

## الكشف عن بعض المواقع الوراثية ذات العلاقة بمرض الحبن في دنا دجاج اللحم باستخدام تقنية التتابعات البسيطة المكررة

ثامر عبد العزيز عزالدين<sup>١</sup> و ناهل محمد علي سليمان<sup>٢</sup>

<sup>١</sup> فرع الصحة العامة البيطرية، كلية الطب البيطري، <sup>٢</sup> قسم الثروة الحيوانية، كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل، الموصل، العراق

### الخلاصة

أجريت هذه الدراسة بهدف تحديد خارطة الارتباط الوراثية لمرض الحبن في دجاج اللحم باستخدام مؤشر التتابعات البسيطة المكررة. تمت الدراسة على ثلاثة مجاميع مختلفة وعشوائية من الطيور. شملت الدراسة ثلاث مواقع كروموسومية موزعة على كروموسومين وهي: الكروموسوم الأول المنطقة ١٨,٣٨ - ٢١,٤٨ مليون زوج قاعدي (Mbp). الكروموسوم الأول الموقع ١٢٧ - ١٢٨,٥ مليون زوج قاعدي (Mbp). والكروموسوم التاسع: المنطقة ١٣,٥ - ١٥ مليون زوج قاعدي (Mbp). صممت أربعة بادئات (PHS04, PHS03, PHS02, PHS01) لغرض كشف تحليل أليلات التتابعات البسيطة المكررة (SSRs) الموجودة بالقرب من المناطق الكروموسومية المنتخبة، أظهر التحليل الوراثي وجود العديد من الأليلات لهذه التتابعات ووجود ارتباط معنوي للعديد من هذه الأليلات مع الجينات المرشحة لصفة متلازمة ارتفاع الضغط الشرياني الرئوي (الحبن) وهي: (MAPK II) و (Rho-GTPase) و (AGTR 1). وعليه، يمكن الاستفادة من المؤشرات المدروسة لبرامج الانتخاب المستقبلية الخاصة بهذا المرض في دجاج اللحم.

## Detection of some genetic locations related to ascites in the DNA of broiler chickens using microsatellite marker

Th.A. Ezzulddin<sup>1</sup> and N.M. Ali<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine,

<sup>2</sup> Department of Animal Resources, College of Agriculture, University of Mosul, Mosul, Iraq

### Abstract

The objective of this study was to detect the genetic linkage map of ascites disease in broiler using microsatellite markers. Three different random groups were used. Three chromosomal regions distributed on two chromosomes were covered by this study, which were: The first chromosome the region 18.38-21.48 Mega base pair. The first chromosome: The region 127.01 Mbp. The ninth chromosome: The region 13.5-15 Mbp. Four primers were designed; (PHS01, PHS02, PHS03, PHS04), for the purpose of detection and analysis microsatellite alleles which occur close to the selected regions. Existence of multiple alleles per locus was detected by genetic analysis, with a significant linkage for many of these alleles to the candidate genes for The Pulmonary Hypertension Syndrome (Ascites); MAPK II, Rho- GTPase, AGTR 1. Therefore, there is possibility of using all the tested markers in the future programs selection associated with Ascites disease in broiler chickens.

Available online at <http://www.vetmedmosul.org/ijvs>

### المقدمة

(١,٢ × ١٠<sup>٦</sup>) زوج قاعدي (Base pair) والتي يبلغ طولها تقريباً ٤٠٠٠ وحدة خريطة (Map Unit) أو (Centi Morgan)، (١ و ٢) وعليه فإن كل cM يساوي تقريباً ٣٠٠ كيلو من الأزواج القاعدية (kbp) من الدنا (DNA).

أن المؤشرات الوراثية (Genetic Markers) هي عبارة عن تتابعات معينة من الدنا تكونت نتيجة الطفرات الوراثية وتوجد في

يتألف مجين (Genome) الدجاج من ٣٩ زوجاً من الكروموسومات منها ثمانية أزواج (الأولى) كبيرة الحجم وثلاثون زوجاً من الكروموسومات الصغيرة الحجم إضافة إلى كروموسومي الجنس (W/Z)، ويقدر حجم المجين في الدجاج من

### سحب الدم من الطيور

سحب الدم من الطيور في عمر ستة أيام بطريقة النزف Bleeding وذلك بوخز وريد الجناح بواسطة ابرة صغيرة معقمة، يؤخذ ٢٠ مايكروليتر من الدم بواسطة آلة ماصة دقيقة (Micropipette). ثم يوضع في ٤٠٠ مايكروليتر من محلول STM الذي يتكون من (٦٤ ملي مول من السكروز (Sucrose) + ٢٠ ملي مول من دارى حامض الهيدروكلوريك (TrisHCl pH 7.5) + ١٠ ملي مول كلوريد المغنيسيوم (10 mM MgCl<sub>2</sub>) + ٠,٥% ترايتون (0.5 Triton X-100) حسب ماجاء في (٩).

### تصميم البادانات

حددت التتابعات البسيطة المكررة (SSRs) عن طريق استخدام مستعرض المجين (UCSC Genome Browser) ومن ثم الاستعانة ببرنامج Primer3 لتصميم البادانات المناسبة للدراسة.

### التفاعل التسلسلي PCR

أجري التفاعل في اطاق سعة ٩٦ حفرة باستخدام Eppendorf Mastercycler Gradient إذ احتوت كل حفرة على ٢٠ مايكرو ليتر من مزيج التفاعل الرئيس مكونة من دارى ١ X و ٠,٢ مايكرو مول من القواعد منقوصة الأوكسجين ثلاثية الفوسفات (dNTP) و ١,٠ ملي مول من البادانات و ٣ وحدة من الأنزيم Taq polymerase و ٢ مايكرو ليتر من الدنا (DNA). وحسب برنامج التضخيم الآتي:

| الخطوة | المرحلة                    | درجة الحرارة °م                  | الزمن         |
|--------|----------------------------|----------------------------------|---------------|
| ١      | البدء Initial denaturation | ٩٠                               | ٦٠ ثانية      |
| ٢      | التحطيم Denaturation       | ٩٠                               | ٢٥ ثانية      |
| ٣      | الارتباط Annealing         | تختلف حسب طول ونوع قواعد البادان | ٣٠ ثانية دورة |
| ٤      | الاستطالة Extension        | ٧٢                               | ٦٠ ثانية      |
| ٥      | النهائية Final Extension   | ٧٢                               | ٣ دقائق       |

### هلام الاكريلاميد

تم ترحيل ناتج التفاعل ال (PCR) على هلام الاكريل اميد تركيز ٦%، ويتكون الهلام من: ٣٠ غرام Pure Urea جوهر اليوريا، ٢٢ مللتر diH<sub>2</sub>O مقطر منزوع الايونات، ٣ مللتر دارى البوريت و اثيلين ثنائي الأمين رباعي حامض الاستيك 2 M Tris (TEB) 40 mM EDTA 200 mM، ٩٠ مايكروليتر اثيلين داي امين رباعي المثيل Tetramethyl-ethylenediamine (TEMED)، ٩ مللتر Acryl amid اكريل اميد، ١٢٠ مايكروليتر 10% Ammonium per sulphate (APS) سلفات الامونيوم.

كافة مناطق المجين (٣) فمنها ما يوجد ضمن الجينات وتعرف بالمؤشرات المباشرة (Direct Markers)، ومنها ما يوجد قريباً من الجينات وتعرف بالمؤشرات غير المباشرة بحيث يكون مرتبطاً بها وتنتقل معها من الآباء إلى الأبناء إذ يمكن الاعتماد عليها في قياس التباين الوراثي وتحديد المواقع الجينية مثل مؤشر التتابعات البسيطة المكررة (Microsatellite Marker) وهي الأكثر انتشاراً واستخداماً في الوقت الحاضر بسبب كونها عالية التباين، وسهولة استخدامها وكلفتها المعقولة (٤).

إن التقدم الملحوظ في الصفات الإنتاجية صاحبه بعض المشاكل والجوانب السلبية التي ظهرت، ولا سيما في سلالات إنتاج اللحم إذ يعكف العاملون في حقل التحسين الوراثي حالياً على حلها، ومنها مشكلة عدم تحمل الساقين والمفاصل، وزيادة نسبة الهلاكات

نتيجة التغيرات الوظيفية المصاحبة للنمو السريع (قلة تحمل الطيور لبعض الظروف البيئية مثل المناطق المرتفعة ودرجات الحرارة المنخفضة وسوء التهوية)، زيادة الكتلة الدهنية المترسبة في التجويف البطني، وكذلك الحبن الذي يعرف بـ (Pulmonary Hypertension syndrome) وهو اضطرابات ايفية ناتجة عن النمو السريع في الدواجن مع قلة سعة الأوعية الدموية الرئوية (٥). يلعب الجهاز التنفسي وجهاز الدوران دوراً مهماً في الإصابة بمرض الحبن (٦). أشار (٧) إلى وجود عدة علامات سريرية لمرض الحبن، منها تضخم البطين الأيمن واحتقان البوابة الوريدية وتلف الكبد وتجمع السوائل في التجويف البطني. إن الخارطة الجينية لمرض الحبن لم تحدد بصورة كاملة إلى الوقت الحاضر (٨).

تهدف هذه الدراسة إلى تحديد بعض من المواقع الجينية التي تلعب دوراً للإصابة بمرض الحبن ودراسة التباين الوراثي في تلك المواقع المختارة.

### المواد وطرائق العمل

أجريت الدراسة في مختبر قسم علوم الحياة- كلية العلوم - جامعة اركنساس في الولايات المتحدة الأمريكية للفترة من ١-١-٢٠١٠ لغاية ٣٠-٦-٢٠١٠، استخدمت أربعة مجاميع عشوائية من أصول دجاج اللحم المخصصة من قبل إحدى شركات تربية وتحسين الدواجن للأغراض البحثية التي يمارس عليها الانتخاب الانفراسي (Divergent Selection) لتثبيت الأليلات المقاومة وغير المقاومة لمرض الحبن.

المجموعة الأولى: ضمت ٦٢ طيراً مقاوماً للمرض رمزت ٧٣٢. المجموعة الثانية: ضمت ١٥٤ من الطيور ذات الاستعداد الوراثي للمرض رمزت ٧٠٢. المجموعة الثالثة: ضمت ٩٦ من الطيور التي لم يمارس عليها الانتخاب (Relaxed)، ويتبع فيها نظام التزاوج العشوائي رمزت ٧٢٨.

## تصوير الهلام

مسح (Scan) الهلام بواسطة جهاز خاص يسمى Typhoon imager موديل ٩٦٠٠.

## التحليل الإحصائي

استخدم برنامج اكسل (Microsoft Excel) في حساب وتحليل عدد الأليلات والتراكيب الوراثية واستخرجت العلاقة الإحصائية بين المشاهد والمتوقع من الأليلات باستخدام اختبار مربع كاي.

## النتائج

يبين الجدول (١) رموز البادئات المستخدمة في تحديد المواقع الكروموسومية ذات العلاقة بمرض الاستسقاء، فضلاً عن مواقعها والنتائج الخاص بها، إذ تراوح طولها من ١٨ - ٢٤

نيوكليوتيد مما يعطيها الخصوصية للالتحام بمنطقة واحدة في المجين وهي المنطقة ذات الاهتمام. كما يبين الجدول التتابعات البسيطة المكررة المستهدفة (التي تقع قرب المناطق الكروموسومية التي يُعتقد بعلاقتها بالمرض) والمطلوب مضاعفتها ومن ثم تحليلها للكشف عن علاقة المناطق المرتبطة بها بالمرض، كما يشير الجدول إلى درجات الحرارة المُثلى اللازمة لارتباط هذه البادئات بالدنا القالب وتتوقف درجة حرارة الارتباط أو الالتحام على طول البادئ وما يحتويه من القواعد (AT) و (GC) ويفضل أن تكون نسبة (GC) أعلى من ٥٠% من نسبة قواعد البادئ، وكذلك يتضمن الجدول نتائج تحليل ناتج التفاعل التسلسلي المتعدد (PCR) بواسطة ترحيله على هلام الأكريل أمايد باستخدام جهاز الترحيل الكهربائي والمتمثلة بعدد الأليلات وحجمها لكل تتابع بسيط وتراوح عدد الأليلات للتتابعات البسيطة المكررة من ١ - ٦ أليلات.

الجدول (١): رموز البادئات وموقعها والتتابع الأمامي والخلفي الخاص بها، والتتابعات البسيطة المكررة المستهدفة ودرجة حرارة ارتباط البادئات بالدنا، وعدد أليلات التتابعات البسيطة المكررة وحجمها.

| رمز البادئ | الموقع المستهدف بالبادئ | تتابع البادئ الأمامي والخلفي                   | التتابع البسيط المكرر | درجة حرارة الارتباط | عدد الأليلات | حجم الأليلات (زوج قاعدي)                        |
|------------|-------------------------|--|-----------------------|---------------------|--------------|---|
| PHS01      | *Gga1:20.28             | ATCTGTAACCAGAGCACATA<br>CTTTTAGGACTTCCTTCTTG   | (TTTC) <sub>32</sub>  | ٥٠                  | ٦            | ٢٠٨، ١٩٢، ١٨٨<br>٢٢٢، ٢١٨، ٢١٤                  |
| PHS02      | Gga1:20.56              | TCACGTGGGGAATTAACACA<br>AAGATGGAGTTCCCAAGCAG   | (GGATA) <sub>20</sub> | ٥٠                  | ٨            | ١٧٤، ١٧٩، ١٨١، ١٨٤<br>٢٣٠، ٢٢٥، ١٩٤، ١٨٩        |
| PHS03      | Gga1:127.85             | CCGCTCCCTGTTTATCCTTA<br>TCCATTTATTGGGGAGTGAAA  | (TTTC) <sub>20</sub>  | ٥٠                  | ٩            | ٢٦٨، ٢٨٣، ٢٨٨<br>٢٩٣، ٢٩٨، ٣٠٣<br>٣١٨، ٣٢٣، ٢٦٣ |
| PHS04      | Gga9:13.111             | TTTTTCTTGTGTATATGGCTAAT<br>GCAATGCAAAAATGTGAAA | (GA) <sub>13</sub>    | ٤٥                  | ٥            | ١٥١، ١٥٩، ١٦٣<br>١٦٥، ١٦٧                       |

\* رمز الاسم العلمي للدجاج، يتبعه رقم الكروموسوم ثم الموقع على الكروموسوم.

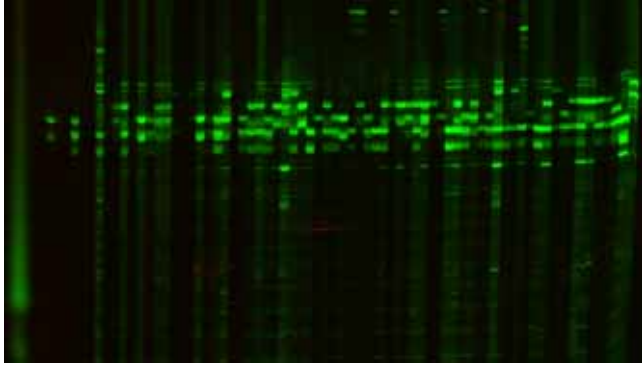
## الأليلات الناتجة من استخدام البادئ PHS 01

وجد عند الكشف عن أليلات التتابع البسيط المكرر المرتبط بالموقع الجيني ٢١،٤٨ - ١٨،٣٨ مليون زوج قاعدي Mbp على الكروموسوم الأول باستخدام البادئ PHS01 في الموقع Gga 1:20.28 (*Gallus gallus*) عن وجود ستة أليلات مختلفة للتتابع (TTTC)<sub>32</sub> الموجود في هذه المنطقة هي ٢١٨، ٢٢٢، ٢١٤، ٢٠٨، ١٩٢، ١٨٨ زوج قاعدي في جميع مجاميع الطيور المستخدمة في هذه الدراسة ويوضح الجدول (٢) مقارنة توزيع تلك الأليلات في مجموعتي الطيور المقاومة (٧٣٢) وغير المقاومة (٧٠٢)، اقتصر التمثيل المعنوي على الأليلات ٢١٨، ١٩٢، ٢١٤ إذ كان الأليلين ٢١٤ و ١٩٢ ذات انتشار أعلى معنوياً (≥ ٠,٠١) في مجموعة الطيور غير المقاومة، إذ كان

المشاهد من الأليل ٢١٤ هو ٦ و ٦٤ والمتوقع ٢٠ و ٥٠ وكان تكراره ٠,٠٥ و ٠,٢٢ في طيور المجموعتين المقاومة وغير المقاومة على التوالي، كذلك للأليل ١٩٢ فقد كان انتشاره أعلى معنوياً (≥ ٠,٠١) مجموعة الطيور غير المقاومة، إذ بلغ العدد المشاهد من الأليل ٦، ٦٤ وكان العدد المتوقع ١٩ و ٥٠ وبتكرار قدره ٠,٠٥ و ٠,٢٢ في كل من المجموعتين المقاومة وغير المقاومة للمرض، وبخصوص الأليل ٢١٨ فقد كان تمثيله أعلى معنوياً في الطيور المقاومة، ولوحظ أن المشاهد ٤٦ و ٣٠ والمتوقع ٢٢ و ٥٥ وبلغ تكراره ٠,٣٨ و ٠,١٠ في مجموعتي الطيور المقاومة وغير المقاومة على التوالي. لوحظ في المجموعة الثالثة التي لم يمارس فيها الانتخاب (٧٢٨) أن الأليلات ٢١٤ و ٢٠٨ و ١٩٢ محدودة التمثيل في

وأظهر اختلافاً معنوياً ( $\geq 0,01$ ) بين المشاهد والمتوقع في كلتا المجموعتين، إذ كان العدد المشاهد منه ٤٠ و ٦٢ وكان العدد المتوقع ٢٨ و ٧٤ وبلغ تكرار الأليل ٠,٣٤ و ٠,٢٠ في المجموعتين المقاومة وغير المقاومة على التوالي. وجد في المجموعة الثالثة ٧٢٨ التي تضم طيوراً مقاومة وأخرى غير مقاومة اختلافاً عالي المعنوية ( $\geq 0,01$ ) بين المشاهد والمتوقع للأليل ١٨٤ لصالح الطيور المقاومة، إذ لوحظ أن العدد المشاهد ٢٢ و ٩ وكان العدد المتوقع ١٣ و ١٨ وبلغ تكرار المشاهد ٠,٢٧ و ٠,٠٨ في الطيور المقاومة وغير المقاومة على التوالي. في حين أظهر الأليل ١٧٩ اختلافاً عالي المعنوية ( $\geq 0,01$ ) بين المشاهد والمتوقع لصالح الطيور غير المقاومة، ووجد أن العدد المشاهد ١٤ و ٥٠ وكان العدد المتوقع ٢٧ و ٣٦ وكانت نسبة العدد المشاهد ٠,١٧ و ٠,٤٥ في الطيور المقاومة وغير المقاومة على التوالي، ويلاحظ من ذلك ارتفاع تكرار هذا الأليل في الطيور غير المقاومة مما قد يعطي لهذا الأليل أهمية بالغة للانتخاب لارتباطه بالحالة المرضية.

702, PHS 02



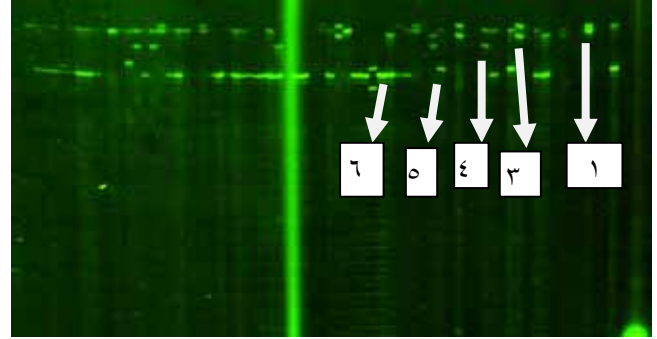
الشكل (٢): اليلات البادئ: PHS 02 (٢٣٠، ٢٢٥، ١٩٤، ١٨٩، ١٨٤، ١٧٩، ١٨١، ١٧٤).

### الأيليات المتكونة من استخدام البادئ PHS 03

وجد عند تحليل أليات التتابع البسيط المكرر المرتبط بالموقع الجيني ١٢٧-١٢٨,٥ مليون زوج قاعدي (Mbp) على الكروموسوم الأول باستخدام البادئ PHS 03 في الموقع ١٢٧,٨٥ مليون زوج قاعدي (Mbp) عن وجود تسعة أليات مختلفة للتتابع  $20(TTCTC)$  هي ٣٢٣ و ٣١٨ و ٣٠٣ و ٢٩٨ و ٢٩٣ و ٢٨٨ و ٢٨٣ و ٢٦٨ و ٢٦٣ زوج قاعدي في جميع مجاميع الطيور المستخدمة في هذه الدراسة (الجدول ٤) و (الشكل ٣)، وكشفت نتائج التحليل الإحصائي عن وجود اختلافات معنوية بين المشاهد والمتوقع في عدد بعض تلك الأليات بين الطيور المصابة والطيور المقاومة لمرض الحبن الذي يعرف بارتفاع الضغط الشرياني الرئوي (Pulmonary Hypertension Syndrome)، فعند مقارنة المجموعة الأولى وهي مجموعة الطيور المقاومة التي يرمز لها بالرقم (٧٣٢) مع المجموعة

هذه المجموعة في كل من الطيور المقاومة وغير المقاومة على حد سواء، أما الأليات ٢٢٢ و ٢١٨ و ١٨٨ فقد اختلف تمثيلها معنوياً في الطيور المقاومة عن الطيور غير المقاومة، فقد كان المشاهد من الأليل ٢٢٢ هو ٢ و ١٣ والمتوقع ٦ و ٨ ويتكرر ٠,٠٣ و ٠,١٢ في الطيور المقاومة وغير المقاومة على التوالي، وكان العدد المشاهد من الأليل ٢١٨ هو ١٥ و ٤٧ لمتوقع قدره ٢٦ و ٣٦ وكان التكرار ٠,١٨ و ٠,٤٢ في الطيور المقاومة وغير المقاومة، على التوالي، ويلاحظ أن الأليلين أعلاه أكثر انتشاراً في الطيور غير المقاومة، أما الأليل ١٨٨ فقد كان انتشاره أعلى معنوياً ( $\geq 0,01$ ) في الطيور المقاومة، إذ بلغ المشاهد منه ٥٦ و ٤٤ في حين كان المتوقع ٤٢ و ٥٨ وكان تكرار المشاهد ٠,٧٠ و ٠,٤٠ في الطيور المقاومة وغير المقاومة على التوالي.

702, PHS 01



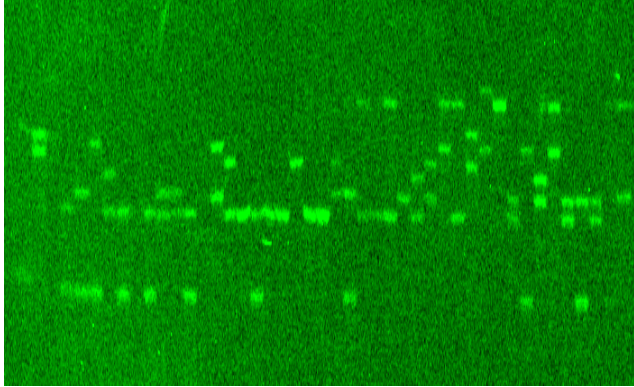
الشكل (١): اليلات البادئ PHS01: (٢٢٢، ٢١٨، ٢١٤، ٢٠٨، ١٩٢، ١٨٨).

### الأيليات الناتجة من استخدام البادئ PHS 02

وجد عند تحليل أليات التتابع البسيط المكرر المرتبط بالموقع الجيني ١٨,٣٨ - ٢١,٤٨ مليون زوج قاعدي (Mbp) على الكروموسوم الأول باستخدام البادئ PHS 02 في الموقع  $Gga1:20,56$  أن هناك ثمانية أليات مختلفة للتتابع  $20(GGATA)$  هي ٢٣٠ و ٢٢٥ و ١٩٤ و ١٨٩ و ١٨٤ و ١٨١ و ١٧٩ و ١٧٤ زوج قاعدي في مجاميع الطيور الأولى والثانية والثالثة (٧٣٢ و ٧٠٢ و ٧٢٨) على التوالي، ووجود الأليات ١٩٤ و ١٨٩ و ١٨٤ و ١٧٩ في المجموعة الرابعة ٦٢٦ المستخدمة في هذه الدراسة كما هو موضح في (الجدول ٣) و (الشكل ٢) عند مقارنة توزيع الأليات في المجموعة ٧٣٢ المقاومة مع المجموعة ٧٠٢ غير المقاومة، وجد أن هناك تمثيلاً أو انتشاراً واسعاً للأليل ١٨٤ وبفارق معنوي بين المشاهد والمتوقع ( $\geq 0,01$ )، إذ بلغ العدد المشاهد من هذا الأليل ٢٧ و ١٥٤ في حين كان العدد المتوقع له ٤٩ و ١٣١ وكانت نسبته ٠,٢٣ و ٠,٥٠ في المجموعتين المقاومة وغير المقاومة لصالح المجموعة غير المقاومة، في حين كان الأمر مختلفاً مع الأليل ١٧٩ الذي أظهر انتشاراً واسعاً في المجموعة المقاومة كما

٣٢٣ و ٣١٨ و ٣٠٣ و ٢٩٨ و ٢٨٣ و ٢٦٣ فلم تكن العلاقة معنوية بين المشاهد والمتوقع، في حين كانت العلاقة معنوية للأليلات ٢٩٣ و ٢٨٨ و ٢٨٣ وكما موضح في الجدول (٤)، بالنسبة للأليل ٢٩٣ كان المشاهد ٥ و ٢٤ وكان المتوقع ١٢ و ١٦ وبتكرار ٠,٠٦ و ٠,٢٣ في الطيور المقاومة وغير المقاومة، على التوالي، أما الأليل ٢٨٨ فكان العدد المشاهد ٨ و ٢٥ بينما كان المتوقع ١٤ و ١٩ وبتكرار ٠,١٠ و ٠,٢٤ في الطيور المقاومة وغير المقاومة، على التوالي، ويتضح من هذه النتائج أن العدد المشاهد للأليلين ٢٩٣ و ٢٨٨ أعلى من المتوقع وبتكرار أكبر في الطيور المصابة مما هو عليه في الطيور المقاومة وهذا قد يشير إلى وجود ارتباط بين تلك الأليلات والمرض، وبخصوص الأليل ٢٨٣ كان العدد المشاهد ٢٣ و ١٠ والمتوقع ١٤ و ١٩ ويمثل العدد المشاهد من الأليل نسبة ٠,٢٨ و ٠,٠٩ من العدد الكلي للأليلات في الطيور المقاومة والمصابة على التوالي، ويلاحظ الانتشار الواسع (٠,٢٨) لهذا الأليل في الطيور المقاومة.

702B, PHS03



الشكل (٣): الأليلات البادئ: PHS03 (٣٢٣، ٣١٨، ٣٠٣، ٢٩٨، ٢٩٣، ٢٨٨، ٢٨٣، ٢٦٨، ٢٦٣).

الثانية وهي الطيور المصابة التي يرمز لها بالرقم (٧٠٢) لم يُلاحظ وجود فرق معنوي في توزيع الأليلات ٣٢٣ و ٣١٨ و ٣٠٣ و ٢٩٨ و ٢٦٣ (الجدول ٢)، بينما أظهرت الأليلات ٢٨٨ و ٢٨٣ و ٢٦٨ اختلافاً معنوياً ( $\geq 0,01$ ) بين المشاهد والمتوقع، بالنسبة للأليل ٢٨٨ فقد وجد أن العدد المشاهد (٦) أقل من المتوقع (١٦) في مجموعة أفراد الطيور المقاومة، وكان العدد المشاهد (٥٠) أعلى من المتوقع (٤٠) في الطيور المصابة فضلاً عن انخفاض تكرار هذا الأليل في مجموعة الطيور المقاومة (٠,٠٥) وارتفاع تكراره بين الطيور غير المقاومة (٠,١٨) مما يعطي أهمية لهذا الأليل واحتمال ارتباطه بالمرض، كذلك الحال بالنسبة للأليل ٢٨٣ إذ وجد أن العدد المشاهد (٢٠) نسخة في مجموعة الطيور المقاومة بينما كان العدد المتوقع (٣١) نسخة وكانت نسبة هذا الأليل هي ٠,١٧، مقابل ذلك في المجموعة المصابة كان المشاهد من نسخ هذا الأليل (٨٨) والمتوقع (٧٧) وكانت نسبة التكرار (٠,٣٢) وهذا يدل على أن الأليل ٢٨٣ واسع الانتشار في أفراد المجموعة المصابة، وبذلك يصبح مجموع التكرار أو النسبة الكلية للأليلين ٢٨٨ و ٢٨٣ في هذه المجموعة تساوي ٥٠% وهي نسبة كبيرة يمكن الاعتماد عليها في الانتخاب.

أما الأليل ذو الحجم ٢٦٨ زوج قاعدي فقد كان أوسع انتشاراً في طيور المجموعة المقاومة وكان العدد المشاهد ٢٥ في حين كان العدد المتوقع من هذا الأليل ٩ وبتكرار مقداره ٠,٢١، وكان المشاهد منه ٦ والمتوقع ٢٢ وبتكرار مقداره ٠,٠٢ في مجموعة الطيور المصابة، وربما يدل هذا على ارتباط هذا الأليل بالنسخة الجينية المقاومة للمرض، أما الأليل ٢٦٣، فيعد غير مهم لانخفاض نسبة تكراره في مجموعتي الطيور المقاومة والمصابة. أما في المجموعة الثالثة التي لم يمارس فيها الانتخاب والتي يرمز لها بالرقم ٧٢٨، فقد وجدت الأليلات نفسها في المجموعتين السابقتين مع اختلاف المشاهد والمتوقع بين الطيور المقاومة والمصابة التي وجدت ضمن هذه المجموعة، بالنسبة للأليلات

الجدول (٢): يوضح عدد وحجم الأليلات الناتجة من استخدام البادئ PHS01، والمشاهد منها والمتوقع وتكرارها في الطيور المقاومة وغير المقاومة لمرض الحبن في مجاميع الدراسة.

| PHS 01<br>حجم الأليل<br>(زوج قاعدي) | المجموعة الأولى<br>٧٣٢ مقاوم |         | المجموعة الثانية<br>٧٠٢ غير مقاوم |         | المجموعة الثالثة<br>٧٢٨ مقاوم |         | المجموعة الثالثة<br>٧٢٨ غير مقاوم |         |
|-------------------------------------|------------------------------|---------|-----------------------------------|---------|-------------------------------|---------|-----------------------------------|---------|
|                                     | مشاهد: متوقع                 | التكرار | مشاهد: متوقع                      | التكرار | مشاهد: متوقع                  | التكرار | مشاهد: متوقع                      | التكرار |
| ٢٢٢                                 | ١٥ (٢١)                      | ٠,١٢    | ٥٧ (٥١)                           | ٠,١٩    | ٣١ (٨)                        | ٠,٠٣    | ٢ (٦)                             | ٠,١٢    |
| ٢١٨                                 | ٤٦ (٢٢)                      | ٠,٣٨    | ٣٠ (٥٥)                           | ٠,١٠    | ٤٧ (٣٦)                       | ٠,١٨    | ١٥ (٢٦)                           | ٠,٤٢    |
| ٢١٤                                 | ٦ (٢٠)                       | ٠,٠٥    | ٦٤ (٥٠)                           | ٠,٢٢    | ٣ (٤)                         | ٠,٠٥    | ٤ (٣)                             | ٠,٠٣    |
| ٢٠٨                                 | ٤ (٢)                        | ٠,٠٤    | ٠ (٣)                             | ٠,٠٠    | ٢ (٢,٣)                       | ٠,٠٣    | ٢ (١,٧)                           | ٠,٠٢    |
| ١٩٢                                 | ٦ (١٩)                       | ٠,٠٥    | ٦٤ (٥٠)                           | ٠,٢٢    | ١ (١,٢)                       | ٠,٠١    | ١ (١,٨)                           | ٠,٠١    |
| ١٨٨                                 | ٤٣ (٣٦)                      | ٠,٣٥    | ٨١ (٨٧)                           | ٠,٢٧    | ٤٤ (٥٨)                       | ٠,٧٠    | ٥٦ (٤٢)                           | ٠,٤٠    |

(\*): اختلاف معنوي عند مستوى احتمال ٠,٠٥، (\*\*): اختلاف معنوي عند مستوى احتمال ٠,٠١

الجدول (٣): عدد الأليلات الناتجة من استخدام البادئ PHS 02 وحجمها، والمشاهد منها والمتوقع وتكرارها في الطيور المقاومة وغير المقاومة لمرض الحبن في مجاميع الدراسة.

| المجموعة الأولى |               | المجموعة الثانية |               | المجموعة الثالثة |               | PHS 02<br>حجم الأليل<br>(زوج قاعدي) |
|-----------------|---------------|------------------|---------------|------------------|---------------|-------------------------------------|
| ٧٣٢ مقاوم       | ٧٠٢ غير مقاوم | ٧٢٨ مقاوم        | ٧٢٨ غير مقاوم | ٧٢٨ مقاوم        | ٧٢٨ غير مقاوم |                                     |
| مشاهد: متوقع    | التكرار       | مشاهد: متوقع     | التكرار       | مشاهد: متوقع     | التكرار       |                                     |
| ٤ (١)           | ٠,٠٣          | ٠ (٣)            | ٠,٠٩          | ٧ (٣,٨)          | ٢ (٥,٢)       | ٢٣٠                                 |
| ١ (٢)           | ٠,٠١          | ٠ (٥,٧)          | ٠,٠١          | ١ (٥,٩)          | ١ (١,١)       | ٢٢٥                                 |
| ٧ (٥)           | ٠,٠٦          | ١٠ (١٢)          | ٠,٠٣          | ٥ (٤,٣)          | ٥ (٥,٧)       | ١٩٤                                 |
| ٢٩ (٣٠)         | ٠,٢٥          | ٨٢ (٨٠)          | ٠,٢٦          | ٣٠ (٢٩,٥)        | ٣٩ (٣٩,٥)     | ١٨٩                                 |
| ٢٧ (٤٩)**       | ٠,٢٣          | ١٥٤ (١٣١)**      | ٠,٥٠          | ٢٢ (١٣)**        | ٩ (١٨)**      | ١٨٤                                 |
| ٣ (٥,٨)         | ٠,٠٢          | ٠ (٢)            | ٠,٠٢          | ٢ (١,٣)          | ١ (١,٧)       | ١٨١                                 |
| ٤٠ (٢٨)**       | ٠,٣٤          | ٦٢ (٧٤)**        | ٠,٢٠          | ١٤ (٢٧)**        | ٥٠ (٣٦)**     | ١٧٩                                 |
| ٥ (١)           | ٠,٠٤          | ٠ (٤)            | ٠,٠١          | ١ (٢)            | ٣ (٢)         | ١٧٤                                 |

(\* ) اختلاف معنوي عند مستوى احتمال ٠,٠٥، (\*\* ) اختلاف معنوي عند مستوى احتمال ٠,٠١.

الجدول (٤): عدد الأليلات الناتجة من استخدام البادئ PHS03 وحجمها، والمشاهد منها والمتوقع وتكرارها في الطيور المقاومة وغير المقاومة لمرض الحبن في مجاميع الدراسة.

| المجموعة الأولى |               | المجموعة الثانية |               | المجموعة الثالثة |               | PHS 03<br>حجم الأليل<br>(زوج قاعدي) |
|-----------------|---------------|------------------|---------------|------------------|---------------|-------------------------------------|
| ٧٣٢ مقاوم       | ٧٠٢ غير مقاوم | ٧٢٨ مقاوم        | ٧٢٨ غير مقاوم | ٧٢٨ مقاوم        | ٧٢٨ غير مقاوم |                                     |
| مشاهد: متوقع    | التكرار       | مشاهد: متوقع     | التكرار       | مشاهد: متوقع     | التكرار       |                                     |
| ٥ (٣)           | ٠,٠٤          | ٤ (٦)            | ٠,٠١          | ١٣ (١٥)          | ٢٢ (١٩)       | ٣٢٣                                 |
| ٢٠ (١٦)         | ٠,١٧          | ٣٦ (٣٤)          | ٠,١٢          | ٦ (٤,٦)          | ٥ (٦)         | ٣١٨                                 |
| ١٤ (١١)         | ٠,١٢          | ٢٣ (٢٥)          | ٠,٠٨          | ٧ (٦)            | ٧ (٨)         | ٣٠٣                                 |
| ١٥ (١٤)         | ٠,١٣          | ٣٦ (٣٧)          | ٠,١٣          | ١١ (٨)           | ٧ (١٠)        | ٢٩٨                                 |
| ٦ (٨)           | ٠,٠٥          | ٢٢ (١٩)          | ٠,٠٨          | ٥ (١٢)**         | ٢٤ (١٦)**     | ٢٩٣                                 |
| ٦ (١٦)**        | ٠,٠٥          | ٥٠ (٤٠)**        | ٠,١٨          | ٨ (١٤)*          | ٢٥ (١٩)*      | ٢٨٨                                 |
| ٢٠ (٣١)**       | ٠,١٧          | ٨٨ (٧٧)**        | ٠,٣٢          | ٢٣ (١٤)**        | ١٠ (١٩)**     | ٢٨٣                                 |
| ٢٥ (٩)**        | ٠,٢١          | ٦ (٢٢)**         | ٠,٠٢          | ٧ (٤)            | ٣ (٦)         | ٢٦٨                                 |
| ٧ (٩)           | ٠,٠٦          | ١٠ (٩)           | ٠,٠٤          | ٠ (١)            | ٣ (٢)         | ٢٦٣                                 |

(\* ) اختلاف معنوي عند مستوى احتمال ٠,٠٥، (\*\* ) اختلاف معنوي عند مستوى احتمال ٠,٠١.

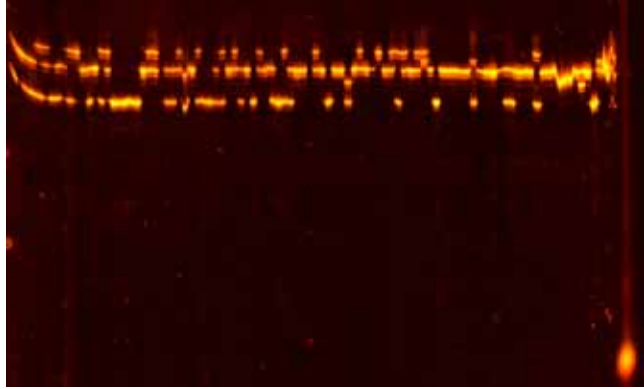
#### الأليلات الناتجة من استخدام البادئ PHS 04

كشفت أليلات التتابع البسيط المكرر Microsatellites المرتبط بالموقع الجيني ١٣,٥ - ١٥ مليون زوج قاعدي (Mbp) على الكروموسوم التاسع باستخدام البادئ (الأمامي والخلفي) PHS04 في الموقع Gga 9:13.11، ان هناك خمسة أليلات مختلفة للتتابع هي ١٦٧ و ١٦٥ و ١٦٣ و ١٥٩ و ١٥١ زوج قاعدي (GA)<sub>13</sub> في مجاميع الطيور الأولى والثانية والثالثة (٧٣٢ و ٧٠٢ و ٧٢٨) على التوالي، (الجدول ٥)، (الشكل ٤).

وجد عند مقارنة المشاهد والمتوقع من الأليلات في طيور المجموعة الأولى ٧٣٢ والتي تضم طيوراً مقاومة للمرض مع طيور المجموعة الثانية ٧٠٢ غير المقاومة إن هناك فرقاً معنوياً

( $\geq 0,01$ ) بين العدد المشاهد والمتوقع للأليل ١٦٥ في المجموعتين، إذ لوحظ أن العدد المشاهد من الطيور التي تحمل هذا الأليل في المجموعتين الأولى (٧٣٢) والثانية (٧٠٢) هو ٠ و ١٣ وكان العدد المتوقع من هذا الأليل ٤ و ٩ وبلغت نسبة المشاهد من الأليل ١٠ و ٠ في تلك المجموعتين على التوالي، و يلاحظ وجود الأليل في الطيور المقاومة حصراً وبنسبة جيدة مما يعطي أهمية للأليل في حالة اللجوء للانتخاب ضد المرض، كذلك وجد تمثيل عالي ومعنوي ( $\geq 0,01$ ) للأليل ١٦٣ في مجموعة الطيور المقاومة، إذ وجد ان العدد المشاهد ٧٣ و ١٢٦ بينما كان العدد المتوقع ٥٦ و ١٤٢ وبلغت نسبة المشاهد ٠,٦٠ و ٠,٤١ في كل من مجموعتي الطيور المقاومة و غير المقاومة على

702,732.phs04



التوالي، في حين أظهر الأليل ١٥١ اختلافاً معنوياً ( $\geq 0,01$ ) لصالح الطيور غير المقاومة، فقد وجد أن العدد المشاهد من الطيور التي تحمل هذا الأليل ١٥ و ١٣٣ وكان العدد المتوقع من هذه الطيور ٤١ و ١٠٦ وبلغ تكرار المشاهد ٠,١٢ و ٠,٤٣ في مجموعتي الطيور المقاومة وغير المقاومة على التوالي. في المجموعة ٧٢٨، أبدت الطيور التي تحمل الأليل ١٥١ استعداداً وراثياً للإصابة بالمرض من خلال الفرق المعنوي ( $\geq 0,01$ ) بين المشاهد والمتوقع بين الطيور المقاومة وغير المقاومة، إذ وجد أن العدد المشاهد من الطيور بلغ ١١ و ٤٦ بينما كان المتوقع منها ٢٤ و ٣٣ وبتكرار قدره ٠,١٣ و ٠,٤٢ في مجموعتي الطيور المقاومة وغير المقاومة على التوالي.

شكل (٤): اليلات البادئ: PHS 04 (١٦٧، ١٦٥، ١٦٣، ١٥٩، ١٥١) زوج قاعدي.

الجدول (٥): عدد الأليلات الناتجة من استخدام البادئ PHS 04 وحجمها، والمشاهد منها والمتوقع تكرارها في الطيور المقاومة وغير المقاومة لمرض الحبن في مجاميع الدراسة.

| PHS 04<br>حجم الأليل<br>(زوج قاعدي) | المجموعة الأولى<br>٧٣٢ مقاوم |         | المجموعة الثانية<br>٧٠٢ غير مقاوم |         | المجموعة الثالثة<br>٧٢٨ غير مقاوم |         |
|-------------------------------------|------------------------------|---------|-----------------------------------|---------|-----------------------------------|---------|
|                                     | مشاهد: متوقع                 | التكرار | مشاهد: متوقع                      | التكرار | مشاهد: متوقع                      | التكرار |
| ١٦٧                                 | ١٤ (١٧)                      | ٠,١١    | ٤٩ (٤٤)                           | ٠,١٥    | ١١ (١٢)                           | ٠,١٣    |
| ١٦٥                                 | ١٣ (٤)                       | ٠,١٠    | ٠ (٩)                             | ٠,٠     | ٩ (٦)                             | ٠,١١    |
| ١٦٣                                 | ٧٣ (٥٦)                      | ٠,٦٠    | ١٢٦ (١٤٢)                         | ٠,٤١    | ٤٧ (٤٠)                           | ٠,٥٧    |
| ١٥٩                                 | ٧ (٤)                        | ٠,٠٦    | ٠ (٥)                             | ٠,٠     | ٤ (٢)                             | ٠,٠٤    |
| ١٥١                                 | ١٥ (٤١)                      | ٠,١٢    | ١٣٣ (١٠٦)                         | ٠,٤٣    | ١١ (٢٤)                           | ٠,١٣    |

(\*): اختلاف معنوي عند مستوى احتمال ٠,٠٥، (\*\*): اختلاف معنوي عند مستوى احتمال ٠,٠١.

#### المناقشة

أما المنطقة ١٢٧,٠١ - ١٢٨,٥ مليون زوج قاعدي (Mbp) على الكروموسوم الأول، المستهدفة بالبادئ ١٤٤ إذ يوجد الجين المسؤول عن الأنزيم Rho-GTPase، المعروف بتأثيره في ارتفاع ضغط الدم (١١). وان وجود الفرق المعنوي بين المشاهد والمتوقع لاليلات المؤشر (الجدول ٤) تؤكد وجود الارتباط غير المتزن للمؤشر (Linkage Disequilibrium) بالمنطقة الجينية المستهدفة ومن ثم وجود علاقة بين هذا الموقع مع المقاومة أو الإصابة بالمرض وبالتالي يمكن إدراج هذا الموقع ضمن الخارطة الوراثية للمرض.

تم استهداف المنطقة ١٣,٥ - ١٥ مليون زوج قاعدي (Mbp) على الكروموسوم التاسع بواسطة البادئ ١٥، تحتوي المنطقة على الجين Angiotensin II Type1 Receptor (AGTR1)، وهو الجين المسؤول عن أنزيم Angiotensin الذي يفرز من الكبد إلى مجرى الدم وعندما يصل إلى الرئتين يتحول إلى (2) Aniotensin Converting تحت تأثير أنزيم (Enzyme) وله علاقة وثيقة بحدوث ارتفاع الضغط الشرياني

إن المنطقة الجينية ١٨,٣ - ٢١,٤٨ Mega base pair (مليون زوج قاعدي) الواقعة على الكروموسوم الأول، تحتوي على جين P<sub>38</sub>MAPK ويعرف أيضاً بالاسم MAPKII (Mitogen activated protein kinase II). وهو يساعد على تنشيط المسارات الحيوية الكيميائية (Biochemical pathways) للأنزيم (Angiotensin II). كما انه يشترك مع الأنزيم c-Jun-N- terminal kinase في نمو العضلات القلبية وتضخمها (١٠) إن وجود الفرق المعنوي (الجدولين ٢ و ٣) بين المشاهد والمتوقع على المستوى الأليلي للبادئات ١١٨ و ١٢٦ يؤكد قوة المؤشر في الكشف عن هذا الموقع وكذلك علاقة الموقع في التأثير على الإصابة أو مقاومة المرض حسب ما أشار إليه (٨)، وبالتالي يمكن إدراج المنطقة ضمن الخارطة الوراثية لمرض الحبن، ويمكن الاعتماد على التكرارات العالية في حالة اللجوء للانتخاب حسب ما تم التوصل إليه في كل مجموعة.

3. Emara M G, Kim H. Genetic markers and their applications in poultry breeding. *Poult Sci.*2003;82:952-957.
4. Jerry B, Hans H, Ronald O. DNA marker technology:A Revolution in animal genetics. *Poult Sci.*1997;76:1108-1114.
5. Gonzales E, Buyes L, Takita T S, Sartori J R. Metabolic disturbance in male broilers of different strains. 1. Performance , mortality, and right ventricular hypertrophy. *Poult Sci.* 1998;77:1664-1653.
6. Maxwell M H, Robertson G W, Spence S. Studies on ascites syndrome in young broilers. *Avian Pathol.*1986 ;15:511-524.
7. Mersalimi S M, Brien J O, Julian. Blood volume increase in salt-induced pulmonary hypertension, heart failure and ascites in broiler and white leghorn chickens. *Canadian Journal of Veterinary Res.* 1992b;57:110-113.
8. Smith C D. Application of variable number of tandem repeats genotyping in the validation of an animal medical model and gene flow studies in threatened populations of reptiles. PhD Thesis, Univ. of Arkansas USA,2009.
9. Rhoads D. Molecular genetic laboratory procedure. University of Arkansas, SA, 2008.
10. Metha P K, Griendling K K. Angiotensin II cell signaling physiological and pathological effect in the cardiovascular system. *Am J Physiology Cell Physiol.*2007; 1:C82-97.
11. Humbert M, Morrell N. Cellular and molecular pathology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol.*2004;43:13-24.
12. Abraham W T, Reynolds M V. Angiotensin converting enzyme DD genotype in patients with primary pulmonary hypertension: increased frequency and association with preserved hemodynamics'. *Journal of Renin – Angiotensin – Aldosterone System* 2003;1:27-30.

الرئوي (١٢) و (٨)، ويظهر الجدول ٥ فروقات معنوية بين المشاهد والمتوقع من اليلات هذا المؤشر في كل من الطيور المقاومة وغير المقاومة وهذا يشير الى الارتباط غير المتزن بين اليلات المؤشر والمنطقة الجينية القريبة المستهدفة في كل من الطيور المقاومة وغير المقاومة بالإضافة الى ان الفروقات المعنوية تعني وجود علاقة بين المنطقة الجينية والمقاومة او الإصابة بالمرض، ان النتائج المعنوية للتحليل الإحصائي لتوزيع او انتشار الاليلات في كل الطيور المقاومة وغير المقاومة للمرض يشير الى وجود علاقة بين جميع المناطق المنتخبة مع مرض الحبن في دجاج انتاج اللحم، أما في حالة عدم الحصول على فروقات معنوية عند المستوى الاليلي فيمكن اللجوء الى تحليل التراكيب الوراثية للأفراد او تحليل النمط الفردي للاليلات المتجاورة على كروموسوم واحد Haplotype للتأكد من علاقة الموقع الجيني مع الصفة قيد الدراسة.

#### المصادر

1. Bloom S E, Delany M E, Muscarella D E. Manipulation of the avian genome. CRC Press, Boca Raton, 1993.
2. Groenen M A, Cheng H H, Bumstead N, Benkel B F, Briles T, Bruke D W, Burt L B, Hillel J, Lamont S J. A consensus linkage map of the chicken genome. *Genome Res.*2000; 10:137-147.