

شناسایی و بررسی الگوی بیان ژن پروتئین ذخیره‌ای هگزامرین (Hexamerin) در حشرات دیاپوزی و غیر دیاپوزی سن گندم *Eurygaster integriceps*

زینب البرزی^۱، علیرضا بندانی^{۲*}، احمد عاشوری^۳، ماریا دالرس پیولاکس^۴

۱. دانشجوی دکتری حشره‌شناسی کشاورزی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

۲. استاد گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران.

۳. استاد گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران.

۴. استاد موسسه زیست‌شناسی تکاملی (Institut de Biologia Evolutiva)، دانشگاه پمپئوفابرا، بارسلونا، اسپانیا.

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۰۳ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۰۷)

چکیده

دیاپوز یک سازگاری فیزیولوژیکی است که امکان بقای موجود زنده تحت شرایط سخت را فراهم می‌کند. سن گندم *Eurygaster integriceps* (Heteroptera: Scutellaridae) آفت کلیدی گندم و جو و حشره‌ای تک‌نسلی است که چرخه زندگی این آفت دارای دو فاز متفاوت است. فاز تولیدمثلی و دیاپوز مرحله بالغ. در این پژوهش الگوی بیان ژن پروتئین ذخیره‌ای هگزامرین در اجسام چربی حشرات ماده سن گندم، در دو فاز در حال دیاپوز و خارج از دیاپوز، با استفاده از آنالیز کمی **Real time PCR** بررسی شد. بیان ژن هگزامرین در ماده‌های دیاپوزی سن گندم ۶/۴ برابر بالاتر از ماده‌های غیر دیاپوزی بود. نتایج پیش‌بینی قرارگیری درون سلولی و سیگنال پپتید نشان می‌دهد که این پروتئین در دسته پروتئین‌های خارج سلولی قرار می‌گیرد. بر اساس نتایج آنالیز فیلوژنتیک و آنالیز هم‌ردیفی توالی آمینو اسیدی ژن هگزامرین در سن گندم و سایر گونه‌های سن متعلق به راسته همی‌پترا، توالی آمینو اسیدی در کلاد متعلق به راسته همی‌پترا قرار گرفت (با عدد بوت استرپ ۱۰۰) و شباهت و نزدیکی بسیار زیادی را به توالی آمینو اسیدی ژن هگزامرین در سن برگی قهوه‌ای *Halyomorpha halys* نشان داد (شباهت ۶۲/۶ درصد). شناسایی ژن هگزامرین به‌عنوان یک شاخص بیوشیمیایی قابل اعتماد در فاز دیاپوز سن گندم می‌تواند یک گزینه مناسب و ارزشمند در جهت انجام مطالعات آتی مرتبط با دیاپوز در سطوح سلولی و ملکولی در این آفت باشد.

واژه‌های کلیدی: شاخص بیوشیمیایی، آنالیز هم‌ردیفی، آنالیز فیلوژنتیک، سیگنال پپتید، دیاپوز.

Identification and gene expression analysis of Hexamerin storage protein in diapausing and non-diapausing insects of Sunn pest, *Eurygaster integriceps*

Zeynab Alborzi¹, Alireza Bandani^{2*}, Ahmad Ashouri², Maria Dolors Piulachs³

1. Ph.D. student, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

2. Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

3. Institute of Evolutionary Biology (CSIC- Pompeu Fabra University), Barcelona, Spain

(Received: Oct, 25, 2022 - Accepted: Dec, 28, 2022)

ABSTRACT

Diapause is a physiological adaptation that allows an organism to survive adverse environmental conditions. Sunn pest, *Eurygaster integriceps* (Heteroptera: Scutellaridae), is a key pest of wheat and barley and univoltine species and its life cycle has two different phases, reproductive phase, and adult stage diapause. In this study, the gene expression patterns of Hexamerin storage protein were evaluated by quantitative Real-Time PCR assay in diapause and non-diapause female insects, in the Sunn pest's fat body. The Hexamerin gene expression in diapausing females of sunn pest was 6.4 times higher than in non-diapausing females. The results of subcellular localization and signal peptide prediction suggested that the protein was categorized as an extracellular protein. According to phylogenetic analysis and multiple alignment analysis of the Sunn pest's Hexamerin amino acid sequence and other bugs belonging to the Hemiptera order, the amino acid sequence was placed at clade belonging to the Hemiptera order (with 100 bootstrap number) and revealed high similarity and closeness to brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* Hexamerin gene amino acid sequence (identity 62.6%). Identifying the Hexamerin gene as a reliable biochemical indicator for Sunn pest diapause can be a proper and valuable candidate for further studies at the cellular and molecular levels in this pest.

Key words: Biochemical indicator, Alignment analysis, Phylogenetic analysis, Signal peptide, Diapause.

* Corresponding author E-mail: abandani@ut.ac.ir

مقدمه

همگزامرین‌ها به یک بالاخانواده پروتئینی در بندپایان تعلق دارند که علاوه بر همگزامرین‌ها شامل هموسیائین ها، فنول‌اکسیدازها و گیرنده‌های همگزامرین کشف شده در دوبالان هستند (Burmester, 2002; Burmester, 2015). آنالیزهای فیلوژنتیک مولکولی نشان داده‌اند که همگزامرین‌ها در دودمان شش‌پایان یک نسب مشترک با فنول‌اکسیدازهای بندپایان مانند تیروزینازها و هموسیائین‌های سخت پوستان دارند که حامل‌های اکسیژن حاوی مس هستند که در همولف بندپایان وجود دارند و پس از واگرایی از هموسیائین سخت‌پوستان تکامل یافته‌اند (Burmester, 2004, 2015; Pick *et al.*, 2010). همگزامرین‌ها از نظر ساختار و توالی شبیه هموسیائین‌های بندپایان هستند (Burmester & Schellen, 1996)، با این تفاوت که که هموسیائین‌ها به‌عنوان پروتئین‌های تنفسی عمل می‌کنند اما همگزامرین‌ها در طول تکامل توانایی اتصال به اکسیژن را از دست داده‌اند و به تدریج به پروتئین‌های ذخیره‌ای مواد مغذی تبدیل شده‌اند (Beintema *et al.*, 1994; Cunha *et al.*, 2005). پروتئین‌های متعلق به خانواده هموسیائین در حشرات، در طول متامورفوز، تولیدمثل و زمانی که غذا در دسترس نیست و تقاضا برای اسیدهای آمینه زیاد است، به عنوان منبع اسیدهای آمینه عمل می‌کنند. پیش از آغاز متامورفوز و تولیدمثل این پروتئین‌ها به مقدار قابل توجهی در همولف لاروها ذخیره می‌شوند. همگزامرین‌ها به‌طور عمده توسط اجسام چربی در طی دوره رشدی سنتز می‌شوند، در همولف ذخیره شده و در اجسام چربی، جایی که به عنوان منبع نیتروژن و اسیدهای آمینه برای شفیره‌ها و حشرات بالغ در طول متامورفوز و تولیدمثل عمل می‌کند، تجمع می‌یابند (Bitondi *et al.*, 2006; Kanost *et al.*, 1990; Tang *et al.*, 2010). همگزامرین‌ها، به‌عنوان پروتئین‌های ذخیره‌ای، جهت حفظ انرژی فرایندهای متابولیسمی در طی دوره‌های غیر تغذیه‌ای در حشرات بسیار ضروری هستند و با تهیه آمینو اسیدهای ضروری در طی متامورفوز، رشد تخم‌ها و دیپوز در حشرات، وظیفه تامین انرژی را بر

یکی از راهبردهای تکامل یافته در بندپایان برای عبور از شرایط نامطلوب محیطی دیپوز است. دیپوز یک توقف رشدی برنامه‌ریزی شده ژنتیکی است که با کاهش سوخت و ساز بدن، افزایش ذخیره منابع انرژی و افزایش تحمل در برابر استرس در پاسخ به محرک‌های محیطی یا داخلی در مقاومت در برابر شرایط نامساعد محیطی در فصول نامطلوب نقش دارد (J. Wang *et al.*, 2019). دیپوز در حشرات بر دو نوع اجباری (کنترل ژنتیکی) و اختیاری (القا به‌وسیله‌ی علائم خاص محیطی مثل تغییرات طول روز، دما و کیفیت غذا) است (Denlinger & Armbruster, 2014). دیپوز می‌تواند در هر مرحله‌ای از رشد حشره از جمله جنینی، لاروی یا پورگی و یا حشره کامل رخ دهد و تنها به یک مرحله رشدی معین محدود می‌شود (Zhai *et al.*, 2016). درک تغییرات محیطی مانند دوره نوری، دما، در دسترس بودن غذا و رطوبت می‌تواند باعث ایجاد دیپوز در حشرات شود که در این میان دوره نوری و دما نقش اصلی را ایفا می‌کنند (Hahn & Denlinger, 2011). دیپوز در حشرات فرآیندی پویا و پیچیده است که در آن تعاملات چندین ژن سبب بروز ویژگی‌های فیزیولوژیکی و رفتاری مشخص می‌شود. از دیدگاه فیزیولوژیکی، حشرات در حالت دیپوز از بسیاری جهات به طور مشخص با هم‌تایان غیردیپوزی خود تفاوت دارند. یکی از شاخص‌های معمول دیپوز در حشرات، سنتز و تجمع "پروتئین‌های مرتبط با دیپوز" است (Chippendale, 1988). در افراد خارج از دیپوز، این پروتئین‌ها یا قابل تشخیص نیستند و یا در غلظت‌های بسیار پایین یافت می‌شوند (De Kort, 1996; Spiliotopoulos *et al.*, 2007). این یافته‌ها بیانگر این است که دیپوز می‌تواند با الگوی خاصی از بیان ژن به جای توقف فعالیت ژنتیکی مرتبط باشد. مطالعات نشان داده‌اند که پروتئین‌های مرتبط با دیپوز در حشرات پروتئین‌های ذخیره‌ای همگزامری (Hexameric) هستند (Hahn & Denlinger, 2011; Hejnikova *et al.*, 2016; Lewis *et al.*, 2002; Spiliotopoulos *et al.*, 2007; Šula *et al.*, 1995).

این آفت یک حشره تک نسلی است که دارای دو فاز تابستان گذرانی در طول ماه‌های گرم و خشک در آخر تابستان و پاییز و زمستان گذرانی در طول ماه‌های خیلی سرد و زمستان است (Radjabi, 2000). مهاجرت سن‌های بالغ زمستان‌گذران به سمت مزارع از اواخر اسفند و اوایل فروردین شروع شده و تا اواخر اردیبهشت ادامه دارد. حشرات کامل پس از استقرار و تغذیه، جفت‌گیری و تخم‌ریزی می‌نمایند. با اتمام سنین پورگی و در نهایت ظهور حشره کامل نسل جدید، یک نسل تکمیل می‌شود. ظهور حشرات کامل مصادف با گرم و خشک شدن هوا است. اتمام دیپوز زمستانه در سن گندم همزمان با ظهور خوشه‌های گندم در اواخر اسفند و اوایل فروردین در مزارع است که باعث خسارت و کاهش محصول به‌دنبال تغذیه آفت از برگ و ساقه و دانه‌های گندم می‌شود (Radjabi, 2000). با توجه به اینکه مطالعات گسترده-ای در زمینه بررسی ویژگی‌های فیزیولوژیک دیپوز در حشرات صورت گرفته است، بررسی فاکتورهای شاخص فیزیولوژیک دیپوز سن گندم می‌تواند به درک بهتر فرایند دیپوز، که نقطه عطفی در زندگی این حشره است، کمک کند. بعلاوه معرفی یک شاخص ژنتیکی مختص به فرایند دیپوز در سن گندم می‌تواند به تسهیل و صحت انجام پژوهش‌های ملکولی مرتبط با دیپوز در این آفت کمک بسزائی کند. در تحقیق حاضر ژن پروتئین ذخیره‌ای هگزامرین در سن گندم شناسایی شد و توالی پروتئینی این ژن با سایر گونه‌های نزدیک از نقطه نظر نواحی حفاظت شده مورد مقایسه و بررسی قرار گرفت. همچنین به منظور بررسی بیان این ژن در حشرات دیپوز رفته و دیپوز نرفته سن گندم، پروفایل بیانی این ژن در فاز دیپوز و خارج از دیپوز مورد بررسی قرار گرفت.

جمع‌آوری و پرورش حشرات

حشرات سن گندم ماده بالغ و فعال در فاز تولیدمثلی در فصل بهار، از مزارع گندم روستای تنکمان واقع در شهرستان نظرآباد جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. در فصل تابستان نیز حشرات در حال دیپوز از

عهده دارند (Martins *et al.*, 2008; Saraswathi *et al.*, 2014; Tian *et al.*, 2021; Tsai *et al.*, 2014). علاوه بر نقش ذخیره‌ای در نظر گرفته شده برای هگزامرین‌ها نقش‌های متعدد دیگری در سایر حشرات از جمله تنظیم سطح هورمون جوانی در تمایز کاست در موربانه‌ها (Zhou *et al.*, 2007)، درگیر در پاسخ ایمنی به باکتری‌ها (Eliautout *et al.*, 2016; Ma *et al.*, 2014; Poopathi *et al.*, 2012; *al.*, 2014)، پلاسمودیوم (Lombardo & Christophides, 2016)، پارازیتوئید (Zhu *et al.*, 2009) و اتصال به سایر ترکیبات آلی مانند ریپوفلاوین (Miller & Magee *et al.*, 1994; Silhacek, 1995; Pan & Telfer, 1999) و یا حشره کش‌های خاص (S. Wang *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2019) دارند. گزارش‌ها نشان داده است که میزان سطح پروتئین‌های هگزامرین در همولف سن *Pyrrhocoris apterus* در طی دیپوز بسیار بالا بوده است (Šula *et al.*, 1995)، همچنین در پی بررسی اثر آلانکتومی (عدم حضور هورمون جوانی) که شبیه‌سازی حالت دیپوز در این حشره بود، افزایش بیان ژن هگزامرین در حشره مورد مطالعه دیده شد (Hejnikova *et al.*, 2016). طی مطالعه‌ای سطح بسیار پایینی از mRNA پروتئین ذخیره‌ای هگزامرین در لارو *Sesamia nonagrioides* گزارش شده است، در حالی که بیان این ژن در حشرات دیپوزی به میزان قابل توجهی افزایش داشته است (Spiliotopoulos *et al.*, 2007). در بررسی نشانه‌های پروتئومیک دیپوز اولیه در زنبور *Nasonia vitripennis* و مقایسه پروتئومیکس حشرات دیپوزی و غیر دیپوزی، از میان ۷ پروتئین ذخیره‌ای شناسایی شده که در طی دیپوز افزایش بیان نشان داده بودند، شواهد حاکی از آن بود که هر کدام حداقل در یک فاز مشخص از دیپوز حشره نقش دارند و در این میان هگزامرین‌ها به‌عنوان اهدا کننده اسید آمینه در طی دیپوز عمل می‌کنند (Wolschin & Gadau, 2009). سن گندم *Eurygaster integriceps* Put. (Heteroptera: Scutellaridae) مهم‌ترین آفت مزارع گندم و جو در ایران، کشورهای آسیایی، مناطق جنوبی و شرقی اروپا و اقیانوسیه (نیوزلند) است (Dizlek & Özer, 2017).

از مکان‌های دیپوز گذران واقع در ارتفاعات خور (شمال غرب کرج)، از زیر بوته‌های گون *Astragalus spp* و درمنه *Artemisia herba-alba* جمع‌آوری و در شرایط آزمایشگاهی با دمای 26 ± 1 درجه سلسیوس، دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی و رطوبت نسبی 55 ± 5 درصد نگهداری شدند (Amiri *et al.*, 2012).

تشریح حشرات

پس از انتقال حشرات به آزمایشگاه، حشرات تشریح شدند. بافت اجسام چربی در حشرات ماده بالغ سن گندم در آب DEPC (فاقد RNase) با استفاده از استریومیکروسکوپ و تحت شرایط استریل و روی یخ تشریح شدند. بافت‌های جمع‌آوری شده حاصل تشریح ۶ عدد حشره ماده بالغ (~ 100 میلی‌گرم) به درون تیوب‌های حاوی ۱ میلی‌لیتر تریزول (TRI Reagent) منتقل شدند و تا زمان استخراج RNA درون یخ خشک نگهداری شدند (Amiri *et al.*, 2016).

استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج Total RNA با استفاده از کیت TRI Reagent (Sigma, Aldrich) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت انجام شد. کمیت RNA استخراج شده از سن گندم به وسیله دستگاه نانودراپ ۱۰۰۰ (Thermo Scientific) و کیفیت آن با استفاده از ژل آگارز یک درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت اطمینان از عدم آلودگی RNA استخراج شده به DNA ژنومی، نمونه‌های RNA با Ambion DNase1 (RNase-free) شرکت ترموفیشر (Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, Pennsylvania, USA) تیمار شدند. RNA استخراج شده تا انجام مراحل بعدی آزمایش در فریزر با دمای -80 درجه سلسیوس نگهداری شد. ساخت cDNA تک رشته‌ای با استفاده

از آغازگر oligo-dt کیت سنتز cDNA (ADDBIO, Korea) انجام شد. لازم به ذکر است که در طی مراحل سنتز cDNA همه مواد روی یخ نگهداری شدند. غلظت سنجی cDNA با استفاده از دستگاه نانودراپ ۱۰۰۰ انجام شد (Amiri *et al.*, 2016). برای تکثیر ژن مورد مطالعه و به منظور بهینه‌سازی دمای اتصال آغازگر ژن هگزامرین به رشته‌های DNA هدف، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به صورت گرادیانت PCR و امتحان دماهای اتصال مختلف (شیب دمایی) استفاده شد. برای انجام گرادیانت PCR، از برنامه دمایی 94°C به مدت ۳ دقیقه برای واسرشت‌سازی اولیه و به دنبال آن 40°C چرخه حرارتی شامل 94°C به مدت ۳۰ ثانیه برای واسرشت‌سازی، 62°C (دمای اتصال آغازگر) به مدت ۳۰ ثانیه برای اتصال و 72°C به مدت ۴۵ ثانیه برای تکثیر و در نهایت 72°C به مدت ۷ دقیقه برای تکثیر نهایی انجام گرفت. هر ۲۵ میکرولیتر از مخلوط واکنش PCR شامل یک میکرولیتر cDNA الگو، $2/5$ میکرولیتر بافر (polymerase chain reaction)، ۲ میکرولیتر MgCl_2 ، $1/5$ میکرولیتر dNTP (deoxynucleotide triphosphate)، $1/5$ میکرولیتر از آغازگر فوروارد و ریورس ژن هدف و یا ریورس، $0/2$ میکرولیتر Taq polymerase و $14/8$ میکرولیتر ddH₂O بود (Amiri *et al.*, 2016). آغازگرهای مورد استفاده در گرادیانت PCR با استفاده از بازیابی توالی cDNA ژن هگزامرین حاصل از آنالیز ترانسکریپتوم بافت اجسام چربی سن گندم، انجام شده توسط نویسندگان (داده چاپ نشده است)، با استفاده از نرم افزار آنلاین Primer3 (<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) طراحی شد (جدول ۱) و جهت اطمینان از مناسب بودن آغازگر انتخاب شده از نرم افزار آنلاین Oligo analyzer استفاده شد.

جدول ۱. توالی آغازگرهای استفاده شده در گرادیانت PCR

Table 1. Primers sequence used for Gradient PCR

Gene name	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')
Hexamerin	TCCCACAGAAGACGGACAGG	AATGGGTGTGAAGAAGTTGGG
18s ribosomal RNA	CCTTTAACGAGGATCTATTGG	ATACTTGGCAAATGCTTTTCG

برنامه حرارتی شامل واسرشت سازی اولیه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵°C و ۴۰ چرخه با واسرشت-سازی به مدت ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵°C، اتصال به آغازگر به مدت ۲۰ ثانیه در دمای ۶۲°C و تکثیر به مدت ۲۰ ثانیه در دمای ۷۲°C انجام گرفت. کمیت نسبی بیان ژن با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد (Livak & Schmittgen, 2001). در ابتدا، میانگین مقادیر Ct تکرارهای تکنیکال محاسبه شد. سپس ΔCt که حاصل تفریق Ct ژن هدف (ژن هگزامرین) از Ct ژن مرجع (ژن 18s ribosomal RNA) در هر دو فاز در حال دیپوز و خارج از دیپوز محاسبه شد.

بررسی تغییرات بیان ژن به روش Real-Time PCR

به منظور تعیین تغییرات بیان ژن در فازهای مختلف از تکنیک Quantitative Real-time PCR استفاده شد (Macpherson *et al.*, 2006). ۵۰۰ نانوگرم از cDNA برای انجام آنالیز بیان ژن استفاده شد. در این مطالعه از ژن رفرنس 18S (شماره دسترسی در پایگاه اطلاعاتی KP890857) به عنوان ژن مرجع استفاده شد (Amiri *et al.*, 2016). آغازگرهای به کار رفته در qRT-PCR در جدول ۲ ذکر شده است. واکنش qRT-PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر cDNA، ۲ میکرولیتر از مخلوط دو آغازگر فرورارد و ریورس، ۴ میکرولیتر مستر میکس اوآگرین (Eva green master mix) و با استفاده از دستگاه Rotor-

جدول ۲. توالی آغازگرهای استفاده شده در qRT-PCR

Table 2. Primers sequence used for qRT-PCR

Gene name	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')
Hexamerin	TCCCACAGAAGACGGACAGG	GTGATCCCATAAAGAGGTCC
18s ribosomal RNA	GGCCTTCGGGATCGGAGTAA	GCAAATGCTTTCGCAGTTGTT

حفاظت شده توالی ژن هگزامرین در سن گندم و سایر حشرات، توالی پروتئینی این ژن در چند حشره از پایگاه اطلاعاتی GeneBank دانلود شد. هم ردیفی نواحی حفاظت شده ژن هگزامرین در سن گندم و سه گونه دیگر از راسته همیپترا شامل *Halyomorpha riptortus clavatus jalys* (XP_014272953.1) و *Pyrrhocoris apterus* (BAA13324.1) با استفاده از نرم افزار آنلاین Clustal (AIC66433.1) (https://www.ebi.ac.uk) و Omega (https://www.ebi.ac.uk) انجام شد. به منظور تعیین روابط فیلوژنتیک و رسم درخت فیلوژنی، هم ردیفی توالی‌های اسید آمینه ژن هگزامرین سن گندم و سایر حشرات با استفاده از الگوریتم هم ردیفی چندگانه MUSCLE (Multiple alignment algorithm) در نرم افزار MEGAX بر طبق پارامترهای پیش فرض انجام شد و درخت فیلوژنی با روش neighbor-joining، بر اساس مدل پویسن و با بوت استرپ ۱۰۰۰ جهت ارزیابی صحت ترسیم هر شاخه، رسم شد (Tamura *et al.*, 2011).

همردیفی ژن هگزامرین با دیگر حشرات و آنالیز فیلوژنی

چهارچوب خوانش باز^۱ (ORF) با استفاده از ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder>) انجام شد. وزن ملکولی^۲ (Mw) و نقطه ایزوالکتریک^۳ (pI) با استفاده از نرم افزار Expasy (https://web.expasy.org/compute_pi) محاسبه شد. پیش بینی محل قرار گیری درون سلولی^۴ پروتئین با استفاده از برنامه CELLO v2.5 (<http://cello.life.nctu.edu.tw>) انجام شد.

سرور SignalP-6.0

(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP>)
 برای پیش بینی سیگنال پپتید پروتئین هگزامرین استفاده شد. برای مقایسه و بررسی نواحی

1 Open Reading Frame
 2 Molecular weight
 3 Isoelectric point
 4 Subcellular localization

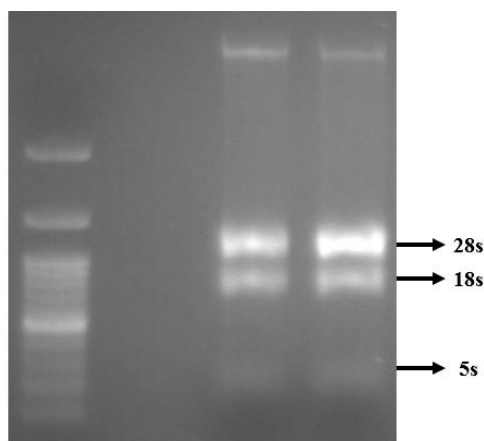
آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل آماری جهت تعیین اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها و رسم نمودار به ترتیب با استفاده از آزمون آماری Welch's t test و نرم افزار GraphPad Prism8 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) و در سطح خطای ۰/۰۵ ($P < 0/05$) انجام شد.

نتایج گرادیانت PCR

اعداد نسبت جذب نمونه‌های استخراج شده در طول موج A260/A280 بین ۱/۷۷ - ۱/۹ بود که بیانگر کیفیت مناسب و مطلوب RNAهای استخراج شده می‌باشد و وجود سه باند ۲۸S، ۱۸S و ۵S نشان‌دهنده سالم بودن RNA و عدم وجود باند اضافی نشان‌دهنده خلوص آن می‌باشد (شکل ۱).

نتایج

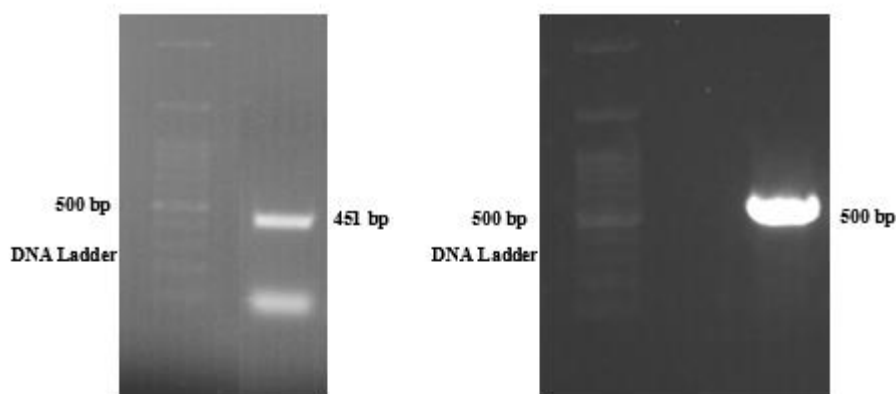


شکل ۱. کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد. نمونه‌ای از RNAهای استخراج شده از بافت اجسام چربی در سن گندم.

Figure 1. Quality of RNA extracted using 1% agarose gel. A sample of RNAs extracted from the fat bodies in Sunn pest.

(A)

(B)

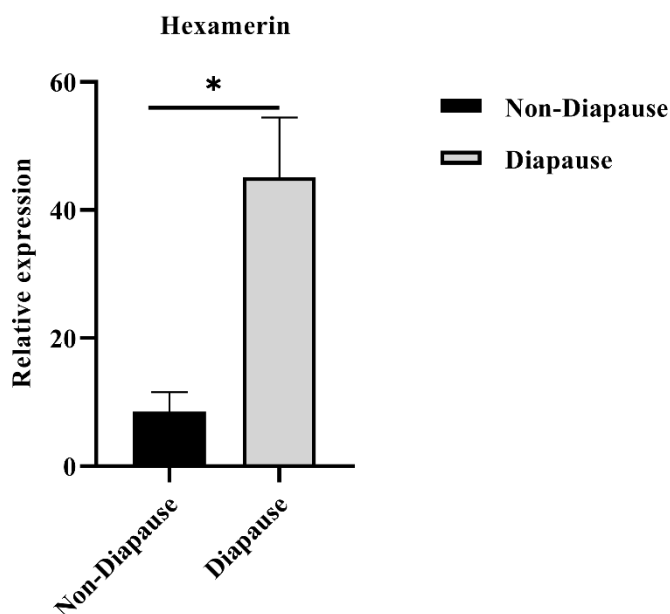


شکل ۲. الکتروفورز محصول PCR با cDNA بافت اجسام چربی برای ژن هگزامرین با آغازگر اختصاصی ژن هدف ۴۵۱ bp (A)، ژن مرجع 18s ribosomal RNA، ۵۰۰ bp (B)، با استفاده از ژل آگارز یک درصد.

Figure 2. PCR product electrophoresis of fat bodies cDNA for hexamerin gene with specific primers of target gene (A) and 18s ribosomal RNA as a reference gene (B) using 1% agarose gel

(یک درصد) مورد بررسی قرار گرفتند. مشاهده‌ی تک باند در محدوده ۴۵۱ bp برای ژن هگزامرین و ۵۰۰ bp برای آغازگر 18s ribosomal RNA بیانگر صحت انجام آزمایش و تکثیر قطعه مورد نظر می‌باشد (شکل ۲).

برای یافتن دمای اتصال مناسب آغازگر ژن هدف (هگزامرین) واکنش PCR شیب دمایی انجام شد و مناسب ترین دما برای اتصال آغازگر های اختصاصی (دمای ۶۲ °C) انتخاب گردید. بعد از انجام واکنش، محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز ژل آغازز



شکل ۳. بیان ژن هگزامرین در سن گندم در حالت دیاپوز و خارج از دیاپوز. ستاره نمایانگر تفاوت معنی‌دار بیان ژن در حالت دیاپوز و خارج از دیاپوز است (Welch's correction t-test; $p < 0.05$).

Figure 3. Hexamerin gene expression in diapause and non-diapause Sunn pest. Asterisk shows significant differences with a $P < 0.05$ (Welch's correction t-test).

توالی cDNA ژن هگزامرین سن گندم (شماره دسترسی GenBank: OP263093.1) از آنالیز مجموعه داده ترانسکریپتومیکس در *E. integriceps* بدست آمده و در پایگاه داده NCBI ثبت شد. cDNA این ژن دارای ORF کامل شامل ۲۱۲۱ جفت باز است و پروتئین هگزامرین سن گندم را کد می‌کند که از ۷۰۶ باقیمانده اسید آمینه^۵ تشکیل شده است (شکل ۴). به صورت تئوری وزن ملکولی (Mw) و نقطه ایزوالکتریک (pI) این پروتئین به ترتیب ۸۱۷۳۶/۷۷ دالتون و ۸/۷۱ محاسبه شد.

highlighted in blue The start codon (ATG) and stop codon (TAA) are in .

میزان تغییرات بیان ژن هگزامرین

برای بررسی تغییرات بیان ژن هگزامرین در سن گندم در دو فاز خارج از دیاپوز و در حال دیاپوز، اندازه‌گیری کمی بیان ژن توسط qRT-PCR در سطح رونویسی انجام شد. نتایج بررسی میزان بیان نسبی ژن هگزامرین در سن گندم در دو فاز خارج از دیاپوز و در حال دیاپوز در شکل ۳ مشاهده می‌شود. بررسی نتایج میزان بیان این ژن، بین دو فاز مختلف تفاوت معناداری را در سطح ۰/۰۵ ($F= 9.641, P<0/05$) نشان داد. بیان ژن هگزامرین در حشرات ماده دیاپوزی ۶,۴ برابر حشرات ماده غیر دیاپوزی بود (Fold change: 6.39).

مشخصات توالی هگزامرین در سن گندم

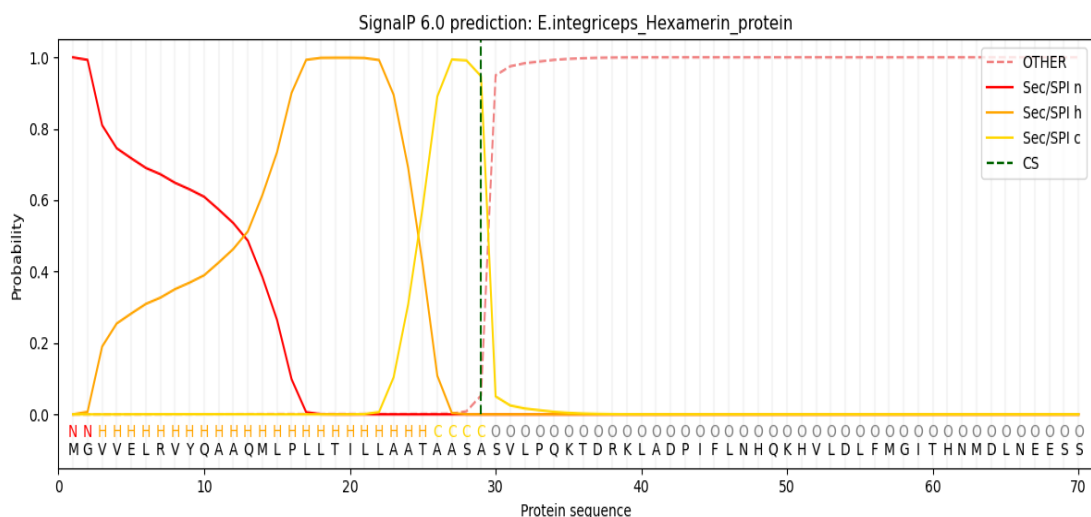
```

M G V V E L R V Y Q A A Q M L P L L T I L L A A T A A S A S
1 ATGGGAGTTGTGAGCTCAGAGTGTACCAAGCTGCTCAGATGTTGGCTCTACTCAGGATTCTGTTAGCAGCCAGGCTGCTCCGCTTCT
V L F Q K T D R K L A D P I F L N H Q K H V L D L F M G I T
91 GTCTCCACAGAGACGGACAGGAAGCTCGCTGATCCCATCTTCCTTAATCATCAAAAGCATGTACTGGACCTCTTTATGGGAATCACA
H N M D L N E E S S K F D I S A N L G S F T D E K Y P K E F
181 CACAATATGGAGCTGAATGAGGAATCCTCAAAAGTTTGACATAAGTGTAACTTAGGTTCTTTTACTGATGAAAAATACCCAAAAGAGTTC
L K A Y K R G L L P K N G I F T L F C S H T R S D A I K L F
271 CTCAAAGCATACAAGCGAGGTTTATTACCTAAGAAATGGCATCTTCACCCCTTTTCTGTTTACATACTAGGTCGTGATGCCATCAAGCTCTTT
D L F F F A K D V D T F L K V A S W A K V H I N P V M F A Y
361 GACCTATTCTTTGCAAAAGGATGTTGACACCTTCTCTGAAAGTGGCAAGTGGGCTAAGGTCACATCAACCCAGTGTATGTTGCTTAT
A Y A L A L I H R S D T Q Q F Q I P P A Y E V F P N F F T P
451 GCTTACGCTATGGCCCTGATACATAGGAGTGACACTCAGCAATTCCAAATCCCAACTGCTTATGAAAGTCTTCCCAACTTCTTACACCC
I D T L H H V F D Y K M E G I K E G R F T Y N N S G Y E Y N
541 AITGACACTCTTCATCATGTCTTCCACTACAAAATGGAAGGAATCAAAAGGGGGCGATTCACTTACAACAACCTCTGTTATGAGTACAA
Y H E S M F G G L L S P D N R G Y G D F R I S Y L R E D V G
631 TATCATGAATCGATGTTCCGTTGATTATTGAGTCTGTATACAGAGGATACGGTGTACTTCAGGATCTCTACTTAAAGGAAAGATGTTGGC
L G D F F V N A R L R N P S W M S P V K Y N S P W L K R R G
721 TTGGGAGATTTCTTGTCAATGCCAGGCTCAGAAACCTTCTGTTGATGTCGCCAGTGAATATAATTCCCTTGGTTAAAGAGGAGAGGA
E R F Y Y R V Q Q I L A R Y S L E R F S H G L P N T E S L Y
811 GAGAGATTTTACTACAGGGTGCAGCAGATTTCTGCAAGATACAGTTTGGAGAGATTTCTCCCATGGACTTCGGAATACAGAGTCACTCTAT
W E R P I K V G Y N P R V A Y V N G Q N M Y N R P D N L I P
901 TGGAAAGGCCAATCAAGTCCGATACAAATCTCTGTGCTGCTATGAAATGGACAAAATATGTACAACAGACCCAGACAACCTTAATTCCT
E F F N P R Q V N K M K N I E R R I Y D V I D A R S V W D L
991 GAATTTTTCAACCCAGACAAGTCAACAAAATGAAAAACATAGAAAGAAATCTATGATGTCATTGATGCAAGATCACTTGGGATTTG
S N G T L V S L Q N E N G I E I L G E I V Q G A N G S I S P
1081 TCCAATGGAACACTTGTCTCTGCAAAATGAAATGATATTGAGTACTTGGAGAAATTTGACAAGCCGCAAAATGGAAGTATTAGTCCA
Q L Y R S P Y Y M G I E A L A F V T T T A N D R S Y I G N A
1171 CAACTTTATCCAGCCCATATTATATGGAATCGAAGCTCTAGCTTTTGTAAACACCCTGCAATGATCGTTCTTACATAGGGAATGCT
L S S A F T A L R D P M F F N Y L T R I N R M F Q H F K K T
1261 TTGAGCAGTGTCTTTACAGCTCTCAGAGACCCAAATGTTCTTTAACTACTTGGACAAGAAATAAACCGAATGTTCCAACTTTTAAAGAGACA
L G P Y N H D E V A F K G V Q V Q N V E V D K F V T Y F D M
1351 CTAGGCCCATATAACCCAGATGAGGTGGCATTCAAAGGAGTGCAGATGCAAAATGTAGAAAGTGGATAAGTTCGTCACCTACTTTGATATG
F E Y E V G N A V P M Q K R S D F K E H K Y Y A R Q F R L N
1441 TTTGAATATGAAGTAGTAATGCTGTACCAATGCAAAAGAGAGAGGACTTCAAGGAAACATAAGTATTATGCTCGTCAATTCGGCTCAAT
H K P Y H F N I T V N S E Q T C D A I I R V F I G Q N H D A
1531 CACAAGCCCTACCCTCAATATCACCGTAAACAGTGAACAAACTTGTGATGCTATCATCAGGATATTCAITGGTCAAAACCATGATGCT
D M R R I N V K Q A R L S F F E I D R F I V K M N T G V N V
1621 GATATGCTCGAATTAATGTTAAACAGGCCAGGTTATCCTTTTGTGAGATTGACCCCTTCATAGTCAAGATGAACACTGGTGTAAAGTT
F E R N S K E S P F F V N D L E S F R S L Y E N I N N A I N
1711 TTTGAGAGGAACCTCAAAGGAATCTCCATTTCTTGAATGATCTTGAAGCTTTCAGGAGCCCTCTATGAAAATATTAAATAGCCATCAAC
Q K S P Y Y V S Q S G R C G A P D R F Q L P M G W K G G R P
1801 CAAAATCTCCATATTATGTTTCTCAGTCTGGACGATGTGGAGCACCCGATAGGTTCCAACTGCTATGGGTGGAAAGGAGGTCGCCCCA
A Q L A V V V S S Y D P S S V K A V N K N F D I A C G G D A
1891 GCACAGTTGGCAGTAGTTGTGAGTTCATATGATCCGAGCTCAGTAAAGGCAGTAAACAAAAATTTTGACATAGCTTGTGGAGGTGATGCT
L H D G R P M G F P F D R E P H H G E F H L P N I Y F K D V
1981 CTTCAAGCAGCCGCTCCGATGGGTTTCCCATTTGATAGAGAACTCACCATGGAGAAATCCACCTTCCAAACATCTACTTCAAGGATGTT
D I Y H K E Q T E V N R P T P A *
2071 GACATCTATCACAAGGAACAGACTGAGGTCAATAGACCAACACCAGCATAA

```

شکل ۴. چارچوب خوانش باز (ORF) و توالی اسید آمینه استنباط شده هگزامرین سن گندم با استفاده از ORF Finder. کدون آغاز (ATG) و کدون پایان (TAA) به رنگ آبی مشخص شده است.

Figure 4. Hexamerin *E.integriceps* Open reading frame (ORF) and deduced amino acid sequence of protein by using ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder>)



شکل ۵. نمایش پیش بینی محل قرار گیری درون سلولی پروتئین هگزامرین در سن گندم با استفاده از CELLO v2.5. Figure 5. Displaying the subcellular localizations of Hexamerin protein in *E.integriceps* by using CELLO v2.5 (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>).

Eurygaster

Predicted localizations: Extracellular

Predicted signals: Signal peptide

Localization	Cytoplasm	Nucleus	Extracellular	Cell membrane	Mitochondrion	Plastid	Endoplasmic reticulum	Lysosome/Vacuole	Golgi apparatus	Peroxisome
Probability	0.2037	0.1108	0.8197	0.1017	0.0545	0.0148	0.1698	0.2295	0.1398	0.0010

شکل ۶. پیش بینی سیگنال پپتید توسط سرور SignalP 6.0. محل برش پیش بینی شده نشان داده شد.

Figure 6. Signal peptide prediction of Hexamerin protein by SignalP 6.0 server (<https://services.Healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP>). The predicted cleavage site was shown.

۰/۹۴۷۱۲۸ بود (شکل ۶). ناحیه n: ناحیه n-ترمینال سیگنال پپتید با برچسب N، ناحیه h: ناحیه مرکزی آگریز سیگنال پپتید با برچسب H، ناحیه c-region: ناحیه c- ترمینال سیگنال پپتید، سیستئین: سیستئین حفاظت شده در محل برش +1 لیپوپروتئین ها که برای لیپیداسیون استفاده می شود با برچسب C، نشان داده شده است. از آنجایی که Sec/SPI بیان کننده یک سیگنال پپتید ترشحی است، نشان می دهد که هگزامرین یک پپتید ترشحی است.

نتایج پیش بینی محل قرارگیری درون سلولی^۶ (شکل ۵) پروتئین و ویژگی ساختاری سیگنال پپتید آن (شکل ۶) نشان می دهد که این پروتئین در دسته پروتئین های خارج سلولی^۷ قرار می گیرد که به درون همولنف ترشح می شوند. نتیجه محل قرارگیری درون سلولی در صورتی پیش بینی می شود که مقدار احتمال آن بالاتر از حد آستانه تعیین شده باشد (Extracellular localization probability = 0.6173) (threshold =). با استفاده از سرور SignalP 6.0 پیش بینی شد که پروتئین هگزامرین دارای یک سیگنال پپتید Sec/SPI است. محل برش سیگنال پپتید بین اسیدهای آمینه ۲۹ و ۳۰ و مقدار احتمال آن

6 Subcellular
7 Extracellular proteins

در سن گندم با توالی پروتئینی این ژن در سه گونه دیگر از راسته همیپترا نواحی حفاظت شده مشترکی را (RDP, RLNH and GFP) بین این ۳ گونه و سایر حشرات (Tang *et al.*, 2010) نشان داد (شکل ۷).

آنالیز فیلوژنی

درخت فیلوژنتیک با استفاده از توالی ژن هگزامرین شناسایی شده در این مطالعه و توالی این ژن در سایر حشرات رسم شد (شکل ۸). همانطور که انتظار می‌رفت و بر اساس موقعیت گونه‌ها در درخت فیلوژنتیک، به دلیل اشتراک توالی بسیار حفاظت شده متعلق به کلاد پروتئینی *E. integriceps* و گونه‌های *H. halys*، *P. apterus*، *R. clavatus* و *L. lineolaris* همگی در یک کلاد قرار گرفتند. علاوه بر این به دلیل قرابت فیلوژنی بین خانواده Scutelleridae و Pentatomidae که پیش از این توسط یافته‌های فیلوژنتیک اثبات شده بود، نتایج آنالیز فیلوژنی در این مطالعه هم شباهت و نزدیکی بسیار زیاد *E. integriceps* و *H. halys* در مقایسه با ۳ گونه دیگر متعلق به راسته همیپترا را نشان داد. این نتایج حاکی از شباهت بسیار زیاد این دو گونه نه تنها از منظر فیلوژنی و بلکه از منظر چرخه زندگی به یکدیگر است (Xu *et al.*, 2021).

مقایسه توالی و هم‌ردیفی ژن هگزامرین سن گندم با دیگر حشرات

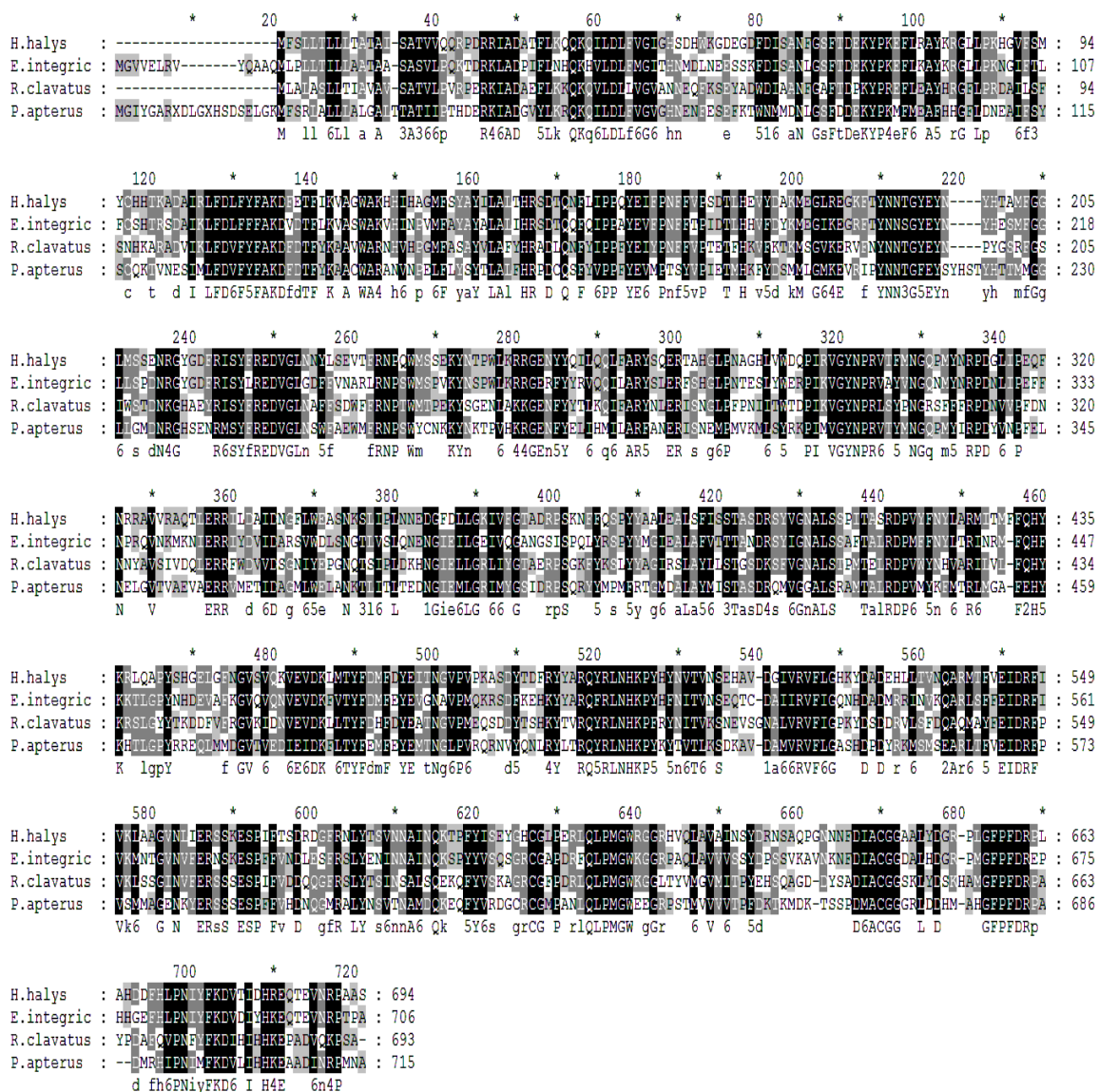
به منظور بازیابی توالی‌های پروتئینی مشابه با هگزامرین سن گندم، پایگاه‌های داده مربوطه با استفاده از الگوریتم BLAST جستجو شدند. مشخص شد که این پروتئین در توالی اسید آمینه (مشابهت ۶۲/۰۶ درصد)، نزدیک‌ترین ارتباط را با پروتئین هگزامرین در سن *H. halys* دارد. همچنین نتایج نشان داد که این پروتئین با ۵۳/۴۰ و ۴۶/۹۱ درصد، به ترتیب به توالی پیش‌ساز جز بتا سیانو پروتئین در *R. clavatus* و توالی هگزامرین در *P. apterus* شباهت دارد (جدول ۳).

با جستجو در پایگاه اطلاعاتی GeneBank، با استفاده از توالی ژن هگزامرین در سن گندم، همولوگ این پروتئین با توالی اسیدهای آمینه پروتئین هگزامرین در سه گونه دیگر متعلق به راسته همیپترا یافت شد. هم‌ردیفی توالی برای سه گونه متعلق به راسته همیپترا نواحی بسیار حفاظت شده را نشان داد (LDLXXGX/ KYP/ LFDXFXFAKD/ YNNXGXEXX/ RXXSYXREDVGLX/ VGYNPR/ RPD/ ERR/ LDL/ KYP/ RDP/ ALS/ RLNHKP/ RVF/ EIDRF/ QLPMGW/ CGG/ GFPFDR) که به رنگ سیاه و خاکستری مشخص شده‌اند. نتایج هم‌ردیفی توالی پروتئینی ژن هگزامرین

جدول ۳. مشابهت (I) و همسانی (S) توالی بین پروتئین ذخیره‌ای هگزامرین در سن گندم *E. integriceps* و سه گونه دیگر متعلق به راسته همیپترا. توالی‌های به کار رفته شامل (accession no. XP_014272953.1) *Halyomorpha halys*، (accession no. BAA13324.1) *Riptortus clavatus* و (accession no. AIC66433.1) *Pyrrhocoris apterus* هستند.

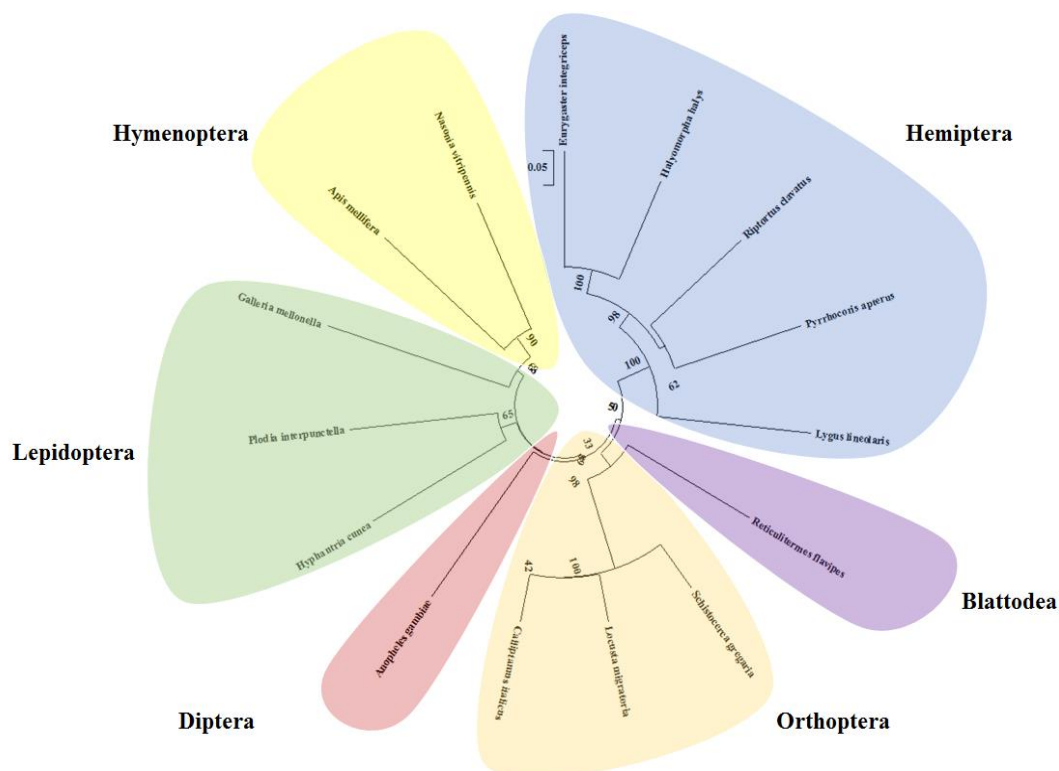
Table 3. Sequence identity (I) and similarity (S) between *E. integriceps* Hexamerin storage protein and three other insects belong to the Hemiptera order. The sources of sequences are: *Halyomorpha halys* (accession no. XP_014272953.1), *Riptortus clavatus* (accession no. BAA13324.1), *Pyrrhocoris apterus* (accession no. AIC66433.1)

		<i>H. halys</i>	<i>R. clavatus</i>	<i>P. apterus</i>
<i>E. integriceps</i>	I	62.06%	53.40%	46.91%
	S	97%	96%	95%



شکل ۷. هم ردیفی توالی‌های اسیدآمینو ژن هگزامرین در سن گندم و ۳ گونه نزدیک از راسته همیپترا. هم ردیفی توالی‌های اسیدآمینو با استفاده از نرم افزار MEGAX و مشخص کردن نواحی Conserved توسط نرم افزار Genedoc v. 2.7 انجام شد (Nicholas, 1997). آمینو اسیدهای یکسان به رنگ سفید با پس زمینه سیاه و آمینو اسیدهای حفاظت شده به رنگ سفید با پس زمینه خاکستری نشان داده شده‌اند. توالی‌های به کار رفته در هم‌ردیفی شامل: *Eurygaster integriceps* (accession no. OP263093), *Halyomorpha halys* (accession no. XP_014272953.1), *Riptortus clavatus* (accession no. BAA13324.1), *Pyrrhocoris apterus* (accession no. AIC66433.1) گونه مورد مقایسه و سایر حشرات در کادر قرمز رنگ مشخص شده است.

Figure 7. Sequence alignment of Hexamerin protein in *Eurygaster integriceps* and three related species of Hemiptera order. The alignment was performed by MEGAX and edited with Genedoc. The identical amino acids are shown in white with a black background, and the conserved amino acids are shown in white with a grey background. The sources of sequences are: *Eurygaster integriceps* (accession no. OP263093), *Halyomorpha halys* (accession no. XP_014272953.1), *Riptortus clavatus* (accession no. BAA13324.1), *Pyrrhocoris apterus* (accession no. AIC66433.1). Conserved regions between the 4 compared species and other insects are shown in red boxes.



شکل ۸. درخت فیلوژنتیک توالی اسید آمینه ژن هگزامرین سن گندم و حشرات دیگر. درخت فیلوژنتیک توسط نرم افزار MEGAX با استفاده از روش neighbor-joining رسم شد. اعداد در گره ها مقادیر درصد بوت استرپ هستند (۱۰۰۰ تکرار) و نشان دهنده درصدی است که شاخه‌های مشخص با هم در یک درخت قرار گرفته‌اند. حشرات نمایش داده شده در درخت به همراه شماره دسترسی آن‌ها بدین قرارند: *Eurygaster integriceps* (accession no. OP263093)، *Halyomorpha halys* (accession no. XP_014272953.1)، *Riptortus clavatus* (accession no. BAA13324.1)، *Pyrrhocoris apterus* (accession no. AIC66433.1)، *Lygus lineolaris* (accession no. DQ471300.1)، *Galleria mellonella* (accession no. L21997.1)، *Plodia interpunctella* (accession no. AF356843.1)، *Hyphantria cunea* (accession no. AF157013.1)، *Apis mellifera* (accession no. EU105212.1)، *Nasonia vitripennis* (accession no. NM_001170885.2)، *Anopheles gambiae* (accession no. U51225.1)، *Reticulitermes flavipes* (accession no. AY572858.2)، *Locusta migratoria* (accession no. KX073965.1)، *Calliptamus italicus* (accession no. JX204835.1)، *Schistocerca gregaria* (accession no. XM_049997573.1).

Figure 8. Phylogenetic tree of Hexamerin protein in *Eurygaster integriceps* and other insects. A neighbour-joining phylogenetic tree constructed using MEGA X. Bootstrap values were expressed as a percentage of 1000 replicates, indicating the percentage of specific branches which are placed together in one. The sources of sequences are: *Eurygaster integriceps* (accession no. OP263093), *Halyomorpha halys* (accession no. XP_014272953.1), *Riptortus clavatus* (accession no. BAA13324.1), *Pyrrhocoris apterus* (accession no. AIC66433.1), *Lygus lineolaris* (accession no. DQ471300.1), *Galleria mellonella* (accession no. L21997.1), *Plodia interpunctella* (accession no. AF356843.1), *Hyphantria cunea* (accession no. AF157013.1), *Apis mellifera* (accession no. EU105212.1), *Nasonia vitripennis* (accession no. NM_001170885.2), *Anopheles gambiae* (accession no. U51225.1), *Reticulitermes flavipes* (accession no. AY572858.2), *Locusta migratoria* (accession no. KX073965.1), *Calliptamus italicus* (accession no. JX204835.1), *Schistocerca gregaria* (accession no. XM_049997573.1).

پروتئین، به‌عنوان پروتئین‌های خارج سلولی تلقی شده و به درون همولف ترشح می‌شوند. عملکرد بسیار شناخته شده هگزامرین‌های ترشح شده در همولف،

بحث

هگزامرین‌ها عمدتاً در اجسام چربی بیان می‌شوند و با توجه به ویژگی ساختاری در سیگنال پپتید این

هورمون جوانی در طی دیپوز در سن گندم، بیان ژن هگزامرین به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. بنابراین، همبستگی معکوس بیان ژن پروتئین ذخیره-ای هگزامرین و وتیلوژنین نشان می‌دهد که هگزامرین ممکن است توسط JH سرکوب شود (Lewis et al., 2002). مطالعات نشان داده‌اند که JH، بیان ژن هگزامرین ذخیره‌ای را در چندین گونه از حشرات تنظیم می‌کند. در مطالعه‌ای که به منظور بررسی اثر هورمون جوانی بر میزان فراوانی mRNA ژن هگزامرین در سن *P. apterus* توسط هنجیکووا و همکاران (Hejnikova et al., 2016) انجام شد، دریافتند که حذف اجسام الاتا، اندام بیوسنتز کننده هورمون جوانی، به منظور شبیه سازی حالت دیپوز در این حشره و به دنبال آن توقف بیوسنتز هورمون جوانی، سبب افزایش قابل توجهی در میزان بیان ژن هگزامرین در اجسام چربی و آزادسازی پروتئین آن به همولنف می‌شود. در *R. clavatus* دو تا از چهار سیانوپروتئین (CP1-CP4) که به‌عنوان هگزامرین‌های ذخیره‌ای در این حشره شناخته شده‌اند، به‌طور متفاوتی توسط JH تنظیم می‌شوند. در حشرات فعال تولیدمثلی و خارج از فاز دیپوز، فقط CP1 در طول مراحل تولیدمثل سنتز می‌شود (Chinzei et al., 1992). در حشرات ماده در حال دیپوز، CP4 هگزامرین ذخیره‌ای غالب است. تیمار حشرات در حال دیپوز با متوپرن، آنالوگ هورمون جوانی، به طور موثری سنتز CP1 را القا و سنتز CP4 را مهار می‌کند (Chinzei et al., 1992; Miura et al., 1998). نتایج این مطالعات نشان می‌دهد پروتئین‌های ذخیره‌ای در اجسام چربی افراد در حال دیپوز سنتز و در همولنف آزاد شده و بیان‌شان در افراد در حال دیپوز ادامه می‌یابد (Palli et al., 1998; Šula et al., 1995). همچنین گزارش شده است که JH سنتز و یا بیان چندین پروتئین هگزامرین ذخیره‌ای در دیگر حشرات متعلق به راسته بالپولکداران را سرکوب می‌کند (Corpuz et al., 1991; Hwang et al., 2001; Jones et al., 1993; Memmel et al., 1994). گزارش شده است که در ماده‌های بالغ *Blaberus discoidalis* و در

به عنوان پروتئین‌های ذخیره‌ای، تامین منابع اسید آمینه و انرژی برای دوره‌های غیر تغذیه‌ای است (Burmester, 1999; Tang et al., 2010; Tian et al., 2021)، اما شواهد اخیر نقش‌های دیگری را نیز برای آن‌ها نشان می‌دهد. هگزامرین‌ها برای رشد حشرات بسیار مهم هستند، مطالعات نشان می‌دهد که اختلال در بیان هگزامرین تأثیر منفی بر رشد و حرکت لارو دارد که ممکن است در نهایت منجر به مرگ حشره شود. سرکوب بیان ژن هگزامرین در *Spodoptera exigua* (SeSP) از طریق خاموشی با استفاده از تکنیک RNAi منجر به کاهش زنده‌مانی حشرات بالغ شد (Tang et al., 2010)، که نشان می‌دهد بیان هگزامرین برای زندگی حشرات بسیار حیاتی است. پژوهش حاضر با هدف بررسی ویژگی‌های مرتبط با دیپوز در سن گندم، از طریق مطالعه تغییرات فراوانی ژن‌های وابسته به دیپوز از جمله بررسی الگوی بیان mRNA ژن پروتئین ذخیره‌ای هگزامرین در دو فاز متفاوت دیپوز و خارج از دیپوز در سن گندم صورت گرفت. بیان mRNA ژن هگزامرین در هر دو دوره دیپوز و خارج از دیپوز در سن گندم تایید شده است. در دوره دیپوز در مقایسه با فاز خارج از دیپوز، فراوانی mRNA در اجسام چربی در در سطوح بالایی یافت شد (شکل ۳) در حالی که میزان بیان ژن وتیلوژنین در اجسام چربی حشرات ماده دیپوز رفته سن گندم بسیار پایین بود و حالت معکوس آن در حشرات خارج از دیپوز مشاهده شد (داده چاپ نشده است). در بسیاری از حشرات، هورمون جوانی (JH) و یا آنالوگ‌های آن سبب القای سنتز وتیلوژنین و تحریک رشد تخمدان و یا شکسته شدن دیپوز در حشرات بالغ در حال دیپوز می‌شود (Denlinger & Armbruster, 2014). پیشتر در مطالعه صورت گرفته توسط امیری و همکاران (Amiri et al., 2012) مشخص شد که تیمار حشرات ماده دیپوز رفته در سن گندم با دزهای مختلف پیری پیروکسی فن، آنالوگ هورمون جوانی، سبب شکسته شدن دیپوز تولیدمثلی و آغاز تخم‌گذاری در حشرات ماده شد. این شواهد بیانگر این است که به‌دلیل عدم بیوسنتز

وتیلوژنین در حشرات ماده، این پتانسیل را دارد که ابزار مؤثری برای ارزیابی وضعیت دیاپوز در سن گندم باشد. مشاهده بیش‌بیانی ژن هگزامرین در طول دیاپوز، سن گندم در مقایسه با حشرات ماده خارج از دیاپوز، ضرورت بیوسنتز این پروتئین به‌عنوان پروتئین ذخیره‌ای و منبع اسیدهای آمینه در طول دوره‌های رشدی غیرتغذیه‌ای مانند متامورفوز و دیاپوز در حشرات را تایید می‌کند و در نهایت ما را به این نتیجه می‌رساند که دیاپوز حشره ماده بالغ سن گندم با سنتز مداوم و تجمع پروتئین‌های ذخیره‌ای همراه است. نتایج پژوهش حاضر با نتایج سایر مطالعات در زمینه بررسی بیان ژن هگزامرین در دیاپوز در گونه‌های متعددی از سن‌های متعلق به راسته همی‌پترا که تاکنون مورد بررسی قرار گرفته‌اند، هم راستا بوده است. سعی بر این است که در مطالعات بعدی اثر هورمون جوانی و یا آنالوگ‌های آن بر میزان بیان ژن هگزامرین در حشرات در حال دیاپوز و نیز تاثیر خاموشی این ژن بر بقا و زنده‌مانی افراد در حال دیاپوز سن گندم مورد بررسی قرار بگیرد.

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق به‌وسیله گرانت (شماره طرح ۹۹۰۱۷۷۶۶) صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور حمایت مالی شده است.

لاروهای سن آخر و ماده‌های بالغ تحت طول روز کوتاه *Leptinotarsa decemlineata* بیان ژن‌های هگزامرین Bar و DP1 به ترتیب توسط JH سرکوب می‌شوند (De Kort & Koopmanschap, 1994; Jamroz *et al.*, 1996). در مطالعه صورت گرفته بر *Sesamia monagrioides* مشاهده شده است که تیمار لاروهای در حال دیاپوز با متروپرن بیان ژن هگزامرین (SnoSP1) در این حشره را سرکوب می‌کند، که نشان دهنده اثرات هورمون جوانی بر میزان بیان این ژن در سطح رونویسی است (Spiliotopoulos *et al.*, 2007).

در این مطالعه روابط فیلوژنی این پروتئین با مقایسه توالی اسیدهای آمینه با سایر پروتئین‌های ذخیره‌ای در راسته همی‌پترا ارزیابی شد (شکل ۸). نتایج آنالیز فیلوژنی توالی آمینو اسیدی ژن هگزامرین نشان داد که توالی هگزامرین سن *E. integriceps* بسیار نزدیک و مشابه توالی این ژن در سایر حشرات متعلق به راسته همی‌پتراست، که با بررسی رابطه تکاملی بین چهار گونه مورد مطالعه متعلق به این راسته، از طریق انجام هم‌ردیفی توالی آمینو اسیدی این ژن، سازگار است (شکل ۷).

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر یک شاخص بیوشیمیایی قابل اعتماد دیاپوز را در سن گندم شناسایی کرده است. سطح mRNA ژن هگزامرین در حشرات ماده بالغ در حال دیاپوز در مقایسه با حشرات ماده بالغ در فاز تولیدمثل (خارج از دیاپوز) بسیار بالا بود. تجزیه و تحلیل سطح mRNA ژن هگزامرین، علاوه بر فراوانی سطح

REFERENCES

1. Amiri, A., Bandani, A., & Darvishzadeh, A. (2012). Effects of the insect growth regulators methoxyfenozide and pyriproxyfen on adult diapause in sunn pest eurygaster integriceps (Hemiptera: Scutelleridae). *Journal of Agricultural Science and Technology*, 14(6), 1205-1218.
2. Amiri, A., Bandani, A. R., & Alizadeh, H. (2016). Molecular identification of cysteine and trypsin protease, effect of different hosts on protease expression, and rnaI mediated silencing of cysteine protease gene in the sunn pest. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 91(4), 189-209.
3. Beintema, J. J., Stam, W. T., Hazes, B., & Smidt, M. P. (1994). Evolution of arthropod hemocyanins and insect storage proteins (hexamerins). *Molecular biology and evolution*, 11(3), 493-503.
4. Bitondi, M. M., Nascimento, A. M., Cunha, A. D., Guidugli, K. R., Nunes, F. M., & Simões, Z. L. (2006). Characterization and expression of the Hex 110 gene encoding a glutamine-rich hexamerin in the honey bee, *Apis mellifera*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 63(2), 57-72.

5. Burmester, T. (1999). Evolution and function of the insect hexamerins. *European Journal of Entomology*, 96, 213-226.
6. Burmester, T. (2002). Origin and evolution of arthropod hemocyanins and related proteins. *Journal of Comparative Physiology B*, 172(2), 95-107.
7. Burmester, T. (2004). Evolutionary history and diversity of arthropod hemocyanins. *Micron*, 35(1-2), 121-122.
8. Burmester, T. (2015). Expression and evolution of hexamerins from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and other Lepidoptera. *Insect biochemistry and molecular biology*, 62, 226-234.
9. Burmester, T., & Schellen, K. (1996). Common origin of arthropod tyrosinase, arthropod hemocyanin, insect hexamerin, and dipteran arylphorin receptor. *Journal of Molecular Evolution*, 42(6), 713-728.
10. Chinzei, Y., Miura, K., Kobayashi, L., Shinoda, T., & Numata, H. (1992). Cyanoprotein: Developmental stage, sex and diapause-dependent expression, and synthesis regulation by juvenile hormone in the bean bug, *Riptortus clavatus*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 20(1), 61-73.
11. Chippendale, G. (1988). Roles of proteins in insect diapause. *Endocrinological Frontiers in Physiological Insect Ecology*, 331-346.
12. Corpuz, L. M., Choi, H., Muthukrishnan, S., & Kramer, K. J. (1991). Sequences of two cDNAs and expression of the genes encoding methionine-rich storage proteins of *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry*, 21(3), 265-276.
13. Cunha, A. D., Nascimento, A. M., Guidugli, K. R., Simões, Z. L., & Bitondi, M. M. (2005). Molecular cloning and expression of a hexamerin cDNA from the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology*, 51(10), 1135-1147.
14. De Kort, C. (1996). Cosmic influences on the expression of a specific gene in the Colorado potato beetle: the diapause protein 1 gene. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 32(3-4), 567-573.
15. De Kort, C., & Koopmanschap, A. (1994). Nucleotide and deduced amino acid sequence of a cDNA clone encoding diapause protein 1, an arylphorin-type storage hexamer of the Colorado potato beetle. *Journal of Insect Physiology*, 40(6), 527-535.
16. Denlinger, D. L., & Armbruster, P. A. (2014). Mosquito diapause. *Annual review of entomology*, 59, 73-93.
17. Dizlek, H., & Özer, M. S. (2017). Improvement bread characteristics of high level sunn pest (*Eurygaster integriceps*) damaged wheat by using transglutaminase and some additives. *Journal of cereal science*, 77, 90-96.
18. Eliatout, R., Dubrana, M.-P., Vincent-Monégat, C., Vallier, A., Braquart-Varnier, C., Poirié, M., Saillard, C., Heddi, A., & Arricau-Bouvery, N. (2016). Immune response and survival of *Circulifer haematoceps* to *Spiroplasma citri* infection requires expression of the gene hexamerin. *Developmental & Comparative Immunology*, 54(1), 7-19.
19. Hahn, D. A., & Denlinger, D. L. (2011). Energetics of insect diapause. *Annual review of entomology*, 56, 103-121.
20. Hejnikova, M., Paroulek, M., & Hodkova, M. (2016). Decrease in Methoprene tolerant and Taiman expression reduces juvenile hormone effects and enhances the levels of juvenile hormone circulating in males of the linden bug *Pyrrhocoris apterus*. *Journal of Insect Physiology*, 93, 72-80.
21. Hwang, U. W., Friedrich, M., Tautz, D., Park, C. J., & Kim, W. (2001). Mitochondrial protein phylogeny joins myriapods with chelicerates. *Nature*, 413(6852), 154-157.
22. Jamroz, R. C., Beintema, J. J., Stam, W. T., & Bradfield, J. Y. (1996). Aromatic hexamerin subunit from adult female cockroaches (*Blaberus discoidalis*): molecular cloning, suppression by juvenile hormone, and evolutionary perspectives. *Journal of Insect Physiology*, 42(2), 115-124.
23. Jones, G., Manczak, M., & Horn, M. (1993). Hormonal regulation and properties of a new group of basic hemolymph proteins expressed during insect metamorphosis. *Journal of Biological Chemistry*, 268(2), 1284-1291.
24. Kanost, M. R., Kawooya, J. K., Law, J. H., Ryan, R. O., Van Heusden, M. C., & Ziegler, R. (1990). Insect haemolymph proteins. In *Advances in insect physiology* (Vol. 22, pp. 299-396). Elsevier.
25. Lewis, D., Spurgeon, D., Sappington, T., & Keeley, L. (2002). A hexamerin protein, AgSP-1, is associated with diapause in the boll weevil. *Journal of Insect Physiology*, 48(9), 887-901.
26. Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *methods*, 25(4), 402-408.
27. Lombardo, F., & Christophides, G. K. (2016). Novel factors of *Anopheles gambiae* haemocyte immune response to *Plasmodium berghei* infection. *Parasites & vectors*, 9(1), 1-6.

28. Ma, G., Rahman, M. M., Grant, W., Schmidt, O., & Asgari, S. (2012). Insect tolerance to the crystal toxins Cry1Ac and Cry2Ab is mediated by the binding of monomeric toxin to lipophorin glycolipids causing oligomerization and sequestration reactions. *Developmental & Comparative Immunology*, 37(1), 184-192.
29. Ma, G., Roberts, H., Sarjan, M., Featherstone, N., Lahnstein, J., Akhurst, R., & Schmidt, O. (2005). Is the mature endotoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* inactivated by a coagulation reaction in the gut lumen of resistant *Helicoverpa armigera* larvae? *Insect biochemistry and molecular biology*, 35(7), 729-739.
30. Macpherson, J. S., Jodrell, D. I., & Guichard, S. M. (2006). Validation of real-time reverse-transcription-polymerase chain reaction for quantification of capecitabine-metabolizing enzymes. *Analytical biochemistry*, 350(1), 71-80.
31. Magee, J., Kraynack, N., Massey Jr, H. C., & Telfer, W. H. (1994). Properties and significance of a riboflavin-binding hexamerin in the hemolymph of *Hyalophora cecropia*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 25(2), 137-157.
32. Martins, J. R., Nunes, F. M. F., Simões, Z. L. P., & Bitondi, M. M. G. (2008). A honeybee storage protein gene, hex 70a, expressed in developing gonads and nutritionally regulated in adult fat body. *Journal of Insect Physiology*, 54(5), 867-877.
33. Memmel, N. A., Trewitt, P. M., Grzelak, K., Rajaratnam, V. S., & Kumaran, A. K. (1994). Nucleotide sequence, structure and developmental regulation of LHP82, a juvenile hormone-suppressible hexamerin gene from the waxmoth, *Galleria mellonella*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 24(2), 133-144.
34. Miller, S., & Silhacek, D. (1995). Riboflavin binding proteins and flavin assimilation in insects. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 110(3), 467-475.
35. Miura, K., Shinoda, T., Yura, M., Nomura, S., Kamiya, K., Yuda, M., & Chinzei, Y. (1998). Two hexameric cyanoprotein subunits from an insect, *Riptortus clavatus*: Sequence, phylogeny and developmental and juvenile hormone regulation. *European journal of biochemistry*, 258(3), 929-940.
36. Nicholas, K. B. (1997). GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *Embnew. news*, 4, 14.
37. Palli, S., Ladd, T., Ricci, A., Primavera, M., Mungrue, I., Pang, A., & Retnakaran, A. (1998). Synthesis of the same two proteins prior to larval diapause and pupation in the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *Journal of Insect Physiology*, 44(5-6), 509-524.
38. Pan, M., & Telfer, W. H. (1999). Equivalence of riboflavin-binding hexamerin and arylphorin as reserves for adult development in two saturniid moths. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 42(2), 138-146.
39. Pick, C., Schnerer, M., & Burmester, T. (2010). Ontogeny of hemocyanin in the ovoviviparous cockroach *Blattella germanica* suggests an embryo-specific role in oxygen supply. *Journal of Insect Physiology*, 56(5), 455-460.
40. Poopathi, S., Thirugnanasambantham, K., Mani, C., Mary, K. A., Mary, B., & Balagangadharan, K. (2014). Hexamerin a novel protein associated with *Bacillus sphaericus* resistance in *Culex quinquefasciatus*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 172(5), 2299-2307.
41. Saraswathi, S., Bodampalli Sarvesh, C., Kiran, T., Ravindran, M., Ramachandra, S., Rao, K. V., & Doddamani, M. (2021). A comparative protein profile of accessory glands of virgin and mated *Leucinodes orbonalis* males. *Physiological Entomology*, 46(1), 60-69.
42. Spiliotopoulos, A., Gkouvtzas, T., Fantinou, A., & Kourti, A. (2007). Expression of a cDNA encoding a member of the hexamerin storage proteins from the moth *Sesamia nonagrioides* (Lef.) during diapause. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 148(1), 44-54.
43. Šula, J., Kodrik, D., & Socha, R. (1995). Hexameric haemolymph protein related to adult diapause in the red firebug, *Pyrrhocoris apterus* (L.) (Heteroptera). *Journal of Insect Physiology*, 41(9), 793-800.
44. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, 28(10), 2731-2739.
45. Tang, B., Wang, S., & Zhang, F. (2010). Two storage hexamerins from the beet armyworm *Spodoptera exigua*: cloning, characterization and the effect of gene silencing on survival. *BMC molecular biology*, 11(1), 1-13.

46. Tian, Y., Qu, Y., Dong, K., He, S., Jie, W., & Huang, J. (2021). Characterization and Developmental Expression Patterns of Four Hexamerin Genes in the Bumble Bee, *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Insect Science*, 21(5), 13.
47. Tsai, M. C., Tsai, C. L., & Chen, M. E. (2014). cDNA cloning and transcriptional expression profiles of a hexamerin in the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 86(3), 180-191.
48. Wang, J., Fan, H., Wang, P., & Liu, Y.-H. (2019). Expression analysis reveals the association of several genes with pupal diapause in *Bactrocera minax* (Diptera: Tephritidae). *Insects*, 10(6), 169.
49. Wang, S., Hu, B., Wei, Q., & Su, J. (2019). Cloning and characterization of hexamerin in *Spodoptera exigua* and the expression response to insecticide exposure. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 22(2), 602-610.
50. Wolschin, F., & Gadau, J. (2009). Deciphering proteomic signatures of early diapause in *Nasonia*. *PloS one*, 4(7), e6394.
51. Xu, S., Wu, Y., Liu, Y., Zhao, P., Chen, Z., Song, F., Li, H., & Cai, W. (2021). Comparative mitogenomics and phylogenetic analyses of Pentatomoidea (Hemiptera: Heteroptera). *Genes*, 12(9), 1306.
52. Zhai, Y., Lin, Q., Zhang, J., Zhang, F., Zheng, L., & Yu, Y. (2016). Adult reproductive diapause in *Drosophila suzukii* females. *Journal of Pest Science*, 89(3), 679-688.
53. Zhou, X., Tarver, M. R., & Scharf, M. E. (2007). Hexamerin-based regulation of juvenile hormone-dependent gene expression underlies phenotypic plasticity in a social insect.
54. Zhu, J. Y., Ye, G. Y., Fang, Q., Hu, C., & Akhtar, Z. r. (2009). cDNA of an arylphorin-type storage protein from *Pieris rapae* with parasitism inducible expression by the endoparasitoid wasp *Pteromalus puparum*. *Insect Science*, 16(3), 227-236.