

بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت تمساح مردابی (*Crocodylus palustris*) در استان سیستان و بلوچستان

- کتایون فروتن: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین، پیشوا
 - سیامک یوسفی سیاهکلرودی*: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین، پیشوا
 - قباد عسگری جعفرآبادی: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین، پیشوا
- تاریخ دریافت: مهر ۱۳۸۸ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۸۸

چکیده

برای اولین بار مطالعه‌ای بر روی جمعیت تمساح مردابی (*Crocodylus palustris*) در استان سیستان و بلوچستان انجام گرفت. تمساح مردابی که منطقه پراکنش آن در ایران محدود به قسمتی از مکران ایران در بلوچستان و همچنین بخشی از منطقه باهوکلالت می‌باشد، تمساحی است با جثه متوسط تا بزرگ با پوزه پهن. جمعیت موجود در ایران تنها بخش کوچکی از جمعیت جهانی این گونه بشمار می‌آید. از دوازده تمساح موجود در شرایط اسارت در منطقه درگس از شهرستان چابهار بعد از اندازه‌گیری‌های زیست‌سنجی، نمونه‌گیری بعمل آمد، نمونه‌ها از بافت فلس تهیه و سپس با استفاده از کیت، DNA استخراج گردید. از هفت آغازگر مخصوص RAPD با توالی ۱۰ نوکلئوتید جهت RAPD-PCR استفاده شد. از بین هفت آغازگر به جز آغازگر شماره ۳ همگی باعث ایجاد چند شکلی بین افراد نمونه شدند، بطور میانگین ۷ جایگاه در هر بار استفاده از این آغازگرها چند شکلی بروز دادند. نتایج با نرم افزار ۳۲ PopGene آنالیز گردید که نشاندهنده تقریباً ۵۶ درصد چند شکلی بین نمونه‌ها بود که این امر نشان می‌دهد که درون این جمعیت تنوع ژنتیکی وجود دارد.

کلمات کلیدی: تمساح مردابی، *Crocodylus palustris*، RAPD، فلس، تنوع ژنتیکی

مقدمه

کروکودیل‌ها از نظر اقتصادی قابل توجه هستند، بطوریکه پوست، گوشت، خون و ناخن آنها از شهرت و جاذبه بسیاری برخوردار است و کشورهای مانند هند، تایلند و چین از پرورش‌دهندگان عمده این حیوان می‌باشند و نیاز عمده بازار جهانی را تامین می‌کنند (۹). تمساح مردابی با نام انگلیسی Muger از ایران به سمت شرق تا آسام هند و به سمت جنوب تا سریلانکا پراکنش دارد (۸) و ایران غربی‌ترین نقطه پراکنش جهانی این گونه بحساب می‌آید. تمساح مردابی که منطقه پراکنش آن در ایران محدود به قسمتی از مکران ایران در بلوچستان و محدود به بخشی از منطقه باهوکلالت می‌باشد (۴)، تمساحی است با جثه متوسط تا بزرگ با پوزه پهن که آفتاب گرفتن بارزترین فعالیت روزانه آن بشمار می‌رود. جمعیت موجود در ایران تنها بخش کوچکی از جمعیت جهانی این گونه را تشکیل می‌دهد. در ایران تنها یک نوع اکوتیپ از تمساح مردابی وجود دارد (۲). Cheng-Yuan و همکاران در سال ۲۰۰۲ مطالعه‌ای روی تمساح‌های بومی چین انجام دادند که در آن جمعیت‌های گوناگونی از تمساح چینی را در مناطق مختلف مورد بررسی قرار دادند و با روش نشانگرهای تصادفی مولکولی (RAPD) پراکندگی ژنتیکی بین تمساح‌های چینی را بررسی کردند، هیچ تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های این تمساح‌ها مشاهده نشد. Patricia و همکاران در سال ۲۰۰۷ مطالعه‌ای بر روی گونه کیمن لاتیروستیرس انجام دادند و با روش RAPD، ۱۱۴ جمعیت از این گونه را در آرژانتین بررسی کردند که در آن میانگین هتروزایگوسیتی، میانگین آلل‌های هر لوکوس و درصد لوکوس‌های چند شکل را مشخص نمودند، در بین جمعیت‌های تحت بررسی قرابت ژنتیکی بسیاری مشاهده و فواصل ژنتیکی اندازه‌گیری شده بیانگر وجود آللهای مشترک بسیاری بین این جمعیت‌ها بود. Changjiang و همکاران در سال ۲۰۰۹ تحقیقی روی دو گونه تمساح کروکودیلوس پالوستریس و تمساح اورینوکو انجام دادند. در این تحقیق آنها DNA ژن بتا کراتین موجود در فلس این دو تمساح را توالی‌یابی کردند و سپس نتایج را با توالی‌های این ژن در پر پرندهگان مقایسه نمودند. از بررسی‌های فیلوژنتیکی خود به این نتیجه رسیدند که از نظر فیلوژنتیکی تمساح‌ها در مقایسه با سایر خزندگان رابطه نزدیک‌تری با پرندگان دارند.

مواد و روشها

در این تحقیق، به منظور بررسی ژنتیک جمعیت تمساح مردابی سیستان و بلوچستان از فلس پشتی دوازده تمساح مردابی بدون محدودیت در جنسیت نمونه‌گیری بعمل آمد، تمساح‌ها همگی در شرایط اسارت بودند و در پاسگاه محیط‌بانی درگس از شهرستان چابهار در استان سیستان و بلوچستان نگهداری شدند. پس از انجام عملیات زیست‌سنجی، نسبت به نمونه‌برداری اقدام شد، بطوریکه بعد از قطع کردن قسمتی از فلس پشتی که بافت کراتینی پشت بوده، نمونه‌ها را بلافاصله در لوله‌های حاوی الکل اتانول ۷۰ درصد قرار داده شدند تا هنگام انجام عملیات آزمایشگاهی مربوط به استخراج DNA، سالم و عاری از آلودگی باشند. سپس به منظور استخراج DNA، نمونه‌ها توسط نیتروژن مایع تا حد ممکن خرد و با استفاده از کیت استخراج DNA به نام دی این ایزی محصول شرکت کیا ژن که مخصوص استخراج DNA از انواع بافت (نرم، سخت)، خون بخصوص مو، ناخن و پر پرندگان بود. استخراج بصورت بهینه انجام گردید. سپس به منظور مطالعه ساختار ژنتیکی جمعیت مورد بررسی، از هفت آغازگر RAPD که توالی آنها مشابه بعضی از آغازگرهای RAPD پرندگان بود استفاده گردید (جدول ۱) و بدلیل قرابت ژنتیکی پرندگان و تمساح‌ها پیش‌بینی شد که در *C. palustris* نیز جوابگو باشد، که توالی این هفت آغازگر سفارش به شرکت سینا ژن با OD ۱۵-۲۰ واکنش بشرح زیر بود:

مواد بکار رفته جهت تهیه بافر PCR حاوی مواد زیر با حجم کلی ۵۰ ماکرولیتتر بدین شرح بود: ۲ ماکرولیتتر dNTP، ۵ ماکرولیتتر ۱۰X، ۴ ماکرولیتتر کلرور منیزیم $MgCl_2$ ، ۵ ماکرولیتتر DNA، ۲۸ ماکرولیتتر آب دیونیزه، آغازگر ۵ ماکرولیتتر و ۱ ماکرولیتتر آنزیم Taq polymerase. پس از تهیه مخلوط اصلی به هر تیوپ PCR، مقدار مورد نظر از مخلوط اصلی اضافه شده تا بعنوان الگوی برای تکثیریک رشته DNA مستلزم ۳ مرحله Denaturation، Extention و Annealing است. ۱۰ ماکرولیتتر از محصول PCR (محتویات داخل تیوپ PCR) الکتروفورز گردید و با استفاده از دستگاه UVP مورد مطالعه قرار می‌گرفت. در اینجا از ژل آغاز ۱ درصد استفاده شد و با توجه به اینکه وزن قطعات DNA بسیار کمتر از DNA ژنومی است از مارکرهای سبک‌تر استفاده شد.

جدول ۱: توالی آغازگرها

شماره آغازگر	توالی آغازگر
۱	۵'-caggcccttc-۳'
۲	۵'-tgccgcgctg-۳'
۳	۵'-agtgagccac-۳'
۴	۵'-gaaacgggtg-۳'
۵	۵'-gtgacgtagg-۳'
۶	۵'-gtgacgtagg-۳'
۷	۵'-gtgatcgag-۳'

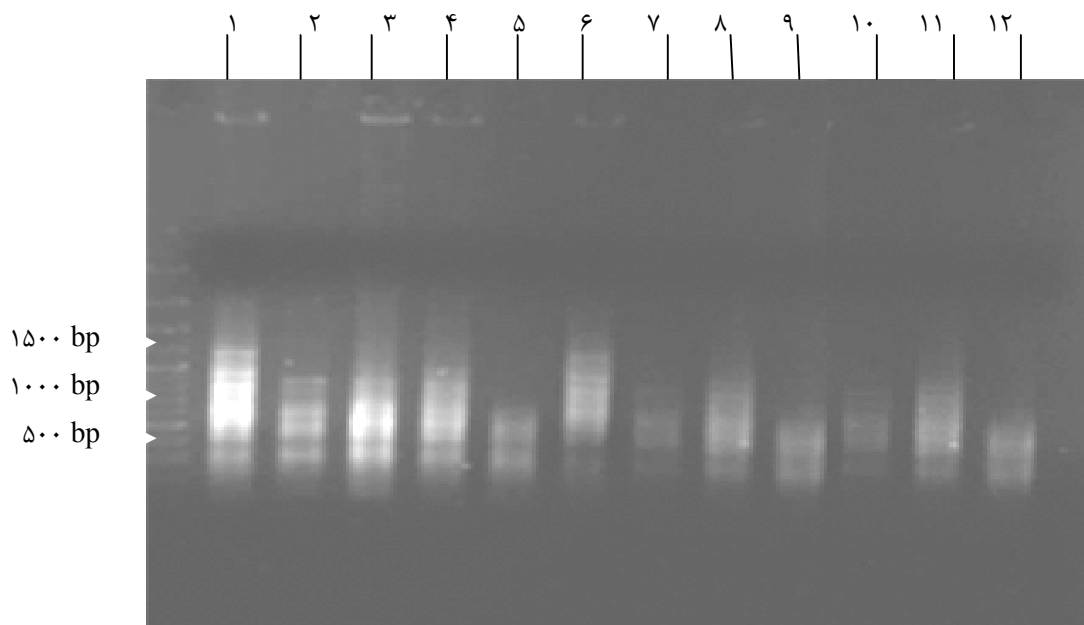
نتایج

آغازگر شماره ۷ نیز قابل مشاهده است این آغازگر نیز با ۴۱/۷۶ درصد چندشکلی بین ۵ نمونه از ۱۲ نمونه با ۹ الگوی تشکیل باند، بدلیل بیشترین وضوح در کل آغازگرها در تشکیل باندهای قوی با الگوی باندی تکراری در هر بار تکرار RAPD-PCR به نظر بهترین آغازگر تصادفی RAPD در بین ۷ آغازگر بکار رفته جهت نمونه‌های تمساح مردابی بود.

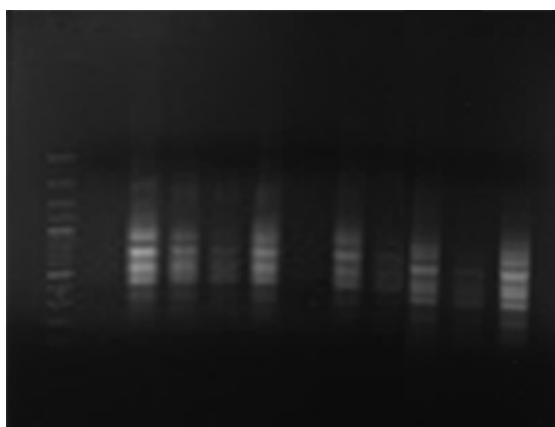
بجز نمونه‌هایی که از آغازگر شماره ۳ استفاده شده بود و هیچ محصول PCR تولید نکرد، هر یک از آغازگرها الگوی باندی مشابه تولید نمودند. باندهای حاصل از آغازگر آغازگرهای ۴ و ۷ دارای بیشترین میزان وضوح بودند. میزان چند شکلی در بین نمونه‌های تحت تاثیر آغازگر ۴ نسبتاً بالا بود میزان ۴۱/۷۶ درصد چند شکلی بین ۵ نمونه از ۱۲ نمونه با ۹ الگوی تشکیل باند، در استفاده از این آغازگر، نتیجه مساعدی است. این وضعیت در

جدول ۲: میانگین درصد چند شکلی و میزان افراد چندشکل تمساح مردابی

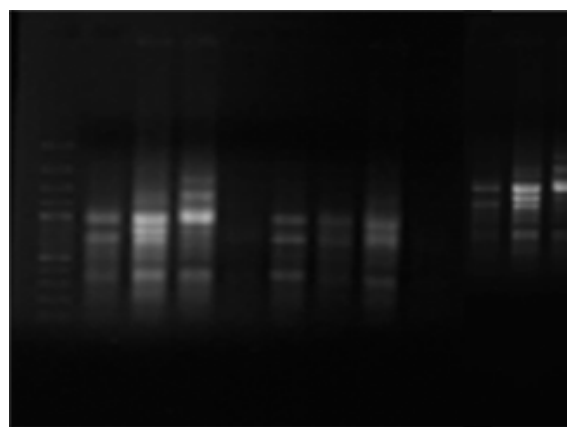
نام آغازگر	آغازگر ۱	آغازگر ۲	آغازگر ۴	آغازگر ۵	آغازگر ۶	آغازگر ۷	میانگین
درصد چندشکلی	۷۵	۷۵	۴۱/۶۷	۵۸/۳۳	۴۱/۶۷	۴۱/۶۷	۵۵/۶
تعداد نمونه‌های چندشکل	۹	۹	۵	۷	۵	۵	تقریباً ۷



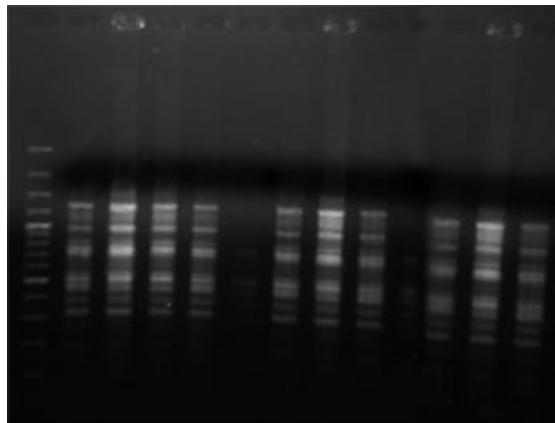
شکل ۱: تصویر آغازگر ۳ بر روی افراد نمونه که نمایانگر هیچ باند واضحی نبود



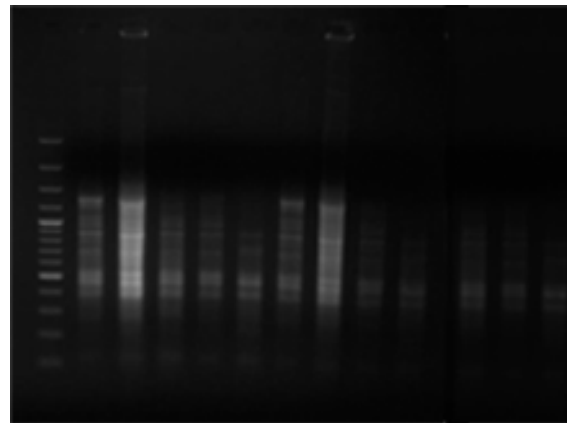
شکل ۲: تصویر آغازگر ۱



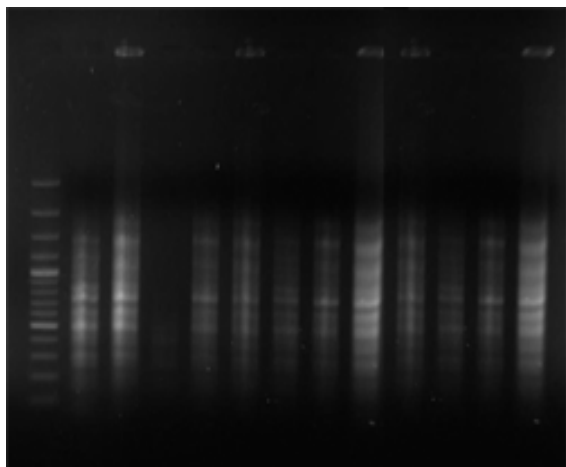
شکل ۳: تصویر آغازگر ۲



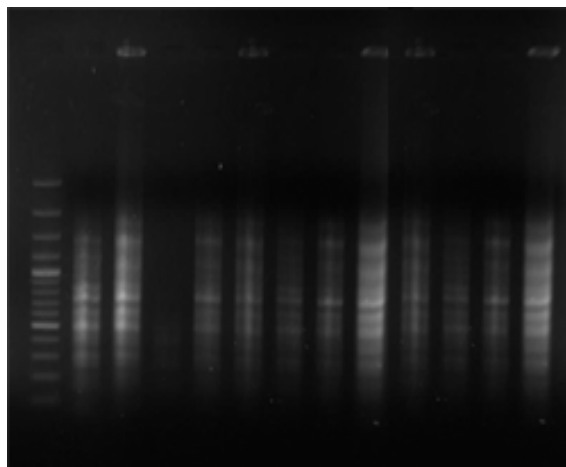
شکل ۴: تصویر آغازگر ۴



شکل ۵: تصویر آغازگر ۵



شکل ۶: تصویر آغازگر ۶



شکل ۷: تصویر آغازگر ۷

بحث

ذکر است که جمعیت *C. palustris* در بخش پنجاب پاکستان از بین رفته ولی هنوز جمعیت‌های کوچکی در بخش سند وجود دارند (۱). جمعیت این گونه در بنگلادش و میانمار از بین رفته و بررسی‌های اولیه در نپال نشان می‌دهند که هنوز جمعیت‌های بسیار کوچک، محدود و جدا افتاده‌ای از این گونه در آن کشور وجود دارد. تمساح مردابی هنوز نتوانسته پراکنش وسیع خود را در منطقه بلوچستان پاکستان حفظ کند (۳). تفاوت‌های فردی بین نشست باندهای DNA و عدم نشست آن باعث تمایز بین افراد جامعه می‌شود به بیان بهتر بدلیل تفاوت‌های فردی میزان تقریباً ۵۶ درصد چند شکلی بین این افراد مشاهده شده است. از آن جایی که این جمعیت دارای تعداد محدودی عضو می‌باشد، اطلاق واژه زیر جمعیت مناسب‌تر به نظر می‌رسد. لازم به ذکر است که در این زیر جمعیت گزینش و مهاجرت وجود ندارد. طبق نتایج حاصله ۵۶ درصد چند شکلی بدست آمد اما تحقیقات بیشتری باید انجام گیرد زیرا بدلیل محدودیت در نمونه‌گیری و تعداد افراد نمی‌توان این چند شکلی را به میزان درون زادآوری این جمعیت نسبت داد. شرایط محیطی در تعیین جنسیت تمساح موثر است. در این مطالعه نمونه‌گیری و یافتن تمساح‌ها بدون در نظر گرفتن جنسیت آنها صورت پذیرفت و براساس نتایج حاصل چنین می‌توان تصور کرد که جنسیت نمونه‌ها روی نتایج تأثیری نداشته است.

جمعیت *C. palustris* در ایران بسیار اندک است. شرط اول در بررسی جمعیت‌های ژنتیکی پیروی کردن جمعیت از توزیع نرمال است و در حالیکه در برآوردهای ژنتیکی جمعیت اولیه را دارای تعداد بیشمار فرض می‌کنند اما این جمعیت فاقد شرط اول است. افراد این زیر جمعیت در منطقه محدودی از ایران زیست می‌نمایند و بدلیل شرایط نامساعد منطقه امکان مهاجرت تمساح‌ها یا ورود ژن (فرد) از سایر جمعیت‌های *C. palustris* وجود ندارد. میزان ۵۵/۶ درصد چند شکلی که بطور میانگین از نتایج تمامی آغازگرها حاصل گردید نشان‌دهنده تفاوت در بین افراد این مطالعه است. می‌توان این طور استنباط نمود که این افراد در بعضی از صفات و در مواردی ساختار ژنتیکی با هم متفاوت هستند. البته میزان چند شکلی حاصل آنقدر نیست که بتوان از آن بعنوان معنی‌دار بودن یا نبودن در سطح آماری خاصی بیان نمود و بعنوان یک ادله قوی جهت اثبات تفاوت و انشقاق در جمعیت تمساح مردابی ایران استفاده کرد. لازم بذکر است که این اولین مطالعه روی ژنتیک جمعیت *C. palustris* در ایران است، اما این جمعیت تنها به ایران و استان سیستان و بلوچستان محدود نمی‌شود، بلکه *C. palustris* بومی کشورها و مناطق دیگری نیز می‌باشد. مطالعه کافی بر روی جمعیت‌های این گونه از تمساح‌ها در هند و سریلانکا صورت گرفته و نتایج حاصله موید این نکته است که جمعیت‌ها در حالیکه عمدتاً کوچک و جدا افتاده می‌باشند، کاملاً گسترده و پراکنده هستند (۴). شایان

۳- مبارکی، ا. و ایافت، ا.، ۱۳۸۶. تمساح حفاظت و پرورش. انتشارات روز نو. صفحات ۱۴۸ تا ۱۵۰.

۴- یوسفی، س. و مبارکی، ا.، ۱۳۸۶. نگرشی بر تمساح مردابی در ایران. انتشارات موج سبز. صفحات ۳۷ تا ۴۰.

۵- Agrawal, R., Chandrashekhar, R., Mishra, A.K., Ramadevi, J., Sharma, Y. and Aggarwal, R.K., ۲۰۰۲. Cloning and sequencing of complete tau-crysatallin cDNA from embryonic lenses of crocodile, *Crocodylus palustris*. J. Biosci., Vol. ۲۷, No. ۳, pp. ۲۵۱-۲۵۹.

۶- Changjiang, Ye., Xiaobing, Wu., Peng Yan and Amato, G., ۲۰۰۹. β -Keratins in crocodiles reveal amino acid homology with avian keratins. Journal of Springer, Netherlands. ۱۵۷۳-۴۹۷۸ (Online).

با توجه به شرایط موجود، اولین پیشنهاد درباره تمساح مردابی امر محافظت و پرورش این تمساح جهت جلوگیری از انقراض نسل آن در ایران می‌باشد. از آنجایی که بین این جمعیت و زیرجمعیت فاصله زمانی و مکانی بسیار بدون انتقال و تبادل ژنی ایجاد شده است، پیش‌بینی می‌شود این زیر جمعیت نسبت به جمعیت کل دچار افتراق ژنتیکی عمده‌ای شده باشد، زیرا تعداد افراد تشکیل دهنده این زیر جمعیت بسیار کم است و بالطبع اغلب آمیزش‌ها در بین افراد موجود در همان محدوده صورت می‌گیرد. همین امر سبب کاهش تنوع ژنتیکی در زیر جمعیت خواهد شد و هرچه این امر بیشتر اتفاق بیافتد احتمال تمایز ژنتیکی بین زیر جمعیت و جمعیت کل بالا می‌رود. می‌توان با تحقیقاتی مشابه، بر روی سایر جمعیت‌های *C. palustris* در جمعیت‌های بزرگتر آن میزان این انشقاق را بررسی کرد و حتی در مورد افتراق ژنتیکی احتمالی بین *C. palustris* ایران با سایر جمعیت‌های مشابه آن در دنیا مقایسه بعمل آورد. پیشنهاد می‌گردد که آزمایشات مشابه‌ای با مبنای تفاوت جنسیت تمساح‌های مردابی در کشور انجام گیرد تا میزان احتمالی جنسیت بر روی نتایج حاصله بررسی گردد. علاوه بر آن می‌توان بر روی ژن‌های آن بررسی انجام داد و ژن‌های توالی‌یابی شده را به بانک‌های ژنی ارائه کرد. هند چندین ژن از *C. palustris* را توالی‌یابی کرده است (۵). می‌توان همین ژن‌ها را در تمساح‌های موجود در ایران توالی‌یابی کرد و نتایج را مقایسه نمود. با یافتن توالی‌های مربوط به یک ژن خاص در *C. palustris* ایرانی، می‌توان همان توالی را در سایر گونه‌های آن در دنیا مقایسه و روابط فیلوژنتیک تمساح مردابی ایرانی را با سایر کروکودیل‌ها یا سایر خزندگان مثل لاک‌پشت‌ها و سوسمارها بررسی کرد (۱۱). می‌توان برای حفاظت از ژن‌های تمساح‌های بومی ایران مبادرت به تهیه کتابخانه ژنومی نمود تا سایر محققین مجموعه‌ای ارزشمند و قابل دستیابی از توالی‌های نوکلئوتیدی این جانور با ارزش در کشور را در اختیار داشته و نیز بعنوان یک ذخیره ژنتیکی حفظ گردد.

منابع

- ۱- مبارکی، ا.، ۱۳۷۷. مقدمه‌ای بر شناخت کروکودیل. فصلنامه محیط‌زیست، شماره اول، بهار ۷۷، صفحات ۴۱ تا ۴۳.
- ۲- مبارکی، ا.، ۱۳۸۰. بررسی کروکودیل پوزه کوتاه در ایران. فصلنامه محیط‌زیست، شماره ۳۵، صفحات ۱۸ تا ۲۴.

- ۷- **Cheng-Yuan, Xu., Wen-Ju, Zh., Cui-Zhang, Fu and Bao-Rong, Lu., ۲۰۰۲.** Genetic diversity of alligator weed in China by RAPD analysis. Journal of Springer, Netherlands. Vol. ۱۲, No. ۴.
- ۸- **Mobaraki, A., ۱۹۹۹a.** Borrowing behavior of Mugger in Iran. CSG Newsletter. Vol. ۱۸, No. ۲, pp.۹-۱۰.
- ۹- **Mobaraki, A., ۱۹۹۹b.** Mugger feeding in Iran. CSG Newsletter, Vol. ۱۸, No. ۱, pp.۸-۹.
- ۱۰- **Patricia, S., Amavet, E., Rosa, L., Markariani, M. and Larriera A., ۲۰۰۷.** Analysis of the population structure of Broad-snouted Caiman (*Caiman Latiostris*) in Santa Fe, Argentina, using the RAPD Technique. Journal of Herpetology, Vol. ۴۱, No. ۲, pp.۲۹۴-۳۰۰.
- ۱۱- **Janke, A., Erpenbeck, D., Malin Nilsson and Ulfur Arnason, ۲۰۰۰.** The Mitochondrial Genomes of the Iguana (*Iguana iguana*) and the Caiman (*Caiman crocodylus*): Implications for Amniote Phylogeny. Biological Sciences, Vol. ۲۶۸, No. ۱۴۶۷, pp.۶۲۳-۶۳۱.

Study on molecular genetic of *Crocodylus palustris* population in Sistan & Baluchistan province

- **Kataun Foroutan:** Islamic Azad University, Varamin Branch, Iran
- **Siamak Yousefi*:** Islamic Azad University, Varamin Branch, Varamin, Iran
- **Qobad Asgari:** Islamic Azad University, Varamin Branch, Varamin, Iran

Received: October ۲۰۰۹

Accepted: December ۲۰۰۹

Keywords: Mugger, *Crocodylus palustris*, RAPD, Scale, Genetic diversity

Abstract:

For the first time, study on *Crocodylus palustris* population was conducted in Sistan & Baluchistan province of Iran for the first time. Their distribution is being limited to part of Makran in Baluchistan and also part of Yahoukalat region. The *Crocodylus palustris* has a medium or big body with wide snout. In Iran, the population of this animal belongs to small number of them in whole world. Sample was made from ۱۲ crocodiles captive in Dargas region of Chabahar province and after biometric measurement, the samples were provided from scale tissue and then DNA was extracted by kit. RAPD seven primers with ۱۰ Nucleotides sequence was used for RAPD-PCR. All seven primers except primers number ۳ caused polymorphism among samples. Averagely, in per use of these primers, seven locus are present polymorphism. The result was analyzed by PopGene۳۲ software which showed approximately ۵۶% of polymorphism was among samples and genetic species in this population.