

بررسی ساختار ژنتیکی و تجزیه فیلوژنتیکی گوزن قرمز ایران بر اساس ناحیه D-Loop میتوکندری

لیلا آقازاده^۱، سعید نیک‌بین^{۲*}، فرزاد میرزایی آقجه قشلاق^۳ و نعمت هدایت ایوریق^۳

تاریخ دریافت: ۹۷/۴/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۸/۶/۲۰

^۱ دانش‌آموخته‌ی کارشناس ارشد گروه علوم دامی دانشگاه محقق اردبیلی

^۲ استادیار گروه علوم دامی دانشگاه محقق اردبیلی

^۳ دانشیار گروه علوم دامی دانشگاه محقق اردبیلی

*مسئول مکاتبه: Email: snikbin@uma.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: آنالیز ژنتیکی جمعیت‌های وحشی برای حفظ تنوع زیستی و افزایش دانش در مورد بقای این گونه‌ها و یافتن عوامل تهدید کننده و یا کمک کننده در حفظ این جمعیت مهم و ضروری می‌باشد. هدف: لذا مطالعه حاضر برای شناسایی توده ژنتیکی موجود، بررسی چگونگی روابط، شکل‌گیری و تنوع ژنتیکی مارال‌های ایرانی با بهره‌گیری از اطلاعات توالی ناحیه D-Loop از ژنوم میتوکندریایی انجام شد. روش کار: جهت انجام پژوهش حاضر نمونه‌های خون، مو یا بافت ۷۸ رأس مارال اخذ و DNA آنها استخراج گردید. ناحیه D-Loop از ژنوم میتوکندریایی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی با روش PCR تکثیر شده و تمامی محصولات PCR 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. توالی‌های مارال با استفاده از نرم افزار *DnaSP* آنالیز شد. نتایج: نتایج حاصل منجر به شناسایی جهش‌هایی گردید که به ایجاد هاپلوتیپ برای ناحیه D-Loop منتهی شد و تنوع هاپلوتیپی، تنوع نوکلئوتیدی و متوسط تفاوت نوکلئوتیدی برای ناحیه D-Loop به ترتیب ۰/۲۱۸، ۰/۰۰۰۷ و ۰/۴۹۱ به دست آمد. شاخص‌های تنوع ژنتیکی نشان داد که شش جمعیت مورد بررسی مارال احتمالاً تجربه باتل نک را پشت سر گذاشته است. نتیجه‌گیری: در پرتو نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل جمعیت‌ها 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.

واژگان کلیدی: تنوع زیستی، فیلوژنی، مارال، D-Loop، mtDNA

مقدمه

ارسباران در آذربایجان شرقی و فندقلو در اردبیل منتقل شده است. مارال‌های بومی ایران از انواع بزرگ جثه مارال به‌شمار می‌روند (کیابی و همکاران ۱۹۹۴ و ۱۹۹۷). خانواده *Cervus* به دو گروه تقسیم شدند که عبارتند از گونه *elaphus* (گوزن اروپایی *elaphoid*) و گونه *canadensis* (گوزن اورآسیا و آمریکای شمالی

گوزن قرمز ایران یا مارال بزرگترین گونه گوزن ایران می‌باشد و زیستگاه آن، مناطق جنگلی و بیشه‌زارهای مناطق کوهستانی می‌باشد. گوزن قرمز در قاره اروپا، شمال آفریقا، آسیا و در ایران در استان‌های گلستان، مازندران و گیلان پراکنده است. تعدادی نیز به منطقه

کونراد و داویس (۲۰۰۱). توالی‌یابی میتوکندری با مقایسه نوکلئوتیدها و مشخص شدن اختلاف بین توالی‌های مختلف، تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتایپی تعیین می‌گردد. با استفاده از این اطلاعات، رابطه فیلوژنتیکی و فیلوژئوگرافی گونه‌ها و جمعیت‌ها ترسیم می‌شود. به کمک این روش و همچنین استفاده از اطلاعات بانک ژن^۱، تشخیص گونه‌ها و بررسی فرآیند اهلی‌سازی میسر می‌شود (هندل لدر و همکاران ۱۹۹۸ و ۲۰۰۸، منژونات و همکاران ۲۰۰۳ و مانن و همکاران ۲۰۰۴). در این میان چند شکلی‌های ژنوم میتوکندریایی برای شناسایی مواد بیولوژیکی (شامل پوست، خون، نمونه‌های گوشت و استخوان فک و دندان) به دست آمده از گونه‌های مختلف از جمله گاو، گوسفند، بز، گوزن و گوزن قرمز نیز مورد مطالعه قرار گرفته است (نتونک و همکاران ۲۰۱۰).

منطقه‌ای در ژنوم میتوکندری وجود دارد که کدکننده پروتئین نبوده و جهش در آن منطقه می‌تواند تجمع پیدا کند. این منطقه در ناحیه D-Loop قرار دارد. D-Loop ناحیه پیشبر برای آغاز همانندسازی ژنوم میتوکندری است (آندرسون و همکاران ۲۰۰۴). دو منطقه به نام‌های HVR1 و HVR2 در D-Loop وجود دارد که به دلیل آنکه این دو ناحیه کدکننده هیچ پروتئینی نیستند و در ناحیه D-Loop که پیشبر در رونویسی است نقش مهمی ندارند، جهش‌های صورت گرفته در آن ابقاء می‌شوند (جازین و همکاران ۱۹۹۸) و در نتیجه میانگین جهش در آنها بیشتر از سایر قسمت‌های میتوکندری است. ناحیه D-Loop میتوکندریایی به‌عنوان یک نشانگر خوب در مطالعات ژنتیک جمعیت حیات وحش شناخته شده است و برای تجزیه و تحلیل ژنتیکی جمعیت مناسب و مفید است (ساسون ۱۹۹۱).

طول توالی‌یابی‌های انجام شده بر روی mtDNA متفاوت بوده ولی تعداد ثابتی جهش‌های تکراری در زیر گونه‌های مختلف مارال گزارش شده است و از این رو می‌تواند به عنوان یک مارکر تشخیصی برای زیرگونه‌های آن

می‌باشد. *Cervus Nippon* متعلق به گوزن شوکای ژاپن و مناطق اطراف تایوان است. گوزن قرمز به عنوان گسترده‌ترین و فراوان‌ترین گونه گوزن در جهان شناخته شده است و امروزه با بیش از ۲۲ زیر گونه پراکندگی وسیعی را در ناحیه هولارکتیک (قطبی) دارند (گیست ۱۹۹۱، ترنس ۱۹۸۹ و وایت هد ۱۹۷۲).

در حوزه ژنتیک و به نژادی، اطلاع از ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها می‌تواند کمک بزرگی برای برنامه‌ریزی جهت استفاده در طرح‌های اصلاح نژادی و از همه مهم‌تر، حفظ نخایر ژنتیکی باشد (علی‌نقی‌زاده و همکاران ۲۰۱۰). استفاده از DNA میتوکندریایی (mtDNA) در تشخیص گونه‌ها و ترسیم رابطه فیلوژنتیکی دارای مزایایی از جمله تعداد زیاد نسخه به ازای هر سلول (تقریباً ۱۰۰۰ نسخه و بیشتر)، اندازه کوچک‌تر آن نسبت به DNA ژنومی (بوم و همکاران ۱۹۹۰، قوتی و همکاران ۲۰۰۹ و تلتچا ۲۰۰۵)، وراثت پذیری مادری (زین و همکاران ۲۰۰۷)، هاپلوئید بودن و در نتیجه انجام نشدن فرآیند میوز، عدم وجود نوترکیبی در آنها (گرویس و همکاران ۱۹۹۵ و نادری و همکاران ۲۰۰۷)، وجود نواحی حفاظت شده (آزور و همکاران ۲۰۰۵) و وجود نواحی حفاظت نشده‌ای مانند ناحیه D-Loop برای مطالعات تکاملی گونه‌های وابسته می‌باشد (آمیلس و همکاران ۲۰۰۴، بور و همکاران ۱۹۹۹ و کیم و همکاران ۲۰۰۲). همچنین سرعت بالای تکامل mtDNA در مقایسه با DNA هسته‌ای، باعث شده که از آن برای مطالعات تکاملی و نیز شناسایی روابط فیلوژنتیکی جمعیت‌ها استفاده گردد. سرعت جایگزینی نوکلئوتیدها در برخی از نواحی ژنی mtDNA مهره‌داران عالی تقریباً ۵ تا ۱۰ برابر بیشتر از ژنوم هسته‌ای است (نادری و همکاران ۲۰۰۷). در بین نشانگرهای ژنتیکی، توالی‌یابی ژنوم میتوکندری یکی از کاربردی‌ترین روش‌ها برای تعیین رابطه فیلوژنتیکی بین جمعیت‌ها و گونه‌های نزدیک به هم محسوب می‌شود (برفورد و همکاران ۲۰۰۳، کولگان و همکاران ۲۰۰۱، کلومبو و همکاران ۲۰۰۲ و

¹- National Center for Biotechnology Information

شمالی کشور وجود دارد اما اطلاعات درستی از وضعیت ژنتیکی این جمعیت‌ها در دست نیست. بنابراین مطالعه این جایگاه‌ها به منظور شناسایی بهتر جمعیت‌های مارال ایران ضروری به نظر می‌رسد. هدف این پژوهش بررسی میزان تنوع موجود در جمعیت‌های مارال ایران و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی با استفاده از توالی جایگاه ژنی D-Loop از DNA میتوکندریایی این جمعیت‌ها در نواحی ارسباران آذربایجان، جنگل فندقلو اردبیل، زیاران قزوین، جنگل قرق گلستان، پارک جنگلی سمسکنده و نوشهر مازندران و نیز مقایسه آنها با جمعیت‌های مختلف گوزن در خارج از ایران از جمله گوزن‌های آمریکایی، اروپایی، ژاپنی، لهستانی و چینی بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و استخراج DNA

نمونه‌گیری با هماهنگی سازمان محیط زیست و حیات وحش استان‌های اردبیل، آذربایجان شرقی، قزوین، گلستان و مازندران و همچنین با سازمان موزه منابع طبیعی و ذخایر بانک ژن تهران انجام شد. ۴۷ نمونه خون مارال از سازمان موزه منابع طبیعی و ذخایر بانک ژن تهران (۱۵ نمونه خون مارال از آذربایجان شرقی، ۳۲ نمونه خون از قزوین)؛ ۳ نمونه مو و ۳ نمونه از بافت‌های استخوان، گوشت و شاخ از استان اردبیل، ۴ نمونه خون از استان گلستان، ۱۷ نمونه مو و ۴ نمونه بافت از استان مازندران گرفته شد (جدول ۱). نمونه‌های خون از مارال-هایی که جهت تست سلامتی یا درمان و یا انتقال به زیستگاه‌های محافظت شده با داروهای بی‌هوشی از جمله کتامین^۱، مدتومیدین^۲ و آتیپومازول^۳ و با استفاده از اسلحه بادی بی‌هوش شده بودند در لوله‌های خلأ حاوی ماده ضد انعقاد EDTA جمع‌آوری شد. نمونه‌های مو نیز بطور مستقیم از حیوانات زنده و سایر نمونه‌های بافتی

استفاده شود. تنوع توالی در ناحیه کنترلی میتوکندری برای تعیین گونه و مرز زیرگونه و برای مکان‌یابی منشأ جغرافیایی گونه‌های که در اسارت تکثیر شده‌اند حاوی اطلاعات مفیدی است. اتور راندی و همکاران (۲۰۰۰) در یک پژوهش، برای پی بردن به روابط تکامل نژادی در ۲۵ گونه گوزن از توالی مناطق کنترل کامل میتوکندری استفاده کردند. جمعیت‌های طبیعی و پرورشی بعضی از گونه‌ها عمیقاً توسط مدیریت انسانی تحت تاثیر قرار گرفته‌اند و برای حفاظت از جمعیت گوزن می‌بایستی با شناسایی مناسب تفاوت‌های تکاملی و واحدهای طبقه‌بندی جمعیتی به آن کمک کرد (اتور راندی و همکاران ۲۰۰۰). اگرچه بررسی فیلوژنی گونه‌های گوزن قرمز مورد مطالعه قرار گرفته است، اما با این وجود تفاوت‌های نیز در بین گونه‌ها وجود دارد (گیست ۱۹۹۹). برای شناسایی و تشخیص گونه‌ها در تحقیقی یک قطعه ۲۴۸ جفت بازی از ژن سیتوکروم b برای شناسایی گوزن قرمز از گوزن زرد و شوکا مورد استفاده قرار گرفت (کیتانو و همکاران ۲۰۰۷).

عدم وجود اطلاعات شجره‌نامه و فیلوژنیک در صفات مهم تجاری برای دام‌های وحشی مانع از پیشرفت‌های آن‌ها در زمینه ژنتیک نژادها و افزایش جمعیت می‌شود و باید توجه بیشتری به جمعیت‌های موجود در برنامه‌های تولیدمثلی و اسناد شجره‌نامه در ذخیره‌سازی مولدین انجام داد. بنابراین با انتخاب روش صحیح می‌توان موجب پیشگیری از افزایش سطوح آمیزش خویشاوندی از یک نسل تا نسل بعدی و نتیجتاً محافظت گونه مورد نظر شد (لوندینگ و همکاران ۲۰۰۵).

با توجه به مطالعات و بررسی‌های صورت گرفته تا کنون در کشور تحقیقات وسیعی که به منظور شناسایی جایگاه-های mtDNA مبتنی بر توالی‌یابی ناحیه D-Loop مارال ایرانی صورت نگرفته است. به این ترتیب اگرچه جمعیت‌های محافظت شده از این حیوان بخصوص در نوار

³-Atipamezole

¹-Ketamine

²-Medetomidine

و به روش اتوماتیک سانگر در شرکت ماکروژن کشور کره جنوبی توالی‌یابی شد.

تجزیه و تحلیل داده‌های توالی‌یابی

توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار *BioEdit* با روش *Clustal W* با همدیگر هم‌تراز گردید. براساس هاپلوتیپ‌های به‌دست آمده و روابط فیلوژنی توالی‌های ناحیه *D-Loop* بهترین مدل جایگزینی نوکلئوتید در نرم‌افزار *MEGA 6.0* شناسایی و با استفاده از روش حداکثر درست‌نمایی، درخت فیلوژنتیکی با بیشترین درست‌نمایی بین هاپلوتیپ‌های مختلف ترسیم گردید. آماره تاجما *D* جهت بررسی تنوع نوکلئوتیدی حاصل از مشاهدات با استفاده از تنوع حاصل از فراوانی آللی در جایگاه‌های چندشکلی انجام گرفت (تاجیما ۱۹۸۳). با بهره‌گیری از نرم‌افزار *DnaSp 5.10* هاپلوتیپ‌ها و فراسنجه‌های مربوط به تنوع ژنتیکی شامل تنوع نوکلئوتیدی، تنوع هاپلوتیپی، فاصله ژنتیکی، تمایز ژنتیکی، فراوانی نوکلئوتیدی و غیره انجام شد. جهت آنالیز داده‌های ژنتیک جمعیت کلیه پارامترها، آلل‌های اختصاصی، مقادیر *Rst*، *Fst* و فاصله ژنتیکی^۳ سلسله مراتب ۶ جمعیت شامل ارسباران، زیاران، سمسکنده، فندقلو، قرق، نوشهر با استفاده از نرم‌افزار *DnaSP* محاسبه گردید و در نهایت با استفاده از نرم‌افزار *NETWORK* آنالیز شبکه‌ای جهت مشخص کردن گروه‌های هاپلوتیپ انجام گرفت.

داده‌های مربوط به توالی‌های استخراج شده جمعیت‌های مختلف گوزن دنیا از طریق پایگاه اطلاعاتی *NCBI* جهت تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک بین جمعیت‌ها استحصال شد که در مجموع ۱۳۰ توالی (۵۲ توالی مربوط به داده‌های *NCBI* و ۷۸ توالی مربوط به نمونه‌های مارال ایران) مربوط به ناحیه *D-Loop* گوزن بود (جدول ۱). داده‌های مورد نظر با نرم‌افزار *BioEdit* هم‌تراز گردید. مقایسه‌ی توالی نوکلئوتیدیهای ناحیه *D-Loop* جمعیت‌های ایرانی با توالی‌های به‌دست آمده از بانک ژن *NCBI* با استفاده از

از حیوانات تلف شده یا شاخ‌های تازه افتاده استحصال و به آزمایشگاه انتقال داده شد.

با توجه به تنوع نمونه‌ها روش‌های مختلفی برای استخراج *DNA* استفاده شد. لذا از کیت استخراج *Exgene* (شرکت *Gene all* کشور کره جنوبی)^۱ برای استخراج *DNA* از خون و از روش دستی (بایلس و همکاران ۲۰۰۷) برای استخراج *DNA* استخوان، بافت و مو استفاده گردید. پس از پایان کار استخراج، کمیت و کیفیت *DNA* استخراج شده، تعیین گردید. برای تعیین کیفیت و کمیت *DNA* از نانو دراپ (اسپکتروفتومتری) و نیز الکتروفورز نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۰.۸٪ استفاده شد.

تهیه پرایمرها و واکنش زنجیره‌ای پلیمران

جهت تکثیر ناحیه *D-Loop* از یک جفت آغازگر (پرایمر) که شامل پرایمر رفت 5'-AAGCCATAGCCCCACTATCAA-3' و پرایمر برگشت 5'-GTCCTGTGACCATTGACTGC-3' تصحیح شده بر اساس ژنوم مارال استفاده گردید (ناباتا و همکاران ۲۰۰۷). واکنش *PCR* با استفاده از کیت *Master PCR* (*Cinnagen, Iran*) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و مطابق دستورالعمل کیت، ۱.۲ میکرولیتر پرایمر رفت، ۱.۲ میکرولیتر پرایمر برگشت، ۲.۵ میکرولیتر *DNA*، ۱۲.۵ میکرولیتر مسترمیکس و ۷.۶ میکرولیتر آب مقطر استفاده شد. برنامه حرارتی برای تکثیر ژن به ترتیب، واسرشته‌سازی اولیه ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، واسرشته‌سازی ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر ۶۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، بسط آغازگر ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، تکرار مرحله ۲ الی ۴ (۳۳ مرتبه)، و بسط نهایی آغازگر ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمران بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد صورت گرفت. مقدار ۲۲ میکرولیتر از محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمران، خالص‌سازی شده

³-Genetic distance

¹ GeneAll® Exgene™ Blood SV mini

²-Macrogen Korea

نرم افزار MEGA 6.0 با رویه Find Best DNA/Protein و مدل Maximum likelihood و مدل Tamura- Nei به دلیل مناسب بودن این مدل استفاده شد.

بهترین مدل جایگزینی نوکلئوتید در نرم افزار MEGA 6.0 شناسایی برای رسم درخت های فیلوژنتیکی از روش

جدول ۱- توالی های مربوط به ناحیه D-Loop استخراج شده از NCBI و مارال ایرانی

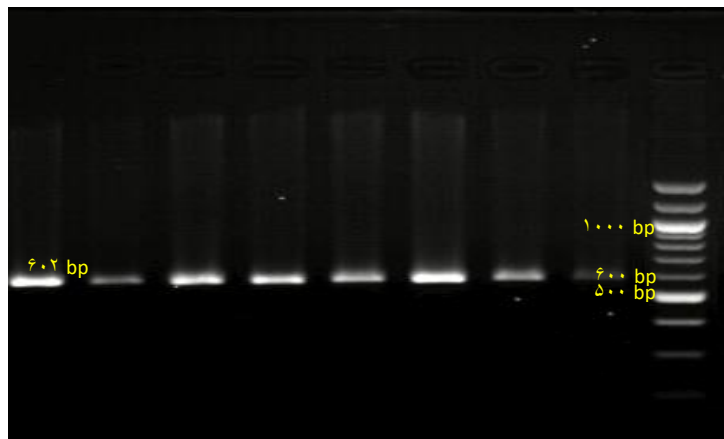
Table 1- The D-Loop region sequences extracted from NCBI and Iranian Maral

Acc. No.	N	Geographical origin	Common name	Species name
-	15	Iran- Arasbaran	Red deer	<i>Cervus elaphus maral</i>
-	5	Iran- Ziyaran	Red deer	<i>Cervus elaphus maral</i>
-	4	Iran- Gorog	Red deer	<i>Cervus elaphus maral</i>
-	6	Iran- Fandoglo	Red deer	<i>Cervus elaphus maral</i>
-	17	Iran- Semeskande	Red deer	<i>Cervus elaphus maral</i>
-	4	Iran- Noshaher	Red deer	<i>Cervus elaphus maral</i>
AB004300, AB004299	5	Japane	Sika deer	<i>Cervus nippon</i>
KX496940, KX496939, KX496937, KX496929, KX496927, KX494625, KX496923, KX496922, KX494618, KX496914, KX496912	22	Poland	Red deer	<i>C.elaphus elaphoid</i>
AM279273, AY854044, AY854042, AY860057,	8	China	Roe deer	<i>Capreolus pygargus</i>
KY564426, KY564431, KY564425, KY564427, KY564429	11	European	Fallow deer	<i>Cervus dama</i>
U12867, AB012385	6	USA	Red deer	<i>C.elaphus wapitoid</i>

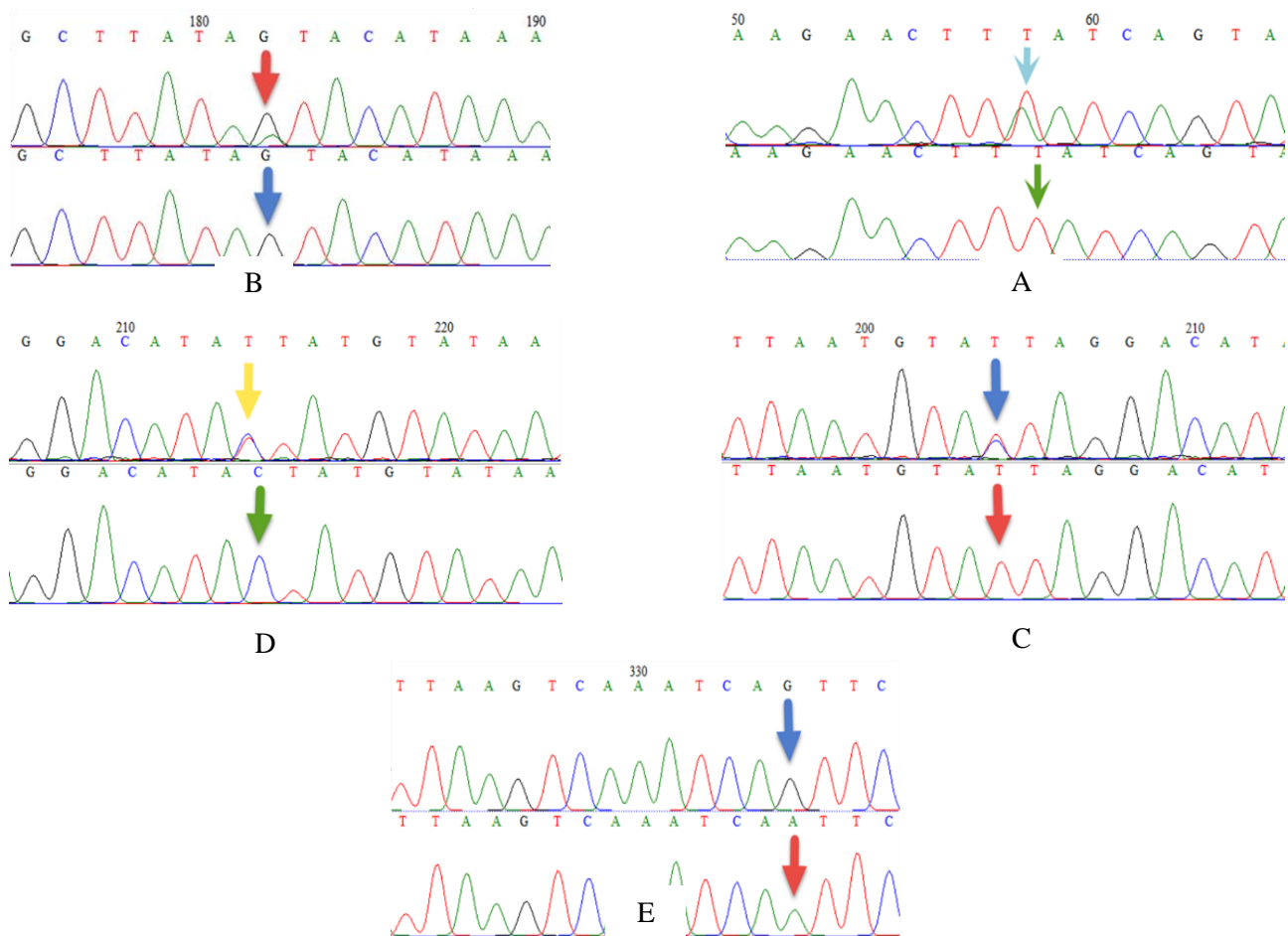
نتایج و بحث

داد که پرایمرهای استفاده شده به خوبی فعالیت نموده و قطعات اختصاصی برای ژن D-Loop به طول ۶۰۲ جفت باز تکثیر شدند. وجود یک باند اختصاصی نشان داد که توالی مشابهی برای جفت شدن آغازگرهای طراحی شده در محل های دیگر ژنوم وجود نداشته است (شکل ۱).

استخراج DNA تمامی نمونه ها با موفقیت انجام شد. نتایج طیف سنجی نشان داد که DNA استخراج شده از کیفیت مناسبی برخوردار است. الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره ای پلیمرز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد نشان



شکل ۱ - الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ژن‌های D-Loop
 Figure 1- Electrophoresis of the PCR products of the D-Loop gene



شکل ۲- جهش‌های نقطه‌ای و جانشینی در ناحیه D-Loop (الف) جهش نقطه‌ای در موقعیت ۵۸، (ب) در موقعیت ۱۸۲ (ج)، در موقعیت ۲۰۴، (د) در موقعیت ۲۱۴ و در موقعیت ۳۳۵

Figure 2- The SNPs in D-Loop region. A) the SNPs in position 58, B) in position 182, C) in position 204, D) in position 214 and E) in position 335

K با متوسط تفاوت‌های نوکلئوتیدی ۰/۴۹۱ برآورد شد، مقدار تنوع هاپلوتیپی نیز ۰/۲۱۸ به دست آمد. در این بررسی مقدار تست تاجما D برابر ۱/۵۶۴- بدست آمد که در سطح ۹۹٪ معنی‌دار بود. تاجما منفی نشان دهنده وجود هم‌خونی بین جمعیت‌های مورد مطالعه می‌باشد. فاصله ژنتیکی حاصل از آنالیز توالی‌های مربوط به جمعیت‌های مارال در پایین قطر جدول ۲ نشان داده شده است که بیشترین فاصله ژنتیکی مربوط به جمعیت‌های قرق با نوشهر (۰/۰۰۲۶۹) و کمترین فاصله ژنتیکی مربوط زیاران با جمعیت فندقلو و سمسکنده (صفر) است. بر مبنای رده‌بندی NCBI گونه‌هایی که به هم نزدیک هستند فاصله ژنتیکی برآورد شده برای آن‌ها پایین می‌باشد، در واقع نشان می‌دهد جمعیت زیاران به جمعیت فندقلو و سمسکنده نزدیک است. تمایز ژنتیکی بین جمعیت ارسباران با قرق کمترین مقدار (۰/۰۹۰۹-) را نشان می‌دهد که بیانگر نزدیکی این جمعیت‌ها بهم است. بیشترین تمایز ژنتیکی (۰/۴۰۰۰) بین جمعیت‌های سمسکنده با زیاران و نوشهر با فندقلو و سمسکنده می‌باشد که نشان دهنده تمایز این جمعیت‌ها از هم است. تمایز ژنتیکی حاصل از آنالیز توالی‌های مربوط به جمعیت‌های مارال در بالای قطر جدول ۲ نشان داده شده است.

تعیین توالی‌های مورد توافق^۱ یکی از روش‌های معمول جهت ثبت و شناسایی نژادهای مختلف می‌باشد. توالی‌های D-Loop به طول ۶۰۲ جفت باز به عنوان توالی شاخص در جمعیت‌های مورد مطالعه، تعیین گردید. نتایج توالی-یابی‌ها نشان داد که ناحیه D-Loop در موقعیت‌های بازهای ۵۸، ۱۸۲، ۲۰۴، ۲۱۴ و ۳۳۵ دارای چند شکلی می‌باشد (شکل ۲).

چندشکلی‌های مشاهده شده در دو جایگاه ۲۰۴ و ۲۱۴ مربوط به ناحیه D-Loop در هیچ مطالعه‌ی دیگری گزارش نشده است و آللهای اختصاصی جدید برای جمعیت مارال ایران به حساب می‌آیند. محققین به بررسی ناحیه D-Loop DNA میتوکندریایی هشت گونه از خانواده‌های گوزن‌سانان، گاوسانان و گرازها از جمله مارال، آهو، شوکا، جبیر، گوزن زرد ایرانی، گراز، پازن و قوچ پرداختند و به این نتیجه رسیدند که در طول ناحیه D-Loop میتوکندری در شوکا و مارال چندشکلی پایین بوده در حالی که سایر گونه‌های مورد مطالعه چندشکلی بالایی را نشان دادند (زمانی و همکاران ۲۰۱۴).

تعداد ۵ هاپلوتیپ از بین توالی‌های مورد بررسی ۷۸ مارال مربوط به ۶ جمعیت مورد بررسی تعیین شدند که ناشی از ۵ جایگاه پلی‌مورفیک بودند. تنوع نوکلئوتیدی در جمعیت‌های مارال با استفاده از نرم‌افزار *DnaSP* ۰/۰۰۰۷،

جدول ۲- تمایز ژنتیکی (بالای قطر) و فاصله ژنتیکی جمعیت‌های مارال ایرانی ناحیه D-Loop (پایین قطر)

Table 2- Genetic differentiation (diagonal up border) and genetic distance for Iranian Maral population in D-loop region (diagonal down border)

Noshaheer	Semeskande	Fandoglo	Gorog	Ziyaran	Arasbaran	F_{st} D_{xy}
0.2978	0	0	-0.0909	0	0	Arasbaran
0	0.4000	0	0	0	0.00032	Ziyaran
0.1176	0	0	0	0.00095	0.00016	Gorog
0.4000	0	0	0.00095	0	0.00032	Fandoglo
0.4000	0	0	0.00095	0	0.00032	Semeskande
0	0.00237	0.00237	0.00269	0.00232	0.00248	Noshaheer

¹ - Consensus

تفاوتی بین جمعیت‌های زیاران با سمسکنده، ارسباران با زیاران، و ارسباران با فندقلو وجود ندارد. بیشترین فاصله بین جمعیت سمسکنده با جمعیت نوشهر (۰/۱۵۳) می‌باشد. این بدین معنی می‌باشد که جمعیت نوشهر دارای تنوع ژنتیکی بالا می‌باشد. طول بین جمعیت سمسکنده با جمعیت فندقلو ۰/۰۵۷، طول بین جمعیت فندقلو با جمعیت قرق ۰/۰۸۷۴، طول قرق با ارسباران و قرق با زیاران ۰/۰۰۸۵، طول فندقلو با قرق ۰/۰۹۶ بود. جمعیت ارسباران، زیاران، سمسکنده و فندقلو از یک جمعیت منشا قرق نشأت گرفته‌اند. جمعیت نوشهر یک جمعیت مستقل از سایر جمعیت‌ها بود.

نتایج نشان داد که جمعیت‌های گوزن قرمز در مناطق مختلف چه از لحاظ جغرافیایی نزدیک و چه دور با فاصله‌های ژنتیکی مختلف، متفاوت و متمایز می‌باشد. به‌طور مثال، جمعیت نوشهر از نظر جغرافیایی نزدیک به جمعیت سمسکنده می‌باشد اما در فاصله ژنتیکی دورتری نسبت به سایر مناطق مورد بررسی باهم قرار دارند. نتایج این مطالعه نشان داد که در مجموع ۵ جمعیت از ۶ جمعیت مورد بررسی به لحاظ فیلوژنتیکی به یکدیگر نزدیک بوده و احتمالاً همگی از یک جمعیت منشا گرفته‌اند. همچنین جمعیت نوشهر در یک زیر گروه جداگانه قرار گرفتند. اگرچه انجام مطالعه در مقیاس وسیع و با تعداد نمونه بالا در حال حاضر مقدور نیست اما انجام تحقیق در مقیاس کوچک و انتخاب توالی بخش‌هایی از ژن که توالی آن‌ها در بانک ژن موجود بوده و مقایسه توالی‌های به‌دست آمده با آن‌ها می‌تواند به اطلاعات به‌دست آمده برای مارال ایران کمک نموده و زمینه را برای استفاده بهتر از آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی و حفاظت از ذخایر ژن‌های زنده فراهم آورد. در بررسی‌های مشابه نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل ۳۰ جمعیت گوزن قرمز کشور لهستان بر روی ناحیه D-Loop (۷۵۰ جفت باز) تعداد ۳۵۷ هاپلوטיפ، تنوع هاپلوטיפی ۳۵، فراوانی نوکلئوتیدی ۰/۹ بیان شد (بارویسکی و همکاران ۲۰۱۶) که در مقایسه با جمعیت‌های مارال داخل ایران تنوع بسیار بالاتری را نشان دادند.

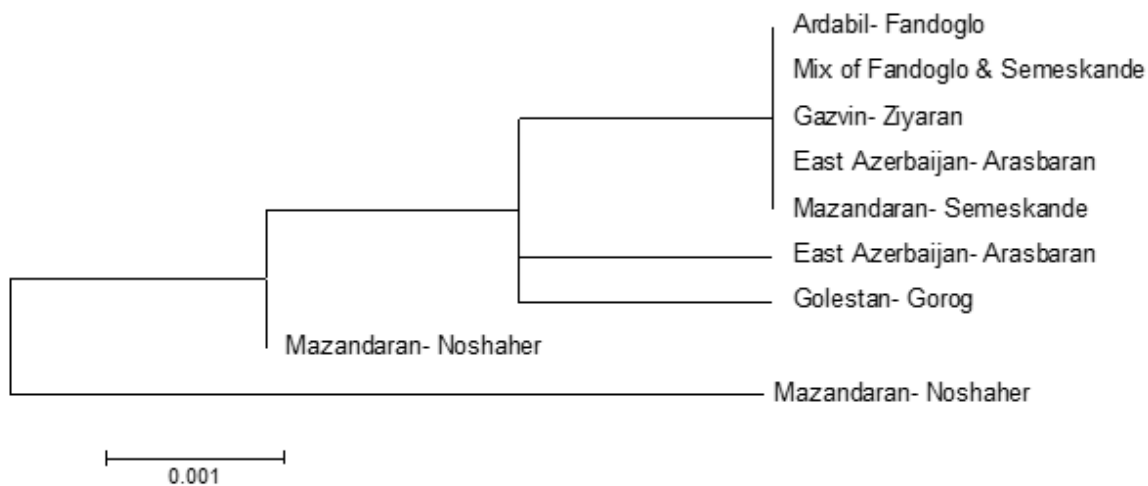
یکی از بهترین روش‌ها برای بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها تست تمایز بین نمونه‌هاست (ویارد و همکاران ۱۹۹۷). تحقیقات نشان می‌دهد که وجود اختلاف ژنتیکی در درون و همچنین ما بین جمعیت‌های مختلف تحت تاثیر عوامل مختلفی قرار دارد که عبارتند از تاریخچه مشترک، جریان ژنی حال و گذشته و همین‌طور فرایندهای مختص جمعیت مانند رانش ژنتیکی و انتخاب انطباقی (اپرسون ۲۰۰۳ و روست ۲۰۰۴).

مقایسه‌ی توالی‌های مورد مطالعه با توالی‌های ثبت شده در بانک ژن NCBI مشخص نمود که میزان همپوشانی بین توالی‌های مورد مطالعه و توالی‌های موجود در این پایگاه تا حد زیادی بالا می‌باشد. درخت فیلوژنتیکی با استفاده از ناحیه D-Loop در مارال در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج حاصل از بررسی درخت فیلوژنتیکی نشان می‌دهد که جمعیت مارال‌ها به دو شاخه اصلی تقسیم شده‌اند. شاخه اصلی اول شامل جمعیت نوشهر بوده و شاخه اصلی دوم خود به دو شاخه تقسیم شده که شاخه فرعی اول شامل جمعیت ارسباران، زیاران، سمسکنده، قرق و فندقلو و شاخه فرعی دوم شامل جمعیت نوشهر می‌باشد. جمعیت فندقلو، جمعیت آمیخته فندقلو و سمسکنده، زیاران، ارسباران و سمسکنده در یک شاخه فرعی و جمعیت ارسباران و جمعیت قرق در شاخه‌های فرعی دیگری ولی نزدیک بهم قرار دارند که این امر ممکن است به دلیل قرابت ژنتیکی بسیار نزدیک بهم این جمعیت‌ها باشند اما متفاوت با جمعیت نوشهر می‌باشند. فاصله بیشتر این جمعیت از سایر گروه‌ها احتمالاً نشان از تنوع بیشتر این گروه است. تعداد شاخه‌های بیشتر نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالا بین جمعیت‌ها است. با در نظر گرفتن این واقعیت که مارال‌های فندقلو با مارال‌های سمسکنده آمیخته شده است به نظر می‌رسد که درخت‌های فیلوژنتیکی ترسیم شده برای این گونه با استفاده از داده‌های ژنتیکی تصویر دقیقی از منشا ژنتیکی جمعیت‌های مختلف این گونه فراهم کند.

کاهش نسبت اندازه موثر جمعیت به اندازه جمعیت باشد (جوانروح ۲۰۰۲).

با توجه به اینکه مارال‌های ایرانی از زیر گروه *Servus elaphus Maral* می‌باشند، لذا مطالعه مارال ایرانی به عنوان شاخص از اهمیت خاصی برخوردار است. در بخش دیگر این مطالعه بررسی جایگاه D-Loop به منظور تعیین فاصله جمعیت‌های مارال ایرانی و سایر گوزن‌های دنیا صورت گرفت.

یکی از شاخص‌هایی که برای تعیین رابطه بین نژادهای مختلف مورد بررسی قرار می‌گیرد، تنوع نوکلئوتیدی می‌باشد. تنوع نوکلئوتیدی بین گروه‌های هاپلوטיפی مورد مطالعه در این پژوهش برای جایگاه D-Loop حدود ۰/۰۰۰۷ بود. تنوع ژنتیکی به وسیله انقراض جمعیت‌ها و فقدان تنوع در درون جمعیت‌های محدود از بین می‌رود؛ کم بودن میزان تنوع در جمعیت‌های مورد مطالعه ممکن است به دلیل کوچکی اندازه نمونه، کاهش فاصله نسلی و



شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی بر اساس ناحیه D-Loop جمعیت‌های مختلف مارال ایرانی

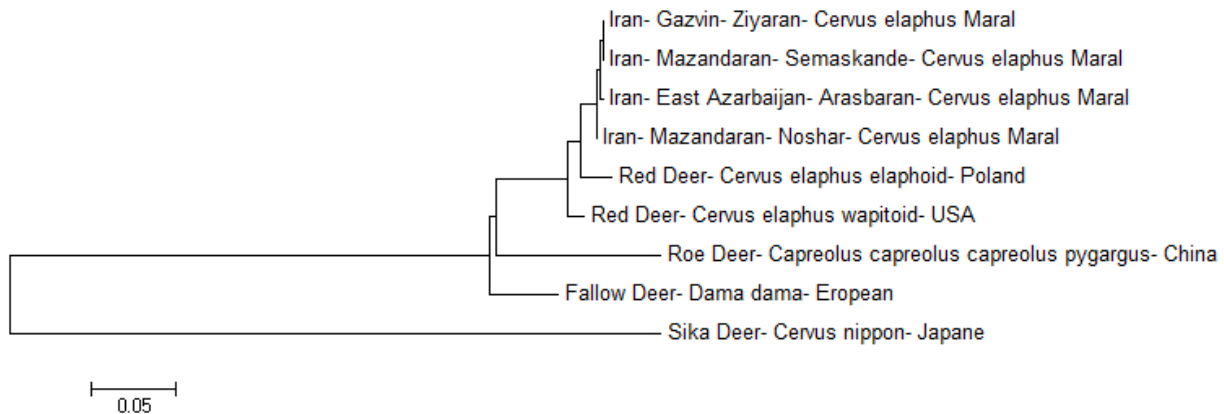
Figure 3- The phylogenetic tree based on D-Loop region of different Iranian Maral populations

و K یا متوسط تفاوت‌های نوکلئوتیدی ۵۹ برآورد شدند و مقدار تنوع هاپلوטיפی ۰/۹۳۹ به دست آمد. توالی‌های به دست آمده با استفاده از روش حداکثر درست‌نمایی و حذف کامل نوکلئوتیدی، بهترین مدل برای توصیف داده انتخاب شد که مدل کیمورا ۲ بهترین مدل توصیف کننده جایگزینی نوکلئوتیدی در بین گونه‌ها برای داده مورد نظر به دست آمد. درخت فیلوژنی برای ناحیه D-Loop با استفاده از نرم افزار *MEGA 6.0* مدل کیمورا ۲ و روش حداکثر درست‌نمایی در شکل ۵ نمایش داده شد. در این مطالعه گوزن قرمز، گوزن حنایی و گوزن زرد در یک شاخه اما هر کدام در گروه‌های جدا قرار گرفتند و شوکا یک شاخه‌ی جداگانه به خود اختصاص داد. در

در کل ۱۳۰ توالی (۵۲ توالی مربوط به داده‌های NCBI و ۷۸ توالی مربوط به نمونه‌های مارال ایران) مربوط به گوزن برای ناحیه D-Loop (جدول ۱) جهت تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک بین گونه‌ها از طریق پایگاه اطلاعاتی NCBI استحصال گردید.

تعداد ۹ هاپلوטיפ از بین توالی‌های مورد بررسی تعیین شدند که ۴۵ جایگاه پلی‌مورفیک بودند. در این بررسی مقدار تست تاجما D برابر ۱/۹۵- بود که در سطح ۹۵٪ معنی‌دار شد. تاجما D منفی نشان دهنده فراوانی پایین پلی- مورفیسیم مشاهده شده نسبت به انتظار است، که گسترش اندازه جمعیت بعد از باتلنک و یا انتخاب را بیان می‌کند. تنوع نوکلئوتیدی با استفاده از نرم‌افزار *DnaSP ۱۱.۰۶۹*

مطالعه حاضر کلیه گوزن‌های قرمز ایرانی مورد بررسی در یک گروه جداگانه از گوزن‌های قرمز اروپایی و آسیایی و امریکایی ولی در یک شاخه قرار دارند.

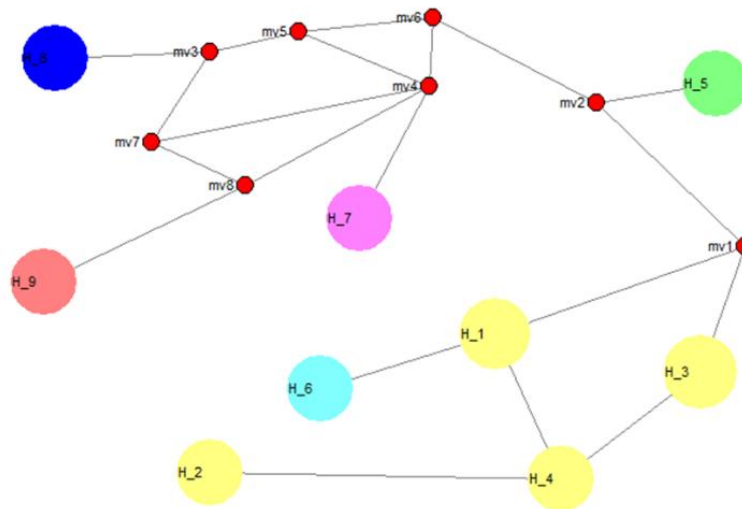


شکل ۵- درخت فیلوژنی ناحیه D-Loop گوزن‌های دنیا

Figure 5- The phylogenetic trees for the D-Loop region of the world deers

مربوط به جمعیت‌های زیاران، فندقلو و سمسکنده و هاپلوتیپ ۴ (زرد) مربوط به جمعیت قرق می‌باشد. هاپلوتیپ ۵ (سبز) مربوط به گوزن قرمز آمریکایی، هاپلوتیپ ۶ (آبی) مربوط به گوزن قرمز لهستان، هاپلوتیپ ۷ (بنفش) مربوط به گوزن حنایی چین، هاپلوتیپ ۸ (آبی تیره) مربوط به گوزن زرد اروپایی و در نهایت هاپلوتیپ ۹ (قرمز) مربوط به شوکای ژاپن می‌باشد (شکل ۶).

شبکه روابط هاپلوتیپی در گونه‌های مختلف گوزن با استفاده از نرم افزار *NetWork* ترسیم گردید به طوری که ۹ هاپلوتیپ مختلف با تنوع هاپلوتیپی ۰/۹۳۹ در گونه‌های مورد مطالعه تشخیص داده شد. بررسی تنوع هاپلوتیپی نشان داد که در داخل گونه‌های گوزن قرمز، گوزن زرد، گوزن حنایی، شوکا و گوزن قرمز ایرانی ۱۲ هاپلوتیپ مشاهده شد که ۴ هاپلوتیپ مربوط به مارال ایرانی بود. هاپلوتیپ ۱ (زرد) مربوط به جمعیت نوشهر، هاپلوتیپ ۲ (زرد) مربوط به جمعیت ارسباران، هاپلوتیپ ۳ (زرد)



شکل ۶- آنالیز شبکه‌ای هاپلوتیپی گونه‌های مختلف گوزن با استفاده از ناحیه D-Loop
Figure 6- Analysis of haplotype network of different deer species using D-Loop area

حوضه کارپات یک هاپلوگروه مشترک بین گوزن‌های قرمز جزیره ایبری و بالکان وجود دارد (فرانک و همکاران ۲۰۱۷).

با توجه به کاهش تنوع ژنتیکی و نیز تاریخچه جمعیت‌های مارال ایرانی به نظر می‌رسد که شش جمعیت مارال مورد بررسی احتمالاً تجربه باتل‌نک را پشت سر گذاشته است و همچنین در بین جمعیت‌ها درصد همخونی بالاست بنابراین 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 تعداد معدودی از یک جمعیت به زیستگاه‌های مختلف در گذشته و حال بر ساختار ژنتیکی فضایی جمعیت مارال ایرانی موثر بوده و نقش عمده‌ای بازی کرده است. بیشترین تشابه بین جمعیت‌های گوزن در مطالعه ژاو و همکاران (۲۰۱۷) مشاهده شد که توالی کامل ژنوم میتوکندریایی در ناحیه D-Loop گوزن سیهوان (*Cervus* و جنوب شرقی تبت بررسی نمود. آنها با تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک به نتایج با ارزش در زمینه مطالعه ژنتیک و

نکته قابل توجه در این آنالیز قرار گرفتن گوزن قرمز لهستان در کلاستر مارال ایران و در مجاورت گوزن نوشهر بود. گوزن قرمز امریکایی با فاصله نسبت به گوزن‌های ایران قرار گرفت و سایر گونه‌های گوزن از جمله گوزن حنایی چین، گوزن زرد اروپایی و شوکای ژاپن طبق انتظار کلاسترهای جداگانه‌ای را تشکیل دادند. در ارتباط با نزدیکی مشاهده شده بین گوزن قرمز لهستان و نمونه مربوط به ناحیه نوشهر احتمال انتقال نمونه‌هایی از سایر کشورها وجود دارد اگر چه شواهد تاریخی برای آن پیدا نشد. مشابه با نتایج این تحقیق، بارویسکی و همکاران (۲۰۱۶) نیز که توالی‌های کامل ناحیه D-Loop مربوط به ۳۰ جمعیت گوزن قرمز در مناطق مختلف لهستان بررسی نمودند، ارتباط گوزن‌های قرمز غربی و جنوب شرقی در این گونه را تایید و حضور یک هاپلوتیپ مشترک را ثابت کردند. البته در آن تحقیق هم اشاره‌ای به ارتباط گوزن قرمز لهستان و ایران نشد. بعلاوه در یک پژوهش دیگر که ۹۶ توالی کامل ناحیه D-Loop بررسی و ساختار ژنتیکی گوزن‌های قرمز حوضه کارپات انجام شد علی‌رغم کشف ۳۹ هاپلوتیپ و سطح تنوع هاپلوتیپی بالا به این نتیجه رسیدند که مطابق با پیش فرض‌های قبلی

میتوکندریایی از توان بالایی در تعیین روابط فیلوژنتیک در بخش حیات‌وحش و بخصوص در جمعیت‌های مارال برخوردار است. نتایج مطالعه حاضر بیانگر مستقل و متمایز بودن جمعیت مارال‌های نوشهر از سایر جمعیت‌های مارال ایرانی می‌باشد. این موضوع خود عامل تنوع ژنتیکی بالا در جمعیت نوشهر می‌باشد. در واقع دو گروه متمایز در بین جمعیت‌های مورد بررسی تشخیص داده شد که شامل جمعیت‌های نوشهر و سایر جمعیت‌های مارال ایران از جمله، ارسباران، زیاران، قرق، فندقلو و سمسکنده می‌باشند. علی‌رغم انتقال تعدادی از مارال‌های سایت فندقلو به سایت سمسکنده، درصد بالایی از همخونی در میان جمعیت مارال‌های سمسکنده مشاهده شده است. میزان تنوع ژنتیکی بالاتر در جمعیت مارال‌های نوشهر در مقایسه با سایر جمعیت‌های مارال بیانگر آن است که محیط‌های جنگلی و باز می‌تواند به حفظ تنوع ژنتیکی گونه‌ها کمک نماید. در حالی‌که نگهداری مارال‌ها در سایت‌های حفاظت شده اگر چه موجب افزایش زاد و ولد می‌گردد ولی میزان تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها را کاهش داده است. با توجه به این‌که میزان تنوع ژنتیکی در بین جمعیت‌ها نسبتاً پایین است، لذا ضرورت دارد برای احیاء جمعیت‌های دارای ضریب همخونی بالا، مارال‌هایی از جمعیت‌های جنگلی و آزاد مانند نوشهر به سایت‌های حفاظت شده منتقل و با پلاک‌زنی تمام مارال‌ها بخصوص نرها، در سایت‌های بسته، از احتمال وقوع آمیزش خویشاوندی در نسل‌های متوالی جلوگیری شوند. برای جلوگیری از رانش ژنتیکی و کاهش آمیزش‌های خویشاوندی در سایت‌های مارال و به‌طبع کاهش همخونی از تعداد بیشتری از نرهای جوان استفاده شوند و تنوع ژنتیکی در برنامه‌ریزی و مدیریت بازسازی ذخایر و حفظ فراوانی جمعیت‌های مختلف مارال ایرانی به‌عنوان یک دستورالعمل کاربردی لحاظ شود. طبیعتاً حفظ جریان ژنی بین جمعیت‌ها کمک بزرگی در این راستا خواهد بود.

حفاظت از گوزن قرمز و روابط تکاملی گونه‌ها دست یافتند. نتایج پژوهش حاضر نشان داد گوزن‌های قرمز این منطقه یک دسته از گونه‌های دیگر گوزن قرمز را شامل می‌شود. اگرچه به نظر می‌رسد جمعیت نوشهر فشار کمتری را در این زمینه تجربه کرده باشد. بنابراین و در پرتو نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل هاپلوتیپ‌ها، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که وقفه در جریان ژن احتمالاً به دلیل انتقال گوزن‌های قرمز یک جمعیت به سایر زیستگاه‌ها در گذشته باشد. شباهت ژنتیکی قابل توجهی در میان پنج زیر جمعیت از شش زیر جمعیت گوزن قرمز مورد بررسی در مطالعه حاضر مشاهده شد. این تحقیق نشان داد که هیچ ارتباط معنی‌داری بین فاصله جغرافیایی میان زیر جمعیت‌ها وجود ندارد.

نتیجه‌گیری کلی

تعداد پنج هاپلوتیپی که در این بررسی مشاهده شدند نشان از وجود پلی‌مورفیسم در ناحیه D-Loop و تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های مارال ایرانی برای جایگاه ژنی است. نکته قابل توجه وجود تنوع ژنتیکی بالاتر در ناحیه D-Loop در جمعیت‌های ارسباران و نوشهر نسبت به سایر جمعیت‌ها بوده و جمعیت‌های قرق هم‌چنان تنوع ژنتیکی کمتری نسبت به سایر جمعیت‌ها نشان داد. این امر احتمالاً می‌تواند مربوط به شرایط محیطی بسته و وجود تعداد محدود نر غالب در هر جمعیت، و در نتیجه تولد گوساله‌های کمتر و همچنین شکار غیر قانونی و بدون برنامه در جمعیت‌های آزاد و مهاجرت به بیرون در جمعیت‌های حفاظت شده باشد.

نتایج حاصل از توالی‌یابی در بین جمعیت‌های ایرانی برای ناحیه D-Loop باعث شناسایی جهش‌هایی گردید که خود منجر به ایجاد ۵ هاپلوتیپ، ۰/۰۰۰۷ تنوع نوکلئوتیدی و ۰/۲۱۸ تنوع هاپلوتیپی در جمعیت‌های مورد مطالعه شد. همچنین نتایج بررسی حاضر نشان داد که ناحیه D-Loop

منابع مورد استفاده

- Alijani S, 2009. Tracking major genes in farm animals using business statistics and molecular markers, PhD thesis. Karaj Faculty of Agriculture. University of Tehran.
- Alinaghizadeh H, Mohammad Abadi MR and Zakizadeh S, 2010. Exon 2 of BMP15 gene polymorphism in Jabal Barez Red Goat. *Journal of Agricultural Biotechnology* 2: 69-80.
- Amills M, Capote J, Tomas A, Kelly L and Obexer-Ruff G, 2004. Strong phylogeographic relationships among three goat breeds from the Canary Islands. *Journal of Dairy Research* 71(3):257-262.
- Anderson SAT, Bankier G, Barrell M, De Bruijn A, Coulson J, Drouin I, Nierlich B, Roe F, Sanger PH and Young IG, 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290:457-465.
- Azor PJ, Monteagudo LV, Luque M, Tejedor MT and Rodero E, 2005. Phylogenetic relationships among Spanish goats breeds. *Animal Genetics* 36(5): 423-425.
- Bailes SM, Devers JJ, Kirby JD and Rhoads DD, 2007. An Inexpensive, Simple Protocol for DNA Isolation from Blood for High-Throughput Genotyping by Polymerase Chain Reaction or Restriction Endonuclease Digestion. *Poultry Science* 86:102-106.
- Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jenzen CL, WertheimVan Dillen PME and Van Der Noordaa J, 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology* 28(3): 495-503.
- Boore JL, 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research* 27:1767-1780.
- Borowski Z, Wisłocka M, Matosiuk P, Mirski K, Krysiuk M, Czajkowska A and Borkowska M, 2016. Purifying Selection, Density Blocking and Unnoticed Mitochondrial DNA Diversity in the Red Deer, *Cervus elaphus*. *The Journal of Animal and Plant Sciences* 119: 163-191.
- Cavalli-Sforza, LL and Feldman MW, 2003. The application of molecular genetics approaches to the study of human evolution. *Nature and Genetics* 33: 266-275.
- Bruford M, Bradley D and Luikart G, 2003. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nature Reviews Genetics* 3: 900-910.
- Colgan S, O'Brien L, Maher M, Shilton N, McDonnell K and Ward S, 2001. Development of a DNA-based assay for species identification in meat and bone meal. *Journal of Food Research* 34: 409-414.
- Colombo F, Marchisio E, Pizzini A and Cantoni C, 2002. Identification of the goose species (*Anser anser*) in Italian mortara salami by DNA sequencing and a polymerase chain reaction with an original primer pair. *Journal of Materials Science* 61:261-294.
- Conrad AM and Davis SK, 2001. Molecular Insights into the Evolution of the Family Bovidae: A Nuclear DNA Perspective. *Journal Molecular Biology Evolution* 18:1220-1230.
- Ettore Randi NM, Françoise CH, Amélie B and Emmanuel JP, 2000. A mitochondrial DNA control region phylogeny of the Cervinae, Speciation in *Cervus* and implications for conservation. *Animal Conservation the Zoological Society of London*, Vol. 4, pp. 10.
- Epperson BK, 2003. *Geographical Genetics*. Princeton: Princeton University Press.
- Frank KN, Bleier B, Toth L, Suger P, Horn E, Barta L and Orosz V, 2017. The presence of Balkan and Iberian red deer (*Cervus elaphus*) mitochondrial DNA lineages in the Carpathian Basin. *Mammalian Biology - Zeitschrift für Säugetierkunde* 86: 48-55.
- Geist V, 1991. Bones of contention revisited: did antlers enlarge with sexual selection as a consequence of neonatal security strategies? *Applied Animal Behaviour Science* 29: 453-469.
- Geist V, 1999. *Deer of the World. Their Evolution, Behaviour and Ecology*. Swan Hill Press, UK.
- Ghovvati S, Nassiri MR, Mirhoseini SZ, Moussavi AH and Javadmanesh A, 2009. Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay. *Food Control* 20: 696-699.
- Groves T, Katis P, Madden Z, Manickam K, Ramsdem D, Wu G and Guidos CJ, 1995. In vitro maturation of clonal CD4+CD8+ cell lines in response to TCR engagement. *Journal of Immunology* 154: 5011-5022.

- Haghi H, Malekian M, Montazami S, Khordazadeh P and Goshtasib Miogony H, 2012. Determination of genetic purity of Iranian yellow deer populations. The 17th National Congress and the 5th International Congress on Biology of Iran.
- Hiendleder S, Lewalski H, Wassmuth R and Janke A, 1998. The complete mitochondrial DNA sequence of the domestic sheep (*Ovis aries*) and comparison with the other major ovine haplotype. *Journal Molecular Evolution* 47: 441-448.
- Hiendleder S, Mainz K, Plante Y and Lewalski H, 1998. Analysis of mtDNA indicate that domestic sheep are derived from two different ancestral maternal sources: no evidence for contribution from urial and argali sheep. *Journal Heredity* 89: 113-120.
- Hiendleder S, Kaupe B and Janke A, 2008. Complete mitochondrial genomes of *Bos taurus* and *Bos indicus* provide new insights into intraspecies variation, taxonomy and domestication. *Cytogenet. Genome Research* 120: 150-156.
- Hmwe SS, Zachos FE, Eckert I, Lorenzini R, Fico R and Hartl GB, 2006. Conservation genetics of the endangered red deer from Sardinia and Mesola with further remarks on the phylogeography of *Cervus elaphus corsicanus*. *Biological Journal of the Linnean Society* 88: 691-701.
- Javanroh Ali Abad A, 2002. Genetic Diversity Evaluation of Six Native Iranian Goat Lumps Using RAPD Marker. Master's Degree in Animal Science Karaj Agricultural College. Tehran University p.74.
- Jazin E, Soodyall H, Jalonen P, Lindholm E, Stoneking M and Gyllensten U, 1998. Mitochondrial mutation rate revisited: hot spots and polymorphism. *Nature Genetics* 18: 109-110.
- Kiabi BH, Zehzad B, Darreh Shouri BF, Majnoonian H and Meigouni HG, 1994. Golestan National Park [in Farsi]. – Department of the Environment. Tehran, 204 pp.
- Kiabi BH, Salmann Mahini A, Rezaie HR and Mir Karimi SH, 1997. A model for Habitat Evaluation (Wildlife habitat evaluation in GNP) [in Persian]. Department of Environment and Gorgan University, 295 pp.
- Kim KH and Lee JH, 2002. Phylogenetic relationships of Asian and European Pig breeds determined by mitochondrial DNA D-LOOP sequence polymorphism. *Journal of Animal Genetics* 33:19-25.
- Kitano T, Umetsu KS, Lockley AK and Osawa M, 2007. Two universal primer sets for species identification among vertebrates. *International Journal of Legal Medicine* 121. 5: 16-20.
- Lorenzini R and Garofalo L, 2015. Insights into the evolutionary history of *Cervus* (Cervidae, tribe Cervini) based on Bayesian analysis of mitochondrial marker sequences, with first indications for a new species. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 53: 340-349.
- Ludt CJ, Schroeder W, Rottmann O and Kuehn R, 2004. Mitochondrial DNA phylogeography of red deer (*Cervus elaphus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 31: 1064-1083.
- Lundrigan T, Reist JD and Ferguson M, 2005. Microsatellite genetic variation within and among Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) from aquaculture and natural populations in North America. *Aquaculture* 244: 63-75.
- Manjunath B, Paramod K and Rout K, 2003. Phylogeography and origin of Indian domestic goats. *Journal Molecular Biology Evolution* 21: 223-233.
- Mannen H, Kohno M, Nagata Y, Tsuji S and Bradley DG, 2004. Independent mitochondrial origin and historical genetic differentiation in North Eastern Asian cattle. *Journal Molecular Phylogenetic Evolution* 32: 539-544.
- Nabata K, Kaji K, Nagata J and Masuda R, 2007. Genetic structure changes of expanding sika deer (*Cervus nippon*) populations in central and western Hokkaido, revealed by mitochondrial DNA analysis. *Mammal Study* 33: 17-22.
- Naderi S, Rezaei HR, Taberlet P, Zundel S, Rafat SA, Naghash HR, el-Barody MA, Ertugrul O, Pompanon F and Econogene C, 2007. Large-Scale Mitochondrial DNA Analysis of the Domestic Goat Reveals Six Haplogroups with High Diversity. *Plos One* 10:1-10.
- Natonek-Wisniewska MN, Slota E and Kalisz B, 2010. Use of cytochrome b polymorphism for species identification biological material derived from cattle, sheep, goat, deer and red deer. *Folia biologica* 58: 47-50.

- Rousset F, 2004. Genetic Structure and Selection in Subdivided Populations. Princeton: Princeton University Press.
- Saccone E, 1991, Commento a Zen: saggio sul testo di Svevo. Mulino- Bologna.
- Tajima F, 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* 85: 3514-3517.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S, 2007. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA). Center of Evolutionary Functional Genomics Biodesign Institute. Arizona State University. 229p.
- Teletchea F, Maudet C and Hanni C, 2005. Food and forensic molecular identification: update and challenges. *Trends Biotechnol* 23: 359-366.
- Trense W, 1989. The Big Game of the World. Paul Parey. Hamburg. Vrba A, Schaller GB, 2000. Antelopes, Deer, and Relatives. Fossil Record, Behavioral Ecology, Systematics and Conservation. Yale University Press.
- Viard F, Justy F, Jarne P, 1997. Population dynamics inferred from temporal variation at microsatellite loci in the selfing snail *Bulinus truncatus*. *Genetics* 14: 6973-6982.
- Whitehead GK, 1972. The Deer of the World. Constable, London. Kiabi BH, 1978. Ecology and management of Maral (*Cervus elaphus maral*) in Northern Iran. 1976-78. Ph.D. Dissertation, Michigan State University, 83.
- Xin C, Chen H, Lei C, Wang S, Xue K and Zhang B, 2007. mtDNA diversity and genetic lineages of eighteen cattle breeds from *Bos taurus* and *Bos indicus* in China. *Genetica* 131: 175-183.
- Yuasa T, Nagata J, Hamasaki S, Tsuruga H, Furubayashi K, 2006. The impact of habitat fragmentation on genetic structure of the Japanese sika deer (*Cervus nippon*) in southern Kantoh, revealed by mitochondrial D-loop sequences. *Ecological Research*, 22: 97-103.
- Zamani V, Rezaei HR, Baziyan S, Aghili SM, Shabani A, Asadi Aghbaghaghi M, Zamani N, 2014. Molecular Approach for Identification of Couple Based on Multidrug-Regulated Mitochondrial Polymorphism. *Journal of Agricultural Biotechnology* pp. 73-63.
- Zhao Q, Xu H, Li D, 2017. Complete mitochondrial genome and phylogenetic analysis of Sichuan deer (*Cervus elaphus macneilli*). *Conservation Genetic Resources* 10: 431-435.

Using D-Loop region to study the genetic structure and phylogenetic analysis of Iranian red deer

L Aghazadeh¹, S Nikbin^{2*}, F Mirzaei-Aghjeheshlagh³, N Hedaiat-Evrigh³

Received: July 21, 2018

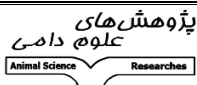

Accepted: September 11, 2019

¹ MSc Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh, Ardabili, Iran

² Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh, Ardabili, Iran

³ Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh, Ardabili, Iran

*Corresponding author: Email: snikbin@uma.ac.ir

	Journal of Animal Science/vol.29 No.4/ 2020/pp 17-33 https://animalscience.tabrizu.ac.ir	
© 2009 Copyright by Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran. This is an open access article under the CC BY license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0)		

Introduction: The breeds and subpopulations of any species, which are the result of mutation processes, genetic drift, natural selection and gene-environment interactions, are very precious. They have been inherited down to the present generation, and their preservation is of great value and importance (Alijani, 2009). Genetic analysis of wild populations is essential for conserving biodiversity, increasing knowledge about the survival of these species, and finding the factors that threaten or contribute to the survival of these populations. The red deer is one of the biggest free-ranging mammals of central Europe and as it is not endangered in terms of population numbers, is the perfect model for studying the genetic population effects of a multitude of deliberate and unintentional anthropogenic influences on natural populations over a long period of time (Kiabi et al, 1998). Red deer gene pools are affected by habitat fragmentation, keeping of populations in enclosures, translocations, (re)introductions, and trophy hunting (Bruford et al, 2003). Various schedules of population regulation by hunting are applied throughout Europe. Many autochthonous stocks have been hybridized with the introduced animals, thus blurring the historical boundaries between formerly natural populations (Hiendleder et al, 1998). The objectives of the present studies were to gain insight into phylogeographic history; to characterize and quantify the genetic diversity within and among populations to implement conservation and management strategies, and to compare different molecular marker systems with regard to their respective resolution power (Cavalli –Sforza, 2003). For this purpose, a research program was designed to characterize populations of Iranian red deer (*Cervus elaphus*), using the mitochondrial control region (CR). In order to understand the origin, phylogeny, and phylogeography of the species *C. elaphus*, the DNA sequence variation of the mitochondrial D-loop gene of five populations of deer was examined from the entire distribution area of Cervinae with an emphasis on Iran. Several methods, including maximum parsimony, maximum likelihood, and nested clade analysis revealed that red deer originated from the area between Noshahr and other populations. The mitochondrial DNA (mtDNA) data do not support the traditional classification of red deer as only one species nor its division into numerous subspecies. The discrepancies between the geographical pattern of differentiation based on mtDNA D-loop and the existing specific and sub-specific taxonomy based on morphology are discussed. The present study was carried out to identify the existing gene pool, study the relationship and genetic variation of the Maral (Caspian red deer, *C. elaphus*) using the D-loop sequence data from the mitochondrial genome.

Material and methods: Blood, hair or tissue samples were taken from 78 Maral and their DNA was extracted. Sampling was carried out in coordination with Environmental and Wildlife Organization of the provinces of Ardebil, East Azarbaijan, Qazvin, Golestan and Mazandaran, as well as the Museum of Natural Resources and the reserves of the Gene Bank of Tehran. Blood samples were taken from those animals that were captured for population health check or treatments to use fumigant drugs and pneumatic gun in vacuum tubes contained EDTA. Hair samples were also taken directly from live animals and other tissue samples were provided from dead animals which newly dehorned. The D-loop region of the mitochondrial genome was amplified using specific primers with PCR and all PCR products were sequenced. A total of 130 sequences of D-Loop region from deer species (52 sequences from NCBI and 78 sequences from Maral populations were studied) were used for bioinformatics analysis between the species. The sequences were aligned and compared using BioEdit software to find nucleotide diversity. Using Mega software, a phylogenetic tree was drawn. Haplotypes and genetic diversity parameters including nucleotide diversity, haplotype diversity, genetic distance, genetic differentiation, nucleotide frequency, etc., were performed using the DnaSP 5.10 software. DnaSP software was used to analyze the genetic data of the population, haplotypes and genetic diversity parameters, specific alleles, Rst, Fst values, and genetic distances of the 6-population hierarchy including Arasbaran, Ziaran, Semeskandeh, Fandoghlu, Ghorgh, Noshahr. Finally, NETWORK software applied to analyze the network to identify haplotypes.

Results and discussion: The results of Maral sequence analysis using DnaSP software led to the identification of mutations that resulted in the creation of 5 haplotypes for the D-loop region. The haplotype diversity, nucleotide diversity and mean nucleotide difference for the D-loop region were 0.218, 0.0007 and 0.491, respectively. The negative and significant Tajima D test result demonstrated an inbreeding among the populations. Results showed that the Noshahr population was in highest genetic distance from other populations. The genetic distance estimated for other populations were low. The phylogenetic tree using the D-Loop region showed that the Maral's populations is divided into two main branches. The main branch of the first consists of the population of Noshahr and its second main branch is divided into two branches, the first branch of which is Arasbaran, Ziaran, Semaskand, Gorgan, and Fandoghlo, and the second branch of the population is Noshahr. It revealed that there were a close relationship among Arasbaran, Ziaran, Semaskand, Gorgan and Fandoghlo populations, while Noshahr population showed a higher diversity. The genetic diversity indices showed that the 6 investigated populations of Maral have probably experienced a bottleneck (Yuasa et al, 2006). Results of analysis D-loop sequences of Maral and other deer species showed that red deer, fawn deer and yellow deer were in a branch, but each was in separate groups, and Shoka was a separate branch. In this study, all Iranian Maral in a separate group of European, Asian and American red deer placed in one branch (Zamani, 2014). Placement of Polish red deer in the Maral Cluster, in network analysis, was an interesting result (Lorenzini, 2015); however, no historical evidence was found to support this result.

Conclusion: In conclusion, the recent fluctuations in population size and interruption in the gene flow are due to the past geographical transfer of red deer from a population to other habitats. A high risk of inbreeding was observed in Maral populations. Therefore, for conserving the populations, it is necessary to consider a program for introducing new blood from other populations and increasing their genetic diversity.

Keywords: Biodiversity, Phylogeny tree, Maral, D-Loop, mtDNA