



بررسی تنوعات درون گونه‌ای آگامای سرتخت (*Trapelus lessonae*) در ایران

اسرا بانی مهجور^۱، اسکندر رستگار پویانی^{۲*}، ویدا حجتی^۱

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران
 ۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران
 مسئول مکاتبات: e.rastegar@hsu.ac.ir
 تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۱۵

چکیده

آگامای سرتخت (*Trapelus lessonae*) متعلق به خانواده Agamidae، مارمولکی روزفعال است که زیستگاه در محدوده وسیعی از شمال غرب تا جنوب شرق کشور پراکنده دارد. این تحقیق، به منظور بررسی تنوعات درون گونه‌ای، روابط خویشاوندی و وضعیت تاکسونومیک جمعیت‌های گونه تراپلوس لسونه که گونه‌ای نسبتاً کمیاب و منزوی است از قسمت‌های شمال غرب تا نواحی مرکزی کشور از استان آذربایجان (شهرستان مرند)، استان کردستان (شهرستان میوان)، شمال کرمانشاه (منطقه شمال کرمانشاه)، شرق کرمانشاه (قصر شیرین)، غرب کرمانشاه (شهرستان کنگاور)، مرز استان‌های ایلام، کرمانشاه، استان مرکزی (شازند) و استان اصفهان (شهرستان شهرضا) از اردیبهشت تا شهریور ماه سال ۱۳۹۱ انجام شد و بیش از ۹۹ نمونه بدست آمد. نتایج مطالعات فیلوژنی مولکولی جمعیت‌های جمع‌آوری شده در محدوده مطالعاتی با استفاده از توالی‌های بدست آمده از ژن میتوکندریایی ND2، نشان داد که جمعیت‌های مختلف این گونه در نواحی آذربایجان، کردستان، کرمانشاه، استان مرکزی و اصفهان تفاوت‌های قابل توجهی با یکدیگر دارند و فاصله ژنتیکی معنادار است. نمونه‌های کردستان و آذربایجان بیشتر با هم خویشاوند هستند و در جاهایی که جمعیت‌های گونه شبیه هم نیستند ایزوله بوده و ارتباط ژنتیکی باهم نداشتند که احتمالاً وجود رشته‌کوه زاگرس مانع انتشار بوده است.

کلمات کلیدی: آگامای سرتخت، تنوع درون‌گونه‌ای، فیلوژنی مولکولی، ژن ND2، *Trapelus lessonae*

مقدمه

نواحی نیمه بیابانی و خشک، دشت‌های باز، ناهمواری‌های زمین سنگلاخی، صخره‌های رسوبی، ستیخ و بریدگی‌های کوه‌ها و دره‌های تنگ و عمیق با پوشش گیاهی پراکنده اندک می‌باشد [۱]. اغلب در لابه لای بوته‌ها و یا در نزدیکی بوته‌ها به سر می‌برند. این سوسمارها غالباً روز فعالند اما در روزهای بسیار گرم در هنگام غروب فعالیت بیشتری دارند. در هنگام فرار از دشمن تا چند متر می‌دوند سپس بی حرکت می‌ایستند تا خود را استتار کنند. از حشراتی نظیر قاب‌بالان و لارو آنها، مورچه‌ها و عنکبوت‌ها تغذیه می‌کنند. آگامای فلس شاخی در سال ممکن است دو بار تخم‌گذاری کند و در هر بار ۳ تا ۱۲ تخم و گاهی تا ۱۵ تخم گزارش شده است. آگامای سرتخت در گذشته با نام علمی *T. ruderatus* شناخته می‌شده است که در سال ۲۰۰۲ توسط نصرالله رستگار پویانی تغییر نام

آگامای سرتخت یا فلس شاخی (*Trapelus lessonae*) مارمولکی متعلق به خانواده آگامیده است که در محدوده وسیعی از شمال غرب تا جنوب شرق کشور پراکنده دارد. دارای جثه کوچک تا بزرگ، پلک‌های متحرک، گلو در بعضی از آنها دارای کیسه گلوبی است. فرم فلس‌های پشتی در این گونه یکنواخت نیست و اغلب دارای فلس‌های شکمی صاف هستند. اندازه بزرگترین فلس‌های پشتی حدوداً سه برابر پهنای فلس مجاور است. ۸۰ تا ۱۲۱ فلس در اطراف ناحیه میانی شکم قرار دارد و سطح زیرین ران با قسمتی از فلس‌های بزرگ در میان فلس‌های کوچک پوشیده شده است. فلس‌های پینه بسته پیش‌مخرجی در دو یا سه ردیف قرار دارند. نرها فاقد کیسه گلوبی هستند. در زمین‌های پست کوهستانی اکثر مناطق غربی و مرکزی کشور می‌توان دید. زیستگاه این گونه



یافته است [۱]. به دلیل این که سوسمارها مانند پرندگان و پستانداران قادر نیستند مهاجرت و تغییر مکان به فواصل بسیار دور را انجام دهند، با تخریب زیستگاه‌ها بیشتر در معرض خطر نابودی قرار گرفته و امروزه بیشتر مورد توجه سازمان حفاظت محیط زیست و محققان قرار گرفته‌اند.

با توجه به قدمت این گونه‌ی کمیاب و منزوی به نظر می‌رسد که تنوع ژنتیکی زیادی میان جمعیت‌های منطقه‌ای آن وجود داشته باشد. با این وجود تاکنون هیچ مطالعه مولکولی روی این تاکسون صورت نگرفته و وضعیت تاکسونومیکی جمعیت‌های آن مبهم و نامعلوم است.

مطالعات فیلوژنی به مرتب کردن گروه‌ها از قلمرو تا گونه می‌پردازد و فیلوژنی، تعیین ارتباط خویشاوندی جانداران، مستقل از زمان و مکان است. افزودن اطلاعاتی در مورد ساختارهایی از قبیل ترکیبات شیمیایی و ترادف‌های ژنی، نتایج مشابهی در مورد این خویشاوندی‌ها ارائه می‌دهند که می‌توان این روابط تبارشناختی را به صورت یک تبارنمای فیلوژنیک نشان داد. یکی از جالبترین پیشرفت‌ها در دهه اخیر استفاده از داده‌های DNA در سیستماتیک مولکولی است.

این تحقیق به منظور بررسی تنوعات درون گونه‌ای، روابط خویشاوندی و وضعیت تاکسونومیکی جمعیت‌های گونه *تراپلوس لسونه* انجام شد.

مواد و روش کار

آگامای سرتخت (شکل ۱ و ۲) یک آگامای روزفعال است و معمولاً بعد از طلوع آفتاب برای آفتاب‌گیری بیرون آمده و تا غروب آفتاب فعال می‌ماند فقط در روزهای گرم تابستان در اواسط روز که هوا به شدت گرم می‌شود به مخفی‌گاه پناه برده و دیدن آن سخت می‌شود، بنابراین زمان صید آنها نیز در طول اوایل و اواخر روز می‌باشد. برای گرفتن *تراپلوس لسونه* از روش گرفتن مستقیم با

دست استفاده شد. در این پژوهش جهت صید نمونه‌ها اولاً سعی شده که مناطق وسیعی جهت جستجو انتخاب و مورد بررسی قرار گیرد که بدین منظور طی چند سفر در تاریخ‌های مختلف از قسمت‌های شمال غرب تا نواحی مرکزی کشور از استان آذربایجان، کردستان، مرکزی و نمونه‌برداری انجام گردید و به علاوه نمونه‌هایی نیز از مناطق مختلف استان کرمانشاه و ایلام از بخش جانورشناسی دانشگاه رازی کرمانشاه در اختیار این مطالعه قرار گرفت. برای نگهداری نمونه‌های جمع‌آوری شده از ظروف پلاستیکی و شیشه‌ای در الکل اتیلیک ۹۶ به عنوان محلول ثابت کننده استفاده شد. برای استخراج DNA از روش ساده استخراج نمکی استفاده گردید. سپس ژن میتوکندریایی ND2 در تمام نمونه‌ها با استفاده از پرایمرهای:

Forward: T-Metf:5'-ggatctgctacttaagcaattggg-3

Reverse: T-Alar1: 5'-gagcccactagtctctgtagg-3

طی فرایند PCR تکثیر گردید. پس محصولات PCR برای اطمینان از تکثیر درست ژن‌ها در با استفاده از ژل آگارز کنترل گردیده و تمام ژن‌های تکثیر یافته برای توالی‌یابی به شرکت بایونیر کره جنوبی ارسال گردیدند. ژن‌های توالی‌یابی شده در نهایت با استفاده از نرم افزار Bioedit هم‌ردیف و ادیت گردیدند. فواصل ژنتیکی میان جمعیت‌ها با استفاده از نرم‌افزار Mega 5 محاسبه و آنالیزهای فیلوژنتیکی نیز با استفاده از نرم‌افزارهای Mr. Bayes و Paup به انجام رسید. در این مطالعه از شیوه‌های باز سازی تباری پیوستگی همسایگان (Neighbor Joining)، میانبرترین درخت (Maximum Parsimony) استفاده گردید. در تمام این آنالیزها از گونه *Trapelus persicus* به عنوان تاکسون برون گروه استفاده گردید.



شکل ۱- تراپلوس لسونه در استان کرمانشاه



شکل ۲- تراپلوس لسونه در آذربایجان شرقی

نتایج

طوری که عموماً جمعیت‌هایی که از نظر جغرافیایی به هم نزدیک هستند روی درخت نیز جمعیت‌های خواهری هم می‌باشند. بر اساس توالی‌یابی ژن ND2 در *Trapelus lessonae* و با استفاده از مدل فاصله‌ی *(Kimura) k2p* (2-parameter distance) بیشترین فاصله ژنتیکی (۱۵/۵ درصد) بین کلاد ۲ (اصفهان) با کلادهای ۵

روابط بین جمعیت‌های این گونه در کلادوگرام‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است. همان گونه که در شکل‌ها مشخص است جمعیت‌های منطقه‌ای این جانور در ایران به خوبی از هم قابل تفکیک بوده و عموماً میزان اطمینان انشعابات جمعیت‌ها بر روی درخت قابل ملاحظه است. روابط بین جمعیت‌ها دارای یک انطباق جغرافیایی منطقی می‌باشد به



کلادهای ۲ (اصفهان) با کلادهای ۵ (کردستان) و ۶ (غرب کرمانشاه) و کمترین فاصله (۱۳/۴ درصد) بین کلاد ۷ (مرز ایلام و کرمانشاه) و کلاد ۸ (استان مرکزی) مشاهده می-شود (جدول ۲)

(کردستان) و ۶ (غرب کرمانشاه) و کمترین فاصله ژنتیکی (۱۳/۴ درصد) بین کلاد ۷ (ایلام- کرمانشاه) و کلاد ۸ (استان مرکزی) مشاهده می‌شود (جدول ۱).
در ارزیابی فاصله خام ژنتیکی (P- distance) میان جمعیت‌ها بیشترین فاصله‌ی ژنتیکی (۱۳/۹ درصد) بین

جدول ۱- تنوع ژنتیکی (فاصله ژنتیکی k2- p) برای ژن ND2 در کلادهای اصلی *Trapelus lessonae*

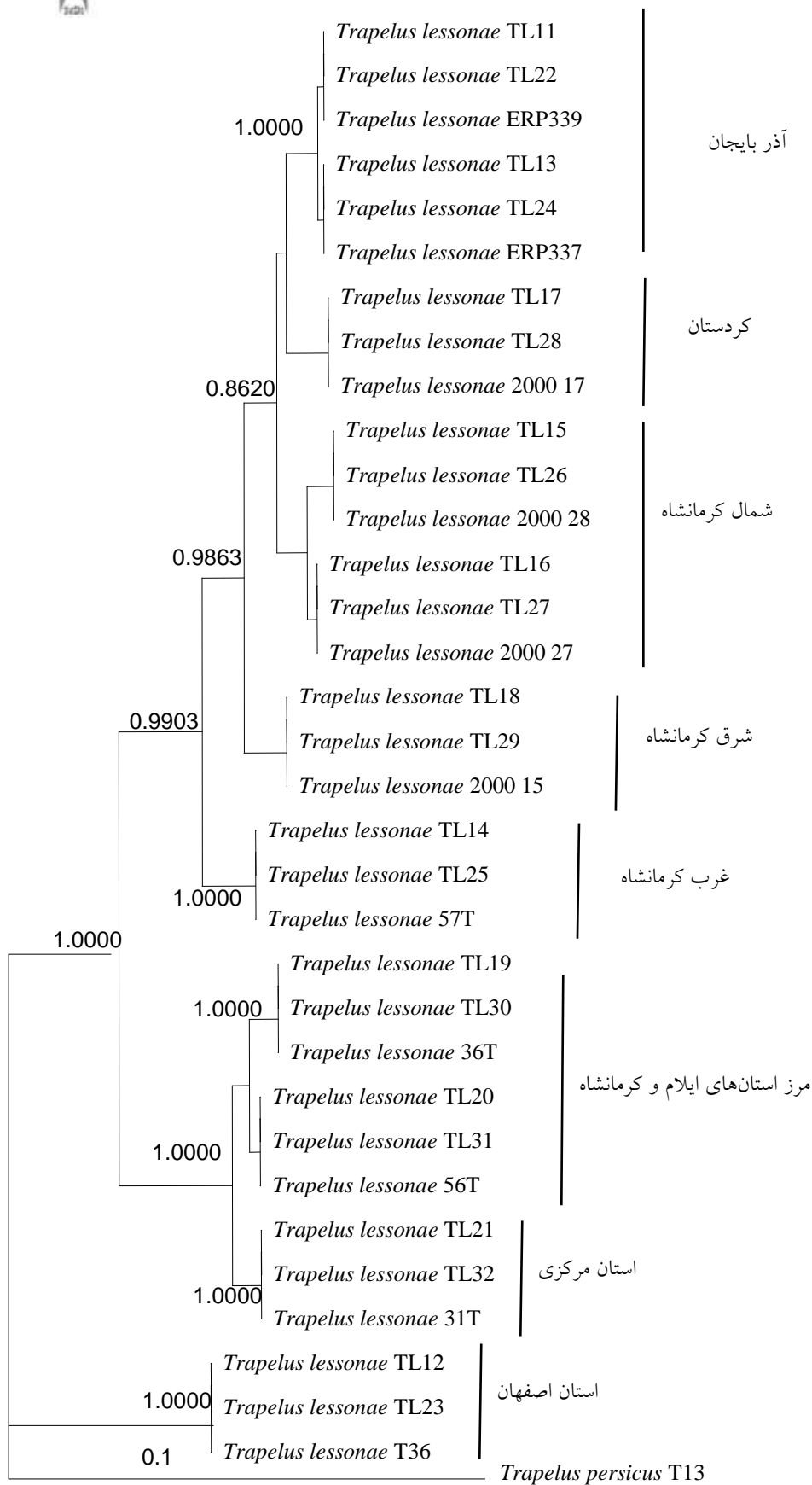
	1	2	3	4	5	6	7	8
[1]								
[2]	0.144							
[3]	0.038	0.148						
[4]	0.023	0.154	0.048					
[5]	0.019	0.155	0.045	0.022				
[6]	0.033	0.155	0.028	0.024	0.032			
[7]	0.084	0.129	0.053	0.094	0.093	0.070		
[8]	0.078	0.130	0.054	0.091	0.088	0.073	0.014	

کلاد ۱= آذربایجان کلاد ۲= اصفهان کلاد ۳= شرق کرمانشاه کلاد ۴= شمال کرمانشاه کلاد ۵= کردستان
کلاد ۶= غرب کرمانشاه کلاد ۷= ایلام - کرمانشاه کلاد ۸= مرکزی

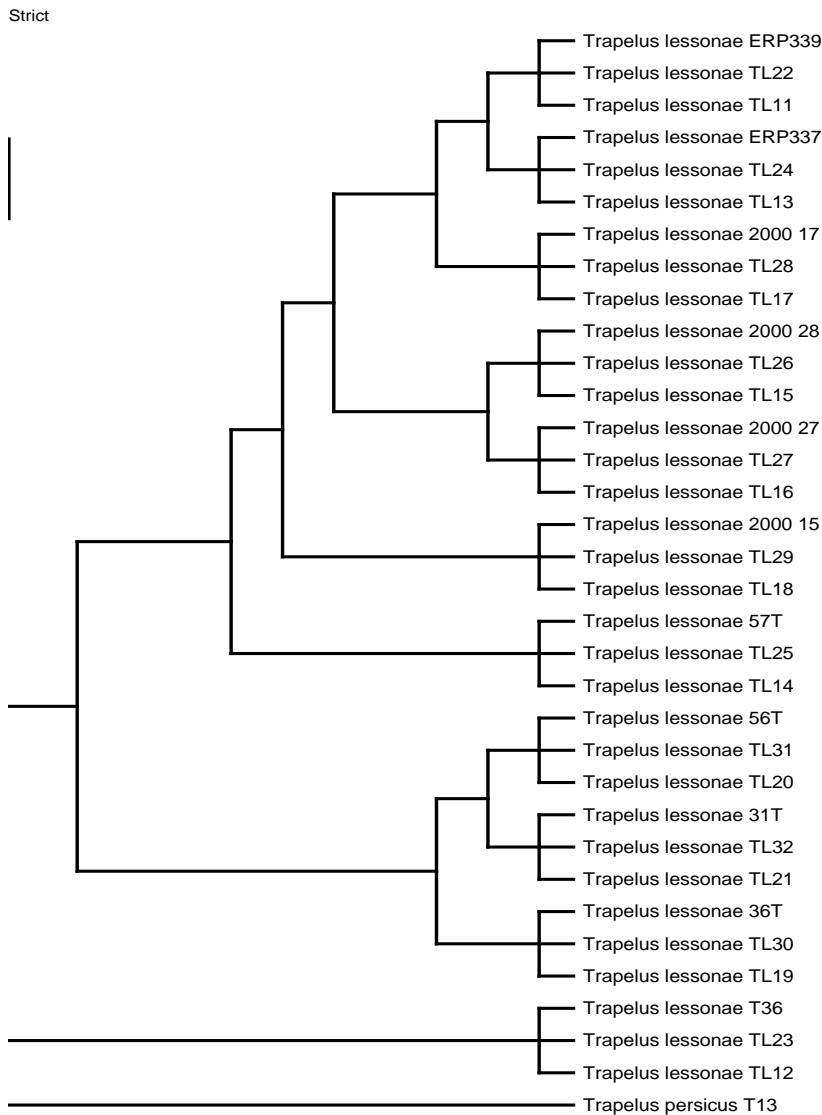
جدول ۲- تنوع ژنتیکی (فاصله p) برای ژن ND2 در کلادهای اصلی *Trapelus lessonae*

	1	2	3	4	5	6	7	8
[1]								
[2]	0.130							
[3]	0.037	0.133						
[4]	0.023	0.138	0.046					
[5]	0.019	0.139	0.043	0.021				
[6]	0.033	0.139	0.027	0.024	0.032			
[7]	0.078	0.118	0.051	0.087	0.086	0.067		
[8]	0.074	0.118	0.052	0.085	0.082	0.069	0.014	

کلاد ۱= آذربایجان کلاد ۲= اصفهان کلاد ۳= شرق کرمانشاه کلاد ۴= شمال کرمانشاه کلاد ۵= کردستان کلاد ۶=
غرب کرمانشاه کلاد ۷= ایلام - کرمانشاه کلاد ۸= مرکزی



کلادوگرام ۱- روابط فیلوژنتیکی میان جمعیت‌های مختلف *تراپلوس لسونه* با استفاده از توالی‌های ژن میتوکندریایی ND2 با روش Neighbor Joining. اعداد نشان دهنده بوتسترپ بدست آمده برای هر شاخه است (با ۳۰۰۰ تکرار).



کلادوگرام ۲- روابط فیلوژنتیکی میان جمعیت‌های مختلف تراپلوس لسونه، بدست آمده با استفاده از توالی‌های ژن ND2 که با شیوه میانبرترین درخت (Maximum Parsimony). شمای حاضر، درخت اجماعی (Consensus tree) بدست آمده از ۱۱ درخت حاصل از آنالیز را نشان می‌دهد.

بحث

مولکولی بایستی با ساختار و عملکرد مولکول‌های مورد مطالعه آشنا باشند همانگونه که با خود جانوران آشنا. به طور کلی سلول‌های جانوری حاوی دو ژنوم میتوکندریایی و هسته‌ای هستند. متخصصان سیستماتیک از داده‌های مربوط به هر دو ژنوم استفاده می‌کنند. جنس تراپلوس شامل ۱۵ گونه است که دارای توزیع گسترده‌ای در سرتاسر آفریقا، خاور میانه و آسیا می‌باشد به طور کلی

اسیدهای نوکلئیک نقش بخصوصی را در سلول دارند و توالی آنها ناگزیر در ارتباط با آن نقش تنظیم شده است. هر مولکول مانند هر دسته از صفات ریخت‌شناسی، تاریخ طبیعی خاص خود را دارد که منعکس‌کننده تاریخ احتمالی پیدایش آن، فشارهای تکوینی، سازگاری‌های گذشته و حال، تغییرات ضمنی و تثبیت شده یا بی‌ثبات بودن آن است. این بدین معنا است که متخصصان سیستماتیک



اصفهان در بین سایر کلادها نشان می‌دهند. در کلادوگرام- های حاصله از استنباط‌های فیلوژنی این مناطق پلی‌تومی- های معدودی به چشم می‌خورد و بوتستراب‌ها ارقام اطمینان بالایی را نشان می‌دهند.

نتیجه‌گیری

می‌توان نتیجه‌گیری کرد که جمعیت‌های متمایز و دور از هم این گونه در ایران احتمالاً با بررسی مفصل‌تر از دیدگاه‌های مورفولوژیک و اکولوژیک ممکن است مبین تاکسون‌های متفاوت در سطح گونه و یا حداقل زیرگونه باشند. از آنجا که قاعدتاً تغییرات بطور مستقل و جداگانه در هر دودمان رخ می‌دهد میزان تفاوت بین دو گونه باید به طور قاطع بیشتر از میزان تغییری است که در هر گونه نسبت به آخرین جد مشترک به وجود می‌آید اگر چه نمی‌توان به طور قطع این مسأله را اذعان کرد. به هر حال غیر از چند جمعیت گفته شده در سایر جمعیت‌ها واگرایی ژنتیکی جدی به چشم نمی‌خورد و اندک تفاوت- هایی که به چشم می‌خورد احتمالاً به علت بروز جهش- های نقطه‌ای در جمعیت‌های این گونه می‌باشد. به نظر می‌رسد این تاکسون به بررسی‌های ژنتیکی و مولکولی کامل‌تری برای تعیین وضعیت تاکسونومی خود نیاز دارد.

تشکر و قدردانی

برخی نمونه‌های استفاده شده در این مطالعه توسط آقای دکتر نصرالله رستگار پویانی از بخش جانورشناسی دانشگاه رازی در اختیار قرار گرفته است که از لطف و توجه و کمک‌های سخاوتمندانه ایشان تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

۱- رستگار پویانی ن.، جوهری، م.، رستگار پویانی، ا. ۱۳۸۷. راهنمای صحرایی خزندگان ایران (جلد اول: سوسماران)، انتشارات دانشگاه رازی کرمانشاه، ۳۲۰ صفحه.

این جنس به علت آن که با کمپلکس‌های گونه‌ای متعددی شناسایی می‌شود دارای مشکلات تاکسونومیکی زیادی است [۲]. جنس *Trapelus* گروه تاکسونومیکی پیچیده- ای است که با داشتن گونه‌های متعدد، هنوز هم نیاز به بررسی سیستماتیک دارد. تا به حال مطالعه مولکولی بر روی *تراپلوس لسونه* در ایران انجام نشده است. در رابطه با این این گونه وجود مسائلی از جمله شباهت‌های مورفولوژیکی در میان جمعیت و وجود تنوع و تمایز مورفولوژیکی بالا درون جمعیتی بین نر و ماده منجر به بروز مشکلاتی در خصوص شناسایی این گونه شده است [۴]. در مطالعات اخیر جنس *Bufoniceps* به عنوان تاکسون خواهری جنس *Trapelus* تأیید و *Phrynocephalus* رد شد [۳]. نتایج حاصل از بررسی روابط فیلوژنتیک این گونه نشان داد که گروه‌های بارزی با تنوع ژنتیکی بالا و با گستره جغرافیایی متفاوت در این جمعیت‌ها وجود دارند که محصول تکامل در مناطق جغرافیایی مختلف بوده و نیازمند حفاظت به عنوان واحدهای مستقل می‌باشند. نتایجی که از درخت‌های باز سازی شده بدست می‌آید مبتنی بر این است که هر دو درخت همدیگر را تأیید می‌کنند. جمعیت‌های مختلف *Trapelus lessonae* در نواحی آذربایجان، کردستان، کرمانشاه، استان مرکزی و اصفهان تفاوت‌های جدی با یکدیگر دارند و فاصله ژنتیکی معنادار است. نمونه‌های کردستان و آذربایجان بیشتر باهم خویشاوند هستند. در جاهایی که جمعیت‌های گونه شبیه هم نیستند، ایزوله بوده و احتمالاً ارتباط ژنتیکی باهم نداشته و شاید وجود رشته کوه زاگرس مانع این انتشار بوده است. در این مطالعه تمامی کلادوگرام‌ها با تفاوت ناچیزی نتایج مشابهی را نشان دادند و درخت‌های ترسیم شده در این مطالعه نمایانگر وجود اختلاف ژنتیکی معتبر در جمعیت‌های مناطق مورد مطالعه می‌باشند. فواصل ژنتیکی و الگوی انشعابی موجود در درخت‌ها همگی نشان‌دهنده این امر هستند که نمونه‌های غرب کرمانشاه و مرز ایلام و کرمانشاه بیشترین واگرایی و فاصله ژنتیکی را با نمونه‌های



morphology. Bulletin of Natural History Museum, London (Zoology) 13: 1-15.

4- Rastegar-Pouyani N. (2005), Taxonomic status of *Trapelus ruderatus* (Olivier) and *T. persicus* (Blandford), and validity of *T. lessonae* (De Filippi). *Amphibia-Reptilia* 21: 11-142.

2- Anderson S.C. (1999), *The Lizards of Iran*. Society for the Study of Amphibians and Reptiles, Ithaca, New York. i-vii, 112 pp.

3- Arnold E.N. (1999), Phylogenetic relationships of toad-headed lizards (*Phrynocephalus*, Agamidae) based on