(DOI): 10.22034/AEJ.2020.126433

بررسی ژنتیک جمعیت، فیلوژنی و تعیین خط شناسه DNA در لاک‌پشت سبز (*Chelonia mydas*) دریای عمان، سواحل استان سیستان و بلوچستان

- **سیداحسان حیدری**: گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده منابع‌طبیعی و محیط‌زیست، واحد واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- **محمدحسن شاه‌حسینی***: گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده منابع‌طبیعی و محیط‌زیست، واحد واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- **هادی میراحمدی**: گروه انگل‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران
- **پرگل قوام مصطفوی**: گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده منابع‌طبیعی و محیط‌زیست، واحد واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- **سیدمحمدرضا فاطمی**: گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده منابع‌طبیعی و محیط‌زیست، واحد واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: مهر ١٣٩٨ تاریخ پذیرش: دی ١٣٩٨

چکیده

در گذشته از صفات مورفولوژیکی برای طبقه‌بندی موجودات استفاده می‌کردند، اما امروزه استفاده از نشانگرهای مولکولی به‌دلیل مزیت‌هایی که دارد مورد توجه قرار گرفته است. نشانگرهای میتوکندریایی یکی از بهترین گزینه‌ها در بررسی روابط فیلوژنتیک است. در این مطالعه ١٠ نمونه از لاک‌پشت دریایی سبز از سه منطقه چابهار ٤ نمونه، گواتر ٣ نمونه و کنارک ٣ نمونه در استان سیستان و بلوچستان جمع‌آوری شد. پس از استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج و هم‌چنین روش استخراج استات آمونیوم، نمونه‌ها از قطعه ژنی mtDNA و COI توالی‌یابی شدند. توالی‌ها به‌کمک نرم‌افزارهای MEGA، Bioedit و Arlequin بررسی شدند. نتایج نشان داد که براساس آنالیز فیلوژنتیکی جمعیت مورد مطالعه، نمونه‌ها در سه جمعیت قرار گرفتند. میانگین کلی فاصله در میان جمعیت براساس P-distance برابر با ٠/١٨ بود. نتایج کلاستال دابلیو نشان داد که بیش‌ترین تفاوت میان توالی‌ها مربوط به ابتدا و انتهای توالی است. میزان تنوع هاپلوئیدی صفر بود. هم‌چنین تعداد محل‌های پلی‌مورفیک برابر با صفر بود که نشان می‌دهد تفاوت به اندازه‌ای نبوده که اشتقاق گونه انجام شود. هیچ نوترکیبی در توالی‌ها رخ نداده که با ماهیت ناحیه مورد بررسی هم‌خوانی داشته باشد. نتایج حاصل از این مطالعه را می‌توان در بررسی تنوع ژنتیکی لاک‌پشت‌های سبز دریایی در شرایط متفاوت جغرافیایی مورد استفاده قرار داد. هم‌چنین در مدیریت جمعیت این گونه، جلوگیری از انقراض آن و در تهیه یک بانک ژنی مناسب برای شناسایی این گونه به کمک تکنیک‌های مولکولی به‌ویژه در مواردی که فقط تخم یا بافت این گونه موجود است نیز می‌تواند یک راهکار مناسب باشد.

کلمات کلیدی: ژنتیک جمعیت، فیلوژنی، لاک‌پشت دریایی، دریای عمان

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: shahhosseiny@yahoo.com

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.126433

مقدمه

از میان ۸ گونه لاک‌پشت دریایی که در دنیا وجود دارند فقط ۵ گونه منقار عقابی (*Eretmochelys imbricata*)، سبز (*Chelonia mydas*)، سرخ (*Caretta caretta*) و زیتونی (*Lepidochelys olivacea*) از خانواده Cheloniidae، و پشت چرمی (*Dermochelys coriacea*) از خانواده Dermochelyidae در خلیج فارس و دریای عمان مشاهده شده‌اند. از میان این پنج گونه تنها دو گونه منقار عقابی و سبز در سواحل ایران لانه‌گزینی و تخم‌گذاری می‌کنند. سه گونه دیگر به‌عنوان گونه‌های تغذیه‌ای می‌باشند (Mobaraki و Elmi، ۲۰۰۵). با توجه به این‌که لاک‌پشت‌های دریایی در راس هرم غذایی قرار دارند، نقش اکولوژیکی بسیار حساسی را در شبکه غذایی دریاها ایفا می‌کنند، به‌طوری‌که با تغذیه از بسترهای علفی، لارو آبزیان، خرچنگ‌ها، صدف‌ها و نرم‌تنان وکنترل جمعیت آنان، باعث حفظ تعادل دیگر طبقات هرم می‌گردند. همه ساله در فصول تولیدمثل، هزاران لاک‌پشت به سواحل مختلف جهان و ایران مهاجرت نموده و اقدام به تخم‌ریزی می‌کنند، ولی برنامه حفاظتی جامعی در مورد این موجود انجام نمی‌شود و در نتیجه تلاش این آبزی برای بقا روز به روز کم‌رنگ‌تر می‌گردد. به‌همین دلیل طی سال‌های اخیر کلیه گونه‌های لاک‌پشت دریایی از طرف IUCN به‌عنوان گونه‌های در خطر انقراض معرفی گردیده‌اند (صمدی، ۱۳۹۳). به‌علت پیشرفت‌های پرشتاب سال‌های گذشته در زمینه توالی‌یابی DNA و روش‌های محاسباتی برای آنالیز داده‌ها، توالی‌های DNA به مهم‌ترین منبع اطلاعاتی برای درک بهتر سیستم‌های زنده تبدیل شده‌اند. ردپای شیوه‌های مبتنی بر مقایسه توالی، در شاخه‌های گوناگون علوم زیستی، از نمو تا همه‌گیری‌شناسی دیده می‌شود. در این میان، دو زمینه از زیست‌شناسی روش‌ها و ابزارهایی را برای پی‌بردن به روابط میان جانداران از روی توالی DNA پدید آورده‌اند: ژنتیک جمعیت و فیلوژنتیک که سطوح سازمان‌یافتگی متفاوتی را دنبال می‌کنند. ژنتیک جمعیت به مفهوم گروهی از افراد درون زادآور است که زمان و فضایی مشترک با یکدیگر دارند، حال آن‌که فیلوژنتیک به بررسی هم‌ریشگی‌های ژرف‌تر گروه‌های دور و نزدیک در درخت فرگشت جانداران گرایش دارد. هم‌چنین خط شناسه‌گذاری DNA جایگاهی در میانه این دو دارد: مرز میان گونه‌ها. در واقع خط شناسه‌گذاری DNA عبارت است از استفاده از یک توالی کوتاه از یک منطقه استاندارد ژنوم جهت کمک به تشخیص، تمایز گونه‌ها و تخصیص دادن نمونه‌ها به گونه‌های شناخته شده یا جدید (مصطفوی و همکاران، ۱۳۸۹).

آنالیز فیلوژنتیکی: تعیین روابط بین گونه‌ای از زمان لینه با مقایسه ویژگی‌های مورفولوژیک صورت می‌گرفته است. اگرچه تاکسونومی هم‌چنان بر پایه ویژگی‌های مورفولوژیک بنا شده است اما اطلاعات رو به گسترش مولکولی مانند توالی‌یابی نوکلئوتیدی به آشکار کردن روابط فیلوژنتیکی می‌پردازد. در بین زیست‌شناسان استفاده از داده‌های مولکولی جهت ترسیم درخت‌های فیلوژنتیکی اهمیت قابل توجهی پیدا کرده است لیکن هم‌چنان داده‌های مورفولوژیکی این روابط را با جزئیات بیش‌تر بررسی می‌کنند. در مولکول DNA قطعات ژنی خاصی وجود دارند که به نشانگر مولکولی شناخته می‌شوند. مقایسه این نشانگرهای خاص در بین جانداران گوناگون می‌تواند رابطه فیلوژنتیکی (اجدادی) آن‌ها را آشکار کند. آنالیزهای فیلوژنتیکی ارتباط بین این قطعات ژنی را مشخص می‌کند. اما پیش از این‌که این آنالیزها صورت گیرد بایستی توالی‌های به‌دست آمده از نشانگرهای مورد مطالعه در هر گروه جانوری با یکدیگر تطبیق داده شوند و با همه تفاوت‌ها و شباهت‌هایشان در کنار یکدیگر قرار گیرند (Lemey و همکاران، ۲۰۰۹).

مواد و روش‌ها

روش نمونه‌برداری: در این پروژه، ۱۰ نمونه از لاک‌پشت سبز دریایی (*Chelonia mydas*) به‌صورت تصادفی و با استفاده از ابزار مخصوص صید ترال و هم‌چنین صید ضمنی صیادان، در تاریخ ۲۶ شهریور و ۲۲ اسفند ۱۳۹۶ از سواحل استان سیستان و بلوچستان گردآوری گردید. این نمونه‌ها از سه منطقه شامل کنارک با موقعیت جغرافیایی E ۶۱,۱۱ و N ۲۵,۰۹ به تعداد ۳ نمونه و چابهار با موقعیت جغرافیایی E ۶۰,۳۷,۱۷ و N ۲۵,۱۷,۴۶ به تعداد ۴ نمونه و گواتر با موقعیت جغرافیایی E ۶۰,۳۰ و N ۲۵,۱۹ به تعداد ۳ نمونه بودند. نمونه‌ها پس از برداشت در اتانول مطلق نگه‌داری شدند. در شکل ۱ مناطق نمونه‌برداری مشخص گردیده است.

شکل ۱: محدوده جغرافیایی مکان‌های نمونه‌برداری (کنارک، چابهار، گواتر)

برای انجام این آزمایش از لوله فالکون ۵۰ میلی‌لیتری، بن‌ماری، آون، لوله‌های اپندورف ۱/۵ و ۲ میکرولیتری، دستگاه میکروسانتریفیوژ،

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.126433

دستگاه ترموسایکلر، دستگاه مولد برق، مخزن الکتروفورز، دستگاه مایکروویو، ترازوی دیجیتال، دستگاه ورتکس، Gel Documantation، دستگاه UV transiluminator و سمپلر استفاده گردید. هم‌چنین از مواد شیمیایی آب دوبار تقطیر دیونیزه و استریل، بافر PCR 10X، MgCl2، dNTP، *Taq* DNA Polymerase، آغازگر جلویی و آغازگر عقبی، پودر آگارز، بافر TBE X ۰/۵ و بافر TAE 1X، ladder، رنگ ژل قرمز، بافر راهنما و کیت استخراج از ژل استفاده گردید. لازم به ذکر است این مطالعه به‌روش PCR انجام شد به این ترتیب که ابتدا DNA هسته‌ای نمونه‌ها با استفاده از هضم بافت توسط پروتئیناز K انجام و خالص سازی و استخراج رسوب اتانولی صورت گرفت. در ادامه رسوب DNA به‌دست آمده در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر استریل حل و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام PCR نگه‌داری شد. جهت تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به‌ترتیب از روش الکتروفورز با ژل آگارز و اسپکتروفتومتری استفاده گردید. پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و الکتروفورز ژل ۲٪ نمونه‌ها تعیین ترادف ژنی شد و سپس به‌منظور تعیین ژنتیک جمعیت با نرم‌افزار Arlequin و برای فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزار Bioedit سکانس‌ها بررسی و هم‌چنین مراحل آنالیز فیلوژنی و ترسیم درخت با استفاده از نرم‌افزار مگا (Mega) انجام گردید.

شناسایی مولکولی: از همه نمونه‌ها، به‌کمک ابزارهای استریل شده (اسکالپل و پنس)، تکه بافتی به اندازه تقریبی ۳۰-۵ میلی‌متر از ناحیه باله آن‌ها برای استخراج DNA برداشته شد. بافت با محلول رقیق کننده مخلوط شد تا حالت مایع پیدا کند. سپس مخلوط بافت و DNAB در تیوپ‌های ۱/۵ میکرولیتری ریخته شد. تیوپ‌های حاوی نمونه با دور rpm ۲۰۰۰ به‌مدت ۱۰دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. سپس فاز بالا دور ریخته شد و رسوب بافتی برای استخراج DNA استفاده گردید، سپس با استفاده از کیت استخراج، DNA مورد نیاز اسنخراج گردید. از تمامی نمونه‌های استخراجی به میزان۵ میکرولیتر به اضافه ۱ میکرولیتر بافر راهنمای مخلوط با رنگ Gel red در چاهک‌های ژل آگارز ۱٪ ریخته شد و در مخزن الکتروفورز حاوی بافر TBE ۰/۵X با ولتاژ ۱۰۰ ولت و شدت جریان ۴۰ میلی‌آمپر به‌مدت نیم ساعت الکتروفورز گردید. سپس ژل آگارز با نور UVدر دستگاه Gel Documantation مورد بررسی قرار گرفت. هم‌چنین جهت بررسی کیفیت DNA استخراجی، غلظت نمونه‌ها با استفاده از دستگاه نانوداراپ در طول موج‌های ۲۳۰، ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر سنجیده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR): واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز جهت تکثیر قطعه ژنی سیتوکروم اکسیداز COI با استفاده از آغازگرهای D-loop انجام شد:

F (5'-GGC ACC CAA AGC CAA AAT TC-3') آغازگر پیشین R (5' TAG ATC CAG ACC AGA TGC CGG-3') آغازگر پسین لوله‌های مصرفی جهت واکنش PCR از نوع اپندورف‌های ۲ میکرولیتری بودند. در لوله‌های کنترل منفی همه موارد به‌غیر از DNA اضافه شد. برنامه حرارتی واکنش زنجیره پلی‌مراز جهت تکثیر قطعه ژنی COI در دما و زمان‌های ذیل بهینه گردید. جدول ۱ مشخصات چرخه‌های PCR را نمایش می‌دهد.

جدول ۱: مشخصات چرخه‌های PCR

تعداد چرخه	نوع چرخه	زمان	درجه حرارت (سانتی‌گراد)
۱ چرخه	واسرشت اولیه (Initial denaturation)	۵ دقیقه	۹۴
۳۰ چرخه	واسرشت (Denaturation)	۵ دقیقه	۹۴
	اتصال (Annealing)	۳۰ ثانیه	۵۷
	گسترش (Elongation)	۱ دقیقه	۷۲
۱ چرخه	گسترش نهایی (Final elongation)	۷ دقیقه	۷۲

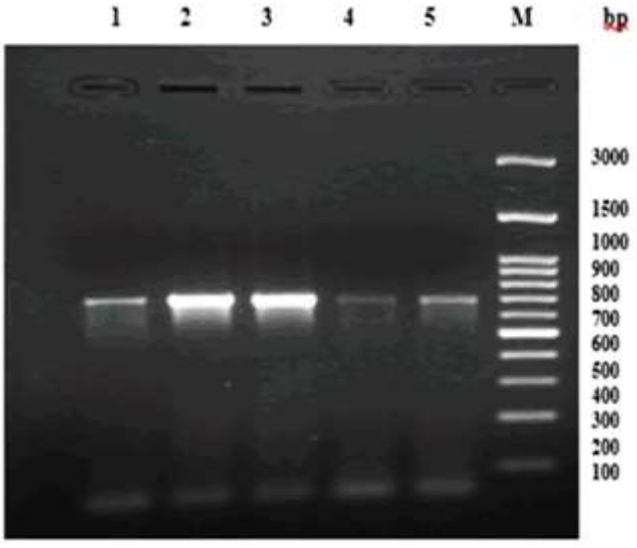
محصولات PCR به‌دست آمده در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای آنالیزهای بعدی نگه‌داری گردیدند.

الکتروفورز محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز: الکتروفورز روی ژل آگارز، متداول‌ترین و سریع‌ترین روش بررسی محصولات PCR می‌باشد. این روش، روشی استاندارد برای جدا کردن، شناسایی و تخلیص قطعات DNA و تکنیک ساده و سریعی است که قادر است قطعات DNAای را که نمی‌توانند توسط روش‌های دیگر هم‌چون سانتریفیوژ شیب چگالی از هم جدا شوند، از هم تفکیک کند. علاوه بر این مکان DNA درون ژل، مستقیماً از طریق رنگ‌آمیزی با غلظت‌های پایین رنگ فلوئورسانت اتیدیوم بروماید تعیین می‌شود. به‌کمک این ژل با غلظت‌های مختلف می‌توان قطعات DNA از ۲۰۰ جفت باز تا تقریباً ۲۰ کیلوباز را از هم جدا کرد. ژل آگارز به‌صورت افقی در میدان الکتریکی ثابت قرار می‌گیرد. محصول PCR به‌روش الکتروفورز با ژل آگارز ۱/۵٪ مورد ارزیابی قرار گرفت و قطعات تکثیر شده از نظر کیفیت باند حاصله بررسی شد.

استخراج محصول نهایی PCR از ژل آگارز: یکی از راه‌های تمیز کردن محصول PCR برای تعیین توالی استخراج باند مورد نظر از ژل است که با استفاده از این روش علاوه بر حذف باندهای غیر اختصاصی و نامطلوب می‌توان پرایمر دایمرها و اسمیرهای ایجاد شده در واکنش PCR را از باند مورد نظر جدا کرد تا نتایج به‌دست آمده از

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.126433

تعیین توالی از کیفیت مطلوبی برخوردار باشند. برای این منظور در این تحقیق از روش استخراج محصول PCR از ژل آگارز استفاده شد. ابتدا غلظت نمونه‌ها با استفاده از دستگاه نانودراپ سنجیده شد سپس نمونه‌ها روی ژلی ساخته شده از آگارز و بافر TAE الکتروفورز گردید. پس از پایان الکتروفورز قطعه باند اصلی در زیر دستگاه UV transiluminator آشکار و توسط اسکالپل برش داده شد. قطعه بریده شده در یک تیوپ ۲ میلی‌لیتری که وزن اولیه آن مشخص بود قرار داده شد. سپس با توزین تیوپ حاوی ژل وزن ژل محاسبه گردید و ۳ برابر وزن ژل به آن محلول Binding Buffer اضافه شد. تیوپ به‌مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از گذشت ۱۵ دقیقه، Silica Powder Suspension به نمونه‌ها اضافه و ورتکس شدند. سپس این ترکیب به مدت ۵ دقیقه در بن ماری ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت (در این مرحله DNA به Silica متصل شد و هم‌چنین هر چند دقیقه یک‌بار ورتکس شدند) جهت رسوب DNA موجود در ژل، سانتریفیوژ با دور ۸۰۰۰ RPM و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱دقیقه انجام و مایع رویی دور ریخته شد. برای شستشوی DNA حاصل ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ اضافه شد. بعد از چندین بار ورتکس و پیپت کردن، سانتریفیوژ با دور ۸۰۰۰ RPM و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه انجام و اتانول خالی شد (مرحله شستشو، ۲ الی ۳ مرتبه تکرار شد). سپس تیوپ‌ها به حالت خوابیده و باز در هوای آزاد گذاشته شد تا زمانی که پلیت‌های داخل تیوپ کاملاً خشک شدند. در آخر ۵۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه (براساس میزان رسوب موجود) افزوده شده و بعد از چند ثانیه ورتکس، به‌مدت ۵ الی ۱۰ دقیقه در بن‌ماری ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند (در این فاصله دوبار ورتکس شدند). بعداز سانتریفیوژ با دور ۸۰۰۰ RPM و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، مایع رویی به تیوپ جدید منتقل و رسوب باقی‌مانده دور ریخته شد. شکل ۲ باند حاصل را روی ژل آگارز نمایش می‌دهد.



شکل ۲: نمایش باند حاصل از PCR روی ژل آگارز ۱/۵٪

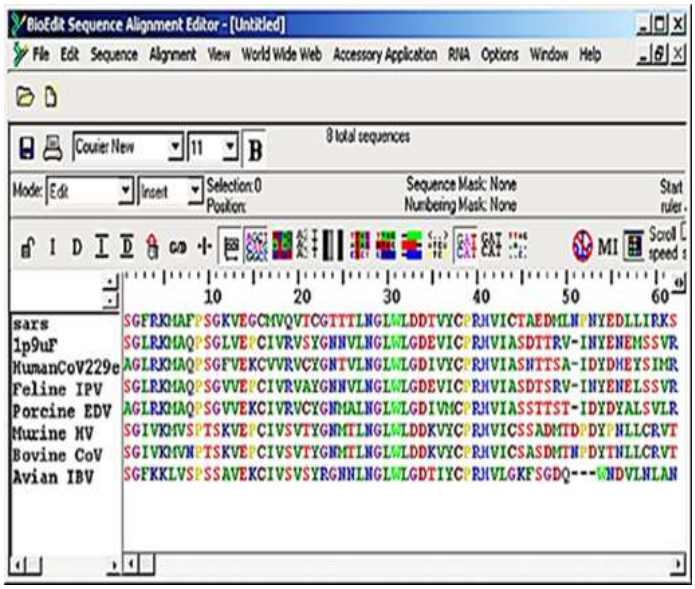
توالی‌یابی (Sequencing) محصولات PCR: محصولات PCR مناسب (باندهای پررنگ و ضخیم فاقد اسمیر، دایمر پرایمر، باند غیر اختصاصی) جهت تعیین توالی به‌روش ختم زنجیره Dideoxy Chain Termination به شرکت بیونیر (Bioneer) کره‌جنوبی ارسال گردیدند. توالی از قطعه ژنی D-loop به‌دست آمد.

نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی

نرم‌افزار Arlequin: این نرم‌افزار تعداد جهش مشاهده شده، جایگاه‌های پلی‌مورفیک، سطح تنوع نوکلئوتیدی و ساختار و تنوع هاپلوتایپی را در جمعیت مشخص می‌نماید.

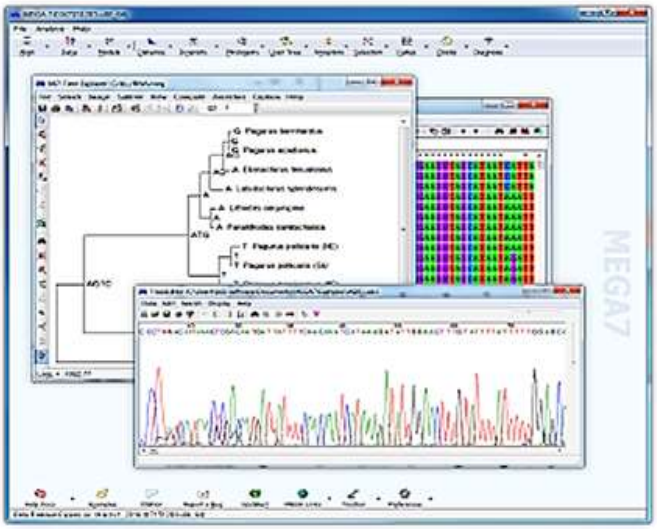
نرم‌افزار BioEdit: نرم‌افزار بیوانفورماتیک بسیار خوب که کاربردهای زیادی برای ویرایش، هم‌ردیفی، دست‌ورزی و آنالیز توالی‌های DNA و پروتئین دارد. از این نرم‌افزار برای بررسی کیفیت توالی‌ها استفاده شد. کروماتوگرام نتایج توالی‌یابی در شکل ۳ نشان داده شده است.

نرم‌افزار MEGA: برای ترسیم درخت فیلوژنتیکی، نرم‌افزار MEGA یکی از نرم‌افزارهای فوق‌العاده و پرکاربرد بیوانفورماتیک که جهت آنالیز فیلوژنتیکی توالی‌های DNA و پروتئینی و ترسیم درخت‌های فیلوژنتیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد. آنالیز فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار MEGA در شکل‌های ۴، ۵ و ۶ نشان داده شده است.

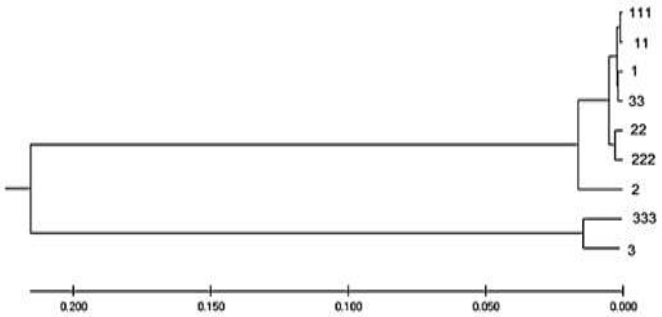


شکل ۳: کروماتوگرام نتایج توالی‌یابی در نرم‌افزار BioEdit

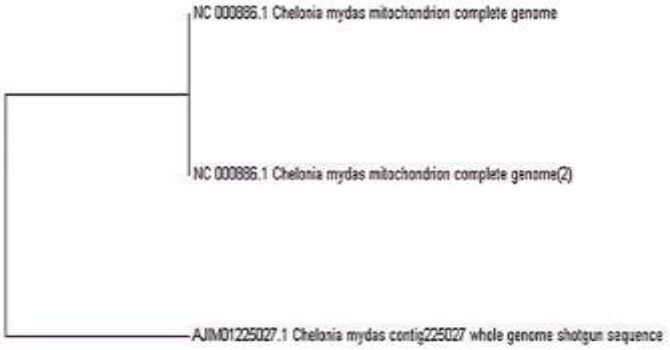
(DOI): 10.22034/AEJ.2020.126433



شکل ۴: آنالیز فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار MEGA



شکل۵: درخت فیلوژنتیکی نمونه‌های مورد بررسی با استفاده از نرم‌افزار مگا



شکل ۶: توالی‌های مشابه استخراج شده از NCBI

نتایج

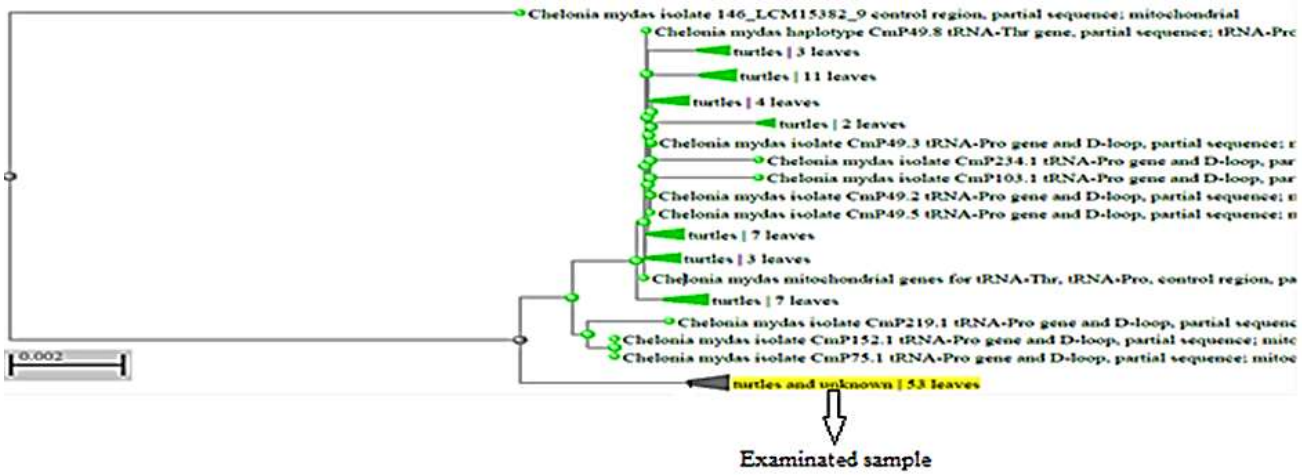
در این تحقیق درخت فیلوژنتیکی با استفاده از برنامه MEGA ۶/۱۰ ترسیم شد (www.megasoftware.net). Bootstrap بر پایه ۱۰۰۰ تکرار جهت انجام برنامه MEGA انتخاب گردید. درخت فیلوژنتیکی برای نمونه‌های انتخاب شده به‌کمک P-distance و با روش آماری UPGMA رسم شد. فاصله میان توالی‌ها به‌صورت جفتی در این نرم‌افزار به‌کمک دو مدل اندازه‌گیری شد. یکی p-distance و دیگری Maximum composite likelihood هم‌ردیفی مقایسه‌ای توالی‌ها به‌کمک روش ClustalW انجام شد. بررسی تنوع ژنتیکی در سطح نوکلوئیدی به‌کمک نرم‌افزار ۳/۵ Arlequin انجام شد (www.arlequin3.5/software.net). از نرم‌افزار BioEdit برای بررسی کیفیت توالی‌ها استفاده شد. در بیش‌تر توالی‌ها قسمت‌های ابتدایی و انتهایی توالی کیفیت خوانش خوبی نداشتند که حذف شدند. بعد از حذف توالی‌های با کیفیت پایین که معمولاً در ابتدا و انتهای سکانس بودند. به کمک نرم‌افزار BioEdit رشته مکمل توالی Reverse تهیه شد و بعد قسمتی از توالی که در هر دو رشته یکسان بودند (Consensus) به‌عنوان توالی اصلی برای انجام مراحل بعدی کار انتخاب شد. به‌همین دلیل طول توالی کوتاه‌تر از میزانی بود که توالی‌یابی برای آن انجام شده بود. برای هر ده توالی کار به این صورت تکرار شد. سپس تک‌تک توالی‌ها در NCBI بلاست شدند و همه مربوط به *Chelonia mydas* بودند به‌جز یکی از توالی‌ها که پس از بلاست مشخص شد که مربوط به گونه دیگری به نام لاک‌پشت زیتونی *Lepidochelys olivace* بود که به احتمال زیاد هنگام نمونه‌گیری به اشتباه *Chelonia mydas* در نظر گرفته شده است، به‌همین دلیل به اجبار این توالی در ادامه آنالیزها حذف شد. پس از انجام بلاست در NCBI درخت فیلوژنتیکی برای بررسی ارتباط با دیگر گونه‌ها رسم شد که به صورت زیر بود. نمونه‌ای که با رنگ زرد مشخص شده است مربوط به نمونه مورد بررسی در این مطالعه می‌باشد. نتایج نشان داد که همه نمونه‌های حاصل از بلاست مربوط به *Chelonia mydas* بود که در سایر مناطق جهان توالی‌یابی شده بودند و در NCBI ثبت شده بود. شکل ۷ درخت فیلوژنتیکی گونه‌های مورد مطالعه را نشان می‌دهد.

نتایج مگا:

اندازه‌گیری فاصله بین توالی‌ها: فاصله میان توالی‌ها به‌صورت جفتی در این نرم‌افزار به‌کمک دو مدل اندازه‌گیری شد. یکی p-distance و دیگری Maximum composite likelihood که نتایج حاصل از آن در جداول ۲ و ۳ گزارش شده است.

فاصله بین توالی‌ها به‌کمک روش P-distance در محدوده ۰/۰۰۱۶۸ الی ۰/۴۳۷۱۴ بود و میانگین کلی فاصله در میان جمعیت به‌کمک P-distance برابر با ۰/۱۸ بود. درخت فیلوژنتیکی در میان ۹ نمونه انتخاب شده به‌کمک P-distance و باروش آماری UPGMA رسم شد. به‌کمک نرم‌افزار مگا اطلاعات مربوط به هر توالی مثل تعداد نوکلئوتید و درصد هر کدام از نوکلئوتیدها تهیه شد که در جدول ۴ مشاهده می‌شود. هم‌چنین میزان ناجور بودن و تفاوت توالی‌ها در جدول ۵ مشخص شده است.

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.126433



شکل ۷: درخت فیلوژنتیکی گونه‌های مورد مطالعه

جدول ۲: فاصله بین توالی‌ها به‌کمک روش Maximum composite likelihood

شماره	۱	۱۱	۱۱۱	۲	۲۲	۲۲۲	۳	۳۳
۱								
۱۱	۰/۷۱۸۷۸							
۱۱۱	۰/۷۰۶۴۸	۰/۰۰۹۱۳						
۲	۰/۰۲۹۸۵	۰/۹۵۵۳۴	۰/۹۲۰۳۷					
۲۲	۰/۹۶۰۷۱	۰/۰۱۲۵۸	۰/۰۰۳۳۳	۱/۴۱۷۴۷				
۲۲۲	۰/۹۶۰۷۲	۰/۰۱۱۵۲	۰/۰۰۱۶۸	۱/۴۷۸۶۹	۰/۰۰۳۱۵			
۳	۰/۹۵۹۶۱	۰/۰۰۵۷۵	۰/۰۰۵۴۶	۱/۵۰۶۶۶	۰/۰۰۸۵۰	۰/۰۰۷۹۴		
۳۳	۰/۹۶۰۷۱	۰/۰۱۶۷۱	۰/۰۰۳۳۴	۱/۲۶۶۶۱	۰/۰۰۳۱۳	۰/۰۰۶۲۸	۰/۰۱۱۸۷	
۳۳۳	۱/۱۳۱۰۹	۰/۰۳۸۶۲	۰/۰۳۱۱۷	۱/۳۳۷۶۱	۰/۰۳۲۶۸	۰/۰۳۰۹۶	۰/۰۳۲۸۴	۰/۰۳۶۴۱

جدول ۳: فاصله بین توالی‌ها به‌کمک روش P-distance

شماره	۱	۱۱	۱۱۱	۲	۲۲	۲۲۲	۳	۳۳
۱								
۱۱	۰/۴۳۱۶۵							
۱۱۱	۰/۴۳۰۴۳	۰/۰۰۹۰۵						
۲	۰/۰۲۸۸۸	۰/۴۳۵۹۰	۰/۴۲۷۹۷					
۲۲	۰/۴۳۱۱۷	۰/۰۱۲۴۲	۰/۰۰۳۳۲	۰/۴۳۴۴۴				
۲۲۲	۰/۴۲۷۱۳	۰/۰۱۱۳۹	۰/۰۰۱۶۸	۰/۴۳۶۲۹	۰/۰۰۳۱۴			
۳	۰/۴۲۹۱۵	۰/۰۰۵۷۱	۰/۰۰۵۴۳	۰/۴۳۷۱۴	۰/۰۰۸۴۳	۰/۰۰۷۸۷		
۳۳	۰/۴۳۱۱۷	۰/۰۱۶۳۹	۰/۰۰۳۳۳	۰/۴۳۶۰۵	۰/۰۰۳۱۲	۰/۰۰۶۲۳	۰/۰۱۱۷۱	
۳۳۳	۰/۴۲۳۶۶	۰/۰۳۷۱۱	۰/۰۳۰۱۸	۰/۴۲۷۶۷	۰/۰۳۱۶۰	۰/۰۲۹۹۸	۰/۰۳۱۷۵	۰/۰۳۴۹۹

نتایج حاصل از کلاستال دابلیو: ۹ توالی در کلاستال دابلیو هم‌ردیف شدند که قسمت‌هایی که مشابه هستند و قسمت‌هایی که در آن توالی تغییر یافته است را می‌توان مشاهده کرد. بیش‌تر تفاوت مشاهده شده مربوط به ابتدا و انتهای توالی است که به‌دلیل متفاوت بودن طول توالی‌ها در نتیجه حذف توالی با کیفیت خوانش پایین در نتایج حاصل از توالی‌یابی است. داده‌ها برای این‌که بتوانند در Arlequin خوانده شوند باید به فرمت arp.* تبدیل شوند که از نرم‌افزار DNA Sequence Polymorphism (DNASP) بدین‌منظور استفاده شد.

محل‌های پلی‌مورفیک (Polymorphic sites): هیچ ناحیه کد کننده پروتئینی در توالی‌ها شناسایی نشد که مطابق با ژنی

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.126433

هست که تکثیر شد چرا که این ژن کد کننده هیچ پروتئینی نیست که با نتایج آنالیز هم‌خوانی دارد. به‌جز نواحی دارای گپ (Gap) تعداد محل‌های پلی‌مورفیک صفر بود.

پلی‌مورفیسم در توالی DNA(DNA polymorphism): تعداد هاپلوتیپ‌ها یک (h=1) بود و به‌همین دلیل تنوع هاپلوتیپی مساوی صفر (Hd=0) بود. هم‌چنین تعداد کل حذف و اضافه (InDel) هایی که اتفاق افتاده‌بود مساوی ۴۰ بود. هیچ‌نوترکیبی در توالی‌های مورد بررسی رخ نداده است و تغییرات به‌وجود آمده در نتیجه نوترکیبی نبوده است.

تنوع DNA بین نمونه‌ها: در نمونه اول با ۳ توالی تعداد محل‌های پلی‌مورفیک برابر با ۳ و متوسط تعداد اختلاف نوکلئوتیدی که با K نشان داده می‌شود برابر با ۱/۵ بود. هم‌چنین در این نمونه میزان تنوع نوکلئوتیدی که با Pi نشان‌داده می‌شود برابر با ۰/۰۰۲۸۴ بود. در نمونه دوم با سه توالی تعداد محل‌های پلی‌مورفیک برابر با ۲۰ و متوسط تعداد اختلاف نوکلئوتیدی که با K نشان داده می‌شود برابر با ۱۳/۳۳ بود. هم‌چنین در این نمونه میزان تنوع نوکلئوتیدی که با Pi نشان داده می‌شود برابر با ۰/۰۲۵۲۰ بود.

جدول ۴: ترکیب نوکلئوتیدی توالی‌های مورد بررسی

توالی	T%	C%	A%	G%
۱	۳۵/۳	۱۳/۹	۲۹/۷	۲۱/۱
۱۱	۲۹/۴	۲۱/۵	۳۵/۸	۱۳/۲
۱۱۱	۳۱/۷	۲۰/۳	۳۳/۱	۱۴/۸
۲	۳۵/۶	۱۳/۵	۳۰/۶	۲۰/۴
۲۲	۳۱/۳	۲۱/۰	۳۳/۴	۱۴/۳
۲۲۲	۳۰/۸	۲۱/۳	۳۳/۵	۱۴/۴
۳	۳۱/۵	۲۰/۵	۳۳/۷	۱۴/۳
۳۳	۳۱/۴	۲۰/۷	۳۳/۴	۱۴/۴
۳۳۳	۳۰/۶	۲۰/۵	۳۵/۰	۱۳/۸
میانگین	۳۱/۹	۱۹/۳	۳۳/۲	۱۵/۶

جدول ۵: میزان ناجور بودن توالی‌های مورد بررسی به‌صورت جفتی

شماره	۱	۱۱	۱۱۱	۲	۲۲	۲۲۲	۳	۳۳	۳۳۳
۱									
۱۱	۲/۶۱۳۹								
۱۱۱	۲/۴۳۲۶	۰/۰۰۰۰							
۲	۰/۰۰۰	۲/۸۱۱۱	۲/۵۶۵۶						
۲۲	۲/۵۴۰۴	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۰	۳/۰۴۳۰					
۲۲۲	۲/۳۳۸۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۲/۹۲۸	۰/۰۰۰۰				
۳	۲/۰۵۴۶	۰/۰۰۳۸	۰/۰۰۳۶	۲/۴۸۹۳	۰/۰۱۳۴	۰/۰۰۰۰			
۳۳	۲/۳۶۲۳	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰۰	۲/۶۹۳۷	۰/۰۰۳۱	۰/۰۰۱۵	۰/۰۰۰۰		
۳۳۳	۲/۷۰۱۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰۰	۲/۷۱۰۶	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۰۰	

اگر این دو نمونه و در واقع ۷ توالی باهم مقایسه شوند تعداد محل‌های پلی‌مورفیک ۲۴ عدد است و متوسط تعداد اختلاف نوکلئوتیدی که با K نشان‌داده می‌شود برابر با ۷/۵۲۴ بود. هم‌چنین در این ۷ توالی میزان تنوع نوکلئوتیدی که با Pi نشان داده می‌شود برابر با ۰/۰۱۴۲۲ بود. موتاسیون مشترکی بین این ۷ توالی وجود نداشت و تعداد متوسط اختلاف نوکلئوتیدی برابر با ۹/۰۸ و تعداد متوسط جانشینی نوکلئوتیدی بین دو نمونه برابر با ۰/۰۱۷ بود. در نمونه سوم با دو توالی تعداد محل‌های پلی‌مورفیک برابر با ۱۷ و متوسط تعداد اختلاف نوکلئوتیدی که با K نشان داده می‌شود برابر با ۱۷ بود. هم‌چنین در این نمونه میزان تنوع نوکلئوتیدی که با Pi نشان داده می‌شود برابر با ۰/۰۳۲۰۲ بود. در مقایسه نمونه سوم با نمونه اول که در واقع ۶ توالی با هم مقایسه شدند، تعداد محل‌های پلی‌مورفیک ۲۳۴ عدد است و متوسط تعداد اختلاف نوکلئوتیدی که با K نشان داده می‌شود برابر با ۱۲۲/۹۳۳ بود. هم‌چنین در این ۶ توالی میزان تنوع نوکلئوتیدی که با Pi نشان داده می‌شود برابر با ۰/۲۳۱۵۱ بود. موتاسیون مشترکی بین این ۶ توالی وجود نداشت و تعداد متوسط اختلاف نوکلئوتیدی خالص برابر با ۰/۴۲۷۹۷ بود. در مقایسه نمونه سوم و دوم که در واقع ۵ توالی با هم مقایسه شدند، تعداد محل‌های پلی‌مورفیک ۱۳۵ عدد است و متوسط تعداد اختلاف نوکلئوتیدی که با K نشان داده می‌شود برابر با ۷۸/۵۰ بود. هم‌چنین در این ۵ توالی میزان تنوع نوکلئوتیدی که با Pi نشان داده می‌شود برابر با ۰/۲۴۹۲۱ بود. موتاسیون مشترکی بین این ۵ توالی وجود نداشت و تعداد متوسط اختلاف نوکلئوتیدی برابر با ۱۲۳ و تعداد متوسط جانشینی نوکلئوتیدی بین دو نمونه برابر با ۰/۳۹۲۰۶ بود. در مقایسه ۹ توالی با هم تعداد نواحی پلی‌مورفیک برابر با ۳۰۷ و حفاظت توالی (Sequence conservation) که با C نشان داده می‌شود برابر با ۰/۶۳۵ بود. در جدول ۶ توالی حفاظت شده میان ۹ توالی همراه با مقادیر Conservation، Homozigosity، P-value آورده شده است.

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.126433

جدول ۶: توالی مناطق حفاظت شده (Conserved Regions)

Region_1: 72-243	۰/۷۳۲	۰/۸۹۷	۰/۰۰۲۰
Region_2: 171-246	۰/۷۵۰	۰/۹۰۵	۰/۰۱۷۹
Region_3: 259-450	۰/۷۹۹	۰/۹۳۰	۰/۰۰۰۰

Dynamic Defined Parameters given the observed S:
Minimum window length, MWL: 74
Conservation threshold, CT: 0/73
{Region: Start-End Conservation Homozigosity P-value}

بحث

گونه‌ها پس از تعیین توالی ژن مورد نظر و بلاست کردن در سایت بانک ژن با توالی‌های ثبت‌شده از *Chelonia mydas* هم‌پوشانی داشتند. هر چند که توالی‌های مورد مطالعه در این تحقیق شباهت زیادی با توالی‌های موجود در بانک ژن NCBI که ثبت شده بودند نشان دادند اما از این توالی‌های جدید می‌توان به‌عنوان یک نشانگر مولکولی و بررسی تغییرات گونه در مناطق مختلف جغرافیایی استفاده کرد. نزدیک‌ترین گونه براساس نتایج بلاست، *Chelonia mydas* isolate CmP ۷۵/۱ بود که در سواحل شمال‌شرقی استرالیا مورد مطالعه قرار گرفته بود (Ardura و همکاران، ۲۰۱۰). بعد از این گونه بیش‌ترین شباهت با گونه *Chelonia mydas* isolate CmP ۲۱۹/۱ بود که توسط Blaxter و همکاران (۲۰۰۴) مورد مطالعه قرار گرفته بود. این مطالعه در ناحیه جنوبی چین مثل هنگ کنگ و تایوان انجام شده بود. در مطالعات گذشته توالی این ژن در لاک‌پشت‌های سبز در کشور قطر که نزدیک به دریای عمان است، بررسی شده است. نتایج این مطالعه نیز نشان داد که در قطر توالی DNA میتوکندریایی این نوع لاک‌پشت بیش‌ترین همولوژی (۹۹/۸۴٪) را با *Chelonia mydas* داشت و هم‌چنین ۹۳/۷۹٪ شباهت با گونه *Natator depressa* که بومی استرالیا است، مشاهده شد. پس از آن بیش‌ترین میزان همولوژی با *Eretmochelys imbricata* بود. این گونه لاک‌پشت دریایی به‌دلیل مهاجرت‌های طولانی که انجام می‌دهند شناسایی مولکولی و رده‌بندی آن دارای اهمیت است و استفاده از نشانگر DNA میتوکندریایی یک راهکار مناسب می‌باشد. Bowen و همکاران (۱۹۹۲) از این نشانگر مولکولی برای رده‌بندی لاک‌پشت‌ها استفاده کردند.

هم‌چنین نتایج مگا نشان می‌دهد که در ۹ توالی مورد بررسی به‌طور متوسط درصد AT (۶۵/۱٪) بیش‌تر از GC (۳۴/۹٪) بود. درخت فیلوژنتیکی بر اساس فاصله ژنتیکی به‌دست آمد و معیار فاصله ژنتیکی تعداد جایگزینی‌های نوکلئوتیدی در هر جایگاه بین توالی‌ها می‌باشد. نتایج آنالیز فیلوژنتیکی جمعیت مورد مطالعه نشان داد که همه نمونه‌ها در سه جمعیت قرار گرفتند. کلاد اول شامل نمونه‌های مربوط به منطقه چابهار بود که با عدد یک این توالی‌ها مشخص شدند در این کلاد ۴ نمونه قرار گرفت که علاوه بر سه نمونه چابهار یک نمونه از گواتر هم در این دسته قرار گرفت که نشان می‌دهد تفاوت بین توالی‌ها در این ناحیه بسیار کم است و تنوع ژنتیکی زیادی در این دو ناحیه دیده نمی‌شود. کلاد دوم شامل نمونه‌های منطقه کنارک و کلاد سوم هم مربوط به منطقه گواتر بود.

نتایج کلاستال دابلیو نشان داد که بیش‌ترین تفاوت میان توالی‌ها مربوط به ابتدا و انتهای توالی است. میانگین کلی فاصله در میان جمعیت به‌کمک P-distance برابر با ۰/۱۸ بود. بیش‌ترین فاصله بین دو نمونه ۲ و ۳ از دو منطقه چابهار و گواتر بود که برابر با ۰/۴۳۷ است و میزان ناجور بودن هم در بین این دو عدد بالایی (۲/۴۸۹۳) است. علت این تفاوت می‌تواند به فاصله مکانی این دو ناحیه برگردد هرچند که به‌دلیل توانایی مهاجرتی که این نوع لاک‌پشت دارد فاصله مکانی نمی‌تواند عامل اصلی باشد و شاید به شرایط متفاوت محیطی و عواملی مثل صید برگردد. این درحالی است که کم‌ترین فاصله مربوط به دو نمونه ۱۱۱ و ۲۲۲ مربوط به‌دو منطقه چابهار و کنارک است که فاصله مکانی زیادی با هم ندارند میزان ناجور بودن میان این دو نمونه برابر با صفر بود.

میزان تنوع هاپلوئیدی صفر بود هم‌چنین تعداد محل‌های پلی‌مورفیک برابر با صفر بود که نشان می‌دهد تفاوت به اندازه‌ای نبوده که اشتقاق گونه انجام شود. هیچ نوترکیبی در توالی‌ها رخ‌نداده که با ماهیت ناحیه مورد بررسی هم‌خوانی دارد.

کم‌ترین تنوع ژنتیکی مربوط به ناحیه چابهار بود که می‌تواند به دلیل صید، آلودگی و مسائل زیست محیطی مثل میزان بالای فلزات سمی و فعالیت‌های انسانی باشد. با وجود تنوع ژنتیکی که ذکر شد اما همه نمونه‌ها در یک گونه قرار می‌گیرند که نشان می‌دهد با وجود تنوع درون گونه‌ای منجر به تغییر جایگاه آن در ساختار فیلوژنتیکی لاک‌پشت‌ها نمی‌شود.

نتایج آنالیز واریانس مولکولی در نرم‌افزار آرلکوین نشان داد که تفاوت در بین این جمعیت‌ها بیش از تفاوت در درون جمعیت‌هاست به‌طورکلی تنوع ژنتیکی در نواحی دورتر به‌دلیل عدم وجود ارتباط با سایر جمعیت‌ها کم‌تر از نواحی دیگر بود. بیش‌ترین میزان تنوع ژنتیکی مربوط به گواتر و کم‌ترین میزان تنوع در جمعیت چابهار مشاهده شد. برنامه حفاظتی که برای این مناطق درنظر گرفته می‌شود باتوجه به این مسئله باید متفاوت باشد.

نتایج نرم‌افزار آرلکوین نشان داد که در هر سه ناحیه مورد بررسی بین ۹ نمونه هیچ اختلاف نوکلئوتیدی وجود ندارد و جمعیت در این بخش از ژنوم میتوکندری فاقد تنوع ژنتیکی است که این نشان دهنده شدت بالای هم‌خونی و روابط شدید خانوادگی در جمعیت مورد مطالعه می‌باشد و به‌طور آشکاری نشان‌دهنده وضعیت بحرانی تنوع زیستی این جمعیت است. تنوع زیستی لازمه بقای یک گونه در محیط می‌باشد و سطح پایین تنوع، کل جمعیت را در خطر انقراض در مواجه

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.126433

با شرایط خاص مانند تغییرات اقلیمی و یا پیدایش بیماری‌های خاص قرار می‌دهد. تنوع ژنتیکی درون جمعتی از دو لحاظ برای بقای بلند مدت جمعیت‌ها مهم می‌باشد. اول این‌که تنوع فنوتیپی وابسته به ژنوتیپ که تعیین‌کننده میزان سازگاری یک جمعیت می‌باشد محصول تنوع ژنتیکی است. دوماً تنوع ژنتیکی خنثی در یک جمعیت طبیعی انعکاس‌دهنده هم‌خونی و رانش ژنتیکی است که هر دو مورد از عوامل مشخص کاهش توان بقای جمعیت‌ها هستند. با این وجود نمی‌توان انتظار داشت که تنوع ژنتیکی خنثی مستقیماً مترادف با تنوع در هر ویژگی فنوتیپیک خاصی باشد اما به خاطر ارتباط ان با اندازه جمعیت موثر می‌تواندانعکاس‌دهنده پتانسیل سازگاری جمعیت‌ها در بلندمدت باشد. در نتیجه کاهش تنوع ژنتیکی درون جمعیتی (چه تنوع ژنتیکی انطباقی و در نتیجه فشار انتخاب باشد و چه تنوع ژنتیکی خنثی و نهفته در ژنوم‌باشد) با افزایش خطر انقراض جمعیت‌های طبیعی مرتبط است. DNA میتوکندریایی چون تحت تاثیر نوترکیبی قرار نمی‌گیرد (چون هاپلوئید است) در نتیجه تنوع آن تنها به‌علت انتخاب طبیعی است و تنوع ژنتیکی آن وابسته به اندازه جمعیت نیست. هم‌چنین انتخاب شدیدی بر ضد جهش‌های مضر میتوکندری در لایه زاینده جنس ماده صورت می‌گیرد که منجر به همگن شدن بیش‌تر سطح تنوع آن می‌گردد (انتخاب پس زمینه‌ای).

نتایج حاصل از این مطالعه را می‌توان در بررسی تنوع ژنتیکی لاک‌پشت‌های سبز دریایی در شرایط متفاوت جغرافیایی مورد استفاده قرار داد. هم‌چنین در مدیریت جمعیت این گونه و جلوگیری از انقراض می‌تواند کمک کند. در تهیه یک بانک ژنی مناسب برای شناسایی این گونه به کمک تکنیک‌های مولکولی به‌ویژه در مواردی که فقط تخم یا گوشت این گونه موجود است نیز می‌تواند یک راهکار مناسب باشد.

هم‌چنین با توجه به اهمیت بررسی فیلوژنی و جمعیتی در نشان دادن تنوع زیستی پیشنهاد می‌شود:

الف) تعداد بیش‌تری از گونه‌ها و جنس‌های مختلف با همین نشانگر و سایر نشانگرها مورد بررسی مشابه قرار گیرند.

ب) گونه‌های مورد بررسی در نقاط مختلف جغرافیایی با استفاده از ژن‌های مناسب از ژنوم میتوکندریایی و هسته‌ای از نظر جمعیتی مورد بررسی قرار گیرند.

منابع

۱. **افشاریان، ا.؛ نصیریان، م.؛ ابراهیمی، ا. و جوادمنش، ع.، ۱۳۸۶.** بررسی تنوع ژنتیکی گاندو، تمساح پوزه کوتاه ایرانی (*Crocodylus Palustris*) با استفاده از توالی‌یابی نواحی D-loop و Cyt b میتوکندری. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی. دوره ۹، شماره ۴، صفحات ۱۷ تا ۳۸.

۲. **صفایی، ن. و مهدیزاده، و.، ۱۳۹۲.** آموزش نرم‌افزارهای آنالیز فیلوژنتیکی و ژنتیک جمعیت. تهران، انتشارات سازمان آموزش، تحقیقات و ترویج کشاورزی. ۲۴۲ صفحه.

۳. **صمدی، س.، ۱۳۹۳.** بررسی مورفولوژیک، فیلوژنی و تعیین خط شناسه DNA سخت‌پوستان ده پا شاخص و تجاری خلیج فارس و دریای عمان. پایان‌نامه دکتری رشته زیست‌شناسی دریا. دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران.

۴. **طبیب، م.، ۱۳۹۳.** بررسی خصوصیات تولیدمثلی لاک‌پشت منقار عقابی در سواحل جزیره کیش. نشریه پژوهش‌های جانوری. جلد ۲۷، شماره ۳، صفحات ۳۷۷ تا ۳۸۵.

۵. **فریلند، ج. ۱۳۸۹.** بوم شناسی مولکولی. ترجمه ملکیان، م.، مشهد، انتشارات جهاد دانشگاهی. چاپ دوم. ۳۰۴ صفحه.

۶. **قوام‌مصطفوی، پ.؛ شهنواز، ش.؛ نوروزی، م.؛ فاطمی، س.م.ر. و شاه‌حسینی، م.، ۱۳۸۹.** بررسی ژنتیکی لاک‌پشت منقار عقابی جزایر هنگام، هرمز و نخیلو در خلیج فارس با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره. فصلنامه محیط زیست جانوری. دوره ۲، شماره ۴، صفحات ۴۳ تا ۴۸.

۷. **لقمانی، م.، ۱۳۹۶.** خصوصیات زیستی لاک‌پشت سبز، گونه در خطر انقراض و تخم گذار در سواحل جنوبی ایران. فصلنامه انسان و محیط زیست. دوره ۱۵، شماره ۴، صفحات ۹۹ تا ۱۱۰.

۸. **مهدیزاده، و.؛ نساج‌حسینی، م.؛ صفایی، ن. و سعیدی، ع.، ۱۳۹۲.** راهنمای کاربردی NCBI با ارائه آخرین تغییرات وبگاه NCBI.. تهران، انتشارات سازمان آموزش، تحقیقات و ترویج کشاورزی. ۱۸۶ صفحه.

۹. **نساج‌حسینی، م. و شمس‌بخش، م.، ۱۳۸۹.** روش‌های آنالیز فیلوژنتیکی. رشت، انتشارات حق‌شناس. ۲۴۸ صفحه.

۱۰. **Ardura, A.; Linde, A.R.; Moreira, J.C. and Garcia Vazquez, E., 2010.** DNA barcoding for conservation and management of Amazonian commercial fish. Biological Conservation. Vol. 143, pp: 1438-1443.

۱۱. **Asensio, G.L., 2007.** PCR-based methods for fish and fishery products authentication**.** Trends in Food Science and Technology. Vol. 18, pp: 558-566.

۱۲. **Avise, J.C. and Ball Jr, R.M., 1990.** Principles of genelogical concordance in species concepts and biological taxonomy. Oxford Survey of Evolutionary Biology. Vol. 7, pp: 45-67.

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.126433

۱۳. **Balakrishnan, R., 2004**. Species Concepts, Species Boundaries and Species Identification: A View from the Tropics. Syst. Biol. Vol. 54, No. 4, pp: 689-693.

۱۴. **Blaxter, M.L., 2004.** The promise of a DNA taxonomy. Phil. Trans. Royal Society of London. B. Vol. 359, pp: 669-679.

۱۵. **Bowen, B.W.; Meylan, A.B.; Ross, J.P.; Limpus, C.J.; Balazs, G.H. and Avise, J.C., 1992.** Global population structure and natural history of the green turtle (*Chelonia mydas*) in terms of matriarchal phylogeny. Evolution. International Journal of Organic Evolution. Vol. 4, pp: 865-881.

۱۶. **Dawkins, R., 1976**. The selfish gene. Oxford, New York: Oxford University Press.

۱۷. **Hebert, P.D.N.; Cywinska, A.; Ball, S.L. and deWaard, J.R., 2003.** Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London. B. Vol. 270, pp: 313-321.

۱۸. **Lemey, P.; Salemi, M. and Vandamme, A.M., 2009.** The phylogenetic handbook: a practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing, Cambridge. University Press Cambridge. Vol. 25, pp:120-125.

۱۹. **Spotila, J., 2004.** Sea Turtles: A Complete Guide to their Biology, Behavior, and Conservation. Baltimore, MD: Johns Hopkins University Press. Vol. 3, pp: 260-271.

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.126433

Scientific Research Journal of Animal Environment Vol. 12, No. 4, Winter 2020

Population genetics, phylogeny and DNA barcoding of Sea Turtles (*Chelonia mydas*) in the Oman Sea (Sistan & Baluchestan province coasts)

- **Seyed Ehsan Heidari:** Department of Marine Biology, Faculty of Natural Resources and Environment, Tehran Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
- **Mohammad Hasan Shahhosseiny*:** Department of Marine Biology, Faculty of Natural Resources and Environment, Tehran Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
- **Hadi Mirahmadi:** Department of Parasitology, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran
- **Pargol Ghavam Mostafavi:** Department of Marine Biology, Faculty of Natural Resources and Environment, Tehran Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
- **Seyed Mohammad Reza Fatemi:** Department of Marine Biology, Faculty of Natural Resources and Environment, Tehran Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: October 2019 Accepted: January 2020

Key words: Population genetics; DNA barcoding; Sea Turtles; Oman Sea

Abstract

In the past, morphological traits were used to classify organisms, but because of the problems encountered in classification using this method, the use of molecular markers was due to its advantages. Mitochondrial markers are one of the best options for the study of phylogenetic relationships. In this study, 10 specimens of green sea turtle were collected from three areas of Chabahar, Govater and Konarak in Sistan and Baluchestan province. After DNA extraction, the samples were sequenced. Sequences were studied using MEGA, BioEdit and Arlequin software. The results showed that based on the phylogenetic analysis of the studied population, all of the samples were placed in three populations. The average distance of the population with the help of P-distance was 0.18. The results of the Clustal W show that the greatest difference between the sequences is at the beginning and the end of the sequence. The amount of haploid variety was zero, and the number of polymorphic sites was zero, which indicates that the difference was not such as to make the species derivative. No recombination has taken place in sequences that are consistent with the nature of the area under study. The results of this study, can be used to study the genetic diversity of marine turtles in different geographical conditions. It can also help to manage this population and prevent extinction. It can also be a good solution to provide a suitable Gene bank for the identification of this species through molecular techniques, especially in cases where only the eggs or meat of this animal is present.

* Corresponding Author's email: shahhosseiny@yahoo.com