

بررسی تنوع ژنتیکی جنس *Gammarus* در چشمه‌ها و رودخانه پارک ملی گلستان با استفاده از توالی ژن میتوکندریایی COI

فائزه هدایتی راد^۱، حمیدرضا رضایی*^۱، اولیاقلی خلیلی پور^۲، جواد رضانی^۳، احمدرضا کاتوزیان^۴

^۱گروه محیط زیست، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

^۲گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران.

^۳گروه تنوع و ایمنی زیستی، پژوهشکده محیط زیست و توسعه پایدار، سازمان حفاظت محیط زیست، تهران، ایران.

^۴گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول hamid.r.rezaei@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۸/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۷/۲۹

چکیده

گاماروس بزرگ‌ترین جنس از سخت‌پوستان آبی خانواده Gammaridea است که بیش از ۲۰۰ گونه در سراسر جهان دارد. این گروه از سخت‌پوستان اجزای بسیار مهم زنجیره غذایی در آب‌های جاری هستند. بنابراین تغییرات جمعیتی آن‌ها می‌تواند بر جوامع، به‌ویژه بر سلامت ذخایر ماهیان اثر گذاشته و تعادل اکوسیستم را برهم زند. به دلیل اندازه نسبتاً کوچک، فراوانی زیاد و حساس بودن به شرایط محیطی، به‌عنوان گونه‌های شاخص برای ارزیابی محیط‌های آبی مناسب هستند. این پژوهش، به بررسی تنوع ژنتیکی جنس گاماروس بین جمعیت‌های مختلف موجود در پارک ملی گلستان پرداخته است. پس از نمونه‌برداری جهت شناسایی ریختی اولیه از کلیدهای شناسایی رایج و جهت انجام مطالعات مولکولی از توالی ژن میتوکندریایی COI استفاده شد. روابط تبارشناختی با روش حداکثر درست‌نمایی (ML) تعیین شد. فاصله ژنتیکی موجود در جمعیت‌ها و برخی شاخص‌های تنوع ژنتیکی (تعداد هاپلوتاایپ (h)، تنوع هاپلوتاایپ (Hd) و تنوع نوکلئوتیدی (Pi)) محاسبه شد. بر اساس نتایج درخت‌های تبارشناسی نمونه‌های مورد مطالعه در ۲ کلاد مجزا قرار گرفتند و با بوت‌استرپ بالا (۰/۹۲) از نمونه‌های اخذ شده از ژن بانک جدا شدند. نتایج تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی نشان داد که تنوع بین جمعیت‌ها (۷۲/۴۹) بیش از تنوع درون جمعیت‌ها (۲۷/۵۱) است و مقدار شاخص F_{st} (۰/۶۸) تفاوت ژنتیکی بارز بین جمعیت‌ها و محدودیت جریان ژن را نشان می‌دهد. تنوع هاپلوتاایپی برابر با ۰/۹۴ بود که بیش‌ترین و کم‌ترین آن به ترتیب مربوط به رودخانه خان‌دوشان (۱/۰) و چشمه گلستان (۰/۴۰) می‌باشد. هم‌چنین در بین هاپلوتاایپ‌های شناسایی شده ۱۷ هاپلوتاایپ فقط دارای یک فرد بودند که این امر بیانگر تنوع بالای جمعیت‌های گاماروس در پارک ملی گلستان و وجود جمعیت‌های بومی می‌باشد. *G. komareki*، به‌عنوان یک مجموعه گونه‌ای غالب با گونه‌های پنهان فراوان در منطقه شناخته شد که هنوز به‌طور دقیق شناسایی نشده است.

واژگان کلیدی: تنوع ژنتیکی، جریان ژنی، گلستان، گاماروس.

مقدمه

یک گونه مربوط به دریای مدیترانه است (شعبانی، ۱۳۹۶). سخت‌پوستان خانواده Gammaridea یکی از شاخص‌ترین خانواده‌های این راسته (با صدها گونه) است که تقریباً در تمام منطقه Holarctic (به‌جز جنوب غربی آمریکای شمالی) عمدتاً در بستر چشمه‌ها، رودخانه‌ها، دریاچه‌ها، تالاب‌های ساحلی، مناطق ساحلی دریایی و حتی آبگیرهای زیرزمینی پراکنش دارند. جنس گاماروس (*Gammarus*)

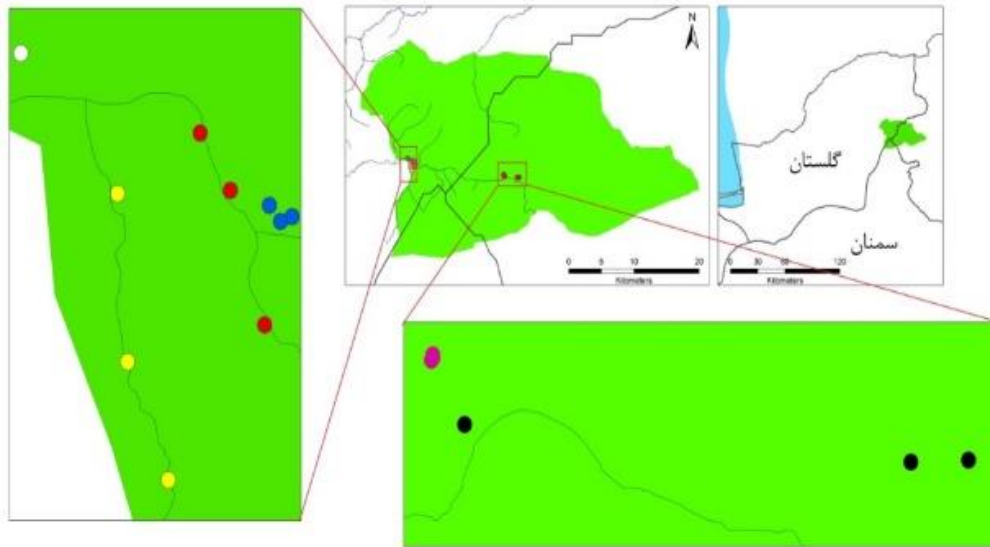
دوجورپایان (Amphipoda) یکی از راسته‌های سخت‌پوستان هستند که به دلیل فراوانی و تنوع زیاد، بخش مهمی از اکوسیستم‌های آبی را تشکیل می‌دهند (تقوی‌جلودار، ۱۳۹۵) و تاکنون حدود ۴۳۰۰ گونه از آن‌ها در نواحی مختلف جهان شناسایی شده است. از این راسته ۷۴ گونه در دریای خزر پراکنش دارند که ۶۹ گونه بومی خزر، ۴ گونه دارای نژاد قطب شمالی و

شعبانی پور، ۱۳۹۲) می‌باشد. این روش اطلاعات کمی برای این ارگانسیم‌های کوچک فراهم می‌کند. بنابراین چنین ارگانسیم‌هایی معمولاً فقط در سطوح طبقه‌بندی بالاتر یعنی راسته، خانواده و یا جنس شناسایی می‌شوند و در این صورت ممکن است اطلاعات ارزشمند مربوط به الزامات بوم‌شناختی خاص هر گونه و میزان تحمل عوامل استرس‌زای آن‌ها مورد توجه قرار نگیرد (Macher *et al.*, 2016; Beermann *et al.*, 2018). این امر به‌نوبه خود علاوه بر ارزیابی‌های نادرست از کیفیت آب و سوء مدیریت اکوسیستم‌های آب شیرین می‌تواند منجر به از دست‌دهی تنوع ژنتیکی گونه‌ها و افزایش خطر انقراض جمعیت‌ها گردد. با پیشرفت سریع تکنولوژی، بسیاری از محققان از روش‌های مولکولی برای ارائه بینش‌های جدید و درک بهتر از گونه‌ها و ساختار جمعیت دوجورپایان استفاده می‌کنند تا به سوالاتی پاسخ دهند که ممکن است تنها از طریق ریخت‌شناسی قادر به پاسخگویی به آن‌ها نباشند (Hou *et al.*, 2007; Meland and Willassen, 2004).

ویژگی‌های متفاوت توالی DNA میتوکندری، مانند کوچک بودن اندازه، یکسان بودن ترتیب قرارگیری ژن‌ها و فراوانی آغازگرهای عمومی آن‌ها به یک نشانگر پرکاربرد در مطالعه جمعیت‌ها و تعیین هویت گونه‌ها تبدیل کرده است (Hadrýs *et al.*, 2009; Valentini *et al.*, 1992). ژن زیر واحد سیتوکروم اکسیداز (COI) در میان ژن‌های میتوکندریایی تکامل کندتری دارد و به‌همین دلیل به عنوان یک نشانگر تاکسونومیک و فیلوژنتیک مناسب در سطح گونه بکار می‌رود (Hou *et al.*, 2007). جنس گاماروس بخش مهمی از سخت‌پوستان آبی آب‌های شیرین در ایران را تشکیل می‌دهد که پارک ملی گلستان با دارا بودن منابع آبی فراوان زیستگاه بسیار متنوعی برای این جوامع جانوری آبی فراهم می‌کند. بررسی میزان تنوع و شناخت دقیق اعضای این جنس علاوه بر ارائه اطلاعات ارزشمند برای مدیریت زیستگاه‌های آبی از انقراض این گونه‌ها

بزرگ‌ترین جنس از سخت‌پوستان آبی خانواده گاماریده است که بیش از ۲۰۰ گونه در سراسر جهان دارد. گونه‌های متعلق به این جنس در زیستگاه‌هایی دریایی، لب شور و آب شیرین زندگی می‌کنند که تعداد گونه‌های موجود در آب شیرین بیش از گونه‌های دریازی است (Väinölä *et al.*, 2008). این گروه از سخت‌پوستان اجزای بسیار مهم زنجیره غذایی در آب‌های جاری هستند (Hou *et al.*, 2007) و اثرات مهمی در تغذیه آبزیان به‌ویژه در مراحل اولیه رشد و نمو دارند. به‌دلیل اندازه نسبتاً کوچک (۱ الی ۱۵ میلی‌متر)، فراوانی زیاد و حساس بودن به شرایط محیطی، به‌عنوان گونه‌های شاخص برای ارزیابی و نظارت بر محیط‌های آبی مناسب هستند (Phoenix Baird *et al.*, 2012). وجود روند تکوین مستقیم در آن‌ها و عدم وجود مرحله لاروی مستقل، از ویژگی‌های اصلی این گروه می‌باشد. بنابراین به‌نظر می‌رسد که پراکندگی آن‌ها محدود به تحرک فرم‌های بالغ است که این روند زندگی و تولید مثلی با افزایش تأثیر جدایی‌های جغرافیایی باعث افزایش تنوع گونه‌ای می‌شود. بررسی میزان تنوع همراه با شناخت و طبقه‌بندی دقیق این گونه‌ها می‌تواند در بیان علل توزیع کنونی آن‌ها مفید باشد و به شناسایی جمعیت‌هایی که به مدت طولانی جدا شده‌اند و ممکن است ژن‌های منحصر به فردی داشته باشند؛ کمک کند.

تنوع دوجورپایان در نقاط حساس تنوع زیستی ایران-آناطولی و قفقاز مورد توجه قرار نگرفته و این گونه‌ها در معرض خطر انقراض قرار دارند زیرا اکثراً ناشناخته باقی مانده‌اند (Katouzian *et al.*, 2016). شناسایی دوجورپایان در زیستگاه‌های آبی ایران عمده‌تاً مبتنی بر شباهت‌های ریخت‌شناختی از جمله بررسی تاکسونومیک گاماروس آب شیرین (Zamanpoore *et al.*, 2011)، شناسایی گونه‌های جنس گاماروس در رودخانه زاینده‌رود (ابراهیم‌نژاد و همکاران، ۱۳۸۴) و بررسی صفات گاماروس‌های دریای خزر با استفاده از اجزای ضمائم دهانی آن (آزادکارلنگرودی و



شکل ۱- موقعیت جغرافیایی نقاط نمونه‌برداری شده در پارک ملی گلستان (سفید: چشمه گلستان، زرد: رودخانه خان‌دوشان، قرمز: رودخانه دوغ، آبی: چشمه گلشن، صورتی: آبشار گلستان، سیاه: رودخانه آق‌سو).

چشمه‌های گلشن و گلستان، آبشار گلستان) که احتمال حضور گونه در آن قطعی بود به روش طرح بلوک‌های کامل تصادفی انجام شد. نمونه‌ها در فواصل جغرافیایی قابل توجه از هم (در سه ایستگاه بالا دست، میان‌دست و پایین‌دست هر رودخانه) از لابه‌لای گیاهان کناره آب یا سطح بستر با استفاده از تور نمونه‌برداری به اندازه چشمه ۱*۱ میلی‌متر جمع‌آوری شد. هر یک از نمونه‌ها به صورت جداگانه در تیوب‌هایی با کد مشخص مکانی (حروف نشان‌دهنده مناطق و اعداد بیانگر تکرارها) و حاوی اتانول ۹۰ درصد قرار داده شد. تعداد ۳۲ نمونه از نقاط مختلف پارک جمع‌آوری شد (شکل ۱).

مطالعات ریخت‌شناسی: جهت انجام مطالعات ریخت‌شناسی در ابتدا با استفاده از کلیدهای شناسایی رایج (Karaman and Pinkster 1977a,b; Stock et al., 1998; Zamanpoore et al., 2011) و همچنین توصیفات اصلی گونه‌های دوجورپایان، جنس‌های گاماروس آب شیرین از لحاظ ریختی مورد شناسایی اولیه قرار گرفتند. سپس برای شناسایی گونه‌های مختلف از صفات تابع تشخیصی مختلفی استفاده شد. به‌طور کلی، شکل سر، شاخک ۲ و صفحات اپیمرال در شناسایی گونه‌های آب شیرین

جلوگیری می‌کند. بنابراین در مطالعه حاضر با رویکرد مولکولی به بررسی میزان تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها در پارک ملی گلستان به منظور شناسایی گونه‌های پنهان می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

منطقه مورد مطالعه: پارک ملی گلستان به‌عنوان اولین پارک ملی ایران (با ۹۱۸۹۵ هکتار) بین سه استان گلستان، خراسان شمالی و سمنان قرار دارد که به دلیل موقعیت جغرافیایی خاص خود از تنوع اقلیمی، توپوگرافی و زیستی بالایی برخوردار است. منابع آبی در این پارک بسیار غنی هستند و علاوه بر رودخانه دائمی و نهرهای متعدد چشمه‌های فراوانی دارد که در تمام سطح آن پراکنده‌اند. مهم‌ترین رودخانه پارک ملی گلستان رودخانه دوغ یا مادرسو است که جریان دائمی دارد. آبشار آق‌سو و آبشار جنگل گلستان نیز با ارتفاع ۷۰ متر و آب‌دهی ۳۰ لیتر بر ثانیه از آبشارهای مهم این پارک می‌باشند (دهداردرگاهی و مخدوم، ۱۳۸۱).

نمونه برداری: پس از بازدید اولیه از برخی منابع آبی پارک ملی گلستان در تابستان ۱۳۹۸، نمونه‌برداری از ۶ منطقه (رودخانه‌های دوغ، آق‌سو، خان‌دوشان،

جدول ۱- مشخصات و توالی آغازگرهای استفاده شده برای تکثیر بخش‌هایی از ژن COI جهت بررسی میزان تنوع ژنتیکی جنس *Gammarus* پارک ملی گلستان.

جایگاه ژنی	نام آغازگر	توالی آغازگر	طول قطعه (bp)
COI	LCO1490-jz	5-CHACWAAAYCATAAAGATATYGG-3	۶۵۸
	HCO2198-jz	5-AWACTTCVGGRTGVCCAAARAATCA-3	۶۵۸

منطبق با هریک از مجموعه داده‌های مورد استفاده در این مطالعه بر اساس معیارهای AICc و BIC و با استفاده از نرم‌افزارهای jModeltest نسخه ۲/۱/۳ (Darriba *et al.*, 2012) و Mrmodeltest نسخه ۴/۲ (Nylander, 2004) به دست آمد. از توالی گونه *Gammarus aequicauda* با شماره دسترسی (KT778399.1) به عنوان برون گروه استفاده شد. برای مقایسه تبارشناسی، تعداد ۱۹ توالی سیتوکروم اکسیداز گونه‌های مختلف جنس گاماروس در دامنه شمالی البرز مربوط به مطالعه کاتوزیان و همکاران (۱۳۹۴)، از ژن بانک استخراج شد. مشخصات این توالی‌ها به همراه موقعیت مکانی آن‌ها در جدول ۲ ارائه شده است. جهت تعیین روابط تبارشناختی از روش حداکثر درست‌نمایی (ML) با ۲۰۰۰ بوت‌استرپ در نرم‌افزار مگا نسخه ۱۰/۰/۵ استفاده گردید و درخت فیلوژنی نمونه‌ها بر اساس مدل هاسگاوا-کیشینو-یانو (HKY) به علاوه G رسم شد. برخی شاخص‌های تنوع ژنتیکی (تعداد هاپلوتایپ‌ها (h)، تنوع هاپلوتایپی (Hd) و تنوع نوکلئوتیدی (Pi)) نیز برای هر قطعه ژن با استفاده از نرم‌افزار DNAsp نسخه ۵/۱۰/۰۱ محاسبه شد. (Librado and Rozas, 2009). فواصل ژنتیکی (p-uncorrected) درون و بین جمعیت‌ها با نرم افزار MEGA نسخه ۱۰/۰/۵ محاسبه شد. تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی (AMOVA) با استفاده از نرم‌افزار Arlequin نسخه ۳/۵/۱/۲ (Excoffier and Lischer, 2010) به منظور برآورد توزیع سلسله مراتبی تنوع ژنتیکی (COI) میتوکندریایی درون و بین جمعیت‌ها با ۱۰۰۰۰ جایگشت انجام شد. جهت بررسی تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌های مختلف در این مطالعه از شاخص تثبیت (F_{ST}) استفاده شد.

جنس گاماروس می‌توانند صفات بارز مناسبی باشند (Katouzian *et al.*, 2016).

مطالعات مولکولی: برای انجام مطالعات مولکولی، در ابتدا از روش‌های استخراج نمکی DNA نمونه‌ها مورد استخراج قرار گرفت (Bruford *et al.*, 1998). سپس از الکتروفورز افقی با ژل آگارز یک درصد و دستگاه Nanodrop نسخه ۲۰۰۰ جهت بررسی کیفیت و کمیت DNA به دست آمده استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای نشانگر ژنتیکی COI با استفاده از یک آغازگر اختصاصی انجام شد (Astrin *et al.*, 2008).

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در ۴۲ چرخه با واسرشت اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد در ۵ دقیقه، واسرشت ۹۴ درجه سانتی‌گراد در ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در ۵۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه، گسترش زنجیره در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی زنجیره در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و مدت ۷ دقیقه اجرا شد. به منظور تأیید تکثیر ناحیه مورد نظر طی واکنش‌های PCR، الکتروفورز افقی محصولات PCR روی ژل آگارز یک درصد گذاشته شد. مقدار ۲۰ میکرولیتر از محصولات حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به همراه ۱۰۰ میکرولیتر از هریک از آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ پیکومول برای انجام توالی‌یابی به شرکت ژن فناوری ارسال و با دستگاه ABI 3130 توالی‌یابی شد. از ابزار BLAST در پایگاه NCBI برای تعیین همولوژی توالی‌ها استفاده شد. اصلاح نوکلئوتید توالی‌ها با نرم‌افزار Seqscape نسخه ۲/۶ انجام شد (Dogan, 2014). به منظور ردیف‌یابی توالی‌ها از الگوریتم Clustal W در نرم‌افزار مگا نسخه ده استفاده شد (Kumar *et al.*, 2016). انتخاب بهترین مدل

جدول ۲- فهرست توالی‌های استخراج شده جنس *Gammarus* از ژن بانک.

ردیف	نام علمی	موقعیت	شماره دسترسی
۱	<i>Gammarus aequicauda</i>	تالاب گمیشان	KT778399.1
۲	<i>Gammarus cf. komareki</i>	بالادست رود دگرمانلی	KT778356.1
۳	<i>Gammarus cf. komareki</i>	چشمه کرکولی	KT778413.1
۴	<i>Gammarus cf. komareki</i>	چشمه ذغالی	KT778379.1
۵	<i>Gammarus cf. komareki</i>	چشمه یکی برماق	KT778503.1
۶	<i>Gammarus cf. komareki</i>	منبع آب لهندر	KT778427.1
۷	<i>Gammarus cf. komareki</i>	چشمه چنار	KT778455.1
۸	<i>Gammarus cf. komareki</i>	آبشار گلستان	KT778331.1
۹	<i>Gammarus cf. komareki</i>	رود جانلر	KT778405.1
۱۰	<i>Gammarus cf. komareki</i>	چشمه و غار چاتال قباق	KT778459.1
۱۱	<i>Gammarus cf. komareki</i>	قنات میرزابایلو	KT778461.1
۱۲	<i>Gammarus cf. komareki</i>	چشمه کریم ایلان	KT778416.1
۱۳	<i>Gammarus cf. komareki</i>	آبشار لوه	KT778424.1
۱۴	<i>Gammarus cf. komareki</i>	رود آق سو	KT778342.1
۱۵	<i>Gammarus cf. komareki</i>	النگ سفلی	KT778408.1
۱۶	<i>Gammarus cf. komareki</i>	آبشار شیرآباد	KT778350.1
۱۷	<i>Gammarus cf. lacustris</i>	چهارباغ	KT778376.1
۱۸	<i>Gammarus cf. komareki</i>	هریجان	KT778403.1
۱۹	<i>Gammarus cf. komareki</i>	کلاردشت	KT778420.1
۲۰	<i>Gammarus cf. komareki</i>	دیوشل	KT778391.1

بازها به ترتیب $A(34/13)$ ، $T(23/91)$ ، $C(19/59)$ و $G(22/37)$ تعیین شد. الگوهای جاننشینی و نرخ‌ها بر اساس مدل هاسگاوا-کیشینو-یانو (HKY) به علاوه G برآورد شد. این مدل، کم‌ترین مقدار آماره $AICc$ و BIC را در بین سایر مدل‌ها داشت بنابراین به عنوان بهترین مدل شناسایی شد که مقدار آماره G آن برابر با $0/2020$ محاسبه گردید. درخت تبارزایی نمونه‌ها نیز بر اساس این مدل رسم شد. نتایج نشان داد که نمونه‌های مورد مطالعه در دو کلاد غربی و مرکزی پارک ملی گلستان قرار می‌گیرند. نمونه‌های مربوط به چشمه‌های گلشن، گلستان و رودخانه‌های دوغ و خاندوشان در کلاد غربی و نمونه‌های آبشار گلستان و رودخانه آق سو در کلاد مرکزی پارک ملی گلستان قرار گرفتند (شکل ۵). مقایسه نمونه‌های این مطالعه با سایر توالی‌های اخذ شده از ژن بانک (شکل ۶) نشان داد که نمونه‌های آبشار گلستان در یک کلاد و یک گروه قرار می‌گیرند اما نمونه اخذ شده از

مقادیر $PairwiseFST$ در نرم‌افزار Arlequin نسخه ۳/۵/۱ با در نظر گرفتن فرکانس‌های هاپلوتیپ برآورد شد. هم‌چنین با استفاده از نرم‌افزار Network نسخه ۴/۶ و با روش اتصال میانه شبکه هاپلوتیپی نمونه‌های مورد مطالعه ترسیم شد. به منظور شناسایی هر گونه انحراف از فرضیه صفر تکامل خنثی و شناسایی اثرات انتخاب طبیعی بر این ژن‌ها در جمعیت‌های مختلف، تست تاجیما مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

پس از ریخت‌شناختی اولیه، مشخص شد که نمونه‌ها متعلق به گونه $G. Schäferna, 1922$ می‌باشند. وجود تارچه‌های متراکم بر شاخک ۲، عدم وجود تارچه بر پالپ آرواره بالا و شکل صفحات اپیمرال از مهم‌ترین ویژگی‌های این گونه تشخیص داده شد (Katouzian et al., 2016). بر اساس نتایج تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی فراوانی

جدول ۳- اطلاعات مربوط به محل‌های نمونه‌برداری و نتایج تجزیه و تحلیل ژنتیکی نمونه‌های *Gammarus* بر اساس ژن COI.

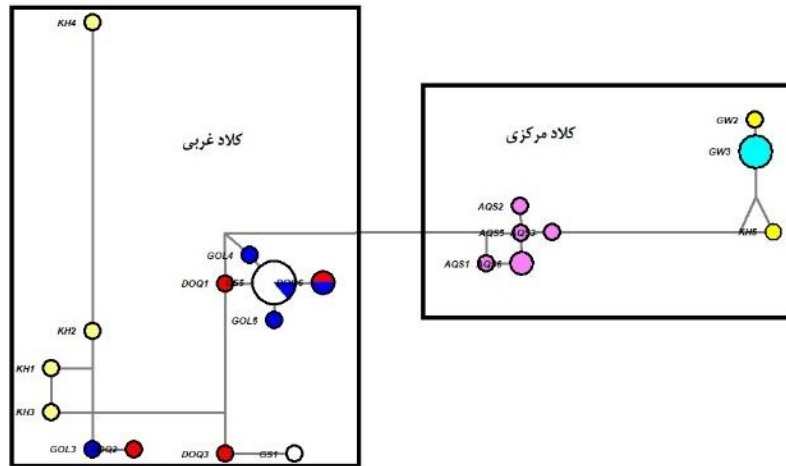
نام ایستگاه	نام اختصاری	تعداد نمونه	تعداد هاپلوتاپی	تنوع نوکلئوتیدی (Pi)	تنوع هاپلوتاپی (HD)
رودخانه دوغ	DOQ	۶	۵	۰/۰۱۷۰۴	۰/۹۳۳۳۳
رودخانه آق‌سو	AQS	۶	۵	۰/۰۰۳۲۲	۰/۹۳۳۳۳
رودخانه خان‌دوشان	KH	۵	۵	۰/۱۱۷۵۱	۱/۰۰
چشمه گلشن	GOL	۵	۴	۰/۰۱۴۴۹	۰/۹۰۰۰۰
چشمه گلستان	G.S	۵	۲	۰/۰۱۰۴۶	۰/۴۰۰۰۰
آبشار گلستان	G.W	۵	۲	۰/۰۰۸۰	۰/۴۰۰۰۰
مجموع		۳۲	۲۳	۰/۰۸۵۷۵	۰/۹۳۹۵۲

جدول ۴- هاپلوتاپی‌های شناسایی شده بر اساس نمونه‌های مورد مطالعه از جنس *Gammarus*.

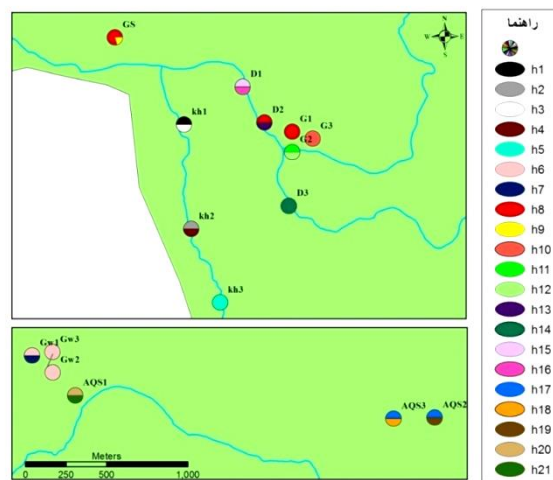
هاپلوتاپی‌ها	خان‌دوشان	چشمه گلستان	چشمه گلشن	آبشار گلستان	رودخانه آق‌سو	رودخانه دوغ
Hap_1	Kh ₂					
Hap_2	Kh ₃					
Hap_3	Kh ₁					
Hap_4	Kh ₄					
Hap_5	Kh ₅					
Hap_6				GW ₃ GW ₁ GW ₄ GW ₅		
Hap_7				GW ₂		
Hap_8		GS ₅ GS ₄ GS ₃ GS ₂	GOL ₂ GOL ₁		DOQ ₄	
Hap_9		GS ₁				
Hap_10			GOL ₅			
Hap_11			GOL ₄			
Hap_12			GOL ₃			
Hap_13					DOQ ₃	
Hap_14					DOQ ₆ DOQ ₅	
Hap_15					DOQ ₂	
Hap_16					DOQ ₁	
Hap_17					AQS ₆ AQS ₄	
Hap_18					AQS ₅	
Hap_19					AQS ₃	
Hap_20					AQS ₂	
Hap_21					AQS ₁	
مجموع هاپلوتاپی‌ها در هر منطقه	۵	۲	۴	۲	۵	۵

گرفته بود با نمونه اخذ شده از ژن بانک مربوط به آبشار لوه شباهت بیشتری دارد هرچند که با بوت‌استرپ بالا (۰/۹۶) از هم جدا شده‌اند و به‌نظر می‌رسد که هر جمعیت به‌طور جداگانه در حال تکامل است. تحلیل شبکه هاپلوتاپی شکل ۲ نیز یافته‌های

ژن بانک متعلق به رودخانه آق‌سو با نمونه‌های این رودخانه در مطالعه حاضر در یک کلاد قرار نگرفته و با بوت‌استرپ بالا (۰/۶۹) از هم جدا شدند. نمونه ۴ رودخانه خان‌دوشان (KH₄) نیز که در یک شاخه منفرد و جدا از سایر جمعیت‌های این رودخانه قرار



شکل ۲- شبکه هاپلوتایپی نمونه‌های مورد مطالعه با استفاده از روش اتصال میانه.



شکل ۳- فراوانی هاپلوتایپ‌های گاماروس در محل‌های نمونه‌برداری.

شکل ۳ نشان داده شده است. نمونه‌های مربوط به هر منطقه جهت مقایسه دو به دو جمعیت‌ها به‌عنوان یک جمعیت فرضی در نظر گرفته شد و محاسبات مربوطه بر همین اساس انجام شد. اعداد حاصل از ماتریس فواصل ژنتیکی میزان جانشینی نوکلئوتیدها در توالی‌های مورد مطالعه را بیان می‌کند. در صورتی که هیچ آلل مشترکی بین جمعیت‌های مورد بررسی وجود نداشته باشد عدد برابر یک و فاصله میان آن‌ها در حداکثر مقدار ممکن است. بر این اساس بیش‌ترین فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های رودخانه آقسو و آبشار گلستان (۰/۹۷۵۷۱) محاسبه شد که در ترسیم درخت‌های تکاملی هر دو در یک کلاد قرار گرفته بودند. کمترین فاصله ژنتیکی (۰/۱۶۵۴۱-) نیز مربوط به نمونه‌های چشمه گلشن و چشمه گلستان بود. نتایج به‌دست آمده از تجزیه و تحلیل واریانس

حاصل از درخت تبارشناسی را تأیید می‌کند. تعداد ۲۱ هاپلوتایپ متفاوت از ۳۲ نمونه مورد بررسی در این پژوهش شناسایی شد. جدول ۴ میزان تنوع ژنتیکی محاسبه شده بین نمونه‌های توالی‌یابی شده را نشان می‌دهد که بر اساس این نتایج مقدار تنوع هاپلوتایپی برابر با ۰/۹۴ است که بیش‌ترین آن مربوط به رودخانه خان‌دوشان (۱/۰۰) رودخانه‌های دوغ، آقسو (۰/۹۳) و چشمه گلشن (۰/۹۰) می‌باشد. چشمه گلستان نیز کم‌ترین تنوع هاپلوتایپی (۰/۴۰) را دارا بود. هاپلوتایپ شماره ۸ با تعداد هفت فرد (چهار فرد از چشمه گلستان، دو فرد از چشمه گلشن و یک فرد از رودخانه دوغ) فراوان‌ترین هاپلوتایپ بود. هم‌چنین در بین هاپلوتایپ‌های شناسایی شده ۱۷ هاپلوتایپ فقط دارای یک فرد بودند. فراوانی هاپلوتایپ‌های گاماروس در محل‌های نمونه‌برداری در

جدول ۵- مقایسه دو به دو جمعیت‌های *Gammarus* توالی یابی شده بر اساس روش Pairwise differences

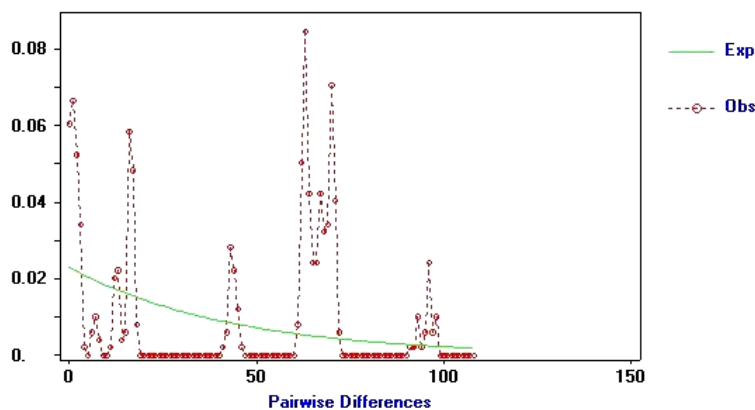
منطقه	خان‌دوشان	آبشار گلستان	چشمه گلستان	چشمه گلشن	رودخانه دوغ	رودخانه آق‌سو
خان‌دوشان	۰					
آبشار گلستان	۰/۵۱۸۶۱	۰				
چشمه گلستان	۰/۲۳۲۲۳	۰/۹۵۹۷۷	۰			
چشمه گلشن	۰/۲۰۱۷۲	۰/۹۴۵۴۰	۰/۱۶۵۴۱	۰		
رودخانه دوغ	۰/۱۹۳۰۷	۰/۹۲۷۲۸	۰/۰۸۰۰۰	۰/۱۰۴۱۵	۰	
رودخانه آق‌سو	۰/۵۷۹۷۹	۰/۹۷۵۷۱	۰/۹۴۹۱۵	۰/۹۳۴۷۴	۰/۹۱۷۸۹	۰

جدول ۶- نتایج واریانس مولکولی (AMOVA) بین نمونه‌های *Gammarus* بر اساس ژن COI

نوع واریانس	درجه آزادی	مجموع مربعات	واریانس	درصد واریانس
بین جمعیت‌ها	۵	۴۹۳/۶۶۹	۱۷/۳۰۷۸۹	۷۲/۴۹
درون جمعیت‌ها	۲۶	۱۷۰/۸۰۰	۶/۵۶۹۲۳	۲۷/۵۱
کل	۳۱	۶۶۴/۴۶۹	۲۳/۸۷۷۱۲	
شاخص تثبیت (FST)			۰/۷۲۴۸۷	

جدول ۷- مقادیر محاسبه شده شاخص‌های تاجیما و فو.

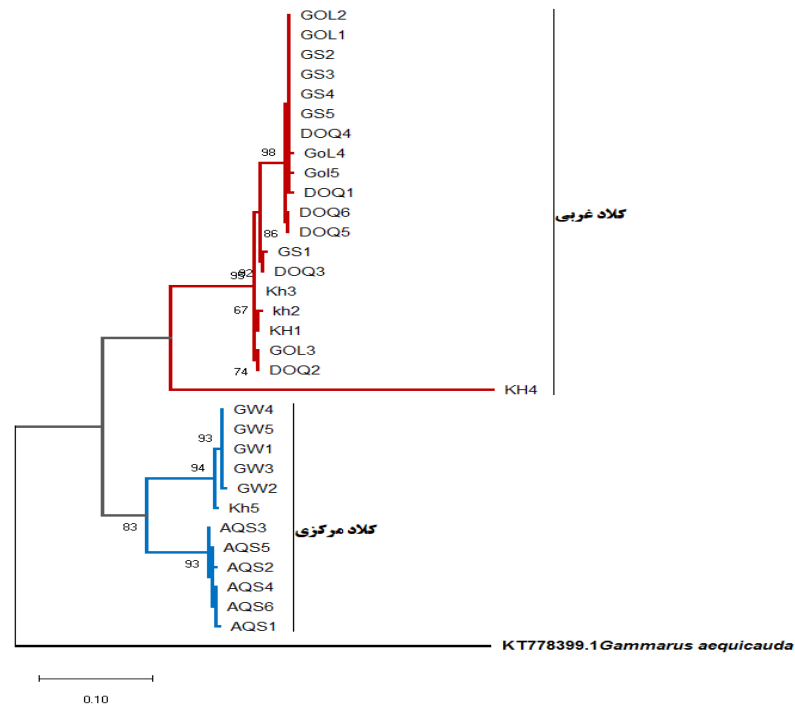
Tajima'D	۰/۱۰۶۱۳	$P > ۰/۱$
Fu and Li's D	-۰/۸۳۹۵۶	$P > ۰/۱$
Fu and Li's F	-۰/۶۱۳۴۴	$P > ۰/۱$
Fu's Fs	۳/۵۲۹	



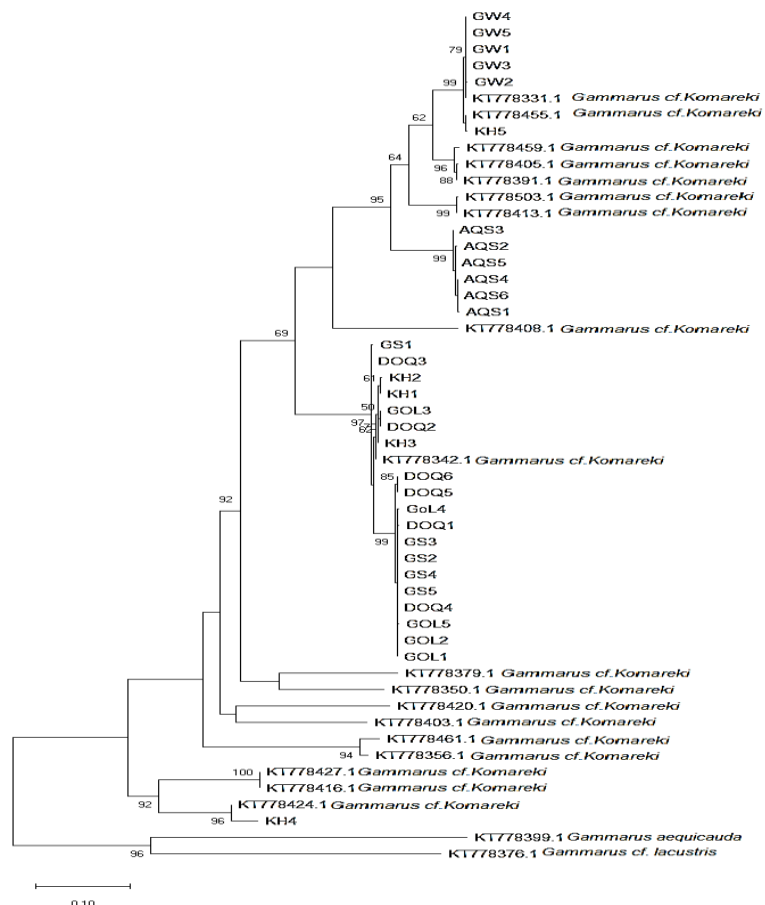
شکل ۴- نمودار مربوط به شاخص راجر-هارپندینگ بر اساس توالی ژن COI میتوکندریایی.

مقایسه با نمونه‌های تصادفی استفاده می‌شود. هرچه این مقدار منفی‌تر باشد جمعیت گسترش بیشتری را در گذشته تجربه کرده و در صورتی که این مقدار مثبت باشد نشان‌دهنده ثبات جمعیت در گذشته و عدم گسترش ناگهانی آن است. همچنین بر اساس شاخص راجر و هارپندینگ در صورتی که توزیع عدم تطابق به صورت تک‌نمایی باشد نشان‌دهنده گسترش ناگهانی جمعیت در گذشته بوده و دو یا چند

مولکولی (AMOVA) حاکی از آن بود که تنوع بین جمعیت‌ها (۷۲/۴۹ درصد) بیش از تنوع درون جمعیت‌ها (۲۷/۵۱ درصد) است (جدول ۶). مقدار F_s فو در این پژوهش مثبت شده (جدول ۷) و نمودار شاخص راجر-هارپندینگ چندنمایی به‌دست آمد (شکل ۴). آماره F_s فو بر اساس میانگین تعداد تفاوت‌های نوکلئوتیدی نمونه‌ها جهت سنجش میزان افزایش معنی‌دار در تعداد جهش‌ها یا آلل‌های نادر در



شکل ۵- درخت تبارزایی نمونه‌های مورد مطالعه در پارک ملی گلستان، ناحیه COI میتوکندریایی به روش بیش‌ترین احتمال. (این درخت با استفاده از مدل HKY+G و بوت‌استرپ ۲۰۰۰ در نرم‌افزار MEGA 10 ترسیم شده است. توالی گونه *Gammarus aequicauda* به‌عنوان برون‌گروه استفاده شد).



شکل ۶- درخت تبارزایی نمونه‌های مورد مطالعه در پارک ملی گلستان با سایر توالی‌های اخذ شده از ژن بانک، ناحیه COI میتوکندریایی به روش بیش‌ترین احتمال (این درخت با استفاده از مدل HKY+G و بوت‌استرپ ۲۰۰۰ در نرم‌افزار MEGA 10 ترسیم شده است. توالی گونه *Gammarus aequicauda* به‌عنوان برون‌گروه استفاده شد).

نمایی بودن این شاخص نشان‌دهنده ثبات جمعیتی در گذشته است.

بحث و نتیجه گیری

سخت‌پوستان آب‌های شیرین به دلیل پراکنش محدود، نحوه پراکندگی در زیستگاه‌های آب شیرین و تأثیری که تغییر ویژگی‌های سیمای محیط آبی بر جریان ژنی این گونه‌ها در طول تاریخ زمین‌شناسی داشته است برای مطالعات تبارشناسی مناسب هستند (Rock et al., 2007). جنس گاماروس از فراوان‌ترین سخت‌پوستان خانواده گاماریده و گروه‌های بی‌مه‌ره کفزی در اکوسیستم‌های آبی هستند که از اهمیت بالایی برخوردارند زیرا در خط ساحلی، جانوران کفزی اصلی بوده و تغذیه ماهیان از آن‌ها صورت می‌گیرد. بنابراین تغییرات جمعیتی آن‌ها سلامت ذخایر ماهیان و تعادل اکوسیستم را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Weiss and Lees, 2016). با این حال، برخلاف اهمیت بوم‌شناختی آن‌ها، تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی این موجودات هنوز به اندازه کافی مورد مطالعه قرار نگرفته است. تاکنون فقط تعداد ۱۸ گونه از جنس گاماروس آب شیرین در ایران شناسایی شده‌اند که پراکنش بسیاری از آن‌ها به برخی مناطق کوهستانی محدود شده است بنابراین به‌جز گونه‌های *G. lacustris* (به‌طور گسترده در هولارکتیک و تعداد کم جمعیت در ایران)، *G. komareki* (به‌طور گسترده در شبه‌جزیره بالکان، آسیای صغیر و کل منطقه البرز در ایران) و *G. pseudosyriacus* (به‌طور گسترده در آسیای کوچک و کل منطقه زاگرس در ایران) سایر گونه‌ها ممکن است به‌عنوان گونه‌های بومی ایران شناخته شوند (Zamanpoore et al., 2011).

بر اساس نتایج این پژوهش بیشترین تعداد هاپلو تایپ‌های شناسایی شده (۱۷ هاپلو تایپ) فقط دارای یک فرد بودند که این امر می‌تواند بیانگر تنوع بالای جمعیت‌های گاماروس در پارک ملی گلستان و وجود جمعیت‌های بومی باشد. گاماروس‌ها جانورانی با

بومی‌گرایی بالا در مقیاس قاره هستند. حدود ۱۱۰ گونه بومی اروپا و آسیای غربی، ۱۶ گونه بومی آمریکای شمالی و بیش از ۷۰ گونه در شرق آسیا پراکنش دارد (Väinölä et al., 2008; Hou et al., 2011; Grabowski et al., 2017). پراکنش کنونی و بومی‌گرایی بالای گاماروس‌ها ممکن است به ظرفیت پراکندگی آن‌ها در آب شیرین نسبت داده شود. از آنجایی که گاماروس‌ها توانایی پراکندگی ضعیفی دارد، بیش‌تر گونه‌های تازه تشکیل‌شده در یک مکان مشخص نزدیک به محل تولد خود قرار می‌گیرند و منجر به بومی‌سازی محلی می‌شوند. توانایی پراکندگی می‌تواند تأثیرات قدرتمندی بر فرآیند گونه‌زایی داشته باشد. همچنین بر اساس مطالعات مولکولی اخیر، جنس گاماروس تک نیا است (Hou et al., 2011) که این مورد در درخت‌های تبارشناسی رسم شده این پژوهش مشهود است و نمونه‌های مورد بررسی با قرارگیری در دو کلاد مختلف به دو گروه تقسیم شدند. بنابراین این احتمال وجود دارد که نمونه‌ها متعلق به گونه‌های دیگری باشند. با توجه به فواصل جغرافیایی این مناطق در هر کلاد، نتایج به‌دست آمده منطقی به نظر می‌رسد.

یکی از روش‌های بررسی ساختار ژنتیکی و میزان واگرایی جمعیت‌ها از یکدیگر آزمون تحلیل واریانس مولکولی (AMOVA) است. با توجه به نتایج این آزمون بیشترین واریانس توجیهی به واریانس بین جمعیت‌ها مربوط بوده که با نتایج محققان دیگر همخوانی دارد (Quan et al., 2004). به‌طور کلی یک جریان ژنی محدود در میان جمعیت‌های موجودات ساکن رودخانه مانند سخت‌پوستان (Siegismund and Muller, 1991) یافت می‌شود. گاماریدها به‌عنوان سخت‌پوستان مهاجر به بالادست رودخانه شناخته شده‌اند (Goedmakers and Pinkster, 1981). بنابراین ممکن است برخی جریان‌های ژنی بین جمعیت‌های همسایه امکان‌پذیر باشد با این حال، جابجایی از یک جمعیت به جمعیت دیگر ممکن است تحت تأثیر موانع طبیعی محدود

این است که سرعت تکامل ریختی در سخت‌پوستان آهسته باشد (Palumbi and Benzie, 1991). Meyran و همکاران (۱۹۹۷)، نیز درصد قابل توجهی از واگرایی توالی (حدود ۱۱/۵٪) بین گونه‌هایی از جنس گاماروس با ویژگی‌های ریختی مشابه مانند *G. pulex* و گونه‌هایی مانند *G. roeseli* و *G. pulex* که از نظر اکولوژیکی شبیه‌تر هستند مشاهده کردند که با بررسی مطالعه حاضر در مورد واگرایی توالی mtDNA مطابقت دارد. همچنین به نظر می‌رسد جمعیت‌های *G. komareki* که از نظر جغرافیایی گسترده‌تر هستند، از نظر ژنتیکی بیش‌ترین تمایز را در بین خود داشته باشند (Zamanpoore et al., 2011). مطالعه تبارشناختی Hou و همکاران (۲۰۱۱)، نیز درجه بالایی از تنوع پنهان را در این گونه نشان دادند. سایر مطالعات مشابه روی چندین گونه از گاماریده آب شیرین به‌ویژه آن‌هایی که دامنه پراکنش وسیعی دارند نیز تنوع پنهان بالا و بومی‌گرایی محلی را در گونه‌ها تایید کردند (Mamos et al. 2016; Grabowski et al. 2017; Copilaș-Ciocianu et al. 2017). سایر مطالعات انجام شده روی گونه‌های دریایی نیز نشان داد که دودمان‌های پنهان یا حتی هاپلوگروه‌ها ممکن است بر اساس توزیع‌های جغرافیایی، شرایط زیستگاه‌های مختلف، محدوده ارتفاعی و عمقی، تاریخچه جمعیتی یا تحمل به عوامل محیطی متفاوت باشند (Krebs et al. 2011; Hupało et al. 2018). بنابراین به دلیل توزیع گسترده و وجود جمعیت‌های جدا شده و پنهان گونه *G. komareki*، طبقه‌بندی آن در حال حاضر نامشخص است (Grabowski and Pešić, 2007) و بر اساس نتایج این مطالعه، می‌توان آن را به‌عنوان یک مجموعه گونه‌ای غالب با گونه‌های پنهان فراوان در منطقه در نظر گرفت که هنوز به‌طور دقیق مورد شناسایی قرار نگرفته است. با توجه به اینکه بخش غالب رودخانه‌های مورد مطالعه در این پژوهش را مناطق کم‌عمق با بستر قلوه‌سنگی و سنگلاخی تشکیل می‌دهد؛ بنابراین برخی ویژگی‌های فیزیکی

شود. همچنین ممکن است این مورد برای نمونه‌های رودخانه خان‌دوشان (به‌ویژه نمونه KH₄)، که هاپلوטיפ آن بسیار متفاوت‌تر از جمعیت‌های همسایه به‌نظر می‌رسد صادق باشد، زیرا بافت صخره‌ای این رودخانه باعث ایجاد نوعی سد شده که این جمعیت را از سایرین جدا می‌کند. بر اساس یافته‌های Hou و همکاران (۲۰۰۷)، چنانچه میزان شاخص Fst بیش‌تر از ۰/۳۳ باشد وجود ساختار ژنتیکی متفاوت مهم‌ترین عامل تفکیک جمعیت‌ها است. نتایج Fst در مطالعه حاضر برابر با ۰/۶۸ بود که بیانگر وجود تفاوت ژنتیکی بارز بین جمعیت‌های بررسی شده و نشان دهنده محدودیت جریان ژن بین این جمعیت‌ها می‌باشد و با مطالعه آلوزیمی Siegismund و همکاران (۱۹۹۱)، بر جمعیت‌های *G. fossarum* مطابقت دارد. بنابراین فقدان آشکار جریان ژن در میان اکثر جمعیت‌های گاماریده ممکن است منعکس‌کننده درجه انزوای جغرافیایی آن‌ها باشد.

نتایج شناسایی مولکولی و درخت تکاملی و تطبیق آن‌ها با یکدیگر و سایر نمونه‌های گاماروس اخذ شده از ژن بانک در دامنه شمالی البرز نشان داد که تفاوت‌های ژنتیکی بین نمونه‌های گاماروس الزاماً با تشابهات ریخت‌شناسی یا بوم‌شناختی آن‌ها مطابقت ندارد. سطح نسبتاً بالایی از واگرایی اندازه‌گیری شده در بین تمام توالی‌های مورد بررسی، تمایز واضح گونه‌های گاماروس را نشان می‌دهد. نمونه‌های مورد مطالعه در این پژوهش که از لحاظ ریخت‌شناسی به‌عنوان گونه *G. komareki* شناخته شده بود و با بوت‌استرپ بالا از نمونه‌های *G. komareki* اخذ شده از ژن بانک که از لحاظ بوم‌شناختی نیز در محیط‌های مشابه بودند، جدا شدند که با نتایج تحقیقات یوسفی سیاه‌کلرودی و همکاران (۱۳۹۹) در بررسی و شناسایی شناسایی مولکولی این گونه در رودخانه جاجرود مطابقت دارد. این ویژگی ممکن است به دلیل بالاتر بودن نرخ تکامل mtDNA در مقایسه با سرعت تکامل ریختی باشد که در مطالعه Palumbi و Benzie (۱۹۹۱)، نیز بیان شده است. احتمال دیگر

نتیجه گرفت که تعداد گونه‌های گزارش شده از جنس گاماروس در منطقه مورد مطالعه قطعاً کم‌تر از تعداد واقعی موجود است و یافته‌های مربوط به شناسایی این گونه‌های پنهان همراه با پژوهش‌های ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی می‌تواند به ارزیابی تنوع زیستی و مسائل حفاظتی کمک می‌کند.

سپاسگزاری

این تحقیق در قالب رساله دکتری و با حمایت‌های مادی و معنوی دانشگاه علوم کشاورزی گرگان و حمایت‌های صندوق ملی پژوهشگران و فناوران کشور با شماره طرح ۹۸۰۲۰۶۴۲ انجام پذیرفت.

آب مانند دبی و سرعت جریان آب (از جمله مهم‌ترین متغیرهای تعیین‌کننده و محدودکننده زیستگاه و توزیع گاماروس‌ها) در این مناطق تحت تأثیر قرار می‌گیرد و ویژگی‌های کیفی زیستگاه و جوامع زیستی آن را با تغییراتی مواجه می‌سازد که به نوبه خود در تنوع فون آبزیان رودخانه نقش عمده‌ای ایفا می‌کند (Brookes, 1995).

به‌طور کلی نتایج نشان داد که طبقه‌بندی جنس گاماروس به‌دلیل شباهت‌های ریختی بین گونه‌های چالش برانگیز است و استفاده از روش‌های مولکولی در آشکار کردن تفاوت بین گاماروس‌ها (در هر دو سطح بین گونه‌ای و درون گونه‌ای) و تشخیص گونه‌های پنهان بسیار مؤثر است. بنابراین می‌توان

منابع

- ابراهیم نژاد م.، حسینی ل.، ساری ع. ۱۳۸۴. جمع‌آوری و شناسایی گونه‌های جنس *Gammarus* در رودخانه زاینده رود. زیست‌شناسی ایران. ۱۸(۳): ۲۲۷-۲۱۸.
- آزادکارلنگرودی ی.، شعبانی پور ن. ۱۳۹۲. بررسی صفات گاماروس دریای خزر (*Pontogammarus maeoticus*) و اجزای ضمائم دهانی آن در تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM). فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان. ۱(۲): ۹۳-۸۱.
- تقوی جلودار ح. ۱۳۹۵. مطالعه همآوری و ساختار جمعیتی گاماروس *Pontogammarus maeoticus* در سواحل جنوبی دریای خزر، مجله علمی شیلات ایران. ۱(۲۶): ۱۷۸-۱۶۷.
- دهداردرگاهی م.، مخدوم م. ۱۳۸۱. زون بندی پارک ملی گلستان. محیط‌شناسی. ۲۸(۲۹): ۷۷-۷۱.
- شعبانی ب. ۱۳۹۶. بررسی تنوع فنوتیپی و ژنوتیپی جمعیت‌های گاماروس سواحل استان گیلان و ارتباط آن با ویژگی‌های اکولوژیک منطقه، پایان‌نامه کارشناسی ارشد، شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه. ۲۰-۱۵.
- یوسفی سیاهکلرودی س.، یوسفی سیاهکلرودی ه.، چناری ف.، خاتمی ش. ۱۳۹۹. شناسایی مولکولی و فیلوژنی گونه *Gammarus komareki* از رودخانه جاجرود با روش بارکدگذاری DNA. شیلات ایران ۲۹(۳): ۶۹-۵۷.
- Astrin J.J., Stüben P.E. 2008. Phylogeny in cryptic weevils: molecules, morphology and new genera of western Palaearctic Cryptorhynchinae (Coleoptera: Curculionidae). *Invertebrate Systematics* 22, 503-522.
- Beermann A.J., Elbrecht V., Karnatz S., Ma L., Matthaei C.D., Piggott J.J., Leese, F. 2018. Multiple-stressor effects on stream macroinvertebrate communities: A mesocosm experiment manipulating salinity, fine sediment and flow velocity. *Science of the Total Environment* 610, 961-971.
- Brookes A. 1995. Challenges and objectives for geomorphology in UK river management. *Earth Surface Processes and Landforms* 20(7), 593-610.
- Bruford M.W., Hanotte, O., Brookfield J.F., Burke T. 1998. Multilocus and single-locus DNA fingerprinting. *Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach* 2, 287-336.
- Copilaș-Ciocianu D., Petrussek A. 2017. The southwestern Carpathians as an ancient centre of diversity of freshwater gammarid amphipods: insights from the *Gammarus*

- taxonomy approach. *PeerJ* 6, 4457.
- Karaman G.S., Pinkster S. 1977. Freshwater *Gammarus* species from Europe, North Africa and adjacent regions of Asia (Crustacea-Amphipoda). Part I. *Gammarus pilex*-group and related species. *Bijdragen tot de Dierkunde* 47(1), 1-97.
- Karaman G.S., Pinkster S. 1977. Freshwater *Gammarus* species from Europe, North Africa and adjacent regions of Asia (Crustacea-Amphipoda): Part II. *Gammarus roeseli*-group and related species. *Bijdragen tot de Dierkunde* 47(2), 165-196.
- Katouzian A.R., Sari A., Macher J.N., Weiss M., Saboori A., Leese F., Weigand A.M. 2016. Drastic underestimation of amphipod biodiversity in the endangered Irano-Anatolian and Caucasus biodiversity hotspots. *Scientific Reports* 6, 22507.
- Krebs L., Blank M., Bastrop R. 2011. Phylogeography, historical demography and postglacial colonization routes of two amphipod distributed amphipods. *Systematics and Biodiversity* 9, 259-273.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33, 1870-1874.
- Librado P., Rozas J. 2009. DnaSP v5: software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25(11), 1451-1452.
- Macher J.N., Salis R.K., Blakemore K.S., Tollrian R., Matthaei C.D., Leese F. 2016. Multiple-stressor effects on stream invertebrates: DNA barcoding reveals contrasting responses of cryptic mayfly species. *Ecological Indicators* 61, 159-169.
- Mamos T., Wattier R., Burzyński A., Grabowski M. 2016. The legacy of a vanished sea: a high level of diversification within a European freshwater amphipod species complex driven by 15 My of Paratethys regression. *Molecular Ecology* 25(3), 795-810.
- Meyran J.C., Monnerot M., Taberlet P. 1997. Taxonomic Status and Phylogenetic Relationships of Some Species of the Genus *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda) Deduced from Mitochondrial *fossarum* species complex. *Molecular Ecology* 24(15), 3980-3992.
- Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9(8), 772-772.
- Dogan H., Akdemir F., Tasdemir S., Atis O., Diyarbakir E., Yildirim R., Ikbal M. 2014. A novel insertion mutation identified in exon 10 of the MEFV gene associated with Familial Mediterranean Fever. *BMC Medical Genetics* 15(1), 1-6.
- Excoffier L., Lischer H.E.L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analysis under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10, 564-567.
- Goedmakers A., Pinkster S. 1981. Population dynamics of three gammarid species (Crustacea, Amphipoda) in a French chalk stream. Part III. Migration. *Bijdragen tot de Dierkunde* 51(2), 145-180.
- Grabowski M., Mamos T., Baćela-Spychalska K., Rewicz T., Wattier R.A. 2017. Neogene paleogeography provides context for understanding the origin and spatial distribution of cryptic diversity in a widespread Balkan freshwater amphipod. *PeerJ* 5, 3016.
- Grabowski M., Pesic V. 2007. New data on the distribution and checklist of fresh-and brackishwater Gammaridae, Pontogammaridae and Behningiellidae (Amphipoda) in Bulgaria. *Lauterbornia* 59, 53-62.
- Hadrys H., Balick M., Schierwater B. 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology* 1(1), 55-63.
- Hou Z., Sket B., Fišer C., Li S. 2011. Eocene habitat shift from saline to freshwater promoted Tethyan amphipod diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 108, 14533-14538.
- 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.
- Hupało K., Mamos T., Wrzesińska W., Grabowski M. 2018. First endemic freshwater *Gammarus* from Crete and its evolutionary history an integrative

- populations. *Heredity* 66, 419-436.
- Stock J.H., Mirzajani A.R., Vonk R., Naderi S., Kiabi B.H. 1998. Limnic and brackish water Amphipoda (Crustacea) from Iran. *Beaufortia* 48(9), 173-234.
- Väinölä R., Witt J.D.S., Grabowski M., Bradbury J.H., Jazdzewski K., Sket B. 2008. Global diversity of amphipods (Amphipoda; Crustacea) in freshwater. *Hydrobiologia* 595, 241-255.
- Valentini A., Pompanon F., Taberlet P. 2009. DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology and Evolution* 24(2), 110-117.
- Zamanpoore M., Grabowski M., Poeckl M., Schiemer F. 2011. Taxonomic review of freshwater *Gammarus* (Crustacea: Amphipoda) from Iran. *Zootaxa* 3140(1), 1-14.
- DNA Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 8(1), 1-10.
- Nylander J.A.A. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Center, Uppsala University
- Palumbi S.R., Benzie J. 1991. Large mitochondrial DNA differences between morphologically similar penaeid shrimp. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 1(1), 27-34.
- Quan J., Zhuang Z., Deng J., Dai J., Zhang Y.P. 2004. Phylogenetic relationships of 12 Penaeoidea shrimp species deduced from mitochondrial DNA sequences. *Biochemical Genetics* 42(9), 331-345.
- Siegismund H.R., Muller J. 1991. Genetic structure of *Gammarus fossarum*

Investigating the genetic diversity of the genus *Gammarus* in the springs and rivers of Golestan National Park using the COI mitochondrial gene sequence

Faezeh Hedayati Rad¹, Hamidreza Rezaei*¹, Olyaghali Khalilipour², Javad Ramezani³,
Ahmed Reza Katouzian⁴

¹Department of Environmental Science, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

²Department of Environment, Faculty of Natural Resources, Khorramshahr University of Marine Sciences and Technologies, Khorramshahr, Iran.

³Department of Biodiversity and Biosafety, Institute of Environment and Sustainable Development, Environmental Protection Organization, Tehran, Iran.

⁴Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran.

*Corresponding author: hamid.r.rezaei@gmail.com

Received: 2022/10/21

Accepted: 2022/11/13

Abstract

Gammarus is the largest genus of aquatic crustaceans in the family Gammaridea, with more than 200 species worldwide. These crustaceans are very important components of the food chain in running waters. Therefore, their population changes can affect all communities, especially the health of fish stocks, and disturb the balance of the ecosystem. Due to their small size, high abundance and sensitivity to environmental conditions, they are suitable as indicator species for evaluation. This study investigated the genetic diversity of the genus *Gammarus* between different populations in Golestan National Park. After sampling, the common identification keys were used to identify the basic morphology and the COI mitochondrial gene sequence was used to conduct molecular studies. Genealogical relationships were determined by maximum likelihood (ML) method. The genetic distance in the populations and some indices of genetic diversity (number of haplotypes (h), haplotype diversity (Hd) and nucleotide diversity (Pi)) were calculated. Based on the results of the genealogical trees, the samples were placed in two separate clades (western and central) and separated from the gene bank samples with high bootstrap. The results of molecular variance analysis showed that the diversity between populations (72.49) is more than the diversity within populations (27.51) and the value of Fst index (0.68) shows the significant genetic difference between populations and the limitation of gene flow. Haplotype diversity is equal to 0.94, the highest and lowest of which is related to Khandushan River (1.00) and Golestan Spring (.40). Also, among the identified haplotypes, 17 haplotypes had only one individual, which indicates the high diversity of *Gammarus* populations in Golestan National Park. Also, *G. komareki* was identified as a dominant species complex with many hidden species in the region that have not yet been accurately identified.

Keywords: Genetic diversity, Gene flow, Golestan, *Gammarus*.