

بررسی ژنتیکی لاک پشت منقار عقابی (*Eretmochelys imbricata*) جزایر

هنگام، هرمز و نخیلو در خلیج فارس با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره

- پرگل قوام مصطفوی: واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران صندوق پستی: ۴۹۳۳-۱۴۱۵۵
 - شیما شهنواز*: واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران صندوق پستی: ۴۹۳۳-۱۴۱۵۵
 - مهرنوش نوروژی: دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، صندوق پستی: ۶۴۶-۴۸۱۵
 - محمد رضا فاطمی: واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران صندوق پستی: ۴۹۳۳-۱۴۱۵۵
 - محمد حسن شاه حسینی: دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس، صندوق پستی: ۳۷۵۱۵-۳۷۴
 - الهه قطب رزمجو: واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران صندوق پستی: ۴۹۳۳-۱۴۱۵۵
 - آرش نکوییان: سازمان حفاظت محیط زیست تهران، صندوق پستی: ۶۷۹-۴۸۱۸۵
- تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۸۹ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۸۹

چکیده

لاک پشت منقار عقابی از جمله آبزیانی است که از سال ۱۹۷۰ در لیست قرمز IUCN قرار گرفته است و در سواحل شنی جزایر شمالی خلیج فارس تخم گذاری می کند. به منظور بررسی ساختار ژنتیکی این گونه، از مناطق هنگام، هرمز و نخیلو تعداد ۹۰ نمونه (از هر منطقه ۳۰ نمونه) گرفته شد و پس از استخراج DNA، با استفاده از ۸ نشانگر ریزماهوره (مارکر میکروساتلایت) پارامترهای آماری مربوطه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بررسی نشان داد که کلیه جایگاه‌ها دارای چند شکلی بوده همچنین حداکثر و حداقل میانگین تعداد آلی بترتیب در مناطق هرمز (۷/۳) و نخیلو (۵/۳) مشاهده شد و لوکوس‌ها در تمامی مناطق خارج از تعادل هاردی-واینبرگ بودند ($P < 0.001$). میانگین He و Ho بترتیب ۰/۳۵ و ۰/۶۹ محاسبه شد و همچنین میزان Fst اختلاف معنی داری را بین جمعیت‌های لاک پشت منقار عقابی نشان داد که با وجود پایین بودن تنوع ژنتیکی، اما جمعیت‌های مجزا از لحاظ ژنتیکی در جزایر مورد بررسی قابل تشخیص می باشد.

کلمات کلیدی: لاک پشت منقار عقابی، ریز ماهوره، خلیج فارس



مقدمه

لاکپشت منقار عقابی (*Eretmochelys imbricata*) به زبان انگلیسی Hawksbill نامیده می‌شوند و دارای پراکنش وسیعی در اقیانوس اطلس، آرام، هند و دریای عمان و خلیج فارس است. آیسنگهای مرجانی، علفهای دریایی و جلبکها از جمله زیستگاههای این گونه محسوب شده و اسفنجها یکی از مهمترین منابع غذایی این گونه بشمار می‌روند (۳). این گونه در سواحل شنی جزایر شمالی خلیج فارس تخم‌گذاری می‌کند. توانایی مهاجرت در لاکپشت‌های دریایی از مناطق تغذیه‌ای به سرزمین‌های تخم‌گذاری یکی از ویژگی‌های آنها بشمار می‌رود (۵). رفتارهای مهاجرتی لاکپشت‌های نر و ماده در بسیاری از گونه‌های لاکپشت‌های دریایی را با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره به راحتی می‌توان مورد مطالعه قرار داد (۷). یکی از مورد توجه‌ترین عملکردها در سلسله جانوران دریایی فرضیه بازگشت به زادگاه (Natal Homing Hypothesis) می‌باشد که بر طبق آن لاکپشت‌های ماده پس از رسیدن به سن بلوغ برای تخم‌گذاری به ساحلی برمی‌گردند که در آن زاده شده‌اند و به احتمال زیاد در صورتی که شرایط زیست‌محیطی در زادگاهشان همچنان مناسب باقیمانده باشد، همه تخم‌گذاری‌های بعدی نیز در همان ساحل زادگاه صورت می‌گیرد. استفاده از ریزماهوره‌ها که تحت عنوان SSRs (Simple Sequence Repeats) شناخته می‌شوند، امکان تعیین تنوع و فاصله ژنتیکی در درون جمعیت لاکپشت‌های منقار عقابی در هر یک از مناطق تخم‌گذاری و مقایسه آن با سایر جمعیت‌ها را میسر می‌سازد (۴). این تحقیق با این فرض صورت گرفت که بین جمعیت‌های مختلف لاکپشت منقار عقابی خلیج فارس در محدوده مورد بررسی ارتباط ژنتیکی وجود دارد، در راستای این فرضیه اهدافی از جمله تعیین میزان تنوع ژنتیکی و یافتن ارتباط و اختلافات ژنتیکی بین جمعیت‌های لاکپشت‌های منقار عقابی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

به منظور انجام این تحقیق ابتدا نمونه‌برداری از پوست شانه باله لاکپشت‌های منقار عقابی مولد در ایستگاههای مورد بررسی در فصول تخم‌گذاری صورت گرفت. در مجموع تعداد ۹۰ نمونه که شامل ۳۰ نمونه از جزیره هنگام، ۳۰ نمونه از جزیره هرمز و

۳۰ نمونه از جزیره نخیلو بود جمع‌آوری شد. نمونه‌برداری با استفاده از تیغ جراحی یکبار مصرف، پوست از شانه جدا و در ویال‌های ۱/۵ میلی‌لیتر حاوی محلول DMSO ۲۰ درصد نمکی نگهداری شد. سپس محل مورد نظر با اسپری آنتی باکتریال ضد عفونی گردید. برای انجام آزمایش‌های مولکولی نمونه‌ها به آزمایشگاه بیولوژی دریا واقع در مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات تهران منتقل و در فریزر ۲۰- درجه نگهداری شدند. سپس DNA ژنومی هر یک از نمونه‌ها با استفاده از کیت استخراج DNA (DN8115C) استخراج شدند و کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از طریق دستگاه اسپکتروفوتومتری و ژل آگارز ۱ درصد مورد سنجش قرار گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با استفاده از هشت جفت پرایمر مربوط به ریز ماهوره شامل: Cc-2, Cc-13, Cc-28, HKB-31, HKB-30, HKB-29, HKB-26, HKB-17 صورت گرفت (۸ و ۱۲). در هر واکنش ۲۵ میکرولیتری غلظت نهایی مواد شامل بافر (۱X), MgCl₂ ۰/۵ میلی مولار، dNTP ۰/۲ میلی مولار، پرایمر رفت و برگشت هر یک ۰/۴ میکرو مولار، آنزیم DNA Polymerase Taq ۱/۵ U/μl و ۳۰-۲۰ نانوگرم DNA الگو بود. برنامه حرارتی برای واکنش مورد نظر شامل: مرحله واسرشته‌سازی اولیه: ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه و واسرشته‌سازی: ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه؛ مرحله الحاق: ۶۵-۶۱ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه؛ مرحله بسط: ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و نهایتاً مرحله بسط نهایی: ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۷ دقیقه و تعداد چرخه‌ها ۳۰ چرخه در نظر گرفته شد. محصول تکثیر شده (PCR) به همراه سایز مارکر ۱۰۰ bp از طریق ژل پلی آکریل آمید ۶ درصد الکتروفورز و توسط نیترات نقره رنگ‌آمیزی شد. پس از اسکن ژل‌ها و ثبت تصاویر، با استفاده از نرم‌افزار UVDoc سایز باندهای هر نمونه تعیین گردید. پس از رتبه‌دهی به آلل‌ها، آنالیزهای آماری مربوطه شامل فراوانی آللی، هتروزایگوسیتی مشاهده شده و قابل انتظار، شباهت و فاصله ژنتیکی، میزان Fst و Rst، جریان ژنی و تعادل هاردی-واینبرگ با استفاده از نرم افزار GenAlex صورت گرفت (۶).



نتایج

DNAهای استخراج شده دارای کمیت و کیفیت مناسب و فاقد هر گونه آلودگی پروتئینی و RNA بودند. غلظت DNA بین ۷۰ تا ۱۰۰ نانوگرم و OD260/280 آنها بین ۱/۸ تا ۲ قرار داشت. از آنجایی که این موجود دیپلوئید است تعداد باندهای مشاهده شده در هنگام شمارش الگوی باندهای در تمامی نمونه‌ها یک یا حداکثر دو باند بود که بیانگر هتروزیگوت بودن آن است. در بین آللهای شناسایی شده ۲ آلل اختصاصی در لوکوس HKB-26 با فراوانی (۰/۰۵) و (۰/۰۸۳) در منطقه هرمز مورد شناسایی قرار گرفت که در نمونه‌های سایر مناطق مورد بررسی مشاهده نشد. همچنین میانگین تعداد آللها ۶/۴ آلل تخمین زده شد که حداکثر میانگین در منطقه هرمز (۷/۳) و حداقل آن در منطقه نخیلو (۵/۳) دیده شد (جدول ۱). در بررسی حاضر دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) بین مناطق نمونه‌برداری در تمامی لوکوسها ۱-۰ بود و میانگین آن (۰/۳۵) محاسبه شد که بیشترین و کمترین مقدار بترتیب مربوط به مناطق هنگام (۰/۴۵) و نخیلو (۰/۲۳) بود. دامنه هتروزیگوسیتی قابل انتظار (He) بین ۰/۴۷-۰/۸۴ و متوسط آن ۰/۶۹ بود که کمترین مقدار مربوط به نخیلو (۰/۶۵) و بیشترین مقدار مربوط به هرمز (۰/۷۷) می‌باشد (جدول ۱). به منظور تعیین تعادل هاردی-واینبرگ در تمامی مناطق مورد بررسی از آزمون مربع کای استفاده شد. براین اساس همه لوکوسها در تمامی مناطق خارج از تعادل بودند ($P < 0.001$). حداکثر Fst بین نمونه‌های مناطق هنگام و نخیلو (۰/۱۹۰) که دارای کمترین جریان ژنی بودند، ($Nm = 1/06$) دیده شد و حداقل آن بین نمونه‌های مناطق هنگام و هرمز (۰/۰۹۷) که دارای بیشترین جریان ژنی بودند، ($Nm = 2/32$) مشاهده شد. در نتیجه بیشترین فاصله ژنتیکی، مربوط به نمونه‌های مناطق نخیلو و هنگام (۰/۹۱۲) بود و کمترین فاصله ژنتیکی در بین مناطق هرمز و هنگام (۰/۴۷) مشاهده شد. حداکثر Rst بین نمونه‌های مناطق هنگام و نخیلو (۰/۴۵) که دارای کمترین جریان ژنی بودند ($Nm = 0/30$) دیده شد و حداقل آن بین نمونه‌های مناطق هنگام و هرمز (۰/۱۱۹) که دارای بیشترین جریان ژنی بودند ($Nm = 1/85$) مشاهده گردید ($P < 0.001$).

بحث

امروزه با مروری بر مطالعات انجام شده و ارزیابی ذخایر و مکان‌های تخم‌گذاری گونه لاک‌پشت منقار عقابی مشخص شده که تعداد افراد این گونه در سواحل لانه‌گزینی و تخم‌گذاری روند نزولی دارند بطوریکه از سال ۱۹۷۰ در لیست قرمز IUCN قرار گرفته است. یکی از عوامل مهم در جدایی جمعیت‌ها در لاک‌پشت‌های منقار عقابی بازگشت به زادگاه در ماده‌ها می‌باشد و چنانچه تعداد افراد یک جمعیت در منطقه کاهش یابد به احتمال زیاد توسط ذخایر سایر مناطق بازسازی نخواهد شد (۸). در مطالعه حاضر، در بین آللهای شناسایی شده ۲ آلل اختصاصی در منطقه هرمز مورد شناسایی قرار گرفت. مناطقی که دارای آللهای اختصاصی می‌باشند بستر مناسبی را برای توسعه ژنتیکی جمعیت فراهم می‌کنند (۱۱ و ۱۳). میانگین آلی بدست آمده در این بررسی تفاوت چندانی با میانگین آلی بدست آمده توسط Lin و همکاران (۲۰۰۸) نداشت با این وجود به دلیل پایین بودن فرکانس (فراوانی) آلی تنوع ژنتیکی پایینی مشاهده شد و یکی از دلایل آن به تاریخچه خلیج فارس باز می‌گردد که جمعیت‌های بزرگی از این گونه در گذشته در این آبها زندگی می‌کردند اما امروزه این وضعیت تغییر کرده است و حضور فزاینده ساخت و سازهای ساحلی، از بین رفتن زیستگاههای طبیعی و مناطق تغذیه‌ای باعث افزایش روند نزولی در تعداد مولدین شده است (۹). در بررسی حاضر میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده کمتر از میانگین هتروزیگوسیتی گزارش شده توسط Monzon و همکاران (۲۰۰۸) بود. معمولاً کاهش تنوع ژنتیکی در تمامی نمونه‌ها را می‌توان ناشی از جمعیت موسس کوچک، رانش ژنتیکی و استفاده‌های ممنوعه از تخمها در سالهای گذشته دانست (۲ و ۱۵). در بررسی تعادل هاردی-واینبرگ، همه مناطق در تمامی لوکوسها خارج از تعادل بودند ($P < 0.001$). با در نظر داشتن اینکه عدم مهاجرت در یک جمعیت، تصادفی بودن جفتگیری در جوامع، پایین بودن نرخ جهش در ژنهای مورد مطالعه و بالا بودن تعداد نمونه‌های مورد مطالعه از شرایط قرار گرفتن یک جمعیت در تعادل هاردی-واینبرگ می‌باشد (۶).



جدول ۱: مقادیر تعداد آللی (Na)، آلل‌های مؤثر (Ne)، هتروزایگوسیتی مشاهده شده (Ho)، هتروزایگوسیتی قابل انتظار (He)، تعادل هاردی واینبرگ ($P < 0.001$; $**P < 0.01$; $*P < 0.05$) در سه منطقه هنگام، هرمز و نخیلو با استفاده از ۸ جفت آغازگر ریزماهوره

جایگاه		هنگام	هرمز	نخیلو	میانگین
Cc-2	Na	۶	۶	۷	۶/۳۳
	Ne	۲/۲۵	۴/۸۱	۳/۶۳	۳/۵۶
	Ho	۰/۴۳***	۰/۲۳***	۰/۳**	۰/۳۲
	He	۰/۰۵	۰/۷۹	۰/۷۲	۰/۵۲
Cc-13	Na	۷	۷	۵	۶/۳۳
	Ne	۵/۰۵	۳/۹۸	۳/۵۵	۴/۱۹
	Ho	۰/۷۳*	۰/۵***	۰/۳***	۰/۵۱
	He	۰/۸	۰/۷۴	۰/۷۱	۰/۷۵
Cc-28	Na	۹	۹	۶	۸
	Ne	۶/۱۸	۶/۵۲	۳/۸۱	۵/۵
	Ho	۰/۲۶***	۰/۳۶***	۰/۳۵***	۰/۳۲
	He	۰/۸۳	۰/۸۴	۰/۷۳	۰/۸
HKB-17	Na	۲	۵	۴	۳/۶۶
	Ne	۱/۹۲	۲/۶۶	۲/۹۳	۲/۵
	Ho	۰/۰۰***	۰/۰۰***	۰/۰۵***	۰/۰۵
	He	۰/۴۸	۰/۶۲	۰/۶۵	۰/۵۸
HKB-26	Na	۷	۹	۶	۷/۳۳
	Ne	۵/۷۵	۵/۳۲	۳/۱۶	۴/۷۴
	Ho	۱***	۱***	۰/۱۵***	۰/۷۱
	He	۰/۸۲	۰/۸۱	۰/۶۸	۰/۷۷
HKB-29	Na	۶	۷	۴	۵/۶۶
	Ne	۳/۳۵	۴/۶۲	۲/۴۴	۳/۴۷
	Ho	۰/۴***	۰/۰۶***	۰/۲۵***	۰/۲۳
	He	۰/۷	۰/۷۸	۰/۵۹	۰/۶۹
HKB-30	Na	۷	۸	۴	۶/۳۳
	Ne	۵/۲	۵/۵۵	۱/۹۱	۴/۲۲
	Ho	۰/۵***	۰/۵۶***	۰/۱۵**	۰/۴
	He	۰/۸	۰/۸۲	۰/۴۷	۰/۶۹
HKB-31	Na	۹	۸	۷	۸
	Ne	۵/۵۲	۴/۲۳	۳/۲۳	۴/۳۲
	Ho	۰/۲۶***	۰/۴***	۰/۳***	۰/۳۲
	He	۰/۸۱	۰/۷۶	۰/۶۹	۰/۷۵
	میانگین آللی	۶/۶	۷/۳	۵/۳	±۶/۴۵
	میانگین آلل‌های مؤثر	۴/۴	۴/۷۱	۳/۰۸	±۴/۰۶
	میانگین هتروزایگوسیتی مشاهده شده	۰/۴۵	۰/۳۹	۰/۲۳	±۰/۳۵
	میانگین هتروزایگوسیتی مورد انتظار	۰/۶۶	۰/۷۷	۰/۶۵	±۰/۶۹



- Massachusetts, USA.
- 3-Bowen, B.W. and Karl, S.A., 1996.** Population genetics, phylogeography, and molecular evolution. *In: P.L. Lutz & J.A. Musick Eds.*) The Biology of Sea Turtles. CRC Press, Florida, USA. pp.29-50.
- 4-Chistiakov, D.A.; Hellemans, B.; Haley, C.S.; Law, A.S.; Tsigonopoulos, C.S.; Kotoulas, G.; Bertotto, D.; Libertini, A. and Volckaert, F.A., 2005.** A microsatellite linkage map of the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Genetic*. 170:1821-1826.
- 5-FitzSimmons, N.; Moritz, C. and Bowen, B.W., 1999.** Population identification. *In: Research and management techniques for the conservation of Sea Turtles. Specialist Group Publication, No. 4.*
- 6- Frankham, R.; Ballou, J.D. and Briscoe, D.A., 2002.** Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press, Cambridge.
- 7-Jensen, M.P.; Abreu-Grobois, F.A.; Frydenberg, J. and Loeschke, V., 2006.** Microsatellites provide insight into contrasting mating patterns in arribada vs. non-arribada olive ridley sea turtle rookeries. *Molecul.*, 15(9):2567-2575.
- 8-Lin, G.; Chang, A.; Yap, H.W. and Yue, H., 2008.** Characterization and cross-species amplification of microsatellites from the endangered Hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*). *In: Conserv. Genet.*, 9:1071-1073. DOI 10.1007/ s10592-007-9459-z.
- 9- Lutcavage, M.E.; Plotkin, P.; Witherington, B. and Lutz, P.L., 1997.** Human impacts on sea turtle survival. *In: (P.L. Lutz and J.A. Musick eds.) The Biology of Sea Turtles. Boca Raton, FL: CRC Press, pp.387-409.*

خارج از تعادل بودن لوکوس‌های مورد مطالعه را می‌توان چنین تفسیر کرد که گونه لاک‌پشت منقار عقابی علاوه بر اینکه دارای مهاجرت‌های طولانی است، دارای مهاجرت در مسافت‌های کوتاه و در بین جمعیت‌های یک گونه نیز می‌باشد (۱۰). همچنین بالا بودن احتمال آمیزش خویشاوندی ناشی از جمعیت موسس کوچک منجر به کاهش تنوع ژنتیکی در جمعیت لاک‌پشت‌های منقار عقابی در محدوده مورد بررسی شده است که مجموعه این عوامل در خارج از تعادل بودن لوکوس‌ها در تعادل هاردی-واینبرگ نقش به‌سزایی داشته‌اند. دو فاکتور F_{st} و R_{st} بطور معمول در تشریح تمایز ژنتیکی در بین جمعیت‌های مختلف یک گونه بکار می‌رود (۱). در مطالعه حاضر میزان F_{st} در تمام مناطق نمونه‌برداری پایین اما دارای تفاوت معنی‌داری بود ($P < 0.01$). در کل بین مقدار F_{st} و قابلیت پراکنش همبستگی منفی وجود دارد (۱۴). به این ترتیب که هر چه مهاجرت در منطقه بیشتر باشد میزان F_{st} کمتر می‌باشد. طبق این فرضیه احتمال بالا بودن تمایز ژنتیکی در مناطق نخیلو و هنگام به مراتب بیشتر از مناطق هرمز و هنگام می‌باشد. در کل این تحقیق بیانگر این است که با وجود پایین بودن تنوع ژنتیکی، اما جمعیت‌های مجزا از لحاظ ژنتیکی در لاک‌پشت‌های منقار عقابی جزایر مورد بررسی قابل تشخیص می‌باشد که این نتایج در هموار کردن راه به منظور مدیریت و حفاظت از جمعیت‌های در معرض خطر انقراض این گونه اهمیت حیاتی دارند.

تشکر و قدر دانی

بدینوسیله از مسئولین دفتر محیط‌زیست دریایی سازمان حفاظت محیط‌زیست برای تأمین بودجه این تحقیق تشکر و سپاسگزاری می‌نمایم.

منابع

- 1-Balloux, F. and Moulin, N.L., 2002.** The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Mol. Ecol.*, 11:155-165.
- 2-Baverstock, P.R. and Moritz, C., 1996.** Project design, p.17-27. *In: (D.M. Hillis, C. Moritz, and B.K. Mable Eds.) Molecular Systematics. Second edition. Sinauer Assoc., Sunderland,*



- 10-Manolis, C.; Carrillo, E.C.; Webb, G.J.W.; Koike, H.; Diaz, R.; Moncada, F.G.; Meneses, A.P.; Nodarse, G.A.; Espinosa, G. and Baker, B., 2000.** Research update on the Cuban Hawksbill Turtle program. *In: Proceedings 18th International Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation*. Mazatlan, Mexico.
- 11- Michalakis, Y. and Excoffier, L., 1996.** A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. *Genetics*, 142:1061-1064.
- 12-Monzon, C.; Munoz, J.; Marco, A.; Jurado, L.F. and Rico, C., 2008.** Twelve new polymorphic microsatellite markers from the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) and cross-species amplification on other marine turtle species. *In: Conserv. Genet.*, 9:1045-1049. DOI 10.1007/s10592-007-9446-4.
- 13-Schroth, W.; Streit, B. and Schierwater, B., 1996.** Evolutionary handicap for turtles. *Nature*, 384:521-522.
- 14-Walpes, R.S., 1998.** Separating the wheat from the chaff: Patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *Hered.* 89:438-450.
- 15-Xia, J.; Zheng, J. and Wang, D., 2005.** Ex situ conservation status of an endangered Yangtze finless porpoise population (*Neophocaena phocaenoides asiaeorientalis*) as measured from microsatellites and mtDNA diversity. *ICES J. Mar. Sci.*, 62:1711-1716.

