

اکولوژی و اثرات متقابل زیست محیطی در آبی پروری

شناسایی گونه‌های جدید از جنس *Epixanthus* (*Brachyuran: Oziinae*) بر اساس مطالعات فراساختاری و مولکولی

فریده چناری*، سیدمحمدباقر نبوی^۱، محمد علی سالاری^۱، احمد سواری^۱، حسین ذوالقرنین^۱

۱- دانشجوی دکتری زیست شناسی دریا گرایش جانوران دریا، گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه

علوم و فنون دریایی خرمشهر، پست الکترونیکی: chenari_bio@yahoo.com

۲- دانشیار گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، پست الکترونیکی:

nabavishiba31@gmail.com

۳- دانشیار گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، پست الکترونیکی:

salari@kmsu.ac.ir

۴- استاد گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، پست الکترونیکی:

savari53@yahoo.com

۵- دانشیار استاد گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، پست الکترونیکی:

zolgharnein@kmsu.ac.ir

*مسئول مکاتبات: فریده چناری آدرس: دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر پست الکترونیکی: chenari_bio@yahoo.com

شماره تماس: 09166435331

کلمات کلیدی: *Epixanthus*، مولکولی، COI، فراساختار، گونوپود، خلیج فارس

مقدمه:

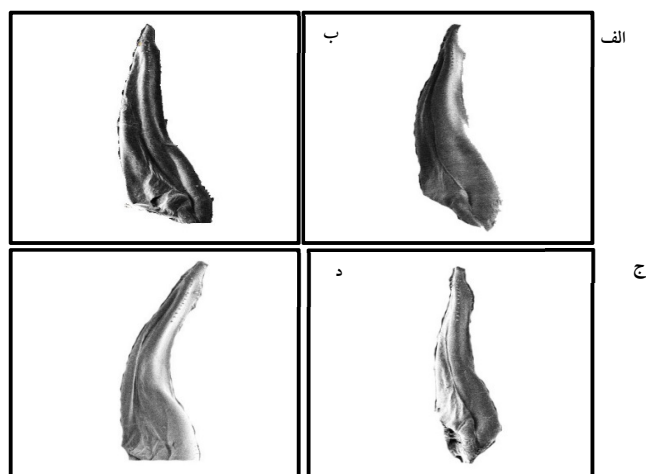
اخیراً در اثر فعالیت‌های بشر مانند صید بی رویه و ورود آلاینده‌های مختلف به سواحل، جمعیت خرچنگ‌ها در معرض خطر نابودی قرار گرفته است. بنابراین لزوم اطلاعاتی راجع به زیست‌شناسی، بوم‌شناسی و شناسایی خرچنگ‌ها، کمک زیادی به حفظ و باسازی جمعیت آنها خواهد کرد. ارزیابی تنوع زیستی در درجه اول بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیک نه تنها با سختی‌های فراوانی همراه است بلکه این امکان وجود دارد که تعداد موجودات را کمتر یا بیشتر از حد تنوع زیستی موجود تخمین بزنیم (Lefebure et al., 2006). برای غلبه بر چنین مسایلی، درحال حاضر روشی استاندارد مبتنی بر توالی ژن COI میتوکندری که در حدود ۶۵۰ bp می‌باشد، به عنوان ابزاری سودمند برای شناسایی موجودات و تعیین مرز گونه‌ها به کار می‌رود. در این مطالعه الگوهای رنگی مختلف از این گونه‌ها با توجه به فراساختار مورفولوژی اولین گونوپود جنس نر و با استفاده از ژن سیتوکروم اکسیداز COI مورد بررسی قرار گرفت برای اینکه نشان داده شود آیا همه مورفوتایپ‌های رنگی متعلق به یک گونه می‌باشند یا در میان آن‌ها گونه‌های پنهان نیز وجود دارد.

روش کار:

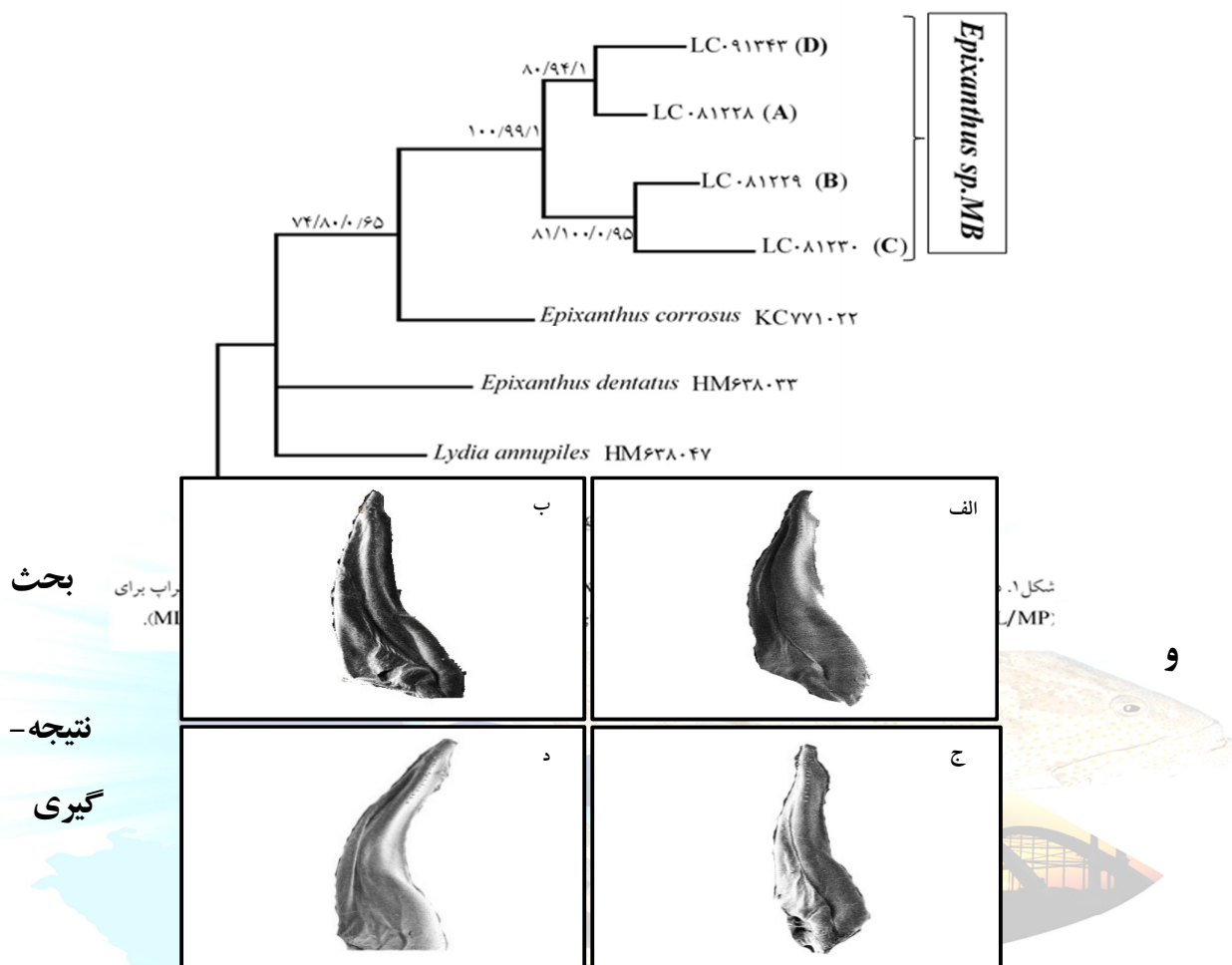
در این مطالعه ۴ مورفوتایپ متفاوت با الگوی های رنگی مختلف از گونه *Epixanthus frontalis* در آبان ماه ۱۳۹۳ از مناطق جزرومدی سواحل صخره ای استان بوشهر در دو ایستگاه بندر دیر (اولی جنوبی) و بندر بوشهر شناسایی و جمع آوری شدند. اولین گونوپودهای خرچنگ های نر، بوسیله پنس جدا شدند و در فرمالین ۱۰٪ برای بررسی با میکروسکوپ الکترونی قرار گرفتند. برای شناسایی مولکولی استخراج DNA از ۶۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده CTAB (۲٪ CTAB, 100mM TrisHCl, 20mM EDTA, 1.4 M NaCl, CTAB) استفاده شد و سپس باقیمانده استخراج با روش فنل-کلروفرم انجام شد. سپس با استفاده از آغازگر جهانی (Folmer et al., 1994) واکنش زنجیره ای پلیمرز جهت تکثیر قطعه ژنی سیتوکروم اکسیداز I (COI) انجام شد. درخت فیلوژنی تجزیه و تحلیل ماتریس داده ها بر اساس روش های ماکزیم پارسیمونی (Maximum Parsimony) با استفاده از نرم افزار PAUP، ماکزیم احتمال (Maximum Likelihood) با استفاده از نرم افزار Mega6 و روش احتمال پسین (Posterior probability) با استفاده از روش بایزین و نرم افزار MrBayes 3.2.5 انجام گردید. درخت فیلوژنی با استفاده از توالی های به دست آمده و چندین توالی از گونه های دیگر خانواده Oziinae بر پایه گونه *Portunus pelagicus* ترسیم شد.

نتایج

تطبیق توالی های به دست آمده با توالی های موجود در ژن بانک جهانی NCBI نشان داد تا کنون هیچ توالی از این گونه برای ژن COI ثبت نشده است. مقایسه توالی های به دست آمده از ۴ نوع مورفوتایپ مختلف گروه مورفولوژی *Epixanthus frontalis* نشان داد این توالی ها بر هم منطبق نیستند و می توانند متعلق به گونه های جداگانه باشند (شکل ۱). در بررسی فراساختار مورفوتایپ های مختلف این گونه تغییراتی واضح در شکل راسی گونوپود برخی گونه ها مشاهده شد. در گونه A و D قسمت نوک تیز راسی نسبت به دو گونه دیگر اندازه کوتاهتری دارد. تعداد خارهای حاشیه داخلی در گونه D کمتر بوده و طرز قرارگیری خارهای پراکنده در انتهای بخش نوک تیز همه گونه ها تفاوت دارد. قسمت نوک تیز بخش راسی در گونه های C و B به طور واضحی از دو گونه دیگر بلندتر است (شکل ۲).



شکل ۱. تصاویر کلی فراساختار گونوپود گونه های *Epixanthus sp. PG-2015*. الف) A، ب) B، ج) C، د) D



شکل ۲. تصاویر کلی فراساختار گونوپود گونه‌های *Epixanthus sp.* PG- 2015 (الف A، ب B، ج C، د D)

بطور کلی، این جنس دارای سه گونه در جهان می باشد که بر اساس یافته‌های Heller (۱۸۶۱) شناسایی آن‌ها بر اساس کاراپاس و دندان‌های حاشیه جلویی- جانبی آن صورت می گیرد و این ویژگی سبب شناسایی آن از دیگر گونه‌های این جنس می شود. در آب‌های سواحل ایرانی خلیج فارس بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیک تنها گونه‌ای از جنس *Epixanthus* که به ثبت رسیده است گونه *Epixanthus frontalis* می باشد که برای اولین بار توسط Heller (1861) از جزیره خارک گزارش شد. به منظور شناسایی دقیق از روش DNA بار کدینگ (COI) استفاده شد. DNA بار کدینگ قادر است گونه‌هایی را که دارای خصوصیات مورفولوژیک مشابه (گونه‌های خواهری) می باشند را از هم تفکیک کند (Hebert et al., 2003). نتایج مطالعه حاضر نشان داد ۴ مورفوتایپ متعلق به یک گونه نیستند و در میان آن‌ها گونه‌های ناشناخته وجود دارد و شناسایی بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیک برای شناسایی مرز گونه‌ها ناکافی است. بررسی فراساختار با میکروسکوپ الکترونی (SEM) سبب ظاهر شدن تفاوت‌های بارز میان گونوپودهای این

گونه‌ها از هم جدا می‌شوند. اختلافات ظریف در مورفولوژی این اندام که در بررسی با میکروسکوپ لوپ دیده نمی‌شود در مطالعه فرا ساختار آن با تصاویر الکترونی مشهود بود و توانست در تشخیص گونه‌های نزدیک به هم مفید باشد. Moyano (۲۰۱۱) بیان داشت مورفولوژی اولین گونوپود جنس نر می‌تواند فاکتور قابل اعتمادی برای تشخیص گونه‌های نزدیک بهم شود و بیان داشت قسمت راسی اولین گونوپود جنس نر دارای تغییرات واضحی در گونه‌های مختلف می‌باشد و این ویژگی در خرچنگ‌های حقیقی ارزش تاکسونومیک دارد. تلفیقی از روش‌های مورفولوژی دقیق بر اساس میکروسکوپ الکترونی اسکینینگ (SEM)، سیستماتیک مولکولی و دیگر مشخصات ظاهری بهترین روش برای شناسایی و کشف گونه‌های جدید و پنهان در میان خرچنگ‌ها خواهد بود.

منابع

- Moyano, M.P.S.; Gavio, M.A.; Cuartas, E.I. (2011). Copulatory system of the spider crab *Libinia spinosa* (Crustacea: Brachyura: Majoidea). *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 91:1617-1625.
- Hebert, P.D.N.; Cywinska, A.; Ball, S.L.; deWaard, J.R.. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society*, 270:313-321.
- Lefebvre, T.; Douady, C.J.; Gouy, M.; Gibert, J. (2006). Relationship between morphological taxonomy and molecular divergence within Crustacea: Proposal of a molecular threshold to help species delimitation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 40:435-447.
- Heller, C. (1861) Beiträge zur Crustaceen-Fauna des Rothen Meeres. I. Theil. *Sitzungsberichte der mathematisch-naturwissenschaftlichen Klasse der kaiserlichen Akademie der Wissenschaften Wien*, 43, 297-374.