

بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های کمرکولی جنگلی

(*Sitta europaea* Linnaeus, ۱۷۸۵) در ایران با استفاده از نشانگر mtDNA

- مسعود نظری زاده: گروه محیط‌زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، صندوق پستی: ۴۱۱۱
- محمد کابلی*: گروه محیط‌زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، صندوق پستی: ۴۱۱۱
- حمیدرضا رضائی: گروه محیط‌زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۴۸۷-۴۹۱۷۵
- فائزه فاطمی زاده: گروه محیط‌زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، صندوق پستی: ۴۱۱۱

تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۴

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹۴

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی تنوع، تغییرات و ساختار ژنتیکی جمعیت‌های کمرکولی در زیستگاه‌های البرز و زاگرس است. بدین منظور تعداد ۱۹ فرد از چهار جمعیت در جنگل‌های البرز (گلستان و گیلان) و زاگرس (کرمانشاه و یاسوج) زنده‌گیری و نمونه‌های خون برداشت گردید. سپس تغییرات ژنتیکی با استفاده از توالی کامل ژن ND۲ (۱۰۴۱ جفت باز) مورد بررسی قرار گرفت. تحلیل‌های تبارشناسی با استفاده از مدل TRN + I و رسم درخت بیزین و حداکثر درست‌نمایی انجام گرفت. هم‌چنین روابط بین هاپلوتایپ‌ها با استفاده از منطق اتصال میانه نمایش داده شد. نتایج نشان داد که جمعیت‌های البرز از زاگرس با احتمال پسین یک و بوت استرپ ۱۰۰٪ از یکدیگر جدا شده‌اند. هم‌چنین از ۱۹ نمونه توالی‌یابی شده، ۱۲ هاپلوتایپ منحصر به فرد (۸ هاپلوتایپ در البرز و ۴ هاپلوتایپ در زاگرس) حاصل شد که هاپلوتایپ‌های البرز با ۳۲ جهش از هاپلوتایپ‌های جمعیت زاگرس جدا شدند. نتایج آماره F_{CT} حاصل از آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) تغییرات معنی‌دار ساختار ژنتیکی در بین جمعیت‌های البرز و زاگرس و آماره F_{ST} تغییرات معنی‌دار در بین کل جمعیت‌ها را نشان داد. وقوع گسترش ناگهانی جمعیت‌های البرز و زاگرس توسط آزمون‌های خنثی‌سازی به‌دست آمد. در نهایت وجود سه درصد فاصله ژنتیکی در بین جمعیت‌های البرز و زاگرس حاکی از وجود سازش‌های محلی توسط این دو زیرگونه است که می‌تواند به‌عنوان واحدهای تکاملی مجزا در طرح‌های حفاظت از تنوع‌زیستی در نظر گرفته شوند.

کلمات کلیدی: کمرکولی جنگلی، تنوع ژنتیکی، جمعیت‌های البرز و زاگرس، نشانگر میتوکندریایی



مقدمه

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 (Mills, ۲۰۱۲؛ McNeely و همکاران، ۱۹۹۰). لیکن عوامل متعددی تهدیدکننده این ویژگی مهم از جمعیت است. یکی از مهم‌ترین مشکلات پرنده‌های درختی کاهش اندازه جمعیت بر اثر فعالیت‌های بشر شامل تغییر کاربری اراضی، قطع درختان کهنسال، چرای بی‌رویه و تخریب زیستگاه است (Strubbe و Matthyssen, ۲۰۰۹؛ Fahrigr, ۲۰۰۲)، به‌طوری‌که با تخریب و تکه‌شدگی زیستگاه جمعیت‌های موجود در آن‌ها به دلیل تغییرات تصادفی ژنتیکی و جمعیت شناختی تحت تاثیر فرسایش درون آمیزی قرار می‌گیرند و به این ترتیب برآزش افراد و در نتیجه بقای جمعیت آن‌ها به شدت کاهش می‌یابد (Zuckerberg و همکاران، ۲۰۱۴). لذا با توجه عوامل ذکر شده بررسی تنوع ژنتیکی برای حفاظت از این گونه امری ضروری و اجتناب ناپذیر است. توسعه نشانگرهای مولکولی نقش به‌سزایی در مطالعات ژنتیک جمعیت ایفا می‌کند (de Queiroz و Ashton, ۲۰۰۱). DNA میتوکندریایی (mtDNA) به‌عنوان یک نشانگر مولکولی در تشخیص گونه‌ها و ترسیم رابطه تکاملی (Phylogenetic) دارای مزایایی از جمله تعداد زیاد نسخه به‌ازای هر سلول (تقریباً ۱۰۰۰ نسخه و بیش‌تر)، اندازه کوچک‌تر از DNA ژنومی، هاپلوئید بودن (وراثت پذیری مادری)، عدم وجود نوترکیبی در آن‌ها و وجود نواحی حفاظت شده است (Colombo و همکاران، ۲۰۰۲). از این‌رو mtDNA نشانگر مناسبی برای تشخیص گروه‌هایی است که برای ۱۰۰ تا ۱۰۰۰۰ سال از هم جدا بوده‌اند. هم‌چنین سرعت بالای تکامل mtDNA در مقایسه با DNA هسته‌ای، باعث شده است که از آن برای مطالعات تکاملی استفاده گردد (Hiendleder و همکاران، ۱۹۹۸). از سوی دیگر برخی از مطالعات ژنتیکی در راسته گنجشک‌شکلان نشان داده است که ND۲ میتوکندریایی دارای تنوع ژنتیکی بالاتری نسبت به چند لوکوسی‌ها (Multilocus یا اینترون‌ها) بوده است (Hung و همکاران، ۲۰۱۲). حتی عملکرد ژن ND۲ در شناسایی گنجشک‌شکلان به‌مراتب بهتر از ژن COI گزارش شده است (Aliabadian و Nouri, ۲۰۱۴).

اولین مطالعه ریخت‌شناسی در مورد کمرکولی جنگلی ایران نشان داد که زیرگونه البرزی (*S. e. rubiginosa*) با پره‌ای تیره‌تر، بال و نوکی بزرگ‌تر از زیرگونه زاگرسی (*S. e. persica*) جدا شده است (Vaurie, ۱۹۵۰). علی‌رغم این‌که مطالعات گسترده‌ای در زمینه ژنتیک جمعیت کمرکولی‌های جنگلی

کمرکولی‌های جنس *Sitta* شامل ۲۷ گونه از خانواده کمرکولیان (Sittidae) و راسته گنجشک‌شکلان (Passeriformes) هستند. که در این میان کمرکولی جنگلی (*Sitta europaea*) با ۱۸ زیرگونه یکی از متمایزترین گونه‌های چندسختی (Polytypic) در این جنس محسوب می‌شود (Clements و همکاران، ۲۰۱۴؛ Kononova و Red'kin, ۲۰۰۶). این گونه مقیم زیستگاه‌های جنگلی پهن‌برگ بوده و در دامنه وسیعی از آسیا تا اروپا (شرق سبیری تا غرب اروپا) پراکنش دارد (Kral, ۲۰۱۰؛ Pravosudov, ۱۹۹۳). کمرکولی جنگلی (*S. europaea*) نسبت به تکه‌شدگی زیستگاه و ساختار پوشش گیاهی بسیار حساس است و در انتخاب زیستگاه به‌طور تخصصی عمل می‌کند (González-Varo و همکاران، ۲۰۰۸؛ Fahrigr, ۲۰۰۲؛ Opdam و همکاران، ۱۹۸۴). این خصوصیات به همراه پراکنش به نسبت وسیع، این پرنده را به‌عنوان یک گونه شاخص تغییرات محیط زیستی معرفی کرده است (González-Varo و همکاران، ۲۰۰۸). لذا چنین گونه‌ای می‌تواند وضعیت سیستم‌های بوم‌شناختی پیچیده را منعکس سازد و اطلاعات مناسبی از آسیب جمعیتی نسبت به تکه‌شدگی زیستگاه فراهم سازد (Baguette و همکاران، ۲۰۱۲؛ Mortelliti و همکاران، ۲۰۱۰؛ Bianconi و همکاران، ۲۰۰۳؛ Matthyssen و همکاران، ۱۹۹۵). هم‌چنین به‌دلیل آن که این گونه نیازهای مکانی سایر گونه‌های درختی را دربرمی‌گیرد، می‌تواند به‌عنوان یک گونه چتر برای پرندگان جنگلی معرفی شود به‌طوری‌که با حفاظت از این گونه سایر پرندگان درختی در چتر حفاظتی آن قرار گیرند (van Langevelde و همکاران، ۲۰۰۰؛ Simberloff, ۱۹۹۸). متأسفانه در ۳۵ سال گذشته تقریباً یک سوم جنگل‌های کشور از بین رفته است و چنان‌چه روند تخریب جنگل‌های کشور با همین سرعت ادامه یابد می‌توان تصور نمود که در ۳۲ الی ۴۲ سال آینده جنگل‌های کنونی نابود خواهند شد (مهاجرمروی، ۱۳۸۴). با توجه به نابودی رو به رشد جنگل‌ها و تکه‌شدگی زیستگاه‌های جنگلی خطر انقراض ناشی از مخاطرات ژنتیکی جمعیت‌های منزوی به‌طور فزاینده‌ای رو به رشد است.

مطالعات ژنتیک جمعیت در دهه‌های اخیر به‌سرعت به‌منظور 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 (Hrbek و همکاران، ۲۰۰۵؛ Frankham و همکاران، ۲۰۰۲؛ Avise, ۱۹۹۶).

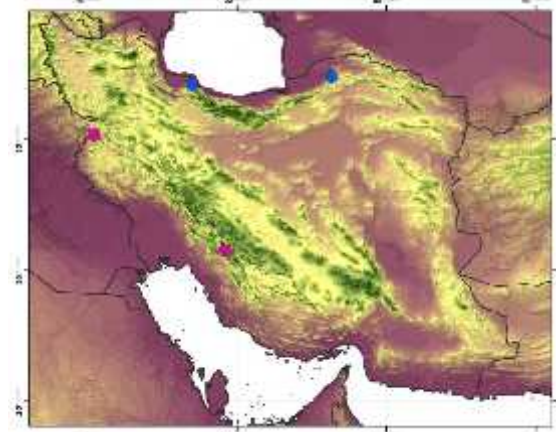
قطعه‌ای به طول ۱۰۴۱ جفت باز استفاده شد. تکثیر جایگاه‌های ژنی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم ۵۰ میکرولیتر (TopTaq Master Mix Kit) و شرایطی شامل یک میکرولیتر DNA، ۱/۲۵ واحد آنزیم تک پلی‌مراز، ۲۰۰ میکرومولار dNTP، یک میکرولیتر $MgCl_2$ ، ۰/۴ میکرومولار مخلوط آغازگر پنج پیکومولار، ۵/۲ میکرولیتر بافر ۱۰X و آب دو بار تقطیر تا رسیدن به حجم ۵۰ میکرولیتر انجام گرفت. چرخه دمایی برای تکثیر توالی کامل ژن ND۲ عبارت بود از ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۵ چرخه، شامل ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه و ۳۰ ثانیه در دمای ۵۸ درجه و یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و بسط نهایی با ۷۲ درجه در پنج دقیقه (Drovetski و همکاران، ۲۰۰۴). به منظور تایید تکثیر ناحیه مورد نظر، الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۲ درصد با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید صورت گرفت. در نهایت محصول PCR با استفاده از دستگاه Applied Biosystems ۳۷۳۰/Bioneer از دستگاه Applied Biosystems ۳۷۳۰ و به روش اتوماتیک سانگر توالی‌یابی گردیدند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: توالی‌های دریافت شده در ابتدا توسط SeqScape نسخه ۲/۶ بررسی و خطاهای موجود اصلاح گردید (Applied Biosystems). سپس با استفاده از نرم‌افزار BioEdit نسخه ۷/۲/۵ و الگوریتم Clustalw توالی‌ها هم‌ردیف شدند (Thompson و همکاران، ۱۹۹۴). برای تعیین فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها، فراوانی بازهای مختلف و تعیین میزان جانیشینی‌های نوع اول و دوم توسط نرم‌افزار MEGA نسخه ۵/۳ و با ۱۰۰۰۰ تکرار انجام گردید (Tamura و همکاران، ۲۰۱۱). تعیین تعداد هاپلوتایپ‌ها، جایگاه‌های چندشکلی با استفاده از نرم‌افزار DNASP ۵/۱۰ برآورد شد (Librado و Rozas، ۲۰۰۹). همچنین از نرم‌افزار Arlequin نسخه ۳/۵ برای تعیین شاخص تنوع ژنتیکی (تنوع هاپلوتایپی و نوکلئوتیدی) در جمعیت‌ها و آزمون‌های خنثی‌سازی (Neutrality tests) مورد استفاده گرفت. تحلیل واریانس مولکولی (AMOVA) با استفاده از این نرم‌افزار و با ۱۰۰۰۰ تکرار به دو نوع گروه‌بندی صورت گرفت (Excoffier و Schneider، ۱۹۹۹). در روش اول همه جمعیت‌های زاگرس و البرز در یک گروه قرار گرفتند و در روش دوم جمعیت‌های البرز و زاگرس به دو گروه مستقل در نظر گرفته شدند. سپس آماره‌های F_{ST} (تغییرات ژنتیکی در میان گروه‌ها)، F_{CT} (تغییرات ژنتیکی در میان جمعیت‌ها) و F_{SC} (تغییرات ژنتیکی در میان جمعیت‌های یک گروه) تعیین شدند (Khalilipour و همکاران، ۲۰۱۴؛ Poulakakis و همکاران، ۲۰۰۸).

جهان صورت گرفته (Hung و همکاران، ۲۰۱۲؛ Zink و همکاران، ۲۰۰۶) ولی فقدان اطلاعات ژنتیکی در جمعیت‌های این گونه کانونی در ایران مشاهده می‌شود. لذا در این مطالعه برخی ویژگی‌های ژنتیکی بین دو زیرگونه *S.e. rubiginosa* در جنگل‌های البرز و *S.e. persica* در جنگل‌های زاگرس با استفاده از توالی کامل ژن ND۲ (۱۰۴۱ bp) مطالعه شده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه: نمونه‌برداری از تعداد ۱۹ فرد با مجوز شماره ۹۴/۶۰۴۹ برای استان‌های گلستان، گیلان، کرمانشاه و کهگیلویه و بویراحمد انجام شد (شکل ۱، جدول ۳). با پخش آواز کمرکلی جنگلی در هر قلمرو، فرد صاحب آن قلمرو به سوی صدا جذب و سپس به وسیله تور نامرئی (Mist net) زنده‌گیری شدند. با استفاده از لوله موئین (micro blood collection tube) به مقدار ۸۰ تا ۱۵۰ میکرولیتر (کم‌تر از یک درصد وزن بدن پرنده) از سیاهرگ زیر بال (Brachial Vein) خون‌گیری شده و در بافر EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid) آزمایشگاه منتقل شد (Owen، ۲۰۱۱). پس از خون‌گیری، نمونه‌ها بلافاصله در محل صید رهاسازی شدند.



شکل ۱: مناطق جمع‌آوری نمونه در جنگل‌های البرز (دایره‌های آبی رنگ) و زاگرس (دایره‌های صورتی رنگ)

استخراج DNA، چرخه PCR و توالی‌یابی: DNA از نمونه‌های خون با استفاده از دستورالعمل کیت بافت و خون کبازن (DNeasy Blood & Tissue Kit) استخراج گردید. در ابتدا از آغاز گرفت L5215; TATCGGGCCCATACCCCGAAAAAT و آغازگر برگشت H1064; CTTTGAAGGCCTTCGGTTTA (Drovetski و همکاران، ۲۰۰۴؛ Hackett، ۱۹۹۶) برای تکثیر

بازهای پورین و پیریمیدین با یکدیگر) در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول ۱: فراوانی نوکلئوتیدهای ژن ND_۲ در کمرکولی جنگلی

فراوانی نوکلئوتید (بر حسب درصد)	نوکلئوتید
۲۱/۲	تیمین
۳۶/۷	سیتوزین
۳۲/۱	ادنین
۱۰/۰	گوانین

جدول ۲: برآورد الگوی جانیشینی نوکلئوتیدی کمرکولی جنگلی

نوکلئوتید	A	T	C	G
A	-	۰/۲۹	۰/۵۱	۱۴/۴۲
T	۰/۴۴	-	۲۳/۲۷	۰/۴۴
C	۰/۴۴	۱۳/۴۶	-	۰/۴۴
G	۴۶/۰۸	۰/۲۹	۰/۵۱	-

اعداد پرنگ نشان‌دهنده نرخ جانیشینی نوع اول و سایر اعداد نشان‌دهنده نرخ جانیشینی نوع دوم هستند.

از ۱۴ هاپلوتایپ مشاهده شده، یک هاپلوتایپ بین جمعیت‌های البرز (گلستان و گیلان) و یک هاپلوتایپ بین جمعیت‌های زاگرس (کرمانشاه و یاسوج) مشترک بود. بنابراین، ۱۲ هاپلوتایپ منحصر به فرد مشاهده شد. بیشترین تنوع هاپلوتایپی و نوکلئوتیدی در جمعیت‌های گلستان و گیلان و کمترین مقدار به ترتیب در کرمانشاه و یاسوج مشاهده گردید. به دلیل تعداد کم نمونه در هر جمعیت تحلیل‌های گسترش جمعیت (Range expansion) براساس تمامی جمعیت‌های البرز (گلستان و گیلان) و زاگرس (کرمانشاه و یاسوج) صورت گرفت. که در این میان جمعیت‌های البرز و زاگرس براساس آماره Fu's Fs مقدار منفی و معنی‌داری را نشان دادند.

برای تعیین بهترین مدل جانیشینی نوکلئوتیدی از نرم‌افزار JModelTest نسخه ۲/۱/۵ استفاده شد (Darriba و Posada, ۲۰۱۴). سپس با توجه به مدل انتخاب شده از نرم‌افزار Phylm نسخه ۳/۱ برای ترسیم درخت حداکثر درست‌نمایی (Maximum Likelihood) (Guindon و Gascuel, ۲۰۰۳) و از نرم‌افزار MrBayes نسخه ۳/۲/۲ برای ترسیم درخت بیزین استفاده شد (Huelsenbeck و Ronquist, ۲۰۰۱). تحلیل‌های بیزین براساس چرخه زنجیره مارکوو (Markov chain Monte Carlo) با ۱۰ میلیون تکرار و فراوانی نمونه (Sample frequency) ۱۰۰ انجام شد. درخت‌های بیزین و حداکثر درست‌نمایی به وسیله برون‌گروه‌های (*Sitta canadensis*, *S. e. arctica* و *S. pygmaea*) (Outgroups) اختصاری ثبت شده در بانک ژن به ترتیب DQ219774.1, DQ219776.1, DQ219777.1, EF108553.1. در نهایت درخت‌های ترسیم شده به وسیله قانون اکثریت (Majority-rule) یک پارچه (Consensus) شدند. برای بررسی ارتباط بین هاپلوتایپ‌ها و ترسیم شبکه هاپلوتایپی از منطق اتصال میانه و نرم‌افزار Network نسخه ۶/۴/۱ استفاده شد (Bandelt و همکاران, ۱۹۹۹).

نتایج

تحلیل داده‌ها با استفاده از توالی ۱۰۴۱ جفت باز ژن ND2 نشان داد که ۹۹۹ جایگاه حفاظت‌شده و ۴۲ جایگاه چندشکلی (Polymorphic site) بوده که شامل ۳۳ جایگاه حاوی اطلاعات پارسیمونی (Parsimony informative site) و ۹ جایگاه تک متغیر (Singleton variable site) بوده است. فراوانی هر کدام از نوکلئوتیدها مطابق جدول ۱ برآورد گردید. سیتوزین (۳۶/۷ درصد) و گوانین (۱۰ درصد) به ترتیب بیشترین و کم‌ترین فراوانی نوکلئوتیدها تشکیل دادند. میزان جانیشینی نوع اول (جانیشینی بازهای پورین A-G با یکدیگر و جانیشینی بازهای پیریمیدین C-T با یکدیگر) و جانیشینی نوع دوم (جانیشینی

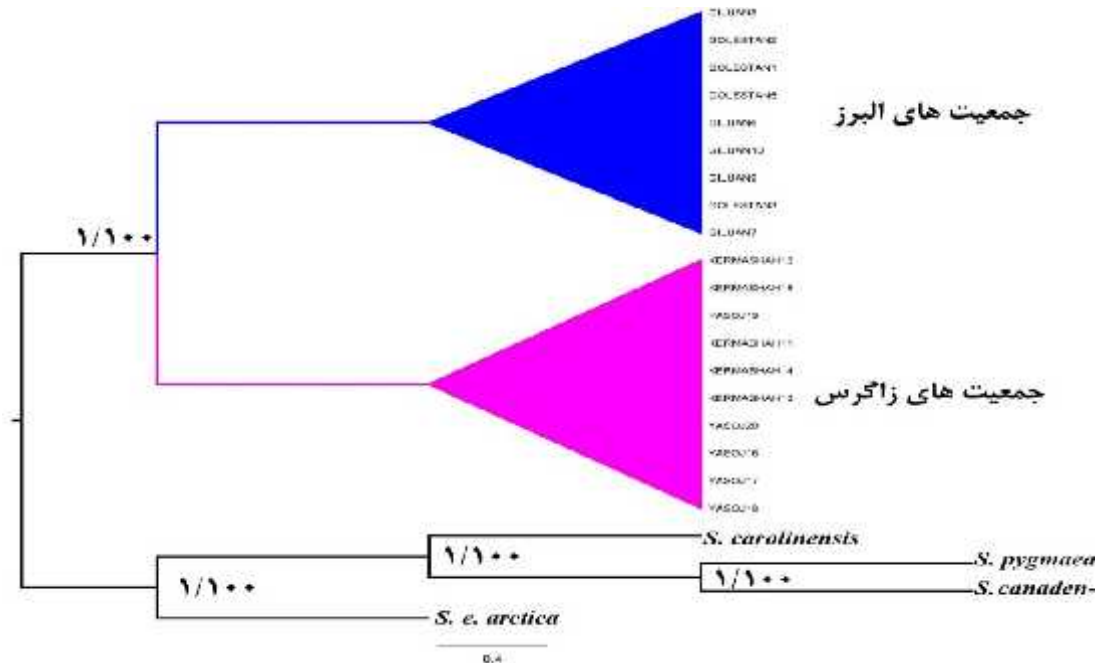
جدول ۳: ویژگی‌ها و تعداد نمونه‌های جمع‌آوری شده از هر جمعیت، شاخص‌های تنوع ژنتیکی (تنوع نوکلئوتیدی Pi، تنوع هاپلوتایپی Hd به SD انحراف معیار) و آزمون‌های تحلیل گسترش جمعیت‌های گونه (Fu' Fs و Tajima's D)

نمونه‌برداری	مختصات جغرافیایی	زیرگونه	N	h	Hd (SD)	Pi (SD)	Tajima's D	Fu' Fs
گلستان	۳۷°۲۵' / ۵۵°۵۱'	<i>rubiginosa</i>	۴	۴	۱(۰/۱۷)	۰/۰۰۱۹ (۰/۰۰۰۵)	-۱/۷۹*	-۶/۴۳*
گیلان	۳۷° ۳' / ۵۰° ۸'	<i>rubiginosa</i>	۵	۵	۱(۰/۱۲)	۰/۰۰۱۵ (۰/۰۰۰۳)	p<۰/۰۵	p<۰/۰۵
یاسوج	۳۰°۴۶' / ۵۱°۳۰'	<i>persica</i>	۵	۳	۰/۷(۰/۲۲)	۰/۰۰۰۸(۰/۰۰۰۳)	-۱/۵۶	-۱/۹۶*
کرمانشاه	۳۵°۱۰' / ۴۶°۱۲'	<i>persica</i>	۵	۲	۰/۴(۰/۲۴)	۰/۰۰۰۴(۰/۰۰۰۳)	۰/۱۰ > p > ۰/۰۵	p<۰/۰۵

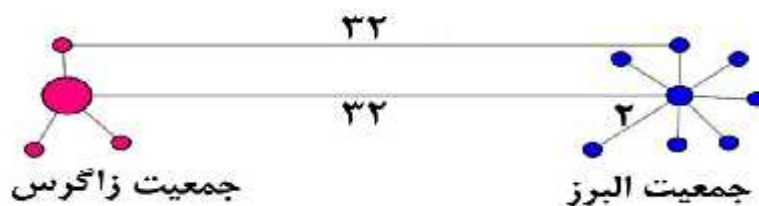


داد که جمعیت‌های البرز از جمعیت‌های زاگرس با احتمال پسین (posterior probability) برابر یک و بوت استرپ ۱۰۰٪ از یکدیگر جدا شدند (شکل ۲). همچنین، نتایج تحلیل شبکه هاپلوتایپی جدایی نمونه‌های البرز از زاگرس را تایید نموده و نشان داد که این دو هاپلوگروپ با ۳۲ جهش از یکدیگر جدا می‌شوند (شکل ۳).

آزمون معیارهای اطلاعات بیزین (BIC=Bayesian information criterion) و اطلاعات آکایکه (Akaike) نشان داد که مدل TRN+ ۰/۶۹۲ (AIC=information criterion) بهترین مدل تکاملی نوکلئوتیدی برای توالی‌های مورد نظر شناسایی شد. توپولوژی درخت‌های تبارشناسی بیزین و حداکثر درست‌نمایی بر مبنای مدل تکاملی انتخاب شده نشان



شکل ۲: درخت تبارشناسی کمرکولی جنگلی با استفاده از دو روش بیزین و حداکثر درست‌نمایی (توپولوژی یکسان) اعداد سمت چپ نمایانگر احتمال پسین حاصل از درخت بیزین و اعداد سمت راست مربوط به شاخص بوت استرپ حاصل از روش حداکثر درست‌نمایی



شکل ۳: شبکه هاپلوتایپی کمرکولی جنگلی با استفاده از منطق اتصال میانه

اعداد نمایگر تعداد جهش رخ داده در بین هاپلوتایپ‌ها بوده است

جدول ۴ نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی را نشان می‌دهد. این نتایج حاکی از آن است که اگر همه جمعیت‌ها یک گروه در نظر گرفته شود، ۹۵/۰۸ درصد واریانس تغییرات ساختار ژنتیکی مربوط به بین گروه‌ها و ۴/۹۲ درصد واریانس توجیحی مربوط به درون گروه‌ها است. همچنین اگر جمعیت‌های البرز و زاگرس در گروه مجزا طبقه‌بندی شوند، تغییرات ساختار ژنتیکی در بین این دو گروه مختلف ۹۶/۶۳، تغییرات در داخل

جمعیت‌های هر گروه ۰/۰۴ و تغییرات درون جمعیتی ۳/۳۳ درصد است. آماره F (F_{CT} و F_{ST}) در دو نوع گروه‌بندی در سطح خطای ۰/۰۰۱ معنی‌داری شدند (به جز آماره F_{SC} که مربوط به فاصله ژنتیکی در بین جمعیت‌های هر گروه است). بیش‌ترین میانگین فاصله ژنتیکی در بین جمعیت‌های البرز با زاگرس ۰/۰۳۳±۰/۰۰۶ محاسبه شد، درحالی‌که کم‌ترین فاصله در بین جمعیت‌های کرمانشاه با یاسوج مشاهده گردید (جدول ۵).



جدول ۴: تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) در بین جمعیت‌های کمرکولی جنگلی

منابع تغییر	f.d.	مجموع مربعات	درصد واریانس	آماره F
بین جمعیت‌های مختلف	۳	۱۵۹/۷۰	۹۵/۰۸	$F_{ST}=0/95$
درون جمعیت‌ها	۱۵	۸/۶۲	۴/۹۲	
کل	۱۸	۱۶۸/۳۲		
بین گروه‌های مختلف	۱	۱۵۸/۴۹	۹۶/۶۳	$F_{CT}=0/96$
بین جمعیت‌های داخل یک گروه‌ها	۲	۱/۲۱	۰/۰۴	$F_{SC}=0/01$
بین افراد درون یک جمعیت	۱۵	۸/۶۲	۳/۳۳	$F_{ST}=0/96$
کل	۱۸	۱۶۸/۳۲		

جدول ۵: فاصله ژنتیکی در بین ۴ جمعیت کمرکولی جنگلی در زاگرس و البرز

جمعیت	یاسوج	کرمانشاه	گلستان	گیلان
یاسوج		۰/۰۰۰	۰/۰۰۶	۰/۰۰۶
کرمانشاه	۰/۰۰۱		۰/۰۰۶	۰/۰۰۶
گلستان	۰/۰۳۳	۰/۰۳۳		۰/۰۰۱
گیلان	۰/۰۳۳	۰/۰۳۳	۰/۰۰۲	

بحث

می‌توان با احتمال زیاد وقوع یک گسترش ناگهانی در جمعیت‌های البرز را استنباط نمود. این درحالی است که مقادیر شاخص Tajima's D هم منفی (ولی نه معنی‌دار) به دست آمد. از آن جایی که آزمون Fs نسبت به سایر آزمون‌ها توان بیشتری در تعیین گسترش ناگهانی جمعیت دارد (Ramírez-Soriano و همکاران، ۲۰۰۸؛ Ramos-Onsins و Rozas، ۲۰۰۲)، در نتیجه می‌توان وقوع گسترش ناگهانی در جمعیت‌های زاگرس و البرز را تفسیر نمود. Zink و همکاران (۲۰۰۶) با استفاده از ژن ND₂ به بررسی آزمون خنثی‌سازی در ۲۲ جمعیت جوجه‌آور کمرکولی جنگلی در اوراسیا پرداختند، نتایج این مطالعه نشان داد که مقادیر شاخص Tajima's D و Fu's Fs برای جمعیت‌های آسیا منفی و معنی‌دار شدند درحالی‌که این مقادیر برای جمعیت اروپا معنی‌دار نبود. لذا از آن جایی‌که جمعیت‌های کمرکولی جنگلی ایران در محدوده پراکنش جمعیت‌های آسیایی است، می‌توان وقوع چنین گسترش جمعیتی را همسویی با مطالعه حاضر دانست.

از سوی دیگر Harrp و Quina (۱۹۹۵) کمرکولی‌های جنگلی اوراسیا را براساس صفات ریخت‌شناختی به سه دسته شامل *caesia* (زیر تنه نخودی و زیر گلو سفید)، *europaea* (زیر تنه سفید) و *sinensis* (زیر تنه و گلو زرد) تقسیم کردند. بر مبنای این طبقه‌بندی، کمرکولی‌های جنگلی البرز و زاگرس در گروه *caesia* جای گرفتند. با این وجود مطالعه حاضر براساس ژن ND_۲ نشان داد که درخت‌های تبارشناسی بیزین و حداکثر درست‌نمایی جمعیت‌های کمرکولی جنگلی در البرز و زاگرس را

این مطالعه با توالی‌یابی کامل ژن ND₂ میتوکندری و بر اساس جایگاه‌های تغییرپذیر (۴۲ جایگاه) نشان داد که کمرکولی جنگلی جنگل‌های نیم‌رخ شمالی البرز نسبت به کمرکولی جنگلی جنگل‌های بلوط زاگرس دارای تنوع هاپلوتایپی و نوکلئوتیدی بیشتری است. هم‌چنین، تنوع هاپلوتایپی بالا همراه با تنوع نوکلئوتیدی پایین در جمعیت‌های البرز و زاگرس می‌تواند دلیلی بر گسترش سریع جمعیت باشد (Avisé، ۲۰۰۰). تحلیل شبکه هاپلوتایپی مربوط به جمعیت‌های البرز نیز با ساختار ستاره‌ای شکل خود وجود چنین شرایطی را تأیید می‌نماید. حتی این ساختار ستاره‌ای شکل تا حد زیادی در جمعیت‌های زاگرس هم مشاهده می‌شود. مشاهده چنین ساختاری می‌تواند نتیجه‌ای از گسترش ناگهانی جمعیت‌ها باشد (Khalilipour و همکاران، ۲۰۱۴؛ Yu و همکاران، ۲۰۱۲). هم‌چنین استفاده از شاخص‌های آزمون خنثی‌سازی یک روش مطمئن برای تصمیم‌گیری در مورد بروز یا عدم بروز گسترش ناگهانی جمعیت‌ها معرفی شده است (Wang و همکاران، ۲۰۰۹؛ Milá و همکاران، ۲۰۰۷). به این ترتیب که اگر مقادیر شاخص‌های Fu's Fs و یا Tajima's D منفی و معنی‌دار شوند، می‌توان به وقوع یک گسترش ناگهانی در جمعیت تعبیر شود (Fu، ۱۹۹۷؛ Tajima، ۱۹۸۹). بر این اساس، نتایج این مطالعه نشان داد که شاخص Fu's Fs و Tajima's D برای جمعیت‌های البرز و زاگرس منفی و معنی‌دار بوده و لذا

4. **Avise, J.C., 2000.** Phylogeography: the history and formation of species: Harvard university press.
5. **Baguette, M.; Legrand, D.; Fréville, H.; Van Dyck, H.; Ducatez, S.; Clobert, J.; Baguette, M.; Benton, T. and Bullock, J., 2012.** Evolutionary ecology of dispersal in fragmented landscape. *Dispersal ecology and evolution*. pp: 381-391.
6. **Bandelt, H.J.; Forster, P. and Röhl, A., 1999.** Median joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. Vol. 16, pp: 37-48.
7. **Bianconi, R.; Battisti, C. and Zapparoli, M., 2003.** Pattern of richness, abundance and diversity of four interior bird species in a hilly landscape in Central Italy: a contribution to assess their sensitivity to habitat fragmentation. *J. of Mediterranean Ecology*. Vol. 4, pp: 37-44
8. **Clements, J.; Schulenberg, T.; Iliff, M.; Robertson, D.; Fredericks, T.; Sullivan, B. and Wood, C., 2014.** The eBird/Clements checklist of birds of the world: Version 6.9. Available at <http://www.birds.cornell.edu/clements-checklist/downloadable-clements-checklist>.
9. **Colombo, F.; Marchisio, E.; Pizzini, A. and Cantoni, C., 2002.** Identification of the goose species (*Anser anser*) in Italian "Mortara" salami by DNA sequencing and a Polymerase Chain Reaction with an original primer pair. *Meat Science*. Vol. 61, pp: 291-294.
10. **Darriba, D. and Posada, D., 2014.** J Model Test 2.0 Manual v 0. 1.1 .
11. **Drovetski, S.V.; Zink, R.M.; Fadeev, I.V.; Nesterov, E.A.; Koblik, E.A.; Red'kin, Y. and Rohwer, S., 2004.** Mitochondrial phylogeny of *Locustella* and related genera. *Journal of Avian Biology*. Vol. 35, pp: 105-110.
12. **Excoffier, L. and Schneider, S., 1999.** Why hunter gatherer populations do not show signs of Pleistocene demographic expansions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 96, pp: 10597-10602.
13. **Fahrig, L., 2002.** Effect of habitat fragmentation on the extinction thres hold: asynthesis. *Ecological applications*. Vol. 12, pp: 346-353.
14. **Frankham, R.; Briscoe, D.A. and Ballou, J.D., 2002.** Introduction to conservation genetics: Cambridge University Press.
15. **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.
16. **González-Varo, J.P.; López-Bao, J.V. and Guitián, J., 2008.** Presence and abundance of the Eurasian nuthatch *Sitta europaea* in relation to the size, isolation and the intensity of management of chestnut woodlands in the NW Iberian Peninsula. *Landscape Ecology*. Vol. 23, pp: 79-89.
17. **Guindon, S. and Gascuel, O., 2003.** A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*. Vol. 52, pp: 696-704.
18. **Hackett, S.J., 1996.** Molecular phylogenetics and biogeography of tanagers in the genus *Ramphocelus* (Aves). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Vol. 5, pp: 368-382.
19. **Harrap, S. and Quinn, D., 1995.** Chickadees, tits, nuthatches & treecreepers: Princeton University Press Princeton, New Jersey.
20. **Hiendleder, S.; Lewalski, H.; Wassmuth, R. and Janke, A., 1998.** The complete mitochondrial DNA sequence of the domestic sheep (*Ovis aries*) and comparison with the other major ovine haplotype. *Journal of Molecular Evolution*. Vol. 47, pp: 441-448.
21. **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

به ترتیب با احتمال پسین و بوت استرپ بالای (۱۰۰/۱) از یکدیگر جدا کردند. هم‌چنین شبکه هاپلوتایپی با ۳۲ جهش جدایی این دو جمعیت را تایید می‌کند و آنالیز واریانس مولکولی تغییرات واریانس ساختار ژنتیکی بین این دو جمعیت را تا ۹۶/۶۳ درصد از کل تغییرات ژنتیکی تخمین زد که در نتیجه آماره F_{CT} به‌طور معنی‌داری از نظر ساختار ژنتیکی جمعیت‌های البرز از زاگرس را جدا نمود. به این ترتیب می‌توان تفکیک کمرکلی جنگلی جنگل‌های نیم‌رخ شمالی البرز از کمرکلی جنگلی جنگل‌های بلوط زاگرس را تایید نمود. Hung و همکاران (۲۰۱۲) با استفاده از توالی ژن ND_۲ و قطعات اینترون‌های هسته‌ای به بررسی ۱۳۶ فرد از کمرکولی جنگلی در ارواسیا پرداختند. نتایج آن مطالعه نشان داد که تمامی نمونه‌ها در سه گروه با فاصله ژنتیکی دو درصد از یکدیگر متمایز شدند و در نتیجه این ۳ گروه را به‌عنوان گونه‌های تکامل‌نژادی (Phylogenetic species) معرفی نمود. فاصله ژنتیکی در پژوهش حاضر نشان داد که جمعیت‌های البرز به‌طور متوسط با سه درصد اختلاف توالی نوکلئوتیدی در حال واگرایی از جمعیت‌های زاگرس هستند. بدین ترتیب می‌توان کمرکولی جنگلی ایران را به دو گروه گونه تکامل‌نژادی در جنگل‌های نیم‌رخ شمالی البرز و جنگل‌های بلوط زاگرس طبقه‌بندی نمود.

به‌طور کلی زیرگونه‌ها در صورتی که نشان‌دهنده واحدهای تکاملی باشند می‌توانند در استراتژی‌های حفاظت نقش موثری را ایفا کنند چرا که شاخصی از سازش محلی گونه با زیستگاه به حساب می‌آیند (Zink, ۲۰۰۴). در واقع این نوع از سازگاری‌ها، باعث بقای طولانی مدت گونه در هنگام گسترش در زیستگاه‌های مختلف است. در مجموع نتایج این مطالعه نشان داد که کمرکولی جنگلی به‌عنوان یک گونه کانونی دارای دو واحد تکاملی مجزا در جنگل‌های زاگرس و البرز است که بایستی به‌طور جداگانه در جهت افزایش واگرایی سازشی این گونه در جنگل‌های پهن برگ ایران تحت مدیریت قرار بگیرند.

منابع

۱. **مروی مهاجر، م.، ۱۳۸۴.** جنگل‌شناسی و پرورش جنگل. انتشارات دانشگاه تهران. ۵۴ صفحه.
2. **Ashton, K.G. and de Queiroz, A., 2001.** Molecular systematics of the western rattlesnake, *Crotalus viridis* (Viperidae), with comments on the utility of the D-loop in phylogenetic studies of snakes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Vol. 21, pp: 176-189.
3. **Avise, J.C., 1996.** Introduction: the scope of conservation genetics. In *Conservation genetics*. Springer US. pp: 1-9.



- analysis of neutrality tests under demographic expansions, contractions and bottlenecks with recombination. *Genetics*. Vol. 179, No. 1, pp: 555-567.
38. Ramos-Onsins, S.E. and Rozas, J., 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution*. Vol. 19, pp: 2092-2100.
 39. Red'kin, Y. and Konovalova, M., 2006. Systematic notes on Asian birds. 63. The eastern Asiatic races of *Sitta europaea* Linnaeus, 1758. *Zoologische Mededelingen*. pp: 261-241.
 40. Simberloff, D., 1998. Flagships, umbrellas, and keystones: is single-species management passé in the landscape era? *Biological Conservation*. Vol. 83, pp: 247-257.
 41. Strubbe, D. and Matthysen, E., 2009. Experimental evidence for nest-site competition between invasive ring-necked parakeets (*Psittacula krameri*) and native nuthatches (*Sitta europaea*). *Biological Conservation*. Vol. 142, pp: 1588-1594.
 42. 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, pp: 2731-2739.
 43. Tajima, F., 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, Vol. 123, No. 3, pp: 585-595.
 44. Thompson, J.D.; Higgins, D.G. and Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. Vol. 22, pp: 4673-4680.
 45. Van Langevelde, F.; Schotman, A.; Claassen, F. and Sparenburg, G., 2000. Competing land use in the reserve site selection problem. *Landscape Ecology*. Vol. 15, pp: 243-256.
 46. Vaurie, C., 1950. Notes on some asiatic nuthatches and creepers. *The American Museum of Natural history city of newyork*. pp: 1-10.
 47. Wang, L.Y.; Ikeda, H.; Liu, T.L.; Wang, Y.J. and Liu, J.Q., 2009. Repeated range expansion and glacial endurance of *Potentilla glabra* in the Qinghai Tibetan Plateau. *J. of Integrative Plant Biology*. Vol. 51, pp: 698-706.
 48. Yu, F.; Li, S.; Kilpatrick, W.C.; McGuire, P.M.; He, K. and Wei, W., 2012. Biogeographical study of plateau pikas *Ochotona curzoniae* (Lagomorpha, Ochotonidae). *Zoological Science*. Vol. 29, pp: 518-526.
 49. Zink, R.M., 2004. The role of subspecies in obscuring avian biological diversity and misleading conservation policy. *Proceedings of the Royal Society of London B : Biological Sciences*. Vol. 271, pp: 561-564.
 50. Zink, R.M.; Drovetski, S.V. and Rohwer, S., 2006. Selective neutrality of mitochondrial ND2 sequences, phylogeography and species limits in *Sitta europaea*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Vol. 40, pp: 679-686.
 51. Zuckerberg, B.; Carling, M.; Dor, R.; Ferree, E.; Spellman, G. and Townsend, A., 2014. Differential relationships between habitat fragmentation and within population genetic diversity of three forest-dwelling birds. *bioRxiv* 004903.
 - Amazon basin: implications for its conservation. *Animal Conservation*. Vol. 8, pp: 297-308.
 22. Huelsenbeck, J.P. and Ronquist, F., 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*. Vol. 17, pp: 754-755.
 23. Hung, C.M.; Drovetski, S.V. and Zink, R.M., 2012. Muti locus coalea sence analyses support a mtDNA-based phylogeographic history for a wide spread palearctic passerine bird, *Sitta europaea*. *Evolution, Sitta europaea*. Vol. 66, pp: 2850-2864.
 24. Khalilipour, O.; Rezaei, H.R.; Alizadeh Shabani, A.; Kaboli, M. and Ashrafi, S., 2014. Genetic structure and differentiation of four populations of Afghan Pika (*Ochotona rufescens*) in Iran based on mitochondrial cytochrome b gene. *Zoology in the Middle East*. Vol. 60, pp: 288-298.
 25. Král, M., 2010. Hnízdni biologie a dlouhodobé fenologické trendy u brhlíka lesního (*Sitta europaea*) v nízkém Jeseníku Breeding biology and long-term phenological trends in the Eurasian Nuthatch (*sitta europaea*) v Nízkém Jeseníku. *Sylvia*. Vol. 46, pp: 41-52.
 26. Librado, P. and Rozas, J., 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. Vol. 25, pp: 1451-1452.
 27. Matthysen, E.; Adriaensen, F. and Dhondt, A.A., 1995. Dispersal distances of nuthatches, *Sitta europaea*, in a highly fragmented forest habitat. *Oikos*. pp: 375-381.
 28. 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.
 29. Milá, B.; McCormack, J.E.; Castañeda, G.; Wayne, R.K. and Smith, T.B., 2007. Recent postglacial range expansion drives the rapid diversification of a songbird lineage in the genus *Junco*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. Vol. 274, pp: 2653-2660.
 30. Mills, L.S., 2012. Conservation of wildlife populations: demography, genetics, and management: John Wiley & Sons. Ltd., West Sussex, UK.
 31. Mortelliti, A.; Fagiani, S.; Battisti, C.; Capizzi, D. and Boitani, L., 2010. Independent effects of habitat loss, habitat fragmentation and structural connectivity on forest dependent birds. *Diversity and distributions*. Vol. 16, pp: 941-951.
 32. Nouri, S. and Aliabadian, M., 2014. Performance of two mitochondrial genes, ND2 and COI to identify Passerine birds of Khorasan Province. In 18th National and 6th International Congress of Biology in Iran.
 33. Opdam, P.; van Dorp, D. and Ter Braak, D., 1984. The effect of isolation on the number of woodland birds in small woods in the Netherlands. *J. of Biogeography*. pp: 473-478.
 34. Owen, J.C., 2011. Collecting, processing, and storing avian blood: a review. *J. of Field Ornithology*. Vol. 82, pp: 339-354.
 35. Poulakakis, N.; Antoniou, A.; Mantziou, G.; Parmakelis, A.; Skartsis, T.; Vasilakis, D.; Elorriaga, J.; De La Puente, J.; Gavashelishvili, A. and Ghasabyan, M., 2008. Population structure, diversity, and phylogeography in the near-threatened Eurasian black vultures *Aegypius monachus* (Falconiformes; Accipitridae) in Europe: insights from microsatellite and mitochondrial DNA variation. *Biological J. of the Linnean Society*. Vol. 95, pp: 859-872.
 36. Pravosudov, V.V., 1993. Breeding biology of the Eurasian Nuthatch in northeastern Siberia. *The Wilson Bulletin*. pp: 475-482.
 37. Ramirez-Soriano, A.; Ramos-Onsins, S.E.; Rozas, J.; Calafell, F. and Navarro, A., 2008. Statistical power

