Archive of SID

فصلنامه علوم محیطی،دوره هفدهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۸

۱۷۶-۱۶۳

بررسی تنوع ژنتیکی خرچنگ *Potamon elbursi* در رودخانه‌های شرق استان تهران

سیامک یوسفی سیاه کلرودی[1*]، سمانه فدایی[1]، فریده چناری[2] و شادی خاتمی[3]

[1] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی ورامین، ایران
[2] گروه تحقیق و توسعه ماهیران، شرکت پروتئین گستر سینا، تهران، ایران
[3] گروه بیولوژی دریا، دانشکده منابع طبیعی، واحد بندرعباس، دانشگاه آزاد اسلامی بندرعباس، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۴/۲۶

یوسفی سیاه کلرودی، س.، س. فدایی. ف. چناری و ش. خاتمی. ۱۳۹۸. بررسی تنوع ژنتیکی خرچنگ *Potamon elbursi* در رودخانه‌های شرق استان تهران. فصلنامه علوم محیطی. ۱۷(۳): ۱۷۶-۱۶۳.

سابقه و هدف: بررسی تنوع ژنتیکی ابزار موثری در حفظ ژنتیکی گونه های پراهمیت، با ارزش و هم چنین گونه های کمیاب در معرض خطر انقراض می باشد. با توجه به اینکه مطالعات، در ارتباط با گونه های خرچنگ های آب شیرین در ایران بسیار اندک است و از نظر حفاظتی توجه چندانی به آن ها صورت نگرفته است. این مطالعه به بررسی تنوع ژنتیکی خرچنگ حقیقی*Potamon elbursi* در رودخانه های شرق استان تهران می پردازد.

مواد و روش‌ها: برای بررسی تنوع درون این گونه ۱۰ ایستگاه نمونه‌برداری در بخش‌های مختلف رودخانه‌های جاجرود، حبله رود و لار انتخاب شد و تعداد ۱۰ نمونه از هر ایستگاه با تور دستی مورد صید قرار گرفتند، سپس نمونه‌ها در الکل اتانول ۹۶ درصد تثبیت و برای انجام مرحله‌های بعدی به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌ها در ابتدا برای مطالعات ریخت شناسی توسط کلیدهای شناسایی مورد مطالعه قرار گرفتند و سپس برای بررسی های مولکولی از ژن قطعه ژنی زیر واحد یک سیتوکروم اکسیداز میتوکندری (COI) و نشانگر ریزماهواره[1] استفاده شد. برای استخراج ژنوم از کیت استخراج DNA سیناژن استفاده گردید و کیفیت و کمیت DNA توسط بیوفتومتر و ژل آگاروز ۱٪ درصد مورد بررسی قرار گرفت. برای شناسایی مولکولی، ژنIOC تکثیر و توالی یابی شد. سپس برای بررسی پنج جایگاه ژنی (hxx2،Ga2،Gal،Gagt4،hxx3) از آغازگرهای[2] ریزماهواره‌ای طراحی شده بر اساس ترادف DNA ژنومی خرچنگ گرد *Longpotamon yangtsekiense* برای بررسی های تنوع درون گونه ای استفاده گردید. بمنظور انجام آنالیز نهایی محصولات PCR مربوط به هریک از جایگاه های ریزماهواره، این محصولات بر روی ژل اکریل آمید ۸٪ شارژ شدند. سنجش وزن مولکولی نوارهای محصول PCR و اندازه آلل ها با استفاده از نرم افزار Lab Image v.3.3.3 و با بکارگیری تصویرهای گرفته شده از ژل پلی اکریل آمید رنگ آمیزی شده انجام شد. فراوانی آللی، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده، تعداد آلل‌های واقعی و موثر در جایگاه‌های ریزماهواره‌ای، تنوع ژنتیکی و آزمون AMOVA در سطح احتمال ۰/۰۱ در نرم افزارهای Gene Alex، محاسبه گردید. درخت تبارشناختی[3] با استفاده از نرم افزار MEGA v. 5.5 ترسیم گردید.

نتایج و بحث: نتایج توالی یابی ژن COI نشان داد نمونه خرچنگ های مورد مطالعه مربوط به گونه *P. elbursi* می باشد که با نتایج شناسایی ریخت- شناسی منطبق بود. در این مطالعه در مجموع از ۵ جفت نشانگر ریزماهواره ای استفاده شد که جایگاه Ga2 با وجود بهینه سازی تکثیر نشد و دیگر جایگاه

*Corresponding Author: *Email Address.*Siamak.yousefi1@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

ها چند شکلی[4] نشان دادند. جایگاه hxx2 و Ga1 با ۷ آلل و جایگاه Gagt4 با ۳ آلل بترتیب دارای بیشترین و کمترین تعداد آلل در بین تمام جایگاه های هتروزیگوت بودند. نتایج نشان داد که جمعیت های این گونه خرچنگ دارای تنوع درون جمعیتی اندکی می باشد. دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho)[5] در میان ایستگاه های نمونه برداری در جایگاه های چهارگانه ۰/۷۰۰-۱۰۰/۰ و دامنه هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He)[6] بین ۰/۸۱۰- ۰/۵۱۵ بود. در این بررسی در تمامی مناطق نمونه برداری شده و در تمامی لوکوس ها، هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوسیتی قابل انتظار پایین تر بود.

نتیجه‌گیری: شناسایی بر اساس نشانگرهای ژنتیکی برای قرار دادن صحیح گونه ها در جایگاه اصلی خود مفید بوده و می تواند تایید کننده شناسایی‌های مبتنی بر ریخت شناسی باشد. کاهش هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوسیتی مورد انتظار نشان دهنده کاهش در تغییرپذیری ژنتیکی نمونه ها است.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، *Potamon elbursi*، آب شیرین، استان تهران..

مقدمه

خرچنگ های حقیقی جزء پیشرفته ترین اعضای راسته ده پایان (شاخه بندپایان) بشمار می روند که از میان بیش از ۶۷۰۰ گونه شناخته شده از خرچنگ های حقیقی، بیش از ۱۳۰۰ گونه آن خرچنگ های واقعی آب شیرین هستند (Ng *et al*., 2008). خرچنگ های آب شیرین هم از نظر اقتصادی و هم از نظر بوم شناختی گروه بسیار مهمی هستند. از آنجایی که آن ها در بسیاری از نقاط جهان مصرف غذایی دارند. بنابراین در اقتصاد شیلات نقش بسیار مهمی دارند. آن ها همچنین نسبت به آلودگی آب بسیار حساس می باشند. بنابراین در ارزیابی کیفیت آب دارای اهمیت هستند (بهمنی، ۱۳۷۳). اگرچه نسبت به برنامه حفاظتی این گروه از جانوران غفلت صورت گرفته است. ولی بدلیل صفاتی از قبیل رشد سریع، تولید تعداد زیادی نوزاد و بلوغ جنسی سریع، ثبات جمعیتی خود را حفظ کرده اند. جمعیت خرچنگ های آب شیرین دارای اندمیسم[7] بالایی هستند که ممکن است بدلیل توانایی محدود آن ها در پراکندگی و همچنین تخریب زیستگاه های آن ها توسط جمعیت‌های انسانی باشد (Keikhosravi *et al*., 2015). تنوع ژنتیکی، قابلیت بقای یک گونه یا جمعیت را از طریق ایجاد توانایی سازگاری با تغییر های محیطی فراهم می کند. بنابراین، تنوع ژنتیکی برای بقای طولانی مدت یک گونه، ضروری است (Bataillon *et al*.,1996). بطور کلی مدیریت تنوع ژنتیکی در موجودات، نیازمند ارزیابی ساختار ژنتیکی و تفکیک ذخیره های گونه مورد نظر است.(Pujolar *et al*., 2009). بررسی روابط تکاملی میان موجودات، می تواند نشان دهنده منشا مشترک گونه ها باشد و آنالیزهای ژنتیکی برای تفسیر روند تکاملی جمعیت هایی که دارای تنوع ژنتیکی بیشتری نسبت به جمعیت های کوچک تر هستند، مفید می باشد (Monaghan *et al*., 2005). این تنوع در آن ها سبب رشد سریع تر، تکامل و ترکیب شدن ژن ها و در پی آن عادت پذیری جمعیت های مختلف تحت شرایط محیطی متفاوت می شود. افراد جامعه های کوچک تر از نظر ژنتیکی مشابه تر هستند، بنابراین تنوع کمتری دارند و همین نبود تنوع از سازگاری آن ها با شرایط محیطی مختلف می کاهد. از این رو بررسی تنوع ژنتیکی ابزار موثری در حفظ ژنتیکی گونه های پراهمیت و با ارزش و هم چنین گونه های کمیاب در معرض خطر انقراض می باشد. در مقایسه اطلاعات تبارشناختی، از پروتئین و یا از DNA موجودات استفاده می شود که بی گمان اطلاعات تبارشناختی به دست آمده از DNA کامل تر از اطلاعات به دست آمده از پروتئین ها می باشد. از این رو استفاده از ابزارهای مولکولی برای بررسی تنوع ژنتیکی بخاطر توانایی این ابزارها در شناسایی تغییر ها در سطح DNA ارزشمند می باشد. نشانگرهای مولکولی از جمله ابزارهایی هستند که استفاده از آن ها بخاطر عدم تاثیرپذیری آن ها از شرایط محیط خارجی و داخلی موجود و حتی استفاده از آن ها در مورد گونه های منقرض شده، پایه دیگری در انقلاب ژن محسوب می شوند. تاکنون انواع زیادی از نشانگرها شناسایی و بکار گرفته شده اند و کاربردهای متنوعی برای آن ها پیشنهاد شده است (Carver *et al*., 2012). یکی از کاربردهای عمده نشانگرها که سطح های بالایی از چندشکلی را بروز می دهند، آنالیز تنوع ژنتیکی در داخل و بین جمعیت ها می باشد که از کشف آن ها بیش از ۲۰ سال نمی گذرد و اولین بار

www.SID.ir

Archive of SID

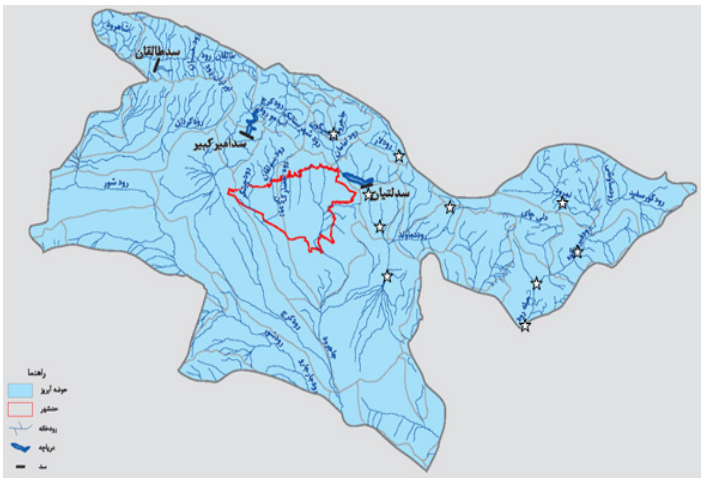
توسط Litt و Luty (1989) بکار برده شد. نخستین خرچنگ آب شیرین ایران توسط Olivier (1804)شناسایی و گزارش شده است. از این تاریخ به بعد محققان اروپایی دیگر نمونه های فراوانی از خرچنگ های ایران را جمع آوری نموده اند (خاتمی، ۱۳۷۸). همچنین چند گونه دیگر در جنوب شرق ایران شناسایی و معرفی شدند (Alcock, 1909). Keikosravi *et al.* (2014) به بررسی خرچنگ گرد آب شیرین *Potamon* ایران، بر اساس ویژگی های ریخت-شناسی و ژنتیکی پرداختند و توانستند چندین گونه شامل *Potamon* ilam، *Potamon Savigny* را بر اساس شکل اولین گونوپود جنس نر و ویژگی کاراپاس شناسایی کنند. آن ها بیان داشتند تمایز گونه ها از نظر ظاهری بسیار مشکل بوده که برای تشخیص آن ها از یکدیگر توالی ژن 16S rRNA و 28S rRNA را مورد استفاده قرار دادند. که این مطالعه توانست شمار گونه ها را در جنس *Potamon* به ۲۲ عدد افزایش دهد. ساختار ژنتیکی جمعیت و تاریخچه جمعیتی خرچنگ گرد آب شیرین *P. elbursi* از کوه های البرز بر اساس ژن COI در شمال ایران توسط Keikhosravi *et al.* (2015) مورد بررسی قرار گرفت. ۶۱ نمونه از ۶ رودخانه با دو حوضه رودخانه ای متفاوت از کوه های البرز، دریاچه نمک قم و حوضه جنوبی دریای خزر جمع آوری شدند. آنالیز مقایسه‌ای توالی ژن زیرواحد COI میتوکندریایی، تنوع هاپلوتیپی بالا و تنوع نوکلئوتیدی پایینی را نشان داد. در ۴ جمعیت، وابستگی بین شبکه هاپلوتیپ و جداسازی جغرافیایی بین حوضه رودخانه ها وجود ندارد، در حالیکه دو جمعیت باقی مانده دارای هاپلوتیپ های اختصاص یافته بودند. آنالیز توزیع نابرابر[8]، همراه با شبکه هاپلوتیپ و سنجه های تنوع هاپلوتیپی و نوکلئوتیدی، نشان داد جمعیت های اخیر از تنگناهای نوسانات آب و هوایی دوره پلیستوسن[9] تاثیر پذیرفته اند. با توجه به این که مطالعات جامعی در مورد خرچنگ های گرد آب شیرین در کشور انجام نشده است و مطالعات مولکولی در این زمینه اندک است این مطالعه قصد دارد مشخص کند که افراد خانواده Potamidae در رودخانه های شرق استان تهران با توجه به شرایط خاص آن متعلق به کدام گونه بوده و از چه ساختار ژنتیکی برخوردار هستند؟ چرا که پاسخ به این پرسش ها از نظر تنوع زیستی، تکاملی و حفاظتی بسیار دارای اهمیت می باشد.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه ها و شناسایی ریختی

انتخاب ایستگاه ها براساس امکان دسترسی، وضعیت طبیعی منطقه، پوشش گیاهی، شیب زمین، پیوستن شاخه های فرعی به شاخه اصلی، سرعت جریان آب، پوشش گیاهی و بستر رودخانه صورت پذیرفت. شکل ۱ محدوده رودخانه جاجرود و جدول ۱ ایستگاه های نمونه برداری را بر روی آن نشان می‌دهد.

نمونه ها توسط تور دستی کوچک جمع آوری شدند سپس توسط الکل ۹۶ تثبیت گردیدند. نمونه ها، به آزمایشگاه دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران منتقل شدند و پس از شناسایی توسط کلیدهای شناسایی (خاتمی، ۱۳۷۸) برای بررسی های مولکولی



شکل ۱- نقشه رودخانه های استان تهران بهمراه موقعیت ایستگاه های نمونه برداری که با علامت ستاره (☆) مشخص شده است
Fig. 1- Map showing rivers of Tehran Province. Sampling locations are marked by☆

www.SID.ir

Archive of SID

مورد استفاده قرار گرفتند. برای شناسایی ریخت شناسی از ویژگی های ریخت شناسی مانند وزن بدن، طول کاراپاس، عرض کاراپاس، جنسیت، وجود موهای ریز در اطراف لبه کاراپاس، دندانه‌دار بودن فاصله حد واسط بخش خارجی چشم ناحیه برون آبششی، کم‌عرض بودن قسمت پیشانی، رنگ کاراپاس و سه‌گوش بودن گوشه حدقه بیرونی چشم استفاده شد.

آنالیزمولکولی

بمنظور بررسی های مولکولی از هر ایستگاه، ۱۰ نمونه جمع آوری شد. بنابر دستورالعمل کیت استخراج DNA سیناژن، از ۵۰ میلی گرم بافت ماهیچه پا برای استخراج DNA نمونه ها استفاده گردید. کیفیت و کمیت DNA توسط بیوفتومتر و ژل آگاروز یک درصد مورد بررسی قرار گرفت.

سپس با استفاده از پرایمر LCO1490:5′-GGTCAACAAATC ′ATAAAGATATTGG-3 و HCO2198 5′-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3′ Folmer *et al*., (1994) واکنش های زنجیره ای پلیمر برای تکثیر قطعه ژن سیتوکروم اکسیداز I(COI) انجام شد. در این مطالعه از آغازگرهای ریزماهواره ای طراحی شده توسط Yufang *et al*. (2009) بر اساس ترادف DNA ژنومی خرچنگ گرد استفاده شد. ویژگی های آغازگرهای اختصاصی ریزماهواره استفاده شده برای تکثیر ژن های خرچنگ گرد آب شیرین *Longpotamon yangtsekiense* در جدول ۲ آورده شده است. برای آنالیز نهایی، محصول های PCR مربوط به آنالیز ریزماهواره بر روی ژل اکریل آمید ۸ ٪ ظاهرسازی شدند. سنجش وزن مولکولی نوارهای محصول PCR، اندازه آلل ها با استفاده از نرم افزار Lab Image v.3.3.3 و با بکارگیری تصویر های گرفته شده از ژل پلی اکریل آمید رنگ آمیزی شده انجام شد. مشاهده یک نوار برروی ژل پلی اکریل آمید هموزیگوسیتی و مشاهده دو نوار، هتروزیگوسیتی را نشان می دهد. فراوانی آللی[10]، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده، تعداد آلل های واقعی و موثر[11] در جایگاه‌های ریزماهواره‌ای، سنجه شانون[12]، تنوع ژنتیکی، آزمون AMOVA در سطح احتمال ۰/۰۱ در نرم افزار Gene Alex v. 6.4 (Peakall and Smouse, 2009)، محاسبه گردید. بمنظور ترسیم درخت بیشینه احتمال[13] در ابتدا بهترین مدل با استفاده از نرم افزار JModel Test 0.1 تعیین شد و سپس این درخت توسط نرم افزار MEGA v. 5.5 (Tamura *et al*., 2007) ترسیم گردید. داده های ژنتیکی این مطالعه برای تحلیل و مقایسه در برنامه‌ی Excel وارد و سپس توسط نرم‌افزار SPSS22 به روش آنالیز واریانس تک متغیره مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌ها از طریق آزمون دانکن[14] در سطح ۰/۰۵ صورت گرفت.

جدول ۱- ویژگی های رود و ایستگاه‌های نمونه‌برداری
Table 1. characteristics of rivers and sampling stations

رودخانه River	ایستگاه Station	موقعیت جغرافیایی Geographical situation		
		طول (شمالی) Longitude	عرض (شرقی) Latitude	ارتفاع از سطح دریا (متر) Altitude
جاجرود (Jajroud)	فشم (Qhesgm)	35 55’ 43“	51 31’ 27“	1931
	سعیدآباد (Saeedabad)	35 43’ 26“	51 42’ 65“	1455
	خجیر (Khojir)	35 40’ 08“	51 43’ 09“	1328
	پاکدشت (Pakdasht)	35 31’ 26“	51 47’ 83“	1167
حبله‌رود (Hableroud)	زرین‌دشت (Zarindasht)	35 35’96“	52 37’33“	1640
	سیمین‌دشت (Simindasht)	35 31’ 02“	52 30’ 11“	1514
	خمده (Khomdeh)	35 40’ 32“	52 41’ 19“	1789
	انزها (Anzaha)	35 35’ 78“	52 38’ 32“	1687
لار (Lar)	پلور (Plour)	35 49 18“	52 02’ 13“	2307
	لار (Lar)	35 50’ 20“	52 02’ 38“	2259

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- جدول ویژگی های آغازگرهای ریزماهواره استفاده شده در این پژوهش بهمراه نام آغازگر، واحدهای تکرار شونده و توالی نوکلئوتیدی آغازگرها (Yufang *et al.*, 2009)

Table 2. Satellite primers used for the study (based on Yufang *et al.*, 2009)

نام آغازگر Primer name	واحد تکرار شونده Repeat unit	توالی نوکلئوتیدی آغازگر Nucleotide sequence of primer
hxx2-F	(TG)14	F: GTGACGCACCGTGTTGTCT
hxx2-R		R: CGCATTGCCAATTAGTGT
hxx3-F	(TG)13…(AG)6	GTAACGATGCAAGATGCT
hxx3-R		CTAGATAAGCCTATCGCTCAT
Ga1-F	(GA)25	TGTTGTAGGTAAAGTGGGAG
Ga1-R		GCACGTCAGGAGTAAGAAT
Ga2-F	(TC)13	TTTAGTCCTCCCTACTCGTT
Ga2-R		TCGTTTCTTCAGTGTGCC
Gagt4-F	(CTCA)7	CTTAGTATTGCAAGTTCAGTC
Gagt4-R		CAGCTGTACTGAGCACTTAG

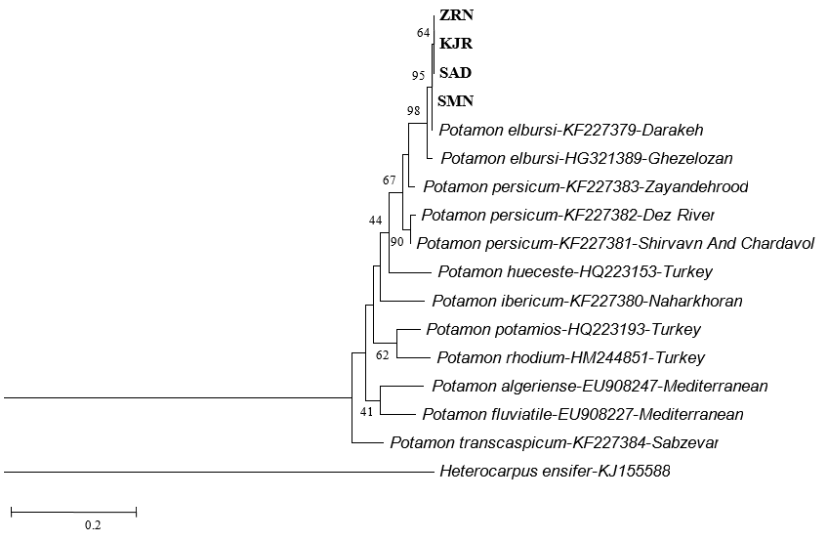
نتایج و بحث

اگرچه استفاده از سنجه‌های مولکولی نقش مهمی را در شناسایی گونه ها بازی می کند، اطلاعات ریخت شناختی و زیست شناختی همچنان ابزار اولیه شناسایی محسوب می شوند (Franklin *et al.*, 2007; Duda, 2008; Lorenz and Puillandre, 2015). در مطالعه حاضر نیز شناسایی نمونه ها توسط ویژگی های ریخت شناسی کلیدی بر اساس کلیدهای شناسایی صورت گرفت. کاراپاس این خرچنگ کمابیش مربعی شکل است که دارای پهنای وسیع تری نسبت به طول آن می باشد. حاشیه بالایی جانبی کاراپاس حد واسط بخش خارجی چشم[15] و ناحیه برون آبششی[16] دندانه‌دار است. چشم‌ها در لبه فوقانی جانبی کاراپاس قرار دارند. قسمت جلو یا پیشانی کم‌عرض، یکپارچه و اندکی موجدار به نظر می رسد. پیش پاره‌های[17] پاهای حرکتی (پاهای حرکتی ۲ تا ۵) صاف و انگشت پاهای حرکتی دندانه‌دار است. اندازه چنگال‌ها در هر دو جنس متفاوت است. چنگال‌ها مدور شده و انگشت بالایی متحرک است. انگشت متحرک چنگال بزرگ‌تر باریک و دارای خمیدگی است. لبه‌های داخلی سومین پای آرواره‌ای از طول در قسمت جلو به هم متصل شده‌اند، سومین پای آرواره‌ای دارای تاژک است. زائده حسی آرواره فوقانی دارای سه بند است و بند آخر آن یکپارچه می‌باشد. بند انتهایی اولین پای تناسلی مخروطی شکل است و از نصف بخش زیرین آن کوچک‌تر است. بخش زیرین بند انتهایی کمی به سمت داخل متمایل شده است و دارای شیار می‌باشد. دومین پای تناسلی باریک و دارای یک تاژک است. با توجه به ویژگی های ریخت-شناسی خرچنگ‌های مطالعه حاضر می توان بیان داشت این نمونه ها متعلق به گونه *P.elbursi* می باشند. تبارشناختی و رده بندی[18] خرچنگ های آب شیرین، بویژه در جنس *Potamon* در خاورمیانه، توسط کارشناسان مورد مطالعه قرار گرفته است. در گذشته، ۵ زیرجنس از *Potamon* تشخیص داده شد که براساس ریخت شناسی G1 (اولین گونوپود) آن ها بوده است (Brandis *et al.*, 2005). بعدها (Ng *et al.* 2008) تمام زیرجنس ها را حذف کرد، ولی در مطالعه تبارشناختی که بر روی سیر تکامل *Potamon* در ناحیه اژه انجام شد از به رسمیت شناختن این زیرجنس ها حمایت کرده است (Jess *et al.*, 201). با این حال در حال حاضر روشی استاندارد مبتنی بر توالی ژن COI میتوکندری که دارای طولی در حدود ۶۵۰bp می باشد، بعنوان ابزاری سودمند برای شناسایی موجود ها و تعیین مرز گونه ها بکار می رود بر این اساس تغییر هایی که در توالی ژن COI در گونه های مختلف ایجاد می شود، ابزاری دقیق برای شناسایی و

www.SID.ir

Archive of SID

طبقه بندی موجود ها و معرفی گونه های جدید مطرح می باشد (Costa and Carvalho, 2007). نتایج شناسایی مولکولی نمونه های مطالعه حاضر بر اساس ژن COI میتوکندری نیز تایید کننده نتایج شناسایی ریخت شناسی در به رسمیت شناختن این گونه به نام *P. elbursi* می باشد. درخت تبارشناختی و فاصله ژنتیکی نشان داد همه نمونه ها با بوت استراپ [19] بالا (BS=98) با توالی ثبت شده گونه *P. elbursi* که از منطقه درکه می باشد رابطه خواهری داشته و همگونه می باشند بنابراین تمام نمونه های مورد مطالعه متعلق به گونه *P. elbursi* می باشند (شکل۲، جدول۳). که با نتایج مطالعات ریخت شناسی مطابقت دارد.



شکل ۲- درخت ML(Maximum Likelihood) از قطعه ژنی میتوکندریائی COI از جنس *Potamon* (ZRN نمونه زرین دشت، KJR نمونه خجیر، SAD نمونه سعیدآباد، SMN نمونه سیمین دشت)

Fig. 2- The Maximum Likelihood tree of COI fragment of Potamon. ZRN: Zarindasht, KJR: Khajir, SAD: Saeedabad, SMN: Simindasht

جدول ۳- فاصله ژنتیکی گونه های نزدیک به *Potamon elbursi* بر حسب مدل K2P

Table 3. Genetic distance of some species related to *Potamon elbursi* according to the K2P Modele

ZRN											
KJR	0/000										
SAD	0/000	0/000									
SMN	0/000	0/000	0/000								
Potamon_elbursi-KF227379-Darakeh	0/000	0/000	0/000	0/000							
Potamon_elbursi-HG321389-Gezelozon	0/009	0/009	0/009	0/009	0/009						
Potamon_persicum-KF227383-Zayandehrood	0/036	0/036	0/036	0/036	0/036	0/042					
Potamon_persicum-KF227382-Dez_river	0/033	0/033	0/033	0/033	0/033	0/033	0/030				
Potamon_persicum-KF-227381Shirvan_and_Chardavol	0/033	0/033	0/033	0/033	0/033	0/033	0/024	0/006			
Potamon_hueceste-HQ223153-Turkey	0/076	0/076	0/076	0/076	0/076	0/076	0/066	0/069	0/063		
Potamon_potamios-HQ223193-Turkey	0/085	0/085	0/085	0/085	0/085	0/079	0/069	0/079	0/073	0/082	
Heterocarpus_ensifer-KJ155588	0/211	0/211	0/211	0/211	0/211	0/218	0/202	0/211	0/211	0/236	0/227

www.SID.ir

Archive of SID

در این پژوهش، ۵ جایگاه hxx2، hxx3، Ga1، Ga2 وGagt4 در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، مورد تکثیر قرار گرفت که در این میان جایگاه‌های hxx2، hxx3، Ga1 وGagt4 در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر شدند ولی جایگاه Ga2 باوجود تغییر های مختلف ایجادشده در بهینه‌سازی شرایط PCR آن، تکثیر نگردید. محدوده باندی و تعداد آلل به دست آمده از هرجایگاه ژنی در جدول ۳ آورده شده است و در ادامه پارامترهای آماری به دست آمده برای هر جایگاه ژنی، در هر جمعیت به تفصیل آمده است (جدول۴، شکل۳).

براساس نتایج به دست آمده بیشترین تعداد آلل واقعی با ۷ آلل در جایگاه ژنی Ga1و hxx2 وکمترین آلل واقعی در جایگاه ژنی Gagt4 با ۳ آلل مشاهده گردید (شکل ۲). بررسی تعداد آلل های اختصاصی و هتروزیگوسیتی در جمعیت های مختلف برای حفاظت ژنتیکی بسیار مفید هستند. یکی از اقدام های ضروری برای توصیف وضعیت ژنتیکی یک جمعیت که به ژن های حامل آن جمعیت اشاره می کند تشخیص تنوع آللی و شمارش هر ژنوتیپ است. هتروزیگوسیتی مورد انتظار برای محاسبه تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار می گیرد، ولی حساسیت کمتری نسبت به حضور آلل های نادر دارد. برای مثال جمعیت های در تنگنا، فراوانی آللی را سریعتر از هتروزیگوسیتی کاهش می دهند (Kalinowski, 2005). خرچنگ ها بعنوان موجود هایی با توانایی پراکنش پایین و تمایل و توانایی محدود برای عبور از فاصله های خشکی می باشند که این مساله سبب شده که خرچنگ های آب شیرین از نظر بیوجغرافیایی دارای اهمیت باشند و تبدیل به مدل های مناسبی برای بازسازی تاریخ تکاملی سیستم های آبی، دموگرافی جمعیت های هم گونه، براورد تاثیر فعالیت های انسانی روی زیستگاه های آب شیرین و میزان تاثیر های یخبندان ها روی تنوع ژنتیکی گونه ها شوند (Keikhosravi, 2013). بدلیل فیلوپاتریک[20] بودن و میزان بالای انزوا در خرچنگ های آب شیرین، گونه زایی ناهمجا[21] به فراوانی در این گروه اتفاق می افتد. ریزماهواره ها سنجه ای حساس در اندازه گیری هموزیگوسیتی در جفتگیری های همخون می باشند، بنابراین برای تشخیص تمایز اندک بین جمعیت ها مناسب هستند (Alarcon *et al*., 2004). بمنظور بررسی تنوع ژنتیکی درون جمعیتی معیارهای هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) و مورد انتظار (He) برای هر منطقه و در هر جایگاه ژنی به دست آمد. بنابر نتایج به دست آمده، دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده در تمامی جایگاه های ژنی جمعیت‌ها، بین ۰/۱۰۰تا ۰/۷۰۰ بود و بیشترین هتروزیگوسیتی مشاهده شده در جایگاه ژنی Ga1 سعیدآباد و کمترین مقدار در جایگاه های ژنی Gagt4 سعیدآباد .با فراوانی ۰/۱۰۰ مشاهده گردید (جدول ۴).

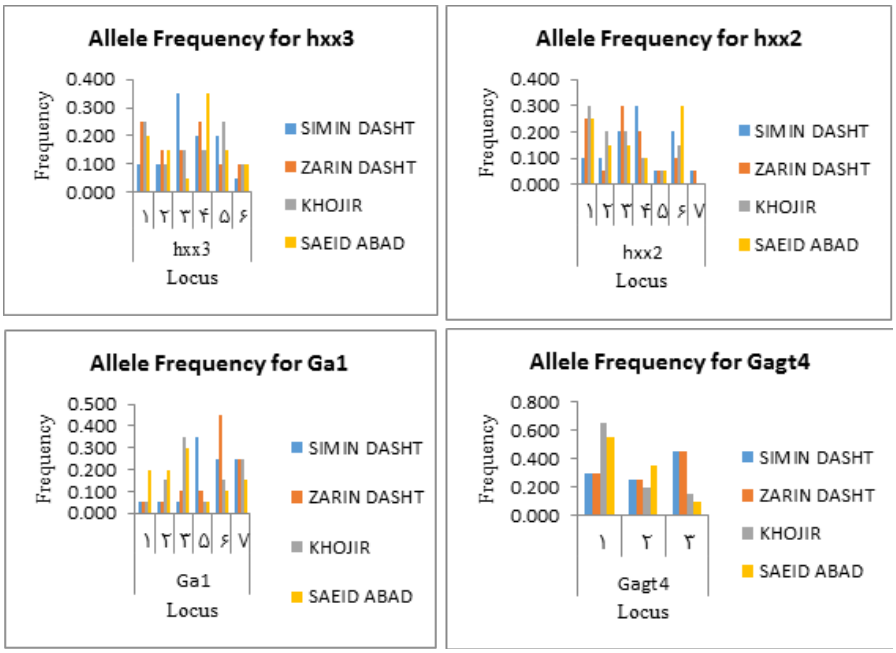
در مطالعه حاضر دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) بین ایستگاه های نمونه برداری در جایگاه های چهارگانه بین ۰/۷۰۰- ۰/۱۰۰ بود. بیشترین میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده در جایگاه ژنی Ga1 با مقدار۰/۷۰۰ بیشترین بوده و کمترین مقدار در جایگاه ژنی Gagt4 با مقدار ۰/۱۰۰ در بین نمونه های جمع آوری شده از منطقه دیده شد. کاهش در هتروزیگوسیتی مشاهده شده می تواند نتیجه عامل هایی از قبیل وجود آلل های null، یا عامل های بیولوژیکی از قبیل درون آمیزی، ادغام جمعیت ها یا انتخاب طبیعی باشد (Zheng *et al*., 2009). دامنه هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He) بین ایستگاه های نمونه برداری در جایگاه ها بین ۰/۸۱۰-۰/۵۱۵ بود. بیشترین میزان

جدول۴- ویژگی ها و نتایج به دست آمده از جایگاه‌های ریزماهواره‌ای مورد مطالعه
Table 4. Properties of the studied satellite loci

جایگاه ژنی Loci	تعداد چرخه cycles#	تعداد آلل # allele	دمای اتصال Annealing temperature	واحدتکرارشونده Repeated unit	دامنه آللی مشاهده شده Observed allele range
hxx3	35	6	50	TG)13…(AG)6)	260-390
Gagt4	35	3	49	CTCA)7)	116-128
Ga1	35	7	50	GA)25)	134-300
hxx2	35	7	51	TG)14)	136-332

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۳- نمودار فراوانی آللی جایگاه ژنی hxx2، hxx3، Ga1، Gagt4 در جمعیت‌های مورد مطالعه با استفاده از نرم افزار Gene Alex

Fig. 3- Allelic abundance at hxx2، hxx3، Ga1، Gagt4 loci in the studied population using Gene Alex

هتروزیگوسیتی مورد انتظار در جایگاه hxx3 زرین دشت و خجیر و کمترین میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار مربوط به جایگاه Gagt4 خجیر می باشد. در این بررسی در همه منطقه های نمونه برداری شده و در تمامی لوکوس ها، هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوسیتی قابل انتظار پایین تر بود. کاهش هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوسیتی مورد انتظار نشان دهنده کاهش در تغییرپذیری ژنتیکی نمونه ها است. دلیل این کاهش تنگناهای ژنتیکی می باشند که احتمالا بر اثر تخریب زیستگاه های طبیعی، آمیزش های خویشاوندی بوجود می آید و در نتیجه با گذشت زمان موجب کاهش آلل و کاهش هتروزیگوسیتی در ذخیره ها می شود (Norris *et al*., 1999). آلل های مشاهده شده در هر جایگاه ژنی بشدت تحت تاثیر اندازه نمونه بوده و به همین جهت این امکان وجود دارد که در آزمایش های گوناگون با تعداد نمونه های متفاوت، تعداد آلل های واقعی مختلفی برای یک جایگاه معین به دست آید (Peakall and Smous, 2005). Heldstab (1995) and Katoh در مطالعه ای که بمنظور بررسی تنوع ژنتیکی ماهی سوف حاجی طرخان در سیستم های آب های زهکشی انجام دادند، تنوع ژنتیکی پایینی را بدلیل مشاهده هتروزیگوسیتی پایین گزارش کردند. آن ها دلیل این امر را به نظریه های مطرح شده توسط Nei *et al*. (1975) نسبت دادند بدین شرح که چنانچه جمعیتی، کاهش شدیدی را از نظر اندازه تجربه کند، تنوع ژنتیکی جمعیت در اثر رانش ژنتیکی کم خواهد شد. از سوی دیگر از زمان آخرین عصر یخبندان در حدود ۱۰۰۰۰ سال قبل که بسیاری از گونه ها از تنگناهای ژنتیکی عبورکردند زمان کافی برای رسیدن به سطح نرمال هتروزیگوسیتی سپری نشده است. بنابر مطالعات، محققان بیان داشتند آخرین پراکنش گونه *P. elbursi* به دوره پلیستوسن برمی گردد و به نظر می رسد یک میلیون سال پیش رخ داده است. دلیل صحت این مدعا نوسانات آب و هوایی در طول این دوران بیان شده که بر روی ساختار جمعیت ها تاثیر گذاشته و سبب پراکنش گونه های ساکن در کوه های البرز شده و به نفع روندهای گونه زایی در این منطقه پیش رفته است (Keikhosra-vi *et al*., 2015). در مطالعه ای که توسط کیخسروی و همکاران بر روی مطالعات ژنتیک جمعیت خرچنگ *P. elbursi* صورت گرفت دریافتند از شش جمعیت مورد بررسی در استان البرز تنها در دو جمعیت، هاپلوتایپهای اختصاصی دیده می شود که آن ها دلیل این امر را پراکندگی محدود اندک خرچنگ، توانایی و تمایل پایین آن ها در عبور از مرزهای خشکی دانسته اند. همچنین Ng *et al*. (2008) بیان داشتند. خرچنگ ها با مراقبت والدینی بطور مستقیم رشد می یابند و این روند سبب کمبود تنوع درون

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۵- تعداد آلل‌های واقعی، موثر سنجه شانون، هتروزیگوسیتی مشاهده شده، هتروزیگوسیتی مورد انتظار در تمام جمعیت‌ها به ازای هر جایگاه ژنی با استفاده از نرم افزار Gene Alex

Table 5. Allele frequency(actual, effective), Shannon index, observed heterozygosity, and expected heterozygosity in all populations for each locus using Gene Alex

جمعیت Population	جایگاه ژنی Loci	تعداد نمونه Number of samples	تعداد آلل واقعی frequency of actual allele	تعداد آلل موثر fre-quency of effective allele	شاخص شانون Shannon index	هتروزیگوسیتی مشاهده شده(H_O) Observed het-erozygosity	هتروزیگوسیتی مورد انتظار(He) Expected het-erozygosity
سیمین دشت	hxx3	10	6000	4.444	1.622	0.200	0.775
	Gagt4	10	3000	2.817	1.067	0.200	0.645
	Ga1	10	6000	3.992	1.510	0.600	0.745
	hxx2	10	7000	5.128	1.765	0.500	0.805
زرین دشت	hxx3	10	6000	5.263	1.723	0.400	0.810
	Gagt4	10	3000	2.817	1.067	0.200	0.645
	Ga1	10	6000	3.448	1.466	0.600	0.710
	hxx2	10	7000	4.762	1.769	0.400	0.790
خجیر	hxx3	10	6000	5.263	1.723	0.400	0.810
	Gagt4	10	3000	2.062	1.886	0.300	0.515
	Ga1	10	6000	4.255	1.583	0.500	0.765
	hxx2	10	6000	4.787	1.673	0.500	0.795
سعید آباد	hxx3	10	6000	5.545	1.639	0.400	0.780
	Gagt4	10	3000	2.299	0.927	0.100	0.565
	Ga1	10	6000	4.878	1.670	0.700	0.795
	hxx2	10	6000	4.762	1.657	0.500	0.790

جمعیتی در آن ها می گردد. چرا که خرچنگ ها بطور معمول در مجاورت رودخانه ها گشت زنی می کنند بنابراین انتظار می رود جمعیت آن ها از نظر ژنتیکی در این مکان ها همگون می باشد (Cumberlidge *et al*., 2009).

نتیجه گیری

مطالعه حاضر نشان داد شناسایی بر اساس نشانگرهای ژنتیکی برای قرار دادن صحیح گونه ها در جایگاه اصلی خود مفید بوده و می تواند تایید کننده شناسایی های مبتنی بر ریخت شنایی باشد. از طرفی میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده در مطالعه حاضر در بیشتر موارد بیش از هتروزیگوسیتی مورد انتظار بود .بطورکلی کاهش هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوسیتی مورد انتظار نشان دهنده کاهش در تغییرپذیری ژنتیکی نمونه ها است. همچنین محاسبه ضرایب افت هتروزیگوسیتی نشان داد که در همه منطقه های نمونه برداری و در تمام جایگاه ها، افزایش هتروزیگوسیتی وجود داشته است. بنابراین پیشنهاد می شود، شناسایی های ژنتیکی بعنوان مکمل در کنار تاکسونومی سنتی استفاده شود و سبب تسهیل پژوهش در زمینه تنوع گونه ای و توصیف گونه ها، بویژه گونه های نزدیک بهم گردد و همچنین پیشنهاد می گردد از طریق مطالعات مولکولی سیتماتیک خرچنگ های گرد آب شیرین مطالعه شود تا وضعیت روابط خویشاوندی بین آن ها مشخص شده و بتوان نسبت به چگونگی سیر تکامل آن ها اطلاعات بیشتری به دست آورد.

پی نوشت ها

[1] Microsatellite
[2] Primer
[3] Polymorph
[4] Observed heterozygosity

www.SID.ir

Archive of SID

[5] Expected heterozygosity
[6] Phylogeny
[7] Endemism
[8] Unequal distribution
[9] Pleistocene
[10] Allele frequency
[11] Effective allele
[12] Shannon index
[13] Maximum likelihood
[14] Duncans multiple range test
[15] Exorbital
[16] Epibranchial
[17] Propodus
[18] Taxonomy
[19] Bootsratp
[20] Philopatric
[21] Allopatric

منابع

Alarco´na, J.A., Magoulasb, A., Georgakopoulosb, T., Zourosb, C., Alvarez, M.C., 2004. Genetic comparison of wild and cultivated European populations of the gilthead sea bream (Sparus aurata), Aquaculture. 230, 65–80.

Alcock, A., 1909. Diagnoses of new species and varieties of freshwater crabs. No. 4. Records of the Indian Museum. 3, 375–381.

Bahmani, M. 1994. identification and distribution study of crabs in Hormozgan province, MSc thesis, Tehran Shomal unit, Islamic Azad University.

Bataillon,T.M.. David, J.L., Schoen, D.J., 1996. Neutral Genetic Markers and Conservation Genetics: Simulated Germplasm Collections. Genetics. 14, 409-417.

Brandis, D., storch, V., Türkay, M., 2000. Taxonomy and zoogeography of the freshwater crabs of europe, North Africa, and the Middle east. Senckenbergiana Biologica. 80, 5-56.

Carver T, Harris SR, Berriman M, Parkhill J, McQuillan JA, 2012. Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. Bioinformatics. 28, 464-469.

Christian P. Ridley, Ho Young Lee, and Chaitan Khosla. 2008. Evolution of polyketide synthases in bacteria. creavatity and collaboration. 105, 4595-4600.

Costa, F.O., Carvalho, G.R., 2007. The Barcode of Life Initiative: synopsis and prospective societal impacts of DNA barcoding of Fish. Genomics, society, and policy. 3, 29-40

Cumberlidge, N., Ng, P.K.L., Yeo, D.C.J., Magalhaes, C., Campos, M.R., Alvarez, F., Naruse, T., Daniels, S.R., Esser, L.J., Attipoe, F.Y.K., Clotilde-Ba, F.L., Darwall, W., McIvor, A., Baillie, JE..M., Collen, B., Ram, M., 2009. Freshwater crabs and the biodiversity crisis: importance, threats, status, and conservation challenges. Biology Conservation. 142, 1665-1673.

Duda, T.F. 2008. Differentiation of venoms of predatory marine gastropods: Divergence of orthologous toxin genes of closely related Conus species with different dietary specializations.Journal of Molecular Evolution,67:315-321.

Franklin J, B., Fernando, S.A., Chalke, B.A. and Krishnan, K.S. 2007. Radular morphology of Conus (Gastropoda: Caenogastropoda: Conidae) from India. Molluscan Research, 27:111–122.

Heldstab, H., Katoh, M., 1995. Low genetic variation in perch (Perca fluviatilis L.) from three major European drainage systems in Switzerland. Aquatic Sciences. 57, 14–19.

Jesse, r., Pfenninger, M., Fratini, s., scalici, M., streit, B., schubart, C.D., 2009. Disjunct distribution of the Mediterranean freshwater crab Potamon fluviatile - natural expansion or human introduction? Biology invasions. 10, 2209-2221.

Kalinowski, S.T., 2005. Do polymorphic loci require large sample sizes to estimate genetic distances. Journal of Heredity. 94, 33-36.

KeiKhosrAvi, A., Fratini, S., Schubart, C.D., 2015. Population genetic structure and demographic history of the freshwater crab Potamon elbursi (Brachyura: Potamidae) from the Alborz Mountains in northern Iran. Journal of Limnology. 74, 512-518.

www.SID.ir

Archive of SID

Khatami, Sh, 1999. species identification and biological study of a freshwater crab from Jajrood River. MSc thesis, Tehran Shomal unit, Islamic Azad University. pp145.

Litt, M., Luty, J.A., 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. American Journal of Human Genetics. 44, 397–401.

Lorenz, F. and Puillandre, N. 2015. Conus hughmorrisoni, a new species of cone snail from New Ireland, Papua New Guinea (Gastropoda: Conidae). EuropeanJournal of Taxonomy, 129: 1–15.

Monaghan, M.T., Balke, M., Gregory, T.R.and Vogler, A.P., 2005. DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers. Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences, 360, 1925–1933.

Nei, M., Maruyama, T., Chakraborty, R.,1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. Evolution. 29, 1-10.

Ng, P.K.L., Guinot, D. and Davie, P.J.F., 2008. Systema Brachyurorum: Part I. An annotated checklist of extant brachyuran crabs of the world. Raffles Bulletin of Zoology, Supplement. 17, 1–286.

Norris, A.T., Bradley, D.G., Cunningham, E.P., 1999. Microsatellite genetic variation between and within/farmed and wild Atlantic salmonSalmo salarpopulations. Aquaculture. 180, 247–264.

Pujolr, J.M., Capoccioni, F., Ciccotti, E., Deleo, G.A., Zane, L. 2009. Genetic variability is unrelated to growth and parasite infestation in natural populations of the European eel (Anguilla anguilla). Molecular Ecology. 18, 4604-4616.

Peakall, R., Smouse, P.E., 2008. A heterogeneity test for fine-scale genetic structure. Central European Journal of Biology.17, 3389-3400.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. 2013. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0.

Zheng, X., Ikeda, M., Kong, L., Lin, Q.L., Taniguchi, N., 2009. Genetic diversity and population structure of the golden cuttlefish, Sepia esculenta (Cephalopoda: Sepiidae) indicated by microsatellite DNA variations. Marine ecology. 4, 448-454.

www.SID.ir

Archive of SID

Environmental Sciences Vol.17/ No.3/ Autumn 2019

163-176

Assessment of genetic diversity of *Potamon elbursi* in eastern rivers of Tehran Province

Simak Yosefi Siahkalroudi[1*], Samaneh Fadaie[1], Farideh Chenari[2] and Shadi Khatami[3]

[1]Department of Biology, Faculty of Biological Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University of Varamin, Iran
[2]Research and Development of mahiran, Protein Gostar Sina Co., Tehran, Iran
[3]Department of Marine Biology, Faculty of Natural Resources, Bandar Abbas Branch, Islamic Azad University of Bandar Abbas, Iran

Received: 2019.02.18 Accepted: 2019.07.17

Yosefi Siahkalroudi, S., Fadaie, S., Chenari, F. and Khatami, Sh., 2019. Assessment of genetic diversity of *Potamon elbursi* in eastern rivers of Tehran Province. Environmental Science.17(3): 163-176.

Introduction: investigation in genetical diversity are an effective tools for conservation of valuable, rare and endangered species. up until now, few studies have been conducted on the ecology of freshwater crabs in Iran and so their conservation issues are not fully known. This study aimed to assess the genetic diversity of the true crab, *Potamon elbursi*, from the eastern lakes of Tehran.

Material and methods: The genetic structure of *P. elbursi* crab was investigated from the eastern rivers of Tehran Province using microsatellite markers. In order to study the genetic diversity within populations, 10 samples were caught with hand-operated net in different parts of Jajroud, Hablehrood and Lar rivers. Samples were first assessed for morphological variations using appropriate keys. Molecular identification of species was performed by COI gene sequencing. Then, the characterization of microsatellite loci (i.e., hxx3, Gagt4, Ga1, Ga2, and hxx2) was done using primers from *Longpotamon yangtsekiense*. Allelic abundance, expected/ observed heterozygosity, true alleles abundance, and genetic diversity were assessed using AMOVA at p= 0.01 level. Using images of the stained polyacrylamide gel, the molecular weight of the PCR product bands and the size of alleles were measured using Lab Image v.3.3.3 software. The allele frequency, expected and observed heterozygosity, number of actual and effective alleles in microsatellite loci, genetic diversity, and AMOVA test were calculated at 0.01 probability level in Gene Alex software. The MEGA software v.5.5 was used for plotting the phylogenetic tree.

*Corresponding Author: *Email Address.*Siamak.yousefi1@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

Results and discussion: The results showed that the COI sequences of all specimens were identical with those of *P. elbursi,* which was also confirmed by morphological analysis. The hxx2 and Ga1 positions with 7 alleles and Gagt4 with 3 alleles had the highest and lowest allele number among all heterozygote sites, respectively. The results also showed that the populations of this crayfish had a small intrinsic diversity.The observed and expected heterozygosity among the sampling stations at tetrad loci ranged from 0.100 to 0.51 and 0/81. 0.515-0.810, respectively.

Conclusion: Molecular identification methods may be useful for finding the exact lineage of the species and confirming morphological identification methods. In this study, in all samples from all locations and all loci, the observed heterozygosity was lower than the expected heterozygosity.

Keywords: Genetic diversity, *Potamon.elbursi*, Fresh water, Tehran Province.

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir