تحديد درجة القرابة الوراثية بين طرز وراثية من الدجاج البلدي باستخدام تقنية الـ ISSR

ميشيل نقولا(1) **سلام لاوند(2)** **شيرين العيسى(3)**

المُلخَّص

أجريت الدراســـة على 30 عينة دم من طرز وراثبة للدجاج البلدي في مخبر التقانات الحيوية التابع لكلية الزراعة – في جامعة دمشــق لتحديد درجة القرابة الوراثية فيما بينها، وذلك باســتخدام تقنية تكرارات المقاطع الداخلية البســيطة ISSR (Inter Simple Sequence Repeats)، واســتخدم لهذا الغرض 12 بادئة. أثبتت جميع البادئات فعاليتها في إعطاء تعددية شـكلية (polymorphism) بين االعينات المدروســة، ونجم عن اســتخدامها مجموعه 63 حزمة بنســبة تعددية عالية بلغت 97.56%، منها61 حزمة متعددة شــكليا، تراوح عدد الحزم بين ثلاث حزم للبادئة (p25)(p12)(p1) و8 حزم للبادئة (p10) كأعلى عدد من الحزم بين عينات الدجاج المدروســـة، تراوحت درجة القرابة الوراثية مابين(0.0227 –0.8251) للطرزالوراثية المدروسة من الدجاج البلدي حيثُ كانت أقل قيمة لــ PDV هي 0.02 بين النمطين الأنثى البنية مع الانثى البنية، بينما سُجلت أعلى قيمة لها 0.82 بين النمطين الذكرالأسود والانثى البيضـاء، وكانت النسبة المئوية للتعـدديـة الشـــكليـة الأقـل مـع الـبـادئـة (p21) بـمـقـدار83.3% والأكبـر مـع الـبـادئـات (P1,P3,P12,P13,P14,P15,P16,P25,P26,P28) بمقدار100%، تراوحت قيم معامل التعددية الشـــكلية بين 0.233 كأقل قيمة مع البادئ p12 و 0.500 كأعلى قيمة مع كلا من البادئات p10، p26 ، p28 وبمتوسط قدره 0.411 . فرز التحليل العنقودي الطرز الوراثية المدروسة الذكور عن الاناث، وأظهرت النتائج تنوعاً وراثياً بين الطرز الوراثية المدروسة ضمن كل مجموعة.

الكلمات المفتاحية: الدجاج البلدي، تقنية تكرارات المقاطع الداخلية البسيطة ISSR، قرابة وراثية، معامل التعددية الشكلية.

(1) أستاذ مساعد، ،قسم انتاج حيواني، كلية الهندسة الزراعية جامعة البعث
(2) أستاذ مساعد ، قسم المحاصيل الحقلية ، كلية الهندسة الزراعية ، جامعة دمشق
(3) طالبة دكتوراة في الهندسة الزراعية، قسم انتاج حيواني، جامعة الفرات

المقدمة

يعرف التنوع الوراثي Genetic diversity داخل الأعداد الكبيرة من الأنواع والسلالات التي تنتشر في نطاق جغرافي واســع، بأنه مجموعة من الخصــائص والمتغيرات، ويزداد التباين الوراثي بين هده الأنواع مع ازدياد التباعد الجغرافي فيما بينها، والعزلة الديموغرافية لكل نوع أو ســـلالة (Parker *et al.* 2004). ويعزى الاختلاف الوراثي بين سلالات الدواجن المختلفة التي تم تجميعها أثناء عملية التدجين الى عدة أسباب منها: تأثير مكان منشــأ الســلالات أثناء عملية التدجين، العزلة اللاحقة للســلالات المدجنة والظروف البيئية التي تعيش فيها والتي يمكن أن تحدث مجموعة من الانحرافات الوراثية، أو انتخاباً طبيعياً ذاتياً داخل هده الســلالات، إضــافة الى معايير التكاثر التي يفرضــها المربون وفقاً للصــفات إالإنتاجية التي يرغبون فيها من هده الســلالات، ويتم حالياً توزيع التنوع الوراثي بين ســلالات الدجاج المحلية التقليدية والســلالات المعيارية المختارة وفقاً لسلالة معينة من أجل استنباط خطوط تجارية قياسية ذات صفات محددة ومختارة بعناية فائقة (Tixier Boichard *et al.* 2009). وقد أشــار بعض الباحثين الى أن فقدان عدد من ســلالات الدجاج البلدية الأصــلية، وبالتالي انخفاض التنوع الوراثي قد حدث نتيجة لاســتبدال الدجاج البلدي بســلالات محددة سواء في المزارع الريفية الصغيرة أو المداجن الضخمة لتلبية الطلب المتزايد على منتجات الدجاج من البيض واللحوم(Hoffmann 2010; Ozdemir *et al.* 2013). مما يستدعي مواجهة فقدان التنوع الوراثي داخل الأنواع، واتخاد تدابير المحافظة على الحيوانات الأصـــلية، والمصـــادر الوراثية المتنوعة من أجل الاحتفاظ بالقدرات الوراثية لتأمين التحديات المستقبلية غير المتوقعة والمتعلقة بشكل أساسي بالقدرة على التكيفات مع المتغيرات المختلفة، ويجب أن تستند هده التدابير على رؤية شاملة وفهم واضح لأهمية التنوع الوراثي داخل الأنواع (Simianer 2005; Oldenbroek, 2007; Lenstra *et al.* 2012). وتعد عملية التنوع الوراثي والتوصيف الديموغرافي لمجموعات الدجاج المختلفة هامة للغاية عند تحديد أولويات الحفظ (Groeneveld *et al.* 2010).

تقدم المؤشـــرات الجزيئية Molecular markers معلومات مفيدةً عن تركيب الجماعة Population Structure وعلاقات القرابة Phylogeny بالإضـافة إلى التحقق من الأنسـاب (Feral , 2002) وتسـاعد في تطبيق الانتخاب (Bünger,2008) من خلال مقدرتها على توصـيف مواقع الصـفات الكمية المرتبطة بالمؤشـر Marker assisted Selection (MAS). كما أنها تسـمح بدراسـة التكوين الوراثي للأفراد على مستوى الـــ DNA (Nagvi , 2007) وتزود بمعلومات عن تنوع الصـنويات لموقع وراثي معين وبالتالي تحدد التنوع الوراثي وتكشـــف عن الجينات التي تؤثر في الصـــفات المهمة اقتصـــادياً (Erhardt & Weimann , 2007) يضـــاف إلى ذلـك أهميتهـا في تحـديـد مواقع الصـــفـات الكميـة (QTL) Quantitative trait Loci (Simianer,2005) ورســم خرائط الارتباط الوراثية Genetic Linkage (Diez-Tascon *et al*., 2000; Moazami-Goudarzi *et al* ., 1997) . تتميز معلماتISSR بأنها تعطي عددا كبيرا من الحزم، والقدرة العالية على التضـــخيم ، والتكاليف المنخفضـــة نســـبيا كما ان جهد تنفيذها منخفض(Van Der nest وزملاؤه 2000) وتعد هذه التقنية بشـــكل عام بســـيطة وســـريعة وذات مصـداقية عالية ويمكن تصـميم بادئاتها بسـهولة، وبدون معلومات مسـبقة عن التسـلسـل الجيني لقطعة الـ DNA (Qian *et al*. 2007 ؛2004،Polibok ,Rakoczy–Troganowska). درس Jossi وزملاؤه (2003) التنوع الوراثي مابين اثنان وخمسون سلالة من الدجاج باستخدام 22 واسم جزيئي وتبين ان متوسط عدد القرائن مابين الســـلالات المختلفة 9.6 ومتوســـط حجم القرين pb191 . ودرس التنوع الوراثي مابين خمس عروق من الدجاج التجاري (Leghorn، New Hampshire Red ،Cornish, , Plymouth Rock, Rhode Island Red) اعتمادا على 40 مؤشـرا جزيئيا حيث وجد اختلاف وراثي كبير مابين عرق Leghorn والعروق الأخرى (Tadano *et al*. 2007a). وتعتمد هذه التقنية على وجود سـلاسـل بسـيطة متكررة (SSR) في الحمض الريبي النووي منقوص الأوكســـجين بتتـابع يتـألف من زوج قـاعـدي واحـد (Bruford و Wayne، 1993) إلى عدة أزواج قاعدية وعادة تكون بطول 1–6 أزواج قاعدية مكررة في

مسـارات منتظمة (Provan *et al*.2001) وتنقسـم إلى تكرارات أحادية، ثنائية، ثلاثية، رباعية، خماسـية وسداسية (Provan *et al*.1999) حيث يتم تضـخيم المنطقة الموجودة بين المايكروستالايت والمجاورة للبادئات المسـتخدمة، ويسـتخدم لذلك نوعين من البادئات تسـمى الأولى منها anchored primers وهي بادئات تحوي بالإضافة إلى تكرارات بعض السلاسل البسيطة على لاحقة واحدة في أحد الاتجاهين'3 أو 5' (Davila *et al*.1999) وتسمى الثانية nonanchored primers وهذه تحوي فقط على تكرارات بعض السلاسل البسيطة بدون وجود أي لاحقة بأي اتجاه من السلسلة (Bornet و Branchard، 2001)، تعد تقنية ISSR أكثر التقنيات تكرارية بسبب طول البادئ المستخدم (Chowdhury وزملاؤه 2002). إمكانية الكشـف عن التتاليات النيكليوتيدية ذات السـيادة في التوريث، ووفرتها وتواجدها في مجينات حقيقيات النوى ولا تحتاج إلى معلومات عن التسلسل النكليوتيدي المدروس (Kijas *et al*.1995). ويمكن نشر البادئات وتبادلها بسـهولة بين المخابر بمجرد معرفة التسـلسـل النيكليوتيدي لها (Ziekiewicz *et al*.1994). قام(Grygorieva *et al*. 2020 بدراسـة التنوع الوراثي للدجاج باسـتخدام تقنية ISSR تم اسـتخدام 7بادئات حيث أعطت ما مجموعه 74 حزمة واسـتطاعت تقنية ISSR التمييز بين احجام الدجاج الكبيرة والمتوسطة والصغيرة. كما قام Tuncaو Taskin(2016) بدراسة التنوع الوراثي لستة مجموعات من الدجاج المحلي في تركيا باسـتخدام 15 بادئة لتقنية الـــ ISSR ونجم عنها 86حزمة ، وقد وجد (*et al*.2003 Hillel) ان المسافة الوراثية تراوحت بين (0.19) لخط الفروج Reynolds و(0.61) لـــ Landrace الفلندي.

مبررات البحث:

يعد تحديد درجة القرابة الوراثية مهماً في مجال برامج التربية المستقبلية، حيث سيتمكن مربو الحيوان من إدخال واستثمار الطرز الوراثية المتفوقة والمتأقلمة بيئياً في الانتخاب والتهجين للوصول إلى سلالات مبشرة وطرز مما سيوفر الجهد والوقت والتكاليف العالية. وبناءً عليه يهدف هذا البحث إلى تحديد درجة القرابة الوراثية لطرز وراثية من الدجاج البلدي باستخدام تقنية ISSR.

مواد البحث وطرائقه

1- مكان تنفيذ البحث:

تم تنفيذ البحث في مخبر التقانات الحيوية التابع لكلية الزراعة بجامعة دمشق خلال 2021-2022

2- المادة الحيوانية:

تتألف المادة الحيوانية من 30 عينة تم الحصول عليها من منطقة الشميطية في ريف دير الزور. جمعت عينات الدم من الوريد الجناحي للطيور بمقدار(1) مل ووضعت في انابيب تحوي على مادة مانعة للتخثر EDTA ثم نقلت العينات في الثلج وخزنت في درجة حرارة −20 م حتى موعد استخلاص 30عينة دم من الطرزالوراثية للدجاج البلدي الـ DNA. جدول 1.

الجدول 1.العينات المدروسة من الدجاج البلدي

اللون	صفات النمط
ابيض	انثى دجاج
ابيض	انثى بلدي
ابيض	انثى دجاج
بني	انثى بلدي
ابيض	ذكر بلدي
اسود	انثى بلدي
اسود	انثى بلدي
اسود	انثى بلدي
ابيض	انثى بلدي
بني	انثى بلدي
ابيض	انثى بلدي
رمادي	انثى بلدي
بني	انثى بلدي
ابيض	انثى بلدي
اسود	انثى بلدي
بني	ذكر بلدي
اسود	ذكر بلدي
بني	انثى بلدي
بني	انثى بلدي
رمادي	انثى بلدي
بني	انثى بلدي
ابيض	ذكر بلدي
ابيض	انثى بلدي
ابيض	انثى بلدي
رمادي	انثى بلدي
بني	انثى بلدي
رمادي	انثى بلدي
رمادي	انثى بلدي
رمادي	ذكر بلدي
اسود	انثى بلدي

3- استخلاص الحمض الريبي النووي الDNA :

استخلص الDNA بواسطة كيت استخلاص من شركة iNtRON,sG-spin^{TM} حسب الخطوات التالية:وضع 200 ميكروليتر من الدم في أنبوب دقيق سعة 1.5مل واضيف اليه 20 ميكروليتر بروتيناز K و5ميكروليتر RNase ويمزج ويخلط وبعده يضاف 200ميكروليتر من محلول BL ويخلط جيدا، يترك المزيج في درجة حرارة الغرفة لمدة دقيقتين، تحضن العينات في حمام مائي لمدة 10 دقائق في درجة حرارة 56°م، نترك المحلول لفترة وجيزة في أنبوب سعة 1.5مل لازالة القطرات من داخل الغطاء، اضيف 200ميكروليتر من الكحول الايتيلي المطلق ويخلط جيدا بواسطة خلاط vortex، وبعد الخلط لفترة تترك أيضا للتخلص من القطرات من داخل الغطاء، وضعت العينات في جهازالطرد المركزي على سرعة 13000rpm لمدة دقيقة واحدة، اضيف 700ميكروليتر من محلول WA {اضيف اليه 40 مل من الكحول الايتيلي} ووضعت في جهاز التثفيل على سرعة 13000rpm لمدة دقيقة واحدة. ونزيل الفلتر ونضع العينات في انابيب جديدة سعة 2 مل مع ترقيم العينات ثم وضعت في جهاز التثفيل لمدة دقيقة واحدة على سرعة 13000الف دورة /دقيقة.اضيف بعدها 30-100ميكروليتر من محلول CA وحضنت لمدة دقيقة واحدة في درجة حرارة الغرفة وبعدها الى جهاز الطرد المركزي لمدة دقيقة واحدة على سرعة 13000 دورة /دقيقة.حل الحمض النووي DNA في50µl من محلول TE المكون من[10 mM Tris-Hcl، 1 mM EDTA PH=8]حفظت العينات على درجة حرارة 4 م لمدة 24 ساعة ثم خزنت على درجة حرارة -20م لحين الاستخدام.

4-تطبيق تقنية ISSR :

استخدم في الدراسة 12 بادئة تم الحصول عليها من الهيئة العامة للطاقة الذرية في سورية، ويوضح الجدول (2) التسلسل النيكليوتيدي ودرجة حرارة الالتحام للبادئات المستخدمة.

الجدول 2. التسلسل النيكليوتيدي للبادئات المستخدمة باستخدام تقنية ISSR ودرجة حرارة التحامها.

البادئة	التسلسل النيكليوتيدي للبادئة	درجة حرارة الالتحام (°م)
P1	$(AG)_8C$	52
P3	$(GA)_8T$	50
P10	$(CT)_8G$	52
P12	$(CA)_7AG$	48
P13	$(TC)_8C$	52
P14	$(TG)_8G$	52
P15	$(AC)_8TT$	52
P16	$(AC)_8GG$	56
P21	$CCAG(GT)_7$	56
P25	$(AC)_8T$	50
P26	$(GT)_4(GA)_5$	52
P28	$(CA)_8G$	54

أُجري تفاعل البلمرة المتسلسل PCR وفقاً لـــ Lawyer وزملائه (1993) مع بعض التعديلات فكان حجم التفاعل النهائي 25 µl باســـتخدام 2X Master mix تم الحصـــول عليه من شـــركة (Fermentas, Germany): يتكون التفاعل من 2µl من البادئ بتركيز 10mM و 12.5µlمن Master mix و 8.5µl ماء مقطر والـDNA بتركيز 40ng/µl. ويتم هذا التفاعل في جهاز التدوير الحراري وفقاً للظروف التالية:

1- الانفصال: عند درجة حرارة 94 °م لمدة 5 دقائق ليتم انفصال سلسلتي الحمض النووي DNA.

2- 40 دورة تتضمن كل منها المراحل التالية:

- الانفصال : يتم عند حرارة94 °م لمدة 30 ثانية.

- الالتحام: حسب درجة حرارة الالتحام لكل بادئ من الجدول 2 وذلك لمدة دقيقة واحدة.

- الاستطالة عند حرارة 72 °م لمدة دقيقة.

3- اكتمال الاستطالة عند درجة حرارة 72 °م لمدة عشر دقائق.

ثم تحفظ العينات في درجة حرارة 4 °م ، بعد ذلك نقوم بالترحيل على هلامة الآجاروز.

5- الرحلان الكهربائي والتلوين والتصوير:

تم الترحيل على هلامة الآجاروز 2 % في المحلول المنظم TBE 1X {(10X TBE buffer = 108 g Tris borate + 55 g Boric acid + 9.2 EDTA, pH 8.0)}و المضـــاف إليها 5µl من صـــبغة الايثيديوم بروماید (10 mg/ml)، حيث حملت عينات الحمض النووي DNA على هلامة الآجاروز بإضـــافة 5 ميكرولتر من ســـائل التحميل الخاص (1X Loading buffer Bromophenol blue) و المكون من:

(15% Ficoll 400 + 1.03 % Bromophenol blue + 0.03 % xylene cyanol FF + 0.4 % Orange G + 10 mM Tris-HCl + 50 mM EDTA)

كما تم حقن مؤشـــر من الحمض النووي (DNA) 1Kpb من شـــركة (Fermentas, Germany)، وذلك لتحديد الحجم و الوزن الجزيئي للحزم الناتجة ليتم بعد ذلك الترحيل بمرور حقل كهربائي قدره 100 فولط وذلك لفصل حزم الـــــحمض النووي DNA الناتجة عن التضخيم، لتصور الهلامة بعد ذلك بجهاز تصوير هلامة الآجاروز Image Analyzer.

6 - التحليل الإحصائي:

جُمعت نتائج عملية الرحلان الكهربائي الناتجة عن تطبيق تقنية ISSR ونُظمت الجداول لكل بادئة على حدة اعتماداً على وجود أو غياب حزم الحمض النووي DNA في العينات المدروســـة، حيث يدل الرقم 1 على وجود حزمة الـــحمض النووي الواضحة فقط والرقم 0 يدل على غياب الحزمة حسب Nei، (1987)، وأُجري التحليل الإحصـــائي باســـتخدام البرنامج POPGENE V1.31 (Yeh وزملاؤه، 1999). وتمت دراسـة العلاقة الوراثية بين الانماط الوراثية المدروسـة بتطبيق مصـفوفة النسـب المئوية لعدم التوافق (PDV) Percent Disagreement Values ويتم إنشـاء هذه المصـفوفة وفقاً لعدد وحدات التضـاعف المشـتركة بينها وفقاً لـــ Nei، (1972)، حيث أن ارتفاع قيم هذه المصفوفة يدل على وجود اختلاف وراثي، وبازديادها يزداد التباين الوراثي بين النمطين المدروســين، وأُجري التحليل العنقودي اعتماداً على نتائج المســافة الوراثية بين الطرز المدروسة وفقاً لمعادلة Nei، (1978) ، ورسمت شجرة القرابة الوراثية (Dendrogram) بتطبيق متوسطات المجموعات الزوجية غير المتزنة UPGMA حسب Sneath و Sokal، (1973). حسبت قيم معامل التعددية الشكلية للبادئات المستخدمة وفق المعادلة:

$PIC = [\Sigma 2(PI(1- PI)^2]$ حيث Pi تكرارية الحزم I الناتجة عن اســـتخدام البادئ في جميع العينات المدروسة.(Botstein et al. 1980 ؛ Mohammadi و Prasanna، 2003) .

النتائج والمناقشة

1- التعددية الشكلية polymorphism:

بينت النتائج (الجدول 3) أن 12 بادئة من البادئات المدروســـة أعطت منتجات تضـــخيم في تفاعل البلمرة المتسلسل حيث أثبتت البادئات المستخدمة فعاليتها في إعطاء تعددية شكلية بين الطرز الوراثية المدروسة ونجم عن اســـتخدام هذه البادئات حزم مجموعها63 حزمةً (قطعة من DNA)، حيث أعطت هذه البادئات

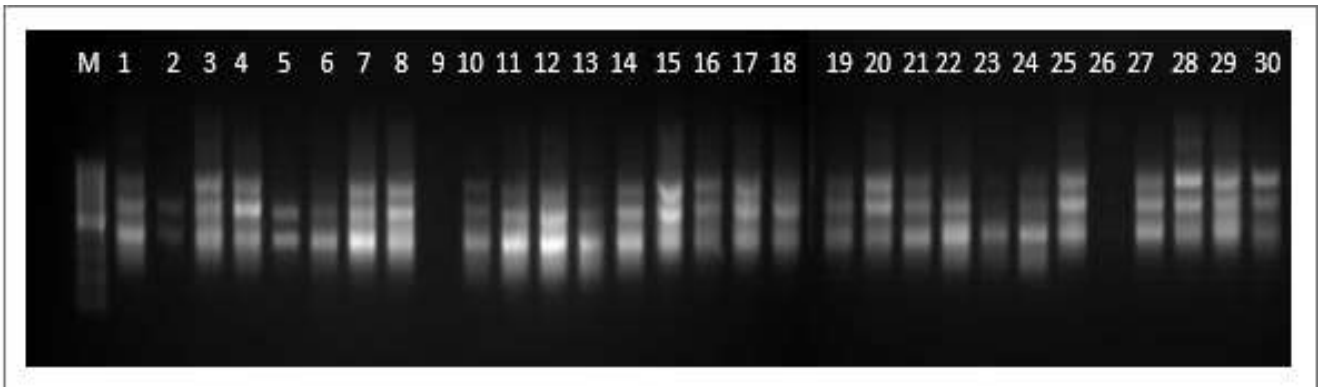
تعددية شــكلية (polymorphism) بلغت نســبتها 97.56%، كما تراوح عدد الحزم لكل بادئة بين ثلاث حزم كأقل عدد مع البادئة (p25)(p12)(p1) و8 حزم كأعلى عدد مع البادئة (p10) بمتوسط بلغ 5.25 حزمة لكل بادئة.

الجدول 3 . رموز البادئات المستخدمة، عدد الحزم الكلية والمتباينة، النسبة المئوية للتعددية الشكلية % في عينات الدجاج المدروسة.

اسم البادئة مع عينات الدجاج المدروسة	عدد الحزم الكلية	عدد الحزم ذات التعددية الشكلية	النسبة المئوية للتعددية الشكلية %	معامل التعددية الشكلية PIC
P1	3	3	100	0.266
P3	5	5	100	0.424
P10	8	7	87.5	0.500
P12	3	3	100	0.233
P13	5	5	100	0.477
P14	6	6	100	0.496
P15	4	4	100	0.281
P16	7	7	100	0.482
P21	6	5	83.3	0.494
P25	3	3	100	0.335
P26	6	6	100	0.500
P28	7	7	100	0.500
المجموع	63	61	-	4.936
المتوسط	5.25	5.08	97.56	0.411

وكانت النســبة المئوية للتعددية الشــكلية الأقل مع البادئة (p21) بمقدار83.3% والأكبر مع البادئات(P1,P3,P12,P13,P14,P15,P16,P25,P26,P28) بمقدار100%. الشــكل 1، كما تباينت

البادئات التي استخدمت في هذه الدراسة بقيم معامل التعددية الشكلية (PIC) التي وجدت بين الأنماط، حيث كانت أعلى قيمة لمعامل التعددية الشكلية هي0.500 باستخدام البادئة p10، p26 ، p28 وكانت أقل قيمة لمعامل التعددية الشكلية هي0.233 باستخدام البادئة p12 وبمتوسط قدره 0.411 .



الشكل1. صورة هلامة الآجاروز2% توضح التعددية الشكلية الناتجة عن استخدام البادئة (p12) في جميع الأنواع المدروسة، M يمثل المؤشر الجزيئي لتحديد الأوزان وأحجام حزم الحمض النووي DNA.

تحديد درجة القرابة الوراثية بين الانماط الوراثية المدروسة:

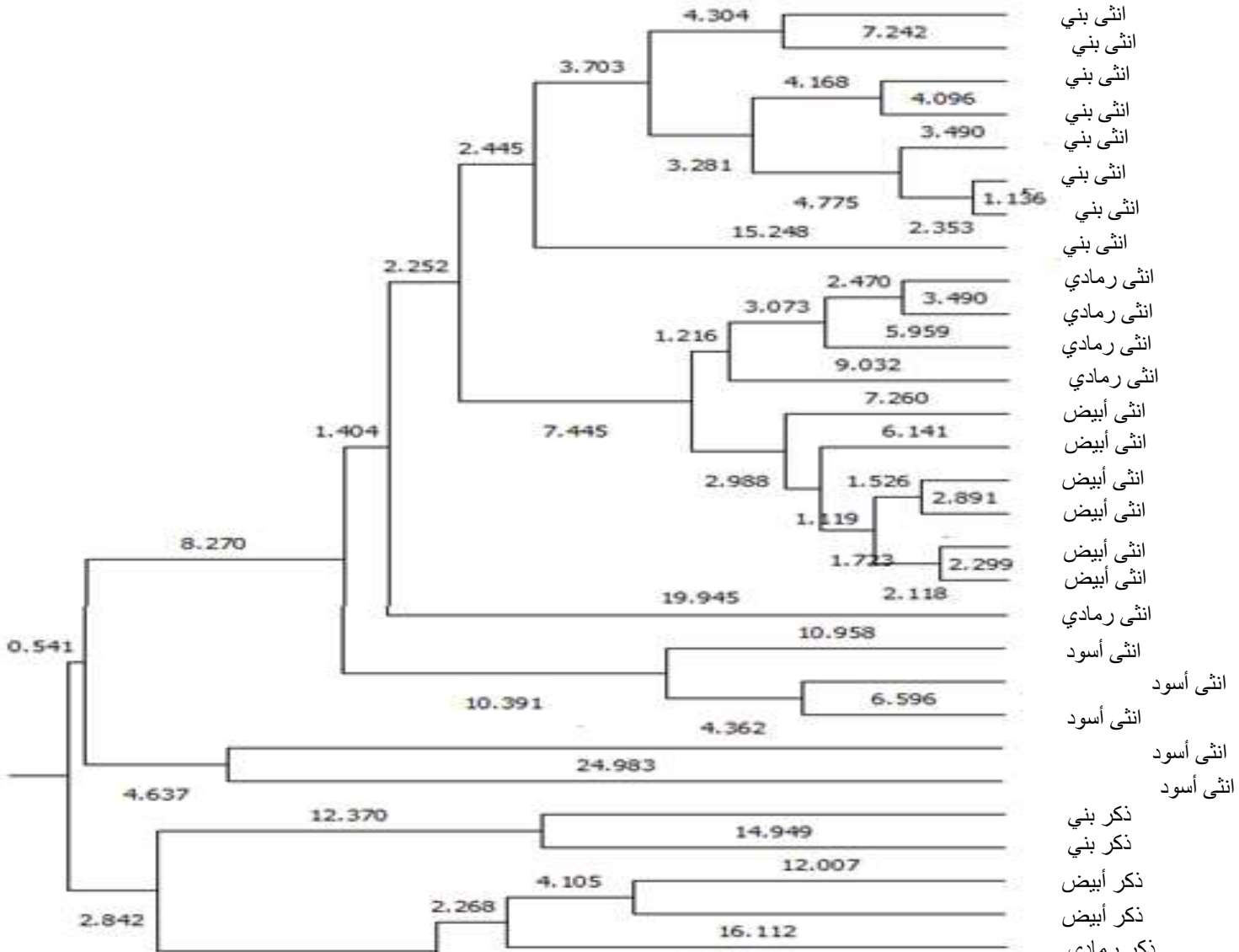
يفيد تحديد درجة القرابة الوراثية بين االطرز الوراثية في برامج تربية الحيوان، لتأمين قاعدة وراثية كبيرة، للاستفادة منها في برامج التهجين، وعلى إمكانية انتقال المورثات بين الأنواع والطرز، يُلاحظ من الجدول 4 أن أقل قيمة لـــــ PDV هي 0.02 بين النمطين الأبيض والرمادي، بينما سُـــجلت أعلى قيمة لها 0.82 بين النمطين الذكرالبني والانثى البنية وهذا يدل على تباعد وراثي بينها.

الجدول4. مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق (PDV) بين الطرز الوراثية للدجاج البلدي المدروسة.

	أنثى بنية	أنثى بنية	أنثى بنية	أنثى موحدة	أنثى موحدة	أنثى موحدة	أنثى موحدة	أنثى موحدة	أنثى موحدة	أنثى بيضاء	أنثى بيضاء	أنثى بيضاء	أنثى بيضاء	أنثى رمادية	أنثى رمادية	أنثى رمادية	أنثى رمادية	ذكر بني	ذكر أسود	ذكر أبيض	ذكر أبيض	أنثى بنية	أنثى بنية	ذكر رمادي	أنثى بنية	أنثى بيضاء	أنثى بيضاء	أنثى بيضاء	أنثى بيضاء	أنثى رمادية	أنثى رمادية
أنثى بنية	—																														
أنثى بنية	0.82	—																													
أنثى بنية	0.21	0.24	—																												
أنثى موحدة	0.46	0.42	0.51	—																											
أنثى موحدة	0.42	0.42	0.21	0.55	—																										
أنثى موحدة	0.49	0.48	0.66	0.53	0.49	—																									
أنثى موحدة	0.51	0.48	0.57	0.24	0.61	0.44	—																								
أنثى بنية	0.36	0.36	0.24	0.36	0.39	0.44	0.41	—																							
أنثى موحدة	0.21	0.28	0.53	0.13	0.57	0.58	0.19	0.22	—																						
أنثى بيضاء	0.24	0.21	0.49	0.46	0.61	0.72	0.41	0.21	0.24	—																					
أنثى بيضاء	0.25	0.24	0.44	0.37	0.63	0.66	0.46	0.24	0.26	0.08	—																				
أنثى بيضاء	0.25	0.24	0.44	0.34	0.63	0.66	0.42	0.24	0.24	0.1	0.04	—																			
أنثى رمادية	0.41	0.37	0.53	0.53	0.66	0.63	0.51	0.37	0.41	0.04	0.08	0.08	—																		
أنثى رمادية	0.41	0.37	0.57	0.49	0.66	0.59	0.41	0.37	0.37	0.01	0.03	0.03	0.06	—																	
أنثى رمادية	0.39	0.39	0.37	0.55	0.63	0.75	0.66	0.42	0.53	0.36	0.34	0.37	0.46	0.46	—																
ذكر بني	0.66	0.66	0.63	0.51	0.77	0.75	0.66	0.57	0.53	0.66	0.59	0.55	0.66	0.7	0.68	—															
ذكر أسود	0.75	0.7	0.72	0.72	0.72	0.75	0.75	0.7	0.75	0.85	0.63	0.63	0.66	0.72	0.75	0.51	—														
أنثى بنية	0.29	0.29	0.48	0.37	0.68	0.61	0.49	0.41	0.32	0.32	0.41	0.41	0.53	0.53	0.52	0.41	0.48	—													
ذكر أبيض	0.75	0.75	0.77	0.63	0.58	0.61	0.66	0.66	0.66	0.66	0.63	0.68	0.66	0.61	0.66	0.51	0.77	0.49	—												
أنثى بنية	0.21	0.21	0.37	0.44	0.72	0.66	0.57	0.24	0.39	0.24	0.21	0.24	0.46	0.46	0.44	0.51	0.34	0.48	—												
أنثى بنية	0.11	0.11	0.26	0.32	0.53	0.63	0.44	0.24	0.39	0.14	0.24	0.26	0.41	0.41	0.36	0.66	0.15	0.61	1.1	—											
ذكر أبيض	0.51	0.51	0.61	0.61	0.7	0.63	0.55	0.63	0.63	0.44	0.49	0.46	0.37	0.44	0.52	0.38	0.39	0.24	0.32	0.37	—										
ذكر رمادي	0.63	0.59	0.75	0.53	0.75	0.63	0.63	0.59	0.49	0.53	0.63	0.59	0.42	0.44	0.52	0.28	0.57	0.62	0.36	0.29	0.34	—									
أنثى بنية	0.18	0.21	0.21	0.41	0.57	0.46	0.21	0.46	0.39	0.21	0.46	0.37	0.46	0.46	0.58	0.77	0.25	0.42	0.42	0.18	0.42	—									
ذكر بني	0.44	0.44	0.49	0.57	0.79	0.72	0.63	0.59	0.41	0.63	0.59	0.57	0.53	0.95	0.68	0.61	0.29	0.75	0.32	0.24	0.44	0.32	—								
أنثى بيضاء	0.24	0.21	0.41	0.41	0.59	0.75	0.46	0.32	0.26	0.46	0.32	0.07	0.07	0.26	0.21	0.36	0.82	0.61	0.44	0.37	0.66	0.37	0.66	—							
أنثى بيضاء	0.59	0.17	0.36	0.36	0.61	0.19	0.44	0.25	0.19	0.44	0.25	0.1	0.1	0.22	0.36	0.66	0.32	0.7	0.29	0.19	0.51	0.26	0.59	0.55	—						
أنثى بيضاء	0.21	0.18	0.37	0.37	0.59	0.7	0.46	0.37	0.26	0.21	0.89	0.84	0.24	0.18	0.37	0.62	0.34	0.62	0.25	0.18	0.34	0.49	0.26	0.49	0.42	—					
أنثى رمادية	0.21	0.46	0.53	0.57	0.63	0.41	0.51	0.22	0.21	0.41	0.21	0.21	0.11	0.11	0.38	0.75	0.46	0.7	0.36	0.16	0.37	0.63	0.39	0.63	0.37	0.16	—				
أنثى رمادية	0.24	0.21	0.49	0.53	0.57	0.41	0.41	0.28	0.24	0.41	0.24	0.21	0.14	0.22	0.38	0.79	0.46	0.66	0.39	0.26	0.44	0.63	0.39	0.63	0.37	0.16	0.07	—			

3 - التحليل العنقودي Cluster analysis:

يســمح التحليل العنقودي بتقســيم الطرز الوراثية المدروســة إلى مجموعات، وتعكس هذه المجموعات درجة القرابة الوراثية فيما بينها، وقد تتجمع االطرزضــمن مجموعة واحدة بناءً على موطنها الأصــلي أو بناءً على أصـلها ونسـبها. أجري التحليل العنقودي للنتائج التي تم الحصـول عليها وذلك لإنشـاء شـجرة القرابة الوراثية (Dendrogram) لتحديد درجة القرابة الوراثية، حيث أظهرت شـجرة القرابة عنقودين رئيسـيين ضـم العنقود الأول الذكور بكافة الألوان (اسـود وبني ورمادي وابيض) ، انقسـم العنقود الأول إلى تحت عنقودين، ضـم تحت العنقود الأول الذكور الرمادي والأبيض والأسـود بمسـافة وراثية قدرها (8.393)، في حين انفرد الذكر البني بمســافة وراثية قدرها (12.370) في تحت العنقود الثاني. أما العنقود الثاني فضــم الاناث الســوداء والرمادية والبيضــاء والبنية ، فانقســم إلى تحت عنقودين، ضــم تحت العنقود الأول الانثى الســوداء منفردة بمســافة وراثية قدرها (4.637). بينما انفردت الانثى الســوداء أيضــا بتحت العنقود الثاني بمســافة وراثية (10.391) إضــافة الى الانثى الرمادية والبيضــاء والبنية. وبذلك اســتطاعت تقنية ISSR التمييز بين الأنماط المدروسة.


انثى بني
انثى بني
انثى بني
انثى بني
انثى بني
انثى بني
انثى بني
انثى بني
انثى رمادي
انثى رمادي
انثى رمادي
انثى رمادي
انثى أبيض
انثى أبيض
انثى أبيض
انثى أبيض
انثى أبيض
انثى أبيض
انثى رمادي
انثى أسود
انثى أسود
انثى أسود
انثى أسود
انثى أسود
ذكر بني
ذكر بني
ذكر أبيض
ذكر أبيض
4.304
7.242
3.703
4.168
4.096
3.490
2.445
3.281
4.775
1.156
15.248
2.353
2.252
2.470
3.490
3.073
5.959
1.216
9.032
7.260
1.404
7.445
6.141
2.988
1.526
2.891
1.119
8.270
1.723
2.299
2.118
19.945
0.541
10.958
10.391
6.596
4.362
24.983
4.637
12.370
14.949
12.007
4.105
2.842
2.268
16.112

الشكل (1) شجرة القرابة الوراثية لعينات الدجاج المدروسة

الاستنتاجات و المقترحات:

1- أظهرت تقنية ISSR تعددية شكلية بلغت 97.56 %، الناتجة عن استخدام 12 بادئة وبالتالي أظهرت التقنية فعالية في التمييز بين الأنماط المدروسة.

2- انقسمت شجرة القرابة الوراثية إلى عنقوديين رئيسيين ضم العنقود الأول الذكور ، في حين ضم العنقود الثاني الاناث، وانفصلت الأنماط ضمن كل عنقود وحسب درجة القرابة الوراثية فيما بينها.

3- يمكن العمل مستقبلاً على تحديد مواقع المورثات المسؤولة عن الصفات المهمة باستخدام QTLs وعزلها، والاستفادة منها في برامج التربية واستخدامها آباءً في عمليات التهجين لاختيار الآباء المتباعدة وراثياً ضمن كل مجموعة.

المراجع

1-Burke., Asili Barre-Dirle., Richard,P.M.A. Crooijman,S., Kari,E., Marcus,W., Feldman., Paul,J., Freidlin., SkoMaki-Tanila., OORTWIJN,M., THOMSON,P., VIGNAL,A., WIMMERS,K., WEIGEND,S. (2003). Biodiversity of 52 chicken populations assessed by microsatellite typing of DNA pools.

2-Bornet, B., and M, Branchard. 2001. Nonanchored inter simple sequence repeat(ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting Plant Mol Biol Rep, 19: 209–215

3-Botstein, D.; R. L. White, M. Skolinck, and R.W. Davis. 1980. Constraction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am. J. Hum. Genetic. 32: 314-331.

4-Bruford, M. W. and R. K. Wayne. 1993. Microsatellites and their applications to population genetic studies. Current Opinion in Genetics and Development 3, 939-943.

5- 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,17-20 November, Aleppo, Syria.

6-Chowdhury, M.A., B. Vandenberg and T. Warkentin. 2002. Cultivar identification and genetic relationship among selected breeding lines and cultivars in chickpea (*Cicer arietinum L.*). Euphytica 127:317–325.

7-Davila, J.A., Loarce Y., Ramsay L., Waugh R., and E. Ferrer. 1999. Comparison of RAMP and SSR markers for the study of wild barley genetic diversity. Hereditas, 131: 5–13.

8-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.

9-Dodgson J.B., Cheng H.H., Okimoto R.,(1997) DNA marker technologt: A revolution in animal genetics. Poult. Sci.76:1108-1114.

10-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.

11-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.

12-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.

13-Groeneveld L.F., Lenstra J.A., Eding H. et al. 2010. Genetic diversity in farm animals—a review. Animal Genetics 41(Suppl. 1), 6–31.

14-Grygorieva M.A, Velichko O.A,Zhigileva O.N ,Pak I.V ,Vinogradsky I.A,Rustamov R.D.,Trofimov O.V.ISSR polymorphism of laying hens of broiler parental stock distinguished by rates of growth and productivity indicators. Agricultural Science Euro-North-East. 2020;21(4):453-461.(InRusss.) httpss://doi.org/10.30766/2072-9081.2020.21.4.453-461

15-Hoffmann, I. 2010. Climate change and the characterization, breeding and conservation of animal genetic resources. Anim. Genet. 41, 32–46. doi: 10.1111/j.1365-2052.2010.02043.x

16-Hillel, J; Groenen, M.A; Tixier-Boichard, M; Korol, A.B; David, L; Kirzhner, V.M; Burke, T; Barre-Dirie, A; Crooijmans, R.P; Elo, K; Feldman, M.W; Fre-idlin, P.J; Maki-Tanila, A; Oortwijn, M; Thomson, P; Vignal, A; Wimmers, K; Weigend, S. (2003). Biodiversity of 52 chicken populations assessed by microsatellite typing of DNA pools. Genet. Select. vol., 35: 533–557.

17-Jossi,H., Martien,A.M. GROENE,N., Michèle Tixie-Boichard., Abraham B. Korol., Lior David., Valery,M., Kirzhne,R., Terry

18-Kijas, J.M.H., J.C.S. Fowler and M.R. Thomas. 1995. An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within Citrus and related species. Genome 38:349–355.

19-Lenstra J.A., Groeneveld L.F., Eding H. et al. 2012. Molecular tools and analytical approaches for the characterization of farm animal genetic diversity. Animal Genetics 43, 483–502.

20-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.

21-Mohammadi, S. A.; and B.M. Prasanna. 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants: salient statistical tools and considerations cropscie . 43: 1235-1248

22-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.

23-Ozdemir D, Ozdemir ED, De Marchi M, Cassandro M. 2013. Conservation of local chicken breeds of Turkey and Italy: a case study. Ital J Anim Sci. 12:e49.

24-Oldenbroek, K., ed. 2007. Utilisation and Conservation of Farm Animal Genetic Resources. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands.

25-Parker, H. G. et al. 2004.Genetic structure of the purebred domestic dog. Science 304, 1160–1164 .

26-Provan, J., J.R, Russell, A. Booth, and W. Powell, 1999. Chloroplast microsatellites simple sequence repeat primers for systematic and population studies in the genus Hordeum. Molecular ecology. 8: 505-511.

27-Provan, J. W, Powell, and P. M. Hollingworth. 2001. Chloroplast microsatellites: new tests studies in plant ecolgy and evolution. Trends in ecology and Evolution. 16:142-147.

28-Qian, Z; Hong, D; Dong Hang, Z. (2007). ISSR Molecular Marker and its application in plant researches. Molecular Plant Breeding, V.(5). 6:123-129.

29-Rakoczy-Trojanowska, M; and Bolibok, H. (2004).
Characteristtics and comparision of three classes of Microsatellitebased markers and their application in plants. Agricultural university, Nowoursynowska, Wraszawa, Poland.

30-Sneath, P. and R. Sokal. 1973. Numerical Taxonomy. San Francisco: W.H. Freeman.

31-Simianer H., (2005) Use of molecular markers and other information for sampling germplasm to create an animal genebank, The Role of Biotechnology, pp: 37-42, 5-7 March ,Villa Gualino, Turin, Italy.

32-Tadano, R; Nishibori, M; Nagasaka, N; Tsudzuki, M. (2007a). Assessing genetic diversity and population structure for commercial chicken lines based on forty microsatellite analyses. Poult Sci. 86: 2301–2308.

33-Tixier-Bichard M., Bordas A., and Rognon X. 2009. Characterisation and monitoring of poultry genetic resources. World's Poultry Science Journal 65: 272-285.

34-Tunca R. Ivgin and Tasskin. A(2016) Acomparison of genetic varintion among native and some local chicken populations in Turkey.Mugla Sitki Kocman University.Ula Ali Kocman Vocational School,Dept. of Animal and plant Breeding. Mugla. Turkey.Indian J.Anim. Res,ISSN;0367-6722/Online ISSN;0976-0555.

35-Van Der Nest, M.A; Steenkamp, E.T; Wigfield, B.D; Wingfield,

M.J. (2000). Development of simple sequence repeat (SSR) markers in Eucalyptus from amplified inter-simple sequence repeats (ISSR). Plant Breed, 119: 433-436.

36-Ziekiewicz, E., Rafalski and A. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20:178–183.