ژنتیک نوین
دوره دوازدهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۶
صفحه ۳۷ - ۲۹

بررسی ساختار ژن سیتوکروم b در نمونه‌های سرگین گوزن مرال ایرانی حفاظت‌شده (*Cervus elaphus maral*)

The structure of cytochrome b gene in fecal samples of conserved Iranian Maral deer (*Cervus elaphus maral*)

طرلان فرهوش[۱]، رسول واعظ ترشیزی*[۲]، علی‌اکبر مسعودی[۲]، حمیدرضا رضایی[۳]، محمود تولایی [٤]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی اصلاح نژاد دام، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- به‌ترتیب دانشیار، استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- دانشیار، گروه محیط‌زیست، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران
٤. دانشیار، مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله، تهران، ایران

Farahvash T[1], Vaez Torshizi R[*2], Masoudi AA[2], Rezaei HR[3], Tavallaei M[4]

1- PhD Student, Animal Genetics and Breeding, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2- Associate Professor, Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3- Associate Professor, Department of Environmental Science, Faculty of Fisheries and Environmental Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Recourses, Gorgan, Iran
4- Associate Professor, Human Genetic Research Center, Baqiatallah Medical University, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: rasoult@modares.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۵/۵/۱٦ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۲٦)

چکیده

به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی گوزن‌های مرال ایران، توالی کامل ژن سیتوکروم b سه جمعیت حفاظت‌شده در نواحی شمالی و شمال غربی ایران تجزیه‌وتحلیل شد. این جمعیت‌ها به دلیل کوچک بودن، از نظر کاهش تنوع ژنتیکی موردتوجه هستند. از جمعیت‌های موردبررسی، تعداد ۲۵ نمونه سرگین تازه در سال ۱۳۹۳ جمع‌آوری شد. نتایج حاصل نشان داد که توالی‌های ژن سیتوکروم b سه جمعیت مرال ایرانی فاقد تنوع ژنتیکی بوده و تمام افراد این جمعیت‌ها علی‌رغم وجود فاصله جغرافیایی، یک هاپلوتایپ را تشکیل دادند. بررسی توالی ژن سیتوکروم b مرال ایران با توالی همین ژن در مرال ترکیه نشان داد که هفت جایگاه چندشکل در بین این دو گروه وجود داشته و یکی از این جایگاه‌ها دارای جایگزینی غیر هم نام می‌باشد. تنوع نوکلئوتیدی بین این دو گروه ۰/۰۰۳ و فاصله ژنتیکی بین این دو جمعیت ۰/۰۰۲ به‌دست‌آمد که رقم پایینی بوده و نشان‌دهنده کم بودن اختلاف ژنتیکی بین جمعیت‌های مرال ایران و مرال ترکیه است. مقدار عددی Tajima's D (۱/۵۵) نشان‌دهنده وقوع انتخاب طبیعی در بین جمعیت‌های مرال ایرانی و مرال ترکیه بود. وضعیت توالی ژن سیتوکروم b مرال ایرانی با دیگر زیرگونه‌های گوزن قرمز مقایسه شد. مقدار فاصله ژنتیکی بین این جمعیت‌ها ۰/۰۰٤±۰/۰۳۷، مقدار تنوع نوکلئوتیدی در بین تمامی ٤٦ توالی موردبررسی ۰/۰۳۵۱۷ و تعداد جایگاه‌های تفکیک ۱۳۵ بود. مقدار شاخص Tajima' D برابر ۰/۳۲۲ و غیر معنی‌دار بود که نشان‌دهنده وقوع جهش در این جمعیت‌ها است. نتایج بررسی شبکه هاپلوتایپی نشان داد که گوزن مرال بومی ایران، در گروه گوزن‌های قرمز اروپایی قرار می‌گیرد و در این شبکه با مرال‌های ترکیه یک کلاستر را تشکیل دادند. با توجه به پایین بودن تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مرال حفاظت شده مورد بررسی در این تحقیق، به‌نظر می‌رسد که بایستی مدیریت مناسب حفاظت برای حفظ این گونه و در درجه دوم برای افزایش اندازه مؤثر این جمعیت‌ها اتخاذ شود.

واژه‌های کلیدی

تنوع ژنتیکی
ژن سیتوکروم b
گوزن مرال
منطقه حفاظت‌شده

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-30]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.4.4]

مقدمه

تنوع ژنتیکی و مدیریت منابع ژنتیکی به‌عنوان یکی از اجزای مهم پروژه‌های اصلاحی محسوب می‌شود، چراکه یک‌گونه بدون تنوع ژنتیکی کافی، قادر به سازگاری با تغییرات محیطی و مبارزه با انگل‌ها و رقیب‌ها نیست (Askari et al. 2011). تنوع ژنتیکی یک جمعیت حیوان وحشی، تحت تأثیر عوامل مختلفی قرار دارد و موانع طبیعی و ایجادشده توسط بشر، بر روند تنوع ژنتیکی این جمعیت‌ها و جریان ژن بین آن‌ها تأثیر می‌گذارند (Cullingham et al. 2009; Niedziałkowska et al. 2011). این موانع باعث به وجود آمدن فاصله جغرافیایی بین جمعیت‌های مختلف و تفکیک جمعیت‌ها شده و به دنبال آن تنوع ژنتیکی در داخل این جمعیت‌ها، به دلیل کاهش اندازه جمعیت، کاهش می‌یابد. مدیریت حفاظت ژنتیکی باید بر اساس دانش عمیقی از منابع ژنتیکی نژادهای خاص باشد، لذا تلاش برای شناسایی و تعیین خصوصیات ژنتیکی نژادهای بومی و محلی بسیار اهمیت دارد (Shojaei et al. 2010). بررسی ساختار ژنتیکی این جمعیت‌ها، می‌تواند اطلاعات مناسبی را برای اتخاذ تصمیم‌های مناسب مدیریتی حفاظت در اختیار قرار دهد. DNA میتوکندریایی به دلیل سرعت جهش بالا و تعداد کپی زیاد در داخل یک سلول، یک مارکر بسیار حساس ژنتیکی می‌باشد که قادر است ساختار جمعیتی را درون یک نژاد بررسی نماید (Sunnucks 2000). توالی یابی دو ناحیه از این DNA به نام‌های ژن سیتوکروم b و ناحیه کنترل در مطالعات تاکسونومی حیوانات گیاهخوار، به‌عنوان یک تکنیک کارآمد مورداستفاده قرار می‌گیرد (Cook et al. 1999). نتایج حاصل از این توالی یابی، به مشخص شدن اختلاف ژنتیکی بین افراد، مقدار تنوع ژنتیکی، تنوع نوکلئوتیدی و همچنین تعیین هاپلوتیپ‌ها کمک می‌نماید (Zachos et al. 2007). در مطالعات حیات‌وحش، نمونه‌های سرگین، به دلیل خصوصیت گریزان زیستی این حیوانات، یکی از بهترین منابع در دسترس برای بررسی و کسب اطلاعات ژنتیکی، تغذیه‌ای، فیزیولوژیکی و بهداشتی در مورد گله‌های حیوانی است (Kuhen et al. 1997). با توجه به غنای زیستگاه‌های کشور از لحاظ تنوع جانوری و خطر انقراض تعدادی از گونه‌های موجود، بررسی ساختار ژنتیکی این گونه‌ها و حفظ این ذخایر ژنتیکی، از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. گوزن قرمز[1] حیوانی وحشی است که در مناطق مختلف دنیا به‌ویژه آسیا و اروپا پراکندگی زیادی دارد. این حیوان از راسته زوج سمان بوده و دارای زیرگونه‌های متعددی است (Geist 1999) و در بسیاری از مناطق ارزش اقتصادی و فرهنگی بالایی داشته و حتی در بخش‌هایی از شمال اروپا، به‌عنوان یک دام اهلی پرورش داده می‌شود (Markove et al. 2015). گوزن مرال (*Cervus elaphus maral*) که زیرگونه گوزن قرمز است، بزرگ‌ترین گوزن بومی ایران بوده و بااینکه درگذشته جمعیت‌های بزرگی از آن در اغلب نواحی جنگلی سواحل دریای خزر، ارتفاعات البرز و دامنه‌های زاگرس می‌زیسته‌اند، امروزه صرفاً در جنگل‌های انبوه شمال ایران به‌ویژه در پارک ملی گلستان (Kiabi et al. 2004) و برخی مناطق حفاظت‌شده در شمال و شمال غربی ایران زیست می‌نماید. همچنین جمعیت‌های کوچکی از این گوزن در حال حاضر در کشور ترکیه، روسیه و قفقاز وجود دارند (Ludt et al. 2004). گوزن مرال به دلیل نقش مؤثر خود بر اکوسیستم منطقه، همچنین امکان تبدیل آن به یکی از جاذبه‌های اکوتوریسم، موردتوجه است. در تحقیق حاضر تلاش شده‌است تا با استفاده از نمونه‌های سرگین گوزن مرال حفاظت‌شده مناطق شمال و شمال غربی ایران، توالی کامل ژن سیتوکروم b تکثیر و توالی یابی شده و تنوع ژنتیکی جمعیت‌های حاضر بررسی و جایگاه مرال ایرانی در بین دیگر زیرگونه‌های گوزن قرمز مشخص شود.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق ۲۵ نمونه سرگین از مناطق حفاظت‌شده شامل منطقه آینالو (واقع در منطقه ارسباران استان آذربایجان شرقی) ۱۱ نمونه، قرق (واقع در ۳۰ کیلومتری شرق شهر گرگان) ۹ نمونه و گیلان (واقع در استان گیلان) ۵ نمونه، در طی فصول پاییز و زمستان ۱۳۹۳، جمع‌آوری شد. با توجه به‌اندازه کوچک این جمعیت‌ها، تلاش شد که از تمام افراد جمعیت نمونه‌گیری شود. نمونه‌ها تازه بوده و بلافاصله داخل ظرف حاوی الکل اتانول ۹۶ درصد قرارگرفته و به آزمایشگاه ژنتیک گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس انتقال داده شدند. DNA نمونه‌ها

[1] *Cervus elaphus*

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-30]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.4.4]

با استفاده از کیت Stool DNA Isolation Mini Kit. Cat no: YT9032 (شرکت یکتاتجهیزآزما) استخراج شد.

برای تکثیر توالی کامل ژن سیتوکروم b، از آغازگرهای گزارش‌شده توسط دیگر محققین (Zachos et al. 2003; Ludt et al. 2004; Skog et al. 2009) استفاده و قطعه‌ای به طول ۱۱٤۰ جفت باز تکثیر شد. توالی آغازگرهای مورداستفاده در جدول ۱ ارائه‌شده است.

جدول ۱- توالی آغازگر مورداستفاده برای تکثیر توالی کامل ژن سیتوکروم b

ژن	توالی آغازگر	تعداد نوکلئوتید
cyt-b	A1 (5'-GAAAAACCATCGTTGTCATTCA-3')	۲۲
	B2 (5'-GGAGGTTGGTAGCTCTCCTTTT-3')	۲۲

جدول ۲- برنامه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

ردیف	واکنش	دما (درجه سانتی‌گراد)	مدت‌زمان
۱	واسرشته‌سازی اولیه	۹٤	۳ دقیقه
۲	واسرشته‌سازی	۹٤	٤٥ ثانیه
۳	اتصال آغازگرها	٥٤	٤٥ ثانیه
٤	بسط آغازگرها	۷۲	۷۰ ثانیه
٥	تکرار مراحل ۲ تا ٤ (۳٤ سیکل)	-	-
٦	بسط نهایی آغازگرها	۷۲	۳ دقیقه

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتر و با Super PCR Master Mix 2x, Cat No: YT1553 (شرکت یکتا تجهیزآزما) انجام شد. برنامه واکنش در جدول ۲ ارائه‌شده است. به‌منظور به‌دست آوردن نتایج دقیق و عاری از آلودگی، محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با کیت KBC PCR (Cat.No. K1132-50) purification kit تخلیص[1] شدند. مقدار ۲۰ میکرولیتر از محصولات تخلیص شده، به همراه ۱۰۰ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت‌وبرگشت مورداستفاده، با غلظت ۱۰ پیکومول، به‌منظور تعیین توالی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال شد. توالی‌های به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار BLAST و روش blastn در پایگاه داده NCBI به آدرس (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) بررسی شدند. توالی‌های رفت‌وبرگشت با کمک نرم‌افزار SEQSCAPE2.6 مرتب و تبدیل به یک توالی شده و در نرم‌افزار (Tamura et al. 2011) MEGA5 به روش clustalW هم‌تراز شدند. پس از گروه‌بندی توالی‌ها، مقدار فاصله ژنتیکی (D)، ترکیب نوکلئوتیدی، درصد جایگزینی هم نام[2] و غیر همنام[3] و نسبت این دو جایگزینی (R) محاسبه شد. در مرحله بعد با کمک نرم‌افزار DNASP51001 هاپلوتیپ‌ها تعیین‌شده و تنوع نوکلئوتیدی (π)، تنوع هاپلوتایپی (Hd)، تعداد سایت‌های پلی مورف، سایت‌های (PI)[4] و شاخص Tajima'D (Tajima et al. 1999) برآورد شدند.

توالی پروتئین حاصل از توالی کامل ژن سیتوکروم b به‌وسیله نرم‌افزار MEGA5، ترجمه شد. برای بررسی رابطه فیلوژنتیکی بین توالی‌های موردبررسی، از نرم‌افزار MEGA5 با روش حداکثر درست نمایی و Bootstrap برابر با ۱۰۰۰ و با توجه به مدل برآورد شده برای هر سری توالی استفاده شد. توالی کامل ژن سیتوکروم b مربوط به ۲۱ جمعیت مختلف زیرگونه گوزن قرمز باهدف مقایسه با توالی‌های مرال بومی ایران از بانک ژن (NCBI) دریافت شد تا جایگاه گوزن مرال بومی ایران در بین دیگر گونه‌های گوزن‌های قرمز تعیین شود (جدول ۳). رابطه فیلوژنتیکی بین این جمعیت‌ها با استفاده از نرم‌افزار MEGA5 به روش حداکثر درستنمایی و مدل دو پارامتری Kimura (Kimura 1980) تعیین و صحت این مدل به‌روش Bootstrap با تعداد تکرار ۱۰۰۰ بررسی شد. توالی سیتوکروم b گوزن زرد *Dama dama* (JN632629) و گوزن شوکا *Capreolus capreolus* (KJ681491) به‌عنوان outgroup مورداستفاده قرار گرفتند. شبکه ارتباط ژنتیکی هاپلوتایپ‌های حاصل با نرم‌افزار POPART1-7 و با استفاده از روش Median-joining (Bandelt et al. 1999) ترسیم شد.

نتایج و بحث

استخراج DNA از تمام نمونه‌ها با موفقیت انجام شد و وجود کنترل منفی نیز نشان از صحت واکنش زنجیره‌ای پلیمراز داشت (شکل ۱). نتایج حاصل از خوانش توالی‌ها، تکثیر قطعه کامل ژن سیتوکروم b به طول ۱۱٤۰ جفت باز را نشان دادند.

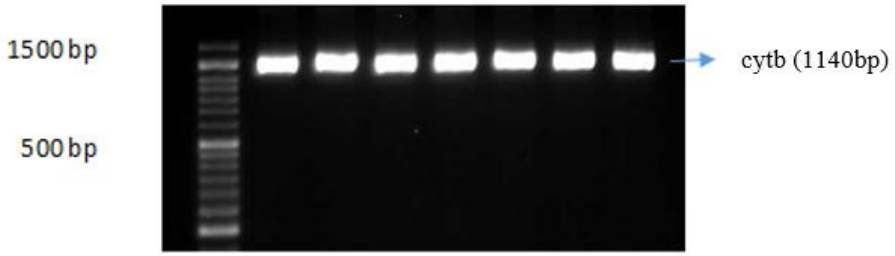
[1] Purification

[2] Transition
[3] Transversion
[4] Parsimony Informative

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-30]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.4.4]

جدول ۳- نام علمی و شماره دسترسی توالی‌های ژن سیتوکروم b اخذشده از NCBI

ردیف	شماره دسترسی در بانک ژن	اسم گونه	نام	محل جغرافیایی
۱	AY070222	*Cervus e. barbarus*	Barbary Red Deer	Tunisia, Tunis
۲	AY244489	*Cervus e. corsicanus*	Sardinian Deer	Sardinia
۳	AY070224	*Cervus e. xanthopygus*	Isubra	Russia, Anjui
٤	AY070226	*Cervus e. atlanticus*	Red Deer	Norway, Hitra
٥	AY044859	*Cervus e. hispanicus*	Spanish Red Deer	Spain, enclosure
٦	AB021099	*Cervus e. scoticus*	Scottish Red Deer	Scotland
۷	AF423198	*Cervus e. canadensis*	American Wapiti	North America
۸	AY044862	*Cervus e. sibericus*	Siberian Wapiti	China, Mongolia
۹	AY035871	*Cervus e. songaricus*	Tien Shan Wapiti	China, Tien Shan
۱۰	AY035875	*Cervus e. macneilli*	McNeill's Deer	China, Qinghai
۱۱	AY044861	*Cervus e. wallichi*	Shou	China, Tibet
۱۲	AY044857	*Cervus e. hippelaphus*	Middle-Europeanred deer	Austria
۱۳	AF423196	*Cervus e. hippelaphus*	Red Deer	Germany, enclosure
۱٤	AF489279	*Cervus e. hippelaphus*	Middle-Europeanred deer	Hungary
۱٥	AY118197	*Cervus e. hippelaphus*	Middle-Europeanred deer	Turkey, Istanbul
۱٦	AY142327	*Cervus e. bactrianus*	Bactrian Red Deer	Tadzikistan
۱۷	AY142326	*Cervus e. yarkandensis*	Yarkand Red Deer	China, Urumki
۱۸	AY118199	*Cervus e. maral*	Maral	Turkey, Bolu
۱۹	AF489280	*Cervus e. maral*	Maral	Iran
۲۲	AY070223	*Cervus e. kansuensis*	Kansu Red Deer	China, Dong Da Shan
۲۳	AY244490	*Cervus e. xanthopygus*	Isubra	China, Sinkiang



شکل ۱- محصولات PCR توالی کامل ژن سیتوکروم b در نمونه‌های سرگین گوزن مرال ایرانی حفاظت‌شده (ژل آگارز ۲ درصد)

توالی ژن سیتوکروم b گوزن مرال بومی ایران با توالی همین ژن در گوزن مرال ترکیه (AY118199) و گوزن قرمز اروپایی (JX966163) ۱۰۰ درصد شباهت نشان داد. توالی ژن سیتوکروم b در گوزن مرال بومی ایران به‌صورت زیر بدست آمد:

```
ATG ACC AAT ATC CGA GAA ACC CAC CCG CTAATA AAAATT GTA AACA AC GCA TTT ATT GAC CTC CCA GCC CCA TCA AAT  [ 78]
ATT TCA TCC TGA TG A AAT TTC GGC TCA TTA CTA GGA ATC TGT CTA ATC CTA CAA ATC CTC ACA GGC CTA TTC CTA GCG  [156]
ATA CAC TAT ACA TCT GAT ACA ATA ACA GCA TTC TCC TCT GTC ACC CAT ATC TGT CGA GAT GTC AAT TAT GGC TGA ATT  [234]
ATT CGA TAT ATA CAC GCA AAC GGG GCA TCA ATA TTT TTC ATC TGT CTA TTC ATA CAT GTA GGG CGA GGC CTG TAC TAC  [312]
GGA TCA TAT ACT TTT CTA GAG ACA TGA AAC ATC GGA GTA GTT CTT CTA TTT ACA GTC ATA GCC ACA GCA TTC GTA GGG  [390]
TAT GTC CTA CCA TGA GGA CAA ATA TCA TTC TGA GGA GCA ACA GTC ATT ACC AAC CTT CTC TCA GCA ATT CCA TAT ATT  [468]
GGA ACA AAC CTA GTC GAA TGA ATC TGA GGG GGC TTT TCA GTA GAC AAA GCAACC CTA ACC CGA TTTTTC GCT TTC CAC  [546]
TTT ATT CTC CCA TTT ATC AT C GCA GC A CTC GCT ATA GTA CAC TTA CTC TTC CTT CAC GAA ACA GGA TCT AAT AAC CCA  [624]
ACA GGA ATT CCA TCA GAC GCA GAC AAA ATC CCC TTT CAT CCT TAT T AT ACC ATT AAA GAT ATC TTA GGC ATC TTA CTT  [702]
CTA GTA CTC TTC TTA ATA TTA CTA GTA TTA TTC GCA CCA GAC CTA CTT GGA GAC CCA GAT AAC TAC ACC CCA GCA AAC  [780]
CCA CTC AAC ACA CCC CCT CAT ATT AAA CCT GAA TGA TAC TTC CTA TTT GCA TAC GCA ATC CTA CGA TCA ATT CCC AAC  [858]
AAA CTA GGA GG A GTC CTA GCC CTA GTC TCA TCC ATC CTA ATC TTA ATT CTC ATG CCT CTT CT T CAC ACA TCC AAACAA  [936]
CGC AGC ATG ATA TTC CGA CCA TTC AGC CAA TGC CTA TTC TGA ATC TTA GTA GCA GAT CTA TTA ACA CTT ACA TGA ATC  [1014]
GGA GG A CAA CCA GTT GAA TAC CCC TTT ATC ATT A TT GGA CAA CTA GCA TCT ATC TTA TAT TTC TTC ATC ATC CTA GTC  [1092]
CTC ATA CCA ATC ACC AGC ACA ATC GAA AAC AA C CTC CTA AAA TGA AGA                                            [1140]
```

توالی پروتیینی (۳۸۰ اسید آمینه) حاصل از ترجمه ژن سیتوکروم b گوزن مرال به‌صورت زیر می‌باشد:

```
MTNIRETHPL MKIVNNAFID LPAPSNISSW WNFGSLLGIC LILQILTGLF LAMHYTSDTM TAFSSVTHIC RDVNYGWIIR  [ 80]
VEWIWGGFSV DKATLTRFFA FHFILPFIIA ALAMVHLLFL HETGSNNPTG IPSDADKIPF HPYYTIKDIL GILLLVLFLM  [240]
LLVLFAPDLL GDPDNYTPAN PLNTPPHIKP EWYFLFAYAI LRSIPNKLGG VLALVSSILI LILMPLLHTS KQRSMMFRPF  [320]
SQCLFWILVA DLLTLTWIGG QPVEYPFIII GQLASILYFF IILVLMPITS TIENNLLKW*                         [380]
```

ترکیب نوکلئوتیدی توالی کامل ژن سیتوکروم b در گوزن مرال عبارت بود از ۳۱/۳۲ درصد A، ۲۸/۵۱ درصد T، ۱۲/۹۸ درصد C و ۲۷/۱۹ درصد G. در انتهای همه توالی‌ها کدون اختتام AGA مشاهده شد که نشان‌دهنده صحیح بودن فرآیند توالی‌یابی بود.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-30]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.4.4]

نتایج هم‌ترازی ۲۵ توالی گوزن مرال ایرانی، هیچ اختلاف ژنتیکی بین نوکلئوتیدهای این توالی‌ها نشان نداد. جایگاه چندشکل و جایگزینی هم‌نام و غیرهم‌نام نیز در بین این توالی‌ها مشاهده نشد. تنوع هاپلوتایپی صفر بود و سه جمعیت مرال حفاظت‌شده مورد بررسی در این تحقیق، یک هاپلوتایپ را تشکیل دادند. با توجه به این نتیجه، می‌توان بیان نمود که علی‌رغم وجود فاصله جغرافیایی زیاد بین زیستگاه‌های این سه جمعیت (مناطق شمال و شمال غرب کشور)، کاهش شدید تنوع ژنتیکی در این جمعیت‌ها مشاهده می‌شود. اندازه کوچک این جمعیت‌ها می‌تواند ازجمله دلایل اصلی کاهش تنوع ژنتیکی باشد. ضریب Tajima's D مثبت و غیر معنی‌دار شد که با توجه به آن می‌توان این نتیجه را بیان نمود که جمعیت‌های مرال حفاظت‌شده ایران در معرض انتخاب شدید طبیعی قرار داشته‌اند. تفاوت ژنتیکی موجب می‌شود که جمعیت‌ها از یکدیگر متمایز شوند و این خود به لحاظ افزایش تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها، می‌تواند در حفظ و بقای گونه‌های مختلف مؤثر باشد (Frankham et al. 2002). اما زمانی‌که اختلاف ژنتیکی بین جمعیت‌های مختلف از یک گونه کاهش می‌یابد، مسئله به‌صورت بحرانی در جهت در معرض انقراض قرار گرفتن این‌گونه، خود را نشان می‌دهد (Geist 1999).

توالی ژن سیتوکروم b گوزن مرال ایرانی با توالی این ژن در گوزن قرمز به روش clustalW هم‌تراز شدند. تعداد ۲۲ جایگاه چندشکل مشاهده شد که صرفاً یکی از جایگاه‌ها (جایگاه ۷۰۵) دارای جایگزینی غیرهمنام بود و باقی، جایگزینی هم‌نام داشتند. برای تعیین تأثیر این جایگزینی بر روی توالی پروتئین تولید شده توسط ژن سیتوکروم b، توالی پروتئین حاصل از ژن سیتوکروم b در گوزن بومی ایران و گوزن قرمز مقایسه شد. این توالی در چهار جایگاه چندشکل بود که در تمام جایگاه‌ها اسیدآمینه تیروزین در گوزن قرمز با اسیدآمینه ایزولوسین در مرال بومی ایران جایگزین شده بود و این امر تفاوت عملکردی در پروتئین حاصل از ژن سیتوکروم b بین این دو گروه ایجاد نکرد. متوسط تنوع نوکلئوتیدی (K) برابر دو و مقدار تنوع نوکلئوتیدی (π) ۰/۰۰۱۷۵ برآورد شد. توالی‌ها شامل سه هاپلوتایپ بودند که تنوع هاپلوتایپی Hd=۰/۱۷۷۵ به‌دست آمد. شاخص D، منفی و معنی‌دار به‌دست آمد. مقدار متوسط فاصله ژنتیکی بین توالی‌های مرال و گوزن قرمز ۰/۰۰۲ برآورد شد و نسبت جایگزینی هم نام/ غیرهمنام R=۰/۰٤۷ بود.

با توجه به شباهت بالای توالی سیتوکروم b گوزن مرال بومی ایران و گوزن مرال ترکیه، این دو توالی مقایسه شده و نتایج هم‌ترازی نشان داد که تعداد هفت جایگاه چندشکل وجود داشت که همگی دارای جایگزینی غیرهم‌نام بوده و درنتیجه تنوع پایینی دارند. با توجه به اینکه جایگزینی غیرهمنام مشاهده نشد و هم‌چنین تنوع نوکلئوتیدی در توالی‌های موردبررسی پایین بود، این امر نشان می‌دهد که گوزن مرال بومی ایران در طی دوره زمانی اخیر از گوزن مرال ترکیه جدا شده‌است. وجود فاصله جغرافیایی و موانع طبیعی می‌تواند از دلایل احتمالی این امر باشد. مقدار تنوع نوکلئوتیدی ۰/۰۰۳ و فاصله ژنتیکی این دو جمعیت ۰/۰۰۲ ± ۰/۰۰۲ برآورد شد. تعداد جایگاه‌های تفکیک ۱٦ و تعداد ۱۰ جایگاه PI بود. مقدار ضریب Tajima'D برابر با ۱/۵۵ برآورد شد و غیر معنی‌دار بود. این رقم نشان‌دهنده بروز جهش ژنتیکی بین مرال ایرانی و مرال ترکیه می‌باشد که تائید کننده مطلب ذکرشده در مورد فاصله جغرافیایی بین این دو گروه گوزن است. توالی پروتئینی این دو گروه، دارای ۵ جایگاه چندشکل بود که این جایگاه‌ها اختلاف معنی‌داری را در توالی پروتئین حاصل، ایجاد نکرده‌اند.

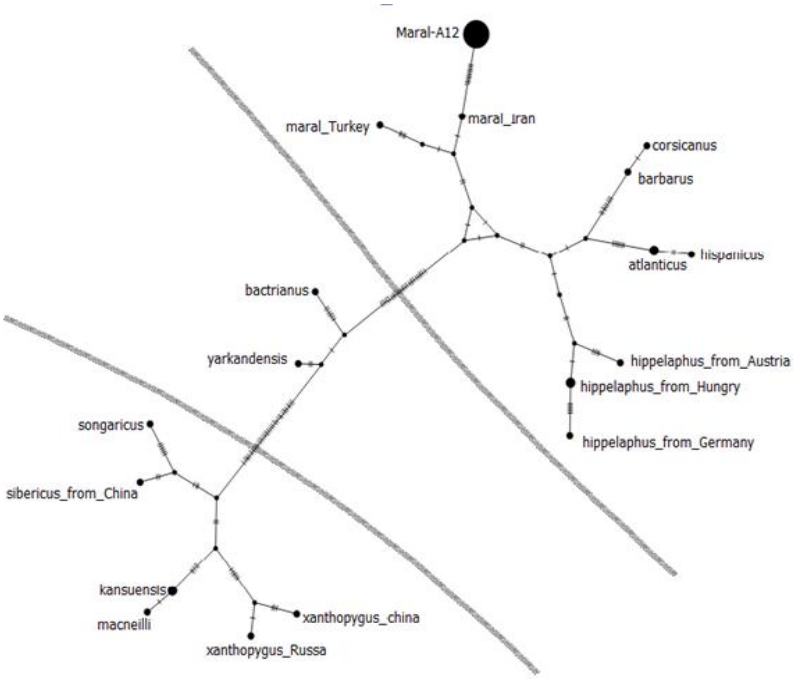
به‌منظور بررسی جایگاه مرال بومی ایران در بین گوزن‌های زیرگونه گوزن قرمز، تعداد ۲۱ توالی کامل ژن سیتوکروم b از بانک ژن (NCBI) (جدول ۳) استخراج‌شد و پس از هم‌ترازی با توالی مرال بومی ایران، پارامترهای ژنتیکی محاسبه شدند. مقدار تنوع نوکلئوتیدی در بین تمامی ٤٦ توالی موردبررسی، ۰/۰۳۵۱۷ و تعداد ۱۳۵ جایگاه چندشکل بود که از این تعداد، ۹۵ جایگاه PI بودند. مقدار شاخص Tajima'D برابر ۰/۳۲۲ و غیر معنی‌دار به‌دست آمد. این رقم نشان‌دهنده بروز جهش طبیعی در بین جمعیت‌های مختلف گوزن قرمز موردبررسی و درنتیجه افزایش تنوع ژنتیکی است. در بررسی جایگاه‌های چندشکل، مشاهده شد که ۹٤ درصد از این جایگاه‌ها دارای جایگزینی هم نام بودند و نسبت جایگزینی هم نام/ غیرهمنام R=۱۳/۵٦۳ برآورد شد. مقدار فاصله ژنتیکی ۰/۰۰٤± ۰/۰۳۷ به‌دست آمد. در بین توالی‌های موردبررسی، تعداد ۲۳ هاپلوتیپ مشاهده شد که دارای تنوع

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-30]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.4.4]

Hd=۰/۹۹۳۳ بودند. محققین متعددی کم بودن مقدار تنوع ژنتیکی در بین جمعیت‌های مختلف گوزن قرمز را در مناطق مختلف اروپایی و آسیایی گزارش نموده‌اند. Zachos et al. (2003) در بررسی جمعیت‌های گوزن قرمز بومی ایتالیا (*Cervus elaphus cursicanus*)، Zachos and Hartl (2011) در بررسی فیلوژنتیکی گوزن قرمز اروپایی به کمک جمعیت‌های مختلف گوزن قرمز در اروپا و Ludt et al. (2004) در مطالعه رابطه فیلوژنتیکی جمعیت‌های مختلف خانواده سروینه، به پایین بودن مقدار تنوع ژنتیکی در این جمعیت‌ها اشاره‌کرده‌اند.

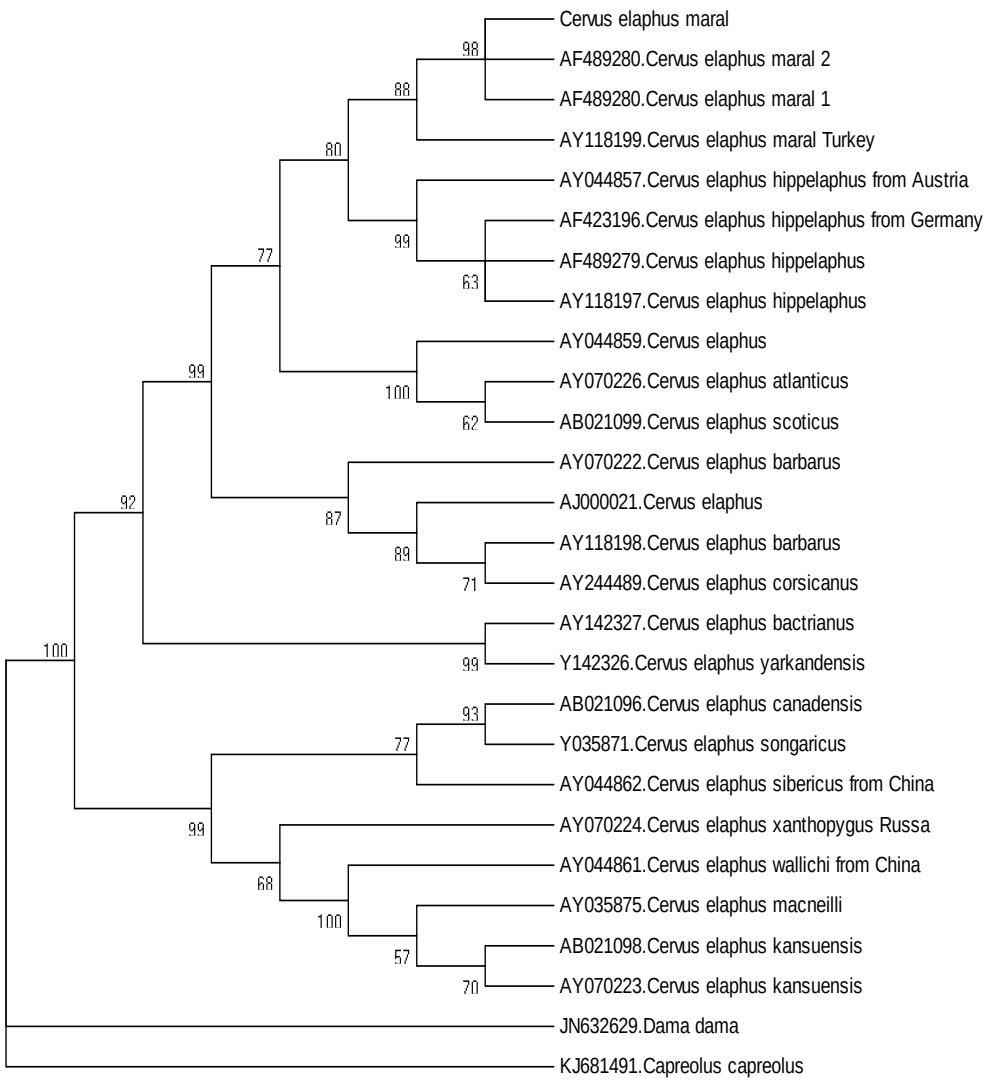
شبکه هاپلوتایپی بین جمعیت‌های مختلف گوزن قرمز ترسیم شد (شکل ۲) و نتایج نشان داد که جمعیت‌های مختلف مورد بررسی را می‌توان به سه گروه عمده گوزن‌های قرمز اروپایی، گوزن‌های قرمز آسیایی و گوزن‌های قرمز شمال آفریقا-آمریکا (به‌نام Tarim) تفکیک نمود. برخی از مطالعات پیشنهاد نموده‌اند که گوزن‌های قرمز دارای تعداد زیادی زیرگونه بوده و در این میان مرال خود شامل زیرگونه‌های مرال یارکندی[1]، مرال بختیاری[2]، مرال والاچین تبتی[3] و مرال کانسنسوس[4] می‌باشد. هم‌چنین در این مطالعه مرال در گروه گوزن‌های منطقه آسیایی طبقه‌بندی شده است (Giest 1999). این در حالی است که نتایج حاصل از تحقیق حاضر، با نتایج دیگر محققین در مورد تقسیم‌بندی گوزن‌های قرمز به سه گروه اصلی آسیایی، اروپایی و آفریقایی-آمریکایی مطابقت داشت (Skog et al. 2009; Ludt et al. 2004; Zachos et al. 2003; Randi, 1998) و مرال بومی ایران در گروه اروپایی قرارگرفته و بیشترین شباهت را با مرال ترکیه نشان داد. Ludt et al. (2005) نیز مرال ایران و مرال ترکیه را در یک هاپلوتایپ (*Cervus elaphus maral*) تقسیم‌بندی نمودند و نتایج مشابهی را به‌دست آوردند. البته این نتیجه با نتایج گزارش‌شده توسط Geist (1999) مغایر بود به‌طوری‌که مرال بومی ایران در گروه گوزن‌های قرمز اروپایی طبقه‌بندی‌شده و گوزن‌هایی که به‌عنوان زیرگونه‌های مرال ایرانی معرفی شده‌اند در گروه گوزن‌های آسیایی و Tarim قرار گرفتند.

[1] *Cervus elaphus yarkandensis*
[2] *Cervus elaphus bacterianus*
[3] *Cervus elaphus vallichi*
[4] *Cervus elaphus consensus*



شکل ۲- نتایج بررسی Median-joinin network توالی سیتوکروم زیرگونه‌های مختلف گوزن قرمز جدول ۳. موقعیت جغرافیایی هرکدام از نمونه‌ها در جدول ذکرشده است. خطوط جداکننده نشان‌دهنده تعداد جهش‌های تأثیرگذار بر جمعیت‌هاست که عامل تفکیک و تنوع ژنتیکی بین این جمعیت‌ها شده‌است. (Maral-A12 نتایج تحقیق حاضر می‌باشد)

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-30]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.4.4]



شکل۳- درخت فیلوژنی رابطه گوزن مرال ایرانی و گوزن‌های قرمز دنیا

برای بررسی رابطه فیلوژنتیکی بین توالی‌های سیتوکروم b گوزن‌های قرمز دنیا و گوزن‌های مرال بومی ایران، از روش حداکثر درست‌نمایی با مدل HKY+G و Bootstrap برابر با ۱۰۰۰ استفاده شد (شکل ۳). در این شکل مشاهده می‌شود که گوزن‌های مرال ایرانی در کلاستر گوزن‌های مرال ایران و ترکیه گزارش‌شده توسط (Ludt et al. 2005) به‌ترتیب با Bootstrap برابر با ۹۸ و ۸۸ قرار می‌گیرند و دارای منشأ مشترک با گوزن‌های قرمز اروپایی هستند. این نتیجه تائیدکننده نتیجه مشاهده شده در شبکه هاپلوتایپی است.

نتیجه‌گیری کلی

به‌نظر می‌رسد که وجود تنوع ژنتیکی در توالی ژن سیتوکروم b در جنس سروینه برای تفسیر روابط فیلوژنتیکی بین جمعیت‌های مختلف و حتی بررسی فیلوجغرافیایی این جمعیت‌ها مفید باشد. نتایج تحقیق حاضر بر مبنای توالی کامل ژن سیتوکروم b نشان داد که بین جمعیت مرال بومی ایران مناطق حفاظت‌شده آینالو، قرق و گیلان، تنوع ژنتیکی وجود نداشته و این جمعیت‌ها یک هاپلوتایپ را تشکیل می‌دهند. این مطلب بیانگر کاهش تنوع ژنتیکی گوزن مرال ایرانی حفاظت‌شده بر مبنای توالی ژن سیتوکروم b در این مناطق است. مرال ایرانی بر مبنای تجزیه و تحلیل توالی کامل ژن سیتوکروم b در طبقه‌بندی گوزن‌های قرمز دنیا در گروه گوزن‌های اروپایی قرارگرفته و بیش‌ترین شباهت را با مرال ترکیه نشان داد. این مطالعه کمک می‌کند تا با شناخت جمعیت‌های گونه مرال حفاظت‌شده، بتوان از آن‌ها به‌عنوان پشتیبان مناسب برای جلوگیری از نابودی گونه و کاهش تنوع

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-30]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.4.4]

زیستی استفاده کرد. برای این منظور در درجه اول می‌توان مدیریت حفاظت برای حفظ این گونه را از طریق برقراری جریان ژن بین جمعیت‌های مختلف اعمال نمود و در مرحله بعد با افزایش اندازه موثر این جمعیت‌ها، موجب افزایش تعداد و کاهش خطر انقراض این گونه شد. توصیه می‌شود که برای بررسی‌های بیش‌تر، تنوع ژنتیکی بین این جمعیت‌ها با کمک نشانگرهای ریز ماهواره نیز مورد آزمون قرار گیرد تا بتوان با در دسترس داشتن اطلاعات بیشتر، تصمیمات مدیریتی دقیق‌تر و اقدامات مناسب‌تری در جهت حفاظت گوزن مرال ایرانی اتخاد نمود.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی و آزمایشگاهی دانشگاه تربیت مدرس صورت گرفت. نویسندگان از سازمان حفاظت محیط‌زیست ایران، موزه حیات‌وحش و بانک ژن این سازمان، اداره‌های کل حفاظت محیط‌زیست استان‌های آذربایجان شرقی، گرگان و گیلان بابت همکاری در تهیه نمونه‌های سرگین تشکر می‌نمایند.

منابع

Askari N, Abadi MRM and Baghizadeh A, 2011. ISSR markers for assessing DNA polymorphism and genetic characterization of cattle, goat and sheep populations. Iranian Journal of Biotechnology 9: 222-229.

Bandelt H, Forster P, Rohl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology and Evolution 16:37-48.

Cullingham CI, Merrill EH, Pybus MJ, Bollinger TK, Wilson GA, Coltman DW (2011) Broad and fine-scale genetic analysis of white-tailed deer populations: estimating the relative risk of chronic wasting disease spread. Blackwell Publishing Ltd 4:116-131

Cook CE, Wang Y, Sensabaugh G (1999) A mitochondrial control region and cytochrome b phylogeny of Sika deer (Cervus nippon) and report of tandem repeats in the control region. Molecular Phylogenetic and Evolution 12:47-56.

Frankham R, Balbu JD, Brisco DA (2002) Introduction to conservation genetics. First Edition. Cambridge University Press.

Frantz AC, Pourtois JT, Heuertz M, Schley L, Flamand MC, Krier A, Bertouille S, Chaumont F, Burke T (2006) Genetic structure and assignment tests demonstrate illegal translocation of red deer (Cervus elaphus) into a continuous population. Molecular Ecology 15:3191-3203.

Geist V (1999) Deer of the World: Their Evolution, Behavior and Ecology. Swan Hill Press, UK.

Guha S, Goyal SP, Kashyap VK (2007) Molecular phylogeny of musk deer: A genomic view with mitochondrial 16S rRNA and cytochrome b gene. Molecular Phylogenetic and Evolution 42:585-577.

Kiabi BH, Ghaemi RA, Jahanshahi M, Sassani A (2004) Population status, biology and ecology of the Maral, Cervus elaphus maral, in Golestan National Park, Iran. Zoology in the Middle East 33:125-138.

Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution16:111-120.

Kuhen MW, Wayne RK (1997) Facts from feces revisited. Trends in Ecology and Evolution. 12:223-227.

Ludt CJ, Schroeder W, Rottmann O, Kuehn R (2004) Mitochondrial DNA phylogeography of red deer (Cervus elaphus). Molecular Phylogenetics and Evolution 31:1064-1083.

Markov GG, Kuznetsova MV, Danilkin AA, Kholodova MV, Sugár L, Heltai M (2015) Genetic Diversity of the Red Deer (Cervus elaphus L.) in Hungary Revealed by Cytochrome b Gene. Acta Zoologica Bulgarica 67:11-17.

Niedziałkowska M. Jedrzejewska B, Honnen AC, Otto T, Sidorovich VE, Perzanowski K, Skog A, Hartl GB, Borowik T, Bunevich AN, Lang J, Zachos FE (2011) Molecular biogeography of red deer Cervus elaphus from Eastern Europe: insights from mitochondrial DNA sequences. Acta Theriologica 56:1-12.

Pérez-Espona S, Pérez-Barbería FJ, Mcleod JE, Jiggins CD, Gordon IJ, Pemberton JA (2008) Landscape features affect gene flow of Scottish Highland red deer (Cervus elaphus). Molecular Ecology 17:981-996.

Skog A, Zachos FE, Rueness EK, Feulner PGD, Mysterud A, Langvatn R, Lorenzini R, Hmwe SS, Lehoczky I, Hartl GB, Stenseth NC, Jakobsen KS (2009) Phylogeography of red deer (Cervus elaphus) in Europe. Journal of Biogeography 36:66- 77.

Randi E, Mucci N, Pierpaoli M, Douzery E (1998) New phylogenetic perspectives on the Cervidae (Artiodactyla) are provided by the mitochondrial cytochrome b gene. Proceeding of Royal Society London Britain 265:793-801.

Shojaei M, Mohammad Abadi M.R, Asadi Fozi M, Dayani O, Khezri A, and Akhondi M, 2010. Association of growth trait and Leptin gene polymorphism in Kermani sheep. Journal of Cell and Molecular Research 2: 67-73.

Sunnucks P (2000) Efficient genetic markers for population biology. Trends in Ecology and Evolution 15:199-203.

Tajima f (1999) Statistical methods for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics. 123:585-595.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-30]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.4.4]

Zachos FE, Hartl GB (2011) Phylogeography, population genetics and conservation of the European red deer Cervus elaphus. Mammal Review 41:138-150.
Zachos FE, Althoff C, Steynitz YV, Eckert I, Hartl GB (2007) Genetic analysis of an isolated red deer (Cervus elaphus) population showing signs of inbreeding depression. European Journal of Wildlife Research 53:61-67.
Zachos FE, Hartl GB, Apollonio M, Reutershan T (2003) On the phylogeography c origin of the Corsican red deer (Cervus elaphus cursicanus): Evidence from microsatellite and mitochondrial DNA. Mammalian Biology 68:284-298.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-30]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.4.4]