

بررسی تبارشناسی و تنوع ژنتیکی تشی (*Hystrix indica*) بر اساس ژن سیتوکروم

بی میتوکندریایی در استان فارس

علیرضا صحرائیان جهرمی^۱

جلیل ایمانی هرسینی^{۲*}

jalil.imani@srbiau.ac.ir

حمیدرضا رضایی^۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۶/۲۲

چکیده

زمینه و هدف: تشی به‌عنوان بزرگ‌ترین جونده ایران در سالیان اخیر دچار تعارضاتی با انسان در خصوص تخریب باغات و محصولات کشاورزی و نیز بروز تلفات به واسطه شکار غیرمجاز و استفاده از سموم شیمیایی شده است و با این وجود اطلاعات کارآمدی که زمینه ایجاد برنامه مدیریتی و حفاظتی برای این گونه را فراهم کند وجود ندارد، به همین منظور این مطالعه با هدف بررسی ساختار و تنوع ژنتیکی تشی در زیستگاه‌های استان فارس به انجام رسید.

روش بررسی: ۱۵ نمونه تیغ و بافت از این گونه در زیستگاه‌های استان فارس جمع‌آوری شد. پس از استخراج DNA، ژن سیتوکروم بی میتوکندریایی در ۱۳ نمونه توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، تکثیر و ۹۱۲ جفت نوکلئوتید از این ژن برای هر نمونه توالی‌یابی و ویرایش شد.

یافته‌ها: براساس درخت تبارشناسی ترسیم شده با بیشینه احتمال، تمامی نمونه‌های مورد مطالعه مربوط به یک شاخه و از گونه *Hystrix indica* هستند. در بین نمونه‌های مورد بررسی تنها دو هاپلوتایپ متفاوت شناسایی و تنوع هاپلوتایپی برابر با ۰/۲۸۲ و تنوع نوکلئوتیدی ۰/۰۰۰۲۹ برآورد شد.

بحث و نتیجه‌گیری: براساس نتایج بدست آمده میزان تنوع هاپلوتایپی تشی در استان فارس پایین بوده براین اساس پیشنهاد می‌شود ضمن انجام مطالعات جمعیت شناختی با تدوین برنامه مدیریتی و حفاظتی برای این گونه، از بحران‌های بیشتر محیط زیستی مرتبط با آن نظیر اختلال در زنجیره غذایی جلوگیری گردد.

واژه‌های کلیدی: تشی، تبارشناسی، تنوع ژنتیکی، سیت، استان فارس.

۱- کارشناس ارشد علوم محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲- گروه علوم محیط زیست و جنگل، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. * (مسئول مکاتبات)
۳- گروه محیط زیست، دانشکده محیط زیست و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

Phylogeny and genetic diversity of Indian crested porcupine (*Hystrix indica*) based on mtDNA cytochrome *b* in Fars province

Alireza Sahraeian Jahromi ¹

Jalil Imani Harsini^{2*}

jalil.imani@srbiau.ac.ir

Hamidreza Rezaei³

Admission Date: February 13, 2023

Date Received: September 13, 2022

Abstract

Background and Objective: In recent years, *Hystrix indica* as the biggest rodent in Iran has been in conflict with humans regarding the destruction of gardens and agricultural products, and the population of this species has been decreased due to illegal hunting and the use of pesticides and chemical poisons. Meanwhile there is not effective information which provide the possibility of developing a management and conservation plan for this species, so the aim of this study is to investigate the structure and genetic diversity of *Hystrix indica* in Fars province habitats.

Material and Methodology: 15 quill and tissue samples of this species were collected in the Fars province habitats. After DNA extraction, mitochondrial cytochrome *b* gene was amplified in 13 samples by polymerase chain reaction and 912 nucleotide pairs of this gene were sequenced and edited for each sample.

Findings: Based on the Maximum Likelihood Estimation of Phylogenetic Tree, all the studied samples are related to the same clade and belong to *Hystrix indica* species. Among the studied samples, only two different haplotypes were identified and the haplotype diversity was equal to 0.282 and the nucleotide diversity was estimated to be 0.00029.

Discussion and Conclusion: the results showed that haplotype diversity of *Hystrix indica* is low in Fars province, so it is suggested to avoid further environmental crises like disruption of its food chain, while conducting demographic studies in order to develop a conservation and management plan for this species.

Keywords: *Hystrix indica*, Phylogenetics, genetic diversity, cytochrome B, Fars province

1- M.Sc. graduate in Environmental Science, Faculty of Natural Resources and Environment, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2- Department of Environmental and Forest Science, Faculty of Natural Resources and Environment, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. *(Corresponding Author)

3- Department of Environmental Sciences, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

مقدمه

گونه نیز بشدت در معرض خطر انقراض قرار دارند و روند کاهشی سایر گونه ها نیز همچنان وجود دارد (15)

تشی بزرگترین جونده ایران است که وزنی بین ۱۱ تا ۲۵ کیلوگرم دارد. بدن تشی از بینی تا پایه دم بین ۷۰ تا ۹۰ سانتیمتر است که دمی به اندازه ۸ تا ۱۰ سانتیمتر به آن اضافه می شود (۱۵). تشی در سراسر جنوب شرقی و آسیای مرکزی و در بخش هایی از خاورمیانه از جمله کشورهای ایران، عربستان، سعودی، یمن، فلسطین، اردن، لبنان، ترکیه، پاکستان، سریلانکا، بنگلادش، بوتان، نپال، هند، افغانستان، ارمنستان، آذربایجان، چین، گرجستان و ترکمنستان یافت می شود (۱۵).

تشی به دلیل ویژگی های زیستی خاص، نظیر شب فعال بودن و تمایل به زندگی دور از انسان و گوشه گیر بودن، کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است، اما تشی با استفاده از گیاهان زراعی به عنوان منبع غذایی و تخریب باغ ها و زمین های کشاورزی موجب بروز تعارضاتی با انسان می شود. جنبه دیگری از تعارض این گونه را می توان مشکلات سلامت و پزشکی ناشی از بیماری های مشترک و صدمات ناشی از برخورد خارهای آن با انسان و حیوانات اهلی برشمرد (۱۶).

اگرچه مطالعات ژنتیکی و جمعیت شناسی این گونه بسیار محدود است، اما در زمینه ارزیابی مطلوبیت زیستگاهی (۱۵)، بررسی خسارات محصولات کشاورزی و نقش اقتصادی این این جانور بر کشاورزی و جنگلداری (۲۰-۱۷)، (۲۱)، مقایسه کارایی روش های کنترل خسارت این گونه (۱۶، ۲۲، ۲۳) و، بیماری های مشترک با انسان و حیوانات اهلی (۲۴) مطالعات مختلفی انجام شده

با وجود اینکه با توسعه فعالیت های انسانی نظیر جاده ها و مناطق مسکونی، زیستگاه های مناسب برای تشی ها کاهش یافته است و از سوی دیگر، استفاده از آفت کش ها، شکار مستقیم تشی برای استفاده از گوشت آن و سایر محصولات جانبی آن سبب کاهش جمعیت تشی در مناطق مختلف کشور شده است، اما با توجه به سازگاری تشی با محدوده وسیعی از زیستگاه ها و انواع غذاها و عدم وجود مطالعات کافی و جدید در زمینه

از دست رفتن زیستگاه ها، تغییر و تبدیل زیستگاه ها و بهره برداری بیش از حد و تغییر اقلیم عامل اصلی از بین رفتن تنوع زیستی هستند (۱). امروزه یکی از نگرانی های عمده جهان، کاهش تنوع زیستی باقی مانده است (۲). حفاظت از جمعیت های طبیعی اکوسیستم ها می تواند راهی مؤثر برای کاهش این نگرانی ها باشد (۳). دانش کافی در مورد گونه ها، تأثیر مستقیمی بر اقدامات حفاظتی دارد (۴). مدیریت و حفاظت از حیات وحش نیازمند داشتن تصویری جامع از تنوع ژنتیکی در ساختارهای گیاتشناسی است (۵) و تدوین و اجرای برنامه های مدیریتی فعلی و آینده نیازمند شناسایی تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت ها است (۶).

برای برنامه ریزی به منظور مدیریت واحدهای جمعیتی در یک منطقه و حفاظت آن ها باید ارتباطات هر جمعیت محلی با سایر جمعیت های منطقه را به دقت ارزیابی نمود (۷)؛ بنابراین ارزیابی تنوع ژنتیکی موجود در یک جمعیت از مهمترین اهداف در مطالعه ژنتیک جمعیت هاست و کاربرد مهمی در زیست شناسی حفاظت مانند شناخت روابط تاکسونومیک (۸)، حفظ ذخایر ژنتیکی (۹) و تعیین ذخایر و گونه های حاصل از برنامه های تکثیر در اسارت برای معرفی مجدد در آینده دارد (۱۰) (۱۱). شناسایی ساختار ژنتیک جمعیت های یک محدوده نیز بسیار با اهمیت است. زیرا آگاهی از ساختار ژنتیکی یک جمعیت در شناخت پتانسیل حفاظت جمعیت مذکور و ریسک در معرض انقراض قرار گرفتن گونه ها، امری مهم است (۱۲-14).

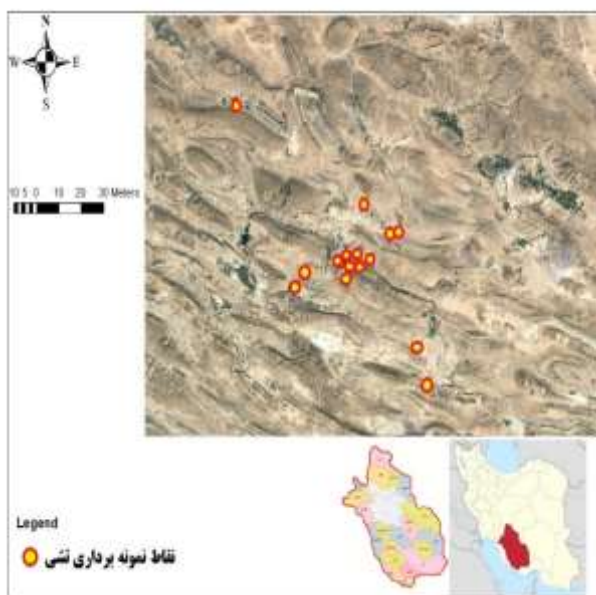
ایران به دلیل قرارگیری در فلات ایران و هم جوار با اقلیم های مختلف آسیای دارای پراکندگی جانوری منحصر به فردی است که در این میان راسته جوندگان به عنوان بزرگترین راسته پستانداران سهم مهمی در تنوع زیستی ایران دارد و هشت خانواده و بیش از هفتاد گونه از این راسته در ایران زیست می کنند. با وجود فراوانی و گسترش زیاد این گونه ها در جهان، در دو قرن اخیر ۴۵ گونه از اعضای این راسته منقرض شده و ۷۸

بهتری از وضعیت این گونه به عمل آورد تا اقدامات مدیریتی مناسب جهت حفاظت از این گونه ارزشمند امکان پذیر گردد.

روش بررسی

نمونه برداری: تعداد ۱۵ نمونه از تیغ‌های رها شده در طبیعت و بافت (از تشی های تلف شده بر اثر سوانح یا گوشت‌های مصادره شده از شکارچیان غیر مجاز) از نقاط مختلف استان فارس، جمع‌آوری و پس از قرارگیری در اتانول ۹۶٪ به آزمایشگاه انتقال یافت (شکل ۱).

فراوانی و جمعیت شناختی، این گونه در لیست کمترین نگرانی قرار گرفته است و برنامه مدیریتی مشخصی برای حفاظت از این گونه در سطح کشور وجود نداشته است؛ بر همین اساس، این مطالعه با هدف بررسی وضعیت ساختار و تنوع ژنتیکی تشی در استان فارس به‌عنوان یکی از زیستگاه‌های اصلی این گونه در ایران تدوین شد تا بتوان به شکل بهتر و دقیق‌تر با دستیابی به وضعیت ژنتیکی این گونه در زیستگاه‌های طبیعی آن، برآورد



شکل ۱- نقاط نمونه‌برداری از تشی در استان فارس

Figure 1. Locations of Sampling points of porcupine in Fars province



شکل ۲- نقشه پراکنش تشی در ایران (۲۵)

Figure 2. Indian crested porcupine distribution map in Iran (۲۵)

استخراج و توالی‌یابی DNA:

استخراج DNA از نمونه‌ها با استفاده از کیت‌های استخراج DNA بر اساس دستورالعمل استاندارد انجام شد. سپس کیفیت DNA هر یک از نمونه‌ها به کمک دستگاه نانودراپ بررسی شد. تکثیر ژن سیتوکروم بی با استفاده از آغازگرهای L14724 (۲۶) و H15748 (۲۷) و PCR Master Kit در دستگاه ترموسایکلر با دستورالعمل: واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، واسرشت سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغاز در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۶۰ ثانیه و مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، (۳۵ بار) و مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد. حجم واکنش برابر ۲۵ میکرولیتر و محتوای آن شامل ۱۳ میکرولیتر از مستر میکس، ۹ میکرولیتر آب مقطر، ۱

میکرولیتر DNA و ۱ میکرولیتر از هر آغازگر می باشد. به منظور تأیید تکثیر ناحیه مورد نظر طی واکنش‌های PCR الکتروفورز محصولات به‌دست‌آمده روی ژل آگارز ۲ درصد با رنگ‌آمیزی سیف استین صورت گرفت. از جمع نمونه‌ها ۱۳ نمونه دارای باند قوی و شفاف بودند. پس از اطمینان از تکثیر و عدم وجود آلودگی، مقدار ۲۰ میکرولیتر از محصولات PCR به منظور تعیین توالی به شرکت BGI چین ارسال شد. نمونه‌ها با استفاده از دستگاه ABI ۳۷۳۰ به روش خودکار توالی‌یابی شدند. برای بررسی فیلوژنتیکی نمونه‌های مورد مطالعه با دیگر گونه‌ها از خانواده تشی توالی‌های به‌دست‌آمده در این تحقیق ابتدا به‌وسیله نرم‌افزار Seqscape v2.7 ویرایش شد. سپس در نرم‌افزار Mega11 (۲۸) ردیف‌آرایی نمونه‌های مورد بررسی همراه با نمونه‌های دریافت شده از ژن بانک انجام شد (جدول ۱).

جدول ۱- فهرست توالی‌های ناحیه سیتوکروم بی میتوکندریایی استفاده شده در این تحقیق

Table 1. List of mitochondrial cytochrome b sequences used in this research

شماره نمونه	نام علمی گونه	نام فارسی گونه	کشور	موقعیت	منبع
H ۱	<i>Hystrix Indica</i>	تشی	ایران	استان فارس، جویم	مطالعه حاضر
H ۲	<i>Hystrix Indica</i>	تشی	ایران	استان فارس، علویه	مطالعه حاضر
H ۳	<i>Hystrix Indica</i>	تشی	ایران	استان فارس، بناارویه	مطالعه حاضر
H ۴	<i>Hystrix Indica</i>	تشی	ایران	استان فارس، چهارم	مطالعه حاضر
H ۵	<i>Hystrix Indica</i>	تشی	ایران	استان فارس، چهارم	مطالعه حاضر
H ۶	<i>Hystrix Indica</i>	تشی	ایران	استان فارس، چهارم	مطالعه حاضر
H ۷	<i>Hystrix Indica</i>	تشی	ایران	استان فارس، موسویه	مطالعه حاضر
H ۸	<i>Hystrix Indica</i>	تشی	ایران	استان فارس، چهارم	مطالعه حاضر
H ۹	<i>Hystrix Indica</i>	تشی	ایران	استان فارس، علویه	مطالعه حاضر
H ۱۰	<i>Hystrix Indica</i>	تشی	ایران	استان فارس، چهارم	مطالعه حاضر
H ۱۱	<i>Hystrix Indica</i>	تشی	ایران	استان فارس، چهارم	مطالعه حاضر
H ۱۲	<i>Hystrix Indica</i>	تشی	ایران	استان فارس، خفر	مطالعه حاضر
H ۱۳	<i>Hystrix Indica</i>	تشی	ایران	استان فارس، چهارم	مطالعه حاضر
MT152313.1	<i>Hystrix Indica</i>		(۲۹)		ژن بانک
FJ472579.1	<i>Hystrix Indica</i>		(۳۰)		ژن بانک
FJ472567.1	<i>Hystrix Cristata</i>		(۳۰)		ژن بانک
FJ472568.1	<i>Hystrix Cristata</i>		(۳۰)		ژن بانک
FJ472572.1	<i>Hystrix Cristata</i>		(۳۰)		ژن بانک

FJ472571.1	<i>Hystrix Cristata</i>	(۳۰)	ژن بانک
FJ472573.1	<i>Hystrix Cristata</i>	(۳۰)	ژن بانک
FJ472575.1	<i>Hystrix Cristata</i>	(۳۰)	ژن بانک
FJ472574.1	<i>Hystrix Cristata</i>	(۳۰)	ژن بانک
FJ472569.1	<i>Hystrix Cristata</i>	(۳۰)	ژن بانک
FJ472566.1	<i>Hystrix Cristata</i>	(۳۰)	ژن بانک
FJ472565.1	<i>Hystrix Cristata</i>	(۳۰)	ژن بانک
FJ472570.1	<i>Hystrix Cristata</i>	(۳۰)	ژن بانک
X70674.1	<i>H.Africaeaaustralis</i>	(۳۱)	ژن بانک
NC050263.1	<i>Hystrix Brachyura</i>	(۳۲)	ژن بانک
MT024305.1	<i>Atherurus Macrourus</i>	(۳۳)	ژن بانک
FJ931121.1	<i>Atherurus Macrourus</i>	(۳۴)	ژن بانک
KC463889.1	<i>Erethizon</i>	(۳۵)	ژن بانک
KT321364.1	<i>Fukomys Damarensis</i>	(۳۶)	ژن بانک

یافته‌ها

نتایج نشان داد همه نمونه‌ها شبیه به هم بوده و همه توالی‌های تشی در یک شاخه قرار گرفته‌اند و تنوع ژنتیکی پایینی در گونه‌ها مشاهده شد. بر اساس مقادیر به‌دست‌آمده از هر سه مدل بیشترین فاصله ژنتیکی بین تشی شماره ۲ و ۷ با مقدار ۰/۰۰۱۰۳ با سایر نمونه‌ها بود؛ ولی سایر نمونه‌ها هیچ فاصله ژنتیکی نداشتند.

در مطالعات هاپلوتایپی مشخص شد تنوع هاپلوتایپی ۰/۲۸۲ و تنوع نوکلئوتیدی ۰/۰۰۰۲۹ می‌باشد. مثبت شدن عدد F_s نشان داد گسترش گونه در گذشته بسیار پایین بوده است. مقدار تاجیما با مقدار منفی گسترش جمعیت و ناهمگونی نرخ جهش به صورت ناگهانی را نشان داد که ثابت شد مقدار F_o از تاجیما در بحث گسترش، از قدرت بیشتری برخوردار است. با توجه به نتایج تخمین الگوی جانیشینی نوکلئوتیدها چهار گونه نرخ جانیشینی اول و باقی اعداد نرخ جانیشینی دوم هستند.

فاصله تکاملی بین گونه‌ها بر اساس مدل p -distance در جدول ۲، فاصله تکاملی بین افراد مورد مطالعه بر اساس مدل p -distance در جدول ۳ و فاصله تکاملی بین افراد مورد مطالعه و نمونه به‌دست‌آمده از ژن بانک بر اساس مدل p -distance در جدول ۴ مشخص شده است.

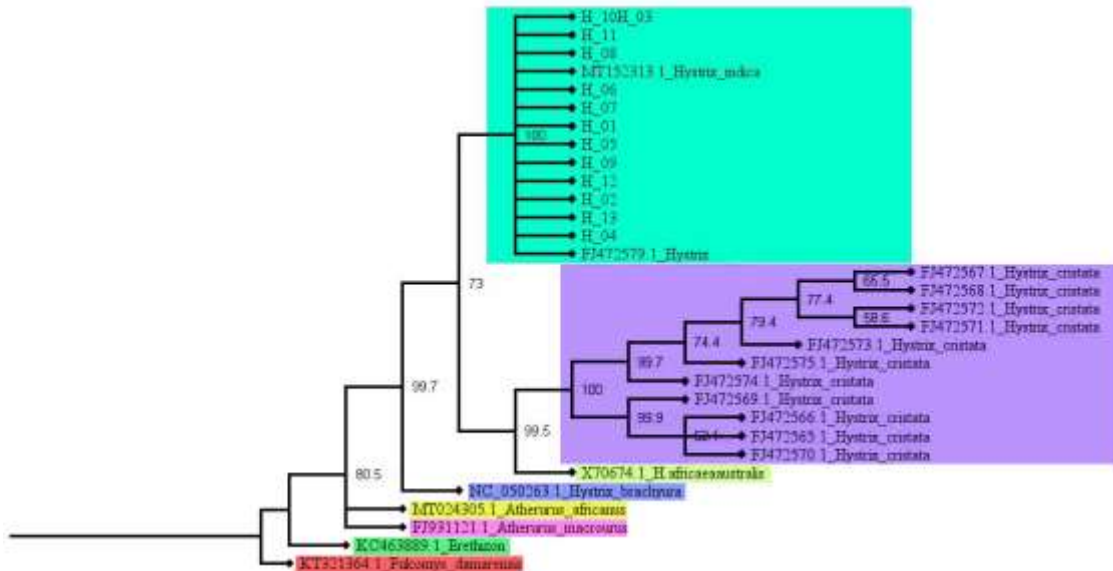
برای تعیین فاصله ژنتیکی بین نمونه‌ها، فراوانی بازهای آلی مختلف و تعیین میزان جانیشینی‌های نوع اول و دوم توسط نرم‌افزار MEGA11 و با ۱۰۰۰۰ تکرار انجام گردید (۳۷). تعداد هاپلوتایپ‌ها، جایگاه‌های چندشکلی با استفاده از نرم‌افزار DNAsp 5.2 (38) برآورد شد.

پس از اضافه‌کردن سایر نمونه‌های استخراج شده از ژن بانک، برای تعیین بهترین مدل جانیشینی نوکلئوتیدی از نرم‌افزار JModelTest 2.1.5 و دو آماره BIC و AIC استفاده شد و درخت تبارشناسی با روش بیشینه احتمال با ۱۰۰۰ بوت‌استرپ در نرم‌افزار Mega11 بر اساس مدل تکاملی HKY+I که بر اساس نتایج نرم‌افزار jmodeltest به‌عنوان بهترین مدل تکاملی انتخاب شده بود ترسیم شد.

برای مقایسه فواصل ژنتیکی نمونه‌ها در جمعیت مورد مطالعه تشی با نمونه‌های استخراج شده از ژن بانک از ماتریس فاصله ژنتیکی در نرم‌افزار Mega11 استفاده شد. با استفاده از نرم‌افزار مذکور فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های تشی مشخص شد. ارتباط بین هاپلوتایپ‌ها و ترسیم شبکه هاپلوتایپی از نرم‌افزار PopART 1.7 و منطق اتصال میانه بررسی شد. ژن سیتوکروم بی میتوکندریایی در نمونه‌ها توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، تکثیر و ۹۱۲ جفت نوکلئوتید از این ژن برای هر نمونه توالی‌یابی و ویرایش شد.

نمونه‌ها بود؛ اما سایر تشی‌ها هیچ فاصله ژنتیکی نداشتند.

بر اساس مقادیر به‌دست‌آمده از هر سه مدل بیشترین فاصله ژنتیکی بین تشی شماره ۲ و ۷ با مقدار ۰/۰۰۱۰۳ با سایر



شکل ۳- درخت تبارشناسی تشی ناحیه سیتوکروم بی میتوکندریایی به روش ML با ۱۰۰۰ بوت‌استرپ در نرم‌افزار (نمونه KT321364 به‌عنوان outgroup انتخاب شد (39))

Figure 3. The ML phylogenetic tree of porcupine based on the cytochrome b gene with the bootstrap value of 1000 replicates (ML/NJ) (sample KT321364 was selected as outgroup(39))

جمعیت نمونه‌های مورد بررسی دارای دو هاپلوتایپ است (جدول ۵). همچنین جایگاه هاپلوتایپ‌ها در جدول ۶ نشان‌داده شده است.

در درخت فیلوژنتیک به روش ML همه نمونه‌ها شبیه به هم بوده و همه توالی‌های مورد بررسی در یک شاخه قرار گرفته‌اند و تنوع ژنتیکی پایینی در نمونه‌ها مشاهده شد. نتایج حاصل از آنالیز داده‌های تشی در نرم‌افزار Dna SP نشان داد که

جدول ۵- لیست هاپلوتایپ‌های به‌دست‌آمده از جمعیت مورد مطالعه تشی

Table 5. list of haplotypes that were identified in the porcupine population studied

شماره هاپلوتایپ	موقعیت	شماره نمونه
۱	استان فارس، جویم	H ۱
۲	استان فارس، علویه	H ۲
۱	استان فارس، بنارویه	H ۳
۱	استان فارس، جهرم	H ۴
۱	استان فارس، جهرم	H ۵
۱	استان فارس، جهرم	H ۶
۲	استان فارس، موسویه	H ۷
۱	استان فارس، جهرم	H ۸

۱	استان فارس، علویه	H ۹
۱	استان فارس، جهرم	H ۱۰
۱	استان فارس، جهرم	H ۱۱
۱	استان فارس، خفر	H ۱۲
۱	استان فارس، جهرم	H ۱۳

جدول ۶- جایگاه هاپلوتایپ‌های تشی در نرم‌افزار Dna SP

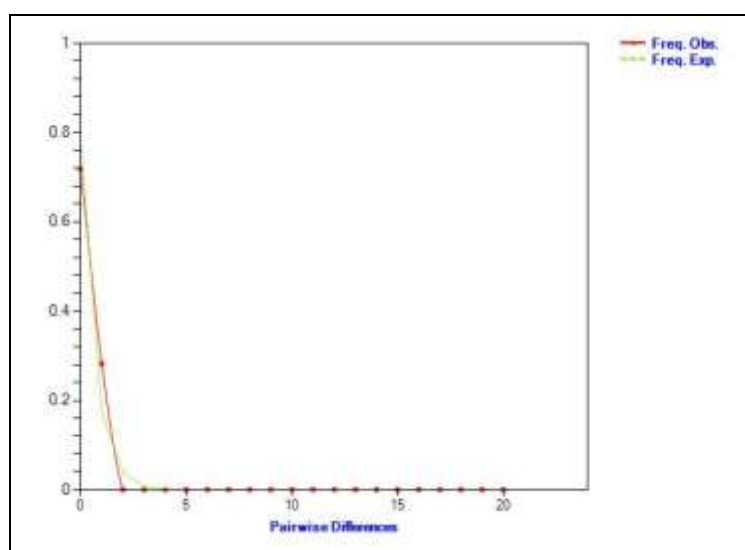
Table 6. The position of porcupine haplotypes in Dna SP software

جایگاه	۸۱۰
هاپلوتایپ ۱	G
هاپلوتایپ ۲	A

مقادیر پارامترهای تنوع مولکولی از قبیل تنوع‌های هاپلوتایپی، F_S و D تاجیما توسط نرم‌افزار Dna SP محاسبه شده است واریانس تنوع هاپلوتایپی و تنوع نوکلئوتیدی و همچنین مقادیر که در جدول ۷ قابل مشاهده است.

جدول ۷- مقادیر محاسبه شده برخی از پارامترهای تنوع مولکولی و شاخص تاجیما و F_u در نرم‌افزار Dna SPTable 7. The molecular diversity parameters and Tajima and F_u index were calculated using Dna SP software.

۰/۲۸۲	تنوع هاپلوتایپی
۰/۰۲۰۰۷	واریانس تنوع هاپلوتایپی
۰/۰۰۰۲۹	تنوع نوکلئوتیدی
-۰/۲۷۴۲۹ not significant, $P > 0.10$	D تاجیما
۰,۲۴۰ not significant, $P > 0.10$	F_S و F_u

شکل ۴- توزیع تحلیل Mismatch برای *Hystrix indica* در استان فارس با استفاده از نشانگر میتوکندریایی سیتوکروم بیFigure 4. Demographic history of *Hystrix indica* represented by mismatch distribution analyses

فواز تاجیما در بحث گسترش از قدرت بیشتری برخوردار است. پس از تعیین تعداد هاپلوتایپها در نرم‌افزار dna sp، تخمین الگوی جانیشینی نوکلئوتیدها با استفاده از رویه MCL در نرم‌افزار Mega11 محاسبه شد که در جدول ۸ ذکر شده است.

لازم به ذکر است برای تاریخ جمعیتی یک گونه از شاخص‌های فو و لی و تاجیما استفاده می‌شود. به طور مثال فو در جدول ۴- ۷ مثبت شده است که گسترش گونه در گذشته را بسیار پایین توصیف می‌کند. مقدار تاجیما با مقدار منفی گسترش جمعیت و ناهمگونی نرخ جهش به صورت ناگهانی را توصیف می‌کند. مقدار

جدول ۸- تخمین الگوی جانیشینی نوکلئوتیدها با استفاده از رویه MCL در نرم‌افزار مگا

Table 8. Estimation of nucleotide substitution pattern using MCL procedure in Mega software

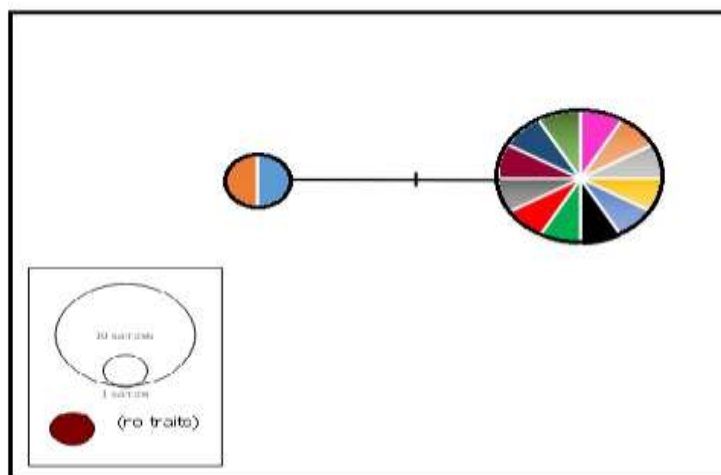
From\To	A	T	C	G
A	-	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۱۲/۳۶۱۴
T	۰/۰۰۰۱	-	۲۷/۷۷۷۶	۰/۰۰۰۰
C	۰/۰۰۰۱	۲۹/۹۳۸۱	-	۰/۰۰۰۰
G	۲۹/۹۳۲۳	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	-

در جدول فوق اعداد پررنگ شده نشان دهنده نرخ جانیشینی اول و باقی اعداد نرخ جانیشینی دوم هستند.

بر اساس قطعات جفت بازی ناحیه سیتوکروم بی میتوکندریایی شبکه‌های هاپلوتایپی به روش اتصال میانه با استفاده از نرم‌افزار

PopART 1.7 رسم گردید. شبکه هاپلوتایپی ارتباطات تکاملی بین هاپلوتایپها را به صورت گرافیکی نشان می‌دهد.

بر اساس قطعات جفت بازی ناحیه سیتوکروم بی میتوکندریایی شبکه‌های هاپلوتایپی به روش اتصال میانه با استفاده از نرم‌افزار



شکل ۵- شبکه هاپلوتایپی - اتصال میانه ناحیه سیتوکروم بی میتوکندریایی (هر رنگ معرف یک فرد است). در این شکل تعداد جهش‌های نقطه‌ای مابین هاپلوتایپ‌های تشی بر روی خط نوشته شده است. هر رنگ معرف یک فرد است. اندازه دایره‌ها با فراوانی هاپلوتایپ در ارتباط است.

Figure 5. The median-joining network constructed from the haplotypes of the mitochondrial cytochrome b DNA sequences. Different colors represent the different samples. The size of the circle in the network is proportional to the haplotype frequency observed in populations.

بحث و نتیجه‌گیری

جلوگیری گردد چرا که حذف یک گونه از طبیعت، تمامی گونه‌ها را با مشکل جدی مواجه می‌کند.

عدم اطلاع کافی از شاخص‌های اثرگذار بر مطلوبیت زیستگاهی، لکه‌های جمعیتی و چگونگی کمیت و کیفیت روابط بوم‌شناختی این گونه، سبب می‌شود تا مسئولان حفاظت از تنوع زیستی و زیستگاه‌ها در برنامه‌ریزی دقیق و جامع و تعیین اولویت جهت اقدامات حفاظتی و مدیریتی این گونه با ابهامات بسیاری روبه‌رو شوند. با استفاده از نتایج این پژوهش و انجام پژوهش‌های مشابه آتی، می‌توان با فراهم آوردن امکان شناسایی هرچه بهتر لکه‌های زیستگاهی و پارامترهای محیطی اثرگذار بر توزیع این گونه گامی مؤثر برای تدوین و اجرای برنامه‌های حفاظتی و مدیریتی این گونه بزرگ در ایران برداشت.

بر اساس نتایج در بین نمونه‌های توالی‌یابی شده دو هاپلوتایپ متفاوت شناسایی و تنوع هاپلوتایپی برابر با ۰/۲۸۲ و تنوع نوکلئوتیدی ۰/۰۰۰۲۹ برآورد شد. نتایج درخت تبارشناسی با روش ماکسیمم لایکلیهود نشان داد که تمامی گونه‌ها مربوط به یک شاخه و از گونه *Hystrix indica* هستند. این مطالعه به‌عنوان نقطه آغاز مطالعات ژنتیکی بر روی تشی در ایران است که می‌تواند راهگشای دیگر مطالعات بر روی این گونه در کشور باشد. متأسفانه تا به امروز گزارش واحدی در مورد وضعیت جمعیت یا ارزیابی تهدیدات این گونه وجود ندارد. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که *Hystrix indica* به طور مستقیم یا غیرمستقیم دامنه منابع موجود برای گونه‌های دیگر را با ایجاد تغییرات فیزیکی در مواد زنده یا غیرزنده محدود می‌کند. از این رو، ما توصیه می‌کنیم که مطالعات بیشتری برای تعیین وضعیت جمعیت، پراکنش، تهدیدها و اکولوژی این گونه انجام شود تا به‌زودی اقدامات مؤثر حفاظتی اجرا شود. از جمله تهدیدهایی که این گونه را در معرض خطر قرار می‌دهد شکار بی‌رویه است.

نتایج این پژوهش بسیار نگران‌کننده بوده و نشان‌دهنده بحرانی بودن وضعیت تنوع ژنتیکی تشی در استان فارس است؛ لذا پیشنهاد می‌شود با اقدامات مدیریتی و حفاظتی برای این گونه از بحران‌های بیشتر محیط زیستی مرتبط با آن نظیر اختلال در زنجیره غذایی و برهم‌خوردن نظم اکوسیستم‌ها

References

1. Lande R. Extinction Risks from Anthropogenic, Ecological. Genetics and the extinction of species: DNA and the conservation of biodiversity. 1999:1.
2. Fleishman E, Noss RF, Noon BR. Utility and limitations of species richness metrics for conservation planning. Ecological indicators. 2006; 6 (3):543-53.
3. Brooks T. Rose-tinted ecology. Public Library of Science San Francisco, USA; 2003.
4. Hackländer K, Ferrand N, Alves PC. Overview of lagomorph research: what we have learned and what we still need to do. Lagomorph Biology: Springer; 2008. p. 381-91.
5. Davison J, Ho SY, Bray SC, Korsten M, Tammeleht E, Hindrikson M, et al. Late-Quaternary biogeographic scenarios for the brown bear (*Ursus arctos*), a wild mammal model species. Quaternary Science Reviews. 2011; 30(3-4):418-30.
6. Jafari HNZ, Hamid; Bolandi, Ahmad Reza; Darzi Ramandi, Hadi. Investigating the genetic diversity and phylogenetic relationships of some species of the saffron genus in Iran using the RAPD marker. Biotechnology of Medicinal Plants. 2014;1(No 1), 55-63 (In Persian)
7. Tobe S, Linacre A. Species identification of human and deer from mixed biological material. Forensic science international. 2007;169(2-3):278-9.
8. Avise JC. A role for molecular genetics in the recognition and

17. Fattahi M. . The effect of ash on the forests of Zagros (Case study in the cradle of Islamabad West). Journal of Research and Construction. 1994;24 (In Persian)
18. Chaudbry M, Ahmad A. Trial of poisonous gases and baits against porcupines. Pakistan journal of forestry. 1975.
19. Chaudhry G. Wildlife an Economic Zoologist's view point. Pak J For. 1970; 20: 369-72.
20. Khan A, Ahmad S, Hussain I, Munir S. Deterioration impact of Indian crested porcupine, *Hystrix indica*, on forestry and agricultural systems in Pakistan. International Biodeterioration & Biodegradation. 2000;45(3-4):143-9.
21. Khan H, Arif I, Al Farhan A, Al Homaidan A. Phylogenetic analysis of oryx species using partial sequences of mitochondrial rRNA genes. Genetics and Molecular Research. 2008;7(4):1150-5.
22. Moshtagh M. Evaluation of bait fresh food to manage *Hystrix indica*. Pakistan Journal of Zool, 40: p 179. 2008.
23. Pervez A. Developmental biology, feeding patterns and management strategy against Indian crested porcupine (*Hystrix indica*) in Sindh and Balochistan provinces. 3rd Annual Progress Rep(2005-2006), ALP Project VPCI/SARC/PARC, Karachi. 2006:56.
24. Rasi Y, Jalali M, Javadian E, Motazedian M. Confirmation of *Meriones libycus* (Rodentia; Gerbillidae) as the Main Reservoir Host of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis in Arsanjan, Fars conservation of endangered species. Trends in Ecology & Evolution. 1989; 4(9): 279-81.
9. Movaghar S. Iranocypris typhlops Kaiser the blind cave fish from Iran. Journal of the Veterinary Faculty of the University of Tehran. 1973; 29:43-50.
10. Vogler AP, Desalle R. Diagnosing units of conservation management. Conservation Biology. 1994; 8(2):354-63.
11. Freeland JR. Molecular ecology: John Wiley & Sons; 2020.
12. Hilborn R, Quinn TP, Schindler DE, Rogers DE. Biocomplexity and fisheries sustainability. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2003;100(11):6564-8.
13. Hughes JB, Daily GC, Ehrlich PR. Population diversity: its extent and extinction. Science. 1997; 278(5338):689-92.
14. Luck GW, Daily GC, Ehrlich PR. Population diversity and ecosystem services. Trends in Ecology & Evolution. 2003;18(7):331-6.
15. Memarzadeh Kiani A, Imani Harsini J, Karami M. Modeling the habitat desirability of *Hystrix indica* in Khajir National Park using the entropy treatment method (MaxEnt). Animal Environment Quarterly. 2021;13 (4):9-18. (In Persian)
16. Namvar P, Derini A. Controlling the damage of the rodent (Rodentia: Hystricidae) *Hystrix indica* Kerr in the fields of natural resources in the south of Kerman province. national conference on sustainable agriculture and natural resources, Tehran. 2012. (In Persian)

- Mitochondrial DNA Part B. 2020;5(2):1945-6.
33. Gombeer S, Nebesse C, Musaba P, Ngoy S, Peeters M, Vanderheyden A, et al. Exploring the bushmeat market in Brussels, Belgium: a clandestine luxury business. *Biodiversity and Conservation*. 2021; 30(1):55-66.
34. Vilela RdV. *Roedores e biomas neotropicais: estudos evolutivos e comparativos*: Universidade de São Paulo; 2011.
35. Voss RS, Hubbard C, Jansa SA. Phylogenetic relationships of New World porcupines (Rodentia, Erethizontidae): implications for taxonomy, morphological evolution, and biogeography. *American Museum Novitates*. 2013; 2013(3769):1-36.
36. Shi H, Ren M, Zhang S, Mao X. A complete mitochondrial genome of the Damaraland mole rat *Fukomys damarensis* retrieved from the published genome of the brandt's bat *Myotis brandtii*. *Mitochondrial DNA Part A*. 2016;27(6): 4282-3.
37. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular biology and evolution*. 2007;24(8):1596-9.
38. Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 2009; 25(11):1451-2.
39. Sheng G, Hu J, Tong H, Llamas B, Yuan J, Hou X, et al. Ancient DNA of northern China Hystricidae sub-fossils reveals the evolutionary history of old world porcupines in the Late Pleistocene. *BMC evolutionary biology*. 2020; 20(1):1-8.
- Province, South of Iran (1999-2000). 2001.
25. Karami M, Qadirian T, Faizullahi K. *Mammal Atlas of Iran*. jahad daneshgahi Publications, Khwarazmi branch. 2015. (In Persian)
26. Hsieh H-M, Chiang H-L, Tsai L-C, Lai S-Y, Huang N-E, Linacre A, et al. Cytochrome b gene for species identification of the conservation animals. *Forensic science international*. 2001;122(1):7-18.
27. Lopez-Oceja A, Gamarra D, Borrigan S, Jiménez-Moreno S, De Pancorbo M. New cyt b gene universal primer set for forensic analysis. *Forensic Science International: Genetics*. 2016;23:159-65.
28. Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics*. 2001;17(12):1244-5.
29. İbiş O. Partial mitogenome sequence of the Indian crested porcupine (*Hystrix indica*) in Turkey, with the phylogeny of the subgenus *Hystrix*. *Biology Bulletin*. 2020;47(4):399-406.
30. Trucchi E, Gentile G, Sbordoni V. Development of primers to amplify mitochondrial DNA control region of Old World porcupines (subgenus *Hystrix*). *Molecular ecology resources*. 2008;8(5):1139-41.
31. Din-Pow M, Zharkikh A, Graur D, VandeBerg JL, Lie W-H. Structure and evolution of opossum, guinea pig, and porcupine cytochrome b genes. *Journal of Molecular Evolution*. 1993;36(4):327-34.
32. Tu F, Huang X, Zhang Y, Feng Y. Complete mitochondrial genome of captive Chinese porcupine *Hystrix hodgsoni* (Rodentia: Hystricidae).