

فیلوژنی و تنوع ژنتیکی کل و بز *Capra aegagrus* (Erxleben, 1777)

در استان مازندران براساس ژن ناحیه‌ی D-Loop میتوکندریایی

سیده مژگان حسینی حیدری^۱، سعید نادری^{۲*}، حسن رجبی مهام^۳، حمیدرضا رضایی^۴

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

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

۳- استادیار گروه علوم و زیست فناوری جانوری، دانشکده علوم و فناوریهای زیستی، دانشگاه شهید بهشتی

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

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

چکیده:

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

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

۱. مقدمه

جدا مانده، از جمعیت قابل توجهی برخوردار نبوده و عموماً به دلیل واقع بودن در مناطق آزاد شامل کیاسر ساری (بندین)، دچار تهدیدهای جدی هستند.

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

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

بر اساس گزارش های سازمان حفاظت محیط زیست، این گونه در نواحی کوهستانی شمال ایران و از جمله در استان مازندران نیز دیده می شود که در بعضی نقاط آن به دلیل فعالیت های مخرب انسانی نظیر شکار بی رویه و غیر قانونی، جنگل تراشی، رقابت برای غذا با دام اهلی، کشاورزی، معدن کاوی، سدسازی، توسعه های شهری و غیره، دچار تخریب جمعیت و زیستگاه های طبیعی شده است. گستردگی و پیوستگی منطقه کوهستانی حفاظت شده البرز مرکزی شمالی (مناطق کمربین و بلده)، عامل مهمی در حفظ جمعیت کل و بز در این منطقه حساس بوده، همچنین شرایط مهاجرت و جابجایی بین زیستگاه های آن را فراهم نموده است. سایر مناطق زیست کل و بز، به ویژه در بخش های مرکزی و شرقی استان با دارا بودن گله های پراکنده و زیستگاه های

۲.۲. استخراج DNA

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

۳.۲. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) و توالی

یابی

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

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

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

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. نمونه برداری

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

هاپلوتایپ‌ها، تنوع هاپلوتایپی، تنوع نوکلئوتیدی، تعیین فاصله‌های ژنتیکی نمونه‌های مورد مطالعه، محاسبه تنوع میان جمعیت‌ها با انجام آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) و نیز Pairwise F_{st} value و آزمون توزیع عدم تطابق^۳ و مقادیر شاخص‌های F_s و D_{Tajima} جهت بررسی سرعت گسترش جمعیت‌های مورد مطالعه از گذشته تاکنون، از نرم‌افزارهای DNAsp 5.10 و Arlequin 3.5 استفاده شد (Librado & Rozas, 2009). (Excoffier & H.E.L.Lischer, 2010).

۳. نتایج

۱.۳. نتایج توالی یابی و خصوصیات ژنتیکی نمونه‌های مورد مطالعه

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

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

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

نتایج حاصل از توالی‌یابی با استفاده از نرم افزار (Seqscape (Applied Biosystem) ویرایش شدند. همچنین تعداد ۴۶۹ توالی مربوط به همین گونه از پایتبانک ژن (GenBank) جهت انجام آنالیزهای مختلف استفاده شد. آنگاه توالی‌های اصلاح شده، به همراه توالی‌های دریافت شده از بانک ژن جهت ردیف آرایشی در نرم افزار MEGA6 با استفاده از الگوریتم Clustal W وارد شدند. در نهایت درخت فیلوژنی بر اساس درخت فیلوژنی براساس روش اتصال مجاور^۱ و بیشینه درست نمایی^۲ با استفاده از نرم افزار MEGA 6 بدست آمد (Tamura *et al.*, 2013). به منظور بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های مورد مطالعه و مقایسه شاخص‌های تنوع ژنی آنها (از قبیل تعیین

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

منحصر در ۳ منطقه مورد مطالعه، تشخیص داده شد. همچنین بعضی هاپلوتایپ‌های تشخیص داده شده در این مطالعه، مشابه تعدادی از هاپلوتایپ‌های شناسایی شده در مطالعه مقیاس وسیع Naderi و همکاران در نقاط مختلف ایران، است. بیشترین مقدار تنوع هاپلوتایپی (h) و تنوع نوکلئوتیدی (Pi) در سه منطقه مورد مطالعه، در کمرین و کمترین مقدار در بندین مشاهده شد. همچنین، بیشترین اختلاف میانگین تعداد نوکلئوتیدها در مقایسه دو به دوی نمونه‌ها (K) مربوط به کمرین و کم‌ترین مقدار این اختلاف در بین نمونه‌هایی از جمعی بندین محاسبه شد.

۴۶۹ توالی اکتباس شده از بانک ژن با استفاده از نرم‌افزار Mega 6، به منظور داشتن قابلیت انجام آنالیزهای مختلف و امکان مقایسه با مطالعات قبلی، قطعه به طول ۴۸۱ جفت باز از قطعه کلی جدا و به عنوان قطعه مورد بررسی در انواع آنالیزها، در نظر گرفته شد. نتایج خصوصیات ژنتیکی ۲۲ فرد مورد مطالعه حاضر در جدول (شماره ۱) ارائه شده است. در مجموع، تعداد ۱۴ هاپلوتایپ در ۳ منطقه مختلف مورد مطالعه، شناسایی شدند. بر اساس نتایج به دست آمده، در بین ۳ منطقه مورد مطالعه حاضر در استان مازندران، هاپلوتایپ‌های مشابه مشاهده شد. لذا بر این اساس، در مجموع تعداد ۱۱ هاپلوتایپ

جدول ۱- خصوصیات تنوع ژنتیکی نمونه‌های مورد مطالعه در پژوهش حاضر

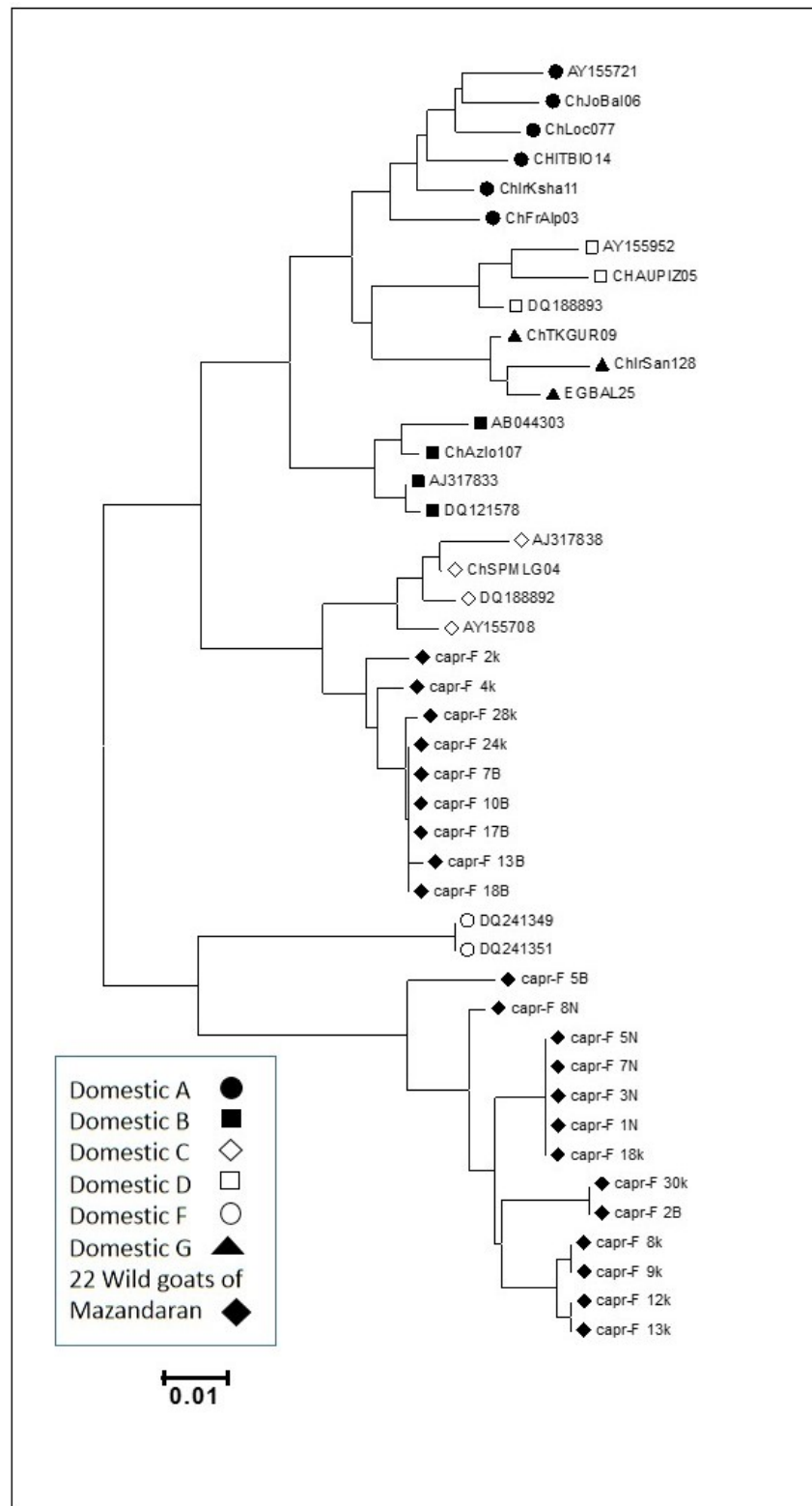
جمعیت	N	H	h	K	Pi	Tajima's D	P(D simul < D obs)	Fu's Fs	Prob(sim_Fs <= obs_Fs)
کمرین	۱۰	۸	۰/۹۵	۳۳/۸۰	۰/۰۷	۱/۴۸	۰/۹۶	۲/۳۳	۰/۸۴
بلده	۷	۴	۰/۷۱	۲۵/۶۱	۰/۰۵	۰/۵۶	۰/۷۳	۶/۲۹	۰/۹۹
بندین	۵	۲	۰/۴۰	۲/۴۰	۰/۰۰۵	-۱/۱۴	۰/۰۷	۳/۰۲	۰/۹۱

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

۲.۳. نتایج بررسی‌های فیلوژنتیک

جفت باز به دست آمده از ۲۲ فرد مطالعه حاضر، مربوط به جمعیت‌های ۳ زیستگاه مختلف به همراه ۲۲ فرد بز اهلی، اکتباس شده از بانک ژن (Naderi *et al.*, 2007)، مورد تحلیل قرار گرفت. با توجه به یکسان بودن توپولوژی درخت‌های فیلوژنی ترسیم شده، فقط یک درخت ارائه شد و میزان Bootstrap، بر روی شاخه‌های آن مشخص شد (شکل ۱). براساس ژن میتوکندریایی ناحیه D-Loop در این درخت، ۷ کلاد مجزا مشاهده می‌شود که به طور معنی داری از هم جدا هستند.

پس از مرتب‌سازی مجموعه داده‌های نمونه‌های مورد مطالعه و توالی‌های به دست آمده از بانک ژن، بهترین مدل تکاملی برای این ژن با استفاده از نرم‌افزار Mega 6، مدل T92+G+I (Tamura 3-) Invariable site و ۰/۳۷ (parameter) با نرخ گامای ۰/۳۷ و وضعیت حدود ۰/۷۲ محاسبه شد. برای درک وضعیت فیلوژنتیکی گونه بز وحشی مازندران، در ابتدا توالی‌های مربوط به ژن ناحیه D-Loop با طول توالی ۴۸۱

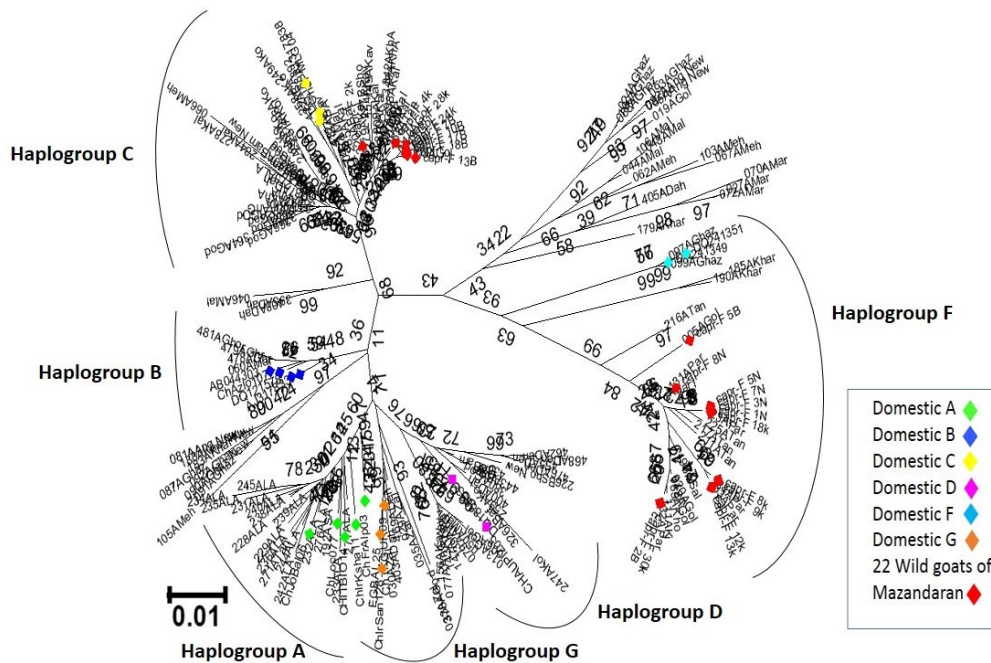


شکل ۱- درخت فیلوژنتیک بیشینه درست نمایی حاصل از ۲۲ بز وحشی مطالعه حاضر و ۲۲ رفرنس ۶ هاپلوگروپ بزهای اهلی دنیا جهت تعیین کلادهای مختلف کل و بزهای مازندران. توالی های بدست آمده از مطالعه حاضر (نمادهای لوزی توپر) با کلادهای C و F دارای جد مشترک هستند که به ترتیب با نمادهای لوزی توخالی و دایره ای توخالی،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

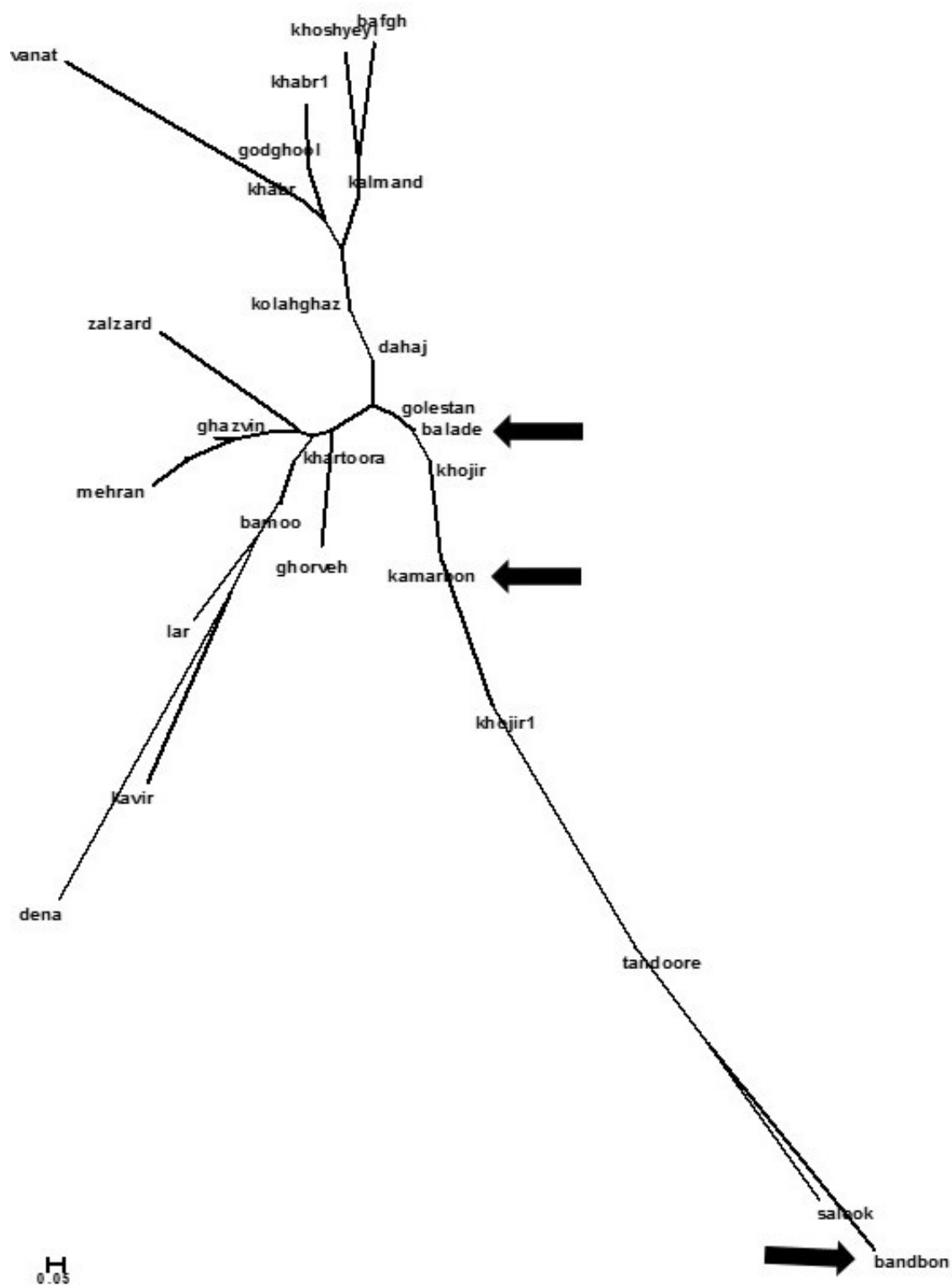
اهلی (Naderi *et al.*, 2007) بر گرفته از بانک ژن، درخت فیلوژنتیکی (شکل ۲) به دست آمد که نتایج آن تاییدکننده وضعیت درخت فیلوژنتیک قبلی (شکل ۱) است. بر اساس توپولوژی درخت حاصله، باز هم نمونه‌های بز وحشی ۳ منطقه مختلف استان مازندران، دارای جد مشترک با ۲ کلاد C و F بودند. همچنین، برای نمونه‌های مطالعه حاضر و نمونه‌های برگرفته از بانک ژن با استفاده از ماتریس فاصله ژنتیکی Fst/1-Fst، درخت NJ رسم شده نشان دهنده رابطه ژنتیک و جغرافیا است (شکل ۳). مناطق سه‌گانه مورد مطالعه در این پژوهش بر روی درخت، دارای رابطه نزدیک با مناطق جغرافیایی هم جوار هستند. به طوری که هر سه منطقه بر روی یکی از کلادها قرار دارند و رابطه نزدیک ژنتیکی و جغرافیایی در بین این مناطق از درخت رسم شده به خوبی استنباط می‌شود.

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

مطالعه درخت پیشینه درست نمایی در شکل ۱ نشان می‌دهد که نمونه‌های مناطق کمرین و بلده به هر دو کلاد C و F تعلق دارند، ولی نمونه‌های بندین فقط به کلاد F مربوط هستند. همچنین، برای درک بهتر جایگاه تبارشناسی کل و بزهای مورد مطالعه حاضر مربوط به استان مازندران، در تحلیلی دیگر ۱۴۴ هاپلوتایپ بزهای وحشی مناطق مختلف ایران اقتباس شده از بانک ژن، بر اساس مطالعه در مقیاس وسیع Naderi و همکاران در سال ۲۰۰۸ و ۲۲ فرد مورد مطالعه حاضر و نیز ۲۲ سکانس رفرنس جهانی بزهای



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

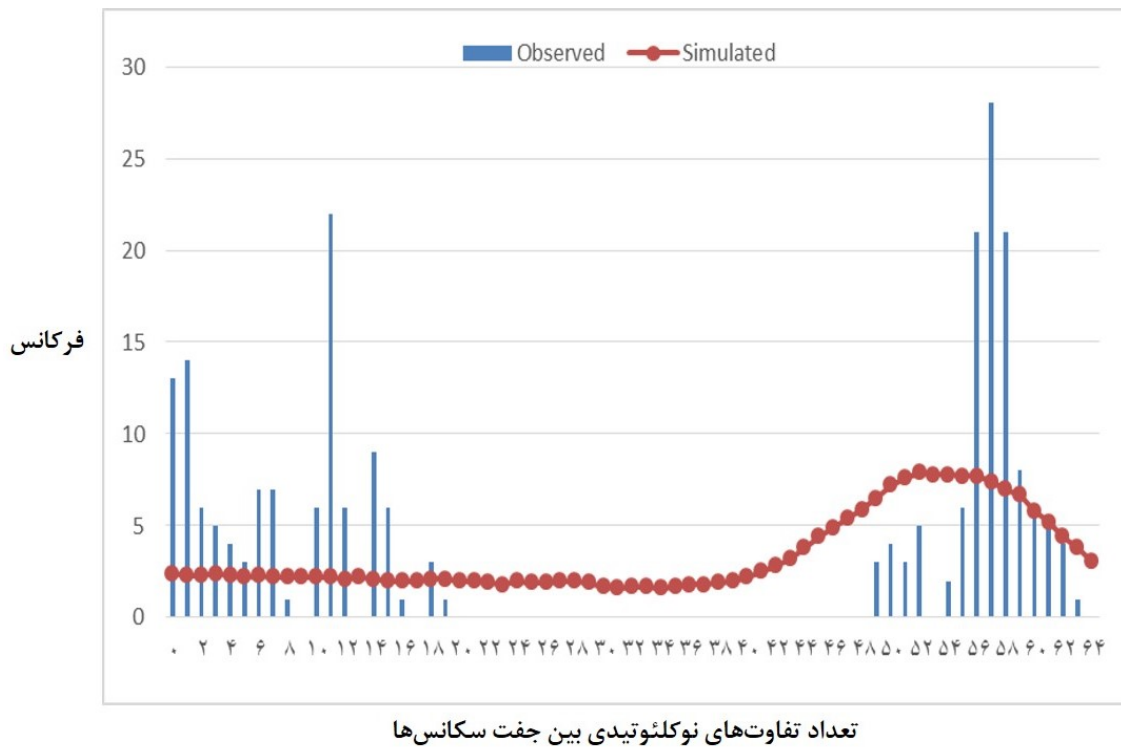


شکل ۳- درخت فیلوژئوگرافی بدست آمده از فاصله ژنتیکی $F_{st}/1-F_{st}$ برای بررسی رابطه ژنتیک و جغرافیا در بین نواحی نمونه برداری و مطالعه نحوه اشتقاق آن‌ها از یکدیگر، بر اساس نمونه های اقتباس شده بزهای وحشی از بانک ژن و ۲۲ نمونه بز وحشی سه منطقه مازندران (فلش های مشکی) در مطالعه حاضر.

۳.۳. بررسی ساختار جمعیتی، تنوع ژنتیکی و آنالیزهای دموگرافیک

آنالیزهای دموگرافیک شامل آزمون توزیع عدم انطباق (Mismatch Distribution) مربوط به مدل گسترش ناگهانی، بررسی فواصل ژنتیکی بین جمعیت‌ها و آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) و آزمون Neutrality شامل مقادیر F_s و F_u و Tajima's D به منظور بررسی ساختار دموگرافیک جمعیت کل و بزهای مازندران در جدول ۱ ارائه شده است. نتایج آزمون های F_s و F_u و Tajima's D نشان داد که انحرافی از فرضیه صفر مشاهده نمی‌شود

و در جمعیت های مورد نظر، رانش و جهش ژنتیکی در تعادل هستند. با توجه به مقادیر (Sum of Squared deviation) R و R (Harpending's Raggedness index) بدست آمده برای جمعیت کل و بزهای مازندران، در آزمون توزیع عدم انطباق، نزدیکی کامل بین مقادیر مشاهده شده و مورد انتظار، و فقدان مقادیر معنی‌دار برای این شاخص‌ها نشان از تبعیت این جمعیت از مدل گسترش ناگهانی و نرمال بودن جمعیت دارد. در عین حال، دو موج کاملاً متمایز، نشان دهنده تعلق این جانوران به دو کلاد کاملاً متفاوت است که تاییدکننده نتایج درختان تبارشناسی به دست آمده نیز می‌باشد (شکل ۴).



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

مناطق مختلف ایران از مطالعه در مقیاس وسیع Naderi و همکاران در سال ۲۰۰۸ و با در نظر گرفتن هر هاپلوگروپ به عنوان یک جمعیت در

نتایج آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) نیز بر اساس داده‌های ۲۲ فرد بز وحشی مطالعه حاضر و نمونه های وحشی اقتباس شده از بانک ژن برای

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

۴. بحث و نتیجه گیری

نتایج خصوصیات ژنتیکی به دست آمده بر اساس ۲۲ نمونه بز وحشی مطالعه حاضر، حاکی از وجود بیشترین مقدار تنوع هاپلوتایپی و نیز تنوع نوکلئوتیدی در منطقه کمرین و کمترین میزان در منطقه بندبن است (جدول ۱). کوچکتر بودن تنوع نوکلئوتیدی می‌تواند نشانه تنوع ژنتیکی پایین‌تر و جمعیت جداتر منطقه بندبن از دو جمعیت دیگر استان مازندران باشد. لازم به ذکر است که تعداد نمونه کمتر در منطقه بندبن، می‌تواند تا حدودی بر این نتیجه موثر باشد، ولی این تاثیر به مقدار زیاد نبوده و در عین حال بر اساس سایر تحلیل‌ها نیز نتیجه به دست آمده تایید شده است. وجود

هاپلوتایپ‌های مشابه در بین سه منطقه مورد مطالعه در استان مازندران و همچنین بین هاپلوتایپ‌های تشخیص داده شده در این مطالعه و هاپلوتایپ‌های تعیین شده در مطالعه Naderi و همکاران در سال ۲۰۰۸ در نقاط مختلف ایران، نشانگر حرکات زیاد گونه بز وحشی بوده و با توجه به وضعیت هاپلوتایپ‌ها، به خوبی با گستره جغرافیایی نیز همپوشانی دارد. وجود هاپلوتایپ‌های مشترک و نیز مقدار فاصله ژنتیکی کمتر با مناطقی مانند جمعیت‌های کل و بز پارک ملی گلستان، منطقه حفاظت شده پرور، منطقه حفاظت شده خارتوران، پارک ملی تندوره و پارک ملی خجیر، با توجه به فاصله جغرافیایی کمتر، قابل تفسیر است. این نتیجه با نتایج حاصل از مطالعه در مقیاس وسیع تنوع ژنتیکی کل و بز در ایران Naderi و همکاران در سال ۲۰۰۸، به لحاظ توزیع تنوع هاپلوتایپی و نیز پراکنش جغرافیایی، همخوانی دارد.

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

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

بر اساس توپولوژی درختان فیلوژنتیکی (تصاویر ۱ و ۲)، نمونه‌های بز وحشی سه منطقه مختلف استان مازندران دارای دو منشأ متفاوت بوده و به صورت مشخصی نمونه‌های منطقه بندبن، دارای تفاوت با نمونه‌های دو منطقه کمرین و بلده هستند. نمونه‌های مناطق کمرین و بلده دارای جد مشترک با دو کلاد C و F بودند. در حالیکه نمونه‌های بندبن فقط به کلاد F مربوط هستند. ممکن است بتوان مقدار کمتر تنوع

هاپلوتایپی و نوکلئوتیدی جمعیت بندبن را به این موضوع مرتبط دانست. همچنین، وجود کلادهای با غالبیت نمونه‌های جمعیت منطقه بندبن و نیز کلادهای با غالبیت نمونه‌های منطقه کمرین، قابل ملاحظه است. تمامی شاخه‌های انشعابی بر روی این درخت‌ها دارای صحت بالایی از مقدار عدد bootstrap بوده و حاکی از معنی‌دار بودن تفاوت این کلادها از نظر آماری است. این موضوع که با

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

با این دیدگاه و بر اساس تحلیلی دیگر، وضعیت ارتباط توزیع جغرافیایی ۲۲ نمونه بز وحشی استان مازندران، در ترکیب پایگاه داده‌ای نمونه‌های مختلف جمعیت‌های مختلف بز وحشی در ایران، اقتباس شده از بانک ژن، در یک درخت فیلوجرافی مورد سنجش قرار گرفت (شکل ۳). بر اساس این تحلیل، تمام نمونه‌های بز وحشی مازندران، بر روی یک شاخه قرار دارند که نشان‌دهنده وجود کریدور مشابه حرکتی در آنهاست. همچنین در این شاخه، مشاهده می‌شود که جمعیت بندبن در انتها واقع شده و در واقع با قرار گرفتن در دورترین نقطه، ضمن نشان دادن تنوع ژنتیکی پایین، حاکی از جمعیت تقریباً متفاوت از جمعیت دو منطقه دیگر استان مازندران است. وجود افراد مربوط به جمعیت‌های نقاط جغرافیایی هم جوار مانند استان گلستان، تندوره و خجیر، قابل توجه و

نشان‌دهنده احتمال تلاقی بیشتر با این جمعیت‌ها است. تمامی این نتایج مکمل و موید داده‌های مطالعه مقیاس وسیع تنوع ژنتیکی بز وحشی در ایران Naderi و همکاران در سال ۲۰۰۸ است. وجود تعادل بین جهش و رانش ژنتیکی در جمعیت‌های مورد مطالعه، بر اساس تحلیل ساختار جمعیتی و نتایج آنالیزهای دموگرافیک آزمون Neutrality شامل شاخص‌های F_s و $Tajima's D$ ، نشان داد که در گذشته حوادث ژنتیکی ناگوار مانند رانش ژنی (Genetic Drift)، گردنه بطری (Bottleneck) و اثر جمعیت بنیانگذار (Effect Founder) را تجربه نکرده‌اند. همچنین نتایج آزمون توزیع عدم انطباق مربوط به مدل گسترش ناگهانی، انطباق کامل بین مقادیر مشاهده شده و مورد انتظار، نشان از تبعیت جمعیت‌های مورد مطالعه از مدل گسترش ناگهانی دارد. در واقع به نظر می‌رسد با وجود فشار و انواع تهدید در مناطق مطالعاتی، جمعیت‌ها در حال افزایش به صورت مناسب هستند. شاید این نشانه‌ای از حفاظت مناسب توسط محیط‌بانان و مسئولین مناطق مطالعاتی باشد. در عین حال، وجود دو موج کاملاً متمایز، نشان‌دهنده تعلق این جانوران به دو کلاد کاملاً متفاوت است. به طوری که وجود ۶۴ نوکلئوتید اختلاف بین دو فرد در ۴۸۲ جفت باز مورد مطالعه، نشان از تفاوت بارز بعضی افراد دارد. این موضوع با مشاهده دو کلاد متفاوت در درخت‌های فیلوژنتیک تحلیلی (تصاویر ۱ و ۲)، و وجود دو منشاء متفاوت بزهای وحشی استان مازندران، نیز همخوانی دارد.

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

آنالیز واریانس مولکولی نشان می‌دهد که جمعیت‌های کلادهای مختلف که هر هاپلوگروپ ایجاد می‌کند، با کلادهای دیگر تفاوت کاملاً معنی‌داری داشته و مقدار بزرگ شاخص F_{st} ، علاوه بر معنی‌دار بودن، نشان‌دهنده تفاوت ژنتیکی بالا در بین کلادهای مختلف کل و بزهای تشکیل‌دهنده کلادهای مجزا از نظر ژنتیکی است. با توجه به آنکه در حال حاضر بر اساس تشخیص سازمان‌های جهانی حفاظت گونه‌ها، بز وحشی ایران در وضعیت آسیب‌پذیر قرار دارد و گزارش‌ها حاکی از آن است که این گونه در برخی مناطق ایران به کلی از بین رفته است، لذا داده‌های مطالعه حاضر و سایر مطالعات مشابه در مورد جمعیت‌های این گونه می‌تواند برای ارائه راهکارهای حفاظتی عملکردی، مفید باشد.

تفاوت ژنتیکی میان منطقه‌ای در حد پایینی در مقایسه با بسیاری از گونه‌های نشخوارکننده است. این امر نشان‌دهنده ساختار فیلوجغرافیایی ضعیف این گونه در ایران دارد. به نظر می‌رسد با رفتار خاص این گونه، دامنه جابجایی آن و نیز تاثیر انسان در جابجایی‌های کل و بز به عنوان یکی از اولین جانوران اهلی شده در زندگی انسانها مرتبط باشد. این اختلاط در مقیاس وسیع، به ویژه برای افراد هاپلوگروپ C که دارای پراکنش گسترده کنونی هستند، صادق است (Naderi *et al.*, 2008). در مطالعه حاضر، برای داشتن تصویری دیگر، از روش آنالیز واریانس مولکولی برای تحلیل نحوه توزیع تنوع ژنتیکی در ساختار جمعیت‌های مختلف بز وحشی ایران بر اساس در نظر گرفتن هر هاپلوگروپ به عنوان یک جمعیت، استفاده شد. بررسی فواصل ژنتیکی بین جمعیت‌ها و

References:

- Amillset *al.*, 2004. Strong phylogeographic relationships among three goat breeds from the Canary Islands. *J. Dairy Res.* 71(3):257–262.
- Azoret *al.*, 2005. Phylogenetic relationships among Spanish goats breeds. *Anim. Genet.* 36(5): 423–425.
- Boore, J. L. 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res.* 27:1767-1780.
- Colombo *et al.*, 2002. Identification of the goose species (*Anseranser*) in Italian "Mortara" salami by DNA sequencing and a polymerase chain reaction with an original primer pair. *J. MeatSci.* 61:261-294.
- Excoffier, L. and H.E.L.Lischer. 2010. Arlequin suite 3.5: A new series of programs to perform population genetic analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources.* 10:564-567.
- Groves *et al.*, 1995. In vitro maturation of clonal CD4+CD8+ cell lines in response to TCR engagement. *J. Immunol.* 154: 5011-5022.
- Kim, K. H, and J. H. Lee. 2002. Phylogenetic relationships of Asian and European Pig breeds determined by mitochondrial DNA D-LOOP sequence polymorphism. *J. Anim. Genet.* 33:19-25.
- Librado, P. and Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Malekian, m. 1998. *The translation of molecular ecology*, Freeland, G. (author), Jahad University of Mashhad, 304 p. in Persian.

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

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

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

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

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

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

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

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