

## بررسی مولکولی و فایلوژنتیک خرچنگ *Chiromantes boulegeri* (Decapoda, Brachyura, Sesarmidae) از اروندرود

نجمه نوذریور، محمد باقر نبوی\*، محمد تقی رونق، بیتا ارچنگی، نسرین سخایی

خرمشهر، دانشگاه علوم و فنون دریایی، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، گروه بیولوژی دریا

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۷/۱۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۳/۱

### چکیده

مطالعه حاضر، در سال ۱۳۹۳ به منظور درک صحیح از خصوصیات ژن mtDNA خرچنگ *Chiromantes boulegeri* (Calman, 1920) در آب‌های جزر و مدی اروندرود در منطقه جزیره مینو (پل مینو شهر و منطقه‌ام العجاج) انجام گردید. بدین منظور در مهر ماه سال ۱۳۹۳ گونه مورد مطالعه از پهنه‌های جزر و مدی و نواحی کم عمق جزیره مینو جمع‌آوری گردید و در الکل ۷۰٪ نگهداری شدند و در آزمایشگاه دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر مورد بررسی قرار گرفت. سپس به منظور آنالیزهای مولکولی جهت بررسی ارتباط فایلوژنتیک این گونه با گونه‌های نزدیک در بانک ژنی NCBI، DNA نمونه‌ها با استفاده از روش فنل-کلروفرم استخراج و قطعه ژنی میتوکندریایی 16S rRNA توسط PCR تکثیر و در نهایت توالی‌یابی شدند. نتایج شناسایی‌های ریخت‌شناسی همراه با بررسی فیلوژنی توالی‌های به‌دست آمده از نشانگر میتوکندریایی، حاکی از وجود گونه *C. boulegeri* در منطقه مورد مطالعه می‌باشد. با استناد به بررسی پلی‌مورفیسم، بین گونه‌های *C. boulegeri* دو منطقه جهش رخ داده است که بیانگر سیر تکاملی و سازش گونه *C. boulegeri* جهت بقای بهتر در شرایط مختلف اکولوژیکی در منطقه مورد مطالعه می‌باشد.

واژگان کلیدی: *Chiromantes boulegeri*، اروندرود، DNA میتوکندری، فیلوژنی.

\* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: nabavishiba@yahoo.com

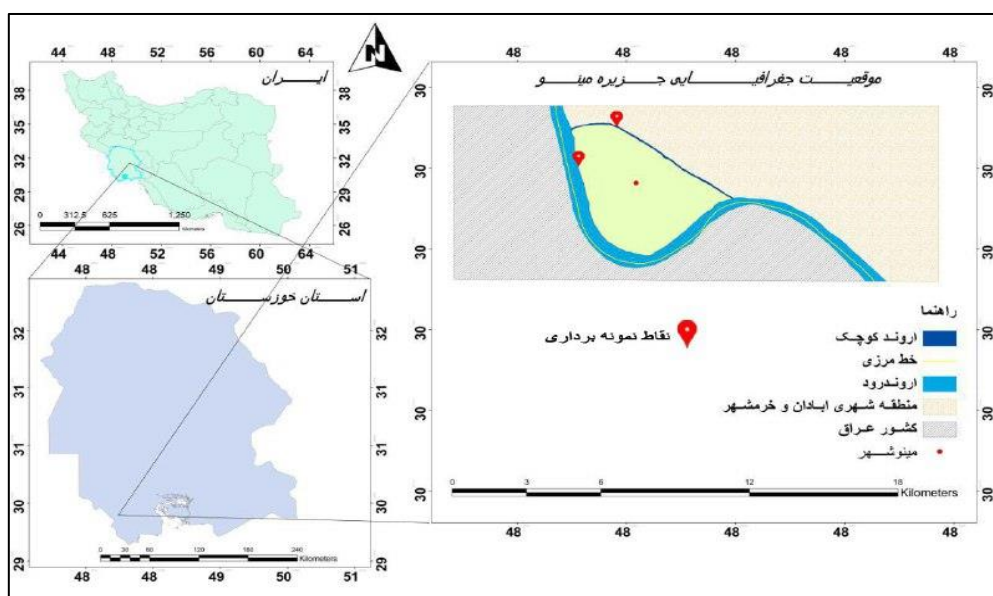
## ۱. مقدمه

سه رودخانه مهم قسمت شمالی خلیج فارس را تغذیه می کنند، که شامل رودخانه های اروند رود، بهمینشیر و کارون هستند و تاثیر به سزایی بر ویژگی های فیزیکی و بیولوژیکی زیستگاه های میان جزر و مدی و پایین جزر و مدی دارند. زیستگاه های دریایی زیادی در خلیج فارس وجود دارد که دارای تنوع زیستی بالایی می باشند (Jones, 1985). یکی از منابع مهم آبی که قسمت شمالی خلیج فارس را تغذیه می کند، رودخانه اروند رود (شکل ۱) می باشد که با توجه به شرایط اکولوژیکی حاکم بر رودخانه اروند رود ناشی از تغییرات شوری، کدورت بالا و جریانات جزر و مدی تاثیر به سزایی بر فاکتورهای زیستی زیستگاه های جزر و مدی داشته است. گونه *C. bouleengeri* (Calman, 1920) از خرچنگ های معمول در رودخانه هستند که اغلب دور از دریا می مانند (Naderloo et al., 2009). در این تحقیق با توجه به فراوانی و پراکنش گونه *C. bouleengeri* (Calman, 1920) در منطقه اروند رود و از آنجایی که این منطقه حالت خور دارد و تاثیر پذیر از دریاست و به دلیل اینکه این

موجودات عمل حفاری و نقب زدن را انجام می دهند، جهت بررسی سیستماتیک گونه *C. bouleengeri* (Calman, 1920) در دو منطقه مختلف از اروند رود (منطقه ام العجاج و پل مینو شهر) انتخاب شد. نمونه برداری از دو ایستگاه از اروند رود در جزیره مینو انجام گرفت. مطالعه حاضر با هدف بررسی آنالیزهای مولکولی گونه *C. bouleengeri* (Calman, 1920) در دو منطقه از اروند رود و تعیین خاستگاه دقیق گونه *C. bouleengeri* (Calman, 1920) بر اساس داده های مورفولوژیکی (نوذرپور، ۱۳۹۴) و مولکولی می باشد.

## ۲. مواد و روش ها

جهت شناسایی گونه *C. bouleengeri* (Calman, 1920)، نمونه برداری در مهرماه ۱۳۹۳ از سخت پوستان ده پا مناطق بین جزر و مدی در طول ساحل اروند رود خلیج فارس انجام گرفت. گونه های مورد مطالعه در دو ایستگاه (شکل ۱) از بسترهای گلی جزر و مدی اروند رود در آبادان، جزیره مینو (مناطق ام العجاج و پل مینو شهر) توسط دست جمع آوری گردید.



شکل ۱. موقعیت جغرافیایی منطقه نمونه برداری

خرمشهر انتقال یافتند و DNA از ماهیچه پاهای حرکتی هفت نمونه (شش عدد جنس نر و یک عدد

نمونه ها جهت آنالیزهای مولکولی در الکل ۷۰٪ نگهداری شدند و به دانشگاه علوم و فنون دریایی

*Neosarmatium striaticarpus* AM180680  
*Armases elegans* AJ784011 *smithi* AJ784014  
*Armases Neosarmatium meinerti* FN392171  
*recordi* (H.Milne Edwards, 1853) AJ250637  
*Neosarmatium Aratus sp.* HG939511  
*Parasesarma fourmanoiri* FN392195  
*Sesarmops leptosoma* AJ784024 و گونه  
*sinensis* AY497290 به عنوان برون گروه انتخاب  
 شد. آنالیزهای DNA Polymorphism بین هفت توالی  
 شناسایی شده از دو منطقه در ارونرد رود با توالی‌های  
 گونه‌های نزدیک توسط نرم افزار DnaSP5 (Librado  
*et al.*, 2009) محاسبه شد.

### ۳. نتایج

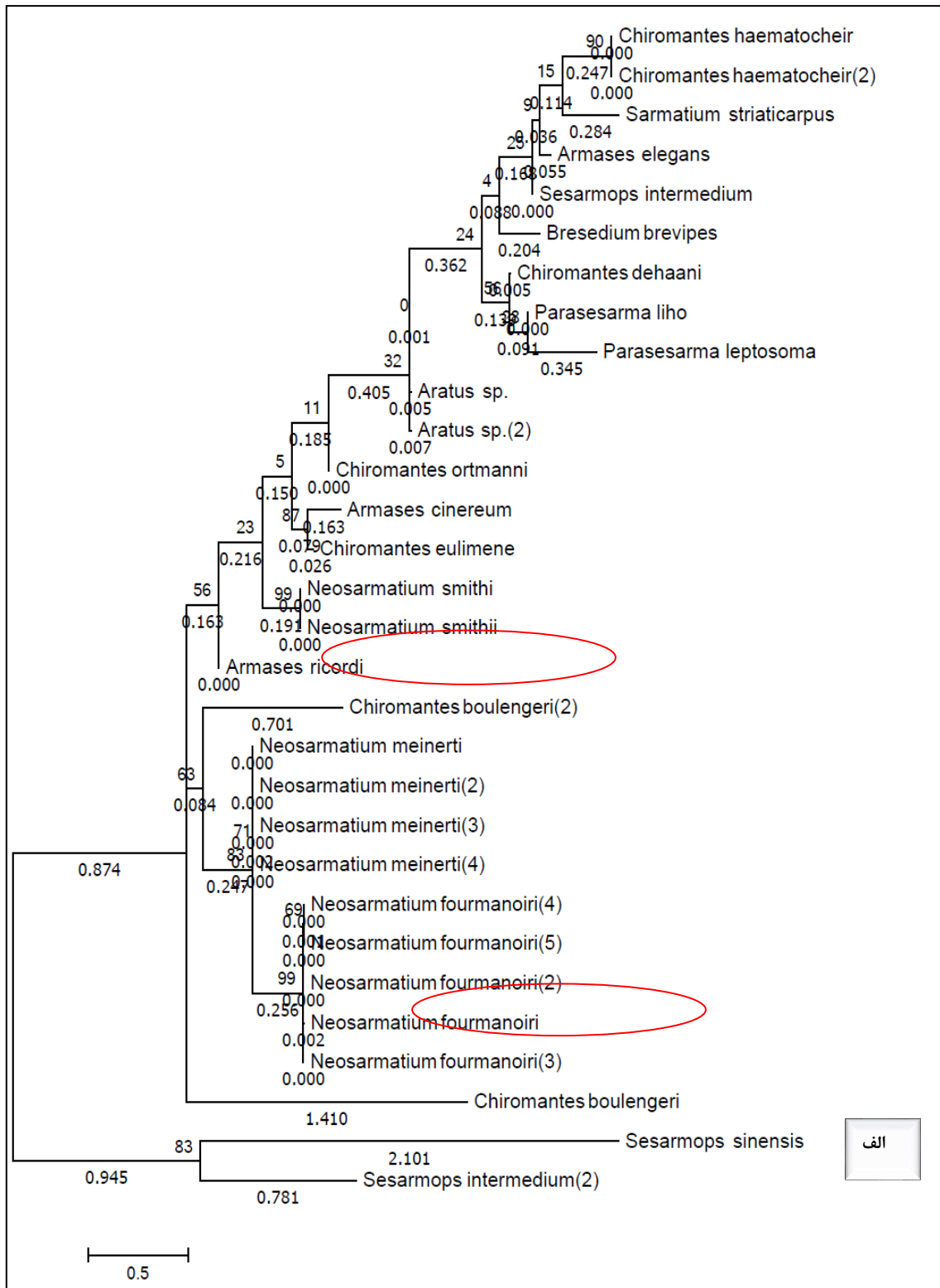
طبقه‌بندی (جدول ۱) گونه *C. boulegeri*  
 (Calman, 1920) (شکل ۲) مطابق طبقه‌بندی  
 NCBI از خانواده *Sesarmidae* Dana, 1851 جنس  
*Chiromantes* Gistel, 1848 می‌باشد.



شکل ۲. *Chiromantes boulegeri* (Calman, 1920). جنس  
 نر، رودخانه ارونرد رود. الف، سطح پشتی، ب، سطح جلویی.

جنس ماده) به روش فنل- کلروفرم ( Michele,  
 2002) جداسازی شدند. در این مطالعه تکثیر قطعات  
 از ژن 16S rRNA (16S) میتوکندری با استفاده از  
 پرایمرهای 16S Forward و 16S Reverse صورت  
 گرفت. تکثیر قطعات DNA در حجم  $25 \mu\text{l}$  از  
 ترکیبات مخلوط شده که شامل  $1 \mu\text{l}$  از DNA الگو و  
 $2/5 \mu\text{l}$  از PCR buffer (10X)،  $1/5 \mu\text{l}$  از  
 $1 \mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$  (50mM)،  $1 \mu\text{l}$  از هر پرایمر ( $10 \text{Pmol} / \mu\text{l}$ )،  
 $1 \mu\text{l}$  از dNTP (10mM) و  $0/3 \mu\text{l}$  از Tag DNA  
 Polymerase (5U/  $\mu\text{l}$ ) و  $16/7 \mu\text{l}$  از آب دو بار  
 تقطیر صورت گرفت.

بنابراین، تکثیر قطعات ژن بوسیله PCR با چهار  
 دقیقه در دمای  $94^\circ\text{C}$  و  $40$  سیکل با  $45$  ثانیه در  
 دمای  $94^\circ\text{C}$ ، یک دقیقه در دمای  $48^\circ\text{C}$ ، یک دقیقه  
 در دمای  $72^\circ\text{C}$  و مرحله نهایی  $10$  دقیقه در دمای  
 $72^\circ\text{C}$  انجام شد و پرایمرهای 16S Forward و 16S  
 Reverse مورد استفاده قرار گرفتند. محصولات PCR  
 جهت توالی‌یابی به شرکت ژن فناوران ارسال گردیدند.  
 داده‌های توالی‌های بدست آمده در بانک ژنی NCBI  
 ثبت شدند. آنالیزهای فیلوژنی توالی‌ها به منظور  
 بررسی ارتباط فایلوژنتیک گونه *C. boulegeri*  
 (Calman, 1920) بر اساس Maximum Composite  
 Likelihood با  $5000$  تکرار و Neighbor-Joining در  
 نرم افزار Mega6 (Tamura *et al.*, 2013) با گونه‌های  
 نزدیک که در مکان‌های مختلف دنیا در داده‌های  
 بانک ژنی وجود دارند مقایسه شد، شامل: *C.*  
*dehaani* (H.Milne Edwards, 1853) FN296221  
*Sesarmops intermedium* (De Haan, 1835)  
*Bresedium brevipes* (De Man, FN296222  
*Chiromantes* AM1800685 1889،  
*haematocheir* (De Haan, 1833) DQ131499  
*Chiromantes Chiromantes ortmani* AJ784016  
*Armases eulimene* (De Man, 1897) AJ784017  
*cinereum* (Bosc, 1802) AJ784010  
*Sarmatium Parasesarma liho* FN659068





شکل ۳. روابط فایلوژنی گونه های انتخاب شده از جنس *Chiromantes* و دیگر *Sesarmidae* ها. الف، بر اساس Maximum composite Likelihood با ۵۰۰۰ تکرار، ب، بر اساس Neighbor- Joining.

(ایران) داشتند (شماره های دسترسی: FN296219- FN296220). آنالیزهای مولکولی، طبق درخت فیلوژنی (شکل ۷) نشان دهنده ارتباط نزدیک بین جنس *Chiromantes* با جنس *Neosarmatium* می باشد.

تعداد هفت توالی از *C. bouengeri* شناسایی مولکولی شدند که شامل یک عدد جنس ماده و شش عدد جنس نر بودند که شباهت ۹۹٪ با گونه *S. bouengeri* شناسایی شده توسط Calman (1920) از بصره (عراق) و همچنین گونه *C. bouengeri* شناسایی شده توسط ندرلو (۲۰۰۹) در بهمنشیر

گروه‌های کوچکتری بین آنها وجود دارد و گونه *C. bouleengeri* در موقعیت برون گروه نسبت به شاخه گونه‌های *C. dehaani*، *C. haematocheir* و *C. ortmanni* قرار گرفته است و در ضمن رابطه خواهری بین گونه *C. bouleengeri* و گونه‌های دیگر وجود ندارد و همچنین با توجه به درخت‌های فیلوژنی (شکل ۳) بین گونه *C. bouleengeri* در منطقه بهمنشیر و عراق نیز رابطه‌ای وجود ندارد و گونه مذکور در عراق زمان تکاملی طولانی‌تری را طی کرده است. بنابراین، مدرکی دال بر اینکه رابطه ژنتیکی نزدیک بین گونه‌های *C. bouleengeri* و *C. dehaani* که از لحاظ مورفولوژی طبق مطالعه Calman (1920) مقایسه شده بودند، وجود ندارد و با توجه به درخت فیلوژنی (شکل ۳) گونه *C. bouleengeri* زمان تکاملی طولانی‌تری را نسبت به گونه *C. dehaani* طی نموده است و تمایز ژنتیکی قابل توجهی بین آنها وجود دارد. همچنین با توجه به نتایج آنالیزهای DNA Polymorphism هفت توالی شناختی شده در دو منطقه رودخانه اروند رود، جهش‌های ژنتیکی مشاهده شد که احتمالاً به دلیل پراکنش لاروها در رودخانه و اثرات شرایط محیطی حاکم بر منطقه می باشد، که این تغییرات جهشی در طول زمان تکاملی رخ داده است. با توجه به ابهامات تاکسونومیکی در این گروه از سخت پوستان، در تحقیق حاضر خاستگاه دقیق گونه *C. bouleengeri* با استناد بر تصاویر SEM (Nozarpour, 1394) و مکمل آن بررسی ژنوم گونه‌ها، مورد تایید قرار گرفت. به طور کلی از مطالعه حاضر می‌توان چنین نتیجه گرفت که خرچنگ *C. bouleengeri* با توجه به تفاوت موجود در ریخت-شناسی (Nozarpour, 1394) نسبت به تحقیق ندرلو و همکاران و جهش‌های پلی‌مورفیسم، در ارتباط با متفاوت بودن منطقه جغرافیایی و اثرات اکولوژیکی می‌باشد، بنابراین شرایط محیطی بر ریخت‌شناسی و پلی‌مورفیسم گونه *C. bouleengeri* اثر گذار است.

آنالیزهای DNA Polymorphism هفت توالی شناسایی شده گونه *C. bouleengeri* از دو منطقه در اروند رود شامل، ۱۰ ناحیه پلی‌مورف و ۱۱ جهش می‌باشد و تنوع نوکلئوتیدی  $Pi = 0.11957$  تخمین زده شد و همچنین بین گونه *C. bouleengeri* و گونه‌های نزدیک که در درخت فیلوژنی (شکل ۷) رسم شده اند، ۸۰ ناحیه پلی‌مورف و ۹۴ جهش مشاهده شد و تنوع نوکلئوتیدی  $Pi = 0.0580$  تخمین زده شد.

جدول ۱. طبقه بندی NCBI گونه *Chiromantes bouleengeri*

(Calman, 1920).

DOMAIN	Eukaryota
KINGDOM	Metazoa
PHYLUM	Arthropoda
SUBPHYLUM	Crustacea
CLASS	Malacostraca
SUBCLASS	Eumalacostraca
SUPERORDER	Eucarida
ORDER	Decapoda
SUBORDER	Pleocyemata
INFRAORDER	Brachyura
SUPERFAMILY	Grapsoidea
FAMILY	Sesarmidae
GENUS	Chiromantes

#### ۴. بحث و نتیجه گیری

از آنجاکه شرایط بستر با توجه به نوع و جنس آن در تنوع گونه‌ای خرچنگ‌ها اثرگذار است، فراوانی گونه *C. bouleengeri* در سواحل مختلف نشانه سازگاری آن با شرایط حاکم بر نواحی مختلف است (Naderloo et al., 2009).

با توجه به مطالعات انجام شده مشخص شد که *C. bouleengeri* توسط Calman (1920) تحت عنوان *S. bouleengeri* معرفی شده بود که Calman (1920) به مقایسه جزئی کلی‌پد گونه *S. bouleengeri* پرداخته بود، که گونه *S. bouleengeri* توسط Apel & Turkay (1999) جز خرچنگ‌های جنس *Chiromantes* (Gistel, 1848; Hartnoll, 1975) قرار داده شد و *C. bouleengeri* نام گرفت. طبق درخت‌های فیلوژنی (شکل ۷)، گونه‌ها در چند گروه مجزا شدند که

## Reference

- Calman, W. T., 1920. A new crab of the Genus *Sesarma* from Basra. *Annals and Magazine of Natural History*. 5 (9), 62–65.
- Gistel, H., 1848. *Naturgeschichte de Thierreiches für höhere Schulen bearbeitet*. Stuttgart. 220 pp, 32 pls. Hartnoll, R.G., 1975. The Grapsidae and Ocypodidae (Decapoda: Brachyura) of Tanzania. *Journal of Zoology*, 177, 305–328.
- Jones, C. G., Lawton, J. H., and Shachak, M., 1994. Organisms as ecosystem engineers. *Oikos*, 69: 373-386.
- Librado, P., and Rozas, J., 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Man, J. G., 1889. Über einige neue oder selten indopacifische Brachyuren. *Zoologische Jahrbucher, Abtheilung für Systematik. Geographie und Biologie der Thiere* 4, 409–452 pls. 9, 10.
- Michele, k., 2002. Techniques in Molecular Systematics and Evolution, In: Rob Desalle *et al* (Ed), DNA Isolation Procedures. First Edition. Brikhauser Basal. 249- 287 PP.
- Naderloo, R., and Schubart, C. D., 2009. Redescription and mitochondrial identification of *Chiromantes boulengeri* (Calman, 1920) (Decapoda: Brachyura: Sesarmidae) based on fresh material from the Persian Gulf, Iran. *Zootaxa* 2128, 61–68.
- Ng, P. K. L., 1998. Crabs, FAO species identification guide for fishery purposes. (2): 1045-1155 pp.
- Nozarpour, N., 2014. Molecular and phylogenetic analysis species *Chiromantes boulengeri* (Decapoda, Brachyura, Sesarmidae) from Arvand River. M.Sc. thesis. Marine biology Dept., Faculty of Marine Science, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Iran. 58p.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729

## Molecular and phylogenetic investigation of *Chiromantes boulengeri* (Decapoda, Brachyura, Sesarmidae) species from Arvand River

Nozarpour N., Nabavi M.B\*, Ronagh M.T., Archangi B. and Sakhai N.

Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Oceanography, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr

### Abstract

In this study, the molecular characteristics of *Chiromantes boulengeri* were investigated from intertidal waters of Arvand River, Minoo Island in 2014. For this reason, samples from intertidal zones of two areas across Minoo Island were collected and preserved in 70% ethanol, followed by transferring to the laboratory for further examinations. Genomic DNA was extracted using phenol- chloroform method and mitochondrial gene 16SrRNA was sequenced and compared with other species from GenBank NCBI. The morphological examinations using identification keys and phylogeny sequence results showed that all specimens belonged to *Chiromantes boulengeri* in the study area. Phylogenetic analysis revealed that there are mutation within *C. boulengeri* from two areas of Arvand River. It seems that, this species most probably is adapted to the different ecological conditions in this area.

**Keywords:** *Chiromantes boulengeri*, Arvand River, mt DNA, phylogeny.

Figure 1. Geolocation of sampling area

Figure 2. *Chiromantes boulengeri* (Calman, 1920). Male, Arvand River. a, dorsal view; b, ventral view.

Figure 3. Reconstruction of the phylogenetic relationships of selected species of *Chiromantes* and other Sesarmidae according to a. Maximum Composite Likelihood (5,000 pseudoreplicates), b. Neighbor- Joining analysis.

---

\*Corresponding author, E-mail: nabavishiba@yahoo.com