تاکسونومی و بیوسیستماتیک، سال چهارم، شماره یازدهم، تابستان ۱۳۹۱، صفحه ۱-۱۲
دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۹/۰۱ پذیرش نهایی: ۱۳۹۰/۱۲/۱۴

رده‌بندی فیلوژنتیکی همتافت‌گونهٔ جغد انباری (*Tyto alba* Scopoli, 1769) با استفاده از ژن میتوکندریایی (*16S* rRNA): ارزیابی آرایه‌شناختی

منصور علی‌آبادیان *، نیلوفر علایی کاخکی و جمشید درویش
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

چکیده

همتافت‌گونهٔ جغد انباری (*Tyto alba*) گونه‌ای جهان‌گستر است و تغییرات ریختی قابل توجهی را نشان می‌دهد. این تغییرات زیاد ریختی و جغرافیایی سبب شده است که گونه جغد انباری دارای زیرگونه‌های متعددی در سرتاسر جهان باشد. با وجود این، هنوز مطالعات گسترده‌ای در مورد این گونه انجام نشده است. در این مطالعه، تعیین توالی ژن میتوکندریایی غیر کُدینه (*16S* rRNA) به طول ۵۶۹ نوکلئوتید برای ۴۰ نمونه از جغد انباری از سراسر جهان انجام شد. این احتمال که زیرگونه‌های جغد انباری دنیای جدید از زیرگونه‌های آن در دنیای قدیم متمایز شده باشند بررسی شد. اطلاعات حاصل از تحلیل درخت‌های میانبُرترین (Maximum Parsimony)، محتمل‌ترین (Maximum Likelihood) و بیزین (Baysian) نشان‌دهنده وجود دو تبار مجزای دنیای قدیم با نام *T. alba* و دنیای جدید با نام *T. furcata* است. میزان تنوع ژنتیکی بین تبارهای دنیای قدیم و دنیای جدید، ۳/۸ درصد است. با توجه به نتایج به دست آمده، این احتمال وجود دارد که زیرگونه‌های دنیای جدید و قدیم از نظر ژنتیکی جدا بوده و فاقد تبادل ژنتیکی باشند که مبتنی بر حضور دو گونه جغرافیایی جدا در این همتافت‌گونهٔ با زیرگونه‌های متعدد است.

واژه‌های کلیدی: فیلوژنی (تبارزایی)، جغد انباری، DNA میتوکندری، رمزنگار مولکولی DNA، *16S* rRNA

مقدمه

جغدها شامل دو خانواده Tytonidae و Strigidae هستند، که خانواده Tytonidae دارای دو جنس *Tyto* (Billberg 1828) (با ۲۵ گونه) و *Phodiles* (Geoffroy Saint-Hilaire, 1830) (با دو گونه) است. تمامی جغدهای جنس *Tyto* دارای صورت دیسکی قلبی‌شکل، چشمانی کوچک و سیاه و پاهای نسبتاً بلند هستند. شایان ذکر است که طول انگشتان داخلی و خارجی جغدهای جنس *Tyto* با طول انگشت وسطی آنها یکسان است (König *et al.*, 2008). گونه جغد انباری با نام علمی *Tyto alba* (Scolopi, 1769)، بیشترین میزان پراکندگی را در میان سایر گونه‌های جنس *Tyto* دارد. Dickinson (۲۰۰۳) در فهرست پرندگان جهان برای جنس *Tyto*، ۱۷ گونه و برای گونه

* aliabadi@um.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

T. alba، ۳۲ زیرگونه در سرتاسر جهان تعریف کرده است. Wink و همکارانش (۲۰۰۴) توالی ژن میتوکندریایی *CYTB* (mitochondrial cytochrome *b*) و نشانگر هسته‌ای (*intron LDHb-DNA*) را برای ۱۶ گونه از اعضای خانواده Tytonidae و ۸۰ گونه از اعضای خانواده Strigidae مطالعه و بررسی کردند و در نهایت علاوه بر نشان دادن ارتباط بین گونه‌های این دو جنس بر مبنای اطلاعات مولکولی دو زیر گونه *T. f. delicatula* و *T. f. sumbaensis* را به مرتبه گونه ارتقاء دادند. Wink و همکارانش (۲۰۰۸) با بررسی ژن میتوکندریایی *CYTB* و ژن هسته‌ای *RAG-1* (*Recombination Activating Gene 1*) برای نمونه‌هایی از گونه جغد انباری، زیرگونه *T. f. bargei* را به مرتبه گونه ارتقاء دادند. آنها واگرایی مولکولی قابل ملاحظه‌ای را بین نمونه‌های دنیای جدید و قدیم نشان دادند ولی شاخص بوت‌استرپ بالایی را برای این جدایی ارائه ندادند. König و همکارانش (۲۰۰۸) با استناد به مطالعه Wink و همکاران (۲۰۰۸) در دومین چاپ کتاب جغدهای جهان، زیرگونه *T. f. insularis* را به عنوان گونه‌ای مجزا معرفی کردند. آنها برای جنس *Tyto*، ۲۵ گونه و برای گونه *T. alba*، ۱۵ زیرگونه در سرتاسر جهان تعریف کردند که از این تعداد ۱۰ زیرگونه به دنیای قدیم و پنج زیرگونه به دنیای جدید متعلق است. Aliabadian و Nijman (۲۰۱۲) با استفاده از تعیین توالی ژن *COX1* (Mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1)، در بین زیرگونه‌های جغد انباری در نقاط متفاوت جهان واگرایی مولکولی را در بین زیرگونه‌های دنیای قدیم و جدید نشان دادند.

ژن *16s* rRNA (*16S Ribosomal RNA*)، یکی از ژن‌های ساختاری و غیر کدینه میتوکندریایی است. این ژن به عنوان نشانگر مناسب برای رمزنگار مولکولی (DNA barcoding) در دوزیستان پیشنهاد شده است (Vences *et al.*, 2000). البته به عنوان نشانگر مکمل برای رمزنگار مولکولی سایر گروه‌های جانوری در کنار سایر ژن‌های میتوکندریایی *CYTB* و *COX1* به کار رفته است (Aliabadian and Nijman, 2012).

در این مطالعه، توالی ژن میتوکندری غیرکُدینه *16S* rRNA برای ۴۰ نمونه از زیرگونه‌های جغد انباری بررسی شد. یافته‌های Wink و همکاران (۲۰۰۸) مبنی بر جدایی گونه جغد انباری دنیای جدید از دنیای قدیم و بررسی آنها به عنوان دو گونه مجزا مورد آزمون قرار گرفت و میزان واگرایی مولکولی بین گونه‌ای و درون‌گونه‌ای برای دو تبار دنیای قدیم و جدید تعیین گردید.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

تعداد ۴۰ نمونه بافت ماهیچه‌ای، پَر و خون متعلق به ۱۱ زیرگونه متفاوت از پنج ناحیه جغرافیایی جانوری اوراسیا، آفریقا، هندوچین، استرالیا، آمریکای شمالی و آمریکای جنوبی برای انجام کارهای مولکولی تهیه شد. از مجموع ۷ زیرگونه متعلق به ناحیه جغرافیایی پالئارتیک، نمونه‌های *T. a. alba*، *T. a. ernesti*، *T. a. affinis* و *T. a. stertens* و از دو زیرگونه متعلق به هندوچین، نمونه *T. a. erlangeri* و از پنج زیرگونه متعلق به آمریکا شمالی و جنوبی نمونه‌های *T. f. paratincula*، *T. f. tuidara* و *T. f. hellmayeri* و گونه‌های *T. bargei* متعلق به جزیره کوراسائو واقع در خلیج مکزیک و *T. delicatula* متعلق به استرالیا

Archive of SID

www.SID.ir

بررسی شد. نمونه‌های بافت ماهیچه درون الکل خالص ۹۶ درصد برای تثبیت طولانی مدت نگهداری شدند. زیرگونه *Ninox novaeseelandiae* به عنوان برون گروه در درخت فیلوژنتیک مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌های بافت ماهیچه‌ای از موزه جانورشناسی یونان (Natural History Museum of Greece, NHMC)، موزه جانورشناسی آمستردام (Zoological Museum of Amsterdam, ZMA)، موزه جانورشناسی لوئیزیانا (Museum of Natural Science Louisiana State University, LSUMNSL) و موزه جانورشناسی دانشگاه فردوسی مشهد (Museum of Ferdowsi University of Mashhad, MFUM) تهیه گردید (جدول ۱).

جدول ۱- فهرست نمونه‌های بررسی شده

ردیف	آرایه	منطقه نمونه‌برداری	شماره موزه‌ای	مشخصات جغرافیایی
۱	*T. alba alba*	هلند	ZMA 58963	عرض شمال ´۳۰ °۵۲ طول شرقی ۴۵ °۵
۲	*T. alba alba*	هلند	ZMA 58964	عرض شمال ´۳۰ °۵۲ طول شرقی ۴۵ °۵
۳	*T. alba alba*	هلند	ZMA 58962	عرض شمال ´۳۰ °۵۲ طول شرقی ۴۵ °۵
۴	*T. alba alba*	هلند	ZMA 58963	عرض شمال ´۳۰ °۵۲ طول شرقی ۴۵ °۵
۵	*T. alba alba*	هلند	ZMA 58964	عرض شمال ´۳۰ °۵۲ طول شرقی ۴۵ °۵
۶	*T. alba alba*	هلند	ZMA 58965	عرض شمال ´۳۰ °۵۲ طول شرقی ۴۵ °۵
۷	*T. alba alba*	هلند	ZMA 58843	عرض شمال ´۳۰ °۵۲ طول شرقی ۴۵ °۵
۸	*T. alba alba*	هلند	ZMA 58844	عرض شمال ´۳۰ °۵۲ طول شرقی ۴۵ °۵
۹	*T. alba affinis*	آفریقا	ZMA 19883	عرض شمال ´۱۱ °۷ طول شرقی ´۵ °۲۱
۱۰	*T. alba stertens*	اندونزی	ZMA334	عرض جنوبی ۰ °۵ طول شرقی ´۰ °۱۲۰
۱۱	*T. alba stertens*	اندونزی	ZMA335	عرض جنوبی ´۰ °۵ طول شرقی ´۰ °۱۲۰
۱۲	*T. alba erlangri*	ایران	MFUM 800001	عرض شمالی ´۰ °۳۲ طول شرقی ´۰ °۵۳
۱۳	*T. alba erlangri*	ایران	MFUM 800002	عرض شمالی ´۰ °۳۲ طول شرقی ´۰ °۵۳
۱۴	*T. alba erlangri*	ایران	MFUM 800003	عرض شمالی ´۰ °۳۲ طول شرقی ´۰ °۵۳

Archive of SID

www.SID.ir

ردیف	آرایه	منطقه نمونه‌برداری	شماره موزه‌ای	مشخصات جغرافیایی
۱۵	*T. alba ernesti*	یونان	NHMC 80.4.108.9	عرض شمالی ´۰ °۳۹ طول شرقی ´۰ °۲۲
۱۶	*T. alba ernesti*	یونان	NHMC 80.4.108.8	عرض شمالی ´۰ °۳۹ طول شرقی ´۰ °۲۲
۱۷	*T. alba ernesti*	یونان	NHMC 80.4.108.7	عرض شمالی ´۰ °۳۹ طول شرقی ´۰ °۲۲
۱۸	*T. alba ernesti*	یونان	NHMC 80.4.108.6	عرض شمالی ´۰ °۳۹ طول شرقی ´۰ °۲۲
۱۹	*T. bargie*	کوراسائو	ZMA55939	عرض شمالی ´۱۲ °۱۲ طول غربی ´۰ °۶۹
۲۰	*T. bargie*	کوراسائو	ZMA55941	عرض شمالی ´۱۲ °۱۲ طول غربی ´۰ °۶۹
۲۱	*T. bargie*	کوراسائو	ZMA55942	عرض شمالی ´۱۲ °۱۲ طول غربی ´۰ °۶۹
۲۲	*T. bargie*	کوراسائو	ZMA55943	عرض شمالی ´۱۲ °۱۲ طول غربی ´۰ °۶۹
۲۳	*T. bargie*	کوراسائو	ZMA 58966	عرض شمالی ´۱۲ °۱۲ طول غربی ´۰ °۶۹
۲۴	*T. furcata hellmayri*	بونر	ZMA55945	عرض شمالی ´۳۷ °۳۸ طول غربی ´۴۸ °۷۹
۲۵	*T. furcaata hellmayri*	بونر	ZMA58257	عرض شمالی ´۳۷ °۳۸ طول غربی ´۴۸ °۷۹
۲۶	*T. furcaata hellmayri*	بونر	ZMA58259	عرض شمالی ´۳۷ °۳۸ طول غربی ´۴۸ °۷۹
۲۷	*T. furcata paratincola*	لوئیزیانا	LSUMZ.16306	عرض شمالی ´۱۰ °۳۱ طول غربی ´۵۲ °۹۱
۲۸	*T. furcata paratincola*	لوئیزیانا	LSUMZ.44989	عرض شمالی ´۱۰ °۳۱ طول غربی ´۵۲ °۹۱
۲۹	*T. furcata paratincola*	لوئیزیانا	LSUMZ.20610	عرض شمالی ´۱۰ °۳۱ طول غربی ´۵۲ °۹۱
۳۰	*T. furcata paratincola*	لوئیزیانا	LSUMZ.20485	عرض شمالی ´۱۰ °۳۱ طول غربی ´۵۲ °۹۱
۳۱	*T. furcata paratincola*	فلوریدا	LSUMZ.49512	عرض شمالی ´۴۹ °۲۷ طول غربی ´۴۳ °۸۱
۳۲	*T. furcata paratincola*	فلوریدا	LSUMZ.49511	عرض شمالی ´۴۹ °۲۷ طول غربی ´۴۳ °۸۱
۳۳	*T. furcata paratincola*	فلوریدا	LSUMZ.49510	عرض شمالی ´۴۹ °۲۷ طول غربی ´۴۳ °۸۱

Archive of SID

www.SID.ir

ردیف	آرایه	منطقه نمونه‌برداری	شماره موزه‌ای	مشخصات جغرافیایی
۳۴	*T. furcata paratincola*	فلوریدا	LSUMZ.49509	عرض شمالی ´۴۹ °۲۷ طول غربی ´۴۳ °۸۱
۳۵	*T. furcata paratincola*	تگزاس	LSUMZ.21734	عرض شمالی ´۶ °۳۱ طول غربی ´۳۸ °۹۷
۳۶	*T. furcata paratincola*	کلرادو	LSUMZ.29566	عرض شمالی ´۳۸ °۱۰۵ طول غربی ´۵۹ °۳۸
۳۷	*T. delicatula*	استرالیا	ZMA 21.978	عرض جنوبی ´۰ °۲۷ طول شرقی ´۰ °۱۳۳
۳۸	*T. delicatula*	استرالیا	ZMA 21.979	عرض جنوبی ´۰ °۲۷ طول شرقی ´۰ °۱۳۳
۳۹	*T. furcata tuidara*	آرژانتین	ZMA 22.100	عرض جنوبی ´۰ °۳۵ طول غربی ´۰ °۶۴
۴۰	*T. furcata tuidara*	آرژانتین	ZMA 22.101	عرض جنوبی ´۰ °۳۵ طول غربی ´۰ °۶۴

استخراج و تعیین توالی DNA

DNA ژنومی با قرار دادن نمونه‌ها در بافر استخراج (سدیم دو دسیل سولفات (SDS) ۲ درصد و ۱۰mg/ml پروتئیناز K در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد و با استفاده از روش استاندارد نمکی (salt method) استخراج شدند (Bruford *et al.*, 1992). قطعه ژن میتوکندریایی *16S* rRNA با استفاده از پرایمرهای جهانی:

16SA- L (5-CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT-3)

و

16SB-H (5-CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T-3)

تکثیر شد (Vences *et al.*, 2000).

شرایط آماده‌سازی محلول PCR برای ژن *16S* طبق روش Vences و همکاران (۲۰۰۰) فراهم شد. در این این روش، برای تکثیر منطقه مورد نظر از رژیم حرارتی: دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۹۰ ثانیه، ۳۳ دور شامل دمای ۹۴ درجه سانتیگراد ۴۵ ثانیه (مرحله واسرشت شدن)، دمای ۵۵ درجه سانتیگراد ۴۵ ثانیه (مرحله اتصال پرایمر) و دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۹۰ ثانیه در (مرحله طویل شدن) و برای خالص‌سازی محصولات PCR از کیت Qia-quick PCR Purification (Qiagen) استفاده گردید.

ژن‌های تکثیر شده توسط دستگاه تعیین‌کننده توالی خودکار ABI PRISMA مدل ۳۷۰۰ با پروتکل (روش پیش‌نویس) شرکت سازنده تعیین توالی گردیدند.

توالی ژن *16S* با ارجاع به نقشه ساختاری ثانویه ژن (Gutell and Fox, 1988) و با استفاده از نرم‌افزار Sequence Navigator (1,0,1) هم‌تراز شد (Kjer, 1995) و در انتها توالی به طول ۵۶۹ نوکلئوتید برای هر تاکسون استفاده شد که در آن ۳۱۰ نوکلئوتید برای ناحیه حلقه (Loop) و ۲۵۸ نوکلئوتید برای ناحیه ساقه (Stem) تشخیص داده شد.

تحلیل داده‌ها

مقایسه فاصله مولکولی K2P داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Mega 5.1 (Tamura *et al.*, 2011) و تحلیل‌های فیلوژنتیک، با محاسبه درخت‌های مولکولی میانبُرترین (Maximum Parsimony, MP)، محتمل‌ترین (Maximum Likelihood, ML) و بیزین

Archive of SID

www.SID.ir

(Baysian) برای توالی ژن *16S* انجام شد. تحلیل‌های MP و ML برای تمامی داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار PAUP v.4.0b10 (Swofford, 2002) انجام گرفت. مدل تکاملی و شاخص‌هایش با استفاده از معیار آزمون نسبی سلسله مراتبی محتمل (Akaike Information Criterion, AIC) تعیین و در نرم‌افزار Modeltest (Posada and Crandall, 1998) اجرا گردید (Schmitz *et al.*, 2005). مدل‌های تخمینی در رسم درخت ML با جابجایی شاخه‌ای TBR بر اساس جستجوی Heuristic و اضافه شدن درختی به صورت پله‌ای با ۱۰ تکرار اضافی و تصادفی انجام شد. برای آزمون میزان صحت گره‌ها شاخص بوت‌استرپ ۵۰۰ و ۲۰۰۰ به ترتیب برای تحلیل‌های MP و ML استفاده شد.

تحلیل بیزین با استفاده از روش زنجیره مارکوف مونت کارلو (Markov Monte Carlo Chain) با نرم‌افزار MrBayes 3.1.1 انجام شد (Huelsenbeck and Ronquist, 2001). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که ژن‌ها و نواحی متفاوت یک ژن می‌توانند تحت تأثیر مدل‌های تکاملی مختلف قرار گیرند و این خود بهترین دلیل برای استفاده از تحلیل‌های گروه‌بندی شده است. دو بخش P1 و P2 برای ژن *16S* طراحی شد (P1: ژن *16S* بدون هیچ گونه تقسیم‌بندی؛ P2: ژن *16S* که به دو بخش ساقه و لوپ تقسیم شده است). این بخش‌ها با توجه به ساختار، محدودیت‌های تکاملی و بیوشیمیایی ژن مورد نظر در نظر گرفته شده‌اند. مدل‌های مناسب تکاملی برای هر بخش توسط AIC با استفاده از Modeltest انتخاب شدند (Schmtiz *et al.*, 2005). برای انتخاب راهبرد گروه‌بندی مناسب که مجموعه داده‌ها را با حداقل اشتباه تصادفی توضیح دهد از عامل بیس (Bays) استفاده شد (Brandley *et al.*, 2005).

عامل بیس بر اساس تفاوت لگاریتم میانگین هارمونیک احتمال پیش‌فرض اولیه در بین دو گروه انتخابی و ضرب عدد حاصله در دو تخمین زده شد (Brandley *et al.*, 2005). میانگین هارمونیک در تحلیل بیزین و دستور sump قابل محاسبه است. عوامل بیس با استفاده از معیار $2\ln \geq 10$ ارزیابی شد (Huelsenbeck and Imennov, 2002؛ Lovette, 2003; Brandley *et al.*, 2005). در فرآیند زنجیره مارکوف مونت کارلو، دو زنجیره به طور همزمان برای ده میلیون تکرار با پیش‌فرض قبلی انتخاب درخت در هر ۱۰۰۰ نسل (نتیجه ۱۰۰/۰۰۰ درخت) اجرا گردید. این تحلیل با انتخاب یک درخت به طور تصادفی شروع می‌شود. ۵۰۰۰ درخت اول برای حفظ سطح اطمینان نادیده گرفته و مقدار احتمال اولیه برای سایر درخت‌های باقی‌مانده محاسبه می‌شود. تنها توپولوژی‌هایی که با شاخص بوت‌استرپ بیش از ۷۰ درصد در ML و MP و بیش از ۹۵ درصد در روش بیزین حمایت شده و معتبر شناخته می‌شوند (Hillis *et al.*, 1993).

نتایج

از ۵۶۹ نوکلئوتید ژن *16S* به کار رفته برای ۴۱ نمونه، با احتساب توالی نمونه *Ninox novaeseelandiae* به عنوان برون گروه در تحلیل مولکولی، ۲۹۷ متغیر تک ریخت و ۷۴ متغیر چند ریخت بودند. از ۴۸ متغیر متغیر یگانه (Singleton variable sites) تمامی آن دو متغیر بودند. تعداد هاپلوتیپ‌های به دست آمده برای گونه‌های *Tyto* با احتساب گروه خارجی ۱۱ عدد بود. میانگین فاصله ژنتیکی درون گونه‌ای (Kimura-2-Parameter) با نرم‌افزار Mega 5.1 (Tamura *et al.*, 2007) برای

Archive of SID

www.SID.ir

گونه *T. bargei* ۰/۰۹ درصد، گونه *T. furcata* ۰/۵ درصد، گونه *T. alba* ۱/۷۹ درصد و گونه *T. delicatula* ۰/۵ درصد محاسبه شد. کمترین میزان واگرایی ژنتیکی درون گونه‌ای متعلق به گونه *T. bargei* و بیشترین میزان واگرایی ژنتیکی متعلق به گونه *T. alba* است. فاصله ژنتیکی بین گونه‌های *T. alba* و *T. furcata* ۳/۷۶ درصد، بین گونه‌های *T. alba* و *T. bargei* ۳/۵۲ درصد، بین گونه‌های *T. delicatula* و *T. alba* ۴/۳۲ درصد، بین گونه‌های *T. bargei* و *T. Furcata* ۰/۲ درصد، بین گونه‌های *T. bargei* و *T. delicatula* ۴/۲ درصد و بین گونه‌های *T. delicatula* و *T. furcata* ۴/۲۲ درصد اندازه‌گیری شد (جدول ۲). بیشترین میزان واگرایی ژنتیکی بین گونه‌ای مربوط به گونه‌های *T. alba* و *T. delicatula* و کمترین میزان آن مربوط به گونه‌های *T. furcata* و *T. Bargei* است (جدول ۳).

جدول ۲- میانگین فاصله ژنتیکی بین گونه‌ای و درون گونه‌ای (Kimura-2-Parameter) برای گونه‌های جنس *Tyto*

	T. bargei	*T. furcata*	*T. alba*	*T. delicatula*
T. bargei	۰/۰۰۰۹			
T. furcata	۰/۰۰۲۶	۰/۰۰۵		
T. alba	۰/۰۳۵۲	۰/۰۳۷۶	۰/۰۱۷۹	
T. delicatula	۰/۰۴۲	۰/۰۴۲۲	۰/۰۴۳۲	۰/۰۰۵۶

جدول ۳- اطلاعات ژنتیکی مربوط به ۴ گونه از جنس *Tyto* در جهان

	T. bargei	*T. alba*	*T. furcata*	*T. delicatula*
تعداد توالی‌های نوکلئوتیدی	۵	۱۸	۱۵	۲
تعداد نوکلئوتیدها	۵۶۹	۵۶۹	۵۶۹	۵۶۹
تعداد هاپلوتیپ‌ها	۲	۴	۵	۲
میانگین تفاوت نوکلئوتیدی	۰/۴	۴/۸۵۰	۱/۵۲۴	۳
تنوع نوکلئوتیدی	۰/۰۰۰۷۵	۰/۰۰۹۴۰	۰/۰۰۳۸۹	۰/۰۰۵۵۸
تعداد متغیرهای جدا کننده	۱	۲۶	۸	۳
تنوع هاپلوتیپی	۰/۴	۰/۳۹۹	۰/۴۷۶	۱
میانگین فاصله ژنتیکی درون گونه‌ای	۰/۰۰۰۹	۰/۰۱۷۹	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵۶

تحلیل بیزین (Baysian)

این درخت دو تبار اصلی، یکی مربوط به آمریکای شمالی و کوراسائو (*T. furcata* و *T. bargei*) و دیگری مربوط به آسیا و آفریقا و اروپا (*T. alba*) را با شاخص بوت‌استرپ ۱۰۰ درصد از هم جدا می‌کند. گونه مربوط به استرالیا (*T. delicatula*) و زیرگونه متعلق به اندونزی (*T. a. stertens*) با شاخص بوت‌استرپ ۱۰۰ درصد به عنوان تاکسون‌های خواهری به طور مجزا در تبار *T. furcata* قرار گرفتند. نمونه‌های متعلق به گونه *T. bargei* در تبار مربوط به دنیای جدید (*T. furcata*) در کنار سایر زیرگونه‌های *T. furcata*، *T. f. hellmayeri* و *T. f. pratincola* قرار گرفته‌اند (شکل ۱).

Archive of SID

www.SID.ir

تحلیل میانبُرترین درخت (Maximum Parsimony, MP)

تعداد متغیرهای بهینه دارای اطلاعات، ۲۶ عدد بوده که ۱۸ متغیر آن دارای دو واریانت، هشت متغیر آن دارای سه واریانت است. میانبُرترین درخت توسط نرم‌افزار PAUP به دست آمد و در نهایت همراه با آزمون تأییدی شاخص بوت‌استرپ رسم گردید. در این درخت نیز دو تبار دنیای قدیم و جدید با شاخص بوت‌استرپ بالای ۱۰۰ درصد از هم دیگر جدا شدند. زیرگونه اندونزیایی (*T. a. stertens*) و گونه متعلق به استرالیا (*T. delicatula*) با شاخص بوت‌استرپ ۱۰۰درصد به عنوان تاکسون‌های خواهری در تبار *T. furcata* قرار می‌گیرند. در این درخت هم گونه *T. bargei* در تبار *furcata* قرار گرفته و واگرایی ژنتیکی اندکی را نسبت به سایر زیرگونه‌های این تبار نشان می‌دهد (شکل ۱).

تحلیل محتمل‌ترین درخت (Maximum Likelihood, ML)

تحلیل ML با استفاده از نرم‌افزار PAUP انجام شد. ابتدا ۵۶ مدل تکاملی برای توالی‌ها بررسی شد که در نهایت بر اساس معیار AIC (Akaike Information Criterion) مدل TVM+I+G انتخاب شد. نسبت متغیرهای نامتغیر به کل متغیرها برابر ۰/۵۸۱۷ و نسبت متغیرهای فاقد تغییر (شاخص شکل توزیع گاما) برابر با ۰/۶۶۶۳ است. فرکانس نوکلئوتید آدنین ۰/۳۰۹۸، گوانین ۰/۲۱۳۰، سیتوزین ۰/۲۶۸۲ و تیمین ۰/۲۰۸۹ محاسبه شد. درخت ML با شاخص بوت‌استرپ ۵۰۰ مرتبه تکرار بر اساس مدل TVM+I+G رسم گردید. نتایج به دست آمده از درخت ML با نتایج به دست آمده از درخت MP همخوانی کامل داشت. مشابه دو درخت قبلی دو تبار اصلی وجود دارد. در این درخت دو تبار *T. alba* متعلق به دنیای قدیم و *T. furcata* متعلق به دنیای جدید با شاخص بوت‌استرپ ۹۰ درصد از هم جدا شده‌اند. نمونه‌های متعلق به اندونزی با شاخص بوت‌استرپ ۹۹ درصد همراه با نمونه‌های متعلق به استرالیا در تبار جداگانه‌ای قرار گرفته‌اند که این تبار با تبار *T. furcata* همراه شده است. گونه *T. bargei* در تبار *T. furcata* در کنار زیرگونه‌های *T. f. hellmayri* و *T. f. pratincola* قرار گرفته است (شکل ۱).

بحث

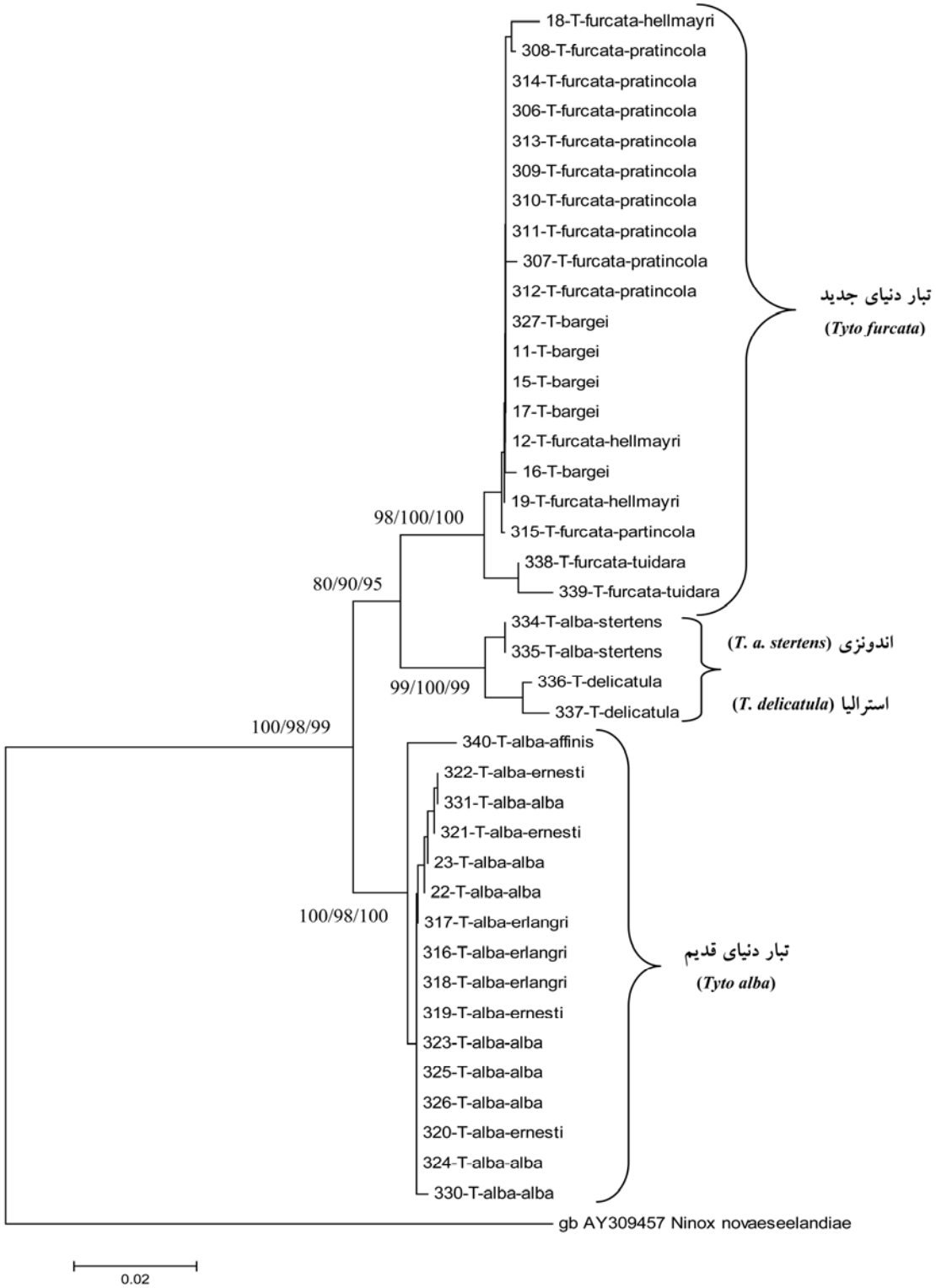
تمامی درخت‌های ترسیم شده در این مطالعه مؤید وجود دو تبار اصلی بین گونه‌ای جغد انباری پراکنده شده در دنیای قدیم و جدید هستند. در تمامی درخت‌ها این دو تبار اصلی با شاخص بوت‌استرپ بالای ۹۰ درصد از یکدیگر جدا می‌شوند (شکل ۱).

DNA میتوکندری بارها برای مطالعه و بازبینی روابط فیلوژنتیک در گروه‌های متفاوت جانوری استفاده شده است. ژن‌های میتوکندریایی به مراتب سریع‌تر از ژن‌های هسته‌ای تکامل می‌یابند. در نتیجه توانایی بیشتری برای نشان دادن تفاوت‌های موجود در بین تاکسون‌های نزدیک را دارند. معمولاً از این ژن‌ها برای نشان دادن واگرایی بین جمعیت‌هایی که برای دوره زمانی نسبتاً کوتاهی از یکدیگر جدا شده‌اند، استفاده می‌شود.

میزان واگرایی ژنتیکی بین گونه‌های متفاوت، به مراتب از واگرایی ژنتیکی درون گونه‌ای بیشتر است. در واقع، نتایج به دست آمده از بررسی و مقایسه mtDNA در گونه‌های متفاوت، بیانگر فواصل آرایه‌شناختی است که توسط آرایه‌شناسان به عنوان گونه شناسایی می‌شود (Hebert *et al.*, 2004).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- درخت حاصل از تحلیل میانبُرترین درخت (MP) به همراه مقادیر شاخص بوت‌استرپ سه تحلیل مربوط به میانبُرترین درخت (MP)، محتمل‌ترین درخت (ML) و بیزین (Baysian)

www.SID.ir

Hebert و همکارانش (۲۰۰۴) از ژن میتوکندریایی *COX1* با طول ۶۴۸ جفت نوکلئوتید به عنوان نشانگر مولکولی برای شناسایی گونه‌های جانوری استفاده کردند. آنها ژن *COX1* را برای ۲۶۰ تاکسون از ۶۶۷ گونه پرندگان آمریکا شمالی را بررسی کردند و متوسط واگرایی ژنتیکی بین و درون گونه‌ای را به ترتیب ۷/۹۳ و ۰/۴۳ درصد محاسبه کردند. آنها میزان واگرایی ژنتیکی بین گونه‌ای را در ژن *COX1* ۱۰ برابر بیشتر از واگرایی ژنتیکی درون گونه‌ای معرفی کردند. در واقع فقدان واگرایی ژنتیکی در ژن *COX1* دلالت بر این مطلب دارد که جمعیت‌های بررسی شده بخش‌هایی از یک گونه واحد هستند.

امروزه استفاده از نشانگرهای مولکولی از جمله ژن *COX1* به عنوان روشی کارآمد برای شناسایی گونه‌های جانوری استفاده می‌شود به خصوص در مواقعی که خصوصیات ریخت‌شناسی به تنهایی کارآمد نیستند.

در این مطالعه، میانگین فاصله مولکولی (Kimura-2-Parameter, K2P) بیش از ۳/۷درصد در بین دو تبار *T. alba* و *T. furcata* وجود دارد. با توجه به مطالعات Hebert و همکاران (۲۰۰۴) این میزان تغییرات در حد تغییرات بین گونه‌ای است و با توجه به این میزان تغییرات می‌توان آنها را به عنوان دو گونه مجزا در نظر گرفت. این نتیجه با نتایج به دست آمده توسط Aliabadian و Nijman (۲۰۱۲) با استفاده از توالی ژن *COX1* و Wink و همکاران (۲۰۰۸) با استفاده از ژن‌های *CYTB* و *RAG-1* همخوانی دارد.

König و همکاران (۲۰۰۸) با بررسی توالی ژن میتوکندریایی *CYTB* و ژن هسته *RAG-1* میزان واگرایی ژنتیکی بالایی را برای *T. bargei* ارائه دادند. در مطالعه حاضر، میزان تغییرات ژنتیکی بین گونه‌ای *T. bargei* و *T. furcata* ۰/۷درصد محاسبه شد که جدایی گونه‌ای را در این دو تاکسون تأیید نمی‌کند و در تمامی درخت‌های حاصل از تحلیل‌های MP، ML و Baysian نمونه‌های متعلق به گونه *T. bargei* در تبار *T. furcata* و مابین زیرگونه‌های *T. f. hellmayri* و *T. f. pratincola* قرار گرفته است. Aliabadian و Nijman (۲۰۱۲) با استفاده از ژن *COX1* نیز به هیچ شاهدی مبنی بر جدایی گونه *T. bargei* از *T. furcata* دست نیافتند، در نتیجه محتمل است که *T. bargei* را بتوان به عنوان زیرگونه‌ای از گونه *T. furcata* در نظر گرفت. البته باید در نظر داشت که مطالعات تکمیلی نظیر ریخت‌سنجی، ریخت‌شناسی، رفتارشناسی و زادآوری نیز می‌بایست انجام گیرد تا مکمل داده‌های بعدی باشد.

König و همکاران (۲۰۰۸) در کتاب جغدهای جهان *T. delicatula* را به عنوان گونه‌ای جدا معرفی کردند. در درخت به دست آمده توسط ژن *16S* این تاکسون در تبار جداگانه با زیرگونه مربوط به اندونزی (*T. a. stertens*) قرار می‌گیرد و میزان تغییرات ژنتیکی محاسبه شده در بین دو تبار *T. furcata* و *T. delicatula* ۴/۲ است که فراتر از تغییرات بین گونه‌ای است. نتایج به دست آمده از بررسی ژن *16S* نتایج König و همکاران (۲۰۰۸) را مبنی بر ارتقاء جمعیت‌های مربوط به استرالیا به مرتبه گونه را تأیید می‌کند.

در این مطالعه، در تمامی درخت‌های بررسی شده، نمونه‌های مربوط به اندونزی (*T. a. stertens*) با شاخص بوت‌استرپ ۹۹ و ۱۰۰ درصد در تبار جداگانه‌ای همراه با نمونه‌های مربوط به استرالیا (*T. delicatula*) قرار می‌گیرند. میزان واگرایی ژنتیکی

Archive of SID

www.SID.ir

محاسبه شده در بین تبار *T. alba* و تبار مربوط به اندونزی ۴/۴۷ درصد است که این میزان تغییرات فراتر از حد تغییرات بین گونه‌ای است. با توجه به نتایج حاصل از تحلیل‌های MP، ML و Baysian واگرایی ژنتیکی موجود بین دو تبار *T. alba* شامل نمونه‌های متعلق به دنیای قدیم و تبار مربوط به نمونه‌های اندونزی (*T. a. stertens*) این احتمال وجود دارد که بتوان این زیرگونه را به مرتبه گونه ارتقاء داد.

تشکر و قدردانی

از خانم Donna L. Dittmann مدیریت مجموعه منابع ژنتیکی موزه علوم طبیعی ایالت لوئیزیانا، دانشگاه باتن روژ (Baton Rouge)، آقای Christos Barboutis از موزه تاریخ طبیعی یونان، دانشگاه یونان و خانم Tineke Prines سرپرست بخش پرندگان موزه آمستردام جهت در اختیار گذاشتن نمونه‌های بافت و پوست پرندگان مورد مطالعه قدردانی می‌شود. از دانشگاه فردوسی مشهد، معاونت پژوهشی جهت حمایت مالی پروژه دانشجویی نیلوفر علایی کاخکی (p/۱۰۲۱)، دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زیست‌شناسی دانشگاه قدردانی می‌شود.

منابع

Aliabadian, M. and Nijman, V. (2012) Mitochondrial sequence divergence suggest old world a new world barn owls are genetically distinct (submitted).

Brandley, M. C., Schmitz, A. and Reeder, T. W. (2005) Partitioned Bayesian analyses, partition choice and the phylogenetic relationships of scincid lizards. Systematic Biology 54: 373-390.

Bruford, M. W., Hanotte, O., Brookfield, J. F. Y. and Burke, T. (1992) Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. In: Molecular genetic analysis of populations: a practical approach (ed. Hoelzel, A. R.) 225-269. Oxford University Press, New York.

Dickinson, E. C. (2003) Complete checklist of the birds of the world. Christopher Helm, London.

Gutell, R. R. and Fox, G. E. (1988) A compilation of large subunit RNA sequences presented in a structural format. Nucleic Acids Research 16: 175-269.

Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. A., Zemlak, T. S. and Francis, C. M. (2004) Identification of birds DNA through barcodes. PLoS One 2: 1657-1663.

Hillis, D. M., Ammerman, L. K., Dixon, M. T. and de Sa,´ R. O. (1993) Ribosomal DNA and the phylogeny of frogs. Herpetological Monographs 7: 118-131.

Huelsenbeck, J. and Imennov, N. (2002) Geographic origin of human mitochondrial DNA: Accommodating phylogenetic uncertainty and model comparison. Systematic Biology 51: 155-165.

Huelsenbeck, J. and Ronquist, F. (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny Bioinformatics 17: 754-755.

Kjer, K. M. (1995) Use of rRNA secondary structure in phylogenetic studies to identify homologous positions: an example of alignment and data presentation from the frogs. Molecular Phylogenetics and Evolution 4: 314-330.

König, C., Weick, F. and Becking, J. H. (2008) Owls of the world, 2nd ed. Christopher Helm, London.

Lovette, I. J. (2003) Mitochondrial dating and mixed support for the "2% Rule" in birds. Auk 121: 1-6.

Posada, D. and Crandall, K. A. (1998) Modeltest: Testing the model of DNA substitution. Bioinformatics 14: 817-818.

Archive of SID

www.SID.ir

Schmitz, A., Mausfeld, P. and Embert, D. (2005) Molecular studies on the genus *Eumeces* Wiegmann 1834: phylogenetic relationships and taxonomic implications. Hamadryad 28: 73-89.

Swofford, D. L. (2002) PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), version 4.0b10 (Alvitec). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher G., Nei, M. and Kumar S. (2011) MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution 28: 2731-2739.

Vences, M., Kosuch, J., Lotters, S., Widmer, A., Jungfer, K. H., Kohler, J. and Veith, M. (2000) Phylogeny and classification of poison frogs (Amphibia: Dendrobatidae), based on mitochondrial 16S and 12s ribosomal RNA gene sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution 15: 34-40.

Wink, M., Heidrich, P., Sauer-Gürth, H., El sayed, A. A. and Gonzalez, J. (2008) Molecular phylogeny and systematic of owls (Strigiformes). In: Owls of the world (ed. König, C. and Weick, F.) 42-63. Christopher Helm, London.

Wink, M., Saur-Gürth, H. and Fuchs, M. (2004) Phylogenetic relationship in owls based on nucleotid sequences of mitochondrial and nuclear marker gene. In: Proceedings of the 6th world conference on birds of prey and owls. Raptors worldwide (eds. Chancellor, R. D. and Meyburg, B. U.) Budapest, Hungary.

Archive of SID

www.SID.ir

Phylogenetic systematics of Barn Owl (*Tyto alba* (Scopoli, 1769)) complex inferred from mitochondrial rDNA (*16S* rRNA) taxonomic implication

Mansour Aliabadian *, Niloufar Alaee Kakhky and Jamshid Darvish

Department of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Abstract

The Barn owl, *Tyto alba* (Scopoli, 1769), occurs worldwide and shows a considerable amount of morphological and geographical variations, leading to the recognition of many subspecies throughout the world. Yet, no comprehensive study has not been done on this species. Data from mitochondrial gene (16S Ribosomal RNA (*16S*)) with 569 bp length were analyzed for 41 individuals around the world. Maximum likelihood (ML), maximum parsimony (MP) and Bayesian analysis showed two distinct clades including *alba* clad (old world) and *furcata* clad (new world). The amount of genetic variation within each of these clades ranged from 0.5-1.7 but variation between clades was 3.7. This data may suggest that Barn owls of the Old World may be a separate species from those of the New World.

Key words: Phylogeny, *Tyto alba*, mtDNA, DNA barcoding, *16S* rRNA

Archive of SID

* aliabadi@um.ac.ir

www.SID.ir