

تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی افعی جعفری (*Echis carinatus* (SCHNEIDER, 1801) در ایران بر اساس ژن‌های میتوکندریایی

رضا فرخی‌زاده^۱، محمد کابلی^۲، جلیل ایمانی هرسینی^۳، یان اشتفکا^۴، لعبت تقوی^۵

چکیده

افعی جعفری (*Echis carinatus*) یکی از مهم‌ترین مارهای زهرآگین از نظر پزشکی در ایران و بخش وسیعی از آسیای جنوب‌غربی است. با وجود اهمیت بالینی و حفاظتی این گونه، ساختار و تنوع ژنتیکی جمعیت‌های آن در ایران تاکنون به‌طور جامع بررسی نشده است. در این پژوهش، تنوع ژنتیکی جمعیت‌های این گونه در ایران با استفاده از چهار ژن میتوکندریایی *cyt b*، *ND4*، *16S* و *12S* مورد مطالعه قرار گرفت. تعداد ۲۸ نمونه از ۱۸ نقطه مختلف در شرق، شمال‌شرق، مرکز، جنوب و جنوب‌غرب ایران و نیز جزایر خلیج فارس جمع‌آوری و توالی‌یابی شد. نتایج نشان داد که ژن *cyt b* بالاترین سطح تنوع هاپلوتیپی ($Hd = 0.931$) و تعداد هاپلوتیپ (۱۵) را داراست. آزمون‌های خنثی بودن (به‌ویژه $Fu's$ -4.989 و تحلیل توزیع $Mismatch$) شواهد روشنی از انبساط جمعیتی اخیر در جمعیت‌های مورد مطالعه ارائه کردند. نتایج آنالیز شبکه‌های هاپلوتیپی ساختار جغرافیایی قوی را نشان ندادند، هرچند جدایی نسبی هاپلوتیپ‌های مناطق جنوب‌غربی و شرقی در برخی ژن‌ها قابل تشخیص بود. این الگو با همگنی نسبی گزارش‌شده در جمعیت‌های شمالی و غربی گروه *E. carinatus* (زیرگونه *E. c. sochureki*) و نظریه گسترش اخیر این گونه از جنوب آسیا به سوی غرب و شمال سازگار است. یافته‌های حاضر علاوه بر روشن ساختن بخشی از تاریخچه جمعیت شناختی گونه در ایران، بر ضرورت تلفیق داده‌های ژنتیکی با مطالعات زهرشناسی برای انتخاب جمعیت‌های نماینده در تولید آنتی‌ونوم و تعریف واحدهای حفاظتی تأکید دارند.

واژگان کلیدی:

افعی جعفری، تنوع هاپلوتیپی، انبساط جمعیتی، ژن‌های میتوکندریایی، آنتی‌ونوم، ایران.



مقاله پژوهشی

۱. دانشجوی دکتری، گروه علوم محیط زیست، دانشکده کشاورزی، منابع طبیعی و محیط زیست، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

Rezafarrokhi1404@yahoo.com

۲. استاد، گروه محیط زیست، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

mkaboli@ut.ac.ir

* نویسنده مسئول

۳. دانشیار، گروه علوم محیط زیست، دانشکده کشاورزی، منابع طبیعی و محیط زیست، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

jalil.imani@srbiau.ac.ir

۴. دانشیار، دانشکده علوم، دانشگاه South Bohemia، جمهوری چک.

yan.stefka@gmail.com

۵. استاد، گروه علوم محیط زیست، دانشکده کشاورزی، منابع طبیعی و محیط زیست، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

lobat.taghavi@iaua.ac.ir

شناسه مقاله:

۲۶۰۸-۱۱۹۷

شماره صفحه پایایی:

۱۳۹۸-۱۴۱۰

تاریخ دریافت:

۱۴۰۵/۰۵/۳۰

تاریخ پذیرش:

۱۴۰۵/۰۶/۱۶

انتشار آنلاین:

۱۴۰۵/۰۷/۰۹

زمان پذیرش:

۱۸ روز

استناددهی:

فرخی‌زاده، ر.، کابلی، م.، ایمانی هرسینی، ج.، اشتفکا، ی.، و تقوی، ل. (۱۴۰۵). تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی افعی جعفری (*Echis carinatus* (SCHNEIDER, 1801) در ایران بر اساس ژن‌های میتوکندریایی. مدیریت اکوسیستم‌های طبیعی، ۱۳(۳): ۱-۶.

۱- مقدمه

افعی جعفری در ایران از جنس *Echis* و متعلق به زیرخانواده Viperinae از خانواده افعیها (Viperidae) است. این جنس شامل ۱۲ گونه از افعی‌های بسیار زهرآگین کوچک تا متوسط جثه در مناطق خشک و نیمه‌خشک آفریقا، خاورمیانه و بخش‌هایی از جنوب و جنوب‌غرب آسیا هستند که از نظر پزشکی به‌عنوان مهم‌ترین مار زهرآگین و مسئول ده‌ها هزار گزش سالیانه در قاره‌های آفریقا و آسیا و همچنین در ۱۳ استان در ایران محسوب می‌شوند (Casewell et al., 2010; Yousefi et al., 2020; Ghezellou et al., 2021). مسمومیت ناشی از مارگزیدگی یک بحران جهانی بهداشت عمومی است که در حدود ۱/۸ تا ۲/۷ میلیون مورد مسمومیت سالانه و به بیش از ۱۰۰,۰۰۰ مرگ در سال منجر می‌شود (Gutiérrez et al., 2017). مطالعات تبارشناسی مولکولی متعددی در خصوص گونه‌زایی و روابط تکاملی جنس *Echis* با سایر جنس‌ها و همچنین در بین گونه‌های این جنس به انجام رسیده و نتایج حاصل، تفاوت‌های قابل توجهی با یکدیگر نشان می‌دهند که دال بر وجود ابهامات عمیق در درک کامل از روابط تکاملی و جریان ژن در این جنس در قاره آفریقا و آسیاست (Cherlin, 1990; Lenk et al., 2001; Babocsay, 2004; Arnold et al., 2009; Pook et al., 2009; Escoriza, 2009; Feroze et al., 2010; Alencar et al., 2016; Mobaraki and Oraie, 2024; Highland and Myerse, 2025). Pook et al. (۲۰۰۹) اعضای جنس *Echis* را به چهار گروه طبقه‌بندی نمودند که عبارتند از: (۱) گروه *E. coloratus* (شامل دو گونه در خاورمیانه و شبه جزیره عربستان)، (۲) گروه *E. ocellatus* (با سه گونه در منطقه ساحل و غرب آفریقا)، (۳) گروه *E. pyramidum* (از غرب آفریقا تا شبه‌جزیره عربستان در امتداد ساحل و شاخ آفریقا با ۶ گونه) و (۴) *E. carinatus* (با پنج زیرگونه *E. c. carinatus* در هند، *E. c. astolae* در جزیره‌ای در پاکستان، *E. c. multisquamatus* در ازبکستان، ترکمنستان، تاجیکستان، *E. c. sinhaleyus* در سریلانکا و *E. c. sochureki* در شمال هند، جنوب افغانستان، پاکستان، ایران، عراق، عمان و امارات متحده عربی). رجبی‌زاده (۱۳۹۷) و Safaei-Mahroo et al. (۲۰۱۵) نیز حضور *E. c. carinatus* را در ایران اعلام نمودند. Pook et al. (۲۰۰۹) نشان دادند که گروه *E. carinatus* به تازگی از سایر تبارهای جنس *Echis* جدا شده است و بیشترین واگرایی در جمعیت‌های جنوبی در محدوده شبه قاره هند مشاهده می‌شود. اما Cherlin (۱۹۹۰) *E. carinatus* را به سه گونه تقسیم نمود که شامل *E. carinatus* در جنوب هند و سریلانکا، *E. sochureki* در شمال هند تا پاکستان و *E. multisquamatus* در آسیای مرکزی و ایران بوده است. از سوی دیگر، برخی متخصصان *E. carinatus* را به‌عنوان کلاد خواهری (یا کلاد بیسال) سایر کلادهای این جنس (Ashraf et al., 2020)؛ (Cherlin, 1990; Alencar et al., 2016) برخی دیگر *E. coloratus* را به‌عنوان کلاد خواهری (Arnold et al., 2009; Feroze et al., 2010)؛ (Highland and Myerse, 2025) و برخی نیز *E. ocellatus* را به‌عنوان کلاد خواهری (Wüster et al., 2008; Murugananthan et al., 2025) معرفی نموده‌اند.

رویدادهای تبارزایی در اکیس در ابتدای دوره میوسن (حدود ۲۰ میلیون سال پیش) و همزمان با فعالیت‌های زمین‌ساختی عمده در آن زمان شروع شد. پراکنش جنس *Echis* در منطقه‌ای فعال از نظر زمین‌ساختی واقع شده که شامل وقایع بزرگی از جمله برخورد صفحات آفریو-عربی و اوراسیا و نیز منطقه گسل‌زایی فعال است. آفریقا و شبه‌جزیره عربستان که توسط دریای تیتیس از اوراسیا جدا شده بودند، تقریباً ۱۹ میلیون سال پیش با صفحه آناطولی (ترکیه کنونی) برخورد کردند (Rögl, 1999; Amer and Kumazawa, 2005; Harzhauser et al., 2007). در نتیجه این برخورد یک ارتباط زمینی به نام پل خشکی گومفوتریوم^۳ به وجود آمد و گسترش پراکنش و تبارزایی بسیاری از تاکسون‌ها را در سراسر منطقه آفریو-آسیا تسهیل کرد. در همان زمان، چرخش تدریجی ضدساعتگرد شبه‌جزیره عربستان و تشکیل دریای سرخ و خلیج عدن و همچنین شکل‌گیری سیستم گسل‌های شرق آفریقا نیز پراکندگی بسیاری از موجودات زنده با پراکنش وسیع از جمله اعضای جنس *Echis* را در منطقه آفریو-آسیایی تحت تأثیر قرار داد (Chorowicz, 2005).

با این وجود، بازسازی زیست‌جغرافیای تاریخی جنس *Echis* با مشکل کمبود درک کافی از منشاء جغرافیایی این جنس و وضوح ناکافی شکاف‌های پایه‌ای در جنس روبرو است. Wüster et al. (۲۰۰۸) منشاء آفریقایی برای زیرخانواده Viperinae و جنس *Echis* استنتاج کردند. رابطه خواهری گروه *Echis* و *Cerastes* فرضیه منشاء آفریقایی جنس *Echis* را تقویت می‌کند زیرا گونه‌های *Cerastes* به‌طور عمده پراکندگی آفریو-عربی دارند و گونه عربی *C. gasperettii* در میان گونه‌های آفریقایی *C. cerastes* و *C. vipera* قرار دارد (Lenk et al., 2001). چنین الگویی از جریان ژن ناشی از برخورد صفحات آفریو-عربی و اوراسیا در سایر گروه‌های خزندگان از جمله *Uromastix* (Amer and Kumazawa, 2005) و همچنین اعضای جنس *Naja* (Wüster et al., 2007; Szyndlar and Rage, 1990) نیز گزارش شده است. شاخه *E. Carinatus* به‌عنوان تنها گونه زنده‌زاد در این جنس شناخته می‌شود، در حالی که سایر گونه‌های جنس *Echis* تخم‌گذار هستند (Mallow et al., 2003). این امر نشان می‌دهد که زنده‌زایی ممکن است در شاخه *E. Carinatus* به‌طور مستقل تکامل یافته باشد (Wüster et al., 2008).

از سوی دیگر، Cherlin (۱۹۹۰) فرضیه انتشار جنس *Echis* را از آسیا به سوی آفریقا عنوان کرده است. بر اساس نظر او، منشا این گونه در شبه قاره هند بوده که در ادامه به سوی ایران و از آنجا به ترکمنستان و آسیای صغیر، خلیج فارس و دریای عمان (مناطق شمالی عربستان، امارات متحده عربی

1. Sister clade

2. Basal clade

3. Gomphotherium bridge

و عمان) و همچنین بخش‌های شمالی دریای سرخ (جنوب عربستان، یمن و جنوب عمان و در ادامه با گذر از شمال دریای سرخ به سوی شمال و شمال شرقی آفریقا گسترش یافته است (Cherlin, 1990).

مدل‌سازی مطلوبیت زیستگاه و پراکنش بالقوه افعی جعفری در ایران و ارتباط آن با پیش‌بینی خطر مارگزیدگی نشان می‌دهد که نواحی جنوبی ایران، شمال خلیج فارس و مناطق وسیعی در بخش‌های مرکزی کشور، بالاترین مطلوبیت زیستگاهی را برای این گونه دارد. فصلی بودن بارش و شاخص پوشش گیاهی، مهم‌ترین عوامل تعیین‌کننده مطلوبیت زیستگاه این گونه در کشور بودند. این مطالعه نشان داد که در حدود ۳۰،۳۳۹ روستا در ریسک بالا تا متوسط خطر گزش افعی جعفری در ایران قرار دارند (Yousefi et al., 2020).

الگوهای پروتئینی زهر گونه‌های مختلف در جنس *Echis* تفاوت قابل توجهی با یکدیگر نشان می‌دهد به نحوی که در الگوهای واکنش ایمنی متقابل میان آنتی‌سرم‌های اختصاصی گونه‌های مختلف، آنتی‌ونوم‌های تخصصی برای هر گونه توصیه شده است (Casewell et al., 2010). زهر این گونه‌ها دارای هموتوکسین‌ها و آنزیم‌های پروتئولیتیک متعددی است که بر سیستم انعقاد و تخریب بافت اثر گذاشته و سبب خون‌ریزی، اختلالات انعقادی، نارسایی کلیه و در موارد شدید، منجر به مرگ شود. به علاوه، تفاوت‌های جغرافیایی در ترکیب زهر در جمعیت‌ها یا زیرگونه‌های یک گونه نیز این مشکل را تشدید می‌کند. Bhatia and Vasudevan (۲۰۲۰) زهر سه جمعیت مختلف از *E. carinatus* را در هند مقایسه کرده و نشان دادند که تفاوت میان الگوهای زهر عمدتاً ناشی از تغییر در ترکیب نسبی خانواده‌های مختلف زهر بوده است. نتایج آنها بر ضرورت ارزیابی کارایی آنتی‌ونوم چندظرفیتی در خنثی‌سازی گزش جمعیت‌های جغرافیایی متفاوت *E. carinatus* تأکید نمود (Bhatia and Vasudeva, 2020). اما Ghezellou et al. (۲۰۲۱) در مقایسه زهر سه جمعیت از افعی جعفری در ایران (استان‌های هرمزگان، سیستان و بلوچستان و خراسان جنوبی) نشان دادند که مقادیر دوز کشنده میانه، سمیت و ترکیبات زهر خام سه جمعیت مورد مطالعه بسیار مشابه بوده است. این مطالعه نشان داد که تعداد ۲۲ خانواده پروتئینی در زهر افعی‌های جعفری مورد مطالعه از این سه جمعیت قابل شناسایی بوده است. همچنین این مطالعه چندین خانواده پروتئینی جدید شامل پروتئین‌های آسپارتیک شبه‌رنین (RLAPs)، فاکتورهای رشد فیبروبلاستی (FGFs)، ایزومرازهای پپتیدیل-پرولیل-سیس-ترانس (PPIs) و پپتیدهای گشادکننده عروق زهر (VVPs) را معرفی نمود.

متأسفانه تاکنون مطالعاتی در خصوص ارتباط تنوع ژنتیکی جمعیت‌های افعی جعفری در ایران با تنوع الگوهای پروتئینی زهر به انجام نرسیده است، امر مهمی که در صنعت داروسازی (تولید آنتی‌ونوم) و درمان مسمومیت ناشی از گزش این گونه در کشور بسیار حیاتی است. وجود مورف تیره رنگ از افعی جعفری در جزیره شیدور (Mobaraki and Oraie, 2024) بیانگر آن است که همچنان احتمال کشف آرایه‌های پنهان‌آز این گونه در ایران وجود دارد و آگاهی از تغییرات تنوع ژنتیکی این گونه از نظر پزشکی، بسیار ضروری است.

بررسی تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت‌های گونه‌هایی با گستره پراکنش وسیع همچون افعی جعفری، یک نیاز ابتدایی و اساسی برای حفاظت و مدیریت مبتنی بر شواهد قوی و مستدل است. شناسایی جمعیت‌ها و دودمان‌های ژنتیکی متمایز، به‌ویژه در مناطق دورافتاده یا کم‌نمونه‌برداری شده، امکان تعریف واحدهای حفاظتی دارای تاریخچه تکاملی مستقل را فراهم می‌کند و در اولویت‌بندی حفاظت، طراحی برنامه‌های نمونه‌برداری و کاهش فرسایش ژنتیکی ناشی از تخریب و تکه‌تکه‌شدن زیستگاه مؤثر است (Allendorf et al., 2022). علاوه بر اهمیت حفاظتی، ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها می‌تواند با ناهمگنی جغرافیایی در ترکیب و عملکرد زهر مرتبط باشد (Bhatia and Vasudevan, 2020). از این رو، در گستره‌های وسیع پراکنش افعی جعفری در ایران، تلفیق داده‌های ژنتیکی و زهرشناسی برای شناسایی جمعیت‌های نماینده، انتخاب منابع مناسب جهت استحصال زهر و تولید یا ارزیابی آنتی‌ونوم‌هایی با قدرت خنثی‌سازی قوی ضروری است. نادیده گرفتن جمعیت‌های ژنتیکی متمایز یا ناشناخته ممکن است اثربخشی منطقه‌ای آنتی‌ونوم را کاهش داده و مدیریت بالینی مارگزیدگی را در کشور با چالش مواجه سازد.

لذا این مطالعه با هدف بررسی روابط فیلوژنتیکی و تنوع هاپلوتیپی جمعیت‌های افعی جعفری در ایران با بهره‌گیری از چهار ژن میتوکندریایی *cyt b*، *ND4*، *ND6* و *12S* طراحی و اجرا گردید. در این راستا، سطح تنوع ژنتیکی و هاپلوتیپی در گستره پراکنش گونه در کشور برآورد شد، وجود ساختار جغرافیایی در الگوهای تنوع مورد ارزیابی قرار گرفت و تاریخچه دموگرافیک جمعیت‌ها از طریق آزمون‌های خنثی بودن و تحلیل توزیع Mismatch بررسی گردید.

۲- مواد و روش‌ها:

۲-۱- گونه مورد مطالعه:

افعی جعفری با نام علمی *Echis carinatus* و نام‌های محلی مار جعفری، کج مار، کک مار و مار بُک در ایران گونه‌ای به نسبت شناخته شده در ایران است. زیستگاه این گونه اغلب در مناطق دشتی و تپه ماهورهای شنی با پوشش گیاهی اندک، در لابلای تخته سنگ‌ها در دامنه‌های کوهستانی با بستر سنگی، همچنین در جلگه‌های دارای خاک رس است. حداکثر طول ۹۸ سانتیمتر و دم ۷ سانتیمتر است. پوزه پهن و کوتاه، سر و گردن کاملاً مشخص، پولک‌ها تیغه دار، مردمک چشم عمودی، سطح پشتی قهوه‌ای تیره تا روشن، قهوه‌ای خاکستری تا خاکستری نقره‌ای، روی سر دارای علامتی

1. Normalized Difference Vegetation Index

2. LD₅₀

3. Cryptic species

4. Saw-scaled Viper, Carpet Viper

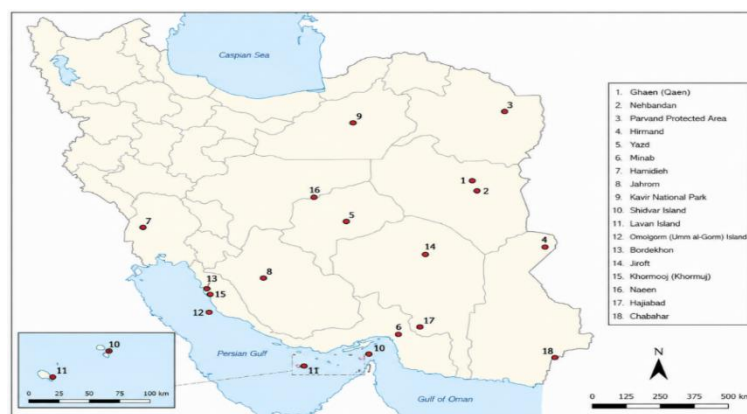
صلیبی شکل به رنگ روشن، در پهلوها دارای خط سفید موجی شکل کامل یا بریده همراه با لکه‌های سفید با کناره‌های تیره متمایل به سیاه و سطح شکمی سفید یا روشن گاهی همراه با خال‌های ریز تیره رنگ دیده می‌شود. این گونه از نظر وضعیت حفاظتی در طبقه کم‌ترین تهدید (LC) فهرست قرمز کمیته بقاء گونه‌های اتحادیه جهانی حفاظت از طبیعت و منابع طبیعی قرار دارد. مهم‌ترین عامل تهدید این گونه صید بی‌رویه جهت استحصال زهر معرفی شده است. همچنین در فهرست خزندگان حمایت و حفاظت شده سازمان حفاظت محیط زیست ایران قرار داشته ولی در ضامم کنوانسیون منع تجارت بین‌المللی گونه‌های در معرض انقراض (CITES) فهرست نشده است.

۲-۲- محدوده مورد مطالعه:

این پژوهش با هدف بررسی و مقایسه تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت‌های افعی جعفری (*E. carinatus*) در ایران انجام شد. محدوده جغرافیایی در این مطالعه، بخش وسیعی از زیستگاه‌های شناخته‌شده از این گونه در ایران، شامل مناطق مرکزی کشور، دامنه‌ها و دشت‌های مجاور رشته‌کوه زاگرس، نواحی جنوبی و جنوب‌غربی کشور تا سواحل خلیج فارس و همچنین برخی از جزایر جنوبی ایران را دربر گرفت. مناطق نمونه‌برداری به گونه‌ای در نظر گرفته شدند که بخش قابل توجهی از دامنه پراکنش جغرافیایی گونه در ایران پوشش داده شود. به منظور تعیین مناطق مناسب برای نمونه‌برداری، ابتدا اطلاعات موجود درباره پراکنش، زیستگاه و سوابق ثبت افعی جعفری از طریق بررسی منابع علمی، گزارش‌های پیشین، اطلاعات موجود در دانشگاه‌ها و ادارات کل حفاظت محیط زیست استان‌ها و همچنین سوابق مشاهده و جمع‌آوری نمونه بررسی شد. بر این اساس، مطالعات میدانی در استان‌های خراسان شمالی، خراسان رضوی، خراسان جنوبی، سمنان، کرمان، یزد، فارس، هرمزگان، بوشهر و خوزستان و نیز برخی از جزایر جنوبی ایران انجام گرفت.

۲-۳- نمونه برداری میدانی:

نمونه‌برداری‌های میدانی طی سال‌های ۱۴۰۱-۱۳۹۹ در مناطق واقع در شرق، شمال‌شرق، مرکز، جنوب و جنوب‌غرب ایران انجام شد. مجوز نمونه‌برداری و جمع‌آوری نمونه‌ها از سازمان حفاظت محیط زیست با شماره ۹۹/۴۲۰/۲۵۲۴۷ مورخ ۱۳۹۹/۰۷/۰۸ اخذ شد. در جریان بازدیدهای میدانی، زیستگاه‌های بالقوه و گزارش‌شده برای حضور افعی جعفری مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌های زنده با رعایت اصول ایمنی و استانداردهای کار با مارهای سمی جمع‌آوری شدند. بخشی از نمونه‌ها پس از صید به آزمایشگاه تکثیر و پرورش جانوران در معرض خطر انقراض دانشگاه تهران منتقل و پس از طی دوره قرنطینه در شرایط مناسب نگهداری شدند. علاوه بر نمونه‌های جمع‌آوری شده در مطالعات میدانی، در موارد لازم از نمونه‌های تثبیت شده موجود در مجموعه‌های دانشگاهی و مراکز وابسته به ادارات کل حفاظت محیط زیست استان‌ها نیز استفاده شد. در مجموع، ۲۸ نمونه از افعی جعفری از ۱۸ نقطه مختلف مورد استفاده قرار گرفتند. تلاش شد نمونه‌ها از مناطق جغرافیایی مختلف انتخاب شوند تا تنوع ژنتیکی احتمالی در سطح دامنه پراکنش گونه تا حد امکان نمایندگی شود. شکل (۱) موقعیت جغرافیایی نقاط نمونه‌برداری از افعی جعفری در ایران را نشان می‌دهد.



شکل (۱): موقعیت نقاط نمونه‌برداری از افعی جعفری در ایران. نقاط قرمز محل‌های جمع‌آوری نمونه‌ها را در استان‌ها و نواحی مختلف کشور نشان می‌دهند و شماره هر نقطه با فهرست سمت راست شکل مطابقت دارد. نقشه کوچک پایین شکل، موقعیت نمونه‌های جزایر شیدور و لاوان در خلیج فارس را با جزئیات بیشتر نشان می‌دهد.

۲-۴- جمع‌آوری و نگهداری نمونه‌های بافتی:

برای تهیه نمونه بافتی از افراد زنده، حاشیه خارجی پنج فلس شکمی از هر نمونه با رعایت اصول بهداشتی و حداقل آسیب به جانور برداشت شد. ابزار مورد استفاده برای نمونه‌برداری پیش از برداشت هر نمونه ضدعفونی گردید تا احتمال آلودگی متقاطع میان نمونه‌ها کاهش یابد. نمونه‌های بافتی

بلافاصله پس از برداشت در لوله‌های مجزا حاوی اتانول ۹۶ درصد قرار داده شدند و تا زمان انجام مراحل مولکولی در شرایط مناسب نگهداری شدند. برای هر نمونه، اطلاعات مربوط به محل نمونه‌برداری، استان، تاریخ جمع‌آوری، جنسیت در صورت امکان تشخیص و سایر اطلاعات میدانی ثبت شد.

۲-۵- استخراج DNA، تکثیر و تعیین توالی ژنهای میتوکندریایی:

DNA ژنومی از نمونه‌های بافتی فلس با استفاده از کیت DNA Extraction Kit (ParsTs, Iran) مطابق دستورالعمل مربوطه استخراج شد. کیفیت DNA استخراج‌شده با استفاده از اسپکتروفتومتر و ژل آگارز یک درصد بررسی گردید. چهار ژن میتوکندریایی (*cyt b*)، زیر واحد ۴ NADH دهیدروژناز (NADH4)، زیر واحد کوچک 12S rRNA (12S) و زیر واحد کوچک 16S rRNA (16S) با استفاده از پرایمرها و شرایط دمایی شرح داده شده توسط Pook et al. (۲۰۰۹) با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) تکثیر شدند. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در جدول (۱) ارائه شده است.

جدول (۱): مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در تکثیر توالی‌های ژن میتوکندریایی (Pook et al., 2009).

ژن	نام آغازگر	توالی	موقعیت تقریبی
<i>cyt b</i>	GludgMod2a	CTGAAAAACCAACCGTTGT	14902
	EchRa	GCTCCDCCBAGTTTTRTT	15787
ND4	NADH4b	CACCTATGACTACCAAAAGCTCATGTAGAAGC	11677
	HIS12763Vc	TTCTATCACTTGGATTTCACCA	12594
12S	L1091d	AAACTGGGATTAGATACCCCACTAT	478
	H1557d	GTACACTTACCTTGTTACGACTT	980
16S	L2510e	CGCCTGTTTATCAAAAACAT	1828
	H3059e	CCGGTCTGAACCTCAGATCACGT	2376

واکنش‌های PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد. برنامه دمایی کلی شامل دناتوراسیون اولیه در ۹۴ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ تا ۵ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه و در نهایت طولی‌سازی نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه بود. محصولات PCR پس از بررسی کیفیت و اندازه قطعات تکثیر شده توسط الکتروفورز ژل آگارز، خالص‌سازی و برای تعیین توالی نوکلئوتیدی به روش Sanger sequencing ارسال شدند. از ابزار FinchTV ver.1.4 برای بررسی کیفیت و حذف بخش‌های نامطمئن در ابتدا و انتهای توالی‌ها، ویرایش و آماده‌سازی برای تحلیل‌های بعدی استفاده شد.

۲-۶- روش‌های مورد استفاده برای تجزیه و تحلیل داده‌ها:

در مجموع، قطعاتی از چهار ژن میتوکندریایی در ۲۸ فرد از نمونه‌های افعی جعفری مورد بررسی قرار گرفت. به‌منظور ویرایش توالی‌ها، از نرم‌افزار Geneious Prime 2021/1 استفاده شد. برای بررسی فراوانی بازهای مختلف و تعیین میزان جانشینی‌های نوع اول و دوم و فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها از نرم‌افزار MEGA 11 استفاده شد. توالی‌ها با استفاده از الگوریتم Clustalw در MEGA 11 هم‌ردیف شدند. آزمون اشباع جایگزینی برای داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار DAMBE6 انجام شد. با استفاده از نرم‌افزار DnaSP، تعداد جایگاه‌های چندشکلی (S)، تعداد کل جهش‌ها (Eta)، تعداد هاپلوتیپ‌ها (h)، تنوع هاپلوتیپی (Hd)، تنوع نوکلئوتیدی (π)، میانگین تعداد اختلافات نوکلئوتیدی بین توالی‌ها (k) و پارامتر جهشی تتا بر اساس تعداد جایگاه‌های تفکیک‌شونده (θ) محاسبه شد. همچنین تنوع نوکلئوتیدی اصلاح‌شده بر اساس مدل Jukes-Cantor برای ارزیابی اثر احتمالی جایگزینی‌های متعدد در یک جایگاه محاسبه گردید. همچنین جهت بررسی چگونگی تکامل جمعیت‌های افعی جعفری در ایران و تاثیر انتخاب طبیعی بر آن، از شاخص‌های *Tajima's D*، *F_s* و *Strobeck's S* در نرم‌افزار DnaSP 5.10 استفاده شد. به‌منظور بررسی روابط تبارشناختی بین هاپلوتایپ‌ها، شبکه‌های هاپلوتایپی هر چهار ژن میتوکندریایی با استفاده از نرم‌افزار popart (popart.maths.otago.ac.nz) نسخه ۱/۷ و بر اساس روش TCS که یک ابزار گرافیکی و آماری قوی بر پایه صرفه‌جویی آماری برای نمایش روابط خویشاوندی و فراوانی هاپلوتیپ‌ها در سطح درون‌گونه‌ای است، ترسیم گردید. در شبکه‌های حاصل، هر هاپلوتیپ بر اساس فراوانی نمونه‌های متعلق به آن و در صورت وجود اطلاعات جغرافیایی، بر اساس منشأ جغرافیایی نمونه‌ها مشخص شد. تعداد جهش‌های نوکلئوتیدی میان هاپلوتیپ‌ها نیز بر اساس ارتباط میان گره‌های شبکه مورد بررسی قرار گرفت. این شبکه برای ارزیابی ارتباط ژنتیکی میان هاپلوتیپ‌ها و بررسی وجود ساختار جغرافیایی احتمالی در جمعیت‌های مورد مطالعه استفاده شد.

۳- نتایج:

تحلیل داده‌ها با استفاده از توالی چهار ژن مورد مطالعه انجام شد. فراوانی نوکلئوتیدها و نرخ جانشینی‌های همسان و ناهمسان برای این چهار ژن در جدول (۲) ارائه شده است. در تمام ژن‌ها، فراوانی گوانین پایین‌ترین مقدار را داشت که ویژگی رایج ژنوم میتوکندریایی است. نسبت جانشینی‌های همسان به ناهمسان در ژن *cyt b* به‌طور قابل‌توجهی بالاتر از سایر ژن‌ها بود، در حالی که ND 4 کمترین نسبت را نشان داد. این تفاوت‌ها می‌تواند ناشی از تفاوت در نرخ تکامل و محدودیت‌های ساختاری هر ژن باشد.

جدول (۲): فراوانی نوکلئوتیدی و تخمین الگوی جانیشینی نوکلئوتیدی در نمونه‌های مورد استفاده از جمعیت‌های افعی جعفری در ایران.

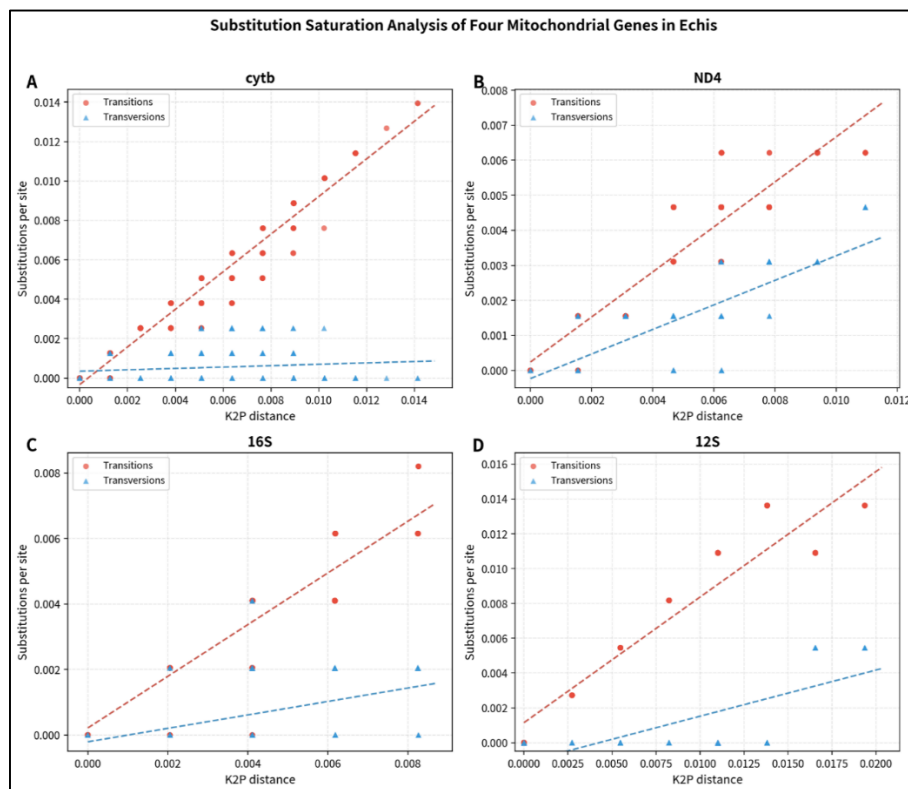
ژن	طول (bp)	A	C	G	T	Ts/Tv
cyt b	789	0.2612	0.3475	0.1200	0.2713	8.72
ND4	644	0.2897	0.3750	0.1113	0.2240	2.29
16S	488	0.3409	0.2329	0.1819	0.2442	5.68
12S	367	0.3189	0.2727	0.1996	0.2088	5.78

۳-۱- اشباع جایگزینی:

آزمون اشباع جایگزینی بر اساس شاخص Xia نشان داد که در هیچ‌یک از چهار ژن مورد بررسی cyt b، ND4، 16S و 12S اشباع جایگزینی وجود ندارد (شکل ۲). مقدار Iss برای ژن‌های cyt b، ND4، 16S و 12S به ترتیب برابر با ۰/۰۰۶۶، ۰/۰۰۵۸، ۰/۰۰۴۳ و ۰/۰۱۰۵ محاسبه شد که همگی به‌طور معنی‌داری کمتر از آستانه‌های بحرانی Iss.c بودند. الگوی جانیشینی‌های همسان و ناهمسان در برابر فاصله K2P نیز در تمامی ژن‌ها خطی و غیر اشباع بود و مناسب بودن داده‌ها را برای آنالیزهای بعدی تأیید نمود (جدول ۳).

جدول (۳): نتایج آزمون اشباع جایگزینی برای چهار ژن میتوکندریایی مورد استفاده برای افعی جعفری.

ژن	طول (bp)	سایت‌های پلی مورفیک (S)	Iss	شرایط اشباع
cyt b	789	21	0.0066	None
ND4	644	10	0.0058	None
16S	488	6	0.0043	None
12S	367	10	0.0105	None



شکل (۲): آنالیز اشباع جایگزینی چهار ژن میتوکندریایی. نمودارها تعداد Transitions جایگزینی‌های همسان (دایره‌های قرمز) و ناهمسان (مثلث‌های آبی) را در برابر فاصله ژنتیکی K2P نشان می‌دهند (A) ژن cyt b، (B) ژن ND4، (C) ژن 16S و (D) ژن 12S را نشان می‌دهد. خطوط چین‌دار روند رگرسیون خطی را نشان می‌دهند. در هیچ‌یک از ژن‌ها اشباع جایگزینی مشاهده نشد.

۳-۲- تنوع ژنتیکی:

بالاترین سطح تنوع هاپلوتیپی و نوکلئوتیدی در ژن cyt b مشاهده شد ($H_d = 0.931$ و $\pi = 0.00518$). ژن ND4 تنوع هاپلوتیپی متوسط ($H_d = 0.855$) و تنوع نوکلئوتیدی نسبتاً پایین ($\pi = 0.00480$) نشان داد. در ژن‌های ریوزومی، 16S دارای تنوع هاپلوتیپی نسبت بالا ($H_d = 0.839$) و تنوع نوکلئوتیدی به نسبت پایین ($\pi = 0.00369$) و ژن 12S دارای تنوع هاپلوتیپی و نوکلئوتیدی به نسبت پایین بوده است ($H_d = 0.791$ و $\pi = 0.00938$). تعداد هاپلوتیپ‌ها در ژن‌های cyt b، ND4، 16S و 12S به ترتیب ۱۵، ۷، ۸ و ۶ و تعداد جایگاه‌های چندشکلی ۲۱، ۱۰، ۶ و ۱۰ به‌دست آمد. نسبت جایگزینی‌های همسان به ناهمسان در تمام ژن‌ها بالا و بین ۲/۲۹ تا ۸/۷۲ متغیر بود (جدول ۴).

جدول (۴): شاخص‌های تنوع ژنتیکی برای چهار ژن میتوکندریایی نمونه‌های افعی جعفری از ایران.

ژن	n	h	Hd	π	k	S	θW	Singleton haplotypes
cyt b	28	15	0.9312	0.005184	4.090	21	5.396	9
ND4	28	7	0.8545	0.004798	3.090	10	2.570	1
16S	28	8	0.8386	0.003692	1.802	6	1.542	3
12S	28	6	0.7910	0.009378	3.442	10	2.570	1

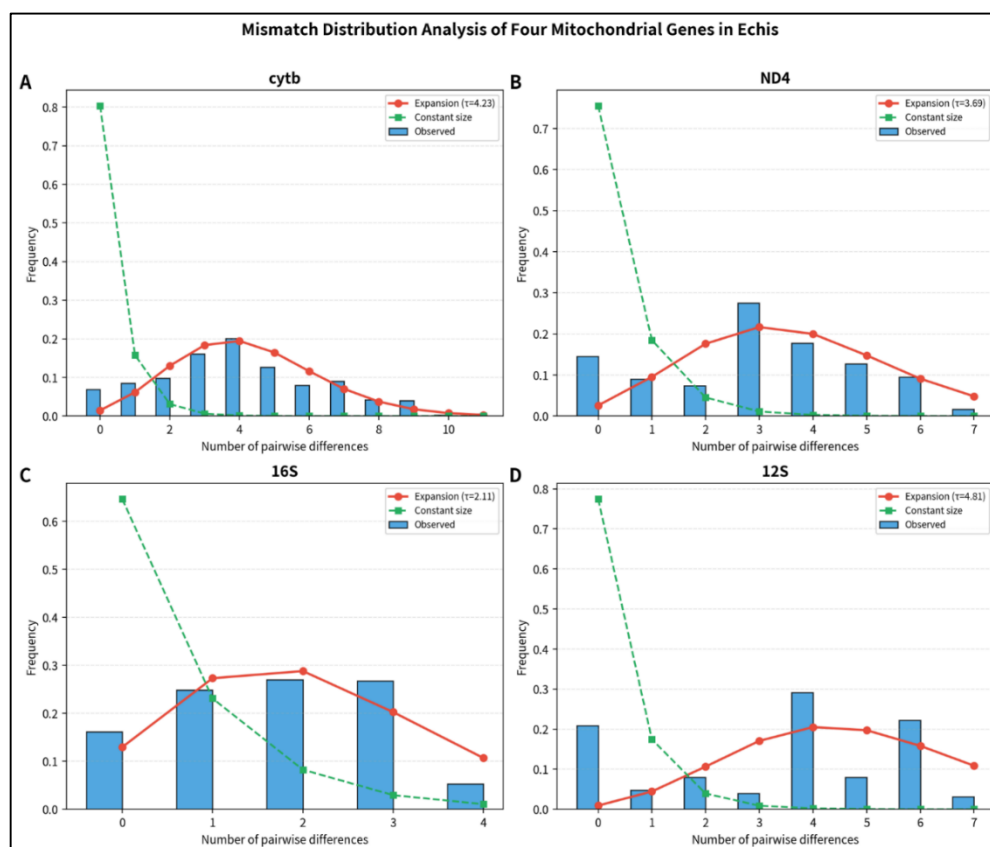
۳-۳- آزمون‌های خنثی بودن و تحلیل دموگرافیک:

الگوی آزمون‌های خنثی بودن در چهار ژن یکسان نبوده است. در ژن *cyt b*، مقادیر منفی $Tajima's D$ (-0.859) و به‌ویژه $Fu's Fs$ (-۴/۹۸۹) به‌دست آمد که نشانه‌ای قوی از انبساط جمعیتی اخیر است. در ژن 16S نیز $Fu's Fs$ منفی (-۱/۷۸۹) مشاهده شد. در مقابل، ژن‌های ND4 و 12S مقادیر مثبت برای هر دو آماره $Tajima's D$ و $Fu's Fs$ نشان دادند و فاقد شواهد انبساط بودند (جدول ۵).

جدول (۵): نتایج آزمون‌های خنثی بودن در چهار ژن میتوکندریایی گونه افعی جعفری.

ژن	$Tajima's D$	$Fu's Fs$	$Strobeck's S$
<i>cyt b</i>	-0.859	-4.989	0.035
ND4	+0.651	+0.827	0.555
16S	+0.489	-1.789	0.087
12S	+1.092	+2.129	0.746

تحلیل توزیع Mismatch نیز نتایج فوق را تأیید کرد (شکل ۳). مدل انبساط ناگهانی جمعیت در ژن‌های *cyt b* و 16S برازش بسیار مطلوبی داشته است (SSD به ترتیب ۰/۰۰۸۸ و ۰/۰۰۹۰)، در حالی که در ژن‌های ND4 و به‌ویژه 12S برازش ضعیف‌تری مشاهده شد و شاخص ناهمواری مقادیر بالاتری را نشان داد (جدول ۶).



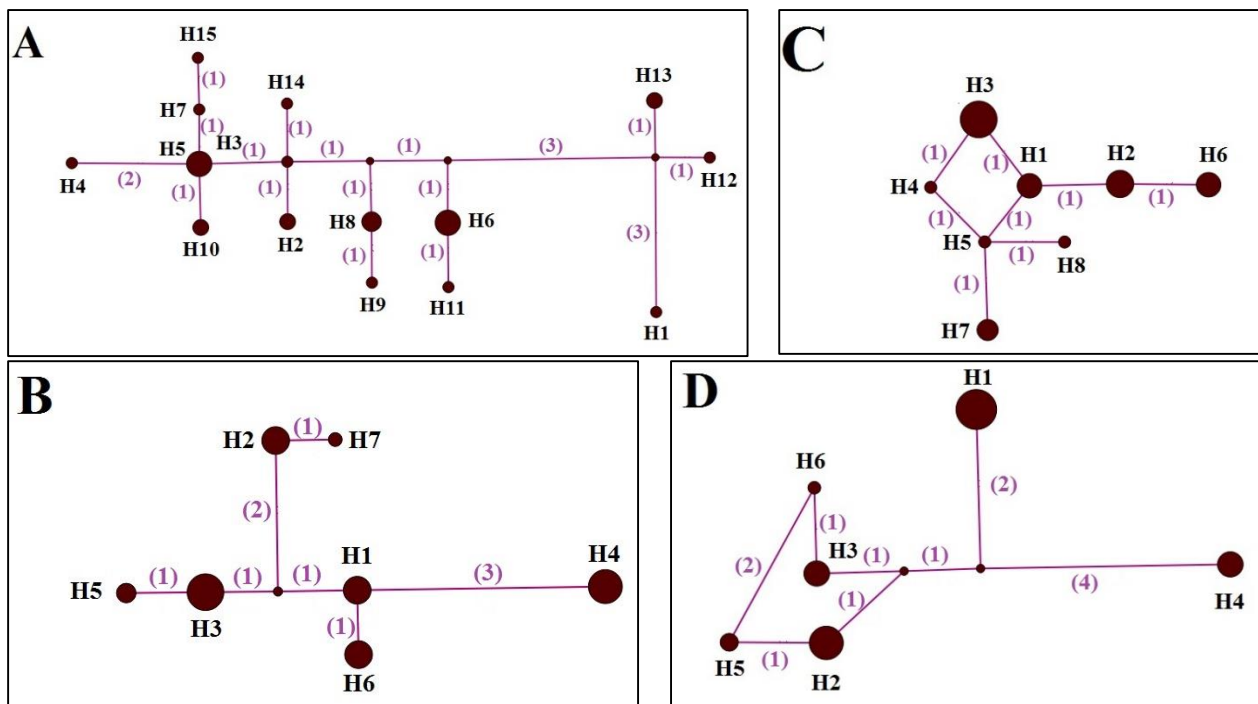
شکل (۳): تحلیل توزیع Mismatch در چهار ژن میتوکندریایی برای افعی جعفری ایران. میله‌های آبی فراوانی مشاهده شده، خط قرمز مدل انبساط ناگهانی جمعیت و خط سبز چین‌دار مدل اندازه ثابت جمعیت را نشان می‌دهند. (A) ژن (*cyt b*)، (B) ژن ND4، (C) ژن 16S، (D) ژن 12S.

جدول (۶): پارامترهای تحلیل توزیع Mismatch و شاخص های برازش مدل انبساط ناگهانی جمعیت در چهار ژن میتوکندریایی در نمونه های افعی جعفری.

ژن	Mean k	τ	SSD (expansion)	SSD (constant)	Raggedness (r)
cyt b	4.090	4.233	0.0088	0.6476	0.0176
ND4	3.090	3.692	0.0302	0.5074	0.0632
16S	1.802	2.109	0.0090	0.3294	0.0540
12S	3.442	4.809	0.0891	0.4790	0.1933

۳-۴- شبکه های هاپلوتیپی:

شبکه های هاپلوتیپی چهار ژن میتوکندریایی ساختارهای متفاوتی را نشان دادند (شکل ۴). شبکه ژن cyt b دارای ساختار به طور عمده خطی با شاخه های جانبی کوتاه و تعداد به نسبت زیاد هاپلوتیپ های تک نمونه ای بود که با الگوی انبساط جمعیتی همخوانی دارد. در این شبکه، دو هاپلوتیپ پرتعداد Hap_5 و Hap_6 به ترتیب در مناطق جنوبی تا جنوب غربی و نیز شرق تا شمال شرقی پراکنده بودند. شبکه های ژن های ND4 و 12S فشرده تر و با تعداد هاپلوتیپ کمتر بودند و الگوی ستاره مانند قوی در آن ها مشاهده نشد. شبکه ژن 16S نیز ساختاری نسبتاً فشرده همراه با یک حلقه کوچک نشان داد که می تواند ناشی از همپلازی باشد.



شکل (۴): شبکه هاپلوتیپی نمونه های افعی جعفری مبتنی بر توالی های ژن های مورد مطالعه. (A) ژن (cyt b)، (B) ژن (ND4)، (C) ژن 16S و (D) ژن 12S. اندازه گره ها متناسب با تعداد نمونه های مشترک در هر هاپلوتیپ است. اعداد روی شاخه ها نیز بیانگر تعداد گام های جهشی میان هاپلوتیپ ها هستند.

تعلق هر یک از نمونه ها به هاپلوتیپ های شناسایی شده در چهار ژن در جدول (۷) ارائه شده است. همان گونه که در جدول (۷) مشاهده می شود، الگوهای هاپلوتیپی در ژن های مختلف کاملاً یکسان نیست و برخی نمونه ها در ژن های گوناگون به هاپلوتیپ های متفاوتی تعلق دارند. این موضوع بیانگر نرخ تکامل متفاوت نشانگرهای مولکولی و قدرت تفکیک متغیر آن ها در آشکارسازی تنوع ژنتیکی درون جمعیتی است. به طور کلی، اگرچه در برخی ژن ها جدایی نسبی هاپلوتیپ های مناطق جنوب غربی و شرقی قابل تشخیص بود، اما ساختار جغرافیایی قوی و واضحی در هیچ یک از شبکه ها مشاهده نگردید.

۳-۵- جمع بندی مقایسه ای:

در مجموع، ژن cyt b بالاترین سطح تنوع ژنتیکی و قوی ترین شواهد انبساط جمعیتی را نشان داد. ژن 16S شواهد ضعیف تری از انبساط ارائه نمود، در حالی که ژن های ND4 و 12S فاقد نشانه های واضح انبساط بودند. در هیچ یک از چهار ژن مورد استفاده، ساختار جغرافیایی قوی مشاهده نشد، هرچند جدایی نسبی هاپلوتیپ های غالب مناطق جنوب غربی و شرقی در برخی ژن ها قابل تشخیص بود. این یافته ها در مجموع نشان دهنده تاریخچه دموگرافیک پیچیده و احتمالاً انبساط جمعیتی اخیر در جمعیت های مورد مطالعه است که با وضوح بیشتری در ژن cyt b منعکس شده است.

جدول شماره (۷): تعلق هر یک از نمونه‌های مورد بررسی به هاپلوטיפ‌های شناسایی شده در چهار ژن میتوکندریایی *cyt b*، ND4، 16S و 12S را نشان می‌دهد. شماره‌گذاری هاپلوטיפ‌ها در هر ژن به‌طور مستقل و بر اساس فراوانی انجام شده است.

نمونه	<i>cyt b</i>	ND4	16S	12S
بردخون_۲۰۲۲	Hap_10	Hap_3	Hap_3	Hap_5
بردخون_۲۰۲۶	Hap_10	Hap_3	Hap_3	Hap_5
چابهار_۲۰۴۹	Hap_12	Hap_1	Hap_1	Hap_1
چابهار_۲۰۵۰	Hap_13	Hap_1	Hap_1	Hap_1
چابهار_۲۰۵۱	Hap_13	Hap_1	Hap_1	Hap_1
قائن_۲۰۳۸	Hap_6	Hap_4	Hap_4	Hap_3
قائن_۲۰۳۹	Hap_6	Hap_4	Hap_5	Hap_3
حاجی آباد_۲۰۱۱	Hap_1	Hap_1	Hap_1	Hap_1
حمیدیه_۲۰۱۵	Hap_4	Hap_3	Hap_3	Hap_2
حمیدیه_۲۰۱۷	Hap_5	Hap_3	Hap_3	Hap_2
هیرمند_۲۰۵۳	Hap_6	Hap_4	Hap_8	Hap_1
چهرم_۲۰۲۹	Hap_5	Hap_2	Hap_2	Hap_1
جیرفت_۲۰۲۵	Hap_14	Hap_7	Hap_2	Hap_1
کوبر_۲۰۴۲	Hap_7	Hap_5	Hap_3	Hap_2
خورموج_۲۰۵۶	Hap_5	Hap_3	Hap_3	Hap_2
لاوان_۱۴۴۲	Hap_8	Hap_6	Hap_6	Hap_4
میناب_۲۰۱۹	Hap_3	Hap_2	Hap_2	Hap_1
میناب_۲۰۲۰	Hap_2	Hap_2	Hap_2	Hap_1
نابین_۱۱۳۷	Hap_15	Hap_5	Hap_3	Hap_2
نهبندان_۲۰۴۵	Hap_6	Hap_4	Hap_7	Hap_3
نهبندان_۲۰۴۶	Hap_6	Hap_4	Hap_7	Hap_6
ام الگرم_۲۰۳۴	Hap_5	Hap_3	Hap_3	Hap_2
ام الگرم_۲۰۳۵	Hap_5	Hap_3	Hap_3	Hap_2
پروند_۲۰۴۷	Hap_11	Hap_4	Hap_7	Hap_3
شیدور_۱۴۵۵	Hap_8	Hap_6	Hap_6	Hap_4
شیدور_۱۴۵۶	Hap_9	Hap_6	Hap_6	Hap_4
شیدور_۲۰۳۰	Hap_8	Hap_6	Hap_6	Hap_4
یزد_۲۰۱۲	Hap_2	Hap_2	Hap_2	Hap_1

۴- بحث:

نتایج حاصل از تحلیل چهار ژن میتوکندریایی *cyt b*، ND4، 16S و 12S در مجموع ۲۸ فرد از جمعیت‌های افعی جعفری در گستره وسیعی از زیستگاه‌های ایران، تصویر نسبتاً همگنی از تنوع ژنتیکی را همراه با نشانه‌های روشن از تاریخچه جمعیت شناختی پویا ارائه می‌دهد. بالاترین سطح تنوع هاپلوטיפی در ژن *cyt b* مشاهده شد ($Hd = 0.931$) که همراه با تعداد نسبتاً زیاد هاپلوטיפ‌های تک‌نمونه (نه هاپلوטיפ) و تنوع نوکلئوتیدی متوسط ($\pi \approx 0.00518$) بود. این ترکیب از تنوع هاپلوטיפی بالا و تنوع نوکلئوتیدی نسبتاً پایین، الگوی کلاسیک جمعیت‌هایی است که پس از یک دوره تنگنای جمعیتی یا مهاجرت، دچار انبساط جمعیتی اخیر شده‌اند. این الگو با انبساط جمعیتی اخیر سازگار است و مقدار منفی و نسبتاً قوی ($Fu's Fs = -4/989$) در ژن *cyt b* و همچنین برآزش مطلوب مدل انبساط ناگهانی در تحلیل توزیع Mismatch و Raggedness پایین ($SSD = 0.0088$) شواهد محکمی برای انبساط جمعیتی اخیر فراهم می‌آورند. چنین الگوهایی در جمعیت‌های شمالی و غربی گروه *E. carinatus* پیش‌تر نیز گزارش شده است. مطالعات فیلوژئوگرافی نشان داده‌اند که هاپلوטיפ‌های مناطق پاکستان، امارات متحده عربی، عراق و نواحی مجاور واگرایی بسیار پایینی نشان داده و ساختار جغرافیایی قوی ندارند (Pook et al., 2009; Rhadi et al., 2016). این همگنی ژنتیکی با فرضیه گسترش نسبتاً اخیر جمعیت‌ها از جنوب شبه‌قاره هند به سوی شمال و غرب هم‌خوانی دارد (Pook et al., 2009; Arnold et al., 2009). ژن 16S نیز نشانه‌های ضعیف‌تری از انبساط نشان داد، در حالی که ژن‌های ND4 و 12S الگوی خنثی‌تری داشتند. این تفاوت میان نشانگرها امری رایج در مطالعات درون‌گونه‌ای است و عمدتاً به تفاوت در نرخ تکامل، اندازه مؤثر جمعیت و محدودیت‌های ساختاری و عملکردی هر ژن نسبت داده می‌شود.

شبکه‌های هاپلوטיפی ترسیم‌شده برای چهار ژن نیز ساختار جغرافیایی قوی و واضحی را در مقیاس ایران آشکار نکردند. اگرچه در شبکه ژن *cyt b* جدایی نسبی میان هاپلوטיפ‌های غالب مناطق جنوب‌غربی تا جنوب و شرق تا شمال‌شرقی قابل تشخیص بود و دو هاپلوטיפ پرتعداد به‌طور عمده در این دو پهنه جغرافیایی توزیع شده بودند، اما جریان ژن ظاهراً در مقیاس وسیع حفظ شده و هیچ شکاف عمیقی میان جمعیت‌های مختلف مشاهده نگردید. این الگوی همگنی نسبی با یافته‌های پیشین در مورد گروه *E. carinatus* در نواحی غربی و شمالی دامنه پراکنش آن کاملاً سازگار است که نشان دهنده واگرایی بسیار پایین و عدم ساختار جغرافیایی قوی در هاپلوטיפ‌های جمعیت‌های پاکستان، امارات متحده عربی، عراق و نواحی مجاور است (Rhadi et al., 2016). Pook et al. (۲۰۰۹) نیز گزارش کردند که هاپلوטיפ‌های بخش شمالی دامنه پراکنش *E. carinatus* شامل شبه‌جزیره

عربی، پاکستان، آسیای مرکزی و شمال غرب هند، خوشه‌ای فشرده و بدون ساختار فیلوژئوگرافی واضح تشکیل می‌دهند. وجود مورف تیره در جزیره شیدور نیز بدون واگرایی ژنتیکی قابل توجه، نشان‌دهنده تنوع فنوتیپی محلی در چارچوب همین کلاد نسبتاً همگن است (Mobaraki and Oraie, 2024)، یافته‌های حاضر را می‌توان در چارچوب مناقشات دیرینه تبارزایی و زیست‌جغرافیای تاریخی جنس *Echis* تفسیر کرد. تحلیل‌های مولکولی جامع نشان داده‌اند که این جنس به چهار کلاد اصلی تقسیم می‌شود که تا حد زیادی با مناطق جغرافیایی همخوانی دارند: گروه *E. ocellatus* در غرب آفریقا، گروه *E. pyramidum* در شمال استوایی آفریقا و بخش‌هایی از عربستان، گروه *E. coloratus* در شبه‌جزیره عربستان، و گروه *E. carinatus* در جنوب غرب و جنوب آسیا (Pook et al., 2009; Arnold et al., 2009). کلاد *E. carinatus* کمترین میزان واگرایی داخلی را در میان این چهار گروه نشان می‌دهد و توزیع فعلی آن احتمالاً نتیجه گسترش محدوده‌ای نسبتاً اخیر از جنوب شبه‌قاره هند به سوی شمال و غرب است (Pook et al., 2009; Ashraf et al., 2020). داده‌های میتوکندریایی جمعیت‌های ایرانی که سطح پایین واگرایی نوکلئوتیدی و الگوی انبساط جمعیتی اخیر را نشان می‌دهند، با این سناریوی گسترش به سوی شمال و غرب شبه جزیره هند، سازگارتر به نظر می‌رسند تا فرضیه‌هایی که منشأ محلی در عمان یا جنوب ایران را پیشنهاد می‌کنند. با این حال، اظهار نظر قطعی منشأ جغرافیایی جنس و ترتیب دقیق انشعاب کلادها همچنان نیازمند نمونه‌برداری گسترده‌تر از کل دامنه پراکنش این گونه، به‌ویژه از مناطق مرکزی و جنوبی هند و نیز استفاده از مارکرهای بیشتر به ویژه مارکرهای هسته‌ای است.

از دیدگاه کاربردی و پزشکی، نتایج این مطالعه حاضر اهمیت ویژه‌ای هستند. تفاوت‌های قابل توجه در ترکیب زهر میان گونه‌های مختلف جنس *Echis* و حتی میان جمعیت‌های جغرافیایی یک گونه به‌خوبی مستند شده و می‌تواند به‌طور مستقیم بر کارایی آنتی‌ونوم تأثیر بگذارد (Casewell et al., 2010; Casewell et al., 2014). مطالعات پیش‌بالینی نشان داده‌اند که آنتی‌ونوم‌های تولیدشده علیه گونه‌های آفریقایی (مانند EchiTabG که علیه *E. ocellatus* ساخته شده است) اغلب در خنثی‌سازی اثرات کشنده زهر *E. c. sochureki* ناکارآمد بوده‌اند (Casewell et al., 2010). در مقابل، مطالعه جامع پروتئومیکس در خصوص سه جمعیت ایرانی *E. c. sochureki* از استان‌های هرمزگان، سیستان و بلوچستان و خراسان جنوبی نشان داد که ترکیب زهر خام، مقادیر دوز کشنده میانه (LD50) و سمیت کلی در این سه جمعیت بسیار مشابه است و در مجموع ۲۲ خانواده پروتئینی به‌علاوه چندین خانواده پروتئینی جدید بوده است (Ghezellou et al., 2021). سطح بالای تنوع هاپلوپتیپی مشاهده‌شده در مطالعه حاضر، به‌ویژه وجود هاپلوپتیپ‌های اختصاصی در مناطق مختلف، نشان می‌دهد که حتی در صورت شباهت نسبی پروتئوم زهر در مقیاس فعلی نمونه‌برداری، نادیده گرفتن تنوع ژنتیکی منطقه‌ای ممکن است در بلندمدت بر پوشش و اثربخشی آنتی‌ونوم‌های تولیدی تأثیر منفی بگذارد. بنابراین، انتخاب جمعیت‌های نماینده برای استحصال زهر و تولید یا ارزیابی آنتی‌ونوم نه صرفاً بر مبنای فاصله جغرافیایی بلکه باید بر اساس تلفیق داده‌های ژنتیکی و زهرشناسی صورت گیرد (Bhatia and Vasudevan, 2020).

از منظر حفاظت و مدیریت خطر مارگزیدگی، یافته‌های ژنتیکی حاضر باید در کنار داده‌های بوم‌شناختی تفسیر شوند. مدل‌سازی مطلوبیت زیستگاه نشان داده که نواحی جنوبی ایران، شمال خلیج فارس و بخش‌های وسیعی از مناطق مرکزی کشور بالاترین مطلوبیت زیستگاهی را برای *E. carinatus* داشته و حدود ۳۰،۳۳۹ روستا در معرض خطر متوسط تا بالای گزش این گونه قرار دارند (Yousefi et al., 2020). فقدان ساختار ژنتیکی قوی در داده‌های میتوکندریایی به‌معنای وجود یک واحد مدیریتی واحد و همگن نیست. هاپلوپتیپ‌های خصوصی و نشانه‌های انبساط جمعیتی اخیر می‌توانند نشان‌دهنده جمعیت‌هایی باشند که در گذشته دچار نوسانات جمعیتی شده‌اند و ممکن است نسبت به تخریب زیستگاه، تغییر اقلیم و فشارهای انسانی آسیب‌پذیرتر باشند. تعریف واحدهای حفاظتی تکاملی (Evolutionarily Significant Units) نیازمند تلفیق داده‌های میتوکندریایی با نشانگرهای هسته‌ای (مانند SNPها یا ریزماهورها) و مطالعات فنوتیپی دقیق‌تر، از جمله بررسی مورف تیره گزارش‌شده از جزیره شیدور است.

محدودیت‌های مطالعه حاضر شامل اندازه نمونه به نسبت متوسط (۲۸ فرد)، تمرکز بر نشانگرهای میتوکندریایی که تنها تاریخچه مادری را بازتاب می‌دهند و همچنین فقدان داده‌های هسته‌ای و زهرشناسی همزمان از همان افراد است. این محدودیت‌ها باعث می‌شود نتوان با قطعیت در مورد جریان ژن دوطرفه یا وجود ساختار ژنتیکی ظریف‌تر در سطح هسته‌ای اظهار نظر کرد. مطالعات آینده باید با افزایش پوشش جغرافیایی (به‌ویژه از مناطق غربی، مرزی و جزایر جنوبی ایران)، استفاده از توالی کامل ژنوم میتوکندریایی یا داده‌های ژنومی در مقیاس وسیع و نیز تلفیق آنالیزهای زهرشناسی (Venomics) با آزمایش‌های خنثی‌سازی آنتی‌ونوم، تصویر بسیار دقیق‌تری از تنوع ژنتیکی - فنوتیپی جمعیت‌های ایرانی ارائه دهند. چنین رویکرد تلفیقی نه تنها به درک بهتر تاریخچه تکاملی و زیست‌جغرافیایی *E. carinatus* در منطقه آفرو-آسیایی کمک شایانی خواهد کرد، بلکه پایه‌ای علمی و مستدل برای تولید آنتی‌ونوم‌های منطقه‌ای با قدرت خنثی‌سازی بالاتر و طراحی برنامه‌های حفاظتی مبتنی بر شواهد فراهم خواهد ساخت.

در مجموع، جمعیت‌های افعی جعفری در ایران از تنوع هاپلوپتیپی قابل توجه، به‌ویژه در ژن *cyt b* و نشانه‌های روشن از انبساط جمعیتی اخیر برخوردارند، در حالی که ساختار جغرافیایی قوی و عمیقی در داده‌های میتوکندریایی مشاهده نشد. این الگوها با یافته‌های پیشین درباره همگنی نسبی زیرگونه *E. c. sochureki* و گسترش نسبتاً اخیر آن از جنوب آسیا به سوی غرب و شمال کاملاً سازگار است و هم از نظر تکاملی و هم از نظر کاربردی (پزشکی)

و حفاظتی) اهمیت ویژه‌ای دارند. نادیده گرفتن این تنوع ژنتیکی، حتی در صورت شباهت ظاهری زهر، می‌تواند پیامدهای منفی برای مدیریت بالینی مارگزیدگی و حفاظت بلندمدت گونه در ایران به‌همراه داشته باشد.

منابع:

- رجبی‌زاده، م. ۱۳۹۷. مارهای ایران. تهران: انتشارات ایران‌شناسی، ۴۹۶ص.
- Alencar, L.R.V., Quental, T.B., Grazziotin, F.G., Alfaro, M.L., Martins, M., Venzon, M., and Zaher, H. (2016). Diversification in vipers: Phylogenetic relationships, time of divergence and shifts in speciation rates. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 105, 50–62.
- Allendorf, F.W., Funk, W.C., Aitken, S.N., Byrne, M., and Luikart, G. (2022). *Conservation and the Genetics of Populations* (3rd ed.). USA: Wiley-Blackwell, 664p.
- Amer, S.A.M., and Kumazawa, Y. (2005). Mitochondrial DNA sequences of the Afro-Arabian spiny-tailed lizards (genus *Uromastix*; family Agamidae): Phylogenetic analyses and evolution of gene arrangements. *Biological Journal of the Linnean Society*, 85(2), 247–260.
- Arnold, E.N., Robinson, M.D., and Carranza, S. (2009). A preliminary analysis of phylogenetic relationships and biogeography of the dangerously venomous carpet vipers, *Echis* (Squamata, Serpentes, Viperidae) based on mitochondrial DNA sequences. *Amphibia-Reptilia*, 30(2), 273–282.
- Ashraf, M.R., Nadeem, A., Smith, E.N., Javed, M., Smart, U., Yaqub, T., Hashmi, M. and Thammachoti, P. (2020). Molecular phylogenetics of saw-scaled viper (*Echis carinatus*) from Pakistan. *Pakistan Journal of Zoology*, 52(4), 1517–1524.
- Babocsay, G. (2004). A new species of saw-scaled viper of the *Echis coloratus* complex (Ophidia: Viperidae) from Oman, Eastern Arabia. *Systematics and Biodiversity*, 1(4), 503–514.
- Bhatia, S., and Vasudevan, K. (2020). Comparative proteomics of geographically distinct saw-scaled viper (*Echis carinatus*) venoms from India. *Toxicon*: X, 7, 100048.
- Casewell, N.R., Cook, D.A., Wagstaff, S.C., Nasidi, A., Durfa, N., Wüster, W., and Harrison, R.A. (2010). Pre-clinical assays predict pan-African *Echis* viper efficacy for a species-specific antivenom. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(10), e851.
- Casewell, N.R., Wagstaff, S.C., Wüster, W., Cook, D.A., Bolton, F.M., King, S.I., ... and Harrison, R.A. (2014). Medically important differences in snake venom composition are dictated by distinct postgenomic mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(25), 9205–9210.
- Cherlin, V.A. (1990). Taxonomic revision of the genus *Echis* (Viperidae). Part II: A review of the classification and description of new forms. *Proceedings of the Zoological Institute, USSR Academy of Sciences, Leningrad*, 207, 193–223.
- Chorowicz, J. (2005). The East African rift system. *Journal of African Earth Sciences*, 379–410.
- Escoriza, D. (2009). Biogeography of the white-bellied carpet viper *Echis leucogaster* Roman, 1972 in Morocco, a study combining mitochondrial DNA data and ecological niche modeling. *Butlletí de La Societat Catalana d'Herpetologia*, 18, 55–68.
- Feroze, A., Malik, S.A., and Kilpatrick, C.W. (2010). Phylogenetic relationships of medically important vipers of Pakistan inferred from cytochrome *b* sequences. *The Journal of Animal and Plant Sciences*, 20(3), 147–157.
- Ghezellou, P., Albuquerque, W., Garikapati, V., Casewell, N. R., Kazemi, S.M., Ghassempour, A., and Spengler, B. (2021). Integrating top-down and bottom-up mass spectrometric strategies for proteomic profiling of Iranian saw-scaled viper, *Echis carinatus sochureki*, venom. *Journal of Proteome Research*, 20(1), 895–908.
- Gutiérrez, J.M., Calvete, J.J., Habib, A.G., Harrison, R.A., Williams, D.J., and Warrell, D.A. (2017). Snakebite envenoming. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 17063.
- Harzhauser, M., Kroh, A., Mandic, O., Piller, W. E., Göhlich, U., Reuter, M., and Berning, B. (2007). Biogeographic responses to geodynamics: A key study all around the Oligo-Miocene Tethyan Seaway. *Zoologischer Anzeiger*, 246(4), 241–256.
- Highland, D.K., and Myers, E.A. (2025). Mitochondrial phylogeny and molecular-based species delimitation illuminate cryptic diversity in saw-scaled vipers (Viperidae: *Echis*). *Herpetological Journal*, 35(4), 333–340.
- Lenk, P., Kalyabina, S., Wink, M., and Joger, U. (2001). Evolutionary relationships among the true vipers (Reptilia: Viperidae) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 19(1), 94–104.
- Mallow, D., Ludwig, D., and Nilson, G. (2003). *True Vipers: Natural History and Toxinology of Old World Vipers*. Krieger Publishing Company, Malabar, 412p.
- Mobaraki, A., and Oraie, H. (2024). Melanism in the saw-scaled viper, *Echis carinatus* (Schneider, 1801) from Sheedvar Island, Persian Gulf, Iran. *Zoology in the Middle East*, 70(4), 301–305.
- Murugananthan, A., Gnanathan, A., Kumanan, T., Amarasinghe, K.P., and Pirasath, S. (2025). (2025). Molecular phylogeography of *Echis carinatus* revisited: Insights from the Sri Lankan population of saw-scaled viper (Serpentes: Viperidae: *Echis*). *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 53(1).
- 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*, 53(3), 792–807.
- Rhadi, F.A., Rastegar-Pouyani, E., Rastegar-Pouyani, N., Ghaleb Mohammed, R., and Saeed Hosseini Yousefkhani, S. (2016). Phylogenetic affinities of the Iraqi populations of Saw-scaled vipers of the genus *Echis* (Serpentes: Viperidae), revealed by sequences of mtDNA genes. *Zoology in the Middle East*, 62(4), 299–305.
- Rögl, F. (1999). Circum-Mediterranean Miocene paleogeography. In G. Rössner and K. Heissig (Eds.), *The Miocene Land Mammals of Europe* (pp. 39–48). Dr. Fritz Pfeil Verlag, Munich.
- Safaei-Mahroo, B., Ghaffari, H., Fahimi, H., Broomand, S., Yazdani, M., Najafi-Majd, E., ... and Kazemi, M. (2015). The herpetofauna of Iran: Checklist of taxonomy, distribution and conservation status. *Asian Herpetological Research*, 6(4), 257–290.
- Szyndlar, Z., and Rage, J.-C. (1990). West Palearctic cobras of the genus *Naja* (Serpentes: Elapidae): Interrelationships among extinct and extant species. *Amphibia-Reptilia*, 11(4), 385–400.

- 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*, 45(2), 437–453.
- Wüster, W., Peppin, L., Pook, C.E., and Walker, D.E. (2008). A nesting of vipers: Phylogeny and historical biogeography of the Viperidae (Squamata: Serpentes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49(2), 445–459.
- Yousefi, M., Kafash, A., Khani, A., and Nabati, N. (2020). Applying species distribution models in public health research by predicting snakebite risk using venomous snakes' habitat suitability as an indicating factor. *Scientific Reports*, 10, 18073.

Genetic diversity and population structure of the Saw-scaled viper (*Echis carinatus* [Schneider, 1801]) in Iran based on mitochondrial genes

Reza Farrokhizadeh¹, Mohammad Kaboli^{2*}, Jalil Imani-Harsini³, Jan Štefka⁴, Lobat Taghavi⁵



Research Article

1. PhD Student, Department of Environmental Science, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

rezafarrokhhi1404@yahoo.com

2. Professor, Department of Environment, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

mkaboli@ut.ac.ir

* Corresponding author

3. Associate Professor, Department of Environmental Science, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

jalil.imani@srbiau.ac.ir

4. Associate Professor, Faculty of Science, University of South Bohemia, Czech Republic.

yan.stefka@gmail.com

5. Professor, Department of Environmental Science, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

lobat.taghavi@iau.ac.ir

Article Code: 2608-1197
Continous Pagination: 1398-1410

Received: 21 August 2026
Accepted: 07 September 2026
Online: 01 October 2026
Review speed: 18 days

Citation:

Farrokhizadeh, R., Kaboli, M., Imani-Harsini, J., Štefka, J., and Taghavi, L. (2026). Genetic diversity and population structure of the Saw-scaled viper (*Echis carinatus* [Schneider, 1801]) in Iran based on mitochondrial genes, 6(3), 1-13.

Abstract

The saw-scaled viper (*Echis carinatus*) is one of the most medically important venomous snakes in Iran and across much of southwestern Asia. Despite the clinical and conservation importance of this species, the genetic structure and diversity of its populations in Iran have not yet been comprehensively investigated. In this study, the genetic diversity of populations of this species in Iran was examined using four mitochondrial genes: *cyt b*, ND4, 16S, and 12S. A total of 28 samples were collected and sequenced from 18 localities across eastern, northeastern, central, southern, and southwestern Iran, as well as the Persian Gulf islands. The results showed that the *cyt b* gene exhibited the highest haplotype diversity ($H_d = 0.931$) and the highest number of haplotypes (15). Neutrality tests - particularly Fu's F_s (-4.989) and mismatch distribution analysis - provided clear evidence of recent population expansion among the populations studied. The results of haplotype network analyses did not reveal a strong geographic structure, although the relative separation of haplotypes from southwestern and eastern regions was detectable for some genes. This pattern is consistent with the reported relative homogeneity among northern and western populations of the *E. carinatus* group, (the subspecies *E. c. sochureki*), as well as with the hypothesis of the recent expansion of this species from South Asia westward and northward. The present findings not only shed light on part of the demographic history of this species in Iran but also highlight the need to integrate genetic data with toxicological studies to select representative populations for antivenom production and define conservation units.

Key Words:

Echis carinatus, haplotype diversity, population expansion, mitochondrial genes, antivenom, Iran.