

بررسی احتمال وجود چندشکلی در ژن های $FecX^H$ و $FecX^I$ مرتبط با دوقلوزایی در گوسفند شال

نعمت هدایت ایوریق^{۱*}، سیدرضا میرایی آشتیانی^۲، اردشیر نجاتی جوارمی^۳

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی دکتری، استاد، دانشیار گروه علوم دامی دانشگاه تهران

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Hedayatuma@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۸۹/۱/۲۸ - تاریخ پذیرش: ۹۰/۷/۵)

چکیده

چندقلوزایی از صفات مهم اقتصادی در پرورش گوسفند به شمار می رود. یافته های اخیر نشان می دهد که بخش قابل توجهی از واریانس این صفت تحت تاثیر ژن های بزرگ اثر است. باروری بالا در گوسفندان اینوردل و هانا به علت جهش در جایگاه BMP15 با منشأ اووسیتی است که به عنوان ژن فاکتور رشد شناخته می شود. این مطالعه برای بررسی احتمال وجود چندشکلی های ژن های $FecX^I$ و $FecX^H$ در گوسفند دنبه دار نژاد شال صورت گرفت. در این مطالعه از روش PCR-RFLP برای شناسایی $FecX^H$ و $FecX^I$ استفاده شد. از تعداد ۲۳۹ راس میش نژاد شال نمونه برداری خون و استخراج DNA با استفاده از روش بهینه یافته نمکی انجام گرفت. قطعات مورد نظر با استفاده از دو جفت آغازگر اختصاصی، یک قطعه ۲۰۴ جفت بازی از $FecX^I$ و یک قطعه ۲۳۵ جفت بازی از ژن $FecX^H$ ، توسط واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) تکثیر گردید. محصولات حاصل از PCR به ترتیب تحت تیمار آنزیم های برشی $XbaI$ و $SpeI$ قرار گرفتند. این مطالعه تنها وجود آللهای وحشی این دو ژن را تایید کرد. بدین ترتیب تمامی نمونه ها برای ژن های $FecX^I$ و $FecX^H$ دارای ژنوتیپ ++ بودند و جهش های اینوردل و هانا در آن ها یافت نشد.

مقدمه

جمعیت جهان با رشد تصاعدی در حال افزایش است و با این رشد جمعیت در تأمین مواد خوراکی مورد نیاز مردم دنیا، ضرورت به کارگیری فناوری های قدرتمند کاملاً احساس می شود (۱۴)، و کشاورزی به عنوان محوری ترین صنعت در تأمین غذا نقش بسیار بارزی را بر عهده دارد. یکی از اهداف عمده پرورش گوسفند (از جمله در ایران) تولید گوشت است و از صفات مهمی که بر روی تولید گوشت تاثیر می گذارد می توان به چندقلوزایی، دوبار زایش در سال، سرعت رشد بره و غیره اشاره کرد. همچنین تولید تعداد بیش تر بره از هر میش مولد (داشتی) و افزایش بازده تولید مثل یکی از راه حل های مناسب به منظور کاهش فشار دام بر مراتع است، به این ترتیب که با توجه به ضریب تبدیل بهتر بره ها نسبت به دام های مولد و مدت چرای کمتر آن ها بر روی مراتع، با استفاده از میش های دو یا چندقلوزا می توان با چرای تعداد کمتر دام های مولد از فشار دام بر مراتع کاست و در عین حال با افزایش بازده از هر دام مولد، می توان نیاز جمعیت انسانی به پروتئین حیوانی را مرتفع کرد.

واژه های کلیدی

چندقلوزایی،
گوسفند نژاد شال،
 $FecX^H$
 $FecX^I$
PCR-RFLP

از طرفی دیگر با توجه به کم بودن درصد بهره‌زایی در شرایط فعلی و پیش‌بینی روند تدریجی صنعتی‌شدن پرورش گوسفند، دیگر پرورش گوسفندان با شرایط سنتی ممکن است مقرون به صرفه نباشد نژادهای بومی علیرغم بازدهی تولید کم نسبت به برخی نژادهای خارجی گوسفند در مقابل شرایط سخت محیطی مقاوم بوده و در طی زمان با محیط سازگاری پیدا کرده‌اند. استراتژی جایگزینی نژادهای خارجی به جای نژادهای بومی به خاطر بازده کم آن‌ها، دغدغه بسیار مهم و قابل توجه کاهش تنوع ژنتیکی صفاتی مانند مقاومت و تطابق را به همراه دارد و یک راهبرد منطقی نیست. با این تفاسیر افزایش بازده گوسفند از طریق توسعه صفت زادآوری (از جمله دوقلو زایی و چندقلو زایی) در گوسفندان بومی امری لازم و ضروری به حساب می‌آید، تا از این طریق هم تنوع ژنتیکی در منطقه و کشور حفظ شود و هم پرورش گوسفند به یک صنعت اقتصادی تبدیل شود. به‌طور کلی مکانیسم کلی فولیکوژنیزس تخمدان در پستانداران به‌طور قابل توجهی شناخته شده است که با یک ارتباط مرکب غدد درون‌ریز و عصبی بین سیستم عصبی مرکزی و تخمدان و همچنین توسط انواع ترشحات پاراکرینی داخل تخمدانی تنظیم می‌شود. هر چند در پستانداران ماده مکانیسم‌های بنیادی وجود دارد که میزان اوولاسیون در هر چرخه فحلی را کنترل می‌کنند، اما هنوز این ساز و کارها به اندازه کافی شناخته شده نیستند. انسان، گاو، بز و گوسفند از جمله موجوداتی هستند که یک و یا دو نتاج در هر دوره زایش تولید می‌کنند در حالی که پستانداران دیگری از جمله جوندگان، سگ و خوک از میزان زادآوری بالایی برخوردار بوده و تعداد نتاج بیش‌تری (معمولاً ۴ و یا بیش‌تر) تولید می‌کنند (۱۰). یکی از دستاوردهای علم ژنتیک مولکولی، شناخت ژن‌هایی بزرگ اثر است که در فرایند انتخاب برای صفات مورد نظر مورد توجه قرار می‌گیرند. این ژن‌ها به‌عنوان ژن‌های کاندیدا نام برده می‌شوند. اثر یک ژن وقتی عمده (Major gene) گفته می‌شود که هموزیگوت‌های مربوط ۰/۵ انحراف معیار از میانگین جمعیت اختلاف ایجاد کند و طبق این تعریف یک ژن عمده موثر بر باروری و چندقلو زایی ژنی است که نرخ تخمک‌ریزی را بیشتر از ۰/۲ افزایش دهد (۲، ۵ و ۶). تنوع ژنتیکی در میزان تخمک‌گذاری در گوسفند به‌طور عمده در نژادهای مختلف بررسی شده و اکنون

به خوبی مشخص شده است که بخش مهمی از پدیده چندقلو زایی به‌واسطه تفرق ژن‌های بزرگ اثر مرتبط با تولیدمثل و تخمک‌گذاری می‌باشد. ژن‌های BMP15، BMPR-IB، $FecX$ و GDF9 از جمله ژن‌های کاندیدا برای چندقلو زایی هستند و جهش‌های شناسایی شده در سطح این ژن‌ها به طور معنی‌داری باعث کاهش یا افزایش نرخ تخمک‌گذاری می‌شود (۵). با توجه به اینکه نژاد شال (در دشت قزوین پراکنده است) یکی از نژادهایی است که درصد دوقلو زایی نسبتاً بالایی دارد این پژوهش به دنبال بررسی وجود و فراوانی ژن‌های کاندیدای هانا و اینوردل از BMP15 در گوسفند شال انجام شد که نتایج بدست آمده در این مقاله ارائه شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و استخراج DNA

برای نمونه‌برداری از سیاهرگ وداجی تعداد ۲۳۹ راس از میش-های نژاد شال که از چند گله در دشت قزوین جمع آوری شده بودند خون‌گیری به عمل آمد. برای خون‌گیری از لوله‌های آزمایش استریل، حاوی ماده ضد انعقاد EDTA، استفاده شد. استخراج DNA به روش نمکی بهینه یافته که در سال ۱۹۸۸ توسط میلر و همکاران ارائه شده است (۱۵)، انجام گرفت. کمیت و کیفیت DNA با استفاده از ژل آگارز ۰/۸ درصد تعیین گردید و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید با غلظت ۱۰ µg/µl انجام شد و برای شناسایی SNP های ممکن در این تحقیق از روش PCR-RFLP استفاده شد.

تکثیر ژن اینوردل ($FecX^I$)

به کمک تکنیک PCR دو آغازگر اختصاصی به توالی زیر، جهت تکثیر قطعه ۲۰۵ بازی از جایگاه BMP15 گوسفندی (۹) مورد استفاده قرار گرفت.

Forward: 5'-GGCAGTATTGCATCGGAAGTTCC-3'
Reverse: 5'-CATGATTGGGAGAATTGAGACC-3'

برنامه حرارتی برای تکثیر ژن اینوردل BMP15 به‌ترتیب دمای واسرشت شدن اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل دمای واسرشت ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای یک دقیقه، اتصال آغازگرها ۵۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵۰ ثانیه، تکثیر قطعه مورد نظر ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه و یک سیکل

دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه استفاده شد. غلظت های مورد استفاده از مواد بعد از بهینه سازی برای انجام PCR به ترتیب $MgCl_2$ (1.6 mM/ μ l) بافر 1X PCR، dNTP (0.16 mM/ μ l)، آغازگرها (0.8 pm/ μ l)، Taq DNA Polymerase (1.25 unite)، DNA ژنومی (1.5 μ l) و مابقی را تا رسیدن به ۲۵ μ l از آب مقطر استفاده شد.

شرایط انجام PCR برای جایگاه ژن هانا ($FecX^H$)

توالی آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه برای جایگاه ژن هانا BMP15 از مقاله هوا و همکاران (۲۰۰۷) اقتباس شد (۱۲) و یک قطعه ۲۳۵ جفت بازی ژن مربوطه تکثیر گردید. آغازگرهایی با توالی به شرح زیر تهیه و مورد استفاده قرار گرفت:

Forward: 5'- TATTTCAATGACACTCAGAG -3'
Reverse: 5'- GAGCAATGATCCAGTGATCCCA -3'

پروتکل حرارتی برای تکثیر جایگاه ژن هانا BMP15 به شرحی که می آید استفاده شد. دمای واسرشت شدن اولیه ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه و در ادامه ۳۵ سیکل به ترتیب دمای واسرشت ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵۰ ثانیه، اتصال آغازگرها ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵۰ ثانیه، تکثیر قطعه مورد نظر ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه ۳۰ ثانیه و یک چرخه دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه انجام شد. غلظت های مورد استفاده از مواد بعد از بهینه سازی برای انجام PCR به ترتیب $MgCl_2$ (2 mM/ μ l) بافر 1x PCR، dNTP (0.14 mM/ μ l)، آغازگرها (0.6 pm/ μ l)، Taq DNA Polymerase (1.5 unite)، DNA ژنومی (2 μ l) و مابقی را تا رسیدن به ۲۵ μ l از آب مقطر استفاده شد.

هضم آنزیمی جایگاه $FecX^L$

آنزیم برشی مورد استفاده برای این جایگاه آنزیم محدودالانتر $XbaI$ می باشد که قادر به شناسایی و برش در جایگاه T/CTAGA است. در حالت ژنوتیپ جهش یافته، قطعه ۲۰۵ بازی تکثیر شده از محصول PCR توسط آنزیم $XbaI$ به دو قطعه ۸۱ و ۱۲۴ بازی برش داده می شود. در صورتی که در میش های ژنوتیپ وحشی آنزیم قادر به شناسایی و برش جایگاه مذکور نیست. هضم آنزیمی در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۵ ساعت انجام گرفت. جهت هضم آنزیمی قطعه تکثیر یافته توسط PCR، مواد زیر و

مقدار مناسب استفاده آن ها جهت هضم جایگاه $FecX^L$ عبارت است از: ۶ میکرولیتر محصول PCR، ۲ میکرولیتر محلول بافر 10X، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم $XbaI$ با غلظت ۱۰ u/ μ l است که با استفاده از آب مقطر دیونیزه به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانیده شد. هضم آنزیمی اگزون دو ژن $FecX^H$

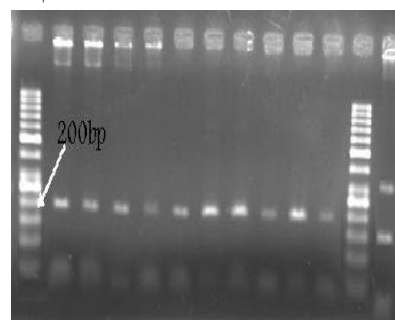
آنزیم برشی مورد استفاده برای این جایگاه آنزیم محدودالانتر $SpeI$ (BcuI) می باشد که قادر به شناسایی و برش در جایگاه A/CTAGT است. این آنزیم روی آل تیپ وحشی (+) اثر نداشته ولی ال جهش یافته (H) را به دو قطعه ۶۸ و ۱۶۷ جفت بازی می شکند. بنابراین ژنوتیپ H+ دارای دو باند ۶۸ و ۱۶۷ جفت بازی و ژنوتیپ ++ دارای یک باند ۲۳۵ جفت بازی است. هضم آنزیمی در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۶ ساعت انجام گرفت. جهت هضم آنزیمی قطعه تکثیر یافته توسط PCR مواد مقادیر مورد استفاده آن ها به شرح زیر آورده شده است. مقادیر مناسب مواد جهت هضم اگزون ۲ ژن $FecX^H$ ، ۵ میکرولیتر محصول PCR، ۱/۳ میکرولیتر محلول بافر 10X، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم $SpeI$ با غلظت ۱۰ u/ μ l است که با استفاده از آب مقطر دیونیزه به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانیده شد.

نتایج و بحث

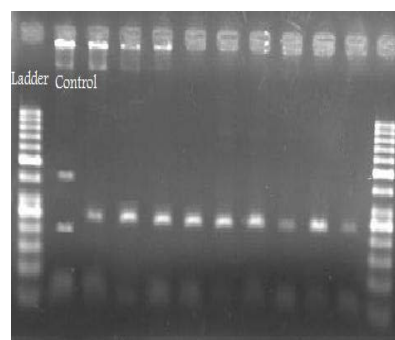
تکثیر ژن اینوردل، هضم محصولات PCR توسط آنزیم محدودالانتر $XbaI$ و مشاهده نتایج آن بر روی ژل نشان داد که تمامی گوسفندان مورد مطالعه دارای ژنوتیپ تیپ وحشی $FecX^+/FecX^+$ می باشند (شکل ۱) با توجه به اینکه آنزیم $XbaI$ در حالت جهش یافته جایگاه را شناسایی و برش می دهد وقتی هیچ یک از نمونه ها محصول تاثیر یافته مشاهده نشد که حاکی از این است که تمام محصولات PCR دارای آل تیپ وحشی بوده اند، این سوال می تواند مطرح شود که شاید مشکلی در آنزیم یا فرایند وجود داشته باشد. بنابراین برای اطمینان از کارکردن آنزیم بر روی جایگاه از چند نمونه کنترل مثبت استفاده کردیم که آنزیم در حالت عادی بر روی آن تاثیر گذاشته و توالی تکثیر شده ۴۷۸ بازی را به دو قطعه ۳۲۵ و ۱۵۳ بازی تبدیل می کند. (این توالی از

اقتصادی مهم محسوب می شود و دام های بومی از لحاظ این صفت وضعیت خوبی ندارند و احتمالاً برای دامداری صنعتی مقرون به صرفه نیستند. بنابراین دامداران مایل به این هستند که از دام های پربازده استفاده کنند و در صورتی که صفات اقتصادی مانند زادآوری در گوسفند توسعه و بهبود نیابد، احتمال رو آوردن تولیدکنندگان صنعتی گوسفند به نژادهای پربازده خارجی به جای حیوانات بومی در آینده وجود خواهد داشت، که در این شرایط نژادهای بومی در خطر از بین رفتن قرار می گیرند و موجب می شود که یکی از هدف اصلاح نژاد که حفظ تنوع ژنتیکی است با مشکل جدی مواجه شود. برای گذر از این مشکل بایستی صفات اقتصادی در دام های بومی را بهبود دهیم تا پرورش این دام ها برای دامدار مقرون به صرفه باشد. یکی از روش های بهبود سریع تر و دقیق تر استفاده از نشانگرهای مولکولی است که از طریق شناسایی SNP های مرتبط با صفات و انتخاب آن ها بتوان سریع تر به اهداف مربوطه رسید. با توجه به اینکه گوسفند شال دارای باروری نسبی بالاتری در میان نژادهای گوسفندان ایران است (۱۱)، نتیجه مربوط به جایگاه اینوردل با نتایج آزمایشات انجام شده در نژاد لری بختیاری (۱)، نژاد هان چین (۱۳)، هیو یانگ و مرینو چینی (۱۹)، گوسفند گارول (۱۶)، گوسفند شمال آفریقا (۱۸) و ۲۱ نژاد دیگر گوسفند از ۱۳ کشور (۸) که همه دام دارای ژنوتیپ تیپ وحشی می باشند مطابقت دارد ولی با نتیجه حاصل از نژاد رامنی اینوردل متفاوت است (۱۰) گیمیل وجان ایسلیت در سال ۲۰۰۶ میزان فراوانی ژن $FecX^I$ را در گوسفند نژاد رامنی اینوردل حدود ۰/۲۱ بدست آوردند (۱۰) که این گوسفند از نژادهای چندقلوزا به شمار می رود. وجود یک کپی از آلل موتانت اینوردل ($FecX^I$) باعث افزایش میزان اوولاسیون می شود که این عمل با افزایش میزان LH و حساس شدن فولیکول های انترال تخمدان به LH اتفاق می افتد (۱۷) اما در ژنوتیپ هموزیگوس جهش یافته میش ها عقیم بوده و دارای تخمدان تکامل نیافته کوتاهی هستند که در آن فولیکول ها فقط از یک لایه گرانولوزا تشکیل شده است (۷ و ۳). این عملکرد ژن اینوردل ایجاب می کند که برنامه آمیزش ها به نحوی باشد که تولید میش های هتروزیگوت از آن حاصل شود. در مطالعه حاضر بررسی نتایج حاصل از PCR الگوی باندی یکسانی را در تمام نمونه ها نشان

یک کار پژوهشی که بر روی بیماری های گیاهی انجام می شد، بدست آمد) این آزمون درست بودن عملکرد آنزیم را ثابت کرد.



شکل ۱- هضم ژن تکثیر شده اینوردل (۲۰۵bp) با آنزیم $XbaI$ با سایز مارکر ۵۰bp



شکل ۲- هضم ژن تکثیر شده هانا (۲۳۵bp) با آنزیم $SpeI$ با سایز مارکر ۵۰bp

تکثیر جایگاه هانا و هضم محصولات PCR توسط آنزیم محدودالثر $SpeI$ نشان داد که تمامی گوسفندان مورد مطالعه دارای ژنوتیپ تیپ وحشی $FecX^+/FecX^+$ هستند (شکل ۲). با توجه به اینکه آنزیم $SpeI$ در حالت جهش یافته جایگاه را شناسایی و برش می دهد و همانند وضعیت اینوردل وقتی در هیچ یک از نمونه ها محصول تاثیر یافته مشاهده نشد حاکی از این است که تمام محصولات دارای آلل تیپ وحشی بوده اند. لذا این سوال می تواند مطرح شود که شاید مشکلی در آنزیم یا فرایند وجود داشته باشد بنابراین برای اطمینان از کارکردن آنزیم بر روی جایگاه از چند نمونه کنترل مثبت استفاده کردیم که آنزیم در حالت عادی بر روی آن تاثیر گذاشته و توالی تکثیر شده ۶۱۵ بازی را به دو باند ۴۱۵ و ۲۰۰ برش داد. یکی از اهداف اصلاح نژاد حفظ تنوع ژنتیکی است و از طرف دیگر دامدار به فکر افزایش سود خود نیز می باشد و برای همین از دام های پربازده استفاده می کند. با توجه به اینکه صفت چندقلوزایی یک صفت

داد که آن نیز حاکی از عدم وقوع جهش در جایگاه مذکور در میش‌های شال تحت بررسی است. نتیجه به دست آمده از بررسی جایگاه هانا با نتایج آزمایشات انجام شده در نژادهای هان در چین (۴)، گوسفند گارول (۱۶)، گوسفند شمال آفریقا (۱۸) مطابقت دارد که دارای ژنوتیپ تیپ وحشی می‌باشند و از نتیجه حاصل از نژاد رامنی هانا متفاوت است (۱۰) گیمل و جان ایسلیت در سال ۲۰۰۶ میزان فراوانی ژن $FecX^H$ را در گوسفند نژاد رامنی هانا حدود ۰/۲۱ بدست آوردند (۲۱). نظر به این‌که جهش هانا به مانند جهش اینوردل در حالت هتروزیگوت باعث افزایش میزان اوولاسیون نسبت به هموزیگوت تیپ وحشی شده و در حالت هموزیگوت جهش یافته باعث عقیم شدن میش می‌شود، در حالت تیپ وحشی بعد از هضم یک باند ۲۳۵ bp و در حالت تیپ جهش یافته هضم با $SpeI$ باعث تولید باندهای ۶۸ bp و ۱۶۷ می‌شود. در مطالعه حاضر بررسی نتایج حاصل از PCR الگوی بانندی یکسان ۲۳۵ bp را در تمام نمونه‌ها نشان داد که حاکی از عدم وقوع جهش در جایگاه مذکور در میش‌های تحت بررسی می‌باشد. تلاش برای یافتن SNPهای با اثر بیش‌تر روی تولید مثل و زادآوری در این نژاد ممکن است نتیجه بخش باشد. صفات تولید مثل غالباً از واریانس ژنتیکی افزایشی زیادی برخوردار نیستند و تاثیر عوامل غیر ژنتیکی بر آن‌ها قابل توجه است. به هر حال در بسیاری از نژادها ژن‌های عمده اثر موثر بر تولیدمثل کشف و معرفی شده‌اند ولی وجود موتانت‌های مورد نظر مانند اینوردل و هانا در بسیاری از نژادها وجود نداشته و برای زادآوری و چندقلوایی قابل توجه آن‌ها بایستی بدنبال عوامل دیگر ژنتیکی و غیر ژنتیکی باشیم. به عنوان مثال می‌توان گوسفند تایرولین را نام برد که در مناطق آلپاین قرار دارد و به علت شرایط سخت، میش‌های این نژاد بیش از دو بره تولید نمی‌کنند و یا گوسفند هیو که به عنوان گوسفندی که سالانه فقط یک بار زایش می‌کند، شناخته می‌شود. انتخاب در گوسفندان کوه تایرولین باعث کوتاهی فاصله بره‌زایی شده، اما این انتخاب علیه تعداد زایش در هر بره-زایی عمل کرده است. در حالی که در گوسفند هیو بر اساس

¹ Tyrolian

شرایط برای تعداد بره‌زایی، انتخاب مطلوبی صورت گرفته است که منجر به تثبیت شدن ژن‌های بزرگ اثری به مانند $FecB$ بورولا با اثرات بیشتر بر روی باروری شده است (۸). لذا شاید بتوان این نکته را بحث کرد که طبیعت در گوسفندان ایرانی به نفع شایستگی حیوان برای ماندگاری عمل کرده و با توجه به اینکه از لحاظ موقعیت جغرافیایی ایران در شرایط کوهستانی خشک و نیمه خشک قرار دارد و مراتع در کشور نسبتاً فقیر هستند و پرورش گوسفند در ایران به صورت سنتی انجام می‌گیرد، احتمالاً طبیعت خود به خود علیه دوقلو زایی انتخاب کرده و در نتیجه جهش‌های موثر بر زادآوری در طول زمان باقی نمانده یا حذف شده‌اند یا اینکه از اول این نوع جهش‌های شناخته شده در تعدادی از نژادهای خارجی، در نژادهای بومی ایجاد نشده‌اند. حیوان دوقلوزا به میزان تغذیه مناسب‌تری نسبت به تک‌قلوزا نیاز دارد و از طرفی گوسفندان ایرانی تولید شیر کمتری دارند. لذا بره-های تک‌قلو بهتر از چندقلو رشد کرده و در ایجاد نسل بعدی و انتقال ژن شانس بیشتری را داشته‌اند. البته همه این مباحث دلیلی بر این نیست که در گوسفندان ایرانی ژن عمده اثر موثر بر روی چندقلو زایی وجود نداشته باشد، بلکه ممکن است ژن یا ژن‌هایی باشد، که هنوز شناسایی نشده‌اند هرچند ممکن است تک‌قلو زایی در پرورش سنتی گوسفند مقرون به صرفه بوده باشد، اما با توجه به اینکه پرورش گوسفند در ایران به سمت صنعتی شدن می‌رود، برای این سیستم حیوانات با زادآوری کم مقرون به صرفه نیستند و لذا ممکن است نیاز باشد با استفاده از روش‌های مختلف از جمله دورگ‌گیری با نژادهای خارجی، انتقال ژن و غیره اقدام به افزایش تعداد بره زاییده شده در گوسفند بکنیم تا در سیستم متراکم و صنعتی پرورش گوسفند مقرون به صرفه باشد و البته از طرف دیگر برای حفظ تنوع ژنتیکی نیز لازم است تدابیر لازم اندیشیده شود.

منابع

۱. امیری ا، رحیمی میانجی ق، وطن خواه م (۱۳۸۷). عدم وجود چند شکلی آلی در ژن بورولا و اینوردل در گوسفند نژاد لری-بختیاری. مجله ژنتیک نوین، ج ۳، ش ۴، ۶۳-۵۷.
2. Beuzen N D, Stear M J and Chang K C (2000) Molecular marker and their use in animal breeding. Vet. J, 160(1):13-14.
3. Brawtal R, McNatty K P, Smith P, Heath D A, Hudson N L, Phillips D J, McLeod B J and Davis G H (1993) Ovaries of ewes homozygous for the X-linked Inverdale gene ($FecX^I$) are devoid of secondary and tertiary follicles but contain many abnormal structures. Biol. Reprod, 49: 895-907.
4. Chu M X, Liu Z H, Jiao C L, He Y Q, Fang L, Ye S C, Chen G H and Wang J Y (2006) Mutations in BMPR-IB and BMP-15 genes are associated with litter size in small tailed Han sheep (*Ovis aries*). Anim. Sci, doi: 10.2527-324.
5. Davis G H (2004) Fecundity gene in sheep. Anim. Reprod. Sci, 82-83: 253-274.
6. Davis G H (2005) Major genes affecting ovulation rate in sheep. Genet. Sel. Evol, 37: S11-S23.
7. Davis G H, Dodds K G, McEwan J C, and Fennessy P F (1993) Liveweight, fleece weight and prolificacy of Romney ewes carrying the Inverdale prolificacy gene ($FecX^I$) located on the X-chromosome. Liv. Prod. Sci, 34: 83-91.
8. Davis G H, Balakrishnan L, Ross I K, Wilson T, Galloway S M, Lumsden B M, Hanrahan J P, Mullen M, Mao X Z, Wang G L, Zhao Z S, Zeng Y Q, Robinson J J, Mavrogenis A P, Papachristoforou C, Peter C, Baumung R, Cardyn P, Boujenane I, Cockett N E, Eythorsdottir E, Arranz J J and Notter D R (2006) Investigation of the Booroola ($FecB$) and Inverdale ($FecX^I$) mutations in 21 prolific breeds and strains of sheep sampled in 13 countries. Anim. Reprod. Sci, 92: 87-96.
9. Davis G H, Galloway S M, Ross I K, Gregan S M, Ward J, Nimbkar B V, Ghalsasi P M, Nimbkar C, Gray G D, Subandriyo, Inounu I, Tiesnamurti B, Martyniuk E, Eythorsdottir E, Mulsant P, Lecerf F, Hanrahan J P, Bradford G E and Wilson T (2002) DNA tests in prolific sheep from eight countries provide new evidence on origin of the Booroola ($FecB$) mutation. Biol. Reprod, 66:1869-1874.
10. Gemmell J and Jonslate N (2006) Hetrozygote advantage for fecundity. PLOS E1, (1): e125. doi:10.1371/journal.pone.0000125.
11. Ghaffari M, Nejati-Javaremi A and Rahimi G (2009) Detection of polymorphism in BMPR-IB gene associated with twinning in Shal heep using PCR-RFLP method. Int. J. Agric. Biol., 11: 97-99
12. Hua, G H, Chena S L, Ai J T and Yang L G (2007) None of polymorphism of ovine fecundity major genes $FecB$ and $FecX$ was tested in goat. Anim. Reprod. Sci. doi:10.1016/j
13. Lio S F, Jiang Y L and Du L X (2003) Studies of BMPR-IB and BMP15 as candidate genes for fecundity in little tailed Han sheep. Yi. Chuan. Xue. Bao, 30(8):755-60.
14. Matzuk M M and Lamb D J (2002) Genetic dissection of mammalian fertility pathways. Nature. Cell. Biol. Medic, S41-S49.
15. Miller S A, Dykes D D and Polesky H F (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic. Acids. Res, 16:3.
16. Polley S, De S, Brahma B, Mukherjee A, Vinesh PV, Batabyal S, Arora JS, Pan S, Samanta AK, Datta TK, and Goswami SL (2010) Polymorphism of BMPR1B, BMP15 and GDF9 fecundity genes in prolific Garole sheep. TROPICAL ANIMAL HEALTH AND PRODUCTION, 42(5): 985-993.
17. Shackell G H, Hudson N L, Heath D A, Lun S, Shaw L, Condell L, Blay L R and McNatty K P (1993) Plasma gonadotropin concentrations and ovarian characteristics in Inverdale ewes that are heterozygous for a major gene ($FecX^I$) on the X chromosome that influences ovulation rate. Biol. Reprod, 48:1150-1156.
18. Vacca GM, Dhaouadi A, Rekik M, Carcangiu V, Pazzola M, and Dettori ML (2010) Prolificacy genotypes at BMPR 1B, BMP15 and GDF9 genes in North African sheep breeds. SMALL RUMINANT RESEARCH. 88 (1): 67-71
19. Wang Q G, Zhong F G, Li H, Wang X H, Liu S R, Chen X J and Gan S Q (2005) Detection of major gene on litter size in sheep. Yi. Chuan, 27(1):80-4.