

## بررسی ساختار و تنوع ژنتیکی روباه معمولی (*Vulpes vulpes*) در شمال شرق ایران

### براساس ژن سیتوکروم b

- **جلیل ایمانی هر سینی\***: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشکده محیط زیست و انرژی، گروه زیستگاه‌ها و تنوع زیستی
- **حمیدرضا رضایی**: گروه محیط زیست، دانشکده محیط زیست و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۴۸۷-۹۱۷۵
- **سعید نادری**: گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، رشت، صندوق پستی: ۱۸۴۱
- **حسین وارسته مرادی**: گروه محیط زیست، دانشکده محیط زیست و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۴۸۷-۹۱۷۵

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۴

### چکیده

به منظور بررسی ساختار و تنوع ژنتیکی روباه معمولی (*Vulpes vulpes*) در شمال شرق ایران، ۲۵ نمونه بافت از سه استان (خراسان رضوی، خراسان شمالی و گلستان) جمع‌آوری شد. پس از استخراج DNA، ژن سیتوکروم b توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، تکثیر و پس از خالص‌سازی و توالی‌یابی، قطعه‌ای به طول ۱۰۹۸ جفت نوکلئوتید از این ژن برای هر نمونه ویرایش شد. سپس با تجزیه و تحلیل این قطعه در نمونه‌ها، جایگاه‌های چندشکلی، تنوع هاپلوتایپی و نوکلئوتیدی، میزان تفاوت ژنتیکی براساس آماره Fst، گسترش و پراکنش تاریخی جمعیت با سه روش شاخص راجر-هارپندینگ، آزمون تاجیما و آزمون Fu Fs محاسبه شد و درخت فیلوژنتیکی براساس منطق بیزین و هم‌چنین شبکه هاپلوتایپی با منطق اتصال میانه رسم شد. نتایج نشان داد که ۱۳ هاپلوتایپ متفاوت و ۲۲ جایگاه متغیر در بین نمونه‌ها وجود دارد و تنوع هاپلوتایپی برابر با ۰/۸۸ است. مقدار آماره  $F_{st}$  ( $p < ۰/۰۵$ ) برابر با ۰/۶۳۸۲ بود که با توجه به این مقدار و نتایج تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی، جریان ژنی قوی بین جمعیت‌ها وجود نداشته و هر جمعیت تا حدی متمایز از جمعیت‌های دیگر است. درخت فیلوژنتیکی رسم شده بیانگر این مسئله است که ساختار ژنتیکی مستقلی برای جمعیت‌های مورد بررسی، قابل تشخیص است و شبکه هاپلوتایپی رسم شده نیز این نظر را تأیید می‌کند. بر همین اساس می‌توان گفت تاریخ تکاملی روباه معمولی پیچیده بوده و الگوی پراکنش این گونه در شمال شرق ایران حاصل یک فرآیند بسیار طولانی است.

**کلمات کلیدی:** ساختار ژنتیکی، تنوع ژنتیکی، روباه معمولی، سیتوکروم b، شمال شرق ایران

## مقدمه

روابط تکاملی واحدهای تاکسونومیک رافیلوژنی (Phylogeny) می‌نامند. گونه مهم‌ترین واحد تاکسونومی (Taxonomy) است که در منابع اکولوژیک مورد استفاده قرار می‌گیرد (Allendorf و Luikart, 2007). برنامه‌های مدیریتی به این منظور وضع می‌شوند که با توجه به منابع موجود بتوان جمعیت را حفظ نمود (Hobbs و Mooney, 1998؛ Hughes و همکاران، 1997). مسأله کلیدی در مدیریت، تعیین این موضوع است که چه شرایطی بر بقاء گونه مؤثر است (Campbell و Nunney, 1993). یک رویکرد کارآمد و سریع در تأمین اطلاعات مربوط به حفاظت از تنوع زیستی می‌تواند نقش اساسی در سیاست‌گذاری و بهینه‌سازی تخصیص منابع داشته باشد (Marsh و همکاران، 2007؛ Naidoo و Ricketts, 2006). برای شناسایی و طبقه‌بندی گونه‌ها، آگاهی از ساختار ژنتیکی، ابزار ارزشمند و کارآمدی محسوب می‌شود و پیشرفت‌های جدید در ژنتیک مولکولی، امکان مناسبی را جهت پاسخگویی به بسیاری از پرسش‌ها در زمینه رده‌بندی گونه‌ها، بررسی روابط فیلوژنی و تکاملی گونه‌ها فراهم کرده است. با استفاده از روش‌های مولکولی می‌توان برای شناسایی جمعیت‌ها، افراد و گونه‌ها و بررسی رفتار آن‌ها به شکل غیرمستقیم و از طریق ژن‌هایشان در آزمایشگاه اقدام کرد و زمانی که این مطالعات با عملیات میدانی همراه شود، نتیجه بررسی‌ها خیلی دقیق‌تر و قابل استنادتر است (Taberlet و همکاران، 1999).

در بین گونه‌ها، شناسایی ساختار ژنتیک جمعیت‌های یک محدوده نیز بسیار با اهمیت است، زیرا آگاهی از ساختار ژنتیکی یک جمعیت در شناخت پتانسیل حفاظت جمعیت مذکور و ریسک در معرض انقراض گرفتن گونه، امری مهم است (Hughes و همکاران، 2007؛ Hilborn و همکاران، 2003؛ Luck و همکاران، 2003). علاوه بر این، اغلب جمعیت‌های محلی به‌عنوان واحدهایی فعال در ارتباط با اکوسیستم، مورد بررسی قرار می‌گیرند. برای برنامه‌ریزی به‌منظور مدیریت واحدهای جمعیتی در یک منطقه و حفاظت آن‌ها باید ارتباطات هر جمعیت محلی با سایر جمعیت‌های منطقه را به دقت ارزیابی نمود (Allendorf و Luikart, 2007).

روباه معمولی (*Vulpes vulpes* Linnaeus, 1758) یکی از گوشت‌خواران کوچک است و 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 (Steinmetz و Garshelis, 2008؛ Macdonald و Reynolds,

2008؛ Larivière و Pasitschniak-Arts, 1996). با وجود مطالعات متعدد انجام شده، هنوز در بسیاری از مناطق جهان در خصوص این گونه کمبود اطلاعات وجود دارد که منطقه خاورمیانه از مهم‌ترین این مناطق است (İbiş و همکاران، 2014). روباه معمولی از گونه‌های نسبتاً فراوان در ایران است که در اکثر مناطق کشور پراکنش دارد (Karami و همکاران، 2008؛ Firouz, 2005). شمال شرق ایران به‌دلیل برخورداری از تنوع اقلیمی، اشکال متفاوت ناهمواری و داشتن پوشش گیاهی متنوع، دارای تیپ‌های زیستگاهی خاص و منحصر به فردی است که سبب شده تا یکی از متنوع‌ترین فون‌های جانوری کشور ایران را در خود جای دهد. یکی از رایج‌ترین گوشت‌خواران این نواحی روباه معمولی است که با استفاده از قدرت سازگاری بالا توانسته است در زیستگاه‌های مختلف این نواحی حضور داشته باشد.

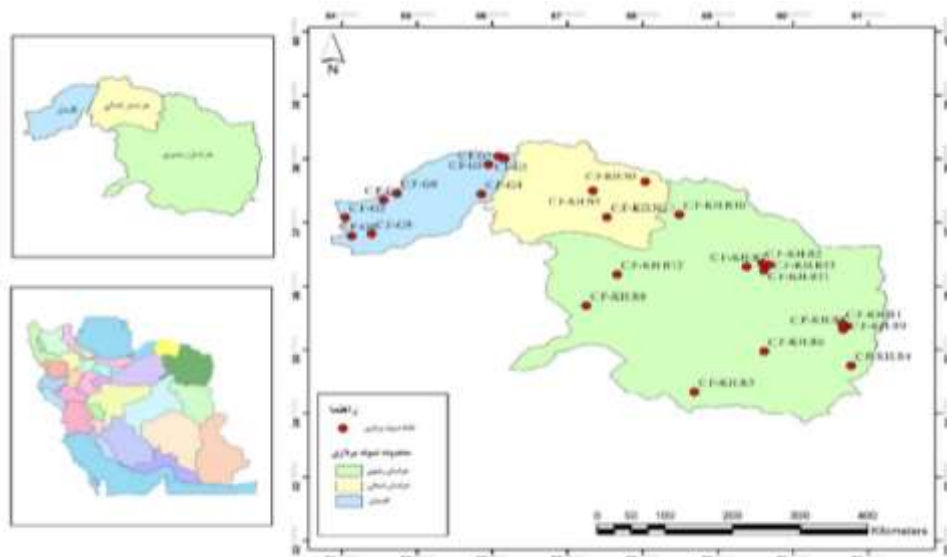
وضعیت رده‌بندی و تنوع ژنتیکی روباه معمولی با توجه به گستره پراکنش وسیع آن و لکه‌لکه شدن زیستگاه‌ها و وجود جمعیت‌های کوچک با تفاوت‌های ریختی زیاد، بسیار مبهم و پیچیده است و برای تعیین وضعیت تنوع ژنتیکی و ساختار ژنتیکی این گونه، نیاز مبرمی به انجام مطالعات متعدد وجود دارد و به همین دلیل است که در سال‌های اخیر یکی از گونه‌های مهم مورد مطالعه در جهان بوده است، از میان مطالعات انجام شده بروی این گونه می‌توان به مطالعات بررسی ساختار و تنوع ژنتیکی و فیلوژئوگرافی (Phylogeography) روباه معمولی در مناطق مختلف جهان با استفاده از ژن سیتوکروم *b* (Cytochrome *b*) میتوکندری (Statham و همکاران، 2014؛ Kutschera و همکاران، 2013؛ Edwards و همکاران، 2012؛ Statham و همکاران، 2012؛ Yu و همکاران، 2012؛ Sacks و همکاران، 2011؛ Statham و همکاران، 2011؛ Teacher و همکاران، 2011؛ Sacks و همکاران، 2010؛ Aubry و همکاران، 2009؛ Fernandes و همکاران، 2008؛ Inoue و همکاران، 2007؛ Perrine و همکاران، 2007؛ Frati و همکاران، 1998) اشاره نمود. ژن سیتوکروم *b*، ژن میتوکندریایی کدینه است که تاکنون به فراوانی برای تاکسون‌های گوناگون تعیین توالی شده است. این ژن نشانگری مناسب در سطح جنس و گونه است و تغییرات درون و بین گونه‌ای را به‌خوبی نشان می‌دهد (Wink و Heidrich, 2000) و فاقد تغییرات حذف، الحاق و واژگونی است. اگرچه این ژن توانایی نشان دادن واگرایی‌های قدیمی‌تر از ۲۰ میلیون سال را ندارد (Konig و همکاران، 2008) اما برای پرداختن به بررسی روابط تکاملی بسیار ارزشمند است (Wilson و Meyer, 1990). بر اساس نتایج به‌دست آمده از مطالعات پیشین، چنین



## مواد و روش‌ها

از آن جایی که روباه معمولی به‌عنوان یک گونه گوشت‌خوار، به‌شدت مخفی کار و شب فعال بوده و نمونه‌برداری از آن به سختی امکان‌پذیر است، در این مطالعه نمونه‌گیری از طریق تلفات جاده‌ای این گونه، انجام گرفت. تعداد ۲۵ نمونه بافت روباه معمولی از ۳ استان در شمال شرقی ایران شامل استان‌های خراسان رضوی، خراسان شمالی و گلستان در طی سال ۱۳۹۲ و ۱۳۹۳ با همکاری ادارات کل حفاظت محیط زیست این استان‌ها جمع‌آوری شد که به‌ترتیب شامل: ۱۳، ۳ و ۹ نمونه بافت بوده است (شکل ۱)، در جدول ۱ نام نمونه‌ها و موقعیت مکانی آن‌ها آورده شده است. نمونه بافت به‌دست آمده، در الکل اتیلیک ۹۶ درجه نگهداری و به آزمایشگاه منتقل گردید.

به‌نظر می‌آید که بررسی ژن سیتوکروم *b* می‌تواند ابزار مناسبی در بررسی ساختار و تنوع ژنتیکی این گونه باشد. در ایران، تاکنون مطالعه‌ای در مورد بررسی ساختار جمعیتی و تنوع ژنتیکی روباه معمولی انجام نشده است، این در حالی است که با توجه به وجود جمعیت‌های مختلفی از این گونه در ایران، شناسایی ساختار ژنتیکی و تعیین میزان تنوع ژنتیکی آن‌ها می‌تواند در حفاظت جمعیت‌های این گونه کمک شایانی نماید. از آن‌جاکه شمال شرق ایران یکی مناطقی است که روباه معمولی در زیستگاه‌های متفاوت آن زیست می‌کند، در این پژوهش تلاش شده است تا با استفاده از داده‌ها و نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل مولکولی پلی‌مورفیسم (polymorphism) ژن سیتوکروم *b*، ساختار ژنتیکی جمعیت‌های روباه معمولی را در شمال شرق کشور بررسی شده و میزان تنوع ژنتیکی موجود در آن‌ها تعیین شود.



شکل ۱: موقعیت مکانی نمونه‌های جمع‌آوری شده در استان‌های مورد مطالعه

**استخراج DNA و بررسی کمی و کیفی DNA:** استخراج DNA از نمونه‌های بافت، با استفاده از کیت *AccuPrep® Genomic DNA Extraction* (شرکت Bioneer، کره جنوبی) و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. پس از استخراج DNA برای تأیید کیفیت استخراجی از روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ و هم‌چنین دستگاه نانودراپ استفاده شد.

**چرخه PCR و توالی‌یابی قسمتی از ژن سیتوکروم *b*:** واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR = polymerase chain reaction) با استفاده از پرایمرهای (Primer) L۱۴۷۲۴ و H ۱۵۹۱۵ (Irwin و همکاران، ۱۹۹۱) در دستگاه Applied Biosystems Thermal Cycler ۲۷۲۰ (ساخت آمریکا) به‌شرح زیر انجام گرفت:

واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه، واسرشت‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، واسرشت‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۹ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۹۰ ثانیه، مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه و در پایان مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۷ دقیقه. حجم واکنش برابر با ۲۵ میکرولیتر و اجزای آن شامل ۱۰۰ نانوگرم DNA، یک واحد آنزیم *Taq* دی‌ان‌ای پلی‌مرز، ۵ میلی‌مول dNTPs، ۵۰ میلی‌مول  $MgCl_2$ ، ۵ پیکومولار از هر آغازگر، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X و ۱۸ میکرولیتر آب دوبار تقطیر بود.



جدول ۱: موقعیت مکانی نمونه و شماره مربوط به هر نمونه

نام نمونه‌ها	موقعیت مکانی
C.F-KH.R(۱,۲,۳,۴,۵,۶,۷,۸,۹,۱۰,۱۱,۱۲,۱۳)	خراسان رضوی (KH-R)
C.F-KH.N(۱,۲,۳)	خراسان شمالی (KH-N)
C.F-G(۱,۲,۳,۴,۵,۶,۷,۸,۹)	گلستان (G)

ریشه‌دار شد (شماره اختصاری ثبت شده در بانک ژن به ترتیب KP۳۴۲۴۵۱, NC۰۲۶۵۲۹, KP۲۰۰۸۷۶, NC۰۲۳۹۵۸, KJ۱۴۰۱۳۷). در نهایت، درخت‌های ترسیم شده، به وسیله قانون اکثریت (Majority-rule) یک پارچه (Consensus) شدند. فراوانی و اگرایی هاپلوتایپ‌ها با استفاده از نسخه ۳/۵ نرم‌افزار Arlequin محاسبه شد (Excoffier و همکاران، ۲۰۱۰) و همان برنامه برای برآورد تنوع هاپلوتایپی و نوکلئوتیدی ( $\pm SE$ ) براساس ضریب (NEI، ۱۹۸۷) و برآورد تفاوت بین جفت جمعیت‌های فرضی با استفاده از آماره  $F_{ST}$  مورد استفاده قرار گرفت. بررسی ارتباط بین هاپلوتایپ‌ها و ترسیم شبکه هاپلوتایپی با استفاده از منطق اتصال میانه و نسخه ۴/۶/۱/۳ نرم‌افزار Network انجام گرفت (Bandelt) و همکاران، ۱۹۹۹).

## نتیجه

در این مطالعه که بروی ژنوم میتوکندری ۲۵ نمونه روباه معمولی در سه استان خراسان شمالی، رضوی و گلستان انجام شد ۱۰۹۸ جفت باز از ژن سیتوکروم *b* تکثیر و توالی‌یابی شد و مورد تحلیل قرار گرفت که در مجموع، فراوانی بازها به ترتیب (۲۸،۴) A، (۲۹، ۶) T، (۲۷، ۹) C و (۱۴، ۱) G تعیین شد. بر همین اساس در قطعه مطالعه شده، ۱۳ هاپلوتایپ و ۲۲ جایگاه متغیر شناسایی شد (جدول ۲).

میزان جانیشینی نوع اول (جانیشینی بازهای پورینی با یکدیگر و جانیشینی بازهای پیریمیدینی با یکدیگر) و جانیشینی نوع دوم (جانیشینی بازهای پورین و پیریمیدین با یکدیگر) در نمونه‌های سه 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 براساس مدل تامورا- نیی برآورد شده است (Nei و Tamura، ۱۹۹۳).

آزمون معیارهای اطلاعات بیزین (BIC) و اطلاعات آکایکه (AIC) در نرم‌افزار jModelTest نشان داد که مدل HKY+G با مقدار آماره G برابر با ۰/۲۹۳۰ به عنوان بهترین مدل تکاملی نوکلئوتیدی برای قطعه سیتوکروم *b* شناسایی شد.

به منظور تأیید تکثیر ناحیه مورد نظر طی واکنش‌های PCR الکتروفورز محصولات به دست آمده روی ژل آگارز ۲ درصد با رنگ آمیزی اتیديوم بروماید انجام شد. پس از اطمینان از تکثیر و عدم وجود آلودگی، مقدار ۲۰ میکرولیتر از محصولات PCR برای تعیین توالی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال شد. این نمونه‌ها با استفاده از دستگاه ۳۷۳۰ ABI به طور خودکار توالی‌یابی شد. **تجزیه و تحلیل داده‌ها:** از ابزار BLAST و رویه BLASTN در پایگاه NCBI جهت تعیین همولوژی توالی‌ها استفاده گردید، سپس توالی‌های دریافت شده توسط نسخه ۲/۶ نرم‌افزار SeqScape بررسی و خطاهای موجود اصلاح گردید (Thermo Fisher Scientific). در مرحله بعد، در نسخه ۵ نرم‌افزار Mega (Tamura و همکاران، ۲۰۱۱) و با استفاده از Clustal W، هم‌ردیف‌سازی (Alignment) انجام شد.

برای تعیین فاصله ژنتیکی بین افراد، فراوانی بازهای مختلف و تعیین میزان جانیشینی‌های نوع اول و دوم توسط نسخه ۵ نرم‌افزار MEGA انجام گردید (Tamura و همکاران، ۲۰۱۱). تعیین تعداد هاپلوتایپ‌ها، جایگاه‌های چندشکلی با استفاده از نسخه ۵/۱۰ نرم‌افزار DNAsp تخمین زده شد (Librado و Rozas، ۲۰۰۹) و از همین نرم‌افزار برای بررسی تاریخچه جمعیتی (Demographic history) بین افراد با استفاده از توزیع عدم تطابق (Mismatch distribution) براساس شاخص راجرز هارپندینگ (Harpending's raggedness index)، شاخص بی‌طرفی (Neutrality tests) تاجیما (Tajima، ۱۹۸۹) و تست Fu's Fs (Fu، ۱۹۹۷) استفاده شد. برای تعیین بهترین مدل جهت رسم درخت فیلوژنتیکی از نرم‌افزار jModelTest و دو آماره (Akaike Bayesian information criterion) AIC و (Bayesian information criterion) BIC استفاده شد (Posada و همکاران، ۲۰۰۸). سپس با توجه به مدل انتخاب شده از نسخه ۳/۲/۲ نرم‌افزار MrBayes برای محاسبه و ترسیم درخت بیزین استفاده شد (Huelsenbeck و Ronquist، ۲۰۰۱). تحلیل‌های بیزین براساس چرخه زنجیره مارکو (Markov chain Monte Carlo) با ۱۰ میلیون تکرار و فراوانی نمونه (Sample frequency) ۱۰۰ انجام شد. درخت بیزین به وسیله برون گروه‌های (*V. laopus* و *V. corsac*) (Outgroups)



جدول ۲: هاپلوتیپ‌های یافت شده گونه روباه معمولی (*V. vulpes*) براساس نمونه‌های توالی‌یابی شده

استان	نام نمونه	هاپلوتایپ سیتوکروم b	شماره نوکلئوتید(های) متفاوت با هاپلوتایپ ۲C
خراسان رضوی	C.F-KH.R۱	Haplotype-۱C	۱۰۳۱-۱۰۳۵
	C.F-KH.R۲	Haplotype-۲C	-
	C.F-KH.R۳	Haplotype-۲C	-
	C.F-KH.R۴	Haplotype-۳C	۹۶۵-۱۰۲۳-۱۰۳۱
	C.F-KH.R۵	Haplotype-۴C	۳۳-۱۰۷-۱۰۳۱-۱۰۳۵
	C.F-KH.R۶	Haplotype-۲C	-
	C.F-KH.R۷	Haplotype-۲C	-
	C.F-KH.R۸	Haplotype-۲C	-
	C.F-KH.R۹	Haplotype-۵C	۱۰۳۵
	C.F-KH.R۱۰	Haplotype-۶C	۱۰۳۸-۱۰۳۹-۱۰۴۱
	C.F-KH.R۱۱	Haplotype-۷C	۹۴۵
	C.F-KH.R۱۲	Haplotype-۲C	-
	C.F-KH.R۱۳	Haplotype-۲C	-
خراسان شمالی	C.F-KH.N۱	Haplotype-۸C	۷۷۷-۱۰۳۶-۱۰۴۱
	C.F-KH.N۲	Haplotype-۹C	۶۱۵-۷۷۷-۸۵۹-۱۰۰۲-۱۰۳۶-۱۰۴۱
	C.F-KH.N۳	Haplotype-۱۰C	۴۸۰-۶۱۵-۷۷۷-۱۰۳۶-۱۰۴۱
گلستان	C.F-G۱	Haplotype-۱۱C	۴۴۴-۷۶۲-۸۰۴-۸۱۶-۱۰۹۶
	C.F-G۲	Haplotype-۱۲C	۲۵۲-۸۰۴-۱۰۹۶
	C.F-G۳	Haplotype-۱۳C	۷۶۲-۸۰۴-۸۱۶-۱۰۹۶
	C.F-G۴	Haplotype-۱۳C	۷۶۲-۸۰۴-۸۱۶-۱۰۹۶
	C.F-G۵	Haplotype-۱۳C	۷۶۲-۸۰۴-۸۱۶-۱۰۹۶
	C.F-G۶	Haplotype-۱۲C	۲۵۲-۸۰۴-۱۰۹۶
	C.F-G۷	Haplotype-۱۳C	۷۶۲-۸۰۴-۸۱۶-۱۰۹۶
	C.F-G۸	Haplotype-۱۱C	۴۴۴-۷۶۲-۸۰۴-۸۱۶-۱۰۹۶
	C.F-G۹	Haplotype-۱۲C	۲۵۲-۸۰۴-۱۰۹۶

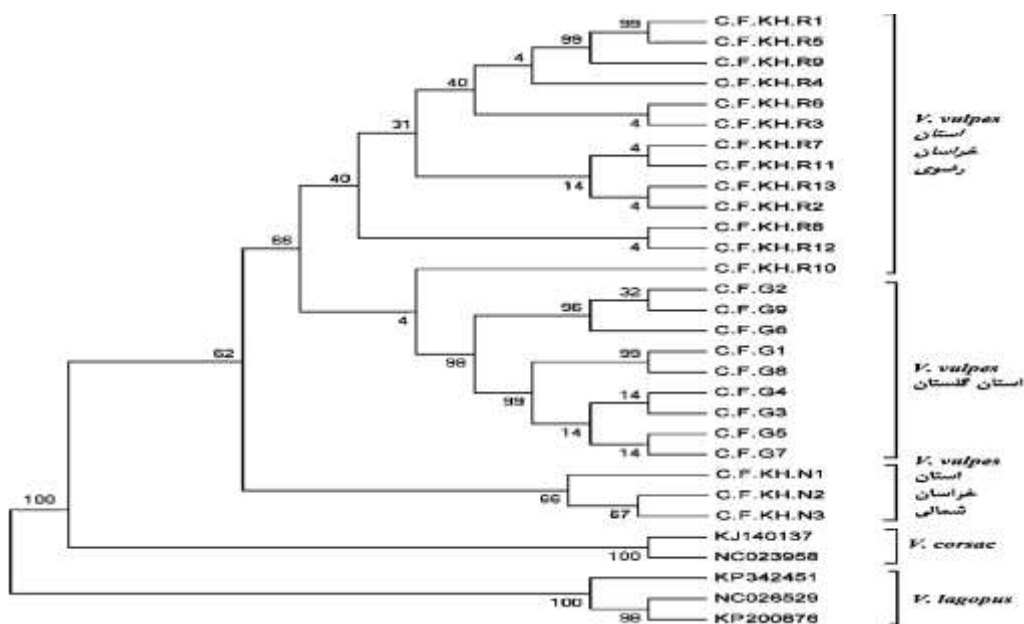
جدول ۳: تخمین الگوهای جانیشینی نوکلئوتیدی براساس قطعه سیتوکروم b

نوکلئوتید	A	T/U	C	G
A	-	۶/۱۸	۵/۸۴	۸/۵۰
T/U	۵/۸۳	-	۱۶/۲۵	۳/۰۵
C	۵/۸۳	۱۷/۲۱	-	۳/۰۵
G	۱۶/۲۴	۶/۱۸	۵/۸۴	-

بود که مقدار قابل قبولی محسوب می‌گردد. شکل ۲ درخت فیلوژنتیکی حاصل را نشان می‌دهد.

درخت فیلوژنتیکی نمونه‌ها براساس این مدل محاسبه و ترسیم شد که پس از تعداد تکرار ۵۰ میلیون بار، میزان انحراف معیار فراوانی خرد شده برای قطعه سیتوکروم b برابر با ۰/۰۰۰۱۹

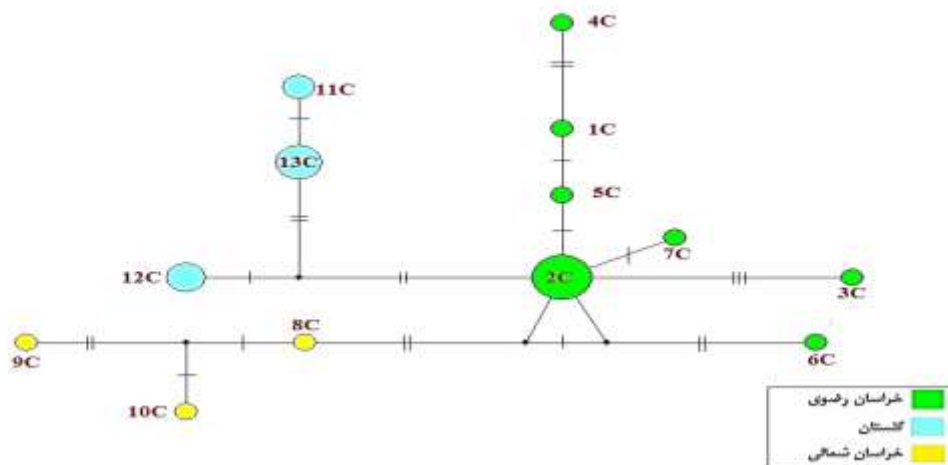




شکل ۲: درخت فیلوژنتیکی نمونه‌های سه استان مورد مطالعه حاصل از نرم‌افزار MrBayes براساس ژن سیتوکروم *b*

جمعیت قابل تصور است (اعداد بیانگر بوت استرپ می‌باشند). براساس داده‌های به‌دست آمده، شبکه هاپلوتایپی ژن سیتوکروم *b* در نمونه‌های مورد مطالعه مطابق شکل ۳ است.

درخت ترسیم شده نشان می‌دهد نمونه‌های به‌دست آمده به‌خوبی از دو گونه دیگر استخراج شده از ژن بانک (روباه کورساک و روباه قطبی) تفکیک شده‌اند. نمونه‌های هر استان نیز در یک کلاسه جدا قرار می‌گیرد و به‌خوبی ساختار مشخصی برای هر



شکل ۳: شبکه هاپلوتایپی نمونه‌های به‌دست آمده از سه استان با استفاده از نرم‌افزار Network.

جمعیت‌های مورد مطالعه، مقایسه دوه‌دوی جمعیت‌ها انجام شد که در این مطالعه، نمونه‌های مربوط به هر استان، یک جمعیت فرضی در نظر گرفته شدند و آنالیزها بر همین اساس انجام گرفت (جدول ۵).

شبکه هاپلوتایپی نیز تفکیک ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها را به‌خوبی نشان می‌دهد هاپلوتایپ ۲C فراوان‌ترین هاپلوتایپ بوده و هاپلوتایپ مرکزی نمونه‌ها محسوب می‌شود. نتایج تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی (Analysis of Molecular Variance) در جدول ۴ نشان داده شده است. برای مقایسه



جدول ۴: نتایج آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) حاصل از نرم افزار Arlquine

نوع واریانس	درجه آزادی	مجموع مربعات	واریانس	درصد واریانس
بین جمعیت‌ها	۲	۲۸/۳۰۴	۱/۷۹	۶۲/۸۲
درون جمعیت‌ها	۲۲	۲۲/۳۷۶	۱/۰۲	۳۶/۱۸
کل	۲۴	۵۰/۶۸۰	۲/۸۱	-
شاخص تثبیت (FST)		۰/۶۳۸۲		

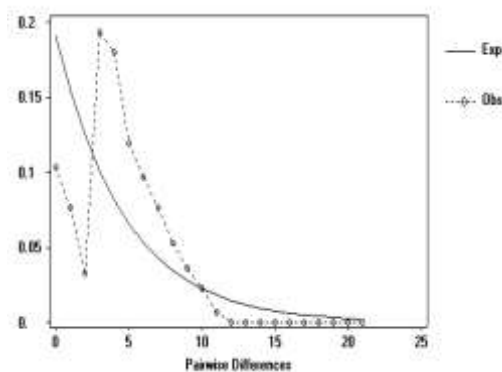
جدول ۵: نرخ واگرایی جمعیت‌ها براساس روش Pairwise differences در نرم‌افزار Arlquine

خراسان رضوی	گلستان	خراسان شمالی
		۰/۰۰۰
	۰/۰۰۰	۰/۷۵۷
۰/۰۰۰	۰/۶۰۴	۰/۶۱۷

کوتاهی به دلیل یکسان کردن طول قطعه در تمامی نمونه‌ها انجام گرفته است.

براساس نتایج حاصل در ۲۵ نمونه مورد بررسی ۱۳ هاپلوتایپ شناسایی شد. تاکنون تقریباً تمام مطالعات انجام شده بروی این ژن با قطعات کوتاه‌تری انجام شده است و بر همین اساس ممکن است مقایسه نتایج این مطالعه با مطالعات مشابه دارای تفاوت اندکی باشد. Frati و همکاران (۱۹۹۸) با بررسی ۳۷۵ جفت باز از ژن سیتوکروم *b* در بین ۴۱ نمونه از حوزه دریای مدیترانه، ۱۸ هاپلوتایپ مختلف را شناسایی کردند، Inoue و همکاران (۲۰۰۷) با بررسی ۳۷۵ جفت باز در ۸۸ نمونه شمال ژاپن ۱۴ هاپلوتایپ، YU و همکاران (۲۰۱۲) با بررسی ۳۳۸ جفت باز در ۲۲ نمونه شرق آسیا ۹ هاپلوتایپ، Perrine و همکاران (۲۰۰۷) و Aubry و همکاران (۲۰۰۹) به ترتیب با بررسی ۳۵۴ جفت باز در ۷۳ فرد ۱۴ هاپلوتایپ و با بررسی ۳۵۴ جفت باز در ۲۲۰ فرد ۲۹ هاپلوتایپ، İbiş و همکاران (۲۰۱۴) با بررسی ۳۷۵ جفت باز در ۵۱ نمونه در ترکیه توانستند ۱۰ هاپلوتایپ متفاوت را شناسایی کنند، در صورتی که قطعه سیتوکروم *b* کوتاه‌تر و در حدود اندازه قطعات مطالعات قبلی در نظر گرفته شود (بین ۳۲۰ تا ۳۸۰ جفت نوکلئوتید)، تعداد هاپلوتایپ‌های شناسایی شده به ۴ تا ۷ هاپلوتایپ تغییر خواهد کرد که این امر بیانگر اهمیت اندازه قطعه مورد مطالعه در بررسی تنوع ژنتیکی است، اگرچه طول قطعه کوتاه سبب کم شدن تعداد و تنوع هاپلوتایپی می‌شود اما در مجموع، مقایسه تعداد و تنوع هاپلوتایپی شناسایی شده در این پژوهش با سایر مطالعات انجام شده با توجه به تعداد نمونه و گستره

میزان شاخص Harpending's raggedness برابر با ۰/۲ ( $p > 0/5$ ) و نمودار آن تک‌نمایی به دست آمد (شکل ۴) و شاخص تاجیما برابر با  $-1/23$  ( $p > 0/1$ ) و آماره آمون FU برابر با  $-1/53$  ( $p > 0/1$ ) محاسبه گردید. با توجه به تک‌نمایی بودن نمودار، امکان گسترش گونه در گذشته وجود دارد.



شکل ۴: نمودار مربوط به شاخص Harpending's raggedness رسم شده در نرم افزار DnaSp

## بحث

نتایج به دست آمده نشان داد که پرایمر مورد استفاده دارای قابلیت مناسب برای تکثیر ژن سیتوکروم *b* بوده و می‌تواند تقریباً قطعه کامل سیتوکروم *b* را جداسازی کند. اگرچه طول قطعه نهایی مورد استفاده در آنالیزها، ۱۰۹۸ جفت باز بود که این قطعه ۴۲ جفت باز کمتر از طول کامل سیتوکروم *b* است، اما این



مطالعه به‌دست نیامده است و هاپلوتایپ‌های نزدیک، از نظر جغرافیایی فاصله کم‌تری نسبت به هم داشته‌اند. این مساله می‌تواند در امر حفاظت از این گونه مد نظر قرار گیرد که جمعیت‌های روباه برخلاف اغلب گوشت‌خواران احتمالاً مهاجرت و جابجایی طولانی ندارند و بیش‌تر جابجایی‌ها در فواصل کوتاه است، به همین جهت جریان ژنی در آن‌ها به کندی صورت خواهد گرفت. این مساله می‌تواند توجیه‌کننده ساختار مشخص جمعیت‌های جغرافیایی در مناطق مورد بررسی باشد.

باید توجه داشت که این نتایج و یافته‌ها براساس نمونه‌های به‌دست آمده بوده و برای بررسی‌های جامع‌تر و دقیق‌تر پیشنهاد می‌گردد در مطالعات تکمیلی، افزایش تعداد نمونه و نیز تحلیل سایر ژن‌های میتوکندریایی و هسته مورد نظر قرار گیرد و هم-چنین به بررسی ارتباط بین این جمعیت‌ها با سایر مناطق کشور نیز توجه شده و در نهایت، استفاده از سایر روش‌های تحلیل ژنتیکی نظیر ریزماهوره‌ها می‌تواند مفید واقع شود.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله بر خود واجب می‌دانند تا از همکاری ادارات کل حفاظت محیط زیست استان‌های مورد مطالعه و هم‌چنین آقایان علی خانی، محمود شکیبی و داوود میلانو 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.

## منابع

- Allendorf, F.W. and Luikart, G., 2007. Conservation and the genetics of populations. Blackwell Publishing. USA. 663 p.
- 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*. Vol. 18, No. 12, pp: 2668-2686.
- Bandelt, H.J.; Forster, P. and Röhl, A., 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution*. Vol. 16, No. 1, pp: 37-48.
- 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*. Vol. 57, pp: 95-104.
- Excoffier, L. and Lischer, H.E., 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population

مطالعات، می‌تواند وجود تنوع هاپلوتایپی مناسبی را در شمال شرق ایران تأیید کند.

محاسبه فواصل ژنتیکی میان جمعیت‌های مختلف مورد مطالعه و همین‌طور درخت فیلوژنتیکی رسم شده با منطق بیزین و شبکه هاپلوتایپی ترسیم شده نشان می‌دهد جمعیت‌های روباه معمولی در سه استان مورد مطالعه با توجه به نمونه‌های به‌دست آمده تا حد زیادی از یکدیگر تفکیک شده و میزان واگرایی ژنتیکی این جمعیت‌ها از یکدیگر نسبتاً زیاد است. با توجه به نتایج این آنالیزها می‌توان چنین برداشت کرد که تاریخ تکاملی روباه معمولی پیچیده بوده و الگوی پراکنش این گونه در ایران حاصل یک فرآیند بسیار طولانی است.

با توجه به میزان بالای واگرایی ژنتیکی در بین این سه جمعیت با وجود فاصله جغرافیایی نسبتاً محدود و نتایج آزمون تجزیه واریانس مولکولی که در آن درصد واریانس بین جمعیت‌ها بیش‌تر از درصد واریانس درون جمعیت‌هاست، می‌توان چنین نتیجه گرفت که جریان ژنی قوی بین جمعیت‌ها وجود نداشته و هر جمعیت تا حدی متمایز از دو جمعیت دیگر است. شبکه هاپلوتایپی نشان می‌دهد که با توجه به نمونه‌های موجود، هاپلوتایپ 2C را می‌توان هاپلوتایپ مرکزی این شبکه در نظر گرفت و با توجه به فاصله تقریباً مساوی هاپلوتایپ‌های خراسان شمالی و گلستان از این هاپلوتایپ می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً مسیر جریان ژنی به درون جمعیت‌ها از جمعیت یا جمعیت‌هایی در خارج از مناطق مورد مطالعه قرار دارد.

در صورتی که توزیع عدم تطابق براساس شاخص راجرز و هارپندینگ به‌صورت تک‌نمایی باشد نشان‌دهنده گسترش ناگهانی جمعیت در گذشته است و در صورتی که به‌صورت دونمایی یا چند نمایی باشد نشان‌دهنده ثبات جمعیتی در گذشته است (Rogers و Harpending, 1992) و بر همین اساس مطابق نتایج شکل ۴ می‌توان گفت که گسترش گونه، قبلاً اتفاق افتاده است اما مقدار محاسبه شده برای دو آماره تاجیما و FU منفی بوده ولی از آن‌جا که  $p > 0.1$  است، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت هرچند که امکان گسترش گونه در گذشته وجود دارد اما این گسترش معنی‌دار نبوده است.

روبه پراکنش وسیعی در سطح جهان و ایران دارد، مانند سایر گوشت‌خواران گستره خانگی نسبتاً وسیعی دارد و در سه استان مورد بررسی نیز در زیستگاه‌های متنوعی زندگی می‌نماید، ولی براساس نتایج این پژوهش می‌توان نتیجه‌گیری نمود که میزان جریان ژنی احتمالاً در جمعیت‌های بررسی شده بسیار پایین است و هیچ هاپلوتایپ مشترکی در پهنه مورد



22. Luck, G.W.; Daily, G.C. and Ehrlich, P.R., 2003. Population diversity and ecosystem services. Trends in Ecology & Evolution. Vol. 18, No. 7, pp: 331-336.
23. Marsh, H.; Dennis, A.; Hines, H.; Kutt, A.; McDONALD, K.; Weber, E.; Williams, S. and Winter, J., 2007. Optimizing allocation of management resources for wildlife. Conservation Biology. Vol. 21, No. 2, pp: 387-399.
24. Meyer, A. and Wilson, A.C., 1990. Origin of tetrapods inferred from their mitochondrial DNA affiliation to lungfish. Journal of Molecular Evolution. Vol. 31, No. 5, pp: 359-364.
25. Naidoo, R. and Ricketts, T.H., 2006. Mapping the economic costs and benefits of conservation. PLoS biology. Vol. 4, No. 11, pp: e360.
26. Nei, M., 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia university press. 512 p.
27. Nunney, L. and Campbell, K.A., 1993. Assessing minimum viable population size: demography meets population genetics. Trends in Ecology & Evolution. Vol. 8, No. 7, pp: 234-239.
28. 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. Vol. 8, No. 5, pp: 1083-1095.
29. Posada, D., 2008. JModelTest: phylogenetic model averaging. Molecular biology and evolution. Vol. 25, No. 7, pp: 1253-1256.
30. Rogers, A.R. and Harpending, H., 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. Molecular biology and evolution. Vol. 9, No. 3, pp: 552-569.
31. 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. Vol. 20, No. 2, pp: 326-341.
32. 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. Vol. 11, No. 4, pp: 1523-1539.
33. 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. Vol. 23, No. 19, pp: 4813-4830.
34. 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. Vol. 93, No. 1, pp: 52-65.
35. 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. Vol. 103, No. 1, pp: 168-175.
- genetics analyses under Linux and Windows. Molecular ecology resources. Vol. 10, No. 3, pp: 564-567.
6. Fernandes, C.A.; Ginja, C.; Pereira, I.; Tenreiro, R.; Bruford, M.W. and Santos-Reis, M., 2008. Species specific mitochondrial DNA markers for identification of non-invasive samples from sympatric carnivores in the Iberian Peninsula. Conservation genetics. Vol. 9, No. 3, pp: 681-690.
7. Firouz, E., 2005. The complete fauna of Iran. IB Tauris. UK. 352 p.
8. 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. Vol. 245, No. 01, pp: 43-51.
9. Fu, Y.X., 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. Genetics. Vol. 147, No. 2, pp: 915-925.
10. Hilborn, R.; Quinn, T.P.; Schindler, D.E. and Rogers, D.E., 2003. Biocomplexity and fisheries sustainability. Proceedings of the National Academy of Sciences. Vol. 100, No. 11, pp: 6564-6568.
11. Hobbs, R.J. and Mooney, H.A., 1998. Broadening the extinction debate: population deletions and additions in California and Western Australia. Conservation Biology. Vol. 12, No. 2, pp: 271-283.
12. Huelsenbeck, J.P. and Ronquist, F., 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics. Vol. 17, No. 8, pp: 754-755.
13. Hughes, J.B.; Daily, G.C. and Ehrlich, P.R., 1997. Population diversity: its extent and extinction. Science. Vol. 278, No. 5338, pp: 689-692.
14. 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. Vertebrate zoology. Vol. 64, No. 2, pp: 273-284.
15. 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. Vol. 24, No. 12, pp: 1178-1186.
16. Irwin, D.M.; Kocher, T.D. and Wilson, A.C., 1991. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. Journal of molecular evolution. Vol. 32, No. 2, pp: 128-144.
17. Karami, M.; Hutterer, R.; Benda, P.; Siahsarvie, R. and Krystufek, B., 2008. Annotated check-list of the mammals of Iran. Lynx, series nova. Vol. 39, No. 1.
18. König, C.; Weick, F. and Wink, M., 2008. Owls of the world. A&C Black. 528 p.
19. 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. Vol. 13, No. 1, pp: 114.
20. Larivière, S. and Pasitschniak-Arts, M., 1996. *Vulpes vulpes*. Mammalian species. pp: 1-11.
21. Librado, P. and Rozas, J., 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics. Vol. 25, No. 11, pp: 1451-1452.



36. Steinmetz, R. and Garshelis, D.L., 2008. Distinguishing Asiatic black bears and sun bears by claw marks on climbed trees. The Journal of Wildlife Management. Vol. 72, No. 3, pp: 814-821.
37. Taberlet, P.; Waits, L.P. and Luikart, G., 1999. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. Trends in Ecology and Evolution. Vol. 14, No. 8, pp: 323-327.
38. Tajima, F., 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics. Vol, 123, No. 3, pp: 585-595.
39. 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. Vol. 10, No. 3, pp: 512-526.
40. 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. Vol. 28, No. 10, pp: 2731-2739.
41. 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. Vol. 11, No. 1, 214 p.
42. Wink, M. and Heidrich, P., 2000. Molecular systematics of owls (Strigiformes) based on DNA-sequences of the mitochondrial cytochrome b gene. Raptors at Risk'. (Eds RD Chancellor and B.-U. Meyburg.). pp: 819-828.
43. 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. Vol. 29, No. 11, pp: 753-760.

