

## تأثیر رژیم‌های غذایی مختلف بر بیان ژن آلفا- آمیلاز در لاروهای سن پنجم شب‌پره هندی،

### *Plodia interpunctella* Hubner (Lepidoptera: Pyralidae)

پریا معصومی<sup>۱</sup>، رضا فرشباغ پورآباد<sup>۲\*</sup>، سید ابوالقاسم محمدی<sup>۳</sup> و رضا خاکور<sup>۲</sup>

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد حشره‌شناسی کشاورزی، گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

۲- استاد و استادیار گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

۳- استاد گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

\*مسئول مکاتبه [rfpourabad@yahoo.com](mailto:rfpourabad@yahoo.com)

تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۱۹

تاریخ دریافت: ۹۳/۸/۲۶

#### چکیده

شب‌پره هندی (*Plodia interpunctella* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae) از آفات مهم انباری است که انتشار جهانی داشته و به طیف وسیعی از فراورده‌های انباری از جمله حبوبات و غلات خسارت وارد می‌کند. در این مطالعه، پس از استخراج DNA و RNA کل، و تایید حضور ژن آلفا- آمیلاز در نمونه‌ها با روش PCR معمولی، میزان تغییرات بیان ژن این آنزیم با استفاده از روش Real-time PCR در لاروهای سن پنجم پرورش یافته روی پسته، توت خشک، آلو، خشکباری، دانه گندم و یک رژیم غذایی مصنوعی (شاهد) مورد بررسی قرار گرفت. با انجام تست کارایی PCR برای ژن هدف، راندمان تکثیر دو آغازگر SiAmyC و SiAmy به ترتیب ۹۹ و ۹۸ درصد به دست آمد. بر اساس نتایج، هر چهار رژیم غذایی باعث تغییرات متفاوتی در بیان ژن گردیدند. رژیم غذایی پسته در مقایسه با شاهد باعث افزایش بیان ژن آلفا- آمیلاز به میزان پنج درصد گردید در حالی که سه رژیم غذایی آلو، گندم و توت به ترتیب با ۱۰، ۲۷ و ۶۰ درصد کاهش بیان ژن نسبت به شاهد باعث مهار بیان این ژن در بدن لاروها گردیدند. حداکثر اختلاف بیان ژن آلفا- آمیلاز در لاروهای تغذیه کرده از توت مشاهده شد. نتایج نشان دادند که مهار بیان ژن آلفا- آمیلاز توسط منابع مختلف گلوکز در لاروهای تغذیه کرده از رژیم‌های غذایی مختلف، متفاوت بوده است و بین میزان قند موجود در رژیم غذایی و مقدار بیان ژن آلفا- آمیلاز آن همبستگی معکوس وجود داشت.

واژه‌های کلیدی: استخراج RNA، آلفا- آمیلاز، بیان ژن، سنتز cDNA، رژیم غذایی.

#### مقدمه

ترشحات غدد لوله گوارش حشرات دارای ترکیب متنوع و منحصر به فردی از انواع پروتئازها، آلفا- آمیلازها و لیپازها می‌باشد که با توجه به رژیم غذایی حشره تکامل یافته‌اند (افشار و همکاران ۲۰۱۰). سیستم گوارشی اغلب بالپولکداران، پروتئاز را به عنوان یک آنزیم مهم مورد استفاده قرار می‌دهند، اما آلفا- آمیلازها نیز با تجزیه کردن نسبت‌های مختلفی از ترکیبات نشاسته‌ای موجود در رژیم غذایی، برای تامین

آلوده شدن خشکبار و میوه‌های خشک به شب‌پره هندی *Plodia interpunctella* یکی از مشکلات عمده موجود در انبارداری و عرضه آن‌ها به بازار می‌باشد. این شب‌پره آفتی با انتشار جهانی است که از طریق تغذیه کیفیت، سلامت و بازار پسندی محصولات انباری را کاهش می‌دهد (آزلمات و همکاران ۲۰۰۵).

شب‌پره هندی و ارتباط آن با سطح گلوکز در رژیم غذایی با استفاده از تکنیک Real time PCR مورد مطالعه قرار گرفت. آفات انباری از عوامل مهم نابودکننده ذخیره غذایی انسان می‌باشند. بنابراین، کنترل خسارت ناشی از آن‌ها امری بلامنازع است به طوری که از دیرباز برای کنترل این آفات از روش‌های مختلفی استفاده شده است که مهم‌ترین آن استفاده از سموم شیمیایی است. توسعه سریع مقاومت به سموم در سال‌های اخیر، تلاش‌ها را به سمت استفاده از روش‌های جایگزین سوق داده است و بدین منظور، در ابتدا باید جزییات برهم‌کنش آفت و میزبان به خوبی درک شود. در این مطالعه با استفاده از روش‌های مولکولی رابطه آنزیم و سوبسترا و برهم‌کنش این دو مورد نظر قرار می‌گیرد تا با استفاده از اطلاعات حاصل راه برای انجام تحقیقات جامع‌تر باز شود.

#### مواد و روش‌ها

##### پرورش حشره

کلنی شب‌پره هندی موجود در گلخانه گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تبریز مورد استفاده قرار گرفت. لاروهای این حشره (جنس نر و ماده یک روزه) در شرایط آزمایشگاهی (دمای  $27 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی  $50 \pm 5$  درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی به ۸ ساعت تاریکی) روی چهار رژیم غذایی شامل آلو خشک، توت خشک، مغز پسته و دانه گندم پرورش یافتند. رژیم غذایی مصنوعی (شاهد) نیز متشکل از ۸۰۰ گرم سبوس، ۱۶۰ گرم مخمر، ۲۰۰ میلی‌لیتر گلیسیرین، ۲۰۰ میلی‌لیتر عسل، و ۸/۸ گرم اکسی‌تتراسایکلین (برای پیشگیری از آلوده شدن احتمالی لاروها به بیمارگرهای میکروبی) بود (سیت و همکاران ۱۹۹۷). از لاروهای سن پنجم دو روزه پس از تغذیه از رژیم‌های غذایی ذکر شده، به منظور استخراج RNA و DNA استفاده شد.

انرژی مورد نیاز سلولی به همان اندازه مهم هستند (ترا و فریرا ۱۹۹۴، زو و همکاران ۲۰۰۵ و والنسیا و همکاران ۲۰۰۸). سازوکار بیان ژن‌های رمزگذار آنزیم‌های گوارشی، به وسیله کیفیت مواد مغذی و در دسترس بودن آن‌ها تنظیم می‌شود (کوکر و همکاران ۲۰۱۲). آگاهی از زمان بیان ژن‌های آنزیم‌های گوارشی در لاروهای در حال رشد برای ارزیابی مناسب بودن رژیم غذایی فرموله شده، ضروری می‌باشد (داگلاس و همکاران ۲۰۰۰).

آلفا- آمیلازها یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های گوارشی هستند که پیوندهای آلفا-۱،۴- گلیکوزیدی را در نشاسته، گلیکوژن و سایر کربوهیدرات‌های وابسته، به عنوان منبع انرژی هیدرولیز می‌کنند (فرانکو و همکاران ۲۰۰۰). آمیلازها همچنین در بهبود ظرفیت گوارشی حشرات نقش مهمی ایفا می‌کنند که این امر به زنده‌مانی در شرایط مختلف و افزایش شایستگی آن‌ها کمک می‌کند. آلفا- آمیلازها در مراحل غیرتغذیه‌ای مانند تخم، شفیره و حشره کامل نیز فعال هستند (کوکر و همکاران ۲۰۰۹). در مطالعات انجام شده روی فعالیت آلفا- آمیلازهای بال‌پولک‌داران، بیان ژن‌های آنزیمی و رابطه آن با ترکیب رژیم غذایی نسبتاً ناشناخته باقی مانده است (پارتاساراتی و کوپیناتان ۲۰۰۵، اشواس و همکاران ۲۰۱۰ و نیرنیانک و همکاران ۲۰۱۱). ایزوفرم‌های متعدد آلفا- آمیلازها به ویژه در پاسخ به تغذیه از ماکرومولکول‌های مختلف رژیم‌های غذایی طبیعی، گزارش شده‌اند (کوکر و همکاران ۲۰۰۹). تنوع آلفا- آمیلازها و خانواده چندژنی آن‌ها، نشان‌دهنده رویدادهای همگرایی، مانند پیوندهای دی‌سولفیدی در پروتئین‌ها، از دست دادن موتیف‌ها، تکثیر ژن، از دست دادن اینترون‌ها و غیره می‌باشد (دالاگ و همکاران ۲۰۰۲).

در مطالعه حاضر که اولین مطالعه مولکولی از این نوع در ایران می‌باشد، میزان بیان ژن آلفا- آمیلاز

## آغازگرهای مورد استفاده

برای بررسی وجود ژن الفَا- آمیلاز به روش PCR معمولی و نیز کمی سازی میزان بیان آن با استفاده از Real Time-PCR، توالی آغازگرهای مربوط به ژن بر اساس مطالعات قبلی (شارما و همکاران ۲۰۰۹، کوتکر و

همکاران ۲۰۱۲) تهیه و سنتز گردید. ویژگی های آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است. در این پژوهش از توالی ژن Actin (کوتکر و همکاران ۲۰۱۲) به عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

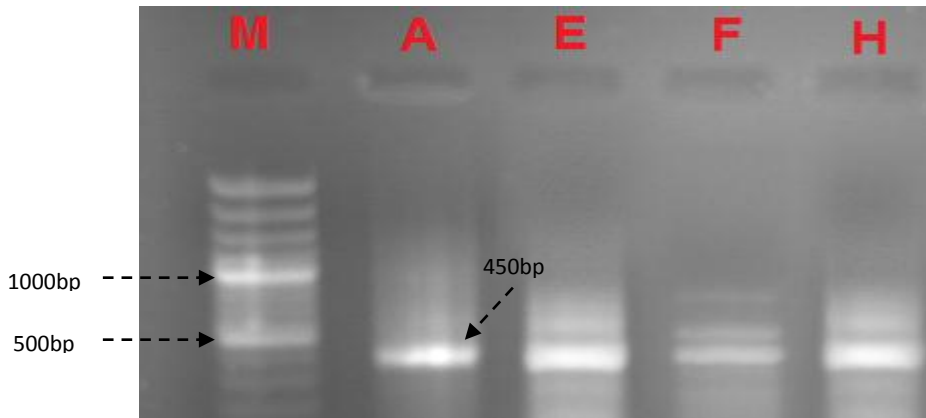
جدول ۱- ویژگی های جفت آغازگرهای مورد استفاده در بررسی الگوی بیان ژن الفَا- آمیلاز شب پره هندی.

نام آغازگر	توالی آغازگر
SiAmyC	F-5' ATGATTCCTCTAATATTACTAGCCGTG 3' R-5' TAGCCGGCTCTGAGGACCAAT
Actin	F-5' GATCGTGC GCGACATCAAG 3' R-5' GCCATCTCCTGCTCGAAGTC 3'
SiAmy	F-5' GTGCACCTCTTCGAATGG 3' R-5' CTCAAATCGGCTGGCCAC 3'

## استخراج DNA

در لاروهای سن پنجم شب پره هندی، DNA به روش CTAB (دویل و دویل ۱۹۹۰) استخراج شد. در این روش، بافت حشره در ازت مایع خرد شده و ۶۰۰ میکرولیتر از بافر پیش آماده CTAB به آن افزوده و به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری ۶۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر از محلول کلروفرم- ایزوامیل الکل (۱:۲۴) به آن افزوده شده و پس از سانتریفیوژ فاز رویی به تیوب جدید انتقال داده شد. پس از اضافه کردن ایزوپروپانول سرد به مدت یک شب در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد، DNA رسوب داده شد. روز بعد پس از چند بار شستشو با اتانول ۷۰ درصد، پلت DNA در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر حل گردید. برای تکثیر و بررسی ژن الفَا- آمیلاز به منظور اثبات وجود آن در بدن حشره، از آغازگرهای اختصاصی SiAmy و SiAmyC هر کدام به میزان نیم میکرولیتر با غلظت نهایی نیم میکرومول، چهار میکرولیتر از Master mix (Ampligon, Denmark) با غلظت ۱x، دو

میکرولیتر از نمونه و سه میکرولیتر آب مقطر استفاده شد. چرخه گرمایی شامل واسرشت سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت دو دقیقه، ۳۰ چرخه شامل واسرشت سازی به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، اتصال آغازگر به مدت ۶۰ ثانیه در دمای ۵۶ تا ۶۰ درجه سانتی گراد، بسط به مدت ۶۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد و در نهایت یک چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت پنج دقیقه بود. برای مشخص کردن دمای بهینه اتصال آغازگرها نیز از چرخه گرمایی ذکر شده استفاده شد. آغازگرهای مورد نظر در یک شیب دمایی در دستگاه ترمال سایکلر (Gradient PCR) قرار داده شدند و با ارزیابی محصول واکنش روی ژل آگارز، بهترین گزینه دمایی (وجود تک نوار که نشانگر دمای اتصال آغازگر بوده است و نشان می دهد که آغازگرها به جایگاه اختصاصی خود متصل شده و توالی مورد نظر را تکثیر کرده اند، شکل ۱) انتخاب گردید.



شکل ۱- الگوهای نواری تشکیل شده از نتایج PCR معمولی در لاروهای سن پنجم شب‌پره هندی در الکتروفورز ژل آگارز ۱/۲ درصد. M: نشانگر. A، E، F و H به ترتیب نوارهای مربوط به لاروهای تغذیه کرده از دانه گندم، آلو خشک، توت خشک و مغز پسته.

شده در کیت منتقل شده و به مدت دو دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. پس از این مرحله به محلول حاصله ۶۵۰ میکرولیتر اتانول ۸۰ درصد (رقیق شده با آب تیمار شده با DEPC) اضافه شد. محلول به ستون جدید<sup>۳</sup> منتقل و به مدت یک دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید و فاز مایع دور ریخته شد. مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از بافر شستشوی<sup>۴</sup> تهیه شده در کیت (رقیق شده با اتانول ۹۵ درصد) به داخل ستون تزریق و به مدت یک دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید و فاز مایع دور ریخته شد. سپس از بافر شستشوی دوم<sup>۵</sup> (رقیق شده با اتانول ۹۵ درصد) مقدار ۵۰۰ میکرولیتر به داخل ستون ریخته و به مدت یک دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید و دوباره فاز مایع دور ریخته شد. مرحله شستشوی پایانی دو مرتبه انجام گردید، بدین صورت که از بافر شستشوی اول ۵۰۰ میکرولیتر به داخل ستون ریخته و به مدت یک دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد و مایع به دست آمده دور ریخته شد. در نهایت، ستون به میکروتیوب جدید (RNase Free) منتقل گردید. به هر یک از نمونه‌ها ۴۰ میکرولیتر از آب تیمار شده با DEPC اضافه شد تا RNA موجود در فیلتر داخل آن حل شود. میکروتیوب‌ها را به مدت یک دقیقه در ۱۰۰۰۰

جهت بررسی RNA و DNA استخراج شده و محصولات PCR به ترتیب از الکتروفورز ژل آگارز ۱ و ۱/۲ درصد و بافر TAE 1X استفاده شد. عکسبرداری نیز با دستگاه Gel-Doc صورت گرفت (سم بروک و راسل ۲۰۰۱).

### استخراج RNA

به منظور پیشگیری از اثر آنزیم RNase و تجزیه RNA، از سرسمپلرها و تیوب‌های RNase Free استفاده شد. همچنین، برای تهیه کلیه محلول‌های مورد نیاز جهت استخراج RNA، آب تیمار شده با DEPC مورد استفاده قرار گرفت. برای استخراج RNA از کیت تجاری Vivantis طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد (Vivantis, USA). بدین منظور ۳۰ میلی‌گرم از بافت حشره شامل کل بدن لارو (لارو سن آخر) در ازت مایع پودر شده، سپس بافت پودر شده را به درون میکروتیوب‌های دو میلی‌لیتری حاوی ۷۰۰ میکرولیتر از محلول استخراج کیت<sup>۱</sup> (پس از اضافه کردن مرکاپتواتانول) ریخته شده و به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه Ultrasonic bath room همگن‌سازی انجام شد. محلول حاصله به مدت سه دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. سپس محلول به ستون‌های<sup>۲</sup> آماده

<sup>۳</sup>RNA binding column

<sup>۴</sup>Wash Buffer

<sup>۵</sup>Inhibitor Removal Buffer

<sup>۱</sup>Buffer TR

<sup>۲</sup>Homogenization column

**واکنش زنجیره ای پلی مرز معکوس (RT-PCR)**

واکنش زنجیره ای پلی مرز معکوس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و آنزیم RT بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد (Thermo Scientific, USA). برای بررسی کیفیت cDNAهای سنتز شده، محصول واکنش زنجیره ای پلی مرز معکوس به عنوان الگو در PCR مورد بررسی قرار گرفت. برای تکثیر و بررسی ژن مورد نظر از آغازگرهای اختصاصی SiAmyC و SiAmy، هر کدام به میزان نیم میکرولیتر با غلظت نهایی نیم میکرومول، چهار میکرولیتر از Master mix با غلظت 1X، دو میکرولیتر از نمونه و سه میکرولیتر آب مقطر استفاده شد. از چرخه گرمایی مشابه PCR معمولی استفاده شد. در نهایت، وجود و عدم وجود باندهای مربوط به ژن الفَا- آمیلاز با الکتروفورز ژل آگارز 1/2 درصد مورد بررسی قرار گرفت.

**بررسی بیان ژن به روش Real-Time PCR**

برای انجام Real-Time PCR از کیت TAKARA و طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد (TAKARA Bio, Japan). برای ژن مورد نظر، از هر نمونه دو تکرار در نظر گرفته شد. چرخه گرمایی شامل واسرشت سازی اولیه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، ۴۰ چرخه با واسرشت سازی به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، اتصال آغازگر به مدت ۶۰ ثانیه در دمای ۵۶ تا ۶۰ درجه و بسط به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه بود. جمع آوری داده ها در انتهای هر چرخه صورت گرفت. پس از اتمام برنامه تکثیر، منحنی ذوب از دمای ۶۰ تا ۹۵ درجه سانتی گراد با شیب افزایش دمایی ۰/۵ درجه سانتی گراد بر ۱۰ ثانیه ترسیم شد. در پایان، با استفاده از نرم افزار LinRegPCR میزان کارایی PCR برای ژن الفَا- آمیلاز محاسبه گردید.

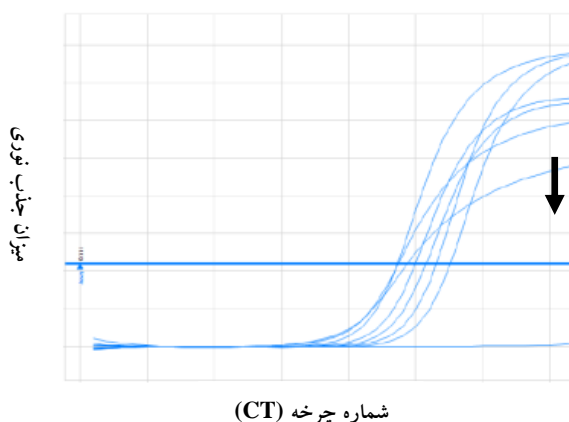
دور سانتریفیوژ کرده و RNA به دست آمده جهت نگهداری در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد قرار داده شد. به منظور اطمینان از کیفیت مطلوب RNA استخراج شده و تعیین غلظت آن، از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج های ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر استفاده گردید. پس از محاسبه غلظت RNA هر نمونه و با توجه به غلظت های محاسبه شده، RNAها با آب تیمار شده با DEPC رقیق شدند و به غلظت ۰/۲ میکروگرم در میکرولیتر رسیدند. سپس، الکتروفورز RNA کل استخراج شده با استفاده از ژل آگارز 1/2 درصد انجام گردید.

**تیمار RNA استخراج شده با آنزیم DNase 1**

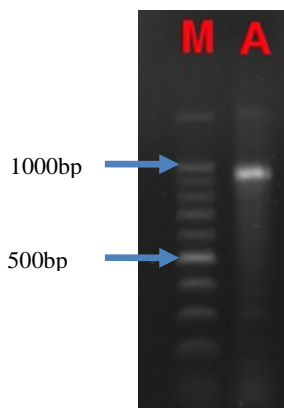
حذف آلودگی DNA ژنومی با استفاده از DNase 1 انجام شد. بدین منظور، در داخل یک میکروتیوب حاوی ۴۰ میکرولیتر RNA، دو میکرولیتر بافر واکنش (10x) و دو میکرولیتر آنزیم DNase 1 اضافه شد و سپس میکروتیوب به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در دستگاه ترمومیکسر قرار داده شد. در ادامه، جهت غیر فعال کردن DNase 1، یک میکرولیتر (0.05mM) EDTA به نمونه ها اضافه گردید و میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد در دستگاه ترمومیکسر قرار داده شد. برای اطمینان از حذف آلودگی های DNA از RNA های استخراج شده، واکنش زنجیره ای پلی مرز با استفاده از RNA تیمار شده با آنزیم DNase1 به عنوان الگو به اجرا گذاشته شد. در صورت حذف کامل DNA، هیچ تکثیری نباید در PCR رخ دهد. همچنین، تکثیر DNA ژنومی مینوز گوجه فرنگی *Tuta absoluta* به عنوان شاهد مثبت با آغازگر SiAmyC و برای حصول اطمینان از انجام PCR در نظر گرفته شد. محصولات واکنش زنجیره ای پلی مرز از طریق الکتروفورز ژل آگارز یک درصد و بافر TAE 1X تفکیک شدند و توسط دستگاه Gel-Doc از آن ها عکس برداری گردید.

رژیم غذایی پسته با رژیم غذایی توت و گندم نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده شد.

Amplification Plot



شکل ۲- نمودار تکثیر ژن آلفا- آمیلاز لاروهای سن پنجم شب‌پره هندی. علامت فلش، مشخص‌کننده Non-Template Control (NTC) می‌باشد.



شکل ۳- وزن DNA، ۱۰۰۰bp، ژن آلفا- آمیلاز حاصل از  
A: PCR

## تجزیه آماری داده‌های حاصل از روش Real-Time PCR

پس از به دست آوردن حد آستانه<sup>۱</sup> (CT) مربوط به هر رژیم غذایی (شکل ۲)، میزان بیان ژن بر اساس مقادیر حدود آستانه‌ای حاصل از تکثیر جفت آغازگرهای اختصاصی روی نمونه‌های مورد آزمایش با استفاده از نرم‌افزار شرکت Illumine محاسبه و به صورت نرخ بیان ژن<sup>۲</sup> برای حشرات پرورش یافته روی رژیم‌های غذایی مختلف اندازه‌گیری شد. تجزیه واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین‌ها (به روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد) با استفاده از نرم‌افزار MSTAT-C انجام گرفت. نرمال‌سازی داده‌ها با استفاده از ژن خانه‌دار Actin انجام گرفت.

### نتایج

#### تایید وجود ژن آلفا- آمیلاز با PCR

طبق نتایج به دست آمده از PCR معمولی، وجود قطعه ۹۰۰ جفت بازی نمایانگر تکثیر این ژن بود (شکل ۳).

#### بررسی کیفیت RNAهای استخراج شده

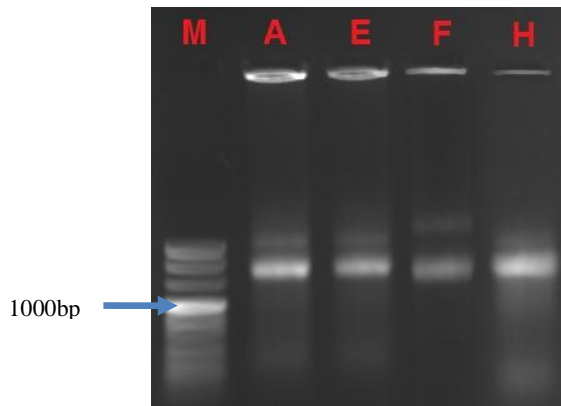
شکل ۴ کیفیت RNAهای استخراج شده را در ژل آگارز ۱/۲ درصد نشان می‌دهد. به طوری که مشاهده می‌شود، RNAهای استخراج شده دارای کیفیت خوبی بودند، علاوه بر این، آلودگی پروتئینی و DNA ژنومی نیز مشاهده نمی‌شود.

#### نرخ بیان ژن

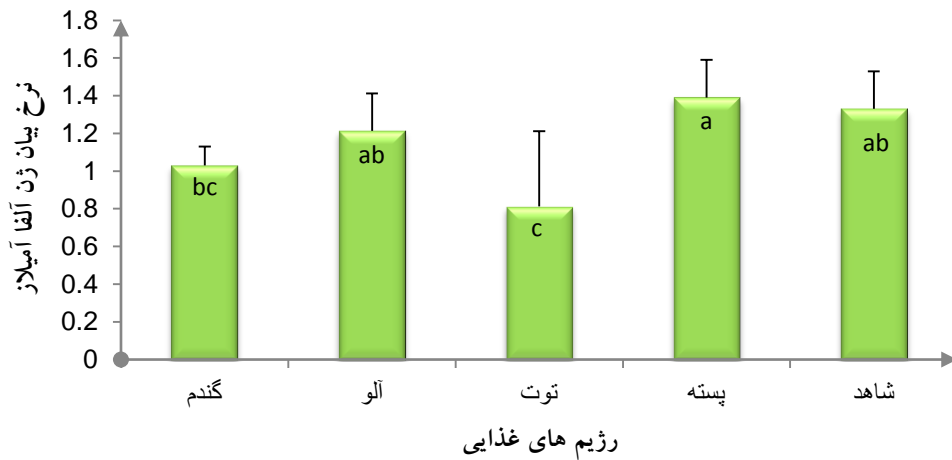
با در نظر گرفتن رژیم غذایی مصنوعی به عنوان شاهد، در رژیم غذایی توت، آلو و گندم کاهش بیان ژن مشاهده گردید ولی در رژیم غذایی پسته در مقایسه با شاهد افزایش بیان ژن مشاهده شد (شکل ۵، جدول ۲). با توجه به نتایج، رژیم‌های غذایی گندم و آلو اختلاف معنی‌داری با رژیم غذایی توت نشان می‌دهند. همچنین، بین

<sup>۱</sup>Cycle of threshold

<sup>۲</sup>Expression rate



شکل ۴- الگوی نواری نمونه‌های RNA استخراج شده در ژل آگارز ۱/۲ درصد. نشانگر وزن: M، A، E، F و H به ترتیب نوارهای مربوط به لاروهای تغذیه کرده از دانه گندم، آلو خشک، توت خشک و مغز پسته.



شکل ۵- نرخ بیان ژن آلفا- آمیلاز لاروهای سن پنجم شب‌پره هندی پرورش یافته روی رژیم‌های غذایی مختلف (حروف، نتایج مقایسه میانگین‌ها را در سطح احتمال ۵ درصد در آزمون چنددامنه‌ای دانکن نشان می‌دهند،  $(LSD(\alpha=0/05)=0/28)$ ).

جدول ۲- میزان گلوکز موجود در رژیم‌های غذایی مورد بررسی و نرخ بیان ژن آلفا- آمیلاز در لاروهای سن پنجم شب‌پره هندی تغذیه

کرده از این رژیم‌های غذایی

رژیم غذایی	میزان گلوکز (گرم بر ۱۰۰ گرم بافت تازه)	نرخ بیان ژن
پسته	۱۵	۱/۳۹۱
توت	۲۴	۰/۸۱۲
آلو	۱۸	۱/۲۱۳
گندم	۲۱	۱/۰۳
رژیم غذایی مصنوعی	۱۶	۱.۳۳

$$(\text{Gene expression} = -0/055(\text{level of glucose}) + 2.21, \text{MSR}^{**} = 0.137, R^2 = 99.5\%)$$

فعالیت آنزیم‌های گوارشی می‌تواند به ماهیت ماده

بحث

موجود در ماده غذایی تنظیم می‌شود. در مطالعه حاضر نیز این نوع تنظیم در شب‌پره هندی مشاهده شد. به طوری که با افزایش میزان گلوکز در رژیم غذایی (توت)، یک خودتنظیمی منفی وارد عمل شد و باعث کاهش میزان بیان ژن آلفا- آمیلاز گردید. همچنین، با افزایش میزان نشاسته در رژیم غذایی (پسته)، حشره برای استفاده از آن نیازمند تجزیه شدن نشاسته به مونومرهای آن (گلوکز) می‌باشد که این امر باعث افزایش میزان بیان ژن آلفا- آمیلاز در بدن حشره می‌شود.

دانه گندم منبع ترکیبات پلی ساکاریدی مانند نشاسته است. این نوع از کربوهیدرات‌ها برای گوارش و جذب به زمان بیشتری نیازمند می‌باشند که این امر باعث افزایش تدریجی و آرام قند خون شده و می‌تواند بیان ژن در لاروهای تغذیه کرده از گندم را توجیه کند. لارو ماده غذایی مورد نیاز خود را یا به روش جذب مستقیم مولکول‌های ساده و یا به روش تجزیه ماکرومولکول‌های پیچیده به کمک آنزیم‌های گوارشی به دست می‌آورد. در مطالعه حاضر نیز در لاروهای تغذیه کرده از پسته (غنی از پلی ساکاریدهای پیچیده) سطح بیان ژن آلفا- آمیلاز از لاروهای تغذیه کرده از توت (غنی از گلوکز) بیشتر بود. به عبارت دیگر چون گلوکز آزاد رژیم غذایی توت نسبت به سه رژیم دیگر با فراوانی بیشتری وجود دارد، به گوارش بیشتر غذا (نشاسته) و در نتیجه ترشح بیشتر آنزیم‌های آلفا- آمیلاز و آلفا- گلوکزیداز نیاز نمی‌باشد. به همین دلیل، بیان ژن نیز کمتر بوده است.

ساکارز یکی از محصولات عمده فرایند فتوسنتز می‌باشد که از برگ به سایر اندام‌ها منتقل می‌شود. در حشرات، پس از تغذیه، ساکارز به گلوکز و فروکتوز تجزیه می‌شود. در پسته غنی از نشاسته و ساکارز، کاهش میزان قند اندک است، در حالی که در آلو که نخیره نشاسته‌ای و ساکارزی کمتری دارد، کاهش قند در سطوح متوسطی رخ می‌دهد. به نظر می‌رسد زمانی که رژیم غذایی لارو دارای مقادیر بالایی از ساکارز باشد،

غذایی یا ترکیبات شیمیایی مصرف شده بستگی داشته باشد (سیلوا و همکاران ۲۰۱۵b)، این امر در نتایج این تحقیق به وضوح نمایان بود و وابستگی میزان فعالیت یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های گوارشی به نوع ماده غذایی مصرف شده مشاهده گردید.

در خیلی از حشرات، تغذیه از رژیم‌های غذایی غنی از نشاسته به کارایی آلفا- آمیلاز وابسته می‌باشد. در حشرات، این آنزیم‌ها همراه با دیگر آنزیم‌های گوارشی توسط سلول‌های پوششی روده سنتز و ترشح می‌شوند (باکر ۱۹۸۳، ترا و فریرا ۲۰۰۵). در مطالعات متعددی، وجود اختلاف در نرخ بیان ژن‌های آلفا- آمیلازها را به تفاوت در شایستگی ژنوتیپ‌ها نسبت داده‌اند (پاول و آنجل‌کاوچ ۱۹۸۳، کلارک و دان ۱۹۸۴، یامازاکی و ماتسو ۱۹۸۴). هیکی (۱۹۸۱) و هیکی و بنکل (۱۹۸۲) بیان داشتند که تفاوت نرخ بیان ژن در ژنوتیپ‌های مختلف و نیز تحت رژیم‌های غذایی متفاوت، پدیده‌هایی جداگانه هستند، ولی در مطالعات بعدی روی مگس *Drosophila melanogaster* نشان داده شد که هر دو عامل رژیم غذایی و ژنوتیپ، دو جنبه از یک پدیده واحد می‌باشند. در بررسی حاضر، تاثیر عامل رژیم غذایی روی بیان ژن آلفا- آمیلاز مشاهده گردید و برای بررسی تاثیر ژنوتیپ روی آن مطالعات بیشتر مورد نیاز می‌باشد.

بنکل و هیکی (۱۹۸۶) نشان دادند که اثر رژیم غذایی نسبت به اثر ژنوتیپ سهم مهم‌تری دارد. به عنوان مثال، لاروی از ژنوتیپ کم‌فعالیت آمیلاز نسبت به لاروی از ژنوتیپ پرفعالیت (که در حضور گلوکز رشد بهتری دارد) می‌تواند در غیاب گلوکز فعال‌تر باشد. آن‌ها به عنوان یک نتیجه بیان داشتند که با اضافه کردن گلوکز به رژیم غذایی حشرات کامل، تفاوت زیادی در فعالیت آلفا- آمیلاز مرحله لاروی دیده نمی‌شود.

سیلوا و همکاران (۲۰۱۵a) نشان دادند که محصول بیان ژن آلفا- آمیلاز با توجه به مقدار نشاسته یا گلوکز



تجزیه نشاسته به مونوساکارید ساکارز، تغییرات محیط را در طول آزمایش افزایش داده است.

تغییر سطح آلفا- آمیلازهای همولنف با توجه به جذب غذا و مرحله نشو و نمایی لاروها پیوسته مورد گزارش قرار گرفته است (سالاما و همکاران ۱۹۹۲، آیات ۱۹۶۱). به نظر می رسد که در همولنف لاروهای چندخوار، کاهش قند تعیین کننده سطح آلفا- آمیلازها باشد. کوتکر و همکاران (۲۰۱۲) بیان کردند که *HaAmy1* و *HaAmy2* در تمام مراحل نشو و نمایی کرم غوزه پنبه وجود دارند. تنظیمات حین رونویسی و پس از رونویسی، نشان دهنده انعطاف پذیری بیان آنزیم های گوارشی در پاسخ به سیگنال های رسیده از رژیم غذایی (کاراسو و همکاران ۲۰۱۱) و مناطق مختلف روده (نیرنیانک و همکاران ۲۰۱۱) می باشد.

نتایج نشان دادند که مهار بیان ژن آلفا- آمیلاز توسط منابع مختلف گلوکز در اثر تغذیه لاروهای تغذیه کرده از رژیم های غذایی مختلف، متفاوت بوده و این امر دیدگاه "وقتی میزبان های غذایی در درشت مغذی های خود تفاوت دارند، آنزیم ها و سوبستراها در روابط خود منعطف تر می باشند وجود تفاوت در درشت مغذی های رژیم های غذایی باعث تغییر رفتار آنزیم ها و سوبستراها می شود" را تایید می کند. وجود پیچیدگی در بیان ژن آلفا- آمیلاز نشان دهنده اجرای مکانیسم سازوکارهای درگیر در تشخیص تعادل مواد غذایی مورد نیاز برای اجتناب از هزینه های شایستگی در حشرات می باشد.

در هنگام بلع غذا، یک منبع آماده از انرژی مولکولی فوراً در دسترس لارو قرار می گیرد که احتمالاً مصرف آلفا- آمیلاز برای هیدرولیز مولکول های پیچیده مانند نشاسته را کاهش می دهد، اما ممکن است سایر آنزیم ها را در تجزیه قندهای بافت گیاه میزبان درگیر کند (کوتکر و همکاران، ۲۰۱۲).

بر اساس نتایج کوتکر و همکاران (۲۰۱۲)، تعدیل ژن های *HaAmy1* و *HaAmy2* توسط ساکارز مهار می شود که نشان می دهد سطوح بالای قند در گیاه میزبان باعث بیان کمتر ژن آلفا- آمیلاز می گردد. با توجه به این همبستگی، جذب مواد غذایی و تعدیل آنزیم های گوارشی از سازگاری های مهم حشرات می باشد.

نتایج مطالعه حاضر بیانگر آنست که لاروهای سنین بالاتر با کنترل رهاسازی آنزیم های خود، توانایی سازگاری با بروز تغییر در ترکیبات تغذیه ای و ضد تغذیه ای ماده ای غذایی را دارا هستند. اگرچه بیان ژن آلفا- آمیلاز متغیر بوده، اما به نظر می رسد که گیاه میزبان در این مورد نقش قابل توجهی دارد. در این تحقیق و برای بررسی مهار آلفا- آمیلاز توسط گلوکز، یک مشکل ذاتی بر سر راه انتخاب نوع آزمایش وجود داشت چرا که متغیر محیط زیست آزمایش (رژیم غذایی پلی ساکاریدی) می تواند تحت شرایطی، یک واکنش عمده را در سطح بیان آلفا- آمیلاز به وجود آورد. آنزیم آلفا- آمیلاز به صورت فعال از روده لاروها و حشرات کامل دفع می شود. لذا در این آزمایش، آلفا- آمیلاز شب پره هندی در محیط غذایی فعال باقی مانده و در نتیجه با

## منابع

- Afshar K, Dufresne PJ, Pan L, Merckx-Jacques M and Bede JC, 2010. Diet-specific salivary gene expression and glucose oxidase activity in *Spodoptera exiqua* larvae. *Journal of Insect Physiology* 59: 1798-1806.
- Ashwath SK, Sreekumar S, Torns JT, Dandin SB and Kamble CK, 2010. Identification of RAPD markers linked to digestive amylase genes using near isogenic lines of the silkworm *Bombyx mori*. *Journal of Insect Science* 10: 1-10.
- Azelmat K, Sayah F, Mouhib M, Ghailani N and El Garrouj D, 2005. Effects of gamma irradiation on fourth-instar *Plodia interpunctella*. *Journal of Stored Products Research* 41: 423-431.

- Baker JE, 1983. Properties of amylases from midguts of larvae of *Sitophilus zeamais* and *Sitophilus granaries*. *Insect Biochemistry* 13: 421-428.
- Benkel BF and Hickey DA, 1986 a. Glucose repression of amylase gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 114: 137-144.
- Clark AG and Doane WW, 1984. Interactions between the amylase and adipose chromosomal regions of *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 38: 957-982.
- Da Lage J, Wormhoudt A and Cariou M, 2002. Diversity and evolution of the alpha amylase genes in animals. *Biologia Bratislava* 57: 181-189.
- Douglas SE, Mandla S and Gallant JW, 2000. Molecular analysis of the amylase gene and its expression during development in the winter flounder, *Pleuronectes americanus*. *Aquaculture* 190: 247-260.
- Doyle JJ and Doyle JL, 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15
- Franco OL, Rigden DJ, Melo FR, Bloch JCP and Grossi MF, 2000. Activity of wheat alpha amylase inhibitors towards bruchid alpha amylase and structural explanation of observed specificities. *European Journal of Biochemistry* 267: 2166-2173.
- Hickey DA and Benkel B, 1982. Regulation of amylase activity in *Drosophila melanogaster*: effects of dietary carbohydrate. *Biochemistry Genetics* 20: 1117-1129.
- Hickey DA, 1981. Regulation of amylase activity in *Drosophila melanogaster*: variation in the number of enzyme molecules produced by different amylase genotypes. *Biochemistry Genetics* 19: 783-796.
- Karasov WH, Martinez Del Rio C and Caviedes-Vidal E, 2011. Ecological physiology of diet and digestive systems. *Annual Review Physiology* 73: 69-93.
- Kotkar HM, Bhide AJ, Gupta VS and Giri AP, 2012. Amylase gene expression patterns in *Helicoverpa armigera* upon feeding on a range of host plants. *Genome* 50: 1-7.
- Kotkar HM, Sarate PJ, Tamhane VA, Gupta VS and Giri AP, 2009. Responses of midgut amylases of *Helicoverpa armigera* to feeding on various host plants. *Journal of Insect Physiology* 55:663-70.
- Ngernyuang N, Kobayashi I, Promboon A, Ratanapo S, Tamura T and Ngensiri L, 2011. Cloning and expression analysis of the *Bombyx mori* alpha amylase gene (*Amy*) from the indigenous Thai silkworm strain, Nanglai. *Journal of Insect Science* 11:38
- Parthasarathy R and Gopinathan KP, 2005. Comparative analysis of the development of the mandibular salivary glands and the labial silk glands in the mulberry silkworm, *Bombyx mori*. *Gene Expression Patterns* 5: 323-339.
- Powell JR and Andjelkovic M, 1983. Population genetics of *Drosophila* amylase. 4. Selection in laboratory populations maintained on different carbohydrates. *Genetics* 103: 675-689.
- Sait SA, Begon M, Thompson DJ, Harvey JA and Hails RS, 1997. Factors affecting host selection in an insect host-parasitoid interaction. *Ecological Entomology* 22:225-230.
- Salama MS, Schouest LP and Miller TA, 1992. Effect of diet on the esterase patterns in the hemolymph of the corn earworm and the tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* 85: 1079-1087.
- Sambrook J and Russell DW, 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sharma P, Shankar PR, Subramaniam G, Kumar A, Tandon A, Suresh CG, Rele MV and Kumar LS, 2009. Cloning and sequence analysis of the amylase gene from the rice pest *Scirpophaga incertulas* Walker and its inhibitor from wheat (variety MP sehore). *International Journal of Insect Science* 1: 29-44.

- Silva CP, Terra WR, Desa MFG, Samuels RI, Isejima EM, Bifano TD and Almeida JS, 2001a. Induction of digestive alpha amylase in larvae of *Zabrotessub fasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) in response to ingestion of common bean alpha amylase inhibitor 1. *Journal of Insect Physiology* 47: 1283-1290.
- Silva CP, Terra WR, Xavier-Filho J, Grossi de Sa MF, Isejhma EM, DaMatta RA, Miguens FC and Bifano TD, 2001b. Digestion of legume starch granules by larvae of *Zabrotessub fasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) and the induction of alpha amylase in response to different diets. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31: 41-50.
- Terra WR and Ferreira C, 1994. Insect digestive enzymes: properties compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology* 109: 1-62.
- Terra WR and Ferreira C, 2005. Biochemistry of digestion. Pp.55-68. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S.S. (eds.) *Comprehensive Molecular Insect Science. Biochemistry and Molecular Biology Vol.4*. Elsevier, Amsterdam.
- Valencia-Jimenez A, Arboleda JW, Lopez Avila A, and Grossi-de-Sa MF, 2008. Digestive alpha amylase from *Tecia solanivora* larvae: response to pH, temperature and plant amylase inhibitors. *Bulletin of Entomological Research* 98: 575-579.
- Wyatt GR, 1961. The biochemistry of insect haemolymph. *Annual Review of Entomology* 6: 75-102.
- Yamazaki T and Matsuo Y, 1984. Genetic analysis of natural populations of *Drosophila melanogaster* in Japan. 3. Genetic variability of inducing factors of amylase and fitness. *Genetics* 108: 223-235.
- Zhu YC, Liu X, Maddurb AA, Oppert B and Chen MS, 2005. Cloning and characterization of chymotrypsin and trypsin-like cDNAs from the gut of the Hessian fly. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35: 23-32.

## Effect of Four Different Nutrition Regimes on the Alpha-Amylase Gene Expression in *Plodia interpunctella* Hubner (Lepidoptera: Pyralidae)

P Masoumi<sup>1</sup>, R Farshbaf Pourabad<sup>2</sup>, SA Mohommadi<sup>3</sup> and R Khakvar<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Former MSc Student of Agricultural Entomology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran.

<sup>2</sup>Professor and Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran.

<sup>3</sup>Professor, Department of Plant Breeding, and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran.

\*Corresponding author: [rfpourabad@yahoo.com](mailto:rfpourabad@yahoo.com)

Received: 17 Nov 2014

Accepted: 8 Feb 2015

### Abstract

*Plodia interpunctella* Hubner (Lepidoptera: Pyralidae) is a cosmopolitan species known to infest a wide range of dried plant materials, including legumes and cereals. In this study, after confirmation of the presence of alpha-amylase gene in samples using gene specific primers, total RNA was extracted from fifth instar larvae of *P. interpunctella*, grown on the five different nutrition regimes including pistachio, white mulatto, plum, wheat and artificial diet (as control). After synthesis of cDNA, change in gene expression was studied with Real-time PCR assay. PCR performance test indicates 99 and 98% amplification efficiency for SiAmy and SiAmyC primers, respectively. Different nutrition regimes caused differential change in the expression of the gene. In comparison with the control, pistachio regime caused 5% increase in the expression of the alpha-amylase gene, whereas 10%, 27% and 60% decreases were observed in the larva grown on plum, wheat and mulatto respectively. Maximum variation in expression of alpha-amylase gene was observed in the larvae fed on mulatto. The results showed that the inhibition of alpha-amylase gene expression varied in the different sources of glucose in larvae fed on different diets and there was a negative correlation between the amount of sugar in the diet and alpha-amylase gene expression.

**Keywords:** Alpha-amylase, Alpha-amylase gene diets, cDNA synthesis, Gene expression, RNA extraction, RT-PCR, Real-time PCR.