

تنوع ژنتیکی و تبارشناسی کوکر شکم سفید (*Pterocles alchata* (Linnaeus, ۱۷۶۶) با استفاده از توالی ناحیه سیتوکروم بی میتوکندری در شمال شرق ایران (مطالعه موردی: منطقه گمیشان)

- **آزاده تقویان اول:** گروه محیط زیست، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۴۹۱۳۸-۱۵۷۳۹
- **حمیدرضا رضایی*:** گروه محیط زیست، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۴۹۱۳۸-۱۵۷۳۹
- **جلیل ایمانی هرسینی:** گروه تنوع زیستی، دانشکده محیط زیست، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، صندوق پستی: ۷۷۵-۱۴۵۱۵

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۵

چکیده

یکی از بزرگترین جمعیت‌های کوکر شکم سفید (*Pterocles alchata*) با بیش از چند هزار قطعه در فصل پاییز و زمستان در منطقه گمیشان استان گلستان پراکنش دارد. این گونه در زیستگاه‌های استپی خشک، باز و بدون درخت و بوته‌های بلند زیست می‌کند و با وجود کاهش جمعیت این گونه به دلیل استفاده از سموم آفت کش، شکار غیرقانونی، تغییر زیستگاه و اقلیم، تاکنون هیچ گونه مطالعه بوم‌شناسی و ژنتیکی بر روی این گونه در ایران صورت نگرفته است. در این تحقیق برای دستیابی به اولین اطلاعات در مورد روابط ژنتیکی در میان جمعیت‌های کوکر شکم سفید در شمال شرق ایران ۹ نمونه بافت این گونه در منطقه گمیشان جمع‌آوری شد. پس از استخراج دی‌ان‌ای، ژن سیتوکروم بی میتوکندری در ۹ نمونه توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، تکثیر و ۹۱۲ جفت نوکلئوتید از این ژن برای هر نمونه توالی‌یابی و ویرایش شد. براساس نتایج در بین نمونه‌های توالی‌یابی شده، سه هاپلوتایپ متفاوت شناسایی و تنوع هاپلوتایپی برابر با ۰/۴۱۷ برآورد شد. نتایج درخت تبارشناسی با روش Bayesian و بیشترین احتمال نشان داد که تمامی نمونه‌ها مربوط به یک شاخه هستند و به‌خوبی از دو گونه کوکر گندمی (*P. coronatus*) و کوکر ناماکوا (*P. namaqua*) که تنها توالی‌های ثبت شده از جنس کوکر در ژن‌بانک بودند جدا شده است که این امر بیانگر روند تکاملی خاص این گونه از سایر گونه‌های این جنس است. این مطالعه به‌عنوان نقطه آغاز مطالعات بر روی کوکر شکم سفید با استفاده از ناحیه سیتوکروم بی در دیاست که می‌تواند روابط تبارشناسی جمعیت‌های مختلف این گونه را مشخص کند.

کلمات کلیدی: کوکر شکم سفید، تبارشناسی، تنوع ژنتیکی، سیتوکروم بی، گمیشان، استان گلستان



مقدمه

کوکر شکم سفید (*Pterocles alchata*) از خانواده کوکر یا باقرقره (Pteroclididae) است. کوکر شکم سفید حدود ۳۵ تا ۳۹ سانتی متر طول دارد. دم بلند و تاب دار، شاه پره های بال سیاه رنگ، سطح پشتی بدن جنس نر به رنگ قهوه ای مایل به خاکستری و جنس ماده کم رنگ تر، روتنه نخودی با خطوط نقطه نقطه ای تیره است. سطح زیرین بدن سفید رنگ است. پرند نر دارای نوار سینه ای بلوطی رنگ، با حاشیه باریک سیاه رنگی در بالا و پایین است. نوار سینه ای در پرند ماده به رنگ طلایی و زرد کم رنگ که سه نوار عرضی باریک سیاه از آن گذشته است (منصوری، ۱۳۸۷). زیستگاه این گونه شامل زمین های خشک، علفزارهای باز بدون درخت و بوته های بلند و مقدار متعارفی از زمین های آیش و کشت نشده است (Suárez و همکاران، ۱۹۹۷) و دشت های پست با موزاییکی از مراتع طبیعی، زمین های خشک و شنی غیر قابل کشت یا زمین های شور را ترجیح می دهد (Simmons و Cramp، ۱۹۸۰). از مزارع غلات، باغ های زیتون و تاکستان ها (Martín و همکاران، ۲۰۱۰a) و مناطق با پوشش متر اکم، محصولات زراعی بلند و مناطق تپه ای دوری می کند و معمولاً در ارتفاع زیر ۱۰۰۰ متر یافت می شود (Madge و همکاران، ۲۰۰۲). کوکر شکم سفید که در زمستان اغلب با زنگوله بال (*Tetrax tetrax*) دیده می شود (Martín و همکاران، ۲۰۱۰b)، در بهار و تابستان به خصوص در اواخر بهار و تیر ماه به طور متوسط سه عدد تخم می گذارد (Madge و همکاران، ۲۰۰۲؛ Urban و همکاران، ۱۹۸۶). این گونه برای لانه سازی از خراش های کوچک بر روی زمین یا از فرورفتگی طبیعی بدون پوشش استفاده و اکثراً از دانه ها و به میزبان کم تر از شاخه ها و برگ های سبز تغذیه می کند (Madge و همکاران، ۲۰۰۲). جمعیت این گونه در اروپا در حدود ۱۰۰۰۰-۲۱۰۰۰ جفت برآورد شده است (BirdLife International، ۲۰۰۴) و به دلیل تغییرات فعالیت های کشاورزی کاهش یافته است (Madge و همکاران، ۲۰۰۲). در اسپانیا بیش از نیمی از آشفته گی های جمعیت کوکر شکم سفید مربوط به پرندگان شکاری است اما پستانداران شکارگر و انسان نیز از منابع آشفته گی هستند (Hinsley و Ferns، ۱۹۹۴). دشت های شنی، نواحی صخره ای، ریگزارهای بیابانی خشک و پرگرد و غبار و زمین های گلی خشک از جمله زیستگاه های این گونه است (Martín و همکاران، ۲۰۱۰b) و به دلیل تاثیر پذیری زیستگاه های باز از تغییرات سرزمین و تخریب زیستگاه، این پرندگان استیجی در خطر هستند اما داشتن جمعیت های مناسب این گونه را در رده کم ترین نگرانی در IUCN قرار داده است (BirdLife International، ۲۰۱۴).

کوکر شکم سفید در ایران در دو منطقه غرب زاگرس در جنوب غرب ایران و مناطق شمال شرق ایران پراکنش دارد. که جمعیت غرب

زاگرس در استان های خوزستان و بوشهر ساکن و بومی است و جمعیت شمال شرق در استان های خراسان و گلستان به صورت مهاجر و زمستان گذران پراکنش دارد. کوکر شکم سفید در شمال استان گلستان در مناطق اطراف رودخانه گرگان رود تا نزدیکی مراوه تپه پراکنش دارد که این محدوده شامل مناطق مرزی ترکمن صحرا و شمال خالد نبی به سمت غرب مراوه تپه است. بیشترین تراکم کوکر شکم سفید در فصول پاییز و زمستان بین تالاب آلاگل و تالاب گمیشان مخصوصاً در منطقه گمیشان دیده می شود. برآورد جمعیت در شمال نواحی استیجی استان گلستان در بعضی سال ها از پانزده هزار الی بیست هزار قطعه بوده است که براساس سرشماری های صورت گرفته روند کاهش در بین جمعیت این گونه را در سال های اخیر نشان می دهد. از عوامل تهدید کننده جمعیت کوکرها در استان گلستان می توان به استفاده از سموم کشاورزی، شکار غیرقانونی با اسلحه، تله و دام، تغییر اقلیم و تخریب زیستگاه اشاره کرد. با وجود پراکنش وسیع جنس کوکر در اوراسیا و افریقا، مطالعات ژنتیکی بر روی این گونه ها بسیار محدود است و تنها چند توالی از ناحیه COI این گونه و دو توالی سیتوکروم بی مربوط به گونه کوکر گندمی (*P. coronatus*) و کوکر ناما کوا (*P. namaqua*) در ژن بانک ثبت شده است. در ایران، مطالعات اندکی بر روی خانواده کوکرها صورت گرفته که شامل بررسی مطلوبیت و تعیین نیازهای زیستگاهی کوکر شکم سیاه (*Pterocles orientalis*) است (الهامی راد و همکاران، ۱۳۹۴؛ الهامی راد و همکاران، ۱۳۹۳). این مطالعه اولین تحقیق در مورد کوکر شکم سفید در ایران است که برای اولین بار داده های ژنتیکی در مورد این گونه از ایران از جمعیت های مختلف تشکیل شده را بررسی می کند. هدف از این مطالعه بررسی وضعیت کوکر شکم سفید در استان گلستان به عنوان یکی از بزرگترین جمعیت ها در شمال شرق کشور و تنوع ژنتیکی آن با استفاده از توالی یابی ناحیه سیتوکروم بی (*Cytochrome b*) دی ان ای میتوکندریایی است. ژن سیتوکروم بی به خوبی در بین پرندگان و دیگر مهره داران مورد بررسی قرار گرفته و به دلیل داشتن نرخ تکاملی سریع برای بررسی روابط ژنتیکی در سطح گونه (Smith و همکاران، ۱۹۹۱) و خانواده (Murray و همکاران، ۱۹۹۴) مناسب است. این قطعه یکی از ژن های بزرگ کدکننده پروتئین در ژنوم میتوکندریایی پرندگان است (Desjardins و Morais، ۱۹۹۰) و تاکنون هیچ مشکل ردیف آرایبی در میان پرندگان در آن مشاهده نشده است، بنابراین استفاده از توالی ژن سیتوکروم بی می تواند اطلاعات با ارزشی را برای طبقه بندی پرندگان ایجاد کند چرا که در آینده نزدیک اطلاعات ژنتیکی از اکثر گونه ها به درک تبارشناسی دقیقی در میان پرندگان می انجامد (Nunn و همکاران، ۱۹۹۶).



مواد و روش‌ها

معرفی منطقه: منطقه گمیشان که در شمالی‌ترین قسمت حاشیه

شرقی دریای خزر در ایران قرار دارد، از طرف شمال به کشور ترکمنستان، از جنوب به بندر ترکمن، از شرق به آق‌قلا و از طرف غرب به دریای خزر ختم می‌شود. متوسط حداقل درجه حرارت ۹/۶۷ در دی ماه و متوسط حداکثر درجه حرارت ۲۸/۹۵ در مرداد ماه است. این منطقه به دلیل در برداشتن مزارع وسیع و مسطح کشاورزی، عدم وجود تپه‌ها و دوری از جنگل‌های هیرکانی دارای آب و هوای خشک و نیمه‌خشک بوده و زیستگاه مناسبی برای کوکر شکم سفید و سایر کوکرها است. در این منطقه دسته‌های از ۵۰۰ تا چند هزار قطعه کوکر شکم سفید (*P. alchata*) در اراضی بایر و کشاورزی اطراف تالاب گمیشان به‌ویژه شرق تالاب از آبان ماه تا حدود بهمن ماه به هنگام کاشت گندم و جو قابل مشاهده است. میانگین سالانه دما در این

منطقه براساس اطلاعات هواشناسی شهر گمیشان ۱۷/۶ سانتی‌گراد است و میانگین بارندگی به ۳۸۱ میلی‌متر می‌رسد. در تیرماه میزان بارش در کم‌ترین حد خود قرار دارد که میانگین آن ۱۲ میلی‌متر است. بیش‌ترین میزان بارش متعلق به ماه اسفند است که به‌طور میانگین به ۵۶ میلی‌متر می‌رسد و با دمای میانگین ۲۷/۸ درجه سانتی‌گراد، مرداد گرم‌ترین ماه سال است. در دی‌ماه متوسط دما ۷/۷ درجه سانتی‌گراد است که این میزان کم‌ترین میانگین دما در تمام سال است. بین خشک‌ترین و مرطوب‌ترین ماه سال، تفاوت میزان بارش ۴۴ میلی‌متر است.

نمونه‌برداری: از ۹ نمونه کوکر شکم سفید که توسط اداره کل محیط زیست استان گلستان در سال ۱۳۹۳ از شکارچیان متخلف در منطقه گمیشان ضبط شده بود با رعایت شرایط استاندارد نمونه‌برداری شد و نمونه‌ها در اتانول ۹۶٪ فیکس شده به آزمایشگاه منتقل شد (جدول ۱).

جدول ۱: فهرست توالی‌های ناحیه سیتوکروم بی‌دی‌ان‌ای میتوکندریایی استفاده شده در این مطالعه که یا از ژن‌بانک گرفته شده

یا توسط نویسندگان این مقاله به‌دست آمده است

نام نمونه در درخت	نوع نمونه	نام علمی	نام فارسی	کشور	موقعیت	هاپلو تایپ	منبع
S ۱	بافت	<i>P. alchata</i>	کوکر شکم سفید	ایران	استان گلستان، گمیشان	۲	مطالعه حاضر
S ۲	بافت	<i>P. alchata</i>	کوکر شکم سفید	ایران	استان گلستان، گمیشان	۲	مطالعه حاضر
S ۳	بافت	<i>P. alchata</i>	کوکر شکم سفید	ایران	استان گلستان، گمیشان	۲	مطالعه حاضر
S ۴	بافت	<i>P. alchata</i>	کوکر شکم سفید	ایران	استان گلستان، گمیشان	۲	مطالعه حاضر
S ۵	بافت	<i>P. alchata</i>	کوکر شکم سفید	ایران	استان گلستان، گمیشان	۱	مطالعه حاضر
S ۶	بافت	<i>P. alchata</i>	کوکر شکم سفید	ایران	استان گلستان، گمیشان	۲	مطالعه حاضر
S ۷	بافت	<i>P. alchata</i>	کوکر شکم سفید	ایران	استان گلستان، گمیشان	۲	مطالعه حاضر
S ۸	بافت	<i>P. alchata</i>	کوکر شکم سفید	ایران	استان گلستان، گمیشان	۳	مطالعه حاضر
S ۹	بافت	<i>P. alchata</i>	کوکر شکم سفید	ایران	استان گلستان، گمیشان	۲	مطالعه حاضر
EU۱۶۷۰۱۸	ژن‌بانک	<i>P. coronatus</i>	کوکر گندمی				Brown و همکاران، ۲۰۰۸
DQ۳۸۵۲۱۶	ژن‌بانک	<i>P. namaqua</i>	کوکر ناما‌کوا				Baker و Paton، ۲۰۰۶
AF۴۸۳۳۳۶	ژن‌بانک	<i>Caloenas nicobarica</i>	کبوتر نیکوبار				Guerrini و همکاران، ۲۰۰۷
AF۱۸۲۷۱۲	ژن‌بانک	<i>Leucosarcia melanoleuca</i>	کبوتر ونگا				Clayton و Johnson، ۲۰۰۰
AM۰۸۴۵۷۵	ژن‌بانک	<i>Alectoris chukar</i>	کبک				Shapiro و همکاران، ۲۰۰۲

استخراج و توالی‌یابی دی‌ان‌ای: استخراج DNA از نمونه‌ها با

استفاده از کیت مخصوص استخراج DNA از بافت شرکت تکاپوزیست برای ۹ نمونه براساس پروتکل انجام شد. برای تکثیر ناحیه سیتوکروم بی به طول ۹۱۲ جفت‌باز از یک جفت پرایمر به نام‌های L۱۴۹۹۰ با توالی CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA و H۱۶۰۶۵ با توالی GGAGTCTTCAGTCTTTGGTTTACAAGAC استفاده شد (Hackett، ۱۹۹۶؛ Kocher و همکاران، ۱۹۸۹). حجم واکنش در ۲۵ میکرولیتر که شامل ۱/۵ میکرولیتر دی‌ان‌ای، ۱۲/۵ میکرولیتر تگ مسترمیکس، ۲ میکرولیتر پرایمر و ۹ میکرولیتر آب مقطر بود

انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز توسط دستگاه ترموسایکلر در ۳۵ سیکل انجام شد. واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۶۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۳ درجه برای ۶۰ ثانیه، تکثیر در دمای ۷۲ درجه برای ۶۰ ثانیه که یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه و یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه برای ۷ دقیقه نیز انجام شد. پس از مرحله تکثیر نهایی، دمای ترموسایکلر تا زمان برداشت محصولات PCR در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید. به‌منظور تایید تکثیر ناحیه مورد نظر طی واکنش‌های PCR الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز ۲ درصد

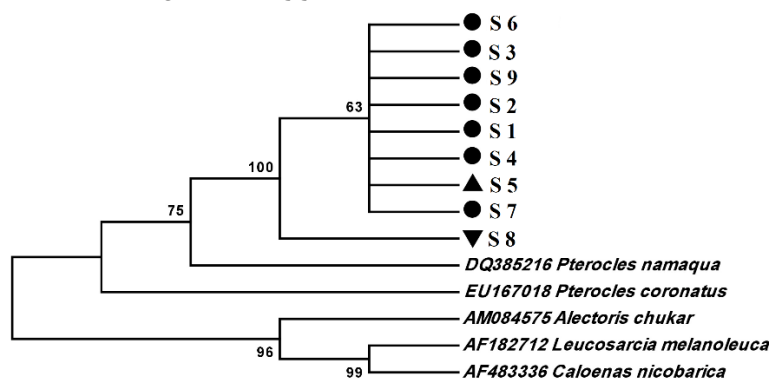


احتمال (Maximum likelihood) با ۵۰۰۰ بوتاسترپ (bootstrap) با استفاده از مدل GTR در نرم افزار Mega۵ ترسیم شد. تعداد هاپلوتایپ‌ها، تنوع نوکلئوتیدی و تنوع هاپلوتایپی نرم افزار DNAsp (Librado و Rozas، ۲۰۰۹) تعیین شد. براساس قطعه ۹۱۲ جفت بازی ناحیه سیتوکروم بی از دی‌ان‌ای میتوکندری شبکه هاپلوتایپی به روش اتصال میانه (Median-joining) با استفاده از نرم افزار NETWORK ۴،۱،۰ (Bandelt و همکاران، ۱۹۹۹) رسم گردید.

نتیجه

۹ نمونه از کوکر شکم سفید تکثیر و توالی یابی و این توالی‌ها با دو توالی کوکرگندمی (EU۱۶۷۰۱۸) (Brown و همکاران، ۲۰۰۸) و کوکر ناما کوا (DQ۳۸۵۲۱۶) (Baker و Paton، ۲۰۰۶) حاصل از ژن بانک ردیف‌آرایی شد که در نهایت ۹۱۲ جفت باز از ناحیه سیتوکروم بی با نمونه‌های دریافت شده از ژن بانک ردیف‌آرایی گردید. فهرست توالی‌ها و هاپلوتایپ‌های مربوط در جدول ۱ آورده شده است. نتایج نشان‌دهنده وجود سه هاپلوتایپ متفاوت در جمعیت کوکرهای شکم سفید استان گلستان بود. هاپلوتایپ شماره دو شامل نمونه‌های کوکر شماره ۱، ۲، ۳، ۴، ۶، ۷ و ۹ بود که فراوان‌ترین هاپلوتایپ است و دو هاپلوتایپ یک و سه به ترتیب مربوط به نمونه‌های کوکر شماره ۵ و شماره ۸ می‌باشد. مقادیر پارامترهای تنوع مولکولی از قبیل تنوع هاپلوتایپی، واریانس تنوع هاپلوتایپی و تنوع نوکلئوتیدی به ترتیب ۰/۴۱۷، ۰/۰۳۶۳۵ و ۰/۰۰۰۷۳ محاسبه گردید.

نتایج درخت تبارشناسی به روش بیش‌ترین احتمال و Bayesian در شکل ۱ و ۲ نشان داده شده است که همه نمونه‌های کوکر شکم سفید در یک شاخه قرار می‌گیرند و از دو گونه کوکرگندمی (*P. coronatus*) و ناما کوا (*P. namaqua*) کاملاً متمایز است. آنالیز تبارشناسی به روش Bayesian صحت آماری بالایی برای جداسازی این گونه از دو گونه دیگر را داشت (شکل ۲).



شکل ۱: درخت تبارشناسی کوکر شکم سفید (*Pterocles alchata*) ناحیه سیتوکروم بی میتوکندریایی به روش بیش‌ترین احتمال

این درخت با استفاده از مدل GTR و ۵۰۰۰ بوتاسترپ در نرم افزار Mega۵ ترسیم شده است.

با رنگ آمیزی اتیدیوم بر مایند صورت گرفت و پس از اطمینان از کیفیت قطعه تکثیر شده، به منظور تعیین توالی به شرکت بایونیر کره جنوبی ارسال و در نهایت این نمونه‌ها با استفاده از دستگاه ABI ۳۷۳۰ به روش اتوماتیک سانگر توالی‌یابی شدند.

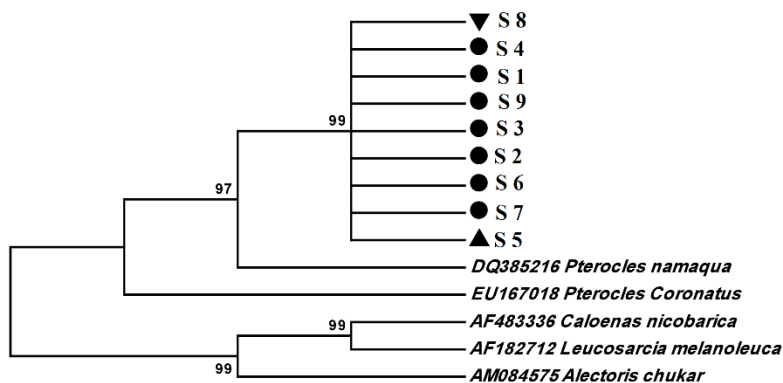
روش تحلیل تبارشناسی و تنوع ژنتیکی: نتایج حاصل از

توالی‌یابی توسط نرم افزار Seqscape V ۲،۶ (Applied Biosystems) ویرایش شد. سپس توالی‌ها توسط الگوریتم Clustal W (Thompson و همکاران، ۱۹۹۴) در نرم افزار Mega۵ (Tamura و همکاران، ۲۰۱۱) ردیف‌آرایی انجام شد. بهترین مدل تغییر نوکلئوتیدی با استفاده از نرم افزار Modeltest (Crandall و Posada، ۱۹۹۸) براساس آماره BIC با مقدار ۵۵۸۶/۶۲۲۲ مدل GTR (Rodriguez و همکاران، ۱۹۹۰) شد. از توالی گونه‌های کبک (*Alectoris chukar*) با شماره دسترسی (AM۰۸۴۵۷۵) (Shapiro و همکاران، ۲۰۰۲)، کبوترونکا (*Leucosarcia melanoleuca*) با شماره دسترسی (AF۱۸۲۷۱۲) (Johnson و Clayton، ۲۰۰۰) و کبوتر نیکوبار (*Caloenas nicobarica*) با شماره دسترسی (AF۴۸۳۳۳۶) (Guerrini و همکاران، ۲۰۰۷) به عنوان گروه خارجی استفاده شد. تنها دو توالی سیتوکروم بی از جنس *Pterocles* در ژن بانک وجود داشت که برای مقایسه تبارشناسی از ژن بانک گرفته شد (جدول ۱).

درخت تبارشناسی Bayesian با استفاده از نرم افزار MrBayes

V ۳،۲ (Ronquist و Huelsenbeck، ۲۰۰۳) براساس مدل GTR تکامل توالی با دو اجرای مستقل از چهار چرخه مارکو (یک سرد یا cold و سه حرارت داده شده یا heated) در طی ۵ میلیون نسل و نمونه‌گیری در هر ۱۰۰ نسل ترسیم شد. ۲۵٪ اول از همه درخت‌های نمونه‌گیری و پارامترهای تخمین زده شده به عنوان نسل سوخته در نظر گرفته شد. هم‌گرایی با کاهش مقدار انحراف استاندارد پیش شد که مقدار آن به زیر ۰/۰۱ رسید که در این حالت مقدار نسل‌ها برای اجرای مدل رسم درخت مناسب است. درخت تبارشناسی بیش‌ترین





شکل ۲: تبارشناسی براساس ردیف آرایه توالی‌های ناحیه سیتوکروم بی با استفاده از تحلیل Bayesian

نمونه‌های کوکر شکم سفید به همراه توالی‌های دو گونه کوکر موجود در ژن بانک با مدل GTR انجام شد که مقدار نشان داده شده بر روی نقاط درخت احتمال خلفی (Posterior Probability) می‌باشد.

دیگر بیشترین فاصله با مقدار ۰/۱۶۹۰ بین نمونه ۵ کوکر شکم سفید و کوکر گندمی است و دو گونه کوکر گندمی و ناماکوا نیز با مقدار ۰/۱۵ از یکدیگر فاصله دارند.

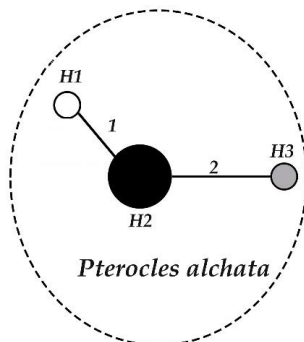
فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های کوکر شکم سفید و دو گونه کوکر گندمی و ناماکوا در جدول ۲ آورده شده است که بیشترین فاصله ژنتیکی با مقدار ۰/۰۳۳ بین نمونه‌های کوکر شکم سفید بین کوکر شماره ۵ و کوکر شماره ۸ است. بین کوکر شکم سفید و دو گونه کوکر

جدول ۲: فاصله ژنتیکی بین کوکرهای شکم سفید در جمعیت شمال شرق ایران و نمونه‌های استخراج شده از ژن بانک به روش P-DISTANCE در نرم افزار MEGA ۵

نام	S _۵	S _۶	S _۷	S _۱	S _۸	S _۹	S _۲	S _۳	S _۴	<i>P. namaqua</i>	<i>P. coronatus</i>
S _۵	۰										
S _۶	۰/۰۰۲۲	۰									
S _۷	۰/۰۰۲۲	۰	۰								
S _۱	۰/۰۰۲۲	۰	۰	۰							
S _۸	۰/۰۰۳۳	۰/۰۰۱۱	۰/۰۰۱۱	۰/۰۰۱۱	۰						
S _۹	۰/۰۰۲۲	۰	۰	۰	۰/۰۰۱۱	۰					
S _۲	۰/۰۰۲۲	۰	۰	۰	۰/۰۰۱۱	۰	۰				
S _۳	۰/۰۰۲۲	۰	۰	۰	۰/۰۰۱۱	۰	۰	۰			
S _۴	۰/۰۰۲۲	۰	۰	۰	۰/۰۰۱۱	۰	۰	۰	۰		
<i>P. coronatus</i>	۰/۱۶۹۰	۰/۱۶۶۳	۰/۱۶۶۳	۰/۱۶۶۳	۰/۱۶۶۳	۰/۱۶۶۳	۰/۱۶۶۳	۰/۱۶۶۳	۰/۱۶۶۳	۰	
<i>P. namaqua</i>	۰/۱۶۳۵	۰/۱۶۰۸	۰/۱۶۰۸	۰/۱۶۰۸	۰/۱۶۰۸	۰/۱۶۰۸	۰/۱۶۰۸	۰/۱۶۰۸	۰/۱۶۰۸	۰/۱۶۰۸	۰/۱۵۰

ترتیب مربوط به نمونه‌های کوکر شماره ۵ و ۸ بوده و هاپلوتایپ شماره دو شامل سایر نمونه‌ها است.

در شبکه هاپلوتایپی به روش اتصال میانه ارتباط بین هاپلوتایپ‌های کوکر شکم سفید در منطقه گمیشان نشان داده شده (شکل ۳) که از سه هاپلوتایپ تشکیل شده است. هاپلوتایپ‌های شماره یک و سه به



شکل ۳: شبکه هاپلوتایپی اتصال میانه ناحیه سیتوکروم بی دی ان ای میتوکندری مشاهده شده در کوکرهای شکم سفید جمعیت شمال شرق ایران در استان گلستان
اندازه هر کدام از دایره‌ها با فراوانی هاپلوتایپ‌ها در ارتباط است. تعداد جهش‌های نقطه‌ای مابین هاپلوتایپ‌های کوکر شکم سفید در استان گلستان بر روی خطوط نوشته شده است.



بحث

روابط تکاملی مابین پرندگان برای درک طبقه‌بندی زیست‌شناسی چالشی همیشگی در مطالعات پرندگان بوده و مطالعات ژنتیکی به دنبال پاسخ دادن به این موضوع بوده است (Zhang و همکاران، ۲۰۱۴؛ Shapiro و همکاران، ۲۰۱۳). دی‌ان‌ای میتوکندریایی به‌عنوان پلی بین ژنتیک جمعیت و طبقه‌بندی است (Avisé و همکاران، ۱۹۸۷)، اما اطلاعات ژنتیکی مربوط به بافرقه‌ها که از پرندگان شکاری و دارای اهمیت حفاظتی هستند بسیار محدود می‌باشد (Brown و همکاران، ۲۰۰۸؛ Paton و Baker، ۲۰۰۶).

از آن‌جاکه با پراکنش وسیع این گونه در جهان و وجود دو جمعیت شناخته شده بزرگ از کوکر شکم سفید در جنوب غرب و شمال شرق کشور تاکنون مطالعه‌ای در خصوص این گونه در ایران و جهان انجام نشده است نتایج این مطالعه با وجود تعداد اندک نمونه‌ها می‌تواند نقطه شروعی برای شناخت بهتر این گونه باشد. در پژوهش حاضر ۹۱۲ جفت باز از ژن سیتوکروم ب در ۹ نمونه تکثیر شد و مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ۳ هاپلوتایپ متفاوت در بین نمونه‌ها وجود دارد و تنوع هاپلوتایپی برابر با ۰/۴۱۷ است. از آن‌جاکه تاکنون مطالعه بوم‌شناختی و ژنتیکی بر روی کوکر شکم سفید در جهان صورت نگرفته و هیچ توالی از ناحیه سیتوکروم بی نیز در ژن‌بانک از این گونه در جهان ثبت نشده است امکان مقایسه در این پژوهش وجود نداشت، اما براساس نتایج این پژوهش به نظر می‌رسد که اکثر نمونه‌ها دارای روابط ژنتیکی نزدیکی با یکدیگر هستند. هاپلوتایپ شماره دو بزرگ‌ترین هاپلوتایپ در میان نمونه‌های این مطالعه و ۷ نمونه در این هاپلوتایپ قرار گرفته است. هاپلوتایپ شماره سه با دو جهش و هاپلوتایپ شماره یک با یک جهش از هاپلوتایپ شماره دو جدا شده‌اند، این میزان جهش اندک نیز می‌تواند بیانگر نزدیکی هاپلوتایپ‌های شناسایی شده به یکدیگر باشد. هاپلوتایپ شماره دو دارای فراوانی بیش‌تری است و علاوه بر این با داشتن بیش‌ترین ارتباطات با دیگر هاپلوتایپ‌ها احتمالاً قدیمی‌تر از دیگر هاپلوتایپ‌های شناسایی شده در منطقه گمیشان است (شکل ۳). بیش‌ترین فاصله ژنتیکی براساس روش P-distance بین هاپلوتایپ‌های یک و سه می‌باشد که به ترتیب همان نمونه‌های شماره ۵ و ۸ هستند و کم‌ترین فاصله بین نمونه‌های هاپلوتایپ دو است (جدول ۲) که این مورد نیز به خوبی نزدیکی نمونه‌های مورد مطالعه و وجود روابط خویشاوندی در بین این نمونه‌ها را نشان می‌دهد.

براساس نتایج درخت‌های تبارشناسی بیش‌ترین احتمال و Bayesian (شکل ۱ و ۲) نمونه‌های کوکرهای شکم سفید در شمال شرق ایران در یک شاخه قرار می‌گیرند که به خوبی کوکر شکم سفید

با احتمال تعلق پسین و بوت استرپ بالا از سایر گونه‌ها متفاوت است، اما از آن‌جاکه به جز دو گونه *P. namaqua* و *P. coronatus* نمونه دیگری از این جنس تاکنون از نظر ژنتیکی مورد بررسی قرار نگرفته است نمی‌توان با اطمینان در مورد جایگاه آرایه‌شناختی این گونه اظهار نظر کرد، اما براساس جایگاه کاملاً متمایز نمونه‌های کوکر شکم سفید از سایر گونه‌ها و شباهت ژنتیکی زیاد این نمونه‌ها با هم‌دیگر و نیز فاصله ژنتیکی بالای این نمونه‌ها از دو گونه دیگر این جنس، می‌توان با قطعیت آن‌ها را متعلق به یک گونه دانست و سیر تکاملی آن‌ها را مجزا از سایر گونه‌ها در نظر گرفت.

اگرچه مطالعه حاضر اولین پژوهش در خصوص کوکر شکم سفید در سطح دنیا بوده و اطلاعات نسبتاً خوبی را در خصوص این گونه در سطح منطقه گمیشان فراهم آورده است، اما باید توجه داشت که نتایج حاصل مربوط به تعداد اندک نمونه‌ها از جمعیت استان گلستان بوده و نمی‌تواند بخوبی وضعیت این گونه را مشخص سازد. برای درک بهتر وضعیت ژنتیکی این گونه نیاز است در مطالعات تکمیلی ضمن افزایش تعداد نمونه‌های این منطقه، نمونه‌های کوکر شکم سفید در مناطق جنوب غرب کشور را نیز در مطالعات آتی مورد بررسی قرار داد تا بتوان به دید مناسبی در خصوص جمعیت‌های کوکر شکم سفید در ایران رسید. علاوه بر این در صورتی که نمونه‌های سایر مناطق از قبیل ترکمنستان، ازبکستان، قرقیزستان، افغانستان و سایر محدوده پراکنشی کوکر شکم سفید در کنار این داده‌ها قرار بگیرد می‌توان دقیقاً مشخص کرد که ارتباطات تبارشناسی و ژنتیکی بین این جمعیت‌ها به چه صورتی است و آنگاه زمینه برای مدیریت بهتر و انجام اقدامات حفاظتی در سطح بین‌المللی و ملی فراهم خواهد شد.

خانواده کوکر در جهان دارای ۱۶ گونه است که تا به حال ۷ گونه آن در ایران به ثبت رسیده است ولی مطالعات ژنتیکی اندکی بر روی تبارشناسی و تنوع ژنتیکی گونه‌های آن در ایران و جهان صورت گرفته است. به همین دلیل روابط تبارشناختی و ژنتیک حفاظت آن‌ها کاملاً ناشناخته باقی مانده است. به منظور دستیابی به این مهم نیاز است که سایر گونه‌های موجود در کشور نیز نمونه‌برداری و پژوهش مشابهی بر روی آن‌ها صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

از همکاری اداره کل حفاظت محیط زیست استان گلستان که در تهیه نمونه‌های مورد مطالعه، یاری رساندند و نیز جناب آقای مهندس رضانعلی قائمی که اطلاعات قابل توجهی در خصوص کوکر شکم سفید در استان گلستان ارائه کردند، تشکر می‌گردد.



منابع

- inferred from mtDNA sequencing data. *Animal Biodiversity and Conservation*. Vol. ۳۰, No. ۱, pp: ۱۰۵-۱۱۴.
۱۳. **Hackett, S.J., ۱۹۹۶.** Molecular phylogenetics and biogeography of tanagers in the genus *Ramphocelus* (Aves). *Molecular phylogenetics and evolution*. Vol. ۵, No. ۲, pp: ۳۶۸-۳۸۲.
 ۱۴. **Johnson, K.P. and Clayton, D.H., ۲۰۰۰.** Nuclear and mitochondrial genes contain similar phylogenetic signal for pigeons and doves (Aves: Columbiformes). *Molecular phylogenetics and evolution*. Vol. ۱۴, No. ۱, pp: ۱۴۱-۱۵۱.
 ۱۵. **Kocher, T.D.; Thomas, W.K.; Meyer, A.; Edwards, S.V.; Paabo, S.; Villablanca, F.X. and Wilson, A.C., ۱۹۸۹.** Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. ۸۶, No. ۱۶, pp: ۶۱۹۶-۶۲۰۰.
 ۱۶. **Librado, P. and Rozas, J., ۲۰۰۹.** DnaSP v۵: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. Vol. ۲۵, No. ۱۱, pp: ۱۴۵۱-۱۴۵۲.
 ۱۷. **Madge, S.; McGowan, P.J.K. and Kirwan, G.M., ۲۰۰۲.** Pheasants, partridges and grouse: a guide to the pheasants, partridges, quails, grouse, guineafowl, buttonquails and sandgrouse of the world. A&C Black.
 ۱۸. **Martín, C.A.; Casas, F.; Mougeot, F.; García, J.T. and Viñuela, J., ۲۰۱۰.** Positive interactions between vulnerable species in agrarian pseudo-steppes: Habitat use by pin-tailed sandgrouse depends on its association with the little bustard. *Animal Conservation*. Vol. ۱۳, No. ۴, pp: ۳۸۳-۳۸۹.
 ۱۹. **Martín, C.A.; Casas F.; Mougeot, F.; García, J.T. and Viñuela, J., ۲۰۱۰.** Seasonal Variations in Habitat Preferences of the Pin-Tailed Sandgrouse in Agrarian Pseudo-Steppes Variaciones Estacionales En Las Preferencias De Hábitat De La Ganga Ibérica En Estepas Agrícolas. *Ardeola*. Vol. ۵۷, No. ۱, pp: ۱۹۱-۱۹۸.
 ۲۰. **Murray, B.W.; McGillivray, W.B.; Barlow, J.C.; Beech, R.N. and Strobeck, C., ۱۹۹۴.** The use of cytochrome b sequence variation in estimation of phylogeny in the Vireonidae. *Condor*. pp: ۱۰۳۷-۱۰۵۴.
 ۲۱. **Nunn, G.B.; Cooper, J.; Jouventin, P.; Robertson, C.J.R. and Robertson, G.G., ۱۹۹۶.** Evolutionary relationships among extant albatrosses (Procellariiformes: Diomedidae) established from complete cytochrome-b gene sequences. *The Auk*. pp: ۷۸۴-۸۰۱.
 ۲۲. **Paton, T.A. and Baker, A.J., ۲۰۰۶.** Sequences from ۱۴ mitochondrial genes provide a well-supported phylogeny of the Charadriiform birds congruent with the nuclear RAG-۱ tree. *Molecular phylogenetics and evolution*. Vol. ۳۹, No. ۳, pp: ۶۵۷-۶۶۷.
 ۱. **الهامی‌راد، ا.؛ رضایی، ح.ر.؛ وارسته‌مرادی، ح. و کابلی، م.، ۱۳۹۳.** ارجحیت‌های زیستگاهی کوکر شکم سیاه (*Pterocles orientalis*) در مقیاس سیمای سرزمین (مطالعه موردی: پناهگاه حیات وحش شیراحمد سبزوار). فصلنامه علمی پژوهشی محیط زیست جانوری. دوره ۶، شماره ۴، صفحات ۲۹ تا ۳۸.
 ۲. **الهامی‌راد، ا.؛ رضایی، ح.ر.؛ وارسته‌مرادی، ح. و کابلی، م.، ۱۳۹۴.** متغیرهای زیستگاهی تاثیرگذار بر انتخاب زیستگاه کوکر شکم سیاه (*Pterocles orientalis*) در فصل تابستان در پناهگاه حیات وحش شیراحمد سبزوار. فصلنامه علمی پژوهشی محیط زیست جانوری. دوره ۷، شماره ۱، صفحات ۱۱۳ تا ۱۱۸.
 ۳. **منصوری، ج.، ۱۳۸۷.** راهنمای پرندگان ایران. انتشارات کتاب فرزانه. تهران. ۵۱۳ صفحه.
 ۴. **Avise, J.C.; Arnold, J.; Ball, R.M.; Bermingham, E.; Lamb, T.; Neigel, J.E.; Reeb, C.A. and Saunders, N.C., ۱۹۸۷.** Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA Bridge between population genetics and systematics. *Annual review of ecology and systematics*. Vol. ۱۸, pp: ۴۸۹-۵۲۲.
 ۵. **Bandelt, H.J.; Forster, P. and Röhl, A., ۱۹۹۹.** Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution*. Vol. ۱۶, No. ۱, pp: ۳۷-۴۸.
 ۶. **BirdLife International. ۲۰۰۴.** Birds in Europe: population estimates, trends and conservation status. BirdLife International, Cambridge, U.K.
 ۷. **BirdLife International. ۲۰۱۲.** *Pterocles alchata*. The IUCN Red List of Threatened Species ۲۰۱۲: e.T۲۲۶۹۲۹۸۳ A۳۸۹۱۴۷۱۴. <http://dx.doi.org/۱۰.۲۳۰۵/IUCN.UK.۲۰۱۲-۱.RLTS.T۲۲۶۹۲۹۸۳A۳۸۹۱۴۷۱۴.en>. Downloaded on ۲۰ June ۲۰۱۶.
 ۸. **Brown, J.W.; Rest, J.S.; Garcia-Moreno, J.; Sorenson, M.D. and Mindell, D.P., ۲۰۰۸.** Strong mitochondrial DNA support for a Cretaceous origin of modern avian lineages. *BMC biology*. Vol. ۶, No. ۱, p: ۱.
 ۹. **Cramp, S. and Simmons, K.E.L., ۱۹۸۰.** The Birds of the Western Palearctic, Oxford University Press. Oxford. ۶۹۵ p.
 ۱۰. **Desjardins, P. and Morais, R., ۱۹۹۰.** Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome: a novel gene order in higher vertebrates. *Journal of molecular biology*. Vol. ۲۱۲, No. ۴, pp: ۵۹۹-۶۳۴.
 ۱۱. **Ferns, P.N. and Hinsley, S.A., ۱۹۹۴.** Effects of Raptors on the Activity of Sandgrouse. *Journal of Raptor Research*. Vol. ۲۸, No. ۴, pp: ۲۳۶-۲۴۱.
 ۱۲. **Guerrini, M.; Panayides, P.; Hadjigerou, P.; Taglioli, L.; Dini, F. and Barbanera, F., ۲۰۰۷.** Lack of genetic structure of cypriot *Alectoris chukar* (Aves, Galliformes) populations as



۲۳. **Posada, D. and Crandall, K.A., ۱۹۹۸.** Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*. Vol. ۱۴, No. ۹, pp: ۸۱۷-۸۱۸.
۲۴. **Rodriguez, F.; Oliver, J.L.; Marín, A. and Medina, J.R., ۱۹۹۰.** The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal of Theoretical Biology*. Vol. ۱۴۲, No. ۴, pp: ۴۸۵-۵۰۱.
۲۵. **Ronquist, F. and Huelsenbeck, J.P., ۲۰۰۳.** MrBayes ۳: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. Vol. ۱۹, No. ۱۲, pp: ۱۵۷۲-۱۵۷۴.
۲۶. **Shapiro, B.; Sibthorpe, D.; Rambaut, A.; Austin, J.; Wragg, G.M.; Bininda-Emonds, O.R.P.; Lee, P.L.M. and Cooper, A., ۲۰۰۲.** Flight of the dodo. *Science* (۸۰). American Association for the Advancement of Science. Vol. ۲۹۵, No. ۵۵۶۰, p: ۱۶۸۳.
۲۷. **Shapiro, M.D.; Kronenberg, Z.; Li, C.; Domyan, E.T.; Pan, H.; Campbell, M.; Tan, H.; Huff, C.D.; Hu, H.; Vickrey, A.I. and Nielsen, S.C., ۲۰۱۳.** Genomic diversity and evolution of the head crest in the rock pigeon. *Science*. Vol. ۳۳۹, No. ۶۱۲۳, pp: ۱۰۶۳-۱۰۶۷.
۲۸. **Smith, E.F.G.; Arctander, P.; Fjeldså, J. and Amir, O.G., ۱۹۹۱.** A new species of shrike (Laniidae: Laniarius) from Somalia, verified by DNA sequence data from the only known individual. *Ibis*. Vol. ۱۳۳, No. ۳, pp: ۲۲۷-۲۳۵.
۲۹. **Suárez, F.; Martínez, C.; Herranz, J. and Yanes, M., ۱۹۹۷.** Conservation status and farmland requirements of pin-tailed sandgrouse *Pterocles alchata* and black-bellied sandgrouse *Pterocles orientalis* in Spain. *Biological Conservation*. Vol. ۸۲, No. ۱, pp: ۷۳-۸۰.
۳۰. **Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M. and Kumar, S., ۲۰۱۱.** MEGA۵: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. Vol. ۲۸, No. ۱۰, pp: ۲۷۳۱-۲۷۳۹.
۳۱. **Thompson, J.D.; Higgins, D.G. and Gibson, T.J., ۱۹۹۴.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*. Vol. ۲۲, No. ۲۲, pp: ۴۶۷۳-۴۶۸۰.
۳۲. **Urban, E.K.; Fry, C.H. and Keith, S., ۱۹۸۶.** The birds of Africa. Gamebirds to pigeons. London: Academic Press. Vol. ۲.
۳۳. **Zhang, G.; Li, B.; Li, C.; Gilbert, M.T.P.; Jarvis, E.D. and Wang, J., ۲۰۱۴.** Comparative genomic data of the Avian Phylogenomics Project. *GigaScience*. Vol. ۳, No. ۱, p: ۱.

