



Original Research Paper

Sex determination in Red deer (*Cervus 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 (*Cervus 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](https://doi.org/10.22034/aej.2020.135241)

مقاله پژوهشی

تعیین جنسیت گوزن قرمز (زیرگونه مرال) با استفاده از تکنیک Duplex PCR به عنوان، روشی مناسب برای تخمین اندازه مؤثر جمعیت، جهت طراحی برنامه های حفاظت ژنتیکی آن در زیستگاه های کشور

جواد قهاری^۱، داود رادمهر^۲، شیرین محمودی^{۳*}

^۱ اداره کل حفاظت محیط زیست آذربایجان شرقی، تبریز، ایران

^۲ داروخانه دامپزشکی، تبریز، ایران

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

چکیده

کلمات کلیدی

ارسباران
گوزن قرمز
تعیین جنسیت

مقدمه: به علت اندازه کوچک جمعیت و ایزوله شدن گوزن قرمز زیرگونه مرال (*Cervus elaphus*) در منطقه حفاظت شده ارسباران-آینالو، مقدار هم خونی بالاست. کنترل جنسیت جهت حفظ اندازه مؤثر جمعیت در حد مناسب، امکان ایجاد هم خونی را کاهش می دهد. **هدف** از تحقیق حاضر، دستیابی و بهینه سازی تکنیک تعیین جنسیت در گوزن مرال به عنوان روشی مناسب برای تخمین اندازه مؤثر جمعیت و حفاظت ژنتیکی آن در ارسباران و زیستگاه های کشور می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه نمونه خون از ورید و داجی و ورید دمی گوزن ها به مقدار ۵ سی سی در داخل لوله های حاوی خلأ و EDTA تهیه و به بانک ژن اداره کل حفاظت محیط زیست آذربایجان شرقی منتقل گردید. روش Duplex PCR بر طبق آغازگرهای کروموزوم (Y) تعیین جنسیت منطبق با ژن DEAD-box Y-linked protein (DBY) جایگاه ریزماهوراک BMC1009 به عنوان کنترل داخلی تکثیر شد. پس از دستیابی به شرایط بهینه تکنیک و تأیید جنسیت نمونه های با جنسیت معلوم از پیش تعیین شده، بار دیگر اقدام به جمع آوری مدفوع و استخراج DNA از نمونه های با جنسیت مجهول و تعیین جنسیت آن ها گردید.

نتایج: نتایج این تحقیق با تکرارپذیری بالا، وجود دو باند ۳۱۰-۲۸۰ (ریزماهوراک پلی مورف) و ۱۸۰ جفت باز (bp) در گوزن های نر و ۳۱۰-۲۸۰ (ریزماهوراک پلی مورف) جفت باز (bp) در گوزن های ماده را نشان داد.

نتیجه گیری و بحث: نتایج ژنوتایپینگ نشان داد که تعداد ۸ ماده و ۱۵ نر شناسایی شد و شاخص اندازه مؤثر جمعیت (۴) محاسبه گردید.

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

تاریخ دریافت: ۱۳ خرداد ۱۳۹۹؛ تاریخ داوری: ۳۰ مرداد ۱۳۹۹؛ تاریخ اصلاح: ۲۴ 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 Fredstad، ۲۰۰۶). چندین روش مولکولی برای تعیین جنسیت وجود دارد که شامل آنالیزهای کروموزومی، تعیین آنتی‌ژن ایموگلوبین، تعیین فعالیت آنزیمی مرتبط با کروموزوم جنسی و هیبریداسیون پروب خاص کروموزوم Y است (Edwards و Gurdner، ۱۹۶۸؛ Anderson، ۱۹۸۷؛ Caoe و همکاران، ۲۰۰۵). آنالیزهای مبتنی بر PCR به دلیل این که نتایج حساس، سریع و قابل اعتمادی نسبت به سایر رویکردهای آزمایشگاهی مانند تست ایمونولوژیکی برای آنتی‌ژن H-R، کاربوتاپینگ 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 به منظور تعیین جنسیت استفاده شده است (Gandini و همکاران، ۲۰۰۷). آمپلوژن 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 به جز اقیانوس 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 mesopotami*)، گوزن قرمز زیرگونه مرال (*Cervus elaphus*) و شوکا (*Capreolus 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 به منظور 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 به منظور تعیین جنسیت نیازمند صید حیوان است و گاهی منجر به تحمیل استرس به حیوان می‌شود و حتی ممکن است دقت آن بالا نباشد لذا روش‌های مولکولی جایگزین مناسبی برای این امر محسوب می‌شوند. اگرچه هزینه‌بر می‌باشند ولی معایب روش‌های غیرمولکولی 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 نباشد و به دلیل این که به سن، ویژگی‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی بستگی دارد. دسترسی به برخی از گونه‌ها به دلایل مختلف از جمله گریز یا 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 در دسترس 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 کلبر و در ارتفاع ۱۵۰۰ متری از سطح دریا) واقع در شمال غرب کشور، صورت گرفت. خونگیری از ورید و داج گردن و ورید دمی ۵ راس گوزن به میزان ۵ سی‌سی در لوله‌های خلأدار حاوی ماده ضدانعقاد EDTA انجام گرفت. پس از اتمام خونگیری، نمونه‌ها به آزمایشگاه ژنتیک مولکولی (بانک شمال غرب) 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 آن جایی که 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 به روش Boom و همکاران (۱۹۸۹) که مبتنی بر استفاده از گوانیدین تیوسیانات و سلیکاژل 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.

سانتی گراد نگهداری شدند. از آنجایی که تعیین خلوص DNA مورد مطالعه از اهمیت خاصی برخوردار است لذا برای بررسی کیفیت و تعیین مقدار DNA از روش های الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد واسپکتروفومتری (دستگاه اسپکتروفومتری مدل HACH DR/4000U)، استفاده شد.

واکنش زنجیره ای پلی مرز: در این مطالعه به منظور تکثیر دو قطعه پلی مورف ۳۱۰-۲۸۰ جفت باز و مونومورف ۱۸۰ جفت باز از روش Duplex PCR بر طبق آغازگرهای کروموزوم (Y) تعیین جنسیت، و جایگاه ریزماهورک با الگوی مونومورف BMC1009 کنترل داخلی (جدول ۱) تکثیر شد.

سپس رسوب باقی مانده با بافر سالیین نرمال شستشو داده شد. در ادامه برای استخراج DNA از خون ۵۰۰ میکرولیتر بافر هضم کننده (۵M تیوسیونالات گوانیدین، ۲۰mM EDTA، ۴۰mM Tris، ۴۰ گرم TritonX100، ۱۰ گرم DTT) به هر یک از نمونه ها اضافه شده و به مدت ۵ دقیقه در بن ماری با دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. سپس ۲۰ میکرولیتر محلول نوکلئاز (۴ گرم ذرات سیلیکا، ۱۰۰ میکرولیتر گوانیدین) اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه به آرامی ورتکس گردید. سپس به محیط همگن شده، ۴۰۰ میکرولیتر بافر سالیین-Tris، ۲۰mM EDTA، ۱۰mM KCl، ۱۰mM HCl، ۱M NaCl) اضافه و در نهایت از طریق ماده Extra Gene (۱۰٪ رزین ۰/۰۲٪ ماده رنگی OrangG، ۰/۰۱ درصد TritonX 100)، DNA زرد رنگ از سایر ناخالصی ها جدا گردید. نمونه های DNA استخراج شده در دمای ۷۰- درجه

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	۱۸۰ bp	Ellegren (۲۰۰۳)
BMC1009	GCACCAGCAGAGAGGACATT ACCGGCTATTGTCCATCTTG	اتوزومی	۲۸۰-۳۱۰ bp	

مخلوط نموده سپس در چاهک های ژل قرار داده شدند. نمونه ها با ولتاژ ۷۰ ولت و به مدت ۱ ساعت الکتروفورز شدند و سپس با استفاده از دستگاه ژل داک مورد بررسی قرار گرفتند. در ضمن مدل دستگاه الکتروفورز Biometra Standard Power Pack P25 بود.

استفاده از تکنیک Size Fragmentation: پس از حصول نتایج و بارگذاری محصولات حاصل از تکثیر به منظور تأیید نتایج به دست آمده، محصولات باقی مانده 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، نمونه های DNA استخراج شده مورد بررسی قرار گرفت به گونه ای که وجود باندهای کاملاً تیز و بدون کم ترین کشیدگی که حاکی از بهترین کیفیت DNA است، مشاهده شد (شکل ۱A). با استفاده از شرایط بهینه PCR جهت تعیین جنسیت، همان طور که در شکل ۱B مشاهده می شود قطعات ۱۸۰، ۲۸۰ و ۳۱۰ جفت باز به خوبی تکثیر شدند.

واکنش زنجیره ای پلیمرز در حجم ۵۰ میکرولیتر شامل dNTPs (۱۰ میلی مولار) یک میکرولیتر، پرایمر ۱۰۰ پیکومول بر میلی لیتر، 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. چرخه های دمایی واکنش PCR به ترتیب شامل مرحله واسرشت اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، واسرشت ثانویه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال پرایمر به هدف در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله تکثیر نهائی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه بهینه سازی گردید. جهت تأیید مجدد، نمونه ها و محصولات تکثیری برای تعیین سایز در دستگاه QIAxcel 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 ۰/۲٪ به همراه بافر سنگین کننده استفاده شد. جهت رنگ آمیزی ژل از اتیدیوم بروماید استفاده شد. برای تأیید قطعات تکثیر شده و نتایج حاصل از هضم آنزیمی از سایز مارکر Ladder 1 Kb از شرکت Fermentase، استفاده گردید. ابتدا آگارز ۰/۱٪ با به کارگیری بافر (۰/۰۹mM Tris، ۰/۰۹mM EDTA و ۰/۰۲mM TBE1X) تهیه و به ازای هر ۱۰ میلی لیتر ژل ۰/۲ میکرولیتر اتیدیوم بروماید (۱۰ میلی گرم/میلی لیتر) به آن اضافه و در ظرف مخصوص حاوی شانه ریخته شد. بعد از بسته شدن ژل، به ازای ۷ میکرولیتر محصول PCR، ۲ میکرولیتر لودینگ بافر (بروموفنل بلو ۰/۲۵ درصد، ساکارز ۴۰ درصد)

نمونه‌های با اندازه باند پلی‌مورف ۲۸۰-۳۱۰ 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 تأیید می‌کند (شکل ۲).

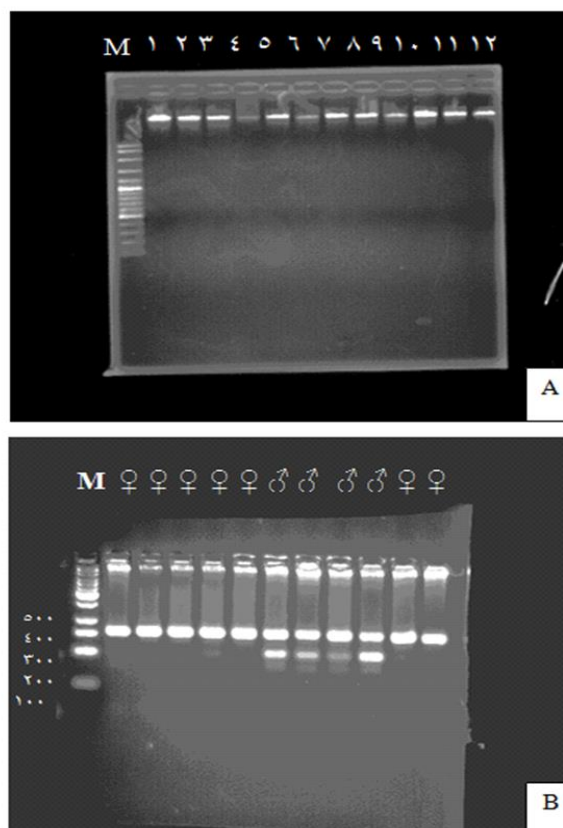
اندازه مؤثر جمعیت: برای جمعیت گوزن اقدام به محاسبه شاخص اندازه مؤثر جمعیت با در دست داشتن تعداد نر و ماده شناسایی شده از روی نمونه‌های سرگین در نرم‌افزار اکسل محاسبه گردید. برای جمعیت‌هایی که به‌صورت تصادفی آمیزش می‌کنند با تعداد مساوی افراد نر و ماده، ارتباط بین اندازه جمعیت واقعی و اندازه جمعیت مؤثر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

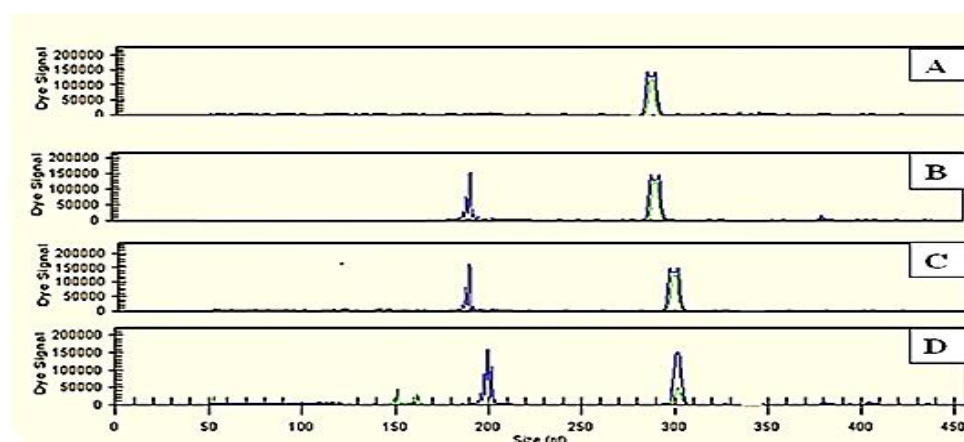
$$\frac{1}{N_e} = \frac{1}{4} \left[\frac{1}{N_{males}} + \frac{1}{N_{females}} \right] = N_e = \left[\frac{4(N_{males} + N_{females})}{N_{males} + N_{females}} \right] = 4$$

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.



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



شکل ۲: تأیید نتایج تعیین جنسیت با استفاده از دستگاه سیکونسر و روش Size Fragmentation همان‌طور که 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 بهینه سازی تکنیک تعیین جنسیت در گوزن قرمز مرال به عنوان ابزاری مناسب برای تخمین اندازه مؤثر جمعیت و حفاظت ژنتیکی این گونه در ارسباران و متعاقب آن زیستگاه های کشور می باشد. نتایج این تحقیق نشان داد که به طور تخمینی عدم تعادل بین تعداد گوزن های نر و ماده وجود دارد که خود به طور غیرمستقیم باعث کاهش اندازه مؤثر جمعیت می گردد. کاهش اندازه مؤثر جمعیت با افزایش نرخ درون آمیزی رابطه مستقیم دارد و منجر به کاهش تنوع ژنتیکی ناشی از رانش ژنتیکی می شود که کاهش تنوع ژنتیکی منجر به کاهش تنوع آلی و افزایش هموزیگوسیتی می شود. بنابراین تعیین اندازه مؤثر جمعیت های طبیعی یک موضوع مهم به منظور مدیریت و حفاظت این گونه ها است (Graham و همکاران، ۲۰۰۱) از این رو اتحادیه جهانی حفاظت این موضوع را یک عنصر مهم و ضروری در تعیین گونه های در خطر انقراض در نظر گرفته است بنابراین مدیریت و حفاظت از حیات وحش نیازمند برآورد اندازه مؤثر جمعیت است (Gour و همکاران، ۲۰۰۸). از نقطه نظر تئوری بیولوژی حفظ ذخائر اندازه جمعیت مؤثر بایستی بیش از ۵۰ حیوان باشد، در غیر این صورت تجمع موتاسیون های تخریبی جزئی، باعث انقراض جمعیت مربوطه خواهد شد (Lynch و همکاران، ۱۹۹۵). در سیستم های مدیریت تلاقی گوزن های موجود در مناطق ایزوله و محافظت شده، کنترل جنسیت دارای مزیتی آشکار است. چرا که حفظ اندازه مؤثر جمعیت در حد مناسب، امکان ایجاد هم خونی و Bottleneck را کاهش می دهد و از کاهش شایستگی تولیدمثل و بروز بیماری های ژنتیکی و کاهش سازگاری در برابر تغییرات محیطی جلوگیری می کند. اطلاع از نسبت گوزن نر به ماده در قرنطینه آینالو در ارسباران می تواند راهکارهای مدیریتی برای طراحی برنامه ابقاء گونه و تولیدمثل مؤثر در جمعیت قرنطینه را میسر سازد. این موضوع در معرفی ترکیب جنسی مناسب و ایجاد گله پشتیبان فاقد هم خونی در مراحل بعدی طرح احیاء نسل مرال در این منطقه اهمیت به سزایی خواهد داشت. تعیین جنسیت در حیات وحش اغلب دشوار می باشد. تعیین جنسیت گوزن های یک ساله و بزرگ از روی ظاهر استخوان های بزرگ نظیر جمجمه به آسانی صورت می گیرد، اما تعیین جنسیت در گوساله گوزن ها به دلیل ظهور صفات جنسی ثانویه، سخت تر است (Takahashi و همکاران، ۱۹۹۸). تکنیک های پیشرفته متعددی برای تعیین جنسیت در انواع گوزن ها شناسایی شده است (Scandura، ۲۰۰۵). تاکنون، در میان ۱۷ گونه زیرخانواده Cervinae تنها تعداد کمی با روش های مولکولی تعیین جنسیت شده اند. جنس نر با تکثیر ژن SRY Determination (Region of Y) بر روی کروموزوم جنسی در بیش تر گونه های گوزن شناسایی می شود. ژن SRY پروتئینی را که به عنوان جعبه گروهی با

تحرک بالا (High) Motility Group HMG شناخته می شود، کددهی می کند. 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 به ترتیب AMELX و AMELY نامیده می شود، در تعیین جنسیت گوزن قرمز اروپایی (*Cervus elaphus*) به کار رفته است (Pfeiffer و همکاران، ۲۰۰۵). پرایمرهای ژن آملوژنین به کار رفته در گله های گاوی برای تعیین جنسیت در گوزن Sika نشان داد که بیش از ۹۰ درصد هم پوشانی میان ژن آملوژنین گونه های گوزن و گاو وجود دارد. AMELY گوزن Sika ۵۴ جفت باز (bp) کوتاه تر از AMELX می باشد که این حذف تنها در یک نقطه ملاحظه گردید (Torbatinejad و همکاران، ۲۰۱۱). راهکاری مدیریتی پیشنهادی برای افزایش شاخص اندازه مؤثر جمعیت در حیات وحش را می توان در تکنیک های حفظ ذخائر ژنتیکی دانست. تکنیک های حفظ ذخائر ژنتیکی جانوری (AnGR) به طور کلی به روش های in situ و روش های ex situ تقسیم می شوند. روش های in situ، یعنی نگهداری به صورت جانوران زنده از یک نژاد در شرایطی خارج از سیستم تولید خودشان. به عنوان مثال می توان به نگهداری مرال در زیستگاه آن واقع در منطقه حفاظت شده ارسباران-قرنطینه آینالو اشاره کرد. روش های ex situ خود به روش های Cryo Conservation که به صورت منجمد نمودن مواد ژنتیکی که شامل سلول های هاپلوئید مثل (اسپرم و اوول)، منجمد نمودن سلول های دیپلوئید مثل (انجماد در شرایط in vivo و in vitro برای جنین و سلول های غیر جنسی) و انجماد DNA می باشد که در مراحل تحقیقاتی و باروری با تکنیک IUI می توان به تکثیر این زیرگونه با ارزش پرداخت و ex situ live (حفظ و نگهداری جانوران به صورت زنده و در محیطی غیر از محیط تولید خود آن ها) تقسیم می شود. در روش in situ به خاطر این که بر نگهداری جانوران در محیط و سیستم تولیدی خود آن ها تأکید شده در نتیجه این روش طیف وسیعی از اهداف حفظ ذخائر ژنتیکی را می تواند محقق کند (Gandini و همکاران، ۲۰۰۷). شایان ذکر است با وجود این که نمونه های سرگین تازه جمع آوری شدند ولی کیفیت DNA استخراج شده از خون بهتر از نمونه های سرگین بود. با این حال در نمونه برداری غیر تهاجمی به دلیل این که هیچ گونه استرسی به گونه وارد نمی شود و سلامتی حیوان را تهدید نمی کند بنابراین جایگزین مناسبی برای روش های نمونه برداری تهاجمی است و به منظور اهداف حفاظتی در الویت قرار دارد و رویکردهای نوینی برای برآورد توزیع و فراوانی گونه ها و تعیین جنسیت گونه ها فراهم می کند. Alec و همکاران (۲۰۰۷) از تکنیک مبتی PCR برای تعیین جنسیت گوزن دم سفید (*Odocoileus virginianus*) استفاده کرد و اذعان داشتند که روش مبتنی بر PCR در شناسایی

6. Dreessen, C.I.E.M., Dumonlin, I.C.M., Evers, J.T.H., Geraedts, I.P.M. and Pieters, M.H.F.C.: 1995. Multilocus polymerase chain reaction for sex determination of single mouse blastomeres. *Mol human reprod* Vol. 10, pp: 743-748.
7. Etemad, F.: 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 noninvasive research.
9. Gardner, R.J. 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, I., Tolleson, D., Stuth, J. and Norman, A.: 2001. Use of near infrared reflectance spectroscopy to differentiate neonancy status and gender of hair sheep in the tropics. *J. Anim. Sci.* Vol. 79, No. 26.
11. Gokulakrishnan, P., Kumar, R., Sharma, R., Mendiratta, S. and Sharma, D.: 2012. Sex determination of cattle meat by polymerase chain reaction amplification of the DFAD 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, 374 p. Published by Planning office of Ministry of Agriculture, Iran, Jame Comnanv, Tehran, 1992.
16. Lee, J.H., Park, J.H., Lee, S.H., Park, C.S. and Jin, D.L.: 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 Stroheck, C.: 2000. Estimating noninvasive size of grizzly bears using hair capture, DNA profiling, and mark-recapture analysis. *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 Wildlife society meeting*, College Station Texas, 25-27 March.
25. Ventrella, D., Elmi, A., Barone, F., Carnevali, G., Govoni, N. and Barci, 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 Benkeboom, T.W.: 1998. Sex determination, sex ratios, and genetic conflict. *Annual Review of Ecology 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 (*Odocoileus virginianus*) using the polymerase chain reaction. *Journal of Forensic Science*, Vol. 43, No. 3, pp: 477-82.
29. Yamauchi, K., Hamasaki, S.I., Miyazaki, K., Kikuchi, T., Takeuchi, Y. and Mori, Y.: 2000. Sex Determination based on fecal DNA analysis of the amelogenin gene in sika deer (*Cervus nippon*). *Journal of Veterinary Medical Science*, Vol. 62, No. 6, pp: 669-671.

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 استفاده نمودند. 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 پلی‌مرز 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 در نتیجه برای هر گونه، نژاد متفاوت است. با توجه به نتایج به‌دست آمده در این مطالعه و نتایج مطالعات مشابه، نتیجه‌گیری می‌شود که استفاده از روش‌های مولکولی در تعیین 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 نزدیک جمعیت این گونه به‌شدت در معرض خطر انقراض قرار می‌گیرد از این‌رو بررسی ژنتیکی گونه حائز اهمیت است. یکی از مشکلات مطالعه حاضر تعداد کم نمونه بود و به‌دلیل این که مطالعات ژنتیکی به تعداد کم نمونه حساس هستند بدین منظور 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 مرحله‌سخت نمونه‌گیری و مهار گوزن‌هایاری نمودند کمال سپاسگزاری و امتنان به‌عمل می‌آید.

منابع

1. Anderson, G.B.: 1987. Identification of embryonic sex detection of H-Y antigen. *Theriogenology* Vol. 27, pp: 81-97.
2. Alec, R., Lindsay, A., Jerrold, F. and Belant, L.: 2007. A simple and improved PCR-based technique for white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) sex identification, *Conserv Genet* Vol. 9, pp: 443-447.
3. Bennett, L.L., English, P.F. and McCain, R.: 1940. A study of deer populations 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.T., Wertheim-Van Dillen, P.M.F. 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.