



<https://ui.ac.ir/en>

Journal of Taxonomy and Biosystematics
E-ISSN: 2322-2190
Document Type: Research Paper
Vol. 13, Issue 1, No.46, Spring 2021, P:1
Received: 13/12/2020 Accepted: 13/03/2021

Genealogy of Lesser Whitethroat Subspecies (*Sylvia Curruca Halimodendri*) in Qeshm Island Using a Systematic Molecular Approach

Hadi Pourmosa Sheikhalikalayeh

Ph .D. Student, Department of Environmental Sciences, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences,
Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
hadi_pourmosa@modares.ac.ir

Seyed Mahmoud Ghasempouri

*Corresponding author: Assistant Professor, Department of Environmental Sciences, Faculty of Natural Resources
and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
ghasempm@modares.ac.ir

Abstract

The genealogy of songbirds has long been considered. In the present study, the *cytb* mitochondrial marker was used in one of the southernmost regions of its distribution in Iran to identify the lesser whitethroat subspecies (*Sylvia curruca*). Comparing the sequences obtained from the Qeshm Island specimens with the Gene Bank, it was found that this array in southern Iran is considered as *halimodendri*, which ultimately reflects the cladistic status of the lesser whitethroats of Qeshm Island in southern Hormozgan as a study area not established in Iran. Also, with a systematic molecular approach and using genealogical analysis, it was found that this subspecies had two distinct groups and haplotypes with the highest value relative to the index taxa of this species (i.e. *curruca*). The Qeshm Island specimens were divided into two clades due to genetic distance and phylogenetic trees. The results of the study also indicated that these two clades formed in Qeshm Island had major differences, which could be linked to the separation of migration routes and breeding areas in the northern habitats.

Key words: Genealogy, Lesser Whitethroat, Molecular Systematics, Qeshm, Subspecies.

تاکسونومی و بیوسیستماتیک، سال سیزدهم، شماره چهل و ششم، بهار ۱۴۰۰، صفحه ۱۶-۱

نوع مقاله: پژوهشی

پذیرش نهایی: ۱۳۹۹/۱۲/۲۳

دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۹/۲۳

تبارشناسی زیرگونه سسک گلوسفید کوچک (*Sylvia curruca halimodendri*) جزیره قشم با رویکرد سیستماتیک مولکولی

هادی پورموسی شیخعلی کلایه، دانشجوی دکتری گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس،

ایران

hadi_pourmosa@modares.ac.ir

سید محمود قاسمپوری*، استادیار گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، ایران (مسوول

مکاتبات) ghasempm@modares.ac.ir

چکیده

به تبارشناسی پرندگان آوازه‌خوان از دیرباز بسیار توجه شده است. در این مطالعه، از نشانگر میتوکندریایی cytb به منظور شناخت جایگاه آرایه‌شناختی زیرگونه سسک گلوسفید کوچک (*Sylvia curruca*) در یکی از جنوبی‌ترین مناطق پراکنش آن در ایران استفاده شده است. از مقایسه توالی‌های به دست آمده از نمونه‌های جزیره قشم با بانک ژن، مشخص شد این آرایه در جنوب ایران با نام *halimodendri* قلمداد می‌شود و در نهایت، وضعیت کلادیستیک سسک‌های جزیره قشم در جنوب هرمزگان، در جایگاه منطقه‌ای مطالعه‌نشده در ایران مشخص شد؛ همچنین با رویکرد سیستماتیک مولکولی و با استفاده از تحلیل‌های تبارشناسی مشخص شد این زیرگونه، دو کلاد و هاپلوتایپ جداگانه با بیشترین گره تکاملی نسبت به آرایه شاخص این گونه، یعنی *curruca*، را به خود اختصاص می‌دهد. تجزیه و تحلیل‌های فاصله ژنتیکی و درخت‌های تبارشناسی، ضمن جای دادن سسک‌های جزیره قشم در دو کلاد جدا از هم، نشان داد این تفاوت در دو نوکلئوتید شماره ۴۳۵ و ۴۳۸ بارز می‌شود. این تفاوت‌ها در دو کلاد تشکیل شده از جزیره قشم وجود دارد که ممکن است ناشی از تفرق مسیرهای مهاجرتی و مکان‌های مجزای زادآوری در زیستگاه‌های شمالی باشد.

واژه‌های کلیدی: تبارشناسی، سسک گلوسفید کوچک، سیستماتیک مولکولی، قشم، زیرگونه.

مقدمه

گونه شناخته شده در جهان است (Gill and Donsker, 2018). خانواده سسک‌ها (Sylviidae) از راسته گنجشک‌سانان یکی از خانواده‌هایی است که به دلیل شباهت‌های ریختی زیاد، ابهامات متعددی در شناسایی و طبقه‌بندی آنها وجود دارد. طبق چک لیست

رده پرندگان یکی از بزرگ‌ترین رده‌های جانوری با بیش از ۱۰ هزار گونه شناخته شده است. راسته گنجشک‌سانان (Passeriformes) بزرگ‌ترین راسته از رده پرندگان با بیش از ۱۴۰ خانواده و بیش از ۶۵۰۰

است که DNA میتوکندری بارها برای مطالعه و بازبینی روابط فیلوژنتیک در گروه‌های متفاوت جانوری استفاده شده است. ژن‌های میتوکندریایی به مراتب سریع‌تر از ژن‌های هسته‌ای تکامل می‌یابند؛ در نتیجه توانایی بیشتری برای نشان دادن تفاوت‌های موجود بین تاکسون‌های نزدیک دارند (Aliabadian *et al.*, 2012). به‌طور معمول از این ژن‌ها به منظور نشان دادن واگرایی بین جمعیت‌هایی که برای دوره زمانی به نسبت کوتاهی از یکدیگر جدا شده‌اند، استفاده می‌شود. پیشرفت در روش‌های مولکولی، دسترسی به نشانگرهای مختلف DNA را افزایش داده و آنها را به ابزارهای مناسبی در مطالعات حفاظت ژنتیکی و تنوع زیستی مبدل کرده است (Avise, 2006; Haig, 2008)؛ بنابراین استفاده از داده‌های ژنتیکی یک گروه از گونه‌ها در جایگاه راهکاری مفید در علم زیست‌شناسی حفاظت شناخته شده است که در این بین داده‌های ژنتیکی موجود در میتوکندری، یکی از ابزارها برای بررسی تبارزایی حیات وحش به شمار می‌رود (Batista *et al.*, 2011). از بین ژن‌های موجود در DNA میتوکندریایی، ژن‌های سیتوکروم b از دسته ژن‌های کدکننده پروتئین هستند که سریع‌تر تکامل می‌یابند و این امر باعث شده است در جایگاه ابزاری برای سنجش تاریخ تکاملی در سطوح پایین از قبیل جنس، گونه و حتی زیرگونه برای بیشتر مهره‌داران به‌ویژه پرندگان استفاده شوند (Johns and Avise, 1998). به‌طور کلی، شناسایی سسک‌ها به دلیل شباهت ظاهری زیاد برای پرندگان و پرندشناسان دشوار است؛ بنابراین مطالعه حاضر به دلیل نبود شناخت کافی و به تبع آن طبقه‌بندی‌های متعددی که در مقیاس جهانی با تردید روبه‌رو هستند، با هدف شناسایی و طبقه‌بندی

Clements، از معتبرترین چک‌لیست‌های طبقه‌بندی پرندگان، ۹۹ آرایه از خانواده سسک‌ها تاکنون شناسایی شده است (Clements *et al.*, 2019). سسک گلوسفید کوچک (*Sylvia curruca*) که نخستین بار در سال ۱۷۵۸ توسط Carl Linné توصیف شد، یکی از اعضای جنس *Sylvia* است که شباهت زیاد این گونه با سایر اعضای این جنس و تغییرات تدریجی به صورت کشانه (cline)، بررسی وضعیت آرایه‌شناسی این گونه را بسیار دشوار و پیچیده کرده است؛ به طوری که بسیاری از پرندشناسان این آرایه را گونه‌ای چندسنخی می‌دانند که در بردارنده زیرگونه‌های مختلفی است (Del Hoyo *et al.*, 1992; Loskot, 2005). این گونه در فهرست پرندگان حمایت‌شده جهانی قرار ندارد؛ اما وضعیت رده‌بندی آن تا حد زیادی مبهم و پیچیده است. زیرگونه‌های احتمالی آن در مناطق مختلف ممکن است یکی از زیرگونه‌های *S.c.althaea*، *S.c.curruca*، *S.c.minula*، *S.c.blythi*، *S.c.halimodendri* و *S.c.margelanica* یا حتی *S.c.zagrossiensis* (Abdlizadeh *et al.*, 2013; 2020). این پرندگان کوچک جثه به واسطه ارتباط‌هایی که با یکدیگر دارند، این پتانسیل را دارند که به‌طور دائم، تغییراتی در ژنتیک و همین‌طور ریخت‌شناسی آنها رخ دهد (Böhning-Gaese *et al.*, 2003)؛ به همین دلیل مطالعه تبارشناسی گونه سسک گلوسفید کوچک از نظر گونه‌زایی حائز اهمیت است (Olsson *et al.*, 2013). پژوهش‌های تبارشناسی اهمیت زیادی در توسعه علم بیوسستماتیک دارد و پیشرفت‌های صورت گرفته در تبارزایی مولکولی، زمینه‌ساز طبقه‌بندی‌های مختلفی از موجودات زنده شده است (Mayr, 1968). گفتنی

بخشی از ابهامات مربوط به جایگاه کلادیستیک این گونه به طور تقریبی رفع شده است (Abdilizadeh *et al.*, 2019, 2020)؛ اما یکی از جنوبی ترین ناحیه های پراکنش گونه سسک گلوسفید کوچک در ایران که شامل جزیره قشم می شود، همچنان با ابهاماتی در جایگاه آرایه شناسی گونه یا زیرگونه های این منطقه مواجه است. هدف از انجام این مطالعه، پاسخ به این پرسش است که زیرگونه سسک مطالعه شده به طور دقیق در کدام کلاد طبقاتی از آرایه سسک ها قرار می گیرد؛ به عبارتی دیگر این زیرگونه در جزیره قشم *minula* است یا *halimodendri* و در صورت اثبات دومی، همگی یک منشأ تولید مثل دارند یا خیر.

مواد و روش ها

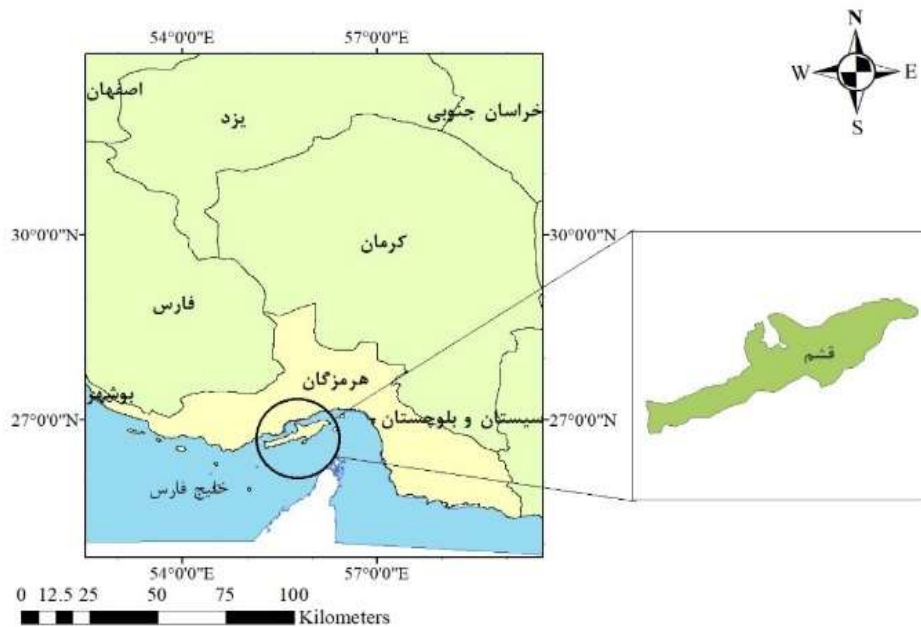
معرفی محدوده مطالعاتی

منطقه مطالعه شده در این پژوهش شامل یکی از جنوبی ترین مناطق پراکنش گروه گونه ای سسک گلوسفید کوچک در ایران است که در جزیره قشم زیست می کند. جزیره قشم با طول تقریبی ۱۳۵ کیلومتر و عرض ۴۰ کیلومتر با وسعتی حدود ۱۴۹۱ کیلومتر مربع از جنوبی ترین گستره های زیستگاهی سسک گلوسفید کوچک در دنیا است که منطقه ای مطالعه نشده برای این گونه محسوب می شود (شکل ۱). اگرچه تاکنون شواهدی از تولید مثل این گونه در جزیره قشم مشاهده نشده است، با توجه به مناطق مرتفع در نزدیک ترین نقطه از فلات ایران از جزیره قشم (ارتفاعات شهر بابک) امکان مشاهده آن منتفی نیست.

گونه سسک گلوسفید کوچک در یکی از جنوبی ترین نواحی پراکنش آن در دنیا و در جنوبی ترین ناحیه پراکنش این گونه در ایران انجام شد. یکی از راههای حفاظت از تنوع زیستی و حیات وحش، شناخت دقیق گونه ها است؛ زیرا شناخت گونه ها به برنامه ریزی های محیط زیست در قالب حفاظت هر چه بهتر از گونه ها سامان می بخشد و با شناخت دقیق زیرگونه ها در جای جای کشور پهناور ایران، گامی مثبت برای شناساندن هر چه بیشتر غنای گونه ای ایران کهن به جهان برداشته می شود.

Blondel و همکاران (1996) یکی از نخستین مطالعات درباره طبقه بندی خانواده سسک ها را انجام و سسک ها را در سه گروه گونه ای شرق مدیترانه، مرکز مدیترانه و غرب مدیترانه جای دادند. مطالعه دیگری توسط Brambilla و همکاران (2008) روی گروه گونه ای *Sylvia cantillans* در حوزه مدیترانه انجام شد. Olsson و همکاران (2013) مطالعه جامعی براساس داده های چهار ژن *cytb*، *brm(z)*، *myo(a)* و *odc(a)* در کل محدوده پراکنش این گونه با استفاده از ۲۱۳ فرد از جنس سسک گلوسفید کوچک انجام دادند.

طبق آخرین مطالعات صورت گرفته، محدوده پراکنش گونه سسک گلوسفید کوچک شامل محدوده ای از غرب پالتارکتیک تا شرق روسیه، قسمت های وسیعی از فلات تبت به همراه بخش هایی از هند و چین، ایندومالایا و فلات آناتولی و یکی از جنوبی ترین محدوده پراکنش آن در قشم و کویر لوت می شود (Olsson *et al.*, 2013). از مناطق پراکنش گونه سسک گلوسفید کوچک در ایران و جهان،



شکل ۱- منطقه مطالعه شده برای بررسی سسک گلوسفید کوچک

کوچک جنس نر یا ماده زنده گیری شد (شکل ۲).
مختصات جغرافیایی محل های نمونه گیری در جدول ۱
مشخص شده است.

عملیات میدانی

در منطقه مطالعه شده، جمع آوری نمونه ها به صورت
به طور کامل تصادفی با استفاده از تور زنده گیری
پرندگان انجام و تعداد ۳۳ نمونه از سسک گلوسفید



شکل ۲- نمونه گیری سسک گلوسفید کوچک با استفاده از تور زنده گیری

جدول ۱- مختصات نقاط نمونه‌گیری سسک گلوسفید کوچک در جزیره قشم

ایستگاه نمونه‌گیری	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی
۱	" E۲۳ ۱۸' ۵۵°	" N۳۹ ۳۷' ۲۶°
۲	" E۰۴ ۲۸' ۵۵°	" N۴۲ ۳۹' ۲۹°
۳	" E۵۶ ۳۸' ۵۵°	" N۱۹ ۴۴' ۲۶°
۴	" E۱۰ ۴۹' ۵۵°	" N۴۶ ۴۹' ۲۶°

محلول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب (بن‌ماری) با دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. به میکروتیوب‌ها به نسبت ۱:۲۴:۲۵ فنل - کلروفورم ایزوآمیل (درمجموع ۵۰۰ میکرولیتر) افزوده و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰rpm سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، محلول رویی به میکروتیوب استریل شده دیگری منتقل و به آن ۲۵۰ میکرولیتر کلروفورم ایزوآمیل اضافه شد. بعد از سانتریفیوژ دوباره محلول به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰rpm و برداشتن محلول رویی و ریختن آن در میکروتیوبی جدید، مقدار ۴۰۰ میکرولیتر اتانول مطلق سرد اضافه شد و پس از تکرار سانتریفیوژ، DNA در کف میکروتیوب رسوب کرد. پس از تخلیه محلول رویی از داخل میکروتیوب، مقدار ۷۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۵ درصد به‌منظور شستشوی DNA چسبیده به کف میکروتیوب اضافه و فرآیند سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰rpm و به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. پس از اتمام سانتریفیوژ، محلول رویی برداشته شد و میکروتیوب به‌صورت برعکس زیر هود قرار گرفت تا الکل آن از بین برود. درنهایت، ۴۵ میکرولیتر آب مقطر به میکروتیوب حاوی DNA افزوده و به‌منظور آزاد شدن DNA چسبیده به کف میکروتیوب، نمونه‌ها به مدت پنج دقیقه در بن‌ماری با دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. درنهایت، محلول حاصل در

علاوه بر خون‌گیری از نمونه‌ها (از زیر بال)، یک جفت شاهپر ثانویه به‌طور متقارن از بال‌های چپ و راست جدا شد؛ سپس ضمن جمع‌آوری پرهای به‌جای‌مانده در تور زنده‌گیری، پرنده در همان محل زنده‌گیری به طبیعت بازگردانده شد. با استفاده از زخم حاصل از نوک سرنگ انسولین، از سیاهرگ زیر بال به اندازه کمتر از یک میکرولیتر خون از پرنده گرفته شد (Seutin *et al.*, 1996). بعد از انجام خون‌گیری، نمونه‌های خون برای استخراج DNA، درون بافر کوئین به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه‌های پر نیز پس از خشک کردن در هوای آزاد به‌دلیل جلوگیری از قارچ‌زدگی در نایلون‌های استریل قرار داده و به همراه نمونه‌های خون برای انجام آزمایش‌های مولکولی به آزمایشگاه منتقل شد (Segelbacher, 2002).

روش‌های آزمایشگاهی

به‌منظور استخراج DNA از خون و همین‌طور پر، از روش فنل - کلروفورم استفاده شد (Ong and Vellayan, 2008). در استخراج با این روش ابتدا، در میکروتیوب مقداری خون یا پر پودر شده ریخته و دو مرحله سانتریفیوژ با دور ۵۰۰rpm انجام شد؛ سپس به این میکروتیوب مقدار ۵۰ میکرولیتر محلول ۱۰ درصد SDS، ۵۰۰ میکرولیتر بافر STE (Sodium Chloride, Tris, EDTA) و پنج میکرولیتر پروتیناز k افزوده شد.

میکرولیتراژ از DNA استخراج شده، ۱۲/۵ میکرولیتراژ مسترمیکس PCR (تولیدشده توسط شرکت Ampliqon)، از آغاز گره‌های رفت و برگشت هر کدام به اندازه ۱/۳ میکرولیتراژ و نه میکرولیتراژ آب دوبار تقطیر اضافه و میکروتیوب حاصل، با پروتوکول‌های دمایی ویژه و دمای اتصال ۵۶ درجه سانتی‌گراد در دستگاه PCR قرار داده شد.

در این مطالعه با اقتباس از پژوهش Olsson و همکاران (2013) از آغاز گره‌های اختصاصی زیر برای تکثیر قطعه cytb از mtDNA استفاده شد:

5'-CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3' F: L14841
5'-GCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3' R: H15149

تکثیر از خود نشان ندادند از آغاز گره‌های L14995 و H16065 در جایگاه آغاز گره‌های تکمیلی استفاده شد:

5'-CAACATCTCAGCATGATGAAACTTCG-3' F: L14995
5'-GGAGTCTTCAGTCTCTGGTTTACAAGAC-3' R: H16065

اتیدیم پروماید فاقد عوارض شناخته شده برای سلامتی انسان است (Voytas, 2000).

آنالیزهای مولکولی

به منظور توالی‌یابی محصول PCR از دستگاه DNA Sequencer استفاده شد. نمونه‌ها برای توالی‌یابی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال شد. این دستگاه قطعات DNA را به صورت یکجا و با روش موسوم به سانگر (Sanger) جدا می‌کند (Min et al., 2011). خروجی فایل‌ها در دو فرمت txt و ab1 دریافت شد.

یخچال و سپس در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (McKiernan and Anielson, 2017).

برای کنترل کمیت و کیفیت DNA استخراجی، از دستگاه نانودراپ (مدل Thermo 2000c) استفاده شد. دستگاه ابتدا با حلال استفاده شده در رقیق‌سازی DNA، یعنی آب مقطر، کالیبره (Blank) شد. به منظور خوانش، مقدار دو میکرولیتراژ محلول DNA روی پروب دستگاه قرار داده و با کمک دستگاه نانودراپ، کمیت DNA استخراجی مشخص شد؛ سپس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر قطعات مشخصی از DNA استفاده شد. برای این منظور، داخل هر میکروتیوب مقدار یک

در ادامه، علاوه بر استفاده از آغاز گره‌های اشاره شده، برای آن دسته از نمونه‌هایی که موفقیت چندانی در

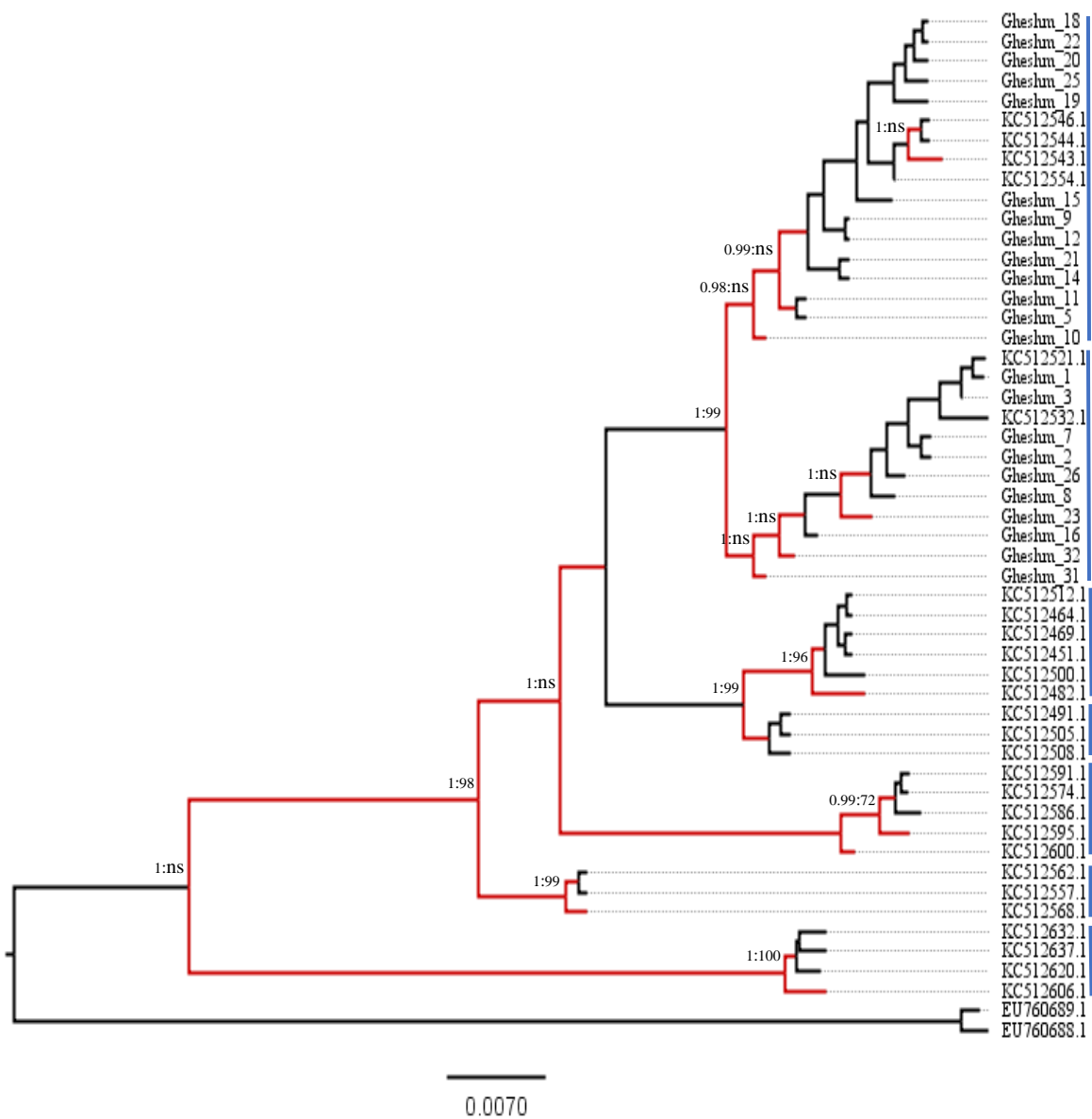
پس از مرحله آخر چرخه PCR (Close Loop)، محلول به مدت پنج دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده و محلول نهایی برای نگهداری به یخچال منتقل شد.

به منظور آنالیز کیفی محصولات PCR ابتدا، مقدار یک گرم آگارز در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و روی هیتر ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. ژل آگارز با مقدار یک میکرولیتر از رنگ Green Viewer رنگ آمیزی شد تا DNA در بستر رنگ آمیزی شده و تحت نور UV مشاهده شود. این ماده برخلاف

نتایج

در مطالعه حاضر از تعداد ۳۳ نمونه گرفته شده، ۳۲ استخراج و تکثیر موفق حاصل شد. در بررسی کمی و کیفی محصول استخراج نمونه‌ها با استفاده از نانودراپ، نسبت ۲۶۰/۲۸۰ اغلب بیشتر از ۱/۸ و نسبت ۲۶۰/۲۳۰ بیشتر از دو بود که نشان‌دهنده مزاحمت‌نداشتن پروتئین و کربوهیدرات‌ها از نمونه‌های موجود است؛ بنابراین توالی‌های ۳۲ نمونه پس انجام فرآیند PCR با دستگاه خوانش شد. از این تعداد، از نه نمونه به دلیل وجود گپ زیاد، اختلال یا آمیختگی نوکلئوتیدها و تعداد پایین نوکلئوتیدهای خوانش شده چشم‌پوشی و درنهایت، توالی‌های ۲۳ نمونه از قشم و ۲۹ توالی دانلودشده از بانک ژن، مرتب‌سازی شد. پس از مرتب‌سازی توالی‌ها، ۱۰۵۷ جفت نوکلئوتید از ناحیه *cytb* در جایگاه ورودی نهایی به منظور ترسیم درخت‌های تبارشناسی انتخاب شد. در این مطالعه، الگوی شاخه‌زایی هر دو نوع درخت تبارشناختی به طور تقریبی شبیه هم بود؛ به این معنی که زیرگونه‌های مختلف را به شکل مشابهی در کلادهای جداگانه جای دادند. تلفیق دو درخت نام‌برده به همراه احتمال پسین‌های مربوط به آنها در شکل ۳ نمایش داده شده است.

برای بررسی توالی‌ها، مرتب‌سازی، ویرایش و محاسبه فاصله ژنتیکی براساس مدل جایگزینی K2P، از نرم‌افزارهای BioEdit، MEGA-X و وبسایت Mafft تحت الگوریتم ماسل استفاده شد (Hall *et al.*, 2011; Katoh and standley, 2013; Kumar *et al.*, 2018). درنهایت، توالی‌های مرتب‌شده، برای ترسیم درخت‌ها و شبکه‌های پلوتایی استفاده و نوکلئوتیدهای عامل بروز تفاوت‌ها از بین توالی‌های مربوط به نمونه‌های سسک گلوسفید کوچک جزیره قشم جداسازی شد (جدول ۲). از آنجایی که انتخاب مدل تکاملی ویژه برای بلوک‌های دربرگیرنده داده‌های ژنتیکی ممکن است نتایج تحلیل‌های تبارشناختی را تغییر دهد، برای ترسیم درخت‌های احتمال بیشینه و بیزین، ابتدا بهترین مدل در نرم‌افزار jModeltest تعیین (TrN+I) و سپس در نرم‌افزارهای MEGA-X و MrBayes on XSEDE به ترتیب با پشتوانه‌های تکرار ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلیون بار تحت وبسایت CIPRES رسم شد (Sullivan and Joyce, 2005; Miller *et al.*, 2010). برای برون‌گروه از دو نمونه *Sylvia contilans* استفاده شد (Brambilla *et al.*, 2008). به منظور ترسیم شبکه‌های پلوتایی، از نرم‌افزار PopART 1.7 با استفاده از روش اتصال میانه و روش TCS بهره گرفته شد (Leigh and Bryant, 2015; Keis *et al.*, 2013).



شکل ۳- درخت نهایی ژن cytb برای سسک گلو سفید کوچک ایران و جهان به ترتیب BI:ML. درخت احتمال بیشینه با تکرار ۱۰۰۰ (معنی داری >۷۰) و درخت بیزین با تکرار ۱۰۰ میلیون (معنی داری >۰/۹۵) محاسبه شده و درج ns نشان دهنده معنی دار نبودن است.

جدایی دو کلاد اول در درخت بالا ممکن است به دلیل وجود تفاوت در نوکلئوتیدها و جایگاه آنها باشد (جدول ۲).

جدول ۲- تفاوت نوکلئوتیدهای موجود در دو کلاد مربوط به نمونه‌های قشم

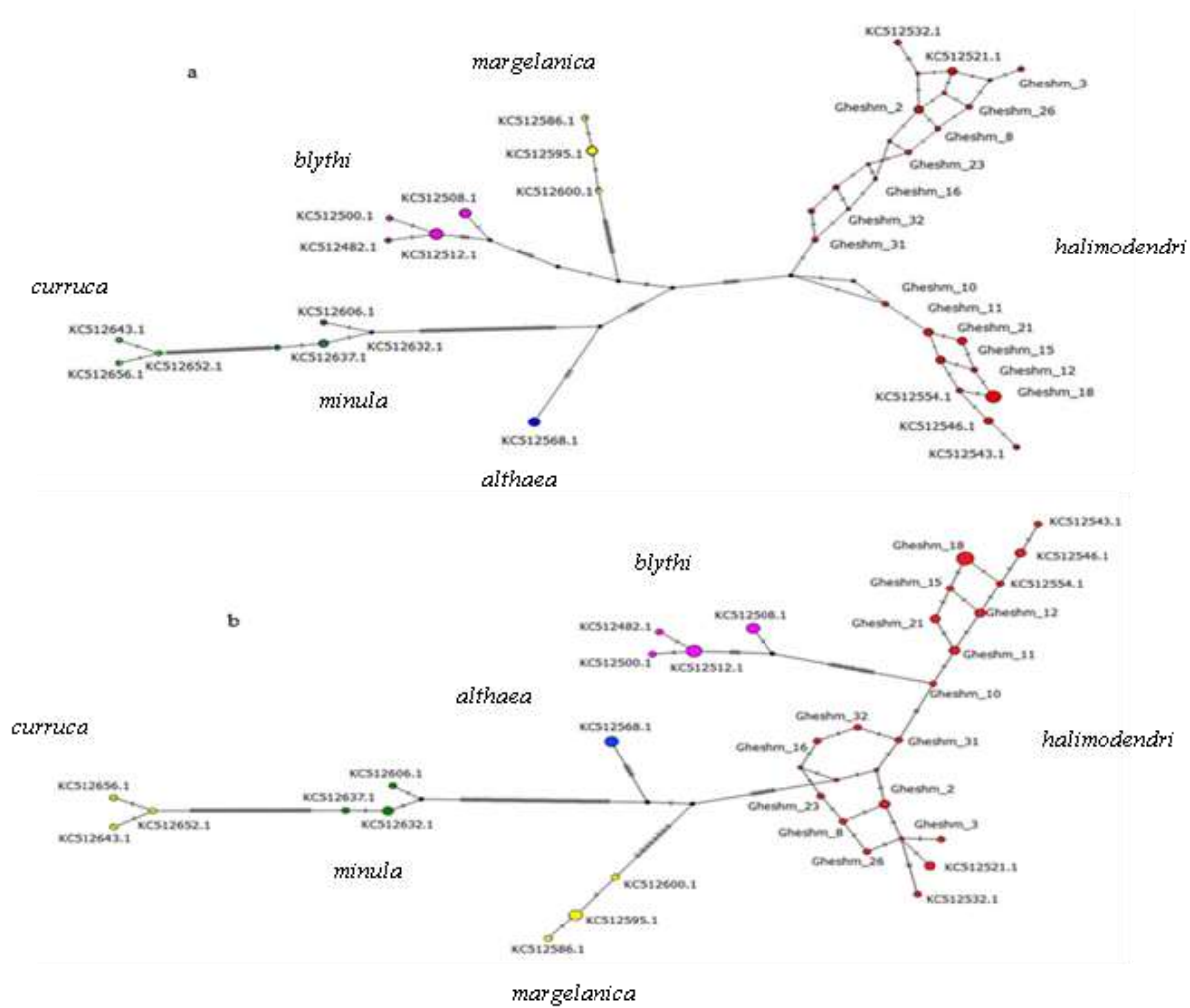
شماره نوکلئوتید										کلادها
۱۰۰۰	۷۹۵	۷۸۴	۶۳۳	۵۶۸	۵۴۹	۴۳۸	۴۳۵	۳۸۱	۳۴۹	
A	G	C	G	A	C	A	A	T	A	کلاد ۱
A	G	C	G	A	C	A	A	T	A	
A	G	C	G	A	C	A	A	T	A	
A	G	C	G	A	C	A	A	T	A	
A	G	C	G	A	C	A	A	T	A	
G	G	C	A	A	C	A	A	T	A	
G	G	C	A	A	C	A	A	T	A	
A	G	C	A	A	C	A	A	T	A	
A	G	T	A	A	C	A	A	T	A	
A	G	T	A	A	C	A	A	T	A	
G	G	T	A	A	C	A	A	T	A	
G	G	T	A	A	C	A	A	T	A	
G	G	T	A	A	C	A	A	C	A	
G	G	T	A	A	C	T	G	C	A	کلاد ۲
A	G	T	A	A	C	T	G	C	A	
A	G	C	A	A	C	T	G	C	A	
A	G	C	A	G	T	T	G	C	A	
A	A	T	A	A	T	T	G	C	G	
A	G	T	A	G	T	T	G	C	G	
A	G	C	A	G	T	T	G	C	G	
G	G	C	A	G	T	T	G	C	G	
G	G	C	A	G	T	T	G	C	G	
G	A	T	A	G	T	T	G	C	G	

میان و روش TCS محاسبه و ترسیم و از هر دو روش، نتایج به‌طور تقریبی مشابهی حاصل شد (جدول ۳، شکل ۴).

به‌منظور مشخص شدن تفاوت‌های ژنتیکی در بین زیرگونه‌های مختلف این گونه، فاصله ژنتیکی براساس مدل جایگزینی K2P و همین‌طور شبکه هاپلوتایپی با استفاده از نرم‌افزارهای مربوط با کمک روش اتصال

جدول ۳- ماتریس فاصله بین کلادهای درخت احتمال بیشینه براساس مدل جایگزینی انتخاب‌شده

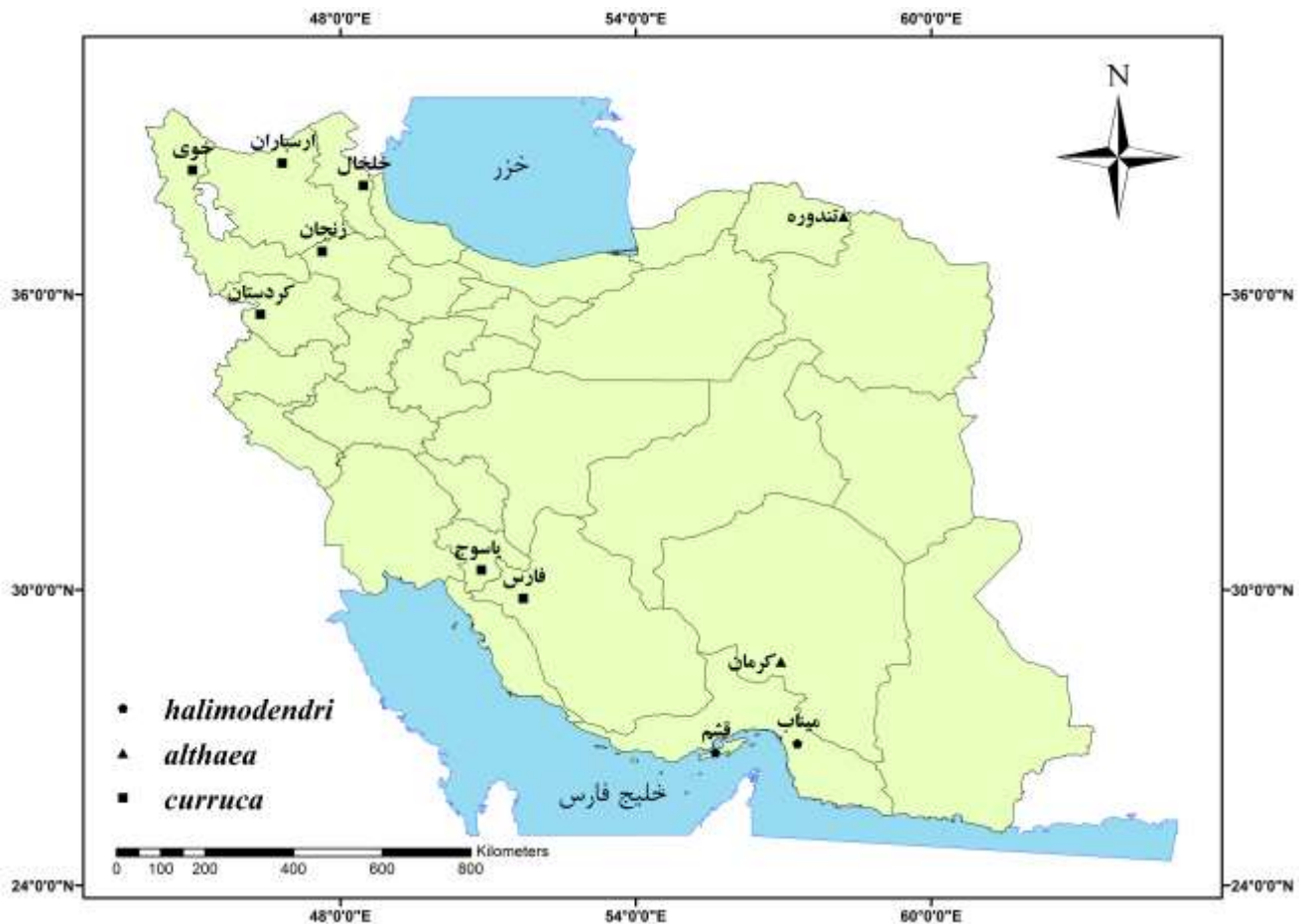
کلاد ۱	کلاد ۲	کلاد ۳	کلاد ۴	کلاد ۵	کلاد ۶	برون گروه
۰						کلاد ۱
۰/۰۰۷	۰					کلاد ۲
۰/۰۱۳	۰/۰۱۶	۰				کلاد ۳
۰/۰۱۵	۰/۰۱۷	۰/۰۰۳	۰			کلاد ۴
۰/۰۷۵	۰/۰۲۲	۰/۰۱۹	۰/۰۲۱	۰		کلاد ۵
۰/۰۱۳	۰/۰۱۵	۰/۰۱۲	۰/۰۱۴	۰/۰۱۸	۰	کلاد ۶
۰/۰۷۰	۰/۰۷۱	۰/۰۷۰	۰/۰۷۲	۰/۰۷۵	۰/۰۶۹	برون گروه



شکل ۴- شبکه هاپلوتایپی ترسیم شده از توالی‌های نهایی شده براساس دو مدل MJ (a) و TCS (b). خطوط عرضی معادل تعداد گره‌های تکاملی و رنگ‌های متفاوت نشان‌دهنده زیرگونه‌های مختلف است. قطر دایره‌ها بیانگر درصد فراوانی هاپلوتایپ‌ها است. به‌طور معمول با افزایش فاصله از قسمت مرکزی به حاشیه، گروه‌های اجدادی به سمت گروه‌های جدیدتر کشیده می‌شود.

در این پژوهش، نقاط پراکنش زیرگونه سسک گلوسفید کوچک جزیره قشم که به اسم زیرگونه‌های شناخته شده در ایران افزوده شد (شکل ۵).

در این پژوهش، نقاط پراکنش زیرگونه سسک گلوسفید کوچک جزیره قشم که به اسم



شکل ۵- نقاط پراکنش سسک گلوسفید کوچک جزیره قشم به همراه سایر زیرگونه‌ها در ایران (اقتباس از Abdilzadeh et al., 2019).

بحث

در مطالعات مختلف از درخت‌های تبارشناسی به منظور مشخص کردن جایگاه کلادیستیک گونه‌ها استفاده شده است. در مطالعه Olsson و همکاران (2013) براساس درخت‌های تبارشناسی شش کلاد مختلف از گروه گونه‌ای سسک گلوسفید کوچک تحت آرایه‌های *althaea halimodendri blythi* و *minula curruca smargelanica* به ثبت رسید. به طور کلی هر دو درخت بیزین و حداکثر احتمال، تا اندازه زیادی یکدیگر را تأیید کرده‌اند. براساس درخت بیزین، گروه گونه‌ای سسک گلوسفید کوچک در یکی از جنوبی‌ترین مناطق ایران به تنهایی دو کلاد جدا از هم با احتمال پسین یک را به نمایش گذاشته است و همه

آنها در مجاورت نمونه‌هایی از بانک ژن با نام *halimodendri* قرار گرفته‌اند؛ در نتیجه در جزیره قشم در فصل زمستان تا اوایل بهار سسک‌های زیرگونه *halimodendri* مربوط به مسیرهای مهاجرتی مختلف، از این زیستگاه برای اقامت بهره می‌برند؛ در عین حال با توجه به اینکه نمونه‌های KC512521 و KC512532 که در کلاد پایینی (کلاد ۲) قرار گرفتند، در قزاقستان تا شمال غرب منطقه Xinjiang در سرحدات مرزی چین تولید مثل دارند، به طور احتمالی ۱۰ نمونه از بین پرندگان مطالعه شده دارای منطقه تولید مثلی اشاره شده خواهند بود. در کلاد بالایی (کلاد ۱) درخت مولکولی نیز ۱۳ نمونه از سسک گلوسفید کوچک قشم به خوبی توالی‌یابی شد که به احتمال زیاد

(and Seibold, 1999). فاصله ژنتیکی بین زیرگونه‌های گونه سسک گلوسفید کوچک کم است (جدول ۳)؛ بنابراین نتیجه گرفته می‌شود که این زیرگونه‌ها در فاصله زمانی به‌طور تقریبی کوتاهی از یکدیگر جدا شده‌اند. در بین دو کلاد تشکیل شده از جزیره قشم، میزان فاصله ژنتیکی به‌طور تقریبی ۰/۰۰۷ است؛ یعنی اختلاف در بین این دو کلاد به نسبت کمتر از سایر کلادها است؛ پس سسک‌های قشم در مقیاس جهانی، هاپلوتایپی جدا را همراه با زیرگونه *halimodendri* تشکیل می‌دهند و اختلاف به نسبت بیشتری با سایر کلادها دارند.

شبکه هاپلوتایپی، ارتباط بین گروه‌های گونه‌ای است. با استفاده از شبکه‌های هاپلوتایپی، آرایه‌ها براساس شباهت‌ها و تفاوت‌های ژنتیکی در گروه‌های متفاوت جای داده می‌شود؛ به علاوه آن دسته از جمعیت‌هایی که اخیراً از جمعیت مادری تکامل یافته‌اند، مشخص می‌شود (Templeton, 2002). در این مطالعه، شبکه هاپلوتایپی نیز همانند درخت‌های تبارشناسی وجود دو تیپ مختلف از زیرگونه سسک گلوسفید کوچک را در جزیره قشم تأیید کرد. مطالعه Abdilzadeh و همکاران (۲۰۲۰) شبکه هاپلوتایپی تشکیل شده از سه آرایه گونه سسک گلوسفید کوچک را به نمایش گذاشت که آرایه‌های *halimodendri* و *althaea* با گره‌های تکاملی به‌طور تقریبی برابر، از آرایه *curruca* جدا شدند؛ اما نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر نشان داد دو کلادی که نمونه‌های قشم را دربر می‌گیرند (کلاد یک و دو)، با بیشترین گره تکاملی از آرایه *curruca* جدا شدند؛ این بدان معنی است که سسک‌های جزیره قشم که با اطلاعات کنونی از نوع *halimodendri* قلمداد می‌شوند، نسبت به

متعلق به گروه زادآور دوم در منطقه مغولستان تا چین است. شماری از آرایه‌شناسان و پرندنگران اعتقاد دارند که زیرگونه سسک گلوسفید کوچک در جزیره قشم از نوع *minula* است؛ اما با تکیه بر نتایج این پژوهش مشخص شد این زیرگونه در جنوبی‌ترین نواحی ایران از نوع *halimodendri* و از لحاظ ژنتیکی با زیرگونه *minula* متفاوت است؛ همچنین با وجود احتمال پسین یک در بین دو کلاد تشکیل شده از جزیره قشم (کلادهای ۱ و ۲)، این احتمال وجود دارد که با مطالعات تکمیلی در آینده، سسک‌های گلوسفید کوچک منطقه قشم تا سطح یک زیرگونه جدید جدا شده یا آرایه در حال تکوین باشند. این یافته‌ها براساس یک ژن بوده است؛ پس انجام مطالعات بیشتر همچنان پیشنهاد می‌شود.

در مطالعه Abdilzadeh و همکاران (2020) زیستگاه زیرگونه *halimodendri* از سسک گلوسفید کوچک، مناطق پست و جلگه‌ای سواحل میناب در نظر گرفته شد؛ اما جای نمونه‌های قشم در پژوهش آنها خالی بود؛ بنابراین با توجه به نتایج به‌دست آمده از درخت‌های تبارشناسی، زیرگونه *halimodendri* در سواحل جزیره قشم و میناب زمستان‌گذرانی دارد؛ به طوری که در ایران مناطق پست و کم‌ارتفاع را ترجیح می‌دهد و از مناطق جنگلی مرتفع دوری می‌کند؛ چیزی که مطالعه حاضر با تعداد مقبولی نمونه و درخت مولکولی با شواهد قوی آن را تأیید کرده است.

فاصله ژنتیکی زیرگونه‌های مختلف نشان‌دهنده میزان تفاوت‌های ژنتیکی در بین آنها است. هرچه این اعداد به یک نزدیک‌تر باشد، نشان‌دهنده این است که دو آرایه با یکدیگر تفاوت بیشتری دارند؛ به عبارت دیگر از جدایی آنها زمان بیشتری می‌گذرد (Helbig

زیرگونه‌های دیگر در زمان متفاوتی از جد مشترک خود جدا شده‌اند و نسبت به سایر گونه‌ها اختلاف بیشتری با آرایه *curruca* دارند. هر دو مدل MJ و TCS یافته‌های بالا را تأیید کردند.

جمع‌بندی

امروزه مطالعات تبارشناسی جایگاه ویژه‌ای در علم بیوسیستماتیک دارد. شناخت دقیق گونه‌ها که از الزامات حفاظت از تنوع زیستی است، از طریق مطالعات تبارشناسی میسر خواهد شد. وجود زیرگونه‌های مختلف از یک گونه به‌خوبی نمایانگر تنوع و پویایی حیات روی کره زمین است. اینکه این زیرگونه‌ها تا چه مقدار ممکن است از جمعیت مادری فاصله بگیرند و در زیستگاه‌های مختلف در جایگاه عنصری در چرخه زیستی نقش ایفا کنند، توجه دانشمندان را به خود جلب کرده است. در مطالعه حاضر وضعیت کلادیستیک زیرگونه سسک گلوسفید کوچک در یکی از جنوبی‌ترین مناطق پراکنش آن در ایران با رویکرد سیستماتیک مولکولی با استفاده از ناحیه *cytb* از mtDNA تجزیه و تحلیل و سسک‌های این منطقه با نام *halimodendri* مفروض شد؛ همچنین شواهد نشان داد این سسک‌ها زیستگاه مناطق پست ساحلی را انتخاب

کرده‌اند و به‌طور احتمالی از دو منطقه متفاوت برای زمستان‌گذرانی به جزیره قشم مهاجرت می‌کنند؛ بنابراین به احتمال زیاد چون مسیرهای مهاجرتی متفاوتی دارند و در دو منطقه متفاوت تولید مثل می‌کنند، این پتانسیل را دارند که در جایگاه دو زیرگونه متفاوت از گونه سسک گلوسفید کوچک جدا شوند؛ اگرچه برای اثبات قطعی مسیرهای جداگانه مهاجرتی نیاز به استفاده از ایزوتوپ‌های پایدار و مقایسه نتایج دو منطقه زادآوری و غیر زادآور خواهد بود. با در دست داشتن این اطلاعات مفید از جزیره قشم، یکی از مناطق زمستان‌گذرانی زیرگونه سسک گلوسفید کوچک در ایران معرفی می‌شود.

سپاسگزاری

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد انجام شده است. نویسندگان از کارکنان دانشگاه تربیت مدرس برای مهیا کردن بستر انجام آزمایش‌های پژوهش تشکر و قدردانی می‌کنند؛ همچنین از همکاری معاونت فنی اداره کل محیط زیست استان هرمزگان و اداره محیط زیست منطقه آزاد قشم، برای تسهیل در اخذ مجوزهای مطالعه و فرآیند نمونه‌گیری تشکر می‌شود.

منابع

- Abdilizadeh, R., Aliabadian, M., & Olsson, U. (2019). A Molecular Assessment of the Taxonomy of Iranian *Sylvia* Warblers (Aves; Sylviidae). *Journal of Genetic Resources*, 5(2), 149-162.
- Abdilizadeh, R., Aliabadian, M., & Olsson, U. (2020). Molecular Assessment of the Distribution and Taxonomy of the Lesser Whitethroat *Sylvia Curruca* Complex in Iran, With Particular Emphasis on the Identity of the Contentious Taxon, *Zagrossiensis* Sarudny, 1911. *Journal of Ornithology*, 161(3), 665-676.

- Aliabadian, M., Alae Kakhky, N., & Darvish, J. (2012). Phylogenetic Systematics of Barn Owl (*Tyto Alba* (Scopoli, 1769)) Complex Inferred from Mitochondrial rDNA (16s rRNA) Taxonomic Implication. *Taxonomy and Biosystematics Journal*, 4(11), 1-12 (in Persian).
- Avise, J. C. (2006). The Ontogeny of Molecular Ecology. *Molecular Ecology*, 15(10), 2687-2690.
- Batista, F. M., Lallias, D., Taris, N., Guedes-Pinto, H., & Beaumont, A. R. (2011). Relative Quantification of the M and F Mitochondrial DNA Types in the Blue Mussel *Mytilus Edulis* by Real-Time PCR. *Journal of Molluscan Studies*, 77(1), 24-29.
- Blondel, J., Catzeflis, F., & Perret, P. (1996). Molecular Phylogeny and the Historical Biogeography of the Warblers of the Genus *Sylvia* (Aves). *Journal of Evolutionary Biology*, 9(6), 871-891.
- Böhning-Gaese, K., Schuda, M. D., & Helbig, A. J. (2003). Weak Phylogenetic Effects on Ecological Niches of *Sylvia* Warblers. *Journal of Evolutionary Biology*, 16(5), 956-965.
- Brambilla, M., Vitulano, S., Spina, F., Baccetti, N., Gargallo, G., Fabbri, E., Guidali, F., & Randi, E. (2008). A Molecular Phylogeny of the *Sylvia Cantillans* Complex: Cryptic Species within the Mediterranean Basin. *Journal of Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48(2), 461-472.
- Clements, J. F., Schulenberg, T. S., Iliff, M. J., Roberson, D., Fredericks, T. A., Sullivan, B. L., & Wood, C. L. (2018). The eBird/Clements checklist of birds of the world: v2016. *Extraído el*, 31(12), 2018.
- Del Hoyo, J., Elliott, A., & Sargatal, J. (1992). *Handbook of the Birds of the World*. Barcelona: Lynx Edicions.
- Gill, F., & Donsker, D. (2018). *IOC World Bird List (v8. 1)*. Retrieved from: www.worldbirdnames.org.
- Haig, S. M. (1998). Molecular Contributions to Conservation. *Ecology*, 79(2), 413-425.
- Hall, T., Biosciences, I., & Carlsbad, C. (2011). BioEdit: An Important Software for Molecular Biology. *GERF Bulletin of Biosciences Journal*, 2(1), 60-61.
- Helbig, A. J., & Seibold, I. (1999). Molecular Phylogeny of Palearctic–African Acrocephalus and Hippolais Warblers (Aves: Sylviidae). *Journal of Molecular Phylogenetics and Evolution*, 11(2), 246-260.
- Johns, G. C., & Avise, J. C. (1998). A Comparative Summary of Genetic Distances in the Vertebrates from the Mitochondrial Cytochrome b Gene. *Journal of Molecular Biology and Evolution*, 15(11), 1481-1490.

- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Journal of Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772-780.
- Keis, M., Remm, J., Ho, S. Y., Davison, J., Tammeleht, E., Tumanov, I. L., & Margus, T. (2013). Complete Mitochondrial Genomes and a Novel Spatial Genetic Method Reveal Cryptic Phylogeographical Structure and Migration Patterns among Brown Bears in North-Western Eurasia. *Journal of Biogeography*, 40(5), 915-927.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Journal of Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549.
- Leigh, J. W., & Bryant, D. (2015). POPART: Full-Feature Software for Haplotype Network Construction. *Journal of Methods in Ecology and Evolution*, 6(9), 1110-1116.
- Loskot, V. M. (2005). Morphological Variation and Taxonomic Revision of Five South-Eastern Subspecies of Lesser Whitethroat *Sylvia curruca* (L.) (Aves: Sylviidae). *Zoologische Mededelingen*, 79, 157-165.
- Mayr, E. (1968). Theory of Biological Classification. *Nature*, 220(5167), 545-548.
- McKiernan, H. E., & Danielson, P. B. (2017). Molecular Diagnostic Applications in Forensic Science. In *Molecular Diagnostics* (pp. 371-394). Academic Press.
- Miller, M. A., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for Inference of Large Phylogenetic Trees. In *2010 Gateway Computing Environments Workshop (GCE)* (pp. 1-8).
- Min, S. K., Kim, W. Y., Cho, Y., & Kim, K. S. (2011). Fast DNA Sequencing with a Graphene-Based Nanochannel Device. *Nature Nanotechnology Journal*, 6(3), 162-165.
- Olsson, U., Leader, P. J., Carey, G. J., Khan, A. A., Svensson, L., & Alström, P. (2013). New Insights into the Intricate Taxonomy and Phylogeny of the *Sylvia Curruca* Complex. *Journal of Molecular Phylogenetics and Evolution*, 67(1), 72-85.
- Ong, A. H., & Vellayan, S. (2008). An Evaluation of CHD-Specific Primer Sets for Sex Typing of Birds from Feathers. *Zoo Biology: Published in Affiliation with the American Zoo and Aquarium Association*, 27(1), 62-69.
- Segelbacher, G. (2002). Noninvasive Genetic Analysis in Birds: Testing Reliability of Feather Samples. *Journal of Molecular Ecology Notes*, 2(3), 367-369.
- Seutin, G., White, B. N., & Boag, P. T. (1991). Preservation of Avian Blood and Tissue Samples for DNA Analyses. *Canadian Journal of Zoology*, 69(1), 82-90.

- Shirihai, H., Gargallo, G., & Helbig, A. J. (2001). *Sylvia Warblers: Identification, Taxonomy and Phylogeny of the Genus Sylvia*. A&C Black.
- Sullivan, J., & Joyce, P. (2005). Model Selection in Phylogenetics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 36, 445-466.
- Templeton, A. (2002). Out of Africa Again and Again. *Nature*, 416(6876), 45-51.
- Voytas, D. (2000). Agarose Gel Electrophoresis. *Current Protocols in Molecular Biology*, 51(1), 2-5.