

بررسی تغییرات ژن ناحیه کنترل (d-loop) میتوکندری در سه گونه سنجاب قرمز، سنجاب

ژاپنی و سنجاب ایرانی

مرضیه اسدی آقبلاغی^۱، فراهم احمدزاده^{۱*}، بهرام کیابی^۲ و نوشا کیقبادی^۳^۱ ایران، تهران، دانشگاه شهید بهشتی، پژوهشکده علوم محیطی، گروه تنوع زیستی و مدیریت اکوسیستم‌ها^۲ ایران، تهران، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم زیستی و فناوری زیستی، گروه زیست‌شناسی و زیست‌فناوری جانوری، دریا و آبریان^۳ کانادا، لندن، دانشگاه غرب اونتاریو، دانشکده زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۴/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۹/۱۰

چکیده

سنجاب‌های متعلق به جنس *Sciurus* جزو سنجاب‌های درختی هستند که با اقلیم نیمه قطبی و مناطق جنگلی سازش پیدا کرده‌اند و توزیع گسترده‌ای در نیم‌کره شمالی دارند. سنجاب قرمز، سنجاب ژاپنی و سنجاب ایرانی از جمله گونه‌های شاخص جنس *Sciurus* در اورپا و آسیا هستند. محدوده پراکنش سنجاب قرمز از اروپا تا چین بوده در حالیکه، سنجاب ایرانی محدود به فلات ایران-آناتولی است و سنجاب ژاپنی نیز در جزایر ژاپن حضور دارد. منشأ و تاریخچه تکاملی گونه سنجاب ایرانی مبهم است و در حال حاضر اطلاعات ژنتیکی قابل توجهی از این گونه وجود ندارد. ژنوم میتوکندری کاربرد گسترده‌ای در تصحیح رده‌بندی‌های کنونی موجودات دارد و برای تعیین روابط تبارزادی استفاده می‌شود. با توجه به اینکه تک نیایی و چند نیایی سنجاب‌های درختی در منطقه پالئارکتیک نامشخص است، ناحیه کنترل ژنوم میتوکندری به دلیل نرخ جهش‌پذیری مناسب در گونه‌های مذکور مورد بررسی قرار گرفت. ژن ناحیه کنترل برای اولین بار در سنجاب ایرانی از لحاظ میزان تغییرپذیری جهش، جایگاه‌های حفاظت‌شده و فاصله ژنتیکی بررسی شد. همچنین نتیجه رده‌بندی حاصل از ناحیه کنترل ژنوم میتوکندری و ژن سیتوکروم بی مورد مقایسه قرار گرفتند. این پژوهش نشان داد که نتایج رده‌بندی بدست آمده از ناحیه کنترل ژنوم میتوکندری و ژن سیتوکروم بی مشابه هستند. همچنین از لحاظ تغییرپذیری و جهش، گونه سنجاب ایرانی در مقایسه با سنجاب قرمز و سنجاب ژاپنی دارای بیشترین میزان تغییرات است و گونه سنجاب قرمز دارای کمترین میزان تغییرپذیری جهش، و بیشترین تعداد جایگاه‌های حفاظت‌شده است. از لحاظ فاصله ژنتیکی سنجاب قرمز و سنجاب ژاپنی فاصله ژنتیکی کمتری با یکدیگر دارند و در یک کلاد قرار می‌گیرند و به‌عنوان گونه‌های خواهری محسوب می‌گردند ولی سنجاب ایرانی با دو گونه مذکور فاصله ژنتیکی بیشتری دارد و در کلاد جداگانه‌ای قرار می‌گیرد.

واژه‌های کلیدی: سنجاب ایرانی، سنجاب ژاپنی، سنجاب قرمز، ژنوم میتوکندری، ناحیه کنترل

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۲۲۴۳۱۹۷۱، پست الکترونیکی: f_ahmadzade@sbu.ac.ir

مقدمه

سنجاب‌ها یکی از بزرگترین خانواده‌های پستانداران هستند و در بیشتر نقاط دنیا یافت می‌شوند. یک مساله کلیدی در خصوص سنجاب‌ها نرخ سریع گونه‌زایی است (۱۹، ۲۸ و ۳۰). تاکنون مطالعات زیادی در خصوص سنجاب‌ها انجام شده است ولی منشأ سنجاب‌های امروزی ناشناخته است (۱۵ و ۱۹). تغییر گستره‌های آبی و خشکی از جمله شاخص‌های مهم زمین‌شناسی و محیط‌زیستی هستند که نقش زیادی در گونه‌زایی سنجاب‌ها داشتند (۱۹). خانواده

از لحاظ اندازه و شکل لاله گوش و رنگ بدن باهم تفاوت ظاهری دارند. عدم حضور منگوله روی گوش‌ها نشانه‌ای برای گونه سنجاب ایرانی (۱، ۴ و ۵) وجود منگوله روی گوش‌ها ویژگی سنجاب قرمز است. رنگ پشت در سنجاب ژاپنی آهنی قهوه‌ای است، رنگ پوشش شانه‌های آن‌ها مایل به قرمز و رنگ شکم آن‌ها سفید است (۳۰).

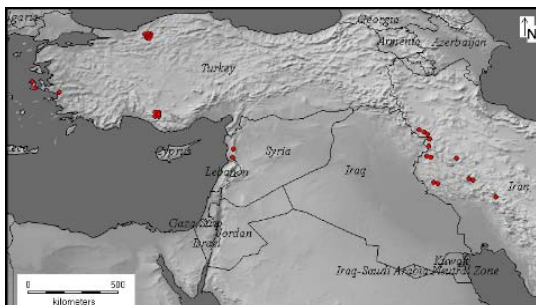


شکل ۱- نقشه پراکنش سنجاب ایرانی (رنگ خاکستری تیره)، سنجاب قرمز (رنگ خاکستری روشن) و سنجاب ژاپنی (رنگ سیاه) (۲۳).

در سال ۲۰۰۰ اوشیدا و همکارانش با استفاده از ژن سیتوکروم بی (Cyt b) تبارزایی سنجاب ایرانی را تنها براساس نمونه‌هایی (تعداد چهار نمونه) که از ترکیه در اختیار داشتند، مورد بررسی قرار دادند. نتایج آنها نشان داد که سنجاب ایرانی به گونه‌های آمریکای شمالی نزدیکتر است ولی منشأ تکامل این گونه همچنان مبهم است، که آیا این گونه در اوراسیا شکل گرفته است و یا ابتدا در آمریکای شمالی شکل گرفته و سپس به سمت اوراسیا پراکنش یافته است (۲۲). در حالی که سنجاب ایرانی علی‌رغم اینکه تنها در محدوده فلات ایران-آناتولی و حاشیه دریای مدیترانه حضور دارد، فاصله ژنتیکی بیشتری با دو گونه سنجاب قرمز و سنجاب ژاپنی دارد و به سنجاب‌های آمریکای شمالی نزدیکتر است (۲۲). لذا در جهت ادامه مباحث مطرح شده در مقاله مذکور در این مطالعه تلاش شد که با نمونه‌برداری از کل گستره پراکنش این گونه، نتایج ناحیه کنترل ژنوم میتوکندری با نتایج ژن سیتوکروم بی مورد مقایسه قرارگیرد و میزان شباهت‌ها، تفاوت‌ها و فاصله ژنتیکی بین سه گونه سنجاب ایرانی، سنجاب قرمز و سنجاب ژاپنی بررسی شود. در واقع ناحیه کنترل در ژنوم میتوکندری به دلیل عدم وجود نوترکیبی در ژنوم

سنجاب‌ها (Sciuridae) به راسته جونندگان تعلق دارند، اجداد سنجاب‌ها حدود ۳۰ الی ۴۰ میلیون سال پیش از سایر جونندگان جدا شدند و در حال حاضر به ۲۲ جنس و ۲۷۳ گونه که منسوب به این خانواده هستند تکامل یافته‌اند (۹). سنجاب‌های جنس *Sciurus* (لینه، ۱۷۵۸) جزو سنجاب‌های درختی هستند که با اقلیم مناطق نیمه قطبی و مناطق جنگلی سازش پیدا کرده‌اند و توزیع گسترده‌ای در نیم کره شمالی دارند (۲۳). جنس *Sciurus* حدود ۱۳ میلیون سال پیش از جنس *Tamiasciurus* جدا شده است. براساس شواهد دیرین‌شناسی منشأ و تاریخچه تکامل جنس *Sciurus* مبهم است. این جنس شامل هفت زیر جنس است که سنجاب ایرانی به یک زیر جنس مجزا به نام *Tenes* تعلق دارد ولی سنجاب ژاپنی و قرمز هر دو به زیر جنس *Sciurus* متعلق هستند. گونه *Sciurus anomalus* به ترکیه، قفقاز و غرب ایران، سوریه، لبنان، فلسطین و عراق محدود شده است و در حال حاضر نیز اطلاعات کمی در خصوص تاریخچه تکاملی و رده‌بندی این گونه وجود دارد (۶). گونه *Sciurus lis* بومی جزایر ژاپن است و به دلیل فعالیت‌های جنگل تراشی جمعیت آن روبه انقراض است و در بعضی از جزایر ژاپن نیز منقرض شده است (۲۸ و ۳۰). در مقایسه گونه *Sciurus vulgaris* محدوده بزرگی را نسبت به سنجاب‌های درختی اشغال کرده است و در سرتاسر پاله آرکتیک یافت می‌شود (شکل ۱)، آنچنان که در منابع معتبر ذکر شده حدود ۴۰ زیرگونه برای سنجاب قرمز ثبت شده است. البته آرایه‌شناسی این گونه دچار ابهام است، بنابر برخی مطالعاتی که اخیراً انجام شده برخی از زیرگونه‌های سنجاب قرمز می‌توانند به سطح گونه ارتقا یابند ولی هنوز به صورت قطعی مورد تأیید قرار نگرفته‌اند (۱۰، ۱۴، ۱۷، ۱۸، ۲۶ و ۳۲).

در هر سه گونه سنجاب تعداد بازوهای کروموزوم‌های غیرجنسی ۷۶ است ولی شکل کروموزوم Y در سنجاب ایرانی متفاوت است (۷، ۳۰ و ۳۳). سه گونه مذکور



شکل ۲- نقشه نقاط نمونه برداری از سنجاب ایرانی

جدول ۱- مشخصات نمونه برداری و کد نمونه‌های سنجاب ایرانی

گونه	کد	موقعیت
<i>S. anomalus</i>	ES1101	ایران-کردستان
<i>S. anomalus</i>	ES1102	ایران-کردستان
<i>S. anomalus</i>	ES1103	ایران-کردستان
<i>S. anomalus</i>	ES1104	ایران-کردستان
<i>S. anomalus</i>	ES1105	ایران-کردستان
<i>S. anomalus</i>	ES1106	ایران-کرمانشاه
<i>S. anomalus</i>	ES1127	سوریه
<i>S. anomalus</i>	ES1128	سوریه
<i>S. anomalus</i>	ES1129	یونان
<i>S. anomalus</i>	ES1130	یونان
<i>S. anomalus</i>	ES1146	ترکیه
<i>S. anomalus</i>	ES1149	ترکیه
<i>S. anomalus</i>	ES1159	ترکیه
<i>S. anomalus</i>	ES1160	ترکیه
<i>S. anomalus</i>	ES1161	ترکیه
<i>S. anomalus</i>	ES1166	ترکیه
<i>S. anomalus</i>	ES1167	ترکیه
<i>S. anomalus</i>	ES1169	ترکیه
<i>S. anomalus</i>	ES1171	ترکیه
<i>S. anomalus</i>	ES1172	ایران- چهارمحال و بختیاری
<i>S. anomalus</i>	ES1173	ایران-کرمانشاه
<i>S. anomalus</i>	ES1174	ایران-همدان
<i>S. anomalus</i>	ES1175	ایران- ایلام
<i>S. anomalus</i>	ES1176	ایران- ایلام
<i>S. anomalus</i>	ES1177	ایران- لرستان
<i>S. anomalus</i>	ES1178	ایران- لرستان

میتوکندری، تغییر در تعداد تکرار توالی بازها و نرخ سریع جهش‌پذیری از چندشکلی بالایی برخوردار است (۱۲) و (۱۳). طول ناحیه کنترل در گونه‌های مختلف متفاوت است و بخش میانی آن در گونه‌های مختلف پستانداران تقریباً مشابه است، این نشانگر به دلیل نرخ تکاملی سریع، قادر است تا اختلافات درون‌گروهی را نسبت به سایر نشانگرها بهتر نشان دهد و تاریخچه جمعیت‌ها را به‌خوبی بیان کند (۸).

مواد و روشها

جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه‌ها: با همکاری سازمان حفاظت محیط‌زیست ۱۳ نمونه بافت از سنجاب ایرانی در جنگل‌های زاگرس بدست آمد. نمونه‌برداری با استفاده از روش غیرتهاجمی از نمونه‌های زنده و غیرزنده انجام شد. جهت تهیه نمونه از موجود زنده، زنده‌گیری با استفاده از تله انجام شد، سپس از وسایل کاملاً استریل برای تهیه بافت از موی جانور استفاده شد. و پس از اتمام نمونه‌گیری نمونه‌ها رهاسازی شدند. نمونه‌ها در الکل قرار داده شدند و جهت استخراج DNA به آزمایشگاه منتقل شدند. همچنین با همکاری موزه‌های خارج از کشور در اتریش، آلمان و یونان از سایر نقاط پراکنش این‌گونه در خارج از ایران از جمله کشورهای عراق، ارمنستان، ترکیه، سوریه، لبنان و یونان نمونه تهیه شد. به دلیل کیفیت پایین نمونه‌های موزه تنها نمونه‌های متعلق به ترکیه، سوریه و یونان با موفقیت توالی‌یابی شدند (تعداد ۱۳ نمونه) (شکل ۲، جدول ۱).

استخراج DNA با استفاده از روش نمکی و فنول کلروفرم صورت گرفت (۲۵). DNA استخراج شده در دمای ۲۰- درجه نگهداری شد. کیفیت و کمیت DNA استخراجی نیز با استفاده از ژل آگاروز ۱ درصد و دستگاه نانودراپ تعیین شد.

استفاده از نرم‌افزار مسترمدل‌تست (MrModel test) (۲۱) بهترین مدل تکاملی انتخاب شد. بهترین مدل تکاملی برای سه گونه سنجاب ایرانی، قرمز و ژاپنی به ترتیب HKY+I، HKY+G+I، HKY+G+I برآورد گردید. با استفاده از نرم‌افزارهای آرلکون (Arlequin) (۱۱) و مگا (Mega) (۲۸) میزان فراوانی هر یک از نوکلئوتیدها (Nucleotide frequency)، جایگاه‌های تغییرپذیر (Variable sites)، جایگاه‌های حفاظت‌شده (Conserve sites)، نرخ جانشینی نوع اول (Transation) و جانشینی نوع دوم (Transversion) و تخمین الگوهای جانشینی نوکلئوتیدی برآورد شدند. فاصله ژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار مگا و براساس مدل p -distance محاسبه شد. درخت ژنی با استفاده از نرم‌افزار رکسمل (RAxML)، روش حداکثر بیشینه احتمال (Maximum likelihood)، مدل تکاملی GTR و تعداد بوت استرپ ۱۰۰۰ ترسیم گردید (۲۶). همچنین از گونه *Tamiasciurus hudsonicus* به‌عنوان برون‌گروه استفاده شد، درواقع این جنس نزدیکترین به جنس *Sciurus* است.

نتایج

دراین پژوهش حدود ۴۰۰ جفت باز از توالی ژن ناحیه کنترل میتوکندری در سه گونه سنجاب ایرانی، سنجاب قرمز و سنجاب ژاپنی مورد بررسی قرارگرفتند. فراوانی هر یک از نوکلئوتیدها مطابق جدول (۲) برآورد شد (باز آدنین با بیش‌ترین فراوانی و باز گوانین با کم‌ترین فراوانی).

جدول ۲ - فراوانی‌های نوکلئوتیدی در سه گونه مورد بررسی

سنجاب ژاپنی	سنجاب قرمز	سنجاب ایرانی	DNA بازهای
۳۱/۴	۳۰/۷	۳۲/۱	A
۳۳	۳۰/۶	۳۰/۸	T
۲۶/۳	۲۶/۳	۲۶/۵	C
۹/۴	۱۰/۴	۱۰/۶	G

جانشینی نوع دوم (جانشینی بازهای پورین و پیریمیدین با یکدیگر) به ترتیب مطابق جدول (۳) برآورد شد.

تعداد ۲۶ توالی از ناحیه کنترل ژنوم میتوکندری سنجاب قرمز از جمعیت‌های مختلف موجود در کشور فرانسه (JX645426-JX645400) و ۲۶ توالی سنجاب ژاپنی از جزایر ژاپن (AB192435-AB192960) از پایگاه بانک ژن (NCBI) استخراج شدند (۱۰ و ۲۰).

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، الکتروفورز و توالی‌یابی: تکثیر جایگاه‌های ژنی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم ۲۵ میکرولیتر و شرایطی شامل ۲۰ نانوگرم DNA، یک واحد tag DNA پلی‌مراز، بافر PCR1x، ۱/۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم و آب مقطر تا رسیدن به حجم ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت. از آغازگرهای خارجی پیشرو (5'-CGCAATACTCGACCAATCC-3') DFSloopF و آغازگر پسرو (5'-TGATGATTTCACGGAGGTAGG-3') جهت تکثیر قطعه‌ای به طول تقریبی ۴۰۰ جفت باز استفاده گردید (۲۰). چرخه دمایی برای تکثیر ناحیه کنترل ژنوم میتوکندری عبارت بود از ۲ دقیقه دردمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۵ چرخه، شامل ۳۰ ثانیه در ۹۴ °C و ۳۰ ثانیه در ۵۰ °C و ۱ دقیقه در ۷۲ °C و بسط نهایی با ۷۲ °C در ۵ دقیقه. خالص‌سازی محصولات PCR با استفاده از برش از روی ژل آگاروز انجام شد. سپس توالی‌یابی محصول PCR انجام شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: نتایج حاصل از توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزارهای سکاسکیپ (Seqscape) ویرایش شدند. با

میزان جانشینی نوع اول (جانشینی بازهای پورین A-G با یکدیگر و جانشینی بازهای پیریمیدین C-T با یکدیگر) و

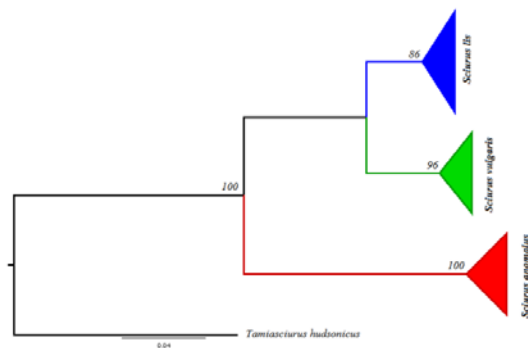
بیش‌ترین میزان جانیشینی مربوط به جانیشینی نوع اول بوده است. همانطور که در جدول مربوطه مشخص است، میزان جانیشینی نوع اول بازهای آدنین، گوانین و سیتوزین بیشتر است. در کل تعداد جایگاه‌های حفاظت‌شده در طول توالی مورد بررسی در سنجاب ایرانی ۳۶۷ جفت باز، در سنجاب قرمز ۳۸۱ جفت باز و در سنجاب ژاپنی ۳۶۴ جفت باز بدست آمد. جایگاه‌های چندریختی و جایگاه‌های حفاظت‌شده در طول ناحیه کنترل در سه گونه مورد مطالعه نشان داده شده است (جدول ۴). فاصله ژنتیکی اصلاح‌نشده بین سه گونه مطابق جدول (۵) بدست آمد. جایگاه‌های پارسیمونی ناحیه کنترل ژنوم میتوکندری در سنجاب ایرانی، سنجاب ژاپنی و سنجاب قرمز به ترتیب در جدول-های (۶، ۷ و ۸) بیان شده است. درخت ژنی ترسیم شده مطابق شکل (۳) می‌باشد که هر یک از گونه‌ها کلاد مجزایی تشکیل دادند.

جدول ۳ - تخمین الگوهای جانیشینی نوکلئوتیدی در سنجاب ایرانی، سنجاب قرمز و سنجاب ژاپنی. اعداد پررنگ نشان‌دهنده نرخ جانیشینی همنام و سایر اعداد نشان‌دهنده نرخ جانیشینی ناهمنام هستند

نوکلئوتید	A	T	C	G
<i>Sciurus anomalus</i>	A	۰/۷۸	۰/۵۷	۱۰/۸۴
	T	۰/۸۳	-	۰/۲۷
	C	۰/۸۳	۲۹/۴۴	۰/۲۷
	G	۳۳/۵۲	۰/۷۸	۰/۵۷
<i>Sciurus vulgaris</i>	A	۰/۹۳	۰/۸۰	۱۳/۵۵
	T	۱	-	۰/۳۰
	C	۱	۲۱/۴	۰/۳۰
	G	۴۴/۱۸	۰/۹۳	۰/۸۰
<i>Sciurus lis</i>	A	۰/۲۴	۰/۲۰	۱۰/۳۳
	T	۰/۲۵	-	۰/۰۷
	C	۰/۲۵	۲۸/۲۳	۰/۰۷
	G	۳۶/۲۹	۰/۲۴	۰/۲۰

جدول ۴ - جایگاه‌های تغییرپذیر و حفاظت‌شده ناحیه کنترل در سه گونه مورد بررسی

سنجاب ایرانی	سنجاب قرمز	سنجاب ژاپنی	
۳۲	۲۰	۳۷	جایگاه تغییرپذیر
۳۶۷	۳۸۱	۳۶۴	جایگاه حفاظت‌شده
۲۲	۱۴	۲۰	جایگاه پارسیمونی
R=۱۷/۲۳	R=۱۲/۷	R=۵۷/۸۶	نسبت جانیشینی همنام به ناهمنام



شکل ۳- درخت ژنی ترسیم شده با استفاده از روش حداکثر احتمال بیشینه، میزان حمایت بر روی هر شاخه بیان شده است (قرمز: سنجاب ایرانی، سبز: سنجاب قرمز، آبی: سنجاب ژاپنی)

جدول ۵- فاصله ژنتیکی براساس مدل *p-distance*

	۱	۲	۳
۱ <i>Sciurus vulgaris</i>	-	۱/۷	۱/۲
۲ <i>Sciurus anomalus</i>	۱۷/۲	-	۱/۸
۳ <i>Sciurus lis</i>	۶/۶	۱۸	-

جدول ۶ - جایگاه‌های پارسیمونی ناحیه کنترل ژنوم میتوکندری در سنجاب ایرانی

نمونه	جایگاه‌هایی پارسیمونی
ES1101	T G T A T T G T T C A A C T A T Y T T C A T
ES1102	T G C A T T G T C C A A C T A T C T C C A T
ES1103	T G C A T T G T T C A A C T A T C T T C A T
ES1104	T G C A T T G T C C A A C T A T C T T C A T
ES1105	T G C A T T G T T C A A C T A T C T T C A T
ES1106	T G C A T T G T T C A A T T A T C T T C A T
ES1127	T A C A T T G T T C A A C T A T C T T C A T
ES1128	T G T A T T G T C C A G C T A T C T T C A T
ES1129	T A C T T T G T C C A A C T G C C C C T A T
ES1130	T A C T T T G T C T A A C T A C C C C T A T
ES1146	T A C T T T G T C C A A C T G T T T C C G T
ES1149	T A C T T T G C C C ? ? ? ? ? ? ? ? ?
ES1159	T A C T T T G T C C A A T T G T C C C T A T
ES1160	T A C T T T G T C C A A C T G T T T C C G T
ES1161	C A C A C C A T C C G G C T A C C T C C A T
ES1166	T A C T T T G T C C A A C T G T T T C C G T
ES1167	C A C A C C A T C C G G C T A C C T C C A T
ES1169	T A C T T T G C C C A A C T G T T T C C G T
ES1171	C A C A T C A T C C G G C T G C C T C C A T
ES1172	C G C A T T G T C C A A T T A T C T T T A T
ES1173	T G C A T T G T C C A A T C A T C T T C A C
ES1174	T G C A T T G T C C A A T C A T C T T C A C
ES1175	T G C A T T G T T C A A T T A T C T T C A T
ES1176	T G C A T T G T C C A A C T A T C T T C A T
ES1177	T G C A T T G T T T A A T C A T C T T C A C
ES1178	T G C A T T G T T C A A T C A T C T T C A C

جدول ۷ - جایگاه‌های پارسیمونی ناحیه کنترل ژنوم میتوکندری در سنجاب ژاپنی

نمونه	جایگاه‌هایی پارسیمونی
AB192935	T G A A A T T C T C A C C T C T A A T G
AB192936	T G A A A T T C T C A C C T C T A A T G
AB192937	T G A A A T T C C T A C C T C T A A T G
AB192938	C A G A A C C T C T A T T T C T G A T A
AB192939	C A A A A T T T C T A T T C C T A A C G
AB192940	T G A A A T T C T C A C C T C T A A T A
AB192941	T G A A A T T C T C A C C T C T A A T A
AB192942	T G A A A C C C C T A C C T C C A G T G
AB192943	T G A A A C C C C T A C C T C C A A T G
AB192944	T G A A A C C C C T A C C T C C A A C G
AB192945	T G A A A C C C C T A C T T C C A G T G
AB192944	T G A A A C C C C T A C C T C C A A T G
AB192945	T G A A A C C C C C C C A C C T C A A T G
AB192946	T G A A G T T C C T G C C C C T G A T G
AB192947	T G A A G T T C C T G C C C C T G A T G
AB192948	T G A A A C C C C T A C C T C C A G T G
AB192949	T G A A G T T C C T A C C T C T A A T G
AB192950	T G A A G T T C C T G C C C C T G A T G
AB192951	T G A A A C C C C T A C T T C C A G T G
AB192952	T G A A A T C C C C A C T T T T A A T G
AB192953	C A G A A T T T C T A T T T C T A A C G
AB192954	T G A G A T T C C T A C C T C T G A T G
AB192955	T G A A G T T C C T A C C T C T G A T G
AB192956	T G A G A T C C C T A C C T C C A G T G
AB192957	T G A A G T T C C T G C C T T T G A T G
AB192958	T G A A G T T C C T G C C T T T G A T G
AB192959	T G A A A T T C T C A C C T C T A A T G
AB192960	T G A A A T T C T C A C C T C T A A T G

جدول ۸- جایگاه‌های پارسیمونی ناحیه کنترل ژنوم میتوکندری در سنجاب قرمز

نمونه	جایگاه‌هایی پارسیمونی
JX645400	C G T A T C T A T C T A C G
JX645401	T G T A T C C A C C T G T G
JX645402	C G T A T C T A T C T A C G
JX645403	T A T A T C T A T C T G T G
JX645404	C A T A T C C A C C T G T G
JX645405	C G T A T C T G C C T A C G
JX645406	C A C A C C T A C T C A T G
JX645407	C G T A T C T A T C T A C G
JX645408	C A C A C C T A C T C A T G
JX645409	C A C A T T T A C C T G T A
JX645410	C A C G T T T G C C T G T A
JX645411	C A T A T T T A C C T G T A
JX645412	C A C A T T T A C C T G T A
JX645413	C A T A T T T A C C T G T A
JX645414	C A T A T T T A C C T G T A
JX645415	C A C G T T T G C C T G T A
JX645416	C A T A T C T C C C T G T G
JX645417	C A C A T T T A C C T G T A
JX645418	C A C A T T T A C C T G T A
JX645419	C A C G T T T G C C T G T A
JX645420	C A C A T T T A C C T G T A
JX645421	C A C G T T T G C C T G T A
JX645422	C A C G T T T G C C T G T A
JX645423	C A T A T T T A C C T G T A
JX645424	C A C A T T T A C C T G T A
JX645425	C A C A T T T A C C T G T A
JX645426	C G T A T C T A T C T A C G

بحث و نتیجه‌گیری

قرمز ساختار ژنتیکی که وابسته به موقعیت جغرافیایی باشد وجود ندارد و همه جمعیت‌های آن با یکدیگر در ارتباط هستند و به‌صورت منزوی نیستند (۱۰، ۱۴ و ۱۷). لذا به نظر می‌رسد دلیل کمتر بودن جایگاه‌های پارسیمونی در سنجاب قرمز در ارتباط بودن جمعیت‌ها و پیوستگی آن‌ها باشد. فاصله ژنتیکی بین سنجاب ایرانی و دو سنجاب دیگر حدود ۱۷-۱۸ درصد می‌باشد در صورتی که این فاصله بین سنجاب قرمز و سنجاب ژاپنی حدود شش درصد می‌باشد، که نسبت به فاصله ژنتیکی بدست آمده از ژن سیتوکروم بی در مطالعه اوشیدا و ماسودا و همکارانش در سال ۲۰۰۰ بیشتر هستند. براساس درخت ژنی ترسیم شده دو گونه سنجاب قرمز و سنجاب ژاپنی با حمایت بالایی در یک کلاذ قرار می‌گیرند درحالی‌که گونه سنجاب ایرانی از دو گونه مذکور جدا می‌شود (۲۲). نتایج حاصل از مطالعه اوشیدا و ماسودا و همکارانش در سال ۲۰۰۰ براساس ژن

در این مطالعه ناحیه کنترل ژنوم میتوکندری در سه گونه سنجاب قرمز، سنجاب ژاپنی و سنجاب ایرانی در اورپا و آسیا مورد بررسی قرارگرفت. فراوانی بازهای ناحیه کنترل در هر سه گونه تقریباً مشابه بدست آمد، چراکه هر سه گونه متعلق به یک جنس می‌باشند. در هر سه گونه بیشترین فراوانی مربوط به باز آدنین و کمترین فراوانی مربوط به باز گوانین است. میزان جانشینی همانم و ناهمنام بازها در سنجاب ایرانی و سنجاب ژاپنی تقریباً مشابه است ولی در سنجاب قرمز میزان جانشینی باز گوانین با آدنین بیشتر است، بطورکلی میزان نسبت جهش‌پذیری همانم به ناهمنام در سنجاب قرمز کمتر است. همچنین سنجاب قرمز تعداد جایگاه‌های پارسیمونی کمتری در مقایسه با دو گونه دیگر دارد. به‌طورکلی در تمامی گستره پراکنش سنجاب

سنجاب‌های درختی اشغال کرده است و سرتاسر جنگل‌های پالئارکتیک را از شبه جزیره ایبریا تا چین به اشغال درآورده است (۱۷). به‌طور کلی سنجاب قرمز قدرت سازگاری بیشتری دارد و توانسته از دو گونه رقیب دیگر یعنی سنجاب ایرانی و سنجاب ژاپنی پیشی بگیرد و در بخش عظیمی از اوراسیا گسترش پیدا کند (۱۶). جمعیت سنجاب قرمز در کشورهای اروپایی به دلیل معرفی کردن گونه سنجاب خاکستری (*Sciurus carolinensis*) که بومی آمریکای شمالی است، کاهش یافته است. سنجاب ژاپنی نیز در ناحیه کنترل جایگاه‌های پارسیمونی بیشتری نسبت به سنجاب قرمز دارد، جمعیت این‌گونه به دلیل تخریب گسترده جنگل‌ها در برخی از جزایر منقرض شده است و نسبت به دو گونه سنجاب قرمز و سنجاب ایرانی گستره بسیار کوچکی را در جزایر ژاپن به خود اختصاص داده است.

باتوجه به نتایج کسب‌شده براساس ژنوم میتوکندری سنجاب ایرانی به تنهایی یک گروه منحصر به فرد را تشکیل می‌دهد و در واقع تنها نماینده جنس *Sciurus* و تنها گونه زیر جنس *Tenes* در غرب آسیا است و از لحاظ آرایه‌شناسی دارای ارزش حفاظتی ویژه‌ای می‌باشد (۴). در سال‌های اخیر جمعیت سنجاب ایرانی در بسیاری از زیستگاه‌ها به دلیل روند رو به رشد تخریب زیستگاه، خشکسالی، تغییر اقلیم و شکار بیرویه کاهش یافته است (۴). مطالعات ژنتیکی که تاکنون درباره سنجاب ایرانی صورت گرفته با استفاده از ژنوم میتوکندری هستند و نرخ جهش‌پذیری این ژنوم در پستانداران حدود ۱۰ برابر میزان جهش‌پذیری در ژن‌های رمزگذار هسته می‌باشد (۲، ۳ و ۱۳). با توجه به اینکه نتایج دو ژن میتوکندریایی تأیید کننده روابط نزدیک دو گونه سنجاب قرمز و سنجاب ژاپنی و جدا بودن سنجاب ایرانی از این دو گونه هستند، جهت رفع ابهامات رده‌بندی در این گونه‌ها، تعیین دقیق روابط آرایه‌شناختی، خاستگاه سنجاب ایرانی، بررسی زمان جدایی گونه‌های سنجاب درختی موجود در اوراسیا

سیتوکروم بی نیز تک‌نمایی بودن این سه گونه را تأیید نکرد. سنجاب قرمز و سنجاب ژاپنی کاملاً مرتبط بودند و به‌عنوان گونه‌های خواهری در نظر گرفته می‌شوند ولی سنجاب ایرانی در گروه گونه‌های آمریکای شمالی قرار گرفت. براساس مطالعه اوشیدا و ماسودا و همکارانش در سال ۲۰۰۰ با استفاده از ژن سیتوکروم بی مشخص شد که گونه‌های جنس *Sciurus* در دوشاخه با فاصله ژنتیکی زیاد قرار دارند، یک گروه در اوراسیا و یک گروه در آمریکای شمالی. مطالعه اوشیدا و ماسودا در سال ۲۰۰۰ با بررسی سنجاب ایرانی نشان داد که *S. anomalus* می‌تواند خاستگاه آمریکای شمالی و نه اوراسیایی داشته باشد، اما فاصله ژنتیکی یکسانی نسبت به هر دو گروه دارد. مطالعه مذکور سه گروه بزرگ برای جنس *Sciurus* پیشنهاد کرد که گروه اول تنها در برگیرنده سنجاب ایرانی است، گروه دوم در برگیرنده دو گونه سنجاب ژاپنی و سنجاب قرمز است و گروه سوم حاوی سنجاب‌های آمریکای شمالی است. با وجود نرخ بالای جهش‌پذیری در ناحیه کنترل، درخت‌های ژنی حاصل از ژن‌های ناحیه کنترل و سیتوکروم بی هر دو ساختار یکسانی دارند و نتایج این دو ژن میتوکندریایی تأیید کننده روابط تبارزایی نزدیک دو گونه سنجاب قرمز و سنجاب ژاپنی و جدا بودن سنجاب ایرانی از این دو گونه هستند. نتایج مطالعه پچنرو و مارتین کوا در سال ۲۰۱۲ براساس بررسی ناحیه کنترل ژن میتوکندری نیز روابط خواهری دو سنجاب قرمز و سنجاب ژاپنی را تأیید کرد و نشان دادند که *S. vulgaris* و *S. lis* از اجداد خود در پالئارکتیک مشتق شده‌اند و این نتایج با توزیع جغرافیایی گونه‌ها سازگاری دارد (۲۴). همچنین براساس الگوی توزیع جغرافیایی بیان کردند *S. anomalus* کاملاً مرتبط به پالئارکتیک است. این سه گونه سنجاب درختی در زیستگاه‌های متنوعی گسترش یافته‌اند، از تنوع رنگی قابل‌توجهی برخوردار هستند و براساس نقشه پراکنش جدایی زیستگاه برای آن‌ها رخ داده است (۱۹ و ۳۱). سنجاب قرمز محدوده بزرگی را نسبت به سایر گونه‌های

مسئولین موزه تاریخ طبیعی وینا در کشور اتریش، موزه تاریخ طبیعی برلین در کشور آلمان و موزه تاریخ طبیعی کرت در کشور یونان تقدیر و تشکر به عمل می‌آید. این تحقیق با حمایت مالی ستاد توسعه زیست‌فناوری، معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری اسلامی ایران به انجام رسیده است (شماره حمایت مالی: ۹۶۰۸۰۱).

ضروری به نظر می‌رسد. همچنین مطالعه و رده‌بندی سنجاب‌های جنس *Sciurus* در آمریکای شمالی و در اوراسیا با استفاده از ژن‌های هسته نیز پیشنهاد می‌گردد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از کلیه همکارانی که در مراحل نمونه برداری این تحقیق همکاری نمودند، بویژه جناب آقای دکتر شهرام کبودوندپور، جناب آقای مهندس نوید زمانی و همچنین از

منابع

- ۱- اعتماد، ا.، ۱۳۶۴. پستانداران ایران، جلد اول. انتشارات سازمان حفاظت محیط‌زیست، ۳۰۰ صفحه.
- ۲- حسین زاده، م.، و دوریش، ج.، ۱۳۹۲. بررسی بیوسیتما تیک گونه جرد بزرگ *Rhombomys opimus* Lichtenstein, 1823 (Rodentia: Gerbillinae) ایران، مجله پژوهش‌های جانوری زیست‌شناسی ایران، جلد بیست و ششم، شماره سوم، صفحات ۲۸۲-۲۸۸.
- ۳- رجبی مهم، ح.، و عزیزی، و.، ۱۳۹۲. بررسی فیلوژغرافیای موش مقدونیه *Mus macedonicus* Petrov & Ruzic
- 11- Excoffier, L., Laval, G., and Schneider, S., 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, PP: 47-50.
- 12- Frankham, R., 2005. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press. New York, 640 p.
- 13- Freeland, J., 2005. Molecular Ecology. Chichester (U.K.): Wiley & Sons.
- 14- Grill, A., Amori, G., Aloise, G., Lisi, A., Tosl, G., Wauters, L., and Randi, E., 2009. Molecular phylogeography of European *Sciurus vulgaris*: refuge within refugia? *Molecular Ecology*, Vol, 18, PP: 2687-2699.
- 15- Hale, M. L., Lurz, P. W. P., Shirley, M. D. F., Rushton, S., Fuller, R. M., and Wolff, K., 2001. Impact of landscape management on the genetic structure of red squirrel populations. *Science*, Vol, 293, PP: 2246-2248.
- 16- Haughland, D. L., and Larsen, W. K., 2004. Ecology of North American red squirrels across contrasting habitats: relating natal dispersal to habitat. *Mammalogy*, Vol, 85, PP: 225-236.
- 17- Liu, Z., Li, B., Ma Jianzhang Zheng, D., and Xu, Y., 2014. Phylogeography and genetic diversity
- (1983خ) در شمال غرب ایران، مجله پژوهش‌های جانوری زیست‌شناسی ایران، جلد بیست و ششم، شماره سوم، صفحات ۲۸۹-۲۹۷.
- ۴- کرمی، م.، قدیریان، ط.، و فیض‌الهی، ک.، ۱۳۹۵. اطلس پستانداران ایران، انتشارات سازمان حفاظت محیط‌زیست، ۲۸۸ صفحه.
- ۵- هرینگتون، ف.، و فیروز، ا.، ۱۳۵۵. راهنمای پستانداران ایران، انتشارات سازمان حفاظت محیط‌زیست، ۳۰۰ صفحه.
- 6- Abi-Said, M. R. E., Khoury, J., Makhlof, H., and Amr, Z. S., 2014. Ecology of the Persian squirrel, *Sciurus anomalus*, in Horsh Ehden Nature Reserve, Lebanon. *Vertebrate Zoology*, Vol, 64, PP: 127-135.
- 7- Albayrak, U., and Arsalan, A., 2006. Contribution to the Taxonomical and Biological Characteristics of *Sciurus anomalus* in Turkey (Mammalia: Rodentia). *Turkish Journal of Zoology*, Vol, 30, PP: 111-116.
- 8- Atkinson, Q., Gray, R., and Drummond, A., 2008. MtDNA Variation Predicts Population Size in Humans and Reveals a Major Southern Asian Chapter in Human Prehistory. *Molecular Biology*, Vol, 25, PP: 468-474.
- 9- Blanga-Kanfi, S., Miranda, H., Penn, O., Pupko, T., DeBry, R. W., and Huchon, D., 2009. Rodent phylogeny revised: analysis of six nuclear genes from all major rodent clades. *Evolutionary Biology*, PP: 9-71.
- 10- Dozie`res, A., Chapuis, J. L., Thibault, S., and Baudry, E., 2012. Genetic Structure of the French Red Squirrel Populations: Implication for Conservation, *PLOS ONE*, 7, 10, e47607 p.

- of the red squirrel (*Sciurus vulgaris*) in China: Implications for the species' postglacial expansion history. *Mammalian Biology*, Vol, 79, PP: 247–253.
- 18- Lurz, P. W. W., Gurnell, J., and Magris, L., 2005. "Sciurus vulgaris" (PDF) *Mammalian Species*. 769, PP: 1–10.
- 19- Mercer, J. M., and Roth, V. L., 2003. The effects of Cenozoic global change on squirrel phylogeny. *Science*, Vol, 299, PP: 1568–1572.
- 20- Moncrief, N. D., Lack, J. B., and Van Den Bussche, R. A., 2010. Eastern fox squirrel (*Sciurus niger*) lacks phylogeographic structure: recent range expansion and phenotypic differentiation. *Mammalogy*, Vol, 91, PP: 1112–1123.
- 21- Nylander, J. A. A., 2004. Bayesian phylogenetics and the evolution of Gall wasps. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations for the Faculty of Science and Technology 937. Uppsala University.
- 22- Oshida, T., and Masuda, R., 2000. Phylogeny and zoogeography of six squirrel species of the genus *Sciurus* (Mammalia, Rodentia), inferred from cytochrome b gene sequences. *Zoological Science*. 17, PP: 405–409.
- 23- Oshida T, Arslan A, Noda M. 2009. Phylogenetic relationships among the Old World *Sciurus* squirrels. *Folia Zoologica*, 58: 14-25.
- 24- Pečnerova, P., and Martínková, N., 2012. Evolutionary history of tree squirrels (Rodentia, Sciurini) based on multilocus phylogeny reconstruction. *Zoologica Scripta*. 41, 3, PP: 211–219.
- 25- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbour, NY: Cold Spring Harbour Press.
- 26- Sidorowicz, J., 1971. Problems of subspecific taxonomy of squirrel (*Sciurus vulgaris* L.) in Palaeartic". *Zoologischer Anzeiger*. 187, PP: 123–14.
- 27- Stamatakis, A., 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, Vol, PP: 2688–2690.
- 28- Steppan, S. J., Storz, B. L., and Hoffmann, R. S., 2004. "Nuclear DNA phylogeny of the squirrels (Mammalia: Rodentia) and the evolution of arboreality from c-myc and RAG1". *Molecular Phylogeny and Evolution*, Vol, 30, PP: 703–719.
- 29- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S., 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology Evolution*, Vol, 24, PP: 1596–1599.
- 30- Thorington, R. W., Koprowski, J. L., Steele, M. A., and Whatton, J. F., 2012. Squirrels of the World. Johns Hopkins University Press. 12 p. ISBN 1421404699.
- 31- Trizo, I., Crestanello, B., Galbusera, P., Wuters, L. A., Tosi, G., Matthyssen, E., and Hauffe, H. C., 2005. Geographical distance and physical barriers shape the genetic structure of Eurasian red squirrels (*Sciurus vulgaris*) in the Italian Alps. *Molecular Ecology*, Vol, 14, PP: 469-481.
- 32- Wauters, L. A., Giovanni, A., Gaetano, A., Spartaco, G., Paolo, A., Andrea, G., Maurizio, C., Damiano, P., and Adriano, M., 2017. New endemic mammal species for Europe: *Sciurus meridionalis* (Rodentia, Sciuridae). *Hystrix*, 28 (1), PP: 1–28.
- 33- Zuhair, A. S., Eid, E., Qarqaz, M. A., and Abubaker, M., 2006. The Status and Distribution of the Persian Squirrel, *Sciurus anomalus* (Mammalia: Rodentia: Sciuridae), in Dibbeen Nature Reserve, Jordan. *Zoology. Abhandlungen*, Vol, 55, 199 p.

Variability of the Mitochondrial Genome (d-Loop) in Red squirrel, Japanese squirrel and Persian squirrel

Asadi Aghbolaghi M.,¹ Ahmadzadeh F.,¹ Kiabi B.² and Keyghobadi N.³

¹ Dept. of Biodiversity and Ecosystem Management, Environmental Sciences Research Institute, Shahid Beheshti University, G.C., Tehran, I. R. of Iran

² Dept. of Animal Sciences and Marine Biology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, I.R. of Iran

³ Dept. of Biology, University of Western Ontario, London, Canada

Abstract

Squirrels of the genus *Sciurus* are tree squirrels adapted to subarctic climatic conditions. They inhabit temperate forests and are widely distributed in the Northern hemisphere. Red squirrel, Japanese squirrel and Persian squirrel are the specific species from *Sciurus* in Europe and Asia. Of the Palearctic species, the red squirrel (*Sciurus vulgaris*) has the broadest distribution, ranging from Europe to China. In contrast, the other two Palearctic species have much narrower ranges; the Persian squirrel (*Sciurus anomalus*) is limited to the Iranian - Anatolian region while the Japanese squirrel (*Sciurus lis*) is limited to the Japanese Islands. The evolutionary history and phylogenetic status of the Persian squirrel are ambiguous and genetic information about this species is currently limited. Furthermore, although there are only three species of tree squirrel in the Palearctic region, it remains unclear whether they are monophyletic or polyphyletic. Mitochondrial genes are frequently used for taxonomic and phylogenetic studies, and the mitochondrial control region (d-loop) has sufficient variability for assessing relationships among congeneric species. Here, we describe for the first time the variability in mitochondrial d-loop sequences within and among the three Palearctic *Sciurus* species. Result of d-loop and Cyt b compared for phylogeny and they have similar result. Our results show that the Persian squirrel has higher variability than the other two species, while the red squirrel has lowest variability. The red squirrel and Japanese squirrel are genetically similar to each other and form a single clade, while the Persian squirrel is more genetically distant from these other two species and is placed in a separate clade.

Key words: *Sciurus anomalus*, *Sciurus vulgaris*, *Sciurus lis*, mtDNA, control region (d-loop)