13 (2) 33-38, Spring 2021

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

Original Research Paper

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

Javad Ghahari , Davood Radmehr , Shirin Mahmoodi *

*HQHUDO 'HSDUWPHQW RI (QYLURQPHQWDO 3URWHFWLRQ RI (DVW $]HUEDL
9HWHULQDU\ 3KDUPDF\ 7DEUL] ,UDQ
'HSDUWPHQW RI (QYLURQPHQW)DFXOW\ RI 1DWXUDO 5HVRXUFHV DQG (QY

Key Words
Arasbaran
Red Deer
sex determination

Abstract

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

Materials & Methods: For this purpose, bleeding in deer, taken from jugular vein 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 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 fema deer showed. To confirm this, residual PCR products was applied for sequencing.

Conclusion: Genotyping results showed that 9 females and 15 males were identified a indicators of effective population size, 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 Y (SRY) که فقط روی کروموزوم Y وجود دارد به‌منظور تعیین جنسیت استفاده شده است (Gandini و همکاران، ۲۰۰۷). آمیلوژن AMEL که‌روی 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 ۲۰°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 (۵M 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 (NaCl 1M ،HCl 10mM ،KCl۱M) 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 (دستگاه‌اسپکتروفتومتر 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 درحجم 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، ۰/۰۹mM اسیدبوریک و ۰/۰۲EDTA 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 A1). با استفاده از شرایط بهینه PCR جهت تعیین جنسیت، همان‌طورکه در شکل B1 مشاهده می‌شود قطعات ۱۸۰، ۲۸۰ و ۳۱۰ جفت باز به خوبی تکثیر شدند.