة الوزنية الشهرية	54
5-4	تأثير جنس المولود على الوزن والزيادة الوزنية الشهرية طيلة مدة التجربة	56
6-4	تأثير عمر الام في الوزن والزيادة الوزنية الشهرية	58-57
7-4	تأثير الموقع الجغرافي على أبعاد الجسم	62-60
8 -4	تأثير الجنس على أبعاد الجسم	62
9 -4	تأثير عمر الام في أبعاد الجسم	69-64
10 – 4	معامل الارتباط	71-69
11 – 4	معامل الارتباط بين الوزن عند الفطام والزيادة النهائية والزيادة الوزنية الكلية وأبعاد الجسم	73
الفصل الخامس	**الاستنتاجات و التوصيات Conclusions & Recommendations**	**74**
1-5	الاستنتاجات : Conclusions	74
2-5	التوصيات : Recommendations	74
الفصل السادس	**المصادر**	**93-75**
1-6	المصادر العربية	78-75
2-6	المصادر الاجنبية	93-79

قائمة الجداول

الجدول	العنوان	الصفحة
1	بعض الانزيمات القاطعة الشائعة الاستخدام ومواقع عملها	19
2	النسب والتركيب الكيمياوي للمواد العلفية الداخلة في تكوين العليقة المركزة على أساس المادة الجافة (DM)%	30
3	أهم الأجهزة والمعدات المستعملة	32-31
4	المواد الكيمياوية	32
5	البرايمرات المستخدمة المجهزة من شركة IDT (Integrated DNA Technologies) وشركة ALFA الكندية	40
6	مكونات مخلوط تفاعل البلمره المتسلسل بحجم 25 µl	41
7	يمثل البرنامج الدورات الحرارية لتفاعل البلمرة (PCR) المستخدم لاكثار قطع الدنا المستهدفة	41
8	البرنامج المستخدم لدراسة التعدد المظهري لجين IGFBP-3 للمنطقه المضاعفة باستخدام تقنية PCR-RFLP	43
9	متوسط مربعات الصغرى ± الخطأ القياسي لتأثير الموقع الجغرافي في معدل الوزن والزيادة الوزنية الكلية والشهرية للحملان خلال مدة التجربة	55
10	متوسط المربعات الصغرى ± الخطأ القياسي لتأثير الجنس في الوزن والزيادة الوزنية للحملان طيلة مدة التجربة	56
11	متوسط المربعات الصغرى ± الخطأ القياسي لتأثير عمر الأم في الوزن والزيادة الوزنية الشهرية والكلية للحملان خلال مدة التجربة	59
12	متوسط المربعات الصغرى ± الخطأ القياسي لتأثير الموقع الجغرافي في أبعاد الجسم / سم للحملان العواسية خلال مدة التجربة	61
13	متوسط المربعات الصغرى ± الخطأ القياسي لتأثير جنس المولود في أبعاد الجسم / سم للحملان خلال مدة التجربة	63
14	متوسط المربعات الصغرى ± الخطأ القياسي لتأثير عمر الأم في أبعاد الجسم للحملان للشهر الثالث والرابع خلال مدة التجربة من عمر الحملان	64
15	متوسط المربعات الصغرى ± الخطأ القياسي لتأثير عمر الأمهات على أبعاد الجسم للحملان العواسية للشهر الخامس والسادس خلال مدة التجربة	68

16	معامل الارتباط بين ابعاد الجسم عند الحملان والوزن والزيادة الوزنية الكلية وابعاد الجسم للحملان عند عمر 6 اشهر	72
17	معامل الارتباط بين الوزن عند الفطام والزيادة الوزنية الكلية والوزن وابعاد الجسم للحملان عند عمر 6 اشهر	73

قائمة الاشكال

الشكل	العنوان	الصفحة
1	متطلبات تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)	11
2	مراحل تفاعل البلمرة المتسلسل	12
3	التعرف على تسلسل قواعد النتروجينية بأستخدام الاشعة المنبعثة من قواعد المعلمة لصبغة المشعة	16
4	قطع الـ DNA على لوح من الجل بالكهرباء	18
5	مخطط يوضح خطوات التجربة	33
6	طريقة عمل أستخلاص DNA	36
7	أستخلاص الـ DNA	47
8	ناتج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR للمنطقة المدروسة (جزء من الانترون الاول وجميع الاكسون الثاني وجزء من الانترون الثاني)	48
9	نواتج هضم جين IGFBP-3 وبأستخدام أنزيم التقيد *Hae III*	49
10	تتابع القواعد النتروجينية للمنطقة المدروسة من جين IGFBP-3 جزء من الانترون الاول وجميع الاكسون الثاني وجزء من الانترون الثاني(اللون الاسود يمثل الانترون واللون الاحمر يمثل الاكسون)	50
11	نتائج التقطيع ضمن برنامج Webcutter	52

قائمة الصور

الصورة	العنوان	الصفحة
1	جهاز الترحيل الكهربائي Gel Electrophoresis	38
2	آلة تصوير الخاصة مسندة على صندوق الاشعة فوق البنفسجية	39
3	قياسات أبعاد الجسم	45
4	واجهة برنامج geniuos يوضح تتابع القواعد النتروجينية ومنطقة القطع بالأنزيم *HaeIII*	51

قائمة مصطلحات

الرمز	المصطلح
dNTPs	Deoxynucleotide
DNA	Deoxyribonucleic acid
IGFBP–3	Insulin-like Growth Factor Binding Protein
PCR	Polymerase Chain Reaction
SNPs	Single Nucleotide Polymorphisms
ALS	Acid Labile Subunit
SDS PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
PCR–SSCP	Single-stranded conformation polymorphism
TBE	Tris Boris acid- EDTA
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic acid

ذ

Nitrogen free Extract	NFE
Crude fiber	CF
Crude protein	CP
Ether Extract	EE
Organic matter	OM
Dry matter	DM

المقدمة Introduction

يحتلُ قطاع الثروةَ الحيوانية أهمية كبيرة في حياة الشعوب من خلال مساهمته في تحقيق الأمن الغذائي . ألا أن الانتاج لا زال أدنى بكثير من الأحتياجات ، ويعزى هذا النقص لعوامل عديدة ، يتمثل أهمها في نقص التغذية هذا الى جانب عدم استخدام التقانات الحديثة ، لذا أتجه التطور الى استخدام التحسين الوراثي الذي يعتبر من أحد أهم الوسائل لزيادة إنتاجية الحيوانات من خلال انتخاب الحيوانات ذات العوامل الوراثية المرغوبة وزيادة قدرتها الكامنة (Gutierrez و Goyache ، 2007) .

تُشكل الأغنام العواسي 58.2% من أغنام العراق (Al-Barzinji و Othman , 2013) البالغ عددها 7,722,000 رأس لعام 2008 (وزارة التخطيط ، 2008) وهي من السلالات ثلاثية الغرض، إذ تنتج اللحم والصوف والحليب ، وتَّعد السلالة الرئيسة في بلدان الشرق الأوسط، ولها قابلية عالية على تحمل الظروف البيئية القاسية (Salman و Abdallah ، 2014) . ممّا دفع الباحثين والمربين لإيجاد وسائل بديلة عن الانتخاب التقليدي الذي كان متبعاً طوال العقود الماضية والذي يتطلب وقتا" وجهداً كبيرين وتعد تقانة تفاعل الكوثر المتسلسل PCR (Polymerase Chain Reaction) التي توصل إليها Kari Mullis عام 1983 والذي حصل من خلالها على جائزة نوبل عام 1993 (Lorenz ، 2012) إحدى التقانات المستخدمة لدراسة التنوع الوراثي بين السلالات والأفراد الذي يعتمد بالدرجة الأساس على معرفة الجينات المسؤولة عن الصفات الكمية ، أذ يمكن من خلال ذلك وضع برامج التحسين الوراثي (Verona وآخرون ، 2016) .

وقد استثمر العلماء هذه التقانة لدراسة وتتبع الطفرات الوراثية التي تحدث على المادة الوراثية للكائنات الحية ومنها (Single Nucleotide Polymorphisms – SNPs) واستخدامها كواشمات وراثية (Genetic Markers) ويتمّ الانتخاب على أساسها للصفات الإنتاجية ذات المكافئ الوراثي المنخفض التي تخضع لسيطرة عدد من المواقع الجينية والتي تعرّفَ بمواقع الصفات الكمية (Quantitative traits loci QTL) ، ويمكن من خلال هذه

الواسمات المرتبطة معرفة المواقع بها للتنبؤ بالتباين المظهري للصفات المراد تحسينها بوقت مبكر ووضع برامج الانتخاب على أساسها (Williams ، 2005) .

وأعطت قيمة هذه المعلومات الجينية والبيانات الضخمة لتعدد المظاهر المتوفرة حالياً فرصاً لا مثيل لها لدراسة المواقع التي تستخدم للانتخاب بين السلالات (Falcon وآخرون ، 2009) وفي الوقت الحاضر لا يتركز طلب المستهلكين للحوم الأغنام على الصفات الكمية فقط ، ولكن أيضا الصفات النوعية للحوم ويمكن لمربي الحيوانات تسريع معدل التحسين الوراثي الذي تم التوصل إليه في مواصفات الذبيحة وخصائص نوعية اللحوم من خلال تطبيق الانتقاء بمساعدة الجينات ، والذي يقوم ببساطة على دمج جينات مرشحة مواتية في برامج التربية التقليدية (Anderson ، 2001) . إن تباين الألي داخل الجينات المرشحة بين السلالات له ما يبرره لتفريقها على أساس جيني وقد تساعد نتيجة هذا الاختلاف في اختيار أفضل استراتيجية لخيارات التحسين لهذه الموارد الجينية. هناك العديد من المقالات المنشورة حول الجينات المختلفة المرتبطة بالصفات مثل اللحم في سلالات الأغنام المتنوعة ، من بين هذه الجينات هي CAST, MSTN, DGAT1, IGFBP3 , Feb. (Tahiti وآخرون ، 2013) .

ويعد IGFBP-3 من أهم هذه الأنواع لأنه المسؤول عن التأثيرات المختلفة لعوامل النمو الشبيهة بالأنسولين (IGFs) في معظم أنواع البائن كما يعد البروتين الرئيس الناقل لعوامل النمو عادة عن طريق تكوينه معقد بروتيني يتكون بشكل رئيس من بروتينات IGF-I وIGF-II إضافة لبروتين ثالث يدعى Acid Labile Subunit (ALS) (Zhan وأخرون ، 2015) .

نظرا" لندرة الدراسات حول جين IGFBP-3 في العراق ، لذا تهدف الدراسة الحالية إلى تسليط الضوء على :-

1- دراسة تأثير الموقع الجغرافي ، عمر الام وجنس المولود في صفات النمو وأبعاد الجسم لدى الحملان قيد الدراسة .
2- دراسة تأثير الأرتباط في صفات النمو وأبعاد الجسم لدى الحملان .
3- دراسة تأثير المظاهر المتعددة لجين IGFBP-3 في أداء صفات النمو لدى الحملان قيد الدراسة .