

تنوع ژنتیکی سنجاب زمینی زرد (*Spermophilus fulvus* (Lichtenstein, 1823) در ایران

- افسانه اصغر زاده: گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- محمد کابلی*: گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
- حسن رجبی مهام: گروه علوم و زیست فناوری جانوری، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
- مرتضی نادری: گروه علوم محیط زیست، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۸

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی تنوع، تغییرات و ساختار ژنتیکی جمعیت‌های سنجاب زمینی زرد (*Spermophilus fulvus*) در ایران است. بدین منظور ۷۹ نمونه بافت این گونه از هفت استان (خراسان رضوی، خراسان شمالی، زنجان، قزوین، البرز، همدان و کردستان) جمع‌آوری شد. پس از استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، تنوع ژنتیکی با استفاده از توالی کامل ژن سیتوکروم b (۱۱۴۰ جفت باز) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج درخت بایزین و حداکثر درست‌نمایی بر پایه این ژن برای ۷۹ فرد نشان داد که سنجاب زمینی زرد (*S. fulvus*) با توزیع جغرافیایی وسیع از شرق تا غرب ایران شامل سه تبار فیلوژنتیکی است. تبار اول مربوط به شرقی‌ترین جمعیت‌های این گونه در نوار مرزی ایران و افغانستان بوده و تبار دوم و سوم شامل سایر جمعیت‌های این گونه از استان‌های شمال شرقی تا غرب ایران شامل خراسان رضوی، خراسان شمالی، زنجان و کردستان و نیز قزوین، البرز و همدان است. بررسی‌ها وقوع گسترش ناگهانی در جمعیت‌های این گونه را تصدیق نمود. ۲۶ هاپلوتایپ منحصر به فرد و ۳۵ جایگاه متغیر از نتایج بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های ایرانی سنجاب زمینی زرد بوده و این گونه در ایران تنوع هاپلوتایپی و ژنتیکی بالایی را براساس ژن میتوکندریایی مذکور نشان داده است. تجزیه واریانس مولکولی و شاخص FST ساختار ژنتیکی متفاوت و معنی‌داری را در بین جمعیت‌ها مشخص ساخته است. در نهایت در نظر گرفتن یک واحد تکاملی معنی‌دار برای هر تبار مجزای این گونه برای اهداف مدیریت حفاظت سنجاب زمینی زرد در ایران و نیز برای تداوم بقای آن پیشنهاد می‌گردد.

کلمات کلیدی: سنجاب زمینی زرد، *Spermophilus fulvus*، تنوع ژنتیکی، جمعیت‌ها، نشانگر میتوکندریایی



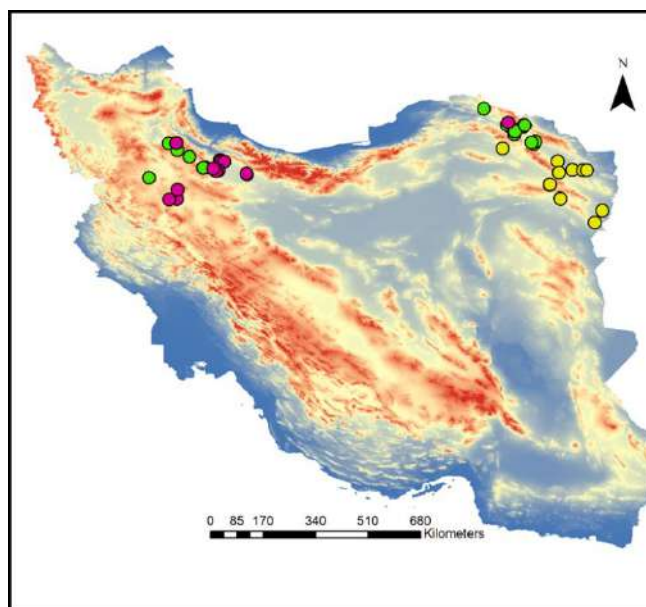
مقدمه

سنجاب‌های زمینی، جنس (*Spermophilus* (Cuvier, ۱۸۲۵) شامل ۱۴ گونه بوده که در اروپا و آسیا پراکنده شده‌اند (Thorington و همکاران، ۲۰۱۲). در این بین، سنجاب زمینی زرد *Spermophilus fulvus* (Lichtenstein, ۱۸۲۳) به‌عنوان یکی از اعضای خانواده بزرگ سنجاب‌ها، محدوده پراکنش وسیعی را به خود اختصاص داده است (IUCN، ۲۰۱۹). گستره پراکنش این گونه، کشورهای روسیه و قزاقستان، از دریای خزر و رودخانه ولگا تا دریاچه بالکاش، جنوب ازبکستان، جنوب تاجیکستان و ترکمنستان تا شمال شرق ایران، شمال افغانستان و چین را در بر گرفته و قسمت‌های جنوبی محدوده پراکنش آن تکه‌تکه شده است (IUCN، ۲۰۱۹). در ایران اما، در دو گستره کاملاً مجزا در شمال شرقی و غربی کشور در استانهای خراسان رضوی، خراسان شمالی و نیز زنجان، کردستان، همدان، قزوین و البرز وجود دارد (کرمی و همکاران، ۱۳۹۵؛ Vohralík و Kryštufek، ۲۰۱۲). استپ‌های مناطق سردسیر با پوشش گیاهی تنک، اراضی نرم رسی و حاصلخیز، از زیستگاه‌های مورد ترجیح این گونه می‌باشد (کرمی و همکاران، ۱۳۹۵). در نیم قرن گذشته، تغییرات بیش‌تر در شیوه‌های کشاورزی، باعث تضعیف زیستگاه‌های علفی و تکه‌تکه شدن زیستگاه‌ها و از بین رفتن جمعیت‌های *Spermophilus* (Kryštufek و همکاران، ۲۰۰۹)، تا حد در معرض تهدید قرار گرفتن بسیاری از گونه‌های این جنس شده است (IUCN، ۲۰۱۹). از این‌رو، مدیریت و حفاظت از آن‌ها به‌عنوان جزیی از حیات‌وحش نیازمند داشتن تصویری جامع از تنوع و تغییرپذیری ژنتیکی در ساختارهای جغرافیایی است (Davison و همکاران، ۲۰۱۱). از سویی دیگر، علی‌رغم پراکنش و توزیع گسترده اعضای خانواده سنجاب‌ها، روابط فیلوژنتیکی بین آن‌ها تا حد زیادی مبهم باقی مانده است (Herron و همکاران، ۲۰۰۴). علاوه بر این، گونه‌هایی با پراکنش جغرافیایی وسیع، نظیر گونه‌های طبقه‌بندی شده در *Spermophilus*، به‌دلیل امکان کشف احتمالی گونه جدیدی در درون آن‌ها، برای جنبه‌های مبهم مولکولی تنوع ژنتیکی بسیار با ارزش هستند (Gündüz و همکاران، ۲۰۰۷). مطالعات ژنتیک جمعیت در دهه‌های اخیر به سرعت به‌منظور بررسی پویایی جمعیت و درک فرآیندهای تکاملی افزایش یافته است به‌طوری‌که این مطالعات پایه و اساس تدوین و اجرای هر گونه طرح مدیریتی برای حفاظت از گونه‌ها شده است (Frankham و همکاران، ۲۰۰۲؛ Hrbek و همکاران، ۲۰۰۵). تنوع ژنتیکی قابلیت بقای یک گونه و یا جمعیت را از طریق ایجاد توانایی سازگاری با تغییرات محیطی فراهم می‌کند. بنابراین تنوع ژنتیکی برای بقای طولانی مدت یک گونه ضروری است (McNeely و همکاران، ۱۹۹۰؛ Bataillon و همکاران، ۱۹۹۶). لیکن عوامل متعددی

تهدیدکننده این ویژگی مهم جمعیتی است. علاوه بر توسعه روز افزون کشاورزی، رشد و توسعه جاده‌ها، بزرگراه‌ها، مراکز صنعتی و شهرها و شهرک‌ها با کاهش ارتباط بین جمعیت‌ها و یا قطع آن‌ها (در عصر حاضر)، می‌تواند یکی از این عوامل باشد، به‌طوری‌که با تکه‌تکه شدن زیستگاه‌ها، جمعیت‌های موجود در آن‌ها به‌دلیل تغییرات رانش ژنتیکی و جمعیت‌شناختی تحت تاثیر فرسایش درون آمیزی قرار می‌گیرند و بدین ترتیب برازش افراد و در نتیجه بقای جمعیت آن‌ها به‌شدت کاهش می‌یابد (Herkert و همکاران، ۱۹۹۴؛ Zuckerberg و همکاران، ۲۰۱۴). از این‌رو با توجه به عوامل ذکر شده، مطالعات ژنتیکی برای حفاظت از این گونه به منظور جلوگیری از آسیب‌پذیر شدن آن، امری ضروری و اجتناب‌ناپذیر است. توسعه نشانگرهای مولکولی، نقش به‌سزایی را در مطالعات ژنتیک جمعیت ایفا کرده است (Queiroz و Ashton، ۲۰۰۱). DNA میتوکندریایی (mtDNA) به‌عنوان یک نشانگر مولکولی در تشخیص گونه‌ها و ترسیم روابط تبارشناختی، بررسی ویژگی‌های تبار گیشتاشناسی (Phylogeography) و ارزیابی تنوع و ساختار جمعیت‌های یک گونه دارای مزایایی بسیاری است (Colombo و همکاران، ۲۰۰۲). در این میان ژن سیتوکروم *b*، ژن میتوکندریایی کدینه است که تاکنون به فراوانی برای تاکسون‌های گوناگون تعیین توالی شده است (Helgen و همکاران، ۲۰۰۹؛ Khalilipour و همکاران، ۲۰۱۴؛ Ashrafzadeh و همکاران، ۲۰۱۶). این ژن نشانگری مناسب در سطح جنس و گونه است و تغییرات درون و بین گونه‌ای را به خوبی نشان می‌دهد (Wink و Heidrich، ۲۰۰۰). براساس نتایج به‌دست آمده از مطالعات پیشین، سیتوکروم *b*، به‌عنوان یک نشانگر درست و منطقی برای تخمین روابط بین سنجاب‌های زمینی معرفی (Harrison و همکاران، ۲۰۰۳) و تقریباً در همه پژوهش‌های انجام شده برای تبارشناسی و ساختار ژنتیکی سنجاب‌های زمینی دنیا از آن بهره گرفته شده است (Harrison و همکاران، ۲۰۰۳؛ Herron و همکاران، ۲۰۰۴؛ Gündüz و همکاران، ۲۰۰۷؛ Helgen و همکاران، ۲۰۰۹؛ Kapustina و همکاران، ۲۰۱۵؛ Faerman و همکاران، ۲۰۱۷). با این وجود، مطالعات محدودی در خصوص بررسی ساختار و تنوع ژنتیکی سنجاب زمینی زرد در ایران انجام شده است (Asgharzadeh و همکاران، ۲۰۱۹). این در حالی است که با توجه به جمعیت‌های مجزای این گونه در شرق و غرب کشور، شناسایی ویژگی‌ها و تعیین میزان تنوع ژنتیکی آن‌ها می‌تواند در حفاظت از جمعیت‌های منزوی این گونه در استان‌های شرقی و غربی کشور موثر باشد. از این‌رو، در مطالعه حاضر تلاش شده است با استفاده از توالی کامل ژن سیتوکروم *b* (۱۱۴۰ جفت باز)، برخی از ویژگی‌های ژنتیکی جمعیت‌های این گونه شناسایی شود تا بستر مناسبی برای تکمیل خلاء اطلاعاتی موجود و نیز اقدامات آتی مدیریتی فراهم آید.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه: از آن جاکه اوج فعالیت این گونه در فصل بهار است، لذا جمع‌آوری نمونه طی سه سال (۱۳۹۶-۱۳۹۴) از اواسط فروردین تا اوایل تیر ماه در محدوده پراکنش این گونه از نواحی مرزی شرقی و شمال‌شرقی تا غرب ایران شامل استان‌های خراسان رضوی، خراسان شمالی، همدان، کردستان، زنجان، قزوین و البرز صورت گرفت. بدین ترتیب با جستجوهای وسیع میدانی و مصاحبه با بومیان، محیط‌بانان و کارشناسان مرتبط مراحل مقدماتی و برنامه‌ریزی‌های لازم انجام و از زیستگاه‌های شرقی و غربی پراکنش سنجاب زمینی در کشور، تعداد ۷۹ نمونه تحت مجوز شماره ۹۴/۵۷۸۷۹ و ۹۴/۶۱۵۰ سازمان حفاظت محیط‌زیست جمع‌آوری شد (شکل ۱). از این تعداد فقط ۲۰ نمونه از افراد زنده با نمونه‌گیری از بافت غضروفی لاله گوش در مناطق حفاظت شده و سایر زیستگاه‌های آزاد گونه با تشخیص لانه‌های شامل سنجاب و محبوس نمودن حیوان با تور انجام و بلافاصله پس از نمونه‌گیری در محل رهاسازی شده است. سایر نمونه‌ها شامل لاشه‌های جمع‌آوری شده از تصادفات جاده‌ای و غیره بوده است. نمونه‌ها در اتانول ۹۶ درصد فیکس و برای انجام آزمایش مولکولی و استخراج DNA به آزمایشگاه ژنتیک مولکولی منتقل شدند.



شکل ۱: محل‌های نمونه‌گیری سنجاب زمینی زرد در مطالعه حاضر؛ دایره‌های زرد، سبز و ارغوانی با کلاهای تبارشناختی ایران (به ترتیب کلاهای IR1، IR2 و IR3 در شکل ۳) مطابقت دارند.

استخراج DNA و بررسی کمی و کیفی DNA استخراج

شده: برای استخراج DNA از نمونه‌های بافت از روش فنل-کلروفرم

استفاده شد (Sambrook و همکاران، ۱۹۸۹). کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ یا با روییت آن بر روی ژل آگارز (۱٪) سنجیده شد.

چرخه PCR و توالی‌یابی: واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR: Polymerase Chain Reaction) با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر صورت گرفت. در هر تیوب مقدار ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس با غلظت ۱/۵ مولار $MgCl_2$ شرکت امپلیکون دانمارک (Ampliqon Taq DNA Polymerase 2x Master Mix Red) و $1.5\text{ Mm } MgCl_2$ final concentration، ۱ میکرولیتر پرایمر رفت، ۱ میکرو لیتر پرایمر برگشت و ۱ میکرو لیتر DNA ریخته شد. برای تکثیر قطعه مربوط به ژن *cyt b* از پرایمرهای (5'-TGAAAAAYCATCGTTGT-3') و (5'-TCTTCATTTTWWGGTTTACAAGAC-3')؛ H۱۵۹۱۵ و L۱۴۷۲۵ استفاده شد (Harrison و همکاران، ۲۰۰۳). چرخه دمایی برای تکثیر توالی کامل ژن *cyt b* عبارت بود از ۳ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۵ چرخه، شامل ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه و ۴۰ ثانیه در دمای ۴۸ درجه و یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و بسط نهایی با ۷۲ درجه در ده دقیقه. برای بررسی میزان کیفیت محصول PCR (PCR Product) از ژل آگارز یک درصد استفاده و کیفیت محصول به کمک دستگاه الکتروفورز بررسی و باندهای با کیفیت برای توالی‌یابی به شرکت MacroGen و Bioneer کره جنوبی ارسال شدند. این نمونه‌ها با استفاده از دستگاه ABI ۳۷۳۰ (Applied Biosystems) به‌طور خودکار توالی‌یابی شدند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: توالی‌های دریافت شده توسط نرم‌افزار SeqScape (Applied Biosystems) نسخه ۲/۶ بررسی، بازهای ناخوانا مورد تفسیر و تصحیح قرار گرفته و ویرایش توالی‌ها انجام گرفت. هم‌ردیفی توالی‌ها (Alignment) با استفاده از نسخه ۶ نرم‌افزار MEGA انجام (Tamura و همکاران، ۲۰۱۳) و در ادامه فاصله ژنتیکی بین افراد و گروه‌ها، فراوانی بازهای مختلف و تعیین میزان جانشینی‌های نوع اول و دوم توسط همین نرم‌افزار با ۱۰۰۰۰ تکرار انجام شد. با استفاده از نرم‌افزار DAMBE نسخه ۶،۰،۴ بروز اشباع یا عدم اشباع در داده‌ها سنجیده و اجازه ادامه آنالیزها گرفته شد (Xia و Xie، ۲۰۰۱؛ Xia و Lemey، ۲۰۰۹). تعیین تعداد هاپلو تایپ‌ها، جایگاه‌های چندشکلی با استفاده از نسخه ۵،۰ نرم‌افزار DnaSP تخمین زده شد (Librado و Rozas، ۲۰۰۹). برای تعیین بهترین پارتیشن‌بندی و مدل تکاملی با توجه به مقدار متغیر نرخ تکاملی برای جایگاه اول، دوم و سوم کدن‌ها از نرم‌افزار PartitionFinder استفاده شد (Lanfear و همکاران، ۲۰۱۲). با استفاده از نتایج پارتیشن‌بندی و مدل تکاملی به‌دست آمده از این نرم‌افزار، از نرم‌افزار IQ-Tree نسخه ۱،۶،۸ (Nguyen و همکاران، ۲۰۱۴) با در نظر گرفتن ۱۰۰۰ تکرار برای ترسیم درخت حداکثر درست‌نمایی



در جدول ۲ ارائه شده است. نتایج نشان می‌دهد که سنجاب زرد زمینی در اکثر استان‌های کشور از تنوع هاپلوتایپی خوبی برخوردار بوده و بیش‌ترین مقدار تنوع هاپلوتایپی و تنوع نوکلئوتیدی در استان خراسان شمالی مشاهده شده است (جدول ۳). آزمون تحلیل گسترش جمعیت ($Fu's F_s$ و Tajima's D) برای اکثر جمعیت‌ها منفی بوده که در این میان جمعیت همدان برای هر دو آماره $Fu's F_s$ و Tajima's D مقدار منفی و معنی‌داری را نشان داده است (جدول ۳).

جدول ۱: فراوانی نوکلئوتیدهای ژن *cyt b* در سنجاب زمینی زرد ایران

فراوانی نوکلئوتید (بر حسب درصد)	نوکلئوتید
۳۴	تیمین
۲۵/۲	سیتوزین
۲۸/۳	آدنین
۱۲/۶	گوانین

جدول ۲: تخمین الگوی جانیشینی نوکلئوتیدی سنجاب زمینی زرد ایران

نوکلئوتید	A	T	C	G
A	-	۰/۴۵	۰/۳۳	۱۳/۸
T	۰/۳۷	-	۲۲/۳۵	۰/۱۷
C	۰/۳۷	۳۰/۱۶	-	۰/۱۷
G	۳۱/۰۴	۰/۴۵	۰/۳۳	-

اعداد پررنگ نشان‌دهنده نرخ جانیشینی نوع اول و سایر اعداد نشان‌دهنده نرخ جانیشینی نوع دوم هستند.

تحلیل‌ها داده‌ها نشان داد که دسته داده‌ها دارای کم‌ترین اشباع جایگزینی هستند (شکل ۲) و شاخص ISS به‌طور معنی‌داری کم‌تر از شاخص ISSc بوده است که نشان می‌دهد دسته داده‌های این مطالعه برای تحلیل‌های فیلوژنتیک مناسب و ادامه آنالیزها با آن‌ها مجاز است. یافته‌های این مطالعه براساس ژن سیتوکروم *b*، سه پارتیشن به‌شرح ذیل را دربرداشت که برای رسم درخت تکاملی از آن استفاده شد: (i) *cyt b_pos3*, (ii) *cyt b_pos2*, (iii) *cyt b_pos1* و مدل‌های K80، F81 و GTR به‌عنوان بهترین مدل‌های تکاملی نوکلئوتیدی برای توالی‌های مورد نظر شناسایی و استفاده شد. درخت‌های تبارشناسی بایزین و حداکثر درست‌نمایی در ترسیم روابط خویشاوندی و تکاملی توپولوژی یکسانی را نشان دادند. براساس شکل ۳ سنجاب زرد زمینی ایران با احتمال پسین یک و بوت استرپ ۱۰۰ درحالی با قوت ظاهر شده است که دو نمونه روسیه و قزاقستان در خارج از گستره پراکنش سنجاب زمینی زرد ایران قرار گرفته‌اند. از سویی دیگر سنجاب‌های زمینی زرد نوار شرقی و شمال‌شرقی ایران (کلاد IR1) به‌وضوح و با احتمال پسین ۰/۹۸ و بوت‌استرپ ۹۴/۵ از دیگر جمعیت‌های این گونه در ایران جدا شده‌اند. براین اساس دو کلاد خواهری باقی‌مانده، کلاد ۲ و ۳ (به‌ترتیب

(ML) maximum likelihood) و از نسخه ۳,۲,۶ نرم‌افزار MrBayes (Ronquist و Huelsenbeck, ۲۰۰۳) برای ترسیم درخت بیزین استفاده شد. تحلیل‌های بیزین براساس چرخه زنجیره مارکوف (Markov Chain Monte Carlo) با ۵۰ میلیون تکرار و فراوانی نمونه (Sample frequency) ۱۰۰۰ انجام شد. درخت‌های بیزین و حداکثر درست‌نمایی به‌وسیله برون گروه‌های (*Spermophilus taurensis* Outgroups) و *Spermophilus citellus* با نام‌های اختصاری به‌ترتیب (KY۹۳۸۰۵۸) و (AF۱۵۷۸۵۹) ثبت شده در NCBI ریشه‌دار شدند. دو تکرار چرخه ۵۰ میلیونی با دوره‌های نمونه‌برداری در هر ۱۰۰۰ تکرار به‌کار گرفته شد. ۲۵ درصد از تکرارها به‌عنوان Burn in در نظر گرفته شد. از نسخه ۱,۵ نرم‌افزار Tracer version (Drummond و Rambaut, ۲۰۰۷) به منظور قابلیت اطمینان نتایج حاصل از نرم‌افزار Beast مبنی بر ارزیابی برآوردهای پسین (Posterior probability) پارامترهای نمونه‌برداری شده در زنجیره مارکوف، ارزیابی هم‌گرایی و اندازه موثر نمونه (ESS) استفاده و درخت مربوط با استفاده از نرم‌افزار Tree annotator و نسخه ۱,۴,۱ نرم‌افزار Figtree رسم و مشاهده شد (Drummond و Rambaut, ۲۰۱۲). ارتباط بین هاپلوتایپ‌ها و ترسیم شبکه هاپلوتایپی با استفاده از الگوریتم TCS در نرم‌افزار POPART انجام شد (Bryant و Leigh, ۲۰۱۵). در ادامه تحلیل واریانس مولکولی (AMOVA) با استفاده نسخه ۳,۱ نرم‌افزار Arlequin و با ۱۰۰۰۰ تکرار پس از گروه‌بندی صورت گرفت (Excoffier و همکاران, ۲۰۰۵). جمعیت‌ها براساس آنالیزهای تبارشناسی گروه‌بندی شدند. سپس شاخص‌های F_{ST} (تغییرات ژنتیکی در میان جمعیت‌ها) و $Fu's F_s$ بر همین اساس تعیین شد. در ادامه با کمک همین نرم‌افزار شواهد احتمالی برای رشد جمعیت در گذشته با استفاده از شاخص‌های $Fu's F_s$ (Fu, ۱۹۹۷) و $Tajima's D$ (Tajima, ۱۹۸۹) ارزیابی شد.

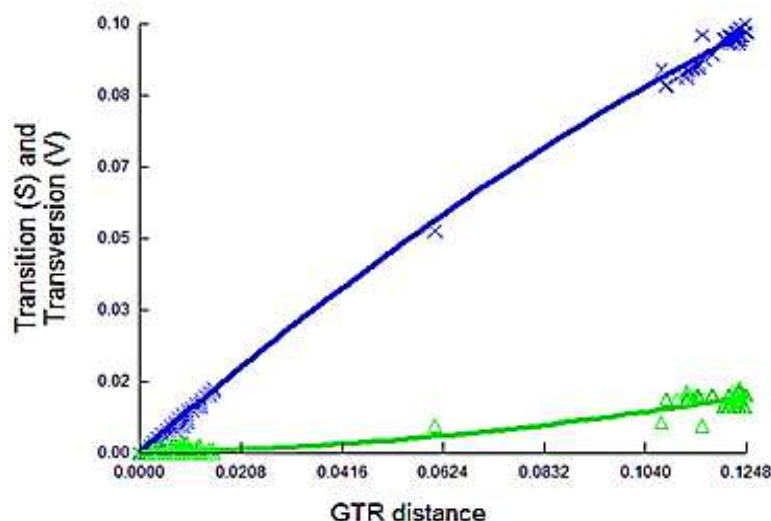
نتایج

تحلیل داده‌ها با استفاده از ۱۱۴۱ جفت باز و ۷۹ توالی ژن سیتوکروم *b* نشان داد که ۱۱۰۵ جایگاه حفاظت شده و ۳۵ جایگاه چندشکلی (Polymorphic site) بوده که شامل ۲۴ جایگاه حاوی اطلاعات پارسیمونی (Parsimony informative site) و ۱۱ جایگاه تک متغیره (Singleton variable site) بوده است. فراوانی هر کدام از نوکلئوتیدها مطابق جدول ۱ برآورد گردید. این فراوانی شامل ۳۴ درصد تیمین، ۲۵/۲ درصد سیتوزین، ۲۸/۳ درصد آدنین و ۱۲/۶ درصد گوانین بوده است. میزان جانیشینی نوع اول (جانیشینی بازهای پورین A-G با یکدیگر و جانیشینی بازهای پورین و پریمیدین C-T با یکدیگر) و جانیشینی نوع دوم (جانیشینی بازهای پورین و پریمیدین با یکدیگر)

فرد بوده و با هیچ جمعیت دیگر هاپلوتایپ مشترک نداشته است. از سوی دیگر، دو گروه هاپلوتایپی دیگر ایران که با چهار جهش به هم متصل شده‌اند، جمعیت‌هایی از همدان، قزوین و البرز (کلاد IR3) و خراسان، زنجان و کردستان (کلاد IR2) را در بر می‌گیرند. فراوانترین هاپلوتایپ مشاهده شده، هاپلوتایپ شماره سه (Hap_3) است که بین جمعیت استان‌های خراسان شمالی، زنجان، البرز و همدان مشترک بوده است (جدول ۴، شکل ۴). نتایج تحلیل واریانس مولکولی در جدول ۵ نشان داده شده است. بر این اساس این آنالیز، تمایز ژنتیکی قابل توجهی بین جمعیت‌های سنجاب زمینی زرد در ایران قابل مشاهده است ($P < 0.05$; $F_{ST} = 0.109$; جدول ۵). علاوه بر آن، آزمون مقایسه جفتی بین اغلب جمعیت‌ها معنی‌دار بوده است (اعداد پررنگ در جدول ۶).

کلاد IR2 و IR3 در شکل ۳، احتمال پسین ۰/۸۲ و بوت‌استرپ ۷۹/۸ را به نمایش گذاشته‌اند. کلاد IR2 شامل جمعیت‌هایی از استان‌های شمال شرقی و غربی ایران (خراسان شمالی، خراسان رضوی، زنجان و کردستان) بوده است، در حالی که کلاد IR3 جمعیت‌هایی از غرب ایران (همدان، قزوین و البرز) را شامل می‌شود.

منطبق بر درخت فیلوژنتیک، سه هاپلوگروپ مشخص برای ایران مشاهده شد که با چهار و هفت جهش از یکدیگر تفکیک شده‌اند (شکل ۴). در مجموع ۲۶ هاپلوتایپ منحصر به فرد برای ۷۹ فرد از سنجاب زمینی زرد در ایران برای ژن *cyt b* به دست آمده است و به‌طور کلی براساس این ژن، *S. fulvus* در ایران، از تنوع هاپلوتایپی خوبی برخوردار بوده است (جدول ۳ و ۴). از ۲۶ هاپلوتایپ مشاهده شده، نوار شرقی ایران (کلاد IR1)، دارای هفت هاپلوتایپ منحصر به



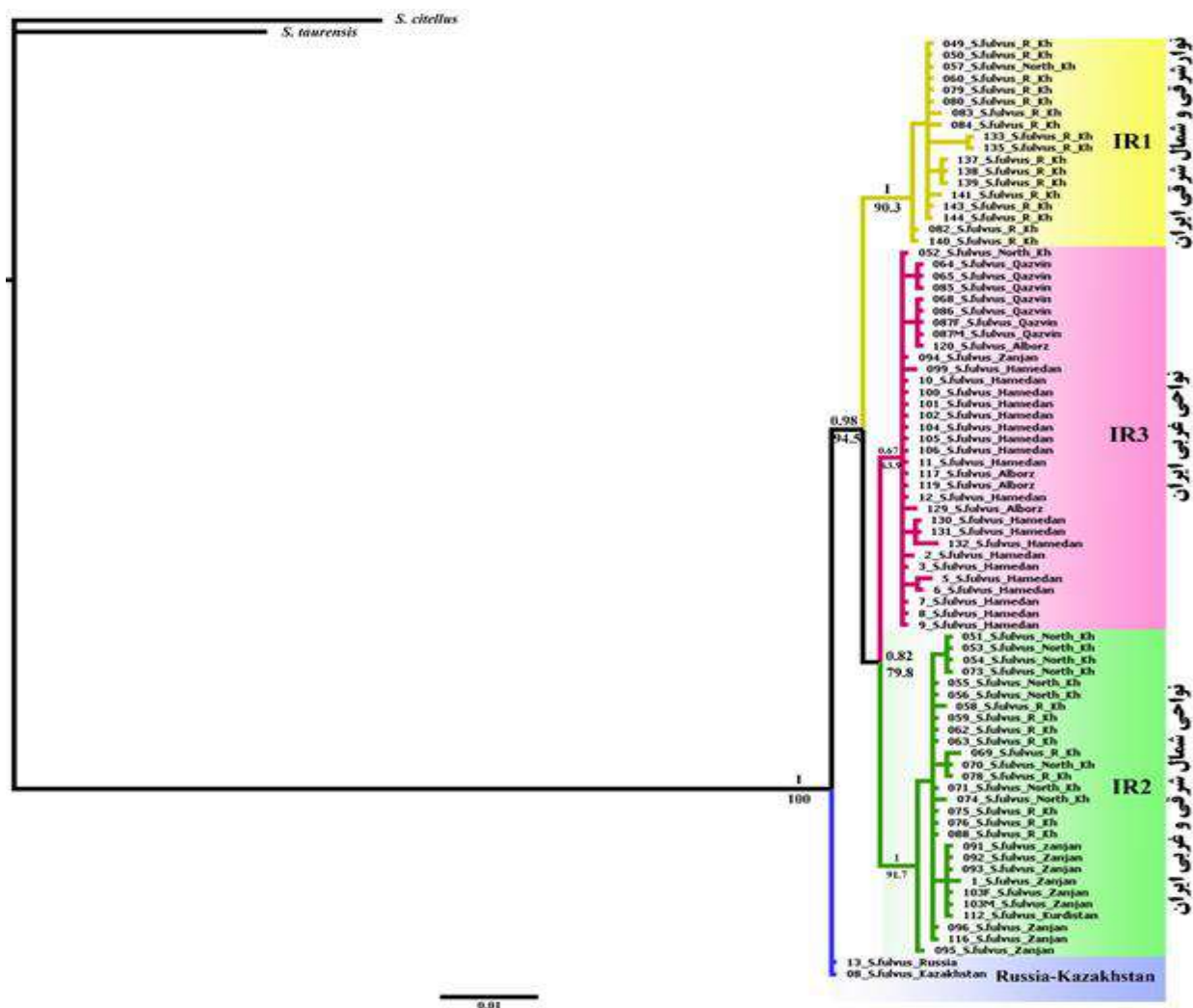
شکل ۲: آنالیز اشباع جایگزینی خط آبی رنگ جانشینی نوع اول (S) و خط سبز رنگ جانشینی نوع دوم (V) را برای ژن *cyt b* را نشان می‌دهد.

جدول ۳: ویژگی‌ها و تعداد نمونه‌های جمع‌آوری شده از هر جمعیت، شاخص تنوع ژنتیکی (تنوع نوکلئوتیدی π ، تنوع هاپلوتایپی H_d به SD انحراف معیار) و آزمون تحلیل گسترش جمعیت‌های گونه (Fu' Fs و Tajima's D)

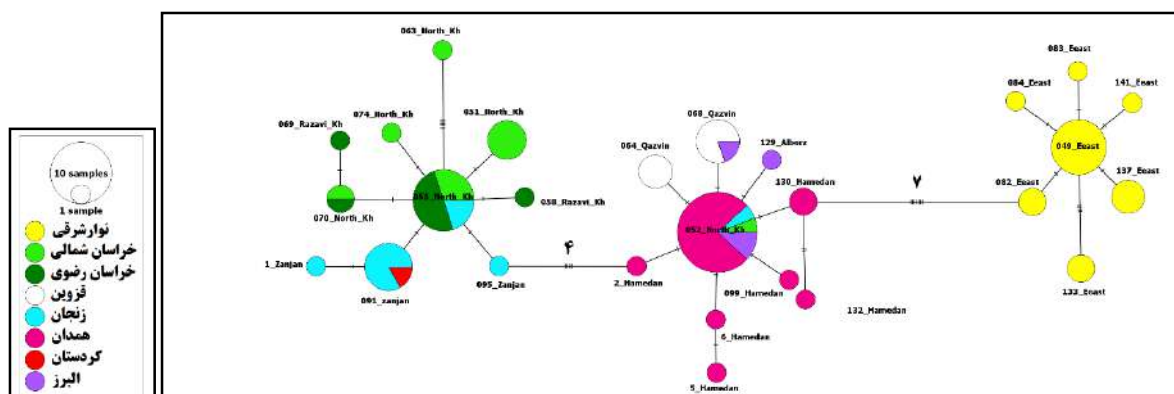
Fu' Fs	Tajima's D	Pi	Hd(SD)	h	N	نمونه برداری
-۴/۹۰۲	-۰/۲۷۱	۰/۰۰۵۶۸	۰/۹۱۶ (۰/۰۱۷)	۲۶	۷۹	کل
-۱/۹۹۲	-۱/۲۷۷	۰/۰۰۱۴۷	۰/۷۸۴ (۰/۰۸۵)	۷	۱۸	نوار شرقی ایران
-۱/۴۱۷	-۰/۹۳۶	۰/۰۰۰۷۳	۰/۵۸۳ (۰/۱۸۳)	۴	۹	خراسان رضوی (منهای نوار شرقی)
-۰/۴۵۵	-۱/۴۴۳	۰/۰۰۱۸۷	۰/۸۰۰ (۰/۱۰۰)	۵	۱۰	خراسان شمالی
-۰/۵۵۲	-۰/۷۳۶	۰/۰۰۱۷۹	۰/۷۵۶ (۰/۱۳۰)	۵	۱۰	زنجان
۲/۰۴۷	۱/۶۵۰	۰/۰۰۱۰۰	۰/۵۷۱ (۰/۱۱۹)	۲	۷	قزوین
-۰/۸۸۷	-۰/۷۱۰	۰/۰۰۰۸۸	۰/۸۳۳ (۰/۲۲۲)	۳	۴	البرز
-۳/۷۱۱	-۱/۶۹۲	۰/۰۰۰۸۴	۰/۵۸۴ (۰/۱۲۷)	۷	۲۰	همدان

اعداد پررنگ در تحلیل (Fu' Fs و Tajima's D)، بیانگر مقدار معنی‌دار این آماره می‌باشد ($P < 0.05$).





شکل ۳: درخت فیلوژنی سنجاب زرد زمینی در ایران با استفاده از دو روش بایزین و حداکثر درست‌نمایی توپولوژی یکسانی را نشان می‌دهند. اعداد سمت چپ نمایانگر احتمال پسین حاصل از درخت بایزین و اعداد سمت راست مربوط به شاخص بوت استرپ حاصل از روش حداکثر درست‌نمایی هستند. کلا روسیه-قزاقستان به عنوان کلاد خواهری برای سنجاب زرد زمینی ایران در این درخت مشاهده می‌شود. دو گونه *S. taurensis* و *S. citellus* به عنوان برون گروه استفاده شده است.



شکل ۴: شبکه هاپلوتایپی سنجاب زمینی زرد ایران با استفاده از منطق TCS



جدول ۴: هاپلوتاایپ‌های یافت شده سنجاب زمینی زرد ایران براساس نمونه‌های توالی‌یابی شده

محل جغرافیایی	هاپلوتاایپ	کد نمونه	سایت های تغییر پذیر	تعداد هاپلوتاایپ
نوارشرقی ایران	Hap_1	۰۴۹-۰۵۰-۰۵۷-۰۶۰-۰۷۹-۰۸۰-۱۴۳-۱۴۴	TTCGAAGAACCGCTGTAGCTGCTTTACCTTCACAA	۷
	Hap_11	۰۸۲-۱۴۰	T.....	
	Hap_12	۰۸۳	T.....	
	Hap_13	۰۸۴	G.....	
	Hap_21	۱۳۳-۱۳۵	...A.....T.....C.C.....	
	Hap_22	۱۳۷-۱۳۸-۱۳۹	...G.....	
	Hap_23	۱۴۱	T.....	
خراسان رضوی (منهای نوارشرقی)	Hap_4	۰۵۹-۰۶۲-۰۶۳-۰۷۵-۰۷۶-۰۸۸	C.....GTTA.C..G..C...C...T.....G	۴
	Hap_5	۰۵۸	C.....T..GTTA.C..G..C...C...T.....G	
	Hap_8	۰۶۹	C.....GGTTA.C..G..C.G.C...T.....G	
	Hap_9	۰۷۸	C.....GTTA.C..G..C.G.C...T.....G	
خراسان شمالی	Hap_2	۰۵۱-۰۵۳-۰۵۴-۰۷۳	C.....GTTA.C..G..C...C...T...G..G	۵
	Hap_3	۰۵۲	..T.....GTTA....G..C.....C.....G	
	Hap_4	۰۵۵-۰۵۶-۰۷۱	C.....GTTA.C..G..C...C...T.....G	
	Hap_9	۰۷۰	C.....GTTA.C..G..C.G.C...T.....G	
	Hap_10	۰۷۴	C.....GTTA.C..G..C...C...T.....G	
زنجان	Hap_3	۰۹۴	..T.....GTTA....G..C.....C.....G	۵
	Hap_4	۰۹۶-۱۱۶	C.....GTTA.C..G..C...C...T.....G	
	Hap_14	۰۹۱-۰۹۲-۰۹۳-۱۰۳F-۱۰۳M	C.....A.GTTA.C..G..C...C...T.....G	
	Hap_15	۰۹۵	GTTA.C..G..C...C...T.....G	
	Hap_17	۱	C.T...A.GTTA.C..G..C...C...T.....G	
کردستان	Hap_14	۱۱۲	C.....A.GTTA.C..G..C...C...T.....G	۱
قزوین	Hap_6	۰۶۴-۰۶۵-۰۸۵	..T.....GTTA....G.A.C.....C.....G	۲
	Hap_7	۰۶۸-۰۸۶-۰۸۷F-۰۸۷M	..T.....GTTA....A.G..C.....C.....G	
البرز	Hap_3	۱۱۷-۱۱۹	..T.....GTTA....G..C.....C.....G	۳
	Hap_7	۱۲۰	..T.....GTTA....A.G..C.....C.....G	
	Hap_18	۱۲۹	..T.....GTTA....G..C.....C.G...G	
همدان	Hap_3	۱۰-۱۰۰-۱۰۱-۱۰۲-۱۰۴-۱۰۵-۱۰۶-۱۱-۱۲-۳-۷-۸-۹	..T.....GTTA....G..C.....C.....G	۷
	Hap_16	۰۹۹	..T.....GTTA....G..C.....CC....G	
	Hap_19	۱۳۰-۱۳۱	..T.....GTTA....G..C.....C.....	
	Hap_20	۱۳۲	..T.....GTTA....G..C.....C...AC.	
	Hap_24	۲	..T.....GTTA....G..C.....TC....G	
	Hap_25	۵	..CT....GTTA....G..CA.....C.....G	
	Hap_26	۶	..T.....GTTA....G..CA.....C.....G	

جدول ۵: تحلیل واریانس مولکولی (AMOVA) جمعیت‌های سنجاب زمینی زرد

منابع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	درصد واریانس	FST
بین جمعیت‌ها	۷	۲۰۲/۲۷۴	۸۰/۹۵	
درون جمعیت‌ها	۷۱	۵۰/۳۸۴	۱۹/۰۵	۰/۸۰۹
کل	۷۸	۲۵۲/۶۵۸	۱۰۰	P<۰/۰۵

جدول ۶: FST جفتی جمعیت‌ها براساس روش pairwise differences در نرم‌افزار Arlequin

نوارشرقی ایران	خراسان رضوی (منهای نوارشرقی)	خراسان شمالی	زنجان	کردستان	قزوین	البرز	همدان
۰/۸۸۵	۰/۰۶۷	۰/۱۴۴	۰/۷۰۴	۰/۸۵۷	۰/۱۰۹	۰/۰۲۶	۰/۰۰۰
۰/۸۴۷	۰/۲۱۳	۰/۰۳۰	۰/۷۵۵	۰/۸۶۷	۰/۳۱۴		
۰/۸۵۱	۰/۴۲۴	۰/۷۲۴	۰/۷۸۴	۰/۸۷۱			
۰/۸۶۸	۰/۸۷۰	۰/۸۷۳	۰/۷۸۶				
۰/۸۵۷							
۰/۸۴۸							
۰/۸۶۸							



بحث

این مطالعه با توالی‌یابی کامل نشانگر میتوکندریایی سیتوکروم *b* و براساس ۳۵ جایگاه تغییرپذیر نشان داد که جمعیت‌های سنجاب زمینی زرد ایران با توزیع جغرافیایی وسیع از شرق تا غرب این کشور به سه تبار عمده تقسیم می‌شوند. گروه اول دربرگیرنده نوار شرقی و شمال‌شرق ایران شامل جمعیت‌هایی از مناطق تربت حیدریه، زاوه، خواف، تایباد و تربت‌جام تا مرز افغانستان و نیز تاحدی ترکمنستان است. گروه دوم نیز شامل نمونه‌هایی از مرکز و غرب خراسان رضوی، خراسان شمالی، زنجان و کردستان بوده، گروه سوم جمعیت‌هایی از مناطق همدان، قزوین و البرز را دربر می‌گیرد. تجزیه واریانس مولکولی و شاخص F_{ST} ساختار ژنتیکی متفاوت و معنی‌داری را بین این جمعیت‌ها مشخص ساخته است. علاوه بر این F_{ST} جفتی تمایز ژنتیکی معنی‌داری را در بین استان‌های محدوده پراکنش این گونه نمایان و میزان واگرایی ژنتیکی نسبتاً بالایی را نشان داده است.

اگرچه واگرایی عمیق بین تبارها به همراه هم‌پوشی اندک گستره جغرافیایی هاپلوتاپی‌ها بیانگر انشقاق از نوع آلپاتریک است (Avisé, ۲۰۰۰) و بر وجود موانع موثر جغرافیای زیستی اشاره دارد (Kryštufek و همکاران، ۲۰۰۹)، با این وجود، آنالیزهای شبکه هاپلوتاپی و درخت فیلوژنی حاصل از منطق‌های بازین و بیشینه احتمال در این مطالعه نشان داد که جمعیت‌هایی از استان‌های خراسان رضوی و شمالی با جمعیت‌هایی از استان‌های غربی ایران شامل زنجان و کردستان با بیش از حدود ۱۰۰۰ کیلومتر و بدون هیچ مانع مشخص جغرافیایی در یک گروه قرار می‌گیرند. این مهم می‌تواند وجود یک جمعیت پیوسته در گذشته را از شمال‌شرقی تا غرب ایران در جنوبی‌ترین قسمت دریای خزر تداعی کند. بدین ترتیب که با گذشت زمان، جمعیت مرکزی، یا در نتیجه فعالیت‌های انسانی و یا در نتیجه گسترش سریع جمعیت و نیز تداخل و انقباضات مربوط از بین رفته و منجر به تداوم صرف جمعیت شرقی و غربی در این مناطق داشته شده است (Asgharzadeh و همکاران، ۲۰۱۹). علاوه بر این تنوع هاپلوتاپی بالا و میزان تنوع پایین تنوع نوکلئوتیدی در جمعیت‌های سنجاب زمینی زرد ایرانی می‌تواند دلیلی بر گسترش سریع جمعیت باشد (Avisé, ۲۰۰۰).

تحلیل شبکه هاپلوتاپی سنجاب زمینی زرد ایران نیز با ساختار ستاره‌ای شکل خود وجود چنین شرایطی را تأیید می‌نماید. مشاهده چنین ساختاری می‌تواند نتیجه‌ای از گسترش ناگهانی جمعیت‌ها باشد (Slatkin و Hudson, ۱۹۹۱). هم‌چنین استفاده از شاخص‌های آزمون خنثی‌سازی یک روش مطمئن برای تصمیم‌گیری در مورد بروز یا عدم بروز گسترش ناگهانی جمعیت‌ها معرفی شده است (Milá و همکاران،

۲۰۰۷؛ Wang و همکاران، ۲۰۰۹)، به این ترتیب که اگر مقادیر شاخص‌های F_u 's F_s و یا $Tajima's D$ منفی و معنی‌دار شوند، می‌توان به وقوع یک گسترش ناگهانی در جمعیت تعبیر شود (Fu, ۱۹۹۷؛ Tajima, ۱۹۸۹). بر این اساس، نتایج این مطالعه نشان داد که شاخص F_u 's F_s و $Tajima's D$ برای سنجاب زمینی زرد در برخی از جمعیت‌های استانی مانند همدان منفی و معنی‌دار به‌دست آمد و در کل F_u 's F_s برای سنجاب زمینی زرد ایران منفی و معنی‌دار و شاخص $Tajima's D$ هم منفی (ولی نه معنی‌دار) بوده است. از آنجایی که آزمون F_s نسبت به سایر آزمون‌ها توان بیشتری در تعیین گسترش ناگهانی جمعیت دارد (Ramos-Onsins و Rozas, ۲۰۰۲؛ Ramírez-Soriano و همکاران، ۲۰۰۸)، در نتیجه می‌توان با احتمال زیاد وقوع گسترش ناگهانی در جمعیت‌های ایرانی سنجاب زمینی را تفسیر نمود که طی آن جمعیت‌ها به سمت شرق و پس از آن شمال‌شرقی و غرب حرکت کردند (Asgharzadeh و همکاران، ۲۰۱۹). این یافته‌ها با نتایج مطالعه Gündüz و همکاران (۲۰۰۷) با تفکیک پنج گروه فیلوژنتیکی مشخص از سنجاب زمینی آسیای صغیر در ترکیه هم‌خوانی دارد.

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که تبار نوارشرقی ایران با گستره به نسبت کوچکی در حدود ۱۵۰۰۰ کیلومتر مربع در مرزهای ایران و افغانستان محدود شده است. هم‌چنین پراکنش تبار شمال‌شرقی و غربی ایران به‌واسطه تأثیر فعالیت‌های لجام گسیخته انسان و عدم آمایش اصولی سرزمین لکه‌لکه شده است و انزوای این لکه‌ها منجر به قطع جریان ژن و در نتیجه سیر تکاملی مجزای آن‌ها از یکدیگر خواهد شد. بر این اساس، ارزیابی مجدد سطح حفاظتی این گونه توسط IUCN بر پایه درخت تکاملی ضروری به‌نظر می‌رسد. در واقع درخت تکاملی یک گروه از گونه‌ها، می‌تواند میزان حفاظت را برای آن دسته از گونه‌ها ارائه دهد (Stümpel و همکاران، ۲۰۱۶). از این‌رو مطالعه روابط تبارشناختی مبنای هر طرح حفاظتی برای گونه‌ها بوده، اجازه می‌دهد تا هر کلاد به‌طور مجزایی حفاظت شود.

تبارهای فیلوژنتیکی با جریان ژنی بسیار محدود واحدهای تکاملی معنی‌دار مناسبی برای حفاظت محسوب می‌شوند (Fraser و Bernatchez, ۲۰۰۱). از این‌رو همه تبارهای مجزای سنجاب زرد زمینی در ایران را می‌توان به‌عنوان واحدهای تکاملی معنی‌دار مناسب برای حفاظت در نظر گرفت. در مجموع نتایج این مطالعه نشان داد که سنجاب زمینی زرد دارای سه واحد تکاملی مجزا در ایران بوده که در واقع سه واحد تکاملی معنی‌دار را برای سه محدوده پراکنش نوار شرقی ایران تا مرز افغانستان و تا حدودی ترکمنستان، خراسان (شمال، مرکز، غرب)، زنجان و کردستان و نیز قزوین، البرز و همدان را توصیف می‌کنند. لذا توجه به این سه واحد مستقل و در نظر گرفتن این محدوده‌ها و استان‌ها به‌عنوان هم‌گروه در برنامه‌های عمل، ضرورت



analysis of a 30,000-year-old *Urocyon* *glacialis* from northeastern Siberia reveals phylogenetic relationships between ancient and present-day arctic ground squirrels. Scientific Reports. Vol. 7, pp: 42639.

۱۱. Fraser, D.J. and Bernatchez, L., 2001. Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. Molecular Ecology. Vol. 10, pp: 2741-2752.
۱۲. Frankham, R.; Briscoe, D.A. and Ballou, J.D., 2002. Introduction to conservation genetics: Cambridge University Press.
۱۳. Fu, Y.X., 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. Genetics. Vol. 147, No. 2, pp: 915-925.
۱۴. Gündüz, İ.; Jaarola, M.; Tez, C.; Yenyurt, C.; Polly, P.D. and Searle, J.B., 2007. Multigenic and morphometric differentiation of ground squirrels (*Spermophilus*, Scuridae, Rodentia) in Turkey, with a description of a new species. Molecular Phylogenetics and Evolution. Vol. 43, pp: 916-935.
۱۵. Harrison, R.G.; Bogdanowicz, S.M.; Hoffmann, R.S.; Yensen, E. and Sherman, P.W., 2003. Phylogeny and evolutionary history of the ground squirrels (Rodentia: Marmotinae). Journal of Mammalogy Evolution. Vol. 10, pp: 249-276.
۱۶. Helgen, K.M.; Cole, F.R.; Helgen, L.E. and Wilson, D.E., 2009. Generic revision in the Holarctic ground squirrel genus *Spermophilus*. Journal of Mammalogy. Vol. 90, pp: 270-305.
۱۷. Herkert, J.R., 1994. The effects of habitat fragmentation on midwestern grassland bird communities. Ecological applications. Vol. 4, No. 3, pp: 461-471.
۱۸. Herron, M.D.; Castoe, T.A. and Parkinson, C.L., 2004. Sciurid phylogeny and the paraphyly of Holarctic ground squirrels (*Spermophilus*). Molecular Phylogenetics and Evolution. Vol. 31, pp: 1015-1030.
۱۹. Hrbek, T.; Farias, I.P.; Crossa, M.; Sampaio, I.; Porto, J.I. and Meyer, A., 2005. Population genetic analysis of *Arapaima gigas*, one of the largest freshwater fishes of the Amazon basin: implications for its conservation. Animal Conservation. Vol. 8, pp: 297-308.
۲۰. IUCN, 2019. The IUCN Red List of threatened species. Version 2019-2. <http://www.iucnredlist.org>. Accessed 08 August 2019.
۲۱. Kapustina, S.Y.; Brandler, O.V. and Adiya, Y., 2015. Phylogeny of genus *Spermophilus* and position of Alashan ground squirrel (*Spermophilus alashanicus*, Büchner, 1888) on phylogenetic tree of Palearctic short-tailed ground squirrels. Molecular Biology. Vol. 49, pp: 391-396.
۲۲. Khalilipour, O.; Rezaei, H.R.; Alizadeh Shabani, A.; Kaboli, M. and Ashrafi, S., 2014. Genetic structure and differentiation of four populations of Afghan Pika (*Ochotona rufescens*) in Iran based on mitochondrial cytochrome b gene. Zoology in the Middle East. Vol. 60, pp: 288-298.
۲۳. Kryštufek, B.; Bryja, J. and Bužan, E.V., 2009. Mitochondrial phylogeography of the European ground squirrel, *Spermophilus citellus*, yields evidence on refugia for steppic taxa in the southern Balkans. Heredity. Vol. 103, pp: 129-135.
۲۴. Kryštufek, B. and Vohralík, V., 2012. Taxonomic revision of the Palearctic rodents (Rodentia): Sciuridae: Xerinae 1 (*Eutamias* and *Spermophilus*). Lynx, n. s. (Praha). Vol. 43, No. 1-2, pp: 17-111.
۲۵. Lanfear, R.; Calcott, B.; Ho, S.Y.W. and Guindon, S., 2012. PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses.

مدیریت حفاظت این گونه در مباحث برنامه‌ریزی‌های قابل پیش‌بینی و اجرا برای مدیریت حیات وحش در ایران خواهد بود.

تشکر و قدردانی

از ادارات کل حفاظت محیط زیست استان‌های خراسان رضوی، خراسان شمالی، تهران، البرز، قزوین، زنجان، همدان، آذربایجان غربی، محیط‌بانان و کارشناسان گرانقدر به‌خصوص آقایان مهندس خانی، رمضانی، جهانپور، مصطفی‌نژاد، یوسفی، قرجه‌لو، ویسی، حاتمی، محمدی و نیز آقای مسعود نظری‌زاده بخاطر همه محبت‌های بی‌دریغ‌شان سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

۱. کرمی، م.؛ فیض‌الهی، ک. و قدیریان، ط.، ۱۳۹۵. اطلس پستانداران ایران. انتشارات جهاد دانشگاهی واحد استان البرز (واحد خوارزمی). ۲۹۲ صفحه.
۲. Asgharzadeh, A.; Kaboli, M.; Rajabi-Maham, H. and Naderi, M., 2019. Phylogeny and genetic structure of the Yellow ground squirrel, *Spermophilus fulvus*, in Iran. Mammalian Biology. Vol. 98, pp:137-145.
۳. Ashrafzadeh, M.R.; Kaboli, M. and Naghavi, M.R., 2016. Mitochondrial DNA analysis of Iranian brown bears (*Ursus arctos*) reveals new phylogeographic lineage. Mammalian Biology. Vol.81, No.1, pp: 1-9.
۴. Ashton, K.G. and de Queiroz, A., 2001. Molecular systematics of the western rattlesnake, *Crotalus viridis* (Viperidae), with comments on the utility of the D-loop in phylogenetic studies of snakes. Molecular Phylogenetics and Evolution. Vol. 21, pp: 176-189.
۵. Avise, J.C., 2000. Phylogeography: the history and formation of species: Harvard university press.
۶. Bataillon, T.M.; David, J.L. and Schoen, D.J., 1996. Neutral genetic markers and conservation genetics: simulated germplasm collections. Genetics. Vol. 144, No. 1, pp: 409-417.
۷. Colombo, F.; Marchisio, E.; Pizzini, A. and Cantoni, C., 2002. Identification of the goose species (*Anser anser*) in Italian Mortara salami by DNA sequencing and a Polymerase Chain Reaction with an original primer pair. Meat Science. Vol. 61, pp: 291-294.
۸. Davison, J.; Ho, S.Y.; Bray, S.C.; Korsten, M.; Tammelaht, E.; Hindrikson, M.; Ostbye, k.; Ostbye, E.; Lauritzen, S.E.; Austin, J.; Cooper, A. and Saarma, U., 2011. Late-Quaternary biogeographic scenarios for the brown bear (*Ursus arctos*), a wild mammal model species. Quaternary Science Reviews. Vol. 30, pp: 418-430.
۹. Excoffier, L.; Laval, G. and Schneider, S., 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary bioinformatics. Vol. 1, pp: 47-50.
۱۰. Faerman, M.; Bar-Gal, G.K.; Boaretto, E.; Boeskorov, G.G.; Dokuchaev, N.E.; Ermakov, O.A.; Golenishchev, F.N.; Gubin, S.V.; Mintz, E.; Simonov, E.; Surin, V.L.; Titov, S.V.; Zanina, O.G. and Formozov, N.A., 2017. DNA



۴۴. Xia, X. and Lemey, P., 2009. Assessing substitution saturation with DAMBE. *phylogenetic Handb. a Pract. approach to DNA and protein phylogeny*. Vol. 2, pp: 615-630.
۴۵. Xia, X. and Xie, Z., 2001. DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of heredity*. Vol. 92, pp: 371-373.
۴۶. Zuckerberg, B.; Carling, M. and Dor, R., 2014. Differential relationships between habitat fragmentation and within-population genetic diversity of three forest-dwelling birds. *bioRxiv*, 004903.
- Molecular Phylogenetics and Evolution. Vol. 29, pp: 1695-1701.
۲۶. Leigh, J.W. and Bryant, D., 2015. POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecology Evolution*. Vol. 6, pp: 1110-1116.
۲۷. Librado, P. and Rozas, J., 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. Vol. 25, pp: 1451-1452.
۲۸. McNeely, J.A.; Miller, K.R.; Reid, W.V.; Mittermeier, R.A. and Werner, T.B., 1990. Conserving the world's biological diversity: International Union for conservation of nature and natural resources.
۲۹. Milá, B.; McCormack, J.E.; Castañeda, G.; Wayne, R.K. and Smith, T.B., 2007. Recent postglacial range expansion drives the rapid diversification of a songbird lineage in the genus Junco. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. Vol. 274, pp: 2653-2660.
۳۰. Nguyen, L.T.; Schmidt, H.A.; von Haeseler, A. and Minh, B.Q., 2014. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* Vol. 32, pp: 268-274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>.
۳۱. Rambaut, A. and Drummond, A.J., 2007. Tracer. v. 1.5 Available: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
۳۲. Rambaut, A. and Drummond, A.J., 2012. Fig Tree: Tree Figure Drawing Tool Version 1.4.
۳۳. Ramírez-Soriano, A.; Ramos-Onsins, S.E.; Rozas, J.; Calafell, F. and Navarro, A., 2008. Statistical power analysis of neutrality tests under demographic expansions, contractions and bottlenecks with recombination. *Genetics*. Vol. 179, No. 1, pp: 555-567.
۳۴. Ramos-Onsins, S.E. and Rozas, J., 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution*. Vol. 19, pp: 2092-2100.
۳۵. Ronquist, F. and Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. Vol. 19, pp: 1572-1574.
۳۶. Sambrook, J.; Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
۳۷. Slatkin, M. and Hudson, R.R., 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics*. Vol. 129, pp: 555-562.
۳۸. Stümpel, N.; Rajabizadeh, M.; Avci, A.; Wüster, W. and Joger, U., 2016. Phylogeny and diversification of mountain vipers (*Montivipera*, Nilson et al., 2001) triggered by multiple Plio-Pleistocene refugia and high-mountain topography in the Near and Middle East. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Vol. 101, pp: 336-351.
۳۹. Tajima, F., 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. Vol. 123, No. 3, pp: 585-595.
۴۰. 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.
۴۱. Thorington, R.W.J.; Koprowski, J.L.; Steele, M.A. and Wharton, J.F., 2012. *Squirrels of the world*. JHU Press.
۴۲. Wang, L.Y.; Ikeda, H.; Liu, T.L.; Wang, Y.J. and Liu, J.Q., 2009. Repeated range expansion and glacial endurance of *Potentilla glabra* in the Qinghai Tibetan Plateau. *J. of Integrative Plant Biology*. Vol. 51, pp: 698-706.
۴۳. Wink, M. and Heidrich, P., 2000. Molecular systematics of owls (Strigiformes) based on DNA-sequences of the mitochondrial cytochrome b gene. *Raptors at Risk*. (Eds Chancellor, R.D. and Meyburg, B.U.,). pp: 819-828.



Genetic diversity of the Yellow ground squirrel *Spermophilus fulvus* (Lichtenstein, 1823) in Iran

- **Afsaneh Asgharzadeh:** Department of Environment, Faculty of Natural Resources and Environment, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
- **Mohammad Kaboli*:** Department of Environmental Science, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
- **Hassan Rajabi Maham:** Department of Animal Sciences and Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
- **Morteza Naderi:** Department of Environmental Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, Iran

Received: October 2019

Accepted: January 2020

Keyword: *Spermophilus fulvus*, Genetic diversity, Populations, Mitochondrial genes

Abstract

To study the genetic diversity of the Yellow ground squirrel (*Spermophilus fulvus*) in Iran, 79 tissue samples were collected from seven provinces (Razavi Khorasan, North Khorasan, Zanzan, Qazvin, Alborz, Hamedan and Kurdistan). Following DNA isolation and polymerase chain reaction (PCR), genetic variation was investigated using the complete sequencing of the mitochondrial Cytochrome *b* (cyt *b*) (1140 bp). Results of Bayesian and maximum likelihood trees based on cyt *b* using 79 individuals showed that the Yellow ground squirrel was divided into three main mtDNA clades from eastern to western Iran. Clade IR1 included populations from eastern and northeastern Iran, along with individuals from Iran-Turkmenistan-Afghanistan borderline. Clade IR2 included populations from northeastern and western provinces of Iran (North Khorasan, Razavi Khorasan, Zanzan, and Kurdistan provinces), whereas Clade IR3 included populations from western Iran (Hamedan, Qazvin, and Alborz provinces). Our study reveals Iranian populations of the Yellow ground squirrel have undergone sudden range expansions. Based on the genetic diversity analyses, 26 unique haplotypes and 35 informative sites were detected, implying high levels of genetic and haplotype diversity. Additionally, an analysis of molecular variance (AMOVA) and fixation index (F_{ST}) confirmed a significant genetic structure among the main groups and populations. Finally, our results, based on the mitochondrial genealogy, recommend that the distinct clades of *S. fulvus* should be recognized as ESUs and be the focus of conservation efforts in the hope of securing the long-term persistence of the Yellow ground squirrel in Iran.

* Corresponding Author's email: mkaboli@ut.ac.ir

