

## بررسی خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی هیبریدهای حاصل از آمیزش بین گونه های *Artemia sinica* و *A. urmiana*

### در شرایط درون شیشه‌ای

رامین مناف فر<sup>۱\*</sup> Ph.D.، فرح فرخی<sup>۲</sup> Ph.D.، شکوفه اسحاقی<sup>۳</sup> M.Sc.، فاطمه حیدریان<sup>۴</sup> M.Sc.

سمیه غلامی<sup>۳</sup> M.Sc.، راضیه پاک ترمنی<sup>۴</sup> M.Sc.

۱- دانشگاه ارومیه، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات، ارومیه، ایران

۲- دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، ارومیه، ایران

۳- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، ارومیه، ایران

۴- کارشناس گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه ارومیه، پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، ارومیه، ایران

\* پست الکترونیک نویسنده مسئول: Raminmanaffar@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۶/۲۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱/۱۵

### چکیده

**هدف:** با توجه به اهمیت علمی و تجاری شناسایی گونه‌های آرتمیا خصوصاً جمعیت‌های هیبرید، برخی ویژگی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی هیبریدهای متقابل *Artemia sinica* و *A. urmiana* در شرایط آزمایشگاهی مطالعه شدند.

**مواد روش‌ها:** پرورش دو گونه آرتمیا از زمان تفریح سیستم تا بلوغ در شرایط آزمایشگاهی استاندارد صورت گرفت. سپس به تعداد ۶۴ عدد نر و ماده از هر گونه جدا و در تیوب‌های ۵۰ میلی‌لیتری هیبریدگیری متقابل انجام شد. لاروها روزانه جدا و مستقلاً پرورش داده شدند. بررسی پروفایل اسیدهای چرب و الگوی برش آنزیمی ناحیه 12S-16S ژنوم mtDNA با آنزیم HpaII و مقایسه نتایج در والدین خالص و هیبریدهای نسل اول صورت گرفت.

**نتایج:** مقایسه پروفایل اسیدهای چرب تیمارهای هیبرید نسبت به والدین خالص نشان داد که میزان تعدادی از اسیدهای چرب به‌شدت وابسته به منشاء والدینی می‌باشد. در برخی نمونه‌ها نیز الگوی برش آنزیمی مشابهی بین والدین پدری و هیبریدهای نسل اول مشاهده شد که دور از انتظار بود.

**نتیجه‌گیری:** نتایج نشان داد پروفایل اسیدهای چرب به‌شدت تحت تاثیر منشاء مادری و یا پدری ژن‌های به ارث رسیده هستند. لذا با انتخاب جهت‌دار والدین تولید آرتمیاهایی با ویژگی‌های فنوتیپی خاص امکان پذیر است. مقایسه الگوهای برش آنزیمی شاخص گونه‌ها و مقایسه آن با الگوی برش آنزیمی نسل اول هیبرید نیز نشان داد که احتمالاً ژنوم میتوکندریایی (یا همان میتوکندری) از والد پدری نیز به ارث می‌رسد.

**واژگان کلیدی:** آرتمیا، اسیدهای چرب، ژنوتیپ، کراس، هیبرید

## مقدمه

تنوع زیستی یک شرایط دینامیک است که در هر زمانی در اثر برهم کنش پدیده‌های طبیعی، زیستی و غیرزیستی شکل می‌گیرد. در سال‌های اخیر دخالت و دستکاری انسان در طبیعت مهم‌ترین خطر در تغییر تنوع زیستی محسوب شده است. یکی از روش‌های مهم دستکاری انسان در اکوسیستم‌ها و به‌دنبال آن تاثیر روی گونه‌ها و جوامع زیستی، معرفی گونه‌های غیر بومی به زیستگاه‌های جدید می‌باشد. این گونه‌های مهاجم ممکن است سیر تکاملی گونه‌های بومی را تغییر دهند و موجب بی‌خانمانی، تولید جمعیت‌های جدید و هیبرید و حتی انقراض گونه‌های بومی شوند (۱).

آرتمیا یکی از جنس‌های جانوری متعلق به خانواده آبشش پایان سخت پوست می‌باشد که دارای ۷ گونه دوجنسی با نام‌های A. urmiana, A. persimilis, A. tibetiana, A. salina, A. sinica, A. monica و A. franciscana و ده‌ها جمعیت بکرزا می‌باشد. همه گونه‌های آرتمیا، غیر از A. urmiana و A. sinica، جدائی تولیدمثلی داشته و هر کدام از این گونه‌های ویژگی‌های فیزیولوژیک، مورفولوژیک و مولکولی منحصر به فردی دارند (۲). همچنین غیر از جمعیت‌های بکرزا که اغلب دارای پلوئیدی می‌باشند فقط A. persimilis دارای ۴۴ کروموزوم بوده و بقیه گونه‌ها دارای ۴۲ کروموزوم می‌باشند (۲). بر اساس اختلافات مولکولی موجود تاکنون چندین مارکر اختصاصی مولکولی برای شناسایی هر کدام از این گونه‌ها معرفی شده اند که به دلیل اهمیت تجاری گونه‌های مختلف آرتمیا از ارزش زیادی نیز برخوردارند. بررسی‌های اکولوژیک از بین این گونه‌ها A. sinica و A. franciscana قدرت سازش پذیری و تهاجمی بیشتری داشته و در کل دنیا پراکنده شده‌اند (۳). بر اساس این یافته‌ها اثبات شده است نه تنها تاثیر تغییر شرایط زیست بر روی صفات ژنتیکی و مورفولوژیکی موجودات انکار ناپذیر است بلکه در صورت ایجاد هیبرید امکان تغییرات ژنتیکی و فنوتیپی محقق می‌باشد. در مطالعه‌ای که توسط Weigt and Knowlton صورت گرفته است مشخص شد که با تخمین توالی DNA میتوکندری و تعیین پروفایل پروتئین‌های موجود، مشخص شده است که جمعیت‌های میگوهای گاز گیرنده (Alteus) از دو طرف کانال پاناما دارای فواصل ژنتیکی و درجه جدایی در همه گونه‌های جفت مشابه است (۴). در واقع با بلند

شدن تدریجی کانال پاناما و انشقاق تدریجی اقیانوس‌ها، جمعیت‌های متفاوت در اعماق مختلف ساکن شده و احتمال جدایی تولید مثلی مابین جمعیت‌ها برای تولید هیبریدهای جدید افزایش یافته است (۴).

با رشد دانش بشری و شناسایی ویژگی‌های منحصر به فرد ژنتیکی و فنوتیپی موجودات امکان بررسی سازگاری‌های ثانویه و تداخلات ژنتیکی فراهم شده است. محققین علم ژنتیک توانسته‌اند انواع مارکرهای مولکولی برای شناسایی جمعیت‌ها و گونه‌های موجوداتی از قبیل آرتمیا را فراهم سازند. در کنار این مارکرها برخی ویژگی‌های منحصر به فرد فنوتیپی نیز برای شناسایی جمعیت‌های مختلف موجودات همچون آرتمیا فراهم شده است (۵ و ۶). لذا این مارکرهای مولکولی و فنوتیپی برای جمعیت‌های هیبرید قابل استفاده نبوده و پیش بینی شده است با تغییر جهت کراس‌ها و والدین تنوع ژنتیکی و فنوتیپی آن‌ها نیز افزایش یابد. بر این اساس هدف از اجرای این تحقیق بنیادی - کاربردی بررسی آزمایشگاهی تغییرات پروفایل اسیدهای چرب و تنوع ژنتیکی ناحیه 12S-16S از ژنوم mtDNA در هیبریدهای مقابل A. sinica و A. urmiana در مقایسه با جمعیت والدین این گونه‌ها می‌باشد. نظر به اینکه این دو گونه آرتمیا تنها گونه‌هایی هستند که تولید مثل موفق داشته و هیبریدهای حاصل بارو می‌باشد لذا این مطالعه به منظور بررسی برخی ویژگی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی هیبریدهای حاصل می‌باشد که راه را برای شناسایی یک جمعیت جدید آرتمیا محقق می‌سازد.

## مواد و روش‌ها

سیست‌های مورد استفاده در این بررسی از گونه‌های ۱۰۰ درصد خالص گونه‌های A. sinica و A. urmiana از بانک سیست پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه تهیه شد. در انتخاب سیست‌ها سعی شد از جمعیت‌های شناسنامه دار و کاملاً استریل جمعیتی استفاده شود (۶). سیست‌ها در شرایط آزمایشگاهی استاندارد آزمایشگاهی شامل ۲ گرم سیست در یک لیتر از آب با شوری ۳۵ g/l، نور Lux ۳۰۰۰ - ۲۰۰۰، دمای  $27 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد،  $pH=8 \pm 1$  و هوادهی کافی هیچ شدند (۷). ناپلیوس آرتمیا نورگرایی مثبت دارد لذا از این خصوصیت در جداسازی آن‌ها از پوسته سیست‌ها و مواد زاید دیگر استفاده شد. بدین ترتیب که بعد از تفریح سیست‌ها و خروج لاروها عمل هوادهی از پائین و نوردهی از بالا قطع و

ظرف تفریح در محل تاریخ قرار داده شد. به کمک شعاع باریک نور قسمت پایین مخروط نوردهی شد تا لاروها ته مخروط جمع شدند. سپس به کمک پمپ لاروها از ته ظرف جمع آوری و در ظرف دیسگری وارد شد (۸).

آرتمیایا به مدت ۱۵ روز در شوری ۸۰ گرم بر لیتر پرورش داده شدند. بدین منظور ابتدا آب دریاچه ارومیه فیلتر شد و با افزودن آب شیر یا آب مقطر، رقت به شوری ۸۰ گرم بر لیتر رسانده شد. pH آب نیز اندازه‌گیری شد و به میزان ۱۰۰۰ میلی‌لیتر داخل ظروف پرورشی مخروطی شکل ریخته شد و داخل آکواریوم‌های با دمای  $(27 \pm 1)$  درجه سانتی‌گراد قرار داده شد (چهار تکرار برای هر تیمار). سپس به کمک پمپ باستور، پتری‌دیش و شمارشگر، لاروهای تازه تفریح شده شمارش شد و در هر ظرف ته مخروطی، ۵۰۰ عدد لارو وارد شد. هر یک از ظروف کشت توسط یک پمپ پلاستیکی و لوله‌های هوادهی متصل به پمپ مرکزی هوادهی شدند. برای ممانعت از تبخیر آب، هر یک از ظروف فوق‌الذکر توسط پتری‌دیش‌های پلاستیکی که دارای دو سوراخ (یکی برای هوادهی و یکی برای غذادهی) بودند پوشانده شد (۹). لاروها طی چند ساعت اول بعد از تفریح از ذخیره کیسه زرده استفاده کرده و تقریباً هیچ غذایی از محیط نمی‌گیرند. لذا عمل غذادهی از ۲۴ ساعت بعد از تفریح آغاز شده و میزان غذا طبق جدول غذادهی Coutteau و همکاران (۱۰) بر اساس تعداد آرتمیایا در هر لیتر محاسبه و روزانه به ظرف افزوده می‌شد. غذای مورد استفاده در پرورش، ترکیبی از جلبک *Dunaliella salina* با غلظت  $1.6 \times 10^6$  Cells/ml و مخمر غنی شده با اسید چرب بود.

در روز ۱۵ پرورش، برداشت آرتمیایا انجام شد. در این مرحله می‌بایستی قبل از مشاهده جفت‌گیری و حتی بلوغ نهایی آرتمیایا این کار انجام می‌شد. جمعیت‌های جدا شده به صورت منفرد در داخل فالكون‌های ۵۰ میلی‌لیتری که با همان آب شور ۸۰ گرم در لیتر آماده بودند انتقال داده شدند. فالكون تیوب‌ها در داخل انکوباتوری که دمای آن همانند مراحل اول آزمایش بود قرار گرفتند. غذادهی هر آرتمیایا توسط اضافه نمودن یک قطره جلبک و یک قطره مخمر تهیه شده توسط پروتکل Coutteau و همکاران (۱۰) صورت گرفت. تعویض آب نمونه‌ها به منظور ارتقاء آب محیط پرورش و بررسی احتمال تولید لارو (حذف نمونه‌های بکرزا) هر ۳ روز یکبار انجام شد. ۱۰ روز پس

از انتقال آرتمیایا به این فالكون تیوب‌ها و پس از حصول اطمینان از حذف جمعیت‌های بکرزا، در این مرحله والد‌های کاملاً استریل جهت نسل‌گیری مورد استفاده قرار گرفتند. به تعداد ۳۲ عدد نر و ۳۲ ماده از هر گونه آرتمیایا جدا شده و به صورت متقابل در داخل فالكون‌های ۵۰ میلی‌لیتری جدید قرار گرفتند. به جفت‌های آرتمیایا اجازه داده شده تا مدت ۱ ماه جفت‌گیری نموده و روزانه ناپلیوس‌های حاصل از محیط فالكون فیلتر شد. غذا دهی والدین همانند تکنیک ایزوله سازی جمعیت‌های پیشین بکرزا صورت گرفت. لاروهای جدا شده در این مرحله در یک محیط کشت جدید به تفکیک گونه والد (پدر *A. sinica* و یا پدر *A. urmiana*) تا زمان بلوغ تحت شرایط استاندارد پرورشی کشت داده شدند. آنالیزهای بعدی بر روی گونه‌های والدین و نسل اول به ترتیب ذیل صورت گرفت.

پروفایل اسیدهای چرب هر جمعیت (والدین *A. urmiana*، *A. sinica* و نسل اول با منشاء پدری *A. urmiana* و نسل اول با منشاء پدری *A. sinica*) با استفاده از روش گاز کروماتوگرافی و با پروتکل استخراج مستقیم چربی توسط اتر و تولید متیل استر از این اسیدچرب صورت گرفت. نتایج آنالیز اسیدهای چرب بصورت گراف‌هایی توسط دستگاه حاصل شد که در نهایت درصد هر اسیدچرب نسبت به کل اسیدهای چرب هر نمونه با مقایسه سطح زیر منحنی استاندارد خارجی محاسبه شد (۱۱).

پس از پرورش آرتمیایا تمامی تیمارها (والدین *A. urmiana*، *A. sinica* و نسل اول با منشاء پدری *A. urmiana* و نسل اول با منشاء پدری *A. sinica*) و اطمینان از دو جنسی بودن آن‌ها، هر کدام از نمونه‌ها بطور منفرد و جداگانه در داخل میکروتیوب‌های استریل که قبلاً شماره گذاری شده بودند قرار داده شدند. از تکنیک کاهش تدریجی دما (که عموماً برای فیکس نمودن سخت پوستان استفاده می‌شود) برای کشتن نمونه‌های آرتمیایا استفاده شد. میکروتیوب‌های حاوی این ژئوپلانکتون در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا مرحله بعدی آنالیز که شامل مطالعات مولکولی می‌باشد بر روی آنها انجام گیرد.

جهت استخراج DNA از آرتمیایا بالغ از روش Chelex استفاده شد (۱۲). جهت تکثیر ناحیه هدف از آغازگرهای 12S-SP و 16S-SP با ترکیب نوکلئوتیدی شامل پرایمر پیشرو (5'-cta-gga-tta-gat-acc-cta-3') و آغازگر پیرو

آرتمیای خالص در مقایسه با نمونه‌های هیبرید نشان داد، میزان انواع اسیدهای چرب در نمونه‌های تحت مطالعه متغیر می‌باشد. این بررسی همچنین نشان دهنده میزان متفاوت اسیدهای چرب در بین تیمارهای هیبرید متقابل می‌باشد ( $p < 0.05$ ) (جدول ۱). در این مطالعه میزان بسیاری از اسیدهای چرب در تیمارهای هیبرید در میانگین دو آرتمیا والد خاص قرار گرفت. این بررسی نشان داد که میزان دو اسید چرب EPA و DHA در هر دو جمعیت هیبرید به صورت معنی‌داری از تیمارهای والد خالص وضعیت بهتری دارند ( $p < 0.05$ ).

این بررسی همچنین نتایج جالب دیگری را در خصوص تاثیر والدین در به ارث رسیدن ویژگی برخی از اسیدهای چرب نشان داد. به طور مثال در اسیدهای چرب C14:1n5 دیده می‌شود که در صورت هیبریدگیری از آرتمیای ماده A. urmiana با نر A. sinica ویژگی بروز این اسید چرب تمایل بیشتری به A. sinica خواهد داشت در حالی که در حالت عکس میزان این اسید چرب بیشتر تابع ویژگی A. urmiana خواهد شد. در خصوص برخی از اسیدهای چرب همانند C20:5n3 نیز مشاهده شد که هیبریدگیری موجب تشدید تولید یک اسید چرب در نسل اول هیبرید شده هست و میزان این اسید چرب از میانگین والدین خالص بالاتر هست.

(5') 16S-SP (5'-ccg-gtc-tga-act-cag-atc-3') استفاده شد (۵). برنامه مورد استفاده در PCR شامل دناتوره شده در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، ۳۴ سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱/۱۵ دقیقه، اتصال در دمای ۵۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه با یک دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد نهایی به مدت ۴ دقیقه. محصول PCR بر روی ژل ۱/۲ درصد مورد بررسی قرار گرفت. برش آنزیمی نمونه‌هایی که محصول PCR موفق داشتند بر اساس پروتکل استاندارد کارخانه سازنده با استفاده از آنزیم HpaII صورت گرفت (۶).

### آنالیز آماری

بررسی اختلافات آماری مابین میانگین درصد اسیدهای چرب در تیمارهای مختلف توسط تست DUNCAN از آنالیز آماری one way ANOVA در بسته نرم افزاری SPSS-19 انجام گرفت. اختلافات تاسطح ۰/۰۵ مورد بررسی قرار گرفت و اختلافات آماری با حروف لاتین نمایش داده شد. جهت رعایت اخلاق پژوهشی حداقل تعداد مورد قبول آنالیزهای علمی از ژنوتیپ‌نکتون آرتمیا مورد استفاده قرار گرفت.

### نتایج

بررسی انجام شده پیرامون پروفایل اسیدهای چرب نمونه‌های

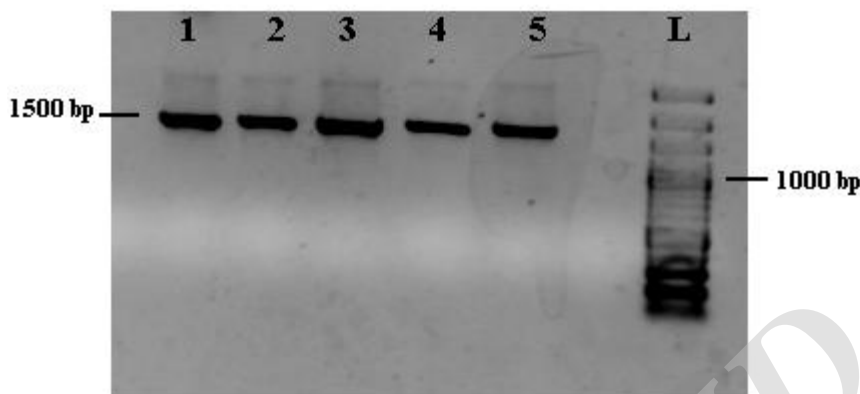
جدول ۱: درصد اسیدهای چرب نسبت به کل اسیدهای چرب در تیمارهای مختلف آرتمیای خالص و هیبرید (Mean±SD).

Saturated	نام عمومی	A. urmiana	A. sinica	A. u(F) × A. s(M)	A. u(M) × A. s(F)
C14:0	Myristic	1.50±0.24a	1.40±0.24a	1.20±0.24b	1.50±0.24a
C16:0	Palmitic	17.90±1.02a	16.90±1.02a	15.20±1.02a	16.30±1.02a
C18:0	Stearic	9.50±0.28a	9.32±0.28a	9.10±0.28a	8.10±0.28b
C20:0	Arachidic	0.20±0.01	0	0.20±0.01	0
C22:0	Behenic	0.50±0.01a	3.70±0.01b	1.60±0.01c	2.10±0.01d
C24:0	Lignoceric	0.10±0.001	0	0	0
Monounsatur.		0	0	0	0
C14:1n5	Myristoleic	0	2.80±0.58a	0.90±0.58b	2.40±0.58a
C16:1n7	Palmitoleic	7.80±0.58a	7.30±0.58a	6.30±0.58b	8.00±0.58c
C18:1n9	Oleic	22.90±0.58	25.10±0.58	25.80±0.58	20.20±0.58a
C18:1n7	Vaccenic	8.10±0.58a	9.20±0.58b	9.80±0.58b	8.20±0.58a
C20:1n9	Eicosenoic	0.40±0.58a	0	0.30±0.58a	0.30±0.58a
C24:1n9	Nervonic	0.40±0.58a	1.20±0.58b	0.10±0.58c	0
C22:1n9	Erucic	0	0	0	0
Polyunsatur.		0	0	0	0
C18:2n6	Linoleic	10.10±0.58a	10.10±0.58a	10.90±0.58a	9.50±0.58a
C18:3n3	α-Linolenic	5.50±0.58a	5.80±0.58a	5.90±0.58a	5.00±0.58a
C20:2n6	Eicosadienoic	0.30±0.17	0	0	0
C20:4n6	Arachidonic	0.80±0.58a	1.00±0.58b	1.50±0.58c	0.70±0.58d
C20:3n3	Eicosatrienoic	0	0	0	0
C20:5n3	Eicosapentaenoic	4.10±0.58a	4.00±0.58a	7.30±0.58b	4.20±0.58a
C22:6n3	Docosahexaenoic	0.80±0.58a	0	1.10±0.58b	1.20±0.58b

اعداد در هر ردیف با حروف لاتین یکسان فاقد اختلاف آماری می‌باشند ( $p > 0.05$ ).

باندهایی با اندازه یکسان در تمامی نمونه‌های خالص و هیبرید هر دو گونه شد.

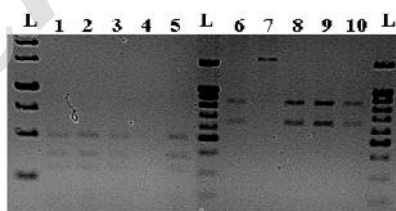
محصول واکنش PCR با اندازه باند حدود ۱۵۰۰ جفت نوکلئوتید در شکل ۱ ارائه شده است. این واکنش منجر به تولید



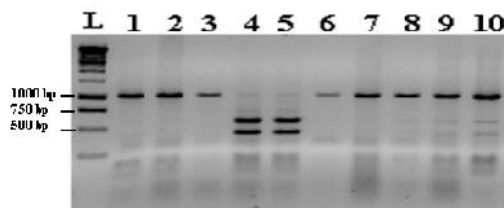
شکل ۱: محصول PCR مربوط به قطعه ۱۵۰۰ جفت بازی از ژنوم mtDNA در تعدادی از نمونه‌های تحت بررسی در ژل ۱/۲٪ L معرف مارکر ۵۰ جفت بازی می‌باشد. نمونه‌ها به ترتیب شامل: (۱) والد خالص *A. urmiana* (۲) والد خالص *A. sinica* (۳) هیبرید نسل اول با والد پدری *A. urmiana* (۴) هیبرید نسل اول با والد مادری *A. urmiana* (۵) نمونه شاهد *A. franciscana* می‌باشد.

با بیش از ۴۰ نمونه برای هر گونه انجام شده و در تمامی نمونه‌ها الگوی ثابتی برای هر گونه مشاهده شد. الگوی مشاهده شده در نمونه ۷ احتمالاً مربوط به تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای و یا آلودگی سیست با یک نمونه دیگر آرتمیا می‌باشد. همچنین در شکل ۳ الگوی برش آنزیمی هیبرید *A. urmiana* (F) × *A. sinica* (M) ایجاد شده توسط آنزیم HpaII ارائه شده است.

الگوی برش آنزیمی ناحیه 12S-16S از ژنوم میتوکندریایی با اندازه ۱۵۰۰ جفت باز توسط آنزیم HpaII در شکل ۲ آورده شده است. بر اساس الگوی مشاهده شده این برش توانست به راحتی گونه‌های آرتمیا *A. urmiana* را از *A. sinica* با الگوهای معرف خود جداسازی و شناسایی دهد. الگوی برش آنزیمی *A. urmiana* با ۳ قطعه کوچک و *A. sinica* با قطعه بزرگتر در شکل قابل تشخیص می‌باشد. این آزمایش



شکل ۲: الگوی برش آنزیمی ناحیه 12S-16S ژنوم mtDNA با آنزیم برش HpaII نمونه‌ها به ترتیب از ۱ تا ۵ نمونه‌های خالص *A. urmiana* و از ۶ الی ۱۰ نمونه‌های خالص *A. sinica* می‌باشند. L معرف مارکر ۱۰۰ جفت باز می‌باشد.



شکل ۳: الگوی برش آنزیمی ناحیه 12S-16S ژنوم mtDNA با آنزیم برش HpaII نمونه‌ها به ترتیب از ۱ تا ۱۰ نمونه‌های آرتمیای هیبرید *A. urmiana* (F) × *A. sinica* (M) می‌باشند. L معرف مارکر ۱۰۰ جفت باز می‌باشد.

همان گونه که مشاهده می‌شود با وجود تست دقیق نمونه‌های آرتمیای والد در خصوص خلوص آرتمیایا، برش آنزیمی انجام شده پیرامون نمونه‌های هیبرید، نشان دهنده تنوع ژنتیکی در این نمونه‌ها بود. نمونه‌های ۴ و ۵ از این آنالیز با تنوع الگوی برش از دیگر نمونه‌ها متمایز شدند. برش آنزیمی نمونه‌ها در دیگر جمعیت‌های هیبرید الگوی متفاوتی را ایجاد نمود.

### بحث

مشخص شده است که تفاوت در ساختار ژنتیکی بین گونه‌های مختلف آرتمیا (۱۳) و نیز میان جمعیت‌های درون یک گونه (۱۴)، احتمال تفاوت‌های فیزیولوژیکی میان نژادها را افزایش می‌دهد (۱۵). در حقیقت وجود برخی پارامترهای فیزیولوژیکی موثر از جمله تغییرات در سطوح پروتئین‌های موثر و همچنین اسیدهای چرب می‌تواند دلیل تفاوت‌های ایجاد شده در نحوه پاسخ به اثرات شوری باشد. مشخص شده است که تفاوت در ساختار ژنتیکی مابین گونه‌های مختلف آرتمیا (۱۳) و نیز میان جمعیت‌های درون یک گونه (۱۴) احتمال تفاوت‌های فیزیولوژیکی میان نژادها را افزایش می‌دهد (۱۵).

نقش اسیدهای چرب خصوصا DHA (docosahexaenoic acid) و EPA (eicosapentaenoic acid) در رشد و تکامل لارو تمام آبزیان خصوصا ماهیان دریازی پیش از این مورد توجه قرار گرفته بود (۱۶). پیش از این اثبات شده است که مهم‌ترین اسیدهای چرب ضروری برای سخت‌پوستان، ماهی‌ها و نرم‌تنان دریازی و آب شور، اسیدهای چرب غیراشباع بلند زنجیر HUFA (n-3) به‌ویژه ایکوزاپنتانوئیک اسید (n-3) 20:5 (EPA) و دکوزاهگزانوئیک اسید (n-3) 22:6 (DHA) هستند. این ترکیبات ضروری برای تشکیل غشا، تنظیم اسمزی و تنظیم پروستاگلندین‌ها (prostaglandins) مورد نیاز هستند. همچنین به‌نظر می‌رسد که آن‌ها دارای نقش فعالی در سیستم ایمنی می‌باشند (۱۷). درباره منشأ دقیق تغییرپذیری در پروفایل اسید چرب آرتمیا شناخت کمی وجود دارد ولی آنچه که اثبات شده است این است که گونه‌های مختلف آرتمیا به‌صورت ذاتی پروفایل متفاوتی از اسیدهای چرب را دارا می‌باشند. در گذشته مطالعاتی روی فاکتورهای موثر بر پروفایل اسید چرب سیستم‌ها و ناپلی‌ها صورت گرفته است (۱۸). به‌ویژه تفاوت‌های ترکیب اسید چرب سیست و ناپلئوس آرتمیا از

طریق تفاوت در ترکیب اسید چرب غذای بلعیده شده توسط جمعیت والدی (۱۹)، ژنوتیپ (۱۰) یا انتخاب ماده غذایی تعیین می‌شود (۱۸).

در مقابل فاکتورهای موثر بر ترکیب اسید چرب نمونه‌های بالغ به تازگی مورد مطالعه قرار گرفته است. Gozalbo (۲۰) دریافت که توده زنده آرتمیای بالغ گونه‌های مختلف تغذیه شده در آزمایشگاه با جلبک یکسان تفاوت‌هایی را در پروفایل اسید چرب نشان می‌دهند. نتایج تحقیق حاضر نیز نشان داد که با وجود تغذیه یکسان تفاوت‌های معنی‌داری مابین اسیدهای چرب تیمارهای مختلف مشاهده می‌شود.

تفاوت در پروفایل اسید چرب در بین جمعیت‌های دیگری از آبزیان به‌طور مثال گونه‌های Anostracan نیز گزارش شده است (۲۱). این قبیل مطالعات تفاوت‌هایی را در مقدار 20:5 (n-3) و 22:6 (n-3) بین تاکسای زوپلانکتون‌ها همانند *Daphnia* Spp. و گونه‌های Copepod مختلف در آب‌های شیرین نشان دادند (۲۲). به‌علاوه تفاوت‌های ویژه گونه‌ای در Copepods گزارش شده است (۲۳). Gozalbo (۲۰) تفاوت‌هایی را در ترکیب اسید چرب بین جمعیت‌های پارتوژنیک و دوجنسی آرتمیا یافت ولی از علت این چنین تغییرپذیری صرف نظر کرد. نقش برخی از اسیدهای چرب در گونه‌هایی از آبزیان مورد تحقیق قرار گرفته و ارتباط منطقی مابین این اسیدهای چرب و سطوح تحمل فیزیولوژیک یافت شد. به‌طور مثال مطالعات نشان داده است که ممکن است سطح (ARA) آراشیدونیک اسید در ماهی‌های دریازی برای تحمل استرس، پیگمانتاسیون، رشد و بقا مهم باشد (۲۴). ایکوزانوئیدها گروهی از مولکول‌های فعال بیولوژیکی هستند که به‌عنوان هورمون‌های موضعی که شامل پروستاگلندین‌ها، ترومبوکسان‌ها و لوکوترین‌ها می‌باشند، شناخته شده‌اند (۲۵). مطالعات متعددی ثابت کرده است که پروستاگلندین‌ها در کنترل فرآیندهای تنظیم اسمزی و استرس شرکت می‌کنند (۲۵).

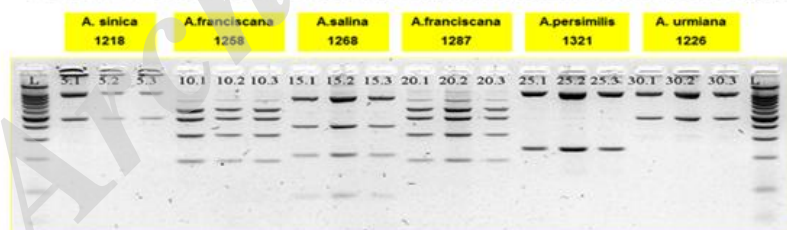
به‌عنوان یک نتیجه جالب در این تحقیق مشخص شد که تنوعات ژنتیکی می‌تواند در اصل پایه ژنتیکی داشته و از یک نسل به نسل دیگر انتقال یابد. البته بایستی به این مورد اشاره نمود که ویژگی‌های درون گونه‌ای و ژنتیکی یکی از مهم‌ترین دلایل تغییر پروفایل اسیدهای چرب در آرتمیا تشخیص داده شده است و نقش تغذیه در بعد دوم قرار دارد. بدین ترتیب

می‌توان انتظار داشت مقاومت نسبت به شرایط استرس‌زای محیط می‌تواند به‌طور کامل در یک نسل مورد ارزیابی قرار گیرد و یا اینکه می‌توان انتظار داشت که در اثر ایجاد شرایط استرس زای محیطی امکان تغییرات ژنتیکی را در این جمعیت انتظار داشت. در این ارتباط به‌طور مثال مطالعات ثابت کرده است که تفاوت اسیدهای چرب بین *A. persimilis* و *A. fanciscana* با تغییرپذیری بین گونه‌های ارتباط واضح‌تری دارد در صورتی‌که تغییرپذیری درون گونه‌ای کمتر است (۲۶).

پیش از این، محققان موفق به شناسایی گونه‌ها و یا تیپ‌های مختلف آرتمیا با استفاده از مارکرهای مولکولی شده بودند. از جمله این مارکرها می‌توان به مارکر Na/K ATPase اشاره نمود که به‌وسیله تکنیک RFLP بر روی ناحیه exon-7 از ژنوم مربوطه، قابلیت شناسایی دو تیپ مختلف از آرتمیای دو جنسی را از بکرزا دارد (۶). همچنین از مارکرهای بسیار موفق می‌توان به ناحیه 12S-16S از ژنوم mtDNA اشاره نمود که به‌وسیله تکنیک RFLP قابلیت شناسایی جمعیت‌های آرتمیا را دارد (۵) (شکل ۴). البته از تکنیک‌های دیگر مولکولی نیز با موفقیت در شناسایی جمعیت‌ها و گونه‌های مختلف آرتمیا استفاده شده است که در این مطالعات *A. sinica* و *A. urmiana* قرابت نیزدیگری را به هم نشان داده اند (۲۷). بخش اغلب این دسته

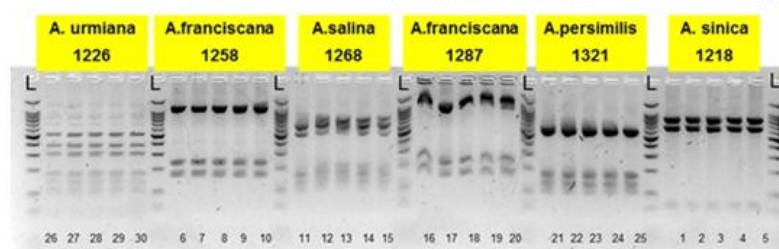
از تحقیقات در راستای شناسایی جمعیت‌ها و گونه‌های جدید آرتمیا و یا تصحیح رده‌بندی این موجود صورت گرفته است (۲۸).  
در یکی از موفق‌ترین مطالعات تقریباً تمامی گونه‌های آرتمیای دو جنسی توسط برش آنزیمی یک قطعه ۱۵۰۰ جفت بازی از ناحیه 12S-16S توسط دو آنزیم HpaII و HaeIII با الگوهای بسیار متفاوت حاصله قابل شناسایی می‌شود (شکل ۴). البته با توجه به قرابت مولکولی نزدیک *A. sinica* و *A. urmiana* (۵) و جداسازی این دو گونه آرتمیا فقط توسط مارکر RFLP و آنزیم HpaII محقق شده و آنزیم برش دیگر نتوانست این دو گونه نزدیک به هم را از هم تشخیص دهد (۵ و ۶). این تحقیق نه تنها در تأیید یافته‌های پیشین اهمیت و قابلیت ناحیه میتوکندریال را در شناسایی جمعیت‌های مختلف آرتمیا نشان داد (۲۹ و ۳۰) بلکه برای اولین بار نشان داد که آرتمیای هیبرید هر دو الگوی برش آنزیمی مربوط به *A. sinica* و *A. urmiana* را نشان می‌دهد. با توجه به نتایج مشاهده شده در این تحقیق پیش بینی شد که تنها هیبریدها ویژگی‌های والد مادری خود را در بررسی مولکولی توسط مارکرهای mtDNA نشان می‌دهند، در حالی‌که در تعدادی هیبریدهای دیگر متقابل نیز الگوهای برش آنزیمی شبیه والد پدری نیز مشاهده شد.

PCR-RFLP of the 12S16S 1500 bp fragment with HaeIII in Artemia spp.



5 ul digest per lane (.3.7 ul PCR product) in triplicate. Agarose 2.5% TBE 0.5X 60V, 1hr. L: 100 pb Ladder promega:

PCR-RFLP of the 12S16S 1500 bp fragment with HpaII in Artemia spp.



12 ul digest per lane (.11 ul PCR product) in quintuplicate. Agarose 2.5% TBE 0.5X 60V, 1hr. L: 100 pb Ladder promega: specie specific banding patterns

شکل ۴: برش آنزیمی ناحیه 12S-16S توسط دو آنزیم برش HaeIII و HpaII.

### نتیجه‌گیری

با توجه به امکان جفت‌گیری و تولید مثل موفق دوگونه A. Sinica و A. urmiana به‌نظر می‌رسد در سال‌های آینده جمعیت‌های هیبرید این دو گونه در نقاط مختلف دنیا گزارش شوند که با استفاده از مارکرهای مولکولی و فنوتیپی مورد استفاده در این تحقیق امکان شناسایی آن‌ها وجود دارد. همچنین به‌نظر می‌رسد بتوان با انتخاب والد پدری یا مادری این هیبریدها، جمعیت‌های ویژه‌ای را با مشخصات فنوتیپی خاص تولید نمود.

### تشکر و قدردانی

از مسئولین محترم پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه برای تامین هزینه‌های اجرای این پروژه تحقیقاتی کمال تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید.

با این حال اصولاً ژنوم مربوط به ناحیه 12S-16S از مادر به ارث می‌رسد، زیرا میتوکندری در درون سیتوپلاسم به‌راحتی همراه با سلول تخم انتقال یافته ولی تاکنون گزارشی مبنی بر به ارث رسیدن میتوکندری توسط اسپرم وجود نداشته است.

بر اساس آنچه که در بررسی موفولوژیک اسپرم موجودات مختلف مشاهده می‌شود، بخشی از اسپرم در ناحیه ابتدای دم (یقه اسپرم) حاوی تعدادی میتوکندری با اشکال مختلف جهت تولید انرژی حرکتی اسپرم می‌باشد که نهایتاً این بخش پیش از ورود اسپرم به‌درون تخمک از هسته n کروموزومی جدا می‌شود. بر اساس گزارش‌های موجود و تحقیقات به‌عمل آمده اشکال مختلفی از اسپرم در سخت پوستان گزارش شده است اما اطلاعات دقیقی در این خصوص در آرتمیا وجود ندارد. بر اساس اشکال مختلف موجود اسپرم در سخت پوستان احتمال به ارث رسیدن میتوکندری از والد پدری غیر محتمل به‌نظر نمی‌رسد.

### منابع

- Amat F.G, Sorgeloos P, Roels O. Jaspers E. (eds), Differentiation in Artemia, strains from Spain. Inpersoone The Brine Shrimp Artemia. Volum Universa Press, Wetteren, Belgium; 1980; 19-39.
- Van Stappen G. Artemia: Use of cysts; p. 132-154 In P. Lavens and P. Sorgeloos (ed.). Manual on the production and use of life food for the aquaculture. FAO Fishery Technical Paper; 1996; No. 361. Rome, FAO.
- Boone E, Bass-Beckins LGM. Salt effects on eggs and nauplii of Artemia sauna L. Journal of General Physiology. 1931; 14(6):753-763.
- Coutteau P, Sorgeloos P. The use of algal substitutes and the requirement for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve molluscs: an international survey. J. Shellfish Res. 1992; 11(2): 467-476.
- Lepage G, Roy CC. Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. J. Lipid Res. 1984; 25(12): 1391-1396.
- Estoup A, Tailliez C, Cornuet JM, Solignac M. Size homoplasy and mutational processes of interrupted microsatellites in two bee species, Apis mellifera and Bombus terrestris (Apidae). Molecular Biology and Evolution 1995; 12(6):1074-1084.
- Mooney HA, Cleland EE. The evolutionary impact of invasive species. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2001; 98(10): 5446-5451.
- Gajardo G, Abatzopoulos T.J, Kappas I. Beardmore J.A. Chapter V. Evolution and speciation. In: Abatzopoulos, T.J., Beardmore, J.A., Clegg, J.S., Sorgeloos, P. (eds). Artemia: basic and applied biology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands; 2002; 225-250.
- Kappas I, Abatzopoulos TJ, Van Hoa N, Sorgeloos P, et al. Genetic and reproductive differentiation of Artemia franciscana in a new environment. Marine biology. 2004; 146(1): 103-117.
- Weigt LA, Knowlton N. Divergence in proteins, mitochondrial DNA, and reproductive compatibility across the Isthmus. Science. 1993; 260(5114): 1629-1632.
- Bossier P, Xiaomei W, Catania F, Dooms F, et al. An RFLP database for authentication of commercial cyst samples of the brine shrimp Artemia spp. (International Study on Artemia LXX). Aquaculture. 2004; 231(1-4): 93-112.
- Manaffar R, Zare S, Agh N, Abdollahzadeh N, et al. SNP detection in Na/K ATP-ase gene 1 subunit of bisexual and parthenogenetic Artemia strains by RFLP screening. Molecular Ecology Resources. 2010; 11(1): 211-214.



22. Farkas T, Nevenzel JC, Benson AA. Lipid labeling with P-32 orthophosphate and C-14 acetate in marine copepod. *Lipids*. 1970; 8(12): 728-731.
23. Graeve M, Kattner G, Hagen W. Diet-induced changes in the fatty acid composition of Arctic herbivorous copepods: experimental evidence of trophic markers. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 1994; 182(1): 97-110.
24. Bell JG, Sargent JR. Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. *Aquaculture*. 2003; 218(1): 491-499.
25. Sargent J, McEvoy L, Estevez A, Bell G, et al. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture*. 1999; 179: 217-229.
26. Ruiz O, Amat F, Saavedra C, Papeschi A, et al. Genetic characterization of Argentinean *Artemia* species with different fatty acid profiles. *Hydrobiologia*. 2008; 610(1): 223-234.
27. Sun Y, Zhong Y, Song W, Zhang R, et al. Detection of genetic relationships among four *Artemia* species using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *International Journal of Salt Lake Research*. 1999; 8: 139-147.
28. Ruebhart DR, Cock IE, Shaw GR. Brine Shrimp Bioassay: Importance of Correct Taxonomic Identification of *Artemia* (Anostraca) Species. *Environmental Toxicology*. 2008; 23(4):555-60.
29. Maniatsi S, Kappas I, Baxevanis A, Farmaki Th, et al. Sharp Phylogeographic Breaks and Patterns of Genealogical Concordance in the Brine Shrimp *Artemia franciscana*. *International journal of molecular science*; 2009, 10: 5455-5470.
30. Gajardo G, Crespo J, Triantafyllidis A, Tzika A, et al. Species identification of Chilean *Artemia* populations based on mitochondrial DNA RFLP analysis. *Journal of Biogeography*. 2004, 31(4): 547-555.
13. Pilla EJS, Beardmore JA. Genetic and morphometric differentiation in Old World bisexual species of *Artemia* (the brine shrimp). *Heredity*. 1994; 73(1): 47-56.
14. Brown RA, Hoops CW. Genotype diversity and selection in asexual brine shrimp (*Artemia*). *Evolution*. 1990; 44: 44: 103-1051.
15. Vanhaecke P, Siddall SE, Sorgeloos P. International study on *Artemia* XXXII. Combined effects of temperature and salinity on the survival of *Artemia* of various geographical origin. *Journal of experimental marine biology and ecology*. 1984; 80: 259-275.
16. Kraul S, Ako H, Brittain K, Cantrell R, et al. Nutritional factors affecting stress resistance in the larval *Coryphaena hippurus*. *Journal of World Aquaculture Society*. 1993; 24: 186-193.
17. Citarasu T, Venket Ramalingam K, Raja Jeya Sekar R, Micheal Babu M, et al. Influence of the antibacterial herbs, *Solanum trilobatum*, *Andrographis paniculata* and *Psoralea corylifolia* on the survival, growth and bacterial load of *Penaeus monodon* post larvae. *Aqua international*. 2003; 11: 583-595.
18. Ruiz O, Medina GR, Cohen RG, Amat F, et al. Diversity of the fatty acid composition of *Artemia* spp. cysts from Argentinean populations. *Marine Ecology Progress Series*. 2007; 335: 155-165.
19. Lavens P, Léger P, Sorgeloos P. Manipulation of the fatty acid profile in *Artemia* offspring produced in intensive culture systems. *Aquaculture—a biotechnology in progress*. 1989; 731-739.
20. Gozalbo D, Hohmann S. Nonsense suppressors partially revert the decrease of the mRNA level of a nonsense mutant allele in yeast. *Current genetics*. 1990; 17(1), 77-79.
21. Mura G. The life history of *Chirocephalus kerkyrensis* Pesta (Crustacea: Anostraca) in temporary waters of Circeo National Park (Latium, Italy). *Hydrobiologia*. 1997; 346(1), 11-23.

## Phenotypic and genotypic characterization of the *in vitro* crossed hybrids of *Artemia urmiana* and *A. sinica* fusions

Manaffar R, Ph.D.\*<sup>1</sup>, Farokhi F, Ph.D.<sup>2</sup>, Es hagi Sh, M.Sc.<sup>3</sup>, Heydarian F, M.Sc.<sup>3</sup>, Golami S, M.Sc.<sup>3</sup>, Pak Tarmani R, M.Sc.<sup>4</sup>

1. Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran

2. Department of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University, Iran

3. Master student, Department of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University, Iran

4. Research Assistant, Department of Biotechnology, Urmia Lake Research Institute, Urmia University, Iran

\* Email corresponding author: Raminmanaffar@gmail.com

Received: 3 Apr. Feb. 2016

Accepted: 11 Sep. 2016

---

### Abstract

**Aims:** Given the importance of the identification of scientific and commercial communities of *Artemia* species, especially hybrid populations, some phenotypic and genotypic characteristics of hybrids between *A. sinica* and *A. urmiana* were studied *in vitro*.

**Materials and Methods:** breeding two species of brine shrimp from hatching to maturity in standard laboratory conditions was provided. Then 64 males and females of each species were separated and mutual hybrid production was done in 50 ml tubes. Daily, the larvae were separated and reared partly and independently. Studies of fatty acids profile and survey by restriction enzyme pattern of 12S-16S mtDNA genome with *HpaII* enzyme in comparing of the parents and offspring's of first-generation were done.

**Results:** Comparing hybrids fatty acids profiles to pure parents showed that some fatty acids amounts are highly dependent on parental origin. In some samples the same restriction enzyme pattern was observed in male parents and the first generation hybrids that was unexpected.

**Conclusion:** The results revealed that fatty acids profile is strongly influenced by maternal or paternal origin genes of inheritance. Therefore, by directional selection of parents it is possible to produce special *Artemia* offspring's with unique phenotypic characteristics. Comparing of enzymatic digestion patterns with the first generated hybrid revealed that the mitochondrial genome (or mitochondria) also is inherited from the sire.

**Keywords:** *Artemia*, Cross, Genotype, Hybrid, Fatty acids