محیط زیست طبیعی، منابع طبیعی ایران، دوره ۷۱ ، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۷
صفحات ۳۱۵ تا ۳۲۷
Archive of SID

فیلوژنی و تنوع ژنتیکی کل و بز *Capraaegagrus* (Erxleben, 1777) در استان مازندران براساس ژن ناحیه‌ی D-Loop میتوکندریایی

سیده مژگان حسینی حیدری[۱]، سعید نادری[۲*]، حسن رجبی مهام[۳]، حمیدرضا رضایی[۴]

۱- *دانش آموخته کارشناسی ارشد محیط زیست،دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان*

۲-*استادیار گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان*

۳-*استادیارگروه علوم و زیست فناوری جانوری، دانشکده علوم و فناوریهای زیستی، دانشگاه شهید بهشتی*

۴-*دانشیار گروه محیط زیست، دانشکده محیط زیست و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان*

(تاریخ دریافت ۹۶/۰۲/۲۷ - تاریخ پذیرش ۹۷/۰۲/۰۳)

چکیده:

کل و بز *Capra aegagrus*، از جمله پستانداران شاخص مناطق کوهستانی ایران است که در سال‌های اخیر به دلیل کاهش جمعیت، در طبقه حفاظتی آسیب پذیر (Vulnerable) قرار گرفته است. در مطالعه حاضر، روابط فیلوژنتیکی و تنوع ژنتیکی سه جمعیت بز وحشی بومی مناطق کمربن، بندبن و بلده در استان مازندران، بر اساس پلی مورفیسم ناحیه D-loop توالی ژنوم میتوکندری (mtDNA) مورد بررسی قرار گرفته است. درختان فیلوژنتیک به دست آمده، ۷ کلاد مجزا را نشان می‌دهند و حاکی از وجود جد مشترک با دو هاپلوگروپ از ۶ هاپلوگروپ شناخته شده گونه بز در دنیا و وجود حداقل ۲ منشأ متفاوت بزهای وحشی مازندران است. همچنین، با استفاده از ماتریس فاصله ژنتیکی Fst/1-Fst و رسم درخت NJ فیلوژئوگرافی، رابطه نزدیک ژنتیکی و جغرافیایی در بین مناطق سه‌گانه مورد مطالعه و مناطق جغرافیایی هم جوار مشخص شد. مقادیر Fu's Fs و Tajima's Dنشان از وجود تعادل بین موتاسیون و رانش ژنتیکی دارند. همچنین با توجه به مقادیر SSDو r در آزمون MMD، انطباق کامل بین مقادیر مشاهده شده و مورد انتظار، نیز نشان از تبعیت این جمعیت از مدل گسترش ناگهانی جمعیت دارد. نتایج آنالیز AMOVA نیز برای مناطق مختلف ایران، بیانگر تفاوت کاملا معنی‌دار کلادهای هاپلوگروپ‌های متفاوت بوده و مقدار بزرگ شاخص Fst، علاوه بر معنی‌دار بودن، نشان‌دهنده تفاوت ژنتیکی بالا در بین کلادهای مختلف کل و بزها است.

کلید واژگان:کل و بز، فیلوژنتیک، mtDNA، D-loop، مازندران

*نویسنده مسئول؛ تلفن: ۰۱۳۴۴۳۲۰۸۹۵ ایمیل :naderi@guilan.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

۱. مقدمه

گونه بز وحشی *Capra aegagrus* (Erxleben, 1777)، گونه شاخص کوهستان‌های ایران بوده و جمعیت آن در سال‌های اخیر در بیشتر زیستگاه‌های کشور به شدت رو به کاهش گذاشته و در بسیاری از مناطق مانند جنوب فارس، بوشهر و غرب کشور که زمانی هزاران راس از کل و بزها مشاهده می‌شد، نسل آن منقرض شده یا در شرف انقراض قرار گرفته است (Ziaei, 1997). همچنین، در کنار این گونه وحشی، تعدادی از نژادهای بومی بز اهلی در ایران دیده می‌شوند و به واقع تاریخچه طولانی و پیچیده پروسه اهلی سازی، تولید و اصلاح نژاد این گونه بر اساس مطالعات باستانشناسی و سلولی- مولکولی، بررسی و مورد تحلیل قرار گرفته و از جنبه‌های مختلف دارای اهمیت است.

بر اساس گزارش های سازمان حفاظت محیط زیست، این گونه در نواحی کوهستانی شمال ایران و از جمله در استان مازندران نیز دیده می‌شود که در بعضی نقاط آن به دلیل فعالیت‌های مخرب انسانی نظیر شکار بی‌رویه و غیر قانونی، جنگل‌تراشی، رقابت برای غذا با دام اهلی، کشاورزی، معدن‌کاوی، سدسازی، توسعه‌های شهری و غیره، دچار تخریب جمعیت و زیستگاه‌های طبیعی شده است. گستردگی و پیوستگی منطقه کوهستانی حفاظت شده البرز مرکزی شمالی (مناطق کمربن و بلده)، عامل مهمی در حفظ جمعیت کل و بز در این منطقه حساس بوده، همچنین شرایط مهاجرت و جابجایی بین زیستگاهی آن را فراهم نموده است. سایر مناطق زیست کل و بز، به ویژه در بخش‌های مرکزی و شرقی استان با دارا بودن گله‌های پراکنده و زیستگاه‌های جدا مانده، از جمعیت قابل توجهی برخوردار نبوده و عموماً به دلیل واقع بودن در مناطق آزاد شامل کیاسر ساری (بندبن)، دچار تهدیدهای جدی هستند.

در طی مطالعه Naderi و همکاران در سال ۲۰۰۸، بر روی تنوع ژنتیکی گونه بز وحشی و بررسی فرایند اهلی سازی این گونه از طریق تجزیه و تحلیل و مقایسه DNA میتوکندری افراد وحشی و اهلی در مقیاس وسیع توزیع گونه، بزهای وحشی استان مازندران از جمله معدود جمعیت های ایرانی بودند که مورد بررسی قرار نگرفتند. لذا شناسایی جزئی و اساسی گونه بز وحشی، به لحاظ بررسی توزیع تنوع ژنتیکی در درون و در میان جمعیتهای استان و مقایسه آن با جمعیت های سایر نقاط کشور، حائز اهمیت است. ارزیابی تنوع ژنتیکی موجود در یک جمعیت از مهمترین اهداف در مطالعات ژنتیکی جمعیت‌هاست و کاربرد مهمی در زیست شناسی حفاظت دارد. نتایج مربوط به ساختار ژنتیکی جمعیت در کنار داده‌های دموگرافیک و روابط زیستگاهی، امروزه به عنوان مهمترین ابزارهای مدیریت علمی جمعیت‌هاست. بنابراین، آگاهی از هریک از این پروسه‌ها برای حفظ پویایی جمعیت‌ها مهم است (Malekian, 1998). ژن‌هایی که به صورت متداول برای شناسایی گونه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند، عموماً ژن‌های حفظ شده میتوکندری هستند (Tobe *et al.*, 2007). ویژگی‌هایی همچون وراثت پذیری مادری و تغییرپذیری زیاد در توالی‌های آن، mtDNA را به ابزاری قدرتمند برای شناسایی گونه‌ها تبدیل کرده است (Rastogi *et al.*, 2007). به علت دارا بودن خصوصیاتی از جمله تعداد زیاد نسخه به ازای هر سلول (تقریبا ۱۰۰۰ نسخه و بیشتر)، کوچک بودن اندازه‌ی آن، هاپلوئید بودن، فقدان نو ترکیبی در

www.SID.ir

Archive of SID

آنها (Zeder *et al.,* 2006 ،Groves *et al.,* 1995) و وجود نواحی دارای تغییر پذیری بالا مانند ناحیه D-Loop برای تشخیص‌گونه‌ها و مطالعات تکاملی گونه‌های وابسته، و نیز برای ترسیم روابط تبارشناسی یا فیلو ژنتیکی آنها به کار گرفته می‌شود (Amills *et al.,* 2004 ، Azor *et al.,* 2005، Boore 2002، Colombo *et al.,* 2002، Kim *et al.,* 2002).

هدف از انجام مطالعه حاضر، بررسی تنوع ژنتیکی گونه کل و بز در استان مازندران و تعیین روابط فیلوژنتیکی و فیلوجغرافیایی آن با سایر جمعیتهای موجود در ایران، با استفاده از ژن ناحیه‌ی D-Loop میتوکندریایی است. مطالعه تنوع ژنتیکی این گونه و نحوه توزیع آن در جمعیت‌های مختلف استان مازندران، می‌تواند جهت شناسایی بیولوژیک و اکولوژیک و مدیریت حفاظتی آن، قدم مهم و ضروری باشد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. نمونه برداری

به دنبال مشاهده جمعیت‌های کل و بز در ارتفاعات سه منطقه‌ی حفاظت شده کمربن (۳۶/۱۱ شمالی ۵۱/۲۶ شرقی)، بلده (۳۶/۲۱ شمالی ۵۱/۸۱ شرقی) و بندبن (۳۶/۷۱ شمالی ۵۱/۰۱ شرقی) که زیستگاه-های مهم این گونه در استان مازندران هستند، بر اساس روش نمونه گیری غیرتهاجمی (Non-invasive method)، سرگین‌های تازه مربوط به ۸۳ فرد شامل ۴۵ نمونه در کمربن، ۲۱ نمونه در بلده و ۱۷ نمونه در بندبن با ثبت مختصات نقاط نمونه گیری، جمع آوری شد.

۲.۲. استخراج DNA

بر اساس شرایط نمونه‌های جمع آوری شده، استخراج DNA از ۵۰ نمونه، با استفاده از کیت مخصوص استخراج DNA از سرگین، مربوط به شرکت یکتا تجهیز آزما و براساس دستورالعمل مربوطه، انجام پذیرفت. کمیت و کیفیت DNA استخراجی توسط دستگاه نانودراپ تعیین شد.

۳.۲. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR) و توالی یابی

برای تکثیر ناحیه‌ی D-loop از ناحیه‌ی کنترل DNA میتوکندریایی به طول ۵۹۸ جفت باز از جفت پرایمرهای اختصاصی به نام‌های CAP-F با توالی 5'- CGTGTATGCAAGTACATTAC -3' و برای تکثیر ناحیه‌ی D-loop از ناحیه‌ی کنترل DNA میتوکندریایی به طول ۵۹۸ جفت باز از جفت پرایمرهای اختصاصی به نام‌های CAP-F با توالی 5'- CGTGTATGCAAGTACATTAC -3' و CAP-R باتوالی '5-CTGATTAGTCATTAGTCCATC-3' استفاده شد (Parma *et al.,* 2003). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز توسط دستگاه ترموسایکلر مدل PCR - Primus 25 – PEQLAB در ۳۰ سیکل و حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شده است. اجزای واکنش PCR و غلظت مواد شامل ۱۲/۵ میکرولیتر Master mix و ۸/۵ میکرولیتر DdH2O و ۲ میکرولیتر DNA و ۱ میکرولیتر Forward primer و ۱ میکرولیتر Reverse primer بوده است. برنامه‌ی حرارتی واکنش PCR برای تکثیر ژن دی‌لوپ مورد نظر شامل سه مرحله‌ی اصلی می‌باشد: مرحله‌ی اول، پروسه مرحله‌ی جداسازی دو رشته DNA از یکدیگر

www.SID.ir

Archive of SID

با عنوان واسرشته شدن، در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی گراد که در ۳۰ ثانیه بوده است. مرحله‌ی دوم، مرحله‌ی اتصال آغازگرها، در دمای ۵۵ درجه‌ی سانتی گراد در ۳۰ ثانیه بوده و مرحله‌ی سوم، مرحله‌ی تکثیر توالی هدف و با دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی گراد و در محدوده‌ی زمانی ۱ دقیقه می‌باشد. این چرخه‌ی حرارتی، به تعداد ۳۰ بار تکرار انجام گرفت. به منظور تایید تکثیر ناحیه‌ی مورد نظر طی واکنش‌های PCR، الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱٪ با رنگ آمیزی Red Safe صورت گرفت. ژل به دستگاه UV منتقل و کمیت و کیفیت DNA مورد نظر، ارزیابی شد. محصولات PCR برای تعیین توالی نوکلئوتیدها به شرکت "ماکرو ژن (Macrogene) کره جنوبی" ارسال شد.

۴.۲.تجزیه و تحلیل نتایج بر اساس توالی‌های به دست آمده

نتایج حاصل از توالی‌یابی با استفاده از نرم افزار Seqscape (Applied Biosystem) ویرایش شدند. همچنین تعداد ۴۶۹ توالی مربوط به همین گونه از سایتبانک ژن (GenBank) جهت انجام آنالیزهای مختلف استفاده شد. آنگاه توالی‌های اصلاح شده، به همراه توالی‌های دریافت شده از بانک ژن جهت ردیف آرایی در نرم افزارMEGA6 با استفاده از الگوریتم Clustal Wوارد شدند. در نهایت درخت فیلوژنی بر اساس درخت فیلوژنی براساس روش اتصال مجاور[1] و بیشینه درست نمائی[2]با استفاده از نرم افزار MEGA 6 بدست آمد (Tamura *etal*., 2013). به منظور بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های مورد مطالعه و مقایسه شاخص‌های تنوع ژنی آنها (از قبیل تعیین هاپلوتایپ‌ها، تنوع هاپلوتایپی، تنوع نوکلئوتیدی، تعیین فاصله‌های ژنتیکی نمونه‌های مورد مطالعه، محاسبه تنوع میان جمعیت‌ها با انجام آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) و نیز Pairwise F_{st} value و آزمون توزیع عدم تطابق[3] و مقادیر شاخص های Fu's Fsو نیز Tajima's D جهت بررسی سرعت گسترش جمعیت‌های مورد مطالعه از گذشته تاکنون، از نرم‌افزارهای DNAsp 5.10 و Arlequin 3.5استفاده شد (Librado & Rozas, 2009، Excoffier & H.E.L.Lischer, 2010).

1-Neighbor joining
2-Maximum likelihood
3 -Mismatch Distribution (MMD)

۳. نتایج

۱.۳. نتایج توالی یابی و خصوصیات ژنتیکی نمونه های مورد مطالعه

از مجموع ۵۰ نمونه سرگین مورد آزمایش از افراد گونه بز وحشی نمونه برداری شده در ۳ زیستگاه عمده آن در استان مازندران، در ۲۲ نمونه، استخراج DNA، تکثیر، نسخه برداری و سپس توالی‌یابی در قطعه مورد نظر در بخش D-Loop ژنوم میتوکندری با موفقیت انجام پذیرفت. نتایج اسپکتروفتومتر نشان داد که DNA استخراج شده از کیفیت مناسبی برای PCR برخوردار هستند. الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر روی ژل آگاروز ۱٪ نشان داد که پرایمرها به خوبی عمل نموده و قطعات اختصاصی برای ژن ناحیه‌ی D-Loop از DNA میتوکندریایی به طول ۵۹۸ جفت باز، تولید شده است. همچنین، نتایج توالی‌یابی نشان داد که توالی‌هایقطعه ژن تکثیر شده ناحیه D-Loop دارای دیاگرام های مناسب با پیک‌های بلند و جدا از هم بودند. پس از مرتب‌سازی مجموعه داده‌های نمونه‌های مورد مطالعه در کنار

www.SID.ir

Archive of SID

۴۶۹ توالی اقتباس شده از بانک ژن با استفاده از نرم‌افزار Mega 6، به منظور داشتن قابلیت انجام آنالیزهای مختلف و امکان مقایسه با مطالعات قبلی، قطعه به طول ۴۸۱ جفت باز از قطعه کلی جدا و به عنوان قطعه مورد بررسی در انواع آنالیزها، در نظر گرفته شد. نتایج خصوصیات ژنتیکی ۲۲ فرد مورد مطالعه حاضر در جدول (شماره۱) ارائه شده است. در مجموع، تعداد ۱۴ هاپلوتایپ در۳ منطقه مختلف مورد مطالعه، شناسایی شدند. بر اساس نتایج به دست آمده، در بین ۳ منطقه مورد مطالعه حاضر در استان مازندران، هاپلوتایپ‌های مشابه مشاهده شد. لذا بر این اساس، در مجموع تعداد ۱۱ هاپلوتایپ منحصر در ۳ منطقه مورد مطالعه، تشخیص داده شد. همچنین بعضی هاپلوتایپ‌های تشخیص داده شده در این مطالعه، مشابه تعدادی از هاپلوتایپ‌های شناسایی شده در مطالعه مقیاس وسیع Naderi و همکاران در نقاط مختلف ایران، است. بیشترین مقدار تنوع هاپلوتایپی(h) و تنوع نوکلئوتیدی (Pi) در سه منطقه مورد مطالعه، در کمربن و کمترین مقادیر در بندبن مشاهده شد. همچنین، بیشترین اختلاف میانگین تعداد نوکلئوتیدها در مقایسه دو به دوی نمونه‌ها (K) مربوط به کمربن و کم‌ترین مقدار این اختلاف در بین نمونه‌هایی از جمعی بندبن محاسبه شد.

جدول ۱- خصوصیات تنوع ژنتیکی نمونه‌های موردمطالعه درپژوهش حاضر

جمعیت	N	H	h	K	Pi	Tajima's D	P(D simul< D obs)	Fu's Fs	Prob(sim_Fs <=obs_Fs)
کمربن	۱۰	۸	۰/۹۵	۳۳/۸۰	۰/۰۷	۱/۴۸	۰/۹۶	۲/۳۳	۰/۸۴
بلده	۷	۴	۰/۷۱	۲۵/۶۱	۰/۰۵	۰/۵۶	۰/۷۳	۶/۲۹	۰/۹۹
بندبن	۵	۲	۰/۴۰	۲/۴۰	۰/۰۰۵	-۱/۱۴	۰/۰۷	۳/۰۲	۰/۹۱

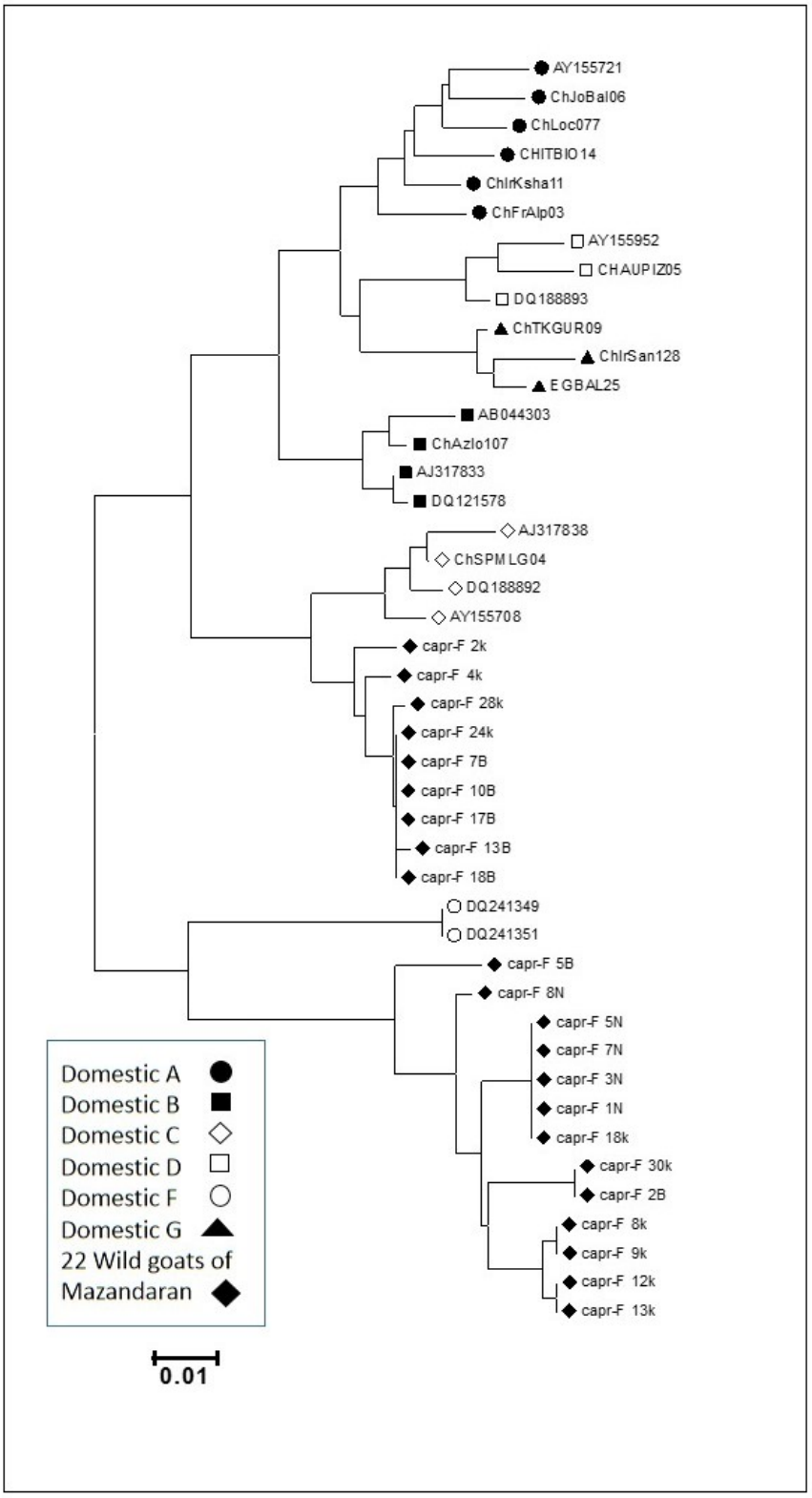
N: تعداد نمونه‌ها، H:تعداد هاپلوتایپ‌ها، h:تنوع هاپلوتایپی، K:تعداد نوکلئوتیدها در مقایسه دو به دوی نمونه‌ها، Pi:تنوع نوکلئوتیدی، Tajima's D: مقیاس سنجش پراکندگی (فراوانی پلی مورفیسم) و Fu's Fsمقیاس سنجش فراوانی آلل‌ها

۲.۳. نتایج بررسی‌های فیلوژنتیک

پس از مرتب‌سازی مجموعه داده‌های نمونه‌های مورد مطالعه و توالی‌های به دست آمده از بانک ژن، بهترین مدل تکاملی برای این ژن با استفاده از نرم‌افزار Mega 6، مدل T92+G+I (Tamura 3-parameter) با نرخ گامای ۰/۳۷ وInvariable site حدود ۰/۷۲ محاسبه شد. برای درک وضعیت فیلوژنتیکی گونه بز وحشی مازندران، در ابتدا توالی‌های مربوط به ژن ناحیه D-Loopبا طول توالی ۴۸۱ جفت باز به دست آمده از ۲۲ فرد مطالعه حاضر، مربوط به جمعیت‌های ۳ زیستگاه مختلف به همراه ۲۲ فرد بز اهلی، اقتباس شده از بانک ژن (Naderi *et al.*, 2007)، مورد تحلیل قرار گرفت. با توجه به یکسان بودن توپولوژی درخت‌های فیلوژنی ترسیم شده، فقط یک درخت ارائه شد و میزان Bootstrap، بر روی شاخه‌های آن مشخص شد (شکل ۱). براساس ژن میتوکندریایی ناحیه D-Loopدر این درخت، ۷ کلاد مجزا مشاهده می‌شود که به طور معنی داری از هم جدا هستند.

www.SID.ir

Archive of SID



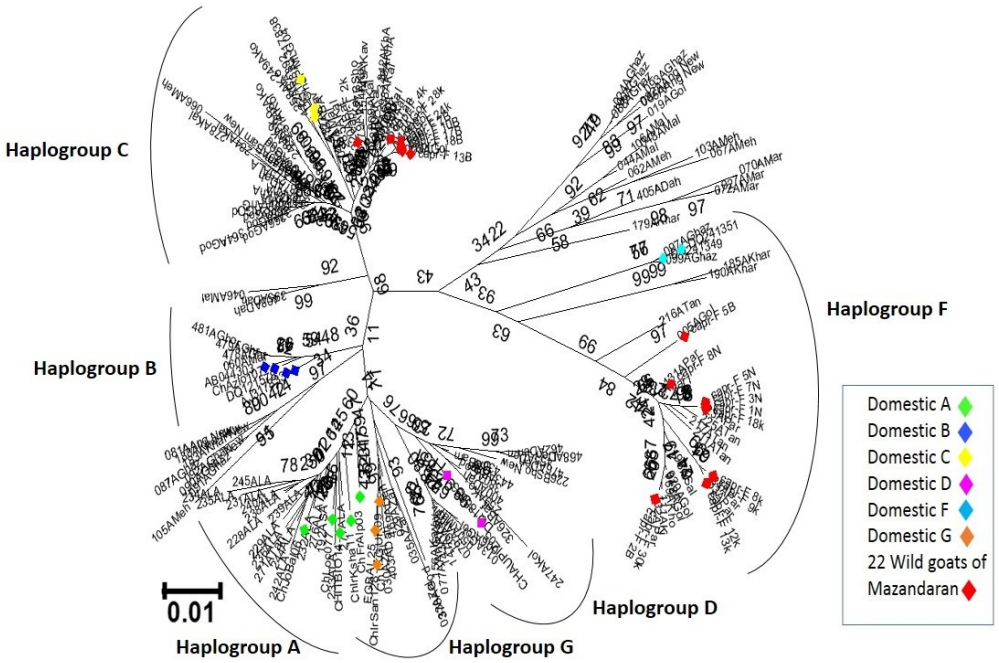
شکل ۱- درخت فیلوژنتیک بیشینه درست نمایی حاصل از ۲۲ بز وحشی مطالعه حاضر و ۲۲ رفرنس ۶ هاپلوگروپ بزهای اهلی دنیا جهت تعیین کلادهای مختلف کل و بزهای مازندران. توالی های بدست آمده از مطالعه حاضر (نمادهای لوزی توپر) با کلادهای C و F دارای جد مشترک هستند که به ترتیب با نمادهای لوزی توخالی و دایره ای توخالی، نشان داده شده‌اند.

www.SID.ir

Archive of SID

برای هر کدام از هاپلوگروپ‌ها، نماد مشخصی استفاده شده و به دو کلادی که نمونه‌های این پژوهش با آنها دارای جد مشترک هستند، نمادهای مجزایی اختصاص داده شد، به طوری که نمونه‌های نزدیک به کلاد C، با نمادهای لوزی توخالی و نمونه‌های نزدیک به کلاد F، با نمادهای دایره ای توخالی مشخص شدند.

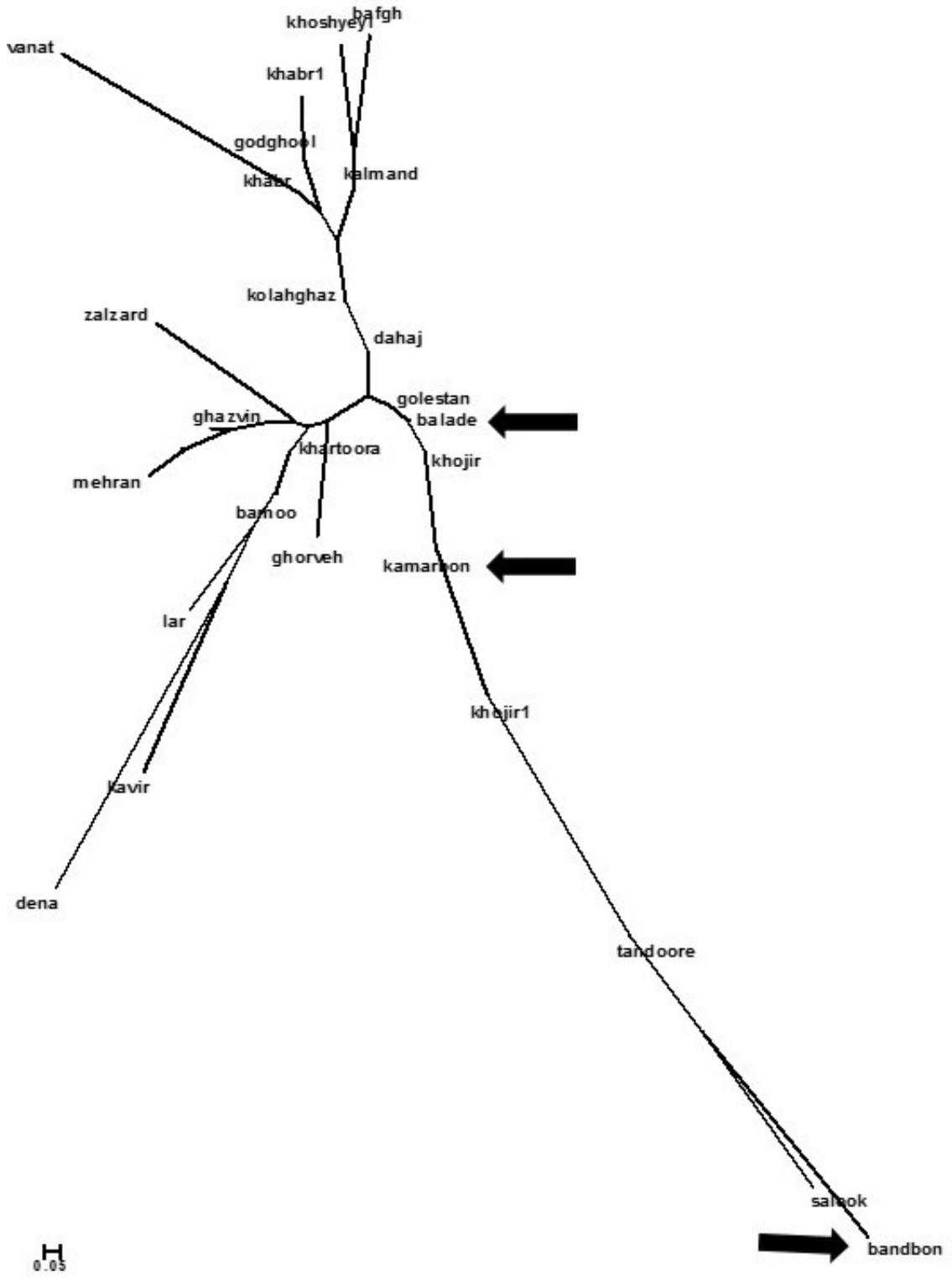
مطالعه درخت بیشینه درست نمایی در شکل ۱ نشان می‌دهد که نمونه‌های مناطق کمربن و بلده به هر دوکلاد C و F تعلق دارند، ولی نمونه‌های بندبن فقط به کلاد F مربوط هستند. همچنین، برای درک بهتر جایگاه تبارشناسی کل و بزهای مورد مطالعه حاضر مربوط به استان مازندران، در تحلیلی دیگر ۱۴۴ هاپلوتایپ بزهای وحشی مناطق مختلف ایران اقتباس شده از بانک ژن، بر اساس مطالعه در مقیاس وسیع Naderi و همکاران در سال ۲۰۰۸ و ۲۲ فرد مورد مطالعه حاضر و نیز ۲۲ سکانس رفرنس جهانی بزهای اهلی (Naderi *et al*., 2007) بر گرفته از بانک ژن، درخت فیلوژنتیکی (شکل ۲) به دست آمد که نتایج آن تاییدکننده وضعیت درخت فیلوژنتیک قبلی (شکل ۱) است. بر اساس توپولوژی درخت حاصله، باز هم نمونه‌های بز وحشی ۳ منطقه مختلف استان مازندران، دارای جد مشترک با ۲ کلاد C و F بودند. همچنین، برای نمونه‌های مطالعه حاضر و نمونه‌های برگرفته از بانک ژن با استفاده از ماتریس فاصله ژنتیکی Fst/1-Fst، درخت NJ رسم شده نشان دهنده رابطه ژنتیک و جغرافیا است (شکل ۳). مناطق سه‌گانه مورد مطالعه در این پژوهش بر روی درخت، دارای رابطه نزدیک با مناطق جغرافیایی هم جوار هستند. به طوری که هر سه منطقه بر روی یکی از کلادها قرار دارند و رابطه نزدیک ژنتیکی و جغرافیایی در بین این مناطق از درخت رسم شده به خوبی استنباط می‌شود.



شکل ۲- درخت فیلوژنتیک بیشینه درست نمایی حاصل از ۱۴۴ هاپلوتایپ بز وحشی مناطق مختلف ایران، ۲۲ فرد بز وحشی مازندران مورد مطالعه حاضر و ۲۲ رفرنس ۶ هاپلوگروپ مختلف بزهای اهلی دنیا.

www.SID.ir

Archive of SID



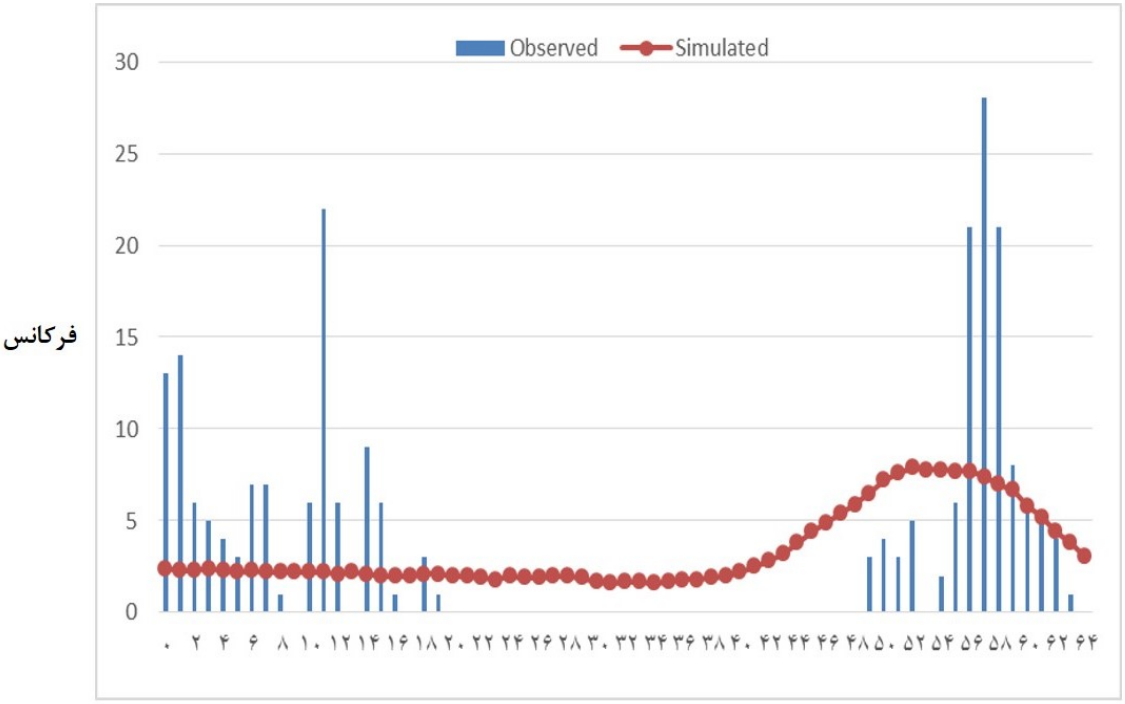
شکل ۳- درخت فیلوژئوگرافی بدست آمده از فاصله ژنتیکی Fst/1-Fstبرای بررسی رابطه ژنتیک و جغرافیا در بین نواحی نمونه برداری و مطالعه نحوه اشتقاق آن‌ها از یکدیگر، بر اساس نمونه های اقتباس شده بزهای وحشی از بانک ژن و۲۲ نمونه بز وحشی سه منطقه مازندران (فلش های مشکی) در مطالعه حاضر.

www.SID.ir

Archive of SID

۳.۳. بررسی ساختار جمعیتی، تنوع ژنتیکی و آنالیزهای دموگرافیک

آنالیزهای دموگرافیک شامل آزمون توزیع عدم انطباق (Mismatch Distribution) مربوط به مدل گسترش ناگهانی، بررسی فواصل ژنتیکی بین جمعیت‌ها و آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) و آزمون Neutrality شامل مقادیر Fu's Fs و Tajima's D به منظور بررسی ساختار دموگرافیک جمعیت کل و بزهای مازندران در جدول۱ ارائه شده است. نتایج آزمون های Fu's Fs و Tajima's D نشان داد که انحرافی از فرضیه صفر مشاهده نمی‌شود و در جمعیت های مورد نظر، رانش و جهش ژنتیکی در تعادل هستند. با توجه به مقادیر (Sum of SSD (Squared deviation و R (Harpending's Raggedness index) بدست آمده برای جمعیت کل و بزهای مازندران، در آزمون توزیع عدم انطباق، نزدیکی کامل بین مقادیر مشاهده شده و مورد انتظار، و فقدان مقادیر معنی‌دار برای این شاخص‌ها نشان از تبعیت این جمعیت از مدل گسترش ناگهانی و نرمال بودن جمعیت دارد. در عین حال، دو موج کاملا متمایز، نشان دهنده تعلق این جانوران به دو کلاد کاملا متفاوت است که تاییدکننده نتایج درختان تبارشناسی به دست آمده نیز می‌باشد (شکل ۴).



شکل ۴- نمودار آزمون توزیع عدم انطباق:توزیع تفاوت‌های تعداد نوکلئوتید بصورت دو به دو در بین سکانس‌های مشاهده شده و مورد انتظار، در جمعیت‌های کل و بز مازندران.

نتایج آنالیز واریانس مولکولی(AMOVA) نیز بر اساس داده‌های ۲۲ فرد بز وحشی مطالعه حاضر و نمونه های وحشی اقتباس شده از بانک ژن برای مناطق مختلف ایران از مطالعه در مقیاس وسیع Naderi و همکاران در سال ۲۰۰۸ و با در نظر گرفتن هر هاپلوگروپ به عنوان یک جمعیت در

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲ ارائه شده است. مقادیر توزیع واریانس در درون و در میان جمعیت‌های متصور و نیز مقدار شاخص F_{st} قابل توجه هستند.

۴. بحث و نتیجه گیری

نتایج خصوصیات ژنتیکی به دست آمده بر اساس ۲۲ نمونه بز وحشی مطالعه حاضر، حاکی از وجود بیشترین مقدار تنوع هاپلوتایپی و نیز تنوع نوکلئوتیدی در منطقه کمربن و کمترین میزان در منطقه بندبن است (جدول ۱). کوچکتر بودن تنوع نوکلئوتیدی می‌تواند نشانه تنوع ژنتیکی پایین‌تر و جمعیت جداتر منطقه بندبن از دو جمعیت دیگر استان مازندران باشد. لازم به ذکر است که تعداد نمونه کمتر در منطقه بندبن، می‌تواند تا حدودی بر این نتیجه موثر باشد، ولی این تاثیر به مقدار زیاد نبوده و در عین حال بر اساس سایر تحلیل‌ها نیز نتیجه به دست آمده تایید شده است. وجود هاپلوتایپ‌های مشابه در بین سه منطقه مورد مطالعه در استان مازندران و همچنین بین هاپلوتایپ‌های تشخیص داده شده در این مطالعه و هاپلوتایپ‌های تعیین شده در مطالعه Naderi و همکاران در سال ۲۰۰۸ در نقاط مختلف ایران، نشانگر حرکات زیاد گونه بز وحشی بوده و با توجه به وضعیت هاپلوتایپ-ها، به خوبی با گستره جغرافیایی نیز همپوشانی دارد. وجود هاپلوتایپ‌های مشترک و نیز مقدار فاصله ژنتیکی کمتر با مناطقی مانند جمعیت‌های کل و بز پارک ملی گلستان، منطقه حفاظت شده پرور، منطقه حفاظت شده خارتوران، پارک ملی تندوره و پارک ملی خجیر، با توجه به فاصله جغرافیایی کمتر، قابل تفسیر است. این نتیجه با نتایج حاصل از مطالعه در مقیاس وسیع تنوع ژنتیکی کل و بز در ایران Naderi و همکاران در سال ۲۰۰۸، به لحاظ توزیع تنوع هاپلوتایپی و نیز پراکنش جغرافیایی، همخوانی دارد.

جدول ۲- نتایج آنالیز AMOVA برای ۸ هاپلوگروپ‌ها به عنوان جمعیت‌های مختلف کل وبزهای ایران

Source of variation	Sum of squares	Variance components	Percentage variation
Among populations	۴۱۵۳/۴۹	۱۱/۸۶	۴۴/۳۴
Within populations	۷۲۰۹/۴۶	۱۴/۸۹	۵۵/۶۵
Total	۱۱۳۶۲/۹۵	۲۶/۷۶	۱۰۰
FST :		۰/۴۴۳ (P< ۰/۰۰۰۰)	

بر اساس توپولوژی درختان فیلوژنتیکی (تصاویر ۱ و ۲)، نمونه‌های بز وحشی سه منطقه مختلف استان مازندران دارای دو منشاء متفاوت بوده و به صورت مشخصی نمونه‌های منطقه بندبن، دارای تفاوت با نمونه‌های دو منطقه کمربن و بلده هستند. نمونه‌های مناطق کمربن و بلده دارای جد مشترک با دو کلاد C و Fبودند. در حالیکه نمونه‌های بندبن فقط به کلاد F مربوط هستند. ممکن است بتوان مقدار کمتر تنوع هاپلوتایپی و نوکلئوتیدی جمعیت بندبن را به این موضوع مرتبط دانست. همچنین، وجود کلادهای با غالبیت نمونه‌های جمعیت منطقه بندبن و نیز کلادهای با غالبیت نمونه‌های منطقه کمربن، قابل ملاحظه است. تمامی شاخه‌های انشعابی بر روی این درخت ها دارای صحت بالایی از مقدار عدد bootstrap بوده و حاکی از معنی‌دار بودن تفاوت این کلادها از نظر آماری است. این موضوع که با

www.SID.ir

Archive of SID

خصوصیات ژنتیکی حاصل از این مطالعه (جدول ۱) همخوانی دارد، می‌تواند به توزیع جغرافیایی جمعیت-ها و امکان گدار با جمعیت‌های مجاور مرتبط باشد که به نظر برای جمعیت بندبن، حالت جدا شده‌تری دارد. همچنین، بر اساس نتایج دو درخت مورد اشاره، نزدیکی نمونه‌های بز وحشی مازندران با هاپلوگروپ-های بزهای اهلی C و F با نتایج مطالعه مقیاس وسیع Naderi و همکاران در سال ۲۰۰۸ همخوانی داشته و بار دیگر نشان‌دهنده وجود مراکز اهلی سازی در بخش‌های مختلف ایران در گذشته است. در مطالعه مذکور، نمونه‌های مربوط به جمعیت‌های استان مازندران به دست نیامده بود و به عنوان یک شکاف اطلاعاتی مطرح بود. نتایج تحقیق حاضر، علاوه بر تکمیل کار قبلی، دیدگاه ویژه‌ای در ارتباط با مسیر و مناطق اهلی سازی آشکار نمود.

با این دیدگاه و بر اساس تحلیلی دیگر، وضعیت ارتباط توزیع جغرافیایی ۲۲ نمونه بز وحشی استان مازندران، در ترکیب پایگاه داده‌ای نمونه‌های مختلف جمعیت‌های مختلف بز وحشی در ایران، اقتباس شده از بانک ژن، در یک درخت فیلوجغرافی مورد سنجش قرار گرفت (شکل ۳). بر اساس این تحلیل، تمام نمونه‌های بز وحشی مازندران، بر روی یک شاخه قرار دارند که نشان‌دهنده وجود کریدور مشابه حرکتی در آنهاست. همچنین در این شاخه، مشاهده می‌شود که جمعیت بندبن در انتها واقع شده و در واقع با قرار گرفتن در دورترین نقطه، ضمن نشان دادن تنوع ژنتیکی پایین، حاکی از جمعیت تقریبا متفاوت از جمعیت دو منطقه دیگر استان مازندران است. وجود افراد مربوط به جمعیت‌های نقاط جغرافیایی هم جوار مانند استان گلستان، تندوره و خجیر، قابل توجه و نشان‌دهنده احتمال تلاقی بیشتر با این جمعیت‌ها است. تمامی این نتایج مکمل و موید داده‌های مطالعه مقیاس وسیع تنوع ژنتیکی بز وحشی در ایران Naderi و همکاران در سال ۲۰۰۸ است. وجود تعادل بین جهش و رانش ژنتیکی در جمعیت‌های مورد مطالعه، بر اساس تحلیل ساختار جمعیتی و نتایج آنالیزهای دموگرافیک آزمون Neutrality شامل شاخص‌های Fs و Tajima's D، نشان داد که در گذشته حوادث ژنتیکی ناگوار مانند رانش ژنی (Genetic Drift)، گردنه بطری (Bottleneck) و اثر جمعیت بنیانگذار (Effect Founder) را تجربه نکرده‌اند. همچنین نتایج آزمون توزیع عدم انطباق مربوط به مدل گسترش ناگهانی، انطباق کامل بین مقادیر مشاهده شده و مورد انتظار، نشان از تبعیت جمعیت‌های مورد مطالعه از مدل گسترش ناگهانی دارد. در واقع به نظر می‌رسد با وجود فشار و انواع تهدید در مناطق مطالعاتی، جمعیت‌ها در حال افزایش به صورت مناسب هستند. شاید این نشانه‌ای از حفاظت مناسب توسط محیط‌بانان و مسئولین مناطق مطالعاتی باشد. در عین حال، وجود دو موج کاملا متمایز، نشان‌دهنده تعلق این جانوران به دو کلاد کاملا متفاوت است. به طوری که وجود ۶۴ نوکلئوتید اختلاف بین دو فرد در ۴۸۲ جفت باز مورد مطالعه، نشان از تفاوت بارز بعضی افراد دارد. این موضوع با مشاهده دو کلاد متفاوت در درخت‌های فیلوژنتیک تحلیلی (تصاویر ۱ و ۲)، و وجود دو منشاء متفاوت بزهای وحشی استان مازندران، نیز همخوانی دارد.

بر اساس نتایج آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA)، اگر چنانچه کلیه جمعیت‌های متفاوت بز وحشی، بر اساس پراکنش جغرافیایی در نظر گرفته شوند، مقدار

www.SID.ir

Archive of SID

تفاوت ژنتیکی میان منطقه‌ای در حد پایینی در مقایسه با بسیاری از گونه‌های نشخوارکننده است. این امر نشان دهنده ساختار فیلوجغرافیایی ضعیف این گونه در ایران دارد. به نظر می‌رسد با رفتار خاص این گونه، دامنه جابجایی آن و نیز تاثیر انسان در جابجایی‌های کل و بز به عنوان یکی از اولین جانوران اهلی شده در زندگی انسانها مرتبط باشد. این اختلاط در مقیاس وسیع، به ویژه برای افراد هاپلوگروپ C که دارای پراکنش گسترده کنونی هستند، صادق است (Naderi *et al.,* 2008). در مطالعه حاضر، برای داشتن تصویری دیگر، از روش آنالیز واریانس مولکولیبرای تحلیل نحوه توزیع تنوع ژنتیکی در ساختار جمعیت‌های مختلف بز وحشی ایران بر اساس در نظر گرفتن هر هاپلوگروپ به عنوان یک جمعیت، استفاده شد. بررسی فواصل ژنتیکی بین جمعیت‌ها و آنالیز واریانس مولکولی نشان می‌دهد که جمعیت‌های کلادهای مختلف که هر هاپلوگروپ ایجاد می کند، با کلادهای دیگر تفاوت کاملا معنی داری داشته و مقدار بزرگ شاخص Fst، علاوه بر معنی دار بودن، نشاندهنده تفاوت ژنتیکی بالا در بین کلادهای مختلف کل و بزهای تشکیل دهنده کلادهای مجزا از نظر ژنتیکی است. با توجه به آنکه در حال حاضر بر اساس تشخیص سازمان‌های جهانی حفاظت گونه‌ها، بز وحشی ایران در وضعیت آسیب پذیر قرار دارد و گزارش‌ها حاکی از آن است که این گونه در برخی مناطق ایران به‌کلی از بین رفته است، لذا داده‌های مطالعه حاضر و سایر مطالعات مشابه در مورد جمعیت‌های این گونه می‌تواند برای ارائه راهکارهای حفاظتی عملکردی، مفید باشد.

References:

Amills*et al.,* 2004. Strong phylogeographic relationshipsamong three goat breeds from the Canary Islands. J. *Dairy Res*. 71(3):257–262.

Azor*et al.,* 2005. Phylogenetic relationships amongSpanish goats breeds. *Anim. Genet*. 36(5): 423–425.

Boore, J. L. 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res*. 27:1767-1780.

Colombo *et al.*, 2002. Identification of the goose species (*Anseranser*) inItalian "Mortara" salami by DNA sequencing and a polymerase chain reaction with an original primer pair. *J. MeatSci.* 61:261-294.

Excoffier, L. and H.E.L.Lischer. 2010. Arlequin suite 3.5: A new series of programs to perform population genetic analyses under Linux and Windows. Molecular Ecology Resources. 10:564-567.

Groves *et al.,* 1995. In vitro maturationof clonal CD4+CD8+ cell lines in response to TCR engagement. *J. Immunol*. 154: 5011-5022.

Kim, K. H, and J. H. Lee. 2002. Phylogenetic relationships of Asian and European Pig breeds determined by mitochondrial DNA D-LOOP sequence polymorphism. *J. Anim. Genet*. 33:19-25.

Librado, P. and Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.

Malekian, m. 1998. *The translation of molecular ecology*, Freeland, G. (author), Jahad University of Mashhad, 304 p. in Persian.

www.SID.ir

Archive of SID

Naderi*et al*., 2007. Large-Scale Mitochondrial DNA Analysis of the Domestic Goat Reveals Six Haplogroups with High Diversity. *Plos one*. 10:1-10.

Naderi*et al*., 2008. The goat domestication process inferred from large-scale mitochondrial DNA analysis of wild and domestic individuals, *PNAS.* 105: 17659-17664.

Parma *et al.,* 2003 .The complete nucleotide sequence of goat(*Caprahircus*) mitochondrial genome. Goat mitochondrial genome. *DNA Seq* 14(3): 199–203.

Rastogi*et al*., 2007. Species identification and authentication of tissues of animal origin using mitochondrial and nuclear markers. *Meat Science*, 76: 666-674.

Tamura *et al.,* 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0, *Molecular Biology and Evolution*: 30: 2725-2729.

Tobe, S. S. and Linacre, A. 2007. A method to identify a large number of mammalian species in the UK from trace samples and mixtures without the use of sequencing. *Forensic Science Internationa*l, 1: 625-627.

Zeder*et al.,* 2006. Documenting domestication: the intersection of genetics and archaeology. *Trends Genet*. 22:139-155.

Ziaei, h., 1997. *Field guide mammals Iran*, Center of Publishing Introduction to Wildlife, Second Edition. 432 p. in Persian.

www.SID.ir