

کاربرد روش DGGE در بررسی تنوع ژنتیکی ژن Na^+/K^+ ATPase در جمعیت- های آرتمیا

DGGE technique application to study genetic diversity of Na^+/K^+ ATPase gene among *Artemia* populations

گلچین موسوی تومتری^{۱*}، رامین منافرا^۱، صمد زارع^۱

۱- به ترتیب کارشناس ارشد، استادیار، استاد، دانشگاه ارومیه

Moosavi Toomatari G^{*1}, Manaffar R¹, Zare S¹

1. Graduated Student, Assistant Professor, Professor, Urmia University, Urmia, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: gmoosavit@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۲/۸/۱۶ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۲۳)

چکیده

روش DGGE در انگشت‌نگاری مولکولی قادر است تفاوت قطعات DNA دو رشته‌ای را بر اساس نقطه ذوب آن‌ها در داخل یک ژل دنا توره کننده آشکار سازد. در این تحقیق به منظور بررسی تنوع ژنتیکی در بخشی از ژن Na^+/K^+ ATPase اگزون شماره ۷ این ژن در جمعیت‌های *Artemia* با نام‌های *Artemia urmiana* Parthenogenetic و *Artemia, Urmia lake Lagoons* Parthenogenetic و *Artemia, Incheh lake* و *Artemia, Maharlou lake* از ایران در مقایسه با دو جمعیت آرتمیای غیر بومی *A. sinica* و *A. franciscana* استفاده از روش‌های DGGE، RFLP و تعیین توالی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور پس از استخراج DNA، اگزون شماره ۷ این ژن با استفاده از آغازگرهای اختصاصی جنس آرتمیا تکثیر یافت. برش آنزیمی قطعه ۲۸۰ جفت بازی به وسیله ۸ آنزیم برش اندونوکلناز نتوانست هیچ تفاوت مولکولی در این اگزون را نمایش دهد. استفاده از روش DGGE برای تفکیک محصول PCR بر روی ژل دنا توره کننده نشان داد که این اگزون به شدت در بین گونه‌های آرتمیا چندشکلی دارد که قبلاً توسط روش RFLP شناسایی نشده بود. تایید نتایج DGGE توسط تعیین توالی و محاسبه فاصله ژنتیکی تنوع نوکلئوتیدی در این اگزون در جمعیت‌های آرتمیا نشان داد که احتمالاً این اگزون دارای نقش بسیار مهمی در ساختار پمپ سدیم-پتاسیم بوده که در طی روند تکاملی آرتمیا و تولید سوبه‌های دو جنسی و پارتنوژنز نقش دارد.

واژه‌های کلیدی

آرتمیا

پمپ سدیم-پتاسیم

ژل دنا توره کننده

DGGE
RFLP

مقدمه

در سال‌های اخیر تکنیک PCR-RFLP شتاب فراوانی به مطالعات مربوط به ساختار ژنومی موجودات بخشیده و یکی از روش‌های مطمئن جهت مقایسه توالی یک ژن یا یک بخش از یک ژن خاص در میان افراد مختلف جمعیت‌های یک گونه یا افراد متعلق به گونه‌های مختلف به شمار می‌رود (Manaffar 2012). الکتروفورز (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) روشی است که بر اساس اختلاف در دنا توره شدن و جدایی قطعات حاصل از PCR با اندازه مشابه در شیب اوره- فرامید استوار است (Myers et al. 1987). این روش بر اساس پایداری جفت‌باز GC (سه پیوند هیدروژنی برای هر جفت) در مقابل جفت‌باز AT (دو پیوند هیدروژنی) عمل می‌کند. مخلوطی از قطعات DNA با توالی‌های متفاوت در یک ژل آکرلامید با شیب افزایش مواد دنا توره کننده DNA، الکتروفورز می‌شوند. عموماً قطعات DNA غنی از GC مقاومت بیشتری کرده و تا زمان رسیدن به غلظت بیشتری از مواد دنا توره کننده، دو رشته‌ای باقی می‌ماند. قطعات DNA دو رشته‌ای بهتر در ژل آکرلامید حرکت می‌کنند، در حالی که مولکول‌های DNA دنا توره شده بزرگتر شده و حرکت آن‌ها در ژل کاهش یافته یا متوقف می‌شود.

مطالعه حاضر با هدف تعیین تفاوت‌ها در سطح مولکولی و جداسازی جمعیت‌های دو جنسی و پارتنوژن آرتیمیا در ایران بر اساس روش‌های PCR-RFLP و DGGE با استفاده از آگزون شماره ۷ ژن Na^+/K^+ ATPase انجام شد.

مواد و روش‌ها

سیست‌های مورد استفاده در این آزمایش، از سیست بانک پژوهشکده آرتیمیا و جانوران آبی تهیه شد. استخراج DNA از سیست‌های فوق به روش Chelex از سیست آرتیمیا انجام گرفت (Estoup et al. 1996). DNA استخراج شده توسط PCR-RFLP و PCR-DGGE مورد بررسی قرار گرفت. واکنش PCR جهت تکثیر آگزون شماره ۷ ژن مورد نظر با آغازگرهای اختصاصی طراحی شده این ناحیه با نام‌های آغازگر پیشرو -5'-CAG-CCA-3' : 5'-AAC-GTA-TGG-CTT-<C>-3'ex7(1) و آغازگر پیرو: 5'-GAA-TTC-AGC-ACG-ACT-GCA-AA-<G>-3'ex7(2):

در جانوران پرسلولی، *Artemia* تنها موجودی است که می‌تواند سطوح بالایی از غلظت نمک را تحمل کند (Browne 1992). بقا تحت چنین شرایطی امکان‌پذیر می‌باشد زیرا آرتیمیا دارای اندام‌های تخصص یافته برای خروج نمک از همولنف ایزواسموتیک داخلی به محیط خارجی می‌باشد. در مراحل اولیه تکامل، لارو اساساً نمک را توسط غده نمک (اندام پستی در ناحیه سر و سینه^۱) و بخش میانی مجرای گوارش^۲ به بیرون ترشح می‌کند (Conte 1984). وظیفه انتقال املاح به بیرون در حیوان بالغ بر عهده غدده می‌باشد که در ضمایم سینه‌ای، غدد آرواره‌ای و دستگاه داخلی گوارش قرار گرفته‌اند (Holliday et al. 1990). سطح بالای فعالیت پمپ Na^+/K^+ ATPase در حالت افزایش غلظت نمک در این اندام‌ها به اثبات رسیده است (Cortes et al. 1990; Holliday et al. 1990). در نتیجه عملکرد این پروتئین در انتقال Na^+ و K^+ از غشای پلاسمایی مشخص شده که پمپ سدیم-پتاسیم نقش ضروری در تحمل اسمزی بالای آرتیمیا ایفا می‌کند (Conte 1984; Cortas et al. 1989; Holliday et al. 1990).

تاکنون ۷ گونه دو جنسی آرتیمیا و چندین جمعیت پارتنوژن آرتیمیا شناسایی شده‌است (Asem et al. 2010). هر یک از این جمعیت‌های آرتیمیا دارای ویژگی‌های فیزیولوژیک و مورفولوژیک خاص خود بوده که به شرایط ویژه اکولوژیکی سازش یافته و در دامنه و محدوده خاصی از کره زمین یافت می‌شوند. در حقیقت سازش به شرایط سخت محیطی بین جمعیت‌های آرتیمیا باعث تولید سویه‌های مختلفی از آرتیمیا شده طوری که قادرند درجات متفاوتی از غلظت نمک و دمای محیط (به عنوان اصلی ترین عوامل اکولوژیک) را تحمل کنند (Lotfi et al. 2003). سازگاری به تنش‌های شوری به ساختار مولکولی ژنی به نام Na^+/K^+ ATPase ارتباط دارد (Cortas et al. 1989; Conte 1989; Holliday et al. 1990). لذا پیش‌بینی می‌شود که بتوان اختلافات قابل توجهی را در بین آرتیمیایی با دامنه تحمل به غلظت‌های مختلف نمک در این ژن یافت.

¹ Cephalothorax² Midgut

همچنین جهت تایید نتیجه آزمایش پس از بررسی کیفیت محصول PCR، قطعه مورد نظر جهت تعیین توالی نوکلئوتیدی به شرکت سیناکلون تهران ارسال شد. محصول تعیین توالی شده به منظور بررسی تنوع نوکلئوتیدی و فاصله ژنتیکی، با نرم افزار POPGENE و بر اساس رابطه Nei's genetic distance (1973) مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج و بحث

نتایج تکثیر قطعه مورد نظر بوسیله آغازگرهای اختصاصی نشان داد که در تمامی جمعیت‌های آرتمیا یک قطعه ۲۸۰ جفت بازی به صورت کامل تکثیر یافته است (شکل ۱).

نتایج بررسی به روش RFLP توسط ۸ آنزیم آندونوکلاز محدودالتر *EcoRI*, *XapI*(*ApoI*), *SmoI*, *HinFI*, *HaeIII*, *SmaI*, *Hin6I* و *AvaII* نتوانست هیچ اختلافی را بین نمونه‌ها نشان دهد. در حقیقت هیچ اختلافی در الگوی برش مابین نمونه‌ها مشاهده نشد (شکل نشان داده نشد).

الکتروفورز قطعات بر روی ژل دنا توره نشان‌دهنده الگوی الکتروفورزی متفاوت بوده که ناشی از اختلافات نوکلئوتیدی زیاد در این آگرون مابین آرتمیاهای مختلف است (شکل ۲). بررسی دقیق باندهای الکتروفورز نشان داد که الگوی الکتروفورز در اغلب نمونه‌ها شامل حداقل سه باند با درجه ذوب مختلف برای هر نمونه (خصوصاً در آرتمیاهای پارتنوژن) بود. در خصوص تنوع باندهای مشاهده شده در ژل الکتروفورز DGGE بایستی اشاره شود که تمامی باندهای فوق در این ژل در اصل دارای وزن مولکولی بسیار نزدیک به هم بوده که در ژل الکتروفورز آگارز هیچگونه تفکیکی بین نمونه‌ها صورت نگرفته بود. اما در این تکنیک که اساس جداسازی آن بر پایه دمای ذوب رشته‌های DNA می‌باشد اختلافات حتی تک نوکلئوتیدی که حاصل جابجایی بازهای آلی است موجب تغییر دمای ذوب رشته‌های DNA شده و سرعت حرکت و در نهایت الگوی حرکت رشته‌ها بر روی ژل متفاوت شده است.

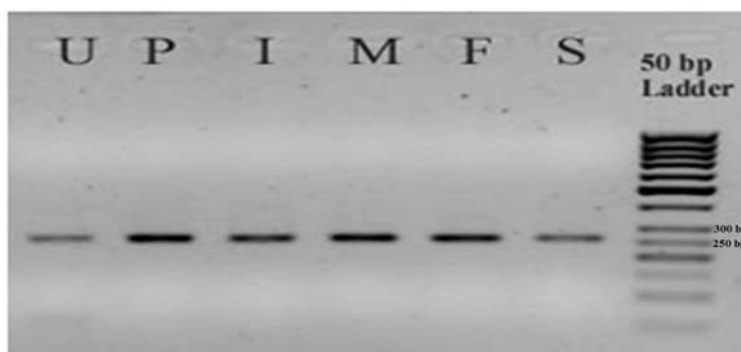
جهت تایید نتایج فوق، قطعه ۲۸۰ جفت نوکلئوتیدی از آگرون

انجام شد. در روش DGGE یک قطعه غنی از GC شامل -CCG-GGG-CCC-GCG-GGC-CCC-CGG-GCC-GGG-CCC- به ناحیه 5' آغازگر پیشرو اضافه شد.

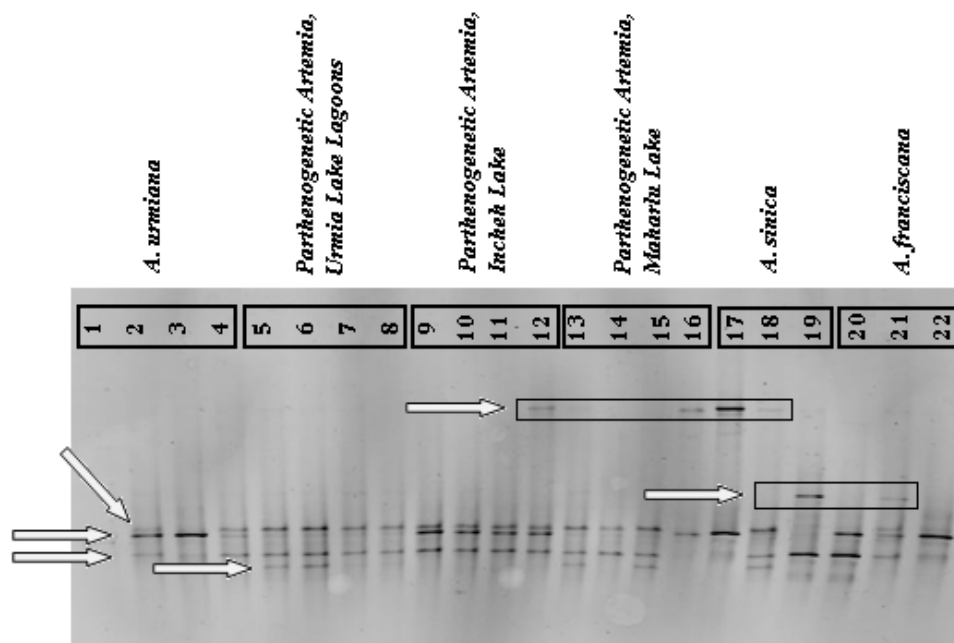
واکنش PCR با ۳/۸ میکرولیتر آب دیونیزه، یک میکرولیتر بافر PCR، ۱/۸ میکرولیتر $MgCl_2$ ، ۰/۸ میکرولیتر $dNTP_s$ ، ۰/۲ میکرولیتر از آغازگر، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم DNA polymerase و دو میکرولیتر DNA با دستگاه ترموسایکلر طبق برنامه ذیل دو دقیقه در دمای $94^{\circ}C$ برای واسرشته‌سازی اولیه (Initial Denaturation)، ۳۲ چرخه سه مرحله‌ای شامل ۲۵ ثانیه در دمای $94^{\circ}C$ برای واسرشته‌سازی (Denaturation)، ۴۵ ثانیه در دمای $56^{\circ}C$ برای اتصال آغازگر (Annealing) و ۲۵ ثانیه در دمای $72^{\circ}C$ برای توسعه (Extension) انجام شد. توسعه نهایی قطعات هدف نیز با یک چرخه سه دقیقه‌ای در دمای $72^{\circ}C$ بود. محصول PCR شده به روش الکتروفورز با ژل آگارز یک درصد در بافر (Cinnagen) TBE (IX) حاوی ۴ میکرولیتر اتیدیوم بروماید، با استفاده از اشعه UV و سیستم عکس‌برداری Gel-documentation مشاهده شد.

به منظور بررسی اختلافات مولکولی ژن مورد مطالعه در ۶ جمعیت دوجنسی و پارتنوژن آرتمیا توسط ۸ آنزیم محدود کننده *EcoRI*, *XapI*(*ApoI*), *SmoI*, *HinFI*, *HaeIII*, *SmaI*, *Hin6I* و *AvaII* در درجه حرارت و زمان ارائه شده توسط شرکت مورد هضم قرار گرفته سپس توسط دستگاه ژل داک زیر اشعه UV مورد بررسی قرار گرفت.

در تکنیک DGGE همانطور که گفته شد، قطعات PCR دو رشته‌ای از میان ژل دنا توره کننده حرکت کرده و با واسرشته شدن محدود سرعت حرکت آن‌ها بر اساس میزان واسرشته شدن تغییر می‌کنند. برای جلوگیری از جدایی کامل قطعات دو رشته‌ای، یک دم GC (قطعه غنی از GC) به یکی از آغازگرها اضافه می‌شود. برای انجام DGGE ژل دنا توره کننده مورد استفاده بر روی شیب غلظتی ۵۰-۲۰ درصد تنظیم شد. نمونه‌ها به مدت ۱۴ ساعت در ولتاژ ۱۲۰ ولت و در دمای $57^{\circ}C$ الکتروفورز شدند. بعد از اتمام زمان الکتروفورز، ژل توسط اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد و سپس زیر اشعه UV مورد بررسی قرار گرفت.



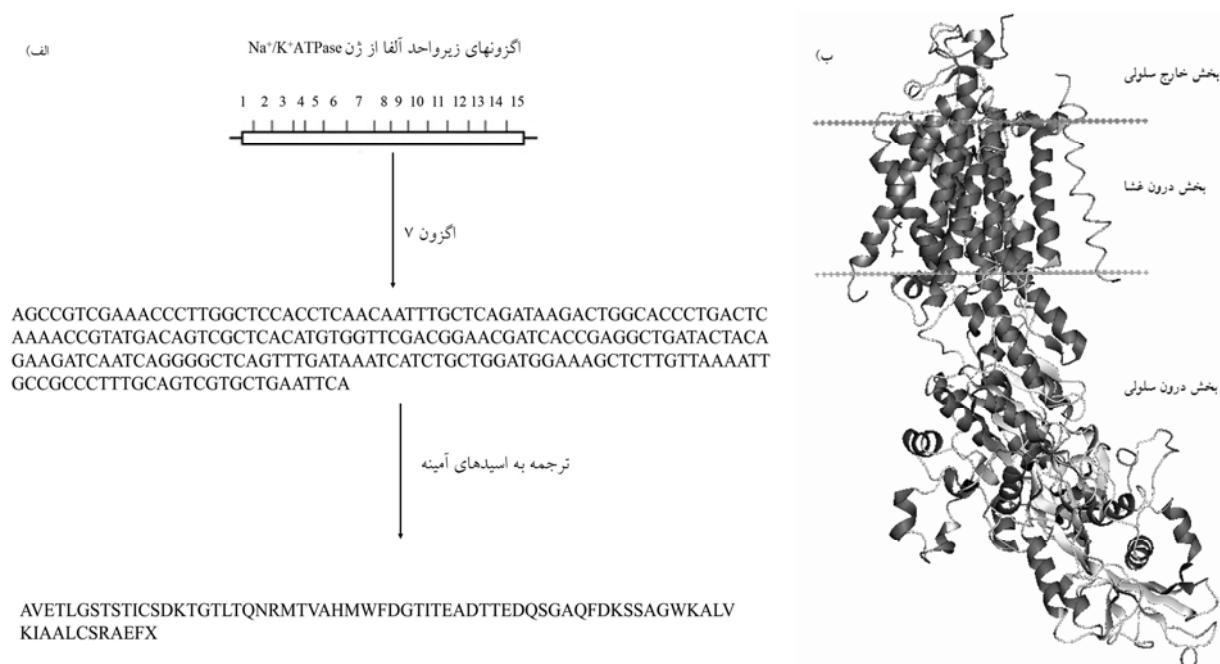
شکل ۱- باندهای ۲۸۰ bp بدست آمده از الکتروفورز تمامی نمونه‌ها در کنار نشانگر از نوع ۵۰ bp. چاهک‌ها به ترتیب (S : *A. sinica* (F : *A. franciscana* (M : *A. urmiana* (U : Parth. Urmia Lake (P : Parth. Incheh Lake (I : Parth. Mahalu Lake می‌باشد.



شکل ۲- الگوی حاصل از الکتروفورز به روش DGGE در ۶ جمعیت آرتمیای ایران. اعداد نمایش دهنده تعداد تکرارها در هر جمعیت می‌باشند. هر پیکان نشان‌دهنده یک الگوی جدید الکتروفورز می‌باشد. در این الکتروفورز فقط آرتمیای متعلق به دریاچه اینچه هیچ گونه تنوع درون جمعیتی نشان نداد.

مابین آرتمیاهای پارتنوژن با *A. urmiana* حاصل شد در حالی که بالاترین فاصله ژنتیکی مابین گونه‌های دوجنسی آرتمیا *A. franciscana* و *A. sinica* مشاهده شد. بررسی دقیق جدول ذیل همچنین نشان داد که فاصله ژنتیکی این دو گونه دوجنسی آرتمیا با آرتمیاهای پارتنوژن بیشتر از فاصله ژنتیکی آرتمیاهای پارتنوژن با *A. urmiana* می‌باشد.

شماره ۷ از ژن Na^+/K^+ ATPase در تمامی جمعیت‌های آرتمیا تعیین توالی نوکلئوتیدی شد. بررسی توالی‌های مرتب شده در یک نمونه از هر جمعیت نشان‌دهنده اختلافات نوکلئوتیدی در این آگزون مابین نمونه می‌باشد (شکل ۳). نتایج بررسی اختلافات نوکلئوتیدی توسط نرم‌افزار POPGENE نشان داد اختلاف قابل توجهی مابین نمونه‌های دو جنسی و پارتنوژن دیده می‌شود (جدول ۱). بر اساس محاسبه به عمل آمده کمترین فاصله ژنتیکی



شکل ۴- الف) توالی نوکلئوتیدی اگزون شماره ۷ متعلق به *A. franciscana* تعیین توالی شده در این تحقیق و ترجمه اسیدهای آمینه آن، ب) زیر بخش α از پمپ $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$.

یک مکان چندشکلی را در *A. franciscana* نشان داده‌اند و ایزوفرم α_1 این پمپ (Shinoda et al. 2009; Sa'ez et al. 2000; Lind et al. 2013) و اگزون شماره ۷ آن احتمالاً نقش کلیدی در سازگاری آرتمیا نسبت به غلظت‌های مختلف نمک ایفا می‌کنند. وجود چندشکلی مولکولی در این ناحیه و توانایی جمعیت‌های مختلف آرتمیا، به زیست در غلظت‌های مختلف نمک، احتمال نقش با اهمیت این بخش کوچک از ژنوم را پیشنهاد می‌کند. در توضیح توانایی جهش‌ها و یا تغییرات تک نوکلئوتیدی در تغییر ساختار سه بعدی و عملکرد پروتئین‌ها تاکنون تحقیقات زیادی به انجام رسیده و جهش‌های تک نوکلئوتیدی مسئول صدها ناهنجاری (Hoj et al. 1993; Sasabe et al. 2007) همچون بیماری داسی شکل گلوبول‌های انسان تشخیص داده شده‌اند. لذا وجود چنین جهش‌های تک نوکلئوتیدی در اگزون شماره ۷ می‌تواند موجب تغییر ساختار پمپ سدیم-پتاسیم در بین جمعیت‌های مختلف آرتمیا باشد که جابه‌جایی در ساختار زیر واحد آلفا از ژن سدیم - پتاسیم موجب تغییر و احتمالاً موجب کاهش یا افزایش کارایی این پمپ شود. در بررسی‌های اخیر نیز وجود

در همین راستا در تحقیق حاضر به منظور بررسی تنوع ژنتیکی اگزون شماره ۷ ژن $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ در ۶ جمعیت متفاوت آرتمیا به ترتیب ناحیه فوق توسط روش‌های DGGE، RFLP و نهایتاً تعیین توالی مورد بررسی قرار گرفت. با بررسی‌های به عمل آمده در خصوص جمعیت‌ها و سویه‌های مختلف آرتمیا مشخص شده که این موجود در طی میلیون‌ها سال با دستیابی به انواع سازگاری‌های متفاوت در شرایط مختلف اکولوژیک به بقای خود ادامه داده (Browne 1992; Yeong 2008) و هم اکنون با سویه‌های مختلفی که ویژگی‌های مختلف اکولوژیک را تحمل می‌کنند شناسایی می‌شوند (Lotfi et al. 2003). با توجه به اینکه آرتمیا در آب‌هایی با غلظت نمک متفاوت یافت می‌شود بخشی از این سازگاری‌های فیزیولوژیک می‌تواند ناشی از ساختار $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ باشد (Holliday et al. 1990; Lind et al. 2013). این ژن که در اغلب موجودات با ساختار متفاوتی دیده می‌شود، حدس زده شده که دارای درجات مختلفی از چندشکلی در بین جمعیت‌های مختلف آرتمیا می‌باشد. گزارش شده که ژن‌های کد کننده زیرواحد α_1 از پمپ $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ علائمی از وجود

فیزیولوژیک این دو جمعیت متفاوت آرتمیا بیشتر به چشم می‌خورد (Manaffar 2012).
 با توجه به گونه‌زایی آلپاتریکی آرتمیا (Manaffar 2012) به نظر می‌رسد اختلافات مولکولی مشاهده شده در بین جمعیت‌های آرتمیا می‌تواند ناشی از فشار اکولوژیکی محیط باشد که نهایتاً موجب انتخاب جمعیتی و یا جهش‌های مفید ژنتیکی شده است. با توجه به تنوع ژنتیکی مشاهده شده در بخش کوچکی از ژن Na^+/K^+ ATPase و قابلیت تکنیک DGGE در ردیابی اختلافات کوچک شاید بتوان در آینده به کسب نتایج ارزشمندتر در خصوص تنوع ژنتیکی خصوصاً دلایل کاربردی تغییرات مولکولی در این ژن بین جمعیت‌های آرتمیا امیدوار بود.

منابع

- Abreu-Grobois FA (1987) A review of the genetics of *Artemia*. In Sorgeloos P D A Bengtson, W. Declair and E. Jaspers (eds.), *Artemia* research and its applications. Morphology, genetics, strain characterization, toxicology. Universa Press, Wetteren, Belgium 1:61-99.
- Avisé JC (2004) Molecular markers, natural history and evolution. Sinauer Associates Inc Publishers, Sunderland, Massachusetts 541p.
- Asem A, Rastegar-Pouyani N, De Los Rios P (2010) The genus *Artemia* Leach, 1819 (Crustacea: Branchiopoda): true and false taxonomical descriptions. *Latin American Journal of Aquatic Research* 38:501-506.
- Baxevanis AD, Kappas I, Abatzopoulos TJ (2006) Molecular phylogenetics and asexuality in the brine shrimp *Artemia*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40:724-738.
- Brown R (1992) Population genetics and ecology of *Artemia*: Insights into parthenogenetic reproduction. Elsevier Science Publishers Ltd.
- Conte FP (1984) Structure and function of the crustacean larval salt gland. *International Review of Cytology* 91:45-106.
- Conte FP (1989) Molecular biology of larval osmoregulation. in Warner, AH, Macrae TH and Bagshaw JC, eds. *Cell and molecular biology of Artemia* development. Plenum Press, New York 174:371-376.
- Cortas N, Arnaout M, Salon J, Edelman IS (1989) Isoforms of Na^+/K^+ ATPase in *Artemia salina*: II. Tissue distribution and kinetic characterization. *Journal of Membrane Biology* 108:187-195.
- Dooms S, Papakostas S, Hoffman S, Delbare D, Dierckens K, Triantafyllidis A, DeWolf T, Vadstein O, Abatzopoulos TJ, Sorgeloos P, Bossier P (2007) Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) as a tool

پدیده gene splicing در تولید محصولات مختلف از این ژن پیش‌بینی شده است (Manaffar 2012; Lind et al. 2013).
 بر اساس مطالعات به عمل آمده ارتباط ژنتیکی نزدیکی ما بین *A. urmiana* با دیگر جمعیت‌های پارتنوژن آرتمیا پیشنهاد شده است (Abreu-Grobois 1987). بر اساس این مطالعات احتمالاً نسل اول آرتمیای پارتنوژن چیزی حدود ۵/۵ میلیون سال قبل از آرتمیای دو جنسی (به احتمال زیاد *A. urmiana*) در منطقه خاورمیانه جدا شده‌اند (Baxevanis et al. 2006). نتایج تحقیق حاضر نیز روابط مولکولی نزدیک این دو جمعیت مختلف آرتمیا را به اثبات رساند. این بررسی نشان داد که با وجود گذشت چندین میلیون سال همچنان این دو جمعیت آرتمیا روابط نزدیک ژنتیکی خود را حفظ کرده‌اند چیزی که در بررسی‌های فنوتیپی، اکولوژیک و

- for the characterisation of *Brachionus* sp. strains. *Aquaculture* 262:29-40.
- Estoup A, Largiader CR, Perrot E, Chourrout D (1996) Rapid one tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 5:295-298.
- Gajardo G, Crespo J, Triantafyllidis A, Tzika A, Baxevanis A, 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. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 49 (In Farsi).
- Hoj S, Fredholm M, Larsen NJ, Nielsen VH, (1993) Growth hormone gene polymorphism associated with selection for milk fat production in lines of cattle. *Animal Genetics* 24:91-96.
- Holliday CW, Roye DB, Roer RD (1990) Salinity induced changes in branchial Na^+/K^+ ATPase activity and transepithelial potential difference in the brine shrimp *Artemia salina*. *Journal of Experimental Biology* 151:279-296.
- Lind U, Alm Rosenblad M, Wrangle AL, Sundell KS, Jonsson PR, Andre C, Havenhand J, Blomberg A (2013) Molecular Characterization of the α -Subunit of Na^+/K^+ ATPase from the Euryhaline Barnacle *Balanus improvisus* Reveals Multiple Genes and Differential Expression of Alternative Splice Variant. *PLoS ONE* 8:10.
- Lotfi VG, Agh N, Sepehri H (2003) Effects of different salinities on survival, growth and reproductive characteristics of *Artemia* parthenogenetica from Lagoons and Maharlu Lake in Iran. *Journal of Basic Sciences, Faculty of Science, Tehran University* 29:305-316. (In Farsi)

- Manaffar R (2012) Genetic diversity of *Artemia* populations in Lake Urmia, Iran. PhD thesis, Ghent University, Belgium.
- Muyzer G, Smalla K (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *AntonieVan Leeuwenhoek* 73:127-141.
- Myers RM, Maniatis T, Lerman LS (1987) Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods in Enzymology* 155:501-527.
- Sa'ez AG, Escalante R, Sastre L (2000) High DNasequence variability at the $\alpha 1$ 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* 17:235-250.
- Sasabe T, Furukawa A, Matsushita S, Higuchib S, Ishiuraa S (2007) Association analysis of the dopamine receptor D2 (DRD2) SNP rs1076560 in alcoholic patients. *Neuroscience Letters* 412:139-142.
- Shinoda T, Ogawa H, Cornelius F, Toyoshima C (2009) Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution. *Nature* 459:446-450.
- Taggart JB, Hynes RA, Prodohi PA, Ferguson A (1992) A simplified protocol for Routine total DNA isolation from salmonid fishes. *Journal of Fish Biology* 40:963-965.
- Yeong YS (2008) Protection of *Artemia* from vibriosis by heat shock and heat shock proteins. PhD thesis, Ghent University, Belgium.