



دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
دانشکده زیست محیطی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته
محیط زیست

**بررسی تنوع ژنتیکی غزال‌های مناطق مرکزی ایران با استفاده از توالی یابی
ژن سیتوکروم *b***

تحقیق و پژوهش:
داود فداکار

استاد راهنما:
دکتر حمیدرضا رضایی

زمستان ۱۳۹۱

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی کرگان
دانشکده شیلات و محیط زیست

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته
محیط زیست

**بررسی تنوع ژنتیکی غزال‌های مناطق مرکزی ایران با استفاده از توالی یابی
ژن سیتوکروم b**

تحقیق و پژوهش:
داود فداکار

استاد راهنما:
دکتر حمیدرضا رضایی

استادان مشاور:
دکتر حسین وارسته مرادی
دکتر شهاب‌الدین منتظمی

زمستان ۱۳۹۱

تعهدنامه پژوهشی

نظر به این که چاپ و انتشار پایان نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان مبین بخشی از فعالیت های علمی- پژوهشی بوده و همچنین با استفاده از اعتبارات دانشگاه انجام می شود، بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد زیر متعهد می شوند:

- قبل از چاپ پایان نامه (رساله) خود مراتب را قبلاً به طور کتبی به مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه اطلاع و کسب اجازه نمایید.
 - در انتشار نتایج پایان نامه (رساله) در قالب مقاله، همایش، اختراع و اکتشاف و سایر موارد، ذکر نام دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان الزامی است.
 - انتشار نتایج پایان نامه (رساله) باید با اطلاع و کسب اجازه از استاد راهنما صورت گیرد.
- اینجانب داود فداکار دانشجوی رشته محیط زیست مقطع کارشناسی ارشد تعهدات فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده و به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی و امضا

داود فداکار

تقدیم بہ طبیعت

مشکر و قدردانی

سپاس از دوست که هر چه دارم از اوست!

خدای مهربان را سپاس که فرصت زندگی و توانایی دانش اندوزی را تا کنون در اختیارم نهاد. اکنون بر خود لازم می‌دانم مراتب سپاس و قدردانی خود را نشانه‌ی عزیزی کنم که تا کنون مرا یاری نمودند.

از پدر، مادر و برادران و خواهرهای عزیز و مهربانم که در تمامی مراحل زندگی و تحصیل همواره حامی و پشتیبانم بودند سپاسگزارم، بی‌مورد این راه بدون این عزیزانم ممکن نبوده و نیست.

همواره قدردان زحمات‌های استاد‌های محترم گروه محیط زیست کرگان، ستم، استاد‌های عزیزی که در تمام عرصه‌های تحصیل در مقطع کارشناسی و کارشناسی ارشد در این دانشگاه مشوقم بودند و از ایشان دانش و نیکی آموختم، صمیمانه سپاسگزارم.

از استاد عزیز و بزرگوارم آقای دکتر حمید رضا رضایی، که همیشه راهنما و مشوق من بودند، برای تمام آموزه‌ها و سنگیایی‌هایشان سپاسگزارم، قدردانی از ایشان در قالب کلمات میسر نیست.

از استاد بزرگوار آقای دکتر حسین وارسته مرادی برای راهنمایی‌های ایشان صمیمانه سپاسگزارم.

از آقای دکتر شهاب‌الدین منظمی برای مساعدت‌ها در انجام این پژوهش کمال سپاس و قدردانی را دارم.

از استاد‌های گرامی و بزرگوارم آقایان دکتر علی شعبانی و دکتر عبدالرسول سلمان مایینی، برای بازخوانی و

داوری این پژوهش کمال تشکر را دارم.

از دوستان و همکاران علمی، خانم مریم ناصری و معصومه میرزاه خواه که در طول انجام پژوهش شریک سختی ها و مشکلات بودند سپاسگذارم.

از دوستان عزیزم آقایان محمد پور قاسم، وحید زمانی، لقمان نادری، صیاد شیخی، صلاح محمودی، عقیل کیوانلو، حمید شهبازی، رضا قاسمی نژاد و خانم مازهره قدسی، یاسنیدیان و لیلادباغ به خاطر همراهی و کمک ایشان صمیمانه سپاسگذارم.

از دوستان عزیزی که در کنار آموهای موز با آنها آشنا شدم، آقایان ایرج خزایی که وصف جیران در شعر بایش از یادم رفتنی نیست، پرویز دره شوری که مناسبت و صبورش برایم لذت بخش بود؛ سرد خزایی و ابولقاسم پوری نیکو سیرت که شادی را بی هیچ منتی با دیگران تقسیم می کنند و محبتی دهبانی که بی هیچ منتی عکس های زیبایش را در اختیارم نهاد، صمیمانه سپاسگذارم.

مراتب تشکر خود را از:

از کارمندان محیط زیست استان یزد، بخصوص خانم اعظم حبیبی پور و معاونت محترم جناب آقای دکتر

حسین اکبری

از کارمندان محیط زیست استان اصفهان، بخصوص خانم مهندس مریم امیدی و آقایان مهندس مهدی

انصاری و کفاشیان

از محیط بانان جان برکف منطقه حفاظت شده کاملند- بهادران آقایان زارع و سرباز و طیفه حسین عثمانی
از محیط بانان جان برکف پناهگاه حیات وحش بورویه خاتم آقایان حجت الله عثمانی، حیدری، حاتمیان
وحسین عباسی

از محیط بانان جان برکف منطقه سیاه کوه نیرد جناب آقای عزیز
از محیط بانان جان برکف پارک ملی و پناهگاه حیات وحش قمیشلو اصفهان آقایان مجتبی دهنقانی، پهلوان زاده،
تقایی، رضنایی، جوهری

از محیط بانان جان برکف پارک ملی و پناهگاه حیات وحش کلاه قاضی اصفهان
از محیط بانان جان برکف پناهگاه حیات وحش موده آقایان ابوالقاسم یآوری، حامد قالیباف، سردخزایی،
پرویزده شوری

در آرزای همه همکاری های خوب و مهربانم و همه ی عزیزانی که به هر نحوی مراد امر تحصیل و به خصوص پیش برد این پایان-
نامه یاری نمودند تشکر کنم.

سلامتی و موفقیت همه ی این عزیزان آرزوی من است.

چکیده

آهو ایرانی (*Gazella subgutturosa*) یکی از مهم‌ترین پستانداران ایران است. کاهش شدید جمعیت این گونه منجر شد که در سال ۲۰۰۸ به جمع گونه‌های آسیب پذیر بپیوندد. این در حالی است که مطالعات ژنتیکی بر روی این گونه بسیار اندک می‌باشد. هدف این مطالعه بررسی فیلوژنتیکی آهوی ایرانی در مرکز ایران بود. برای این منظور، در سال ۹۰، تعداد ۲۵ نمونه از ۵ منطقه شامل پارک ملی و پناهگاه حیات وحش قمیشلو، پناهگاه حیات وحش موته، پارک ملی و پناهگاه حیات وحش کلاه قاضی، منطقه حفاظت شده کالمند-بهداران و پناهگاه حیات وحش بوروییه خاتم جمع‌آوری گردید. پس از استخراج DNA نمونه‌ها، بخشی از ژن سیتوکرم *b* از DNA میتوکندری با طول ۴۲۰ باز آلی برای ۱۵ نمونه از مناطق پارک ملی و پناهگاه حیات وحش قمیشلو، پناهگاه حیات وحش موته در استان اصفهان و منطقه حفاظت شده کالمند-بهداران در استان یزد تکثیر و توالی‌یابی شدند. درخت فیلوژنتیک نشان دهنده دو شاخه جداگانه مونوفیلیک بود. دو جمعیت مربوط به اصفهان در یک شاخه و جمعیت یزد در یک شاخه جداگانه دیگر قرار گرفت. جمعیت‌های مربوط به اصفهان و یزد جمعیت‌های کاملاً جدا بوده ولی هر دو از گونه آهوی ایرانی می‌باشند. به منظور بررسی دقیق‌تر کل سیتوکروم *b* با طول ۱۱۴۰ جفت باز برای همه مناطق تکثیر و توالی‌یابی گردید. نتایج حاصل از درخت فیلوژنتیک نشان داد که جبیر (*Gazella bennettii*) پناهگاه حیات وحش بوروییه خاتم به خوبی از آهوهای سایر مناطق جدا شده و شاخه جداگانه‌ای را تشکیل داده است. در بین آهوها، جمعیت کلاه قاضی و یک نمونه از قمیشلو در یک شاخه قرار گرفتند و دیگر آهوها شاخه دیگری را تشکیل دادند. در شبکه هاپلوتیپی جبیر ۲ هاپلوتیپ تشکیل داد و با فاصله زیادی از ۷ هاپلوتیپ آهو منشعب شد. تعداد ۱۹ هاپلوتیپ از ۱۹ توالی آهو و جبیر به دست آمد که نشان دهنده تنوع خوبی در این مناطق است. هم‌اکنون جمعیت آهو و جبیر با خطر کاهش جمعیت و از دست دادن زیستگاه به دلیل توسعه جاده‌ها و توسعه شهری صنعتی روبرو است و نیازمند کمک فوری حفاظتی به منظور حفظ تنوع ژنتیکی و نرسیدن به لبه انقراض است.

کلمات کلیدی: آهو (*Gazella subgutturosa*)، تنوع ژنتیکی، DNA میتوکندری، مناطق مرکزی

ایران.

فصل اول / مقدمه

۲	۱-۱ مقدمه
۲	۲-۱ خانواده گاو
۲	۳-۱ جنس غزال
۳	۴-۱ رده بندی آهو در جهان
۴	۵-۱ تشخیص آهو از دیگر آنتیلوپها
۶	۶-۱ غزالهای ایران
۶	۱-۶-۱ آهوی ایرانی (<i>Gazella subgutturosa</i> (Guldenstaedt, 1780)
۸	۲-۶-۱ جبیر (<i>Gazella bennettii</i> (Sykes, 1831)
۱۱	۳-۶-۱ آهوی کوهی دره شوری (<i>Gazella gazelle dareshourii</i>
۱۳	۵-۶-۱ وضعیت حفاظتی
۱۳	۷-۱ تنوع ژنتیکی
۱۴	۸-۱ ژنوم میتوکندری
۱۶	۹-۱ مقدمه‌ای بر فیلوژنتیک مولکولی
۱۷	۱۰-۱ ضرورت تحقیق
۱۹	۱۱-۱ اهداف
۲۰	۱۰-۱ فرضیه‌ها

فصل دوم/ بررسی منابع علمی

۲-۱ منابع داخلی ۲۲

۲-۲ منابع خارجی ۲۸

فصل سوم/ مواد و روش‌ها

۳-۱ نمونه‌برداری ۳۶

۳-۲ مناطق مورد مطالعه ۳۷

۳-۲-۱ منطقه حفاظت شده کالمند - بهادران ۳۷

۳-۲-۲ پناهگاه حیات وحش بوروییه خاتم ۴۳

۳-۲-۳ پارک ملی و پناهگاه حیات وحش قمیشلو ۴۶

۳-۲-۴ پارک ملی و پناهگاه حیات وحش کلاه قاضی ۵۰

۳-۲-۵ پناهگاه حیات وحش مونه ۵۵

۳-۳ استخراج DNA ۶۰

۳-۴ الکتروفورز افقی ژل آگارز ۶۲

۳-۵ واکنش زنجیره پلیمرز (PCR) ۶۴

۳-۶ توالی یابی ۶۶

۳-۷ تجزیه و تحلیل نتایج نشانگر mtDNA ۶۶

۳-۷-۱ ردیف آرایی ۶۷

۳-۷-۲ روش‌های ساخت درخت فیلوژنتیک ۶۹

۳-۷-۳ ارزیابی صحت درخت ساخته شده ۷۱

فصل چهارم/ نتایج

۴-۱ بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده ۷۴

۴-۱-۱ روش الکتروفورزی ژل آگارز ۷۴

۴-۲ نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل نشانگر mtDNA ۷۵

فصل پنجم/ بحث و نتیجه گیری

۴-۳ بحث و نتیجه گیری نتایج نشانگر mtDNA ۸۶

۴-۴ تفسیر نتایج حاصل از محاسبه Fst ۸۶

۴-۵ شبکه هاپلوتیپی ۸۸

۴-۶ درخت فیلوژنتیکی ۹۱

۴-۷ نتیجه گیری کلی ۹۴

۴-۸ پیشنهادات اجرایی ۹۴

۴-۹ پیشنهادات پژوهشی ۹۵

فهرست منابع ۹۷

جدول ۳-۱: مناطق مورد مطالعه در مرکز ایران	۳۸
جدول ۴-۱: تخمین الگوهای جانشینی نوکلئوتیدی حاصل از همه مناطق	۷۷
جدول ۴-۲: فراوانی نوکلئوتیدها حاصل از مجموع همه مناطق	۷۷
جدول ۴-۳: تخمین الگوی جانشینی آهو در مناطق نمونه برداری	۷۸
جدول ۴-۴: فراوانی نوکلئوتیدها حاصل از آهو در مناطق نمونه برداری در نرم افزار مگا	۷۸
جدول ۴-۵: تخمین الگوی جانشینی جبیر در مناطق نمونه برداری	۷۸
جدول ۴-۶: فراوانی نوکلئوتیدها حاصل از جبیر در مناطق نمونه برداری در نرم افزار مگا	۷۹
جدول ۴-۷: فراوانی نوکلئوتیدها حاصل از آهو در مناطق نمونه برداری در نرم افزار الکویین	۷۹
جدول ۴-۸: فراوانی نوکلئوتیدها حاصل از جبیر در مناطق نمونه برداری در نرم افزار الکویین	۷۹
جدول ۴-۹: هاپلوتیب‌ها	۸۲
جدول ۴-۱۰: تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی با روش ماتریس فاصله بر اساس اختلاف جفت باز	۸۴
جدول ۴-۱۱: تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی با روش فاصله‌ای و بر اساس مدل تامورا- نئی	۸۴
جدول ۴-۱۲: شاخص Fst مخصوص برای هر جمعیت بر اساس مدل تامورا - نئی	۸۵
جدول ۴-۱۳: میزان آماره Fst بر اساس مدل تامورا - نئی	۸۵