اثر استرس شوری در بیان ژن Na/KATPase دردو جمعیت مختلف آرتمیا *Artemia franciscana* و Parthenogenetic *Artemia* با تکنیک RT-PCR-DGGE

مهدی محمد زاده[1*]، کژال یوسفی[2] و ابراهیم حسین نجدگرامی[1]

ایران، ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۹۶/۲/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۱۶

چکیده

آرتمیا یکی از انواع سخت‌پوستان است که شوری‌های بسیار بالا را تحمل می‌کند. به‌واسطه‌ی تغییرات اقلیمی و بالا رفتن شوری منابع آب‌های داخلی و تالاب‌ها و همچنین اهمیت آرتمیا به‌عنوان یکی از فاکتورهای مهم در امر پرورش و تغذیه لارو ماهی و میگو، درک مکانیسم های مولکولی فرآیندهای زیستی در جمعیت‌های مختلف آرتمیا ضروری به نظر می‌رسد. مطالعه حاضر باهدف تأثیر استرس شوری برروی بیان ژن $Na^+/K^+ATPase$ در اگزون شماره ۷ دو جمعیت مختلف آرتمیا با استفاده از تکنیک RT-PCR-DGGE انجام شد. در این تحقیق ابتدا ۲ جمعیت از آرتمیاهای گونه *Artemia franciscana* و *Artemia* Parthenogenetic در شوری‌های ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ گرم درلیتر پرورش داده شد. در انتهای دوره mRNA ژن Na^+/K ATPase تهیه و پس از تولید cDNA، تصویر آن بااستفاده از تکنیک DGGE بررسی و همچنین باندهای ایجادشده توالی‌یابی شدند. نتایج این بررسی نشان داد محصول تولیدشده ازاین ژن در *A. franciscana* هموزیگوت، درحالی‌که در *Artemia* Parthenogenetic هتروزیگوت که حاصل دو آلل است. همچنین در *Artemia* Parthenogenetic حاصل ترجمه پروتئینی که از دو آلل مختلف حاصل‌شده است. جالب اینکه براساس نتایج این مطالعه، هیچ تفاوتی در نمونه‌های موردبررسی در شوری‌های مختلف مشاهده نشده و ظاهراً تنها اختلاف موجود در ژنوم این جمعیت‌ها می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آرتمیا، استرس شوری، پمپ سدیم-پتاسیم، RT-PCR، تکنیک DGGE.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۴۳۲۷۷۶۷۰۷ ، پست الکترونیکی: m.mohamadzade@urmia.ac.ir

مقدمه

در سال‌های اخیر در بیشتر نقاط جهان، صنعت آبزی‌پروری بعنوان راهی جهت دسترسی سریع به پروتئین ارزان انتخاب شده است. با این‌حال از عمده مشکلات این صنعت تهیه غذای مناسب برای آبزیان از جمله ماهی و میگو می‌باشد (۶، ۱۱ ،۱۳و ۴۸). پرورش آرتمیا و استفاده از آن با وجود داشتن متوسط ۵۵-۵۲ درصد پروتئین و ۱۵- ۴ درصد چربی و برخی اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب ضروری و همچنین بدلیل داشتن برخی آنزیم‌های گوارشی در بدن خود، می‌تواند نقش در رونق صنعت آبزی‌پروری داشته باشد (۷، ۱۵ و ۳۸).

در میان جانوران پرسلولی، آرتمیا یکی از موجوداتی است که قادر به تحمل شرایط بسیار سخت محیطی ازجمله شوری‌های بالا می‌باشد (۱۸ و ۳۲). این موجود زنده دارای اندام‌های تخصص‌یافته برای دفع نمک اضافی (پمپ سدیم-پتاسیم) از همولنف ایزواسموتیک داخلی به محیط خارج می‌باشد (۲۲). محل قرارگیری پمپ‌های پروتئینی دفع نمک، در دوران لاروی و بلوغ دارای تفاوت‌هایی می‌باشد چنانچه محل قرارگیری این پمپ‌ها در دوران لاروی در غدد نمکی پشت گردن و در دوران بلوغ در بخش‌های خارجی پاهای ضمایم سینه‌ای، غدد ماکزیلاری

و لوله گوارش میانی قراردارد (۳۴). نتایج تحقیقات مختلف نشان داده است درنتیجه‌ی عملکرد این پروتئین در انتقال یون‌های Na^+ و K^+ از غشای پلاسمایی آرتمیا، فشار اسمزی داخل بدن آن همیشه در یک محدوده نرمال قرار دارد (۵، ۲۲، ۲۴ و ۳۴).

براساس مطالعات قبلی وجود پلی‌مورفیسم مولکولی در ژن کنترل‌کننده پمپ Na^+/K^+ ATPase در توانایی جمعیت‌های متفاوت آرتمیا برای تحمل شوری‌های مختلف، به اثبات رسیده است (۱۰). براساس نتایج این مطالعات، اختلاف ژنتیکی قابل‌توجهی در ساختار یکی از اگزون‌های ژن Na^+/K^+ATPase بین تیپ‌های مختلف آرتمیا ازجمله آرتمیای دوجنسی و پارتنوژنز وجود دارد بااین‌حال محصول پروتئینی مشابه حاصل می‌شود (۲۱ و۴۰). نظر به اختلافات فنوتیپی و قدرت سازش جمعیت‌های مختلف آرتمیا برای رشد در شوری‌های مختلف، به نظر می‌رسد که بایستی اختلافات ساختاری در محصول این ژن در بین جمعیت‌های مختلف آرتمیا وجود داشته باشد. به‌بیان‌دیگر جهش دراین ژن بایستی موجب تغییر پیرایش (Gene splicing frame shift) در این ژنوم باشد که سبب تغییر پروتئین حاصل از این ژن می‌شود. همچنین وجود جهش-های تک نوکلئوتیدی در اگزون شماره ۷ می‌تواند موجب تغییر ساختار پمپ سدیم-پتاسیم در بین جمعیت‌های مختلف آرتمیا شود. تغییر ناحیه‌ای در ساختار زیر واحد آلفا از ژن Na^+/K^+ATPase می‌تواند احتمالاً موجب تغییر کارایی این پمپ غشایی شود (۱۰).

در زمینهٔ ژنتیک مولکولی و تکنیک‌های مربوط به آن، نظرات مختلفی ارائه‌شده است که به‌واسطه آن‌ها شناسایی جمعیت‌های نادر ژنتیکی فراهم گردیده است. هدف اصلی بسیاری از آزمایشات ژنتیک مولکولی در آبزیان، آنالیز ساختار جمعیتی، تنوع ژنتیکی، ارتباطات گونه‌ای، سیستماتیک و طبقه‌بندی آن‌ها می‌باشد (۳۷). در دهه‌های اخیر بررسی نقش عوامل ژنتیکی در تأثیرپذیری جانداران از عوامل محیطی، اهمیت بسیار زیادی پیدا کرده است. بررسی این عوامل ژنتیکی می‌تواند کمک بسیار زیادی در تعیین جمعیت‌های مقاوم به تنش‌های محیطی نماید. از روش‌های استفاده‌شده در این بررسی‌ها می‌توان از تکنیک RT-PCR-DGGE نام برد. این روش امروزه یکی از مهم ترین ابزارها در زمینهٔ اکولوژی میکروبی محسوب می‌شود (۴۴ و ۴۹). همچنین این روش در متمایز کردن سویه‌های مختلف باکتریایی براساس تفاوت در توالی‌هایشان از یکدیگر (۱ ،۱۶،۲۶ و ۴۷)، شناخت و ردیابی جهش در بین ارگانیسم‌های با ارتباط نزدیک‌تر باهم و در بررسی اکوسیستم‌های پیچیده مانند دریاچه، رودخانه، دریا و خاک کاربرد دارد. نمونه‌ای از استفاده از روش DGGE برای یافتن پلی‌مورفیسم در اگزون ۱۰ گیرنده هورمون رشد توسط جی و همکاران (۱۹۹۹) انجام‌شده است (۳۱).

دریاچه‌ی ارومیه در ایران با مساحتی بالغ بر ۵۰۰۰ کیلومترمربع، همیشه به‌عنوان یکی از زیستگاه‌های طبیعی مناسب برای آرتمیا محسوب می‌شود (۱۴). از زیستگاه‌های طبیعی دیگر تولید آرتمیا می‌توان از دریاچه‌ی بزرگ نمک (Great Salt Lake) در آمریکا که بدون شک نقش حیاتی را در تأمین نیازهای جهانی سیست آرتمیا ایفا می‌کند، مثال زد (۳ ، ۹ و ۳۵). البته در چند سال گذشته به‌دلیل کاهش نزولات آسمانی در دریاچه ارومیه، میزان شوری آب این دریاچه افزایش چشمگیری پیداکرده و به ۳۵۰ گرم برلیتر رسیده است (۴). شوری بالا باعث کاهش میزان تولید توده‌ی زنده و سیست آرتمیا به میزان بسیار قابل‌توجه شده است (۱۹ و ۳۲). به نظر می‌رسد متفاوت بودن ساختار ژن Na+/K ATPase در جمعیت‌های دوجنسی و پارتنوژنز آرتمیا که ناشی از درجات مختلفی از پلی‌مورفیسم مولکولی می‌باشد، قادر می‌باشد فنوتیپ‌های مختلفی را برای رشد در شوری‌های مختلف ایجاد نماید. این مسئله بررسی ویژگی جمعیت‌های مختلف آرتمیا را ازنظر نحوه مقابله بااین شرایط ازنظر مولکولی، ضروری ساخته است. مطالعه حاضر باهدف تأثیر استرس شوری بر روی بیان ژن

$Na^+/K^+ATPase$ با استفاده از اگزون شماره ۷ توسط تکنیک RT-PCR-DGGE انجام شد.

مواد و روشها

سیست‌های آرتمیای مورداستفاده دراین بررسی از بانک سیست پژوهشکده آرتمیا دانشگاه ارومیه تهیه شدند. این سیست‌ها شامل سیست‌های آرتمیا فرانسیسکانا (*Artemia fransiscana*) و آرتمیای پارتنوژنتیک دریاچه ارومیه (Parthenogenetic *Artemia*) بودند. سیست‌های هردو جمعیت تحت شرایط یکسان (آب دریای ۳۵ ppt فیلتر شده با فیلتر ۰/۴۵ میکرون، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و نور و هوادهی به حد کافی) در ظروف فالکون مخروطی براساس پروتکل استاندارد تخم‌گشایی گردید (۲۰). این بررسی در ۳ تیمار شوری (۱۲۰،۱۸۰و۶۰ گرم در لیتر) و هر تیمار با ۳ تکرار انجام شد. از هر جمعیت آرتمیا تعداد۵۰۰ عدد لارو اینستار یک شمارش‌شده و به داخل ظروف استوانه‌ای مخصوص حاوی ۱ لیتر (به ازای هر آرتمیا دو میلی‌لیتر آب) منتقل گردید. دمای پرورش۱ ± ۲۶ درجه سانتی‌گراد و هوادهی از ته ظرف مخروطی با کمک پیپت انجام شد. براساس نتایج کارهای آقای کاتیو و همکاران (۱۹۹۲) غذای مورد استفاده در پرورش آرتمیا، ترکیبی از جلبک *Dunaliella salina* با غلظت ۱۸×۱۰^۶Cells/ml و مخمّر فرموله شده lansy Pz با غلظت ۱g در ۱۵۰mlسرم فیزیولوژیک ۹٪ بود (۲۵). شوری ظروف پرورش، هرروز یکبار توسط شوری‌سنج اندازه‌گیری می‌شد و در صورت افزایش یا کاهش شوری، به ترتیب با اضافه‌کردن آب مقطّر یا آب دریا، شوری آب تنظیم می‌شد. تراکم آرتمیا در روز ۸ به یک آرتمیا در سه میلی‌لیتر آب و در روز ۱۴ به یک آرتمیا در چهار میلی‌لیتر آب کاهش داده شد. در روز ۱۷ پرورش، آرتمیاهای هر تیمار به‌طور جداگانه توسط فیلتر ۴۰۰ میکرومتری جداشده و توسط آب شیر و آب مقطر استریل به‌منظور برداشت نمک و مواد اضافی کاملاً شستشو شدند و به میکروتیوب-های ۱/۵ml منتقل و در دمای $-۸۰^\circ c$ نگهداری شدند تا سایر آنالیزها بر روی آن‌ها صورت گیرد (۱۷).

تکنیک RT-PCR-DGGE اصولاً"برای کشف تغییرات پایه ای و شناسایی تغییرات تصادفی در ساختار DNA و آشکارسازی جهش‌ها است. فراورده‌های PCR در این روش، درصورتی‌که دارای طول قطعات ژنومی بیشتری باشند پس از بررسی بر روی ژل آگارز تحت تأثیر آنزیم برش‌دهنده قرار می‌گیرند و برای جلوگیری از دناتوره شدن کامل قطعات دو رشته‌ای حاصل از زنجیره‌پلی‌مراز، از یک ناحیه حاوی بالاترین دمای ذوب مصنوعی به‌نام GC-clamp با ۴۰-۳۰ جفت‌باز استفاده می‌شود (۲۸). سپس قطعات کوچک در محدود ژنومی(۴۰۰bp-۱۰۰) جهت مشاهده تغییرات احتمالی بر روی ژل دناتوره‌کننده پلی-آکریل‌آمید با گرادیان حاصل از اوره و فورمامید در دمای ثابت (معمولاً $۶۰c^o$-۴۵) به مدت ۱۲ تا ۱۶ ساعت در ۴۵ ولت الکتروفورز می‌گردند (۲ و ۴۹). الکتروفورز DGGEتکنیکی است که براساس اختلاف در دناتوره شدن و جدایی قطعات حاصل از PCR با اندازه مشابه درشیب اوره - فورمامید استوار است (۱۲، ۲۳، ۴۱، و ۴۲). دراین بررسی، برای استخراج RNA از بافت نمونه‌ها، از کیت مخصوص استخراج RNA (سیناکلون، ایران) استفاده شد. مواد موردنیاز جهت فراگمنت موردنظر (اگزون شماره ۷ ژن $Na^+/K^+ATPase$) شامل ۳/۸ میکرولیترآب دیونیزه، ۱/۸ میکرولیتر $MgCl_2$، ۱ میکرولیتر بافر PCR، ۰/۸ میکرولیترdNTPs، ۰/۲ میکرولیتر Taq پلی‌مراز و ۰/۲ میکرولیتر از پرایمرهای ex7(1) و dE-R بودند که در یک میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری باهم مخلوط شدند و سپس به تعداد نمونه‌ها در میکروتیوب‌های کوچک مخصوص PCR تقسیم شدند. سپس آن‌ها به دستگاه ترموسایکلر منتقل شدند و براساس پروتکل دمایی (۱۰) cDNA ساخته شد. پرایمرهای مورداستفاده در این مرحله دارای توالی نوکلئوتیدی به شرح زیر بودند:

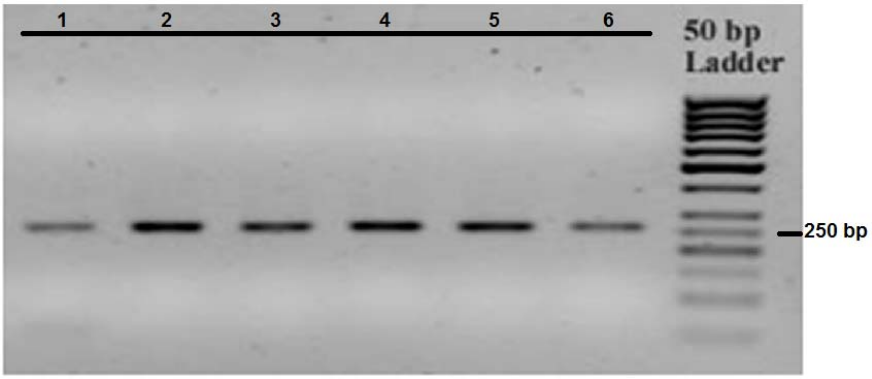
d-ER: 5'-ccg-ggg-ccc-gcg-ggc-ccc-cgg-gcc-ggg-ccc-ggg-gaa-ttc-agc-acg-act-gca-aa-<g>-3'

ex7(1): 5'-cag-cca-aac-gta-tgg-ctt-<c>-3'

بعد از اتمام سیکل‌های PCR، ۱۰ میکرولیتر از نمونه‌ها برای تأیید موفقیت PCR بر روی ژل آگارز یک درصد در بافر تریس/ بورات/EDTA (TBE) حاوی ۴ میکرولیتر اتیدیوم بروماید، با استفاده از اشعه ماوراءبنفش (UV) و سیستم تصویربرداری Gel-documenatation آزمایش شدند و بقیه آن برای استفاده‌های بعدی در دمای$۴^{o}C$ قرار داده شدند. تکنیک DGGE براساس پروتکل (۳۹) انجام شد و شیب غلظتی مورداستفاده در ژل دناتوره کننده، ۵۰-۱۰ ٪ و ژل آکریل‌آمید ٪۹ تنظیم شد. نمونه‌ها به مدت ۱۴ ساعت در ولتاژ ۱۲۰ ولت و در دمای $۵۷^{o}C$ الکتروفورز شدند. بعد از اتمام زمان الکتروفورز، ژل توسط اتیدیوم بروماید رنگ-آمیزی شد و سپس زیر اشعه UV موردبررسی قرار گرفت (۴۱ و۴۹).

نتایج

نتایج الکتروفورز تکثیر قطعه موردنظر بوسیله پرایمرهای اختصاصی نشان داد که در تمامی نمونه‌های موردمطالعه ، یک قطعه حدوداً ۲۸۰ جفت بازی بصورت کامل تکثیر یافته است. شکل ۱ نشان‌دهنده این باند در تعدادی از نمونه‌ها در مقایسه با مارکر وزنی می‌باشد.



شکل ۱- باندهای بدست آمده از الکتروفورز نمونه با وزن ۲۸۰ bp

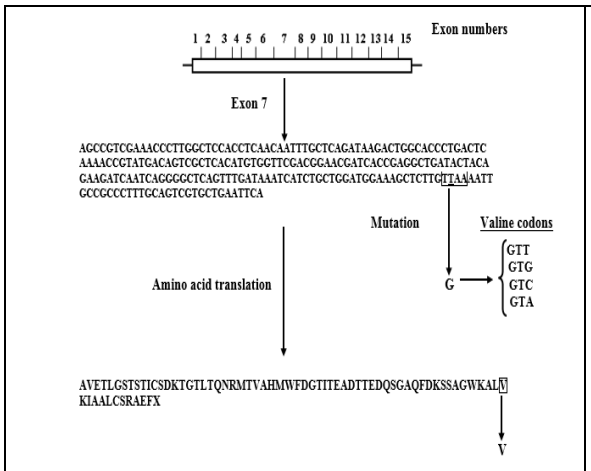
قطعه اگزون ۷ از ژن Na+/K+ATPase برای تعیین توالی به شرکت موردنظر ارسال شد و تعیین توالی نوکلئوتیدی گردید. شکل ۲ نشان‌دهنده توالی‌های مرتب‌شده در یک نمونه از هر جمعیت می‌باشد. این نتایج نشان داد که اختلافات بسیار کوچکی در ناحیه موردنظر برای اگزون مورد بحث وجود دارد، با بررسی توالی نوکلئوتیدی اگزون شماره۷ متعلق به *A. franciscana* تعیین توالی شده در این تحقیق و ترجمه اسیدهای آمینه آن (شکل ۳-الف) بررسی-ها نشان می‌دهد که در محصول نهایی هیچ تغییری مشاهده نمی‌شود(شکل ۳- ب)، با توجه به اینکه تنها اختلاف یافت شده در ناحیه موردبررسی فقط در مولکول DNA یافت شد و هیچ اثری از اختلاف در محصول جهش یافت شده در این اگزون یافت نشد لذا با انجام Reverse transcriptase PCR محصول حاصل از این ژن در الکتروفورز گرادیانت ژل دناتوره‌کننده موردبررسی قرارگرفت. این بررسی نشان داد که محصول تولیدشده از این ژن در *A. franciscana* هموزیگوت بوده درحالی‌که در آرتمیای پارتنوژنتیک (parthenogenetic *Artemia*) هتروزیگوت و حاصل ترجمه پروتئینی با دو آلل مختلف می‌باشد. جالب اینکه هیچ تفاوتی در نمونه‌های مورد بررسی در شوری‌های مختلف مشاهده نشد و ظاهراً تنها اختلاف موجود در جمعیت آرتمیا می‌باشد (شکل ۴).

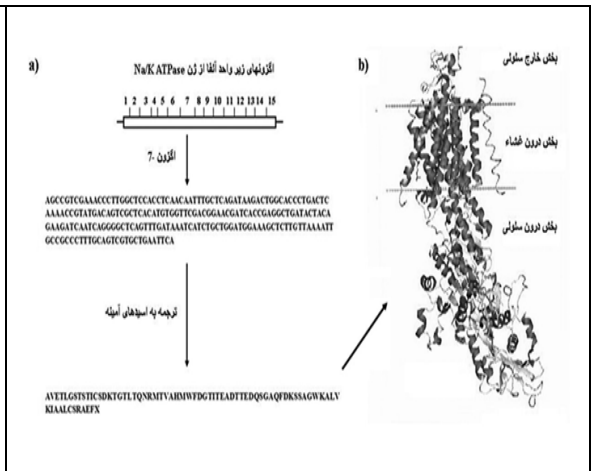
بحث

نتایج مطالعات دیگران نشان داده است برخی از جمعیت‌های آرتمیا دارای مقاومت بیشتری نسبت به نوسانات شوری دارند که باعث تولید سویه‌های مختلفی از آرتمیا شده است (۸ ، ۱۴، ۳۲ و ۵۰).

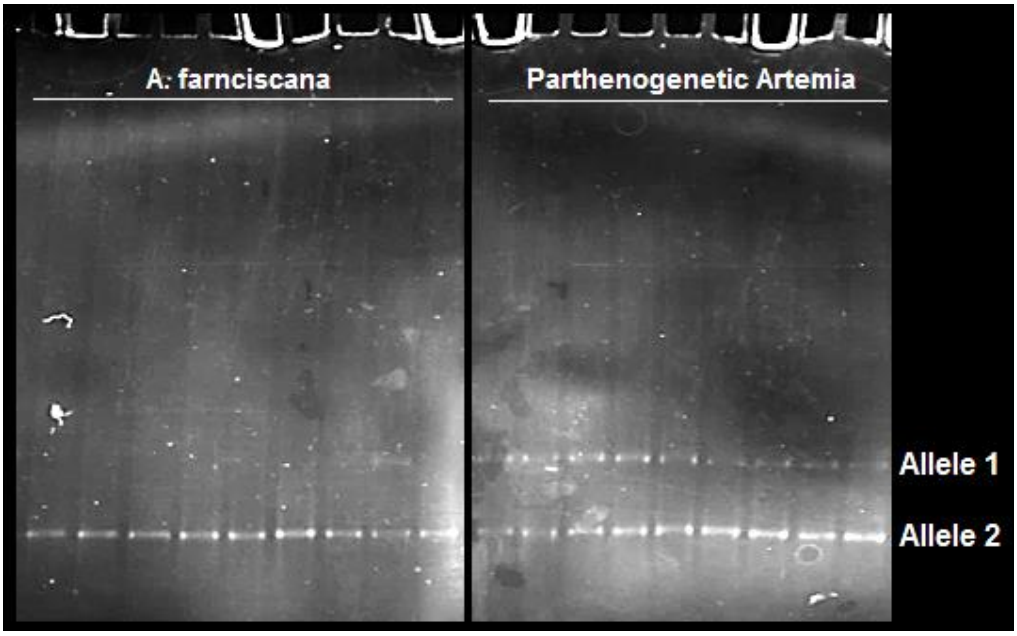
```
Parthenogenetic      AGCCGTCGAAACCCTTGGCTCCACCTCAACAATTTGCTCAGATAAGACCGGCACCCTCAC
60
A.franciscana        AGCCGTCGAAACCCTTGGCTCCACCTCAACAATTTGCTCAGATAAGACTGGCACCCTGAC
60
  ********************************************** ******** **

ParthenogeneticACAAAACCGTATGACAGTCGCTCACATGTGGTTCGATGGAACGATCACTGAGGCTGATAC  120
A.franciscanaTCAAAACCGTATGACAGTCGCTCACATGTGGTTCGACGGAACGATCACCGAGGCTGATAC  120
  ********************************** *********** ***********

ParthenogeneticTACTGAAGATCAGTCAGGGGCTCAGTTTGATAAATCATCGGCTGGATGGAAAGCTCTTGT  180
A.franciscanaTACAGAAGATCAATCAGGGGCTCAGTTTGATAAATCATCTGCTGGATGGAAAGCTCTTGT  180
  *** ******** ************************* *******************

Parthenogenetic      GAAAATTGCCGCTCTTTGCAGTCGTGCTGAATTCA   215
A.franciscana        TAAAATTGCCGCCCTTTGCAGTCGTGCTGAATTCA   215
```

شکل۲- سکانس مرتب شده توسط نرم‌افزار در ۲ جمعیت مختلف آرتمیا





شکل ۳- ب) بررسی جهش یافت شده در اگزون ۷ ژن Na/K Atpase. این بررسی نشان می‌دهد که باوجود یافته شدن جهش در این ناحیه در محصول نهایی هیچ تغییر مشاهده نمی‌شود.	شکل ۳- الف) توالی نوکلئوتیدی اگزون شماره۷ متعلق به *A. franciscana* تعیین توالی شده در این تحقیق و ترجمه اسیدهای آمینه آن.



شکل۴ – ژل الکتروفورز DGGE در دو آرتمیای موردمطالعه در شوری‌های مختلف

تحمل این شرایط مدیون پمپ پروتئینی بسیار مهمی به نام $Na^+/K^+ATPase$ می‌باشد که ازنظر کارایی در آرتمیا منحصربه‌فرد می‌باشد (۳۴). اهمیت این پمپ در آرتمیا در تحمل محیط‌هایی با فشار اسمزی بالا، در نتیجه عملکرد این پروتئین در انتقال Na^+ و K^+ از غشای پلاسمایی به اثبات رسیده است (۲۲ و ۲۴). بررسی‌های برخی محققان، نشان داده است بخشی از سازگاری با تنش‌های شوری می‌تواند به ساختار مولکولی ژن کنترل‌کننده Na^+/K^+ ATPase ارتباط داده شود که در اغلب موجودات با ساختار متفاوتی وجود دارد (۳۴ و ۳۶). نتایج بررسی این ژن و ژن‌هایی مانند آن می‌تواند از دو دیدگاه مهم باشد: دیدگاه اول بررسی مکانیسم و کارکرد ژنتیکی پمپ $Na^+/K^+ATPase$ که ازنقطه‌نظر افزایش دانش در حوزه علوم پایه دارای اهمیت زیادی می‌باشد و دیدگاه دوم بررسی مقاومت دو گونه مهم آرتمیا در برابر شوری و ارتباط آن با بحث‌های ژنتیکی می‌باشد که دیدگاه اخیر درنهایت می‌تواند با بررسی‌های بیشتر و همچنین مهندسی ژنتیک منجر به تولید آرتمیاهایی باشد که دارای اندازه مناسب برای اهداف آبزی‌پروری درعین‌حال مقاوم در برابر نوسانات محیطی باشد.

نتایج مطالعات بر روی ساختار مولکولی ژن Na^+/K^+ ATPase نشان داده است ژن‌های کدکننده زیرواحد α1 از پمپ $Na^+/K^+ATPase$ علائمی از وجود یک مکان پلی-مورفیک را در *A. franciscana* نشان داده‌اند و ایزوفرم α1 این پمپ احتمالاً نقش کلیدی در سازگاری *A. franciscana* به شوری بازی می‌کند (۳۰). این تغییرات می‌تواند حاصل جهش‌هایی در بخش‌هایی از ساختار ژن کنترل‌کننده این پمپ در برخی از گونه‌های آرتمیا باشد. در توضیح توانایی جهش‌ها و یا تغییرات تک نوکلئوتیدی در تغییر ساختار سه‌بعدی و عملکرد پروتئین‌ها تاکنون تحقیقات زیادی انجام‌شده و جهش‌های تک نوکلئوتیدی مسئول صدها ناهنجاری همچون بیماری داسی شکل گلبول‌های انسان تشخیص داده‌شده است (۳۳ و ۴۶). لذا وجود چنین جهش‌های تک نوکلئوتیدی در اگزون شماره ۷ در آرتمیا هم می‌تواند موجب تغییر ساختار پمپ $Na^+/K^+ATPase$ در بین جمعیت‌های مختلف آن باشدکه جایی در ساختار زیرواحد α1 از این ژن موجب تغییر شده

و احتمالاً موجب کاهش یا افزایش کارایی این پمپ می‌شود. در این تحقیق تأثیر شوری‌های مختلف بر روی بیان ژن پمپ $Na^+/K^+ATPase$ با استفاده از بررسی ناحیه اگزون شماره ۷ توسط تکنیک RT-PCR-DGGE انجام شد.نتایج نشان داد که اختلافاتی در ناحیه موردبررسی وجود دارد که با نتایج تحقیقات قبلی همخوانی دارد و می‌تواند توجیه‌کننده توانایی متفاوت دو جمعیت آرتمیا موردبررسی دراین تحقیق در تحمل شوری‌های مختلف باشد.

در مرحله بعد برای بررسی بیشتر این اختلافات، با انجام Reverse transcriptase PCR محصول حاصل ازاین ژن، از طریق تکنیک PCR-DGGE موردبررسی دقیق‌تر قرارگرفت. نتایج نشان داد محصول تولیدشده از این ژن در *A. franciscana* هموزیگوت بوده درحالی‌که در آرتمیای پارتنوژنز (*Artemia* parthenogenetic) هتروزیگوت و حاصل ترجمه، پروتئینی از دو آلل مختلف می‌باشد. نتایج PCR-DGGE توسط تعیین توالی و محاسبه فاصله ژنتیکی تنوع نوکلئوتیدی در اگزون ۷ بین جمعیت‌های مدنظر در این بررسی، این فرضیه را مطرح نمود که احتمالاً این اگزون دارای نقش بسیار مهمی در ساختار پمپ $Na^+/K^+ATPase$ می‌باشد که در طی روند تکاملی آرتمیا و تولید سویه‌های دوجنسی و پارتنوژنز نقش دارد (۱۰). پیش‌ازاین به‌قصد جستجو مارکرهای مولکولی مناسب، به‌طور کلی ۷۳۰ نمونه از ۲۳ جمعیت آرتیما از نواحی مختلف دنیا برای پیدا نمودن اختلافات مولکولی در این ناحیه مورد مطالعه قرارگرفت (۴۰). در این تحقیق روش Chelex برای استخراج DNA از سیست (۲۷) و روش SDS-کلروفرم برای استخراج DNA از افراد بالغ مورداستفاده قرارگرفت (۴۵). اگزون شماره ۷ این ژن با استفاده از آغازگرهای اختصاصی جنس آرتمیا تکثیر یافت.برش آنزیمی قطعه ۲۸۰ جفت بازی بوسیله ۸ آنزیم برش آندونوکلئاز نتوانست هیچ تفاوت مولکولی در این اگزون را نمایش دهد. استفاده از روش DGGE برای تفکیک محصول PCR بر روی ژل دناتوره‌کننده نشان داد که این اگزون به‌شدت در بین گونه‌های آرتمیا پلی‌مورفیسم دارد که قبلاً توسط تکنیک RFLP شناسایی نشده بود (۱۰).

به‌هرحال روش RT-PCR روش پیشرفته و دقیقی می‌باشد که به‌عنوان یک روشSemi quantitaive جهت ارزیابی Up regulation یک ژن موردتوجه قرارگرفته است. با استفاده از این روش، بیان ژن در جنین‌های دیاپوز *A. franciscana* (۴۳) و همچنین میزان بیان DNA متیل ترانسفراز ۲ در طول تمام مراحل رشد در این‌گونه تعیین شد (۲۹). در تحقیقی دیگر نیز میزان بیان ژن زیر واحد آلفا پروتئین کیناز فعال شونده با AMP (AMPK) در طول رشد و در پاسخ به استرس در *A. franciscana* توسط این روش صورت گرفت (۵۱).

منابع

۱- اکبری، ع.، قرنجیک، ش.، کوباز، پ.، کریمی، ا.، و صادقی، ا.،۱۳۹۵. بررسی تأثیر متقابل استرپتومایسس‌های تولیدکننده اکتوئین‌ها و گندم در شرایط تنش شوری، مجله زیست‌فناوری گیاهان زراعی، شماره ۱۳، صفحات ۶۸-۵۷.

۲- توکلی، آ.، ۱۳۹۶. PCR- DGGE: روشی نوین در دنیای میکروبیولوژی، مجله بیولوژی کاربردی، دوره ۷، شماره ۳، صفحات ۱۵-۹.

۳- درویشی خاتونی، ج.، ۱۳۹۰. گزارش لیمنولوژی و پالئولیمنولوژی دریاچه ارومیه، فاز: IV هیدرژئوشیمی دریاچه ارومیه، سازمان زمین‌شناسی کشور، ۸۰ صفحه.

۴- صالحی‌پور، م.ع.، محمدی، ع.، و درویشی خاتونی، ج.، ۱۳۸۹. مدل‌سازی فضایی و زمانی نوسانات دریاچه ارومیه بااستفاده از داده‌های ماهواره‌ای، چهاردهمین همایش انجمن زمین‌شناسی ایران و بیست و هشتمین گردهمائی علوم زمین، ارومیه.

۵- صیاد بورانی، م.، ۱۳۹۲. بررسی قابلیت تحمل به آب دریا و فعالیت آنزیم Na/K-ATPase در طی مراحل مختلف رشد (پار و اسمولت) بچه ماهیان آزاد دریای خزر، فصل‌نامه پژوهش‌های جانوری (مجله زیست‌شناسی ایران)، جلد۲۶، شماره ۴، صفحات ۴۲۴-۴۱۴.

۶- عظیمی راد، م.، مشکینی، س.، احمدی‌فر، ن.، و حسینی فر، ح.، ۱۳۹۵. بررسی اثرات تغذیه با آرتمیای غنی‌شده با سین بیوتیک بر شاخص‌های رشد جمعیت میکروبی روده و مقاومت در برابر استرس ماهی آنجل، نشریه شیلات، شماره ۶۹، صفحات ۷۸-۷۷.

۷- کاظمی، ا.، آق، ن.، و مشکینی، س.، ۱۳۹۲. بررسی جایگزینی روغن‌های گیاهی به‌جای روغن ماهی برای غنی‌سازی ناپلی *Artemia urmiana* و اثرات آن بر بازماندگی و رشد لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، فصل‌نامه پژوهش‌های جانوری (مجله زیست‌شناسی ایران)، جلد۲۶، شماره ۳، صفحات ۲۶۶-۲۵۵.

۸- لطفی، و.، آق. ن.، و سپهری. ح.،۱۳۸۲. اثرات شوری‌های مختلف بر درصد ماندگاری، میزان رشد، طول عمر و صفات تولیدمثلی سه جمعیت از آرتمیاهای ایران، مجله علوم دانشگاه تهران، جلد ۲۹، شماره ۲، صفحات ۳۱۶-۳۰۵.

۹- محمدی، ع.، لک، ر.، و درویشی خاتونی، ج.، ۱۳۸۹. بررسی تاریخچه رسوبگذاری هولوسن دریاچه ارومیه بر اساس مغزه‌های رسوبی تهیه‌شده از غرب دریاچه (جنوب بزرگراه شهید کلانتری)، چهاردهمین همایش انجمن زمین‌شناسی ایران و بیست و هشتمین گردهمائی علوم زمین، دانشگاه ارومیه.

۱۰- موسوی تومتری، گ.، مناف فر، ر.، و زارع، ص.،۱۳۹۳. کاربرد تکنیک DGGE جهت بررسی تنوع ژنNa+/K+ ATPase در بین جمعیت‌های مختلف آرتمیا، فصل‌نامه علمی- پژوهشی ژنتیک نوین، جلد ۹، شماره ۴، صفحات ۴۱۸-۴۱۱.

۱۱- نجد گرامی، ا. ح.، عسگری، ث.، زارع، ص.، و مناف فر، ر.، ۱۳۹۵. تأثیر مخمر غنی‌شده با نانو ذرات اکسید مس بر پارامتر-های رشد، فعالیت آنزیم‌های گوارشی و متابولیسم چربی در آرتمیا ارومیانا (*Artemia urmiana*) و آرتمیا فرانسیسکانا (*Artemia franciscana*)، فصل‌نامه پژوهش‌های جانوری (مجله زیست‌شناسی ایران)، جلد۲۹، شماره۳، صفحات ۳۷۹-۳۶۹.

12- Turaki, A., Bömer, M., Silva, G., and Kumar, P. L., 2017. PCR-DGGE Analysis: Unravelling Complex Mixtures of Badnavirus Sequences Present in Yam Germplasm, *Viruses*, 9(7), 181 PP: 1-24.

13- Agh, N., Sorgeloos, P., Abatzopoulos, T., Razavi, R. S. M., and Lotfi, V.G., 2001. *Artemia* resources in Iran. International Workshop on *Artemia*, Urmia University, 12-15 May 2001, Urmia, Iran.

14- Agh, N., Van Stappen, G., Bossier, P., Sepehri, H., Lotfi, V., Razavi Rouhani, S. M., and Sorgeloos, P., 2008. Effects of Salinity on Survival, Growth, Reproductive and Life Span Characteristics of *Artemia* Populations from Urmia Lake and Neighboring Lagoons, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11 (2), PP: 164-172.

15- Ahmadi, M. R., Leibovitz, H., and Simpson, K. L., 1990. Nutrient composition of the Iranian brine shrimp (*Artemia uromiana*). Comparative Biochemistry and Physiology, 95(2) , PP: 225-228.

16- Alebouyeh, M., 2010. Molecular methods in microbial typing and identification, First ed, Iran: sarcheshme andishe tabligh, PP: 145-147.

17- Boone, E., and Baas-Becking, L. G. M., 1931. Salt effects on eggs and nauplii of *Artemia salina* L, Journal of General physiology, 14(6), PP: 753-763.

18- Browne, R., 1992. Population genetics and ecology of *Artemia*: Insights into parthenogenetic reproduction. Elsevier Science Publishers Ltd. *Trends in Ecology and Evolution*, 7, PP: 232-237.

19- Chen, D. F., Lin, C., Wang, H. L., Zhang, L., Dai, L., Jia, S. N., Zhou, R., Li, R., Yang, J. S., Yang, F., S., Clegg, J., Nagasawa, H., and Yang, W. J., 2016. An La-related protein controls cell cycle arrest by nuclear retrograde transport of tRNAs during diapause formation in *Artemia*, *Bmc Biology*, 14: 16 PP: 1-13.

20- Citarasu, T., Sivaram, V., Immanuel, G., Namita, R. N., and Murugan, V., 2006. Influence of selected Indian immune-stimulant herbs against white spot syndrome virus (WSSV) infection in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* with reference to haematological, biochemical and immunological changes, Fish Shell fish Immunol, 21, PP: 372-384.

21- Comeche, A., Martín-Villamil, M., Pico, Y., and Varó, I., 2017. Effect of methylparaben in

Artemia franciscana, Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 199, PP:98-105.

22- Conte, F. P., 1984. Structure and function of the crustacean larval salt gland, International Review of Cytology, 91, PP: 45-106.

23- Cornelissen, J. B., de Bree, F. M., van der Wal, F. J., Kooi, E. A., Koene, M. G., Bossers , A., Smid, B., Antonis, A. F., and Wisselink, H. J., 2017. Mycoplasma detection by triplex real-time PCR in bronchoalveolar lavage fluid from bovine respiratory disease complex cases, BMC Veterinary Research, 8;13(1):97, PP: 1-12.

24- Cortas, N., Arnaout, M., Salon, J., and Edelman, I. S., 1989. Isoforms of Na/K-ATPase in *Artemia salina*: Tissue distribution and kinetic characterization.J. Membrane Biology, 108, PP:187–195.

25- Coutteau, P., Brendonck, L., Lavens, P., and Sorgeloos, P., 1992. The use ofmanipulated baker's yeast as an algal substitute for the laboratory culture of Anostraca.Hydrobiologia, 234, PP: 25–32.

26- Dooms, S., Papakostas, S., Hoffman, S., Delbare, D., Dierckens, K., Triantafyllidis, A., Wolf, T. D., Vadstein, O. J., Abatzopoulos, T., Sorgeloos, P., and Bossier, P., 2007. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) as a tool for the characterisation of Brachionus sp, Strains,Aquaculture, 262, PP: 29–40.

27- Estoup, A., Largiader, C. R., Perrot, E., and Chourrout, D.,1996. Rapid one -tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes, *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 5, PP: 295-298.

28- Faruk Umar, A., Tahir, F., and Bede Agbo, E., 2017. Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE) Profile of Bacterial Community from Agricultural Soils in Bauchi, North-East Nigeria, Advances in Microbiology, 7, PP: 480-486.

29- Feng, C. Z., Zhu, X. J., Dai, Z. M., Liu, F. Q., Xiang, J. H., and Yang, W. J., 2007. Identification of a novel DNA methyltransferase 2 from the brine shrimp, *Artemia franciscana*, Comparative biochemistry and physiology Part B, Biochemistry & molecular biology, 147, PP: 191-198.

30- García-Sáez, A., Esclante, R., and Sastre, L., 2000. High DNA Sequence Variability at the α1 Na/K-ATPase Locus of *Artemia franciscana* (Brine Shrimp): Polymorphism in a Gene for Salt-Resistance in a salt-Resistant Organism, *Molecular Biology and Evolution*, 17(2), PP: 235-250.

31- Ge, W., Davis, M. E., Hines, H. C., and Irvin, K. M., 2000. Rapid communication: Single nucleotide polymorphisms detected in exon 10 of the bovine growth hormone receptor gene, J ANIM SCI, 78, PP:2229-2230.

32- HangXiao, Z., QiBin, L., Jing, S., Fei, L., Gang, W., Jun, Y., and WeiWei, W., 2013. Mitochondrial genome sequences of *Artemia tibetiana* and *Artemia urmiana*: assessing molecular changes for high plateau adaptation, *Science China Life Sci*ence, 5, PP: 440–452.

33- Hoj, S., Fredholm, M., Larsen, N. J., and Nielsen, V. H., 1993. Growth hormone gene polymorphism associated with selection for milk fat production in lines of cattle, Animal. Genetics , 24, PP: 91-96.

34- Holliday, C. W., Roye, D. B., and Roer ,R. D., 1990. Salinity-induced changes in branchial Na^+/K^+-ATPase activity and transepithelial potential difference in the brine shrimp *Artemia salina*, *Journal of Experimental Biology* **,**151, PP:279-296.

35- Kelts, K., and Shahrabi, M., 1986. Holocene sedimentology of hypersaline Lake urmia, Nortwestern Iran, *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 54, PP: 105-130.

36- Lind, U. 1., Alm Rosenblad, M., Wrange, A. L., Sundell, K. S., Jonsson, P. R., André , C., Havenhand, J., and Blomberg, A., 2013. Molecular characterization of the a-subunit of Na^+/K^+ ATPase from the euryhaline barnacle Balanus improvisus reveals multiple genes and differential expression of alternative splice variants , PLoS One, 8(10),:e77069.

37- Lu, C. C., 1998. Diversity of cephalopoda from the waters around Taiwan, *Phuket Marine Biological Center Special Publication*, 18, PP:331-340.

38- MacDonald, G. H., 1980. The use of *Artemia* cysts as food by the flamingo (*Phoenicopterus ruber roseus*) and the shelduck (*Tadorna tadorna*). In: The Brine Shrimp *Artemia*, Vol. 3 Ecology, Culturing, Use in Aquaculture (Eds G. Persoone, P. Sorgeloos, O. Roels & E. Jaspers), Universa Press, Belgium, PP: 97–104.

39- Manaffar, R., 2012. Genetic diversity of *Artemia* populations in Lake Urmia, Iran. PhD thesis, Ghent University, Belgium, 160 p.

40- Manaffar, R., Zare ,S., Agh, N., Abdolahzadeh, N., Soltanian, S., Sorgeloos, P., Bossier, P., and Van Stappen, G., 2011 .SNP detection in Na/K ATPase gene a1 subunit of bisexual and parthenogenetic *Artemia* strains by RFLP screening, Journal of Molecular Ecology Recourse, 11, PP: 211-214.

41- Myers, R. M., Maniatis, T., and Lerman, L. S., 1987. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis,Methods Enzymol, 155, PP:501–527.

42- Bhakta, N. J., Lahiri, S., , Bhuiyna, A. F., Rokunuzzaaman, M., Ohonishi, K., Iwasaki, K., and Jana, B. B., 2017. Profiling of heavy metal(loid)-resistant bacterial community structure by metagenomic-DNA fingerprinting using PCR – DGGE for monitoring and bioremediation of contaminated environment, *Energy, Ecology and Environment,*2, PP:1-8.

43- Qiu, Z., Tsoi , S. C.M., and MacRae, T. H., 2007. Gene expression in diapause-destined embryos of the crustacean, *Artemia franciscana*, Mech Develop, 124, PP: 856–867.

44- Rychlik, T., Szwengiel, A., Bednarek, M., Arcuri, E., Montet, E., Mayo, B., Nowak, J., and Czarnecki, Z., 2017. Application of the PCR-DGGE technique to the fungal community of traditional Wielkopolska fried ripened curd cheese to determine its PGI authenticity, Food Control ,73, PP: 1074-1081.

45- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning* - A Laboratory Manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, PP: 260-280.

46- Sasabe, T., Furukawa, A., Matsushita, S., Higuchib, S., and Ishiuraa, S., 2007. Association analysis of the dopamine receptor D2 (DRD2) SNP rs1076560 in alcoholic patients, Neuroscience Letters, 412, PP:139-142.

47- Sheu, S. J., Chen, H. C., Lin, C. K., Lin, W. H., Chiang, Y. C., Hwang, W. Z., and Tsen, H. Y., 2013. Development and application of tuf gene-based PCR and PCR-DGGE methods for the detection of 16 Bifidobacterium species, *Journal of Food and Drug Analysis*, 21, PP: 177-183.

48- Sorgeloos, P., Dhert, P., and Can dreva, P., 2001. Use of the shrimp, *Artemia* SPP, in marine fish larviculture, Aquaculture ,200 , PP: 147-159.

49- Vanhoutte, T., Huys, G., and Cranenbrouck, S., 2005. Exploring microbial ecosystems with denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), BCCM NEWS, PP: 2-4.

50- Yik Sung, Y., Pineda, C. H., Macrae, T. h., Sorgeloos, P., and Bossier, P., 2008. Expoosure of gnotobiotic *Artemia franciscana* larvae to abiotic stress promotes heat shock protein 70 synthesis and enhances resisance to pathogenic Vibrio campbelii, Cell Stress and Chaperones,13, PP:59-66.

51- Zhu, X. J., Feng, C. Z., Dai, Z. M., Zhang, R. C., and Yang, W. J., 2007. AMPK alpha subunit gene characterization in *Artemia* and expression during development and in response to stress, Stress, 10, PP:53–63.

Effect of salinity stress on the gene expression of Na/K ATPase on two Artemia populations (*Artemia franciscana* and Parthenogenetic *Artemia*) by RT-PCR-DGGE

Mohammadzadeh M., Yousefi K. and Najde gerami E.H.

Dept. of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, I.R. of Iran

Abstract

Artemia is One of types of crustacean that can withstand in very high salinity. Due to the climate changes and increasing the salinity of inland waters and importance of Artemia as a main food sources for crustacean and marine fish larvae as well, it is necessary to understand the molecular mechanisms of biological processes in different populations of Artemia. The current study, investigates the effects of salinity stress on Na^+/ K ATPase gene expression in exon 7 of two Artemia population with using of RT-RCR-DGGE. Two different populations of *Artemia franciscana* and Parthenogenetic *Artemia* were reared at salinities 60, 120 and 180 mg/l. At the end of the experiment the mRNA of Na^+/ K ATPase was provided and converted to cDNA. Subsequent DGGE and sequencing analyses revealed that the products of these genes in *A. franciscana* is homozygous while in Parthenogenetic *Artemia* is heterozygous which is produced by two alleles. Also it was found that in the Parthenogenetic *Artemia* protein translation and the production of two different alleles is obtained. Interestingly, no difference was observed in the samples studied and apparently the only difference can be related to genomic variation among these populations.

Key words: *Artemia*, salinity stress, sodium-potassium pump, RT-PCR, DGGE technique