

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی کرجان

دانشکده شیلات و محیط زیست

پایان نامه برای اخذ مدرک کارشناسی ارشد (M. Sc) در رشته محیط زیست  
**شناسایی گونه‌های گوشت‌خواران بزرگ جثه بر اساس پلی مورفیسم  
طول دی‌ان‌ای میتوکندریایی**

تحقیق و نگارش

وحید زمانی

اساتید راهنما

دکتر حمیدرضا رضایی

دکتر سید محمود عقیلی

۱۳۹۰



# دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

دانشکده شیلات و محیط زیست

پایان نامه برای اخذ مدرک کارشناسی ارشد (M. Sc) در رشته محیط زیست

شناسایی گونه‌های گوشت‌خواران بزرگ جثه بر اساس پلی مورفیسم

طول دی‌ان‌ای میتوکندریایی

تحقیق و نگارش

وحید زمانی

اساتید راهنما

دکتر حمید رضا رضایی

دکتر سید محمود عقیلی

استاد مشاور

دکتر علی شعبانی

تقدیم بہ

استاد علم و اخلاق دکتر حمید رضا رضایی

و

مخطبانان شہید ایران زمین

## شکر و قدردانی

خدای منان را شاکرم که فرصت علم اندوزی را تا این مرحله در اختیارم نهاد تا در محضر اساتید گران بهای گروه محیط زیست به کسب علم و اخلاق بپردازم. حال که بعد از سه سال کار مداوم نخواست این پایان نامه به پایان رسید، بر خود لازم می دانم از عزیزی که در طول این سه سال در مراحل مختلف مریاری نمود و بدون مساعدت آنان اتمام این پایان نامه ممکن نبود، پاسکزاری کنم.

از استاد راهنمای بزرگوارم دکتر حمید رضا رضایی به خاطر زحمات و حمایت های بی دریغشان، صبر و تحملشان و راهنمایی های ارزنده شان کمال شکر را دارم. بودن در کنار ایشان تجربه تکرار نپذیری بود که مهم تر از کسب دانش به من انسانیت آموخت. پاسکزاری از ایشان در قالب کلمات میسر نیست.

از خانواده عزیز و مهربانم که در تمامی مراحل زندگی حامی و پشتیبانم بودند پاسکزاریم.

از اساتید محترم گروه محیط زیست کرگان به خصوص آقای دکتر وارسته

از دوستان عزیزم آقایان داوود خداکار، محمد پور قاسم، لقمان نادری، علی خانی و اسکندر کردمردی و خانم های ماسمینیان، زهره قدسی، سولماز رفیعی و

ملیکا قلیچ پور به خاطر همکاری در جمع آوری نمونه ها و کارهای آزمایشگاهی سپاسگزارم.

از مهندس قائمی عزیز و بزرگوار به خاطر کمک ها و توصیه های صمیمانه اش تشکر می کنم.

مراتب تشکر خود را از:

از کارمندان محیط زیست استان قزوین به خصوص آقایان مهندس رضا زاده و خسروی

از کارمندان محیط زیست استان گلستان به خصوص آقایان مهندس خیرآبادی، حسینی و شکلیا

از کارمندان محیط زیست استان خراسان شمالی به خصوص آقایان مهندس کردمردی، جعفری و فخرانی

از کارمندان اداره محیط زیست شهرستان سبزوار به خصوص آقای مهندس خانی

از کارمندان محیط زیست استان همدان به خصوص آقایان مهندس نوری و رحیمی

از کارمندان محیط زیست استان اصفهان به خصوص خانم های مهندس رفیعی و امیدی

از کارمندان محیط زیست استان کردستان به خصوص آقای مهندس عامری

از کارمندان محیط زیست استان آذربایجان غربی به خصوص آقای مهندس شجاع، تران، رعناقد و دکتر حسینی

از کارمندان محیط زیست استان مازندران به خصوص آقای مهندس ربیعی و خانم مهندس طالبی

از کارمندان محیط زیست استان سمنان

از محیط بانان جان برکف پارک ملی گلستان به خصوص آقایان غلامی، سعدی زاده، مسعودی، افشین، طبرسا، عیدوزایی، حسینی، حسن زاده، سعیدی،

سیدانگی، دودی و آقایان مهندس رسانی و سلیماری

از محیط بانان جان برکف پارک ملی ساریگل به خصوص آقای مهندس محمد تقی سی

از محیط بانان جان برکف پارک ملی توران

از محیط بانان جان برکف منطقه حفاظت شده جهان نامه خصوص آقایان مهندس پورقاسم ورنجبر و آقایان فتوی و بارانی

از محیط بانان جان برکف منطقه حفاظت شده دره انجیر به خصوص آقای مهندس موسوی

صمیمانه ابراز می دارم.

## چکیده

شناسایی گونه‌های گوشت‌خواران بزرگ جثه بر اساس پلی‌مورفیسم طول دی‌ان‌ای میتوکندریایی

مطالعه بر روی گوشت‌خواران به دلیل جمعیت محدودشان و ویژگی‌های رفتاری خاص (شبگردی، استتار و...) معمولاً به صورت غیرمستقیم و به کمک نمایه‌های زیستی (مدفوع، ادرار، خون و...) صورت می‌گیرد. در این شرایط که به جای خود حیوان با نمایه‌های آن کار می‌کنیم امکان اشتباه در تشخیص گونه‌ها وجود دارد. در مبحث تخلفات شکار نیز شناسایی بافت‌های مکشوفه از شکارچی-های متخلف و آثار خون باقی‌مانده بر روی ادوات شکار به راحتی و با روش‌های متداول چشمی میسر نیست. از این رو، در این پژوهش سعی شده روشی مبتنی بر ویژگی‌های ژنتیکی برای شناسایی این گونه‌ها را به دست آورده و کلیدهای شناسایی ژنتیکی برای گوشت‌خواران بزرگ جثه ارائه شود. در این پژوهش نمونه‌های بافت به دست آمده از ۶ گونه گربه‌سان، ۵ گونه سگ‌سان، یک گونه کفتار و یک گونه خرس مورد استفاده قرار گرفت. پس از استخراج دی‌ان‌ای (DNA) و تکثیر بخشی از ژن ناحیه کنترل میتوکندری به کمک پی‌سی‌آر (PCR) و پرایمرهای جهانی، اندازه قطعه جدا شده به کمک الکتروفورز برای هر گونه مشخص شد. نتایج به دست آمده نشان داد که اندازه طول قطعه مورد نظر در اغلب گونه‌های مورد مطالعه پلی‌مورفیسم دارد. بر همین اساس تشخیص گونه‌ها به کمک این کلید شناسایی امکان پذیر می‌باشد. به این ترتیب با استفاده از نمونه‌های زیستی می‌توان حضور این گونه‌های کمیاب در مناطق را با قطعیت مشخص نمود. همچنین استفاده از این روش و ارائه مدارک ژنتیکی به دادگاه تحولی در زمینه برخورد با تخلفات شکار به وجود خواهد آورد.

**کلمات کلیدی:** گوشت‌خواران، پلی‌مورفیسم، ژن ناحیه کنترل، پی‌سی‌آر، دی‌ان‌ای میتوکندری



## فهرست

- ۱ ..... فصل اول
- ۲ ..... ۱-۱ کلیات
- ۲ ..... ۲-۱ گوشت خواران
- ۴ ..... ۱-۲-۱ گربه سانان (Felidae)
- ۴ ..... ۱-۱-۲-۱ تکامل و سیستماتیک
- ۵ ..... ۲-۱-۲-۱ ویژگی های فیزیکی
- ۵ ..... ۳-۱-۲-۱ پراکنش
- ۵ ..... ۴-۱-۲-۱ زیستگاه
- ۶ ..... ۵-۱-۲-۱ رفتار
- ۶ ..... ۶-۱-۲-۱ اکولوژی تغذیه
- ۶ ..... ۷-۱-۲-۱ زیست شناسی تولیدمثل
- ۷ ..... ۸-۱-۲-۱ وضعیت حفاظتی
- ۸ ..... ۲-۲-۱ سگ سانان (Canidae)
- ۸ ..... ۱-۲-۲-۱ تکامل و سیستماتیک
- ۸ ..... ۲-۲-۲-۱ ویژگی های فیزیکی
- ۸ ..... ۳-۲-۲-۱ پراکنش
- ۹ ..... ۴-۲-۲-۱ زیستگاه

- ۹-۲-۲-۱ رفتار..... ۹
- ۹-۲-۲-۱ اکولوژی تغذیه..... ۹
- ۷-۲-۲-۱ زیست‌شناسی تولیدمثل..... ۱۰
- ۸-۲-۲-۱ وضعیت حفاظتی..... ۱۰
- ۳-۲-۱ خرس‌ها (Ursidae)..... ۱۱
- ۱-۳-۲-۱ تکامل و سیستماتیک..... ۱۱
- ۲-۳-۲-۱ ویژگی‌های فیزیکی..... ۱۱
- ۳-۳-۲-۱ پراکنش..... ۱۱
- ۴-۳-۲-۱ زیستگاه..... ۱۲
- ۵-۳-۲-۱ رفتار..... ۱۲
- ۶-۳-۲-۱ اکولوژی تغذیه..... ۱۳
- ۷-۳-۲-۱ زیست‌شناسی تولید مثل..... ۱۳
- ۸-۳-۲-۱ وضعیت حفاظتی..... ۱۳
- ۴-۲-۱ کفتارها (Hyaenidae)..... ۱۴
- ۱-۴-۲-۱ تکامل و سیستماتیک..... ۱۴
- ۲-۴-۲-۱ ویژگی‌های فیزیکی..... ۱۴
- ۳-۴-۲-۱ پراکنش..... ۱۴
- ۴-۴-۲-۱ زیستگاه..... ۱۴

- ۱۵..... رفتار ۵-۴-۲-۱
- ۱۵..... اکولوژی تغذیه ۶-۴-۲-۱
- ۱۵..... زیست‌شناسی تولیدمثل ۷-۴-۲-۱
- ۱۵..... وضعیت حفاظتی ۸-۴-۲-۱
- ۱۶..... ژنتیک ۳-۱
- ۱۶..... نشانگرهای رایج ۱-۳-۱
- ۱۶..... ژنوم میتوکندری ۲-۳-۱
- ۱۸..... نشانگرهای مورفولوژیکی ۳-۳-۱
- ۱۸..... نشانگرهای مولکولی ۴-۳-۱
- ۱۹..... نشانگرهای پروتئین ۱-۴-۳-۱
- ۱۹..... نشانگرهای DNA ۲-۴-۳-۱
- ۲۰..... تقسیم‌بندی نشانگرهای مولکولی ۷-۳-۱
- ۲۰..... پی‌سی‌آر (PCR) ۸-۳-۱
- ۲۲..... سایر انواع PCR ۱-۸-۳-۱
- ۲۲..... کاربردهای PCR ۲-۸-۳-۱
- ۲۳..... ضرورت تحقیق ۴-۱
- ۲۴..... اهداف تحقیق ۵-۱
- ۲۵..... سوالات تحقیق ۶-۱

۲۶.....	۷-۱ فرضیات
۲۷.....	فصل دوم.....
۲۸.....	۱-۲ منابع داخلی.....
۲۸.....	۲-۲ منابع خارجی.....
۳۵.....	۳-۲ جمع بندی.....
۳۷.....	فصل سوم.....
۳۸.....	۱-۳ نمونه گیری.....
۴۷.....	۲-۳ تهیه کلیدهای شناسایی.....
۴۷.....	۳-۳ نحوه تهیه محلولها و مواد مورد نیاز.....
۴۷.....	۱-۳-۳ بافر TAE (Tris, Acetic Acid, EDTA).....
۴۸.....	۲-۳-۳ بافر سنگین کننده (Loading Buffer).....
۴۸.....	۳-۳-۳ آمونیوم پرسولفات (A.P.S) (Amonium per sulfate).....
۴۸.....	۴-۳-۳ TEMED.....
۴۸.....	۵-۳-۳ آکریل آمید ۳۰ درصد.....
۴۸.....	۶-۳-۳ ژل آگارز ۲ درصد.....
۴۹.....	۷-۳-۳ ۱۰ X TBE (Tris, Boric Acid, EDTA).....
۴۹.....	۸-۳-۳ بافر STE (Sodium Chloride , Tris. EDTA).....
۵۰.....	۹-۳-۳ بافر SDS (Sodium, 2 decyle, sulfat).....

۵۰.....	۱۰-۳-۳ فنل کالیبره .....
۵۱.....	۴-۳ استخراج DNA.....
۵۱.....	۱-۴-۳ استخراج DNA نمونه‌ها توسط کیت مخصوص AccuPrep .....
۵۲.....	۲-۴-۳ استخراج DNA نمونه‌ها توسط پروتکل فنل کلروفرم.....
۵۵.....	۵-۳ سنجش کیفیت و کمیت DNA.....
۵۵.....	۱-۵-۳ الکتروفورز افقی ژل آگارز .....
۵۶.....	۲-۵-۳ روش اسپکتوفتومتری .....
۵۸.....	۶-۳ واکنش زنجیره پلیمرز (PCR) .....
۵۸.....	۱-۶-۳ چرخه-های حرارتی PCR.....
۵۹.....	۷-۳ الکتروفورز محصول PCR.....
۶۰.....	۱-۷-۳ تهیه ژل اکریل آمید.....
۶۰.....	۲-۷-۳ رنگ آمیزی ژل پلی‌اکریل‌آمید.....
۶۱.....	۸-۳ ثبت تصاویر .....
۶۲.....	۹-۳ دانلود سکانس‌ها از ژن‌بانک.....
۶۳.....	فصل پانجم.....
۶۴.....	۱-۴ بررسی کمی و کیفی DNA استخراجی .....
۶۴.....	۱-۱-۴ روش الکتروفورزی .....
۶۵.....	۲-۱-۴ روش اسپکتوفتومتری .....

۷۵.....	فصل پنجم
۷۶.....	۱-۵ پلی مورفیسم طول میان گونه‌ها
۷۷.....	۲-۵ شناسایی گونه‌های گوشت‌خواران
۷۷.....	۳-۵ مقایسه روش ارائه شده با روش‌های متداول
۷۸.....	۴-۵ مزایای روش
۷۹.....	۵-۵ مطابقت توالی‌ها با ژن بانک
۸۰.....	۶-۵ کلیدهای شناسایی
۸۱.....	۷-۵ جمع‌بندی
۸۲.....	۸-۵ پیشنهادهای اجرایی
۸۲.....	۹-۵ پیشنهادهای پژوهشی
۸۳.....	منابع

## فهرست جداول

جدول ۱-۱ طبقه‌بندی حفاظتی گریه‌سانان بر اساس فهرست سرخ IUCN ۲۰۱۰	۷
جدول ۲-۱ طبقه‌بندی حفاظتی سگ‌سانان بر اساس فهرست سرخ IUCN ۲۰۱۰	۱۰
جدول ۳-۱ طبقه‌بندی حفاظتی خانواده کفتار بر اساس فهرست سرخ IUCN ۲۰۱۰	۱۶
جدول ۱-۳ محل جمع‌آوری نمونه‌ها و نوع بافت مورد استفاده	۴۶
جدول ۲-۳ چرخه حرارتی واکنش زنجیرهای پلی‌مراز	۵۹
جدول ۳-۳ مقادیر مورد نیاز جهت آماده‌سازی ۲ عدد ژل اکریل‌آمید	۶۰
جدول ۴-۳ محلول‌های مورد نیاز برای رنگ آمیزی ژل عمودی پلی‌اکریل‌آمید	۶۱
جدول ۱-۴ طول توالی ناحیه کنترل میتوکندری برای گونه‌های مورد مطالعه	۶۶
جدول ۲-۴ محل اتصال پرایمر L15995 به توالی‌های ناحیه کنترل میتوکندری	۶۸
جدول ۳-۴ محل اتصال پرایمر H16498 به توالی‌های ناحیه کنترل میتوکندری	۶۹
جدول ۴-۴ توالی‌های ناحیه کنترل میتوکندری گونه‌های ثبت شده در ژن‌بانک و مرتب شده توسط نرم-افزار MEGA	۷۰

## فهرست اشکال و تصاویر

۲۲	شکل ۱-۱ ژنوم حلقوی مینوکندری.....
۳۸	تصویر ۱-۳ تلفات جاده‌ای کفتار.....
۳۹	تصویر ۲-۳ تلفات جاده‌ای پلنگ.....
۳۹	تصویر ۳-۳ گربه وحشی.....
۴۰	تصویر ۴-۳ گربه جنگلی.....
۴۰	تصویر ۵-۳ خرس قهوه‌ای.....
۴۱	تصویر ۶-۳ کاراکال.....
۴۱	تصویر ۷-۳ شغال.....
۴۲	تصویر ۸-۳ شاه‌روبه.....
۴۲	تصویر ۹-۳ سگ اهلی.....
۴۳	تصویر ۱۰-۳ گربه شنی.....
۴۳	تصویر ۱۱-۳ گربه خانگی.....
۴۴	تصویر ۱۲-۳ پلنگ.....
۴۴	تصویر ۱۳-۳ روبه معمولی.....
۴۵	تصویر ۱۴-۳ گرگ.....
۴۵	تصویر ۱۵-۳ یوزپلنگ.....
۴۹	شکل ۱۶-۳ ژل آگارز ۲ درصد.....
۵۳	شکل ۱۷-۳ دستگاه Vortex.....
۵۴	شکل ۱۸-۳ دستگاه Thermo Shaker.....



- شکل ۱۹-۳ دستگاه سانتریفیوژ..... ۵۴
- شکل ۲۰-۳ الکتروفورز افقی ..... ۵۶
- شکل ۲۱-۳ دستگاه اسپکتوفتومتر..... ۵۷
- شکل ۲۲-۳ دستگاه ترموسایکلر..... ۵۸
- شکل ۲۳-۳ الکتروفورز عمودی ژل پلی آکریلامید ..... ۵۹
- شکل ۲۴-۳ دستگاه ژل داک ..... ۶۲
- شکل ۱-۴ نمونه بافت مشکوک شناسایی شده..... ۶۴
- شکل ۲-۴ تصویر باندهای ایجاد شده برای گونه‌های گوشت‌خوار بر روی ژل آگارز ..... ۶۵
- شکل ۳-۴ نمونه بافت مشکوک شناسایی شده توسط..... ۶۷

# فصل اول

مقدمه

## ۱-۱ کلیات

انفجار جمعیت، رشد علم و فن‌آوری و صنعتی شدن جوامع آثار ناخوشایند و جبران ناپذیری را بر روی محیط زیست بجا گذاشته است. تنوع زیستی گیاهی و جانوری کره زمین به دلیل فعالیت‌های مخرب بشر به شدت رو به کاهش است. مطالعه‌ای که توسط صندوق جهانی حیات وحش بر روی ۴۰۰۰ جمعیت از ۱۴۷۷ گونه مهره‌دار ساکن زیستگاه‌های خشکی، دریایی و آب شیرین انجام گرفت، کاهش ۲۷ درصدی را در این جمعیت‌ها طی سال‌های ۱۹۷۰ تا ۲۰۰۵ نشان داد (صندوق جهانی حیات وحش<sup>۱</sup>، ۲۰۱۰). با توجه به شمار زیاد گونه‌ها و عدم بودجه و وقت کافی برای مطالعه شمار زیادی از گونه‌ها، مطالعه گونه‌های پر نیاز و شکننده اکوسیستم‌ها که به عنوان گونه چتر قلمداد می‌شوند و حفاظت از آن‌ها حفاظت از گونه‌های دیگر را پوشش می‌دهد در اولویت است. گوشت‌خواران بزرگ جثه با داشتن زی‌توده زیاد و قرار گرفتن در حلقه‌های آخرین زنجیره غذایی وضعیت شکننده‌ای دارند (ایزنبرگ، ۱۹۸۶). بنابراین اهمیت مطالعه گوشت‌خواران بر کسی پوشیده نیست.

## ۲-۱ گوشت‌خواران

راسته گوشت‌خواران شامل پستاندارانی با جثه و شکل‌های مختلف است، از راسوی ۲۵ گرمی تا خرس قهوه‌ای ۲۵۰ کیلویی را در بر می‌گیرد (زیرگونه خرس قهوه‌ای به نام گریزلی که در آلاسکا زندگی می‌کند ۷۸۰ کیلوگرم وزن دارد) (ضیائی، ۱۳۸۸). گوشت‌خواران ۱۰٪ جنس‌های پستانداران و فقط ۲٪ زی‌توده کل پستانداران را تشکیل می‌دهند (ایزنبرگ، ۱۹۸۶). پراکنش جهانی گوشت‌خواران را می‌توان کل بیوتا به استثنا قطب جنوب و جزایر اقیانوسی دانست (گریزمک اینسیکلوپدیا<sup>۲</sup>، ۲۰۰۱). غذای اکثر گوشت‌خواران را گوشت تشکیل می‌دهد، ولی برخی مانند خرس‌ها همه چیزخوارند و قسمت اصلی غذای آن‌ها مواد گیاهی است. دندان‌های گوشت‌خواران مهم‌ترین اسلحه آن‌هاست که برای گرفتن طعمه و بریدن گوشت تغییر شکل یافته است، دندان‌های هر طرف آرواره شامل ۳ دندان پیشین،

1- WWF

2 -Grzimek's Animal Life Encyclopedia

یک دندان نیش بسیار بلند و مخروطی شکل است. دندان‌های پیش‌آسیا و آسیا با تعداد متفاوت است. حداقل یکی از این دندان‌های که گوشت‌بر (کارناسیال<sup>۱</sup>) نامیده می‌شود برای بریدن گوشت تغییراتی یافته و به صورت تیغه مانند در آمده است. این دندان‌های در گربه‌سانان که رژیم غذایی آن‌ها بیشتر گوشت است تغییر بیشتری یافته ولی در گونه‌های همه چیز خوار نظیر خرس پهن‌تر است. در فک بالای گوشت‌خواران بین دندان‌های پیشین و نیش فاصله‌ای وجود دارد که در موقع بسته شدن دهان دندان‌های نیش فک پایین در آن جای می‌گیرند. فک پایین فقط در جهت بالا به پایین حرکت می‌کند. به همین علت گوشت‌خواران قادر به جویدن کامل غذا نیستند و آن را می‌بلعند (خرس‌ها و راکون‌ها مستثنی هستند). به دلیل سهل الهضم بودن گوشت، اکثر گوشت‌خواران معده ساده‌ای دارند و روده کورشان کوچک است. برخی از گوشت‌خواران مانند سگ‌سانان پنجه رو هستند ولی عده‌ای دیگر نظیر خرس‌ها کفرو هستند و مانند انسان پاشنه‌های پا را روی زمین می‌گذارند. به این علت که گوشت‌خواران تا نزدیک زایمان باید تحرک و چالاکی لازم را برای شکار حیوانات داشته باشند بنابراین مدت آبستنی در اکثر آن‌ها بسیار کوتاه است. توله‌ها غالباً در زمان تولد نارس، کور و بی‌دفاع هستند. ولی به صورت جدی توسط مادر و در برخی نظیر شیرها با همکاری پدر مراقبت و محافظت می‌شوند. میزان مرگ و میر در بین توله‌ها بسیار بالاست و غالباً فقط یک توله به حیات خود ادامه می‌دهد (ضیائی، ۱۳۸۸).

اکثر گوشت‌خواران زندگی مخفی و شبانه دارند. در گوشت‌خوارانی نظیر گربه‌سانان که استتار امری حیاتی است پوست بدن از خال‌ها و نوارها پوشیده است. گوشت‌خواران معمولاً به صورت انفرادی زندگی می‌کنند. تعداد آن‌ها نسبت به طعمه‌هایشان بسیار اندک است. بنابراین مشاهده مستقیم آن‌ها بسیار مشکل است. برای آگاهی از وجود آن‌ها مطالعه رد پاها، فضولات و باقیمانده‌های غذا بسیار مفید است. استفاده از دوربین‌های تله‌ای و نصب دستگاه‌های ردیاب بر روی گوشت‌خواران می‌تواند در مطالعه آن‌ها بسیار موثر باشد. از راسته گوشت‌خواران تا کنون ۱۲ خانواده ۱۱۴ جنس و ۲۶۴ گونه معرفی شده است (گیتلمن، ۱۹۸۹).

از خانواده گوشت‌خواران در ایران تا کنون ۸ خانواده و ۳۱ گونه شناسایی شده که دو گونه از آن‌ها (شیر و ببر) منقرض گردیده‌اند (ضیائی، ۱۳۸۸).

---

1- Carnassial