Genetic Diversity of Wild Boar Populations from Iran based on Mitochondrial DNA Control Region Sequences

Mohammad Reza Ashrafzadeh *

Assistant Professor, Department of Fisheries and Environmental Sciences, Faculty of Natural Resources and Earth Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

Abstract

Wildlife management and conservation requires a comprehensive picture of genetic variation and variability in geographic structures. The purpose of the present study was to assess the genetic relationship and diversity of Iranian wild boar populations by analyzing a 572 bp fragment of mtDNA control region. To this end, a dataset was created using our sequences (29 wild boar) together with additional 75 sequences (from the south of Iran) downloaded from GenBank. Our analyses identified four distinct maternal clades within Iranian wild boars including Near East 1 (NE1), Near East 2 (NE2), Asiatic, and European. The European and NE1 clades have the smallest and largest geographical ranges in Iran, respectively. Furthermore, all of the clades are sympatrically distributed in the northwest of the country that this area could be considered as the contact zone of the four clades. According to the results, a total of 20 haplotypes were identified among the 104 sequences belonging to wild boars from Iran. The haplotype and nucleotide diversities were estimated as about 0.882 (±0.014) and 0.0145 (±0.00047), respectively. The AMOVA results of the Iranian clades demonstrated that the proportion of variation among clades (82.84%) was higher than the variation within them (17.16%). Also, the fixation index (FST) confirmed a significant genetic structure among the boar clades. Our findings revealed no evidence for a recent demographic expansion in the Iranian wild boars.

Key words: Genetic Variability, Analysis of Molecular Variance, Haplotype Diversity, *Sus Scrofa*.

* mrashrafzadeh@sku.ac.ir

Copyright©2019, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

تاکسونومی و بیوسیستماتیک، سال دهم، شماره سی و پنجم، تابستان ۱۳۹۷، صفحه ۸۵- ۹۶
دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۰۷/۲۰ پذیرش نهایی: ۱۳۹۸/۰۱/۲۷

بررسی تنوع ژنتیکی گرازهای وحشی ایران بر اساس توالی‌های ناحیهٔ کنترل میتوکندری

محمدرضا اشرف‌زاده *

استادیار گروه شیلات و محیط‌زیست، دانشکدهٔ منابع طبیعی و علوم زمین، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

چکیده

مدیریت و حفاظت از حیات وحش نیازمند داشتن تصویری جامع از تنوع و تغییرپذیری ژنتیکی در ساختارهای جغرافیایی است. هدف پژوهش حاضر، بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گراز وحشی در ایران با استفاده از یک قطعهٔ ۵۷۲ جفت بازی از ناحیهٔ کنترل میتوکندریایی در نظر گرفته شد. به این منظور، تعداد ۲۹ نمونه متعلق به جنوب کشور توالی‌یابی شد؛ همچنین ۷۵ توالی دیگر که به مناطق مختلف ایران مربوط بودند از بانک ژن استخراج شدند. بر اساس تحلیل‌ها، چهار کلاد جهانی متعلق به گراز وحشی شامل کلادهای شرق نزدیک ۱ (NE1)، شرق نزدیک ۲ (NE2)، اروپایی و آسیایی در ایران حضور دارند و کلادهای اروپایی و NE1 به‌ترتیب کمترین و بیشترین پراکنش را به خود اختصاص می‌دهند. حضور هم‌جای کلادها در مناطق مختلف کشور از مهم‌ترین جنبه‌های درخور توجه است. شمال‌غربی کشور منطقهٔ تماس کلادهای اروپایی و آسیایی در نظر گرفته می‌شود. بر اساس یافته‌ها، تعداد ۲۰ هاپلوتایپ در ۱۰۴ توالی از ایران شناسایی شد. تنوع هاپلوتایپی و تنوع نوکلئوتیدی در نمونه‌های ایران به‌ترتیب حدود ۰/۸۸۲ (انحراف معیار= ۰/۰۱۴) و ۰/۰۱۴۵ (انحراف معیار= ۰/۰۰۰۴۷) محاسبه شد. بر اساس تحلیل AMOVA، اختلاف ژنتیکی بین کلادها (۸۲/۸۴ درصد) بیش از اختلاف ژنتیکی داخل این کلادها بود؛ علاوه‌براین، نمایهٔ F_{ST} نیز وجود ساختار ژنتیکی معناداری را بین کلادها تأیید کرد. هیچ‌یک از نمایه‌های Fu's *FS* و Tajima's *D*، نشانه‌های مشخصی از وجود گسترش جمعیت‌شناختی ناگهانی در کلادهای گراز وحشی متعلق به ایران را تأیید نکردند.

واژه‌های کلیدی: تغییرپذیری ژنتیکی، تحلیل واریانس مولکولی، تنوع هاپلوتایپی، *Sus scrofa*.

مقدمه

گراز وحشی (*Sus scrofa* Linnaeus, 1785) توزیع گسترده‌ای در اوراسیا دارد و در شمال‌غرب آفریقا نیز مشاهده می‌شود (Alves *et al*., 2010; Ashrafzadeh and Bordkhani, 2012). بر اساس پژوهش‌های ریخت‌شناختی، زیرگونه‌های متعددی در اروپا، غرب آسیا و شمال‌غرب آفریقا برای گراز وحشی پیشنهاد شده‌اند و Wilson و Reeder (۲۰۰۵) تعداد ۱۶ زیرگونه را برای آن گزارش کرده‌اند. گراز وحشی اوراسیایی حدود یک میلیون سال پیش از گرازهای

* mrashrafzadeh@sku.ac.ir
Copyright©2019, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

آسیایی جدا شده و در اوراسیای غربی نمایان شده است (Frantz *et al*., 2013).

پژوهش‌های پیشین نشان می‌دهند پراکنش کنونی گونه‌ها و ساختار و تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها پیامد عملکرد فرایندهای زمین‌شناسی و تکاملی بلندمدت است (Ricklefs and Schluter, 1993; Avise, 2000)؛ به عبارتی، احتمالاً تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت‌های امروزی گونه‌ها پاسخ آنها را به نوسان‌های اقلیمی گذشته (دورهٔ پلیستوسن) منعکس می‌کند (Hewitt, 2000; Stewart *et al*., 2010; Ashrafzadeh *et al*., 2018a). تغییرات اقلیمی کواترنری پیامدهای مشخصی را بر شکل‌گیری الگوهای جغرافیایی تنوع ژنتیکی گرازهای وحشی داشته‌اند (Maselli *et al*., 2016) که درنتیجهٔ آنها، دو کلاد عمده شکل گرفته است: یک کلاد در آسیا و کلاد دیگر در اروپا (Alves *et al*., 2003; Larson *et al*., 2005; Alexandri *et al*., 2012). حضور توالی‌هایی از هر دو کلاد آسیایی و اروپایی در ایران گزارش شده است؛ به‌طوری‌که کلاد آسیایی تقریباً در سراسر کشور مشاهده شده، ولی کلاد اروپایی با فراوانی بسیار کمتر در شمال (Larson *et al*., 2007; Khalilzadeh *et al*., 2016) و غرب (Larson *et al*., 2007) کشور ثبت شده است. پژوهش‌های بعدی در اوراسیای غربی، سه کلاد مادری را در گرازهای آسیایی (کلادهای NE1 یا شرق نزدیک ۱، NE2 یا شرق نزدیک ۲ و آسیایی) و دو کلاد دیگر را در گرازهای اروپایی (کلاد اروپایی و کلاد ایتالیایی) معرفی کرده‌اند (Larson *et al*., 2007; Ottoni *et al*., 2012).

مدیریت حیات وحش و حفاظت از آن نیازمند داشتن تصویر جامعی از تنوع و تغییرپذیری ژنتیکی ساختارهای گیتاشناختی است (Ashrafzadeh *et al*., 2016). تنوع ژنتیکی به تعداد افراد یک گروه یا جمعیت و مقدار جریان ژنی از دیگر جمعیت‌ها به‌علاوهٔ انتخاب طبیعی در طول زمان وابسته است (Frankham, 1996). میزان گوناگونی ژنتیکی در جمعیت، اطلاعات سودمندی را در زمینهٔ ویژگی‌های جمعیت‌شناختی و تاریخچهٔ آن جمعیت ارائه می‌دهد. تنوع ژنتیکی کم ممکن است به روند کاهش تعداد افراد در گذشته مانند گردنهٔ بطری ژنتیکی (Genetic bottleneck) اشاره داشته باشد (Laikre *et al*., 2009)؛ از سویی، تغییرپذیری ژنتیکی یک گونه و جمعیت‌های آن نقشی اساسی در ارزیابی زیستایی و بقای طولانی‌مدت آن گونه بازی می‌کند (Lacy, 1997). تلاش برای دستیابی به اطلاعات در زمینهٔ تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها بخش عمده‌ای از پژوهش‌های ژنتیکی و حفاظت را به خود اختصاص می‌دهد (Mills *et al*., 2003; Kopatz *et al*., 2014; Ashrafzadeh *et al*., 2018a). پژوهش‌های گسترده‌ای ازجمله Larson و همکاران (۲۰۰۵ و ۲۰۰۷)، Alexandri و همکاران (۲۰۱۲)، Maselli و همکاران (۲۰۱۶)، Khalilzadeh و همکاران (۲۰۱۶) و Ashrafzadeh و همکاران (۲۰۱۸a) تنوع و ساختار ژنتیکی و تبارشناسی گرازهای وحشی را در اروپا و آسیا بررسی کرده‌اند. Larson و همکاران در سال‌های ۲۰۰۵ و ۲۰۰۷ با بررسی توالی‌های ژنتیکی گرازهای وحشی متعلق به ایران، حضور کلادهای آسیایی و اروپایی را در بخش‌هایی از ایران گزارش کردند. Khalilzadeh و همکاران (۲۰۱۶) در پژوهشی منطقهٔ تماس گرازهای وحشی آسیایی و اروپایی را در ایران بررسی کردند. در حال حاضر، اطلاعات چندانی دربارهٔ وضعیت ژنتیکی جمعیت‌های درحال کاهش و کلادها یا جمعیت‌های در

معرض تهدید انقراض در مناطق مختلف کشور وجود ندارد (Meijaard and Moqanaki, 2011)؛ ازاین‌رو هدف پژوهش حاضر، بررسی تنوع ژنتیکی گرازهای وحشی ساکن ایران با استفاده از توالی ناحیهٔ کنترل میتوکندریایی است.

مواد و روش‌ها

تعداد ۲۹ نمونه بافت ماهیچه متعلق به گراز وحشی از استان‌های خوزستان (۱۴ فرد) و کرمان (۱۵ فرد) گردآوری شد. در پژوهش حاضر، نمونه‌برداری از افرادی انجام شد که با مجوز سازمان حفاظت محیط‌زیست و توسط شکارچیان مجاز در قالب کنترل جمعیت حیوانات آسیب‌رسان به زمین‌های کشاورزی شکار شده بودند. نمونه‌ها تا زمان استخراج DNA در اتانول ۹۶ درصد نگهداری شدند. این نمونه‌ها همراه با ۱۰۱ توالی (۷۵ نمونه متعلق به ایران) استخراج‌شده از بانک ژن (Gongora *et al*., 2004; Larson *et al*., 2005; Larson *et al*., 2007; Larson *et al*., 2010; Ottoni *et al*., 2012; Khalilzadeh *et al*., 2016) در تحلیل‌ها استفاده شدند.

کیت ویژهٔ استخراج DNA از بافت (ساخت شرکت کیاژن) و دستورعمل آن برای استخراج DNA استفاده شد. یک قطعهٔ ۵۷۲ جفت بازی از ناحیهٔ کنترل میتوکندری با استفاده از آغازگرهای L15387 و H16108n (Luetkemeier *et al*., 2010) تکثیر شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase Chain Reaction: PCR) با استفاده از کیت ویژهٔ PCR (AccuPower® Premix Kit, Bioneer) در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱ واحد از آنزیم Top DNA polymerase، ۲۵۰ میکرومول از هر dNTP، ۱۰ میلی‌مول از Tris-HCl، ۳۰ میلی‌مول از KCl، ۱/۵ میلی‌مول از $MgCl_2$ و ۲ پیکومول از هر آغازگر اجرا شد. برنامهٔ دمایی PCR با واسرشت اولیه در ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۳ دقیقه آغاز شد؛ سپس ۳۰ چرخه شامل واسرشت در ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگرها در ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه، گسترش زنجیره در ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۵۰ ثانیه انجام شد؛ درنهایت، گسترش نهایی زنجیره در ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه انجام شد. نمونه‌ها با دستگاه ABI 3730 به‌شکل خوانش دوطرفه توالی‌یابی و تمام توالی‌ها با استفاده از Seqscape 2.6 ویرایش شدند. روش ClustalW در Mega 6 (Tamura *et al*., 2013) برای ردیف‌یابی توالی‌ها استفاده شد.

آزمون اشباع جایگزینی برای داده‌های بررسی‌شده با نرم‌افزار DAMBE 5 (Xia, 2013) انجام شد. به‌منظور بررسی اشباع احتمالی در سطوح واگرایی بالاتر از ترسیم جایگزینی‌های هم‌جنس و غیرهم‌جنس در برابر فواصل کیمورا استفاده شد. شبکهٔ هاپلوتایپی بر اساس تحلیل اتصال میانه (Median joining) (Bandelt *et al*., 1999) و با نرم‌افزار PopART 1.7 به دست آمد.

تعداد هاپلوتایپ‌ها، جایگاه‌های چندریختی، تنوع هاپلوتایپی و تنوع نوکلئوتیدی با استفاده از DnaSP 5.10 (Librado and Rozas, 2009) محاسبه شدند. آزمون‌های خنثی‌سازی Fu's F_S، Tajima's D و نرم‌افزار Arlequin 3.5 (Excoffier and Lischer, 2010) برای ارزیابی شواهد احتمالی گسترش ناگهانی جمعیت در گذشته استفاده شدند. برآورد معناداری آزمون‌های یادشده با ۱۰۰۰۰ شبیه‌سازی انجام شد و

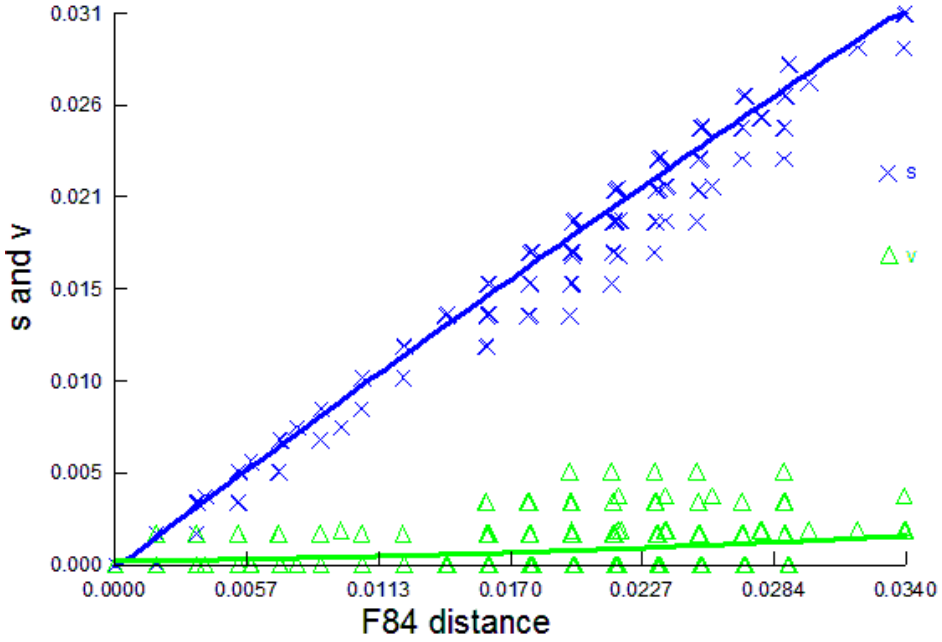
آزمون‌ها بر این فرض استوار بودند که جمعیت مطالعه‌شده طی دورهٔ طولانی تکاملی در تعادل جهش- رانش بوده است (Nei and Kumar, 2000). هنگامی که جمعیت فرض‌شده به‌علت گسترش ناگهانی در تعادل جهش - رانش قرار نداشته باشد، نمایه‌های یادشده به‌سمت ارزش‌های منفی معنادار تمایل می‌یابند (Keis *et al*., 2013; Ashrafzadeh *et al*., 2016). سطوح ساختار جمعیتی با تحلیل واریانس مولکولی (AMOVA) و نمایهٔ F_{ST} (Weir and Cockerham, 1984) در نرم‌افزار Arlequin 3.5 (Excoffier and Lischer, 2010) برآورد شد.

نتایج

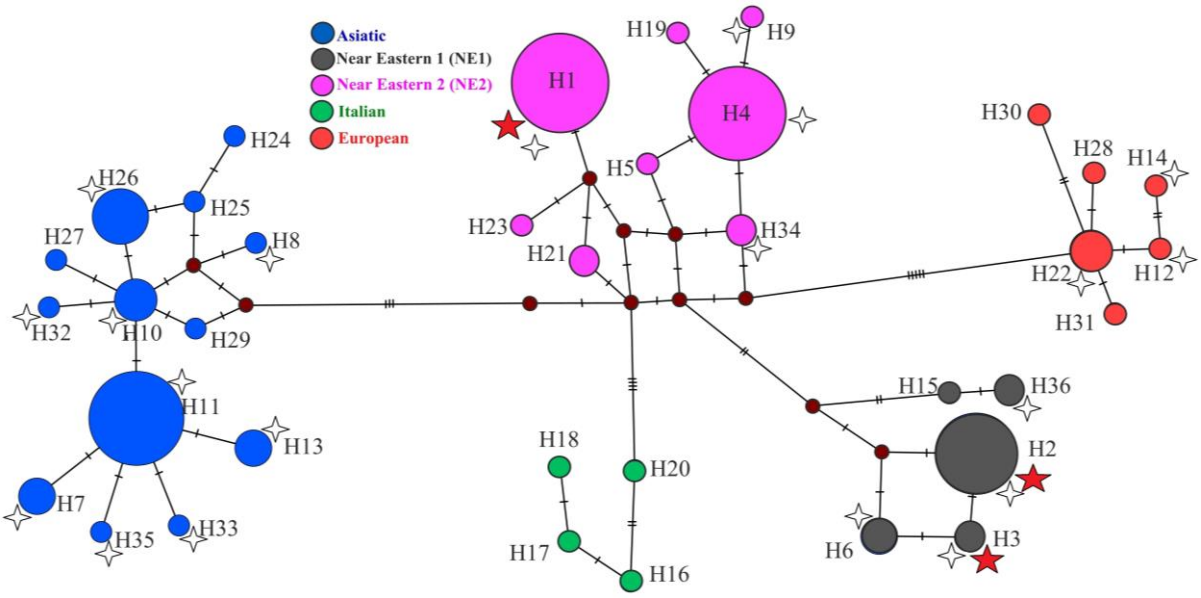
بر اساس تحلیل‌ها، داده‌های بررسی‌شده کمترین اشباع جایگزینی را داشتند (شکل ۱). یافته‌ها نشان دادند ارزش نمایهٔ اشباع جایگزینی (ISS) به‌طور معناداری کمتر از ارزش نمایهٔ بحرانی اشباع جایگزینی (ISS_C) است ($P<۰/۰۱$)؛ بنابراین، داده‌های بررسی‌شده برای اجرای تحلیل‌های تبارشناختی مناسب بودند. بر مبنای یافته‌های تحلیل شبکهٔ هاپلوتایپی، پنج کلاد معرفی‌شده برای گرازهای وحشی اوراسیایی استنتاج‌پذیرند (شکل ۲)؛ در این میان، چهار کلاد NE1، NE2، اروپایی و آسیایی در حال حاضر در ایران حضور دارند: کلاد NE1 در میان نمونه‌هایی از کرمان، کهگیلویه‌وبویراحمد، خوزستان، کرمانشاه، آذربایجان شرقی و اردبیل شناسایی شد؛ کلاد NE2 در میان نمونه‌های متعلق به استان‌های سمنان، گلستان، مازندران، قزوین، اردبیل، آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، کردستان، همدان، چهارمحال‌وبختیاری، خوزستان، کهگیلویه‌وبویراحمد و سیستان‌وبلوچستان مشاهده شد؛ کلاد اروپایی تنها در چهار نمونه از استان‌های گلستان، کرمانشاه و اردبیل شناسایی شد؛ توالی‌های متعلق به کلاد آسیایی در نمونه‌هایی از استان‌های سیستان‌وبلوچستان، خراسان رضوی، خراسان شمالی، گلستان، مازندران، البرز، گیلان، قزوین، آذربایجان غربی و کرمانشاه مشاهده شد. شکل (۳) پراکنش کلادهای مختلف گراز وحشی را در کشور نشان می‌دهد.

به نظر می‌رسد کلاد اروپایی و کلاد NE1 به‌ترتیب کمترین و بیشترین پراکنش را در میان کلادهای شناسایی‌شده در ایران به خود اختصاص می‌دهند؛ علاوه‌براین، حضور هم‌جای کلادها در مناطق مختلف کشور از مهم‌ترین جنبه‌های جالب توجه است و در این بین، هر چهار کلاد به‌شکل هم‌جا در شمال‌غرب کشور مشاهده می‌شوند.

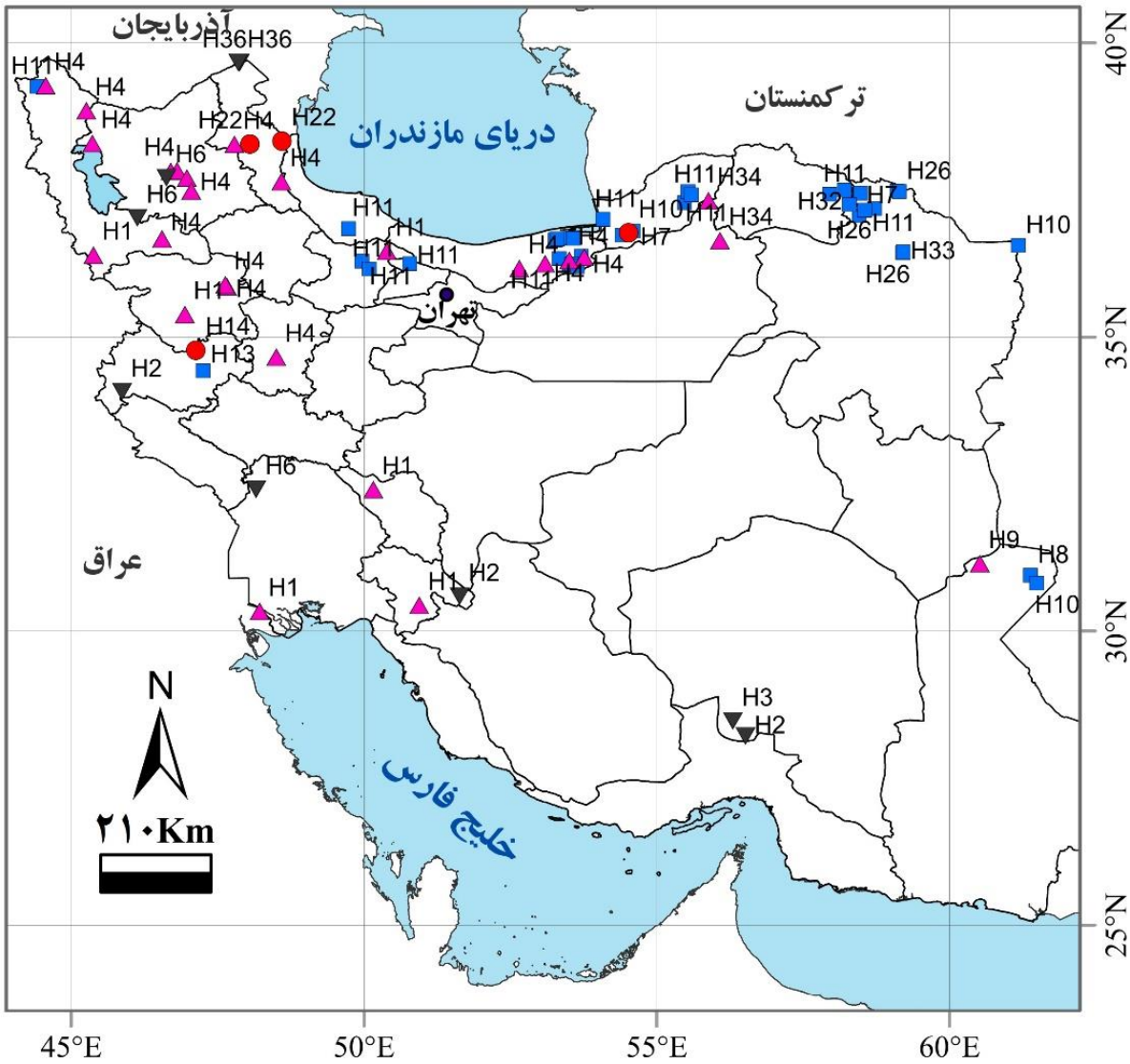
بر اساس تحلیل قطعهٔ ۵۷۲ جفت بازی از ناحیهٔ کنترل، تعداد ۲۰ هاپلوتایپ در ۱۰۴ توالی (دربرگیرندهٔ تمام توالی‌های گراز وحشی ایران) شناسایی شدند. تنوع هاپلوتایپی و تنوع نوکلئوتیدی در گرازهای وحشی ایران به‌ترتیب حدود ۰/۸۸۲ (انحراف معیار= ۰/۰۱۴) و ۰/۰۱۴۵ (انحراف معیار= ۰/۰۰۰۴۷) محاسبه شد. جدول (۱) آماره‌های ژنتیکی را به تفکیک کلادهای گراز وحشی در ایران نشان می‌دهد. بیشترین تنوع هاپلوتایپی و تنوع نوکلئوتیدی به‌ترتیب در کلادهای اروپایی (تنوع هاپلوتایپی= ۰/۸۳۳ و تنوع نوکلئوتیدی به‌ازای هر جایگاه= ۰/۰۰۳۲) و آسیایی (تنوع هاپلوتایپی= ۰/۷۲۵ و تنوع نوکلئوتیدی به‌ازای هر جایگاه= ۰/۰۰۳۸۵)گراز وحشی ساکن ایران برآورد شد.



شکل ۱- جایگزینی‌های هم‌جنس و غیرهم‌جنس در برابر فاصلهٔ کیمورا برای قطعهٔ ۵۷۲ جفت بازی از ناحیهٔ کنترل میتوکندری



شکل ۲- شبکهٔ هاپلوتایپی گرازهای وحشی ایران در میان کلادهای جهانی؛ ستاره‌ها هاپلوتایپ‌های متعلق به ایران را نشان می‌دهند: ستارهٔ سفیدرنگ (✧) نشان‌دهندهٔ هاپلوتایپ‌های استخراج‌شده از بانک ژن و ستارهٔ قرمزرنگ (★)نشان‌دهندهٔ هاپلوتایپ‌های شناسایی‌شده در پژوهش حاضر هستند. پراکنش جغرافیایی هاپلوتایپ‌های متعلق به ایران در شکل (۳) مشاهده می‌شود.



شکل ۳- پراکنش کلادهای گراز وحشی در ایران؛ شکل‌های هندسی کلادهای مختلف را نشان می‌دهند: ■. کلاد آسیایی، ▼. کلاد شرق نزدیک ۱ یا NE1، ▲. کلاد شرق نزدیک ۲ یا NE2، ●. کلاد اروپایی. جزئیات بیشتر در شکل (۲) دیده می‌شوند.

بر اساس تحلیل AMOVA، اختلاف ژنتیکی بین کلادهای گراز وحشی در ایران (۸۲/۸۴ درصد) بیش از اختلاف ژنتیکی داخل این کلادها (۱۷/۱۶ درصد) است (جدول ۲)؛ علاوه‌براین، نمایهٔ F_{ST} وجود ساختار ژنتیکی معنادار را بین کلادهای معرفی‌شده تأیید می‌کند (جدول ۲). نمایه‌های Fu's *FS* و Tajima's *D* به‌منظور بررسی احتمال وجود گسترش‌های ناگهانی جمعیت‌شناختی در گذشته استفاده شدند. هیچ‌یک از نمایه‌های یادشده نشانه‌های مشخصی از وجود گسترش جمعیت‌شناختی را در جمعیت‌های گراز وحشی در ایران تأیید نکردند (جدول ۱).

جدول ۱- برخی آماره‌های ژنتیکی برای کلادهای گرازهای وحشی در ایران بر اساس توالی ۵۷۲ جفت بازی از ناحیهٔ کنترل میتوکندری؛ *n*. تعداد افراد، *h*. تعداد هاپلوتایپ، *Hd*. تنوع هاپلوتایپی، *SD*. انحراف معیار، *Pi*. تنوع نوکلئوتیدی به‌ازای هر جایگاه، *K*. متوسط تعداد اختلاف نوکلئوتیدی، *P*. تعداد جایگاه‌های متغیر

گروه	*n*	*h*	*Hd* (SD)	*Pi* (SD)	*K*	*P*	Fu's F_S	Tajima's *D*
کلاد NE1	۲۲	۴	۰/۵۲۴ (۰/۱۱۶)	۰/۰۰۱۹۹ (۰/۰۰۰۵۸)	۱/۱۳۴	۵	۰/۳۹۳	−۰/۵۱۴
کلاد NE2	۴۰	۴	۰/۵۸۳ (۰/۰۳۹)	/۰۰۳۶۷ (۰/۰۰۰۱۴)	۲/۰۹۷	۵	۳/۱۰۴	۱/۹۹۶
کلاد اروپایی	۴	۳	۰/۸۳۳ (۰/۲۲۲)	۰/۰۰۳۲۲ (۰۰۱۱۷)	۱/۶۶۷	۳	−۰/۱۳۳	۰/۱۶۸
کلاد آسیایی	۳۸	۹	۰/۷۲۵ (۰/۰۶۹)	۰/۰۰۳۸۵ (۰/۰۰۱۴)	۱/۹۹۱	۲۱	−۱/۷۶۸	−۱/۷۴۵

جدول ۲- تحلیل واریانس مولکولی کلادهای گراز وحشی در ایران

منبع تغییرات	درجهٔ آزادی	درصد تغییرات	F_{ST}	P-value
بین کلادها	۳	۸۲/۸۴	۰/۸۲۸	۰/۰۰۰
درون کلادها	۱۰۰	۱۷/۱۶		

بحث

ایران کشوری کوهستانی (تقریباً ۵۴ درصد پوشیده از کوه‌ها) با فلات مرکزی مرتفع است که گستره‌ای از کوه‌ها در چهار جهت جغرافیایی آن را احاطه کرده است (Sagheb Talebi *et al*., 2013). بر اساس تقسیم‌بندی مناطق بوم‌شناختی جهانی فائو، ایران ازنظر ویژگی‌های زیست‌گیتاشناختی و جنبه‌های بوم‌شناختی از بیشتر کشورهای آسیایی متمایز می‌شود. اگرچه ایران ازنظر قلمروهای حیاتی به‌طور عمده در محدودهٔ پالئارکتیک قرار گرفته است، وجود گستره‌هایی از جنبه‌های بوم‌شناختی و عناصر جانوری و گیاهی دو قلمرو دیگر (آفروترپیکال و اورینتال) در بخش‌های جنوبی، این کشور را از دید اندیشمندان زیست‌گیتاشناسی در جایگاه ویژه‌ای قرار داده است. ایران ازنظر تقسیم‌بندی جهانی بوم‌ناحیه‌ها در موقعیت ارزشمندی قرار دارد و ازنظر گیاهی در محل برخورد چندین منطقه شامل اروپا - سیبری، ایرانی - تورانی و صحرا - سندی واقع شده است و به‌عنوان منطقهٔ انتقالی در گسترهٔ متنوعی از الگوهای گیاهی مرطوب تا خشک عمل می‌کند (Sagheb Talebi *et al*., 2013). ایران ازنظر تکتونیک جهانی نیز بخشی از کمربند کوه‌زایی آلپی - هیمالیایی محسوب می‌شود که از اقیانوس اطلس تا آرام غربی کشیده شده است (Mouthereau *et al*., 2012). فعالیت‌های کوه‌زایی در طول اولیگوسن که سبب ظهور کوه‌های البرز و زاگرس شده و تغییرات محیطی و زیستگاهی گسترده‌ای را به همراه داشته است، احتمالاً حوادث تکاملی قدرتمندی را برای ایجاد تنوع و گسترش گونه‌های گیاهی و جانوری بومی و انحصاری در ایران (برای نمونه در بسیاری از خانواده‌های گیاهی (Akhani, 2007)) سبب شده است. این عوامل، مجموعه‌ای از شرایط زیستی را در ایران فراهم کرده‌اند؛ به‌طوری‌که تنوع جالب توجهی از آرایه‌های مختلف و همچنین گروه‌های ژنتیکی مانند کلادها و هاپلوگروپ‌های متعلق به رده‌های مختلف جانوری در این کشور حضور دارند.

گراز وحشی اوراسیایی یکی از گونه‌هایی است که پراکنش نسبتاً گسترده‌ای در ایران دارد. در پژوهش حاضر، تنوع ژنتیکی گرازهای وحشی ایران بررسی شد. باتوجه‌به پژوهش‌های انجام‌شده (Larson *et al*., 2005; Larson *et al*., 2007; Ottoni *et al*., 2012; Ashrafzadeh *et al*., 2018b)، توالی‌های متعلق به گرازهای وحشی مناطق مختلف جهان در پنج گروه شامل کلادهای NE1، NE2، اروپایی، آسیایی و ایتالیایی قرار می‌گیرند؛ بر این اساس، گرازهای وحشی ایران در چهار کلاد مادری شامل NE1، NE2، اروپایی و آسیایی جای می‌گیرند و به نظر می‌رسد کلاد NE1 بیشترین گستردگی زیستگاهی را به خود اختصاص داده است؛ به‌طوری‌که در اغلب مناطق بررسی‌شده از غرب تا شرق و از شمال تا جنوب پراکندگی دارد. کلاد اروپایی کمترین توزیع را نشان می‌دهد و تنها در نمونه‌های محدودی از شمال و غرب کشور شناسایی شده است. توزیع هم‌جای کلادهای مختلف در اغلب مناطق کشور به‌شکلیست که به‌آسانی ردیابی می‌شوند و یکی از مهم‌ترین جنبه‌های درخور توجه است؛ مشاهدهٔ یک منطقهٔ تماس بین هر چهار کلاد در شمال‌غربی کشور نشانهٔ دیگری از ضرورت توجه به جمعیت‌های گراز وحشی ساکن کشور ایران در پژوهش‌های تبارشناختی مرتبط با این گونهٔ جانوری است (Khalilzadeh *et al*., 2016).

در میان ۱۰۴ توالی متعلق به گرازهای وحشی ایران، تعداد ۲۰ هاپلوتایپ بر اساس تحلیل قطعهٔ ۵۷۲ جفت بازی از ناحیهٔ کنترل شناسایی شد. بیشترین تنوع هاپلوتایپی و تنوع نوکلئوتیدی به‌ترتیب در کلادهای اروپایی و آسیایی گراز وحشی ساکن ایران برآورد شد. جالب توجه است که درون کلاد NE2، یک هاپلوتایپ مشترک (H1) در میان گرازهای وحشی خوزستان، چهارمحال‌وبختیاری، کهگیلویه‌وبویراحمد، قزوین، کردستان و آذربایجان غربی همراه با توالی‌هایی از ترکیه (ازمیر و جنگل تارسوس) (Larson *et al*., 2007; Khalilzadeh *et al*., 2016) شکل گرفت. توالی‌هایی از همدان، کردستان، آذربایجان غربی، آذربایجان شرقی، اردبیل و مازندران در ایران همراه با نمونه‌هایی از ارمنستان (Larson *et al*., 2005) نیز هاپلوتایپ مشترک دیگری (H4) را در کلاد NE2 شکل دادند. نمونه‌های گرازهای وحشی متعلق به کرمان همراه با توالی‌هایی از کهگیلویه‌وبویراحمد و کرمانشاه (Larson *et al*., 2007) هاپلوتایپ مشترکی (H2) را در کلاد NE1 ایجاد کردند. فراوان‌ترین هاپلوتایپ (E11) در کلاد آسیایی و بین نمونه‌هایی از آذربایجان غربی، گیلان، قزوین، مازندران، گلستان، خراسان شمالی، خراسان رضوی و ترکمنستان (Larson *et al*., 2007; Khalilzadeh *et al*., 2016) مشاهده شد. همچنین توالی‌هایی از خراسان رضوی و مازندران هاپلوتایپ مشترکی (H26) را در کلاد آسیایی نمایش دادند. بر اساس تحلیل‌ها، کلاد اروپایی دربرگیرندهٔ سه هاپلوتایپ در میان چهار توالی از اردبیل (دو توالی، یک هاپلوتایپ)، کرمانشاه و گلستان بود؛ باوجوداین، توالی‌های متعددی شناسایی شدند که هرکدام به‌تنهایی به یک هاپلوتایپ انحصاری و به موقعیت مشخصی تعلق داشتند. هاپلوتایپ‌هایی مانند H8، H32، H33، H35 در کلاد آسیایی، هاپلوتایپ H3 در کلاد NE1، هاپلوتایپ H9 در کلاد NE2 و هاپلوتایپ‌های H10 و H14 در کلاد اروپایی ازجمله توالی‌های انحصاری یادشده به شمار می‌آیند؛ از سویی، برخی هاپلوتایپ‌ها مانند H2، H4 و H11 که پراکنش گسترده‌ای دارند

ممکن است نشان‌دهندهٔ هاپلوتایپ‌های نیایی باشند (Alves *et al*., 2010).

در پژوهش حاضر، نمایه‌های Fu's F_S و Tajima's D برای بررسی شواهدی از گسترش‌های جمعیت‌شناختی اخیر استفاده شدند. چنانچه هنگام محاسبهٔ این نمایه‌ها ارزش‌های منفی و معناداری برآورد شوند، شواهد به‌نسبت روشنی برای گسترش‌های جمعیت‌شناختی (Fu, 1997; Ojeda, 2010; Keis *et al*., 2013; Kusza *et al*., 2018) وجود خواهند داشت. بر اساس تحلیل توالی‌های بررسی‌شدهٔ متعلق به کلادهای گراز وحشی در ایران، هیچ نشانه‌ای از گسترش‌های جمعیت‌شناختی به دست نیامد.

یافته‌های F_{ST} و AMOVA وجود ساختار ژنتیکی معناداری را بین کلادهای گراز وحشی در ایران تأیید می‌کنند. شناسایی برخی هاپلوتایپ‌های منحصر به موقعیت‌های جغرافیایی مشخص، شواهدی را برای وجود ساختارهای ژنتیکی فراهم می‌کند. این عوامل همراه با سطح تنوع هاپلوتایپی بالا به‌ویژه در شمال‌غربی کشور، شواهدی را از وجود پناهگاه‌های یخچالی متعلق به آخرین عصر یخبندان برای گراز وحشی در این بخش از کشور (یا مناطق نزدیک آن) پیشنهاد می‌کند (Ashrafzadeh *et al*., 2016; Khalilzadeh *et al*., 2016). پژوهش‌ها نشان می‌دهند اغلب الگوی پراکنش بین جنس‌های مختلف پستانداران متفاوت است؛ بر این اساس، ماده‌ها بیشتر به زیستگاه مادری (رفتار وفادارانه) و نرها اغلب به انتشار تمایل دارند (Greenwood, 1980). اریبی جنس‌ها در پراکنش اغلب نتایج متفاوتی را هنگام بررسی ساختار ژنتیکی با نشانگرهای مختلف (نشانگرهای میتوکندریایی و هسته‌ای) به دست می‌دهد؛ از یک سو، رفتار وفادارانهٔ ماده‌ها به افزایش فراوانی هاپلوتایپ‌ها (ژنوم میتوکندری) در گروه‌های جغرافیایی مجزا منجر می‌شود و از سوی دیگر، اریبی پراکنش به‌سمت نرها اغلب سبب همسان‌شدن فراوانی‌های اللی در ژنوم هسته می‌شود (Avise, 2000)؛ بر این اساس، الگوهای مشخصی از ساختار فیلوجغرافیایی میتوکندریایی (مانند کلادهای جغرافیایی مجزا) در جمعیت‌های گونه‌هایی مانند گراز وحشی مشاهده می‌شوند؛ درحالی‌که بررسی‌های مبتنی بر ژنوم هسته ممکن است این ساختار فیلوجغرافیایی مادری را تأیید نکنند. درمجموع، استفاده از چندین نشانگر مولکولی که شیوهٔ وارثتی متفاوتی دارند، ارزیابی بهتری را از ساختار ژنتیکی فراهم و اطلاعات ارزشمندی را در زمینهٔ پراکنش وابسته به جنس نمایان می‌کند (Avise, 2000). پژوهش‌های متعددی که از نشانگرهای با وراثت‌پذیری متفاوت در تحلیل‌ها استفاده کرده‌اند تأیید می‌کنند لوکوس‌های هسته‌ای ساختار ژنتیکی ضعیف‌تری را نسبت به نشانگرهای میتوکندریایی برآورد می‌کنند (Burg *et al*., 1999; Goldsworthy *et al*., 2000; Hoffman *et al*., 2006)؛ بنابراین توصیه می‌شود به‌منظور بررسی کامل‌تر تنوع و ساختار ژنتیکی گرازهای وحشی در ایران، در پژوهش‌های آتی علاوه‌بر نشانگرهای میتوکندریایی از نشانگرهای ژنوم هسته نیز استفاده شود.

سپاسگزاری

از معاونت پژوهشی دانشگاه شهرکرد و گرنت شمارهٔ 95GRN4M41705 برای حمایت مالی پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

منابع

Akhani, H. (2007) Diversity, biogeography, and photosynthetic pathways of Argusia and Heliotropium (Boraginaceae) in South-West Asia with an analysis of phytogeographical units. Botanical Journal of the Linnean Society 155: 401-425.

Alexandri, P., Triantafyllidis, A., Papakostas, S., Chatzinikos, E., Platis, P., Papageorgiou, N., Larson, G., Abatzopoulos, T. J. and Triantaphyllidis, C. (2012) The Balkans and the colonization of Europe: the post-glacial range expansion of the wild boar, *Sus scrofa*. Journal of Biogeography 39: 713-723.

Alves, E., Ovilo, C., Rodriguez, M. and Silio, L. (2003) Mitochondrial DNA sequence variation and phylogenetic relationships among Iberian pigs and other domestic and wild pig populations. Animal Genetics 34: 319-324.

Alves, P. C., Pinheiro, Í., Godinho, R., Vicente, J., Gortázar, C. and Scandura, M. (2010) Genetic diversity of wild boar populations and domestic pig breeds (*Sus scrofa*) in South-western Europe. Biological Journal of the Linnean Society 101: 797-822.

Ashrafzadeh, M. R. and Bordkhani, M. (2012) New morphometric data of wild boar (*Sus scrofa* Linnaeus, 1758) from the Minoo island (Iran). Romanian Journal of Biology 57: 139-153.

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

Ashrafzadeh, M. R., Djan, M., Szendrei, L., Paulauskas, A., Scandura, M., Bagi, Z., Ilie, D. E., Kerdikoshvili, N., Marek, P., Soós, N. and Kusza, S. (2018a) Large-scale mitochondrial DNA analysis reveals new light on the phylogeography of Central and Eastern-European Brown hare (*Lepus europaeus* Pallas, 1778). PloS one 13: p.e0204653.

Ashrafzadeh, M. R., Rezaei, H. R., Khalilipour, O. and Kusza, S. (2018b) Genetic relationships of wild boars highlight the importance of Southern Iran in forming a comprehensive picture of the species' phylogeography. Mammalian Biology-Zeitschrift für Säugetierkunde 92: 21-29.

Avise, J. C. (2000) Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge.

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

Burg, T. M., Trites, A. W. and Smith, M. J. (1999) Mitochondrial and microsatellite DNA analyses of harbour seal population structure in the northeast Pacific Ocean. Canadian Journal of Zoology 77: 930-943.

Excoffier, L. and 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: 564-567.

Frankham, R. (1996) Relationship of genetic variation to population size in wildlife. Conservation Biology 10: 1500-1508.

Frantz, A. C., Zachos, F. E., Kirschning, J., Cellina, S., Bertouille, S., Mamuris, Z., Koutsogiannouli, E. A. and Burke, T. (2013) Genetic evidence for introgression between domestic pigs and wild boars (*Sus scrofa*) in Belgium and Luxembourg: a comparative approach with multiple marker systems. Biological Journal of the Linnean Society 110: 104-115.

Fu, Y.-X. (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. Genetics 147: 915-925.

Goldsworthy, S., Francis, J., Boness, D. and Fleischer, R. (2000) Variation in the mitochondrial control region in the Juan Fernandez fur seal (*Arctocephalus philippii*). Journal of Heredity 91: 371-377.

Gongora, J., Fleming, P., Spencer, P. B. S., Mason, R., Garkavenko, O., Meyer, J.-N., Droegemueller, C., Lee, J. H. and Moran, C. (2004) Phylogenetic relationships of Australian and New Zealand feral pigs assessed by mitochondrial control region sequence and nuclear GPIP genotype. Molecular Phylogenetics and Evolution 33: 339-348.

Greenwood, P. J. (1980) Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals. Animal Behaviour 28: 1140-1162.

Hewitt, G. (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. Nature 405: 907.

Hoffman, J., Matson, C., Amos, W., Loughlin, T. and Bickham, J. (2006) Deep genetic subdivision within a continuously distributed and highly vagile marine mammal, the Steller's sea lion (*Eumetopias jubatus*). Molecular Ecology 15: 2821-2832.

Keis, M., Remm, J., Ho, S. Y. W., Davison, J., Tammeleht, E., Tumanov, I. L., Saveljev, A. P., Männil, P., Kojola, I. and Abramov, A. V. (2013) Complete mitochondrial genomes and a novel spatial genetic method reveal cryptic phylogeographical structure and migration patterns among brown bears in north-western Eurasia. Journal of Biogeography 40: 915-927.

Khalilzadeh, P., Rezaei, H. R., Fadakar, D., Serati, M., Aliabadian, M., Haile, J. and Goshtasb, H. (2016) Contact Zone of Asian and European Wild Boar at North West of Iran. PloS one 11: e0159499.

Kopatz, A., Eiken, H. G., Aspi, J., Kojola, I., Tobiassen, C., Tirronen, K. F., Danilov, P. I. and Hagen, S. B. (2014) Admixture and gene flow from Russia in the recovering Northern European brown bear (*Ursus arctos*). PLoS One 9: e97558.

Kusza, S., Ashrafzadeh, M. R., Tóth, B. and Jávor, A. (2018) Maternal genetic variation in the northeastern Hungarian fallow deer (*Dama dama*) population. Mammalian Biology-Zeitschrift für Säugetierkunde 93: 21-28.

Lacy, R. C. (1997) Importance of genetic variation to the viability of mammalian populations. Journal of Mammalogy 78: 320-335.

Laikre, L., Nilsson, T., Primmer, C. R., Ryman, N. and Allendorf, F. W. (2009) Importance of genetics in the interpretation of favourable conservation status. Conservation Biology 23: 1378-1381.

Larson, G., Dobney, K., Albarella, U., Fang, M., Matisoo-Smith, E., Robins, J., Lowden, S., Finlayson, H., Brand, T. and Willerslev, E. (2005) Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication. Science 307: 1618-1621.

Larson, G., Albarella, U., Dobney, K., Rowley-Conwy, P., Schibler, J., Tresset, A., Vigne, J-D., Edwards, C. J., Schlumbaum, A. and Dinu, A. (2007) Ancient DNA, pig domestication, and the spread of the Neolithic into Europe. Proceedings of the National Academy of Sciences 104: 15276-15281.

Larson, G., Liu, R., Zhao, X., Yuan, J., Fuller, D., Barton, L., Dobney, K., Fan, Q., Gu, Z. and Liu, X.-H. (2010) Patterns of East Asian pig domestication, migration, and turnover revealed by modern and ancient DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences 107: 7686-7691.

Librado, P. and Rozas, J. (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics 25: 1451-1452.

Luetkemeier, E. S., Sodhi, M., Schook, L. B. and Malhi, R. S. (2010) Multiple Asian pig origins revealed through genomic analyses. Molecular Phylogenetics and Evolution 54: 680-686.

Maselli, V., Rippa, D., Deluca, A., Larson, G., Wilkens, B., Linderholm, A., Masseti, M. and Fulgione, D. (2016) Southern Italian wild boar population, hotspot of genetic diversity. Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy 27: 1-8.

Meijaard, E. and Moqanaki, E. M. (2011) Sus scrofa subspecies of Iran. Suiform Soundings 11: 6-11.

Mills, L. S., Schwartz, M. K., Tallmon, D. A. and Lair, K. P. (2003) Measuring and interpreting changes in connectivity for mammals in coniferous forests. In: Mammal community dynamics in western coniferous forests: management and conservation issues: 587-613. Cambridge University Press, Cambridge.

Mouthereau, F., Lacombe, O. and Vergés, J. (2012) Building the Zagros collisional orogen: timing, strain distribution and the dynamics of Arabia/Eurasia plate convergence. Tectonophysics 532: 27-60.

Nei, M. and Kumar, S. (2000) Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press, Oxford.

Ojeda, A. A. (2010) Phylogeography and genetic variation in the South American rodent *Tympanoctomys barrerae* (Rodentia: Octodontidae). Journal of Mammalogy 91: 302-313.

Ottoni, C., Girdland Flink, L., Evin, A., Geörg, C., De Cupere, B., Van Neer, W., Bartosiewicz, L., Linderholm, A., Barnett, R. and Peters, J. (2012) Pig domestication and human-mediated dispersal in western Eurasia revealed through ancient DNA and geometric morphometrics. Molecular Biology and Evolution 30: 824-832.

Ricklefs, R. E. and Schluter, D. (1993) Species diversity in ecological communities: historical and geographical perspectives. The University of Chicago Press, Chicago.

Sagheb Talebi, K., Sajedi, T. and Pourhashemi, M. (2013) Forests of Iran: a treasure from the past, a hope for the future. Springer, Netherlands.

Stewart, J. R., Lister, A. M., Barnes, I. and Dalén, L. (2010) Refugia revisited: individualistic responses of species in space and time. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences 277: 661-671.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30: 2725-2729.

Weir, B. S. and Cockerham, C. C. (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution 38: 1358-1370.

Wilson, D. E. and Reeder, D. M. (2005) Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference. Johns Hopkins University Press, Baltimore.

Xia, X. (2013) DAMBE5: a comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution. Molecular Biology and Evolution 30: 1720-1728.