



مقایسه الگوی بیان ژن در بافت روپوش صدف مرواریدساز پارسی *Pinctada persica* در دو فصل گرم و سرد

فاطمه پرویزی^۱، ابوالفضل ناجی^۲، آرش اکبرزاده^۲، احمد فرهادی^۳، محمد شریف رنجبر^{۴،۵*}

تاریخ دریافت: مرداد ۱۴۰۰

تاریخ پذیرش: مهر ۱۴۰۰

چکیده

با توجه به اثر قابل توجه دما بر فرآیند معدنی‌سازی زیستی، بررسی تاثیر تغییرات فصلی بر عملکرد و الگوی بیان ژن بافت روپوش، عضو مسئول معدنی‌سازی زیستی در صدف‌های مرواریدساز، ضروری است. در این مطالعه، الگوی بیان ۹ ژن معدنی‌ساز زیستی (*ASP*، *KRMP*، *SHEM5*، *PRISM*، *PEARL*، *CHIT*، *MRNP34* و *NACREIN*) در بافت روپوش صدف مرواریدساز *Pinctada persica* در دو فصل گرم و سرد مورد بررسی قرار گرفت. cDNA از بافت روپوش، با استفاده از کیت حاوی آنزیم رونویسی معکوس ساخته شد و میزان بیان ژن به روش qPCR مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان‌دهنده الگوی بیان ژنی متفاوت بین دو فصل گرم و سرد بود. سه ژن مربوط به لایه پریسماتیک (*ASP*، *KRMP* و *SHEM5*) در فصل سرد و یک ژن مربوط به لایه نقیر (*PIF*) در فصل گرم، بیان بیشتری را نشان دادند. به نظر می‌رسد نرخ فعالیت معدنی‌سازی زیستی در دمای بالاتر کاهش یافته و ژن‌های لایه پریسماتیک نقش مهم‌تری در واکنش به تغییرات فصلی داشته باشند. این مطالعه، اطلاعات ارزشمندی را برای شناخت بهتر بافت روپوش گونه *P. persica* و تاثیر عامل محیطی بر مکانیسم‌های مولکولی موثر در شکل‌گیری پوسته و مروارید فراهم کرده است.

واژگان کلیدی: ژن‌های معدنی‌ساز زیستی، بافت روپوش، *Pinctada persica*، فصل گرم، فصل سرد.

- ۱- دکتری تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.
- ۲- دانشیار گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.
- ۳- استادیار گروه مهندسی منابع طبیعی و محیط زیست، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.
- ۴- دانشیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.
- ۵- دانشیار پارک زیست‌فناوری خلیج فارس، جزیره قشم، ایران.

* نویسنده مسئول: sharif.ranjbar@hormozgan.ac.ir

مقدمه

محیطی و جذب کربن دی‌اکسید (CO_2) در اقیانوس‌ها است، بر عملکرد جانوران دریایی بویژه موجودات دارای عملکرد آهکی شدن یا کلسیم‌دار شدن (Calcifying) تاثیر می‌گذارد (Doney et al., 2009). در موجودات دریایی که دارای عملکرد آهکی شدن هستند، معدنی سازی زیستی (Biom mineralization) یک فرآیند فیزیولوژیکی کلیدی برای تولید کلسیم کربنات است (Li et al., 2016). اسیدی شدن (Goffredo et al., 2014) و گرم شدن اقیانوس‌ها (Yao and Somero, 2014) اثر قابل توجهی بر فرآیند معدنی‌سازی زیستی دارد. اثرات این عوامل تنش‌زا بر روی معدنی‌سازی زیستی، به دلیل عملکرد دفاعی بافت‌های آهکی شده در اکوسیستم‌های دریایی، پیامدهای عملکردی و اکولوژیکی دارد (Li et al., 2016). بنابراین مطالعه جزئی و دقیق درباره تاثیر عوامل محیطی بر فرآیند معدنی‌سازی زیستی و بررسی بافت روپوش که مسئول عملکرد حسی، تنفسی و معدنی‌سازی زیستی در صدف‌های مرواریدساز است (Gardner et al., 2011)، ضروری است. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر دما بر الگوی بیان ژنی ۹ ژن معدنی‌سازی زیستی در بافت روپوش صدف مرواریدساز پارسی *Pinctada*

بافت روپوش (Mantle)، آستر داخلی کفه های صدف بوده (Jabbour-Zahab et al., 1992; Fougerouse et al., 2008) و عملکرد بنیادی این بافت، ترشح کلسیم کربنات برای تشکیل کفه‌های پوسته و تضمین رشد آنها است. ولی در صدف‌های مرواریدساز علاوه بر تشکیل پوسته، در ترشح ماده نقیر (Nacre) که باعث تولید مروارید می‌شود، نیز نقش دارد (Dix, 1972; Jabbour-Zahab et al., 1992; Fougerouse et al., 2008). پوسته نرم‌تنان به طور کلی شامل دو لایه است: لایه پریسماتیک (Prismatic) بیرونی و لایه نقیر داخلی. اگر چه هر دو لایه به طور عمده از کلسیم کربنات و ۵-۱ درصد ماتریس آلی (Organic Matrix) تشکیل شده است (Gervis and Sims, 1992; Addadi et al., 2006)، اما معمولا شکل و ساختار کلسیم کربنات در آنها متفاوت است. در صدف‌های مرواریدساز، لایه پریسماتیک و نقیر به ترتیب دارای کلسیت ستونی‌شکل و آراگونیت لایه‌ای است (Lowenstam and Weiner, 1989; Jabbour-Zahab et al., 1992; Samata et al., 1999). کاهش حالت اشباع کلسیت و آراگونیت و یون‌های بی‌کربنات آب دریا که ناشی از تغییرات

مروارید پررنگ‌تر و بهتری را تولید می‌کند (Ky et al., 2019)، بنابراین در این مطالعه بافت روپوش مشکی مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به کمبود اطلاعات درباره گونه *P. persica* اهمیت اقتصادی، کاهش جمعیت این گونه و قرار گرفتن در خلیج فارس با داشتن آب و هوای گرمسیری، بررسی تاثیر دما بر فرآیند فیزیولوژیکی این گونه مهم است. این مطالعه، اطلاعات ارزشمندی را درباره نقش عملکردی ژن‌های معدنی‌ساز زیستی در فصل گرم و سرد و مکانیسم‌های مولکولی درگیر در شکل‌گیری پوسته و مروارید فراهم می‌کند که گامی مهم در جهت پرورش مروارید با کیفیت است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

برای انجام این مطالعه، ۶ عدد صدف از گونه *Pinctada persica* با اندازه شکمی - پشتی پوسته (Dorsal Ventral Measurement: DVM) ۱۷۰-۱۰۰ میلی‌متر، دارای بافت روپوش مشکی در فصل گرم (اواخر شهریور با دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد) و ۴ عدد در فصل سرد (اواخر اسفند با دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد) به وسیله غواصی با کپسول (اسکوبا) از جزیره لارک با مختصات جغرافیایی 26° 53.385' N

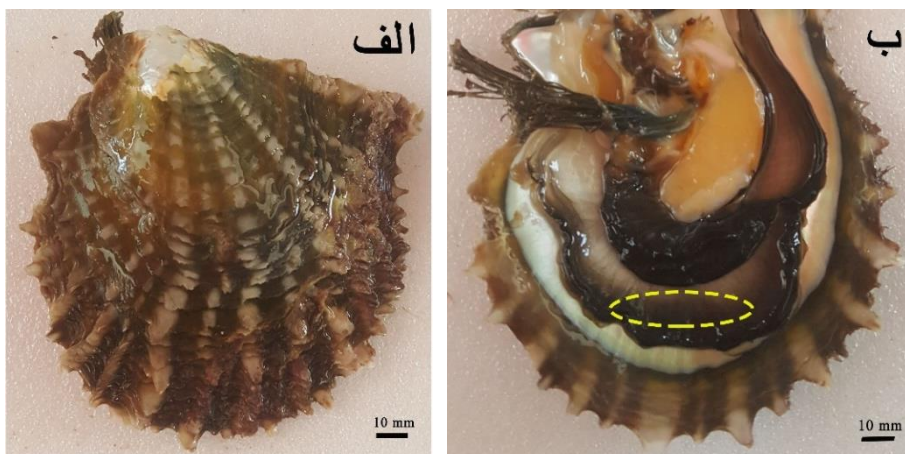
(Ranjbar et al., 2016) گونه بومی خلیج فارس، بین دو فصل گرم و سرد با استفاده از رونویسی معکوس کمی (Real Time PCR) است. چهار ژن *SP5*، *SHEM5*، *PRISM* و *KRMP* مربوط به ساخت لایه پرسماتیک (Suzuki et al., 2004; Tsukamoto et al., 2004; Yano et al., 2006; Zhang et al., 2006; Suzuki and Nagasawa, 2007; Marie et al., 2012b) ژن‌های *MRNP34*، *CHIT*، *PEARL*، *PIF* و *NACREIN* که در ساخت هر دو لایه نقش موثر در تشکیل لایه نقیر (Samata et al., 1999; Kono et al., 2000; Suzuki et al., 2009; Montagnani et al., 2011; Marie et al., 2012a,b; Feng et al., 2017) دارند (Miyamoto et al., 1996; Yano et al., 2006)، مورد بررسی قرار گرفته شد. در گذشته، گونه *Pinctada persica* تحت عنوان *Pinctada margaritifera var. persica* (Linnaeus, 1758) شناخته می‌شد، اما امروزه به عنوان یک گونه جدید در نظر گرفته می‌شود (Ranjbar et al., 2016). این گونه، یکی از بهترین مرواریدهای جهان را تولید می‌کند (Bowen, 1951). بافت روپوش در این گونه دارای فنوتیپ رنگی مشکی و نارنجی است (Parvizi et al., 2018) و فنوتیپ مشکی،

العمل شرکت سازنده انجام شد. به این ترتیب که مقدار ۵۰ میلی گرم بافت بعد از هموژن شدن در ازت مایع در معرض ۱ میلی لیتر تریزول قرار گرفت و بعد از ۳ دقیقه، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه شد. سانتریفیوژ (Hettich، آلمان) ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد برای جداسازی صورت گرفت و RNA خام با کمک ایزوپروپانول سرد رسوب داده شد. مقدار و خلوص RNA توسط نانودراپ (Thermo Fisher Scientific، آمریکا) و کیفیت نمونه‌ها با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

و $56^{\circ} 21.061' E$ جمع‌آوری شد. پس از زیست سنجی اولیه و بیهوش شدن صدف‌ها توسط پودر میخک (۳ گرم در لیتر)، بافت روپوش جدا شد. در این مطالعه منطقه‌ای از بافت روپوش که برای عمل پیوند جهت تولید مروارید پرورشی استفاده می‌شود، برش داده شد (شکل ۱) و بعد از انجماد در ازت مایع، در فریزر -80° درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

استخراج RNA

استخراج RNA از بافت‌ها با استفاده از کیت تریزول (GeneAll، کره جنوبی) طبق دستور



شکل ۱: صدف مرواریدساز پارسی *Pinctada persica* بررسی شده در این مطالعه. الف) نمای بیرونی صدف. ب) نمای داخلی صدف. محل برش بافت روپوش، با خط چین زرد رنگ مشخص شده است.

تیمار DNase و سنتز cDNA

مقدار ۳ میکروگرم از هر نمونه برای حذف آلودگی احتمالی به DNA، وارد فرآیند تیمار با DNase (Thermo Fisher Scientific) آمریکا) شد. از این رو، به نمونه‌ها مقدار ۱ میکرولیتر آنزیم DNase و ۱ میکرولیتر بافر اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در نهایت به هر نمونه ۱ میکرولیتر محلول EDTA ۵۰ میلی‌مولار اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. نمونه‌ها مورد ارزیابی مجدد نانودراپ قرار گرفتند و به دنبال نرمال‌سازی نمونه‌ها در سطح یک میکروگرم، سنتز cDNA انجام شد. از این رو، با استفاده از کیت سنتز cDNA (SMOBio، تایوان) طبق دستورالعمل شرکت سازنده، رونوشت RNA سنتز شد.

بررسی بیان ژن

در این مطالعه ۹ ژن هدف بر اساس نقش آن‌ها در فرآیند معدنی‌سازی زیستی انتخاب شدند. سه ژن Elongation Factor 1 Alpha (*EF-1 α*)، Beta Actin (*β -actin*) و 18S Ribosomal RNA (*18SrRNA*) به عنوان

ژن کنترل مورد بررسی قرار گرفتند و از ژن 18sr به دلیل واریانس بین نمونه‌ای کمتر، برای واکنش نهایی استفاده شد. توالی آغازگرها مربوط به هر ژن در جدول ۱ آورده شده است. عملیات بهینه تکثیر در دستگاه Real Time PCR (Applied Biosystem، StepOne) آمریکا) با حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر (۲۰۰ نانوگرم) cDNA، ۰/۵ میکرومولار از هر آغازگر اختصاصی، ۵ میکرولیتر SYBR Green Mix 2X (Ampliqon، دانمارک) و برنامه دمایی واسرشت اولیه در ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲۰ ثانیه، واسرشت در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و بسط در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه در ۴۰ چرخه صورت گرفت. در نهایت آزمون نقطه ذوب با شیب دمایی پلکانی ۰/۳ درجه‌ای اجرا شد. همه واکنش‌ها در دو تکرار دستگاهی اجرا شدند. Ct ژن‌های مورد نظر به دنبال نرمال‌سازی خط آستانه برای هر ژن با استفاده از نرم‌افزار StepOne Software (ThermoFisher Scientific، آمریکا) به دست آمد و به صورت فایل اکسل (Microsoft Excel 2019) ذخیره شد.

جدول ۱: جزییات ژن‌ها و آغازگرهای مورد استفاده در بررسی الگوی بیان ژنی در گونه *Pinctada persica*

نام ژن	توضیح ژن	توالی آغازگر (5'-3')	عملکرد	طول محصول (bp)	شماره دسترسی
ASP	Aspein Shell Matrix Protein	F-TCACAATGAAGGGGATAGCC R-TACGCCTGATGACCCTAGTT	P	۱۱۰	<u>AB685319.1</u>
KRMP	Lysine (K)-Rich Mantle Protein	F-GCCTTCACCACAGAAGGAAG R-GCCGAATTTCTTCAGACACC	P	۱۴۷	<u>KC494058.1</u>
SHEM5	Shematin 5	F-TTTGTGTCAGGGTTGTGGAG R-TGGCTATCATCATCGTTGCA	P	۱۵۶	<u>HE610376.1</u>
PRISM	Prismalin 14 (Prism Uncharacterized Shell Protein)	F-AGGATTCTACAGATTGGCGA R-TAACAATTGGAGAGGCACGT	P	۱۱۶	<u>HE610393.1</u>
PIF	Pif177-Like Protein	F-AGATTGAGGGCATAGCATGG R-TGAGGCCGACTTTCTTGCC	N	۱۳۷	<u>HE610401.1</u>
PEARL	Perline Matrix Protein	F-TAACCATGACGTGCACACTT R-CTATGTCATACGGCAGCCAA	N	۱۳۲	<u>DQ665305.3</u>
CHIT	Chitin Synthase	F-CCTTGTGGGATGTCTCCTGAA R-GCACTAGCTTGCAAAATCGGA	N	۱۰۳	<u>AB290881.1</u>
MRNP34	Methionine-Rich Nacre Protein 34	F-GGATACTGTGCTTAGCCGTT R-TAGACTTTTGTGGCACTGCA	N	۱۵۶	<u>HQ625028.1</u>
NACREIN	Nacrein B4	F-CAATGAGACCGTCCTTTGGG R-TTTCTCTGTGTGGGACGTCT	P, N	۱۴۱	<u>HQ654772.1</u>
18S rRNA	18S Ribosomal RNA	F-TTAGTTGGTGGAGCGATTT R-TAGCGACGGGCGGTGTG	R	۳۶۵	<u>MK687414.1</u>
EF-1α	Elongation Factor-1 Alpha	F-CCACGAGTCCTTACCAGAGG R-TGGATCACTTTTGTGTCTCC	R	۱۱۵	<u>KP737375.1</u>
β-ACT	Beta actin	F-CCTCACCTCAAGTACCCCAT R-TTGGCCTTTGGGTTGAGTG	R	۱۵۳	<u>XM-011446513.3</u>

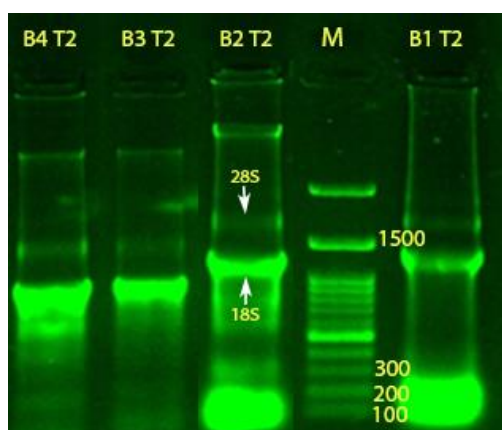
P: پرسماتیک؛ N: نقیر؛ R: ژن رفرنس.

هر ژن با استفاده از نرم‌افزار Sigma Plot-v11 رسم شد. در نهایت الگوی بیان هر ژن در بافت روپوش بین دو فصل گرم و سرد مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

نتایج

کیفیت RNAهای استخراج شده از روپوش مشکی در هر دو فصل گرم و سرد، بر روی ژل آگارز ۱ درصد، در شکل ۲ نشان داده شده است. با توجه به شکل ۲، دو بانده بودن RNA، دلالت بر زیرواحدهای مجزای 18s و 28s ریبوزوم دارد و تایید کننده کیفیت RNA استخراجی بود.

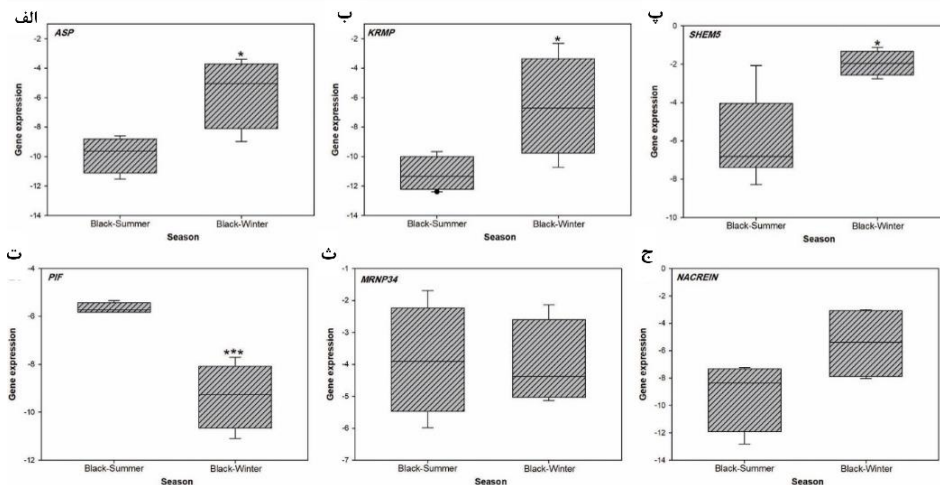
با توجه به تعداد زیاد ژن‌ها و ارزیابی بهتر بین‌گونه‌ای، کارایی آغازگرها و واکنش‌های PCR در نرم‌افزار LinRegPCR Version 11 محاسبه شد (Ramakers et al., 2003). برای تجزیه و تحلیل داده‌ها، بیان نسبی ژن‌های هدف از رابطه $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد (Livak and Schmittgen, 2001). برای اطمینان از نرمال بودن داده‌ها و سنجش برابری واریانس داده‌ها به ترتیب از آزمون‌های Shapiro-Wilk و Leven's Test استفاده شد. تجزیه و تحلیل معنی‌دار بودن تفاوت داده‌های به دست آمده بین دو فصل مختلف، با استفاده از آزمون مستقل T-test انجام شد و نمودارهای مربوط به



شکل ۲: کیفیت نمونه‌هایی از RNA استخراج شده از بافت روپوش *Pinctada persica* بر روی ژل آگارز ۱ درصد. نمونه‌های با علامت T2 در فصل سرد نمونه‌برداری شده‌اند. B1T2-B4T2: RNA استخراج شده از ۴ روپوش مشکی فصل سرد. M: مارکر (لدر). به دلیل شکست باند 28S که در RNA استخراج شده از بی مهرگان رخ می‌دهد باند ذکر شده ضعیف‌تر از 18S می‌شود.

شکل ۳). اما برخلاف این ژن‌ها، ژن *PIF*، ژن مسئول در لایه نقیر، در فصل گرم نسبت به سرد دارای بیان بیشتری بود ($P < 0.05$; شکل ۳). بقیه ژن‌های مورد مطالعه بیان معنی‌داری را نشان ندادند ($P > 0.05$; شکل ۳). ژن *NACREIN* که در ساخت هر دو لایه نقش دارد، اختلاف معنی‌داری بین دو فصل در بافت‌ها مشاهده نشد ($P > 0.05$; شکل ۳). علاوه بر این، بیان دو ژن *CHIT* و *PEARL* در بافت روپوش در هر دو فصل و بیان ژن *PRISM* در فصل گرم مشاهده نشد.

میزان بیان نسبی ۹ ژن مورد نظر بر مبنای بیان ژن *18sr* به عنوان ژن کنترل داخلی، در روپوش مشکی گونه *P. persica* بین دو فصل گرم و سرد مورد مقایسه قرار گرفت (شکل ۳). در نتایج به دست آمده از تحلیل آماری برای بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار در میزان بیان ژن‌ها در بین دو فصل، فقط ۴ ژن *ASP*، *KRMP*، *SHEM5* و *PIF* که در ساخت لایه پرسماتیک نقش دارند، اختلاف معنی‌داری را نشان دادند به طوری که در فصل سرد نسبت به گرم دارای بیان بیشتری بودند ($P < 0.05$;



شکل ۳: نمودار جعبه‌ای بیان ژن در روپوش مشکی گونه *Pinctada persica* در فصل‌های گرم و سرد (میانگین \pm انحراف معیار). الف) ژن *ASP*، ب) ژن *KRMP*، پ) ژن *SHEM5*، ت) ژن *PIF*، ث) ژن *MRNP34*، ج) ژن *NACREIN*. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$.

بحث

KRMP و *SHEM5* در فصل سرد دارای بیان بیشتری بودند و از ژن‌های مربوط به لایه نقیر، فقط ژن *PIF* در فصل گرم بیان بیشتری را نشان داد. نتایج نشان می‌دهد ژن‌های معدنی‌ساز در فصل سرد نسبت به فصل گرم بیان بیشتری داشتند و در فصل گرم کاهش بیان و فعالیت این ژن‌ها رخ داد که نشان‌دهنده کاهش نرخ معدنی‌سازی زیستی در فصل گرم است. بنابراین در گونه *P. persica* ممکن است فقط برخی از ژن‌های معدنی‌ساز تحت تاثیر تغییرات فصلی باشند و ژن‌های مربوط به لایه پریسماتیک نقش مهم تری در واکنش به تغییرات فصلی داشته باشند. اندازه‌گیری بیان ژن پروتئین‌های ماتریس یک شاخص مناسب برای ارزیابی فعالیت معدنی‌سازی زیستی در گونه *Pinctada margaritifera* در شرایط تغییرات محیطی است (Joubert et al., 2014). مطالعات انجام شده درباره پاسخ ژن‌های معدنی‌ساز زیستی در برابر عوامل محیطی (مانند اسیدی شدن و گرم شدن اقیانوس‌ها)، الگوهای مختلف بیان را گزارش کرده‌اند (Liu et al., 2012; Moya et al., 2012; Joubert et al., 2014; Li et al., 2016). اگرچه بیشتر این ژن‌ها در پاسخ به افزایش اسیدیته و دما به طور متفاوتی بیان می‌شوند، اما افراد واکنش متفاوتی از یکدیگر نیز

تحلیل الگوی بیان ژن یک ابزار قدرتمند برای شناسایی مکانیسم‌های مولکولی مرتبط با واکنش صدف مرواریدساز نسبت به عوامل تنش‌زای محیطی است (Li et al., 2016). پاسخ یک موجود به عوامل تنش‌زای فیزیولوژیکی و محیطی شامل مجموعه منظمی از رویدادها از جمله تغییرات در بیان برخی از ژن‌ها و به دنبال آن ساخت پروتئین‌هایی است که در سازگاری موجود دخالت دارند (Staub et al., 2007). دما اثر قابل توجهی بر فرآیند معدنی‌سازی زیستی دارد (Yao and Somero, 2014). بنابراین، بررسی تاثیر تغییرات فصلی بر عملکرد صدف‌های مرواریدساز و الگوی بیان ژن در بافت روپوش که مسئول معدنی‌سازی زیستی است، ضرورت دارد. بررسی ترانسکریپتوم (Transcriptome) در گونه *Pinctada fucata* نشان داد که معدنی‌سازی زیستی نسبت به تغییر pH و دما حساس است (Li et al., 2016). در مطالعه حاضر، الگوی بیان ژن در بافت روپوش مشکی گونه *Pinctada persica* در دو فصل گرم و سرد مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد الگوی بیان ژن بین دو فصل متفاوت است. از ژن‌های مرتبط با لایه پریسماتیک فقط ژن‌های *ASP*

سازگاری موجود با تغییرات است و کاهش سطح بیان *NACREIN* ممکن است با کاهش نرخ متابولیک ویژه همراه باشد (Liu et al., 2014). در مطالعه حاضر، ژن *NACREIN* در بین دو فصل اختلاف معنی‌داری را نشان نداد و ژن‌های *SHEM5* و *ASP* در فصل سرد بیان بیشتری داشتند که الگو و مکانیسم مولکولی متفاوت این ژن‌ها و پیچیدگی ژنتیکی فرآیند معدنی‌سازی زیستی در روپوش مشکی گونه *P. persica* را نشان می‌دهد. طبق مطالعه Liu و همکاران (۲۰۱۲) تفاوت در نتایج با توجه به عدم تفاوت در روش، ممکن است به دلیل ظرفیت انطباقی (سازگاری) یک گونه به تغییر شرایط آب و هوایی باشد که بین جمعیت‌هایی با توزیع جغرافیایی گسترده، متفاوت است (Liu et al., 2012). این نظریه ممکن است درباره نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نیز صدق کند.

تشکیل ریزساختار پوسته می‌تواند تحت تاثیر عوامل محیطی قرار بگیرد (Carter, 1980; Kennish, 1980; Lutz and Clark, 1984). مطالعات مختلفی درباره تاثیر دما بر ضخامت نسبی و رشد پوسته انجام شده است (Pouvreau and Prasil, 2001; Kanazawa and Sato, 2008). ضخامت

نشان می‌دهند (Li et al., 2016) و این نظریه در مطالعه حاضر نیز تایید شده است که این نشان دهنده یک رابطه پیچیده بین بیان ژن و عوامل تنش‌زا است و ممکن است تحت تاثیر عوامل مختلف بسیاری مانند موقعیت جغرافیایی، شوری، مواد غذایی و ترکیبی از عوامل محیطی دیگر باشد.

در مطالعه Liu و همکاران (۲۰۱۲) اثرات هم‌افزایی گرم شدن آب دریا و کاهش pH بر الگوی بیان ژن *ASP*، *NACREIN*، *CALM*، *SHE7-F-10* و *HSP70* در *P. fucata* بررسی شد تا اولین شواهد مولکولی درباره مکانیسم‌های نرم‌تنان دریایی در برابر بالا رفتن اسیدیته و دمای آب دریا را فراهم کنند. در این مطالعه در دمای بین ۲۷ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد، دما تاثیری بر بیان هیچ یک از پنج ژن یاد شده، نداشت (Liu et al., 2012). Liu و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که افزایش دمای آب دریا منجر به تغییر قابل توجهی در الگوی بیان ژن‌های مربوط به کلسیم‌دار شدن (*NACREIN*، *N16*، *N19*، *IRR* و *HSP70*) می‌شود و این ژن‌ها در مقایسه با دمای محیط، نسبت به دمای بالاتر مانند ۳۲ درجه سانتی‌گراد حساس‌تر بودند. تنوع در بیان ژن بعد از شوک حرارتی، نشان دهنده مکانیسم‌های سلولی موثر در

تعامل با چنین پروتئینی، لایه پریسماتیک پوسته را بسازد (Suzuki et al., 2007). در مطالعه حاضر، بیان ژن *CHIT* در دو فصل مشاهده نشده و ژن *PRISM* تنها در فصل سرد بیان شد و در نتیجه ارتباط و الگوی بیان مشابه بین دو ژن یافت نشد.

پوسته‌های نرم تنان در محیط‌های مختلف از جمله آب لب‌شور و منطقه بین جزر و مدی تا اعماق دریا، شامل نشانه‌هایی از تغییرات محیطی و فیزیولوژیکی در ریزساختار خود هستند (Nishida et al., 2012). لایه داخلی گونه *Geukensia demissa* جمع‌آوری شده در زمان‌های مختلف سال، تغییرات فصلی را در ریزساختارهای پوسته نشان داد (Lutz and Clark, 1984). تغییرات ریزساختاری در دوکفه‌ای *Conchocele bisecta* که در اعماق دریا زندگی می‌کند، نیز گزارش شده است. اگرچه شرایط محیطی در آب‌های عمیق، پایدارتر از اعماق کم است، اما این صدف به طور فصلی بخشی از ریزساختارهای خود را در پوسته تغییر داد (Nishida et al., 2011). مطالعات آنتوژنی در گونه *Scapharca broughtonii* نشان داده است که نسبت رشد ضخامت لایه بیرونی به صورت چرخه‌ای با تغییر فصل و مراحل رشدی موجود تغییر می‌کند (Nishida

ریزساختارهای پوسته با تغییرات فصلی دما هماهنگ شده و ساختار لایه‌ای در طی دمای بالا در تابستان ضخیم می‌شود (Nishida et al., 2012). این آستانه‌های حرارتی در هر گونه احتمالاً مخصوص محدودیت‌های اکولوژیکی این گونه‌ها هستند (Joubert et al., 2014). مطالعات نشان داده است در گونه *P. margaritifera* با افزایش دما، میزان رسوب نقیر افزایش می‌یابد (Pouvreau et al., 2000; Joubert et al., 2014). در این مطالعه، ژن‌های مربوط به لایه نقیر (به جز ژن *PIF*)، در فصل گرم بیان معنی‌داری را نشان ندادند که احتمالاً در فصل سرد شاهد ضخامت بیشتری از لایه‌ها نسبت به فصل گرم خواهیم بود. بین درصد کلسیت پوسته و میانگین دمای محیط دوکفه‌ای‌ها رابطه معکوس وجود دارد (Lowenstam, 1954a,b). با توجه به نتایج مطالعه حاضر، فقط برخی از ژن‌های مربوط به لایه پریسماتیک در فصل سرد عملکرد بیشتری در ترشح کلسیت دارند که نشان می‌دهد هر یک از ژن‌های لایه پریسماتیک دارای نقش‌های مخصوص به خود و الگوی متفاوت در فرآیند معدنی‌سازی و ترشح کلسیت هستند. از آنجایی که پروتئین Primalin-14 توانایی متصل شدن با کیتین را دارد، ممکن است کیتین با

به مطالعه حاضر، ممکن است فقط برخی از ژن های معدنی ساز زیستی دارای حساسیت بیشتری نسبت به دما و تغییرات فصلی باشند و ژن های لایه پریسماتیک نقش مهم تری در واکنش به تغییرات فصلی دارند. قابل ذکر است به دلیل این که گونه های موجود در این مطالعه از محیط طبیعی جمع آوری شده اند، ممکن است عوامل محیطی دیگری از جمله شوری، اسیدیته و غیره در بیان ژن ها موثر باشند. این اطلاعات برای شناخت بهتر گونه *P. persica* و همچنین درک بهتر تاثیر عوامل محیطی بر عملکرد معدنی سازی زیستی جهت موفقیت در صنعت پرورش صدف های مرواریدساز و تولید مروارید در خلیج فارس، ارزشمند است.

در مجموع، الگوی بیان ژن در روپوش گونه *P. persica* بین فصل گرم و سرد متفاوت بود و فقط برخی از ژن های معدنی ساز زیستی تحت تاثیر تغییرات فصلی بودند. از ژن های مربوط به لایه پریسماتیک فقط ژن های *KRMP ASP* و *SHEM5* در فصل سرد بیان بیشتری داشتند و از ژن های مربوط به لایه نقیر، فقط ژن *PIF* در فصل گرم بیان بیشتری را نشان داد. ژن های مربوط به لایه پریسماتیک نقش مهم تری در واکنش به تغییرات فصلی داشتند. در فصل گرم کاهش بیان و فعالیت ژن های معدنی ساز رخ داد

(et al., 2012). با توجه به این مطالعات و مطالعه حاضر، تاثیر دما بر ضخامت پوسته در هر گونه در مکان های جغرافیایی مختلف، متفاوت است و ممکن است هر گونه دارای آستانه حرارتی مخصوص و محدود برای رشد و ضخامت پوسته خود باشد.

طبق مطالعه Ky و همکاران (۲۰۱۴) فصل پاییز زمان مناسبی برای انجام عملیات پیوند بافت برای تولید مروارید است. در فصل بهار دمای آب نسبت به پاییز گرم تر است و همزمان با استفاده از منابع انرژی برای گامتوزن، فرآیندی که منجر به شرایط کمبود انرژی در نرم تنان می شود، است (Ky et al., 2014). با توجه به نتایج مطالعه حاضر در فصل گرم انرژی کمتری صرف فعالیت ژن های معدنی ساز زیستی می شود و احتمالاً فصل سرد زمان بهتری برای هسته گذاری برای تولید مروارید خواهد بود. فصل رسیدگی جنسی و تخم ریزی صدف های مرواریدساز *P. persica* در فصل گرم است که تمرکز انرژی به سمت فعالیت های تولیدمثلی رفته و انرژی کمتری صرف عملکردهای دیگر می شود. همچنین ممکن است دمای ۳۲ درجه دمای تنش زا برای گونه *P. persica* باشد و انرژی صرف فعالیت های جبرانی شود و در نتیجه بر الگوی بیان ژن تاثیر منفی می گذارد. با توجه

که نشان دهنده کاهش نرخ معدنی‌سازی زیستی
در فصل گرم است.

منابع

- Addadi L., Joester D., Nudelman F. and Weiner S. 2006.** Mollusk shell formation: a source of new concepts for understanding biomineralization processes. *Chemistry- A European Journal*, 12(4): 980–987.
- Bowen R.L. 1951.** The pearl fisheries of the Persian Gulf. *Middle East Journal*, 5(2): 161–180.
- Carter J.G. 1980.** Environmental and biological controls of bivalve shell mineralogy and microstructure. P: 69–113. In: Rhoads D.C. and Lutz R.A. (Eds.). *Skeletal Growth of Aquatic Organisms: Biological Records of Environmental Change (Topics in Geobiology)*. Plenum Publishing Corp, USA.
- Dix T. 1972.** Histochemistry of mantle and pearl sac secretory cells in *Pinctada maxima* (Lamellibranchia). *Australian Journal of Zoology*, 20(4): 359–368.
- Doney S.C., Fabry V.J., Feely R.A. and Kleypas J.A. 2009.** Ocean acidification: The other CO₂ problem. *Annual Review of Marine Science*, 1: 169–192.
- Feng D., Li Q., Yu H., Kong L. and Du S. 2017.** Identification of conserved proteins from diverse shell matrix proteome in *Crassostrea gigas*: Characterization of genetic bases regulating shell formation. *Scientific Reports*, 7(1): 1–12.
- Fougerouse A., Rousseau M. and Lucas J.S. 2008.** Soft tissue anatomy, shell structure and biomineralization. P: 77–102. In: Southgate P.C. and Lucas J.S. (Eds.). *The Pearl Oyster*. Elsevier, The Netherlands.
- Gardner L.D., Mills D., Wiegand A., Leavesley D. and Elizur A. 2011.** Spatial analysis of biomineralization associated gene expression from the mantle organ of the pearl oyster *Pinctada maxima*. *BMC Genomics*, 12(1): 1–16.
- Gervis M.H. and Sims N.A. 1992.** The biology and culture of pearl oysters (Bivalvia: Pteriidae). *WorldFish, Overseas Development Administration and International Center for Living Aquatic Resources Management*, England. 49P.
- Goffredo S., Prada F., Caroselli E., Capaccioni B., Zaccanti F., Pasquini L., Fantazzini P., Fermani S., Reggi M. and Levy O. 2014.** Biomineralization control related to population density under ocean acidification. *Nature Climate Change*, 4(7): 593–597.
- Jabbour-Zahab R., Chagot D., Blanc F. and Grizel H. 1992.** Mantle histology, histochemistry

- and ultrastructure of the pearl oyster *Pinctada margaritifera* (L.). *Aquatic Living Resources*, 5(4): 287–298.
- Joubert C., Linard C., Le Moullac G., Soyez C., Saulnier D., Teaniniuraitemoana V., Ky C.L. and Gueguen Y. 2014.** Temperature and food influence shell growth and mantle gene expression of shell matrix proteins in the pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *PloS One*, 9(8): 1–9 (e103944).
- Kanazawa T. and Sato S.I. 2008.** Environmental and physiological controls on shell microgrowth pattern of *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia: Veneridae) from Japan. *Journal of Molluscan Studies*, 74(1): 89–95.
- Kennish M.J. 1980.** Shell microgrowth analysis *Mercenaria mercenaria* as a type example for research in population dynamics. P: 255–294. In: Rhoads D.C. and Lutz R.A. (Eds.). *Skeletal Growth of Aquatic Organisms: Biological Records of Environmental Change* (Topics in Geobiology). Plenum Publishing Corp, USA.
- Kono M., Hayashi N. and Samata T. 2000.** Molecular mechanism of the nacreous layer formation in *Pinctada maxima*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 269(1): 213–218.
- Ky C.L., Blay C., Broustal F., Koua M.S. and Planes S. 2019.** Relationship of the orange tissue morphotype with shell and pearl colouration in the mollusc *Pinctada margaritifera*. *Scientific Reports*, 9(1): 1–9.
- Ky C.L., Molinari N., Moe E. and Pommier S. 2014.** Impact of season and grafter skill on nucleus retention and pearl oyster mortality rate in *Pinctada margaritifera* aquaculture. *Aquaculture International*, 22(5): 1689–1701.
- Li S., Liu C., Huang J., Liu Y., Zhang S., Zheng G., Xie L. and Zhang R. 2016.** Transcriptome and biomineralization responses of the pearl oyster *Pinctada fucata* to elevated CO₂ and temperature. *Scientific Reports*, 6(1): 1–10.
- Liu W., Huang X., Lin J. and He M. 2012.** Seawater acidification and elevated temperature affect gene expression patterns of the pearl oyster *Pinctada fucata*. *PLoS One*, 7(3): 1–7 (e33679).
- Liu W., Huang X., Lin J. and He M. 2014.** Effect of temperature on gene expression in the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Journal of Ocean University of China*, 13(3): 509–515.
- Livak K.J. and Schmittgen T.D. 2001.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods*, 25(4): 402–408.

- Lowenstam H.A. 1954a.** Environmental relations of modification compositions of certain carbonate secreting marine invertebrates. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 40(1): 39–48.
- Lowenstam H.A. 1954b.** Factors affecting the aragonite: Calcite ratios in carbonate-secreting marine organisms. The Journal of Geology, 62(3): 284–322.
- Lowenstam H.A. and Weiner S. 1989.** On Biomineralization. Oxford University Press, UK. 334P.
- Lutz R.A. and Clark G.R. 1984.** Seasonal and geographic variation in the shell microstructure of a salt-marsh bivalve (*Geukensia demissa* (Dillwyn)). Journal of Marine Research, 42(4): 943–956.
- Marie B., Joubert C., Belliard C., Tayale A., Zanella-Cleon I., Marin F., Gueguen Y. and Montagnani C. 2012a.** Characterization of MRNP34, a novel methionine-rich nacre protein from the pearl oysters. Amino Acids, 42(5): 2009–2017.
- Marie B., Joubert C., Tayale A., Zanella-Cleon I., Belliard C., Piquemal D., Cochenec Laureau N., Marin F., Gueguen Y. and Montagnani C. 2012b.** Different secretory repertoires control the biomineralization processes of prism and nacre deposition of the pearl oyster shell. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109(51): 20986–20991.
- Miyamoto H., Miyashita T., Okushima M., Nakano S., Morita T. and Matsushiro A. 1996.** A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oyster pearls. Proceedings of the National Academy of Sciences, 93(18): 9657–9660.
- Montagnani C., Marie B., Marin F., Belliard C., Riquet F., Tayale A., Zanella-Cleon I., Fleury E., Gueguen Y. and Piquemal D. 2011.** Pmarg-pearlin is a matrix protein involved in nacre framework formation in the pearl oyster *Pinctada margaritifera*. ChemBioChem, 12(13): 2033–2043.
- Moya A., Huisman L., Ball E., Hayward D., Grasso L., Chua C., Woo H., Gattuso J.P., Foret S. and Miller D.J. 2012.** Whole transcriptome analysis of the coral *Acropora millepora* reveals complex responses to CO₂-driven acidification during the initiation of calcification. Molecular Ecology, 21(10): 2440–2454.
- Nishida K., Ishimura T., Suzuki A. and Sasaki T. 2012.** Seasonal changes in the shell microstructure of the bloody clam, *Scapharca broughtonii* (Mollusca: Bivalvia: Arcidae). Palaeogeography,

- Palaeoclimatology, Palaeoecology, 363: 99–108.
- Nishida K., Nakashima R., Majima R. and Hikida Y. 2011.** Ontogenetic changes in shell microstructures in the cold seep-associated bivalve, *Conchocele bisecta* (Bivalvia: Thyasiridae). *Paleontological Research*, 15(4): 193–212.
- Parvizi F., Monsefi M., Noori A. and Ranjbar M.S. 2018.** Mantle histology and histochemistry of three pearl oysters: *Pinctada persica*, *Pinctada radiata* and *Pteria penguin*. *Molluscan Research*, 38(1): 11–20.
- Pouvreau S. and Prasil V. 2001.** Growth of the black-lip pearl oyster, *Pinctada margaritifera*, at nine culture sites of French Polynesia: Synthesis of several sampling designs conducted between 1994 and 1999. *Aquatic Living Resources*, 14(3): 155–163.
- Pouvreau S., Bacher C. and Heral M. 2000.** Ecophysiological model of growth and reproduction of the black pearl oyster, *Pinctada margaritifera*: Potential applications for pearl farming in French Polynesia. *Aquaculture*, 186(1-2): 117–144.
- Ramakers C., Ruijter J.M. Lekanne Deprez R.H. and Moorman A.F. 2003.** Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters*, 339(1): 62–66.
- Ranjbar M.S., Zolgharnien H., Yavari V., Archangi B., Salari M.A., Arnaud-Haond S. and Cunha R.L. 2016.** Rising the Persian Gulf black-lip pearl oyster to the species level: Fragmented habitat and chaotic genetic patchiness in *Pinctada persica*. *Evolutionary Biology*, 43(1): 131–143.
- Samata T., Hayashi N., Kono M., Hasegawa K., Horita C. and Akera S. 1999.** A new matrix protein family related to the nacreous layer formation of *Pinctada fucata*. *FEBS Letters*, 462(1-2): 225–229.
- Staib J.L., Quindry J.C., French J.P., Criswell D.S. and Powers S.K. 2007.** Increased temperature, not cardiac load, activates heat shock transcription factor 1 and heat shock protein 72 expression in the heart. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 292(1): 432–439.
- Suzuki M. and Nagasawa H. 2007.** The structure-function relationship analysis of Prismaticin-14 from the prismatic layer of the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata*. *The FEBS Journal*, 274(19): 5158–5166.
- Suzuki M., Murayama E., Inoue H., Ozaki N., Tohse H., Kogure T.**

- and Nagasawa H. 2004.** Characterization of Prismaticin-14, a novel matrix protein from the prismatic layer of the Japanese pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Biochemical Journal*, 382(1): 205–213.
- Suzuki M., Sakuda S. and Nagasawa H. 2007.** Identification of chitin in the prismatic layer of the shell and a chitin synthase gene from the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(7): 1735–1744.
- Suzuki M., Saruwatari K., Kogure T., Yamamoto Y., Nishimura T., Kato T. and Nagasawa H. 2009.** An acidic matrix protein, Pif, is a key macromolecule for nacre formation. *Science*, 325(5946): 1388–1390.
- Tsukamoto D., Sarashina I. and Endo K. 2004.** Structure and expression of an unusually acidic matrix protein of pearl oyster shells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 320(4): 1175–1180.
- Yano M., Nagai K., Morimoto K. and Miyamoto H. 2006.** Shematin: A family of glycine-rich structural proteins in the shell of the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Comparative Biochemistry and Physiology (B)*, 144(2): 254–262.
- Yao C.L. and Somero G.N. 2014.** The impact of ocean warming on marine organisms. *Chinese Science Bulletin*, 59(5): 468–479.
- Zhang C., Xie L., Huang J., Liu X. and Zhang R. 2006.** A novel matrix protein family participating in the prismatic layer framework formation of pearl oyster, *Pinctada fucata*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 344(3): 735–740.



Research Paper

Comparison of gene expression of mantle tissue in *Pinctada persica* between warm and cold seasons

Fatemeh Parvizi¹, Abolfazl Naji², Arash Akbarzadeh², Ahmad Farhadi³,
Mohammad Sharif Ranjbar^{4,5*}

Received: August 2021

Accepted: October 2021

Abstract

Regarding the significant effect of temperature on biomineralization process, the study of the seasonal changes impacts on the functions and patterns of gene expression in mantle tissue as an important organ responsible for biomineralization in pearl oysters, is necessary. In this study, the gene expression patterns of 9 biomineralization genes (*ASP*, *KRMP*, *SHEM5*, *PRISM*, *PEARL*, *CHIT*, *PIF*, *MRNP34*, *NACREIN*) were investigated in the mantle tissue of *Pinctada persica* between warm and cold seasons. The cDNA was constructed using reverse transcriptase enzyme and then the expression of genes were quantified in qPCR. The results showed difference in seasonal pattern. Three genes of prismatic layer (*ASP*, *KRMP* and *SHEM5*) had high expression in cold season and *PIF* which involved in nacre layer formation, showed high level of expression in warm season. It is likely, the biomineralization rate reduce in higher temperature and the prismatic related genes play more important role in response to seasonal changes. This study has provided valuable information about mantle tissue traits of *P. persica* and influence of environmental factors in molecular mechanisms involved in the formation of shell and pearl.

Key words: *Biomineralization Genes, Mantle Tissue, Pinctada persica, Warm Season, Cold Season.*

1- Ph.D. in Aquaculture, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

2- Associated Professor in Department of Fisheries, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

3- Assistant Professor in Department of Natural Resources and Environmental Engineering, Faculty of Agricultural Sciences, Shiraz University, Shiraz, Iran.

4- Associated Professor in Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

5- Associated Professor in Persian Gulf Biotechnology Park, Qeshm Island, Iran.

*Corresponding Author: sharif.ranjbar@hormozgan.ac.ir