1007-AMIWR2019

بررسی تغییرات تنوع هاپلوتایپی جنس *Baetis sp.* در اثر آلودگی پساب کارگاه تکثیر و پرورش قزل آلا (مطالعه موردی: رودخانه گاماسیاب)

لیما طیبی
استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران
l.tayebi@malayeru.ac.ir

چکیده

این بررسی برای تعیین اثرات آلودگی پساب کارگاه تکثیر و پرورش ماهی قزل آلا بر تغییرات تنوع هاپلوتایپی جنس باتیس در رودخانه گاماسیاب انجام شد. نمونه برداری از چهار ایستگاه سرچشمه، خروجی کارگاه و فاصله ۵۰۰ و ۱۰۰۰ متری پس از خروجی، در سه تکرار از قسمت میانی و طرفین رودخانه و طی چهار فصل توسط نمونه بردار سوربر انجام شد. نمونه ها پس از شستشو وجداسازی باتیس ها، در الکل ۷۰ در صد فیکس و مراحل استخراج DNA طبق دستورالعمل استخراج توسط کیت ماکروژن کره انجام گردید، سپس کیفیت آنها روی ژل الکتروفورز بررسی شد. پس از تکثیر ژنهای CO1، محصولات PCR برای توالی یابی به کشور کره فرستاده شد و نتایج حاصل همردیف سازی و با نرم افزار MEGA 6 تحلیل شد، تنوع هاپلوتایپی نمونه های باتیس با نرم افزار محاسبه شد و مشخص گردید که تنوع باتیس ها در ایستگاه شماره ۲ که خروجی کارگاه میباشد در مقایسه با سرچشمه کاهش یافته است. بنابراین پساب کارگاه به دلیل آلودگی میتواند موجب کاهش تنوع هاپلوتایپی درشت بی مهرگان آبزی حساس نظیر باتیسها گردد.

مقدمه

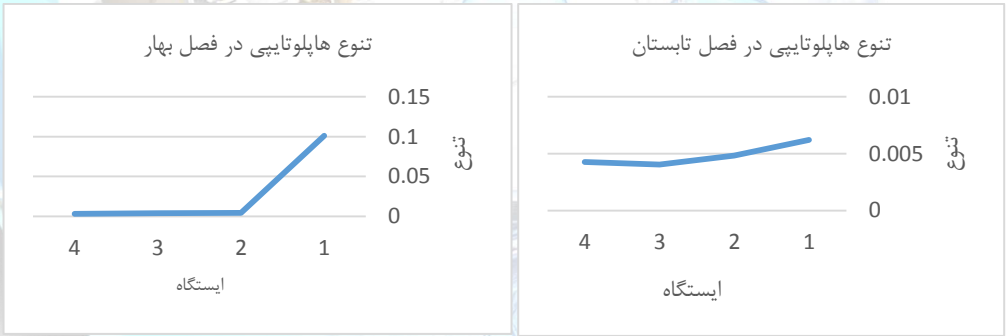
گاماسیاب یکی از رودخانه های دائمی و مهم استان همدان بوده که تحت تاثیر پساب کارگاه های پرورش ماهی ساخته شده در مسیر خود قرار دارد که این موضوع بی شک بر ساختار اکولوژیک و درشت بی مهرگان کفزی این رودخانه موثر خواهد بود. در بررسی تغییرات تنوع و تراکم ماکروبنتوزها، علاوه بر روشهای سنتی، از روش های مولکولی نیز میتوان در مطالعه اثرات آلودگی بر بزرگ بی مهرگان کفزی بهره گرفت. میتوکندری به عنوان یک سیستم عمومی ژنتیکی به دلایلی چون توارث مادری و عدم بروز نوترکیبی، محتوای ژنی ثابت تری داشته و با داشتن نرخ سریع تکاملی و اختلافات ژنتیکی بیشتر نسبت به ژنوم هسته ای در بررسی گروه های متفاوت حشرات یک نشانگر مناسب می باشد، همچنین تجزیه و تحلیل های مبتنی بر mtDNA قابلیت ترسیم تفاوت های درون گونه ای و بین گونه ای را دارد (Carapelli *et al.*, 2007). مطالعات جمعیتی کفزیان آب های شیرین داخلی در ایران بیشتر بر مبنای شناسایی ریخت شناختی این موجودات و نیز بررسی شاخص های تنوع و مشابهت در جمعیت های آن ها صورت پذیرفته ولی بررسی جمعیت های کفزیان از دیدگاه بوم شناختی مولکولی به ندرت انجام شده است. با توجه به تأثیر فعالیت های آبزی پروری بر محیط زیست رودخانه ها سعی بر این است تا این آثار در این مطالعه مورد تجزیه و تحلیل اجمالی قرار گیرد. بر همین اساس این مطالعه با هدف تعیین تنوع جنس *Baetis sp.* از راسته افمروپترا به عنوان یک ماکروبنتوز حساس در رودخانه گاماسیاب انجام شد تا مشخص گردد پساب وارد شده در مسیر رودخانه چگونه بر تنوع آن موثر است.بر این اساس پایش زیستی در سطح مولکولی نیز میتواند انجام گرفته و نوسانات حساس محیطی با استفاده از توالی ژن سیتوکروم اکسیداز (CO1) در ماکروبنتوزها بررسی گردد (Hughes *et al.*, 2003).

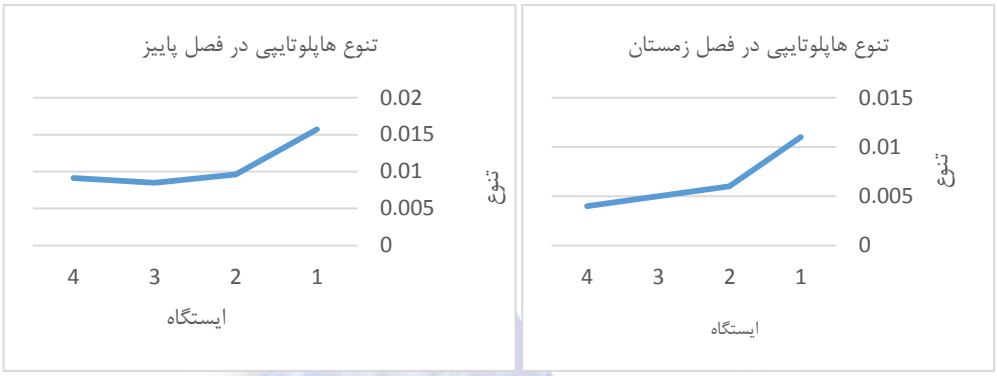
مواد و روش‌ها

نمونه برداری از ماکروبنتوزها توسط نمونه بردار سوربر از چهار ایستگاه واقع بر مسیر رودخانه گاماسیاب از سرچشمه تا مناطق پایین تر تقریبا به فاصله ۵۰۰ متری از یکدیگر با سه تکرار از قسمتهای میانی و جانبی انجام شد. ایستگاه اول سرچشمه رودخانه و ایستگاه دوم خروجی کارگاه و ایستگاه های سوم و چهارم به ترتیب ۵۰۰ و ۱۰۰۰ متر پس از خروجی در نظر گرفته شد. نمونه ها شسته و جداسازی شده و سپس در الکل اتیلیک ۷۰ درصد نگهداری شدند. شناسایی نمونه ها توسط لوپ و میکروسکوپ صورت گرفت و سپس با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر تا سطح جنس شناسایی و جداسازی گردیدند (Cliford, 1991; Pennak, 1953; Quigeley,1977; Thorp and Covich, 2009; Usinger,1956). سپس تعداد ۳۰ عدد باتیس از سه تکرار هر ایستگاه به طور تصادفی برداشته شد و برای انجام آزمایشات مولکولی آماده سازی گردید و پس از آن بلافاصله با افزودن محلول هایی مطابق پروتکل گیت Exgene TM Tissu SV ماکروژن جهت استخراج DNA اقدام گردید. در راستای تکثیر ژن مورد نظر از پرایمر های اختصاصی COI که نسبت به پرایمرهای رایج دیگر برای تکثیر این ناحیه در مطالعات متفاوت (Guryev et al., 2001; Hughes et al., 2003; Herbert et al., 2003; Ekrem et al., 2006; Skevinston et al., 2007; Stahls and Savolainen, 2007) طول بیشتری از ژن COI را آشکار کرده بودند استفاده گردید. محصولات حاصل ازPCR در کمترین زمان پس از بررسی کیفیت شان بر اساس الکتروفورز روی ژل آگارز و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید (Clark and Pazdemik, 2009)، در صورت مشاهده باند شارپ مورد نظر و عدم وجود باند اضافی برای پروسه توالی یابی به کشور کره ارسال گردیدند. برای بررسی نتایج داده های مولکولی، پس از حصول نتایج توالی ها کیفیت خوانش آنها با نرم افزار Bio edit تعیین گردید. سپس توالی هر نمونه بصورت فایل txt مرتب سازی و ذخیره گشته و هم ترازی و تصحیح به روش چشمی انجام شد. سپس فایل توالی با فرمت FASTA ذخیره و با استفاده از نرم افزار MEGA 6.06 توالی ها، همردیف سازی شده و به روشNeighbor-joining آنالیز گردیدند و تنوع هاپلوتایپی باتیس ها برای هر فصل در بین ایستگاه های مختلف با نرم افزار MEGA 6.06 محاسبه گردید.

نتایج و بحث

نتایج محاسبه تنوع ژنتیکی در ایستگاه های مختلف نمونه برداری به تفکیک فصول مختلف در شکل۱ آمده است. همان گونه که در شکل نشان داده شده تنوع ژنتیکی در تمام فصول از ایستگاه ۱ به سمت پایین کاهش می یابد و تنوع هاپلوتایپی در ایستگاه ۱ تفاوت قابل ملاحظه ای با ایستگاه های بعدی دارد.





شکل ۱ - تغییرات تنوع هاپلوتایپی جنس *Baetis sp.* در فصول مختلف سال

در بررسی تنوع هاپلوتایپی باتیس در ایستگاه های مختلف فصول مختلف، تنوع در ایستگاه ۱ به طور قابل ملاحظه ای بیشتر از ایستگاه های دیگر در این فصل می باشد. این موضوع را میتوان بدین صورت توجیه نمود که در ورودی به دلیل وارد نشدن هیچ منبع آلودگی تنوع بالا رفته ولی در ایستگاه ۲ به دلیل وارد شدن پساب خروجی کارگاه، تنوع کاهش یافته است که مطالعات محققین دیگر در مورد مقایسه مناطق آلوده و غیرآلوده در منابع آبی دیگر نیز این یافته را تأیید می نماید (Dorigo *et al.* 2002). بدین ترتیب که در ایستگاه ۱ تنوع زیاد و پس از آن در ۲ بطور قابل ملاحظه ای کاهش یافته و در ایستگاه های بعدی نیز ترمیم نمی شود. از این موضوع می توان به این نتیجه رسید اگرچه از لحاظ شرایط فیزیکوشیمیایی آب رودخانه قادر به خودپالایی است اما تنوع هاپلوتایپی رودخانه پس از طی مسافت یک کیلومتری نیز به حالت عادی که در ایستگاه ۱ مشاهده شد برنمی گردد. به طورکلی بررسی نمودارهای تنوع ژنتیکی باتیس در ایستگاه های مختلف حاکی از کاهش تنوع ژنتیکی در ایستگاه ۲ به عنوان آلوده ترین ایستگاه می باشد.

منابع

Carapelli, A., Liò, P., Nardi, F., Van Der Wath, E., & Frati, F. (2007). Phylogenetic analysis of mitochondrial protein coding genes confirms the reciprocal paraphyly of Hexapoda and Crustacea. *BMC evolutionary biology*, *7*(Suppl 2), S8.

Clifford, H. F. 1991. Aquatic invertebrates of Alberta: An illustrated guide. University of Alberta.

Dorigo, U., Berard, A., 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

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. Series B: 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.

Pennak, R. W. (1953). Fresh-water invertebrates of the United States. In Fresh-water invertebrates of the United States. Ronald Press.

Quigley, M. 1977. Invertebrates of streams and rivers.Nene collage, Northampton,Edward Arnold , London.

Skevington, J. H., Kehlmaier, C., and Stahls, G. (2007). DNA Barcoding: Mixed results for big-headed flies (Diptera: Pipunculidae). Zootaxa, 1423: 1-26.

Ståhls, 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. (Eds.). 2009. Ecology and classification of North American freshwater invertebrates. Academic Press.

Usinger R.L.(Ed.). 1956. Aquatic insects of California: with keys to North American genera and California species. Univ of California Press.489 p.