



بررسی پروفایل طولی تنوع ژنتیکی جنس *Epeorus* رودخانه گاماسیاب در فصول مختلف سال

لیما طیبی^{۱*}، هادی پورباقر^۲، حمید فرحمند^۳

تاریخ دریافت: آذر ۹۶

تاریخ پذیرش: اسفند ۹۶

چکیده

این مطالعه با هدف بررسی تنوع ژنتیکی جنس *Epeorus* در طول رودخانه گاماسیاب انجام شد. نمونه‌برداری از *Epeorus* ها از چهار ایستگاه به ترتیب از سرچشمه رودخانه به سمت پایین با فاصله حدود ۵۰۰ متر از یکدیگر، در چهار فصل سال و با سه تکرار از قسمت‌های جانبی و وسط رودخانه توسط نمونه‌بردار سوربر صورت گرفت. پس از جداسازی و فیکس *Epeorus* ها، مراحل استخراج DNA انجام و کیفیت آن‌ها روی ژل الکتروفورز بررسی شد. سپس تکثیر ژن مورد مطالعه (سیتوکروم اکسیداز-۱) با استفاده از آغازگرهای مشخص انجام شد و محصولات PCR توالی‌یابی شد. هم‌ردیف‌سازی، بررسی و مقایسه توالی‌ها با نرم‌افزار MEGA 6 صورت گرفت. بررسی‌های مولکولی حاکی از آن بود که کاهش تنوع ژنتیکی در ایستگاه شماره ۲ که در معرض آلودگی پساب کارگاه تکثیر و پرورش ماهی قرار داشت به ویژه در فصولی که رودخانه با کاهش دبی آب مواجه شده بود، مشهود است.

واژگان کلیدی: تنوع ژنتیکی، توالی‌یابی، رودخانه گاماسیاب، *Epeorus*، سیتوکروم اکسیداز-۱.

۱- استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران.

۲- دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

۳- استاد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

* نویسنده مسئول: l.tayebi@malayeru.ac.ir

مقدمه

این آلودگی‌ها می‌تواند بر ساختار بوم‌شناختی رودخانه موثر باشد. علاوه بر روش‌های سنتی بررسی تغییرات تنوع و تراکم ماکروبن‌توزها، از روش‌های مولکولی نیز می‌توان در مطالعه اثرات آلودگی بر بزرگ‌بی‌مهرگان کفزی بهره گرفت (Hughes et al., 2003). میتوکندری به عنوان یک سیستم عمومی ژنتیکی به دلایلی چون توارث مادری و عدم بروز نوترکیبی، محتوای ژنی ثابت‌تری دارد و با داشتن نرخ سریع تکاملی، اختلافات ژنتیکی بیشتری را نسبت به ژنوم هسته‌ای نشان می‌دهد، از این رو در بررسی گروه‌های متفاوت حشرات یک نشانگر مناسب است، همچنین تجزیه و تحلیل‌های مبتنی بر mtDNA قابلیت ترسیم تفاوت‌های درون‌گونه‌ای و بین‌گونه‌ای را دارد (Carapelli et al., 2007). بر این اساس پایش زیستی می‌تواند در سطح مولکولی نیز انجام بگیرد و نوسانات حساس محیطی با استفاده از توالی ژن سیتوکروم اکسیداز-۱ (CO1) در ماکروبن‌توزها بررسی شود (Hughes et al., 2003).

از آنجا که ماکروبن‌توزهای اکوسیستم‌های آبی جانورانی بی‌مهره، با تحرک اندک و با چشم غیرمسلح نیز قابل دیدن هستند، شاخص‌های مناسبی برای ارزیابی اکوسیستم‌های آبی به شمار می‌آیند (Loch et al., 1996; Fries and Bowels, 2002; Stephens and Farris, 2004; Yokoyama et al., 2007). اکثر بی‌مهرگان کفزی قادر به گریز از منطقه نیستند و توسط آن‌ها می‌توان تغییرات بلند مدت تاثیر عوامل مختلف در طول بوم‌سازگان آبی را ثابت کرد. غالباً در نواحی بالادست نهرها و رودخانه‌ها، گروه‌های کفزیان و گونه‌های حساس مانند گونه‌های جنس *Epeorus* بیشتر است (Mahboobi Soofiani et al., 2012). گاماسیاب یکی از رودخانه‌های دائمی و مهم استان همدان با منشا یخچال‌های طبیعی است که سرچشمه آن در ۲۰ کیلومتری جنوب شهرستان نهاوند، به سمت روستای نورآباد واقع شده است و از دره‌های شمالی رشته کوه گروین سرچشمه می‌گیرد (طیعی و همکاران، ۱۳۹۵). این رودخانه تحت تاثیر زباله‌های روستاهای منطقه و پساب کارگاه‌های پرورش ماهی ساخته شده در مسیر خود قرار دارد که

تاکنون مطالعات جمعیتی کفزیان آب‌های شیرین داخلی در ایران بیشتر بر مبنای شناسایی ریخت‌شناختی این موجودات و نیز بررسی شاخص‌های تنوع و مشابهت در جمعیت‌های آن‌ها صورت پذیرفته است (طییبی و همکاران، ۱۳۹۵) ولی بررسی جمعیت‌های کفزیان از دیدگاه بوم‌شناختی مولکولی به ندرت انجام شده است. با توجه به تاثیر فعالیت‌های انسانی و آبی‌پروری بر محیط زیست رودخانه‌ها، سعی بر این است تا این آثار در این مطالعه مورد تجزیه و تحلیل اجمالی قرار گیرد. از میان ماکروبن‌توزهای موجود در بستر رودخانه، طی نمونه‌برداری‌های مقدماتی جنس *Epeorus* به علت فراوانی در منطقه و همچنین حساسیت به آلودگی انتخاب شد. بر همین اساس این مطالعه با هدف تعیین پروفایل طولی تنوع ژنتیکی جنس *Epeorus* به عنوان ماکروبن‌توز شاخص در رودخانه گاماسیاب انجام شد تا مشخص شود که آلودگی‌های وارد شده در مسیر رودخانه چگونه بر تنوع ژنتیکی جنس حساسی مانند *Epeorus* موثر است.

مواد و روش‌ها

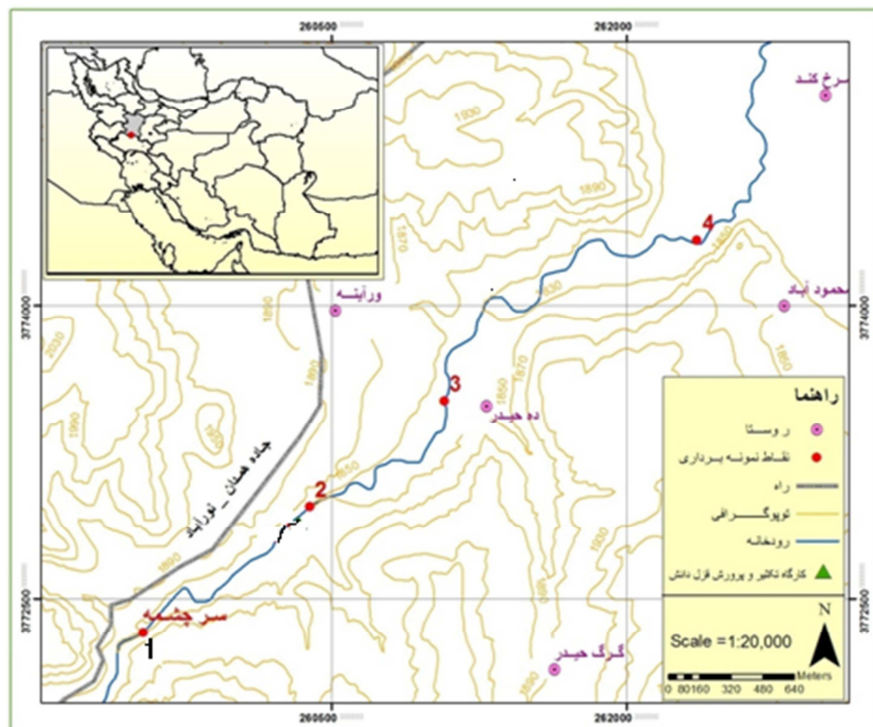
در مسیر رودخانه از سرچشمه تا مناطق

پایین‌تر تقریباً به فاصله ۵۰۰ متری از یکدیگر چهار ایستگاه در نظر گرفته شد (شکل ۱). نمونه‌برداری با سه تکرار از قسمت‌های میانی و جانبی هر ایستگاه توسط نمونه‌بردار سوربر انجام گرفت. از آنجایی که هدف اصلی درک کیفیت بوم‌شناختی رودخانه در محل و تغییرات اعمال شده بر آن بود، کیفیت انتخاب محل نمونه‌برداری و کیفیت نمونه برداشت شده به گونه‌ای بود که ماهیت بخش مورد ارزیابی را مشخص کند. نمونه‌برداری‌ها در اواسط فصل بهار، تابستان، پاییز و زمستان طی یک سال از سمت پایین‌دست رودخانه به سمت بالا انجام شد تا اختلال ایجاد شده ناشی از نمونه‌برداری با توجه به جریان رودخانه تاثیری بر ایستگاه‌های دیگر نداشته باشد. بستر رودخانه در طول مسیر نمونه‌برداری قله سنگی-ریگی بود و هنگام نمونه‌برداری قاب عمودی سوربر در کف بستر و توری متصل به آن عمود بر جریان آب رودخانه قرار داشت و با جریان آب باز نگه داشته می‌شد. کف بستر در چارچوب فلزی سوربر با ضربات متوالی به هم زده شد تا موجودات کفزی با جریان آب شسته و به داخل تور وارد شوند. سپس محتویات وارد شده به تور قیفی جمع‌آوری، به ظروف نمونه‌برداری منتقل و در الکل اتیلیک ۷۰ درصد تثبیت شد.

جداسازی شدند (Pennak, 1953; Usinger, 1956; Quigley, 1977; Clifford, 1991; Thorp and Covich, 2009).

پس از جداسازی، تعداد ۳۰ عدد *Epeorus* از سه تکرار هر ایستگاه به طور تصادفی برداشته شد که در کل برای ایستگاه‌های مورد نظر ۱۲۰ نمونه برای انجام آزمایش‌های مولکولی آماده‌سازی شد.

سپس نمونه‌ها برای شناسایی به آزمایشگاه شیلات دانشکده منابع طبیعی کرج منتقل شدند. در آزمایشگاه نمونه‌ها شسته، جداسازی و در الکل نگهداری شدند. شناسایی نمونه‌ها توسط لوپ و میکروسکوپ صورت گرفت. سپس نمونه‌ها با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر تا سطح جنس شناسایی شدند و نمونه‌های متعلق به جنس *Epeorus*



شکل ۱: نقشه منطقه مطالعاتی و موقعیت ایستگاه‌های نمونه‌برداری بر رودخانه گاماسیاب. ایستگاه ۱: سرچشمه، ایستگاه ۲: ۵۰۰ متری، ایستگاه ۳: ۱۰۰۰ متری و ایستگاه ۴: ۱۵۰۰ متری پس از سرچشمه.

نسبت به آغازگرهای رایج دیگر (Guryev et al., 2001; Hebert et al., 2003; Hughes et al., 2003; Ekrem et al., 2007; Skevington et al., 2007; Stahls and Savolainen, 2008) برای تکثیر این ناحیه طول بیشتری از این ژن را آشکار می‌کند، استفاده شد. برای این منظور، پس از استخراج DNA مناسب با استفاده از آغازگرهای HCO2198 و LCO11490 (Macrogen)، کره جنوبی) که توالی و مشخصات آن‌ها در جدول ۱ آمده است، نسبت به تکثیر قطعه مورد نظر اقدام شد.

برای بررسی کیفیت محصولات PCR نمونه‌ها روی ژل الکتروفورز در ولتاژ ۹۰ و زمان ۶۰ دقیقه بارگذاری شدند. نردبان ژنی مناسب به میزان ۵ میکرولیتر در چاهک اول و سپس به ترتیب محصولات PCR در چاهک‌های بعدی قرار داده شدند. پس از طی زمان مناسب،

ابتدا نمونه‌ها تک تک از درون الکل خارج و روی کاغذ خشک‌کن قرار داده شدند تا خشک شوند. سپس هر کدام از آن‌ها را به طور جداگانه با ازت مایع کوبیده شد تا کاملاً له شود و به صورت پودر درآید. پس از آن بلافاصله برای استخراج DNA، مطابق پروتکل موجود در دستور العمل کیت Exgene TM Tissue SV (Macrogen، کره جنوبی) اقدام شد. متغیر مولکولی مورد بررسی در مطالعه حاضر ساختار خطی ژن سیتوکروم اکسیداز-۱ در بین جمعیت‌های *Epeorus* ناحیه بالایی رودخانه بود.

به منظور اطمینان از انجام فرآیند استخراج و نیز بررسی کیفیت DNA استخراج شده، نمونه‌ها روی ژل الکتروفورز تفکیک شدند. در راستای تکثیر ژن مورد نظر از آغازگرهای اختصاصی ژن سیتوکروم اکسیداز-۱ طراحی شده توسط Folmer و همکاران (۱۹۹۴) که

جدول ۱: مشخصات آغازگرهای استفاده شده در مطالعه حاضر

آغازگر	توالی	وزن مولکولی (پیکومول)	OD (۱۰۰۰µL)	درجه حرارت ذوب (°C)
HCO2198	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	۲۰/۷	۷۹۴۹/۸	۶۱/۶
LCO1490	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	۲۱/۶	۷۶۹۹/۸	۵۹/۲

چشمی انجام شد. سپس فایل توالی با فرمت FASTA ذخیره و با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6.06 توالی‌ها، هم‌ردیف‌سازی شده، به روش Neighbor-Joining آنالیز شد و درخت فایلوژنی برای هر فصل ترسیم شد. همچنین تنوع ژنتیکی در جنس *Epeorus* برای هر فصل در بین ایستگاه‌های مختلف با نرم‌افزار MEGA 6.06 محاسبه شد.

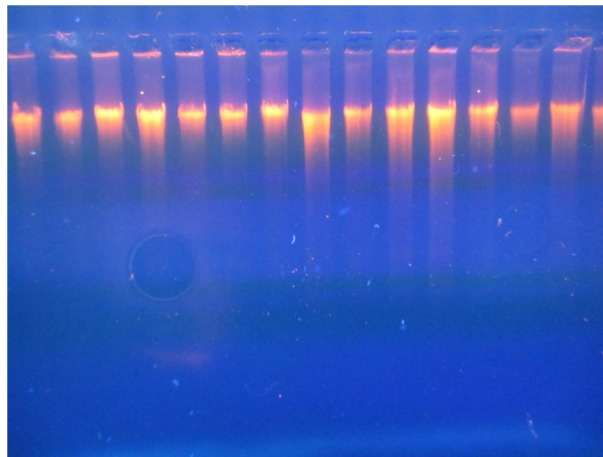
نتایج

شکل‌های ۲ و ۳ نتایج بررسی کیفیت DNA استخراج شده و محصولات PCR را بر روی ژل الکتروفورز نشان می‌دهند.

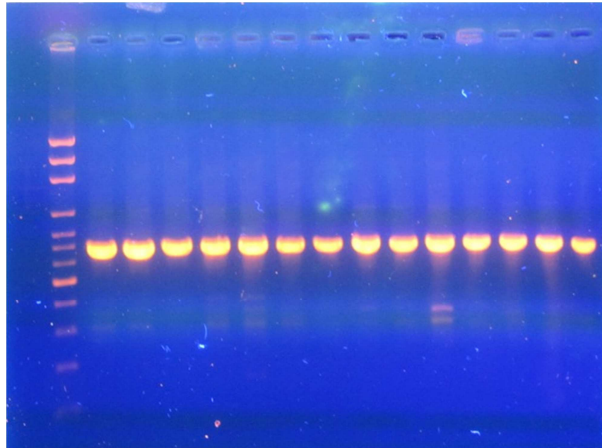
نمونه‌ها روی باند ۷۱۰-bp تفکیک و بر روی دستگاه ژل‌داک (Uvitec, UviDoc-HD6، انگلستان) بررسی و تصویربرداری شد و در کمترین زمان پس از بررسی کیفیت بر اساس الکتروفورز روی ژل آگارز و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، برای فرآیند توالی‌یابی به کشور کره ارسال شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای بررسی نتایج داده‌های مولکولی، پس از حصول نتایج توالی‌ها، کیفیت خوانش آن‌ها با نرم‌افزار Bio Edit تعیین شد. سپس توالی هر نمونه به صورت فایل .txt مرتب‌سازی و ذخیره شد و هم‌ترازی و تصحیح به روش



شکل ۲: بررسی کیفیت DNA استخراج شده بر روی ژل الکتروفورز

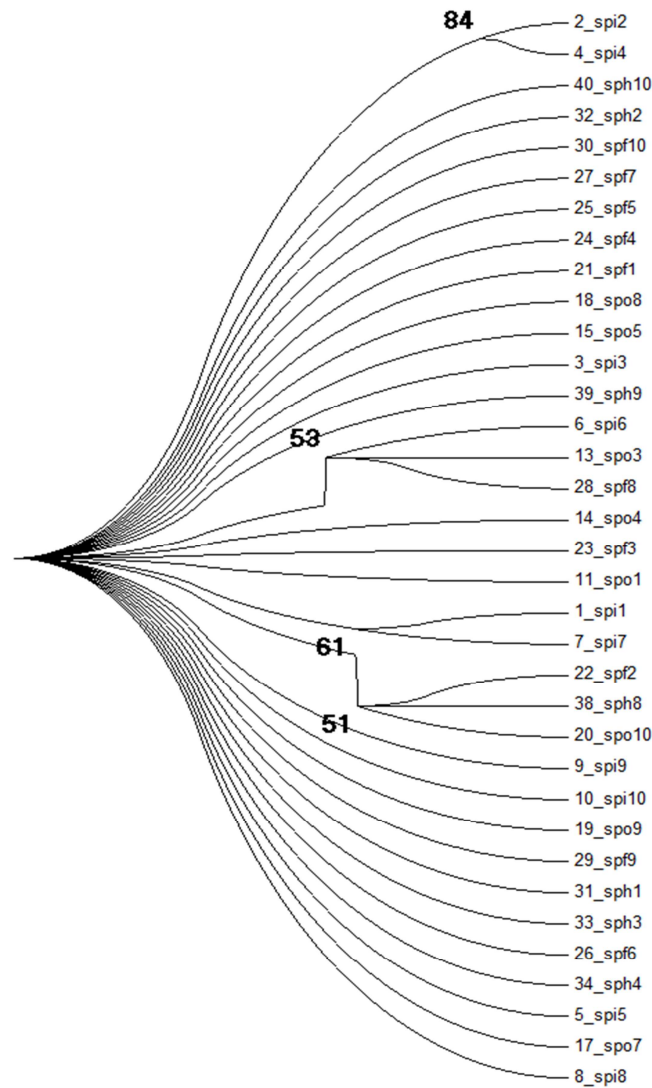


شکل ۳: بارگذاری محصولات PCR بر روی ژل الکتروفورز

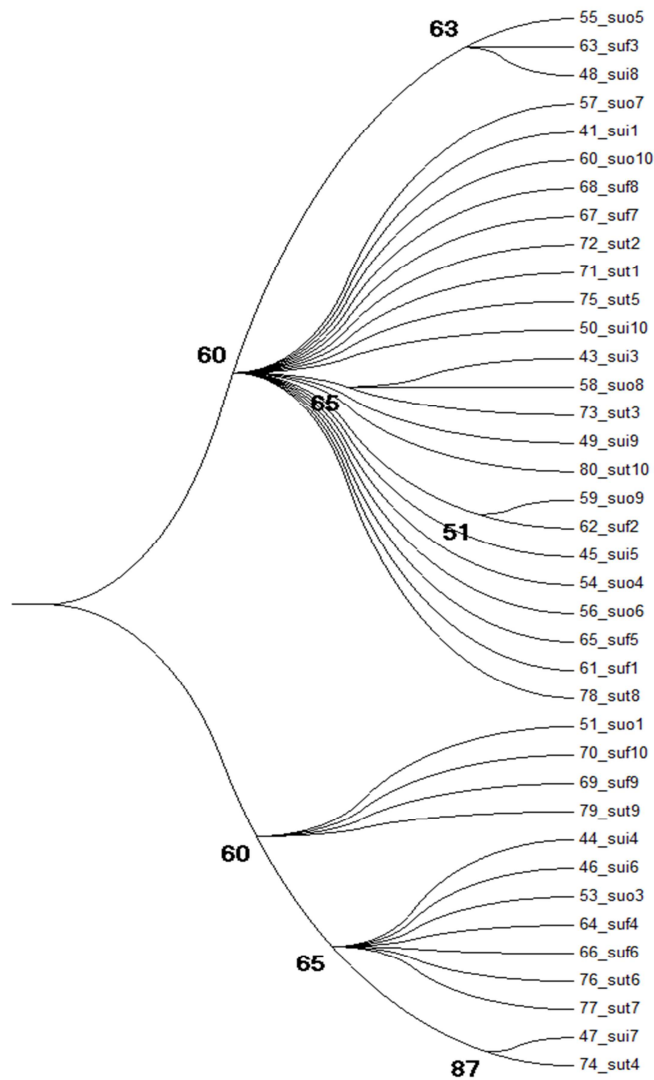
کنار نمونه‌های ایستگاه ۳ و ۴ قرار داشتند (شکل ۴). اگرچه نمونه‌های ایستگاه دوم نیز به صورت پراکنده در بین آن‌ها دیده شد که بیشتر به صورت کلاد جداگانه (نمونه ۱۷) و یا در کنار نمونه‌های f که نزدیک‌ترین ایستگاه به ۲ بود، قرار داشتند (شکل ۴). در بررسی درخت فیلوژنی NJ مربوط به فصل تابستان پراکندگی هاپلوتایپی بین ایستگاه‌های مختلف به شدت مشاهده شد. به طوری که به ندرت نمونه‌های مربوط به یک ایستگاه در کنار هم قرار گرفتند (شکل ۵).

پس از توالی‌یابی نمونه‌های *Epeorus* در هر یک از ایستگاه‌ها، درخت فیلوژنی Neighbor-Joining (NJ) برای توالی‌های سیتوکروم اکسیداز-۱، مربوط به هر فصل به صورت جداگانه در شکل‌های ۴ تا ۷ نشان داده شده است.

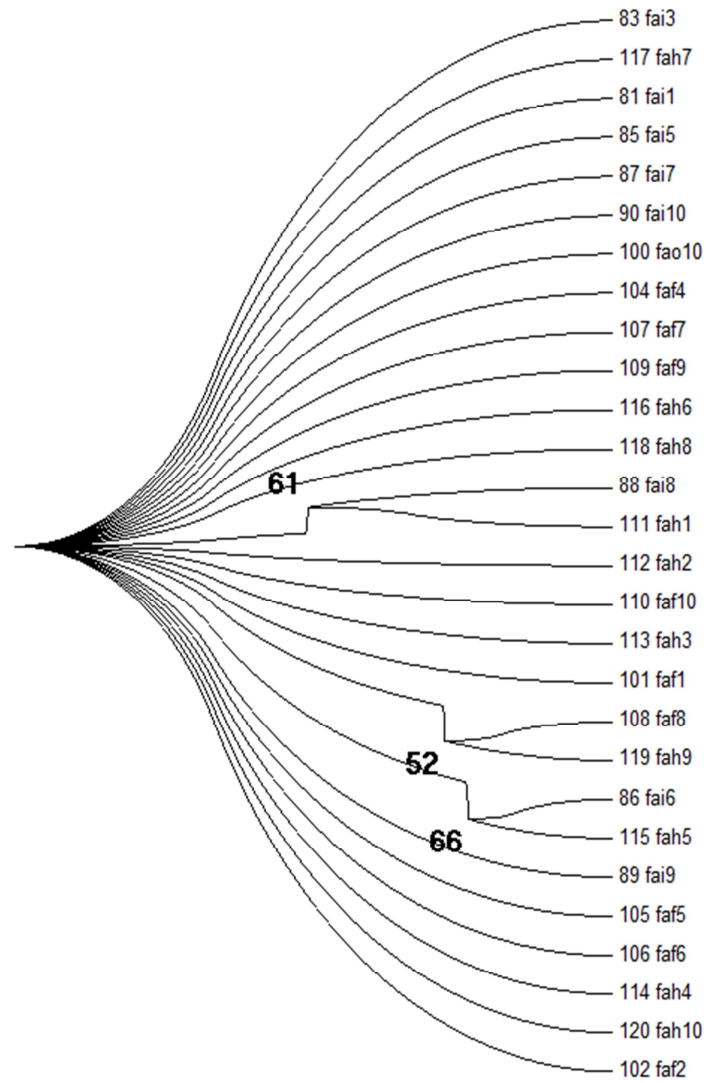
درخت فیلوژنی NJ برای توالی‌های CO1 برای نمونه‌های *Epeorus* فصل بهار در ایستگاه‌های مختلف نشان داد که بیشتر نمونه‌های ایستگاه ۱ در یک کلاد، مثل نمونه ۱ و ۷ با Bootstrap ۲۱ قرار گرفتند و یا در



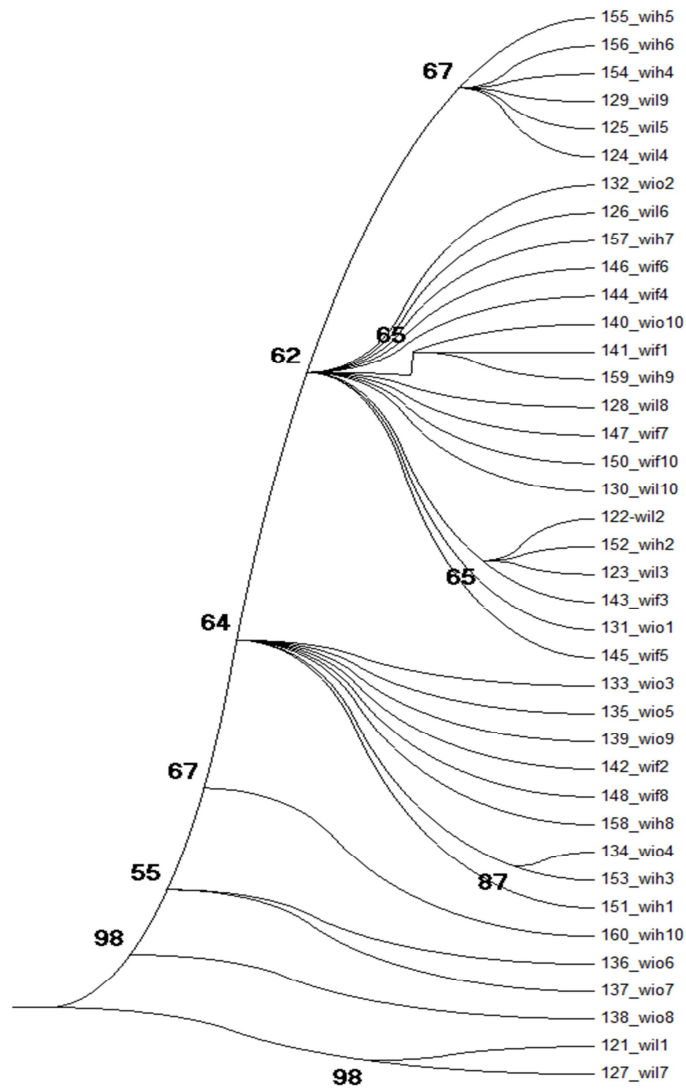
شکل ۴: درخت فیلوژنی Neighbor-Joining برای توالی‌های CO1 در جنس *Epeorus* در ایستگاه‌های مختلف فصل بهار. sp نشان دهنده نمونه‌های فصل بهار و حروف o, i, f و h به ترتیب نشان دهنده ایستگاه‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ است و شماره‌های پس از آن، شماره نمونه موجود در آن ایستگاه را نشان می‌دهد.



شکل ۵: درخت فیلوژنی Neighbor-Joining برای توالی‌های CO1 در جنس *Epeorus* در ایستگاه‌های مختلف فصل تابستان. su نشان دهنده نمونه‌های فصل تابستان و حروف i, o, f و t به ترتیب نشان دهنده ایستگاه‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ است و شماره‌های پس از آن، شماره نمونه موجود در آن ایستگاه را نشان می‌دهد.



شکل ۶: درخت فیلوژنی Neighbor-Joining برای توالی‌های CO1 در جنس *Epeorus* در ایستگاه‌های مختلف فصل پاییز. fa نشان دهنده نمونه‌های فصل پاییز و حروف a، o، f و h به ترتیب نشان دهنده ایستگاه‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ است و شماره‌های پس از آن، شماره نمونه موجود در آن ایستگاه را نشان می‌دهد.



شکل ۷: درخت فیلوژنی Neighbor-Joining برای توالی‌های COI در جنس *Epeorus* در ایستگاه‌های مختلف فصل زمستان. wi نشان دهنده نمونه‌های فصل زمستان و حروف i, o, a, f و h به ترتیب نشان دهنده ایستگاه‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ است و شماره‌های پس از آن، شماره نمونه موجود در آن ایستگاه را نشان می‌دهد.

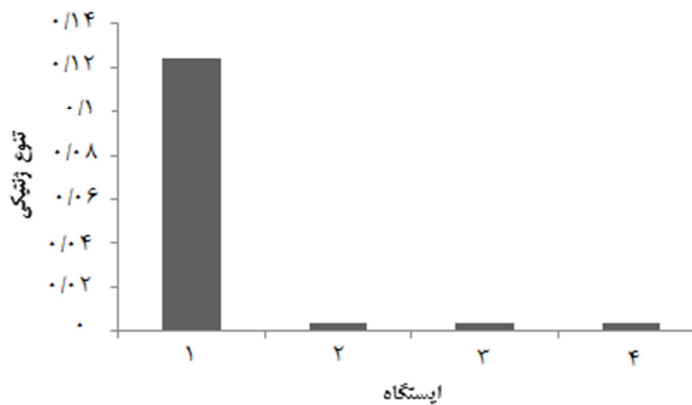
فصول مختلف در شکل‌های ۸ تا ۱۱ آمده است. همان گونه که در شکل ۸ نشان داده شده است، تنوع ژنتیکی در فصل بهار از ایستگاه ۱ به سمت پایین کاهش یافت و تنوع ژنتیکی در این فصل در ایستگاه ۱ تفاوت قابل ملاحظه‌ای با ایستگاه‌های دیگر داشت. تنوع ژنتیکی در فصل تابستان از بالا دست به سمت پایین کاهش و سپس افزایش یافت به طوری که کمترین تنوع در ایستگاه دوم و بیشترین تنوع در ایستگاه سوم ملاحظه شد (شکل ۹).

تنوع ژنتیکی در فصل پاییز در ایستگاه سوم افزایش یافت که تفاوت آن با ایستگاه‌های دیگر قابل ملاحظه بود (شکل ۱۰).

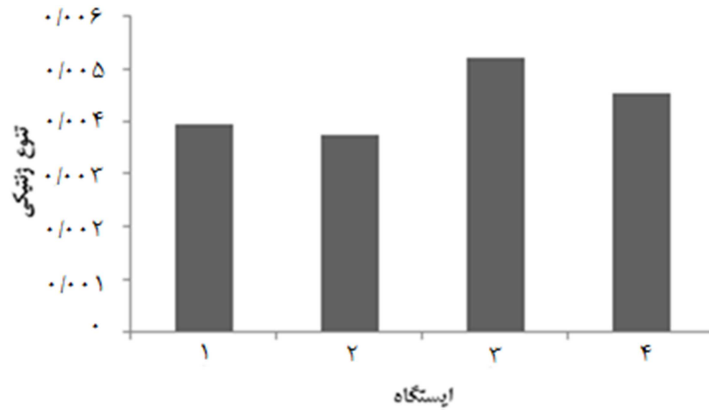
درخت فیلوژنی NJ فصل پاییز نشان داد که در Bootstrap ۶۱ نمونه‌های مربوط به ایستگاه ۱ و ۳ و ۴ تنها در یک کلاد قرار گرفتند. نمونه‌های ایستگاه دوم نیز در کلادهای دیگر به صورت ۳ تایی و ۴ تایی پشت سر هم قرار داشتند. نمونه ۱۰۲ از ایستگاه سوم این فصل نیز به صورت جداگانه و با فاصله زیاد از سایر کلادها قرار داشت (شکل ۶). درخت فیلوژنی NJ نمونه‌های فصل زمستان نیز در ایستگاه‌های مختلف نشان داد که نمونه‌های قرار گرفته در ایستگاه اول و آخر به یکدیگر شباهت داشتند (شکل ۷).

تغییرات تنوع ژنتیکی

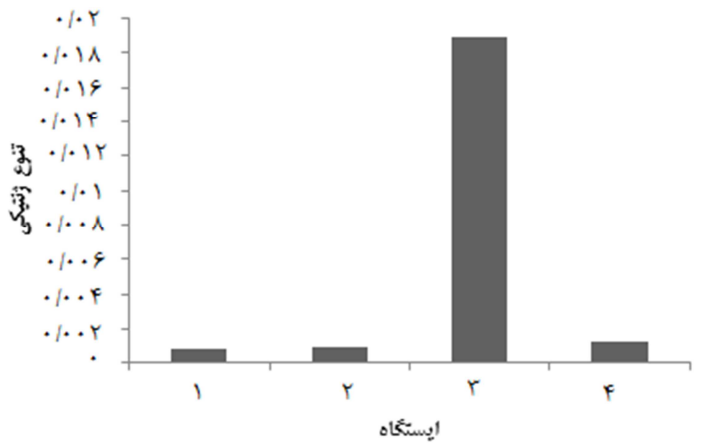
نتایج محاسبه تنوع ژنتیکی بین ایستگاه‌های مختلف نمونه‌برداری به تفکیک



شکل ۸: تغییرات تنوع ژنتیکی در جنس *Epeorus* در فصل بهار در ایستگاه‌های مختلف نمونه‌برداری

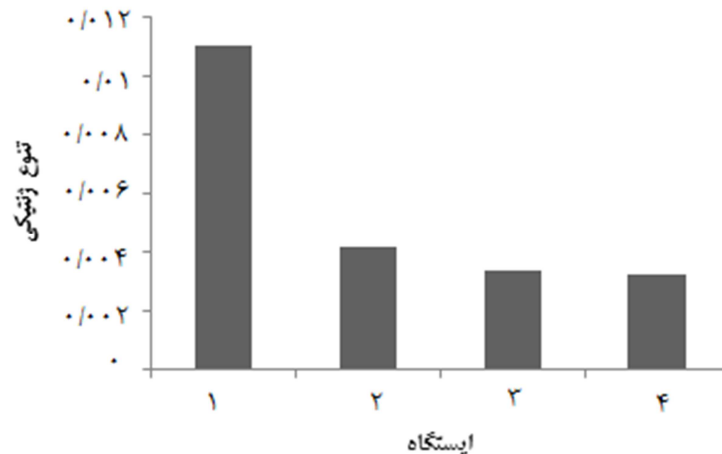


شکل ۹: تغییرات تنوع ژنتیکی در جنس *Epeorus* در فصل تابستان در ایستگاه‌های مختلف نمونه‌برداری



شکل ۱۰: تغییرات تنوع ژنتیکی در جنس *Epeorus* در فصل پاییز در ایستگاه‌های مختلف نمونه‌برداری

تنوع ژنتیکی در فصل زمستان از ایستگاه ۱ مشاهده شد که تفاوت قابل ملاحظه‌ای با ایستگاه‌های دیگر داشت (شکل ۱۱).
 به سمت پایین و ایستگاه‌های پس از آن کاهش یافت. بیشترین تنوع ژنتیکی در ایستگاه ۱



شکل ۱۱: تغییرات تنوع ژنتیکی در جنس *Epeorus* در فصل زمستان در ایستگاه‌های مختلف نمونه‌برداری

بحث

یک نمونه از ایستگاه ۱ نیز به صورت جداگانه و با فاصله زیاد از ایستگاه‌های دیگر قرار گرفت که احتمالاً تفاوت هاپلوتایپی زیادی با نمونه‌های دیگر که پشت سر هم در یک کلاد قرار گرفتند، داشت. مطالعات پژوهشگران دیگر نیز تغییراتی را در ترکیب جمعیت‌های ماکروبتوزی در مناطق آلوده نسبت به غیرآلوده نشان می‌دهد که یافته‌های این مطالعه را تأیید می‌کند (Dorigo et al., 2002). کنار هم قرار گرفتن نمونه‌های سرچشمه با نمونه‌های پایین‌تر رودخانه در درخت‌های فیلوژنی به نوعی نشان داد علاوه بر این که ایستگاه‌ها از لحاظ ویژگی‌های فیزیوشیمی آب شبیه هم

بررسی درخت‌های فیلوژنی

با بررسی درخت‌های فیلوژنی Neighbor-joining (NJ) برای توالی‌های CO1 برای نمونه‌های *Epeorus* فصل بهار در ایستگاه‌های مختلف مشخص شد که بیشتر نمونه‌های بالا دست در یک کلاد و یا در کنار نمونه‌های پایین‌تر h و f قرار گرفتند. اگرچه نمونه‌های ایستگاه ۲ به عنوان آلوده‌ترین ایستگاه که تحت تاثیر زباله‌ها و پساب خروجی کارگاه‌های پرورش ماهی بود نیز به صورت پراکنده در بین آن‌ها دیده شد که بیشتر به صورت کلاد جداگانه و یا در کنار نمونه‌های f که نزدیک‌ترین ایستگاه به ۲ بود، قرار گرفت.

بودند، *Epeorus* های موجود در آن‌ها نیز تشابه هاپلوتایپی بیشتری با همدیگر داشتند.

پراکندگی تنوع ژنتیکی بین ایستگاه‌های مختلف در فصل تابستان را می‌توان به دلیل کاهش دبی آب در فصل تابستان و آلودگی بیشتر آب در این فصل نسبت به فصول دیگر دانست. چرا که با توجه به کاهش حجم آب در تابستان درصد آلودگی آب بالا رفت و حتی ایستگاه‌های ۳ و ۴ را نیز درگیر کرد. به طوری که با توجه به درخت فیلوژنی به سختی می‌توان اختلافات هاپلوتایپی بین ایستگاه‌ها را در این فصل توجیه کرد. مطالعات دیگر نیز از طریق توالی‌یابی ژن سیتوکروم اکسیداز-۱ به بررسی اختلافات ژنتیکی در فصول و دوره‌های خشک با دبی پایین آب نسبت به دوره‌های پر آبی پرداختند و اظهار داشتند که این اختلافات در دوره‌های مرطوب و پرباران با دبی بالای آب مشهودتر است (Hughes et al., 2003). بنابراین پراکندگی تنوع ژنتیکی و عدم مشخص بودن اختلافات تنوع ژنتیکی در جنس *Epeorus* در تابستان را می‌توان به کاهش دبی آب مرتبط دانست.

قرار گرفتن نمونه‌های مربوط به ایستگاه‌های ۱، ۳ و ۴ کنار هم و جدا از نمونه‌های خروجی در فصل پاییز نشان دهنده مشابهت ژنتیکی

نمونه‌های این ایستگاه‌ها است. همچنین قرار گرفتن نمونه‌های ایستگاه اول و آخر در فصل زمستان نشان دهنده شباهت نمونه‌های این دو ایستگاه است که با نتایج حاصل از مطالعات پژوهشگران دیگر هم‌خوانی دارد (Dorigo et al., 2002). در بررسی‌های فیزیکی شیمیایی آب نیز تقریباً در مورد تمام شاخص‌ها مشخص شد که با بهتر شدن شرایط در ایستگاه آخر و شبیه شدن آن به شرایط بالادست، رودخانه توان خودپالایی داشته است که مطالعات دیگر در رودخانه‌های دیگر نیز این نتایج را تایید می‌کند (Naderi Jolodar et al., 2011; Mahboobi Soofiani et al., 2012). بنابراین می‌توان به این نتیجه رسید که کیفیت آب پس از طی ۱۰۰۰ متر از ایستگاه آلوده‌تر با سرچشمه تقریباً یکسان شد و *Epeorus* های قرار گرفته در این دو ایستگاه از لحاظ فیلوژنی به یکدیگر شبیه‌تر بودند، هر چند تنوع ژنتیکی پس از طی این مسافت به حالت اول برگشت.

بررسی تنوع ژنتیکی ایستگاه‌ها در فصول مختلف

در بررسی تنوع ژنتیکی جنس *Epeorus* در ایستگاه‌های مختلف فصل بهار، تنوع در

مشاهده شد بر نمی‌گردد. بررسی تنوع ژنتیکی در فصل تابستان نشان داد که تنوع در ایستگاه ۲ در کمترین حد بود که به دلیل آلودگی پساب، منطقی است که در این فصل در ایستگاه‌های ۳ و ۴ به تدریج تا حدودی جبران شود که می‌تواند به دلیل کاهش دبی آب و فرصت بیشتر برای احیای کفزیان باشد. در فصل پاییز افزایش قابل ملاحظه تنوع در ایستگاه سوم مشاهده شد. این افزایش احتمالاً به دلیل وجود یک نمونه در ایستگاه سوم بود که اختلاف زیادی با نمونه‌های موجود در ایستگاه‌های دیگر داشت و در درخت فیلوژنی فصل پاییز کاملاً مشخص بود که به صورت یک کلاد جداگانه با فاصله زیاد از بقیه نمونه‌ها قرار گرفت. این اختلاف می‌تواند باعث ایجاد تفاوت زیاد در نمودار تنوع ژنتیکی فصل پاییز در ایستگاه سوم شود.

به طور کلی بررسی نمودارهای تنوع ژنتیکی جنس *Epeorus* در ایستگاه‌های مختلف حاکی از کاهش تنوع ژنتیکی در ایستگاه ۲ به عنوان آلوده‌ترین ایستگاه بود که نشان می‌دهد دخالت‌های آنتروپوژنیک در بوم‌سازگان‌های آبی می‌واند تاثیر مستقیم و منفی بر تنوع ژنتیکی ماکروبن‌توزهای رودخانه‌ای ایجاد کند.

ایستگاه ۱ به طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر از ایستگاه‌های دیگر در این فصل بود. این موضوع را می‌توان به این صورت توجیه کرد که در ورودی به دلیل وارد نشدن هیچ منبع آلودگی تنوع بالا رفت ولی در ایستگاه ۲ به دلیل وارد شدن پساب خروجی کارگاه و زباله‌ها تنوع کاهش یافت. مطالعات پژوهشگران دیگر در مورد مقایسه مناطق آلوده و غیرآلوده در منابع آبی دیگر نیز این یافته را تایید می‌کند که ایستگاه‌های آلوده‌تر دارای کمترین تنوع ژنتیکی و جمعیت‌های مقاوم است (Dorigo et al., 2002). همچنین تفاوت هاپلو تایپی زیاد تنها یک نمونه از ایستگاه ۱ فصل بهار که در توالی DNA این نمونه و همچنین درخت فیلوژنی مشخص است، می‌تواند دلیل این اختلاف زیاد در تنوع ژنتیکی باشد. تنوع ژنتیکی جنس *Epeorus* در زمستان نیز مانند بهار بود. به این ترتیب که در ایستگاه ۱ تنوع زیاد و پس از آن در ۲ به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت و در ایستگاه‌های بعدی نیز ترمیم نشد. از این موضوع می‌توان به این نتیجه رسید اگرچه از لحاظ شرایط فیزیوشیمیایی آب رودخانه قادر به خودپالایی است، اما تنوع ژنتیکی رودخانه پس از طی مسافت یک کیلومتری نیز به حالت عادی که در ایستگاه ۱

منابع

- طیپی ل.، پورباقر ه.، فرحمند ح.، رفیعی غ. و میرواقفی ع. ۱۳۹۵. استفاده از تشخیص تحلیلی برای بررسی اثرات اکولوژیک پساب کارگاه تکثیر و پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان بر metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5): 294–299.
- Carapelli A., Lio P., Nardi F., Van Der Wath E. and Frati F. 2007.** Phylogenetic analysis of mitochondrial protein coding genes confirms the reciprocal paraphyly of Hexapoda and Crustacea. *BMC Evolutionary Biology*, 7(2): 1–13 (S8).
- Clifford H.F. 1991.** Aquatic Invertebrates of Alberta: An Illustrated Guide. University of Alberta, Canada. 261P.
- Dorigo U., Berard A. and Humbert J.F. 2002.** Comparison of eukaryotic phytobenthic community composition in a polluted river by partial 18s rRNA gene cloning and sequencing. *Microbial Ecology*, 44: 372–380.
- Ekrem T., Willassen E. and Stur E. 2007.** A comprehensive DNA sequence library is essential for identification with DNA barcodes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43(2): 530–542.
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R. and Vrijenhoek R. 1994.** DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5): 294–299.
- Fries L.T. and Bowels D.E. 2002.** Water quality and macro invertebrates community structure associated with a sport fish hatchery outfall. *North American Journal of Aquaculture*, 64: 257–266.
- Guryev V., Makarevitch I., Blinov A. and Martin J. 2001.** Phylogeny of the genus *Chironomus* (diptera) inferred from DNA sequences of mitochondrial cytochrome b and cytochrome oxidase I. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 19(1): 9–21.
- Hebert P.D., Cywinska A. and Ball S.L. 2003.** Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Biological Sciences*, 270(1512): 313–321.
- Hughes J.M., Hillyer M., and Bunn S.E. 2003.** Small-scale patterns of genetic variation in the mayfly *Bungona narilla* (Ephemeroptera:
- ساختار جوامع بنتیک (مطالعه موردی: رودخانه گاماسیاب). *مجله شیلات منابع طبیعی ایران*، ۶۹(۲): ۲۳۴–۲۲۱.

- Baetidae) in rainforest streams, south-east Queensland. *Freshwater Biology*, 48(4): 709–717.
- Loch D.D., West J.L. and Perlmutter D.G. 1996.** The effect of trout farm effluent on the taxa richness of benthic macroinvertebrates. *Aquaculture*, 147: 37–55.
- Mahboobi Soofiani N., Hatami R., Hemami M.R. and Ebrahimi E. 2012.** Effects of trout farm effluent on water quality and the macrobenthic invertebrate community of the Zayandeh-Roud River, Iran. *North American Journal of Aquaculture*, 74(2): 132–141.
- Naderi Jolodar M., Abdoli A., Mirzakhani M.K. and Sharifi Jolodar A. 2011.** Benthic macroinvertebrates in the Haraz River to the trout farms effluent. *Iranian Journal of Natural Resources*, 64(2): 163–175.
- Pennak R.W. 1953.** Fresh-water invertebrates of the United States. Ronald Press, USA. 482P.
- Quigley M. 1977.** *Invertebrates of Streams and Rivers*. Nene Collage, London. 236P.
- Stahls G. and Savolainen E. 2008.** Mt DNA COI barcodes reveal cryptic diversity in the *Baetis vernus* group (Ephemeroptera, Baetidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46: 82–87.
- Stephens W.W. and Farris J.L. 2004.** Instream community assessment of aquaculture effluents. *Aquaculture*, 231(1): 149–162.
- Skevington J.H., Kehlmaier C. and Stahls G. 2007.** DNA Barcoding: Mixed results for big-headed flies (Diptera: Pipunculidae). *Zootaxa*, 1423: 1–26.
- Thorp J.H. and Covich A.P. 2009.** *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates*. Academic Press, USA. 334P.
- Usinger R.L. 1956.** *Aquatic Insects of California: With Keys to North American Genera and California Species*. University of California Press, USA. 489P.
- Yokoyama H., Nishimura A. and Inoue M. 2007.** Macrobenthos as biological indicators to assess the influence of aquaculture on Japanese coastal environments. P: 407–423. In: Bert T.M. (Ed.). *Ecological and Genetic Implications of Aquaculture Activities*. Springer, Netherlands.



Investigation on genetic diversity of *Epeorus* along Gamasiab River in different seasons

Lima Tayebi^{1*}, Hadi Poorbagher², Hamid Farahmand³

Received: December 2017

Accepted: March 2018

Abstract

This study was conducted to determine the profile of *Epeorus* genetic diversity along the Gamasiab River. The sampling was done from four stations ranged source of the river downward, about 500 meters from each other, in four seasons with three replications from the middle and riverside of the river by the Surber sampler. After isolation and fixation of the *Epeorus*, the DNA extraction steps were performed and the quality of DNA was investigated on the electrophoresis gel. After gene amplification using specific cytochrome oxidase subunit I (COI) primers, PCR products were sequenced. Sequencing was performed with MEGA 6 software. Molecular investigations indicated that the reduction of genetic diversity at station 2 exposed to wastewater and trout farm effluents, especially in the seasons which are associated with decreasing water charge.

Key words: *Genetic Diversity, Sequencing, Gamasiab River, Epeorus, COI.*

1- Assistant Professor in Department of Fisheries, Faculty of Environment and Natural Resources, Malayer University, Malayer, Iran.

2- Associate Professor in Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

3- Professor in Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

*Corresponding Author: l.tayebi@malayeru.ac.ir

