Archive of SID

زیست‌فناوری دانشگاه تربیت مدرس
دورهٔ ۳، شمارهٔ ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۰

سازگاری مولکولی در *Artemia franciscana, Kellog 1906* پس از ۱۰ سال حضور در زیستگاه جدید (دریاچه مهارلو، استان فارس)

لیلا حسینی[۱]، صمد زارع[۲*]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه
۲-عضو هیات علمی و دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه

***ارومیه، صندوق‌پستی ۱۶۵**
s.zare@urmia.ac.ir
(دریافت مقاله: ۹۰/٤/۲۸، پذیرش: ۹۰/۱۲/۳)

چکیده- آرتمیا سخت‌پوست کوچکی است که توانایی تحمل شرایط متفاوت اکولوژیک را دارد. این موجود به‌خاطر ارزش غذایی بالا و ارزش تحقیقاتی خاص، شناخته‌شده است. گونه *Artemia franciscan*، در اصل بومی قاره آمریکا است اما به تازگی حضور آن در دریاچه مهارلو گزارش شده است. با توجه به متفاوت بودن شرایط اقلیمی زیستگاه طبیعی این گونه در آمریکا با دریاچه مهارلو و پایداری این جمعیت مهاجم پس از ۱۰ سال حضور در زیستگاه جدید، به نظر می‌رسد که این موجود توانسته است خود را با شرایط دریاچه مهارلو وفق دهد. از آن‌جا که هر نوع سازش مولکولی می‌تواند تهدیدی برای جمعیت‌های بومی آرتمیا باشد، در این پژوهش تغییرات مولکولی ایجادشده در ساختار دو ژن مهم COI و HSP26 به روشPCR-RFLP بررسی شده است. برش آنزیمی موفق قطعه 700 bp ژن سیتوکروم اکسیداز I با دو آنزیم *Taq*I و *Eco*RI و همچنین قطعه ۲۱۷bp ژن کدکننده HSP26 با آنزیم *Eco*471، نشان دهنده تغییرات ژنتیکی در جمعیت مهاجم است. هفت هاپلوتایپ اختصاصی یافت‌شده در جمعیت مهاجم باعث ایجاد فاصله ژنتیکی D =۰/۱۸ بین این دو جمعیت شد. بر اساس نتایج این آزمایش و حضور موفق این گونه در دریاچه مهارلو، همچنین توان بالای تولید مثل، حدس زده می‌شود این جمعیت آرتمیای غیر بومی را می‌توان در آینده به عنوان یکی از جمعیت‌های دوجنسی دائمی ایران مطرح کرد که یک تهدید جدی برای حذف جمعیت بومی آرتمیای پارتنوژنز محسوب می‌شود.

کلید واژگان: آرتمیا، دریاچه بزرگ نمک، دریاچه مهارلو، سازش، فاصله ژنتیکی.

www.SID.ir

Archive of SID

۱- مقدمه

آرتمیا از زئوپلانکتون‌های بسیار مهم در آبزی‌پروری است. ارزش غذایی بسیار بالای این موجود و دیگر ویژگی‌های مناسب آرتمیا باعث شده است که این موجود از نظر تحقیقاتی بسیار مورد توجه قرار گیرد [۱ و ۲]. جنس آرتمیا با ٦ گونه دوجنسی و یک سویه پارتنوژنز دارد که در مجموع در بیش از ٦۰۰ منطقه از کره زمین توزیع شده است [۳]. هر کدام از این جمعیت‌ها بر اساس ویژگی‌های مولکولی خود و بر اساس سازش‌های ژنی حاصل‌شده، با اقلیم‌ها و زیستگاه‌های مختلف سازگار شده است. گونه *A.franciscana* Kellogg 1906 آرتمیای دوجنسی قاره آمریکا است که بیشتر در دو دریاچه Great salt lake و Sanfancisco bay زندگی می‌کند. این گونه با توجه به ویژگی‌های سازش‌پذیری بالا، به نقاط گوناگون کره زمین انتشار یافته و بیشترین گسترش جهانی را دارد [۳]. دریاچه مهارلو در استان فارس و در ۱۸ کیلومتری شهر شیراز قرار دارد. این دریاچه با توجه به شوری و شرایط خاص اقلیمی آن زیستگاه نوعی آرتمیای پارتنوژنز به‌نام آرتمیای مهارلو است. شوری دریاچه هم‌زمان با آبگیری آن در بهار از حدود ۸۰ گرم در لیتر تا حد اشباع و خشک شدن دریاچه در اواخر تابستان پیش می‌رود. دمای دریاچه در طول سال بین ۵ تا ۳۵ درجه متغیر است و تقریباً هیچگاه به صفر نمی‌رسد [٤]. در سال ۱۳۷۵ گونه دوجنسی جدید آرتمیا در دریاچه مشاهده شد. این جمعیت مهاجم در سال ۲۰۰۸ و پس از آزمایش‌های دقیق مولکولی به عنوان گونه دوجنسی *A. franciscana* تائید شد [۵]. نمونه‌برداری‌های بعدی نیز گویای از افزایش جمعیت این آرتمیا داخل دریاچه مهارلو بود [٤]. با توجه به این‌که آرتمیا *A.franciscana* به‌صورت طبیعی، بیشتر در دریاچه بزرگ نمک (وتعدادی در خلیج سانفرانسیسکو) با شوری و دمای پایین‌تری نسبت به دریاچه مهارلو زندگی می‌کند؛ احتمال ایجاد سازش‌های فیزیولوزیک و مولکولی در این جمعیت نوظهور در دریاچه مهارلو کم نیست.

دریاچه بزرگ نمک آمریکا (Great Salt Lake) بزرگ‌ترین دریاچه نمک در نیم‌کره غربی کره زمین و چهارمین در جهان است. میانگین عمق آن، ۱۰ متر و شوری آن ۲۷۰-۵۰ گرم در لیتر است [٦]. دمای آب دریاچه از زیر صفر در زمستان تا بیش از ۲٦ درجه سانتی‌گراد در تابستان متغییر است؛ البته این شوری برای آرتمیا مناسب است زیرا در بین جانوران پرسلولی آرتمیا تنها جانوریست که قادر است شرایط بسیار سخت محیطی مانند شوری بالا (۳۰۰-۵۰ گرم در لیتر نمک) را تحمل کند [۷]. زندگی در چنین شرایط اقلیمی سختی، آرتمیا را توانا ساخته است که به سرعت به شرایط ناگوار طبیعی سازش یابد. پیش از این تحقیقات مختلفی نشان داده است که عواملی مانند تغییر مقدار پروتئین‌های شوک حرارتی (HSP) یا تغییر و سازگاری مولکولی ژن‌های میتوکندریایی، کلید ایجاد سازش اکتسابی به شرایط جدید است [۸]. تحقیقات Clegg و همکاران (۲۰۰۰) [۹] نشان داده است که حتی سیست‌های آرتمیا به دلیل نقش P26، می‌توانند دماهای بالا، خشکی و چندین سال آنوکسی را تحمل کنند. این پروتئین، یک چاپرون مولکولی است که بقای سلولی را با جلوگیری از تجمع برگشت‌ناپذیر پروتئین [۱۰و۱۱] و مهار آپوپتوزیس پیش می‌برد [۱۲]. دیگر پروتئین‌های این خانواده مانند HSP70-100 نیز نقش مهمی در تحمل استرس داشته و در ایجاد سازش اهمیت دارند. رشد در شرایط دور از حالت نرمال بجز سازش بسیار بالا در پروتئین‌های انتقال دهنده یون‌های ورودی به داخل بدن

www.SID.ir

Archive of SID

به سازش بالایی در تغییر ساختار زنجیره تنفسی برای تأمین نیاز انرژی هم نیاز دارد. به‌عنوان یکی از ساز و کارهای سازش سریع در موجودات مختلف، امروزه ژنوم میتوکندریایی به‌طور گسترده برای دست‌یابی به نشانگرهای ژنتیکی در گونه‌های جانوری به‌کار می‌رود [۱۳]. ویژگی‌هایی مانند کوچکی مولکول [۱٤]، توارث مادری و سرعت بالای جهش، که پنج تا ده برابر ژنوم هسته‌ای است؛ به‌گونه‌ای که در هر میلیون سال، دو درصد تغییر می‌کند؛ و به‌عنوان ساعت تکاملی استفاده می‌شود؛ برخی ژن‌های مستقر در آن برای بررسی‌های بین گونه‌ای مانند سیتوکروم b و c و برخی ژن‌های دیگر برای بررسی درون گونه‌ای و جمعیت‌ها مثل ناحیه D-Loop و ND5/6 بسیار ارزشمند است [۱۵].

میتوکندری منشأ مادری دارد و نوترکیبی در آن اتفاق نمی‌افتد، این خاصیت باعث بروز اختلافات ژنتیکی بیشتر در ژنوم میتوکندری نسبت به ژنوم هسته‌ای شده است .از این رو برای تشخیص گروه‌هایی که برای حتی یک دوره ۱۰ ساله از هم جدا بودند نشانگر است [۱٦]. از طرفی چون ژنوم میتوکندری بر هم کنش شناخته شده‌ای با محیط ندارد به‌نظر می‌رسد گوناگونی ژنتیکی به‌دست آمده، به‌درستی بازتابی از وجود جدایی تولید مثلی باشد [۱۷].

بین ناحیه‌های ژنوم میتوکندری در سخت‌پوستان، ژن COI نشانگر قدرتمندی برای شناسایی، هم در سطوح بین گونه‌ای و هم درون گونه‌ای است. مطالعات Gajardo و همکاران [۱۸] روی این ناحیه با استفاده از تکنیک PCR-RFLP، راه ساده‌ای برای شناسایی گونه‌ها و جمعیت‌های آرتمیا فراهم کرد. بر این اساس ثابت شده که ژن COI برای مطالعات فیلوژنتیک آرتمیا برای ارزیابی تاکساهای که ۱۵۰-۱٤۵ میلیون سال پیش وگرا شده مناسب است [۱۹].

در این پژوهش و با تکیه بر یافته‌های قبلی، تکنیک PCR-RFLP برای ارزیابی اختلافات ایجادشده در جمعیت *A. francisvana* قبل و بعد از مهاجرت به اقلیم جدید استفاده شد. نتایج ارزشمند این پژوهش می‌تواند جوابی برای این سؤال باشد که آیا گونه مهاجم *A. franciscana* یک جمعیت در حال گذر است یا این‌که می تواند در ردیف یک گونه بومی ایران قرار گیرد. به‌این ترتیب مشخص خواهد شد که آیا در آینده گونه بومی پارتنوژنز موجود در دریاچه در خطر انقراض قرار خواهد گرفت یا خیر.

۲- مواد و روش‌ها

با توجه به این‌که سیست آرتمیای واردشده به دریاچه مهارلو از گونه *Artemia franciscana* (GSL) است (گزارش‌های چاپ‌نشده)، مقداری از سیست طبیعی دریاچه که در طی سال‌های ۱۹۹٦-۱۹۹۵ صید شده بود از سیست بانک مرکز جهانی آرتمیا *Artemia* Reference Centre (دانشگاه گنت- بلژیک) تهیه شد. این سیست‌های به‌عنوان یک مستقل همراه سیست‌های تهیه شده از دریاچه مهارلو که آلوده به سیست‌های آرتمیای مهاجم (*A. franciscana*) (تیمار دوم) بود در شرایط استاندارد آزمایشگاهی شامل آب دریا با شوری ۳۵ گرم در لیتر و دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد و PH=۸ و هوادهی و نور کافی تفریخ (hatch) شد [۲۰]. لاروهای اینستار I هر دو تیمار در تراکم ۵۰۰ ناپلیوس در هر لیتر به درون بطری‌های یک لیتری حاوی آب با شوری ۸۰ گرم در لیتر در ٤ تکرار انتقال داده و مدت ۲۰ روز با ترکیبی از

www.SID.ir

Archive of SID

مخمر Lansy PZ و جلبک تک‌سلولی *Dunaliella tertiolecta* پرورش داده شد [۲۱].

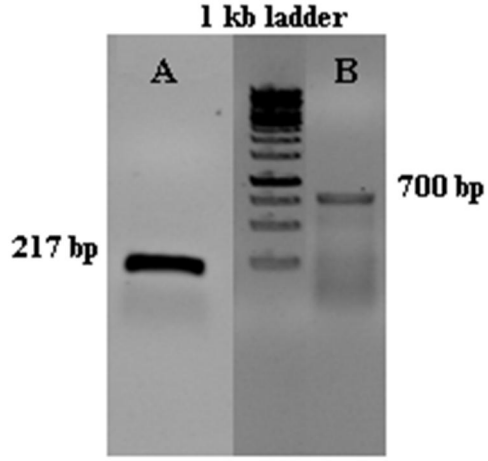
DNA ژنومی به روش Chelex از هر نمونه منفرد آرتمیا از ۲۰ نمونه آرتمیای بالغ استخراج شد [۲۲]. به دلیل آلودگی سیست‌های دریاچه به دو تیپ مختلف آرتمیای دو جنسی و پارتنوزنز، ابتدا درستی آرتمیای دوجنسی به‌روش مولکولی تأیید شد [۲۳]. برای تکثیر قطعه COI ژن میتوکندری از آغازگرهای اختصاصی ژن COI شامل آغازگر پیشرو ('5'-ggt-caa-atc-ata-aag-ata-ttg-g-3') و آغازگر معکوس ('5-taa-act-tca-ggg-tga-cca-aaa-aat-ca-3') استفاده شد [۲٤]. برای تکثیر رشته HSP26 نیز از آغازگرهای پیشرو ('5-gga-gaa-gaa-tga-gaa-g-3') و معکوس ('5'-tct-ctt-tgg-acg-tgt-cca-tat-tc-3') استفاده شد [۲۵]. برنامه دمایی $95^{\circ}C$ مدت ۳ دقیقه (مرحله واسرشت شدن اولیه)، ۳۳ سیکل حرارتی شامل $95^{\circ}C$ به‌مدت ۱ دقیقه (واسرشته شدن)، $50^{\circ}C$ به مدت ۱ دقیقه (اتصال پرایمرها)، $72^{\circ}C$ به مدت ۱ دقیقه و ۲۰ ثانیه (بسط) و یک بسط نهایی دت ۱۰ دقیقه برای ژن COIانجام شد. برنامه دمایی برای تکثیر ژن HSP26 شامل ۱ چرخه به‌مدت ۲ دقیقه در دمای $94^{\circ}C$ و در ادامه ۳۵ چرخه به مدت ۱۵ ثانیه در دمای $94^{\circ}C$، ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه در دمای $54^{\circ}C$ و ۳۰ ثانیه در دمای $72^{\circ}C$ و ۱ چرخه به‌مدت ٤ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای بسط نهایی بود. محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد جداسازی و پس از تهیه تصویر با دستگاه عکس‌برداری، از تکثیر ژن محصول PCR ژن سیتوکروم اکسیداز I با هشت آنزیم (*Hinf*I, *Alu*I, *Taq*I, *Eco*RI, *Nde*II, *Tru1*I, *Mbo*I،*Hae*III) و محصول ژن شوک حرارتی با سه آنزیم (*Alu* I, *Tru1*I, *Eco*471) هضم شد. محلول واکنش آنزیمی حاوی ۸-٦ میکرولیتر از محصول PCR، ۲ میکرولیتر بافر آنزیم و ۰/۵ تا ۱ میکرولیتر از آنزیم‌های مختلف و آب مقطر استریل تا حجم ۲۰ میکرولیتر است. نمونه‌ها برای همه‌ی آنزیم‌ها بجز *Taq* I و *Tru1*I (که در دمای ٦٥ درجه سانتی‌گراد فعالیت می‌کنند) در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱٦ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. نمونه‌های هضم‌شده همراه ٤ میکرولیتر محلول لودینگ در کنار نشانگر DNA روی ژل آگارز ۳ درصد الکتروفوروز شد. محصول برش آنزیمی زیر اشعه UV دستگاه عکس‌برداری از ژل بررسی شد. الگوهای برش آنزیمی به‌صورت دستی تفکیک شده و بر اساس تنوع الگوهای مشاهده‌شده شماره‌گذاری شد. تنوع هاپلوتیپی ایجادشده با استفاده از نرم‌افزار Popgen 32 آنالیز آماری شد. در این آنالیز هر جایگاه برش آنزیمی به عنوان یک لوکوس در نظر گرفته شده و تنوع ژنتیکی و فاصله ژنتیکی با وارد کردن اطلاعات تهیه‌شده در نرم‌افزار و با معادله (۱۹۷۳) Nei's genetic distance محاسبه شد.

۳- یافته‌ها

نتایج الکتروفورز محصول PCR مربوط به قطعه ۷۰۰ جفت‌باز از ژن سیتوکروم اکسیداز I و همچنین قطعه ۲۱۷ جفت‌باز مربوط به ژن HSP26 روی ژل آگارز ۱/۲درصد در شکل ۱ آورده شده است. مقاسیه باندهای الکتروفورزی نشان داد که محصول PCR مربوط به هر دو ژن تولیدشده در هر دو جمعیت آرتمیا، وزن یکسانی داشته و از نظر وزن کلی در بین دو جمعیت اختلافی دیده نمی‌شود.

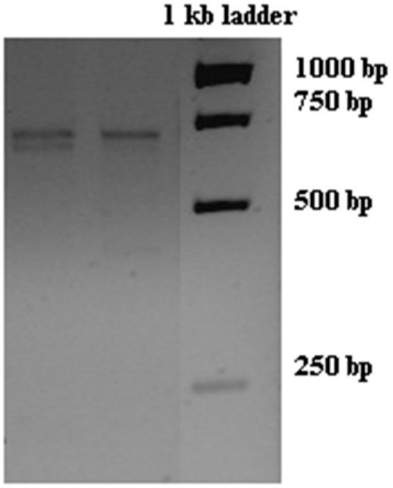
www.SID.ir

Archive of SID

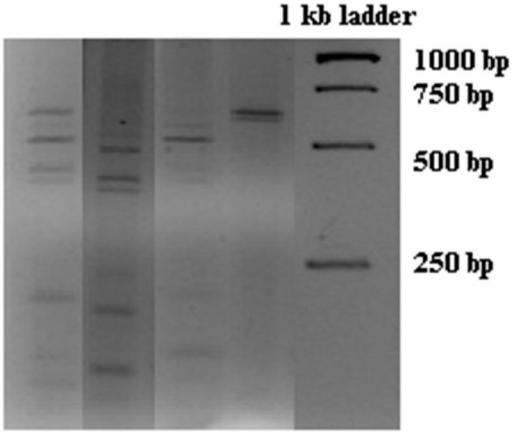


شکل ۱ ژل آگارز مربوط به: A) الکتروفورز قطعه ۲۱۷ جفت‌بازی ناحیه B HSP26) قطعه ۷۰۰ جفت‌بازی ناحیه COI

قطعه bp ۷۰۰ از DNA میتوکندریایی تولیدشده به‌وسیله‌ی PCR پس از برش آنزیمی با ۸ آنزیم شاخص (*Hinf*I, *Alu*I, *Taq*I, *Eco*RI, *Nde*II, *Mbo*I, *Hae*III, *Tru1*I) و رنگ‌آمیزی ژل، عکس‌برداری شد. همه‌ی آنزیم‌ها سبب هضم یا برش DNA نشد و باندهای به‌دست آمده از نظر کیفیت واضح و با میانگین مجموع اندازه قطعات برش‌یافته با محصول اصلی PCR مطابقت داشت. بجز دو آنزیم *Taq*I و *Eco*RI، هیچ تفاوتی در نمونه‌های برش‌یافته از نظر تنوع ژنتیکی مشاهده نشد. نمونه‌های برش‌یافته با دو آنزیم *Taq*I و *Eco*RI، الگوی چندشکلی (polymorphism) جمعیت را نشان داد که نشانگر محل‌های شناسایی متفاوت روی توالی نوکلئوتیدی قطعه مزبور بود. همان‌گونه که در شکل دیده می‌شود تنها الگوی متفاوت (پلی‌مورفیسم) در جمعیت آرتمیای Great Salt Lake مشاهده شده است. بقیه‌ی نمونه‌ها فاقد تفاوت الگوی برش چندشکلی ندارند (شکل ۲ و ۳).



شکل ۲ برش آنزیمی قطعه سیتوکروم اکسیداز با آنزیم *Eco*RI؛ در مجموع ۲ هاپلوتایپ متفاوت از دو جمعیت *A. franciscana* مربوط به دریاچه مهارلو و Great Salt Lake.

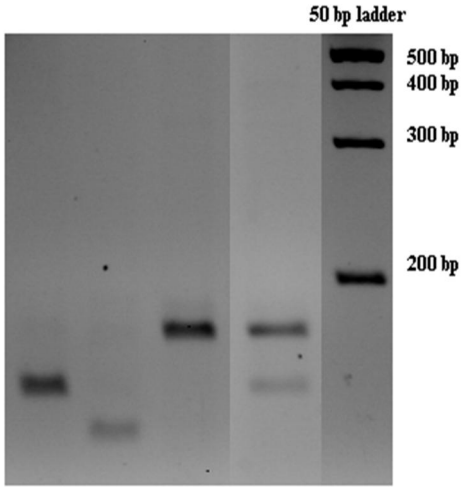


شکل ۳ برش آنزیمی قطعه سیتوکروم اکسیداز با آنزیم *Taq*I؛ در مجموع ٤ هاپلوتایپ متفاوت از دو جمعیت *A. franciscana* مربوط به دریاچه مهارلو و Great Salt Lake.

قطعه bp ۲۱۷ ژن HSP26 با ۳ آنزیم شاخص (*Alu*I, *Tru1*I, *Eco*471) برش داده شد. برش آنزیمی این ناحیه تنها با آنزیم *Eco*471 باعث شد که الگوی برش آنزیمی چندشکلی یا تنوع ژنوتیپی بین این دو جمعیت مشاهده شود (شکل ٤).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ٤ برش آنزیمی قطعه ژن HSP26 با آنزیم *Eco*471؛ در مجموع ٤ هاپلوتایپ متفاوت از دو جمعیت *A. franciscana* مربوط به دریاچه مهارلو و Great Salt Lake.

تنوع ژنتیکی Nei's بالایی بین جمعیت‌های مطالعه شده مشاهده شد. نتایج بررسی تنوع نوکلئوتیدی و فاصله ژنتیکی بین دو جمعیت در معادله Nei's (1973) نشان داد که از نظر ژنتیکی این دو جمعیت ۰/۸۳ شباهت ژنتیکی دارند و فاصله ژنتیکی آن‌ها D=۰/۱۸ است. حضور الل‌های منحصر به فرد در جمعیت آرتمیای مهاجم دریاچه مهارلو توانست الگوهای منحصر به فردی برای آن‌ها ایجاد کند. این آزمون نشان داد که لوکوس آنزیم *Eco*471 پلی‌مورفیک‌ترین ناحیه و ژن HSP26 پلی‌مورفیک‌ترین ژن است (جدول ۱). این بررسی همچنین نشان داد که از ٤ آلل متفاوت یافت‌شده برای لوکوس Eco471 حدود ۲/۸۹ عدد از این آلل‌ها پلی‌مورفیک بود که بیش از دیگر جایگاه‌های ژنی است؛ بالاترین میزان تنوع ژنتیکی بر اساس رابطه Nei's (1973) با کمینه عددی ۰/٦٦٤٤ برای همین جایگاه ژنی یافت شد (جدول ۱).

جدول ۱ بررسی تنوع ژنتیکی بر اساس جایگاه‌های برش آنزیمی (لوسی ها)

جایگاه ژنی (لوکوس)	تعداد آلل‌ها	تعداد آلل‌های موثر	Nei's (1973) gene diversity
*Taq*I	۲/۰۰	۲/۰۰۰	۰/۵۰۰۰
*Eco*RI	۲/۰۰	۱/۷۰٤۱	۰/٤۱۳۲
*Eco*471	٤/۰۰	۲/۹۷۹٤	۰/٦٦٤٤
میانگین	۲/٦٦٦۷	۲/۲۲۷۸	۰/۵۲۵۹
انحراف استاندارد	۱/۱۵٤۷	۰/٦٦۷۵	۰/۱۲۷٦

٤- بحث و نتیجه‌گیری

میگوی آب شور یا آرتمیا گروهی از موجودات است که به‌صورت جنسی و یا پارتنوژنز تولید مثل کرده و حدس زده می‌شود که حدود ۵/۵ سال پیش در نواحی مدیترانه از هم مشتق شده است [۲٦ و ۲۷]. گسترش در نواحی مختلف با ویژگی‌های گوناگون اکولوژیک باعث شده است که با مرور آرتمیاهای اولیه از نظر ژنوتیپی به شرایط ویژه زیستگاه‌های خود سازش پیدا کرده و گونه‌های جدید، به‌شکلی که گونه‌زایی آلوپاتریکی (Allopatric speciation) نامیده می‌شود، ایجاد شود [۲]. با تکیه بر مطالعات آمیزش آزمون (Cross breeding)، مطالعات موفولوژیک و مولکولی انجام‌شده، هم اکنون این جنس در دنیا ٦ گونه و صدها جمعیت در دنیا دارد که در همه‌ی قاره‌ها گسترش یافته است [۳]. به‌این ترتیب آرتمیا می‌تواند مانند هر موجود زنده دیگری به هر نقطه از دنیا انتشار پیدا کند. اما این توزیع اغلب در مورد تمامی گونه‌ها یکنواخت نبوده و برخی گونه‌ها توانایی گسترش و سازش بهتری از خود نشان می‌دهند.

مطالعات انجام‌شده نشان داده که اکوسیستم‌های آبی از مهم‌ترین سیستم‌های آسیب‌پذیر به‌وسیله‌ی گونه‌های

www.SID.ir

Archive of SID

جانوری و گیاهی مهاجم است [۲۸]. گسترش سریع گونه‌های مهاجم در زیستگاه‌های تازه و سیستم‌های دریایی، سواحلی و دریاچه‌های نمک در سرتاسر جهان، طی دهه‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است [۲۹]. این گونه‌های مهاجم آبزی برای چندین دهه می‌توانند در این اکوسیستم‌ها به‌صورت نامشخص باقی بمانند [۳۰] یا با استفاده از تکنیک‌های مولکولی شناخته شوند [۳۱ و ۳۲]. ذخیره‌سازی گونه‌های جدید در یک منطقه، بیشتر مواقع به‌خصوص در زمانی‌که این کار بدون مطالعه انجام شود می‌تواند تهدید بسیار جدی برای حیات زیست محیط محسوب شود.

به‌تازگی تحقیقات نشان داده است که آرتمیای بومی آمریکا (*A. franciscana*) توانایی سازکاری بالایی دارد و در بسیاری از نقاط دنیا به‌عنوان یک گونه غیربومی و مهاجم پخش شده و در آن مناطق ماندگار شده است [۳ و ۳۳]. پایداری موجودات در محیط‌های جدید با تفاوت‌های بسیار زیاد اقلیمی فقط در صورت سازگاری فیزیولوژیک و اکولوژیک امکان‌پذیر است. در ادامه نیز تفاوت‌های اکولوژیک می‌تواند سبب سازگاری ژنتیکی شده و در نتیجه پاسخ‌های فیزیولوژیک را ایجاد می‌کند که موجود از خود در مقابل این استرس‌های محیطی نشان می‌دهد. شدت استرس‌های محیطی بستگی به توالی و اندازه آسیب و توانایی جبران موجود زنده خواهد داشت که قابل ردیابی و بررسی است [۳٤]. امروزه یکی از اهداف اصلی آزمایش‌های ژنتیک مولکولی در آبزیان، آنالیز ساختار جمعیتی، تنوع ژنتیکی، ارتباط‌های گونه‌ای، سیستماتیک و طبقه بندی آن‌ها است. تکنیک‌های متفاوتی مانند RFLP, Allozyme, AFLP و RAPD نقش اساسی برای دستیابی به شاخص تفکیکی بین جمعیت‌ها و روابط ژنتیکی بین گونه‌ها دارند [۳۵].

در این ارتباط، آنالیز PCR-RFLP به‌عنوان یک روش مطمئن برای مطالعات سیستماتیک و تعیین گونه‌ها و همچنین آنالیز جمعیت‌ها شناخته شده [۳٦] روش مناسبی برای شناسایی گونه‌های سخت‌پوستان و ماهیان در همه مراحل چرخه زندگی است [۳۷]. با توجه به ساختار خاص mtDNA (ژنوم میتوکندریایی) پیش از این توالی این ناحیه برای شناسایی تاکسون‌های نامعین، بررسی گونه‌زایی و حتی شناسایی جمعیت‌های آرتمیا بررسی شد [۳۸ و ۳۹]. برای نمونه بررسی گونه‌ها در جنس آرتمیا (نمونه‌های دوجنسی و پارتنوژنز) بر اساس سکانس نوکلئوتیدی دو ناحیه mtDNA شامل COI و Cyt b،اختلاف زیادی در سطح نوکلئوتیدی (به‌طور متوسط ۱۵درصد) بین دو گونه دوجنسی *A. franciscana* و *A. salina* و دو سویه پارتنوژنز از کشور اسپانیا نشان داد [٤۰]. در این تحقیقات فاصله تکاملی بین دو سویه آرتمیای پارتنوژنز حدود D=۰/۱۲۷ محاسبه شد؛ همچنین ارتباط واضحی بین این گونه از آرتمیاها با نمونه‌های دوجنسی مشاهده نشد. استفاده هم‌زمان از نشانگرهای مولکولی و نشانگرهای مورفولوژیک نشان داد که همه‌ی نمونه‌های آرتمیای مطالعه شده حتی آرتمیاهای بکرزای مطالعه به جمعیت‌های متفاوت تعلق داشتند. تحقیقات Bossier و همکاران در سال ۲۰۰٤ با استفاده از mtDNA-RFLP توانست الگوی جالبی را از گوناگونی ژنتیکی سیست‌های تجاری آرتمیا به‌دست آورد.

این پژوهش در کل فقط ۲ آنزیم در ناحیه COI و یک آنزیم در ناحیه HSP26 توانست پلی مورفیسم مولکولی را شناسایی کند. نتایج برش آنزیمی نشان داد که هاپلوتایپ‌های اختصایی تولیدشده در ناحیه ژن HSP26 برای جمعیت مهاجم دریاچه مهارلو به تنهایی می‌تواند برای شناسایی جمعیت غیربومی مهاجم استفاده شود.

www.SID.ir

Archive of SID

به‌عنوان یک نتیجه نهایی، همان‌گونه که در پژوهش Kappas و همکارانش (۲۰۰٤) نیز اشاره شده است پس از بررسی‌های آلوزایمی تعیین توالی این ناحیه به‌دقت می‌تواند میزان دقیق اختلاف این دو جمعیت را تعیین کند. این پژوهش برای درک مفاهیم تکاملی موجودات می‌تواند نقش آرتمیا را به‌عنوان یک جاندار مدل بیش از پیش ثابت کند. فاصله ژنتیکی یافت‌شده در این پژوهش (D=۰/۱۸) به تنهایی نشان‌دهنده اختلاف ژنتیکی زیاد دو جمعیت مطالعه شده بود. لازم به ذکر مطالعات مختلف جمعیتی نشان داده است که مقدار عددی فاصله ژنتیکی یافت‌شده بین این دو جمعیت نشانگر اختلاف بین جمعیتی (inter-population differentiation) است. به‌این ترتیب با وجود این‌که این دو جمعیت در حقیقت متعلق به یک جمعیت واحد بوده است،انتظار داریم اختلاف آنان در حد اختلاف درون جمعیتی (intra-population differentiation) باشد که این اختلاف فراتر رفته است. همان‌گونه که اشاره شد پژوهش محققان مختلف با استفاده از تکنیک‌های گوناگون مولکولی نشان داده است که گونه‌زایی (speciation) در آرتمیا آلوپاتریکی (منشاء گرفته از محیط) است (۲). بر این اساس و با تکیه بر تئوری گونه‌زایی در آرتمیا، و با توجه به فاصله ژنتیکی یافت‌شده بین دو جمعیت و میزان تنوع ژنتیکی یافت‌شده در لوکوس‌های ژنی، پیش‌بینی این جمعیت در چندین سال گذشته در حال جدا شدن از جمعیت اصلی GSL بوده و با کمک سازش مولکولی با محیط زیست جدید و یا با استفاده از پدیده‌هایی مانند تأثیر بنیانگذار (founder effect) یک جمعیت جدید ایجاد کرده است.

لازم به یادآوری است چنین اتفاقاتی در مورد آرتمیا، تازه نیست زیرا همانطور که پیش‌تر نیز اشاره شد در ارتباط با گونه‌های آرتمیای تازه انتقال‌یافته به زیستگاه‌های جدید، بررسی‌های Kappas و همکاران در سال ۲۰۰٤ نشان داد که بین جمعیت آرتمیای بومی San Francisco Bay (SFB) و آرتمیای تجاری ویتنام که بیش از ۱۰ سال پیش (در زمان اجرای پژوهش) به ویتنام انتقال داده شده بود تفاوت‌های زیادی مشاهده می‌شود. این بررسی، کاهش گوناگونی هاپلوتیپی را از٤۰/٦ درصد در *Artemia* (SFB) به ۱۰/۵ درصد در *Artemia* (SFB-Vietnami) معروفی‌شده به ویتنام نشان داد [۳٤]. میزان تفاوت‌های یافت‌شده (در بررسی‌های آلوزامی و بررسی‌های ژنوم میتوکندریایی) و یا به بیان بهتر، گوناگونی ایجادشده بین این دو جمعیت تا حدی بود که اکنون آرتمیای تجاری ویتنام به‌نام *A. franciscana,* Vietnami شناخته می‌شود. این پژوهش نشان داد که بر خلاف نتایج آنالیز آلوزایمی، کاهش معنی‌داری در گوناگونی در mtDNA جمعیت آرتمیای ویتنامی دیده می‌شود.

پیش از این با استفاده از توالی ژنوم در ژن Na/K atpase، فاصله ژنتیکی میانگین دو تیپ آرتمیای دوجنسی با پارتنوژنز حدود D=۰/٤ محاسبه شده بود [۲۳]. در همان پژوهش فواصل ژنتیکی زیادی با مقدار عددی D=۰/۱۱ بین *A. urmiana* و برخی جمعیت‌های پارتنوژنز گزارش شد. در پژوهش سال ۱۹۹۵ به‌وسیله‌ی Gajardo و همکارنش [٤۱] اختلاف مولکولی و فاصله ژنتیکی برابر D=۰/۱۲٦ برای جمعیت‌های *A.franciscana* آمریکای جنوبی گزارش شده بود. پیش از این استفاده از اندازه‌گیری فاصله ژنتیکی (Nei's genetic distance=D) بر اساس اختلافات آلوزامی توانست فاصله ژنتیکی دو دسته آرتمیای عصر قدیم و جدید را حدود D=۱/۹۵۲-۱/٤۹۷ محاسبه کند [۲۷]. با استفاده از همین تکنیک نیز فاصله ژنتیکی

www.SID.ir

Archive of SID

A. franciscana با *A. persimilis* حدود D=۱/۰۷۳ محاسبه شد.

با توجه به آنچه اشاره شد و با مراجعه به نتایج این پژوهش فاصله ژنتیکی یافت‌شده به‌وسیله‌ی بررسی نشانگر میتوکندریایی همراه با بررسی مقایسه‌ای ژنوم هسته‌ای آرتمیای غیربومی انتقال‌یافته به دریاچه مهارلو، نشان می‌دهد فاصله ژنتیکی یافت‌شده، در حد بالایی است. این فاصله ژنتیکی تا اندازه‌ای است که به جرأت می‌توان بومی‌شدن جمعیت *A. franciscana* را ادعا کرد. بدین ترتیب با در نظر گرفتن پویایی جمعیت مهاجم در دریاچه مهارلو، قدرت سازگاری و توانایی تولید مثل بالا و همچنین شرایط اقلیمی دریاچه مهارلو، باید در آینده منتظر افزایش جمعیت آرتمیای دوجنسی داخل دریاچه شد. البته در این‌جا اهمیت پدیده‌های دیگر مانند دریفت ژنتیکی را نباید از نظر دور کرد؛ زیرا جمعیت انتقال‌یافته به دریاچه مهارلو دوجنسی بوده و با شانس پایین جفت‌یابی مناسب، آلل‌های این جمعیت غیربومی در داخل این جمعیت دست‌کاری خواهد شد. در هر حال وجود آرتمیای بیگانه داخل دریاچه مهارلو، زنگ خطر را برای حذف احتمالی جمعیت بومی بکرزای در داخل دریاچه به صدا در می‌آورد. امید است مطالب ارائه‌شده در این مقاله راه را برای تحقیقات بیشتر برای پیش‌گیری از آلودگی ذخایر اکولوژیک بومی و از دست رفتن بانک ژنی ایران هموار سازد.

۵- سپاسگزاری

این پژوهش با همکاری آقای دکتر رامین مناف فر، خانم آفاق فلاحتی و کارشناس محترم، خانم راضیه پاک‌ترمنی در پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبزی دانشگاه ارومیه انجام شد.

٦- مراجع

[1] Dhont, J., and Sorgeloos, P. (2002) Applications of *Artemia*. In: Abatzopoulos, T., Beardmore, J., Clegg, J., Sorgeloos, P. (Eds). *Artemia*: basic and applied biology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands, 251-277.

[2] Gajardo, G., Abatzopoulos, T.J., Kappas, I., and Beardmore J.A. (2002) 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, 225-250.

[3] Van Stappen, G. (2008) *Artemia* biodiversity in Central and Eastern Asia. Ph.D.Thesis, University of Ghent, Ghent, Belgium.

[٤] مناف فر ر؛ مطالعه جامع آرتمیای مهارلو. گزارش نهایی طرح تحقیقاتی مشترک (۱۰۲) دانشگاه ارومیه (۱۳۸۵) اداره کل شیلات استان فارس.

[5] Manaffar, R., Falahati, A., Moshtagiyan, A., Mosavi, S.M., Atashbar, B. and Asem A. (2008) First report for existence of *Artemia franciscana* coexistence with endemic parthenogenetic *Artemia* population in inside of the Lake Maharlu, Iran. Conference of world aquaculture. Bussan, Korea.

[6] Gwynn, J. W. (2002) Great Salt Lake, an Overview of Change: A Special

www.SID.ir

Archive of SID

Publication of the Utah Department of Natural Resources. Salt Lake City: Department of Natural Resources.

[7] Brown, R. (1992) Population genetics andecology of *Artemia*: Insights intoparthenogenetic reproduction. Elsevier SciencePublishers Ltd.

[8] Bossier. P., Gajardo, G., and Beristain, P. (2009) Species- specific RFLP pattern in the Heat Shock Protein 26 gene a single–locus tool for species identification and experimental testing of habitat-induced isolation in the New world *Artemia* species.Molecular Ecology Resources.Vol. 10, pp. 229–231.

[9] Clegg, J.S., Jackson, S.A., Van Hoa, N., and 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.

[10] Sun, Y., Mansour, M., Crack, J.A., Gass, G.L., and MacRae, T.H. (2004) Oligomerization, chaperone activity, and nuclear localization of p26, a small heat shock protein from *Artemia franciscana*, J. Biol. Chem. 279: 39999–40006.

[11] Sun, Y., and MacRae, T.H. (2005) Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function, Cell. Mol. Life Sci. 62: 2460-2476.

[12] Villenueve, T.S., Sun, Y., Oulton, M.M., Oliver, A.E., and MacRae, T.H. (2006) Inhibition of apoptosis by p26: implications for small heat shock protein function during *Artemia* development. Cell Stress and Chaperones. 1: 71-80.

[13] Hynes, A., Ferguson, A., and Mccann, M.A. (1996) Variation in mtDNA and post-glacial colonization of northestern Europe by brown trout. Journal of fish biology.vol.48 ,pp.45-51.

[14] Rezvani Gilkolaei, S. (2000) Study of mtDNA variation of Russian sturgeon population from the south Caspian sea using RFLP Analysis PCR amplified ND 5/6 Gene Regions.Iranian Journal of fisheries science.Vol.2 ,NO1 ,pp.13-36

[15] Beckenbach, A.T.(1991) Rapid mtDNA sequence analysis of populations using polymeras chain reaction.Sci.Vol.46, pp.125-134.

[16] Berrebi, P. (1996) Speciation of the genus Barbus in the north Mediterranean basin:recent advances from biochemical genetics.Biological conservation .Vol.72, pp.237-249.

[17] Ovenden, J.R., and Brasher, D.J. (1994) Stock identity of the red (Jasus edwardsii) and green (J. verreauxi) rock lobster inferred from mitochondrial DNA analysis. In: Phillips BF, Cobb JS, Kittaka J (eds) Spiny lobster

www.SID.ir

Archive of SID

management. Fishing News Books, pp 230-249.

[18] Gajardo, G., Crespo, J., Triantafyllidis, A., Tzika, A., Baxevanis. A., Kappas, I.,Abatzopoulos, T.J. (2004) Species identification of Chilean *Artemia* populations basedon mitochondrial DNA RFLP analysis. Journal of Biogeography 31: 547-555.

[19] Hillis, D.M., and Dixon, M.T. (1991) Ribosomal DNA: molecular evolution phylogenetic inference and.Q.Rev.Biol.66, 411-453.

[20] Lavens, P., Sorgeloos, P. (Eds) (1996) Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper No. 361, 295 pp.

[21] Coutteau, P., Brendonck, L., Lavens, P., and Sorgeloos, P. (1992)The use of manipulated baker'syeast as an algal substitute for laboratory culture of Anostraca. Hydrobiologia 234:25-32.

[22] Estoup, A., Largiader, C.R., Perrot, E., and Chourrout, D. (1996) Rapid one-tube DNA extraction for reliable PCR detectionof fish polymorphic markers and transgenes.*Molecular marine biology and biotechnology*, 5: 295-298.

[23] Manaffar, R., Zare, S., Agh, N., Abdolahzadeh, N., Soltanian, S., Sorgeloos, P., Bossier, P., and Van Stappen, G. (2010) SNP detection in Na/K ATP-ase gene a1 subunit of bisexual and parthenogenetic *Artemia* strains by RFLP screening. Molecular Ecology Resources 11: 211–214.

[24] Folmer, O.M., Black, W., Hoeh, R., Lutz, R., and Vrijenhoek, R. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome coxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 3, 294–299.

[25] Qiu, Z., Bossier, P., and Wang, X. (2006) Diversity structure and expression of the gene for p26 a small heat shock protein from *Artemia*. Genomics, 88, 230-240.

[26] Abreu-Grobois, F.A., and Beardmore, J.A. (1982) Genetic differentiation andspeciation of the brine shrimp *Artemia*. In Barigozzi, C. (ed.), Mechanisms ofspeciation. Alan R. Liss Inc., New York. pp. 345 - 376.

[27] Abreu-Grobois, F.A. (1987) A review ofthe genetics of *Artemia*. In: *Artemia*research and its applications.Morphology, genetics, straincharacterization, toxicology, vol. 1. P.Sogerloos, D.A.Bengtson, W.Decleir,

www.SID.ir

Archive of SID

and E. Jaspers (Eds).Universa Press, Wetteren, Belgium.380 p.

[28] Grosholz, E. (2002) Ecological and evolutionary consequences of coastal invasions. *Trends in Ecology and Evolution*, 17(1): 22-27.

[29] Roman, J., and Darling, J.A. (2007) Paradox lost: genetic diversity and the success of aquatic invasions. Trends in Ecology and Evolution, 22(9): 454-464.

[30] Lee, C.E. (2000) Global phylogegraphy of a cryptic copepod species complex and reproductive isolation between genetically proximate "populations". *Evolution*, 54(6): 2014-2027.

[31] Mergeay, J., Verschuren, D., and De Meester, L. (2005) Cryptic invasion and dispersal of an American *Daphnia* in East Africa. *Limnology and Oceanography*, 50: 1278–1283.

[32] Mergeay, J., Verschuren, D., and De Meester, L. (2006) Invasion of an asexual American water flea clone throughout Africa and rapid displacement of a native sibling species. *Proceedings of the Royal Society, Series B*, 273: 2839–2844.

[33] Kappas, I., Abatzopoulos, T.J., Van Hoa, N., Sorgeloos, P., and Beardmore, A.J. (2004) Genetic and reproductive differentiattion of *Artemia franciscana* in a new environment. Journal of Marine biology.

[34] Dana, G.L., and Lenz, P.H. (1986) Effects of increasing salinity on an *Artemia* population from mono Lake, California.Oecologia 68:428-436.

[35] Badaracco, G., Bellorini, M., and Landsberger, N. (1995) Phylogeneticstudy of bisexual *Artemia* using random amplifiedpolymorphicDNA. Journal of molecular evolution, 41: 150-154.

[36] Cronin, M.A., Hilis, S., Born, E.W., and Potton, C. (1994) MtDNA variation in Atlantic and pacific walruses.Gene.3.2001.Vol.72, pp.1035-1043.

[37] Chow. S., Suzuki, N., Imai, H., and Yoshimura, T. (2006) Molecular species identification of spiny lobster phyllosoma larvae of the genus Panulirus from the Northwestern Pacific.Mar. Biotechol.8:260-267.

[38] Avis, J.C. (2000) Phylogeography; The history and formation of species.Harvard university press. USA.477p.

[39] Bossier, P., Xiaomei, W., Catania, F., Dooms, F., Van Stappen, G., Naessens, E., and Sorgeloos, P. (2004) An RFLP database for authentication of commercial cyst samples of the brine shrimp *Artemia spp*. (International Study on *Artemia* LXX). Aquaculture 231: 93-112.

www.SID.ir

Archive of SID

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

[41] Gajardo, G., Da Conceicao, M., Weber, L., and Beardmore, J.A. (1995) Genetic variability and inter-populational differentiation of Artemia strains from South America. Hydrobiologia, 302: 21-29.

www.SID.ir