

## تغییرات درون‌گونه‌ای دم‌سرخ معمولی (*Phoenicurus phoenicurus*) در محدوده پراکنش آن از ایران تا غرب پالئارکتیک با استفاده از زیست‌نشانه‌گر *COI*

زهره نصیری<sup>۱</sup>، سید محمود قاسمپوری<sup>۱\*</sup> و منصور علی‌آبادیان<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> نور، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، گروه محیط‌زیست

<sup>۲</sup> مشهد، دانشگاه فردوسی، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۹۵/۴/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۵/۹/۱۵

### چکیده

برخی از گونه‌ها به صورت نادر تغییرات درون‌گونه‌ای، تغییرات ژنتیکی و مورفولوژیکی بالایی را از خود نشان می‌دهند. دم‌سرخ معمولی (Common Redstart) از پرندگانی است که در ناحیه جغرافیایی پراکنش خود دارای تغییرات درون‌گونه‌ای بالاتر از حد آستانه برای هر دو زیرگونه خود می‌باشد. وجود دو دودمان متفاوت از نظر ژن سیتوکروم اکسیداز سی زیر واحد یک (*COI*) قبلاً رویت شده بود. هدف از مطالعه حاضر، بررسی تغییرات درون‌گونه‌ای دم‌سرخ معمولی نسبت به تغییرات فاصله جغرافیایی و اثر آن در میزان واگرایی درون‌گونه‌ای، شیب ژنتیکی و وضعیت فیلوجغرافیایی آن می‌باشد. نمونه‌برداری در بهار سال‌های ۹۳ و ۹۴ از زیستگاه جوجه‌آوری صورت گرفت و توالی‌های حاصل از PCR باتفاق نمونه‌های بانک ژن تحلیل شد. نتایج درخت Bayesian، دو کلاد اصلی جدا شده با احتمال پسین ۱۰۰٪ را برای ژن *COI* تایید کرد. شبکه‌های هاپلوتایپی، دو کلاد تشکیل شده در درخت تبارشناسی را به صورت جدا از هم تایید کرد. اما هاپلوگروپ‌های مجزا براساس منطقه جغرافیایی درون شبکه هاپلوتایپی مشاهده نشد. در نمودار تغییرات جریان ژنی به فاصله جغرافیایی، اگرچه روند مثبت نمودار بیانگر کاهش درون آمیزی به ازای افزایش فاصله می‌باشد اما با توجه به ضریب رگرسیون  $R^2 = 0.03$ ، فاصله جغرافیایی به عنوان یک متغیر مستقل بر روی فاصله ژنتیکی اثر معنی‌دار نداشته است ( $P > 0.05$ ). همچنین تحلیل PCoA نشان می‌دهد که جمعیت‌های متعلق به ترکیه در عین حال که به لحاظ ژنتیکی به جمعیت‌های منطقه ایران و روسیه و چک نزدیکتر می‌باشد، از سایر جمعیت‌ها به صورت مجزا قرار گرفته است. حلقه‌گذاری می‌تواند در تایید برخی یافته‌ها راه‌گشا باشد.

**واژه‌های کلیدی:** تغییرات درون‌گونه‌ای، دم‌سرخ معمولی، شبکه هاپلوتایپی، فاصله جغرافیایی به ژنتیکی، PCoA

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۱۱۵۳۰۳۳۲، پست الکترونیکی: ghasempm@modares.ac.ir

### مقدمه

می‌باشد که منجر به نیم‌قرن جنجال در تعاریف مربوط به طبقه‌بندی گونه، روش‌های استنتاج مرزها و تعداد گونه‌ها شده است (۱۱). روش‌های تجربی زیادی در دو طبقه‌بندی اصلی یعنی روش‌های مبتنی بر درخت فیلوژنی و روش‌های غیردرختی، برای تعیین حدود گونه‌ای وجود دارد. در روش‌های مبتنی بر درخت، تعیین حدود گونه‌ای براساس ویژگی‌های مرتبط با توپولوژی درخت فیلوژنی

گونه به عنوان واحد بنیادی در زیست‌شناسی تلقی می‌شود (۲۱) و تعاریف متعددی از جمله زیست‌شناختی، بوم‌شناختی، تکاملی و تبارشناختی برای آن مطرح شده است. به لحاظ زیست‌شناسی گونه به واسطه طبیعت ذاتی و معیارهایی همچون جدایی تولیدمثلی و نه شباهت‌های ظاهری قابل تشخیص است (۱۴ و ۲۷). اما هریک از تعاریف گونه دارای نقایصی در توضیح حدود گونه‌ای

دم‌سرخ معمولی (Common Redstart) پرنده‌ای کوچک و مهاجر از راسته گنجشک‌سانان Passeriformes و خانواده مگس‌گیرها Muscicapidae بانام علمی (Linnaeus 1758) *Phoenicurus phoenicurus* بوده که از دو زیرگونه اصلی با نام‌های *phoenicurus* و *samamisticus* برخوردار است (۱۳). در مجموع، دم‌سرخ معمولی در پالئارکتیک پراکنش وسیعی دارد و بیشترین جمعیت زادآور این‌گونه در اروپا زیست می‌کند (۷). زیرگونه *phoenicurus* در اروپا (به‌غیر از جنوب شرقی آن)، شمال غربی آفریقا، شرق تا مرکز سیبری و شمال مغولستان، و به‌صورت غیر زادآور در آفریقا پراکنش دارد. زیرگونه *samamisticus* در جنوب بالکان و یونان به سمت شرق ترکمنستان، جنوب ازبکستان، ایران و به‌صورت غیر زادآور در شمال شرقی آفریقا و شبه‌جزیره عربستان گسترده شده است. بارزترین وجه تمایز جنس نر این زیرگونه با زیرگونه اول، لکه سفیدروی بال بیان‌شده است (۱۰). در ایران، پایین‌ترین حد حضور دم‌سرخ معمولی در دامنه‌های شمالی البرز و لکه کوچکی در جنوب کشور می‌باشد (۷).

مطالعات نشان می‌دهد که در دم‌سرخ معمولی دو دودمان متفاوت از نظر ژن *COI* وجود دارد که میزان این واگرایی به‌اندازه ۵ درصد K2P می‌باشد. دم‌سرخ‌ها دارای تغییرات درون‌گونه‌ای بالاتر از حد آستانه در ناحیه جغرافیایی پراکنش خود می‌باشند که این تغییرات در هر دو زیرگونه قابل‌مشاهده است. از سال ۲۰۱۰ به بعد، تغییرات درون‌گونه‌ای بالا برای دم‌سرخ معمولی در ناحیه جغرافیایی پالئارکتیک گزارش شده است (۲۲ و ۱۹) که در آن به مواردی از قبیل شیب تغییرات ژنتیکی، میزان تمایز جمعیت‌ها در کشورهای مختلف اروپایی، ترکیه و ایران به‌اندازه کافی توجه نشده، لذا این مطالعه سعی دارد ضمن نشان دادن تفاوت دودمانی بین افراد این‌گونه، به فواصل کلادی و وضعیت شبکه‌های هاپلوتایپی اشاره داشته باشد. هدف از این مطالعه، بررسی تغییرات درون‌گونه‌ای دم‌سرخ معمولی در محدوده پراکنش این‌گونه نسبت به تغییرات

(تک‌نمایی، تطابق با جغرافیا) می‌باشد و روش‌های غیردرختی نیز براساس استنتاج غیرمستقیم از وجود و عدم وجود جریان ژن تمرکز دارد (۳۲).

اگرچه به‌طور معمول انتظار می‌رود افراد یک گونه از تغییرات ژنتیکی کمی برخوردار باشند اما برخی از گونه‌ها سطوح بالایی از تغییرات ژنتیکی و مورفولوژیکی را به‌صورت درون‌گونه‌ای از خود نشان می‌دهند. در حدود ۳۰ سال پیش ریچارد لونتین به این نتیجه رسید که تنوع تغییرات درون‌گونه‌ای به‌شدت غیرطبیعی است و تأیید کرد که رانش ژنتیکی و انتخاب طبیعی توضیحات احتمالی برای این حقیقت را فراهم می‌کند (۲۶). به‌دلیل نرخ تکاملی سریع‌تر تغییرات در ژنوم میتوکندریایی نسبت به ژنوم هسته‌ای، استفاده از آن به‌عنوان بیومارکر در نشان دادن تغییرات ژنتیکی درون‌گونه‌ای کاربرد یافته است (۳). علاوه بر این، کاربرد بیومارکرهای ژنوم میتوکندریایی با توصیف الگوهای ساختار ژنتیکی درون‌گونه‌ای و آشکار کردن دودمان‌های واگرا، رویکرد نسبتاً کارآمدی را برای تشخیص گونه‌های جدید فراهم می‌کند (۵، ۹ و ۱۲). واگرایی ژن *COI* در درون‌گونه‌ها بطور متوسط ۲۰ مرتبه کوچکتر از بین‌گونه‌ها بوده و فاصله مشخصی بین واگرایی درون و بین‌گونه‌ای وجود دارد به همین دلیل مفهوم تغییرات درون‌گونه‌ای و مرز آن با تغییرات بین‌گونه‌ای به‌عنوان پایه و اساس استفاده از یک قطعه ۶۲۸ نوکلئوتیدی از ژنوم میتوکندریایی یعنی *COI* در شناسایی گونه‌ها کاربرد پیدا کرده است. این فاصله بارکد، حد آستانه (۱۰) مرتبه بزرگتر از میانگین واگرایی درون‌گونه‌ای را برای تعریف مرز بین‌گونه‌ای فراهم نموده است و کارایی این ژن در نشان دادن اختلاف بالا بین دو فاصله درون‌گونه‌ای و بین‌گونه‌ای با اولین مطالعات با بررسی ۲۶۰ گونه جوجه‌آور در آمریکای شمالی تأیید شد (۱۷ و ۱۸). به همین ترتیب این ژن کارایی خود را در بازشناسی پراکنش گونه‌ها و الگوهای جغرافیای زیستی نشان داده است (۸، ۱ و ۲).

فاصله جغرافیایی می‌باشد و اینکه فاصله جغرافیایی تا چه اندازه در واگرایی درون گونه‌ای دم‌سرخ، شیب ژنتیکی و وضعیت فیلوژغرافیایی گونه دخیل می‌باشد.

### مواد و روشها

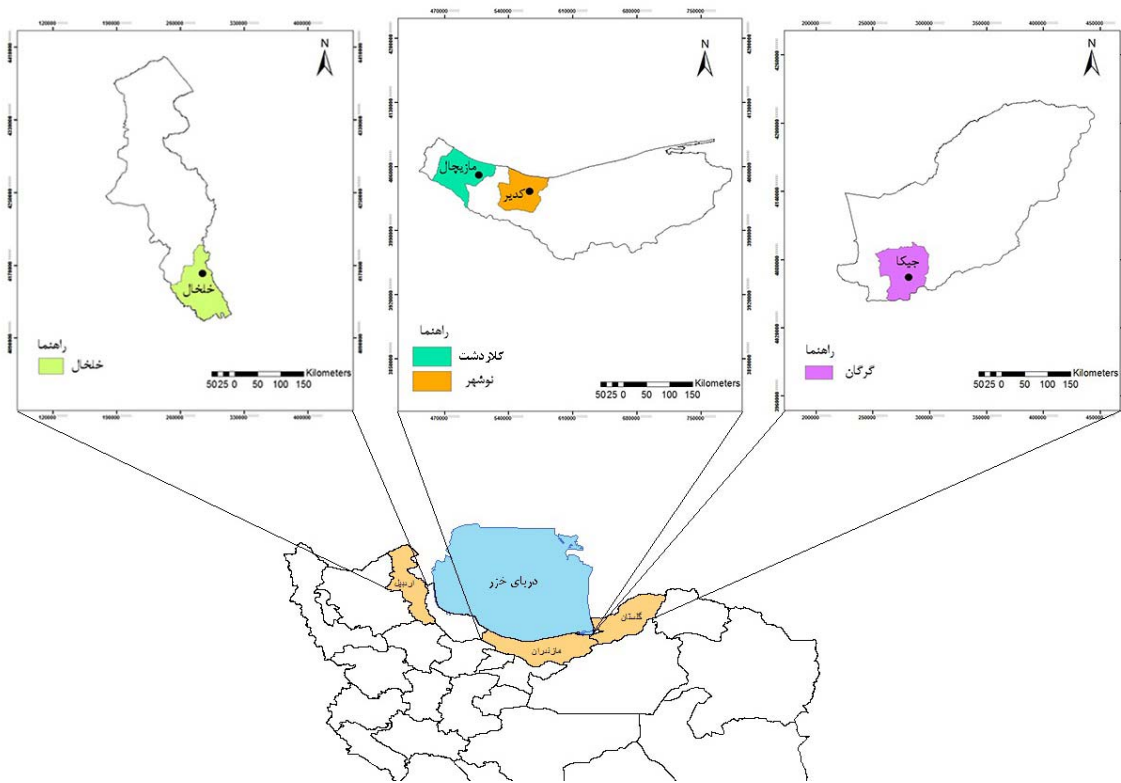
**نمونه‌برداری:** نمونه‌های به‌کاررفته در این مطالعه مربوط به چهار منطقه از شمال ایران با ارتفاع ۱۶۰۰ تا ۲۰۰۰ متری از سطح دریا است. الف) منطقه کدیر، منطقه‌ای کوهستانی در نیمرخ شمالی البرز مرکزی از توابع بخش کجور شهرستان نوشهر در استان مازندران با طول و عرض جغرافیایی ۵۱ درجه، ۲۷ دقیقه و ۲۹/۵۶ ثانیه شرقی و ۳۶ درجه، ۲۶ دقیقه و ۵۰/۸۱ ثانیه شمالی و ب) منطقه شهرستان خلخال در استان اردبیل با طول و عرض جغرافیایی ۴۸ درجه، ۳۱ دقیقه و ۴۹/۸۷ ثانیه شرقی و ۳۷ درجه، ۳۷ دقیقه و ۲۵/۴۳ ثانیه شمالی، که نمونه‌برداری از آن‌ها در طی سال‌های ۹۴-۹۳ انجام گردید. همچنین داده‌های حاصل از نمونه‌برداری در سال‌های ۸۹-۸۷ از دو منطقه دیگر: ج) مازیچال شهرستان کلاردشت استان مازندران با طول و عرض جغرافیایی ۵۱ درجه، ۳ دقیقه و ۱۶/۸۳ ثانیه شرقی و ۳۶ درجه، ۳۲ دقیقه و ۰/۲۳ ثانیه شمالی و د) منطقه جیکا استان گلستان با طول و عرض جغرافیایی ۵۴ درجه، ۱۹ دقیقه و ۳۳/۱۶ ثانیه شرقی و ۳۶ درجه، ۳۵ دقیقه و ۳۵/۵۰ ثانیه شمالی نیز به‌عنوان داده‌های تکمیلی برای ایران از بانک ژن دریافت و مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱). در مجموع ۱۶ عدد نمونه خون از سیاه‌رگ زیرین بال از دم‌سرخ‌های معمولی به دام افتاده در تور نامرئی در فصل زادآوری گونه (بهار) جمع‌آوری و در بافر کوئین نگهداری شد. از ۱۶ عدد نمونه جمع‌آوری شده از منطقه کدیر، ۸ عدد آن متعلق به جنس نر بوده که ۳ نر فاقد لکه سفید بالی (زیرگونه اول) و ۵ نر دارای لکه سفید بالی (زیرگونه دوم) را در برمی‌گیرد، از مابقی نمونه‌ها ۴ عدد مربوط به جنس ماده و ۴ عدد دیگر نیز مربوط به نابالغین بود (شکل ۲).

**PCR و توالی‌یابی:** استخراج DNA از نمونه خون، توسط روش نمکی (Salt Method) طبق پروتکل صورت گرفت (۶). قطعه ژن میتوکندریایی *COI* توسط آغازگرهای عمومی با برنامه دمایی مورد نظر (جدول ۱) تکثیر شد. مقادیر مواد موردنیاز جهت واکنش چرخه پلی‌مراز برای آغازگر اول، ۲۵-۲۰  $\mu\text{l}$  آب مقطر استریل تزریقاتی، ۱  $\mu\text{l}$  ۰/۷۵ آغازگر BirdF1، ۰/۵  $\mu\text{l}$  از هر دو آغازگر BirdR1 و BirdR2 و ۳  $\mu\text{l}$  از DNA استخراج شده می‌باشد. برای آغازگر دوم ۱۹  $\mu\text{l}$  آب مقطر استریل تزریقاتی، ۱  $\mu\text{l}$  آغازگر AF، ۱  $\mu\text{l}$  آغازگر AR و ۴  $\mu\text{l}$  از DNA استخراج شده موردنیاز می‌باشد که داخل و یال‌های PCR خشک آماده ریخته می‌شوند. همچنین به ازای هر نمونه ۰/۲۵ آنزیم تک پلی‌مراز به صورت جداگانه اضافه می‌گردد. بعد از انجام فرآیند PCR در انتها نمونه‌ها جهت توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره ارسال گردید.

**تجزیه و تحلیل داده‌ها:** توالی‌ها توسط نرم‌افزار Bioedit (۱۶) به صورت دستی مرتب‌سازی شده و مورد ویرایش قرار گرفت. در انتها توالی به طول ۵۲۸ نوکلئوتید برای هر نمونه به دست آمد. در مرحله بعد برای اطمینان از عدم وجود کدون‌های متوقف کننده توالی‌ها در نرم‌افزار MEGA6 (۳۳) مورد بررسی قرار گرفتند. تحلیل بی‌زین با استفاده از روش زنجیره مارکوف مونت کارلو (Markov Monte Carlo Chain) با نرم‌افزار MrBayes3.2.2 انجام شد (۲۰) که در آن مگس‌گیر سینه‌سرخ *Ficedula parva* به‌عنوان گروه بیرونی در نظر گرفته شده است. فرایند زنجیره مارکوف مونت کارلو، باده میلیون تکرار با پیش‌فرض قبلی انتخاب درخت در هر ۱۰۰۰ نسل (نتیجه ۱۰۰/۰۰۰ درخت) اجرا گردید. این تحلیل با انتخاب یک درخت به طور تصادفی شروع می‌شود. ۵۰۰۰ درخت اول برای حفظ سطح اطمینان نادیده گرفته و مقدار احتمال اولیه برای سایر درخت‌های باقی‌مانده محاسبه می‌شود. ترسیم شبکه هاپلوتایپی بر مبنای حداقل فاصله (Minimum Spanning) توسط نرم‌افزار PopART (۲۵) صورت گرفت.

جدول ۱ - توالی پرایمرهای مورد استفاده برای ژن سیتوکروم اکسیداز سی زیر واحد یک (COI)

جایگاه	توالی پرایمرها (۵'-۳')	دمای اتصال آغازگرها	منابع
BirdF1 BirdR1 BirdR2	F: 5'-TTCTCCAACCACAAAGACATTGGCAC-3' R: 5'-ACGTGGGACATAATTCCAAATCCT-3' R: 5'-ACTACATGTGAGATGATTCCGAATCCAG-3'	۹۴۰°C	(۱۳)
AF AR	F: 5'-AACCAACCACAAAGACATTGG-3' R: 5'-CCATGTAGCCGAATGGTTCT-3'	۹۴۰°C	(۲۸)



شکل ۱- تصویر منطقه مورد مطالعه که مکان جوجه آوری دم‌سرخ‌های معمولی تابستان‌گذران می‌باشد

می‌دهد. رولف در سال ۱۹۹۳ (۳۱) نشان می‌دهد که برای  $r < 0.07$  (یا  $-0.07$  - برای همبستگی‌های منفی) همبستگی، حتی زمانی که معنی‌داری متفاوت از صفر باشد، ضعیف هستند. زمانی که پیوستگی معنی‌دار بین فاصله جغرافیایی و ژنتیکی یافت شد نمودارهای پراکنندگی به دست آمده مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌گیرند.

### نتایج

به‌منظور انجام تحلیل Bayesian در کنار استفاده از ۳۴ نمونه حاصل از نمونه‌برداری‌های انجام‌شده در ایران، از ۱۸۲ توالی ژن COI متعلق به شش منطقه دیگر (نروژ،

تحلیل فاصله ژنتیکی به فاصله جغرافیایی و تحلیل PCoA برای داده‌های هاپلوئید توسط نرم‌افزار GenALEx6.5 انجام شد (۲۹). اندازه‌گیری فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها توسط آزمون AMOVA انجام شد که در آن  $F_{ST}$  معادل با FST در نظر گرفته می‌شود. در تحلیل فاصله ژنتیکی به فاصله جغرافیایی توسط Mantel test، داده‌ها با ۹۹۹ بار برای تخمین احتمال بالای ۹۵٪ ماتریس ضریب همبستگی جابه‌جا شد. ضریب همبستگی (r) بین اعداد ۱- تا ۱ در حال تغییر است. احتمال  $P < 0.05$  نشان می‌دهد که ضریب همبستگی به طور معنی‌داری متفاوت از ۰ می‌باشد. مقادیر r شدت همبستگی بین فاصله جغرافیایی و ژنتیکی را نشان

این دو کلاد با احتمال پسین ۱۰۰٪ از یکدیگر جدا شده و در کلاد A بخشی از نمونه‌های ایران، ترکیه و روسیه به صورت یک هاپلوگروپ با احتمال پسین مشابه از سایر نمونه‌ها مجزا گشته است (شکل ۳).

ترکیه، چک، روسیه، صربستان، اسپانیا) نیز استفاده شد (جدول ۲). در نهایت ۲۱۶ توالی در ناحیه پراکنش دم‌سرخ معمولی با ۵۲۸ جفت نوکلئوتید مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در درخت حاصل از تحلیل مذکور، دو کلاد اصلی برای ژن COI در دم‌سرخ‌های معمولی به دست آمد.



شکل ۲- تصاویر گرفته شده توسط نگارنده از جنس نر دو زیرگونه دم‌سرخ معمولی (تصاویر پایین) به همراه جنس ماده (بالا، راست) و نابالغ آن (بالا، چپ)

جدول ۲- توالی‌های COI مربوط به پراکنش دم‌سرخ معمولی به کاررفته در این تحقیق که از بانک ژن دریافت شده است

شماره	کد	منطقه	شماره	کد	منطقه	شماره	کد	منطقه
۱	JX970835	Norway	۵۴	JX970783	Norway	۱۰۷	JX970736	Norway
۲	JX970834	Norway	۵۵	JX970782	Norway	۱۰۸	JX970735	Norway
۳	JX970833	Czech Republic	۵۶	JX970781	Norway	۱۰۹	JX970734	Czech Republic
۴	JX970832	Norway	۵۷	JX970780	Norway	۱۱۰	JX970733	Turkey
۵	JX970829	Norway	۵۸	JX970779	Norway	۱۱۱	JX970732	Spain
۶	JX970828	Russia	۵۹	JX970778	Czech Republic	۱۱۲	JX970731	Norway
۷	JX970827	Norway	۶۰	JX970777	Norway	۱۱۳	JX970730	Russia
۸	JX970826	Norway	۶۱	JX970776	Spain	۱۱۴	JX970729	Norway
۹	JX970825	Norway	۶۲	JX970775	Norway	۱۱۵	JX970728	Spain
۱۰	JX970824	Norway	۶۳	JX970774	Norway	۱۱۶	JX970727	Norway
۱۱	JX970823	Norway	۶۴	JX970773	Russia	۱۱۷	JX970726	Czech Republic

۱۲	JX9708 21	Norway	۶۵	JX970772	Norway	۱۱۸	JX970725	Norway
۱۳	JX9708 20	Norway	۶۶	JX970771	Russia	۱۱۹	JX970724	Norway
۱۴	JX9708 19	Norway	۶۷	JX970770	Norway	۱۲۰	JX970723	Norway
۱۵	JX9708 18	Norway	۶۸	JX970769	Norway	۱۲۱	JX970722	Norway
۱۶	JX9706 33	Iran	۶۹	JX970768	Norway	۱۲۲	JX970721	Norway
۱۷	JX9708 17	Norway	۷۰	JX970767	Serbia	۱۲۳	JX970719	Norway
۱۸	JX9708 16	Norway	۷۱	JX970765	Norway	۱۲۴	JX970718	Norway
۱۹	JX9708 14	Russia	۷۲	JX970764	Norway	۱۲۵	JX970717	Serbia
۲۰	JX9708 13	Norway	۷۳	JX970763	Norway	۱۲۶	JX970716	Norway
۲۱	JX9708 12	Norway	۷۴	JX970762	Czech Republic	۱۲۷	JX970715	CzechRepublic
۲۲	JX9708 11	Spain	۷۵	JX970761	Russia	۱۲۸	JX970713	Norway
۲۳	JX9708 10	Norway	۷۶	JX970760	Norway	۱۲۹	JX970712	Norway
۲۴	JX9708 09	Norway	۷۷	JX970759	Norway	۱۳۰	JX970711	CzechRepublic
۲۵	JX9708 08	Norway	۷۸	JX970758	Norway	۱۳۱	JX970710	Norway
۲۶	JX9708 07	Norway	۷۹	JX970757	Turkey	۱۳۲	JX970709	Norway
۲۷	JX9708 06	Spain	۸۰	JX970756	Norway	۱۳۳	JX970708	CzechRepublic
۲۸	JX9708 05	Czech Republic	۸۱	JX970755	Norway	۱۳۴	JX970707	Russia
۲۹	JX9708 02	Norway	۸۲	JX970754	Norway	۱۳۵	JX970706	Norway
۳۰	JX9708 01	Serbia	۸۳	JX970753	Norway	۱۳۶	JX970705	CzechRepublic
۳۱	JX9708 00	Norway	۸۴	JX970752	Norway	۱۳۷	JX970704	Norway
۳۲	JX9707 99	CzechRepubli c	۸۵	JX970751	Norway	۱۳۸	JX970701	Norway
۳۳	JX9707 97	Norway	۸۶	JX970750	Spain	۱۳۹	JX970700	Turkey
۳۴	JX9707 96	Norway	۸۷	JX970749	Czech Republic	۱۴۰	JX970699	CzechRepublic
۳۵	JX9707 95	Norway	۸۸	JX970748	Norway	۱۴۱	JX970698	Norway
۳۶	JX9707 94	Norway	۸۹	JX970747	Norway	۱۴۲	JX970697	Spain
۳۷	JX9707 92	Norway	۹۰	JX970746	Russia	۱۴۳	JX970696	Turkey
۳۸	JX9707 91	Turkey	۹۱	JX970745	Norway	۱۴۴	JX970695	Norway
۳۹	JX9707 90	Norway	۹۲	JX970744	Norway	۱۴۵	JX970694	Norway
۴۰	JX9707 89	Russia	۹۳	JX970743	Czech	۱۴۶	JX970693	Norway
۴۱	JX9707 88	Turkey	۹۴	JX970742	Norway	۱۴۷	JX970692	Norway
۴۲	JX9707 87	Norway	۹۵	JX970741	Serbia	۱۴۸	JX970691	Norway
۴۳	JX9707 86	Norway	۹۶	JX970740	Norway	۱۴۹	JX970689	Serbia
۴۴	JX9707 84	Norway	۹۷	JX970738	Norway	۱۵۰	JX970688	Norway
۴۵	JX9706 86	Russia	۹۸	JX970676	Norway	۱۵۱	JX970667	Norway

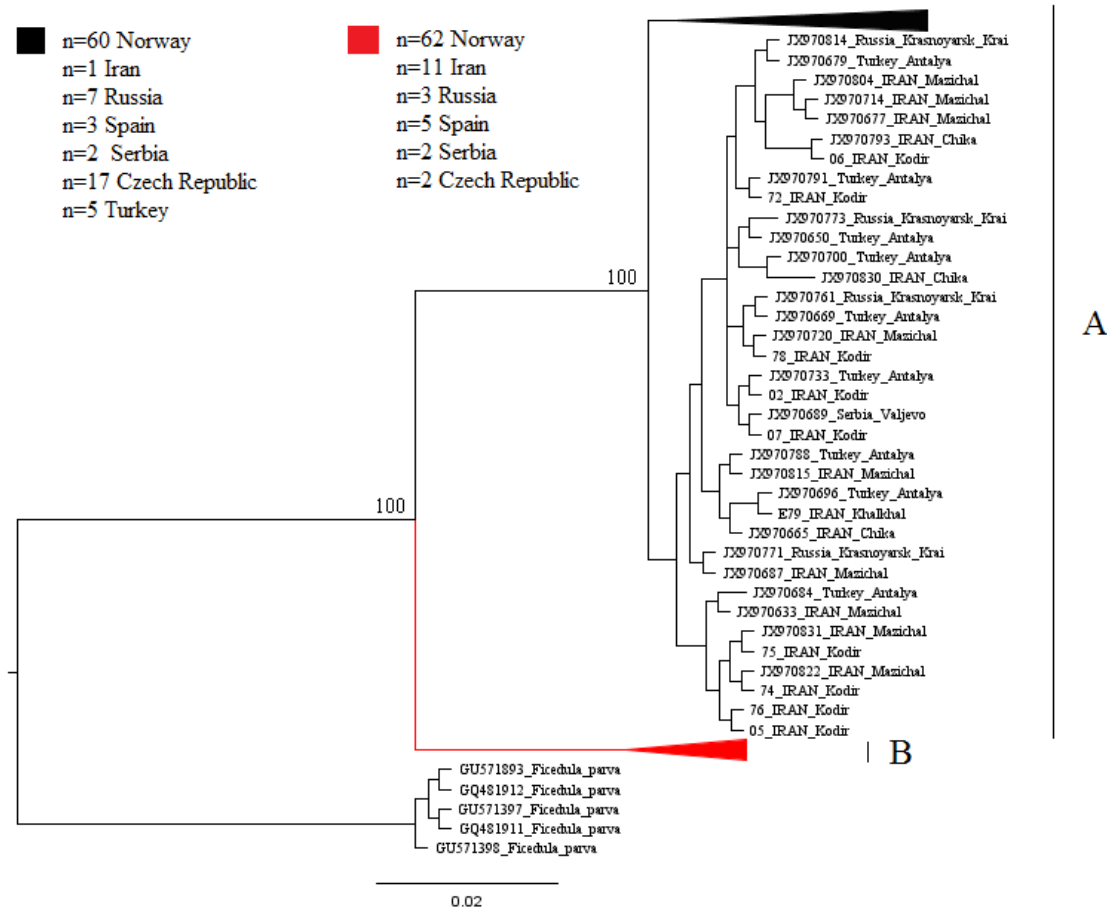
۴۶	JX970685	Norway	۹۹	JX970675	Russia	۱۵۲	JX970666	Norway
۴۷	JX970684	Turkey	۱۰۰	JX970674	Norway	۱۵۳	JX970664	Turkey
۴۸	JX970683	Norway	۱۰۱	JX970673	Norway	۱۵۴	JX970663	Spain
۴۹	JX970682	Norway	۱۰۲	JX970672	Norway	۱۵۵	JX970662	Norway
۵۰	JX970681	Norway	۱۰۳	JX970671	Norway	۱۵۶	JX970661	Norway
۵۱	JX970680	Norway	۱۰۴	JX970670	Turkey	۱۵۷	JX970659	Norway
۵۲	JX970679	Turkey	۱۰۵	JX970669	Turkey	۱۵۸	JX970658	Norway
۵۳	JX970678	Norway	۱۰۶	JX970668	Norway	۱۵۹	JX970657	Norway
۱۶۰	JX970656	Czech_Republic	۱۷۴	JX970642	Czech_Republic	۱۸۸	JX970804	Iran
۱۶۱	JX970655	Norway	۱۷۵	JX970640	Norway	۱۸۹	JX970803	Iran
۱۶۲	JX970654	Norway	۱۷۶	JX970639	Russia	۱۹۰	JX970798	Iran
۱۶۳	JX970653	Norway	۱۷۷	JX970638	Czech_Republic	۱۹۱	JX970793	Iran
۱۶۴	JX970652	Norway	۱۷۸	JX970637	Norway	۱۹۲	JX970766	Iran
۱۶۵	JX970651	Russia	۱۷۹	JX970636	Norway	۱۹۳	JX970739	Iran
۱۶۶	JX970650	Turkey	۱۸۰	JX970635	Czech_Republic	۱۹۴	JX970737	Iran
۱۶۷	JX970649	Norway	۱۸۱	JX970634	Turkey	۱۹۵	JX970720	Iran
۱۶۸	JX970648	Czech_Republic	۱۸۲	JX970632	Norway	۱۹۶	JX970714	Iran
۱۶۹	JX970647	Russia	۱۸۳	JX970631	Turkey	۱۹۷	JX970687	Iran
۱۷۰	JX970646	Norway	۱۸۴	JX970831	Iran	۱۹۸	JX970677	Iran
۱۷۱	JX970645	Norway	۱۸۵	JX970830	Iran	۱۹۹	JX970665	Iran
۱۷۲	JX970644	Norway	۱۸۶	JX970822	Iran	۲۰۰	JX970660	Iran
۱۷۳	JX970643	Norway	۱۸۷	JX970815	Iran			

در شکل ۵ تغییرات فاصله ژنتیکی (محور y) به صورت تابعی از تغییرات فاصله جغرافیایی (محور x) جهت بررسی دقیق‌تر و پاسخ قاطع‌تر به این پرسش که آیا جدایی ژنتیکی تابع جدایی جغرافیایی است یا خیر، نشان داده شده است. رابطه‌ی میزان همبستگی فاصله‌ی جغرافیایی و ژنتیکی با استفاده از آزمون مانتل در جمعیت‌های موجود در کلاد A بررسی شد، زیرا نمونه‌های جوجه آور منطقه البرز را بطور نسبی پوشش داد. اگرچه روند مثبت تابع شاخص جریان ژنی به فاصله جغرافیایی بیانگر کاهش درون آمیزی به ازای افزایش فاصله می‌باشد اما گفتنی است با توجه به ضریب رگرسیون  $R^2 = 0/03$  فاصله جغرافیایی به‌عنوان یک متغیر مستقل بر روی فاصله ژنتیکی اثر معنی‌دار نداشته است

میانگین فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های دم‌سرخ معمولی که در ایران زادآوری دارند و در دو کلاد A و B قرار گرفته‌اند مقدار  $K2P$  ۵/۰۹ محاسبه شد. در شبکه هاپلوتایپی ترسیم‌شده براساس ۲۱۶ توالی، دو کلاد تشکیل شده در درخت تبارشناسی به صورت دو شبکه هاپلوتایپی مجزا از هم مورد تأیید قرار گرفتند (شکل ۴). اما هاپلوگروپ‌های مجزا براساس منطقه جغرافیایی درون شبکه هاپلوتایپی دیده نمی‌شود و همانطور که مشاهده می‌شود در دو هاپلوگروپ اصلی به صورت مختلط پراکنده شده است. از میان هفت منطقه موردنظر فقط کشور ترکیه دریکی از دو هاپلوگروپ موجود دیده می‌شود که نشان می‌دهد فقط یک هاپلوگروپ از دم‌سرخ معمولی در این منطقه وجود دارد.

نمودار PCoA جمعیت صربستان ناهمخوانی بیشتری را در میان این گروه سه‌تایی از خود نشان می‌دهد و براساس مؤلفه دوم به صورت مجزا از جمعیت‌های نروژ و اسپانیا قرار گرفته است. جمعیت‌های نروژ و اسپانیا به علت نزدیکی بیشتر از نظر فاصله جغرافیایی نسبت به سایر جمعیت‌ها نظم بیشتری از نظر تشابه ژنتیکی آشکار می‌نمایند.

( $P > 0.05$ ). همچنین نمودار PCoA ترسیم‌شده (شکل ۶) برای ۲۱۶ توالی مذکور با تقسیم‌بندی جمعیتی به هفت جمعیت نروژ، ایران، ترکیه، روسیه، چک، اسپانیا، صربستان نشان می‌دهد که جمعیت‌های متعلق به ترکیه در عین حال که به لحاظ ژنتیکی به جمعیت‌های منطقه ایران و روسیه و چک نزدیکتر می‌باشد، از سایر جمعیت‌ها به صورت مجزا قرار گرفته است. براساس مؤلفه یک جمعیت‌های روسیه، چک و صربستان از سایر جمعیت‌ها جدا شده‌اند ولی در



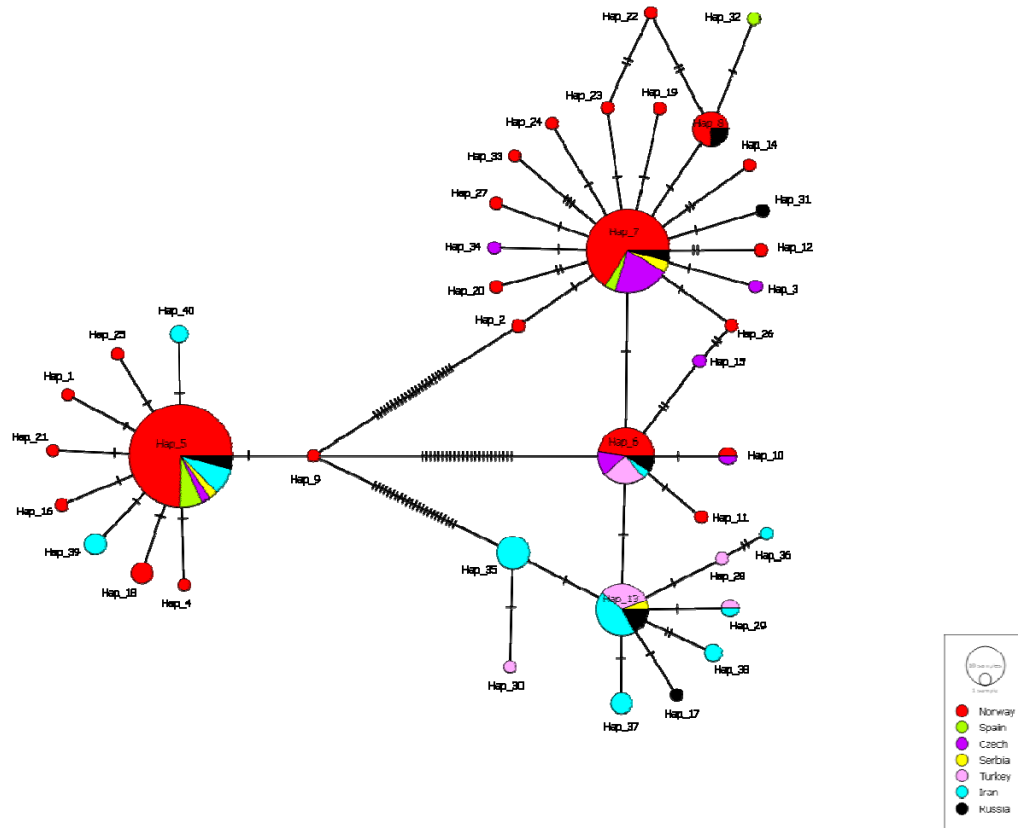
شکل ۳- درخت تبارشناختی ژن میتوکندریایی COI حاصل از تحلیل بی‌زین مربوط به ۲۱۶ نمونه از بعضی نواحی در منطقه پالتارکتیک

## بحث و نتیجه‌گیری

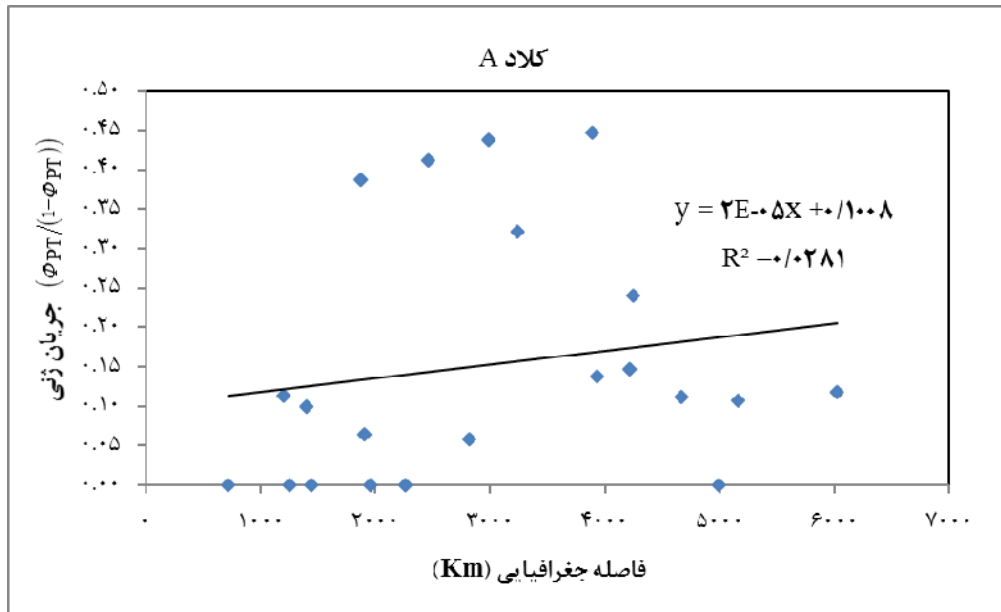
را نشان داد و دو هاپلوگروپ هم‌جا با بوت استرپ بالا برای این گونه تأیید شد که با نتایج ما بر روی دم‌سرخ‌های ایران در محاسبه میانگین فاصله ژنتیکی ۵/۰۹ و وجود دو هاپلوگروپ هم‌جا مطابقت داشت.

مطالعه جانسن و همکاران (۲۲) واگرایی درون‌گونه‌ای ۵/۰۸٪ در ژن‌های میتوکندریایی COI، در دم‌سرخ معمولی

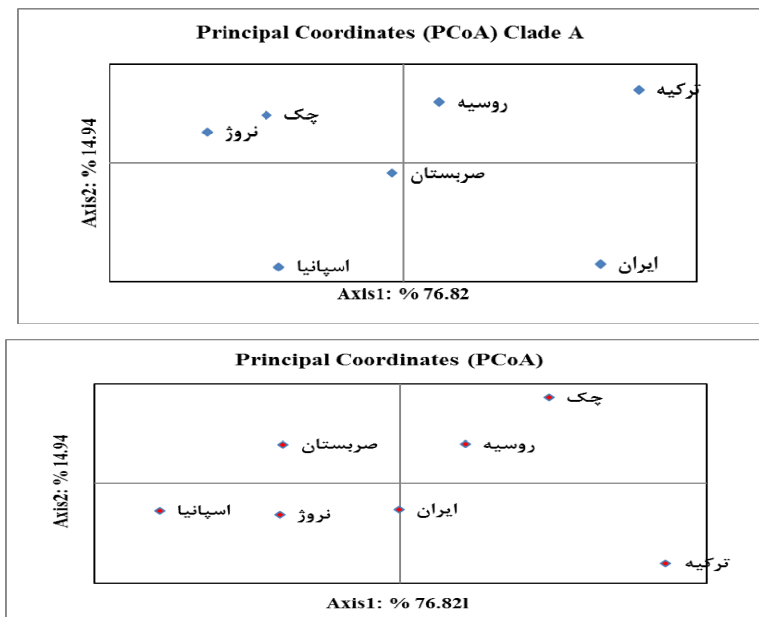




شکل ۴- شبکه هاپلوتایپی ترسیم شده برای نمونه‌های ایران و برخی مناطق پراکنش دم‌سرخ معمولی در پالئارکتیک. اندازه هر دایره طبق مقیاس نشان‌دهنده نمونه‌های داخل آن هاپلوتایپ است و خطوط تیره بین هاپلوتایپ‌ها نشان‌دهنده موتاسیون می‌باشد. هاپلوتایپ‌های مربوط به کلاد A در سمت راست و کلاد B در سمت چپ قرار گرفته‌اند.



شکل ۵- رابطه بین فاصله جغرافیایی (GDD) و میزان جریان ژن (Fst) در هفت جمعیت مورد مطالعه از دم‌سرخ معمولی موجود در کلاد A ( $y=2E-05X + 0.1008$  و  $R^2=0.281$ )



شکل ۶ - تحلیل مختصات اصلی (PCoA) ترسیم شده برای نمونه‌های متعلق به هفت جمعیت موجود در کلاد A و تمام جمعیت‌های هر دو کلاد

اگرچه این کاهش در مقایسه با برخی گونه‌ها بسیار ملایم می‌باشد. برای مثال در مقایسه با دیگر گنجشک‌سانان گفتنی است تغییرات *Fst* با واریانس کمتر برای نوعی سسک تا ۵ برابر به ازای فاصله ۶۰۰۰ کیلومتر نشان داده شده (۱۵). اگرچه به دلیل پایین بودن ضریب رگرسیون و عدم معنی‌داری مقدار P-value این کاهش به لحاظ آماری معنی‌دار تلقی نمی‌شود. وسعت پراکنش نمونه‌ها در بیش از ۶۰۰۰ کیلومتر طول جغرافیایی و عدم یکنواختی مسیرهای مهاجرتی می‌تواند باعث پراکنندگی ابر نقاط داده‌ها شده باشد. این تفاوت به‌قدری بالاست که در صورت تلفیق افراد درون دو کلاد در یک نمودار جهت شیب معکوس می‌گردد. برخی مطالعات نشان می‌دهد به دلیل جابجایی سالانه نرها و عدم تعلق آنها بین زیستگاه‌های مجاور یک بی‌نظمی در روند جریان ژن حاصل می‌شود که به‌مرور زمان نتیجه آن بصورت پراکنش نامنظم نقاط در نمودار شیب ژنتیکی دیده می‌شود (۲۴). این احتمال وجود دارد که شیب ژنتیکی در ماده‌ها در جهت طول جغرافیایی روند معنی‌دارتری را نمایش دهد. در تحلیل PCoA برای روسیه

هاگنر و همکاران (۱۹) برای کل محدوده دم‌سرخ معمولی در پالئارکتیک، توسط دو ژن میتوکندریایی *COI* و *CR* و هاپلوگروپ مجزا ترسیم کردند. که میزان واگرایی بدست آمده در این مطالعه کمتر از میزان واگرایی بدست آمده در مطالعه ما می‌باشد. در پرندگان دارای پراکنش هم‌جا، واگرایی درون‌گونه‌ای زیادی در ژنوم میتوکندریایی در تعدادی از گونه‌ها دیده شده است (۳۰، ۲۳، ۲۲، ۳۴ و ۴). کر و همکاران (۲۳) نیز در نتایج تحقیق خود به واگرایی درون‌گونه‌ای بالا به‌صورت هم‌جا در گونه دیگری از گنجشک‌سانان آمریکای جنوبی رسیدند که برابر با ۳/۵٪ بود. واگرایی درون‌گونه‌ای بالا به‌صورت هم‌جا تنها در راسته گنجشک‌سانان مشاهده نمی‌شود. سابق بر این نیز دو کلاد مجزا با واگرایی ۶/۷٪ را برای غاز برفی (*Chen caerulescens caerulescens*) در ژن میتوکندریایی *CR* تأیید شده بود (۳۰).

مثبت بودن نمودار شیب تغییرات ژنتیکی نشان می‌دهد با افزایش فاصله بین مکان‌های زادآوری دم‌سرخ‌ها مطابق انتظار از میزان درون آمیزی جمعیت‌ها کاسته می‌شود

مجاور به هم به‌منظور جوجه‌آوری اشغال می‌کنند. در درخت مولکولی این مطالعه دم‌سرخ‌های جوجه‌آور اغلب کشورها افرادی در دو کلاد مجزا تحت پوشش قرار می‌گیرند اما به نظر می‌رسد مسیرهای شمال خاورمیانه که شامل ترکیه و ایران می‌باشد از یکدستی بیشتری در گروه کلادی برخوردارند. شواهد این موضوع در نمودار PCoA بین جمعیت ترکیه و ایران مشاهده می‌شود که این بدین معنی است که دم‌سرخ‌های مهاجر به ایران و ترکیه از مناطق زمستان‌گذران نزدیک به هم برخوردار باشند. مطلبی که احتمالاً برای دم‌سرخ‌های غرب پالئارکتیک در کشورهای اروپایی نیز به طور مشابهی مشاهده می‌شود.

و صربستان تفاوت‌هایی دیده می‌شود. تفاوت زیستگاه از طول‌های شرقی (روسیه) به سمت غرب (صربستان) همراه با تغییراتی در تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها همراه بوده است که هم‌جهت با نروژ و اسپانیا می‌باشد. نقشه‌های عمومی مسیرهای مهاجرت برای پرندگان تابستان‌گذران در بخش‌های اروپایی پالئارکتیک اغلب مسیرهای مشترک و مکان‌های زمستان‌گذران مجاور به هم را نشان می‌دهد. این وضعیت برای شمال شرق پالئارکتیک متفاوت از منطقه اروپایی آن است، زیرا به نظر می‌رسد گروه‌های دم‌سرخ معمولی پس از عبور از شمال آفریقا و ورود به بخش‌های اروپایی مسیر مهاجرت خود در ادامه راه از یکدیگر اشتقاق یافته و زیستگاه‌های متفاوتی را در کشورهای اروپایی

## منابع

- ۱- شهابی، س.، درویش، ج.، و علی‌آبادیان، م.، ۱۳۹۲. بررسی وضعیت آرایه شناختی و تبارزانی جمعیت‌های جنس زیبا موش (*Calomyscus*) در فلات ایران با استفاده از داده‌های ژن میتوکندریایی *COI*، مجله پژوهش‌های جانوری، ۲(۶)، صفحات ۱۷۰-۱۶۳.
- ۲- رجیبی مهام، ح.، و عزیزی، و.، ۱۳۹۲. بررسی فیلوژغرافیایی موش مقدونیه (*Mus macedonicus petrov & Ruzic, 1983*) در شمال غرب ایران، مجله پژوهش‌های جانوری، ۲(۶)، ۳، صفحات ۲۹۷-۲۸۹.
3. Avise, J.C., 2000. Phylogeography. Harvard Univ. press, Cambridge, Massachusetts London, England, PP: 453.
4. Barrowclough, G.F., Groth, J.G., Odom, K.J., and Lai, J.E., 2011. Phylogeography of the barred owl (*Strix varia*): species limits, multiple refugia, and range expansion. *Auk*, 128, PP: 696-706.
5. Bradley, R.D., and Baker, R.J., 2001. A test of the genetic species concept: cytochrome b sequences and mammals. *Journal of Mammalogy*, 82, PP: 960-973.
6. Bruford, M.W., Hanotte, O., Brookfield, J.F.Y., and Burke, T., 1992. Single-locus and multilocus DNA fingerprinting In: Molecular genetic analysis of populations: a practical approach (ed. Hoelzel, A. R.), Oxford University Press, New York, PP: 225-269.
7. Burfield, I., Van Bommel, F., Gallo-Orsi, U., Nagy, S., Orhun, C., Pople, R.G., van Zoest, R., and Callaghan, D., 2004. Birds in Europe: population estimates, trends and conservation status: Bird Life International Cambridge.
8. Carr, C.M., Hardy, S.M., Brown, T.M., Macdonald, T.A., and Hebert, P.D., 2011. A tri-oceanic perspective: DNA barcoding reveals geographic structure and cryptic diversity in Canadian polychaetes. *PLoS One*, 6(7), e22232 p.
9. Clare, E.L., Kim, B.K., Fenton, M.B., and Hebert, P.D.N., 2011. Neotropical bats: estimating species diversity with DNA barcodes. *PLOS One*, 6, e22648 p.
10. Del Hoyo, J., Elliott, A., and Christie, D.A. eds., 2005. Handbook of the Birds of the World, Vol (10), Cuckoo-Shrikes to Thrushes, Lynx Edicions, Barcelona, PP: 895.
11. De Queiroz, K., 2007. Species concepts and species delimitation, *Systematic biology*, 56(6), PP: 879-886.
12. Dinca, V., Zakharov, E.V., Hebert, P.D.N., Vila, R., 2011. Complete DNA barcode reference library for a country's butterfly fauna reveals high performance for temperate Europe. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278, PP: 347-355.

13. Dickinson, E.C., and Chistdis, E., 2014. The Howard & Moore Coluplete checklist of the birds of the World, Vol (2): Passerines, Aves Press, Eastbourne, PP: 461.
14. Dobzhansky, T., 1937. Genetics and the origin of species. Columbia University Press, New York, PP: 364.
15. Gibbs, H.L., Dawson, R.J., and Hobson, K.A., 2000. Limited differentiation in microsatellite DNA variation among northern populations of the yellow warbler: evidence for male-biased gene flow. *Molecular Ecology*, 9, PP: 2137-2147.
16. Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, PP: 95-98.
17. Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., and Dewaard, J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes, *Proceedings, Biological sciences / The Royal Society*, 270(1512), PP: 313-321.
18. Hebert, P.D.N., Stoeckle, M.Y., Zemlak, T.S., and Francis, C.M., 2004. Identification of Birds through DNA Barcodes, *PLoS biology*, 2(10), PP: 1657-1663.
19. Hogner, S., Laskemoen, T., Lifjeld, J.T., Porkert, J., Keleven, O., Albayrak, T., Kabasakal, B., and Johnsen, A., 2012. Deep sympatric mitochondrial divergence without reproductive isolation in the common redstart *Phoenicurus phoenicurus*, *Ecology and evolution*, 2(12), PP: 2974-2988.
20. Huelsenbeck, J.P., and Ronquist, F., 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17(8), PP: 754-755.
21. Hull, D.L., 1977. The ontological status of species as evolutionary units, in *Foundational problems in the special sciences* (R. Butts and J. Hintikka, eds). D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holland. PP: 91-102.
22. Johnsen, A., Rindal, E., and Ericson, P., 2010. DNA barcoding of Scandinavian birds reveals divergent lineages in trans-Atlantic species. *Journal of Ornithology*, 151(3), PP: 565-578.
23. Kerr, K.C.R., Lijtmaer, D.A., Barreira, A.S., Hebert, P.D.N., and Tubaro, P.L., 2009. Probing evolutionary patterns in Neotropical Birds through DNA barcodes, *PLoS ONE*, 4, e4379 p.
24. Kerth, G., Mayer, F., and König, B., 2000. Mitochondrial DNA (mtDNA) reveals that female Bechstein's bats live in closed societies. *Molecular Ecology*, 9, PP: 793-800.
25. Leigh, J.W., and Bryant, D., 2015. PopART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9), PP: 1110-1116.
26. Lewontin, R.C., 1974. *The Genetic Basis of Evolutionary Change*. Columbia University Press, New York, PP: 346.
27. Mayr, E., 1942. *Systematics and the origin of species from the viewpoint of a zoologist*. Columbia Press: New York University, PP: 372.
28. Park, H.Y., Yoo, H.S., Jung, G., and Kim, C.B., 2011. New DNA barcodes for identification of Korean birds, *Genes & Genomics*, 33(2), PP: 91-95.
29. Peakall, R.O.D., and Smouse, P. E., 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research, *Molecular ecology notes*, 6(1), PP: 288-295.
30. Quinn, T.W., 1992. The genetic legacy of Mother Goose- phylogeographic patterns of lesser snow goose (*Chen caerulescens caerulescens*) maternal lineage. *Molecular Ecology*, 1, PP: 105-117.
31. Rohlf, R.J., 1993. NTSYS-PC. Numerical Taxonomy and Multivariate Analyses System, Version 1.8. Setauket, New York, PP: 7.
32. Sites, J.W., and Marshall, J.C., 2003. Delimiting species, a Renaissance issue in systematic biology, *Trends in Ecology & Evolution*, 18(9), PP: 462-470.
33. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), PP: 2725-2729.
34. Webb, W.C., Marzluff, J.M., and Omland, K.E., 2011. Random interbreeding between cryptic lineages of the common Raven: evidence for speciation in reverse, *Molecular Ecology*, 20, PP: 2390-2402.

## Intraspecific changes in common redstart (*Phoenicurus phoenicurus*) in distributional range from Iran to west Palearctic using *COI* biomarker

Nasiri Z.<sup>1</sup>, Ghasempouri S.M.<sup>1</sup> and Aliabadian M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Environmental Science Dept., Faculty of Natural Resources & Marine Sciences, Tarbiat Modares University (TMU), Noor, I.R. of Iran

<sup>2</sup> Biology Dept., Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R. of Iran

### Abstract

Some species exhibited a rare intraspecific genetic variation and high morphological changes. Common redstart (Common Redstart) is one of birds with an intraspecific variation above threshold for both subspecies in geographical area of distribution. Two different lineages of *COI* gene were already visible. The aim of this study was to investigate intraspecific changes in redstart regarding geographical distance and the effect of divergence within species, genetic slope and phylogeography situation. In the spring of 2014 and 2015, samples were collected from breeding areas and PCR samples were analyzed with gene banks sequence together. Results of Bayesian tree, confirmed two main isolated clades with Bootstrap 100 for *COI* gene. Haplotype network approved the separated clades formed in phylogeny tree separately. But separated Haplogroup which observed within the network not supported based on geographic region of haplotypes. The graph of gene flow versus geographical distance, although a positive trend graph shows a decrease in violent exchange for increased distance, but according to the regression coefficient  $R^2 = 0.30$ , geographical distance as an independent variable on the genetic distance effect had no significant ( $P > 0.05$ ). Also, PCoA results show population of Turkey is closer to Iran, Czech and Russia, but separated from other population. Banding recovery need to solve some questions.

**Key words:** Intraspecific changes, common redstart, Haplotype network, GD/GDD, PCoA