

تنوع ژنتیکی شوکا (*Capreolus capreolus*) در استان‌های گلستان و مازندران بر اساس توالی ژن دی لوپ (D-loop) میتوکندری

- **حمیدرضا کبیری بالاجاده***: گروه محیط زیست، دانشکده انرژی و محیط زیست، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، صندوق پستی: ۷۷۵-۱۴۵۱۵
- **حمیدرضا رضایی**: گروه محیط زیست، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۱۰۷۳۹-۴۹۱۳۸
- **سعید نادری**: گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صندوق پستی: ۱۸۴۱

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: فروردین ۱۳۹۵

چکیده

شوکا (*Capreolus capreolus*) کوچک‌ترین عضو خانواده گوزن‌ها (Cervidae) در ایران است. این گوزن در جهان دارای دو گونه اروپایی - آسیایی (*C. capreolus*) و سیبریایی (*C. pygargus*) است، که از نظر ریختی با یکدیگر متفاوت هستند. این گونه در ایران عمدتاً در مناطق جنگلی با پوشش زیرین نسبتاً متراکم، جنگل‌های جوان، جنگل‌های بین دشت و مناطق کوهستانی زیست می‌کند. هدف از اجرای این مطالعه شناخت تنوع ژنتیکی شوکای ایران در مناطق مورد مطالعه بر اساس ژن D-loop میتوکندری و کاربرد آن در برنامه‌ریزی‌های حفاظتی این گونه می‌باشد. تعداد ۸ نمونه از شوکای ایران از نقاط پراکنش گونه در استان مازندران و گلستان جمع‌آوری شد. پس از استخراج DNA از نمونه‌ها شامل بافت ماهیچه و سرگین، شاخ تکثیر بخشی از ناحیه کنترل DNA میتوکندری به طول ۳۶۶ جفت باز به کمک یک جفت پرایمر یونیورسال صورت گرفت. محصولات PCR پس از توالی‌یابی جهت بررسی و تعیین فاصله ژنتیکی و تنوع هاپلو تیبی با استفاده از نرم‌افزارهای MEGA، DNASP و NetWork بررسی شدند. بر اساس نتایج به دست آمده، تعداد ۳ هاپلو تیب و ۳ جایگاه چندشکلی تشخیص داده شد. هاپلو تیب‌های مشترک بین نمونه‌های استان گلستان و مازندران وجود دارد که احتمال آن می‌رود ارتباط بین جمعیت‌های دو استان و وجود کریدور ارتباطی بین جمعیت‌های آن‌ها وجود داشته باشد. فاصله ژنتیکی جمعیت دو استان کم بوده و از نظر حفاظتی باید مورد بررسی دقیق‌تری قرار گیرند تا این ارتباط قطع نشود.

کلمات کلیدی: شوکا، D-loop، تنوع ژنتیکی، گلستان، مازندران



مقدمه

امروزه حفاظت از تنوع زیستی به یک مسئله و نگرانی جهانی مبدل شده است. افزایش جمعیت انسان و نیاز روزافزون به منابع منجر به تخریب بوم‌سازگان‌های طبیعی و نابودی تنوع زیستی در ابعاد وسیع گشته است. گرچه انقراض گونه‌ها پدیده‌ای طبیعی است که در گذشته زمین نیز بارها رخ داده است، ولی در سالیان اخیر در اثر عملکرد آدمی صدها برابر افزایش یافته و گونه‌های بی‌شماری در سراسر جهان تحت عنوان گونه‌های تهدید شده طبقه‌بندی شده‌اند. با توجه به این که منابع مالی و انسانی برای مدیریت همه گونه‌ها کافی نیست، مسئله اصلی انتخاب گونه‌ها و جوامع طبیعی است. به گونه‌ای که بتوان تنوع زیستی را برای تداوم حیات و نسل‌های آینده حفظ نمود. پیشرفت‌های جدید در زمینه فن‌آوری و دانش ژنتیک مولکولی فرصت و امکان مناسبی را در جهت پاسخگویی به بسیاری از پرسش‌ها در زمینه رده‌بندی گونه‌ها، بررسی روابط فیلوژنتیک و تکاملی گونه‌ها و مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها فراهم کرده است. این گونه اطلاعات می‌تواند در زمینه تعیین گونه‌ها و الویت‌بندی آن‌ها و همچنین تعیین مناطق حفاظتی بسیار مفید باشد (ملکیان، ۱۳۸۸). برخلاف سطوح بالاتر تاکسونومیک که مبتنی بر صفاتی است که بعضاً قابل مقایسه نیست وجود DNA و RNA در تمام موجودات زنده می‌تواند امکان مقایسه مستقیم موجودات کاملاً متفاوت و متنوع را فراهم آورد (ملکیان، ۱۳۸۸). شوکا کم و بیش در محیط زیست مشابه مرال، یعنی جنگل‌های خزر به سر می‌برد. از وجود آن به تعداد کم در جنگل‌های شمال آذربایجان و کردستان نیز تا اواسط دهه ۱۳۵۰ حکایت می‌شد. طبق بررسی‌های اخیر هنوز تعداد کمی شوکا در جنگل‌های اورامانات وجود دارد (فیروز، ۱۳۷۸). به نظر Ellerman و Scott (۱۹۵۱)، شوکاهای ایران چه در شمال و چه در غرب از نژاد *C. capreolus capreolus* می‌باشند، ولی برخی از مولفین قبلاً شوکای شمال ایران را از نژاد *C. capreolus armenius* و شوکای غرب را از نژادی متفاوت به نام *C. capreolus coxi* می‌دانستند (اعتماد، ۱۳۶۴). شوکا کوچک‌ترین گوزن ایران است و تقریباً اندازه آهوست. به علت بلندتر بودن پاها از دست‌ها، کمی قوزدار به نظر می‌رسد. هر یک از شاخ‌ها در تمام دوران زندگی فقط سه شاخک دارند (در موارد نادر چهار یا پنج شاخک نیز مشاهده شده است). شاخ‌ها در اواسط پاییز می‌افتند و شاخ جدید که کرک‌دار است، در طول زمستان رشد می‌کند و در فصل بهار کامل می‌شود (فیروز، ۱۳۷۸). زیستگاه این گونه مناطق جنگلی با پوشش زیرین نسبتاً متراکم، جنگل‌های جوان،

جنگل‌های بین دشت و مناطق کوهستانی که برخلاف مرال از جنگل‌های مناطق کوهستانی مرتفع دوری می‌کند، می‌باشد. این گونه هم شب‌فعال و هم روزفعال است. شوکا حس بویایی، شنوایی و بینایی قوی دارد، به خوبی شنا می‌کند و در محل زندگی خود اغلب بی حرکت است. به محض احساس خطر به صورت مخفی و با پرش‌های بلند فرار می‌کند. شوکا اغلب از علوفه، برگ‌ها و شاخه‌های درختان و نیز قارچ تغذیه می‌کند (دلفان، ۱۳۸۴). شوکاها حیواناتی بسیار حساس و مهاجم هستند. در حالت اسارت برخلاف اکثر جانوران عمر طولانی ندارد و معمولاً بیش از سه سال قادر به زندگی در باغ وحش‌ها نیستند. ولی در طبیعت حدود ۱۰ سال عمر می‌کنند (ضیایی، ۱۳۸۷). تاکنون بررسی تنوع ژنتیکی در مورد شوکا در ایران انجام نشده است. اغلب مطالعات انجام شده در زمینه پراکنش و بررسی زیستگاه شوکا صورت گرفته است. به عنوان مثال، Ghazanfari و همکاران (۲۰۰۰) به بررسی مقدماتی زیستگاه شوکا در جنگل‌های بوزین مره خیل استان کرمانشاه پرداختند. بخشی، ارزیابی زیستگاه شوکا در پارک ملی گلستان به روش تحلیل عاملی آشیان بوم‌شناختی را در سال ۱۳۹۲ انجام دادند. در جهان در زمینه ژنتیک شوکای اروپایی آسیایی (*C. capreolus*) و سیبریایی (*C. pygargus*) به روش‌های مختلف کار شده است. از جمله می‌توان به مطالعه Randi و همکاران (۱۹۹۸) بر روی چندشکلی DNA میتوکندری در جمعیت‌های شوکای اروپایی و سیبریایی اشاره نمود. در این بررسی ۶۷۹ نوکلئوتید در ناحیه کنترل DNA میتوکندری در ۴۵ شوکا اروپایی و سیبریایی در کشورهای ایتالیا و روسیه انجام شد. هم‌چنین Vernesi و همکاران (۲۰۰۲) ساختار ژنتیکی جمعیت‌های شوکا طبیعی و معرفی شده در آلپ و مرکز ایتالیا را با اشاره به ساختار فیلوژئوگرافی DNA میتوکندری مورد بررسی قرار دادند. در پژوهشی Soffiantini و همکاران (۲۰۰۷) خصوصیات ریختی حیوانات با هاپلوتیپ میتوکندری مشخص در مورد شوکا در استان پارما را مورد بررسی قرار دادند. هدف از این مطالعه، بررسی خصوصیات زیست‌سنجی جمعیت‌های شوکای پارما و ارتباط آن با الگوهای هاپلوتیپی آن‌ها بود. در پژوهشی دیگر Valvo و همکاران (۲۰۰۹) به بررسی و تجزیه و تحلیل ژنتیکی ساختار جمعیتی شوکا در شمال آلپ در ایتالیا پرداختند. این مطالعه، به طور مقدماتی به شرح و تجزیه و تحلیل ساختار جمعیت شوکا براساس ۱۱۹ نمونه از استان‌های Belluno و Trento در شمال شرق آلپ در ایتالیا با استفاده از ۱۱ نشانگر ریزماهواره پرداخته است. هم‌چنین Mucci و همکاران (۲۰۱۲) به بررسی حفاظت از تهدید مجموعه ژن‌های محلی یعنی بررسی ژنتیک سیمای

مازندران و گلستان و تعیین تنوع هاپلوتیپ و بررسی جنبه حفاظتی این گونه در منطقه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مناطق نمونه‌برداری شامل پارک ملی گلستان، منطقه شکار ممنوع چلچلی، منطقه حفاظت‌شده جهان‌نما در استان گلستان و منطقه حفاظت‌شده دودانگه و چهاردانگه در استان مازندران بود (شکل ۱).



شکل ۱: تعداد و مناطق نمونه‌برداری شده شوکا در مطالعه حاضر

سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه می‌باشد و مرحله آخر تکثیر توالی شامل دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۷ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در ادامه می‌باشد. به منظور تایید و کیفیت DNA تکثیر شده ناحیه مورد نظر طی واکنش‌های PCR، الکتروفورز محصولات PCR به دست آمده بر روی ژل آگاروز ۲٪ و با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید صورت گرفت. سپس مقدار ۲۰ میکرولیتر از محصول PCR نمونه‌هایی که دارای کیفیت مناسب بودند، جهت خالص‌سازی و تعیین توالی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال شد. جهت ویرایش توالی‌ها از نرم‌افزار Seqscape ۲/۶ استفاده شد. هم‌چنین توالی‌های ثبت شده قابل قیاس، از ژن بانک پایگاه NCBI دریافت شدند و جهت بررسی تنوع ژنتیکی، تعیین هاپلوتیپ‌ها، میزان چندشکلی، ماتریس فاصله ژنتیکی، رسم درخت فیلوژنی Maximum likelihood و زمان واگرایی و آماره F_{st} به ترتیب از نرم‌افزارهای ARLEQUIN ۳/۱، MEGA.۵، NETWORK ۴/۶ و DNAsp.۵ استفاده شد.

سرزمین جمعیت شوکای ایتالیا پرداختند و نشان دادند که زیرگونه بومی ایتالیا (*C. capreolus italicus*) توسط معرفی گونه شوکای اروپایی (*C. capreolus capreolus*) مورد تهدید قرار گرفته است. بررسی تنوع ژنتیکی ژن D-loop در DNA میتوکندری شوکای سیبری مربوط به ناحیه مغولستان نیز توسط Bayarikhgava و همکاران (۲۰۱۳) مطالعه شد.

در مطالعه حاضر، تنوع ژنتیکی DNA میتوکندری در شوکای ایران *C. capreolus* مطالعه شد و تعیین تبارشناسی شوکای ایران به کمک توالی بخشی از ناحیه کنترل ژن D-loop، DNA میتوکندری و بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف شوکا در استان

تعداد ۱۶ نمونه از نقاط مختلف پراکنش شوکا در استان‌های مازندران و گلستان جمع‌آوری شد که شامل نمونه بافت، سرگین و شاخ بود (جدول ۱). استخراج DNA از نمونه‌ها با استفاده از کیت استخراج بافت و سرگین شرکت‌های Bioneer و سیناژن به‌طور جداگانه براساس مراحل پروتکل استخراج انجام گرفت. فرایند تکثیر ژن دی‌لوپ با استفاده از یک جفت پرایمر H۱۶۴۹۸ (۳′-AATTCTCACCCCTAGCTCCCAAAG-۵′) و L۱۵۹۹۵ (۳-CCTGAAGTAGGAACCAGATG-۵) با دستگاه ترموسایکلر انجام گرفت. حجم نهایی واکنش ۲۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر DNA، ۱ میکرولیتر آغازگر رفت و ۱ میکرولیتر آغازگر برگشت به‌همراه ۲۱ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر شده بود در ۳۵ سیکل انجام گرفت. فرایندها شامل مرحله شکسته شدن DNA در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و فاز اتصال آغازگرها در سه مرحله دمایی با زمان‌های مختلف که به ترتیب شامل دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، دمای ۵۴ درجه



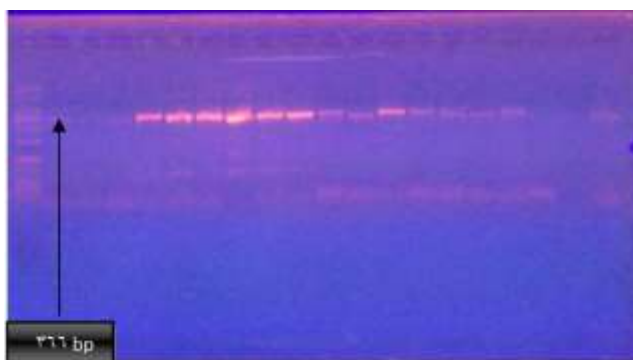
جدول ۱: تعداد افراد نمونه برداری شده شوکا در مطالعه حاضر

نام نمونه	استان نمونه برداری شده	منطقه جمع آوری نمونه	نوع نمونه
شوکا	گلستان	جنگل‌های روستای زیارت (منطقه حفاظت شده جهان‌نما)	شاخ
شوکا	گلستان	جنگل‌های علی‌آباد کتول ریگ چشمه (منطقه شکار ممنوع چلچلی)	شاخ
شوکا	گلستان	جنگل‌های علی‌آباد کتول روستای محمدآباد (منطقه شکار ممنوع چلچلی)	شاخ
شوکا	گلستان	جنگل‌های علی‌آباد کتول روستای استان (منطقه شکار ممنوع چلچلی)	شاخ
شوکا	گلستان	جنگل‌های علی‌آباد کتول افرا تخته (منطقه شکار ممنوع چلچلی)	شاخ
شوکا	گلستان	جنگل‌های جهان‌نما (منطقه حفاظت شده جهان‌نما)	شاخ
شوکا	گلستان	جنگل‌های علی‌آباد کتول منطقه شکار ممنوع سیاه رودبار	شاخ
شوکا	گلستان	جنگل‌های توسکستان شهر جلین (منطقه حفاظت شده جهان‌نما)	شاخ
شوکا	گلستان	جنگل‌های جهان‌نما منطقه دراز نو (منطقه حفاظت شده جهان‌نما)	شاخ
شوکا	گلستان	منطقه شکار ممنوع چلچلی	شاخ
شوکا	گلستان	جنگل‌های جهان‌نما روستای سید میران (منطقه حفاظت شده جهان‌نما)	بافت
شوکا	گلستان	جنگل‌های روستای زیارت (منطقه حفاظت شده جهان‌نما)	شاخ
شوکا	گلستان	جنگل‌های علی‌آباد کتول ریگ چشمه (منطقه شکار ممنوع چلچلی)	شاخ
شوکا	گلستان	پارک ملی گلستان	بافت
شوکا	مازندران	پناهگاه حیات وحش دودانگه چهاردانگه	شاخ
شوکا	مازندران	منطقه حفاظت شده بولا در دودانگه ساری	بافت
شوکا	مازندران	منطقه حفاظت شده بولا در دودانگه ساری	بافت
شوکا	مازندران	منطقه حفاظت شده دودانگه روستای کیاسر	سرگین

نتایج

D-loop، مورد بررسی قرار گرفت. از ۱۶ نمونه، ۸ نمونه دارای توالی مناسب بودند و ۸ نمونه به دلیل قدیمی بودن و آلودگی، دارای توالی مناسب نبوده و حذف گردیدند (شکل ۲).

استخراج DNA برای نمونه‌ها با موفقیت انجام شد. ۱۶ نمونه جهت توالی‌یابی ارسال شدند. نتایج حاصل از توالی‌یابی ژن



شکل ۲: الکتروفورز محصول PCR به طول ۳۶۶ جفت باز بر روی ژل آگارز ۲٪

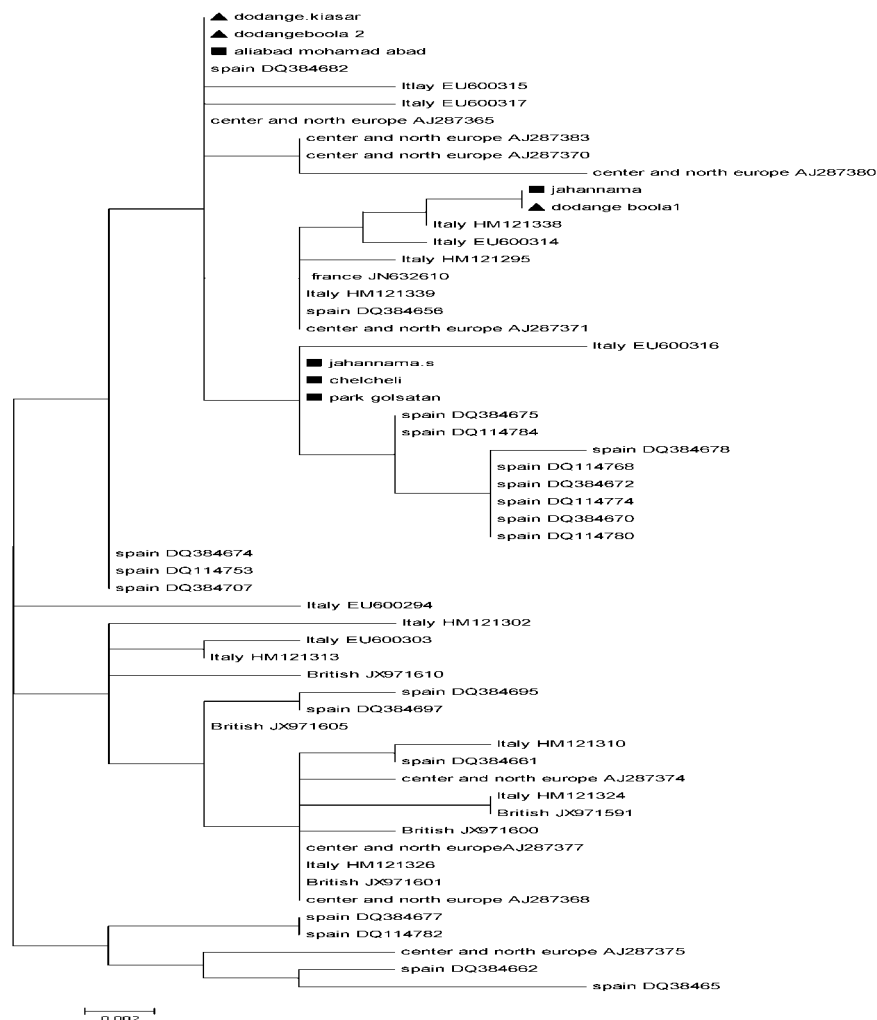
نرم‌افزار ۵ Mega، ردیف و بازرایی شده و همراه با توالی‌های مستخرج از ژن بانک (مجموعاً ۴۹ توالی) با استفاده از نرم‌افزار ۵ Mega مورد آنالیز قرار گرفته و درخت فیلوژنتیکی از نوع Maximum likelihood (شکل ۳) مربوطه به دست آمد. در درخت فیلوژنی به دست آمده، نمونه‌های به شکل مربع ■، نمونه‌های

با استفاده از نرم‌افزار ۲/۶ Seqscape، توالی‌ها بررسی و اصلاح شدند. توالی‌ها با تعداد بازهای آلی مختلف به دست آمده به دلیل کیفیت متفاوت نمونه‌ها در نرم‌افزار فوق مورد بررسی و در نتیجه طول توالی ۳۶۶ نوکلئوتید از ناحیه ژن D-loop به دست آمد. توالی‌های موفق با استفاده از نرم‌افزار ClustalW گنجانده شده در



آسیایی قرار گرفتند. در واقع، نمونه‌های دو استان گلستان و مازندران ضمن نشان دادن قرابت ژنتیکی با یکدیگر، با نمونه‌هایی از اروپا (اسپانیا، ایتالیا و...)، نیز در یک خوشه قرار می‌گیرند.

استان گلستان و نمونه‌های به شکل مثلث ▲ نمونه‌های استان مازندران می‌باشند. براساس تحلیل درخت فیلوژنی، همه نمونه‌های شوکای مربوط به مطالعه حاضر، در شاخه مربوط به شوکای اروپایی



شکل ۳: درخت فیلوژنی شوکاهای استان مازندران و گلستان و نمونه‌های مستخرج از ژن بانک

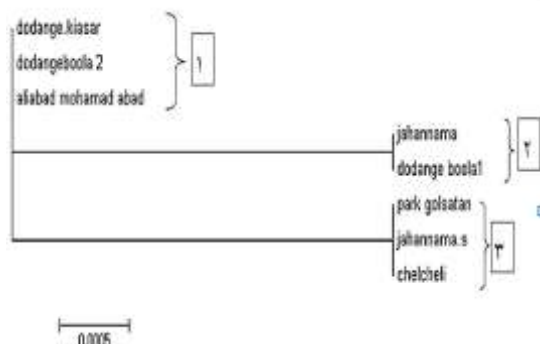
وجود نداشت، اما در برخی مناطق تفاوت ژنتیکی دیده شد به‌عنوان مثال در شکل ۴ بین نمونه‌های ۱ و نمونه ۵ فاصله صفر نشان‌دهنده عدم فاصله ژنتیکی و بین نمونه ۱ و نمونه ۲ فاصله ژنتیکی ۲ که تفاوت ژنتیکی را نشان می‌دهد (شکل ۴). همچنین، درخت فیلوژنی نمونه‌های استان مازندران و گلستان با استفاده از نرم‌افزار Mega.۵ بررسی شد و ۳ هاپلوتیپ در سه گروه شامل گروه اول افراد دودانگه کیاسر، دودانگه بولا ۲ و علی‌آباد محمدآباد و گروه ۲ افراد جهان‌نما، دودانگه بولا ۱ و نهایت گروه ۳ پارک گلستان، جهان‌نما S و چلچلی به‌دست آمد (شکل ۵).

هم‌چنین، مقایسه بین ۸ توالی مورد نظر جهت تعیین تعداد هاپلوتیپ‌ها، توسط نرم‌افزار DNAsp۵ صورت گرفت که وجود ۳ هاپلوتیپ را مشخص نمود که در جدول به‌صورت مشخصی ۸ توالی به ۳ هاپلوتیپ، که هاپلوتیپ شماره ۱ شامل نمونه‌های دودانگه بولا ۲، دودانگه کیاسر و علی‌آباد محمدآباد هاپلوتیپ شماره ۲ شامل نمونه دودانگه بولا ۱ و جهان‌نما و هاپلوتیپ شماره ۳ شامل جهان‌نما S، پارک ملی گلستان و چلچلی دیده شد (جدول ۲). با استفاده از نرم‌افزار Mega.۵ فاصله ژنتیکی بین ۸ نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. طبق نتایج به‌دست آمده بین افراد استان گلستان و مازندران در بعضی مناطق، فاصله ژنتیکی



جدول ۲: تعیین تعداد ۳ هاپلوتیپ با استفاده از نرم‌افزار DNAsp.۵

نوع هاپلوتیپ	جهان نما s	دودانگه بولا ۱	پارک ملی گلستان	چلچلی	دودانگه بولا ۲	جهان نما	دودانگه کیاسر	علی آباد محمد آباد
هاپلوتیپ شماره ۱		*			*		*	*
هاپلوتیپ شماره ۲						*		
هاپلوتیپ شماره ۳	*		*	*				



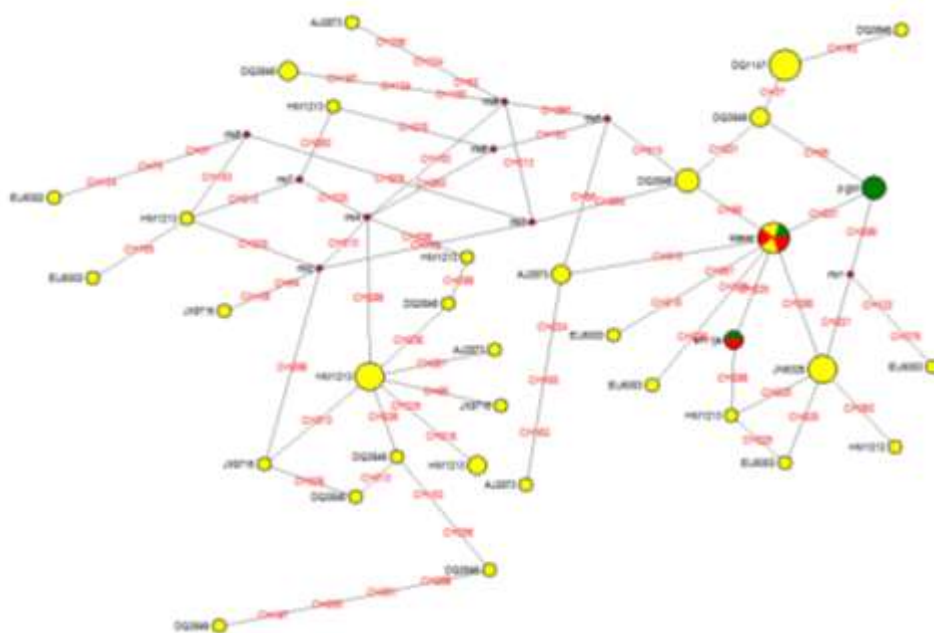
شکل ۵: درخت فیلوژنی نمونه‌های استان مازندران و گلستان با استفاده از نرم‌افزار Mega.۵

	1	2	3	4	5	6	7	8
1. jahannama								
2. park golsatan	2							
3. dodange.kiasar	1	1						
4. jahannama.s	2	0	1					
5. dodange boola1	0	2	1	2				
6. chelcheli	2	0	1	0	2			
7. dodangeboola 2	1	1	0	1	1	1		
8. aliabad mohamad abad	1	1	0	1	1	1	0	

شکل ۴: محاسبه فاصله ژنتیکی بین نمونه‌ها با استفاده از نرم‌افزار Mega.۵

نمونه‌های با رنگ قرمز مربوط به استان مازندران و نمونه‌های با رنگ سبز مربوط به استان گلستان می‌باشند، که نشان‌دهنده ارتباط این دو استان می‌باشد (شکل ۶).

هم‌چنین با استفاده از نرم‌افزار ۴/۶ NETWORK ارتباط شبکه‌ای نمونه‌ها بررسی شد. در این راستا، ابتدا شبکه هاپلوتیپی مربوط به نمونه‌های ایران و سپس شبکه نمونه‌های ایران با نمونه‌های ثبت شده در ژن بانک ترسیم شد. در این شبکه به‌دست آمده،



شکل ۶: شبکه هاپلوتیپی شوکاهای استان گلستان و مازندران در تلفیق با نمونه‌های شوکا در جهان



بحث

بیش تر در مناطق زیستگاهی که شباهت ساختاری دارند، اتفاق می افتد. البته برای درک جزئی تر و بهتر این فرایند و شناخت الگوهای ساختار توزیع فضایی تنوع ژنتیکی این گونه، نیاز به انجام مطالعات در سطح وسیع تر و با بودجه و امکانات بیش تر می باشد. این موضوع می تواند از حیث مدیریت جمعیت های شوکا به لحاظ تعیین واحدهای حفاظتی و مدیریت انتقال و تبادل افراد برای احیاء جمعیت های در خطر، بسیار حائز اهمیت باشد.

هم چنین براساس تحلیل داده های به دست آمده با نرم افزارها، از ۸ توالی به دست آمده، تنها تعداد ۳ هاپلوتیپ به دست آمد، که باز این نتیجه، نمایه نزدیکی و شباهت نمونه های دو استان گلستان و مازندران می باشد. تجزیه و تحلیل روابط ژنتیکی نمونه های مورد بررسی براساس شبکه هاپلوتیپ ها نیز نتایج مشابهی را نشان داده و بر داده های مورد تفسیر در بالا، صحت می گذارد. به طوری که شبکه هاپلوتیپی نمونه های استان گلستان و مازندران با نمونه های اروپایی دارای ارتباطات نزدیک می باشد. در واقع ۳ هاپلوتیپ مشخص شده از نمونه های ایرانی، در بخش های مختلف شبکه قرار گرفته و ضمن مشخص نمودن ارتباط نزدیک نمونه های دو استان گلستان و مازندران، روابط بین نمونه های ایرانی با نمونه های اروپایی را نشان می دهند. به نظر می رسد مانند سایر جمعیت های شوکا در جهان (Randi و همکاران، ۱۹۹۸؛ Wiehler و Tiedemann، ۱۹۹۸) در کنار اثر پدیده های طبیعی، اثرات انسانی نیز از طریق ایجاد آشفتگی در شرایط زیستگاهی و روندهای جمعیتی این گونه در ایران، بر ساختار بندی تنوع ژنتیکی این گونه موثر بوده است. هم چنین در خصوص از بین رفتن کریدورهای ارتباطی از طریق پدیده های انسان ساخت به عنوان مثال بخشی (۱۳۹۲) عبور جاده بین پارک ملی گلستان باعث قطع ارتباط بین دو جمعیت در دو طرف جاده شده و باعث تصادف گونه با وسایل نقلیه عبوری از جاده و از بین رفتن شوکا می گردد، هم چنین قطع ارتباط بین دو جمعیت در دو طرف جاده کاهش هتروزیگوستی می گردد.

البته درک روابط پیچیده حاکم بر جمعیت های شوکا در ایران و به تبع آن اعمال مدیریت حفاظتی، نیاز به بررسی های در مقیاس گسترده تر دارد. لذا پیشنهاد می شود نمونه های دیگر مناطق ایران شامل استان گیلان، منطقه ارسباران استان آذربایجان شرقی و نیز منطقه حفاظت شده بوزین و مره خیل در نواحی غربی ایران، مورد بررسی قرار گیرند. نتایج این مطالعه در مقیاس گسترده، می تواند در مدیریت علمی جمعیت های مناطق مختلف ایران، از حیث ارتباط با یکدیگر و نیز ارتباط با جمعیت های سایر نقاط جهان، بسیار مهم و کاربردی باشد.

ترسیم شبکه با استفاده از نمونه های ایران و جهان مطابق شکل ۳ انجام شد و مشاهده می شود که بین نمونه های ایران و اروپا ارتباط وجود دارد. در واقع هاپلوتیپ شماره ۱ که شامل نمونه های دودانگه کیاسر و دودانگه بولا ۲ از مازندران و علی آباد روستای محمد، تحت عنوان هسته kiasar از استان گلستان می باشد و تقریباً در هسته مرکزی این شبکه هاپلوتیپی قرار دارد. در این هسته علاوه بر نمونه های هاپلوتیپ ۱، نمونه هایی از اسپانیا و نیز ایتالیا وجود دارد، که نشان دهنده شباهت ژنتیکی آن ها با نمونه های هاپلوتیپ ۱ می باشد. هاپلوتیپ ۲ نیز دارای دو نمونه می باشد. یکی در استان مازندران منطقه بولا در دودانگه چهار دانگه و نمونه دیگر در استان گلستان منطقه حفاظت شده جهان نما، که با دو هسته به طور شبکه در ارتباط می باشد. یک هسته مربوط به هسته مرکزی هاپلوتیپ ۱ یا همان kiasar می باشد و هسته دیگر مربوط به نمونه های اسپانیا می باشد که از لحاظ ژنتیکی به هاپلوتیپ ۲ شبیه می باشند. هاپلوتیپ ۳ که هر سه نمونه آن مربوط به استان گلستان می باشد، با دو هسته توسط شبکه متصل می باشد. هسته اول هسته مرکزی هاپلوتیپ ۱ و هسته دیگر شامل نمونه هایی که مربوط به شرق ایتالیا و منطقه آلپ می باشد.

براساس تحلیل درخت فیلوژنتیک منبج از توالی های ۸ نمونه مربوط به مطالعه حاضر و ۴۹ توالی مربوط به سایر مطالعات برگرفته شده از ژن بانک، مشخص گردید که همه ۸ شوکای ایرانی مورد مطالعه حاضر در خوشه مربوط به شوکای اروپایی آسیایی قرار می گیرند. لذا اکنون در کنار داده های ریخت شناسی، داده های مولکولی به دست آمده در مطالعه حاضر، گواه وضعیت تاکسونومیک این گونه می باشد. براساس درخت به دست آمده، تعدادی از نمونه های استان های گلستان و مازندران در مجاورت نمونه های اروپایی از کشورهایی مانند اسپانیا و ایتالیا قرار گرفته و دارای قرابت ژنتیکی است. به خصوص به نظر می رسد که این قرابت، بیش تر نسبت به نمونه های بخش های جنوبی اروپا می باشد. از جمله نکات دیگر درخت فیلوژنتیک به دست آمده آن است که تعدادی از نمونه های دو استان مورد مطالعه، کاملاً از نظر ژنتیکی نزدیک می باشند، در حالی که تعدادی از نمونه های استان گلستان با مقداری فاصله در خوشه دیگری به صورت جدا قرار می گیرند. لذا به نظر می رسد که احتمالاً بین افراد دو استان در بعضی مناطق، گذارها و تبادل ژن هایی صورت می پذیرد. با توجه به داده های به دست آمده، به نظر می رسد که این گذارها



and recent nonequilibrium dynamics, *Molecular Ecology*. Vol. ۱۳, pp: ۳۰۷۱-۳۰۸۳.

۱۶. **Soffiantini, C.S.; Malacarne, M.; Gandolfi, G.; La Fata, I.; Pisani, G.M.; Beetti, V. and Sabbioni, A., ۲۰۰۷.** Roe deer (*Capreolus capreolus*) in Parma Province: Morphological characterization of animals with known mitochondrial haplotype. *Ann. Fac. Medic. Vet. Di Parma*. Vol. ۲۷, pp: ۱۷۳-۱۸۲.
 ۱۷. **Valvo, G.; Sturaro, E.; Maretto, F. and Ramanzin, M., ۲۰۰۹.** Genetic analysis reveals roe deer (*Capreolus capreolus*) population structure in North-Eastern Italian Alps.
 ۱۸. **Vernesi, C.; Pecchioli, E.; Caramelli, D.; Tiedemann, R.; Randi, E. and Bertorelle, G., ۲۰۰۲.** The genetic structure of natural and reintroduced roe deer (*Capreolus capreolus*) populations in the Alps and central Italy, with Reference to the Mitochondrial DNA Phylogeography of Europe. *Molecular Ecology*. Vol. ۱۱, pp: ۱۲۸۵-۱۲۹۷.
 ۱۹. **Wiehler, J. and Tiedemann, R., ۱۹۹۸.** Phylogeography of the European roe deer *Capreolus capreolus* as revealed by sequence analysis of the mitochondrial control S. *Acta Theriologica*. Vol. ۵, pp: ۱۸۷-۱۹۷.
- منابع**
۱. اعتماد، ا.، ۱۳۶۴. پستانداران ایران (جلد دوم)، نشر سازمان حفاظت محیط‌زیست، تهران. ۲۹۳ صفحه.
 ۲. **بخشی، ح.، ۱۳۹۲.** مدل‌سازی مطلوبیت زیستگاه شوکا (*Capreolus capreolus*) با استفاده از روش تحلیل عاملی آشین بوم شناختی در پارک ملی گلستان. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد، گروه محیط‌زیست دانشکده شیلات و محیط‌زیست. دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۶۸ صفحه
 ۳. **ضیایی، ه.، ۱۳۸۸.** راهنمای صحرایی پستانداران ایران. نشر کانون آشنایی با حیات‌وحش. تهران. ۴۳۲ صفحه.
 ۴. **فریلند، ج.، ۱۳۸۹.** بوم‌شناسی مولکولی. ترجمه ملکیان، م.، جهاد دانشگاهی مشهد. ۳۰۴ صفحه.
 ۵. **فیروز، ا.، ۱۳۷۸.** حیات‌وحش ایران. انتشارات مرکز نشر دانشگاهی با همکاری انتشارات دایره سبز. تهران. ۴۹۱ صفحه.
 ۶. **ملکیان، م.، ۱۳۸۸.** کاربرد نشانگرهای مولکولی در حفاظت از تنوع زیستی. سومین همایش و نمایشگاه تخصصی مهندسی محیط زیست.
 ۷. **هلمز، ف.، ۱۳۸۴.** در جستجوی شوکا گوزن در حال انقراض ایران. ترجمه دلفان آذری، ش.، انتشارات مهر. تهران. ۱۲۰ صفحه.
 ۸. **Bayarlkhagva, D., ۲۰۱۳.** Genetic diversity of mitochondrial DNA D-Loop sequence of siberian roe deer (*Capreolus pygargus*) inhabiting mongolia, *International Journal of Sciences*. Vol. ۳, pp: ۱۰۵-۱۰۸
 ۹. **Ellerman, J.R. and Scott, M., ۱۹۵۱.** Checklist of palaeartic and Indian Mammals. *Brit. Mus. (N.H.)* ۱۷۵۸ to ۱۹۴۶ London.
 ۱۰. **Ghazanfari, H.; Alizadeh, A.; Ataie, F. and Krami, M., ۱۹۹۸.** Preliminary study roe deer forest habitat bozin and marakhil Kermanshah Province.
 ۱۱. **Grzimek, B.; Schlager, N. and Olendorf, D., ۲۰۰۲.** Animal life encyclopedia, second edition Vol. ۱۵ Mammals IV.
 ۱۲. **Majnoonian, H.; Zehzad, B.; Kiabi, B.; Darreh shoori, F. and Meigouni, H.G., ۱۹۹۹.** Golestan park (Biosphere Reserve) department of the environment division of natural environment and biodiversity Golestan national park rehabilitation plan. ۱۷ P.
 ۱۳. **Mucci, N.; Mattucci, F. and Randi, E., ۲۰۱۲.** Conservation of threatened local gene pools: Landscape genetics of the Italian doe deer (*c. italicus*) populations. In: *Evolutionary Ecology Research*. Vol. ۱۴, pp. ۸۹۷-۹۲۰.
 ۱۴. **Randi, E.; Pierpaoli, M. and Danilkin, A., ۱۹۹۸.** Mitochondrial DNA polymorphism in populations of Siberian and European roe deer (*Capreolus pygargus* and *C. capreolus*). *Heredity*. Vol. ۸۰, pp: ۴۲۹-۴۳۷.
 ۱۵. **Randi, E.; Alves, P.C.; Carranza, J.; Milosevic-Zlatanovic, S.; Sfougaris, A. and Mucci, N., ۲۰۰۴.** Phylogeography of roe deer (*Capreolus capreolus*) populations: The effects of historical genetic subdivisions

