ژنتیک نوین
دوره دوازدهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۶
صفحه ۲۶۳ - ۲۵۳

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

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 نظری‌زاده 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 M[1], Nazarizadeh Dehkordi M[1], Kaboli M[*1], Rastegar Pouyani E[2]

1- Graduate MSc Student, Associate Professors, Departnment 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*)، به‌عنوان شرقی‌ترین گونه از زیر جنس *Naja* دارای ابهامات زیادی است. هدف از این مطالعه بررسی روابط تکاملی، تنوع، تغییرات و ساختار ژنتیکی کبرای خزری در جمعیت‌های شمال و شمال شرقی ایران بوده است. بدین منظور تعداد ۱۹ نمونه از این گونه در زیستگاه‌های طبیعی آن‌ها 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 فلس‌ها در آزمایشگاه به روش آمونیوم استات DNA کافی استخراج و سپس برای تکثیر ژن دی‌لوپ به‌طول ۵۸۹ جفت‌باز از دو آغازگر پیشرو و پسرو استفاده شد. تحلیل تبارشناسی با استفاده از بهترین مدل تکاملی و رسم درخت بیزین و حداکثر درست‌نمایی انجام گرفت. ارتباط بین هاپلوتایپ با استفاده از منطق حداکثر پارسیمونی با سطح بهینه ۹۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تعداد هفت هاپلوتیپ منحصر به فرد و یک هاپلوتایپ مشترک در بین جمعیت‌های شمال (استان گلستان) و شمال شرق (استان خراسان رضوی و خراسان شمالی) را تایید نمود. نتایج تحلیل تبارشناسی حاکی از جدایی جمعیت‌های کبرای خزری به‌صورت دو شاخه‌ای و با احتمال پسین (۰/۶۱) و بوت استرپ (۵۴/۳۱) نه چندان مستحکمی از کبرای چینی است. در نهایت تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) به‌ترتیب تغییرات ژنتیکی بسیار اندک و غیرمعنی‌داری را در بین جمعیت‌های کبرای خزری در شمال و شمال شرقی کشور و تغییرات ژنتیکی بسیار زیاد و معنی‌داری ($P < 0/01$) 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 جمعیت‌های مختلف آن در شرق و شمال شرقی ایران مدت زمان زیادی نمی‌گذرد. این نتایج نشان می‌دهد که برای حفاظت از کبرای خزری در بین جمعیت‌های شمال و شمال شرقی ایران می‌توان از طرح حفاظتی یکپارچه‌ای استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی

تنوع ژنتیکی
روابط خویشاوندی
ژن دی‌لوپ
کبرای خزری (*Naja oxiana*)

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.10.2]

مقدمه

مارهای کبرا جنس *Naja* (LAURETI 1768) در خانواده الاپیده شامل ۲۸ گونه در سطح جهان هستند که در سال‌های اخیر به چهار زیرجنس مجزا شامل *Uraeus*، *Boulengrina*، *Afronaja* 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 کبرای 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). متاسفانه 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 کبرای 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 تهیه‌ی 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 تاثیر فرسایش درون آمیزی و فرسایش آللی قرار می‌گیرند و بدین‌ترتیب برازش افراد و در نتیجه بقای جمعیت به شدت کاهش می‌یابد (Young 2000; Meister et al. 2010). بدین‌ترتیب 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. 2009; Javanmard et al. 2008). 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 کبرای 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 کبرای آسیایی انجام نشده‌است. لذا، هدف از انجام این مطالعه بررسی روابط تکاملی، تاریخی جمعیتی[1]،

[1] Demographic history

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

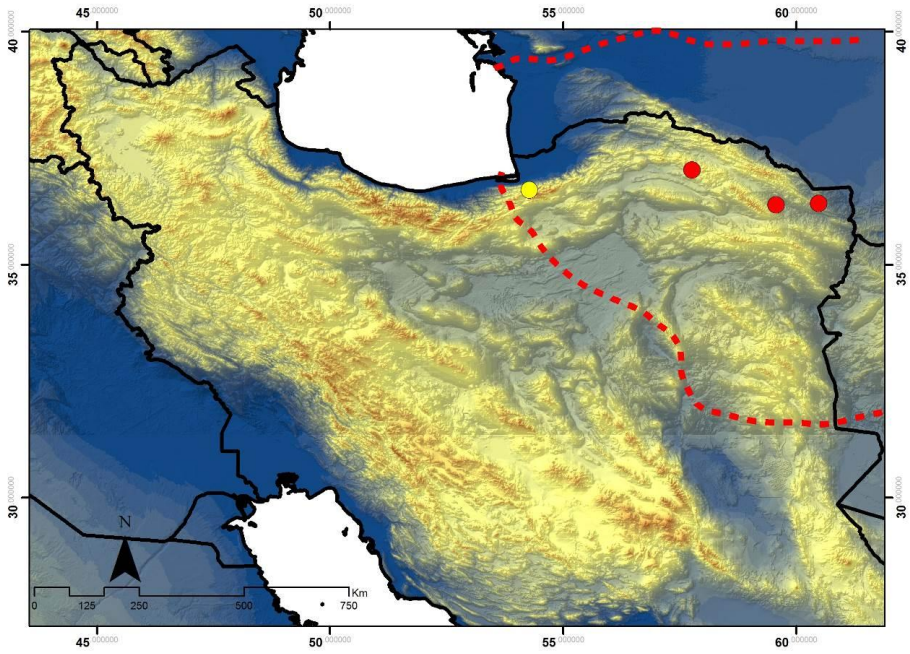
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.10.2]

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

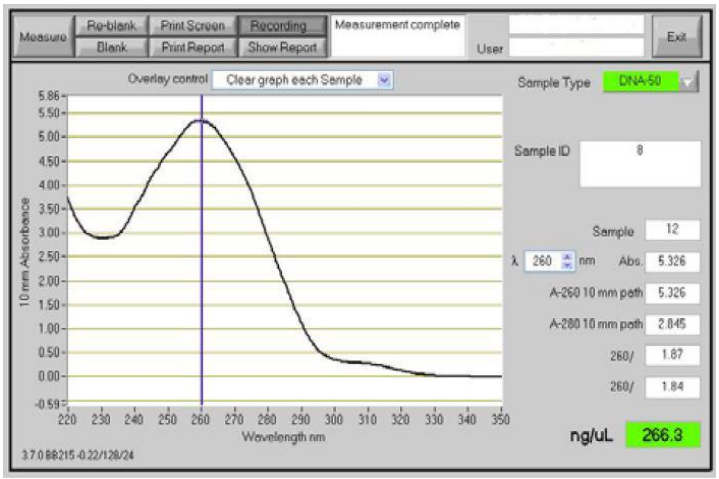
نمونه‌برداری از تعداد ۱۹ فرد با مجوز شماره ۲۱٤٥۲/۹۲ از سازمان حفاظت محیط زیست ایران در زیستگاه‌هایی از شمال و شمال‌شرقی کشور در استان‌های گلستان، خراسان رضوی، خراسان شمالی و خراسان شمالی انجام شد. نمونه‌برداری با برداشت پنج تا ۱۰ فلس از فلس‌های زیر شکمی کبرای خزری توسط قیچی استریل شده، بدون آسیب به پوست شکمی انجام شد و نمونه‌ها در الکل ۹٦ 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 شد. سپس برای تکثیر ژن دی‌لوپ از آغازگر پیشرو PL1: 5′-CCACAAAGCATTGTTCTTGTAAACC-3′ و آغازگر پسرو PH1: 5′-GAAGCTTGCATGTATAAGTAGGG-3′ 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 واحدآنزیم 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 ۹٤ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۵ چرخه، شامل ۳۰ ثانیه در ۹٤ درجه و ٤۰ 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).

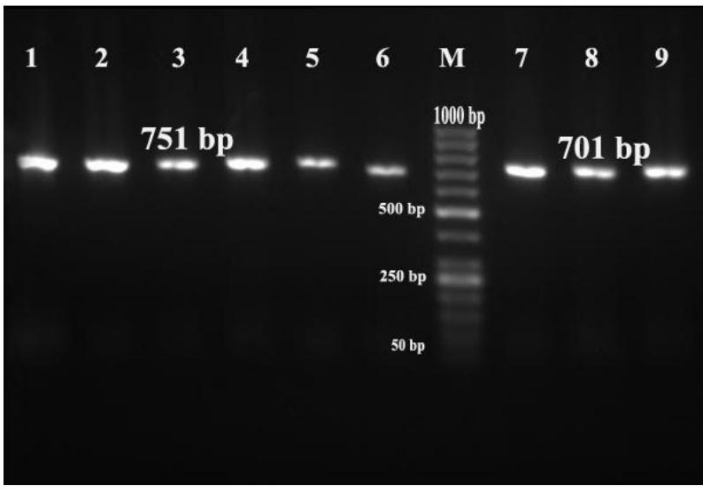


شکل ۱- مناطق جمع‌آوری نمونه در شمال شرق (دایره‌های سبز رنگ) و شمال (دایره‌های قرمز رنگ) مساحت خطوط خط چین قرمز رنگ پراکنش کبرای خزری در ایران را نشان می‌دهد (Wuster 1990).

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.10.2]



شکل ۲- غلظت DNA استخراجی از بافت نمونه‌های کبرای خزری



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

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 3730/ Bioneer و به روش اتوماتیک سانگر توالی‌یابی شدند.

کروماتوگرام توالی هر نمونه با نرم‌افزار SeqScape نسخه‌ی ۲/٦ 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 نسخه‌ی ۷/۲/۵ و الگوریتم Clustalw هم ردیف شدند (Thompson et al. 1994). قبل از آغاز تجزیه‌های تبارشناسی، فرضیه‌ی اشباع جایگزینی[1] 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 نسخه‌ی ۳/۵ برای تعیین شاخص تنوع ژنتیکی (تنوع هاپلوتایپی و نوکلئوتیدی) در جمعیت‌ها و آزمون‌های

[1] Substitution Saturation

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.10.2]

خنثی‌سازی[1] مورد استفاده گرفت. تحلیل واریانس مولکولی (AMOVA) با استفاده از این نرم‌افزار صورت گرفت (Excoffier et al. 1992). در روش اول همه جمعیت‌های کبرای چینی و کبرای خزری در یک گروه قرار گرفتند و در روش دوم جمعیت‌های کبرای چینی و کبرای خزری به‌صورت دو گروه مستقل در نظر گرفته شدند. سپس آماره‌های FCT[2] (تغییرات ژنتیکی در میان گروه‌ها)، FST[3] (تغییرات ژنتیکی در میان جمعیت‌ها) و FSC (تغییرات ژنتیکی در میان جمعیت‌های یک گروه) تعیین شدند. برای تعیین رشد نمایی جمعیت و نرخ θ از فرمول[4] $\theta = N_f . \mu$ با استفاده از منطق بیزین و نرم‌افزار 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. هم‌چنین 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 جانشینی نوکلئوتیدی از نرم‌افزار JModelTest نسخه ۲/۱/۵ استفاده شد (Darriba et al. 2012). سپس با استفاده از مدل تکاملی انتخاب شده از نرم‌افزار RAxML نسخه ۷/۲ برای ترسیم درخت حداکثر درست‌نمایی[5] (Stamatakis et al. 2005) و از نرم‌افزار MrBayes نسخه ۳/۲/۲ برای ترسیم درخت بیزین استفاده شد (Ronquist and Huelsenbeck 2003). تحلیل‌های بیزین بر اساس چرخه زنجیره مارکوو[6] با ۱۰ میلیون تکرار و فراوانی نمونه [7] ۱۰۰ انجام شد و هم‌چنین برای بالا بردن دقت، مقدار ۲۵ درصد درخت‌های اولیه نادیده[8] گرفته شد. در نهایت ایستایی و انحراف معیار درخت بیزین رسم شده در نرم‌افزار Tracer نسخه ۱/٤ مورد بررسی قرار گرفت (Rambaut and Drummond 2007). درخت‌های بیزین و حداکثر درست‌نمایی به‌وسیله سه گونه *N. sumatrana*، *N. siamensis* و *N. kaoutha* (نام اختصاری ثبت شده در بانک ژن به‌ترتیب JN123456, JN614165, JN123457) ریشه‌دار شد. درخت‌های ترسیم شده به وسیله قانون اکثریت[9] یکپارچه[10] شدند. برای بررسی ارتباط بین هاپلوتایپ‌ها و ترسیم شبکه هاپلوتایپی از منطق پارسیمونی و نرم‌افزار PopArt نسخه ۱/۷ استفاده شد (Leigh and Bryant 2015). در نهایت برای بررسی جدایی هاپلوگروپ‌های کبرای چینی و کبرای خزری از منطق پارسیمونی و نرم‌افزار TCS نسخه ۲/۱ استفاده شد (Clement et al. 2000).

نتایج

تمامی DNAهای 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 می‌دهد. براین اساس نمونه‌های PCR شده باندهایی با کیفیت مناسب نسبت به نشانگر سایز DNA[11] نشان دادند.

تحلیل داده‌ها با استفاده از ۵۸۹ جفت باز و ٤۲ توالی دی‌لوپ (۱۹ توالی *N. oxiana* و ۲۳ توالی *N. atra*) نشان داد که ۵۷۲ جایگاه حفاظت شده و ۱۷ جایگاه چندشکلی[12] بوده که شامل ۸ جایگاه حاوی اطلاعات پارسیمونی[13] و ۹ جایگاه تک متغیر[14] بوده است. مقدار Iss[15] (۰/۰۰٦) نسبت به Iss.c[16] (۰/۷۱۱) در تجزیه اشباع جایگزینی کوچک‌تر و معنی‌دار به دست آمد. هم‌چنین نمودار نرخ جانشینی نوع اول و دوم در مقابل واگرایی

[1] Neutrality tests
[2] covariance among groups (c), compare to the total population (T)
[3] relative to the subpopulation (S)
[4] Nf 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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.10.2]

ژنتیکی حاکی از اشباع جایگزینی بسیار اندک در توالی‌های مورد بررسی بود (شکل ٤). فراوانی هر کدام از نوکلئوتیدها مطابق شکل ٥ برآورد شد. تیمین (٣١/٧ درصد) و گوانین (١٤/٦ درصد) به‌ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین فراوانی نوکلئوتیدها را تشکیل دادند (شکل ٥). جدول ١ مقایسه ویژگی‌های ژنتیکی جمعیت‌های کبرای خزری در شمال و شمال شرقی با چهار جمعیت از کبرای چینی را نشان می‌دهد. در بین ٥ توالی از جمعیت‌های شمالی کبرای خزری تعداد ٤ هاپلوتایپ به دست آمد در حالی‌که از ١٤ توالی جمعیت‌های شمال‌شرق کشور ٦ هاپلوتایپ مشاهده شد. براین اساس، به‌ترتیب کم‌ترین و بیش‌ترین تنوع هاپلوتایپی در جمعیت‌های کبرای خزری ٠/٥١ تا ٠/٩٠ برآورد شد. هم‌چنین دو هاپلوتایپ مشترک در بین این دو جمعیت مشاهده شد. کم‌ترین و بیش‌ترین تنوع نوکلئوتیدی در کبرای خزری به‌ترتیب در جمعیت‌های شمال شرقی (٠/٠٠١٤) و شمال (٠/٠٠٥٨) محاسبه شد. مقدار آماره‌ی Fu's Fs برای جمعیت‌های شمال شرقی کشور منفی و معنی‌دار ولی برای جمعیت شمال کشور منفی و غیر معنی‌دار بود.

در این مطالعه تعداد ٨ هاپلوتایپ از ١٩ توالی مورد بررسی کبرای خزری حاصل شد که یک هاپلوتایپ مشترک در بین جمعیت‌های شمال و شمال شرقی کشور و ٧ هاپلوتایپ منحصر به فرد در بین دو جمعیت مورد بررسی تخمین زده شد (جدول ٢).

به‌دلیل 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 به‌ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین این نرخ در کبرای خزری و کبرای چینی محاسبه شد (جدول ٣).

جدول ١- خصوصیات ژنتیکی کبرای خزری و کبرای چینی در توالی ژن دی لوپ. (تنوع نوکلئوتیدیPi، تنوع هاپلوتایپی Hd، h تعداد هاپلوتایپ) و آزمون‌های تحلیل گسترش جمعیت‌های گونه (Fu′ Fs).

نمونه برداری	گونه	n	h	hd	Pi	Fu's Fs	منبع
شمال ایران (گلستان)	*N. oxiana*	٥	٤	٠/٩٠	٠/٠٠٥٨	-٠/١٢$^{n.s}$	مطالعه حاضر
شمال شرقی (خراسان رضوی و شمالی)		١٤	٥	٠/٥١	٠/٠٠١٤	-٢/٠٩*	
شرق تایوان	*N. atra*	٢٢	٥	٠/٦٥	٠/٠٠٠٧	-١/١٦$^{n.s}$	Lin et al. 2014
شمال تایوان		٢٦	٦	٠/٥٥	٠/٠٠٠٦	-٢/٨٦*	
غرب تایوان		٣٠	٨	٠/٨٠	٠/٠٠١٤	-٢/١٧$^{n.s}$	
جنوب تایوان		٢٧	١٢	٠/٩٢	٠/٠٠٢٢	-٥/٦٣**	

ns، * و** به‌ترتیب غیر معنی‌دار، معنی‌دار در سطح پنج درصد و معنی‌دار در سطح یک درصد است.

جدول ٢- 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 ١	TGTCGAGAAA	١	-	٠/٠٥٢٦
هاپلوتایپ ٢	.A..AG.G.G	١	-	٠/٠٥٢٦
هاپلوتایپ ٣	..AA...GGG	١	-	٠/٠٥٢٦
هاپلوتایپ ٤	.......GGG	٢	١٠	٠/٦٣٢
هاپلوتایپ ٥	.A....GGG	-	١	٠/٠٥٢٦
هاپلوتایپ ٦	.......G.G	-	١	٠/٠٥٢٦
هاپلوتایپ ٧	.......A.GG	-	١	٠/٠٥٢٦
هاپلوتایپ ٨	C......G.G	-	١	٠/٠٥٢٦

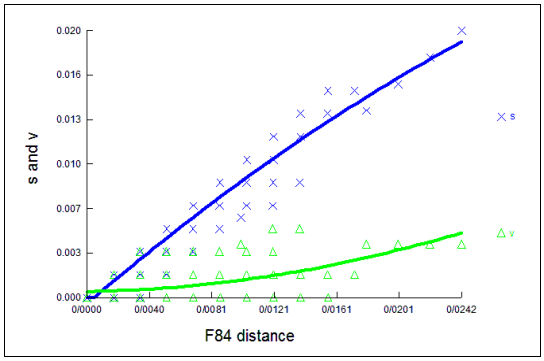
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.10.2]

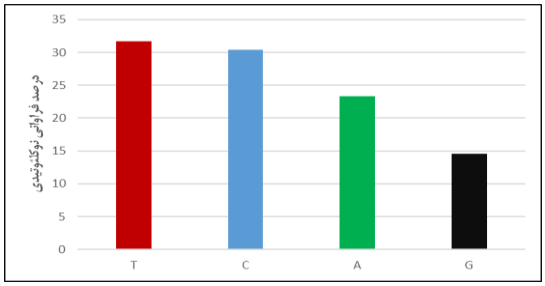
جدول ۳- تحلیل مقایسه‌ای تاریخی جمعیتی کبرای چینی و کبرای خزری براساس ۵۸۹ جفت‌باز دی‌لوپ و با استفاده از تخمین حداکثر احتمال پسین[1] (MPE).

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

آزمون معیارهای اطلاعات بیزین (BIC)[2] و اطلاعات آکایکه (AIC)[3] نشان داد که مدل HKY+ G (G= ۰/۲۲۷) به‌عنوان 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 به‌دست آمد. هم‌چنین از مدل تکاملی GTR+G برای ترسیم درخت حداکثر درست‌نمایی استفاده شد. شکل ٦ درخت تبارشناسی پنج گونه کبرای آسیایی را براساس ۵۸۹ جفت‌باز دی‌لوپ نشان می‌دهد (درخت‌های تبارشناسی حداکثر درست-نمایی و بیزین توپولوژی یکسانی را نشان دادند). نتایج نشان داد که واحدهای عملکرد تاکسونومیک[4] (OTU) با احتمال پسین[5] بالاتری نسبت به بوت استرپ[6] حاصل از درخت حداکثر درست-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*) به‌ترتیب با احتمال پسین و بوت استرپ ۰/٦۱ و ٥٤/۳۱ درصد از هاپلوتایپ‌های کبرای چینی (*N. atra*) به حالت دو شاخه‌ای[7] 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 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 به‌دست 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 ٤ 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، ٦۷/۱٤ درصد از کل تغییرات ژنتیکی در بین جمعیت‌ها و ۳۲/۸٦ 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، ۷۵/٤۸ درصد از واریانس کل تغییرات ژنتیکی به واریانس بین گروه‌های مختلف اختصاص خواهد یافت.



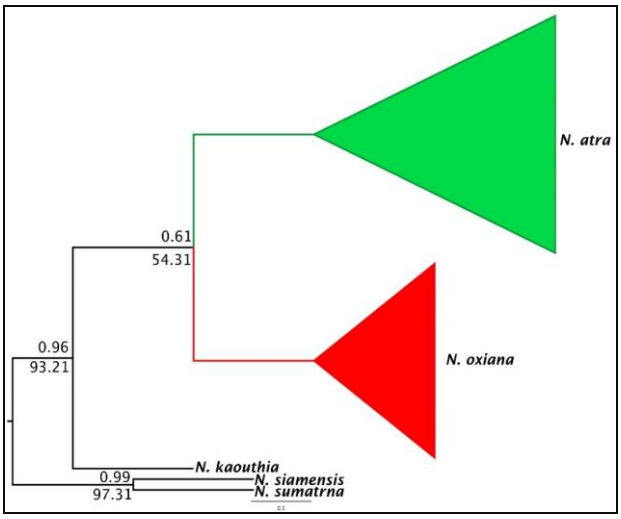
شکل ٤- تجزیه اشباع جایگزینی. خط آبی رنگ جانشینی نوع اول (S) و خط سبز رنگ جانشینی نوع دوم (V) را نشان می‌دهد و محور افقی نشان دهنده فاصله ژنتیکی می‌باشد.



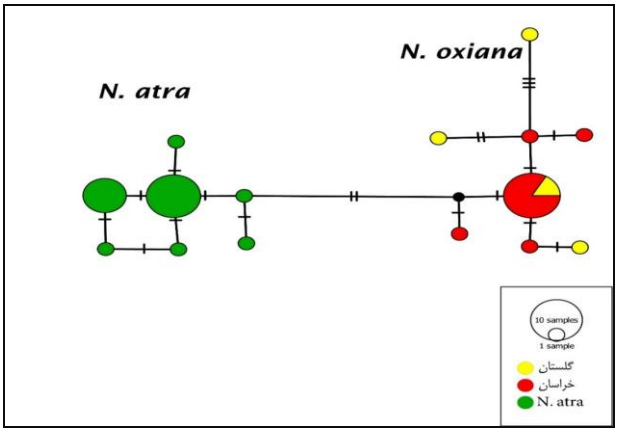
شکل ۵- فراوانی نوکلئوتیدهای ژن دی‌لوپ در کبرای خزری.

[1] Most Probable Estimates (MPE)
[2] Bayesian information criterion
[3] Akaike information criterion
[4] Operation Taxanomic Unit
[5] Posterior probability (PP)
[6] Bootstrap (Bp)
[7] Bifurcate

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.10.2]



شکل ٦- درخت تبارشناسی پنج گونه کبرای آسیای با استفاده از دو روش بیزین و حداکثر درست‌نمایی (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 درست‌نمایی



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

بحث

این مطالعه با توالی‌یابی ۵۸۹ جفت‌باز ژن دی‌لوپ میتوکندریایی و بر اساس ۱۷ جایگاه تغییر پذیر نشان داد که جمعیت‌های کبرای خزری در شمال کشور تنوع ژنتیکی بالاتری (تنوع هاپلوتایپی و نوکلئوتیدی) نسبت به جمعیت‌های شمال شرقی کشور دارد. هم‌چنین میزان تنوع هاپلوتایپی کبرای خزری در مقایسه با کبرای چینی در محدوده تقریباً مشابه و یکسانی از یکدیگر قرار دارند، در حالی‌که دامنه تنوع نوکلئوتیدی در جمعیت‌های مورد بررسی کبرای خزری به مراتب بیش‌تر از کبرای چینی است (جدول ۱).

وجود تنوع هاپلوتایپی بالا به‌همراه تنوع نوکلئوتیدی پایین می‌تواند دلیلی بر گسترش سریع جمعیت‌ها باشد (Avise 2000). هم‌چنین، استفاده از شاخص‌های آزمون خنثی‌سازی یک روش مطمئن برای تصمیم‌گیری در مورد بروز یا عدم بروز گسترش ناگهانی جمعیت‌ها معرفی شده‌است (Milá et al. 2007; Wang et al. 2009). به این ترتیب که اگر مقادیر شاخص‌های Fu's Fs منفی و معنی‌دار شوند، می‌تواند به وقوع یک گسترش ناگهانی در جمعیت تعبیر شود (Fu and Li 1993). نتایج این مطالعه نشان داد که شاخص Fu's Fs برای جمعیت‌های شمال شرقی کبرای خزری منفی و معنی‌دار است ($P < ۰/۰۵$). لذا با توجه به دلایل مذکور می‌توان وقوع یک گسترش ناگهانی را در جمعیت شمال شرقی کشور محتمل دانست.

نرخ θ برای جمعیت‌های کبرای خزری با حدود اطمینان ۹۵ درصد (۰/۰۱٦) به مراتب بیش‌تر از جمعیت‌های کبرای چینی (۰/۰۰۳۱) محاسبه شد (جدول ۳). لذا با بهره‌گیری از حاصل‌ضرب نرخ جهش (μ) ۰/٦۵ سایت به ازای هر میلیون سال (سایت/میلیون سال) (Huang et al. 2007) ژن دی‌لوپ و طول نسل چهار سال به ازای هر نسل (سال/ نسل) (Huang and Huang 2002; Lin et al. 2014) برای کبرای خزری، می‌توان مقدار μ را، $۲/٦\times۱۰^{-۷}$ جانشینی به ازای هر سایت به ازای هر نسل (جانشینی/سایت/نسل) به‌دست آورد. حال با استفاده از معادله‌ی $\theta=N_f.\mu$ اندازه موثر جمعیت ماده کبرای خزری بر اساس ۵۸۹ جفت‌باز ژن دی لوپ مورد استفاده در این محاسبات، ٦۱۵ فرد ماده به ازای هر نسل تعیین می‌شود. هم‌چنین با استفاده از محاسبات بالا می‌توان اندازه موثر جمعیت ماده برای کبرای چینی را ۱۱۹ فرد ماده به ازای هر نسل تخمین زد. در پژوهش حاضر رشد نمایی جمعیت‌های کبرای خزری و کبرای چینی به‌ترتیب ۹۰۸/۵۳ و ۸۷۵/۳۳ تعیین شد. این اعداد حاکی از آن است که هر دو جمعیت دارای نرخ رشد نمایی مثبت بوده‌اند (Kuhner 2006).

در مطالعه‌ی Wallach et al. (2009) در بررسی روابط تبارشناسی شش‌گونه کبرای آسیایی نشان داده شد که گونه‌های *N. siamensis*، *N. sputatrix* و *N. mandalayensis* به‌عنوان یک گروه با احتمال پسین بالایی (۰/۹۵) از *N. atra* و *N. Kaouthia*

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.10.2]

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 (۰/٦۱) و بوت استرپ (٥٤/۳۱) نه چندان مستحکمی از *N. atra* تفکیک شده‌است. این در حالی است که *N. kaouthia* به‌ترتیب 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[1] 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 ٦۷/۱٤ درصد از کل تغییرات ژنتیکی در بین جمعیت‌های مختلف کبرای خزری و کبرای چینی وجود دارد.

بدین ترتیب آماره‌ی F_{ST} و F_{CT} یک تفاوت معنی‌دار ($P<۰/۰۱$) 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 به‌علت وجود یکپارچگی ژنتیکی می‌توان از طرح حفاظتی مشترکی در بین جمعیت‌های شمال و شمال‌شرقی 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 به‌عنوان 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 آشکاری‌سازی 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.

[1] Fixation indices

جدول ٤- تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) در بین جمعیت‌های کبرای خزری و کبرای چینی براساس ۵۸۹ جفت‌باز توالی ژن دی لوپ. ۱) همه‌ی جمعیت‌ها، ۲) تفکیک جمعیتی براساس درخت تبارشناسی.

منابع تغییر	df	مجموع مربعات	درصد واریانس	آماره‌ی F
۱) بین جمعیت‌های مختلف	٥	٤۲/۷۹	٦۷/۱٤	F_{ST}= ۰/٦۷
درون جمعیت‌ها	۳٦	۲۱/۳۲	۳۲/۸٦	
کل	٤۱	٦٤/۱۱		
۲) بین گروه‌های مختلف	۱	۳۹/۹٦	۷٥/٤۸	F_{CT}=۰/۷٥
بین جمعیت‌های داخل یک گروه‌ها	٤	۲/۸۲	۰/۷۸	F_{SC}=۰/۰۳
بین افراد درون یک جمعیت	۳٦	۲۱/۳۲	۲۳/۷٤	F_{ST}=۰/۷٦
کل	٤۱	٦٤/۱۱		

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.10.2]

منابع

Avise 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 HLÆS, Fong ÆJ, 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, Esmailizadeh 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 Evolution53: 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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.10.2]

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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.10.2]