



مقاله پژوهشی

بررسی عوامل موثر بر تغییرات تنوع هاپلوتیپی جنس *Baetis* در نواحی بالادست رودخانه گاماسیاب با ژن سیتوکروم اکسیداز I

لیما طیبی^{۱*}

DOI: 10.22124/japb.2022.22483.1469

تاریخ پذیرش: مرداد ۱۴۰۱

تاریخ دریافت: خرداد ۱۴۰۱

چکیده

در این مطالعه تغییرات تنوع هاپلوتیپی لارو جنس *Baetis* از راسته Ephemeroptera و عوامل موثر بر آن در نواحی بالادست رودخانه گاماسیاب مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور نمونه برداری از درشت‌بی‌مهرگان کفزی از چهار ایستگاه به فاصله ۵۰۰ متر با سه تکرار از طرفین و قسمت میانی رودخانه در چهار فصل توسط نمونه بردار سوربر انجام شد. سپس لاروهای *Baetis*‌ها شناسایی و جداسازی شده، برای آزمایش‌های مولکولی آماده‌سازی شدند. پس از استخراج DNA، تکثیر ژن COI و توالی‌یابی، تنوع هاپلوتیپی *Baetis*‌ها برای هر فصل در بین ایستگاه‌های مختلف با نرم افزار MEGA 6.06 محاسبه شد. بررسی نمودارهای تنوع *Baetis* در ایستگاه‌های مختلف حاکی از کاهش تنوع ژنتیکی در ایستگاه ۲ به عنوان آلوده‌ترین ایستگاه به دلیل وجود پساب کارگاه پرورش ماهی بود. بررسی اثر ایستگاه‌ها بر شاخص‌های توالی نیز بیشترین مقادیر این شاخص‌ها را در ایستگاه اول نشان داد، اما کاهش آنها در ایستگاه‌های دیگر قابل ملاحظه و معنی‌دار نبود. بنابراین می‌توان اثر آلودگی پساب را در کاهش تنوع این ماکروبن‌توزها نادیده انگاشت.

واژگان کلیدی: تنوع هاپلوتیپی، *Baetis*، توالی‌یابی، رودخانه گاماسیاب، ژن سیتوکروم اکسیداز I

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

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

مقدمه

گاماسیاب یکی از رودخانه‌های دائمی و مهم استان همدان است که در طول آن تعدادی مزارع پرورش ماهی قزل‌آلا وجود دارد و عمده‌ترین آنها مزرعه تکثیر و پرورش قزل‌دانش با مساحت ۳ هکتار است که در بالادست رودخانه در مختصات جغرافیایی 34° و $4'$ و $105''$ عرض شمالی و 48° و $28'$ و $154''$ طول شرقی و ارتفاع ۱۷۵۶ متر از سطح دریا قرار گرفته است و معیار نمونه‌برداری این مطالعه محسوب می‌شود. این کارگاه آب مورد نیاز خود را از رودخانه دریافت و دوباره پساب خود را به آب وارد می‌سازد و تجهیزات آبی‌پروری آن از کانال‌های سیمانی تشکیل شده است که ورودی و خروجی جداگانه دارند. ظرفیت تولید آن در سال ۵۰۰ تن قزل‌آلای رنگین‌کمان است. جریان آب ورودی کارگاه دو متر مکعب بر ثانیه است و خروجی پساب مستقیماً یا پس از طی مسافتی وارد رودخانه می‌شود. بنابراین رودخانه تحت تاثیر پساب کارگاه‌های پرورش ماهی ساخته شده در مسیر خود قرار دارد که این موضوع بی‌شک بر ساختار بوم‌شناختی و درشت‌بی‌مهرگان کفزی این رودخانه موثر خواهد بود.

از عوامل موثر بر کاهش تنوع زیستی یک بوم‌سازگان آبی می‌توان فعالیت‌های انسانی، تنش‌های زیست‌محیطی، تخریب زیستگاه و بهره‌برداری غیراصولی را نام برد. پایش‌های دائم یکی از ضروری‌ترین نیازها برای برنامه‌ریزی به منظور کنترل و کاهش آلودگی رودخانه محسوب می‌شود. اطلاع از وضعیت کیفی آب‌های سطحی این امکان را فراهم می‌سازد تا ضمن استفاده از آن در موارد مختلف شیوه‌هایی به کار گرفته شود تا کمترین آسیب به این منابع وارد شود (Varnosfaderani et al., 2010).

نخست بررسی این اثرات روی آب بوم‌سازگان و دیگری بر آبزیان بوم‌سازگان مانند درشت‌بی‌مهرگان کفزی که همان پایش زیستی بوده و بر اساس نمایه‌های اکولوژیکی و ژنتیکی قابل بررسی است. بنابراین در بررسی تغییرات تنوع و تراکم بی‌مهرگان کفزی، علاوه بر روش‌های سنتی از روش‌های مولکولی نیز می‌توان در مطالعه اثرات آلودگی بر درشت‌بی‌مهرگان کفزی بهره گرفت.

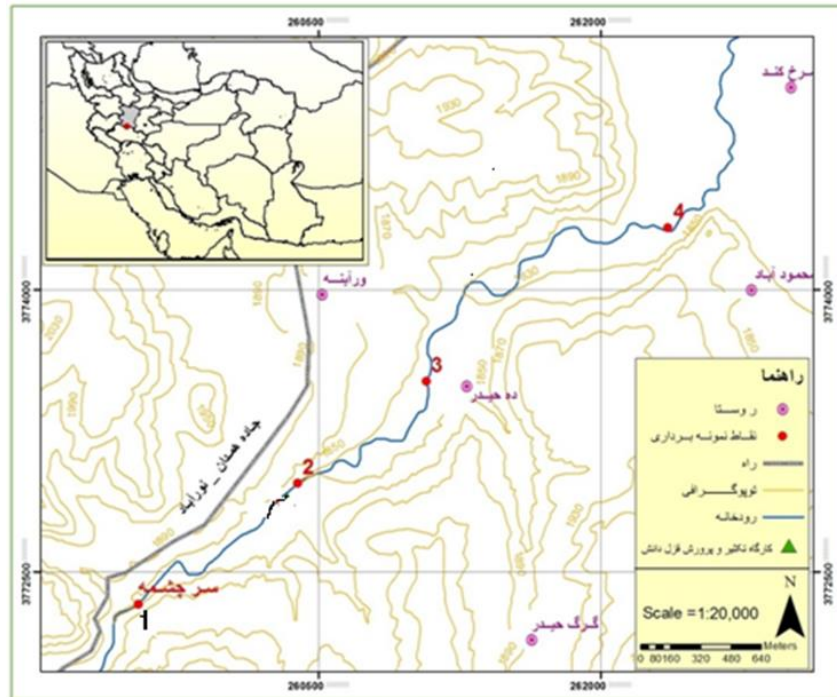
میتوکندری به دلایلی چون توارث مادری و عدم بروز نوترکیبی، محتوای ژنی ثابت‌تری دارد و با داشتن نرخ سریع تکاملی و اختلافات ژنتیکی بیشتر نسبت به ژنوم هسته‌ای در بررسی

بر همین اساس مطالعه حاضر با هدف تعیین تنوع دوره لاروی جنس *Baetis* از راسته زودمیران (Ephemeroptera) به عنوان یکی از درشت‌بی‌مهرگان کفزی حساس به آلودگی در رودخانه گاماسیاب انجام شد تا مشخص شود پساب وارد شده در مسیر رودخانه چگونه بر تنوع آن موثر است. بر این اساس پایش زیستی در سطح مولکولی نیز انجام گرفت و نوسانات حساس محیطی با استفاده از توالی ژن سیتوکروم اکسیداز I (COI) در این درشت‌بی‌مهره کفزی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از درشت‌بی‌مهرگان کفزی توسط نمونه‌بردار سوربر از چهار ایستگاه واقع بر مسیر رودخانه گاماسیاب از سرچشمه تا مناطق پایین‌تر تقریباً به فاصله ۵۰۰ متری از یکدیگر با سه تکرار در چهار فصل سال از قسمت‌های میانی و جانبی انجام شد. ایستگاه اول سرچشمه رودخانه، ایستگاه دوم خروجی کارگاه و ایستگاه‌های سوم و چهارم به ترتیب ۵۰۰ و ۱۰۰۰ متر پس از خروجی در نظر گرفته شد (شکل ۱).

گروه‌های متفاوت حشرات یک نشانگر مناسب است (Carapelli et al., 2007). تجزیه و تحلیل‌های مبتنی بر mtDNA قابلیت ترسیم تفاوت‌های درون و بین گونه‌ای را دارد و از توان قابل ملاحظه‌ای در بیان روابط فیلوژنتیکی و حل ابهامات رده‌بندی آبزیان برخوردار است (Brown et al., 2001). 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، ولی بررسی جمعیت‌های کفزیان از دیدگاه بوم‌شناختی مولکولی به ندرت انجام شده است. یکی از روش‌های مولکولی در بررسی تنوع درون‌گونه‌ای، توالی‌یابی ژن سیتوکروم اکسیداز I است که یک ژن میتوکندریایی بوده و استفاده از آن به عنوان یک شاخص مولکولی متداول است، چرا که تجزیه و تحلیل‌های مبتنی بر DNA میتوکندریایی قادر است تفاوت‌های درون و بین گونه‌ای را به خوبی مشخص کند (Brown et al., 2001). با توجه به تاثیر فعالیت‌های آبی‌پروری بر محیط زیست رودخانه‌ها سعی بر این است تا این آثار در این مطالعه مورد تجزیه و تحلیل اجمالی قرار گیرد.



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

متغیر مولکولی مورد بررسی در این مطالعه ساختار خطی ژن سیتوکروم اکسیداز I (COI) در بین جمعیت‌های *Baetis* ناحیه بالایی رودخانه گاماسیاب بود که به عنوان بی‌مهره کفزی حساس از گروه زودمیران انتخاب شدند. در این راستا تعداد ۳۰ عدد *Baetis* از سه تکرار هر ایستگاه به طور تصادفی برداشته شد که برای هر فصل ۱۲۰ نمونه و به طور کلی ۴۸۰ نمونه بررسی و برای انجام آزمایش‌های مولکولی

نمونه‌ها پس از نمونه‌برداری شسته و جداسازی شده و سپس در الکل اتیلیک ۷۰ درصد نگهداری شدند. شناسایی لاروهای جنس *Baetis* توسط استریومیکروسکوپ و میکروسکوپ صورت گرفت و سپس با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر تا سطح جنس شناسایی و جداسازی شدند (Pennak, 1953; Usinger, 1956; Quigley, 1977; Clifford, 1991; Thorp and Covich, 2009).

آنها با نرم افزار BioEdit Pro Ver.2 تعیین شد. سپس توالی هر نمونه به صورت فایل txt مرتب سازی و ذخیره شد و هم تراز و تصحیح به روش چشمی انجام شد. سپس فایل توالی با فرمت FASTA ذخیره شد و توالی ها با استفاده از نرم افزار MEGA 6.06 هم ردیف سازی شده، به روش Neighbor-joining تجزیه و تحلیل شدند و تنوع هاپلو تیبی *Baetis* ها برای هر فصل در بین ایستگاه های مختلف با نرم افزار MEGA 6.06 محاسبه و تجزیه تحلیل شد. کل توالی های هم ردیف شده با فرمت FASTA به فایل txt تبدیل و وارد نرم افزار Microsoft Excel 2015 شدند و محتویات آن وارد نرم افزار R 3.0.2 شد. هر نوکلئوتید در توالی در نرم افزار R در ستونی مجزا قرار گرفت و با استفاده از پکیج TraMineR برای هر توالی تعداد Transition ها، آنترپی (تنوع) شان و اندیکس پیچیدگی محاسبه شد (Gabadinho et al., 2011).

آماده سازی شد. پس از آن بلافاصله برای استخراج DNA بر اساس پروتکل کیت Exgene™ Tissue SV (Macrogen)، کره جنوبی) اقدام شد. در راستای تکثیر ژن مورد نظر توسط PCR از آغازگرهای اختصاصی COI (جدول ۱) که نسبت به آغازگرهای رایج دیگر برای تکثیر این ناحیه در مطالعات متفاوت طول بیشتری از ژن COI را آشکار کرده بودند (Guryev et al., 2001; Herbert et al., 2003; Hughes et al., 2003; Skevington et al., 2007; Stahls and Savolainen, 2008) استفاده شد. محصولات به دست آمده از PCR در کمترین زمان پس از بررسی کیفیت آنها بر اساس الکتروفورز روی ژل آگارز و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید (Clark and Pazdernik, 2009)، در صورت مشاهده واضح باند مورد نظر و عدم وجود باند اضافی برای فرآیند توالی یابی به کشور کره جنوبی ارسال شدند. برای بررسی نتایج داده های مولکولی، پس از به دست آمدن نتایج توالی ها کیفیت خوانش

جدول ۱: مشخصات آغازگرهای استفاده شده در مطالعه حاضر

| آغازگر | OD (1000µL) | وزن مولکولی (پیکومول) | دمای ذوب (°C) |
|---------|-------------|-----------------------|---------------|
| HCO2198 | ۷۹۴۹/۸ | ۲۰/۷ | ۶۱/۶ |
| LCO1490 | ۷۶۹۹/۸ | ۲۱/۶ | ۵۹/۲ |

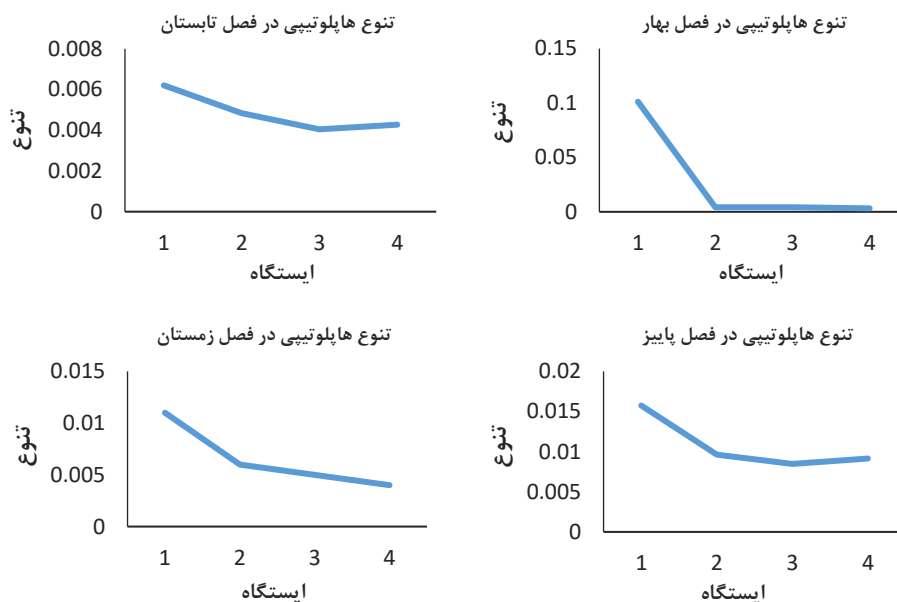
ژنتیکی در تمام فصول از ایستگاه ۱ به سمت پایین کاهش یافت و تنوع هاپلوتیپی در ایستگاه ۱ تفاوت قابل ملاحظه‌ای با ایستگاه‌های بعدی داشت.

بررسی اثر ایستگاه‌های مختلف نمونه‌برداری بر شاخص‌های توالی شامل تعداد ترانزیشن‌ها، آنتروپی شانون و ضریب پیچیدگی در شکل ۳ نشان داده شده است. اثرات متقابل ایستگاه‌های مختلف نمونه‌برداری بر این شاخص‌ها نشان داد بین شاخص‌های توالی در ایستگاه‌های مختلف نمونه‌برداری اختلافات معنی‌دار وجود نداشت.

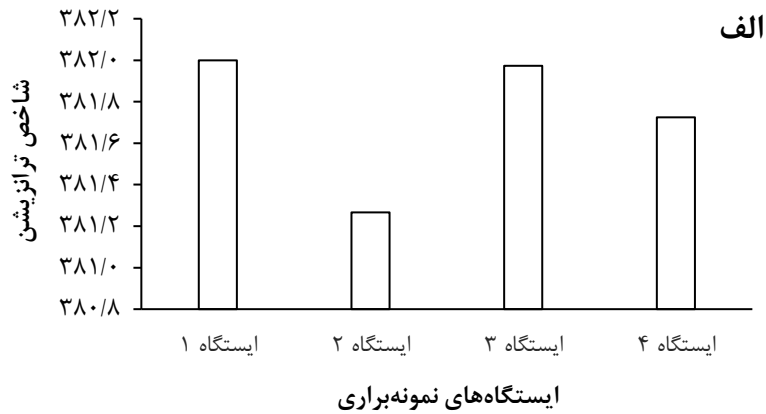
تاثیر فصل و ایستگاه نمونه‌برداری بر شاخص‌های توالی با آزمون تحلیل واریانس دو طرفه و پس‌آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد و در نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ بررسی شد.

نتایج

نتایج محاسبه تنوع ژنتیکی جنس *Baetis* در ایستگاه‌های مختلف نمونه‌برداری به تفکیک فصول مختلف در شکل ۲ آمده است. همان‌گونه که در این شکل نشان داده شده است، تنوع



شکل ۲: تغییرات تنوع هاپلوتیپی جنس *Baetis* در فصول مختلف سال. اختلاف معنی‌داری بین ایستگاه‌ها در هیچ فصلی وجود نداشت.



شکل ۳: اثر ایستگاه‌های مختلف نمونه‌برداری بر شاخص‌های توالی جنس *Baetis* (الف) شاخص ترانزیشن. (ب) شاخص‌های آنتروبی و ضریب پیچیدگی. اختلاف معنی‌داری بین ایستگاه‌ها در هیچ شاخصی وجود نداشت.

ایستگاه‌های دیگر در این فصل بود. این موضوع

بحث

را می‌توان بدین صورت توجیه کرد که در بالادست به دلیل وارد نشدن هیچ منبع آلودگی تنوع بالاتر است، ولی در ایستگاه ۲ به دلیل وارد

در بررسی تنوع هاپلوتیپی جنس *Baetis* در ایستگاه‌های مختلف در فصول مختلف، تنوع در ایستگاه ۱ به طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر از

ایستگاه‌های دیگر معنی‌دار نبود. به طور کلی، هرچه میزان ضریب پیچیدگی و شاخص‌های دیگر در یک توالی کمتر باشد نشان دهنده تکرار بیشتر یکسری از توالی‌ها در آن و در نتیجه کاهش تنوع هاپلوتیپی است که این نتیجه با مطالعات پژوهشگران دیگر نیز مطابقت دارد (Janson et al., 2004; Gabadinho et al., 2011). بدین ترتیب می‌توان گفت که پساب خروجی کارگاه تأثیر چندانی بر شاخص‌های مستخرج از توالی و در نتیجه تنوع هاپلوتیپی نخواهد داشت. هر چند که کاهش جزئی این شاخص‌ها در ایستگاه خروجی مشاهده شد که می‌تواند ناشی از کاهش تنوع هاپلوتیپی (Janson et al., 2004; Gabadinho et al., 2011) در ایستگاه خروجی پساب باشد. در بررسی تنوع ژنتیکی بین ایستگاه‌های فصول مختلف نیز کاهش تنوع ژنتیکی در ایستگاه خروجی مشهود بود، ولی چون این تغییرات کاهش قابل ملاحظه و معنی‌دار نیست می‌توان در بررسی شاخص‌های توالی بین ایستگاه‌ها، اثر پساب را در کاهش تنوع هاپلوتیپی بسیار جزئی و نادیده انگاشت.

شدن پساب خروجی کارگاه، تنوع کاهش یافته است. این یافته با نتایج مطالعات طبی و همکاران (۱۳۹۷) نیز مطابقت دارد که بر روی تنوع ژنتیکی *Epeorus*‌های رودخانه گاماسیاب انجام شد. بدین ترتیب که در ایستگاه ۱ تنوع زیاد و پس از آن در ایستگاه ۲ به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت و در ایستگاه‌های بعدی نیز ترمیم نشد. مطالعات دیگر در مورد مقایسه مناطق آلوده و غیرآلوده در منابع آبی دیگر نیز این یافته را تایید می‌کنند (Dorigo et al., 2002). از این موضوع می‌توان به این نتیجه رسید که اگرچه از لحاظ شرایط فیزیوشیمیایی آب رودخانه قادر به خودپالایی است، اما تنوع هاپلوتیپی رودخانه پس از طی مسافت یک کیلومتری نیز به حالت عادی که در ایستگاه ۱ مشاهده شد بر نمی‌گردد. به طور کلی، بررسی نمودارهای تنوع ژنتیکی *Baetis* در ایستگاه‌های مختلف حاکی از کاهش تنوع ژنتیکی در ایستگاه ۲ به عنوان آلوده‌ترین ایستگاه است. در بررسی اثر ایستگاه‌ها بر شاخص‌های توالی بیشترین مقادیر این شاخص‌ها در ایستگاه ورودی مشاهده شد که اختلاف آن با

منابع

- طیبهی ل.، پورباقر ه. و فرحمند ح. ۱۳۹۷. بررسی پروفایل طولی تنوع ژنتیکی جنس *Epeorus* رودخانه گاماسیاب در فصول مختلف سال. فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان، ۶(۴): ۱۹-۱.
- Brown J.H., Ernest S.M., Parody J.M. and Haskell J.P. 2001.** Regulation of diversity: Maintenance of species richness in changing environments. *Oecologia*, 126(3): 321-332.
- 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, Zoological Science*, 25: 1139-1145.
- Clark D.P. and Pazdernik N.J. 2009.** *Biotechnology: Applying the Genetic Revolution.* Elsevier Academic Press, USA. 750P.
- Clifford H.F. 1991.** *Aquatic invertebrates of Alberta: An illustrated guide.* University of Alberta, Canada. 550P.
- 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.
- Gabadinho A., Ritschard G., Mueller N.S. and Studer M. 2011.** Analyzing and visualizing state sequences in R with TraMineR. *Journal of Statistical Software*, 40(4): 1-37.
- 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.
- Herbert 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: Baetidae) in rainforest streams, south-east Queensland. *Freshwater Biology*, 48(4): 709-717.
- Janson S., Lonardi S. and Szpankowski W. 2004.** On the average sequence complexity. *Annual Symposium on Combinatorial Pattern Matching*. P: 74-88.

- Pennak R.W. 1953.** Fresh-water Invertebrates of the United States. Ronald Press, USA. 769P.
- Quigley M. 1977.** Invertebrates of Streams and Rivers. Nene Collage, UK. 540P.
- Skevington J. H., Kehlmaier C. and Stahls G. 2007.** DNA barcoding: Mixed results for big-headed flies (Diptera: Pipunculidae). *Zootaxa*, 1423: 1–26.
- 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.
- Thorp J.H. and Covich A.P. 2009.** Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates. Academic Press, USA. 573P.
- Usinger R.L. 1956.** Aquatic Insects of California: With Keys to North American Genera and California Species. University of California Press, USA. 489P.
- Varnosfaderani M.N., Ebrahimi E., Mirghaffary N. and Safyanian A. 2010.** Biological assessment of the Zayandeh Rud River, Iran, using benthic macroinvertebrates. *Limnologica, Ecology and Management of Inland Waters*, 40(3): 226–232.



Research Paper

Investigation on haplotype diversity of *Baetis* in upland region of Gamasiab River by COI

Lima Tayebi^{1*}

DOI: 10.22124/japb.2022.22483.1469

Received: June 2022

Accepted: August 2022

Abstract

This study was conducted to determine the effective factors on *Baetis* larva haplotype diversity in upward of Gamasiab River. The macrobenthos 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 riversides by the Surber sampler. After identification, isolation and fixation of the *Baetis*, they prepared for molecular experiments. After DNA extraction, gene amplification and sequencing, haplotype diversity of *Baetis* larva for each season in different station was performed with MEGA 6.06 software. Molecular investigations indicated that the reduction of haplotype diversity at station 2 exposed to wastewater effluents of trout farm. Sequencing parameters in other stations were not significant. Therefore, the effect of effluent in haplotype diversity was not remarkable.

Key words: *Haplotype Diversity, Baetis, Sequencing, Gamasiab River, COI.*

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

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

