

ساختار و تنوع ژنتیکی اردک سیاه‌کاکل (*Aythya fuligula* Linnaeus, 1758) با استفاده از ژن میتوکندریایی سیتوکروم b در منطقه خلیج گرگان

- احمد شعاعی: گروه محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
- حمیدرضا رضایی*: گروه محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
- جلیل ایمانی هرسینی: گروه محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: آذر 1394 تاریخ پذیرش: اسفند 1394

چکیده

اردک سیاه‌کاکل یکی از گونه‌ها فراوان و با پراکندگی بالا در جهان، بین مرغابی‌سانان است. هدف از انجام پژوهش حاضر بررسی ساختار و تنوع ژنتیکی اردک سیاه‌کاکل در منطقه خلیج گرگان با استفاده از ژن سیتوکروم b (Cytochrome b) بود. برای اجرای این پژوهش از 10 قطعه اردک سیاه‌کاکل که از منطقه خلیج گرگان گرفته شده بوده‌اند، نمونه‌برداری انجام شد. تجزیه تحلیل‌های هاپلوتایپی و نوکلئوتیدی با استفاده از نرم‌افزارهای MEGA، Network و DNAsp، Arlequin، MrBayes صورت گرفت. به‌طور کلی، با بررسی 9 قطعه 961 جفت بازی ژن سیتوکروم b اردک سیاه‌کاکل، 4 هاپلوتایپ مختلف شناسایی شد. تنوع هاپلوتایپی 0/6944، تنوع نوکلئوتیدی 0/00095 محاسبه شد. مقدار Nm یا میزان جریان ژنی بین مناطق نمونه‌برداری برابر 1/598 بود ($p < 0/05$) که نشان از جریان ژنی بالا و به‌بیان‌دیگر فاصله بسیار کم بین جمعیت‌های این‌گونه و جمعیت‌های اروپایی و آسیایی آن است. شاخص راجزر-هارپندینگ، شاخص تاجیما و Fu Fs به ترتیب 0/211 و 0/715 و -1/282 محاسبه شد، همچنین نمودار توزیع عدم تطابق به صورت تک‌نمایی رسم شده، که همه آن‌ها نشان داند تاریخچه جمعیتی نامعین و شبیه به مدل گسترش ناگهانی بوده است. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از شبکه هاپلوتایپی و درخت تبارشناختی و همین‌طور تفاوت‌اندک ژنتیکی بین جمعیت‌های بررسی‌شده، احتمال مهاجرت این پرند از هردو منطقه اروپا و شرق آسیا به ایران وجود دارد. با در نظر گرفتن نتایج پژوهش حاضر، باید منطقه خلیج گرگان به‌عنوان یک منطقه مهم و کلیدی شناخته شده و اقدامات مدیریتی و حفاظتی لازم در منطقه صورت گیرد.

کلمات کلیدی: اردک سیاه‌کاکل، تنوع ژنتیکی، ژن سیتوکروم b، ژنوم میتوکندری

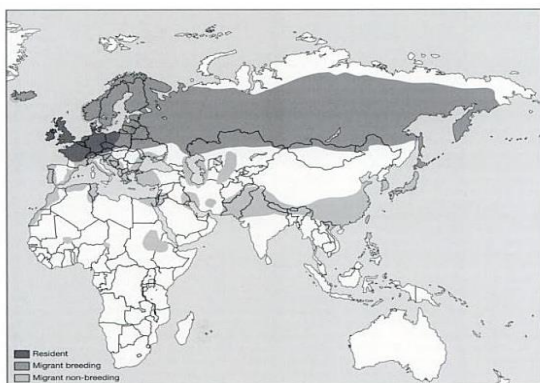
مقدمه

اردک‌های غواص یکی از گروه‌های زیرتیره اردک‌ها می‌باشند که در زیستگاه‌های مختلفی دیده می‌شوند. از این گروه پنج جنس در ایران به‌صورت مهاجر و بومی وجود دارند (فیروز، 1390). اردک سیاه‌کاکل (*Aythya fuligula*) یکی از انواع اردک‌های غواص است که در شمال ایران و در قسمت شرقی و غربی سواحل دریای خزر به‌صورت پراکنده یافت می‌شوند. این‌گونه در گذشته در قسمت‌های بیشتری از ایران یافت می‌شده و حتی جوجه‌آوری نیز داشته است (BirdLife International، 2015). اما در حال حاضر به دلیل تخریب زیستگاه فقط در قسمت‌هایی از خلیج گرگان، تالاب گمیشان، تالاب انزلی و سواحل اطراف لنگرود دیده می‌شوند. در جهان نیز آینده جمعیت‌های این‌گونه به دلایل مختلفی مثل، زهکشی تالاب‌ها، تغییر کاربری اراضی

(Grishanov، 2006)، افزایش کشاورزی در مناطق جوجه‌آوری، استفاده تفریحی از منابع آبی زیستگاه این‌گونه و افزایش آشفستگی‌های این مناطق (Kear، 2005)، افزایش سر و صداهای ماشین‌آلات به دلیل گسترش شهری (Marsden، 2000) و همین‌طور شکار تجاری و تفریحی در مناطق مختلف جهان (Balmaki و Barati، 2006؛ Bregnballe و همکاران، 2006؛ Sorrenti و همکاران، 2006) و همین‌طور برداشت تخم‌های این پرند، مورد تهدید واقع شده است (Gudmundsson، 1979).

این گونه دارای یکی از بزرگ‌ترین مسیرهای مهاجرت در بین اردک‌ها است (Keller و همکاران، 2009) و پراکندگی آن در غرب، شمال و مرکز اروپا (Del Hoyo و همکاران، 1992)، شمال آفریقا، شرق آسیا، خاورمیانه قسمت‌هایی از آسیای مرکزی است. اردک سیاه‌کاکل دارای

در سایر موارد مثل، شناسایی تقسیمات تاریخی و تغییرات جغرافیای زیستی نیز دارد (Jiggins و Hurst، 2005). ژن سیتوکروم *b* یکی از ژنهای میتوکندری است که برای بازسازی ارتباط فیلوژنی بینگونه‌ای و مطالعات ژنتیک جمعیت برای زیرتیره اردک‌ها مناسب و کارآمد است (Johnson و Sorenson، 1998). از این رو به‌عنوان یک نشانگر قابل‌اعتماد برای مطالعات فیلوژنتیکی و ژنتیک جمعیت مورد استفاده قرار می‌گیرد (Meyer و Zardoya، 1996). با توجه به این که استفاده از نشانگر ژن سیتوکروم *b* آسان، و تجزیه و تحلیل نتایج نیز ساده است (Johnson و Sorenson، 1998) لذا، در این پژوهش از ژن سیتوکروم *b* برای بررسی ساختار ژنتیکی و همچنین بررسی جایگاه فیلوژنی اردک سیاهکاکل در بین اردک‌ها غواص استفاده شد.



شکل 1: پراکنش جهانی اردک سیاهکاکل (Kear، 2005)

مواد و روش‌ها

منطقه مورد بررسی: خلیج گرگان بزرگ‌ترین خلیج در جنوب دریای کاسپین است که بر اثر پیشروی و گسترش شرقی رشته ساحلی شبه‌جزیره میانکاله در جنوب شرقی دریای کاسپین تشکیل شده است. وسعت خلیج گرگان حدود 450 کیلومتر مربع است. طول خلیج در جهت غربی به شرقی حدود 70 کیلومتر و عرض آن نیز بین 13 تا 14 کیلومتر است، ولی کاملاً برخلاف شبه‌جزیره میانکاله، از غرب به شرق به عرض خلیج افزوده شده است. مختصات جغرافیایی خلیج از 25-53 تا 54-2 شرقی و از 36-46 تا 36-54 شمالی است. خلیج گرگان کم‌عمق است، به‌طوری‌که با در نظر گرفتن بالآمدگی آب، حداکثر عمق آن به 4 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 شبه‌جزیره میانکاله قرار گرفته است که در رشد و تکثیر آبزیان، ماهیان استخوان‌دار و ماهیان غضروفی و جذب پرندگان مهاجر زمستانی نقش مهمی دارد (کیابی و همکاران، 1378).

گونه مورد مطالعه: اردک سیاهکاکل گونه‌ای دوشکلی است که پرده نر بالغ از پرده ماده (38 تا 42 سانتیمتر) (Felix و Hisek، 2000) بزرگتر است، از مشخصات بارز جنس نر اردک یک کاکل آویخته در پس سر است

بیشترین پراکنش (شکل 1) و همچنین بزرگ‌ترین جمعیت (2.6 تا 2.9 میلیون فرد) در بین اردک‌های غواص است (BirdLife International، 2015). براساس بازیابی نمونه‌های حلقه‌گذاری شده، چهار زیر جمعیت عمده زمستان-گذران برای اردک سیاهکاکل مشخص شده است که شامل زیرجمعیت اروپا، دریای کاسپین، شرق آسیا (هندوستان) و جنوب شرقی آسیا (ژاپن) است (Baumanis و Blums، 1990).

شواهد ژنتیکی زیادی در رابطه با انشعابات ژنتیکی در بین جمعیت‌های اوراسیایی این گونه وجود ندارد و فقط اطلاعات محدودی از حلقه‌گذاری‌های انجام‌شده در مناطق زمستان‌گذران اروپا از این پرده به‌دست‌آمده است (Hofer و همکاران، 2005). البته واضح است که جدایی زیادی بین جمعیت‌های جوجه‌آور و زمستان‌گذران اوراسیایی و هندی این گونه وجود دارد (Hofer و همکاران، 2005). بعلاوه این گونه یکی از گونه‌های حساس به ویروس آنفولانزای پرندگان است (Melville و Shortridge، 2006) و ردیابی مسیرهای مهاجرت آن، برای جلوگیری از احتمال گسترش این ویروس بسیار مهم است (Tubelyte و همکاران، 2011). همچنین برای پی‌بردن به‌درستی و کاربرد نظریه اختلاط جمعیت‌های زمستان‌گذران در مناطق زمستان‌گزانی (Liu و همکاران، 2012) نیز از ردیابی مسیر مهاجرت پرندگان استفاده شده است. مشخص شده که پیشرفت برنامه‌های ژنتیکی و اصلاح نژادی و حفاظتی بستگی به سطح تغییرات ژنتیکی در جمعیت‌ها دارد، بنابراین مطالعه تنوع در نژادهای بومی و وحشی و حفاظت از آن‌ها وظیفه اولیه متخصصین ژنتیک و اصلاح‌گران می‌باشد (Mohammadabadi و همکاران، 2010). چرا که یک گونه بدون تنوع ژنتیکی کافی قادر به سازگاری با تغییرات محیطی و مبارزه با انگل‌ها و رقیب‌ها نیست (Askari و همکاران، 2011). حفاظت باید بر اساس دانش عمیقی از منابع ژنتیکی نژادهای خاص باشد، لذا تلاش برای شناسایی و تعیین خصوصیات ژنتیکی نژادهای بومی و محلی بسیار اهمیت دارد (Shojaei و همکاران، 2010؛ Moazeni و همکاران، 2016).

آنالیزهای ژنتیکی کاربرد خوبی برای حدس راه‌های ارتباطی بین مناطق جوجه‌آوری و زمستان‌گزانی پرندگان دارند اما همه نشانگرهای مولکولی برای استفاده جهت بررسی مهاجرت پرندگان مناسب نیستند (Jahn و همکاران، 2010). انتخاب یک نشانگر مناسب برای این کار نیاز به داشتن آگاهی در زمینه رفتارشناسی مهاجرت و جریان ژن در جمعیت‌های پرندگان دارد (Parker و Arguedas، 2000؛ Zwartjes، 2001). موضوع مهم در انتخاب نشانگر مناسب، توانایی آن در تشخیص تفاوت‌های جغرافیایی گونه‌های مهاجر و توان ردیابی پرندگان مهاجر است (Haig و همکاران، 1994).

استفاده از ژنوم میتوکندری یکی از مهم‌ترین نشانگرهای مورد استفاده برای بررسی ژنتیک جمعیت جانوران است (Nabholz و همکاران، 2008). این ابزار بیشتر با هدف تعیین ساختار ژنتیکی جانوران (Avise و همکاران، 1987) استفاده می‌شود، اما کاربردهای فراوانی

وجود آلودگی، 9 نمونه (جدول 1) برای تعیین توالی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال شد (یکی از نمونه‌ها فاقد کیفیت لازم برای تعیین توالی بود). این نمونه‌ها با استفاده از دستگاه ABI 3730 به‌طور خودکار توالی‌یابی شد.

برای اصلاح نوکلئوتیدی توالی‌ها و مرتب‌سازی آن‌ها از نرم‌افزار Seqscape نسخه 3 (تولید و توسعه‌یافته توسط Life Technologies and Applied Biosystems) استفاده شد. برای تعیین تنوع ژنتیکی (هابلوتایپی و نوکلئوتیدی) و همچنین مشخص نمودن جایگاه‌های چندشکلی از نرم‌افزار DnaSP نسخه 5/1 (Librado و Rozas، 2009) استفاده شد. سپس بر اساس معیار $2^{\circ}BIC$ و $3^{\circ}AIC$ (Kumar و Nei، 2000)، مدل تامورانی (Tamura و Nei، 1993) به‌علاوه آماره G، به عنوان بهترین مدل تکاملی برای نمونه‌ها تعیین شد و رسم درخت تبارشناختی با استفاده از روش حداکثر درست‌نمایی⁴ در نرم‌افزار MEGA نسخه 5 (Tamura و همکاران، 2011) انجام گردید. همچنین درخت تبارشناختی با روش رویکرد استنباط بیزی (Bayesian) در نرم‌افزار MrBayes نسخه 3/2 (Ronquist و همکاران، 2012) رسم گردید.

برای ترسیم شبکه هابلوتایپی از روش اتصال میانه⁵ استفاده و در نسخه 4/6 نرم‌افزار Network (Bandelt و همکاران، 1999) استفاده شد. واگرایی ژنتیکی و آنالیز واریانس مولکولی، به‌صورت جفتی بین منطقه نمونه‌برداری شده و توالی‌های به‌دست‌آمده از ژن بانک (NCBI) با 10000 بار تکرار، گسترش و پراکنش تاریخی جمعیتی با دو روش آزمون تاجیما (D-test of Tajima) (Tajima، 1989) و آزمون فو (Fu Fs) (Fu، 1997) با نرم‌افزار Arlequin نسخه 3/5 (Excoffier و همکاران، 2010) محاسبه شد.

جدول 1: مشخصات نمونه‌های توالی‌یابی شده

ردیف	نام اختصاری	جنس
1	F ₂₀	نر
2	F ₂₁	نر
3	F ₂₂	نر
4	F ₂₃	ماده
5	F ₂₅	ماده
6	F ₂₆	ماده
7	F ₂₇	نر
8	F ₂₈	نر
9	F ₂₉	ماده

نتایج

در این مطالعه 961 جفت باز از ژن سیتوکروم b ژنوم میتوکندری از 9 نمونه در یک منطقه مطالعه شده پس از توالی‌یابی تحلیل شد و در بانک ژن با شماره دسترسی KU697794 تا KU697802 به ثبت رسیدند. به‌طور کلی، با

که تنها اردک با کاکل سیاه و آویخته می‌باشد. در هنگام پرواز قسمت زیرین بدن و بال‌ها سفیدرنگ، سر و روی تنه پرندۀ نر سیاه با برق سبزرنگ و منقاری سبز-آبی است، که گاهی در قاعده آن لکه سفیدی مشاهده می‌شود. پاها سبز-آبی بوده و دارای چشم‌های زردرنگ می‌باشد. پرندۀ ماده معمولاً به رنگ قهوه‌ای تیره و تعدادی پر قهوه‌ای روشن روی سروتنه که موجب نزدیکی رنگ پرندۀ به حالت خاکی رنگ می‌شود. در بعضی از افراد خصوصاً در فصل تابستان رنگ پرهای زیردم مایل به سفید، اما در بیشتر افراد قهوه‌ای رنگ است. (Kear، 2005). این پرندۀ از سخت‌پوستان، نرم‌تنان، حشرات و لاورهایشان و سایر بی‌مهرگان تغذیه می‌نماید. در زمستان صدف گورخری اصلی‌ترین طعمه آن بشمار می‌رود (Visser و de Leeuw، 1999).

نمونه‌برداری و روش‌های آزمایشگاهی: از 10 لاشه اردک سیاه‌کاکل توقیف شده از شکارچیان که در اطراف خلیج گرگان صید شده بودند، نمونه‌برداری شده، قسمتی از بافت سینه پرندۀ جدا و داخل الکل اتیلیک 96 درجه قرار داده و به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه‌گیری در اواخر فصل پاییز انجام گرفت. همچنین تنها توالی‌های ژن سیتوکروم b موجود در بانک ژن با شماره دسترسی‌های EU585624 متعلق به اروپا، NC024595 و KJ722069 متعلق به شرق آسیا استخراج و برای انجام آنالیز استفاده شدند. بعد از استخراج DNA نمونه‌ها با استفاده از کیت استخراج بایونیر و براساس پروتکل استاندارد، با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (مدل Applied Biosystems 2720، ساخت آمریکا) واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس در 40 سیکل و با استفاده از آغازگرهای (5'-14995L)

CTCCCAGCCCCATCCAACATCTCAGCATGATGAA
(5'-16065H) و ACTTCG-3'
CTAAGAAGGGTGGAGTCTTCAGTTTTTGGTTTAC
و AAGAC-3' (Kocher و همکاران، 1989) تکثیر شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس (PCR)¹ در دستگاه ترموسایکلر به شرح زیر انجام گرفت:

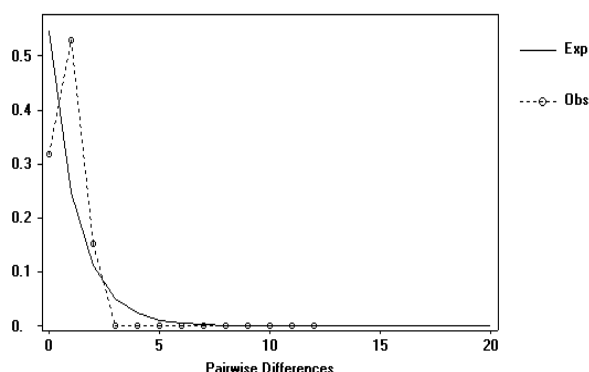
واسرشت‌سازی اولیه در دمای 95 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه، واسرشت‌سازی در دمای 95 درجه سانتی‌گراد به مدت 45 ثانیه، اتصال آغازگر در دمای 60 درجه سانتی‌گراد و به مدت 60 ثانیه، مرحله بسط در دمای 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 60 ثانیه و در پایان، مرحله بسط نهایی در دمای 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 7 دقیقه. حجم واکنش برابر با 25 میکرولیتر و محتوای آن شامل 100 نانوگرم DNA، یک واحد آنزیم Taq دی‌ان‌ای پلی‌مراس، 5 میلی‌مول dNTPs، یک میکرولیتر 50MgCl₂ میلی‌مول، 5 پیکومولار از هر آغازگر، 2/5 میکرولیتر بافر 10X و 18 میکرولیتر آب دوبار تقطیر بود. به‌منظور تأیید تکثیر ناحیه موردنظر، طی واکنش‌های PCR، مقدار 5 میکرولیتر از نمونه تکثیرشده با 2 میکرولیتر Dye مخلوط و روی ژل آگارز 2 درصد قرار گرفت. پس از اطمینان از تکثیر و عدم

likelihood Maximum⁴
Median-Joining⁵

Polymerase chain reaction 1
Bayesian Information Criterion²
Information Criterion Akaike³



آزمون‌های بی‌طرفی (neutrality tests) تاجیما و شاخص فو برای 9 توالی به ترتیب برابر 0/715 و 1/282- بوده که هیچ‌کدام از لحاظ آماری معنی‌دار نبودند ($p \geq 0/01$). میزان شاخص راجرز-هارپدینگ ($r: 0/211$) ($p \geq 0/05$) و نمودار آن تک‌نمایی (شکل 2) به‌دست‌آمده که نشان از گسترش گونه است که البته بدلیل کوچک بودن حجم نمونه نیاز به مطالعات تکمیلی دارد.



شکل 2: نمودار مربوط به شاخص راجرز-هارپدینگ (شاخص عدم تطابق) بر اساس تحلیل ژن سیتوکروم *b* بین تمام نمونه‌های و افراد مربوط به ژن بانک

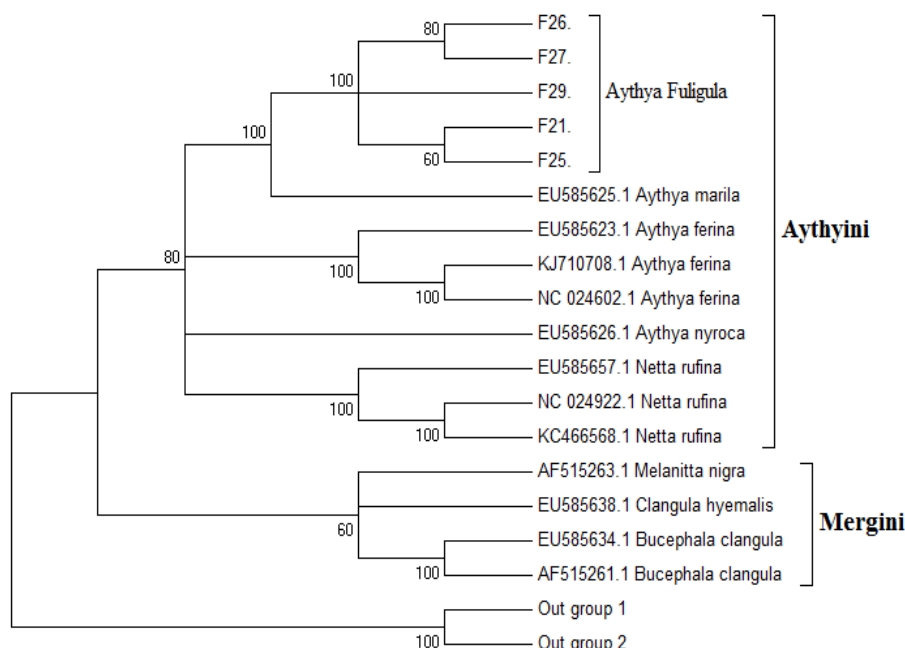
در درخت تبارزایی مربوط به اردک‌های غواص ایران که با استفاده از نمونه‌های موجود در ژن بانک و مطالعه حاضر ترسیم شده است مشخص می‌شود که اردک‌های غواص ایران به دو شاخه اصلی تقسیم‌شده که یکی شامل اردک‌های، سیاه‌کاکل، سرسیاه، بلوطی، سرخنایی و اردک تاجدار (*Aythya*) است و شاخه دیگر از اردک دم‌دراز، اردک چشم‌طلایی و اسکوتر سیاه (*Mergina*) تشکیل‌شده‌اند.

بررسی قطعه 961 جفت بازی 2 جایگاه متغیر، 959 جایگاه حفاظت‌شده و 4 هاپلوتایپ مختلف شناسایی گردید. در بین نمونه‌های بررسی‌شده، بیش‌ترین فراوانی هاپلوتایپی، مربوط به هاپلوتایپ A (55 درصد) و هاپلوتایپ C و D به‌صورت منفرد (11 درصد) کمترین فراوانی را داشتند. میزان تنوع هاپلوتایپی (Hd) و تنوع نوکلئوتیدی (Pi) برای تمامی توالی‌ها به ترتیب $0/6944 \pm 0/147$ و $0/0 \pm 0/00095/0008$ به‌دست‌آمده آمد. نتایج تحلیل نمونه‌های به‌دست‌آمده نشان داد که احتمالاً در این جمعیت دارای تنوع ژنتیکی پایینی است. مقدار F_{st} محاسبه‌شده بین سه جمعیت ایران، شرق آسیا و اروپای مرکزی به شرح جدول 1 بود. همچنین جریان ژنی (Nm) بین جمعیت نمونه‌برداری شده در ایران و شرق آسیا برابر با 1/598 بوده که عدد نسبتاً بالایی است و نشان‌دهنده تفاوت ژنتیکی کم و به‌عبارت‌دیگر، جریان ژنی زیاد بین جمعیت‌ها است. فاصله ژنتیکی بین تمام افراد با مدل تامورانی محاسبه و در جدول 2 آورده شده است.

جدول 1: مقدار تفاوت ژنتیکی بر اساس F_{st}

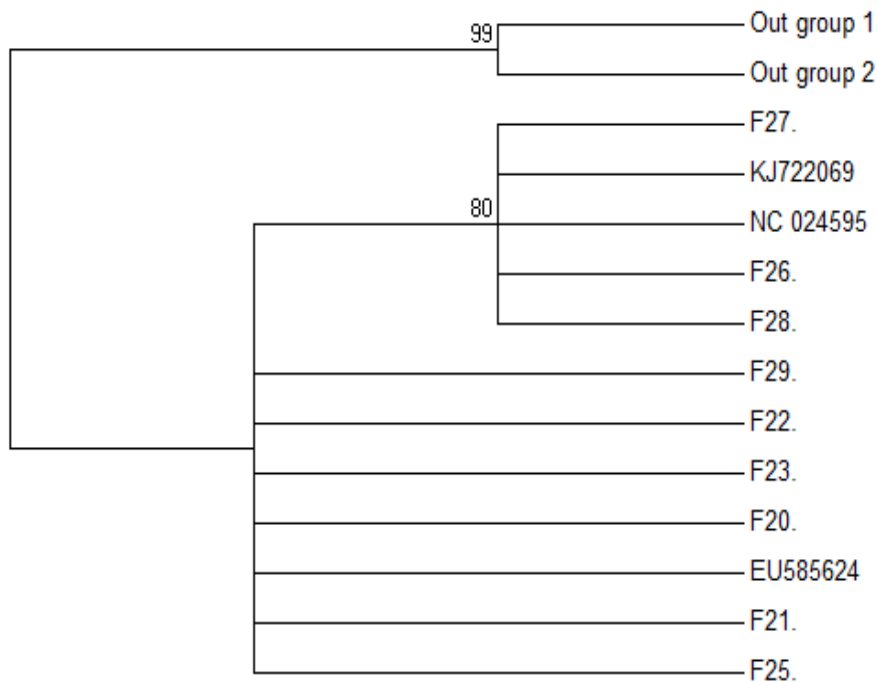
	خطا به دلیل کمبود نمونه		
	ایران	آسیا	اروپا
ایران	-		
آسیا	0/293	-	
اروپا	-0/601	*1/00	-

آزمون تفاوت جمعیت‌ها (p exact non-differentiation) بین تمامی نمونه‌ها $p = 0/5258 \pm 0/008$ محاسبه شد که البته از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($p \geq 0/05$).

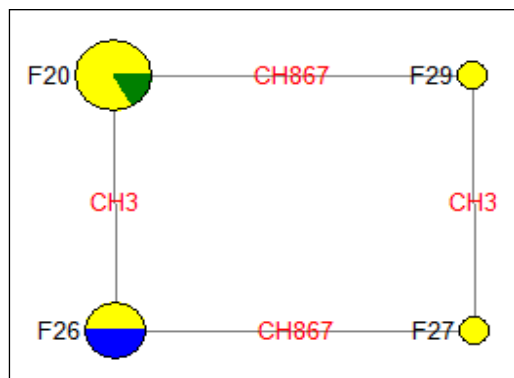


شکل 3: ترسیم درخت تبارشناختی بر اساس روش حداکثر درست نمایی بین اردک‌های غواص موجود در ایران با استفاده از قطعه 961 جفت بازی ژن سیتوکروم *b* ژنوم میتوکندری (از درنای اوراسیایی (*Grus grus*) و درنای سیبری (*G. leucogeranus*) به عنوان گونه خارجی استفاده شده است)

درخت فیلوژنی رسم شده با روش Bayesian که در نرم افزار Mr.bayes شامل نمونه‌های آزمایش شده، نمونه‌های آسیایی و اروپایی ژن بانک و اردک تاجدار و بلوطی به عنوان گونه خارجی است. در این درخت فیلوژنی افراد F₂₆، F₂₇، F₂₈ با نمونه‌های آسیایی با هم و سایر نمونه‌ها در کلاسه‌های دیگر قرار گرفته‌اند (شکل 4).



شکل 4: ترسیم درخت تبارشناختی بر اساس روش Bayesian بین نمونه‌های صید شده و نمونه‌های مربوط به بانک ژن (NCBI) با استفاده از قطعه 961 جفت بازی ژن سیتوکروم *b* ژنوم میتوکندریایی اردک سیاه‌کاکل (از اردک تاجدار و بلوطی به عنوان گونه خارجی استفاده شده است)



شکل 5: شبکه هاپلوتایپی اردک سیاه‌کاکل رسم شده با استفاده از الگوریتم median-joining در نرم افزار Network (رنگ زرد مربوط به نمونه‌های ایران، رنگ آبی برای نمونه‌های شرق آسیا و رنگ سبز برای نمونه اروپایی است)

با استفاده از توالی‌های بدست آمده از منطقه خلیج گرگان و نمونه‌های موجود در ژن بانک شبکه هاپلوتایپی توسط نرم افزار Network رسم گردید (شکل 5). در این شکل هاپلوتایپ 1 که شامل 5 فرد است، دارای بیشترین فراوانی بوده و احتمالاً قدیمی‌ترین توالی است. تنها نمونه اروپایی موجود در ژن بانک (رنگ سبز) به همراه پنج فرد از منطقه خلیج گرگان در این گره قرار گرفته‌اند. دو نمونه آسیایی نیز به همراه نمونه‌های F₂₆ و F₂₈ در یک گره دیده می‌شوند.



جدول 2: فاصله ژنتیکی (مثالث پایین) و انحراف استاندارد (مثالث بالا) بین نمونه‌های صیدشده در ایران و نمونه‌های موجود در بانک ژن NCBI (براساس مدل تاموراحی، با بوت استرپ 10000)

EU585624	NC 024595	KJ722069	F ₂₉	F ₂₈	F ₂₇	F ₂₆	F ₂₅	F ₂₃	F ₂₂	F ₂₁	F ₂₀	
0/000	0/001	0/001	0/001	0/001	0/001	0/001	0/000	0/000	0/000	0/000	-	F ₂₀
0/000	0/001	0/001	0/001	0/001	0/001	0/001	0/000	0/000	0/000	-	0/000	F ₂₁
0/000	0/001	0/001	0/001	0/001	0/001	0/001	0/000	0/000	-	0/000	0/000	F ₂₂
0/000	0/001	0/001	0/001	0/001	0/001	0/001	0/000	-	0/000	0/000	0/000	F ₂₃
0/000	0/001	0/001	0/001	0/001	0/001	0/001	-	0/000	0/000	0/000	0/000	F ₂₅
0/001	0/000	0/000	0/001	0/000	0/001	-	0/001	0/001	0/001	0/001	0/001	F ₂₆
0/001	0/001	0/001	0/001	0/001	-	0/001	0/002	0/002	0/002	0/002	0/002	F ₂₇
0/001	0/000	0/000	0/001	-	0/001	0/000	0/001	0/001	0/001	0/001	0/001	F ₂₈
0/001	0/001	0/001	-	0/002	0/001	0/002	0/001	0/001	0/001	0/001	0/001	F ₂₉
0/001	0/000	-	0/002	0/000	0/001	0/000	0/001	0/001	0/001	0/001	0/001	KJ722069 ^a
0/001	-	0/000	0/002	0/000	0/001	0/000	0/001	0/001	0/001	0/001	0/001	NC 024595 ^a
-	0/001	0/001	0/001	0/001	0/002	0/001	0/000	0/000	0/000	0/000	0/000	EU585624 ^b

^a نمونه آسیا، ^b نمونه اروپا

بحث

ژن میتوکندری برای ردیابی تاریخچه جمعیت‌ها و به‌ویژه تخمین مهاجرت و جریان ژن بسیار مناسب است (Avice, 1994). در پژوهش حاضر، ژن سیتوکروم *b* ژنوم میتوکندری برای تحلیل ژنتیکی جمعیت خلیج گرگان اردک سیاه‌کاکل، همچنین ردیابی مسیر مهاجرت آن‌ها مورد استفاده قرار گرفت. در شبکه هاپلوتایپی رسم شده پنج فرد با نمونه اروپایی موجود در بانک ژن، و دو فرد با نمونه‌های آسیایی موجود در بانک در یک گره قرار گرفته‌اند. در درخت تبارشناختی رسم شده بین افراد صید شده در ایران و نمونه‌های بانک ژن، توالی‌های مربوط به شرق آسیا با سه توالی متعلق به ایران در یک کلاذ قرار گرفته‌اند. با توجه به این نتایج، احتمال مهاجرت اردک سیاه‌کاکل از منطقه شرق آسیا به ایران وجود دارد، البته بیان دقیق‌تر این موضوع نیاز به مطالعات بیشتر دارد. در صورت اثبات، این موضوع نشان‌دهنده این است، که در ایران طیف وسیعی از جمعیت‌های مختلف، از مناطق مختلف، عبور یا زمستان‌گذرانی کرده، و در ایران جمعیت‌ها فرصت اختلاط با جمعیت‌های دیگر را پیدا می‌کنند. در نتیجه‌ی این اختلاط، بعضی از افراد با جمعیتی به‌غیر از جمعیت خود به محل جوجه‌آوری باز می‌گردند و این موضوع باعث افزایش تنوع ژنتیکی از طریق ورود ذخایر ژنی جدید به جمعیت و کاهش اثرات درون آمیزی می‌شود (Liu و همکاران، 2012). فاصله کم ژنتیکی بین نمونه‌ها و وجود هاپلوتایپ‌های مشترک نیز مهاجرت احتمالی این پرندگان از شرق آسیا به ایران را تأیید می‌کند. بر اساس نتایج HE و همکاران (2006) وقتی میزان F_{st} کمتر از 0/33 باشد، نشان‌دهنده جریان ژنی بالا در بین جمعیت‌ها است، که این موضوع بر اساس نتایج نرخ جریان ژنی (Nm) نیز تأیید می‌شود، نتایج پژوهش حاضر نیز نشان داد که جریان ژن با توجه به نمونه‌ها بررسی‌شده بین سه جمعیت ایران، شرق آسیا و اروپا بالا است. با توجه به فاصله بسیار کم ژنی بین این جمعیت‌ها جدا شدن آن‌ها در سطح

زیرگونه اتفاق نیفتاده و تفاوت‌های آن‌ها در سطح جمعیت‌ها مختلف مشاهده می‌شود.

شاخص‌های تاجیما و F_{st} نیز وجود گسترش ناگهانی جمعیت در گذشته را نشان دادند، اما از لحاظ آماری معنی‌دار نبودند، توزیع عدم تطابق¹ براساس شاخص راجرز و هارپندینگ به‌صورت تک نمایی بود که نشان‌دهنده گسترش ناگهانی جمعیت در گذشته است (Rogers و Harpending, 1992) و نتیجه به‌دست آمده از دو شاخص دیگر را تأیید می‌کند. برای دست یافتن به نتیجه دقیق‌تر باید از جمعیت‌ها دیگر این گونه نمونه‌برداری انجام‌شده و بررسی گردد. هرچند که شاخص F_{st} و تاجیما شاخص‌های قوی‌تری نسبت به توزیع عدم تطابق، برای پی‌بردن به شرایط گذشته جمعیت‌ها می‌باشند (Rozas و Ramos-Onsins, 2002).

در درخت تبارشناختی مربوط به گونه‌های مختلف اردک‌های غواص موجود در ایران نتایج مشابه نتایج Gonzalez و همکاران (2009) به‌دست آمده است که دو شاخه کاملاً مجزا (Aythyini و Mergini) تشکیل شده است. در این درخت اردک سرسیاه نزدیک‌ترین گونه به اردک سیاه‌کاکل قرار گرفته که این موضوع نیز با نتایج Gonzalez و همکاران (2009) مشابه است.

بر اساس 9 نمونه مورد بررسی از اردک سیاه‌کاکل زیر جمعیت موجود در خلیج گرگان به‌عنوان نماینده زیرجمعیت دریای کاسپین که به عنوان یکی از 4 زیرجمعیت اصلی این گونه معرفی شده است (Baumanis و Blums, 1990)، 4 هاپلوتایپ در منطقه شناسایی شد که براساس این نتایج، این نمونه‌های مورد مطالعه از دو زیر جمعیت جغرافیایی اصلی دیگر این گونه یعنی شرق آسیا و اروپای مرکزی و آفریقای زبیدی ندارد، تفاوت ژنتیکی بسیار کم و جریانی ژنی بالایی بین این سه زیر جمعیت جغرافیایی برقرار است. بررسی‌های تفاوت ژنتیکی بر اساس F_{st} نیز این موضوع را تأیید می‌کند. بنابراین باید برای منطقه مورد مطالعه که ایستگاه مهمی در زمستان‌گذرانی و



9. **BirdLife International., 2015.** *Aythya fuligula*. The IUCN Red List of Threatened Species 2015: e.T22680391A67187805.
http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T22680391A67187805. En. Downloaded on 01 December 2015.
10. **Blums, P. and Baumanis, J., 1990.** Migration and geographical distribution of pochard and tufted duck populations in the USSR. *Baltic Birds*. Vol. 5, pp: 49–57.
11. **Bregnballe, T.; Noer, H.; Christensen, T.K.; Clausen, P.; Asferg, T.; Fox, A.D. and Delany, S., 2006.** Sustainable hunting of migratory waterbirds: the Danish approach. *Waterbirds around the world*. The Stationary Office. Edinburgh. UK. pp: 854-860.
12. **de Leeuw, J.J.; van Eerden, M.R. and Visser, H.G., 1999.** Wintering Tufted Duck diving for Zebra Mussels *Dreissena polymorpha* balance feeding costs within narrow margins of their energy budget. *Journal of Avian Biology*. Vol. 30, pp: 182–192.
13. **Del Hoyo, J.; Elliot, A. and Sargatal, J., 1992.** Handbook of the birds of the world, Vol. 1: Ostrich to Ducks. Lynx Edicions, Barcelona, Spain.
14. **Evans, D.M. and Day, K.R., 2002.** Hunting disturbance on a large shallow lake: the effectiveness of waterfowl refuges. *Ibis*. Vol. 144, No. 1, pp: 2-8.
15. **Excoffier, L. and Lischer, H.E.L., 2010.** Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. Vol. 10, pp: 564-567.
16. **Felix, J. and Hisek, K., 2000.** Birds of Great Britain & Europe: A Bird Spotter's Guide. Caxton Editions. 47 p.
17. **Fu, Y.X., 1997.** Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*. Vol. 147, pp: 915–925.
18. **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: 310-318.
19. **Grishanov, D., 2006.** Conservation problems of migratory waterfowl and shorebirds and their habitats in the Kaliningrad region of Russia. *Waterbirds around the world*. The Stationary Office. Edinburgh. U.K. 356 p.
20. **Gudmundsson, F., 1979.** The past status and exploitation of the Myvatn waterfowl populations. *Oikos*. Vol. 32, No. 1-2, pp: 232-249.
21. **Haig, S.M.; Rhymer, J.M. and Heckel, D.G., 1994.** Population differentiation in randomly amplified polymorphic DNA of red-cockaded woodpeckers *Picoides borealis*. *Molecular Ecology*. Vol. 3, No. 6, pp: 581-595.
22. **He, H.; Yuan, X.; Wei, C. and Yuan, F., 2006.** Genetic variation of the Mmitochondrial ND4 region among geographical populations of *Sitodiplosis mosellana* (Gehin)

تجدیدقوای این گونه و به نوعی محل حضور همزمان سه زیرجمعیت جغرافیایی اصلی این گونه است، طرح‌های مدیریتی منسجمی طراحی و اجرا کرد تا حیات آینده این گونه با مشکل مواجه نشود.

هرچند که تنوع ژنتیکی به‌دست‌آمده از نتایج این پژوهش نسبتاً پایین است و تنوع هاپلوتایپی و نوکلئوتیدی رقم بالایی را نشان نمی‌دهد، اما برای نتیجه‌گیری مطمئن‌تر نیاز به بررسی‌های بیشتر روی تعداد بیشتری از افراد این‌گونه در ایران و نقاط مختلف جهان است.

با توجه به گزارش IUCN این گونه در گذشته نزدیک در ایران جوجه‌آوری می‌کرده، اما در حال حاضر گزارشی مبنی بر جوجه‌آوری آن در ایران در دست نیست؛ باید شرايطی را فراهم آورد (مثل مراقبت بیشتر از تالاب‌ها و کنترل شکار) تا دوباره شاهد جوجه‌آوری این گونه در کشور باشیم.

تشکر و قدردانی

نگارندگان بدین‌وسیله بر خود لازم می‌دانند، از جناب آقای مهندس قائمی و همکاران اداره کل حفاظت محیط‌زیست استان گلستان که در تهیه و جمع‌آوری نمونه‌ها کمال همکاری را داشتند، تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

1. **فیروز، ا.، 1390.** حیات‌وحش ایران. نشر دانشگاهی. تهران. 491 صفحه.
2. **حسن‌زاده‌کیایی، ب.؛ قائمی، ر. و عبدلی، ا.، 1378.** اکوسیستم‌های تالابی و رودخانه‌ای استان گلستان. اداره کل حفاظت محیط‌زیست استان گلستان. 182 صفحه.
3. **Arguedas, N. and Parker, P.G., 2000.** Seasonal migration and genetic population structure in house wrens. *The Condor*. Vol. 102, No. 3, pp: 517-528.
4. **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.
5. **Awise, 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.
6. **Awise, 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: 489-522.
7. **Balmaki, B. and Barati, A., 2006.** Harvesting status of migratory waterfowl in northern Iran: a case study from Gilan Province. *Waterbirds around the world*. The Stationary Office. Edinburgh. UK. pp: 868-869.
8. **Bandelt, H.J.; Forster, P. and Röhl, A., 1999.** Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution*. Vol. 16, No. 1, pp: 37-48.



34. Moazeni, S.; Mohammadabadi, M.R.; Sadeghi, M.; Shahrababak, H.; Koshkoie, 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.
35. 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.
36. 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.
37. Nei, M. and Kumar S., 2000. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press, New York.
38. 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.
39. 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.
40. Ronquist, F.; Teslenko, M.; van der Mark, P.; Ayres, D.L.; Darling, A.; Höhna, S.; Larget, B.; Liu, L.; Suchard, M.A. and Huelsenbeck, J.P., 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Systematic biology. Vol. 61, No. 3, pp: 539-542.
41. Shojaei, M.; Mohammadabadi, M.R.; Foz, M.A.; Dayani, O.; Khezri, A. and Akhondi, M., 2010. Association of growth trait and Leptin gene polymorphism in Kermani sheep. Journal of Cell and Molecular Research. Vol. 2, pp: 67-73.
42. Sorrenti, M.; Carnacina, L.; Radice, D. and Costato, A., 2006. Duck harvest in the Po delta, Italy. Waterbirds around the world. The Stationary Office. Edinburgh. U.K. pp: 864-865.
43. Tajima F., 1989. Statistical-method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics. Vol. 123, pp: 585-595.
44. Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M. and Kumar S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution. Vol. 28, pp: 2731-2739.
45. Tamura, K. and Nei, M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. (Diptera: Cecidomyiidae) in China. Journal of Kansas Entomology Society. Vol.79, pp: 211-222.
23. Hofer, J.; Korner-Nievergelt, F.; Korner-Nievergelt, P.; Kestenholz, M. and Jenni, L., 2005. Herkunft und Zugverhalten von in der Schweiz u"berwinternden Reiherenten *Aythya fuligula*: eine Ringfundanalyse. Ornithol Beobacht. Vol. 102, pp: 181-204.
24. Hurst, G.D.D. and Jiggins, F.M., 2005. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, 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.
25. 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. 2, pp: 236-243.
26. Johnson, K.P. and Sorenson, M.D., 1998. Comparing molecular evolution in two mitochondrial protein coding genes (cytochrome *b* and ND2) in the dabbling ducks (Tribe: Anatini). Molecular phylogenetics and evolution. Vol. 10, No. 1, pp: 82-94.
27. Kear, J., 2005. Ducks, geese and swans volume 2: species accounts (Cairina to Mergus). Oxford University Press, Oxford, U.K. pp: 671-675.
28. Keller, I.; Korner-Nievergelt, F. and Jenni, L., 2009. Within-winter movements: a common phenomenon in the Common Pochard *Aythya ferina*. Journal of Ornithology. Vol. 150, No. 2, pp: 483-494.
29. Kocher, T.D.; Thomas, W.K.; Meyer, A.; Edwards, S.V.; Pääbo, S.; Villablanca, F.X. and Wilson, A.C., 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. Proceedings of the National Academy of Sciences. Vol. 86, No. 16, pp: 6196-6200.
30. Librado, P. and Rozas, J., 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics. Vol. 25, No. 11, pp: 1451-1452.
31. 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.
32. Marsden, S.J., 2000. Impact of disturbance on waterfowl wintering in a UK Dockland redevelopment area. Environmental Management. Vol. 26, No. 2, pp: 207-213.
33. Melville, D.S. and Shortridge, K.F., 2006. Migratory waterbirds and avian influenza in the East Asian-Australasian Flyway with particular reference to the 2003-2004 H5N1 outbreak. Waterbirds around the world. The Stationary Office. Edinburgh. UK. pp: 432-438.



47. **Zardoya, R. and Meyer, A., 1996.** Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving relationships among vertebrates. *Molecular biology and evolution*. Vol. 13, No. 7, pp: 933-942.
48. **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.
- Molecular biology and evolution. Vol. 10, No. 3, pp: 512-526.
46. **Tubelyte, V.; Švažas, S.; Sruoga, A.; Butkauskas, D.; Paulauskas, A.; Baublys, V.; Viksne, J.; Grishanov, G. and Kozulin, A., 2011.** Genetic diversity of tufted ducks (*Aythya fuligula*, Anatidae) in Eastern Europe. *Central European Journal of Biology*. Vol. 6, No. 6, pp: 1044-1053.

