ژنتیک نوین
دوره نهم، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۳
صفحه ۴۱۸- ۴۱۱

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 مناف‌فر[۱]، صمد زارع[۱]

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

Moosavi Toomatari G*[1], Manaffar R[1], Zare S[1]

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 دناتوره 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 *Artemia*, Incheh lake، Urmia lake Lagoons، Parthenogenetic *Artemia*, Maharlu lake از ایران در مقایسه با دو جمعیت آرتمیای غیر بومی *A. franciscana* و *A. sinica* با 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 به‌وسیله ۸ آنزیم برش اندونوکلئاز نتوانست هیچ تفاوت مولکولی در این اگزون را نمایش دهد. استفاده از روش DGGE برای تفکیک محصول PCR بر روی ژل دناتوره کننده نشان داد که این اگزون به شدت در بین گونه‌های آرتمیا چندشکلی دارد که قبلا 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 احتمالا این اگزون دارای نقش بسیار مهمی در ساختار پمپ سدیم- پتاسیم بوده که در طی روند تکاملی آرتمیا و تولید سویه‌های دو جنسی و پارتنوژنز نقش دارد.

واژه‌های کلیدی

آرتمیا
پمپ سدیم-پتاسیم
ژل دناتوره کننده
DGGE
RFLP

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-14]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.4.3.8]

مقدمه

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 آرتمیا دارای اندام-های تخصص یافته برای خروج نمک از همولنف ایزواسموتیک داخلی به محیط خارجی می‌باشد. در مراحل اولیه تکامل، لارو اساسا نمک را توسط غده نمک (اندام پشتی در ناحیه سر و سینه[1]) و بخش میانی مجرای گوارش[2] به بیرون ترشح می‌کند (Conte 1984). وظیفه انتقال املاح به بیرون در حیوان بالغ بر عهده غددی 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.1989; 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 آرتمیا ایفا می‌کند (Conte 1984; Cortas et al. 1989; Holliday et al. 1990).

تاکنون ۷ گونه دو جنسی آرتمیا و چندین جمعیت پارتنوژنز آرتمیا شناسایی شده‌است (Asem et al. 2010). هر یک از این جمعیت‌های آرتمیا دارای ویژگی‌های فیزیولوژیک و مورفولوژیک خاص خود بوده که به شرایط ویژه اکولوژیکی سازش‌یافته و در دامنه و محدوده خاصی از کره زمین یافت می‌شوند. در حقیقت سازش به شرایط سخت محیطی بین جمعیت‌های آرتمیا باعث تولید سویه‌های مختلفی از آرتمیا 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 آرتمیاهایی با دامنه تحمل به غلظت‌های مختلف نمک در این ژن یافت.

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 DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) روشی است که بر اساس اختلاف در دناتوره شدن و جدایی قطعات حاصل از PCR با اندازه مشابه در شیب اوره- فرمامید 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 آکریلامید با شیب افزایش مواد دناتوره کننده DNA، الکتروفورز می‌شوند. عموما قطعات DNA غنی از GC مقاومت بیشتری کرده و تا زمان رسیدن به غلظت بیشتری از مواد دناتوره کننده، دو رشته‌ای باقی می‌ماند. قطعات DNA دو رشته‌ای بهتر در ژل آکریلامید حرکت می‌کنند، در حالی‌که مولکول‌های DNA دناتوره شده بزرگتر شده و حرکت آن‌ها در ژل کاهش‌یافته یا متوقف می-شود.

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

مواد و روش‌ها

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

[1] Cephalothorax
[2] Midgut

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-14]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.4.3.8]

انجام شد. در روش DGGE یک قطعه غنی از GC شامل -CCG-GGG-CCC -GCG -GGC -CCC -CGG -GCC -GGG -CCC-GGG 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 *Taq* DNA polymerase و دو میکرولیتر DNA با دستگاه ترموسایکلر طبق برنامه ذیل دو دقیقه در دمای ۹۴°C برای واسرشته‌سازی اولیه (Initial Denaturation)، ۳۲ چرخه سه مرحله‌ای شامل ۲۵ ثانیه در دمای ۹۴°C برای واسرشته‌سازی (Denaturation)، ۴۵ ثانیه در دمای ۵۶°C برای اتصال آغازگر (Annealing) و ۲۵ ثانیه در دمای ۷۲°C برای توسعه (Extension) انجام شد. توسعه نهایی قطعات هدف نیز با یک چرخه سه دقیقه‌ای در دمای ۷۲°C بود. محصول PCR شده به روش الکتروفورز با ژل آگارز یک درصد در بافر TBE (1X) (Cinnagen) 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 پارتنوژنز آرتمیا توسط ۸ آنزیم محدود کننده *Eco*RI, *Xap*I(*Apo*I), *Smo*I, *Hin*fI, *Hae*III, *Sma*I, *Hin*61 و *Ava*II 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 دناتوره 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 دناتوره کننده مورد استفاده بر روی شیب غلظتی ۵۰-۲۰ درصد تنظیم شد. نمونه‌ها به مدت ۱۴ ساعت در ولتاژ ۱۲۰ ولت و در دمای ۵۷°C الکتروفورز شدند. بعد از اتمام زمان الکتروفورز، ژل توسط اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد و سپس زیر اشعه UV مورد بررسی قرار گرفت.

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 نرم‌افزار POPGENE و بر اساس رابطه Nei's genetic distance (1973) مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج و بحث

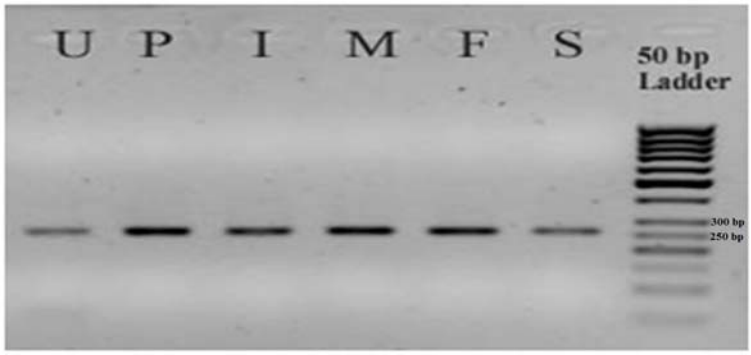
نتایج تکثیر قطعه مورد نظر بوسیله آغازگرهای اختصاصی نشان داد که در تمامی جمعیت‌های آرتمیا یک قطعه ۲۸۰ جفت بازی به صورت کامل تکثیر یافته‌است (شکل۱).

نتایج بررسی به روش RFLP توسط ۸ آنزیم آندونوکلئاز محدودالاثر *Eco*RI, *Xap*I(*Apo*I), *Smo*I, *Hin*fI, *Hae*III, *Sma*I, *Hin*61 و *Ava*II نتوانست هیچ اختلافی را بین نمونه‌ها نشان دهد. در حقیقت هیچ اختلافی در الگوی برش مابین نمونه‌ها مشاهده نشد (شکل نشان داده نشد).

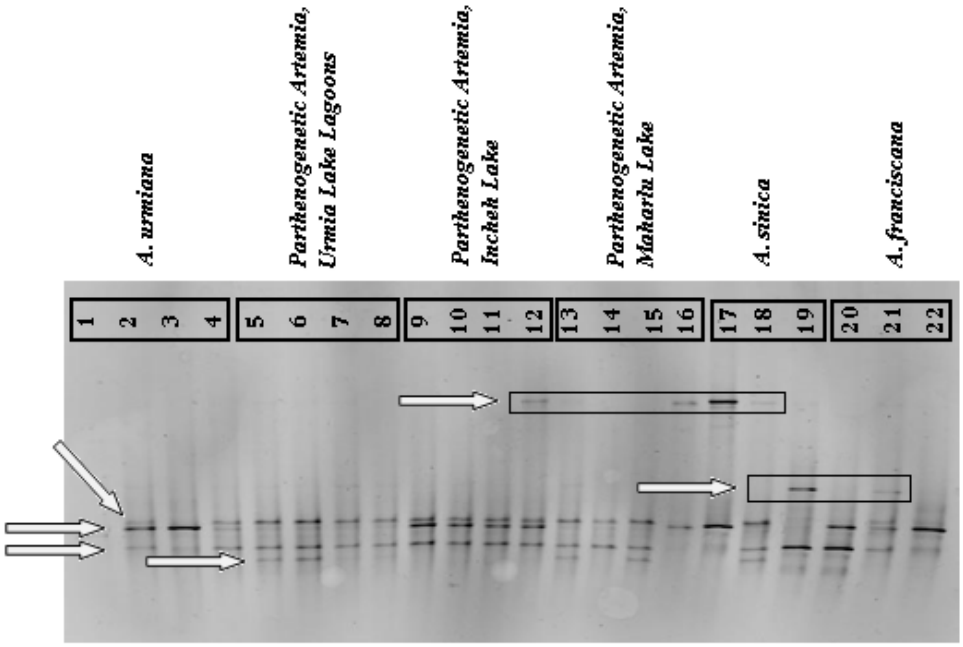
الکتروفورز قطعات بر روی ژل دناتوره نشان‌دهنده الگوی الکتروفورزی متفاوت بوده که ناشی از اختلافات نوکلئوتیدی زیاد در این اگزون مابین آرتمیاهای مختلف است (شکل۲). بررسی دقیق باندهای الکتروفورز نشان داد که الگوی الکتروفورز در اغلب نمونه‌ها شامل حداقل سه باند با درجه ذوب مختلف برای هر نمونه (خصوصا در آرتمیاهای پارتنوژنز) 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 اگزون

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-14]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.4.3.8]



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



شکل۲- الگوی حاصل از الکتروفورز به روش DGGE در ۶ جمعیت آرتمیای ایران. اعداد نمایش دهنده تعداد تکرارها در هر جمعیت می باشند. هر پیکان نشان‌دهنده یک الگوی جدید الکتروفورز می‌باشد. در این الکتروفورز فقط آرتمیای متلعق به دریاچه اینچه هیچ گونه تنوع درون جمعیتی نشان نداد.

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 اگزون مابین نمونه می‌باشد (شکل۳). نتایج بررسی اختلافات نوکلئوتیدی توسط نرم‌افزار POPGENE نشان داد اختلاف قابل توجهی مابین نمونه‌های دو جنسی و پارتوژنز دیده می‌شود (جدول۱). بر اساس محاسبه به عمل آمده کمترین فاصله ژنتیکی مابین آرتمیاهای پارتنوژنز با *A. urmiana* حاصل شد در حالی‌که 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 پارتنوژنز بیشتر از فاصله ژنتیکی آرتمیاهای پارتنوژنز با *A. urmiana* می‌باشد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-14]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.4.3.8]

```
Parth.Maharlu      AGCCGTCGAAACCCTTGGCTCCACCTCAACAATTTGCTCAGATAAGACCGGCACCCTCAC 60
Parth.urmia        AGCCGTCGAAACCCTTGGCTCCACCTCAACAATTTGCTCAGATAAGACCGGCACCCTCAC 60
Parth.Incheh       AGCCGTCGAAACCCTTGGCTCCACCTCAACAATTTGCTCAGATAAGACCGGCACCCTCAC 60
A.urmiana          AGCCGTCGAAACCCTTGGCTCCACCTCAACAATTTGCTCAGATAAGACCGGCACCCTCAC 60
A.sinica           AGCGGTTGAA-CTCTTGGCTC-ACCTCAACAATTTGCTCAGATAAGACCGGCACCCTCAC 58
A.franciscana      AGCCGTCGAAACCCTTGGCTCCACCTCAACAATTTGCTCAGATAAGACTGGCACCCTGAC 60
                   *** ** *** * ******** ************************** ******** **

Parth.Maharlu      ACAAAACCGTATGACAGTCGCTCACATGTGGTTCGATGGAACGATCACTGAGGCTGATAC 120
Parth.urmia        ACAAAACCGTATGACAGTCGCTCACATGTGGTTCGATGGAACGATCACTGAGGCTGATAC 120
Parth.Incheh       ACAAAACCGTATGACAGTCGCTCACATGTGGTTCGATGGAACGATCACTGAGGCTGATAC 120
A.urmiana          ACAAAACCGTATGACAGTCGCTCACATGTGGGTCAATGGAACGATCACTGAGGCTGATAC 120
A.sinica           ACAAAATCGTATGACAGTCGCTCACATGTGGTTCGATGGAACGATCACTGAGGCTGATAC 118
A.franciscana      TCAAAACCGTATGACAGTCGCTCACATGTGGTTCGACGGAACGATCACCGAGGCTGATAC 120
                    ***** ************************ ** * *********** ***********

Parth.Maharlu      TACTGAAGATCAGTCAGGGGCTC--AGTTTGATAAATCATCGGCTGGATGGAAAGCTCTT 178
Parth.urmia        TACTGAAGATCAGTCAGGGGCTC--AGTTTGATAAATCATCGGCTGGATGGAAAGCTCTT 178
Parth.Incheh       TACTGAAGATCAGTCAGGGGCCTCAAGTTTGATAAATCATCGGCTGGATGGAAAGCTCTT 180
A.urmiana          TACTGAAGATCATTCAGGGGCTC--AGTTTGATAAATCATCGGCTGGATGGAAAGCTCTT 178
A.sinica           TACTGAAGATCAGTCAGGGGCTC--AGTTTGATAAATCATCGGCTGGATGGAAAGCTCTT 176
A.franciscana      TACAGAAGATCAATCAGGGGCTC--AGTTTGATAAATCATCTGCTGGATGGAAAGCTCTT 178
                   *** ******** ********    **************** ******************

Parth.Maharlu      GTGAAAATTGCCGCTCTTTGCAGTCGTGCTGAATTCA 215
Parth.urmia        GTGAAAATTGCCGCTCTTTGCAGTCGTGCTGAATTCA 215
Parth.Incheh       GTTAAAATTGCCGCTCTTTGCAGTCGTGCTGAATTCA 217
A.urmiana          GTTAAAATTGCCGCTCTTTGCAGTCGTGCTTAATTCA 215
A.sinica           GTTAAAATTGCCGCCCTTTGCAGTCGTGCTGAATTCA 213
A.franciscana      GTTAAAATTGCCGCCCTTTGCAGTCGTGCTGAATTCA 215
                   ** *********** *************** ******
```

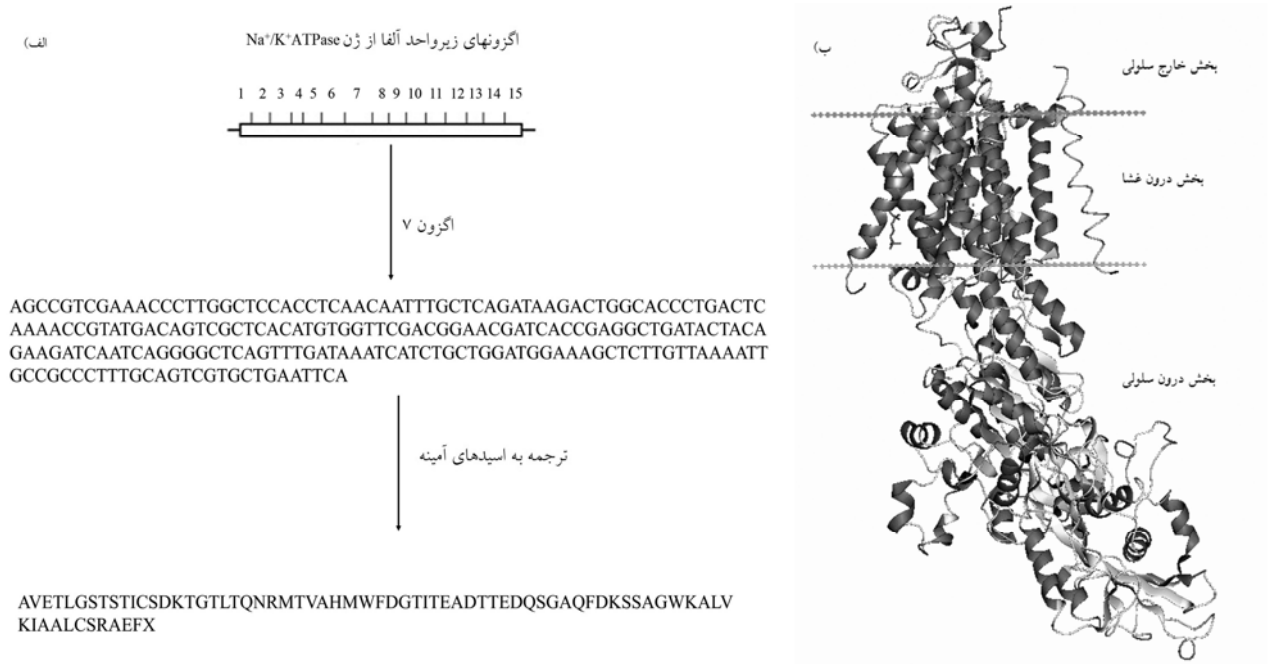
شکل۳- توالی مرتب شده توسط نرم‌افزار در جمعیت‌های مختلف آرتمیای توالی‌یابی شده در این تحقیق. عدم وجود علامت ستاره در زیر هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف نوکلئوتیدی می‌باشد.

جدول۱- فاصله ژنتیکی در اگزون ۷ ژن Na^+/K^+ ATPase در ۶ جمعیت مختلف آرتمیا. (I Parth. Incheh Lake؛ (F *A. franciscana*؛ (M Parth. Mahalu Lake؛ (P Parth. Urmia Lake؛ (S *A. sinica*؛ (U *A. urmiana*

	I	F	M	P	S	U
I	0.0					
F	0.306	0.0				
M	0.273	0.046	0.0			
P	0.273	0.046	0.0	0.0		
S	0.704	0.735	0.726	0.726	0.0	
U	0.292	0.056	0.023	0.023	0.726	0.0

روش RFLP از جمله تکنیک‌های رایج در تعیین چندشکلی در بین جمعیت‌های مختلف می‌باشد که به صورت موثری در بررسی ژن‌های میتوکندری مورد استفاده قرار گرفته (Taggart et al. 1992; Manaffar 2012) و احتمال اشتباه آن یک در میلیون است (Avise 2004). در بررسی جمعیت پارتنوژنتیکای ایران با استفاده از روش PCR-RFLP مشخص شده که به کمک این روش می‌توان جمعیت آرتمیای پارتنوژنیک ایران را به ۵ جمعیت جدا کرد (Hajirostamloo 2009). اخیرا در بررسی به عمل آمده توسط روش RFLP، اختلافات بنیادی در بین دو سویه آرتمیای پاتنوژنز و دوجنسی که ناشی از یک نوکلئوتید اختلاف می‌باشد، کشف شد (Manaffar 2012). با اینکه این روش از پتانسیل بالایی برای نشان دادن تنوع و شباهت‌های ژنتیکی آرتمیا برخوردار بوده (Gajardo et al. 2004) لیکن هنوز هم نتایج قابل قبولی در اختلاف ژنتیکی بین جمعیت‌ها و سویه‌های آرتمیا کشف نشده است. این در حالیست که در تعیین توالی اختلافات نوکلئوتیدی زیادی را نشان می‌دهد. عدم کارایی روش RFLP موجب پیشنهاد استفاده از روش DGGE برای شناسایی جمعیت‌های دو جنسی و پارتنوژنز در ایران شد. این روش در اصل جهت شناسایی تنوع جمعیت‌های باکتری‌ها ابداع شده و با موفقیت مورد استفاده قرار گرفته‌است (Myers et al. 1987; Muyzer and Smalla 1998). این روش همچنین به عنوان یک روش سریع، حساس و کاربردی جهت تشخیص تجاری نژادهای روتیفر کاربرد خوبی یافته‌است (Dooms et al. 2007).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-14]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.4.3.8]



شکل۴- 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 Na^+/K^+ ATPase.

در همین راستا در تحقیق حاضر به منظور بررسی تنوع ژنتیکی اگزون شماره ۷ ژن Na^+/K^+ ATPase در ۶ جمعیت متفاوت آرتمیا به ترتیب ناحیه فوق توسط روش‌های RFLP، DGGE و نهایتا 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 شریط مختلف اکولوژیک به بقای خود ادامه داده (Browne 1992; Yeong 2008) و هم اکنون با سویه-های مختلفی که ویژگی‌های مختلف اکولوژیک را تحمل می کنند 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 Na^+/K^+ 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 Na^+/K^+ ATPase علائمی از وجود یک مکان چندشکلی را در *A. franciscana* نشان داده‌اند و ایزوفرم α_1 این پمپ (Sa´ez et al. 2000; Shinoda et al. 2009; Lind et al. 2013) و اگزون شماره ۷ آن احتمالا 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 گلبول‌های انسان تشخیص داده شده اند. لذا وجود چنین جهش‌های تک نوکلئوتیدی در اگزون شماره ۷ می-تواند موجب تغییر ساختار پمپ سدیم-پتاسیم در بین جمعیت-های مختلف آرتمیا باشد که جابه‌جایی در ساختار زیر واحد آلفا از ژن سدیم - پتاسیم موجب تغییر و احتمالا موجب کاهش یا افزایش کارایی این پمپ شود. در بررسی‌های اخیر نیز وجود

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-14]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.4.3.8]

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 پارتنوژنز آرتمیا پیشنهاد شده است (Abreu-Grobois 1987). بر اساس این مطالعات احتمالا نسل اول آرتمیاهای پاتنوژنز 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 فیزیولوژیک این دو جمعیت متفاوت‌آرتمیا بیشتر به چشم می‌خورد (Manaffar 2012).

با توجه به گونه‌زایی آلوپاتریکی آرتمیا (Manaffar 2012) به نظر می‌رسد اختلافات مولکولی مشاهده شده در بین جمعیت‌های آرتمیا می‌تواند ناشی از فشار اکولوژیکی محیط باشد که نهایتا 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 خصوصا 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. Decleir and E. Jaspers (eds.), *Artemia* research and its applications. Morphology, genetics, strain characterization, toxicology. Universa Press, Wetteren, Belgium 1:61-99.

Avise 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 BagshawJC, 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, DierckensK, Triantafyllidis A, DeWolfT, Vadstein O, Abatzopoulos TJ, Sorgeloos P, Bossier P (2007) Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) as a tool 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, Wrange 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)

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-14]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.4.3.8]

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 a1 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 A° resolution. Nature 459:446-450.

Taggart JB, Hynes RA, Prodohi PA, Fergusen A (1992) Asimplified 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.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-14]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.4.3.8]