دانشگاه تبریز

دانشکده دامپزشکی

گروه علوم درمانگاهی

پایان نامه

برای دریافت مدرک دکترای حرفه‌ای در رشته دامپزشکی

عنوان پایان نامه:

تعیین چند شکلی ژن بورولا در گوسفندان نژاد زل استان مازندران با استفاده از روش PCR-RFLP

استاد راهنما:

دکتر رضا اسدپور

اساتید مشاور:

دکتر رضی اله جعفری جوزانی

دکتر صادق علیجانی

پژوهشگر:

هادی محمودی

شهریور ۱۳۹۰

نام خانوادگی دانشجو: محمودی **نام:** هادی

عنوان پایان نامه:

تعیین چند شکلی ژن بورولا در گوسفندان نژاد زل مازندران با استفاده از روش PCR-RLFP

استاد راهنما : دکتر رضا اسدپور

استادان مشاور: دکتر رضی اله جعفری جوزانی– دکتر صادق علیجانی

مقطع تحصیلی: دکترای حرفه‌ای **رشته**: دامپزشکی **دانشگاه:** تبریز

دانشکده: دامپزشکی تاریخ فارغ التحصیلی: صفحات :٥٤

کلید واژه: گوسفند زل، ژن بورولا، چندشکلی، دوقلوزایی

چکیده:

بالا بودن نرخ تخمک‌گذاری و بره زایی از مهمترین عوامل تاثیرگذار بر افزایش کارآیی تولید مثل و به تبع آن افزایش کارآیی اقتصادی در صنعت پرورش گوسفند به حساب می آیند. مطالعه حاضر به منظور شناسایی جهش‌های موجود در ژن بورولا در گوسفندان نژاد زل انجام گرفت. این ژن از جمله ژن‌های بزرگ اثر بوده و گزارش شده که در نژادهای مختلف گوسفند سبب افزایش میزان تخمک‌گذاری و نیز چند قلوزایی در گوسفند می شوند.

در این مطالعه از ٦٨ راس گوسفند نژاد زل استان مازندران (٥٠ راس با سابقه دوقلوزایی و ١٨ راس

تک‌قلو) خونگیری به عمل آمد و DNA آنها با روش لیز سلولی استخراج و با استفاده از ژل آگارز ارزیابی گردید. جایگاه جهش ژن بورولا با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تکثیر یافت و محصولات بدست آمده (۱۹۰ جفت باز) به وسیله ژل آگارز بررسی گردید. پس از هضم محصولات PCR با آنزیم AvaII جمعیت مورد مطالعه از نظر چندشکلی بررسی گردیدند. در صورتی که حامل هموریگوس در گله باشد، باندهای ۱۶۰ و ۳۰ جفت بازی مشاهده می‌شود ولی اگر ژن در گله نباشد (++)، باندها فقط ۱۹۰ جفت بازی خواهند بود و در حامل‌های هتروزیگوس نیز همه باندهای ۱۹۰ و ۱۶۰ و ۳۰ جفت‌باز است. تنایج نشان می‌دهد که تنها یک نمونه دارای باندهای ۱۹۰و۱۶۰ و ۳۰ جفت باز بوده و بقیه نمونه‌ها دارای باند ۱۹۰ جفت بازی بوده‌اند. بنابراین یک نمونه دارای ژنوتیپ B+ و بقیه نمونه‌ها دارای ژنوتیپ ++ و نوع وحشی یا بدون جهش این ژن بودند.

با توجه به ثبت رکوردهای فنوتیپی دو و یا چند قلوزایی در این نژاد، از تنایج حاصل از این مطالعه می‌توان چنین نتیجه گیری نمود که عامل ژنتیکی مسئول دو یا چندقلوزایی در این نژاد مرتبط به جهش گزارش شده در ژن بزرگ اثر بورولا نبوده بلکه باید به جستجوی ژن‌های دیگری در این نژاد بود.

فهرست مطالب

فصل اول مقدمه ۱

فصل دوم کلیات ۳

۲-۱ جایگاه گوسفند در رده بندی جانوری ۳

۲-۲- نژادهای گوسفند ۳

۲-۳ گوسفند زل ٤

۲-۳-۱ پراکنش ٤

۲-۳-۲-جمعیت ٥

۲-۳-۳- خصوصیات ظاهری و تولیدی ٥

۲-٤- تولید مثل گوسفند ٦

۲-٥- عوامل موثر بر چندقلوزایی در گوسفند ۷

-۱-٥-۲عوامل محیطی ۷

استفاده از داروها جهت تحریک تخمک گذاری (روش فارماکولوژی) ۸

استفاده از روش های طبیعی جهت تحریک تخمکگذاری ۹

۲-٥-۲- تاثیر جهش ژن بر دوقلوزایی گوسفند ۱۰

۱-۲-٥-۲ژن بورولا ۱۰

اثر ژن بورولا بر تولید مثل ۱۲

اثر ژن بورولا در باروری و میزان زنده مانی رویان ۱٤

-۲-٦-۲ژن GDF9 ۱۷

۲-۷- واکنش رنجیره ای پلیمراز ۱۸

نحوه عمل PCR ۱۸
RFLP ۲۲
کلیات تکنیک ۲۲
آنزیمهای محدودگر ۲۳
مبانی الکتروفوز ۲٤
ژل آگارز ۲٤
بافرهای الکتروفورز ۲٦
بافرهای بارگذار الکتروفورز ۲۷
اتیدیوم بروماید ۲۸

فصل سوم مواد و روش کار ۳۰

لیست مواد و وسایل مورد نیاز ۳۰
۳-۱- انتخاب نمونه ۳۰
۳-۲-تعداد نمونه ها ۳۰
۳-۳ – نحوه نمونه گیری ۳۱
۳-٤- جدول رکوردگیری ۳۱
۳-۵- استخراج DNA ۳۱
۳-٦- مراحل انجام واکنش زنجیرهای پلیمراز ۳۵
۳-۷- الکتروفورز ژل آگارز ۳٦
۳-۸- RFLP-PCR و هضم آنزیمی برای ژن بورولا ۳٦
۳-۹- الکتروفورز محصولات نهایی پس از هضم آنزیمیPCR ۳۷

۳-۱۰- روش آنالیز باندهای حاصل از الکتروفورز ۳۸
۳-۱۱- روش آنالیز باندهای حاصل از الکتروفورز ۳۸
۳-۱۲- روش آنالیز اثرات عوامل ثابت ۳۸

فصل چهارم نتایج ۳۹

٤-۱- اطلاعات نمونه گیری ۳۹
٤-۲- نتایج الکتروفورز محصولات PCR-RFLP بر روی ژل آگارز ٤۱
٤-۳- فراوانی توزیع ژنوتیپ های ژن بوروﻻ در زایش و سنین مختلف ٤۲
٤-٤- فراوانی توزیع آلل و ژنوتیپ های مختلف ژن بوروﻻ ٤۳
٤-٥- میزان بره زایی در هر شکم زایش ٤٥

فصل پنجم بحث ٤٦

نتیجه گیری ٥۱

منابع و مآخذ ٥۲

فهرست شکلها و جداول مندرج در پایان نامه:

شکل ۱-۲- میش نژاد زل ۵

شکل ۲-۲- مراحل PCR در دماها و زمان های مختلف ۲۱

شکل ۳-۲- مراحل PCR ۲۱

شکل ٤-۲- تصویر الکتروفورز بعد از استخراج DNA ۳٤

جدول ۱-٤- فراوانی نوع زایش بر اساس شکم زایش ٤۰

جدول۲-٤- فراوانی نوع زایش بر اساس سن ٤۰

شکل ۱-٤ تصویر الکتروفورز محصولات PCR-RFLP ٤۱

جدول ۳-٤- فراوانی چندقلوزایی در ژنوتیپ های مختلف ژن بورولا ٤۲

جدول ٤- ٤- فراوانی سنین مختلف زایش برای ژنوتیپ های مختلف ژن بورولا ٤۳

جدول۵-٤- درصد فراوانی ژنوتیپ های مختلف ٤٤

جدول ٦-٤- درصد فراوانی آلل ها ٤٤

جدول۷-٤- میزان بره زایی در هر شکم زایش در ژنوتیپ های مختلف ٤۵

فصل اول

مقدمه

کشور ایران با دارا بودن بیش از ۵۰ میلیون راس گوسفند از بیش از ۲۵ نـژاد مختلـف، در زمـره مهمترین کشورهای پرورش دهنده گوسفند جهان قرار دارد. اهمیت گوسفندداری در ایران تنها از نظر تنوع نژادی، اندازه و جایگاه آن در جهان نیست بلکه بخش پرورش گوسفند سهم بسزایی در اقتصـاد کشاورزی و دامپروری کشور نیز دارا می باشد. نژادهای بومی در هر کشور بعنوان یک سرمایه ملی و محصولی استراتژیک در اقتصاد و رونق آن کشور محسوب میشوند که حفظ و نگهداری از این نژادها از ارزش و اهمیت بسیاری برخوردار است. بعد از هزاران سال انتخاب طبیعی و گذر از موانع بسیار زیاد و با غلبه بر تمامی ناملایمات و شرایط نامساعد محیطی دامهای بومی همچنان به حیات خویش ادامه داده و به تکثیر و ازدیاد نسل خود پرداخته اند (ادریس و خسروی نیا،۱۳۷۹).

گوسفند نژاد زل در مناطق ساحلی دریای خزر و قسـمتی از دشـت گرگـان پـرورش داده مـی-شود. این گوسفند به نژاد آریایی هم معروف است، زیرا شواهد تاریخی نشان می دهد که قوم آریایی ساکن در نواحی گرگان و مازندران اقدام به اهلی کردن این گوسفند نموده اند. مهمترین خصوصـیت این نژاد داشتن دم بجای دنبه است که در نتیجه نسبت گوشـت بـه چربـی لاشـه افـزایش مـی یابـد (نصیریان و همکاران۱۳۸۷). تنوع ژنتیکی و حفـظ ذخـایر ژنتیکـی از اهـداف مهـم اصـلاح نـژادی محسوب میشوند(Davis و همکاران، ۲۰۰۲). اصلاح ژنتیکی از طریق تغییر نـژاد بـا عمـل انتخـاب صورت می گیرد که یک روش مهم ولی کند برای افزایش عملکرد می باشد لذا برنامه هـای اصـلاح نژاد باید بعنوان روشی دراز مدت برای افزایش تولیدات دام مورد توجه قرار گیرد.(خالداری، ۱۳۸٤)

موفقیت برنامه اصلاح نژادی بستگی به میزان تنوع ژنتیکی موجود در جمعیت دارد. تنوع ژنتیکی ماده اصلی اصلاحگر دام است و کمبود یا فقدان این تنوع قدرت انتخابهای ژنتیکی را کاهش میدهد.(۵) پایه و اساس تنوع ژنتیکی در یک گونه، تغییرات جهشی است که با ایجاد آلل‌های مختلف شکل‌های فنوتیپی و ژنوتیپی متفاوتی را بوجود می آورد(٦).

انتخاب سنتی برای افزایش تعداد بره بدلیل بدیل محدودیتهای جنس و وراثت پذیری کم مشکل است بعلاوه فقدان اطلاعات در زمینه کنترل ژنها ی موثر در میزان بره زایی گوسفندان از محدودیتهای روشهای سنتی بوده است. ژنتیک مولکولی میتواند با آنالیز DNA و تشخیص ژنها موثر در تولید مثل بر این محدودیتها غلبه کرده و باعث بهبود کارایی تولید مثل در گوسفندان گردد. ژن بورولا[1] یک ژن اتوزوم غالب است که بر روی میزان تخمک‌گذاری اثر افزایشی دارد. این ژن اولین بار در گوسفندان نژاد مرینو بورولا گزارش گردید. مطالعات بعدی نشان داد میزان تخمک گذاری و تعداد بره میتواند تحت تاثیر سایرژنها نیز باشد..(Piper and Bindon 1982; Davis et al. 1982)

هدف از این اجرای این پژوهش شناسایی و تعیین چندشکلی[2] ژن بورولا و عوامل دخیل در دوقلوزایی گوسفندان نژاد زل مازندران می باشد که در صورت مسئول بودن این ژن در دوقلوزایی، از این ژن در طرح های ژنتیکی اصلاح نژاد به کار گرفته شود.

[1] Booroola
[2] Polymorphism

فصل دوم

کلیات

۲-۱ جایگاه گوسفند در رده بندی جانوری

طبق رده بندی سیستماتیک جانورشناسی، گوسفند در سلسله جانوران (Animals)، زیر سلسه پرسلولی (Metazoa)، دسته طنابداران (Chordata)، شاخه مهره داران (Vertebrata)، رده پستانداران (Mamalia)، راسته سم داران (Ungulata)، زیر راسته زوج سمان (Artiodactyla)، گروه نشخوارکنندگان (Ruminata)، تیره تهی شاخان (Bovidae) و جنس گوسفند (Ovis) قرار دارد. جنس گوسفند شامل کله نژادهای اهلی و اکثر انواع وحشی آن می باشد. گونه گوسفند اهلی Ovis areis می باشد (سعادت نوری،۱۳۷۵).

۲-۲- نژادهای گوسفند

گوسفند یکی از نخستین حیواناتی است که بدست بشر اهلی شده است. طی هزاران سال، گوسفند اهلی تحت مدیریت انسان تسبت به اصل وحشی‌اش دچار تغییرات بسیاری شده است. انتخاب[1] گوسفند جهت تولید محصولات خاص در زمان طولانی موجب بوجود آمدن تیپ‌های متفاوتی از این حیوان شده است. جهش ژنتیکی[2] نیز یکی از عوامل تغییر در صفات ظاهری و ژنتیک این حیوان بوده است. همچنین زندگی در شرایط خاص زندگی جغرافیایی بمدت طولانی و انتخاب

[1] Selection
[2] Mutation

ممتد موجب ظهور نژادهای مختلف در گوسفند شده است. علاوه بر آن، در دوران قـدیم، مهـاجرت اقوام از سرزمینی به سرزمین دیگر به دلایل مختلف باعث می شد که گوسفندان یک ناحیه بـه ناحیـه جدیدی آورده شده و با گوسفندان سرزمین جدید آمیزش یابند و در نتیجه ترکیب هـای جدیـد پابـه عرصه گذارند. امروزه بیش از ۱۰۰۰ نژاد گوسفند در سراسر جهان وجـود دارد. از زمـان هـای پـیش تقسیم بندی نژادهای گوسفند دنیا براساس نوع محصول اصلی این حیـوان منـداول بـوده و در حـال حاضر نیز بر اساس این روش تمام گوسفندان سراسر جهان به چهار دسته نژادهای پشـمی، نژادهـای گوشتی، نژادهای شیری و نژادهای پوستی تقسیم می شوند (جلالی زنوز، ۱۳۸۲).

۲-۳ گوسفند زل

از نژادهای کوچک جثه ایرانی محسوب می شود، محصول پوست گوسفند زل بدلیل کـوچکی و نازکی مرغوبیت چندانی ندارد . دنبه ندارد و به همین دلیل ذخیره چربی در بین بافتها صورت می گیرد که باعث افزایش کیفیت و بازار پسندی آن می شود. به جای دنبه زائده دمی باریـک بـه طـول ۱۵-۱۰ سانتیمتر دارد. دارای دست و پای کشیده و بدون پشم است که برای راهپیمایی مناسب می باشد.

۲-۳-۱ پراکنش

گوسفند زل ژنوتیپ منحصر به فردی داشته و تنها نژاد بدون دنبه ایـران مـی باشـد. ایـن نـژاد را حدفاصل بین گوسفندان اهلی و وحشی می دانند که به جای دنبه دارای دمی بصورت دنبالچه باریـک متشکل از ۷ مهره است که به ندرت طول آن از ۱۰ الی ۱۵ سانتیمتر تجاوز می نماید. بـه لحـاظ تنـوع اقلیمی منطقه و نیز سـازگاری گوسـفند زل بـا اقلـیم هـای کوهسـتانی و کوهپایـه ای بخـش زیـادی ازروستائیان جنگل نشین و یا حاشیه جنگل اقدام به نگهداری از گوسفند زل می نمایند. این دام به دلیل

نداشتن دنبه و بلندی نسبی دست و پا و نیز سبک بودن وزن حیـوان توانـایی زیـادی در راهپیمـایی و پیمودن مسیرهای مرتفع دارد.

۲-۳-۲-جمعیت

حدود ۲/۵ میلیون راس از این نژاد در مناطق شمالی وجود دارد.

۲-۳-۳- خصوصیات ظاهری و تولیدی

رنگ این تژاد از قهوه ای روشن تا تیره سیاه نخودی و شکری دیده می شود. البته امـروزه بـدلیل تلاقی های بین نژادی به رنگ های مختلف دیده می شود. میانگین قد این نژاد در جـنس مـاده ٦٥-٥٥ و در جنس نر ٦٥-٦٠ سانتی متر و طول بدن در جنس ماده ٥٠-٤٥ و در نـر ٦٠-٥٥ سـانتی متـر است. وزن بره های ماده و نر در هنگام تولد به ترتیـب ۲/۲-۲ و ۲/٦-۲/٤ کیلـوگرم مـی باشـد. وزن بلوغ جسمی به ترتیب در جنس های ماده و نر ٤٠-٣٥ و ٥٠-٤٠ کیلوگرم می باشـد. در ۷-۵ درصـد از میش های این نژاد دوقلوزایی دیده می شود (خالداری، ۱۳۸۴).

شکل ۱-۲- میش نژاد زل

۲-٤- تولید مثل گوسفند

تولید مثل در گوسفند تحت تاثیر عوامل زیادی قرار می گیرد. این عوامل شامل پتانسیل ژنتیکی و عوامل محیطی همچون وضعیت تغذیه ای، اثرات طول روز یا دوره نوری، وصعیت سلامت و غیره می باشد.بطور کلی بیشتر نژادهای گوسفند الگوی تولید مثلی فصلی دارند. بدین صورت که تنها در زمان های معینی از سال فحل[1] می شوند که بنابر اصطلاح به آن فصل تولید مثلی یا فصل جفت گیری گفته می شود. گوسفند از جمله حیواناتی است که دارای پلی استروس فصلی می باشد. بدین معنا که در هر فصل تولید مثلی چندین بار فحل می شود. فصل تولید مثلی در گوسفند و بز با کوتاه شدن دوره روشنایی روزانه آغاز می شود، از این رو آنها را «تولید مثل کننده در روزهای کوتاه»[2] نامیده اند. لذا فصل غیرفحلی[3] آنها همزمان با روزهای بلند سال است (سعادت نوری،۱۳۷۵).

دانشمندان علت اصلی آغاز شدن چرخه‌های فحلی در گوسفند را بی تفاوت شدن میش در برابر تاثیر روزهای بلند در فصل غیرفحلی دانسته اند. چرخه فحلی زمانی آغاز می شود که طول روز هنوز شروع به کم شدن نکرده است. آنچه که سبب تغییرات هورمونی و تخمک اندازی می شود، کاهش حساسیت مغز در برابر تاثیر بازخورد[4] منفی استروئیدها بوده که افزایش تراوش GnRh و گنادوتروپین ها و رشد فولیکول را دارد. در فصل تولید مثلی روزها بتدریج کوتاه می شوند و پس از مدتی که میش در شرایط روزهای کوتاه (تاریکی بیشتر) نگهداری شود، نسبت به روزهای کوتاه نیز بی تفاوت می شود. در روزهای کوتاه تراوش ملاتونین به تدریج افرایش می یابد. ملاتونین سبب

---

[1] Estrus
[2] Short-day breeder
[3] Unestrus
[4] Feedback

افزایش محور هیپوتالاموس- هیپوفیز به تاثیر بازخورد منفی استرویدهای گنادها شده و بدین ترتیب بسامد پالسهای GnRh و گنادوتروپین ها کاهش یافته که آن نیز به نوبه خود توقف چرخه های تخمدان و در نتیجه غیرفحلی را دربردارد.(خالداری ، ۱۳۸۴)

۲-۵- عوامل موثر بر چندقلوزایی در گوسفند

معمولا تولید مثل پدیده ای همراه با موفقیت و یا شکست است، لذا عوارض اقتصادی شکست آن برای دامدار بسیار مهم می باشد. اگر گوسفند آبستن نشود و یا تعداد نوزاد حاصل از آن در هر زایمان یا حتی در سال یک راس بجای دو راس باشد، تاثیر منفی زیادی در سودآوری دامدار خواهد داشت(سعادت نوری، ۱۳۷۵).

۲-۵-۱- عوامل محیطی

تعداد تخمک آزاد شده از تخمدان ها یک عامل مهم در باروری و چندقلوزایی در دامهای ماده می باشد. در شرایط طبیعی میزان تخمک‌گذاری در گوسفند ۱ تا ۳ عدد می باشد. ولی به دلایلی مانند بارور نشدن کلیه تخمک‌های آزاد شده و یا تلف شدن برخی از جنین ها، تعداد نتاج حاصل کمتر است. لذا اطمینان از اینکه فرایند تولید مثل در یک واحد دامپروری، نیازمند استفاده از فنون جدید تولید مثلی است بسیار اهمیت دارد. نتایج تحقیقات نشان می دهد با استفاده از هورمون های سنتتیک و افزایش تعداد تخمک ها و همچنین اصلاح ژنتیک می توان تنایج تولیدی را افزایش داد.

در روش هورمونی، برای افزایش دوقلو و حتی چندقلوزایی در گوسفند، روش کوتاه مدت تحریک تخمک‌گذاری می باشد. شرط لازم برای تحریک تخمک‌گذاری اطمینان از رشد تعداد زیادی

از فولیکول ها است. با این حال تحریک تخمک‌گذاری باید با احتیاط انجام شود و از تخمک‌گـذاری زیاد اجتناب شود.

روش های مورد استفاده برای تحریک تخمک‌گذاری عبارتند از:

الف – استفاده از هورمون ها (داروها) جهت تحریک تخمک‌گذاری: معمولا این روش مسـتلزم همزمان سازی فحلی در دامها می باشد.

ب – استفاده از روش های طبیعی جهت تحریک تخمک‌گذاری: روش های طبیعی را می تـوان به تنهایی و یا با همزمان سازی فحلی استفاده نمود.

استفاده از داروها جهت تحریک تخمک‌گذاری (روش فارماکولوژی)

در این روش با استفاده از گونادوتروفین های خارجی در مرحله رشد فولیکول چرخه فحلی بـه تکمیل گونادوتروفین‌های طبیعی هیپوفیز (LH,FSH) اقدام می شود. گونـادوتروفین‌هـای خـارجی از عصاره هیپوفیز اسب و خوک و یا از سرم مادیان آبستن (eCG یا PMSG)[1] تهیه می شـوند. یکـی از محاسن PMSG دوام دراز مدت آن و در نتیجه تزریق یکبار آن می باشد. در صورتی کـه نیمـه عمـر عصاره های هیپوفیزی کوتاه بوده و نیاز به تزریقات متعدد دارند. لذا عموما در برنامه‌های تولید مثل و تلقیح از PMSG استفاده می شود. همانطور که قبلاً اشاره شد، استفاده از PMSG علاوه بـر نیـاز بـه همزمان سازی فحلی، باید بلافاصله پس از قطع درمان با پروژسترون یا تزریق پروستاگلاندین انجـام شود. مقدار PMSG مورد نیاز برای تحریک تخمک‌گذاری به نژاد و فصل بستگی دارد. معمولا بـرای

[1] Pregnant Mare Serum Gonadotrophin

دام–های ماده در فصل طبیعی تولید مثل IU ۵۰۰–۴۰۰ و درخارج از فصل طبیعی تولید مثل IU ۷۰۰–۶۰۰ می باشد.

برای تحریک تخمک‌گذاری از داروهای مختلف دیگری هم استفاده می شود. یک داروی تجارتی «فکاندین»[1] است. این دارو اثر محدود کننده استروییدهای تخمدانی و همچنین هورمون های مهار کننده تخمدانی (اینهیبین[2]) بر روی هیپوتالاموس و هیپوفیز را کاهش می دهد که با افزایش ترشح FSH فولیکول های بیشتری رشد کرده و به مرحله تخمک‌گذاری می رسند.

از جمله محاسن فکاندین، جلوگیری از تحریک زیاد تخمدان و همچنین عدم نیاز به همزمان سازی فحلی می باشد. با این حال معایبی همچون نتایج ضعیف ناشی از زیاد بودن تلفات جنین و همچنین عدم امکان استفاده از آن در دام های با شرایط بدنی ضعیف و درصد کم بره زایی استفاده از فکاندین را محدود کرده است (خالداری ، ۱۳۸۴).

استفاده از روش های طبیعی جهت تحریک تخمک‌گذاری

روش های طبیعی نیازمند تغییر دادن شرایط محیطی دام ها به گونه ای است که بر فعالیت تولید مثل دام اثر بگذارد. این روش ها به همزمان کردن فحلی نیاز نداشته و بیشتر شامل اثر تغذیه (فلاشینگ) می باشد.

در اصطلاح دامپروری فلاشینگ عبارت است از تغذیه مناسب دام های ماده جهت افزایش آزاد شدن تخمک است. از این روش بیشتر در گوسفند و سپس در خوک استفاده می شود. برای انجام

[1] Fecundin
[2] Inhibin

فلاشینگ حداقل دو هفته قبل از قوچ اندازی، باید دام ها را با جیره مناسب تغذیه نمود. بعنوان مثال این جیره برای یک میس ۵۰ کیلوگرمی باید حداقل دارای ۱۵۰ گرم پروتیین خام و ۳/٤ مگاکالری انرژی قابل متابولیسم باشد. بدیهی است تامین انرژی مذکور مستلزم استفاده از کنسانتره در جیره است. در اثر تغذیه با کنسانتره، تولید اسید پیرورویک زیاد شده و پس از جذب سبب ازدیاد میزان گلوکز خون می شود. افزایش گلوکز خون سبب افرایش میزان ترشح گونادوتروفین های طبیعی هیپوفیز (LH,FSH) شده و لذا باعث رشد تخمک های بیشتر در تخمدان می شود. در سالهای قبل توصیه بر آن بود که تغذیه با این جیره باید تا دو هفته بعد از آمیزش ادامه یابد. ولی تحقیقات جدید استفاده از جیره فلاشینگ را فقط به مدت دو هفته قبل از آمیزش محدود می نماید. زیرا استفاده از جیره بعد از آمیزش میش ها بعلت اختلال در متابولیسم و تخریب پروژسترون سبب بروز تلفات جنینی و شروع مجدد چرخه فحلی می شود (خالدالری، ۱۳۸۴).

۲-۵-۲- تاثیر جهش ژن بر دوقلوزایی گوسفند

۲-۵-۲-۱ ژن بورولا[1]

افزایش تولید مثل در گله های گوسفند مرینوی استرالیایی سال های زیادی است که مورد توجه عموم قرار گرفته است (Turner و همکاران، ۱۹٦۹) و وجود گله های گوسفند تجاری (بورولا) که به نظر می‌رسد سطح بالایی از باروری را دارا باشند، از جمله موارد مورد علاقه بوده است. گله گوسفند بورولا رده‌ای مجزا از میش‌های انتخاب شده برای چندقلوزایی به وسیله برادران Seers به عنوان بخشی از کار آنها در زمینه تولید پشم مرینو در اواخر دهه ۱۹٤۰ و ۱۹۵۰ بود. جزئیات دیگری از

[1] Boorola Gene

منشا گوسفند نژاد بورولا مرینو به وسیله ترنر (Turner) در سال ۱۹۸۲ فـراهم شـده و توسـط پـایپر (Piper) و بایندون(Bindon) در سال ۱۹۹٦ توسـعه یافـت(Hinch و همکـاران، ۱۹۹٦). ایـن مـورد باعث انجام آزمایشاتی در استرالیا و نیوزیلند برای بهره‌گیـری از ژنوتیـپ هـای بـورولا مرینـو بـرای افزایش میزان باروری در گله های مرینو و سایر نژادهـا شـد(Davis و همکـاران، ۱۹۸۲؛ DAVIS و همکاران، ۱۹۸۲). طرح اولیه تعداد زیادی از این آزمایشات در سال ۱۹۷۰ شکل گرفت، یعنی قبـل از اینکه طبق نظریه Piper و Bindon در سال ۱۹۸۰ بفهمند که افزایش باروری بورولا مرینـو در نتیجـه یک ژن اصلی (ژن بورولا) است(Turner et al. 1969). این آزمایشات با احتساب وقایعی که منجـر به فرضیه یک ژن اصلی توسط Piper و Bindon گردید، آغاز گشتند. به دنبال این جریان، یک سری از آزمایشات در استرالیا و نیوزیلنـد انجـام گرفتنـد کـه وجـود یـک ژن اصـلی را تاییـد مـی‌کردنـد (Davis et al. 1982؛ Piper و همکاران، ۱۹۸۵) . نشانگرهای مولکولی کـه بعـداً روی کرومـوزوم ٦ گوسفند یافت شدند(Montgomery و همکاران، ۱۹۹۳؛ Montgomery و همکاران، ۱۹۹٤) و پس از آن نشان داده شد که اثر ژن بورولا در اثر جهشـی روی گیرنـده 1B پـروتئین شـکل دهنـده (BMP) موسـوم بـه BMPR-1B مـی باشـد(Montgomery و همکـاران، ۲۰۰۱؛ Souza و همکـاران، ۲۰۰۱؛ Davis et al. 2002). جهش باعث القـای بلـوغ زودرس فولیکـول هـای تخمـدانی توسـط افـزایش حساسیت فولیکولها به هورمون تحریک کننده فولیکول می‌گردد (و نه به وسیله افزایش غلظت FSH در گردش خون). حال این نکته آشکار می گردد که سیستم BMP نقشی مهـم در تعـدیل پاسـخ بـه تکثیر و تمایز سلول های گرانولوزا و پوششی برای تحریک گنادوتروفین‌ها از طریق اثـر بـر چنـدین

رهیافت داخل فولیکولی دارد. یک تست DNA برای حامل‌های بوررولا در نیوزیلند توسعه یافته و هم اکنون به صورت تجاری موجود است. جهش بوررولا همچنین در نژاد بزرگ جثه جاوانز[1] (Davis et al. 2002؛ Davis 2005)، نژادهای هو[2] وهان[3] در چین (Davis et al. 2006) و نژاد کندراپادا[4] در هند (Kumar و همکاران، ۲۰۰۸) یافت شده است. از آنجا که بهره‌گیری از گوسفند حامل ژن بوررولا باعث افزایش کمیتی در باروری در طی یک نسل می گردد، تلقیح‌هایی به طور آزمایشی در چند کشور برای ارزیابی و داخل کردن ژن بوررولا به سایر نژادها صورت گرفت (Hinch et al. 1996).

در سال‌های اخیر به دنبال تعیین ژن بوررولا در گارول به عنوان منبع احتمالی جهش اصلی، از گارول برای تلقیح در جهت افزایش باروری در نژادهای دکانی[5] (Nimbkar و همکاران،) و مالپورا[6] (Mishra و همکاران، ۲۰۰۹) در هند استفاده شده است. نشان داده شده که چندین نژاد، حامل ژنهایی به غیر از بوررولا هستند که اثری مهم بر باروری دارند و این مورد به وسیله دیویس (2005) مورد بازنگری قرار گرفته‌است.

اثر ژن بوررولا بر تولید مثل

اثرات مختلف بوررولا بر میزان تخمک‌گذاری، میزان بره زایی در هر شکم، بره های از شیر گرفته شده و وزن بره های از شیر گرفته شده ثبت شده است. متوسط اثرات ژن بوررولا در اصل توسط Piper)و همکاران، ۱۹۸۸(وجود یک کپی از ژن بوررولا (+B) میزان تخمک‌گذاری را تا ۱

[1] Javanese
[2] Hu
[3] Hun
[4] Kendrapada
[5] Dekani
[6] Malpura

الی ۱/۵ تخمک و میزان بره‌زایی در هر شکم از زایش را تا ۰.۸+ الی ۱.۲+ افزایش میدهـد. آنهـا، اثـر یک کپی ثانویه (BB) بسته به پس‌زمینه ژنتیکی برای میزان تخمک‌گـذاری حالـت افزایشـی داشـته و برای میران بره‌زایی در هر شکم از زایش از افزایشی تا غالبیت متغییر می باشد. این نتایج اولیه به طور کلی با میانگین‌های ارزش‌گذاری شده رابطه ای پایدار (مستقیم) دارند که در میش‌ها به ازای یک کپی از ژن (+B)، میزان تخمک‌گذاری تا 1.3+ تخمک و میران بره‌زایی در هر شکم زایش تا ۰/۷+بـره بـه دنیا آمده افزایش می یابد. با مقایسه حالات مختلف می‌توان به افزایشی دیگر در میزان تخمک‌گذاری تا ۱.۷+ تخمک و ۰.۱+ بره برای هر میش به ازای دو کپی از ژن (+B) پی بـرد. اثـر یـک کپـی از ژن بورولا (+B) در میش ها از ۰/۸ تا ۲+ برای میزان تخمک‌گذاری متغیر است. بیشترین تاثیر بـر میـزان تخمک‌گذاری در ژنوتیپ با پس زمینه رامنی (Romney) است که برای تولید مثل بسیار خوب اسـت (Davis و همکاران، ۲۰۰۶). ممکن است اثر چندگانه ژن بورولا با افزایش قطعی در میـزان تخمـک-گذاری بسته به تعداد میش‌های غیرحامل قابل قیاس (++) تغییر کنند Gootwine)و همکاران، ۱۹۹۳؛ Gootwineو همکاران، ۲۰۰۶(. اثر کپی ثانویه ژن بورولا (BB) درکـل بـه ازای هـر تخمـک‌گـذاری افزایشی میباشد. اثر ژن بورولا بر میزان تخمک‌گذاری درمیش‌های جـوان در اولـین پـاییز عمـر آنهـا کاسته می شود((Montgomery et al. 1994)). پاسخ به میزان تخمک‌گذاری در میش های +B بیشتر از ++ ها بودپ Boulton)و همکاران، ۱۹۹۵(برای میران بره‌زایی ، میش های +B در هنگـام از شـیر گرفتن بره ها تعداد بره بیشتری نسبت به++ داشتند. (0.4+ تا 0.13+) که در مقایسه با اثر بر تخمک گذاری اثر آن کمتر است. در میان موارد مختلف آمیخته گری بـا بـورولا مرینـو در مـورد BB و +B افزایش قابل ملاحظه ای دیده نشد. بر اساس گزارشات اخیـر از هنـد .Nimbkar et al)؛ Kumar et al. 2008)و چین Guan)و همکاران، ۲۰۰۷؛ Hua و همکاران، ۲۰۰۹(در نژادهـای اینهـا افـزایش