

ارزیابی روابط خویشاوندی، ساختار و تمایز ژنتیکی مار کبرای خزری (*Naja oxiana* Eichwald 1831) در ایران با استفاده از نشانگر میتوکندریایی دی لوپ

Phylogenetic Relationships, Genetic Structure and Differentiation of the Caspian Cobra (*Naja oxiana* Eichwald 1831) snake in Iran Using D-Loop Mitochondrial DNA Marker

محبوبه شورابی^۱، مسعود نظری زاده دهکردی^۱، محمد کابلی^{۱*}، اسکندر رستگار پویانی^۲

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشیاران، گروه محیط زیست، دانشگاه تهران

۲- دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه حکیم سبزواری

Shoorabi M¹, Nazarizadeh Dehkordi M¹, Kaboli M^{*1}, Rastegar Pouyani E²

1- Graduate MSc Student, Associate Professors, Department of Environmental Sciences, University of Tehran

2- Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Hakim Sabzevari University

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mkaboli@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۵/۶/۲۱ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۲/۳۱)

چکیده

روابط خویشاوندی مار کبرای خزری (*Naja oxiana*)، به عنوان شرقی ترین گونه از زیر جنس *Naja* دارای ابهامات زیادی است. هدف از این مطالعه بررسی روابط تکاملی، تنوع، تغییرات و ساختار ژنتیکی کبرای خزری در جمعیت های شمال و شمال شرقی ایران بوده است. بدین منظور تعداد ۱۹ نمونه از این گونه در زیستگاه های طبیعی آن ها در شمال شرقی (استان خراسان رضوی و خراسان شمالی) و شمال (استان گلستان) صید و تعداد پنج تا ۱۰ فلس زیرشکمی از این افراد برداشت شد. از این فلس ها در آزمایشگاه به روش آمونوم استات DNA کافی استخراج و سپس برای تکثیر ژن دی لوپ به طول ۵۸۹ جفت باز از دو آغازگر پیشرو و پسرو استفاده شد. تحلیل تبارشناسی با استفاده از بهترین مدل تکاملی و رسم درخت بیزین و حداکثر درست نمایی انجام گرفت. ارتباط بین هابلوتا پ با استفاده از منطق حداکثر پارسیمونی با سطح بهینه ۹۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تعداد هفت هابلوتیپ منحصر به فرد و یک هابلوتا پ مشترک در بین جمعیت های شمال (استان گلستان) و شمال شرق (استان خراسان رضوی و خراسان شمالی) را تایید نمود. نتایج تحلیل تبارشناسی حاکی از جدایی جمعیت های کبرای خزری به صورت دو شاخه ای و با احتمال پسین (۰/۶۱) و بوت استرپ (۵۴/۳۱) نه چندان مستحکمی از کبرای چینی است. در نهایت تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) به ترتیب تغییرات ژنتیکی بسیار اندک و غیرمعنی داری را در بین جمعیت های کبرای خزری در شمال و شمال شرقی کشور و تغییرات ژنتیکی بسیار زیاد و معنی داری (P < ۰/۰۱) را در بین جمعیت کبرای خزری با کبرای چینی نشان داد. نتایج این مطالعه براساس نشانگر مورد استفاده حاکی از آن است که تبار کبرای خزری به نسبت تباری جوان است و از پرتوش سازشی (Adaptive radiation) و گسترش جمعیت های مختلف آن در شرق و شمال شرقی ایران مدت زمان زیادی نمی گذرد. این نتایج نشان می دهد که برای حفاظت از کبرای خزری در بین جمعیت های شمال و شمال شرقی ایران می توان از طرح حفاظتی یکپارچه ای استفاده نمود.

واژه های کلیدی

تنوع ژنتیکی

روابط خویشاوندی

ژن دی لوپ

کبرای خزری (*Naja oxiana*)

مقدمه

مارهای کبرا جنس (*Naja* (LAURETI 1768 در خانواده اپیپده شامل ۲۸ گونه در سطح جهان هستند که در سال‌های اخیر به چهار زیرجنس مجزا شامل *Afronaja*, *Boulengerina*, *Uraeus* و *Naja* تفکیک شده‌اند (Lin et al. 2012; Wallach et al. 2009). کبراهای آسیایی زیر جنس *Naja* با ۱۱ گونه یکی از متنوع‌ترین چهار زیر جنس شناخته شده این آرایه معرفی شده‌اند (Wallach et al. 2009). مار کبرا برای خزری (*N. oxiana*) به‌عنوان شرقی‌ترین گستره حضور زیرجنس *Naja* در قسمتی از زیستگاه‌های به نسبت خشک و سنگی و مناطقی با پوشش گیاهی پراکنده از شمال شرقی ایران تا جنوب ترکمنستان، جنوب ازبکستان، غرب تاجیکستان، شمال پاکستان و هند پراکنش دارد (Wuester 1990; Wuster and Thorpe 1988). متأسفانه در سال‌های اخیر، جمعیت این گونه ارزشمند به‌عنوان تنها نماینده این زیر جنس در زیستگاه‌های شمال شرقی ایران (خراسان) به‌واسطه صید بی‌رویه و غیرقانونی کاهش شدید یافته است (Darvish and Rastegar-Pouyani 2012) و بیم آن می‌رود که در صورت عدم مدیریت و حفاظت مناسب، به سرنوشت کبرا چینی (*Naja atra*) دچار شده (Zhao 1998) و با روند کنونی کاهش جمعیت، به زودی به عنوان یک گونه در معرض خطر انقراض معرفی شود.

مطالعه ژنتیک جمعیت امری ضروری برای بررسی اثر فرآیندهای تکاملی (انتخاب طبیعی، جریان ژنی، جهش، رانش ژنتیکی، پویایی فراجمعیتی و سیستم جفت‌گیری) بر جمعیت‌های مختلف مارهای سمی است (Mullin and Seigel 2009). چرا که تهدیدهای تنوع زیستی اغلب با اثر بر فرآیندهای تکاملی باعث کاهش تغییرات ژنتیکی و در نتیجه انقراض گونه‌ها خواهد شد (Frankham 2005). براین اساس یکی از مهم‌ترین مشکلات مارهای سمی را می‌توان کاهش اندازه جمعیت آن‌ها بر اثر فعالیت‌های بشر اعم از تخریب زیستگاه و بهره‌برداری بی‌رویه جهت مصارف پزشکی (تولید پاد زهر و تهیه روغن مار) در نظر گرفت (Wüster et al. 2007; Pook et al. 2009) با تکه‌تکه شدن زیستگاه‌ها، جمعیت‌های موجود در آن‌ها به دلیل تغییرات تصادفی ژنتیکی و جمعیت شناختی تحت تأثیر فرسایش درون آمیزی و فرسایش آلی قرار می‌گیرند و بدین ترتیب برازش افراد و

در نتیجه بقای جمعیت به شدت کاهش می‌یابد (Young 2000; Meister et al. 2010). بدین ترتیب با توجه عوامل ذکر شده بررسی ساختار و تغییرات ژنتیکی برای حفاظت از مارهای سمی امری ضروری جهت جلوگیری از ورود این گونه‌های ارزشمند به گرداب انقراض است.

توسعه داده‌های مولکولی و ژنتیکی با تعیین ژنوتیپ یا توالی هاپلوتایپی زمینه‌ای برای تحقیقات تکاملی و تنوع ژنتیکی ایجاد کرده است (Mousavizadeh et al. 2009; Mohammadi et al. 2008; Javanmard et al. 2009). DNA میتوکندریایی (mtDNA) به‌عنوان یک نشانگر مولکولی در تشخیص گونه‌ها و ترسیم رابطه فیلوژنتیکی دارای مزایایی از جمله تعداد زیاد نسخه به ازای هر سلول (تقریباً ۱۰۰۰ نسخه و بیش‌تر)، اندازه کوچک‌تر آن از DNA ژنومی، وراثت‌پذیری مادری، هاپلوئید بودن، عدم وجود نوترکیبی در آن و وجود نواحی حفاظت شده می‌باشد. از این رو mtDNA نشانگر بسیار مناسبی برای تشخیص گروه‌هایی است که برای ۱۰۰ تا ۱۰۰۰۰ سال از هم جدا بوده‌اند. هم‌چنین سرعت بالای تکامل mtDNA در مقایسه با DNA هسته‌ای، باعث شده‌است که از آن برای مطالعات تکاملی استفاده شود (Hiendleder et al. 1998; Naderi et al. 2007). ایجاد جهش‌های گروهی در توالی DNA باعث به‌وجود آمدن جایگاه‌های حاوی اطلاعات پارسیمونی می‌شود که این جایگاه‌ها، نقش مؤثری را در واگرایی ژنتیکی جمعیت‌های مورد بررسی ایفا می‌کند (Frankham 2005). بدین ترتیب توالی‌یابی ژنوم میتوکندری و بررسی جایگاه‌های پارسیمونی یکی از کاربردی‌ترین روش‌ها برای تعیین رابطه فیلوژنتیکی بین جمعیت‌ها و گونه‌های نزدیک به هم محسوب می‌شود (Mills 2012). اگرچه مطالعات ژنتیکی گسترده‌ای در زمینه روابط خویشاوندی و آرایه‌شناختی کبرا آسیایی در جهان انجام شده‌است (Lin et al. 2008; Li et al. 2008; Wüster et al. 2007; Wallach et al. 2009; Lin et al. 2012; L. Lin et al. 2014)، ولی تاکنون مطالعه‌ای در رابطه با وضعیت تبارشناسی، تمایز و ساختار ژنتیکی کفچه خزری در ایران به‌عنوان شرقی‌ترین گستره پراکنش مار کبرا آسیایی انجام نشده‌است. لذا، هدف از انجام این مطالعه بررسی روابط تکاملی، تاریخی جمعیتی،

¹ Demographic history

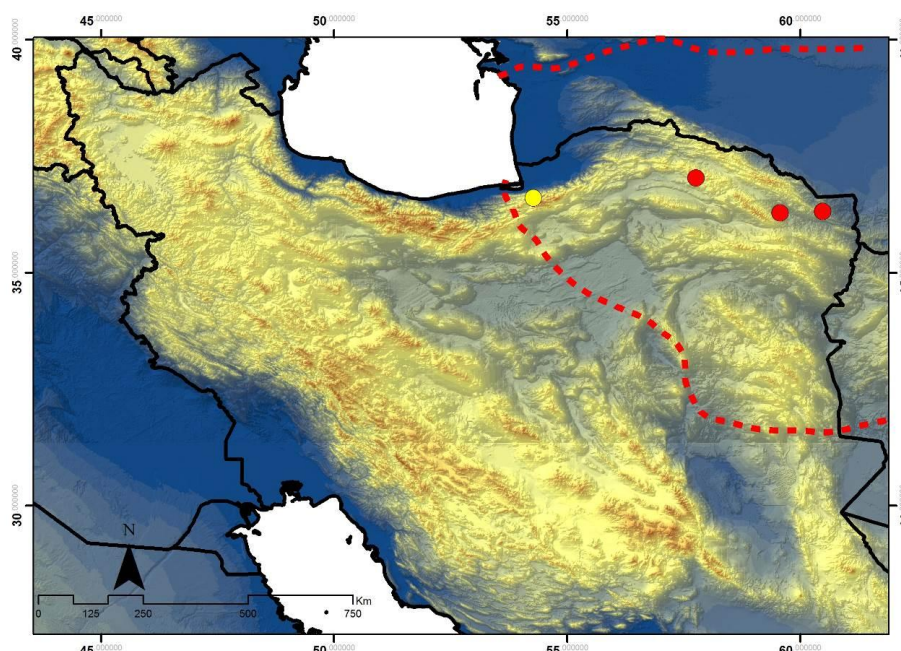
شد. سپس برای تکثیر ژن دی‌لوپ از آغازگر پیشرو 5'-PL1: 3'-CCACAAAGCATTGTTCTTGTAACC و آغازگر پسرو 5'-PH1: 3'-GAAGCTTGCATGTATAAGTAGGG استفاده شد (Li et al. 2008). تکثیر جایگاه‌های ژنی و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) با استفاده کیت 2X Taq PerMix و در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام گرفت. شرایط PCR شامل یک واحد آنزیم تک پلی‌مراز، ۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومی، یک میکرولیتر مخلوط آغازگر ۵ پیکومولار، ۰/۵ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی‌مولار، یک میکرولیتر $MgCl_2$ ۵۰ میلی‌مولار و آب دو بار تقطیر تا رسیدن به حجم ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت.

چرخه دمایی برای تکثیر توالی ژن دی‌لوپ 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 ۵۵ درجه و یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و بسط نهایی با ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ده دقیقه (Li et al. 2008).

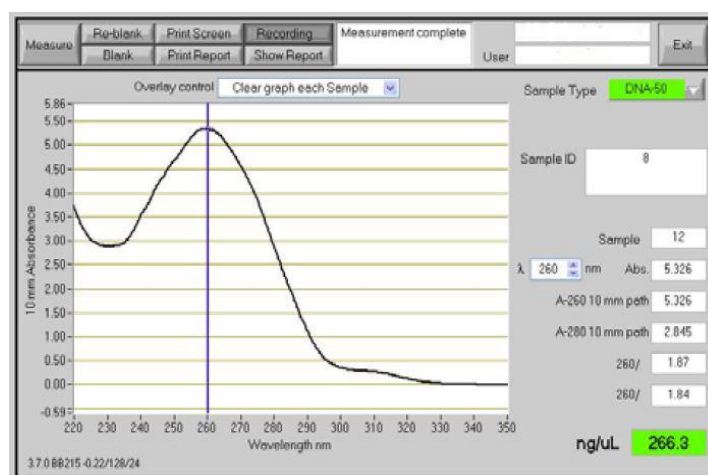
ساختار و تمایز جمعیتی کبرای خزری در شمال و شمال شرقی ایران در مقایسه با جمعیت‌های کبرای چینی (*N. atra*) با استفاده از توالی ژن دی‌لوپ بود.

مواد و روش‌ها

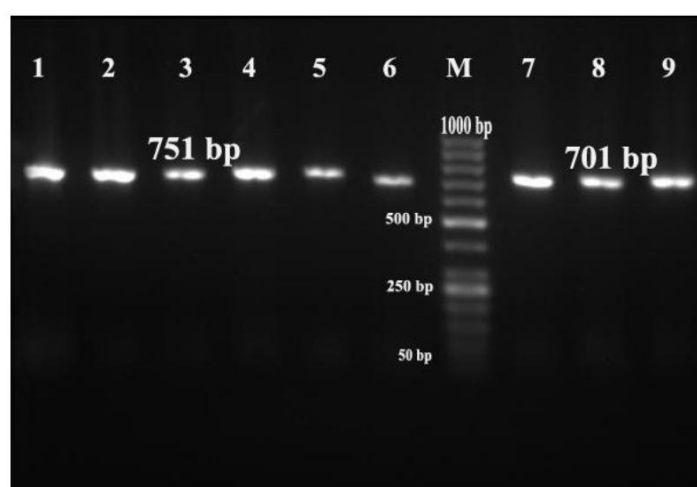
نمونه‌برداری از تعداد ۱۹ فرد با مجوز شماره ۲۱۴۵۲/۹۲ از سازمان حفاظت محیط زیست ایران در زیستگاه‌هایی از شمال و شمال شرقی کشور در استان‌های گلستان، خراسان رضوی، خراسان شمالی و خراسان شمالی انجام شد. نمونه‌برداری با برداشت پنج تا ۱۰ فلس از فلس‌های زیر شکمی کبرای خزری توسط قیچی استریل شده، بدون آسیب به پوست شکمی انجام شد و نمونه‌ها در الکل ۹۶ درصد تا زمان استخراج DNA نگه‌داری شد. DNA از نمونه‌های بافت با استفاده از دستورالعمل روش آمونیوم استات استخراج شد (Kapli et al. 2013). هم‌چنین از دستگاه نانودراپ برای بررسی غلظت DNA استخراجی استفاده



شکل ۱- مناطق جمع‌آوری نمونه در شمال شرق (دایره‌های سبز رنگ) و شمال (دایره‌های قرمز رنگ) مساحت خطوط خط چین قرمز رنگ پراکنش کبرای خزری در ایران را نشان می‌دهد (Wuster 1990).



شکل ۲- غلظت DNA استخراجی از بافت نمونه‌های کبرای خزری



شکل ۳- ارزیابی محصول PCR بر روی ژل آگاروز یک درصد.

شدند (Thompson et al. 1994). قبل از آغاز تجزیه‌های تبارشناسی، فرضیه‌ی اشباع جایگزینی^۱ مورد بررسی قرار گرفت. سپس برای فراوانی بازهای مختلف و تعیین میزان جانشینی‌های نوع اول و دوم توسط نرم‌افزار MEGA نسخه ۵/۳ با ۱۰۰۰ تکرار انجام شد (Tamura et al. 2011). تعیین تعداد هاپلوتایپ‌ها، جایگاه‌های چند شکلی با استفاده از نرم‌افزار DNAsp نسخه ۵/۱ برآورد شد (Librado and Rozas 2009). همچنین، نرم‌افزار Arlequin نسخه ۳/۵ برای تعیین شاخص تنوع ژنتیکی (تنوع هاپلوتایپی و نوکلئوتیدی) در جمعیت‌ها و آزمون‌های

به‌منظور تایید تکثیر ناحیه مورد نظر، الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگاروز یک درصد با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید صورت گرفت. در نهایت محصولات PCR جهت توالی‌یابی به کشور کره جنوبی انتقال یافت و با استفاده از دستگاه 3730 Applied Biosystems/ Bioneer و به روش اتوماتیک سانگر توالی‌یابی شدند.

کروماتوگرام توالی هر نمونه با نرم‌افزار SeqScape نسخه ۲/۶ بررسی و خطاهای موجود تصحیح شد. توالی‌های تصحیح شده برای تجزیه‌های مقایسه‌ای با ۲۳ توالی ژن دی‌لوپ از چهار جمعیت کبرای چینی در تایوان ترکیب شده (شماره اختصاری در بانک ژن DQ224315-337) و سپس با استفاده از نرم-افزار BioEdit نسخه ۷/۲/۵ و الگوریتم Clustalw هم ردیف

¹ Substitution Saturation

بیزین رسم شده در نرم افزار Tracer نسخه ۱/۴ مورد بررسی قرار گرفت (Rambaut and Drummond 2007). درخت های بیزین و حداکثر درست نمایی به وسیله سه گونه *N. sumatrana*، *N. siamensis* و *N. kaoutha* (نام اختصاری ثبت شده در بانک ژن به ترتیب JN123456, JN614165, JN123457) ریشه دار شد. درخت های ترسیم شده به وسیله قانون اکثریت^۹ یکپارچه^{۱۰} شدند. برای بررسی ارتباط بین هاپلوتایپ ها و ترسیم شبکه هاپلوتایپی از منطق پارسیمونی و نرم افزار PopArt نسخه ۱/۷ استفاده شد (Leigh and Bryant 2015). در نهایت برای بررسی جدایی هاپلوگروپ های کبرای چینی و کبرای خزری از منطق پارسیمونی و نرم افزار TCS نسخه ۲/۱ استفاده شد (Clement et al. 2000).

نتایج

تمامی DNA های استخراج شده از غلظت مناسب برای شروع فرآیند PCR برخوردار بودند (شکل ۲). شکل ۳ ارزیابی کیفیت محصول PCR را بر روی ژل آگاروز نمایش می دهد. براین اساس نمونه های PCR شده باندهایی با کیفیت مناسب نسبت به نشانگر سایز DNA^{۱۱} نشان دادند.

تحلیل داده ها با استفاده از ۵۸۹ جفت باز و ۴۲ توالی دی لوپ (۱۹ توالی *N. oxiana* و ۲۳ توالی *N. atra*) نشان داد که ۵۷۲ جایگاه حفاظت شده و ۱۷ جایگاه چندشکلی^{۱۲} بوده که شامل ۸ جایگاه حاوی اطلاعات پارسیمونی^{۱۳} و ۹ جایگاه تک متغیر^{۱۴} بوده است. مقدار Iss^{۱۵} (۰/۰۰۶) نسبت به Iss.c^{۱۶} (۰/۷۱۱) در تجزیه اشباع جایگزینی کوچک تر و معنی دار به دست آمد. هم چنین نمودار نرخ جانیشینی نوع اول و دوم در مقابل واگرایی

خنثی سازی^۱ مورد استفاده گرفت. تحلیل واریانس مولکولی (AMOVA) با استفاده از این نرم افزار صورت گرفت (Excoffier et al. 1992). در روش اول همه جمعیت های کبرای چینی و کبرای خزری در یک گروه قرار گرفتند و در روش دوم جمعیت های کبرای چینی و کبرای خزری به صورت دو گروه مستقل در نظر گرفته شدند. سپس آماره های FCT^۲ (تغییرات ژنتیکی در میان گروه ها)، FST^۳ (تغییرات ژنتیکی در میان جمعیت ها) و FSC (تغییرات ژنتیکی در میان جمعیت های یک گروه) تعیین شدند. برای تعیین رشد نمایی جمعیت و نرخ θ از فرمول^۴ $\theta = N_f \mu$ با استفاده از منطق بیزین و نرم افزار Lamarc نسخه ۲/۱ در ۱۰ زنجیره ابتدایی با ۱۰۰۰ تکرار و دو زنجیره پایانی با ۲۰۰۰۰ تکرار و در حدود اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد. هم چنین از مدل تکاملی GTR با فراوانی نوکلئوتیدی تخمین زده برای انجام این تحلیل استفاده شد (Kuhner 2006; X Xia and Lemey 2009).

برای تعیین بهترین مدل جانیشینی نوکلئوتیدی از نرم افزار JModelTest نسخه ۲/۱/۵ استفاده شد (Darriba et al. 2012). سپس با استفاده از مدل تکاملی انتخاب شده از نرم افزار RAXML نسخه ۷/۲ برای ترسیم درخت حداکثر درست نمایی^۵ (Stamatakis et al. 2005) و از نرم افزار MrBayes نسخه ۳/۲/۲ برای ترسیم درخت بیزین استفاده شد (Ronquist and Huelsenbeck 2003). تحلیل های بیزین بر اساس چرخه زنجیره مارکوف^۶ با ۱۰ میلیون تکرار و فراوانی نمونه^۷ ۱۰۰ انجام شد و هم چنین برای بالا بردن دقت، مقدار ۲۵ درصد درخت های اولیه نادیده^۸ گرفته شد. در نهایت ایستایی و انحراف معیار درخت

¹ Neutrality tests

² covariance among groups (c), compare to the total population (T)

³ relative to the subpopulation (S)

^۴ N_f اندازه موثر جمعیت ماده و μ نرخ جهش ژن دیلوپ

⁵ Maximum Likelihood

⁶ Markov chain Monte Carlo

⁷ Sample frequency

⁸ Burn-in

⁹ Majority- rule

¹⁰ Consensus

¹¹ ladder

¹² Polymorphic site

¹³ Parsimony informative site

¹⁴ Singleton variable site

¹⁵ Index of Substitution Saturation

¹⁶ Critical index of Substitution Saturation

ژنتیکی حاکی از اشباع جایگزینی بسیار اندک در توالی‌های مورد بررسی بود (شکل ۴). فراوانی هر کدام از نوکلئوتیدها مطابق شکل ۵ برآورد شد. تیمین (۳۱/۷ درصد) و گوانین (۱۴/۶ درصد) به ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین فراوانی نوکلئوتیدها را تشکیل دادند (شکل ۵). جدول ۱ مقایسه ویژگی‌های ژنتیکی جمعیت‌های کبرای خزری در شمال و شمال شرقی با چهار جمعیت از کبرای چینی را نشان می‌دهد. در بین ۵ توالی از جمعیت‌های شمالی کبرای خزری تعداد ۴ هاپلوتایپ به دست آمد در حالی‌که از ۱۴ توالی جمعیت‌های شمال شرق کشور ۶ هاپلوتایپ مشاهده شد. براین اساس، به ترتیب کم‌ترین و بیش‌ترین تنوع هاپلوتایپی در جمعیت‌های کبرای خزری ۰/۵۱ تا ۰/۹۰ برآورد شد. هم‌چنین دو هاپلوتایپ مشترک در بین این دو جمعیت مشاهده شد. کم‌ترین و بیش‌ترین تنوع نوکلئوتیدی در کبرای خزری به ترتیب در جمعیت‌های شمال شرقی (۰/۰۱۴) و شمال (۰/۰۵۸) محاسبه شد. مقدار آماره‌ی F_{ST} برای جمعیت‌های شمال شرقی کشور

منفی و معنی‌دار ولی برای جمعیت شمال کشور منفی و غیر معنی‌دار بود.

در این مطالعه تعداد ۸ هاپلوتایپ از ۱۹ توالی مورد بررسی کبرای خزری حاصل شد که یک هاپلوتایپ مشترک در بین جمعیت‌های شمال و شمال شرقی کشور و ۷ هاپلوتایپ منحصر به فرد در بین دو جمعیت مورد بررسی تخمین زده شد (جدول ۲).

به دلیل تعداد کم نمونه در هر جمعیت تحلیل‌های تاریخی جمعیتی بر اساس تمامی جمعیت‌های کبرای خزری (شمال و شمال شرق کشور) و جمعیت‌های کبرای چینی (تمامی جمعیت‌های کشور تایوان براساس مطالعه‌ی Lin et al. (2014) صورت گرفت. در این میان، جمعیت‌های کبرای خزری بیشترین نرخ θ را در مقایسه با جمعیت‌های کبرای چینی نشان دادند. هم‌چنین رشد نمایی جمعیت در هر دو جمعیت مثبت و به ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین این نرخ در کبرای خزری و کبرای چینی محاسبه شد (جدول ۳).

جدول ۱- خصوصیات ژنتیکی کبرای خزری و کبرای چینی در توالی ژن دی لوپ. (تنوع نوکلئوتیدی P_i ، تنوع هاپلوتایپی h ، H_d ، تعداد هاپلوتایپ) و آزمون‌های تحلیل گسترش جمعیت‌های گونه (F_{ST}).

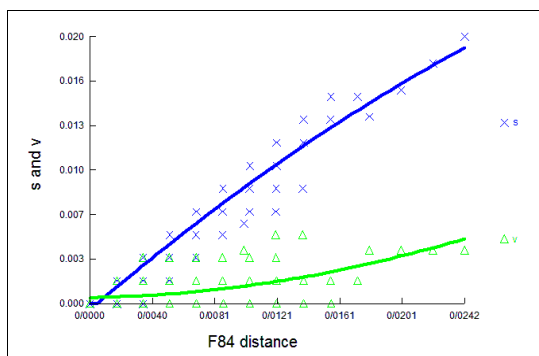
نمونه برداری	گونه	n	h	hd	P_i	F_{ST}	منبع
شمال ایران (گلستان)	<i>N. oxiana</i>	۵	۴	۰/۹۰	۰/۰۵۸	-۰/۱۲ ^{n.s}	مطالعه حاضر
شمال شرقی (خراسان رضوی و شمالی)		۱۴	۵	۰/۵۱	۰/۰۱۴	-۲/۰۹*	
شرق تایوان	<i>N. atra</i>	۲۲	۵	۰/۶۵	۰/۰۰۷	-۱/۱۶ ^{n.s}	Lin et al. 2014
شمال تایوان		۲۶	۶	۰/۵۵	۰/۰۰۶	-۲/۸۶*	
غرب تایوان		۳۰	۸	۰/۸۰	۰/۰۱۴	-۲/۱۷ ^{n.s}	
جنوب تایوان		۲۷	۱۲	۰/۹۲	۰/۰۲۲	-۵/۶۳ ^{oo}	

n.s، * و ** به ترتیب غیر معنی‌دار، معنی‌دار در سطح پنج درصد و معنی‌دار در سطح یک درصد است.

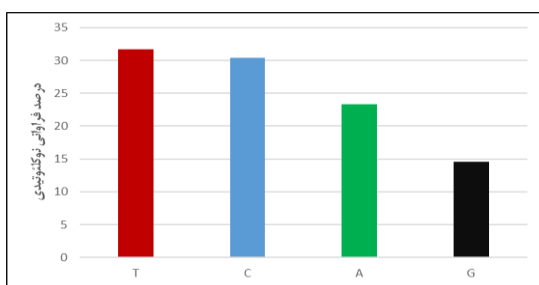
جدول ۲- تعداد هاپلوتایپ‌های کبرای خزری و فراوانی نسبی توالی‌ها در جمعیت‌های شمال و شمال شرقی کشور.

هاپلوتایپ	سایت‌های تغییرپذیر	جمعیت شمال	جمعیت شمال شرقی	فراوانی
هاپلوتایپ ۱	TGTCGAGAAA	۱	-	۰/۰۵۲۶
هاپلوتایپ ۲	.A . . A G . G . G	۱	-	۰/۰۵۲۶
هاپلوتایپ ۳	. . A A . . G G G	۱	-	۰/۰۵۲۶
هاپلوتایپ ۴	 G G G	۲	۱۰	۰/۶۳۲
هاپلوتایپ ۵	. A . . . G G G	-	۱	۰/۰۵۲۶
هاپلوتایپ ۶	 G . G	-	۱	۰/۰۵۲۶
هاپلوتایپ ۷	 A . G G	-	۱	۰/۰۵۲۶
هاپلوتایپ ۸	C G . G	-	۱	۰/۰۵۲۶

نشد. این در حالی است که بعضی از هاپلوتایپ‌های مربوط به جمعیت‌های کبرای خزری در شمال کشور با سه جهش از جمعیت‌های شمال شرقی جدا شدند و در بین این دو جمعیت از کبرای خزری در ایران هاپلوتایپ مشترک به دست آمد (شکل ۷). تحلیل جدایی هاپلوگروه‌ها با استفاده از منطق پارسیمونی نیز هیچ‌گونه جدایی در سطح اتصال بهینه ۹۵ درصد در بین هاپلوگروپ‌های کبرای خزری و کبرای چینی نشان نداد. جدول ۴ نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی را نشان می‌دهد. این نتایج حاکی از آن است که اگر همه جمعیت‌ها یک گروه در نظر گرفته شود، ۶۷/۱۴ درصد از کل تغییرات ژنتیکی در بین جمعیت‌ها و ۳۲/۸۶ درصد آن در داخل جمعیت‌ها بروز نموده است. هم‌چنین اگر گروه‌بندی براساس نتایج حاصل از درخت تبارشناسی انجام گیرد و کبرای خزری و کبرای چینی در دو گروه مجزا تفکیک شوند، ۷۵/۴۸ درصد از واریانس کل تغییرات ژنتیکی به واریانس بین گروه‌های مختلف اختصاص خواهد یافت.



شکل ۴- تجزیه اشباع جایگزینی. خط آبی رنگ جانشینی نوع اول (S) و خط سبز رنگ جانشینی نوع دوم (V) را نشان می‌دهد و محور افقی نشان دهنده فاصله ژنتیکی می‌باشد.



شکل ۵- فراوانی نوکلئوتیدهای ژن دی‌لوپ در کبرای خزری.

جدول ۳- تحلیل مقایسه‌ای تاریخی جمعیتی کبرای چینی و کبرای خزری براساس ۵۸۹ جفت‌باز دی‌لوپ و با استفاده از تخمین حداکثر احتمال پسین^۱ (MPE).

جمعیت	منطقه‌ی نمونه پردای	نرخ θ	رشد جمعیت
کبرای خزری <i>N. oxiana</i>	شمال و شمال شرقی ایران	۰/۰۱۶	۹۰۸/۵۳
کبرای چینی <i>N. atra</i>	تایوان	۰/۰۰۳۱	۸۷۵/۳۳

آزمون معیارهای اطلاعات بیزین (BIC)^۲ و اطلاعات آکایکه (AIC)^۳ نشان داد که مدل HKY+ G ($G = 0.227$) به عنوان بهترین مدل تکاملی نوکلئوتیدی، برای توالی‌های مورد نظر است. توپولوژی درخت‌های تبارشناسی بیزین بر اساس اطلاعات حاصل این مدل رسم شد و انحراف معیار درخت‌های ترسیم شده کمتر ۰/۰۱ به دست آمد. هم‌چنین از مدل تکاملی GTR+G برای ترسیم درخت حداکثر درست‌نمایی استفاده شد. شکل ۶ درخت تبارشناسی پنج گونه کبرای آسیایی را براساس ۵۸۹ جفت‌باز دی‌لوپ نشان می‌دهد (درخت‌های تبارشناسی حداکثر درست‌نمایی و بیزین توپولوژی یکسانی را نشان دادند). نتایج نشان داد که واحدهای عملکرد تاکسونومیک^۴ (OTU) با احتمال پسین^۵ بالاتری نسبت به بوت استرپ^۶ حاصل از درخت حداکثر درست‌نمایی از یکدیگر جدا شده‌اند. بر این اساس در ابتدا *N. siamensis* و *N. sumatrana* با احتمال پسین و بوت استرپ بالایی از یکدیگر جدا شدند و سپس کبرای خزری (*N. oxiana*) به ترتیب با احتمال پسین و بوت استرپ ۰/۶۱ و ۵۴/۳۱ درصد از هاپلوتایپ‌های کبرای چینی (*N. atra*) به حالت دو شاخه‌ای^۷ جدا شده‌است. نتایج حاصل از شبکه هاپلوتایپی براساس منطق پارسیمونی نشان داد که هاپلوتایپ‌های کبرای خزری با دو جهش از هاپلوتایپ‌های کبرای چینی جدا شده‌است. هم‌چنین هیچ هاپلوتایپ مشترکی در بین جمعیت‌های این دو گونه مشاهده

^۱ Most Probable Estimates (MPE)

^۲ Bayesian information criterion

^۳ Akaike information criterion

^۴ Operation Taxonomic Unit

^۵ Posterior probability (PP)

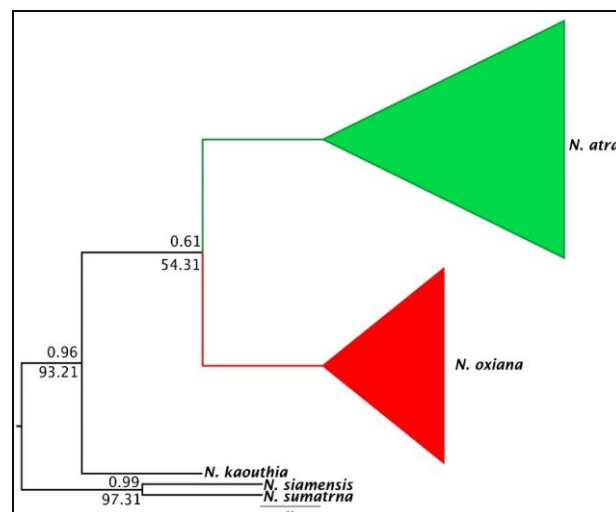
^۶ Bootstrap (Bp)

^۷ Bifurcate

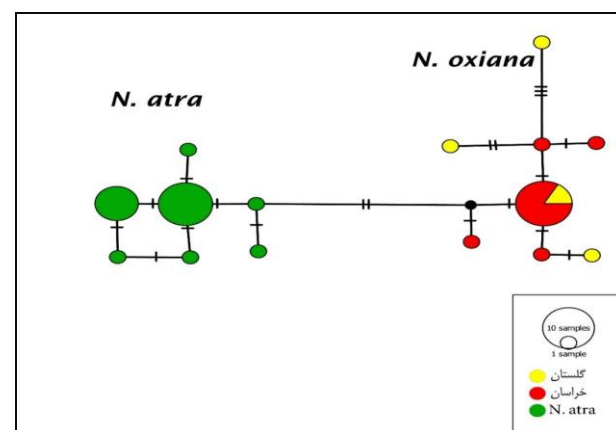
وجود تنوع هاپلوتایپی بالا به همراه تنوع نوکلئوتیدی پایین می تواند دلیلی بر گسترش سریع جمعیت ها باشد (Avisé 2000). هم چنین، استفاده از شاخص های آزمون خنثی سازی یک روش مطمئن برای تصمیم گیری در مورد بروز یا عدم بروز گسترش ناگهانی جمعیت ها معرفی شده است (Milá et al. 2007; Wang et al. 2009). به این ترتیب که اگر مقادیر شاخص های Fu's Fs منفی و معنی دار شوند، می تواند به وقوع یک گسترش ناگهانی در جمعیت تعبیر شود (Fu and Li 1993). نتایج این مطالعه نشان داد که شاخص Fu's Fs برای جمعیت های شمال شرقی کبرای خزری منفی و معنی دار است ($P < 0.05$). لذا با توجه به دلایل مذکور می توان وقوع یک گسترش ناگهانی را در جمعیت شمال شرقی کشور محتمل دانست.

نرخ θ برای جمعیت های کبرای خزری با حدود اطمینان ۹۵ درصد (۰/۰۱۶) به مراتب بیش تر از جمعیت های کبرای چینی (۰/۰۳۱) محاسبه شد (جدول ۳). لذا با بهره گیری از حاصل ضرب نرخ جهش (μ) ۰/۶۵ سایت به ازای هر میلیون سال (سایت/میلیون سال) (Huang et al. 2007) ژن دی لوپ و طول نسل چهار سال به ازای هر نسل (سال/نسل) (Huang and Lin et al. 2014) برای کبرای خزری، می توان مقدار μ را، $2/6 \times 10^{-7}$ جانشینی به ازای هر سایت به ازای هر نسل (جانشینی/سایت/نسل) به دست آورد. حال با استفاده از معادله $\theta = N_e \mu$ اندازه موثر جمعیت ماده کبرای خزری بر اساس ۵۸۹ جفت باز ژن دی لوپ مورد استفاده در این محاسبات، ۶۱۵ فرد ماده به ازای هر نسل تعیین می شود. هم چنین با استفاده از محاسبات بالا می توان اندازه موثر جمعیت ماده برای کبرای چینی را ۱۱۹ فرد ماده به ازای هر نسل تخمین زد. در پژوهش حاضر رشد نمایی جمعیت های کبرای خزری و کبرای چینی به ترتیب ۹۰۸/۵۳ و ۸۷۵/۳۳ تعیین شد. این اعداد حاکی از آن است که هر دو جمعیت دارای نرخ رشد نمایی مثبت بوده اند (Kuhner 2006).

در مطالعه Wallach et al. (2009) در بررسی روابط تبارشناسی شش گونه کبرای آسیایی نشان داده شد که گونه های *N. sputatrix*، *N. mandalayensis* و *N. atrata* به عنوان یک گروه با احتمال پسین بالایی (۰/۹۵) از *N. atrata* و *N. kaouthia*



شکل ۶- درخت تبارشناسی پنج گونه کبرای آسیای با استفاده از دو روش بیزین و حداکثر درست نمایی (توپولوژی یکسان). اعداد بالای شاخه نمایانگر احتمال پسین حاصل از درخت بیزین و اعداد پایین شاخه مربوط به شاخص بوت استرپ حاصل از روش حداکثر درست نمایی



شکل ۷- شبکه ی هاپلوتایپی کبرای خزری و کبرای چینی با استفاده از منطق اتصال میانه. خطوط عمودی بر اتصال هاپلوتایپ ها نمایگر تعداد جهش رخ داده در بین هاپلوتایپ ها بوده است.

بحث

این مطالعه با توالی یابی ۵۸۹ جفت باز ژن دی لوپ میتوکندریایی و بر اساس ۱۷ جایگاه تغییر پذیر نشان داد که جمعیت های کبرای خزری در شمال کشور تنوع ژنتیکی بالاتری (تنوع هاپلوتایپی و نوکلئوتیدی) نسبت به جمعیت های شمال شرقی کشور دارد. هم چنین میزان تنوع هاپلوتایپی کبرای خزری در مقایسه با کبرای چینی در محدوده تقریباً مشابه و یکسانی از یکدیگر قرار دارند، در حالی که دامنه تنوع نوکلئوتیدی در جمعیت های مورد بررسی کبرای خزری به مراتب بیش تر از کبرای چینی است (جدول ۱).

بدین ترتیب آماره‌ی F_{ST} و F_{CT} یک تفاوت معنی‌دار ($P < 0.01$) را در بین جمعیت‌های کبرای خزری با جمعیت‌های کبرای چینی را ثابت می‌کنند. این در حالی است که آماره F_{SC} تفاوت ژنتیکی بسیار اندک و غیر معنی‌داری را در داخل جمعیت‌های کبرای خزری و کبرای چینی نشان داد. بدین ترتیب به علت وجود یکپارچگی ژنتیکی می‌توان از طرح حفاظتی مشترکی در بین جمعیت‌های شمال و شمال شرقی ایران استفاده نمود.

علی‌رغم مطالعات گسترده ژنتیکی، وضعیت و جایگاه تبارشناسی زیرجنس کبرای آسیایی (*Naja*) همچنان دارای ابهامات بسیاری است. این در حالی است که آشکارسازی روابط خویشاوندی و تکاملی به عنوان یک اصل ضروری برای هر گونه بهره‌برداری پزشکی از مار سمی بوده است (Pook et al. 2009; Wüster et al. 2007). اگرچه مطالعه حاضر با ۵۸۹ جفت‌باز دی‌لوپ برای اولین بار، تا حد زیادی ارتباط خویشاوندی بسیار نزدیکی بین جمعیت‌های کبرای خزری ایران و کبرای چینی را ارزیابی نمود لیکن برای بازسازی و آشکارسازی ساختار مستحکم جایگاه کبرای خزری ایران در زیرجنس *Naja* مطالعات تکمیلی با استفاده از ژن‌های کدکننده پروتئین (هسته‌ای و میتوکندریایی) پیشنهاد می‌شود و در صورت اثبات نتیجه مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت که ترکیبات سم کبرای خزری در بین ۱۱ گونه‌ی کبرای آسیایی تا حد زیادی به کبرای چینی مشابه بوده است. لذا شاید بتوان از پادزهر ساخته شده برای کبرای چینی جهت درمان نیش زدگی‌های کبرای خزری استفاده نمود.

تفکیک شده‌اند. هم‌چنین کبرای هندی (*N. naja*) با احتمال پسین بالایی از سایر گونه‌های مذکور واگرا شده‌است. نتایج تبارشناسی مطالعه حاضر، با استفاده از ۵۸۹ جفت باز دی‌لوپ، هیچ‌گونه جدایی در بین جمعیت‌های شمال و شمال شرقی کبرای خزری (*N. oxiana*) نشان نمی‌دهد در حالی‌که شبکه هاپلوتایپی وجود دو هاپلوتایپ مشترک در بین این دو جمعیت را آشکار نموده است. از سوی دیگر *N. oxiana* با احتمال پسین (۰/۶۱) و بوت استرپ (۵۴/۳۱) نه چندان مستحکمی از *N. atra* تفکیک شده‌است. این در حالی است که *N. kaouthia* به ترتیب با احتمال پسین و بوت استرپ بالایی از دو گونه کبرای خزری و کبرای چینی تفکیک پیدا کرده است. هم‌چنین نتایج حاصل از شبکه هاپلوتایپی بدون هیچ‌گونه هاپلوتایپ مشترکی، وجود فقط دو جهش در بین کبرای خزری و کبرای چینی را نشان داد و منطق پارسیمونی نتوانست با سطح اتصال بهینه ۹۵ درصد هاپلوگروپ‌های این دو گونه را از یکدیگر جدا کند.

بر اساس تحلیل نتایج تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) چنانچه مقادیر شاخص‌های تثبیت^۱ حاصل از این تجزیه بین صفر تا ۰/۰۵ باشد، بیانگر تفاوت ژنتیکی اندک بین جمعیت‌های مختلف است. هم‌چنین مقادیر بین ۰/۰۵ تا ۰/۲۵ نشان‌دهنده تفاوت متوسط و بیش از ۰/۲۵ نشانگر تفاوت ژنتیکی زیاد بین جمعیت‌ها است (Excoffier 2001). نتایج این آزمون در مطالعه حاضر نشان داد که ۶۷/۱۴ درصد از کل تغییرات ژنتیکی در بین جمعیت‌های مختلف کبرای خزری و کبرای چینی وجود دارد.

¹ Fixation indices

جدول ۴- تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) در بین جمعیت‌های کبرای خزری و کبرای چینی براساس ۵۸۹ جفت‌باز توالی ژن دی‌لوپ. (۱) همه‌ی جمعیت‌ها، (۲) تفکیک جمعیتی براساس درخت تبارشناسی.

منابع تغییر	df	مجموع مربعات	درصد واریانس	آماره‌ی F
(۱) بین جمعیت‌های مختلف	۵	۴۲/۷۹	۶۷/۱۴	$F_{ST}=0.67$
درون جمعیت‌ها	۳۶	۲۱/۳۲	۳۲/۸۶	
کل	۴۱	۶۴/۱۱		
(۲) بین گروه‌های مختلف	۱	۳۹/۹۶	۷۵/۴۸	$F_{CT}=0.75$
بین جمعیت‌های داخل یک گروه‌ها	۴	۲/۸۲	۰/۷۸	$F_{SC}=0.03$
بین افراد درون یک جمعیت	۳۶	۲۱/۳۲	۲۳/۷۴	$F_{ST}=0.76$
کل	۴۱	۶۴/۱۱		

منابع

- Avice JC (2000) Phylogeography: the history and formation of species. Harvard university press, p. 285.
- Clement M, Snell Q, Walker P, Posada D, Crandall K (2002) TCS: estimating gene genealogies, in: Ipdps. IEEE, p. 184
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nature Methods 9: 772.
- Darvish J, Rastegar-Pouyani E (2012) Biodiversity conservation of reptiles and mammals in the Khorasan Provinces, northeast of Iran. Progress in Biological Sciences. 2: 95-109.
- Excoffier L, 2001. Analysis of population subdivision. Handbook of Statistical Genetics. 713.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics 131: 479-491.
- Frankham R (2005) Genetics and extinction. Biological Conservation 126: 131-140.
- Fu Y-X, Li WH (1993) Statistical tests of neutrality of mutations. Genetics 133: 693-709.
- Huang S, He S, Peng Z, Zhao K, Zhao E (2007) Molecular phylogeography of endangered sharp-snouted pitviper. *Deinagkistrodon acutus*. 44: 942-952.
- Huang S, Huang J (2002) Artificial propagation of the five paced pit viper (*Deinagkistrodon acutus*) Dong wu xue bao. Acta Zoologica Sinica. 49: 854-857.
- Javanmard A, Mohammadabadi MR, Zarrigabayi GE, Gharahedaghi AA, Nassiry MR, Javadmansh A, Asadzadeh N. 2008. Polymorphism within the intron region of the bovine leptin gene in Iranian Sarabi cattle (Iranian *Bos taurus*) Russian Journal of Genetics 44: 495-497
- Kapli P, Botoni D, Ilgaz Ç, Kumlutaş Y, Avcı A, Rastegar-Pouyani N, Fathinia B, Lymberakis P, Ahmadzadeh F, Poulakakis N (2013) Molecular phylogeny and historical biogeography of the Anatolian lizard *Apathya* (Squamata, Lacertidae) Molecular Phylogenetics and Evolution. 66: 992-1001.
- Kuhner MK (2006) LAMARC 2.0: maximum likelihood and Bayesian estimation of population parameters. Bioinformatics 22: 768-770.
- Leigh JW, Bryant D (2015) popart: full-feature software for haplotype network construction. Methods in Ecology and Evolution. 6: 1110-1116.
- Li HL, ES, Fong AEJ, Lin S (2008). Ventral coloration differentiation and mitochondrial sequences of the Chinese Cobra (*Naja atra*) in Taiwan. 9: 1089-1097.
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics. 25: 1451-1452.
- Lin AL, Zhao Q, Ji X, Lin L, Zhao Q, Ji X (2008) Conservation Genetics of the Chinese Cobra (*Naja atra*) Investigated with Mitochondrial DNA Sequences Conservation Genetics of the Chinese Cobra (*Naja atra*) Investigated with Mitochondrial DNA Sequences 25: 888-893.
- Lin L, Hua L, Qu Y, Gao J, Ji X (2014) The Phylogeographical Pattern and Conservation of the Chinese Cobra (*Naja atra*) across Its Range Based on Mitochondrial Control Region Sequences. PLoS One. 9: e106944.
- Lin L, Qu Y, Li H, Zhou K, Ji X (2012) Genetic Structure and Demographic History Should Inform Conservation : Chinese Cobras Currently Treated as Homogenous Show Population Divergence. PLoS One. 7: e36334.
- Lin L-H, Hua L, Qu Y-F, Gao J-F, Ji X (2014) The Phylogeographical Pattern and Conservation of the Chinese Cobra (*Naja atra*) across Its Range Based on Mitochondrial Control Region Sequences. PLoS One 9: e106944.
- Meister B, Hofer U, Ursenbacher S, Baur B (2010) Spatial genetic analysis of the grass snake, *Natrix natrix* (Squamata: Colubridae), in an intensively used agricultural landscape. Biological Journal of the Linnean Society 101: 51-58.
- Milá B, McCormack JE, Castañeda G, Wayne RK, Smith TB (2007) Recent postglacial range expansion drives the rapid diversification of a songbird lineage in the genus Junco. Proc. R. Soc. London B Biological Sciences, 274: 2653-2660.
- Mills LS (2012). Conservation of wildlife populations: demography, genetics, and management. John Wiley and Sons.
- Mohammadi A, Nassiry MR, Mosafer J, Mohammadabadi MR, Sulimova GE. 2009. Distribution of BoLA-DRB3 allelic frequencies and identification of a new allele in the Iranian cattle breed Sistani (*Bos indicus*). Russian journal of genetics 45: 198-202.
- Mousavizadeh A, Mohammad Abadi MR, Torabi A, Nassiry MR, Ghiasi, Esmailzadeh AK 2009. Genetic polymorphism at the growth hormone locus in Iranian Talli goats by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). Iranian Journal of Biotechnology 7: 51-53
- Mullin SJ, Seigel RA (2009) Snakes: ecology and conservation. Cornell University Press.
- Pook CE, Joger U, Stümpel N, Wüster W (2009) When continents collide: phylogeny, historical biogeography and systematics of the medically important viper genus *Echis* (Squamata: Serpentes: Viperidae) Molecular Phylogenetics and Evolution 53: 792-807.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics 19: 1572-1574.
- Stamatakis A, Ludwig T, Meier H (2005) RAxML-III: a fast program for maximum likelihood-based inference of large phylogenetic trees. Bioinformatics 21: 456-463.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution. 28: 2731-2739.
- Wallach V, Wuester W, Broadley DG (2009) In praise of subgenera: taxonomic status of cobras of the genus *Naja Laurenti* (Serpentes: Elapidae) Zootaxa 2236: 26-36.

Wang L, Ikeda H, Liu T, Wang Y, Liu J (2009) Repeated range expansion and glacial endurance of *Potentilla glabra* (Rosaceae) in the Qinghai-Tibetan Plateau. *J. Integr. Plant Biology*. 51: 698-706.

Wuester W (1990) Population evolution of the Asiatic cobra (*Naja naja*) species complex. Univ. Aberdeen 500.

Wüster W, Crookes S, Ineich I, Mané Y, Pook CE, Trape JF, Broadley DG (2007) The phylogeny of cobras inferred from mitochondrial DNA sequences: Evolution of venom spitting and the phylogeography of the African spitting cobras (Serpentes: Elapidae: *Naja nigricollis* complex) *Molecular Biology and Evolution*. 45: 437-453.

Wuster W, Thorpe RS (1988) Population affinities of the asiatic cobra (*Naja naja*) species complex in south-east Asia : reliability and random resampling. *Biology Journal of the Linnean Society* 36: 391-409

Xia X, Lemey P (2009) The phylogenetic handbook: a practical approach to DNA and protein phylogeny.

Young, AG (2000) Genetics, demography and viability of fragmented populations. Cambridge University Press.