بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت تمساح مردابی (*Crocodylus palustris*) ایران با استفاده از ژن Tau-Crystallin

• **سیامک یوسفی‌سیاهکلرودی**: دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۰

چکیده

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی تمساح مردابی (*Crocodylus palustris*) ایران، پس از انتخاب ۵ ایستگاه در استان سیستان و بلوچستان، برای نمونه‌برداری و استخراج DNA از فلس ده تمساح، از ژن Tau-Crystallin (tissue-type eye lens tau-crystallin) استفاده گردید. پس از تکثیر جایگاه ٦٤٨ جفت‌بازی بوسیلهٔ PCR، از تکنیک SSCP استفاده شد. برای مشاهده چند شکلی فضایی تک رشته‌ای (SSCP) محصولات PCR از ژل پلی‌آکریل آمید ۸ درصد و رنگ آمیزی نیترات نقره استفاده گردید. در این تحقیق، در جمعیت تمساح مردابی ایران در جایگاه مورد مطالعه ۱ آلل دیده شد که بیانگر عدم وجود تنوع ژنتیکی در ژن Tau-Crystallin می‌باشد.

کلمات کلیدی: تمساح مردابی، تنوع ژنتیکی، ژن Tau-Crystallin، تکنیک SSCP

مقدمه

تمساح مردابی (*Crocodylus palustris*) یا گاندو که منطقه پراکنش آن در جهان به نپال، بنگلادش، هند، مناطق بلوچستان و پنجاب پاکستان و قسمتی از مکران ایران در بلوچستان که آن هم محدود به بخشی از منطقه باهوکلات می‌باشد، موجودی است با جثه متوسط تا بزرگ با پوزه پهن که آفتاب‌گرفتن بارزترین فعالیت روزانه آن بشمار می‌رود (۲). جمعیت موجود در ایران تنها بخش کوچکی از جمعیت جهانی این گونه به حساب می‌آید و این گونه در آخرین طبقه‌بندی اتحادیه جهانی حفاظت از طبیعت در گروه آسیب‌پذیر طبقه‌بندی گردیده و عمده‌ترین عامل تهدیدکننده آن تخریب زیستگاه می‌باشد، که بطور محتمل در صورت ادامه یافتن عوامل مؤثر در نابودی آنها در آینده در معرض خطر انقراض قرار می‌گیرد و شامل گروه‌هایی می‌شود که عمده جمعیت آنها بدلیل بهره‌برداری یا نابودی شدید زیستگاه و سایر تخریب‌های زیست محیطی کاهش یافته است (۱ و ۴). با توجه به غنای زیستگاه‌های کشور از لحاظ تنوع جانوری و در معرض خطر انقراض قرار گرفتن تعدادی از گونه‌های موجود، بررسی‌های جمعیتی و حفظ این ذخایر ژنتیکی از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. متأسفانه در ایران بررسی ساختار ژنتیکی و تعیین نزدیکی جمعیت‌های مختلف جانوران در سالیان اخیر آغاز شده و حتی تاکنون هیچ مطالعه مدونی در راستای تعیین ساختار برخی از گونه‌های جانوری دارای اهمیت، بویژه در حال انقراض انجام نپذیرفته است. فروتن و همکاران (۱۳۸۹) با تحقیقی روی تمساح مردابی ایران با استفاده از تکنیک RAPD نتیجه گرفتند که تنوع ژنتیکی معنی‌داری در جمعیت تمساح مردابی موجود در ایران وجود ندارد. Yan و همکاران (۲۰۰۶) در

*پست الکترونیکی نویسنده: siamak_yousefi1@yahoo.com

مطالعه‌ای روی تمساح آب شور و مقایسه آن با سایر تمساح‌ها با استفاده از توالی‌یابی ژنوم میتوکندریایی، روابط فیلوژنتیکی این گونه را با سایر تمساح‌ها بررسی نمودند و به این نتیجه رسیدند که این تمساح‌ها قرابت ژنتیکی بیشتری با تمساح‌های آفریقایی دارند. Meganathan و همکاران (۲۰۰۸) با تحقیقی روی شش گونه تمساح کروکودیلوس پالوستریس، کروکودیلوس سیامینس، کروکودیلوس نیلوتیکوس، گاویالیس گانگتیکوس و کایمن کروکودیلوس با استفاده از توالی‌یابی ژن سیتوکروم b میتوکندری، روابط فیلوژنتیکی این شش گونه را بررسی نمودند. Weaver و همکاران (۲۰۰۸) با تحقیقی روی ویژگی‌های ژنتیکی تمساح‌های کوبایی و نتاج دورگه حاصل از تلاقی آنها با تمساح‌های آمریکایی با استفاده از توالی‌یابی نواحی Cyt-b، tRNA(Pro)-tRNA(Phe) و D-loop، روابط فیلوژنتیکی کروکودیل‌های مذکور را با استفاده از معیارهای ماگزیمم پارسیمونی، حداکثر درست نمایی و بیزین بررسی نمودند. بنابراین در این تحقیق نیز با توجه به عدم وجود اطلاعات از میزان تنوع ژنتیکی و ساختار ژنتیکی جمعیت تمساح مردابی ایران (*Crocodylus palustris*)، میزان این تنوع موجود با استفاده از جایگاه ژنی Tau-Crystallin بررسی گردید.

مواد و روشها

در این تحقیق، ۱۰ نمونه تمساح از راه تله‌گذاری از ۵ منطقه شامل: زیارت جنگل، برکه پیرسهراب، کهیر برز، برکه شکر جنگل و سد پیشین صید گردید. سپس نمونه‌برداری از فلس تمساح انجام پذیرفت و تمساح‌های صید شده رهاسازی شدند. نمونه فلس‌های بدست آمده به آزمایشگاه دانشگاه آزاد واحد ورامین منتقل و DNA نمونه‌ها با استفاده از کیت QIAamp® DNA Investigator ساخت شرکت کیاژن- آلمان استخراج گردید.

در این تحقیق، به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی تمساح مردابی ایران، آغازگرهای جایگاه ژنی Tau-Crystallin (tissue-type eye lens tau-crystallin) بکار برده شدند (جدول ۱) و پس از بهینه‌سازی شرایط PCR جایگاه مذکور (جداول ۲ و ۳)، تکنیک SSCP بکار گرفته شد. برای انجام SSCP مقدار ۱۰ میکرولیتر از محصولات تکثیر شده به ۶ میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط و میکروتیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه درون حمام آب گرم با دمای ۹۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند. در ادامه، پس از خارج نمودن، میکروتیوب‌ها در درون محیط یخی قرار داده شدند. بعد از گذشت ۱۰ دقیقه، نمونه‌ها در ژل پلی‌آکریل‌آمید غیرواسرشته‌ساز با ولتاژ ۲۰۰ ولت، به مدت ۴ ساعت در دمای ۵ درجه سلسیوس الکتروفورز گردیدند. پس از رنگ‌آمیزی با نیترات نقره، ژل‌ها اسکن و ژنوتیپ افراد تعیین گردید.

جدول ۱: آغازگرهای جایگاه ژنی Tau-Crystallin

F	GTGGTGCCTCAACTGGAATC
R	GGTAAAACTCAGAGGCAGCC

جدول ۲: غلظت اجزای واکنش PCR

غلظت نهایی	اجزای واکنش
X	بافر PCR
۱/۵ (میلی مول)	$MgCl_2$
۰/۵ (میکرومتر)	آغازگرها
۲۰۰ (میکرومتر)	dNTPs
۰/۵ (واحد)	آنزیم Taq پلی مراز
۱۰۰ (نانوگرم)	DNA الگو

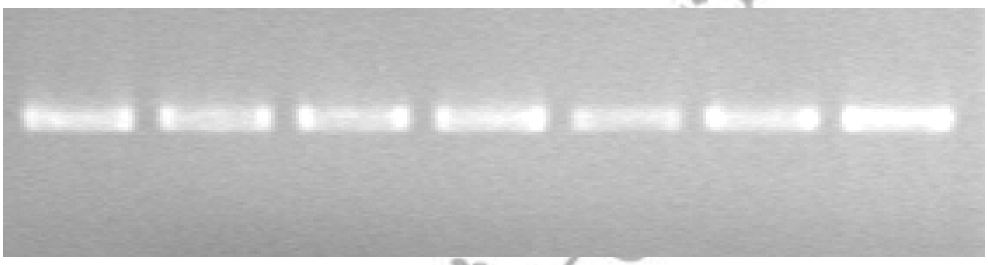
جدول ۳: دما و زمان چرخه‌های حرارتی PCR

ردیف	مراحل PCR	دما (درجه سانتیگراد)	زمان
۱	واسرشته‌سازی اولیه	۹٤	۵ دقیقه
۲	واسرشته‌سازی	۹٤	۳۰ ثانیه
۳	اتصال آغازگر	٦۲	۳۵ ثانیه
٤	بسط آغازگر	۷۲	٦۰ ثانیه
۵	تکرار مرحلهٔ ۲ تا ٤ (۳۵ مرتبه)	–	–
٦	بسط نهایی آغازگر	۷۲	۵ دقیقه

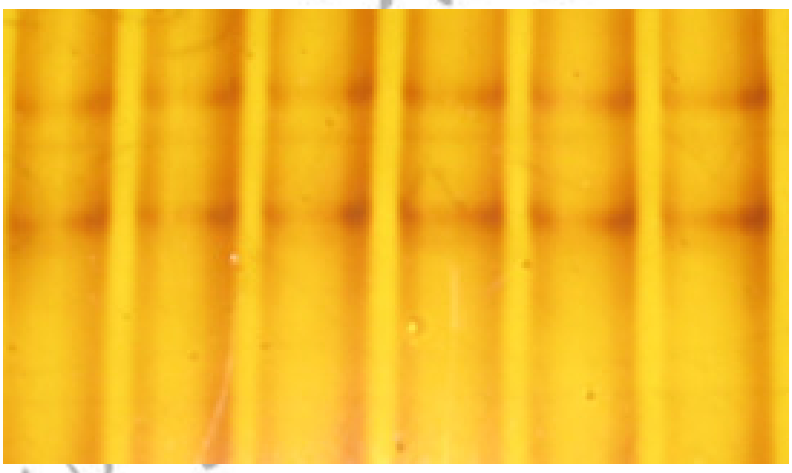
نتایج

نتایج نانودراپ نشان داد که DNA استخراج شده از کیفیت مناسبی برای انجام PCR برخوردار بود. الگوی باندی مربوط به تکثیر قطعه ۶۴۸ جفت بازی ژن Tau-Crystallin موید اختصاصی بودن آغازگرهای طراحی شده برای آن می‌باشد (شکل ۱).

نتایج این تحقیق حاکی از آن بود که تمام الگوهای باندی حاصل از تک‌رشته‌ای کردن محصولات PCR روی ژل پلی‌آکریل آمید با یکدیگر مشابه بودند (شکل ۲) که بدلیل عدم مشاهده الگوهای باندی متفاوت روی ژل پلی‌آکریل آمید می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که جایگاه مورد بررسی در گونه تحت مطالعه مونومورف بوده و ظاهر امر حکایت از عدم تفاوت جمعیت مذکور و شباهت ژنتیکی بالای آنها به یکدیگر دارد.



شکل ۱: الگوی باندی ژن Tau-Crystallin



شکل ۲: الگوی باندی تک‌رشته‌ای نمودن ژن Tau-Crystallin

بحث

از دیدگاه متخصصین ژنتیک جمعیت، تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها همزمان بایک تعادل و توازن بین رانش و جریان ژنی شروع شده و هر جمعیت متحمل نرخ جهش و رانش ژنتیکی خود خواهد شد که تمایل به متمایز کردن جمعیت‌ها از یکدیگر داشته و بالعکس جریان ژنی جمعیت‌ها را به یکدیگر شبیه‌تر می‌نماید. همان طوری که اشاره گردید جایگاه مورد بررسی در گونه تحت مطالعه دارای یک الگو بوده و ظاهر امر حکایت از عدم تفاوت افراد جمعیت تمساح مردابی و شباهت ژنتیکی بالای آنها به یکدیگر داشته که با توجه به نتایج حاصله از تعداد نمونه موجود و فرض بر نمونه‌گیری تصادفی از افراد مختلف هر جمعیت و با توجه به اینکه کریدورهایی در بین این افراد تحت مطالعه وجود دارد، این امر قابل توجیه است که این نتیجه با نتایج حاصله از تحقیق فروتن و همکاران (۱۳۸۹) روی تمساح مردابی ایران با استفاده از تکنیک RAPD، مبنی بر عدم وجود تنوع معنی‌دار در بین افراد این جمعیت، کاملاً مطابقت دارد. با استناد به نتایج حاصله مبنی بر وجود شباهت ژنتیکی در بین افراد و خلوص بالای ژنتیکی، امکان وجود هم‌خونی و اثرات نامطلوب آن از جمله کاهش شایستگی (Fitness)، کاهش قدرت زنده‌مانی (Viability)، کاهش تولید مثل، بروز ناهنجاری‌های ژنتیکی و غیره امری محتمل به نظر رسیده و بروز این عوامل مخرب در این گونه که یکی از گونه‌های آسیب‌پذیر و حمایت شده محسوب می‌شوند، تداوم و بقاء این گونه را به مخاطره انداخته و به شدت آنها را در خطر انقراض قرار خواهد داد بنابراین برای حفاظت از گونه مذکور، لزوم کاهش هم‌خونی و تبعات آن امری ضروری به نظر می‌رسد.

منابع

۱-مبارکی، ا.، ۱۳۷۷. مقدمه‌ای بر شناخت کروکودیل، فصلنامه محیط‌زیست، جلد دهم، شماره اول، بهار ۱۳۷۷، صفحات ۳۴ تا ۴۱.

۲-یوسفی، س. و مبارکی، ا.، ۱۳۸۶. نگرشی بر تمساح مردابی در ایران. انتشارات موج سبز. ۸۲ صفحه.

۳-فروتن، ک.؛ یوسفی سیاهکلرودی، س.؛ عسکری جعفرآباد، ق. و خدرزاده، ص.، ۱۳۸۹. بررسی ژنتیکی تنوع موجود در جمعیت تمساح مردابی ایران (*Crocodylus palustris*) با استفاده از نشانگرهای RAPD. یازدهمین کنگره ژنتیک ایران، ۱ تا ۳ خرداد ۱۳۸۹، مرکز همایش‌های بین‌المللی دانشگاه شهید بهشتی، تهران.

4-Mobaraki, A. and Abtin, E., 2007. Movement behaviour of Muggers: A potential threat. Crocodile Specialist Group Newsletter, Vol. 26, No. 1, pp.4-5.

5-Meganathan, P. R.; Dubey B. and Haque, I., 2008. Molecular identification of crocodile species using novel primers for forensic analysis. Journal of Springer Netherlands, Vol. 10, No. 3, pp.767-770.

6-Weaver, J.P.; Rodriguez, D.; Venegas-Anaya, M.; Cedeño-Vázquez, J.R; Forstner, M.R. and Densmore, LD., 2008. Genetic characterization of captive Cuban crocodiles (*Crocodylus rhombifer*) and evidence of hybridization with the American crocodile (*Crocodylus acutus*). J Exp. Zool. A Ecol. Genet. Physiol., Vol. 309, No. 10, pp.649-60.

7-Yan, L., Xiaobing; Wu., Xuefeng; Ji., Peng Yan and Amato, G., 2006. The complete mitochondrial genome of salt-water crocodile (*Crocodylus porosus*) and phylogeny of crocodilians. J. Gene. Genom., Vol. 34, No. 2, pp.119-128.

Investigation of genetic diversity of Mugger (*Crocodylus palustris*) in Iran using Tau-Crystallin gene

• **Siamak Yousefi Siahkalrodi:** Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, Varamin Pishva Branch, Varamin Pishva, Iran

Received: September 2011 Accepted: February 2012

Keywords: Mugger, Genetic diversity, Tau-Crystallin gene, SSCP technique

Abstract

In order to study genetic diversity of Iranian Mugger (*Crocodylus palustris*), after chosen 5 regions in Sistan and Balochestan province, sampling and DNA extraction from 10 Mugger scab, Tau-Crystallin gene (tissue-type eye lens tau-crystallin) was used. The SSCP technique was used after amplifying of 648 bp in PCR .For observing of SSCP band from PCR product, %8 Polyacrylamide and silver staining were used. In this study, there was 1 allele which showed no fenetic diversity in Tau-Crystallin gene of Iranian Mugger.

*Corresponding author's email: siamak_yosefi1@yahoo.com