مقاله پژوهشی

علوم و تکنولوژی محیط زیست، دوره بیست و پنجم، شماره یک، فروردین ماه ۱۴۰۲(٦٦-٥٣)

مقایسه ساختار و تنوع ژنتیکی اردک سرحنائی(*Aythya ferina*) با استفاده از ژن میتوکندریایی سیتوکروم ب در مناطق شمالی و جنوبی ایران

شبنم چاوشی [۱]

جلیل ایمانی هرسینی [۲*]

jalil.imani@srbiau.ac.ir

حمیدرضا رضائی [۳]

پرگل قوام مصطفوی [٤]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۳/۲۲ **تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۶/۱۹**

چکیده

زمینه و هدف: اردک سرحنائی (*Aythya ferina*) یکی از گونه های فراوان و با پراکندگی بالا در جهان، بین مرغابی سانان است. هدف از انجام پژوهش حاضر بررسی ساختار و تنوع ژنتیکی این گونه در ایران با استفاده از ژن سیتوکروم ب(Cytochrome *b*) بوده است.

روش بررسی: در این پژوهش نمونه برداری از ۱۰ قطعه اردک سرحنائی که از مناطق شمال و جنوب کشور در سالهای ۱۳۹۹- ۱۴۰۰ برداشت شده بودند، انجام شد. پس از استخراج و تکثیر قطعات DNA تجزیه تحلیل های هاپلوتایپی و نوکلئوتیدی صورت گرفت.

یافته ها: به طور کلی، با بررسی ۸ قطعه ۹۲۹ جفت بازی ژن سیتوکروم *b* اردک سرحنائی، ۷ هاپلوتایپ مختلف شناسائی شد. تنوع هاپلو تایپی ۰/۸۱۸، تنوع نوکلئوتیدی ۰/۰۰۱۴۹ محاسبه شد. مقدار Nm یا میزان جریان ژنی بین منطق نمونه برداری برابر ۱/۳۸۳ بود که نشان از جریان ژنی بالا و به بیان دیگر فاصله ژنی بسیار کم بین جمعیت‌های این گونه و جمعیت‌های اروپایی و آسیایی آن است. شاخص راجرز- هارپندینگ، شاخص تاجیما و Fu Fs به ترتیب ۰/۱۱۲، ۰/۰۲۸- و ۱/۲۸۸- محاسبه شد، همچنین نمودار توزیع عدم تطابق به صورت تک نمائی رسم شده، که همه آنها نشان دهنده تاریخچه جمعیتی نامعین و شبیه به مدل گسترش ناگهانی بوده است.

بحث و نتیجه گیری: با توجه به نتایج به دست آمده از شبکه هاپلوتایپی و درخت تبار شناختی و همین طور تفاوت اندک ژنتیکی بین جمعیتهای بررسی شده، احتمال مهاجرت این پرنده از هر دو منطقه اروپا و شرق آسیا به ایران وجود دارد. با در نظر گرفتن نتایج پژوهش

۱- دکتری محیط زیست، گرایش تنوع زیستی، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- استادیار دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. *(مسوول مکاتبات)

۳- دانشیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران.

۴- استادیار دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

حاضر، باید تالاب های زیستگاهی این گونه در ایران به عنوان مناطق مهم و کلیدی شناخته شده و اقدامات مدیریتی و حفاظتی لازم در این مناطق صورت گیرد.

واژه‌های کلیدی: اردک سرحنائی، تنوع ژنتیکی، ژن سیتوکروم b ، ژنوم میتوکندری.

J. Env. Sci. Tech., Vol 24, No. 1, April, 2022

Comparison of structure and genetic diversity of Common Pochard (*Aythya ferina*) using cytochrome B mitochondrial gene in northern and southern regions of the country

Shabnam Chavoshi [1]
Jalil Iamani Harsini [2*]
jalil.imani@srbiau.ac.ir
Hamidreza Rezaei [3]
Pargol Ghavam Mostafavi[4]

Admission Date:September 12, 2022 Date Received: June 12, 2022

Abstract

Background & Objective: The Common Pochard (*Aythya ferina*) is one of the most abundant and widely distributed species in the world, among ducks. The aim of this study was to investigate the structure and genetic diversity of *Aythya ferina* in Iran using cytochrome b gene.

Material and Methodology: For this study, samples were taken from 10 pieces of *Aythya ferina* that were taken from the north and south of the country. Haplotypic and nucleotide analyzes were performed using MEGA, Papart, DNAsp and Network software.

Findings: In general, 7 different haplotypes were identified by examining 8 fragments of 929 pairs of cytochrome b gene of *Aythya ferina*. Haplotype diversity was calculated 0.818, nucleotide diversity was calculated 0.00149. The value of Nm or the amount of gene flow between the sampling logic was 1.383, which indicates a high gene flow and in other words, a very small gene distance between the populations of this species and its European and Asian populations. Rogers-Harping index, Tajima index and Fu Fs were calculated 0.112, -0.028 and -1.288, respectively. The mismatch distribution diagram is also plotted as a single view, all of which show an indeterminate population history similar to the model of sudden expansion.

Discussion and Conclusion: According to the results obtained from the haplotype network and the cognitive tree, as well as a slight genetic difference between the studied populations, there is a possibility of migration of this bird from both Europe and East Asia to Iran. Considering the results of the present study, Iranian wetlands should be recognized as important and key areas and the necessary management and protection measures should be taken in these areas.

Keywords*:* *Aythya ferina*, Genetic diversity, Cytochrome b gene, Mitochondrial genome.

1- Ph, D., Faculty of Natural Resources and Environment, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Trhran, Iran.

2- Assistant Prof., Faculty of Natural Resources and Environment, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Trhran, Iran. *(*Corresponding Authors*)

3- Associate PR., Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources.

4- Assistant Prof., Faculty of Natural Resources and Environment, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Trhran, Iran.

مقدمه

کشور ایران با توجه به شرایط جغرافیایی خاصی که دارد از تنوع گونه‌ای بالایی برخوردار است. پرندگان بخش مهمی از تنوع‌زیستی را تشکیل می‌دهند. تنوع گونه‌ای پرندگان، مهاجرت طولانی، رفتارهای اجتماعی خیره‌کننده و پرواز باشکوه آن‌ها، جاذبه مشاهده، تعمق و مطالعه بر روی پرندگان را صدچندان نموده است (۱). در ایران از ۵۳۵ گونه پرنده، بیش از ۳۴۰ گونه یعنی حدود ۷۰ درصدشان مهاجرند (۱).

در میان پرندگان مهاجر به کشور اردک‌ها به نسبت زیادی در تالاب‌های شمال و جنوب کشور همواره گزارش‌شده‌اند و متأسفانه موردتوجه شکارچیان بوده و باوجود ممنوعیت شکار آن‌ها همچنان توسط بعضی افراد شکار می‌شوند. (۲)

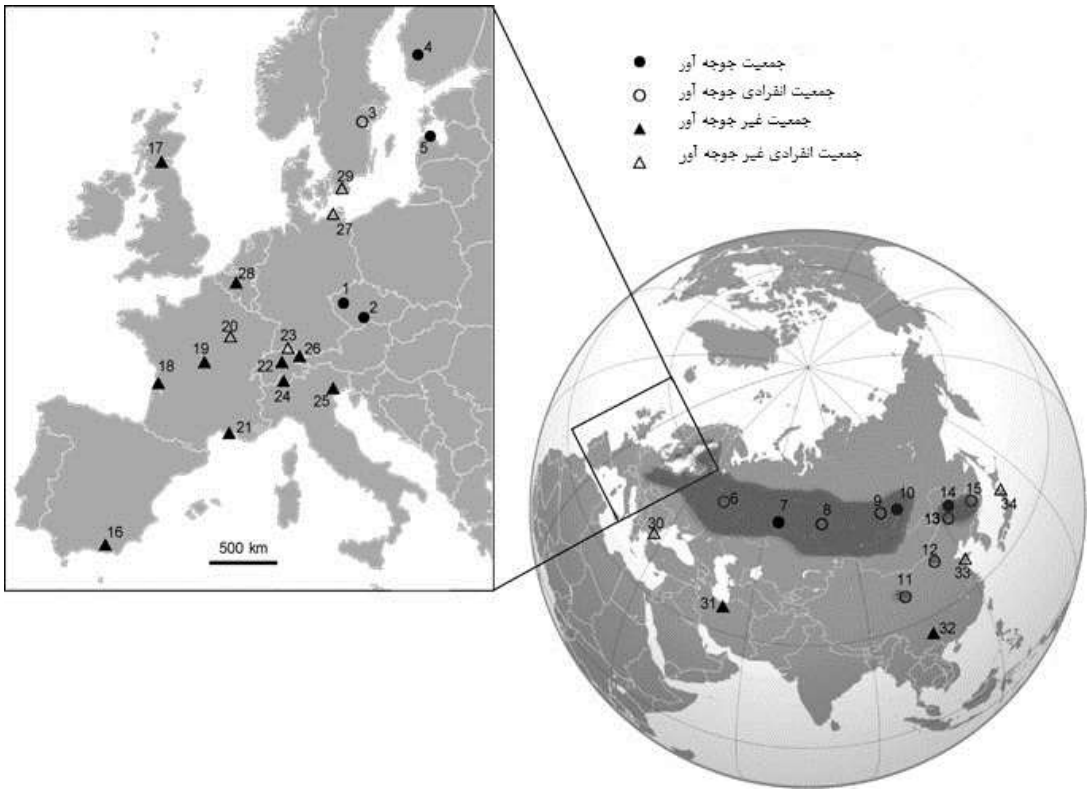
تمامی اردک‌ها در زیر خانواده *Anatineae* قرار دارند. اردک سرحنائی (*Aythya ferina*) از جنس *Aythya* می‌باشد که پرنده‌ای اجتماعی بوده و هنگام مهاجرت به‌طور دسته‌جمعی پرواز نموده و در دسته‌های بزرگ بر روی آب‌های شیرین یا شور فرود آمده، با غوطه ورشدن در آب، غذای گیاهی خود را جستجو می‌کند. اغلب در شب‌پرواز نموده، طلوع و غروب آفتاب را ترجیح می‌دهند. مواقعی که در مهاجرت نباشد، عادت شبانه خودرا از دست داده در روز به چرا می‌رود(۲). سرزمین ایران هرساله از اواسط شهریور تا اواخر زمستان، میزبان گونه‌های نادری از پرندگان مهاجر است که از شمال به سمت مناطق جنوبی کوچ می‌نمایند. طی سرشماری‌هایی که هرساله توسط سازمان حفاظت محیط‌زیست صورت می‌گیرد گونه‌هایی که در فهرست سرخ IUCN قرار دارند شامل، اردک سرحنائی در کنار گونه‌هایی چون عروس غاز، اردک سرسفید، اردک مرمری، درنای سیبری، تلیله بزرگ، غاز پیشانی‌سفید کوچک و پلیکان پا خاکستری در ایران گزارش دیده‌شده‌اند. باوجود کاهش کلی تعداد پرندگان مهاجر در کشور، در چند سال گذشته گونه اردک سرحنایی زمستان گذران بیشترین جمعیت را در میان پرندگان مهاجر آبزی و کنار آبزی ایران داشته است(۳و۴). حضور آن در حدود ۲/۳ از استان‌های مختلف گزارش‌شده است که در استان‌های گلستان، خوزستان، مازندران و گیلان به ترتیب بیشترین جمعیت اردک سرحنائی زمستان گذران دیده‌شده است. طبق گزارش ملی سرشماری زمستانی پرندگان آبزی و کنار آبزی حفاظت محیط زیست در سال ۱۳۹۷ از تمامی استانهای کشور، بیشترین جمعیت پرندگان آبزی و کنار آبزی کشور مهاجر فهرست سرخ IUCN مربوط به گونه اردک سرحنائی با جمعیت ۱۷۸۱۳ پرنده بوده است. (سایت سازمان حفاظت محیط‌زیست کشور)

در سال ۲۰۱۱ با توجه به بالا گرفتن آنفولانزای پرندگان و پراکنش بیماری توسط پرندگان مهاجر اروپا و آسیای شرقی بررسی ژنتیکی بر روی اردک سرحنائی صورت گرفت و نتایج حاصل از بررسی ژنوم میتوکندری و میکرو ستلایت‌های این‌گونه نشان داد که تفاوت درون جمعیت‌ها از تفاوت بین جمعیت‌ها به‌مراتب گسترده‌تر است(۵).به‌عنوان یک‌گونه *palearectic* اردک غواص، در اروپا و آسیا گسترده است و بااین‌حال مانند سایر پرندگان آبزی، با توجه به کاهش جمعیت و از بین رفتن زیستگاه‌های طبیعی آن، نیازمند مدیریت و حفاظت است (۶).

معتبرترین روش برای تعیین میزان پیوستگی جمعیت‌های یک‌گونه بررسی تفاوت‌های ژنتیکی بین آن‌ها است. پیشرفت‌هایی که طی یکی دو دهه گذشته درزمینه زیست‌شناسی مولکولی صورت گرفته است، بسیاری از محققان محیط‌زیست را ترغیب کرده تا با اتکای به آن‌ها تغییرات ژنتیکی داخل و بین جمعیت‌های مختلف را ارزیابی کنند(۷). مشخص شده که پیشرفت برنامه های اصلاح نژادی و ژنتیکی و حفاظتی بستگی به سطح تغییرات ژنتیکی در جمعیت ها دارد، بنابراین مطالعه تنوع در نژادهای بومی و وحشی و حفاظت از آنها وظیفه اولیه متخصصان ژنتیک و اصلاحگران می باشد(۸). به این منظور ارزیابی تنوع‌ژنتیکی موجود در یک جمعیت از مهمترین اهداف در مطالعه ژنتیک جمعیت‌هاست و کاربرد مهمی در زیست‌شناسی حفاظت دارد. چرا که یک گونه بدون تنوع ژنتیکی کافی قادر به سازگاری با تغییرات محیطی و مبارزه با انگل ها و رقیب ها نیست (۹). مدیریت و حفاظت از حیات‌وحش نیازمند داشتن تصویری جامع از تنوع و تغییرپذیری ژنتیکی در ساختارهای گیتا شناختی است. از مهمترین ابعاد تئوری‌های تکاملی و سیستماتیک مطالعه تغییرات صفات در جمعیت‌های

یک‌گونه یا گونه‌های مختلف است که در مناطق جغرافیایی متفاوت هستند (۱۰). حفاظت مبتنی بر دانش عمیق از منابع ژنتیکی نژادهای بومی و محلی بسیار اهمیت دارد (۱۱). این امر تحت تأثیر عوامل متعددی است و این عوامل در جمعیت‌های مختلف، متفاوت است. برخی از مهمترین عوامل تعیین‌کننده تنوع‌ژنتیکی، رانش‌ژنتیکی، گردنه‌بطری، انتخاب طبیعی و روش تولیدمثل است که هیچ‌کدام از این فرآیندها به‌طور مستقل عمل نمی‌کنند (۱۲). آن را می‌توان به‌صورت تنوع توالی DNA ژنومی بین دو موجود یا دو جمعیت از موجودات تعریف کرد (۱۳). مطالعه تغییرات موجود در جوامع، مشخص‌کننده وسعت آن است .از اهداف کلی تحقیقات ژنتیک جمعیت، تعیین مقدار تنوع درون و بین جمعیت‌های هرگونه و محاسبه آن است. میزان آن را درون و بین جمعیت‌ها می‌توان توسط فراوانی ژن‌ها و آلل‌ها با در نظر گرفتن عواملی مثل مهاجرت، جهش، نوترکیبی و پیشامد ژنتیکی که بر فراوانی آن‌ها اثرگذار است، تعیین کرد. تنوع‌ژنتیکی، قابلیت بقاء یک‌گونه و یا جمعیت را از طریق ایجاد توانائی سازگاری با تغییرات محیطی فراهم‌می‌کند، بنابراین برای بقاء طولانی‌مدت یک‌گونه ضروری است(۱۴).

آنالیزهای ژنتیکی کاربرد خوبی برای حدس راه های ارتباطی بین مناطق جوجه آوری و زمستان گذرانی پرندگان دارند اما همه نشانگرهای مولکولی برای استفاده جهت بررسی مهاجرت پرندگان مناسب نیستند (۱۵). انتخاب یک نشانگر مناسب نیاز به داشتن آگاهی در زمینه رفتارشناسی مهاجرت و جریان ژن در جمعیت های پرندگان دارد (۱۶). موضوع مهم در انتخاب نشانگر مناسب، توانایی آن در تشخیص تفاوت های جغرافیایی گونه های مهاجر و توان ردیابی پرندگان مهاجر است(۱۷). استفاده از ژنوم میتوکندری یکی از مهم ترین نشانگرهای مورد استفاده برای بررسی ژنتیک جمعیت جانوران است(۱۸). این ابزار بیشتر با هدف تعیین ساختار ژنتیکی جانوران(۱۹) استفاده می شود، اما کاربردهای فراوانی در سایر موارد مثل، شناسائی تاریخی و تغییرات جغرافیای زیستی نیز دارد(۲۰). ژن سیتو کروم b یکی از ژن های میتوکندری است که برای بازسازی ارتباط فیلوژنی بین گونه ای و مطالعات ژنتیک جمعیت برای زیر تیره اردک ها مناسب و کارآمد است(۲۱). از این رو به عنوان یک نشانگر قابل اعتماد برای مطالعات فیلوژنتیکی و ژنتیک جمعیت مورد استفاده قرار می گیرد(۲۳ و ۲۲). لذا، هدف این پژوهش بررسی ساختار ژنتیکی و جایگاه فیلوژنی جمعیت شمال و جنوب اردک سرحنائی در بین اردکهای غواص ایران با استفاده از ژن میتوکندریایی سیتوکروم b بوده است.



شکل۱- پراکنش اردک سرحنائی در اوراسیا، مناطق زادآوری آن با رنگ خاکستری تیره نشان داده شده است (۴)

Figure 1. Sampling localities of the common pochard *(Aythya ferina*) across its distribution range in Eurasia. The species' breeding range is highlighted (4)

مواد و روش ها

مناطق مورد بررسی

تالاب میانکاله : شبه‌جزیره میانکاله در منتهی‌الیه جنوب‌شرقی دریای مازندران(مختصات‌تالاب۵۰°۳۶′ شمالی ۱۷°۵۳′ شرقی)، در دوازده کیلومتری شمال شهر بهشهر واقع می‌باشد. مساحت آن بیش از شصت‌وهشت هزار هکتار و ارتفاعِ آن بینِ ۱۵ تا ۲۸ متر کمتر از سطحِ دریای آزاد است. میانکاله از سال ۱۳۴۸ به عنوان «منطقه حفاظت‌شده» تعیین شد و هم‌اکنون با عناوین پناهگاه حیات وحش، تالاب بین‌المللی و ذخیره‌گاه طبیعی زیست‌کره تحت حفاظت محیط‌زیست قرار دارد (۲۷).

خلیج گرگان: خلیج گرگان بزرگترین خلیج در جنوب دریای کاسپین است که بر اثر پیشروی و گسترش شرقی رشته ساحلی شبه جزیره میانکاله در جنوب شرقی دریای کاسپین تشکیل شده است. وسعت خلیج گرگان حدود ۴۵۰ کیلومترمربع است. طول خلیج در جهت غربی به شرقی حدود ۷۰ کیلومتر و عرض آن نیز بین ۱۳ تا ۱۴ کیلومتر است، ولی کاملاً برخلاف شبه جزیره میانکاله، از غرب به شرق به عرض خلیج افزوده شده است. مختصات جغرافیایی خلیج از ۵۳-۲۵ تا ۵۴-۲۵ شرقی و ۳۶-۴۶ تا۳۶-۵۴ شمالی است. خلیج گرگان کم عمق است و با در نظر گرفتن بالاآمدگی آب، حداکثر عمق آن به ۴ متر میرسد و از غرب به شرق تا حوالی ضلع جنوبی آشوراده به عمق آب افزوده است. اکولوژی خلیج گرگان تحت تأثیر دریای خزر، رودهای مجاور و شبه جزیره میانکاله قرارگرفته است که در رشد و تکثیر آبزیان، ماهیان استخواندار و ماهیان غضروفی و جذب پرندگان مهاجر زمستانی نقش مهمی دارد (۲۸).

تالاب هوالعظیم: تالاب هورالعظیم در غرب استان خوزستان در انتهای رود کرخه در منطقه مرزی دشت آزادگان واقع شده‌است و دارای طول جغرافیای ۴۷ درجه و ۵۸ دقیقه تا ۴۷ درجه ۱۶ دقیقه و۳۰ ثانیه طول شرقی و عرض جغرافیایی ۳۱ درجه ۵۳ دقیقه تا ۴۱ درجه عرض شمالی است. این تالاب، مشترکاً در شهرستان‌های دشت آزادگان و هویزه استان خوزستان واقع گردیده‌است.

گونه مورد مطالعه: اردک سرحنائی بین ۴۲ تا ۴۹ سانتی متر طول دارد. پیشانی بلندش با شیب تندی به منقار نسبتاً بلندش متصل می‌شود و فاقد تاج سر می‌باشد. در پرنده نر، سر و گردن بلوطی‌رنگ سینه سیاه، زیرتنه و روتنه خاکستری، کم‌رنگ و منقارش آبی کم‌رنگ است که قاعده و نوک آن سیاه است. پرنده نر در حالت تولک به ماده شباهت پیدا می‌کند با این تفاوت که اندکی خاکستری‌تر است. در پرنده ماده سر و سینه قهوه‌ای کم‌رنگ، چانه و نوار چشمی کم‌رنگ‌تر و منقارش به رنگ تیره است که انتهای آن سیاه می‌باشد. تفاوت پرنده ماده با ماده اردک سیاه کاکل در کم رنگی دور منقار و چانه است این پرنده به‌ندرت به ساحل می‌آید و اغلب روی آب به سر می‌برد(۱). متاسفانه با توجه به شرایط تغییر اقلیمی در جهان و گرم شدن کره زمین، ایران نیز از این امر متمایز نبوده و خلیج گرگان، تالابهای میانکاله و هورالعظیم هم تحت تاثیر این شرایط و عدم توجه و رسیدگی به میزان ورودی آب در معرض خطر خشک شده هستند که همین امر باعث از دست رفتن زیستگاه های اردک سرحنائی جهت زمستان گذرانی خواهد شد و جمعیت آن مورد تحدید قرار خواهد گرفت.

نقشه ۱- پراکنش اردک سرحنایی در ایران

Map 1. Distribution of *Aythya ferina* in Iran

نمونه برداری و روش های آزمایشگاهی: نمونه برداری برداری از شمال و جنوب کشور انجام شده ولی متاسفانه از یک طرف به علت همه گیری جهانی بیماری کرونا و محدودیتهای اعمال شده حضور در مناطق شمال و جنوب کشور در سال ۱۳۹۹ و ۱۴۰۰ و از طرف دیگر آلودگی که در تالاب میانکاله باعث تلف شدن تعداد زیادی از پرندگان مهاجر شد، سبب شد تعداد محدودی نمونه برای بررسی در دسترس باشد. از ۱۰ نمونه اردک سرحنائی(۵ نمونه از استانهای شمالی و ۵ نمونه از خوزستان) که از شکارچیان ضبط شده بود، نمونه بافت ماهیچه به کمک اسکالپل استریل شده، جدا و داخل الکل اتیلیک ۹۶درجه قرار داده و به آزمایشگاه منتقل شد.پس از آن یک تکه از بافت داخلی ماهیچه هر نمونه با دقت جدا شد و در هاون چینی قرار داده شد، سپس بر روی هر نمونه با دقت مقداری هیدروژن مایع اضافه شده و بافت با دقت نرم شد تا حداکثر استخراج را داشته باشد. DNA نمونه ها با استفاده از کیت ویراژن و بر اساس پروتکل استاندارد استخراج، با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (مدل ۲۷۲۰ Applied Biosystems، ساخت آمریکا) واکنش زنجیره ای پلی مراز در۳۵ سیکل و با استفاده از آغاز گرهای زیر تکثیرشد.

(۳-۵ L۱۴۹۹۰)

CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA و

(۳-۵ H۱۶۰۶۵)

GGAGTCTTCAGTCTCTGGTTTACAAGAC

واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) در دستگاه ترموسایکلر به شرح زیر انجام گرفت:

واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، واسرشت سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت۴۵ ثانیه، اتصال آغاز در دمای ۵۲ درجه سانتی گراد و به مدت ۶۰ ثانیه و مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه، (سیکل ۳۵ بار) مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه. حجم واکنش برابر ۲۵ میکرولیتر و محتوای آن شامل ۱۳ میکرولیتر از مستر میکس شرکت ویراژن، ۹ میکرولیتر آب مقطر،۱ میکرولیتر DNA و ۱ میکرولیتر از هر آغازگر می باشد. به منظور تایید تکثیر ناحیه مورد نظر، طی واکنش PCR مقدار ۵ میکرولیتر از نمونه تکثیر شده را با ۱ میکرولیتر از DNAGreen روی ژل آگارز ۲درصد قرار گرفت.پس از اطمینان از تکثیر و فقدان آلودگی، ۹ نمونه (جدول۱) برای تعیین توالی به شرکت ایرانی کدن ژن ارسال شد (یکی از نمونه های فاقد کیفیت لازم برای تعیین توالی بود). این نمونه ها با استفاده از دستگاه ABI به طور خودکار توالی یابی شد. پس از بررسی ۸ نمونه قابل استفاده بود.

توالی های ژن سیتوکروم b موجود در بانک ژن با شماره های (KJ710708 MW337298, EU585623,) استخراج و برای انجام آنالیز استفاده شدند. برای آماده سازی نوکلئوتیدی توالی ها و مرتب سازی آنها از نرم افزار Seqscape نسخه ۲,۶ (تولید و توسعه یافته توسط LifeTechnologies and Applied Biosystems) استفاده شد. برای تعیین تنوع ژنتیکی(هاپلوتایپی و نوکلئوتیدی) و هم چنین مشخص نمودن جایگاههای چند شکلی از نرم افزار DnaSP نسخه ۶ (Launch) استفاده شد. سپس بر اساس معیار BIC و AIC (۲۹)، مدل تامورا- نی(۳۰) به علاوه آماره G، به عنوان بهترین مدل تکاملی برای نمونه ها تعیین شد و رسم درخت تبار شناختی با روش حداکثر درست نمائی در نرم افزار MEGA نسخه ۷ (۳۱) انجام شد.

برای ترسیم شبکه هاپلوتایپی از روش اتصال میانه و در نرم افزار Papart استفاده شد. واگرایی ژنتیکیو آنالیز واریانس مولکولی، به صورت جفتی بین منطقه نمونه برداری شده و توالی های به دست آمده از ژن بانک(NCBI) با ۱۰۰۰ بار تکرار، گسترش و پراکنش تاریخی جمعیتی با دو روش آزمون تاجیما (D-test of Tagima) (۳۲) و آزمون فو (Fu *Fs*) (۳۳) با نرم افزار DnaSP نسخه ۶ (Launch) استفاده شد.

جدول ۱- مشخصات نمونه های توالی یابی شده

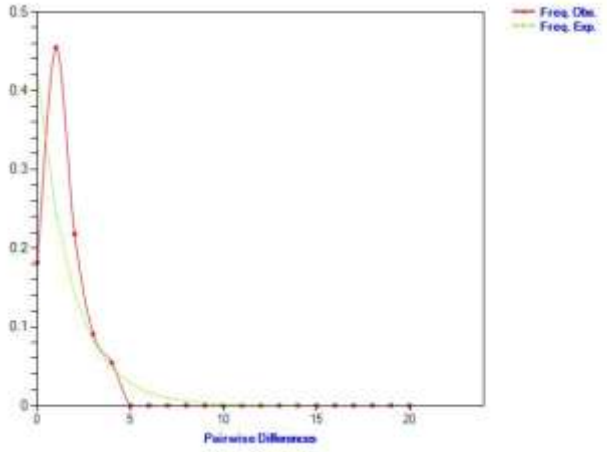
Table 1. Specifications of sequenced samples

ردیف	نام اختصاری	موقعیت در کشور
۱	۱C	شمال ایران
۲	۲C	شمال ایران
۳	۳C	شمال ایران
۴	۴C	شمال ایران
۵	۵C	شمال ایران
۵	۶C	جنوب ایران
۷	۷C	جنوب ایران
۸	۸C	جنوب ایران
۹	۹C	جنوب ایران

نتایج

در این مطالعه با بررسی ۹۲۹ جفت باز از ژن سیتوکروم *b* ژنوم میتوکندری از ۸ نمونه از شمال و جنوب کشور ۶ جایگاه متغیر، ۹۲۳ جایگاه حفظ شده، و ۷ هاپلوتایپ مختلف شناسایی شد. در بین نمونه های بررسی شده، بیشترین فراوانی هاپلوتایپی، مر بوط به C (۳۵٪/۴۷) و کمترین A (۱۵٪/۳۸)را داشتند. میزان تنوع هاپلوتایپی(Hd) و تنوع نوکلئوتیدی(Pi) برای تمامی توالی ها به ترتیب ۰/۱۱۹ ±۰/۸۱۸ و ۰/۰۰۱۴۹±۰/۰۰۰۴۱ به دست آمد. نتایج تحلیل نمونه های بدست آمده نشان داد که احتمالا در جمعیت ایران دارای تنوع ژنتیکی پایینی است. جریان ژنی(Nm) بین جمعیت نمونه برداری شده در ایران و جهان (استخراج شده از ژن بانک,KJ710708 MW337298,EU585623) برابر با ۱/۳۸۱ بوده که عدد نسبتا بالایی است و نشان دهنده تفاوت ژنتیکی کم و به عبارت دیگر، جریان ژنی زیاد بین جمعیت ها است. آزمون های بی‌طرفی (neutrality tests) تاجیما و شاخص فو برای ۸ توالی به ترتیب برابر ۰/۰۲۸- و ۱/۲۸۸- بوده که هیچ کدام از لحاظ آماری

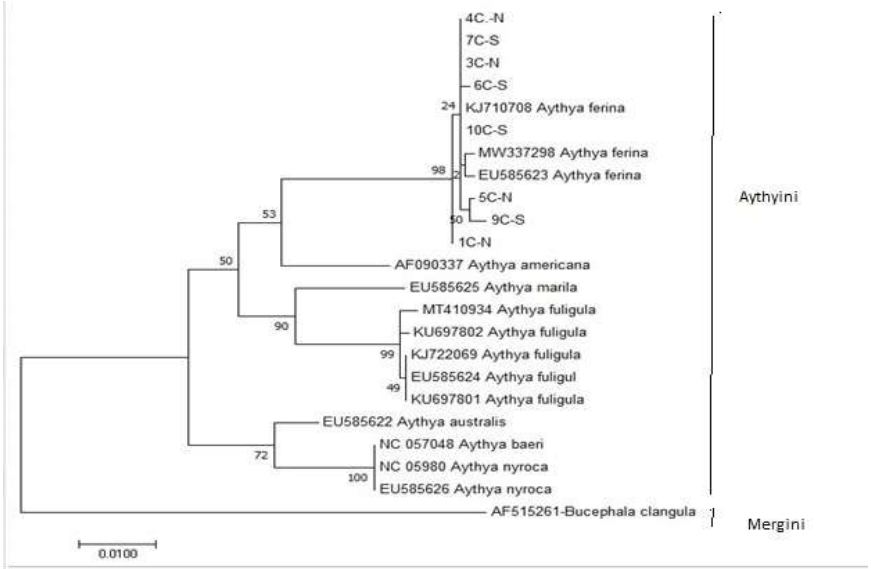
معنی دار نبودند($p\geq$۰/۱). میزان شاخص راجرز هارپندینگ (r:۰/۱۱۲) و نمودار آن تک نمائی (شکل۲) به دست آمده که نشان از گسترش گونه است که البته به دلیل کوچک بودن تعداد نمونه نیاز به مطالعات تکمیلی دارد.



شکل۲- نمودار مربوط به شاخص راجرز- هارپندینگ(شاخص عدم تطابق) بر اساس تحلیل ژن سیتوکروم b بین تمام نمونه های و افراد مربوط به ژن بانک

Figure 2. Rogers-Harping index index (mismatch index) based on cytochrome b gene analysis between all samples and individuals related to the gene bank

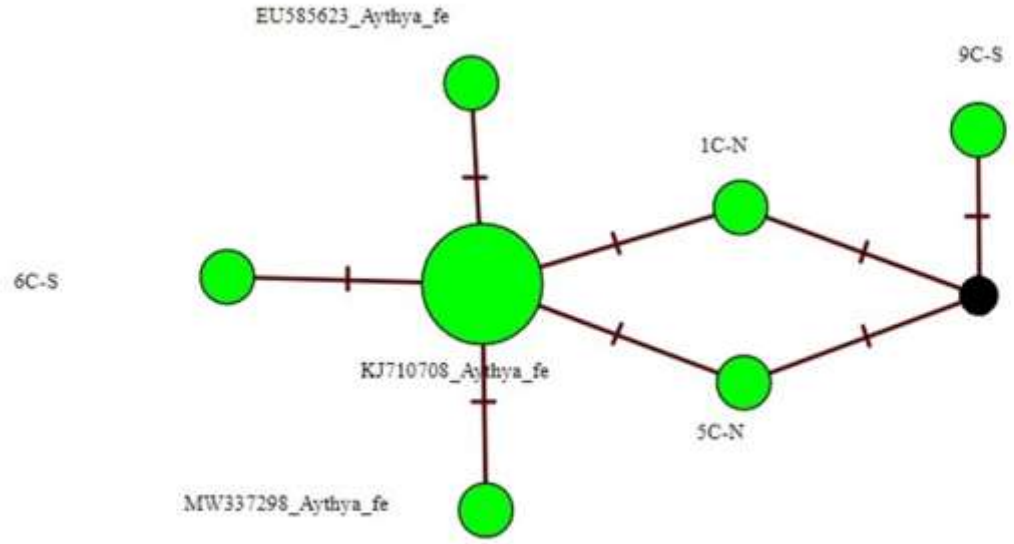
در درخت تبارزایی مربوط به اردک های غواص ایران که با استفاده از نمونه های موجود در ژن بانک و مطالعه حاضر با بوت سترپ ۱۰۰۰ ترسیم شده است مشخص می شود که اردک های غواص ایران به دو شاخه اصلی (Aythyini) و (Mergini) تقسیم شده اند.



شکل ۳- ترسیم درخت تبارشناختی براساس روش حداکثر درست نمایی بین اردکهای غواص موجود در ایران با استفاده از قطعه ۹۲۹ جفت بازی ژن سیتوکروم *b* ژنوم میتوکندری

Figure 3. Drawing a genealogical tree based on the maximum likelihood method between diver ducks in Iran using fragment 929 pairs of cytochrome b gene of mitochondrial genome

با استفاده از توالی های بدست آمده از مناطق شمالی و جنوبی کشور و نمونه های موجود در ژن بانک شبکه هاپلوتایپی توسط نرم افزار papart رسم شد(شکل۴). در این شکل هاپلوتایپ ۱ که شامل ۵ فرد است، دارای بیشترین فراوانی بوده و احتمالا قدیمی ترین توالی است. نمونه آسیایی (KJ۷۱۰۷۰۸) به همراه ۴ فرد (C-،۷C-S،۴C،-N۳C-N ۱۰S) از ایران در این گره قرار گرفته اند. سایر نمونه ها به صورت فردی در این گره ها قرار دارند.



شکل۴- شبکه هاپلوتایپی نمونه های مورد مطالعه

Figure 4. Haplotype network of the studied samples

جدول۲- فاصله ژنتیکی(مثلث پایین) و انحراف استاندارد (مثلث بالا) بین نمونه های صید شده در ایران و نمونه های موجود در بانک ژن NCBI (براساس مدل تامورا-نی، با بوت استرپ ۱۰۰۰)

Table 2. Genetic distance (lower triangle) and standard deviation (upper triangle) between specimens caught in Iran and specimens in the NCBI gene bank (based on Tamura-Nei model, bootstrap 1000)

.Aythya_ferina۷۱۰۷۰۸KJ		۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۲
.Aythya_ferina۳۳۷۲۹۸MW	۰/۰۰۱		۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۲	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۲	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۲
.Aythya_ferina۵۸۵۶۲۳EU	۰/۰۰۱	۰/۰۰۲		۰/۰۰۱	۰/۰۰۲	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۲
_nucleotides.۱۳۹۲C._۱۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱		۰/۰۰۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۲
_nucleotides.۱۳۹۲C._۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۱		۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۲	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۲
_nucleotides.۱۳۹۲C._۳	۰/۰۰۰	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۱		۰/۰۰۰	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۲
_nucleotides.۱۳۹۲C._۴	۰/۰۰۰	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰		۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۲
_nucleotides.۱۳۹۲C._۵	۰/۰۰۱	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۱	۰/۰۰۲	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱		۰/۰۰۲	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱
_nucleotides.۱۳۹۲C._۶	۰/۰۰۱	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۱	۰/۰۰۲	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۲		۰/۰۰۱	۰/۰۰۲
_nucleotides.۱۳۹۲C._۷	۰/۰۰۰	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱		۰/۰۰۲
_nucleotides.۱۳۹۲C._۹	۰/۰۰۳	۰/۰۰۴	۰/۰۰۴	۰/۰۰۳	۰/۰۰۲	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳	۰/۰۰۲	۰/۰۰۴	۰/۰۰۳	

بحث

ژن میتوکندری برای ردیابی تاریخچه جمعیت ها و به ویژه تخمین مهاجرت و جریان ژن بسیار مناسب است (۳۴). در پژوهش حاضر، ژن سیتوکروم b ژنوم میتوکندری برای تحلیل ژنتیکی جمعیت اردک سرحنایی شمال و جنوب کشور مورد استفاده قرار گرفت. در شبکه هاپلوتایپی رسم شده ۴ فرد با نمونه آسیایی (KJ۷۱۰۷۰۸) و سایر نمونه ها به صورت انفرادی در یک گره قرار گرفته اند. در درخت تبار شناختی رسم شده بین افراد مورد مطالعه و نمونه های اروپایی و آسیایی تقریبا همگی در یک کلاد واقع شده اند که این موضوع نشان دهنده این است، که طیف وسیعی از جمعیت های مختلف، از مناطق مختلف، عبور یا زمستان گذرانی کرده و در ایران جمعیتها فرصت اختلاط با جمعیتهای دیگر را پیدا می کنند. در نتیجه این اختلاط، بعضی از افراد با جمعیتی به غیر از جمعیت خود به محل جوجه آوری باز می گردند و این موضوع باعث افزایش تنوع ژنتیکی از طریق ورود ذخایر ژنی جدید به جمعیت و کاهش اثرات درون آمیزی کمی شود(۳۵). طبق مطالعاتی که در سال ۲۰۰۹ بر روی ۲۰۱ نمونه از اردک سرحنائی در اروپای غربی و شرقی و بریتانیا توسط keller و همکارانش صورت گرفت مشخص گردید که این گونه تمایل زیادی به مهاجرت در اثر تغییرات آب و هوا و یا کمبود مواد غذایی دارد که همین امر باعث جریان بالای ژنی در بین افراد این گونه گردیده است (۳۶). فاصله کم ژنتیکی بین نمونه ها و وجود هاپلوتایپهای مشترک نیز این موضوع را تایید می کند. بر اساس نتایج HE و همکاران (۳۷) وقتی میزان Fst کم تر از ۰/۳۳ باشد، نشان دهنده جریان ژنی بالا در بین جمعیت ها است، که این موضوع بر اساس نرخ جریان ژنی (Nm) نیز تایید می شود، نتایج پژوهش حاضر نیز نشان داد که جریان ژَن با توجه به نمونه های بررسی شده بین جمعیت ایران و جهان بالاست. با توجه به فاصله بسیار کم ژنی بین این جمعیت ها جدا شدن آن ها در سطح زیرگونه اتفاق نیفتاده و تفاوت های آنها در سطح جمعیتهای مختلف مشاهده می شود. شاخص تاجیما و فو نیز وجود گسترش ناگهانی جمعیت در گذشته را نشان دادند، اما از لحاظ آماری معنی دار نبودند، توزیع عدم تطابق(mismatch distribution)بر اساس شاخص راجرز و هارپندینگ به صورت تک نمائی بود که نشان دهنده گسترش ناگهانی جمعیت در گذشته است (۳۸) و نتیجه به دست آمده از دو شاخص دیگر را تایید می کند. برای دست یافتن به نتیجه دقیق تر باید از جمعیت های این گونه به تعداد بیشتر نمونه برداری انجام شده و بررسی شود. هرچند که شاخص فو و تاجیما شاخص های قوی تری نسبت به توزیع عدم تطابق، برای پی بردن به شرایط گذشته جمعیت ها می باشند (۳۹) در درخت تبار شناسی مربوط به گونه های مختلف اردک های غواص موجود در ایران نتایجی مشابه نتایج Gonzalez و همکاران(۴۰) به دست آمده است که دو شاخه کاملا مجزا (Aythyini و Mergini) تشکیل شده است. ۷ هاپلو تایپ شناسایی شد که بر اساس این نتایج، این نمونه های مورد مطالعه از جمعیتهای جغرافیایی جهان واگرایی زیادی ندارد، تفاوت ژنتیکی بسیار کم و جریان ژنی بالایی بین این جمعیتهای جغرافیایی بر قرار است. هرچند که تنوع ژنتیکی به دست آمده از نتایج این پژوهش نسبتا پایین است و تنوع هاپلوتایپی و نوکلئوتیدی رقم بالایی را نشان نمی دهد، اما برای نتیجه گیری مطمئن تر نیاز به بررسی های جامع با تعداد بیش تری از افراد این گونه در ایران و نقاط مختلف جهان است.

تشکر و قدردانی

نگارندگان بدینوسیله بر خود لازم می دانند، از جناب آقای مهندس محمد الوندی همکار اداره محیط زیست استان خوزستان، آقای محمد کاظمی همکار اداره محیط زیست استان گیلان و آقای مهندس روح الله اسماعیلی همکار اداره محیط زیست استان مازندران و آقای دکتر طالب خالوئی مدیر کل سازمان حفاظت محیط زیست استان کرمان که در تهیه و جمع آوری نمونه ها کمال همکاری را داشتند، تشکر و قدر دانی نمایند.

References

1. **Mansori, J., 2008**. Ornithology, First Edition, Farzaneh Book Publishing, pp:114-118. (In persian)
2. **Dayan, K., 1988.** Birds of the Middle orient and the Near orient, First edition,

University of Tehran Press, pp:63-65. (In persian)

3. **Ahmadpour, M., Lan-Hai, L., Ahmadpour, M. et al. (2016**). Mercury concentration in the feathers of birds from various trophic levels in Fereydunkenar International wetland (Iran). Environ Monit Assess 188, 666 (2016). https://doi.org/10.1007/s10661-016-5671-y
4. **Nafiseh Momeni, Hamid Reza Rezaei, Mohsen Ahmadpour, Paul Hapeman, (2022).** Mitochondrial DNA cytochrome b diversity and phylogeny of the Eurasian coot (Fulica atra; Linnaeus, 1758) (Gruiformes: Rallidae), Journal of Wildlife and Biodiversity: 6 (2): 22-34.
5. **Yang Liu, Irene Keller, and Gerald Heckel, 2011**. Range-wide genetic population structure of common pochard (Aythya ferina): a potentially important vector of highly pathogenic avian influenza viruses Ecol Evol. Dec; 1(4): 529–545
6. **J.M. Amezaga, L. antamaría, A.J. Green, 2002**. Biotic wetland connectivity—supporting a new approach for wetland policy Acta Oecologica 23; 213–222
7. **Madsen, T.; Olsson, M.; Wittzell, H.; Stille, B.; Gullberg, A.; Shine, R.; Andersson, S.and Tegelstro, H., 2000.** Population size and genetic diversity in sand lizards (Lacerta agilis) and adders (Vipera berus). Biological Conservation. 94: 257-262.
8. **Mohammadabadi, M.R.; Nikbakhti, M.; Mirzaee, H.R.; Shandi, A.; Saghi, D.A.; Romanov, M.N. and Moiseyeva, I.G., 2010.** Genetic variability in three native Iranian chicken populations of the Khorasan province based on microsatellite markers. Russian journal of genetics. Vol. 46, No. 4, pp: 505-509.
9. **Askari, N.; Abadi, M.R.M. and Baghizadeh. A., 2011.** ISSR markers for assessing DNA polymorphism and genetic characterization of cattle, goat and sheep populations. Iranian Journal of Biotechnology. Vol. 9, pp: 222-229.
10. Thorp, J. P., 1982. The molecular clock hypothesis: Biochemical evolution, genetic differentiation and systematic. Annual Review of Ecology and Systematics; vol. 13, pp. 139-168.
11. **Moazeni, S.; Mohammadabadi, M.R.; Sadeghi, M.; Shahrbabak, H.; Koshkoieh, A. and Bordbar, F., 2016.** Association between UCP Gene Polymorphisms and Growth, Breeding Value of Growth and Reproductive Traits in Mazandaran Indigenous Chicken. Open Journal of Animal Sciences. Vol. 6, No. 1, pp: 1-8.
12. **Friland, J., 2005.** Molocular ecology. Jahad university publishers, Mashhad. Iran. pp:44-67
13. **Gunter, K., 2009.** The dictionary of gene Technology Genomies. Transcription protemics, wiley-vch Verlag GmbH and Co. KgaA, Weinheim. 1862 P
14. **Bataillon, T.M., David, J.L., Schoen, D.J., 1996.** Neutral genetic markers and conservation: simulated germplasm collections. Genetics; vol. 144, pp: 409-417.
15. **Jahn, A.E.; Levey, D.J.; Farias, I.P.; Mamani, A.M.; Vidoz, J.Q. and Freeman, B., 2010.** Morphological and genetic variation between migratory and non-migratory Tropical Kingbirds during spring migration in central South America. The Wilson Journal of

Ornithology. Vol. 122, No.5, pp: 236-243.

16. **Zwartjes, P.W., 2001**. Genetic structuring among migratory populations of the black-whiskered vireo, with a comparison to the red-eyed vireo. The Condor. Vol. 103, No. 3, pp:439-448.
17. **Haig, S.M.; Rhymer, J.M. and Heckel, D.G., 1994.**Population differentiation in randomly mplified polymorphic DNA of red-cockaded woodpeckers Picoides borealis. Molecular Ecology. Vol. 3, No. 6, pp: 581-595.
18. **Nabholz, B.; Mauffrey, J.F.; Bazin, E.; Galtier, N. and Glemin, S., 2008**. Determination of mitochondrial genetic diversity in mammals. Genetics. Vol. 178, No. 1, pp: 351-361.
19. **Avise, J.C.; Arnold, J.; Ball, R.M.; Bermingham, E.; Lamb, T.; Neigel, J.E.; Reeb, C.A. and Saunders, N.C.,1987.** Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. Annual review of ecology and systematics. pp: 489-552.
20. **Hurst, G.D.D. and Jiggins, F.M., 2005.** Problems with mitochondrial DNA as a marker in pulation, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences. Vol. 272, No. 1572, pp:1525-1534.
21. **Johnson, K.P. and Sorenson, M.D., 1998.** Comparing molecular evolution in two mitochondrial protein coding genes (cytochrome b and ND5) in the dabbling ducks (Tribe: Anatini). Molecular phylogenetics and evolution. Vol. 10, No. 1, pp: 82-94.
22. **Zardoya, R. and Meyer, A., 1996**. Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving relationships among vertebrates. Molecular biology and evolution. Vol. 09, No. 8, pp: 399-315.
23. Johnson, K.P. and Sorenson, M.D., 1989. Comparing molecular evolution in two mitochondrial protein coding genes (cytochrome b and ND5) in the dabbling ducks (Tribe: Anatini). Molecular phylogenetics and evolution. Vol. 10, No. 1, pp: 82-94.
24. **Bakhtiari, S.2000.** Geological Atlas of Iranian Provinces, Tehran: Institute of Geography and Cartography.
25. **Kiabi, B.; GHaemi, B., and Abdoli, Am., 1989**. Wetland and river ecosystems of Golestan province. Administration Environmental protection of Golestan province. ۱۸۲ pages.
26. **Nei, M. and Kumar S., 2000**. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press, New York.
27. **Tamura, K. and Nei, M., 1993**. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Molecular biology and evolution. Vol. 10, No. 3, pp: 512-526.
28. **Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K., 2016** MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Molecular Biology and Evolution, 33, 1870-1874.
29. **Tajima, F., 1989**. Statistical-method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics. Vol., 123 pp: 585-595.

30. **Fu, Y.X., 1997**. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. Genetics. Vol. 147, pp: 915-925
31. **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. Vol. 91, No. 11, pp:5173-5177.
32. **Liu, Y.; Keller, I. and Heckel, G., 2012.** Breeding site fidelity and winter admixture in a long-distance migrant, the tufted duck (*Aythya fuligula*). Heredity. Vol 109, No. 2, pp: 108-116.
33. **Keller, I.; Korner-Nievergelt, F. and Jenni. L., 2009**. Within-winter movements: acommon phenomenon in the Common Pochard *Aythya ferina*. Journal of Ornithology. Vol. 150, No. 2, pp:483-494
34. **He, H.; Yuan, X.; Wei, C. and Yuan, F., 2006.** Genetic variation of the Mmitochondrial ND1 region among geographical populations of *Sitodiplosis mosellana* (Gehin) (Diptera: Cecidomyiidae) in China. Journal of Kansas Entomology Society. Vol. 79, pp: 211-222.
35. **Rogers, A.R., and Harpending, H., 1992.** Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. Molecular Biology and Evolution. Vol. 9, No. 3, pp: 552-569.
36. **Ramos-Onsins, S.E. and Rozas, J., 2002.** Statistical properties of new neutrality tests against population growth. Molecular biology and evolution. Vol. 19, No. 12, pp: 2092-2100.
37. **Gonzalez, J.; Düttmann, H. and Wink, M., 2009.** Phylogenetic relationships based on two mitochondrial genes and hybridization patterns in Anatidae. Journal of Zoology. Vol.279., No. 3, pp: 310-317.