



بررسی تنوع ژنتیکی گاندو، کروکودیل پوزه کوتاه ایرانی (*Crocodylus Palustris*)، با استفاده از توالی یابی نواحی D-Loop و Cyt b میتوکندری

احمد افشاریان^۱، محمدرضا نصیری^{۲*}، اسماعیل ابراهیمی^۳، علی جوادمش^۴

^۱ دانشجوی مقطع دکتری، گروه علوم دامی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

^۲ استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

^۳ دانشیار، گروه بیومدیکال مولکولی، دانشگاه آدلاید استرالیا.

^۴ استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۵/۱۹، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۷/۱۴

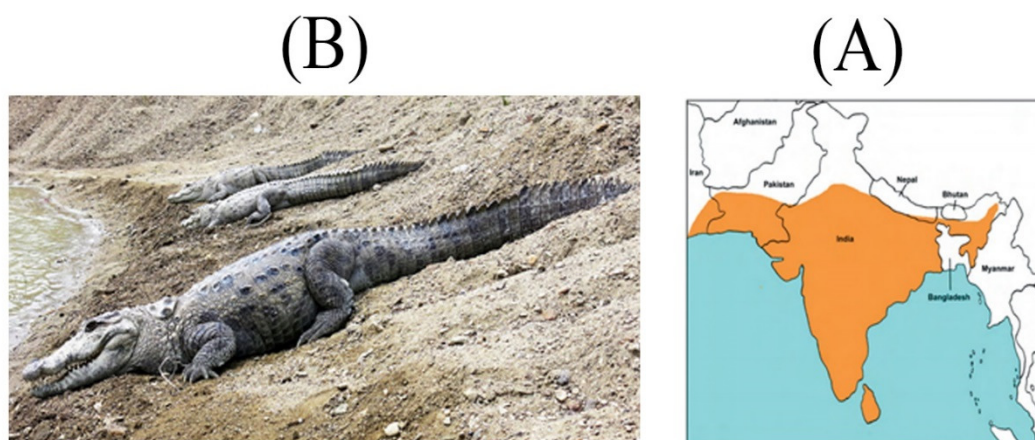
چکیده

شناسایی ویژگی‌های ژنتیکی تمساح پوزه کوتاه ایرانی (گاندو)، در برنامه‌ریزی مدیریتی به منظور حفاظت و نگهداری آن نقش بسیار مهمی دارد، لذا این پژوهش با هدف، بررسی ژنتیکی کروکودیل پوزه کوتاه ایران بر اساس مطالعه جمعیتی نواحی ثابت و متغیر ژنوم میتوکندری انجام گردید. بدین منظور، ۱۲ نمونه بافت پوست و خون از سه منطقه مختلف شهرستان چابهار جمع‌آوری و پس از استخراج DNA، نواحی ثابت و متغیر ژنوم میتوکندری Cyt b و D-loop با استفاده از روش PCR تکثیر گردید. محصولات PCR توالی یابی و سپس آنالیز نتایج با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیک و مبتنی بر داده‌های نوکلئوتیدی و کدون‌های پروتئینی انجام گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که تمامی نمونه‌های مورد مطالعه، دارای توالی نوکلئوتیدی یکسان هستند و هیچ تنوع ژنتیکی در بین این نمونه‌ها یافت نشد. نزدیکترین گونه به گاندو، گونه *Crocodylus palustris* و سپس گونه *C. porosus* بدست آمد. مقایسه توالی‌ها نشان دهنده وجود ۱۲ جایگاه پلی‌مورفیک در بین ۱۱۵۶ جایگاه مورد مطالعه بود و ۵ هاپلوگروپ معرفی گردید. لذا، با توجه به عدم مشاهده تنوع ژنتیکی در بین نمونه‌های مورد مطالعه، استفاده از برنامه‌های حفاظتی جهت افزایش تنوع ژنتیکی در گاندو امری بسیار ضروری به نظر می‌رسد.

کلمات کلیدی: تمساح گاندو، تنوع ژنتیکی، درخت فیلوژنتیک، ژنوم میتوکندری.

تمام اعضای جنس کروکودیلوس (*Crocodylus*) است و بنابراین بیشترین شباهت ظاهری را به آلیگاتورها دارد (Da Silva & Lenin, 2010). اگرچه گونه *C. palustris* ساکن مردابها می‌باشند، اما بررسی‌ها نشان داده که این گونه بیشتر ساکن رودخانه‌ها، دریاچه‌ها و برکه‌ها بوده و به خوبی توانسته در برکه‌های مصنوعی و دست ساز، کانالهای آبیاری، دریاچه پشت سد، برکه‌های طبیعی نواحی هند، پاکستان، سریلانکا و ایران سازگار شود (Whitaker & Andrews 2003; Da Silva & Lenin, 2010).

جنس کروکودیل شامل تعداد زیادی از گونه‌های کروکودیل می‌باشد که ساکن مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری نواحی آسیا، استرالیا، آفریقا و نیوزلند می‌باشد (Brochu, 2003; McAliley et al, 2006). کروکودیل مردابی یا پوزه کوتاه (گاندو) با نام علمی *Crocodylus palustris* اندازه متوسط از جنس کروکودیل است (بیشترین طول قد ۴-۵ متر) که از ایران به سمت شرق تا آسام هند و به جنوب تا سریلانکا پراکنش دارد و حوزه پراکنش آن در ایران غربی ترین نقطه پراکنش جهانی این گونه به حساب می‌آید (شکل ۱). کروکودیل مردابی دارای پهن ترین پوزه در بین



شکل ۱- A: پراکنش کروکودیل گونه *C. palustris* براساس مطالعه (Whitaker and Andrews 2003). B: گاندو در ایستگاه تحقیقات زیست-محیطی ریکوکش چابهار، ایران.

Figure 1- A: Distribution of *C. palustris* crocodile according to Whitaker and Andrews Study (2003). B: Gando in the Environmental Research Station of Rikukash, Chabahar, Iran.

بررسی امکان انشقاق گونه‌های مختلف از یک جد مشترک، مطالعه رابطه فیلوژنی هر موجود با سایر گونه‌ها و نژادها و دستیابی به راهکارهایی برای حفظ ذخایر ژنتیکی گونه‌های مختلف کروکودیل، در کشورهای مختلف جهان انجام شده است (Brochu, 2000; Brochu *et al.*, 2010; Brochu) and Densmore, 2001; Gatesy *et al.*, McAilley *et al.*, 2006; Willis *et al.*, 2004; 2007; Gatesy and Amato, 2008; Meganathan *et al.*, 2010). این مطالعات به برنامه ریزی صحیح جهت حفظ بقای این گونه که در طبقه بندی کتاب سرخ اتحادیه جهانی حفاظت (IUCN) در طبقه آسیب پذیر قرار گرفته است، کمک شایانی می‌نماید (Da Silva & Lenin, 2010). امروزه استفاده از روش‌های مولکولی مبتنی بر DNA در مطالعات تنوع و ساختار جمعیت‌های کروکودیل در اولویت قرار گرفته است. در این بین توالی‌یابی ژن‌های میتوکندری یکی از کاربردی‌ترین روش‌ها برای تعیین رابط فیلوژنتیکی بین جمعیت‌ها و گونه‌های نزدیک به هم محسوب می‌شود (Bruford *et al.*, 2003; Dolati *et al.*, 2016). همچنین DNA میتوکندری نشانگر بسیار مناسبی برای تشخیص بین گونه‌ای گروه‌هایی است که برای ۱۰۰ تا ۱۰۰۰۰ سال از هم جدا بوده‌اند و نیز به دلیل سرعت بالای تکامل DNA میتوکندری در مقایسه با DNA هسته‌ای

اطلاع از ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها می‌تواند کمک بزرگی برای برنامه ریزی برای طرح‌های اصلاح نژادی و از همه مهمتر، حفظ ذخایر ژنتیکی باشد. روش‌های مولکولی و استفاده از نشانگرهای مولکولی در این زمینه یکی از بهترین گزینه‌ها به حساب می‌آید، زیرا با توجه به اطلاعات زیادی که به دست می‌دهد می‌تواند نتایجی که از تجزیه و تحلیل رکوردها با روش‌های آماری به دست آمده است را تأیید و تکمیل نموده و حتی ممکن است که آنها را رد کند (Naderi *et al.*, 2007). به علاوه، استفاده از ژنتیک مولکولی فواید زیادی دارد که یکی از این فواید معنی دار تعیین ژنوتیپ افراد برای جایگاه خاصی است (Mousavizadeh *et al.*, 2009) همچنین استفاده از نشانگرهای ژنتیکی در انتخاب و اصلاح نژاد حیوانات ممکن است به طور مهیجی پیشرفت ژنتیکی را تسریع کند (Javanmard *et al.*, 2008) و مطالعه تنوع ژنتیکی نژادهای بومی برای حفاظت از منابع ژنتیکی ذخایر بومی لازم و ضروری است (Mohammadi *et al.*, 2009). حفاظت باید بر اساس دانش عمیقی از منابع ژنتیکی نژادهای خاص باشد، لذا تلاش برای شناسایی و تعیین خصوصیات ژنتیکی نژادهای بومی و محلی بسیار اهمیت دارد (Zamani *et al.*, 2013). مطالعات متنوعی با هدف طبقه بندی ژنتیکی جمعیت‌ها و گونه‌های نزدیک به هم،

ثابت و متغیر ژنوم میتوکندری که در معرض خطر انقراض می باشد، گزارش می شود.

مواد و روش ها

با هماهنگی و همکاری اداره محیط زیست منطقه چابهار (مختصات: $25^{\circ} 17' 31'' N$, $60^{\circ} 38' 35'' E$)، ۱۲ نمونه بافت از بخش های سطحی پوست و خون از کروکودیل پوزه کوتاه ایرانی، از ۴ منطقه این شهرستان جمع آوری و در داخل اتانول مطلق نگهداری شد. از آنجا که نمونه های بافت، دارای بافتی به شدت متراکم و دیر هضم بودند، مقدار ۰/۱ گرم از هر نمونه با استفاده از تیغ اسکاپل جدا شده و سپس با استفاده از نیتروژن مایع هموزن گردید. سپس استخراج DNA با انجام تغییراتی در کیت GeneJET # K0721 شرکت Genomic DNA Purification Kit Thermo انجام شد. این تغییرات شامل افزایش مدت زمان هضم بافت با استفاده از پروتئیناز K به مدت ۱۶ ساعت بود. مابقی مراحل با توجه به دستورالعمل کیت صورت گرفت. یک ناحیه متغیر و یک ناحیه حفاظت شده از میتوکندری به منظور بررسی پارامترهای ژنتیکی جمعیت مورد بررسی مورد مطالعه قرار گرفت. ناحیه مد نظر برای بخش ثابت کل ناحیه Cyt b و ناحیه مورد نظر برای بخش متغیر، ناحیه ای از منطقه کنترل ژنوم میتوکندری حاوی بخش D-Loop (Displacement Loop) بود. بدین منظور توالی میتوکندریایی مربوط به

باعث شده که از آن برای مطالعات تکاملی استفاده گردد (Nassiri *et al.*, 2010). DNA میتوکندریایی (DNA میتوکندری) در تشخیص گونه ها و ترسیم روابط فیلوژنتیکی دارای مزایایی از جمله تعداد زیادی نسخه به ازای هر سلول، اندازه کوچکتر آن از DNA ژنومی، وراثت پذیری مادری، هاپلوئید بودن، عدم وجود نوترکیبی در آن ها، وجود نواحی حفاظت شده و وجود نواحی حفاظت نشده ای مانند ناحیه D-Loop برای مطالعات تکاملی گونه های وابسته می باشد (Bellagamba *et al.*, 2001). شناسایی توالی ژن های میتوکندری به عنوان مشخصه ژنتیکی ثابت محسوب می شود و به تهیه شناسنامه ژنتیکی، میزان تنوع موجود در جمعیت، امکان تشخیص گونه ها و نژادها، نگهداری خلوص نژادهای بومی و به حفظ گونه های بومی از خطر انقراض و اختلاط ژنتیکی با سایر نژادها کمک می کند (Janke *et al.*, 2005; Roos *et al.*, 2007, 2010; Feng *et al.*, 2010; Meganathan *et al.*, 2010). بنابراین مطالعه ژنتیکی و فیلوژنتیکی کروکودیل پوزه کوتاه استان سیستان و بلوچستان به منظور دستیابی به اطلاعاتی از قبیل تنوع گونه ها و زیرگونه ها، اطلاعات در مورد منشأ اهلی شدن مبنای انجام این پژوهش قرار گرفت. در این پژوهش برای اولین بار در ایران، کروکودیل پوزه کوتاه ایران در منطقه چابهار از دیدگاه ژنتیکی، محاسبه پارامترهای ژنتیکی و تعیین نقشه میتوکندریایی آن بر اساس مطالعه جمعیتی نواحی

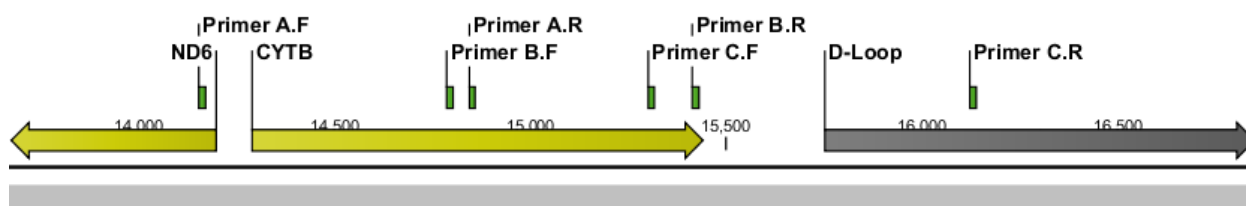
نیز دریافت شدند تا بر اساس نواحی حفاظت شده بین گونه ای طراحی پرایمر صورت بگیرد (جدول ۱) (شکل ۲). طراحی پرایمر بوسیله برنامه Primer Premier v.5 (Lalitha, 2000) صورت پذیرفت (جدول ۲).

میتوکندری گونه *Crocodylus palustris* از بانک ژنی (Benson *et al.*, 2013) دریافت شد (Accession Number: HM488007). همچنین به منظور افزایش ضریب دقت توالی مربوط به گونه های دیگر کروکودیل متعلق به جنس *Crocodylus*

جدول ۱- گونه های کروکودیل مورد مطالعه در طراحی پرایمر.

Table 1- Crocodile species that used to design primer pair.

Species	گونه	accession number	شماره دسترسی
	کروکودیلوس آکیتس	JF502241	
Crocodylus acutus			
	کروکودیلوس ایترمدیس	JF502242	
Crocodylus intermedius			
	کروکودیلوس جانسونی	HM488008	
Crocodylus johnsoni			
	کروکودیلوس مورلتی	HQ585889	
Crocodylus moreletii			
	کروکودیلوس تایلوتیکس	AJ810452	
Crocodylus niloticus			
	کروکودیلوس نواینی	JF502240	
Crocodylus novaeguineae			
	کروکودیلوس پالستوریس	HM488007, FJ173278, FJ173279, FJ173280, FJ173281, FJ173282, FJ173283, FJ173284, FJ173285, FJ173286, FJ173276, FJ173277,	
Crocodylus palustris			
	کروکودیلوس پایروسس	AJ810453	
Crocodylus porosus			
	کروکودیلوس رومبایفر	JF502247	
Crocodylus rhombifer			
	کروکودیلوس سایمنسس	DQ353946	
Crocodylus siamensis			



شکل ۲- تصویر شماتیک منطقه طراحی پرایمر برای تکثیر ناحیه Cyt b و بخشی از ناحیه کنترل میتوکندری کروکودیلوس پالوستریس.

Figure 2- Schematic showing the primer design of Cyt b and D-loop region of *C. palustris*.

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای استفاده شده برای تکثیر ناحیه Cytb و بخشی از D-loop میتوکندری کروکودیلوس پالوستریس.

Table 2- The primer characteristics used for amplifications of Cyt b and D-loop regions of *C. palustris* mitochondria.

نام پرایمر Primer Name	توالی Sequence	طول (جفت باز) Length (bp)	ΔG [- kcal/mol]	محتوای گوانین - سیتوزین GC Content	دمای ذوب Melting Temperature	اندازه محصول (جفت باز) Product Size (bp)
A.F	CCACACTAATTATCATTAAGCA	22	36	32	52	710
A.R	CTGTGAGGATAAACGGGAG	19	35	52		
B.F	AGGAGGACCATCCGTCAACAG	21	40	57	61	649
B.R	CCGAAGGGGTTTGAATAGTGTG	22	42	50		
C.F	GAATCGGAGGACAGCCAGTA	20	38	55	58	846
C.R	CGGGTAGTGGATGAGATCTCC	21	39	57		

(Consensus) بدست آمده بر اساس معیار اکثریت، با استفاده از نرم افزار (Swindell & Plasterer, 1997) SEQMAN تعیین و این توالی توسط ابزار BankIt (Sayers *et al.*, 2011) پایگاه اطلاعاتی NCBI (Sayers *et al.*, 2011) ثبت گردید. بررسی تنوع ژنتیکی در سطح نوکلئوتیدی به کمک ابزار آنالین (DIVEIN) (Deng *et al.*, 2010) و Arlequin suite ver 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010) صورت پذیرفت. به منظور مقایسه داده‌های این مطالعه با دیگر مطالعات از توالی‌های مرجع ثبت شده در بانک داده NCBI موسوم به توالی‌های مرجع استفاده شد (Pruitt *et al.*, 2007). بدین منظور توالی مایتوزنومیکس ۱۳ گونه مربوط به جنس کروکودیل و همچنین توالی‌های مربوط به جنس Osteolaemus دریافت شد. همچنین از دو زیرخانواده Alligatorinae و Gavialinae نیز به عنوان کلاسترهای خواهری استفاده شد. هم‌ردیف سازی در سطح نوکلئوتیدی به کمک الگوریتم Clustal نسخه ۲ (Larkin *et al.*, 2007) صورت گرفت. رسم درخت فیلوژنتیکی به کمک روش‌های مختلف بنا به شرایط، شامل اتصال نزدیک^۱ (Saitou & Nei., 1987)، امساک حداکثر^۲ (Farris, 1970; Fitch, 1971)، روش حداکثر درست نمایی (Felsenstein, 1981) و استنباط بیزی بهبود یافته به کمک زنجیره مارکوف مونت

واکنش زنجیره ای پلیمرز توسط دستگاه ترموسایکلر Biometra مدل T personal در ۳۵ چرخه حرارتی و با حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر انجام شد. از کیت مسترمیکس PCR شرکت آپلیکون (دانمارک) با غلظت MgCl₂، ۱/۵ میلی مولار جهت تکثیر قطعات هدف استفاده گردید. به منظور تایید تکثیر ناحیه مورد نظر، طی واکنش PCR الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با رنگ آمیزی GelRed صورت گرفت. سپس ۵۰ میکرولیتر از محصول PCR با استفاده از کیت GeneJET PCR Purification Kit شرکت Thermo (امریکا) خالص سازی شد و به همراه ۵۰ میکرولیتر از آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ پیکومول به منظور توالی یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال گردید. این نمونه‌ها با استفاده از دستگاه ABI 3130 به روش اتوماتیک سانگر توالی یابی شدند. داده‌های حاصل از توالی یابی ژنوم میتوکندریایی کروکودیل پوزه کوتاه پس از دریافت به منظور تصحیح خطاهای توالی یابی مورد بازبینی قرار گرفتند. بررسی اولیه توالی‌های بدست آمده با استفاده از برنامه Chromas Lite (Mccarthy, 2005) 2.01 انجام شد. جهت تعیین بالاترین همولوژی کروکودیل پوزه کوتاه از رویه بلاست نوکلئوتیدی تحت پایگاه NCBI (Sayers *et al.*, 2011) استفاده شد. توالی مورد توافق

² Maximum Parsimony

¹ Neighbor Joining

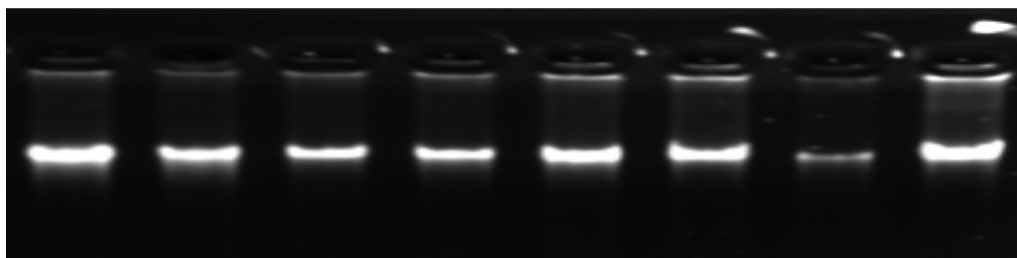
استخراج DNA و حداقل آسیب وارده به آن طی فرایند آماده سازی و استخراج می باشد (شکل ۳). فرآیند تکثیر قطعات مربوط به ناحیه Cyt b و ناحیه کنترل با موفقیت انجام گرفت. کیفیت قطعات تکثیر شده به کمک ژل آگارز ۱/۵ مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به طول ژن Cyt b، دو محصول PCR با اندازه‌های ۷۱۰ و ۶۴۹ جفت باز (شکل ۴A و ۴B) و برای بخش D-loop، محصول PCR به اندازه ۸۴۲ جفت باز تکثیر شد (شکل ۴C).

توالی‌های حاصله از ۱۲ نمونه از لحاظ کیفیت توالی‌یابی برای هر باز توسط نرم افزار Chromas Lite 2.01 و الگوریتم PHRED (Ewing *et al.*, 1998) مورد آنالیز قرار گرفته و کیفیت توالی‌یابی برای هر باز مشخص شد. توالی‌هایی با کیفیت پایین بر اساس انتخاب بلندترین ناحیه با آستانه میانگین خطای کمتر از ۰/۱ درصد، از دو انتهای قطعات حذف شدند. در نتیجه توالی‌هایی با طول کوتاه‌تر از مقدار مورد انتظار برای نمونه‌ها حاصل شد.

کارلو (Yang & Rannala, 1997) بود. ابزار مورد نظر در آنالیز اتصال نزدیک و امساک حداکثر برنامه تجاری PAUP نسخه ۴ (Swofford, 2003) و برای دو آنالیز حداکثر درست نمایی و آنالیز بیزی به ترتیب RAxML (Stamatakis, 2006) و PhyloBayes MPI (Lartillot *et al.*, 2013) انجام گرفت. به منظور ارزیابی و دستیابی به پارامترهای بهینه، روش بوت استرپ (Stamatakis *et al.*, 2008) و (Felsenstein, 1985) 100 چندگانه مکرر انجام شد. همچنین از شاخص‌های امتیاز حداکثر درست نمایی مقیاس شده و شاخص پایداری مقیاس شده (RC) (Farris, 1989) نیز استفاده شد. فاصله ژنتیکی بر اساس توالی نوکلئوتیدی و همچنین توالی کدکننده پروتئینی مربوطه در ناحیه Cyt b انجام پذیرفت. روش مورد استفاده روش Maximum Composite Likelihood بود و در محاسبه فاصله ژنتیکی، سه جایگاه هر کدون، به شکل مشترک مد نظر قرار گرفت.

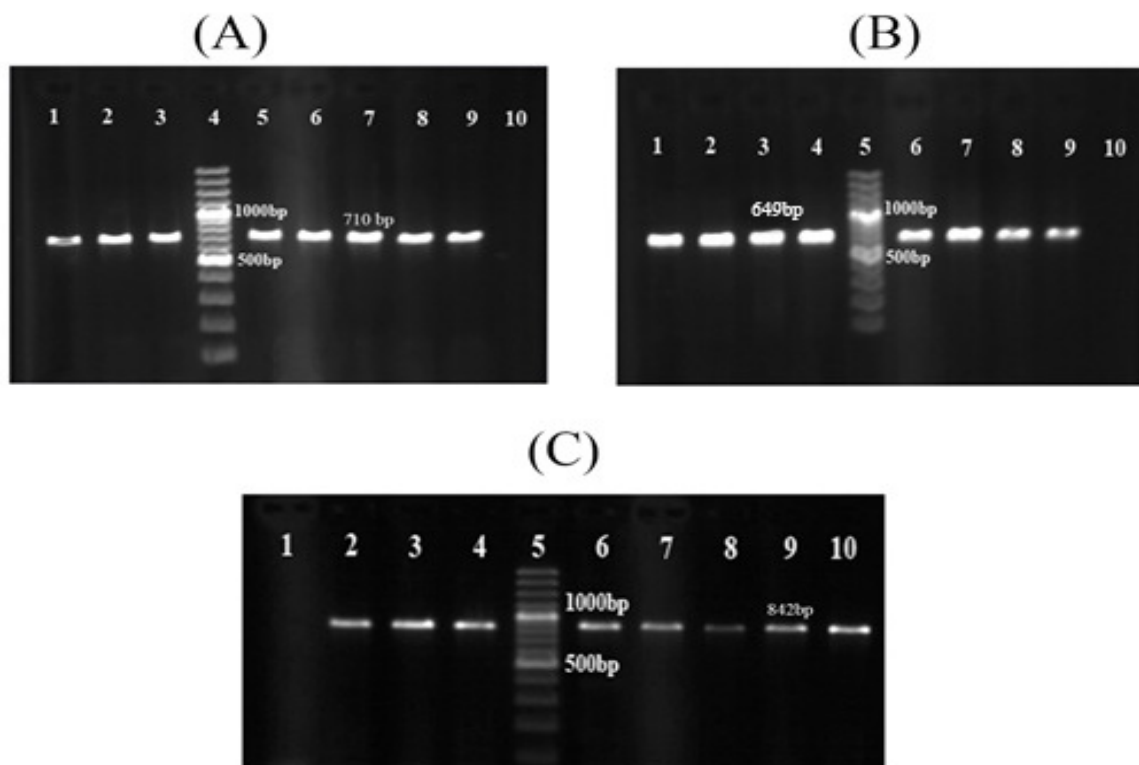
نتایج و بحث

استخراج DNA از بافت در تمامی نمونه‌ها با موفقیت انجام شد. DNAهای استخراج شده فاقد شکستگی می‌باشند که نشان دهنده کیفیت مناسب



شکل ۳- نتایج استخراج DNA بر روی ژل آگارز.

Figure 3- Extracted DNA results on agarose gel.

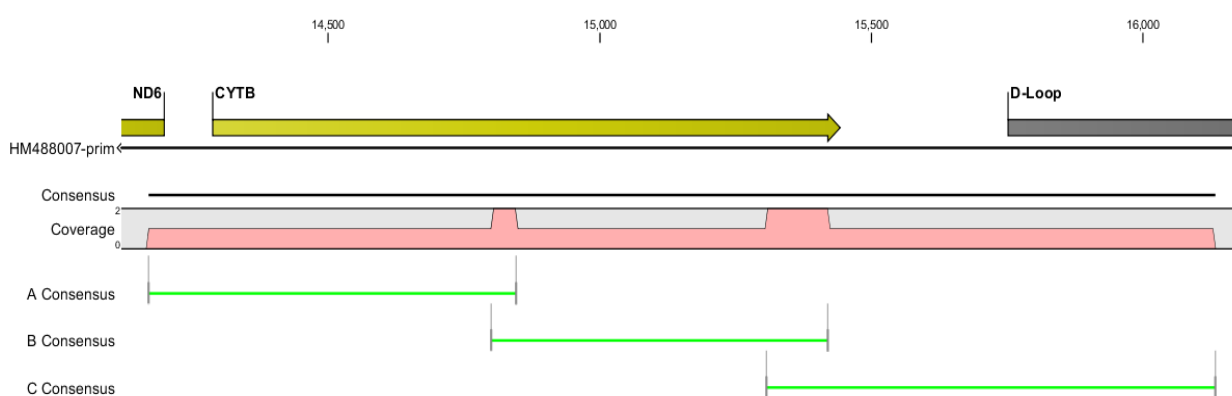


شکل ۴- نتایج تکثیر قطعات Cyt b و D-loop روی ژل آگارز. A: قطعه ۷۱۰ جفت بازی Cyt b، B: قطعه ۶۴۹ جفت بازی Cyt b، C: قطعه ۸۴۲ جفت بازی D-loop. چاهک های خالی نشان دهنده کنترل منفی و مارکر استفاده شده ۱۰۰+ شرکت Thermo می باشد.

Figure 4- Agarose gel electrophoresis of PCR products of Cyt b and D-loop region. A: 710 bp fragments of Cyt b PCR products, B: 649 bp fragments of Cyt b PCR products, C: 842 bp fragments of D-loop PCR products. Empty wells are negative PCR control and 100+ Marker (Thermo, USA) was used in all of gel electrophoresis.

نظر گرفته شده بود، با حذف توالی‌های نامرغوب از دو انتهای توالی‌ها یکپارچگی قطعات مورد مطالعه کاملاً حفظ شده بود و در نتیجه یک قطعه به طول ۱۹۶۲ باز از ژنوم میتوکندری بدست آمد که شامل کل ناحیه Cyt b و بخشی از ناحیه کنترل می‌باشد (شکل ۵).

به طور میانگین بیش از ۹۷ درصد نوکلئوتیدهای این توالی‌ها صحت توالی‌یابی معادل ۹۹ درصد را نشان دادند که نشان دهنده ضریب اطمینان بالا در نتیجه گیری بر اساس توالی‌های بدست آمده می‌باشد. از آنجایی که در طراحی پرایمرها نواحی همپوشان بین قطعات در



شکل ۵- توالی‌های بدست آمده بعد از پردازش دارای همپوشانی کافی به منظور یکپارچه سازی می‌باشند.

Figure 5- Sequences obtained after processing, had sufficient overlap in order to assemble the consensus.

بخش از ژنوم میتوکندری فاقد تنوع ژنتیکی می‌باشد. این پدیده می‌تواند نشان دهنده شدت بالای همخونی و روابط شدید خانوادگی در جمعیت کروکودیل پوزه کوتاه مورد مطالعه باشد و به طور 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 مواجهه با

توالی‌های به دست آمده با نرم افزار DIVEIN و Arlequin suite v.3.5 بررسی شدند. این ابزار تعداد جهش مشاهده شده، جایگاه‌های پلی مورفیک، سطح تنوع نوکلئوتیدی و ساختار و تنوع هاپلوتایپی را در جمعیت مورد مطالعه مشخص می‌نماید. نتایج نشان داد که در هر سه ناحیه مورد بررسی بین ۱۲ نمونه مورد مطالعه هیچ اختلاف نوکلئوتیدی وجود ندارد و جمعیت در این

نوترکیبی قرار نمی‌گیرد (زیرا هاپلوئید است)، تنوع خود را تنها مدیون انتخاب طبیعی است و در نتیجه تنوع ژنتیکی آن وابسته به اندازه جمعیت نیست. همچنین انتخاب شدیدی بر ضد جهش‌های مضر ژنوم میتوکندری در لایه زاینده جنس ماده صورت می‌گیرد که منجر به همگن شدن بیشتر سطح تنوع آن می‌گردد (انتخاب پس زمینه ای) (Stewart *et al.*, 2008). با این حال چندین مطالعه در سالهای اخیر DNA میتوکندریایی به عنوان مارکر اندازه جمعیت را زیر سوال برده‌اند (Ballard & Whitlock, 2004; Hurst & Jiggins, 2005; Bazin *et al.*, 2006). مهمترین این مطالعات شواهدی مبنی بر اینکه تنوع ژنتیکی در DNA میتوکندریایی با اندازه جمعیت همبستگی ندارد را ارائه می‌دهد (Bazin *et al.*, 2006). این نتایج با مطالعه و مقایسه گروه‌های تاکسونومیک بزرگ جانوری بدست آمده است. به عنوان مثال، سطح پلی مورفیسم بین مهره داران و بی مهرگان مشابه یکدیگر بوده‌اند، در حالیکه بی مهره گان اندازه جمعیت بسیار بزرگتری در طبیعت دارند.

نتایج بررسی فیلوژنتیکی بر اساس توالی کامل Cyt b کروکودیل پوزه کوتاه ایران با دیگر اعضای خانواده کروکودیلینه (taxid:8493) نمایش داده شده است (شکل ۶). این مقایسه با استفاده از توالی‌های ژنوم مرجع هر گونه انجام شده است. به طور کلی ۱۱۴۹ جایگاه و ۱۲ گونه مختلف خانواده کروکودیلینه در این بررسی مورد

شرایط خاص مانند تغییرات اقلیمی و یا پیدایش بیماری‌های خاص قرار می‌دهد. تنوع ژنتیکی درون جمعیتی از دو لحاظ برای بقای بلند مدت جمعیت‌ها مهم می‌باشد. اول اینکه تنوع فنوتیپی وابسته به ژنوتیپ که تعیین کننده میزان سازگاری یک جمعیت می‌باشد محصول تنوع ژنتیکی است (Bell & Collins; Blows & Hoffmann, 2005; Hoffmann & Sgrò, 2011). ثانياً تنوع ژنتیکی خنثی (Neutral Genetic Diversity) در یک جمعیت طبیعی انعکاس دهنده هم‌خونی و رانش ژنتیکی است که هر دو مورد از عوامل مشخص کاهش توان بقای جمعیت‌ها هستند (Reed & Frankham 2003; Puurtinen *et al.*, 2006; O'grady *et al.*, 2004). با این وجود نمی‌توان انتظار داشت که تنوع ژنتیکی خنثی مستقیماً مترادف با تنوع در هر ویژگی فنوتیپیک خاصی باشد (Reed & Frankham, 2001)، اما بخاطر ارتباط آن با اندازه جمعیت موثر می‌تواند انعکاس دهنده پتانسیل سازگاری جمعیت‌ها در بلند مدت باشد (Frankham, 2005; Willi *et al.*, 2014; Lanfear *et al.*, 2006). 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 ژنوم باشد) با افزایش خطر انقراض جمعیت‌های طبیعی مرتبط است. DNA میتوکندریایی چون تحت تاثیر

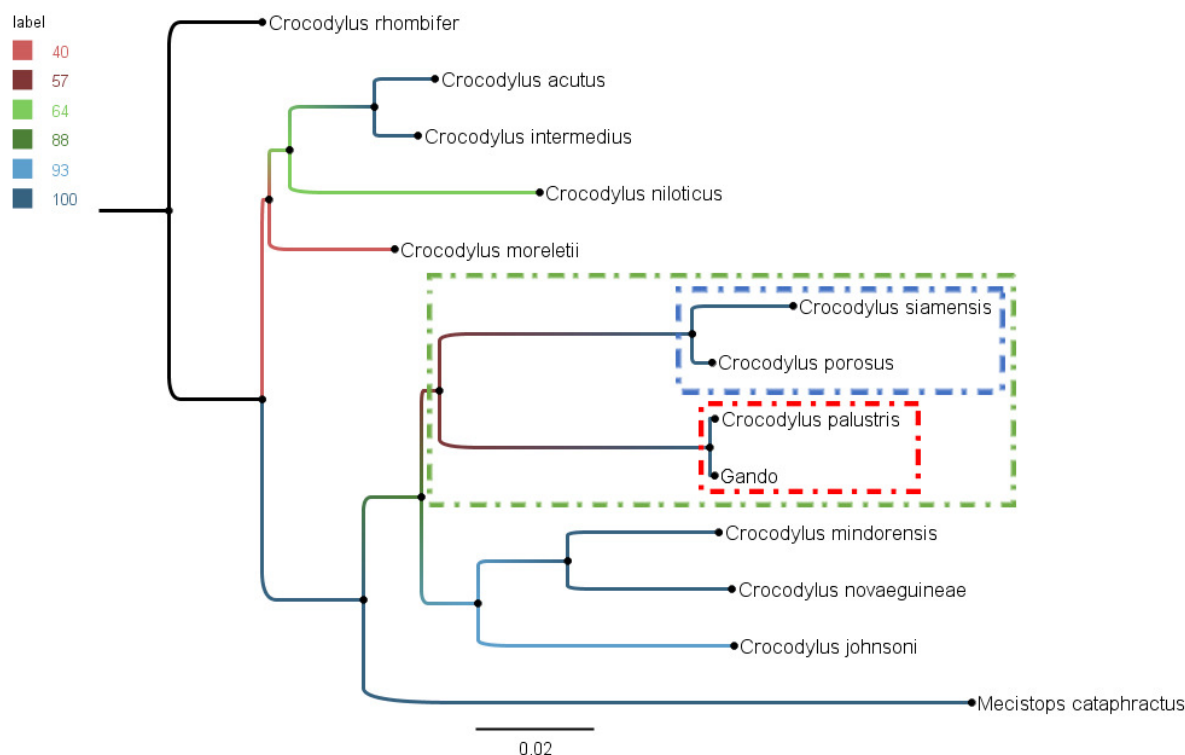
پس از ماگر نزدیکترین گونه به گاندو *Crocodylus porosus* یا کروکودیل آب شور می‌باشد. این در حالی می‌باشد که این کروکودیل از لحاظ مورفولوژیکی تفاوت‌های زیادی با گاندو دارد. به عنوان مثال کروکودیل آب شور بزرگترین خزنده دنیا محسوب می‌شود و طول جنس نر آن به حدود ۶/۳ بالغ می‌شود در حالیکه جنس نر گاندو حدود ۴ الی ۵ متر رشد می‌کند. این کروکودیل عمدتاً در سواحل شرقی هند زندگی می‌کند و در نواحی دیگر هند به ندرت یافت می‌شود (Devos, 1984). تشابه بین این دو گونه ریشه در تاریخ تکامل آن دو دارد و اگر به خاستگاه هر دو گونه توجه شود، به کشور هند خواهیم رسید.

در حال حاضر ماگر و کروکودیل آب شور دو گونه از سه گونه کروکودیل می‌باشد که در هند زندگی می‌کنند. مطالعات متعدد دیگری نیز وجود دارند که خویشاوندی بین این دو گونه را مورد تایید قرار می‌دهند. با توجه به اینکه کروکودیل آب شور و کروکودیل سیامنیس تشکیل یک کلاستر خواهری را می‌دهند. این کلاستر در ادامه با عنوان کلاستر پروسوس و کلاستر خواهری گاندو به عنوان یک کلاد گاندو معرفی می‌شوند (شکل ۶).

استفاده قرار گرفته است و نتایج بدست آمده مبتنی بر داده‌های نوکلئوتیدی و کدون‌های پروتئینی به طور مشترک می‌باشد.

درخت فیلوژنتیکی بدست آمده براساس فاصله ژنتیکی و به کمک روش حداکثر درست‌نمایی ترکیبی بدست آمده است (شکل ۷). برای محاسبه این مقادیر علاوه بر داده‌های نوکلئوتیدی از داده‌های پروتئینی و نرخ جهش در سه جایگاه کدون پروتئینی استفاده شده است. در نتیجه علاوه بر مدل تکاملی خنثی، مدل تکامل انطباقی نیز در محاسبات مد نظر قرار گرفته است. معیار فاصله ژنتیکی تعداد جایگزینی‌های نوکلئوتید در هر جایگاه بین توالی‌ها می‌باشد.

همانطور که در شکل ۷ مشاهده می‌شود، نزدیکترین گونه به گاندو *Crocodylus palustris* یا ماگر است که مطابق با یافته‌های مورفولوژیکی می‌باشد که قبلاً ارائه شده است. این نکته بدین مفهوم است که جایگاه رده بندی کروکودیل پوزه کوتاه به عنوان گونه *palustris* از دیدگاه ژنتیک مولکولی قابل تایید است. از کلاستر خواهری بین این دو در ادامه با عنوان کلاستر گاندو یاد خواهیم کرد (شکل ۶).



شکل ۶- درخت فیلوژنتیک بین گونه های مختلف خانواده کروکودیل و جایگاه گاندو در این خانواده. طول شاخه ها مبین فاصله ژنتیکی و رنگ هر یک نشان دهنده سطح اطمینان محاسبه بر اساس ۱۰۰ تکرار آزمون بوت استرپ می باشد. خط چین قرمز نشان دهنده کلاستر خواهری گاندو، خط چین آبی نشان دهنده کلاستر پروسوس و خط چین سبز نشان دهنده کلاد گاندو می باشد.

Figure 6- Phylogenetic tree of different species of crocodylinae family and Gando position in this tree. The length of the branches indicates the genetic distance and the color of each represents the confidence level of the calculation based on 100 repetitions of the Bootstrap test. The red dashed line represents the Gando's sister cluster, the blue dashed line represents the Prosus cluster and the green dashed line indicates the Gando's clad.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Gando	1												
<i>Crocodylus palustris</i>	2	0.002											
<i>Crocodylus novaeguineae</i>	3	0.095	0.095										
<i>Crocodylus porosus</i>	4	0.093	0.093	0.107									
<i>Crocodylus mindorensis</i>	5	0.098	0.098	0.054	0.109								
<i>Crocodylus johnsoni</i>	6	0.105	0.104	0.086	0.105	0.087							
<i>Crocodylus intermedius</i>	7	0.106	0.106	0.113	0.099	0.105	0.109						
<i>Crocodylus acutus</i>	8	0.108	0.108	0.111	0.101	0.108	0.109	0.018					
<i>Crocodylus moreletii</i>	9	0.109	0.109	0.104	0.102	0.101	0.106	0.050	0.052				
<i>Crocodylus rhombifer</i>	10	0.110	0.110	0.118	0.107	0.110	0.118	0.058	0.058	0.054			
<i>Crocodylus siamensis</i>	11	0.110	0.110	0.120	0.020	0.124	0.121	0.113	0.115	0.114	0.124		
<i>Crocodylus niloticus</i>	12	0.124	0.124	0.127	0.126	0.127	0.124	0.064	0.068	0.065	0.084	0.137	
<i>Mecistops cataphractus</i>	13	0.169	0.170	0.178	0.177	0.172	0.169	0.151	0.165	0.149	0.159	0.191	0.176

شکل ۷- فاصله ژنتیکی بین گاندو و دیگر گونه های خانواده کروکودیلینه که بر اساس روش حداکثر درست نمایی بدست آمده است. مقادیر فاصله ژنتیکی در بخش پایینی جدول و مقادیر خطای استاندارد محاسبه در بخش فوقانی جدول گزارش شده است.

Figure 7- The genetic distance between Gando and other species of the crocodylinae family obtained based on the maximum likelihood method. The genetic distance values in the lower part of the table and the values of the standard error calculation are reported in the upper part of the table.

کروکودیل آب شور در یک کلاد بر اساس مطالعه کل DNA میتوکندری مورد تایید قرار گرفته است (Meredith *et al.*, 2011).

باید توجه داشت که فاصله ژنتیکی بین گاندو و دیگر گونه ها، مانند کروکودیل گینه نو کمتر از فاصله آنها با کلاستر پروسوس می باشد، اما روند تکاملی بین آنها متفاوت از یکدیگر می باشد و در نتیجه گاندو با پروسوس تشکیل کلاد داده است و کروکودیل گینه نو در این کلاد قرار نگرفته است. با بررسی بانک ژنی، ۱۶ توالی برای Cyt b در گونه *Crocodylus palustris* شناسایی شد. مقایسه این توالی ها با توالی Cyt b گاندو که در این مطالعه بدست آمد نشان دهنده وجود ۱۲ جایگاه پلی مورفیک در بین ۱۱۵۶ جایگاه مورد مطالعه بود. ۳ مورد از این جایگاهها بصورت سینگلتون با دو

وجود رابطه خواهری بین کروکودیل آب شور و کروکودیل سیامنیس و تشکیل کلاد با ماگر در چند مطالعه دیگر نیز گزارش شده است (Mcaliley *et al.*, 2006; Meganathan *et al.*, 2010). البته در مطالعات دیگری رابطه نزدیک بین کروکودیل آب شور و ماگر و تشکیل کلاد با کروکودیل سیامنیس گزارش شده است (Densmore & Owen, 1989; Gatesy & Amato, 2008). مطالعاتی دیگری نیز با بررسی ۱۲ ژن کد کننده پروتئین در میتوکندری وجود رابطه نزدیک بین کروکودیل سیامیس و ماگر و تشکیل کلاد با کروکودیل آب شور نشان داده شده است (Man *et al.*, 2011). همین نتیجه در یک بررسی دیگر نیز تایید شده است (Oaks, 2011). در مطالعه ای مشابه قرار گیری ماگر، سیامیس و

واریانت می باشند و ۹ جایگاه دیگر از نوع جایگاه‌های حاوی اطلاعات پارسیمونی هستند که در تعیین جایگاه هر نمونه در ساختار فیلوژنتیکی موثر می باشند (جدول ۳).

جدول ۳- جایگاه های پلی مورفیک در توالی های Cyt b گونه *C. palustris* (جایگاه های پارسیمونی بصورت پر رنگ نمایش داده شده است).

Table 3- Polymorphic positions in the Cyt b sequence of *C. palustris* (parsimony positions were shown in bold).

جایگاه/نمونه	139	270	289	306	475	511	570	603	712	750	876	1127
JF315283	G	A	C	A	G	G	C	C	G	G	T	T
HQ595025	A
JF315254	A
GU144286	A
FJ173286	A	G	.	G	A	A	C	C
HM488007	.	.	A	G	A	.	.	G	A	A	C	C
FJ173285	.	.	A	G	A	.	.	G	A	A	C	C
FJ173284	.	.	A	G	A	.	.	G	A	A	C	C
FJ173283	.	.	A	G	A	.	.	G	A	A	C	C
FJ173282	.	.	A	G	A	.	.	G	A	A	C	C
FJ173281	.	.	A	G	A	.	.	G	A	A	C	C
FJ173280	.	.	A	G	A	.	.	G	A	A	C	C
FJ173279	.	.	A	G	A	.	.	G	A	A	C	C
FJ173278	.	.	A	G	A	.	.	G	A	A	C	C
FJ173277	.	.	A	G	A	.	.	G	A	A	C	C
FJ173276	.	.	A	G	A	.	.	G	A	A	C	C
Gando	T

از چندین نمونه مختلف بازهم تمامی اعضای گونه ماگر در یک کلاستر قرار می گیرند و با فاصله زیادی تشکیل یک کلاد با دو کروکودیل اب شور و پروسوس را می دهند که نشان دهنده صحت نتیجه گیری اولیه در مورد رابطه بین کلاستر پروسوس و گاندو می باشد. این مسئله بدین مفهوم است که تنوع درون گونه ای ماگر منجر به تغییر

تنوع هاپلوتایپی بدست آمده برابر ۰/۵۷۴ بود، که نشان دهنده میزان پراکنش بالایی در ساختار ژنتیکی کروکودیل ماگر می باشد. با آنالیز مجدد فیلوژنتیکی بر اساس مجموعه توالی های Cyt b مربوط به مطالعات مختلف در کنار نتایج این مطالعه به درخت فیلوژنتیکی جدیدی منجر گردید که نشان دهنده اختلاف درون گونه ای برای کروکودیل ماگر می باشد (شکل ۸). حتی با استفاده

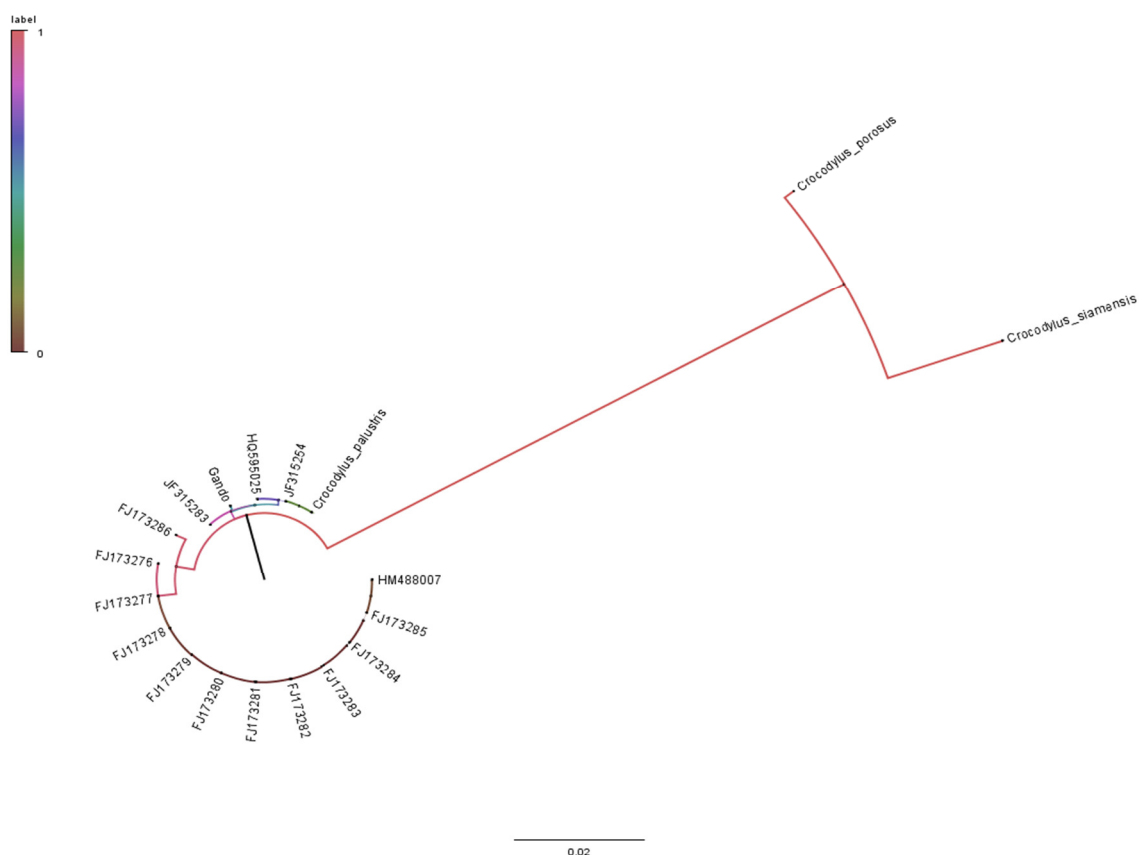
استفاده از برنامه‌های تلاقی مناسب پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج شده از پروژه پژوهشی به شماره ۱۰۰۸۰۷ مصوب معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه فردوسی مشهد می‌باشد. لذا، بدین وسیله از آن معاونت محترم تقدیر و تشکر می‌گردد. تصویب این پروژه از محل حمایت‌های مالی اداره کل حفاظت محیط زیست سیستان و بلوچستان می‌باشد که مراتب تشکر و قدردانی را از آن اداره کل محترم داریم. پروژه در آزمایشگاه دانشکده کشاورزی انجام گرفته و بدین ترتیب از مسئولان مربوطه کمال تشکر را داریم.

جایگاه آن در ساختار فیلوژنتیکی خانواده کروکودلینه نمی‌شود.

نتایج این مطالعه نشان داد که مطابق با یافته‌های مورفولوژیکی، نزدیکترین گونه از لحاظ ژنتیکی به گاندو، گونه *Crocodylus palustris* است. با این حال، با توجه به منطقه جغرافیایی نمونه‌های مورد بررسی، فاصله ژنتیکی بین این دو وجود دارد. نکته حائز اهمیت در این پژوهش، عدم تنوع ژنتیکی در میان گاندوهای سه منطقه مورد بررسی در شهرستان چابهار است. فقدان تنوع ژنتیکی در داخل یک گونه می‌تواند توانایی آن گونه در سازگاری با تغییرات شرایط محیطی را تحت تاثیر قرار داده و در نتیجه خطر انقراض آنها را افزایش بدهد. از آنجاییکه هدف نهایی برنامه‌های حفاظت از گونه‌ها، بقای بلند مدت آنهاست، حفاظت از تنوع ژنتیکی درون جمعیتی باید از جایگاه ویژه‌ای برخوردار باشد. لذا جلوگیری از هم‌خونی بیشتر در میان گاندوها با



شکل ۸- جایگاه کروکودیل‌های گونه ماگر در قیاس با کلاستر پروسوس. تنوع درون گونه‌ای ماگر باعث تغییر موقعیت آن نمی‌شود.

Figure 8- Position of Mugger species of crocodylus in comparison to Crocodylus porosus cluster. Inter-species variation of the Mugger does not change its position.

منابع

- Ballard JWO, Whitlock MC (2004). The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology* 13: 729-744.
- Bazin E, Glemin S, Galtier N (2006). Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals *Science*. 31: 570-572.
- Bell G, Collins S (2008). Adaptation, extinction and global change. *Evolutionary Applications* 1: 3-16.

- Bellagamba F, Moretti VM, Comincini S, Valfare F (2001). Identification of species in animal feedstuffs by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 75-81.
- Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ (2013). GenBank. *Nucleic Acids Research* 41: 36-42.
- Blows MW, Hoffmann AA (2005). A reassessment of genetic limits to evolutionary change. *Ecology* 86: 1371-1384.
- Brochu C (2000). Phylogenetic relationships and divergence timing of *Crocodylus* based on morphology and the fossil record. *Copeia* 3: 657-673.
- Brochu C, Densmore L (2001). Crocodile phylogenetics: a summary of current progress. In: Grigg, G., Seebacher, F., Franklin, C. (Eds.), *Crocodylian Biology and Evolution*. Surrey Beatty and Sons, Chipping Norton, NSW, pp. 3-8.
- Brochu C, Njau J, Blumenschine R, Densmore L (2010). A new horned crocodile from the Plio-Pleistocene hominid sites at Olduvai Gorge, Tanzania. *PloS ONE* 5: 1-13.
- Bruford MW, Bradley DG, Luikart G (2003). DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nature Reviews Genetics* 4: 900-910.
- Da Silva A, Lenin J (2010). Mugger crocodile *Crocodylus palustris*. *Crocodile: Status Survey and Conservation Action Plan (Third ed.)*, Eds. Manolis SC, Stevenson 94-98.
- de Vos A. 1984. Crocodile conservation in India. *Biological conservation* 29: 183-189.
- Deng W, Maust BS, Nickle DC, Learn GH, Liu Y (2010). DIVEIN: a web server to analyze phylogenies, sequence divergence, diversity, and informative sites. *Biotechniques* 48: 405-417.
- Densmore LD, Owen RD (1989). Molecular systematics of the order Crocodylia. *American Zoologist* 29: 831-841.
- Dolati V, Evrigh N, Nikbin S, Behmaram R (2016). Phylogenetic analyzing of Khalkhali goats using cytochrome b gene. *Journal of Agriculture Biotechnology* 9: 75-86 (In Farsi).
- Ewing B, Green P (1998). Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. II. Error Probabilities. *Genome Research* 8: 186-194.
- Excoffier L, Lischer HE (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources* 10: 564-567.
- Farris JS (1970). Methods for computing Wagner trees. *Systematic Biology*. 19: 83-92.
- Farris JS (1989). The retention index and the rescaled consistency index. *Cladistics* 5: 417-419.
- Felsenstein J (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of molecular evolution* 17: 368-376.
- Felsenstein J (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 783-791.
- Feng G, Wu X, Yan P, Li X (2010). Two complete mitochondrial genomes of *Crocodylus* and implications for crocodylians phylogeny. *Amphibia – Reptilia* 31: 299-309.

- Fitch WM (1971). Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Systematic Biology* 20: 406-416.
- Gatesy J, Amato G (2008). The rapid accumulation of consistent molecular support for intergeneric crocodylian relationships. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48: 1232–1237.
- Gatesy J, Baker R, Hayashi C (2004). Inconsistencies in arguments for the supertree approach: supermatrices versus supertrees of Crocodylia. *systematic biology journal*. 53: 342–355.
- Hoffmann AA, Sgrò CM (2011). Climate change and evolutionary adaptation. *Nature* 470: 479-485.
- Hurst GD, Jiggins FM (2005). Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 272: 1525-1534.
- Janke A, Gullberg A, Hughes S, Aggarwal R, Arnason U (2005). Mitogenomic analyses place the gharial (*Gavialis gangeticus*) on the crocodile tree and provide pre-K/T divergence times for most crocodylians. *Journal of molecular evolution* 61: 620–626.
- Javanmard A, Mohammadabadi MR, Zarrigabayi GE, Gharahedaghi AA, Nassiry MR, Javadmansh A, Asadzadeh N (2008). Polymorphism within the intron region of the bovine leptin gene in Iranian Sarabi cattle (Iranian *Bos taurus*). *Russian Journal of Genetics* 44: 495-497.
- Lalitha S (2000). Primer premier 5. *Biotech Software & Internet Report: The Computer Software Journal for Science* 1: 270-272.
- Lanfear R, Kokko H, Eyre-Walker A (2014). Population size and the rate of evolution. *Trends in Ecology & Evolution* 9: 33-44.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown N, Chenna R, McGettigan PA. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
- Lartillot N, Rodrigue N, Stubbs D, Richer J (2013). PhyloBayes MPI. Phylogenetic reconstruction with infinite mixtures of profiles in a parallel environment. *Systematic Biology* 62: 611-616.
- Man Z, Yishu W, Peng Y, Xiaobing W (2011). Crocodylian phylogeny inferred from twelve mitochondrial protein-coding genes, with new complete mitochondrial genomic sequences for *Crocodylus acutus* and *Crocodylus novaeguineae*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 60: 62-67.
- McAliley LR, Willis RE, Ray DA, White PS, Brochu CA (2006). Are crocodiles really monophyletic? Evidence for subdivisions from sequence and morphological data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39: 16-32.
- McCarthy C (2005). *Chromas*, pp. Technelysium Pty Ltd.
- Meganathan P, Dubey B, Batzer M, Ray D, Haque I (2010). Molecular phylogenetic analyses of genus *Crocodylus* (Eusuchia, Crocodylia, Crocodylidae) and the taxonomic position of *Crocodylus porosus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57: 393–402.

- Meredith RW, Hekkala ER, Amato G, Gatesy J (2011). A phylogenetic hypothesis for *Crocodylus* (Crocodylia) based on mitochondrial DNA: evidence for a trans-Atlantic voyage from Africa to the New World. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 60: 183-191.
- Mohammadi A, Nassiry MR, Mosafer J, Mohemmadabadi MR, Sulimova GE (2009). Distribution of BoLA-DRB3 allelic frequencies and identification of a new allele in the Iranian cattle breed Sistani (*Bos indicus*). *Russian Journal of Genetics* 45: 198-202.
- Mousavizadeh A, Mohammad Abadi MR, Torabi A, Nassiry MR, Ghiasi H, Esmailzadeh AK (2009). Genetic polymorphism at the growth hormone locus in Iranian Talli goats by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). *Iranian Journal of Biotechnology* 7: 51-53.
- Naderi S, Rezaei HR, Taberlet P, Zundel S, Rafat SA, Naghash HR, El-Barody MAA, Ertugrul O, Pompanon F (2007) Large-Scale Mitochondrial DNA Analysis of the Domestic Goat Reveals Six Haplogroups with High Diversity. *PLoS ONE* 2(10): 1-12.
- Nassiri MR, Parizadeh SA, Mahdavi M, Ariannejad H (2010). Genetic and phylogenetic analysis of D-Loop in Persian Leopard. *Journal of Agriculture Biotechnology* 3: 82-95 (In Farsi).
- Nassiry M, Tahmorespour M, Javadmanesh A, Soltani M, Foroutani Far S (2006). Calpastatin polymorphism and its association with daily gain in Kurdi sheep. *Iranian Journal of Biotechnology* 4: 188-192.
- O'Grady JJ, Brook BW, Reed DH, Ballou JD, Tonkyn DW (2006). Realistic levels of inbreeding depression strongly affect extinction risk in wild populations. *Biological Conservation* 133: 42-51.
- Oaks JR (2011). A time-calibrated species tree of crocodylia reveals a recent radiation of the true crocodiles. *Evolution* 65: 3285-3297.
- Pruitt KD, Tatusova T, Maglott DR (2007). NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic acids research* 35: 61-65.
- Puurtinen M, Knott KE, Suonpää S, Ooik Tv, Kaitala V (2004). Genetic variability and drift load in populations of an aquatic snail. *Evolution* 58: 749-756.
- Reed DH, Frankham R (2003). Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology* 17: 230-237.
- Roos J, Aggarwal R, Janke A (2007). Extended mitogenomic phylogenetic analyses yield new insight into crocodylian evolution and their survival of the Cretaceous– Tertiary boundary. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 45: 663–673.
- Saitou N, Nei M (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Sayers EW, Barrett T, Benson DA, Bolton E, Bryant SH (2011). Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Research* 39: 38-51.
- Stamatakis A (2006). RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688-2690.

- Stamatakis A, Hoover P, Rougemont J (2008). A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. *Systematic Biology* 57: 758-771.
- Stewart JB, Freyer C, Elson JL, Larsson N (2008). Purifying selection of mtDNA and its implications for understanding evolution and mitochondrial disease. *Nature Reviews Genetics* 9: 657-662.
- Swindell S, Plasterer T (1997). SEQMAN, in *Sequence Data Analysis Guidebook*, edited by S. Swindell. Springer New York. pp. 75-89
- Swofford DL (2003). PAUP. Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Version 4.
- Whitaker R, Andrews H (2003). Crocodile conservation, Western Asia Region: an update. *Journal of the Bombay Natural History Society* 100: 432-445.
- Willi Y, Van Buskirk J, Hoffmann AA (2006). Limits to the adaptive potential of small populations. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 37: 433-458.
- Willis R, McAliley L, Neeley E, Densmore L (2007). Evidence for placing the false gharial (*Tomistoma schlegelii*) into the family Gavialidae: inferences from nuclear gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43: 787-794.
- Yang Z, Rannala B (1997). Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: A Markov chain Monte Carlo method. *Molecular Biology and Evolution* 14: 717-724.
- Zamani P, Akhondi M, Mohamadabadi M, Saki AA, Ershadi A, Banabazi MH, Abdolmohammadi AR (2013). Genetic variation of Mehraban sheep using two inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *African Journal of Biotechnology* 10: 1812-1817.

Genetic Diversity of Persian Crocodile *Crocodylus Palustris* Using Sequencing of D-Loop and Cyt b Regions of Mitochondria

Afsharian A.¹, Nassiri M.R.*², Ebrahimi E.³, Javadmanesh A.⁴

¹PhD Student, Animal Science Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

²Professor, Animal Science Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad. Mashhad, Iran.

³ Associate Professor, School of Molecular and Biomedical Science, The University of Adelaide, Australia.

⁴ Assistant Professor, Animal Science Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Abstract

Identification of the genetic features of Persian mugger crocodile, the Gando, is crucial in management planning for conservation and preservation of this endangered species. Therefore, this study is aimed to investigate the genetic characteristics of Gando in Iran, based on population studies of the conserved and variable regions of the mitochondrial DNA. For this purpose, 12 samples of skin tissue and blood were collected from three regions of Chabahar city, south east of Iran. After DNA extraction, conserved and variable regions of the mitochondrial genome Cyt b and D-loop were amplified using PCR. The PCR products were sequenced and results were analyzed using bioinformatics software based on nucleotide data as well as protein codons. Results revealed that all samples had similar nucleotide sequences and no genetic variation was found among the samples. The closest species to Gando were *Crocodylus palustris* and then *C. porosus*. Comparison of sequences with other Crocodile species revealed the presence of 12 polymorphic loci among 1156 loci studied and also 5 haplogroups were introduced. As we didn't find any nucleotide diversity among studied samples, therefore, to increase the genetic diversity of the Gando, it is essential to include specific conservational plans for this endangered species.

Keywords: *Gando Crocodile, Genetic Diversity, Phylogenetic Tree, Mitochondria Genome.*

* Corresponding author: Nassiri M.R.

Tel: +98 51 38795618

Email: nassiry@um.ac.ir