خاموشی ژن سم زدای CYP6CM1 در سفیدبالک پنبه *Bemisia tabaci* (Gennadius.) با استفاده از تکنیک RNAi

مسلم بسیج[1*]، خلیل طالبی[2]، وحید حسینی نوه[3] و سید علیرضا سلامی[4]

۱- *نویسنده مسوول: استادیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران (moslembasij2014@gmail.com)

۲- استاد، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۴- استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۸/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۲/۲۲

چکیده

سفیدبالک *Bemisia tabaci* (Gennadius.) یکی از مهمترین آفات گیاهان زراعی و محصولات زینتی در جهان است و مشاهده شده است که قابلیت مقاوم شدن به بسیاری از گروه‌های حشره‌کش‌ها را دارد. این آفت توانایی بروز مقاومت به گروه‌های مختلف حشره‌کش از جمله نئونیکوتونوئیدها را دارا می‌باشد. در مطالعه‌ی حاضر تاثیر استفاده از تکنیک خاموشی ژن (RNAi) ژن CYP6CM1 به عنوان یکی از اصلی‌ترین ژن‌های مسئول بروز مقاومت به نئونیکوتینوئیدها روی سطح نسبی بیان، اندازه مقاومت و میزان فعالیت آنزیم سیتوکروم P450 در دو جمعیت سفیدبالک پنبه مقاوم و حساس در برابر حشره‌کش ایمیداکلوپرید مورد ارزیابی قرار گرفت.کلنی جمعیت‌های سفیدبالک پنبه روی برگ‌های گیاه گوجه و در اتاقک رشد پرورش یافت. RNA دو رشته‌ای ژن CYP6CM1 با استفاده از پرایمرهای اختصاصی سنتز شد و آزمایشات زیست‌سنجی پس از وارد کردن dsRNA به داخل بدن حشره از طرق دریافت دهانی و با محاسبه مقدار LC50 و نسبت مقاومت با استفاده از نرم‌افزار کامپیوتری Ploplus انجام شد. اندازه‌گیری فعالیت مونواکسیژناز نیز با استفاده از زیر نهشت ۷- اتوکسی کومارین انجام شد. آنالیز داده‌ها نشان داد که تغذیه دهانی dsRNA به طور موثری میزان سطح بیان نسبی ژن CYP6CM1 (۲ برابری)، اندازه مقاومت (۵/۳ برابری) و میزان فعالیت آنزیم سیتوکروم P450 (٤٥ درصدی) را در جمعیت مقاوم تغذیه‌شده با CYP6CM1dsRNA کاهش داد. کاهش چند برابری اندازه مقاومت بیانگر امکان استفاده عملی از تکنیک RNAi در مدیریت مقاومت *B. tabaci* می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: Bemisia tabaci، ایمیداکلوپرید، مقاومت به حشره‌کش‌ها، خاموشی ژن، CYP6CM1dsRNA

مقدمه

سفیدبالک *Bemisia tabaci* (Gennadius Hem., Aleyrodidae) حشره‌ای پلی‌فاژ با دامنه میزبانی وسیع است که روی بسیاری از گونه‌های گیاهی فعالیت کرده و از شیره گیاهی یا همان محتویات آوندهای آبکش گیاهان تغذیه می‌کند. این گونه دارای اهمیت فراوان روی گیاهان زینتی، سبزی و صیفی و زراعی است. علاوه بر ایجاد خسارت مستقیم به دلیل تغذیه و تولید عسلک، با انتقال ویروس‌های گیاهی، خسارت غیر مستقیم نیز ایجاد می‌کند (De Barro et al., 2011; Legg et al., 2014; Yokomi et al., 1990; Bedford et al., 1994). این حشره دارای پراکنش گسترده‌ای است و در تمام قاره‌ها یافت می‌شود و بیش از ۶۰۰ میزبان شناخته شده گیاهی دارد (Oliveira et al., 2001). این آفت به دلایل

کوتاهی سیکل زندگی که بسته به شرایط محیطی ۲۲-۱۵ روز طول می‌کشد و تعداد نسل زیاد که در شرایط مناسب به ۱۲-۹ نسل در سال می‌رسد در برابر آفت‌کش‌ها به‌سرعت از خود مقاومت نشان می‌دهد. از جمله آفت‌کش‌هایی که به‌طور گسترده علیه سفیدبالک مصرف دارند حشره‌کش‌های نئونیکوتینوئیدی از جمله حشره‌کش ایمیداکلوپرید می‌باشد. نئونیکوتینوئیدها از پرمصرف‌ترین حشره‌کش‌ها در جهان امروز محسوب شده و حدود ۱۵/۷ درصد از فروش جهانی حشره‌کش‌ها را به خود اختصاص داده‌اند و برای کنترل آفات مکنده‌ای ازجمله شته‌ها، زنجره‌ها و سفیدبالک‌ها استفاده می‌شوند (James and Price, 2002). یکی از جدی‌ترین مشکلات در مدیریت کشاورزی و بهداشت عمومی پدیده مقاومت است که با طولانی شدن سابقه مصرف یک آفت‌کش علیه یک آفت به وجود می‌آید. چنانچه در این زمینه پیش‌گیری‌های لازم به عمل نیاید، بی‌شک در آینده صدمات جبران‌ناپذیری چه از نظر تولید فرآورده‌های کشاورزی و چه از نظر بهداشت و سلامت عمومی وجود خواهد داشت. حشرات مقاوم از جمله عجایب علم فیزیولوژی محسوب می‌شوند به‌طوری که برخی از سویه‌ها تا بدان حد نسبت به یک حشره‌کش مقاوم می‌شوند، که قادرند هر دزی از حشره‌کش را تحمل کنند. به‌عنوان مثال Ghadamyari et al. (2008) نشان دادند که یکی از سویه‌های مقاوم شته هلو، *Myzus persicae* به هر دزی از حشره‌کش پریمیکارب مقاوم است، به‌طوری که میسر نشد که اندازه LC_{50} را برای آن اندازه‌گیری کنند. جدا از این‌که هزینه‌های تهیه و تکوین حشره‌کش‌ها و کنه‌کش‌های جدید زیاد است، در بسیاری از موارد ترکیبات جایگزین برای حشره‌کش‌ها و کنه‌کش‌های قبلی که آفات نسبت به آن‌ها مقاوم شده‌اند، وجود ندارد. همه این موارد سبب شده که بشر برای مقابله با عوارض ناخواسته حاصل از بروز مقاومت، روشی را به نام مدیریت مقاومت به حشره‌کش‌ها[1] طراحی کند که در چهارچوب آن از توسعه مقاومت جلوگیری کرده و یا مقاومت ایجاد شده را از بین ببرد. راهبردهای منطقی، استفاده از حشره‌کش‌ها در قالب مدیریت تلفیقی آفات[2] می‌باشد که سبب ممانعت، تأخیر یا بازگرداندن مقاومت ایجاد شده است (Scott, 1990).

RNAi یک فرایند سلولی است که در آن mRNA توسط RNA های کوچکی که مکمل بخشی از mRNA هدف است، مورد حمله قرار گرفته و از بین می‌رود. این عمل منجر به مهار اختصاصی بیان ژن با توجه به توالی آن خواهد شد (Huvenne and Smagghe, 2010). این موضوع به اثبات رسیده است که RNAi در چندین زمینه تحقیقاتی از جمله در ژنومیکس برای تعیین کارکرد ژن و خاموشی ژن در یوکاریوت‌ها و در داروسازی برای کنترل سرطان و بیماری‌های ویروسی بسیار امید بخش بوده است. در بیوتکنولوژی به دلیل تخصصی عمل کردن، RNAi پتانسیل زیادی دارد و میتواند به عنوان یک روش اختصاصی در کنترل حشرات به کار گرفته شود (Huvenne and Smagghe, 2010). از مشکلات آفت‌کش‌ها می‌توان به این موضوع نیز اشاره کرد که اغلب آفت‌کش‌ها موجودات غیر هدف را هم از بین می‌برند اما مزیت استفاده از RNAi در این است که با استفاده از این روش کنترل و با خاموش کردن ژن‌های حیاتی حشره، تنها موجودات هدف از بین رفته و برای موجودات غیر هدف بی‌زیان خواهد بود (Price and Gatehouse, 2008). در ایران تا به حال در زمینه امکان کنترل حشرات با استفاده از خاموشی ژن (تداخل در RNA) تحقیق زیادی صورت نگرفته است که در این تحقیق سعی شده است که این مهم مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

جمع آوری و پرورش سفیدبالک پنبه

با توجه به نتایج پژوهش Basij et al. (2016) شفیره‌های بیوتیپ B جمعیت‌های مقاوم جیرفت (جمع‌آوری‌شده از گلخانه‌های جیرفت) و حساس

1 - Insecticide Resistance Management

2 - Integrated Pest Management

رفسنجان (جمعیت آزمایشگاهی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه ولی عصر رفسنجان) مورد آزمون در این مطالعه قرار گرفت. جمعیت‌های مذکور به‌طور جداگانه در قفس‌های چوبی با پوشش توری به ابعاد ۴۰ × ۵۰ × ۷۰ سانتیمتر در اتاقک‌های پرورش روی گیاه گوجه‌فرنگی در دمای ۲ ± ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۱۰ ± ۶۵ درصد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری و پرورش یافت. با پرورش هر یک از این جمعیت‌ها و استقرار آن‌ها در شرایط پرورشی کنترل‌شده، حشرات هم‌سن از آنها برای آزمون‌های زیست‌سنجی، بیوشیمیایی و ملکولی جمع‌آوری گردید.

مراحل آزمایشگاهی خاموشی ژن

استخراج آر. ان. ای کل

برای استخراج آر. ان. ای کل، از ۲۵۰ عدد حشره بالغ سفیدبالک فریز شده در منفی۸۰ درجه سلسیوس استفاده شد. هاون‌ها با ازت مایع سرد و سپس هموژن کردن حشرات به کمک ازت انجام گرفت. به کمک اسپاتول‌های استریل، بافت پودر شده به تیوب ۱/۵ میلی‌لیتری از قبل سرد شده منتقل شد. استخراج آر. ان. ای با استفاده از بایوزول (Invitrogen, USA) و براساس پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت. تمامی وسایل مورد نیاز برای استخراج آر. ان. ای اعم از تیوب‌ها، شیشه‌های نگهداری محلول‌های مورد نیاز و هاون همگی به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱ اتمسفر اتوکلاو شدند. همچنین برای تهیه تمامی محلول‌های مورد نیاز برای استخراج آر. ان. ای از مواد و آب استریل عاری از RNase استفاده گردید.

بررسی کمی و کیفی آر. ان. ای استخراج شده

به منظور بررسی کیفیت آر. ان. ای‌های استخراج شده، الکتروفورز آر. ان. ای کل انجام گردید. به این منظور، محلولی شامل ۰/۵X TBE و آگارز ۱/۲ درصد حرارت داده شد تا آگارز کاملاً حل شود. ژل در کاستی که به طور افقی روی پایه ثابت شده بود و شانهٔ مورد نظر به طور عمودی روی آن قرار داشت ریخته شد و به مدت ۳۰ دقیقه باقی ماند تا کاملاً ببندد. سپس در تانک الکتروفورز حاوی بافر تانک TBE گذاشته و شانه برداشته شد. در این مرحله ۲ میکرولیتر از آر. ان. ای استخراج‌شده و یک میکرولیتر ژل‌رد[1] در چاهک تزریق گردید. سیستم الکتروفورز به منبع تغذیه وصل و با توجه به ابعاد تانک از ولتاژ ۱۰۰-۶۰ ولت استفاده شد. کیفیت آر. ان. ای‌ها توسط دستگاه Gel-Doc در طول موج‌های ماوراء بنفش (UV) مشاهده و بررسی شد. برای اطمینان از این که مقادیر یکسانی برای ساخت سی. دی. ان. ای[2] مورد استفاده قرار گیرد، آر. ان. ای‌های استخراج شده توسط نانودراپ کمیت سنجی شدند. به این منظور با استفاده از دستگاه نانودراپ نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر، ۲۶۰ به ۲۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شده و غلظت آر. ان. ای هر نمونه محاسبه گردید. از آب مقطر برای کالیبره نمودن دستگاه استفاده شد و ۲ میکرولیتر از هر نمونه برای اندازه گیری روی سنسور دستگاه قرار گرفت. بعد از هر اندازه گیری، سنسور با آب مقطر شستشو داده شده و با کاغذ صافی خشک گردید.

سنتز سی. دی. ان. ای

واکنش سنتز سی. دی. ان. ای با استفاده از کیت iScript synthesis cDNA شرکت BIO-RAD با سه تکرار تکنیکی صورت گرفت. مخلوط واکنش شامل ۱۱ میکرولیتر RNA تیمار شده با DNase ، دو میکرولیتر مخلوط واکنش بافر iScript (10X) و یک میکرولیتر آنزیم رونوشت بردار معکوس iScript بود که نهایت با اضافه کردن شیش میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز، حجم مخلوط واکنش به ۲۰ میکرو لیتر رسانده شد. ابتدا با توجه به تعداد واکنش‌های مورد نظر محلول مادر تهیه گردید. سپس محلول مادر به میزان ۹ میکرولیتر در میکروتیوپ‌های ۰/۲ میلی‌لیتر تقسیم شد و

1- Gel-Red
2- cDNA

بعد از آن آر. ان. ای تیمارهای مورد نظر جداگانه به هر واکنش اضافه گردید. به منظور ساخت رشته سی. دی. ان. ای، نمونه‌ها در دستگاه ترمال سایکلر[1] قرار گرفتند. انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، ساخت سی. دی. ان. ای در دمای ۴۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه و غیرفعال‌سازی آنزیم در دمای ۸۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. برای اطمینان از ساخت و کنترل کیفیت، سی. دی. ان. ای‌ها با استفاده از آغازگرهای ژن مرجع 16S rRNA تحت واکنش پی. سی. آر قرار گرفتند. مخلوط واکنش شامل دو میکرولیتر سی. دی. ان. ای و دو میکرولیتر بافر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۱۰X شرکت فرمنتاز[2]، ۰/۸ میکرولیتر دی. ان. تی. پی[3]، ۰/۶ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ پیکومول، یک میکرولیتر آنزیم تک دی. ان. ای پلی مراز (معادل یک واحد) بود که در نهایت با اضافه کردن ۱۳ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر استریل، حجم مخلوط واکنش پی. سی. آر. به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. واکنش پی. سی. آر. طبق پروفایل حرارتی ذیل انجام گرفت. چرخه‌های حرارتی شامل ۹۴ درجه سلسیوس برای واسرشت سازی اولیه به مدت ۲ دقیقه، تعداد ۳۵ چرخه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، دمای ۵۸ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه جهت اتصال آغاز گرها و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه برای تکثیر قطعات و در نهایت یک چرخه ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه برای تکمیل بسط انجام شد.

سنتز و تولید آران‌ای دو رشته‌ای CYP6CM1

جهت ساخت سی‌دی‌ان‌ای از جفت آغازگر با ترادف نوکلئوتیدی 3'TAATACGACTCACTATAGGG5' و 3'TAATACGACTCACTATAGGG5' استفاده شد. سنتز آر. ان. ای. دو رشته‌ای CYP6CM1 با استفاده از کیت MEGAscript®RNAi Kit (Ambion,USA) و بر اساس پروتکل شرکت سازنده انجام شد. بر اساس پروتکل مربوطه محصولات PCR که دارای پروموتور T7 در هر دو طرف می‌باشند به عنوان الگو مورد استفاده قرار گرفتند. چرخه‌های حرارتی شامل ۹۴ درجه سلسیوس برای واسرشت‌سازی اولیه به مدت ۳ دقیقه، تعداد ۳۵ چرخه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، دمای ۵۶ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه جهت اتصال آغازگرها و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه برای تکثیر قطعات و در نهایت یک چرخه ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه برای تکمیل بسط انجام شد. خالص‌سازی dsRNA به وسیله‌ی ستون‌های Ambion® MEGAclear انجام شد. در نهایت غلظت dsRNA سنتز شده با استفاده از دستگاه نانو دراپ تعیین گردید.

تغذیه dsRNA بوسیله حشرات بالغ سفیدبالک

جهت تغذیه dsRNA به وسیله حشرات بالغ سفیدبالک از رژیم غذای مصنوعی (Kumar et al., 2009) استفاده شد. تغذیه حشرات مورد آزمایش در تیوب‌های ۳۰ میلی‌لیتری که فضایی برای تهویه نیز داشت انجام شد. ۱۰۰ میکرولیتر رژیم غذای مصنوعی (حاوی/ بدون dsRNA) بین دولایه پارافیلم استریلیزه شده و تعبیه شده داخل سرپوش تیوب‌ها قرار داده شد. سرپوش‌ها به صورت روزانه با سرپوش‌های حاوی غذای مصنوعی جدید جایگزین شدند تا احتمال آلودگی میکروبی کم شود. بر اساس مطالعه (Upadhyay et al., 2011; Li et al, 2015) حشرات بالغ هم سن سفید بالک با غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر dsRNA تغذیه شدند.

پاسخ حشرات بالغ سفیدبالک تغذیه شده با dsRNA به حشره کش ایمیداکلوپرید

حشرات بالغ سفیدبالک بعد از تغذیه به مدت دو روز با dsRNA جهت آزمایشات زیست‌سنجی مورد استفاده قرار گرفتند. حشرات بالغ تیمار شده با dsRNA با محلول غذای مصنوعی محتوی ۲۰ میکروگرم

1- Thermal cycler
2- Fermentas
3- dNTP

ایمیداکلوپرید تغذیه شدند. مرگ‌ومیر با شمارش حشرات مرده در کف تیوب‌ها محاسبه گردید. آزمایشات در سه تکرار انجام شد و داده ها با نرم‌افزار آماری Polo-Plus تجزیه و تحلیل و مقادیر LC_{50} و نسبت مقاومت حشرات بالغ سفیدبالک مورد تغذیه با dsRNA و تغذیه شده بدون dsRNA محاسبه گردید. حشرات تیمار شده با حشره‌کش ایمیداکلوپرید در شرایط اتاقک رشد با دمای ۲ ± ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵ ± ۶۰ درصد و دوره‌ی روشنایی ۱۶:۸ (تاریکی : روشنایی) نگهداری شدند. بعد از ۷۲ ساعت حشراتی که نتوانستند با تحریک با نوک قلم مو حرکت کنند مرده محسوب شدند.

اندازه‌گیری فعالیت سیتوکروم P450

سنجش فعالیت سیتوکروم P450 در جمعیت مقاوم پس از تغذیه توسط CYP6CM1dsRNA از زیرنهشت-۷-اتوکسی‌کومارین[1] استفاده شد. در این پژوهش سنجش فعالیت آنزیم مونواکسیژناز سیتوکروم P450 بر اساس روش میکروفلورومتریک[2] با استفاده از آ-دی اتی لاسیون[3] سوبسترای۷- اتوکسی کومارین و طبق روش Stumf and Nauen (2002) با کمی تغییرات انجام شد. برای اندازه‌گیری فعالیت سیتوکروم P450، ۳۰۰ عدد حشره کامل سفیدبالک در یک میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (اسیدیته‌ی ۷/۲) که دارای ۱ میلی‌مولار DTT و ۲۰۰ میلی‌مولار سوکروز بود در دمای ۴ درجه سلسیوس هموژنایز و در ۵۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۵ دقیقه و دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند. محلول رونشین به دست آمده در۱۰۰۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت یک ساعت سانتریفیوژ شد. میکروزومال پلیت[4] (ته‌نشین سانتریفیوژ در دور بالا) در ۳۰۰ میکرولیتر از بافر فسفات بالا دوباره حل شد و به‌عنوان منبع آنزیمی مورد استفاده قرارگرفت. مخلوط واکنش اولیه شامل: ۲۳/۵ میکرولیتر بافر فسفات ، ۲/۵ میکرولیتر ۷-اتوکسی کومارین (۲۰ میلی‌مولار) و ۱۴میکرولیتر NADPH (۱۰ میلی‌مولار) بود که با اضافه کردن ۳۰ میکرولیتر نمونه آنزیمی آماده و درون پلیت ریخته شد. سپس پلیت در درون دستگاه میکروپلیت ریدر با دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. بعد از سپری شدن این زمان ۲۲/۵ میکرولیتر از مخلوط گلوتاتیون احیاءشده و اکسیدشده که شامل ۱۲ میکرولیتر گلوتاتیون اکسیدشده ۳۰ میلی‌مولار، ۵ میکرولیتر گلوتاتیون احیاء شده و ۱۲ میکرولیتر آب مقطر بود، به پلیت اضافه و در دمای اتاق به مدت ۱۰دقیقه واکنش آنزیمی کامل شد. با بکار بردن ۱۵۰ میکرولیتر استونیتریل (۵۰٪ استونیتریل در بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته‌ی ۷) واکنش آنزیمی متوقف شد. مقدار ۷- هیدروکسی کومارین[5] ۴۶۵ نانومتر (طول موج برانگیختن) و در حالی‌که خروجی ۳۹۰ نانومتر (طول موج ساطع) بود سنجش شد. سنجش پروتئین نمونه‌ها با استفاده از روش (Lowry et al., 1951) انجام شد.

بررسی تاثیر dsRNA در خاموشی ژن CYP6CM1 با استفاده از qRT-PCR

برای بررسی تاثیر dsRNA روی خاموشی ژن مورد نظر، نمونه‌برداری در زمان‌های مختلف ۲، ۳، ۴، ۵ و۶ روز پس از تغذیه حشرات با dsRNA صورت گرفت. و استخراج RNA و ساخت cDNA به صورت مشابه با مراحل قبلی انجام شد. در نهایت بیان ژن با استفاده از qRT-PCR در حشرات تیمارشده و کنترل به صورت مقایسه‌ای انجام شد. در تمامی آزمایشات بیان ژن از ژن کنترل Actin با توالی Forward (ACGACCAGCCAAGTCCAAACG) و توالی Reverse (GGCATCACACTTTCTACAATGAG) بعنوان کنترل داخلی استفاده شد. واکنش ریل تایم پی. سی. آر با استفاده از کیت Power SYBR Green PCR Master Mix انجام شد. اجزای مخلوط واکنش

1 - 7-Ethoxycoumarin (7EC)
2- Microfluorimetric
3- O-deethylation
4 - Microsomal pellet
5 - 7-hydroxycoumarin

شامل دو میکرولیتر سی. دی. ان. ای (۱:۲۰ رقیق شده)، ۱۰ میکرولیتر مخلوط واکنش SYBR Green، یک میکرولیتر آغازگر رو به جلو (۱۰ میکرومولار) و یک میکرولیتر آغازگر برگشتی (۱۰ میکرومولار) بود که در نهایت با اضافه کردن شش میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر استریل، حجم مخلوط واکنش ریل تایم پی. سی. آر به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. به منظور اجتناب از بروز هر گونه اختلاف در تهیه مخلوط واکنش بین تیمارهای مختلف، همواره مخلوط واکنش با حجم متناسب با تعداد نمونه مورد آزمایش تهیه شد و در چاهک‌های پلیت مخصوص ریل تایم پی. سی. آر تقسیم گردید و بعد از اضافه کردن سی. دی. ان. ای از تیمارهای مختلف به آن‌ها، روی پلیت با چسب شفاف مخصوص پوشانده شد. پس از آن پلیت با استفاده از سانتریفوژ، اسپین شده و در دستگاه ریل تایم پی. سی. آر (StepOne, ABI) قرار گرفت. پروفایل حرارتی شامل مرحله واسرشت‌سازی اولیه ده دقیقه در ۹۵ درجه سلسیوس سپس ۴۰ چرخه (شامل ۱۵ ثانیه در ۹۵ درجه سلسیوس، یک دقیقه در ۶۰ درجه سلسیوس) بود. پس از اتمام واکنش پی. سی. آر برای رسم منحنی ذوب واکنش در دمای ۹۵-۶۰ درجه سلسیوس با اختلاف ۰/۵ درجه در هر چرخه انجام گرفت.

در نهایت میزان بیان ژن با روش $\Delta\Delta C_T$ محاسبه گردید. در این روش همه داده‌ها با ژن خانه‌دار *Actine* به عنوان کنترل داخلی نرمال شد. یکی از روش‌های مناسب برای آنالیز تغییرات نسبی در بیان ژن برای آزمون‌های ریل تایم پی. سی. آر روش $۲^{-\Delta\Delta CT}$ می‌باشد. در این روش تفاوت نسبی در سطح بیان ژن هدف در نمونه‌های مختلف با استفاده از مراحل زیر قابل تعیین است. ابتدا نرمال کردن مقادیر C_T ژن هدف با استفاده از ژن مرجع برای نمونه تیمار شده و نمونه شاهد انجام می‌گیرد.

ΔC_T(نمونه تیمار شده) = C_T (ژن هدف در تیمار) – C_T(ژن مرجع در تیمار)

ΔC_T(نمونه شاهد) = C_T (ژن هدف در شاهد) – C_T (ژن مرجع در شاهد)

سپس نرمال سازی ΔC_T نمونه تیمار با ΔC_T شاهد انجام می‌گیرد.

$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ (نمونه تیمار شده) - ΔC_T (نمونه شاهد)

در نهایت نیز نسبت بیان محاسبه می شود.

نسبت بیان نرمال شده = $۲^{-\Delta\Delta CT}$

نتایج و بحث

پاسخ حشرات بالغ سفیدبالک تغذیه شده با dsRNA به حشره کش ایمیداکلوپرید و ارزیابی میزان فعالیت سیتوکروم P450

برای ارزیابی کلی مشارکت CYP6CM1 dsRNA در مقاومت جمعیت‌های سفیدبالک به حشره‌کش ایمیداکلوپرید در مرحله نخست اثر خاموشی ژنCYP6CM1 بوسیله تکنیک RNAi بر مقاومت حشرات بالغ بوسیله‌ی آزمایش‌های زیست‌سنجی و اندازه نسبت مقاومت به روش معمول اندازه گیری LC50 ارزیابی شد. نتایج اندازه‌های LC_{50} حشره کش ایمیداکلوپرید روی حشرات بالغ سفیدبالک تغذیه شده با CYP6CM1 dsRNA و بدون تغذیه با dsRNA در جمعیت مقاوم جیرفت و جمعیت حساس رفسنجان بیانگر کاهش مقدار LC50 در جمعیت تغذیه شده با dsRNA نسبت به جمعیت تغذیه نشده بود (جدول ۱). همچنین این نتایج حاکی از کاهش ۵/۳ برابری مقدار نسبت مقاومت در جمعیت مقاوم جیرفت- تغذیه شده با dsRNA بود (جدول ۱). نسبت مقاومت از مقدار ۲۷۷/۳ برابری در جمعیت مقاوم جیرفت- تغذیه نشده با dsRNA به نسبت ۵۱/۶ برابری مقاومت در این جمعیت پس از تغذیه با dsRNA کاهش یافت. در مطالعه‌ی Bautista et al. (2009) نیز کاهش ۲/۶ برابری نسبت مقاومت در جمعیت تغذیه شده با dsRNA در مقایسه با جمعیت بدون تغذیه dsRNA مشاهده شده است. همچنین Li et al. (2014) لی افزایش معنی دار مرگ‌ومیر حشرات بالغ سفید بالک را پس از تغذیه با CYP6CM1 dsRNA در مقایسه با جمعیت کنترل و بدون تغذیه با dsRNA گزارش کردند.

جدول ۱- سمیت حشره‌کش ایمیداکلوپرید روی جمعیت های مقاوم و حساس سفیدبالک پنبه *B. tabaci* تغذیه شده با CYP6CM1 dsRNA و کنترل

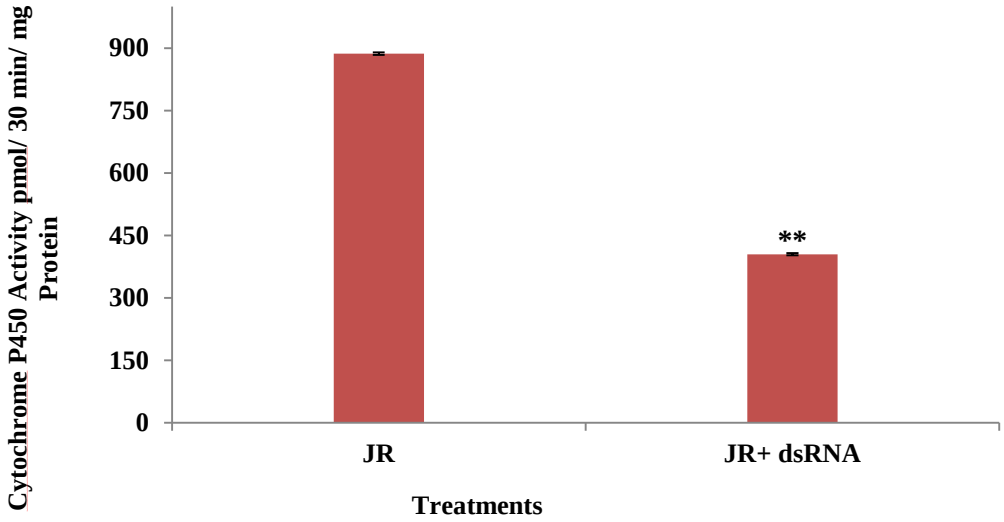
Table 1– Toxicity of Imidacloprid to CYP6CM1 dsRNA-fed and control *B. tabaci* resistance and susceptible populations

Population[1]	Treatment	Slope ± SE	χ2 (df)	LC50 (Cl 95%)[2] mg/l	RR (Cl 95%)[3] mg/l	Fold decrease in resistance
RF	Imidacloprid	1.6 ± 0.35	0.74 (3)	4.89 (4.29 – 5.59)	-	-
	Imidaclopride + dsRNA	2.2 ± 0.27	0.98 (3)	3.08 (2.62 – 3.59)	-	-
JR	Imidacloprid	0.93 ± 1.10	0.85 (3)	855.75 (817.43 -899.41)	277.32 (228.23 – 336.98)	1.0
	Imidacloprid + dsRNA	0.68 ± 0.52	0.92 (3)	252.70 (219.41 – 258.90)	51.60 (41.39 – 64.31)	5.3 *

1. RF: Susceptible Population, JR: Resistance Population.
2. Confidence interval at 95%.
3. Resistance ratio: ratio of LC50 estimations between resistant and susceptible populations according to Robertson & Preisler (1992).
*. Decrease in resistance ratio is significant if confidence interval does not comprise the value 1.0.

برای ارزیابی تاثیر خاموشی ژن CYP6CM1 روی میزان فعالیت سیتوکروم P450 از حشرات بالغ سفیدبالک تغذیه شده با CYP6CM1 dsRNA و بدون تغذیه استفاده شد. کاهش متوسط اما معنی‌دار حدود ۴۵ درصدی در خصوص میزان فعالیت سیتوکروم P450 در جمعیت مقاوم (جیرفت) تغذیه شده با CYP6CM1dsRNA در مقایسه با همین جمعیت در حالت تغذیه نشده با CYP6CM1dsRNA مشاهده شد (شکل ۱). از آنجاییکه خاموشی ژن اتفاق افتاده در این تحقیق بسیار تخصصی و مربوط به ژن CYP6CM1 بوده است، این نتایج به ما اطمینان می‌دهد که این میزان کاهش فعالیت سیتوکروم در جمعیت تغذیه شده با dsRNA تنها مربوط به خاموشی ژن CYP6CM1 بوده است. بنابراین می‌توان گفت کاهش ۵ برابری مشاهده شده در میزان مقاومت در نتیجه کاهش کارایی در فعالیت متابولیکی ژن CYP6CM1 بوده است که این کاهش کارایی در نتیجه القاء و تداخل dsRNA در سطح ترانسکریپتومی بوده است.

سه روش معمول و رایج برای وارد کردن dsRNA به داخل بدن حشرات شامل تغذیه، تزریق مستقیم و گیاهان ترانسژنیک می باشند. در برخی مطالعات از روش تزریق مستقیم dsRNA به داخل بدن حشرات استفاده شده است که این روش به نظر می‌رسد جهت کنترل حشرات آفت در مزرعه کاربردی نباشد (Huvenne and Smagghe, 2010). بعلاوه تزریق dsRNA به حفره‌ها و بندهای بدن بوسیله سوزن‌های نوک‌ریز برای حشرات کوچکی چون سفیدبالک‌ها محدودیت دارد و سبب مرگ‌ومیر زیادی در زمان تزریق می‌شود (Ghanim et al., 2007). اغلب مطالعات نیز تاکید کرده‌اند که تغذیه dsRNA برای خاموشی ژن‌های مورد هدف کاربردی‌تر و عملی‌تر است و می‌تواند منجر به تاثیرات فیزیولوژیکی قوی و حتی مرگ‌ومیر معنی‌دار در حشرات آفت در اثر خاموشی ژن‌های هدف گردد (Upadhya et al., 2011; Livak and Schmittgen, 2001; Turner et al., 2006).



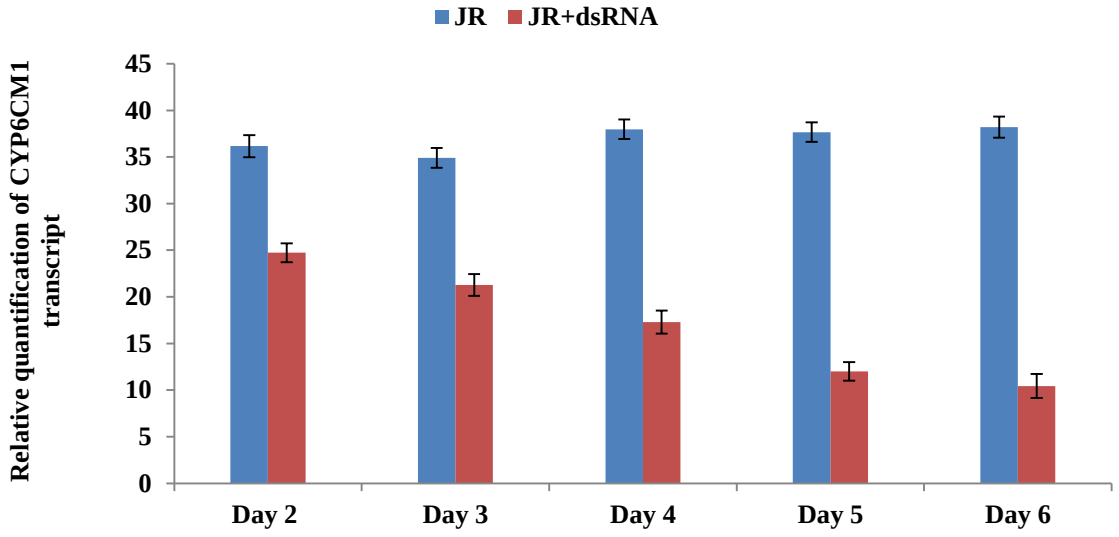
شکل ۱- فعالیت کل سیتوکروم P450 در جمعیت های مقاوم و حساس سفیدبالک پنبه *B. tabaci* تغذیه شده با CYP6CM1 dsRNA و کنترل

Figure 1- Total Cytochrome P450 - activity in CYP6CM1 dsRNA-fed and control *B. tabaci* resistance and susceptible populations

بررسی تاثیر dsRNA در خاموشی ژن CYP6CM1 با استفاده از qRT-PCR

سطح بیان نسبی ژن CYP6CM1 بوسیله ی تکنیک ریل تایم پی سی آر در جمعیت مقاوم تغذیه‌شده با CYP6CM1dsRNA تعیین گردید. اثر مدت زمان پس از تغذیه CYP6CM1dsRNA روی میزان سطح بیان نسبی ژن CYP6CM1 در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که با افزایش مدت زمان بعد از تغذیه dsRNA، میزان ترانسکریپت ژن CYP6CM1 در غلظت ثابت dsRNA کاهش معنی‌داری داشت. در روز پنجم (۳ روز بعد از انجام آزمون زیست سنجی) پس از تغذیه dsRNA میزان بیان نسبی ژن CYP6CM1 نیز در کمترین سطوح بیان مشاهده شد که نسبت به روز دوم بعد از تغذیه dsRNA حدود ۲ برابر کاهش سطح بیان را نشان داد که با توجه به این نتایج می‌توان گفت ثبت داده‌های مرگ‌ومیر در آزمایشات زیست‌سنجی در روز سوم درست و منطقی بوده است. در مطالعه Li et al. (2014) نیز بیان شده است که با افزایش مدت زمان بعد از تغذیه dsRNA، کاهش معنی‌دار سطح بیان ژن خاموش‌شده مشاهده شده است. و از طرفی نیز به این نکته نیز باید توجه داشت که تکنیک RNAi به عنوان یک روش سرکوب معرفی شده است و طبیعتاً نمی‌توان انتظار خاموشی کامل ژن‌های هدف و جلوگیری ازمیزان بیان نسبی صددرصدی را داشته باشیم (Huvenne and Smagghe, 2010).

به طور کلی می‌توان گفت که در پژوهش حاضر پس از استفاده از تکنیک خاموشی ژن در جمعیت مقاوم کاهش چند برابری اندازه مقاومت مشاهده شد که بیان‌گر امکان استفاده عملی از این تکنیک در کنترل و مدیریت مقاومت در *B. tabaci* می‌باشد.



شکل ۲- میزان سطح بیان نسبی ژن CYP6CM1 بعد از ۲، ۳، ٤، ٥ و ٦ روز پس از تغذیه جمعیت مقاوم *B. tabaci* با CYP6CM1dsRNA

Figure 2- Relative expression level of CYP6CM1 gene after 2, 3, 4, 5 and 6 day after CYP6CM1 dsRNA-fed in *B. tabaci* resistance population

سپاسگزاری

تحقیق حاضر با کمک مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور انجام شده است (کد طرح ۹۲۰۳۱۸۷۰) که بدینوسیله تشکر می‌گردد.

REFERENCES

Basij, M., Talebi, K., Ghadamyari, M., Hosseininaveh, V., and Salami, S. A. 2016. Status of Resistance of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) to Neonicotinoids in Iran and Detoxification by Cytochrome P450-Dependent Monooxygenases. Neotropical Entomology, 46(1): 115-124.

Bautista, M. A. M., Miyata, T., Miura, K., and Tanaka, T. 2009. RNA interference-mediated knockdown of a cytochrome P450, CYP6BG1, from the diamondback moth, *Plutella xylostella*, reduces larval resistance to permethrin. Insect Biochemistry Molecular Biology, 39: 38-46.

Bedford, I., Briddon, R. W., Brown, J. K., Rosell, R. C., and Markham, P. G. 1994. Geminivirus transmission and biological characterisation of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographic regions. Annals of Applied Biology, 125: 311–325.

De Barro, P. J., Liu, S., Boykin, L. M., and Dinsdale, A. B. 2011. *Bemisia tabaci* . A statement of Species Status. Annual Review of Entomology, 56: 1-19.

Ghadamyari, M., Mizuno, H., Oh, S., Talebi, K., and Kono, Y. 2008. Studies on pirimicarb resistance mechanisms in Iranian populations of the peach-potato aphid, *Myzus persicae.* Applied Entomology and Zoology, 43(1): 149–157.

Ghanim, M., Kontsedalov, S., and Czosnek, H. 2007. Tissue-specific gene silencing by RNA interference in the whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius). Insect Biochemistry Molecular Biology, 37: 732-738.

Huvenne, H., and Smagghe, G. 2010. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review. Journal of Insect Physiology, 56(3): 227-235.

James, D. G., and Price, T. S. 2002. Fecundity in two spottd spider mite (Acari: Tetranychidae) is increased by direct and systemic exposure to Imidacloprid. Journal of Economic Entomology, 95: 729–732.

Kumar, M., Gupta, G. P., and Rajam, M. V. 2009. Silencing of acetylcholin esterase gene of *Helicoverp armigera* by siRNA affects larval growth and its life cycle. Journal of Insect Physiology, 55: 273-278.

Legg, J. P., Shirima, R., Tajebe, L. S., Guastella, D., Boniface, S., Jeremiah, S., Nsami, E., Chikoti, P., and Rapisarda, C. 2014. Biology and management of *Bemisia* whitefly vectors of cassava virus pandemics in Africa. Pest Managment Science, 70: 1446-1453.

Li, J., Li, X., Bai, R., Shi, Y., Tang, Q., An, S. H., Songb, Q., and Yana, F. 2014. RNA interference of the P450 CYP6CM1 gene has different efficacy in B and Q biotypes of *Bemisia tabaci*. Pest Management Science, 71: 1175–1181.

Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods, 25: 402-408.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. Journal of Biological Chemistry, 193: 265-275.

Oliveira, M. R. V., Henneberry, T. J., and Anderson, P. 2001. History, current status, and collaborative research projects for *Bemisia tabaci*. Crop Protection, 20: 709-723.

Price, D. R., and Gatehouse, J. A. 2008. RNAi-mediated crop protection against insects. Trends in Biotechnology, 26: 393-400.

Robertson, J. L., and Preisler, K. 1992. Pesticide bioassay with arthropods. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. P. 127.

Scott, J. G. 1990. Investigating mechanisms of insecticide resistance: Methods, strategies and pitfalls. In: Pesticides resistance in arthropods, R. T. Roush and E. Tabashnik (Eds.). Chapman and hall Newyork and Landon. pp. 39- 57.

Stumpf, N., and Nauen, R. 2002. Biochemical markers linked to abamectin resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). Pesticide Biochemistry and Physiology, 72: 111-121.

Turner, C. T., Davy, M. W., Macdiarmid, R. M., Plummer, K. M., Birch, N. P., and Newcomb, R. D. 2006. RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker), induced by double-stranded RNA feeding. Insect Molecular Biology, 15: 383-391.

Yokomi, R. K., Hoelmer, K. A., and Osborne, L. S. 1990. Relationships between the sweet-potato whitefly and the squash silverleaf disorder. Phytopathology, 80: 895-900.

Upadhyay, S. K., Chandrashekar, K., Thakur, N., Verma, P. C., Borgio, J. F., and Singh, P. K. 2011. RNA interference for the control of whiteflies (*Bemisia tabaci*) by oral route. Journal of Biosciences, 36: 153-161.

© 2019 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Silencing of *CYP6CM1* gene of cotton whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius) using RNAi technique

M. Basij[1], KH. Talebi[2], V. Hosseininaveh[3] and S. A. Salami[4]

1. ***Corresponding Author:** Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft, Iran (moslembasij2014@gmail.com)
2. Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Iran
3. Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Iran
4. Assistant Professor, Department of Biotechnology, University of Tehran, Tehran, Iran

(DOI): 10.22055/ppr.2019.14471

Received: 8 August 2018 Accepted: 12 May 2019

Abstract

Background and Objectives

The cotton whitefly, *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae), is a significant agricultural pest in arable lands and on ornamental crops in temperate regions of the world and has been shown to be capable of developing resistance to many classes of insecticides. Difficulties in controlling *B. tabaci* mainly result from its resistance to insecticides, including neonicotinoids. Neonicotinoids are a relatively new class of synthetic insecticides used primarily to control of whiteflies, *B. tabaci* is capable of developing resistance to different classes of insecticides as neonicotinoides. It has been experimentally proven that resistance of *B. tabaci* to imidacloprid is associated with overexpression of the P450 genes. RNA interference (RNAi) has been successfully applied in insects to study RNAi mechanisms and gene functions. In this study, the RNA interference (RNAi) effects of P450 CYP6CM1 as key gene in resistance to neonicotinoides on expression, resistance ratio and total P450 activities were evaluated.

Material and Methods

Colony of whitefly reared on leaves of tomato plants in growth chamber at 25 ± 2 ºC, 65±5% RH and a photoperiod 16:8 h (light: darkness). Total RNA was isolated from adult *B. tabaci* using Biosol reagent (Invitrogen). cDNA synthesis was performed using iScript cDNA Synthesis Kit (BIO-RAD). Double-stranded RNA (dsRNA) of P450 *CYP6CM1* was synthesized using specific primers (3' TAATACGACTCACTATAGGG 5', 3' TAATACGACTCACTATAGGG 5'), the bioassay tests after introduce of dsRNA into the insect body of whitefly by oral delivery were carried out for 6 days, and mortality was recorded daily by counting the dead insects at the bottom of the tube. The LC50 and resistance ratio were calculated using Ploplus computer software. The amount of cytochrome P450 activity was measured using 7-ethoxycoumarin based on the microfluorimetric method. Quantification of mRNA expression levels was quantified using the comparative cross-threshold (CT) (the PCR cycle number that crosses the signal threshold) method.

Results

Analysis of knockdown effects of CYP6CM1 on resistance was based on probit analysis and indicates that the gene is responsible for up to 5.3-fold reduction in imidacloprid resistance of dsRNA-fed adults. Moderate, but significant reduction in total P450 activity (45 %) exhibited by microsomal proteins prepared from dsRNA-fed JR population adult when compared to the control (JR population without dsRNA-fed). The results of P450 CYP6CM1 mRNA expression levels showed decrease in mRNA levels of the target genes with increasing the time after feeding dsRNA. Results revealed that delivery dsRNA to adult insect's reduced CYP6CM1 expression up to 2 -fold when comparing to the control.

Discussion

Reduction in resistance ratio by 5.3 fold after CYP6CM1 dsRNA fed in resistance population indicated the possibility of practical use of RNAi technique in insect resistance management (IRM).

Keywords: Bemisia tabaci, imidacloprid, resistance to insecticide, gene silencing, CYP6CM1dsRNA