

روابط فیلوژنتیکی گربه وحشی (*Felis lybica/Felis silvestris*) در ایران با استفاده از ژن میتوکندریایی NADH5 و امکان سنجی شناسایی گربه وحشی آسیایی (*F. lybica ornata*) به وسیله این نشانگر

- سیده مرصیه موسوی: گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- حمیدرضا رضایی*: گروه محیط زیست، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
- سعید نادری: گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۸

چکیده

گربه وحشی (*Felis lybica/Felis silvestris*) یکی از گربه سانانی است که پراکنش گسترده‌ای در بین خانواده گربه سانان دارد و دارای تهدیدی بالقوه، متمایز از سایر گربه سانان یعنی اختلاط با گربه اهلی است. ایران در محل تلاقی حوزه پراکنش دو گونه متفاوت از گربه وحشی یعنی *Felis silvestris* و *Felis lybica* واقع شده است، اما اطلاعاتی از وضعیت تاکسونومیک و هیبریداسیون گربه وحشی در ایران وجود ندارد. در مطالعه حاضر ۸۱۴ جفت باز از قطعه NADH5 از ژنوم میتوکندری برای ۳۸ نمونه گربه وحشی که از سطح زیستگاه‌های این گونه در ایران جمع‌آوری شده بود به منظور ارزیابی روابط تبارشناختی و تنوع ژنتیکی این گونه، توالی‌یابی شد. تحلیل‌های تبارشناسی، گربه وحشی را در ایران به دو زیرکلاسه تقسیم کرد. اما توالی‌های ایران در ترکیب با توالی‌های جهانی گربه وحشی (۳۲ توالی) کلاسه جداگانه‌ای تشکیل ندادند و در بین زیرکلاسه‌های گربه وحشی آسیایی (*ornata*) و گربه وحشی آفریقایی / اهلی (*lybica/catus*) قرار گرفتند. زیرکلاسه‌های ایران براساس آماره F_{st} (۰/۶۶) اختلاف معنی‌دار نشان دادند. ۱۲ هاپلوتایپ در دو موقعیت جغرافیایی مجزا در غرب و شرق رشته کوه زاگرس شناسایی شدند که در برخی مناطق با یکدیگر هم‌پوشانی داشتند. باز G در جایگاه شماره ۱۳۷۷۶ در ژن ND5 امکان شناسایی گربه وحشی آسیایی (*F. l. ornata*) را فراهم می‌کند که در مطالعه حاضر، ۲۴ نمونه از بین ۳۸ نمونه گربه وحشی در ارزیابی اولیه، به‌عنوان گربه وحشی آسیایی شناسایی شدند که نتیجه به‌دست آمده منطبق با درخت تبارشناسی ترسیم شده با استفاده از استنتاج بیزین بود. ضمن این‌که زیرکلاسه گربه وحشی آسیایی تنوع ژنتیکی بالاتری را نسبت به زیرکلاسه آفریقایی نشان داد.

کلمات کلیدی: ژنوم میتوکندری، ژن NADH5، باز G، گربه وحشی آسیایی، هیبریداسیون



مقدمه

رنگ پوشش و علائم روی بدن به طور مشخص قابل تفکیک هستند (Randi و Possenti، ۱۹۹۶؛ Kitchener و همکاران، ۲۰۰۵). گربه وحشی پراکنش گسترده‌ای در ایران دارد (Ghoddousi و همکاران، ۲۰۱۶؛ موسوی و همکاران، ۱۳۹۷) و صرفاً براساس شکل خز که یکی از ویژگی‌های مورفولوژی محسوب می‌شود به گربه وحشی آسیایی تعلق دارد (Nowell و Jackson، ۱۹۹۶؛ Ghoddousi و همکاران، ۲۰۱۶). اما استفاده از مشخصات فنوتیپ مانند الگوی خز، اندازه بدن و رنگ بدن، به تنهایی، نشان داده است رویکرد مناسبی برای شناسایی گونه نیست و رویکردهای مورفولوژی با به‌کارگیری کلیه معیارهای تعیین شده برای این رویکرد، در ترکیب با نشانگرهای مولکولی در کنار یکدیگر ابزار مناسبی برای شناسایی گربه وحشی، اهلی و هیبرید از یکدیگر هستند (O'Brien و همکاران، ۲۰۰۹؛ Senn و همکاران، ۲۰۱۸). گربه وحشی اروپایی و گربه اهلی در کشورهای اروپایی مورد مطالعات جامع مورفولوژی قرار گرفتند و معیارهایی مورفولوژی (۲۰ معیار) مانند شکل نوک دم، طول خط پشتی، نوارهای پهلویی و اتصال یا انقطاع آن‌ها، شکل نوارهای روی پای عقب (متصل یا منقطع بودن نوارها)، حضور خال بر روی پهلوها یا زیر بدن و شکل نوارهای روی دم و ... در قالب پروتکل استخراج شده است و شناسایی گربه وحشی اروپایی، هیبرید و اهلی را در طبیعت امکان‌پذیر کرده است (Possenti و Ragni، ۱۹۹۶؛ Yamaguchi و همکاران، ۲۰۰۴؛ Kitchener و همکاران، ۲۰۰۵؛ Devillard و همکاران، ۲۰۱۳). استفاده از ویژگی‌های آناتومی مانند مورفومتری جمجمه و روده در کنار مشخصات مورفولوژی مانند الگوی خز، رنگ پوشش و اندازه بدن، قدرت شناسایی را افزایش می‌دهد (Possenti و Ragni، ۱۹۹۶؛ Devillard و همکاران، ۲۰۱۳). اما سختی کار تفکیک گونه‌ها از روی مورفولوژی بیش‌تر زمانی است که هدف تفکیک نمونه‌های هیبرید از نمونه‌های وحشی، اهلی یا فرال است (Devillard و همکاران، ۲۰۱۳). اگرچه توالی‌های سیتوکروم b و ناحیه کنترل (D-loop) به دلیل تغییراتی که در آن‌ها مشاهده می‌شود، به صورت گسترده برای تعیین روابط فیلوژنتیک به‌ویژه در پستانداران استفاده می‌شوند به دلیل این‌که این ژن‌ها تحت تاثیر نیروهای تکاملی قرار دارند (اسدی و همکاران، ۱۳۹۲). اما قطعه ND5 از ژنوم میتوکندری هم نرخ جهش‌پذیری نسبتاً بالایی در گوشت‌خواران دارد (Lopez و همکاران، ۱۹۹۷) و مطالعات مشابهی بر روی گربه وحشی، با استفاده از این ژن صورت گرفته است و لذا در مطالعه حاضر از این ژن برای ارزیابی ساختار و تنوع ژنتیکی گربه وحشی استفاده شد. ضمن این‌که ژن ND5، حاوی اطلاعاتی در خصوص تفکیک زیرگونه آسیایی گربه وحشی (*F. l. ornata*) است. در مطالعه Driscoll و همکاران (۲۰۰۷) یکی از رویکردهای تفکیک زیرگونه‌های گربه وحشی استفاده از ژنوم میتوکندری و قطعات ND5-ND6-CYTB برای ارزیابی اولیه

گربه وحشی یکی از گربه‌سانانی است که پراکنش گسترده‌ای در بین خانواده گربه‌سانان در جهان دارد (Macdonald و Loveridge، ۲۰۱۰). براساس آخرین بازنگری تاکسونومیک گربه‌سانان، تغییراتی در نام‌گذاری زیرگونه‌های گربه وحشی اعمال شده است (Kitchener و همکاران، ۲۰۱۷). گربه وحشی اروپایی به دوزیرگونه *F. s. caucasica* و *F. s. silvestris* تقسیم شده است و گربه وحشی آفریقایی نیز به سه زیرگونه *F. lybica ornata*، *F. lybica cafra* و *F. lybica lybica* تقسیم‌بندی شده است. گربه وحشی در بین گونه‌های گربه‌سانان علاوه بر عوامل انسانی و تهدیداتی مانند تخریب زیستگاه و شکار غیرمجاز، به دلیل وقوع هیبریداسیون با گربه اهلی در خطر است، به دلیل گسترش پراکنش گربه اهلی و هم‌پوشانی کامل زیستگاهی با گربه وحشی، هیبریداسیون، اتفاق معمول و فراگیری بین این تاکسون‌ها است که تهدیدکننده خلوص ژنتیکی گربه وحشی است (Daniels و همکاران، ۲۰۰۱؛ Pierpaoli و همکاران، ۲۰۰۳؛ Kitchener و همکاران، ۲۰۰۵؛ Driscoll و همکاران، ۲۰۰۷؛ O'Brien و همکاران، ۲۰۰۹؛ Say و همکاران، ۲۰۱۲؛ Driscoll و همکاران، ۲۰۱۱). براساس اطلاعات باستان‌شناسی گربه اهلی (*F. catus*) بیش از ۱۰۰۰۰ سال قبل از گربه وحشی در منطقه‌ای به نام هلال حاصل‌خیز (Fertile Crescent) که زیستگاه امروزی گربه وحشی آفریقایی (Near East) (*F. lybica lybica*) بوده و اولین تمدن‌های انسانی در آن‌جا شکل گرفته، جدا شده است (Daniels و همکاران، ۲۰۰۱؛ Pierpaoli و همکاران، ۲۰۰۳؛ Kitchener و همکاران، ۲۰۰۵؛ Yamaguchi و همکاران، ۲۰۰۴؛ Driscoll و همکاران، ۲۰۰۷؛ O'Brien و همکاران، ۲۰۰۹؛ Say و همکاران، ۲۰۱۲؛ Ottoni و همکاران، ۲۰۱۷). از این‌رو به دلیل شباهت ظاهری فراوان بین این دو تاکسون، دشواری‌هایی در تفکیک گربه وحشی از گربه اهلی به وسیله صفات مورفولوژی پیش‌روی برنامه‌ریزان حفاظت است که در نتیجه آن، حفاظت از گربه وحشی بر خلاف سایر گربه‌سانان با چالش‌هایی مواجه بوده است (Kitchener و همکاران، ۲۰۰۵؛ Kilshaw و همکاران، ۲۰۱۴). این یک واقعیت است که برخلاف سایرگونه‌های اهلی که انسان در اهلی شدن آن‌ها نقش داشته است، گربه وحشی همراه با انسان اهلی شده است نه به‌سیله انسان و این واقعیت پیچیدگی‌های مطالعه بر روی این گونه را افزایش داده است (Driscoll و همکاران، ۲۰۰۷). گربه وحشی دارای تنوع مورفولوژیکی در حوزه پراکنش خود است (Nowell و Jackson، ۱۹۹۶؛ Sunquist و Sunquist، ۲۰۱۴). این تنوع مورفولوژیکی، نشان‌دهنده وجود مخازن ژنی مجزا در گربه وحشی است (Randi و همکاران، ۲۰۰۱). گربه وحشی اروپایی، آسیایی، آفریقایی و گربه اهلی به وسیله مشخصات ژنتیکی،



که به عنوان برون گروه در آنالیزهای رسم درخت تبارشناسی از آن‌ها استفاده شد. یک نمونه گربه اهلی نیز در این مطالعه به دست آمده که از همان ابتدا بر اساس فرم غیر معمول خز (Kitchener و همکاران، ۲۰۰۵)، به عنوان گربه اهلی شناسایی شد و در رسم درخت تبارشناسی از آن استفاده شد. نمونه‌های بافت تا زمان استخراج DNA، در اتانول ۹۶ درصد نگهداری شدند. برای استخراج DNA از نمونه‌های بافت، از کیت DynaBio متعلق به شرکت تکاپوزیست و دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. ترکیب مواد به کار رفته در واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر از مسترمیکس‌های با غلظت ۱/۵ میلی‌مولار MgCl₂ ساخت شرکت امپلیکن دانمارک، ۰/۳۷۵ میکرو لیتر از هریک از آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت پنج پیکومول، ۲/۵ میکرولیتر DNA با غلظت (۱۵۰-۲۰ نانوگرم بر میکرولیتر) و ۹/۲۵ میکرولیتر آب مقطر استفاده شد. در هنگام آماده‌سازی نمونه‌ها برای واکنش PCR یک میکروتیوب به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شد. قطعه مورد نظر از ژن ND5 با استفاده از یک جفت آغازگر زیر تکثیر شد (Driscoll و همکاران، ۲۰۰۷):

F2B: 5'-TGCCGCCCTACAAGCAAT-3'
R3B: 5'-TAAGAGACGTTTAATGGAGTTGAT-3'

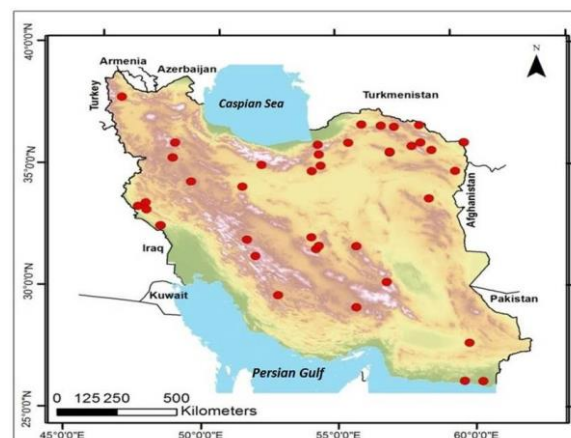
واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز برای تکثیر قطعه ژن ND5 در ۳۵ چرخه، با وسرشت اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد در سه دقیقه، و وسرشت ۹۴ درجه سانتی‌گراد در یک دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، گسترش زنجیره در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و در نهایت گسترش نهایی زنجیره در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ دقیقه اجرا شد (Tamada و همکاران، ۲۰۰۵). برای بررسی کیفیت محصول به دست آمده و تأیید تکثیر قطعه مورد نظر از ژل آگارز یک درصد و با رنگ‌آمیزی Gel Red™ (ساخت شرکت Biotium) در الکتروفورز افقی، با ولتاژ ۸۰ و به مدت ۵۰ دقیقه استفاده شد. در نهایت تصاویر مربوط به ژل‌ها با استفاده از دستگاه مستندساز ژل و با استفاده از نور UV ثبت شد. پس از آن محصول PCR تا زمان ارسال برای توالی‌یابی در دمای ۲۰- درجه نگهداری شدند. مقدار ۲۰ میکرولیتر از محصولات PCR به همراه مقدار مورد نیاز هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت با غلظت پنج پیکومول به منظور تعیین توالی به شرکت Bioneer کره جنوبی (سنول) ارسال شدند. مراحل تخلیص توسط خود شرکت انجام شد و نمونه‌ها با استفاده از دستگاه XLABI 3730 به روش اتوماتیک سانگر توالی‌یابی شدند. از ابزار BLAST در پایگاه NCBI جهت تعیین همولوژی توالی‌ها استفاده گردید. توالی‌های دریافت شده توسط نرم‌افزار (Applied Biosystems) SeqScape 2.6 بررسی و خطاهای موجود اصلاح گردید و ویرایش نوکلئوتیدی توالی‌ها به وسیله این نرم‌افزار انجام شد. ردیف‌یابی توالی‌ها

از کارایی این قطعات در تفکیک زیرگونه‌های گربه وحشی بوده است. در این مطالعه که اولین مطالعه مولکولی گربه وحشی در ایران است و مطالعه‌ای مقدماتی در خصوص جایگاه فیلوژنتیکی گربه وحشی است، با استفاده از قطعه NADH5 از ژنوم میتوکندری روابط تبارشناسی گربه وحشی و ارتباط آن با سایر زیرگونه‌های گربه وحشی در جهان، هم‌چنین تنوع ژنتیکی گربه وحشی در ایران مورد ارزیابی قرار گرفت. اعتبارسنجی ژن ND5 در شناسایی گربه وحشی آسیایی (*F.l.ornata*) در جایگاه ۱۳۷۷۶ (باز G) نیز مورد آزمون واقع شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و استخراج DNA: برای انجام این مطالعه ۳۸

نمونه از بافت نمونه‌های مشکوک به گربه وحشی در بازه زمانی ۹۶-۱۳۹۴ از مناطق حوزه پراکنش این گونه در سراسر کشور از داخل مناطق تحت مدیریت سازمان حفاظت محیط زیست یا حاشیه مناطق تحت مدیریت، جمع‌آوری شد. شکل ۱، موقعیت جغرافیایی نمونه‌های برداشت شده را نشان می‌دهد.



شکل ۱: نقاط نمونه‌برداری از گربه وحشی در پژوهش حاضر

نمونه‌های بافت از لاشه‌های مشاهده شده از گربه وحشی که به دلایل متفاوت از جمله تصادف جاده‌ای از بین رفته بودند، به دست آمدند. در مواردی گربه‌هایی که در روستاهای حاشیه مناطق به مرغداری‌ها حمله کرده بودند و یا دچار صدمه شده بودند و توسط مردم بومی یا محیط‌بانان در تله، گیر افتاده بودند، از لاله گوش آن‌ها به مقدار ناچیزی نمونه بافت برداشته شد و بعد از نمونه‌برداری، گربه‌ها رهاسازی شدند. هم‌چنین نمونه‌های بافت گربه وحشی، موجود در بانک ژن دفتر موزه تاریخ طبیعی و ذخایر ژنتیک سازمان حفاظت محیط زیست، نیز برای این مطالعه استفاده شدند. هم‌چنین دو نمونه گربه جنگلی از استان ایلام و استان اردبیل در این مطالعه توالی‌یابی شدند



با استفاده از (Thompson و همکاران، ۱۹۹۴) ClustalW در نرم‌افزار MEGA 6 (Tamura و همکاران، ۲۰۱۳) انجام شد.

آنالیزهای فیلوژنتیکی: درخت تبارشناسی با استفاده از ۳۸

توالی مشکوک به گربه وحشی از ایران، ۳۲ توالی جهانی گربه وحشی که از بانک ژن استخراج شدند شامل گربه وحشی اروپایی (*F. silvestris*)، گربه وحشی آسیایی (*F. l. ornata*)، گربه وحشی آفریقایی (*F. l. lybica*)، گربه وحشی جنوب آفریقا (*F. l. cafra*) و گربه اهلی (*F. catus*) (جدول ۱) ترسیم شد. درخت تبارشناسی با استفاده از تحلیل بیزین با استفاده از نرم‌افزار MrBayes 3.2.2 (Huelsenbeck و Ronquist، ۲۰۰۳)، براساس چرخه زنجیره مارکوف (MCMC) با چهار اجرای هم‌زمان و تعداد ۲۰ میلیون تکرار اجرا شد. نمونه‌برداری‌ها در هر ۱۰۰ تکرار انجام و برای دستیابی به بهترین درخت از قانون اکثریت استفاده شد. در رسم درخت تبارشناسی، از توالی‌های گربه جنگلی ایران که در این مطالعه به دست آمدند به عنوان برون‌گروه استفاده شد. برای تعیین بهترین مدل تکاملی نوکلئوتیدی برای قطعات مختلف با معیار

بیزین (BIC) از نرم‌افزار Jmodel test (Posada، ۲۰۰۸) استفاده شد، بهترین مدل تکاملی برای دسته داده‌های موجود شامل توالی‌های ایران و ۳۲ توالی جهانی گربه وحشی مدل HKY+I به دست آمد که در رسم درخت بیزین از آن استفاده شد. علاوه بر این، روابط تبارشناسی بین هاپلو تایپ‌ها، براساس تحلیل اتصال میانه با استفاده از نرم‌افزار Network ۵.۰ (Bandelt و همکاران، ۱۹۹۹) انجام شد. تعداد هاپلو تایپ‌ها، جایگاه‌های چندریختی، تنوع هاپلو تایپی و تنوع نوکلئوتیدی در محیط نرم‌افزار DnaSP5.10 (Rozas و Librado، ۲۰۰۹) اجرا شد. سطوح ساختار جمعیتی براساس تحلیل واریانس مولکولی (AMOVA) و نمایه (Cockerham و Weir، ۱۹۸۴) F_{st} در نرم‌افزار Arlequin 3.5 (Lischer و Excoffier، ۲۰۱۰) با ۱۰۰۰۰ تکرار تعیین شد. هم‌چنین محاسبه جریان ژن (N_m) بین زیرکلادهای به دست آمده توالی‌های ایران در نرم‌افزار Arlequin 3.5 صورت گرفت. فاصله ژنتیکی بین زیرکلادهای به دست آمده گربه وحشی ایران، به وسیله مدل‌های Kimura2P و Jukes-Cantor با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6 محاسبه شد.

جدول ۱: توالی‌های استخراج شده از ژن بانک برای آنالیزهای تبارشناسی ژن ND5

ردیف	نام علمی گونه	شماره دسترسی در ژن بانک	ردیف	نام علمی گونه	شماره دسترسی در ژن بانک
۱	<i>F. l. cafra</i>	EF587016	۱۷	<i>F. silvestris</i>	EF587174
۲	<i>F. l. cafra</i>	EF587018	۱۸	<i>F. l. lybica</i>	MG813961
۳	<i>F. l. cafra</i>	EF587025	۱۹	<i>F. l. lybica</i>	MG813966
۴	<i>F. l. ornata</i>	EF587026	۲۰	<i>F. l. lybica</i>	MG813960
۵	<i>F. l. ornata</i>	EF587028	۲۱	<i>F. l. lybica</i>	MG813953
۶	<i>F. l. ornata</i>	EF587029	۲۲	<i>F. l. lybica</i>	MG813967
۷	<i>F. l. ornata</i>	EF587030	۲۳	<i>F. l. lybica</i>	KP202275
۸	<i>F. l. ornata</i>	EF587031	۲۴	<i>F. catus</i>	EF587099
۹	<i>F. l. ornata</i>	EF587032	۲۵	<i>F. catus</i>	EF587111
۱۰	<i>F. silvestris</i>	EF587155	۲۶	<i>F. catus</i>	EF587040
۱۱	<i>F. silvestris</i>	EF587167	۲۷	<i>F. catus</i>	EF587126
۱۲	<i>F. silvestris</i>	EF587169	۲۸	<i>F. catus</i>	EF587042
۱۳	<i>F. silvestris</i>	EF587170	۲۹	<i>F. catus</i>	EF587121
۱۴	<i>F. silvestris</i>	EF587171	۳۰	<i>F. catus</i>	EF587119
۱۵	<i>F. silvestris</i>	EF587172	۳۱	<i>F. catus</i>	EF587087
۱۶	<i>F. silvestris</i>	EF587173	۳۲	<i>F. catus</i>	EF587123

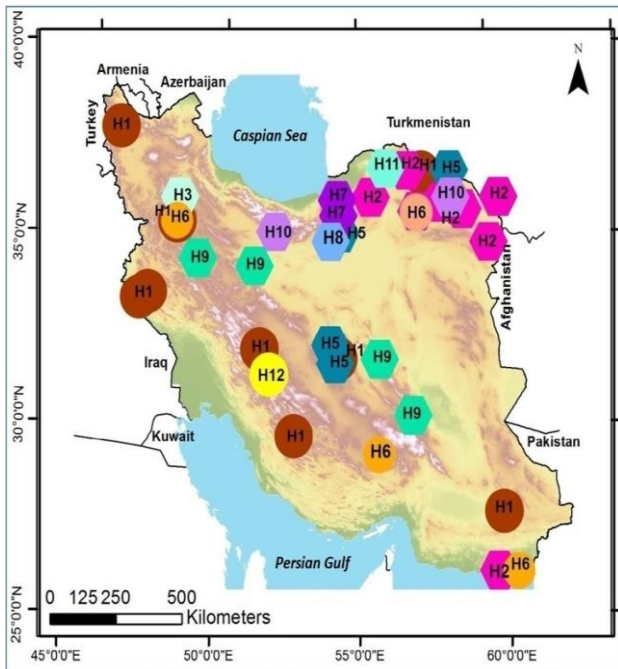
نتایج

۸۱۴ جفت باز از قطعه ND5 برای ۳۸ توالی مشکوک به گربه وحشی و یک توالی مشکوک به گربه اهلی به دست آمد. برای ۳۸ توالی مشکوک به گربه وحشی، در مجموع ۱۷ جایگاه پلی مورفیسم شناسایی شد که از بین آن‌ها ۴ جایگاه Singleton و ۱۳ جایگاه Parsimony

شناسایی شد. درخت تبارشناسی شامل ۳۹ توالی ایران (۳۸ توالی مشکوک به گربه وحشی و یک توالی مشکوک به گربه اهلی از خراسان جنوبی) به همراه توالی‌های جهانی گربه وحشی شامل گربه وحشی اروپایی (*F. silvestris*)، گربه وحشی آفریقایی (Near Eastern) (*F. l. lybica*)، گربه وحشی آسیایی (*F. l. ornata*)، گربه وحشی جنوب آفریقا (*F. l. cafra*) و توالی‌های جهانی گربه اهلی (*F. catus*) ترسیم شد. توالی‌های

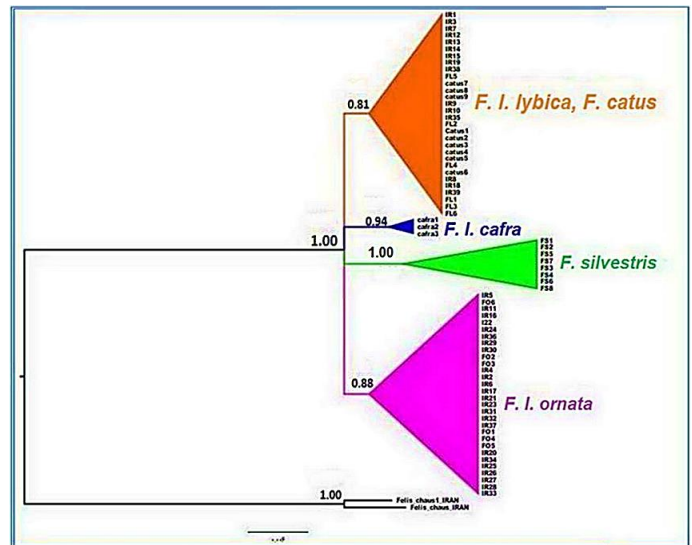


از آن جا که به دلیل واگرایی گربه اهلی از گربه وحشی آفریقایی (*F. l. lybica*)، ارتباط ژنتیکی نزدیکی بین گربه وحشی آفریقایی و گربه اهلی وجود دارد، توالی‌های جهانی گربه اهلی کلاد جداگانه‌ای تشکیل ندادند و در زیرکلاد توالی‌های جهانی گربه وحشی آفریقایی همراه با توالی‌های ایران (زیرکلاد آفریقایی) قرار گرفتند. تحلیل شبکه هاپلوتایپی براساس توالی ۸۱۴ جفت باز از ژن ND5، یافته‌های درخت تبارشناختی را تأیید می‌کند که نشان می‌دهد توالی‌های ایران به دو زیرکلاد تقسیم می‌شوند. ۳۸ توالی مشکوک به گربه وحشی ایران، ۱۲ هاپلوتایپ تشکیل دادند (شکل ۳). هاپلوتایپ شماره ۱ متعلق به زیرکلاد آفریقایی با ۹ فرد و هاپلوتایپ شماره ۲ متعلق به زیرکلاد آسیایی نیز با ۹ فرد، فراوان‌ترین هاپلوتایپ‌ها بودند. با توجه به نقشه پراکنش هاپلوتایپ‌ها مشاهده می‌شود پراکنش افراد در هاپلوگروپ شماره ۱ و ۲، در گستره وسیعی اتفاق افتاده است که به نظر می‌رسد این افراد، آلل‌های قدیمی‌تری هستند که محدوده پراکنش وسیعی دارند و حاملان این آلل‌ها فرصت بیشتری برای پراکنش داشته‌اند. وقوع هاپلوتایپ‌های زیرکلاد آفریقایی عمدتاً در نیمه غربی کشور و در غرب رشته کوه زاگرس و وقوع هاپلوتایپ‌های زیرکلاد آسیایی عمدتاً در نیمه شرقی و شمال شرق کشور و در شرق رشته کوه زاگرس است (شکل ۴).

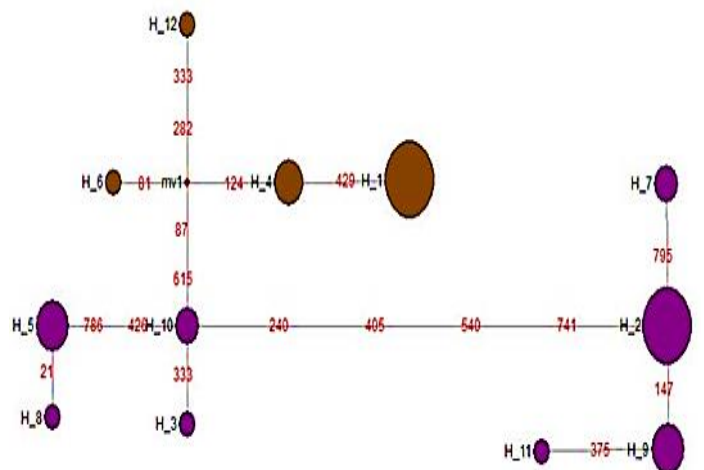


شکل ۴: موقعیت هاپلوتایپ‌های گربه وحشی بر اساس ۸۱۴ جفت باز از ژن ND5، شکل پلیگون نشان‌دهنده موقعیت هاپلوتایپ‌های زیرکلاد آسیایی (*ornata*) و شکل دایره نشان‌دهنده موقعیت هاپلوتایپ‌های زیرکلاد آفریقایی (*lybica*) است.

جهانی گربه وحشی (*F. catus*) به این دلیل وارد آنالیزها شدند تا موقعیت نمونه‌های احتمالی اهلی ایران که از روی خز شناسایی نشدند (به استثنای نمونه مشکوک به اهلی خراسان جنوبی)، مشخص شود. نتایج نشان دادند توالی‌های ایران در بین زیرکلادهای جهانی گربه وحشی آفریقایی و گربه اهلی و کلادهای جهانی گربه وحشی آسیایی قرار می‌گیرند و کلاد جداگانه‌ای تشکیل ندادند (شکل ۲).



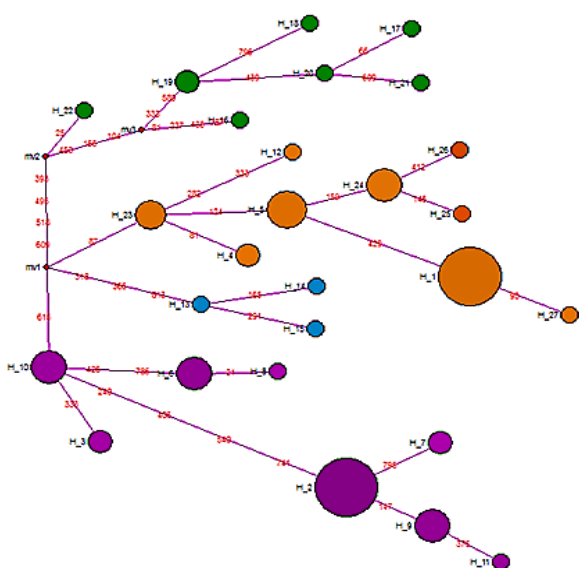
شکل ۲: روابط تبارشناختی بین گربه‌های وحشی ایران و گربه‌های وحشی جهان براساس ۸۱۴ جفت باز از ژن ND5، دو توالی گربه جنگلی (*Felis chaus*) از ایران نیز به عنوان برون گروه استفاده شدند. اعداد روی شاخه‌ها مقدار احتمال پسین را براساس احتمال بیشینه نشان می‌دهند، نمونه‌های ایران با IRN نشان داده شده‌اند.



شکل ۳: روابط تبارشناختی گربه‌های وحشی ایران براساس ۸۱۴ جفت باز از قطعه ND5، با استفاده از روش اتصال میانه، زیرکلاد آفریقایی با رنگ قهوه‌ای و زیرکلاد آسیایی با رنگ بنفش نشان داده شده‌اند.



(جدول ۳). درصد واریانس بین دو زیرکلاد آسیایی و آفریقایی گربه وحشی در ایران (۰/۶۶/۱۷) بیش‌تر از درصد واریانس درون گروه‌ها است (۰/۳۳/۸۳). هم‌چنین میزان $F_{ST} = ۰/۶۶$ به‌دست آمد. جریان ژن (Nm) بین دو زیرکلاد گربه وحشی ایران با استفاده از نرم‌افزار ۳.۵ Arlequin، ۰/۳ به‌دست آمد و میانگین فاصله ژنتیکی براساس ۸۱۴ جفت باز از ژن ND5 بین دو زیرکلاد آسیایی و آفریقایی گربه وحشی در ایران ۰/۰۰۹ به‌دست آمد.



شکل ۵: روابط تبارشناختی گربه‌های وحشی ایران و توالی‌های جهانی گربه وحشی و گربه اهلی با استفاده از روش اتصال میانه بر اساس قطعه ۸۱۴ جفت باز از ژن ND5. در شبکه هاپلوتایپی فوق، هاپلوتایپ‌های زیرگونه اروپایی (*F. silvestris*) با رنگ سبز، زیرگونه آفریقایی / اهلی (*F. lybica lybica*, *F. catus*) با رنگ قهوه‌ای، زیرگونه جنوب آفریقا (*F. l. cafra*) با رنگ آبی و هاپلوتایپ‌های زیرگونه آسیایی (*F. l. ornata*) با رنگ بنفش مشخص شده‌اند.

جدول ۲: تحلیل‌های ژنتیکی گربه وحشی براساس ۸۱۴ جفت باز از ژن ND5

نام زیرکلاد	n	h	Hd (SD)	Pi (SD)	K	P
زیرکلاد آفریقایی	۱۴	۴	۰/۵۷ (۰/۱۳۲)	۰/۰۰۱۴۶ (۰/۰۰۰۵۳)	۱/۲	۵
زیرکلاد آسیایی	۲۴	۸	۰/۸۲ (۰/۰۵۸)	۰/۰۰۴۰۵ (۰/۰۰۰۵۵)	۳/۳	۱۱
کل نمونه‌ها	۳۸	۱۲	۰/۸۳ (۰/۰۳۱)	۰/۰۰۶۰۱ (۰/۰۰۰۲۶)	۴/۹	۱۶

n تعداد افراد، h تعداد هاپلوتایپ‌ها، Hd تنوع هاپلوتایپی، SD انحراف معیار، Pi تنوع نوکلئوتیدی، K میانگین تفاوت‌های نوکلئوتیدی، P سایت‌های پلی‌مورفیسم.

باتوجه به نقشه پراکنش هاپلوتایپ‌ها (شکل ۴) مشاهده می‌شود در برخی مناطق، این هاپلوتایپ‌ها باهم هم‌پوشانی دارند که البته احتمال اهلی بودن یا هیبرید بودن این نمونه‌ها دور از انتظار نیست. هم‌چنین با استفاده از توالی‌های جهانی گربه وحشی، شبکه هاپلوتایپی دیگری رسم شد (شکل ۵). ۲۷ هاپلوتایپ در این شبکه هاپلوتایپی متشکل از ۳۹ نمونه ایران (یک فرد مشکوک به گربه اهلی از استان خراسان جنوبی نیز منظور شد) و ۳۲ توالی جهانی گربه وحشی و گربه اهلی به‌دست آمد. نمونه مشکوک به گربه اهلی در این مطالعه، با هیچ‌کدام از توالی‌های جهانی آفریقایی / اهلی هاپلوتایپ مشترکی تشکیل نداد و تنها با نمونه دیگری از استان خراسان رضوی (سبزوار) (در زیرکلاد آفریقایی / اهلی)، در یک هاپلوگروپ قرار گرفت. در هاپلوتایپ شماره ۱، یک فرد از توالی جهانی گربه وحشی آفریقایی و دو فرد از توالی‌های گربه اهلی از کشور فرانسه و انگلستان، به‌همراه ۹ فرد از توالی‌های ایران جای گرفتند. در هاپلوتایپ شماره ۲ نیز سه فرد از توالی‌های جهانی گربه وحشی آسیایی از کشور ترکمنستان و قزاقستان به‌همراه ۹ فرد از توالی‌های ایران قرار دارند. توالی گربه وحشی آسیایی از زنجان (پناهگاه حیات وحش انگوران) با یک توالی از زیرگونه آسیایی از کشور مغولستان، هاپلوتایپ شماره ۳ را تشکیل دادند. هاپلوتایپ شماره ۵، نیز شامل پنج فرد شد که سه فرد از توالی‌های ایران، یک فرد از توالی جهانی گربه وحشی آفریقایی و یک فرد از توالی جهانی گربه اهلی متعلق به کشور انگلستان در آن قرار گرفتند. بدین ترتیب در هر شرایطی توالی گربه وحشی آفریقایی و اهلی در کنار یکدیگر بودند و این موضوع تفکیک نمونه‌های اهلی را از وحشی آفریقایی برای نمونه‌های ایران، غیرممکن می‌کرد. هم‌چنین هاپلوتایپ شماره ۱۰، متشکل از دو توالی از ایران (تهران و خراسان رضوی) و دو توالی جهانی گربه وحشی آسیایی از باغ وحش Cincinnati در کشور آمریکا شد، که منشأ یک نمونه از کشور هندوستان بود.

در جدول ۲، آماره‌های ژنتیکی مربوط به ژن ND5 برای ۳۸ توالی مشکوک به گربه وحشی و دو زیرکلاد آفریقایی و آسیایی به تفکیک آمده است. بر این اساس، ۱۲ هاپلوتایپ برای توالی‌های ایران شناسایی شد. تنوع هاپلوتایپی زیرکلاد آسیایی (۰/۸۲±۰/۰۵۸)، بزرگ‌تر از گروه آفریقایی به‌دست آمد (۰/۵۷±۰/۱۳۲). هم‌چنین میانگین تفاوت نوکلئوتیدی زیرکلاد آسیایی گربه وحشی ایران (۳/۳)، بزرگ‌تر از زیرکلاد آفریقایی (۱/۲) به‌دست آمد. تعداد سایت‌های پلی‌مورفیسم در زیرکلاد آسیایی ۱۱ و در زیرکلاد آفریقایی، ۵ به‌دست آمد، لذا با توجه به نتایج به‌دست آمده به‌نظر می‌رسد تنوع ژنتیکی زیرکلاد آسیایی در ایران بیش‌تر از زیرکلاد آفریقایی باشد. نتایج آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) برای دستیابی به اختلاف ژنتیکی زیرکلاد‌های گربه وحشی در ایران با استفاده از نرم‌افزار Arlequin به‌دست آمد

جدول ۳: نتایج تحلیل AMOVA برای توالی‌های ایران براساس قطعه ۸۱۴ جفت

باز از ژن ND5			
منبع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	درصد تغییر
بین زیرکلادها	۱	۴۵/۳۸۶	۶۶/۱۷
درون زیرکلادها	۳۶	۴۵/۹۱۸	۳۳/۸۳
کل جمعیت	۳۷	۹۱/۳۰۳	
Significance tests (۱۰۱۰۰ permutations),			
P-value < ۰/۰۰۰		۰/۶۶	F _{ST}

بحث

در این مطالعه از ۳۸ نمونه تنها به تصویر خز ۱۵ نمونه که اطلاعات ناقصی از ویژگی‌های مورفولوژی را فراهم می‌کرد دسترسی داشتیم که به‌طور کامل حاوی کلیه اطلاعات شناسایی کننده گربه وحشی از اهلی یا هیبرید (Randi و Possenti، ۱۹۹۶؛ Kitchener و همکاران، ۲۰۰۵؛ Devillard و همکاران، ۲۰۱۳) نبودند، از این تعداد نمونه که تصاویر خز آن‌ها در اختیار بود براساس تفکیک انجام شده در درخت تبارشناسی، ۹ نمونه به زیرکلاد آسیایی و ۶ نمونه به زیرکلاد آفریقایی/اهلی تعلق گرفت. بدون استفاده از نتایج تحلیل‌های تبارشناسی این تفکیک قابل انجام نبود چرا که داده‌های مورفولوژی در دسترس، شناسایی قابل اطمینانی مهیا نمی‌کرد. اما با استفاده از الگوی پوشش تنها یک نمونه که شکل خز آن به‌طور کاملاً واضحی مشخصات گربه اهلی را داشت شناسایی و از آنالیزها حذف شد و فقط در رسم درخت تبارشناسی و شبکه هاپلوتایپی از آن استفاده شد (نمونه اهلی از خراسان جنوبی). تحلیل‌های مولکولی نشان داد گربه وحشی ایران به دو زیرکلاد تقسیم می‌شود: گربه وحشی آسیایی (*F. l. ornata*) که بیش‌تر در شرق رشته کوه زاگرس پراکنش دارد و گربه وحشی آفریقایی/اهلی (*F. l. lybica* / *F. catus*) که بیش‌تر در غرب رشته کوه زاگرس پراکنش دارد ولی در برخی مناطق این دو زیرکلاد با یکدیگر هم‌پوشانی دارند (شکل ۴). کمربند کوهستانی رشته کوه زاگرس در حدود ۲۰۰۰ کیلومتر از آناتولی شرقی در شرق ترکیه تا مکران در جنوب ایران گسترش دارد (Muthereau و همکاران، ۲۰۱۲).

رشته کوه زاگرس یکی از غنی‌ترین مناطق زیستی در خاورمیانه است (Sagheb-Talebi و همکاران، ۲۰۱۴) و لذا به‌نظر می‌رسد رشته کوه زاگرس منطقه اکوتون بین دو زیرکلاد آسیایی و آفریقایی در ایران است ولی به‌عنوان مانع جغرافیایی در جریان ژن عمل نکرده است. در مطالعه حاضر توالی‌های گربه اهلی و گربه وحشی آفریقایی (*F. l. lybica*) در هیچ شرایطی از یکدیگر جدا نشدند مطابق با سایر مطالعات فیلوژغرافی (Driscoll و همکاران، ۲۰۰۷؛ Baca و همکاران،

۲۰۱۸) که این نتیجه مونوفیلیتیک بودن گربه وحشی آفریقایی (*F. l. lybica*) و گربه اهلی را تایید می‌کند. هاپلوتایپ‌های به‌دست آمده در برخی مناطق هم‌پوشانی داشتند که وجود نمونه‌های اهلی یا هیبرید در مناطق هم‌پوشانی دور از انتظار نیست. ذکر این نکته ضروریست، دستیابی به نتایج قابل اطمینان از وضعیت هیبریداسیون و نرخ هیبرید بین دو زیرکلاد و یا شناسایی نمونه‌های اهلی در بین زیرکلاد آفریقایی منوط به استفاده از مارکرهای هسته‌ای است که امکان آن در مطالعه حاضر مهیا نشد.

با توجه به نتایج شبکه هاپلوتایپی و اشتراک هاپلوتایپ‌های ایران با توالی‌هایی از کشورهای ترکمنستان، قزاقستان و مغولستان به‌نظر می‌رسد زیرگونه آسیایی گربه وحشی (*F. l. ornata*) از سمت شمال شرق ایران وارد کشور شده و در طول زمان به تدریج به سمت غرب کشور پیشروی کرده است (در استان زنجان و همدان زیرگونه آسیایی از گربه‌وحشی شناسایی شد) و در مناطقی پراکنش آن با زیرگونه آفریقایی هم‌پوشانی پیدا کرده و جریان ژن بین آن‌ها برقرار شده است. نتایج آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) برای دستیابی به اختلاف ژنتیکی زیرکلادهای گربه وحشی در ایران با استفاده از نرم‌افزار Arlequin به‌دست آمد (جدول ۳). درصد واریانس بین دو زیرکلاد آسیایی و آفریقایی گربه وحشی در ایران (۶۶/۱۷٪) بیش‌تر از درصد واریانس درون گروه‌هاست (۳۳/۸۳٪) هم‌چنین میزان $F_{ST} = ۰/۶۶$ به‌دست آمد که نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین دو زیرکلاد گربه وحشی در ایران است و زیرکلادهای مذکور براساس ۸۱۴ جفت باز از ژن ND5 از یکدیگر متمایز می‌شوند. در شکل ۶، تصویری از قطعات ژن‌های ND5، ND6 و ژن سیتوکروم *b* به‌صورت توالی پیوسته آمده است (در این تصویر به‌خوبی می‌توان با استفاده از موقعیت بازهای شناسایی کننده ژنوم میتوکندری، زیرگونه‌های مختلف گربه وحشی را تفکیک کرد البته از ژن مادری). همان‌گونه که مشاهده می‌شود موقعیت بازهای شماره ۱۳۰۸ و ۱۴۰۱۰ بر روی قطعه ND5 که باز "T" است، متمایز کننده گربه اهلی از سایر زیرگونه‌های گربه وحشی است و باز شماره ۱۳۷۷۶ بر روی همان قطعه که باز "G" است زیرگونه آسیایی گربه وحشی را از سایر زیرگونه‌ها تفکیک می‌کند (Driscoll و همکاران، ۲۰۰۷). در مطالعه حاضر، تفکیک زیرگونه آسیایی گربه وحشی با این روش برای توالی‌های موجود انجام شد و تجزیه و تحلیل‌های تبارشناختی نیز این تفکیک را تأیید کرد. ولی به‌دلیل کوتاه بودن قطعه در این مطالعه، موفق به تفکیک نمونه‌های اهلی از این طریق نشدیم. بر این اساس، تعداد ۲۴ نمونه، به‌عنوان گربه وحشی آسیایی (*F. l. ornata*) شناسایی شدند که همه نمونه‌ها در حوزه پراکنش زیرکلاد آسیایی قرار گرفتند و هاپلوتایپ مشترکی با زیرکلاد آفریقایی تشکیل ندادند.



۱۷. **Mouthereau, F.; Lacombe, O. and Vergés, J., 2012.** Building the Zagros collisional orogen: timing, strain distribution and the dynamics of Arabia/Eurasia plate convergence. *Tectonophysics*. Vol. 532, pp: 27-60.
۱۸. **Nowell, K. and Jackson P., 1996.** Wild cats: Status survey and conservation action plan. IUCN, Gland, Switzerland.
۱۹. **O'Brien, J.; Devillard, S.; Say, L.; Vanthomme, H.; Leger, F.; Ruetter, S. and Pontier, D., 2009.** Preserving genetic integrity in a hybridizing world: are European Wildcats (*Felis silvestris silvestris*) in eastern France distinct from sympatric feral domestic cats? *Biodiversity and Conservation*. Vol. 18, pp: 2351-2360
۲۰. **Otoni, C.; Van Neer, W.; De Cupere, B.; aligault, J.; Guimaraes, S.; Peters, J.; Spassov, N.; Prendergast, M.E.; Boivin, N.; Morales-Muñiz, A. and Bălăşescu, A., 2017.** The palaeogenetics of cat dispersal in the ancient world. *Nature Ecology & Evolution*. Vol. 1, 139 p.
۲۱. **Posada, D., 2008.** JModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*. Vol. 25, pp: 1253-1256.
۲۲. **Purvis, A.; Gittleman, J.L. and Brooks, T.H., 2005.** *Phylogeny and Conservation*. Cambridge University Press.
۲۳. **Ragni, B. and Possenti, M., 1996.** Variability of coat-colour and markings system in *Felis silvestris*. *Italian Journal of Zoology*. Vol. 63, pp: 285-292.
۲۴. **Ronquist, F. and Huelsenbeck, J.P., 2003.** MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. Vol. 19, pp: 1572-1574.
۲۵. **Sagheb-Talebi, K.; Sajedi, T. and Pourhashemi, M., 2014.** *Forests of Iran: A Treasure from the Past, a Hope for the Future*. Springer Berlin.
۲۶. **Say, L.; Devillard, S.; Leger, F.; Pontier, D. and Ruetter, S., 2012.** Distribution and spatial genetic structure of European wild cat in France. *Animal Conservation*. Vol. 15, pp: 18-27.
۲۷. **Senn, H.V.; Ghazali, M.; Kaden, J.; Barclay, D.; Harrower, B.; Campbell, R.D.; Macdonald, D.W. and Kitchener, A.C., 2018.** Distinguishing the victim from the threat: SNPbased methods reveal the extent of introgressive hybridization between wildcats and domestic cats in Scotland and inform future in situ and ex situ management options for
۷. **Driscoll, C.A.; Menotti-Raymond, M.; Roca, A.L.; Hupe, K.; Johnson, W.E.; Geffen, E.; Harley, E.; Delibes, M.; Pontier, D.; Kitchener, A.C.; Yamaguchi, N.; O'Brien, S.J. and MacDonald, D., 2007.** The near eastern origin of cat domestication. *Science*. Vol. 317, pp: 519-523.
۸. **Driscoll, C.; Yamaguchi, N.; O'Brien, S.J. and MacDonald, D.W., 2011.** A suite of genetic markers useful in assessing wildcat (*Felis silvestris* spp.), domestic cat (*Felis silvestris catus*) admixture. *Journal of Heredity*. Vol. 102, No. 1, pp: 87-90.
۹. **Excoffier, L. and Lischer, H.E.L., 2010.** Arlequin suite ver ۳.۰: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology*. Vol. 10, pp: 564-567.
۱۰. **Ghoddousi, A.; Hamidi, A.K.; Ghadirian, T. and Baniasadi, S., 2016.** The Status of wildcat in Iran: A Crossroad of Subspecies? *Cat-News Special Issue*. Vol. 10, pp: 60-63.
۱۱. **Kilshaw, K.; Johnson, P.J.; Kitchener, A.C. and Macdonald, D., 2014.** Detecting the elusive Scottish wildcat *Felis silvestris silvestris* using camera trapping. *Oryx*. Vol. 49, pp: 1-9.
۱۲. **Kitchener, A.C.; Yamaguchi, N.; Ward, J.M. and Macdonald, D.W., 2005.** A diagnosis for the Scottish wildcat (*Felis silvestris*): a tool for conservation action for a critically-endangered felid. *Animal Conservation*. Vol. 8, pp: 223-237.
۱۳. **Kitchener, A.C.; Britenmoser-Wursten, C.H.; Eizirik, E. and Gentry, A., 2017.** A revised taxonomy of the Felidae. The final report of the Cat Classification Task Force of IUCN/SSC Cat Specialist Group. *Cat News Special Issue*. Vol. 11, 80 p.
۱۴. **Librado, P. and Rozas, J., 2009.** DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. Vol. 25, pp: 1451-1452.
۱۵. **Lopez, J.V.; Culver, M.; Stephens, J.C.; Johnson, W.E. and O'Brien, S.J., 1997.** Rates of nuclear and cytoplasmic mitochondrial DNA sequence divergence in mammals. *Molecular Biology and Evolution*. Vol. 14, pp: 277-286.
۱۶. **Macdonald, D.W. and Loveridge, A.J., 2010.** *Biology and conservation of wild felids*. Oxford University Press, Oxford. 784 p.



- species restoration. Evolutionary applications. Vol. 12, pp: 399-414.
۲۸. Tamada, T.; Kurose, N. and Masuda, R., 2005. Genetic diversity in domestic *Felis catus* of the Tsushima islands, Based on Mitochondrial DNA Cytochrome b and Control Region Nucleotide Sequence. Zoological science. Vol. 22, pp: 627-633.
۲۹. Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipski, A. and Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Molecular Biology and Evolution. Vol. 30, pp: 2725-2729.
۳۰. Yamaguchi, N.; Driscoll, C.H.; Kitchener, A.C.; Ward, J.M. and Macdonald, D.W., 2004. Craniological differentiation between European wildcats (*Felis silvestris silvestris*), African wildcats (*F. s. lybica*) and Asian wildcats (*F. s. ornata*): implications for their evolution and conservation. Biological Journal of the Linnean Society. Vol. 83, pp: 47-63.
۳۱. Weir, B.S. and Cockerham, C.C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution. Vol. 38, pp: 1358-1370.

