



## بررسی تنوع ژنتیکی در میان جمعیت‌های مختلف افعی زنجانی (*Montivipera albicornuta*) در

### حوزه پراکنش آن با استفاده از توالی‌یابی ژن DNA میتوکندری

زینب فخارمنش<sup>۱\*</sup>، اسکندر رستگار پویانی<sup>۲</sup>، حاجی قلی کمی<sup>۳</sup>

۱- گروه محیط زیست، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران

۳- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران

مسئول مکاتبات: z\_fakharmanesh@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۳/۸/۳۰

تاریخ دریافت: ۹۳/۸/۱

#### چکیده

افعی زنجانی (*Montivipera albicornuta*) اولین بار در سال ۱۹۸۵ توسط نیلسون و آندرن توصیف و شناسایی گردید و از گونه‌های اندمیک ایران می‌باشد. انتشار جغرافیائی آن محدود به ایران در ارتفاع ۲۵۰۰ متری از سطح دریا و پراکندگی آن در استان‌های گیلان، زنجان، آذربایجان شرقی و قزوین می‌باشد. به منظور بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف ژنتیکی در بین جمعیت‌های مختلف این گونه، ۳۵ نمونه از بافت انتهای دم افعی زنجانی در ۳ استان گیلان، زنجان و آذربایجان شرقی جمع‌آوری گردید. پس از استخراج DNA، ژن CO1 ژنوم میتوکندریایی توسط PCR تکثیر و پس از توالی‌یابی، توالی‌ها با نرم‌افزار Mega5 و PAUP آنالیز شدند و روابط خویشاوندی میان جمعیت‌های گونه در درخت‌های فیلوژنتیک پیوند همجواری (Neighbor-joining)، محتمل‌ترین درخت (Maximum Likelihood) و میانبرترین درخت (Maximum parsimony) ترسیم گردید. یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد که جمعیت‌های مختلف این گونه در ایران از نظر ژن CO1 کاملاً همگن و یک‌نواخت هستند و تقریباً هیچ تفاوت ژنتیکی با هم نشان نمی‌دهند طوری که میانگین تفاوت در بین گروه‌ها ناچیز و ۰/۰۰۵ محاسبه گردید. این نتایج به احتمال زیاد حاکی از آن است که جمعیت‌های مختلف آن در ایران به تازگی از هم جدا شده‌اند و زمان کافی برای واگرایی ژنتیکی نداشته‌اند.

کلمات کلیدی: تنوع ژنتیکی، افعی زنجانی، ژن CO1

#### مقدمه

معرض خطر به خوبی شناخته شده است. به دلیل آنکه تجزیه و تحلیل‌های ژنتیک مولکولی باعث ارتقای آگاهی ما نسبت به وضعیت آرایه شناختی، تاریخ تکاملی گذشته و وضعیت سلامت فعلی آرایه‌های در معرض تهدید می‌گردد، همواره در اکثر طرح‌های حفاظتی، مدیریتی و نیز برنامه‌ریزی جهت استفاده و بهره‌برداری پایدار مورد توجه بوده‌اند. گونه افعی زنجانی با نام علمی (*Montivipera albicornuta*) (Goran علمی Nilson, Clases Andren 1985) متعلق به خانواده افعی‌ها (Viperidae) می‌باشد. افعی زنجانی از گونه‌های اندمیک ایران می‌باشد (شکل ۱) انتشار جغرافیائی آن

تنوع ژنتیکی، قابلیت بقای یک گونه و یا جمعیت را از طریق ایجاد توانایی سازگاری با تغییرات محیطی فراهم می‌کند. بنابراین تنوع ژنتیکی برای بقای طولانی مدت یک گونه ضروری است [۲]. بسیاری از عوامل تکاملی بر میزان و پراکنش تنوع ژنتیکی در میان جمعیت‌ها و در نتیجه اختلاف جمعیت‌ها تاثیرگذارند [۴]. به دلیل در دسترس نبودن اطلاعات قابل اتکایی در زمینه زیست‌شناسی بسیاری از گونه‌ها در طبیعت و چرخه زندگی آن‌ها و نیز شرایط کنونی آن‌ها از نظر جمعیتی و پراکنشی، حفاظت از گونه‌ها دشوار خواهد بود. امروزه نقش رویکردهای ژنتیک مولکولی در حفاظت از آرایه‌های در



بین جمعیت‌های این گونه را نشان داد (۵). بررسی‌ها نشان می‌دهد تاکنون مطالعه ژنتیکی در خصوص این گونه در ایران انجام نگرفته است. این پژوهش به منظور تعیین میزان تنوع ژنتیکی میان جمعیت‌های مختلف این گونه و تخمین زمان منشا و نحوه پراکندگی آن در ایران و کمک به مدیریت و حفاظت از گونه انجام پذیرفته است.

#### مواد و روش کار

به منظور مطالعه ژنتیکی تعداد ۲۰ نمونه از بافت انتهای دم افعی زنجانی از زنجان (شهرستان طارم) (نقشه ۲) و گیلان و ۱۵ نمونه از آذربایجان شرقی منطقه بستان آباد در بهار ۱۳۹۱ جمع‌آوری گردید. در این پژوهش گونه‌ی افعی گرز (Macrovipera lebetina) به عنوان نمونه خارجی مورد استفاده قرار گرفت. پس از نمونه‌برداری، نمونه‌های بافت در الکل ۹۶ درصد نگهداری شد. از تمام نمونه‌ها با استفاده از سیستم استخراج نمکی DNA استخراج گردید. سپس برای تکثیر ژن مورد هدف در مطالعه (Co1) از پرایمرای Rep Co1 F+R استفاده شد (جدول ۱). برای تکثیر ژن هدف در مطالعه از دستگاه PCR و محلول Master mix که به روش زیر در آزمایشگاه درست گردیده بود استفاده گردید (جدول ۲). حجم کل محلول Master Mix مورد استفاده برای یک نمونه ۲۰/۲۵ میکرولیتر بوده که آن را داخل میکروتیوپ ریخته و مقدار دو میکرولیتر ژنوم DNA استخراج شده را به آن اضافه کردیم و حجم آن با آب مقطر به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. سپس برای آنکه با یکدیگر بخوبی مخلوط شوند برای مدت بسیار کوتاهی در دستگاه سانتریفوژ قرار داده شد. سپس میکروتیوپ را به داخل دستگاه PCR منتقل و دستگاه با برنامه چرخه زمانی مطابق جدول ۳ تنظیم گردید. این چرخه یک ساعت و ۵۵ دقیقه بطول انجامید. برای بررسی محصولات PCR از الکتروفورز ژل استاندارد آگارز ۱٪ استفاده گردید. سپس نمونه‌های با کیفیت مناسب جدا و برای تعیین توالی به کره جنوبی ارسال گردید. توالی‌های به دست آمده، توسط

محدود به ایران در ارتفاع ۲۵۰۰ متری از سطح دریا و پراکندگی در استان‌های گیلان، زنجان، آذربایجان شرقی و قزوین بوده (شکل ۱) و عموماً وابسته به زیستگاه‌های صخره‌ای شامل دیواره‌های سنگی، صخره‌ها و سنگلاخ‌ها می‌باشد [۱]. این گونه همانند سایر مارهای سمی ایران در طی سال‌های اخیر به شدت متأثر از برداشت از طبیعت به خاطر استفاده از سم آن جهت تولید پادزهر و نیز برخی سودجویان و همچنین تخریب زیستگاه به اشکال مختلف بوده است به طوری که بیش از ۳۰٪ جمعیت آن در ۱۰ سال اخیر کاهش یافته است [۷]. همچنین افعی زنجانی با وضعیت جهانی آسیب‌پذیر (Vulnerable) در فهرست سرخ اتحادیه جهانی حفاظت از طبیعت و منابع طبیعی (IUCN) به عنوان گونه در معرض تهدید به شمار می‌رود [۷] با توجه به غنای زیستگاه‌های کشور از لحاظ تنوع جانوری و در معرض خطر قرار گرفتن تعدادی از گونه‌های موجود، بررسی‌های جمعیتی و حفظ این ذخایر ژنتیکی از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. استامپل و همکاران (۲۰۰۹) در مطالعه‌ای روی افعی‌ها در خاورمیانه و خاور نزدیک با استفاده از توالی‌یابی ژن‌های CO1، Cytb و ND5 روابط فیلوژنتیکی و تاکسونومی را بررسی نمودند (۶). بر این اساس جنس‌های افعی به شرح ذیل تقسیم شده‌اند. *Dobia* شامل: *Vipera palaestinae* و *D. russelli* شامل *Macrovipera lebetina*، *M. schweizeri* و یک گونه ناشناخته *Montivipera* شامل *Vipera xanathina* و *V. raddei complexes* و بر اساس بررسی‌های صورت گرفته تنوع ژنتیکی کم در *M. raddei complexes* و تنوع ژنتیکی بالایی در *M. xanathina complexes* را نتیجه گرفتند. Ferchaud و همکاران (۲۰۱۱) مطالعه‌ای بر روی جمعیت‌های گونه *Vipera ursinii ursinii* در فرانسه با استفاده از توالی‌های ژنوم میتوکندریایی و ۶ جایگاه ریزماهوره انجام که نتایج این مطالعه تمایز ژنتیکی بالایی

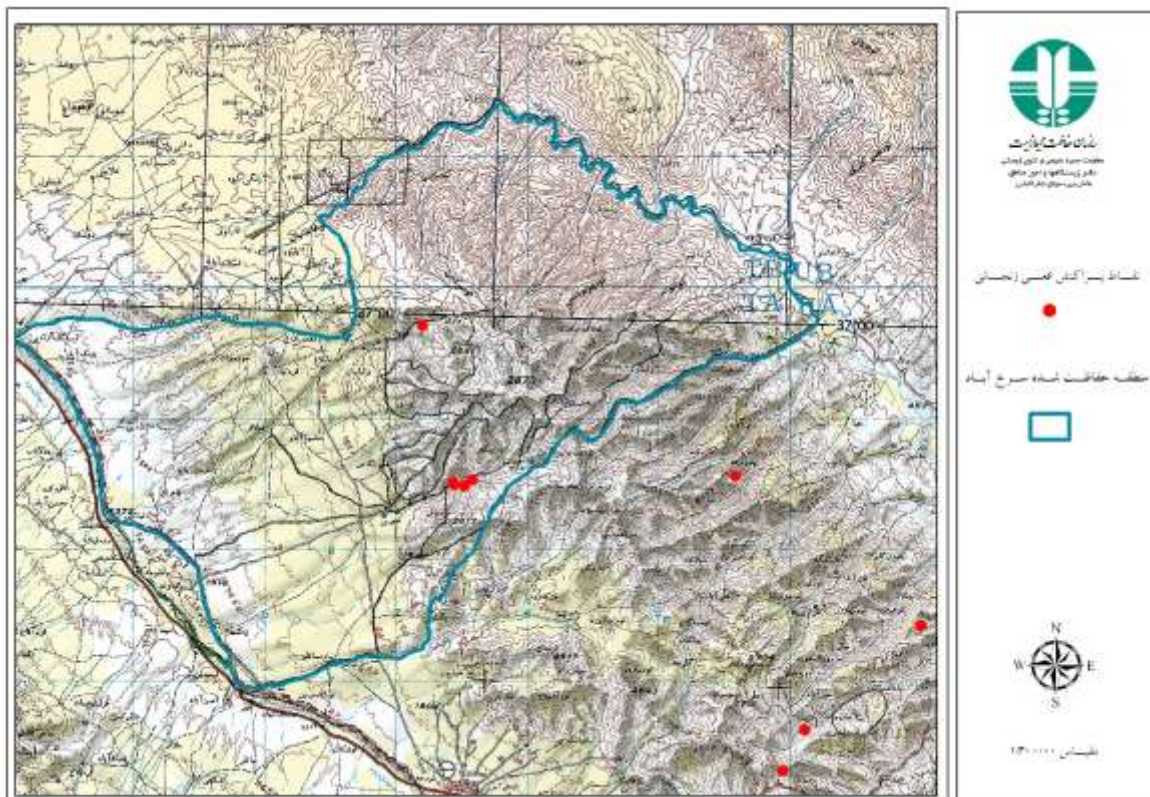


Mega5 درخت‌های پیوند همجاری (Neighbor-joining) احتمال‌ترین درخت (Maximum Likelihood) و میانبرترین درخت (Maximum Parsimony) ترسیم گردید.

نرم‌افزار BioEdit مرتب (Align) گردیدند، سپس برای بررسی تغییرات درون‌گونه‌ای و بین جمعیتی، فواصل ژنتیکی داده‌های مولکولی به دست آمده توسط نرم‌افزار Mega5 محاسبه شد و توسط نرم‌افزارهای PAUP و



شکل ۱- افعی زنجانی (*Montivipera albicornuta*) و نقشه پراکنش آن در ایران



نقشه ۱- نقاط نمونه برداری شده افعی زنجانی در منطقه حفاظت شده سرخ آباد زنگان



جدول ۱- پرایمر Rep Co1 F+R

<b>RepCOI-F: TNT TMT CAA CNA ACC ACA AAG A</b>
<b>RepCOI-R: ACT TCT GGR TGK CCA AAR AAT CA</b>

جدول ۲- مقدار مواد لازم برای ساختن Master Mix

مقدار لازم برای یک نمونه	نوع ماده
۱۴/۵ میکرولیتر	DW (آب دی یونیزه شده برای متعادل کردن کاتیون آنیون)
۲/۵ میکرولیتر	محلول بافر (10X PCR Buffer)
۰/۷۵ میکرولیتر	MgCl <sub>2</sub> کلرید منیزیم
۱ میکرولیتر	پرایمر رفت
۱ میکرولیتر	پرایمر برگشت یک
۰/۵ میکرولیتر	dNTP (کاتالیزور)
۲۰/۲۵ میکرولیتر	جمع

جدول ۳- چرخه (رژیم) حرارتی دستگاه PCR

مرحله اول	مرحله دوم	مرحله سوم	مرحله چهارم
۱	۳۷	۱	۱
چرخه (دفعه)	۴۰	۸۰	۱۸۰
زمان (ثانیه)	۴۰	۷۲	۴
دما (درجه سانتیگراد)	۹۴	۴۹	۷۲

## نتایج

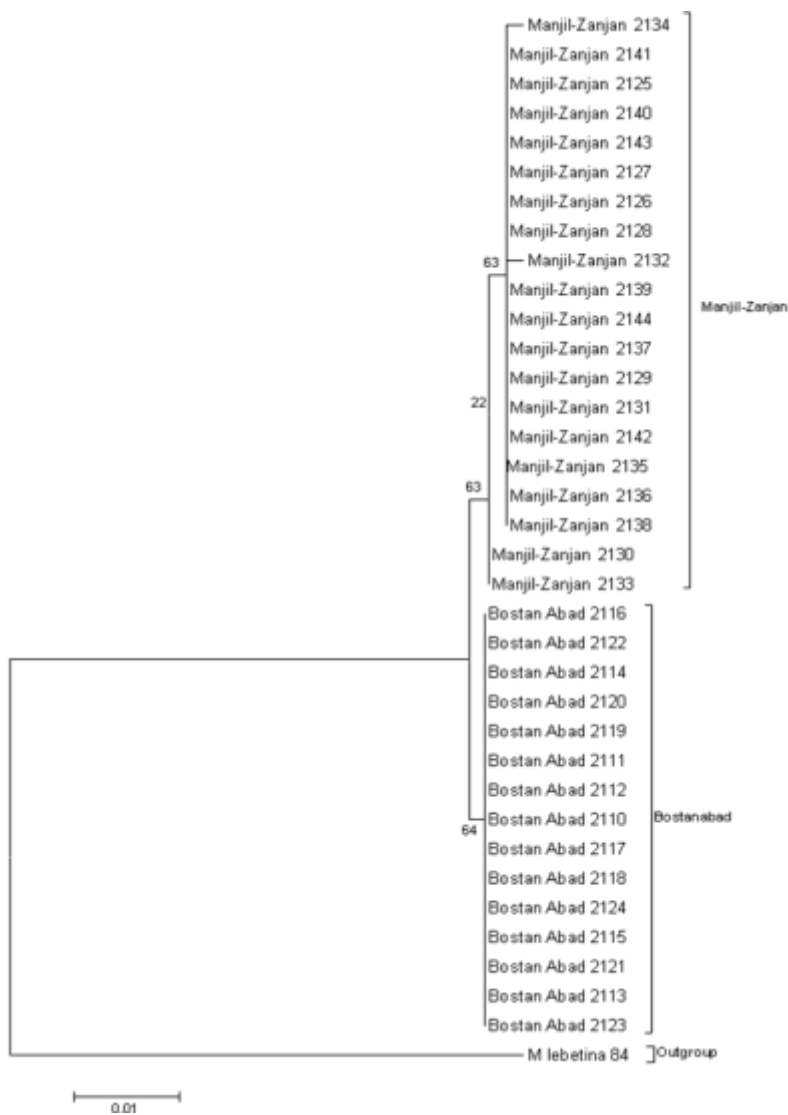
مقایسه اطلاعات حاصل از نمونه‌ها نشان داد که میانگین فاصله ژنتیکی بین گروه‌های منطقه منجیل - زنجان و بستان آباد ۰/۰۰۵ می‌باشد. نتایج نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی کمی بین این دو جمعیت وجود دارد (جدول ۴). ترسیم درخت فیلوژنی به روش پیوند همجواری (Neighbor-Joining) (شکل ۲) نشان می‌دهد که این دو جمعیت با هم تفاوت معنی‌داری ندارند. اساساً ژن CO1 مورد استفاده در این مطالعه به دلیل وجود سیگنال-های فیلوژنتیکی ضعیف در آن برای ترسیم درختی که نشان‌دهنده روابط بین جمعیت‌ها این گونه باشد کافی

نبوده و اطلاعات لازم را ندارد. برای بررسی بیشتر نتایج، محتمل‌ترین درخت (Maximum Likelihood) (شکل ۳) و میانبرترین درخت (Maximum parsimony) (شکل ۴) ترسیم و با درخت پیوند همجواری (Neighbor-Joining) مقایسه گردید. نتایج بدست آمده از درخت ML و MP با درخت پیوند همجواری NJ همخوانی دارد و بیانگر توپولوژی تقریباً یکسان برای روابط فیلوژنتیک جمعیت افعی زنجانی است و نشانگر وجود شباهت ژنتیکی بالایی میان جمعیت‌های منزوی و دور از هم افعی زنجانی می‌باشد.



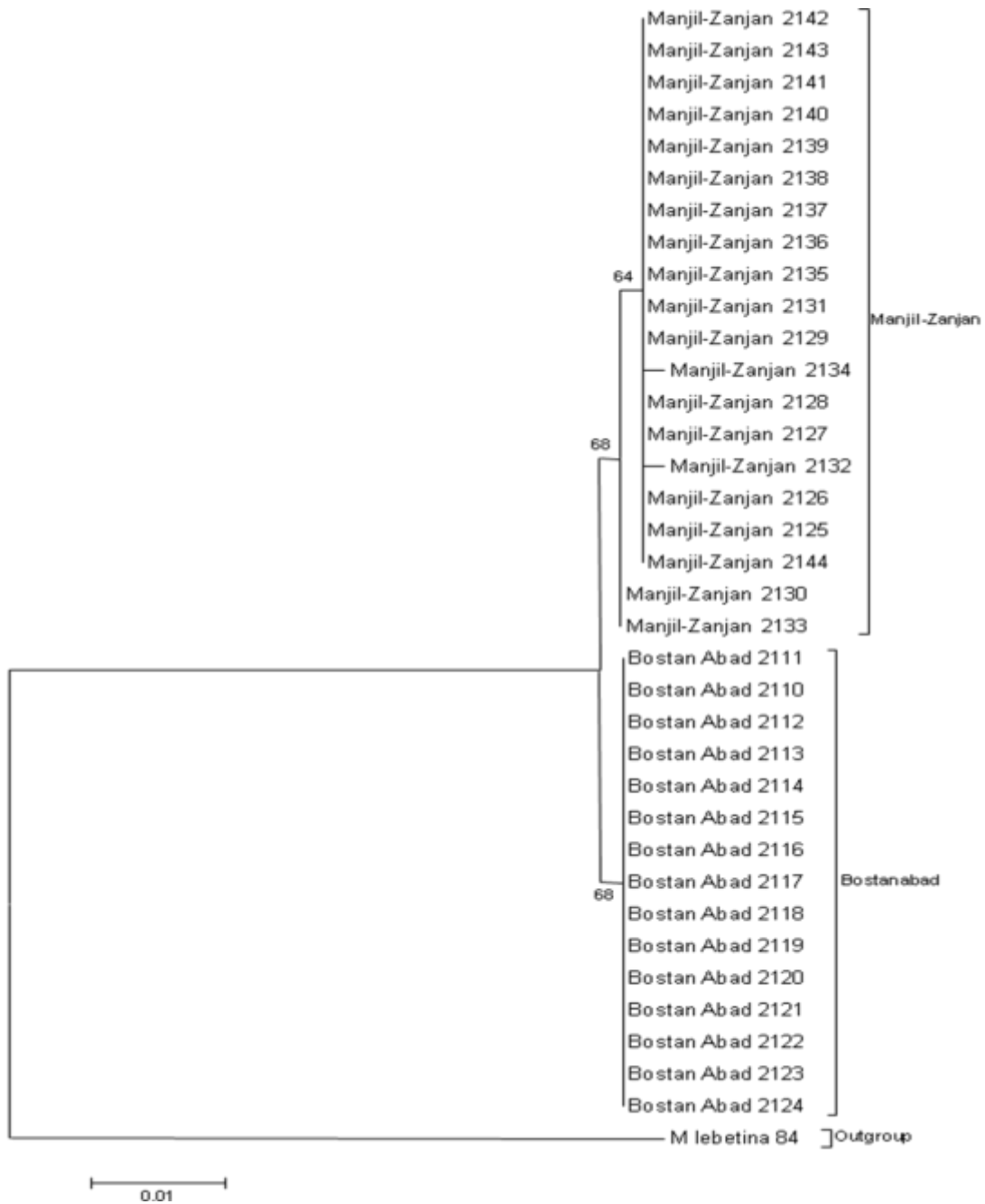
جدول ۴- میانگین فاصله ژنتیکی بین گروه‌ها (Kimura-2-parameter) در ژن میتوکندری CO1

	1	2	3
1. Outgroup			
2. Bostanabad	0.094		
3. Manjil-Zanjan	0.096	0.005	

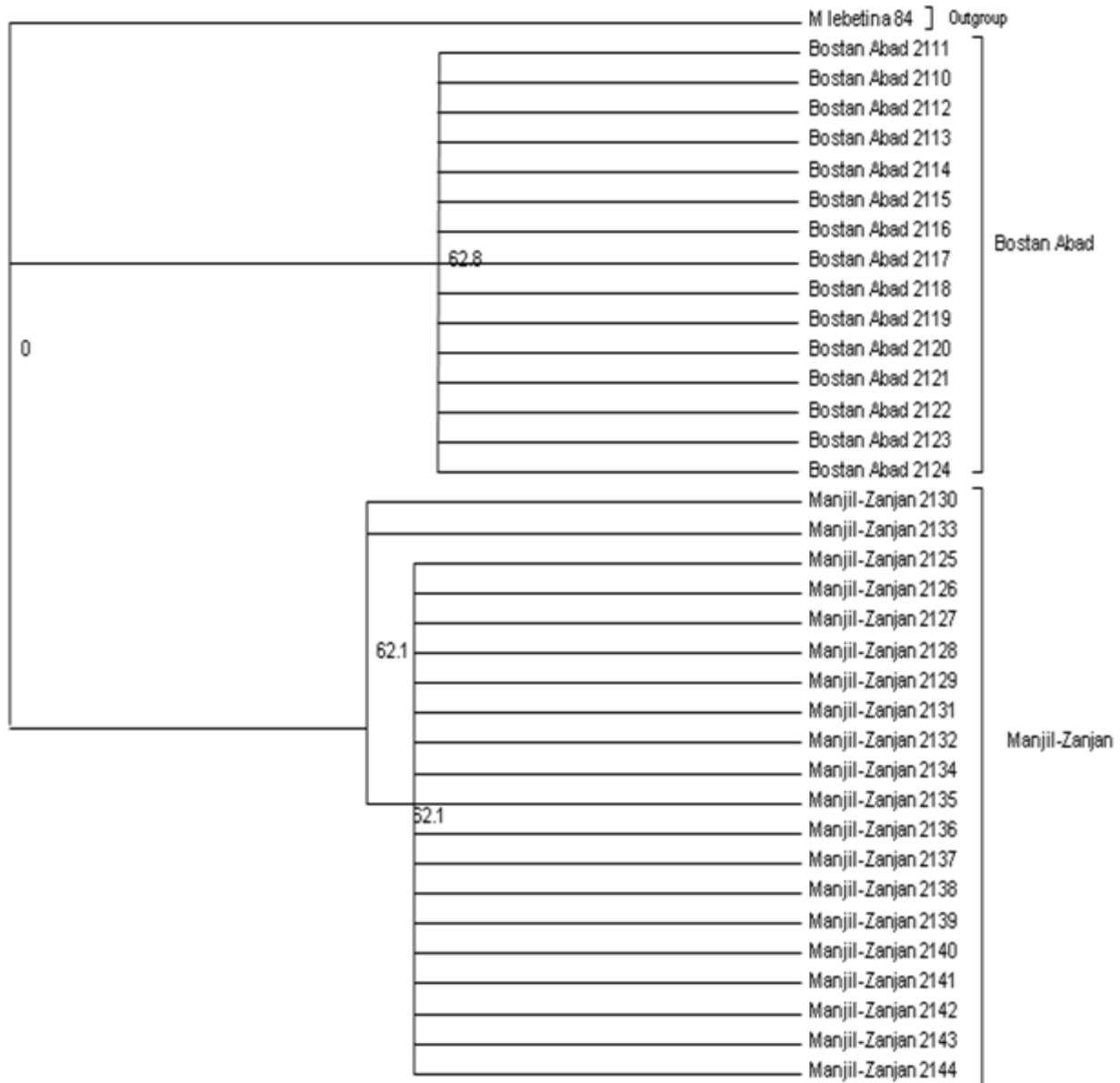


شکل ۲- درخت حاصل از آنالیز پیوند همجواری (Neighbor-Joining) بر اساس داده‌های ژن میتوکندریایی CO1 همراه با آزمون بوت استرپ (۴۰۰۰ مرتبه تکرار)





شکل ۳- درخت حاصل از آنالیز محتمل‌ترین درخت (Maximum Likelihood) بر اساس داده‌های ژن میتوکندریایی CO1 همراه با آزمون بوت استرپ (۱۰۰۰ مرتبه تکرار)



شکل ۴- درخت حاصل از آنالیز میانبرترین درخت (Maximum parsimony) بر اساس داده‌های ژن میتوکندریایی CO1 همراه با آزمون بوت استرپ (۲۰۰۰ مرتبه تکرار)

#### بحث

محاسبه فواصل ژنتیکی میان جمعیت‌های مختلف این جانور در ایران و همین‌طور آنالیزهای میانبرترین درخت (MP)، محتمل‌ترین درخت (ML) و درخت مولکولی پیوند همجواری (N-j) نشان می‌دهد تفاوت‌های ژنتیکی اندکی میان جمعیت‌های منزوی و دور از هم افعی زنجانی وجود دارد. به نظر می‌رسد جمعیت‌های افعی زنجانی در

در این مطالعه از داده‌های ژن میتوکندریایی CO1 برای بررسی موقعیت تاکسونومیکی جمعیت‌های گونه افعی زنجانی (*Montivipera albicornuta*) استفاده شد. بررسی‌های مولکولی با استفاده از تغییرات در ۶۳۰ نوکلئوتید ژن CO1 برای ۳۵ نمونه از گونه افعی زنجانی (*Montivipera albicornuta*) انجام گردید.



کارشناسان محترم بخش جانوران سمی موسسه سرم‌سازی رازی جهت در اختیار گذاشتن نمونه‌های مورد مطالعه قدردانی می‌شود.

#### منابع

۱- لطیفی، م. ۱۳۷۹. مارهای ایران، چاپ سوم، سازمان حفاظت محیط زیست، ۴۷۸ صفحه.

2- Bataillon T.M., David J.L., Schoen D.J. (1996), Neutral genetic markers and conservation: simulated Germplasm collections. *Genetics*, 144: 409-417.

3- David P., Vogel G. (2010), Venomous snakes of Europe, Northern, Central and Western Asia. Edition Chimaira.

4- Felsenstein J. (1985), Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39:783-791.

5- Ferchaud A-L., Ursenbacher S., Cheylan M., Luiselli L., Jelić D., Halpern B., Major A., Kotenko T., Keyan N., Behrooz R., Crnobrnja-Isailović J., Tomović L., Ghira I., Ioannidis Y., Arnal V., Montgelard C. (2012), Phylogeography of the *Vipera ursinii* complex (Viperidae): mitochondrial markers reveal an east-west disjunction in the Palearctic region. *Journal of Biogeography*, 39: 1836-1847.

6- Stumpel N., Joger U. (2009), Recent advances in phylogeny and taxonomy of Near and Middle Eastern Vipers- an update. *Journal of Zoo Keys*, 31:179-191.

7- www.iucn.org

ایران تاریخ تکاملی طولانی ندارند و یا حداقل الگوی فعلی پراکندگی آن‌ها و تشکیل جمعیت‌های به ظاهر ایزوله شده فعلی حاصل حوادث بسیار اخیر در پراکندگی این گونه در ایران است. این واقعیت که با وجود فاصله جغرافیایی قابل ملاحظه بین جمعیت‌ها تفاوت ژنتیکی آنها این قدر اندک است و به عبارت دیگر دارای یکنواختی بالایی هستند گویای یا جدایی بسیار اخیر آن‌ها است یا وجود جریان قوی ژن میان این جمعیت‌ها و یا وجود فشارهای اکولوژیکی تقریباً یکسان در تمام زیستگاه‌های موجود این گونه و به عبارت دیگر پرده‌های اکولوژیکی یکسان ولو با فواصل جغرافیایی زیاد و زمان جدایی طولانی توانسته یکسانی ژنتیکی جمعیت‌ها را تضمین کند.

#### نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد که بررسی دقیق‌تر وضعیت این گونه بوسیله انجام مطالعات اکولوژی و تحلیل و مدل‌سازی نیچ و مقایسه آن با نتایج مطالعات مولکولی و همینطور نمونه برداری تکمیلی از سایر گونه‌های جنس *Montivipera* در گستره وسیع‌تری از کشور برای تکمیل مطالعات مولکولی و شناسایی گستره پراکنش جمعیت‌های مشابه هر گونه می‌تواند نتایج این مطالعه را کامل نماید.

#### تشکر و قدردانی

از جناب آقای مهندس اصغر مبارکی رئیس محترم گروه خزندگان و دوزیستان سازمان حفاظت محیط زیست جهت همکاری خالصانه شان، همچنین جناب آقای دکتر اکبری معاون محترم موسسه سرم‌سازی رازی، جناب آقای مهندس ربیعی و سرکار خانم مهندس تیمورزاده