تحقیقات تولیدات دامی

سال ششم/شماره دوم/تابستان ۱۳۹۶ (۹۷-۸۷)

Animal Production Research

اثر نوع والد و جنس کرم ابریشم بر بیان ژن HSP70 در پاسخ به تنش شدید حرارتی

نجمه فاضلی مقدم[۱]، سید حسین حسینی مقدم[۲*]، محمد مهدی سوهانی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

۲- استادیار گروه علوم دامی و گروه پژوهشی کرم ابریشم، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

۳- دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

(تاریخ دریافت: ۹۵/۱۰/۰۸ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۲/۲۶)

چکیده

به منظور بررسی تفاوت‌های ژنتیکی اعم از نوع والد و جنسیت بر پاسخ لارو کرم ابریشم به افزایش دما، بیان پروتئین شوک حرارتی ۷۰ (HSP70) در دو جنس نر و ماده در چهار والد ۱۱۰ و ۱۰۴ (واریته‌های چینی) و ۱۰۳ و ۱۰۷ (واریته‌های ژاپنی) اندازه‌گیری شد. لاروها در روز چهارم از سن پنجم لاروی به مدت ۳۵ دقیقه در معرض شوک حرارتی ۴۵°C قرار گرفته و سپس نمونه‌گیری از بافت چربی در صفر، دو، چهار و بیست و چهار ساعت پس از شوک حرارتی انجام شد. پس از استخراج RNA و اندازه‌گیری میزان بیان نسبی ژن (qRT-PCR) مشخص شد بیان ژن در جنس ماده ۱۳/۸ برابر جنس نر بوده و این تفاوت از نظر آماری بسیار معنی‌دار بود (P<۰/۰۰۰۱). لذا مقایسه والدها در چهار نوبت نمونه‌گیری به تفکیک جنس با استفاده از تجزیه فاکتوریل و آزمون دانکن انجام شد. تفاوت‌های بیان ژن در واریته‌های مورد بررسی بسیار معنی دار بود (P<۰/۰۰۱). در جنس ماده، واریته ۱۰۷ بیشترین بیان ژن HSP70 را با ۵۵۲ واحد و در جنس نر، واریته ۱۱۰ با ۵۳ واحد نشان داد. بیش-ترین بیان ژن دو ساعت پس از شوک حرارتی مشاهده شد لیکن با زمان صفر تفاوت معنی‌داری نداشت. آزمایش تحمل حرارتی نشان داد که دو والد ۱۱۰ و ۱۰۷ (۰/۶۳ و ۰/۴۴) نسبت به دو والد ۱۰۳ و ۱۰۴ (۰/۹۴ و ۰/۷۴) تلفات کمتر و تحمل حرارتی بیشتری داشتند. به‌طور کلی واریته ۱۰۳ که پایین‌ترین میزان بیان ژن HSP70 را داشت به میزان زیادی به شوک حرارتی حساس بود.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، پروتئین شوک حرارتی ۷۰ (HSP70)، تحمل حرارتی، والدین کرم ابریشم

* نویسندهٔ مسئول: hosseini@guilan.ac.ir

مقدمه

صفات مهم اقتصادی کرم ابریشم تحت تاثیر عوامل محیطی هم‌چون دما، رطوبت نسبی، نور و تغذیه قرار می‌گیرند. کرم ابریشم جز حیوانات خونسرد بوده و دما اثر مستقیمی بر فعالیت‌های فیزیولوژیک و در نتیجه رابطه مستقیمی با رشد کرم ابریشم دارد. بالا رفتن دما فعالیت-های فیزیولوژیک را افزایش داده و کاهش دما، فعالیت‌های فیزیولوژیک را کاهش می‌دهد. نوسانات زیاد دمایی رشد و نمو کرم ابریشم را کم می‌کند. دمای مساعد برای رشد طبیعی کرم ابریشم بین ۲۰ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد و دمای مطلوب برای سنین چهارم و پنجم که متضمن حداکثر تولید است بین ۲۳ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد است. دمای بالای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به طور مستقیم بر سلامتی کرم ابریشم اثر می‌گذارد و دمای پایین‌تر از ۲۰ درجه سانتی‌گراد باعث به تاخیر انداختن فعالیت‌های فیزیولوژیک می‌شود. به خصوص در مراحل اولیه، لاروها بسیار ضعیف شده و به بسیاری از بیماری‌ها حساس می-شوند. مطالعات نشان می‌دهد که کرم ابریشم در سنین چهارم و پنجم لاروی به گرما حساس‌تر است (Rahmathulla, 2012).

تحمل گرمایی یکی از صفات مهم در اصلاح نژاد کرم ابریشم به منظور انتخاب بهترین آمیخته‌ها برای مناطق مختلف به خصوص در شرایط ناسازگار محیطی است. به منظور تولید آمیخته‌های تجاری کرم ابریشم بین واریته-های چینی و ژاپنی تلاقی دو طرفه انجام می‌شود که این خود سبب افزایش تحمل و مقاومت کرم ابریشم نسبت به والدین آنها خواهد شد (حسینی مقدم، ۱۳۹۲). آمیخته-گری در کرم ابریشم سبب می‌شود تا بتوانیم والدین با تولید بالا را با والدین ممتاز از نظر صفات مقاومت به بیماری و تحمل نسبت به شرایط ناسازگار محیطی ترکیب نماییم.

حشرات می‌توانند آسیب‌های حرارتی را در طیف گسترده-ای از دماهای غیر مهلک تحمل کنند، ولی این صدمات ممکن است در طول رشد و نمو منجر به کاهش بقاء و زنده‌مانی موجودات شود (Chown and Nicolson, 2004). پروتئین‌های شوک حرارتی یا HSPs از جمله بیومولکول-هایی هستند که بر عملکرد طیف وسیعی از فعالیت‌های سلولی مانند کنترل گیرنده‌های سطح سلولی، تاخوردگی پروتئین‌ها، واسرشتگی آنزیم‌ها، تنظیم پاسخ‌های ایمنی، عوامل رونوشت‌برداری اسیدهای هسته‌ای و مرگ برنامه-ریزی شده سلول تاثیرگذار می‌باشند. به این دلیل HSPها در زمره مهم‌ترین مولکول‌های حفاظتی (چاپرونی) می-باشند (Mayer and Bukau, 2004). ژن‌هایی که HPSها را کد می‌کنند، بسیار محافظت شده‌اند (Evgen'ev 2005 *et al.*,). بسیاری از این ژن‌ها و تولیدات آن‌ها بر اساس توالی و وزن مولکولی‌شان شناخته می‌شوند مانند HSP100، HSP90، HSP70، HSP60، HSP40 و sHSP (Evgen'ev *et al.*, 2004). خانواده‌های کوچک مولکول (sHSP) و HSP70 دو گروه از اعضای خانواده HSPها هستند که نقش مؤثری در تحمل حرارتی ایفاء می نمایند. بیان افزاینده ژن‌های HSP70 و sHSP در پاسخ به استرس حرارتی نقش مهمی در حفظ هموستاز سلول و جلوگیری از تخریب سلولی ایفا می‌کند (Mayer and Bukau, 2007; King and Macrae, 2015). HSP70 با دیگر HSPsها اثر متقابل داشته و افزایش HSP70 باعث افزایش در دیگر HSPها می‌شود (Bettencourt *et al*., 2008).

اگر کرم ابریشم در معرض دمای ۳۸ و ۴۲ درجه سانتی-گراد قرار گیرد با مقایسه باندهای ژل‌های الکتروفورز مشاهده می‌شود که بیان ژن‌های HSP70 و HSP40 نسبت به شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافته، میزان آن نسبت به پروتئین‌های شوک حرارتی کوچک مولکول HSP20.4 و HSP20.8 بیشتر می‌شود (Velue *et al*., 2008). بعلاوه میزان بیان HSP70 در روده میانی نسبت به کوتیکول و غده ابریشمی نیز بیشتر می‌شود. در مطالعات انجام شده در یک نوع مگس سرکه (*Ceratitis caitata*) و یک نوع سوسک (*Neobathyscia pasai*)، افزایش دما باعث افزایش معنی‌داری در بیان HSP70 شد (Kalosaka *et al*., 2009; Bernabo *et al*., 2011). غلظت اعضای خانواده HSP70 در برخی از گونه‌ها هم‌چون یک نوع مورچه صحرایی به نام *Cataglyphis*، هنگامی که دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد را تحمل می‌کند افزایش می-یابد (Gehring and Wehner, 1995). از طرفی در حشرات دیگر همچون آفت چغندر (*Spodoptera exigu*) که مقاومت حرارتی بالایی دارند، بروز افزایشی ژن HSP70 در لاروهای جوان مشاهده شد و با افزایش سن این روند

کاهش پیدا کرد (Jiang *et al*., 2012). با توجه به اهمیت HSP70 در پاسخ به شوک حرارتی، بررسی بیشتر این تفاوت‌ها می‌تواند به درک بهتر از مکانیسم حفظ سلول در برابر تنش‌های محیطی کمک نماید.

با بررسی گونه‌ها و نژادهای مگس سرکه در مناطق مختلف آب و هوایی نشان داده شد که در تعدادی از گونه‌ها و نژادها بین بیان ژن HSP70 و تحمل حرارتی همبستگی مثبت و برای بعضی دیگر رابطه منفی وجود دارد (Garbuz *et al*., 2002) تحقیقات گذشته اثر تفاوت-های ژنتیکی را بر بیان ژن HSP70 کرم ابریشم با مقایسه نژادهای دو نسله با نژادهای چند نسله هم‌چون نیستاری (Nistari) نشان داد (Li *et al*., 2011). بنابراین به نظر می‌رسد HSP70 می‌تواند به عنوان نشانگر مولکولی برای جمعیت‌هایی که در دماهای بالا زندگی می‌کنند به شمار رود (Lovell *et al*., 2007). از سوی دیگر با توجه به نقش تفاوت‌های ژنتیکی در بیان ژن‌ها لازم است کارآیی چنین نشانگرهایی برای نژادهایی که به طور طبیعی در معرض دماهای بالا نیستند نیز بررسی شود تا قابلیت تعمیم رهیافت‌های علمی قبلی در این شرایط نیز مورد بررسی قرار گیرد. در این راستا بررسی میزان بیان پروتیئن‌های شوک حرارتی در والدین حساس و مقاوم و حتی جنس-های مختلف کرم ابریشم پس از اعمال تیمار حرارتی می-تواند کارآیی این نشانگرها را مشخص نماید. در این تحقیق بیان ژن HSP70 در هر دو جنس نر و ماده چهار والد کرم ابریشم (واریته‌های ۱۰۷، ۱۰۳، ۱۰۴ و ۱۱۰) اندازه‌گیری شد. بعلاوه تحمل حرارتی این چهار واریته بر مبنای سرعت مرگ و میر لاروی حاصل از اعمال یک برنامه حرارتی طولانی مدت در طول سن پنجم لاروی نیز مشخص شد.

مواد و روش‌ها

لاروهای چهار والد کرم ابریشم در روز چهارم سن پنجم در آزمایشگاه کرم ابریشم دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان به مدت ۳۵ دقیقه تحت شوک حرارتی ۴۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. نمونه‌گیری در زمان‌های صفر، دو، چهار و بیست و چهار ساعت پس از شوک حرارتی از بافت چربی کرم ابریشم و با سه تکرار برای هر تیمار و هم‌چنین از نمونه‌های شاهد (بدون شوک حرارتی) انجام شد. استخراج RNA با استفاده از محلول تریزول (TRIzol-Invitrogen) و تعیین غلظت RNA با استفاده از اسپکتروفوتومتری (NanoDrop 2000, USA) انجام شد. RNA با استفاده از آغازگرهای اولیگودی‌تی و آنزیم رونوشت‌بردار معکوس (Reverse Transcriptase) مطابق دستورالعمل سازنده (Fermentas, USA) به cDNA تبدیل شد. سپس واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی (Real-time PCR) به منظور اندازه‌گیری بیان ژن HSP70 کرم ابریشم به عنوان ژن هدف در برابر ژن RPL27a کرم ابریشم به عنوان ژن از کیت آماده مصرف Maxima SYBR Green/ROX (Fermentas, USA) استفاده شد. ژن RPL27 از جمله ژن‌هایی است که نشان داده شده پایداری بسیار بالایی در انواع سلول‌های مختلف و در شرایط مختلف آزمایشگاهی دارد (de Jonge e*t al*., 2007).

آغازگرهای ژن هدف و ژن مرجع با رعایت طول قطعات، دمای اتصال مناسب و عدم تشکیل ساختارهای ثانویه طراحی شد (جدول ۱). جهت تکثیر ژن HSP70 در فرآیند PCR، واسرشت‌سازی اولیه ۳ دقیقه ۹۴°C، واسرشت سازی ثانویه ۳۰ ثانیه ۹۴°C، اتصال آغازگر ۳۰ ثانیه ۶۰°C، بسط ۴۵ ثانیه ۷۲°C و بسط نهایی ۷ دقیقه ۷۲°C بود. برای بهینه‌سازی واکنش PCR از روش گرادیان غلظتی و دمایی نیز استفاده شد. پس از مشخص شدن خروجی دستگاه Real-time PCR و به منظور اندازه-گیری میزان بیان ژن از فرمول لایوک ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) استفاده شد. در واقع در این روش داده‌ها طی دو مرحله یکبار نسبت به ژن مرجع و یک بار نسبت به گروه شاهد تصحیح شده و نتایج آن قابل اعتماد است. داده‌ها پس از نرمال-سازی با تابع جذر، با کمک تجزیه فاکتوریل حاصل از چهار والد (۱۰۷،۱۰۴،۱۰۳ و۱۱۰) و چهار بار اندازه‌گیری بیان ژن (زمان‌های صفر، دو، چهار و بیست و چهار) در سه تکرار، در قالب طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از رویه GLM نرم‌افزار آماری SAS بررسی شد. برای مقایسه میانگین صفات از سطح پنج درصد آزمون دانکن استفاده شد.

جدول ۱- ویژگی پرایمرهای اختصاصی ژن‌های HSP70 و RPL27a

Table 1. Characteristics of specific primers of HSP70 and RPL27a

Primer	Sequence of primer	Products size (bp)	Primer length (bp)	Annealing temperature (°C)
HSP70 F	5'TCGCCTTGAACCCTAACAAC3'	92	20	60
HSP70R	5'GTGCTTCATGTCCTGCTGAA3'	92	20	60
Rpl27aF	5'ACAGACGAGGCTGAAGTATGC3'	144	21	60
Rpl27aR	5'TATGACAGGTTGTTTGGGGAG3'	144	21	60

به منظور اندازه‌گیری تحمل حرارتی و صفت ماندگاری کرم ابریشم، لاروهای سن پنجم در معرض دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد از روز دوم تا روز هفتم به مدت هشت ساعت از ساعت ۹ صبح تا ۵ بعد از ظهر قرار گرفتند. به این منظور دو اتاق یکی برای تیمار حرارتی و یکی برای شاهد (دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد) در مرکز تحقیقات ابریشم کشور اختصاص یافت. با توجه به حرارت زیاد در اتاق تیمار، رطوبت مازاد نیز به وسیله دستگاه بخارساز تا حد ممکن تامین شد. آزمایش شامل چهار واریته در سه تکرار و هر تکرار ۲۰۰ لارو سن پنجم بود که در طول سن پنجم، تلفات لاروی به محض مشاهده با ذکر تاریخ ثبت - شد. با توجه به برنامه حرارتی طولانی‌مدت اعمال شده انتظار است که لاروهای ضعیف به تدریج با تداوم تیمار حرارتی از بین بروند. در این شرایط سرعت مرگ و میر لاروها در یک واریته به عنوان معیار تحمل در نظر گرفته شد و رکوردهای تلفات در دوره شوک حراتی به دو بازه زمانی تقسیم شدند. دوره اول که شامل دو روز اول تیمار حرارتی بود (Lo1) و دوره دوم که پس از دوره اول تا پایان دوره تیمار حرارتی (Lo2) را شامل می‌شد. معیار تحمل حرارتی و ماندگاری کرم ابریشم همان درصد تلفات در اولین مرحله اندازه‌گیری در نظر گرفته شد، چرا که با تداوم در معرض قرار گرفتن لاروها در حرارت زیاد تعداد بیشتری از لاروها در تکرارهای آزمایشی از بین خواهند رفت. این آزمایش برای نخستین بار در کشور انجام شد و می‌تواند دستورالعملی برای اندازه‌گیری صفت تحمل گرمایی در کرم ابریشم نیز باشد. از تبدیل لگاریتمی (log-transformed) به منظور نرمال‌سازی درصد تلفات لاروی استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها بر مبنای مدل آماری زیر با آزمون فاکتوریل ۴×۲ برای چهار والد مورد آزمون و با دو برنامه حرارتی (تیمار حرارتی و شاهد) در سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از رویه GLM نرم‌افزار آماری SAS انجام شد. برای مقایسه میانگین صفات از سطح پنج درصد آزمون دانکن استفاده شد:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + G_j + (TG)_{ij} + e_{ijk}$$

Y_{ijk}: مقدار هر مشاهده

μ: میانگین کل صفت

T_i: اثر تیمار حرارتی

G_j: اثر ژنوتیپ (والدین مختلف)

$(TG)_{ij}$: اثر متقابل تیمار حرارتی و ژنوتیپ

e_{ijk}: خطای آزمایش

نتایج و بحث

این مطالعه نشان داد که تفاوت معنی‌داری (P<۰/۰۰۰۱) بین بیان ژن HSP70 در جنس‌های نر و ماده والدین کرم ابریشم وجود داشته به طوری که بروز ژن HSP70 در جنس ماده بیشتر از جنس نر بود. اثر والد و زمان نمونه-گیری و اثرات متقابل آن‌ها در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). تفاوت بین والدها در هر دو جنس نیز معنی‌دار است (P< ۰/۰۱).

ژن HSP70 بلافاصله بعد از شوک حرارتی در هر دو جنس تمام واریته‌ها افزایش یافت. در جدول ۲ نسبت تغییر بیان ژن در چهار واریته مورد بررسی به تفکیک جنس ارائه شده است. این مقادیر نشان می‌دهد که متوسط میزان تغییر در بیان ژن هدف تا حدود ۵ برابر در جنس ماده (۱۰۷/۱۰۳) و ۱۲ برابر در جنس نر (۱۱۰/۱۰۳) می‌رسد. این مطالعه نشان داد که تفاوت معنی‌داری (P<۰/۰۰۰۱) بین بیان ژن HSP70 در جنس-های نر و ماده والدین کرم ابریشم وجود داشته به طوری که بروز ژن HSP70 در جنس ماده بیشتر از جنس نر بود (شکل ۱). بیش‌ترین میزان بیان ژن HSP70 در هر دو جنس دو ساعت پس از شوک حرارتی و کم‌ترین میزان بیان ژن ۲۴ ساعت پس از شوک حرارتی بود.

جدول ۲- نسبت تغییر بیان ژن HSP70 در چهار واریته کرم ابریشم به تفکیک جنس ماده و نر

Table 2. Expression change ratio of HSP70 gene in the four silkworm varieties by female and male*

	Female				Male			
Varieties	104	110	103	107	104	110	103	107
104	1	0.67	0.23	1.21	1	2.16	0.18	0.53
110	1.49	1	0.35	1.8	0.46	1	0.08	0.24
103	4.25	2.85	1	5.15	5.5	11.98	1	2.94
107	0.82	0.55	0.19	1	1.88	4.07	0.34	1

*Reading of numbers is column-based

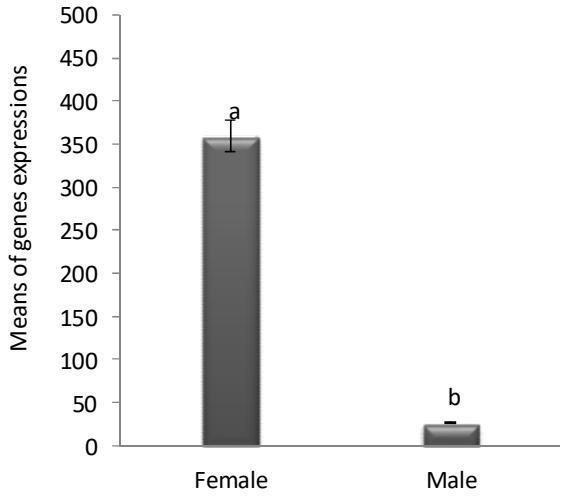

Fig.1. HSP70 gene expression in the male and female of studied silkworms

شکل ۱- تفاوت بیان ژن HSP70 در جنس نر و ماده کرم ابریشم‌های مورد بررسی

تغییرات بیان ژن HSP70 در ساعت‌های پس از شوک حرارتی در جدول ۳ به خوبی نمایان است. بیش‌ترین میزان بروز ژن دو ساعت پس از شوک حرارتی بود که از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با زمان صفر پس از شوک حرارتی نداشت. بیان ژن چهار ساعت پس از تیمار حرارتی به شدت کاهش یافت. اگرچه ۲۴ ساعت پس از شوک حرارتی بیان ژن به حداقل رسید لیکن این مقدار بیان به طور عمده افزایشی و قابل توجه بود.

در شکل ۲ متوسط بیان ژن در چهار واریته مورد بررسی به تفکیک جنس نشان داده شده است. بیش‌ترین میزان بیان ژن HSP70 در جنس ماده، در واریته ۱۰۷ و کم-ترین میزان بروز ژن در واریته ۱۰۳ مشاهده شد. پس از واریته ۱۰۷ واریته‌های ۱۰۴ و ۱۱۰ به ترتیب بیش‌ترین بیان ژن را نشان دادند. در جنس نر، واریته ۱۱۰ بیش-ترین و واریته ۱۰۷ کم‌ترین میزان بیان ژن HSP70 را در بین واریته‌ها داشتند. پس از واریته ۱۱۰، واریته‌های ۱۰۴ و ۱۰۳ به ترتیب بالاترین میزان بیان ژن HSP70 را نشان دادند. تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر والد و زمان نمونه‌گیری و اثرات متقابل آن‌ها معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$). شکل ۲ نشان می‌دهد که تفاوت بین والدها در هر دو جنس نیز معنی‌دار است ($P<۰/۰۱$).

جدول ۳- میانگین حداقل مربعات بیان ژن HSP70 در چهار واریته و چهار زمان پس از اعمال شوک حرارتی در کرم ابریشم نر و ماده

Table 3. Least squares means of gene expression of HSP70 in four varieties and four times after heat shock in male and female silkworms

Varieties	Time	Least squares means	
		Male	Female
104	0	43.65[c]	937.8[b]
104	2	43.94[c]	598.24[b]
104	4	10.48[d]	229.61[f]
104	24	0.6[f]	58.49[i]
110	0	77.84[b]	491.8 [e]
110	2	90.93[a]	475.95 [e]
110	4	44[c]	227.2 [g]
110	24	1.06[f]	26.78[ij]
103	0	6.21[d]	129.6[h]
103	2	7.25[d]	234.25[b]
103	4	2.53[d]	64.55[i]
103	24	1.86[e]	0.35[j]
107	0	4.68[c]	714.88[c]
107	2	43.19[c]	1124.59[a]
107	4	2.54[d]	238.22[g]
107	24	2.1[d]	131.05[h]
S.E.		3.57	20.66

[a-j] Different superscripts within a column indicate significant differences (P<0.0001)

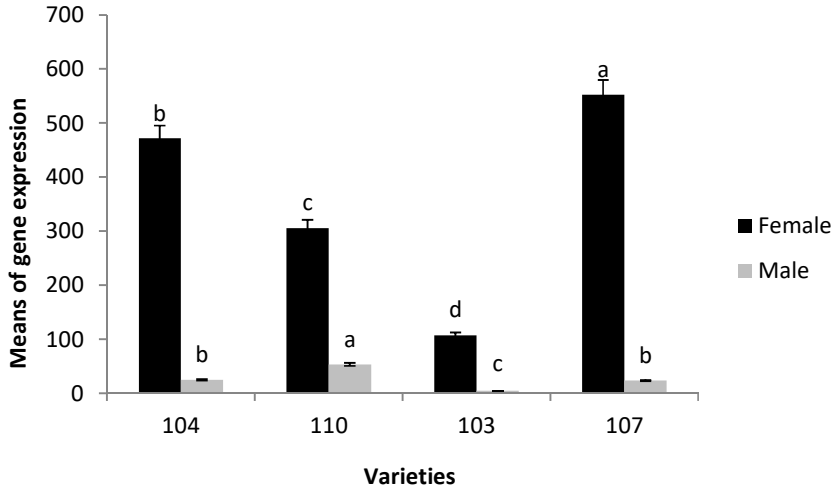

Fig. 2. Average gene expression in males and females of four studied silkworm varieties

شکل ۲- میانگین میزان بیان ژن در جنس‌های نر و ماده چهار واریته کرم ابریشم مورد بررسی

نتایج آزمایش تحمل حرارتی چهار والد مورد بررسی نشان داد که تیمار حرارتی دراز مدت اعمال شده توانسته تفاوت‌های والدین کرم را برای صفت تحمل حرارتی مشخص نماید. تجزیه فاکتوریل چهار والد در دو شرایط حرارتی (تنش و شاهد) در اولین رکوردگیری (Lo1) و هم در دومین رکوردگیری (Lo2) برای صفت تلفات لاروی معنی‌دار بود (P<۰/۰۰۰۱). با وجود این، اثر متقابل تیمار حرارتی و واریته‌های کرم ابریشم برای هیچ کدام از صفات Lo1 و Lo2 معنی‌دار نبود. این مقایسه‌ها نشان داد که دو والد ۱۱۰ و ۱۰۷ در هر دو رکوردگیری دارای تلفات کمتر و در نتیجه تحمل بیشتری بودند (شکل ۳). داده‌های اولین رکوردگیری می‌تواند به عنوان معیار تحمل در نظر

گرفته شود زیرا تفاوت‌های ژنتیکی در تحمل حرارتی در همان اوایل دوره تنش خود را نشان داده و هر چقدر لارو بیشتر تحت تأثیر تنش حرارتی قرار گیرد حساس‌تر خواهد بود. نتایج تجزیه واریانس داده‌های درصد تلفات لاروی نیز نشان داد که این دو صفت مرتبط با تلفات لاروی یکسان نبودند. درحالیکه اثر تیمار حرارتی (نسبت به شاهد) و هم‌چنین نوع والد برای هر دو صفت معنی‌دار بود ($P<$ ۰/۰۵) لیکن اثر متقابل این دو عامل برای Lo1 معنی‌دار نبود.

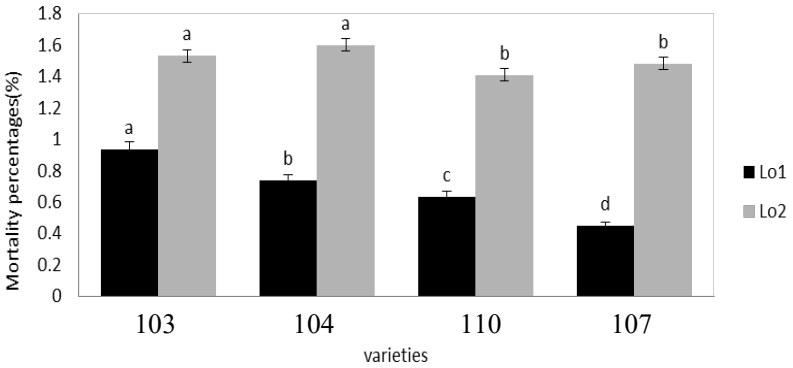

Fig. 3. Two times recording (Lo1 and Lo2) of larval mortality (%) during heat treatment in the four silkworm varieties

شکل ۳- درصد تلفات لاروی در دو نوبت رکوردگیری در دوران تنش حرارتی در چهار واریته کرم ابریشم

ژن HSP70 بلافاصله بعد از شوک حرارتی در هر چهار واریته و در هر دو جنس بروز افزایشی داشته و بین چهار والد و دو جنس نیز تفاوت بیان ژن زیاد است. بیان نسبتاً زیاد HSP70 در واریته ۱۰۷ در جنس ماده و واریته ۱۱۰ در جنس نر بلافاصله پس از شوک حرارتی نشان داد که نیاز به محافظت‌کننده‌های مولکولی یا چپرون‌ها به منظور کاهش اثر استرس ایجاد شده در این واریته‌ها به محض اینکه در معرض تنش حرارتی قرار می‌گیرند بسیار حیاتی است. این در حالی است که این دو واریته تحمل حرارتی بالاتری نسبت به واریته‌های ۱۰۳ و ۱۰۴ داشتند (شکل ۲). تحمل حرارتی بیشتر این واریته‌ها ممکن است به دلیل توانایی در بیان بالای محافظت‌کننده‌های مولکولی هم‌چون HSP70 باشد تا بتوانند اثرات استرس حرارتی را به حداقل برسانند. در تعدادی از بررسی‌های قبلی اثر تنش حرارتی در سویه‌های مختلف حشرات بر بیان ژن-های کاندید نشان داده شده است (Bettencourt *et al*., 2008; Hosseini Moghaddam *et al*., 2008). در یک گزارش میزان بیان ژن HSP70 بر ژل اگارز (روش نیمه کمّی) تفاوت جزئی بین دو نژاد مقاوم و حساس کرم ابریشم به گرما را پس از شوک حرارتی ملایم (۴۱ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت) مشاهده شد (Velu *et al*., 2008)، اما در گزارش پس از اعمال شوک حرارتی شدید (۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۵ دقیقه) تفاوت معنی‌دار بیان HSP70 بین نژاد چند نسله نیستاری کرم ابریشم و واریته یک نسله جینگ سونگ مشاهده شد، به طوری که بیان HSP70 در نژاد نیستاری کمتر از جینگ سونگ بود (Li *et al*., 2011). در مطالعه‌ای دیگر بیان شد که به نظر می‌رسد پروتئین‌هایی با وزن ۹۷-۶۸ کیلو دالتون وظیفه تحمل حرارتی را بر عهده داشته باشند. نتایج بررسی نشان داد که پاسخ حرارتی و ظهور پروتئین-ها در نژادهایی که مقاوم به حرارت بودند هم‌چون نیستاری در مقایسه با نژادهای حساس به حرارت هم‌چون CSR2 سریع‌تر بود (Sreekumar *et al*., 2007).

بیان پروتئین‌های شوک حرارتی در حشرات مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. HSP70 از لحاظ کمّی، بزرگترین پروتئین شوک حرارتی در انواع ژنوتیپ‌های مختلف مگس سرکه بود (Garbuz *et al*., 2002). در مورد گونه‌های مختلف کرم ابریشم، لیشمانیاز و مارمولک‌ها نشان داده شده که مقاومت بالای سلول‌ها در دمای بالا، با ساخت HSP70 در سلول فراهم می‌شود (Evegen'ev *et al*., 2005). مقایسه دو جمعیت حساس و مقاوم به حرارت از پاروپایان (copepod *Tigriopus californicus*) نشان داد که در جمعیت با تحمل حرارتی بالاتر، بیان افزایشی (up-regulated) ژن‌های HSP بیشتر از جمعیت حساس بود

که در این میان بیان ژن HSP70 خیلی بیشتر از بقیه HSPها بود (Schoville *et al*., 2012). میزان بیان ژن HSP70 در دو گونه از مگس سرکه *Bactrocera* در مراحل مختلفی از رشد و نمو و شوک‌دهی حرارتی تعیین شد. بیان بالای HSP70 در لاروها در پاسخ به حرارت، در دماهای ۳۵ و ۳۹ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد. هر دو گونه یک الگوی بسیار سازگار و پایدار از پاسخ حرارتی از نظر میزان زنده ماندن و سطوح بیان ژن HSP به نمایش گذاشتند. نتایج نشان داد که تفاوت در تنوع حرارتی ممکن است مسئول توزیع‌های مختلف دو گونه در مناطق مختلف بوده و بیان HSP ممکن است در تنظیم واکنش-های مختلف در برابر حرارت نقش داشته باشد (Hu *et al*., 2014).

در کرم ابریشم به دلیل حساسیت به افزایش دما، دمای آستانه که منجر به ۱۰۰ درصد مرگ و میر می‌شود با دیگر حشرات متفاوت است. کرم ابریشم هنگامی که در معرض دماهای بالاتر از طیف ۴۷-۴۳ درجه سانتی‌گراد قرار گیرد، سطوح متفاوتی از مقاومت حرارتی را در مراحل مختلف رشد هم‌چون تخم، لارو، شفیره و بزرگسالی نشان می‌دهد. در یک مطالعه همه واریته‌های کرم ابریشم توانستند دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد را به مدت ۳۵ دقیقه تحمل کنند و سن پنجم لاروی را بدون مشکل به پایان برسانند (Hsieh *et al*., 1995). سنین لاروی بالاتر و مراحل شفیرگی مقاومت بیشتری را نسبت به دماهای بالاتر نشان می‌دهند به طوری که سن پنجم لاروی بیش-ترین مقاومت را نسبت به لاروهای جوان در طیف دمایی ۴۵-۴۱ درجه سانتی‌گراد نشان داد (Joy and Gopinathan, 1995). بنابراین سن پنجم لاروی برای تمام مطالعات در زمینه شوک حرارتی و از جمله تحقیق حاضر انتخاب می‌شود. بررسی سویه‌های مختلف حشرات نظیر مگس سرکه (Guerra *et al*., 2000)، ملخ (Kang and wang, 2005)، سرخرطومی برنج (*et al*., 2015 Tungjitwitayakul) و نوعی مگس (Huang *et al*., 2007) نشان می‌دهد که تحمل حرارتی آنها با یکدیگر متفاوت است.

معمولاً در کرم ابریشم عمده مطالعات فیزیولوژیک در روزهای سوم و چهارم سن پنجم لاروی انجام می‌شود (حسینی مقدم، ۱۳۹۲). مقایسه میزان بیان ژن‌ها نیز در سن پنجم لاروی به سهولت قابل انجام است (قیامی، ۱۳۹۰)، اگرچه در تمام سنین لاروی قابل اندازه‌گیری است. در گونه *Frankliniella occidentalis* بیان هر دو ژن HSP70 و HSP70 در سراسر مراحل رشد و توسعه حشره بیان افزایشی داشت (Li and Du, 2013). هم-چنین در این تحقیق از بافت چربی کرم ابریشم استفاده شد. در تحقیقی نشان داده شد که بیان ژن HSP70 در همه بافت‌های حرارت دیده شامل کوتیکول، غده ابریشمی و بافت چربی افزایش یافت ولی بیان HSP70 به طور معنی‌داری در بافت چربی بالاتر از بقیه بافت‌ها بود (Singh and Lakhotia, 2000).

نتایج حاصل از تحقیق حاضر تفاوت بیان ژن HSP70 را در جنس نر و ماده کرم ابریشم نشان داد. در تحقیقی دیگر نیز تفاوت معنی‌داری در بروز HSPها در جنس نر و ماده کرم ابریشم مشاهده شد (Li *et al.,* 2011). با اندازه-گیری بیان ژن HSP70 در *Bemisia tabaci* نشان داده شد که شدت تنش حرارتی در تفاوت جنس نر و ماده مؤثر است. به عبارتی در بعضی دماها بیان ژن در جنس نر بیشتر و در بعضی دماها در جنس ماده بیشتر بود (Lu and Wan, 2010). در تحقیق حاضر بیان ژن در تمام واریته‌های مورد بررسی در جنس ماده بیشتر از نر بود. در بررسی حشره Busck که یک گونه از *Grapholita molesta* است HSP70 در حشرات بالغ ماده بسیار زودتر از حشرات نر تولید شد. درجه حرارت القایی موثر در ماده‌ها نیز کمتر از نرها بود. بنابراین HSP70 ممکن است نقش مهمی در حشرات بالغ در پاسخ به یک تهدید حرارتی بازی کرده، و از طرفی تفاوت آشکاری در القاء این ژن در دو جنس نر و ماده وجود دارد (Chen *et al*., 2014). میزان بیان رونوشت HSP70 در طول تنش گرمایی یا سرمایی در *Ericerus pela* (Homoptera: Coccidae) به وسیله روش qRT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. چهار نوع HSPs در طول تنش گرمایی و سرمایی در افراد بالغ ماده بیان افزایشی نشان دادند که دلالت بر همبستگی بین چهار نوع HSPs با تحمل استرس گرمایی در افراد بزرگسال ماده داشت. هم‌چنین HSP70 در طی استرس حرارتی در لاروهای نر نیز افزایش نشان داد (Liu *et al.,* 2014).

بیان ژن‌های حفاظتی بلافاصله پس از تنش حرارتی شروع به افزایش می‌کند. این بررسی و بررسی‌های مشابه در کرم ابریشم (قیامی، ۱۳۹۰ و Li *et al.,* 2011) نشان داد که این

افزایش پس از دو ساعت شروع به کاهش می‌نماید. در جدول ۳ ملاحظه می‌شود که چهار ساعت پس از شوک حرارتی بیان ژن به شدت کاهش یافته و بنابراین ادامه آن قابل پیش‌بینی است. در پروانه Glanville Fritillary (*Melitaea cinxia*) که یک گونه مدل در زیست‌شناسی است و رفتار و زندگی آن تا حد زیادی به وسیله دمای محیط تحت تاثیر قرار می‌گیرد، الگوهای بیان ژن مختلف HSP70 تحت تنش‌های حرارتی گوناگون با استفاده از PCR کمّی تجزیه و تحلیل شد. شوک حرارتی ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت دو ساعت باعث بیان بالایی از HSP70 در این گونه شد و حداکثر سطح HSP70s در اولین دو ساعت بعد از شوک حرارتی مشاهده شد (Luo *et al.*, 2015). تفاوت بیان ژن HSP70 بلافاصله بعد از شوک حرارتی در چهار والد کرم ابریشم و در هر دو جنس نشان‌دهنده همبستگی زیاد بین تفاوت‌های ژنتیکی و تفاوت‌های بیان ژنی است. بیان افزایشی این ژن تا چهار ساعت پس از تنش حرارتی نشان‌دهنده اهمیت آن در شرایط تنش حرارتی به ویژه در ژنوتیپ‌هایی با تحمل حرارتی بالاتر است. بعلاوه با توجه به اختلاف بسیار زیاد بیان ژن در جنس نر و ماده والدین کرم ابریشم، ضروری است پس از تفکیک جنسیت میکروسکپی و سپس تنش حرارتی، فراسنجه‌های فیزیولوژیک در هر دو جنس اندازه-گیری و سپس ارتباط آن را با تغییرات میزان بیان ژن‌ها بررسی نمود. چون اساس ژنتیکی تحمل حرارتی تاکنون ناشناخته مانده است (Schoville *et al.*, 2012; Clarke, 2003)، لذا مشاهده چنین تفاوت‌هایی می‌تواند به درک روابط فیزیولوژیک مرتبط با تنش حرارتی کمک شایانی نماید.

نتیجه‌گیری کلی

نوع والد و جنس کرم ابریشم بر بیان ژن HSP70 در هنگام تنش شدید حرارتی موثر بوده، به طوری که شوک شدید حرارتی باعث افزایش بیان ژن در هر دو جنس (جنس ماده بیشتر از جنس نر) و دو والد (۱۱۰ و ۱۰۷) شد.

فهرست منابع

حسینی مقدم، س. ح. ۱۳۹۲. اصول پرورش کرم ابریشم. انتشارات دانشگاه گیلان. صفحات ۱۵-۵.

قیامی، ر. ۱۳۹۰. بررسی عملکرد تولیدی و بیان ژن رمزکننده پروتئین های شوک حرارتی کوچک مولکول sHSP در واریته‌های کرم ابریشم در پاسخ به شوک های حرارتی، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان.

Bettencourt B. R., Hogan C. C., Nimali M. and Drohan B. W. 2008. Inducible and constitutive heat shock gene expression responds to modification of Hsp70 copy number in *Drosophila melanogaster* but does not compensate for loss of thermotolerance in Hsp70 null flies. BMC Biology, 6: 5

Chen H., Xu X. L., Li Y. P. and Wu J. X. 2014. Characterization of heat shock protein 90, 70 and their transcriptional expression patterns on high temperature in adult of *Grapholita molesta* (Busck). Journal of Insect Science, 4: 439-448.

Chown S. L. and Nicolson S. W. 2004. Insect Physiological Ecology (Mechanism and patterns), Lethal Temperature Limits. New York: Oxford University Press. pp. 122-124.

Clarke A. 2003. Costs and consequences of evolutionary temperature adaptation. Journal of Trends in Ecology and Evolution, 18: 573–581.

De Jonge H. J. M., Fehrmann R. S. N., De Bont E. S. J. M., Hofstra R. M. W., Gerbens F., De Vries E. G. E., Van der Zee A. G. J., Te Meerman G. J. and Ter Elst A. 2007. Evidence Based Selection of Housekeeping Genes. PLoS ONE 2(9): e898. doi:10.1371/journal.pone.0000898.

Evgen'ev M. B., Garbuz D. G. and Zatsepina O. G. 2005. Heat Shock Proteins: Functions and Role in Adaptation to Hyperthermia. Journal of Developmental Biology, 4: 218–224.

Garbuz D. G., Molodtsov V. B., Velikodvorskaia V. V., Evgenev M. B. and Zatsepina O. G. 2002. Evolution of the response to heat shock in genus Drosophila. Russian Journal of Genetics, 38: 925-936.

Gehring W. J. and Wehner R. 1995. Heat shock protein synthesis and thermotolerance in Cataglyphis, an ant from the Sahara desert. Proceedings of the National Academy of Sciences, 92(7): 2994-2998

Guerra D., Loeschcke V. and Cavicchi S. 2000. Chromosomal and cytoplasmic analysis of heat shock resistance in natural population of *Drosophila melanogaster*. Hereditas, 132: 143–149.

Hu J. T., Chen B. and Li Z. H. 2014. Thermal plasticity is related to the hardening response of heat shock protein expression in two Bactrocera fruit flies. Journal of Insect Physiology, 67: 105–113.

Hosseini Moghaddam S. H., Du X., Li J., Cao J., Zhong B. and Chen Y. Y. 2008. Proteome analysis on differentially expressed proteins of the fat body of two silkworm breeds *Bombyx mori* exposed to heat shock exposure. Journal of Biotechnology and Bioprocess Engineering, 13: 624-631.

Hsieh F. K., Yu S. J., Su S. Y. and Peng S. J. 1995. Studies on the Thermotolerance of the Silkworm, *Bombyx mori*. Chinese Journal of Entomology, 15: 91-101.

Huang L. H., Chen B. and Kang L. 2007. Impact of mild temperature hardening on thermotolerance fecundity and HSP gene expression in *Liriomyza huidobrensis*. Journal of Insect Physiology, 53: 1199–1205.

Jiang X., Zhai H., Wang L., Luo L., Sappington T. W. and Zhang L. 2012. Cloning of the heat shock protein 90 and 70 genes from the beet armyworm, *Spodoptera exigua*, and expression characteristics in relation to thermal stress and development. Journal of Cell Stress and Chaperones, 17: 67–80.

Joy O. and Gopinathan K. T. P. 1995. Heat shock response in mulberry silkworm races with different thermotolerances. Journal of Biosciences, 20: 499-513.

Kalosaka K., Soumaka E., Politis N. and Mintas A. C. 2009. Thermotolerance and HSP70 expression in the Meditrranean fruit fly *Ceratitis capitata*. Journal of Insect physiology, 55(6): 568-573.

King A. M. and MacRae T. H. 2015. Insect heat shock proteins during stress and diapause. Journal of Annual Review of Entomology, 60: 59-75.

Li J., Hosseini Moghaddam S. H., Du X., Zhong B. and Chen Y. Y. 2011. Comparative analysis on the expression of inducible HSPs in the silkworm, *Bombyx mori.* Journal of Molecular Biology Reports, 1-9.

Li H. B. and Du Y. Z. 2013. Molecular cloning and characterization of an Hsp90/70 organizing protein gene from *Frankliniella occidentalis* (Insecta: Thysanoptera, Thripidae). Journal of Gene*,* 520: 148–55.

Liu W. W., Yang P., Chen X. M., Xu D. L. and Hu Y. H. 2014. Cloning and expression analysis of four heat shock protein genes in *Ericerus pela* (Homoptera: Coccidae). Journal of Insect Science, 14: 1-9.

Lovell R., Madden L., McNaughon L. R. and carrol S. 2007. Effect of active and passive hyperthermia on heat shock protein 70 (HSP70). Journal of Amino Acids, 34: 203-211.

Lu Z. C. and Wan F. H. 2010. Using double-stranded RNA to explore the role of heat shock protein genes in heat tolerance in *Bemisia tabaci* (Gennadius). Journal of Experimental Biology, 214: 764-76.

Luo S., Ahola V., Shu C., Xu C. and Wang R. 2015. Heat shock protein 70 gene family in the Glanville fritillary butterfly and their response to thermal stress. Journal of Gene, 132-141.

Mayer M. P. and Bukau B. 2004. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. Journal of Cellular and Molecular Life sciences, 62: 670-684.

Rahmathulla V. K. 2012. Management of Climatic Factors for Successful Silkworm (*Bombyx mori L.)* Crop and Higher Silk Production: A Review. Psyche: A Journal of Entomology, Article ID:121234, 12 pages.

Schoville S. D., Barreto F. S., Moy G. W., Wolff A. and Burton R. S. 2012. Investigating the molecular basis of local adaptation to thermal stress: population differences in gene expression across the transcriptome of the copepod *Tigriopus californicus.* Journal of BMC Evolutionary Biology, 12-170.

Singh A. K. and Lakhotia S. C. 2000. Tissue-specific variations in the induction of HSP70 and HSP64 by heat shock in insects. Journal of Cell Stress and Chaperons, 5(2): 90-97.

Sreekumar S., Chitra S., Ashwath S. K. and Rajesh G. K. 2007. Comparison of haemolymph protein profiles between multivoltine and bivoltine silkworm breeds under temperature stress. In: Proceeding of International Conference on Sericulture Challenges the 21st Century**,** 18-21 Sep. Bulgaria, pp. 125.

Velu D., Ponnuvel K. M. and Hussaini Qadri S. M. 2008. Expression of the heat shock protein genes in response to thermal stress in the silkworm *Bombyx mori*. International Journal of Industrial Entomology, 16(1): 21-27.

Wang X. H. and Kang L. 2005. Differences in egg thermotolerance between tropical and temperate populations of themigratory locust *Locusta migratoria Orthop-tera: Acridiidae*. Journal of Insect Physiology, 51: 1277–1285.

Wang L., Yang S., Zhao K. and Han L. 2015. Expression profiles of the heat shock protein 70 gene in response to heat stress in *Agrotis c-nigrum* (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Insect Science, 15 (1): 9.

Animal Production Research

Vol. 6, No. 2, 2017 (87-97)

University of Guilan

Effect of parent type and sex on HSP70 gene expression of silkworm in response to severe heat shock

N. Fazeli Moghaddam[1], S. H. Hosseini Moghaddam[2*], M. M. Souhani[3]

1. MSc student, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Iran
2. Assistant Professor, Department of Animal Science and Department of Sericulture, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Iran
3. Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Iran

(Received: 28-12-2016 – Accepted: 16-05-2017)

Abstract

In order to study the parents and sexes effect as genetic elements on response of silkworm larva to increased temperature, the expression of HSP70 was measured in both sexes of four silkworm parents including 110 , 104 (Chinese varieties) and 103, 107 (Japanese varieties). Larvae was exposed to 35 min of heat shock at 45°C and then sampling of larval fat body was done at zero, two, four and twenty-four hours after heat shock in the fourth day of the fifth instar. After RNA isolation and determination of HSP70 relative gene expression by qRT-PCR, results showed that the gene expression in female was 13.8 times of male larvae with high significant differences (P<0.0001). Therefore, the comparison of silkworm parents in the four times samplings were done by factorial analysis and Duncan's test in each sex separately. HSP70 gene expression differences among varieties was highly significant (P<0.0001). 107 and 110 varieties showed the highest expression of HSP70 gene (552 and 53) among female and male silkworm larvae groups, respectively. This gene was increasingly expressed immediately after heat exposure, but there were no significant differences between the times of zero and 2 hour after heat shock. Thermal tolerance test showed that two varieties of 110 and 107 (0.63 and 0.44) had less mortality and more tolerant than 103 and 104 (0.94 and 0.74). The results showed that the 103 variety which had the lowest HSP70 expression, was also so sensitive to heat stress.

Keywords: Gene expression, HSP70 gene expression, Thermotolerance, Silkworm parents

*Corresponding author: hosseini@guilan.ac.ir