

Bioinformatics identification of induced genes in *Marsupenaeus japonicus* in response to injection of long non-specific dsRNA and their association with immunity against white spot syndrome virus (WSSV)

Reza Pasandideh 

*Corresponding author. Assistant Professor, Iranian Shrimp Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education & Extension Organization (AREEO), Bushehr, Iran. E-mail address: Rezapasandideh63@gmail.com

Majid Pasandideh 

Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran. E-mail address: Majidpasandideh@gmail.com

Abstract

Objective

The sustainable development of the farmed shrimp industry is threatened by a wide range of important pathogens, including white spot syndrome virus (WSSV), which causes severe economic losses to the industry. The aim of this study was to identify differentially expressed genes (DEGs) in Kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) in response to injection of long non-specific dsRNA and their association with survival and immunity against white spot disease (WSD).

Materials and methods

Eight microarray data from shrimp hemocytes injected with PBS and long non-specific dsRNA (four samples from each group) at time intervals of 24 and 48 hours after injection were extracted from the GEO database with accession number GSE61541 and analyzed using the GEO2R tool. After automatic normalization, the data were imported into Excel software and differentially expressed genes (DEGs) were identified with an adjusted P-Value less than 0.05. Genes with LogFC greater than 2 and less than -2 were considered as up- and down-expressed genes, respectively. Then, the common DEGs were identified using the VENN 2.0.2 tool.

Results

Data analysis showed that 160 DEGs were identified in 24 hours after dsRNA injection, of which 111 genes were up-regulated and 49 genes down-regulated. As well as, the results showed that 206 DEGs were identified in 48 hours after dsRNA injection, of which 138 genes were up-regulated and 68 genes down-regulated. The analysis of DEGs using the VENN tool showed that 74 common genes were identified in 24 and 48 hours after dsRNA injection, of which 67 genes were up-regulated and 7 genes down-regulated. Shrimp injected with dsRNA had a higher number of DEGs than the PBS-injected group, most of which were up-regulated. The results of this study confirmed that injection of long non-specific dsRNAs could induce many genes related to innate immunity, such as Ribonuclease T2, C-type lectin 2, HSP90, Caspase Nc-like, and TRIM64 in response to WSSV infection in Kuruma shrimp.

Conclusions

Various biological functions were predicted for genes induced in Kuruma shrimp in response to injection of long non-specific dsRNA included recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), binding, homeostasis, apoptosis, catalytic, transmembrane, chaperone and RNAi. Identification of these genes could be useful in finding markers associated with white spot infection, diagnosis, or designing inhibitors against that disease.

Keywords: Innate immunity, RNA interference (RNAi), Microarray, Kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*), White spot syndrome virus (WSSV).

Paper Type: Research Paper.

Citation: Pasandideh, R., & Pasandideh, M. (2025). Bioinformatics identification of induced genes in *Marsupenaeus japonicus* in response to injection of long non-specific dsRNA and their association with immunity against white spot syndrome virus (WSSV). *Agricultural Biotechnology Journal*, 17(2), 237-262.

Agricultural Biotechnology Journal, 17(2), 237-262. DOI: 10.22103/jab.2025.24530.1638

Received: March 10, 2025.

Received in revised form: May 09, 2025.

Accepted: May 10, 2025.

Published online: June 30, 2025.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors

Introduction

Kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) is one of the most important commercial crustacean species in the aquaculture industry. As a warm-water shrimp, this species is distributed from Japan and Southeast Asia to East Africa and the Red Sea, and its production accounts for more than 5% of the world's shrimp. There are reports of the presence of Kuruma shrimp in the waters of the Persian Gulf and the Sea of Oman as an indigenous species. Since this species can be cultivated in the temperature conditions of the second half of the year, new research approaches have been initiated by the Iranian Fisheries Science Research Institute on this species since 2022 in order to develop the shrimp farming industry, create food security, and sustain production with the aim of species diversity. The distinctive color, unique flavor, high price, export demand, and the possibility of live trade have made this species a suitable option in aquaculture and a specialty seafood. However, the sustainable development of the shrimp farming industry is threatened by a wide range of diseases, including viral, bacterial, fungal and parasitic diseases. Among them, white spot disease (WSD), caused by white spot syndrome virus (WSSV), is one of the most important diseases for all shrimp farming species worldwide. This disease is caused by a highly lethal, stress-dependent virus of the genus *Whispovirus* and the family Nimaviridae. This disease causes significant mortality and economic losses in the global shrimp industry. In recent decades, various methods have been developed to understand the impact of various environmental factors, including diseases, on the expression of genes in organisms. One of these methods is microarray technology. Several studies have been conducted using microarray technology to investigate differential gene expression in different shrimp species exposed to WSSV. For example, microarray technology has been used in *Litopenaeus stylirostris*, *Fenneropenaeus chinensis*, *Litopenaeus vannamei*, *Penaeus monodon*, and *Marsupenaeus japonicus*. The RNA interference (RNAi) mechanism, initially identified as a natural antiviral immunity in plants and arthropods, was a significant discovery in the field of studying immune responses in shrimp. RNAi is a post-transcriptional gene silencing mechanism in which double-stranded RNA (dsRNA) molecules suppress the expression of genes with homologous sequences. Significant success has been reported in preventing disease progression in shrimp by injecting dsRNAs specific to viral genes. RNAi has been used as an antiviral treatment in shrimp for Taura syndrome virus (TSV), WSSV, and Yellowhead virus (YHV). However, another interesting approach by RNAi is the injection of non-specific dsRNAs with different lengths, sequences and base combinations, which can induce non-specific immunity and protect shrimp against fatal diseases, although its biological mechanisms are not fully understood. The first study in this field, conducted in 2004, confirmed that the injection of dsRNA in *Litopenaeus vannamei* reduced shrimp mortality after exposure to TSV and WSSV infections. As mentioned, the mechanisms of non-specific dsRNAs in inducing

immunity in shrimp and biological defense against diseases are not completely clear. Therefore, microarray data from Japanese shrimp samples injected with PBS and long non-specific dsRNA, extracted from the GEO database, were analyzed to identify host-induced genes against WSSV in this study. This information can be used to analyze virus-host interactions to determine which genes are expressed and in what relative amounts during infection. It can also be used to identify the relationship between differentially expressed genes and shrimp survival after virus exposure and the induction of immunity against white spot infection.

Materials and methods

Eight microarray datasets from shrimp hemocytes, injected with either PBS or long non-specific dsRNA (four samples per group), were retrieved from the GEO database (accession number GSE61541) and analyzed using the GEO2R platform at 24- and 48-hours post-injection. Following automatic normalization, the data were transferred to Excel software, where differentially expressed genes (DEGs) were identified based on an adjusted P-value threshold of less than 0.05. Genes exhibiting a LogFC greater than 2 or less than -2 were classified as upregulated and downregulated, respectively. Subsequently, common DEGs were determined using the VENNY 2.0.2 tool. The protein name of each gene or its predicted function was extracted from the UniProt, Expasy, EMBL-EBI, GeneCards, and gene ontology databases using the DAVID tool.

Results

Data analysis revealed that 160 differentially expressed genes (DEGs) were detected 24 hours after dsRNA injection, comprising 111 upregulated and 49 downregulated genes. Similarly, at 48 hours post-injection, 206 DEGs were identified, including 138 upregulated and 68 downregulated genes. Further analysis using the VENNY tool indicated that 74 genes were commonly expressed at both 24 and 48 hours after dsRNA treatment, with 67 being upregulated and 7 downregulated. Shrimp injected with dsRNA exhibited a greater number of DEGs compared to the PBS-injected group, with the majority showing upregulation. These findings confirmed that the administration of long non-specific dsRNAs could activate numerous innate immunity-related genes—such as Ribonuclease T2, C-type lectin 2, HSP90, Caspase Nc-like, and TRIM64—in response to WSSV infection in Kuruma shrimp.

Conclusions

Several biological functions were predicted for the genes induced in Kuruma shrimp following the injection of long non-specific dsRNA, including the recognition of pathogen-

associated molecular patterns (PAMPs), binding activities, homeostasis regulation, apoptosis, catalytic processes, transmembrane functions, chaperone activity, and RNA interference (RNAi). The identification of these genes may prove valuable for discovering markers linked to white spot syndrome infection, improving diagnostic methods, or developing inhibitors to combat the disease.

Author Contributions

Methodology, R.P.; software, R.P.; formal analysis, R.P.; validation, M.P., writing—review and editing, M.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript. All authors contributed equally to the conceptualization of the article and writing of the original and subsequent drafts.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are openly available in GEO database at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE61541> with accession number GSE61541.

Acknowledgements

This study was conducted with the valuable guidance and comments of Dr. Hidehiro Kondo of “Graduate School of Marine Science and Technology and Laboratory of Genome Science, Tokyo University”. The authors sincerely thank him for his scientific cooperation.

Ethical Considerations

The study was approved by the Ethics Committee of the Iran Shrimp Research Center (ISRC) (Ethical code: ISRC.2025.01). The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for profit sectors.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

شناسایی بیوانفورماتیکی ژن‌های القاء شده در میگوی ژاپنی (*Marsupenaeus japonicus*) در پاسخ به تزریق dsRNA غیراختصاصی با طول بلند و ارتباط آن‌ها با ایمنی علیه ویروس سندروم لکه سفید (WSSV)

رضا پسندیده

*نویسنده مسئول: استادیار، پژوهشکده میگوی کشور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، بوشهر، ایران. رایانامه: Rezapasandideh63@gmail.com

مجید پسندیده

استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران. رایانامه: Majidpasandideh@gmail.com
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۲۰ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۴/۰۲/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۲۰

چکیده

هدف: توسعه پایدار صنعت میگوی پرورشی در معرض تهدید طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زای مهم از جمله ویروس سندرم لکه سفید (WSSV) قرار دارد که موجب ضررهای اقتصادی شدیدی به این صنعت می‌شود. هدف از این مطالعه، شناسایی ژن‌های افتراقی بیان شده (DEGs) در میگوی کروما یا ژاپنی (*Marsupenaeus japonicus*) در پاسخ به تزریق dsRNA غیراختصاصی با طول بلند و ارتباط آن‌ها با القای ایمنی علیه بیماری لکه سفید (WSD) بود.

مواد و روش‌ها: هشت داده ریزآرایه مربوط به هموسیت میگوی‌های تزریق شده با PBS و dsRNA غیراختصاصی با طول بلند (از هر گروه ۴ نمونه) در فواصل زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تزریق، از پایگاه داده GEO با شماره دسترسی GSE61541 استخراج و با استفاده از ابزار GEO2R آنالیز شدند. داده‌ها پس از نرمال‌سازی خودکار، به نرم‌افزار اکسل وارد و ژن‌های افتراقی بیان شده (DEGs) با P-Value تصحیح شده کمتر از ۰/۰۵ مشخص شدند. ژن‌هایی با LogFC بزرگتر از ۲ و کوچکتر از -۲ به ترتیب به عنوان ژن‌های با بیان بالا و پایین در نظر گرفته شدند. سپس ژن‌های افتراقی بیان شده مشترک در دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تزریق، با استفاده از ابزار VENNY 2.0.2 شناسایی شد.

نتایج: بر اساس تحلیل داده‌های ریزآرایه، در مجموع ۱۶۰ ژن با بیان افتراقی (شامل ۱۱۱ ژن با بیان بالا و ۴۹ ژن با بیان پایین) در ۲۴ ساعت پس از تزریق dsRNA و ۲۰۶ ژن با بیان افتراقی (شامل ۱۳۸ ژن با بیان بالا و ۶۸ ژن با بیان پایین) در ۴۸ ساعت

پس از تزریق شناسایی شدند. تحلیل ژن‌های افتراقی با استفاده از ابزار VENNY نشان داد که ۷۴ ژن مشترک (شامل ۶۷ ژن با افزایش بیان و ۷ ژن با کاهش بیان) بین دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تزریق dsRNA وجود داشت. تزریق dsRNAهای غیراختصاصی با طول بلند توانست موجب القای بسیاری از ژن‌های مرتبط با ایمنی ذاتی نظیر C-type, Ribonuclease T2, lectin 2, HSP90, Caspase Nc-like و TRIM64 در پاسخ به WSSV در میگوهای ژاپنی گردد.

نتیجه‌گیری: فعالیت‌های مختلف زیستی نظیر تشخیص الگوهای مولکولی مرتبط با عامل بیماری، اتصال، حفظ هموستازی، آپوپتوزیس، کاتالیزوری، انتقال غشایی، چپرونی و RNAi برای ژن‌های القاء شده در میگوی ژاپنی در پاسخ به تزریق dsRNA غیراختصاصی با طول بلند پیش بینی شد. شناسایی این ژن‌ها می‌تواند در جهت یافتن نشانگرهای زیستی مرتبط با بیماری لکه سفید در میگو، تشخیص و یا طراحی مهارکننده علیه آن مفید باشد.

کلیدواژه‌ها: ایمنی ذاتی، تداخل RNA (RNAi)، ریزآرایه، میگوی کروما (میگوی ژاپنی)، ویروس سندروم لکه سفید (WSSV) **نوع مقاله:** پژوهشی.

استناد: پسندیده رضا، پسندیده مجید (۱۴۰۴) شناسایی بیوانفورماتیکی ژن‌های القاء شده در میگوی ژاپنی (*Marsupenaeus japonicus*) در پاسخ به تزریق dsRNA غیراختصاصی با طول بلند و ارتباط آن‌ها با ایمنی علیه ویروس سندروم لکه سفید (WSSV). *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۷(۲)، ۲۶۲-۲۳۷.



Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مقدمه

میگوی کروما^۱ یا میگوی ژاپنی (*Marsupenaeus japonicus*) یکی از گونه‌های مهم تجاری سخت پوستان در صنعت آبزی‌پروری است. این گونه به عنوان یک میگوی آب گرم، از ژاپن و آسیای جنوب شرقی تا شرق آفریقا و دریای سرخ پراکنده شده است و تولید آن بیش از ۵ درصد میگوی جهانی را شامل می‌شود (Zhong et al., 2017). گزارش‌هایی مبتنی بر حضور میگوی ژاپنی در آب‌های خلیج فارس و دریای عمان به عنوان یک گونه بومی وجود دارد (Shiri et al., 2020). از آنجا که قابلیت پرورش این گونه در شرایط دمایی شش ماهه دوم سال وجود دارد، رویکردهای پژوهشی جدیدی، از سال ۱۴۰۱، توسط موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور روی این گونه به منظور توسعه صنعت پرورش میگو، ایجاد امنیت غذایی و پایداری تولید با هدف تنوع گونه‌ای آغاز شده است. در صورت بهینه‌سازی شرایط پرورشی این گونه و سازگاری آن با شرایط محیطی مزارع پرورشی ایران،

¹ Kuruma shrimp

صنعت میگوی کشور می‌تواند بر خطرات ناشی از پرورش تک گونه‌ای میگو که در حال حاضر تنها بر میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) استوار است، فائق گردد. رنگ خاص، طعم منحصر به فرد، قیمت بالا، تقاضای صادرات و امکان تجارت زنده، این گونه را به گزینه‌ای مناسب در آبی‌پروری و یک غذای دریایی ویژه تبدیل کرده است (Shiri et al., 2020). با این حال، توسعه پایدار صنعت میگوی پرورشی در معرض تهدید طیف وسیعی از بیماری‌ها از جمله بیماری‌های ویروسی، باکتریایی، قارچی و انگلی قرار دارد. در این میان، بیماری لکه سفید (^۱WSD) که توسط ویروس سندرم لکه سفید (^۲WSSV) ایجاد می‌شود، یکی از مهم‌ترین بیماری‌ها برای همه گونه‌های میگوی پرورشی در سراسر جهان می‌باشد (Millard et al., 2021). این بیماری توسط یک ویروس بسیار کشنده و وابسته به استرس از جنس *Whispovirus* و خانواده *Nimaviridae* ایجاد می‌شود. ژنوم این ویروس شامل یک DNA دو رشته‌ای حلقوی بزرگ با اندازه حدود ۲۹۲/۹ تا ۳۰۷/۲ کیلوباز است که در جدایه‌های مختلف آن تفاوت‌هایی از نظر حدت بیماری‌زایی وجود دارد. این بیماری موجب مرگ و میر و خسارت‌های اقتصادی قابل توجهی در صنعت جهانی میگو می‌شود (Millard et al., 2021). طی دهه‌های اخیر، روش‌های مختلفی برای درک تأثیر عوامل محیطی مختلف از جمله بیماری‌ها بر بیان ژن‌های موجودات ایجاد شده‌اند. یکی از این روش‌ها فناوری ریزآرایه^۳ می‌باشد. تاکنون تحقیقات متعددی با استفاده از فناوری ریزآرایه برای بررسی بیان ژن‌های افتراقی در مواجهه گونه‌های مختلف میگو با WSSV انجام شده است. برای مثال در این زمینه از فناوری ریزآرایه در میگوی آبی (*Litopenaeus stylirostris*) (Dhar et al., 2003)، میگوی سفید چینی (*Fenneropenaeus chinensis*) (Wang et al., 2006)، میگوی سفید غربی (Robalino et al., 2007)، میگوی ببری سیاه (*Penaeus monodon*) (De la Vega et al., 2007) و میگوی ژاپنی (Fagutao et al., 2008) استفاده شده است. با آنالیز داده‌های ریزآرایه مرتبط با ایمنی در میگو می‌توان اطلاعات جدید مفیدی در زمینه تنظیم درون سلولی و برهمکنش بسیاری از ژن‌های ایمنی ذاتی این حیوان فراهم نمود. علاوه بر این، فناوری ریزآرایه می‌تواند به عنوان ابزاری سودمند جهت شناسایی نشانگرهای ژنی مرتبط با ایمنی برای برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر (MAS)^۴ مطرح باشد (Lu et al., 2011). آنالیز مجدد داده‌های ریزآرایه در تحقیقات جدید می‌تواند مزایای متعددی از جمله مقرون به صرفه بودن، افزایش قدرت آماری، شناسایی نشانگرهای زیستی جدید، اعتبارسنجی یافته‌های قبلی و کاوش در سؤالات تحقیقاتی جدید داشته باشد (Tarca et al., 2006). سازوکار تداخل RNA^۵ (RNAi) که در ابتدا به عنوان ایمنی ضد ویروسی طبیعی در گیاهان و بندپایان شناسایی شد، یک کشف قابل توجه در زمینه مطالعه پاسخ‌های ایمنی در میگو بود (Wang et al., 2006). RNAi یک سازوکار خاموش کننده ژن پس از رونویسی است که طی آن مولکول‌های RNA دو رشته‌ای (dsRNA)، بیان ژن‌ها با توالی‌های همولوگ را

^۱ White spot disease (WSD)

^۲ White spot syndrome virus (WSSV)

^۳ Microarray

^۴ Marker-assisted selection (MAS)

^۵ RNA interference (RNAi)

سرکوب می‌کنند. موفقیت‌های قابل توجهی در زمینه جلوگیری از پیشرفت بیماری در میگو از طریق تزریق dsRNAهای اختصاصی ژن‌های ویروسی گزارش شده است (Robalino et al., 2007). RNAi به عنوان یک درمان ضد ویروسی در میگو برای ویروس سندرم تورا^۱ (TSV)، WSSV و ویروس سر زردی (YHV)^۲ استفاده شده است زیرا این ویروس‌ها dsRNAهایی را تشکیل می‌دهند که قابلیت درگیر شدن با مسیر RNAi میگو را دارند و منجر به پاسخ‌های ضد ویروسی موثر می‌شوند (Maralit et al., 2015). با این حال، یکی دیگر از راهکارهای جالب توسط RNAi، تزریق dsRNAهای غیر اختصاصی با طول‌ها، توالی‌ها و ترکیب‌های پلیه مختلف می‌باشد که می‌تولند موجب القای ایمنی غیراختصاصی و محافظت میگو در برابر بیماری‌های کشنده شود، اگرچه سازوکارهای زیستی آن کاملاً مشخص نیست (Maralit et al., 2015). اولین مطالعه در این زمینه در سال ۲۰۰۴ تایید نمود که تزریق dsRNA به میگوی سفید غربی موجب کاهش مرگ و میر میگو پس از مواجهه با عفونت‌های ناشی از TSV و WSSV گردید (Robalino et al., 2004). همان طور که گفته شد، سازوکارهای dsRNAهای غیر اختصاصی در القای ایمنی در میگو و دفاع زیستی علیه بیماری‌ها کاملاً روشن نیست. بنابراین، در این مطالعه داده‌های ریزآرایه مربوط به نمونه‌های میگوی ژاپنی تزریق شده با PBS^۳ و dsRNA غیراختصاصی با طول بلند، استخراج شده از پایگاه داده GEO، به منظور شناسایی ژن‌های القاء شده میزبان علیه WSSV مورد آنالیز قرار گرفت. این اطلاعات می‌توانند از طریق آنالیز برهمکنش‌های ویروس و میزبان تعیین نمایند که کدام ژن‌ها و در چه مقدار نسبی در طی عفونت بیان می‌شوند. همچنین با استفاده از این اطلاعات می‌توان ارتباط بین ژن‌های افتراقی بیان شده با زنده‌مانی میگو پس از مواجهه با ویروس و القای ایمنی علیه عفونت لکه سفید را شناسایی نمود.

مواد و روش‌ها

داده‌های ریزآرایه مربوط به نمونه‌های میگوی ژاپنی تزریق شده با PBS و dsRNA غیراختصاصی با طول بلند از پایگاه داده GEO در مرکز ملی اطلاعات بیولوژیکی (NCBI) با شماره دسترسی GSE61541 استخراج شدند. به طور خلاصه، ابتدا میگوها در دو گروه با ۱۰۰ میکرولیتر از PBS و dsRNA به صورت داخل ماهیچه‌ای تزریق شدند. سپس همولف میگوها در فواصل زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تزریق جمع‌آوری و بلافاصله سلول‌های هموسیت آن‌ها با سانتریفیوژ استخراج گردید. دو روز پس از تزریق PBS یا dsGFP، میگوها با مایع حاوی WSSV بدست آمده از بافت میگوهای آلوده به صورت عضلانی تلقیح و مرگ و میر آن‌ها روزانه به مدت ۱۴ تا ۲۰ روز ثبت شد (Maralit et al., 2015). در ابتدا ۸ داده ریزآرایه مربوط به هموسیت ۴ میگوی تزریق شده با PBS و ۴ میگوی تزریق شده با dsRNA در فواصل زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تزریق مورد مطالعه قرار

^۱ Taura syndrome virus (TSV)

^۲ Yellowhead virus (YHV)

^۳ Phosphate-buffered saline (PBS)

گرفتند. شماره دسترسی داده‌های مورد مطالعه در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است. داده‌های ریزآرایه توسط ابزار تحت وب GEO2R (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) آنالیز شدند. GEO2R یک ابزار وب تعاملی است که برای مقایسه بیان ژن‌ها در دو یا چند گروه نمونه استفاده می‌شود و اهمیت آن در شناسایی ژن‌های مهمی است که در گروه‌های مختلف نمونه، بیان متفاوتی دارند تا از آن‌ها به عنوان نشانگرهای بیولوژیکی مرتبط با صفت مورد نظر استفاده شود. ابتدا کیفیت داده‌ها مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به اینکه داده‌های مورد مطالعه، نرمال نبودند از قابلیت خودکار نرم‌افزار برای نرمال‌سازی استفاده شد. به منظور نرمال شدن داده‌ها، اطلاعات مربوط به یکی از نمونه‌های میگو در ۲۴ ساعت (نمونه با شماره دسترسی GSM1507873) پس از تزریق dsRNA حذف شد. سپس داده‌ها به نرم‌افزار اکسل وارد و ژن‌های افتراقی بیان شده (DEGs)^۱ با P-Value تصحیح شده^۲ کمتر از ۰/۰۵ مشخص شدند. سپس ژن‌های با LogFC^۳ بزرگتر از ۲ به عنوان ژن‌های با بیان بالا و ژن‌های با LogFC کوچکتر از -۲ به عنوان ژن‌های با بیان پایین در نظر گرفته شدند. سپس ژن‌های افتراقی بیان شده با P-Value تصحیح شده کمتر از ۰/۰۵ در دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تزریق با استفاده از ابزار VENNY 2.0.2 (<https://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/>) آنالیز و ژن‌های مشترک شناسایی شدند. نام پروتئین مربوط به هر ژن و یا عملکرد پیش‌بینی شده آن از پایگاه‌های داده UniProt (<https://www.uniprot.org/>)، Expasy (<https://www.expasy.org/>)، EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/>)، GeneCards (<https://www.genecards.org/>) و هستی‌شناسی ژن^۴ توسط ابزار DAVID^۵ (<https://david.ncifcrf.gov>) استخراج شدند.

نتایج

شناسایی ژن‌ها با بیان افتراقی: با مقایسه داده‌های ریزآرایه مربوط به نمونه‌های میگو در ۲۴ ساعت پس از تزریق dsRNA با استفاده از ابزار GEO2R مشخص شد که در مجموع ۱۶۰ ژن بیان افتراقی داشتند که از این تعداد ۱۱۱ ژن بیان بالا و ۴۹ ژن بیان پایین نشان دادند ($\text{adjP} < 0.05$). نمودار آتشفشانی ژن‌ها با بیان افتراقی در شکل ۳ آورده شده است. همچنین با مقایسه داده‌های ریزآرایه مربوط به نمونه‌های میگو در ۴۸ ساعت پس از تزریق dsRNA با استفاده از ابزار GEO2R مشخص شد که در مجموع ۲۰۶ ژن بیان افتراقی داشتند که از این تعداد ۱۳۸ ژن بیان بالا و ۶۸ ژن بیان پایین نشان دادند ($\text{adjP} < 0.05$). نمودار آتشفشانی ژن‌ها با بیان افتراقی در شکل ۴ آورده شده است.

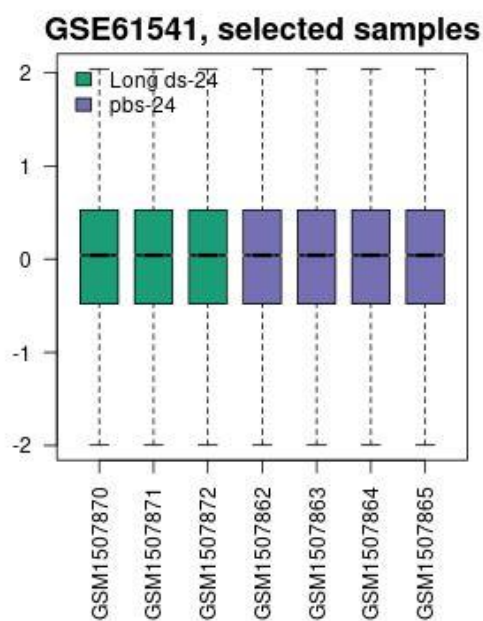
¹ Differentially expressed genes (DEGs)

² adjP-Value

³ Log Fold Change

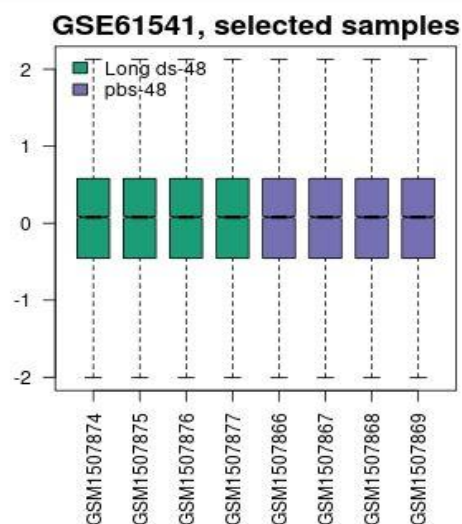
⁴ Gene ontology

⁵ The database for annotation, visualization and integrated discovery



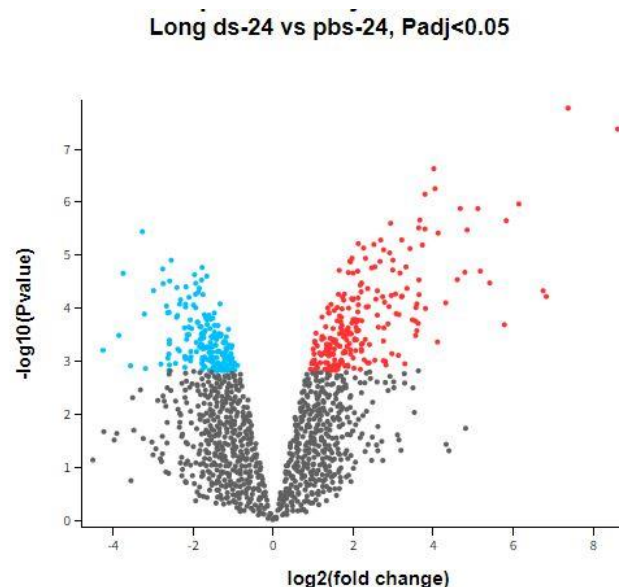
شکل ۱. شماره دسترسی داده‌های ریزآرایه مورد استفاده مربوط به سلول‌های هموسیت نمونه‌های میگو در ۲۴ ساعت پس از تزریق PBS و dsRNA

Figure 1. Accession number of microarray data used for hemocyte cells of shrimp samples at 24 hours after PBS and dsRNA injection



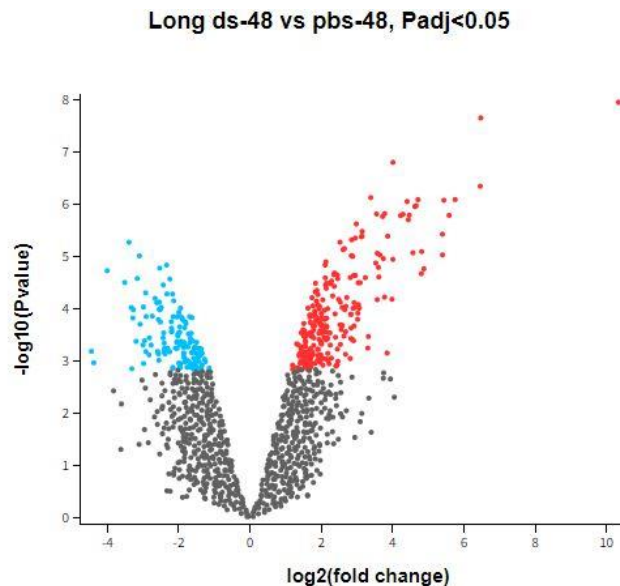
شکل ۲. شماره دسترسی داده‌های ریزآرایه مورد استفاده مربوط به سلول‌های هموسیت نمونه‌های میگو در ۴۸ ساعت پس از تزریق PBS و dsRNA

Figure 2. Accession number of microarray data used for hemocyte cells of shrimp samples at 48 hours after PBS and dsRNA injection



شکل ۳. نمودار آتشفشانی نشان‌دهنده ژن‌ها با بیان افتراقی در سلول‌های هموسیت نمونه‌های میگو در ۲۴ ساعت پس از تزریق dsRNA. ژن‌ها با افزایش بیان با نقاط قرمز و ژن‌های با کاهش بیان با نقاط آبی مشخص شده‌اند

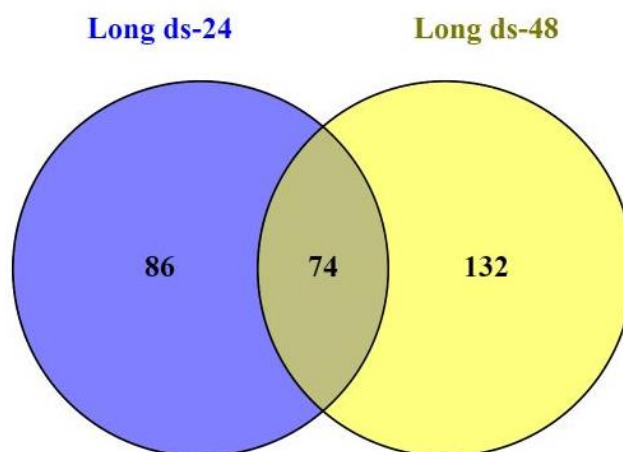
Figure 3. Volcano plot showing genes with differential expression in hemocyte cells of shrimp samples at 24 hours after dsRNA injection. Genes with increased expression are marked with red dots and genes with decreased expression are marked with blue dots



شکل ۴. نمودار آتشفشانی نشان‌دهنده ژن‌ها با بیان افتراقی در سلول‌های هموسیت نمونه‌های میگو در ۴۸ ساعت پس از تزریق dsRNA. ژن‌ها با افزایش بیان با نقاط قرمز و ژن‌های با کاهش بیان با نقاط آبی مشخص شده‌اند

Figure 4. Volcano plot showing genes with differential expression in hemocyte cells of shrimp samples at 48 hours after dsRNA injection. Genes with increased expression are marked with red dots and genes with decreased expression are marked with blue dots

شناسایی ژن‌های افتراقی بیان شده مشترک: همان‌طور که در شکل ۵ مشخص است، نتایج آنالیز ژن‌ها با استفاده از ابزار VENNY 2.0.2 نشان داد که ۷۴ ژن با بیان افتراقی به طور مشترک بین دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تزریق dsRNA وجود داشتند ($\text{adjP} < 0.05$). از این تعداد ۶۷ ژن افزایش بیان و ۷ ژن کاهش بیان نشان دادند ($\text{adjP} < 0.05$). در جدول ۱ تعداد ۱۰ ژن مشترک با بالاترین میزان بیان و در جدول ۲ ژن‌های مشترک با بیان پایین آورده شده‌اند ($\text{adjP} < 0.05$).



شکل ۵. ژن‌های افتراقی بیان شده مشترک و اختصاصی در فاصله‌های زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تزریق dsRNA

Figure 5. Common and specific differentially expressed genes at 24 and 48 hours after dsRNA injection.

شناسایی ژن‌های افتراقی بیان شده اختصاصی در ۲۴ ساعت پس از تزریق dsRNA: همان‌طور که در شکل ۵ مشخص است، نتایج آنالیز ژن‌ها با استفاده از ابزار VENNY 2.0.2 نشان داد که ۸۶ ژن اختصاصی در ۲۴ ساعت پس از تزریق dsRNA بیان افتراقی داشتند ($\text{adjP} < 0.05$). از این تعداد ۴۴ ژن افزایش بیان و ۴۲ ژن کاهش بیان نشان دادند ($\text{adjP} < 0.05$). در جدول ۳ تعداد ۱۰ ژن اختصاصی با بالاترین و پایین‌ترین میزان بیان در ۲۴ ساعت پس از تزریق dsRNA آورده شده‌اند ($\text{adjP} < 0.05$).

شناسایی ژن‌های افتراقی بیان شده اختصاصی در ۴۸ ساعت پس از تزریق dsRNA: همان‌طور که در

شکل ۵ مشخص است، نتایج آنالیز ژن‌ها با استفاده از ابزار VENNY 2.0.2 نشان داد که ۱۳۲ ژن اختصاصی در ۴۸ ساعت پس از تزریق dsRNA بیان افتراقی داشتند ($\text{adjP} < 0.05$). از این تعداد ۷۱ ژن افزایش بیان و ۶۱ ژن کاهش بیان نشان دادند ($\text{adjP} < 0.05$). در جدول ۴ تعداد ۱۰ ژن اختصاصی با بالاترین و پایین‌ترین میزان بیان در ۴۸ ساعت پس از تزریق dsRNA آورده شده‌اند ($\text{adjP} < 0.05$).

جدول ۱. تعداد ۱۰ ژن مشترک با بالاترین میزان بیان در فاصله‌های زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تزریق

(adjP<۰/۰۵) dsRNA

Table 1. Ten common genes with the highest expression levels at 24 and 48 hours after dsRNA injection (adjP<0.05)

48 ساعت پس از تزریق dsRNA 48 hours after dsRNA injection			24 ساعت پس از تزریق dsRNA 24 hours after dsRNA injection		
عملکرد پیش‌بینی شده Predicted function	LogFC	ژن Gene	عملکرد پیش‌بینی شده Predicted function	LogFC	ژن Gene
فاکتور نسخه برداری RFX3 Transcription factor RFX3	6.476	Transcription factor RFX3	پروتئین مرتبط با هموستاز هموسیت Hemocyte homeostasis-associated protein	6.747	Hemocyte homeostasis-associated protein
ژن خانه‌دار (مرجع) Housekeeping gene	6.461	Dom-3 homolog z	گیرنده لیپوپروتئین با چگالی کم Low density lipoprotein receptor	6.140	Low density lipoprotein receptor
آپوپتوز Apoptosis	5.756	Caspase Nc-like	ژن خانه‌دار (مرجع) Housekeeping gene	5.780	Dom-3 homolog z
لکتین نوع-C-2 C-type lectin 2	5.588	C-type lectin 2	لیپوپروتئین مرتبط با ویروس Virus-associated lipoprotein	5.412	Virulent strain associated lipoprotein
پروتئین اتصال Binding protein	5.403	Ankyrin partial	لکتین نوع-C-2 C-type lectin 2	5.180	C-type lectin 2
نسخه‌برداری معکوس Reverse transcriptase	5.399	Reverse transcriptase	آپولیپوپروتئین D Apolipoprotein	5.118	Apolipoprotein D
گیرنده لیپوپروتئین با چگالی کم Low density lipoprotein receptor	4.880	Low density lipoprotein receptor	چپرون Chaperone	4.848	Trigger factor
پروتئین مرتبط با هموستاز هموسیت Hemocyte homeostasis-associated protein	4.816	Hemocyte homeostasis-associated protein	نسخه‌برداری معکوس Reverse transcriptase	4.792	Reverse transcriptase
آنزیم مهم در مسیرهای گلیکولیز و گلوکونئوز Important enzyme in the glycolysis and gluconeogenesis pathways	4.808	Triosephosphate isomerase	پپتیداز Peptidase	4.603	Legumain precursor
فاکتور رشد چندعملکردی Multi-functional growth factor	4.715	Granulin precursor	فاکتور نسخه برداری RFX3 Transcription factor RFX3	4.314	Transcription factor RFX3

جدول ۲. ژن‌های مشترک با پایین‌ترین میزان بیان در فاصله‌های زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تزریق

(adjP<۰/۰۵) dsRNA

Table 2. The common genes with the lowest expression levels at 24 and 48 hours after dsRNA injection (adjP<0.05)

48 ساعت پس از تزریق dsRNA 48 hours after dsRNA injection			24 ساعت پس از تزریق dsRNA 24 hours after dsRNA injection		
عملکرد پیش‌بینی شده Predicted function	LogFC	ژن Gene	عملکرد پیش‌بینی شده Predicted function	LogFC	ژن Gene
کاست اتصال ATP ATP-binding cassette (ABC)	-3.004	ABC subfamily ABCG	پاسخ ایمنی ذاتی Innate immune response	-3.266	Ribonuclease T2
پاسخ ایمنی ذاتی Innate immune response	-2.990	Ribonuclease T2	متالوپروتئاز TIKI1 Metalloprotease TIKI1	-3.217	UPF0632 protein C2orf89-like
فاکتور ضد لیپوپلی ساکاریدی A (ALF-A)	-2.831	Anti-lipopolysaccharide factor A (ALF-A)	پروتئین مربوط به تمایز چربی Protein related to adipogenesis	-2.749	Adipose differentiation related isoform cra_a
Anti-lipopolysaccharide factor A (ALF-A)	-2.570	UPF0632 protein C2orf89-like	پروتئین جدید مرتبط با ایمنی Unknown function	-2.404	Novel protein related immunity
پروتئین جدید مرتبط با ایمنی Unknown function	-2.532	Novel protein related immunity	فاکتور ضد لیپوپلی ساکاریدی A (ALF-A)	-2.336	Anti-lipopolysaccharide factor A (ALF-A)
پروتئین مرتبط با روده Protein related bowel	-2.434	Protein related bowel	پروتئین مرتبط با روده Protein related bowel	-2.179	Protein related bowel
پروتئین مربوط به تمایز چربی Protein related to adipogenesis	-2.092	Adipose differentiation related isoform cra_a	کاست اتصال ATP (ABC) ATP-binding cassette (ABC)	-2.159	ABC subfamily ABCG

جدول ۳. ژن‌های اختصاصی با بالاترین و پایین‌ترین میزان بیان در ۲۴ ساعت پس از تزریق dsRNA

(adjP<0.05)

Table 3. The specific genes with the highest and lowest expression levels at 24 hours after dsRNA injection (adjP<0.05)

ژن‌های افتراقی با کاهش بیان Differential genes with reduced expression			ژن‌های افتراقی با افزایش بیان Differential genes with increased expression		
Predicted function	LogFC	ژن Gene	Predicted function	LogFC	ژن Gene
عملکرد پیش‌بینی شده پروتئین انتقال غشایی Transmembrane protein	-4.252	7 transmembrane	آنزیم سولفوترانسفراز Sulfotransferase enzyme	3.646	Heparan sulfate 2-o-sulfotransferase 1
فعال کردن اتصال یون فلزی، پروتئین سرین فسفاتاز و پروتئین ترئونین فسفاتاز Activate metal ion binding, protein serine phosphatase and protein threonine phosphatase	-3.853	Calcineurin-like phosphoesterase domain containing 1	پروتئین مشابه NFx1 NFx1-like protein	3.561	NFX1-type zinc finger-containing protein 1-like 2
ناقل فسفات وابسته به سدیم Sodium-dependent phosphate transporter	-2.801	Sodium-dependent phosphate transporter	اتوفاژی (خودخواری)، هموستاز یون کلسیم میتوکندریایی و پاسخ به استرس اکسیداتیو Autophagy, mitochondrial calcium ion homeostasis, and the response to oxidative stress	3.266	Riken cDNA 1600014c10-like isoform 2 3
انتقال کاتیون‌های آلی Transport of organic cations	-2.663	Organic cation transporter	پروتئین مشابه SET و MYND SET and MYND-like protein	3.214	SET and MYND domain-containing protein 4-like 4
فاکتور ضد لیپوبلی ساکاریدی B (ALF-B) Anti-lipopolysaccharide factor B (ALF-B)	-2.602	Anti-lipopolysaccharide factor B (ALF-B)	پروتئین حاوی دامین Phox Phox domain-containing protein	3.143	Phox domain-containing protein 5
فاکتور رونویسی Transcription factor	-2.597	Basic Helix-Loop-Helix (BHLH) factor	پروتئین انتقال غشایی Transmembrane protein	2.954	Innexin inx1 6
آلدئید دهیدروژناز Aldehyde dehydrogenase	-2.590	Aldehyde dehydrogenase family 8 member A1 isoform 1	پروتئین 120 کیلو دالتونی Pistil مشابه 120 kDa Pistil-like protein	2.821	120 kDa Pistil extensin-like protein 7
انتقالی توالی‌های خاص Transition of specific sequences	-2.438	rRNA intron-encoded homing endonuclease	تغییرات پس از ترجمه Post-translation modification	2.806	Ubiquitin family protein 8
کاتالیز مرحله دوم بیوسنتز پرولین Catalysis of the second step of proline biosynthesis	-2.411	Glutamate semialdehyde dehydrogenase	پاسخ ایمنی ذاتی Innate immune response	2.754	Tripartite motif-containing protein 64-like (TRIM64) 9
پروفنولوکسیداز Prophenoloxidase	-2.388	Prophenoloxidase	اندونوکلاز – نسخه بردار معکوس (ERT) Endonuclease-reverse transcriptase (ERT)	2.568	Endonuclease-reverse transcriptase (ERT) 10

جدول ۴. ژن‌های اختصاصی با بالاترین و پایین‌ترین میزان بیان در ۴۸ ساعت پس از تزریق dsRNA (adjP<۰/۰۵)

Table 4. The specific genes with the highest and lowest expression levels at 48 hours after dsRNA injection (adjP<0.05)

ژن‌های افتراقی با کاهش بیان Differential genes with reduced expression			ژن‌های افتراقی با افزایش بیان Differential genes with increased expression		
Predicted function	LogFC	ژن Gene	Predicted function	LogFC	ژن Gene
عملکرد پیش‌بینی شده کاتالیز سولفات Sulfate catalysis	-4.450	Sulfotransferase 1C4	پروتئین مشابه آپولیپوپروتئین D Apolipoprotein D-like	3.847	Apolipoprotein D-like
گلیکوپروتئین Glycoprotein	-3.286	Glycoprotein GP2	فعالیت پروتئازی Protease activity	3.646	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme 13
انتقال آنیون‌ها Anion transport	-3.162	Bestrophin isoform A	پروتئین چندعملکردی Multifunctional protein	3.322	Meckelin-like
پروتئین شوک حرارتی 70 Heat shock protein 70	-3.103	Heat shock protein 70	واسطه برای تعاملات پروتئین-پروتئین، تخریب پروتئین و انتقال سیگنال Mediator for protein-protein interactions, protein degradation and signal transduction	3.091	Kelch motif family protein
سیستم ایمنی Immune system	-2.986	PPE family protein	پروتئین شوک حرارتی 90 Heat shock protein 90	3.041	Heat shock protein 90
سم زدایی آب اکسیژنه Hydrogen peroxide detoxification	-2.960	Glutathione peroxidase 6 precursor	نقش در چرخه سلولی، تکثیر سلولی و حفظ ثبات کروموزوم Cell cycle, cell proliferation and maintenance of chromosome stability	2.956	F-box protein 7
فاکتور ضد لیپوپلی ساکاریدی C (ALF-C) Anti-lipopolysaccharide factor C (ALF-C)	-2.922	Anti-lipopolysaccharide factor C (ALF-C)	پروتئین کانال غشایی برای انتقال dsRNA Transmembrane Protein for dsRNA	2.955	Sid-1-like protein
اتصال سلنیوم Selenium binding	-2.775	Selenium protein-1 binding	فاکتور رشد، شروع، قاء و حفظ متابولیسم و هموستازی Growth factor, metabolism and homeostasis	2.906	Bone morphogenetic protein
هیدرولاز Hydrolase	-2.590	Gamma-glutamyl hydrolase	پروتئین مرتبط با فیبرینوژن Fibrinogen-related protein	2.850	Fibrinogen domain-containing protein 1-like
مهارکننده سرین پروتئاز (سرین) Serine protease inhibitor	-2.571	Serine protease inhibitor-6 (Serpine)	تغییر تعاملات بین DNA و اکتامر هیستونی Alteration of interactions between DNA and histone octamer	2.833	Non-histone chromosome protein 2

بحث

در مطالعه حاضر از داده‌های ریزآرایه مربوط به نمونه‌های میگوی ژاپنی تزریق شده با PBS و dsRNA غیراختصاصی با طول بلند، استخراج شده از پایگاه داده GEO، به منظور شناسایی ژن‌های القاء شده میزبان علیه WSSV استفاده شد. این اطلاعات می‌توانند از طریق آنالیز برهمکنش‌های ویروس و میزبان تعیین نمایند که کدام ژن‌ها و در چه مقدار نسبی در طی عفونت بیان می‌شوند. همچنین با استفاده از این اطلاعات می‌توان ارتباط بین ژن‌های افتراقی بیان شده با زنده‌مانی میگوهای ژاپنی و القای ایمنی علیه عفونت لکه سفید را شناسایی نمود. یکی از ژن‌های مشترک شناسایی شده در این مطالعه ژن کدکننده پروتئین مرتبط با هموستاز هموسیت (HHAP)^۱ بود که در گروه‌های میگو در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تزریق dsRNA افزایش بیان نشان داد ($\text{adjP} < 0.05$). HHAP یک پروتئین ویروسی است که در هموستاز هموسیت اهمیت دارد. در مطالعه‌ای که در میگوهای ببری سیاه تزریق شده با WSSV صورت گرفت مشخص شد که تنظیم افزایشی PmHHAP، با جلوگیری از تخریب خیلی سریع هموسیت‌ها، به عنوان سازوکاری برای حفظ سطح هموسیت‌ها در گردش خون است و همچنین موجب کنترل هموستاز ایمنی در سخت پوستان در طول عفونت ویروسی می‌گردد (Prapavorarat et al., 2010). نتایج تحقیق دیگر در میگوی ببری سیاه نشان داد که PmHHAP با پروتئین WSSV134 از WSSV برای کنترل آپوپتوزیس در طول عفونت ویروسی برهمکنش دارند (Apitanyasai et al., 2018). با توجه به اینکه در مطالعه حاضر، میگوهای ژاپنی تزریق شده با dsRNA پس از مواجهه با WSSV زنده‌مانی بالاتری را نسبت به گروه شاهد نشان دادند، ممکن است این موضوع به تنظیم افزایشی ژن HHAP و پایداری کافی هموسیت‌ها در طول عفونت ویروسی مرتبط باشد. ژن مشترک شناسایی شده دیگر به نام لکتین نوع-C-۲^۲ بود که در هر دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تزریق dsRNA افزایش بیان نشان داد ($\text{adjP} < 0.05$) که این نتیجه با مطالعات قبلی مطابقت داشت. لکتین‌های نوع C، پروتئین‌های تشخیص الگوی کلیدی در سیستم ایمنی میگو هستند که الگوهای مولکولی به شدت حفاظت شده مرتبط با عامل بیماری (PAMPs)^۳ را روی سطوح میکروبی شناسایی می‌کنند (Wang et al., 2020). در مطالعه‌ای گزارش شد که لکتین نوع-C-۲ توانست عفونت و تکثیر WSSV در میگوی ژاپنی را از طریق اتصال به پروتئین پوششی vp28 مهار و موجب افزایش زنده‌مانی میگو گردد (Xu et al., 2014). در مطالعه دیگر مشخص شد که الگوی بیان یک لکتین نوع C به نام LvLectin-2 در بافت‌های مختلف میگوی سفید غربی به ویژه در هپاتوپانکراس در ۶ و ۱۲ ساعت پس از مواجهه با عفونت‌های ناشی از WSSV و باکتری ویبریو/نگوییلاروم^۴ افزایش معنی داری ($\text{adjP} < 0.05$) داشت (Wei et al., 2012). در یک مطالعه اخیر، یک ژن جدید لکتین نوع C به نام MjCTL در میگوی ژاپنی شناسایی شد که میزان بیان آن به

^۱ Hemocyte homeostasis-associated protein^۲ C-type lectin 2^۳ Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)^۴ *Vibrio anguillarum*

طور معنی داری ($\text{adj}P < 0.05$) در هپاتوپانکراس میگوهای تزریق شده با WSSV افزایش یافت (Zheng et al., 2020). در مطالعه دیگر، یک ارتولوگ لکتین نوع C به نام LvPLP در میگوی سفید غربی شناسایی شد که با اتصال و چسباندن^۱ باکتری‌ها و تأثیرگذاری روی فاگوسیتوز و بیان پپتیدهای ضد میکروبی (AMPs)^۲ نقش مهمی را در پاسخ ایمنی میگو به عفونت باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس^۳ ایفا می‌کند (Bi et al., 2020). در یک تحقیق گزارش شد که بیان یک لکتین نوع C به نام LvCTL3 در همه بافت‌های میگوی سفید غربی به ویژه آبشش‌ها پس از مواجهه با عوامل بیماری‌زای ویبریو پاراهمولیتیکوس و WSSV و محرک‌های سیستم ایمنی مانند لیپوپلی ساکارید و پلی (I:C) افزایش یافت ($P < 0.05$) (Li et al., 2014). ژن مشترک شناسایی شده دیگر مربوط به یک گیرنده لیپوپروتئین با چگالی کم (LDLR)^۴ بود که در هر دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تزریق dsRNA افزایش بیان نشان داد ($\text{adj}P < 0.05$). لکتین‌های نوع C که حاوی یک دامین اضافی کلاس A گیرنده لیپوپروتئین با چگالی کم (LdlrCTL) هستند در بسیاری از سخت پوستان شناسایی شده‌اند. در یک مطالعه اخیر، یک ژن LdlrCTL جدید از میگوی سفید غربی (LvLdlrCTL) شناسایی شد که پس از تحریک سیستم ایمنی به طور معنی داری ($P < 0.05$) در هموسیت‌ها افزایش بیان نشان داد. خاموش کردن این ژن به شکل متضاد موجب تشدید عفونت ویبریو پاراهمولیتیکوس و مهار عفونت WSSV شد (Liang et al., 2019). در مطالعات دیگر، بیان دو ژن LdlrLec1 و LdlrLec2 در میگوی ژاپنی مواجهه شده با WSSV و بیان ژن FmLdlr در هموسیت‌های میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguensis*) در پاسخ به عفونت باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس و WSSV به طور معنی داری ($P < 0.05$) افزایش یافت (Xu et al., 2014; Kwankaew et al., 2018). ژن تریوز فسفات ایزومراز (TPI)^۵ و یک ژن مشابه کاسپاز- Nc^6 به عنوان ژن‌های مشترک در هر دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تزریق dsRNA افزایش بیان نشان دادند ($\text{adj}P < 0.05$) که با نتایج پیشین مطابقت داشتند. برای مثال در مطالعه‌ای در میگوهای *Exopalaemon carinicauda* مشخص شد که افزایش بیان ژن تریوز فسفات ایزومراز (EcTPI) در ۲۴ ساعت پس از مواجهه با WSSV از طریق تغییر مسیر گلیکولیتیک به تکثیر این ویروس کمک می‌کند (Liu et al., 2017). در مطالعه‌ای مشخص شد که بیان یک ژن کاسپاز جدید به نام PjCaspase در میگوهای ژاپنی بازمانده از مواجهه با WSSV به طور معنی داری ($P < 0.05$) افزایش یافت که ممکن است این ژن از طریق آپوپتوز ویروس‌ها یک نقش ضدویروسی در بهبود ایمنی میگو داشته باشد (Janewanthanakul et al., 2020). در این مطالعه بیان یک ژن مشابه پروتئین حاوی موتیف انگشت روی نوع NFX1^۷ به طور اختصاصی در ۲۴ ساعت پس از تزریق dsRNA در

¹ Agglutination

² Antimicrobial peptides (AMPs)

³ *Vibrio parahaemolyticus*

⁴ Low-density lipoprotein receptor

⁵ Triosephosphate isomerase

⁶ Caspase Nc-like

⁷ NFX1-type zinc finger-containing protein 1-like

میگوی ژاپنی افزایش یافت ($\text{adj}P < 0.05$) که با مطالعه پیشین در مورد افزایش بیان این پروتئین و نقش آن در سیستم ایمنی میگوی سفید غربی مطابقت داشت (Xia et al., 2023). پروتئین NFX1 یک پروتئین تحریک شونده با اینترفرون است که با غشای خارجی میتوکندری مرتبط می‌باشد. این پروتئین قادر به اتصال با dsRNAها و تعامل با پروتئین‌های سیگنالینگ ضد ویروسی میتوکندریایی (MAVS^۱) بوده و پاسخ اینترفرون نوع I را در مراحل اولیه عفونت ویروسی تقویت می‌کند (Blasi et al., 2022). در این مطالعه بیان ژن اندونوکلاز-نسخه بردار معکوس (ERT)^۲ به طور اختصاصی در ۲۴ ساعت پس از تزریق dsRNA افزایش یافت ($\text{adj}P < 0.05$) که با مطالعه پیشین در مورد نقش این ژن در ایمنی در مقابل عفونت لکه سفید در میگوی ژاپنی مطابقت داشت (Jin et al., 2019). در مطالعه دیگر روی میگوی ژاپنی مشخص شد که ممکن است ژن mjERT در القای پاسخ‌های ایمنی در میگو موثر باشد به طوری که ناک دوز^۳ این ژن موجب افزایش تلفات میگوها در مواجهه با عفونت لکه سفید گردید (Ma et al., 2018). در این مطالعه بیان یک ژن مشابه TRIM64^۴ به طور اختصاصی در ۲۴ ساعت پس از تزریق dsRNA در میگوی ژاپنی افزایش یافت ($\text{adj}P < 0.05$) که با نتایج پیشین در مورد سایر ژن‌های این خانواده در میگو مطابقت داشت. برای مثال در مطالعه‌ای مشخص شد که سطح بیان یک همولوگ از ژن TRIM37 به نام PmTRIM37 در هپاتوپانکراس و اندام‌های لنفاوی میگوهای ببری سیاه پس از مواجهه با عفونت WSSV به طور معنی داری ($P < 0.05$) افزایش یافت و ممکن است این ژن تکثیر ویروس لکه سفید را از طریق تنظیم مثبت مسیر NF-kB محدود سازد (Zhao et al., 2023). در مطالعه دیگر مشخص شد که ژن LvTRIM32 عضوی از سیستم استرس آنتی اکسیدانی در میگوی سفید غربی بوده و در مقاومت میگو در برابر عفونت‌های ناشی از WSSV و ویبرو آلترینولیتیکوس^۵ نقش دارد (Wang et al., 2020). در این مطالعه بیان ژن پروتئین شوک حرارتی ۹۰ (HSP90)^۶ به طور اختصاصی در ۴۸ ساعت پس از تزریق dsRNA افزایش یافت ($\text{adj}P < 0.05$) که با نتایج مطالعات قبلی مطابقت داشت. پروتئین‌های شوک حرارتی چپرون‌های میزبان هستند که به القای بسیاری از عفونت‌های ویروسی کمک می‌کنند. برای مثال در مطالعه‌ای بیان ژن HSP90 در میگوی سفید غربی مواجهه شده با عفونت WSSV به طور معنی داری افزایش یافت بنابراین ممکن است این ژن با القای تکثیر WSSV در بیماری‌زایی این ویروس نقش داشته باشد (Yingsunthonwattana et al., 2022). با این حال این افزایش بیان ژن HSP90 ممکن است پاسخی برای محافظت میزبان در برابر عفونت WSSV یا استرس ناشی از ورود ویروس نیز باشد (Maralit et al., 2015). در این مطالعه بیان ژن پروتئین Sid-1-like به طور اختصاصی در ۴۸ ساعت پس از تزریق dsRNA افزایش یافت ($\text{adj}P < 0.05$) که با نتایج مطالعات قبلی مطابقت داشت. پروتئین Sid-1-like یکی از مولکول‌های دخیل در سازوکار RNAi می‌باشد که به

¹ Mitochondrial antiviral signaling proteins (MAVS)

² Endonuclease-reverse transcriptase

³ Knockdown

⁴ Tripartite Motif-Containing Protein 64-like

⁵ *Vibrio alginolyticus*

⁶ Heat shock protein 90

dsRNAهای غیراختصاصی پاسخ می‌دهد. Sid-1-like جزء پروتئین‌هایی است که به عنوان کانال غشایی برای انتقال سیستمیک dsRNAها عمل می‌کنند (Labreuche et al., 2010). از آنجایی که dsRNA یک لیگاند شناخته شده برای مولکول‌های دخیل در سازوکار RNAi می‌باشد، بنابراین افزایش بیان پروتئین Sid-1-like در این مطالعه مورد انتظار بود. افزایش بیان این گروه از ژن‌ها تنها برای خاموش کردن یک ژن خاص نمی‌باشد بلکه برخی پاسخ‌های فیزیولوژیکی دیگر را نیز تنظیم می‌کنند که شاید عملکرد ضد ویروسی یکی از آن‌ها باشد (Maralit et al., 2015). نتایج این مطالعه نشان داد که افزایش بیان ژن Sid-1-like باعث یک حالت ضد ویروسی و بهبود زنده‌مانی میگوهای ژاپنی در مواجهه با عفونت WSSV گردید که با نتایج مطالعات پیشین مطابقت داشت (Maralit et al., 2015). این نتایج تاییدی بر نقش این ژن در فعال‌سازی غیر اختصاصی ایمنی ضد ویروسی علیه WSSV می‌باشد. در این مطالعه بیان یک پروتئین به نام پروتئین حاوی دامین C فیبرینوژن-۱ (FCDP1) به طور اختصاصی در ۴۸ ساعت پس از تزریق dsRNA افزایش یافت ($\text{adj}P < 0.05$) که با نتایج مطالعات قبلی مطابقت داشت. برای مثال بیان ژن‌های مرتبط با فیبرینوژن در میگوهای ببری سیاه مواجهه شده با عفونت‌های ویبریو هاروی^۲ و ویروس لکه سفید (Oangkhana et al., 2021)، در میگوهای موزی مواجهه شده با عفونت ویبریو پاراهمولیتیکوس (Senghoi et al., 2019)، در میگوهای سفید غربی مواجهه شده با عفونت ویبریو هاروی (da Rosa Coelho et al., 2016) و در میگوهای ژاپنی مواجهه شده با عفونت ویبریو/انگوپیلاروم (Sun et al., 2014) افزایش معنی‌داری داشت. در این مطالعه دو ژن به نام‌های پروفنولوکسیداز^۳ و پروتئین شوک حرارتی ۷۰ (HSP70)^۴ به طور اختصاصی در به ترتیب ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تزریق dsRNA کاهش بیان داشتند ($\text{adj}P < 0.05$). در مطالعه‌ای که روی میگوهای سفید غربی آلوده با WSSV صورت گرفت، بیان HSP70 و ژن کلیدی در سیستم فعال کننده پروفنولوکسیداز به نام LvproPO در ۲۴ ساعت پس از مواجهه افزایش یافت ($P < 0.05$) (Wang et al., 2008). مغایرت ذکر شده در مطالعه حاضر با مطالعه پیشین ممکن است به دلیل بیان موقتی^۵ ژن‌ها به ویژه ژن‌های مرتبط با سیستم ایمنی، تغییر پایداری پروتئین‌های تولید شده طی زمان‌های مختلف و تفاوت گونه‌ای باشد. علاوه بر اینکه بیان ژن‌های یوکاریوتی به طور موقت و چند بعدی کنترل می‌شود، تنها مجموعه نسبتاً کوچکی از کل ژنوم در هر نوع بافت بیان می‌شود و بیان ژن‌ها به مرحله رشد حیوان نیز بستگی دارد (Khabiri et al., 2023). همچنین، سازوکارهای مختلف اپی‌ژنومی شامل متیلاسیون DNA، بازسازی مجدد، اصلاحات دم هیستون، ریز RNAهای کروماتین و RNAهای با طول بلند غیر کدکننده با عوامل محیطی مانند تغذیه، عوامل بیماری‌زا و آب و هوا برای تأثیر روی بیان ژن‌ها و ظهور فنوتیپ‌های خاص در تعامل هستند (Barazandeh et al., 2016). بنابراین، ممکن است تعاملات چند سطحی بین ژنوم، اپی‌ژنوم و عوامل

¹ Fibrinogen C domain-containing protein 1-like

² *Vibrio harveyi*

³ Prophenoloxidase

⁴ Heat shock protein 70

⁵ Temporal expression

محیطی رخ دهد (Amiri Roudbar et al., 2020). همچنین، میزان فراورده‌های ژنی که در همان بافت و سایر بافت‌های سازنده آن محصول ساخته می‌شود، بیان آن ژن را تنظیم می‌کند (Bordbar et al., 2022). در این مطالعه سه ژن مربوط به فاکتورهای ضد لیپوپلی ساکاریدی (ALF)^۱ شناسایی شدند که در جدول‌های ۲، ۳ و ۴ به صورت قراردادی با حروف A، B و C نشان داده شده‌اند. ژن ALF-A به طور مشترک در هر دو زمان و ژن‌های ALF-B و ALF-C به طور اختصاصی در به ترتیب ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تزریق dsRNA کاهش بیان نشان دادند ($\text{adj}P < 0.05$). برخی از ایزوفرم‌های ALF به شکل اختصاصی در یک بافت مشخص بیان می‌شوند در حالی که بیان بیشتر آن‌ها در بسیاری از بافت‌ها و در سطوح مختلف گزارش شده است. رونویسی ALF‌ها توسط چندین مسیر سیگنالینگ کلاسیک شامل مسیرهای IMD^۲، Toll و JAK/STAT تنظیم می‌شود (Hoeger & Harris 2020). در یک مطالعه مشخص شد که بیان ALF1 و ALF2 در میگوی ژاپنی توسط مسیر سیگنال دهی IMD تنظیم می‌شود زیرا مهار بیان MjIMD موجب مهار بیان ژن‌های ALF1 و ALF2 در گروه آلوده به باکتری ویبریو/نگویلا/روم گردید (Lan et al., 2013). با وجود اینکه در مطالعات مختلف، بیان ژن‌های ALP در میگو پس از مواجهه با عوامل بیماری‌زا افزایش یافته است، با این حال کاهش بیان ALP‌های شناسایی شده در این مطالعه می‌تواند به دلیل بیان اختصاصی ژن‌ها نسبت به بافت‌ها و یا مهار مسیر سیگنالینگ آن‌ها باشد. در این مطالعه یک ژن به نام مهارکننده سرین پروتئاز (سرپین)^۳ به طور اختصاصی در ۴۸ ساعت پس از تزریق dsRNA کاهش بیان نشان داد ($\text{adj}P < 0.05$) که با نتایج مطالعات پیشین مطابقت داشت. برای مثال کاهش بیان این ژن در میگوی ببری سیاه (Homvises et al., 2010) و میگوی چینی (Liu et al., 2009) مواجهه شده با عفونت WSSV گزارش شده است ($P < 0.05$). این محققان گزارش نمودند که کاهش بیان ژن سرپین در میگوهای چینی ممکن است منجر به بیان بیش از حد^۴ پروتئین‌های سرین و اختلال در تعادل پروتئیناز سرپین-سرین در سیستم ایمنی گردد (Liu et al., 2009).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه تایید نمود که تزریق dsRNA‌های غیراختصاصی با طول بلند توانست موجب القای

بسیاری از ژن‌های مرتبط با ایمنی ذاتی نظیر ریونوکلئاز T2، لکتین نوع-C-۲، پروتئین شوک حرارتی ۹۰، کاسپاز- Nc و TRIM64 در پاسخ به عفونت WSSV در میگوهای ژاپنی گردد. این ژن‌ها دارای فعالیت‌های مختلف زیستی نظیر تشخیص الگوهای مولکولی مرتبط با عامل بیماری، اتصال، حفظ هموستازی، آپوپتوزیس، کاتالیزوری، انتقال غشایی، چپرونی و RNAi بودند. این ژن‌ها یک حالت ضد ویروسی را در میزبان القاء نموده و موجب بهبود ایمنی علیه عفونت لکه سفید می‌شوند. میگوهای تزریق شده با dsRNA تعداد ژن‌های افتراقی بیشتری را نسبت به گروه شاهد تزریق شده با PBS داشتند که اغلب آن‌ها دارای بیان بالا بودند. به طور کلی نتایج این مطالعه و شناسایی ژن‌های القا شده در پاسخ به مولکول‌های dsRNA غیراختصاصی با

¹ Anti-lipopolysaccharide factor (ALP)

² Immune deficiency (IMD)

³ Serine protease inhibitor (Serpin)

⁴ Overexpression

طول بلند می‌تواند در جهت یافتن نشانگرهای زیستی مرتبط با بیماری لکه سفید در میگو، تشخیص و یا طراحی مهارکننده علیه آن مفید باشد.

سپاسگزاری: برای انجام این مطالعه، از راهنمایی‌ها و نظرات ارزنده جناب آقای دکتر Hidehiro Kondo عضو محترم "دانشکده علوم و فناوری دریایی و آزمایشگاه علوم ژنوم، دانشگاه علوم و فناوری دریایی توکیو، ژاپن" استفاده گردید. بنابراین به پاس احترام، نگارندگان مقاله از همکاری علمی ایشان صمیمانه سپاسگزاری می‌کنند. همچنین از داوران و اساتید ارجمند مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، به خاطر ارزیابی مقاله و ارائه نظرات ساختاری و علمی تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

شیری نیما، سوری مرتضی، صفدریان بهزاد (۱۴۰۰) مقایسه میگوی ژاپنی (*Marsupenaeus japonicus*) و پاسفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) از نظر معیارهای تکثیر و پرورش با رویکرد امکان سنجی. مجله ترویجی میگو و سخت پوستان، ۶ (۲)، ۱۲-۴.

References

- Amiri Roudbar, M., Mohammadabadi, M. R., Ayatollahi Mehrgardi, A., Abdollahi-Arpanahi, R., Momen, M., Morota, G., Brito Lopes, F., Gianola, D., & Rosa, G. J. (2020). Integration of single nucleotide variants and whole-genome DNA methylation profiles for classification of rheumatoid arthritis cases from controls. *Heredity*, 124(5), 658-674. <https://doi.org/10.1038/s41437-020-0301-4>
- Apitanyasai, K., Amparyup, P., Charoensapsri, W., Sangsuriya, P., & Tassanakajon, A. (2018). Shrimp hemocyte homeostasis-associated protein (PmHHAP) interacts with WSSV134 to control apoptosis in white spot syndrome virus infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 76, 174-182. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.01.043>
- Barazandeh, A., Mohammadabadi, M., Ghaderi-Zefrehei, M., & Nezamabadi-Pour, H. (2016). Genome-wide analysis of CpG islands in some livestock genomes and their relationship with genomic features Original Paper. *Czech Journal of Animal Science*, 61(11). <https://doi.org/10.17221/78/2015-CJAS>
- Bi, J., Ning, M., Xie, X., Fan, W., Huang, Y., Gu, W., Wang, W., Wang, L., & Meng, Q. (2020). A typical C-type lectin, perlucin-like protein, is involved in the innate immune defense of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 103, 293-301. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.05.046>
- Blasi, G., Bortoletto, E., Gasparotto, M., Filippini, F., Bai, C.-M., Rosani, U., & Venier, P. (2022). A glimpse on metazoan ZNFX1 helicases, ancient players of antiviral innate immunity. *Fish & Shellfish Immunology*, 121, 456-466. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.01.019>
- Bordbar, F., Mohammadabadi, M., Jensen, J., Xu, L., Li, J., & Zhang, L. (2022). Identification of candidate genes regulating carcass depth and hind leg circumference in simmental beef cattle using Illumina Bovine Beadchip and next-generation sequencing analyses. *Animals*, 12(9), 1103. <https://doi.org/10.3390/ani12091103>
- da Rosa Coelho, J., Barreto, C., da Silva Silveira, A., Vieira, G. C., Rosa, R. D., & Perazzolo, L. M. (2016). A hemocyte-expressed fibrinogen-related protein gene (LvFrep) from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: expression analysis after microbial infection and during larval development. *Fish & Shellfish Immunology*, 56, 123-126. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.06.046>

- De la Vega, E., Hall, M. R., Wilson, K. J., Reverter, A., Woods, R. G., & Degnan, B. M. (2007). Stress-induced gene expression profiling in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Physiological genomics*, 31(1), 126-138. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00068.2007>
- Dhar, A., Dettori, A., Roux, M., Klimpel, K., & Read, B. (2003). Identification of differentially expressed genes in shrimp (*Penaeus stylirostris*) infected with White spot syndrome virus by cDNA microarrays. *Archives of virology*, 148, 2381-2396. <https://doi.org/10.1007/s00705-003-0172-z>
- Fagutao, F. F., Yasuike, M., Caipang, C. M., Kondo, H., Hirono, I., Takahashi, Y., & Aoki, T. (2008). Gene expression profile of hemocytes of kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus* following peptidoglycan stimulation. *Marine Biotechnology*, 10, 731-740. <https://doi.org/10.1007/s10126-008-9110-0>
- Hoeger, U., & Harris, J. R. (2020). *Vertebrate and invertebrate respiratory proteins, lipoproteins and other body fluid proteins* (Vol. 94). Springer Nature. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-41769-7>
- Homvises, T., Tassanakajon, A., & Somboonwiwat, K. (2010). *Penaeus monodon* SERPIN, PmSERPIN6, is implicated in the shrimp innate immunity. *Fish & Shellfish Immunology*, 29(5), 890-898. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.07.017>
- Janewanthanakul, S., Supungul, P., Tang, S., & Tassanakajon, A. (2020). Heat shock protein 70 from *Litopenaeus vannamei* (LvHSP70) is involved in the innate immune response against white spot syndrome virus (WSSV) infection. *Developmental & Comparative Immunology*, 102, 103476. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.103476>
- Jin, Q., & Zhu, F. (2019). Differentially expressed genes of the shrimp *Marsupenaeus japonicus* in response to infection by white spot syndrome virus or *Vibrio alginolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 92, 348-355. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.06.034>
- Khabiri, A., Toroghi, R., Mohammadabadi, M., & Tabatabaeizadeh, S.-E. (2023). Introduction of a Newcastle disease virus challenge strain (sub-genotype VII. 1.1) isolated in Iran. *Veterinary Research Forum*, 14(4):221-228. <https://doi.org/10.30466/vrf.2022.548152.3373>
- Kwankaew, P., Praparatana, R., Runsaeng, P., & Utarabhand, P. (2018). An alternative function of C-type lectin comprising low-density lipoprotein receptor domain from *Fenneropenaeus merguensis* to act as a binding receptor for viral protein and vitellogenin. *Fish & Shellfish Immunology*, 74, 295-308. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.12.044>
- Labreuche, Y., Veloso, A., de La Vega, E., Gross, P. S., Chapman, R. W., Browdy, C. L., & Warr, G. W. (2010). Non-specific activation of antiviral immunity and induction of RNA interference may engage the same pathway in the Pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Developmental & Comparative Immunology*, 34(11), 1209-1218. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.06.017>
- Lan, J.-F., Zhou, J., Zhang, X.-W., Wang, Z.-H., Zhao, X.-F., Ren, Q., & Wang, J.-X. (2013). Characterization of an immune deficiency homolog (IMD) in shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) and crayfish (*Procambarus clarkii*). *Developmental & Comparative Immunology*, 41(4), 608-617. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.07.004>
- Li, M., Li, C., Ma, C., Li, H., Zuo, H., Weng, S., Chen, X., Zeng, D., He, J., & Xu, X. (2014). Identification of a C-type lectin with antiviral and antibacterial activity from pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Developmental & Comparative Immunology*, 46(2), 231-240. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.07.004>
- Liang, Z., Yang, L., Zheng, J., Zuo, H., Weng, S., He, J., & Xu, X. (2019). A low-density lipoprotein receptor (LDLR) class A domain-containing C-type lectin from *Litopenaeus vannamei* plays opposite roles in antibacterial and antiviral responses. *Developmental & Comparative Immunology*, 92, 29-34. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.11.002>

- Liu, F., Li, S., Liu, G., & Li, F. (2017). Triosephosphate isomerase (TPI) facilitates the replication of WSSV in *Exopalaemon carinicauda*. *Developmental & Comparative Immunology*, 71, 28-36. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.01.018>
- Liu, Y., Li, F., Wang, B., Dong, B., Zhang, X., & Xiang, J. (2009). A serpin from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* is responsive to bacteria and WSSV challenge. *Fish & Shellfish Immunology*, 26(3), 345-351. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.08.016>
- Lu, J., Hsiao, Y., Wu, J., Bondad-Reantaso, M., Jones, J., Corsin, F., & Aoki, T. (2011). Applications of shrimp immune DNA microarray in aquaculture. *Diseases in Asian aquaculture VII. Fish health section. Selangor: Asian Fisheries Society*, 241-252.
- Ma, X., Sun, B., & Zhu, F. (2018). Molecular cloning of Kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* endonuclease-reverse transcriptase and its positive role in white spot syndrome virus and *Vibrio alginolyticus* infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 73, 297-308. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.12.031>
- Maralit, B. A., Komatsu, M., Hipolito, S. G., Hirono, I., & Kondo, H. (2015). Microarray analysis of immunity against WSSV in response to injection of non-specific long dsRNA in kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Marine Biotechnology*, 17, 493-501. <https://doi.org/10.1007/s10126-015-9637-9>
- Millard, R. S., Ellis, R. P., Bateman, K. S., Bickley, L. K., Tyler, C. R., van Aerle, R., & Santos, E. M. (2021). How do abiotic environmental conditions influence shrimp susceptibility to disease? A critical analysis focussed on White Spot Disease. *Journal of invertebrate pathology*, 186, 107369. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107369>
- Oangkha, P., Amparyup, P., Tassanakajon, A., Preetham, E., & Wongpanya, R. (2021). Characterization and functional analysis of fibrinogen-related protein (FreP) in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology*, 109, 87-96. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.12.012>
- Prapavorarat, A., Vatanavicharn, T., Söderhäll, K., & Tassanakajon, A. (2010). A novel viral responsive protein is involved in hemocyte homeostasis in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Journal of Biological Chemistry*, 285(28), 21467-21477. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.130526>
- Robalino, J., Almeida, J. S., McKillen, D., Colglazier, J., Trent III, H. F., Chen, Y. A., Peck, M. E., Browdy, C. L., Chapman, R. W., & Warr, G. W. (2007). Insights into the immune transcriptome of the shrimp *Litopenaeus vannamei*: tissue-specific expression profiles and transcriptomic responses to immune challenge. *Physiological genomics*, 29(1), 44-56. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00165.2006>
- Robalino, J., Browdy, C. L., Prior, S., Metz, A., Parnell, P., Gross, P., & Warr, G. (2004). Induction of antiviral immunity by double-stranded RNA in a marine invertebrate. *Journal of virology*, 78(19), 10442-10448. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.19.10442-10448.2004>
- Senghoi, W., Thongsoi, R., Yu, X.-Q., Runsaeng, P., & Utarabhand, P. (2019). A unique lectin composing of fibrinogen-like domain from *Fenneropenaeus merguensis* contributed in shrimp immune defense and firstly found to mediate encapsulation. *Fish & Shellfish Immunology*, 92, 276-287. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.06.009>
- Shiri, N., Sour, M., & Safdarian, B. (2020). Comparison of *Marsupenaeus japonicus* and *Litopenaeus vannamei* shrimp in terms of reproduction and breeding criteria with a feasibility approach. *Shrimp and Crustacean Journal*, 6(2), 4-12 (in Persian).
- Sun, J.-J., Lan, J.-F., Shi, X.-Z., Yang, M.-C., Yang, H.-T., Zhao, X.-F., & Wang, J.-X. (2014). A fibrinogen-related protein (FREP) is involved in the antibacterial immunity of *Marsupenaeus japonicus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 39(2), 296-304. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.05.005>
- Tarca, A. L., Romero, R., & Draghici, S. (2006). Analysis of microarray experiments of gene expression profiling. *American journal of obstetrics and gynecology*, 195(2), 373-388. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2006.07.001>

- Wang, B., Li, F., Dong, B., Zhang, X., Zhang, C., & Xiang, J. (2006). Discovery of the genes in response to white spot syndrome virus (WSSV) infection in *Fenneropenaeus chinensis* through cDNA microarray. *Marine Biotechnology*, 8, 491-500. <https://doi.org/10.1007/s10126-005-6136-4>
- Wang, L., Lu, K.-C., Chen, G.-L., Li, M., Zhang, C.-Z., & Chen, Y.-H. (2020). A *Litopenaeus vannamei* TRIM32 gene is involved in oxidative stress response and innate immunity. *Fish & Shellfish Immunology*, 107, 547-555. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.11.002>
- Wang, L., Zhi, B., Wu, W., & Zhang, X. (2008). Requirement for shrimp caspase in apoptosis against virus infection. *Developmental & Comparative Immunology*, 32(6), 706-715. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2007.10.010>
- Wang, X.-W., Vasta, G. R., & Wang, J.-X. (2020). The functional relevance of shrimp C-type lectins in host-pathogen interactions. *Developmental & Comparative Immunology*, 109, 103708. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103708>
- Wei, X., Liu, X., Yang, J., Fang, J., Qiao, H., Zhang, Y., & Yang, J. (2012). Two C-type lectins from shrimp *Litopenaeus vannamei* that might be involved in immune response against bacteria and virus. *Fish & Shellfish Immunology*, 32(1), 132-140. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.11.001>
- Xia, Y., Zhong, X., Zhang, X., Zhang, X., Yuan, J., Liu, C., Sha, Z., & Li, F. (2023). Gene structure, expression and function analysis of MEF2 in the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5832. <https://doi.org/10.3390/ijms24065832>
- Xu, Y.-H., Bi, W.-J., Wang, X.-W., Zhao, Y.-R., Zhao, X.-F., & Wang, J.-X. (2014). Two novel C-type lectins with a low-density lipoprotein receptor class A domain have antiviral function in the shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Developmental & Comparative Immunology*, 42(2), 323-332. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.10.003>
- Yingsunthonwattana, W., Junprung, W., Supungul, P., & Tassanakajon, A. (2022). Heat shock protein 90 of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) is possibly involved in promoting white spot syndrome virus infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 128, 405-418. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.08.016>
- Zhao, C., Peng, C., Wang, P., Zhang, B., Yan, L., Wang, C.-L., & Qiu, L. (2023). Molecular characterization and functional analysis of TRIM37 from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish & Shellfish Immunology*, 140, 108940. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.108940>
- Zheng, J., Mao, Y., Su, Y., & Wang, J. (2020). Identification and functional characterization of a novel C-type lectin from the kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 530(3), 547-553. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.07.067>
- Zhong, S., Mao, Y., Wang, J., Liu, M., Zhang, M., & Su, Y. (2017). Transcriptome analysis of Kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) hepatopancreas in response to white spot syndrome virus (WSSV) under experimental infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 70, 710-719. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.09.054>