



شناسایی ژنتیکی و طبقه بندی آرمیای ایران با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره

رضازینالپور^۱، سیدضیاءالدین میرحسینی^{۲*}، سید بنیامین دلیرصفت^۳، جلال زارع^۱^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد رشته ژنتیک و اصلاح نژاد دام دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان^۲ استاد ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان^۳ دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۶/۱۰، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۹/۱۲

چکیده

در این پژوهش، تنوع ژنتیکی جمعیت آرمیا اورمیانا و آرمیا فرانسیسکانای موجود در ایران با استفاده از ۵ جفت آغازگر ریزماهوره‌ای (Apdq04TAIL، Apdq03TAIL، Af-A136، Af-B105TAIL) و Apdq05TAIL) ویژه‌ی آرمیا فرانسیسکانا و آرمیا پارتنوژنتیکا بررسی شد. DNA ژنومی ۵۰ سیستم آرمیا از هر جمعیت به صورت انفرادی و با روش گلوله‌ی داغ استخراج شد. محصولات PCR با استفاده از ۵ جفت آغازگر با موفقیت تکثیر و فرآورده‌های حاصل بر روی ژل پلی اکریل آمید واسرشته‌ساز ۶٪ الکتروفورز شده و با روش نیترات نقره رنگ آمیزی گردیدند. تمامی جایگاه‌ها چندشکل بودند. میانگین تعداد آلل‌ها و محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) برای جمعیت آرمیا فرانسیسکانا و آرمیا اورمیانا به ترتیب برابر با ۳، ۰/۵۴۲۸ و ۲/۵، ۰/۳۸۳۳ بود. در آرمیا اورمیانا تمامی جایگاه‌ها در تعادل هاردی-وینبرگ قرار داشتند، در حالی که در آرمیا فرانسیسکانا تنها جایگاه Af-A136 در تعادل هاردی-وینبرگ قرار داشت. میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار برای آرمیا فرانسیسکانا و آرمیا اورمیانا به ترتیب ۰/۶۲۰۹ و ۰/۴۵۳۱ محاسبه شد. دندروگرام فیلوژنتیکی در داخل جمعیت‌ها براساس فاصله‌ی ژنتیکی و با استفاده از روش UPGMA ترسیم گردید. براساس تعداد آلل‌ها و فراوانی آنها در جمعیت آرمیاهای مورد بررسی می‌توان دریافت که این جمعیت‌ها از ترکیب ژنتیکی مناسبی برخوردار هستند.

کلمات کلیدی: آرمیا، تنوع ژنتیکی، چندشکلی، ریزماهوره، هتروزیگوسیتی.

مقدمه

می‌شود (Lee et al., 1999; Nováková et al., 2007). با توجه به ارزش غذایی و فواید زیست محیطی این موجود، شناسایی و حفاظت آن از اهمیت بسزایی برخوردار است. تشکیل بانک ژن روش مطمئنی برای حفاظت از گونه‌ها و جمعیت‌های مختلف آرتمیا و ایجاد این ذخایر زیستی با ارزش است. امروزه جهت برآورد تنوع ژنتیکی و تعیین فواصل ژنتیکی بین جمعیت‌ها از روش‌های پیشرفته مولکولی در سطوح DNA استفاده می‌شود (Beigi Nasiri et al., 2007). روش‌های مولکولی که قادر به تشخیص تفاوت-های ژنتیکی در سطح مولکول DNA هستند، ابزاری کارآمد برای شناسایی تفاوت‌های ژنتیکی بین موجودات محسوب می‌شوند. انواع نشانگرهای مولکولی برای مطالعات مربوط به تنوع قابل استفاده هستند، بر اساس بررسی‌های ثبت شده توسط FAO، ۶۶ درصد کل مطالعات تعیین فاصله ژنتیکی با استفاده از ریزماهورها انجام گرفته است و ۷۰ درصد پژوهشگران ریزماهورها را انتخاب کرده‌اند (Mohammadifar and Mohammadabadi, 2011). ریزماهورها به علت استفاده آسان در PCR معمولی، شناسایی و تعیین تعداد و اندازه آلل‌ها از طریق ژل‌های واسرشته ساز در الکتروفورز و دارا بودن درجه آللی بالا به ازای هر جایگاه، دارای اهمیت بالایی هستند (Beigi Nasiri et al., 2007). این نشانگرهای ژنتیکی، به‌عنوان یکی از پارامترهای قابل ارزیابی در بررسی جمعیت‌ها، درک تفاوت‌های ژنتیکی بین

آرتمیا موجود ظریفی از رده‌ی سخت پوستان است که به زندگی در آب‌های شور عادت کرده و به دلیل عدم وجود جانوران شکارچی و رقابای غذایی در چنین محیط‌هایی سازگار شده است (Clegg, 2001). این موجود می‌تواند شرایط سخت مانند نمک بالا، تابش مقدار زیاد اشعه‌ی فرابنفش، اکسیژن کم و دمای پایین را تحمل کند (et al., 2004; Clegg et al., 2000). سیستم آرتمیا طی فرآیندهای فیزیولوژیکی می‌تواند تا صدها سال به صورت غیرفعال در محل باقی بماند و به محض اینکه شرایط محیطی مساعد شد، به یک ناپلیوس تبدیل شود (Sugumar and Munuswamy, 2006).

گونه‌های آرتمیا مرکب از گونه‌های دو جنسی و بکرزا هستند که از لحاظ خصوصیات مورفولوژیکی شباهت فراوانی به هم دارند (Asem and Rastegar-Pouyani, 2008). آرتمیا در زیستگاه‌های طبیعی از جلبک‌های تک‌سلولی، ذرات ریز گیاهان، پلانکتون‌ها و باکتری‌های موجود در آب تغذیه می‌نماید (Benedictal et al., 2009).

آرتمیا به دلیل داشتن ارزش غذایی بالا، برای ماهی‌ها، سخت پوستان، دام و طیور و حتی انسان به‌عنوان منبع غذایی با کیفیت تلقی می‌شود (Montiel and Canché, 2005). آرتمیا به دلیل نیاز به تجهیزات آزمایشگاهی کمتر، به‌عنوان سازواره‌ای مناسب برای شناسایی آلودگی محیط به فلزات سنگین و سموم سیانو باکتری‌ها استفاده

مواد و روش ها

از هر یک از جمعیت‌های آرتمیا اورمیا از دریاچه ارومیه و آرتمیا فرانسیسکانا از دریاچه نوق، ۵۰ عدد سیست جمع آوری شد. استخراج DNA ژنومی به صورت انفرادی و با روش گلوله داغ انجام شد.

DNA ژنومی استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتر و ژل آگارز ۱/۵ درصد تعیین کمیت و کیفیت شد. در این پژوهش از ۵ جایگاه ریزماهواره ویژه آرتمیا فرانسیسکانا و آرتمیا پارتوژنتیکا (جدول ۱) استفاده شد (Muñuz *et al.*, 2009). آغازگرهای مورد نیاز از شرکت بیونیر کره جنوبی تهیه شد.

آنها، تعیین انساب، شناسایی تنوع ژنتیکی و تمایز جمعیت‌های مختلف، ابزار مولکولی مناسبی محسوب می‌شوند. تنوع ژنتیکی و مدیریت منابع ژنتیکی به عنوان یکی از اجزای مهم پروژه‌های اصلاح نژادی می‌باشند. چراکه یک گونه بدون تنوع ژنتیکی کافی قادر به سازگاری با تغییرات محیطی و مبارزه با انگل‌ها و رقیب‌ها نیست (Askari *et al.*, 2011). حفاظت باید بر اساس دانش عمیقی از منابع ژنتیکی نژادهای خاص باشد، لذا تلاش برای شناسایی و تعیین خصوصیات ژنتیکی نژادهای بومی و محلی بسیار اهمیت دارد (Shojaei *et al.*, 2010).

جدول ۱- مشخصات جایگاه های انتخاب شده.

جایگاه ریز ماهواره	آغازگرها	واحد تکراری
Af B105TAIL	F:NED-GGCAGATCAGTTTGACAGGAC R:GTGTCTTAGATTACGCCAACGGTTGTAG	GG(GA) ₁₃ ,(GA) ₁₆
Af-A136	F:PET-TCTGGAAACCCTGATTAGACG R: CGTCACTCGACACACAAACAT	(TG) ₁₀
Apdq03TAIL	F:NED- CACGAAAACAAGCCGTGATAG R: GTGTCTTTCTCTCTGCTTTCTGTCC	(GA) ₁₁
Apdq05TAIL	F:PET- CAGAGTAAATCGACCATGTG R:GTGTCTTAGAGCAAATCTCTCCTCTCC	(AG) ₃₅
Apdq04TAIL	F:VIC- GGACATTTTCGTTTCCAGTG R:GTGTCTTTCTGCAGCGTTGGACTATTG	(AG) ₂₁

دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، واسرشته سازی ثانویه DNA طی ۶۰ ثانیه با ۷۲ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر به DNA طی ۶۰ ثانیه با ۵۵ درجه سانتی‌گراد، بسط آنزیمی طی ۳۰ ثانیه و دمای ۹۵

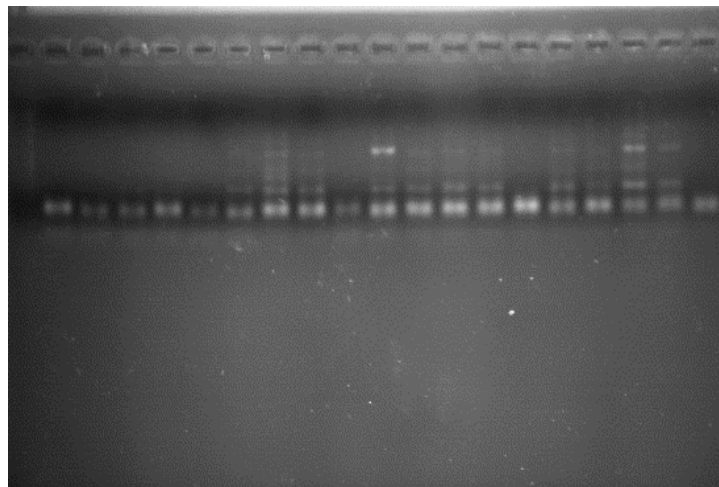
غلظت نهایی اجزای واکنش در حجم ۲۰ میکرولیتر تهیه شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در ۳۳ سیکل و با برنامه حرارتی زیر انجام شد: واسرشته سازی اولیه DNA به مدت ۵ دقیقه در

واقعی، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، شاخص شانون، جریان ژنی، فاصله ژنتیکی، معیار محتوای اطلاعات ژنتیکی و رسم درخت فیلوژنتیکی از نرم افزارهای PopGene1.3، TFPGA و HET استفاده شد.

نتایج و بحث

الکتروفورز ژل آگارز نشان داد که DNA ژنومی استخراج شده از کیفیت مناسبی برخوردار است. پنج جایگاه ریز ماهواره آرتمیا فرانسیسکانا و آرتمیا پاتنوژنتیکا با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تکثیر شد (شکل ۱).

درجه سانتیگراد و بسط آنزیمی نهایی طی ۷ دقیقه و دمای ۷۲ درجه سانتیگراد و نگهداری در دمای ۴ درجه سانتیگراد. برای مشاهده جایگاه تکثیر شده از الکتروفورز ژل آکرلامید واسرشته‌ساز ۶٪ با قدرت ۱۰۰ وات به مدت ۱ ساعت و روش رنگ آمیزی نترات نقره استفاده شد (Sanguinetti et al., 1994). برای بدست آوردن اندازه آلل‌ها و تعیین انواع آلل و ژنوتیپ، پس از تصویربرداری از ژل، باندهای مربوط به فرآورده‌های PCR دقیقاً تعیین و مشخص گردیده و سپس باندهای هر نشانگر با در نظر گرفتن نشانگر اندازه بررسی شد. برای آزمون تعادل هاردی-وینبرگ، تعیین فراوانی آللی مشاهده شده و تعداد آلل



شکل ۱- نمونه ای از تکثیر جایگاه Apdq05TAIL در جمعیت آرتمیا اورمیانا.

وینبرگ قرار داشتند. هتروزیگوتی مورد انتظار برای آرتمیا فرانسیسکانا و اورمیانا به ترتیب در محدوده‌ی ۰/۶۴۲۹-۰/۵۸۷۵ و ۰/۵۹۳۸-۰/۴۶۸۸ بود. تعداد آلل واقعی برای آرتمیا اورمیانا در محدوده ۲ (Af-105TAIL و Apdg03TAIL) تا

الگوی باندهای تکثیر شده در دو جمعیت آرتمیا فرانسیسکانا و آرتمیا اورمیانا نشان داد که تمامی جایگاه‌ها چند شکل هستند. در آرتمیا فرانسیسکانا تنها جایگاه Af-A136 و در آرتمیا اورمیانا تمامی جایگاه‌ها در تعادل هاردی-

الگوی بانندی تمامی جایگاه های ریزماهوره مورد استفاده به صورت باندهای دوتایی دیده می شد که احتمالاً به دلیل ویژگی خاص این جایگاه هاست. جمعیت آرتمیا اورمیانا در تمامی جایگاه های Af-B105TAIL، Apdq03TAIL، Apdq04TAIL و Apdq05TAIL در تعادل هاردی-وینبرگ قرار داشت. با افزایش شوری دریاچه ی ارومیه، کاهش مهاجرت پرندگان به این دریاچه، عدم امکان ورود ژنوتیپ های جدید و تشدید انتخاب طبیعی، بکرزایی و آمیزش های Polyandry (آمیزش یک ماده با چند نر) و Polygyny (آمیزش یک نر با چند ماده) در جمعیت افزایش می یابند که این آمیزش ها جمعیت را به سمت تشابه جفت ژن ها، توسعه ی همخونی و افزایش واریانس نمونه گیری مندلی سوق می دهند. اما به دلیل بزرگ بودن جمعیت، این واریانس نتوانسته است تعادل هاردی-وینبرگ را برهم بزند.

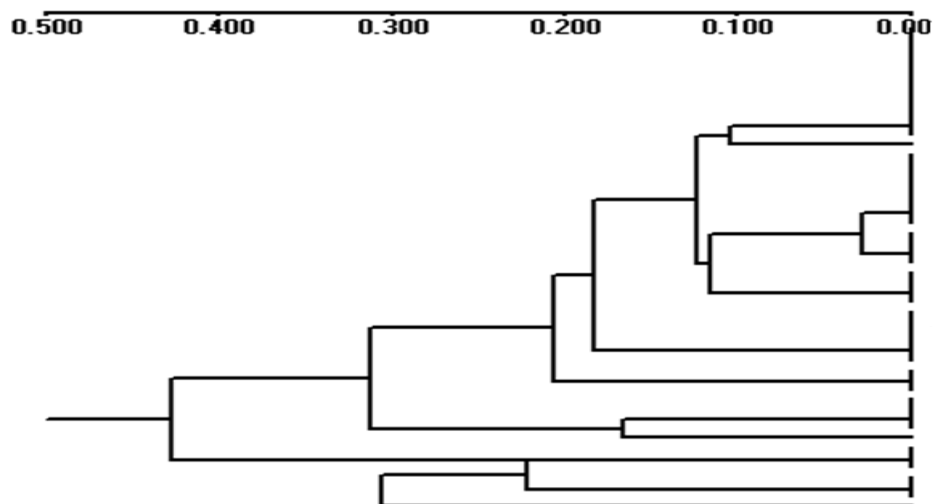
از آنجا که سیستم ها به مدت طولانی نگهداری می شوند، توصیه می شود که از مناطق مختلف دریاچه جمع آوری و نگهداری شوند تا میزان تنوع فعلی حفظ شود. با ادامه ی روند فعلی می توان انتظار داشت که با کاهش تعداد، جمعیت از تعادل خارج شده و منجر به کاهش تنوع ژنتیکی شود.

در جمعیت آرتمیا فرانسیسکانا تنها جایگاه Af-A136 در تعادل هاردی-وینبرگ قرار داشت. نتایج حاصله در مورد آرتمیا فرانسیسکانا با نتایج Muñuz *et al.* (2009) مطابقت دارد. براساس

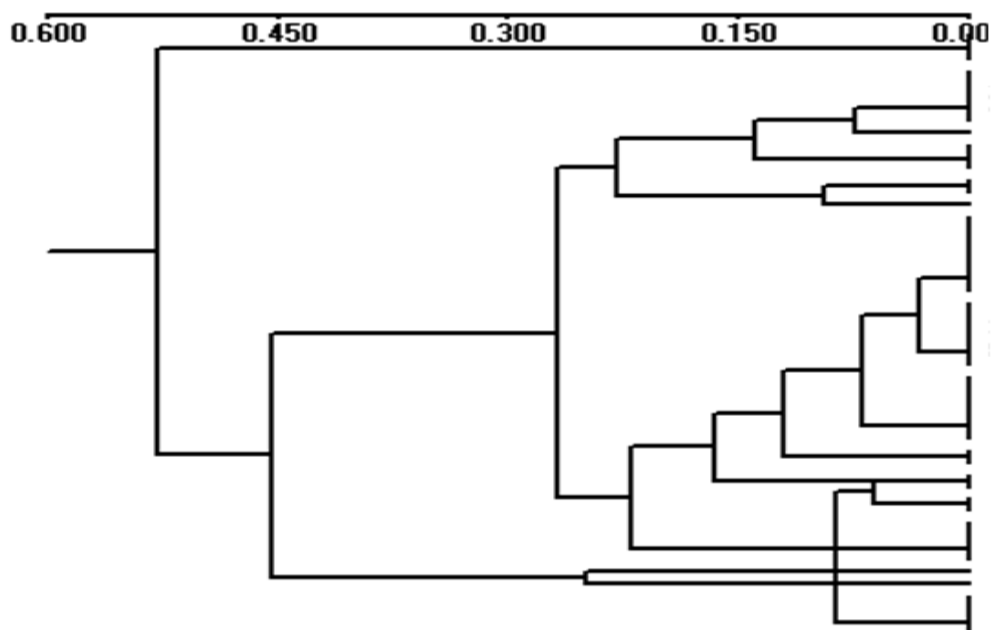
۳ (Apdg04TAIL و Apdg05TAIL) و برای آرتمیا فرانسیسکانا ۳ بود. تعداد آل مؤثر برای آرتمیا فرانسیسکانا و اورمیانا به ترتیب در محدوده ۲/۸ - ۲/۴۲۴۰ و ۲/۴۶۱۵ - ۱/۸۸۲۴ بود. در این مطالعه، محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) برای آرتمیا اورمیانا و آرتمیا فرانسیسکانا به ترتیب در محدوده ۰/۵۱۱۲ - ۰/۱۹۴۸ و ۰/۵۷۰۵ - ۰/۵۰۳۴ بود. شاخص شانون در آرتمیا فرانسیسکانا در محدوده ۰/۹۸۶۸ (Af-) 105TAIL تا ۱/۰۶۴۶ (Apdg03TAIL) و در آرتمیا اورمیانا در محدوده ۰/۳۷۶۸ (Apdg03TAIL) تا ۰/۹۷۴۳ (Apdg05TAIL) قرار داشت. تنوع ژنتیکی درون جمعیتی در آرتمیا اورمیانا ۰/۴۵۳۱ و در آرتمیا فرانسیسکانا ۰/۶۲۰۹ بود. با استفاده از دو جایگاه مشترک (Af-) B105TAIL و Apdg03TAIL فاصله ژنتیکی و میانگین جریان ژنی بین آرتمیا فرانسیسکانا و آرتمیا اورمیانا به ترتیب برابر با ۰/۶۹۴۶ و ۱ شد. مقادیر F_{ST} برای دو جایگاه مشترک Af- B105TAIL و Apdg03TAIL به ترتیب ۰/۱۵۷۹ و ۰/۲۵ بدست آمد. در دندروگرام فیلوژنتیکی مربوط به آرتمیا فرانسیسکانا، از هر گروه اصلی چندین زیر گروه تشکیل شده که این گروه ها به صورت درون و بین گروهی با همدیگر مرتبط هستند (شکل ۲). در آرتمیا اورمیانا گروه های فرعی به وسیله بخشی از گروه اصلی تشکیل شده اند و روابط بین زیر گروه های تشکیل شده بسیار نزدیک است (شکل ۳).

ردیف‌های نوکلئوتیدی، توالی‌های هدف آغازگر دچار تغییر می‌شوند. در آرتمیا اورمیانا تعداد آلل واقعی برای جایگاه‌های Af-B105TAIL و Apdq03TAIL برابر با ۲ و برای جایگاه‌های Apdq04TAIL و Apdq05TAIL برابر با ۳ شد. در بررسی صورت گرفته در جمعیت آرتمیا پارتنوژنتیکا برای جایگاه‌های Apdq03TAIL، Apdq04TAIL و Apdq05TAIL به ترتیب اعداد ۵، ۴ و ۱۰ را گزارش کردند (Muñuz *et al.*, 2009). از دیگر معیارهای چند شکلی، تعداد جایگاه‌های چند شکل است. اگر فراوانی معمول-ترین آلل در یک جایگاه کمتر از ۰/۹۹ یا کمتر از ۰/۹۵ باشد آن جایگاه چند شکل خواهد بود. هر دوی این حدود اختیاری است و اگر اندازه‌ی نمونه کافی باشد (بیشتر از ۱۰۰ فرد)، ۰/۹۹ بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد (Hedrick, 1999). Perez *et al.* (1994) با استفاده از آنالیز فیلوژنتیکی RFLP حاصل از mtDNA آرتمیا پارتنوژنتیکا، فرانسیسکانا و سالی‌نای موجود در اسپانیا به این نتیجه رسیدند که آرتمیا فرانسیسکانا چندشکلی زیادی دارد. آنالیز فیلوژنتیکی RFLP حاصل از mtDNA، تک شکل بودن آرتمیا فرانسیسکانای نوق و چندشکل بودن آرتمیا اورمیانا را نشان دادند (Hajirostamloo, 2009). تفاوت در شرایط اقلیمی حاکم بر اکوسیستم آرتمیا در بازه‌های زمانی مختلف می‌تواند بر میزان چندشکلی تأثیرگذار باشد.

بررسی‌هایی که Hajirostamloo and Pourrabbi (2011) با استفاده از هضم آنزیمی ژن ریپوزومال در مولکول mtDNA آرتمیا انجام داده‌اند، بین آرتمیای موجود در دریاچه‌ی نوق و آرتمیا فرانسیسکانای موجود در خلیج سانفرانسیسکو تشابه ژنتیکی وجود دارد. به همین دلیل، هماهنگی و تشابه نتایج این پژوهش با یافته‌های Muñuz *et al.* (2009) منطقی به نظر می‌رسد. تعداد آلل واقعی همان تعداد آلل مشاهده شده برای آن جایگاه ژنی در جمعیت بوده که تحت تأثیر اندازه‌ی نمونه است. لذا باید در به کار بردن این معیار برای مقایسه‌ی بین جمعیت‌هایی با اندازه‌ی متفاوت قدری محتاط بود. به جای این معیار می‌توان از تعداد آلل مؤثر (برخلاف هتروزیگوتی مورد انتظار) نیز استفاده نمود (Hedrick, 1999). در مطالعه حاضر در جمعیت آرتمیا فرانسیسکانا تعداد آلل واقعی برای تمامی جایگاه‌های Af-A136، Af-B105TAIL و Apdq03TAIL برابر با ۳ شد در حالیکه Munuz *et al.* (2009) در جمعیت آرتمیا فرانسیسکانا تعداد آلل واقعی را در جایگاه‌های Af-B105TAIL و Af-A136 به ترتیب اعداد ۳۱ و ۱۹ گزارش کرده‌اند. دلیل این تفاوت به شرایط اقلیمی حاکم بر اکوسیستم دو گونه‌ی آرتمیا فرانسیسکانای دریاچه‌ی نوق و خلیج سانفرانسیسکو برمی‌گردد. در راستای سازگاری با شرایط اقلیمی، به‌مرور زمان در اثر پدیده‌هایی مثل جهش‌های نوکلئوتیدی و در نتیجه‌ی تغییر



شکل ۲- درخت فیلوژنتیکی حاصل از فاصله ژنتیکی D_A در آرتمیا فرانسیسکانا.



شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی حاصل از فاصله ژنتیکی D_A در آرتمیا اورمیانا.

معمولی‌ترین معیار تنوع ژنتیکی در جمعیت است. در این پژوهش نیز این فراسنجه به عنوان شاخص اصلی بررسی تنوع ژنتیکی در داخل جمعیت معرفی شده است. هتروزیگوسیتی مشاهده شده برای جمعیت آرتمیا اورمیانا در جایگاه‌های Af-B105TAIL، Apdq03TAIL، Apdq04TAIL و Apdq05TAIL به ترتیب برابر با ۰/۲۵، ۰/۲۵، ۰/۷۵ و ۰/۵ شد. میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده برای همین جایگاه-ها در جمعیت آرتمیا پارتنوژنتیکا به ترتیب ۰/۷۳۵، ۰/۰۵۷، ۰/۰۰۰، ۰/۹۷۱ گزارش شد (Muñuz *et al.*, 2009). هتروزیگوسیتی مشاهده شده برای جمعیت آرتمیا فرانسیسکانا در جایگاه-های Af-B105TAIL، Af-A136 و Apdq03TAIL به ترتیب ۰/۴۶۹۴، ۰/۵۱۰۲ و ۰/۴۰۸۲ محاسبه شد در حالیکه میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده برای همین جایگاه-ها در جمعیت آرتمیا فرانسیسکانا به ترتیب ۰/۵۳۶، ۰/۱۵۹ و ۰/۹۳۳ گزارش شد (Muñuz *et al.*, 2009). تفاوت بین نتایج بدست آمده در آرتمیا فرانسیسکانا با نتایج سایر بررسی‌ها به پراکنش نامتقارن این موجود در سراسر جهان، تفاوت در شرایط اقلیمی و تعداد جایگاه‌های ریز-ماهواره‌های استفاده شده مربوط است. در این پژوهش تنوع درون جمعیتی برای جمعیت آرتمیا فرانسیسکانا و آرتمیا اورمیانا به ترتیب برابر با ۰/۶۲۰۹ و ۰/۴۵۳۱ برآورد گردید. در پژوهشی، Gajardo *et al.* (2004) جمعیت‌های آرتمیای موجود در شیلی را براساس آنالیز RFLP

لازم به ذکر است که ریزماهواره‌ها به دلیل ایجاد هتروزیگوسیتی بالا نسبت به RFLP چند-شکلی بالایی را ایجاد می‌کنند. با استفاده از آلوزایم مشخص شد که میزان جایگاه‌های چند-شکل در آرتمیاهای دنیای قدیم و جدید ۶۵٪-۳۰٪ و بیشترین چندشکلی متعلق به آرتمیا اورمیانا (۶۵٪) است (Ernanir *et al.*, 1993). ریزماهواره‌ها برخلاف آلوزایم‌ها، نسبت به انتخاب طبیعی و مصنوعی، خنثی هستند. لذا تفاوت در شرایط اقلیمی حاکم بر اکوسیستم آرتمیا در بازه-های زمانی مختلف که می‌تواند بر روند انتخاب مؤثر باشد، سبب کاهش چندانی در چندشکلی ایجاد شده توسط ریزماهواره در بازه‌های زمانی مختلف نمی‌شود اما در آلوزایم اینگونه نیست. معیار چند شکلی برای جایگاه‌های بسیار چند شکل همچون ریز ماهواره‌ها مناسب کمتری دارد (Hedrick, 1999). بنابراین از دیگر معیارهای چند شکلی نظیر محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) می‌توان استفاده کرد. در این مطالعه، میانگین ارزش‌های PIC برای دو جایگاه مشترک، برای جمعیت آرتمیا اورمیانا و آرتمیا فرانسیسکانا به ترتیب ۰/۲۷۶۹ و ۰/۵۳۷ بود. از آنجاییکه مقایسه ارزش‌های PIC در سطح دو جمعیت به ازای تمامی جایگاه‌ها می‌تواند سطح تغییرپذیری را در داخل هر جمعیت در مقایسه با سایر جمعیت‌ها نشان دهد (Buchanan and Thue, 1998)، می‌توان دریافت که سطح تغییرپذیری در جمعیت آرتمیا فرانسیسکانا نسبت به آرتمیا اورمیانا بیشتر است. هتروزیگوسیتی

نمی‌گیرند و خنثی محسوب می‌شوند. از آنجا که حداکثر مقدار هتروزیگوسیتی یک است، مقایسه‌ی آنها به‌عنوان معیاری برای بررسی تنوع درون جمعیتی نشانگرهای با چندشکلی زیاد مانند ریزماهورها که اکثراً هتروزیگوسیتی حدود ۰/۸ یا بالاتر دارند، دقیق نبوده و تفاوت‌های میان آنها اطلاعات کاملی را ارائه نمی‌کند. از این رو شاخص اطلاعات شانون (H') به‌عنوان معیار دیگری برای بررسی تنوع ژنتیکی در داخل جمعیت استفاده می‌شود. با وجود آنکه تفسیر بیولوژیکی این معیار مشخص نیست، ممکن است برای اندازه‌گیری تنوع جایگاه‌های بسیار متغیر مفید باشد (Hedrick, 1999). نتایج شاخص اطلاعات شانون (H') هم از لحاظ روند و هم از لحاظ بیشترین و کمترین مقدار مشابه نتایج هتروزیگوسیتی محاسبه شده است و از لحاظ مقدار نسبت به هتروزیگوسیتی متناظرشان بیشتر هستند. از این رو نسبت به صحت نتایج اطمینان بیشتری می‌توان حاصل نمود. در پژوهش حاضر فاصله‌ی ژنتیکی بین دو جمعیت آرتمیا اورمیانا و آرتمیا فرانسیسکانا با احتساب نااریبی و با استفاده از نرم افزار Popgene، ۰/۶۹۴۶ بدست آمد. Ermani et al. (1993) با استفاده از آلوزایم فاصله‌ی ژنتیکی بین آرتمیاهای دنیای قدیم و جدید را ۰/۷۵ محاسبه کردند. ریزماهورها برخلاف آلوزایمها تحت تاثیر محیط قرار نمی‌گیرند، لذا تعداد زیادی آلل با سطح بالایی از هتروزیگوسیتی دارند و طبق مدل مندلی واقعی توارث می‌یابند و بهتر می‌توانند بیان‌کننده‌ی

mtDNA مورد بررسی قرار دادند. آنها تنوع بین گونه‌های آرتمیا فرانسیسکانا را ۱/۵٪ برآورد کردند. استفاده از DNA میتوکندریایی به‌جای DNA ژنومی با محدودیت‌هایی همراه است. DNA میتوکندریایی برخلاف DNA ژنومی حاوی تمام اطلاعات موجود نیست و از لحاظ ساختار و عملکرد از آن ساده‌تر است. Eimanifar et al. (2006) با استفاده از نشانگر RFLP، میانگین تنوع درون جمعیتی آرتمیا اورمیانا را ۰/۵۶٪ بدست آوردند. با استفاده از نشانگر RFLP میانگین تنوع نوکلئوتیدی بین گونه‌های آرتمیا فرانسیسکانا در آرژانتین، ۱٪ برآورد شد (Perez et al., 2008).

در پژوهشی دیگر Baxevanis et al. (2005) با استفاده از نشانگر RFLP آرتمیاهای اورمیانا، فرانسیسکانا، سینیکا، سالینا، پرسیمیلیس و تیبیتان را مورد مطالعه قرار دادند و تنوع درون گونه‌ای در آرتمیا فرانسیسکانا را ۰/۰۷۵٪ برآورد کردند. Baxevanis et al. (2006) با استفاده از نشانگر RFLP تمام گونه‌های آرتمیا را بررسی کردند و تنوع درون گونه‌ای آرتمیا اورمیانا را ۰/۸٪ گزارش کردند. باید توجه داشت که گذشت زمان و سخت‌تر شدن شرایط اقلیمی حاکم بر اکوسیستم موجب ایجاد رانش ژنتیکی و در نتیجه کاهش تنوع درون جمعیتی می‌شود. همچنین ریز-ماهورها به دلیل قابلیت ایجاد چندشکلی بالا نسبت به RFLP بهتر می‌توانند عمل ژن‌ها و نهایتاً فنوتیپ افراد را تحت تاثیر قرار دهند، هرچند که هر دو نشانگر تحت تاثیر محیط قرار

مدل‌های جریان ژنی است (Mallet, 2001). در پژوهش حاضر میانگین F_{ST} و N_m به ترتیب ۰/۲ و ۱ محاسبه شد. تحقیقات دیگری پیرامون محاسبه‌ی مقدار F_{ST} و جریان ژنی (N_m) بین دو جمعیت آرتمیا اورمیانا و آرتمیا فرانسیسکانا با استفاده از جایگاه‌های ریزماهواره انجام نشده است اما با نشانگرهای دیگر این فراسنجه‌ها بررسی شده است. (Naihong *et al.* (2000). استفاده از آلوزایم برای انواع گونه‌های آرتمیا سینیکا و فرانسیسکانا به ترتیب $F_{ST} = 0/12$ و $(N_m = 1/83)$ و $F_{ST} = 0/24$ - $0/38$ و $(N_m = 1/408)$ بدست آوردند. Ernanir *et al.* (1993) با استفاده از آلوزایم بین آرتمیاهای دنیای قدیم و جدید $F_{ST} = 0/616$ و $(N_m = 0/156)$ و برای انواع آرتمیا فرانسیسکانا $F_{ST} = 0/24$ و $(N_m = 0/792)$ گزارش کردند. از آنجا که ریز-ماهواره‌ها برخلاف آلوزایم‌ها تحت تأثیر محیط قرار نمی‌گیرند و طبق مدل مندلی واقعی توارث می‌یابند، لذا بهتر می‌توانند بیان‌کننده‌ی جریان ژنی باشند. تفاوت در منطقه‌ی عمق نمونه‌گیری از عواملی هست که می‌تواند سبب ایجاد جریان ژنی متفاوت شود. (Eimanifar *et al.* (2006). استفاده از نشانگر RFLP میانگین F_{ST} بین تمامی نمونه‌های آرتمیا اورمیانای دریاچه‌ی ارومیه را برابر با ۰/۱۹ ($N_m = 12/908$) محاسبه کردند. (Abreu-Grobois and Beardmore (1982) استفاده از نشانگر RFLP بین چندین نوع از آرتمیا فرانسیسکانا $F_{ST} = 0/24$ و $(N_m = 0/792)$ و چندین نوع از آرتمیا سالینا $F_{ST} = 0/12$

فاصله‌ی ژنتیکی باشند. در پژوهشی (Manaffar *et al.* (2011) با استفاده از نشانگر RFLP فاصله-ی ژنتیکی بین آرتمیاهای دنیای قدیم و جدید را در محدوده‌ی ۰/۷۳۵ - ۰/۰۲۳ بدست آوردند. از آنجا که ریزماهواره‌ها نسبت به نشانگر RFLP توزیع مناسبی در سرتاسر ژنوم دارند، لذا برای محاسبه‌ی فاصله‌ی ژنتیکی مناسب‌تر هستند. البته باید توجه داشت که بیان فاصله‌ی ژنتیکی بین دو گونه بسیار مناسب‌تر از محاسبه‌ی فاصله‌ی ژنتیکی بین خویشاوندان دو گونه است. از آنجا که جریان ژنی به صورت جابه‌جایی و انتقال آلل‌های ژن از یک جمعیت به جمعیت دیگر تعریف می‌شود، لذا مهاجرت به داخل و یا خارج از جمعیت، می‌تواند نقشی کلیدی در تغییر فراوانی آلل‌ها در آن جمعیت داشته باشد. البته می‌توان مهاجرت را به عنوان عاملی در شناساندن شکل‌های متنوع ژن به استخر ژنی تثبیت شده‌ی یک جمعیت یا گونه دانست. چندین عامل در میزان جریان ژنی بین جمعیت‌های گوناگون تأثیرگذارند. تحرک را باید از اساسی‌ترین این عوامل دانست. هر اندازه توان حرکت یک جاندار بالاتر باشد به همان نسبت توان مهاجرتش نیز افزایش خواهد یافت. تداوم در جریان ژنی بین دو جمعیت می‌تواند سبب ادغام استخرهای ژنی آن دو جمعیت گردد که خود باعث کاهش تفاوت ژنی می‌گردد (Mallet, 2001). در پژوهشی، Wright (1931) دریافت که در جمعیت‌های تحت تأثیر توارث، عوامل مهمی منجمله اندازه‌ی جمعیت تأثیرگذار می‌باشد. مدل F_{ST} ، یکی از

فرانسیسکانا است، که این امر به کاهش انتخاب و تعادل هاردی-وینبرگ می‌تواند مربوط باشد.

نتیجه‌گیری

جایگاه‌های ریز ماهواره‌ی استفاده شده در پژوهش حاضر مختص آرتمیا فرانسیسکانا و آرتمیا پارتنوژنتیکا بودند، آرتمیا فرانسیسکانای دریاچه‌ی نوق به Af-B105TAIL و Af-A136 (نشانگرهای اختصاصی این گونه) و Apdq03TAIL (نشانگر اختصاصی آرتمیا پارتنوژنتیکا) پاسخ داد. آرتمیا اورمیانا به نشانگر-های مختص آرتمیا پارتنوژنتیکا (Apdq03TAIL، Apdq04TAIL و Apdq05TAIL) و یک نشانگر خاص آرتمیا فرانسیسکانا (Af-B105TAIL) پاسخ داد. این مطالعه، کارآمدی نشانگرهای ریزماهواره برای بررسی تنوع ژنتیکی و حفاظت از ذخایر ژنتیکی آرتمیای ایران را مشخص می‌کند. براساس تعداد آلل‌ها و فراوانی آنها در جمعیت آرتمیای مورد بررسی می‌توان دریافت که این جمعیت‌ها از ترکیب ژنتیکی مناسبی برخوردار هستند. محتوای چند شکلی و هتروزیگوسیتی قابل قبول جایگاه‌های ریز ماهواره‌ی پژوهش حاضر در جمعیت‌های آرتمیا-ی مورد بررسی، نشان‌دهنده‌ی آن است که این جمعیت‌ها از تنوع ژنتیکی قابل قبولی برخوردار هستند. این سطح از تنوع امکان جلوگیری از انقراض این ذخایر ژنتیکی کشور را با به کار-گیری روش‌های صحیح مدیریتی فراهم می‌آورد. دندروگرام جفت گروه‌های غیر وزنی (UPGMA) در داخل جمعیت‌های آرتمیای مورد

Gajardo *et al.* ($N_m = 1/833$) برآورد کردند. (2004) با استفاده از نشانگر RFLP بین آرتمیای شیلی $F_{ST} = 0/98$ ($N_m = 0/005$) و بین انواع آرتمیا فرانسیسکانا $F_{ST} = 0/91$ ($N_m = 0/025$) بدست آوردند. (Perez *et al.* (2008). با استفاده از نشانگر RFLP بین آرتمیای دنیای قدیم و جدید $F_{ST} = 0/97$ ($N_m = 0/0078$) را برآورد کردند. تفاوت در شرایط اقلیمی و در نتیجه امکان ایجاد تغییرات در ساختار ژنتیکی موجود در جهت بقا و سازگاری با محیط پیرامون، کاهش میزان انتخاب طبیعی در اثر افزایش مهاجرت گونه‌های جدیدتر و در نتیجه تداوم جریان ژنی، امکان ادغام استخرهای ژنی و کاهش تفاوت ژنی بین موجودات را فراهم می‌کند. درخت فیلوژنتیکی آرتمیا فرانسیسکانا (شکل ۲) نشان می‌دهد که در آرتمیا فرانسیسکانا، از هر گروه اصلی چندین زیر گروه تشکیل شده که این زیرگروه‌ها به صورت درون و بین گروهی با همدیگر مرتبط هستند. این موضوع نشانگر جریان ژنی بین مناطق پراکنش مختلف آنها از طریق مهاجرت بین گروهی و آمیزش‌های انجام شده بین افراد می‌باشد. به طور کلی روابط بین این زیرگروه‌ها، نشانگر روابط نزدیک بین افراد این جمعیت می‌باشد. روابط فیلوژنتیکی آرتمیا اورمیانا (شکل ۳) نشان داد که در این گونه تنها بخشی از گروه اصلی، گروه‌های دیگر را تشکیل می‌دهد. این نشان می‌دهد روابط بین زیر گروه‌ها-ی تشکیل شده بسیار نزدیکتر از آرتمیا

این مطالعه به وسیله دانشگاه گیلان و مرکز تحقیقات آرتمیای کشور پشتیبانی و حمایت شد. نویسندگان از خانم دکتر صالحی استاد گروه زیست شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه گیلان (ایران) و دکتر مונوز استاد گروه بیولوژی دانشگاه سویل اسپانیا و عضو شورای ملی تحقیقات اسپانیا به خاطر همکاری های ارزنده تشکر و قدردانی را می نمایند.

بررسی، آنها را از لحاظ ژنتیکی به گروه های مختلفی تقسیم نموده است که بررسی فواصل ژنتیکی بین گروه ها و زیر گروه ها می تواند امکان مطالعات بعدی بر روی آنها را آسان و گسترده تر نماید.

تشکر و قدردانی

منابع

- Abreu-Grobois FA, Beardmore JA (1982). Genetic differentiation and speciation in the brine shrimp *Artemia*. In: Barigozzi C (Ed.), Mechanisms of Speciation. Alan R. Liss, New York, USA, pp. 336-345.
- Asem A and Rastegar-Pouyani N (2008). Morphological differentiation of *Artemia urmiana* Günther, 1899 (Crustacea: Anostraca) in different geographical stations from the Urmia Lake, Iran. Research Journal of Biological Sciences 3: 222-228.
- Askari N, Abadi MM, Baghizadeh A (2011). ISSR markers for assessing DNA polymorphism and genetic characterization of cattle, goat and sheep populations. Iranian Journal of Biotechnology 9: 222-9.
- Baxevanis AD, Triantaphyllidis GV, Kappas I, Triantaphyllidis I, Triantaphyllidis DC, Abatzopoulos TJ (2005). Evolutionary assessment of *Artemia tibetiana* (Crustacea, Anostraca) based on morphometry and 16S rRNA RFLP analysis. Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research 43: 189-198.
- Baxevanis A, Kappas DI, Abatzopoulos TJ (2006). Molecular phylogenetics and asexuality in the brine shrimp *Artemia* Journal of Molecular Phylogenetics and Evolution 40: 724-738.
- Beigi Nasiri MT, Shokri F, Esmail Khanian S, Tavakoli S (2007). Study on polymorphism of Isfahan native chickens population using microsatellite markers. International Journal of Poultry Science 6: 835-837.
- Benedictal A, Veluraja K, Palavesam A, Immanuel G (2009). Formalin and salinity stress induced cyst induction in *Artemia parthenogenetica*. Romanian Journal of Biological Sciences 3: 4370-4380.
- Buchanan FC, Thue TD (1998). Intra-breed polymorphic information content of microsatellites in cattle and sheep. Canadian Journal of Animal Science 78: 425-428.
- Clegg JS, Jackson SA, Hoa NV, Sorgeloos P (2000). Thermal resistance, developmental rate and heat shock proteins in *Artemia franciscana* from San Francisco Bay and southern Vietnam. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 252: 85-96.
- Clegg JS (2001). Physiological and biochemical adaptations of *Artemia* and their practical use. International Workshop on *Artemia*, May 12-15, 2001, California, USA.
- 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.
- Ernani J, Philla S, Beardmore J (1993). Genetic and morphometric differentiation in Old World bisexual species of *Artemia* (the brine shrimp). Journal of Heredity 73: 47- 56.

- Gajardo G, Crespo J, Triantaphillidis A, Tzika A, Baxevanis AD, Kappas I, Abatzopoulos TJ (2004). Species identification of Chilean *Artemia* populations based on mitochondrial DNA RFLP analysis. *Journal of Biogeography* 31: 547-555.
- Hajirostamloo M (2009). Genetic differentiation of *Artemia Parthenogenetica* from various ecological population of Iran. *Journal of World Academy of Science* 49: 154-160.
- Hajirostamloo M, Pourrabbi R (2011). Genetic differentiation of *Artemia franciscana* in a New World environment. *Journal of Zoology* 6: 16-21.
- Hedrick PW (1999) *Genetic of Populations*. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, Manhattan, USA.
- Lee TH, Chen YM, Chou HN (1999). Toxicity assay of Cyanobacterial strains using *Artemia salina* in comparison with the mouse bioassay. *Taiwanica Journal of Zoologica* 10: 1-8.
- Mallet J (2001). *Gene Flow*. University College London Press, England. pp. 337-360.
- Manaffar R, Zare S, Agh N, Abdolazadeh N, Soltanian S, Sorgeloos P, Bossier P, Vansteppen G (2011). SNP detection in NaK ATP-ase gene $\alpha 1$ subunit of bisexual and parthenogenetic *Artemia* strains by RFLP screening. *Journal of Molecular Ecology Resources* 11: 211– 214.
- Mohammadifar A, Mohammadabadi MR (2011). Application of Microsatellite Markers for a Study of Kermani Sheep Genome. *Iranian Journal of Animal Science*. 42: 337-344 (in Farsi).
- Montiel TM, Canché LGR (2005). Biomass production and nutritional value of *Artemia* sp.(Anostraca: Artemiidae) in Campeche, México. *International Journal of Tropical Biology and Conservation* 53: 447-454.
- Muñuz J, Green AJ, Figuerola J, Amat F, Rico C (2009). Characterization of polymorphic microsatellite markers in the brine shrimp *Artemia* (Branchiopoda, anostraca). *Journal of Molecular Ecology Resources* 9: 547–550
- Naihong X, Audenaert E, Vanoverbeke J, Brendonck L, Sorgeloos P, Meester LD (2000). Low among population genetic differentiation in Chinese bisexual *Artemia* populations. *Heredity Journal and Genetical Society of Great Britain* 84: 238-243.
- Nováková J, Daňová D, Strišková K, Hromada R, Mičková H, Rabibišková M (2007). Zinc and cadmium toxicity using a biotest with *Artemia franciscana*. *Journal of Veterinary Brno* 76: 635-642.
- Perez ML, Valverde JR, Batuecas B, Amat F, Marco R Garesse R (1994). Sepeciation in the *Artemia* genus: Mitochondrial DNA analysis of bisexual and parthenogenetic brine shrimps. *Journal of Molecular Evolution* 38: 156-168.
- Sanguinetti CJ, Neto ED, Simpson AJG (1994). Rapid silver staining and recovery of PCR product separated on polyacrylamide gels. *Journal of Biotechniques* 17: 915-919.
- Shojaei M, Mohammad Abadi M, Asadi Fozzi M, Dayani O, Khezri A, Akhondi M (2010). Association of growth trait and Leptin gene polymorphism in Kermani sheep. *Journal of Cell and Molecular Research* 2: 67-73.
- Sugumar V, Munuswamy N (2006). Interpolation study of three *Artemia* strains from South India based on cyst membrane proteins. *Journal of Marine Biology* 86: 1097-1100.
- Tanguay JA, Reyes RC, Clegg J (2004). Habitat diversity and adaptation to environmental stress in encysted embryos of the crustacean *Artemia*. *Indian Journal of Academy Science* 29: 489-501.
- Wright S (1931). *Evolution in Mendelian Populations*. *Journal of Genetics*. University of Chicago Press, Chicago, USA.

Genetic identification and classification of Iranian *Artemia* using microsatellite markers

Zeynalpour R¹, Mirhosseini S.Z.^{*2}, Dalirsefat S.B³, Zare J¹

¹Msc Student, Dept of Animal Breeding and Genetics, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan. Iran

² Professor of Animal Breeding and Genetics . Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Iran.

³PhD, Dept. of Animal Breeding and Genetics, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Iran.

Abstract

In this study genetic variation of *Artemia urmiana* and *Artemia franciscana* populations were assessed using five microsatellite markers including Af-B105TAIL, Af-A136, Apdq03TAIL, Apdq04TAIL and Apdq05TAIL from *Artemia franciscana* and *Artemia parthenogenetica*. DNA was extracted from 50 cysts of *Artemia urmiana* and *Artemia franciscana* populations individually by Hot Shot method. Polymerase chain reactions (PCR) were successfully conducted with all primers and then the PCR products were electrophoresed using 6% none denaturing gel and stained using silver nitrate method. Hence, all alleles were polymorphic. Average number of alleles and polymorphic information content (PIC) for *Artemia urmiana* and *Artemia franciscana* populations were 3.0, 0.54 and 2.5, 0.38, respectively. All loci in *Artemia urmiana* were in HWE but only the Af-A136 locus in *Artemia franciscana* was in HWE. The average expected heterozygosity for *Artemia franciscana* and *Artemia urmiana* were estimated as 0.6209 and 0.4531, respectively. The phylogeny dendrogram based on the Distance Matrix was drawn using UPGMA for within populations. Our findings demonstrated that microsatellite markers could be an appropriate tool for screening biodiversity in animals. Therefore, extinction of these invaluable genetic resources can be preserved using accurate breeding and management programs.

Keywords: Microsatellite, *Artemia*, Genetic diversity, Heterozygosity, Polymorphism

* Corresponding Author: Mirhosseini S.Z.

Tel: 09111318459

email: szmirhoseini@gmail.com