

ساختار ژنتیکی روباه معمولی (*Vulpes vulpes*) در مرکز ایران با استفاده از توالی

ژن ناحیه کنترل میتوکندری

جلیل ایمانی هرسینی^۱، حمیدرضا رضایی^{۲*}، سعید نادری^۳، حسین وارسته مرادی^۲

۱- دانشجوی دوره دکتری محیط زیست، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۲- استادیار گروه محیط زیست، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۳- استادیار گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان،

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۴ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۱۰/۱۵)

چکیده

در این مطالعه به منظور بررسی ساختار ژنتیکی روباه معمولی در مناطق مرکزی ایران، ۳۲ نمونه بافت از پنج استان (اصفهان، تهران، سمنان، کرمان و یزد) جمع‌آوری شد. پس از استخراج DNA، ژن ناحیه کنترل از ژنوم میتوکندری توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر و ۳۲۷ جفت نوکلئوتید از این ژن برای هر نمونه توالی‌یابی شد. نتایج نشان داد که ۲۴ هاپلوتایپ متفاوت در بین نمونه‌ها وجود دارد و تنوع هاپلوتایپی برابر با ۰/۹۸ است. با توجه به نتایج تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی (AMOVA) نمونه‌ها، شباهت متوسطی بین جمعیت‌ها وجود دارد و بیش‌ترین واریانس نمونه‌ها مربوط به تغییرات درون جمعیتی است. بر اساس میزان شاخص راجر-هارپندینگ و چند نمایی بودن نمودار آن گسترش گونه اتفاق نیفتاده است، اما بر اساس نتایج دو آماره تاجیما و FU می‌توان نتیجه گرفت که امکان گسترش گونه در گذشته وجود داشته، اما این گسترش معنی‌دار نبوده است. درخت تبارزایشی رسم شده بیانگر این مسئله است که ساختار ژنتیکی مستقلی برای جمعیت‌های مورد مطالعه وجود ندارد و تفاوت درون جمعیتی بیش‌تر از تفاوت بین جمعیتی است و شبکه هاپلوتایپی رسم شده نیز این نظر را تأیید می‌کند. اگرچه با توالی‌یابی یک قسمت کوتاه از ژنوم یک گونه به تنهایی نمی‌توان برنامه حفاظتی برای یک گونه را مشخص نمود ولی بر اساس نتایج بدست آمده می‌توان نتیجه گرفت که جمعیت روباه در این مناطق در حال حاضر با مشکل گردنه بطری روبرو نیست.

کلید واژگان: ساختار ژنتیکی، روباه معمولی، ژنوم میتوکندری، مناطق مرکزی ایران.

۱ - مقدمه

روباه معمولی (*Vulpes vulpes*; Linnaeus, 1758) یکی از گوشت‌خواران کوچک جثه ایران است. این گونه بیش‌ترین گستره پراکنش را در بین گوشت‌خواران خشکی‌زی دارد و در تمام قاره‌های نیمکره شمالی شامل مناطق شمال آمریکا، آسیا، اروپا و شمال آفریقا در زیستگاه‌های توندرای قطبی تا بیابان‌های گرم زیست می‌کند (Larivière & Pasitschniak-Arts 1996; Macdonald & Reynolds, 2008). روباه معمولی با وجود گوشت‌خوار بودن از سایر منابع غذایی نیز استفاده می‌کند و قدرت سازگاری بالایی با شرایط مختلف از خود نشان می‌دهد و به همین دلیل با وجود تهدیدات مختلفی نظیر شکار برای حفاظت از حیوانات اهلی و یا استفاده از پوست، مسمومیت ناشی از طعمه‌های آلوده و از دست دهی زیستگاه (Won & Smith, 1999) توانسته است از گسترش وسیع و تراکم مطلوب در زیستگاه‌های مختلف برخوردار باشد (Mitchell-Jones et al., 1999).

روباه معمولی از گونه‌های نسبتاً فراوان در ایران است که در اکثر مناطق کشور پراکنش دارد (Firouz, 2008; karami et al., 2005). اما مطالعه‌ای در مورد بررسی ساختار جمعیتی و ژنتیکی آن تاکنون انجام نشده است، این در حالی است که شناسایی دقیق این گونه در جهت حفاظت از آن بسیار حائز اهمیت است. البته، در سال‌های اخیر مطالعات زیادی در مورد این گونه انجام شده است که می‌توان مطالعات انجام شده را به سه دسته کلی شامل:

تبارشناختی^۱ (Wayne et al., Zhang et al., 2010)؛
 بررسی تنوع و ساختار ژنتیکی (Leite et al., 2015; Inoue et al., Galov et al., 2014)؛
 و فیلوژئوگرافی^۲ (Perrine et al., 2007; 2007; Statham et al., 2014; Kutschera et al., 2013)؛
 تقسیم بندی کرد. (Edwards et al., 2012)

مطالعات متعددی که براساس ژنوم میتوکندریایی (mtDNA)^۳ در مورد روباه معمولی صورت گرفته، نشان داده است که این ژنوم قادر به ارائه تصویر کاملی از تنوع ژنتیکی این گونه در دامنه پراکنش آن در یک محدوده زیست جغرافیایی گسترده است و توالی‌یابی ژنوم میتوکندری مخصوصاً در ناحیه کنترل، ابزاری قدرتمند در بررسی تنوع ژنتیکی گونه روباه معمولی به شمار می‌آید (Fрати et al., 1998; Inoue et al., 2007; Perrine et al., 2007; Aubry et al., 2009; Teacher et al., 2011; Edwards et al., 2012; Yu et al., 2012; Kutschera et al., 2013).

با وجود مطالعات زیاد انجام شده و تقسیم‌بندی‌های صورت گرفته، هنوز در بسیاری از مناطق جهان کمبود اطلاعات وجود دارد که منطقه خاورمیانه از مهم‌ترین این مناطق است (İbiş et al., 2014). ایران یکی از مهم‌ترین کشورهایی است که تاکنون مطالعه‌ای در این زمینه صورت نگرفته است و با توجه به ویژگی‌های خاص سرزمینی و وسعت و تنوع زیستگاهی موجود در

¹ Phylogeny

² Phylogeography

³ Mitochondrial DNA

از آنجایی که روباه معمولی جزء گونه‌های گوشت‌خوار است و گونه‌های گوشت‌خوار بشدت مخفی کار و شب فعال بوده و نمونه‌برداری از آن‌ها بسختی امکان‌پذیر است، در این مطالعه نمونه‌گیری از تلفات جاده‌ای حیوانات مذکور انجام گرفت. تعداد ۳۲ نمونه بافت روباه معمولی از ۵ استان مرکزی ایران شامل استان‌های تهران، سمنان، یزد، کرمان و اصفهان در طی سال ۱۳۹۲ و ۱۳۹۳ جمع‌آوری شد که به ترتیب شامل؛ ۳، ۷، ۱۱، ۸ و ۳ نمونه بافت بوده است (شکل شماره ۱)، در جدول شماره ۱ نام نمونه‌ها و موقعیت مکانی آن‌ها آورده شده است.

استخراج DNA از نمونه‌ها با استفاده از کیت مخصوص Accuprep و بر اساس پروتکل شرکت Bioneer انجام گرفت و پس از تأیید کیفیت DNA استخراجی با روش باندگیری در ژل آگارز یک درصد با الکتروفورز افقی قسمتی از ناحیه کنترل با طول ۳۲۷ جفت باز توسط پرایمرهای (-5') L15995 CTCCACTATCAGCACCCAAAG-3' (Taberlet *et al.*, 1994) و (-5') H16498 CCTGAAGTAAGAACCAGATG-3 (Fumagalli *et al.*, 1996) تکثیر شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)^۲ در دستگاه ترموسایکلر (مدل Applied Biosystems ۲۷۲۰، ساخت آمریکا) به شرح زیر انجام گرفت:

واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، واسرشت‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳۰ ثانیه،

آن نیاز به انجام مطالعه دقیقی در این زمینه وجود دارد.

تنوع ژنتیکی قابلیت بقای یک گونه و یا جمعیت را از طریق ایجاد توانایی سازگاری با تغییرات محیطی فراهم می‌کند. بنابراین تنوع ژنتیکی برای بقای طولانی مدت یک گونه ضروری است (McNeely *et al.*, 1990; Mills, 2012). مطالعات ژنتیک جمعیت در دهه‌های اخیر به سرعت به منظور بررسی پویایی جمعیت و درک فرآیندهای تکاملی افزایش یافته است. این دسته از مطالعات پایه و اساس تدوین و اجرای هر گونه طرح مدیریتی برای حفاظت از گونه‌ها شده است (Avise, 1996; Frankham *et al.*, 2002; Hrbek *et al.*, 2005)، بنابراین، در این پژوهش تلاش شده است تا با استفاده از داده‌ها و نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل مولکولی، پلی‌مورفیسم ژن ناحیه کنترل^۱ از DNA میتوکندریایی جمعیت‌های روباه معمولی تعیین و میزان تنوع ژنتیکی موجود در جمعیت‌های این گونه در مرکز ایران تعیین شود. شناسایی جمعیت‌ها و تعیین میزان تنوع ژنتیکی آن‌ها می‌تواند در تعیین جمعیت‌های اصلی، هاپلوتایپ‌های رایج و نیز هاپلوتایپ‌های کمیاب و جمعیت‌های دارای تنوع ژنتیکی اندک نقش مهمی داشته باشد و اطلاعات پایه مناسبی را برای مدیریت صحیح گونه فراهم آورده و سبب شود تا اقدامات مدیریتی با رویکرد علمی جایگزین راهکارهای غیر صحیح شود.

۲- مواد و روش‌ها

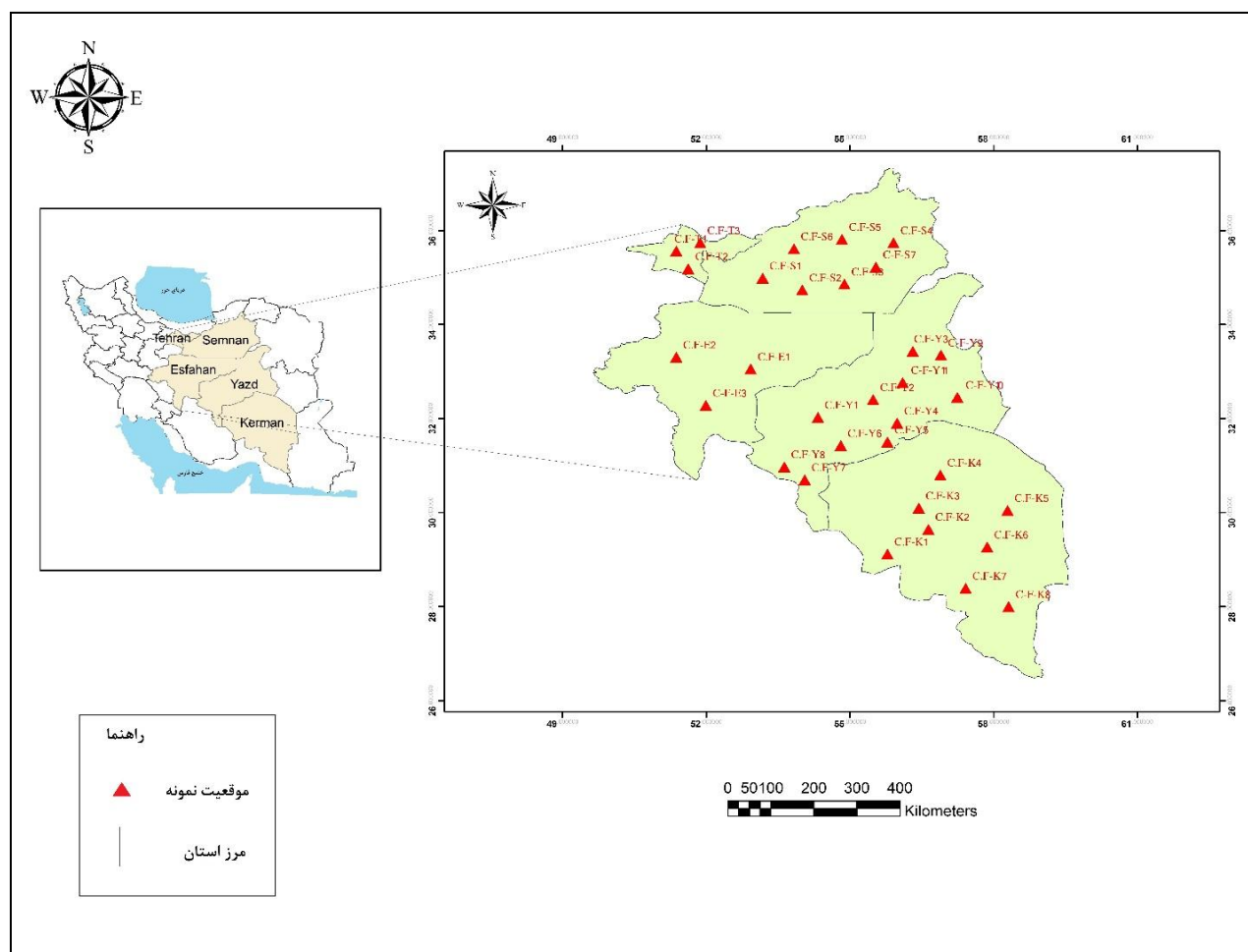
² polymerase chain reaction

⁴ Control region

مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و در پایان مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه. حجم واکنش ۲۵

جدول شماره ۱ - موقعیت مکانی نمونه‌ها و شماره مربوط به هر نمونه

نام نمونه‌ها (Common fox)	موقعیت مکانی نمونه‌ها
C.F-E1,2,3	اصفهان (E)
C.F-T1,2,3	تهران (T)
C.F-S1,2,3,4,5,6,7	سمنان (S)
C.F-K1,2,3,4,5,6,7,8	کرمان (K)
C.F-Y1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11	یزد (Y)



شکل شماره ۱- پراکنش نمونه‌ها در مناطق مورد مطالعه در پنج استان مورد مطالعه

بایزین در نرم افزار MrBayes نسخه ۳/۲ (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) ترسیم شد.

برای بررسی تاریخچه جمعیتی^۳ بین افراد از توزیع عدم تطابق^۴ براساس شاخص راجرز هارپندینگ^۵، شاخص بی طرفی^۶، تاجیما^۷ (Tajima, 1989) و تست Fu's Fs (Fu, 1997) با استفاده از نرم افزار Dnasp نسخه ۵ (Rozas *et al.*, 2003) استفاده گردید. فراوانی و واگرایی هاپلوتایپها با استفاده از نرم افزار Arlequin 3.1 محاسبه شد (Excoffier *et al.*, 2005) و همان برنامه برای برآورد تنوع هاپلوتاییبی و نوکلئوتیدی ($\pm SE$) براساس ضریب NEI (1987) مورد استفاده قرار گرفت. برای برآورد تفاوت بین جفت جمعیت‌های فرضی از آماره F_{ST} استفاده شد.

برای بررسی روابط فیلوژنتیکی بین هاپلوتایپها و رسم شبکه هاپلوتاییبی با روش Median-joining و با استفاده از نرم افزار NETWORK نسخه ۴,۶,۰۱ (Bandelt *et al.*, 1999) استفاده شد، این روش بهترین شبکه برای نشان دادن ارتباط ژنی یک گونه است (Cassens *et al.*, 2003). علاوه بر رسم شبکه هاپلوتاییبی نمونه‌های مربوط به این پژوهش، یک شبکه هاپلوتاییبی با استفاده از سایر هاپلوتایپهای روباه معمولی در جهان که در پژوهش‌های قبلی معرفی شده بودند و از ژن بانک استخراج شدند (Galva *et al.*, 2014; Teacher *et al.*, 2011; valiere *et al.*, 2003; Abury *et al.*, 2009; Sacks *et al.*, 2010; 2011; Statham *et al.*, 2005, 2011; 2012;

میکرولیترو اجزای آن شامل یک میکرولیترو DNA، یک واحد آنزیم *Taq* پلی‌مراز، ۰/۵ میکرولیترو dNTPs ۱۰ میلی مولار، یک میکرولیترو $MgCl_2$ ، ۵۰ میلی مولار، یک میکرولیترو از هر آغازگر ۵ پیکومولار، ۲/۵ میکرولیترو بافر 10X و ۱۸ میکرولیترو آب دو بار تقطیر بود. به منظور تأیید تکثیر ناحیه موردنظر طی واکنش‌های PCR الکتروفورز محصولات به دست آمده روی ژل آگارز ۲ درصد با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید صورت گرفت. پس از اطمینان از تکثیر و عدم وجود آلودگی، مقدار ۲۰ میکرولیترو از محصولات PCR به منظور تعیین توالی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال شد. نمونه‌ها با استفاده از دستگاه ABI 3730 به روش خودکار توالی‌یابی شد.

از ابزار BLAST و رویه BLASTN در پایگاه NCBI جهت تعیین همولوژی توالی‌ها استفاده گردید. از نرم افزار SeqScape نسخه ۲/۶ (Applied Biosystems) جهت تصحیح توالی‌های نوکلئوتیدی استفاده شد و سپس در نسخه ۵ نرم افزار Mega (Tamura *et al.*, 2011) و با استفاده از Clustal W بازآرایی انجام شد و به صورت دستی تنظیم نهایی توالی‌ها انجام گرفت.

برای تعیین بهترین مدل جهت رسم درخت فیلوژنی از نرم افزار j ModelTest (Posada 2008) و دو آماره^۱ AIC و ^۲BIC استفاده شد و سپس درخت فیلوژنتیکی نمونه‌ها با استفاده از گونه روباه ترکمنی (*V. corsac*) به عنوان برون گروه، که با شماره دسترسی KJ140137 از ژن بانک استخراج شد و براساس منطق

³ Demographic history

⁴ mismatch distribution

⁵ Harpending's raggedness index

⁶ Neutrality tests

⁷ Tajima

¹ Akaike information criterion

² Bayesian information criterion

با توجه به خروجی نرم افزار jModelTest و دو آماره AIC_C و BIC در مورد مدل HKY+G، کمترین مقدار را در بین سایر مدل‌ها داشتند و به همین دلیل این مدل به عنوان مدل برگزیده انتخاب شد. آماره G براساس همین نتایج برابر با ۰/۵۵۷ در نظر گرفته شد؛ و درخت فیلوژنتیکی نمونه‌ها بر اساس این مدل رسم شد که پس از تعداد تکرار پنج میلیون بار، میزان انحراف معیار فراوانی خرد شده برابر با ۰/۰۰۰۲۱ بود که مقدار قابل قبول محسوب می‌گردد. شکل دو درخت حاصل را نشان می‌دهد. میزان شاخص راجر-هارپندینگ ۰/۰۸ ($P>0.5$) و نمودار آن چند نمایی به دست آمد (شکل ۳) و شاخص تاجیما برابر با ۰/۰۲- ($P>0.1$) و آماره آزمون FU برابر با ۰/۱۴- ($P>0.1$) محاسبه گردید. همچنین، شبکه هاپلوتایپی نمونه‌های مناطق مرکزی ایران بصورت جداگانه ترسیم شد (شکل ۴).

Inoue *et al.*, 2007; Kirschning *et al.*, 2007; (Arnason *et al.*, 2006; Kutschera *et al.*, 2013

نیز ترسیم گردید.

۳- نتایج

در بخشی از ژن ناحیه کنترل ژنوم میتوکندری از ۳۲ نمونه روباه معمولی در پنج استان مرکزی کشور که مورد مطالعه قرار گرفت، فراوانی بازها به ترتیب A(26.58)، T(29.78)، C(25.50) و G(17.16) تعیین شد. با بررسی این قطعه ۳۲۷ جفت بازی، ۳۱ جایگاه متغیر، ۲۹۶ جایگاه حفاظت شده و ۲۴ هاپلوتایپ شناسایی شد (جدول ۲).

میزان جانیشینی نوع اول (جانیشینی بازهای پورین A-G با یکدیگر و جانیشینی بازهای پیریمیدین C-T با یکدیگر) و جانیشینی نوع دوم (جانیشینی بازهای پورین و پیریمیدین با یکدیگر) در نمونه‌های پنج استان مورد مطالعه محاسبه شده است (جدول ۳). در این جدول اعدادی که به صورت پررنگ نشان داده شده‌اند، نرخ جانیشینی نوع اول را بیان می‌کنند و سایر اعداد نشان‌دهنده نرخ جانیشینی نوع دوم هستند. الگوهای جانیشینی و نرخ‌ها بر اساس مدل تامورا-ئی برآورد شده است (Tamura & Nei, 1993).

نتایج تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی^۱ (AMOVA) در جدول ۴ نشان داده شده است. برای مقایسه جمعیت‌های مورد مطالعه، مقایسه دو به دو جمعیت‌ها انجام شد که در این مطالعه نمونه‌های مربوط به هر استان یک جمعیت فرضی در نظر گرفته شده و آنالیزها بر همین اساس انجام گرفت (جدول ۵).

¹ Analysis of Molecular Variance

جدول ۲- هاپلوتایپ‌های شناسایی شده گونه روباه معمولی (*V. vulpes*) بر اساس نمونه‌های توالی شده.

هاپلوتایپ‌ها	سمنان	یزد	کرمان	اصفهان	تهران	فراوانی نسبی هر هاپلوتایپ (درصد)
HAP1	C_F_S1					۳/۱
HAP2	C_F_S2	C_F_Y1				۱۲/۵
	C_F_S3	C_F_Y10				
HAP3	C_F_S4					۳/۱
HAP4	C_F_S5					۳/۱
HAP5	C_F_S6					۳/۱
HAP6	C_F_S7					۳/۱
HAP7		C_F_Y2	C_F_K4			۹
		C_F_Y5				
HAP8		C_F_Y3				۶/۲۵
		C_F_Y4				
HAP9		C_F_Y6		C_F_E3		۶/۲۵
HAP10		C_F_Y7				۳/۱
HAP11		C_F_Y8				۳/۱
HAP12		C_F_Y9				۳/۱
HAP13		C_F_Y11				۳/۱
HAP14					C_F_T1	۳/۱
HAP15					C_F_T2	۳/۱
HAP16					C_F_T3	۳/۱
HAP17				C_F_E1		۳/۱
HAP18				C_F_E2		۳/۱
HAP19			C_F_K1			۳/۱
HAP20			C_F_K2			۳/۱
HAP21			C_F_K3			۳/۱
HAP22			C_F_K5			۳/۱
HAP23			C_F_K6			۶/۲۵
			C_F_K8			
HAP24			C_F_K7			۳/۱
مجموع هاپلوتایپ‌ها	۷	۸	۷	۳	۳	۱۰۰

جدول ۳. تخمین الگوهای جانشینی نوکلئوتیدی.

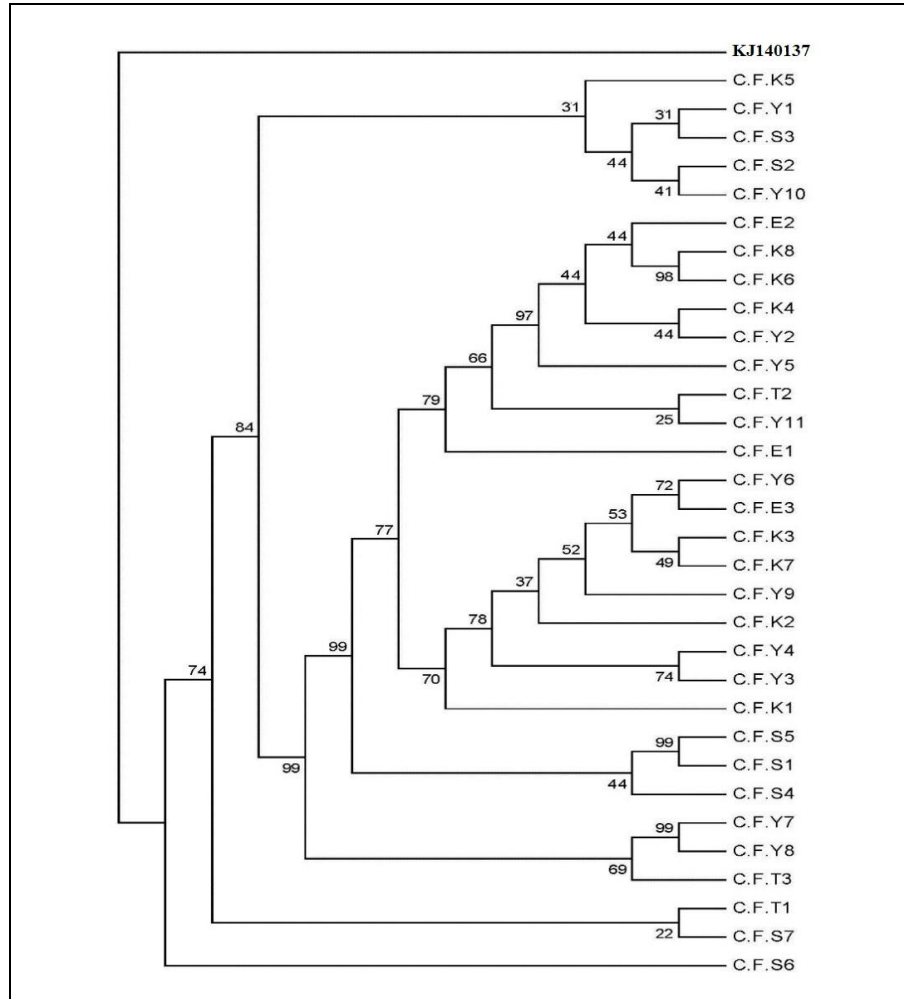
نوکلئوتید	A	T/U	C	G
A	-	۰/۵۳	۰/۴۷	۲۵/۲
T/U	۰/۴۸	-	۱۵/۱۶	۰/۳۱
C	۰/۴۸	۱۷/۰۳	-	۰/۳۱
G	۳۹/۰۳	۰/۵۳	۰/۴۷	-

جدول ۴- نتایج آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) در نرم افزار Arlequin V3.5.

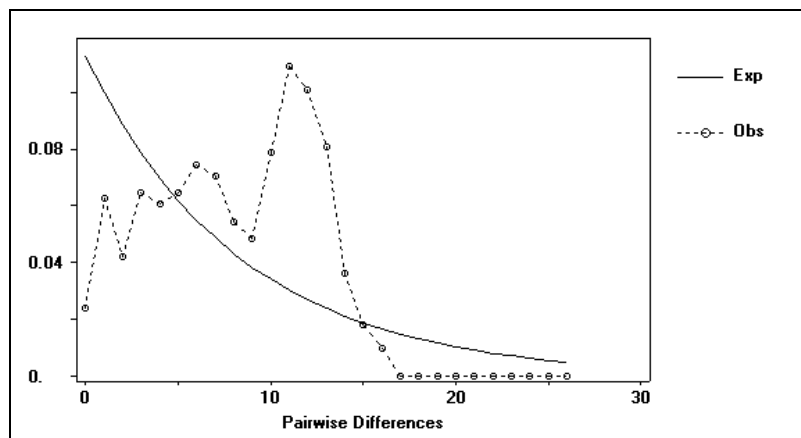
درصد واریانس	واریانس	مجموع مربعات	درجه آزادی	نوع واریانس
۹/۵۲	۰/۳۸۴۱۹	۲۳/۸۷۵	۴	بین جمعیت‌ها
۹۰/۴۸	۳/۶۵۱۶۲	۹۸/۵۹۴	۲۷	درون جمعیت‌ها
-	۴/۰۳۵۸۱	۱۲۲/۴۶۹	۳۱	کل
۰/۰۹۵۲	شاخص تثبیت (FST)			

جدول ۵- مقایسه دو به دو جمعیت‌ها در نرم افزار Arlequin V3.5 بر اساس روش Pairwise differences

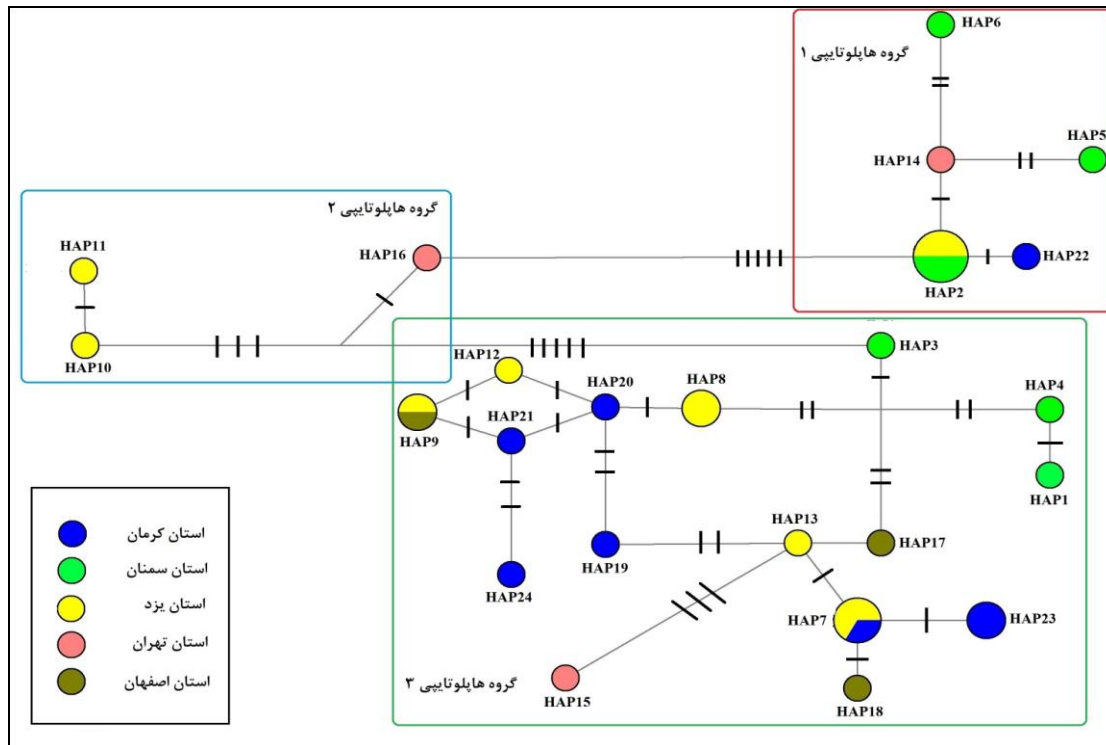
نام استان	سمنان	یزد	تهران	اصفهان	کرمان
سمنان	۰,۰۰۰				
یزد	۰/۱۰۲۵۶	۰,۰۰۰			
تهران	-۰/۱۴۳۲۰	-۰/۱۰۱۹	۰,۰۰۰		
اصفهان	۰/۳۰۱۸۷	-۰/۰۳۴۰۴	۰/۲۳۲۵۶	۰,۰۰۰	
کرمان	۰/۲۷۴۵۶	۰/۰۰۱۸۵	۰/۲۱۱۲۰	-۰/۱۲۸۷۰	۰,۰۰۰



شکل شماره ۲ - درخت فیلوژنتیکی روباه معمولی در مناطق مرکزی ایران. درخت رسم شده نشانگر این است که اگرچه تفکیک نمونه‌های روباه معمولی بخوبی از روباه ترکمنی صورت گرفته است، اما بدلیل وجود تنوع ژنتیکی زیاد، ساختار منظمی در بین نمونه‌های استان‌های مورد مطالعه وجود ندارد.



شکل شماره ۳ - نمودار مربوط به شاخص راجر-هارپندینگ براساس تحلیل ناحیه کنترل ژن میتوکندری. چند نمایی بودن نمودار بیانگر عدم گسترش گونه در گذشته است.



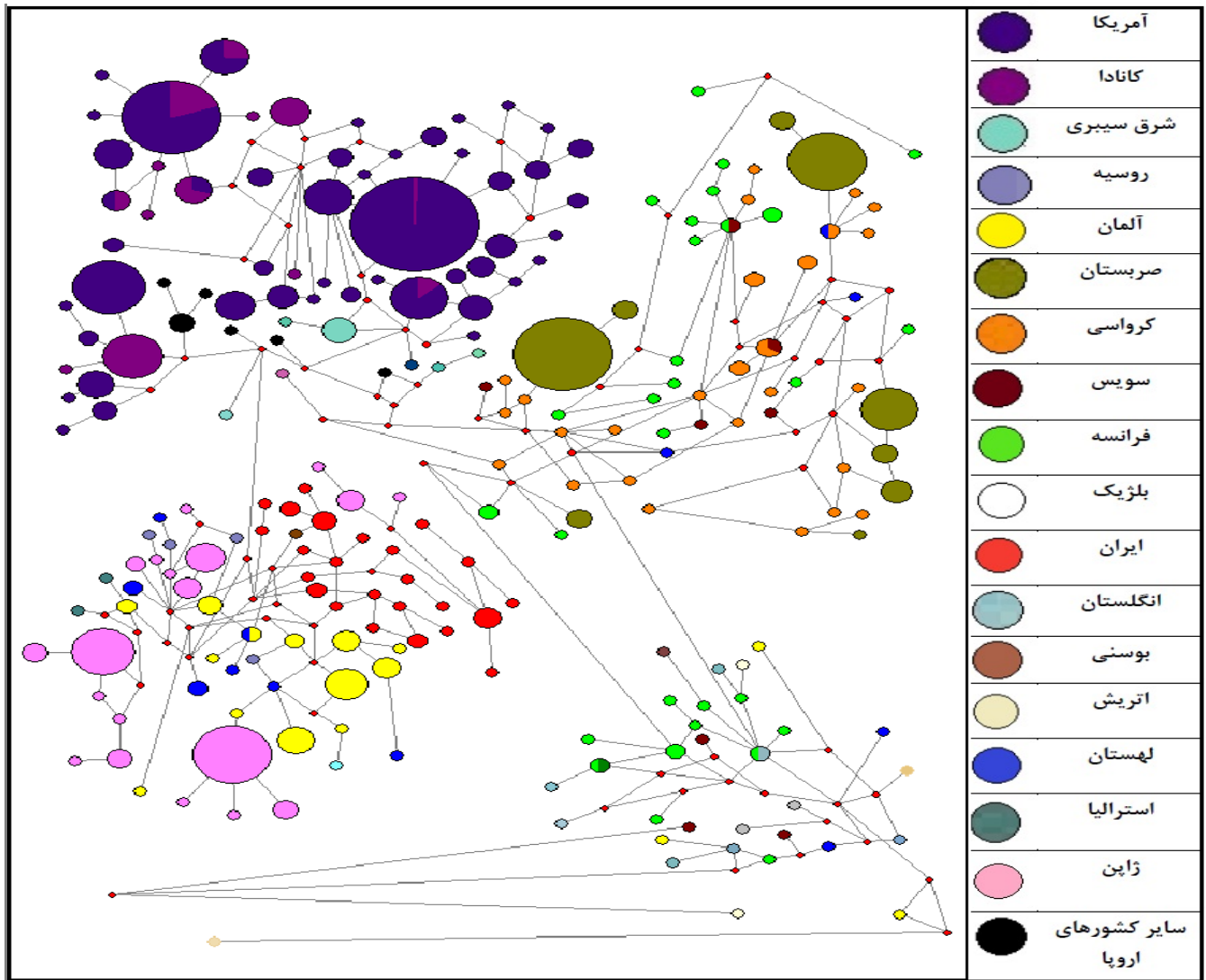
شکل شماره ۴- شبکه هاپلوتایپی نمونه‌های مورد مطالعه. شبکه هاپلوتایپی ترسیم شده، نشانگر سه گروه هاپلوتایپی عمده بوده که گروه هاپلوتایپی شماره ۳ دارای بیشترین فراوانی و گسترش بوده و نمونه‌هایی از تمام مناطق مورد مطالعه در آن قرار دارد، گروه هاپلوتایپی ۲، محدودترین گروه بوده و تنها نمونه‌هایی از استان یزد و تهران در آن وجود دارد.

پژوهش حاضر ۳۲۷ جفت باز از این ژن در ۳۲ نمونه تکثیر شد و مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ۲۴ هاپلوتایپ متفاوت در بین نمونه‌ها وجود دارد و تنوع هاپلوتایپی برابر با ۰/۹۸ است که این میزان در مقایسه با مطالعات انجام شده در سایر مناطق نظیر هوکایدو ژاپن (۰/۶)، دودمان آمریکای شمالی (۰/۷۴۲) (Kutschera, 2013) و کرواسی (۰/۹۰۱) (Galov *et al.*, 2014)، آلمان (۰/۹۲)، فرانسه و سوئیس (۰/۹۵) و سوئد (۰/۹۱) (Edwards *et al.*, 2012) بالاتر است و

به منظور بررسی موقعیت فیلوژنتیک روباه معمولی نسبت به دیگر جمعیت‌های جهان، این روش با ۲۴۶ هاپلوتایپ در دسترس منحصربه‌فرد نیز مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

۴- بحث و نتیجه گیری

ژن ناحیه کنترل دی‌ان‌ای میتوکندری در بسیاری از تاکسون‌های مطالعه شده نرخ تکاملی بالایی را نشان می‌دهد (Wilson, 1985) و برای بررسی تاریخچه جمعیت‌ها و نیز جریان ژنی مناسب تشخیص داده شده است (Avisé *et al.*, 1994). به همین منظور در



شکل شماره ۵- شبکه هاپلوتایپی روباه معمولی در جهان. براساس این شبکه می توان نتیجه گرفت که نمونه های مرکز ایران در کلاد اورسیا قرار می گیرد و کاملاً از نمونه های کلاد آمریکا و آمریکای شمالی فاصله دارد.

است. چنین سطح تنوع بالایی در بین جمعیت های روباه معمولی در مرکز ایران نشان دهنده اندازه جمعیت مؤثر بزرگ این گونه در گذشته و حال حاضر است که این مورد با مطالعات قبلی نیز همخوانی دارد (Galov *et al.*, 2014).

وجود این میزان تنوع با توجه به وسعت مناطق مورد مطالعه در مقایسه با مناطق مورد مقایسه قرار گرفته، بسیار قابل توجه است. هاپلوتایپ شماره ۷ فراوان ترین هاپلوتایپ بوده و در بین هاپلوتایپ های شناسایی شده، نوزده هاپلوتایپ فقط دارای یک فرد بودند که این امر بیانگر تنوع زیاد درون جمعیت ها

شده برای دو آماره تاجیما و FU منفی بوده ولی از آنجا که ($P > 0.1$) است، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که هرچند که امکان گسترش گونه در گذشته وجود دارد، اما این گسترش معنی‌دار نبوده است.

با وجود تنوع هاپلوتایپی بالا در میان نمونه‌ها می‌توان سه گروه هاپلوتایپی عمده را در میان نمونه‌ها تشخیص داد این سه گروه بروی شکل شماره ۴ مشخص شده است. گروه هاپلوتایپی ۳ دارای بیشترین تنوع هاپلوتایپی بوده و نمونه‌هایی از تمامی مناطق مورد مطالعه در این گروه هاپلوتایپی وجود دارد. گروه هاپلوتایپی دوم که در میانه شبکه ترسیم شده قرار دارد دارای کمترین میزان تنوع هاپلوتایپی بوده و نمونه‌هایی از استان‌های تهران و یزد در این گروه قرار می‌گیرند و گستره پراکنش این گروه هاپلوتایپی محدودتر از دو گروه دیگر است.

تنوع هاپلوتایپی بالا و گستره پراکنش گروه‌های هاپلوتایپی نیز بحث جدایی جمعیت‌های روباه در این استان‌ها را تا حد زیادی بی‌اعتبار نموده و بیانگر این مورد است که میزان تنوع درون جمعیتی بسیار بالا بوده و تشابهات ژنی که بیانگر وجود ارتباط بین جمعیت‌ها و شارش ژنی بین آن‌هاست در مناطق مورد مطالعه بسیار بالا است.

درخت تبارزایشی رسم شده نیز وجود سه گروه عمده را در بین نمونه‌ها نمایان ساخته و همانند شبکه هاپلوتایپی، فراوانی و فاصله بین نمونه‌ها در گروه بزرگتر درخت تبارزایشی که معادل گروه هاپلوتایپی دوم است بیشتر بوده و براساس شکل درخت ترسیم شده، جریان ژنی بین جمعیت‌ها مشهود است. در نتیجه این جریان ژنی قوی، مقدار واریانس بین جمعیت‌ها بسیار کمتر از

با توجه به نتایج تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی، شباهت متوسطی بین جمعیت‌ها وجود دارد و بیش‌ترین واریانس، مربوط به تغییرات درون جمعیتی است. با توجه به رابطه $Nm \approx (1/F_{st}-1)/4$ زمانی که میزان F_{st} کم‌تر از 0.33 باشد، جریان ژنی را می‌توان به عنوان عامل اصلی بین جمعیت‌ها در نظر گرفت (HE *et al.*, 2006). نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که تقریباً جریان ژنی بین جمعیت‌ها بالاست و ارتباط زیستگاهی بین جمعیت‌های محلی به خوبی برقرار است. از آنجا که مهم‌ترین عوامل محدود شدن جریان ژنی، موانع فیزیکی بین زیستگاه‌ها و فاصله جغرافیایی است (Wang & Summers, 2010)، با توجه به اینکه مناطق مورد مطالعه علی‌رغم وسعت زیاد از لحاظ خصوصیات زیستگاهی چندان از یکدیگر متفاوت نیستند و روباه معمولی نیز گونه‌ای دارای توان تحمل و قدرت جابجایی بالا است (Won & Smith, 1999)، این موانع فیزیکی عامل موثری در جدایی جمعیت‌ها از یکدیگر نبوده و جریان ژنی مناسبی بین این مناطق وجود دارد که این نتیجه با مطالعات قبلی (Galov *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2012) مطابقت دارد.

در صورتی که توزیع عدم تطابق بر اساس شاخص راجرز و هارپندینگ به صورت تک‌نمایی باشد، نشان‌دهنده گسترش ناگهانی جمعیت در گذشته است و در صورتی که به صورت دو نمایی یا چند نمایی باشد نشان‌دهنده ثبات جمعیتی در گذشته است (Rogers & Harpending, 1992). براساس میزان شاخص راجر-هارپندینگ و چند نمایی بودن نمودار آن، گسترش گونه اتفاق نیفتاده است؛ اما مقدار محاسبه

جمعیت‌ها بقای آنها را تضمین کرد. در مطالعه حاضر میزان تنوع ژنتیکی بدست آمده از پنج استان کشور نسبتاً مناسب بود که بیانگر عدم وجود گردنه بطری در این جمعیت‌هاست، البته باید توجه داشت که این نتایج و یافته‌ها براساس نمونه‌های بدست آمده بوده و برای بررسی‌های جامع‌تر و دقیق‌تر پیشنهاد می‌گردد در مطالعات تکمیلی، افزایش تعداد نمونه و نیز تحلیل سایر ژن‌های میتوکندریایی موردنظر قرار گیرد و همچنین به بررسی ارتباط بین این جمعیت‌ها با سایر مناطق کشور نیز توجه شده و در نهایت، استفاده از سایر روش‌های تحلیل ژنتیکی نظیر ریزماهورها می‌تواند مفید واقع شود.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله بر خود واجب می‌دانند تا از همکاری ادارات کل حفاظت محیط زیست استان‌های مورد مطالعه و همچنین آقایان حسن اکبری، محمد ابراهیم صحتی و محمد علی ادیبی تشکر و قدردانی نمایند. لازم به ذکر است که این پژوهش با حمایت و همکاری "صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور" انجام شده است.

مقدار واریانس درون جمعیت‌ها بوده و سبب شده است که ساختار ژنتیکی مستقلی برای جمعیت‌های در نظر گرفته شده، قابل تشخیص نباشد. این نتیجه کاملاً با شبکه هاپلوتایپی همخوانی داشته و مورد تایید است.

شبکه هاپلوتایپی ترسیم شده نمونه‌ها، همراه با سایر نمونه‌های دنیا نشان دهنده تمایز بین نمونه‌های کانادا و آمریکا از نمونه‌های مربوط به آسیا و اروپا بوده و نمونه‌های مورد مطالعه همراه با سایر نمونه‌های مربوط به آسیا یعنی ژاپن در یک گروه عمده هاپلوتایپی قرار می‌گیرند. قرار گرفتن نمونه‌های مربوط به آلمان و لهستان به همراه نمونه‌های ایران و ژاپن ممکن است مربوط به نظریه مهاجرت بعد از آخرین عصر یخبندان باشد که در آن احتمال مهاجرت روباه معمولی از مسیر مهاجرتی شمال مدیترانه به سمت شمال اروپا وجود دارد (Taberlet *et al.*, 1998)، اما از آنجا که نمونه‌های مربوط به مناطق دیگر در مسیر مهاجرتی موجود نیست، نمی‌توان با قطعیت در این مورد اظهار نظر نمود.

یکی از اهداف اساسی مطالعات تنوع ژنتیکی حیات وحش، بررسی وضعیت تنوع ژنتیکی جمعیت‌های موجود در مناطق مختلف به منظور اعمال مدیریت صحیح آنهاست تا بتوان با حفظ حداکثری تنوع درون

References

Arnason, U., Gullberg, A., Janke, A., Kullberg, M., Lehman, N., Petrov, E. A and Väinölä, R. 2006. Pinniped phylogeny and a new hypothesis for their origin and dispersal. *Molecular phylogenetics and evolution*, 41(2): 345-354.

Aubry, K. B., Statham, M. J., Sacks, B. N., Perrine, J. D and Wisely, S. M. 2009. Phylogeography of the North American red fox: vicariance in Pleistocene forest refugia. *Molecular Ecology*, 18(12): 2668-2686.

Avise, J. C. 1996. Introduction: the scope of conservation genetics, *Conservation genetics*: 1-9: Springer.

AvISE, J. C., Nelson, W. S and Sibley, C. G. 1994. DNA sequence support for a close phylogenetic relationship between some storks and New World vultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(11): 5173-5177.

Bandelt, H.-J., Forster, P and Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution*, 16(1): 37-48.

Cassens, I., Van Waerebeek, K., Best, P. B., Crespo, E. A., Reyes, J and Milinkovitch, M. C. 2003. The phylogeography of dusky dolphins (*Lagenorhynchus obscurus*): a critical examination of network methods and rooting procedures. *Molecular Ecology*, 12(7): 1781-1792.

Edwards, C. J., Soulsbury, C. D., Statham, M. J., Ho, S. Y., Wall, D., Dolf, G., Iossa, G., Baker, P. J., Harris, S and Sacks, B. N. 2012. Temporal genetic variation of the red fox, *Vulpes vulpes*, across Western Europe and the British Isles. *Quaternary science reviews*, 57: 95-104.

Excoffier, L and Lischer, H. E. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources*, 10(3): 564-567.

Firouz, E. 2005. *The complete fauna of Iran*: IB Tauris.

Frati, F., Hartl, G., Lovari, S., Delibes, M and Markov, G. 1998. Quaternary radiation and genetic structure of the red fox *Vulpes vulpes* in the Mediterranean Basin, as revealed by allozymes and mitochondrial DNA. *Journal of Zoology*, 245(01): 43-51.

Fu, Y.-X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147(2): 915-925.

Fumagalli, L., Pope, L. C., Taberlet, P and Moritz, C. 1997. Versatile primers for the amplification of the

mitochondrial DNA control region in marsupials. *Molecular Ecology*, 6(12): 1199-1201.

Galov, A., Sindičić, M., Andreanszky, T., Čurković, S., Deždek, D., Slavica, A., Hartl, G. B and Krueger, B. 2014. High genetic diversity and low population structure in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Croatia. *Mammalian Biology-Zeitschrift für Säugetierkunde*, 79(1): 77-80.

He, H., Yuan, X., Wei, C and Yuan, F. 2006. Genetic variation of the mitochondrial ND4 region among geographical populations of *Sitodiplosis mosellana* (Gehin)(Diptera: Cecidomyiidae) in China. *Journal of the Kansas Entomological Society*, 79(3): 211-221.

Hrbek, T., Farias, I. P., Crossa, M., Sampaio, I., Porto, J. I and Meyer, A. 2005. Population genetic analysis of *Arapaima gigas*, one of the largest freshwater fishes of the Amazon basin: implications for its conservation. *Animal Conservation*, 8(03): 297-308.

İbiş, O., Tez, C and Özcan, S. 2014. Phylogenetic Status of the Turkish Red Fox (*Vulpes vulpes*), based on Partial Sequences of the Mitochondrial Cytochrome b Gene.

Inoue, T., Nonaka, N., Mizuno, A., Morishima, Y., Sato, H., Katakura, K and Oku, Y. 2007. Mitochondrial DNA phylogeography of the red fox (*Vulpes vulpes*) in northern Japan. *Zoological science*, 24(12): 1178-1186.

KARAMII, M., HUTTERER, R., BENDA, P., SIAHSARVIE, R and KRYŠTUFEK, B. 2008. Annotated check-list of the mammals of Iran. *Lynx*, series nova, 39.(¹)

Kirschning, J., Zachos, F. E., Cirovic, D., Radovic, I. T., San Hmwe, S and Hartl, G. B. 2007. Population genetic analysis of Serbian red foxes (*Vulpes vulpes*) by means of mitochondrial control region sequences. *Biochemical genetics*, 45(5-6): 409-420.

Kutschera, V. E., Lecomte, N., Janke, A., Selva, N., Sokolov, A. A., Haun, T., Steyer, K., Nowak, C and Hailer, F. 2013. A range-wide synthesis and timeline

- for phylogeographic events in the red fox (*Vulpes vulpes*). *BMC evolutionary biology*, 13(1): 114.
- Larivière, S and Pasitschniak-Arts, M. 1996. *Vulpes vulpes*. *Mammalian species*: 1-11.
- Leite, J. V., Álvares, F., Velo-Antón, G., Brito, J. C and Godinho, R. 2015. Differentiation of North African foxes and population genetic dynamics in the desert—insights into the evolutionary history of two sister taxa, *Vulpes rueppellii* and *Vulpes vulpes*. *Organisms Diversity and Evolution*: 1-15.
- Macdonald, D. W., Reynolds, J. C, 2008. *Vulpes vulpes*, In: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. [http:// www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org) (accessed on 10 November 2011).
- McNeely, J. A., Miller, K. R., Reid, W. V., Mittermeier, R. A and Werner, T. B. 1990. *Conserving the world's biological diversity: International Union for conservation of nature and natural resources*.
- Mills, L. S. 2012. *Conservation of wildlife populations: demography, genetics, and management: John Wiley and Sons*.
- Mitchell-Jones, A. J and Kryštufek, B. 1999. *The atlas of European mammals: T and AD Poyser London*.
- Nei, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics: Columbia university press*.
- Perrine, J. D., Pollinger, J. P., Sacks, B. N., Barrett, R. H and Wayne, R. K. 2007. Genetic evidence for the persistence of the critically endangered Sierra Nevada red fox in California. *Conservation Genetics*, 8(5): 1083-1095.
- Posada, D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular biology and evolution*, 25(7): 1253-1256.
- Rogers, A. R and Harpending, H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular biology and evolution*, 9(3): 552-569.
- Ronquist, F and Huelsenbeck, J. P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12): 1572-1574.
- Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J. C., Messeguer, X and Rozas, R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19(18): 2496-2497.
- Sacks, B. N., Moore, M., Statham, M. J and Wittmer, H. U. 2011. A restricted hybrid zone between native and introduced red fox (*Vulpes vulpes*) populations suggests reproductive barriers and competitive exclusion. *Molecular Ecology*, 20(2): 326-341.
- Sacks, B. N., Statham, M. J., Perrine, J. D., Wisely, S. M and Aubry, K. B. 2010. North American montane red foxes: expansion, fragmentation, and the origin of the Sacramento Valley red fox. *Conservation Genetics*, 11(4): 1523-1539.
- Statham, M., Turner, P and O'reilly, C. 2005. Use of PCR amplification and restriction enzyme digestion of mitochondrial D-loop for identification of mustelids in Ireland. *The Irish Naturalists' Journal*: 1-6.
- Statham, M. J., Murdoch, J., Janecka, J., Aubry, K. B., Edwards, C. J., Soulsbury, C. D., Berry, O., Wang, Z., Harrison, D and Pearch, M. 2014. Range-wide multilocus phylogeography of the red fox reveals ancient continental divergence, minimal genomic exchange and distinct demographic histories. *Molecular ecology*, 23(19): 4813-4830.
- Statham, M. J., Sacks, B. N., Aubry, K. B., Perrine, J. D and Wisely, S. M. 2012. The origin of recently established red fox populations in the United States: translocations or natural range expansions? *Journal of Mammalogy*, 93(1): 52-65.
- Statham, M. J., Trut, L. N., Sacks, B. N., Kharlamova, A. V., Oskina, I. N., Gulevich, R. G., Johnson, J. L., Temnykh, S. V., Acland, G. M and Kukekova, A. V. 2011. On the origin of a domesticated species: identifying the parent population of Russian silver foxes (*Vulpes vulpes*).

Biological Journal of the Linnean Society, 103(1): 168-175.

Taberlet, P and Bouvet, J. 1994. Mitochondrial DNA polymorphism, phylogeography, and conservation genetics of the brown bear *Ursus arctos* in Europe. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 255(1344): 195-200.

Taberlet, P., Fumagalli, L., Wust-Saucy, A.-G and Cosson, J.-F. 1998. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. Molecular ecology, 7(4): 453-464.

Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics, 123(3): 585-595.

Tamura, K and Nei, M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Molecular biology and evolution, 10(3): 512-526.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M and Kumar, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular biology and evolution, 28(10): 2731-2739.

Teacher, A. G., Thomas, J. A and Barnes, I. 2011. Modern and ancient red fox (*Vulpes vulpes*) in Europe show an unusual lack of geographical and temporal structuring, and differing responses within the carnivores to historical climatic change. BMC evolutionary biology, 11(1): 214.

Valière, N., Fumagalli, L., Gielly, L., Miquel, C., Lequette, B., Poulle, M. L., Weber, J. M., Arlettaz, R and Taberlet, P. 2003. Long-distance wolf recolonization of France and Switzerland inferred from non-invasive genetic sampling over a period of 10 years. Animal Conservation, 6(1): 83-92.

Wang, I. J and Summers, K. 2010. Genetic structure is correlated with phenotypic divergence rather than geographic isolation in the highly polymorphic strawberry poison-dart frog. Molecular Ecology, 19(3): 447-458.

Wayne, R. K., Geffen, E., Girman, D. J., Koepfli, K. P., Lau, L. M and Marshall, C. R. 1997. Molecular systematics of the Canidae. Systematic biology, 46(4): 622-653.

Won, C and Smith, K. G. 1999. History and current status of mammals of the Korean Peninsula. Mammal review, 29(1): 3-36.

Wilson, A. C, 1985. Mitochondrial and two perspectives on evolutionary genetics, Biological Journal of the Linnean Society, 26: 375-400.

Yu, J.-N., Han, S.-H., Kim, B.-H., Kryukov, A. P., Kim, S., Lee, B.-Y and Kwak, M. 2012. Insights into Korean Red Fox (*Vulpes vulpes*) based on mitochondrial cytochrome b sequence variation in East Asia. Zoological science, 29(11): 753-760.

Zhong, H.-M., Zhang, H.-H., Sha, W.-L., Zhang, C.-D and Chen, Y.-C. 2010. Complete mitochondrial genome of the red fox (*Vulpes vulpes*) and phylogenetic analysis with other canid species.

Genetic structure of Red Fox (*Vulpes vulpes*) based on D-Loop region sequence of mitochondrial genome in central region of IRAN

Jalil Imani Harsini¹, Hamid Reza Rezaei*², Saeid Naderi³, Hossein Varasteh Moradi²

¹ PhD Student of Environmental Sciences, College of Fisheries and Environmental Sciences,
Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

² Assistant professor of Environmental Sciences, College of Fisheries and Environmental
Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

³ Assistant professor of Environmental Sciences, College of Natural Resources, Guilan
University, Rasht, Iran.

Received: 23-Feb.-2015 Accepted: 5-Jan-2016

Abstract

In this research in order to survey genetic structure of Red Fox in central region of Iran, 32 sample tissues were collected from five Provinces (Isfahan, Tehran, Semnan, Kerman and Yazd). After DNA extracting, D-Loop gene of mitochondrial genome was amplified using polymerase chain reaction (PCR) and 327 base pairs (bp) of this gene were sequenced for each sample. The results showed that there are 24 different haplotypes in the samples and haplotype diversity is equal to 0.98. Based on the results of the analysis of molecular variance (AMOVA), there is an average similarity between populations and the highest amount of sample variance is related to inter population changes. Species expansion has not been occurred due to Harpending's Raggedness index and its multi exponential diagram. However based on the results of Tajima's D and Fu's F_s statistics, it could be concluded that species expansion had been possible in the past but it was not significant. Phylogenetic tree shows that there is no independent genetic structure for studied populations and in population differences are greater than among population differences. Haplotype network curve has also confirmed this issue. Although it is not possible to adopt a protection strategy by studying a short part of species genome, but due to the results of this research it might be concluded that there is a good gene flow among populations and currently there is no evidence of bottle neck problem among Fox populations of these regions.

Keyword: genetic Structure, Red Fox, Mitochondrial Genome, Central region of IRAN

*Corresponding author; Tel: +98-9112691624

Email: rezaei@gau.ac.ir