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

۱۶۳-۱۷۶

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 گونه‌های پراهمیت، با ارزش و هم چنین گونه‌های کمیاب در معرض خطر انقراض می‌باشد. با توجه به اینکه مطالعات، در ارتباط با گونه‌های خرچنگ‌های آب شیرین در ایران بسیار اندک است و از نظر حفاظتی توجه چندانی به آن‌ها صورت نگرفته است. این مطالعه به بررسی تنوع ژنتیکی خرچنگ حقیقی *Potamon elbursi* در رودخانه‌های شرق استان تهران می‌پردازد.

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 بررسی‌های 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 بررسی‌های تنوع درون گونه ای استفاده گردید. بمنظور انجام آنالیز نهایی محصول‌های PCR مربوط به هریک از جایگاه‌های ریزماهواره، این محصول‌ها بر روی ژل اکریل آمید ۸٪ شارژ شدند. سنجش وزن مولکولی نوارهای محصول PCR و اندازه آلل‌ها 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 خرچنگ‌های مورد مطالعه مربوط به گونه *P. elbursi* می‌باشد 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 جایگاه‌ها 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 جایگاه‌های هتروزیگوت بودند. نتایج نشان داد که جمعیت‌های این گونه خرچنگ دارای تنوع درون جمعیتی اندکی می‌باشد. دامنه

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

هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho)[5] در میان ایستگاه‌های نمونه برداری در جایگاه‌های چهارگانه ۱۰۰/۷۰۰-۰/۰ و دامنه هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He)[6] بین ۰/۸۱۰- ۰/۵۱۵ بود. در این بررسی در همه‌ی منطقه‌های نمونه برداری شده و در تمامی لوکوس‌ها، هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوسیتی قابل انتظار پایین‌تر بود.

نتیجه‌گیری: شناسایی بر اساس نشانگرهای ژنتیکی برای قرار دادن صحیح گونه‌ها در جایگاه اصلی خود مفید بوده و می‌تواند تایید کننده شناسایی‌های مبتنی بر ریخت شنایی باشد. کاهش هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوسیتی مورد انتظار نشان دهنده کاهش در تغییرپذیری ژنتیکی نمونه‌ها است.

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

مقدمه

خرچنگ‌های حقیقی جزء پیشرفته‌ترین اعضای راسته ده پایان (شاخه بندپایان) بشمار می‌روند که از میان بیش از ۶۷۰۰ گونه شناخته شده از خرچنگ‌های حقیقی، بیش از ۱۳۰۰ گونه آن خرچنگ‌های واقعی آب شیرین هستند (Ng *et al*., 2008). خرچنگ‌های آب شیرین هم از نظر اقتصادی و هم از نظر بوم شناختی گروه بسیار مهمی هستند. از آنجایی که آن‌ها در بسیاری از نقاط جهان مصرف غذایی دارند. بنابراین در اقتصاد شیلات نقش بسیار مهمی دارند. آن‌ها همچنین نسبت به آلودگی آب بسیار حساس می باشند. بنابراین در ارزیابی کیفیت آب دارای اهمیت هستند (Bahmani, 1994). اگرچه نسبت به برنامه حفاظتی این گروه از جانوران غفلت صورت گرفته است. ولی بدلیل صفت‌هایی از قبیل رشد سریع، تولید تعداد زیادی نوزاد و بلوغ جنسی سریع، ثبات جمعیتی خود را حفظ کرده‌اند. جمعیت خرچنگ‌های آب شیرین دارای اندمیسم[7] بالایی هستند که ممکن است بدلیل توانایی محدود آن‌ها در پراکندگی و همچنین تخریب زیستگاه‌های آن‌ها توسط جمعیت‌های انسانی باشد (Keikhosravi *et al*., 2015). تنوع ژنتیکی، قابلیت بقای یک گونه یا جمعیت را از طریق ایجاد توانایی سازگاری با تغییرهای 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 ذخیره‌های گونه مورد نظر است.(Pujolar *et al*., 2009). بررسی روابط تکاملی میان موجودات، می‌تواند نشان دهنده منشا مشترک گونه‌ها باشد و آنالیزهای ژنتیکی برای تفسیر روند تکاملی جمعیت‌هایی که دارای تنوع ژنتیکی بیشتری نسبت به جمعیت‌های کوچک‌تر هستند، مفید می‌باشد (Monaghan *et al*., 2005). این تنوع در آن‌ها سبب رشد سریع‌تر، تکامل و ترکیب شدن ژن‌ها و در پی آن عادت پذیری جمعیت‌های مختلف تحت شرایط محیطی متفاوت می‌شود. افراد جامعه‌های کوچک‌تر از نظر ژنتیکی مشابه‌تر هستند، بنابراین تنوع کمتری دارند و همین نبود تنوع از سازگاری آن‌ها با شرایط محیطی مختلف می‌کاهد. از این رو بررسی تنوع ژنتیکی ابزار موثری در حفظ ژنتیکی گونه‌های پراهمیت و با ارزش و هم چنین گونه‌های کمیاب در معرض خطر انقراض می‌باشد. در مقایسه اطلاعات تبارشناختی، از پروتئین و یا از DNA موجودات استفاده می‌شود که بی گمان اطلاعات تبارشناختی به دست آمده از DNA کامل‌تر از اطلاعات به دست آمده از پروتئین‌ها می‌باشد. از این رو استفاده از ابزارهای مولکولی برای بررسی تنوع ژنتیکی بخاطر توانایی این ابزارها در شناسایی تغییرها در سطح DNA ارزشمند می‌باشد. نشانگرهای مولکولی از جمله ابزارهایی هستند که استفاده از آن‌ها بخاطر عدم تاثیرپذیری آن‌ها از شرایط محیط خارجی و داخلی موجود و حتی استفاده از آن‌ها در مورد گونه‌های منقرض شده، پایه دیگری در انقلاب ژن محسوب می‌شوند. تاکنون انواع زیادی از نشانگرها شناسایی و بکار گرفته شده‌اند و کاربردهای متنوعی برای آن‌ها پیشنهاد شده است (Carver *et al*., 2012). یکی از کاربردهای عمده نشانگرها که سطح‌های بالایی از چندشکلی را بروز می‌دهند، آنالیز تنوع ژنتیکی در

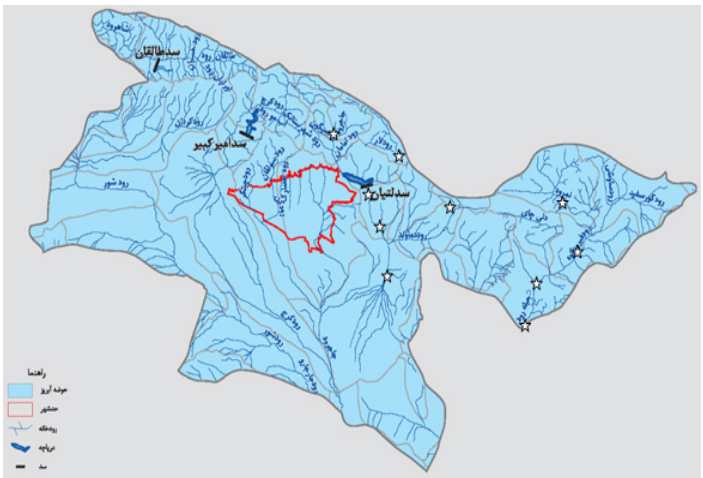
داخل و بین جمعیت‌ها می‌باشد که از کشف آن‌ها بیش از ۲۰ سال نمی‌گذرد و اولین بار توسط Litt and Luty (1989) بکار برده شد. نخستین خرچنگ آب شیرین ایران توسط Olivier (1804) شناسایی و گزارش شده است. از این تاریخ به بعد محققان اروپایی دیگر نمونه‌های فراوانی از خرچنگ‌های ایران را جمع آوری نموده‌اند (Khatami, 1999). 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 ویژگی‌های 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. آن‌ها بیان داشتند تمایز گونه‌ها از نظر ظاهری بسیار مشکل بوده که برای تشخیص آن‌ها از یکدیگر توالی ژن 16S rRNA و 28S rRNA را مورد استفاده قرار دادند. که این مطالعه توانست شمار گونه‌ها را در جنس *Potamon* به ۲۲ عدد افزایش دهد. ساختار ژنتیکی جمعیت و تاریخچه جمعیتی خرچنگ گرد آب شیرین *P. elbursi* از کوه‌های 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 کوه‌های البرز، دریاچه نمک قم و حوضه جنوبی دریای خزر جمع آوری شدند. آنالیز مقایسه ای 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 رودخانه‌ها وجود ندارد، در حالیکه دو جمعیت باقی مانده دارای هاپلوتیپ‌های اختصاص یافته بودند. آنالیز توزیع نابرابر[8]، همراه با شبکه هاپلوتیپ و سنجه‌های تنوع هاپلوتیپی و نوکلئوتیدی، نشان داد جمعیت‌های اخیر از تنگناهای نوسانات آب و هوایی دوره پلیستوسن[9] تاثیر پذیرفته‌اند. با توجه به این که مطالعات جامعی در مورد خرچنگ‌های 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 رودخانه‌های 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 پرسش‌ها از نظر تنوع زیستی، تکاملی و حفاظتی بسیار دارای اهمیت می باشد.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه‌ها و شناسایی ریختی

انتخاب ایستگاه‌ها براساس امکان دسترسی، وضعیت طبیعی منطقه، پوشش گیاهی، شیب زمین، پیوستن شاخه‌های فرعی به شاخه اصلی، سرعت جریان آب، پوشش گیاهی و بستر رودخانه صورت پذیرفت. شکل۱ محدوده رودخانه جاجرود و جدول۱ ایستگاه‌های نمونه برداری را بر روی آن نشان می‌دهد.

نمونه‌ها توسط تور دستی کوچک جمع آوری شدند سپس توسط الکل ۹۶ تثبیت گردیدند. نمونه‌ها، به آزمایشگاه دانشکده



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☆

دامپزشکی دانشگاه تهران منتقل شدند و پس از شناسایی توسط کلیدهای شناسایی (Khatami, 1999) برای بررسی‌های مولکولی مورد استفاده قرارگرفتند. برای شناسایی ریخت شناسی از ویژگی‌های 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 بررسی‌های 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 نمونه‌ها استفاده گردید. کیفیت و کمیت DNA توسط بیوفتومتر و ژل آگاروز یک درصد مورد بررسی قرار گرفت.

سپس با استفاده از پرایمر LCO1490:5′-GGTCAA-CAAATCATAAAGATATTGG-3′ و HCO2198 5′-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3′ (Folmer *et al*., 1994) واکنش‌های 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. ویژگی‌های آغازگرهای اختصاصی ریزماهواره استفاده شده برای تکثیر ژن‌های خرچنگ گرد آب شیرین-*Longpota mon yangtsekiense* در جدول ۲ آورده شده است. برای آنالیز نهایی، محصول‌های PCR مربوط به آنالیز ریزماهواره بر روی ژل اکریل آمید ۸ ٪ ظاهرسازی شدند. سنجش وزن مولکولی نوارهای محصول PCR، اندازه آلل‌ها 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. مشاهده یک نوار برروی ژل پلی اکریل آمید هموزیگوسیتی و مشاهده دو نوار، هتروزیگوسیتی را نشان می‌دهد. فراوانی آللی[10]، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده، تعداد آلل‌های 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. داده‌های ژنتیکی این مطالعه برای تحلیل و مقایسه در

جدول ۱- ویژگی‌های 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 (Fasham)	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
	زرین‌دشت (Zarindasht)	35 35’96“	52 37’33“	1640
حبله‌رود (Hableroud)	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

جدول ۲-جدول ویژگی‌های 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)

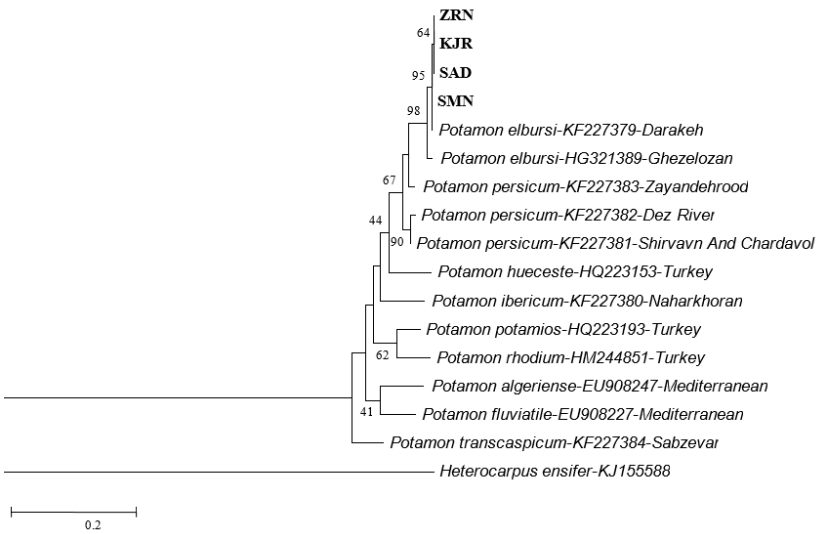
نام آغازگر Primer name	واحد تکرار شونده Repeat unit	توالی نوکلئوتیدی آغازگر Nucleotide sequence of primer
hxx2-F	(TG)14	F: GTGACGCACCGTGTTGTCT
hxx2-R		R: CGCATTGCCAATTAGTGT
hxx3-F	(TG)13…(AG)6	GTAACGATGCAAGATGCT
hxx3-R		CTAGATAAGCCTATCGCTCAT
Ga1-F	(GA)25	TGTTGTAGGTAAAGTGGGAG
Ga1-R		GCACGTCAGGAGTAAGAAT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

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.

نتایج و بحث

اگرچه استفاده از سنجه‌های مولکولی نقش مهمی را در شناسایی گونه‌ها بازی می‌کند، اطلاعات ریخت شناختی و زیست شناختی همچنان ابزار اولیه شناسایی محسوب می‌شوند (Franklin *et al.*, 2007; Duda, 2008; Lorenz and Puillandre, 2015). در مطالعه حاضر نیز شناسایی نمونه‌ها توسط ویژگی‌های ریخت شناسی کلیدی بر اساس کلیدهای شناسایی صورت گرفت. کاراپاس این خرچنگ کمابیش مربعی شکل است که دارای پهنای وسیع‌تری نسبت به طول آن می‌باشد. 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 آواره‌ای از طول در قسمت جلو به هم متصل شده‌اند، سومین پای آواره‌ای دارای تاژک است. زائده حسی آواره 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 ویژگی‌های ریخت شناسی خرچنگ‌های مطالعه حاضر می‌توان بیان داشت این نمونه‌ها متعلق به گونه *P. elbursi* می باشند. تبارشناختی و رده بندی[18] خرچنگ‌های 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) آن‌ها بوده است (Brandis *et al.*, 2005). بعدها (Ng *et al.*, 2008) تمام زیرجنس‌ها را حذف کرد، ولی در مطالعه تبارشناختی که بر روی سیر تکامل *Potamon* در ناحیه اژه انجام شد از به رسمیت شناختن این زیرجنس‌ها حمایت کرده است (Jess *et al.*, 2009). با این حال در حال حاضر روشی استاندارد مبتنی بر توالی ژن COI میتوکندری که دارای طولی در حدود ۶۵۰bp می‌باشد، بعنوان ابزاری سودمند برای

شناسایی موجودها و تعیین مرز گونه‌ها بکار می رود بر این اساس تغییرهایی که در توالی ژن COI در گونه‌های مختلف ایجاد می‌شود، ابزاری دقیق برای شناسایی و طبقه بندی موجودها و معرفی گونه‌های جدید مطرح می‌باشد (Costa and Carvalho, 2007). نتایج شناسایی مولکولی نمونه‌های مطالعه حاضر بر اساس ژن COI میتوکندری نیز تایید کننده نتایج شناسایی ریخت شناسی در به رسمیت شناختن این گونه به نام *P. elbursi* می‌باشد. درخت تبارشناختی و فاصله ژنتیکی نشان داد همه نمونه‌ها با بوت استراپ [19] بالا (BS=98) با توالی ثبت شده گونه *P. elbursi* که از منطقه درکه می‌باشد رابطه خواهری داشته و



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 گونه‌های 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-KF227381Shirvan_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

همگونه می‌باشند بنابراین تمام نمونه‌های مورد مطالعه متعلق به گونه *P. elbursi* می‌باشند (شکل۲، جدول۳). که با نتایج مطالعات ریخت شناسی مطابقت دارد.

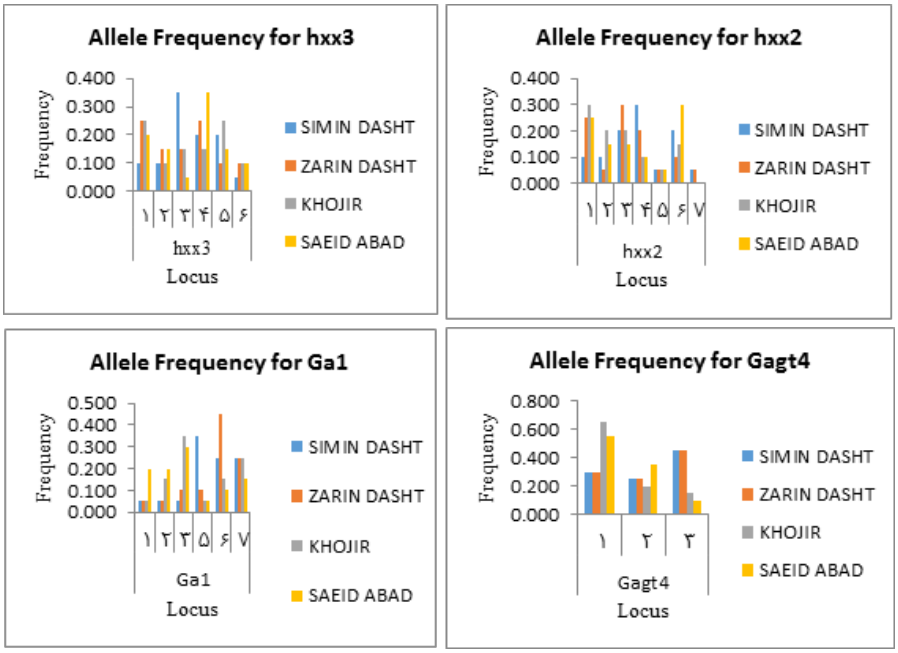
در این پژوهش، ۵ جایگاه hxx2، hxx3، Ga1، Ga2 و Gagt4 در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، مورد تکثیر قرار گرفت که در این میان جایگاه‌های hxx2، hxx3، Ga1 و Gagt4 در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر شدند ولی جایگاه Ga2 باوجود تغییرهای مختلف ایجادشده در بهینه‌سازی شرایط PCR آن، تکثیر نگردید. محدوده باندی و تعداد آلل 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 Ga1 و hxx2 وکمترین آلل واقعی در جایگاه ژنی Gagt4 با ۳ آلل مشاهده گردید (شکل ۲). بررسی تعداد آلل‌های اختصاصی و هتروزیگوسیتی در جمعیت‌های مختلف برای حفاظت ژنتیکی بسیار مفید هستند. یکی از اقدام‌های ضروری برای توصیف وضعیت ژنتیکی یک جمعیت که به ژن‌های حامل آن جمعیت اشاره می‌کند تشخیص تنوع آللی و شمارش هر ژنوتیپ است. هتروزیگوسیتی مورد انتظار برای محاسبه تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد، ولی حساسیت کمتری نسبت به حضور آلل‌های نادر دارد. برای مثال جمعیت‌های در تنگنا، فراوانی آللی را سریعتر از هتروزیگوسیتی کاهش می‌دهند (Kalinowski, 2005). خرچنگ‌ها بعنوان موجودهایی با توانایی پراکنش پایین و تمایل و توانایی محدود برای عبور از فاصله‌های خشکی می‌باشند که این مساله سبب شده که خرچنگ‌های آب شیرین از نظر بیوجغرافیایی دارای اهمیت باشند و تبدیل به مدل‌های مناسبی برای بازسازی تاریخ تکاملی سیستم‌های آبی، دموگرافی جمعیت‌های هم گونه، برآورد تاثیر فعالیت‌های انسانی روی زیستگاه‌های آب شیرین و میزان تاثیرهای یخبندان‌ها روی تنوع ژنتیکی گونه‌ها شوند (Keikhosravi, 2013). بدلیل فیلوپاتریک[۲۰] بودن و میزان بالای انزوا در خرچنگ‌های آب شیرین، گونه زایی ناهمجا[۲۱] به فراوانی در این گروه اتفاق می‌افتد. ریزماهواره‌ها سنجه ای حساس در اندازه گیری هموزیگوسیتی در جفتگیری‌های همخون می‌باشند، بنابراین برای تشخیص تمایز اندک بین جمعیت‌ها 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 جایگاه‌های ژنی جمعیت‌ها، بین۰/۱۰۰تا ۰/۷۰۰ بود و بیشترین هتروزیگوسیتی مشاهده شده در جایگاه ژنی Ga1 سعیدآباد و کمترین مقدار در جایگاه‌های ژنی Gagt4 سعیدآباد با فراوانی ۰/۱۰۰ مشاهده گردید (جدول ۴).

در مطالعه حاضر دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) بین ایستگاه‌های نمونه برداری در جایگاه‌های چهارگانه بین ۰/۱۰۰-۰/۷۰۰ 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 نمونه‌های جمع آوری شده از منطقه دیده شد. کاهش در هتروزیگوسیتی مشاهده شده می‌تواند نتیجه عامل‌هایی

جدول۴- ویژگی‌ها 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



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

از قبیل وجود آلل‌های Nwl، یا عامل‌های بیولوژیکی از قبیل درون آمیزی، ادغام جمعیت‌ها یا انتخاب طبیعی باشد (Zheng *et al*., 2009). دامنه هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He) بین ایستگاه‌های نمونه برداری در جایگاه‌ها بین ۰/۸۱۰-۰/۵۱۵ بود. بیشترین میزان 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 منطقه‌های نمونه برداری شده و در تمامی لوکوس‌ها، هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوسیتی قابل انتظار پایین‌تر بود. کاهش هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوسیتی مورد انتظار نشان دهنده کاهش در تغییرپذیری ژنتیکی نمونه‌ها است. دلیل این کاهش تنگناهای ژنتیکی می‌باشند که احتمالا بر اثر تخریب زیستگاه‌های طبیعی، آمیزش‌های خویشاوندی بوجود می‌آید و در نتیجه با گذشت زمان موجب کاهش آلل و کاهش هتروزیگوسیتی در ذخیره‌ها می‌شود (Norris *et al*., 1999). آلل‌های مشاهده شده در هر جایگاه ژنی بشدت تحت تاثیر اندازه نمونه بوده و به همین جهت این امکان وجود دارد که در آزمایش‌های گوناگون با تعداد نمونه‌های متفاوت، تعداد آلل‌های واقعی مختلفی برای یک جایگاه معین به دست آید (Peakall and Smous, 2005).

Heldstab and Katoh (1995) در مطالعه ای که بمنظور بررسی تنوع ژنتیکی ماهی سوف حاجی طرخان در سیستم‌های آب‌های زهکشی انجام دادند، تنوع ژنتیکی پایینی را بدلیل مشاهده هتروزیگوسیتی پایین گزارش کردند. آن‌ها دلیل این امر را به نظریه‌های 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 گونه‌ها از تنگناهای ژنتیکی عبور کردند زمان کافی برای رسیدن به سطح نرمال هتروزیگوسیتی سپری نشده است. بنابر مطالعات، محققان بیان داشتند آخرین پراکنش گونه *P. elbursi* به دوره پلیستوسن برمی‌گردد و به نظر می‌رسد یک میلیون سال پیش رخ داده است. دلیل صحت این مدعا نوسان های آب و هوایی در طول این دوران بیان شده که بر روی ساختار جمعیت‌ها تاثیر گذاشته و سبب پراکنش گونه‌های ساکن در کوه‌های البرز شده و به نفع روندهای گونه زایی در این منطقه پیش رفته است (Keikhosravi *et al*., 2015). در مطالعه ای که توسط Keikhosravi *et al*. (2015) بر روی مطالعات ژنتیک جمعیت خرچنگ *P. elbursi* صورت گرفت دریافتند از شش جمعیت مورد بررسی در استان البرز تنها در دو

جدول ۵- تعداد آلل‌های واقعی، موثرسنجه 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	سنجه شانون Shannon index	هتروزیگوسیتی مشاهده شده(H_O) Observed het-erozygosity	هتروزیگوسیتی مورد انتظار(H_e) 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

جمعیت، هاپلوتایپ‌های اختصاصی دیده می‌شود که آن‌ها دلیل این امر را پراکندگی محدود اندک خرچنگ، توانایی و تمایل پایین آن‌ها در عبور از مرزهای خشکی دانسته‌اند. همچنین Ng *et al*. (2008) بیان داشتند. خرچنگ‌ها با مراقبت والدینی بطور مستقیم رشد می‌یابند و این روند سبب کمبود تنوع درون جمعیتی در آن‌ها می‌گردد. چرا که خرچنگ‌ها بطور معمول در مجاورت رودخانه‌ها گشت زنی می‌کنند بنابراین انتظار می‌رود جمعیت آن‌ها از نظر ژنتیکی در این مکان‌ها همگون می‌باشد (Cumberlidge *et al*., 2009).

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد شناسایی بر اساس نشانگرهای ژنتیکی برای قرار دادن صحیح گونه‌ها در جایگاه اصلی خود مفید بوده و می‌تواند تایید کننده شناسایی‌های 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 نمونه‌ها است. همچنین محاسبه ضرایب افت هتروزیگوسیتی نشان داد که در همه منطقه‌های نمونه برداری و در تمام جایگاه‌ها، افزایش هتروزیگوسیتی وجود داشته است. بنابراین پیشنهاد می‌شود، شناسایی‌های ژنتیکی بعنوان مکمل در کنار تاکسونومی سنتی استفاده شود و سبب تسهیل پژوهش در زمینه تنوع گونه ای و توصیف گونه‌ها، بویژه گونه‌های نزدیک بهم گردد و همچنین پیشنهاد می‌گردد از طریق مطالعات مولکولی سیتماتیک خرچنگ‌های گرد آب شیرین مطالعه شود تا وضعیت روابط خویشاوندی بین آن‌ها مشخص شده و بتوان نسبت به چگونگی سیر تکامل آن‌ها اطلاعات بیشتری به دست آورد.

پی نوشت‌ها

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

Alarcona, J.A., Magoulasb, A., Georgakopoulosb, T., Zourosb, C. and 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. 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, Tehran, Iran.

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

Brandis, D., Storch, V. and 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, S.R., Berriman, M., Parkhill, J. and McQuillan, J.A., 2012. Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. Bioinformatics. 28, 464-469.

Costa, F.O. and 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. and 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. and 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. and 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. and 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.

Khatami, Sh., 1999. Species identification and biological study of a freshwater crab from Jajrood River. MSc. Thesis. Tehran Shomal unit, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Litt, M. and 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). European Journal 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. and 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. 17, 1–286.

Norris, A.T., Bradley, D.G. and Cunningham, E.P., 1999. Microsatellite genetic variation between and within/farmed and wild Atlantic salmon (Salmo salar) populations. Aquaculture. 180, 247–264.

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

Pujolr, J.M., Capoccioni, F., Ciccotti, E., Deleo, G.A. and 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.

Ridley, C.P., Lee, H.Y. and Khosla, C., 2008. Evolution of polyketide synthases in bacteria. Creavatity and Collaboration. 105, 4595-4600.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S., 2013. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Molecular biology and evolution. 30(12), 2725-2729.

Zheng, X., Ikeda, M., Kong, L., Lin, Q.L. and 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.

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, S., 2019. Assessment of genetic diversity of *Potamon elbursi* in eastern rivers of Tehran Province. Environmental Sciences. 17(3): 163-176.

Introduction: Investigating genetic diversity is 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. 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.

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

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

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*, Freshwater, Tehran Province.