

تنوع ژنتیکی پایین پلنگ ایرانی (*Panthera pardus saxicolor*) بر اساس ژنوم NADH5 میتوکندری

محمدصادق فرهادی نیا^۱، سهراب اشرفی^{۱*}، حمید فرحمنند^۲، محمدرضا اشرف زاده^۳ و محمد کابلی^۱

۱- گروه محیط زیست دانشکده منابع طبیعی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

۲- گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

۳- گروه شیلات و محیط زیست دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین، دانشگاه شهرکرد

(تاریخ دریافت ۹۵/۱۰/۰۹-تاریخ پذیرش ۹۶/۰۷/۱۹)

چکیده:

بررسی جایگاه تبارشناختی و تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها از اهمیت به‌سزایی در مدیریت و حفاظت از حیات وحش برخوردار است. در این میان، گونه‌های در معرض خطر انقراض که دارای جمعیت‌های لکه‌ای و کوچک هستند از اولویت‌های حفاظتی ویژه در هر کشور به‌شمار می‌روند. در این پژوهش، تبارشناسی و تنوع ژنتیکی پلنگ ایرانی در سرتاسر کشور مورد بررسی قرار گرفته است. به این منظور، ۵۵۰ جفت باز از ژنوم میتوکندری (متعلق به ژن NADH5) مربوط به ۳۹ نمونه بافت از پلنگ‌های مناطق مختلف کشور با استفاده از دو جفت آغازگر توالی‌یابی شد. بر اساس یافته‌ها، سه هاپلوتایپ در میان نمونه‌های ایران مشاهده شد، که یک هاپلوتایپ به‌طور عمومی در سراسر کشور پراکنش دارد و دو هاپلوتایپ دیگر به‌گستره‌های جغرافیایی کوچکی در شمال (استان گلستان) و غرب (استان فارس) محدود هستند. نتایج نشان می‌دهد که پلنگ ایرانی در سرتاسر کشور ایران و حتی تمامی گستره پراکنش آن در مرکز و غرب آسیا دارای تنوع و تغییرپذیری ژنتیکی پایینی در ژن موردبررسی است. علاوه بر این، به نظر می‌رسد که پلنگ ایرانی در مقایسه با سایر زیرگونه‌های پلنگ در جهان یا سایر گوشتخواران بزرگ جثه، از تنوع هاپلوتایپی پایین‌تری برخوردار است. نتایج این مطالعه نشان‌دهنده اهمیت و ضرورت ارتقای سطح حفاظت در حوزه پراکنش هاپلوتایپ اختصاصی در استان فارس به‌منظور پیشگیری از انقراض آن است.

کلید واژگان: پلنگ ایرانی، تبارشناسی، NADH5، تنوع ژنتیکی، *Panthera pardus saxicolor*

۱. مقدمه

پراکنش زیرگونه پلنگ ایرانی مانع جغرافیایی قابل توجهی وجود ندارد، که تمایزهای ریخت شناختی را بین جمعیت های ساکن در این گستره منجر شود. لازم به ذکر است، از آنجایی که تقریباً تمامی نمونه های استفاده شده توسط Uphyrkina و همکاران متعلق به پلنگ های در اسارت بوده و احتمال هیبرید شدن با سایر زیرگونه ها وجود دارد بنابراین به منظور کسب اطمینان بیشتر در مورد برخی یافته های آنها بررسی های بیشتری مورد نیاز است.

Khorozyan و همکاران (۲۰۰۶)، با استفاده از بررسی های ریخت سنجی جمجمه ای، این نظریه که تمامی جمعیت های غرب آسیا به استثنای شبه جزیره عربستان به زیرگونه *P. p. saxicolor* تعلق دارند را رد کردند و به طور کلی دو زیرگونه را برای شمال ایران، ترکمنستان و حوزه قفقاز (*P. p. ciscaucasica*) و جنوب ایران و پاکستان (*P. p. sindica*) پیشنهاد دادند (Khorozyan et al., 2006). در پژوهشی دیگر، با استفاده از تحلیل مورفوژنتیک نمونه های متعلق به سرتاسر ایران نظریه مذکور مردود شده و حضور یک دودمان تک تباری در پلنگ های ایرانی مورد تأیید قرار گرفت (Farhadinia et al., 2015).

یکی از مشکلات جدی در پژوهش های گذشته، کمبود نمونه ها، عدم نمایندگی نمونه های موجود از سرتاسر حوزه انتشار آرایه و همچنین عدم اطمینان در خصوص خلوص نمونه ها و عدم هیبرید شدن آنها بوده است. از همین رو، به منظور تبیین دقیق تر تنوع ژنتیکی و تبارشناسی پلنگ ها در غرب آسیا، پژوهشگران مختلفی تلاش کرده اند با نمونه برداری

پلنگ (*Panthera pardus*) گسترده ترین پراکنش را در میان گربه سانان در سراسر دنیا دارد (Nowell & Jackson, 1996). در غرب آسیا، زیرگونه پلنگ ایرانی با نام علمی *P. p. saxicolor* حضور دارد که از افغانستان و پاکستان تا ایران، قفقاز، ترکیه و عراق پراکنده است (Jacobson et al., 2016). کشور ایران به عنوان عمده ترین حوزه پراکنش پلنگ ایرانی در سطح جهان شناخته می شود (Jacobson et al., 2016).

گستره وسیع پراکنش پلنگ در جهان همراه با الگوهای متنوع رنگ آمیزی بدن و ویژگی های ریخت شناختی و ریخت سنجی آن در مناطق مختلف منجر شد که در رده بندی اولیه این گونه توسط Pocock (۱۹۳۰) تعداد ۲۷ زیرگونه توصیف شود. در سال ۱۹۹۶، Miththapala و همکاران با استفاده از تحلیل های مولکولی هشت زیرگونه را برای تمامی پلنگ ها شناسایی نمودند و پلنگ های مرکز آسیا را با عنوان پلنگ ایرانی (*P. p. saxicolor*) معرفی کردند. در سال ۲۰۰۱، Uphyrkina و همکارانش با استفاده از نشانگرهای میتوکندریایی و ریزماهوره ها، پلنگ های غرب و مرکز آسیا در دو زیرگونه *P. p. nimr* و *P. p. saxicolor* قرار دادند. بنابراین، تعداد نه زیرگونه برای پلنگ در سرتاسر محدوده پراکنش آن شناسایی شد. بر اساس نظر Uphyrkina و همکارانش (۲۰۰۱) تمامی پلنگ های خاورمیانه، به جز پلنگ عربی *P. p. nimr* باید در زیرگونه *P. p. saxicolor* طبقه بندی گردند. آنها یادآور شدند که در سرتاسر گستره

کامل تر، یافته های خود را در این زمینه ارائه کنند. در گذشته سه هاپلوتایپ SAX1، SAX2 و SIN در محدوده انتشار پلنگ ایرانی در غرب آسیا شناسایی شده است (Uphyrkina *et al.*, 2001). در پژوهشی دیگر با استفاده از ۲۴ نمونه از غرب آسیا، هاپلوتایپ های af1، ir2 و az2/k1 معرفی شدند که همان هاپلوتایپ SAX2 بود که قبلاً ثبت شده بود (Rozhnov *et al.*, 2011). اخیراً، با استفاده از ژن NADH5 در ژنوم میتوکندری، سه هاپلوتایپ در میان ۲۵ پلنگ از سرتاسر ایران شناسایی شد که با نامهای IRAN1، IRAN2 و IRAN3 توصیف شدند و غیر از IRAN3، دو هاپلوتایپ دیگر در پژوهش های پیشین گزارش شده بودند (Farhadinia *et al.*, 2015). به این ترتیب تاکنون شش هاپلوتایپ منحصر به فرد در سرتاسر گستره انتشار پلنگ های ایرانی در غرب آسیا (۵۰ نمونه پلنگ وحشی و نه پلنگ در اسارت) شناسایی شده است. از این تعداد هاپلوتایپ، یک هاپلوتایپ فقط در داخل پلنگ های در اسارت گزارش شده است (SAX1)، یک هاپلوتایپ تنها در یک فرد از افغانستان معرفی شده است (SIN) و دو هاپلوتایپ فقط در ایران ثبت شده اند. همچنین، یک هاپلوتایپ پراکنش نسبتاً گسترده تری داشته و در پلنگ های وحشی ایران، آذربایجان و ترکمنستان شناسایی شده است. ششمین هاپلوتایپ (af1) در پلنگ های افغانستان و ارمنستان گزارش شده است (Rozhnov *et al.*, 2011)، که عدم حضور آن در ایران که در میان این دو کشور است، به طور شگفت آوری بحث برانگیز است.

بخش عمده ژنوم میتوکندریایی مهره داران به

شدت درون و میان گونه ها حفاظت شده و بین ۱۴ تا ۱۷ هزار باز طول دارد. در مقایسه با سایر ژنهای میتوکندریایی، برآورد شده که ژنهای 16S rRNA و NADH5 به ترتیب با نرخ ۰/۵۶٪ جفت باز اشتقاق و ۰/۷۱٪ جفت باز اشتقاق در میلیون سال تکامل می یابند (Lopez *et al.*, 1997). ژنهای 16S rRNA و NADH5 ظاهراً برای بررسی اشتقاق های اخیر (۲ تا ۵ میلیون سال پیش) بیشترین کارایی را دارند، ولی قادر به حل روابط اجدادی (مربوط به ۶ تا ۱۲ میلیون سال پیش) نیستند (Uphyrkina *et al.*, 2001).

بر اساس پژوهش های گذشته، ژن NADH5 از نرخ جهش به نسبت زیادی در میان گوشتخواران برخوردار بوده و از سال ۱۹۹۷ توسط جانسون و اوبراین برای رده بندی و بررسی تبارشناسی گربه سانان به کار رفته است (Lopez *et al.*, 1997). از این رو، به منظور امکان بررسی کامل تنوع میان پلنگ های ایران و همچنین قابل قیاس بودن نتایج با پژوهش های دیگر، ژن NADH5 انتخاب گردید تا تصویری کامل تر را مبتنی بر نمونه های بیشتر در زمینه تنوع ژنتیکی پلنگ ها، به ویژه در ایران در اختیار پژوهشگران قرار می دهد. هدف از پژوهش حاضر، بررسی تنوع ژنتیکی و روابط تبارشناختی بین پلنگ های ایرانی و سایر پلنگ ها با استفاده از تحلیل توالی ژن NADH5 در ژنوم میتوکندری است. نتایج این پژوهش علاوه بر تدقیق بیشتر سیستماتیک پلنگ ایرانی، می تواند به تعریف اولویت های حفاظتی و تحقیقاتی برای ارتقای وضعیت پلنگ ایرانی در ایران و غرب آسیا کمک نماید.

۲. مواد و روش ها

۲.۱. گردآوری نمونه ها

تعداد ۱۴ نمونه پلنگ از گستره پراکنش این گونه در سراسر کشور گردآوری شد. نمونه برداری برای انجام این پژوهش با استناد به مجوزهای صادر شده توسط سازمان حفاظت محیط زیست با شماره های ۳۱/۱۲۶۳۰ (مورخه ۱۳۸۸/۲/۲۹)، ۹۳/۱۶۲۵۸ (مورخه ۱۳۹۳/۴/۱۵) و ۹۳/۱۶۲۷۰ (مورخه ۱۳۹۳/۴/۱۵) از لاشه پلنگ های مختلفی که بر اثر عوامل متعدد از قبیل تصادف، مرگ طبیعی و شکار از پا در آمده بودند، صورت گرفت. همچنین از پلنگ های زنده گیری شده در جریان پروژه نصب ردیاب های ماهواره ای در پارک ملی تندوره نیز (مجوز شماره ۹۳/۱۶۲۷۰ مورخه ۱۳۹۳/۴/۱۵) نمونه برداری شد. نمونه گیری از لاشه ها عمدتاً مربوط به عضلات یا لایه های زیرپوست بوده، حال آنکه در پلنگ های زنده عمدتاً بخش بسیار کوچکی از داخل گوش میانی می باشد. برای نگهداری نمونه های بافت از اتانول ۹۶٪ استفاده شد.

۲.۲. استخراج DNA و واکنش زنجیره ای

پلیمرز (PCR)

استخراج DNA با استفاده از روش فنل-کلروفورم انجام شد که جزئیات آن توسط Sambrook و همکاران (۱۹۸۹) توصیف شده است. به منظور تهیه آغازگرها، اطلاعات مربوطه از *Uphyrkina* و همکاران (۲۰۰۱) برای ژن *NADH5* به دست آمد. تنها

آغازگر F از مقاله Johnson و همکاران (۱۹۹۸) به دست آمد. تمامی آغازگرها بر اساس توالی های پلنگ طراحی شده اند. این دو جفت آغازگر، بخشی از ۶۱۱ جفت باز انتهایی ۵ ژن میتوکندریایی *NADH5* مربوط به جایگاه های 12632-13242 توالی کامل *mtDNA* گربه اهلی در دو قطعه جدا که در تقریباً ۱۴۰ جفت باز با هم هم پوشی دارند، را تقویت می نمایند. جزئیات این دو جفت آغازگر با نامهای *F/RL2* و *FL2/RL4* که هر دو از پژوهش *Uphyrkina* و همکاران (۲۰۰۱) اقتباس شده اند، عبارتند از:

F/RL2: (F: 5'-GTGCAACTCCAAATAAAAAG-3'
RL2: 5'-TAAACAGTTGGAACAGGTT-3'
FL2/RL4: (FL2: 5'-CGTTACATGATCGATCATAG-3'
RL4: 5'-TTAGGTTTTTCGTGTGGGT-3')

۳.۲. تجزیه و تحلیل

از نرم افزار Seqscape 2.6 برای ویرایش نوکلئوتیدی توالی ها استفاده شد. توالی ها با استفاده از *ClustalW* (Thompson *et al.*, 1994) در نرم افزار *Mega 6* (Tamura *et al.*, 2013) ردیف یابی شدند. پس از بررسی توالی های استخراج شده از بانک ژن، یک قطعه دربرگیرنده ۵۵۱ جفت باز از ژنوم میتوکندری متعلق به بخشی از ژن *NADH5* در تحلیل ها استفاده شد. از توالی های متعلق به شیر (*P. leo*) (AF385613 و AF385614)، ببر (*P. tigris*) (EF551003، HM185182، HM589214 و HM589215) و پلنگ برفی (*P. unica*) (EF551004) به عنوان برون گروه استفاده شد.

به منظور ارزیابی موقعیت کدون ها و پیدا کردن

۱۰۰۰۰ شبیه‌سازی، استفاده شد. در این آزمون‌های خنثی‌سازی فرض می‌شود که جمعیت مورد مطالعه در یک دوره طولانی تکاملی در تعادل جهش-رانس بوده است (Nei & Kumar, 2000). در مواردی که جمعیت هدف به واسطه گسترش ناگهانی در تعادل جهش-رانس نباشد، این آماره‌ها به سمت ارزش‌های منفی معنی‌دار تمایل خواهند داشت (Ojeda, 2010). همچنین، به منظور ارزیابی معنی‌داری برازش توزیع یک گسترش جمعیتی، از آماره R_2 (Ramos- & Rozas, 2002)، با ۱۰۰۰ تکرار، در نرم افزار DnaSP 5.10 استفاده شد. واگرایی ژنتیکی بین گروه‌ها بر اساس مدل Kimura 2-P با تعداد ۱۰۰۰۰ تکرار در نرم افزار Mega 6 (Tamura *et al.*, 2013) محاسبه شد.

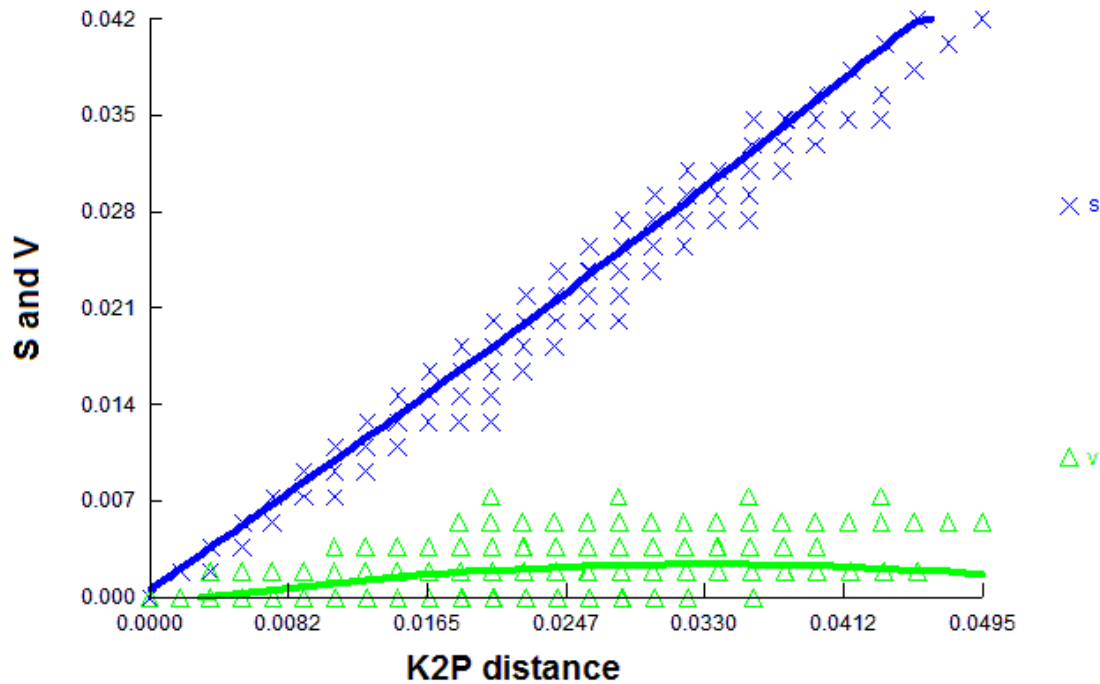
۳. نتایج

در این پژوهش تعداد ۱۴ نمونه پلنگ از مناطق مختلف ایران با موفقیت توالی‌یابی شد. علاوه بر این، تعداد ۲۵ توالی متعلق به پژوهش قبلی (Farhadinia *et al.*, 2015) همراه با ۱۸۱ توالی ثبت شده در بانک ژن (چهار نمونه از ایران، ۱۷۷ نمونه از سایر کشورها و پلنگ‌های در اسارت) در تحلیل‌ها استفاده شدند. در مجموع، تعداد ۲۱۹ توالی در تحلیل‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. بر اساس تحلیل‌ها، دسته داده مورد بررسی دارای کمترین اشباع جایگزینی است (شکل شماره ۱). ارزش‌های نمایه اشباع جایگزینی (ISS) به طور معنی‌دار کمتر از ارزش‌های نمایه بحرانی اشباع جایگزینی (ISSC) برآورد شدند ($p < 0.01$). بنابراین، دسته داده‌های

کدون- توقف‌های احتمالی، نرم افزارهای Seaview 4 و Mega 6 مورد استفاده قرار گرفتند. آزمون اشباع جایگزینی (Xia *et al.*, 2003) با استفاده از نرم افزار DAMBE 5 (Xia, 2013) انجام شد. همچنین، به منظور بررسی اشباع احتمالی در سطوح واگرایی بالاتر از رسم جایگزینی‌های هم‌جنس و غیرهم‌جنس در برابر فواصل کیمورا استفاده شد. بهترین مدل‌های جایگزینی نوکلئوتیدی با استفاده از PartitionFinder 1.1.1 با معیار اطلاعاتی بیزین (BIC) تعیین شد. بنابراین، HKY+I+G به عنوان بهترین مدل جایگزینی شناسایی شد. درخت تبارشناختی بیزین با استفاده از نرم افزار MrBayes 3.2.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003)، بر اساس چرخه زنجیره مارکوف (MCMC) با چهار اجرای هم‌زمان و تعداد ۵۰ میلیون تکرار رسم شد. نمونه‌برداری‌ها در هر ۱۰۰۰ تکرار انجام شد و ۱۰ درصد درخت‌های به دست آمده از تحلیل‌ها کنار گذاشته شدند. مناسب‌ترین درخت با استفاده از قانون اکثریت به دست آمد. شبکه هاپلوتایپی، بر اساس تحلیل اتصال میانه (Bandelt *et al.*, 1999) و با استفاده از نرم افزار PopART 1.7 رسم شد.

تعداد هاپلوتایپ‌ها، جایگاه‌های چندریختی، تنوع هاپلوتایپی و تنوع نوکلئوتیدی با استفاده از DnaSP 5.10 (Librado & Rozas, 2009) محاسبه شد. به منظور ارزیابی شواهد احتمالی برای رشد جمعیت در گذشته (Ramirez-Soriano *et al.*, 2008) از آزمون‌های Fu's F_S (Fu, 1997) و Tajima's D (Tajima, 1989) در نرم‌افزار Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010)، با

مورد بررسی مناسب تحلیل های تبارشناختی بوده و ادامه تحلیل ها با آنها مجاز بوده است.

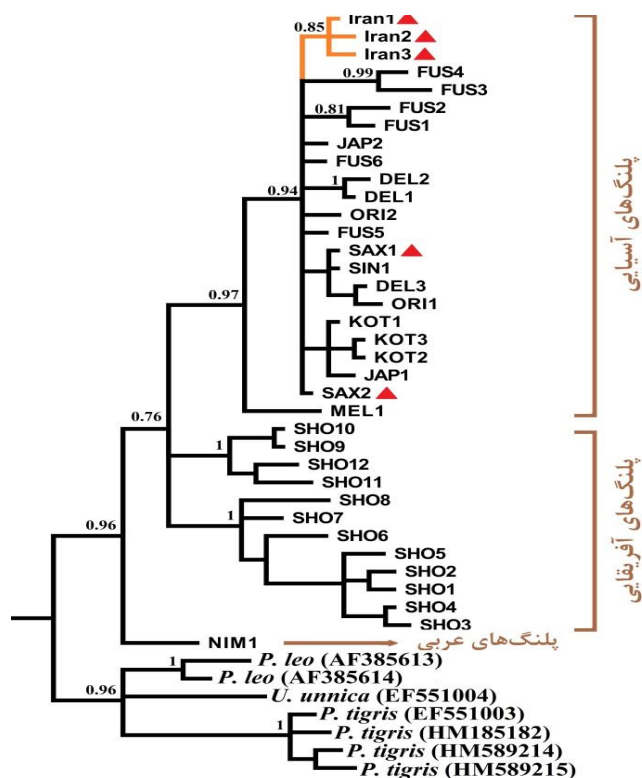


شکل ۱- جایگزینی های هم جنس و غیرهم جنس در برابر فاصله کیمورا برای توالی ۵۵۱ جفت باز از ژن NADH5 میتوکندری.

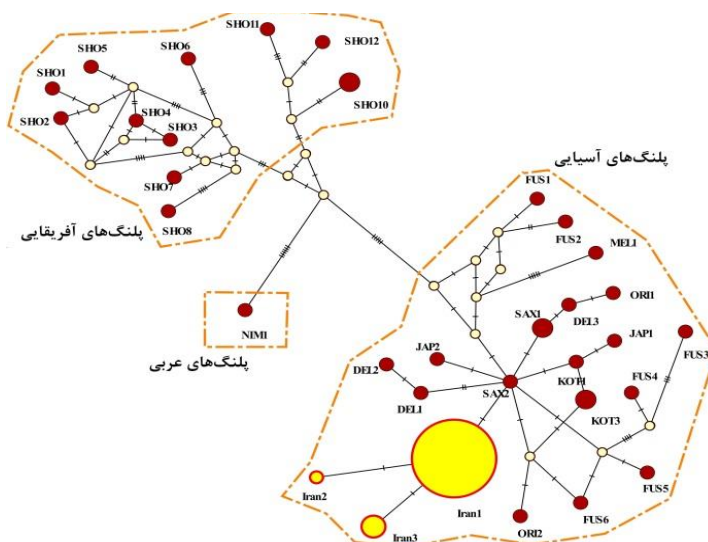
IRAN1 و IRAN2 در جایگاه نوکلئوتیدی ۱۲۹۹۵ با پرولین در هاپلوتایپ IRAN3 جایگزین شده است. همچنین در جایگاه نوکلئوتیدی شماره ۱۳۰۴۳، اسید آمینه کدکننده ترئونین در هاپلوتایپ های IRAN1 و IRAN3 با متیونین در IRAN2 جایگزین شده است.

بر اساس یافته ها، سه هاپلوتایپ در ۱۴ نمونه متعلق به این پژوهش شناسایی شد که برای نامگذاری، از پژوهش قبلی پیروی شد (Farhadinia *et al.*, 2015) و با نامهای IRAN1 برای کل ایران، IRAN2 برای استان گلستان و IRAN3 برای استان فارس معرفی می شوند (شکل های شماره ۲، ۳ و ۴). اسید آمینه کدکننده لوسین در هاپلوتایپ های

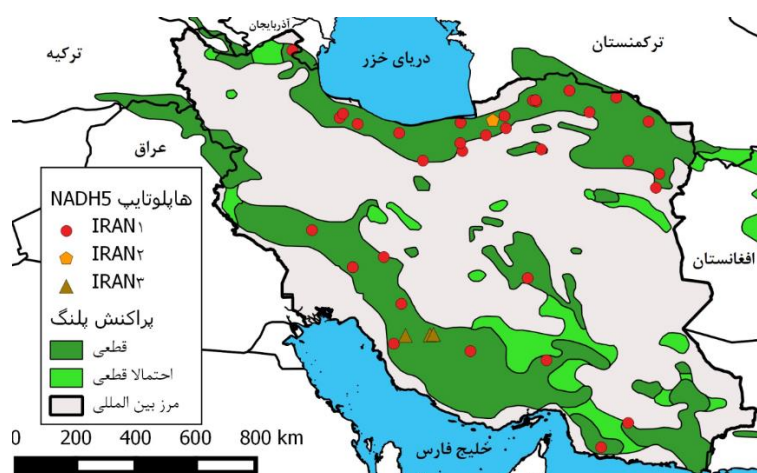
تنوع ژنتیکی پایین پلنگ ایرانی...



شکل شماره ۲: روابط تبارشناختی بین پلنگ‌های ایرانی و سایر پلنگ‌های جهان بر اساس ۵۵۱ جفت باز از ژن *NADH5*. شیر و ببر به عنوان برون‌گروه استفاده شدند. اعداد روی شاخه‌ها مقدار احتمال پسین را بر اساس استنتاج بی‌زین نشان می‌دهند. مثلث‌ها (▲)، هاپلو تایپ‌های شناسایی شده از ایران را نشان می‌دهند. نمونه‌های IRAN1 تا IRAN3 سه هاپلو تایپ شناسایی شده در این پژوهش را نشان می‌دهند.



شکل شماره ۳: شبکه هاپلو تایپی بین پلنگ‌های ایرانی و سایر پلنگ‌های جهان با استفاده از روش اتصال میانه بر اساس ۵۵۱ جفت باز از ژن *NADH5*. دایره‌های روشن (زرد رنگ) هاپلو تایپ‌های شناسایی شده در پژوهش حاضر هستند.



شکل شماره ۴: نقشه پراکنش نمونه های پلنگ بدست آمده برای این پژوهش و هاپلوتایپ های شناسایی شده بر اساس ۵۵۱ جفت باز از ژن NADH5 در حوزه پراکنش پلنگ در کشور. نقشه پراکنش پلنگ در ایران از مقاله Jacobson و همکاران (2016) اقتباس شده است.

هاپلوتایپی در پلنگ های آسیایی و آفریقایی به ترتیب ۰/۷۲۴ و ۰/۸۷۴ برآورد شد. بر اساس آزمون های Tajima's D و Fu's F_s ، نشانه های مشخصی از یک گسترش جمعیت شناختی ناگهانی در پلنگ های آسیایی مشاهده می شود ($p < 0.01$). با این وجود، بر اساس آماره R_2 گسترش جمعیت شناختی در هیچ کدام از گروه ها معنی دار نیست.

جدول شماره ۱، آماره های ژنتیکی محاسبه شده را برای ۲۱۹ توالی از پلنگ های جهان نشان می دهد. لازم به یادآوری است که در این تحلیل آماره های ژنتیکی مربوط به پلنگ های ایران به صورت مجزا از دیگر پلنگ های آسیایی نیز برآورد شده است. پلنگ های ایرانی در مقایسه با دیگر پلنگ ها، سطح تنوع هاپلوتایپی (۰/۲۹۲) و تنوع نوکلئوتیدی کمی (۰/۰۰۵۵) را نشان می دهند (شکل شماره ۳). تنوع

جدول شماره ۱: برخی آماره های ژنتیکی برای پلنگ های ایران در مقایسه با سایر پلنگ های جهان بر اساس توالی ۵۵۱ جفت باز NADH5. n : تعداد افراد؛ h : تعداد هاپلوتایپ؛ Hd : تنوع هاپلوتایپی؛ SD : انحراف معیار؛ Pi : تنوع نوکلئوتیدی به ازای هر جایگاه؛ K : متوسط تعداد اختلاف نوکلئوتیدی؛ P : تعداد جایگاه های متغیر.

گروه	N	h	Hd (SD)	Pi (SD)	K	P	Fu's F_s	Tajima's D	R_2
ایران	۴۳	۳	۰/۲۹۲ (۰/۰۸۵)	(۰/۰۰۱۷) ۰/۰۰۰۵۵	۰/۳۰۶	۲	-۰/۶۶۴	-۰/۶۲۷	۰/۱۲۹
آسیا	۷۳	۲۳	(۰/۰۵۸) ۰/۷۲۴	(۰/۰۰۰۷۶) ۰/۰۰۴۶۴	۲/۵۵۶	۳۵	-۱۳/۳۸۶**	-۲/۰۶۷**	۰/۰۹۷
آفریقا	۱۴۵	۲۲	(۰/۰۱۳) ۰/۸۷۴	(۰/۰۰۰۳۶) ۰/۰۱۶۴۵	۹/۰۶۵	۴۰	۱/۹۱۱	۰/۷۷۵	۰/۰۸۵
عربی	۱	۱	-	-	-	-	-	-	-

تنوع ژنتیکی پایین پلنگ ایرانی...

ایرانی و آسیایی (۰/۰۰۶۱) به دست آمد. پلنگهای ایرانی بیشترین فاصله ژنتیکی (۰/۰۳۳۸) را با پلنگهای آفریقایی دارند.

به منظور دستیابی به برآوردهایی از اختلاف ژنتیکی بین پلنگهای ایرانی و سایر پلنگها، از مدل‌های K2P استفاده شد (جدول شماره ۲). بر اساس یافته‌های هر دو مدل، کمترین برآورد بین پلنگهای

جدول شماره ۲: برآورد میانگین واگرایی تکاملی بین پلنگهای ایرانی و سایر پلنگها بر اساس ۵۵۱ جفت باز از ژن NADH5 با استفاده از مدل‌های K2P.

گروه	ایران	آسیا	آفریقا	عربی
ایران	-	-	-	-
آسیا	۰/۰۰۶۱	-	-	-
آفریقا	۰/۰۳۳۸	۰/۰۳۴۲	-	-
عربی	۰/۰۲۷۱	۰/۰۲۸۵	۰/۰۲۵۶	-

جمعیت در پلنگ‌های ماده است (Ropiquet *et al.*, 2015) و فقدان چنین ساختار مکانی نشان از آن دارد که جابجایی گسترده‌ای در میان پلنگ‌های ایرانی وجود دارد. نتایج این پژوهش، وجود ساختارهای متمایز جمعیتی در سرتاسر ایران و حتی کشورهای همسایه را در ژنوم مورد بررسی تأیید نمی‌کند.

پلنگ‌ها تنوع ژنتیکی بالاتری نسبت به برخی از دیگر گربه‌سانان مانند شیر (Dubach *et al.*, 2005) و جگوار (Eizirik *et al.*, 2001) دارند (Uphyrkina *et al.*, 2001). ولی چنین آرایش فضایی تنوع ژنتیکی پلنگ‌ها در سرتاسر حوزه انتشار آنها همگن نیست. پلنگ‌های ساکن آفریقا و هندوستان از تنوع ژنتیکی بالاتری در مقایسه پلنگ‌های مناطق دیگر برخوردارند. در پژوهش دیگری، ۲۱ نمونه پلنگ مربوط به آفریقای جنوبی براساس قطعه‌ای به طول ۶۶۰ جفت باز مربوط به ژن NADH5 و

۴. بحث و نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر یافته‌های پژوهش قبلی (Farhadinia *et al.*, 2015) را درباره پلنگ‌های ایرانی تأیید نموده و از وجود یک دودمان تک شاخه حمایت می‌کند. در این پژوهش تعداد نمونه‌های بیشتری از ایران (۳۹ پلنگ از سراسر ایران) در مقایسه به پژوهش‌های پیشین (۲۵ نمونه) استفاده شد. با این وجود، تنها همان سه هاپلوتایپی که در گذشته ثبت شده بود شناسایی شدند. وجود هاپلوتایپ غالب در سراسر کشور و همچنین کشورهای همسایه (Rozhnov *et al.*, 2011) در کنار دو هاپلوتایپ نزدیک به آن مؤید آن است که پلنگ‌های ایران و حتی کشورهای همسایه دارای یک منشأ مادری مشترک بوده و از نیا‌های متفاوتی نبوده‌اند (Farhadinia *et al.*, 2015). نشانگرهای میتوکندریایی به دلیل وراثت مادری مبین ساختار

عنوان شاخص نشان دهنده چندریختی ژنتیکی موردبررسی قرار داده اند، تنوع بالاتر آن در قیاس با سایر ژن های میتوکندریایی مانند D-loop یا cyt b می باشد (Tensen et al. 2011). علی رغم انتظار مشاهده چندریختی در این ژن، مطالعه فعلی در کنار پژوهش های قبلی (Uphyrkina et al., 2001, Rozhnov et al., 2011, Farhadinia et al., 2015) به خوبی نشان از تنوع ژنتیکی پایین در سطح این ژن میتوکندریایی در بخش های گسترده ای از حوزه انتشار پلنگ های ایرانی در غرب آسیا دارد. ارزیابی وضعیت ژنتیکی پلنگ های ایرانی با استفاده از نشانگرهای مبتنی بر ژنوم هسته ای می تواند تصویر کامل تری ارائه نماید.

تنوع هاپلوتایپی بالا همراه با تنوع نوکلئوتیدی پایین، یک گسترش سریع از یک اندازه موثر کوچک جمعیت را پیشنهاد می دهد (Avice, 2000). همچنین، ارزش های منفی و معنی دار به دست آمده در آزمون های خنثی سازی شواهد به نسبت روشنی را برای گسترش های جمعیت شناختی (Fu, 1997؛ Ojeda, 2010) در پلنگ های آسیایی نشان می دهد. در حالی که بر اساس آماره R_2 گسترش جمعیت شناختی در هیچ کدام از گروه های پلنگ ها معنی دار نیست. آماره هایی مانند Fu's FS و R_2 ، از قدرتمندترین آزمون ها برای شناسایی رشد جمعیت هستند. به هر حال، آماره R_2 برای اندازه های کوچک نمونه برآوردهای بهتری دارد (Ramos-Onsins & Rozas, 2002).

در کنار یک هاپلوتایپ رایج در سرتاسر ایران که در بیشتر نمونه ها (۹۰٪) دیده می شود، دو هاپلوتایپ

D-loop، مورد بررسی قرار گرفته و تنوع ژنتیکی بالایی رؤیت شد، بطوریکه هر نمونه نماینده یک هاپلوتایپ منحصر به فرد بودند (Tensen et al., 2011). در هندوستان نیز در بررسی توالی NADH5 مورد استفاده قرار گرفته در مقاله پیش رو با طول ۶۱۱ جفت باز، شش هاپلوتایپ در میان نه نمونه پلنگ از بخش های مختلف این کشور شناسایی شد (Uphyrkina et al., 2001). پژوهش دیگری مبتنی بر ۱۴۵ نمونه پلنگ از آفریقای جنوبی براساس توالی یابی ۱۷۳۷ جفت باز دو ژن NADH5 و cyt b که منجر به شناسایی ۲۸ هاپلوتایپ شد (Ropiquet et al., 2015). این در حالی است که همانند تنوع هاپلوتایپی پایین پلنگ های ایرانی که در این مطالعه نشان داده شد، سایر زیرگونه ها نیز از تنوع چندانی برخوردار نیستند، مانند زیرگونه در آستانه انقراض پلنگ آمو که تنها دو هاپلوتایپ در ۱۲ نمونه پلنگ وحشی شناسایی شد (Uphyrkina et al., 2002).

ذکر این نکته ضروری است که برای مقایسه هاپلوتایپ های شناسایی شده و تنوع ژنتیکی جمعیتها، ضروری است تا ژنهای مشابه با طول حتی الامکان نزدیک به هم مورد استفاده قرار گیرد. در تمامی چهار پژوهش پیشین در زمینه تنوع ژنوم میتوکندریایی پلنگ (Uphyrkina et al., 2001; 2002, Tensen et al., 2011, Ropiquet et al., 2015)، ژن NADH5 مورد بررسی و تحلیل قرار گرفته است و از همین رو، به پژوهش حاضر براساس نمونه های ایرانی اجازه می دهد تا بتواند یافته های خود را برای سنجش تنوع ژنتیکی پلنگ ها با آنها مورد مقایسه قرار دهد. علت اصلی که تمامی این پژوهش ها این ژن را به

منطقه ای نیز در حوزه پراکنش پلنگ ایرانی حضور دارند. هاپلوتایپ نخست تاکنون تنها در یک نمونه پلنگ از استان گلستان گزارش شده است. هاپلوتایپ دیگر در پلنگ‌های ساکن در بخش‌هایی از استان فارس (یک نمونه از شهرستان کازرون و دو نمونه از پارک ملی بمو) شناسایی شد. در پژوهشی دیگر، وجود هاپلوتایپ اختصاصی در خرس‌های قهوه‌ای ساکن بخش‌هایی از استان فارس (اطراف مرودشت) گزارش شده است که در مقایسه با سایر هاپلوتایپ‌های خرس قهوه‌ای در ایران، کاملاً مجزا است (Ashrafzadeh *et al.*, 2016). یافتن علل تنوع ژنتیکی متمایز گوشتخواران بزرگ جثه مانند پلنگ و خرس قهوه‌ای در حوزه زاگرس در استان فارس خود می‌تواند به کسب تصویری دقیق‌تر از تبارشناسی و تکامل این گونه‌ها در کشور کمک نماید.

در این پژوهش تعدد هاپلوتایپ‌ها در مقیاس خرد (مانند یک یک منطقه حفاظت شده) مشاهده نشد. به عنوان مثال هر دو نمونه موجود از پارک ملی بمو دارای هاپلوتایپ IRAN3 بودند. در بررسی دیگری بر اساس ژنوم محدود کنترلی در سه پلنگ در پارک ملی تندوره نشان داد که همگی به هاپلوتایپی که پیش از این توسط Uphyrkina و همکاران (۲۰۰۱) در میان پلنگ‌های ایران گزارش شده بود، تعلق دارند (Nassiri *et al.*, 2011).

هنوز به درستی نمی‌توان علل چنین تنوع ژنتیکی پایینی در سطح ژن NADH5 را در پلنگ‌های غرب آسیا و ایران توضیح داد. با این حال یک فرضیه در این خصوص شاید با دوران یخبندان و خشکسالی مرتبط باشد که در نیمه دوم دوره

پلئیسستوسن رخ داده است. زمان احتمالی انشقاق دودمان مادری پلنگ‌های ایرانی از سایر پلنگ‌های آسیا در نیمه دوم پلئیسستوسن که هم‌زمان با آغاز آخرین عصر یخبندان می‌باشد، برآورد شده است (Farhadinia *et al.*, 2015). در این دوره، احتمالاً پلنگ‌های غرب آسیا محدود به تعدادی پناهگاه شده باشند که شارش ژنی بسیار محدودی با سایر زیرگونه‌های پلنگ‌ها داشته‌اند، ولی احتمالاً ارتباط ژنتیکی بیشتری درون زیرگونه وجود داشته است. همچنین پلنگ‌ها گونه‌هایی هستند که مسافت‌های گسترده‌ای را برای یافتن منابع جدید طی می‌کنند (Fattebert *et al.*, 2013) که در کنار فقدان موانع جغرافیایی قابل توجه در بخش‌های گسترده‌ای از حوزه پراکنش پلنگ در غرب و مرکز آسیا (Gavashelishvili & Lukarevskiy, 2008) خود می‌تواند به فقدان ساختار جمعیتی و وجود هاپلوتایپ مشترک کمک نماید.

دومین فرضیه تنوع هاپلوتایپی پایین پلنگ‌های ایرانی مربوط به نقش ژن‌های میتوکندریایی است که برای تولید انرژی ضروری در ساختن ATP و حفظ دمای بدن بکار می‌رود. از همین رو، این ژنها ممکن است تحت فشارهای انتخابی در گونه‌هایی که در ارتفاعات بالا زیست می‌کنند، باشند. چنین پدیده‌ای در انواعی از Caprini (خانواده گاوسانان) مشاهده شده است (Hassanin *et al.*, 2009). تنوع پایین هاپلوتایپی در ژنوم میتوکندریایی پلنگ برفی *P. unica* نیز به وضوح دیده شده است و یکی از علت‌های آن به کارکرد ژنوم میتوکندریایی نسبت داده شده است. به این صورت که این بخش از سلول

فارس غیرقابل بازگشت به طبیعت هستند، برای ایجاد یک برنامه تکثیر در اسارت جامع بهره جوید. همچنین، این پژوهش نشان دهنده آن است که در صورت نیاز سایر کشورهای داخل حوزه پراکنش پلنگ ایرانی برای به دست آوردن افراد زادآور از ایران برای ایجاد برنامه تکثیر و معرفی مجدد پلنگ، افراد موجود در اسارت از لحاظ ژنتیکی به خوبی می توانند نماینده پلنگ های ایران بوده و نیازی به زنده گیری پلنگ از طبیعت از بخشهای خاصی از کشور نمی باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می دانند از همکاری صمیمانه کارشناسان آزمایشگاه مرکزی (بخش زیست فناوری) پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران آقای کاوه خسرویانی و خانم ندا قوتی سپاسگزاری نمایند. همچنین از دفاتر موزه تاریخ طبیعی و ذخایر ژنتیکی و مدیریت شکار و صید سازمان حفاظت محیط زیست بابت صدور مجوز نمونه برداری سپاسگزاری می شود.

مسئول تنفس هوایی و در نتیجه تحت فشار انتخابی در محیطهایی است که اکسیژن در آن کم باشد (Janecka *et al.*, 2017). نمی توان با قاطعیت درباره صحت این فرضیه برای پلنگ های ایرانی اظهار نظر کرد، زیرا معمولا در ارتفاعی که پلنگ های ایرانی زندگی می کنند (معمولا ۱۵۰۰ تا ۲۵۰۰ متر بالاتر از سطح دریا) مشکل کمبود اکسیژن به نظر نمی رسد مشکل قابل توجهی باشد. در عین حال، این دو گونه تا ارتفاع ۴۵۰۰ متری در چین ثبت شده اند و احتمال دارد این فرضیه فشار انتخابی در مورد پلنگ در بخشهایی از حوزه انتشار آن صادق باشد (Buzzard *et al.*, 2017).

نیمی از هاپلوتایپ های شناخته شده پلنگ های مرکز و غرب آسیا در پلنگ های موجود در اسارت دیده نشده که مبین آن است که حتی همین تنوع ژنتیکی پایین پلنگ های این حوزه در اسارت به صورت کامل وجود ندارد. از همین رو، توصیه می شود که سازمان حفاظت محیط زیست با توجه بیشتری پلنگ هایی که به هر دلیلی قادر به بازگشت به طبیعت نیستند را مورد توجه قرار داده و از آنها، به ویژه افرادی که از حوزه های استان های گلستان و

References

Ashrafzadeh, M.R., Kaboli, M., Naghavi, M.R., 2016. Mitochondrial DNA analysis of Iranian brown bears (*Ursus arctos*) reveals new phylogeographic lineage. *Mammalian Biology-Zeitschrift für Säugetierkunde*, 81(1): 1-9.

Avice, J.C., 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge.

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

- Buzzard, P.J., Li, X. & Bleisch, W. V., 2017. The status of snow leopards *Panthera uncia*, and high altitude use by common leopards *P. pardus*, in north-west Yunnan, China. *Oryx*, pp.1–3.
- Dubach, J., Patterson, B.D., Briggs, M.B., Venzke, K., Flammand, J., Stander, P., Scheepers, L., Kays, R., 2005. Molecular genetic variation across the southern and eastern geographic ranges of the African lion, *Panthera leo*. *Conservation Genetics* 7:15-24.
- Eizirik, E., Kim, J.H., Menotti-Raymond, M., Crawshaw, J.R., Peter, G., O'Brien, S.J., Johnson, W.E., 2001. Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). *Molecular Ecology* 10(1): 65-79.
- Excoffier, L., Lischer, H.E., 2010., Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10(3): 564-567.
- Farhadinia, M.S., Farahmand, H., Gavashelishvili, A., Kaboli, M., Karami, M., Khalili, B., Montazamy, S., 2015. Molecular and craniological analysis of leopard, *Panthera pardus* (Carnivora: Felidae) in Iran: support for a monophyletic clade in Western Asia. *Biological Journal of the Linnean Society*, 114(4): 721-736.
- Fattebert, J., Dickerson, T., Balme, G., Slotow, R., Hunter, L., 2013. Long-distance natal dispersal in leopard reveals potential for a three-country metapopulation. *South African Journal of Wildlife Research*, 43(1): 61-67.
- Fu, Y.X., 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147(2): 915-925.
- Gavashelishvili, A., Lukarevskiy, V., 2008. Modelling the habitat requirements of leopard *Panthera pardus* in west and central Asia. *Journal of Applied Ecology* 45(2): 579-588.
- Hassanin, A., Ropiquet, A., Couloux, A., Cruaud, C., 2009. Evolution of the mitochondrial genome in mammals living at high altitude: new insights from a study of the tribe Caprini (Bovidae, Antilopinae). *Journal of Molecular Evolution*, 68(4), pp.293–310.
- Jacobson, A.P., Gerngross, P., Lemeris Jr, J.R., Schoonover, R.F., Anco, C., Breitenmoser-Würsten, C., Durant, S.M., Farhadinia, M.S., Henschel, P., Kamler, J.F. and Laguardia, A., 2016. Leopard (*Panthera pardus*) status, distribution, and the research efforts across its range. *PeerJ* 4, p.e1974.
- Janecka, J.E., Zhang, Y., Li, D., Munkhtsog, B., Bayaraa, M., Galsandorj, N., Wangchuk, T. R., Karmacharya, D., Li, J., Lu, Z., 2017. Range-Wide Snow Leopard Phylogeography Supports Three Subspecies. *Journal of Heredity*, p.esx044.
- Johnson, W.E., Culver, M., Iriarte, J.A., Eizirik, E., Seymour, K.L., O'Brien, S.J., 1998. Tracking the evolution of the elusive Andean mountain cat (*Oreailurus jacobita*) from mitochondrial DNA. *Journal of Heredity*, 89, 227–232.
- Khorozyan, I.G., Baryshnikov, G.G., Abramov, A., 2006. Taxonomic status of the leopard, *Panthera pardus* (Carnivora, Felidae) in the Caucasus and adjacent areas. *Russian Journal of Theriology* 5(1): 41-52.
- Librado, P., Rozas, J., 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11): 1451-1452.
- Lopez, J.V., Culver, M., Stephens, J.C., Johnson, W.E., O'Brien, S.J., 1997. Rates of nuclear and cytoplasmic mitochondrial DNA sequence divergence in mammals. *Molecular Biology and Evolution* 14:277–286.
- Miththapala, S., Seidensticker, J., O'Brien, S.J., 1996. Phylogeographic subspecies recognition in leopards (*Panthera pardus*): molecular genetic variation. *Conservation Biology* 10: 1115–1132.
- Nassiri, M.R., Parizadeh, S.A., Mahdavi, M., Ariannejad, H., 2011. Genetic and phylogenetic

- analysis of D-Loop in Persian leopard. *Journal of Agricultural Biotechnology* 2(3): 81-95 (In Persian).
- Nei, M., Kumar, S., 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*, Oxford university press.
- Nowell, K., Jackson, P., 1996. *Wild cats: status survey and conservation action plan*, IUCN Gland.
- Ojeda, A.A., 2010. Phylogeography and genetic variation in the South American rodent *Tympanoctomys barrerae* (Rodentia: Octodontidae). *Journal of Mammalogy*, 91(2), pp.302–313.
- Ramírez-Soriano, A., Ramos-Onsins, S.E., Rozas, J., Calafell, F., Navarro, A., 2008. Statistical power analysis of neutrality tests under demographic expansions, contractions and bottlenecks with recombination. *Genetics*, 179(1), pp.555–567.
- Ramos-Onsins, S.E., Rozas, J., 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution*, 19(12), pp.2092–2100.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12), pp.1572–1574.
- Ropiquet, A., Knight, A.T., Born, C., Martins, Q., Balme, G., Kirkendall, L., Hunter, L., Senekal, C., Matthee, C.A., 2015. Implications of spatial genetic patterns for conserving African leopards. *Comptes rendus biologies*, 338(11): 728-737.
- Rozhnov, V.V., Lukarevsky, V.S., Sorokin, P.A., 2011. Application of molecular genetic characteristics for reintroduction of the leopard (*Panthera pardus*) in the Caucasus. In *Doklady Biological Sciences* (Vol. 437, No. 1, pp. 97-102). MAIK Nauka/Interperiodica.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniati, T., 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Tajima, F., 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), pp.585–595.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), pp.2725–2729.
- Tensen, L., Roelofs, D., Swanepoel, L.H., 2014. A note on the population structure of leopards (*Panthera pardus*) in South Africa. *South African Journal of Wildlife Research* 44(2): 193-197.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., 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*, 22(22), pp.4673–4680.
- Uphyrkina, O., Johnson, W.E., Quigley, H., Miquelle, D., Marker, L., Bush, M., O'Brien S.J., 2001. Phylogenetics, genome diversity and origin of modern leopard (*Panthera pardus*). *Molecular Ecology* 10: 2617–2633.
- Uphyrkina, O., Miquelle, D., Quigley, H., Driscoll, C., O'Brien, S.J., 2002. Conservation genetics of the Far Eastern leopard (*Panthera pardus orientalis*). *Journal of Heredity* 93: 303–311.
- Xia, X., 2013. DAMBE5: a comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Molecular biology and evolution*, 30(7): 1720-1728.