مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC

شناسایی ژنتیکی و طبقه بندی آرتمیای ایران با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره

رضازینالپور[۱]، سیدضیاءالدین میرحسینی*[۲]، سید بنیامین دلیرصفت[۳]، جلال زارع[۱]

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد رشتهٔ ژنتیک و اصلاح نژاد دام دانشکدهٔ علوم کشاورزی دانشگاه گیلان
[۲]استاد ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم‌دامی، 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 آرتمیا اورمیانا و آرتمیا فرانسیسکانای موجود در ایران با استفاده از ۵ جفت آغازگر ریزماهواره‌ای (Af-B105TAIL، Af-A136، Apdq03TAIL، Apdq04TAIL و Apdq05TAIL) ویژه‌ی آرتمیا فرانسیسکانا و آرتمیا پارتنوژنتیکا بررسی شد. DNA ژنومی ۵۰ سیست آرتیمیا 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 ٦٪ 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 آرتمیا فرانسیسکانا و آرتمیا اورمیانا به‌ترتیب برابر با ۳، ۰/٥٤٢٨ و ۲/۵، ۰/۳۸۳۳ بود. در آرتمیا اورمیانا تمامی جایگاه‌ها در تعادل هاردی-وینبرگ قرار داشتند، در حالی که در آرتمیا فرانسیسکانا تنها جایگاه Af-A136 در تعادل هاردی-وینبرگ قرار داشت. میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار برای آرتمیا فرانسیسکانا و آرتمیا اورمیانا به‌ترتیب ۰/٦٢٠٩ و ۰/٤٥٣١ 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 آرتمیاهای مورد بررسی می‌توان دریافت که این جمعیت‌ها از ترکیب ژنتیکی مناسبی برخوردار هستند.

کلمات کلیدی: آرتمیا، تنوع ژنتیکی، چندشکلی، ریزماهواره، هتروزیگوسیتی.

*نویسنده مسئول: سیدضیاءالدین میرحسینی تلفن: ۰۹۱۱۱۳۱۸٤٥۹ email: szmirhoseini@gmail.com

مقدمه

آرتمیا موجود ظریفی از رده‌ی سخت پوستان است که به زندگی در آبهای شور عادت کرده و به دلیل عدم وجود جانوران شکارچی و رقبای 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 Tanguay). سیست 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، به عنوان سازواره‌ای مناسب برای شناسایی آلودگی محیط به فلزات سنگین و سموم سیانو باکتری‌ها استفاده 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، ٦٦ درصد کل مطالعات تعیین فاصله ژنتیکی با استفاده از ریزماهواره‌ها انجام گرفته است و ۷۰ درصد پژوهشگران ریزماهواره‌ها را انتخاب کرده‌اند (Mohammadifar and Mohammadabadi, 2011). ریزماهواره‌ها به علت استفاده آسان در PCR معمولی، شناسایی و تعیین تعداد و اندازهٔ آلل‌ها از طریق ژل‌های واسرشته ساز در الکتروفورز و دارا بودن درجهٔ 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 جمعیت ها، درک تفاوت های ژنتیکی بین

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).

مواد و روش ها

از هر یک از جمعیت‌های آرتمیا اورمیانا از دریاچهٔ ارومیه و آرتمیا فرانسیسکانا از دریاچهٔ نوق، ۵۰ عدد سیست جمع آوری شد. استخراج DNA ژنومی به‌صورت 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 ریزماهوارهٔ ویژهٔ آرتمیا فرانسیسکانا و آرتمیا پارتوژنتیکا (جدول۱) استفاده شد (Muñuz *et al*., 2009). آغازگرهای مورد نیاز از شرکت بیونیر کرهٔ جنوبی تهیه شد.

جدول ۱- مشخصات جایگاه های انتخاب شده.

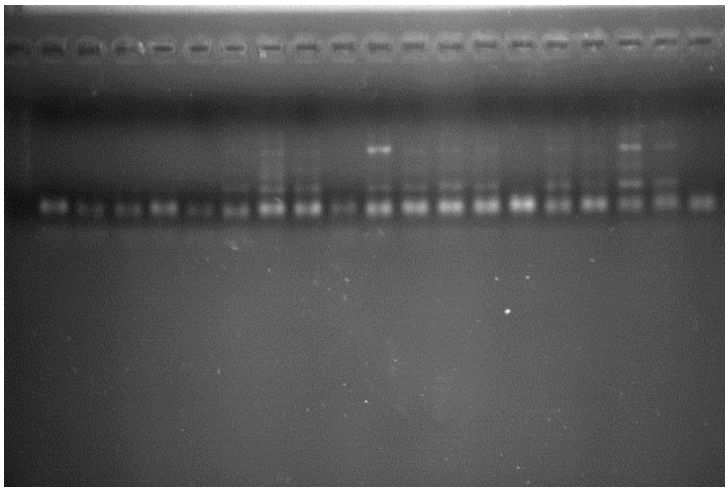
جایگاه ریز ماهواره	آغازگرها	واحد تکراری
Af B105TAIL	F:NED-GGCAGATCAGTTTGACAGGAC R:GTGTCTTAGATTACGCCAACGGTTGTAG	$GG(GA)_{13}$،$(GA)_{16}$
Af-A136	F:PET-TCTGGAAACCCTGATTAGACG R: CGTCACTCGACACACAAACAT	$(TG)_{10}$
Apdq03TAIL	F:NED- CACGAAAACAAGCCGTGATAG R: GTGTCTTTCTCTCTCTGCCTTTCTGTCC	$(GA)_{11}$
Apdq05TAIL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

غلظت نهایی اجزای واکنش در حجم ۲۰ میکرولیتر تهیه شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در ۳۳ سیکل و با برنامهٔ حرارتی زیر انجام شد: واسرشته سازی اولیه DNA به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد، واسرشته سازی ثانویه DNA طی ٦۰ ثانیه با ۷۲ درجهٔ سانتیگراد، اتصال آغازگر به DNA طی ٦۰ ثانیه با ۵۵ درجهٔ سانتیگراد، بسط آنزیمی طی ۳۰ ثانیه و دمای ۹۵

درجهٔ سانتیگراد و بسط آنزیمی نهایی طی ۷ دقیقه و دمای ۷۲ درجهٔ سانتیگراد و نگهداری در دمای ٤ درجهٔ سانتیگراد. برای مشاهده جایگاه تکثیر شده از الکتروفورز ژل آکریلامید واسرشته‌ساز ٦٪ با قدرت ۱۰۰ وات به مدت ۱ساعت و روش رنگ آمیزی نیترات نقره استفاده شد (Sanguinetti *et al.*, 1994). برای بدست آوردن اندازه آلل‌هاو تعیین انواع آلل و ژنوتیپ، پس از تصویربرداری از ژل، باندهای مربوط به فرآورده-های 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 واقعی، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، شاخص شانون، جریان ژنی، فاصلهٔ 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).



شکل۱- نمونه ای از تکثیر جایگاه Apdq05TAIL در جمعیت آرتمیا ارومیانا.

الگوی باندی جایگاه های تکثیر شده در دو جمعیت آرتمیا فرانسیسکانا و آرتمیا اورمیانا نشان دادکه تمامی جایگاه‌ها چند شکل هستند. در آرتمیا فرانسیسکانا تنها جایگاه Af-A136 و در آرتمیا اورمیانا تمامی جایگاه‌ها در تعادل هاردی-وینبرگ قرار داشتند. هتروزیگوتی مورد انتظار برای آرتمیا فرانسیسکانا و اورمیانا به ترتیب در محدوده‌ی ۰/٦٤۲۹-۰/۵۸۷۵و ۰/۵۹۳۸-۰/٤٦۸۸ بود. تعداد آلل واقعی برای آرتمیا اورمیانا در محدودهٔ ۲ (Af-105TAIL و Apdg03TAIL) تا

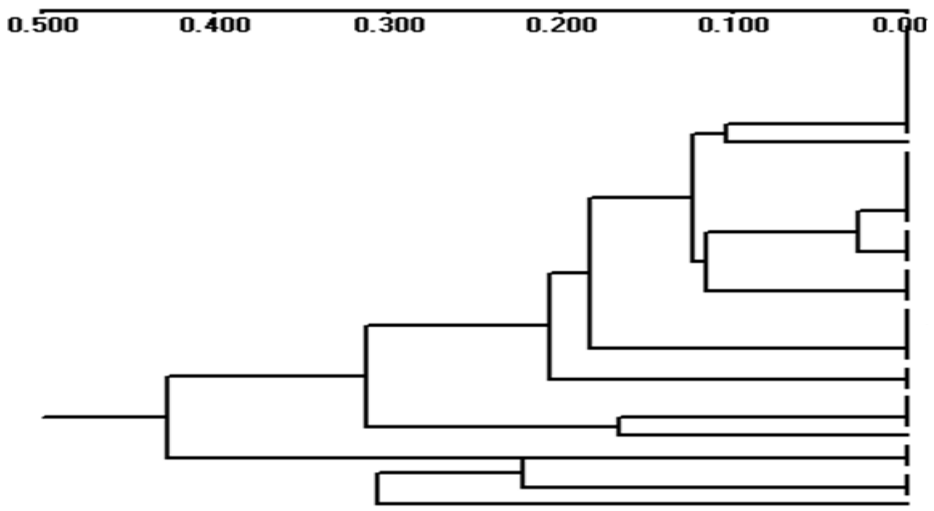
۳ (Apdg04TAIL و Apdg05TAIL) و برای آرتمیا فرانسیسکانا ۳ بود. تعداد آلل مؤثر برای آرتمیا فرانسیکانا و اورمیانا به ترتیب در محدودهٔ ۲/۸ – ۲/٤۲٤۰ و ۲/٤٦۱۵ – ۱/۸۸۲٤بود. در این مطالعه، محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) برای آرتمیا اورمیانا و آرتمیا فرانسیسکانا به ترتیب در محدودهٔ ۰/۵۱۱۲–۰/۱۹٤۸و ۰/۵۷۰۵– ۰/۵۰۳٤ بود. شاخص شانون در آرتمیا فرانسیسکانا در محدودهٔ ۰/۹۸٦۸ (Af-105TAIL) تا ۱/۰٦٤٦ (Apdg03TAIL) و در آرتمیا اورمیانا در محدودهٔ ۰/۳۷٦۸ (Apdg03TAIL) تا ۰/۹۷٤۳ (Apdg05TAIL) قرار داشت. تنوع ژنتیکی درون جمعیتی در آرتمیا اورمیانا ۰/٤۵۳۱و در آرتمیا فرانسیسکانا ۰/٦۲۰۹ بود. با استفاده از دو جایگاه مشترک (Af-B105TAIL و Apdg03TAIL) فاصلهٔ ژنتیکی و میانگین جریان ژنی بین آرتمیا فرانسیسکانا و آرتمیا اورمیانا به ترتیب برابر با ۰/٦۹٤٦ 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 (شکل۲). در آرتمیا اورمیانا گروه های فرعی به وسیلهٔ بخشی از گروه اصلی تشکیل شده اند و روابط بین زیر گروه‌های تشکیل شده بسیار نزدیک است (شکل۳).

الگوی باندی تمامی جایگاه های ریزماهواره 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 دریاچه‌ی ارومیه، کاهش مهاجرت پرندگان به این دریاچه، عدم امکان ورود ژنوتیپ‌های جدید و تشدید انتخاب طبیعی، بکرزایی و آمیزش‌های Polyandry (آمیزش یک ماده با چند نر) و Polygyny (آمیزش یک نر با چند ماده) در جمعیت افزایش می‌یابند که این آمیزش‌ها جمعیت را به سمت تشابه جفت ژن‌ها، توسعه‌ی همخونی و افزایش واریانس نمونه‌گیری مندلی سوق می‌دهند. اما به‌دلیل بزرگ بودن جمعیت، این واریانس نتوانسته است تعادل هاردی–وینبرگ را برهم بزند.

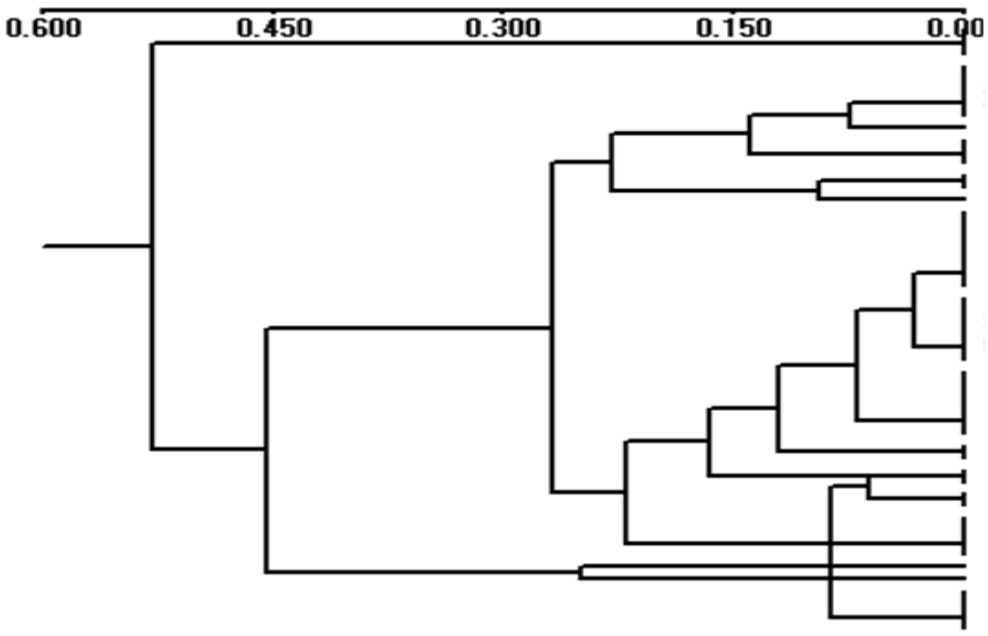
از آنجا که سیست‌ها به مدت طولانی نگهداری می‌شوند، توصیه می‌شود که از مناطق مختلف دریاچه جمع‌آوری و نگهداری شوند تا میزان تنوع فعلی حفظ شود. با ادامه‌ی روند فعلی می‌توان انتظار داشت که با کاهش تعداد، جمعیت از تعادل خارج شده و منجر به کاهش تنوع ژنتیکی شود.

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

بررسی‌هایی که Hajirostamloo and Pourrabbi (2011) با استفاده از هضم آنزیمی ژن ریبوزومال 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 به‌نظر 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-B105TAIL، Af-A136 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 کرده اند. دلیل این تفاوت به شرایط اقلیمی حاکم‌بر 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 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 به‌ترتیب اعداد ۵، ٤ 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.



شکل۲- درخت فیلوژنتیکی حاصل از فاصلهٔ ژنتیکی D_A در آرتمیا فرانسیسکانا.



شکل۳- درخت فیلوژنتیکی حاصل از فاصلهٔ ژنتیکی D_A در آرتمیا اورمیانا.

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 ٪٦٥-٪۳۰ و بیشترین چندشکلی متعلق به آرتمیا اورمیانا (٪٦٥) است (Ernanir *et al.*, 1993). ریزماهواره‌ها برخلاف آلوزایم‌ها، نسبت‌به 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 جایگاه های بسیار چند شکل همچون ریز ماهواره‌ها مناسبت کمتری دارد (Hedrick, 1999). بنابراین از دیگر معیارهای چند شکلی نظیر محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) می توان استفاده کرد. در این مطالعه، میانگین ارزش های PIC برای دو جایگاه مشترک، برای جمعیت آرتمیا اورمیانا و آرتمیا فرانسیسکانا به ترتیب ۰/۲۷٦۹ و ۰/۵۳۷ بود. از آنجاییکه مقایسهٔ 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 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 به‌ترتیب ۰/٤٦۹٤، ۰/۵۱۰۲ و ۰/٤۰۸۲ محاسبه شد در حالیکه میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده برای همین جایگاه-ها در جمعیت آرتمیا فرانسیسکانا به‌ترتیب ۰/۵۳٦، ۰/۱۵۹ و ۰/۹۳۳گزارش 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 ۰/٦۲۰۹ و ۰/٤۵۳۱ برآورد گردید. در پژوهشی، Gajardo *et al.* (2004) جمعیت‌های آرتمیای موجود در شیلی را براساس آنالیز RFLPی

mtDNA مورد بررسی قرار دادند. آنها تنوع بین گونه‌های آرتمیا فرانسیسکانا را ۱/۵٪ برآورد کردند. استفاده از DNA میتوکندریایی به‌جای DNA ژنومی با محدودیت هایی 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 ۰/۵٦٪ 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 تیبتیانا 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-ماهواره‌ها به دلیل قابلیت ایجاد چندشکلی بالا نسبت به RFLP بهتر می توانند عمل ژن‌ها و نهایتاً فنوتیپ افراد را تحت تاثیر قرار دهند، هرچند که هر دو نشانگر تحت تاثیر محیط قرار نمی‌گیرند و خنثی محسوب می‌شوند. از آنجا که حداکثر مقدار هتروزیگوزسیتی یک است، مقایسه‌ی آنها به‌عنوان معیاری برای بررسی تنوع درون جمعیتی نشانگرهای با چندشکلی زیاد مانند ریزماهواره‌ها 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') بعنوان معیار دیگری برای بررسی تنوع زنتیکی در داخل جمعیت استفاده می‌شود. با وجود آنکه تفسیر بیولوژیکی این معیار مشخص نیست، ممکن است برای اندازه گیری 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 این‌رو نسبت‌به 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، ۰/٦۹٤٦ بدست آمد. Ernani *et al.* (1993) با استفاده از آلوزایم فاصله‌ی ژنتیکی بین آرتمیاهای دنیای قدیم و جدید را ۰/۷۵ محاسبه کردند. ریزماهواره‌ها برخلاف آلوزایم‌ها تحت تاثیر محیط قرار نمی-گیرند، لذا تعداد زیادی آلل با سطح بالایی از هتروزیگوسیتی دارند و طبق مدل مندلی واقعی توارث می‌یابند و بهتر می‌توانند بیان کننده‌ی

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 به‌صورت جابه جایی و انتقال آلل-های 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 به‌عنوان عاملی در شناساندن شکل‌ها-ی 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 به‌همان 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 تاثیر توارث، عوامل مهمی منجمله اندازه‌ی جمعیت تأثیرگذار می‌باشد. مدل F_{ST}، یکی از مدل‌های جریان ژنی است (Mallet, 2001). در پژوهش حاضر میانگین F_{ST} و N_m به‌ترتیب 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) با استفاده از آلوزایم برای انواع گونه‌های آرتمیا سینیکا و فرانسیسکانا به‌ترتیب F_{ST} =۰/۱۲ (N_m =۱/۸۳) و ۰/۳۸- F_{ST} =۰/۲٤ (۰/۷۹۲ – N_m = ۰/٤۰۸) بدست آوردند. Ernanir *et al.* (1993) با استفاده از آلوزایم بین آرتمیاهای دنیای قدیم و جدید F_{ST} =۰/٦۱٦ (N_m = ۰/۱٥٦) و برای انواع آرتمیا فرانسیسکانا F_{ST} =۰/۲٤ (N_m = ۰/۷۹۲) گزارش کردند. از آنجا که ریز-ماهواره‌ها برخلاف آلوزایم‌ها تحت تأثیر محیط قرار نمی‌گیرند و طبق مدل مندلی واقعی توارث می‌یابند، لذا بهتر می‌توانند بیان کننده‌ی جریان ژنی باشند. تفاوت در منطقه ی عمق نمونه‌گیری از عواملی هست که می‌تواند سبب ایجاد جریان ژنی متفاوت شود. Eimanifar *et al.* (2006) با استفاده از نشانگر RFLP میانگین F_{ST} بین تمامی نمونه‌های آرتمیا اورمیانای دریاچه‌ی ارومیه را برابر با ۰/۰۱۹ (N_m = ۱۲/۹۰۸) محاسبه کردند. Abreu-Grobois and Beardmore (1982) با استفاده از نشانگر RFLP بین چندین نوع از آرتمیا فرانسیسکانا F_{ST} =۰/۲٤ (N_m = ۰/۷۹۲) و چندین نوع از آرتمیا سالینا F_{ST} =۰/۱۲

(N_m = ۱/۸۳۳) برآورد کردند. (Gajardo *et al.* 2004) با استفاده از نشانگر RFLP بین آرتمیاهای شیلی F_{ST} =۰/۹۸ (N_m = ۰/۰۰۵) و بین انواع آرتمیا فرانسیسکانا F_{ST} =۰/۹۱ (N_m = ۰/۰۲۵) بدست آوردند. Perez *et al.* (2008) با استفاده از نشانگر RFLP بین آرتمیاهای دنیای قدیم و جدید F_{ST} =۰/۹۷ (N_m=۰/۰۰۷۸) را برآورد کردند. تفاوت در شرایط اقلیمی و درنتیجه 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 (شکل۲) نشان می‌دهد که در آرتمیا فرانسیسکانا، از هر گروه اصلی چندین زیر گروه تشکیل شده که این زیرگروه‌ها به‌صورت 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. به‌طور کلی روابط بین این زیرگروه‌ها، نشانگر روابط نزدیک بین افراد این جمعیت می‌باشد. روابط فیلوژنتیکی آرتمیا اورمیانا (شکل۳) نشان داد که در این گونه تنها بخشی از گروه اصلی، گروه‌های دیگر را تشکیل می‌دهد. این نشان می‌دهد روابط بین زیر گروه‌های تشکیل شده بسیار نزدیکتر از آرتمیا فرانسیسکانا است، که این امر به کاهش انتخاب و تعادل هاردی- وینبرگ می‌تواند مربوط باشد.

نتیجه گیری

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 آرتمیاهای 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

بررسی، آنها را از لحاظ ژنتیکی به گروه‌های مختلفی تقسیم نموده است که بررسی فواصل ژنتیکی بین گروه‌ها و زیر گروه‌ها می‌تواند امکان مطالعات بعدی بر روی آنها را آسان و گسترده تر نماید.

تشکر و قدردانی

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

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, Triantaphillidis 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, Esmaeil 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). Intrabreed 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 Sanfrancisco 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, May12-15, 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 enviroment. 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. Univetsity College London Press, England. pp. 337-360.

Manaffar R, Zare S, Agh N, Abdolahzadeh N, Soltanian S, Sorgeloos P, Bossier P, Vansteppen G (2011). SNP detection in Na⁄K ATP-ase gene α1 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 Brnno 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 Fozi 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 R[1], Mirhosseini S.Z.[*2], Dalirsefat S.B[3], Zare J[1]

[1]Msc 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.
[3]PhD, 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