magiran.com

بررسی مولکولی جمعیت آرتمیا پارتنوژنتیکا (*Artemia parthenogenetica*) در ایران به روش PCR-RFLP

محبوبه حاجی رستملو[۱]*؛ سهراب رضوانی گیل کلائی[۲]؛ سید محمدرضا فاطمی[۳]؛ مجید صادقی‌زاده[۴] و فرامرز لالویی[۵]

hajirostamlo_m@yahoo.com

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرند، مرند صندوق پستی: ۱۶۱-۵۴۱۶۵

۲- موسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران صندوق پستی: ۶۱۶۱- ۱۴۱۵۵

۳- واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی ، تهران صندوق پستی:۷۷۵- ۱۴۵۱۵

۴- دانشگاه تربیت مدرس، تهران صندوق پستی: ۱۷۵- ۱۴۱۱۵

۵- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری صندوق پستی: ۹۶۱

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۸۴ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۸۶

چکیده

نظر به اهمیت مطالعات ژنتیکی در شناسایی جمعیت های یک گونه، نمونه برداری آرتمیا پارتنوژنتیکا از ۷ منطقه شامل دریاچه های شور و اینچه برون در استان گلستان، حوض سلطان و نمک در استان قم، مهارلو و بختگان در استان فارس و آبگیر میقان اراک در استان مرکزی انجام و DNA ۲۱۰ نمونه به روش فنل-کلروفرم استخراج گردید. طراحی پرایمر براساس توالی قطعه ای از ژن ریبوزومال میتوکندری (۱۶SrRNA) آرتمیا انجام و PCR صورت پذیرفت. هضم آنزیمی محصول PCR بطول تقریبی ۱۵۸۴ جفت باز توسط ۱۰ آنزیم قطع‌کننده *AluI, EcoRI, Eco47I, HaeIII, HindIII, HinfI, MboI, MspI, RsaI, TaqI*، ۱۲ هاپلوتیپ متفاوت شامل ۴ هاپلوتیپ در شور و اینچه برون، ۱ هاپلوتیپ در نمک و حوض سلطان، ۳ هاپلوتیپ در میقان، ۱ هاپلوتیپ مشترکاً در بختگان و مهارلو و۳ هاپلوتیپ در مهارلو را نشان داد. میزان تنوع هاپلوتیپی درون نمونه‌های جمع‌آوری شده از صفر در نمونه‌های حوض سلطان، دریاچه نمک و بختگان تا ۰/۷۴۲۵ در نمونه‌های اینچه برون و شور و میزان تنوع نوکلئوتیدی درون نمونه‌های جمع‌آوری شده نیز از صفر (حوض سلطان، دریاچه نمک و بختگان) تا ۰/۰۰۷۷ (میقان اراک) محاسبه گردید. کمترین میزان تنوع نوکلئوتیدی بین نمونه‌های جمع‌آوری شده، صفر بود که بین نمونه‌های حوض سلطان با دریاچه نمک و بیشترین مقدار، ۰/۱۷۰۰ بین نمونه‌های اینچه برون و شور با میقان اراک مشاهده شد. اختلاف نوکلئوتیدی بین نمونه‌ها نیز برای نمونه‌های اینچه برون با شور کمترین مقدار (۰/۰۲- درصد) و برای نمونه‌های اینچه برون و شور با میقان اراک بیشترین مقدار (۱۶/۱۸درصد) بدست آمد (میانگین ۳/۴۰ درصد). فاصله تکاملی بین هاپلوتیپ‌های بدست آمده محاسبه گردید که بیشترین مقدار به هاپلوتیپ‌های میقان با هاپلوتیپ‌های اینچه برون و شور متعلق بود. با توجه به الگوی هضمی ایجاد شده برای هر آنزیم در مناطق مورد مطالعه، آنزیم *Eco47 I* بعنوان بهترین مارکر منطقه‌ای گونه آرتمیا پارتنوژنتیکا در ایران معرفی گردید. بررسی جدایی جمعیتها براساس فراوانی هاپلوتیپ‌ها تفاوت آماری معنی‌داری را به جز در مقایسه حوض سلطان با نمک و اینچه برون با شور نشان داد ($P\leq ۰/۰۰۱$) و در سطح هاپلوتیپی، مدارک کافی برای تفکیک جمعیتی آرتمیا پارتنوژنتیکا در ایران به ۵ جمعیت جدا شامل جمعیت حوض سلطان- نمک، میقان اراک، مهارلو، بختگان و اینچه برون - شور مشاهده گردید.

کلمات کلیدی: آرتمیا پارتنوژنتیکا، *Artemia parthenogenetica* ، RFLP،mtDNA، تنوع ژنتیکی، ایران

---

* نویسندهٔ مسئول

magiran.com

مقدمه

آرتمیا مجموعه‌ای است از ۸ گونه دو جنسی و تعداد زیادی جمعیت‌های بکرزا با تفاوت‌های قابل توجه از نظر پلوئیدی که همگی تحت عنوان آرتمیا پارتنوژنتیکا نامیده می‌شوند (Eimanifar *et al.*, 2005). تولید مثل دو جنسی بعنوان نگهدارنده تفاوتهای ژنتیکی در بین افراد یک جمعیت، توان زیست و پراکندگی در زیستگاههای مختلف را فراهم می‌کند و در تغییر شرایط محیطی، سرعت تکامل را بالا می‌برد. پدیدهٔ بکرزایی دارای مزیت تولید آنی و سریع است و هر دو روش به دو شیوهٔ تخمگذاری و زنده‌زایی انجام می‌گیرد (حافظیه، ۱۳۸۲).

آرتمیا به جهت تفاوت‌های ژنی موجود در اشکال دو جنسی و بکرزا (با هم و در بین جمعیت‌ها)، وجود گونه‌های دارای تشابه ریختی با تفاوت‌های قابل توجهی از نظر جدایی تولید مثلی، استراتژی دوگانه تولید مثلی (زنده‌زایی و تخمگذاری)، اثر تغییرات در خصوصیات و ترکیبات یونی آب بر جدایی اکولوژیک جمعیت‌ها و پراکنش سیست‌های دیاپوزی توسط باد، آب، پرندگان و مقاومت آنها در مقابل تغییرات شرایط که امکان مطالعه مقایسه‌ای جمعیت‌ها در مناطق مختلف را فراهم می‌کند پتانسیل بالایی جهت مطالعات تکاملی دارد (Gajardo *et al.*, 2002).

مطالعات مختلفی به جهت بررسی جمعیتی و فیلوژنیک آرتمیا با استفاده از تکنیک‌های مولکولی در جهان صورت گرفته است که از آن جمله می‌توان به مطالعات آلوزایمی (Abreu-Grobois & Beardmore, 1982; Gajardo & Beardmore, 1989, 1993; Zhang & King, 1992; Pilla & Beardmore, 1994; Gajardo *et al.*, 1995, 1999; Naihong *et al.*, 2000; Abatzopoulos *et al.*, 2002)، سیتوژنتیکی (یارمحمدی و همکاران، ۱۳۸۱; Barigozzi, 1974, 1980; Barigozzi *et al.*, 1984; Abatzopoulos *et al.*, 1986, 1987; Colihueque & Gajardo, 1996) مطالعات مبتنی بر ژنوم میتوکندری (ایمانی فر، ۱۳۸۲; Bagshaw, 1991; Brown, 1992; Perez *et al.*, 1994; Gajardo *et al.*, 2004) و ژنوم هسته ای (Badaracco *et al.*, 1995; Thomas *et al.*, 1995; Triantaphyllidis *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 1999; Berestain *et al.*, 2004) اشاره کرد.

در سالهای اخیر تکنیک PCR-RFLP شتاب فراوانی به مطالعات مربوط به ساختار ژنومی موجودات بخشیده و یکی از روشهای مطمئن جهت مقایسه توالی یک ژن یا یک بخش از یک ژن خاص در میان افراد مختلف جمعیتهای یک گونه یا افراد متعلق به گونه‌های مختلف بشمار می‌رود. در این میان mt DNA به دلایل متعدد یک سیستم عمومی ژنتیکی برای مطالعات است: ژنوم میتوکندری در ساختار و عملکرد در مقایسه با ژنوم هسته ساده و حاوی اطلاعاتی است که در نشانگرهای هسته‌ای نگهداری نمی شوند (Brown *et al.*, 1982)، و وراثت آن مادری است به همین دلیل و با توجه به نرخ سریع تکامل در اندازه‌گیری تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌ها کاربرد وسیعی دارد (Ovenden & Brasher, 1994). دو ژن ریبوزومال (۱۶S و ۱۲S) بخشی از مولکول mtDNA هستند که توسط ژن tRNA-val از هم تفکیک می‌شوند. مطالعات قبلی (Bossier *et al.*, 2004; Gajardo *et al.*, 2004; Eimanifar *et al.*, 2005) نشان می‌دهند که ژن SrRNA ۱۶ از پتانسیل بالایی برای نشان دادن تنوع، تفاوت و نیز شباهت ژنتیکی آرتمیا برخوردار است. به همین منظور مطالعه حاضر با هدف شناسایی ساختار ژنتیکی، تعیین تفاوتها در سطح مولکولی و جداسازی جمعیت‌های مختلف گونه آرتمیا پارتنوژنتیکا در ایران براساس تکنیک PCR-RFLP با استفاده از ژن ریبوزومال مستقر بر mtDNA آرتمیا انجام گردید.

مواد و روش کار

نمونه‌ها از دریاچه‌های شور و اینچه برون در استان گلستان، دریاچه نمک و حوض سلطان در استان قم، آبگیر میقان اراک در استان مرکزی و دریاچه‌های مهارلو و بختگان در استان فارس پس از تعیین ایستگاه جمع‌آوری‌گردید. در هر ایستگاه نمونه‌برداری با تور با چشمه ۱۰۰ میکرون به شکل قیف، طول یک متر و قطر ۲۵ سانتیمتر، به روش کشیدن بطول ۱۰۰ متر انجام و نمونه‌های ایستگاههای مختلف در هر منبع آبی، با هم مخلوط و پس از شستشو، در اتانول خالص تثبیت و به آزمایشگاه (پژوهشکده اکولوژی دریای خزر) منتقل گردید. پارتنوژنز بودن این نمونه‌ها براساس دستورالعمل موجود یعنی وجود ۱ یا نبود آرتمیای نر در هر ۱۰۰ عدد آرتمیای نمونه‌برداری شده (Sorgeloos, 1980)، احراز و بطور تصادفی ۳۰ عدد آرتمیا از هر منبع آبی جهت مطالعات مولکولی مورد استفاده قرار گرفت.

magiran.com

استخراج DNA با سانتریفوژهای متوالی و به روش فنل-کلروفرم با اندکی تغییر انجام (حاجی رستملو، ۱۳۸۳) و DNA استخراجی به روش الکتروفورز با ژل آگارز ۱ درصد در بافر TBE (1X) (Cinnagen) حاوی ۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر اتیدیوم بروماید (Sigma)، با استفاده از اشعه UV و سیستم مستندسازی ژل، مورد ارزیابی کیفی قرار گرفت.

پرایمر براساس ترادف ژن ۱۶SrRNA از DNA میتوکندری آرتمیا فرانسیسکانا (Valverde *et al.*, 1994) بطول ۱۸ باز برای دو سر ژن طراحی و با نرم‌افزارهای DNA sis و Oligo مورد آنالیز قرار گرفته و برای سنتز به شرکت MWG-Biotech سفارش داده شد که توالی آن به شرح زیر است:

Forward primer: 5′-CCG GTC TGA ACT CAG ATC – 3′

Reverse primer: 5′-CTA GGA TTA GAT CTA – 3′

هر واکنش PCR با ۱ میکرولیتر DNA، ۲ میکرولیتر از پرایمرها (MWG-Biotech، که به نسبت ۱ به ۵ با آب مقطر رقیق شده)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (MBI Fermentas، حاوی ۱۰ میلی مول از هر یک از نوکلئوتیدهای خالص dGTP, dTTP, dATP, dCTP در بافری با pH=۷/۵)، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم *Taq* پلی مراز (Cinnagen، حاوی ۵ واحد Taq DNA Polymerase در هر میکرولیتر محلول)، ۵ میکرولیتر بافر PCR (10X) (Cinnagen، شامل ۵۰۰ میلی مولار KCl و Tris-HCl ۲۰۰ میلی مولار) و۲ میکرولیتر $MgCl_2$ (Cinnagen، با غلظت ۵۰ میلی لیتر مولار) که حجم نهایی مجموعه با آب مقطر به ۵۰ میکرولیتر رسانده شده، با دستگاه ترموسایکلر (Corbett Research) طبق برنامه زیر انجام شد:

۴ دقیقه و ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد برای واسرشته سازی اولیه (Initial Denaturation)، ۳۰ چرخه سه مرحله‌ای شامل ۱ دقیقه و ۱۵ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد برای واسرشته سازی (Denaturation)، ۵۰ ثانیه در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد برای اتصال پرایمرها (Annealing) و ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه برای توسعه (Extention)، توسعه نهایی قطعات هدف نیز با یک چرخه ۴ دقیقه‌ای در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد انجام گردید.

محصول PCR با ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد و اندازه قطعات حاصل از PCR با مقایسه با مارکر DNA (Lambda DNA Marker,3، MBI Fermentas) بر روی ژل پلی آکریل آمید ۶ درصد و با روش رنگ آمیزی با نیترات نقره بدست آمد.

برای هر نمونه ۴ تا ۷ میکرولیتر از محصول PCR با آنزیمهای *AluI, EcoRI, Eco47I, HaeIII, HindIII, HinfI, MboI, MspI, RsaI, TaqI* در درجه حرارت و مدت توصیه شده توسط شرکت سازنده مورد هضم قرار گرفت. نمونه‌های هضم شده به انضمام ۲ میکرولیتر بافر ویژه لود کردن (Loading Buffer) بطور جداگانه و همراه با مارکر Ladder DNA (MBI Fermentas ،50bp) در ژل پلی‌آکریلامید ۶ درصد ریخته شدند. باندهای حاصل از هضم پس از طی زمان الکتروفورز (۲/۵ تا ۳ ساعت با ولتاژ ۱۰۰ تا ۱۲۰ ولت) و رنگ‌آمیزی با روش نیترات نقره قابل رویت بودند که اندازه قطعات در مقایسه با مارکر بدست آمد.

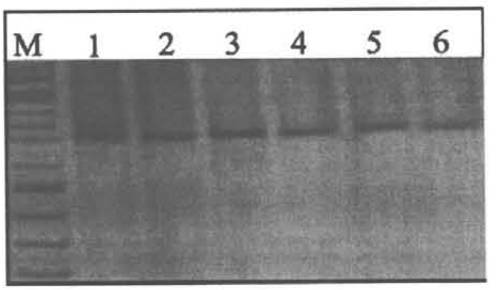
پس از هضم آنزیمی، ژنوتیپ‌های مربوط به هر منطقه شناسایی و بر مبنای وجود یا عدم وجود قطعات مشابه برش خورده توسط یک آنزیم، باندهای حاصل کدگذاری شدند. به منظور محاسبه هاپلوتیپ‌ها، ژنوتیپ بدست آمده برای نمونه‌ها در اثر هضم با آنزیم خاص با حرف مشخصی نامگذاری شده سپس جهت محاسبه هاپلوتیپ‌ها حروف مربوط به ژنوتیپ‌های ایجاد شده در کنار همدیگر قرار داده شد. بطوریکه تعداد حروف موجود در نمایش هاپلوتیپی نمایانگر تعداد آنزیم‌های بکار برده می‌باشد. این داده‌ها پس از موازنه یکسان صفات نوکلئوتیدی به منظور تعیین تنوع هاپلوتیپی و نوکلئوتیدی درون جمعیتی، تنوع و اختلاف نوکلئوتیدی بین جمعیت‌های احتمالی و فاصله تکاملی میان هاپلوتیپ‌های مختلف با نرم افزار Reap آنالیز شدند. فراوانی هتروژنیتی جغرافیایی هاپلوتیپ‌ها با آزمون مربع کای (X^2) و شبیه سازی Monte-Carlo با هزار بار تکرار محاسبه گردیدند.

نتایج

بررسی باند DNA استخراجی با ژل آگارز ۱ درصد و مشاهده تیزی و شدت باندهای تولید شده، نشانگر کیفیت قابل قبول برای استفاده در PCR و عدم وجود هر گونه آلودگی بود (شکل ۱). بخش تکثیر یافته ژن 16SrRNA ژنوم میتوکندری (با استفاده از آغازگرها وتکنیک PCR) بر روی ژل پلی آکریل آمید ۶ درصد مورد بررسی قرار گرفت. طول این قطعه (تقریبی) ۱۵۸۴ جفت باز بود که این اندازه در تمام نمونه‌ها مشابه بوده و اثری از پدیدهٔ هتروپلاسمی در آنها دیده نشد (شکل ۲).

magiran.com

شکل ۱: DNA استخراج شده نمونه ها پس از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید



شکل ۲: محصول PCR ژن 16SrRNA بطول تقریبی ۱۵۸۴ جفت باز (۱ تا۶ نمونه‌های مختلف و M مارکر)

در این بررسی با ۱۰ آنزیم *AluI, EcoRI, Eco47I, HaeIII, HindIII, HinfI, MboI, MspI, RsaI, TaqI* محصول PCR هضم گردید. تمام آنزیمها موجب هضم DNA شدند و باندهای قطع شده از نظر کیفیت واضح و میانگین مجموع اندازه قطعات هضم شده با محصول نهایی PCR مطابقت داشت. ۸ آنزیم محدودگر از ۱۰ آنزیم بکار رفته (*AluI, Eco47I, HaeIII, HindIII, HinfI, MspI, RsaI, TaqI*) الگوی چند شکلی (polymorphism) جمعیتی را نشان دادند که نشانگر محلهای شناسایی متفاوت بر روی توالی نوکلئوتیدی ژن مزبور بودند. استفاده از این آنزیمها بطور متوسط حدود ۱۵۹ باز آلی را روی توالی این ژن مورد مطالعه قرار داد (جدول ۱) که با توجه به طول قطعه تکثیر شده به نظر می‌رسد بطور متوسط ۱۰ درصد از کل توالی قطعه ژن تکثیر شده مورد مطالعه قرار گرفته باشد.

هضم آنزیمی نمونه‌ها با آنزیمهای *EcoRI* و *MboI* الگوی مشابه و تنها یک نوع ژنوتیپ را در تمامی نمونه‌ها نشان دادند. هضم آنزیمی محصول PCR با آنزیم *AluI* ، ۲ ژنوتیپ متفاوت A و B را نشان داد که نمونه‌های اینچه برون، بختگان، حوض سلطان، نمک، شور و مهارلو ژنوتیپ A و نمونه‌های میقان اراک ژنوتیپ B را نشان دادند.

آنزیم *Eco47I* با هضم محصول PCR ۳، الگوی هضمی A، B و C را ایجاد نمود. نمونه‌های بختگان، حوض سلطان، نمک و مهارلو ژنوتیپ A، نمونه‌های میقان اراک ژنوتیپ B و نمونه‌های اینچه برون و شور ژنوتیپ C را نشان دادند (شکل۳).

جدول ۱: تعداد نوکلئوتیدهای بررسی شده از ژن مورد مطالعه با روش RFLP

تعداد متوسط بازهای بررسی شده	تعداد متوسط قطعات	کلاس آنزیم
۱۰۱/۲۵	۲۵/۳۱	۴/۰
۰/۰۰	۰/۰۰	۴/۶
۴۲/۱۹	۸/۴۴	۵/۰
۰/۰۰	۰/۰۰	۵/۳
۱۵/۳۸	۲/۵۶	۶/۰
۱۵۸/۸۲	۳۶/۳۱	جمع

magiran.com

الکتروفورز محصول PCR هضم شده با آنزیم *HaeIII* ، ۲ ژنوتیپ متفاوت A و B را نشان داد بطوریکه نمونه‌های بختگان، حوض سلطان، نمک، مهارلو و میقان اراک ژنوتیپ A و نمونه‌های اینچه برون و شور ژنوتیپ A و B را نشان دادند.

الگوی هضم آنزیمی محصول PCR با آنزیم *HindIII* نشانگر ۲ ژنوتیپ متفاوت A و B بود که نمونه‌های اینچه برون، بختگان، حوض سلطان، نمک، شور و مهارلو ژنوتیپ A و نمونه‌های میقان اراک ژنوتیپ B را نشان دادند (شکل۴).

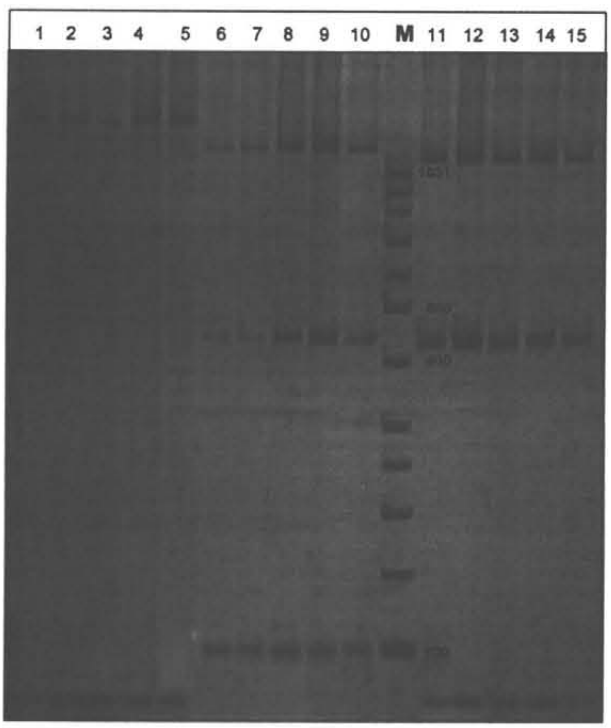
هضم آنزیمی محصول PCR با آنزیم *HinfI*، ۳ ژنوتیپ متفاوت A، B وC را نشان داد بطوریکه نمونه‌های اینچه برون، شور و مهارلو دارای دو ژنوتیپ A و B، نمونه‌های بختگان ژنوتیپ B، نمونه‌های حوض سلطان و نمک ژنوتیپ A و نمونه‌های میقان اراک ژنوتیپ C بودند.

آنزیم *MspI* با هضم محصول PCR، ۲ ژنوتیپ متفاوت A و B را ایجاد کرد که ژنوتیپ A در نمونه‌های اینچه برون، بختگان، حوض سلطان، نمک و شور و ژنوتیپ A و B در نمونه‌های میقان اراک و مهارلو دیده شد.

الکتروفورز محصول PCR هضم شده با آنزیم *RsaI*، ۲ ژنوتیپ متفاوت A و B را نشان داد بطوریکه نمونه‌های اینچه برون، بختگان، حوض سلطان، نمک، شور و مهارلو ژنوتیپ A و نمونه های میقان اراک ژنوتیپ A و B را نشان دادند.

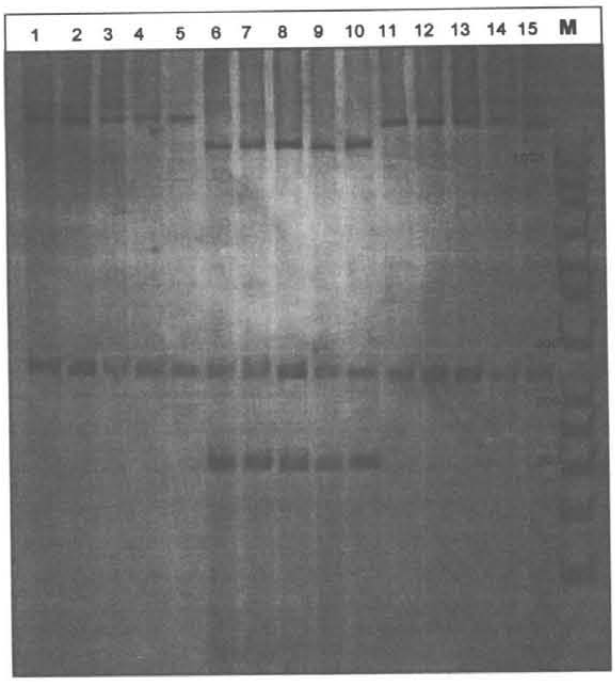
الگوی هضم آنزیمی محصول PCR با آنزیم *TaqI* نشانگر ۲ ژنوتیپ A و B بود که نمونه‌های حوض سلطان و نمک ژنوتیپ A، نمونه‌های میقان اراک و بختگان ژنوتیپ B و نمونه‌های اینچه برون، شور و مهارلو ژنوتیپ A و B را نشان دادند.

آنالیز RFLP از مجموع نهایی ژنوتیپ‌های حاصله برای ۸ آنزیم پلی مورفیک، ۱۲ هاپلوتیپ متفاوت در ۲۱۰ نمونه در ۷ منطقه مورد بررسی را نشان داد که همراه با فراوانی در جداول ۲ و ۳ ملاحظه می‌گردند.



شکل۳ : الگوی هضم آنزیمی محصول PCR با آنزیم *Eco47I* روی ژل پلی آکریل آمید ۶ درصد. ستون ۱ تا ۵ : ژنوتیپ C در نمونه‌های اینچه برون و شور، ستون ۶ تا ۱۰ : ژنوتیپ B در نمونه های میقان اراک، ستون ۱۱ تا ۱۵ : ژنوتیپ A در نمونه‌های دریاچه نمک، حوض سلطان، مهارلو و بختگان، ستون M : مارکر50 pb Ladder

magiran.com



شکل ۴ : الگوی هضم آنزیمی محصول PCR با آنزیم *HindIII* روی ژل پلی آکریل آمید ۶ درصد. ستون ۱ تا ۵ و ۱۱ تا ۱۵ : ژنوتیپ B در نمونه‌های میقان اراک ۶ تا ۱۰ : ژنوتیپ A در نمونه‌های دریاچه نمک، اینچه برون، شور، حوض سلطان، مهارلو و بختگان، ستون M : مارکر 50 pb Ladder

جدول ۲: ژنوتیپ و هاپلوتیپ محصول PCR آرتمیا با ۸ آنزیم قطع‌کننده

هاپلوتیپ	آنزیمهای قطع کننده								مناطق مورد بررسی
	MspI	*HinfI*	*HindIII*	*Eco47I*	*AluI*	*HaeIII*	*RsaI*	*TaqI*	
AAAAAAAA	A	A	A	A	A	A	A	A	حوض سلطان
AAAAAAAA	A	A	A	A	A	A	A	A	دریاچه نمک
ACBBBAAB	A	C	B	B	B	A	A	B	
BCBBBAAB	B	C	B	B	B	A	A	B	
BCBBBABB	B	C	B	B	B	A	B	B	آبگیر میقان
BBAAAAAA	B	B	A	A	A	A	A	A	
ABAAAAAA	A	B	A	A	A	A	A	A	
ABAAAAAB	A	B	A	A	A	A	A	B	دریاچه مهارلو
AAAAAAAB	A	A	A	A	A	A	A	B	
ABAAAAAB	A	B	A	A	A	A	A	B	دریاچه بختگان
ABACAAAA	A	B	A	C	A	A	A	A	
AAACAAAA	A	A	A	C	A	A	A	A	
AAACABAA	A	A	A	C	A	B	A	A	اینچه برون
AAACABAB	A	A	A	C	A	B	A	B	
ABACAAAA	A	B	A	C	A	A	A	A	
AAACAAAA	A	A	A	C	A	A	A	A	
AAACABAA	A	A	A	C	A	B	A	A	دریاچه شور
AAACABAB	A	A	A	C	A	B	A	B	

magiran.com

جدول ۳: فراوانی هر یک از هاپلوتیپ‌های مندرج در جدول ۲

شماره هاپلوتیپ	هاپلوتیپ	تعداد نمونه	درصد
۱	AAAAAAAA	۶۰	۲۸/۵۷
۲	AAAAAAAB	۶	۲/۸۵
۳	ABAAAAAA	۱۶	۷/۶۱
۴	ABAAAAAB	۳۶	۱۷/۱۴
۵	BBAAAAAA	۲	۰/۹۵
۶	AAACAAAA	۱۶	۷/۶۱
۷	ABACAAAA	۲۰	۹/۵۲
۸	AAACABAB	۱۸	۸/۵۷
۹	AAACABAA	۶	۲/۸۵
۱۰	ACBBBAAB	۴	۱/۹۰
۱۱	BCBBBAAB	۱۶	۷/۶۱
۱۲	BCBBBABB	۱۰	۴/۷۶
جمع		۲۱۰	۱۰۰

کمترین مقدار تنوع هاپلوتیپی در حوض سلطان، دریاچه نمک و بختگان و حداکثر مقدار آن در اینچه برون و شور دیده شد و میانگین مقدار تنوع هاپلوتیپی نیز ۰/۰۱۶۷۶ ± ۰/۳۳۹۵ محاسبه گردید (جدول۴).

کمترین تنوع نوکلئوتیدی متعلق به حوض سلطان، دریاچه نمک و بختگان و بیشترین تنوع متعلق به میقان اراک بوده و مقدار متوسط ۰/۰۰۰۰۰۲۰ ± ۰/۰۰۳۵ بدست آمد. در میزان تنوع نوکلئوتیدی بین نمونه های جمع آوری شده کمترین مقدار بین نمونه‌های حوض سلطان و دریاچه نمک (۰/۰۰۰۰) و بیشترین مقدار بین نمونه‌های اینچه برون و دریاچه شور با میقان اراک (۰/۱۷۰۰) مشاهده شد. میانگین تنوع نوکلئوتیدی بین نمونه‌ها نیز ۰/۰۰۰۰۷۵۶ ± ۰/۰۳۷۶ محاسبه گردید (جدول۵).

در محاسبه اختلاف نوکلئوتیدی بین نمونه‌های جمع‌آوری شده (جدول ۵) حداقل و حداکثر اختلاف نوکلئوتیدی بترتیب بین نمونه‌های اینچه برون با دریاچه شور (۰/۰۲- درصد) و نمونه‌های اینچه برون و دریاچه شور با میقان اراک (۱۶/۱۸درصد) دیده شد. میانگین اختلاف نوکلئوتیدی بین نمونه‌ها نیز ۳/۴۰ درصد محاسبه گردید.

لازم به ذکر است که عدد صفر نشانگر عدم وجود تنوع نوکلئوتیدی یا هاپلوتیپی درون یا میان مناطق مورد مطالعه و علامت منفی بعضی از ارقام مربوط به میزان اختلاف نوکلئوتیدی بین مناطق نمایانگر آن است که جدایی اندکی میان این مناطق به چشم می‌خورد (Wilding *et al.*, 1997).

جدول ۴: تنوع هاپلوتیپی ونوکلئوتیدی در نمونه‌های جمع‌آوری شده داخل هر منطقه

منطقه	تنوع هاپلوتیپی	تنوع نوکلئوتیدی	
	Selfing	Non -Selfing	
حوض سلطان	۰/۰۰۰۰ ± ۰/۰۰۰۰۰	۰/۰۰۰۰ ± ۰/۰۰۰۰۰	۰/۰۰۰۰
نمک	۰/۰۰۰۰ ± ۰/۰۰۰۰۰	۰/۰۰۰۰ ± ۰/۰۰۰۰۰	۰/۰۰۰۰
میقان	۰/۶۰۶۹ ± ۰/۰۵۶۲۷	۰/۵۹۶۶ ± ۰/۰۳۸۲۸	۰/۰۰۷۷
مهارلو	۰/۶۵۲۹ ± ۰/۰۶۸۱۵	۰/۶۴۱۸ ± ۰/۰۴۷۱۵	۰/۰۰۶۰
بختگان	۰/۰۰۰۰ ± ۰/۰۰۰۰۰	۰/۰۰۰۰ ± ۰/۰۰۰۰۰	۰/۰۰۰۰
اینچه برون	۰/۷۴۲۵ ± ۰/۰۳۲۰۳	۰/۷۲۹۹ ± ۰/۰۱۹۹۹	۰/۰۰۶۲
شور	۰/۷۴۲۵ ± ۰/۰۳۲۰۳	۰/۷۲۹۹ ± ۰/۰۱۹۹۹	۰/۰۰۶۲
میانگین	۰/۳۳۹۵ ± ۰/۰۱۶۷۶	۰/۳۳۳۷ ± ۰/۰۱۶۱۹	۰/۰۰۳۵ ± ۰/۰۰۰۰۰۲۰

magiran.com

جدول ۵ : تنوع و اختلاف نوکلئوتیدی بین نمونه‌های جمع‌آوری شده مناطق مختلف

تنوع نوکلئوتیدی (Nucleotide diversity، مثلث بالا) اختلاف نوکلئوتیدی (Nucleotide divergence، مثلث پائین)

	شور	اینچه برون	بختگان	مهارلو	میقان	نمک	حوض سلطان
حوض سلطان	۰/۰۲۱۳	۰/۰۲۱۳	۰/۰۱۰۲	۰/۰۰۵۵	۰/۰۸۸۹	۰/۰۰۰۰	
نمک	۰/۰۲۱۳	۰/۰۲۱۳	۰/۰۱۰۲	۰/۰۰۵۵	۰/۰۸۸۹		۰/۰۰۰۰
میقان	۰/۱۷۰۰	۰/۱۷۰۰	۰/۰۷۰۷	۰/۰۸۱۳		۰/۰۸۳۸	۰/۰۸۳۸
مهارلو	۰/۰۲۵۰	۰/۰۲۵۰	۰/۰۰۶۲		۰/۰۷۳۲	۰/۰۰۲۵	۰/۰۰۲۵
بختگان	۰/۰۲۶۷	۰/۰۲۶۷		۰/۰۰۳۲	۰/۰۶۵۶	۰/۰۱۰۲	۰/۰۱۰۲
اینچه برون	۰/۰۰۵۹		۰/۰۲۳۷	۰/۰۱۹۰	۰/۱۶۱۸	۰/۰۱۸۲	۰/۰۱۸۲
شور		۰/۰۰۰۲ -	۰/۰۲۳۷	۰/۰۱۹۰	۰/۱۶۱۸	۰/۰۱۸۲	۰/۰۱۸۲

	تنوع نوکلئوتیدی	اختلاف نوکلئوتیدی
میانگین	۰/۰۳۷۶ ± ۰/۰۰۰۰۷۵۶	۰/۰۳۴۰ ± ۰/۰۰۰۰۶۹۷
حداقل	۰/۰۰۰۰	-۰/۰۰۰۲
حداکثر	۰/۱۷۰۰	۰/۱۶۱۸

فاصله ژنتیکی یا تکاملی (evolutionary distance) میان ۱۲ هاپلوتیپ حاصل از آنالیز RFLP در جدول ۶ ارائه شده است. بیشترین فاصله تکاملی بین هاپلوتیپ AAACABAA (مشترک در اینچه برون و شور) با BCBBBABB (میقان اراک) به میزان ۰/۲۲۶۷ می‌باشد. پس از آنها، فاصله تکاملی هاپلوتیپ‌های ACBBBAAB، BCBBBAAB، BCBBBABB (میقان اراک) با AAACABAB، AAACAAAA، ABACAAAA، و (مشترک در اینچه برون و شور) مقدار بیشتری را بخود اختصاص داده‌اند. در مجموع بیشترین فاصله تکاملی به هاپلوتیپ‌های مختلف میقان با هاپلوتیپ‌های اینچه برون و شور تعلق دارد (جدول۶). در عین حال ملاحظه می‌گردد که در برخی موارد میان نمونه‌هایی که از لحاظ تولید مثلی، زیستگاهی و حتی ریختی از یکدیگر مجزا می باشند، فاصله تکاملی اندکی وجود دارد نظیر آنچه که بین هاپلوتیپ AAAAAAAA (مشترک در حوض سلطان و دریاچه نمک) و ABAAAAAA (مهارلو) دیده می شود ودر برخی موارد نیز میان هاپلوتیپ های گوناگون یک نمونه، فاصله تکاملی قابل توجه وجود دارد. نظیر آنچه که در هاپلوتیپ‌هایACBBBAAB و BCBBBABB از میقان اراک و هاپلوتیپ‌های ABAAAAAB و BBAAAAAA از مهارلو دیده می‌شود.

جدول ۶: میزان فاصله تکاملی میان هاپلوتیپ‌های مختلف براساس اطلاعات حاصل از قطعات هضم شده

	هاپلوتیپ ۱	هاپلوتیپ ۲	هاپلوتیپ ۳	هاپلوتیپ ۴	هاپلوتیپ ۵	هاپلوتیپ ۶	هاپلوتیپ ۷	هاپلوتیپ ۸	هاپلوتیپ ۹	هاپلوتیپ ۱۰	هاپلوتیپ ۱۱	هاپلوتیپ ۱۲
هاپلوتیپ ۱	۰/۰۰۰۰											
هاپلوتیپ ۲	۰/۰۰۷۳	۰/۰۰۰۰										
هاپلوتیپ ۳	۰/۰۰۲۸	۰/۰۱۰۲	۰/۰۰۰۰									
هاپلوتیپ ۴	۰/۰۱۰۲	۰/۰۰۲۹	۰/۰۰۷۳	۰/۰۰۰۰								
هاپلوتیپ ۵	۰/۰۱۲۱	۰/۰۲۲۵	۰/۰۰۹۲	۰/۰۱۹۵	۰/۰۰۰۰							
هاپلوتیپ ۶	۰/۰۱۵۴	۰/۰۲۳۰	۰/۰۲۲۲	۰/۰۳۰۰	۰/۰۳۲۲	۰/۰۰۰۰						
هاپلوتیپ ۷	۰/۰۲۲۲	۰/۰۳۰۰	۰/۰۱۵۴	۰/۰۲۳۰	۰/۰۲۵۱	۰/۰۰۲۸	۰/۰۰۰۰					
هاپلوتیپ ۸	۰/۰۲۶۴	۰/۰۱۸۷	۰/۰۳۳۴	۰/۰۲۵۸	۰/۰۴۷۷	۰/۰۱۰۷	۰/۰۱۳۶	۰/۰۰۰۰				
هاپلوتیپ ۹	۰/۰۱۸۱	۰/۰۲۶۴	۰/۰۲۵۰	۰/۰۳۳۴	۰/۰۳۵۸	۰/۰۰۲۷	۰/۰۰۵۵	۰/۰۰۷۳	۰/۰۰۰۰			
هاپلوتیپ ۱۰	۰/۰۵۶۸	۰/۰۴۷۷	۰/۰۵۶۸	۰/۰۴۷۷	۰/۰۷۶۷	۰/۱۳۷۰	۰/۱۳۷۰	۰/۱۳۳۱	۰/۱۴۱۸	۰/۰۰۰۰		
هاپلوتیپ ۱۱	۰/۰۷۶۷	/۰۶۳۰	۰/۰۷۶۷	۰/۰۶۳۰	۰/۰۶۱۷	۰/۱۵۹۸	۰/۱۵۹۸	۰/۱۵۳۲	۰/۱۶۷۶	۰/۰۱۰۶	۰/۰۰۰۰	
هاپلوتیپ ۱۲	۰/۱۲۱۲	۰/۰۹۲۲	۰/۱۲۱۲	۰/۰۹۲۲	۰/۰۹۰۳	۰/۲۰۴۳	۰/۲۰۴۳	۰/۱۸۸۲	۰/۲۲۶۷	۰/۰۳۰۸	۰/۰۱۵۶	۰/۰۰۰۰

magiran.com

هرگاه الگوی بدست آمده یا ژنوتیپ مختص یک منطقه باشد، معرفی مارکرهای ژنتیکی خاص منطقه‌ای ممکن خواهد بود. نتایج حاصله براساس الگوهای بدست آمده در جدول ۲ نشان می دهند که:

آنزیم *HinfI* ۳ ژنوتیپ A و B وC را ایجاد می‌کند که دو الگوی A و B بین اکثر نمونه‌های مورد مطالعه مشترک بوده و پراکنش مشابه البته با فراوانی متفاوت بین آنها نشان می‌دهد، اما ژنوتیپ C مختص میقان اراک بوده و در نمونه‌های دیگر دیده نمی شوند. براساس فراوانی این ژنوتیپ به نظر می‌رسد که می‌تواند بعنوان مارکر ژنتیکی برای تمایز نمونه‌های مربوطه استفاده شود.

آنزیم *HindIII* با ایجاد ۲ ژنوتیپ A و B نشان می‌دهد که ژنوتیپ B برای میقان اراک اختصاصی است. براساس فراوانی این ژنوتیپ می‌توان چنین فرض نمود که این آنزیم نیز بعنوان مارکر برای این منطقه از پتانسیل لازم برخوردار است.

آنزیمهای *MspI* با ۲ ژنوتیپ، *HaeIII* با ۲ ژنوتیپ، *RsaI* با ۲ ژنوتیپ و *TaqI* با ۲ ژنوتیپ به رغم اینکه تفاوتهایی را از نظر ژنوتیپ ایجاد شده در بین بعضی از نمونه‌های مورد بررسی نشان می‌دهند، ولی به علت اشتراک این ژنوتیپ در بیشتر نمونه‌ها از ارزش چندانی برای تمایز و استفاده بعنوان مارکر برخوردار نیستند.

آنزیم *Eco47I* ، ۳ ژنوتیپ متفاوت A و B را با پراکنش‌های متفاوت در مناطق مورد مطالعه نشان می‌دهد که ژنوتیپ B مختص میقان اراک و C مختص اینچه برون و شور است که برای شناسایی نمونه های این مناطق می‌توانند بکار برده شوند.

آنزیم *AluI* ژنوتیپ‌های A و B را ایجاد می‌کند که از این میان ژنوتیپ B خاص میقان اراک است که می‌تواند جهت تفکیک و شناسایی این نمونه‌ها بکار برده شود.

بنابراین از مجموع آنچه گفته شد می‌توان چنین نتیجه گرفت که به رغم کارآیی تمام ۸ آنزیمی که تفاوتهای نوکلئوتیدی موجود را نشان داده‌اند آنزیمهای *HinfI, HindIII, AluI, Eco47I* از توانایی تفکیک اختصاصی برخوردارند. با توجه به ژنوتیپ ایجاد شده توسط آنزیم *Eco47I* و ارائه ۲ ژنوتیپ اختصاصی و توانایی تفکیک نمونه‌های دو منطقه بعنوان بهترین مارکر منطقه‌ای گونه آرتمیا پارتنوژنتیکا در ایران معرفی می‌گردد.

میزان X^2 فراوانی هاپلوتیپ‌ها بین تمام مناطق مورد مطالعه محاسبه گردید و نتایج نشان داد که جز دریاچه نمک با حوض سلطان به دلیل عدم مشاهده آنزیم پلی مورفیک و یکسان بودن هاپلوتیپ‌های حاصل و نیز دریاچه اینچه برون با دریاچه شور که تفاوت معنی‌داری بین پراکنش هاپلوتیپ‌های آنها دیده نمی شود (X^2 = ۱۵/۲۷ و $P\geq0.001$)، در سایر مقایسه‌ها مناطق دارای تفاوت معنی‌داری در فراوانی هاپلوتیپ‌ها هستند ($P\leq0.001$). با توجه به مقادیر X^2 محاسبه شده برای مناطق میقان و مهارلو در مقایسه با سایر مناطق و به دلیل متفاوت بودن کامل ژنوتیپ‌های حاصل از آنزیمهای پلی مورفیک در مقایسه نمونه‌های دریاچه نمک و حوض سلطان با دریاچه بختگان، این مناطق بصورت جمعیتهای مجزا مشخص گردیدند. در مجموع با توجه به مقادیر X^2 محاسباتی و تفاوتهای موجود در سطح هاپلوتیپی، مدارک کافی برای تفکیک جمعیتی آرتمیا پارتنوژنتیکا در ایران به ۵ جمعیت جدا شامل جمعیت حوض سلطان- نمک، جمعیت میقان اراک، جمعیت مهارلو، جمعیت بختگان و جمعیت اینچه برون- شور در اختیار قرار گرفت (جدول۷).

جدول۷: مقادیر X^2 محاسباتی بین مناطق مورد بررسی

مناطق	X^2 محاسباتی	درجه آزادی	X^2
نمک یا حوض سلطان و میقان	۱۲/۸۰	۳	۱۱/۳۴۴۹
نمک یا حوض سلطان و مهارلو	۱۷/۸۰	۴	۱۳/۲۷۶۷
نمک یا حوض سلطان و اینچه برون یا شور	۱۵/۲۴	۴	۱۳/۲۷۶۷
میقان و مهارلو	۱۸/۷۷	۶	۱۶/۸۱۱۹
میقان و بختگان	۱۴/۹۳	۳	۱۱/۳۴۴۹
میقان و اینچه برون یا شور	۲۲/۳۳	۶	۱۶/۸۱۱۹
مهارلو و بختگان	۱۵/۷۲	۴	۱۳/۲۷۶۷
مهارلو و اینچه برون یا شور	۱۹/۸۵	۷	۱۸/۴۷۵۳
بختگان و اینچه برون یا شور	۲۰/۰۴	۴	۱۳/۲۷۶۷
اینچه برون و شور	۱۵/۲۷	۷	۱۸/۴۷۵۳

magiran.com

بحث

گوناگونی ژنتیکی بعنوان صفات ماندگار یک گونه با مرگ جاندار ناپدید نمی‌شود بلکه به نسلهای بعد منتقل می‌گردد و بعنوان عوامل پایدار و اسناد محکمی در مطالعات رده‌بندی محسوب می‌شوند. یکی از راههای بررسی ساختار ژنتیکی آبزیان، استفاده از ژنتیک جمعیت بوده و شناسایی تحولات درون گونه‌ای و ساختار جمعیت یکی از نیازهای اساسی در اعمال مدیریت صحیح بهره برداری می‌باشد. امروزه یکی از اهداف اصلی آزمایشات ژنتیک مولکولی در آبزیان، آنالیز ساختار جمعیتی، تنوع ژنتیکی، ارتباطات گونه‌ای، سیستماتیک و طبقه‌بندی آنها می‌باشد (Lu, ; Rezvani Gilkolaei, 1997 1998). در زمینه ژنتیک مولکولی و تکنیکهای مربوط به آن، رهیافت‌های مختلفی ارائه شده است که بواسطه آنها مدیریت و شناسایی جمعیتهای نادر ژنتیکی فراهم گردیده است. از آن جمله می‌توان به RAPDs، RFLP، Allozyme و AFLPs اشاره نمود که می‌توانند جهت دستیابی به شاخص تفکیکی بین جمعیتها و روابط ژنتیکی موجود بین گونه ها بکار برده شوند (Badaracco *et al.*, 1995).

استفاده از روش فنل - کلروفرم از متداول‌ترین روشها در اکثر آزمایشات مولکولی در جهت دستیابی به DNA با وزن مولکولی و کیفیت بالا در مطالعات ژنتیک جمعیت می‌باشد. به رغم سمی بودن تعدادی از مواد مورد استفاده و وجود خطر آلودگی، استخراج DNA با روش فنل - کلروفرم به دلیل مزیت جداکنندگی فنل و کلروفرم در مقابل پروتئین، یکی از روشهایی است که در آن نسبت به بقیه روش‌ها احتمال استخراج DNA خالص بیشتر وجود دارد ولی در روش جوشاندن به دلیل آنکه پس از لیز شدن بافت توسط گرما و هیدروکسید پتاسیم، مواد زاید از عصاره حاصل شده جدا نمی‌گردند، نتایج مطلوبی پس از الکتروفورز بر روی ژل مشاهده نمی‌شود و باندها بصورت ضعیف ظاهر شده و تشخیص موقعیت باندها نسبت به یکدیگر مشکل می‌باشد (Bonnaud *et al.*, 1994).

در مطالعات تکمیلی و مقایسه‌ای در بی مهرگان، از آرتمیا بعنوان الگوی تکاملی استفاده می‌شود. از فواید استفاده از آرتمیا قابلیت دسترسی، هزینه نسبتاً پایین نمونه، آداپتاسیون سریع با شرایط آزمایشگاهی و آگاهی از جنبه بیوشیمیایی ارگانیسم می‌باشد. اولین مرحله در مطالعات ژنتیکی و بیان ویژگی ژنها، آنالیز مستقیم DNA با شیوه‌های متفاوت استخراج DNA می‌باشد. در شاخه بندپایان توالی کامل نوکلئوتیدی آرتمیا با طولی در حدود kb ۱۵/۳ ±۰/۱ تعیین شده که کوچکترین اندازه میتوکندری مطالعه شده می باشد (Valverde *et al.*, 1994).

در بررسی Bagshaw در سال ۱۹۹۱ با استفاده از تکنیک RFLP در ژن ریبوزومال جمعیتهای متفاوت آرتمیا، تفاوت ژنتیکی فاحش بین گونه‌های دو جنسی آرتمیا و حتی بین جمعیتهای دو جنسی و بکرزا گزارش شده است که این تفاوتها با نتایج بدست آمده بین جمعیتهای بکرزای ایران مشابهت دارد.

بررسی گونه‌ها در جنس آرتمیا (نمونه‌های دو جنسی و پارتنوژنز) براساس سکانس نوکلئوتیدی دو ناحیه mtDNA شامل CO I و Cyt b، میزان بالای اختلاف در سطح نوکلئوتیدی (بطور متوسط ۱۵درصد) را بین دو گونه دو جنسی آرتمیا فرانسیسکانا و آرتمیا سالینا و دو سویه پارتنوژنز از کشور اسپانیا نشان داد (Perez *et al.*, 1994). فاصله تکاملی بین دو سویه آرتمیا پارتنوژنتیکا بالا بوده (۰/۱۲۷) و آنها ارتباط واضحی را با هیچکدام از نمونه‌های دو جنسی نشان ندادند. استفاده همزمان از مارکرهای مولکولی و نشانگرهای مورفولوژیک نشان داد که تمام نمونه‌های آرتمیای مورد مطالعه حتی آرتمیاهای بکرزای مورد مطالعه به جمعیتهای متفاوت تعلق داشتند. نگاهی به نتایج ارائه شده در جداول ۵ و ۶ در این تحقیق، ضمن تائید نتایج فوق، از وجود اختلاف نوکلئوتیدی (بطور متوسط ۳/۴۰ درصد) و فاصله ژنتیکی قابل توجه (حداکثر ۰/۲۲۶۷) بین جمعیت‌های پارتنوژنز ایران حکایت دارد.

در بررسی مولکولی آرتمیای دریاچه ارومیه که با استفاده از ژنوم mtDNA و با تکنیک RFLP انجام گرفت (ایمانی فر، ۱۳۸۲) از ۱۱ آنزیم محدودگر جهت هضم ژن ریبوزومال آرتمیا اورمیانا بطول ۱۶۰۰ جفت باز استفاده گردید. ۴ آنزیم از آنزیمهای استفاده شده، پلی مورفیسم جمعیتی را در آرتمیا اورمیانا نشان دادند که براساس تفاوت در طول و قطعات هضم شده منجر به تولید الگوهای متفاوت ژنوتیپی در ژن ریبوزومال گردید که نشانگر توزیع ژنوتیپ متفاوت در ستونهای متفاوتی از آب بوده و حاکی از وجود جمعیتهای بارز در سطح و عمق دریاچه ارومیه می‌باشد. جدول فراوانی هاپلوتیپی نشان می‌دهد میزان فراوانی هاپلوتیپ غالب در جمعیتهای بکرزا نیز در مناطق

magiran.com

مختلف یکسان نیست و وجود تعداد فراوان هاپلوتیپ نشان می‌دهد (جدول۳) که تنوع در ژنوم میتوکندریایی آرتمیا پارتنوژنتیکا در مناطق مورد مطالعه بالا ست. این نتیجه با آنچه که در موجودات با قابلیت پراکنش وسیع یافت شده است مشابهت دارد (Ovenden, 1990).

چنانکه در جدول ۶ ملاحظه می‌گردد در برخی موارد میان جمعیت‌هایی که از لحاظ خصوصیات ظاهری، تولید مثلی، زیستگاهی و... مجزا هستند فاصله تکاملی اندکی وجود دارد. بعنوان مثال می‌توان به فاصله تکاملی کوتاه (۰/۰۰۲۸) در هاپلوتیپ‌های ۱ (مشترک در حوض سلطان و دریاچه نمک) و۳ (از مهارلو) اشاره کرد. این امر احتمالاً می‌تواند مبین این مطلب باشد که ایجاد فاصله تکاملی (ژنتیکی) بسیار اندک برای تمایز هاپلوتیپ‌ها از یکدیگر کفایت می‌نماید. از طرفی ملاحظه می‌گردد که در میان هاپلوتیپ‌های گوناگون یک جمعیت فاصله تکاملی قابل توجه وجود دارد. بعنوان مثال می‌توان به فاصله هاپلوتیپ‌های ۱۰ و ۱۲ از جمعیت میقان اراک (۰/۰۳۰۸) و هاپلوتیپ‌های ۴ و ۵ از جمعیت دریاچه مهارلو (۰/۰۱۹۵) اشاره کرد. این مطلب احتمالاً بر این امر دلالت دارد که این جمعیت‌ها، جمعیت‌هایی پویا و درحال تغییر و تبدیل هستند لذا هنوز به یکنواختی و ثبات ژنتیکی نرسیده‌اند (Perez *et al.*, 1994)، البته اعداد مربوط به تنوع هاپلوتیپی و تنوع نوکلئوتیدی که در جدول ۴ ذکر شدند نیز موید همین مطلب بودند.

در مطالعه حاضر میزان تنوع هاپلوتیپ درون جمعیتی در نمونه‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف محاسبه گردیده است (جدول ۴). تراز تنوع هاپلوتیپ می‌تواند از صفر (تمام افراد جمعیت دارای هاپلوتیپ یکسان) تا یک (همه افراد جمعیت دارای هاپلوتیپ‌های متفاوت) متغیر باشد. میزان تنوع هاپلوتیپی درون جمعیتی برای مناطق مختلف بطور متوسط ۰/۳۳۹۵±۰/۰۱۶۷۶ می باشد که در مقایسه با دریاچه ارومیه (۰/۵۴۱۹±۰/۰۰۲۹۲) (ایمانی فر، ۱۳۸۲) از مقدار پائین‌تر و وضعیت یکنواخت‌تری برخوردار است. میانگین میزان تنوع نوکلئوتیدی درون جمعیتی نیز۰/۰۰۳۵±۰/۰۰۰۰۰۲۰ و بین جمعیتی ۰/۰۳۷۶±۰/۰۰۰۰۷۵۶ بدست آمد که در مقایسه با نمونه‌های دریاچه ارومیه (با میزان تنوع نوکلئوتیدی درون جمعیتی برابر با ۰/۰۰۶۵±۰/۰۰۰۰۰۰۳ و میزان تنوع نوکلئوتیدی بین جمعیتی برابر با ۰/۰۰۶۷±۰/۰۰۰۰۰۰۱) مقادیر کمتر و جمعیت‌های یکدست‌تر را نشان می‌دهد. همانطور که قبلاً ذکر شد با آنکه تنوع پذیری mtDNA در جمعیت‌های مورد مطالعه بالاست و ناهمگنی ژنتیکی قابل توجهی بین این مناطق وجود دارد، بنظر می‌رسد در تعدادی از مناطق وجود جمعیت‌های مشابه و گاهی یکدست و یکنواخت طبق نظر Silberman *et al.*,1994 ناشی از عواملی نظیر چرخه زندگی کوتاه و پراکنش وسیع آرتمیا توسط عواملی نظیر باد (که می‌توانند از زیر تقسیم ژنتیکی بین جمعیت‌ها جلوگیری کنند) باشد و اگر چه فاصله اندک بین تعدادی از مناطق مورد مطالعه خود عامل دیگری برای همگنی ژنتیکی است، نقش پرندگان مهاجر را نیز بعنوان عامل اصلی همگن نمودن پراکنش جمعیت‌ها نباید از نظر دور داشت. در مجموع مقایسه الگوی ژنوتیپی و هاپلوتیپی در مناطق مختلف، بیانگر آن است که توزیع نمونه‌ها در نواحی مختلف تحت تاثیر عوامل مختلف فیزیکی و اکولوژیک می‌باشد که احتمالاً تغییرات تنوع نژادی در جمعیت‌های گوناگون را تحت تاثیر قرار داده و نژادهای حساس به تغییرات اکوسیستم از بین رفته‌اند. از سوی دیگر از آنجایی که اگر دو کمیت برابر باشند شاخص تنوع ژنی (Index of gene diversity) آنها صفر یا نزدیک به صفر خواهد بود (Ovenden & Brasher, 1994)، پس عدم وجود تنوع نوکلئوتیدی در نمونه‌های حوض سلطان و دریاچه نمک ممکن است نمایانگر این مطلب باشد که این نمونه‌ها به یک ذخیره ژنتیکی واحد (افراد مربوط به یک جمعیت) تعلق دارند (Smith *et al.*,1980) یا از آنجا که معنی‌دار بودن تفاوتهای عددی در میزان تنوع و اشتقاق نوکلئوتیدی بین جمعیت‌ها دلیل بر محدود بودن جریان ژنی (gene follow) بین آنهاست (Ovenden, 1990). بنابراین عدم وجود تفاوت در تنوع و اشتقاق نوکلئوتیدی نمونه‌های ذکر شده بدلیل جریان ژنی بین این جمعیت‌ها در مناطق پراکنش آنها بوده یا اینکه چون این نمونه‌ها جمعیت‌هایی قدیمی محسوب می‌شوند، بنابراین به ثبات ژنتیکی رسیده و به اندازه سایر هاپلوتیپ‌ها پویا نمی‌باشند.

نمونه‌های حوض سلطان و نمک، اینچه برون و شور جمعیت‌های یکسانی هستند در حالیکه آرتمیای موجود در سایر مناطق به جمعیت‌های متفاوتی متعلق می‌باشند. در مجموع براساس نتایج حاصل (و انطباق آنها با منابع موجود) به نظر می‌رسد به جهت تفاوتهای اقلیمی محیط و تفاوتهای فیزیکی و

magiran.com

شیمیایی آب، مناطق مختلف کشور جمعیت‌های متفاوتی از آرتمیا را در خود جای داده‌اند. بنابراین با تائید فرضیه ابتدایی این مطالعه، برای اولین بار در کشور وجود ۵ جمعیت متفاوت آرتمیاپارتنوژنتیکا شامل جمعیت حوض سلطان- نمک، جمعیت میقان اراک، جمعیت مهارلو، جمعیت بختگان و جمعیت اینچه برون - شور گزارش می‌گردد.

تشکر و قدردانی

از موسسه تحقیقات شیلات ایران به جهت تامین اعتبارات مالی این طرح، مسئولین محترم مراکز تحقیقات شیلات شیراز، قم، گرگان و اراک که تهیه نمونه‌ها مرهون همکاری صمیمانه آنهاست، اساتید محترمی که داوری این مقاله را بر عهده داشته‌اند و با نکته سنجی و رهنمودهای ارزشمند خود به پربار شدن مجموعه حاضر کمک نموده‌اند و کلیه عزیزانی که در مسیر انجام پروژه از مساعدت آنان برخوردار بودیم بخصوص آقای تقوی و سرکار خانم نیرانی کارشناسان آزمایشگاه ژنتیک مولکولی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

ایمانی فر، ا. ؛ ۱۳۸۲. بررسی مولکولی و مورفولوژیک سیست شناور آرتمیا در دریاچه ارومیه با آنالیز PCR-RFLP. پایان‌نامه دکترای حرفه‌ای دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه. ۱۲۰ صفحه.

حاجی رستملو، م. ؛ ۱۳۸۳. بررسی تنوع درون گونه‌ای و ساختار جمعیتی به روش ژنتیک ملکولی در آرتمیای ایران. پایان‌نامه دکترای بیولوژی دریا دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران. ۱۲۰ صفحه.

حافظیه، م. ؛ ۱۳۸۲. آرتمیا (میگوی آب شور). موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۲۳۵ صفحه.

یارمحمدی، م. ؛ پورکاظمی، م. و کمالی، ا. ؛ ۱۳۸۱. بررسی سیتوژنتیک آرتمیای دریاچه ارومیه. مجله علمی شیلات ایران، شماره ۱، بهار ۱۳۸۱، صفحات ۸۵ تا ۱۰۰.

Abatzopolous, T.J. ; Kastrisis, C.D. and Triantaphyllidis, C.D. , 1986. A study of karyotypes and heterochromatic associations in *Artemia* with reference to two north Greek populations. Genetica, Vol. 71, pp.3-10.

Abatzopolous, T.J. ; Triantaphyllidis, C.D. and Kastrisis, C.D. , 1987. Preliminary studies on some *Artemia* population from northern Greece. *In*: *Artemia* research and its application (Eds. P. Sorgeloos; D.A. Bengston; W. Declair and B. Jaspers), Vol. 1, pp.107-114.

Abatzopolous, T.J. ; Kappas, I. ; Bossier, P. ; Sorgeloos, P. and Beardmore, J.A. , 2002. Genetic characterization of *Artemia tibetiana* (Crustacea: Anostraca). Biological Journal of the Linnean Society. Vol.75, No. 3, pp.333-344.

Abreu-Grobois, F.A. and Beardmore, J.A. , 1982. Genetic differentiation of the brine shrimp *Artemia*. *In*: Mechanisms of speciation (Ed. C. Barigozzi), Alan R. Liss Publication, New York, USA. pp.345-376.

Badaracco, G. ; Baratelli, L. ; Ginelli, E. and Meneveri, R. , 1987. Variation in repetitive DNA and heterochromatin in the genus *Artemia*. Chromosoma. Vol. 95, pp.71-75.

Badaracco, G. ; Bellorini, M. and Landsbeger, N. , 1995. Phylogenetic study of bisexual *Artemia* using Random Amplified Polymorphic DNA. Journal of Molecular Evolution. Vol. 41, pp.150-154.

Bagshaw, J.C. , 1991. RFLP analysis of Ribosomal RNA genes among species and population of *Artemia*. ASCB Abstract Form.

Barigozzi, C. , 1974. *Artemia*: A survey of its significance in genetic problems. Evol. Biol., Vol. 7, pp.221-252.

Barigozzi, C. , 1980. Genus *Artemia*: Problems of systematic. *In*: The brine shrimp *Artemia* (Eds. G. Persoone; P. Sorgeloos; O. Roels and E. Jaspers), Vol. 1, pp.147-153.

magiran.com

Barigozzi, C. ; Badaracco, G. ; Plevani, L. ; Baratelli, L. and Profeta, S. , 1984. Heterochromatin in the genus *Artemia* . Chromosoma. Vol. 90, pp.332-337.

Berestain, P. ; Gajardo, G. ; Bossier, P. and Sorgeloos, P. , 2004. Genetic characterization of Chilean *Artemia* strains based on RFLPs. Universidad de Los Lagos. Chile. 17P.

Bonnaud, L. ; Boucher-Rodoni, R. and Monnerot, M. , 1994. Phylogeny of decapod cephalopods based on partial 16S rDNA nucleotide sequences. C.R. Acad. Sci., Vol. 317, No. 6, pp.581-588.

Bossier, P. ; Xiaomei, W. ; Catania, F. ; Dooms, S. and VanStappen, G. , 2004. An RFLP database for authentication of commerical cyst samples of the brine shrimp *Artemia spp.* International study on *Artemia*, LXX. Aquaculture. Vol. 231, pp.93-112.

Brown, W.M. ; Prager, E.M. ; Wang, A. and Wilson, A.C. , 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution. Journal of Molecular Evolution, Vol.18, pp.225-239.

Brown, R.A. , 1992. Population genetics and ecology of *Artemia*: Insights into parthenogenetic reproduction. TREE, Vol.7, pp.232-237.

Colihueque, N. and Gajardo, G. , 1996. Chromosomal analysis in *Artemia* populations from South America. Cytobios. Vol. 88, pp.141-148.

Eimanifar, A. ; Rezvani Gilkolaei, S. and Carapetian, J. , 2005. Application of RFLP analysisis to identify cyst populations of *Artemia urmiana* Gunther, 1899 (BRANCHIOPODA, ANOSTRACA) from Urmia Lake, Iran. Crustacean. Vol. 78, No. 11, pp.1311-1323.

Gajardo, G. and Beardmore, J.A. , 1989. Ability to switch reproductive mode in *Artemia* is related to maternal heterozygosity. Mar. Ecol. Progr. Ser., Vol. 55, pp.191-195.

Gajardo, G. and Beardmore, J.A. , 1993. Electrophoretic evidence suggests that the *Artemia* found in the Salar de Atacama Chile is *A. franciscana* Kellogg. Hydrobiologia. Vol. 257, pp.65-71.

Gajardo, G. ; Conceicao, D.A. ; Weber, L. and Beardmore, A. , 1995. Genetic variability and inter populational differences in *Artemia* strains from South America. Hydrobiologia. Vol. 302, pp.21-29.

Gajardo, G. ; Mercado, C. ; Beardmore, A. and Sorgeloos, P. , 1999. Allozyme data suggest that a new *Artemia* population in southern Chile is *A. persimilis*. International study on *Artemia*, LX Hydrobiologia. Vol. 405, pp.117-123.

Gajardo, G. ; Abatzopoolos, T.J. ; Kappas, I. and Beardmore, J.A. , 2002. Evolution and speciation, *Artemia*: Basic and Applied Biology. Kluwer Academic Publishers, pp.225-250.

Gajardo, G. ; Crespo, J. ; Triantafyllidis, A. ; Tzika, A. ; Baxevanis, A. ; Kappas, I. and Abatzopoulos, T.J. , 2004. Species identification of Chilean *Artemia* population based on mitochondrial DNA RFLP analysis. Journal of Biogeography. Vol. 31, pp. 547-555.

Lu. C.C. , 1998. Diversity of cephalopoda from the waters around Taiwan. Phuket Marine Biological Center Special Publication. Vol. 18, No.2, pp.331-340.

magiran.com

Naihong, X. ; Audenaert, E. ; Vanoverbeke, J. ; Brendonck, L. ; Sorgeloos, P. and DeMeester, L. , 2000. Low among-population genetic differentiation in Chinese bisexual *Artemia* population. Heredity. Vol. 84, pp.238-243.

Ovenden, J.R. , 1990. Mitochondrial DNA and marine stock assessment: A review. Australian Journal of Marine and Freshwater Research. Vol. 41, pp.835-853.

Ovenden, J.R. and Brasher, D.J. , 1994. Stock identity of the red (*Jasus edwardsii*) and green (*Jasus verreauxi*) rock lobsters from mitochondrial DNA analysis. *In*: Spiny Lobster Management. (Eds. B.F. Phillips; J.S. Cobb and J. Kittaka). Blackwell Scientific. Cambridge, pp.230-249.

Perez, M.L. ; Valverde, J.R. ; Batuecas, B. ; Amat, F. ; Marco, R. and Garesse, R. , 1994. Speciation in the *Artemia* genus: Mitochondrial DNA analysis of bisexual and parthenogenic brine shrimps. Journal of Molecular Evolution. Vol. 38, pp.156-168.

Pilla, E.J.S. and Beardmore, J.A. , 1994. Genetic and morphometric differentiation in old world bisexual species of *Artemia* (the brine shrimp). Heredity. Vol. 73, pp.47-56.

Rezvani Gilkolaei, S. , 1997. Molecular population genetic studies of sturgeon species in the south Caspian Sea. Ph.D Thesis. School of Biological Sciences, University of Wales, Swansea U.K. 196P.

Silberman, J.D. ; Sarver, S.K. and Walsh, P.J. , 1994. Mitochondrial DNA variation and population structure in the spiny lobster *Panulirus argus*. Marine Biology. Vol. 120, pp.601-608.

Smith. P.J. ; McKoy , J.L. and Machin, P.J. , 1980. Genetic variation in the rock lobsters *Jasus edwardsii* and *Jasus novaehollandiae*. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research. Vol. 14, No. 1, pp.55-63.

Sorgeloos, P. , 1980. The use of the brine shrimp *Artemia* in aquaculture. *In*: The brine shrimp *Artemia*. Vol. 3, Ecology, culture, use in Aquaculture (Eds. G. Persoon; P. Sorgeloos; O. Roela and E. Jaspers). Universa Press, Wettern, Belgium. pp.25-46.

Sun, Y. ; Cheng Zhong, Y. ; Qin Song, W. ; Sheng Zhang, R. and Yang Chen, R. , 1999. Detection of genetic relationships among four *Artemia* species using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). International Journal of Salt Lake Research. Vol. 8, pp.139-147.

Thomas, K.M. ; Pilla, E.J.S. ; Beardmore, J.A. , 1995. Genetic variation and differentiation in Asian brine shrimp *Artemia*. Aquaculture. Vol. 137, pp.45-560.

Triantaphyllidis, G.V. ; Criel, G.R.J. ; Abatzopolous, T.J. ; Thomas, K.M. ; Peleman, J. ; Beardmore, J.A. and Sorgeloos, P. , 1997. International study of *Artemia* LVII. Morphological and molecular characters suggest conspecifity of all bisexual European and North African *Artemia* populations. Marine Biology. Vol. 129, pp.477-487.

Valverde, J.R. ; Batuecas, B. ; Moratilla, C. ; Marco, R. and Garesse, R. , 1994. The complete mitochondrial DNA sequence of the crustacean *Artemia Franciscana*. Journal of Molecular Evolution. Vol.39, pp.400-408.

Wilding, C.S. ; Beaumont, A. R. and Latchford, J.W. , 1997. Mitochondrial DNA variation in

magiran.com

the scallop *Pecten maximus* (L.) assessed by a PCR-RFLP method. Heredity. Vol.79, pp.178-189.

Zhang, L and King, C.E. , 1992. Genetic variation in sympatric population of diploid and polyploid brine shrimp (*Artemia parthenogenetica*). Genetica. Vol. 85, pp.211-221.

magiran.com

Molecular study of the populations of *Artemia partenogenetica* in Iran using PCR-RFLP Method

Hajirostamloo M.[1]* ; Rezvani Gilkolaei S.[2] ; Fatemi M.R.[3] ; Sadeghizadeh M.[4] and Laloei F.[5]

Hajirostamlo_m@yahoo.com

1- Islamic Azad University, Marand Branch, P.O.Box: 54165-161 Marand, Iran

2- Iranian Fisheries Research Organization, P.O.Box:14155-6116 Tehran, Iran

3- Islamic Azad University, Science and Research Branch, P.O.Box: 14515-775 Tehran, Iran

4- Tarbiat Modarres University, P.O.Box: 14115-175 Tehran, Iran

6- Caspian Sea Ecology Research Institute, P.O.Box: 961 Sari, Iran

Received: November 2005 Accepted: November 2007

Keywords: *Artemia parthenogenetica*, mtDNA, RFLP, Iran

Abstract

Considering the importance of genetic studies to manifest inter population differences in species, samples of *Artemia partenogenetica* were collected from seven inland lakes including Shoor and Inche-Borun lakes in Golestan Province, Hoze-Soltan and Namak lakes in Qom Province, Maharloo and Bakhteghan lakes in Fars Province and Mighan pool in Markazi Province. A total of 210 samples were subjected to DNA extraction by phenol-chloroform method. Primers were designed on a ribosomal fragment (16SrRNA) of the species' mtDNA sequence and the PCR was conducted on the samples. Digestion of the PCR product with approximately 1584bp lengths by 10 restriction endonuclease (*AluI, EcoRI, Eco47I, HaeIII, HindIII, HinfI, MboI, MspI, RsaI, TaqI*) showed 12 different haplotypes: 4 haplotypes in Shoor and Inche-Borun, 1 in Namak and Hoze-Soltan, 3 in Mighan pool, 1 in Bakhtegan and Maharloo and 3 in Maharloo. Haplotype diversity values within collected samples varied from zero in Hoze-Soltan, Namak and Bakhteghan samples to 0.7425 in Inche-Borun and Shoor while nucleotide diversity varied from zero in Hoze-Soltan, Namak and Bakhteghan, to 0.0077 in Mighan. The minimum nucleotide diversity among samples was zero between Hoze-Soltan vs. Namak and the maximum was 0.1700 between Inche-Borun and Shoor vs. Mighan. Nucleotide divergences among samples were least in Inche-Borun vs. Shoor (%-0.02) and most in Inche-Borun and Shoor vs. Mighan (%16.18), averaging to %3.40. The evolutionary distances between 12 haplotype showed that the maximum value belonged to Mighan haplotypes vs. Inche-Borun and Shoor haplotypes. Regarding the digestive patterns produced by each enzyme in the studied region, *Eco47I* is introduced as the population-specific marker of *A. partenogenetica* in Iran. Test of population differentiation based on haplotype frequencies were statistically significant ($P \leq 0.001$) with the exception of Hoze-Soltan vs. Namak and Inche-Borun vs. Shoor. We conclude that there are enough evidences in haplotypic level for dividing *A. partenogenetica* in Iran into five populations: Hoze-Soltan and Namak, Mighan, Maharloo, Bakhtegan, Incheh-Borun and Shoor.

* Corresponding author