دانشکده‌ی کشاورزی و منابع طبیعی

گروه آموزشی علوم دامی

پایان‌نامه برای دریافت درجه‌ی کارشناسی ارشد

در رشته‌ی علوم دامی گرایش ژنتیک و اصلاح نژاد دام

عنوان:

ارزیابی ژنتیکی ساختار جمعیت‌های مارال با استفاده از ژنوم میتوکندریایی

استاد راهنما:

دکتر سعید نیک بین

اساتید مشاور:

دکتر فرزاد میرزایی آقجه قشلاق

دکتر نعمت هدایت ایوریق

پژوهشگر:

لیلا آقازاده

تابستان ۹۶

نام خانوادگی دانشجو: **آقازاده** نام: **لیلا**

عنوان پایان‌نامه: **ارزیابی ژنتیکی ساختار جمعیت‌های مارال با استفاده از ژنوم میتوکندریایی**

استاد راهنما: **دکتر سعید نیک بین**

اساتید مشاور: **دکتر فرزاد میرزایی آقجه قشلاق- دکتر نعمت هدایت ایوریق**

مقطع تحصیلی: **کارشناسی ارشد** رشته: **علوم دامی**

گرایش: **ژنتیک و اصلاح نژاد دام** دانشگاه: **محقق اردبیلی**

دانشکده:**کشاورزی و منابع طبیعی** تاریخ دفاع: **۹۶/۰۶/۲۶** تعداد صفحات: **۱۲۰**

چکیده:

نژادها و زیر جمعیت‌های مختلف هر گونه، که حاصل فرآیندهای جهش، رانش ژنتیکی، انتخاب طبیعی و اثرات متقابل ژنتیک و محیط است، سرمایه‌ای گرانبها بوده که از زمان‌های کهن به نسل کنونی به ارث رسیده است و حفظ آن از ارزش و اهمیت زیادی برخوردار است. آنالیز ژنتیکی مارال برای حفظ تنوع زیستی و افزایش دانش در مورد بقای این گونه و یافتن عوامل تهدید کننده و یا کمک کننده در حفظ جمعیت مهم و ضروری می‌باشد. لذا مطالعه حاضر برای شناسایی توده ژنتیکی موجود، بررسی چگونگی روابط، شکل‌گیری و تنوع ژنتیکی مارال‌های ایرانی با بهره‌گیری از اطلاعات توالی نواحی سیتوکروم b و D-Loop از ناحیه ژوم میتوکندریایی انجام می‌شود.

جهت انجام پژوهش حاضر نمونه های خون، مو یا بافت تعداد ۷۸ رأس مارال آنالیزگردید. نمونه‌های خون از سیاهرگ گردنی مارال گرفته شد. خون‌ها در داخل شیشه‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA ریخته شده و پس از انتقال به آزمایشگاه تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه نگهداری شد. استخراج DNA از نمونه های خون به وسیله یک کیت تجارتی و از نمونه های بافت و مو با روش دستی صورت گرفت. آغازگرهای اختصاصی برای نواحی سیتوکروم b و D-Loop برای تکثیر قطعات مزبور با روش PCR استفاده شد. قطعات تکثیر شده بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند. تمامی محصولات PCR به‌دست آمده توالی‌یابی گردید. سپس توالی‌های مورد نظر با استفاده از نرم افزارهای BIOEDIT جهت بررسی تنوع نوکلئوتیدی هم‌تراز شد، با استفاده از نرم افزار Mega ، درخت فیلوژنتیکی رسم گردید، با استفاده از نرم افزار PopGene آنالیز داده‌های ژنتیک جمعیت انجام شد و با استفاده از نرم افزارDnaSP آنالیز پلی‌مورفیسم در توالی DNA انجام گردید. و در نهایت با استفاده از نرم افزار NETWORK آنالیز شبکه‌ای جهت مشخص کردن گروه‌های هاپلوتیپ انجام گرفت. نتایج حاصل از آنالیز توالی مارال منجر به شناسایی جهش‌هایی گردید که به ایجاد ۵ هاپلوتیپ برای ناحیه D-Loop و ۱۹ هاپلوتیپ برای ناحیه سیتوکروم b منتهی شد و به ترتیب تنوع هاپلوتیپی، تنوع نوکلئوتیدی و متوسط تفاوت نوکلئوتیدی برای ناحیه D-Loop به ترتیب ۰/۲۱۸ ، ۰/۰۰۰۷ و ۰/۴۹۱ و برای ناحیه سیتوکروم b به ترتیب ۰/۹۹۵، ۰/۰۱۶۷ و ۱۵/۹ به‌دست آمده است. تاجماD برای ناحیه D-Loop و سیتوکروم b به ترتیب ۱/۵۶۴- و ۱/۲۰۵- است که بیان‌گر وجود همخونی در جمعیت‌ها می‌باشد. شاخص‌های تنوع ژنتیکی نشان می‌دهد که شش جمعیت مارال احتمالا تجربه باتل نک را پشت سر گذاشته است. بنابراین و در پرتو نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل گروه‌های تو در تو از این هاپلوتیپ‌ها ، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که نوسانات اخیر در اندازه جمعیت و وقفه در جریان ژن به دلیل انتقال گوزن‌های قرمز یک جمعیت به سایر زیستگاه‌ها در گذشته باشد.

کلید واژه‌ها: mtDNA; سیتوکروم b، D-Loop، فیلوژنی، تنوع زیستی، مارال

فهرست مطالب

شماره و عنوان مطالب **صفحه**

فصل اول: کلیات پژوهش

۱-۱- مقدمه ۲

فصل دوم: مبانی نظری پژوهش

۲-۱- مطالعه مارال ۷
۲-۲- اهمیت پرورش مارال ۹
۲-۳- تاریخچه مارال ۱۰
۲-۴- رده‌بندی جانوری مارال ۱۱
۲-۵- جمعیت های مارال در ایران ۱۱
۲-۶- فرآورده‌های مارال ۱۲
۲-۶-۱- گوشت ۱۲
۲-۶-۲- پوست ۱۲
۲-۶-۳- شاخ ۱۲
۲-۷- معیت و پراکندگی مارال ۱۲
۲-۸- دشمن مارال ۱۳
۲-۹- مارال ایرانی ۱۳
۲-۱۰-تاریخچه مطالعه روی میتوکندری ۱۳
۲-۱۱-منشا میتوکندری در سلول‌های یوکاریوتی ۱۴
۲-۱۲- ساختمان میتوکندری ۱۶
۲-۱۳- نقش زیستی و فعالیت فیزیولوژیکی میتوکندری ۱۷
۲-۱۳-۱- فسفوریلاسیون اکسیداتیو (تنفس هوازی یا تنفس سلولی) ۱۷
۲-۱۳-۲- سنتز اسیدهای چرب و دخالت میتوکندری در گوارش چربی‌ها . Error! Bookmark not defined.
۲-۱۳-۳- سنتز پروتئین ..... Error! Bookmark not defined.

۲-۱۴- ساختار ژنوم میتوکندری ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۱۴-۱- ناحیه D-Loop ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۱۴-۲- نواحی HVR-I و HVR-II ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۱۴-۳- ناحیه Cytochrome b ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۱۵- ژنوم میتوکندریایی(mtDNA)،D-Loop و سیتوکروم b و نقش آن‌ها در روابط فیلوژنی..... Error! Bookmark not defined.
۲-۱۶- توارث میتوکندری ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۱۷- آستانه هتروپلاسمی ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۱۸- کاربردهای ژنوم میتوکندری ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۱۸-۱- تشخیص انساب ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۱۸-۲- تشخیص تقلب‌ها ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۱۸-۳- تشخیص اختصاصی گونه‌ها ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۱۸-۴- اختلالات و بیماری‌های میتوکندریایی ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۱۸-۵- بررسی تنوع ژنتیکی و فیلوژئوگرافیک ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۱۹- مزایای ژنوم میتوکندری در تشخیص گونه‌ها و رسم درخت فیلوژنی..... Error! Bookmark not defined.
۲-۲۰- فیلوژئوگرافی ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۲۱- فیلوژنی ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۲۱-۱- روش جفت گروهی غیر وزنی از طریق میانگین حسابی (UPGMA) ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۲۲- دندوگرام فاصله ژنتیکی ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۲۳- تعاریف و اصطلاحات ژنتیکی ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۲۳-۱- ساختار جمعیت(population structure) ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۲۳-۲- آلل‌های واقعی و موثر(Real and Effective Alleles) ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۲۳-۳- تنوع هتروزایگوسیتی یا تنوع ژنی(Gene or Heterozygosity Variation) ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۲۳-۴- تعادل هاردی- واینبرگ(Harady-Weinberg Equlibrium) ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۲۳-۵- فاصله ژنتیکی(Genetic Distance) ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۲۳-۶- روش‌های حفظ تنوع ژنتیکی ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۲۴- نشانگر ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۲۵- انواع نشانگرهای ژنتیکی ..... Error! Bookmark not defined.

۲-۲۶- تعیین سودمندی نشانگرها ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۲۷- اهمیت تنوع ژنتیکی ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۲۸- اهمیت نشانگرهای مولکولی در علوم دامی ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۲۹-کاربرد نشانگرهای مولکولی در فیلوژئوگرافی ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۳۰- روش‌های مختلف شناسایی تفاوت تک نوکلئوتیدی (SNP) ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۳۱- تعیین کمیت و کیفیت DNA ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۳۱-۱- سنجش کمیت و کیفیت DNA توسط الکتروفورز ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۳۱-۲- سنجش کمیت و کیفیت DNA به روش اسکپتروفتومتری ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۳۲- واکنش زنجیرهای پلیمراز (PCR) ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۳۲-۱- مراحل واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۳۲-۲- آغازگرها ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۳۳- DNA الگو ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۳۴- الکتروفورز ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۳۴-۱- آنالیز DNA در ژل آگارز ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۳۴-۲- آنالیز DNA در ژل پلی آکریل آمید ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۳۵- عواملی که باعث ایجاد باند غیراختصاصی می‌شود: ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۳۶- توالی‌یابی ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۳۷- انواع توالی‌یابی‌های نسل جدید ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۳۷-۱-توالی‌یابی کل ژنوم (WGS) ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۳۷-۲- توالی‌یابی اگزومی(WES) ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۳۸- توالی‌یابی DNA میتوکندریایی ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۳۹- شاخص‌های اندازه‌گیری تنوع درون جمعیتی ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۳۹-۱- هتروزیگوسیتی ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۳۹-۲- تنوع ژنی ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۴۰- آنالیز بیوانفورماتیک ژن‌ها ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۴۰-۱- تمایز ژنتیکی (Fst) ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۴۰-۲- آماره‌ی تاجماD ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۴۰-۳- شباهت و فاصله ژنتیکی(D_{xy}) ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۴۰-۴- تعداد آلل واقعی (Na) و موثر (Ne) ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۴۱- روش‌های آماری در مطالعهٔ تنوع درون جمعیتی ..... Error! Bookmark not defined.
۲-۴۱-۱- پلی‌مورفیسم ..... Error! Bookmark not defined.

۲-۴۲- مروری بر پژوهش‌های انجام شده در دنیا بر روی ناحیه سیتوکروم b..... Error! Bookmark not defined.
۲-۴۳- مروری بر پژوهش‌های انجام شده در دنیا بر روی ناحیه D-Loop. Error! Bookmark not defined.

فصل سوم: مواد و روش پژوهش

۳-۱- نحوه جمع‌آوری نمونه‌ها ..... Error! Bookmark not defined.
۳-۲- مواد و تجهیزات مورد نیاز برای استخراج DNA ..... Error! Bookmark not defined.
۳-۲-۱-بافر STM..... Error! Bookmark not defined.
۳-۲-۲- بافرTEN-pronase..... Error! Bookmark not defined.
۳-۳- استخراج DNA با استفاده از روش دستی(بیلز و همکاران، ۲۰۰۷) .. Error! Bookmark not defined.
۳-۴- استخراج DNA با استفاده از پروتکل کیت Exgene..... Error! Bookmark not defined.
۳-۵-تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده ..... Error! Bookmark not defined.
۳-۵-۱- نانودراپ ..... Error! Bookmark not defined.
۳-۵-۲- الکتروفورز بر روی ژل آگارز ..... Error! Bookmark not defined.
۳-۵-۳-بافر بار کننده (Loading buffer) ..... Error! Bookmark not defined.
۳-۵-۴-TBE (10X) ..... Error! Bookmark not defined.
۳-۵-۵- طرز تهیه ژل آگارز و الکتروفورز ..... Error! Bookmark not defined.
۳-۶-آغازگرها..... Error! Bookmark not defined.
۳-۷-رقیق کردن پرایمرها به منظور استفاده برای PCR ..... Error! Bookmark not defined.
۳-۸-تکثیر قطعه ۶۰۲ جفت بازی ناحیه D-Loop با استفاده از PCR ..... Error! Bookmark not defined.
۳-۹-تکثیر قطعه ۱۱۴۰ جفت بازی ناحیه سیتوکرومb با استفاده از PCR. Error! Bookmark not defined.
۳-۱۰-الکتروفورز محصولات PCR..... Error! Bookmark not defined.
۳-۱۰-۱-سیستم Gel Documentation..... Error! Bookmark not defined.
۳-۱۱- توالی‌یابی نمونه‌ها ..... Error! Bookmark not defined.
۳-۱۲- بررسی تکاملی نواحی D-Loop و سیتوکروم b مارال ایران با سایر گوزن‌های دنیا..... Error! Bookmark not defined.
۳-۱۲-۱- بررسی تکاملی ناحیه D-Loop مارال‌های ایران با سایر گوزن‌های دنیا..... Error! Bookmark not defined.
۳-۱۲-۲- بررسی تکاملی ناحیه سیتوکروم b مارالهای ایران با سایر گوزنهای دنیا.... Error! Bookmark not defined.
۳-۱۳- آنالیزهای آماری..... Error! Bookmark not defined.

فصل چهارم: نتایج و بحث

۴-۱- کیفیت DNA استخراج شده..... Error! Bookmark not defined.

۴-۲- نتایج الکتروفورز محصولات PCR ژن‌ها ..... Error! Bookmark not defined.

۴-۳- نتایج توالی‌یابی‌ها ..... Error! Bookmark not defined.

۴-۳-۱- نتایج توالی‌یابی‌ها ناحیه D-Loop ..... Error! Bookmark not defined.

۴-۳-۲- نتایج توالی‌یابی‌ها ناحیه سیتوکروم b..... Error! Bookmark not defined.

۴-۴- آنالیز بیوانفورماتیک ژن‌ها تمایز ژنتیکی (F_{st}) و فاصله ژنتیکی(D_{xy}) ..... Error! Bookmark not defined.

۴-۴-۱- آنالیز بیوانفورماتیک ناحیه D-Loop..... Error! Bookmark not defined.

۴-۴-۲- آنالیز بیوانفورماتیک ناحیه سیتوکروم b..... Error! Bookmark not defined.

۴-۵- فراوانی‌های ژنی و ژنوتیپی ..... Error! Bookmark not defined.

۴-۵-۱- فراوانی‌های ژنی و ژنوتیپی D-Loop ..... Error! Bookmark not defined.

۴-۵-۲- فراوانی‌های ژنی و ژنوتیپی سیتوکروم b..... Error! Bookmark not defined.

۴-۶- تنوع ژنی یا هتروزیگوسیتی (Heterozygosity) ..... Error! Bookmark not defined.

۴-۷- بررسی تکاملی نواحی D-Loop و سیتوکروم b مارال‌های ایران با سایر گوزن‌های دنیا..... Error! Bookmark not defined.

۴-۷-۱- بررسی تکاملی ناحیه D-Loop مارال‌های ایران با سایر گوزن‌های دنیا..... Error! Bookmark not defined.

۴-۷-۲- بررسی تکاملی ناحیه سیتوکروم b مارال‌های ایرانی با سایر گوزن‌های دنیا Error! Bookmark not defined.

فصل پنجم: نتیجه‌گیری و پیشنهادات

۵-۱- جمع‌بندی و نتیجه گیری کلی..... Error! Bookmark not defined.

۵-۲- پیشنهادات..... Error! Bookmark not defined.

فهرست منابع و مآخذ..... Error! Bookmark not defined.

فهرست جداول

شماره و عنوان جدول **صفحه**

جدول ۲-۱- آخرین وضعیت جمعیت مارال در زیستگاه های موجود..... ۹

جدول ۲-۲- طبقه‌بندی علمی گوزن..... ۱۱

جدول ۳-۱- نمونه‌های مارال به تفکیک ناحیه جغرافیایی..... Error! Bookmark not defined.

جدول ۳-۲- توالی نوکلئوتیدی آغازگر نواحی D-Loop و سیتوکروم b ..... Error! Bookmark not defined.

جدول ۳-۳- غلظت‌های مناسب شرایط PCR ناحیه D-Loop..... Error! Bookmark not defined.

جدول ۳-۴- دما و زمان چرخه‌های حرارتی PCR ناحیه D-Loop..... Error! Bookmark not defined.

جدول ۳-۵- غلظت‌های مناسب شرایط PCR ناحیه سیتوکروم b ..... Error! Bookmark not defined.

جدول ۳-۶- دما و زمان چرخه های حرارتی PCR ناحیه سیتوکروم b. Error! Bookmark not defined.

جدول ۳-۷- توالی‌های مربوط به ناحیه D-Loop استخراج شده از NCBI..... Error! Bookmark not defined.

جدول ۳-۸- توالی‌های مربوط به ناحیه سیتوکروم b استخراج شده از NCBI ... Error! Bookmark not defined.

جدول ۴-۱- فراوانی نوکلئوتیدی ناحیه D-Loop جمعیت‌های مارال ایرانی..... Error! Bookmark not defined.

جدول۴-۲- نرخ جانشینی نوکلئوتیدی ناحیه D-Loop جمعیت‌های مارال ایرانی Error! Bookmark not defined.

جدول ۴-۴- فاصله ژنتیکی جمعیت‌های مارال ایرانی ناحیه D-Loop.. Error! Bookmark not defined.

جدول۴-۳- تست تاجما D بر اساس ناحیه D-Loop جمعیت‌های مختلف مارال ایرانی Error! Bookmark not defined.

جدول ۴-۵- تمایز ژنتیکی جمعیت‌های مارال ایرانی ناحیه D-Loop... Error! Bookmark not defined.

جدول ۴-۶- فراوانی نوکلئوتیدی ناحیه سیتوکروم b جمعیت‌های مارال ایرانی.... Error! Bookmark not defined.

جدول۴-۷- نرخ جانشینی نوکلئوتیدی ناحیه سیتوکروم b جمعیت‌های مارال ایرانی . Error! Bookmark not defined.

جدول ۴-۸- تست تاجماD بر اساس ناحیه سیتوکروم b جمعیت‌های مختلف مارال ایرانی ..... Error! Bookmark not defined.
جدول ۴-۹- فاصله ژنتیکی جمعیت‌های مارال ایرانی ناحیه سیتوکروم b..... Error! Bookmark not defined.
جدول ۴-۱۰- تمایز ژنتیکی جمعیت‌های مارال ایرانی ناحیه سیتوکروم b ..... Error! Bookmark not defined.
جدول ۴-۱۱- فراوانی ژنوتیپی و فراوانی آللی مشاهده شده برای ناحیه D-Loop Error! Bookmark not defined.
جدول ۴-۱۲- فراوانی ژنوتیپی و فراوانی آللی مشاهده شده برای ناحیه سیتوکروم b . Error! Bookmark not defined.
جدول ۴-۱۳- فراوانی نوکلئوتیدی ناحیه D-Loop گوزن‌های دنیا ..... Error! Bookmark not defined.
جدول ۴-۱۴- نرخ جانشینی نوکلئوتیدی ناحیه D-Loop گوزن‌های دنیا..... Error! Bookmark not defined.
جدول ۴-۱۵- جدول فراوانی نوکلئوتیدی ناحیه سیتوکروم b گوزن‌های دنیا ..... Error! Bookmark not defined.
جدول ۴-۱۶- نرخ جانشینی نوکلئوتیدی سیتوکروم b گوزن‌های دنیا... Error! Bookmark not defined.

فهرست شکل‌ها

شماره و عنوان شکل **صفحه**

شکل ۲-۱- نقشه پراکنش مارال در ایران(تهیه شده توسط نگارنده با استفاده از Google Earth)..... ۱۰
شکل۲-۲- ورود DNA سلول‌های پروکاریوتی به سلول‌های یوکاریوتی ۱۶
شکل۲-۳- دیاگرام سه بعدی از یک میتوکندری در برش طولی ۱۷
شکل ۲-۴- نقش میتوکندری در فسفوریلاسیون اکسیداتیو..... Error! Bookmark not defined.
شکل۲-۵- نقش میتوکندری در تولید پروتئین..... Error! Bookmark not defined.
شکل۲-۶- ژنوم میتوکندری، جایگاه ژن‌ها، ناحیه Cytochrome b و ناحیه D-Loop..... Error! Bookmark not defined.
شکل ۲-۷- نواحی HVR-I و HVR-II..... Error! Bookmark not defined.
شکل۲-۸- ناحیه Cytochrome b..... Error! Bookmark not defined.
شکل۲-۹- شجره توارث مادری DNA میتوکندری ..... Error! Bookmark not defined.

شکل۲-۱۰- میتوکندری‌های اسپرم و تخمک و نحوه توارث مادری ..... Error! Bookmark not defined.
شکل۲-۱۱- هتروپلاسمی در سلول‌های مختلف ..... Error! Bookmark not defined.
شکل ۲-۱۲- تصویر شماتیک یک درخت فیلوژنی ساده ..... Error! Bookmark not defined.
شکل ۲-۱۳- طبقه بندی نشانگرهای ژنتیکی ..... Error! Bookmark not defined.
شکل ۲-۱۴- مراحل واکنش زنجیرهای پلیمراز ..... Error! Bookmark not defined.
شکل ۳-۱- بی‌هوش نمودن با استفاده از تفنگ بی‌هوشی..... Error! Bookmark not defined.
شکل ۳-۲- خون‌گیری پس از بی‌هوشی مارال ها ..... Error! Bookmark not defined.
شکل ۳-۳- تصویر ژل الکتروفورز برای تعیین کیفیت DNA..... Error! Bookmark not defined.
شکل۳-۴- محصول PCR ناحیه D-Loop ..... Error! Bookmark not defined.
شکل۳-۵- محصول PCR ناحیه سیتوکروم b..... Error! Bookmark not defined.
شکل۴-۱- الکتروفورز DNA استخراج شده برروی ژل آگارز ۰/۸ درصد..... Error! Bookmark not defined.
شکل ۴-۲- الکتروفورز نتایج تکثیر ناحیه D-Loop در دمای ۶۴ درجه سانتیگراد با مارکر 100bp Error! Bookmark not defined.
شکل ۴-۳- الکتروفورز نتایج تکثیر ناحیه سیتوکروم b در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد با مارکر 100bp ..... Error! Bookmark not defined.
شکل۴-۴- جهش نقطه‌ای در ناحیه D-Loop در موقعیت ۵۸..... Error! Bookmark not defined.
شکل۴-۵- جهش نقطه‌ای در ناحیه D-Loop در موقعیت ۱۸۲..... Error! Bookmark not defined.
شکل۴-۶- جهش نقطه‌ای در ناحیه D-Loop در موقعیت ۲۰۴ ..... Error! Bookmark not defined.
شکل ۴-۷- جهش نقطه‌ای در ناحیه D-Loop در موقعیت ۲۱۴ ..... Error! Bookmark not defined.
شکل ۴-۸- جهش جایگزینی در ناحیه D-Loop در موقعیت ۳۳۴ ..... Error! Bookmark not defined.
شکل۴-۹- جهش نقطه‌ای در ناحیه سیتوکروم b در ۲۱ جایگاه در موقعیت‌های ۵۳، ۷۷، ۱۰۴، ۱۱۶، ۱۲۸، ۱۶۷، ۲۳۰، ۲۵۸، ۳۰۸، ۳۶۳، ۳۷۰، ۳۸۰، ۴۲۴، ۵۲۴، ۶۱۷، ۶۳۶، ۶۴۷، ۶۸۰، ۶۹۵ و ۸۳۰..... Error! Bookmark not defined.
شکل ۴-۱۰- درخت فیلوژنتیکی بر اساس ناحیه D-Loop جمعیت‌های مختلف مارال ایرانی..... Error! Bookmark not defined.
شکل ۴-۱۱- دندروگرام فاصله ژنتیکی نمونه‌های جمع آوری شده مارال کلیه جمعیت‌های ایرانی ناحیه D-Loop. جمعیت ارسباران= pop 1، جمعیت زیاران= pop 2، جمعیت قرق= pop 3، جمعیت فندقلو= pop 4، جمعیت سمسکنده= pop 5 و جمعیت نوشهر- نور= pop 6. ..... Error! Bookmark not defined.
شکل ۴-۱۲- درخت فیلوژنتیکی بر اساس ناحیه سیتوکروم b جمعیت‌های مارال ایرانی ..... Error! Bookmark not defined.
شکل ۴-۱۳- دندروگرام فاصله ژنتیکی نمونه‌های جمع آوری شده مارال جمعیت‌های ایرانی برای ناحیه سیتوکروم b. جمعیت ارسباران= pop 1، جمعیت زیاران= pop 2 و جمعیت قرق= pop 3. ..... Error! Bookmark not defined.
شکل۴-۱۴- درخت فیلوژنی ناحیه D-Loop گوزن‌های دنیا..... Error! Bookmark not defined.
شکل ۴-۱۵- آنالیز شبکه‌ای هاپلوتیپی گونه‌های مختلف گوزن با استفاده از ناحیه D-Loop..... Error! Bookmark not defined.
شکل۴-۱۶- درخت فیلوژنی ناحیه سیتوکروم b گوزنهای دنیا ..... Error! Bookmark not defined.

شکل ۴-۱۷- آنالیز شبکه‌ای هاپلوتیپی گونه های مختلف گوزن با استفاده از ناحیه سیتوکروم b ..... Error! Bookmark not defined.

فهرست علائم اختصاری

علامت اختصاری	مفهوم یا توضیح
IUCN	International Union for Conservation of Nature
NCA	National Communication Association
NCPA	Nested Clade Phylogeographic Analysis
SSR	Short simple Repeat
ISSR	Inter – Simple Sequence Repeat

Single Strand Confotmation Polymorphism	SSCP
Random Amplified Polymorphic DNA	RAPD
DNA Amplification Fingerprinting	DAF
Sequence Characterized Amplified Region	SCAR
Restriction Fragment Length Polymorphism	RFLP
Restriction Landmarh Genomic Scaning	RLGS
Variable Namber of Tundem Repeat	VNTR
Amplicon Length Polymorphism	ALP
PCR Based RFLP	PBR
Amplified Fragment Length Polymrphism	AFLP
Next Generation Sequencing	NGS
Massive Parallel Sequencing	MPS
Whole Genome Sequencing	WGS
Genome-Wide Association	GWAS
Whole Exome Sequencing	WES
Single Nucleotide Polymorphism	SNP
Single Strand Conformation Polymorphosm	SSCP
Mitochondrial DNA	mtDNA
Polymerase Chain Reaction	PCR

فصل اول:

کلیات پژوهش

۱-۱- مقدمه

نژادهای مختلف هر گونه حاصل فرآیندهای جهش، رانش ژنتیکی، انتخاب طبیعی و اثرات متقابل ژنتیک و محیط است که در طی قرون و اعصار اتفاق افتاده است. بنابراین تنوع ژنتیکی آن‌ها سرمایه‌ای گرانبها بوده که از زمان‌های کهن به نسل کنونی به ارث رسیده است. به همین دلیل حیوانات و گیاهان بومی به عنوان سرمایه های بومی و ذخایر استراتژیک هر کشور محسوب شده و حفظ و تکثیر آن‌ها از ارزش و اهمیت زیادی برخوردار است. این موجودات پس از هزاران سال انتخاب طبیعی و با غلبه بر تمامی شرایط نامساعد محیطی همچنان به حیات خود ادامه داده و به تکثیر و ازدیاد نسل پرداخته‌اند. بنابراین به عنوان بانک ژن‌های سازگار با محیط بومی، مواد ژنتیکی پایه برای برنامه‌های اصلاح نژادی در زیستگاه خویش محسوب می‌شوند (علیجانی، ۱۳۸۸).

وجود تنوع، لازمه انجام برنامه اصلاح نژادی و بهره‌گیری از توان تولیدی حیوانات و گیاهان در هر منطقه است (قلیزاده و همکاران، ۲۰۰۸). لذا حفظ تنوع ژنتیکی گونه‌ها در دستور کار موسسات اصلاح نژادی هر منطقه قرار دارد. بنابراین پیشرفت در آنالیز ژنتیک مارال برای داشتن امنیت غذایی، حفظ تنوع زیستی و افزایش دانش در مورد اهلی کردن حیوانات از بعد جهانی مهم و ضروری می‌باشد. شواهد نشان می دهد که جمعیت مارال‌های ایرانی در حال کاهش است و ممکن است در آینده در خطر حذف و از بین رفتن قرار گیرد.

طبق قانون حفاظت از حیات وحش ایران این زیر گونه جزو حیوانات حفاظت شده محسوب می‌گردد و توسط اتحادیه بین‌المللی حفاظت از منابع طبیعی (IUCN)[1]، به عنوان گونه‌ی در خطر انقراض معرفی شده است . از این بابت شناسایی دقیق این گونه در جهت حفاظت از آن بسیار حائز اهمیت است. روش‌های مولکولی مانند توالی‌یابی ژنوم میتوکندری یکی از کاربردی‌ترین روش‌ها برای تعیین رابطه فیلوژنتیکی بین جمعیت‌ها و گونه‌های نزدیک به هم محسوب می شود (برفورد و همکاران، ۲۰۰۳).

در طی دهه‌های گذشته، چهره اصلاح دام تا حد زیادی تغییر یافته است. امروزه در اصلاح دام از دانش و فن‌آوری بیشتری استفاده می‌شود. اعمال روش‌های متداول اصلاحی برمبنای اطلاعات فنوتیپی، پیشرفت‌های بزرگی را در اصلاح ژنتیکی گونه‌های بومی نقاط مختلف جهان سبب شده و واریته‌ها، لاین‌ها

1-International Union for Conservation of Nature

و نژادهای پرتولید امروزی را ایجاد کرده است. با ورود فن آوری‌های زیستی، پیشرفت‌های عمده دیگری نیز به وجود آمده است. در سال‌های اخیر علاوه بر فن‌آوری‌های تولیدمثلی، پیشرفت‌های تحسین برانگیزی در زمینه زیست شناسی سلولی و مولکولی و تکنولوژی زیستی حاصل شده که ابزار قدرتمندی را برای مطالعات ژنتیکی تفصیلی موجودات زنده و بالطبع گونه‌های دامی فراهم آورده است(کین قورن و واندر، ۲۰۰۰).

استفاده از تکنیک‌های مولکولی می‌تواند برخی محدودیت‌های رایج در اصلاح دام را رفع نماید. گسترش استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، توسعه تکنیک‌های توالی‌یابی ژنوم، شناسایی و کشف انواع نشانگرهای مولکولی در سطح ژنوم، ارائه نقشه‌های ژنتیکی متراکم از گونه‌های مختلف حیوانات اهلی و پیشرفت‌های حاصله در علوم آمار و کامپیوتر از جمله تکنیک‌هایی است که امروزه در اصلاح دام از آن‌ها استفاده‌های زیادی می‌شود. گسترش تکنیک‌های مولکولی امکان تعیین تنوع موجود در جوامع را برای نواحی ویژه‌ای از سطح ژنوم فراهم آورده است(مونتالدو و مرزا-هرزا، ۱۹۹۸). در ضمن پیشرفت ها در زمینه ژنتیک ملکولی به ما قدرت مطالعه دقیق تر و کارا تر جمعیت های وحشی را داده است.

در سال‌های اخیر، تعداد پروژه‌های ژنتیکی در خصوص جمعیت دام‌های اهلی در حال افزایش است. عموما توجیه انجام چنین پروژه‌هایی این است که می‌تواند به تشخیص نژادهای منحصر بفرد ژنتیکی کمک کند که بتوانیم از آن‌ها در برنامه حفاظت نژادی استفاده کنیم. پروژه‌هایی از این دست بر روی نژادهایی از تمامی گونه‌های اهلی چه در کشورهای در حال توسعه و چه در کشورهای توسعه یافته در حال انجام است (بارکر و همکاران، ۱۹۹۳).

مارال‌های بومی ایران از انواع بزرگ جثه مارال به شمار می‌روند(کیابی و همکاران، ۱۹۸۳؛۱۹۹۴؛۱۹۹۷). به گفته مورخان گوشت گوزن از ۴۰-۱۶ هزار سال پیش از میلاد مسیح به مصرف غذایی می‌رسیده است و گوشت مارال از ۴ هزار سال پیش از میلاد، حتی تا ۱۰ هزار سال قبل آن عمده ترین گوشتی بوده است که در سرتاسر اروپا مصرف می‌شده است. براساس چنین نظریه‌هایی گمان می‌رود انسان از گوزن به عنوان یک حیوان نیمه اهلی نگهداری می‌کرده است. در حال حاضر نیز گله‌های گوزن در نقاط شمالی کره زمین مانند اسکاندیناوی، روسیه، آلاسکا و در میان اسکیموها دیده می‌شود. احتمال می‌رود پرورش گوزن در مزارع ، مانند سایر دام‌ها از دو هزار سال پیش در چین مرسوم بوده است اما پرورش گوزن در غرب در سال ۱۹۷۰ میلادی در اسکاتلند آغاز شد، و هر چند در آغاز جنبه مطالعاتی و تحقیقاتی داشته ولی به زودی اهداف اقتصادی نیز دنبال گشته است. در همین سال‌ها در نیوزیلند پرورش گوزن برای تولید گوشت و صادرات به اروپا و همچنین شاخ گوزن برای صادرات به کشورهای آسیایی آغاز گردید(همو؛ ایکرت و همکاران، ۲۰۰۶). در سال‌های اخیر مارال در ایران در زیاران قزوین نیز به صورت صنعتی پرورش داده

می‌شد. هم اکنون پرورش گوزن در بسیاری از نقاط جهان رایج است. گوشت گوزن‌های پرورشی دارای بافت ریز، ملایم، ترد و خوش‌طعم و مطبوع می باشد و متمایز از گوشت گوزن شکار و وحشی است. همچنین با توصیه‌های متخصصان قلب برای چربی، کلسترول و کالری سازگاری دارد. مارال باروری بالا و عمر پرورشی و تولید مثلی طولانی دارد. به‌راحتی زایمان می‌کنند و به‌زودی بچه‌هایشان را از شیر می‌گیرند. رفتار آرام آن‌ها و جثه مناسب، بررسی دام‌ها و جابجایی‌ها را آسان می‌سازد. زمستان‌های سرد و تابستان‌های گرم را تحمل می‌کنند و حساسیت به بیماری پائینی دارند. علاوه بر تولید گوشت با کیفیت، محصولات فرعی و شاخ مارال، مزیت دیگر این نژاد می‌باشد. در حالی که جمعیت مارال در ایران به شدت کاهش یافته و اگر این روند ادامه یابد در آینده نزدیک در خطر انقراض قرار خواهد گرفت.

از دهه ۱۹۸۰، بیو تکنولوژی زمینه جدیدی را برای رشد پیدا نمود که این تغییر مرهون پیشرفتی است که حاصل فن‌آوری برش و اتصال مولکول DNA به صورت دلخواه می‌باشد. اکنون این تفکر که بیوتکنولوژی با تکیه بردست آوردهای مهندسی ژنتیک قادر است منافع عظیمی را نصیب بشریت نمایند، به شدت تقویت یافته است. مهندسی ژنتیک در واقع انقلاب عظیمی را در علوم زیستی به وجود آورده و با سابقه کوتاه قریب بیست سال، سرشار از نتایج مثبت است. تحلیل‌گران آگاه، قرن آینده را قرن امپراطوری ژنتیک، کامپیوتر و لیزر نامیده‌اند. امروزه در اثر مطالعات عمیق و بررسی‌های ژرف مرزهای ژنتیک مولکولی و یافته‌های مربوطه شناخت ژن‌ها به گونه‌ای دور از تصور گسترش یافته و حجم اطلاعات حاصله و رشد روز افزون آن قابل مقایسه با هیچ دورانی نمی‌باشد.

سال‌های طولانی است که مشخص شده میتوکندری یک اندامک نیمه مستقل و دارای ژنوم مختص به خود می‌باشد که مکانیسم همانندسازی، رونویسی و سنتز پروتئین مخصوص به خود را دارد. mtDNA قطعه‌ای کروموزوم است که جایگاه آن در ماده زمینه میتوکندری و بعضی مواقع چسبیده به غشای داخلی میتوکندری است. هر سلول پستانداران دارای صدها عدد میتوکندری بوده و هر میتوکندری حاوی ۱۰-۲ نسخه از مولکول mtDNA است. اما با وجود این که هزاران نسخه از آن در هر سلول وجود دارد به دلیل این که اندازه آن $۱۰^{۵}$ برابر کوچکتر از ژنوم هسته‌ای است مجموع mtDNA موجود در هر سلول تنها حدود یک درصد از DNA سلول را تشکیل می‌دهد(بوم و همکاران، ۱۹۹۰).

mtDNA دارای مزایایی مثل تعداد زیاد نسخه‌ها در هر سلول، توارث مادری، نداشتن نوترکیبی و نرخ تکامل بالای آن در مقایسه با ژنوم هسته‌ای می‌باشد(نادری و همکاران، ۲۰۰۷). از طرف دیگر mtDNA به دلایلی مثل نداشتن سیستم کارآمد ترمیم، نبود پروتئین‌های حفاظتی مثل هیستون و فقدان اینترون در مقابل فرآیند جهش آسیب‌پذیر است. نوکلئوتیدهای جهش یافته در میتوکندری از طریق مادر به فرزندان دختر و پسر انتقال می‌یابند(گیلرز و همکاران، ۱۹۹۱؛ ۱۹۹۲). مجموع این چند

شـکلی‌ها را در یک فرد هاپلوتایپ می‌گویند. هاپلوتایپ‌ها متنوع در شجره های مختلف شاخه‌های درخت فیلوژنتیـک mtDNA را ایجـاد می‌کننـد از تجمع هـاپلوتیـپ‌هـا در روی درخـت فیلوژنتیـک mtDNA خوشه‌هایی به اسم هاپلوگروه تشکیل می‌دهد. تنوع هاپلوتیپ و تنوع نوکلئوتیدی mtDNA شاخص مهمی در ارزیابی چندشـکلی جمعیتی و تمایز ژنتیکی اسـت بالا بودن تنوع نشـان دهنده بالا بودن چندشـکلی جمعیتی اســـت. از این رو ژنوم میتوکنـدری در مطـالعـات تنوع ژنتیکی و تعیین رابطه فیلوژنتیکی بین جمعیت‌ها و گونه‌های نزدیک به هم کاربرد دارد(کاوالیا-اسـفروزا و همکاران، ۲۰۰۳؛ ناسـیدز و همکاران، ۲۰۰۱).

هدف این مطالعه بهره‌گیری از اطلاعات توالی نواحی سیتوکروم b وD-Loop از ناحیه میتوکندریایی برای بررسی چگونگی روابط، شکل‌گیری و تنوع ژنتیکی زیر جمعیت‌های مارال ایران و همینطور مقایسه آنها با سایر جمعیت های مشابه در خارج از ایران می‌باشد. لذا این تحقیق برای شناسایی توده ژنتیکی موجود و تنوع زیستی انجام شد.

فصل دوم:

مبانی نظری پژوهش

۲-۱- مطالعه مارال

مارال (*Red Deer*) با نام علمی *Cervus elaphus* از خانواده گوزن‌ها *Cervidae* می‌باشـــد. این حیوان که به گوزن قرمز نیز شهرت دارد . از دو نوع دیگر گوزن (گوزن زرد و شوکا) جثه بزرگ‌تر داشته دارای ارتفاع متوسط ۱۱۷ سانتی‌متر است . نرها نیز غالباً بزرگ‌تر از ماده‌ها بوده ، میانگین وزن جنس نر ۲۴۰-۱۶۰ کیلوگرم، طول بدن ۲۳۰-۱۷۰ سـانتی‌متر و ارتفاع حدود ۱۵۰ سـانتی‌متر می‌باشد. در جنس ماده دامنه وزنی ۱۷۰-۱۲۰ کیلوگرم، طول بدن ۲۱۰-۱۶۰ سانتی‌متر و ارتفاع بدن حدود ۱۲۰ سانتی‌متر می‌باشد.

در این حیوانات شـاخ‌ها در سـن ۱۰ تا ۱۵ ماهگی شروع به رشد کرده و پس از دو سال ریزش دارند . در اولین سـال ریزش شاخ ها دارای دو شاخک بوده و هر ساله با افتادن شاخ‌ها دو شاخک جدید رویش پیدا می‌کند. داشـتن شاخک پیش یا گرگ از مشخصات این حیوان است. در اصطلاح محلی به این شاخک‌ها خال می‌گویند. طول و فرم شـاخک‌ها به عواملی چون وراثت، و طبیعت تغذیه‌ای، سـن، ترشـح هورمون بستگی دارد.

شـاخک‌ها هنگام ریزش حالت خارش به‌خود می‌گیرد. در چنین مواقعی حیوان شاخ خود را به درختان و بوته‌ها می‌مالد. زخم‌هایی که این حیوان روی تنه درختان و نهال‌های جوان به جا می‌گذارد کاملاً مشهود بوده و یکی از روش‌های پیدا کردن منطقه مارال نشین محسوب می‌شود. ریزش شاخ معمولاً در اوایل بهار اتفاق می‌افتد.

گاهی تعداد شـاخک را برابر سن در نظر می‌گیرند که این قضیه صحت علتی نداشته و اکثراً مشاهده شده که رشـد شـاخک تا ۱۱ سالگی می‌باشد و گاهی نیز شاخک‌های یک گاو پیر مانند یک بچه گاو می‌باشد. شاخک‌های ساده روی شاخ حیوان پیر را سیخو می‌گویند.

تعیین سـن دقیق حیوان از روی برش برداری از دندان آسـیاب میسـر اسـت. گاهی نیز از روی صدا برای حیوان شناسان خبره امکان تشخیص سن وجود دارد.

اعضـای خانواده گوزن‌ها گیاه‌خوار و نشـخوارکننده می‌باشـند دارای حس شـنوایی و بویایی بسـیار قوی، معمولاً شب گرد و به صورت اجتماعی زندگی می‌کنند. طول عمر این حیوان تا ۱۷ سال نیز گزارش شده اسـت. مارال ماده فاقد شـاخ بوده و در ۲ سالگی آماده بهره‌برداری می‌شود. دوران بارداری ۸ ماه به طول می‌انجامد و معمولاً یک و به‌ندرت دو بچه می‌زاید. نوزاد مارال را گوساله گویند و دارای خال‌هایی است که

این خال‌ها تا ۴ سالگی از بین می‌روند و غالباً دیده شده است که گوساله‌ها به اتفاق نرها و ماده تا ۳ سال به‌صورت اجتماعی زندگی می‌کنند. این حیوان در جنگل‌های متراکم سکونت دارد. عادت مهاجرت غذایی دارد و از محیط‌های بالا دست به پایین و بالعکس تردد دارد. سکونت‌گاه غالب این حیوان مناطق میان‌بند به سمت بالا دست می‌باشد.

جفت‌گیری مارال‌ها از اواخر مرداد تا اواسط مهر می‌باشد. فصل مرداد و شهریور زمان جفت‌گیری حیوان بوده در این موسم حیوان قلمروگرا می‌شود و معمولاً هر نر چندین ماده را در اختیار دارد و با ایجاد نعره که به گاوبانگی معروف است آن‌ها را کنترل و تعقیب می‌کند. مارال نر غالباً پشت سر ماده‌ها حرکت می‌کند. در موسم جفت‌گیری حیوان حالت مستی به‌خود می‌گیرد و به نوعی ترس آن می‌ریزد و بیشتر خود را نمایان می‌سازد. که این عامل باعث افزایش شکار آن می‌شود. در فصل جفت‌گیری نرها اقدام به افزایش وزن خود می‌کنند و دیده شده است که قبل از موعد جفت‌گیری حیوان به ارتفاعات رفته و خود را قوی و مهیای این فصل می‌کند. این عمل در مورد مارال‌های با تجربه به کرات دیده شده ولی مارال‌های کم سن‌تر در همان اوایل فصل جفت‌گیری خود را درگیر آن می‌کنند و غالباً در نزاع‌ها بر سر انتخاب جفت و قلمرو شکست می‌خورند.

موضوع دیگر در مورد این حیوان فصل چله‌گزاردن است. که در فصل گرم سال به‌خصوص اوایل تابستان حیوان برای فرار از گرما خود را در گل و لای قرار می‌دهد به مناطق مربوط رفت و آمد بیشتری دارند.

عمل لیسینگ نیز در این حیوانات دیده می‌شود. بدین ترتیب که مناطقی که دارای آهک یا نمک و به طور کلی شوره‌زار باشند حیوان در این مناطق شروع به لیسیدن این مواد کرده و این مکان‌ها نیز می‌تواند در جهت شناسایی و شکار حیوانات مورد توجه قرار گیرد که این کار به‌طور مصنوعی در منطقه فی‌بیل و آغوزی توسط کارشناسان و محیطبانان منطقه انجام گرفته و شاهد تردد و حضور این حیوان در این مناطق بوده‌اند. که این عمل لیسینگ غالباً در فصل بهار و اوایل آن بیشتر مورد توجه حیوان است.

طرز نوشیدن آب نیز جالب توجه بوده به طوری که همانند سگ آب را می‌لیسد. مارال‌ها در زمستان و با ریزش بیش از اندازه برف که بوته‌های کوچک و علف‌های را می‌پوشاند می‌توانند از گیاه جلی تغذیه نمایند. در حالی که این مورد درباره شوکا دیده نشده است. یا به طور کلی در مناطق که جلی داشته باشد احتمال حضور مارال نیز بیشتر است.

رد پای مارال‌های نر گرد و پهن است در حالی که مارال ماده دارای پای کشیده و تیز می‌باشد. همچنین در مورد این جانوران نیز این تفاوت وجود دارد که ماده‌ها از هر دو طرف تیز بوده ولی نرها از یک طرف تیزه طرف دیگر پهن و با قاعده می‌باشد.

رژیم غذایی آن شامل علوفه، جوانه، برگ‌های جوان، پوست درختان، قارچ، توت، تمشک و انواع میوه‌های جنگلی می باشد.

۲-۲- اهمیت پرورش مارال

پرورش گوزن هرچند در ایران کاملا ناشناخته است ولی در بسیاری از کشورهای جهان مانند نیوزیلند و امریکای شمالی طرفداران بی‌شماری دارد. گوشت گوزن نسبت به گاو دارای کیفیت بالایی است و همین امر یکی از دلایل محبوبیت پرورش گوزن به عنوان منبع غذایی است. مارال باروری بالا و عمر پرورشی و تولید مثلی طولانی دارد. به‌راحتی زایمان می‌کنند و به‌زودی بچه‌هایشان را از شیر می‌گیرند. رفتار آرام آن‌ها و جثه مناسب، بررسی دام‌ها و جابجایی‌ها را آسان می‌سازد. زمستان‌های سرد و تابستان‌های گرم را تحمل می‌کنند و حساسیت به بیماری پائینی دارند. زمینه بالای گوشت با کیفیت، محصولات فرعی و شاخ مارال، مزیت دیگر این نژاد می‌باشد. درحالی که جمعیت مارال در ایران به شدت کاهش یافته و اگر این روند ادامه یابد در آینده نزدیک در خطر انقراض قرار خواهد گرفت.

بر اساس آخرین آمار سرشماری گردآوری شده توسط نگارنده از منابع مختلف(از جمله مکاتبات سازمان حفاظت محیط زیست) در سال ۱۳۹۶-۱۳۹۵ ، امروزه قریب ۳۰۰ راس مارال در استان‌های آذربایجان شرقی، اردبیل، قزوین، گلستان، گیلان و مازندران (جدول ۲-۱ و شکل ۲-۱) وجود دارد.

جدول ۲-۱- آخرین وضعیت جمعیت مارال در زیستگاه های موجود

ردیف	نام استان	نام منطقه تحت مدیریت	مساحت (هکتار)	نر	ماده	گوساله	تعداد کل	سال آمارگیری	مبدأ اولیه
۱	آذربایجان شرقی	پناهگاه حیات وحش ارسباران	۲۰۰	۹	۱۴	۳	۲۶	۹۶	قزوین
۲	اردبیل	پناهگاه حیات وحش فندقلو	۷	۱۰	۱۴	۴	۲۸	۹۶	قزوین
۳	قزوین	پارک جنگلی زیاران	۸	۱۷	۳۱	۱۳	۶۱	۸۸	جنگل قرق
۴	گلستان	پناهگاه حیات وحش قرق	۶	۸	۱۰	۱	۱۹	۹۵	بومی منطقه
۵	گیلان	پناهگاه حیات وحش لوندویل	۵	۳	۴	۲	۹	۹۵	بومی منطقه- قزوین
۶	مازندران	پناهگاه حیات وحش سمسکنده	۲۰۰	۹	۱۷	۹	۳۵	۹۶	بومی منطقه- اردبیل- قرق- قزوین

شکل ۲-۱- نقشه پراکنش مارال در ایران(تهیه شده توسط نگارنده با استفاده از Google Earth)

۲-۳- تاریخچه مارال

به گفته مورخان گوشت گوزن از ۴۰-۱۶ هزار سال پیش از میلاد مسیح به مصرف غذایی می‌رسیده است و گوشت مارال از ۴ هزار سال پیش از میلاد، حتی تا ۱۰ هزار قبل آن عمده‌ترین گوشتی بوده است که در سرتاسر اروپا مصرف می‌شده است. براساس چنین نظریه‌هایی گمان می‌رود انسان از گوزن به‌عنوان یک حیوان نیمه اهلی نگهداری می‌کرده است. در حال حاضر نیز گله‌های گوزن در نقاط شمالی کره زمین مانند اسکاندیناوی، روسیه، آلاسکا و در میان اسکیموها دیده می‌شود. احتمال می‌رود پرورش گوزن در مزارع ، مانند سایر دام‌ها از دو هزار سال پیش در چین مرسوم بوده است اما پرورش گوزن در غرب در سال

۱۹۷۰ میلادی در اسکاتلند آغاز شد، و هر چند در آغاز جنبه مطالعاتی و تحقیقاتی داشته ولی به‌زودی اهداف اقتصادی نیز دنبال گشته است. در همین سال‌ها در نیوزیلند پرورش گوزن برای تولید گوشت و صادرات به اروپا و همچنین شاخ گوزن برای صادرات به کشورهای آسیایی آغاز گردید(همو؛ اکرت و همکاران، ۲۰۰۶). در سال‌های اخیر مارال در زیاران قزوین نیز به‌صورت صنعتی پرورش داده می‌شد. هم اکنون پرورش گوزن در بسیاری از نقاط جهان رایج است.

۲-۴- رده‌بندی جانوری مارال

گوزن به اعضای خانواده گوزنیان (*Cervidae*) در راسته جفت سمان گفته می‌شود (جدول ۲-۲).

جدول ۲-۲- طبقه‌بندی علمی گوزن

طبقه‌بندی علمی	
فرمانرو	جانوران
شاخه	طنابداران
رده	پستانداران
راسته	جفت‌سم‌سانان
زیرراسته	نشخوارکنندگان
تیره	گوزنیان
Goldfuss, 1820	

آن‌ها حدود ۲۷ تا ۲۸ میلیون سال پیش از گاوسانان جدا شدند و اکنون حداقل ۹۰ گونه زنده از آن‌ها در نقاط مختلف دنیا زندگی می‌کنند. جنس نر تمام گونه‌های گوزن به جز گوزن آبی شاخ دارد اما در بیشتر گونه‌ها جنس ماده شاخ ندارد. شاخ گوزن‌ها تفاوت مهمی با سایر حیوانات شاخ‌دار مثل گاوسانان و کرگدن‌ها دارد. شاخ آن‌ها دائمی نیست و هر سال می‌افتد و به جایش شاخ جدیدی می‌روید.

۲-۵- جمعیت های مارال در ایران

زیر گونه‌های مارال شامل مارال اروپای غربی، مارال اروپای مرکزی، مارال خزری (پراکنش در آسیای صغیر، قفقاز و شمال ایران)، مارال اسکاتلندی، مارال کرسی، مارال کشمیری، مارال بلخی و مارال یارکندی

می‌باشد. مارال‌های بومی ایران از انواع بزرگ جثه مارال به‌شمار می‌روند(کیابی و همکاران، ۱۹۸۳؛ ۱۹۹۴؛ ۱۹۹۷).

۲-۶- فرآورده‌های مارال

۲-۶-۱- گوشت

گوزن به‌عنوان یکی از این حیوانات با گوشت حلال و قابل استفاده شناخته می‌شود. گوشت گوزن های پرورشی دارای بافت ریز، ملایم، ترد و خوش طعم و مطبوع می‌باشد و متمایز از گوشت گوزن شکار و وحشی است. همچنین با توصیه‌های متخصصان قلب برای چربی، کلسترول و کالری سازگاری دارد.

گوشت گوزن از گذشته‌های دور به عنوان یکی از با کیفیت‌ترین و لذیذترین انواع گوشت‌های قرمز مد نظر آشپزان و مردم عادی بوده است. گوشت این حیوان از نظر مقدار چربی از گوشت گاو چربی کمتری دارد و گوشت یک گوزن در مقایسه با گوشت یک گاو هم سن بسیار نرم‌تر است. همچنین سختی‌های شکار و دسترسی به گوشت این حیوانات در گذشته باعث شده تا همیشه از آن به عنوان یک غذای اشرافی یاد شود.

۲-۶-۲- پوست

چرم و پوست این موجودات هم بسیار با کیفیت و گران قیمت است.

۲-۶-۳- شاخ

گوزن‌های نر بالغ که دارای شاخ‌های گسترده‌ای نیز هستند فروش کله همراه با شاخ به‌صورت تاکسی درمی‌شده هم یکی از درآمدهای جانبی هر مزرعه پرورش گوزن به‌شمار می‌رود.

۲-۷- معیت و پراکندگی مارال

پراکنش آن در قاره اروپا، شمال آفریقا، آسیا و در ایران در استان‌های گلستان، مازندران و گیلان پراکنده است. تعدادی نیز به منطقه ارسباران در آذربایجان‌شرقی و فندقلو در اردبیل منتقل شده است. مارال بزرگترین گونه گوزن ایران می‌باشد و زیستگاه آن، مناطق جنگلی و بیشه‌زارهای مناطق کوهستانی می‌باشد.

۲-۸- دشمن مارال

مهم‌ترین دشمنان طبیعی مارال در اروپا گرگ خاکستری و پس از آن خرس قهوه‌ای است. سیاه‌گوش اورآسیا و گراز هم گاهی بچه مارال‌ها را شکار می‌کنند. در ایران دشمن طبیعی اصلی این حیوان پلنگ و سپس گرگ و خرس قهوه‌ای است. شکار مارال در بسیار از کشورها مشتاقان فراوانی دارد. یکی از محبوب‌ترین روش‌های شکار این حیوان در گذشته تقلید صدای جنس نر این حیوان در فصل جفت‌گیری برای فریب دادن گوزن‌های دیگر و کشانیدن آن‌ها به سوی خود بود. با این حال این روش خطرات خاص خود را داشت از جمله این‌که گاه به‌جای مارال، ببر را که شکارچی اصلی مارال بود به سوی انسان می‌کشاند.

۲-۹- مارال ایرانی

در دنیا ۲۶-۲۷ گونه گوزن زندگی می‌کند که تنها در ایران ۳ گونه قابل مشاهده است، و متأسفانه در اثر ۳ عامل مهم تخریب زیستگاه، افزایش جمعیت انسانی و شکار بی‌رویه و غیرمجاز، واقعاً در ایران شرایط مناسبی ندارند. گوزن، حیوانیست که در زیستگاه‌های جنگلی و نیمه‌جنگلی با مرز مرتع و استپی قادر به ادامه حیات است و برخلاف پازن، قوچ و آهو که به‌ترتیب در زیستگاه‌های صخره‌ای- کوهستانی، تپه ماهوری- کوهپایه‌ای و دشتی قابل مشاهده هستند؛ گوزن، پستانداری زوج‌سم و نشخوارکننده است و معده چهار قسمتی دارد. شاخ که در نرها دیده می‌شود، از استخوان جمجمه رشد می‌کند و هر سال هم شاخ می‌افتد و شاخ جدیدی شروع به رشد می‌کند که در مدت رشد، پوست مخملی شکلی روی شاخ‌ها پوشیده شده که نقش تغذیه و تکامل شاخ‌ها رو به عهده دارد.

۲-۱۰-تاریخچه مطالعه روی میتوکندری

اولین بررسی‌های انجام شده بر روی میتوکندری، به‌عنوان یک اندامک درون سلولی بیش از ۱۰۰ سال پیش توسط دانشمندی آلمانی به نام ریچارد آلتمن در ساال ۱۸۹۰ صورت گرفت و بیوبلاست[1] یا جایگاه‌های زنده نام گرفت. او تصور می‌کرد که این ارگان‌های شبیه باکتری، موجودات ریز اولیه‌ای هستند که درون سلول‌ها زندگی می‌کنند. وی همچنین بیان کرد که بین واکنش‌های اکسایش و کاهش سلول و میتوکندری وابستگی وجود دارد. سپس بندا در سال ۱۸۹۷ با بررسی‌های بیشتر اجزای اصلی آن را توصیف کرد، وی در هنگام اسپرماتوژنز اجسام رشته مانند درون سلولی را میتوکندری که ترکیبی از دو واژه یونانی میتو[2] به معنای رشته و کوندریون[3] به معنای دانه نام نهاد. چون این اندامک اغلب رشته‌ای یا به صورت دانه‌های

1-Bioblast
2-Mito
3-Chondrion

کوچک در سیتوپلاسم همه سلول‌های یوکاریوتی وجود دارد. از سال ۱۸۹۷ به بعد میتوکندری‌ها به‌طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفت، به تدریج روش‌هایی برای جداسازی میتوکندری‌های سالم دست نخورده ابداع شد. در سال ۱۹۰۰، میکائیلیس به کمک معرف رنگی سبز ژانوس میتوکندری را در سلول‌های زنده مشاهده کرد. واربورگ در سال ۱۹۱۳ آنزیم‌های تنفسی را در این اندامک نشان داد. سرانجام برای اولین بار در سال ۱۹۳۴، بنسلی و هر، توانستند آن‌ها را از سلول‌های کبدی جدا کنند(یوسفی، ۱۳۸۵).

کندی و لنینگر در سال ۱۹۴۹ نشان دادند که میتوکندری آنزیم‌های فسفریلاسیون اکسیداتیو چرخه اسید سیتریک و اکسیداسیون اسیدهای چرب را در بر دارد. پیشرفت غیر منتظره زمانی اتفاق افتاد که ناس در سال۱۹۶۳ وجود DNA در میتوکندری را توسط میکروسکوپ الکترونی نشان داد. از اواخر دهه ۱۹۸۰ تاکنون، بر شمار بیماری‌های مرتبط با اختلال در ژنوم میتوکندریایی افزوده می‌شود(مهدوی و همکاران، ۱۳۸۵).

توالی‌یابی ژنوم میتوکندری انسان در سال ۱۹۸۱ توسط اندرسون و هکاران که به طول ۱۶۵۶۷ جفت باز بود، انجام گرفت. امروزه برای بسیاری از گونه‌ها و نژادهای مختلف جانوری، توالی کامل DNA میتوکندری شناخته شده است که بر مبنای آن فاصله ژنتیکی و سرعت تکامل قابل محاسبه است(نیو و همکاران، ۲۰۰۲).

۲-۱۱-منشا میتوکندری در سلول‌های یوکاریوتی

شواهد فسیلی نشان می‌دهد موجودات تک سلولی در دوران اولیه حیات بر روی زمین فاقد اندامک‌های درون سلولی بوده‌اند و یا اندامک‌های بسیار کوچک داشتند. مرگ جلبک‌های سبز- آبی که در ابتدای حیات در کره زمین وجود داشته‌اند پس از ۱/۵ بیلیون سال با آزادسازی مقدار زیادی اکسیژن باعث افزایش اکسیژن اقیانوس‌ها و اتمسفر شد و امکان زندگی در محیط‌های اکسیژن‌دار را برای سایر موجودات سلولی فراهم آورد.

براساس تئوری لین مارگولیس که در کتاب خود با عنوان "همزیستی در تکامل سلولی" در سال ۱۹۸۱ به چاپ رسید، مراحل سیر تکاملی یوکاریوت‌ها به شرح زیر است:

۱- اکسیژن تولید شده توسط جلبک‌های سبز- آبی که محصول فرایند فتوسنتز بود، اکسیژن موجود در جو را فراهم نمود.

۲- هم‌زمان با جلبک‌های سبز-آبی، باکتری‌ها(سلول‌های پروکاریوتی) رشد و گسترش پیدا کردند که بعضی از آن‌ها توانایی زندگی هوازی را به‌دست آوردند.

۳- سلول‌های بی‌هوازی و هتروتروف، باکتری‌های هوازی را در برگرفتند و به داخل سلول خود بردند و همزیستی دوطرفه را آغاز کردند.

در این همزیستی دوطرفه از یک سو مواد غذایی مورد نیاز باکتری هوازی در برگرفته شده توسط سلول میزبان تامین می‌شد و از طرف دیگر سلول میزبان انرژی مورد نیاز خود را از فعالیت هوازی آن باکتری به‌دست می‌آورد که این همزیستی سرآغاز فعالیت میتوکندری‌ها در سلول محسوب می‌شود.

در این تئوری باکتری هوازی در برگرفته شده، میتوکندری اولیه نام داشت که در نهایت با گذشت زمان و سیر تکاملی میتوکندری اولیه به یک اندامک درون سلولی همزیستی درون سلولی تخصص یافته در سلول‌های یوکاریوتی تبدیل شد(شکل ۲-۲).

شواهدی که تئوری همزیستی درون سلولی را تایید می‌کنند عبارتند از:

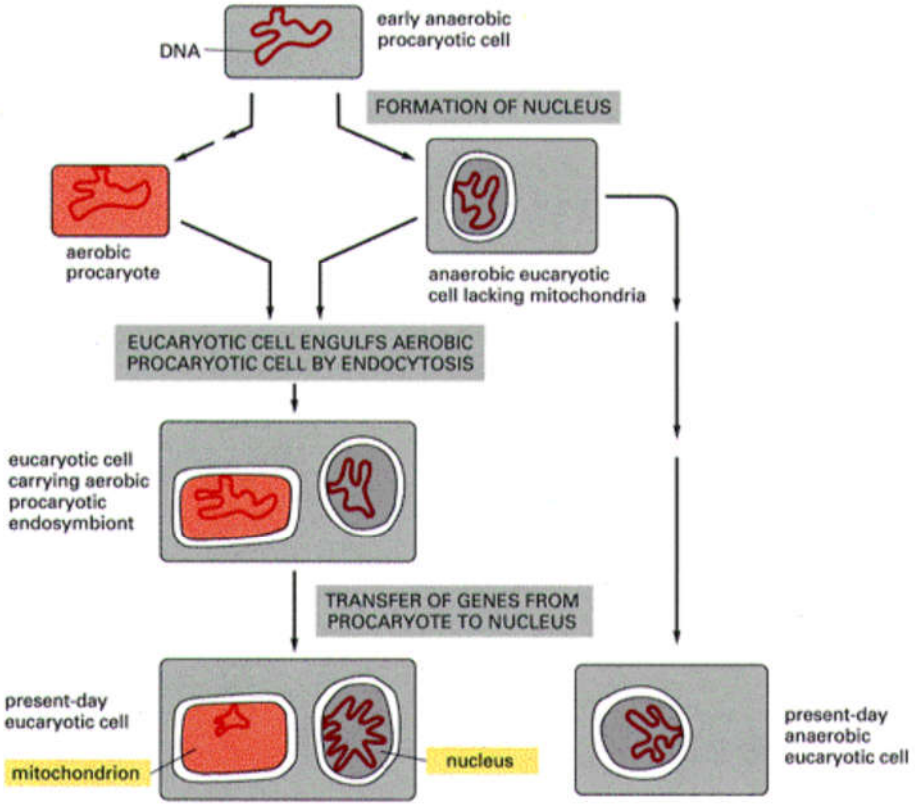
۱- میتوکندری‌ها تنها اندامک درون سلولی هستند که اندازه آن‌ها به باکتری‌ها نزدیک‌تر است.

۲- میتوکندری‌ها همانند بسیاری از باکتری‌ها، دارای غشای سلولی دو لایه حاوی مولکول‌های چربی هستند.

۳- مولکول‌های rRNA میتوکندری به مولکول‌های rRNA باکتری‌ها شباهت بیشتری دارند.

۴- تقسیم و تکثیر میتوکندری در فرایند مشابه تولیدمثل باکتری‌ها انجام می‌گیرد.

۵- مولکول DNA مستقل میتوکندری، نشان دهنده زندگی مستقل آن در گذشته است(محمدی، ۱۳۸۷).

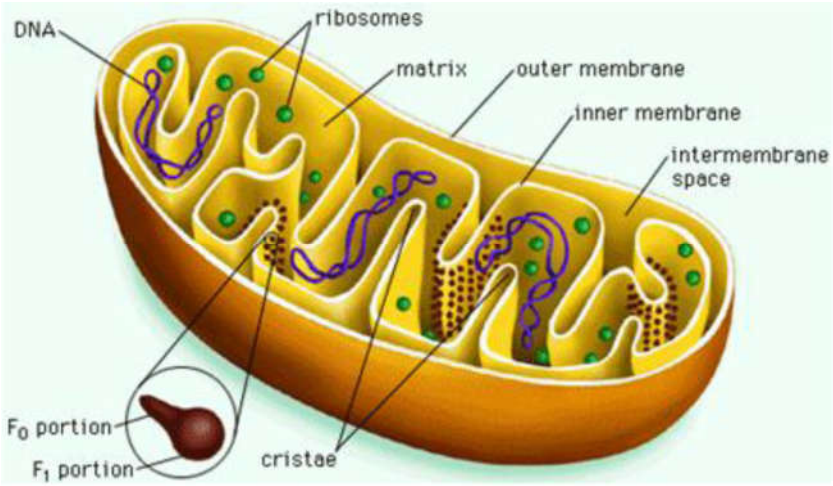


شکل۲-۲- ورود DNA سلول‌های پروکاریوتی به سلول‌های یوکاریوتی

۲-۱۲- ساختمان میتوکندری

میتوکندری دارای یک غشاء خارجی[1]، فضای بین دو غشاء[2]، ویک غشاء داخلی[3] است(شکل ۲-۳). فضای درون میتوکندری را ماتریکس[4] اشغال کرده که توسط غشای داخلی احاطه شده است. غشاء داخلی فرورفتگی‌هایی را در ماتریکس ایجاد می‌کند که کریستا[5] نامیده می‌شوند. این فرورفتگی‌ها توسط یک یا دو ساقه[6] به غشاء داخلی متصل می‌شوند(امتیازی، ۱۳۸۶).

1-Outer membrane
2-Inner membrane
3-Inter membrane
4-Matrix
5-Crista
6-Peduncle



شکل۲-۳- دیاگرام سه بعدی از یک میتوکندری در برش طولی

۲-۱۳- نقش زیستی و فعالیت فیزیولوژیکی میتوکندری

۲-۱۳-۱- فسفوریلاسیون اکسیداتیو (تنفس هوازی یا تنفس سلولی)

مهمترین عمل میتوکندری‌ها در سلول‌های یوکاریوتی امروزی، تنفس هوازی فسفوریلاسیون اکسیداتیو[1] است که شامل تولید انرژی به فرم آدنوزین تری فسفات(ATP) می‌باشد.

غشاهای میتوکندری در واقع جایگاه لنتقال الکترون و سنتز ATP می‌باشند. پیرووات دهیدروژناز در ماتریکس میتوکندری پیرووات را به استیل COA و دی اکسید کربن(CO_2) تبدیل می‌کند. در هر دور از چرخه اسید سیتریک، استیل COA با سیترات چهار کربنی به اگزالواستات تبدیل شده، طی یک سری واکنش‌هایی که دو مولکول CO_2 آزاد کرده و سه مولکول NADH و یک مولکول $FADH_2$ تولید می‌کند. الکترون‌ها از NADH و $FADH_2$ از طریق حاملین الکترون در غشای داخلی میتوکندری به اکسیژن(O_2) منتقل شده و دوباره NADH و $FADH_2$ تولید می‌کنند. مرحله بعدی حرکت الکترون‌ها مربوط می‌شود به پمپ پروتون‌ها در عرض غشای داخلی که نتیجه آن تولید بیشتر ATP از اکسیداسیون هوازی گلوکز است. در شکل ۲-۴ نقش میتوکندری در فسفوریلاسیون نشان داده شده است(مهدوی و همکاران، ۱۳۸۵).

1-Oxidative phosphorylation

Family name: **Aghazadeh** Name: **Leila**

Title of Thesis : **Genetic Assessment of Red Deer Population Structure using mtDNA**

Supervisor: **Dr. Saeid Nikbin**
Advisors: **Dr. Farzad Mirzaei Aghjehgheshlagh- Dr. Nemat Hedayat Evrigh**

Graduate Degree **M.Sc.**
Major: **Animal Science** Specialty: **Animal Breeding and Genetics**
University: **Mohaghegh Ardabili** Faculty: **Agriculture and Natural Resources**
Graduation date: **2017/9/17** Number of pages: **120**

Abstract:
The breeds and sub-populations of each species are the result of mutation processes, genetic drift, natural selection, and the interaction between genetics and environment. It is a precious asset inherited from ancient times to the present generation, and its preservation has great value and importance. The genetic analysis Maral (*Cervus elaphus*) is essential for biodiversity conservation, knowledge about the survival of this species and identifying threatening or contributing factors in surviving the population. Therefore, the present study is carried out to identify the existing genetic mass, to study the relationship among populations, the formation and genetic variation of Iranian Maral using the sequence data of mitochondrial DNA (mtDNA) cytochrome b genes and mt DNA D-Loop region. To conduct the present research, Blood, hair or tissue samples of 78 heads Maral from 6 populations were analysed. The blood samples were collected from their jugular vein. The blood was poured into the EDTA vacuum blood collection tubes and then transferred to the laboratory until the test is carried out at -20 ° C. The DNA was isolated by a commercial kit for blood and a manual method for hair and tissue samples. Specific primers for cytochrome b and D-Loop genes were used to amplify the fragments by PCR. The amplified fragments were electrophoresed on 1.5% agarose gel. All PCR products obtained were sequenced. Then, the sequences were aligned using the BIOEDIT software to evaluate the nucleotide polymorphisms. Using the Mega software, a phylogenetic tree was drawn. The genetic population data analysis was performed by PopGene32 software. The analysis of polymorphisms were performed in DNA sequences using DnaSP. Finally, NETWORK software analyzes the network to identify haplotypic groups. The results of the sequence analysis of Maral revealed mutations that resulted in the creation of 5 haplotypes and 19 haplotypes for D-Loop region and cytochrome b gene, respectively. The haplotype diversity, nucleotide diversity and mean nucleotide difference for the D-Loop were 0.218, 0.0007 and 0.491, respectively, and for cytochrome b were 0.95, 0.0167 and 15.9, respectively. Tajima's D for the D-Loop and cytochrome b genes is -1.564 and -1.205, respectively, suggesting the presence of evolutionary forces such as inbreeding, or drift events. Genetic diversity indices show that six Maral populations are likely to experience the Battle Neck experience. The haplotypes analysis results revealed that the recent fluctuations in population size and interruption in the gene flow due to the transfer of the Marals from a population to other habitats in the past.

Keywords: mtDNA; Cytochrome b, D-Loop, Phyllenes, Biodiversity, Maral

University of Mohaghegh Ardabili

Faculty of Agriculture and Natural Resources

Department of Animal Sciences

Thesis submitted in partial fulfilment of the requirements for the degree of M.Sc. in Animal Breeding and Genetics

Title:

Genetic Assessment of Red Deer Population Structure using mtDNA

Supervisor:

Saeid Nikbin (Ph. D)

Advisors:

Farzad Mirzaei Aghjehgheshlagh (Ph.D)

Nemat Hedayat Evrigh (Ph. D)

By:

Leila Aghazadeh

September – 2017