دانش گیاهپزشکی ایران
دورهٔ ۴۶، شمارهٔ ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۴ (ص ۲۱۸-۲۰۷)

ایجاد لاین‌های تراریخت برای مطالعهٔ نشو و نمای مغز در *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae)

مهدیه بی‌غم [۱]، وحید حسینی‌نوه [۲]* و حسین اللهیاری [۳]
۱، ۲ و ۳. دانشجوی دکتری و دانشیاران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۵/۲۴ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۹/۱۷)

چکیده

در حال حاضر، انتقال ژرم لاین در حشرات روشی گسترده برای تجزیه و تحلیل عملکرد ژن و توسعهٔ گونه‌های اصلاح‌شدهٔ ژنتیکی است. اطلاعات زیادی دربارهٔ نشو و نمای قسمت‌هایی از مغز جنین حشرات موجود نیست. به این منظور، چندین لاین تراریخت *T. castaneum* به هدف تعیین نقش برخی ژن‌های درگیر در نشو و نمای مغز ایجاد گردید. توالی کامل ژنوم *T. castaneum* مشخص شده است و روش‌هایی نیز برای ایجاد حشرات تراریخت این گونه ارائه شده است. در این پژوهش از عنصر متحرک *piggy Bac* به عنوان ناقل به *T. castaneum* استفاده شد. پلاسمید دهنده حاوی ناحیهٔ ژنی مورد نظر، به جنین استرین چشم‌سفید (*Tc vermilion*-deficient) تزریق گردید. لاین جهش‌یافتهٔ چشم‌سفید، دارای آسیب در ژن *vermilion* است، اما از طرفی پلاسمید دهندهٔ مورد نظر دارای ژن *Tc vermilion* و تحت پروموتر 3xP3 است که سوسک‌های تراریخت را قادر به بیان ژن مذکور و در نتیجه ایجاد رنگ تیرهٔ چشم می‌کند. در این مطالعه، لاین‌های تراریخت حاوی نواحی تنظیمی برخی ژن‌های مهم در نشو و نمای مغز ایجاد شدند. این لاین‌ها به منظور ردیابی رشد نئورو بلاست‌ها از ابتدای رشد تا ساختار کاملاً رشدیافته در مغز حشرهٔ تراریخت، ساخته شدند. به‌علاوه، این لاین‌ها امکان تشخیص ژن‌ها و مطالعات عملکردیشان را در مغز *T. castaneum* فراهم خواهند آورد.

واژه‌های کلیدی: انتقال ژن حشرات، تغییر و تبدیل ژرم لاین، ریزتزریق، عناصر متحرک.

مقدمه

در سال ۱۹۸۲ یک روش کارآمد برای ورود دی ان ای برونزاد (Exogenous DNA) به ژنوم حشرات گزارش شد که به نسل بعد هم منتقل می‌شد (Rubin & Spradling, 1982). این فرایند انتقال ژنتیکی اولین بار در مگس *Drosophila melanogaster* و با استفاده از عنصر متحرک P (P-element) انجام گرفت و به‌طور موفقیت‌آمیزی در بسیاری از آزمایش‌ها به‌کار رفت (Beall & Rio, 1997; Handler *et al*., 1993). امروزه با شناسایی عناصر متحرک (Transposable element) دیگر امکان به‌کاربردن فناوری‌های انتقال ژن در دیگر گونه‌های حشرات امکان‌پذیر شده است. برای ایجاد حشرات تراریخت (Transgenic insects): ۱. باید روش‌های درون بدن (*In vivo*) برای معرفی ساختار ژن قابل تزریق به سلول‌های ژرم لاین (Germline cells) موجود زندهٔ هدف بناگذاری شوند؛ ۲. باید یک سیستم انتقال ژنتیکی، مانند یک عنصر متحرک به‌کار رود؛ ۳. موجود تراریخت باید نشانه‌گذاری شود تا نتاج قابل تشخیص باشند. در واقع، به منظور ایجاد یک سیستم تغییر و تبدیل فراگیر، ناقل‌ها و نشانگرهای

* تلفن: (۳۲۶) ۲۴-۳۲۲۴۰۲۲-۰۲۶
E-mail: vnaveh@ut.ac.ir

قابل کاربرد ضروری‌اند (Wimmer, 2003). برای تولید حشرات تراریخت، ژن مورد نظر (Transgene of interest) باید به ژرم لاین منتقل شود. همچنین عناصر متحرک معمولاً به عنوان ناقل‌هایی به منظور ادغام در ژنوم حشرات به‌کار می‌روند. برای ادغام پایدار (Stable integration) یک ساختار تراریخت، دو پلاسمید جداگانه مورد نیاز است: پلاسمید اول، پلاسمید دهنده (Donor plasmid) نامیده می‌شود که هم حمل‌کنندهٔ تراریخت مورد نظر است (Transgene of interest) و هم دارای یک نشانگر قابل مشاهده و قابل ردیابی (Visibly detectable transformation marker) است. همچنین این پلاسمید دارای تکرارهای معکوس انتهایی (Terminal inverted repeats (TIRs است. پلاسمید دوم، پلاسمید کمک‌کننده (Helper plasmid) است که در واقع آنزیم ترانسپوزاز را کد می‌کند (Wimmer, 2003). به منظور شناسایی حشرات تراریخت، نشانگری قابل اعتماد و به‌آسانی قابل تشخیص لازم است. یک نشانگر قابل کاربرد با استفاده از پروموتر مصنوعی 3xP3 بناگذاری شده است که موجب بیان پروتئین فلورسانت افزایش‌یافته (Enhanced green fluorescent protein) (EGFP) در چشم راسته‌هایی از حشرات از جمله دوبالان، سخت‌بال‌پوشان و بال‌پولک‌داران می‌شود. همچنین تعداد زیادی نشانگرهای فلورسانت دیگر و نشانگرهای جهش‌یافته در دسترس‌اند (Handler & James, 2000; Horen *et al.*, 2002). با در دسترس بودن سیستم‌های انتقال ژن در حشرات، امکان مطالعهٔ ژنتیک کاربردی در چندین گونه از حشرات امکان‌پذیر شده است و در واقع این امر موجب تسهیل پژوهش‌های تکاملی کاربردی شده است. *T. castaneum* در حال حاضر به‌عنوان یک موجود زندهٔ مدل، برای بیولوژی رشدی تکاملی مقایسه‌ای، پی بردن به دگردیسی، تنوع (Diversity) حشرات بالغ، مطالعهٔ کنترل آفات و فیزیولوژی پایه‌ای ارائه شده است. ویژگی‌هایی مانند ژنوم تعیین توالی شده، آمادگی برای خاموشی ژن، ژنتیک سطح بالا و روش‌های تراریخت‌کردن، *Tribolium* را به یک انتخاب عالی برای مطالعات مقایسه‌ای تبدیل کرده است (Brown *et al.*, 2009). در حال حاضر، دو موجود مدل در حشرات وجود دارد که سلول‌های بنیادین عصبی مغز، با جزئیات در آنها مطالعه شده است. این دو حشره شامل *Schistocerca gregaria* و *Drosophila melanogaster* می‌شوند. در *S. gregaria* رشد مغز جنین توسط مطالعات مورفولوژیک، مانند ایمونوهیستوشیمی، تزریق رنگ و غیره بررسی شده است (Boyan & Williams,1997; Boyan *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2005). از آنجا که ژنوم *Schistocerca* توالی‌یابی نشده است، مطالعات مولکولی و ژنتیکی مشکل است (Dong & Friedrich, 2010). *D. melanogaster* یک حشرهٔ مدل بسیار توسعه‌یافته از لحاظ مورفولوژیک، مولکول و ژنتیک است. برای این موجود، بسیاری از ابزارها در دسترس بوده و بنابراین اجازهٔ مطالعات تعیین ژنتیکی فرایندهای پیچیدهٔ مغز فراهم آمده است. مغز لارو *Drosophila* در این مرحلهٔ رشدی دارای اجسام قارچی‌شکل کوچک و فاقد نئوروپیل‌های سنترال کمپلکس است (Boquet *et al.*, 2000). مطالعات اخیر نشان داده است که شروع رشد مجموعهٔ مرکزی در این حشره با پل پروتوسربرال و اجسام بادبزن‌مانند (Fan- shaped body) طی سومین سن لاروی شروع شده است (Young & Armstrong, 2010). بنابراین *D. melanogaster* برای تحقیق دربارهٔ سیگنال‌های جنینی مورد نیاز برای رشد مجموعهٔ مرکزی مناسب نیست. با این حال، *T. castaneum* یک موجود مدل برای مطالعهٔ فرایند رشد مغز در مرحلهٔ جنینی است. از طرفی توالی ژنوم این حشره در دسترس است و از سوی دیگر، این حشره موجب پاسخ‌های سیستمیک قوی به خاموشی ژن می‌گردد که یکی از بزرگ‌ترین پتانسیل‌های این حشره است (Bucher *et al.*, 2002; Tomoyasu & denella, 2004; Posnien *et al.*, 2009). بناگذاری عناصر متحرک در *T. castaneum* که ایجاد حشرات تراریخت را میانجی‌گری می‌کند، موجبات رشد ابزارهایی به منظور عملکرد و کنترل ژنتیکی ژن‌ها و شبکهٔ ژنتیکی پیچیده را فراهم آورده است (Berghammer *et al.*, 1999). هدف از این مطالعه ایجاد لاین‌های تراریخت *T. castaneum* به منظور بررسی سلول‌های عصبی بنیادینی است که در تشکیل

مجموعهٔ مرکزی شرکت دارند. بنابراین، مطالعهٔ برخی ژن‌های ضروری برای مشخصات فضایی این سلول‌ها لازم است. برای رسیدن به این هدف ناحیهٔ بالادست (Upstrem) ژن‌های *Tc-vnd*، *Tc-dpn*، *Tc-chx* و *Tc-ase* و ناحیهٔ اینترونی *Tc-chx*، *Tc-ase* انتخاب شدند.

مواد و روش‌ها

استرین حشره

برای تکثیر ناحیه‌های ژنی مورد نظر، دی ان ای ژنومیک استرین San Bernardino *T. castaneum* (Sokoloff, 1972) و برای انتقال ژن (Transgenesis) جنین، استرین چشم‌سفید *Tc-vermilion* deficient به‌کار گرفته شد (Berghammer *et al.*, 2009).

بیولوژی مولکولی

پس از استخراج دی ان ای ژنومیک، به منظور تکثیر ناحیه‌های ژنی مورد نظر، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز توسط یک برنامهٔ استاندارد انجام گرفت. به منظور تکثیر نواحی ژنی ژن‌های *Tc-vnd*، *Tc-chx*، *Tc-ase* و Tc-*dpn* از آغازگرهای توصیه‌شده استفاده شد (جدول ۱). برای تعیین صحت تکثیر ناحیهٔ ژنی مورد نظر، از ژل یک درصد آگارز استفاده شد. همچنین از یک نشانگر دی ان ای (DNA lader) ۱ کیلو جفت باز (From New England Biolab, USA) استفاده شد. باندهای قابل مشاهده از درون ژل خارج شد و به کمک کیت NucleoSpin ® Gel and PCR Clean up-Macherey-(Negal, Germany) جداسازی و توسط نانودراپ درجهٔ خلوص دی ان ای اندازه‌گیری شد. به منظور انجام کلونینگ، طی مرحلهٔ لایگیشن دی ان ای‌های حاصل می‌بایست به درون پلاسمید دهنده [pBac(3xP3-gTcv_HspP-Gal4D-Sv40_attp)] منتقل شوند. به این منظور از آنزیم (Thermo scientific, Germany) T4 DNA ligase استفاده شد. پلاسمید خالص خطی‌شده به همراه ناحیهٔ ژنی خالص حاصل از پی سی آر به‌علاوهٔ T4 DNA ligase و بافر 10x T4 DAN ligase (Thermo scientific, Germany) مخلوط شد و در دمای ۱۴ درجهٔ سلسیوس در حمام آب گرم به مدت یک شب (Overnight) نگهداری شد. طی انجام ترانسفورماسیون، در ابتدا ۵۰ میکرولیتر از سلول‌های باکتری اشرشیاکلی استرین TM DH5α به همراه ۵ میکرولیتر محصول حاصل از اتصال مخلوط شد و به‌کار رفت. سلول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در یخ، به مدت ۹۰ ثانیه در ۴۵ درجهٔ سلسیوس و مجدداً دو دقیقه در یخ قرار گرفتند. به سلول‌های ترانسفورم‌شده ۵۰۰ میکرولیتر محیط کشت LB اضافه شد. در مرحلهٔ بعد، مخلوط واکنش برای مدت یک ساعت در شیکر و با دور ۲۲۵rmp و دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس قرار گرفت و در نهایت محیط کشت به پلیت‌های LB به‌علاوه آمپی‌سیلین (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آمپی‌سیلین) اضافه شد و پلیت‌ها به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس قرار گرفتند. کلون‌های حاوی ژن مورد نظر از طریق کلونی پی‌سی‌آر و ژل کراکینگ (Nemirov, 2012) شناسایی شدند. ژل کراکینگ برای جست‌وجوی کلونی‌هایی که حاوی پلاسمید مثبت‌اند به‌کار رفت. کلونی‌های منفرد با نوک پیپت برداشته شد و در ۲۵ میکرولیتر آب مقطر حل شد. ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون به یک میکروتیوب منتقل و در چهار درجهٔ سلسیوس نگهداری شد. حجم ۲۰ میکرولیتر از بافر کراکینگ به بقیهٔ ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی اضافه شد. حجم ۴ میکرولیتر از رنگ بارگذاری ۱۰x به مخلوط اضافه شد و همهٔ نمونه‌ها به ژل آگارز ۰/۷ درصد اضافه شدند. در یک چاهک جداگانه حدود ۱۰۰ نانوگرم از پلاسمید اصلی حلقوی به عنوان مرجع اضافه گردید. بعد از الکتروفورز، هر چاهکی که یک تغییر ژل در مقایسه با رفرنس را نشان داد، به عنوان نمونهٔ مثبت شناخته شد. مقدار کمی از دی ان ای پلاسمید (۱۰-۲۵ میکروگرم) برای تعیین توالی با استفاده از NucleoSpin® Plasmid Kit (Macherey-Nagel, Germany) استخراج شد. محلول دی ان ای تا نسبت ۱۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر رقیق شد و به شرکت ال جی سی ژنومیک در آلمان به منظور توالی‌یابی فرستاده شد. نتایج توسط (Geneious®software Biomattres,USA) بررسی شد. جداسازی مقادیر بیشتر پلاسمید دی ان ای (۱۰۰-۲۰۰ میکروگرم) برای به‌دست آوردن پلاسمید عاری از اندوتوکسین برای تزریق به جنین با کیت QIAfilter Plasmid Midi Kit (Qiagen) انجام گرفت.

جدول ۱. آغازگرهای به‌کاررفته به منظور تکثیر نواحی ژنی به همراه آنزیم‌های محدودکننده

نواحی تنظیمی	پرایمر رفت (۵'-۳')	پرایمر برگشت (۵'-۳')	آنزیم محدودکننده
Tc-ase 5up	GCGACTGGCCGGCCCACCTAGACCAGGAGCCAATTG (Fse I)	GCCAGTGGCCGGCCGTTCAGATCTGTTAAGTGGATG (Fse I)	Fse I
Tc-ase Intron	GCGACTGGCCGGCCCGACTCATTCAGTTGAGTGTCG (Fse I)	GCCAGTCCATGGACTCATTGCACTGATATACTGC (Nco I)	Fse I, Nco I
Tc-chx 5up	GCGACTGGCCGGCCTCTCAATGGCCAAGTTGTGCCA (Fse I)	GCCAGTGGCCGGCCGTTCATGGTCAGATGTGGGAAC (Fse I)	Fse I
Tc-chx Intron	GCGACTCCATGGTGGAAGGTTTACATTATCGTGC (Nco I)	GCCAGTGGGCCCCATAGTAGCTTTGCAATTTGAC (Apa I)	Nco I, Apa I
Tc-vnd 5up	GCGACTCCATGGCAAGTTAGCCTTGTATCTCCAG (Nco I)	GCCAGTGGGCCCGTCGGTTTACCTTTCCGACACC (Apa I)	Nco I, Apa I
Tc-dpn 5up	GCGACTGGCCGGCCGATAAGACCATTCTTGAGCACGA (Fse I)	GCCAGTCCATGGGATACCGACAGTACTTTTACCGAC (Nco I)	Fse I, Nco I

تغییر و تبدیل ژنتیکی (Transformation)

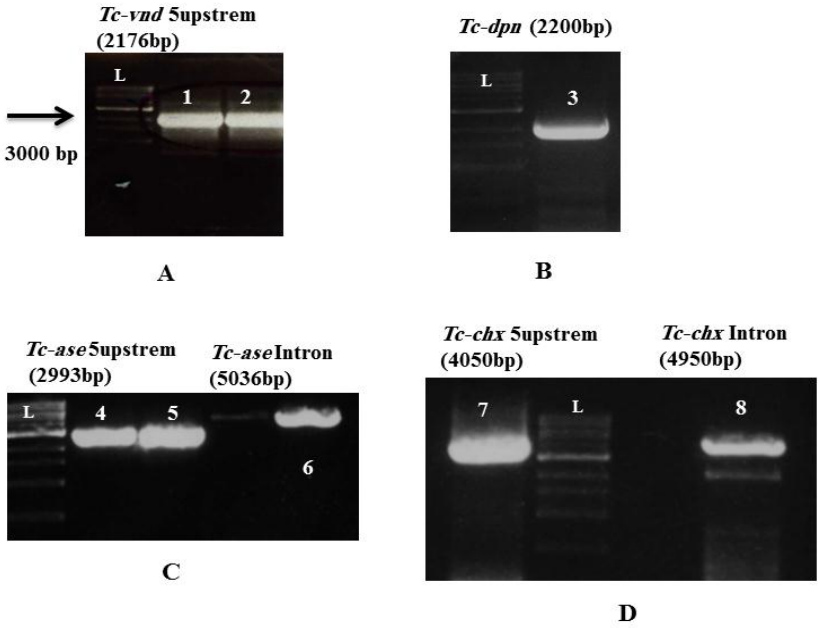
سوزن‌های باریک بروسیلیکات (Sutter instrument, USA) توسط دستگاه کشش میکروپیپت (Micopipette puller) تهیه شدند. سپس انتهای سوزن‌ها توسط یک اسکالپل به صورت اریب برش داده شده است. بلافاصله پیش از استفاده، به سوزن‌ها محلول تزریق افزوده شد و آنها در یک نگهدارندهٔ سوزن که به FemtoJet instrument (Eppendorf, Germany) متصل است، قرار داده شدند. فشار تزریق طوری تنظیم شد که قطره‌ای از محلول تزریق به اندازهٔ مناسب ایجاد می‌شد. فشار ثابتی در حدود ۱۰۰ تا ۲۰۰ پاسکال ایجاد شد تا از برگشت محتویات تخم به خارج جلوگیری گردد. سوسک‌های حدود ۱ تا ۳ ماهه درون غربال‌های با مش ۸۰۰ میکرومتر غربال شدند و همهٔ آرد قبلی از بدن حشرات حذف گردید. در مرحلهٔ بعد، سوسک‌های غربال‌شده در آرد سفید تازه نگهداری شدند. تخم‌ها در فاصله‌های زمانی هر یک ساعت، با غربال با مش ۳۰۰ میکرومتر جداسازی و سپس به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار داده شدند. تخم‌ها بعد از زمان ذکرشده، درون غربال پلاستیکی با مش ۲۵۰ میکرومتر قرار گرفتند و با محلول کلراکس یک درصد دو مرتبه و هر مرتبه حدود ۳۰ ثانیه شسته شدند. سپس تخم‌ها آبکشی و در پلیت‌های آگار ۳ درصد برای اجتناب از خشک شدن قرار گرفتند. در این مرحله، طبق آنچه ذکر شد، تزریق صورت گرفت. تخم‌های تزریق‌شده درون پلیت‌های آگار در دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس در یک جعبهٔ کاملاً درزگیری‌شده به منظور حفظ رطوبت نگهداری شدند. پس از ۷۲ ساعت، پلیت‌ها از دورن جعبه خارج و مستقیماً درون انکوباتور با دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. بعد از ۲۴ ساعت، لاروهای تفریخ‌شده جمع‌آوری شدند و درون آرد سفید در دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند تا تبدیل یه شفیره شوند. بعد از سه هفته، شفیره‌ها با عبور از غربال ۸۰۰ میکرومتر جداسازی شدند و جنسیت شفیره‌ها از طریق شکل برآمدگی جنیتال تشخیص داد شد. شفیره‌های حاصل از تخم‌های تزریق‌شده، به‌صورت منفرد در ظرف‌های حاوی آرد قرارگرفتند و به منظور انجام بک‌کراس، دو یا سه شفیره از جنس دیگر در کنار آنها قرار داده شد. ظرف‌های حاوی بک‌کراس‌ها در دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس قرار گرفتند تا تقریباً حدود ۱۰۰ حشرهٔ کامل ظهور پیدا کرد. حشرات بالغ این ظرف‌ها توسط غربال ۸۰۰ جداسازی و توسط دی‌اکسید کربن بیهوش شدند و چشم‌های آن‌ها با استفاده از استریومیکروسکوپ به منظور بیان نشانگر چشم سیاه بررسی شد.

نتایج و بحث

نواحی ژن‌های مورد نظر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با موفقیت تکثیر شد. با رؤیت قطعه‌هایی با جفت بازهای مورد انتظار، وجود نواحی ژنی ذکرشده در این پژوهش با موفقیت تأیید شد (شکل ۱). همچنین به منظور تأیید حضور نواحی ژنی موردنظر در پلاسمید دهنده و اطمینان از اتصال ناحیهٔ مورد نظر در آن، از روش‌های کلونی پی‌سی‌آر و ژل کراکینگ استفاده شد. نتایج روی ژل آگارز نشان داده شده است (شکل ۲). در نهایت با استفاده از توالی‌یابی DNA صحت قطعهٔ کلون‌شده تأیید گردید. پس از تأیید توالی‌ها و تکثیر پلاسمیدها، انتقال پلاسمید دهنده حامل ناحیهٔ ژنی موردنظر و پلاسمید کمک‌دهنده حاوی آنزیم ترانسپوزاز، به اندازهٔ کافی، به ژرم لاین توسط

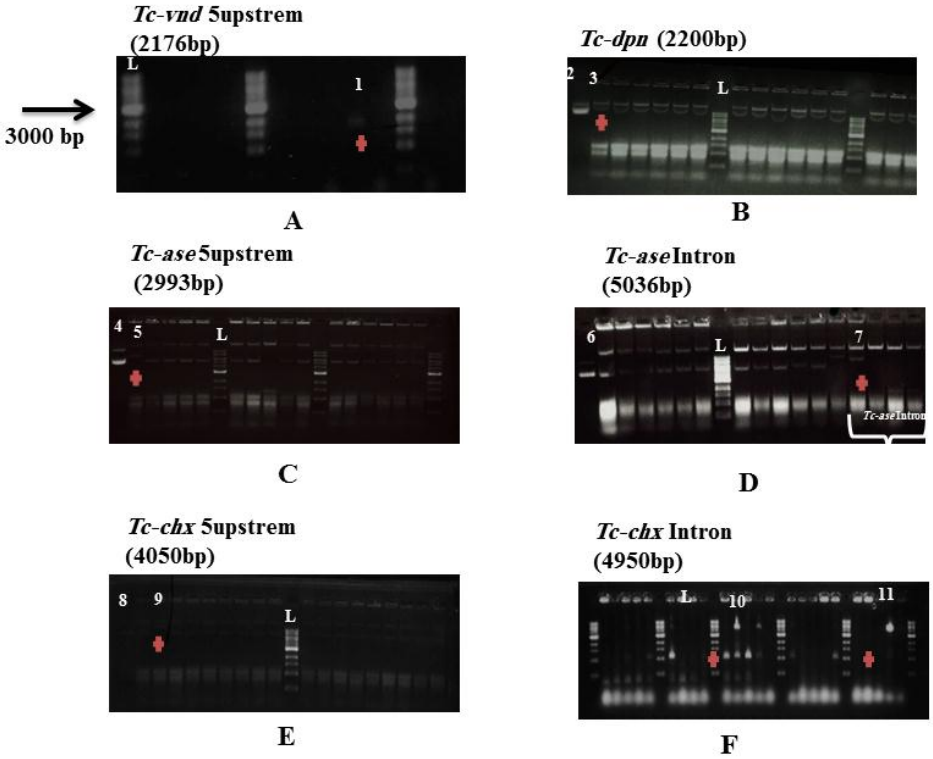
سوزن‌های بروسیلیکات انجام گرفت. بنابراین شش ناحیهٔ ژنی به‌صورت جداگانه به تخم استرین چشم سفید *Tribolium* تزریق شد. لاین مذکور دارای آسیب در ژن *Tc-vermilion* است، اما از طرفی پلاسمید دهنده مورد نظر دارای ژن *Tc-vermilion* و تحت پروموتر 3xP3 است. از این رو، سوسک‌های تراریخت قادر به بیان ژن مذکور و در نتیجه ایجاد رنگ سیاه چشم به عنوان یک نشانگر مشخص‌اند. بعد از انجام بک‌کراس، بررسی بیان نشانگر مورد نظر در حشرات تحت استریومیکروسکوپ قرار گرفت که در واقع بیان نشانگر چشم سیاه نشان‌دهندهٔ این است که الحاق ژنی انجام گرفته است (شکل ۳).

در بسیاری از روش‌های انتقال ژن موفق در حشرات، دو پلاسمید به ناحیه‌ای از جنین مراحل اولیه که به نظر می‌رسد ژرم پلاسم دارند، تزریق می‌شود. در این ناحیه سلول‌های زایای اولیه تشکیل می‌شود و برخی از هسته‌های آنها پلاسمید را دریافت می‌کند. همان‌طور که جنین شروع به نشو و نما می‌کند، آنزیم ترانسپوزاز بیان‌شده جابه‌جایی کانستراکت تراریخت را از پلاسمید دهنده به کروموزوم میانجی‌گری می‌کند. بنابراین برخی از سلول‌های زایا دارای الحاق‌های تراریخت ژنومی (Genomic transgene) اند. اگر چنین الحاقی به نتاج انتقال پیدا کند، افراد دریافت‌کننده به‌طور پایدار تراریخت خواهند شد. از آنجا که کارایی الحاق‌های تراریخت ژنومی کم است، نشانگری قابل اعتماد و با قابلیت ردیابی آسان برای شناسایی تراریخت‌ها لازم است (Wimmer, 2003). پژوهش‌های مرتبط با انتقال ژن در بی‌مهرگان مواردی همچون شناسایی و توسعهٔ ناقل‌های انتقال‌دهنده (Transgene vectors)، تجزیه و تحرک آنها در یک گونهٔ خاص و سازمان‌دهی کاربردهای عملی آنها را در بر داشته است.



شکل ۱. تصاویر ژل الکتروفورز ناحیه‌های ژنی حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز
L: نشانگر وزن مولکولی ۱Kb DNA
A) ۱ و ۲ محصول واکنش زنجیره‌ای پلی مراز ناحیهٔ ژنی *Tc-vnd* 5 upstrem (2176bp).
B) ۳ محصول واکنش زنجیره‌ای پلی مراز ناحیهٔ ژنی *Tc-dpn* (2200bp).
C) ۵ و ۴ محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ناحیهٔ ژنی *Tc-ase*5upstrem (2993bp)
و ۶ محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ناحیهٔ ژنی *Tc-ase* Intron (5036bp).
(D) ۷ محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ناحیهٔ ژنی*Tc-chx* 5upstrem (4050bp)
و ۸ محصول زنجیره‌ای پلی‌مراز ناحیهٔ ژنی

(4950 bp) *Tc-chx* Intron



شکل ۲. حضور نواحی ژنی تحت مطالعه در پلاسمید

L: نشانگر وزن مولکولی 1 Kb DNA.

A و F) محصول کلونی PCR

A) چاهک ۱) نمونهٔ کلون مثبت برای ناحیهٔ ژنی (2176bp) *Tc-vnd* 5 upstrem F

چاهک ۹ و ۸) نمونه‌های کلون مثبت برای ناحیهٔ ژنی (4950bp) *Tc-chx* Intron.

E و B-C-D) محصول کلونی مثبت از طریق کراکینگ ژل

B) چاهک ۲) پلاسمید اصلی حلقوی به عنوان مرجع چاهک ۳) نمونهٔ کلون مثبت برای ناحیهٔ ژنی(2200 bp) *Tc-dpn*

C) چاهک ۴) پلاسمید اصلی حلقوی به عنوان مرجع چاهک ۵) نمونه‌های کلون مثبت برای ناحیهٔ ژنی (2993bp) *Tc-ase* upstrem.

D) چاهک ۶) پلاسمید اصلی حلقوی به عنوان مرجع چاهک ۷) نمونه‌های کلون مثبت برای ناحیهٔ ژنی (5036bp) *Tc-ase* Intron.

E) چاهک ۸) پلاسمید اصلی حلقوی به عنوان مرجع چاهک ۹) نمونه‌های کلون مثبت برای ناحیهٔ ژنی (4050bp) *Tc-chx* upstrem.

شکل ۳. ۱ و ۳ سوسک‌های تراریخت ایجاد شده توسط پلاسمید دهنده، این پلاسمید حاوی ژن *Tc- vermilion* تحت کنترل پروموتر 3xP3 است. ۲ و ۴ سوسک‌های استرین چشم‌سفید به منظور تزریق پلاسمید دهندهٔ حاوی ناحیهٔ ژنی مورد نظر به‌کار رفت.

ناقل‌های متعدد ژنی با هدف الحاق و بیان ژن، تقریباً در هر گونه از حشرات، به منظور تجزیه و تحلیل ژنتیکی گونه‌های حشرات مدل و کاربرد استراتژی برای کنترل حشرات انتقال‌دهندهٔ بیماری و آفات کشاورزی موجودند. عناصر متحرک، به طور گسترده‌ای مورد توجه قرار گرفته‌اند و موفقیت چشمگیری به عنوان وسیله‌ای برای ادغام ژن‌ها در ژنوم حشرات و دیگر بی مهرگان نشان داده‌اند. این دی ان ای های متحرک دارای ویژگی‌های عمومی انتقال ژن موفق و ادغام نسبی تصادفی‌اند. عناصر مذکور به منظور القای جهش‌های ژنتیکی، تجزیه و تحلیل بیان ژن و تغییر و تبدیل گونه‌های هدف برای بیان ژن قابل توجه‌اند. در حال حاضر، چهار سیستم انتقال جابه‌جایی (Transposon vector system) به‌طور نسبتاً گسترده‌ای برای انتقال گونه‌های بی‌مهرهٔ غیر مگس سرکه بررسی شده است که شامل عناصر خانوادهٔ مارینر *Mos1* و *Minos*، عنصر وابسته به *hAT* یعنی *Hermes* و عنصر جابه‌جایی نسبتاً متمایز *piggyBac* است. اگرچه هر یک از این سیستم‌های مبتنی بر جابه‌جایی در تولید تراریخت‌ها در گونه‌های مختلف مؤثرند، اما استفاده از آنها به عنوان وسیله‌ای برای تجزیه و تحلیل برخی از ژنوم بی‌مهرگان محدود شده است (Fraser, 2012).

عناصر متحرک مرتبط با مارینر و *Tc1* دارای منشأ مشترک‌اند و حدود ۱۸ تا ۲۵ درصد از اسیدهای آمینهٔ آنها مشابه است (Doak *et al*., 1994). خانوادهٔ عناصر مارینر به‌طور قابل ملاحظه‌ای در سلسلهٔ جانوری گسترده است و در گونه‌هایی از کرم‌های پهن، حشرات و انسان‌ها شناسایی شده‌اند (Robertson, 1995). به همین ترتیب، خانوادهٔ *Tc1* نیز در نماتدها، حشرات، مهره‌داران و قارچها متنوع است. اعضای این بالا خانواده که به‌طور گسترده‌ای برای دستکاری حشرات به‌کار می‌روند، *Mos1* و *Minos* اند. *Mos1* قابلیت تبدیل (Transformation capabilities) برای طیف وسیعی از حشرات را نشان داده است، اما اثر قوی آن به عنوان وسیله‌ای برای انتقال ژن به *Aedes aegypti* به اثبات رسیده است (Mathur *et al*., 2010; Coates *et al*., 2000). *Minos* برای تبدیل طیف گسترده‌ای از گونه‌های بی‌مهره به‌کار می‌رود. با وجود توانایی‌های نشان‌داده‌شده *Minos* برای حرکت در ژرم لاین برخی گونه‌ها، حرکت در ژرم لاین *Anopheles stephensi* مشاهده نشده است (Burt & Koufopanou, 2004). نمونهٔ اولیهٔ عناصر متحرک بالاخانوادهٔ *hAT* در حشرات عنصر جابه‌جایی *hobo* در *Drosophila melanogaster* است. *Hermes* و *Herves* دو عنصر از بالاخانوادهٔ *hAT* با پتانسیل بسیار بالا برای تبدیل و تغییرشکل در حشرات به حساب می‌آیند (Atkinson *et al*., 2001; Sundararajan, 1999). *Hermes* یک عنصر متنوع مختلط (Versatile) برای تغییر و تبدیل در ژرم لاین گونه‌هایی از حشرات است (Kato *et al*., 2010). عنصر اخیراً شناخته‌شدهٔ این بالاخانواده در حشرات *Herves* است که در استرین PEST *Anopheles gambiae* شناسایی گردید و از استرین RSPجداسازی شد (O'Brochta *et al*., 2006). *piggyBac* یک عنصر متحرک متمایز کلاس II است که به اصطلاح به عنوان خانوادهٔ TTAA در عناصر متحرک نام‌گذاری شده است (Fraser, 2000). در حال حاضر، *piggyBac* به عنوان یک ناقل انتقال‌دهنده به‌طور گسترده استفاده می‌شود و به‌طور موفقیت‌آمیزی برای مهندسی ژنتیک در بسیاری از یوکاریوت‌ها، از جمله انگل‌های تک‌سلولی و حشرات و مهره‌داران به‌کار می‌رود (Handler & James, 2000). این عنصر متحرک موجب تسهیل در گسترش استراتژی‌های تقویت به دام انداختن (Enhancer trapping) و تجزیه و تحلیل عملکرد ژن‌ها در دو حشرهٔ مدل بسیار مهم *Bombyx mori* و *T. castaneum* می‌شود. تاکنون بیشترین برنامه‌های منتشرشده از حشرات تراریخت غیر از *Drosophila*، دربارهٔ *B. mori* بوده است که با استفاده از ناقل *piggyBac* تراریخت شده است. این حشرات از لحاظ اقتصادی به عنوان یک راکتور زیستی پروتئینی مؤثر به مدت بیش از ۵۰۰۰ سال برای تولید ابریشم به‌کار گرفته شده‌اند. اولین تغییر و تبدیل موفق *B.mori* با استفاده از سیستم ناقل *piggyBac* و پروموتر Actin3 (BmA3) بوده که هم موجب راندن کمک‌دهندهٔ ترانسپوزاز (Transposase helper) و هم ناقل

piggyBac متصل به پروتئین افزایش‌دهندهٔ سبز فلورسانت (EGFP) شده است (Tamura *et al*., 2000). این انتقال ژنتیکی فلورسانت شدن کل بدن لارو را به دنبال داشت. در مطالعات بعدی، پروموتر خاص چشم 3xP3 (Thomas *et al*., 2002) و پروموتر Silk-gland-specific fibroin light chain برای راندن بیان ژن‌های پروتئین فلورسانت به‌کار گرفته شد (Tomita *et al*., 2003). همچنین دیگر پروموترها به منظور بیان انحصاری ژن‌ها در غدد ابریشم‌ساز، به منظور بیان تولیدات ژن و ایجاد حشرات تراریخت، به منظور تولید پروتئین ایجاد و استفاده شدند (Tomita, 2011). ایجاد حشرات تراریخت به منظور کنترل بیولوژیک آفات مهم کشاورزی و پزشکی در حال توسعه است (Robinson *et al*., 2004). روش‌های تراریخت پتانسیل زیادی برای بناگذاری SIT دارند. حشرات تراریخت ممکن است برای بهبود برنامه‌های SIT با ارائهٔ قابلیت‌هایی برای تعیین جنسیت، عقیم‌سازی و نظارت به‌کار روند (Scolari *et al*., 2008; Scolari *et al*., 2011). در ساده‌ترین حالت، حشرات تراریخت‌شده با بیان ژن‌های نشانگر، موفقیت تراریخت شدن را نشان می‌دهند. به دلیل انتشار تنها جنس نر، روش کنترل SIT بسیار مؤثر بوده است. برنامه‌های SIT سنتی با استفاده از اشعه برای استریل کردن نرهای آزادشده استفاده می‌کردند که این امر موجب کاهش رقابت در جفت‌گیری با جنس ماده می‌شد. معرفی ژن‌های کشندهٔ جنس (Sex-lethal genes) می‌تواند به عنوان یک جایگزین جزئی یا کامل برای روش تابش با اشعه باشد که به نوبهٔ خود می‌تواند موجب افزایش اثربخشی برنامه‌های SIT از طریق کاهش هزینهٔ تناسب برای آزادسازی نرهای عقیم باشد (Rull *et al*., 2005). سهولت مطالعهٔ ژن‌ها در مراحل بعد جنینی در *Tribolium* این سوسک را به عنوان یک مدل با ارزش برای برهم‌کنش‌های ژنتیکی در حشرات بالغ تبدیل کرده است. تنظیم ژنتیکی رشد سنترال کمپلکس شناخته شده نیست. ما می‌خواهیم سلول‌های بنیادین عصبی و دودمان‌هایشان راکه در ساختن سنترال کمپلکس نقش دارند و همچنین برخی ژن‌هایی را که برای مشخصات فضایی سلول‌های عصبی بنیادین نقش دارند، شناسایی کنیم. در این پروژه برخی از ژن‌های انتخاب‌شده که در تشخیص هویت سلول‌های بنیادین عصبی در مغز حشرات نقش دارند، بررسی شدند. ژن مهره‌داران، *Chx10*، در طی رشد رتینا بیان می‌شود (Levine *et al*., 1994; Liu *et al*., 1994). ژنوم *Drosophila* دارای دو ارتولوگ *Dchx1* و *Dchx2* است که در رشد مغز نقش دارند. همچنین *Dchx1* به عنوان یک نشانگر برای پارس اینتر سربرالیز سیستم نئورواکتودرم بناگذاری شده است (Erclik *et al*., 2008; de velasco *et al*., 2007). بیان ارتولوگ تریبولیوم، *Tc-chx*، در قسمت جلویی مغز احتمالاً مرتبط با پارس اینترسربرالیز (Pars intercerebralis) و ناحیهٔ بینایی است. علاوه بر این، بیان در قسمت لبروم (Labrum) هم دیده شده است (Posnien *et al*., 2011). به منظور بررسی تکامل کنترل ژنتیکی پیش‌سازهای عصبی، ارتولوگ‌های تریبولیوم *ind*، *msh* و *vnd* شناسایی شد و بیان و عملکرد آنها در طی رشد مغز در این حشره بررسی گردید. تحقیقات مشخص کرد الگوی بیان *Tc-vnd*, *Tc-msh-Tc-ind* بین *Tribolium* و *Drosophila* حفاظت شده است که نشان‌دهندهٔ این است که نقش ژن‌ها در الگوی پیش‌سازهای عصبی مشابه است. این ژن‌ها به‌ترتیب در قسمت‌های نیمه‌میانی، جانبی و میانی مغز در حال رشد، بیان می‌شوند. *vnd* در رشد جنینی مغز در *Drosophila* نقش داشته و نشان داده شده که این ژن زیرمجموعه‌ای از سلول‌های عصبی در پروتوسربرال، دئوتوسربرال و تریتوسربرال است و مخصوصاً برای رشد مغز در تریتوسربرال مغز نقش مهمی دارد (Sprecher *et al*., 2006; Cowden *et al*., 2003). مطالعهٔ ژن‌های *achaete-scute* (ac/sc) به منظور درک رشد و تکامل سیستم عصبی بندپایان تحت مطالعه قرار گرفته است. توصیف و شناسایی ژن‌های *ac/sc* در *T. castaneum* دو ژن همولوگ *achaete-scute* و *asense* (*Tc-ase*) را مشخص کرد. اولی یک ژن پرونئورال و دومی یک ژن پیش‌ساز عصبی است. ژن *ase* در *Drosophila* در پیش‌سازهای تمام ارگان‌های حسی حشرات بالغ، سلول‌های مادر حسی و نتاج آنها بیان می‌شود. حذف آن موجب

کاهش برخی ارگان‌های حسی و تفرق غیرنرمال در برخی ارگان‌های باقی مانده می‌گردد (Wheeler *et al*., 2003; Wheeler *et al*., 2005; Dominguez & Campuzano, 1993). ژن‌های *dpn* و *scrt* در مگس سرکه در بسیاری یا همهٔ سلول‌های پیش‌ساز عصبی سیستم عصبی مرکزی و سیستم پیرامونی در حال رشد، بیان می‌شوند. سلول‌های بنیادین عصبی به تجدید خودشان قادرند، استفاده از سلول‌های بنیادین عصبی لارو در *Drosophila* به عنوان یک مدل نشان داد که پروتئین dpn نقش مهمی را در خودتجدیدکردن و مشخصات سلول‌های بنیادین عصبی ایفا می‌کند. کاهش *dpn* منجر به از دست دادن زودرس این سلول‌ها می‌شود (Emery *et al*., 1995; Zhu *et al*., 2012). مغز حشرات از یک مجموعه نئوروپیل‌های بسیار حفاظت‌شده مانند اجسام قارچی‌شکل و سنترال کمپلکس تشکیل شده است. این مجموعه از نئوروپیل‌ها با تنوعاتی در بسیاری از حشرات دیده می‌شود (Rein *et al*., 2002; Dreyer *et al*., 2010). سنترال کمپلکس دارای نئوروپیل‌هایی هست که در قسمت خط وسط قرار گرفته‌اند و شامل پل پروتوسربرال، جسم مرکزی (Fan-shaped body و جسم الیپسوئیدی در مگس‌ها) با گره و لوب‌های جانبی بود که با یکدیگر در ارتباطند. سنترال کمپلکس دارای عملکردهای جهت‌یابی در آسمان (Heinze and Homberg, 2007)، کنترل پرواز (Ilius *et al*., 1994)، رفتارهای حرکتی (Martin *et al*., 1999)، جفت‌یابی (Popov *et al*., 2003) و حافظه (Wu *et al*., 2007) است. تمام نئوروپیل‌های سنترال کمپلکس در طول جنین‌زایی در حشرات همی‌متابولا تشکیل می‌شوند و در مراحل بعدی توسعه می‌یابد (Bentley & Toroian, 1981; Wegerhoff & Breidbach, 1992). تجزیه و تحلیل عملکرد یک ژن با بیان آن در سلول‌ها، بافت‌ها و مراحل مختلف رشدی، یافتهٔ کارآمدی است. ایجاد سیستم‌های بیان دوگانه (Binary expression systems) یکی از راه‌های دستیابی به این اهداف است که تنها در صورتی اجازهٔ بیان نابجا را می‌دهند که دو تراریخت جداگانه موجود است (Wimmer, 2003). با استفاده از سیستم‌های بیان دوگانه، امکان بیان انتخابی ژن کلون‌شده در الگوهای تعریف‌شدهٔ خاص بافت یا سلول امکان‌پذیر می‌شود. این سیستم‌ها به دو قسمت پاسخ‌گو (Responder) و محرک (Driver) تقسیم شده‌اند. یکی از سیستم‌های دوگانه بر اساس فعال‌کنندهٔ ترانس مخمر (GAL4) و توالی فعال بالادست بالادست Upstream activation sequence (UAS) است. این سیستم برای اهداف بسیاری سازگار شده است و در *T.castaneum* نیز برای مطالعات ژنتیکی به‌کار می‌رود (Shinko *et al*., 2010). در ساختار محرک یک افزایش‌دهندهٔ (Enhancer) خاص بافت، بیان ترانس فعال‌کنندهٔ هترولوگ (Expression of a heterologous transactivator) را کنترل می‌کند که در واقع دارای منشأ مخمر یا ویروسی باکتریایی است و برای ارگانیسم تراریخت غیر مضر است. در ساختار پاسخ‌گو، ژن مورد نظر توسط پروموتر کنترل‌کنندهٔ ترانس فعال‌کنندهٔ هترولوگ (Heterologous transactivator-controlled promoter) تنظیم می‌شود. در این پروژه با تزریق پلاسمیدهای دهندهٔ حاوی نواحی ژنی مورد نظر به‌طور جداگانه به ژنوم *Tribolium*، لاین‌های حاوی ساختار محرک ساخته شده است و تنها بعد از دو رگه‌گیری لاین‌های تراریخت ذکرشده در این پروژه با لاین تراریخت حاوی ساختار پاسخ‌گو- ایجادشده توسط پروژه‌های دیگر- بیان نابه‌جا در نتاج دیده خواهد شد.

نتیجه‌گیری

استفادهٔ گسترده از سیستم‌های انتقال ژن اجازهٔ تجزیه و تحلیل عملکرد ژن را در گونه‌های مختلف امکان‌پذیر کرده است. این موضوع درک ما را از رشد و زیست‌شناسی تکاملی افزایش می‌دهد. علاوه بر این انتقال ژن در حشرات، استراتژی‌های جدیدی را به منظور کنترل آفات و روش‌هایی را برای معیوب کردن انتقال پاتوژن‌های ناقل بیماری‌های انسانی ارائه کرده است. در این پروژه با ساختن برخی لاین‌های تراریخت، در واقع ابزاری به منظور بررسی برخی سلول‌های بنیادین دخیل در ساختار مغز در پروژه‌های بعدی فراهم شد. لاین‌های ایجادشده اجازهٔ مطالعات

کاربردی ژن‌هایی را می‌دهند که احتمالاً در ساخت مجموعهٔ مرکزی نقش دارند. در مجموع، هدف از این مطالعه فراهم آوردن پایه‌هایی به منظور بررسی شبکهٔ ژنتیکی پیچیده در مغز جنین و رشد مجموعهٔ مرکزی در *T. castaneum* است.

Acknowledgment

The work has been fully funded by Dr. Gregor Bucher, and has been supervised by Dr. Gregor Bucher and Dr. Marita Büscher in Dr. Bucher's Lab, Department of Evolutionary Developmental Genetics, Johann-Friedrich-Blumenbach Institute, GZMB, CNMPBGeorg-August-University Göttingen.

REFERENCES

1. Atkinson, P.W., Pinkerton, A.C. & O'Brochta, D.A. (2001). Genetic transformation systems in insects. *Annual Review of Entomology*, 46, 317-46.
2. Badisco, L., Huybrechts, J., Simonet, G., Verlinden, H., Marchal, E., Huybrechts, R., Schoofs, L., De Loof, A. & Vanden Broeck, J. (2011). Transcriptome Analysis of the Desert Locust Central Nervous System: Production and Annotation of a *Schistocerca gregaria* EST Database. *PLoS One* 6, e17274.
3. Beall, E. L. & Rio, D. C. (1997). *Drosophila* P-element transposase is a novel site-specific endonuclease. *Genes & Development*, 11(16), 2137-2151.
4. Bentley, D. & Toroian-Raymond, A. (1981). Embryonic and postembryonic morphogenesis of a grasshopper interneuron. *Journal of Comparative Neurology*, 201, 507-18.
5. Berghammer, A.J., Klingler, M. & Wimmer, E.A. (1999). A universal marker for transgenic insects. *Nature*, 402, 370-71.
6. Berghammer, A.J., Weber, M., Trauner, J. & Klingler, M. (2009). Red flour beetle (*Tribolium*) germline transformation and insertional mutagenesis. *Cold Spring Harb Protoc*, pdb.prot5259.
7. Boquet, I., Hitier, R., Dumas, M., Chaminade, M. & Preat, T. (2000). Central brain postembryonic development in *Drosophila*: implication of genes expressed at the interhemispheric junction. *Journal of Neurobiology*, 42, 33-48.
8. Boyan, G., Herbert, Z. & Williams, L. (2010). Cell death shapes embryonic lineages of the Central Complex in the grasshopper *Schistocerca gregaria*. *Journal of Morphology*, 271, 949-959.
9. Boyan, G.S. & Williams, J.L.D. (1997). Embryonic development of the pars intercerebralis/ Central Complex of the grasshopper. *Development Genes and Evolution*, 207, 317-329.
10. Brown, S.J., Shippy, T.D., Miller, S., Bolognesi, R., Beeman, R.W., Lorenzen, M.D., Bucher, G., Wimmer, E.A. & Klingler, M. (2009). The Red Flour Beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera): A Model for Studies of Development and Pest Biology. *Cold Spring Harbor Protocols*, 4(8), 1-9.
11. Bucher, G., Scholten, J. & Klingler, M. (2002). Parental RNAi in *Tribolium* (Coleoptera). *Current Biology*, 12, R85.
12. Burt, A. & Koufopanou V. (2004). Homing endonuclease genes: the rise and fall and rise again of a selfish element. *Current Opinion in Genetics & Development*, 14, 609-15.
13. Coates, C.J., Jasinskiene, N., Morgan, D., Tosi, L.R., Beverley, SM. & James, A.A. (2000). Purified *mariner* (*Mos1*) transposase catalyzes the integration of marked elements into the germ-line of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30, 1003-8.
14. Cowden, J. & Levine, M. (2003). Ventral dominance governs sequential patterns of gene expression across the dorsal–ventral axis of the neuroectoderm in the *Drosophila* embryo. *Developmental Biology*, 262, 335-349.
15. de Velasco, B., Erclik, T., Shy, D., Sclafani, J., Lipshitz, H., McInnes, R. & Hartenstein, V. (2007). Specification and development of the pars intercerebralis and pars lateralis, neuroendocrine command centers in the *Drosophila* brain. *Developmental Biology*, 302, 309-323.
16. Doak, T.G., Doerder, F.P., Jahn, C.L. & Herrick, G. (1994). A proposed superfamily of transposase genes: transposon-like elements in ciliated protozoa and a common "D35E" motif. In: Proceedings of *the National Academy of Sciences*, 91, 942-46.
17. Dominguez, M. & Campuzano, S. (1993). Asense, a member of the *Drosophila* achaete scutecomplex, is a proneural and neural differentiation gene. *The EMBO Journal*, 2(5), 20149-2060.
18. Dong, Y. & Friedrich, M. (2010). Enforcing biphasic eye development in a directly developing insect by transient knockdown of single eye selector genes. *Journal of experimental zoology. Part B, Molecular and Developmental Evolution*, 314B, 104-114.
19. Dreyer, D., Vitt, H., Dippel, S., Goetz, B., El Jundi, B., Kollmann, M., Huetteroth, W. & Schachtner, J. (2010). 3D Standard Brain of the Red Flour Beetle *Tribolium Castaneum*: A Tool to Study Metamorphic Development and Adult Plasticity. *Frontiers in Systems Neuroscience* 4, 3.

20. Emery, J.F. & Bier, E. (1995). Specificity of CNS and PNS regulatory sub elements comprising pan-neural enhancers of the deadpan and scratch genes is achieved by repression. *Development*, 121, 3549-3560.
21. Erclik, T., Hartenstein, V., Lipshitz, H. D. & McInnes, R. R. (2008). Conserved Role of the Vsx Genes Supports a Monophyletic Origin for Bilaterian Visual Systems. *Current Biology*, 18, 1278-1287.
22. Fraser, J. M.J. (2012). Insect Transgenesis: Current Applications and Future Prospects. *Annual Review of Entomology*, 57, 267-89.
23. Fraser, M. (2000). The TTAA-specific family of transposable elements: identification, functional characterization, and utility for transformation of insects. *In Insect Transgenesis: Methods and Applications*.
24. Handler, A. M., Gomez, S. P. & O'Brochta, D. A. (1993). A functional analysis of the P-element gene transfer vector in insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 22(3-4), 373-384.
25. Handler, A. M. & James, A. A. (2000). *Insect Transgenesis: Methods and Applications* (CRC, Boca Raton, Florida).
26. Heinze, S. & Homberg, U. (2007). Maplike representation of celestial E-vector orientations in the brain of an insect. *Science*, 315, 995-7.
27. Horn, C., Schmid, B. G. M., Pogoda, F. S. & Wimmer, E. A. (2002). Fluorescent transformation markers forinsect transgenesis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32, 1221-1235.
28. Ilius, M., Wolf, R. & Heisenberg, M. (1994). The central complex of *Drosophila melanogaster* is involved in flight control: studies on mutants and mosaics of the gene ellipsoid body open. *Journal of Neurogenetics*, 9, 189-206.
29. Kato, T., Kajikawa, M., Maenaka, K. & Park, EY. (2010). Silkworm expression system as a platform technology in life science. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 459-70.
30. Kurylas, A. E., Rohlfing, T., Krofczik, S., Jenett, A. & Homberg, U. (2008). Standardized atlas of the brain of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Cell and Tissue Research*, 333, 125-45.
31. Levine, E. M., Hitchcock, P. F., Glasgow, E. & Schechter, N. (1994). Restricted expression of a new pairedclass homeobox gene in normal and regenerating adult goldfish retina. *Journal of Comparative Neurology*, 348, 596-606.
32. Liu, I. S. C., Chen, J., Ploder, L., Vidgen, D., Van der Kooy, D., Kalnins, V. I. & Mclnnes, R. R. (1994). Developmental expression of a novel murine homeobox gene (Chx10): Evidence for roles in determination of the neuroretina and inner nuclear layer. *Neuron*, 13, 377-393.
33. Martin, J. R., Raabe, T. & Heisenberg, M. (1999). Central complex substructures are required for the maintenance of locomotor activity in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Comparative Physiology A*, 185, 277-88.
34. Mathur, G., Sanchez-Vargas, I., Alvarez, D., Olson, K.E., Marinotti, O. & James AA. (2010). Transgene mediated suppression of dengue viruses in the salivary glands of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 19, 753-63.
35. Nemirov, A. (2012). Simply Cloning-Cracking Gel from www.youtube.com/watch?v=BfQ-UIabquk.
36. O'Brochta, D. A. & Atkinson, P. W. (1998). Building the better bug. *Scientific American*, 279, 90-95.
37. O'Brochta, D.A., Subramanian, R.A., Orsetti, J., Peckham, E., Nolan, N., Arensburger, P., Atkinson, PW. & Charlwood, DJ. (2006). *hAT* element population genetics in *Anopheles gambiae* s.l. in Mozambique. *Genetica*, 127, 185-98.
38. Popov, A. V., Sitnik, N. A., Savvateeva-Popova, E. V., Wolf, R. & Heisenberg, M. (2003). The role of central parts of the brain in the control of sound production during courtship in *Drosophila melanogaster*. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 33, 53-65.
39. Posnien, N., Koniszewski, N. D. B., Hein, H. J. & Bucher, G. (2011b). Candidate Gene Screen in the Red Flour Beetle *Tribolium* Reveals Six3 as Ancient Regulator of Anterior Median Head and Complex Development. *PLoS Genetics*, 7, e1002416.
40. Posnien, N., Schinko, J., Grossmann, D., Shippy, T.D., Konopova, B. & Bucher, G. (2009). RNAi in the red flour beetle (*Tribolium*). *Cold Spring Harb Protoc*, pdb.prot5256.
41. Rein, K., Zockler, M., Mader, M. T., Grubel, C. & Heisenberg, M. (2002). The *Drosophila* standard brain. *Current Biology*, 12, 227-31.
42. Robertson, H. M. (1995). The Tcl-mariner superfamily of transposons in animals. *Journal of Insect Physiology*, 41(2), 99-105.
43. Robinson, A.S., Franz, G. & Atkinson, P.W. (2004). Insect transgenesis and its potential role in agriculture and human health. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34, 113-20.
44. Rubin, G. M. & Spradling, A. C. (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science*, 218, 348-353.
45. Rull, J., Brunel, O. & Mendez, M.E. (2005). Mass rearing history negatively affects mating success of male *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) reared for sterile insect technique programs. *Journal of Economic Entomology*, 98, 1510-16.

46. Schinko, J.B., Weber, M., Viktorinova, I., Kiupakis, A., Averof, M., Klingler, M., Wimmer, E.A. & Bucher, G. (2010). Functionality of the GAL4/UAS system in *Tribolium* requires the use of endogenous core promoters. *Developmental Biology*. 10:53 doi: 10.1186/1471-213X-10-53.
47. Scolari, F., Schetelig, M.F., Bertin, S., Malacrida, A.R., Gasperi, G. & Wimmer, E.A. (2008). Fluorescent sperm marking to improve the fight against the pest insect *Ceratitis capitata* (Wiedemann; Diptera: Tephritidae). *Nature Biotechnology*, 25, 76-84.
48. Scolari, F., Siciliano, P., Gabrieli, P., Gomulski, L.M., Bonomi, A., Gasperi, G. & Malacrida, A.R. (2011). Safe and fit genetically modified insects for pest control: from lab to field applications. *Genetica*, 139, 41-52.
49. Sokoloff, A. (1974). The` biology of *Tribolium*: with special emphasis on genetic aspects. Clarendon Press.
50. Sprecher, S.G., Urbach, R., Technau, G.M., Rijli, F.M., Reichert, H. & Hirth, F. (2006). The columnar gene *vnd* is required for tritocerebral neuromere formation during embryonic brain development of *Drosophila*. *Development*, 133, 4331-4339.
51. Sundararajan, P., Atkinson, P.W. & O'Brochta, D.A. (1999). Transposable element interactions in insects: crossmobilization of *hobo* and *Hermes*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 8, 359-68.
52. Tamura, T., Thibert, C., Royer, C., Kanda, T., Abraham, E., Kamba, M., Komoto, N., Thomas, J.L., Mauchamp, B., Chavancy, G., Shirk, P., Fraser, M., Prudhomme, J.C. & Couble, P. (2000). Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a *piggyBac* transposon-derived vector. *Nature Biotechnology*, 18, 81-84.
53. Thomas, J.L., Da Rocha, M., Besse, A., Mauchamp, B. & Chavancy, G. (2002). 3xP3-EGFP marker facilitates screening for transgenic silkworm *Bombyx mori* L. from the embryonic stage onwards. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32, 247-53.
54. Tomita, M. (2011). Transgenic silkworms that weave recombinant proteins into silk cocoons. *Biotechnology Letters*, 33, 645-54.
55. Tomita, M., Munetsuna, H., Sato, T., Adachi, T., Hino, R., Hayashi, M., Shimizu, K., Nakamura, N., Tamura, T. & Yoshizato, K. (2003). Transgenic silkworms produce recombinant human type III procollagen in cocoons. *Nature Biotechnology*, 21, 52-56.
56. Tomoyasu, Y. & Denell, R.E. (2004). Larval RNAi in *Tribolium* (Coleoptera) for analyzing adult development. *Development Genes and Evolution*, 214, 575-78.
57. Wegerhoff, R. & Breidbach, O. (1992). Structure and development of the larval central complex in a holometabolous insect, the beetle *Tenebrio molitor*. *Cell and Tissue Research*, 268, 341-358.
58. Wheeler, S.R., Carrico, M.L., Wilson, B.A. & Skeath, J.B. (2005). The *Tribolium* columnar genes reveal conservation and plasticity in neural precursor patterning along the embryonic dorsal–ventral axis. *Developmental Biology*, 279, 491-500.
59. Wheeler, S.R., Carrico, M.L., Wilson, B.A., Brown, SJ. & Skeath, J.B. (2003). The expression and function of the *achaete-scute* genes in *Tribolium castaneum* reveals conservation and variation in neural pattern formation and cell fate specification. *Development*, 130, 4373-4381.
60. Williams, J.L.D., Guentner, M. & Boyan, G.S. (2005). Building the Central Complex of the grasshopper *Schistocerca gregaria*: temporal topology organizes the neuroarchitecture of the w,x, y, z tracts. *Arthropod Structure & Development*, 34, 97-110.
61. Wimmer, E. A. (2003). Applications of insect transgenesis. *Nature Reviews Genetics*, 4(3), 225-32.
62. Wu, C. L., Xia, S., Fu, T. F., Wang, H., Chen, Y. H., Leong, D., Chiang, A. S. & Tully, T. (2007). Specific requirement of NMDA receptors for long-term memory consolidation in *Drosophila* ellipsoid body. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 10, 1578-86.
63. Young, J.M. & Armstrong, J.D. (2010). Building the Central Complex in *Drosophila*: The generation and development of distinct neural subsets. *Journal of Comparative Neurology*, 518, 1525-541.
64. Zhu, S., Wildonger, J., Barshow, S., Younger, S., Huang, Y. & Lee T. (2012). The bHLH Repressor Deadpan Regulates the Selfrenewal and Specification of *Drosophila* Larval Neural Stem Cells Independently of Notch. *PLoS ONE*. 7(10): e46724. doi:10.1371/journal.pone.0046724 1-15.

Iranian Journal of Plant Protection, Vol. 46, No. 2, Autumn & Winter 2015-2016

Generation of transgenic lines for studying of the brain development in *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae)

Mahdiyeh Bigham[1], Vahid Hosseininaveh[2*] and Hossein Allahyari[2]
1, 2. Ph.D. Student and Associate Professors, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
(Received: Aug. 15, 2015 - Accepted: Dec. 8, 2015)

ABSTRACT

Germ-line transformation of insects is now widely used for analyzing gene function and for the development of genetically modified strains for various purposes. There is not enough information on the embryonic development of some brain parts in insects. In order to study the genetic control of embryonic brain development, we established some transgenic lines to identify some genes involved in embryonic brain development. The genome has been sequenced and transgenic approaches are established for this model organism. Transposable element *piggyBac* was used as a vector for the transformation of *T. castaneum. Tc-vermilion* line- a *Tribolium* eye-color mutant- was also used for the microinjection of the donor vector. The donor vector contained the *Tc-vermilion* gene under the control of 3xP3 promoter, resulting in black eyes as a marker of their identity. In the present study, several transgenic lines bearing the regulatory regions of some important genes were generated. Additionally, transgenic lines for tracing of neuroblast development from the onset to the respective fully developed structure in the brain were established. Taken together, valuable tools which allow investigations of the complex genetic network needed for embryonic brain development in *T. castaneum* were established. Furthermore, the system will allow identification of genes and their functions in *Tribolium* brain formation.

Keywords: transposable elements, insect transgenesis, germ-line transformation, microinjection.

* Corresponding author E-mail: vnaveh@ut.ac.ir Tel: +98 261 2224022-24 (326)