تنوع ژنتیکی جمعیت نزد گونه های جنس *Rattus* در شهر تهران

حسن رجبی مهام[1*]، سمیه کشتکار[1]، بهرام حسن زاده کیابی[1] و مهین میرزایی[2]

[1] **تهران، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم جانوری**

[2] **تهران، شرکت ساماندهی صنایع و مشاغل**

تاریخ دریافت: ۹۰/۵/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۱۹

چکیده

رتها امروزه از یک طرف مدل آزمایشگاهی بسیار مهمی به حساب می آیند و از طرف دیگر یک آفت بسیار مهم و بالقوه خطرناک می توانند باشند. مطالعه در مورد رتها به خصوص برای شناسایی آنها، ژنتیک جمعیتشان و جغرافیای تکاملی آنها با استفاده از روشهای مورفولوژیک و بالاخص مولکولی یک ضرورت است. این پژوهش با هدف شناسایی و بررسی ژنتیک رتهای کلان شهر تهران با استفاده از ژنوم میتوکندری در ناحیه D-Loop انجام گرفت و نتایج آن نشان داد که در شهر تهران فقط گونه های رت سیاه و قهوه ای وجود دارد. از میان ۲۲۹ نمونه فقط یک نمونه رت سیاه و در بین رتهای قهوه ای نیز دو زیرگونه احتمالی کاملاً متفاوت تشخیص داده شد. نتیجه آنالیزهای ژنتیک جمعیت و دموگرافیک نشان داد که این جانوران دارای تنوع ژنتیکی خیلی پایینی هستند و دو گروه متفاوت با زمان مختلفی وارد ایران شده اند: ورود گروه اول که جدیدتر است حدود ۷۰۰ و گروه قدیمی ۵۶۰۰ سال پیش تخمین زده شد. داده ها همچنین نشان داد که جمعیت رتهای تهران در حال رشد و افزایش حجم است ولی در گذشته کنترلهای خوبی انجام شده است. مناطقی از تهران مثل ۱۸، ۱۹،۱۳، ۱۲، ۹، ۴ و ۱ دارای جمعیت با تنوع ژنتیکی خیلی بیشتری از رتها هستند و می توانند محل اصلی کلنیها باشند.

واژه های کلیدی: ژنتیک جمعیت، D-Loop ، رت قهوه ای (*Rattus norvegicus*)

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۲۹۹۰۲۷۲۵، پست الکترونیکی: H_Rajabi@sbu.ac.ir

مقدمه

رتها به عنوان یکی از جانوران همزیست انسان، مدل آزمایشگاهی برای بسیاری از تحقیقات، آفت بسیار مهمی که سالانه میلیاردها دلار به بشر خسارت می زند و برای مبارزه با آن هر سال هزینه های بسیار سنگینی را انسان متحمل می شود و به عنوان ناقل بعضی از بیماریها از دیر باز مورد توجه زیست شناسان قرار داشته و مطالعات بسیاری نیز در زمینه های مختلف بر روی آن انجام شده است. رت قهوه ای (*Rattus norvegicus*) به احتمال زیاد از آسیا منشاء گرفته و گفته می شود که ابتدا از حدود چین و ژاپن شیوع پیدا کرده و به تدریج با رشد تجارت خارجی و پراکندگی انسان ، توانسته خود را به نقاط دیگر منتقل کند. این جانور از قرن ۱۶ شروع به راه یابی به نقاط دیگر دنیا نمود و در اوایل قرن در اروپا توسعه پیدا کرد و اولین بار در سال ۱۷۱۶ از دانمارک گزارش گردید و سپس در سال ۱۷۲۸ در انگلستان، در سال ۱۷۵۰ در فرانسه، در سال ۱۷۶۲ در نروژ، در سال ۱۷۹۰ در سوئد و بالاخره در سال ۱۷۷۵ از شمال آمریکا گزارش گردید و در حال حاضر می توان گفت که دراکثر نقاط دنیا دیده می شود. نام رت نروژی در واقع به وسیله دانشمندان جانورشناس انتخاب شده است چون این جانور در سال ۱۷۲۶ در نروژ گزارش گردید و مورد مطالعه دقیق دانشمندان قرار گرفت در صورتی که به هیچ عنوان بومی نروژ نبوده و احتمالاً توسط

کشتی از کشورهای آسیایی به نروژ منتقل شده است. این رت در ایران مانند رت سیاه در سواحل دریای خزر و سواحل خلیج فارس تا دریای عمان گزارش شده است (۱).

پس از موش خانگی، موش صحرایی آزمایشگاهی *Rattus norvegicus* به عنوان یکی از جانوران مدل آزمایشگاهی تحقیقات بسیار زیادی بر روی آن انجام شده است. این مدل برای بررسی تعدادی از بیماریهای مهم انسان از جمله استعداد ابتلاء به سرطان، فشار خون بالا، چاقی، دیابت، سکته و بیماریهای خودایمنی از اهمیت زیست پزشکی زیادی برخوردار است. و در این میان بعضی افراد به شناسایی و رده بندی آن پرداخته و بعضی دیگر سویه های مختلف آن را با نمونه هایی که در آزمایشگاهها مورد استفاده قرار می گیرند مورد مقایسه قرار داده اند. تعدادی از مطالعات مربوط به استفاده از داده های مولکولی به ویژه کروموزوم میتوکندری است که با استفاده از آن فیلوژنی و جغرافیای تکاملی این جانوران مطالعه شده است. داده های مولکولی نشان دهنده این است که: جنس *Rattus*، مشتمل بر حدود ۶۶ گونه ، به احتمال زیاد از آسیای جنوب شرقی منشاء گرفته است. در حال حاضر با گسترده ترین حوزه در آسیای جنوب شرقی، جزیره های جنوب شرقی آسیا (ISEA) و گینه نو پراکنده است (۱۱). تصور بر این است که گینه نو دارای ۱۴ و یا ۱۱ گونه بومی و ۵ گونه *rattus* معرفی شده یا مهاجم از مناطق دیگر است (۱۱و۲۰). تعدادی از گونه های بومی اندمیک با دامنه بسیار محدود هستند. طبقه بندی این جانوران به خاطر وجود نامگذاری های مترادف برای یک گونه به وسیله افراد مختلف بسیار پیچیده به نظر می رسد (به عنوان مثال ۴۹ مورد برای *R. exulans* و بیش از ۸۰ مورد برای هر یک از گونه های *R. rattus* و *R. tanezumi* (۱۱)) . شاید علت این عدم قطعیت طبقه بندی این است که بسیاری از رتها به وسیله صفات مورفولوژی حتی با استفاده از تمام خصوصیات بدنی قابل شناسایی صد در صد در سطح گونه نیستند.

سرگذشت مهاجرتهای انسانی با استفاده از تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکDNA میتوکندری (mtDNA) مربوط به *R. exulans* در اقیانوس آرام(۷) و در ماداگاسکار با استفاده از *R. rattus* (۶) مطالعه شده است. در اقیانوس آرام ، *R. exulans* تنها رتی است که توسط انسان به دورترین نقاط پولینزی انتقال یافته است. ولی رتهای دیگر مانند رت اندمیک گینه نو *R. praetor* نیز منتقل شده اند و بقایای آنها در مناطق باستان شناسی در مناطق دور دستی مثل فیجی و وانواتو دیده می شوند(۲۲). تحقیقات اخیر نشان دهنده این است که علاوه بر نواحی اقیانوس آرام نقاطی مثل نزدیکیهای جزایر آسیای جنوب شرق و گینه نو مراکز عمده پیدایش و گسترش این جوندگان می باشند. این نواحی بیشترین تنوع گونه ای رت را نشان داده و بحث برانگیز ترین مناطق برای رده بندی این جانوران هستند خصوصاً زمانی که صفات مورد بررسی خصوصیات جمجمه های کشف شده از سایتهای باستان شناسی باشند. در برخی موارد اگر تمام بدن جانور بطور کامل و دست نخورده نیز در دسترس باشد، بعضی گونه های جنس *Rattus* را نمی توان با استفاده از صفات مورفولوژیک از همدیگر تمایز داد. در این موارد DNA استخراج شده از بقایای کشف شده فک پایین یا استخوان ران جانور می تواند به کمک دانشمندان بشتابد، به طوری که می توان حتی گونه های کریپتیک (گونه هایی که از نظر مورفولوژیک فاقد تفاوت معنی دار ولی از نظر ژنتیکی متفاوتند) را از همدیگر به وسیله این روش متمایز نمود (۵).

گروه *Rattus rattus* در برگیرنده حدود ۲۱ گونه متفاوت از جمله *R. rattus* ، *R. tanezumi* ، *R. hoffmanni* و *R. tiomanicus* می باشد. گونه *R. rattus* بر اساس تعداد کروموزوم به دو زیر گروه تقسیم می شود (۲۳) : تیپ

اقیانوسیه ای (همچنین اروپایی نیز نامیده می شود) با 2n=38 که (Musser & Carlton, 2005) آن را *R. rattus* نامیدند و یک تیپ آسیایی با 2n=42 کروموزوم که Musser و Carlton در سال ۲۰۰۵ آن را *Rattus tanezumi* نامیدند. تیپ آسیایی بومی جنوب شرق آسیاست ولی در ژاپن، تایوان، فیلیپین، جزایر آسیای جنوب شرق، گینه نو و فیجی نیز یافت می شوند (۱۰). تصور می شود که شبه جزیره هند مهد *R. rattus* می باشد که از آن فرم اقیانوسیه یا اروپایی در قرن سوم به انگلستان راه یافته است. از اروپا به وسیله راههای دریایی به تمام جهان راه یافته و در ۱۸۵۰ به اقیانوس آرام رسید. فرم اقیانوسیه ای یا اروپایی محدود به بنادر کشورهاست در حالی که تیپ آسیایی بومی و داخلی محسوب می شود. برای تشخیص خیلی از گونه های جنس *Rattus* به صورت مورفولوژیک هم متخصصان وهم غیرمتخصصان با مشکل مواجه هستند. پژوهشگرانی مثل Vázquez–Domínguez و همکاران در ۲۰۰۱ (۲۱) نشان دادند که تشخیص *R. fusci* و *R. leucopus* از یکدیگر بسیار مشکل است و Taylor وهمکاران در ۱۹۸۲ (۲۰) خاطر نشان کردند که شناسایی *R. steini*، *R. praetor*، *R. mordax*، *R. jobiensis* و *R. novaeguinea* گیج کننده و ابهام انگیز است. تیلور و همکارانش مشخصاً از گونه *R. praetor* به عنوان یک گونه بسیار متنوع نام بردند که اشکالات زیادی در تاکسونومی آن دیده می شود. آنها خاطر نشان کردند که گونه های *R. niobe*، *R. verecundus* ، *R. leucopus* و *R. exulans* ممکن است در شناسایی با یکدیگر اشتباه شوند به خصوص اگر افراد جوان مطالعه شوند.

استفاده از داده های مولکولی اخیرا برای تخمین زمان پیدایش جمعیتها، گسترش یا کاهش اندازه آنها، بررسی سرگذشت و تاریخ تکاملی و همچنین وضعیت مهاجرت و نحوه کلونیزاسیون مناطق مختلف بسیار متداول است و دانشمندان زیادی با استفاده از این نوع داده ها به مطالعه فیلوژنی، فیلوژئوگرافی، تنوع زیستی و حتی ژنتیک جمعیت موجودات زنده می پردازند. در این میان افراد دیگری نیز وجود دارند که بر استفاده از این روشها خرده گرفته و ساعت مولکولی که اساس آنالیزهای مربوط به این نوع مطالعات است را مورد تردید قرار می دهند. با تمام این مشکلات روشهای مولکولی در بسیاری از زمینه ها به کمک دانشمندان بیولوژیست شتافته و به عنوان یک روش نوین و پیشرفته سعی در حل معماهایی دارد که کارهای مورفولوژیک و انتولوژیک جوابی برای آنها ندارند. بسیاری از دانشمندان اعتقاد دارند که ژنوم موجودات زنده با یک سرعت وشدت یکسان و هماهنگی تکامل می یابد و در زمان معین تعداد مشخصی از نوکلئوتیدها در گذشته تغییر یافته است که می تواند نمایانگر وجود یک ساعت مولکولی برای تکامل ژنتیکی موجودات باشد. حال با استفاده از این خصوصیت ژنوم می توان نحوه به وجود آمدن جمعیتهای جدید از جمعیتهای قدیمی تر را مطالعه و پیگیری کرد و قدمت پیدایش آنها ، نحوه مهاجرت، میزان رابطه و درصد مهاجرت بین آنها، جمعیتهای اجدادی و نقاط وجود کلونیها و حتی حدود تعداد افراد تشکیل دهنده کلونیها را تحت بررسی و مطالعه قرار داد.

کشور ایران در جنوب غربی قاره آسیا و در منطقه خاورمیانه واقع شده است و از گذشته های دور تا کنون پل ارتباطی شرق و غرب به حساب می آید. ایران در ۳۲ درجه شمالی خط استوا و ۵۳ شرقی نصف النهار گرینویچ قرار دارد و از شمال به ارمنستان، آذربایجان، ترکمنستان و دریای خزر، از شرق به افغانستان، و پاکستان، از جنوب به خلیج فارس و دریای عمان و از غرب به عراق و ترکیه محدود می شود. کوههای متعددی در ایران به چشم می خورند که مهم ترین آنها عبارتند از رشته کوه زاگرس در غرب، رشته کوه البرز در شمال و کوههای خراسان در شمال شرقی. در بخشهای مرکزی مثل جنوب تهران و شرق کشور بخشی از فلات ایران وجود دارد که دو کویر نمکی مهم دشت کویر و کویر لوت در آن قرار دارند (۸ و ۹). همچنین در این نواحی واحه هایی دیده می شوند که

در گذشته مسیرهای کاروانها از آنها می گذشتند (۸). کشور ایران علی رغم این که به طور کلی یک کشور گرم و خشک در نظر گرفته می شود اما از نظر آب و هوا، ارتفاع جغرافیایی و همچنین پوششهای گیاهی از تنوع قابل توجهی برخوردار است. این تنوع به نوبه خود باعث وجود تنوع جانوری فوق العاده ای در این کشور شده است که کمتر به آن پرداخته شده است.

شهر تهران پایتخت ایران و در قلب کشور، از شمال به وسیله رشته کوههای البرز محدود شده و از جنوب با دشتهای مسطح شهر ری و قم ارتباط تنگاتنگی دارد. از شرق به کوههای لواسانات و دشت گرمسار و از غرب نیز به نواحی مسطح حومه غربی تهران راه دارد. جانورانی که قصد مهاجرت از شرق به غرب یا بالعکس داشته یا دارند مجبور به گذر از این منطقه هستند بنابراین، این جریان ژنی که به طور مداوم از منطقه انجام می گیرد، می تواند موجودات بومی منطقه را بسیار تحت تأثیر قرار دهد. پس مطالعه ژنتیک جمعیت موجودات منطقه می تواند بسیار حائز اهمیت باشد. بنابراین کشور ایران و بالاخص شهر تهران نه تنها از جنبه های سیاسی و اقتصادی بلکه از جنبه های زیستی و جانوری نیز از موقعیت و جایگاه بسیار استراتژیکی برخوردارند.

هدف از پژوهش حاضر تشخیص و شناسایی گونه های مختلف رت در تهران با استفاده از توالی ناحیه کنترل ژنوم میتوکندریایی و بررسی مولکولی موشهای جنس *Rattus* در مناطق بیست دو گانه تهران می باشد که می تواند اطلاعات اساسی در مورد تفاوتها و منشاء آنها ارائه دهد و با مقایسه این داده ها با نتایج حاصل از مطالعات در سایر مناطق دنیا، می توان در مورد منشا و نحوه پراکندگی آنها در سراسر دنیا نیز ایده های صحیح تری بیان کرد. همچنین بر روی رتهای ایران و به خصوص تهران از نظر مولکولی مطالعه زیاد و در خوری انجام نشده و نیاز به این مطالعات برای مبارزه با این حیوانات بیش از پیش ضروری به نظر می رسد. به علاوه یافتن محل تجمع، محل تولید و تکثیر کلنیها در این منطقه، یافتن مسیر مهاجرت، و ورود آنها به شهر، بررسی ژنتیک جمعیت آنها و در صورت امکان تخمین زمان حضور آنها از اهداف دیگر پژوهش می باشد.

مواد و روشها

نمونه ها: تعداد ۲۲۹ رت از ۱۷ منطقه تهران بزرگ به وسیله پیمانکارهای منطقه ای زیر نظر شرکت ساماندهی صنایع و مشاغل شهر وابسته به شهرداری تهران در سالهای ۱۳۸۸ و ۱۳۸۹ به وسیله تله های زنده گیر شکار شده و با درج منطقه و محل شکار نمونه ها بر روی قفسها به طور زنده به آزمایشگاه بیوسیستماتیک جانوری مولکولی واقع در دانشکده علوم زیستی دانشگاه شهید بهشتی منتقل شدند. در جدول ۱ نحوه پراکنش نمونه ها درمناطق مختلف تهران نشان داده شده است. به علاوه تعداد ۲۲ ترادف مربوط به رت نروژی از Genbank دانلود شده و به همراه دیگر نمونه ها آنالیز داده ها انجام شد. برای استفاده به عنوان گروه Outgroup تعداد ۴ نمونه از رتهای *R. exulans*، *R. praetor*، *R. tanezumi*، *R. rattus* نیز از Genbank دانلود گردید.

استخراج DNA : ژنوم کامل رت به وسیله روش فنل – کلروفورم استخراج شد. برای اطمینان از وجود DNA و تعیین کیفیت آن مقدار ۵ میکرولیتر از محلول استخراج DNA را به همراه ۳ میکرولیتر بافر لودینگ بر روی ژل ۱ درصد آگارز شارژ کرده و پس از رنگ آمیزی به وسیله اتیدیوم بروماید ژل مطالعه شده و حضور یا عدم حضور باندها و شدت و قطر باندها که نشان دهنده کیفیت DNA بود، بررسی شد. به وسیله اسپکتروفتومتر نانودراپ غلظت DNA در محلول تعیین و غلظتهای مورد نیاز برای انجام PCR (۱۵ نانوگرم بر میکرولیتر) تهیه شدند. محلولهای تهیه شده برای نگهداری به مدت طولانی در فریزر ۲۰- گذاشته شدند.

جدول ۱- نحوه پراکنش هاپلوتیپها وتعداد آن در هر منطقه در مناطق مورد مطالعه و سوشهای آزمایشگاهی

هاپلوتیپ / منطقه	1	2	3	4	5	6	7	8	9	12	13	14	15	16	17	18	19	سوشها
1	4	3	7	18	3	4			6	3		15	3		3	10	4	3
2								1										
3	12			1		6	2	2			18	4	3			3	1	2
4	1					1				15				1	1	1		
5									2						2			1
6									1									
7										1								
8																1		
9	3		1	1							2							
10	1								1								1	
11									1						1			
12		1																
13		2																
14										1								
15				1														
16					1													
17															1			
18																1		
19																	1	
20																	1	
21																1		
22										1	1					1		
23											1							
24											1							
25																		1
26																		6
27																		2
28																		1
29																		1
30																		2
31																		1
32																		1
33																		1

انجام PCR: برای انجام PCR ابتدا ترادف پرایمرهای مورد نیاز از پژوهش Robins و همکاران در ۲۰۰۷ (۱۵) برای ناحیه D-Loop میتوکندری رت برگرفته و به شرکت سیناژن سفارش ساخت آنها داده شد. تکثیر قطعه ای از ژنوم ناحیه D-Loop از میتوکندری به وسیله دستگاه PCR مدل peqlab با استفاده از ۴۵ میکرولیتر از مواد اولیه انجام شد که شامل: $Mgcl_2$ با غلظت ۱۵ میلی مولار، dNTP به مقدار ۱۵ میلی مولار، بافر X ۱۰ به مقدار ۵ میکرولیتر، آنزیم Taq polymerase به مقدار ۵ یونیت، پرایمر از هرکدام ۵ میکرو مولار، DNA به مقدار ۵۰ نانوگرم وآب میلی کیو به مقدار ۳۶/۵ میکرولیتر.

شرایط انجام PCR نیز شامل یک مرحله دناتوراسیون اولیه در دمای۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه و ۳۰ سیکل مرحله تکثیر که شامل دناتوراسیون ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال با درجه حرارت ۶۰ به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله طویل سازی با دمای ۷۲ درجه به مدت ۶۰ ثانیه و در نهایت مرحله تکمیل زنجیره های ناقص DNA با درجه حرارت ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه بوده است.

پس از انجام PCR به مقدار ۵ میکرولیتر از محصول آن با ۳ میکرولیتر بافر لودینگ (اورانژ G) بر روی ژل ۱ درصد آگارز شارژ شده و به مدت نیم ساعت به آن اجازه ران داده شد. سپس به وسیله اتیدیوم بروماید به مدت ۱ ساعت رنگ آمیزی و پس از شستشو با آب مقطر به وسیله دستگاه ژل خوان بررسی و از آن برای مطالعه بیشتر عکس گرفته شد. برای اطمینان از اینکه آیا قطعه ژن مورد بررسی این تحقیق به درستی تکثیر شده است یا نه مقدار ۳ میکرولیتر از DNA ladder با قطعات bp ۱۰۰ نیز درکنار نمونه های آزمایشی بر روی ژل ران شد. پس از اطمینان از اینکه قطعه PCR شده همان قطعه مورد نظر است و هیچ باند اضافی در بالا یا پایین باند مربوط به ژن کاندید مورد مطالعه بر روی ژل دیده نمی شود، ما بقی محصولات PCR در فریزر ۲۰- نگهداری شدند. تعداد ۱۹۲ نمونه از کل ۲۲۹ نمونه رت از مناطق مختلف مورد بررسی انتخاب و در دانشگاه مونپلیه ۲ فرانسه، تعیین ترادف شد.

آنالیز داده ها: در این مطالعه برای آنالیز آماری داده ها از نرم افزارهای مختلفی استفاده شد. برای مرتب کردن ترادف توالیهای مربوط به نمونه ها از نرم افزار Mega 5 (۱۹) استفاده شد. پس از مرتب کردن توالیها به وسیله نرم افزار و پس از آن به وسیله چشم و با دست، با همین برنامه درختهای فیلوژنی با استفاده از متد حداکثر تشابه Maximum likelihood ترسیم شدند. برای به دست آوردن درصد اطمینان صحت درختهای رسم شده از روش Bootstraping استفاده شد، که معمولاً از میزان ۱۰۰۰ دور از آن در این پژوهش استفاده می شد. برای آنالیز داده ها به منظور مطالعه ژنتیک جمعیت از نرم افزار Arlequin3. 1 (۳) و DNASP 5 . 1 (۱۷) استفاده شد. درصد تنوع نوکلئوتیدی (Pi) ، تنوع هاپلوتیپی (H) ، تعداد هاپلوتیپ ها، ارزش Tau و آزمون عدم انطباق پراکنش (Mismatch Distribution) که به منظور تخمین میزان رشد جمعیت درگذشته و تغییرات آن بکار می رود، همگی به وسیله این نرم افزارها به دست آمد. از برنامه کمپلکس Splittree (۲) برای رسم درخت هاپلوتیپی بدون ریشه نیز برای مطالعه وضعیت و حالات هاپلوتیپها نسبت به همدیگر استفاده شد. برای رسم جداول و گرافها از نرم افزارExcel استفاده شد.

نتایج

شناسایی نمونه ها با استفاده از ترادف D-Loop: از کل ۱۹۲ نمونه آنالیز شده تنها یک نمونه مربوط به گونه *R. rattus* بوده و بقیه مربوط به گونه *R. norvegicus* هستند. از دیگر گونه های رت که در مناطق مختلف آسیای جنوب شرقی به وفور یافت می شوند، در تهران موردی یافت نشد. علت این اتفاق بیشتر به دلیل کار گذاشتن تله ها برروی زمین و محدود بودن نمونه برداری به مناطق داخل شهری می تواند باشد.

آنالیز ژنتیک جمعیت: آنالیز ها نشان داد که در کل ۲۴ هاپلوتیپ در میان ۱۹۱ نمونه مطالعه شده رت نروژی در تهران وجود دارد که به همراه ۹ هاپلوتیپ از میان ۲۲ نمونه رت سوش که از Genbank دانلود شد، تعداد هاپلوتیپها به ۳۳ رسید. جدول شماره ۱ نحوه پراکنش این هاپلوتیپها را در ۱۷ منطقه مورد بررسی و نمونه های به دست آمده از بانک اطلاعات ژنومی را نشان می دهد. از میان این هاپلوتیپها شماره های ۱، ۳ و۴ بیشترین مقدار فراوانی را دارا هستند. تعداد ۲۱ هاپلوتیپ از کل ۳۳ هاپلوتیپ هر کدام فقط دریک منطقه دیده می شوند. ۱۲ هاپلوتیپ به صورت مشترک بین ۲ یا چند منطقه هستند به طوریکه نحوه پراکنش آنها در مناطق مختلف تا حدودی از قاعده خاصی تبعیت می کند. همان طور که در جدول ۱ مشاهده می شود مناطقی که با همدیگر همجوار هستند دارای هاپلوتیپهای مشترک بیشتری هستند. عموماً تنوع هاپلوتیپی در مناطق حاشیه ای تهران خیلی بیشتر است با اینکه تعداد نمونه هایی که از این مناطق آنالیز شده است تفاوت فاحشی با مناطق مرکزی ندارند. فراوانی هاپلوتیپها براساس تقسیم بندی آنها به دو گروه عمده هاپلوگروپهای A و B در جدول ۲ قابل مشاهده است.

جدول ۲- این جدول نشان دهنده مناطق و تعداد هاپلوتیپها و کلادهای موجود در آن است. همچنین این جدول نشان می دهد که سوشها بیشتر در کلاد B قرار می گیرند و تنها ۴ هاپلوتیپ ازآن جز کلادA هستند.

منطقه	شماره هاپلوتیپ	تعداد	کلاد
14	1	15	A
	3	4	B
15	1	3	A
	3	3	B
16	4	1	A
17	1	3	A
	4	1	A
	5	2	B
	11	1	B
	17	1	A
18	1	10	A
	3	3	B
	4	1	A
	8	1	A
	18	1	B
	21	1	A
	22	1	A
19	1	4	A
	3	1	B
	10	1	A
	19	1	A
	20	1	A
سوشها	1	3	A
	3	2	B
	5	1	B
	25	1	B
	26	6	B
	27	2	B
	28	1	B
	29	1	B
	30	2	B
	31	1	B
	32	1	A
	33	1	B

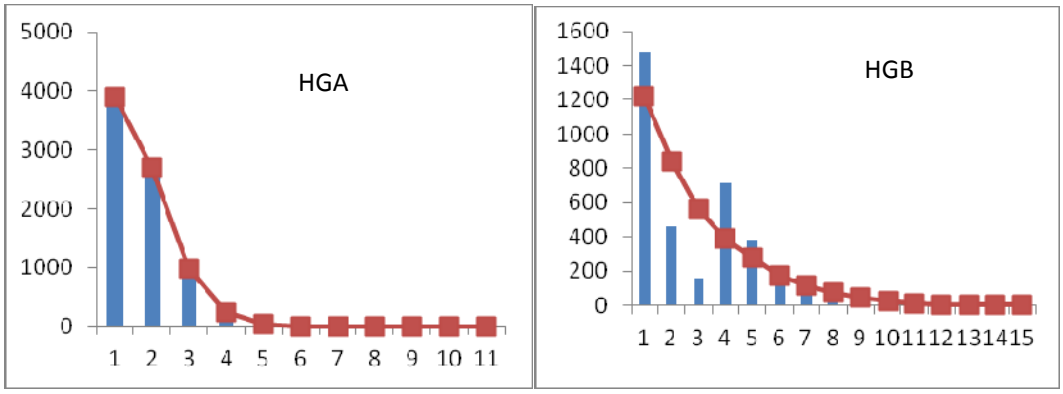
منطقه	شماره هاپلوتیپ	تعداد	کلاد
1	1	4	A
	3	12	B
	4	1	A
	9	3	B
	10	1	A
2	1	3	A
	12	1	A
	13	2	A
3	1	7	A
	9	1	B
4	1	18	A
	3	1	B
	9	1	B
	15	1	A
5	1	3	A
	16	1	A
6	1	4	A
	3	6	B
	4	1	A
7	3	2	B
8	2	1	B
	3	2	B
9	1	6	A
	5	2	B
	6	1	A
	10	1	A
	11	1	B
12	1	3	A
	4	15	A
	7	1	A
	14	1	A
	22	1	A
13	3	18	B
	9	2	B
	22	1	A
	23	1	B
	24	1	B

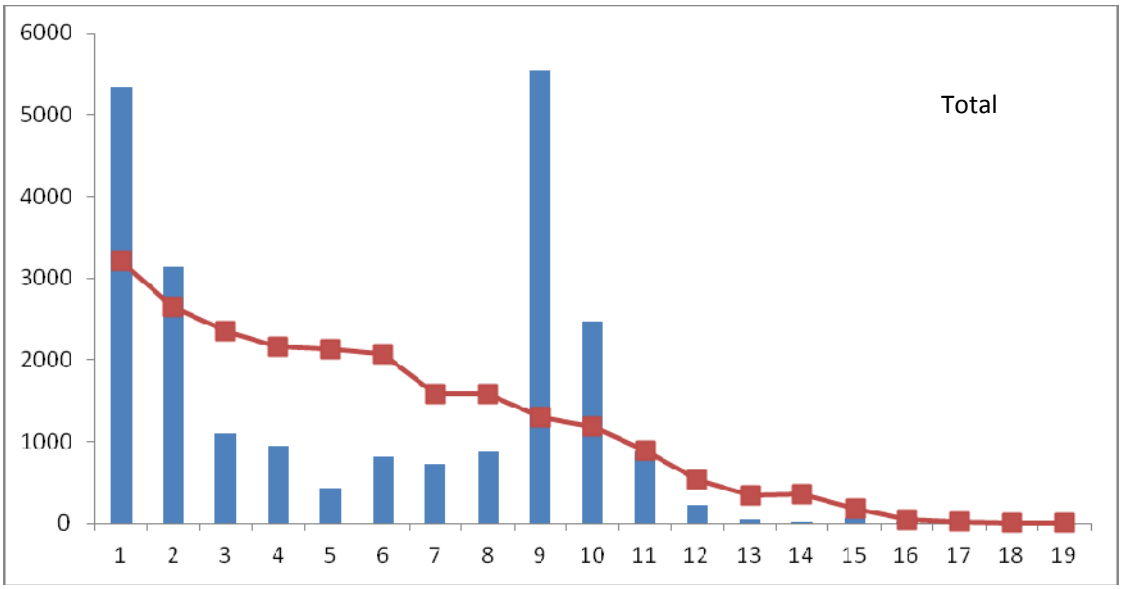
باتوجه به اینکه آنالیزهای فیلوژنتیک نشان دهنده دو هاپلوگروپ کاملاً متمایز است، این دو هاپلوگروپ هر کدام به عنوان یک گروه مجزا مورد مطالعه قرارگرفتند. درصد تنوع ژنتیکی برای هر گروه در جدول ۳ آمده است. همان طور که مشاهده می شود در کل تنوع نزد این جانوران در شهر تهران بسیار پایین است. درصد تنوع هاپلوتیپی (h) برای هاپلوگروپ A حدود ۰/۵۱ و در گروه B ۰/۶ می باشد و میزان تنوع نوکلئوتیدی در هاپلوگروپ A حدود ۰/۰۰۱۱ و در گروه B ۰/۰۰۳۶ که تمام این داده ها مبین این حقیقت است که رتهای تهران دارای تنوع بسیار پایینی هستند. هاپلوتیپهای ۱، ۳ و ۴ دارای فرکانس بسیار بالا با تفاوت معنی داری با بقیه هاپلوتیپها می باشند،

به طوری که هاپلوتیپ ۱ تقریبا درتمام مناطق جزء ۳ منطقه مشاهده می شود.

جدول ۳- تنوع هاپلوتیپی(*h*) و نوکلئوتیدی(*Pi*)، میانگین تنوع نوکلئوتیدی (k)، تعداد هاپلوتیپها (H)، با استفاده از سکانس ترادف ناحیه D-loop ژنوم میتوکندری. مقادیر Tau، SSD ، Raggedness index و ارزش P در داخل پرانتز و همچنین نتایج آزمونهای Tajima's D و Fu's Fs و ارزش P آنها در داخل پرانتز نشان داده شده است.

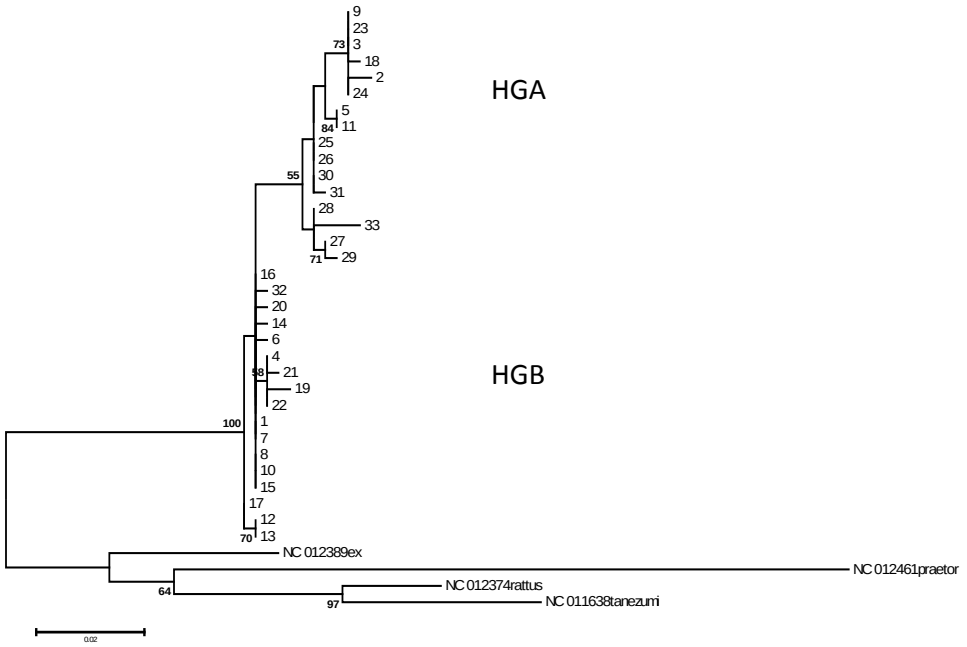
Haplogroups	Sample size	H	h	pi	k	Tau	SSD (p-value)	Raggedness index(p-value)	Tajima'sD (p-value)	Fu's FS (p-value)
HGA	126	17	0.5109	0.001148	0.577509	0.7715	0.00022 (0.86200)	0.03457 (0.45300)	-1.75085 (0.00900)	-1.19101 (0.11600)
HGB	87	16	0.6044	0.003564	1.792681	5.5918	0.07965 (0.79000)	0.11475 (0.44000)	-15.95292 (0.00000)	-5.46322 (0.02500)
TOTAL	**213**	**33**	**0.7638**	**0.009064**	**4.595314**	**9.1231**	**0.06190 (0.10000)**	**0.08563 (0.09000)**	**-0.10357 (0.54200)**	**-8.73305 (0.03100)**



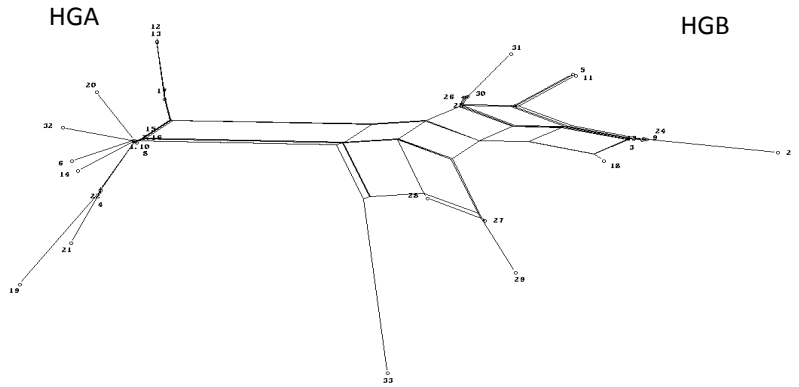


شکل ۱- آزمون پراکنش عدم انطباق Mismatch distribution تفاوت نوکلئوتیدی هاپلوتیپها. این آزمون برای HGA، HGB و Total یا تمام نمونه ها انجام شد که نتایج و تفسیر آنها در متن آمده است. ستونهای آبی نمایانگر مقادیر مشاهده شده و خط-نقطه ها نشانگر مقادیر مورد انتظار است.

آنالیزهای دموگرافیک (وضعیت زمانی جمعیت ها): این آنالیزها برای مطالعه وضعیت جمعیتها در زمان گذشته و رشد یا کاهش اندازه آنها و تخمین زمان شروع این افزایش و یا کاهش با استفاده از نرخ موتاسیون و تئوری ساعت مولکولی است. این آزمون با استفاده از مقدار تفاوت نوکلئوتیدهای هاپلوتیپها نزد تمام افراد مطالعه شده انجام می شود. آزمون پراکنش عدم انطباق یا Mismatch Distribution (MMD) برای این منظور انجام شد (شکل ۱). مقادیر Tau، SSD ، Raggedness index و ارزش P هرکدام در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج این آزمون نشان داد که برای گروههای HGA و HGB و تمام نمونه ها با همدیگر تئوری صفر را نمی توان رد کرد. بنابراین این گروهها در حال افزایش هستند. نتایج آزمونهای دیگری به نام Tajima's D (۱۸) و Fu's Fs (۴) نیز به دلیل معنی دار بودن ارزش P در آنها نشان می دهد که هر دو گروه HGA و HGB درگذشته نوساناتی در تعداد افراد زایا و بارور خود داشته اند. مقادیر Tau به دست آمده از این آزمون برای تخمین شروع ورود رتها به تهران و تبدیل شدن آنها به مشکل جدی، مورد استفاده قرار گرفتند. با استفاده از فرمول Tau = 2ut که در آن u درصد موتاسیون در ژن درمیلیون سال و t زمان شروع رشد جمعیت یا به عبارتی ورود آنها به شهر و تبدیل شدنشان به معضل آفت شهری است. محاسبات زمانی در حدود ۷۰۰ سال برای HGA، ۵۶۰۰ سال برای HGB و ۹۰۰۰ سال برای تمام نمونه های موجود در تهران نشان می دهد که در آن نرخ موتاسیون حدود ۵ درصد است که Robin و همکارانش در ۲۰۰۸ برای ژنوم میتوکندری رتها ذکر کرده اند(۱۶).



شکل۲- درخت فیلوژنتیکی هاپلوتیپها مربوط به D-Loop میتوکندری با استفاده از روش Maximum-likelihood : درخت بهینه حاصل از bootstrap (۱۰۰۰ تکرار) ترسیم شده است که درصدهای مربوطه در کنار شاخه ها نوشته شده است (درصدهای زیر ۵۰ نشان داده نشده اند).



شکل ۳- درخت بدون ریشه NeighbourNet رسم شده با تنظیمات پیش فرض نرم افزار که نشان دهنده رابطه هاپلوتیپها با یکدیگر است. وجود دو گروه متفاوت در این شکل کاملاً مشخص است. خطهای عرضی وصل کننده شاخه هاپلوتیپها به همدیگر نشان دهنده هوموپلازی محدود بین هاپلوتیپها است.

آنالیز فیلوژنتیک: درخت رسم شده به روش Maximum Likelihood در شکل ۲ نشان دهنده وجود دو لاین مختلف رت در تهران است که با یکدیگر اختلاف زیادی دارند. HGA دارای ۱۲۶ نمونه و HBG در ۸۷ نمونه یافت می شود. این درختها با استفاده از مدل تکاملی HKY+G کشیده شده است که مقدار G در آن حدود ۰/۱۱ درنظر گرفته شده است (۱۳). گروههای خارجی یا Outgroup در این درختها شامل رتهایی است که بیشتر در آسیای جنوب شرقی پراکنش زیادی دارند. این رتها شامل: *R. rattus, R.exulans, R. tanezumi* و *R. praetor* می باشند. در شکل ۳ درخت بدون ریشه NeighbourNet که رابطه فیلوژنتیک بین هاپلوتیپها را نشان می دهد، نمایانگر دو کلاد کاملاً متمایز نزد رتهای تهران است. این گروهها که همان HGA و HGB هستند به صورت معنی داری از یکدیگر متفاوت هستند.

بحث و نتیجه گیری

همان طور که در مقدمه ذکر شد استفاده از داده های مولکولی برای شناسایی گونه ها و زیرگونه های خیلی از جانوران اجتناب ناپذیر است، به خصوص در مورد رتها که این جانوران به دلیل داشتن گونه های کریپتیک به وسیله مطالعات مورفولوژیک شناسایی دقیق و بی عیب و نقص نمی شوند. در مطالعه حاضر با توجه اینکه برای نمونه برداری از تله های زنده گیری استفاده می شد که به منظور مبارزه و کشتن رتها به وسیله پیمانکاران در مناطق مختلف تهران گذاشته می شدند، بنابراین انتظار می رود که نمونه ها فقط از داخل شهر گرفته شده باشند و گونه ها و زیرگونه های دیگر که با انسان همزیست نیستند، در این نمونه برداری وارد نشوند. از طرف دیگر بنا به عادت همواره تله ها در کف زمین قرار داده می شوند، بنابراین گرفتن رتهایی مثل گونه *R. rattus* که بیشتر در سقفهای کاذب زندگی می کند کمتر اتفاق می افتد. همان طور که در بخش نتایج اشاره شد از ۲۲۹ نمونه گرفته شده که ۱۹۲ مورد از آنها تعیین توالی شدند، فقط یک مورد گونه رت سیاه یا *R. rattus* مشاهده شد و از گونه های دیگر نیز به هیچ عنوان در شهر تهران مشاهده نشده است. از میان ۱۹۱ نمونه باقی مانده که همگی به گونه *R. norvegicus* تعلق دارند دو گروه کاملا متمایز دیده می شود. شکلهای مربوط به درختهای فیلوژنتیک، آنالیز MMD و درخت بدون ریشه NeighbourNet که نشان دهنده رابطه هاپلوتیپها با یکدیگر است همگی شواهدی هستند که نمایانگر این واقعیت هستند که در شهر تهران بدون شک دو گروه کاملاً متفاوت از رت نروژی وجود دارد. از طرف دیگر مطالعات متعددی

نشان داده است که گونه رت نروژی دارای حد اقل سه زیرگونه متفاوت می باشد (۱۲). این سه زیر گونه به نامهای *Rattus norvegicus norvegicus* و *Rattus norvegicus albicans* و *Rattus norvegicus caraco* (Pallas, 1779) نام گذاری شده اند. حال کدام گروه از رتهایی که در تهران یافت می شوند به کدام زیرگونه تعلق دارند؟ سؤالی است که هنوز نمی توان به آن جواب داد. علت آن این است که هنوز محققی از نظر مولکولی این زیرگونه ها را مطالعه نکرده است و داده ها در بانک ژنی مبنی بر اینکه کدام زیرگونه دارای کدام ترادف ژنی است، وجود ندارد. لذا در حال حاضر سعی بر آن است که جواب سؤال را پیدا کرده و با ادامه کار بر روی رتهای تهران و مطالعه ژئومتریک – مورفومتریک و مورفولوژیک از طریق پیگیری این سریمطالعات سعی می گردد.

آنالیزهای مربوط به ژنتیک جمعیت رتها نشان داد که این جانوران دارای تنوع ژنتیکی بسیار پایین در تهران هستند. تنوع هاپلوتیپی و نوکلئوتیدی و همچنین تعداد بسیار کم هاپلوتیپها در تهران در مقایسه با مطالعات دیگری که پژوهشگران بر روی موش خانگی انجام داده اند، بسیار پایین است. به عنوان مثال رجبی مهام و همکاران در سال ۲۰۰۸ و ۲۰۱۱ (۱۴) با مطالعه بر روی تنوع ژنتیکی موشهای خانگی ایران مشاهده کردند که در بعضی مناطق تنوع بسیار بالاست. به عنوان مثال در استان سیستان و بلوچستان در میان۲۲ قطعه موشی که از دو خانه مجاور هم گرفته شده بودند ۱۷ هاپلوتیپ در میان آنها یافت شد در صورتی که در مورد رتهای کلان شهر تهران از کل ۱۹۱ نمونه فقط ۲۴ هاپلوتیپ پیدا شد. دلیل این امر تا حدود زیادی می تواند مربوط به مبارزات پیگیر شهرداری تهران بر علیه این جانور باشد که با کنترل جمعیت آنها توانسته است تنوع ژنتیکی را تا این حد پایین نگاه دارد. درحقیقت Bottelneck های متعددی که برای این جانور در گذشته اتفاق افتاده است، باعث شده است تا رتهای تهران امروزه تنوع آنچنانی نداشته باشند. دلیل دیگری که می توان ارائه داد این است که علت می تواند مربوط به نوعی اثر جمعیتهای بنیانگذار یا Founder Effect باشد. یعنی اینکه اولین رتهایی که وارد شهر تهران شده اند دارای تنوع ژنتیکی بسیار پایینی بوده اند و با گذشت زمان این تنوع همواره پایین نگه داشته شده است. تئوری اولیه این تحقیق نیز همانند بسیاری از افراد که اعتقاد دارند این جانور یک گونه مهاجم است ((۱) و مطالعات مورفولوژیک در دانشگاه مشهد) و اخیراً وارد ایران و تهران شده است، همین نظر بود. ولی با یک نگاه به نتایج این پژوهش می توان گفت که این تئوری برای همه رتهای تهران نمی تواند درست باشد. در تخمین زمانهای شروع افزایش رشد جمعیتها برای گروه HGA که ۷۰۰ سال تخمین زده شد شاید این حدس درست باشد و در ۵۰۰ تا ۷۰۰ سال اخیر این گروه وارد تهران شده باشند، ولی در مورد HGB که زمان تخمینی آن ۵۶۰۰ سال پیش است، این گفته ناصحیح است. متأسفانه در مورد رتهای کشورهای همسایه شرقی ایران مطالعه مولکولی انجام نشده است و داده ای در بانک ژنی وجود ندارد تا مطالعه جغرافیای تکاملی کاملی انجام شود و اینکه آیا این جانوران از طریق بندرها و واردات مواد غذایی وارد ایران شده اند و یا اینکه به صورت زمینی و در زمان بسیار قدیم وارد ایران شده اند، ثابت شود. ولی با تکیه به داده های همین مطالعه می توان گفت که با توجه به قدمت حداقل یکی از سویه های رت تهران شکی نیست که این جانوران در دوره پس ازآخرین یخبندان جهانی که ۱۲۰۰۰ سال پیش پایان یافت، وارد ایران و تهران شده اند ولی مسیر مهاجرت شان به دلیلی که در بالا ذکر شد مشخص نیست. تأیید کننده این گفته می تواند مطالعات متعددی باشد که بر روی رت(۱۵ و ۱۶) و موش خانگی (۱۴) انجام شده است.

بنابراین اگر نظر تحقیقی این مطالعه در مورد تقریباً بومی بودن بخشی از این جانوران پذیرش گردد در مورد HGB که قدمت بیشتری دارد ولی دارای تعداد هاپلوتیپ کمتری

است، می توان گفت که ممکن است برای این گروه دو اتفاق افتاده باشد:

اول اینکه مبارزات کنترل جمعیتی برای این گروه مؤثرتر بوده است و این گروه ذاتاً دارای خصوصیتی هستند که قابل کنترل تر به نظر می آیند.

دوم اینکه این گروه در مقابل زیرگونه مهاجم که جدیداً وارد تهران شده است، میدان مبارزه را در حال واگذار کردن می باشد. به طوری که در دراز مدت ممکن است پیروز میدان گروه مهاجم تازه وارد باشد. داده های آنالیز دموگرافیک نشان دهنده در حال افزایش بودن حجم جمعیت گروه HGA تازه وارد هستند و برای مبارزه و به کنترل درآوردن این جمعیتها بایستی تدابیر برنامه دار و منظمی اندیشیده شود.

با یک نگاه به جدول ۱ که نشان دهنده نحوه پراکنش هاپلوتیپها در مناطق مختلف تهران است، ملاحظه می شود که بیشترین تنوع هاپلوتیپی مربوط به مناطق حاشیه ای تهران مانند: ۱، ۴، ۱۳، ۱۸ و ۱۹ می باشد. احتمالاً در این مناطق شرایط رشد و پرورش این جانوران خیلی مساعد تر از مناطق دیگر است. مناطق ۹ و ۱۲ نیز دارای رفت آمد فراوان مسافرین و مراکزی است که در ارتباط تنگاتنگ با خرید و فروش مواد غذای یا وجود رستورانهاست. در این مناطق به دلیل عدم رعایت اصول بهداشتی دفع فاضلاب یا مواد دور ریختنی غذایی، محیط بسیار مناسبی برای این جانوران مهیا می کند به طوری که عملا این مناطق به عنوان مراکز وجود کلنیهای رتها در تهران می توانند محسوب شوند.

سپاسگزاری

این تحقیق از طریق یک پروژه به وسیله شرکت ساماندهی صنایع و مشاغل شهر وابسته به شهرداری تهران تأمین اعتبار مالی شده است. از تمام کسانی که در نمونه برداری و انجام این تحقیق یاری رسانده اند، خصوصاً سرکار خانم مهین میرزایی به خاطر توصیه های ارزشمندشان، قدردانی می شود.

منابع

۱- سپیدار, ع.ا. ۱۳۶۹. موش ها (جوندگان) شناخت و روش مبارزه با آنها.

2- Bryant D, and Moulton V. 2004. Neighbor-Net: An Agglomerative Method for the Construction of Phylogenetic Networks. *Mol Biol Evol* 21: 255-265.

3- Excoffier L, Laval G, and Schneider S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50.

4- Fu Y-X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection .*Genetics* 147: 913–925.

5- Hebert P, Penton E, Burns J, Janzen D, and Hallwachs W. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly Astraptes fulgerator. *Proceedings National Academy of Sciences, USA,* 101.۱۴۸۱۷-۱۴۸۱۲ :

6- Hingston M, Goodman S, Ganzhorn J, and Sommer S. 2005. Reconstruction of the colonization of southern Madagascar by introduced Rattus rattus. *Journal of Biogeography* 32: 1549-1559.

7- Matisoo-Smith E, and Robins J. 2004. Origins and dispersals of Pacific peoples: evidence from mtDNA phylogenies of the Pacific rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 101: 9167-9172.

8- Mccoll RW. 2005. *Encyclopedia Of World Geography (Facts on File Library of World Geography)*. Facts on File.

9- Merriam-Webster's Geographical Dictionary 3rd ed, ed. D.J. Hopkins. 1997: Merriam-Webster.

10- Musser GG, and Carleton MD. 1993. Family muridae. In: Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference. In: Wilson DE RD, ed.: Smithsonian Institution Press, Washington. 501-755.

11- Musser GG, and Carleton MD. 2005. Family muridae. In: Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference. In: Wilson DE RD, ed.: The John Hopkins University Press, Baltimore. 894-1531.

12- Nuri YİĞİT, Ercüment ÇOLAK, Mustafa SÖZEN, and ÖZKURT Ş. 1998. The Taxonomy and Karyology of Rattus norvegicus (Berkenhout, 1769) and *Rattus rattus* (Linnaeus, 1758) (Rodentia: Muridae) in Turkey. *Turk. J. Zool.* 22: 203-212.

13- Posada D, and Crandall K. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.

14- Rajabi-Maham H, Orth A, and Bonhomme F. 2008. Phylogeography and postglacial expansion of Mus musculus domesticus inferred from mitochondrial DNA coalescent, from Iran to Europe. *Molecular Ecology* 17th: 627-641.

15- Robins JH, Hingston M, Matisoo-Smith E, and Ross HA. 2007. Identifying Rattus species using mitochondrial DNA. *Molecular Ecology Notes* 7: 717–729.

16- Robins JH, McLenachan PA, Phillips MJ, Craig L, Ross HA, and Matisoo-Smith E. 2008. Dating of divergences within the Rattus genus phylogeny using whole mitochondrial genomes. *Mol Phylogenet Evol* 49: 460-6.

17- Rozas J, Sanchez-DelBarrio JC, Messeguer X, and Rozas R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.

18- Tajima F. 1989. Statistical-Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.

19- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and S K. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*.

20- Taylor JM, Calaby JH, and Deusen HMV. 1982. A revision of the genus *Rattus* (Rodentia, Muridae) in the New Guinean region. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 173: 177-336.

21- Vazquez-Dominguez E, Paetkau D, Tucker N, Hinten G ,and Moritz C. 2001. Resolution of natural groups using iterative assignment tests: an example from two species of Australian native rats (*Rattus*). *Molecular Ecology* 10: 2069-2078.

22- White J, Clark G, and Bedford S. 2000. Distribution, present and past, of *Rattus praetor* in the Pacific and its implications *Pacific Science* 54: 105-117.

23- Yosida TH, Kato H, Tsuchiya K, Sagai T, and Moriwaki K. 1974. Cytogenetical Survey of Black Rats ,*Rattus rattus*, in Southwest and Central Asia, with Special Regard to the Evolutional Relationship between Three Geographical Types. *Chromosoma* 45: 99 -109.

Population genetic diversity of genus *Rattus* species in Tehran city

Rajabi-Maham H.[1], Keshtkar S.[1], Hassanzadeh Kiabi B.[1] and Mirzaei M.[2]

[1] Animal Biology Dept., Faculty of Biological Sciences, Shahid–Beheshti University, Tehran, I.R. of Iran

[2]Organization for Re-locating & Systematizing of Urban Indastries Trade Occupation, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Today, the rats are considering as an important laboratory model and from another aspect, as very important potentially dangerous pest. Rats reseach, especially to identify them, their genetics of populations and phylogeography, using morphological and especially molecular techniques is a necessity. This study performed using D-Loop region of mtDNA to identify them and study genetic of Tehran metropolis rats and the results showed presence of only the black and brown rat species in Tehran. Among the 229 samples, only one sample was the black rat and remians diagnosed as the brown rats belonging to two different subspecies probably. Demographic and population genetics analyses showed that these animals have a very low genetic diversity and the two different groups have entered Iran in different times: The estimated time for the first or newer group and for older group was about 700 and 5600 years, respectively. The data also revealed that Tehran's rat populations have had an expansion period in past but one could see the well-done controls in the past, too. The districts such as 18, 19, 13, 12, 9, 4 and 1 have much more groups of rats and could be the niche of colonies.

Key words: Population Genetic, D-Loop, Brown rat *(Rattus norvegicus).*