

تنوع ژنتیکی گاماروس در رودخانه‌های شرق استان تهران با استفاده از توالی‌یابی ژن CO1 میتوکندریایی

هادی یوسفی سیاهکلرودی^۱، سیامک یوسفی سیاهکلرودی^{۲*}، شادی خاتمی^۳

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی ورامین، ایران.

۲. دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی ورامین، ایران.

۳. استادیار، گروه بیولوژی دریا، دانشکده منابع طبیعی، واحد بندرعباس، دانشگاه آزاد اسلامی، بندرعباس، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۶/۳ تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۹/۲۲

چکیده

خانواده گاماریده از شاخص‌ترین و متنوع‌ترین خانواده‌های راسته دوجورپایان هستند. دوجورپایان غذای اصلی بسیاری از گونه‌های ماهی هستند و نسبت به آلودگی محیطی حساسیت بالایی دارند، بنابراین دارای اهمیت اقتصادی و اکولوژیکی می‌باشند. به دلیل تفاوت در ویژگی‌های ریخت‌شناسی و اکولوژیکی گونه‌های مختلف، گام اول شناسایی گونه‌های آن‌ها است. جمع‌آوری و شناسایی گونه‌های جنس *Gammarrus* در رودخانه‌های شرق استان تهران، یعنی جاجرود، حبله‌رود و لار هدف اصلی این مطالعه می‌باشد. برای این منظور ۱۰ ایستگاه نمونه‌برداری در بخش‌های مختلف رودخانه‌های جاجرود، حبله‌رود و لار انتخاب شد. نمونه‌برداری به صورت فصلی از مهرماه ۱۳۹۲ تا تیرماه ۱۳۹۳ انجام شد. از هر ایستگاه ۲۰ نمونه با استفاده از نمونه‌بردار درج (dredge) جمع‌آوری، در الکل اتانول ۹۶ تثبیت و برای انجام مراحل بعدی به آزمایشگاه منتقل گردید. شناسایی با استفاده از کلیدهای شناسایی موجود تا سطح گونه انجام شد و نتایج نشان داد که همه نمونه‌ها متعلق به گونه *G. komareki* می‌باشند. پس از انجام عملیات شناسایی، بررسی‌های مولکولی با استخراج DNA، بررسی کیفیت آن، جداسازی ژن میتوکندریایی ناحیه CO1 به وسیله پرایمر یونیورسال تحت شرایط PCR و در انتها توالی‌یابی انجام شد. پس از انجام توالی‌یابی نتایج آن با ژن‌های موجود در بانک جهانی ژن مقایسه شد. سپس توالی‌های نمونه‌های مناطق مختلف با هم مقایسه گردید و درخت فیلوژنی ترسیم شد. این تحقیق نشان داد که *G. komareki* دارای جمعیت‌های متنوعی در رودخانه‌های شرق استان تهران می‌باشد. با این که از نظر ریخت‌شناسی تفاوت عمده‌ای در این جمعیت‌ها مشاهده نشد. هم‌چنین فراوانی آن در ایستگاه‌های مختلف متفاوت بود که بیانگر اختلاف شرایط محیطی رودخانه‌ها بود.

واژگان کلیدی: تنوع ژنتیکی، گاماروس، جاجرود، حبله رود، لار.

۱. مقدمه

گاماریده‌ها از سخت‌پوستان ناجورپایی هستند که در بسیاری از محیط‌های آب‌شیرین و شور دیده می‌شوند. گاماریده‌ها منبع غذایی بسیار با ارزشی برای ماهیان اقتصادی مهم دریای خزر (مانند فیلماهی، سوف، گوماهی و کیلکا) می‌باشند. این جانوران می‌توانند محدود و وسیعی از دما و شوری را تحمل و از مواد گیاهی و جانوری گوناگون تغذیه نمایند، علاوه بر این قادرند از ماهیان مرده و غذاهای خورده نشده در داخل استخر تغذیه کنند. این سخت‌پوستان می‌توانند در جیره غذایی ماهی قزل‌آلا باعث بهبود رنگ بدن و بازارپسندی ماهیان گردند (Tayebi, 2004).

گاماروس‌ها در بیش‌تر آب‌های سطحی اروپا، آسیا و امریکای شمالی دیده می‌شوند. این موجودات در آب‌های شور، لب‌شور و شیرین و حتی در برخی از مناطق مرطوب نیز یافت می‌شوند. تاکنون ۴۳۰۰ گونه از ناجورپایان (Amphipods) شناسایی شده‌اند. تا به امروز ۱۹ جنس متعلق به خانواده گاماریده در دریای خزر تشخیص داده شده است. در ایران در بیش‌تر رودخانه‌های دارای آب شفاف و در برخی از چشمه‌ها و آبگیرها در زیر سنگ‌ها و بین گیاهان و جلبک‌ها می‌توان گاماروس را مشاهده نمود (Moghaddasi, 2001).

روابط تنوع ژنتیکی نشان‌دهنده تاریخ مشترک گونه‌ها هستند. از این‌رو آنالیزهای ژنتیکی برای تفسیر روند تکاملی و ترتیب زمانی وقایع کاربرد دارد. جمعیت‌های بزرگ عموماً دارای تنوع ژنتیکی بیش‌تری نسبت به جمعیت‌های کوچک‌تر هستند. این تنوع در آن‌ها سبب رشد سریع‌تر، تکامل و ترکیب شدن ژن‌ها و متعاقب آن عادت‌پذیری جمعیت‌های مختلف تحت شرایط محیطی متفاوت می‌شود. افراد جوامع کوچک‌تر از نظر ژنتیکی مشابه‌تر هستند، بنابراین تنوع کم‌تری دارند و همین عدم تنوع از سازگاری آن‌ها با شرایط محیطی مختلف می‌کاهد. از این‌رو بررسی تنوع ژنتیکی ابزار موثری در حفظ ژنتیکی گونه‌های پر اهمیت و با ارزش و همچنین گونه‌های کمیاب در معرض خطر از بین رفتن می‌باشند. در مقایسه اطلاعات فیلوژنی از پروتئین یا DNA موجودات استفاده می‌شود که بی‌گمان اطلاعات فیلوژنتیکی به‌دست آمده از DNA

کامل‌تر از اطلاعات به‌دست آمده از پروتئین‌ها می‌باشد. از این‌رو استفاده از ابزارهای مولکولی برای بررسی تنوع ژنتیکی به‌خاطر توانایی این ابزارها در شناسایی تغییرات در سطح DNA ارزشمند می‌باشد. نشانگرهای مولکولی از جمله ابزارهایی هستند که استفاده از آن‌ها به‌خاطر عدم تاثیرپذیری آن‌ها از شرایط محیط خارجی و داخلی موجود و حتی استفاده از آن‌ها در مورد گونه‌های منقرض شده پایه دیگری در انقلاب ژن محسوب می‌شوند. تاکنون انواع متعددی از نشانگرها شناسایی و به‌کار گرفته شده‌اند و کاربردهای متنوعی برای آن‌ها پیشنهاد شده است. یکی از کاربردهای عمده نشانگرها که سطوح بالایی از چندشکلی را بروز می‌دهند، آنالیز تنوع ژنتیکی در داخل و بین جمعیت‌ها می‌باشد که از کشف آن‌ها بیش از ۲۰ سال نمی‌گذرد و اولین بار توسط Litt و Luty (۱۹۸۹) به‌کار برده شد (Naghavi et al., 2006). از این‌رو می‌توان مهم‌ترین کاربرد ریزماهورها را مطالعه تنوع ژنتیکی، مطالعه فیلوژنتیکی و تکاملی و تهیه نقشه ژنومی و نشانگری در پژوهش‌های اکولوژیکی و تکامل جمعیت‌ها دانست. پس از تعیین جایگاه ژنتیکی و روند تکاملی هر جمعیت درختان فیلوژنتیکی رسم می‌گردد.

Grabowski و همکاران (۲۰۱۲) به مطالعه جمعیت *Gammarus varsoviensis* در رودخانه‌های اوکراین پرداختند. بررسی‌ها نمایانگر این مطلب بود که در گذشته و براساس مطالعات مورفولوژیک این گونه با گونه *G. lacustris* یک گونه منظور می‌شد، اما مطالعات تکمیلی مانند بررسی‌های ژنتیکی نشان داد که این دو گونه از هم مجزا بوده و گونه *G. varsoviensis* بومی دریای سیاه بوده که در اوایل قرن نوزدهم به حوضه بالتیک مهاجرت نموده است. Meyran و همکاران (۱۹۹۸) تحقیقاتی در زمینه بررسی تنوع ژنتیکی *G. fossarum* از طریق آنالیز توالی DNA میتوکندریایی انجام دادند. همچنین ساختار جمعیتی از نظر پراکنش جغرافیایی نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان کلسیم بدن که ناشی از کلسیم موجود در محیط زندگی این جانور است، بر روی تنوع ژنتیکی جمعیت آن بسیار تاثیرگذار است. به‌طوری‌که تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی نشان داد که جمعیت از نظر میزان کلسیم



شکل ۱- نقشه رودخانه‌های استان تهران و موقعیت ایستگاه‌های نمونه برداری (☆) در این تحقیق.

می‌گیرد. رود لار، از کوه‌های برف گیر و پرباران کلون بستک، که در شرق و شمال شرقی استان تهران قرار دارد، سرچشمه می‌گیرد. رودخانه جاجرود، یکی از مهم‌ترین رودخانه‌های استان تهران است که از کوه‌های کلون بستک، در بلندی‌های خرسنگ کوه، سرچشمه می‌گیرد (Afshin, 1999). در این مطالعه گاماروس-های رودخانه‌های شرق استان تهران از نظر تنوع ژنتیکی مورد بررسی قرار گیرد.

۲. مواد و روش‌ها

این تحقیق به صورت میدانی و آزمایشگاهی انجام گرفت. رودخانه‌هایی که برای تحقیق در نظر گرفته شدند عبارت بودند از: رودخانه جاجرود، لار و حبله‌رود. ابتدا براساس امکان دسترسی، وضعیت طبیعی منطقه، پوشش گیاهی، شیب زمین، پیوستن شاخه‌های فرعی به شاخه اصلی، سرعت جریان آب، پوشش گیاهی و بستر رودخانه نسبت به تعیین ایستگاه در رودخانه‌های مورد تحقیق اقدام شد. به طوری که در رودخانه جاجرود چهار ایستگاه، رودخانه لار دو ایستگاه و رودخانه خجیر چهار ایستگاه در نظر گرفته شد. جدول ۱ ایستگاه‌های مختلف را در هر رودخانه نشان می‌دهد (شکل ۱).

جمع‌آوری نمونه‌ها توسط تور دستی کوچک انجام شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده در ظروف کوچک درب‌دار قرار گرفت و توسط الکل اتانول ۹۶٪ تثبیت شد. نمونه‌ها، به آزمایشگاه دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران منتقل گردید و پس از شناسایی توسط کلیدهای شناسایی موجود جهت بررسی‌های مولکولی مورد استفاده قرار گرفتند (Stock, 1998; Pinkster and Karaman, 1977). به منظور مطالعه مولکولی مقداری

متنوع هستند، این موضوع نشان می‌دهد که همبستگی بین تنوع ژنتیکی و غلظت کلسیم در آب وجود دارد. با این حال، به نظر می‌رسد از این قبیل عوامل محیطی به طور غیرمستقیم، نقشی در کاهش تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های کوچک‌تر ندارند. Westram و همکاران (۲۰۱۱) توزیع تنوع گونه *G. fossarum* از Amphipoda آب شیرین اروپا را مورد بررسی قرار دادند. آزمایشات نشان داد که جمعیت‌های متفاوتی از این گونه در کشورهای سوئیس، آلمان و شرق فرانسه وجود دارد. به طوری که هر یک از جمعیت‌ها دارای اندازه‌های مختلفی هستند. Shapoori و همکاران (۲۰۱۱) در مورد ارزیابی سریع کیفیت آب رودخانه گرگانود بر پایه شاخص‌های زیستی تحقیقاتی را انجام دادند. مطالعات نشان داد که کاهش غنای گونه‌ای و تراکم و فراوانی کفزی‌های بزرگ مانند گاماروس در این رودخانه به علت عدم وجود پوشش گیاهی مناسب در طول رودخانه می‌باشد. از طرفی آلودگی‌ها و فاضلاب‌های ناشی از آلودگی‌های انسانی و طبیعی نیز از عوامل موثر دیگر در کاهش جمعیت گاماروس‌ها در این رودخانه محسوب می‌شوند. Mohammadi و همکاران (۲۰۱۰) در تحقیقی به بررسی و شناسایی گونه‌های جنس *Gammarus* در رودخانه زاینده‌رود پرداختند. نتایج این تحقیق نشان داد که ۴ گونه *G. apseudosyriacus*، *G. komareki*، *G. Proiectus* و *G. bakhteyaricus* از خانواده گاماریده در این رودخانه وجود دارد.

ایران در منطقه‌ای واقع است که از نظر جغرافیای جانوری بسیار حائز اهمیت است، ولی اطلاعات کمی درباره فون ناچورپایان آن که بسیار جالب توجه و متنوع هستند، وجود دارد. مطالعات انجام شده درباره جوامع ماهیان رودخانه‌ها نشان می‌دهد که فاکتورهای غیرزیستی از قبیل دما، سرعت جریان آب و نوع بستر رودخانه در پراکنش و فراوانی گونه‌های مختلف گاماروس موثر بوده که روی غنای گونه‌ای و تولیدات نیز در قسمت‌های مختلف موثر است (Sattarvand et al., 2012). حبله‌رود، رود لار و جاجرود از مهم‌ترین جریانات سطح الارضی استان تهران در شرق این استان قرار دارند، به شمار می‌روند. حبله‌رود، که به نام فیروزکوه نیز معروف است از فیروزکوه، سوادکوه و کوه‌های شهمیرزاد سرچشمه

جدول ۱ - محل رودخانه‌ها و ایستگاه‌های نمونه‌برداری در شرق استان تهران.

موقعیت جغرافیایی			ایستگاه	رودخانه
ارتفاع از سطح دریا (متر)	عرض (شرقی)	طول (شمالی)		
۱۹۳۱	۵۱°۳۱'۲۷"	۳۵°۵۵'۴۳"	فشم	جاجرود
۱۴۵۵	۵۱°۴۲'۶۵"	۳۵° ۴۳'۲۶"	سعیدآباد	
۱۳۲۸	۵۱°۴۳'۰۹"	۳۵°۴۰'۰۸"	خجیر	
۱۱۶۷	۵۱°۴۷'۸۳"	۳۵°۳۱'۲۶"	پاکدشت	
۱۶۴۰	۵۲°۳۷'۳۳"	۳۵°۳۵'۹۶"	زرین‌دشت	حبله‌رود
۱۵۱۴	۵۲°۳۰'۱۱"	۳۵°۳۱'۰۲"	سیمین‌دشت	
۱۷۸۹	۵۲°۴۱'۱۹"	۳۵°۴۰'۳۲"	خمده	
۱۶۸۷	۵۲°۳۸'۳۲"	۳۵ ۳۵'۷۸"	انزها	
۲۳۰۷	۵۲°۰۳'۱۳"	۳۵°۴۹'۱۶"	پلور	لار
۲۲۵۹	۵۲°۰۲' ۳۸"	۳۵°۵۰'۲۲"	لار	

جدول ۲ - نام و توالی نوکلئوتیدی آغازگرها.

نام آغازگر	توالی نوکلئوتیدی آغازگر
COI-F	GGTCAACAAATCATAAAGAGTATTGG
COI-R	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA

جدول ۳ - سیکل حرارتی مورد استفاده جهت تکثیر ژن.

مدت زمان	درجه حرارت	مراحل PCR
لازم	(سانتی‌گراد)	چرخه
۵ دقیقه	۹۵	واسرشته‌سازی کلی
۴۵ ثانیه	۹۵	واسرشته‌سازی
۴۰ ثانیه	۵۰	اتصال آغازگرها
۶۰ ثانیه	۷۲	بسط اولیه
۷ دقیقه	۷۲	بسط نهایی

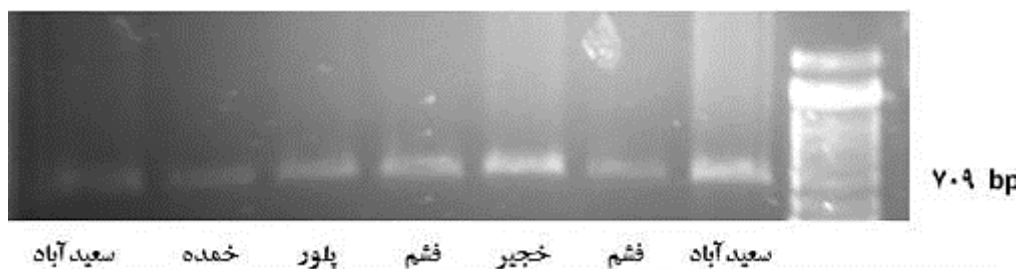
بافت از هر نمونه با اسکالپل جدا شد. نمونه‌های بافتی در الکل اتیلیک ۹۵ درصد تا زمان استخراج DNA نگهداری شدند. برای تعیین مقدار و کیفیت DNA استخراج شده، از روش متداول الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد. جهت رنگ‌آمیزی ژل در این تحقیق، به دلیل سرطان‌زا بودن محلول اتیدیوم بروماید از ترکیبی جدید که امنیت بالایی نسبت به اتیدیوم بروماید دارد به نام GelRed استفاده شد. باندهای حاصل از DNA هر نمونه که دارای کم‌ترین کشیدگی و کاملاً تمیز باشد نشان‌دهنده کیفیت مطلوب DNA استخراجی آن نمونه می‌باشد. به منظور بررسی ساختار مولکولی گاماروس، از جایگاه CO1 ژنوم میتوکندریایی استفاده گردید. برای این منظور از پرایمر یونیورسال استفاده گردید (Folmer et al., 1994) (جدول ۲). سیکل‌های حرارتی استفاده شده در این پژوهش در جدول ۳ ارائه شده است.

پس از انجام PCR نمونه‌های ژن برای اطمینان یافتن از انجام صحیح واکنش بایستی محصول PCR را روی ژل آگارز برده و باندهای تشکیل شده از لحاظ کیفیت و وزن مولکولی بررسی شد. با توجه به نوع ژل، برای نمایان‌سازی آل‌ها از روش رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید استفاده شد. سپس ژل رنگ‌آمیزی شده توسط دستگاه GEL/Doc ساخت شرکت BIORAD ایتالیا و با برنامه Quantity One اسکن گردید. سپس

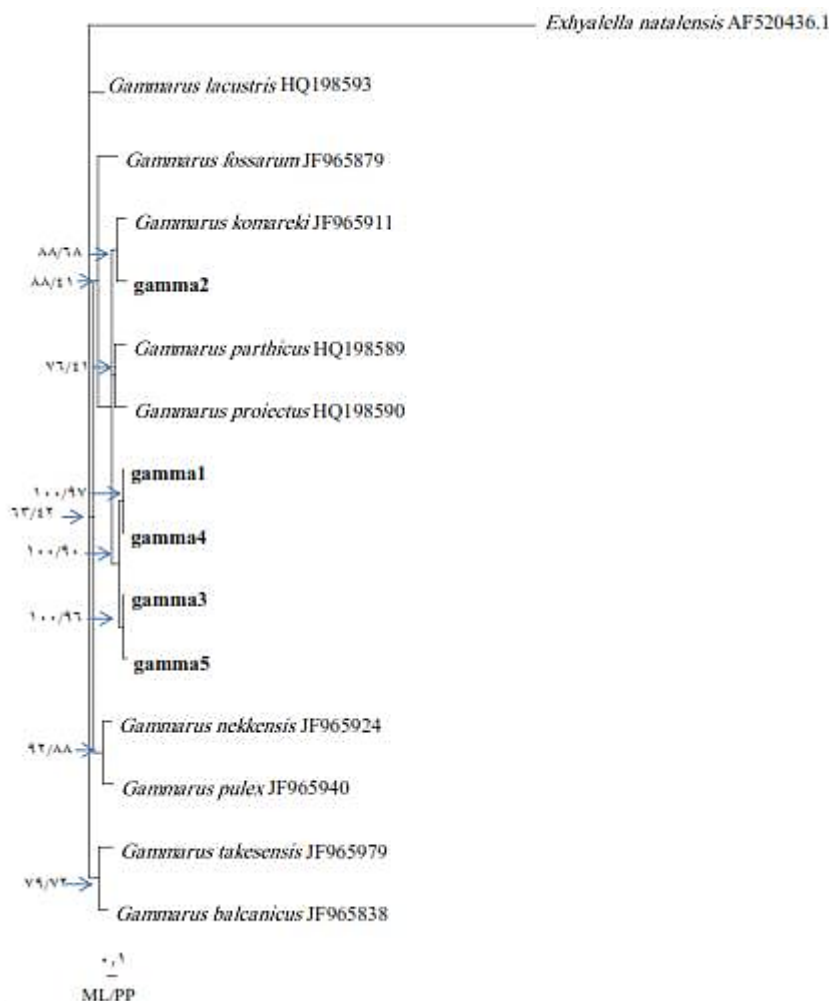
نمونه‌ها به شرکت تکاپو زیست (کره جنوبی، BioNEER) تحویل و توالی‌یابی با دقت بالایی توسط دستگاه توالی‌یاب ABI انجام گردید. آنالیز توالی نوکلئوتیدی ژن‌های مورد بررسی با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6 تعیین گردید. از نرم‌افزار MEGA 6 به منظور آنالیز توالی‌ها استفاده شد. هم‌چنین برای رسم درخت فیلوژنتیکی از روش Bayesian استفاده گردید.

۳. نتایج

در این تحقیق، نمونه‌های *G. komareki* از تمامی ایستگاه‌های منتخب در رودخانه‌های جاجرود، حبله رود و لار واقع در شرق استان تهران جمع‌آوری شدند. نمونه‌های صید شده، بعد از انتقال به آزمایشگاه مورد شناسایی قرار گرفتند. مشاهدات، نتایج حاصله از فقدان آلودگی پروتئینی نمونه‌ها که توسط دستگاه نانودراپ ارزیابی شده بود را تأیید نمود. حصول DNA مناسب و ایده‌آل، بیانگر کارآمدی بالای کیت استفاده شده در این پژوهش است. در این پژوهش، جایگاه CO1 ژنوم میتوکندریایی در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز



شکل ۲ - الگوی بانندی جایگاه COI.



شکل ۳ - درخت ML و Bayesian از قطعه ژنی میتوکندریایی COI از جنس گاماروس (gamma1 نمونه پلور، gamma2 نمونه خجیر، gamma3 نمونه خمده، gamma4 نمونه فشم و gamma5 نمونه سعیدآباد).

۴. بحث و نتیجه‌گیری

جنس *Gammarus* در تمامی قسمت‌های نیم-کره شمالی از پراکنش گسترده‌ای برخوردار بوده و جایگاه رده‌بندی عظیمی را به خود اختصاص داده است. این امر باعث بروز مشکلات متعددی در زمینه رده‌بندی این گونه‌ها شده است و شاهد این نکته نیز تغییرات چندگانه‌ای است که در رده بندی این گونه‌ها از ۱۷۸۵ اعمال شده‌اند. علاوه بر این، هم‌چنان قرابت

مورد تکثیر قرار گرفت. در این مطالعه، تعداد نوکلئوتید حدود ۷۰۹ bp بود (شکل ۲).

در شکل ۳، نام نمونه‌های مطالعه حاضر به صورت پر رنگ و نام گونه‌های شاهد به صورت ایتالیک همراه با شماره مسلسل آن‌ها در بانک ژنی مشخص گردیده است. اعداد روی گره‌ها به ترتیب درصد‌های بوت استرپ Maximum Likelihood از ۱۰۰۰ درخت و احتمال توزیع پسین (Posterior Probability) را نشان می‌دهد.

Sari و Alizadeh Eghtedar. *G. komareki* بودند. (۲۰۰۸) نیز با مطالعه گاماروس‌های استان‌های آذربایجان غربی، آذربایجان شرقی و اردبیل نتیجه گرفتند که گونه مذکور، گونه غالب استان می‌باشد. پراکنش این گونه را در بلغارستان، شمال یونان، مولداوی، سواحل دریای سیاه و نیمه شمالی کشور ترکیه و شمال ایران ذکر کرده‌اند (Pinkster and Karaman, 1977). در ایران برای اولین بار این گونه توسط Karaman از سلطان آباد گزارش شد و سپس توسط وی از ویلا دره از کوه‌های سبلان در آذربایجان گزارش گردید. این گونه به‌عنوان گونه‌ای با پراکنش وسیع در کشور از بسیاری از استان‌ها گزارش شد. در مطالعات سال‌های اخیر این گونه از استان تهران، لرستان، اصفهان، چهارمحال و بختیاری، کردستان و از سه استان گلستان، مازندران و گیلان گزارش شدند (Alizadeh Eghtedar and Sari, 2008).

بررسی‌های مولکولی در این تحقیق بیانگر اطلاعات بسیار جالبی در خصوص تفاوت جمعیت گاماروس‌های جمع‌آوری شده در رودخانه‌های شرق استان تهران بود. به نحوی که مطالعات فیلوژنتیک نشان داد که تمامی نمونه‌های مورد مطالعه از نظر ژنتیکی با یکدیگر تفاوت داشتند. نتایج نشان داد که تفاوت‌های ژنتیکی بین نمونه‌های گاماروس الزاماً با تشابهات ریخت‌شناسی و یا اکولوژیک آن‌ها مطابقت ندارد. نمونه‌های مطالعه حاضر با قرار گرفتن در دو کلاذ مختلف به دو دسته تقسیم شدند، بنابراین این احتمال وجود دارد که این نمونه‌ها متعلق به گونه‌های مخفی و جداگانه باشند. زمانی که یک گونه در شاخه‌ای جداگانه با ضریب حمایت بالا قرار بگیرد نشان می‌دهد متعلق به گونه‌ای جداگانه یا متفاوتی می‌باشد و در غیر این صورت نتیجه عکس خواهد شد (Monaghan et al., 2005). Hou و همکاران (۲۰۰۷) با بررسی‌های mtDNA نشان دادند که تفاوت‌های ژنتیکی جغرافیائی میان اکثریت جمعیت‌های مجزا یا دور خانواده Gammaridae وجود دارد و عدم وجود ظاهری جریان ژن میان اکثر جمعیت‌های Gammaridae نماینده میزان جدایی جغرافیائی است. حتی در جمعیت‌های یک گونه نیز که از نظر جغرافیائی دارای پراکنش گسترده‌ای هستند، تفاوت ژنتیکی بسیار زیادی مشاهده می‌شود. به‌نحوی که

فیلوژنتیکی میان گونه‌ها ناشناخته مانده و مشکلات مربوط به چندنیایی موجود در این جنس نیز حل نشده باقی مانده‌اند (Pinkster and Karaman, 1977). استفاده از صفات ریخت‌شناسی برای رده‌بندی گاماروس به تنهایی سخت می‌باشد به‌طوری که نخست، بررسی دقیق ریخت‌شناسی مستلزم بررسی صفات متعددی است که برخی از آن‌ها به سختی مشاهده می‌شوند و دوم، تنوع ریخت‌شناسی قابل ملاحظه درون گونه‌ای باعث پیچیده شدن رده‌بندی این جانوران شده است (Pinkster, 1983). بررسی صفات اکولوژیک نیز می‌تواند برای تعیین رده‌بندی برخی جمعیت‌ها بسیار مفید باشد، ولی چنین دستاوردی نیز به‌علت مشکلات فنی متعدد با محدودیت‌هایی مواجه است (Meyran et al., 1998). چنین مسائلی به وضوح توجیه می‌کنند که چرا راه به سمت مسائل فیلوژنتیکی باز می‌شود. به‌همین دلیل اخیراً از تفاوت‌های ژنتیکی برای تعیین جایگاه گونه‌های Gammaridae استفاده شده است. داده‌های مربوط به جایگاه‌های ژنی خاص امکان بررسی الگوهای تنوع ژنتیکی میان گونه‌های مختلف و میان جمعیت‌های مختلف از یک گونه را فراهم نموده است. امروزه DNA میتوکندری یا mtDNA به‌عنوان یک نشانگر قدرتمند برای مطالعه گونه‌زایی، قرابت فیلوژنتیکی و تکامل مولکولی به‌کار می‌رود.

گزارشات در مورد سخت‌پوستان تنها به چند گونه مهم اقتصادی، تکاملی یا برتر از نظر زیست‌شناسی یا اکولوژیک محدود شده است. از میان چند ژن میتوکندری مطالعه شده در سخت‌پوستان، ژن زیرواحد I اکسیداز سیتوکروم C یا ژن COI ظاهراً نشانگر رده‌بندی قدرتمند و فیلوژنتیک است. این ژن می‌تواند یکی از حفاظت شده‌ترین ژن‌ها در mtDNA موجودات عالی باشد (Hou et al., 2007).

در این تحقیق بر روی گاماروس‌های رودخانه‌های شرق استان تهران یعنی جاجرود، حبله‌رود و لار مطالعاتی انجام شد. در طی تحقیق و پس از بررسی‌های ریخت‌شناسی مشخص گردید که گاماروس‌های موجود در این رودخانه‌ها گونه *G. komareki* بودند. این نتیجه با نتایج Zamanpoore و همکاران (۲۰۱۱) مطابق بود به‌طوری که اعلام کرده بودند که گاماروس‌های جمع‌آوری شده از حاشیه شمالی البرز گونه

بررسی در این تحقیق می‌تواند از یک سو به دلیل نبودن پوشش گیاهی و جنس بستر که شامل گل و لای و لجن می‌باشد و از سوی دیگر آلودگی ناشی از ورود فاضلاب‌های شهری و صنعتی به رودخانه‌ها باشد. به طوری که فاضلاب‌های خانگی به رودخانه لار وارد می‌شد که در ایستگاه لار هیچ نمونه‌ای به دست نیامد. از سوی دیگر فاضلاب صنعتی شهرک سعیدآباد نیز به رودخانه جاجرود راه می‌یافت که نمونه‌های بسیار کمی از این ایستگاه و در بالادست شهرک مذکور به دست آمد. حضور گردشگران در فشم و فاضلاب منازل مسکونی و رستوران‌ها باعث آلودگی شدید آب شده بود به طوری که نمونه‌های بسیار کمی از این ایستگاه جمع‌آوری شد.

در تحقیق اخیر دو نمونه پلور و فشم در یک کلاد، دو نمونه خمده و سعیدآباد در یک کلاد و نمونه خجیر نیز به تنهایی در یک کلاد قرار گرفته‌اند ولی از نظر ریخت‌شناسی همگی در یک گروه قرار داده شدند. از طرفی علاوه بر تفاوت‌های اکولوژیک مثلاً تفاوت بستر، پوشش‌های گیاهی، پوشش سنگی رودخانه‌ای، کیفیت آب، گل آلودگی و ... بین رودخانه‌های حبله-رود، جاجرود و لار، ایستگاه‌های تعیین شده نیز قبل و بعد از سدهای احداث شده در رودخانه‌های مذکور است. این دلایل خود بیانگر تفاوت جمعیتی بین نمونه‌های گاماروس جمع‌آوری شده در مطالعه حاضر است.

جریان ژن میان جمعیت‌های مجاور نیز امکان‌پذیر است چراکه گاماریده‌ها به‌عنوان سخت‌پوستان مهاجر بالادست رودخانه و پراکنده شناخته شده‌اند. آن‌ها همچنین نشان دادند که جابجایی‌های مهاجرتی در اثر موانع طبیعی باعث بروز اختلافات ژنتیکی از یک جمعیت به جمعیت دیگر می‌شوند. این نکته حتی در مورد جمعیت‌هایی که توسط سد از سایرین جدا شده‌اند نیز صادق است.

طبق نتایج فراوانی گاماروس‌ها در ایستگاه‌های مختلف متفاوت بود به طوری که بیش‌ترین فراوانی در ایستگاه خجیر در رودخانه جاجرود، ایستگاه پلور از رودخانه لار بود و سپس ایستگاه‌های خمده از رودخانه حبله رود، ایستگاه‌های سعیدآباد و فشم از رودخانه جاجرود فراوانی کم‌تری را نشان دادند. در ایستگاه‌های دیگر اثری از حضور گاماروس نبود. دلیل این وضعیت آلودگی ایستگاه‌هایی بود که گاماروس در آن‌ها مشاهده نشد. هم‌آوری و چرخه‌ی زایشی یک جمعیت محلی از *G. pulex* در چشمه کمهر فارس نشان داد پارامترهای فیزیکیوشیمیایی آب شامل دمای آب، اکسیژن محلول، پی اچ آب، غلظت یون‌های نیترات، نیتريت، فسفات، کل مواد جامد محلول، هدایت الکتریکی، سختی کل، کلسیم و منیزیم بر روی جمعیت و پارامترهای زیستی گاماروس تاثیر دارند (Mohammadi et al., 2010). نوسانات فصلی بر روی ساختار جمعیت و بیولوژی گونه مذکور بسیار موثر است (Gholipour et al., 2012). دلیل پایین بودن میزان تراکم در ایستگاه‌های مورد

References

- Alizadeh Eghtedar, H., Sari, A., 2008. Dontoise Ponto-Caspian and *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda) of Iran in Azerbaijan Province. *Journal of Science, University of Tehran* 33, 35-47. (In Persian)
- Bassam, B.J., Caetano-Anolles, G., Gresshoff, G.M., 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Annual Biochemistry* 84, 680-683.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3, 294-299.
- Gholipour, A., Fathpour, H., Mirzajani, A., 2012. Study of Seasonal Changes in *Gammarus aequicauda* population in Gulf of Miyankalah. *Journal of Iran Biology* 24, 558-565. (In Persian)
- Grabowski, M., Mamos, T., Rewicz, T., Bacela Spsychalska, K., Ovcharenko, M., 2012. *Gammarus varsoviensis* Jazdzewski, 1975 (Amphipoda, Gammaridae): a long overlooked species in Ukrainian rivers. *North-Western Journal of Zoology* 8, 198-201.
- Hillis, D.M., Mortiz, C., 1996. Molecular systematic. 2nd Ed, Sinauer Associates Inc, Publishers, Sunderland, Massachusetts. 147 p.
- Hou, Z., Fu, J., Li, S., 2007. A molecular phylogeny of the genus *Gammarus* (Crustacea: Amphipoda) based on mitochondrial and nuclear genes sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 45, 596-611.

- Igor, A., Grigorovich, T., Therriault, W., MacIsaac, H.J., 2003. History of aquatic invertebrate invasions in the Caspian Sea. *Biological Invasions*, 5, 103-115.
- Khatami, S.H., Riazi, B., Modiri Asari, S.A., 2008. Investigating the quality of Karaj River based on the diversity of large families of bottomless invertebrates. *Environmental Science and Technology* 9, 71-78. (In Persian)
- Karaman, G.S., Pinkster, S., 1977. Freshwater Gammarus species from Europe, North Africa and adjacent regions of Asia (Crustacea Amphipoda) part I. *Gammarus pulex*- group and related species. *Bijdr. Dierk* 47, 1-97.
- Kelly, D.W., Muirhead, J.R., Heath, D.D., Macisaac, H.J., 2006. Contrasting patterns in genetic diversity following multiple invasions of fresh and brackish waters. *Molecular Ecology* 15, 3641-3653.
- Meyran, J.C., Gielly, L., Taberlet, P., 1998. Environmental calcium and mitochondrial DNA polymorphism among local populations of *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda). *Molecular Ecology* 7, 1391-1400.
- Mirzajani, A., Abbasi, K., Sabokara, J., Makaremi, M., Abedini, M., Sayadbourani, M., 2013. Limnology of the Tahom Oligo mezotroph Lake in Zanjan Province. *Journal of Iran Biology*, 25, 74-89. (In Persian)
- Moghaddasi, B., 2001. Study of Major Bacteriological Compositions of Gamariids along the southern coast of the Caspian Sea. MSc thesis. Islamic Azad University of North Tehran Branch. (In Persian)
- Mohammadi, Gh., Nasr, A., Zamanpour, M., 2010. Collaborative study and biochemical study of a local *Gammarus pulex* population in Fars province. *Journal of Wetland Ecobiology* 1, 46 -59. (In Persian)
- Moore, G., Cheung, W., Schwarzacher, T., Flavell, R., 1991. BIS-I, a major component of the cereal genome and atool for studying genomic organisation. *Genomics* 10, 469-476.
- Monaghan, M.T., Balke, M., Gregory, T.R., Vogler, A.P., 2005. DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 360, 1925-1933.
- Naghavi, M., Gharehyazi, B., Salkadeh, Gh., 2006. Molecular markers. Tehran University Press. 124 p. (In Persian)
- Nei, M., 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106, 283-292.
- Peakall, R., Smouse, P.E., 2006. GenAlex 6: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology* 6, 288-295.
- Pinkster, S., 1983. The value of morphological characters in taxonomy of *Gammarus. Beaufortia* 33, 15-28.
- Raymond, M., Rousset, F., 1995. Genpop (Version 1.3): Population genetic software for exact tests and ecumenicisim. *Heredity* 86, 248-249
- Ruppert, E.E., Fox, R.S., Barnes, R.D., 2003. Invertebrate zoology, a functional evolutionary approach. 7th Ed. Brooks/Cole Thomson Learning. Belmont, CA. pp. 1-26.
- Sattarvand, S., Yousefi Siahkalroodi, S., Elmi, A.M., 2012. Identification of native fish in the water resources of the city of Varamin. The final report of the research project of Islamic Azad University, Varamin-Pishva Branch. 113 p. (In Persian)
- Shapoori, M., Zoolriasatain, N., Azarpad, H., 2011. A quick assessment of the water quality of the Gorganroud River based on biological indicators. *Journal of Natural Resources Science and Technology* 5, 115-129. (In Persian)
- Stock, J.H., Mirzajani, A.R., Vonk, R., Naderi, S., Hassanzadeh Kiabi, B., 1998. Limnic and brackish water Amphipoda from Iran. *Beaufort* 48, 173-234.
- Tayebi, L., 2004. Study of *Gemaras* cultivation and its application in Aquaculture. Seminar MS. Tarbiat Modares University. 78 p. (In Persian)
- Vainola, R.J., Witt, D.S., Grabowski, M., Bradbury, J.H., Jazdzewski, K., Sket, B., 2008. Global diversity of amphipods (Amphipoda; Crustacea) in freshwater. *Hydrobiologia* 595, 241-255
- Westram, A.M., Jokela, A.M., Baumgartner, J.C., Keller, I., 2011. Spatial distribution of cryptic species diversity in European Freshwater Amphipods (*Gammarus fossarum*) as revealed by pyrosequencing. *Plos One* 6, 238-279.
- Wijnhoven, S., van Riel, M.C., van der Velde, G., 2003. Exotic and indigenous freshwater gammarid species: physiological tolerance to water temperature in relation to ionic content of the water. *Aquatic Ecology* 37, 151-158.
- Yeh, F.C., Yang, R.C., Boyle, T., 1999. POPGENE version 1.3.1. Microsoft window bases freeware for population genetic analysis. University of Alberta and the Centre for International Forestry Research. 234 p.
- Zamanpoore, M., Grabowski, M., PoECKl, M., Schiemer, F., 2011. Taxonomic review of freshwater *Gammarus* (Crustacea: Amphipoda) from Iran. *Zootaxa* 3140, 1-14.
- Zar, J.H., 1999. Biostatistical analysis, 4th Ed,

- Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey. 178 p.
- Zickovich, J.M., Bohonak, A.J., 2007. Dispersal ability and genetic structure in aquatic invertebrates: a comparative study in southern California streams and reservoirs. *Freshwater Biology* 52, 1982-1996.