مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية ــ (2015) المجلد (31) ــ العدد 1 ــ الصفحات: 221-232

تجنيس أجنة الأبقار الشامية باستخدام تقانة التفاعل التسلسلي البوليميرازي

ماجد الدكاك[1] و سليمان سلهب[2] و هيثم السيد[3]
و المعتصم بالله الدقر[1] و رعد عبد الكريم[4]

الملخَّص

استُخدم 13 جنيناً مجمّداً بعد إذابتها بمرحلتي التويتة أو الكيسة الأريمية وذات حيوية جيدة، حُصل عليها من أبقار شامية حية محرّضة بطريقة الإباضة المتعددة والتلقيح الصنعي بهدف معرفة جنس الجنين قبل نقله باستخدام تقانة التفاعل التسلسلي البوليميرازي (Polymerase Chain Reaction (PCR. سُحبت 1-2 قُسيم أرومي من كل منها باستخدام إبرة رفيعة مركبة على مجهر مقلوب. كما أخذت عينات دموية من ذكور وإناث أبقار شامية لاستخدامها شاهداً للتأكد من نجاح التجنيس. أجري تضخيم الـ DNA المستخلص من القُسيمات المأخوذة بواسطة تقانة التفاعل التسلسلي البوليميرازي، وأختبر 16 بادئ لتحديد المناسب منها في التجنيس. أظهرت النتائج نجاح التجنيس باستخدام 4 بادئات فقط (P2sex،P1sex, P2Aut،P1Aut) من الـ 16 المدروسة. وكان لظهور حزمة DNA على هلامة الآغار حجمها 141bp في أي جنين بمثابة مؤشر دالّ على صفة الذكورة مع غيابها في أجنة الإناث. واستنتج أن سحب 1-2 قُسيم أرومي من أجنة الأبقار الشامية في مرحلة التويتة أو الكيسة الأريمية تكفي لتحديد جنس الجنين في الأبقار الشامية باستخدام تقانة التفاعل التسلسلي البوليميرازي المتعدد، وحُددت، ولأول مرة بادئات نوعية يمكن استخدامها لتجنيس أجنة الأبقار الشامية، ما يفيد في تقنيات نقل الأجنة المرغوبة وتقسيمها والإستفادة منها مبكراً في عمليات التحسين الوراثي.

الكلمات المفتاحية: تجنيس الأجنة، تقانة التفاعل التسلسلي البوليميرازي، الأبقار الشامية.

[1]دكتور باحث، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، دمشق، سورية.
[2]أستاذ، قسم الإنتاج الحيواني، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية.
[3]أستاذ مساعد، كلية الهندسة التقنية، جامعة حلب، سورية.
[4]تقني متخصص في الإخصاب المخبري، سورية.

Sexing of bovine Shami embryos using PCR

AL-Dakkak, M.[1] , S. A. Salhab[2], H. Sayed[3],

M. B. AL-Daker[1] and R. Abdulkarim[4]

Abstract

Thirteen viable and post - frozenthawed Shami cows embryos obtained by super-ovulation and artificial insemination technique in order to determine sex of embryos. Biopsies (1-2 cells) of embryos at morula or blastocyst stage were taken using micromanipulation under inverted microscope. Blood samples from male and female of Shami cows were also taken as a control. 16 primers were used to amplify DNA fragments using Polymerase Chain Reaction (PCR) to determine possibility of Shami sexing embryos. Results indicated, for the first time that four out of 16 primers (P1sex, P2sex, P1Aut, P2Aut) were approved to help successfully in showing bands with a size of 141bp distinguishing male embryos of Shami cattle. It was concluded that aspiration of 1-2 blastomere (s) from embryos at morula or blastocyst stage was enough to determine sex of embryo using PCR and it is recommended that using this technique can be a useful tool in splitting and transferring of desired sex embryos in genetic improvement program.

Keywords: Sexing embryos, PCR, Shami Cattle.

[1] General Commission for Scientific Agricultural Research، Damascus, Syria.
[2] Professor, Dep. Anim.Prod, Fac. Agric, Univ. Damascus, Syria.
[3] Fac. Technol. Eng., Univ. Aleppo, Syria.
[4] IVF technician, Syria.

المقدمة

يُفيد تحديد جنس المولود قبل نقله في البقر في تحسين القدرة الوراثية الكامنة في القطيع، ويمكن عادة الحصول على 6-8 مواليد خلال الحياة التناسلية للأبقار، ومن الممكن زيادة عدد الأجنة المستحصل عليها عن طريق تطبيق تقانة الإباضة المتعددة ونقل الأجنة. وفي حال جنّست الأجنة قبل نقلها، يمكن الحصول على الجنين المفضّل من الأبقار ذات القدرة الوراثية المتميزة، الأمر الذي يزيد من الفاعلية الاقتصادية لبرامج نقل الأجنة (Willett وHillers، 1994)، ومن معدل الربح الوراثي للقطيع (Colleau، 1991)، وبالتالي تسريع وتيرة التحسين الوراثي للأنواع الحيوانية (Lopatarova وزملاؤه، 2008).

استخدمت طرائق متعددة لتحديد الجنس في الحيوانات، كالتحاليل الوراثية الخلوية cytogenetic analysis (Rall وLeibo، 1987)، والمقايسة المناعية immunological assay (Booman وزملاؤه، 1989)، وتحديد التباينات الاستقلابيةmetabolic differences بين أجنة الذكور والإناث (Monk وHandyside، 1988)، وتحليل الاختلافات في معدلات الانقسام cleavage rates (Avery وزملاؤه، 1989)، أو استخدام مسابر خاصة ترتبط مع منطقة من الصبغي Y chromatin with Y-specific DNA probes (Kobayashi وزملاؤه، 1998)، أو طريقة التهجين في الموضع التألقي Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH) (Cenariu وزملاؤه، 2011)، وكانت أفضل الطرائق باستعمال تقنية تفاعل البوليميراز التسلسلي PCR، إذ تتميز بسهولة استخدامها وسرعة إجرائها نسبياً، ودقتها مقارنة مع الطرق الأخرى (Pomp، وزملاؤه، 1995). واستخدمت هذه التقانة لتحديد الجنس في أجنة الأبقار الهندية (Prashant وزملاؤه، 2008)، والمجرية (Machaty وزملاؤه، 1993)، وأبقار الفريزيان في تركيا (Ekici وزملاؤه، 2006).

تتألف الصيغة الصبغية للأبقار من 58 صبغي جسمي ومن صبغيين جنسيين، إذ يكون الذكر ذو صيغة صبغية (58 + XY)، والأنثى (58 + XX) (Gallagher وWomack، 1992)، ويمكن الحصول على قُسيمة أو عدة قُسيمات من الجنين بغرض الكشف عن الصبغيين الجنسيين (X أو Y) باستخدام شفرة حادة رفيعة جداً تركب على المجهر المقلوب (Lopatarova وزملاؤه، 2008)، أو عن طريق سحب قُسيمة واحدة أو عدة قُسيمات من الجنين باستخدام إبرة رفيعة خاصة (Chrenek وزملاؤه، 2001)، أو حتى من خلال حك الطبق البتري لتثبيت الجنين في قعره ثم تقسينه باستخدام شفرة حادة جداً (Ekici وزملاؤه، 2006) بالاستعانة بالمجسام الضوئي Stereomicroscope.

ونظراً لعدم وجود دراسات تتعلق بتجنيس أجنة الأبقار الشامية فقد هدفت هذه الدراسة إلى اختبار فاعلية عدة بادئات primers (مستهلات) استُخدمت في عروق أبقار مختلفة لتحديد المناسب منها في تحديد جنس أجنة الأبقار الشامية بهدف التحكم بجنس المولود في

هذا العرق المحلي كمؤشر جزيئي يساعد في اختيار جنس الأجنة المثمرة قبل نقلها بما يتوافق ورغبة المربي.

مواد البحث وطرائقه

مكان تنفيذ التجربة ورعاية الحيوانات: نفذت الدراسة في محطة بحوث دير الحجر للأبقار الشامية، وفي مخبر نقل الأجنة في إدارة بحوث الثروة الحيوانية-الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية- محافظة ريف دمشق ناحية الغزلانية، بينما جنست الأجنة بمخبر كلية الهندسة التقنية بجامعة حلب. استُخدمت 3 أبقار شامية مانحة متوسط عمرها 10.2±67.1 شهراً، ووُضعت في حظيرة ذات إيواء نصف مفتوح مزودة بمزنق يتيح سحب الأجنة منها. غذيت الحيوانات وفق نظام تغذية جماعية، وقدمت العليقة على دفعتين صباحية ومسائية وفق الاحتياجات العلفية التي تناسب أعمار الحيوانات وأوزانها.

الإباضة المتعددة: أُودعت اللوالب المهبلية controlled internal drug release (CIDR) الحاوية على 1.38غ بروجستيرون (شركة Pfizer Ltd, Hamilton النيوزلندية) في مهابل الأبقار لمدة 7 أيام، وحُقنت كل منها عضلياً بدءاً من اليوم الرابع حتى اليوم السابع (يوم سحب اللوالب) بثمان جرعات متناقصة تدريجياً في حجمها بمعدل مرتين يومياً (3.0، 3.0؛ 2.5، 2.5؛ 1.5، 1.5؛ 1.0، 1.0) من الهرمون المنمي للجريبات المبيضية Follicle-Stimulating Hormone(FSH) المستخلص من الغدة النخامية للخنازير لإحداث الإباضة المتعددة للأبقار بجرعة كلية قدرها 16مل وهي تعادل (750 وحدة دولية من هرمون FSH، و750 وحدة دولية من هرمون اللوتنة LH: Luteinizing Hormone) (مستحضر Pluset، شركة Calier، اسبانيا)، كما حقن البروستاغلاندين F2α عضلياً بجرعة قدرها 3 مل من مستحضر Alfaglandine الذي يعادل 750 ميكروغرام كلوبروستينول (Alfasan-Woerden، هولندا) قبل 12 ساعة من نزع اللولب، ولقحت الأبقار صنعياً عبر المهبل بعد 12، و24 ساعة من بدء الشبق باستخدام قشتين من سائل منوي مجمّد مأخوذ من ثيران شامية مختبرة (تحوي كل قشة على الأقل 10×10^6 نطفة).

جمع الأجنة: جُمعت الأجنة بعد 7 أيام من التلقيح بطريقة غير جراحية بواسطة قسطرة ثلاثية الشعب غُسل الرحم من خلالها بمحلول الجمع الحاوي على ملح الفوسفات الواقي Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS) (شركة Bioniche الأمريكية) بمعدل 350-500 مل لكل قرن رحم ضمن وعاء استقبال مدرج حتى 500 مل، تُركت الأجنة لمدة نصف ساعة حتى تستقر، ثم أُخذ القسم العلوي الذي تمت فلترته بواسطة وعاء فلترة Millipore filter يزيل كافة الشوائب التي يقل قطرها عن قطر الجنين بحيث يبقى الجنين فيها إن وجد ضمن الوعاء، وبعدها بُحث عن الأجنة ضمن الجزء السفلي وضمن وعاء الفلترة بواسطة المجسام الضوئي stereomicroscope بتكبير

X 40، وعُزلت الأجنة بواسطة ماصة شعرية 10 ميكروليتر، ووضعت في محلول غسيل الأجنة SYNGRO® Holding (يحوي على hyaluronan و linear polysaccharide of alternating D-glucaronic acid وN-acetel-D-glucosamine من شـــركة Bioniche الأمريكية) ضمن أطباق رباعية الحجرات. وبعد عملية غسيل الأجنة قُيمت حسب المعايير المظهرية (المورفولوجية) وفق ما جاء في معايير الجمعية العالمية لنقل الأجنة (1998).

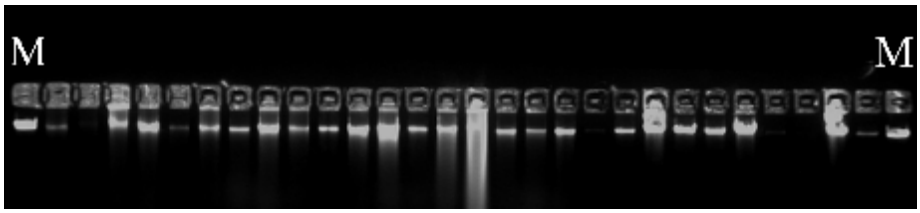
تجميد الأجنة: جُمّدت الأجنة الحيوية الناتجة (تحوي على 80% على الأقل من كتلـــة خلوية جنينية منتظمة) بطريقة التزجيج vitrification، وحُـــضر وســـط التجميـــد وفـــق Lopatarova وزملاؤه (2006) إذ وضعت الأجنة في محلول احتفاظ مرحلـــي holding medium (HM) مكون مـــن 10% ســـيروم دم العجـــل + 90% PBS (Phosphate Buffer Saline) (شركة Egg Technology البريطانية) أضيف له 7.5% إتيلين غليكول و7.5% داي متيل سولفوكسيد DMSO (شركة Sigma الامريكية) لمدة ثـــلاث دقـــائق، وبعدها نقلت الأجنة إلى محلول احتفاظ آخرHM يحوي 16.5% إتيلين غليكول و16.5% داي ميتيل سولفوكسيد و0.5 مول/ليتر سكروز. رُشّحت الأوساط باستخدام مرشح (filter) دقيق 0.22 ميكرومتر. وتم اتزان المحاليل في درجة حرارة الغرفة (22 -30 °س).

عُبئت 2-3 أجنة في قشات 0.25 مل حـــسب طريقـــة (JLTA، 1995)، ورُقمـــت بواسطة قلم خاص مع وسط التجميد وأُغلقت القشات باستخدام عصا الإغلاق بعد تعبئتهـــا بالأجنة، ثم غُمرت مباشرة في السائل الآزوتي لمدة لا تتجاوز 30 ثانية، وحفظـــت فـــي خزانات السائل الآزوتي (-196 سْ) حتى وقت فك التجميد.

إذابة الأجنة المجمدة وتقييمها: بعد تخزين الأجنة لنحو 1-4 أشهر، أذيبت القـــشات الحاملة للأجنة في ماء دافئ 37°م لمدة 30 ثانية. وفرغت محتويات كل قشة فـــي طبـــق بتري، ونقلت إلى محلول احتفاظ HM يحوي سكروز بتركيز 0.25 مول/ل لمدة 1 دقيقة، ومن ثم بتركيز0.15 مول/ل لمدة 5 دقائق، وبعدها بتركيز0 مول/ل لمدة 5 دقائق أخرى (Lopatarova وزملاؤه، 2006)، ثم غُسلت ثلاث مرات في وسط مفلتر مكون من 10% سيروم دم العجل + 90% PBS، ثم وُضعت في حجرة تحوي 0.5 مل من الوسط السابق في حاضنة درجة حرارتها 38.5 سْ في جو رطب ونسبة غاز Co_2 5%. لمدة 4 ساعات ثم أخرجت من الحاضنة وقيمت الأجنة مظهرياً إلى أجنة صالحة للنقـــل وأخـــرى غيـــر صالحة للنقل (JLTA، 1995).

تجنيس الأجنة: سُحبت 1-2 قُسيمة أريمية من 13 جنيناً مجمداً ومذابـــة وتتـــصف بحيوية جيدة، باستخدام المجهر المقلوب (شركة Nikon اليابانيـــة) والمحقـــن المجهـــري الليزري (شركة Eppendorf الألمانية) في طبق بتري يحوي وسط التقسيم مـــن شـــركة cook الاسترالية. كما سُحبت عينات دم من الوريد الوداجي من 5 ذكور و5 إناث أبقـــار شامية لاستخدامها كشاهد للتأكد من نجاح التجنيس. استُخلـــصت المـــادة الوراثيـــة مـــن

القُسيمات المسحوبة من الأجنة حسب طريقة Wan وزملاؤه (2003)، ومن الدم حسب Sayed وزملاؤه (2002). قدرت كمية المادة الوراثية المستخلصة باستخدام جهاز الرحلان الأفقي Agarose gel Electrophoresis (الصورة 1)، بينما قدرت جودة المادة الوراثية باستخدام جهاز المطياف الضوئي عن طريق امتصاصها للأشعة فوق البنفسجية عند طول الموجة 260 نانومتر(Maniatis وزملاؤه، 1982).



الصورة (1) كثافة عينات DNA المختبرة مقارنة مع كثافة حزم DNA العيارية DNA Ladder المعلومة التركيز في المسار الأول والأخير.

استُخلص DNA من قُسيمات 10 أجنة من أصل 13 نجح منها عزل القُسيمات، وأجريت اختبارات تمهيدية على الدم باستخدام 16 من البادئات (المستهلات Primers) لتحديد المناسب منها في عملية التجنيس في البقر الشامي (الجدول1). وعند تحديد البادئ المناسب أجريت عملية التجنيس السابقة على قُسيمات الأجنة المعزولة.

الجدول (1) يبين البادئات المختبرة لتحديد جنس جنين الأبقار الشامية:

References	Oligonucleotide sequence (5'3')	Primers	No.
Ekici *et al.*, 2006	TCC AAT CCC AAA GAA AGG C	Bovine Y-Sense	1
Ekici *et al.*, 2006	TGT CAT CCA CAC AGT CAA AAC C	Bovine Y-Anti-sense	2
Ekici *et al.*, 2006	AAC GGG AAG CTC GTC ATC AAT GG	Bovine G3PDH- Sense	3
Ekici *et al.*, 2006	ATC ATA CTT GGC AGG TTT CTC CAG GCG G	Bovine G3PDH- Anti-sense	4
Prashant et al.2008	CGA AGA CGA AAG **K**TG GCT CT	SRY-1F	5
Prashant *et al.*, 2008	TGT GCC TCC TCA AAG AAT GG	SRY-1R	6
Prashant *et al.*, 2008	CCA ACG TGT CTG TTG TGG ATC TGA	GAPDH-1F	7
Prashant *et al.*, 2008	GAG CTT GAC AAA GTG GTC GTT GAG	GAPDH1R	8
Matthews and Reed 1992	CCC TTC CAG CTG CAG TGT CA	Y-specific-F	9
Matthews and Reed 1992	GAT CTG TAA CTG CAA ACC TGG C	Y-specific-R	10
Plucienniczak *et al.*, 1982	TGG AAG CAA AGA ACC CCG CT	Bovine DNA specific- F	11
Plucienniczak *et al.*, 1982	TCG T**G**A GAA ACC GCA CAC TG	Bovine DNA specific- R	12
Park *et al.*, 2001	GAT CAC TAT ACA TAC ACC ACT	P1 SEX	13
Park *et al.*, 2001	GCT ATG CTA ACA CAA ATT CTG	P2 SEX	14
Park *et al.*, 2001	TGG AAG CAA AGA ACC CCG CT	P1 AUT	15
Park *et al.*, 2001	TCG T**C**A GAA ACC GCA CAC TG	P2 AUT	16

اختُبرت فعالية كل من الأزواج (1، و2) و(3، و4) و(5، و6)، و...و(15، و16) من البادئات الـــ16 لتحديد الجنس في عينات الدم، وتبين أن الـــزوجين (13، و14)، و(15، و16) هما الذين أظهرا فعالية في تحديد الجنس في عينات الدم ومن ثـــم اعتمـــدت هـــذه البادئات لاستخدامها في تحديد جنس الأجنة فكانت النتائج متطابقة تماماً. وأُجري التفاعل التسلسلي المتعدد Multiplex Polymerase Chain Reaction على مرحلتين أضيف فـــي كل منها زوج من البادئات: إذ استخدم الزوج (13، و14)، أو(15، و16)، حيث حُضّرت الخلطة الخاصة بهذه المرحلة على النحو التالي:

المادة	الكمية
10x PCR Buffer	2ميكروليتر
2.5 ميلي مول dNTPs	2ميكروليتر
25 ميلي مول $MgCl_2$	4ميكروليتر
Forward Primer (10 µM)	2ميكروليتر
Reverse Primer (10 µM)	2ميكروليتر
Taq DNA polymerase	2ميكروليتر

مُزجت هذه الخلطة مع 2 ميكروليتر من الـــDNA المستخلصة بالطريقـــة المـــذكورة آنفاً والمضبوط تركيزها عند 50 نغ/ميكروليتر ليصبح الحجم الداخل في تفاعل الـــPCR الأول 2 ميكروليتر، ومن ثم وُضعت الخلطة المذكورة على برنامج PCR التالي:

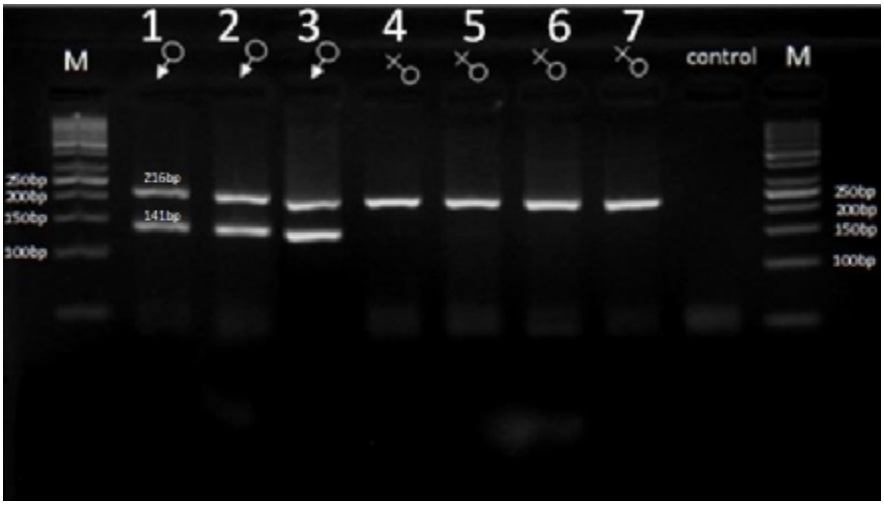
(95 م° لمدة 7 دقائق لدورة واحدة، ثم 95 م° لمدة 30 ثانية، 57 م° لمدة 30 ثانيـــة، 72 م° لمدة 30 ثانية لعشر دورات، ثم 72 م° لمدة 7 دقائق)، وأثناء إجراء هذا التفاعـــل في جهاز PCR، حضرت خلطة ثانية مؤلفة من زوج من البادئات الذي يُضخم في كـــلا الجنسين كالتالي:(2 µl primer-R،2 µl primer-L)، وعند انتهاء التفاعـــل الأول تمـــت إضافة الخلطة الثانية إلى كل عينة وخلطت جيداً لتدخل بعدها فـــي تفاعـــل PCR ثـــاني كالتالي:

(95 م° لمدة 7 دقائق لدورة واحدة، ثم 95 م° لمدة 30 ثانية، 57 م° لمدة 30 ثانيـــة، 72 م° لمدة 30 ثانية بعدد 25 دورة، ثم 72 م° لمدة 7 دقائق). ثم حمّلت العينات علـــى هلامة الآغار بتركيز 3% وفُصلت حزم الـــ DNA باستخدام جهاز الرحلان الكهربـــائي الأفقي حسب أوزانها الجزيئية، وتم الكشف عن وجود الحزم المضخمة بـــصبغ الهلامـــة باستخدام الايثيديوم بروماید تحت الأشعة فوق البنفسجية (UV).

النتـــائـــج

أظهرت النتائج أن البادئات 13، 14، 15، 16 (الجدول 1) فقط أظهرت فعاليتها فـــي تحديد الجنس في دم حيوانات معروفة الجنس (ذكور وإناث أبقار شامية)، اختُبرت هـــذه

البادئات على القُسيمات المعزولة من الأجنة فكانت النتائج متطابقة تماماً، إذ ميّز زوجي البادئات المستخدمة بنسبة نجاح 100% في تحديد جنس القُسيمات المعزولة من الأجنة وذلك من خلال ارتباط زوجي البادئات (P1Aut، P2Aut ، P2SEX، P1SEX) لقطعة DNA من الصبغي الجنسي Y الخاص بالذكور وعدم ارتباطها مع أي قطعة من المادة الوراثية عند الإناث. وكان لظهور حزمة DNA على هلامة الآغار بحجم 141bp (bp: base pair قاعدة مزدوجة) في أي جنين بمثابة مؤشر دلّ عن صفة الذكورة، كما أن غياب مثل هذه القطعة عند أي جنين من الأبقار يدل بأن الجنين أنثى. أما قطعة DNA التي حجمها 216bp فهي متماثلة وموجودة على الصبغيات الجسمية في كلا الجنسين(الصورة 2)، وبالتالي فإن استخدامها مع حزمة DNA التي حجمها 141bp المميزة لجنس الذكر ساعدت في التأكد من نجاح التقنية بالإضافة إلى الشاهد السلبي. وكانت نسبة نجاح تقنية عزل القسيمات 13/10 (77%)، ودقة التجنيس 10/7 (70%).



الصورة (2) العينات 1، و2، و3 تمثل جنين ذكر (لاحظ ظهور القطعة المضخمة على الصبغي الجنسي Y وحجمها 141bp)، العينات 4، و5، و6، و7 تمثل جنين أنثى (لاحظ غياب القطعة ذات الحجم 141bp الخاصة بالصبغي الجنسي Y)، وبجانب هذه العينات تم تحميل عينة شاهد سلبي للتأكد من عدم حدوث تلوث في مكونات التفاعل (حيث تم وضع جميع المكونات واتباع جميع الخطوات السابقة عدا وجود المادة الوراثية الـ DNA في التفاعل)، وإلى يمين ويسار العينات تم تحميل سلم قياسي لأحجام القطع المضخمة (50bp).

المناقشة

تُمثل الإجراءات المعتمدة على تضخيم تتابع DNA النوعي للصبغي Y المستخدمة لتحديد جنس أجنة الأبقار قبل الانغراس نموذجاً جيداً للتطبيق السريع لتقنيات البيولوجية الجزيئية في الحقل (Lopatarova وزملاؤه، 2007)، ومن الضروري عزل القُسيمات الأرومية blastomere من الجنين دون التسبب في أذى الجنين وفقده حيويته، وهذا يعتمد على المهارة والخبرة (Yu وزملاؤه، 2006).

نجح سحب القُسيمات (1-2 قُسيمة) في 10 أجنة (77%)، بينما تأذت باقي الأجنة (3) ولم يُستطع سحب القُسيمات منها، وربما يعود ذلك إلى أخطاء فنية في عزل القُسيمات وكسر بعض الإبر عند محاولة السحب، وحُدّد الجنس في القُسيمات المعزولة بنسبة 70%، إذ فشلت عملية عزل DNA في 3 أجنة نتيجة حدوث تلوث بالبروتينات أو مواد الاستخلاص الأخرى (Maniatis وزملاؤه، 1982)، أو نتيجة وجود غباشة في صورة للحزم bands الخاصة بالصبغي Y بسبب عدم اكتمال تضاعف DNA نتيجة استخدام قُسيمة أريمية واحدة صغيرة جداً، أو عينة DNA متدهورة والتي قد تتعرض للدنترة (للتمسخ) denaturation وبالتالي تؤثر سلباً في تفاعلات التضاعف، ومن الممكن أحياناً عدم ملاحظة الحزم بسبب تلوث DNA أو الهجرة غير المنتظمة للحزم عند الرحلان الكهربائي، أو عند عدم حدوث تضاعف تفاعل البوليميراز، أو عند الفشل في توزيع عينات القُسيمات إلى أنابيب التفاعل (Lopes da Costa وزملاؤه، 2002).

وبالرغم أن أخذ عدد كبير من القُسيمات الأرومية يُزيد دقة التجنيس إلا أنه يؤثر سلباً في تطور الجنين (Lopatarova وزملاؤه، 2007)، ويرتبط عدد القُسيمات المسحوبة من الجنين بمرحلة تطور المتعضية، فعلى سبيل المثال عزل Tominaga وHamada(2004) 1-2 قُسيمة من أجنة أبقار تحوي 8-16 قُسيمة، وحُدّد الجنس بنسبة 90% باستخدام تقانة الـ PCR، واستمرت الانقسامات في الأجنة إلى مرحلة الكيسة الأريمية بنسبة 65.1% مقارنة مع 74.5% للشاهد. بينما وجد Shea (1999) أن إزالة 10-20% من قُسيمات الجنين لاستخدامه في تحديد الجنس لم يؤثر سلباً في معدل الحمل بعد النقل، ووجد Lee وزملاؤه (2004) أن إزالة جزء كبير من الجنين يفقده الكثير من حيويته وبالتالي لا يمكن تجميده وإعادة إزالة تجميده، بينما وجد Lopatarova وزملاؤه (2007) أن عزل 6-12 قُسيمة من جنين جيد النوعية بعمر 7 أيام لا يؤثر سلباً في سلامة الجنين، وحُدّد الجنس في 90% من الأجنة.

تتوافق نتائج هذه الدراسة مع ما وجده Machaty وزملاؤه (1993)، و Prashant وزملاؤه (2008) من أن تحديد جنس جنين الأبقار باستخدام تقانة PCR تعد وسيلة جيدة للكشف عن جنس الجنين دون الإضرار به. أما تطور الجنين بعد التجنيس فقد وثّق من قبل العديد من الباحثين، إذ زرع Cenariu وزملاؤه (2011) أجنة أبقار مجنسة لعرق السيمنتال في أرحام أبقار مستقبلة، ووجدوا أن نحو 38% منها كانت حاملة، وأن دقة تحديد الجنس باستخدام جهاز PCR تتجاوز 96%، وكان معدل الحمل بعد نقل أجنة مجنسة نحو 52.6% في مرحلة التويتة (Machaty وزملاؤه، 1993)، بينما لم يلحظ Lopes وزملاؤه (2001) وجود فرق معنوي بين معدل حمل الأجنة المجنسة (60%)، والأجنة غير المجنسة الطازجة (61%)، ومما لاشك فيه أن تطور تقنيات سحب القُسيمات الأريمية دون التسبب في أذى الأجنة يزيد من معدل حدوث الحمل (Cenariu وزملاؤه، 2011).

تكمن أهمية هذه النتائج في أنها تُدرس لأول مرة في القطر وتسمح بتجنيس الأجنة قبل نقلها كأساس لإكثار هذا العرق وتسريع وتيرة التحسين الوراثي فيه، كما حددت ولأول مرة أيضا البادئات التي يمكن اعتمادها في تجنيس أجنة الأبقار الشامية مستقبلاً.

References المراجع

Avery, B., A. Bak and M. Schmidt. 1989. Different cleavage rates and sex determination in bovine embryos. Theriogeno., 32: 139-147.

Booman, P., L. Kruijt, R. Veerhuis, A. M. Hengst, M. Tiemann and F.E. Ruch.1989. Sexing bovine embryos with monoclonal antibodies against the H-Y antigen. Livestock Production Science, 23: 1–16.

Cenariu, M., I. Groza, P. Emoke, L. Bogdan, I. Morar, S. Ciupe and R. Pop. 2011. Sexing of bovine embryos using polymerase chain reaction (PCR) and fluorescent *In Situ* hybridization (FISH). Romanian Biotechnological Letters, 16(2): 6055-6061.

Chrenek, P., L. Boulange, Y. Heyman, P. Uhrin, J. Laurincik, J. Bulla and J. P. Renard. 2001. Sexing and multiple genotype analysis from a single cell of bovine embryo. Theriogeno., 55:1071–1081.

Colleau, J. J. 1991. Using embryo sexing within closed mixed multiple ovulation and embryo transfer schemes for selection on dairy cattle. Journal of Dairy Science, 74:3973-3984.

Ekici, H., N. Turan, B.H. Sontas, C.R. Helps, A. Senunver and H. Ylmaz. 2006. Sex determination of bovine embryos using polymerase chain reaction (PCR). Revue de Medicine Veterinaire, 157:441–444.

Gallagher, Jr. D. S. and J. E. Womack.1992. Chromosome conservation in the bovidae. J. Hered. 83 (4): 287-298.

JLTA, Japan Livestock Technology Association. 1995. Manual of bovine embryo transfer: cryopreservation of embryos. Pp: 259-315.

Kobayashi, J., A. Sekimoto, H. Uchida, T. Wada, K. Sasaki, H. Sasada, M. Umezu and E. Sato. 1998. Rapid detection of male-specific DNA sequence in bovine embryos using fluorescence in situ hybridization. Molecular Reproduction and Development, 51:390–394.

Lee, J. H., J. H. Park, S. H. Lee, C. S. Park and D. I. Jin. 2004. Sexing using single blastomere derived from IVF bovine embryos by fluorescence in situ hybridization (FISH). Theriogeno., 62:1452–1458.

Lopatarova, M., S. Cech, L. Holy and R. Dolezel. 2006. The effect of vitrificationin open pulled straws on pregnancy rates after transfer of *in vivo* produced bovine embryos. Vet. Med., 51(9): 454–460.

Lopatarova, M., S. Cech, P. Krontorad, L. Holy, J. Hlavicova and R. Dolezel. 2007. Lower quality bovine embryos may be successfully used for sex determination. Veterinarni Medicina, 52 (12): 540–546.

Lopatarova, M., S. Cech, P. Krontorad, L. Holy, J. Hlavicova and R. Dolezel. 2008. Sex determination in bisected bovine embryos and conception rate after the transfer of female demi-embryos. Veterinarni Medicina, 53 (11): 595–603.

Lopes da Costa, L., J. Chagas e Silva, P. Diniz and R. Cidadão. 2002. Preliminary report on sexing bovine pre-implantation embryos under the conditions of Portugal. Revista Portuguesa de Ciencias Veterinarias, 97 (542): 95-98

Lopes, R. F. F., F. Forell, A. T. D. Oliveira and J. L. Rodrigues. 2001. Splitting and biopsy for bovine embryo sexing under field conditions. Theriogeno., 56:1383–1392.

Machaty, Z., A. Paldi, T. Csaki, Z. Varga, I. Kiss, Z. Barandi and G. Vajta. 1993. Biopsy and sex determination by PCR of IVF bovine embryos. Journal of Reproduction and Fertility, 98:467–470.

Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook. 1982. Molecular cloning: laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor/ NY. Pp 507-520.

Manual of the International Embryo Transfer Society. 1998. A procedure guide and general information for the use of embryo transfer technology emphasizing sanitary procedures. ed. Savoy, IL: IETS. 3rd.

Matthews, M. E. and K. C. Reed. 1992. Sequences from a family of bovine Ychromosomal repeats. Genomics, 13(4): 1267-1273.

Monk, M. and A. H. Handyside. 1988. Sexing of preimplantation mouse embryos by measurement of X-linked gene dosage in a single blastomere. Journal of Reproduction and Fertility, 82:365–368.

Park, J. H., J. H. Lee, K. M. Choi, S. Y. Joung, J. Y. Kim, G. M. Chung, D. I. Jin and K. S. Im. 2001. Rapid sexing of preimplantation bovine embryo using consecutive and multiplex polymerase chain reaction (PCR) with biopsied single blastomere. Theriogeno., 55:843–853.

Plucienniczak A., Skowronski J. and J. Jaworski. 1982. Nucleotide sequence of bovine 1.715 satellite DNA and its relation to other bovine satellite sequences Journal of Molecular Biology 158 293-304.

Pomp, P., B. A. Good., R. D. Geisert, C. J. Corbin and A. J. Conley 1995.Sex identification in mammals with polymerase chain reaction and its use to examine sex effect on diameter of day-10 or -11 pig embryos. Journal of Animal Science, 73: 1408–1415.

Prashant, D., S. Gour, P. P. Dubey, A. Jain, S. C. Gupta, B. K. Joshi and D. Kumar. 2008. Sex determination in 6 bovid species by duplex PCR. Journal of Applied Geneics, 49(4):379-381.

Rall, W. F. and S. P. Leibo. 1987. Production of sexed bovine pregnancies by cytogenetic analysis of cultured demiembryos. Theriogeno., 27:269-279.

Sayed, H., H. Kayyal, L. Ramsey, S. Ceccarelli and M. Baum. 2002- Segregation distortion in doubled haploid lines of barley (*Hordeum vulgare L.*) detected by simple sequence repeat (SSR). Euphytica, 225: 265-272.

Shea, B. F. 1999. Determining the sex of bovine embryos using polymerase chain reaction results: a six-year retrospective study. Theriogeno., 51:841–854.

Tominaga, K. and Y. Hamada..2004.. Efficient production of sex-identified and cryosurvived bovine in-vitro produced blastocysts. Theriogeno.,61:1181–1191.

Wan, Q. H., X. Q., K. X. Qian and S. G. Fang. 2003. A simple DNA extraction and rapid specific identification technique for single cells and early embryos of two breeds of Bos Taurus. Anim. Rep. Sci. 77: 1–9

Willett, G. S. and J. K. Hillers. 1994. Analyzing the economics of alternative dairy embryo transfer technology. Agricultural Economics Staff Paper A.E. 94-8, Washington State University, Pullman, WA, USA.

Yu, W., S. Li, J. Fang, X. Sun, L. Cui, J. Fu, Y. Bai, Y. Fang and B. Shangguan .2006. Field studies on the effectiveness of the YCD embryo sexing technique in bovine. Reproduction, Fertility and Development, 19: 299–300.

Received	**2013/10/10**	**إيداع البحث**
Accepted for Publ.	**2013/11/18**	**قبول البحث للنشر**