بسم الله الرحمن الرحیم

دانشکده علوم کشاورزی
گروه علوم دامی
(گرایش ژنتیک و اصلاح دام)

بررسی عملکرد تولیدی و بیان ژنی رمز کننده پروتئین‌های شوک حرارتی‌کوچک مولکول(sHSPs)در واریته‌های‌کرم ابریشم در پاسخ به شوک حرارتی

از:
رسول قیامی

استاد راهنما:
دکتر سید حسین حسینی‌مقدم

اساتید مشاور:
دکتر محمدمهدی سوهانی
مهندس رامین صیقلانی

اسفند ماه ۱۳۹۰

تقدیم به با ارزش ترین داشته هایم

پدر و مادر مهربانم

و همسر فداکارم

خدایا تو را سپاس که داشته‌هایم بیش از نداشته‌هایم است.

و سپاس تو را که دریای علم نزد توست و قطره‌ای از آن را به من ارزانی داشتی، و نیز خدا را سپاسگزارم که مرا پدر و مادری عطا کرد که در تربیت و رسیدنم به سعادت هر آنچه در توان داشتند بی‌منّت به پایم ریختند و همیشه مرا در راه کسب علم و فضیلت یار و یاور بودند.

همچنین بر خود می‌دانم از استاد بزرگوارم جناب آقای دکتر سید حسین حسینی مقدم که در سراسر طول انجام این تحقیق چون آموزگاری صبور و آگاه مرا در مسیر درست علمی هدایت و رهنمون نمودند و همواره برایم معلم و الگوی اخلاق هستند تشکر و قدردانی نمایم.

از جناب آقای دکتر محمد مهدی سوهانی که زحمت مشاوره اینجانب را در مراحل علمی و عملی این پژوهش به عهده گرفتند سپاس فراوان دارم. از جناب آقای مهندس رامین صیقلانی نیز کمال تشکر را دارم.

از جناب آقای دکتر میر حسینی و دکتر قوی حسینی زاده به خاطر قبولی زحمت بازخوانی و داوری این پایان نامه قدردانی می‌نمایم.

از پرسنل مرکز تحقیقات کرم ابریشم کشور خصوصا جناب آقایان مهندس مواج پور، مهندس خیرخواه و مهندس جلوه به خاطر همکاری در انجام این پژوهش کمال تقدیر و تشکر را دارم.

از نماینده‌ی محترم تحصیلات تکمیلی جناب آقای دکتر اسدی نیز متشکرم. از مسئول آزمایشگاه کرم ابریشم جناب آقای مهندس بنیامین دلیر صفت به خاطر همکاری در انجام این تحقیق متشکرم.

تقدیر و تشکر ویژه می‌کنم از دوست گرامی ام آقای مهندس حسین مجتهدی فر که در تمام مراحل این پژوهش، برادرانه در کنارم بود.

همچنین از برادران عزیزم آقایان عطایی، یوسفی، بهادری، تیزرو، اسدی، افشار، زارع، بازرگانی، رمضان پور، امیرسالاری و سرکار خانم حیدرپور و حسینی و سایر عزیزانی که در این مقطع تحصیلی لحظات خوب و خوشی را در کنارشان داشتم سپاسگذارم.

فهرست مطالب

عنوان صفحه
چکیده فارسی ..... ذ
چکیده انگلیسی ..... ر
مقدمه ۲

فصل اول- کلیات و مرور منابع

۱-۱- اهمیت اقتصادی و ژنتیکی کرم ابریشم ۵
۱-۲- فیزیولوژی کرم ابریشم ۵
۱-۳- اهداف اصلاح نژاد کرم ابریشم در رابطه با تحمل ۵
۱-۳-۱-قابلیت سازگاری و تولید در مناطق جدید ۵
۱-۳-۲- تداوم تولید در شرایط محیطی غیر یکنواخت ۶
۱-۴- از DNA تا پروتئین ۷
۱-۵- اساس تاخوردگی پروتئین‌ها ۷
۱-۶- پروتئین‌ها و چاپرون‌های مولکولی ۸
۱-۷- پروتئین‌های شوک حرارتی ۹
۱-۷-۱- پروتئین‌های شوک حرارتی کوچک مولکول ۱۱
۱-۷-۲- α-کریستالین‌ها ۱۲
۱-۷-۳- HSP70 ..... ۱۳
۱-۷-۴- HSP60 ..... ۱۴
۱-۷-۵- HSP90 ..... ۱۴
۱-۸- تحمل حرارتی (THERMOTOLERANCE) ۱۵
۱-۹- پاسخ شوک حرارتی ۱۵
۱-۹-۱ تنظیم بروز ژن HSPها ۱۶
۱-۹-۲- فاکتور سیگما۳۲ (σ^{32}) ۱۶
۱-۱۰- REAL TIME PCR ۱۷
۱-۱۰-۱- بروز ژن و روش REAL TIME PCR ۱۷
۱-۱۰- ۲- مراحل Real Time PCR ۱۸
۱-۱۰-۳- رنگ متصل شونده به DNA ۱۸
۱-۱۰-۴- بازدهی Real Time PCR ۱۸
۱-۱۰-۵- ژن مرجع ۱۹
۱-۱۰-۶- نرمال سازی ۱۹

۱-۱۰-۷- کمی‌سازی نسبی ۱۹
۱-۱۰-۸- تحلیل اطلاعات کمی Real Time PCR ۲۰
۱-۱۱- پروتئین‌های شوک حرارتی کوچک مولکول در کرم ابریشم ۲۰
۱-۱۱-۱- ساختار sHSPها کرم ابریشم ۲۰
۱-۱۱-۲- عملکرد sHSPها در کرم ابریشم ۲۳
۱-۱۲- تأثیر شوک حرارتی بر عملکرد صفات تولیدی ۲۵

فصل ۲: مواد و روش‌ها

۲-۱- پرورش کرم ابریشم ۲۸
۲-۲- تعیین جنسیت ۲۸
۲-۳- توزین لاروها ۲۹
۲-۴- نمونه‌گیری ۳۰
۲-۵- استخراج RNA ۳۰
۲-۶- الکتروفورز ژل آگارز ۳۱
۲-۷- تعیین کمیت و کیفیت RNA ۳۲
۲-۸- حذف آلودگی DNA ژنومی ۳۳
۲-۹- ساخت cDNA ۳۴
۲-۹-۱- کنترل منفی RT ۳۴
۲-۹-۲- کنترل منفی RNA ۳۴
۲-۹-۳- کنترل مثبت ۳۵
۲-۱۰- طراحی آغازگر اختصاصی ۳۵
۲-۱۱- PCR ۳۶
۲-۱۲- واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی ۳۷
۲-۱۳- اندازه‌گیری صفات تولیدی و ماندگاری ۳۸
۲-۱۴- تجزیه و تحلیل و جمع‌آوری اطلاعات ۳۹
۲-۱۴-۲- تجزیه و تحلیل آماری ۳۹

فصل ۳: نتایج و بحث

۳-۱- تجزیه واریانس اثرات اصلی ۴۱
۳-۲- تفاوت بروز sHSPها ۴۱
۳-۳- تغییرات بروز sHSPها در ساعت‌های پس از شوک حرارتی ۴۲
۳-۴- بروز sHSPها و جنسیت ۴۳
۳-۵- بروز sHSPها و واریته‌های کرم ابریشم ۴۳
۳-۶- تفاوت بین واریته‌ها ۴۴
۳-۶-۱- تفاوت در میزان بروز ژن sHSPها در واریته ۱۰۴ ..... ۴۴

۳-۶-۲- تفاوت در میزان بروز sHSPها در واریته ۱۱۰ ..... ۴۴
۳-۶-۳- تفاوت در میزان بروز sHSP ها در واریته ۱۰۷ ..... ۴۵
۳-۶-۴- تفاوت در میزان بروز sHSP ها در واریته ۱۰۳ ..... ۴۶
۳-۷-بررسی روند بروز ژن به تفکیک جنس و واریته ۴۶
۳-۷-۱-ژن sHSP19.9 ..... ۴۶
۳-۷-۱-۱-ژن sHSP19.9 و جنسیت ۴۶
۳-۷-۱-۲-تغییرات بروز ژن sHSP19.9 در واریته‌های مختلف ۴۷
۳-۷-۲- ژن sHSP20.1 ..... ۴۸
۳-۷-۲-۱- ژن sHSP201 و جنسیت ۴۸
۳-۷-۲-۲-تغییرات بروز ژن sHSP20.1 در واریته‌های مختلف ۴۸
۳-۷-۳-ژن sHSP20.4 ..... ۴۹
۳-۷-۳-۱-ژن sHSP20.4 و جنسیت ۴۹
۳-۷-۳-۲-تغییرات بروز ژن sHSP20.4 در واریته‌های مختلف ۴۹
۳-۷-۴-ژن sHSP20.8 ..... ۵۰
۳-۷-۴-۱-ژن sHSP20.8 و جنسیت ۵۰
۳-۷-۴-۲-تغییرات بروز ژن sHSP20.8 در واریته‌های مختلف ۵۱
۳-۷-۵-ژن sHSP21.4 ..... ۵۱
۳-۷-۵-۱-ژن sHSP21.4 و جنسیت ۵۱
۳-۷-۵-۲- تغییرات بروز ژن sHSP21.4 در واریته‌های مختلف ۵۲
۳-۷-۶- ژن sHSP23.7 ..... ۵۳
۳-۷-۶-۱- ژن sHSP23.7 و جنسیت ۵۳
۳-۷-۶-۲- تغییرات بروز ژن sHSP23.7 در واریته‌های مختلف ۵۳
۳-۷-۷- ژن sHSP25.4 ..... ۵۴
۳-۷-۷-۱- ژن sHSP25.4 و جنسیت ۵۴
۳-۷-۷-۲- تغییرات بروز ژن sHSP25.4 در واریته‌های مختلف ۵۴
۳-۸- پایداری ژن مرجع نسبت به تیمار آزمایشی ۵۵
۳-۹- عملکرد تولیدی و ماندگاری ۵۵
۳-۱۰- شوک حرارتی ۴۵ درجه و سن پنجم لاروی ۵۶
۳-۱۱- بافت چربی ۵۹
۳-۱۲- واریته‌های کرم ابریشم مورد بررسی ۶۰
۳-۱۳- روند و اوج بروز ژن sHSPها در کرم ابریشم ۶۰
۳-۱۴- تفاوت جنسیت در بروز ژن sHSPها ۶۲
۳-۱۵- تحمل حرارتی واریته‌های کرم ابریشم ۶۳
۳-۱۶- بروز افزایشی ژن sHSPهای کرم ابریشم ۶۴

۳-۱۷- بروز کاهشی ژن sHSPهای کرم ابریشم ۶۵
۳-۱۸- sHSPهای کرم ابریشم ۶۵
۳-۱۸-۱- ژن sHSP19.9 کرم ابریشم ۶۶
۳-۱۸-۲- ژن sHSP20.1 کرم ابریشم ۶۷
۳-۱۸-۳- ژن sHSP20.4 کرم ابریشم ۶۷
۳-۱۸-۴- ژن sHSP20.8 کرم ابریشم ۶۸
۳-۱۸-۵- ژن sHSP21.4 کرم ابریشم ۶۸
۳-۱۸-۶- ژن sHSP23.7 کرم ابریشم ۷۰
۳-۱۸-۷- ژن sHSP25.4 کرم ابریشم ۷۰
۳-۱۹- دستاوردهای تحقیق ۷۱
۳-۲۰-پیشنهادها ۷۲
منابع ۷۴
ضمیمه‌ها ۸۳

فهرست اشکال

شکل (۲-۲) دوره پرورش در مرکز تحقیقات کرم ابریشم کشور ۲۹
شکل (۲-۳) تعیین جنسیت لاروهای کرم ابریشم در روز سوم سن پنجم لاروی ۳۰
شکل (۲-۴) نمونه گیری از بافت چربی کرم ابریشم بر روی پارافین جامد ۳۱
شکل (۲-۵) استخراج RNA با محلول TRIzol ۳۲
شکل (۲-۶) الکتروفورز RNA بر روی ژل آگارز ۱٪ ۳۳
شکل (۲-۷) محصولات PCR نمونه های cDNA، کنترل مثبت و کنترل منفی RT بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد ۳۸
شکل (۲-۸) منحنی ذوب محصولات PCR با آغازگر sHSP23.7 ثبت شده با دستگاه Real Time PCR ۳۹
شکل (۲-۹) پلیت طراحی شده با دستگاه Real Time PCR برای ژن sHSP23.7 ..... ۳۹
شکل (۳-۲) تفاوت بروز sHSPها در کرم ابریشم ۴۳
شکل (۳-۳) تفاوت بروز sHSPها در زمان های پس از شوک حرارتی ۴۳
شکل (۳-۴) تفاوت بروز sHSPها در جنس نر و ماده ۴۴
شکل (۳-۵) تفاوت بروز sHSPها در واریته های کرم ابریشم ۴۴
شکل (۳-۶) تفاوت در میزان بروز sHSP ها در واریته ۱۰۴ ..... ۴۵
شکل (۳-۷) تفاوت در میزان بروز sHSP ها در واریته ۱۱۰ ..... ۴۶
شکل (۳-۸) تفاوت در میزان بروز sHSP ها در واریته ۱۰۷ ..... ۴۷
شکل (۳-۹) تفاوت در میزان بروز sHSP ها در واریته ۱۰۳ ..... ۴۷
شکل (۳-۱۰) تغییرات بروز sHSP19.9 در زمانهای پس از شوک حرارتی ۴۸
شکل (۳-۱۱) تغییرات بروز ژن sHSP19.9 در واریته های مختلف ۴۸
شکل (۳-۱۲) تغییرات بروز sHSP20.1 در زمانهای پس از شوک حرارتی ۴۹
شکل (۳-۱۳) تغییرات بروز ژن sHSP20.1 در واریته های مختلف ۴۹
شکل (۳-۱۴(تغییرات بروز sHSP20.4 در زمانهای پس از شوک حرارتی ۵۰
شکل (۳-۱۵) تغییرات بروز ژن sHSP20.4 در واریته های مختلف ۵۱
شکل (۳-۱۶) تغییرات بروز sHSP20.8 در زمان های پس از شوک حرارتی ۵۱
شکل (۳-۱۷) تغییرات بروز ژن SHSP20.8 در واریته های مختلف ۵۲
شکل (۳-۱۸) تغییرات بروز SHSP21.4 در زمانهای پس از شوک حرارتی ۵۳

شکل (۳-۱۹) تغییرات بروز ژن SHSP21.4 در واریته های مختلف ۵۳
شکل (۳-۲۰) تغییرات بروز SHSP23.7 در زمان های پس از شوک حرارتی ۵۴
شکل (۳-۲۱) تغییرات بروز ژن SHSP23.7 در واریته های مختلف ۵۴
شکل (۳-۲۲) تغییرات بروز SHSP25.4 در زمان های پس از شوک حرارتی ۵۵
شکل (۳-۲۳) تغییرات بروز ژن SHSP25.4 در واریته های مختلف ۵۵
شکل (۳-۲۴) انحراف معیار بروز ژن های مرجع کرم ابریشم در برابر شوک حرارتی ۵۶

فهرست جداول

جدول ۲-۱- پروتئین‌های چاپرونی شناسایی شده در جنین کرم ابریشم به روش پروتئومیکس در پاسخ به تنش ۹

جدول ۲-۲- میانگین وزن لاروی واریته‌های کرم ابریشم در روز دوم سن پنجم لاروی ۳۰

جدول ۲-۳- نسبت طول موج ۲۶۰/۲۸۰ RNA استخراج شده با TRIZOL ۳۴

جدول ۲-۴- مشخصات آغازگرهای طراحی شده با نرم افزار PRIMER PRIMER 5..... ۳۷

جدول۳-۱- تجزیه واریانس اثرات اصلی در پاسخ شوک حرارتی کرم ابریشم ۴۲

جدول۳-۲- عملکرد تولیدی و ماندگاری واریته‌های کرم ابریشم در برابر شوک حرارتی ۵۷

جدول۳-۳- صفات ماندگاری و تولیدی کرم ابریشم ۵۷

چکیده

بررسی عملکرد تولیدی و بیان ژنی رمز کننده پروتئین‌های شوک حرارتی کوچک مولکول (sHSPs) در واریته‌های کرم ابریشم در پاسخ به شوک حرارتی

رسول قیامی

در این آزمایش کمیت بروز ژن پروتئین‌های شوک حرارتی کوچک مولکول با روش qRT-PCR اندازه‌گیری شد. RNA نمونه گروه‌های شاهد و نمونه‌های تیمار حرارتی ۴۵ درجه به مدت ۳۵ دقیقه پس از استخراج به cDNA تبدیل شدند. بروز ژن پروتئین‌های شوک حرارتی کوچک مولکول القاء شده براساس مقایسه با گروه شاهد (دارای هر دو ژن هدف و مرجع) با دستگاه Real Time PCR اندازه‌گیری شد. هفت ژن پروتئین‌های شوک حرارتی کوچک مولکول کرم ابریشم در بافت چربی واریته‌های ۱۰۳، ۱۰۴، ۱۰۷ و ۱۱۰ در زمان‌های صفر، دو، چهار و ۲۴ ساعت پس از شوک حرارتی در هر دو جنس نر و ماده بررسی شدند. در بین هفت ژن مورد بررسی بیشترین میزان بروز برای ژن sHSP19.9 و کمترین میزان بروز برای ژن sHSP25.4 بود که با مقادیر بروز sHSP21.4 تفاوت معنی‌داری نداشت. همچنین واریته ۱۱۰ کمترین میزان بروز ژن‌های sHSP را نشان داد. بیشترین میزان بروز ژن‌های sHSP به طور معنی‌داری در واریته ۱۰۷ مشاهده شد ($p<۰/۰۰۰۱$). همچنین تجزیه آماری تفاوت معنی‌دار در بروز sHSP ها را در دو جنس نر و ماده مشخص کرد که جنس نر بروز ژن بیشتری نسبت به جنس ماده داشت($p<۰/۰۰۰۱$). از دیگر نتایج تجزیه آماری تفاوت معنی‌دار زمان دو ساعت پس از شوک حرارتی با ساعت صفر و ۲۴ بود؛ به طوری که زمان دو ساعت پس از شوک حرارتی اوج بروز sHSP ها را نشان داد ($p<۰/۰۰۰۱$)، که با ساعت چهار تفاوت معنی‌داری نداشت. اندازه‌گیری‌های بروز ژن‌ها نشان داد که sHSP25.4, sHSP20.8, sHSP20.4, sHSP20.1, sHSP19.9 وsHSP23.7 در کرم ابریشم تحت تأثیر تنش حرارتی بروز افزایشی داشته و ژن sHSP21.4 بروز کاهشی نشان می‌دهد. علاوه بر این در این تحقیق ۴ ژن مرجع (RPL27a, EF1a, GAPDH و UBIQUITIN) مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت که ژن RPL27a به عنوان ژن مرجع مناسب برای آزمایش‌های کمی بروز ژن در کرم ابریشم تأیید شد.

کلمات کلیدی: کرم ابریشم، پروتئین‌های شوک حرارتی کوچک مولکول، بروز ژن

Abstract

Study of performance and gene expression of small heat shock proteins (sHSPs) in the response to heat shock of silkworm varieties.

Rasool gheyami

In this study, small heat shock protein gene expression quantity was measured by qRT-PCR method. Extracted RNA samples of control and heat treated groups exposed to 45 °C for 35 minutes were reverse transcribed to cDNA. The expression of induced small heat shock proteins were measured by Real Time PCR compared with control group (both target and reference genes). The 7 genes of small heat shock proteins of silkworm fat body was studied in the four varieties of 103, 104, 107 and 110 in the time zero, two, four and 24 hours after heat shock for both sexes. Among the seven genes examined the sHSP19.9 and sHSP25.4 genes had highest and lowest levels of expression which had no differences with sHSP21.4 significantly. 110 varietiy showed lowest expression and for. Most of the sHSP, 107 had highest expression significantly ($p<0.0001$). The statistical analysis indicated significant differences of male and female expression that females had more sHSPs gene expression than males($p<0.0001$). Statistical analysis also showed significant differences between two hours and zero and 24 hours after heat shock ($p<0.0001$) so that the peak of expression was for two hours after heat shock which had no differences with four hours. The quantity of gene expression showed that sHSP19.9, sHSP20.1, sHSP20.4, sHSP20.8, sHSP25.4 and sHSP23.7 genes were up regulated but sHSP21.4 gene was down regulated by thermal stress. In addition, in this study four housekeeping genes: RPL27a, EF1a, GAPDH and UBIQUITIN were studied that among them RPL27a gene showed less affection by heat stress and suitable reference genes for quantitative gene expression experiment in the silkworm.

Keywords: Silkworm varieties, Small heat shock proteins, Gene expression, Real-time PCR.

مقدمه

مقدمه

پرورش کرم ابریشم برای تولید پیله‌ی ابریشمی و سایر مصارف در جهان رواج بسیار دارد. در کشورهایی نظیر ایران که توسعه روستایی اهمیت زیادی دارد، پرورش کرم ابریشم نقش مهمی در اشتغال‌زایی اقشار کم درآمد دارد. هدف نهایی این حرفه عمدتاً رسیدن به نخ ابریشم جهت تأمین ماده اولیه منسوجات، فرش و تابلو فرش و سایر محصول‌ها برای مصارف صنعتی، کشاورزی، پزشکی، بهداشتی و غیره می‌باشد. در حال حاضر با گذشت قرن‌ها چین بزرگ‌ترین تولید کننده‌ی ابریشم در جهان است، هندوستان دومین، تایلند و برزیل مقام‌های بعدی را در جهان دارا هستند [حسینی‌مقدم، ۱۳۸۲].

حرارت و تنش‌های محیطی در طی دوره پرورش کرم ابریشم از جمله عوامل موثر بر کیفیت و کمیت تولید پیله می‌باشد. حساسیت زیاد هیبریدهای تجارتی پر تولید به حرارت، از موانع گسترش آن در مناطق گرم و حاشیه کویرها است. از طرفی تحمل کرم ابریشم به حرارت محیط در نژادهای مختلف متفاوت است. لذا بررسی عوامل مؤثر بر تحمل کرم ابریشم می‌تواند نقش اثرات ژنتیکی و محیطی را تبیین نموده و به سؤال‌های محققین در ارتباط با تحمل حرارتی[1] پاسخ دهد. موجودات زنده، اعم از پر سلولی و تک سلولی به طور مستقیم یا غیر مستقیم در معرض عوامل محیطی هستند و بنابراین هنگامی که تحت تأثیر تنش‌های محیطی قرار می‌گیرند، باید بتوانند به گونه‌ای این تنش‌ها را تحمل کنند. در چنین شرایطی پروتئین‌هایی بروز می‌کنند که بنام عمومی پروتئین‌های شوک حرارتی[2] شناخته می‌شوند. پروتئین‌های شوک حرارتی در میزان تحمل کرم ابریشم به حرارت و تنش‌های محیطی نقش اساسی دارند. تنش‌های محیطی از قبیل اشعه ماوراء بنفش ، شوک‌های حرارتی و املاح فلزات سنگین [Linqusit and Carig, 1988] در اغلب موجودات زنده اعم از یوکاریوتی و پروکاریوتی ژن‌های پروتئین-های شوک حرارتی را فعال کرده، و باعث تولید HSPها می‌شود [Leppa and Sistonen, 1997; Steen et al., 2002]. واکنش‌های متقابل پروتئین‌های شوک حرارتی با دیگر پروتئین‌های سلولی، تا خوردن[3] مناسب پروتئین‌های هدف و انتقال آن‌ها به درون اندامک‌های سلولی را تسهیل می‌کند. به دلیل گستردگی وظایف به ویژه نقش آن‌ها بر تاخوردگی پروتئین‌های دیگر، HSPها را تحت عنوان حفاظت کننده‌های[4] مولکولی نامیده‌اند [Hartl, 1996]. این پروتئین‌ها علاوه بر نقش چاپرونی سلول را در مقابل آسیب‌های ناشی از تنش‌های محیطی محافظت می‌کنند.

پروتئین‌های شوک حرارتی به اشکال مختلفی تقسیم بندی می‌شوند، اما در حشرات براساس وزن مولکولی به سه خانواده پروتئین‌های شوک حرارتی کوچک مولکول (sHSPs) با وزن مولکولی تقریباً ۱۲-۴۳ کیلو دالتون، پروتئین‌های شوک حرارتی

[1] Thermotolerance
[2] Heat shock proteins (HSPs)
[3] .Folding
[4] .Chaperone

با وزن متوسط مثل HSP70 با وزن مولکولی تقریباً ۷۰ کیلو دالتون و پروتئین‌های شوک حرارتی با وزن مولکولی بالا نظیر HSP90 تقسیم‌بندی می‌شوند. sHSPها در بین پروتئین‌های شوک حرارتی بیشترین گستردگی را دارند که در کرم ابریشم عبارتند از: sHSP19.9، sHSP20.1، sHSP20.4، sHSP20.8، sHSP21.4، sHSP23.7 و sHSP25.4 [Sakano et al., 2006; Sheng et al., 2010].

القاء بروز ژن[1] sHSPها و ازدیاد آن‌ها در زمان تنش نشان دهنده اهمیت آن‌ها در مکانیسم پاسخ سلولی است [Ledesma et al., 2004 ; Dell' Aquila, 2000]. مقایسه نژادهای حساس و مقاوم به حرارت در کرم ابریشم نشان داد که بروز پروتئین‌های شوک حرارتی در نژادهای کرم ابریشم و تیمارهای حرارتی مختلف متفاوت است [Hosseini Moghaddam et al., 2008]. همچنین نتایج ولو و همکاران[Velo et al., 2008] اثبات کرد که افزایش فعالیت پروتئین‌های شوک حرارتی تأثیر مهمی بر تحمل حرارتی کرم ابریشم دارد. لی و همکاران [Li et al., 2009] اذعان داشتند که مطالعه بر روی تکامل، مکانیسم و عملکرد ژن‌های پروتئین‌های شوک حرارتی به درک و فهم چگونگی عادت‌پذیری کرم ابریشم به محیط‌های متفاوت کمک خواهد کرد. لذا در ادامه تحقیقات گذشته هدف از انجام این پژوهش بررسی بروز ژنی پروتئین‌های شوک حرارتی کوچک مولکول در واریته‌های کرم ابریشم در پاسخ به شوک‌های حرارتی می‌باشد. همچنین عملکرد صفات تولیدی و ماندگاری ژنوتیپ‌های مورد بررسی نیز در پاسخ به همان تیمارهای اندازه گیری‌های مولکولی مقایسه خواهند شد.

[1] .Gene expression

فصل اول

کلیات و مرور منابع

۱-۱- اهمیت اقتصادی و ژنتیکی کرم ابریشم

ابریشم از محصولات کشاورزی آسیای قدیم است. منطقه آسیا تولید کننده اصلی ابریشم برای بازارهای جهانی است. از بین کشورهای تولیدکننده ابریشم، چین پاسخ‌گوی حجم عمده‌ای از صادرات ابریشم دنیا است. این مهم بدون توجه به توسعه واریته‌ای جدید محقق نشده است. این کشور با اصلاح واریته‌های مختلف کرم ابریشم تلاش نمود جایگاه ژاپن و کره را در این زمینه بدست آورد و در این راستا منابع ژنتیکی خود را توسعه داد. با این وجود بیشتر کشورها فاقد منابع ژنتیکی و ذخایر مناسب لاین‌های خالص کرم ابریشم هستند تا بتوانند واریته‌های مناسب و پر تولیدی داشته باشند. اصلاح نژاد کرم ابریشم می تواند برای بهبود صفات و ویژگی‌های ژنتیکی کرم ابریشم با توجه به کاربردهای اقتصادی و نیازهای منطقه‌ای آن باشد.

۱-۲- فیزیولوژی کرم ابریشم

صنعت نوغانداری متکی بر کرم ابریشم توت با نام علمی (*Bombyx mori L. (Lep. Bombycide*) می‌باشد. کرم ابریشم درخت توت حشره‌ای با دگردیسی کامل از شاخه بندپایان، زیر شاخه ناقص شاخکان، رده حشرات، زیر رده بالداران، طبقه کامل دگردیسان، راسته پروانه‌ها، بالا خانواده بامبیکوئیده، خانواده بامبیسیده، زیر خانواده بامبیسینه، جنس بامبیکس و گونه موری می‌باشد [حسینی‌مقدم، ۱۳۸۲]. چرخه زندگی کرم ابریشم از ۵ مرحله تشکیل می‌شود: تخم نوغان ، لارو جوان شامل سن اول، سن دوم و سن سوم لاروی، لارو بالغ شامل سن چهارم و سن پنجم لاروی، شفیره و پروانه است. پوست کرم ابریشم که بافت چربی در زیر آن است از اندام‌های داخلی شامل لوله گوارش، غده ابریشمی، همولنف، لوله‌های مالپیگی برای دفع ادرار، رگ پشتی طولی متشکل از قلب پسین و منافذ آئورتی قدامی، سیستم عصبی و اندام‌های تولید مثلی محافظت می‌کند [حسن آبادی، ۱۳۸۵].

۱-۳- اهداف اصلاح نژاد کرم ابریشم در رابطه با تحمل

از جمله اهداف اصلاح نژاد کرم ابریشم می‌توان به افزایش قابلیت سازگاری کرم ابریشم برای مناطق جدید و همچنین برای تداوم تولید در شرایط مختلف محیطی اشاره کرد که به اختصار به آن می‌پردازیم:

۱-۳-۱-قابلیت سازگاری و تولید در مناطق جدید

با توجه به خونسرد بودن کرم ابریشم، ژنتیک و بیولوژی کرم ابریشم باید با تغییرات محیطی که در آن پرورش می‌یابد هماهنگ شود تا در مناطق جغرافیایی جدید قابل پرورش باشد. تاکنون پیشرفت چندانی در این زمینه مشاهده نشده است، هر

چند که برنامه های اصلاح نژادی توانسته است در مورد سازگار نمودن کرم ابریشم دو نسله[1] و هیبریدهای آن‌ها که متعلق به مناطق معتدله است موفقیت‌های خوبی کسب نموده و سبب توسعه پرورش کرم ابریشم دونسله در مناطق گرمسیری هند نظیر ایالت کارناتاکا[2] و تایلند شود[حسینی‌مقدم، ۱۳۸۲]. گسترش بانک ژن، دست‌یابی به منابع ژنتیکی جدید، دستکاری‌های ژنتیکی و شناسایی ژن‌هایی از جمله پروتئین‌های شوک حرارتی که در این رابطه فعالیت می‌کنند نقش مهمی در برنامه‌ریزی‌ها برای ارائه طرح‌های اصلاح ژنتیکی تحمل کرم ابریشم و تطبیق واریته‌ها در این محیط‌ها دارد.

۱-۳-۲- تداوم تولید در شرایط محیطی غیر یکنواخت

مقاومت در برابر بیماری‌ها، تحمل شرایط نامساعد و رژیم غذایی استاندارد سبب ثبات و پایداری در تولید پیله در هر دوره پرورش می‌شود. توان ژنتیکی کرم ابریشم سبب مقاومت در برابر بیماری‌ها، آفات یا شرایط سخت محیطی شده و یا برعکس موجب افزایش مرگ و میر و کاهش رشد آن‌ها می‌شود. امروزه توصیه می‌شود برای مناطق متفاوت جغرافیایی واریته‌های مختص همان منطقه اصلاح نژاد شده و هیبریدهای آن معرفی شود تا بتوانند نوسانات شرایط محیطی را به خوبی تحمل نمایند. به عنوان مثال در کشور چین واریته‌هایی که در شرق، مرکز و یا جنوب آن کشور عرضه می‌شود با یکدیگر متفاوت است[Hosseini Moghaddam et al., 2008]. این امر جهت ثبات و پایداری تولید پیله به خصوص در پرورش کرم ابریشم یک نسله در مناطق معتدله بسیار مهم است. در ایران نیز می‌توان برای مناطق خراسان ، اصفهان ، گنبد ، یزد و آذربایجان هیبریدهای متفاوتی از آنچه در شمال کشور پرورش داده می‌شود عرضه کرد.

اخیراً برخی خصوصیات فیزیولوژیکی کرم ابریشم توسط متخصصان ژنتیک و پژوهشگران بیوشیمی جهت کمک به متخصصان اصلاح نژاد مورد مطالعه قرار گرفته است. نتایج پژوهش‌های مختلف سبب شد چند لاین حساس یا مقاوم به دماهای بالا نیز شناخته شوند. همچنین ژنی موسوم به STU مسئول مقاومت در برابر دما و رطوبت بالا در لاین مناطق گرمسیری شناخته شده است. در مقایسه با دستاوردهای قابل ملاحظه‌ای که در زمینه کمیت و کیفیت پیله و ابریشم خام به دست آمده است تاکنون پیشرفت چندانی در زمینه افزایش مقاومت و تحمل کرم ابریشم در برابر بیماری و شرایط دشوار محیطی نشده است. محدودیت‌های بیولوژیکی نظیر همبستگی منفی تولید/کیفیت با مقاومت/تحمل تنها بخشی از موانع بهبود این امر هستند. علی‌رغم مشکلات موجود متخصصان اصلاح نژاد کرم ابریشم جهت افزایش مقاومت و تحمل این حشره در برابر بیماری‌ها و شرایط نامساعد محیطی انتظار دارند سرانجام موفق به انتقال ژن‌های مقاومت و تحمل از واریته‌های چند نسله مناطق گرمسیری به خزانه ژنی واریته‌های دو نسله مناطق استوایی شوند که دارای توان تولیدی بالا هستند [بیژن‌نیا و

[1] Bivoltine
[2] Karnataka