13 (2) 35-40, Summer 2021

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

Sex determination in Red deer (*Ceruvus elaphus maral*); suitable method for estimating the effective population size for genetic conservation programs in the country habitats

Javad Ghahari [1], Davood Radmehr [2], Shirin Mahmoodi [3*]

[1] General Department of Environmental Protection of East Azerbaijan, Tabriz, Iran
[2] Veterinary Pharmacy, Tabriz, Iran
[3] Department of Environment, Faculty of Natural Resources and Environment, University of Tehran, Karaj, Iran

Key Words

Arasbaran
Red Deer
sex determination

Abstract

Introduction: Unfortunately, due to the small population size and isolation of red deer (*Cervus elaphus*) in protected area-Arasbaran-Aynalu, there are inbreeding and the highly rate of bottleneck. For this purpose, the objective of this study was access and optimization techniques for Sex determination in Red deer (*Ceruvus elaphus*); suitable method for estimating the effective population size for genetic conservation programs in Arasbaran and the country habitats.

Materials & Methods: For this purpose, bleeding in deer, taken from jugular vein and tail vein after anesthesia, blood samples in tubes containing EDTA vacuum with ice -4^{0c} to the gen bank of Department of East Azerbaijan was transferred. Duplex PCR using primers based on the chromosome (Y) in accordance with the sex-determining gene DEAD-box Y-linked protein (DBY) simultaneously used with BMC1009 locus were amplified as an internal control per each reaction.

Result: The results are reliable, there are two bands 280-310 (polymorphic band) and 180 base pairs (bp) in male deer and 280-310 (polymorphic band) base pairs (bp) in female deer showed. To confirm this, residual PCR products was applied for sequencing.

Conclusion: Genotyping results showed that 8 females and 15 males were identified as indicators of effective population size 4, respectively.

* Corresponding Author's email: shirin.mahmoodi@ut.ac.ir

Received: 2 June 2020; Reviewed: 20 August 2020; Revised: 14 September 2020; Accepted: 19 October 2020
(DOI): 10.22034/aej.2020.135241

مقاله پژوهشی

تعیین جنسیت گوزن قرمز (زیرگونه مرال) با استفاده از تکنیک Duplex PCR به‌عنوان، روشی مناسب برای تخمین اندازه مؤثر جمعیت، جهت طراحی برنامه‌های حفاظت ژنتیکی آن در زیستگاه‌های کشور

*جواد قهاری[۱]، داود رادمهر[۲]، شیرین محمودی[۳]**

[۱] اداره کل حفاظت محیط زیست آذربایجان‌شرقی، تبریز، ایران

[۲] داروخانه دامپزشکی، تبریز، ایران

[۳] گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه تهران، کرج، ایران

کلمات کلیدی

ارسباران
گوزن قرمز
تعیین جنسیت

چکیده

مقدمه: به‌علت اندازه کوچک جمعیت و ایزوله‌شدن گوزن قرمز زیرگونه مرال (*Cervus elaphus*) در منطقه حفاظت شده ارسباران–آینالو، مقدار هم‌خونی بالاست. کنترل جنسیت جهت حفظ اندازه مؤثر جمعیت در حد مناسب، امکان ایجاد هم‌خونی را کاهش می‌دهد. هدف از تحقیق حاضر، دستیابی و بهینه‌سازی تکنیک تعیین جنسیت در گوزن مرال به‌عنوان روشی مناسب برای تخمین اندازه مؤثر جمعیت و حفاظت ژنتیکی آن در ارسباران و زیستگاه‌های کشور می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه نمونه خون از ورید وداجی و ورید دمی گوزن‌ها به‌مقدار ۵ سی‌سی در داخل لوله‌های حاوی خلأ و EDTA تهیه و به بانک ژن اداره کل حفاظت محیط زیست آذربایجان‌شرقی منتقل گردید. روش Duplex PCR بر طبق آغازگرهای کروموزوم (Y) تعیین جنسیت منطبق با ژن DEAD-box Y-linked protein (DBY) جایگاه ریزماهوارک BMC1009 به‌عنوان کنترل داخلی تکثیر شد. پس از دستیابی به شرایط بهینه تکنیک و تأیید جنسیت نمونه‌های با جنسیت معلوم از پیش تعیین شده، بار دیگر اقدام به جمع‌آوری مدفوع و استخراج DNA از نمونه‌های با جنسیت مجهول و تعیین جنسیت آن‌ها گردید.

نتایج: نتایج این تحقیق با تکرارپذیری بالا، وجود دو باند ۳۱۰–۲۸۰ (ریزماهوارک پلی‌مورف) و ۱۸۰ جفت باز (bp) در گوزن‌های نر و ۳۱۰–۲۸۰ (ریزماهوارک پلی‌مورف) جفت باز (bp) در گوزن‌های ماده را نشان داد.

نتیجه‌گیری و بحث: نتایج ژنوتایپینگ نشان داد که تعداد ۸ ماده و ۱۵ نر شناسایی شد و شاخص اندازه مؤثر جمعیت (٤) محاسبه گردید.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: shirin.mahmoodi@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳ خرداد ۱۳۹۹؛ تاریخ داوری: ۳۰ مرداد ۱۳۹۹؛ تاریخ اصلاح: ۲٤ شهریور ۱۳۹۹؛ تاریخ پذیرش: ۲۸ مهر ۱۳۹۹
(DOI): 10.22034/aej.2021.135241

مقدمه

پیشرفت‌های اخیر در تکنیک‌های مولکولی و نمونه‌برداری غیر تهاجمی رویکردهای جدیدی را برای تخمین فراوانی، توزیع و تعیین جنسیت گونه‌ها در مناطق جغرافیایی فراهم می‌کند (Mowat و Strobe، ۲۰۰۰). در حال حاضر نشانگرهای مولکولی مناسبی برای تعیین جنسیت، در بسیاری از گونه‌های وحشی پستانداران توسعه یافته‌اند (Foran و همکاران، ۱۹۹۷؛ Villesen و Fredstod، ۲۰۰۶). چندین روش مولکولی برای تعیین جنسیت وجود دارد که شامل آنالیزهای کروموزومی، تعیین آنتی‌ژن ایمنوگلوبین، تعیین فعالیت آنزیمی مرتبط با کروموزوم جنسی و هیبریداسیون پروب خاص کروموزوم Y است (Gurdner و Edwars، ۱۹۶۸؛ Anderson، ۱۹۸۷؛ Caoe و همکاران، ۲۰۰۵). آنالیزهای مبتنی بر PCR به‌دلیل این‌که نتایج حساس، سریع و قابل اعتمادی نسبت به سایر رویکردهای آزمایشگاهی مانند تست ایمونولوژیکی برای آنتی‌ژن H-R، کاریوتایپینگ و اسکن Barrbody از کروموزوم X غیرفعال و تست سیتوژنتیک برای ژن اختصاصی کروموزوم Y با استفاده از هیبریداسیون ارائه می‌دهند، بهتر می‌باشند. در مطالعاتی، روش مبتنی بر PCR برای انواع نمونه‌های حاصل از حیوانات اعم از عضله، سلول‌های جنینی، نمونه‌های فسیلی و حتی مدفوع استفاده شده است (Dreesen و همکاران، ۱۹۹۵؛ Shea، ۱۹۹۹؛ Yamauchi و همکاران، ۲۰۰۰؛ Lee و همکاران، ۲۰۰۴؛ Bennett و همکاران، ۱۹۹۰). در مطالعات قبلی مشخص شده است که توالی جزئی ژن تعیین کننده جنس (SRY) Y که فقط روی کروموزوم Y وجود دارد به‌منظور تعیین جنسیت استفاده شده است (Gandini و همکاران، ۲۰۰۷). آمیلوژن AMEL که روی کروموزوم X و Y وجود دارد برای تعیین جنسیت گاو و انسان استفاده شده است. پایش و تخمین اندازه جمعیت موثر پستانداران یک موضوع کلیدی و مهم برای مدیریت و حفاظت از آن‌ها است و این امر نیازمند داده‌های دقیق و قابل اعتماد براساس رویکردهای علمی است (Pfeiffer و همکاران، ۲۰۰۵). در میان پستانداران وحشی، خانواده Cervidae یا گوزن‌ها یکی از جذاب‌ترین جانوران با پراکندگی که متعلق به رده Mammalia و راسته Artrodactyla می‌باشد. این راسته شامل ۴ زیر خانواده، ۱۸ جنس و ۴۲ تا ۵۰ گونه می‌باشد این خانواده بزرگ در تمامی مناطق جغرافیایی به‌جز اتیوپی و استرالیا وجود دارد. گوزن قرمز گونه‌ای از گوزن‌های بزرگ است که بومی اروپا، غرب آسیا و هم‌چنین بخش‌هایی از آفریقای شمالی است (IUCN، ۲۰۱۷). در ایران، سه گونه گوزن از گوزن‌های دنیا شناسایی شده است که با نام‌های گوزن زرد (*Dama mesopatami*)، گوزن قرمز زیرگونه مرال (*Cervus elaphus*) و شوکا (*Caprealus capreolus*) می‌باشد. زیرگونه مرال یکی از بزرگ‌ترین انواع گوزن‌ها در آسیا است. پراکنش مرال در ایران، منطقه خزری بوده و در تمام مناطق جنگلی خزری از آستارا تا پارک ملی گلستان پراکنده است (Etemad، ۱۹۸۶). تعیین جنسیت در جمعیت‌های حیات وحش به‌منظور شناخت پویایی جمعیت، کنترل و مدیریت بیماری‌ها، تعیین ساختار جمعیت، استفاده از زیستگاه و سیستم جفتگیری و رفتاری کاربرد دارد و حائز اهمیت است. روش‌هایی از جمله مشاهده مستقیم ناحیه تناسلی به‌منظور تعیین جنسیت نیازمند صید حیوان است و گاهاً منجر به تحمیل استرس به حیوان می‌شود وحتی ممکن است دقت آن بالا نباشد لذا روش‌های مولکولی جایگزین مناسبی برای این امر محسوب می‌شوند. اگرچه هزینه‌بر می‌باشند ولی معایب روش‌های غیرملکولی ذکر شده در فوق را ندارند. Ventrella و همکاران (۲۰۱۸) به تعیین جنسیت گوزن با استفاده از سطح تستسترون پرداختند این روش ممکن است برای همه گونه‌ها مناسب نباشدو به‌دلیل این‌که به سن، ویژگی‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی بستگی دارد. دسترسی به برخی از گونه‌ها به‌دلایل مختلف ازجمله گریز پا بودن حیوان، در معرض خطر انقراض بودن حیوان، نادر و کمیاب بودن حیوان امکان‌پذیر نیست لذا روش‌های مولکولی این امکان را فراهم می‌کند که تنها با دردسترس داشتن نمونه مو، بافت، سرگین و... بتوان جنسیت حیوات را تعیین کرد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و محل جمع‌آوری نمونه: نمونه‌گیری از خون و مدفوع جمع‌آوری شده از گوزن‌های موجود در منطقه حفاظت شده آینالو (در ۴۵ کیلومتری شهر کلیبر و در ارتفاع ۱۵۰۰ متری از سطح دریا) واقع در شمال‌غرب کشور، صورت گرفت. خونگیری از ورید وداج گردن و ورید دمی ۵ راس گوزن به‌میزان ۵ سی‌سی در لوله‌های خلأدار حاوی ماده ضدانعقاد EDTA انجام گرفت. پس از اتمام خونگیری، نمونه‌ها به آزمایشگاه ژنتیک مولکولی (بانک شمال‌غرب) منتقل و در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. در مرحله بعد نمونه برداری از سرگین‌های موجود روی برف به تعداد ۲۵ نمونه در فصل زمستان (به‌خاطر قابل مشاهده بودن بر روی برف) صورت گرفت. از آن‌جایی‌که روش نمونه‌برداری در کمیت و کیفیت DNA استخراج شده حائز اهمیت است، لذا سرگین‌های تازه بلافاصله در لوله‌های آزمایش حاوی اتانول ۷۰ درصد قرار داده شد و تا زمان استخراج DNA در دمای منفی ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

استخراج DNA و تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده: استخراج DNA به‌روش Boom و همکاران (۱۹۸۹) که مبتنی بر استفاده از گوانیدین تیوسیانات و سیلیکاژل است صورت گرفت. به منظور استخراج DNA از مدفوع، ابتدا نمونه‌های مدفوع (سرگین) در اتانل ۹۵ درصد حل شد و به فریزر با دمای $-20^{\circ}C$ منتقل شدند.

سپس رسوب باقی‌مانده با بافر سالین نرمال شستشو داده شد. در ادامه برای استخراج DNA از خون ۵۰۰ میکرولیتر بافر هضم کننده (5M تیوسیونالات گوانیدین، EDTA ۲۰mM، Tris ۴۰mM، ۴۰ گرم TritonX100، ۱۰ گرم DTT) به هر یک از نمونه‌ها اضافه شده و به مدت ۵ دقیقه در بن ماری با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس ۲۰ میکرولیتر محلول نوکلئاز (۴ گرم ذرات سیلیکا، ۱۰۰ میکرولیتر گوانیدین) اضافه شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه به‌آرامی ورتکس گردید. سپس به محیط همگن شده، ۴۰۰ میکرولیتر بافر سالین-Tris، EDTA 20mM (KCl۱M، HCl 10mM، NaCl 1M) اضافه و در نهایت از طریق ماده Extra Gene (۱۰٪ رزین ۰/۰۲٪ ماده رنگی OrangG، ۰/۰۱ درصد TritonX100)، DNA زرد رنگ از سایر ناخالصی‌ها جدا گردید. نمونه DNAهای استخراج شده در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. از آن‌جایی‌که تعیین خلوص DNA مورد مطالعه از اهمیت خاصی برخوردار است لذا برای بررسی کیفیت و تعیین مقدار DNA از روش‌های الکتروفورز بر روی‌ژل آگارز ۰/۸ درصد واسپکتروفتومتری (دستگاه اسپکتروفتومتر مدل HACH DR/4000U)، استفاده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز: در این مطالعه به‌منظور تکثیر دو قطعه پلی‌مورف ۳۱۰-۲۸۰ جفت باز و مونومورف ۱۸۰ جفت باز از روش Duplex PCR برطبق آغازگرهای کروموزوم (Y) تعیین جنسیت، و جایگاه ریزماهوارک با الگوی مونومورف BMC1009 کنترل داخلی (جدول ۱) تکثیر شد.

جدول ۱: مشخصات و جزئیات جایگاه، توالی آغازگر، محصول حاصل از تکثیر

نام جایگاه	توالی آغازگر	ژنوم	اندازه محصول مورد انتظار	منبع
DEAD-box Y-linked protein (DBY) gene	CCCCAACAAGAGAATTGGCT CAGCACCACCATAKACTACA	جنسی	۱۸۰bp	Ellegren (۲۰۰۳)
BMC1009	GCACCAGCAGAGAGGACATT ACCGGCTATTGTCCATCTTG	اتوزومی	۲۸۰-۳۱۰bp	

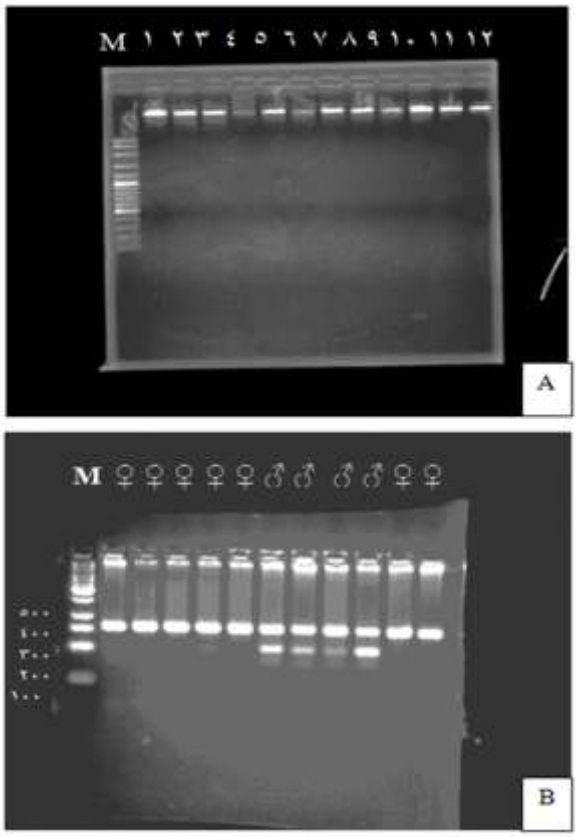
واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۵۰ میکرولیتر شامل dNTPs (۱۰میلی‌مولار) یک میکرولیتر، پرایمر ۱۰۰پیکومول بر میلی‌لیتر، DNA ۱۰۰ نانوگرم، بافر PCR ۵ میکرولیتر با غلظت 10X و Taq-Polymerase ۰/۵ در دستگاه ترموسایکلر مدل Biometra Standard Power Pack P25 انجام گرفت. چرخه‌های دمایی واکنش PCR به ترتیب شامل مرحله واسرشت اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، واسرشت ثانویه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال پرایمر به هدف در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، مرحله تکثیر نهائی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳ دقیقه بهینه‌سازی گردید. جهت تأیید مجدد، نمونه‌ها و محصولات تکثیری برای تعیین سایز در دستگاه QIAexcle اجرا شدند و مجدداً الگوهای متفاوت باندی را بین دو جنس نر و ماده تعیین شد.

الکتروفورز محصولات PCR: برای آنالیز محصول حاصل از PCR از ژل آگارز ۲٪ به‌همراه بافر سنگین‌کننده استفاده شد. جهت رنگ‌آمیزی ژل از اتیدیوم برماید استفاده شد. برای تأیید قطعات تکثیر شده و نتایج حاصل از هضم آنزیمی از سایز مارکر Ladder 1 Kb از شرکت Fermantase، استفاده گردید. ابتدا آگارز ۱/۸٪ با به‌کارگیری بافر (TBE1X، Tris ۰/۰۹mM، اسیدبوریک و ۰/۰۹mM EDTA ۰/۰۲ mM) تهیه و به‌ازای هر ۱۰ میلی‌لیتر ژل ۰/۲ میکرولیتر اتیدیوم بروماید (۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) به آن اضافه و در ظرف مخصوص حاوی شانه ریخته شد. بعد از بسته شدن ژل، به‌ازای ۷ میکرولیتر محصول PCR، ۲ میکرولیتر لودینگ بافر (بروموفنل بلو ۰/۲۵ درصد، ساکارز ۴۰ درصد) مخلوط نموده سپس در چاهک‌های ژل قرار داده شدند. نمونه‌ها با ولتاژ ۷۰ ولت و به‌مدت ۱ ساعت الکتروفورز شدند و سپس با استفاده از دستگاه ژل داک مورد بررسی قرار گرفتند. در ضمن مدل دستگاه الکتروفوز Biometra Standard Power Pack P25 بود.

استفاده از تکنیک Size Fragmentation: پس از حصول نتایج و بارگذاری محصولات حاصل از تکثیر به‌منظور تأیید نتایج به‌دست آمده، محصولات باقی‌مانده حاصل از تکثیر در دستگاه سیکونسر تزریق و اندازه قطعات و تکرارپذیری و حساسیت نتایج اولیه مجدداً مورد تأیید قرار گرفت.

نتایج

پس از قرار دادن ژل در داخل دستگاه، نمونه‌های DNA استخراج شده مورد بررسی قرار گرفت به گونه‌ای که وجود باندهای کاملاً تیز و بدون کم‌ترین کشیدگی که حاکی از بهترین کیفیت DNA است، مشاهده‌شد (شکل A۱). با استفاده از شرایط بهینه PCR جهت تعیین جنسیت، همان‌طورکه در شکل B۱ مشاهده می‌شود قطعات ۱۸۰، ۲۸۰ و ۳۱۰ جفت باز به خوبی تکثیر شدند.



شکل ۱: تصویر کیفیت DNA استخراج شده همراه با تعیین ژنوتیپ نر و ماده نمونه‌های خون و سرگین (نتایج این تحقیق با تکرارپذیری بالا، وجود دو باند پلی‌مورف ۲۸۰-۳۱۰ و مونومورف ۱۸۰ جفت باز (bp) در جمعیت گوزن‌های نر و پلی‌مورف ۲۸۰-۳۱۰ جفت باز (bp) در جمعیت گوزن‌های ماده را نشان داد.

بر اساس نتایج حاصل از تکثیر DNA تهیه شده از نمونه‌های خون و مدفوع گوزن‌ها جنسیت آن‌ها تعیین شد به‌طوری‌که نمونه‌های با اندازه باند پلی‌مورف ۳۱۰-۲۸۰ جفت باز به‌عنوان دام نر و نمونه با اندازه باند ۱۸۰ جفت باز به‌عنوان دام ماده شناسایی شد. هم‌چنین محصولات حاصل از تکثیر هر کدام از حیوانات کدگذاری شده در دستگاه سیکونسر تزریق شد که نتایج حاصل از این تزریق صحت نتایج را تائید می‌کند (شکل ۲).

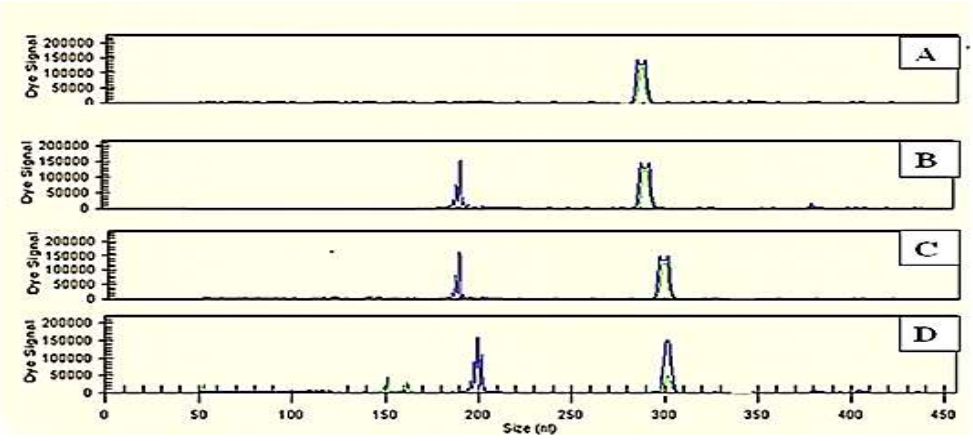
اندازه موثر جمعیت: برای جمعیت گوزن اقدام به محاسبه شاخص اندازه مؤثر جمعیت با در دست داشتن تعداد نر و ماده شناسایی شده از روی نمونه‌های سرگین در نرم‌افزار اکسل محاسبه گردید. برای جمعیت‌هایی که به‌صورت تصادفی آمیزش می‌کنند با تعداد مساوی افراد نر و ماده، ارتباط بین اندازه جمعیت واقعی و اندازه جمعیت مؤثر عبارتند از:

$$\frac{1}{N_e} = \frac{1}{4}\left[\frac{1}{N_{males}} + \frac{1}{N_{females}}\right]$$

شاخص اندازه مؤثر جمعیت با این بضاعت موجود از فرمول ذیل محاسبه شد:

$$\frac{1}{N_e} = \frac{1}{4}\left[\frac{1}{N_{males}} + \frac{1}{N_{females}}\right] = N_e = \left[\frac{4(N_{males} + N_{females})}{N_{males} + N_{females}}\right] = 4$$

عدد ۴ نشان می‌دهد که از بین این گوزن‌ها امکان تلاقی تصادفی تخمینی ۴ گوزن وجود دارد که این شاخص خود پیامدهای منفی هم‌چون کاهش تنوع و امکان بروز Bottleneck و هم‌خونی و افزایش امکان ابتلا به بیماری‌های ژنتیکی را افزایش می‌دهد. براساس نتایج ژنوتایپینگ تعداد ۸ ماده و ۱۵ نر شناسایی شد. از هفت نمونه به علت عوامل احتمالی مانند قدیمی بودن و دیر کرد در انتقال به آزمایشگاه، استخراج DNA امکان‌پذیر نشد و هیچ محصول تکثیری بعد از PCR به‌دست نیامد.



شکل۲: تایید نتایج تعیین جنسیت با استفاده از دستگاه سیکونسر و روش Size Fragmentation همان‌طورکه مشاهده می‌شود هر ردیف متعلق به یک فرد می‌باشد. نمونه اول متعلق به پروفایل و الگوی باندی گوزن ماده و سه نمونه بعدی با داشتن دو باند متعلق به گوزن نر می‌باشد.

بحث

هدف از تحقیق حاضر دستیابی و بهینه‌سازی تکنیک تعیین جنسیت در گوزن قرمز مرال به‌عنوان ابزاری مناسب برای تخمین اندازه مؤثر جمعیت و حفاظت ژنتیکی این گونه در ارسباران و متعاقب آن زیستگاه‌های کشور می‌باشد. نتایج این تحقیق نشان داد که به‌طور تخمینی عدم‌تعادل بین تعداد گوزن‌های نر و ماده وجود دارد که خود به‌طور غیرمستقیم باعث کاهش اندازه موثر جمعیت می‌گردد. کاهش اندازه مؤثر جمعیت با افزایش نرخ درون‌آمیزی رابطه مستقیم دارد و منجر به کاهش تنوع ژنتیکی ناشی از رانش ژنتیکی می‌شود که کاهش تنوع ژنتیکی منجر به کاهش تنوع آللی و افزایش هموزیگوسیتی می‌شود. بنابراین تعیین اندازه موثر جمعیت‌های طبیعی یک موضوع مهم به‌منظور مدیریت و حفاظت این گونه‌ها است (Graham و همکاران، ۲۰۰۱) از این‌رو اتحادیه جهانی حفاظت این موضوع را یک عنصر مهم و ضرروی در تعیین گونه‌های در خطر انقراض درنظر گرفته است بنابراین مدیریت و حفاظت از حیات‌وحش نیازمند براورد اندازه موثر جمعیت است (Gour و همکاران، ۲۰۰۸). از نقطه نظر تئوری بیولوژی حفظ ذخائر اندازه جمعیت مؤثر بایستی بیش از ۵۰ حیوان باشد، در غیر این‌صورت تجمع موتاسیون‌های تخریبی جزئی، باعث انقراض جمعیت مربوطه خواهد شد (Lynch و همکاران، ۱۹۹۵). در سیستم‌های مدیریت تلاقی گوزن‌های موجود در مناطق ایزوله و محافظت شده، کنترل جنسیت دارای مزیتی آشکار است. چرا که حفظ اندازه مؤثر جمعیت در حد مناسب، امکان ایجاد هم‌خونی و Bottleneck را کاهش می‌دهد و از کاهش شایستگی تولیدمثل و بروز بیماری‌های ژنتیکی و کاهش سازگاری در برابر تغییرات محیطی جلوگیری می‌کند. اطلاع از نسبت گوزن نر به ماده در قرنطینه آینالو در ارسباران می‌تواند راهکارهای مدیریتی برای طراحی برنامه ابقاء گونه و تولیدمثل مؤثر درجمعیت قرنطینه را میسر سازد. این موضوع درمعرفی ترکیب جنسی مناسب و ایجاد گله پشتیبان فاقد هم‌خونی در مراحل بعدی طرح احیاء نسل مرال در این منطقه اهمیت به‌سزایی خواهد داشت. تعیین جنسیت در حیات‌وحش اغلب دشوار می‌باشد. تعیین جنسیت گوزن‌های یک‌ساله و بزرگ از روی ظاهر استخوان‌های بزرگ نظیر جمجمه به آسانی صورت می‌گیرد، اما تعیین جنسیت در گوساله گوزن‌ها به‌دلیل ظهور صفات جنسی ثانویه، سخت‌تر است (Takahashi و همکاران، ۱۹۹۸). تکنیک‌های پیشرفته متعددی برای تعیین جنسیت در انواع گوزن‌ها شناسایی شده است (Scandura، ۲۰۰۵). تاکنون، در میان ۱۷ گونه زیرخانواده Cervinae تنها تعداد کمی با روش‌های مولکولی تعیین جنسیت شده‌اند. جنس نر با تکثیر ژن SRY Determination (Region of Y) بر روی کروموزوم جنسی در بیش‌تر گونه‌های گوزن شناسایی می‌شود. ژن SRY پروتئینی را که به‌عنوان جعبه گروهی با تحرک بالا HMG Motility Group (High) شناخته می‌شود، کددهی می‌کند. توالی نسبی مختلف ناحیه جعبه HMG در تعیین جنسیت گوزن Sika (Pfeiffer، ۲۰۰۵)، Elk (*Cervus elaphus*) و گوزن دم سفید (Wilson و همکاران، ۱۹۹۸) استفاده شده است. ژن آملوژنین بر روی هر دو کروموزوم X و Y وجود دارد و به‌ترتیب AMELX و AMELY نامیده می‌شود، در تعیین جنسیت گوزن قرمز اروپایی (*Cervus elaphus*) به‌کار رفته است (Pfeiffer و همکاران، ۲۰۰۵). پرایمرهای ژن آملوژنین به‌کار رفته در گله‌های گاوی برای تعیین جنسیت در گوزن Sika نشان داد که بیش از ۹۰ درصد هم‌پوشانی میان ژن آملوژنین گونه‌های گوزن و گاو وجود دارد. AMELY گوزن Sika ۵۴ جفت باز (bp) کوتاه‌تر از AMELX می‌باشد که این حذف تنها در یک نقطه ملاحظه گردید (Torbatinejad و همکاران، ۲۰۱۱).

راهکاری مدیریتی پیشنهادی برای افزایش شاخص اندازه مؤثر جمعیت در حیات‌وحش را می‌توان در تکنیک‌های حفظ ذخائر ژنتیکی دانست. تکنیک‌های حفظ ذخائر ژنتیکی جانوری (AnGR) به‌طور کلی به‌روش‌های in situ و روش‌های ex situ تقیسم می‌شوند. روش‌های in situ، یعنی نگه‌داری به‌صورت جانوران زنده از یک نژاد در شرایطی خارج از سیستم تولید خودشان. به‌عنوان مثال می‌توان به نگه‌داری مرال در زیستگاه آن واقع در منطقه حفاظت شده ارسباران-قرنطینه آینالو اشاره کرد. روش‌های ex situ خود به‌روش‌های Cryo Conservation\ که به‌صورت منجمد نمودن مواد ژنتیکی که شامل سلول‌های هاپلوئید مثل (اسپرم و اوول)، منجمد نمودن سلول‌های دیپلوئید مثل (انجماد در شرایط in vivo و in vitro برای جنین و سلول‌های غیرجنسی) و انجماد DNA می‌باشد که در مراحل تحقیقاتی و باروری با تکنیک IUI می‌توان به تکثیر این زیرگونه با ارزش پرداخت و ex situ live (حفظ و نگه‌داری جانوران به‌صورت زنده و در محیطی غیر از محیط تولید خود آن‌ها) تقسیم می‌شود. در روش in situ به‌خاطر این‌که بر نگه‌داری جانوران در محیط و سیستم تولیدی خود آن‌ها تأکید شده در نتیجه این روش طیف وسیعی از اهداف حفظ ذخائر ژنتیکی را می‌تواند محقق کند (Gandini و همکاران، ۲۰۰۷). شایان ذکر است با وجود این‌که نمونه‌های سرگین تازه جمع‌آوری شدند ولی کیفیت DNA استخراج شده از خون بهتر از نمونه‌های سرگین بود. با این‌حال در نمونه‌برداری غیرتهاجمی به‌دلیل این‌که هیچ‌گونه استرسی به گونه وارد نمی‌شود و سلامتی حیوان را تهدید نمی‌کند بنابراین جایگزین مناسبی برای روش‌های نمونه‌برداری تهاجمی است و به‌منظور اهداف حفاظتی در الویت قرار دارد و رویکردهای نوینی برای برآورد توزیع و فراوانی گونه‌ها و تعیین جنسیت گونه‌ها فراهم می‌کند. Alec و همکاران (۲۰۰۷) از تکنیک مبتی بر PCR برای تعیین جنسیت گوزن دم سفید (*Odocilous viriginianus*) استفاده کردو اذعان داشتند که روش مبتنی بر PCR در شناسایی سریع و قابل قبول نمونه‌های ناشناخته، به متخصصان ژنتیک حفاظت و مدیران حیات وحش کمک می‌کند. Tolleson و همکاران (۲۰۰۰) برای بررسی وضعیت فیزیولوژیکی گاو، هم‌چنین Godfrey و همکاران

(۲۰۰۱) برای مطالعه وضعیت فیزیولوژی گوسفند از نمونه مدفوع استفاده‌نمودند. Gokulakrishnan و همکاران (۲۰۱۲) به بررسی تعیین جنسیت گوزن و گوسفند به‌روش مولکولی پرداختند. Wilson و White (۱۹۹۸) به بررسی تعیین جنسیت گوزن الک (*Cervus elaphus Canadensis*)، گوزن موس (*Alces alces*) و گوزن دم سفید (*Odocoileus virginianus*) با استفاده از زنجیره پلی‌مراز پرداختند و از نمونه بافت استفاده کردند. نتایج نشان دادند که اندازه باندها به نوع گونه و نژاد و مقدار طول جهش از نوع حذف وابسته است و درنتیجه برای هرگونه، نژاد متفاوت است. باتوجه به نتایج به‌دست آمده در این مطالعه و نتایج مطالعات مشابه، نتیجه‌گیری می‌شود که استفاده از روش‌های مولکولی درتعیین جنسیت گونه‌های کمیاب حیوانات یک‌روش مناسب می‌باشد که در جهت حفظ آن‌ها و جلوگیری از ایجاد هم‌خونی، موثر می‌باشد. هم‌چنین به‌منظور جلوگیری از ایجاد ترس و استرس در این حیوانات، استفاده از روش نمونه‌گیری غیرتهاجمی می‌تواند یک روش مناسب و به صرفه نسبت به روش نمونه‌گیری تهاجمی باشد. به‌دلیل تخریب و نابودی زیستگاه گونه و هم‌چنین فشار ناشی از شکار غیرمجاز گونه ممکن است در آینده نزدیک‌جمعیت این گونه به‌شدت درمعرض خطر انقراض قرار می‌گیرد از این‌رو بررسی ژنتیکی گونه حائز اهمیت است. یکی از مشکلات مطالعه حاضر تعداد کم نمونه بود و به‌دلیل این‌که مطالعات‌ژنتیکی به تعداد کم‌نمونه‌حساس هستند‌بدین‌منظور پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی از تعداد نمونه‌های بیش‌تر و هم‌چنین مقیاس گسترده‌تر استفاده شود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از همکاران محترم سازمان محیط زیست که در مرحله‌سخت‌نمونه‌گیری و مهارگوزن‌ها یاری نمودند کمال سپاسگزاری و امتنان به‌عمل می‌آید.

منابع

1. **Anderson, GB., 1987.** Identification of embryonic sex detection of H-Y antigen. Theriogenology. Vol. 27, pp: 81-97.
2. **Alec, R.; Lindsay, A.; Jerrold, E. and Belant, L., 2007.** A simple and improved PCR-based technique for white-tailed deer sex identification. Conserv Genet. Vol. 9, pp: 443-447.
3. **Bennett, L.J.; English, P.F. and McCain, R., 1940.** A study of deer pop ulations by use of pellet-group counts. J. Wildl. Manage. Vol. 4, pp: 398-403.
4. **Boom, R.; Sol, C.J.A.; Salimans, M.M.M.; Jansen, C.L.; Wertheim-Van Dillen, P.M.E. and Van der Noordaa, J., 1989.** Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J of clinical microbiology. Vol. 28, No. 3, pp: 495-503.
5. **Cao, X.; Jiang, H. and Zhang, X., 2005.** Polymorphic karyotypes and sex chromosomes in the tufted deer (*Elaphodus cephalophus*): cytogenetic studies and analyses of sex chromosome-linked genes. Cytogenet Genome Res. Vol. 109, pp: 512-518.
6. **Dreesen, C.J.F.M.; Dumoulin, J.C.M.; Evers, J.L.H.; Geraedts, J.P.M. and Pieters, M.H.E.C., 1995.** Multiplex polymerase chain reaction for sex determination of single mouse blastomeres. Mol human reprod. Vol. 10, pp: 743-748.
7. **Etemad, E., 1986.** Mammals of Iran part 2 (first ed.) Department of Environment, Tehran, Iran. 253 p.
8. **Foran, D.R.; Minta, S.C. and Heinemeyer, K.S., 1997.** DNA-based analysis of hair to identify species and individuals for population research.
9. **Gardner, R.L. and Edwards, R.G., 1968.** Control of the sex ratio at full term in rabbit by transferring sexed blastocysts. Nature. Vol. 218, pp: 346-349.
10. **Godfrey, R.; Dodson, R.; Bultman, J.; Tolleson, D.; Stuth, J. and Norman, A., 2001**. Use of near infrared reflectance spectroscopy to differentiate pregnancy status and gender of hair sheep in the tropics. J. Anim. Sci. Vol. 79, No. 26.
11. **Gokulakrishnan, P.; Kumar, R.; Sharma, B.; Mendiratta, S. and Sharma, D., 2012**. Sex determination of cattle meat by polymerase chain reaction amplification of the DEAD box protein (DDX3X/DDX3Y) gene. Asian Australas J Anim Sci. Vol. 25, pp: 733.
12. **Gour, D.S.; Dubey, P.P.; Jain, A.; Gupta, S.C.; Joshi, B.K. and Kumar, D., 2008**. Sex determination in 6 bovid species by duplex PCR. JAG. Vol. 49, pp: 379-381.
13. **Gandini, G. and Oldenbroek, K., 2007**. Strategies for moving from conservation to utilisation. In K. Oldenbroek, ed. Utilisation and conservation of farm animal genetic resources, Wageningen, the Netherlands, Wageningen Academic Publishers, pp: 29-54.
14. **IUCN. 2017**. The IUCN Red List of Threatened Species. http://www.iucnredlist.org.
15. **Javanshir, K., 1992.** Study of the vegetation, agricultural general plan of Urmia water catchment, 324 p, Published by Planning office of Ministry of Agriculture, Iran Jame Company, Tehran, 1992.
16. **Lee, J.H.; Park, J.H.; Lee, SH.; Park, C.S. and Jin, D.I., 2004.** Sexing using single blastomere derived from IVF bovine embryos by fluorescence in situ hybridization (FISH). Theriogenology. Vol. 62, pp: 1452-1458.
17. **Lynch, M.; Conery, J. and Burger, R., 1995.** Mutation Accumulation and the Extinction of small Populations. The American Naturalist. Vol. 146, No. 4, pp: 489-518.
18. **Mowat, G. and Strobeck, C., 2000.** Estimating population size of grizzly bears using hair capture, DNA profiling, and mark-recaptureanalysis. J Wildlife Manage. Vol. 64, pp: 183-193 & monitoring. Wildlife soc bull. Vol. 25, pp: 840-847.
19. **Pfeiffer, I. and Brenig, B., 2005.** X-and Y- chromosome specific variants of the amelogenin gene allow sex determination in sheep (*Ovis aries*) and European red deer (*Cervus elphus*). BMC Genetics. Vol. 6, pp: 16.
20. **Shea, B.F., 1999.** Determining the sex of bovine embryos using polymerase chain reaction results: a six-year retrospective study. Theriogenology. Vol. 51, pp: 841-854.
21. **Scandura, M., 2005.** Individual sexing and genotyping from blood spots on the snow: A reliable source of DNA for non invasive genetic surveys. Conservation Genetics. Vol. 6, pp: 871-874.
22. **Takahashi, M.; Masuda, R.; Uno, H.; Yokoyama, M.; Suzuki, M.; Yoshida, M. and Ohtaishi, N., 1998.** Sexing of carcass remains of the sika deer (*Cervus nippon*) using PCR amplification of the Sry gene. Journal of Veterinary Medical Science. Vol. 60, No. 6, pp: 713-716.
23. **Torbatinejad, N. and Razmazar, V., 2011.** Principles of deer farming (first ed.) Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran. 100 p.
24. **Tolleson, D.; Osborn, R.; Neuendorff, D.; Grevling, M.; Randel, R.; Stuth, J. and Ginnett, T., 2001.** Determination of gender in four wildlife species by near infrared reflectance spectroscopy of feces. In: Proceedings of the Texas Chapter. Wildlifesocietymeeting, College Station Texas, 25-27 March.
25. **Ventrella, D.; Elmi, A.; Barone, F.; Carnevali, G.; Govoni, N. and Bacci, M., 2018**. Hair testosterone and cortisol concentrations in pre-and post-rut roe deer bucks: Correlations with blood levels and testicular morphometric parameters. Animals. Vol. 8, pp: 113.
26. **Villesen, P. and Fredsted, T., 2006.** A new sex identification tool: one primer pair can reliably sex ape and monkey DNA samples. Conserv Genet. Vol. 7, pp: 455-459.
27. **Werren, J.H. and Beukeboom, L.W., 1998.** Sex determination, sex ratios, and genetic conflict. Annual Review of Ecolo y and Systematics. Vol. 29, pp: 233-261.
28. **Wilson, P.J. and White, B.N., 1998.** Sex identification of elk (*Cervus elaphus canadensis*), moose (*Alces alces*), and white-tailed deer using the polymerase chain reaction. Journal of Forensic Science. Vol. 43, No. 3, pp: 477-82.
29. **Yamauchi, K.; Hamasaki, S.I.; Miyazaki, K.; Kikusui, T.; Takeuchi, Y. and Mori, Y., 2000.** Sex Determination based on fecal DNA analysis of the amelogenin gene in sika deer. J of Veterinary Medical Science. Vol. 62, No. 6, pp: 669-671.