فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال دوازدهم، شماره ۲، بهار ۱۳۹۹ ص. ۱۰-۱

مقاله پژوهشی

شناسایی مولکولی و بررسی فیلوژنی قورباغه‌های مردابی در جنوب‌شرق استان تهران با استفاده از توالی ژن ۱۲srRNA میتوکندریایی

سیامک یوسفی‌سیاه‌کلرودی[۱*]، فریده چناری[۲]، مینا بابایی[۳]، مهیار یوسفی‌سیاه‌کلرودی[۴]

[۱] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، پیشوا، ایران

[۲] گروه تحقیق و توسعه ماهیران، شرکت پروتئین گستر سینا، تهران، ایران

[۳] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، پیشوا، ایران

[۴] دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[*] Email: siamak.yousefi1@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۱/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۳/۲۵

چکیده

تاکنون اغلب قورباغه‌های مردابی آب‌های ایران بر مبنای روش ریخت‌شناسی مورد شناسایی قرار گرفته‌اند و تمامی جمعیت قورباغه های مردابی با وجود دامنه گسترده توزیع آن ها به یک گونه واحد به نام *Rana (Pelophylax) ridibunda* نسبت داده شده‌اند. بنابراین در این تحقیق شناسایی دقیق‌تر از قورباغه‌های مردابی شهرستان های جنوب‌شرق استان تهران براساس توالی ژن ۱۲srRNA میتوکندریایی مورد بررسی ژنتیکی قرار گرفت. برای این منظور ۴ ایستگاه اصلی (پاکدشت، ورامین، قرچک، پیشوا) در جنوب‌شرق استان تهران انتخاب شد. سپس تعداد ۱۹ عدد نمونه توسط توردستی صید، به ظروف دربدار حاوی الکل منتقل و سپس جهت بررسی های مولکولی به آزمایشگاه منتقل گردیدند. جهت شناسایی مولکولی، استخراج DNA ز عضله پا به روش CTAB انجام شد. سپس با استفاده از پرایمر اختصاصی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت تکثیر توالی ژن ۱۲srRNA میتوکندریایی انجام شد. درخت فیلوژنی تجزیه و تحلیل ماتریس داده‌ها براساس روش‌های (Neighbor-joining) و ماکزیمم احتمال (Maximum Likelihood) با استفاده از نرم‌افزار Mega6 انجام گردید. نتایج بررسی های فیلوژنی نشان داد، دو کلاد اصلی با ضریب حمایت ۱۰۰ وجود دارد، که یک زیرشاخه متعلق به نمونه های مطالعه حاضر و دیگر گروه مربوط به جمعیت قورباغه های *P. bedriagae* می باشد. در نتیجه احتمال می‌رود جمعیت قورباغه های مردابی شرق تهران متعلق به گونه *P. bedriagae* و یا زیر گونه *Pelophylax Sp.* باشند که مستلزم بررسی های بیش‌تر با سایر نشانگرهای مولکولی می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: شناسایی مولکولی، قورباغه های مردابی، ژن ۱۲srRNA، شرق استان تهران.

مقدمه

امروزه به سبب فعالیت‌های انسانی برخی از گونه‌های دوزیستان در فهرست در معرض خطر یا تهدید قرار گرفته‌اند. دوزیستان کاربردهای فراوانی در حوزه تولید دارو، آزمایشگاه‌های تحقیقاتی و انجام آزمایش‌های زیستی، صنعت غذایی در بسیاری کشورها و در کنترل جمعیت پاره‌ای از بی‌مهرگان دخالت دارند. هم‌چنین بسیاری از دوزیستان به‌عنوان جانور زینتی و خانگی نگه‌داری می‌شوند (6). در ایران، دوزیستان بی‌دم شامل چهار خانواده Ranidae، Hylidae، Bufonida، Pelobatidae و چهار جنس *Rana*، *Hyla*، *Euphlyctis*، *Pelophylax* می‌باشند و تمام جمعیت قورباغه‌های مردابی آب‌های ایرانی، با وجود دامنه گسترده توزیع آن‌ها، به یک گونه واحد به نام *Rana ridibunda* نسبت داده شده‌اند [21].

این گونه، در اصل از منطقه قزاقستان، منشا گرفته و به طور سریع از اروپای مرکزی از سمت شمال دریای بالتیک و به سمت جنوب مناطق مدیترانه و از آنجا به سمت شرق منطقه آسیایی روسیه و جنوب تا منطقه خاورمیانه [15] گسترش یافته است. Frost و همکاران در سال (۲۰۰۶) بر اساس نتایج مطالعات مولکولی پیشنهاد دادند نام عمومی قورباغه مردابی از *Rana* به *Pelophylax* تغییر یابد. قورباغه‌های مردابی اوراسیا از ۲۵ گونه و چندین هیبرید تشکیل شده‌اند (گونه‌های دوزیست جهان، ۲۰۰۹). گونه‌های قورباغه‌های مردابی اروپایی- آسیایی جنس *Pelophylax* و میزان پراکنش جغرافیایی آنها بطور قابل توجهی در چهار دهه گذشته تحت تغییرات زیادی درآمده است (Pesarakloo et al., 2016). اگرچه بازنگری تاکسونومی قورباغه‌های مردابی توسط Berger (۱۹۶۶) آغاز شد، اما Sinsch and Schneider (۱۹۹۹) نقش برجسته‌ای در درک و شناخت آنها داشتند. تحقیقات زیادی همچنین در ارتباط با روابط تاکسونومی قورباغه‌های مردابی جنس *Pelophylax* در اروپا، خاورمیانه و شرق دریای مدیترانه (22 ;14 ;13) صورت گرفته است. هر چند مطالعه دوزیستان ایران، سابقه نسبتاً طولانی دارد. پژوهشگران زیادی بر روی دوزیستان ایران مطالعاتی انجام داده‌اند که از میان آنها می‌توان به مطالعات Blanford (۱۸۷۴)، Nikolsky (۱۸۹۵)، Shmith (۱۹۵۲)، Mertens (۱۹۵۶)، Anderson (۱۹۵۷)، Tuck (۱۹۷۷)، Leviton و همکاران (۱۹۹۲)، کمی و بلوچ (۱۳۷۳)، فیروز (۱۳۷۸) یوسفی‌سیاه‌کلرودی و همکاران (۱۳۹۲) اشاره کرد. بابایی و همکاران (۱۳۹۵) بر روی دوزیستان بی‌دم در جنوب‌شرق تهران مطالعاتی را انجام دادند، نتایج این بررسی ریخت‌شناسی نشان داد که دو *P. ridibunda* و *Pseudepidalea viridis* در این مناطق زیست می‌کنند. در آخرین مطالعاتی که توسط Pesarakloo و همکاران (۲۰۱۶) بر روی شناسایی جمعیت قورباغه‌های مردابی غرب ایران با تاکید بر مطالعات مورفومتریک و bioacoustics انجام شد بیان کردند تمامی جمعیت قورباغه‌های مردابی ایران متعلق به گونه *P. bedriagae* می‌باشند. اخیراً Pesarakloo و همکاران (۲۰۱۷) جمعیت‌های متفاوت از قورباغه مردابی را در بخش‌های مختلف ایران براساس تفاوت‌های ژن میتوکندریایی مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها پیشنهاد کردند که قورباغه‌های مردابی ایران باید به دو کلاد مجزا تقسیم‌بندی شوند. *P. bedriagae* که در مرکز، غرب و شمال‌غرب ایران و *Pelophylax sp.* که در شمال ایران پراکنش یافته است. با این‌حال تاکنون در ارتباط با جمعیت قورباغه‌های مردابی ایران با وجود میزان پراکنش وسیع آنها مطالعه چندانی موجود نمی باشد. در سال‌های اخیر، تکنیک‌های مولکولی برای تعیین و شناسایی گونه‌های جنس *Pelophylax* مفید ارزیابی شده‌اند [11,13; 14,19, 22,25,26]. بر این اساس محققان بیان کردند با وجود شباهت زیاد در قورباغه‌های مردابی منطقه شرق مدیترانه واگرایی‌های ژنتیکی زیادی در آنها دیده می‌شود و در نتیجه این سطح تمایزات چندین گونه متنوع را ایجاد کرده‌اند [22]. به عنوان مثال، قورباغه‌های مردابی آب‌های ترکیه که قبلاً تحت عنوان یک تک گونه به نام *R. rindibunda*، شناسایی شده بودند اخیرا براساس مطالعات مولکولی به حداقل سه گونه و ده گونه هیدروژنیک هیبرید [11, 13] تقسیم‌بندی گردیده‌اند. بنابراین در مطالعه حاضر جهت

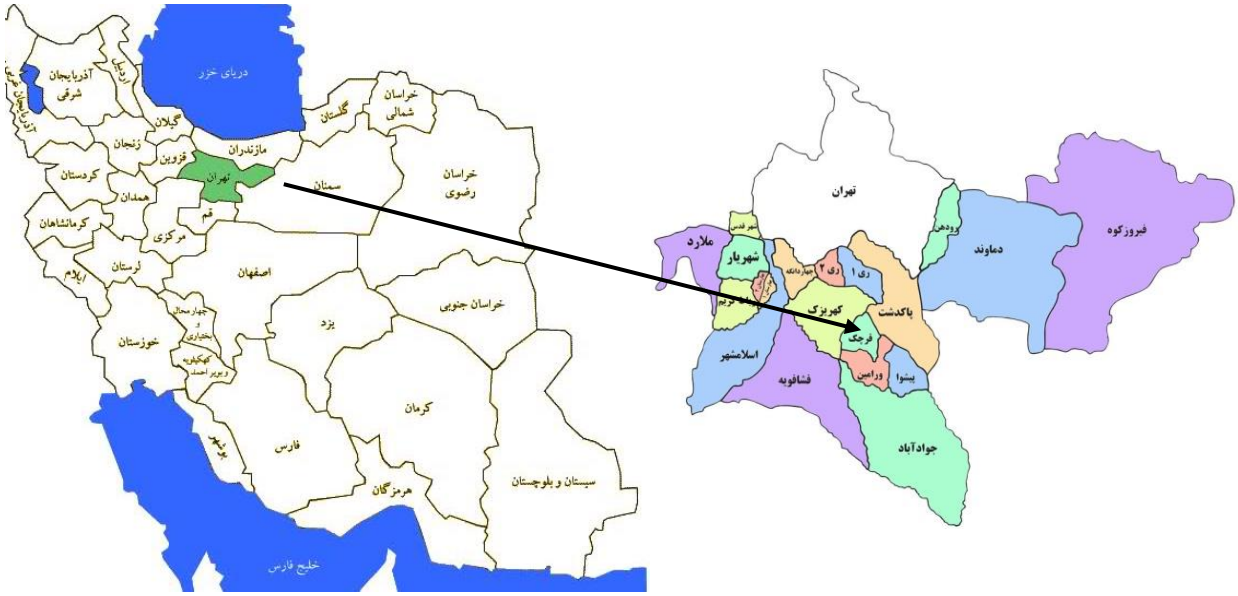
شناسایی وضعیت تاکسونومی قورباغه‌های مردابی جنوب-شرق استان تهران تغییرات توالی ژن ۱۲srRNA میتوکندریایی مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش کار

طی بهار و تابستان سال ۱۳۹۴ از اوایل فروردین تا اواخر شهریورکار جمع‌آوری نمونه‌های دوزیستان در ۴ ایستگاه اصلی مناطق جنوب‌شرقی استان تهران آغاز شد. برای دستیابی به این هدف با توجه به موقعیت منطقه و شرایط آبی حوزه مذکور، تعیین ایستگاه انجام شد (جدول۱). که عبارت بودند از: شهرستان پاکدشت (شامل ایستگاه‌های حمامک، فیلستان، جیتو)، شهرستان ورامین (شامل ایستگاه‌های قوئینک، خالدآباد، کانال چرمشهر)، شهرستان قرچک (شامل ایستگاه‌های تالاب عشق آباد، بهرام، داودآباد)، شهرستان پیشوا (شامل ایستگاه‌های رودخانه پیشوا، سنادرک و پارک جنگلی) که نمونه‌گیری از آنها انجام گردید.

جدول ۱: مشخصات ایستگاه‌های مورد مطالعه

ردیف	منطقه	نام ایستگاه	طول جغرافیایی (N)	عرض جغرافیایی (E)	ارتفاع از سطح دریا
		حمامک	۳۵ ۳۰ ۵۳/۷۲	۵۱ ۴۷ ۰۹/۲۱	۱۱۷۰/۱۰ متر
۱	پاکدشت	فیلستان	۳۵ ۲۵ ۴۹/۸۴	۵۱ ۴۰ ۰۴/۹۹	۱۰۰۵/۴۵متر
		جیتو	۳۵ ۲۷ ۴۴/۷۱	۵۱ ۴۰ ۵۴/۱۸	۱۰۱۷ متر
		قوئینك	۳۵ ۲۳ ۴۵/۵۲	۵۱ ۴۰ ۱۱/۲۸	۹۸۱ متر
۲	ورامین	خالدآباد	۳۵ ۱۶ ۴۹/۸۴	۵۱ ۳۶ ۳۶/۰۹	۹۳۵ متر
		کانال (جاده چرمشهر)	۳۵ ۱۸ ۳۳/۱۹	۵۱ ۳۸ ۱۵/۳۴	۹۰۹ متر
		تالاب عشق‌آباد	۳۵ ۲۴ ۲۰/۱۷	۵۱ ۳۰ ۱۸/۶۹	۹۱۵ متر
۳	قرچك	ایستگاه بهرام	۳۵ ۲۷ ۵۴/۸۳	۵۱ ۳۱ ۲۵/۰۶	۹۶۲ متر
		داودآباد	۳۵ ۲۳ ۲۰/۷۸	۵۱ ۳۱ ۰۵/۳۸	۹۱۲ متر
		رودخانه پیشوا	۳۵ ۲۰ ۰۸/۳۴	۵۱ ۴۳ ۵۴/۳۵	۹۴۴ متر
۴	پیشوا	سناردک	۳۵ ۱۷ ۵۲/۲۹	۵۱ ۴۳ ۲۷/۲۲	۹۰۸ متر
		پارک جنگلی	۳۵ ۱۸ ۳۶/۲۱	۵۱ ۴۳ ۵۵/۰۵	۹۷۳ متر



شکل ۱: موقعیت قرارگرفتن مناطق مورد مطالعه در شهرستان‌های جنوب‌شرقی استان تهران

مطالعه به صورت میدانی انجام گرفت. سپس جمع‌آوری ۱۹عدد نمونه به صورت دستی و توسط تور دسته‌دار انجام شد. نمونه‌ها به صورت زنده توسط ظرف‌های دربدار حاوی اتانول ۹۶ درصد به آزمایشگاه زیست شناسی جهت انجام مطالعات مولکولی انتقال داده شدند.

مطالعات مولکولی

برای ارزیابی مولکولی و استخراج DNA، ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت عضله پا جدا شد و پس از هموژن کردن، ۶۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده CTAB ۲% (CTAB، ۱/٤ NaCl مولار، TrisHCL ۱۰۰ میلی مولار، EDTA ۲۰ میلی‌مولار) به آن اضافه گردید و نسبت به استخراج DNA اقدام شد. کیفیت و کمیت با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱% تعیین گردید. سپس با استفاده از آغازگر مربوطه (5'-AAACTGGGATTAGATACCCCACTAT-3') L2519 و (5'-GCTAGACCATKATGCAAAAGGTA-3' H3296 جدول۲) واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت تکثیر قطعه ژنی 12srRNA میتوکندری انجام شد. هر واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتری شامل بافر (1X)، ۱میلی مولار Mgcl2، ۰/۲ میلی مولار dNTP، ۵ پیکومول از هر آغازگر رفت و برگشت، ۱/۵U آنزیم Tag DNA Polymerase و ۲۰-۳۰ نانوگرم DNA الگو بود. برنامه حرارتی برای واکنش موردنظر شامل: مرحله واسرشته‌سازی اولیه: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و مرحله واسرشته‌سازی: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله الحاق: ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله بسط: ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه و نهایتاً مرحله بسط نهائی: ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه و تعداد ۳۵ چرخه در نظر گرفته شد (جدول ۳). محصولات تکثیر شده به همراه نشانگر مولکولی۱۰۰bp بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز و توسط safe stain رنگ‌آمیزی شدند. محصولات PCR مناسب، جهت تعیین توالی به شرکت Bioneer کره‌ی جنوبی ارسال گردیدند. سپس توالی های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Clustal W با یکدیگر همردیف شدند. جهت شناسائی نمونه‌ها با استفاده از نرم افزار آنلاین BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) مورد بررسی قرار گرفته سپس با استفاده از توالی‌های مطالعه حاضر و توالی‌های ثبت شده از خانواده Ranidae در بانک ژن جهانی به عنوان توالی مرجع، درخت فیلوژنی ترسیم شد. درخت فیلوژنی تجزیه و تحلیل ماتریس داده‌ها بر اساس روش‌هاي مبتنی بر فاصله یا پیوند همجواري (Joining Neighbour)) و ماکزیمم احتمال (Maximum Likelihood) با استفاده از نرم افزار Mega6 (Tamura و همکاران، ۲۰۱۳) با ۱۰۰۰ تکرار ترسیم گردید. درخت فیلوژنی با استفاده از توالی‌های به دست آمده و چندین توالی از گونه‌های دیگر از جنس Pelophylax بر پایه برون گروه *Rana nigromaculata* (AF۲۰۵۵۴۸) ترسیم شد.

جدول ۲. آغازگر 12srRNA

نام پرایمر	توالی	رفرنس
L2519	AAACTGGGATTAGATACCCCACTAT	Kocher et al. (1989)
H3296	GCTAGACCATKATGCAAAAGGTA	Kocher et al. (1989)

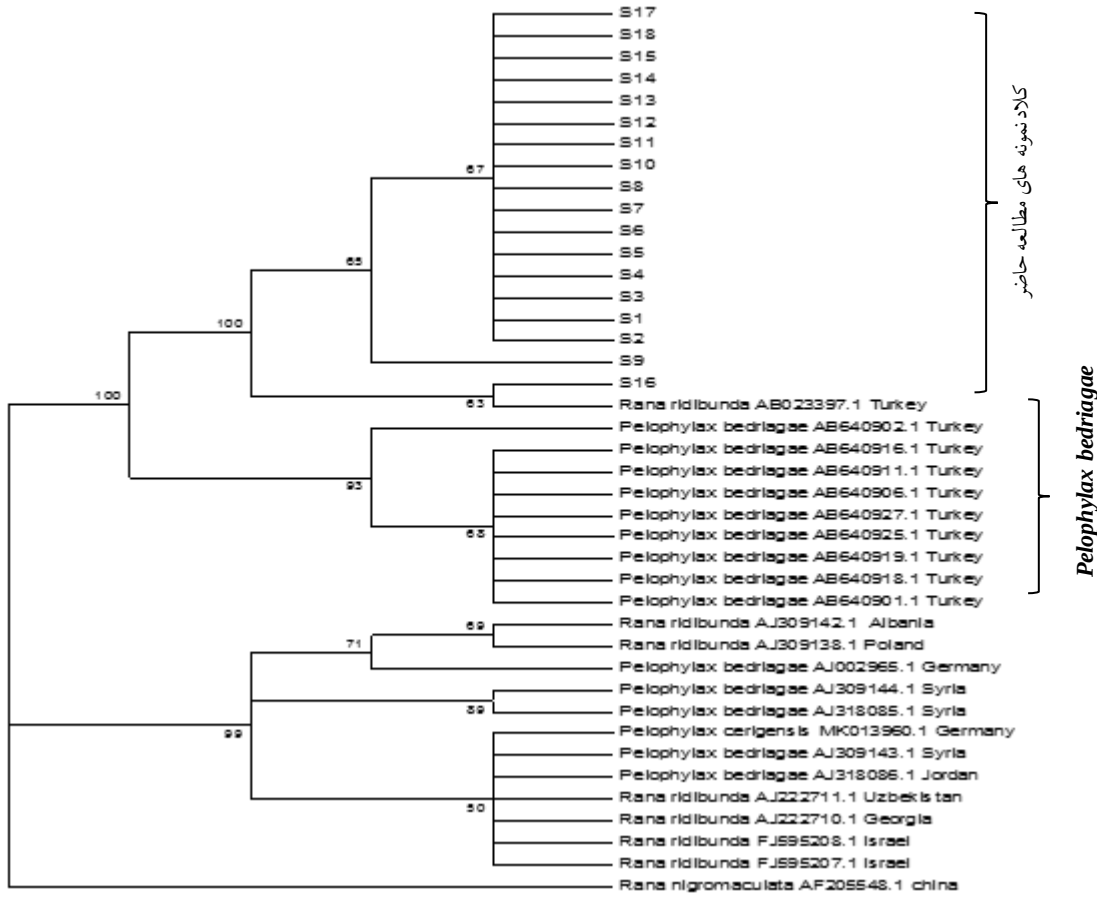
جدول ۳. برنامه داده شده به دستگاه PCR

مراحل	درجه حرارت (سانتی گراد)	زمان (دقیقه)	تعداد چرخه (سیکل)
واسرشته سازی اولیه	۹۵	۵	۱
واسرشته سازی	۹۵	۴	
الحاق	۴۲	۱	۳۵
بسط	۷۲	۱:۳۰	
بسط نهایی	۷۲	۱۰	۱

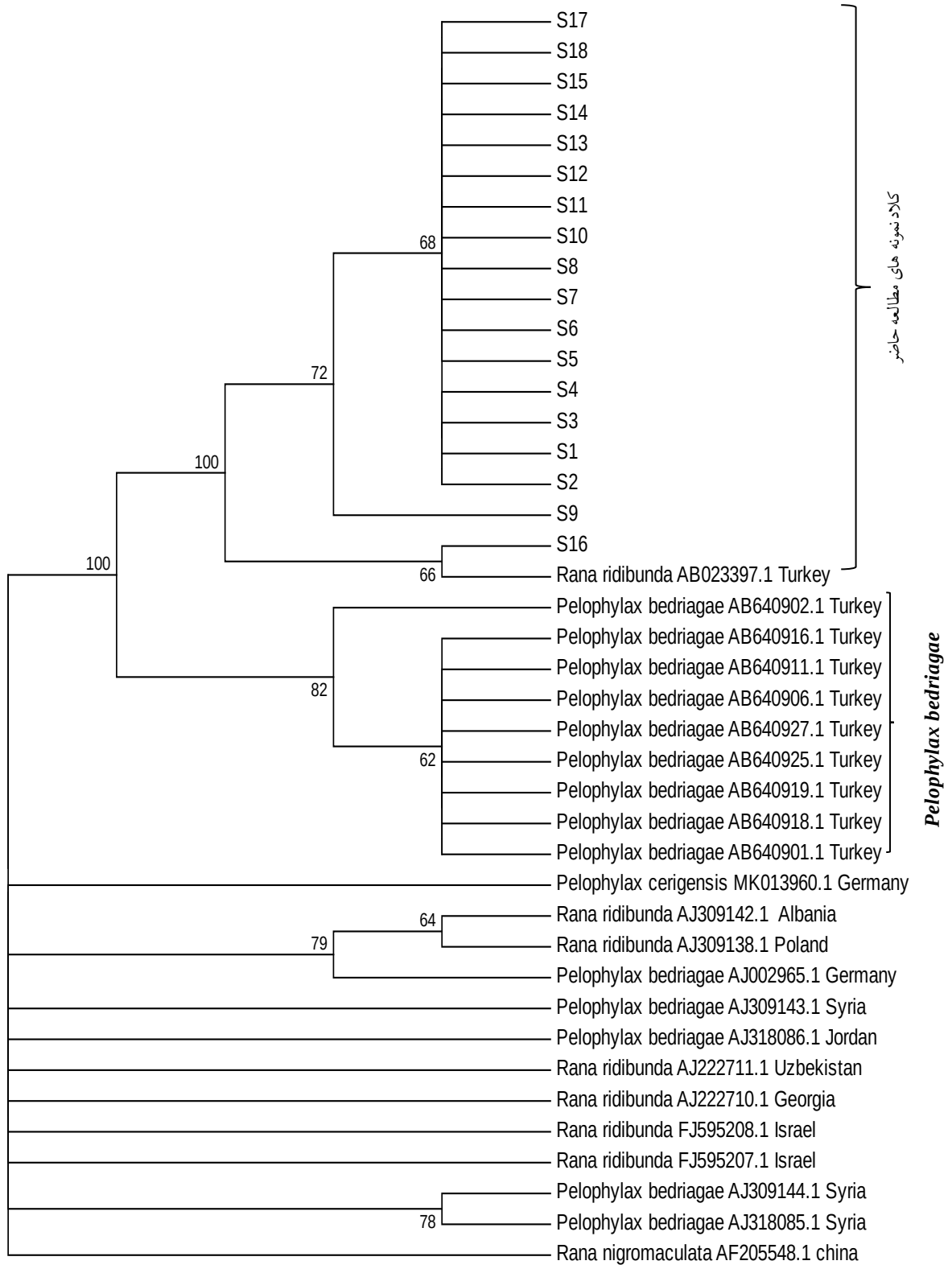
نتایج

مقایسه توالي‌هاي به دست آمده از ۱۹ نمونه نشان داد اکثرا توالی ها با ضریب تشابه ۹۹ درصد در یک شاخه قرار گرفتند با اینحال توالي‌هاي به‌دست آمده در بعضي نمونه‌ها به طور کامل بر هم منطبق نیستند و توالي نمونه‌هاي S9 و S16 در مقایسه با توالي نمونه‌هاي ديگر داراي جايگاه‌هاي حذف و تفاوت‌هاي نوكلئوتيدي مي‌باشند. این توالي‌ها در بانک داده‌هاي جهاني NCBI با دريافت شماره پذیرش به ترتیب با MK130844، MK130845، MK130846، MK130847، MK130848، MK130849، MK130850، MK130851، MK130852، MK130853، MK130854، MK130855، MK130856، MK130857، MK130858، MK130859، MK130860، MK130861، MK130862، MK130863، ثبت گردیدند.

نتیجه محاسبات فیلوژني و روابط تکاملي (ML, NJ) الگوي توپولوژي يكساني را براي درختان تکاملي نشان داد. نتايج اختلافات ژنتيكي در توپولوژي درختان تکاملي منعكس شد (شكل‌هاي ۲، ۳). تمامي نمونه‌هاي مطالعه حاضر کلاد مونوفیلتیک مشترک را تشکیل دادند و این کلاد با ارزش‌هاي بوت استراپ قطعی (NJ= 100، ML= 100) حمایت شد با این حال نمونه (S16) و (S9) از دیگر مورفوتایپ‌هاي خواهري خود جدا شدند. توپولوژي درختان تکامل نشان داد کلاد مربوط به نمونه‌های مطالعه حاضر با گونه *P. bedriagae* از غرب کشور و ترکیه رابطه خواهري دارد و این روابط مونوفیلتیک با ارزش بوت استراپ قطعی (NJ= 100 ،ML= 100) حمایت شده‌اند.



شکل ۲. نتایج ترسیم درخت Maximum likelihood، حاصل از نرم‌افزار MEGA6. درصدهاي بوت استراپ براي ۱۰۰۰ تکرار روي گره ها نشان‌داده شده است (ML).



شکل ۳. نتایج ترسیم درخت Neibour joining، حاصل از نرم‌افزار MEGA6. درصدهای بوت استراپ برای ۱۰۰۰ تکرار روی گره ها نشان داده شده است (NJ).

بحث

خانواده Ranidae گروهی از قورباغه‌های مردابی با پراکنش جهانی می‌باشند. افراد این خانواده قورباغه‌های حقیقی هستند که یک گروه بزرگ را تشکیل داده و همه جا به جز قطب جنوب یافت می‌شوند. با اینحال تنها جنس *Rana* دارای پراکندگی جهانی می‌باشد [۶،۱۷]. ۳۶ جنس امروزی از این خانواده تشخیص داده شده است. این جنس خود در برگیرنده چندین زیرجنس با گونه‌های فراوان می‌باشد. بررسی‌های ریخت‌شناسی نشان می‌دهد در ایران از این جنس دو گونه *Euphlyctis cyanophlyctis* و *Rana macrocnemis* و دو زیر گونه *P. ridibunda* و *Rana camerani pseudodealmatina* گزارش شده است (محمدی آلوچه و همکاران، ۱۳۸۸). شناسایی‌هایی که تاکنون در ارتباط با قورباغه‌های مردابی ایران انجام شده بیشتر بر روش‌های ریخت شناسی استوار بوده و در ارتباط با شناسایی با نشانگرهای مولکولی مطالعات اندکی صورت گرفته است [۱۴]. بررسی‌های ریخت‌شناسی انجام شده توسط سایر محققان [۱] نشان داده است قورباغه شناسایی شده مناطق جنوب‌شرقی استان تهران متعلق به زیرگونه *Pelophylax ridibunda ridibunda* می‌باشد این گونه، قبلاً توسط میرزاجانی (۱۳۸۵) از تالاب انزلی، هزاوه و همکاران(۱۳۸۶) از استان مرکزی، محمدی آلوچه و همکاران (۱۳۸۸) از رودخانه بالخلو استان اردبیل، حجتی و همکاران (۱۳۸۸) در پارک ملی شهید زارع ساری، پسرکلو و همکاران (۱۳۹۰) از گلستان، ذاکری‌نسب و همکاران (۱۳۹۷) از منطقه لواسانات و یوسفی‌سیاه‌کلرودی و همکاران (۱۳۹۷) در رودخانه‌های شرق استان تهران گزارش شده بود. نتایج بررسی‌های مولکولی بر پایه ژن ۱۲srRNA میتوکندریایی مطالعه حاضر نشان داد نمونه‌های مورد مطالعه از ایستگاه‌های مورد نظر مناطق جنوب‌شرق استان تهران همگی متعلق به یک گونه می‌باشند و با ضریب حمایت قطعی (ML= 100 ،NJ= 100) با قورباغه‌های مردابی غرب کشور و ترکیه که تحت عنوان *P. bedriagae* شناسایی شده بودند در یک کلاد قرار گرفتند و این احتمال را که این گونه متعلق به گونه *P. bedriagae* یا زیر گونه *Pelophylax Sp.* باشند را تقویت می‌کند. این نتایج با مطالعاتی که Pesarakloo و همکاران (۲۰۱۷) در ارتباط با قورباغه های مردابی ایران بر اساس ژن سیتوکروم b انجام دادند هم خوانی داشت که نشان دادند قورباغه های مردابی ایران که سابقاً در بررسی‌های مورفولوژی به عنوان *P. ridibunda* معرفی شده بودند شامل دو گروه اصلی می باشند که شامل گونه *P. bedriagae* متعلق به مناطق غرب، جنوب غرب و شمال-غربی ایران و گونه بی‌نام *Pelophylax Sp.* متعلق به مناطق شمال و شمال‌شرقی ایران می‌باشند و گونه‌ای به نام *P. ridibundus* که بر اساس ریخت شناسی به عنوان گونه-های قورباغه‌های مردابی ایران شناسایی شده بود باید از چک لیست گونه‌های قورباغه‌های مردابی ایران برداشته شود. نتایج تحقیقات حاضر که براساس ۱۲srRNA میتوکندریایی به‌دست آمد با نتایج نشانگر سیتوکروم b هم‌خوانی داشت. قورباغه مردابی جنس *Pelophylax* [16] شامل چندین گونه در زیستگاه‌های آب شیرین در منطقه غربی پالاآرکتیک می‌باشند که در میان این جنس چندین گونه جدید که به‌طور طبیعی به صورت هیبرید در طبیعت رخ می‌دهند وجود دارند [۱۱]. برای مثال، در مرکز و شرق اروپا گونه *Pelophylax lessonae* (Camerano, 1882) براساس نوعی از تولیدمثل غیرمعمول با قورباغه‌های مردابی گونه *P. ridibundus* (Pallas,1771) می‌تواند جفت‌گیری کرده و یک هیبرید به نام *Pelophylax esculentus* (Linnaeus, 1758) شکل گیرد که حاصل هیبریدوژنز می‌باشد. همچنین در مطالعه‌ای که Pesarakloo و همکاران (۲۰۱۵) با بررسی مورفومتریک و bioacoustics بر روی جمعیت‌های قورباغه *P. bedriagae* از مناطق غربی ایران انجام دادند به این نتیجه رسیدند تمامی قورباغه‌های مردابی حاصل از مناطق مختلف قسمت‌های غربی ایران صرفا به عنوان گونه *P. bedriagae* می‌باشند. مطالعه حاضر نشان داد زمانی که شناسایی گونه‌ها بر مبناي مورفولوژي براي شناختن ناكافي است و با اشتباهاتی مواجه است، تکیه بر روش‌های مولکولی برای شناسایی دقیق‌تر گونه‌ها بسیار مفید می‌باشد.

منابع

[۱] بابائی، م. یوسفی‌سیاه‌کلرودی، س. و دادگر. ش.، ۱۳۹۵. بررسی فونستیک دوزیستان بی‌دم در شهرستان‌های جنوب‌شرقی استان تهران. مجله محیط زیست جانوری. دوره ۸، شماره ۳، ۶۰-۵۳.

[۲] پسرکلو، ع. قارزی، ا. کمي، ح.ق. و همایوني، م.، ۱۳۹۰. مطالعه چند ریختی رنگی در قورباغه مردابی *Rana ridibunda* در استان گلستان. مجله زیست شناسی ایران. جلد ۲۴. شماره۳. ۴۵۵-۴۴۶.

[۳] حجتي، و. مقدس، د. و فقیری، ا.، ۱۳۸۸. شناسایی دوزیستان و خزندگان پارک ملی شهید زارع ساری. فصلنامه زیست شناسی جانوری. سال ۱. شماره ۳. ۴۱-۳۱.

[۴] ذاکري‌نسب، م. یوسفی‌سیاه‌کلرودی، س. و خوشنود. ز.، ۱۳۹۷. بررسی پراکندگی و ریخت‌سنجی دوزیستان منطقه لواسانات در استان تهران. مجله محیط زیست جانوری. دوره ۱۰، شماره ۴، صفحات ۲۲۸-۲۱۹.

[۵] کمی، ح.ق. و بلوچ، م.، ۱۳۷۳. دوزیستان ایران. انتشارات و چاپ دانشگاه تهران. ۱۷۷ صفحه.

[۶] محمدی آلوچه، ر.؛ کمي، ح. ق.؛ شجیعي، ه. و داداشي، ع. ۱۳۸۸. بررسی زیستی دوزیستان رودخانه بالخلو استان اردبیل. فصلنامه زیست شناسی جانوری. سال۲. شماره۱. ۴۹-۴۱.

[۷] میرزاجاني، ع.، کیابي، ب.، باقری، س.، ۱۳۸۵. بررسی رشد لارو و برآورد جمعیت گونه *Rana ridibunda* در تالاب انزلی، مجله زیست شناسی ایران. جلد ۱۹. شماره ۲. ۲۰۲-۱۹۱.

[۸] هزاوه، ن؛ قاسم زاده، ف و درویش، ج.، ۱۳۸۶. بررسی بیوسیستماتیک (مورفولوژی، کاریولوژی و مورفومتری) دوزیستان بی دم استان مرکزی. مجله زیست شناسی ایران. جلد ۲۰. شماره ۴. ۴۶۷-۴۵۸.

[۹] یوسفی سیاه‌کلرودی، س. دادگر، ش. طیبی، خ. و یوسفی‌سیاه‌کلرودی، م.، ۱۳۹۷. بررسی فونستیک دوزیستان بی‌دم در رودخانه‌های شرق استان تهران. فصلنامه دانش زیستی ایران. جلد ۱۳، شماره ۴، ۲۱-۱۱.

[۱۰]یوسفي‌سیاه‌کلرودی، س. سعیدی، ه. بهفر، م.ا. فلاحی، ر. و ایزدیان، م.، ۱۳۹۲. اطلس دوزیستان ایران. سازمان حفاظت محیط زیست. تهران. ۱۱۲ صفحه.

[11] Ak n,C., Bilgin, C.C., Beerli, P., Westaway, R, Ohst, T., Litvinchuk, S.N., Uzzell, T., et al. 2010. Phylogeographic patterns of genetic diversity in eastern Mediterranean water frogs were determined by geological processes and climate change in the Late Cenozoic. J Biogeogr, 37: 211-24. doi: 10.1111/j.1365-2699.2010.02368.x.

[12] Berger, L. 1966. biometrical studies on the population of green frogs from the environs of Poznan. Ann Zool 12: 292-213.

[13] Bülbül, U., Matsui, M., Kutrup, B., Eto, K., 2011. Taxonomic relationships among Turkish water frogs as revealed by phylogenetic analyses using mtDNA gene sequences. Zool Sci, 28: 930-936. https://doi.org/10.2108/zsj.28.930.

[14] Domeneghetti, D., Bruni, G., Fasola, M., Bellati, A., 2013. Discoveryofalien water frogs (G E N Pelophylax) in Umbria, with first report of P. shqipericus for Italy. Acta Herpetol, 8: 171-176. https://doi.org/10.13128/Acta_Herpetol-13338.

[15] Frost, D. R, Grant, T., Faivovich, J., bain, R.H., Haas, A., Haddad, CFB, De Sa RO, et al. 2006. The amphibian tree of life. Bull Am Museum Natural History 297:1-370. doi: 10.1206/0003-0090(2006)297[0001:TATOL]2.0.CO;2.:

[16] Frost, D.R., 2011. Amphibian species of the world: An online reference. Version 5.5 (31 January, 2011), New York. Available at. http://esearch.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/Am Mus Nat Hist.

[17] Fakharzadeh, F. Darvish, J. Kami, H.G. Ghassemzadeh, F. Rastegar-Pouyani, E. and StÖck, M., 2015. Discovery of triploidy in Palearctic green toads (Anura: Bufonidae) from Iran with indications for a reproductive system involving diploids and triploids. Zoologischer Anzeiger. Vol. 944: 94-13. https://doi.org/10.1016/j.jcz.2015.01.001.

[18] Kocher, T.D, Thomas, W.K, Meyer, A., Edwards, S.V., Paavo, S., Villablanca, F.X., and Wilson, A.C. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. Proc Natl Acad Sci, 86: 6196-6200. doi: 10.1073/pnas.86.16.6196.

[19] Lymberakis, P., Poulakakis, N., Manthalou, G., Tsigenopoulos, C.S., Magoulas, A., Mylonas, M., 2007. Mitochondrial phylogeography of *Rana* (*Pelophylax*) populations in the Eastern Mediterranean region. Mol Phylogenetics Evol 44: 115-25. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.03.009.

[20] Pesarakloo, A., Rastegar-Pouyani, E., Rastegar-Pouyani,N., Kami, H., Najibzadeh, M., Oraie, K., 2015. The first taxonomic revaluation of the Iranian water frogs of the genus *Pelophylax* (Anura: Ranidae) using sequences of the mitochondrial genome. the Journal of Mitochondrial DNA. 1-7. doi: 10.3109/19401736.2015.1127362.

[21] Pesarakloo, A., Rastegar-Pouyani, E., Rastegar-Pouyani, N., Kami, H.G, Najibzadeh, M, Khosravani, A, Oraie, H., 2017. the first taxonomic revaluation of the Iranian water frogs of the genus *Pelophylax* (Anura: Ranidae) using sequences of the mitochondrial genome. Mitochondor DNA 28:392-398. https://doi.org/10.3109/19401736.2015.1127362.

[22] PlÖtner J, Uzzell T, Beerli P, Ak n C, Bilgin CC, Haefeli C, Ohst, T., et al., 2010. Genetic divergence and evolution of reproductive isolation in eastern Mediterranean water frogs. In: Glaubrech M, Schneider H (eds) Evolution in action. Case studies in adaptive radiation and the origin of biodiversity. Special volume from the SPP 1127 Bradiations -genesis of biological diversity of the DFG. Heidelberg. Springer, Berlin. doi: 10.1007/978-3-642-12425-9_18.

[23] PlÖtner, J., Baier, F., Ak n, C., Mazepa, G, Schreiber, R., Beerli, P, Litvinchuk, A.N., et al. 2012. Genetic data reveal that water frogs of Cyprus (genus *Pelophylax*) are an endemic species of Messinian origin. Z Zool Syst Evol, 88: 261-283. https://doi.org/10.1002/zoos.201200021.

[24] PlÖtner, J., Ak n, C., Baierc, F., Uzzelld, T., Bilgin, C.C., 2015. Genetic evidence for human-mediated introduction of Anatolian water frogs (*Pelophylax* cf. *bedriagae*) to Cyprus (Amphibia: Ranidae). Zool Middle East 26:1-8.

2008. Widespread unidirectional transfer of mitochondrial DNA: A case in western Palearctic water frogs. J Evol Biol, 21:668-81. doi: 10.1111/j.1420-9101.2008.01527.

[25] Plotner, J., Ohst, T., Bohme, W., Schreiber, R., 2001. Divergence in mitochondrial DNA of Near Eastern water frogs with special reference to the systematic status of Cypriote and Anatolian populations (Anura, Ranidae). Amphibia-Reptilia 22:397-412. doi: 10.1163/15685380152770363.

[26] Plotner, J., Uzzell, T., Beerli, P., Ak n, C., Bilgin, C.C., Haefeli, C., Ohst, T., et al. 2010. Genetic divergence and evolution of reproductive isolation in eastern Mediterranean water frogs. In: M. Glaubrecht, H. Schneider, editors. Evolution in action. Case studies in adaptive radiation and the origin of biodiversity. Special volume from the SPP 1127 ``Radiations Genesis of Biological Diversity'' of the DFG. Heidelberg, Berlin: Springer. p 372-403. doi:10.1007/978-3-642-12425-9_18.

[27] Plotner, J., Uzzell, T., Beerli, P., Spolsky, C., Ohst, T., Litvinchuk, S.N., Guex, G.D., et al., 2008. Widespread unidirectional transfer of mitochondrial DNA: A case in western Palearctic water frogs. J Evol Biol, 21:668-81. doi: 10.1111/j.1420-9101.2008.01527.

[28] Plotner, J., Ak n, C., Baierc, F., Uzzelld, T., Bilginb, C.C., 2015. Genetic evidence for human-mediated introduction of Anatolian water frogs (Pelophylax cf. bedriagae) to Cyprus (Amphibia: Ranidae). Zool Middle East, 26: 1-8. doi: 10.1080/09397140.2015.1027495.

[29] Schneider, H., Sinsch, U., 1999.Taxonomicreassessmentofmiddleeastern water frogs: bioacoustic variation among populations considered as Rana idibunda,R.bedriagae or R.levantina. J Zool Syst Evol Res, 37:57-65. https://doi.org/10.1046/j.1439-0469.1999.372098.x.

[30] Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0.

Identification and study of water Frogs population in eastern Tehran province using mitochondrial 12srRNA gene sequence

Yousefi Siahkalroodi S.[1 *], Chenari F. [2], Babaei M.[3], Yousefi Siahkalroodi M[4].

[1] Department of Biology, Faculty of Biological Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Pishva, Iran
[2] Research and Development of mahiran, Protein Gostar Sina co. Tehran, Iran
[3] Department of Biology, Faculty of Biological Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Pishva, Iran
[4] Faculty of Veterinary Medicine, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

* Email: siamak.yousefi1@gmail.com

Received: 3 April 2020 Accepted: 14 June 2020

Abstract

Up to now most species of Iranian frogs has been identified morphologically and all populations (albeit their vast distribution) are assigned to *Rana* (*Pelophylax*) *ridibunda*. The main objective of this research was to study frog populations of the South eastern Tehran using mitochondrial 12srRNA sequencing. For this purpose, n=19 water frogs were sampled in four stations (i.e. Pakdasht, Varamin, Gharchak, Pishva). The samples specimens were preserved at 96% ethanol solution and transferred to the laboratory for further analysis. DNA was extracted from leg tissue using CTAB method and the 12srRNA gene was ampilified and sequenced using primers developed by Kocher et al. (1989). The phylogenic tree was drawn using Joining Neighbor and Maximum Likelihood methods in Mega6 software the results indicate that indicated two clads with 100% affinity. The first clade assigned to *P. bedriagae* populations and the next clade included our samples. In conclusion, the frog populations of Tehran province may be assigned to *P. bedriagae* or a subspecies. Further research is needed to reveal this.

Keywords: molecular identification, water frogs, 12srRNA, the eastern of Tehran province.