

Dolkhalers fysiologi, genetiske diversitet og udbredelse



Af projektleder, ph.d. Peter Funch, ph.d. Matthias Obst og Prof. Tobias Wang, Biologisk Institut, Aarhus Universitet.

Togtben 17 og 18

Øvrige deltagere: Centerleder Thomas Nielsen, ph.d.-studerende Søren Faurby, specialestuderende Melissa Wetter og Kasper Kollerup Nielsen, alle Biologisk Institut, Aarhus Universitet.

Hovedformål

Formålet med projektet er at undersøge og sammenligne økofysiologi og populationsstruktur hos de fire nulevende arter af dolkhale, hvoraf tre arter lever i Sydøstasien. Den fjerde art lever på den amerikanske østkyst. Alle fire arter er truet af bestandsnedgange, og resultaterne fra vores undersøgelser vil kunne bruges i arbejdet med at bevare disse bemærkelsesværdige dyr ved at udpege fremtidige beskyttede kyster og havområder.

Særlige hypoteser og spørgsmål

Vi ønsker at beskrive populationsstrukturen i udvalgte områder for alle fire arter af dolkhale. Her forventer vi at samle tilstrækkelig information til f.eks. at identificere genetisk adskilte populationer, se hvordan populationer står i forbindelse med hinanden og udpege områder med høj og lav genetisk diversitet. Denne viden vil blive offentliggjort og kunne bruges i forbindelse med overvejelser om bevarelse af dolkhalerne.

De genetiske data vil også blive anvendt til at analysere dolkhalernes indbyrdes slægtskab og fortidige og nutidige udbredelse.

Hvis de genetiske analyser danner grundlag for hypoteser om f.eks. adskilte populationer/underarter, vil disse blive afprøvet med andre sammenlignende undersøgelser. Således opmåles voksne dolkhale fra forskellige populationer morfometrisk, hvilket suppleres med undersøgelser af f.eks. spermier, embryoner eller larvestadier. Hvis de genetiske og anatomiske undersøgelser peger på tilstedeværelsen af en historisk adskilt art/underart, foretager vi en taksonomisk revision.

Forskningsmæssig status

Hovedvægten af vores studier af dolkhale indtil nu er udført i tætte samarbejder med universiteter i Vietnam og Thailand. Vi har ligeledes undersøgt dolkhale langs den amerikanske østkyst og er ved at knytte et samarbejde til forskere i Me-

xico. Den største del af vores prøvetagning er gennemført, og vi har fået flerårige forskningstilladelser i Vietnam, Thailand, Kina og i relevante stater på USA's østkyst. Vi har ligeledes fået tilladelse til indførelse af levende dolkhale af de danske myndigheder. Vi har truffet aftaler med internationale samarbejdspartnere om at få blodprøver fra dolkhale fra andre lande, blandt andet Japan. Gennem vores kontakter i Vietnam er det blevet muligt at importere et stort antal dyr, som indgår i de fysiologiske eksperimenter. Vi har på nuværende tidspunkt alle fire arter levende på Aarhus Universitet og Kattegatcentret i Grenå og kan befrugte æg fra den amerikanske dolkhale, *L. polyphemus*, som udvikles til levende dolkhalelarver i laboratoriet på Aarhus Universitet. Dette giver os mulighed for at undersøge alle stadier i livscyklus og bruge dem i undervisning og formidling fremover.

Vi deltog på de to sidste togtben af Galathea 3-ekspeditionen (US Virgin Islands-Boston-København) med seks personer. Vores arbejde om bord var delt op i fire delprojekter:

1. Der blev udtaget blodprøver til dna-undersøgelser
2. Dyrene blev omhyggeligt målt op og fotograferet
3. Vi gennemførte fysiologiske eksperimenter, hvor dolkhale blev holdt ved forskellige temperaturer og saltholdigheder. Der blev udtaget blodprøver undervejs for blandt andet at måle blodets vandindhold
4. Dolkhale blev strøget for kønsceller, og fra befrugtede æg blev trilobitlarver udviklet og hjembragt til yderligere undersøgelser.

I løbet af første projektår er det lykkedes at indsamle prøver fra alle fire arter i store dele af Thailand (190 individer), Vietnam (161 individer), Kina (27 individer) og USA (177 individer). Vi har sekventeret det mitochondrielle gen cytochrome

Amerikanske dolkhale, som gyder på stranden i Delaware-bugten.
Foto: Peter Funch



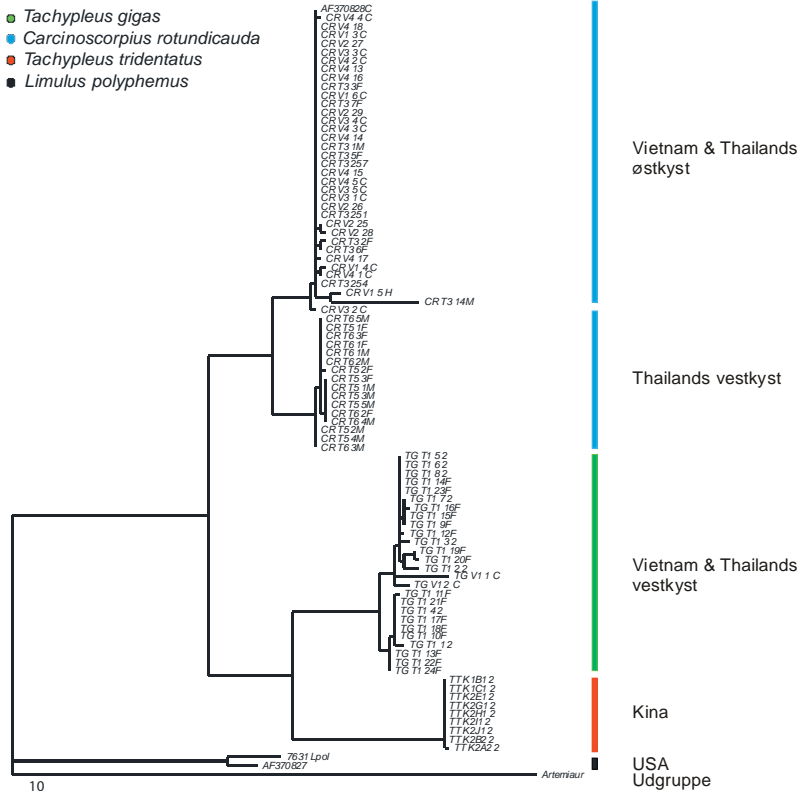


Fig. 1. Foreløbigt fylogenetisk stamtræ baseret på over 100 sekvenser af det mitochondrielle gen cytochrome c oxidase I (COI). Markøren har tilstrækkelig oplysning til at vise slægtskab mellem de fire dolkhalearter. Hos arten *Carcinoscorpius rotundicauda* ser man, at populationerne på henholdsvis Thailand's vest- og østkyst er meget forskellige genetisk.

c oxidase I (COI) fra ca. 100 dolkhale. Disse data indgår i vores analyse af den genetiske diversitet blandt arter og populationer. Det fragment af genet COI, vi anvender, har tilstrækkelig information til adskillelse af arter og populationer. I samarbejde med Cino Pertoldi, Biologisk Institut, Aarhus Universitet og den amerikanske forsker Tim King er vi i færd med at analysere mikrosatellit-data fra amerikanske dolkhale over hele deres udbredelsesområde. Senere i år vil vi sekvencere flere genetiske markører, specielt ribosomale gener, med langsommere evolutionsrater end COI.

Uddannelsesmæssig status

Melissa Wetter, som deltog på det sidste togtben, har færdiggjort sit kandidatstudium om dolkhales økofysiologi. Biologistuderende Kasper Kollerup Nielsen, som også var om bord på den sidste del, er i færd med at afslutte sit specialearbejde omhandlende morfometriske undersøgelser af dolkhale. Ariel Conradsen er begyndt på et speciale om dolkhales slægtskabsforhold og larvernes morfologi i samarbejde med Erasmus-studerende Javier Garcia Sanchez fra Universida Autónoma de Madrid. To Erasmus-studerende fra Portugal, Maria Xaragosa og Luiza Andrade, har afsluttet et projektarbejde om blodets iltbinding hos vietnamesiske *Carcinoscorpius*. To danske projektstuderende, Grete Fogtmann Jensen og Tenna Boye, har afsluttet et projektarbejde om respiration hos asiatiske dolkhale.

Formidlingsmæssig status

Der har været en overvældende interesse for dolkhaleprojektet, som bl.a. er resulteret i en lang række avisartikler om projektet i større og mindre dagblade. Der har også været nogle indslag i tv. Vi har holdt foredrag i folkeskoler, på Folkeuniversitetet og i diverse foreninger med naturvidenskabeligt sigte. Det er værd at fremhæve samarbejdet med Kattegatcentret, hvor utallige gæster har set særudstillingen om Galathea 3 og dolkhaleprojektet. Vi har desuden medvirket i udarbejdelsen af undervisningsmaterialer til folkeskolen og gymnasiet.

Foreløbige resultater

Fylogenetiske studier

Vores resultater viser tydeligt, at de asiatiske dolkhale og slægten *Tachypleus* er monofyletisk (se fig. 1). De nulevende dolkhale har muligvis udviklet sig biogeografisk fra lavvandsområder i den centrale del af Sydøstasien (med centrum i Thailand, Indonesien og Malaysia) og har spredt sig derfra (se fig. 2). Der er grund til at antage, at *Carcinoscorpius rotundicauda* har invaderet ferskvandshabitater sympatrisk (=geografisk overlappende), hvorimod *T. tridentatus* muligvis opstod allopatrisk (=geografisk adskilt) ved at bevæge sig nordpå til Japan. Ved at anvende flere genetiske markører regner vi med senere at kunne koble disse begivenheder til historiske miljøændringer som f.eks. stigning/fald af vandstand i Pleistocene.

Populationsgenetiske studier

Vi kan allerede se, at populationsdynamikken i den centrale del af Sydøstasien er meget forskellig hos arterne *C. rotundicauda* (CR) og *T. gigas* (TG). Vores foreløbige analyser viser, at CR bevæger sig mindre end TG (vores undersøgelser viser stor genetisk forskel (meget høje F_{ST} -værdier) mellem CR-populationer fra Thailands øst- og vestkyst). En mulig forklaring kan være forskellig levevis hos de to arter. TG lever kystnært og ser ud til let at kunne sprede sig langs kyster og lavvandsområder. Derimod ser CR ud til at være knyttet til ferskvandspå-

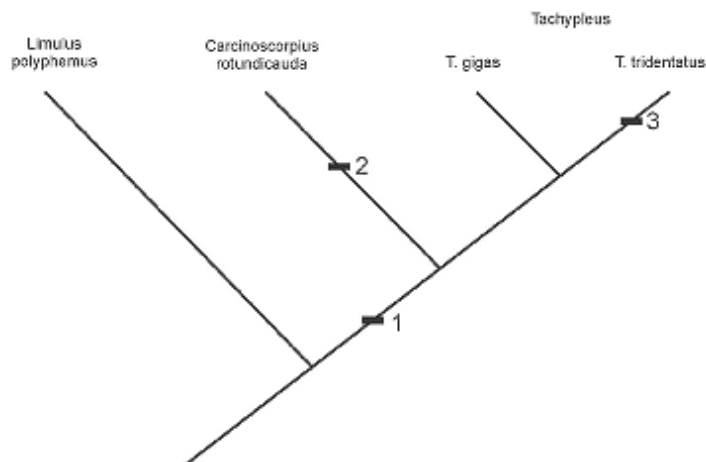


Fig. 2. Foreløbig rekonstruktion af dolkhalernes slægtskabsforhold, som viser mulige begivenheder i deres biogeografiske evolution. 1: tilstedeværelse i den centrale del i Sydøstasien, 2: invadering af ferskvandsbiotoper, 3: udvandring til Japan og østlige del af Sydøstasien.

virkede flodudmundinger og mangrover, hvorfra migration er stærkt begrænset.

De økofysiologiske undersøgelser af dolkhaleerne
Det primære formål med de fysiologiske undersøgelser af dolkhaleerne er at klarlægge, hvordan dyrenes udbredelse er betinget af miljøets beskaffenhed. Det er således velkendt fra andre dyregrupper, at udbredelsen og evnen til at overleve i forskellige habitater er helt eller delvist bestemt af temperatur, vandets saltholdighed, iltforhold med mere. Indflydelsen af disse parametre var ikke undersøgt på nogen af de asiatiske arter inden projektets start, og der fandtes kun få undersøgelser på *Limulus*. Vi har i særdeleshed undersøgt den mindste af de tre asiatiske dolkhalearter, *Carcinoscorpius*, som ofte antages at være den mest sjældne af de asiatiske arter. *Carcinoscorpius* er desuden særligt interessant, fordi den lever i brak- og saltvand og lader til at leve i områder med store ændringer i vandets iltkoncentration.

Undersøgelserne på *Carcinoscorpius* har fokuseret på følgende områder:

1. Blodets iltbinding: Som hos de fleste andre større hvirvelløse dyr spiller dolkhalernes blod, hæmolymfen, en vigtig rolle i transporten af ilt mellem gællerne og vævet i kroppen. Blodprøver er blevet analyseret i et diffusionskammer, og blodets ilttransportør hæmocyaninens (Hc) iltaffinitet er blevet bestemt ved forskellige pH. Dolkhalens Hc udviser en omvendt Bohr-effekt (det betyder, at iltaffiniteten øges ved nedsat pH), som det tidligere er påvist hos *Limulus*. Vores studier viser også, at Hc fra *Carcinoscorpius* har en relativt høj iltaffinitet, som kunne være en del af forklaringen på artens store tolerance over for iltmangel.
2. Måling af iltoptag ved forskellige saltholdigheder. Iltoptaget kan bruges som et godt mål for stofskiftet, og vi har derfor målt iltoptag ved forskellige saltholdigheder i vandet for at undersøge, om vandets saltholdighed medfører et ændret stofskifte. Dyrene blev målt efter neddykning i saltvand i kort tid ved to forskellige saltholdigheder. Vi fandt ikke synderlig forskel på iltoptaget, hvilket sikkert kan forklares ved, at dyrenes osmolaritet følger omgivelserne (de er osmoconformere), se nedenfor.
3. Osmoregulering hos *Carcinoscorpius*. *Limulus* er et velkendt eksempel på et dyr, som ikke regulerer kroppens osmolaritet, og vores undersøgelser viser, at *Carcinoscorpius* også mangler denne evne. Ændringer i vandets salinitet modsvares således af lignende ændringer i hæmolymfens salinitet (primært gennem ændringer af natrium og klorid), men medfører meget store væskebevægelser, som afspejles som store ændringer i dyrenes vægt.
4. Syre-base-regulering under hyperkapni samt effekten af ændret saltholdighed. Dyr, som lever i mangroven, vil ofte opleve forhøjede CO₂-værdier i forbindelse med mikrobiel nedbrydning af organisk materiale. Denne CO₂ virker som

en syre og kan nedsætte kroppens pH. De fleste dyr regulerer pH ved at udveksle syre-/baserelevante ioner med omgivelserne, men vores undersøgelser viser, at *Carcinoscorpius* er relativt dårlige til at tilbageregulere pH.

I vores fremtidige undersøgelser vil vi blandt andet undersøge, hvordan vand- og saltbalancen og syre-/basestatus påvirkes af lufteksponering.

Agenda 2008

Indsamling og eksperimenter i udlandet

Den største del af vores indsamling er afsluttet. Vi forventer at få flere prøver tilsendt i løbet af 2008 specielt fra områder i Kina, Malaysia, Indonesien og Japan.

Fylogenetiske studier

Vi forventer at forbedre vores analyse af slægtskab ved at bruge flere molekylære markører. Vi overvejer blandt andet at benytte ribosomale gener som f.eks. 18S og 28S rDNA, som har en relativt langsom evolutionsrate og derfor normalt anvendes til at undersøge slægtskab, som ligger længere tilbage i tid. Populationer, som viser en stor genetisk afstand i disse markører, kan antages at have været reproduktivt isoleret i langt tid. Desuden vil det blive muligt at kalibrere et molekylært ur og efterfølgende kombinere vores fylogeni med en historisk tidsramme.

Populationsgenetiske studier

I løbet af 2008 kommer vi til at uddybe vores populationsgenetiske analyser i særligt interessante områder, hvor vi formoder, der findes adskilte populationer, biogeografiske barrierer eller regioner med særlig høj diversitet. Her kommer vi til at anvende mikrosatellitter som genetiske markører på grund af deres variation over relativt korte distancer.

Taksonomiske studier

En stor del i vores arbejde i det næste år vil blive en omfattende sammenlignende anatomisk undersøgelse af alle stadier i livscyklus hos samtlige fire arter og eventuelle underarter. Vi vil specielt se på morfologien af spermier, embryonalstadier og larver. I tilfælde, hvor adskillige genetiske og anatomiske data antyder nye taksonomiske enheder med egen evolutionsnære historie, vil en taksonomisk revision blive foretaget.

Barcoding

En stor del af vores genetiske data kan også anvendes til molekylære stregkoder. Alle genetiske data, der genereres sammen med den tilhørende geografiske information, vil blive leveret til en database (CBOL), som er tilgængelig via internettet (<http://www.barcoding.si.edu/>). Denne information kan anvendes til at identificere stadier som f.eks. æg eller larver i fremtiden, hvilket blandt andet kan bruges til at identificere gydeområder for populationer, man er særligt interesseret i at beskytte.