Genetic Diversity of the Iranian Stripped Hyaena (*Hyaena hyaena* Linnaeus, 1753), using Mitochondrial ND2 Gene in Iran

Leili Heidari [1*], Shahram Kaboodvandpour [2], Hanyeh Ghaffari [3], Mohammad Ali Adibi [4], Edris Ghaderi [5]

[1] M. S. Graduate of Environmental Sciences, Faculty of Natural Resources, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

[2] Assistant Professor, Department of Environmental Sciences, Faculty of Natural Resources, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

[3] Assistant Professor, Department of Environmental Sciences, Faculty of Natural Resources, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

[4] Ph. D. Student of Environmental and Energy, Islamic Azad University, Research and Sciences, Tehran Branch, Iran

[5] M. S. Fisheries Department, Natural Resources, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

Abstract

Striped hyena is the only member of *Hyaena* genus from Hyaenidae family which lives in Iran. In overall, our information about this species is little nationally and internationally. Therefore, basic information would be required to perform the informed protection action plan toward such valuable species. In the present study, we evaluated the gene diversity within the hyena populations in Iran by reproducing a 404 base pairs from mitochondrial gene ND2. DNA was extracted from 30 muscle tissue samples of the Iranian stripped hyena collected form road killed specimens in 12 different provinces. To determine the taxonomic status of the studied species, Mega 6 and Mr. Bayes 3.2 software were used to draw phylogenetic trees (i.e. Neighbor Joining, Minimum Evaluation and Maximum Likelihood models). The obtained results revealed that there are only 0.74 percent genetic distances between specimens and there is no significant gene diversity amongst the Iranian stripped hyena populations. In addition, the obtained posterior probability of over 90 percent for all specimens suggests that all studied specimens belong to the same species. Although, observed low genetic diversity in Iranian stripped hyena could be interpreted due to the lower sensitivity of this species against environmental stresses. But, according to the fact that gene differential relatively could reduce by using short base sequence, using other mitochondrial genes as well as longer base sequences are suggested to obtain a more clear picture from the Iranian striped hyena genetic status.

Keywords: Taxonomic Status, Stripped Hyena, Mitochondrial DNA, ND2.

* s.kaboodvandpour@uok.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 ششم، پاییز ۱۳۹۷، صفحه ۷۱- ۸۲
دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۱۱/۱۴ پذیرش نهایی: ۱۳۹۸/۰۴/۲۲

بررسی تنوع ژنتیکی گونهٔ کفتار راه‌راه ایرانی (*Hyaena hyaena* Linnaeus, 1753) با استفاده از ژن میتوکندریایی *ND2* در ایران

لیلی حیدری [۱]، شهرام کبودوندپور [۲*]، هانیه غفاری [۳]، محمد علی ادیبی [۴]، ادریس قادری [۵]

[۱] دانش آموخته کارشناسی ارشد رشته محیط زیست، گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران
[۲] استادیار گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران
[۳] استادیار گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران
[۴] دانشجوی دکتری دانشکده محیط‌زیست و انرژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[۵] کارشناس ارشد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

چکیده

گونهٔ کفتار راه‌راه (*H. hyeana*) تنها عضو جنس *Hyeana* از خانوادهٔ کفتارها (Hyaenidae) است که در ایران زندگی می‌کند. باتوجه‌به اینکه اطلاعات ما دربارهٔ سیستماتیک این گونه در مقیاس‌های ملی و بین‌المللی محدود است، اجرای هر گونه برنامهٔ حفاظتی برای حمایت از این گونه به اطلاعات پایه نیاز دارد. در مطالعهٔ حاضر با استفاده از یک قطعهٔ ۴۰۴ جفت بازی از ژن میتوکندریایی *ND2*، تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های این گونه در ایران بررسی شد. به این منظور، ۳۰ نمونه بافت عضلهٔ کفتارهای تلف‌شده بر اثر تصادف جاده‌ای از ۱۲ استان کشور گردآوری شدند. به‌منظور تعیین جایگاه تاکسونومیکی گونهٔ مطالعه‌شده، درختان تبارشناسی با استفاده از بهترین مدل‌های تکاملی و شیوه‌های استنتاج بایزین، بیشینه درست‌نمایی، نزدیک‌ترین همسایه و تکامل کمینه رسم شدند. نتایج، فاصلهٔ ژنتیکی ۰/۷۴ درصد و تنوع ژنتیکی ناچیزی را در ژن بررسی‌شده بین جمعیت‌های گونهٔ مطالعه‌شده نشان دادند؛ همچنین احتمال پسین بیش از ۹۰ درصد به‌دست‌آمده برای همهٔ نمونه‌ها بیان‌کنندهٔ این حقیقت بود که همهٔ نمونه‌های مطالعه‌شده به یک گونه تعلق دارند. اگرچه نتایج مطالعهٔ حاضر را می‌توان این‌گونه تفسیر کرد که تنوع ژنتیکی کم مشاهده‌شده مؤید حساسیت کم این گونه به تنش‌های محیطی است، باتوجه‌به این حقیقت که احتمال وجود تفاوت ژنتیکی در بازهٔ توالی کوتاه کاهش می‌یابد؛ پیشنهاد می‌شود در مطالعه‌های تکمیلی از طول توالی بلندتر و تعداد ژن بیشتر برای بررسی دقیق‌تر و دستیابی به تصویر کامل‌تر ازتنوع ژنتیکی گونهٔ کفتار راه‌راه ایرانی استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: جایگاه تاکسونومیکی، کفتار راه‌راه، DNA میتوکندریایی، ND2.

* s.kaboodvandpour@uok.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.

مقدمه

طبق گزارش اتحادیهٔ بین‌المللی حفاظت از طبیعت، حفاظت از تنوع ژنتیکی به سه علت اهمیت دارد: اول، جمعیت‌ها برای مقاومت و تحمل در برابر تغییرات محیطی به تنوع ژنتیکی نیاز دارند؛ دوم، کاهش تنوع ژنتیکی سبب بروز پدیدهٔ درون‌آمیزی و درنتیجه، کاهش توان تجدید نسل و میزان بقای گونه‌ها می‌شود؛ سوم، تنوع زیستی تضمین‌کنندهٔ تنوع و پایداری اکوسیستم است (McNeely *et al*., 1990). امروزه، تمام سطوح تنوع زیستی (ژن، گونه و اکوسیستم) با انواع نوینی از تهدید روبه‌رو هستند که مهم‌ترین آنها عبارتند از: تکه‌تکه‌شدن و نابودی زیستگاه‌ها، انتشار گونه‌های بیگانهٔ مهاجم، شکار بی‌رویه و قاچاق، آلودگی‌های محیط‌زیست و استفادهٔ بی‌رویه از منابع‌طبیعی. بسیاری از پژوهشگران معتقدند ما در آستانهٔ موج ششم انقراض‌های جمعی قرار داریم (Frankham *et al*., 2002; Barnosky *et al*., 2011; Ceballos and Ehrlich, 2018)؛ ازاین‌رو، امروزه شناخت تنوع زیستی و حفاظت از آن بیش از هر زمان دیگری اهمیت دارد و در این میان، گوشت‌خوران بزرگ‌جثه اهمیت بیشتری دارند؛ زیرا به‌علت قرارگرفتن در افق‌های غذایی انتهایی در زنجیره‌های غذایی طبیعی، بیشتر از سایر زیست‌مندان در معرض خطر قرار دارند (Garner *et al*., 2005).

فراخانوادهٔ گربه‌شکلان (Feliformia) به راستهٔ گوشت‌خواران (Carnivora) تعلق دارد (Agnarsson *et al*., 2010). این فراخانواده از ۶ خانواده و ۸ زیرخانواده تشکیل شده است که در این میان، خانواده‌های Nandinidae، Herpestidae و Hyaenidae بدون زیرخانواده‌اند (Zhou *et al*., 2017). خانوادهٔ کفتارها (Hyaenidae) متعلق به فراخانوادهٔ گربه‌شکلان و از کوچک‌ترین خانواده‌های راستهٔ گوشت‌خواران با چهار گونه شامل گونه‌های گرگ خاکی (*Proteles cristata*)، کفتار خال‌دار (*Crocuta crocuta*) کفتار قهوه‌ای (*Parahyanea brunnea*) و کفتار راه‌راه (*Hyanea hyaena*) است (Wozencraft, 1993). تنها یک جنس (*Hyaena*) از خانوادهٔ کفتارها در خاستگاه جانوری پالئارکتیک یافت می‌شود؛ این جنس دو گونه دارد که گونهٔ *H. brunnea* محدود به جنوب آفریقا و تنها گونهٔ *H. hyaena* در پالئارکتیک پراکنده است (Majnoonian *et al*., 2005).

گونهٔ کفتار راه‌راه (*Hyaena hyaena* Linnaeus, 1758) با جثه‌ای متوسط و ظاهری شبیه به سگ، دست‌هایی بلندتر از پاها دارد و خطوط عمودی سیاهی روی بدن خاکستری آن دیده می‌شود (Mills and Hofer, 1998; Wilson and Reeder, 2005). دست و پای این حیوان چهار انگشت دارد و این حیوان در علفزارها، بیشه‌زارهای باز و مناطق انبوه و معمولاً در زمین‌های سخت، سرزمین‌های کوهستانی تا ارتفاع ۲۱۰۰ متر بالاتر از سطح دریا دیده می‌شود (Wilson and Reeder, 2005; Karami *et al*., 2016). این گونه از بیشتر مناطق ایران به‌جز مناطق جنگلی هیرکانی تا آذربایجان غربی گزارش شده است (Ziaie, 2011; Karami *et al*., 2016). به استناد فهرست سرخ اتحادیهٔ بین‌المللی حفاظت از طبیعت (IUCN, 2018)، کفتار راه‌راه گونه‌ای نزدیک به تهدید (Near Threatened) در مقیاس جهانی است و در بسیاری از نقاط جهان، در مقیاس محلی نیز با خطر انقراض مواجه است. درکل، اطلاعات دربارهٔ گونه‌های مختلف کفتار ازجمله گونهٔ

کفتار راه‌راه در مقیاس ملی و بین‌المللی محدود است و به‌همین‌علت، در فهرست گونه‌های دارای اولویت حفاظت اتحادیهٔ جهانی حفاظت از طبیعت قرار دارد (Watts and Holekamp, 2007)؛ ازاین‌رو، در مطالعهٔ حاضر سعی شده است با بررسی تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌های مختلف گونهٔ کفتار راه‌راه ایرانی، گوشه‌ای از زوایای تاریک زیست‌شناسی این گونه در ایران روشن شود تا پژوهشگران و متولیان امر حفاظت از گونه‌های حیات وحش در کشور بتوانند از این اطلاعات استفاده کنند.

بر اساس مطالعه‌های دیرینه‌شناسی ژنتیکی، گونه‌های متعلق به خانوادهٔ کفتارها در اواخر دورهٔ اولیگوسن، حدود ۲۵ میلیون سال پیش، از تبارگونه‌های متعلق به فراخانوادهٔ گربه‌شکلان اشتقاق یافته‌اند (Agustí and Antón, 2002; Turner and Antón, 2004). خانوادهٔ کفتارها در اواخر دورهٔ میوسن با ۲۰ تا ۳۰ گونه به حداکثر واگرایی خود رسیده و پس‌از این دوره، تنوع آن به‌تدریج کاهش یافته است و درنهایت، ۴ گونهٔ فعلی باقی مانده‌اند (Agustí and Antón, 2002). بر اساس منابع موجود، سه موج مهاجرت برای کفتارها از آفریقا به آسیا اتفاق افتاده است که این مهاجرت برای کفتار راه‌راه ۰/۱ میلیون سال پیش محاسبه شده و به‌سبب آن، گسترش چشمگیر پهنهٔ پراکنش گونهٔ کفتار راه‌راه اتفاق افتاده است (Rohland *et al*., 2005). اگرچه در حال حاضر، این گونه در بیشتر نقاط قاره‌های آفریقا و آسیا پراکنش دارد، اطلاعات پایه دربارهٔ سیستماتیک و ژنتیک آن محدود است.

امروزه، مطالعه‌های ژنتیکی به‌منظور حفاظت از حیات وحش و تدوین برنامه‌های مدیریتی و حفاظتی مدنظر قرار گرفته‌اند. داده‌های مولکولی می‌توانند دورنمایی از روند تکاملی موجودات کنونی نشان دهند (Kaas *et al*., 2010). داده‌های ژنتیکی و مولکولی با تعیین ژنوتیپ یا توالی هاپلوتایپی (Mohammadi *et al*., 2009) به‌منظور شناخت روابط آرایه‌شناسی و مطالعهٔ تغییرات ژن‌ها و گونه‌ها در طول زمان و درنهایت، حفظ تنوع زیستی کاربرد بسیاری دارند (Avise, 1989). در حال حاضر، DNA میتوکندریایی در ترسیم روابط تبارشناختی و بررسی روابط تکاملی گونه‌ها در کنار بهره‌گیری از اطلاعات بانک ژن به‌فراوانی برای تشخیص گونه‌ها استفاده می‌شود (Hiendleder, 1998; Beaumont and Hoare, 2003).

روابط تبارشناسی‌ای که Werdelin و Solounias (۱۹۹۱) از چهار گونهٔ خانوادهٔ کفتارها به دست آورده‌اند، رابطهٔ نزدیک گونه‌های کفتار راه‌راه و کفتار قهوه‌ای با یکدیگر و رابطهٔ نزدیک‌تر این دو گونه با کفتار خال‌دار نسبت به گرگ خاکی را که Walker (۱۹۶۴) در نخستین ویرایش کتاب پستانداران جهان و Nowak و Paradiso (۱۹۸۴) در چهارمین ویرایش همین کتاب اشاره کرده‌اند، نشان می‌دهد. اگرچه تاکنون بررسی‌های فیلوژنتیکی متعددی دربارهٔ راستهٔ گوشت‌خواران و فراخانوادهٔ گربه‌شکلان در دنیا انجام شده‌اند، تنها دو مطالعه (Rohland *et al*., 2005; Koepfli *et al*., 2006) به‌منظور بررسی روابط فیلوژنتیک کفتارها به‌طور ویژه انجام شده‌اند که هر دوی آنها نتایجی را تأیید می‌کنند که Werdelin و Solounias (۱۹۹۱) گزارش کرده‌اند. تاکنون چندین مطالعه دربارهٔ گونهٔ کفتار راه‌راه ایران انجام شده است که ازجملهٔ آنها عبارتند از: ارائهٔ مدل مطلوبیت زیستگاه

و ارزیابی زیستگاه (Karami *et al*., 2007)، بررسی پراکنش فصلی (Karami *et al*., 2009)، بررسی پراکندگی منطقه‌ای کفتار راه‌راه (Ildermi *et al*., 2011) و پتانسیل توزیع گونه‌ای کفتار راه‌راه (Ebrahimi *et al*., 2017)؛ باوجوداین، تاکنون مطالعه‌ای در زمینهٔ تنوع ژنتیکی این گونه در ایران انجام نشده است.

در پژوهش حاضر، به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی موجود بین جمعیت‌های گونهٔ کفتار راه‌راه در ایران و مقایسهٔ آنها با توالی‌های ثبت‌شدهٔ سایر اعضای این خانواده در بانک ژن، از ژن میتوکندریایی *ND2* استفاده شد. ژن *ND2* ژن متغیریست که برای حل روابط درون‌خانوادگی گربه‌سانان از راستهٔ گوشت‌خواران بسیار استفاده شده و کاربردی بوده است (Yoder *et al*., 2003; Flynn *et al*., 2005). پژوهش حاضر باتوجه‌به وجود فواصل جغرافیایی زیاد و تفاوت‌های زیستگاهی درخور توجه در ایران به‌منظور بررسی این احتمال انجام شده است که جمعیت یا جمعیت‌های متمایزی از گونهٔ کفتار راه‌راه در مناطق مختلف کشور وجود دارند و فاصلهٔ ژنتیکی می‌تواند مؤید آن باشد یا خیر.

مواد و روش‌ها

گردآوری نمونه، استخراج DNA و توالی‌یابی

تعداد ۳۰ نمونه از بافت عضلهٔ کفتارهای راه‌راهی که بر اثر تصادف جاده‌ای تلف شده بودند، طی دورهٔ پنج‌ساله و با همیاری کارشناسان سازمان حفاظت محیط‌زیست از ۱۲ استان کشور گردآوری شدند؛ بیشترین تعداد نمونه به استان سمنان تعلق داشت. نمونه‌ها به تفکیک استان و تعداد نمونه به‌ترتیب در شکل (۱) و جدول (۱) آورده شده‌اند.

شکل ۱- نقشهٔ پراکنش نمونه‌های گردآوری‌شده

جدول ۱- تعداد نمونه‌های بافت گردآوری‌شده به تفکیک استان‌های مربوطه

ردیف	استان	تعداد نمونه
۱	اردبیل	۱
۲	اصفهان	۲
۳	خوزستان	۱
۴	خراسان رضوی	۳
۵	سمنان	۱۰
۶	فارس	۱
۷	قم	۲
۸	گلستان	۱
۹	لرستان	۱
۱۰	مرکزی	۱
۱۱	همدان	۳
۱۲	یزد	۴

نمونه‌های گردآوری‌شده تا زمان استخراج DNA در الکل ۹۶ درصد و دمای منفی ۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخراج DNA از نمونهٔ بافت به روش

نمکی طبق شیوهٔ کار (پروتکل) انجام شد (Lopera-Barrero *et al*., 2008). پس‌از تأیید کیفیت DNA با مشاهده روی ژل آگارز ۱ درصد و کمیت آن به روش طیف‌سنجی با استفاده از دستگاه Biophotometer شرکت Eppendorf، دو جفت آغازگر (جدول ۲) به‌منظور تکثیر بخشی از ژن *ND2* با نرم‌افزار Primer3 طراحی شدند و درنهایت، آغازگر N503 به‌منظور انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) استفاده شد.

جدول ۲- آغازگرهای استفاده‌شده در مطالعهٔ حاضر

جایگاه ژنی	آغازگر	توالی
نشانگر *ND2*	آغازگر پیشرو (N 503)	5'-ATCGCACCCCTATCAGTCCT-3'
	آغازگر معکوس (N 503)	3'-GTTAGTGCTGTGGCGTAGGT-5'

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر قطعهٔ ۴۰۴ جفت بازی از DNA میتوکندریایی *ND2* در حجم ۲۰ میکرولیتر به‌وسیلهٔ دستگاه ترموسایکلر (Ependorf، آلمان) انجام شد. مواد لازم برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به شرح زیر بود: ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس (شرکت سیناژن)، ۰/۵ میکرولیتر از هر آغازگر، ۰/۵ میکرولیتر DNA و ۸/۵ میکرولیتر آب دیونیزه. برنامهٔ دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر قطعهٔ مدنظر به‌شکل واسرشته‌سازی اولیه به‌مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد و ۳۵ چرخه شامل به‌ترتیب واسرشته‌سازی به‌مدت ۴۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد، اتصال آغازگر به‌مدت ۴۰ ثانیه در دمای ۵۴ درجهٔ سانتی‌گراد، مرحله بسط به‌مدت ۳ دقیقه در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد و درنهایت، مرحلهٔ بسط نهایی به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد انجام شد. پس‌از اطمینان‌یافتن از تکثیر DNA و وجودنداشتن آلودگی، محصول PCR نمونه‌ها خالص‌سازی و تعیین توالی شد.

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

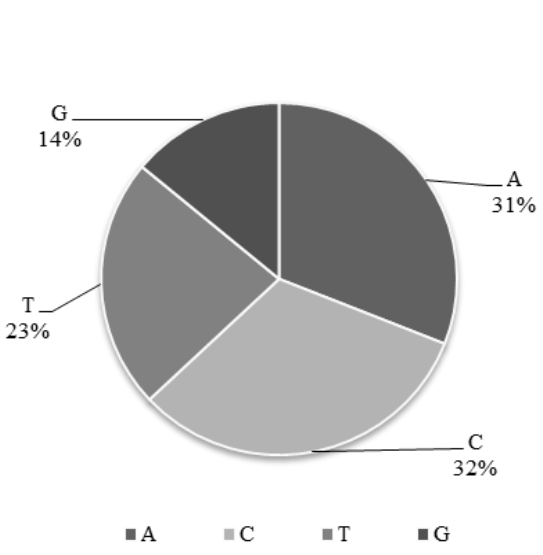
توالی‌های حاصل با نرم‌افزار Bioedit 7.0.5.3 (Hall, 1999) ویرایش و سپس با توالی استخراج‌شدهٔ همین گونه (Bon *et al*., 2012) از سایت مرکز ملی اطلاعات زیست‌فناوری (NCBI) برای تعیین فاصلهٔ ژنتیکی بین نمونه‌ها، فراوانی بازهای مختلف و تعیین میزان جانشینی‌های نوع اول و دوم وارد نرم‌افزار Mega6 شدند (Tamura *et al*., 2013). درخت فیلوژنی تجزیه‌وتحلیل ماتریس داده‌ها بر اساس روش‌های مبتنی بر نزدیک‌ترین همسایگی (Neighbor Joining)، تکامل کمینه (Minimum Evolution) و بیشینه تشابه (Maximum Likelihood) با استفاده از مدل K2P در نرم‌افزار Mega6 رسم شد؛ همچنین به‌منظور رسم درخت بایزین، ابتدا توالی‌ها در نرم‌افزار Clustal W هم‌ردیف‌سازی شدند و سپس برای دستیابی به بهترین مدل از نرم‌افزار JModel Test 2.0.5 (Posada, 2008) و برای محاسبهٔ مقدار احتمال اولیه برای درختان باقیمانده از آمارهٔ AIC (Akaike Information Criterion) استفاده شد. روش احتمال پسین با استفاده از مدل GTR+G، با ۱۰ میلیون تکرار و با پیش‌فرض قبلی انتخاب درخت در هر ۱۰۰۰ نسل به همراه نادیده‌گرفتن ۵۰۰ درخت اول در نرم‌افزار Mrbayes 3.2.5 انجام شد. درنهایت، انحراف معیار درخت بایزین رسم‌شده در نرم‌افزار Tracer 1.4 بررسی شد (Rambaut and Drummond, 2007). باتوجه‌به

شیوهٔ رایج انتخاب برون‌گروه (Graham *et al*., 2002; Harrison and Langdale, 2006)، درختان به‌دست‌آمده با برون‌گروه گونه‌های *Canis lupus* و *Herpestes edwardsii* ریشه‌دار شدند.

نتایج

از ۳۰ نمونهٔ بررسی‌شده، ۱ نمونهٔ متعلق به استان یزد به‌علت ناخوانابودن توالی از مجموعهٔ نمونه‌ها حذف شد. پس‌از ویرایش و هم‌ردیف‌کردن توالی نمونه‌های بررسی‌شده و اضافه‌کردن نمونهٔ ثبت‌شده در بانک ژن (این نمونه موقعیت مکانی مشخصی ندارد و از نمونهٔ باغ وحشی به نام Cerza در فرانسه به دست آمده است)، ۴۰۴ جفت نوکلئوتید ژن *ND2* به‌منظور تحلیل و رسم درخت استفاده شدند. بیشترین و کمترین فراوانی نوکلئوتیدها به‌ترتیب شامل آدنین (۳۰/۵۷) و گوانین (۱۴/۱۴) بود (شکل ۲).

از تعداد نمونه‌های توالی‌یابی‌شده، تفاوت نوکلئوتیدی تنها در سه توالی (نمونه‌هایی از استان‌های خراسان رضوی، سمنان و قم) مشاهده شد. باتوجه‌به داده‌های حاصل از مقایسهٔ جفتی نمونه‌ها بر اساس مدل P-distance، بیشترین فاصله برای نمونه‌هایی از استان قم، سمنان و خراسان رضوی به‌ترتیب با مقادیر ۰/۷۵، ۰/۲۸ و ۰/۲۴ درصد به دست آمد و این مقدار برای سایر نمونه‌ها صفر محاسبه شد. بر اساس گروه‌بندی منطقه‌ای در کشور، بیشترین فاصلهٔ درون‌گروهی برای نمونه‌های استان قم با ۰/۷۵، استان خراسان رضوی با ۰/۱۷ و استان سمنان با ۰/۰۵ درصد به دست آمد. مطابق جدول ۳، بیشترین فاصله در محاسبهٔ فاصلهٔ بین گروه‌ها بین نمونه‌های استان قم با خراسان رضوی مشاهده شد و در این میان، کمترین فاصله به‌طور مشترک بین نمونه‌های استان همدان، یزد و اصفهان با سایر نمونه‌ها به دست آمد.

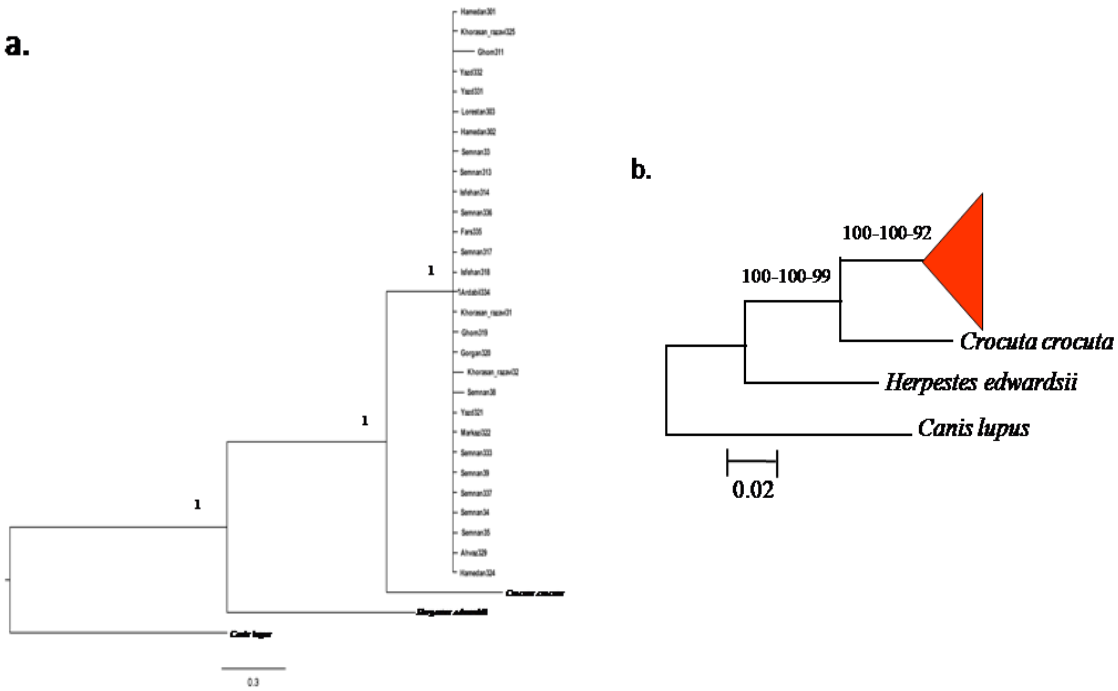


شکل ۲- فراوانی نوکلئوتیدهای حاصل از توالی‌های ژن *ND2* (درصد)

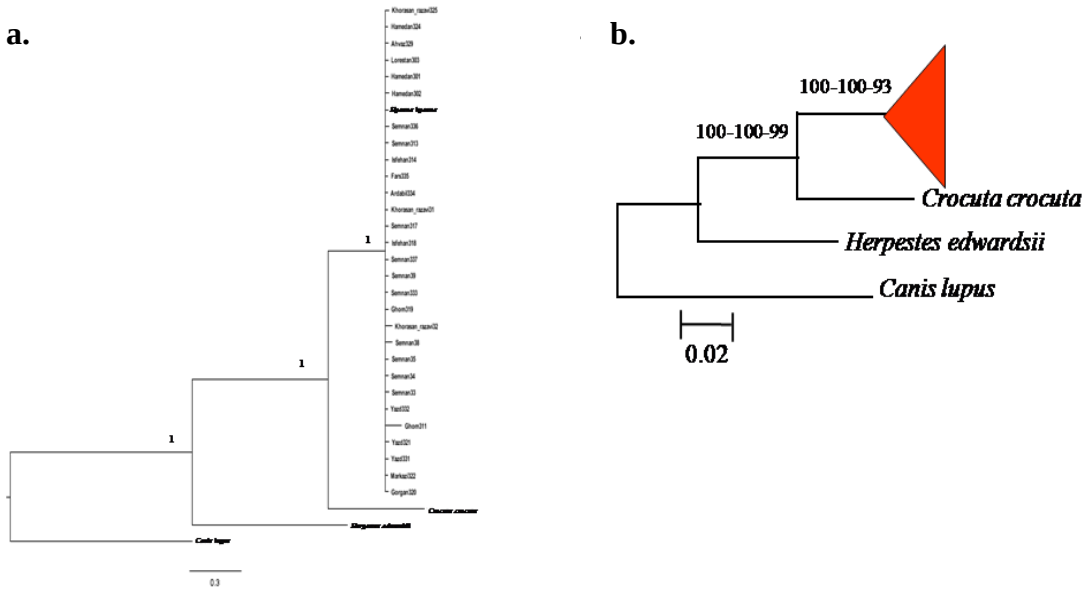
جدول ۳- فاصلهٔ ژنتیکی بین‌گروهی گونهٔ کفتار راه‌راه ایرانی با استفاده از ژن *ND2*

		۱	۲	۳	٤	٥	٦
۱	همدان						
۲	خراسان رضوی	۰/۰۸۳۰۰					
۳	سمنان	۰/۰۲۵۰۰	۰/۱۰۷۵۰				
۴	قم	۰/۳۷۴۰۱	۰/۴۵۷	۰/۳۹۹۰۱			
۵	اصفهان	۰	/۰۸۲۷۰	۰/۰۲۴۹۰	۰/۳۷۴۰۱		
۶	یزد	۰	۰/۰۸۲۷۰	۰/۰۲۴۸۰	۰/۳۷۴۰۱	۰	

نتایج تحلیل درخت حاصل از روش بایزین و سه درخت دیگر نشان‌دهندهٔ شباهت بسیار زیاد نمونه‌های مطالعه‌شده است (شکل ۳). در هر سه درخت، تمام نمونه‌ها همراه با نمونهٔ بازیابی‌شده از بانک ژن در یک کلاد قرار می‌گیرند و همچنین کلاد نمونه‌های مطالعهٔ حاضر و نمونهٔ کفتار خال‌دار (که به‌عنوان کلاد خواهری کفتار راه‌راه در نظر گرفته می‌شود) با احتمال پسین ۹۹ از یکدیگر جدا شدند (شکل‌های ۳ و ۴).



شکل ۳- درختان فیلوژنی ترسیم‌شده با استفاده از ژن *ND2*؛ a. درخت حاصل از روش بایزین، b. اعداد در محل گره‌ها به‌ترتیب از راست نمایندهٔ ضریب حمایت درخت ML، MG و NG هستند.



شکل ۴- درختان فیلوژنی ترسیم‌شده با استفاده از ژن *ND2* همراه با نمونه توالی ثبت‌شده در بانک ژن؛a. درخت حاصل از روش بایزین، b. اعداد در محل گره‌ها به‌ترتیب از راست نمایندهٔ ضریب حمایت درخت ML، MG و NG هستند.

بحث

در مطالعهٔ حاضر، تنوع ژنتیکی گونهٔ کفتار راه‌راه با استفاده از ۳۰ نمونهٔ گردآوری‌شده از ۱۲ استان کشور و با تأکید بر ژن میتوکندریایی *ND2* بررسی شد. گفتنی است گونهٔ کفتار راه‌راه در ایران برای نخستین‌بار از شهرستان لار در استان فارس گزارش (نمونهٔ تایپ) و در مطالعهٔ حاضر، ۱ نمونه بافت از این منطقه بررسی شده است. فاصلهٔ ژنتیکی اندکی با استفاده از ژن *ND2* میان نمونه‌های مطالعه‌شده مشاهد شد. به‌منظور بررسی دقیق‌تر تنوع ژنتیکی کفتار راه‌راه لازم است در مطالعه‌های تکمیلی از دیگر ژن‌ها و تعداد نمونه‌های بیشتر استفاده شود تا تصویر کامل‌تری از وضعیت ژنتیکی کفتار راه‌راه در کشور به دست آید؛ ذکر این نکته ضروریست که گونهٔ کفتار راه‌راه، گونه‌ای تک‌زی با تراکم کم در کشور ایران است و به‌علت خجالتی‌بودن و شب‌کاربودن آن (Ziaie., 2011; Karami *et al*., 2016)، به‌دست‌آوردن نمونه‌های ژنتیکی با تعداد زیاد به سال‌ها زمان نیاز دارد که در مطالعهٔ حاضر مقدور نبود.

باوجود اهمیت گونهٔ کفتار راه‌راه، تاکنون و پیش‌از مطالعهٔ حاضر، مطالعه‌ای دربارهٔ تنوع ژنتیکی این گونه در کشور انجام و منتشر نشده است. Rohland و همکاران (۲۰۰۵) در مطالعهٔ خود با استفاده از ۱۳ فرد از گونهٔ کفتار راه‌راه که از آفریقا تا آسیا گردآوری شده بودند و با بهره‌گیری از ژن سیتوکروم b تنوع بسیار کمی را گزارش کردند که با نتایج مطالعهٔ حاضر همخوانی دارد؛ در مطالعهٔ یادشده از میان توالی نمونه‌های بررسی‌شده، تنها چهار توالی و در دو نوکلئوتید متفاوت بودند. نتایج مطالعهٔ حاضر نیز باوجود تنها سه توالی متفاوت، هم‌راستا با نتایج مطالعهٔ Rohland و همکاران (۲۰۰۵) بودند. آنها فرضیه‌ای پیشنهاد کردند که بیان می‌کند این تنوع ژنتیکی کم در این مقیاس بزرگ ممکن است بر اثر روی‌دادن پدیدهٔ تنگنای جمعیتی باشد و می‌توان استنباط کرد

زیستگاه‌های کنونی کفتارهای راه‌راه در اوراسیا در اثر مهاجرت اخیر آنها در دورهٔ پلیستوسن از آفریقا باشند؛ این مطلب برای تمام گونه‌های اروپایی دارای تنوع ژنتیکی کم پیشنهاد شده است (Walker *et al*., 2001).

باتوجه‌به داده‌های حاصل از محاسبهٔ فاصلهٔ ژنتیکی درون‌گروهی، بیشترین فاصلهٔ ژنتیکی برای نمونه‌های استان‌های قم، خراسان رضوی و سمنان به دست آمد. اگرچه مقادیر حاصل، تفاوت‌ها را نشان می‌دهند، این مقادیر ناچیز برای اثبات وجود تنوع بین نمونه‌ها کافی نیستند. نتایج بیان می‌کنند جریان ژنی زیادی بین زیستگاه‌های گونهٔ کفتار راه‌راه وجود دارد (Shafee *et al*., 2013) و تمام نمونه‌های مطالعه‌شده، تک‌تبار و دارای یک منشأ مادری مشترکند؛ بدیهی است اظهارنظر قطعی در این زمینه مستلزم انجام مطالعه‌های تکمیلی است.

در مطالعهٔ حاضر، ضریب حمایت بیش از ۹۰ درصد در نتایج حاصل از روش‌های NG، ME و MLو ضریب حمایت ۱ حاصل از روش Baysian از وجود یک دودمان تک‌شاخه‌ای در تمام درختان حمایت می‌کند و تمام نمونه‌های مطالعه‌شده در یک کلاد و در کلاد مجاور گونهٔ کفتار خال‌دار قرار می‌گیرند. نتایج حاصل از درختان رسم‌شده در پژوهش حاضر مشابه نتایج درختان فیلوژنی حاصل از مطالعه‌های پیشین دربارهٔ جایگاه تبارشناختی گونهٔ کفتار راه‌راه نسبت به سایر گونه‌هاست (Werdelin and Solounias., 1991; Koepfli *et al*., 2006; Agnarsson *et al*., 2010; Bon *et al*., 2012; Zhou *et al*., 2017).

تاکنون مطالعهٔ ژنتیکی‌ای دربارهٔ گونهٔ کفتار راه‌راه در ایران منتشر نشده است و نتایج مطالعهٔ حاضر باوجود تعداد کم نمونه و دسترسی‌نداشتن به نمونه‌هایی از جنوب‌شرق کشور، به‌عنوان مطالعهٔ پایه و نقطهٔ آغازی برای مطالعه‌های جامع بعدی دربارهٔ این گونهٔ باارزش اهمیت دارد. باتوجه‌به این نکته که گونهٔ کفتار راه‌راه در ردهٔ حیوانات در مرز تهدید قرار دارد (اعلام‌شده توسط متخصصان کفتار اتحادیهٔ بین‌المللی حفاظت از طبیعت (Hyaena Specialist Group/IUCN)، تنوع ژنتیکی کم نشان‌دهندهٔ این مسئله است که این گونه در ایران به‌طور بالقوه در رویارویی با مخاطرات محیطی یا سایر تهدیدها بسیارآسیب‌پذیر است و بنابراین، تهیهٔ برنامهٔ عمل برای مدیریت زیستگاه و حفظ گونه در بلندمدت اهمیت دارد و اکیداً پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

بخش استخراج DNA و PCR پژوهش حاضر در آزمایشگاه ژنتیک دانشکدهٔ منابع‌طبیعی دانشگاه کردستان انجام شده است. از مهندس محمدشفیع رحمانی و مهندس هوشیار گویلیان سپاسگزاری می‌شود.

منابع

Agnarsson, I., Kuntner, M. and May-Collado, L. (2010) Dogs, cats and kin: Amolecular species-level phylogeny of carnivore. Molecular Phylogenetics and Evolution 54: 726-745.

Agustí, J. and Antón, M. (2002) Mammoths, sabertooths, and Hominids: 65 million years of mammalian evolution in Europe. Columbia University Press, New York.

Avise, J. C. (1989) A role for molecular genetics in the recognition and conservation of endangered species. Trends in Ecology and Evolution 4: 9: 181-279.

Barnosky, A. D., Matzke, N., Tomiy, S., Wogan, G. O. U., Swartz, B., Quental, T. B., Marshall, C., McGuire, J. L., Lindsey, E. L., Maguire, K. C., Mersey, B. and Ferrer, E. A. (2011) Has the Earth's sixth mass extinction already arrived? Nature 471(7336) 51-57.

Beaumont, A. and Hoare, K. (2003) Biotechnology and genetics in fisheries and aquaculture. Wiley-Blackwell, Chichester.

Bon, C., Berthonaud, V., Maksud, F., Labadie, K., Poulain, J., Artiguenave, F., Wincker, P., Aury, J. M. and Elaiouf, J-M. (2012) Coprolites as a source of information on the genome and diet of the cave hyena. Proceedings of the Royal Society 279(1739): 2825-2830.

Ceballos, G. and Ehrlich, P. R. (2018) The misunderstood sixth mass extinction. Science 360(6393): 1080-1081.

Ebrahimi, E., Ahmadzadeh, F. and Naimi, B. (2017) Species distribution potential of striped hyaena (*Hyaena hyaena*) in response to climate change in Iran. Environmental Sciences 15(4): 215-232.

Garner, A., Rachlow, J. L. and hicks, J. F. (2005) Patterns of genetic diversity and its loss in mammalian populations. Conservation Biology 4: 311-324.

Flynn, J. J., Finarelli, J. A., Zehr, S., Hsu, J. and Nedbal, M. A. (2005) Molecular phylogeny of the carnivora (mammalia): Assessing the impact of increased sampling on resolving enigmatic relationships. Systematic Biology 54: 317-337.

Frankham, R., Ballou, J. D. and Briscoe, D. A. (2002) Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press, Cambridge.

Graham, S. W., Olmstead, R. G. and Barrett, S. C. H. (2002) Rooting phylogenetic trees with distant outgroups: A case study from the commelinids monocots. Molecular Biology and Evolution 19(10) 1769-1781.

Hall, T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41: 95-98.

Harrison, C. J. and Langdale, A. J. (2006) A step by step guide to phylogeny reconstruction. The Plant Journal 45: 561-572.

Hiendleder, S., Lewalski, H., Wassmuth, R. and Janke, A. (1998) The complete mitochondrial DNA sequence of the domestic sheep (*Ovis aries*) and comparison with the other major ovine haplotype. Journal of Molecular Evolution 47: 441-448.

Ildermi, A., Mirsanjari, M., Barati, A. and Alizadeh shabani, A. (2011) Prestudy of stripped hyena's distribution in Lashgardar protected area, Hamedan. Environmental Sciences and Sustainable Development Nation Conference, Malayer, Iran.

IUCN, Red List of Threatened Species. Retrieved from https://www.iucnredlist.org. On: 20 December 2018.

Kaas, Q., Westermann, J. C. and Craik, D. J. (2010) Conopeptide characterization and classifications: An analysis using ConoServer. Toxicon 55(8): 1491-1509.

Karami, M., Riazi, B. and Kalani, N. (2007) Habitat evaluation of the Striped Hyena (*Hyaena hyaena hyaena*) in Khojir national park. Environmental Sciences 3: 11.

Karami, M., Riazi, B. and Kalani, N. (2009) Seasonal distribution of striped hyena (*Hyaena hyaena hyaena*) in Khojir national park. Environment Sciences and Technology 10(2): 99-104.

Karami, M., Ghadirian, T. and Faizolah, K. (2016) The atlas of mammals of Iran. Jahad Daneshgahi Mashhad, Mashhad.

Koepfli, K-P., Jenks, S., Eizirik, E., Zahirpour, T., Van Valkenburghm, B. and Wayne, R. (2006) Molecular systematics of thehyaenidae: Relationships of relictual lineage resolved by a molecular supermatrix. Molecular Pylogenetics and Evolution 38: 603-620.

Lopera-Barrero, N. M., Povh, J. A., Ribeiro, R. P., Gomes, P. C., Jacometo, C. B. and Da Silva Lopes, T. (2008) Comparison of DNA extraction protocols of fish fin and larvae samples: modified salt (NaCl) extraction. Ciencia e Investigación Agraria 35: 65-74.

Majnoonian, H., Kiabi, B. and Danesh, M. (2005) Reading in zoogeography of Iran (Part II). Department of the Environment, Tehran (in Persion).

Mills, M. G. L. and Hofer, H. (1998) Hyaenas: Status survey and conservation action plan. IUCN/SSC Hyaena Specialist Group, Gland.

Mohammadi, A., Nassiry, M. R., Mosafer, J., Mohammadabadi, M. R. and Sulimova, G. E. (2009) Distribution of BoLA-DRB3 allelic frequencies and identification of a new allele in the Iranian cattle breed Sistani (Bosindicus). Russian Journal of Genetics 45: 198-202.

McNeely, J. A., Miller, K. R., Reid, W. V., Mittermeier, R. A. and Werner, T. B. (1990) Conserving the world's biological diversity. World Resources Institute WWF-US, Washington, DC.

Nowak, R. M. and Paradiso, J. L. (1984) Mammals of the world. vol. 1. 4th Edition. Johns Hopkins University Press, Baltimore.

Posada, D. (2008) J Model Test: phylogenetic model averaging. Molecular Biology and Evolution 25(7): 2253-2256.

Rambaut, A. and Drummond, A. (2007) Tracer Version. 4. Retrieved from: http://groups.google.com/group/beast-users. On: 19 April 2008

Rohland, N., Pollack, J., Nagel, D., Beauval, C., Airvaux, J., Paabo, S. and Hofreiter, M. (2005) Thepopulation history of extinct hyenas. Molecular Biology and Evolution 22: 2435-2443.

Shafee, Z., Dorafshan, S., Keivany, Y. and Qasemi, S. A. (2013) Genetic structure of Mosul bleak (*Alburnus mossulensis* Heckel, 1843) using microsatellite marker in Tigris basin. Taxonomy and Biosystematic 5(7): 9-22.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution 28(10): 1731-2739.

Turner, A. and Antón, M. (2004) Evolving eden: An illustrated guide to the evolution of the african large-mammal fauna. Columbia University Press, New York.

Walker, C., Vila, C., Landa, A., Linden, M. and Ellegren, H. (2001) Genetic variation and population structure in Scandinavian wolverine (Gulogulo) populations. Molecular Ecology 10: 53-63.

Watts, H. E. and Holekamp, K. E. (2007) Hyena societies. Current Biology 17: 657-660.

Werdelin, L. and Solounias, N. (1991) The Hyaenidae: Taxonomy, systematics and evolution. Fossils and Strata 30: 1-104.

Wilson, D. E. and Reeder, D. A. M. (2005) Mammal species of the world. A Taxonomic and geographic Reference. 3rd Edition. Johns Hopkins University Press, Baltimore.

Wozencraft, W. C. (1993) Carnivora. In: Mammal species of the World: A taxonomic and geographic reference (Eds. Wilson, D. E. and Reeder, D. M.) 279-348. Smithsonian Institution Press, Washington, DC.

Yoder, A. D., Burns, M. M., Delefosse, T., Veron, G., Goodman, S. M. and Flynn, J. (2003) Single originof malagasycarnivora from an African ancestor. Nature 421: 734-737.

Ziaie, H. (2011) A field guide to the Mammala of Iran. 4th Edition. Environmental Protection Agency, Tehran.

Zhou, Y., Wang, S-R. and Ma, J-Zh. (2017) Comprehensive species set revealing the phylogeny and biogeography of Feliformia (Mammalia, Carnivora) based on mitochondrial DNA. PloS ONE 12(3).