



Original Research Paper

Genetic diversity of *Naja oxiana* (Eichwald, 1831) populations in Iran using cytochrome *b* mitochondrial marker

Elmira Kazemi¹, Mohammad Kaboli *², Nematollah Khorasani²

¹ Department of Environment, Faculty of Natural Resources and Environment, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Department of Environmental Sciences, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

Key Words

Caspian cobra
Naja oxiana
 Cyt *b*
 Genetic diversity
 Phylogenetic analyses
 Haplotype network

Abstract

Introduction: The phylogenetic relationships of the Caspian cobra (*Naja oxiana*), the easternmost species of the subgenus *Naja*, have remained contentious for long. The present study aims at investigating the genetic diversity and structure, as well as phylogenetic relationships of the Caspian cobra populations from northeastern Iran, Afghanistan and Turkmenistan.

Materials & Methods: We sequenced 1107 base pairs of the mitochondrial gene cytochrome *b* for 54 samples to assess the genetic diversity, genetic structure and phylogenetic relationships of the Caspian cobra. Phylogenetic analyses were conducted under Bayesian and Maximum likelihood inferences using the best-fitting evolutionary model. Haplotype relationships were inferred using maximum parsimony.

Result: Reconstruction of the phylogenetic trees confirmed that the Caspian cobra is the sister taxon of *Naja kaouthia*. The estimated haplotype and nucleotide diversity were 0.42 and 0.00058, respectively, indicating low genetic variation among Caspian cobra populations.

Conclusion: Our findings suggest that populations of the species have experienced a recent radiation and sudden range expansion from the northeast toward Golestan province. The results, based on a single mitochondrial marker, revealed no significant genetic differentiation between the populations and recommend that all populations of the Caspian cobra be considered as a significant evolutionary unit in future conservation plans.

* Corresponding Author's email: mkaboli@ut.ac.ir

Received: 3 January 2020; Reviewed: 26 March 2020; Revised: 19 May 2020; Accepted: 17 June 2020

(DOI): [10.22034/aej.2020.133240](https://doi.org/10.22034/aej.2020.133240)

مقاله پژوهشی

بررسی ساختار و تنوع ژنتیکی کبرای خزری (*Naja oxiana* (Eichwald, ۱۸۳۱) در ایران با استفاده از نشانگر میتوکندریایی سیتوکروم *b*

المیرا کاظمی^۱، محمد کابلی^{۲*}، نعمت‌الله خراسانی^۲^۱ گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران^۲ گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

چکیده

کلمات کلیدی

مقدمه: تبارشناسی و چگونگی تکامل کبرای خزری به عنوان شرقی ترین گونه از زیرجنس *Naja* دارای ابهامات زیادی است. هدف این مطالعه، بررسی تنوع و ساختار ژنتیکی و همچنین ارتباطات تبارشناختی جمعیت‌های کبرای خزری در شمال شرق ایران، افغانستان و ترکمنستان بوده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۱۱۰۷ جفت باز از قطعه ژن میتوکندریایی سیتوکروم *b* برای ۵۴ نمونه از کبرای خزری مورد بررسی قرار گرفت. تحلیل تبارشناسی با استفاده از بهترین مدل تکاملی و رسم درخت بیزین و حداکثر درست‌نمایی و ارتباط بین هاپلوتایپ با استفاده از منطق پارسیمونی مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: بازسازی درخت تبارشناسی نشان داد که همه جمعیت‌های کبرای خزری در نواحی شمال شرقی ایران به همراه نمونه‌های کشورهای افغانستان و ترکمنستان متعلق به یک تبار جغرافیائی هستند. هم‌چنین، گونه *Naja kaouthia* به عنوان آرایه خواهری کبرای خزری شناسائی شد. تنوع هاپلوتیپی و تنوع نوکلئوتیدی ژن سیتوکروم *b* در نمونه‌های مورد بررسی به ترتیب برابر با ۰/۴۲ و ۰/۰۰۰۵۸ محاسبه شد که نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی به نسبت پایین در جمعیت کبرای خزری است.

نتیجه‌گیری و بحث: نتایج حاکی از گسترش اخیر و ناگهانی جمعیت‌های این گونه از مرزهای شمال شرقی کشور به سوی استان گلستان بوده است و حاکی از آن است که هنوز تمایز ژنتیکی معنی‌داری بین جمعیت‌های این گونه به وقوع نپیوسته و همه جمعیت‌های کبرای خزری ایران را می‌توان به عنوان یک واحد تکاملی در نظر گرفته و مورد حفاظت قرار داد.

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

تاریخ دریافت: ۱۳ دی ۱۳۹۸؛ تاریخ داوری: ۷ فروردین ۱۳۹۹؛ تاریخ اصلاح: ۳۰ اردیبهشت ۱۳۹۹؛ تاریخ پذیرش: ۲۸ خرداد ۱۳۹۹

(DOI): 10.22034/aej.2021.133240

مقدمه

آگاهی از تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها نقش مهمی در حفاظت و مدیریت گونه‌ها دارد و می‌تواند به‌عنوان ابزاری سودمند در بررسی پیامدهای ناشی از تخریب زیستگاه بر گونه‌ها مورد استفاده قرار گیرد (محسنی نژاد و کرمی، ۱۳۹۹؛ کرمی و شایسته، ۱۳۹۷). حفاظت، نگهداری و تقویت تنوع ژنتیکی گونه‌ها عاملی مهم در مدیریت و تضمین بقای جمعیت‌ها معرفی شده است (Hall و همکاران، ۱۹۹۹). استفاده از نشانگرهای مولکولی در سال‌های اخیر جهت تعیین تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها و حیوانات حفاظت شده، کاربرد گسترده‌ای یافته است (محمودی و همکاران، ۱۳۹۶). میزان چندشکلی به‌دست‌آمده از این نشانگرهای ژنتیکی، یکی از پارامترهای قابل ارزیابی برای مطالعه جمعیت‌های مختلف و درک تفاوت‌های ژنتیکی بین جمعیت‌هاست (Mohammadabadi، ۲۰۱۷). تهدیدهای تنوع زیستی اغلب با اثر بر فرآیندهای تکاملی باعث کاهش تنوع ژنتیکی و در نتیجه انقراض گونه‌ها می‌شود (Frankham، ۲۰۰۵). بر این اساس، یکی از مهم‌ترین مشکلات مارهای سمی را می‌توان کاهش اندازه جمعیت آن‌ها بر اثر فعالیت‌های بشر اعم از تخریب زیستگاه و بهره‌برداری بی‌رویه برای مصارف پزشکی (تولید آنتی‌ونوم و تهیه برخی داروهای خاص) در نظر گرفت (Pook و همکاران، ۲۰۰۹؛ Wüster و همکاران، ۲۰۰۷). با تکه‌تکه شدن زیستگاه‌ها، جمعیت‌های موجود در آن‌ها به‌دلیل تغییرات تصادفی ژنتیکی و جمعیت‌شناختی تحت تاثیر فرسایش ژنتیکی ناشی از درون آمیزی و فرسایش اللی قرار می‌گیرند و به این ترتیب بقای جمعیت به‌شدت کاهش می‌یابد (Young، ۲۰۰۰؛ Meister و همکاران، ۲۰۱۰). با توجه عوامل ذکر شده، بررسی ساختار و تغییرات ژنتیکی برای حفاظت از مارهای سمی امری ضروری در راستای جلوگیری از ورود این گونه‌های ارزشمند به گرداب انقراض است. کبراها، جهان، جنس *Naja Laurenti*, 1768 متعلق به چهار زیرجنس از کبراها آسیایی و آفریقائی هستند که شامل *Naja Laurenti*, 1768، *Uraeus Wagler*, 1830، *Boulengerina Dollo*, 1830 و *Afronaja subgen.nov* می‌شوند (Wallach و همکاران، 2009). کبراها آسیایی شامل ۱۱ گونه از زیرجنس *Naja* هستند که در نواحی از جنوب و جنوب‌شرقی آسیا، جزایر فیلیپین و هم‌چنین از شرق هندوستان تا دشت‌های اطراف دریای خزر پراکنش دارند (Wüster و Slowinski، ۲۰۰۰؛ Wüster و Broadley، ۲۰۰۳). زیرجنس آسیایی را نتیجه یک جریان ژن از آفریقا به آسیا می‌دانند (Wüster و Slowinski، ۲۰۰۰؛ Wüster و همکاران، ۲۰۰۷؛ Wallach و همکاران، ۲۰۰۹) که شامل دو گروه کبراها پرتاب‌کننده و عدم پرتاب‌کننده سم هستند (Thorpe و Wüster، ۱۹۸۸؛ Gold و همکاران، ۲۰۰۲؛ Wüster و Broadley، ۲۰۰۳؛ O'Shea، ۲۰۰۸؛ Lin و همکاران، ۲۰۱۴). در این میان، گونه کبرا برای خزری

(*Naja oxiana*) و کبرا برای هندی (*Naja naja*) به‌دلیل عدم قابلیت پرتاب سم به خارج از دهان، متفاوت از سایر کبراها آسیایی هستند و به‌نظر می‌رسد که مسیر تکاملی متفاوتی را نسبت به سایر گونه‌های این زیرجنس در آسیا پشت سر گذاشته‌اند (Gold و همکاران، ۲۰۰۲؛ Wüster و همکاران، ۲۰۰۷؛ O'Shea، ۲۰۰۸). از زیرجنس *Naja* فقط گونه کبرا برای خزری (*Naja oxiana*) در ایران پراکنش دارد (رجبی‌زاده، ۱۳۹۷). در این گونه سر تا حدی از گردن مشخص است، دارای فلس آهیانه کشیده و فاقد فلس گونه‌ای است. هم‌چنین این گونه دارای فلس پوزه‌ای پهن و دو فلس جلو پیشانی که بزرگ‌تر از فلس‌های بین بینی هستند (Latifi، ۱۹۹۱)، رنگ بدن زرد تیره، قهوه‌ای و یا خاکستری مایل به سیاه است و دارای یک یا چند حلقه تیره‌رنگ در قسمت قدامی سطح شکمی است. در نوزادان حلقه‌های تیره در سرتاسر بدن مشاهده می‌شود (Latifi، ۱۹۹۱). کبرا برای خزری در قسمتی از زیستگاه‌های به‌نسبت خشک و سنگی و مناطقی با پوشش گیاهی پراکنده از شمال شرقی ایران تا جنوب ترکمنستان، جنوب ازبکستان، غرب تاجیکستان، افغانستان، شمال پاکستان و هند پراکنش دارد (Klemmer، ۱۹۶۸؛ Valenta، ۲۰۰۹). در سال‌های گذشته جمعیت این گونه ارزشمند به‌عنوان تنها نماینده این زیرجنس در زیستگاه‌های شمال شرقی ایران کاهش یافته است (Rastegar-Pouyani و Darvish، ۲۰۱۲) و این نگرانی عمده را به‌وجود آورده است که در صورت عدم مدیریت و حفاظت مناسب، کبرا برای خزری نیز به سرنوشت کبرا برای چینی (*Naja atra*) دچار شود (Zhao و همکاران، ۱۹۹۸). در حال حاضر کبرا برای خزری به‌عنوان یک گونه با اطلاعات ناکافی (Data Deficient) جهت طبقه‌بندی در فهرست قرمز اتحادیه بین‌المللی حفاظت از طبیعت، در ضمیمه II کنوانسیون منع تجارت گونه‌های در خطر انقراض (CITES) و هم‌چنین به تازگی در طبقه گونه‌های حمایت و حفاظت شده سازمان حفاظت محیط زیست ایران قرار گرفته است (سازمان حفاظت محیط زیست، ۱۳۹۸؛ IUCN، ۲۰۱۹). اگرچه مطالعات ژنتیکی گسترده‌ای در زمینه روابط خویشاوندی و آرایه‌شناختی کبراها آفریقائی و آسیایی به انجام رسیده است (Wüster و همکاران، ۲۰۰۷؛ Lin و همکاران، ۲۰۰۸؛ Wallach و همکاران، ۲۰۰۹؛ Lin و همکاران، ۲۰۱۲؛ Lin و همکاران، ۲۰۱۴)، لیکن اطلاعات اندکی از وضعیت پراکنش، جمعیت‌شناسی، زیست‌شناسی و ساختار و تنوع ژنتیکی کبرا برای خزری در ایران در دست است، به‌نحوی که تاکنون فقط یک مطالعه در رابطه با وضعیت تبارشناسی این گونه در ایران با استفاده از ۵۸۹ جفت باز از ژن دی‌لوپ (D-Loop) انجام شده است. نتایج این مطالعه نشان داد که تغییرات ژنتیکی اندکی در بین جمعیت‌های کبرا برای خزری در ایران مشاهده شده است. لذا هدف از انجام این مطالعه، بررسی ساختار و تنوع ژنتیکی کبرا برای خزری در شمال و شمال شرقی

استخراج DNA، چرخه PCR و توالی‌یابی: DNA نمونه‌های مورد مطالعه براساس روش فنل-کلروفوم (Sambrook و همکاران، ۱۹۸۹) استخراج گردید. جهت اطمینان از کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از دستگاه نانودراپ و با رؤیت آن بر روی ژل آگارز یک درصد استفاده شد. برای تکثیر ژن سیتوکروم b از دو جفت آغازگر پیش‌رو و پس‌رو Burbrink و همکاران (۲۰۰۰) و Queiroz و همکاران (۲۰۰۲) استفاده شد. از آن‌جا که تکثیر ژن هدف با پرایمرهای مورد استفاده چندان موفقیت‌آمیز نبوده است، دو جفت آغازگر پیش‌رو و پس‌رو با ایجاد تغییراتی در آغازگرهای Burbrink و همکاران (۲۰۰۰) و Queiroz و همکاران (۲۰۰۲) توسط نرم‌افزار Genious طراحی شد (جدول ۱).

جدول ۱: آغازگرهای پیش‌رو و پس‌رو طراحی شده در این

مطالعه برای تکثیر ژن سیتوکروم b در کبرای خزری

(Caspian cobra; *Naja oxiana*)

آغازگر	توالی
cyt b-F1	ATCCTGCGGTCTGAACAACCACCGTCTGT
cyt b-R1	ATTTGGTGTACAAGAGGAATGCTCAG
cyt b-F2	CACAGCCTTCGTGCGCATAGT
cyt b-R2	GATCGTGTGAGGGATGGC

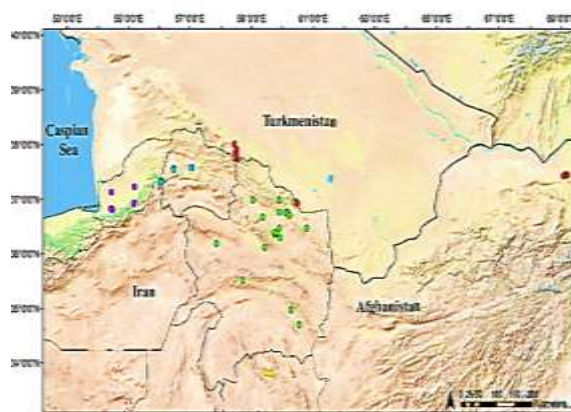
به‌منظور دست‌یابی به دمای بهینه در تکثیر توالی مورد نظر، یک برنامه تغییر تدریجی دما (سه دمای مختلف در گستره‌ای از ۵۴ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد) استفاده شد. پس از مشاهده کیفیت محصول تولید شده در ژل آگارز ۱/۵ درصد، مناسب‌ترین دما ۵۸ درجه انتخاب شد. تکثیر جایگاه‌های ژنی و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت. شرایط PCR شامل، ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (، Tris-HCl, Dntp, TopDNA polymerase, KCl, MgCl₂)، ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر، یک میکرولیتر آغازگر پیش‌رو، یک میکرولیتر آغازگر پس‌رو و یک میکرولیتر DNA انجام گرفت. در هنگام آماده‌سازی نمونه‌ها برای واکنش PCR یک میکروتیوب به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. چرخه دمایی برای تکثیر توالی ژن سیتوکروم b عبارت بود از ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۵ چرخه، شامل ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه و ۳۰ ثانیه در دمای ۵۸ درجه و ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و گسترش نهایی زنجیره با ۷۲ درجه در پنج دقیقه (Li و همکاران، ۲۰۰۸). به‌منظور تایید تکثیر ناحیه مورد نظر، الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۲ درصد با رنگ آمیزی اتیدیم بروماید صورت گرفت. محصولات PCR به‌صورت خوانش دوطرفه توسط شرکت Bioneer کره جنوبی (با دستگاه ABI 3730 XL) تعیین توالی شدند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: پس از بررسی توالی‌های استخراج شده، تعداد ۱۱۰۷ جفت باز از ژن میتوکندریایی سیتوکروم b در تحلیل‌ها

ایران با استفاده از توالی ژن سیتوکروم b بوده است. هم‌چنین تعیین وضعیت تبارشناختی جمعیت‌های مختلف این گونه در ایران هدف دیگر این مطالعه بوده است تا از این راه بتوان واحدهای تکاملی معنی‌دار را برای حفاظت از این گونه در سطح ملی تعیین نمود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: نمونه‌برداری تحت مجوز شماره ۹۴/۴۳۰۲۷ سازمان حفاظت محیط‌زیست از جمعیت‌هایی کبرای خزری *Naja oxiana* (Eichwald, 1831) در استان‌های خراسان رضوی، خراسان شمالی، خراسان جنوبی، گلستان و سمنان انجام شد. از هر فرد صید شده لبه خارجی پنج فلس شکمی برداشت و تا زمان استخراج DNA در الکل اتانول ۹۶ درصد نگهداری شد. نمونه‌های صید شده پس از ثبت داده‌های ریخت‌شناختی، بلافاصله در همان نقطه صید رهاسازی شدند. در مجموع تعداد ۴۹ نمونه فلس بین سال‌های ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۵ از ایران جمع‌آوری شد. هم‌چنین تعداد ۱۱ بافت از نمونه‌های موجود در کلکسیون علمی موزه برلین آلمان از کشورهای افغانستان و ترکمنستان جمع‌آوری شد. به‌دلیل نامناسب بودن کیفیت برخی نمونه‌ها، موفقیتی در استخراج DNA حاصل نشد و در نهایت تعداد ۵۴ نمونه برای بررسی‌های مرتبط با ژنوم میتوکندری به کار گرفته شدند. شکل ۱ موقعیت نقاط نمونه‌برداری از کبرای خزری را در ایران، ترکمنستان و افغانستان نشان می‌دهد.

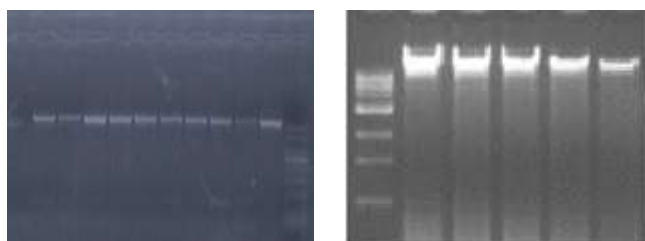


شکل ۱: نقاط نمونه‌برداری از کبرای خزری (*Naja oxiana*) در شمال شرقی ایران (استان‌های گلستان، سمنان، خراسان شمالی، خراسان رضوی و خراسان جنوبی)، ترکمنستان و افغانستان. دایره رنگی نشان‌دهنده موقعیت جغرافیایی نمونه‌های جمع‌آوری شده هستند (سبز: خراسان رضوی، آبی: خراسان شمالی، زرد: خراسان جنوبی، بنفش: گلستان، نارنجی: سمنان و قرمز: افغانستان و ترکمنستان).

(حاصل از تحلیل بیشینه درست‌نمایی) در روی نودها ارائه شدند. آنالیز تاریخی جمعیت‌شناختی توسط آزمون‌های Tajima's D (Tajima, 1998) و Fu's F_s (Fu, 1997) با $10,000$ تکرار تحت مدل مقایسه‌زوجی تفاوت‌ها در نرم‌افزار آرلکوتین (Excoffier و همکاران، 2005) انجام شد. هم‌چنین آنالیز توزیع ناهمخوان (Mismatch distribution) با بررسی تفاوت جفتی بین افراد به‌منظور این که آیا این جمعیت گسترش اخیر را تجربه کرده است یا خیر، مورد استفاده قرار گرفت. سپس توزیع مربوطه با توزیع مورد انتظار از گسترش ناگهانی و اخیر جمعیت تحت مدل راجرز (Rogers, 1995) مقایسه شد.

نتایج

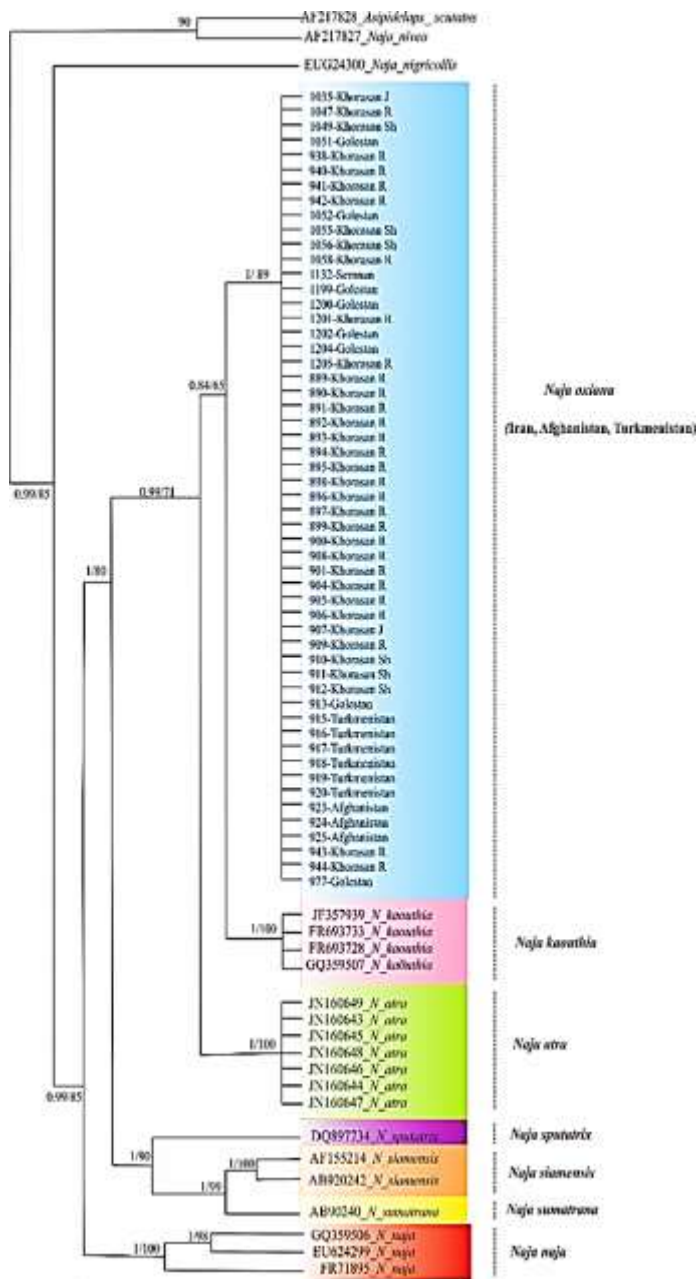
تحلیل داده‌ها برای 54 توالی از ژن سیتوکروم b کبرای خزری (*Naja oxiana*) به طول 1107 جفت باز صورت گرفت که تصویر حاصل از نمونه‌های تکثیر شده بر روی ژل آگاروز مطابق شکل 2 است. براساس نتایج به‌دست آمده یک جایگاه حفاظت (Conserved region) شده و هشت جایگاه شکلی (Polymorphic site) شامل هفت جایگاه پارسیمونی (Parsimony informative site) و یک جایگاه تک‌متغیره (Singleton variable site) بوده است. فراوانی بازهای سیتوزین، ادنین، تیمین و گوانین به ترتیب 31/6، 30/4، 27 و 10/9 درصد و تنوع نوکلئوتیدی (Pi) برابر با 0/0058 محاسبه شد. هم‌چنین نتایج بررسی احتمال اشباع‌شدگی جایگزینی‌ها در سکانس‌ها نشان داد که مقدار شاخص اشباع جایگزینی (Index of Substitution Saturation) برابر با 0/001 و به‌طور معنی‌داری کوچک‌تر از حد بحرانی اشباع جایگزینی ($0/824 = \text{Critical Index of Substitution Saturation}$) بوده است. معنی‌دار شدن اختلاف بین این دو شاخص نشان دهنده قابلیت استفاده از داده‌های موجود در بازسازی و تجزیه و تحلیل‌های تبارشناختی است.



شکل 2: تصویر حاصل DNA بر روی ژل آگاروز (راست)، تصویر حاصل از محصول PCR تکثیر شده ژن سیتوکروم b بر روی ژل آگاروز (چپ)

شبکه هاپلوتیپی: تنوع هاپلوتیپی (Hd) در نمونه‌های کبرای خزری مورد مطالعه برابر با 0/423 محاسبه شد. تعداد 10 هاپلوتیپ در بین 54 سکانس کبرای خزری مشاهده شد که جدول هاپلوتیپ‌ها

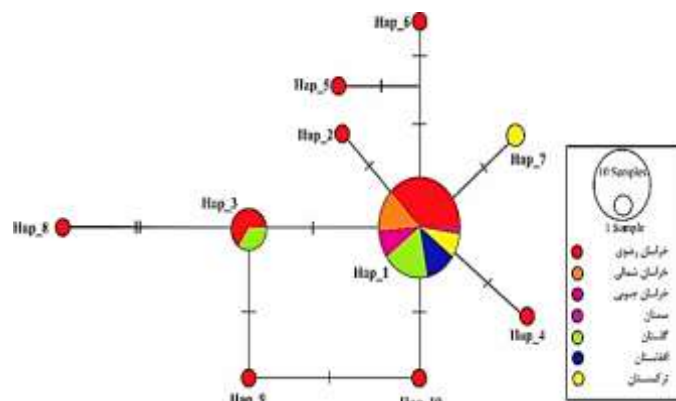
مورد استفاده قرار گرفت. توالی‌ها با نرم‌افزار SeqScape 2.7 بررسی و خطاهای موجود در خوانش نوکلئوتیدها اصلاح گردید. ردیف‌یابی توالی‌ها با استفاده از ClustalW (Thompson و همکاران، 1994) در نرم‌افزار Mega 5.1 (Tamura و همکاران، 2011) انجام شد. برای بررسی موقعیت کدون‌ها و پیدا کردن کدون-توقف‌های (Stop codon) احتمالی از نرم‌افزار ega 5.1M استفاده شد. قبل از آغاز تحلیل‌های تبارشناختی، اشباع جایگزینی در توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار DAMBE 6.0 (Xia, 2013) مورد بررسی قرار گرفت. هم‌چنین بهترین مدل جایگزینی نوکلئوتیدی برای قطعه ژن مورد مطالعه با استفاده از JModelTest 2.1.4 و براساس معیار اطلاعاتی بایزین^۶ (BIC) تعیین شد (Darriba و همکاران، 2012). فراوانی بازهای مختلف و میزان جانشینی‌های نوع اول و دوم توسط نرم‌افزار Mega 5.1 و با 10000 تکرار انجام گردید (Tamura و همکاران، 2011). تعیین تعداد هاپلوتیپ‌ها و جایگاه‌های چندشکلی، هم‌چنین آماره‌های Tajima D و Fu F_s با استفاده از نرم‌افزار DnaSP 5.10 برآورد شد (Librado و Rozas, 2009). هم‌چنین برای بررسی ارتباط بین هاپلوتیپ‌ها و ترسیم شبکه هاپلوتیپی از روش TCS با منطق پارسیمونی در نرم افزار PopArt v.1.7 استفاده شد (Leigh و Bryant, 2015). براساس مدل تکاملی تعیین شده توسط JModelTest 2.1.4، بازسازی درخت تبارشناسی با منطق بیشینه درست‌نمایی (Maximum Likelihood) و به کمک نرم‌افزار RAXML v.7.2 (Stamatakis و همکاران، 2005) و با منطق بایزین در نرم‌افزار MrBayes v.3.2.2 (Rehnquist و Huelsenbeck, 2003) انجام شد. در بازسازی درخت‌های تبارشناسی بایزین و بیشینه درست‌نمایی از 18 سکانس متعلق به کبراهای آسیایی موجود در بانک ژن (جدول پیوست 1) استفاده شد. هم‌چنین درخت‌های تبارشناسی به‌وسیله سه گونه *N. nivea*، *N. nigricollis* و *Aspidelaps scaturatus* ریشه‌دار شدند. تحلیل‌های بایزین براساس چرخه زنجیره مارکوف (Markov chain Monte Carlo) با 20 میلیون تکرار و فراوانی نمونه (Sample frequency) 100 انجام شد. هم‌چنین، برای افزایش دقت در بازسازی درخت تبارشناسی، تعداد 25 درصد درخت‌های ترسیم شده اولیه از ادامه آنالیزها کنار گذاشته شد (Burn-in). در نهایت، ایستایی درخت تبارشناسی رسم شده در نرم‌افزار Tracer v.1.4 مورد بررسی قرار گرفت (Drummond و Rambaut, 2018). درخت‌های ترسیم شده به‌وسیله قانون اکثریت (Majority-rule) یک‌پارچه (Consensus) شدند. با توجه به آن که توپولوژی درخت‌های تبارشناسی بایزین و بیشینه درست‌نمایی (شامل مکان نودها و روابط تکاملی ترسیم شده در شاخه‌های انتهایی) یکسان بود، لذا از درخت بایزین برای تعیین روابط تکاملی در بخش نتایج استفاده شد و مقادیر حمایت از نودها شامل احتمالات پسین (حاصل از تحلیل بایزین) و بوت‌استرپ



شکل ۳: درخت تبارشناسی یک پارچه شده با قانون اکثریت ۵۰ درصد کبراهای آسیایی براساس ژن سیتوکروم b (با توپولوژی یکسان با درخت بیشینه درست نمائی در الگوی شاخه‌ها و موقعیت نودها). سه گونه برون‌گروه عبارتند از از اعشار در روی نودها به ترتیب احتمال پسین و بوت‌استرپ حاصل از آنالیز بایزین (توسط نرم‌افزار MrBayes) و بیشینه درست‌نمائی (به کمک نرم‌افزار IQ-TREE) در رسم درخت‌های تبارشناسی است

نمودار توزیع ناهمخوان نمونه‌های کبرای خزری مورد مطالعه حالت تک مدی (Unimodal) داشته (شکل ۴) که می‌تواند به گسترش سریع و ناگهانی جمعیت تفسیر گردد (Hudson و Slatkin، ۱۹۹۱؛

نشان می‌دهد که هاپلوتایپ شماره یک بین ایران و افغانستان و ترکمنستان مشترک است و هم‌چنین هاپلوتایپ شماره سه بین خراسان رضوی و گلستان مشترک است (جدول ۲). هم‌چنین شبکه هاپلوتایپی ترسیم شده برای نمونه‌های کبرای خزری مورد مطالعه از این سه کشور براساس منطق پارسیمونی نشان‌دهنده عدم تشکیل هاپلوگروه‌های معنی‌دار و ساختاربندی جمعیت‌های نمونه‌برداری شده است به نحوی که همه هاپلوتایپ‌های شناسائی شده با یک تا دو جهش به یکدیگر متصل شده‌اند (شکل ۲).



شکل ۲: شبکه هاپلوتایپی نمونه‌های مورد مطالعه از کبرای خزری (Caspian cobra; *Naja oxiana*) سه کشور ایران، افغانستان و ترکمنستان با استفاده از منطق پارسیمونی. خطوط عمودی بر اتصال هاپلوتایپ‌ها نمایگر تعداد جهش‌های رخ داده در بین هاپلوتایپ‌ها است

بازسازی درخت تبارشناسی: نتیجه انتخاب مدل تکاملی، مدل F81+I را به‌عنوان بهترین مدل تکاملی نوکلئوتیدی نشان داد. درخت تبارشناسی (شکل ۳) *N. naja* را به‌عنوان تاکسون ریشه‌ای درخت فیلوژنی کبراهای آسیائی با احتمال پسین بالا (۱/۰۰) و مقدار بوت‌استرپ متوسط (۱۰۰) معرفی می‌کند. به‌علاوه، این درخت نشان می‌دهد که کبراهای مناطق جنوب‌شرقی آسیا شامل *N. sputatrix*، *N. siamensis* و *N. sumatrana* از کبراهای نواحی مرکز و غرب آسیا شامل *N. oxiana* و *N. kaouthia* با احتمال پسین بالا (۱/۰۰) و مقدار بوت‌استرپ بالا (۹۰) انشقاق یافته‌اند. هم‌چنین *N. atra* با احتمال پسین بالا (۰/۸۴) و مقدار بوت‌استرپ (۶۵) به‌عنوان گونه خواهری برای کبرای خزری نشان داده شده است. با این وجود، ساختار ژنتیکی متمایزی بین جمعیت‌های کبرای خزری (*N. oxiana*) ایران و کشورهای افغانستان و ترکمنستان مشاهده نشد به نحوی که همه نمونه‌های این سه کشور در یک تبار (Lineage) جای گرفته‌اند.

تاریخچه جمعیت‌شناختی: تاریخچه جمعیت‌شناختی کبرای خزری براساس توزیع ناهمخوان (Mismatch distribution) مشاهده شده و شاخص‌های F_s و $Tajima's D$ بررسی شد.

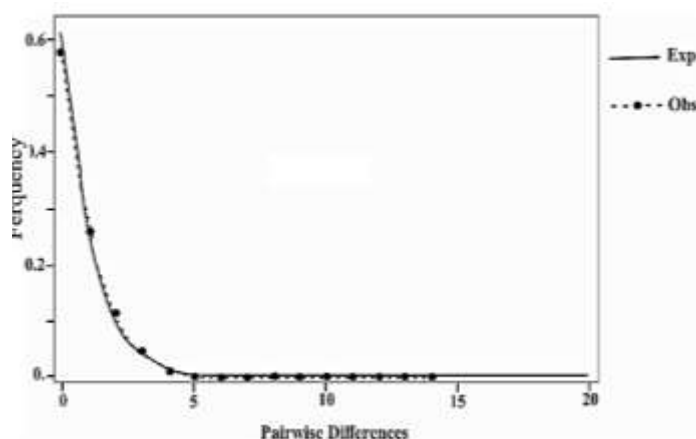
بازهای نزدیک به سایت‌های جهش یافته در مولکول DNA ناشی از تثبیت اخیر برخی ال‌ها در اثر انتخاب طبیعی مثبت) یا رشد سریع جمعیت نیز منتسب دانست (Smith و Haigh، ۱۹۷۴؛ Tajima، ۱۹۸۹؛ Fu، ۱۹۹۷؛ Bolfiková، ۲۰۱۷).

Rogers و Harpending، ۱۹۹۲؛ Excoffier، ۲۰۰۴). به علاوه، مقدار آماره شاخص‌های F_s و $Tajima D$ منفی (به ترتیب $-1/70$ و $-7/988$) محاسبه شد که به گسترش اخیر جمعیت این گونه در منطقه اشاره دارد (Rogers و Harpending، ۱۹۹۲)، اگرچه مقادیر منفی این دو شاخص را می‌توان به بروز پدیده‌های Selective sweep (کاهش تنوع

جدول ۲: هاپلوتایپ‌های شناسائی شده در ۵۴ نمونه کبرای خزری (Caspian cobra; *Naja oxiana*) نمونه‌برداری شده به تفکیک مناطق نمونه‌برداری

هاپلوتایپ‌ها	جایگاه هاپلوتایپی	خراسان رضوی	خراسان شمالی	خراسان جنوبی	گلستان	سمنان	افغانستان	ترکمنستان
Hap_1	CGCCTTCC	۱۶	۶	۴	۷	۱	۳	۴
Hap_2	..G....	۱						
Hap_3	..A....	۲			۱			
Hap_4	A.....	۱						
Hap_5CT.	۱						
Hap_6AC	۱						
Hap_7	.G.....							۲
Hap_8	...A.T.A	۱						
Hap_9	...TA...	۱						
Hap_10	...T...	۱						

نیافته‌اند (Avisé، ۲۰۰۰). منفی بودن آماره‌های F_s و $Tajima's D$ تأیید کننده گسترش اخیر و ناگهانی کبرای خزری در این منطقه از ایران است. همچنین، نمودار توزیع ناهمخوان نشان‌دهنده توزیع تک نمایی است که با نتایج آزمون‌های مذکور هم‌خوانی دارد. به علاوه، شبکه‌های هاپلوتایپی ترسیم شده برای این ژن حاکی از آن است که تعداد جهش‌های اندکی (یک تا دو جهش) بروز نموده است که می‌تواند به جدایی اخیر جمعیت‌ها از یکدیگر و عدم تفاوت معنی‌دار بین آن‌ها است. از سوی دیگر، صید بی‌رویه این گونه توسط موسسه‌های تولید واکسن و دارو در سال‌های اخیر می‌تواند به یک عامل فرعی در کاهش اندازه جمعیت این گونه به‌ویژه در استان‌های خراسان شمالی، رضوی و گلستان و در نتیجه کاهش تنوع ژنتیکی آن‌ها فرض گردد که مطالعات تکمیلی در این خصوص نیاز است. بازسازی درخت تبارشناسی با استفاده از ژن سیتوکروم b براساس الگوریتم‌های بایزین و بیشینه درست‌نمایی منجر به حصول توپولوژی یکسان در شاخه‌ها و نودهای درخت تبارشناسی شد. هر دو تبارنما تأیید نمود که با مقادیر بالا از احتمال پسین و بوت‌استرپ، کبرای خزری ایران و نمونه‌های مورد استفاده در این مطالعه از کشورهای افغانستان و ترکمنستان همگی متعلق به یک تبار تکاملی بوده و هنوز هیچ انشقاقی در بین جمعیت‌های این گونه در شمال و شمال‌شرقی ایران و کشورهای مذکور به وقوع نپیوسته است. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که کبرای خزری ایران آرایه خواهری *N. kaouthia* است که با نتایج حاصل از مطالعه شورابی و همکاران (۱۳۹۳) با استفاده از قطعه ژن D-Loop به طول ۵۸۹ جفت باز متفاوت بوده است (شورابی، ۱۳۹۳). شبکه هاپلوتایپی ترسیم شده براساس ژن سیتوکروم b تعداد ۱۰ هاپلوتایپ را در بین نمونه‌های مورد مطالعه از کبرای خزری در ایران تفکیک نمود که در



شکل ۴: نمودار تک‌مدی توزیع ناهمخوان نمونه‌های کبرای خزری (Caspian cobra; *Naja oxiana*) براساس ۱۱۰۷ جفت باز توالی ژن سیتوکروم b خط نقطه چین نشان‌دهنده جمعیتی است که گسترش ناگهانی را تجربه کرده است. خط ممتد نیز نشان‌دهنده توزیع مورد انتظار برای یک جمعیت باثبات است

بحث

این مطالعه با توالی‌یابی ۱۱۰۷ جفت باز از ژن میتوکندریایی سیتوکروم b نشان داد که تنوع نوکلئوتیدی و تنوع هاپلوتایپی این ژن برای ۵۴ فرد از کبراهای خزری نمونه‌برداری شده از شمال شرقی ایران، افغانستان و ترکمنستان به نسبت پایین بوده است. شاید بتوان دلیل این امر را به گسترش اخیر و سریع جمعیت‌های کبرای خزری در شمال شرقی و شرق ایران نسبت داد به نحوی که همگی به‌تازگی از یک جمعیت اجدادی جدا شده و هنوز ساختار ژنتیکی متفاوتی از یکدیگر

حفاظتی معنی‌دار تحت مدیریت و حفاظت قرار گیرد. صید کبرای خزری از مناطق شمال‌شرقی کشور، به‌ویژه در استان‌های گلستان، خراسان شمالی و خراسان رضوی جهت استحصال زهر و تولید آنتی‌ونوم توسط موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی در طول سالیان گذشته از جمله عوامل تهدیدکننده این گونه به‌شمار می‌رفت که در برنامه‌های حفاظتی مورد توجه قرار نگرفته بود. Latifi (۲۰۰۵) برای نگارش کتاب مارهای ایران در حدود ۱۲۸،۰۰۰ عدد مار از ایران را مورد بررسی قرار داد که از این تعداد، درصد زیادی مربوط به مارهای سمی است که توسط مارگیران این سازمان هر ساله به موسسه مذکور فروخته می‌شدند. خوشبختانه در طی سال‌های اخیر و با درک اهمیت حضور این مارها در چرخه بوم‌سازگان‌های مربوطه، اهمیت غیرقابل جایگزین ژنتیکی و عواقب انقراض هر گونه در تعادل چرخه‌های زیستی، سبب شد تا سازمان حفاظت محیط زیست صید بی‌رویه مارهای سمی ایران را تحت کنترل درآورد. چندسالی است که موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تعداد مارهای سمی مورد نیاز سالانه خود، جهت استحصال زهر را در تعامل و همکاری تنگاتنگ با معاونت محیط طبیعی و تنوع زیستی سازمان حفاظت محیط تهیه می‌نماید که این امر می‌تواند از انقراض این گونه‌های ارزشمند جلوگیری نمود. اقدامات فوری برای حفاظت موثرتر از این گونه و تدوین قوانین سخت‌گیرانه‌تر برای حفاظت جدی از این گونه، به‌ویژه در استان خراسان رضوی به‌عنوان جمعیت مرکزی الزامی است.

منابع

۱. رجیبی زاده، م.، ۱۳۹۷. مارهای ایران. انتشارات ایران‌شناسی. ۴۹۵ صفحه.
۲. شورابی، م.، ۱۳۹۳. بررسی تنوع ژنتیکی میان جمعیت‌های کفچه مار (*Naja oxiana*) در ایران با استفاده از نشانگر mtDNA، پایان نامه، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه تهران. ۱۰۰ صفحه.
۳. کابلی، م.، ۱۳۷۳. مشاهدات شخصی.
۴. کرمی، پ. و شایسته، ک.، ۱۳۹۷. بررسی آشیان بوم شناختی قوچ و میش در مناطق حفاظت شده لشگردر-گلپرآباد، الوند-چال خاتون راسوند و پلنگاب. فصلنامه محیط زیست جانوری. سال ۱۰، شماره ۴، صفحات ۶۵ تا ۷۴.
۵. محسنی‌نژاد، م. و کرمی، پ.؛ ۱۳۹۹. کمی‌سازی توزیع و روند تغییرات آشیان اکولوژیک خرس قهوه‌ای. فصلنامه محیط زیست جانوری. سال ۱۲، شماره ۱، صفحات ۱ تا ۸.
۶. محمودی، م.؛ محمدآبادی، م. و آیت‌اللهی‌مهرجردی، ا.، ۱۳۹۶. بررسی افزون چهارم ژن کاپاکازین گوسفند کرمانی با

این میان هاپلوتیپ Hap_1 به‌عنوان هاپلوتیپ مرکزی بین تمام نمونه‌های مورد مطالعه از مناطق شمال‌شرقی ایران، افغانستان و ترکمنستان مشترک بوده است (جدول ۲). هم‌چنین یک هاپلوتیپ بین جمعیت نمونه‌برداری شده از استان‌های خراسان و گلستان مشترک بوده است (Hap_3، جدول ۲) که می‌تواند دلیلی بر برقراری ارتباط ژنتیکی بین جمعیت‌های این دو منطقه از کشور باشد. این نتایج نشان دهنده آن است که به احتمال زیاد کبرای خزری از شرق آسیا و از مسیر کشورهای افغانستان یا ترکمنستان به ناحیه خراسان در شمال شرقی ایران وارد شده و سپس به‌سرعت در گستره زیستگاه‌های مطلوب تا به استان گلستان (براساس مشاهدات میدانی تا شهر گرگان) گسترش یافته است. نتایج حاصل از شبکه هاپلوتایی شورابی و همکاران (۱۳۹۳) براساس ۵۸۹ جفت باز از ژن D-Loop نیز وجود هاپلوتیپ مشترک را بین جمعیت‌های استان‌های خراسان و گلستان نشان داده بود (شورابی، ۱۳۹۳). به‌نظر می‌رسد این گونه در غیاب رقبای دشت‌زی توانسته است به‌خوبی زیستگاه‌های دشتی و تپه ماهوری گرم و خشک را از افغانستان و ترکمنستان تا شمال‌شرقی و شرق ایران با سرعت اشغال کند، جایی که رقبای قوی از جمله افعی گرز (*Macrovipera lebetina*) از چنین زیستگاه‌های گرم و خشکی در دشت‌ها و تپه‌ماهورها پرهیز می‌کنند. از سوی دیگر موانع جغرافیایی غیرقابل عبوری برای این گونه از جمله رشته‌کوه‌های وسیع و غیرقابل نفوذ، پیکره‌های آبی بزرگ و یا مناطق انسان ساخت نیز در این مناطق وجود ندارد تا مانع از جریان ژن برای این گونه شود. مشاهدات شخصی در سال ۱۳۷۲ نشان می‌دهد که این گونه تا دشت‌های گرگان و حتی شهر گرگان گسترش یافته (کابلی، ۱۳۷۳) و پیش‌بینی می‌شود این گونه گسترش خود را به سرعت در زیستگاه‌های مطلوب به سوی نواحی غربی و شمالی شهر گرگان افزایش بخشد.

الزامات حفاظتی: مطالعات تبارشناختی به‌عنوان ابزاری سودمند جهت تدوین اقدامات و استراتژی‌های مدیریتی و حفاظتی شناخته شده است و این امکان را برای متخصصان حفاظت از تنوع زیستی فراهم می‌آورد تا تلاش‌های حفاظتی خود را بر هر تبار متمرکز کنند به‌جای آن‌که بر گونه به‌عنوان واحد حفاظتی تمرکز شود (Nazarizadeh و همکاران، ۲۰۱۶). این چنین تاکسون‌هایی به‌عنوان واحدهای حفاظتی معنی‌دار (Evolutionary Significant Units (ESUs)) بر حسب تاریخچه تکاملی خود نیازمند توجهات ویژه حفاظتی هستند (Ryder، ۱۹۸۶؛ Moritz، ۱۹۹۴). براساس تعریف Fraser و Bernatchez، ESUs شامل تبارهایی با جریان ژنی بسیار محدود درون گونه‌ای بوده و لذا از نظر حفاظتی معنی‌دار هستند (Fraser و Bernatchez، ۲۰۰۱). با توجه به نتایج این مطالعه، همه نمونه‌های کبرای خزری ایران، افغانستان و ترکمنستان متعلق به یک تبار بوده و می‌تواند به‌عنوان یک واحد

- venomous snakes. *Venom. Anim. Their Venoms*. Vol. 1, pp: 309-325.
22. **Latifi, M., 1991.** The Snakes of Iran., English edition. Society for the study of Amphibians and Reptiles, Oxford, Ohio. viii 159 pp., 24 text-figs; 25 col. pls; 3 tables. (Translated from the Iranian edition by Sajadian, S., volume editors, Leviton, A. and Zug, G.).
 23. **Leigh, J.W. and Bryant, D., 2015.** POPART: full-feature software for haplotype network Construction. *Methods in Ecology and Evolution*. Vol. 6, pp: 1110-1116.
 24. **Li, H.L.; Fong, E.S. and Lin, S., 2008.** Ventral coloration differentiation and mitochondrial sequences of the Chinese Cobra (*Naja atra*) in Taiwan. *Conservation Genetic*. Vol. 9, pp: 1089-1097.
 25. **Librado, P. and Rozas, J., 2009.** DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. Vol. 25, pp: 1451-1452.
 26. **Lin, A.L.; Zhao, Q.; Ji, X.; Lin, L.; Zhao, Q. and 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. *Zoological Science*. Vol. 25, pp: 888-893.
 27. **Lin, L.; Qu, Y.; Li, H.; Zhou, K. and Ji, X., 2012.** Genetic Structure and Demographic History Should Inform Conservation: Chinese Cobras Currently Treated as homogenous show population divergence. Vol 7, pp: e36334.
 28. **Lin, L.; Hua, L.; Qu, Y.; Gao, J. and 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*. Vol. 9, pp: e106944.
 29. **Meister, B.; Hofer, U.; Ursenbacher, S. and Baur, B., 2010.** Spatial genetic analysis of the grass snake, *Natrix natrix* (Squamata: Colubridae), in an intensively used agricultural landscape. *Biological journal of linnean society*. Vol. 101, pp: 51-58.
 30. **Mohammadabadi, M.R., 2017.** Role of clostridium perfringens in pathogenicity of some domestic animals. *Journal of Advances in Agriculture*. Vol. 7, pp: 1117-1121.
 31. **Moritz, C., 1994.** Defining 'evolutionarily significant units' for conservation. *Trends ecology evolution*. Vol. 9, pp: 373-375.
 32. **Nazarizadeh, M.; Kaboli, M., Rezaie, H.R.; Harisini, J.I. and Pasquet, E., 2016.** Phylogenetic relationships of Eurasian Nuthatches (*Sitta europaea* Linnaeus, 1758) from the Alborz and Zagros Mountains, Iran. *Zoology in the Middle East*. Vol. 62, pp: 217-226.
 33. **O'Shea, M., 2008.** Venomous snakes of the world. New Holland Publishers.
 34. **Pook, C.E.; Joger, U.; Stümpel, N. and Wüster, W., 2009.** When continents collide: phylogeny, historical biogeography and systematics of the medically important viper genus *Echis* (Squamata: Serpentes: Viperidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Vol. 53, pp: 792-807.
 35. **Queiroz, A.; Lawson, R., and Lemos-Espinal, J., 2002.** Phylogenetic relationships of North American garter snakes (Thamnophis) based on four mitochondrial genes: how much DNA sequence is enough? *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Vol. 22, No. 2, pp: 315-329.
 36. **Rambaut, A.; Drummond, A.J.; Xie, D.; Baele, G. and Suchard, M.A., 2018.** Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*. Vol. 67, pp: 901-904.
 37. **Ronquist, F. and Huelsenbeck, J.P., 2003.** MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. Vol. 19, pp: 1572-1574.
 - تکنیک PCR-RFL. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی. دوره ۹، شماره ۳، صفحات ۱۱۹ تا ۱۲۸.
 5. **Awise, J.C., 2000.** Phylogeography: the history and formation of species. Harvard university press. 285 p.
 6. **Burbrink, F.T., 2002.** Phylogeographic analysis of the cornsnake (*Elaphe guttata*) complex as inferred from maximum likelihood and Bayesian analyses. *Molecular phylogenetics and evolution*. Vol. 53, No. 2, pp: 465-476.
 7. **Burbrink, F.T.; Lawson, R. and Slowinski, J.B., 2000.** Mitochondrial DNA phylogeography of the polytypic North American rat snake (*Elaphe obsoleta*): a critique of the subspecies concept. *Evolution*. Vol. 54, pp: 2107-2118.
 8. **Bolfíková, B.C.; Eliášová, K.; Loudová, M.; Krytufek, B.; Lymberakis, P.; Sándor, A.D. and Hulva, P., 2017.** Glacial allopatry vs. postglacial parapatry and peripatry: the case of hedgehogs. *Peer J*. Vol. 5, pp: e3163.
 9. **Darriba, D.; Taboada, G.L.; Doallo, R. and Posada, D., 2012.** jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*. Vol. 9, pp: 772.
 10. **Darvish, J. and Rastegar-Pouyani, E., 2012.** Biodiversity conservation of reptiles and mammals in the Khorasan Provinces, northeast of Iran. *Progress in Biological Sciences*. Vol. 2, pp: 95-10.
 11. **Excoffier, L., 2004.** Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model. *Molecular Ecology*. Vol. 13, pp: 853-864.
 12. **Excoffier, L.; Laval, G. and Schneider, S., 2005.** Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatic*. Vol. 1, pp: 47-50.
 13. **Frankham, R., 2005.** Genetics and extinction. *Biological journal of Conservation*. Vol. 126, pp: 131-140.
 14. **Fraser, D.J. and Bernatchez, L., 2001.** Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Molecular Ecology*. Vol. 10, pp: 274-2752.
 15. **Fu, Y.X., 1997.** Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*. Vol. 147, pp: 915-925.
 16. **Gold, B.S.; Dart, R.C. and Barish, R.A., 2002.** Bites of venomous snakes. *The New England Journal of Medicine*. Vol. 347, pp: 347-335.
 17. **Hall, T.A., 1999.** BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. Vol. 41, pp: 95-98.
 18. **Hung, C.; Drovetski, S.V. and Zink, R.M., 2012.** Multilocus coalescence analyses support a mtDNA-based phylogeographic history for a widespread palearctic passerine bird, *Sitta europaea*. *Evolution*. Vol. 66, pp: 2850-2864.
 19. **IUCN. 2019.** The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2019-2 (Accessed 08 August 2019) <http://www.iucnredlist.org>.
 20. **Kapli, P.; Botoni, D.; Ilgaz, Ç.; Kumlutaş, Y.; Avcı, A.; Rastegar-Pouyani, N.; Fathinia, B.; Lymberakis, P.; Ahmadzadeh, F. and Poulakakis, N., 2013.** Molecular phylogeny and historical biogeography of the Anatolian lizard *Apathya* (Squamata, Lacertidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Vol. 66, pp: 992-1001.
 21. **Klemmer, K., 1968.** Classification and distribution of European, North African, and north and west Asiatic

- multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*. Vol. 22, No. 22, pp: 4673-4680.
48. **Valenta, J., 2009.** *Venomous Snakes: Envenoming, Therapy*. Nova Science Publishers.
49. **Wallach, V.; Wuester, W. and Broadley, D.G., 2009.** In praise of subgenera: taxonomic status of cobras of the genus *Naja Laurenti* (Serpentes: Elapidae). *Zoo taxa*. Vol. 2236, pp: 26-36.
50. **Wüster, W., 1990.** Population evolution of the Asiatic cobra (*Naja naja*) species complex. Univ. Aberdeen 500.
51. **Wüster, W. and Broadley, D.G., 2003.** A new species of spitting cobra from north-eastern Africa (Serpentes: Elapidae: *Naja*). *Journal of Zoology, London*. Vol. 259, pp: 345-359.
52. **Wüster, W.; Crookes, S.; Ineich, I.; Mané, Y.; Pook, C.E.; Trape, J.F. and Broadley, D.G., 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 Phylogenetics and Evolution*. Vol. 45, pp: 437- 453.
53. **Wüster, W. and Thorpe, R.S., 1988.** Population affinities of the asiatic cobra (*Naja naja*) species complex in south-east Asia: reliability and random resampling. *Biological Journal of Linnean Society*. Vol. 36, pp: 391-409.
54. **Xia, X. and Lemey, P., 2009.** The phylogenetic handbook: a practical approach to DNA and protein phylogeny.
55. **Young, A.G., 2000.** *Genetics, demography and viability of fragmented populations*. Cambridge University Press.
56. **Zhao, E.; Wang, S. and Commission, E.S.S., 1998.** China red data book of endangered animals: Amphibia and reptilia. Amphibia & reptilia/chiefcopilerZhao Ermi. Science Press.
38. **Rogers, A.R. and Harpending, H., 1992.** Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular biology and evolution*. Vol 9, No. 3, pp: 552-569.
39. **Ryder, O.A., 1986.** Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Trends Ecology Evolution*. Vol. 1, pp: 9-10
40. **Sambrook, J.; Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989.** *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbour: Cold Spring Harbour Press.
41. **Slatkin, M. and Hudson, R.R., 1991.** Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics*. Vol. 129, pp: 555-562.
42. **Slowinski, J.B. and Wüster, W., 2000.** A new cobra (Elapidae: *Naja*) from Myanmar (Burma). *Herpetologica*. pp: 257-270.
43. **Smith, J.M. and Haigh, J., 1974.** The hitch-hiking effect of a favourable gene. *Genetics Research*. Vol. 23, No. 1, pp: 23-35.
44. **Stamatakis, A.; Ludwig, T. and Meier, H., 2005.** RAxML III: a fast program for maximum likelihood-based inference of large phylogenetic trees. *Bioinformatics*. Vol. 21, pp: 456- 463.
45. **Tajima, F., 1989.** Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. Vol. 123, pp: 585-595.
46. **Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M., and Kumar, S., 2011.** MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*. Vol. 28, pp: 2731-2739.
47. **Thompson, J.D.; Higgins, D.G. and Gibson, T.J., 1994.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive

جدول پیوست ۱: سکانس‌های مورد ژن سیتوکروم b مورد استفاده در این مطالعه برگرفته از مطالعه حاضر و بانک ژن (۵۴ سکانس مربوط به مطالعه حاضر به علاوه ۱۸ سکانس کبرای آسیایی و سه سکانس به‌عنوان برون گروه)

منبع	Accession number	مکان	Voucher number	نام علمی
مطالعه حاضر	-	خراسان رضوی	Nezmut-889	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	خراسان رضوی	Nezmut-890	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	خراسان رضوی	Nezmut-891	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	خراسان رضوی	Nezmut-892	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	خراسان رضوی	Nezmut-893	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	خراسان رضوی	Nezmut-894	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	خراسان رضوی	Nezmut-895	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	خراسان رضوی	Nezmut-896	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	خراسان رضوی	Nezmut-897	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	خراسان رضوی	Nezmut-898	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	خراسان رضوی	Nezmut-899	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	خراسان رضوی	Nezmut-900	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	خراسان رضوی	Nezmut-901	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	خراسان رضوی	Nezmut-904	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	خراسان رضوی	Nezmut-905	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	خراسان رضوی	Nezmut-906	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	خراسان جنوبی	Nezmut-907	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	خراسان رضوی	Nezmut-908	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	خراسان رضوی	Nezmut-909	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	خراسان شمالی	Nezmut-910	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	خراسان شمالی	Nezmut-911	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	خراسان شمالی	Nezmut-912	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	گلستان	Nezmut-913	<i>Naja oxiana</i>

ادامه جدول پیوست ۱: سکانس‌های مورد ژن سیتوکروم b مورد استفاده در این مطالعه برگرفته از مطالعه حاضر و بانک ژن (۵۴ سکانس مربوط به مطالعه حاضر به‌علاوه ۱۸ سکانس کبرای آسیایی و سه سکانس به‌عنوان بیرون گروه)

منبع	Accession number	مکان	Voucher number	نام علمی
مطالعه حاضر	-	ترکمنستان	Nezmut-915	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	ترکمنستان	Nezmut-916	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	ترکمنستان	Nezmut-917	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	ترکمنستان	Nezmut-918	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	ترکمنستان	Nezmut-919	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	ترکمنستان	Nezmut-920	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	افغانستان	Nezmut-923	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	افغانستان	Nezmut-924	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	افغانستان	Nezmut-925	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	خراسان رضوی	Nezmut-938	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	خراسان رضوی	Nezmut-940	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	خراسان رضوی	Nezmut-941	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	خراسان رضوی	Nezmut-942	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	خراسان رضوی	Nezmut-943	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	خراسان رضوی	Nezmut-944	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	خراسان جنوبی	Nezmut-1035	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	خراسان رضوی	Nezmut-1047	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	خراسان شمالی	Nezmut-1049	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	گلستان	Nezmut-1051	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	گلستان	Nezmut-1052	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	خراسان شمالی	Nezmut-1055	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	گلستان	Nezmut-1056	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	خراسان رضوی	Nezmut-1058	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	سمنان	Nezmut-1132	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	گلستان	Nezmut-1199	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	گلستان	Nezmut-1200	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	خراسان رضوی	Nezmut-1201	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	گلستان	Nezmut-1202	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	گلستان	Nezmut-1204	<i>Naja oxiana</i>
مطالعه حاضر	-	خراسان رضوی	Nezmut-1205	<i>Naja oxiana</i>
Lin و همکاران، ۲۰۱۲	JN160643	چین	-	<i>Naja atra</i>
Lin و همکاران، ۲۰۱۲	JN160644	چین	-	<i>Naja atra</i>
Lin و همکاران، ۲۰۱۲	JN160645	چین	-	<i>Naja atra</i>
Lin و همکاران، ۲۰۱۲	JN160646	چین	-	<i>Naja atra</i>
Lin و همکاران، ۲۰۱۲	JN160647	چین	-	<i>Naja atra</i>
Lin و همکاران، ۲۰۱۲	JN160648	چین	-	<i>Naja atra</i>
Lin و همکاران، ۲۰۱۲	JN160649	چین	-	<i>Naja atra</i>
Pook و همکاران، ۲۰۰۹	GQ359506	نیپال	-	<i>Naja naja</i>
Wüster و همکاران، ۲۰۰۸	EU624299	نیپال	-	<i>Naja naja</i>
Wüster و همکاران، ۲۰۰۸	FR71895	نیپال	-	<i>Naja naja</i>
Supikamolnseni، ۲۰۱۴	AB920240	تایلند	-	<i>Naja sumatrana</i>
Wüster و همکاران، ۲۰۰۶	DQ897734	اندونزی	-	<i>Naja sputarix</i>
Melaun و همکاران، ۲۰۱۱	FR693733	تایلند	-	<i>Naja kaouthia</i>
Melaun و همکاران، ۲۰۱۱	FR693733	تایلند	-	<i>Naja kaouthia</i>
Melaun و همکاران، ۲۰۱۱	FR693733	تایلند	-	<i>Naja kaouthia</i>
Pook و همکاران، ۲۰۰۹	GQ359507	تایلند	-	<i>Naja kaouthia</i>
Slowinski و همکاران، ۲۰۰۰	AF155214	تایلند	-	<i>Naja siamensis</i>
Supikamolnseni و همکاران، ۲۰۱۴	AB920242	تایلند	-	<i>Naja siamensis</i>
Wüster و همکاران، ۲۰۰۷	EUG24300	آفریقای جنوبی	-	<i>Naja nigricollis</i>
Slowinski و همکاران، ۲۰۰۰	AF217827	آفریقا	-	<i>Naja nivea</i>
Slowinski و همکاران، ۲۰۰۰	AF217828	آفریقا	-	<i>Aspidelaps scutatus</i>