

بررسی تنوع ژنتیکی لاک‌پشت دریایی منقار عقابی (*Eretmochelys imbricata*) موجود در دو جزیره کیش و قشم با استفاده از تعیین توالی ناحیه D-loop ژنوم میتوکندری

- مهدی طبیب*: اداره حفاظت محیط زیست، بندر ماهشهر
- حسین ذوالقرنین: گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، صندوق پستی: ۶۶۹
- مهدی محمدی: گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، صندوق پستی: ۶۶۹
- محمد علی سالاری: مرکز مطالعات خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر
تاریخ دریافت: تیر ۱۳۸۹ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۸۹

چکیده

به منظور مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت لاک‌پشت منقار عقابی (*Eretmochelys imbricata*) در دو جزیره خلیج فارس با استفاده از تعیین توالی ناحیه D-loop ژنوم میتوکندری، ۴۰ عدد جنین مرده لاک‌پشت از دو جزیره قشم و کیش جمع‌آوری گردید. حدود ۸۹۰ bp از ناحیه D-loop ژنوم میتوکندری تکثیر و تعیین توالی شد. در این مطالعه ۵ محل (مکان) پلی‌مورف و ۶ هاپلوتیپ بدست آمد. تنوع هاپلوتیپی و نوکلئوتیدی برای جزیره قشم بترتیب ۰/۸۲ و ۰/۰۰۱ و برای جزیره کیش ۰/۵۶ و ۰/۰۰۲ محاسبه شد. تنوع هاپلوتیپی کل نیز ۰/۷۱ تعیین گردید. نتایج حاصله نشان دهنده میزان مهاجرت و تردد بسیار بالا بین دو جزیره است بطوریکه عملاً جمعیت لاک‌پشت‌های دو جزیره یک جمعیت واحد به حساب می‌آیند. از نقطه نظر جغرافیای تکاملی، مقایسه نتایج این تحقیق با اطلاعات مربوط به مطالعات قبلی نشان داد که جمعیت لاک‌پشت‌های خلیج فارس با گذشتن از اقیانوس آرام و دریای عمان وارد این منطقه گردیده و این جمعیت‌ها از نواحی غربی به این منطقه مهاجرت نمی‌نمایند.

کلمات کلیدی: تنوع ژنتیکی، لاک‌پشت دریایی، D-loop، ژنوم میتوکندری، خلیج فارس



مقدمه

بطور کلی از میان هشت گونه لاکپشت دریایی موجود در اقیانوس‌ها و دریاها، پنج گونه در خلیج فارس و دریای عمان زیست می‌کنند که در قسمت‌های شمالی سواحل خلیج فارس و دریای عمان یعنی در سواحل ایران وجود دوگونه سبز و عقابی کاملاً به اثبات رسیده است (۲۱). در جزایر ایرانی خلیج فارس عمدتاً گونه منقار عقابی تخم‌گذاری می‌کند (۱۷). جزایر قشم و کیش از عمده مکان‌های تخم‌گذاری لاکپشت‌های منقار عقابی می‌باشد (۲). این گونه در بیشتر نواحی گرمسیری جهان و در قسمت‌های مرکزی اقیانوس اطلس و اقیانوس آرام و هند یافت می‌شود (۸). لاکپشت‌های منقار عقابی در حوزه دریای کارائیب عمدتاً از اسفنج‌ها و در ناحیه اقیانوس هند-آرام از اسفنج‌ها، جلبک‌ها و انواع بی‌مهرگان تغذیه می‌کنند (۹). جمعیت لاکپشت‌های منقار عقابی در جهان به شدت رو به کاهش است بطوریکه این گونه در لیست قرمز IUCN در سال ۲۰۰۹، بعنوان گونه به شدت در معرض خطر انقراض قرار گرفت (۱۱). آنالیزهای DNA میتوکندری روشی است که به عنوان ابزار تحقیقی برای زیست‌شناسان با مقاصد شیلاتی استفاده می‌شود (۲۰). ژنوم میتوکندری مهره‌داران حدود ۳۷ ژن دارد که شامل ۲۲ ژن tRNA، ۲ ژن rRNA و ۱۳ ژن mRNA و یک ناحیه غیرکدبندی به نام D-loop است (۲۲). در لاکپشت‌های دریایی به شکل گسترده‌ای برای پی بردن به ساختارهای جمعیتی و نحوه مهاجرت نمونه‌ها از DNA میتوکندری استفاده می‌شود (۴). اولین مطالعات ژنتیکی در ۲ منطقه اقیانوس اطلس و هند-آرام شامل بررسی تنوع ژنتیکی ژنوم میتوکندری و بررسی ساختار ژنتیکی لاکپشت منقار عقابی بوده است (۳ و ۶). مطالعات ژنتیکی زیادی روی لاکپشت‌های منقار عقابی صورت گرفت که از آن جمله می‌توان به بررسی ژنتیک جمعیت و جغرافیای مولکولی در لاکپشت‌های دریایی (۵) و بررسی رفتارهای مهاجرتی و پراکنش لاکپشت منقار عقابی (۲۷) اشاره نمود. هدف از این مطالعه برای شناخت گونه‌های موجود در خلیج فارس، بررسی تنوع ژنتیکی و وضعیت جمعیت‌های این جانور در منطقه انجام شده است.

مواد و روشها

در این مطالعه ۴۰ جنین مرده لاکپشت منقار عقابی از جزایر قشم و کیش (شکل ۱) جمع‌آوری و در اتانول ۹۶ درصد

تثبیت شدند. از بافت کبد و عضله به مقدار ۰/۱ گرم جدا کرده و با استفاده از روش استاندارد فنل-کلروفرم (۱۰) ژنوم کامل جانور استخراج شد. حدود ۸۹۰ bp از ناحیه D-loop ژنوم میتوکندری توسط پرایمرهای

H950 (5'-GTCTCGGATTTAGGGGTTTG-3')

و

(5'-GCTTAACCCTAAAGCATTGG-3')

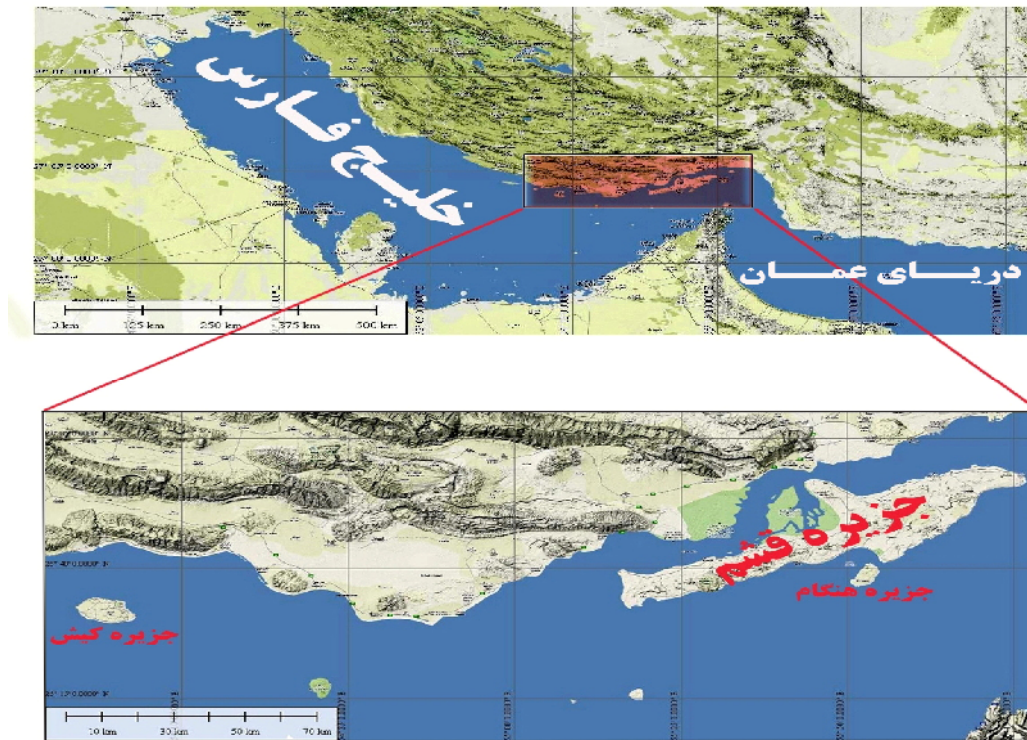
LCM15382 تکثیر گردید (۱۵).

در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) غلظت مورد نیاز مواد مصرفی شامل: بافر ۱X، کلرید منیزیم ۲ mM، dNTP با غلظت ۰/۲ mM، پرایمر ۰/۰۱ Apmol، آنزیم Taq پلیمرز ۵ Unit و ۰/۱ DNA ۱ng/μl - ۰/۵ بود. برنامه مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل: مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۵ سیکل مرحله واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، مرحله اتصال در دمای ۵۳/۵ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه و ۳۰ ثانیه و مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه و در نهایت بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه بود. محصولات PCR برای تعیین توالی به کشور کره جنوبی ارسال شد. از نرم‌افزار Clustal W (۲۵) برای مرتب کردن توالی‌ها و برای آنالیز آماری (تنوع هاپلوتیپی و نوکلئوتیدی) از نرم‌افزار Arlequin ver 2.000 (۲۳) و برای ترسیم درخت ژنتیکی از نرم‌افزار Mega4 استفاده شد (۲۴).

نتایج

از آنالیز ۴۰ توالی ۵ محل (مکان) پلی‌مورف و ۶ هاپلوتیپ بدست آمد که ۴ هاپلوتیپ مربوط به جزیره قشم و ۱ هاپلوتیپ مربوط به جزیره کیش و ۱ هاپلوتیپ بین ۲ جزیره مشترک بود (جدول ۱). در این مطالعه تنوع هاپلوتیپی و نوکلئوتیدی در جزیره قشم به ترتیب ۰/۸۲ و ۰/۰۱ و برای جزیره کیش ۰/۵۶ و ۰/۰۲ و تنوع هاپلوتیپی کل نیز ۰/۷۱ بدست آمد (جدول ۲). در نتیجه می‌توان گفت که تنوع ژنتیکی در جزیره قشم از جزیره کیش بیشتر است. اما با توجه به تعداد کم جایگاه‌های پلی‌مورف، تنوع ژنتیکی در منطقه مورد مطالعه پایین است.





شکل ۱: نقشه و موقعیت جزایر نمونه‌برداری شده لاک‌پشت منقار عقابی در خلیج فارس

مربوط به مطالعات قبلی نشان داد که جمعیت لاک‌پشت‌های خلیج فارس با گذشتن از اقیانوس آرام و دریای عمان وارد این منطقه می‌شوند و این جمعیت‌ها از سمت غرب به این منطقه مهاجرت نمی‌کنند (نمودار ۲).

میزان بسیار پایین شاخص F_{ST} و همچنین وجود هاپلوتیپ مشترک بین دو جزیره نشان‌دهنده میزان مهاجرت و تردد بین دو جزیره است بطوریکه عملاً جمعیت لاک‌پشت‌های دو جزیره یک جمعیت واحد بحساب می‌آیند (نمودار ۱). از نقطه نظر جغرافیای تکاملی، مقایسه داده‌ها در این تحقیق با داده‌های

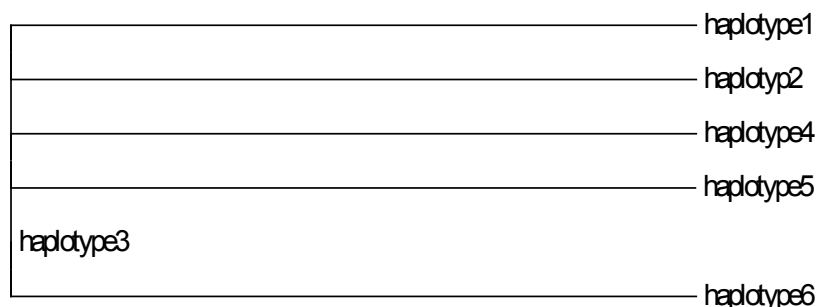
جدول ۱: هاپلوتیپ‌ها و موقعیت جایگاه‌های پلی‌مورف

موقعیت باز هاپلوتیپ	۱۶۳	۱۶۵	۱۶۶	۴۸۴	۶۴۴
هاپلوتیپ ۱	T	C	T	G	C
هاپلوتیپ ۲	T	C	C	G	T
هاپلوتیپ ۳	T	C	T	G	T
هاپلوتیپ ۴	T	C	T	A	T
هاپلوتیپ ۵	G	C	T	G	T
هاپلوتیپ ۶	T	T	T	G	T



جدول ۲: تنوع هاپلوتیپی (h) و نوکلئوتیدی (π) جمعیت‌ها

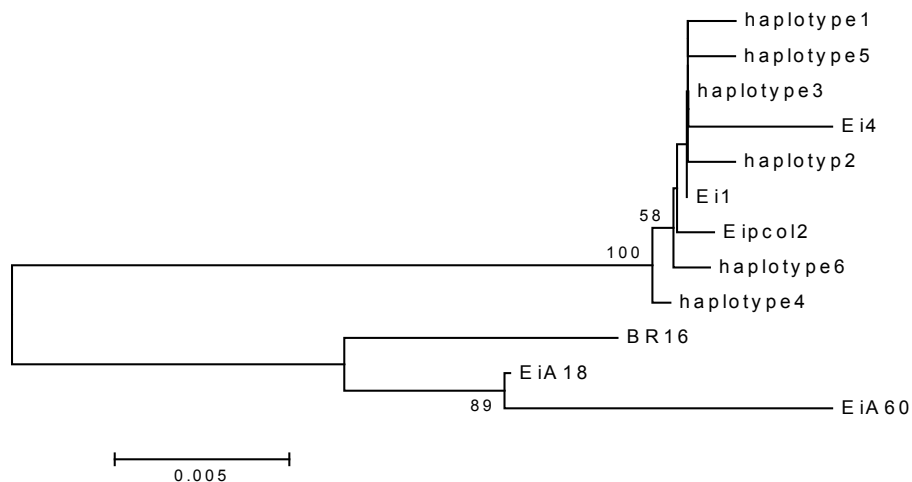
منطقه مورد مطالعه	تنوع هاپلوتیپی (h)	تنوع نوکلئوتیدی (π)
قشم	۰/۸۲	۰/۰۰۱
کیش	۰/۵۶	۰/۰۰۲
تنوع کل	۰/۷۱	۱/۵۶



0.0002

نمودار ۱: درخت فاصله‌ای (Neighbor-joining distance tree) هاپلوتیپ‌های بدست آمده در این تحقیق براساس روش دو

پارامتری Kimura (1980) با ۱۰۰۰ بار تکرار



نمودار ۲: درخت فاصله‌ای (Neighbor-joining distance tree) براساس روش دو پارامتری Kimura (1980) با ۱۰۰۰

بار تکرار. اعداد کمتر از ۵۰ درصد آورده نشده است. هاپلوتیپ‌های EiA60، EiA18 و BR16 (14) مربوط به اقیانوس اطلس و هاپلوتیپ‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ و هاپلوتیپ‌های Ei4، Ei1، Eipcol2 (26) مربوط به منطقه هند-آرام هستند.

بحث

لاکپشت‌های دریایی ماده طبق فرضیه Natal homing برای تخم‌گذاری به زادگاه اولیه خود باز می‌گردند (۷). نزدیکی جزیره

لاکپشت‌های منقار عقابی جزایر ایران، بعنوان جمعیتی از لاکپشت‌های منقار عقابی اقیانوس هند هستند (۱۳).



منابع

- ۱- علی بیک، ه.، ۱۳۸۲. تکامل موجودات زنده. انتشارات فیروزه. ۱۸۴ صفحه.
- ۲- ولوی، ح.، ۱۳۷۳. تخم‌گذاری لاک‌پشت‌های دریایی در جزایر منطقه حفاظت شده مند. فصلنامه علمی محیط‌زیست، شماره ۲۵، صفحات ۲ تا ۸.
- 3- Bass, A.L.; Good, D.A.; Bjorndal, K.A., 1996. Testing models of female reproductive migratory behavior and population structure in the Caribbean hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata*, with mtDNA sequences. Mol. Ecol., 5:321-328.
- 4- Bowen, W. and Karl, S., 1995. Population genetic, Phylogeography and molecular evolution of sea turtles, Bioscience, Vol. 45, 528P.
- 5- Bowen, B.W. and Karl, S.A., 2007. Population genetics and phylogeography of sea turtles. Mol. Ecol. 16:4886-4907.
- 6- Broderick, D. and Moritz, C., 1996. Hawksbill breeding and foraging populations in the Indo-Pacific region. In: (B.W. Bowen and W.N. Witzell eds.). Proceedings of the International Symposium on Sea Turtle Conservation Genetics. NOAA Tech. Memo. NMFSEFSC-396:119-128.
- 7- Carr, A.F., 1975. The Ascension Island green turtle nesting colony. Copeia, pp.547-555.
- 8- FAO, 1990. Species catalogue, sea turtles of worlds. Vol. 11, No. 25, 85P.
- 9- Fraizer, J., 2001. Observation of sea turtles in Aldobra, Ser B. London, UK. pp.206-373.
- 10-Hillis, D.M. and Moritz, C., 1990. Molecular taxonomy. Sinauer Associates Inc Publishers. Sanderland, Massachusetts. U.S.A. 120P.
- 11- IUCN, 2009. The IUCN red list of threatened species. <http://www.iucnredlist.org>. Accessed 15 June 2009.
- 12- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol., Vo. 16, No. 2, pp.111-120.

قشم به تنگه هرمز و وسعت زیاد جزیره قشم باعث می‌شود که لاک‌پشت‌های منقار عقابی بیشتری نسبت به جزیره کیش به این جزیره برای تخم‌گذاری بروند بطوریکه در جزیره قشم لاک‌پشت‌های منقار عقابی در ۳ منطقه تخم‌گذاری می‌کنند. در ضمن فاکتورهای مهم و اساسی که برای لانه‌سازی و تخم‌گذاری لاک‌پشت‌های دریایی در یک ساحل باید وجود داشته باشد شامل دانه بندی، شیب مناسب و ارتفاع ساحل که باعث محافظت تخم‌ها در زمان مد می‌شود در جزیره قشم نسبت به جزیره کیش مناسب‌تر می‌باشد. لازم به ذکر است که در جزیره قشم محافظت مناسب و خوبی از طرف محیط زیست از تخم لاک‌پشت‌ها بعمل می‌آید در نتیجه تعداد تخمی که به نوزاد تبدیل می‌شود بیشتر است. در ضمن با توجه به گفته مسئولین محیط‌زیست قشم با استناد به روش علامت گذاری لاک‌پشت‌ها، هر ساله لاک‌پشت‌های جدیدی علاوه بر لاک‌پشت‌های قبلی که در جزیره تخم‌گذاری کرده‌اند برای تخم‌گذاری به جزیره قشم می‌روند که با نظریه Facilitation مطابقت دارد. Facilitation باعث ورود ژن جدید می‌شود و می‌تواند از عوامل افزایش پلی‌مورفیسم بیشتر در جزیره قشم نسبت به جزیره کیش باشد (۱۶) لاک‌پشت‌های منقار عقابی در منطقه اقیانوس هند- آرام از اسفنج‌ها، جلبک‌ها و انواع بی‌مهرگان تغذیه می‌کنند (۹). با توجه به اینکه لاک‌پشت‌های دریایی جانورانی مهاجر هستند و اکوسیستم‌های پویا و مناسبی مانند جنگل‌های حرای قشم و آبسنگ‌های مرجانی کیش که در منطقه وجود دارد و مکان مناسب و خوبی برای زندگی جانوران زیادی است که می‌توانند غذای مناسبی برای لاک‌پشت‌ها باشند. بنابراین مهاجرت درون منطقه‌ای امری اجتناب ناپذیر است. مهاجرت درون منطقه‌ای باعث ایجاد جریان ژنی می‌شود و جریان ژنی باعث کاهش تفاوت ژنتیکی بین دو جمعیت شده و تشابه ژنتیکی را بالا می‌برد (۱). بطور معمول جریان ژنی زیاد میان جمعیت‌ها موجب محدود کردن فرصت برای ایجاد تفاوت‌های ژنتیکی شده و از ظهور گونه‌های جدید ممانعت می‌کند. با توجه به آنالیزهای صورت گرفته و همچنین وجود هاپلوטיפ مشترک بین دو جزیره قشم و کیش به نظر می‌رسد که مهاجرت درون منطقه‌ای وجود دارد. اوکایاما و همکاران (۱۹۹۹) بیان کردند که لاک‌پشت‌های منقار عقابی منطقه Indo-Pacific و منطقه اقیانوس اطلس در دو کلاد کاملاً جدا از یکدیگر قرار دارند و قرابت ژنتیکی با هم ندارند که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. تنوع هاپلوטיפی بسیار پایین نشان‌دهنده در خطر بودن جمعیت این جانور است و اگر توجه مناسبی به وضعیت این جانوران در منطقه نشود، ممکن است نسل لاک‌پشت‌هایی که وارد این حوزه می‌شوند به مرور زمان کاهش شدید پیدا کرده و در نهایت منقرض شوند.



- 13- **Kinunen, W. and Walczak, P.S., 1971.** Persian Gulf sea turtle nesting surveys. Job Completion Rept., Division of Research Development, F-7-50, 16P.
- 14- **Lara-Ruiz, P.; Lopez, G.G.; Santos, F.R. and Soares, L.S., 2006.** Extensive hybridization in hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) nesting in Brazil revealed by mtDNA analyses. *Conserv. Genet.* Vol. 7, No. 5, pp.773-781.
- 15- **Laurent, L.; Casale, P.; Bradai, M.N.; Godley, B.J.; Gerosa, G.; Broderick, A.C.; Schroth, W.; Schierwater, B.; Levy, A.M.; Freggi, D.; Abd El-Mawla, E.M.; Hadoud, D.A.; Gomati, H.E.; Domingo, M.; Hadjichristophorou, M.; Kornaraky, L.; Demirayak, L.F. and Gautier, C., 1998.** Molecular resolution of marine turtle stock composition in fishery bycatch: A case study in the Mediterranean. *Mol. Ecol.*, 7:1529-1542.
- 16- **Meylan, A.B.; Bowen, B.W. and Avise, J.C., 1990.** A genetic test of the natal homing versus social facilitation models for green turtle migration. *Sci.*, 248:724-727.
- 17- **Mobaraki, A., 2004a.** Marine turtles in Iran: Results from 2002. *Marine turtle Newsletter.* 104:13.
- 18- **Wahideh, M.A. and Syed Abdul Kadir, S.A., 2009.** Identification of the stock population of green and hawksbill turtles in the southeast Asian region. *In: Report on the Third Regional Technical Consultation on Research for Stock Enhancement of Sea Turtles (JTF IV program), Terengganu, Malaysia, 17-15 2008.*
- 19- **Okayama, T.; Diaz-Fernandez, R.; Baba, Y. and Halim, M., 1999.** Genetic diversity of the hawksbill turtle in the Indo-Pacific and Caribbean regions. *Chelonian Con. Biol.* 3:362-367.
- 20- **Ovenden, J.R. and Brasher, D.J., 1994.** Stock identity of the red and green rock lobsters inferred from mitochondrial DNA analysis. *In: (B.F. Phillips, J.S. Cobb and J. Kittaka eds.). "Spiny Lobster Management". Blackwell Scientific Publication. Oxford, UK. pp.230-249.*
- 21- **Ross, J.P. and Barwani, M.A., 1982.** Review of sea turtles in the Arabian area. *In: (K. Bjorndal ed.). The biology and conservation of sea turtles. Smithsonian Institution Press, Washington D.C., USA. pp.373-383.*
- 22- **Saccone, C.; Giorgi, C.O.; Gissi, C.; Pesole, G. and Reyes, A., 1999.** Evolutionary genomics in metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene.* 238:195-209.
- 23- **Schneider, S.; Roessli, D.; Escoffier, L., 2000.** Arlequin: A software for population genetics data analysis, version 2000. Genetic and Biometry Laboratory, Department of Anthropology, University of Geneva, Switzerland.
- 24- **Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M. and Kumar, S., 2007.** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, 24:1596-1599.
- 25- **Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gipson, T.J., 1994.** CLUSTAL W: Improving the sensitivity 759 of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap 760 penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.
- 26- **Trujillo-Arias, N.; Amorocho, D.; Lopez, D.C. and Mejia-Ladino, L.M., 2009.** Caracterización genética de la Tortuga Carey (*Eretmochelys imbricata*) en Colombia, basada en la región control de DNA mt. Universidad del Quindío-Uniquindio programa académico Biología Nombre del orientado: Natalia Trujillo Arias.
- 27- **Velez-Zuazo, X.; Ramos, W.D.; Van Dam, R.P.; Diez, C.E.; Serrano, X.; Abreu-Grobois, A. and McMillan, W.O., 2008.** Dispersal, recruitment and migratory behavior in a hawksbill sea turtle population. *Mol. Ecol.* 17: 839- 853.

