

## تمایز ژنتیکی حشره خوار کوچک دندان سفید (*Crocidura suaveolens* (Pallas, 1811) در ایران مرکزی

حمید حدادیان شاد<sup>۱\*</sup>، جمشید درویش<sup>۲،۱</sup> و اسکندر رستگار پویانی<sup>۳</sup>



<sup>۱</sup> مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

<sup>۲</sup> مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، گروه پژوهشی جوندگی‌شناسی

<sup>۳</sup> سبزوار، دانشگاه حکیم سبزواری، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۴ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۶

### چکیده

تعدادی حشره‌خوار دندان سفید کوچک، *Crocidura suaveolens*، با استفاده از توالی‌های ژن میتوکندریایی سیتوکروم b از مناطق مختلف ایران مورد مطالعه قرار گرفتند. درخت بازسازی شده با تحلیل بیژین، تنوع ژنتیکی نمونه‌ها را در قالب ۴ دودمان با اعتبار بالا تأیید نمود که در مجموع به دو گروه اصلی تقسیم می‌شوند. گروه اول جمعیت‌های شمالی ایران را شامل شده و گروه دوم جمعیت‌های ایران مرکزی و شمال‌غرب را در برمی‌گیرند. جایگاه قاعده‌ای نمونه‌های ایران مرکزی در درخت تبارزایی، تنوع ژنتیکی بالا، مقدار فاصله ژنتیکی نسبتاً بالا (بیش از ۴ درصد) نسبت به سایر کلادها و عدم وجود هاپلوتاپ‌های مشترک با سایر کلادها از وجود دودمان تمایز یافته در این ناحیه حمایت می‌کند. به نظر می‌رسد جمعیت فعلی ایران مرکزی از جمعیتی بازمانده اجدادی منشأ گرفته و تغییرات اقلیمی عصر یخبندان منجر به جدایی آنها شده و زمینه را برای واگرایی بعدی آنان فراهم نموده است.

واژه‌های کلیدی: شیرکوه، سیتوکروم b، حشره‌خوار دندان سفید کوچک

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۵۱۰۰۶۲۱۵، پست الکترونیکی: Hamid\_shad20002001@yahoo.com

### مقدمه

اعضای این جنس، اولین دندان دارای یک برجستگی و بزرگتر از بقیه دندان‌ها بوده و دم دارای موهای پراکنده‌ای است که از بین سایر موها خارج می‌شوند. دندان‌ها بدون رنگیزه بوده و سه دندان در آرواره بالا دارای یک برجستگی هستند (۸). کرمی و همکاران (۲۰۰۸) ۷ گونه از این جنس را در ایران گزارش نموده‌اند (۱۷). این گونه‌ها عبارتند از:

*C. katinka* Bate, ) *Crocidura caspica* Thomas, 1907

*C. suaveolens* ) *C. leucodon* (Hermann, 1780, 1937,

*C. susiana* Redding et Lay, 1978 (Pallas, 1811

راسته حشره‌خواران یکی از قدیمی‌ترین راسته‌های پستانداران بوده و از سه خانواده با پراکنش در منطقه پالئارکتیک شامل *Erinaceidae*، *Soricidae* و *Talpidae* تشکیل شده است. اعضای خانواده *Soricidae* دارای پوشش بدنی بدون خار بوده و بیشترین عرض جملجه در ناحیه جعبه مغزی بوده و فاقد کمانهای زیگوماتیک هستند (۲۱ و ۸). علاوه بر این، اولین دندان پیش در آرواره بالا دارای ۲ برجستگی است. یکی از مهمترین جنس‌های این خانواده، جنس *Crocidura* Wagler, 1832 می‌باشد که از آفریقا تا اروپا و جنوب شرق آسیا گسترش داشته و گونه‌های متعددی برای آن گزارش شده است (۸). در

کوندیلو بازال کمتر از ۱۷/۸ میلی‌متر، طول آرواره پایین کمتر از ۱۱، طول دم کمتر از ۴۰ و پای عقب کوتاه‌تر از ۱۲ میلی‌متر است (۸). مقایسه وضعیت آرایه شناختی در نمونه‌های ایران در منابع مختلف در جدول ۱ خلاصه شده‌اند.

*C. gmelini* (Pallas, ) و *C. zarudnyi* Ognev, 1928، 1811، گونه *Crocidura suaveolens* توسط Lay از استان‌های گلستان، خراسان (۱۸) و اسماعیلی و همکاران آن را از فارس گزارش شده است (۱۲). محل تیپ آن را Crimea از روسیه ذکر کرده‌اند (۲۱). این گونه دارای طول

جدول ۱- مقایسه جایگاه آرایه شناختی حشره خوار دندان سفید در ایران براساس منابع مختلف

(۹) Corbet, 1978	Banikova et al.,2006 (۳)	(۱۲) Dubey et al.,2007	Musser & Carleton, (۲۲) 2005	Mammifères*
-	<i>C. caspica</i>	<i>C. caspica</i> ?	<i>C. caspica</i>	<i>C. caspica</i>
<i>C. suaveolens</i>	<i>C. suaveolens</i>	<i>C. suaveolens</i> group	<i>C. suaveolens</i>	<i>C. suaveolens</i>
<i>C.s. suaveolens</i>			= <i>C. gueldenstaedtti</i>	<i>C. s. astrabadensis</i>
= <i>mimula</i>			= <i>C. mimula</i>	<i>C. s. mimula</i>
= <i>hyrcanica</i>				<i>C. s. suaveolens</i>
-	<i>C. mimula</i>	<i>C. s. mimula</i>	-	-
-	-	<i>C. s. gueldenstaedtti</i>	-	<i>C. gueldenstaedtti</i>

\*<http://www.planet-mammiferes.org>

*C. s. mimula* بوده ولی جدایی این دو گروه براساس توالی سیتوکروم b با حمایت بالا تأیید نشده است (۱۰).

با توجه به مطالعات اندک حشره‌خواران در ایران، مطالعه این جنس نیاز به بررسی آرایه شناختی دارد. به همین منظور نمونه‌هایی از ایران مرکزی صید و مطالعات مولکولی براساس توالی ژن سیتوکروم b میتوکندری به همراه دو نمونه از کرمان و اصفهان مورد مطالعه قرار گرفتند. علاوه بر این، نمونه‌های دیگری از اعضای این جنس براساس توالی‌های موجود در بانک ژن در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند.

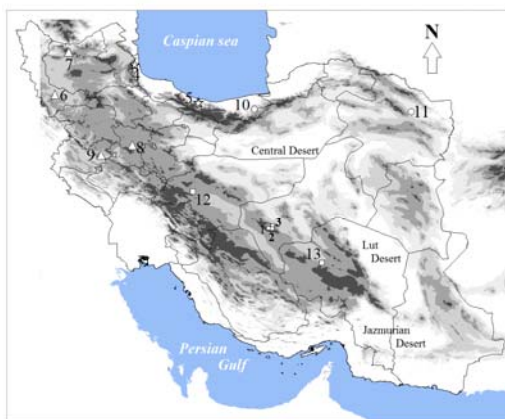
### مواد و روشها

تعداد ۳ نمونه حشره‌خوار از مناطق مختلف شیرکوه شامل بنادک سادات (E ۱۳° ۵۴، N ۳۵° ۳۱)، ده بالا (E ۰۸° ۵۴، N ۳۸° ۳۱) و طزرجان (N ۳۴° ۳۱، E ۰۹° ۵۴) در زیستگاه‌های باغی توسط تله‌های زنده گیر صید گردید. صید با تله‌های Pitfall موفق آمیز نبود. از گوشت مرغ پخته و پفک به‌عنوان طعمه استفاده گردید. شناسایی در سطح گونه با استفاده از کلید شناسایی (۸) انجام گردید. جهت روشن شدن جایگاه آرایه‌شناسی نمونه‌های یزد و

بر طبق ماسر و کارلتون (۲۰۰۵) در ایران دو گونه *C. caspica* و *C. suaveolens* وجود دارد و زیرگونه‌ای از گونه دوم ارائه نشده است. علاوه بر این گونه دوم را با *C. gueldenstaedtti* Pallas, 1901 و *C. mimula* Miller, 1811 مترادف می‌دانند درحالی‌که در منبع دیگر (www.planet-mammiferes.org)، *C. suaveolens* و *C. gueldenstaedtti* را دو گونه مجزا در نظر گرفته و به همراه *C. caspica* در مجموع سه گونه از این جنس را برای ایران معرفی می‌کند.

دویی و همکاران (۲۰۰۷) حشره‌خواران دندان سفید موجود در ایران را به سه دودمان مختلف نسبت می‌دهند: دودمان اول در شمال شرق ایران وجود داشته و متعلق به زیرگونه *C. s. suaveolens* می‌باشد. دودمان دوم در غرب ایران حضور داشته و متعلق به زیرگونه *C. s. gueldenstaedti* (Pallas, 1811) است. سومین دودمان مربوط به ایران مرکزی بوده و در دامنه پراکنشی زیرگونه‌های معرفی شده قرار نمی‌گیرد. تحقیقات آنان نشان داده که دو نمونه اصفهان و کرمان نزدیک به نمونه‌های اروپای مرکزی (ایتالیا، مجارستان، سوئیس، اسلوانی، یک نمونه از فرانسه، اتریش و بلغارستان) موسوم به

همچنین ارتباط آنها با نواحی شمال شرق و شمال غرب، توالی‌ها ژن سیتوکروم b سه نمونه از یزد، به همراه ۲۳ توالی از نمونه‌های متعلق به مناطق مختلف ایران از بانک ژن، سه توالی متعلق به سه گونه دیگر این جنس و دو توالی مربوط به گونه *Talpa caucasica* به‌عنوان برون‌گروه مورد تحلیل قرار گرفتند.



شکل ۱- نقشه جغرافیایی مناطق مورد مطالعه. علائم بکار رفته در هر منطقه مربوط به زیرگونه‌های معرفی شده برای آن منطقه است (۱۱). دایره: نمونه‌های زیرکلاد I متعلق به زیرگونه‌ای از *suaveolens* ستاره: نمونه‌های زیرکلاد II موسوم به *caspiica*، مثلث: نمونه‌های زیرکلاد III از زیرگونه *gueldenstaedtii*، مربع: نمونه‌های زیرکلاد V دودمانی ناشناخته در ایران مرکزی. برای اطلاعات شماره‌های هر منطقه به ستون دوم جدول ۱ مراجعه کنید.

**تحلیل داده‌ها:** از تحلیل بیشین برای بازسازی روابط تبارزایشی با نرم‌افزار MrBayes 3.2.5 (۲۳) استفاده گردید. مدل تکامل با Modeltest 3.7 (۲۲) با معیار Akaike انتخاب گردید. مدل انتخابی  $GTR + \gamma + \text{propinv}$  می‌باشد. چهار زنجیره مارکوف مونت‌کارلو همزمان برای ۵ میلیون تکرار و رقم ۵۰۰ هزار به‌عنوان درختان سوخته اجرا گردید.

جدول ۲- داده‌های مورد استفاده در مطالعه مولکولی حشره خوار کوچک اعداد داخل پرانتز محل هر منطقه را در شکل ۱ نشان می‌دهد. (\* اقباس از ۱۱ و \*\* اقباس از ۳ و # اقباس از ۴).

شماره	مناطق مورد مطالعه (شماره روی نقشه)	شماره موزه‌ای یا بانک ژن	n	جایگاه آرایه شناختی پیش‌فرض
۱	شیرکوه- ده بالا (1)	3805 FUMZM	۱	<i>C. suaveolens</i>
۲	شیرکوه- طزرجان (2)	3759FUMZM	۱	<i>C. suaveolens</i>
۳	شیرکوه- بنادک سادات (3)	3758FUMZM	۱	<i>C. suaveolens</i>

روش استخراج DNA، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و تعیین توالی: تمام DNAهای ژنومی از بافت ماهیچه یا کبدی نگهداری شده در اتانول ۹۵ درصد و در دمای ۲۰ درجه زیر صفر با استفاده از روش استاندارد نمکی استخراج شدند (۱ و ۸). ژن سیتوکروم b (به طول ۹۹۸ باز) با استفاده از پرایمرهای (5'-ACT AAT GAC ATG AAA 3' و 5'-TCT TCA TTT TTG AATCAT CGT T-3')

(GTT TAC AAG AC-3') تکثیر گردید (۱). شرایط تکثیر شامل یک مرحله آغازی دو دقیقه‌ای در دمای ۹۵ درجه است که با ۳۰ دور تکثیر با شرایط ۱ دقیقه در ۹۲ درجه، ۱ دقیقه در دمای ۵۸ درجه و ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه انجام شد و یک مرحله پایانی به مدت ۱۰ دقیقه، در دمای ۷۲ درجه تنظیم گردید (۲۰). مرتب کردن توالی‌ها با برنامه Clustal W (۲۶) در نرم‌افزار Bioedit 7.0.5 (۱۳) انجام شد و بطور چشمی چک گردید. سطح تنوع DNA میتوکندریایی با محاسبه تنوع هاپلوتایپی (h)، تنوع نوکلئوتیدی ( $\pi$ )، و انحراف معیار آنها با DNAsp 5.10.01 (۱۹) محاسبه شد. فاصله ژنتیکی به روش کیمورا دو پارامتری (۱۷) با نرم‌افزار Mega 5 محاسبه گردید (۲۵). ارتباط بین هاپلوتایپ‌ها با نرم‌افزار Network نسخه 4.6.1.3 (قابل دسترسی در وبگاه [www.fluxus.com](http://www.fluxus.com))

<i>C. s. caspica</i>	۱	DQ630055*	اسالم، استان گیلان (4)	۴
<i>C. s. caspica</i>	۱	DQ630056*	چورتی، استان مازندران (5)	۵
<i>C. s. caspica</i>	۱	DQ630057*	اسالم، استان گیلان (4)	۶
<i>C. caspica</i>	۱	AY994368**	آستارا، تالش، استان گیلان (4)	۷
<i>C. caspica</i>	۱	AY994369**	آستارا، تالش، استان گیلان (4)	۸
<i>C. caspica</i>	۱	AY994370**	بوردالالو، استان گیلان (4)	۹
<i>C. s. gueldenstaedtii</i>	۱	DQ630074*	محمد یار، آذربایجان غربی (6)	۱۰
<i>C. s. gueldenstaedtii</i>	۱	DQ630084*	بسطام، آذربایجان غربی (7)	۱۱
<i>C. s. gueldenstaedtii</i>	۱	DQ630091*	بسطام، آذربایجان غربی (7)	۱۲
<i>C. s. gueldenstaedtii</i>	۱	DQ630094*	محمد یار، آذربایجان غربی (6)	۱۳
<i>C. s. gueldenstaedtii</i>	۱	DQ630073*	النجف، استان همدان (8)	۱۴
<i>C. s. gueldenstaedtii</i>	۱	DQ630092*	النجف، استان همدان (8)	۱۵
<i>C. s. gueldenstaedtii</i>	۱	DQ630093*	بیستون، استان کرمانشاه (9)	۱۶
<i>C. s. gueldenstaedtii</i>	۱	DQ630080*	بیستون، استان کرمانشاه (9)	۱۷
<i>C. s. suaveolens</i>	۱	DQ630063*	نوکنده، استان مازندران (10)	۱۸
<i>C. s. suaveolens</i>	۱	DQ630062*	مشهد، استان خراسان رضوی (11)	۱۹
<i>C. suaveolens</i>	۱	DQ630058*	اسپیدان، استان اصفهان (12)	۲۰
<i>C. suaveolens</i>	۱	DQ630059*	کرمان، استان کرمان (13)	۲۱
<i>C. s. mimula</i>	۱	AY843459*	Italy, Vercelli	۲۲
<i>C. s. mimula</i>	۱	DQ630064*	Italy, Varazze	۲۳
<i>C. s. mimula</i>	۱	DQ630051*	Bulgaria, Burgas	۲۴
<i>C. s. mimula</i>	۱	AY843458*	Bulgaria, Sandanski	۲۵
<i>C. mimula</i>	۱	AB077280#	Austria, Vienne	۲۶
<i>C. mimula</i>	۱	AY994388#	Italy, Venice	۲۷
<i>C. s. mimula</i>	۱	EU742605	Germany	۲۸
<i>C. s. mimula</i>	۱	EU742606	Ukraine, Karpaty	۲۹
<i>C. s. mimula</i>	۱	EU742607	Ukraine, Karpaty	۳۰
<i>C. s. mimula</i>	۱	DQ630052*	Italy, Elba	۳۱
<i>C. s. mimula</i>	۱	AY843452*	Switzerland, Gordevio	۳۲
<i>C. s. mimula</i>	۱	AY843453*	Italy, San Nicolo	۳۳
<i>C. s. mimula</i>	۱	AY843450*	Italy, Fivizzano	۳۴
<i>C. brunnea</i>	۱	DQ059025*	-	۳۵
<i>C. nigripes</i>	۱	DQ059024*	-	۳۶
<i>C. zarudnyi</i>	۱	AY925211	-	۳۷
<i>Talpa caucasica</i>	۱	KP717350	-	۳۸
<i>Talpa caucasica</i>	۱	KP717351	-	۳۹

## نتایج

کلاد منسوب به زیرگونه *mimula* را به نشان می‌دهد. بر پایه این داده‌ها، بیشترین تنوع نوکلئوتیدی در نمونه‌های ایران مرکزی و نمونه‌های شمال‌شرق دیده می‌شود. کمترین تنوع نوکلئوتیدی در کلاد شمال غرب مشاهده می‌شود.

بررسی ساختار ژنتیکی ۲۱ نمونه در ایران براساس توالی‌های ژن سیتوکروم b حاکی از وجود ۲۰ هاپلوتاایپ است. جدول ۳ مقایسه ساختار ژنتیکی کلادهای ایرانی و

جدول ۳- مقایسه کلاد های مختلف از نظر تعداد هاپلوتاایپ ها، تنوع هاپلوتاایپی و انحراف استاندارد مربوط به آنها. n: تعداد توالی‌ها،

H: تعداد هاپلوتاایپ ها، h: تنوع هاپلوتاایپی، h\*: انحراف استاندارد تنوع هاپلوتاایپی، Pi: تنوع نوکلئوتیدی، Pi\*: انحراف استاندارد تنوع نوکلئوتیدی، P: تعداد سایت‌های پلی مورف، Ts/Tv: تعداد ترانزیشن به ترانسورژن

Ts / Tv	P	Pi*	Pi	h*	h	H	n	
۱۷/۱۳	۶۵	۰/۰۰۴۳۷	۰/۰۱۶۷۲	۰/۱۲۶	۱	۵	۵	کلاد ایران مرکزی
۹/۶	۴۵۱	۰/۰۰۳۷۵	۰/۰۰۷۵	۰/۵	۱	۲	۲	کلاد شمال شرق
۱۴/۲	۱۶	۰/۰۰۱۲۵	۰/۰۰۷۲۱	۰/۰۹۶	۱	۶	۶	کلاد شمالی
۱۱/۹	۳۲۳	۰/۰۰۰۷۱	۰/۰۰۳۵۲	۰/۰۷۷	۰/۹۶۴	۷	۸	کلاد شمال غرب
۲۲/۶	۲۷	۰/۰۰۱۵۳	۰/۰۰۷۱۴	۰/۰۵۱	۰/۹۳۶	۹	۱۳	کلاد <i>mimula</i>
۱۳۰/۳۶	۵۱۵	۰/۰۱۶	۰/۰۵۲۳۱	۰/۰۱۶	۰/۹۹۵	۲۰	۲۱	کل نمونه‌های ایران

می‌شود. کلاد شمال شرق و شمالی نیز با بیش از ۳۹ مرحله موتاسیونی از هم جدا می‌شوند. نزدیک‌ترین کلادها، کلادهای ایران مرکزی و اروپای مرکزی هستند که با حداقل ۲۰ مرحله موتاسیونی از هم متمایز می‌شوند.

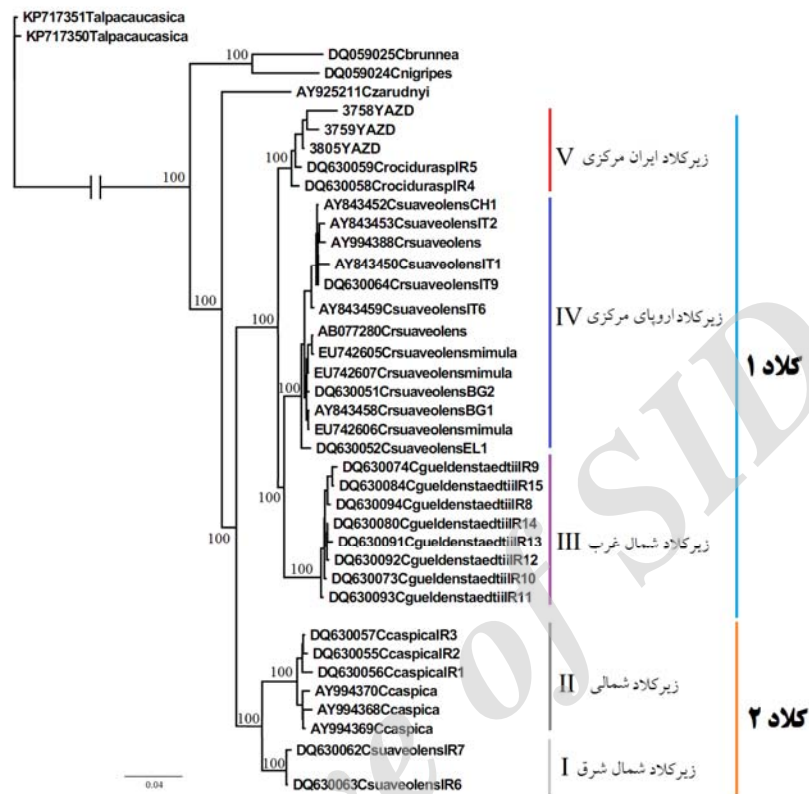
## بحث

مطالعات مولکولی حاضر براساس ژن سیتوکروم b حضور دو کلاد اصلی یکی در البرز و دیگری در امتداد ایران مرکزی (زیرکلاد ایران مرکزی) و زیر کلاد شمال غرب (زاگرس) را نشان می‌دهد. با توجه به فواصل ژنتیکی محاسبه‌شده بین دو کلاد، حضور دو گونه از این جنس در فلات ایران، دور از انتظار نیست. فاصله ژنتیکی بین این دو کلاد ۹/۱ تا ۹/۹ درصد است که در دامنه تعریف‌شده برای دو گونه در جوندگان همخوانی دارد (۳). فاصله درون‌گونه‌ای در کلاد ۱ بین ۴/۲۴ تا ۶/۲۸ است. در مورد دو زیرکلاد سواحل خزر و شمال شرق، فاصله ژنتیکی محاسبه‌شده براساس کیمورا ۲ پارامتری، ۶/۱۵ درصد است که به نظر می‌رسد با برای کسب تراز آرایه شناختی گونه، حداقل نسبت به آنچه برای جوندگان و خفاشان تعیین

درخت بازسازی شده براساس تحلیل بیژین در شکل ۲ نشان داده‌شده است. در نمونه‌های این مطالعه، دو گروه اصلی دیده می‌شود. گروه شمال‌شرق و شمالی که در امتداد رشته‌کوه‌های البرز است و گروه دوم که بطور عمده، نمونه‌های زاگرس و کوه‌های مرکزی ایران را دربرمی‌گیرد. گروه شمالی خود از دو زیرکلاد خواهری تشکیل شده که یکی زیرکلاد شمال شرق نمونه‌های مشهد و نوکنده را شامل شده و دیگری زیرکلاد شمالی یعنی نمونه‌های بخش‌های غربی دریای خزر، تالش و آستارا را دربرمی‌گیرد. گروه دوم از زیرکلادهای خواهری اروپای مرکزی و شمال غربی ایران و زیرکلاد ایران مرکزی مرتبط با آن را شامل می‌شود. اعتبار همه کلادها و زیرکلادها با بیشترین اعتبار در هر گره، تأیید می‌شوند (شکل ۲).

بازسازی ارتباط بین هاپلوتاایپ‌ها بر پایه الگوریتم شبکه (Median Joining Network) مبین حضور ۲۹ هاپلوتاایپ مختلف در قالب پنج آرایه است که با پنج کلاد حاصل از تحلیل بیژین مطابقت دارد (شکل ۳). نمونه‌های ایران مرکزی با حداقل ۵۲ مرحله موتاسیونی از نمونه‌های کلاد شمال‌شرق و توسط ۳۴ مرحله از کلاد شمال‌غرب جدا

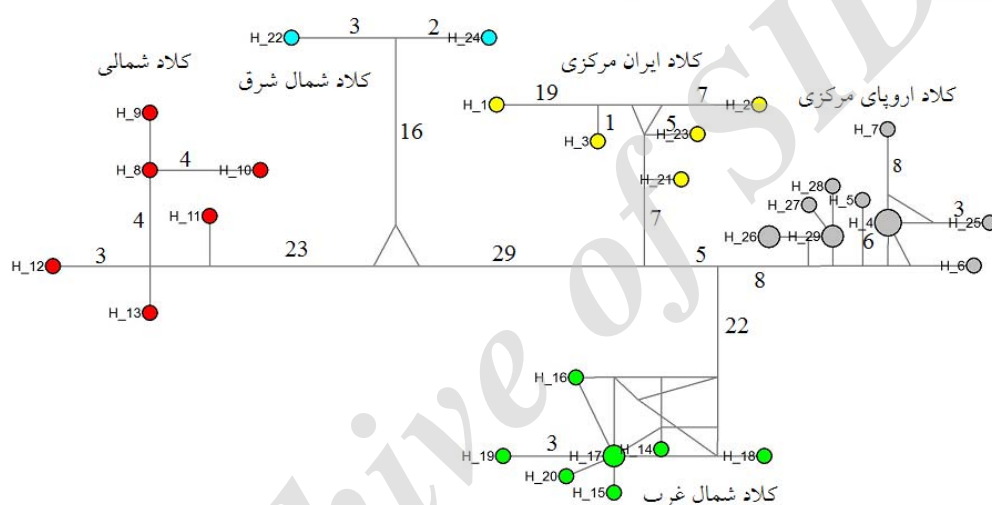
گردیده، کافی نباشد (۷). لذا این مطالعه شواهد کافی برای  
اعتبار گونه *C. caspica* (یعنی نمونه‌های سواحل جنوبی  
خزر در آستارا و تالش) را نشان نمی‌دهد.



شکل ۲- بازسازی درخت حاصل از تحلیل بیژن. اعداد روی هر شاخه میزان اعتبار آن کلاد یا زیرکلاد را نشان می‌دهد.

تمایز ژنتیکی در جمعیت حشره‌خوار دندان سفید کوچک ایران مرکزی، بیانگر وجود آرایه‌ای متمایز در این بخش از فلات ایران بوده و موقعیت قاعده‌ای آنها نسبت به نمونه‌های کلاد شمال غرب دلالت بر قدیمی‌تر بودن آنها داشته و نشان می‌دهد ورود آنها به ایران احتمالاً قبل از نمونه‌های کلاد شمال غرب بوده است و خاستگاه فعلی آنها احتمالاً یک جمعیت بازمانده (رلیکت) است (۱۰). گونه‌های جنس *Crocidura* به سرما بسیار حساس بوده و در عرض‌های جغرافیایی بالا و همچنین ارتفاعات دیده نمی‌شود. علاوه بر این، کوه‌ها و بیابان‌ها به‌عنوان سد قوی در برابر پراکنش این گونه‌ها عمل می‌کنند (۷).

تمایز ژنتیکی کلاد منسوب به *C. caspica* در مطالعات انجام‌گرفته بر روی توالی‌های ژن سیتوکروم b و ژن هسته‌ای (BRCA1 (Breast Cancer Susceptibility 1)، محرز شده ولی اعتبار این کلاد برای احراز سطح آرایه شناختی گونه یا زیرگونه را منوط به بررسی بیشتر می‌دانند (۱۰ و ۱۱). نتایج این مطالعه از گروه‌بندی پیشنهادشده توسط بانیکووا و همکاران حمایت می‌کند (۳). براساس مطالعات آنان، نمونه‌های کلاد غربی اروپا (به همراه نمونه‌هایی از ایران مرکزی و شمال غرب ایران) به‌عنوان گونه *C. mimula* و کلاد شرقی (به همراه نمونه‌های شمالی و شمال شرقی ایران) به‌عنوان گونه *C. suaveolens* پیشنهادشده است. بر پایه این مطالعه می‌توان این دو گونه از این جنس را در ایران پیشنهاد کرد.



شکل ۳- بازسازی شبکه هاپلوتایپی کلاد های حشره خوار دندان سفید کوچک به همراه پراکنش آنها در ایران و اروپای مرکزی. به شباهت نمونه‌های ایران مرکزی با نمونه‌های کلاد اروپای مرکزی توجه نمایید. اعداد روی شاخه‌ها تعداد مراحل جهش بین هاپلوتایپ‌ها را نشان می‌دهند. تعداد مراحل موتاسیونی بالا بین هاپلوتایپ ۱ و ۲ (از شیرکوه) به دلیل طول کوتاه‌تر در انتهای توالی این دو نمونه (Gap) است. برای مشاهده اطلاعات هاپلوتایپ‌ها به جدول S1 در بخش ضمیمه، مراجعه نمایید.

توسط این جمعیت بازمانده، تنوع اجدادی را حفظ نموده و جدایی درازمدت آنها از نواحی دورتر با سدهایی همچون کوه‌ها و بیابان‌ها، سبب واگرایی ژنتیکی بیشتر و ایجاد دودمان جدیدی در ایران مرکزی شده است. فاصله ژنتیکی بیش از ۴ درصدی کلاد ایران مرکزی نسبت به سایر کلادها (جدول ۴) و عدم وجود هاپلوتایپ مشترک بین آنها با سایر کلادها، نشانگر جدایی ژنتیکی آنها در طول زمان است.

زمان واگرایی کلاد ایران مرکزی از نمونه‌های اروپایی، ۰/۸۳ میلیون سال قبل تخمین زده شده است که با اواخر پلیستوسن زیرین ([www.stratigraphy.org](http://www.stratigraphy.org)) همزمان بوده است (۱۱ و ۶). شواهد لایه‌نگاری (Stratigraphy) نشان داده است اقلیم ایران در این زمان سردتر از امروزه بوده و میزان رطوبت به دلیل کاهش میزان تبخیر، بیشتر بوده است (۱۷). احتمالاً این دوره سرما می‌تواند عاملی برای منزوی شدن و شروع واگرایی حشره‌خواران ایران مرکزی بوده باشد. اشغال کوه‌های ایران مرکزی به‌عنوان ناحیه پناهگاهی

جدول ۴- فاصله ژنتیکی حاصل از توالی‌های ژن سیتوکروم b بین کلادهای مورد مطالعه. اعداد پررنگ، فواصل درون هر کلاد را براساس معیار کیمورا ۲ پارامتری نشان می‌دهد.

	کلاد ۵	کلاد ۴	<i>C.brun</i>	<i>C.nigris</i>	<i>C.zarud.</i>	<i>Talpa</i>	کلاد ۲	کلاد ۳	کلاد ۱
کلاد ۵ (ایران مرکزی)	<b>0.0178</b>								
کلاد ۴ ( <i>mimula</i> )	0.0424	<b>0.0068</b>							
<i>C.brunnea</i>	0.1567	0.1569	-						
<i>C.nigris</i>	0.1718	0.1628	0.1047	-					
<i>C.zarudnyi</i>	0.1070	0.1025	0.1586	0.1619	-				
<i>Talpa caucasica</i>	0.3654	0.3697	0.3522	0.3720	0.3568	<b>0.0021</b>			
کلاد ۲ (شمالی)	0.0999	0.0892	0.1765	0.1667	0.1041	0.3557	<b>0.0080</b>		
کلاد ۳ (شمال غرب)	0.0528	0.0488	0.1774	0.1796	0.1144	0.3778	0.1020	<b>0.0066</b>	
کلاد ۱ (شمال شرق)	0.0917	0.0890	0.1746	0.1570	0.1053	0.3438	0.0615	0.0942	<b>0.0170</b>

نسبت پایین است که این موضوع می‌تواند نشانه تکثیر جمعیتی اخیر (کلونیزاسیون) اعضای این کلاد باشد. نمونه‌برداری بیشتر و استفاده از نشانگرهای مولکولی دیگر می‌تواند جایگاه آرایه‌شناسی اعضای این جنس را در ایران، روشن سازد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با همکاری اداره کل حفاظت محیط‌زیست استان یزد در قالب طرح پژوهشی مطالعه چونندگان استان یزد (قرارداد شماره ۱۲۱-۳۲۲۱۷) انجام گرفته است. جهت انجام تحلیل رایانه‌ای، از خدمات مرکز محاسبات سنگین دانشگاه فردوسی مشهد استفاده شده که بدین وسیله تشکر و قدردانی می‌گردد.

این موضوع احتمال وجود دودمان ژنتیکی متمایز را در ایران مرکزی قوت می‌بخشد. وضعیت این دودمان با شکل ناهمواری‌های طبیعی ایران مرکزی به خوبی منطبق است. ایران مرکزی از نواحی شمال‌غرب (زاگرس) توسط دشت سیرجان- سنندج و کویر ابرکوه و از مناطق شمالی توسط دشت مرکزی و رشته‌کوه‌های البرز و از مناطق شمال‌شرق توسط دشت مرکزی ایران و کوه‌های این ناحیه جدا شده است. این ناهمواری‌ها نقش مهمی در تمایز ژنتیکی در آرایه‌های دیگر مانند موش خانگی (۱۴)، زیبا موش البرزی شیرکوه (۲۴ و ۲)، جرد ایرانی (۹) و تمایز جرد بزرگ به‌عنوان زیرگونه *Rhombomys opimus sargadensis* (۱۵) داشته است. برخلاف تنوع ژنتیکی بالایی نمونه‌های ایران مرکزی که نشانه قدمت و پایداری درازمدت آنها است، تنوع ژنتیکی در نمونه‌های کلاد شمال غرب به

جدول SI - اطلاعات مربوط به هاپلوتاایپ‌های شبکه هاپلوتاایپی ترسیم شده در شکل ۵.

هاپلوتاایپ	N	شماره نمونه‌ها
Hap 1	1	[3758]
Hap 2	1	[3759]
Hap 3	1	[3805]
Hap 4	3	[AY8434521Csuaveolens AY8434591Csuaveolens DQ6300641Crsuaveolen]
Hap 5	1	[DQ6300521Csuaveolens]
Hap 6	1	[AY8434531Csuaveolens]
Hap 7	1	[AY8434501Csuaveolens]
Hap 8	1	[DQ6300571CcaspiR3]
Hap 9	1	[DQ6300551CcaspiR2]
Hap 10	1	[DQ6300561CcaspiR1]



Hap 11	1	[AY9943701Caspica]
Hap 12	1	[AY9943681Caspica]
Hap 13	1	[AY9943691Caspica]
Hap 14	1	[DQ6300741Cgueldensta]
Hap 15	1	[DQ6300941Cgueldensta]
Hap 16	1	[DQ6300841Cgueldensta]
Hap 17	2	[DQ6300801Cgueldensta DQ6300921Cgueldensta]
Hap 18	1	[DQ6300931Cgueldensta]
Hap 19	1	[DQ6300911Cgueldensta]
Hap 20	1	[DQ6300731Cgueldensta]
Hap 21	1	[DQ6300581Crocidurasp]
Hap 22	1	[DQ6300621Csuaveolens]
Hap 23	1	[DQ6300591Crocidurasp]
Hap 24	1	[DQ6300631Csuaveolens]
Hap 25	1	[AY9943881Crsuaveolen]
Hap 26	2	[AB0772801Crsuaveolen EU7426051Crsuaveolen]
Hap 27	1	[AY8434581Crsuaveolen]
Hap 28	1	[DQ6300511Crsuaveolen]
Hap 29	2	[EU7426061Crsuaveolen EU7426071Crsuaveolen]

## منابع

- 1- Aliabadian, M., Kaboli, M., Prodon, R., Nijman, V., and Vences, M., 2007. Phylogeny of Palearctic wheatears (genus *Oenanthe*) congruence between morphometric and molecular data, *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 42, PP: 665–675.
- 2- Akbarirad, S., Darvish, J., and Aliabadian, M., 2016. Phylogeography of *Calomyscus elburzensis* (Calomyscidae, Rodentia) around the Central Iranian Desert with Description of a New subspecies in center of Iranian Plateau, *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran*, 27(1), PP: 5 – 21.
- 3- Bannikova, A.A., Lebedev, V.S., Kramerov, D.A., and Zaitsev, M.V., 2006. Phylogeny and systematic of the *Crocidura suaveolens* species group: corroboration and controversy between nuclear and mitochondrial DNA markers. *Mammalia*, 70(1-2), PP: 106–119.
- 4- Bannikova, A.A., B.I. Sheftel, V.S. Lebedev, D. Yu. Aleksandrov, and M. Muehlenberg, 2009. *Crocidura shantungensis*, a New Species for Mongolia and Buryatia, *Doklady Biological Sciences*, Vol. 424, PP: 68–71.
- 5- Bandelt, H.J., Forster, P., Rohl, A., 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies, *Molecular Biology and Evolution*, 16, PP: 37- 48.
- 6- Bobek, H., 1963. Nature and implications of Quaternary climatic changes in Iran, *Changes of Climate* 20, PP: 403-413.
- 7- Bruford, M.W., Hanotte O., Brokfield J. F. Y. and Burke, T., 1992. Single-locus and multilocus DNA fingerprinting, In: A.R. Hoelzel (eds.), *Molecular genetic analysis of populations, a practical approach*, Oxford University Press, New York, PP: 225 – 269.
- 8- Corbet, G.B., 1978. The mammals of the Palaearctic region: a taxonomic review. Cornell University Press, Ithaca, NY, 314 p.
- 9- Dianat, M., Darvish, J., Aliabadian, M., and Haddadian, H., 2016. Integrative taxonomy of *Meriones persicus* (Rodentia, Gerbillinae) in Iran, *Iranian Journal of Animal Biosystematics*, Vol: 12, No. 1, Online at: <http://ijab.um.ac.ir/index.php/biosys/article/view/55424>.
- 10- Dubey, S., Zaitsev, M., Cosson, J.F., Abdulkadier, A., and Vogel, P., 2006. Pliocene and Pleistocene diversification and multiple refugia in a Eurasian shrew (*Crocidura suaveolens* group), *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 38, PP: 635–647.
- 11- Dubey, S., Cosson, J.F., Magnou, E., Vohralik, V., Benda, P., Frynta, D., Hutterer, R., Vpigel, V., and Vogel, P., 2007. Mediterranean populations of the lesser white-toothed shrew (*Crocidura suaveolens* group): an unexpected puzzle of Pleistocene survivors and prehistoric introductions. *Molecular Ecology*, 16, PP: 3438–3452.
- 12- Esmaeili, H.R., Gholamhosseini, G., Zareian, H., and Krystufek, B., 2008. Noteworthy range extension of two white-toothed shrews in Iran:

- Crocidura suaveolens* and *Suncus etruscus*. *Zoology in the Middle East*, 45, PP: 105–107.
- 13- Hall, T.A., 1999. Bio Edit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Research*, 41, PP: 95-98.
  - 14 –Haddadian, S.h.H., Darvish, J., Rastegar-Pouyani, E., and Mahmoudi, A., 2016. Subspecies differentiation of the house mouse *Mus musculus* Linnaeus, 1758 in the center and east of the Iranian plateau and Afghanistan, *Mammalia-2015* (Online), DOI: 10.1515/mammalia-2015-0041.
  - 15- Hosseinzadeh, M.S., and Darvish, J., 2013. Biosystematic study of Great gerbil species *Rhombomys opimus* Lichtenstein, 1823 (Rodentia: Gerbillinae) in Iran. *Animal Researches Journal (Iranian Biology Journal)* Volume 26(3) (In Persian and English abstract), PP: 282-288.
  - 16- Karami, M.R., Hutterer, P., Benda, R., Siahsarvie and Krystufek, B., 2008. Annotated check-list of the mammals of Iran, *Lynx (Praha)*, 39(1), PP: 63–102.
  - 17- Kehl, M., 2009. Quaternary climate change in Iran-the state of knowledge, *Erdkunde*, 63, PP: 1-17.
  - 18- Lay, D.M., 1967. A study of the mammals of Iran resulting from the street expedition of 1962–63, *Fieldiana, Zoology*, 54, PP: 1–282.
  - 19- Librado, P., and Rozas, J., 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, PP: 1451–1452.
  - 20- Montgelard, C., Bentz, S., Tirard, C., Verneau, O., and Catzeflis, F.M., 2002. Molecular systematic of Sciurognathi (Rodentia): the mitochondrial cytochrome b and 12S rRNA genes support the Anomaluroidea (Peptidae and Anomaluridae). *Molecular Phylogeny and Evolution*, 22, PP: 220 – 233.
  - 21 – Musser, G., and Carleton, M., 2005. Superfamily Muroidea, PP: 894–1531. In: Wilson D. E. & Reeder D. M. (eds.): *Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference, Third Edition. Volume 2*, the John Hopkins University Press, Baltimore, PP: 745–2142.
  - 22- Posada, D., 2008. J, ModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular biology and Evolution* 25, PP: 1253–1256.
  - 23- Ronquist, F., and Huelsenbeck, J.P., 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19, PP: 1572–1574.
  - 24- Shahabi, S., Darvish, J., and Aliabadian, M., 2013. Phylogeny of Genus *Calomyscus* (Rodentia: Calomyscidae) from Iranian plateau, inferred from mitochondrial CO1 gene. *Animal Researches Journal (Iranian Biology Journal)* Volume 26(2) (In Persian and English abstract), PP: 163–170.
  - 25- 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*, 28, PP: 2731–2739.
  - 26- Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T. J., 1994. Clustal-W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Researches*, 22, PP: 4673-4680.

## Genetic differentiation of the lesser white-toothed shrew, *Crocidura suaveolens* (Pallas, 1811) inferred from *cytb* sequences and morphometric in the refuges of the central Iran

Haddadian Shad H.<sup>1</sup>, Darvish J.<sup>2</sup> and Rastegar-Pouyani E.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Biology Dept., Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R. of Iran.

<sup>2</sup> Rodentology Research Dept., Institute of Applied Zoology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R. of Iran.

<sup>3</sup> Biology Dept., Hakim Sabzevari University, Sabzevar, I.R. of Iran.

### Abstract

Populations of the lesser white-toothed shrew, *Crocidura suaveolens*, (Pallas, 1811) were investigated using mitochondrial cytochrome *b* gene (*cytb*) and morphometric from different localities of Iran. Phylogenetic tree reconstruction using the Bayesian Inference analysis revealed high genetic diversity into four well-supported clades including two main groups: the first group including northern populations of Iran and the second one including the populations from central and northwest of Iran. Basal status of the central clade in phylogenetic tree, high genetic diversity, fairly high amount of K<sub>2</sub>P genetic distance (greater than 4 percent) in comparison with other clades as well as lack of shared haplotypes supports the presence of differentiated lineage in the central Iran. It seems that, the recent central population has been originated from an ancestral relict population and the Pleistocene climatic oscillations have resulted in its isolation from other populations and subsequent divergence into the new lineage.

**Key word:** Shirkooh, *cytb*, lesser white-toothed shrew, refugia