

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی
مؤسسه تحقیقات شیلات ایران - مرکز تحقیقات آرتمیای کشور

بررسی تفاوت‌های ژنتیکی استرین‌های
دوجنسی و پارتنوژنز آرتمیا در
دریاچه ارومیه به روش PCR-RAPD's

مجری :

امین ایمانی‌فر

شماره ثبت

۱۶/۹۲۸

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی
مؤسسه تحقیقات شیلات ایران - مرکز تحقیقات آرتمیای کشور

عنوان پروژه / طرح : بررسی تفاوت‌های ژنتیکی استرین‌های دوجنسی و پارتنوژنز آرتمیای در دریاچه ارومیه به روش -PCR
RAPD's

شماره مصوب : ۸۴۰۰۶-۰۳-۰۰۰۰-۲۰۰۰۰-۲۰۱۹-۲

نام و نام خانوادگی نگارنده / نگارنده گان : امین ایمانی‌فر

نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه‌ها و طرح‌های ملی و مشترک دارد) :-

نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : امین ایمانی‌فر

نام و نام خانوادگی همکاران : محمد حسن‌زاده - آرش جوانمرد - بیژن مصطفی‌زاده - سیاوش گنجی - فریدون چکمه‌دوز

نام و نام خانوادگی مشاور (ان) : سهراب رضوانی گیل کلائی - محمد پورکاظمی

محل اجرا : استان آذربایجان غربی

تاریخ شروع : ۱۳۸۴/۴/۱

مدت اجرا : ۱ سال و ۹ ماه

ناشر : مؤسسه تحقیقات شیلات ایران

شمارگان (تیراژ) : ۱۵ نسخه

تاریخ انتشار : سال ۱۳۸۶

حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی‌ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

به نام خدا

| صفحه | «فهرست مندرجات» | عنوان |
|------|-----------------|---------------------|
| ۱ | | چکیده |
| ۳ | | ۱- مقدمه |
| ۵ | | ۱-۱- مروری بر منابع |
| ۱۱ | | ۲- مواد و روشها |
| ۱۹ | | ۳- نتایج |
| ۳۶ | | ۴- بحث |
| ۴۶ | | پیشنهادها |
| ۴۷ | | منابع |
| ۴۹ | | چکیده انگلیسی |

چکیده

میگوی شورزی (آرتمیا) شامل گونه‌های دو جنسی و تعداد زیادی از اشکال بکرزا می‌باشد که در دامنه وسیعی از مناطق جغرافیایی در جهان زیست می‌کنند. این تحقیق به منظور مطالعه تفاوت‌های ژنتیکی گونه آرتمیای دریاچه ارومیه (*Artemia urmiana*) با جمعیت‌های بکرزای اطراف این دریاچه و نیز روابط شجره‌ای (فیلوژنتیک) برخی از جمعیت‌های آرتمیاهای ایران (قم، اراک، گلستان و شیراز) با تعدادی از گونه‌های دوجنسی و بکرزای خارجی (*Artemia sinica*, *Artemia franciscana*, *Artemia parthenogenetica*, Russia, *Artemia parthenogenetica*, Turkmenistan) با استفاده از شاخص مولکولی PCR-RAPD انجام گرفت.

از مجموع ۵۶ آغازگر با طول ده جفت باز (bp)، تعداد ۲۹ پرایمر در گروه آرتمیاهای دریاچه ارومیه و نواحی اطراف و ۲۶ پرایمر در گروه آرتمیاهای ایران، الگوی غیر همسان (پلی مورفیسم) با خاصیت تکرار پذیری فوق‌العاده نشان دادند. بیشترین درصد تعداد جایگاه‌های پلی مورف در آرتمیا ارومیا ($P = 78/89\%$) و در مقایسه با نمونه‌های بکرزای اطراف دریاچه ارومیه و سایر نقاط ایران در آرتمیای بکرزا منطقه روستای سرای ($P = 59/8\%$) دیده شد. بیشترین میزان ضریب شانون (Shannon index) در آرتمیا ارومیا ($I = 0/41$) و در مقایسه با نمونه‌های بکرزای اطراف دریاچه و ایران در آرتمیای بکرزا منطقه روستای سرای ($I = 0/3$) بود. آنالیز واریانس مولکولی حاکی از وقوع بیشترین تغییرات ژنتیکی داخل نمونه‌ای در آرتمیا ارومیا و نمونه‌های اطراف دریاچه ($F_{ST} = 0/35$) و مابین نمونه‌ای در آرتمیای ایران ($F_{ST} = 0/76$) بود. الگوی ژنتیکی حاصل با الگوی توزیع جغرافیایی یکسان نبود که این امر حاکی از انتشار وسیع نمونه‌های آرتمیا در مناطق مختلف کشور می‌باشد.

الگوی دسته‌بندی منجر به تفکیک نمونه‌ها به دو خوشه مجزا در گروه آرتمیا ارومیا و نمونه‌های اطراف دریاچه و چهار خوشه مجزا در گروه آرتمیاهای ایران و نمونه‌های خارجی شد. آنچه از الگوی بدست آمده استنباط می‌شود، این است که آرتمیاهای بکرزای اطراف دریاچه شباهت ژنتیکی بیشتری به هم دارند و میزان هتروزیگوسیتی در منطقه روستای سرای بیشتر از دشت فسندوز و سایر آرتمیاهای ایران بوده است.

آرتمیاهای مناطق قم و اراک و گلستان شباهت ژنتیکی بیشتری به آرتمیاهای بکرزای روسیه و ترکمنستان داشته و از میزان هتروزیگوسیتی پائین‌تری برخوردار بودند. در نقشه شجره‌ای حاصل، آرتمیای منطقه شیراز در

مجاورت با آرتمیا فرانسیسکانا (آمریکا) تشکیل یک خوشه کاملا مجزا را داده اند. ارقام مربوط به درجه شاخص تثبیت بیانگر تفاوت‌های ژنتیکی قابل ملاحظه بالا در کلیه گروه‌های آرتمیا بوده و بنظر می‌رسد که میزان جریان ژنی در حدی نبوده که موجب جلوگیری از بروز تفاوت‌های ژنتیکی شود. بنابراین بایستی اقدامات بهره برداری از استرین‌های مناسب آرتمیا با ضرایب ژنتیکی بالا صورت گیرد تا زمینه‌های مناسبی جهت پرورش و تشکیل بانک ژنی آرتمیای دریاچه ارومیه و ایران فراهم گردد.

کلمات کلیدی:

Artemia urmiana ، آرتمیای بکرزای دریاچه ارومیه ، آرتمیاهای ایران و گونه‌های آرتمیای خارجی، روابط ژنتیکی ، RAPD .

۱- مقدمه

آرتمیا، میگوی شورزی، سخت پوستی کوچک و فیلتر کننده غیرانتخابی با قابلیت تطابق بالا به زندگی در اکوسیستم‌های آبی شور می‌باشد. این موجود با دامنه پراکندگی وسیع در جهان و با کاربردهای متعدد در اشکال متفاوت از جمله بعنوان غذای زنده در پرورش آبزیان خوراکی در جهت تأمین منابع پروتئینی مورد نیاز بشر و نیز بعنوان حامل در انتقال عناصر و ترکیبات دارویی از جمله هورمون‌ها، ویتامین‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها و غیره به عنصر تفکیک ناپذیری از صنعت آبزی پروری و یکی از ملزومات این صنعت تبدیل شده است. تاکنون گونه‌های متفاوتی از آرتمیا در جهان توسط محققین شناسایی و خصوصیات زیستی هر یک به وفور بیان شده اند و مطالعات مقایسه‌ای و تکمیلی در خصوص طبقه بندی و تنوع زیستی آنها نیز کم و بیش به انجام رسیده یا در دست انجام هستند. همچنین، اهمیت آرتمیا موجب شده تا توجه روزافزونی به انجام مطالعات ژنتیکی و شناسایی ذخایر ژنی و ژنوتیپ‌های جدید جمعیتی این موجود معطوف گردد.

آرتمیای دریاچه ارومیه (*Artemia urmiana*) یکی از هفت گونه آرتمیای شناخته شده با قابلیت تولیدمثلی دو جنسی می‌باشد (Eimanifar & Mohebbi, 2007) که براساس تحقیقات انجام یافته، شامل جمعیت‌های متفاوت ژنتیکی در نقاط مختلف اکولوژیکی دریاچه می‌باشد

(Eimanifar et al., 2006). این امر حاکی از وجود ذخایر ژنی بالقوه جهت بهره‌برداری پایدار در عرصه شیلاتی از این آبزی می‌باشد. گونه مذکور علاوه بر شیوه تولیدمثلی دوجنسی غالب در دریاچه، شامل سویه‌ها و جمعیت‌هایی با روش تولیدمثلی بکرزایی در دریاچه و بطور عمده در نواحی اطراف دریاچه می‌باشد. در ضمن، بیوتوپ‌های متعددی از آرتمیا در نواحی مختلف جغرافیایی ایران و در شرایط زیست محیطی متفاوت یافت می‌شوند (Abatzopoulos et al., 2006) که همگی بیانگر انتشار وسیع این موجود در اراضی مستعد نواحی ایران پهناور می‌باشد. پراکندگی جمعیت‌ها و سویه متفاوت آرتمیا در ایران باصفت مورفولوژیک متنوع و در اکوسیستم‌های متفاوت می‌تواند حاکی از تکامل پویای (پویایی تکاملی) گونه مزبور باشد. از آنجائیکه تفاوت‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک آرتمیاها اغلب ریشه در اختلافات ژنتیکی و تفاوت ساختارهای ژنتیکی گونه‌ها دارد و با توجه به اینکه فاکتورهای مورفولوژیک بعنوان شاخص‌های مطمئنی در جهت تفکیک جمعیت‌ها و شناسایی خصوصیات ژنتیکی هر یک از آنها محسوب نمی‌شوند، لذا بررسی تأثیر پراکندگی

جغرافیایی در تفاوت های ژنتیکی بین جمعیت ها و سویه های مختلف آرتمیا در برخی نقاط کشور تفکیک آنها از همدیگر مورد توجه و تاکید مسئولین امور شیلاتی و مؤسسات و مراکز تحقیقاتی قرار گرفته است. در این خصوص، پیشرفت علوم مرتبط با زیست شناسی مولکولی در تعیین تفاوت های جمعیتی منجر به بکارگیری روش های حساس و مطمئن مولکولی در جهت تعیین تغییرات ژنتیکی در داخل و مابین جمعیت ها و سویه های هر گونه شده است (Buth *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 2004). لذا استفاده از شاخص های ژنومی اهمیت بسزایی در شناسایی ذخایر ژنتیکی آرتمیاها و توسعه علم تنوع زیستی و دستیابی به الگوهای ژنتیکی نمونه های هدف را خواهد شد. در گام بعدی، در صورت انجام مطالعات تکمیلی و مشخص شدن تفاوت و ویژگی های زیستی و پرورشی هر گروه ژنتیکی

می توان به بهره گیری از سویه های مؤثر در صنعت آبرزی پروری با هدف افزایش رویکرد محصولی پرداخت. از آنجائیکه طبق تحقیقات انجام یافته، آرتمیا های دو جنسی و بکرزا در نواحی مختلف و برکه های اطراف دریاچه ارومیه دارای صفات ریخت شناسی میکروسکوپی و ماکروسکوپی متفاوتی می باشند (Agh & Noori, 1997) لذا مقایسه آنها با یکدیگر و توسعه تحقیقات در جهت شناسایی آرتمیاهای نقاط مختلف کشور، افق روشنی را جهت بهره برداری هدف مند و مؤثر از صفات جمعیت ها و سویه های مختلف در زمینه های متفاوت، از جمله آبرزی پروری، ترسیم خواهد نمود. این امر همچنین می تواند بعنوان گام نخست برای انجام دستکاریهای ژنتیکی بعدی با رویکرد محصولی و با اهداف اقتصادی بشمار رود.

بنابراین هدف از تحقیق حاضر، استفاده از شاخص مولکولی RAPD (تکثیر تصادفی قطعات متفاوت مولکول DNA) در تعیین تفاوت ها یا شباهت های ژنتیکی سویه های دو جنسی و بکرزای آرتمیای دریاچه ارومیه و مناطق اطراف آن و نیز تأثیر تغییرات جغرافیایی در ذخایر ژنومی آرتمیاها بوده است. از سوی دیگر، با بررسی روابط شجره ای آرتمیای دریاچه ارومیه و برخی از آرتمیاهای ایران با آرتمیاهای برخی مناطق دیگر جهان، گامی در تهیه شناسنامه ژنتیکی آرتمیای ایران و تعیین روابط و اختلافات مولکولی آنها برداشته خواهد شد.

۱-۱- مروری بر منابع

مروری بر مطالعات ژنتیکی انجام یافته پیرامون گونه‌های آرتمیا و آبزیان

آرتمیا نخستین بار توسط گانتز در منطقه Wlington انگلیس شناسایی و بعنوان *Artemia salina* نامگذاری گردید. سالهای متمادی *Artemia salina* بعنوان یک گونه دو جنسی شناخته شده بود و این گونه خاص جهت مشاهدات مورفولوژیک، تشخیص وجود تفاوت‌ها و تغییرات بر اثر نوسانات شوری بکار برده می‌شد (Sorgeloos et al., 1980). در سال ۱۸۴۰، Joly میگوی آب شوری را در منطقه‌ای به نام Villeneuve در جنوب فرانسه یافت، که به روش بکرزایی تولید مثل می‌کرد. Vonsiebole در سال ۱۸۷۳ آزمایشها و مطالعات خود را در مورد آرتمیای دریاچه بزرگ نمک در ایالت یوتا شروع کرد. وی ثابت کرد که تخمهای لقاح نیافته آرتمیای جنوب یوتا رشد نکرده‌اند. مشاهدات مورفولوژیک به درک تفاوت بین نمونه‌های مختلف از منشاءهای گوناگون راهنمایی کرد (Sorgeloos et al., 1980).

نقطه شروع تحقیقات ژنتیکی پیرامون آرتمیا در سال ۱۸۹۳ بود که Brauer مطالعات ژنتیکی آرتمیا را با استفاده از آرتمیای بکرزای نمونه برداری شده از منطقه Capodistria دریای آدریاتیک شروع کرد. این آرتمیا دارای ۸۴ کروموزوم بود. سپس، مطالعات انجام گرفته طی سالهای ۱۹۱۲-۱۹۰۵ نشان داد که روش تولید مثلی و تعداد کروموزوم ها در آرتمیا، میتواند در شرایط محیطی متفاوت تغییر کند (Sorgeloos et al., 1980). سپس آرتمیای دو جنسی Cagliari کشف شد که قبلاً دارای ۴۲ کروموزوم بوده است. Artom وابستگی بین عدد کروموزومی و اندازه سلولی و اندازه هسته را اینگونه بیان می‌کند که آرتمیاهای بکرزا (تتراپلوئیدی) با تعداد ۸۴ کروموزوم، دارای هسته و سلولهای بزرگتری از آرتمیای دو جنسی با ۴۲ کروموزوم بودند (Sorgeloos et al., 1980).

Artom تشخیص گونه آرتمیا را منحصر به عدد کروموزومی و روش تولید مثلی دانست، بعدها تحقیق بروی انواع مختلفی از تقسیمات سلولی در آرتمیاهای بکرزا و نیز بررسی چگونگی مکانیسم عمل کروموزوم جنسی آرتمیای صورت گرفت (Sorgeloos et al., 1980).

کشف جهشهای مختلف توسط Bowen و همکاران در سال ۱۹۶۶، Barigozzi در سال ۱۹۷۴ صورت پذیرفت. در سال ۱۹۳۹ دانشمندی به نام Kuenen اولین نمونه‌های جنسهای جدا از هم *Artemia salina* بین فرمهای دو جنسی را تهیه کرد (Sorgeloos et al., 1980).

Gilchrist در سال ۱۹۶۰ جنسهای جدا از هم بین آرتمیاهای آب شور کالیفرنیا و آرتمیای شمال آفریقا و Bowen در سال ۱۹۶۵ جنسهای جدا از هم آرتمیاهای که در شبه جزیره (Sanbartdiome و Sadinita، Mexico، Hidago) زندگی می کردند را یافتند. Bowen و همکاران در سال ۱۹۷۸ و Bowen و Steling در سال ۱۹۷۸ آرتمیا را با استفاده از پلی مورفیسم یافته شده برای آنزیمها و پروتئینهای ناپایدار نژادهای گونههای آرتمیا افزایش دادند (Sorgeloos *et al.*, 1980).

آنچه که در مورد ژنتیک آرتمیا می توان گفت آن است که نژادهای مختلف آرتمیا از گونههای متفاوت اغلب دارای عدد کروموزومی $2n=42$ می باشند و عدد کروموزومی در گونههای بکرزا وابسته به انواع متفاوت تقسیمات میوز و درجات مختلف پلوئیدی می باشند. به عبارت دیگر، درجه پلوئیدی در آرتمیا ارتباط مستقیم با نوع تقسیم میوز سلولهای جنسی آرتمیای ۴۲ کروموزومی دارد (Sorgeloos *et al.*, 1980).

درباره تحقیقات انجام یافته در خصوص فرمول کروموزومی جمعیتهای مختلف آرتمیا، استفاده از روشهای DNA نو ترکیب در زمینه ژنتیک مولکولی، بعنوان ابزاری نیرومند جهت مطالعات سیستماتیک و تکاملی گسترش یافته است. در این خصوص، آرتمیا بعنوان یک موجود مناسب و جالب در انواع متنوعی از مطالعات آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گرفته است (MacRae *et al.*, 1988).

دامنه این مطالعات شامل علوم بیوشیمی، بیولوژی سلولی و مولکولی و تکاملی و جمعیت، مورفولوژی و اکولوژی آرتمیا می باشد. از آنجائیکه محتوای DNA ژنومی آرتمیا بسهولت و با مقادیر بالا قابل استخراج می باشد، مطالعه جمعیتی و فیلوژنی گونههای مختلف آرتمیا، با استفاده از انواع مختلفی از شاخصهای مولکولی قوی و حساس امکانپذیر می باشد. با استفاده از این شاخصها، تعیین و تشخیص گونه ها و نژادهای مجزای ژنتیکی از سایر گونه ها و نژادهای آرتمیا امکانپذیر می باشد.

در ادامه به برخی دیگر از مطالعات انجام شده در زمینه ژنتیک مولکولی و تفریق ریخت شناختی گونههای مختلف آرتمیا اشاره می شود:

در تحقیق Sun و همکاران (۱۹۹۹) در خصوص روابط ژنتیکی مابین چهار گونه آرتمیا با استفاده از روش تکثیر تصادفی RAPD با استفاده از ۷۰ آغازگر تصادفی سنتز شده، تفاوتهای ژنتیکی گونههای مختلف آرتمیا مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیشترین درصد چند شکلی مربوط به *Artemia parthenogenetica* به میزان

۲۸/۸ درصد و کمترین درصد چند شکلی مربوط به *Artemia franciscana* به میزان ۱۶/۱ درصد بود. نمودارهای شجره‌ای حاصل نشان دهنده تشکیل دو گروه مجزا از آرتمیاهای مورد مطالعه بود. گروه اول شامل گونه‌های دوجنسی آرتمیا، *A. franciscana*، *A. urmiana*، *A. sinica*، و خوشه دوم شامل *A. parthenogenetica* بود. بر اساس نمودارهای بدست آمده چنین استنباط شده است که *Artemia sinica* یک گونه مجزا از سایر گونه‌های دوجنسی می‌باشد.

در بررسی مقدماتی روابط ژنتیکی از سویه های متفاوت گونه *A. franciscana* با استفاده از تکنیک RAPD's (Camargo et al., 2002) از ۱۴ استرین متفاوت این گونه از آرتمیا از نواحی مختلف جغرافیایی و از گونه *A. persimilis* بعنوان شاهد به منظور مطالعه روابط ژنتیکی آنها استفاده شد. محصولات RAPD براساس برنامه آماری UPGMA منجر ایجاد ۵ خوشه کاملاً مجزا از سویه های متفاوت گردید. تفاوت ژنتیکی ناچیزی در نمونه‌های آرتمیای نواحی Colombia و Galerazamba مشاهده گردید.

A. persimilis بعلاوه تفاوت‌های ژنتیکی بارز خوشه مجزایی را بخود اختصاص داده بود. جمعیت *A. franciscana* رابطه نزدیکی را به جمعیت‌های سویه های ناحیه Caribbean نشان نداد و کلیه جمعیت سویه های متفاوت *A. franciscana* تفاوت ژنتیکی بارزی از *A. persimilis* داشتند.

در بررسی های Badaracco و همکاران (۱۹۹۵)، روابط شجره ای مابین گونه‌های دوجنسی آرتمیا با استفاده از شاخص مولکولی RAPD مورد تحقیق قرار گرفت.

در این تحقیق، روابط خویشاوندی ۱۴ جمعیت آرتمیا از نواحی آمریکا، مدیترانه و چین با استفاده از هفت آغازگر تصادفی مورد بررسی و تحلیل قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که جمعیت‌های آرتمیا متعلق به گونه *Artemia franciscana* در یک گروه و جمعیت‌های آرتمیای ناحیه مدیترانه و جمعیت‌های گونه *Artemia salina* در گروه دیگر و دو استرین متعلق به گونه دو جنسی آرتمیا از ناحیه چین در خوشه سوم نمودار شجره ای حاصل قرار گرفتند. بیشترین فاصله ژنتیکی مابین *A. persimilis* از بقیه گونه ها و سویه های مورد بررسی بود (D=۱/۱۶۶). میزان فاصله ژنتیکی *A. salina* و *A. persimilis* در حدود D=۱/۲۳۶ و *A. persimilis* و گونه‌ای دو جنسی از چین در حدود D=۱/۲۵۷ بود. نتایج حاکی از آن بود که *A. persimilis* احتمالاً بعلاوه پراکنش جغرافیایی

وسیع در سالیان گذشته، امروزه بعنوان گونه‌ای غالب پدیدار شده و خوشه‌ای کاملاً مجزا را بخود اختصاص داده است.

در مطالعه حاجی رستملو و همکاران ۱۳۸۳، تفاوت های ژنتیکی و روابط فیلوژنتیک آرتمیایا از ۹ ناحیه متفاوت جغرافیایی ایران با استفاده از ژن rRNA مستقر در مولکول میتوکندری و روش RFLP مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق بکارگیری ۱۱ آنزیم برشی، منجر به تفکیک ۲۵ هاپلو تیپ های متفاوت از آرتمیایای مناطق مختلف ایران شد. کمترین مقدار تنوع هاپلو تیپی و نوکلئوتیدی متعلق به جمعیت آرتمیایای مناطق حوض سلطان، دریاچه نمک و بختگان و بیشترین مقدار تنوع هاپلو تیپی در جمعیت آرتمیای دریاچه مهارلو و نیز بیشترین مقدار تنوع نوکلئوتیدی در جمعیت آرتمیای دریاچه ارومیه بود. نتایج حاکی از ناهمگنی ژنتیکی قابل توجهی بین جمعیت های مختلف بود. روابط فیلوژنتیک نشانگر سه شاخه اصلی بوده که شاخه اول شامل آرتمیایای اینچه برون-شور، حوض سلطان-نمک، بختگان و مهارلو و شاخه دوم شامل آرتمیایای نوق و میقان و شاخه سوم شامل آرتمیای دریاچه ارومیه بودند. از مجموع آنزیم های بکار رفته، *Hinfl* بعنوان مارکر تفریقی منطقه ای و گونه ای آرتمیایا در ایران معرفی گردید.

در بررسی ویژگی‌ها و خصوصیات ژنتیکی گونه جدید آرتمیای تبت *Artemia tibetiana* با استفاده از روش مطالعه آلوزایمها و تکنیک PCR-RAPD، Abatzopoulos و همکاران (۲۰۰۲) روابط ژنتیکی مابین برخی از گونه‌های دو جنسی آرتمیا و آرتمیای تبت را با استفاده از دو آغازگر طویل رشته (۲۲ جفت باز) براساس افتراق ژنومی حاصل از روش RAPD و مقایسه ساختار های آنزیمی (Allozyme) مورد تحقیق و تحلیل قرار گرفت. نتایج حاکی از آن بود که *A. tibetiana* از نظر میانگین هتروزیگوسیتی ($Heterozygosity=0/074$) مشابه با سایر گونه‌های دو جنسی مورد بررسی بود. ولی نسبت جایگاههای پلی مورف آن مشابه با گونه آرتمیای دریاچه بود. ($P=40\%$). فاصله ژنتیکی مابین *A. tibetiana* و *A. franciscana* در حدود $D=0/73$ و مابین *A. tibetiana* و *A. urmiana* در حدود $D=0/475$ و نیز مابین *A. tibetiana* و *A. sinica* در حدود $D=0/114$ تعیین گردید. میزان درجه شاخص تثبیت بیانگر این بود که جمعیت آرتمیا تبتیانان در دریاچه Lagkor Co از جمعیت‌های مجزای ژنتیکی تشکیل شده است. همچنین بیشتر تفاوت‌های ژنتیکی، مربوط به تغییرات مابین جمعیت‌ها بود ($0/76/8$). میزان جریان ژنی مابین جمعیت‌های *A. tibetiana* و *A. sinica* در حدود $N_m=0/31$ و مابین کل جمعیت‌ها در حدود یا

مساوی $N_m=1$ محاسبه گردید. آنالیز نمودار خویشاوندی حاصل حاکی از گروه بندی جمعیت های مورد مطالعه به سه خوشه کاملاً مجزا بود که خوشه اول شامل جمعیت‌های *A. franciscana* در نواحی کالیفرنیا و ویتنام و خوشه دوم شامل جمعیت‌های *A. tibetiana* و *A. sinica* و خوشه سوم شامل جمعیت *A. urmiana* بودند.

- بررسی ساختار ژنتیک جمعیتی خرچنگک دراز آب شیرین (*Austropotamobius pallipes*) با استفاده از شاخص مولکولی RAPD در این تحقیق تنوع ژنتیکی ۲۱ جمعیت از گونه خرچنگک دراز آب شیرین جمع آوری شده از مناطق مختلف جغرافیایی با استفاده از شاخص مولکولی RAPD تعیین گردید. تنوع ژنتیکی براساس میانگین ضریب شانن در حدود ۰/۱۵۹ تعیین گردید. آنالیز درخت خویشاوندی مابین جمعیت ها حاکی از گروه بندی نمونه‌ها به سه خوشه کاملاً مجزا شامل نواحی جنوبی و شمال غربی و شرقی مناطق نمونه برداری بود. آنالیز تست AMOVA نشانگر تفاوت بالا در ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها بود ($F_{ST}=0/814$) که دلالت بر وقوع بیشترین تغییرات ژنتیکی مابین خوشه‌ها بود (۷۳/۱۱ درصد). در این خصوص ۸/۳۱ درصد از تغییرات مربوط به تفاوت‌های حاصله مابین جمعیت‌ها و داخل خوشه‌ها بود. سه جمعیت از این گونه خرچنگک شامل Artix ، Arbon و Mortagne هیچگونه پلی مورفیسمی نشان ندادند و در حالیکه بیشترین تغییرات پلی مورفیسم جمعیتی مربوط به جمعیت Magnerolles بود (Gouin et al., 2001).

- مطالعه تنوع ژنتیکی مابین چهارگونه از ماهی کپور هندی با استفاده از شاخص مولکولی RAPD در این تحقیق تفاوت ژنتیکی مابین گونه‌های Rohu ، Kalbasu ، Catla و Mrigal با استفاده از ۳۴ آغازگر تصادفی و براساس شاخص ژنومی RAPD محاسبه گردید. تشابه ژنتیکی مابین گونه Catla و Mrigal مشاهده گردید ($GS=0/278$) در حالیکه بیشترین تشابه ژنتیکی مابین گونه Rohu و Kalbasu بود ($GS=0/336$). آنالیز درخت خویشاوندی بیانگر آن بود که گونه Kalbasu از لحاظ خصوصیات ژنتیکی به گونه Rohu شباهت داشته و نسبت به گونه Mrigal فاصله ژنتیکی بیشتری داشت (Barman et al., 2003).

- بررسی روابط فیلوژنتیکی مابین گونه‌های سس ماهی اسپانیایی با استفاده از شاخص RAPD در این تحقیق ۱۵ جمعیت متعلق به ۸ گونه متفاوت از این ماهی و به تعداد ۲۳۲ عدد ماهی جهت تعیین تفاوت‌های ژنتیکی و روابط ژنتیکی مابین گونه‌های متفاوت با استفاده از ۱۰ آغازگر و شاخص ژنومی RAPD مورد بررسی و تحلیل قرار گرفتند. تشابهات ژنتیکی در داخل جمعیت‌ها از میزان بالایی برخوردار بود که در حدود ۹۳/۳۶ درصد برای

گونه *Barbus bocagei* و در حدود ۱۰۰ درصد برای گونه *B. meridionalis* محاسبه گردید. تشابهات ژنتیکی بین جمعیت‌ها از میزان پایینی برخوردار بود که از ۵۹/۳۰-۹۷/۸۱ درصد در صد متغیر بودند و میانگین تشابه بین جمعیتی در حدود $75/87 \pm 8/17$ درصد بود. بیشترین فاصله ژنتیکی در گونه *B. bocagei* ($D=0/045-0/025$) و کمترین مقدار در گونه *B. comizo* محاسبه گردید. آنالیز درخت خویشاوندی دو شاخه کاملاً مجزا از هم را مشخص نمود که اولی شامل گونه‌های *B. meridionalis* و *B. haasi* که در منطقه شمال شرقی اسپانیا پراکنده‌اند و دومی متشکل از دو خوشه شامل گونه‌های موجود در مناطق مدیترانه و آتلانتیک بودند. آرایش سه بعدی گروه بندی بدست آمده را تایید نمود (Callejas et al., 2002).

- ارزیابی روابط ژنتیکی مابین شش گونه ماهی متعلق به جنس *Labeo* با استفاده از شاخص مولکولی RAPD در این تحقیق شش گونه ماهی از جنس *Labeo* به تعداد ۴۰ عدد با استفاده از ۱۵ آغازگر، مورد بررسی تشابهات و تفاوت‌های ژنتیکی قرار گرفتند. بیشترین مقدار تشابه ژنتیکی در گونه‌های *L. Calbasu* (۰/۹۳)، *L. fimbriatus* و *L. rohu* (۰/۹۱)، *L. bata* (۰/۸۷)، *L. gonius* (۰/۸۶) و گونه *L. dyocheilus* (۰/۷۷) مشاهده گردید. آنالیز درخت خویشاوندی، گروه‌های آزمایشی را به دو شاخه مجزا اولی شامل گونه‌های *L. Calbasu* و *L. rohu* و *L. fimbriatus* و *L. gonius* و دومی شامل گونه‌های *L. bata* و *L. dyocheilus* تفکیک کرد. نتایج حاکی از این بود که شاخص ژنومی RAPD قادر به تفکیک گونه‌های مشابه هم می‌باشد (Das et al., 2005).

مطالعه جمعیت‌های فیل ماهی (*H. huso*) با استفاده از تکنیک RAPD در این تحقیق میزان تشابهات یا تفاوت‌ها و نیز روابط ژنتیکی مابین جمعیت‌های ماهی خاویاری *Huso huso* از دو زیستگاه شرقی و غربی حاشیه جنوبی دریای خزر، با استفاده از ۱۳ آغازگر مورد بررسی قرار گرفته است. میزان درجه شاخص تثبیت حاصله برای جمعیت‌ها معنی دار بوده و میزان جریان ژنی در حدود $N_m = 1$ تعیین گردید. درخت خویشاوندی حاصل بر اساس فواصل ژنتیکی، حاکی از وجود دو شاخه کاملاً مجزا بوده که شاخه اول از سه خوشه تشکیل شده که شامل *Persian sturgeon* و *Great sturgeon* و *Russian sturgeon* بودند. شاخه دوم از دو خوشه شکل یافته که شامل *Ship sturgeon* و *Stellate sturgeon* بودند. نتایج حاکی از این بود که با استفاده از روش RAPD امکان به شناسایی تفاوت‌ها مابین گونه‌ها و نیز افراد داخل هر گونه وجود داشته است. (Rezvani Gilkolaei, 1997).

۲- مواد و روش کار

۲-۱- مواد مصرفی و تجهیزات

۲-۱-۱- تجهیزات مورد استفاده

۱- سمپلرهای با ظرفیت های مختلف ساخت کمپانی Gilson

۲- دستگاه بن ماری Daihan, Scientific

۳- سانتریفوژ مدل Vision- Vs- 15000 CFN II

۴- دستگاه انکوباتور Heraeus

۵- الکتروفورز افقی BIO-RAD, A2

۶- دستگاه ترانس لومی سانس مدل Biometra

۷- دستگاه ترمال سایکلر ساخت کمپانی Techne / FT GRAD2D

۸- دستگاه اسپکتروفتومتر Genesys™ 5

۹- Vortex ساخت IKA / TTS2

۱۰- کامپیوتر و نرم افزارهای مربوطه

۱۱- لوپ

۱۲- توری ۲۰ میکرون

۱۳- فریزر ۲۰°C-

۱۴- اتوکلاو

۱۵- وسایل مورد نیاز برای تفریح سیستم آرتمیا (زوک شیشه ای ۱ لیتری، پمپ هواده، لامپ مهتابی)

۱۶- ترازوی دیجیتال

۲-۱-۲- مواد مورد استفاده

۱- فنل متعادل شده (pH = ۷/۵-۸) ساخت کمپانی مرک

۲- 8-hydroxyquinoline

۳- کلروفورم ساخت کمپانی مرک

۴- اتانول مطلق و ۷۰ درصد ساخت کمپانی مرک

۵- آنزیم پروتئیناز k ساخت کمپانی MBI Fermentas

۶- سرسمپلر زرد (۱۰۰ μl) و آبی (۱۰۰۰ μl) ساخت شرکت AHN

۷- سرسمپلر کریستالی (۱۰ μl) ساخت شرکت Treff

۸- میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری ساخت شرکت Treff

۹- تیوب PCR ساخت شرکت Treff

۱۰- NaCl ساخت کمپانی مرک

۱۱- Tris ساخت کمپانی مرک

۱۲- EDTA ساخت کمپانی مرک

۱۳- SDS^۱ ساخت کمپانی مرک

۱۴- استات سدیم با pH = ۵/۲ ساخت شرکت سیناژن

۱۵- آگارز با درجه مولکولی ساخت شرکت سیناژن

۱۶- آنزیم RNase ساخت کمپانی MBI Fermentas

۱۷- نشانگر وزنی DNA ساخت کمپانی MBI Fermentas

۱۸- ترکیب dNTP ساخت کمپانی MBI Fermentas

۱۹- آنزیم Smar Taq polymerase ساخت شرکت سیناژن

۲۰- MgCl₂ ساخت شرکت سیناژن

۲۱- بافر PCR ساخت شرکت سیناژن

^۱ Sodium Dodecyl Sulfate

۲۲- بافر سنگین کننده^۱ (bromophenol blue)

۲۳- اسید استیک ساخت کمپانی مرک

۲۴- پرایمرها با سکانس های مختلف RAPD^۲ تهیه شده از شرکت MWG-Biotech

۲۵- اتیدیوم بروماید ساخت شرکت Sigma

۲۶- DNA الگو

۲۷- روغن معدنی PCR ساخت شرکت سیناژن

۲۸- نمونه سیست گونه‌های متفاوت آرتمیا، تهیه شده از مرکز رفرانس آرتمیا دانشگاه گنت، (بلژیک)

۲۹- آب مقطر استریل

۳۰- دستکش یکبار مصرف

۳۱- پارافیلیم

۳۲- جلبک دونالیلا و سبوس گندم

۲-۲- نمونه برداری و انتقال نمونه ها

نمونه‌های آرتمیای مورد بررسی شامل ۱۵ نمونه از هر یک از آرتمیای دریاچه ارومیه (*Artemia urmiana*)، آرتمیای بکرزا منطقه دشت فسندوز و آرتمیای بکرزا منطقه روستای سرای واقع در حاشیه دریاچه، بودند. ملاک تشخیص نمونه های دوجنسی از انواع بکرزا، بررسی خصوصیات ظاهری هر یک از نمونه ها در زیر میکروسکوپ از نظر وجود تعداد زیادی ستا (seta) در هر لوب فورکا (forca) و نیز دو لوبی بودن خیلی واضح فورکا و کیسه رحمی پهن در آرتمیای بکرزا بود (Agh & Noori, 1997). علاوه بر نمونه های فوق، آرتمیاهای موجود در برخی نواحی دیگر ایران شامل ۱۰ نمونه از هر یک از آرتمیاهای نمونه برداری شده در استان های قم، مرکزی (اراک) و فارس و گلستان، و نیز نمونه هایی از سایر گونه‌های آرتمیا شامل دو نمونه از هر یک از گونه های *Artemia parthenogenetica*, و *Artemia parthenogenetica* (Russia) *Artemia sinica* *Artemia franciscana* Turkmenistan جهت مطالعه روابط شجره ای آنها مورد بررسی قرار گرفتند. برای انجام بررسی ها فقط از

^۱Loading buffer

^۲ Random Amplified Polymorphic DNA

آرتمیاهای بالغ استفاده گردید. در مورد نمونه‌های خارجی، پس از تهیه سیست آنها از رفرانس آرتمیا (بلژیک)، این سیست‌ها مطابق شرایط استاندارد آزمایشگاهی (Sorgeloos *et al.*, 1997) تفریخ و نوزادان حاصل تا رسیدن به مرحله بلوغ، پرورش داده شدند. جهت حصول اطمینان از فقدان سایر موجودات و آلوده نبودن نمونه‌ها، کلیه نمونه‌های آرتمیا قبل از تثبیت بالکل مطلق مرک، با آب مقطر استریل شستشو داده شد. نمونه‌ها پس از تثبیت جهت مطالعات ژنتیکی به پژوهشکده بیوتکنولوژی شمالغرب و غرب کشور (تبریز) منتقل گردیدند.

۳-۲- استخراج و تعیین کیفیت و کمیت DNA ژنومی

برای استخراج DNA از نمونه‌ها، هر یک از آرتمیاهای بالغ بصورت مجزا در داخل میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری قرار داده شد. روش بکار رفته برای استخراج DNA، استفاده از PCA (فنل - کلروفرم - ایزوآمیل الکل ۱:۲۴:۲۵) بود. استخراج اسیدهای نوکلئیک به روش فنل کلروفرم امکان دستیابی به کیفیت و ماهیت مطلوب اسیدهای نوکلئیک را در مطالعات ژنتیک جمعیت فراهم می‌سازد (Hildebrandt and Igarashi, 1999). DNA ژنومی هر یک از نمونه‌های آرتمیا مشابه روش بکار رفته توسط Eimanifar و همکاران (2006) با هضم بافت مورد نظر و شستشو با فنل - کلروفرم و در مرحله نهایی با رسوب DNA حاصل توسط الکل مطلق انجام گردید. در مرحله نهایی نیز DNA استخراج شده با رقیق سازی توسط محلول TE تا هنگام انجام مطالعات بعدی به فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد منتقل گردیده شد.

جهت بررسی کیفیت DNA استخراج شده، از روش الکتروفورز محصول DNA بروی ژل آگارز (Gel monitoring) و برای ارزیابی کمیت DNA استخراج شده از روش اسپکتروفتومتری استفاده گردید. در انجام الکتروفورز بروی ژل آگارز با قرار دادن چند میکرولیتر از محلول DNA به‌مراه بافر سنگین کننده درون چاهک ژل آگارز ۱ درصد و حرکت دادن آن با شدت جریان الکتریکی ۷۰ ولت به مدت یک ساعت در بافر TAE با غلظت 1X و سپس رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید و عکسبرداری با سیستم مستند ساز ژل (Gel documentation) خصوصیات کیفی DNA شناسایی گردید. در این روش، خلوص DNA استخراج شده با رویت ژل روی دستگاه UV و بصورت عینی با معیارهای وجود اسمیر، انحراف نمکی و وجود RNA در محلول تعیین گردید.

در روش اسپکتروفتومتری، پس از کالیبره کردن دستگاه اسپکتروفتومتر با بافر، مقدار معینی از DNA با حجم مشخصی از بافر رقیق و سپس نمونه DNA مورد نظر، در داخل میکروسول دستگاه ریخته شد. غلظت DNA توسط

اسپکتروفتومتری با جذب نور ماوراء بنفش بطور دقیق اندازه گیری شد. مقدار پرتو ماوراء بنفش جذب شده توسط محلول DNA شاخصی از مقدار DNA موجود در نمونه می‌باشد. میزان جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه گیری شد که در این طول موج جذبی (A260) برابر ۱/۰، معادل با ۵۰ میکروگرم DNA دو رشته‌ای در میلی لیتر و نیز ۴۰ میکروگرم RNA در میلی لیتر می‌باشد. غلظت دقیق DNA در نمونه، طبق فرمول ذیل تعیین شد:

$$\mu\text{g/ml} = \text{A}260\text{nm} \times 100 \times 50$$

نسبت جذب در طول موج ۲۸۰ به طول موج ۲۶۰ نانومتر (A260/A280) در یک نمونه خالص DNA برابر با عدد ۱/۸ است. وجود نسبت‌های کمتر از ۱/۸ بیانگر این است که نمونه DNA دارای ناخالصی پروتئین یا فنول است، که در چنین مواردی توصیه می‌شود نمونه مجدداً رسوب داده شود. نسبت‌های بیشتر از ۱/۸ بیانگر این است که نمونه DNA از لحاظ RNA ناخالصی دارد. از نسبت جذب ۲۳۰ به ۲۶۰ نانومتر (A260/A230) جهت بررسی وجود پپتیدها و دتر جنت‌ها و کربوهیدرات‌ها نیز استفاده شده است که این نسبت بایستی برابر یا بیشتر از ۲/۲ باشد (سیدرضای تهرانی، ۱۳۸۰)

۴-۲- تکثیر تصادفی قطعات DNA (RAPD-PCR)

قبل از شروع آزمایشات RAPD بروی نمونه‌های اصلی DNA آرتمیا، چرخه‌های حرارتی PCR برای تعداد محدودی از نمونه‌های DNA تنظیم گردید و سپس با توجه به محصولات PCR بدست آمده، تغییرات لازم در شرایط PCR داده شد. اینکار با دادن دامنه‌های حرارتی مختلف به نمونه‌های مختلف PCR شروع گردید و بتدریج بهترین دمای اتصال آغازگر بدست آمد. در مرحله بعد، با تغییر در غلظت MgCl_2 نمونه‌ها، باندهای واضح تری بدست آمد. با توجه به اینکه تکنیک RAPD در غلظت‌های پایین DNA در واکنش PCR عملکردی بهتر دارد لذا با استفاده از غلظت‌های مختلف DNA، بهترین غلظت DNA ژنومی برای واکنش PCR محاسبه و بدست آمد. همچنین، با تغییر در غلظت آنزیم *Taq* به شکل مطلوبی شرایط PCR بهینه سازی شد. در اینحالت معمولاً باندهای حاصل از RAPD، کاملاً واضح و بدون پخش شدگی بود. در هر واکنش PCR با حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر، از ۲۰ نانوگرم DNA، بافر PCR (Cinnagen) با غلظت 1X، ۰/۷ mM از هر dNTP (Fermentas)، ۰/۵ μM پرایمر (MWG-Biotech)، یک واحد آنزیم تک پلی مرز (Cinnagen) و دو mM کلرید منیزیم (Cinnagen) استفاده شد. برای اطمینان از نتایج آزمایش PCR، همراه با نمونه‌ها، از کنترل مثبت و منفی استفاده شد. عمل PCR در

تیوب‌های ۰/۲ مایکرولیتری و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر مدل (Techne / FT GRAD2D) انجام گرفت. برای تکثیر تصادفی قطعات DNA دستگاه ترموسایکلر بصورت زیر تنظیم شده بود: ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت چهار دقیقه برای واسرشته سازی اولیه (Pre-denaturation)، همراه با ۴۵ چرخه حرارتی بصورت ۹۴ درجه سانتیگراد بمدت یک دقیقه، ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک (Annealing) و ۷۲ درجه سانتیگراد بمدت دو دقیقه (Extension) انجام شد. پس از آن نیز بمنظور بسط نهایی قطعات اتصال یافته به پرایمرها از درجه حرارت ۷۲ درجه سانتیگراد بمدت هفت دقیقه استفاده گردید. در این بررسی در مجموع ۵۶ پرایمر ۱۰ نوکلئوتیدی با توالی‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفتند. هر یک از پرایمرها بصورت فوق سرد (منجمد) با سفارش سکانس مربوطه به شرکت MWG-Biotech آلمان تهیه و پس از محاسبه غلظت آنها طبق دستورالعمل شرکت مربوطه، رقیق سازی گردیدند. نقشه و توالی نوکلئوتیدها در پرایمرهای مورد استفاده در این بررسی، در جدول ۱-۲ آمده است.

۲-۵- الکتروفورز محصول PCR

محصولات ژنی تکثیر شده در فرایند PCR با استفاده از الکتروفورز بروی ژل آگارز ۱/۵ درصد جداسازی و با رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید آشکارسازی شدند. برای این منظور، ۱۵-۱۰ میکرولیتر از محصول PCR هر نمونه با ۲-۱ میکرولیتر بافر سنگین کننده، همزمان با شاخص وزنی استاندارد DNA (1 kb) در چاهکی جداگانه ریخته شدند و سپس بوسیله ایجاد جریان الکتریسیته یکنواخت (۷۰۰ V بمدت ۴ ساعت) و در بافر الکتریکی TAE با غلظت 1X در یک میدان مغناطیسی به حرکت درآمدند. پس از اتمام الکتروفورز، ژل محتوی DNA در داخل دستگاه Biometra Gel – Documentation که اشعه UV با طول موج ۲۵۴ نانومتر ساطع می کند، قرار داده شد که بعلت وجود اتیدیوم بروماید در نمونه ها، باندهای حاصل از فرایند PCR قابل رویت بودند. تصاویر ژل‌های بدست آمده از دستگاه مستندسازی ژل ثبت و جهت امتیازدهی برای تجزیه و تحلیل های آماری آماده گردیدند.

۲-۶- تجزیه و تحلیل آماری

پس از مشخص شدن اندازه دقیق باندهای حاصله، در مقایسه با اندازه شاخص وزنی DNA، در هر ژل در صورت حضور باند، امتیاز یک و در صورت فقدان باند امتیاز صفر داده شد. برای این منظور ابتدا برای هر گروه مورد بررسی، جدولی تهیه شد که در ستون های آن افراد مختلف هر گروه منفرد و در ردیف های آن جایگاه های

مختلف هر آغازگر، به ترتیب از قطعات سنگین‌تر به سبک‌تر درج گردید. این جدول برای همه افراد در گروه‌های مختلف طبقه بندی شد و تمام آغازگرهای بکار رفته تکمیل شد. برای امتیازدهی، از باندهایی که از کیفیت خوب و تکرارپذیری بالا (سه بار تکرار) برخوردار بودند استفاده گردید. کلیه باندهای پلی مورف و مونومورف حاصله که قابل رویت بودند در ماتریس ۱/۰ امتیازدهی گردیدند. پارامترهای ژنتیکی استاندارد با استفاده از برنامه کامپیوتری PoPGENE ver. 1.31 (Yeh *et al.*, 1999) محاسبه گردیدند. این پارامترها شامل ضرایب شانن (I) و تنوع ژنی (h) و درصد باندهای پلی مورف و میزان متوسط الل‌ها (Na) و میزان مؤثر الل‌ها (Ne) بودند. مقادیر عددی تفاوت‌ها یا تشابهات ژنتیکی بدست آمده مابین آرتمیاهای مورد بررسی، با ماتریس مربوطه جهت محاسبات بعدی به برنامه آماری NTSYS-PC (Rohlf, 1990) منتقل شدند. تجزیه و تحلیل خوشه‌ای برای جمعیت‌های مختلف مورد مطالعه، براساس میانگین فاصله ژنتیکی نی (Nei, 1973) افراد بدست آمده با استفاده از روش UPGMA با برنامه Sahn موجود در نرم افزار آماری NTSYS-PC انجام گردید.

تفاوت ژنتیکی مابین جمعیت‌ها و افراد با استفاده از مقدار عددی G_{ST} محاسبه گردید که براساس آن میزان جریان ژنی (N_m) نیز در نمونه‌های مطالعاتی طبق فرمول ذیل تعیین گردید:

$$N_m = 0.5 (1/G_{ST}-1)$$

(McDermott and McDonald, 1993)

به منظور تعیین تفاوت‌های ژنتیکی مابین افراد داخل جمعیت‌ها و مابین جمعیت‌ها در داخل نواحی و مابین نواحی و نیز ساختار ژنتیکی افراد، از آزمون آماری AMOVA موجود در برنامه Arlequin استفاده گردید.

(AMOVA ; Excoffier *et al.*, 1992; Schneider *et al.*, 2000)

آزمون AMOVA بمنظور تعیین میزان عددی F_{ST} برای دو حالت گروه‌های بدست آمده حاصل از نمودار خویشاوندی و نیز براساس پراکنندگی جغرافیایی نمونه‌ها، انجام گرفت. برای تشخیص دقیق‌تر روابط ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها، تجزیه و تحلیل مؤلفه‌های هماهنگ اصلی (PCA) براساس فاصله ژنتیکی Nei انجام شد.

های مورد استفاده برای

| شماره آغازگر | توالی آغازگر |
|--------------|--------------|
| 1 | ACCCGGTCAC |
| 2 | TTCGAGCCAG |
| 3 | CCGCATCTAC |
| 4 | GAACGGACTC |
| 5 | GTCCCGACGA |
| 6 | GGCTGCAGAA |
| 7 | TGCTGCAGGT |
| 8 | CCAGTACTCC |
| 9 | GGAGTACTGG |
| 10 | AACCCGGGAA |
| 11 | TTCCCGGGTT |
| 12 | TCAGGGAGGT |
| 13 | CTCACCCGA |
| 14 | GACTGCCTCT |
| 15 | GTGACCGAGT |
| 16 | TCGCATCCCT |
| 17 | CTGATGCGTG |
| 18 | ACACCGGAAC |
| 19 | TTCAGGGCAC |
| 20 | TGTGGCAGCA |
| 21 | GACTAAGCCC |
| 22 | TCTGAGGTTC |
| 23 | TCCCCATCAC |
| 24 | GGGGATGAG |
| 25 | GGCGGTGTC |
| 26 | TTCGGGCCGT |
| 27 | GAGGACGTCC |
| 28 | GCACCGAGAG |
| 29 | GCTGCGTGAC |
| 30 | CTCAGCCCAG |
| 31 | AAGCCTCCCC |
| 32 | GAGTAAGCGG |
| 33 | CCACTCACCG |
| 34 | CCGGGCAAGC |
| 35 | AGGAAGGTGC |
| 36 | CAGGCGCACA |
| 37 | GGGCGCCTAG |
| 38 | CCGCTGGGAG |
| 39 | CRACTCACAG |
| 40 | CTAGAGGTCC |
| 41 | GCAGGGCCGA |
| 42 | AGGGAGTTCC |
| 43 | CGGTGACATC |
| 44 | CGACCAGAGC |
| 45 | CTGTCCAGCA |
| 46 | CTGAAGCGGA |
| 47 | TACCGACGGA |
| 48 | TTCCCCGCGA |
| 49 | GGGTGTGTAG |
| 50 | AGGACTGCCA |
| 51 | AATGCCGCAG |
| 52 | GGATGCCACT |
| 53 | GGTGAACGCT |

جدول ۱-۲- توالی آغازگر
آزمایشهای RAPD

| | |
|----|------------|
| 54 | CAGAAGCGGA |
| 55 | GGCGGATAAG |
| 56 | CATAGACTCC |

۳-۱- برآورد کمی و کیفی DNA استخراج شده

بررسی باندهای DNA بر روی ژل آگارز و مشاهده وضوح و تراکم باندهای تولید شده، نشان داد که نمونه‌های DNA استخراج شده از کیفیت و کمیت قابل قبولی برای استفاده در آزمایشات PCR برخوردار بودند. شکل ۳-۱ نمونه‌ای از نوارهای DNA آشکار شده را نشان می‌دهد. محاسبه نسبت میزان جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر به میزان جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر نیز نشان داد که این نسبت در مورد تمام نمونه‌های استخراج شده بر پایه معیار عددی ۱/۸ متغیر بود.

۳-۲- برآورد سطح تنوع ژنتیکی بر اساس نشانگرهای مولکولی RAPD's

۳-۲-۱- چند شکلی نشانگرهای RAPD's در گروههای مختلف مطالعاتی آرتمیا

از مجموع ۵۶ آغازگر تصادفی با طول ۱۰ جفت باز، تعداد ۲۹ آغازگر در گروههای I و II و ۲۶ آغازگر در گروه III آرتمیاهای، چند شکلی را در بین نمونه‌های مورد بررسی ایجاد کردند. در نتیجه، کلیه آنالیزهای آماری براساس این تعداد آغازگر انجام گردیدند. گروه I شامل نمونه‌های آرتمیا ارومیانا، آرتمیای بکرزا منطقه روستای سرای و آرتمیای بکرزا منطقه دشت فسندوز بمنظور مطالعه آرتمیاهای دریاچه ارومیه و نواحی اطراف و گروه II شامل نمونه‌های آرتمیا ارومیانا، آرتمیاهای استانهای قم، مرکزی (اراک)، گلستان، شیراز، *Artemia parthenogenetica*, *Artemia parthenogenetica*, (Russia), *Artemia sinica* (China), *franciscana* (USA) (Turkmenistan) بمنظور مطالعه روابط فیلوژنتیک آرتمیاهای ایران با برخی گونه‌های خارجی و تخمین فواصل ژنتیکی مابین آنها، و گروه III شامل آرتمیا ارومیانا، آرتمیا بکرزای منطقه روستای سرای، آرتمیا بکرزای منطقه دشت فسندوز، آرتمیاهای قم، اراک، شیراز و گلستان بمنظور مطالعه روابط ژنتیکی آرتمیاهای دریاچه ارومیه و نواحی اطراف با آرتمیاهای سایر نقاط ایران بودند. تعداد کل نوارهای تکثیر شده به کمک این آغازگرها در گروههای I و II و III به ترتیب برابر با ۱۹۹، ۲۶۲ و ۲۱۸ بودند که از این تعداد بترتیب ۱۹۳ و ۲۵۹ و ۲۱۱ نوار بعنوان نوارهای ناهمسان در گروههای فوق ظاهر شدند. دامنه طولی نوارهای تکثیر شده ۱۰۰-۲۸۰۰ باز در گروه I و ۱۰۰-۳۵۰۰ باز در گروه II و ۱۰۰-۲۸۰۰ باز در گروه III متغیر بودند. بر این اساس، درجه ناهمگونی در گروههای I و II و III به ترتیب برابر با ۹۷، ۹۸/۸ و ۹۶/۷ درصد و میزان کل همگونی در سه گروه مذکور به

ترتیب برابر با ۱/۳، ۲ و ۳/۳ درصد بوده است. درصد نوارهای ناهمگون و همگون و میانگین آنها برای هر یک از نمونه‌های آرتمیا در گروه‌های متفاوت مطالعاتی، در جداول ۲-۳، ۳-۵ و ۳-۸ آورده شده است.

تعداد نوارهای ایجاد شده به ازای هر آغازگر، در گروه I از ۱۲ نوار برای نشانگر شماره ۲۲ تا یک نوار برای نشانگر شماره ۱۶ متغیر بودند. این مقادیر در گروه II از ۱۴ نوار برای نشانگرهای شماره یک و ۵ و ۱۳ و ۱۸ تا ۳ نوار برای نشانگر شماره ۹ متغیر بودند. در گروه III تعداد نوارها، از ۱۴ نوار برای نشانگر شماره ۲ تا ۴ نوار برای نشانگر شماره ۱۴ متغیر بودند. توالی آغازگرهای مورد استفاده و تعداد کل نوارهای تولیدی و ناهمسان و دامنه اوزان مولکولی برای هر یک از آغازگرها، در گروه‌های متفاوت آرتمیا بترتیب در جداول ۱-۳، ۳-۴ و ۳-۷ آورده شده است. الگوی نواری RAPD's حاصل از آغازگرهای مختلف برای نمونه‌های آرتمیای مورد بررسی در اشکال ۲-۳ و ۳-۳ مشخص شده است.

۲-۲-۳- برآورد تنوع ژنتیکی درون و مابین نمونه‌های آرتمیا در گروه‌های مختلف مطالعاتی

براساس شاخص تنوع ژنتیکی Nei (Nei, 1973)، میزان مقادیر تنوع ژنتیکی آن در داخل نمونه‌های آرتمیا در گروه I از ۰/۱۴-۰/۲۷ و در گروه II از ۰/۰۱-۰/۱۱ و در گروه III از ۰/۰۳-۰/۰۲ برآورد گردیدند. بیشترین میانگین تنوع ژنتیکی Nei در داخل نمونه‌های گروه I مربوط به نمونه *Artemia urmiana* و کمترین آن مربوط به نمونه آرتمیای بکرزای منطقه دشت فسندوز بود (جدول ۳-۳). بیشترین میزان تنوع ژنتیکی نی در داخل نمونه‌های گروه II مربوط به نمونه‌های آرتمیای شیراز و کمترین میزان آن مربوط به نمونه آرتمیای پارتنوژنتیکا (روسیه) بود (جدول ۳-۶). در بین نمونه‌های گروه III، بیشترین میزان تنوع ژنتیکی مربوط به نمونه آرتمیای بکرزای منطقه روستای سرای و کمترین آن مربوط به نمونه‌های آرتمیا نواحی اراک و گلستان بودن (جدول ۳-۹).

بیشترین میزان شاخص شانن در داخل نمونه‌های گروه I مربوط به نمونه‌های *Artemia urmiana* و کمترین میزان مربوط به نمونه‌های آرتمیای بکرزای منطقه دشت فسندوز بود (جدول ۳-۳). بیشترین میزان این شاخص در گروه II مربوط به نمونه‌های شیراز و کمترین میزان مربوط به نمونه‌های پارتنوژنتیکا (روسیه) بود (جدول ۳-۶). بر این اساس، در گروه III نمونه‌های آرتمیای بکرزای منطقه روستای سرای دارای بیشترین مقدار شاخص شانن و نمونه‌های آرتمیای اراک و گلستان دارای کمترین مقدار این شاخص بودند (جدول ۳-۹). میزان عددی

پارامترهای ژنتیکی استاندارد برای هر یک از نمونه‌های آرتمیا در گروه‌های مختلف مطالعاتی، در جداول مربوطه آورده شده است.

میانگین‌های کل تنوع ژنتیکی در گروه‌های I، II و III به ترتیب برابر با ۰/۳، ۰/۳۲ و ۰/۳۱ بودند. میانگین‌های تنوع ژنتیکی در درون نمونه‌ها، در گروه‌های فوق به ترتیب برابر با ۰/۲۱، ۰/۰۵ و ۰/۰۹ بودند. مقادیر تنوع ژنتیکی مابین نمونه‌ها، در گروه‌های I، II و III به ترتیب برابر با ۰/۰۹، ۰/۲۷ و ۰/۲۲ بودند. میانگین درجه تمایز ژنی در گروه‌های سه گانه مذکور به ترتیب برابر با ۰/۳، ۰/۸۲ و ۰/۷ بودند. مقادیر مربوط به جریان ژنی در داخل نمونه‌های گروه‌های I، II و III به ترتیب، برابر با ۱/۱۴، ۰/۱ و ۰/۲ بودند. میانگین‌های هتروزیگوسیتی در نمونه‌های سه گروه I، II و III به ترتیب، برابر با ۰/۲۴، ۰/۰۸ و ۰/۱ بودند.

۳-۳- برآورد فاصله ژنتیکی و تجزیه خوشه‌ای نمونه‌های آرتمیا براساس داده‌های مولکولی

فواصل ژنتیکی مابین نمونه‌های آرتمیا در گروه‌های مختلف مطالعاتی، بصورت ماتریسی براساس فاصله ژنتیکی Nei، برآورد شدند. بیشترین میزان فاصله ژنتیکی در گروه I، مابین نمونه‌های آرتمیای بکرزای منطقه روستای سرای و *Artemia urmiana* با مقدار عددی ($D = 0/22$) و نیز کمترین فاصله ژنتیکی مابین نمونه‌های آرتمیای بکرزای منطقه روستای سرای و دشت فسندوز، با مقدار عددی ($D = 0/16$) بودند. میانگین فواصل ژنتیکی در حدود $D = 0/2$ تعیین گردید. بیشترین میزان فاصله ژنتیکی در گروه II مابین نمونه‌های آرتمیای استان گلستان و *Artemia franciscana* با مقدار عددی (۰/۸) و نیز کمترین فاصله، مابین نمونه‌های آرتمیای قم و اراک، با مقدار عددی $D = 0/09$ بودند. میانگین فواصل ژنتیکی در حدود $D = 0/4$ تعیین گردید. بیشترین میزان فاصله ژنتیکی در گروه III، مابین نمونه‌های آرتمیای شیراز و گلستان با مقدار ($D = 0/87$) و کمترین فاصله ژنتیکی، مابین نمونه‌های آرتمیای قم و اراک ($D = 0/09$) بودند. میانگین فواصل ژنتیکی در حدود $D = 0/37$ محاسبه گردید.

ترسیم نمودارهای شجره‌ای (تجزیه خوشه‌ای) نمونه‌های آرتمیا در سه گروه مورد بررسی، بر اساس فاصله ژنتیکی Nei و به روش UPGMA انجام گرفت. براساس نتایج حاصله، گروه I به دو خوشه مجزا تقسیم شد، بطوریکه خوشه اول مربوط به نمونه‌های آرتمیای بکرزای منطقه روستای سرای و دشت فسندوز و خوشه دوم شامل نمونه‌های *Artemia urmiana* بودند. در گروه II، نمونه‌ها در چهار خوشه مجزا قرار گرفتند، خوشه اول شامل نمونه‌های آرتمیای قم، اراک، گلستان، روسیه و ترکمنستان، خوشه دوم شامل *Artemia sinica* و خوشه

سوم شامل *Artemia urmiana* و خوشه چهارم دربرگیرنده نمونه‌های آرتمیای شیراز و *Artemia franciscana* بودند. نمونه‌های گروه III تشکیل چهار خوشه مجزا را دادند، خوشه اول شامل نمونه‌های آرتمیای بکرزای منطقه روستای سرای و دشت فسندوز، خوشه دوم شامل *Artemia urmiana* و خوشه سوم شامل نمونه‌های آرتمیای قم، اراک، گلستان و خوشه چهارم شامل نمونه‌های آرتمیای شیراز و *Artemia franciscana* بودند. نمودارهای شجره‌ای ترسیم شده برای نمونه‌های گروه‌های I، II و III به ترتیب در اشکال ۴-۳۴، ۶-۳ و ۸-۳ ارائه شده‌اند.

۴-۳ تجزیه واریانس مولکولی و تحلیل به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی، براساس داده‌های مولکولی

نتایج تجزیه واریانس مولکولی برای کلیه نمونه‌های آرتمیا در گروه I، حاکی از معنی دار بودن تفاوت آنها در داخل و مابین نمونه‌ها بود ($F_{ST} = 0/35$). بیشترین پلی مورفیسم جمعیتی مربوط به تغییرات داخل جمعیت‌ها بود (۶۵/۱۳). نتایج آزمون واریانس مولکولی برای کلیه نمونه‌های آرتمیا در گروه II، حاکی از معنی دار بودن تفاوت آنها در داخل و مابین نمونه‌ها بود ($F_{ST} = 0/76$). در این خصوص، بیشترین پلی مورفیسم جمعیتی مربوط به تغییرات مابین نمونه‌های آرتمیا از مناطق مختلف جغرافیایی بود (۷۶/۱۶). تحلیل‌های انجام شده، همچنین حاکی از معنی دار بودن تفاوت‌های ژنتیکی در داخل و مابین نمونه‌های گروه II بود ($F_{ST} = 0/8$). در این بین، بیشترین میزان پلی مورفیسم جمعیتی ناشی از تغییرات حاصله مابین نمونه‌های آرتمیا بودند (۵۶/۱۷). نتایج آنالیز واریانس مولکولی برای کلیه نمونه‌های آرتمیا در گروه III حاکی از معنی دار بودن تفاوت بین آنها بودند ($F_{ST} = 0/7$). در این بین، بیشترین پلی مورفیسم جمعیتی حاصل از تغییرات مابین نمونه‌های آرتمیا بودند (۶۹/۱۴). نتایج این آزمون برای گروه III، براساس طبقه بندی درخت خویشاوندی، حاکی از معنی دار بودن تفاوت بین و داخل نمونه‌ها بودند ($F_{ST} = 0/73$). بیشترین پلی مورفیسم جمعیتی در گروه‌های مذکور مربوط به تغییرات مابین نمونه‌های آرتمیا بودند (۴۲/۵). در کلیه تیمارهای آماری، میزان عددی ضریب شاخص تثبیت، با میانگین درجه تمایز ژنی حاصله، مطابقت آماری داشت. بمنظور تعیین روابط ژنتیکی بین نمونه‌های آرتمیا و مشاهده فواصل بین نمونه‌ها بصورت سه بعدی، تحلیل مؤلفه‌های هماهنگ اصلی (PCA) نیز بعنوان روشی مکمل برای تجزیه خوشه‌ای انجام گرفت. نمایش سه بعدی نمونه‌ها براساس مؤلفه‌های اصلی، گروه بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای را کاملاً تایید کرد و توانست نمونه‌های آرتمیاهای مورد بررسی را همانند تجزیه خوشه‌ای از هم تفکیک نماید. نمایش سه بعدی برای گروه‌های I، II و III به ترتیب، در اشکال ۵-۳، ۷-۳ و ۹-۳ آورده شده است.

جدول ۱-۳: توالی آغازگرها و مشخصات نوارهای تولید شده از هر یک از آنها (گروه I)

| شماره آغازگر | توالی آغازگر | تعداد و درصد نوارهای چند شکل | دامنه اوزان مولکولی (جفت باز) |
|--------------|-----------------|------------------------------|-------------------------------|
| ۱ | 5- TTCGAGCCAG-3 | ۷(۸۷/۵) | ۲۵۰-۱۵۰۰ |
| ۲ | 5- CCGCATCTAC-3 | ۶(۱۰۰) | ۱۰۰-۸۰۰ |
| ۳ | 5- GAACGGACTC-3 | ۷(۱۰۰) | ۲۰۰-۱۴۰۰ |
| ۴ | 5- GTCCCGACGA-3 | ۸(۱۰۰) | ۲۵۰-۲۰۰۰ |
| ۵ | 5- GGCTGCAGAA-3 | ۱۱(۱۰۰) | ۳۵۰-۱۵۰۰ |
| ۶ | 5- TGCTGCAGGT-3 | ۸(۱۰۰) | ۲۰۰-۲۳۰۰ |
| ۷ | 5- GGAGTACTGG-3 | ۹ (۱۰۰) | ۴۰۰-۲۰۰۰ |
| ۸ | 5- TCAGGGAGGT-3 | ۴ (۱۰۰) | ۳۰۰-۱۲۰۰ |
| ۹ | 5- CTTCACCCGA-3 | ۱۰ (۱۰۰) | ۲۰۰-۱۷۰۰ |
| ۱۰ | 5- GACTGCCTCT-3 | ۹ (۱۰۰) | ۲۵۰-۱۳۰۰ |
| ۱۱ | 5- GTGACCGAGT-3 | ۸ (۱۰۰) | ۲۵۰-۱۳۰۰ |
| ۱۲ | 5- TCGCATCCCT-3 | ۵ (۱۰۰) | ۳۵۰-۱۲۰۰ |
| ۱۳ | 5- CTGATGCGTG-3 | ۸ (۱۰۰) | ۲۰۰-۱۶۰۰ |
| ۱۴ | 5- ACACCGGAAC-3 | ۲ (۶۶/۶) | ۸۰۰-۱۵۰۰ |
| ۱۵ | 5- TCCCCATCAC-3 | ۵ (۱۰۰) | ۵۰۰-۹۰۰ |
| ۱۶ | 5- GGCGGTTGTC-3 | ۱ (۱۰۰) | ۶۰۰ |
| ۱۷ | 5- TTCGGGCCGT-3 | ۹ (۱۰۰) | ۲۵۰-۱۷۰۰ |
| ۱۸ | 5- GAGGACGTCC-3 | ۴ (۸۰) | ۲۰۰-۱۷۰۰ |
| ۱۹ | 5- GCACCGAGAG-3 | ۵ (۱۰۰) | ۳۵۰-۱۴۰۰ |
| ۲۰ | 5- GCTGCGTGAC-3 | ۴ (۸۰) | ۴۰۰-۱۴۰۰ |
| ۲۱ | 5- CTCAGCCCAG-3 | ۹ (۱۰۰) | ۲۵۰-۱۷۰۰ |
| ۲۲ | 5- CCACTCACCG-3 | ۱۲ (۱۰۰) | ۳۰۰-۲۸۰۰ |
| ۲۳ | 5- CCGGGCAAGC-3 | ۵ (۱۰۰) | ۴۰۰-۱۴۰۰ |
| ۲۴ | 5- CAGGCGCACA-3 | ۴ (۸۰) | ۱۵۰-۸۰۰ |
| ۲۵ | 5- GGGCGCCTAG-3 | ۶(۱۰۰) | ۲۰۰-۱۳۰۰ |
| ۲۶ | 5- CCGCTGGGAG-3 | ۸ (۸۹) | ۱۰۰-۱۶۰۰ |
| ۲۷ | 5- AGGAAGGTGC-3 | ۷(۱۰۰) | ۳۵۰-۲۰۰۰ |
| ۲۸ | 5- GAGTAAGCGG-3 | ۷(۱۰۰) | ۳۵۰-۱۲۰۰ |
| ۲۹ | | ۵(۱۰۰) | ۴۰۰-۱۴۰۰ |

جدول ۲-۳: تعداد، درصد و میانگین نوارهای غیر همسان و همسان در نمونه‌های متفاوت آرتمیا (گروه I)

| نمونه‌های آرتمیا | PAS* | PAF** | AU*** | مجموع |
|---|------------|------------|-------------|-----------|
| تعداد و درصد نوارهای غیر همسان | ۱۱۹ (۵۹/۸) | ۸۳ (۴۱/۷۱) | ۱۵۷ (۷۸/۸۹) | - |
| تعداد و درصد نوارهای همسان | ۸۰ (۴۰/۲) | ۱۱۶ (۵۸/۲) | ۴۲ (۲۱/۱) | - |
| میانگین نوارهای غیر همسان به ازای هر آغازگر | ۴/۱ | ۲/۸۶ | ۵/۴ | - |
| میانگین نوارهای همسان به ازای هر آغازگر | ۲/۷۵ | ۴ | ۱/۴۴ | - |
| تعداد کل نوار ایجاد شده | ۱۹۹ | ۱۹۹ | ۱۹۹ | ۱۹۹ |
| تعداد کل نوارهای قابل استفاده | — | — | — | ۱۹۳ (%۹۷) |
| میانگین کل نوارهای قابل استفاده | — | — | — | ۶/۶۵ |
| میانگین کل نوارهای غیر قابل استفاده | — | — | — | ۰/۲ |

PAS* (آرتمیای بکرزا منطقه روستای سرای)

PAF** (آرتمیای بکرزا منطقه دشت فسندوز)

AU*** (آرتمیای دریاچه ارومیه)

جدول ۳-۳: مقادیر ضرایب ژنتیکی Nei و شانن، متوسط تعداد آلل‌ها و میزان مؤثر آنها با استفاده از برنامه آماری Popgene برای نمونه‌های متفاوت آرتمیا (گروه I)

| پارامترهای ژنتیکی استاندارد | | | | گونه / سوبه آرتمیا |
|-----------------------------|------|------|------|-----------------------------------|
| I | h | Ne | Na* | |
| ۰/۴۱ | ۰/۲۷ | ۱/۴۷ | ۱/۷۸ | ۱ آرتمیای دریاچه ارومیه |
| ۰/۳۲ | ۰/۲۲ | ۱/۳۹ | ۱/۵۹ | ۲ آرتمیای بکرزا منطقه روستای سرای |
| ۰/۲۲ | ۰/۱۴ | ۱/۲۶ | ۱/۴۱ | ۳ آرتمیای بکرزا منطقه دشت فسندوز |

Na* = متوسط تعداد آلل‌ها

Ne = میزان مؤثر آلل‌ها

h = ضریب تنوع ژنتیکی

I = ضریب شانن

جدول ۴-۳: توالی آغازگرها و مشخصات نوارهای تولید شده از هر یک از آنها (گروه II)

| شماره آغازگر | توالی آغازگر | تعداد و درصد نوارهای چند شکل | دامنه اوزان مولکولی (جفت باز) |
|--------------|------------------|------------------------------|-------------------------------|
| ۱ | 5- ACCCGGTCAC -3 | 14(100) | ۲۰۰-۱۸۰۰ |
| ۲ | 5- TTCGAGCCAG -3 | 8(100) | ۲۶۰-۱۵۰۰ |
| ۳ | 5- CCGCATCTAC -3 | 10(100) | ۲۵۰-۱۴۰۰ |
| ۴ | 5- GAACGGACTC -3 | 9(100) | ۲۰۰-۱۵۰۰ |
| ۵ | 5- GTCCCGACGA -3 | 14(100) | ۲۰۰-۱۵۰۰ |
| ۶ | 5- GGCTGCAGAA -3 | 9(100) | ۲۰۰-۱۶۰۰ |
| ۷ | 5- TGCTGCAGGT -3 | 7(87.5) | ۳۰۰-۱۳۰۰ |
| ۸ | 5- GGAGTACTGG -3 | 8(100) | ۳۰۰-۱۳۰۰ |
| ۹ | 5- TCAGGGAGGT -3 | 3(100) | ۳۵۰-۱۷۰۰ |
| ۱۰ | 5- CTTCACCCGA -3 | 8(100) | ۳۰۰-۱۷۰۰ |
| ۱۱ | 5- GACTGCCTCT -3 | 10(100) | ۳۰۰-۱۷۰۰ |
| ۱۲ | 5- CTTCACCCGA -3 | 10(100) | ۶۰۰-۱۱۰۰ |
| ۱۳ | 5- GACTGCCTCT -3 | 14(100) | ۶۰۰-۱۱۰۰ |
| ۱۴ | 5- GTGACCGAGT -3 | 7(100) | ۲۰۰-۳۵۰۰ |
| ۱۵ | 5- CTGATGCGTG -3 | 7(100) | ۲۵۰-۲۰۰۰ |
| ۱۶ | 5- ACACCGGAAC -3 | 7(100) | ۲۵۰-۲۰۰۰ |
| ۱۷ | 5- GACTAAGCCC -3 | 6(100) | ۲۰۰-۱۳۰۰ |
| ۱۸ | 5- TCCCATCAC -3 | 14(100) | ۲۰۰-۱۷۰۰ |
| ۱۹ | 5- TCCCATCAC -3 | 7(100) | ۲۰۰-۱۷۰۰ |
| ۲۰ | 5- GGGGGATGAG -3 | 4(100) | ۲۰۰-۱۹۰۰ |
| ۲۱ | 5- GGCGGTTGTC -3 | 12(100) | ۶۰۰-۱۸۰۰ |
| ۲۲ | 5- GAGGACGTCC -3 | 12(100) | ۶۰۰-۱۸۰۰ |
| ۲۳ | 5- GCACCGAGAG -3 | 8(100) | ۸۵۰-۱۵۰۰ |
| ۲۴ | 5- GCTGCGTGAC -3 | 6(100) | ۵۰۰-۱۳۰۰ |
| ۲۵ | 5- GCTGCGTGAC -3 | 6(100) | ۵۰۰-۱۳۰۰ |
| ۲۶ | 5- CTCAGCCCAG -3 | 11(91.6) | ۳۰۰-۲۷۰۰ |
| ۲۷ | 5- CCACTCACCG -3 | 9(100) | ۳۰۰-۲۷۰۰ |
| ۲۸ | 5- CCACTCACCG -3 | 9(100) | ۵۰۰-۳۵۰۰ |
| ۲۹ | 5- CCGGGCAAGC -3 | 9(100) | ۵۰۰-۳۵۰۰ |
| ۳۰ | 5- CAGGCGCACA -3 | 11(100) | ۲۵۰-۱۲۰۰ |
| ۳۱ | 5- GGGCGCCTAG -3 | | ۴۵۰-۲۷۰۰ |
| ۳۲ | 5- GGGCGCCTAG -3 | | ۴۵۰-۲۷۰۰ |
| ۳۳ | 5- CCGCTGGGAG -3 | | ۱۵۰-۳۰۰۰ |
| ۳۴ | 5- CCGCTGGGAG -3 | | ۱۵۰-۳۰۰۰ |
| ۳۵ | 5- AGGAAGGTGC -3 | | ۲۰۰-۱۱۰۰ |
| ۳۶ | 5- GAGTAAGCGG -3 | | ۲۰۰-۱۱۰۰ |
| ۳۷ | | | ۳۰۰-۸۵۰ |
| ۳۸ | | | ۳۰۰-۸۵۰ |
| ۳۹ | | | ۴۵۰-۱۰۰۰ |
| ۴۰ | | | ۴۵۰-۱۰۰۰ |
| ۴۱ | | | ۱۵۰-۱۶۰۰ |
| ۴۲ | | | ۱۵۰-۱۶۰۰ |
| ۴۳ | | | ۳۰۰-۱۳۰۰ |
| ۴۴ | | | ۳۰۰-۱۳۰۰ |
| ۴۵ | | | ۳۰۰-۱۷۰۰ |
| ۴۶ | | | ۳۰۰-۱۷۰۰ |
| ۴۷ | | | ۱۰۰-۲۰۰۰ |
| ۴۸ | | | ۱۰۰-۲۰۰۰ |
| ۴۹ | | | ۱۰۰-۲۰۰۰ |

جدول ۳-۵- تعداد، درصد و میانگین نوارهای غیر همسان و همسان در نمونه های متفاوت آرتمیا (گروه II)

| نمونه‌های آرتمیا | QOM* | MIG | MAH | INC | AS | AP.R | AP.T | AF | AU | مجموع |
|---|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| تعداد و درصد نوارهای غیر همسان | ۲۹ (۱۱/۰۷) | ۳۲ (۱۲/۲۱) | ۸۰ (۳۰/۵) | ۲۲ (۸/۴) | ۲۹ (۱۱/۰۷) | ۱۲ (۴/۵۸) | ۳۰ (۱۱/۴۵) | ۳۲ (۱۲/۲۱) | ۸۲ (۳۱/۳۰) | - |
| تعداد و درصد نوارهای همسان | ۲۳۳ (۸۸/۹) | ۲۳۰ (۸۷/۷) | ۱۸۲ (۶۹/۴) | ۲۴۰ (۹۱/۶) | ۲۳۳ (۸۸/۹) | ۲۵۰ (۹۵/۴) | ۲۳۲ (۸۸/۵) | ۲۳۰ (۸۷/۷) | ۱۸۰ (۶۸/۷) | - |
| میانگین نوارهای غیر همسان به ازای هر آغازگر | ۱ | ۱/۱ | ۲/۷۵ | ۰/۷۵ | ۱ | ۰/۴۱ | ۱/۰۳ | ۱/۱ | ۲/۸۲ | - |
| میانگین نوارهای همسان به ازای هر آغازگر | ۸/۰۳ | ۷/۹۳ | ۶/۲۷ | ۸/۲۷ | ۸/۰۳ | ۸/۶۲ | ۸ | ۷/۹۳ | ۶/۲ | - |
| تعداد کل نوار ایجاد شده | ۲۶۲ | ۲۶۲ | ۲۶۲ | ۲۶۲ | ۲۶۲ | ۲۶۲ | ۲۶۲ | ۲۶۲ | ۲۶۲ | - |
| تعداد کل نوارهای قابل استفاده | ۲۶۲ | ۲۵۳ | ۲۵۴ | ۲۶۲ | ۲۵۳ | ۲۶۲ | ۲۶۲ | ۲۴۴ | ۲۳۸ | ۲۵۹ (۹۸/۸) |
| میانگین کل نوارهای قابل استفاده | - | - | - | - | - | - | - | - | - | ۸/۹۳ |
| میانگین کل نوارهای غیر قابل استفاده | - | - | - | - | - | - | - | - | - | ۰/۱ |

QOM* (آرتمیای قم)؛ MIG (آرتمیای اراک)؛ MAH (آرتمیای شیراز)؛ INC (آرتمیای گلستان)؛ AS (آرتمیای سببیکا، چین)؛ AP.R (آرتمیای پارتنوژنیک، روسیه)؛

AP.T (آرتمیای پارتنوژنیک، ترکمنستان)؛ AF (آرتمیای فرانسیسکانه، آمریکا)؛ AU (آرتمیای ارومیه، ایران)

جدول ۶-۳: مقادیر ضرایب ژنتیکی Nei و شانن ، متوسط تعداد اللها و میزان مؤثر آنها با استفاده از برنامه آماری Popgene برای نمونه‌های متفاوت آرتمیا (گروه II)

| پارا مترهای ژنتیکی استاندارد | | | | گونه / سویه آرتمیا |
|------------------------------|------|------|------|--|
| I | h | Ne | Na* | |
| ۰/۰۶ | ۰/۰۴ | ۱/۰۷ | ۱/۱۱ | ۱ آرتمیای قم |
| ۰/۰۷ | ۰/۰۵ | ۱/۰۹ | ۱/۱۲ | ۲ آرتمیای اراک |
| ۰/۰۵ | ۰/۰۳ | ۱/۰۶ | ۱/۰۸ | ۳ آرتمیای گلستان |
| ۰/۱۷ | ۰/۱۱ | ۱/۲ | ۱/۳ | ۴ آرتمیای شیراز |
| ۰/۰۷ | ۰/۰۴ | ۱/۰۸ | ۱/۱۱ | ۵ <i>Artemia parthenogenetica</i> (Turkmenistan) |
| ۰/۰۲ | ۰/۰۱ | ۱/۰۳ | ۱/۰۴ | ۶ <i>Artemia parthenogenetica</i> (Russia) |
| ۰/۰۷ | ۰/۰۵ | ۱/۰۸ | ۱/۱۲ | ۷ <i>Artemia franciscana</i> |
| ۰/۰۶ | ۰/۰۴ | ۱/۰۷ | ۱/۱۱ | ۸ <i>Artemia sinica</i> |
| ۰/۱۶ | ۰/۱ | ۱/۱۸ | ۱/۳۱ | ۹ <i>Artemia urmiana</i> |

Na* = متوسط تعداد اللها

Ne = میزان مؤثر اللها

h = ضریب تنوع ژنتیکی

I = ضریب شانن

جدول ۲-۳: توالی آغازگرها و مشخصات نوارهای تولید شده از هر یک از آنها (گروه III)

| شماره آغازگر | توالی آغازگر | تعداد و درصد نوارهای چند شکل | دامنه اوزان مولکولی (جفت باز) |
|--------------|--------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| ۱ | 5- TTCGAGCCAG -3 5- CCGCATCTAC -3 | ۶(100) | ۲۶۰-۱۵۰۰ |
| ۲ | 5- GAACGGACTC -3 5- GTCCCGACGA -3 | 14(100) 9(100) | ۱۵۰-۱۵۰۰ |
| ۳ | 5- GGCTGCAGAA -3 5- TGCTGCAGGT -3 | 9(90) 8(100) | ۲۰۰-۱۵۰۰ |
| ۴ | 5- GGAGTACTGG -3 5- TCAGGGAGGT -3 | 11(100) 10(100) | ۲۰۰-۱۶۰۰ |
| ۵ | 5- GACTGCCTCT -3 5- GTGACCGAGT -3 | 5(100) 8(100) | ۳۵۰-۱۵۰۰ |
| ۶ | 5- CTGATGCGTG -3 5- ACACCGGAAC -3 | 8(100) 8(88.8) | ۲۳۰-۲۲۰۰ |
| ۷ | 5- ACACCGGAAC -3 5- GACTAAGCCC -3 | 13(100) 7(87.5) | ۴۰۰-۲۰۰۰ |
| ۸ | 5- TCCCCATCAC -3 5- GGCGGTTGTC -3 | 13(100) 7(87.5) | ۲۰۰-۱۲۰۰ |
| ۹ | 5- GGCGGTTGTC -3 5- GAGGACGTCC -3 | 6(85.7) 3(75) | ۲۵۰-۲۰۰۰ |
| ۱۰ | 5- GCACCGAGAG -3 5- GCTGCGTGAC -3 | 11(100) 5(100) | ۲۵۰-۱۳۰۰ |
| ۱۱ | 5- CTCAGCCAG -3 5- CCACTCACCG -3 | 5(100) 7(100) | ۲۰۰-۱۶۰۰ |
| ۱۲ | 5- CCGGGCAAGC -3 5- CAGGCGCACA -3 | 7(100) 9(100) | ۲۰۰-۱۹۰۰ |
| ۱۳ | 5- CAGGCGCACA -3 5- GGGCGCCTAG -3 | 9(100) 10(100) | ۶۰۰-۱۸۰۰ |
| ۱۴ | 5- GGGCGCCTAG -3 5- CCGCTGGGAG -3 | 10(100) 7(100) | ۶۰۰-۱۳۰۰ |
| ۱۵ | 5- CCGCTGGGAG -3 5- AGGAAGGTGC -3 | 7(100) 4(80) | ۳۰۰-۱۳۰۰ |
| ۱۶ | 5- AGGAAGGTGC -3 5- GAGTAAGCGG -3 | 7(100) 9(90) | ۳۵۰-۱۴۰۰ |
| ۱۷ | | 10(100) | ۲۵۰-۱۵۰۰ |
| ۱۸ | | 8(100) | ۲۵۰-۱۷۰۰ |
| ۱۹ | | 7(100) | ۱۵۰-۲۸۰۰ |
| ۲۰ | | | ۳۵۰-۱۵۰۰ |
| ۲۱ | | | ۱۵۰-۸۰۰ |
| ۲۲ | | | ۲۰۰-۱۳۰۰ |
| ۲۳ | | | ۱۰۰-۱۶۰۰ |
| ۲۴ | | | ۳۰۰-۲۰۰۰ |
| ۲۵ | | | ۳۰۰-۱۷۰۰ |
| ۲۶ | | | ۴۰۰-۱۴۰۰ |

جدول ۸-۳- تعداد، درصد و میانگین نوارهای غیر همسان و همسان در نمونه‌های متفاوت آرتیمیا (گروه III)

| نمونه‌های آرتیمیا | PAS* | PAF | QOM | MIG | MAH | INC | AU | مجموع |
|---|------------|-----------|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| تعداد و درصد نوارهای غیر همسان | ۱۱۸(۵۴/۱۳) | ۶۹(۳۱/۶۵) | ۲۴(۱۱) | ۲۰(۹/۱) | ۵۱(۲۳/۴) | ۱۹(۸/۷) | ۸۲(۳۷/۶) | - |
| تعداد و درصد نوارهای همسان | ۱۰۰(۴۵/۸) | ۱۴۹(۶۸/۳) | ۱۹۴(۸۹) | ۱۹۸(۹۰/۸) | ۱۶۷(۷۶/۶) | ۱۹۹(۹۱/۳) | ۱۳۶(۶۲/۴) | - |
| میانگین نوارهای غیر همسان به ازای هر آغازگر | ۴/۵ | ۲/۶ | ۰/۹ | ۰/۷۷ | ۱/۹۶ | ۰/۸۳ | ۳/۱۵ | - |
| میانگین نوارهای همسان به ازای هر آغازگر | ۳/۸۴ | ۵/۸۳ | ۷/۴۶ | ۷/۶۱ | ۶/۴۲ | ۷/۶۵ | ۵/۲۳ | - |
| تعداد کل نوار ایجاد شده | ۲۱۸ | ۲۱۸ | ۲۱۸ | ۲۱۸ | ۲۱۸ | ۲۱۸ | ۲۱۸ | - |
| تعداد کل نوارهای قابل استفاده | ۲۱۸ | ۱۹۴ | ۲۱۸ | ۲۱۰ | ۲۱۱ | ۲۱۸ | ۲۰۸ | ۲۱۱(۹۶/۷) |
| میانگین کل نوارهای قابل استفاده | ۸/۳۸ | ۷/۴۶ | ۸/۳۸ | ۸/۰۷ | ۸/۱۱ | ۸/۳۸ | ۸ | ۸/۱۱ |
| میانگین کل نوارهای غیر قابل استفاده | ۰ | ۰/۹۲ | ۰ | ۰/۳۱ | ۰/۲۷ | ۰ | ۰/۳۸ | ۰/۲۶ |

PAS* (آرتیمیا بکرزا منطقه روستای سرای)؛ PAF (آرتیمیا بکرزا منطقه دشت فسندوز)؛ QOM (آرتیمیا قم)؛ MIG (آرتیمیا اراک)؛ MAH (آرتیمیا شیراز)؛ INC (آرتیمیا گلستان)؛ AU (آرتیمیا ارومیان)

جدول ۹-۳: مقادیر ضرایب ژنتیکی Nei و شانن ، متوسط تعداد الل‌ها و میزان مؤثر آنها با استفاده از برنامه آماری Popgene برای نمونه‌های متفاوت آرتمیا (گروه III)

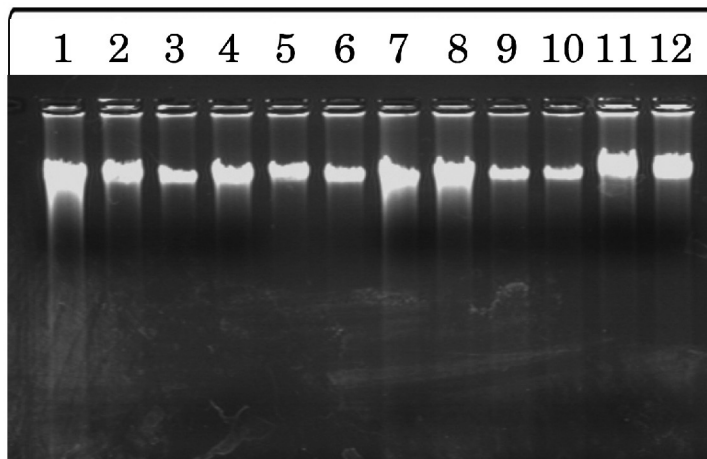
| پارامترهای ژنتیکی استاندارد | | | | گونه/ سویه آرتمیا |
|-----------------------------|------|------|------|-----------------------------------|
| I | h | Ne | Na* | |
| ۰/۳ | ۰/۲ | ۱/۳۶ | ۱/۵۴ | ۱ آرتمیای بکرزا منطقه روستای سرای |
| ۰/۱۶ | ۰/۱۱ | ۱/۱۸ | ۱/۳۱ | ۲ آرتمیای بکرزا منطقه دشت فسندوز |
| ۰/۰۶ | ۰/۰۴ | ۱/۰۸ | ۱/۱۱ | ۳ آرتمیای قم |
| ۰/۰۵ | ۰/۰۳ | ۱/۰۷ | ۱/۰۹ | ۴ آرتمیای اراک |
| ۰/۱۲ | ۰/۰۸ | ۱/۱۴ | ۱/۲۳ | ۵ آرتمیای شیراز |
| ۰/۰۵ | ۰/۰۳ | ۱/۰۶ | ۱/۰۸ | ۶ آرتمیای گلستان |
| ۰/۲ | ۰/۱۳ | ۱/۲۳ | ۱/۳۷ | ۷ آرتمیای ارومیا |

Na* = متوسط تعداد الل‌ها

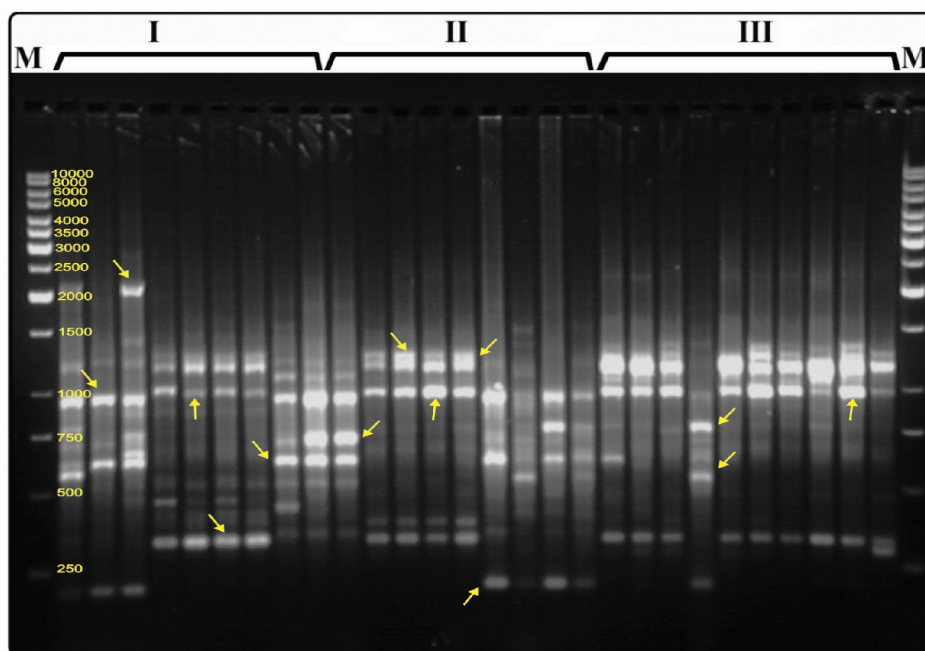
Ne = میزان مؤثر الل‌ها

h = ضریب تنوع ژنتیکی

I = ضریب شانن

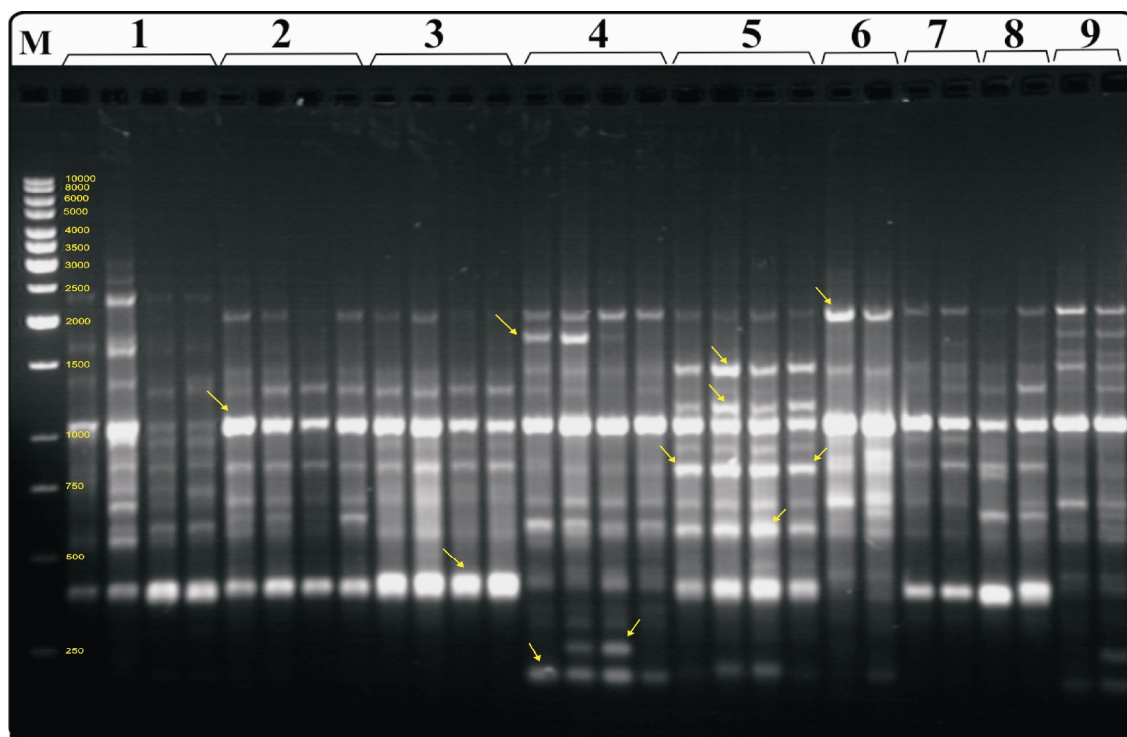


شکل ۱-۳: نمونه‌ای از نوارهای DNA ژنومی آشکار شده آرتمیای در ژل آگارز ۱ درصد. نمونه های ۱-۳: آرتمیای قم، نمونه های ۴-۶: آرتمیای اراک، نمونه های ۷-۹: آرتمیای پارتنوژنتیک، روسیه، نمونه های ۱۰-۱۲: آرتمیای بکرزا منطقه روستای سرای

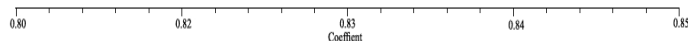


شکل ۲-۳: نمونه‌ای از الگوی نواربندی ژنتیکی نمونه‌های متفاوت آرتمیای، با استفاده از آغازگر شماره ۶ شاخص مولکولی RAPD (گروه I). I (آرتمیای بکرزا منطقه روستای سرای)؛ II (آرتمیای بکرزا منطقه دشت فسندوز)؛ III (*Artemia urmiana*) M (شاخص وزنی ۱Kb)

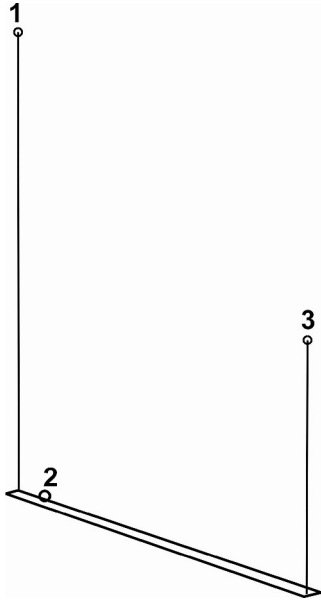
پیکان‌های علامت گذاری شده بیانگر باندهای نمره دهی در ماتریکس ۱/۰ می باشد.



شکل ۳-۳: نمونه‌ای از الگوی نواری بندی ژنتیکی نمونه‌های متفاوت آرتمیا، با استفاده از آغازگر شماره ۲۹ شاخص مولکولی RAPD (گروه II). ۱ (*Artemia urmiana*)؛ ۲ (آرتمیای قم)؛ ۳ (آرتمیای اراک)؛ ۳ (آرتمیای شیراز)؛ ۵ (آرتمیای گلستان)؛ ۶ (*Artemia sinica*)؛ ۷ (*Artemia parthenogenetica, Russia*)؛ ۸ (*Artemia parthenogenetica, Turkmenistan*)؛ ۹ (*Artemia franciscana*). (شاخص وزنی ۱Kb).
 پیکان‌های علامت گذاری شده بیانگر باند های نمره دهی در ماتریکس ۱/۰ می باشد.



شکل ۳-۴: گروه بندی گروه I نمونه‌های آرتمیا بر اساس داده‌های RAPD و با استفاده از روش UPGMA و فاصله ژنتیکی Nei

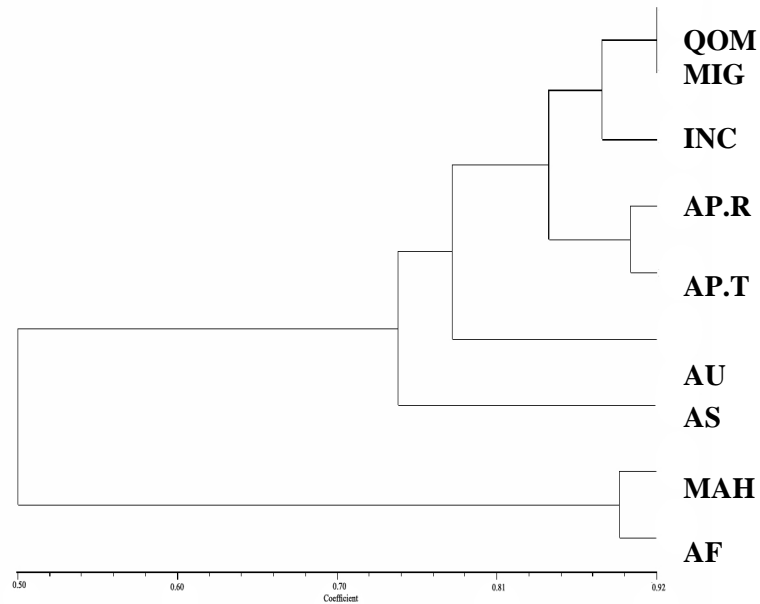


۱- آرتمیای بکرزا منطقه روستای سرای (PAS)

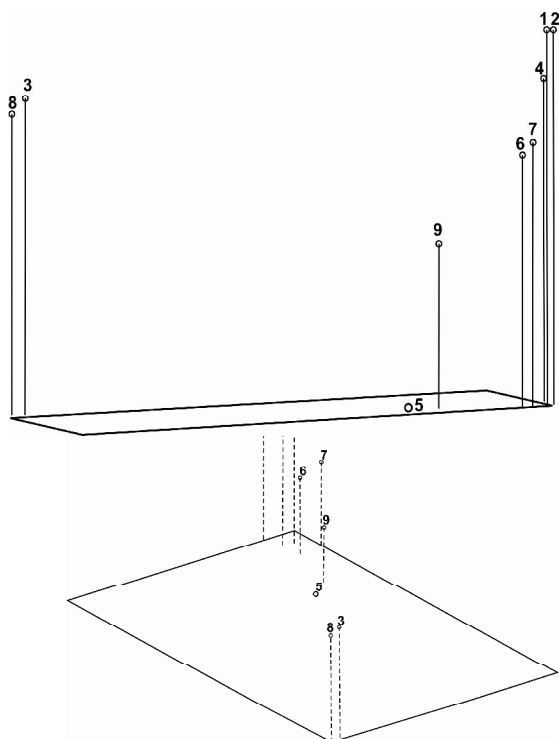
۲- آرتمیای بکرزا منطقه دشت فسندوز (PAF)

۳- آرتمیای ارومیان (AU)

شکل ۵-۳: نمایش سه بعدی ارتباط آرتمیای مورد بررسی، براساس تحلیل مؤلفه‌های هم‌هنگ اصلی حاصل از نشانگرهای RAPD

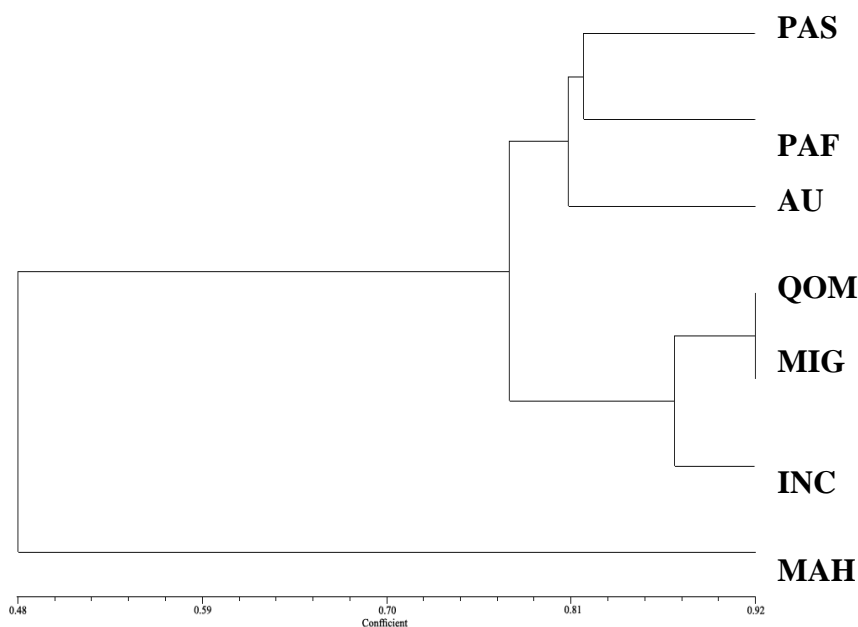


شکل ۶-۳: گروه بندی نمونه‌های آرتمیای، براساس داده‌های RAPD با استفاده از روش UPGMA و فاصله ژنتیکی Nei



- ۱- آرتمیای قم (QOM)
- ۲- آرتمیای اراک (MIG)
- ۳- آرتمیای شیراز (MAH)
- ۴- آرتمیای گلستان (INC)
- ۵- آرتمیای سینیکا (چین) (AS)
- ۶- آرتمیا پارتنوژنتیکا (روسیه) (AP.R)
- ۷- آرتمیا پارتنوژنتیکا (ترکمنستان) (AP.T)
- ۸- آرتمیا فرانسیسکانا (آمریکا) (AF)
- ۹- آرتمیا ارومیا (AU)

شکل ۷-۳: نمایش سه بعدی ارتباط آرتمیاهای مورد بررسی، براساس تحلیل مؤلفه‌های هماهنگ اصلی حاصل از نشانگرهای RAPD



شکل ۸-۳: گروه بندی گروه III نمونه‌های آرتمیا، براساس داده‌های RAPD و با استفاده از روش UPGMA

و فاصله ژنتیکی Nei

۱- آرتمیای بکرزای منطقه روستای سرای (APS)

۲- آرتمیای بکرزای منطقه دشت فسندوز (APF)

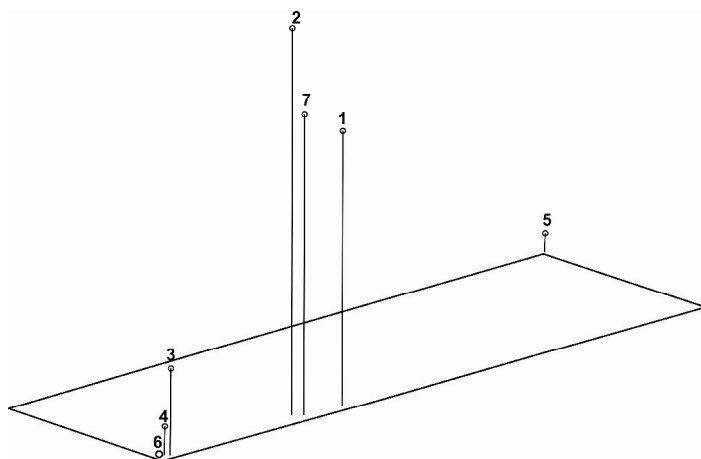
۳- آرتمیای قم (QOM)

۴- آرتمیای اراک (MIG)

۵- آرتمیای گلستان (INC)

۶- آرتمیای شیراز (MAH)

۷- آرتمیا ارومیان (AU)



شکل ۹-۳: نمایش سه بعدی ارتباط آرتمیاهای مورد بررسی، براساس تحلیل مؤلفه‌های هم‌هنگ اصلی حاصل

از نشانگرهای RAPD

۴- بحث و نتیجه گیری

در سالهای اخیر، پیشرفت‌های وسیعی در خصوص استفاده از تکنیک‌های مولکولی DNA به منظور شناسایی تغییرات ژنتیکی در بسیاری از گونه‌ها صورت گرفته است (Isabel *et al.*, 1999). در میان مابین انواع متعدد روش‌های مولکولی با قابلیت‌های متعدد در علوم زیستی، تکنیک RAPD مبتنی بر PCR روشی ساده و سریع در جهت شناسایی تفاوت‌های ژنتیکی، بر اساس تکثیر نقاط ژنومی با استفاده از پرایمرهای تصادفی می‌باشد (Williams *et al.*, 1990). بررسی تفاوت‌های ژنتیکی مابین جمعیت‌ها و نیز داخل افراد جمعیت‌های متفاوت، جهت بررسی تغییرات محیطی لازم و ضروری می‌باشند (Sole-Cava, 2001; Ryman *et al.*, 1995). اغلب جمعیت‌های طبیعی، دارای درجات بالائی از تفاوت‌های ژنتیکی می‌باشند (Sole-Cava, 2001). زمانیکه ذخایر ژنی یک جمعیت رو به کاهش نهد، آن جمعیت در مقابل تغییرات زیان بار محیطی آسیب پذیر واقع شده و در معرض انقراض و نابودی قرار خواهد گرفت (Guttman & Berg, 1998). در بیشتر گونه‌های ماهیان، اغلب رابطه‌ای بین میزان تفاوت ژنتیکی یک جمعیت بومی با نوع تغییرات محیطی وجود دارد (Bickham *et al.*, 2000; Cimmaruta *et al.*, 2003).

در راستای تعیین تفاوت‌های ژنتیکی، خصوصیات مورفولوژیک هر گونه، اطلاعات کاملی را در خصوص طبقه بندی و ساختار جمعیتی آن ارائه می‌دهند. مطالعات چندی در رابطه با خصوصیات ظاهری *Artemia urmiana* و آرتمیای بکرزای مناطق اطراف دریاچه ارومیه و نیز بیومتری سیست و لارو این دو نوع آرتمیا توسط محققین انجام گرفته و گروه بندی و تفکیک جمعیت‌ها بر اساس بررسی خصوصیات مورفومتریکی و مریستیک آنها صورت گرفته است (عاصم و همکاران ۱۳۸۴).

مطالعات آقای آق و همکاران (۱۹۹۷) نشان داده که آرتمیاهای بکرزا در اطراف دریاچه ارومیه به علت غلظت پایین اکسیژن آب و سنتز هموگلوبین، دارای رنگی کدر هستند و میزان نسبت نر به ماده در آنها ۱:۱۰۰ می‌باشد. طول فورکا در آرتمیای بکرزا بیشتر بوده و هر لوب فورکا در آن حاوی ۲۰ عدد ستا می‌باشد. پهنای کیسه رحمی در نوع بکرزا بیشتر است. از سوی دیگر، آرتمیای دوجنسی دریاچه ارومیه دارای رنگی اغلب سفید یا صورتی و نسبت نر به ماده ۱: ۲/۵ می‌باشد. طول کل بدن، شکم و تلسون زیاد است. هر لوب فورکا حاوی حداقل ۳ عدد ستا و پهنای سر و فاصله بین چشم‌های مرکب در آن بیشتر می‌باشد. در تحقیقی دیگر، تفاوت‌های

بیومتریکی در اندازه سیست، ناپلی، و متاناپلی آرتمیا ارومیا و آرتمیای بکرزا منطقه فسندوز توسط Asem و همکاران (۲۰۰۴) مورد مطالعه قرار گرفت. براساس نتایج حاصله، اندازه سیست، ناپلی و متاناپلی در آرتمیای بکرزای منطقه فسندوز نسبت به *Artemia urmiana* در شوری ppt ۳۵ کوچکتر و بنابراین از نظر اندازه بدنی، از کیفیت و پتانسیل مناسبی برای پرورش مصنوعی برخوردار بودند. از آنجائیکه تفکیک جمعیت‌ها و شناسایی ذخایر ژنتیکی، براساس داده‌های ریخت شناختی از درجه اطمینان کمتری نسبت به داده‌های مولکولی برخوردار است و تفاوت‌های مورفولوژیک نیز اساسا ریشه در تفاوت در ذخایر ژنومی هر موجود زنده دارند، لذا در مطالعه حاضر، تفاوت‌های ژنتیکی سویه‌های استرین‌های دو جنسی و بکرزای آرتمیای دریاچه ارومیه و نواحی اطراف دریاچه و نیز برخی نواحی دیگر کشور با شاخص ژنومی مورد بررسی و تحلیل آماری قرار گرفتند. براین اساس، بیشترین و کمترین میزان ناهمگونی ژنتیکی در گروه مطالعاتی آرتمیاهای دریاچه ارومیه و نواحی اطراف، مربوط به گونه *Artemia urmiana* ($P=78/89$) و آرتمیای بکرزای منطقه دشت فسندوز ($P=41/71$) بود. بیشترین میزان ناهمگونی، بدون در نظر گرفتن نمونه‌های فوق‌الذکر و مابین نمونه‌های آرتمیاهای ایران، مربوط به آرتمیای شیراز ($P=23/4$) و کمترین میزان، مربوط به آرتمیای گلستان ($P=8/7$) بود. در مطالعات انجام یافته پیرامون گونه‌های متفاوت آرتمیا، با استفاده از شاخص مولکولی RAPD درصد جایگاه‌های ناهمگون، از ۴۰ درصد در آرتمیای تبت (*Artemia tibetiana*) و *Artemia urmiana* تا ۲۵ درصد در *Artemia franciscana* از ویتنام متغیر بودند (Abatzopoulos et al., 2002). در تحقیقی دیگر، درصد جایگاه‌های ناهمگون شامل ۲۸/۸ درصد در *Artemia parthenogenetica, china*، ۲۶/۶ درصد در *Artemia sinica*، ۲۴/۹ درصد در *Artemia urmiana* و ۱۶/۱ درصد در *Artemia franciscana* متغیر بودند (Sun et al., 1999). با در نظر گرفتن مقادیر فوق، چنین استنباط می‌شود که درصد ناهمگونی حاصله در گروه مطالعاتی آرتمیاهای دریاچه ارومیه و مناطق اطراف بیشتر از مقادیر مشاهده شده در مطالعات گذشته بوده است. از سوی دیگر، آرتمیاهای ایران از درصد ناهمگونی کمتری نسبت به بقیه برخوردار بودند. بیشترین مقادیر عددی ضرایب ژنتیکی Nei و شانن، مربوط به آرتمیای دریاچه ارومیه ($h=0/27$ و $I=0/41$) و نیز در بین دو جمعیت آرتمیای بکرزای مطالعه شده، مربوط به آرتمیای بکرزای منطقه روستای سرای بود ($h=0/22$ و $I=0/32$). با توجه به مقادیر بدست آمده می‌توان چنین گفت که وجود جایگاه‌های نوکلئوتیدی متفاوت حداقل در تعدادی از ژنها منجر به بروز تنوع بالا و ناهمگونی ژنتیکی در

آرتمیای دریاچه ارومیه شده است. نتایج بدست آمده با استفاده از روش RAPD در گروه مطالعاتی آرتمیای دریاچه ارومیه و مناطق مجاور آن با نتایج مطالعات پیشین با استفاده از روش RFLP کاملاً همخوانی دارد، بطوریکه در این بررسی نیز بیشترین تغییرات ژنتیکی مربوط به تفاوت‌های ژنتیکی داخل جمعیت‌ها بوده است (Eimanifar et al., 2006) (۹۸/۲). از آنجا که بیشترین درصد ناهمگونی و تنوع ژنتیکی، مربوط به آرتمیای بکرزای منطقه روستای سرای بوده است، می‌توان چنین استنباط کرد که نمونه‌های این منطقه دستخوش بیشترین تغییرات محیطی قرار گرفته و تحمل بیشتری نسبت به تغییرات اکولوژیک یافته‌اند. به نظر می‌رسد که احتمالاً بروز پدیده "دگر باروری" با انواع متفاوت سیستم‌ها، ناشی از نقل و انتقال عوامل ناقل و بیولوژیک، منجر به بروز چنین تفاوت‌هایی گردیده است. با محاسبه مجموعه فواصل ژنتیکی Nei بین سه جمعیت مطالعاتی گروه I، دو خوشه کاملاً مجزای شجره‌ای، مشاهده شده اند (شکل ۴-۳). ضمن آنکه، آنالیز تجزیه مؤلفه‌های هم‌هانگ اصلی نیز گروه بندی حاصله را تایید کرده است. بر آن اساس میزان نسبی فواصل و تشابهات ژنتیکی مابین نمونه‌ها کاملاً مشهود است. بطوریکه میانگین فاصله ژنتیکی مابین نمونه‌ها، به میزان $D=0/2$ محاسبه گردید. در تحقیقی دیگر، دو خوشه کاملاً مجزای ژنتیکی براساس فواصل ژنتیکی مابین نمونه‌های *Artemia urmiana* از نواحی متفاوت جغرافیایی دریاچه ارومیه، و تفاوت در قطعات ژن rRNA بر اساس روش RFLP ایجاد گردید. ضمن آنکه، میانگین فاصله ژنتیکی مابین نمونه‌ها $D=0/195$ بود

(Eimanifar et al., 2006). در راستای مطالعات ژنتیکی، طبقه بندی و ترسیم نمودارهای شجره‌ای معیتی *Artemia urmiana* و جمعیت‌های بکرزای اطراف دریاچه ارومیه، براساس صفات مورفولوژیک آنها انجام شده است. Asem و همکاران (۲۰۰۵)، ارتباطات ریخت شناسی نمونه های *Artemia urmiana* از چهار ناحیه متفاوت جغرافیایی دریاچه ارومیه را براساس مقایسه ۱۲ فاکتور مورفولوژیک برای جنس نر و ۱۳ فاکتور مورفولوژیک برای جنس ماده، مورد مطالعه قرار گرفتند. حاصل نشان داد که آرتمیای دریاچه ارومیه حداقل ازدو جمعیت اکولوژیکی تشکیل شده است.

در تحقیقی دیگر، روابط ریخت شناختی مابین دو جمعیت آرتمیای بکرزا از نواحی اطراف دریاچه ارومیه براساس مقایسه ۱۳ فاکتور مورفولوژیک مورد مطالعه قرار گرفت. براساس نتایج حاصل، جمعیت‌های مذکور از

نظر شش صفت مورفولوژیک و نیز تعداد ستا در هر لوب فورکا اختلاف کاملاً معنی داری نشان دادند. ($P < 0/05$) (Atashbar et al., 2005).

لذا با توجه به تحقیقات و بررسی های مورفولوژیک و ژنتیکی بر روی جمعیت های متفاوت آرتمیای بکرزای اطراف دریاچه ارومیه، لزوم انجام مطالعات گسترده زیست شناختی بر روی نمونه های موجود در منطقه روستای سرای و امکان معرفی آرتمیای بکرزای این منطقه بعنوان نمونه ای با توان سیست زایی و افزایش محصول توصیه می شود. چرا که میانگین میزان هتروزیگوسیتی در این جمعیت آرتمیا از میزان بالایی برخوردار می باشد ($Het = 0/24$).

بیشترین مقادیر عددی ضرایب ژنتیکی Nei و شانن در گروه مطالعاتی آرتمیای ایران، بدون در نظر گرفتن سه جمعیت آرتمیای دریاچه ارومیه و مناطق اطراف، مربوط به آرتمیای شیراز ($I = 0/12$ و $h = 0/08$) و کمترین مقدار مربوط به آرتمیای اراک و گلستان ($I = 0/05$ و $h = 0/03$) بودند. میانگین فواصل ژنتیکی Nei مابین نمونه های آرتمیای ایران و دریاچه ارومیه در حدود $D = 0/36$ محاسبه گردید که بالاتر از مقدار محاسبه شده توسط Eimanifar و همکاران (۲۰۰۶) ($D = 0/195$) و تقریباً برابر با میزان بدست آمده در مطالعه Sun و همکاران (۱۹۹۹) ($D = 0/39$) بود.

ترکیب فواصل ژنتیکی Nei مابین جمعیت های آرتمیای بکرزای اطراف دریاچه ارومیه و آرتمیای بکرزای ایران، بیانگر آن بود که فاصله ژنتیکی بین آرتمیای شیراز و گلستان ($D = 0/8716$) بیشتر از فاصله بدست آمده مابین آرتمیای قم و اراک بود ($D = 0/0876$). در گروه بندی شجره ای آرتمیای ایران و جمعیت های بکرزای اطراف دریاچه ارومیه، بنظر می رسد که آرتمیای قم، اراک و گلستان بدلیل دارا بودن ضرایب ژنتیکی مشابه، در یک خوشه قرار گرفته اند، در حالیکه آرتمیای شیراز به علت داشتن فاصله ژنتیکی از جمعیت های بکرزای اطراف دریاچه ارومیه، در خوشه ای مجزا قرار گرفته است (شکل ۸-۳). آنالیز تحلیل مؤلفه های هماهنگ اصلی، گروه بندی حاصله را کاملاً تایید نمود. آنچنانکه در شکل ۶-۳ دیده می شود، بنظر می رسد که آرتمیای مناطق قم، اراک و گلستان، خصوصیات ژنتیکی مشابهی با نمونه های بکرزای خارجی یعنی آرتمیای پارتنوژنتیکا مناطق روسیه و ترکمنستان دارند. آرتمیای منطقه شیراز تشابه بیشتری با *Artemia franciscana* داشته و به همراه یکدیگر بصورت گروه خواهری در یک خوشه مجزا قرار گرفتند. میانگین ضرایب شانن و مقادیر

هتروزیگوسیتی بدست آمده برای آرتمیاهای مناطق قم، اراک و گلستان و نیز آرتمیاهای پارتنوژنتیک مناطق روسیه و ترکمنستان تاییدی بر گروه بندی مشاهده شده در نمودارهای شجره ای حاصل است (0.07 vs 0.04 ، $Het=0.04$ ، $I=0.06$ vs 0.045). آنالیز تحلیل مؤلفه‌های هماهنگ اصلی، طبقه بندی ارایه شده در شکل ۶-۳ را کاملاً تایید نمود. مقادیر میزان هتروزیگوسیتی بدست آمده برای آرتمیاهای شیراز و *Artemia franciscana* (0.12 vs 0.14 ، $Het=0.14$) تاییدی بر هم گروه شدن این آرتمیها می‌باشد. آنچه‌انکه در نمودار شجره ای شکل ۸-۳ دیده می‌شود در بررسی برخی از نمونه های آرتمیاهای ایران، آرتمیای منطقه شیراز بدلیل ضرایب بالای ژنتیکی شاخه ای مجزا را بخود اختصاص داده است. در مطالعات Badaracco و همکاران (۱۹۹۵) بروی استرین‌های متفاوت آرتمیای دو جنسی با استفاده از روش RAPD نیز *Artemia persimilis* بعلت داشتن ضرایب ژنتیکی بالا و بیشترین فاصله ژنتیکی از سایر آرتمیاهای مورد بررسی ($D=1/166$) و نیز آرایش کروموزومی متفاوت ($2n=44$)، از سایرین جدا شده و خوشه‌ای کاملاً مجزا را بخود اختصاص داده بود. با توجه به نتایج این تحقیق، چنین استنباط می‌شود که آرتمیای شیراز بوسیله گونه وارداتی *Artemia franciscana* جایگزین شده و لذا در صورت حفاظت نکردن صحیح از ذخایر بومی دریاچه های منطقه، ممکن است جمعیت بومی آرتمیای این منطقه با انقراض و نابودی کامل مواجه شود. در گزارش آقای حافظیه و همکاران (۱۳۷۸)، عنوان شده که آرتمیای مهارلو در منطقه شیراز از نظر چرخه زندگی، با *Artemia franciscana* مشابهت دارد که شامل سیست، ناپلیوس، متاناپلیوس، پست متاناپلیوس و جوان و بالغ می‌باشد و همچنین درصد تفریح آرتمیای مهارلو در منطقه شیراز با ۱۰ بار تکرار آزمایش، بالای ۷۰ درصد تعیین گردید که درصد بسیار بالایی است. در مطالعات انجام یافته در خصوص شناسایی ژنتیکی ذخایر آرتمیای ایران، با استفاده از روش RFLP، آرتمیای شیراز مشابهت ژنتیکی بیشتری با *Artemia franciscana* نشان داد (حاجی رستم لو، ۱۳۸۳).

میزان فاصله ژنتیکی بدست آمده مابین *Artemia urmiana* و *Artemia sinica* در مطالعه حاضر، در حدود $D=0.3$ ، مابین *Artemia urmiana* و *Artemia franciscana* در مطالعه حاضر در حدود $D=0.62$ بود که میزان حاصله برابر با مقدار بدست آمده برای *Artemia urmiana* و *Artemia sinica* و بیشتر از مقدار بدست آمده برای *A. urmiana* و *A. franciscana* ($D=0.38$) در بررسی قبل بود (Sun et al., 1999). در مطالعه Abatzapoulos و همکاران (۲۰۰۲)

میزان فواصل ژنتیکی بین *A. urmiana* و *A. franciscana* در حدود $D=0/75$ و بین *A. sinica* و *A. urmiana* در حدود $D=0/396$ و بین *A. franciscana* (منطقه ویتنام) و *A. urmiana* در حدود $D=0/76$ بدست آمد.

در بررسی نمودارهای شجره ای نمونه‌های آرتمیا در گروه II، چهار خوشه کاملاً مجزا مشاهده شد، بطوریکه *A. urmiana* و *A. sinica* در دو خوشه متفاوت قرار گرفتند (شکل ۶-۳). نمودار شجره ای حاصل از مقایسه استرین‌های دو جنسی آرتمیا، براساس مقایسه ساختار آنزیمی (آلوزیم ها) آنها، نشان داد که *A. urmiana* و *A. sinica* دو گروه مجزا و متفاوت از هم را تشکیل دادند

(Sun et al., 1999; Hou et al., 1997). نتایج بدست آمده در این تحقیق در خصوص ارتباطات شجره ای دو گونه *A. urmiana* و *A. sinica* با استفاده از شاخص ژنومی RAPD با سایر مطالعات انجام شده تاکنون کاملاً همخوانی دارند. میانگین هتروزیگوسیتی بدست آمده در این تحقیق برای *A. urmiana* (۰/۱۴) و *A. sinica* (۰/۱۱) بیشتر از مقادیر حاصل از مطالعه قبلی با استفاده از روش RAPD بود (Abatzopoulos et al., 2002).

گروه بندی آرتمیاهای بکرزای اطراف دریاچه ارومیه و سایر نقاط ایران و روابط شجره‌ای آنها با گونه‌های خارجی مورد بررسی براساس شاخص ژنومی RAPD هم راستا در تحقیقی در خصوص مطالعه ژنتیکی ۱۴ استرین شامل گونه‌های *A. persimilis* و *A. franciscana* حاصل از مناطق متفاوت جغرافیایی با روش RAPD می‌باشد که در آن ۵ خوشه کاملاً مجزا از آرتمیاهای مورد بررسی تشکیل شدند (Camargo et al., 2002). در تحقیقی دیگر نیز روابط شجره ای ۱۴ استرین متفاوت از گونه‌های دو جنسی آرتمیا از کشورهای مختلف (آمریکا، ونزوئلا، برزیل، اسپانیا، ایتالیا، چین) با روش RAPD مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که روش بکار رفته قادر به جداسازی و تفکیک استرین‌ها به سه خوشه کاملاً مجزا از هم بود (Badaracco et al., 1995).

درجه شاخص تثبیت، بعنوان معیاری برای تمایز ژنتیکی جمعیت‌ها محسوب می‌شود که از میزان صفر تا ۱ متغیر می‌باشد (Hartl & Clark, 1997). Wright (1978)، پیشنهاد نمود که مقادیر عددی از ۰/۰۵ تا ۰/۱۵ بیانگر تفاوت ژنتیکی متوسط و مقادیر میزان ۰/۱۵-۰/۲۵ بیانگر تفاوت ژنتیکی بالا می‌باشد. نتایج آنالیز واریانس مولکولی گروه‌های متفاوت مطالعاتی، حاکی از معنی دار بودن تفاوت‌های ژنتیکی در داخل و مابین نمونه‌های آرتمیا بود. بطوریکه بیشترین تفاوت ژنتیکی در گروه I مربوط به اختلاف موجود در داخل جمعیت‌ها، با میانگین عددی $F_{ST}=0/35$ و مابین جمعیت‌ها، در گروه های II و III برترتیب با میانگین های عددی ۰/۷ و $F_{ST}=0/76$ بوده است.

میزان F_{ST} های بدست آمده در سه گروه آرتمیایا با استفاده از شاخص مولکولی RAPD بالاتر از میزان بدست آمده با استفاده از شاخص RFLP در شناسایی تفاوت‌های ژنتیکی بین نمونه های *A. urmiana* حاصل از نواحی متفاوت دریاچه ارومیه ($F_{ST}=0/019$) (Eimanifar *et al.*, 2006) بود. همچنین مقادیر بدست آمده، از مقادیر مربوط به *A. franciscana* ($F_{ST}=0/024$) و *A. salina* ($F_{ST}=0/012$) بیشتر بودند. از سوی دیگر، مقادیر F_{ST} بدست آمده برای جمعیت‌های آرتمیای دریاچه ارومیه و مناطق اطراف از میزان کمتری نسبت به جمعیت *A. franciscana* در منطقه آمریکای جنوبی برخوردار بودند (Abreu-Grobois & Beardmore, 1982; Abreu-Grobois, 1987). بعلاوه مقدار F_{ST} برای سه جمعیت آرتمیای دریاچه ارومیه و بکرزا ($F_{ST}=0/035$) حاصل از روش RAPD از نمونه آرتمیای ایران و آرتمیای قزاقستان مقایسه شده با استفاده از شاخص آلوزایم کمتر بود ($F_{ST}=0/0427$) (Thomas *et al.*, 1995).

یکی از مشکلات موجود در آنالیز ساختار جمعیتی، مربوط به محاسبه مقدار جریان ژنی می‌باشد. شاخص جریان ژنی یکی از مهمترین معیارها در تکوین ساختار جمعیتی گونه‌های مطالعاتی می‌باشد، بطوریکه میزان آن بیانگر واحدهای تکاملی مستقل جمعیت‌های محلی یک گونه می‌باشد

(Slatkin, 1993). زیاد بودن جریان ژنی مابین جمعیت‌ها، بیانگر تکامل گروهی آنهاست و کم بودن آن نشانگر آن است که هر یک از جمعیت‌ها تقریباً بطور مستقل از هم تکامل یافته اند. بنابراین، تفاوت‌های بالای ژنتیکی مابین جمعیت‌ها زمانی رخ می‌دهد که میزان جریان ژنی در بین آنها کمتر از یک باشد. در حالیکه، میزان جریان ژنی بزرگتر از یک بیانگر آن است که جریان ژنی بحدی قوی است که موجب جلوگیری از بروز تفاوت‌های ناشی از تغییرات تصادفی در الل‌ها و انتخاب طبیعی، می‌شود (Tremblay & Ackerman, 2001).

میزان جریان ژنی محاسبه شده برای گروه‌های I ($N_m=1/01$)، II ($N_m=0/1$) و III ($N_m=0/2$) بیانگر وجود تفاوت‌های بالای ژنتیکی در بین آرتمیایا مورد بررسی بود. ضمن آنکه، به نظر می‌رسد میزان جریان ژنی در حدی نبوده است که موجب جلوگیری از بروز تنوع و تفاوت‌های ژنتیکی شود. مقادیر مربوط به جریان ژنی بدست آمده حاصله در این تحقیق، در گروه I بیشتر و در گروه‌های II و III کمتر از مقدار بدست آمده توسط Abatzapoulos و همکاران (۲۰۰۲) مابین گونه های *A. urmiana* و *A. tibetiana* ($N_m=0/31$) بود. میانگین درجه

تمایز ژنی در آرتمیاهای ایران بیشتر از آرتمیاهای دریاچه ارومیه و نواحی اطراف بود ($G_{ST}=0/82$ vs $0/3$)، و در کلیه گروههای مطالعاتی، میزان میانگین درجه تمایز ژنی با میزان میانگین درجه شاخص تثبیت همخوانی داشت. محاسبه زمان انحراف یا جدایی (Dt) (Divergence time) اجداد مشترک گونه‌ها، براساس میزان عددی فواصل ژنتیکی آنها مورد بحث و مجادله محققین بوده و اغلب بعنوان رابطه‌ای منطقی محسوب نمی‌شود (Abreu-Grobois & Beardmore, 1982). بطوریکه تخمین آن بستگی به مقایسه نوع DNA (ژنومی یا میتوکندریایی) دارد (Perez *et al.*, 1994). در هر صورت، روشهای ذکر شده در ترکیب با داده‌های ژئولوژیکی قابل دسترس با موفقیت‌هایی همراه می‌باشد

(Sarich & Gronin, 1977 ; Vawter *et al.*, 1980). معمول ترین روش محاسبه Dt براساس فواصل ژنتیکی Nei می‌باشد (Nei, 1975). بر این اساس، محاسبه زمان انحراف یا جدایی دو گونه از رابطه روبرو امکانپذیر می‌باشد: $Dt = D/2\alpha$ Divergence time (Dt) که در آن α عبارت است از احتمال جهش های ژنتیکی مشخص، با میزان پیشنهاد شده در حدود 10^{-7} به ازای هر سال (Abatzopoulos *et al.*, 2002). با توجه به فرمول فوق محاسبه زمان جدایی برخی از نمونه‌های آرتمیاهای مورد بررسی از یکدیگر براساس میزان حداقل و حداکثر فاصله ژنتیکی آنها به قرار ذیل است:

آرتمیای بکرزای منطقه روستای سرای و آرتمیای بکرزای منطقه دشت فسندوز: سال $Dt=7/87 \times 10^5$

آرتمیای بکرزای منطقه روستای سرای و *A. urmiana*: سال $Dt=1/12 \times 10^6$

آرتمیای بکرزای منطقه دشت فسندوز و *A. urmiana*: سال $Dt=1/07 \times 10^6$

آرتمیاهای مناطق شیراز و گلستان: سال $Dt=4/36 \times 10^6$

آرتمیاهای مناطق قم و اراک: سال $Dt=438 \times 10^3$

آرتمیای بکرزای منطقه دشت فسندوز و گلستان: سال $Dt=1/6 \times 10^6$

Avis در سال ۱۹۹۴ و Ayala در سال ۱۹۹۹ سایر فاکتورهایی را که در تخمین زمان جدایی گونه ها دخیل می‌باشند را بیان کردند که از آن میان می‌توان به زمان تجدید نسل و اندازه جمعیت اشاره نمود. مطالعه دیگری با استفاده از شاخص ژنومی RAPD در بررسی ژنتیکی برخی از گونه‌های دو جنسی آرتمیا، زمان های انحراف برای دو

گونه *A. tibetiana* و *A. urmiana* ($Dt= 2/38 \times 10^6$) سال و برای دو گونه *A. sinica* و *A. tibetiana* ($Dt= 570 \times 10^3$) بدست آمدند (Abatzapoulos et al., 2002).

با در نظر گرفتن موارد بحث شده، می‌توان نکات ذیل را نتیجه‌گیری نمود:

۱- میزان کل تنوع ژنتیکی در نمونه‌های آرتمیای دریاچه ارومیه و نمونه‌های بکرزای اطراف آن (گروه I) از حد بالایی در مقایسه با سایر نمونه‌های بررسی شده برخوردار بود ($Het= 0/32$). در این بین، میانگین تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها در نمونه‌های گروه I بیشتر از آرتمیاهای سایر نقاط ایران (گروه III) بود که حاکی از پتانسیل بالقوه ژنتیکی در آرتمیاهای دریاچه ارومیه و نواحی اطراف آن، بعلاوه شرایط اکولوژیک نسبتاً مساعد در منطقه در مقایسه با سایر نواحی جغرافیایی ایران، می‌باشد. میانگین تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها در آرتمیاهای ایران و برخی از گونه‌های خارجی مورد بررسی (گروه‌های II و III) بیشتر از آرتمیاهای دریاچه ارومیه و نواحی اطراف (گروه I) بود. این امر میتواند حاکی از بروز تفاوت‌های بارز ژنتیکی بعلاوه بعد مسافت و خصوصیات مجزای اکولوژیک هر منطقه، می‌باشد.

۲- میانگین میزان شاخص تثبیت، در گروه‌های متفاوت مطالعاتی آرتمیا از درجه بالایی برخوردار بود. این امر احتمالاً بعلاوه شرایط متفاوت اکولوژیک در محل‌های زیست آرتمیاهای نمونه برداری بوده است و ژنوتیپ‌های مورد نظر در غالبیت بسر می‌برند. در عین حال مشخص شد که میزان جریان ژنی در بین نمونه‌ها در حدی نبوده است که موجب جلوگیری از بروز تنوع و تفاوت‌های ژنتیکی شود.

۳- مقایسه جمعیت‌های آرتمیاهای بکرزا در اطراف دریاچه ارومیه، نشانگر درجه بالای ناهمگونی ژنتیکی در آنها بود و بنظر می‌رسد که استفاده از سیست‌های آرتمیاهای بکرزای منطقه روستای سرای، بعلاوه ضرایب ژنتیکی و هتروزیگوسیتی بالا، ممکن است برای توسعه اهداف شیلاتی در منطقه مناسب باشد.

۴- آرتمیاهای مناطق قم، اراک و گلستان شباهت ژنتیکی بیشتری با نمونه‌های بکرزای روسیه و ترکمنستان داشتند. در حالیکه آرتمیای شیراز با *A. franciscana* قرابت بیشتری نشان داد. قرابت ژنتیکی *A. sinica* و *A. urmiana* براساس آنالیز تحلیل مؤلفه‌های هماهنگ اصلی، مشهود بود.

۵- میزان هتروزیگوسیتی و درجه شاخص تثبیت بدست آمده برای نمونه‌های آرتمیای بکرزای اطراف دریاچه ارومیه، بیشتر از نمونه‌های آرتمیاهای بکرزای سایر نقاط ایران (قم، اراک و گلستان) بود و بنابراین، این دو گروه

خوشه های کاملاً مجزایی را در نمودار شجره ای حاصل بخود اختصاص دادند. با توجه به وجود رابطه مستقیم بین میزان هتروزیگوسیتی با میزان سیست زایی در آرتمیا، (Gajardo and Beardmore, 1989)، ممکن است بکارگیری سیست های آرتمیای بکرزای مناطق ذکر شده (دشت فسندوز و روستای سرای)، برای اهداف پرورشی آرتمیا در راستای تولید محصولی بیشتر، نتایج مثبتی را به همراه داشته باشد.

۶- آنچه از مقادیر فواصل ژنتیکی و نمودار خویشاوندی نمونه های آرتمیای مورد بررسی استنباط می شود این است که آرتمیای بکرزای مناطق اطراف دریاچه ارومیه از شباهت ژنتیکی نسبتاً بالایی برخوردار بودند و نیز آرتمیای مناطق قم، اراک و گلستان بعلاوه تنوع ژنتیکی و هتروزیگوسیتی پایین شباهت بیشتری به آرتمیای بکرزای خارجی، یعنی نمونه های روسیه و ترکمنستان داشتند. آرتمیای ایران بجز نمونه های منطقه شیراز از میزان هتروزیگوسیتی و درجه شاخص تثبیت پایین تری برخوردار بودند. انجام مطالعات گسترده و مستمر در خصوص بیولوژی و فیزیولوژی و بررسی خصوصیات زیستی آرتمیای مناطق مختلف ایران و مقایسه آنها با گونه های خارجی، در جهت تکمیل شناسنامه زیستی آنها و نیز حفظ و افزایش ذخایر ژنتیکی سویه های بومی کشور باید مورد توجه قرار گیرد.

۷- روش مطالعه مولکولی RAPD قادر به تفکیک ژنتیکی و نشان دادن میزان تفاوت ها و تشابهات، بر اساس فواصل ژنتیکی مابین آرتمیای دوجنسی دریاچه ارومیه با نوع بکرزای آن بود. بر این اساس، بیشترین تفاوت بین آرتمیای بکرزای منطقه روستای سرای با *A. urmiana* ($D=0/22$) و بیشترین شباهت، بین آرتمیای بکرزای منطقه روستای سرای و آرتمیای بکرزای منطقه دشت فسندوز ($D=0/16$) مشاهده گردید. نسبت مقادیر مربوط به فاصله ژنتیکی Nei، ضریب شانن، میزان هتروزیگوسیتی و تعداد جایگاه های غیر همشکل برای *A. urmiana* و نوع بکرزای آن به ترتیب زیر می باشند:

آرتمیا بکرزای منطقه دشت فسندوز > آرتمیای بکرزای منطقه روستای سرای > *A. urmiana*

در نتیجه، علاوه بر تفاوت های مورفومتریک مشاهده شده بین آرتمیای دریاچه ارومیه و نوع بکرزای مناطق اطراف آن (عاصم و همکاران 2005; 1384، Atashbar et al.)، شاخص ژنومی RAPD نیز قادر به بیان میزان تفاوت ها یا تشابهات ژنتیکی مابین آنها بوده است و بر آن براساس ارزش متمایز ژنتیکی بر خصوصیات فنوتیپی نمونه های مذکور ارائه داد.

پیشنهادها

- ۱- در راستای تحقیقات انجام گرفته در خصوص تهیه الگوی ژنتیکی آرتمیای دریاچه ارومیه و آرتمیاهای سایر نقاط ایران با استفاده از شاخص‌های مولکولی ژنومی و میتوکندریایی، لزوم انجام مطالعات فراگیر در زمینه بررسی خصوصیات زیستی ذخایر شناخته شده آرتمیا در نواحی مختلف کشور پیشنهاد می‌شود. در گام بعدی، در جهت تکمیل شناسنامه و الگوهای ژنتیکی منحصر به هر استرین یا جمعیت، تشکیل بانک ژنی ذخایر آرتمیای دریاچه ارومیه و سپس استرین‌های مختلف آرتمیا در ایران ضروری می‌نماید که به عنوان گام‌های اصلی در ادامه تحقیقات ژنتیکی آرتمیا به منظور شناسایی توالی ژنهای مستعد و مفید در منطقه محسوب خواهند شد.
- ۲- پیشنهاد میشود با شناسایی ذخایر جدید آرتمیا از نواحی متفاوت جغرافیایی ایران و مقایسه آنها با آرتمیاهای بکرزا از نواحی آسیای میانه و غربی، روابط زیستی و ژنتیکی مابین آنها مشخص گردد تا استرین‌ها یا گونه‌های خالص با تنوع ژنتیکی بالا و مناسب برای مقاصد پرورشی شناسایی شوند.
- ۳- با توجه به توسعه علم ژنتیک مولکولی و استفاده از ابزارهای مولکولی در جنبه‌های مختلف علوم زیستی، راه اندازی بخش زیست‌شناسی مولکولی در مرکز مرجع آرتمیا در منطقه میانی و غرب آسیا وابسته به مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، به منظور انجام تحقیقات بیشتر در زمینه‌های مربوطه و حصول به نتایج علمی و کاربردی و گسترش همکاری‌های علمی با کشورهای دیگر از ضروریات توسعه فعالیت‌های پژوهشی این مرکز می‌باشد.

منابع

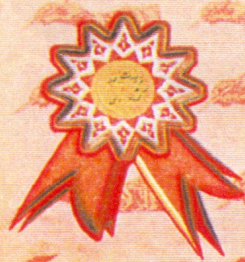
- حافظیه، محمود، حسین پور، حمیرا، ۱۳۷۸. بررسی بیولوژی و تراکم آرتمیا در دریاچه مهارلو. مرکز تحقیقات منابع طبیعی و امور دام جهاد استان فارس؛ ص ۶۸
- حاجی رستم‌لو، محبوبه، ۱۳۸۳. بررسی تنوع درون گونه ای و ساختار جمعیتی به روش ژنتیک مولکولی در آرتمیای ایران. رساله دکتری بیولوژی دریا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ص ۱۲۰.
- سید رضای تهرانی، سید محسن، ۱۳۸۰. واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR). انتشارات پارسیان.
- عاصم، علیرضا، ۱۳۸۴. سیستماتیک آرتمیا ارومیان در دریاچه ارومیه: یک نگرش مورفولوژیکی. دانشگاه رازی کرمانشاه، ص ۱۰۹.
- Abatzopoulos, T.J., Agh, N., Van Stappen, G., Razavi Rouhani, S.M., Sorgeloos, P., 2006. Artemia sites in Iran. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, 86: 299-307.
- Abatzopoulos, T.J., Kappas, I., Bossier, P., Sorgeloos, P., Beardmore, J.A., 2002. Genetic characterization of *Artemia tibetiana* (Crustacea: Anostraca). *Biological Journal of the Linnean Society* 75 (3), 333–344.
- Abreu-Grobois, F.A., 1987.** A review of the genetics of Artemia. In: Sorgeloos, P., Bengston, D.A., Declair, W., Jasper, E. (Eds.), Artemia Research and its Applications. Morphology, Genetics, Strain Characterization, Toxicology, vol. 1. Universa Press, Wetteren, Belgium, pp. 61–69.
- Abreu-Grobois, F.A., Beardmore, J.A., 1982.** Genetic differentiation and speciation in the brine shrimp Artemia. In: Barigozzi, C. (Ed.), Mechanisms of Speciation. Alan R. Liss, New York, pp. 336–345.
- Agh, N., Noori, F., 1997.** 1st report of a parthenogenetic Artemia from Urmia and its morphological comparison with *Artemia urmiana*. First Conference of Zoology, Tarbiat Molalleh University, 17-18 Sep. Tehran, Iran.
- Alireza, A., Rastegar-Pouyani, N., 2004.** Biometrical comparison of the cyst and larva of *Artemia urmiana* in Urmia Lake and Fesendooz region in Miandoab (West Azerbaijan, Iran); World Aquaculture Society, March 1-5, Hawaii Convention Center, Honolulu, Hawaii, USA.
- Alireza, A., Rastegar-Pouyani, N., Agh, N., 2005.** Morphological differentiation of *Artemia urmiana* in four different geographical stations from the Urmia Lake, West Azerbaijan Province, Iran; Sixth international Crustacean Congress, July 18th-22nd, Glasgow, England.
- Atashbar, B., Alireza, A., Agh, N., Manaffar, R., 2005.** Morphological differentiation between two parthenogenetic of *Artemia* from Urmia Lake region; World Aquaculture Society, May 9-13, Bali International Convention Center, Nusa Dua, Bali- Indonesia.
- Ayala, F.J., 1976.** Molecular evolution. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Avis, J.C., 1994.** Molecular Markers, Natural History and Evolution. New York: Chapman & Hall.
- Badaracco, G., Bellowini, M., Landsberger, 1995.** Phylogenetic study of bisexual *Artemia* using random amplified polymorphic DNA. *J. Mol. Evol.*, 41: 150-154.
- Barman, H.K., Barat, A., Yadav, B.M., Banerjee, S., Meher, P.K., Reddy, P.V. G. K., Jana, R.K., 2003.** Genetic variation between four species of Indian major carps as revealed by random amplified polymorphic DNA assay. *Aquaculture*, 217: 115-123.
- Bickham, J.W., Sandhu, S., Hebert, P.D.N., Chickhi, L., Athwal, R., 2000.** Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutation Research* 463: 33–51.
- Buth, D.G., Dowling, T.E., Gold, J.R., 1991.** Molecular and cytological investigations. In: Cyprinid fishes: Systematics, Biology and Exploitation (Eds. Winfield, I. & Nelson, J.). New York: Chapman & Hall. Pp: 83-126.
- Callejas, C., Ochando, M.D., 2002.** Phylogenetic relationships among Spanish *Barbus* species (Pisces, Cyprinidae) shown by RAPD markers. *Heredity* 89: 36-43.
- Camargo, W.N., Bossier, P., Sorgeloos, P., Sun, Y., 2002.** Preliminary genetic data on some Caribbean *Artemia franciscana* strains based on RAPDs. *Hydrobiologia* 468, 245–249.
- Cimmaruta, R., Scialanca, F., Luccioli, F., Nascetti, G., 2003.** Genetic diversity and environmental stress in Italian populations of the cyprinodont fish *Aphanius fasciatus*. *Oceanologica Acta* 26: 101–110.
- Chen, W.J., Orti, G., Mayer, A., 2004.** Novel evolutionary relationship among four fish model systems. *Trends in Genetics* 20(9): 424-431.
- Das, P., Prasad, H., Meher, P.K., Barat, A., Jana, R.K., 2005.** Evaluation of genetic relationship among six *Labeo* species using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *Aquaculture Research* 36: 564-569.
- Eimanifar, A., Mohebbi, F., (2007)** Urmia Lake (Northwest Iran): A brief review. *Saline Systems* 3: 5.

- Eimanifar, A., Rezvani, S., Carapetian, J., 2006.** Genetic differentiation of *Artemia urmiana* from various ecological populations of Urmia Lake assessed by PCR amplified RFLP analysis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 333: 275-285.
- Excoffier, L., Smouse, P., Quattro, J.M., 1992.** Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Gajardo, G.M., Beardmore, J.A., 1989.** Ability to switch reproductive mode in *Artemia* is related to maternal heterozygosity. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 55: 191.
- Gouin, N., Grandjean, F., Bouchon, D., Reynolds, J.D., Souty-Grosset, C., 2001.** Population genetic structure of the endangered freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes*, assessed using RAPD markers. *Heredity* 87: 80-87.
- Guttman, S.I., Berg, D., 1998.** Changes in the genetic diversity of aquatic organisms in the great lakes: causes and consequences. *Setac News* : 23-24.
- Hartl, D.L., Clark, A.G., 1997.** Principles of population genetic (3rd edn). Sinauer Associates, Inc, Sunderland, MA.
- Hildbrandt, F., Igarashi, P., 1999.** Techniques in molecular medicine. Springer Lab Manual.
- Hou, L., Cai, H.J., Zou, X.Y., Yang, G., 1997.** Expression of isozyme genes and taxonomic status of bisexual *Artemia* from china. *Acta Zoology Sinica* 43(2): 184-191 [in Chinese].
- Isabel, N., Beaulieu, J., Theriault, P., Bousquet, J., 1999.** Direct evidence for biased gene diversity estimates from dominant random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints. *Molecular Ecology* 8: 477-483.
- Macrae, T.H., Bagshaw, J.C., Warner, A.H., 1988.** Biochemistry and cell biology of *Artemia*. CRC press, Boca Raton.
- McDermott, J.M., McDonald, B.A., 1993.** Gene flow in plant pathosystems. *Ann. Rev. Phytopathy.* 31: 353-373.
- Nei, M., 1975.** Molecular population genetics and evolution. Amsterdam, Netherlands: North Holland Publishers.
- Nei, M., 1973.** Analysis of gene frequencies in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 70, 3321-3323.
- Nei, M., 1978.** Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89, 583-590.
- Perez, M.L., Valverde, J.R., Batuecas, B., Amat, F., Marco, R., Garesse, R., 1994.** Speciation in the *Artemia* genus: mitochondrial DNA analysis of bisexual and parthenogenetic brine shrimps. *Journal of Molecular Evolution* 38: 156-168.
- Rezvani Gilkolaei, S., 1997.** Molecular population genetic studies of sturgeon species in the south Caspian Sea. Ph.D thesis, School of Biological Science, University of wales, Swansea. Pp. 71-92.
- Rohlf, J., 1990.** Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. NTSYS-PC. Department of Ecology and Evolution, New York, USA, 723 pp.
- Ryman, N., Utter, F., Laikre, L., 1995.** Protection of intraspecific biodiversity of exploited fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 5: 417-446.
- Sarich, V.M., Cronin, V.E., 1977.** Molecaular systematics of the primates. In: Goodman, M., Tashian, R. E. (eds). *Molecular Anthropology*. New York, NY: Plenum Press.
- Schneider, S., Roessli, D., Excoffier, L., 2000.** ARLEQUIN, Version 2.0 A software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Geneva, Switzerland.
- Slatkin, M., 1993.** Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution*, 47: 264-279.
- Sole-Cava, A.J., 2001.** Biodiversidade molecular e genetica da conservacao. In Matioli, S. R. (ed.), *Biologia Molecular e Evolucao*. (1st edn). *Holos, Ribeirao Preto* 171-190.
- Sorgeloos, P., 1980.** The use of the brine shrimp *Artemia* in aquaculture. In: Persoon, G., Sorgeloos, P., Roela, O., and Jaspers, E. (Eds). *The Brine Shrimp Artemia*. Vol. 3. pp: 25-46. Ecology, culture, use in aquaculture. Universa Press, Wettern, Belgium. 456 p.
- Sorgeloos, P., 1997.** Determination and identification of biological characteristics of *Artemia urmiana* for application in aquaculture. In: Sorgeloos, P. (Ed.), *The Lake Urmiah Cooperation Project, Item A. Laboratory of Aquaculture and Artemia Reference Center, Belgium*, pp. 1-50.
- Sun, Y., Zhong, Y., Song, W.Q., Zhang, R.S., Chen, Y., 1999b.** Detection of genetic relationships among four *Artemia* species using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *International Journal of Salt Lake Research* 8: 139-147.
- Thomas, K.M., Pilla, E.J.S., Beardmore, J.A., 1995.** Genetic variation and differentiation in Asian brine shrimp *Artemia*. *Aquaculture* 137: 45-56.
- Tremblay, R.L., Ackerman, J.D., 2001.** Gene flow and effective population size in *Leopantes* (Orchidaceae): a case for genetic drift. *Biological Journal of the Linnean Society* 72: 47-62.
- Vawter, A.T., Rosenblatt, R., Gorman, G.C., 1980.** Genetic divergence among fishes of the eastern Pacific and the Caribbean – support of the molecular clock. *Evolution* 34: 705-711.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.L., Tingey, S.V., 1990.** DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.
- Wright, S., 1978.** Evolution and genetics of populations. University of Chicago Press, Chicago, USA.
- Yeh, F.C., Yang, R.C., Boyle, T., 1999.** POPGENE Version 1.31: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis. <http://www.ualberta.ca/fyeh>.



طرح بررسی تفاوت‌های ژنتیکی استرین‌های دوجنسی و پارتنوژنز آرتمیا در
دریاچه ارومیه به روش PCR-RAPD's با مسئولیت اجرایی آقای امین ایمانی فر^۱ در
تاریخ ۱۳۸۶/۵/۲۲ در کمیته تخصصی شیلات با رتبه عالی تأیید شد.

موسسه تحقیقات شیلات ایران



۱- آقای امین ایمانی فر متولد سال ۱۳۵۸ در شهرستان ارومیه دارای مدرک تحصیلی دکتری در رشته دامپزشکی
بوده و در حال حاضر در مرکز تحقیقات آرتمیای کشور با عنوان شغلی کارشناس ارشد مشغول به فعالیت می-
باشد.

Ministry of Jihad – e – Agriculture
Agriculture Research and Education Organization
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION – Iran Artemia Research Center

Title : The study of genetical differentiation of bisexual and parthenogenetic strains of *Artemia urmiana* by RAPD's method

Approved Number : 2-019-200000-03-0000-84006

Author: *Amin Eimanifar*

Executor : *Amin Eimanifar*

Collaborator : M. Hasanzadeh; A. Javanmard; B. Mostafazadeh; S.Ganji; F. Chakmedooz

Advisors : S. Rezvani Gilkolaei; M. Pourkazemi

Location of execution : West Azarbaijan

Date of Beginning : 2005

Period of execution : *1 year and 9 months*

Publisher : *Iranian Fisheries Research Organization*

Circulation : 15

Date of publishing : 2007

All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURE RESEARCH AND EDUCATION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION- Iran Artemia Research Center

**The study of genetical differentiation of
bisexual and parthenogenetic strains of
Artemia urmiana by RAPD's method**

Executor :
Amin Eimanifar

86.928

Abstract

The brine shrimp *Artemia* consists of a number of bisexual species and a large number of parthenogenetic forms, which collectively, inhabiting a wide range of hypersaline habitats. This research was carried out in order to study the genetic differentiation of *Artemia urmiana* and two parthenogenetic populations originated from surrounding lagoons of the Lake Urmia (Fesendoz, Saray village) and also to find the phylogenetic relationships of some Iranian *Artemia* (Qom, Arak, Golestan, and Shiraz) with a comparison to some foreign *Artemia* species (*A. sinica*, *A. franciscana*, *A. parthenogenetica* (Russia and Turkmenistan) using a molecular technique (PCR-RAPD`s). Of a total number of 56 random primers (10 bp) survey, 29 and 26 oligonucleotides showed polymorphic patterns with highly reproducible bands in *Artemia urmiana* groups and Iranian *Artemia* groups. The highest percentage of polymorphic loci were in *Artemia urmiana* (P= 78.89 %) and in comparison with the other parthenogenetic forms, in parthenogenetic *Artemia* from Saray village (P= 59.8 %). The highest values of Shannon index were estimated in *Artemia urmiana* (I= 0.41), and in comparison with other parthenogenetic forms, in parthenogenetic *Artemia* from Saray village (I= 0.3).

Analysis of molecular variance indicated that most variation were within populations (*A. urmiana* with parthenogenetic forms, $F_{ST}= 0.35$) and among populations (Iranian *Artemia* with foreign species, $F_{ST}= 0.76$). Genetic pattern was not in accordance to geographical distribution, which indicated the wide range of *Artemia* samples at different regions in Iran. UPGMA showed two distinct clusters in group I including *A. urmiana* with two parthenogenetic forms and four clusters in group II including Iranian *Artemia* with some foreign species. It is understood that two parthenogenetic populations (Fesendoz and Saray village) had close genetic relationship together with high value of heterozygosity in parthenogenetic *Artemia* from Saray village. Iranian *Artemia* (Qom, Arak, and Golestan) indicated close genetic relationships with *A. parthenogenetica* (Russia and Turkmenistan) with low values of heterozygosity. A sister group was generated including Shiraz and USA *Artemia* samples which attests a possible contamination of local water with *A. franciscana*. F_{ST} value revealed high genetic structuring at all studied groups. Besides, it is suggested that gene flow was not strong enough to prevent substantial genetic differentiation. Result could lead to a management programmes to use suitable *Artemia* strains with high genetic diversity, for culturing and establishment of gene bank of *Artemia* stocks in Lake Urmia.

Key words: *Artemia urmiana*, Parthenogenetic populations, Iranian *Artemia*, phylogenetic relationships, RAPD`s.