

مطالعه ساختار ژنتیکی پایکای افغانی (*Ochotona rufescens*) با استفاده از توالی ناحیه D-Loop ژنوم میتوکندریایی در خراسان شمالی

اولیاقلی خلیلی پور^{۱*}، افشین علیزاده شعبانی^۱، حمیدرضا رضایی^۲ محمد کابلی^۱ و سهراب اشرفی^۱

^۱ گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

^۲ گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

چکیده

در پژوهش حاضر، با استفاده از ناحیه D-Loop میتوکندریایی، تنوع ژنتیکی پایکای افغانی (*Ochotona rufescens*) در بین چهار جمعیت مختلف در استان خراسان شمالی بررسی و تحلیل شد. به این منظور، تعداد ۱۶ فرد (۴ فرد از هر جمعیت) از چهار منطقه حفاظت شده (قرخود، گلول-سرانی، سالوک و ساریگل) جمع آوری و پژوهش های آزمایشگاهی انجام شد. عوامل ژنتیکی بین و درون جمعیت های پایکا از قبیل تنوع ژنتیکی و نوکلئوتیدی، تفاوت هاپلو تپی، میزان تفاوت ژنتیکی بر اساس آماره F ، جریان ژن (Nm) شاخص توزیع شکل گاما، آزمون و جدایی از طریق فاصله جغرافیایی (IBD) محاسبه و مقایسه شد. به طور کلی، با بررسی قطعه ۴۸۳ جفت بازی ۲۵ جایگاه متغیر، ۴۵۷ جایگاه حفاظت شده و ۱۰ هاپلو تپ مختلف شناسایی شد. مقدار پایین ($0/21$) ولی معنی داری ($F_{st} (P < 0.05)$) بین جمعیت ها بیانگر تفاوت ژنتیکی نسبتاً پایین یا به بیان دیگر جریان ژنی نسبتاً بالا بین جمعیت های مورد مطالعه بود. نتایج مربوط به وجود رابطه بین ماتریس فاصله و ماتریس ژنتیکی بر اساس آزمون منتل ($r = 0/172$; $p = 0/057$) نشان داد که جدایی بر اثر فواصل جغرافیایی بین نمونه ها معنی دار نبوده یا جدایی بر اثر فاصله رخ نداده است. همچنین، این جدایی بر اساس آزمون منتل (10000 تکرار) بین جمعیت های مختلف ($r = -0/64$; $p = 0/159$) به وجود نیامده است. شاخص توزیع شکل گاما به منظور برآورد نرخ یا ضریب ناهمگونی بین چهار جمعیت مورد بررسی عدد ۲۰۰ محاسبه گردید که نشان دهنده ناهمگونی و نرخ جهش پایین بین چهار منطقه است. همچنین، میزان شاخص راجرز-هارپندینگ ($0/08$) و ($P > 0.5$) و شاخص تاجیما $0/37$ ($P > 0.1$) محاسبه گردید و نشان داد که جمعیت در گذشته گسترش ناگهانی نداشته است.

واژه های کلیدی: ساختار ژنتیکی، پایکای افغانی (*Ochotona rufescens*)، تنوع هاپلو تپی، جریان ژن، F_{st} ، خراسان شمالی

مقدمه

یکی از گونه های پایکا است که (Čermak et al.,

2006) پراکندگی آن در خاورمیانه گزارش شده است.

پایکای افغانی با نام علمی *Ochotona rufescens*

پراکندگی آن در کوه‌های افغانستان، شمال غربی پاکستان، تقریباً در تمام نقاط ایران (شرق و شمال شرق، مرکز و غرب ایران) و جنوب غربی ترکمنستان است (Gromov (Ellerman and Morrison-Scott, 1951 and Erbaeva, 1995. پایکای افغانی از لحاظ زیستگاه گونه‌ای حد واسط است که هم در نقاط صخره‌ای و هم نقاط غیر صخره‌ای مشاهده می‌گردد (Smith et al., 1990). این گونه در بعضی از مناطق به علت صدمه زدن به محصولات کشاورزی، آفت محسوب شده و موضوعی برای کنترل به شمار می‌رود و بنابراین، به مقابله با آنها و کاهش جمعیت آنها منجر می‌گردد (Smith et al., 1990). گسترش مزارع کشاورزی نیز خطری برای زیستگاه این گونه محسوب می‌شود و باعث از بین رفتن و جدایی زیستگاه‌های آنها ویژه در مناطق کوهپایه‌ای می‌شود (Smith et al., 1990). همچنین، بر اساس مشاهدات میدانی پایکاها معمولاً دارای نوسانات جمعیتی بالا هستند به صورتی که در مناطق مورد مطالعه به مدت چندین سال دارای ترکم بالا بوده، سپس به صورت ناگهانی جمعیت آنها به شدت کم می‌شود و این نوسانات در تراکم جمعیت مرتب تکرار می‌شود. معمولاً در پستانداران ریز جثه وقتی تراکم جمعیتی پایین است، رانش ژنتیکی به کاهش تفاوت درون جمعیتی و افزایش تفاوت بین جمعیتی منجر می‌گردد (Wright, 1969؛ Zgurski and Hik, 2012). از بین رفتن زیستگاه و به تناسب آن کاهش جمعیت، همچنین نوسانات جمعیتی ممکن است باعث از بین رفتن تنوع ژنتیکی موجود در این گونه شود. همچنین در جمعیت‌های بزرگ مربوط به یک گونه با افزایش

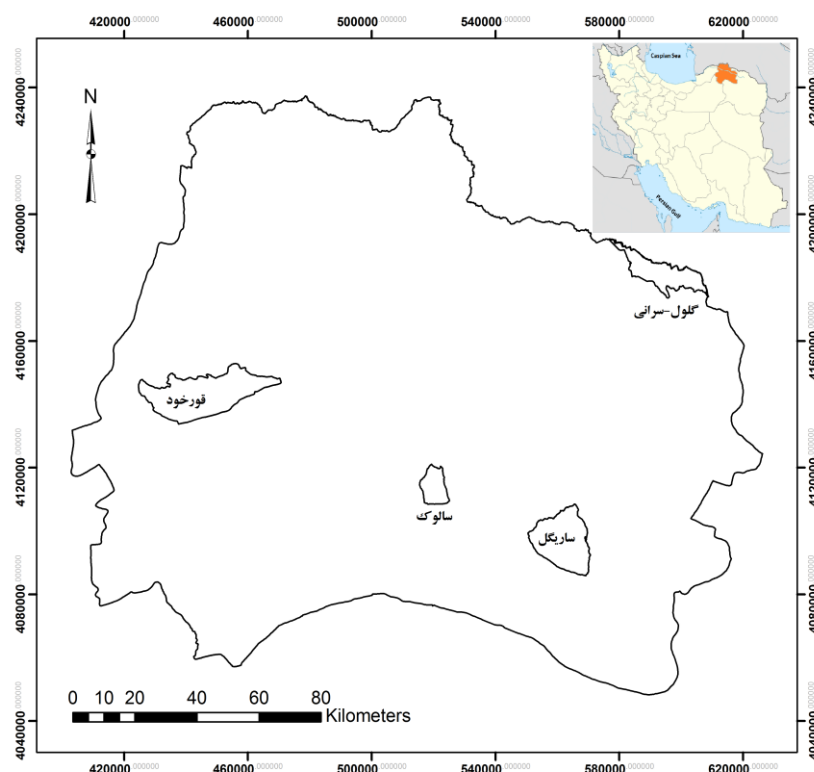
فاصله میزان جریان ژن کم می‌شود که به افزایش تفاوت‌های ژنتیکی بین افراد منجر می‌گردد. فرآیند جدایی از طریق فاصله (isolation by distance) یا IBD نامیده می‌شود (Wright, 1943). این فرآیند را می‌توان از طریق تحلیل تخمین توزیع جفتی فاصله ژنتیکی بین افراد تعیین نمود (Rousset, 2000). مدل به وجود آمده از این رابطه که بر اساس ایجاد ماتریس فاصله ژنتیکی و ماتریس فاصله جغرافیایی به دست می‌آید به نام فرض صفر شناخته می‌شود و نیاز به تحلیل‌های ژنتیکی دارد. بنابراین، برای پی بردن به وضعیت یک گونه از لحاظ ژنتیکی و تحلیل IBD روش‌های مولکولی زیادی توسعه یافته است (Lin et al., 2010). از میان این روش‌ها، استفاده از ژن‌های میتوکندری بیشتر مورد توجه قرار گرفته است و تعیین چندشکلی DNA میتوکندری با موفقیت در تعیین روابط ژنتیکی جمعیت‌های یک گونه و گونه‌های مختلف به کار گرفته شده است (Verardi et al., 2006). نشانگر ژن میتوکندری فرآیندهای جمعیت‌شناختی را که بر جمعیت مؤثر است مانند گسترش جمعیت یا تاریخچه جمعیت‌ها را بیان می‌کند و به دلیل عدم وجود نوترکیبی در این نشانگر به طور متداول برای تهیه درخت تبارشناختی در سطوح مختلف رده‌بندی پستانداران استفاده می‌شود (Randi et al., 1993). ناحیه کنترلی از ژن میتوکندری که D-Loop بخشی از آن است، ناحیه غیر کد شده از ژن میتوکندری است که معمولاً به منظور مطالعه تنوع و تفاوت‌های ژنتیکی بین جمعیت‌های مختلف جانوران به ویژه پستانداران استفاده می‌شود. از آنجا که هیچ مطالعه

ژنتیکی در مورد این گونه در ایران و منطقه مورد مطالعه انجام نشده است؛ هدف از مطالعه حاضر بررسی تنوع ژنتیکی پاپکا در استان خراسان شمالی با تأکید بر تفاوت‌های ژنتیکی موجود بین جمعیت‌های مختلف پاپکا و بررسی تأثیر جدایی فاصله‌ای بر میزان تفاوت‌های ژنتیکی به وجود آمده است. فرضیات تحقیق عبارت است از: الف) تفاوت ژنتیکی بین مناطق مورد مطالعه وجود ندارد؛ ب) فاصله بین جمعیت‌ها باعث جدایی جمعیت‌ها شده و به کاهش جریان ژن منجر شده است.

مواد و روش‌ها

منطقه مورد بررسی: استان خراسان شمالی به مساحت ۲۸۴۳۴ کیلومتر مربع در شمال شرق کشور

واقع شده است. این استان از نظر ناهمواری به دو بخش کوهستانی و مناطق پست تقسیم می‌شود. عمدتاً دارای آب و هوای معتدل کوهستانی در قسمت مرکزی است اما آب و هوای سرد کوهستانی در قسمت کوه‌های کپه‌داغ و آلا‌داغ و آب و هوای نیمه بیابانی در جنوب غربی استان مشاهده می‌گردد (Behzadfar *et al.*, 2009). در بین مناطق تحت مدیریت سازمان حفاظت محیط‌زیست استان چهار منطقه حفاظت‌شده و دو پارک ملی دیده می‌شود که از بین این مناطق، منطقه حفاظت‌شده قورخود و منطقه حفاظت‌شده گلول-سرانی در نیمه شمالی استان و پارک‌های ملی سالوک و ساریگل در نیمه جنوبی استان به‌عنوان مناطقی که احتمال حضور پاپکای افغانی در آن است، انتخاب گردید (شکل ۱).



شکل ۱- موقعیت جغرافیایی مناطق سالوک، ساریگل، قورخود و گلول-سرانی

شیوه اجرای پژوهش: در مجموع، ۱۶ عدد پایکا از دو منطقه حفاظت شده (قورخود و گلول-سرانی) و دو پارک ملی (سالوک و ساریگل) از هر منطقه ۴ نمونه در استان خراسان شمالی جمع آوری شد. نمونه ها در اتانول ۹۶ درصد در ظروف مخصوص نمونه گیری تا زمان استفاده نگهداری شدند. نمونه ها بین مرداد تا آبان ماه سال های ۱۳۹۱ و ۱۳۹۲ با استفاده از تله های زنده گیر شرمن صید گردیدند. استخراج DNA از نمونه ها با

استفاده از کیت مخصوص استخراج DNA (شرکت Bioneer، کره جنوبی) از بافت مربوط به طبق دستورالعمل شرکت سازنده با اندکی تغییر صورت گرفت. کیفیت DNA استخراجی با روش باندگیری در ژل آگاروز ۱ درصد با الکتروفورز افقی مشخص شد. پس از تأیید کیفیت DNA استخراجی، ناحیه D-Loop با طول ۴۸۳ جفت باز با استفاده از یک جفت آغازگر عمومی (جدول ۱) تکثیر گردید (Lee et al., 1995).

جدول ۱- مشخصات آغازگر استفاده شده

جایگاه ژنی	نام آغازگر	توالی آغازگر	طول قطعه تکثیر شده	دمای ذوب آغازگر
D-Loop	L15995	CTCCACTATCAGCACCCAAAG	۴۸۳	۵۳/۶°C
	H16498	CCTGAAGTAAGAACCAGATG		۴۵/۹°C

واکنش زنجیره ای پلیمرز توسط دستگاه ترموسایکلر (مدل Applied Biosystems ۲۷۲۰، ساخت آمریکا) در ۳۵ سیکل و با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. اجزای واکنش PCR به شرح جدول ۲ انجام گردید. برنامه حرارتی برای چرخه PCR با استفاده از آغازگر عمومی D-Loop به شرح زیر است:

واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، واسرشت سازی در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۴ درجه سانتیگراد و به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ ثانیه و در پایان، مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۷ دقیقه. غلظت مواد مصرفی با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر عبارت است از: ۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومی، یک واحد آنزیم تک پلی مرز (شرکت Bioneer، کره جنوبی)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی مولار، ۱

میکرولیتر $MgCl_2$ ۵۰ میلی مولار، ۱ میکرولیتر مخلوط آغازگر ۵ پیکومولار، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X و ۱۸ میکرولیتر آب دو بار تقطیر. به منظور تأیید تکثیر ناحیه مور دنظر، طی واکنش های PCR، مقدار ۵ میکرولیتر از نمونه تکثیر شده با ۲ میکرولیتر Dye مخلوط و روی ژل آگاروز ۱ درصد قرار گرفت. پس از اطمینان از تکثیر و عدم وجود آلودگی، برای تعیین توالی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال شد. این نمونه ها با استفاده از دستگاه ABI 3730 به طور خود کار توالی یابی شد. برای اصلاح نوکلئوتیدی توالی ها و مرتب سازی آنها از نرم افزار Seqscape نسخه ۲/۶ استفاده شد. تعیین تنوع ژنتیکی (هاپلوتیپی و نوکلئوتیدی) و همچنین مشخص نمودن جایگاه های چندشکلی توسط نرم افزار DnaSP نسخه ۵ مشخص گردید. رسم نمودار تبارشناختی با استفاده از روش حداکثر درست نمایی (Maximum likelihood) و

نتایج

در این مطالعه ۴۸۳ جفت باز از ژن DNA D-Loop میتوکندری از ۱۶ نمونه پایکا در چهار منطقه مطالعه شده پس از توالی‌یابی تحلیل شد و در بانک ژن با شماره‌های دسترسی KF835429 تا KF835444 به ثبت رسیدند. به طور کلی، با بررسی قطعه ۴۸۳ جفت بازی ۲۵ جایگاه متغیر، ۴۵۷ جایگاه حفاظت‌شده و ۱۰ هاپلوتیپ مختلف شناسایی گردید. در بین نمونه‌های بررسی شده ۱۰ هاپلوتیپ مشاهده‌شده، بیش‌ترین فراوانی مربوط به هاپلوتیپ ۳ (۲۵ درصد) و هاپلوتیپ‌های ۱، ۲، ۵، ۷، ۹ و ۱۰ به‌صورت منفرد (۶ درصد) کمترین فراوانی را داشتند. به نظر می‌رسد هاپلوتیپ ۳ به‌عنوان اصلی‌ترین هاپلوتیپ در منطقه است که پراکندگی آن در منطقه حفاظت‌شده قورخود و پارک ملی سالوک است. بر اساس نتایج تحقیق حاضر، بیش‌ترین پراکندگی هاپلوتیپی مربوط به منطقه حفاظت‌شده قورخود (۴ هاپلوتیپ) و کمترین پراکندگی در پارک ملی سالوک (۲ هاپلوتیپ) بود. البته برای تأیید نتایج به‌دست‌آمده بهتر است تعداد نمونه‌های بیشتری بررسی شود. پراکندگی هاپلوتیپی نشان داد که هاپلوتیپ‌ها پراکندگی یکنواختی بین تمام جمعیت‌ها ندارند. به طوری که هاپلوتیپ‌های ۱ و ۲ فقط در قورخود، هاپلوتیپ‌های ۵، ۶ و ۷ فقط در ساریگل، هاپلوتیپ‌های ۸ و ۹ فقط در گلول-سرانی و هاپلوتیپ ۱۰ فقط در سالوک وجود دارند و تنها دو هاپلوتیپ وجود دارد که در بیش از یک منطقه مشاهده گردید، یعنی هاپلوتیپ ۳ که در منطقه قورخود و سالوک و هاپلوتیپ ۴ که در مناطق قورخود و گلول-سرانی وجود دارد (جدول ۲).

مدل HKY، بهترین مدل منطبق با توالی‌های این تحقیق بر اساس معیار Akaike به دست آمده در نرم‌افزار Mega نسخه ۵/۲ انجام گردید. محاسبه میزان تفاوت ژنتیکی (Fst) و میزان جریان ژن (Nm) بین جمعیت‌های مختلف با استفاده از نرم‌افزار DnaSP نسخه ۵ صورت گرفت. شاخص توزیع شکل گاما به منظور برآورد نرخ یا ضریب ناهمگونی بین مکان‌های مورد بررسی با استفاده از نرم‌افزار Mega نسخه ۵/۲ انجام گردید. برای بررسی تاریخچه جمعیتی (demographic history) بین افراد از شاخص‌های راجرز-هارپندینگ و شاخص بی‌طرفی (neutrality tests) تاجیما با استفاده از نرم‌افزار Arlquin نسخه ۳/۱ استفاده گردید. بررسی جدایی جمعیت‌ها بر اثر فاصله جغرافیایی (IBD) و وجود ارتباط بین فاصله جغرافیایی با تفاوت ژنتیکی یا فاصله ژنتیکی با استفاده از آماره منتل و نرم‌افزارهای ArcGIS نسخه ۹/۳ و GenAlex نسخه ۶/۵ بررسی شد. برای این منظور، ابتدا با استفاده از ابزار point distance جعبه‌ابزار Analysis tools در نرم‌افزار ARCGIS فاصله مستقیم جغرافیایی بین تمام جفت نقاط (جدول ۴) و همچنین فاصله بین جمعیت‌ها محاسبه و به شکل ماتریس فاصله جغرافیایی مرتب گردید؛ سپس فاصله ژنتیکی محاسبه شده بین تمام جفت افراد با مدل Kimura two parameter و همچنین مقادیر Fst محاسبه‌شده بین جمعیت‌ها به شکل ماتریس ژنتیکی مرتب گردید. رابطه بین ماتریس‌ها توسط نرم‌افزار GenAlex نسخه ۶/۵ بررسی شد (جدول‌های ۴ و ۵). در پایان، ثبت توالی نهایی به‌دست‌آمده با نرم‌افزار Sequin نسخه ۱۰ موجود در بانک ژن انجام شد.

جدول ۲- هاپلوتیپ‌های یافت شده گونه پایکای افغانی (*Ochotona rufescens*) بر اساس نمونه‌های توالی شده

فرآوانی نسبی هر هاپلوتیپ (درصد)	سارگل	گل-سرانی	سالوک	جایگاه‌های متغیر	هاپلوتیپ‌ها
				00111111122222222233333334 250034589234667889903356674 366739323688251082670173617	
۶	۰	۰	۱	TCTTTTCTGTCTTGTCTGCCTAACC	Hap1
۶	۰	۰	۱	□□CC□□□T□C□□T□□□T□□□TC□□□T	Hap2
۲۵	۳	۰	۱	□T□C□□C□TCAC□□□□T□□AT□□G□□T	Hap3
۱۲/۵	۰	۱	۱	□□CC□□□T□C□□T□□□T□□□□C□□□T	Hap4
۶	۰	۰	۱	□T□C□□C□TCAC□□□□T□□AT□□GG□T	Hap5
۱۲/۵	۰	۰	۲	A□□CC□□T□CA□□□C□□□□T□□□□TT	Hap6
۶	۰	۰	۱	□□□□CCTTCA□□□□□T□□AT□□G□□T	Hap7
۱۲/۵	۰	۲	۰	□□□C□□□□□CA□□C□A□□□□□□□T	Hap8
۶	۰	۱	۰	□□□C□□CTTCA□□□□□T□□AT□□G□□T	Hap9
۶	۱	۰	۰	□□□□□CCTTCA□□□□□T□□AT□□G□□T	Hap10
۱۰۰	۲	۳	۳	۴	مجموع هاپلوتیپ

جمعیت‌های مورد مطالعه است. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تقریباً جریان ژن بین تمامی جمعیت‌ها بالا است، به غیر از پارک ملی سالوک که جریان نسبتاً پایینی با سایر مناطق دارد. میزان جریان ژن بین مناطق حفاظت‌شده گل-سرانی و قورخود منفی محاسبه گردید (جدول ۳).

بر اساس فرمول H_e و همکاران (۲۰۰۶) مقدار کلی F_{st} بر اساس تفاوت‌های جفتی بین جمعیت‌ها عدد متوسط (۰/۲۱) ولی معنی‌داری ($P < 0.05$) و همچنین میزان N_m عدد بالای ۰/۹۱ محاسبه گردید که مشخص‌کننده تفاوت ژنتیکی متوسط بین جمعیت‌ها و به بیان دیگر، جریان ژنی نسبتاً بالا بین

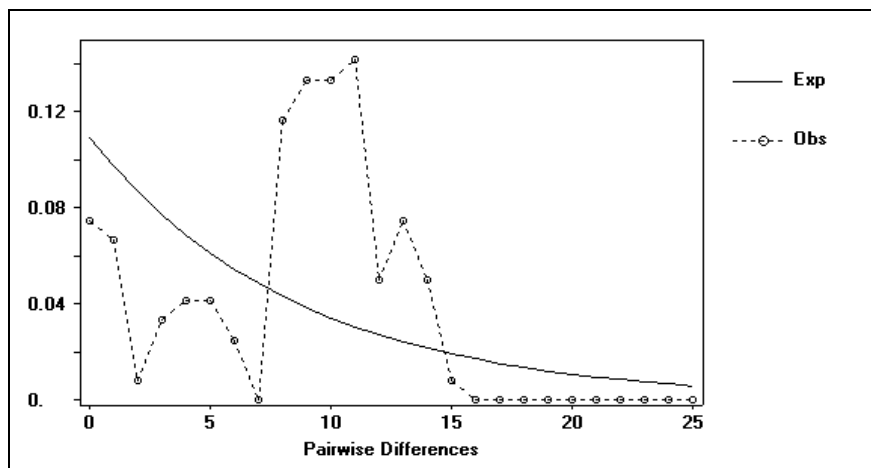
جدول ۳- مقدار تفاوت ژنتیکی بر اساس F_{st} در قسمت پایین و میزان جریان ژن N_m در قسمت بالا بین چهار جمعیت پایکای افغانی

Nm/ F_{st}	قورخود	گل-سرانی	سارگل	سالوک
قورخود				
گل-سرانی	-۰/۰۸۸			
سارگل	۰/۱۴۵	۰/۱۳۵		
سالوک	۰/۳۸۵	۰/۴۴۷	۰/۲۳۴	

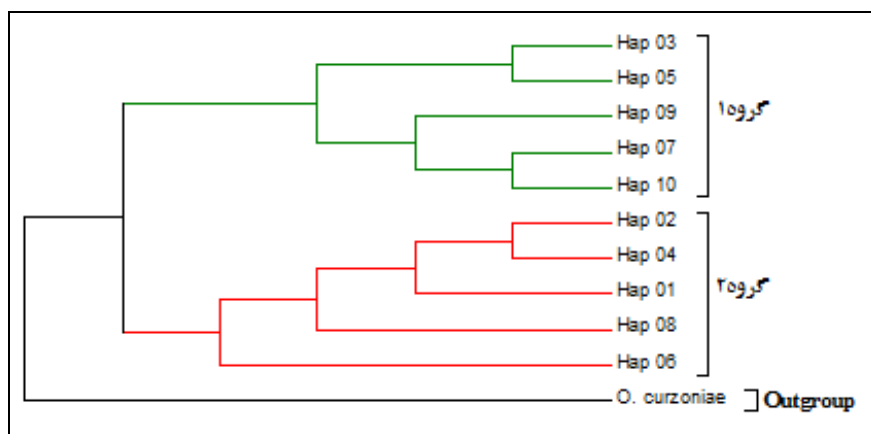
وجود رابطه بین ماتریس فاصله جغرافیایی و ماتریس ژنتیکی (جدول‌های ۵ و ۶) بر اساس آزمون منتل (۱۰۰۰۰ تکرار) با در نظر گرفتن کل نمونه‌ها در یک مقیاس جغرافیایی کوچک ($r = ۰/۱۷۲$, $P = ۰/۰۵۷$) نشان داد که جدایی بر اثر فواصل جغرافیایی بین نمونه‌ها معنی‌دار نبوده (شکل ۴) یا جدایی بر اثر فاصله رخ نداده است. همچنین این جدایی بر اساس آزمون

شاخص توزیع گاما به منظور برآورد نرخ یا ضریب ناهمگونی بین چهار جمعیت مورد بررسی ۲۰۰ محاسبه گردید که نشان‌دهنده ناهمگونی و نرخ جهش پایین بین چهار منطقه است. همچنین میزان شاخص راجرز-هارپندینگ ۰/۰۸ ($P > 0.5$) و نمودار آن چندنمایی به دست آمد و شاخص تاجیما برابر با ۰/۳۷ ($P > 0.1$) محاسبه گردید (شکل ۲). نتایج مربوط به

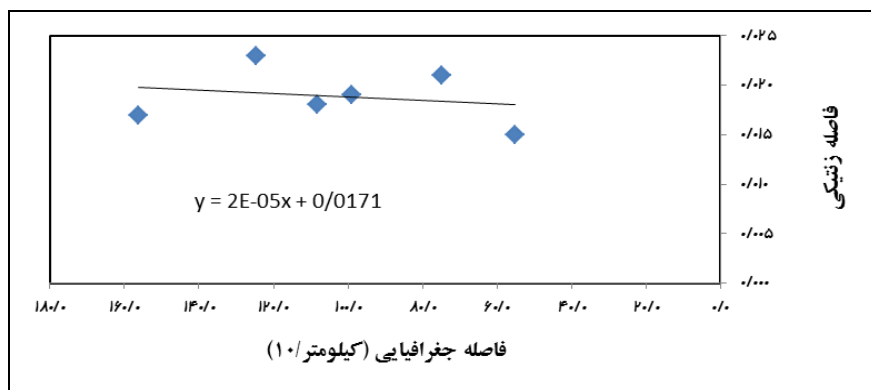
متل (۱۰۰۰۰ تکرار) بین جمعیت‌های مختلف به
وجود نیامده است ($r=-0/64$, $P=0/159$) و تفاوت
ژنتیکی بین چهار جمعیت مربوط به جدایی جغرافیایی
نیست (شکل ۵).



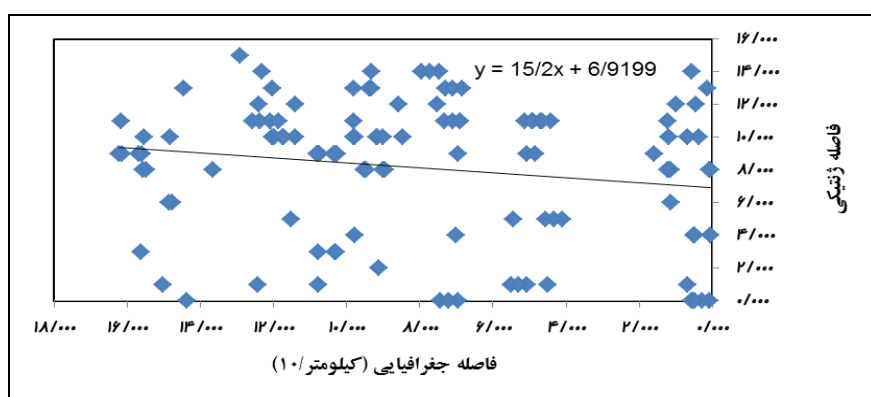
شکل ۲- نمودار مربوط به شاخص راجرز-هاردینگ (شاخص عدم تطابق) بر اساس تحلیل ناحیه D-Loop ژن میتوکندری بین تمام افراد صید شده در منطقه



شکل ۳- ترسیم درخت تبارشناختی بر اساس روش حداکثر درست‌نمایی بین ۱۰ هاپلوتیپ موجود در منطقه با استفاده از قطعه ۴۸۳ جفت‌بازی ناحیه D-Loop ژن میتوکندری



شکل ۴- نمودار مربوط به آزمون متل جهت تعیین وجود رابطه بین فاصله ژنتیکی و فاصله جغرافیایی بر اساس جمعیت‌های مختلف پاپکای افغانی



شکل ۵- نمودار مربوط به آزمون متل جهت تعیین وجود رابطه بین فاصله ژنتیکی و فاصله جغرافیایی بر اساس کل افراد

جدول ۴- فاصله جغرافیایی و ژنتیکی بین تمام نمونه‌های صید شده در مناطق سالوک، ساریگل، قورخود و گلول-سرانی (فاصله جغرافیایی بر حسب کیلومتر در قسمت پایین و فاصله ژنتیکی بر اساس روش K2P در قسمت بالا)

	Gh97	Gh03	Gh92	Gh103	Gl05	Gl15	Gl16	Gl18	Sr32	Sr66	Sr80	Sr1	Sl78	Sl10	Sl64	Sl67
Gh97	۰	۰/۰۲۴	۰/۰۲۸	۰/۰۲۱	۰/۰۲۸	۰/۰۲۱	۰/۰۲۴	۰/۰۲۴	۰/۰۱۶	۰/۰۱۶	۰/۰۲۶	۰/۰۲۴	۰/۰۲۸	۰/۰۲۱	۰/۰۲۸	۰/۰۲۱
Gh03	۶/۹	۰	۰/۰۳۳	۰/۰۰۲	۰/۰۳۸	۰/۰۲۶	۰/۰۳۳	۰/۰۲۴	۰/۰۲۱	۰/۰۲۱	۰/۰۲۶	۰/۰۰۲	۰/۰۳۶	۰/۰۳۶	۰/۰۳۶	۰/۰۳۱
Gh92	۱۵/۸	۱۲/۴	۰	۰/۰۳۱	۰/۰۰۵	۰/۰۲۶	۰/۰۱۴	۰/۰۲۴	۰/۰۲۱	۰/۰۲۱	۰/۰۰۷	۰/۰۳۱	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۱۲
Gh103	۵/۵	۱/۷	۱۲	۰	۰/۰۳۶	۰/۰۲۴	۰/۰۳۱	۰/۰۲۱	۰/۰۱۹	۰/۰۱۹	۰/۰۲۴	۰/۰	۰/۰۳۳	۰/۰۳۳	۰/۰۳۳	۰/۰۲۸
Gl05	۱۵۰/۱	۱۴۳/۶	۱۳۶/۵	۱۴۴/۷	۰	۰/۰۲۶	۰/۰۱۴	۰/۰۲۸	۰/۰۲۶	۰/۰۲۶	۰/۰۱۲	۰/۰۳۶	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۱۲
Gl15	۱۶۱/۳	۱۵۴/۸	۱۴۷/۸	۱۵۵/۸	۱۱۳/۵	۰	۰/۰۲۱	۰/۰۰۲	۰/۰۱۹	۰/۰۱۹	۰/۰۱۹	۰/۰۲۴	۰/۰۲۴	۰/۰۲۴	۰/۰۲۴	۰/۰۱۹
Gl16	۱۶۲/۲	۱۵۵/۶	۱۴۸/۷	۱۵۶/۷	۱۲/۲	۰/۹	۰	۰/۰۲۴	۰/۰۲۶	۰/۰۲۶	۰/۰۰۷	۰/۰۳۱	۰/۰۱۲	۰/۰۱۲	۰/۰۱۲	۰/۰۰۲
Gl18	۱۶۱/۸	۱۵۵/۲	۱۴۸/۳	۱۵۶/۳	۱۱/۹	۰/۸	۰/۵	۰	۰/۰۱۶	۰/۰۱۶	۰/۰۱۶	۰/۰۲۱	۰/۰۲۶	۰/۰۲۶	۰/۰۲۶	۰/۰۲۱
Sr32	۱۲۵/۸	۱۱۹/۲	۱۲۰/۲	۱۲۰/۹	۸۹/۹	۹۴/۸	۹۵	۹۴/۶	۰	۰	۰/۰۱۹	۰/۰۱۹	۰/۰۲۴	۰/۰۲۴	۰/۰۲۴	۰/۰۲۴
Sr66	۱۲۳/۶	۱۱۶/۹	۱۱۷/۴	۱۱۸/۶	۸۴/۶	۸۹/۸	۹۰	۸۹/۶	۵/۶	۰	۰/۰۱۹	۰/۰۱۹	۰/۰۲۴	۰/۰۲۴	۰/۰۲۴	۰/۰۲۴
Sr80	۱۲۰/۲	۱۱۳/۵	۱۱۴/۲	۱۱۵/۲	۸۵/۹	۹۱/۵	۹۱/۷	۹۱/۳	۶/۷	۳۶/۱	۰	۰/۰۲۴	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹	۰/۰۰۵
Sr1	۱۲۹/۱	۱۲۲/۶	۱۲۴	۱۲۴/۳	۹۳/۳	۹۷/۸	۹۸	۹۷/۶	۴/۵	۱۰	۱۱/۴	۰	۰/۰۳۳	۰/۰۳۳	۰/۰۳۳	۰/۰۲۸
Sl78	۷۵/۱	۶۸/۵	۶۹/۶	۷۰/۱	۹۸/۱	۱۰۷/۴	۱۰۸/۱	۱۰۷/۶	۵۰/۸	۴۸/۴	۴۵	۵۴/۳	۰	۰	۰	۰/۰۰۹
Sl10	۷۹/۴	۷۲/۷	۷۳/۳	۷۴/۳	۹۳/۷	۱۰۳	۱۰۳/۵	۱۰۳	۴۶/۹	۴۴/۲	۴۰/۹	۵۰/۶	۵	۰	۰	۰/۰۰۹
Sl64	۷۴/۶	۶۸	۶۹/۱	۶۹/۶	۹۸	۱۰۷/۴	۱۰۸	۱۰۷/۶	۵۱/۳	۴۸/۹	۴۵/۵	۵۴/۸	۰/۶	۵/۲	۰	۰/۰۰۹
Sl67	۷۷/۳	۷۰/۶	۷۰/۹	۷۲/۲	۹۳/۳	۱۰۲/۷	۱۰۳/۳	۱۰۲/۸	۴۹/۳	۴۶/۵	۴۳/۳	۵۳/۱	۴/۸	۲/۷	۴/۷	۰

جدول ۵- فاصله جغرافیایی بین جمعیت‌های صید شده بر حسب کیلومتر بر اساس نرم‌افزار ARCGIS

گلول-سرانی	سالوک	ساریگل	قورخود	قورخود
				۰
			۱۲۰/۳	ساریگل
		۴۵/۵	۷۰/۸	سالوک
۰	۱۰۷/۴	۸۹/۵	۱۵۷/۲	گلول-سرانی

بحث

D-Loop ژن میتوکندری برای تحلیل تغییرات ژنتیکی

بین جمعیت‌های پایکای افغانی (*O. rufescens*) مورد استفاده قرار گرفت.

الگوهای تنوع ژنتیکی اغلب منعکس کننده تنوع

ژن میتوکندری برای ردیابی تاریخچه جمعیت‌ها و به ویژه تخمین مهاجرت و جریان ژن بسیار مناسب است (Avise et al., 1994). در تحقیق حاضر، ناحیه

مکانی در جریان ژن هستند که از طریق عواملی نظیر موانع موجود در سیمای سرزمین و فاصله جغرافیایی بر محدود شدن جریان ژن منجر می‌شوند (Wang and Summers, 2010). از آنجا که مناطق مطالعه شده در مناطق جغرافیایی نه‌چندان متفاوت از هم قرار دارند بنابراین به نظر می‌رسد عوامل مؤثر در جدایی از طریق فاصله (مانند اقلیم متفاوت، موانع جریان ژن) بر روند جدایی از طریق فاصله بین هاپلوگروه‌های مختلف تأثیر زیادی نگذاشته است، به طوری که هاپلو تیپ‌های مناطق شمالی و جنوبی به طور کامل از هم جدا نشده و برخی از هاپلو تیپ‌های مناطق شمالی در مناطق جنوبی و بالعکس قرار دارد. بر اساس یافته‌های He و همکاران (۲۰۰۶) مقدار Nm بر اساس رابطه $Nm \approx (1/F_{st} - 1)/4$ وقتی از 0.5 بیشتر باشد یا میزان F_{st} کمتر از 0.33 باشد جریان ژن را می‌توان به عنوان عامل اصلی بین جمعیت‌ها لحاظ نمود. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تقریباً جریان ژن بین تمامی جمعیت‌ها بالا است، به غیر از پارک ملی سالوک که جریان نسبتاً پایینی را با سایر مناطق دارد. به نظر می‌رسد جریان ژنی بالا یا تفاوت ژنتیکی پایین بین جمعیت‌های مورد مطالعه پاپکای افغانی نشان‌دهنده ارتباط زیستگاهی بین جمعیت‌های محلی باشد. حتی میزان جریان ژن بین مناطق حفاظت‌شده قورخود و گلول-سرانی منفی محاسبه گردید که میزان منفی جریان ژن یا تفاوت ژنتیکی منفی که آن را معمولاً صفر در نظر می‌گیرند، نشان‌دهنده جریان ژن بسیار بالا است می‌تواند ناشی از آن باشد که تغییرات ژنتیکی درون جمعیتی بیشتر از تغییرات بین جمعیتی است (Lim et al., 2002). از سوی دیگر، زمانی می‌توان گفت جدایی در داخل افراد یک گونه رخ داده است که فاصله ژنتیکی بین آنها در حدود ۱۰ درصد باشد (Billington and Hebert,

1991). فاصله ژنتیکی در داخل و بین چهار منطقه مطالعه شده پاپکای افغانی کمتر از $3/6$ درصد مشاهده گردید. بنابراین بر اساس نتایج تحقیق حاضر چهار جمعیت پاپکای افغانی در سطح زیرگونه از هم جدا نشده‌اند و تفاوت‌های آنها فقط در سطح جمعیت‌های مختلف مشاهده می‌شود. برای اطمینان از این یافته و بررسی‌های دقیق‌تر پیشنهاد می‌گردد تعداد نمونه بیشتر و طول قطعه بیشتر مدنظر قرار گیرد و همچنین از سایر روش‌های تحلیل ژنتیکی نظیر ریزماهورها نیز استفاده شود. شاخص توزیع شکل گاما نشان داد که نرخ جهش بین جمعیت‌ها پایین است (ضرایب بزرگ‌تر از یک به عنوان ضریب ناهمگونی پایین به حساب می‌آیند). همچنین شاخص راجرز-هارپندینگ و شاخص تاجیما وجود گسترش ناگهانی جمعیتی در گذشته را نشان ندادند. در صورتی که توزیع عدم تطابق (mismatch distribution) بر اساس شاخص راجرز و هارپندینگ به صورت تک‌نمایی باشد نشان‌دهنده گسترش ناگهانی جمعیت در گذشته است و در صورتی که به صورت دو نمایی یا چند نمایی باشد نشان‌دهنده ثبات جمعیتی در گذشته است (Rogers and Harpending, 1992). جدایی از طریق فاصله (IBD) فرآیند بسیار مهمی در محدود کردن جریان ژن است (Bay et al., 2004). تحلیل‌های مربوط به IBD در مطالعه حاضر نتایج معنی‌داری ($P=0.057$) در مقیاس مطالعه شده و بر اساس اندازه‌گیری‌های مربوط به تمام افراد و همچنین بین جمعیت‌ها نشان نمی‌دهد. به نظر می‌رسد تفاوت ژنتیکی اندکی بین جمعیت‌های مختلف نمونه‌برداری در منطقه مطالعه شده وجود دارد و محدودیت‌های جغرافیایی که موجب پراکندگی لکه‌ای گونه‌ها در طولانی مدت می‌شود (Waples, 1998) از قبیل محدودیت‌های مربوط

به توپوگرافی و عوامل انسان ساخت مانند احداث جاده و افزایش مناطق مسکونی با وجود تحرک کم و قلمروی بسیار کوچک پایکا (کمتر از یک کیلومتر) نتوانسته است باعث جدایی در مقیاس کوچک شود.

جمع بندی

نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر می تواند چارچوبی درست جهت طراحی روش های مدیریتی صحیح را نشان دهد. بر اساس مطالعه تعداد ۱۶ فرد از جمعیت این گونه می توان نتیجه گرفت که دو هاپلوگروه مشخص در منطقه وجود دارد. چهار جمعیت بررسی شده به صورت کامل از هم جدا نشده اند و تفاوت ژنتیکی کم و جریان ژنی بالا بین آنها برقرار است. البته بررسی تفاوت ژنتیکی بین جمعیت های مختلف بر اساس F_{st} نشان داد که در بین جمعیت های بررسی شده، پارک ملی سالوک تفاوت ژنتیکی تقریباً بالایی با سایر جمعیت ها دارد. بنابراین شاید بتوان اظهار داشت که به طور کلی از لحاظ واحدهای مهم تکاملی

(evolutionary significant units) دو واحد مستقل در منطقه وجود دارد که می توان به صورت جداگانه برنامه های مدیریتی را برای آنها تعریف نمود. نتایج تحلیل های مربوط به جدایی از طریق فاصله رابطه معنی داری را نه در سطح افراد و نه در سطح جمعیت نشان داد. شاید بتوان گفت نزدیک بودن مناطق به هم تأثیر جدایی از طریق فاصله را خنثی کرده است. پیشنهاد می شود برای درک دقیق تر تأثیر جدایی از طریق فاصله محدوده بیشتری از ایران در محدوده پراکنش پایکا مورد مطالعه قرار گیرد.

سپاسگزاری

نگارندگان از زحمات همکاران اداره کل حفاظت محیط زیست استان خراسان شمالی به ویژه محیط بانان مناطق حفاظت شده گلول-سرانی و قورخود و همچنین پارک های ملی سالوک و ساریگل که در جهت انجام این تحقیق کمال همکاری را داشتند، قدردانی صمیمانه می نمایند.

منابع

- Avise, J. C., Nelson, W. S. and Sibley, C. G. (1994) DNA sequence support for a close phylogenetic relationship between some storks and New World vultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(11): 5173-5177.
- Bay, L. K., Choat, J. H., Herwerden, L. V. and Robertson, D. R. (2004) High genetic diversities and complex genetic structure in an IndoPacific tropical reef fish (*Chlorurus sordidus*): evidence of an unstable evolutionary past. *International Journal on Life in Oceans and Coastal Waters* 144(4): 757-767.
- Behzadfar, M., Hasanzadeh, H. and Saberi, M. (2009) Estimation of founrier rainfall erosivity factor in North Khorasan province. The 5th National Conference of Watershed Enjeenering, Karaj, Iran (in Persian).
- Billington, N. and Hebert, D. N. (1991) Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 48 (Supplement 1): 80-94.
- Čermak, S., Obuch, J. and Benda, P. (2006) Notes on the genus Ochotona in the Middle East (Lagomorpha: Ochotonidae). *Lynx (Praha)* 37: 51-66.
- Ellerman, J. R. and Morrison-Scott, T. C. S. (1951) Checklist of Palaearctic and Indian Mammals,

- British Museum (Natural History), London.
- Gromov, I. M. and Erbaeva, M. A. (1995) The Mammals of Russia and adjacent territories. Lagomorphs and Rodents, Zoological Institution, Sankt-Peterburg.
- He, H., Yuan, X., Wei, C. and Yuan, F. (2006) Genetic variation of the Mmitochondrial ND4 region among geographical populations of *Sitodiplosis mosellana* (Gehin) (Diptera: Cecidomyiidae) in China. *Journal of Kansas Entomology Society* 79: 211-222.
- Lee, W. J., Conroy, J., Howell, W. H. and Kocher, T. D. (1995) Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions. *Journal of Molecular Evolution* 41(1): 54-60
- Lim, S. L., Wickneswari, R., Lee, S. L. and Latiff A. (2002) Genetic variation of *Dryobalanops aromarica* gaertn. F. (Dipterocarpaceae) in Peninsular Malaysia using microstellite DNA markers. *Forest Genetics* 9(2): 125-136.
- Lin, G., CI, H., Thirgood, S. J., Zhang, T. and Sh J. (2010) Genetic variation and molecular evolution of endangered Kozlov's pika (*Ochotona koslowi* buchner) based on Mitochondrial cytochrome b gene. *Polish Journal of Ecology* 58(3): 563-568.
- Randi, E., Lucchini, V. and Francisci, F. (1993) Allozyme variability in the Italian wolf (*Canis lupus*) population. *Heredity* 71(5): 516-522.
- Rogers, A. R. and Harpending, H. (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9(3): 552-569.
- Rousset, F. (2000) Genetic differentiation between individuals. *Journal of Evolutionary Biology* 13: 58-62.
- Smith, A. T., Formozov, N. A., Hoffmann, R. S., Zheng, C. L. and Erbajeva, M. A. (1990) The pikas. In: Rabbits, hares and pikas: status survey and conservation action plan (Eds. Chapman, J. A. and Flux, J. E. C.) 14-60. International Union for Conservation of Nature and Natural Resource (IUCN), Gland, Switzerland.
- Verardi, A., Luchini, V. and Randi, E. (2006) Detecting introgressive hybridization between free-ranging domestic dogs and wild wolves (*Canis lupus*) by admixture linkage disequilibrium analysis. *Molecular Ecology* 15(10): 2845-2855.
- Wang, I. J. and Summers, K. (2010) Genetic structure is correlated with phenotypic divergence rather than geographic isolation in the highly polymorphic strawberry poison-dart frog. *Molecular Ecology* 19: 447-458.
- Waples, R. S. (1998) Separating the wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *Heredity* 89: 438-450.
- Wright, S. (1943) Isolation by distance. *Genetics* 28: 114-138.
- Wright, S. (1969) Evolution and the genetics of populations: the theory of gene frequencies. University of Chicago Press, Chicago.
- Zgurski, J. M. and Hik, D. S. (2012) Polygynandry and even-sexed dispersal in a population of collared pikas, *Ochotona collaris*. *Animal Behavior* 83: 1075-1082.

Genetic structure of Afghan Pika (*Ochotona rufescens*) populations based on D-loop region of the mitochondrial genome in Northern Khorasan Province

Olyagholi Khalilipour ^{1*}, Afshin Alizadeh Shabani ¹, Hamid Reza Rezaei ²
Mohammad Kaboli ¹ and Sohrab Ashrafi ¹

¹ Department of Environmental Sciences, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Tehran, Iran

² Department of Environmental Sciences, Faculty of Natural Resources,
Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources, Gorgan, Iran

Abstract

This study was carried out for genetic diversity of Afghan Pika (*Ochotona rufescens*) among four different populations in Northern Khorasan Province using D-Loop region of mitochondrial gene. The sixteen specimens were trapped from four different sanctuaries (Ghorkhod, Golol-Sarani, Salouk and Sarigol) and transferred to Laboratory. The intra and inter population genetic factors (haplotype and nucleotide diversity, haplotype differentiation among populations, Fst, Nm, gamma distribution parameter, mismatch distribution, Tajima'D neutrality test and Isolation by distance) were estimated and the results were compared among the populations. Finally, data set with 483 bp was used for each individual. The results showed 25 polymorphic, 457 conserved sites and 10 different haplotypes. The low value of Fst (Fst=0.21, P<0.05) among populations based on D-Loop region of mitochondrial gene showed that genetic differentiation among populations were low and gene flow between populations were high. Mantel test (10000 iterations) showed that the relationship between distance and genetic matrix among all individuals (r=0.172, P=0.057) and among populations (r=-0.64, P=0.159) were not significance and IBD did not occur. Discrete gamma distribution for estimating heterogeneity rate among populations was 200 which indicated low mutation or heterogeneity rate among the four populations. The Rogers-Harpending index for mismatch distribution (0.08, P>0.5) and Tajima 'D test (0.37, P>0.1) showed no population expansion and relatively stable population sizes.

Key words: Genetic structure, Afghan Pika (*Ochotona rufescens*), Haplotype diversity, Gene flow, Fst, Northern Khorasan

* okhalilipour@ut.ac.ir