

بررسی دو فنوتیپ مختلف سمندر غارزی گرگانی (*Paradactylodon gorganensis*) با استفاده از توالی یابی ناحیه D-loop میتوکندری

- **سیامک یوسفی سیاه‌کلرودی***: گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا
- **صابر خدرزاده**: گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا
- **محمد قدیری ابیانه**: سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج جهاد کشاورزی، تهران، صندوق پستی: ۱۱۱۳-۱۹۳۹۵

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۳

چکیده

سمندر غارزی گرگانی (*Paradactylodon gorganensis*) یکی از گونه‌های در معرض خطر است که یگانه زیستگاه این گونه در غاری در شیرآباد استان گلستان است. به منظور بررسی ژنتیکی دو فنوتیپ مختلف سمندر غارزی گرگانی، پس از نمونه برداری از دو فنوتیپ مختلف و استخراج DNA از بافت شکمی ۱۰ سمندر، از ناحیه D-loop میتوکندری استفاده گردید. پس از تکثیر جایگاه ۵۰۴ جفت‌بازی به وسیله PCR، کلیه نمونه‌ها توالی‌یابی شدند. نتایج این پژوهش حاکی از این بود که کلیه الگوهای توالی‌یابی ناحیه D-loop در بین دو فنوتیپ مورد مطالعه با یکدیگر مشابه بودند که به دلیل عدم مشاهده الگوهای متفاوت می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که جایگاه مورد بررسی در دو فنوتیپ گونه تحت مطالعه دارای یک هاپلوتیپ بوده و ظاهر امر حکایت از عدم تفاوت در جمعیت مذکور و شباهت ژنتیکی دو فنوتیپ مذکور به یکدیگر دارد.

کلمات کلیدی: سمندر غارزی گرگانی، تنوع نوکلئوتیدی، ناحیه D-loop



مقدمه

ایران از نظر تنوع زیستی بسیار غنی است و گونه‌های جانوری و گیاهی متنوعی دارد که شاید بتوان گفت بیش از نیمی از آن‌ها هنوز کشف و شناسایی نشده‌اند. سمندر غارزی گرگانی با نام علمی *Paradactylodon gorganensis* متعلق به خانواده سمندرهای آسیایی یا *Hynobiidae* است که در رده دوزیستان (*Amphibia*) و راسته دوزیستان دم‌دار (*Caudata*) طبقه‌بندی می‌شود (تهرانی، ۱۳۸۶؛ محمدیان، ۱۳۸۲). یگانه زیستگاه این گونه در غاری به نام شیرآباد در استان گلستان واقع در دامنه‌های شمالی رشته کوه‌های البرز شرقی است (Kami, ۲۰۰۴). معمولاً سمندرهای بالغ را می‌توان در انتهای غار روی صخره‌ها و سنگ‌های حاشیه نهری که درون غار جاری است در حال استراحت مشاهده کرد (کمی، ۱۳۷۸؛ بلوچ و کمی، ۱۳۷۳؛ کمی، ۱۳۷۰). این سمندر به‌ندرت در خارج از غار دیده می‌شود و اغلب سمندرهای نابالغ به دلیل طغیان آب رودخانه از غار خارج می‌شوند که در بیش‌تر مواقع به غار برمی‌گردند (Ahmadzadeh و همکاران، ۲۰۱۱). سمندر غارزی گرگانی به‌علت داشتن قلمرو کوچک و زیستگاه خاص که فقط شامل یک غار است به‌شدت در معرض خطر است که عمده جمعیت آن‌ها به‌خاطر بهره‌برداری و یا نابودی شدید زیستگاه یا سایر تخریب‌های زیست‌محیطی کاهش یافته است و در حال حاضر جمعیت بسیار اندکی دارد (تهرانی، ۱۳۸۶). سمندر غارزی گرگانی در فهرست قرمز اتحادیه بین‌المللی حفاظت از طبیعت (IUCN) قرار دارد و از نظر زیستی در وضعیت بحرانی (CR) فهرست‌بندی شده است. هرچند که این گونه نادر تحت حفاظت سازمان محیط زیست است ولی با این حال نیاز به حمایت‌های جدی در سطح ملی و بین‌المللی داشته و هر گونه ایجاد تغییرات ناچیز در زیستگاه، صید یا بی‌توجهی در حفاظت آن منجر به نابودی کامل این گونه می‌شود که به‌طور محتمل در صورت ادامه یافتن عوامل مؤثر در نابودی آن‌ها در آینده در معرض خطر انقراض قرار می‌گیرد (Ahmadzadeh و Kami, ۲۰۰۹؛ Kami, ۲۰۰۴).

Wiens و Pyron (۲۰۱۱)، در یک مقیاس وسیع به بررسی فیلوژنی بیش از ۲۸۰۰ گونه از دوزیستان امروزی پرداختند. آن‌ها با ترکیب داده‌های متعدد به دست آمده از محققین قبلی و تجزیه و تحلیل آن‌ها اقدام به تخمین فیلوژنی ۲۸۷۱ گونه از دوزیستان امروزی کردند. آن‌ها همچنین نتیجه گرفتند که این کار را می‌توان در مورد گونه‌های دیگر نیز انجام داد.

Zhang و همکاران (۲۰۰۶) در تحقیق گسترده‌ای از ژاپن، کره شمالی و جنوبی، شمال چین، مغولستان، افغانستان و ایران نسبت به تعیین توالی ژنوم میتوکندریایی خانواده *Hynobiidae* اقدام و به مطالعه فیلوژنتیکی نمونه‌های جمع‌آوری شده برای تبیین منشأ این خانواده که یکی از قدیمی‌ترین خانواده سمندرهای امروزی به‌شمار می‌آیند، پرداختند. نتایج تحقیقات آن‌ها نشان داد که شرایط جغرافیایی حاکم در مناطق مختلف آب و هوایی باعث ایجاد گونه‌های متنوع تحت فشارهای انتخابی زیست محیطی شده است، به‌طوری‌که گونه‌های ۵-۴ انگشته به‌دست آمده از شمال چین تا مغولستان به جنس *Batrachuperus* تعلق دارند در صورتی که گونه‌های یافت شده در افغانستان و ایران به متعلق به جنس *Paradactylodon* می‌باشند.

Steinfartz و همکاران (۲۰۰۲) با مطالعه فیلوژنی مولکولی سمندر جنس *Neurergus* نشان دادند که این جنس، ۱۸ میلیون سال پیش از یک نیای مشترک که شامل *Euproctus asper* و یک سمندر بزرگ جثه از جنس *Triturus* بود انشعاب یافته است. حدود ۱۱ میلیون سال پیش، جنس *Neurergus* از دو گروه عمده سمندرهای ذکر شده نیز تفکیک شد. انشقاق بعدی، درون گروه *Neurergus* جنوبی (شامل: *N. crocatus*، *N. microspilotus* و *N. kaiseri*) در ۵ میلیون سال پیش اتفاق افتاد. *Neurergus*‌های شمالی نیز حدود ۲ میلیون سال پیش به دو زیر گونه *Neurergus s. barani* و *Neurergus s. strauchii* تفکیک شدند.

Titus و Larson (۱۹۹۶) با مطالعه فیلوژنتیکی سمندرهای زیرخانواده *Desmognathine*، به ارزیابی مجدد تکامل، بوم‌شناسی، تاریخچه زندگی و ریخت‌شناسی آن‌ها پرداختند. نتایج آن‌ها نشان داد که تکامل زیرخانواده *Desmognathine* شامل تحولاتی در جهت اندازه بدن بزرگ‌تر، دوره لاروی طولانی و استفاده بیش‌تر از زیستگاه‌های آبی می‌باشد.

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. در این پژوهش میزان تنوع نوکلئوتیدی موجود در بین دو فنوتیپ مختلف مشاهده شده سمندر غارزی گرگانی (*Paradactylodon gorganensis*) با استفاده از توالی‌یابی ناحیه D-loop میتوکندری بررسی گردید.



مواد و روش‌ها

در این پژوهش، ۱۰ نمونه سمندر غارزی گرگانی با دو فنوتیپ مختلف از راه تله‌گذاری از غار شیرآباد استان گلستان صید گردید (شکل ۱).

سپس نمونه برداری از بافت شکمی سمندر انجام پذیرفت. نمونه بافت‌های به دست آمده به آزمایشگاه ژنتیک منتقل و DNA نمونه‌ها با استفاده از کیت QIAamp® DNA Investigator ساخت شرکت کیاژن استخراج گردید. در این پژوهش، به منظور بررسی تنوع نوکلئوتیدی سمندر غارزی گرگانی ایران، آغازگرهای ناحیه D-loop میتوکندری به کار برده شد (جدول ۱). در این پژوهش، حجم واکنش PCR ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۰۰ نانوگرم DNA، بافر PCR ۱X، ۰/۵

میکرومولار از هر پرایمر، ۲۰۰ میکرومولار dNTP، ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$ ، ۰/۵ واحد آنزیم Taq DNA polymerase و آب مقطر استریل تا رسیدن به حجم بود. پس از بهینه‌سازی شرایط PCR حاکم بر هر جایگاه از لحاظ چرخه‌های حرارتی (جدول ۲)، محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد الکتروفورز گردیدند. پس از رنگ آمیزی با GelRed و حصول اطمینان از خلوص باندها، نمونه‌ها توسط شرکت بایونیر کره جنوبی توالی‌یابی گردیدند و کلیه توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار MEGA 5.0 بررسی شدند.

جدول ۱: آغازگرهای ناحیه D-loop

F	TAACCTGAACCGACATCTGG
R	TGTAGGTCATGTCAAGTATGTCC



شکل ۱: تصاویری از نمونه‌های سمندر جمع‌آوری شده از غار شیرآباد

جدول ۲: دما و زمان چرخه‌های حرارتی PCR

ردیف	مراحل PCR	درجه حرارت (درجه سانتی‌گراد)	زمان
۱	واسرشته‌سازی اولیه	۹۴	۵ دقیقه
۲	واسرشته‌سازی	۹۴	۳۰ ثانیه
۳	اتصال آغازگر	۶۴	۳۵ ثانیه
۴	بسط آغازگر	۷۲	۴۵ ثانیه
۵	تکرار مرحله ۲ الی ۴ (۳۵ مرتبه)	-	-
۶	بسط نهایی آغازگر	۷۲	۵ دقیقه

دستگاه نانودراپ نشان داد که OD نمونه‌های DNA در هر بین ۱/۸-۲ و غلظت آن به طور میانگین در حدود ۲۵۰-۶۰ نانوگرم بر میکرولیتر بود. همچنین ارزیابی‌های کیفی DNA حکایت از

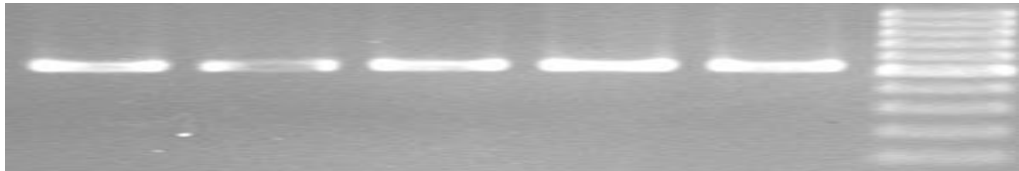
نتایج

ارزیابی‌های کمی و کیفی DNA حاصله با استفاده از

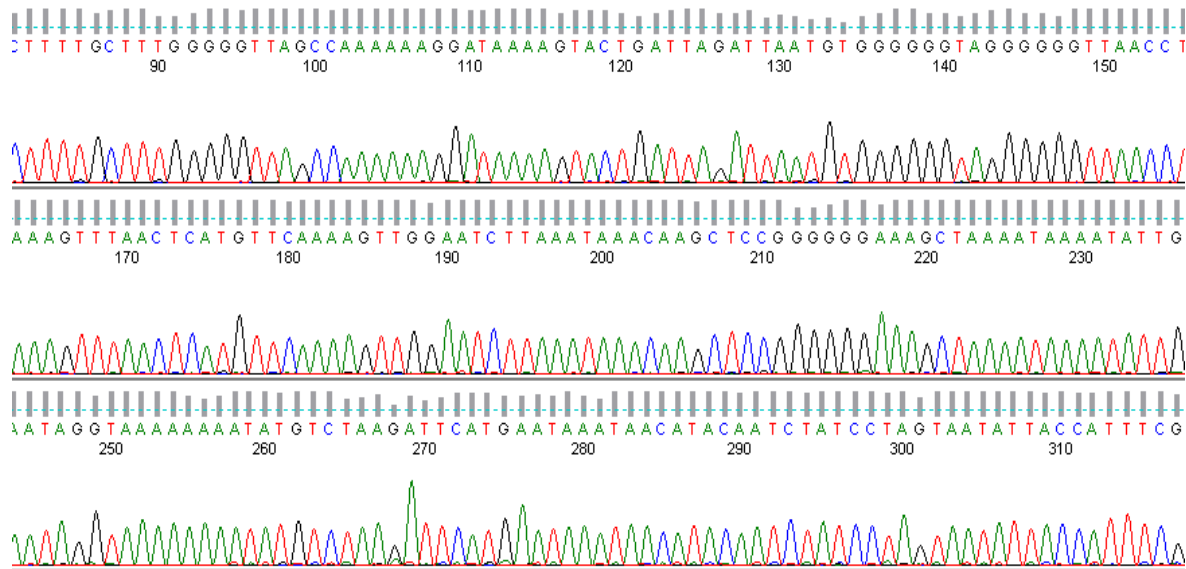


نتایج این پژوهش حاکی از این بود که کلیه الگوهای توالی یابی ناحیه D-loop در بین دو فنوتیپ مورد مطالعه با یکدیگر مشابه بودند (شکل ۴).

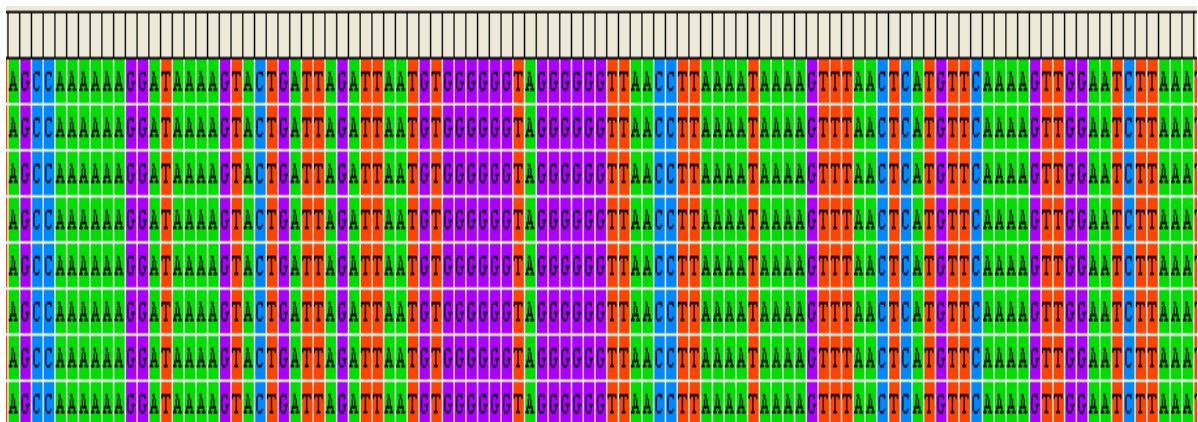
عدم آلودگی پروتئینی نمونه‌ها دارد. هم‌چنین جایگاه مورد مطالعه به خوبی تکثیر گردید که الگوی بانندی مربوط به تکثیر قطعه ۵۰۴ جفت بازی ناحیه D-loop موید اختصاصی بودن آغازگرهای طراحی شده برای آن می‌باشد (شکل ۲) و کلیه نمونه‌ها با قدرت خوانش بالا توالی یابی گردیدند (شکل ۳).



شکل ۲: الگوی بانندی ناحیه D-loop



شکل ۳: الگوی توالی یابی ناحیه D-loop



شکل ۴: الگوی هم‌ترازی نمونه‌ها

بحث

Paradactylodon persicus در طول روز فعال نیستند، در ساعات روشنایی آن‌ها غالباً زیر صخره‌ها در آب یافت می‌شوند و شاید فقط در شب فعال باشند. در حالی که گونه *Paradactylodon gorganensis* در تمام اوقات سال در غار شیرآباد فعالند. تنه در *Paradactylodon persicus* ۱۱-۱۴ شیار دنده‌ای دارد، شیارهای مهره‌ای اغلب دیده می‌شود، اندام‌های جلویی طولی‌تر از اندام عقبی است، نوک انگشتان بالشتک‌های شاخی سیاه داشته و ترتیب انگشتان آن‌ها اغلب $1 > 2 > 3$ است. در حالی که در *Paradactylodon gorganensis* منحصراً ۱۰ شیار دنده‌ای داشته، ناخن یا انتهای کراتینی انگشت، مانند سایر سمندرهای آسیایی ندارند و ترتیب انگشتان آن‌ها $1 > 4 > 3$ است. از سوی دیگر تحقیقات انجام گرفته نشان داد که گونه *Paradactylodon persicus*، احتمالاً در فصل بهار جفت‌گیری نموده و تخم‌های خود را که در دو استوانه ژله‌ای قرار دارند در آب می‌گذارد (Ebrahimi و همکاران، ۲۰۰۴). در حالی که بررسی‌های بافتی انجام شده روی *Paradactylodon gorganensis* نشان داد که در برش‌های بافتی تهیه شده از بیضه‌ها در اردیبهشت، خرداد و تیر اسپرمی دیده نشد و فقط لوبول‌ها توسط اسپرماتوگونی‌ها پر شده بود اما در شهریور گنادها فعال بوده و دستجات اسپرمی در آن‌ها دیده شد (رضاپور و همکاران، ۱۳۸۷).

این در حالی است که بررسی‌های مولکولی نشان از نزدیکی بسیار زیاد این دو گونه به هم دارد. به طوری که Pyron و Wiens (۲۰۱۱)، در مطالعات خود نشان دادند که دو گونه *Paradactylodon persicus* و *Paradactylodon gorganensis* به احتمال بسیار زیاد (۱۰۰ درصد) دارای نیای مشترکی هستند. همچنین Zhang و همکاران (۲۰۰۶) نیز در تحقیقی که انجام دادند نتیجه گرفتند که دو گونه فوق الذکر ممکن است مترادف هم باشند.

در تحقیق اخیر دو فنوتیپ از سمندر *Paradactylodon gorganensis* مورد بررسی قرار گرفتند، این دو فنوتیپ به نام‌های سمندر غارزی گرگانی و سمندر کوهستانی ایران (جویباری) معرفی می‌شوند و هرچند که از نظر ظاهری بسیار به هم شبیه‌اند اما اختلافات رنگی بین آن‌ها (شکل ۱) نویسندگان این مقاله را بر آن داشت تا نشان دهند از نظر ژنتیکی تفاوتی بین دو فنوتیپ وجود ندارد. البته ضرورت انجام تحقیق وسیع‌تر با تعداد نمونه‌های بیش‌تر (در صورت امکان) و منطقه عملیاتی وسیع‌تر که تمام محدوده پراکنش جنس *Paradactylodon* در کشور را شامل شود ضروری به نظر

در حال حاضر بسیاری از گونه‌های مختلف جانوری در معرض تهدید قرار داشته، تخریب و تکه‌تکه شدن زیستگاه‌های اصلی این جانوران، شکار و صید بی‌رویه آن‌ها و خشکسالی‌های متوالی کشور، از جمله عوامل اصلی تهدید آن‌ها به‌شمار می‌آید. اگرچه بسیاری از گونه‌های در معرض خطر تحت حمایت هستند اما متأسفانه ابزار و امکانات کافی برای حفاظت از آن‌ها وجود ندارد. از دیدگاه متخصصین ژنتیک جمعیت، تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها هم‌زمان با یک 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. همان‌طوری که اشاره گردید جایگاه مورد بررسی در گونه تحت مطالعه دارای یک الگو بوده و ظاهر امر حکایت از عدم تفاوت افراد جمعیت سمندر غارزی گرگانی 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 دو فنوتیپ و با توجه به این‌که کریدورهایی در بین این افراد تحت مطالعه وجود دارد، این امر قابل توجیه است. سمندر غارزی گرگانی یکی از گونه‌های ارزشمند کشور است که نتایج این تحقیق حکایت از عدم وجود تنوع ژنتیکی (وجود یک هاپلو تیپ) در این گونه داشته اما حفاظت و مدیریت جمعیت موجود، می‌تواند آن‌را از فرسایش ژنتیکی بیش‌تر و نابودی در زیستگاه‌های موجود حفظ نماید.

یافته‌های اخیر در کشورهای آسیای مرکزی، ایران و افغانستان نشان می‌دهند که جنس *Paradactylodon* غربی‌ترین پراکنش را در کل سمندرهای آسیایی دارند و بقیه بیش‌تر در شرق آسیا متمرکز شده‌اند. از میان خانواده Hynobiidae فقط جنس *Paradactylodon* از ایران گزارش شده است (Zhang و همکاران، ۲۰۰۶). از این جنس، دو گونه *Paradactylodon persicus* و *Paradactylodon gorganensis* معرفی شده‌اند. البته این سوال در این باره وجود دارد که آیا سمندر غارزی گرگانی یک گونه مجزاست یا جمعیتی محلی از سمندر کوهستانی ایران محسوب می‌شود (رضاپور و همکاران، ۱۳۸۷).

بررسی‌های ریخت‌شناسی و زیستی مبین وجود اختلافاتی در این دو گونه می‌باشد. به‌طور مثال، براساس بررسی‌های انجام گرفته توسط Ebrahimi و همکاران (۲۰۰۴)، گونه



- Iranian Journal of Animal Biosystematics (IJAB). Vol. 5, No. 1, pp: 9-15.
9. **Ebrahimi, M.; Kami, H.G. and Stock, M., 2004.** First Description of Egg Sacs and Early Larval Development in Hynobiid Salamanders (Urodela, Hynobiidae, Batrachuperus) from North-Eastern Iran. Asiatic Herpetological Research. Vol.10, pp:168-175.
 10. **Kami, H.G., 2004.** The Biology of the Persian Mountain Salamander, *Batrachuperus persicus* (Amphibia, Caudata, Hynobiidae) in Golestan Province, Iran. Asiatic Herpetological Research. Vol. 10, pp: 182-190.
 11. **Pyron, R.A. and Wiens, J.J., 2011.** A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. Molecular Phylogenetics and Evolution. Vol. 61, pp: 543-583.
 12. **Steinfartz, S.; Hwang, U.W.; Tautz, D.; Öz, M. and Veith, M., 2002.** Molecular phylogeny of the salamandrid genus *Neurergus*: evidence for an intrageneric switch of reproductive biology. Amphibia-Reptilia. Vol. 23, pp: 419-431.
 13. **Tiyus, T.A. and LARSON, A., 1996.** Molecular phylogenetic of Desmognthine salamanders (Caudata: Plethodontidae): A reevaluation of evaluation in ecology, life history and morphology. Syst. Biol. Vol. 45, No. 4, pp: 451-472.
 14. **Zhang, P.; Chen, Y.Q.; Zhou, H.; Liu, Y.F.; Wang, X.L.; Papenfuss, T.J.; Wake, D.B. and Qu, L.H., 2006.** Phylogeny, evolution, and biogeography of Asiatic Salamanders (Hynobiidae). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, No. 19, pp: 7360-7365.
- می‌رسد. از طرف دیگر 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 تولیدمثل، بروز ناهنجاری‌های ژنتیکی و غیره امری محتمل به نظر رسیده و بروز این عوامل مخرب در این گونه که یکی از گونه‌های آسیب‌پذیر و حمایت‌شده 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. بلوچ، م. و کمی، ح.ق.، ۱۳۷۳. دوزیستان ایران. انتشارات دانشگاه تهران. ۱۷۷ صفحه.
 ۲. تهرانی، م.ا.، ۱۳۸۶. بررسی زیستگاه سمندر غاری ایران در استان گلستان. سازمان حفاظت محیط زیست. ۵۸ صفحه.
 ۳. رضایپور، ن.؛ حیدری نصرآبادی، م. و کمی، ح.ق.، ۱۳۸۷. مطالعه بافت شناسی و ریخت‌شناسی دستگاه ادراری تناسلی جنس نر در سمندر *Paradactylodon gorganensis* (دوزیستان دم‌دار، سمندرهای آسیایی). فصلنامه علمی پژوهشی زیست‌شناسی جانوری. سال ۱، شماره ۲، صفحات ۱۵ تا ۲۲.
 ۴. کمی، ح.ق.، ۱۳۷۰. بیوسیستماتیک دوزیستان ترکمن صحرا و دشت گرگان و مروری بر سایر دوزیستان ایران. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد. دانشکده علوم دانشگاه تهران. ۲۰۹ صفحه.
 ۵. کمی، ح.ق.، ۱۳۷۸. گزارشات جدیدی از پراکنش دوزیستان و خزندگان در ایران. برنامه همایش و خلاصه مقالات همایش دیرین‌شناسی و تنوع زیستی. کرمان. سازمان حفاظت محیط زیست. صفحه ۳۳.
 ۶. محمدیان، ح.، ۱۳۸۲. خزندگان و دوزیستان ایران. انتشارات شبیره. ۲۲۶ صفحه.
 7. **Ahmadzadeh, F.; Khanjani, F.; Shadkam, A. and Bhme, W., 2011.** A new record of the Persian Brook Salamander, *Paradactylodon persicus* (Eiselt & Steiner, 1970) (Amphibia: Caudata: Hynobiidae) in northern Iran. Bonn zoological Bulletin. Vol. 60, No. 1, pp: 63-65.
 8. **Ahmadzadeh, F. and Kami, H.G., 2009.** Distribution and conservation status of the Persian Brook Salamander, *Batrachuperus (Paradactylodon) persicus* (Amphibia: Caudata: Hynobiidae) in north-western Iran.

