نامه انجمن حشره‌شناسی ایران ۴۱-۲۷ ,(۱)۳۷ ,۱۳۹۶
JOURNAL OF ENTOMOLOGICAL SOCIETY OF IRAN
2017, 37 (1), 27–41

شناسایی ژن‌های کاندیدای گلوتاتیون اس ترانسفراز (GST)در سن گندم، *Eurygaster integriceps* Put. (Hem.: Scutelleridae)، با آنالیز کل ترانسکریپتوم

مهدی دسترنج[۱و۲]، محمدرضا غفاری[۲]، علیرضا بندانی[۱] و قاسم حسینی سالکده[۲و*]
۱- گروه گیاه‌پزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران و ۲- بخش زیست‌شناسی سامانه‌ها،پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
*مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: h_salekdeh@abrii.ac.ir

چکیده

ژن‌های گلوتاتیون اس ترانسفراز (GST) صفات حیاتی برای متابولیسم سموم مختلف را کنترل می‌کنند که شامل سامانه‌های دفاعی گیاه میزبان و محیط (حشره‌کش‌ها)، که حشره با آن روبرو می‌شود، می‌باشند. سن گندم، مهم‌ترین آفت مزارع گندم و جو در خاورمیانه است که امنیت غذایی را تهدید می‌کند. در این مطالعه با استفاده از توالی یابی RNA، امکان پویش در سطح ترانسکریپتوم برای شناسایی، بررسی ساختار و عملکرد خانواده‌های مختلف ژنی در سن گندم فراهم شد. برای اولین بار با استفاده از آنالیزهای بیوانفورماتیک ۴۳ ژن کاندیدای GST در سن گندم شناسایی شد. آنالیزهای فیلوژنی نشان داد این ژن‌ها در پنج دسته GST سیتوزولی (دلتا، تتا، زتا، امگا، سیگما) و GST میکروزومی طبقه‌بندی می‌شوند. زیرگروه سیگما با ۲۲ ژن کاندیدا، بزرگ‌ترین زیرگروه و GST میکروزومی با یک ژن کوچک‌ترین گروه شناسایی شد. با توجه به نقش این ژن‌ها در میانکش بین حشره، سموم و محیط، نتایج این تحقیق می‌تواند نقشه راه تحقیقاتی در زمینه مقاومت به سموم را فراهم و برای برنامه کاربردی کنترل سن گندم در آینده مورداستفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: گلوتاتیون اس ترانسفراز، *Eurygaster integriceps*، مقاومت،ترانسکریپتوم و RNA-seq

Identification of candidate Glutathione S-transferase (GST) genes in Sunn pest, *Eurygaster integriceps* Put. (Hem.: Scutelleridae), using RNA-seq analysis

Mehdi Dastranj[1&2], Mohammad Reza Ghaffari[2], Alireza Bandani[1] & Ghasem Hosseini Salekdeh[2&*]
1-Department of Plant Protection, University of Tehran, Karaj, Iran and 2- Systems Biology Department, Agricultural biotechnology Research Institute of Iran,Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
*Corresponding author, E-mail: h_salekdeh@abrii.ac.ir

Abstract

Glutathione S-transferase (GST) genes control vital traits for metabolism of the variety of toxins that expose insects to the environment (insecticide) or plant defense systems. Sunn pest is the most important pest of wheat and barley in the Middle East where it threats food security throughout the region. Sequencing the sunn pest's RNA provides an opportunity to identify the structure and function of the different gene families. To our knowledge, this is the first study to identify 43 GST candidate genes in sunn pest using bioinformatics tools. The identified candidate genes clustered in 5 cytosolic GST (Delta, Theta, Zeta, Omega, and Sigma) and Microsomal GST using phylogenetic analysis. The Sigma subclass was identified as the biggest subclass with 22 candidate genes, while microsomal GST found to be the smallest group with one candidate gene. Given the role of GST in the interactions among the insect, toxins, and environment, our results facilitate future investigations on insecticide resistance and their utilization in pest management programs against sunn pest.

Keywords: Glutathione S-transferase, *Eurygasterintegriceps*, Resistance, Transcriptome, RNA-seq
Received: 10 November 2016, *Accepted*: 12 February 2017

دریافت: ۱۳۹۵/۸/۲۰، پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۲۴.
دبیر تخصصی: سعید محرمی‌پور

مقدمه

گلوتاتیون اس ترانسفرازها (Glutathione S-transferase) خانواده گسترده‌ای از آنزیم‌هایچندمنظوره هستندکه در بسیاری از فعالیت‌های فیزیولوژیک از قبیل سم‌زدایی ترکیبات سمی خارجی و داخلی، انتقالات بین سلولی، بیوسنتز هورمون‌ها و دفاع در برابر تنش‌های اکسایشی نقش دارند (Fang, 2012; Shi *et al*., 2012). گلوتاتیون اس ترانسفرازهای انسانی نقش مهمی در حفاظت از ساختار سلولی و DNA علیه مواد سمی و سرطان‌زا دارد. بااین‌حال به نظر می‌رسدGST نقش مهمی در سم‌زدایی حشره‌کش‌ها ایفا کند. فعالیت این آنزیمدر استرین‌های مقاوم به سموم پایروتروئید و ارگانوفسفره در حشره *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) افزایش معنی‌داری نسبت به استرین حساس داشته است (Yu, 1992). در حشره *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae)، GST سه برابر برخی ارگانوفسفره‌ها افزایش فعالیت نشان داده‌است که حاکی از نقش این آنزیم در سم‌زدایی و مقاومت به ارگانوفسفره‌های در شب‌پره پشت الماسی است (Huang *et al*., 1998). ازلحاظ مکانیسم عمل این آنزیم واکنش پیوند بین ترکیبات الکترون دوست با گروه تیول مولکول گلوتاتیون احیاء شده را تسهیل می‌کند. این عمل سبب افزایش قابلیت انحلال در آب و دفع شدن محصول واکنش می‌شود (Habig *et al*., 1974; Clark *et al*., 1984).

بر اساس جایگاه سلولی GSTها به شکل کلی به GST سیتوزولی (Cytosolic)، میکروزومی (Microsomal) و میتوکندریایی تقسیم می‌شوند. تاکنون در حشرات GST میتوکندریایی شناسایی نشده‌است (Shi *et al*., 2012). GST سیتوزولی پروتئین‌هایی با ۲۰۰–۲۵۰ اسیدآمینه هستند. در حالت فعال این آنزیم‌ها به دو شکل هترودیمر و همودیمر می‌باشند. این نوع GST در حشرات بر اساس شباهت توالی، واکنش‌های ایمنی و حساسیت به مهارکننده‌های مختلف به شش دسته دلتا (Delta)، اپسیلون (Epsilon)، امگا (Omega)، سیگما (Sigma)، تتا (Theta) و زتا (Zeta) تقسیم می‌شود (Ranson *et al*., 2001; Ranson *et al*., 2002; Ding *et al*., 2003).از لحاظ ساختار سه‌بعدیGST میتوکندریایی با GST سیتوزولی شباهت دارند اما شباهت ساختاری با GST میکروزومی ندارند. اگرچه هر سه خانواده GST دارای اعضایی هستند که کانژوگه گلوتاتیون احیاء شده را با سوبسترای (1-chloro-2,4-dinitrobenzene) CDNB را کاتالیز می‌کنند و فعالیت گلوتاتیون پراکسیدازی روی کیومین هیدروپروکساید (Cumene hydroperoxide (CuooH)) دارند (Hayes *et al*., 2005).

از زمان توالی یابی ژنوم درزوفیلا، پیشرفت‌های زیادی در حوزه فیزیولوژی حشرات و اندوکرینولوژی ایجادشده است (Hewes & Taghert, 2001). بااین‌حال در تحقیقات آینده در حوزه مدیریت مقاومت به حشره‌کش‌ها، به‌ویژه در حشراتی که ژنوم آن‌ها توالی یابی نشده است، داشتن اطلاعات در حوزه مولکولی در مورد ژن‌ها و آنزیم‌هایی که دخیل در مقاومت هستند بسیار ضروری به نظر می‌رسد. برای رسیدن به این منظور و تولید داده‌های ترانسکریپتوم برای آنالیز پروفایل بیان ژن‌ها در سطح ژنوم، توالی یابی RNA از طریق فنّاوری نسل بعد که توانایی تولید توالی‌های با حجم بالا و هزینه کم را دارد می‌تواند مورداستفاده قرار بگیرد (Hsu *et al*., 2012).

آنالیز ترانسکریپتوم به‌روش‌های مختلفی شامل نورترن بلات، واکنش زنجیرهای پلیمراز رونوشت‌برداری معکوس (RT-PCR)، ریزآرایه (Microarray) و توالی‌یابی به روش‌های سنتی انجام می‌شود (Morozova & Ma Marra, 2008).روش‌هاییادشده دارای معایب خاصی هستند که از مهم‌ترینآن‌هامی‌توان به استفاده از مواد رادیواکتیو در نورترن بلات، کارایی پایین در روش واکنش زنجیرهای پلیمرازرونوشت‌برداری معکوس، عدم شناساییرونوشت‌هایجدیدوعدم تواناییبرای استفاده برای موجوداتی که ژنوم شان توالیابی نشده

استتوسط ریزآرایه و هزینه، زمان و پیچیدگی بالای توالی‌یابی سنتی اشاره کرد.توالی یابی ژنوم و ترانسکریپتوم به شکل High-throughput پنجره جدیدی برای مطالعه اطلاعات ژنتیکی و عملکردی با سرعت بالا و در مقیاس وسیع باز کرده است. برای مثال با توالی یابی RNA محققین قادر به مطالعه ساختار رونوشت (از قبیل پیرایش RNA)، اطلاعات آللی (برای مثال SNPها)، بررسی بیان با دقت بالا و شناسایی و بررسی وجود ژن‌های مختلف می‌سازد. این مزایا به شکل کلی تحقیق در ژنومیکس عملکردی را در گونه‌هاییمانند موجودات غیر مدل (موجوداتی که باوجوداهمیت‌های تکاملی و اکولوژیکی مطالعات کمی روی آن‌ها صورت گرفته است) که دارای محدودیت منابع مالی و ژنتیکی مقدور می‌سازد (Haas *et al*., 2013).

سن گندم *Eurygaster integriceps* Put. (Heteroptera: Scutellaridae) مهم‌ترین آفت مزارع گندم و جو در ایران استو همچنین در بسیاری از کشورهای منطقه خاورمیانه، شرق اروپا و شمال آفریقا پراکنده است. این آفت امنیت غذایی را تهدید می‌کند و کاهش پایداریسامانه‌های کشاورزی گندم‌کاری را به دنبال دارد (Critchley 1998; Yandamuri *et al.*, 2014). سن گندم در مرحله پورگی و حشره کامل با تغذیه از گیاه میزبان باعث خسارت به گندم می‌شود و سبب کاهش محصول به دنبال تغذیه آفت از برگ، ساقه و دانه‌های گندم هست. در کنار اثرات مستقیم روی محصول، ترشحات بزاقی سن‌ها باعث کاهش کیفیت نان می‌شود (Critchley, 1998). مدیریت این آفت تا به امروز به شکل گسترده بر اساس استفاده از حشره‌کش‌ها بوده است اما سطح کنترل کاملاً متغیر هست و نگرانی‌هایی به دلیل پیدایش مقاومت به حشره‌کش‌ها نیز وجود دارد (Iranipour *et al.*,2010).

هدف از مطالعه حاضر پویش ترانسکریپتوم سن گندم به‌منظور شناسایی ژن‌هایGST بود.ازآنجایی‌که ژنوم سن گندم تاکنون توالی یابی نشده‌است برای رسیدن به این منظور از فنّاوریمقرون‌به‌صرفه نسل بعد RNA-seq استفاده شد.با توجه به نقشی که این ژن‌ها در سم‌زداییآفت‌کش‌ها دارند، شناسایی گروه‌های مختلف ژن GST به نظر می‌رسد در برنامه مدیریت مقاومت احتمالی سن گندم به حشره‌کش‌ها کمک کند.

مواد و روش‌ها

پرورش حشره و استخراج RNA

پوره‌های سن چهارم و پنجم سن گندم در خردادماه از مزارع جو موسسه تحقیقات ورامین که سم‌پاشی علیه پوره انجام‌نشده بود جمع‌آوریشدند. سن‌های جمع‌آوری‌شده روزانه بازدید و هم‌سن سازی به شکل روزانه انجام می‌گرفت. حشرات هم‌سن تا زمان ظهور حشرات کامل، در اتاقک رشد با شرایط دمایی ۱±۲۶ رطوبت ۱۰±۶۰ و رژیم نوری (۱۶: L۸D) نگهداری و توسط خوشه‌های تازه و بریده گندم تغذیه شدند. از فالکن‌های آب ۱۰ میلی‌لیتری که درب آن با پنبه پوشیده شده است به‌عنوان منبع آب استفاده شد. استخراج RNA از تک حشره سن گندم با استفاده از کیت RNasymini و با توجه به دستورالعمل شرکت صورت گرفت. کمیتRNA استخراج‌شده از سن گندم به‌وسیله نانودراپ و کیفیت آن بر روی ژل آگارز ۱ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. درنهایت از میزان ۱۵ میکروگرم RNA برای سنتز cDNA به‌منظور توالی‌یابی استفاده شد.

RNA-seq

۲۰۰نانوگرم از RNA استخراج‌شده با استفاده از oligo-dT beads خالص‌سازی شد و سپس mRNA که حاوی دم poly (A) بود با بافرِتجزیه‌کننده تیمار و به قطعات کوتاه شکسته‌شد. با استفاده از First Strand Master Mix and Super Script II شرکت Invitrogen سنتز رشته اول cDNA (شرایط واکنش: دمای ۲۵ درجه

سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه، دمای ٤۲ درجه سانتی‌گراد برای ۵۰ دقیقه، دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ دقیقه) انجام شد. سپس دومین رشته cDNA به‌وسیله second Strand Master Mix در دمای ١٦ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت ساخته شد. سپس قطعات کوچک cDNA خالص‌سازی و برای ترمیم و افزودن زنجیره پلی آ در بافرEB حل و در دمای ۳۷ درجه ۳۰ دقیقه انکوبه شد. سپس قطعات کوچک cDNA همراه Adenylate 3'Ends DNA، RNA Index Adapter و Ligation Mix به‌خوبی با پایپت کردن مخلوط شدند. واکنش اتصال آداپتور در دمای ۳۰درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. در نهایت با Ampure XP Beads (AGENCOURT) خالص‌سازی صورت گرفت. در مرحله بعد تکثیر به‌وسیله واکنش زنجیره پلی‌مراز (PCR) همراه با مستر میکس PCR و پرایمرهای Cocktail برای تقویت قطعات cDNA انجام شد و نهایتاً محصول PCR به‌وسیله Ampure XP Beads (AGENCOURT) خالص شد. کیفیت کتابخانه سنتز شده به‌وسیلهAgilent 2100 bioanalyzer (Agilent DNA 1000 Reagents) و Real-time PCR مورد تأیید قرار گرفت. در مرحله پایانی، کتابخانه cDNA، توسطدستگاه Illumina HiSeq™ 2500 با استفاده از فناوری خوانش دوطرفه

(Pair-end) طبق دستورالعمل موسسه ژنوم بیجینگ (Shenzhen, China) توالی‌یابی شد. نتیجه توالی یابی درمجموع ۳۲۰ میلیون جفت باز با طول توالی ۱۵۰ جفت باز بود.حذف آداپتور و دور انداختن خوانش‌های با کیفیت پایین توسط موسسه بیجینگ (Beijing Genome Institute) انجام شد.

اسمبلی ترانسکریپتوم به روش De novo

کیفیتتوالی‌ها با استفاده از نرم‌افزارFASTQC کنترل شد. نتیجه کنترل کیفیت خوانش‌ها فاقد آلودگی به آداپتور، فاقد توالی‌های بی‌کیفیت (Sequences flagged as poor quality) و نزدیک به ٤۰ درصد محتویGC بودند.خوانش‌های خام در مرحله بعدبا استفاده از نرم‌افزارTrinity در K-mer ۳۲ برای مونتاژ به‌صورت de novo مورداستفاده قرار گرفتند (Haas *et al.*, 2013). این نرم‌افزار از الگوریتم de Bruijn در طی سه مرحله Inchworm، Chrysalis و Butterfly برای مونتاژ خوانش‌ها استفاده می‌کند (Haas *et al.*, 2013). جدول ۱ نشان‌دهنده پارامترهای کیفیت مونتاژ در توالی یابی RNA سن گندم است.

جدول۱- خلاصه کیفیت مونتاژ توالی یابی RNA سن گندم

Table 1. Summary of assembly quality for Sunn pest RNA-seq

پارامترهای کیفیت مونتاژ	
کل کانتیگ‌های تولیدشده	۵۸۲۳۹۸
بیشترین طول کانتیگ	۲٦۰۲٦
کمترین طول کانتیگ	۲۰۱
میانگین طول کانتیگ	۵۵۷/٦
کانتیگ‌های بین ۲۰۰-۵۰۰	٤٤۱۰٦۳
کانتیگ‌های بین ۵۰۰-۱۰۰۰	۷۷٦۷۵
کانتیگ‌های بین ۱۰۰۰-۲۰۰۰	۳۷٦۱۸
کانتیگ‌های بیش از ۲۰۰۰	۱٤۱۳۳۵
N50	٦۹۳

شناسایی ژن‌های کاندیدایگلوتاتیون اس ترانسفراز در سن گندم

با استفاده از توالی‌هایاسیدآمینه GST در سه حشره *Nilaparvata lugens*، *Sogatella furcifera* و*Laodelphax striatellus* (به‌عنوان جستار)، جست‌وجوی TBLASTn با Evalue 10^{-15} برای شناسایی GST کاندیدا بر روی ترنسکریپتوم اسمبل شده (به‌عنوان مرجع) صورت گرفت. بعد از شناسایی ژن‌ها، جست‌وجو برای دومین‌هایحفاظت‌شده GST در Conserved domain NCBI انجام شد.

آنالیز فیلوژنی

برای مقایسه ترادف‌های به‌دست‌آمده ابتدا کلیه توالی‌های به‌دست‌آمده در نرم‌افزار Bioedit به فرمت Fasta تبدیل شدند و پس از آن آنالیز فیلوژنی بر اساس هم‌ردیفی توالی‌های آمینواسید با استفاده از Clustal omega انجام گرفت (Sievers *et al.*, 2011). درخت‌های فیلوژنی با روش neighbor-joining و بر اساس مدل پویسن با استفاده از نرم‌افزارMEGA7 و با بوت استرپ ۱۰۰۰ ترسیم شد.

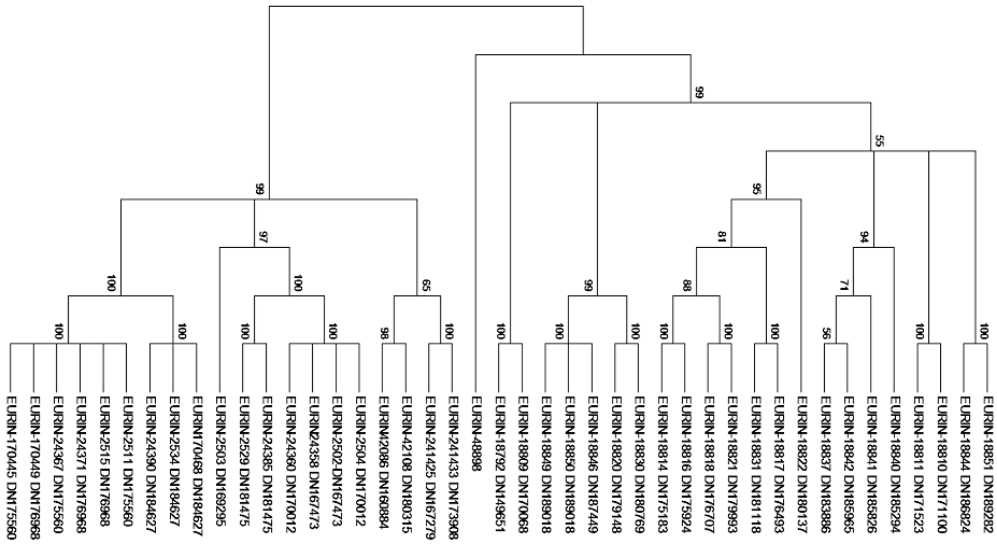
نتایج و بحث

شناسایی ژن‌ها یا آنزیم‌هایی که در پدیده مقاومت به شکل بالقوه یا بالفعل دخیل هستند بسیار ضروری است. گلوتاتیون اس ترانسفراز به‌عنوان یکی از آنزیم‌هایی است که سبب ایجاد مقاومت متابولیکی در حشرات می‌شود تاکنون، اطلاعاتی در زمینه ژن‌های GST در سن گندم وجود ندارد. بنابراین شناسایی پروفایل ژن‌های خانواده بزرگ GST در سطح ترانسکریپتوم در سن گندم برای فهم سازگاری‌های متابولیکی این حشره ارزشمند خواهد بود. بعد از چندین پروژه ژنوم حشرات از قبیل *Drosophila melanogaster*، *Anopheles gambiae*، *Apis mellifera* و *Bombyx mori* به ترتیب ۳۷، ۲۸، ۸ و ۲۳ GST سیتوزولی شناسایی شد (Claudianos *et al.*, 2006).

بر اساس نتایج داده‌کاوی روی ترانسکریپتوم سن گندم و آنالیز فیلوژنی، ٤۳ توالی کاندیدGST از ترانسکریپتوم حشره بالغ سن گندم در فصل بهار شناسایی شد (شکل ۱و جدول ۲). از این میان یک توالی مربوط به GST میکروزومی و ٤۲ توالی مرتبط با GST سیتوزولی است. در تمامی این ٤۳ توالی، دو دومین حفاظت‌شده GST (N و C) وجود داشت..این دو دومین حفاظت‌شده در انتهای آمینی و کربوکسیلی GST واقع‌شده و دارای نقش عملکردی می‌باشند. دومین GST_N که در انتهای آمینی است، یک ساختار شبه تیوردکسین تشکیل می‌دهد که به بخشی از گلوتایتون متصل می‌شود. درحالی‌که دومین GST_C که در انتهای کربوکسیلی است شامل چندین مارپیچ آلفا بوده که به شکل اختصاصی به سوبستراهای آب‌گریز متصل اتصال دارند.

درمجموع این تعداد ژن GST قابل‌مقایسه با *Drosophila melanogaster* با ۳۷ ژن، *Culex quinquefasciatus* با ۳۸ ژن و *Tribolium castaneum* با ۳۵ ژن است (Fang, 2012; Samra *et al.*, 2012; Shi *et al.*,2012). در حالی‌که این تعداد در برخی از حشرات مثل *Apismellifera*، ملخ‌ها به شدت کاهش‌یافته است (Claudianos *et al.*, 2006; Qin *et al.*,2011). از میان ژن‌های شناسایی‌شده، درحالی‌که ٦ ژن در دسته دلتا قرار می‌گیرد، دسته اپسیلون حاوی هیچ‌یک از توالی‌های شناسایی‌شده نیست (شکل ۲). عدم شناسایی دسته اپسیلون در سایر حشرات نظیر ملخ‌ها، *Pediculus humanus*، *Myzuspersicae*،

Acyrthosiphon pisum، *Nasonia vitripennis*، *Apis mellifera*، *Chironomus tentans* نیز مشاهده شده است (Li *et al.*, 2009; Oakeshott *et al.*, 2010; Ramsey *et al.*, 2010; Fang, 2012). این دودسته از GST درواقع دسته‌های اختصاصی در حشرات هستند و فقدان اپسیلون و داشتن فقط یک ژن دلتا در زنبورعسل دلیل حساسیت بالای این‌گونه به حشره‌کش‌ها خاصی است (Claudianos *et al.*, 2006).



شکل ۱- دندروگرام Maximum-likelihood بر اساستوالی‌های پروتئین کاندیدایGST در سن گندم

Fig. 1. Maximum-likelihood dendrogram based on protein sequences of candidate GST in Sunn pest

دسته‌های دیگر GST شامل امگا، سیگما، زتا و تتا به شکل اختصاصی در سایر گونه‌هاگزارش‌شده است. از میان GSTمشاهده‌شده، ۲۲ ژن در دسته سیگما قرار می‌گیرند (شکل ۲). به شکل کلی دسته سیگما در سایر حشرات مانند سخت‌بال‌پوشان، سفیدبالک‌ها، *N. vitripennis*، *A. pisum*، *M. persicae* و *L. migratoria* نیز به شکل گسترده‌ای تکثیرشده است (Richards *et al.*, 2008; Ramsey *et al.*, 2010; Karatolos *et al.*, 2011; Qin *et al.*, 2011). نقش ساختاری برای GST دسته سیگما در حشرات پیشنهادشده که وجود اسیدآمینه پرولین و آلانین در انتهای آمینی آن ممکن است به اتصال ماهیچه‌های پرواز کمک کند. نقش دیگری که برای دسته سیگما در حشرات وجود دارد حذف محصولات جانبی فرآیند پراکسیدشدن چربی‌ها است که دیواره سلولی آسیب می‌رساند؛ بنابراین وجود چندین ژن دسته سیگما ممکن است برای حذف محصولات جانبی استرس‌های اکسیداتیو باشد (Singh *et al.*, 2001).

جدول ۲- توالی‌های اسیدآمینه ژن‌های کاندیدایGST در سن گندم

Table 2. Amino acids sequences of GST candidate genes in Sunn pest

Amino acids sequences of GST	Candidate Gene codes
MTLKFYYDLMSQPCRAIYVFLKLNKINYERKIVNLRFLEHKSEEFLKINPFG LVPVIDDNGFIVKESVGILRYLCREKNVADHWYPKESKAQAKVDEFIEWQ HLGLRLPCGMYFRINCVEPRISGEPALESDLKRFRNAMISSCDLVENVWLN NKEKFLFGSHLTIADLLAVMELEQPRPTGYDPKQGRPRLAAYMDRVRSET	EURIN-2511_DN175560

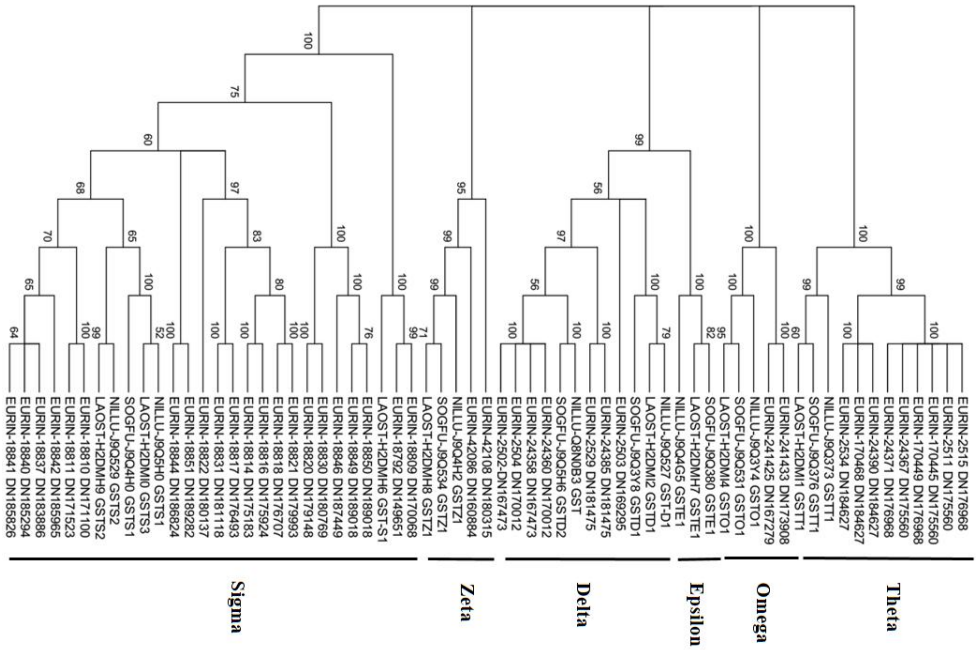
APFYDEANKFINILSSRTDS	
MTLKFYYDLMSQPCRAIYVFLKLNKINYERKIVNLRFLEHKSEEFLKINPFG LVPVIDDNGFIVKESVGILRYLCREKNVADHWYPKESKAQAKVDEFIEWQ HLGLRLPCGMYFRINCVEPRISGEPALESDLKRFRNAMISSCDLVENVWLN NKEKFLFGSHLTIADLLAVMELEQPRPTGYDPKQGRPRLAAYMDRVRSET APFYDEANKFINILSSRTDS	EURIN-2515_DN176968
MVVKLRYFNMTGLGEPIRLMLAATKTEFEDIRLNKEEWAKMKPTLKWPFL PVLEMDGKSMVQSVSICRYIAKKNSLCGSSEDDAYACDATVDHLEDIRKKI VVNYYSPDSKERDEGLEKNIKVDVPFYMKNFEEQLAENNGYLVGGKLTW ADIMFLSYCDYLSFILGHDIVTGFPKLKEHKDKISDLPGIKEWLATRPTSVK DLRTLFM	EURIN-18846_DN187449
MVVKLRYFNMTGLGEPIRLMLAANKTEFEDIRLNKEEWAKMKPTLKWPF LPVLEMDGKSMVQSVSICRYIAKKNSLCGSSEDDAYACDATVDHLEDIRK KIVVHYYSPDSKERDEGLEKNIKVDVPFYMKNFEEQLAENNGYLVGGKLT WADIMFLSYCDYLSFILGHDIVTGFPKLKDHKDKISDLPGIKEWLATRPTSV KDLRTLFM	EURIN-18850_DN189018
MTGREGISKLTNLFWPDWRDGIVRKMVVKLRYFNMTGLGEPIRLMLAAT KTEFEDIRLNKEEWAKMKPTLKWPFLPVLEMDGKSMVQSVSICRYIAKKN SLCGSSEDDAYACDATVDHLEDIRKKIVVHYYSPDSKERDEGLEKNIKVDV PFYMKNFEEQLAENNGYLVGGKLTWADIMFLSYCDYLSFILGHDIVTGFPK LKDHKDKISDLPGIKEWLATRPTSVKDLRTLFM	EURIN-18849_DN189018
MVVKLTYFQIPGRGEPIRMLLSAMKIEFEDRRVTMDEWAKLKPTLKWPHL PMLEMDGKTLFQSMSISRYLARKGGLYASSEDGSLAIDTMVDAIDDMRRK VTDFYYLRDSKERDEGLKNSSEVIVPLYMKNIEEQLAENNGYLVAGKLTW ADINFITYTSYVSYLLGHDILTDFPRLKEHEKKISELPGIKEYLDKRPPFPKD MRTVFGQR	EURIN-18830_DN180769
KGKSVASISRNMVVKLTYFQIPGRGEPIRMLLSAMKIEFEDRRVTMDEWA KLKPTLKWPHLPMLEIDGKTLFQSMSISRYLARKGGLYVSSEDGSLAIDTM VDAIDDMRRKVTDFYYLRDSKERDEGLKNSSEVIVPLYMKNIEEQLAENN GYLVAGKLTWADINFITYTSYVSYLLGHDILTDFPRLKEHEKKISELPGIKE YLDKRPPFPKDM	EURIN-18820_DN179148
MAEVSDPVHHHLRHKKPRRHKKPRYKLTYYDAKALGEPIRYYLSYLGKEF EDIRLPVNPTLDCNVTGPNFKRIPNLQIDRDQMIDHPVAIMRHLANEAGMS GDNFKEYLEIDMIIGLFCEMQSEITKYLNIVLEKEKKRVKELLIRQIIPSYMD RFKDSIDRNRGYMANGRLTWVDIYVVAYCESFPGMLGIDAFEKYPFLKEL KDKVQALPGIKEWINRRPVTEI	EURIN-18822_DN180137
DTTPSNRMPKYKLYYLEAKGLGESIRFILSYMGEEFEDIRLPFEKVFKLRSM PEVPYGKVPYLEVDGKVLHQSTAILRHLANKAGLNGSNENENLNIDMIAG VFGDLIVEIQRFIKAQNPSEKDQIKELLINDIIPYYMEKIEAVLKENGGYLAN GKISWADLYAVGYSESVPGLIGVDLTQKYPHFKALVDRVHSLPGVIEWIEK RPVANV	EURIN-18817_DN176493
QFGDTTPSNRMPKYKLYYLEAKGLGESIRFILSYMGEEFEDIRLPFEKVFKL RSMPEVPYGKVPYLEVDGKVLHQSTAILRHLANKAGLNGSNENENLNIDM IAGVFGDLIVEIQRFIKAQNPSEKDQIKELLINDIIPYYMEKIEAVLKENGGY LANGKISWADLYAVGYSESVPGLIGVDLTQKYPHFKALVDRVHSLPGVIE WIEKRPVANV	EURIN-18831_DN181118
MPQYKLTYFDVKALGEPIRYILSYMGKEFEDHRLGRDEWPKFKEQMPFGK LPILEVDGQVFHQSTAILRYLAIEAGLAGNNARENLEIDMVVGAFGDFATE VSRYYRMEVPSVKEKLKEILINETIPFYMSRLEQLLKNNGGYLANGKLSWA ELYVVGYSTSLPGLLEIDLTEKYNFFKELTNKVHSLPGIKEWIKKRPDTAI	EURIN-18821_DN179993
EYPRLNSFSQWQSPAIHTRSFRKMPQYKLTYFDVKALGEPIRYILSYMGKE	EURIN-

FEDHRLGRDEWPKFKEQMPFGKLPILEVDGQVFHQSTAILRYLAIEAGLAG NNARENLEIDMVVGAFGDFATEVSRYYRMEVPSVKEKLKEILINETIPFYM SRLEQLLKNNGGYLANGKLSWAELYVVGYSTSLPGLLEIDLTEKYNFFKEL TNKVHSLPGIKEWIKKRPDTAI	18818_DN176707
MSHIKLNYFDIRVIGEPIRLLFHYMGKEFEDYRVPRDQWPAYKKVTPFGKM PVLEIDGKVYCQSIPMLRYLAHEAGLTGNNPDENYEIDMIVAAFGDLVSEV SRHFKAHLPQEKEIIRQGIINDAIPFYMEKLEKVVKKNGGYLANGKLSWAE FFVVGYSSSLPGLIGVDLTEKYPFFKELTDKVHSLPGIKEWIKIRPKTPL	EURIN-18816_DN175924
MSHIKLNYFDIRVIGEPIRLLFHYMGKEFEDYRVPRDQWPAYKKVTPFGKM PVLEIDGKVYCQSIPMLRYLAHEAGLTGNNPDENYEIDMIVAAFGDLVSEV SRHFKAHLPQEKEIIRQGIINDAIPFYMEKLEKVVKKNGGYLANGKLSWAE FFVVGYSSSLPGLIGVDLTEKYPFFKELTDKVHSLPGIKEWIKIRPKTPL	EURIN-18814_DN175183
RADSTHSSTLPRSTKEMPPQYKLIYFNARGKAEHIRFIFAEAGVDYIDYRIPK EKWPEMKKTMPFGMVPVLEVEGEGQVGQSNAIARYLAHKYGLAGKTPW EALECDVLVDTLGDLKQVLWQYRTEQDPSKKEERKVNLMKEVIPFYLRRF ERIIRDNNGFAVGNSVTWADFAFAVSLENFELIFGKDSLDPYPNLRGLKDR VYALPRIKEWIARRPQTEF	EURIN-18809_DN170068
DHRADSTHSSTLPRSTKEMPPQYKLIYFNARGKAEHIRFIFAEAGVDYIDYR IPKEKWPEMKKTMPFGMVPVLEVEGEGQVGQSNAIARYLAHKYGLAGKT PWEALECDVLVDTLGDLKQVLWQYRTEQDPSKKEERKVNLMKEVIPFYL RRFERIIRDNNGFAVGNSVTWADFAFAVSLENFELIFGKDSLDPYPNLRGLK DRVYALPRIKEWIARRPQTEF	EURIN-18792_DN149651
MATYKLIYFNIMGLGETIRYMLSYLGKDFEDFRIHNYSDWISEFKPKMPFQ KIPLLEIGEHRLHQSMAICRYFAKEANLYGDNAWEQLQIDMIMDSFVDFRH AVWSYFYNRDEANREHLKGNLFDKIVPLYLGNFDKIIEENEYLANKKLSW ADLYFVAILGYFSFMLKLDIVKEYPNIRALRDKIHEIPNIKAWLEKRPVTDW	EURIN-18851_DN189282
MATYKLIYFNIMGLGETIRYMLSYLGKDFEDFRIHNYSDWISEFKPKMPFQ KIPLLEIGEHRLHQSMAICRYFAKEANLYGDNAWEQLQIDMIMDSFVDFRH AVWSYFYNRDEANREHLKGNLFDKIVPLYLGNFDKIIEENEYLANKKLSW ADLYFVAILGYFSFMLKLDIVKEYPNIRALRDKIHEIPNIKAWLEKRPVTDW	EURIN-18844_DN186824
YWFDNSSPVLLATSRLCLIKLEDCWKMPHYKLTYFPVTALAEPIRYMLSYL GEDFEDYMFKREDWPSIKPKMPFGKVPVLEIDDKQVHQSTAICRYFGKKA QLAGKNDWEALQIDMVVDTVHDMRQAIADYWYDDNEATRAKKKEPLM KETLPFYLKKFDEMVKENNGYLVNSALSWGDIYFIAISNYLIKMIGFDFFEE HENLKRLKDNVLSLPKIQKWIETRPKVEF	EURIN-18810_DN171100
NSSPVLLATSRLCLIKLEDCWKMPHYKLTYFPVTALAEPIRYMLSYLGEDF EDYMFKREDWPSLKPKMPFGKVPVLEIDDKQVHQSTAICRYFGKKAQLAG KNDWEALQIDMVVDTVHDMRQAIADYWYDDNEATRAKKKEPLMKETLP FYLKKFDEMVKENNGYLVNSALSWGDIYFIAISNYLIKMIGFDFFEEHENL KRLKDNVLSLPKIQKWIETRPKVEF	EURIN-18811_DN171523
MPHYKLTYFDITGIAEPIRYLLCILGEEFEEHKVQLEDWPSLKPTTPFGKVP VLEVDGKAVCQCIAICRYLGRKAKLTGKDEWEDLQIDMIVDTLTDLRQAV SEYYWSTDEISKPKMLEVLHKETLPFYFERFDKIVKNNGYLANGKLSWGDI FFVGLLFHFHMYAGGYDYKEHFENLKGLHDKIMALPEIKKWIQSRGNIAY GVDLAKAQSMRQKKLV	EURIN-18840_DN185294
MPTYKLTYFDGSGVGEPIRYMLSMLGDGFEDKRMKFDEWPAIKPTTPFGK VPMLEVDGKTVCQSTAICRYLGRKVNLAGKDEWEDLQIDMMVDTYHDFR REVGDYRHENDVDKKAKKLEVLMSETCPAYLAKFDEYAKKNNGYLANG RLSWGDIYFVAASHTIKNILEYDFTEKYDNLKRLQENVMSLPQIKKWVESR AKTIKT	EURIN-18842_DN185965

MPSYKLTYFDIPGLAEPIRYMFCLLGEDFEDNRIKKEDWISIKPTTPFGKVPI LEVDGKVVCQSVAICRYLGKKAKLAGNDEWEDLQIDMMVESLQDLRQAV GEYFREEDDTLKNKKHEVLLKETAPFYFGKFDEIVKENNGYLANGKLSWA DIYFIGSTILMNPMLGYDFTEHFENLKRLHDTVMSLPQIKKWYDSREKVEG N	EURIN-18841_DN185826
MPSYKLTYFDISGLAEPIRYMFCLLGEDFEDNRLKMEEWAAVKPTTPFGKL PMLEVDGKVVTQSTAICRFLGKKAKLAGKDEWEDLQIDMMIDTFHDLRQ ALSDYYREKDEDSKAKKLEALKNETFPFYFGKFDEIVKNNNGYLANGRLS WGDIYFIGGSLFFKTMTGYDFTEHFENLKRLFDTVMALPQIKKWNDSRAK DA	EURIN-18837_DN183886
MTLKFYYDLMSQPCRAIYVFLKLNKINYERKIVNLRFLEHKSEEFLKINPFG LVPVIDDNGFIVKESVGILRYLCREKNVADHWYPKESKAQAKVDEFIEWQ HLGLRLPCGMYFRINCVEPRISGEPALESDLKRFRNAMISSCDLVENVWLN NKEKFLFGSHLTIADLLAVMELEQPRPTGYDPKQGRPRLAAYMDRVRSET APFYDEANKFINILSSRTDS	EURIN-24371_DN176968
MTLKFYYDLMSQPCRAIYVFLKLNKINYERKIVNLRFLEHKSEEFLKINPFG LVPVIDDNGFIVKESVGILRYLCREKNVADHWYPKESKAQAKVDEFIEWQ HLGLRLPCGMYFRINCVEPRISGEPALESDLKRFRNAMISSCDLVENVWLN NKEKFLFGSHLTIADLLAVMELEQPRPTGYDPKQGRPRLAAYMDRVRSET APFYDEANKFINILSSRTDS	EURIN-24367_DN175560
MTLKFYYDLMSQPCRAIYVFLKLNKINYERKIVNLRFLEHKSEEFLKINPFG LVPVIDDNGFIVKESVGILRYLCREKNVADHWYPKESKAQAKVDEFIEWQ HLGLRLPCGMYFRINCVEPRISGEPALESDLKRFRNAMISSCDLVENVWLN NKEKFLFGSHLTIADLLAVMELEQPRPTGYDPKQGRPRLAAYMDRVRSET APFYDEANKFINILSSRTDS	EURIN-170449_DN176968
MTLKFYYDLMSQPCRAIYVFLKLNKINYERKIVNLRFLEHKSEEFLKINPFG LVPVIDDNGFIVKESVGILRYLCREKNVADHWYPKESKAQAKVDEFIEWQ HLGLRLPCGMYFRINCVEPRISGEPALESDLKRFRNAMISSCDLVENVWLN NKEKFLFGSHLTIADLLAVMELEQPRPTGYDPKQGRPRLAAYMDRVRSET APFYDEANKFINILSSRTDS	EURIN-170445_DN175560
RESSDGLTKMTLKYYYDLFSQPSRAVYIFLKINSIPFESHFVNLMTGEHRKK EFKKINPLSLVPVIDDNGFILRESVGILRYLVREKNLPDHWYPKESKAQARF DEFIEWQHLGLRVPLALYFRILKLEPMLKGKPPLEHDIKRWTDAVVYSCNI FEKVWLNNDKKFLFGDLMSIADLLAAMELEQPRMAGYDPRIGRPVLASY MDRVRNETNPFYDEACQMVYTSIDSKL	EURIN-24390_DN184627
RESSDGLTKMTLKYYYDLFSQPSRAVYIFLKINSIPFESHFVNLMTGEHRKK EFKKINPLSLVPVIDDNGFILRESVGILRYLVREKNLPDHWYPKESKAQARF DEFIEWQHLGLRVPLALYFRILKLEPMLKGKPPLEHDIKRWTDAVVYSCNI FEKVWLNNDKKFLFGDLMSIADLLAAMELEQPRMAGYDPRIGRPVLASY MDRVRNETNPFYDEACQMVYTSIDSKL	EURIN-170468_DN184627
MTIDLYMVPGSSPCRAALLAARAVGVDVNIKLTDLMKGEHLTPEFLKMNP QHNIPTMNDNGFVINESRAIMCYLADQYGKDDSLYPKDPKKRAIVNQRLY FDMGTLYLRFGELYYPMIFGGAPYDEEKAKKLHEALGFLEGFLGNSTYAA GENLTLADLALVASLSTMEVIGCDISKYPKIIKWFNKCKETIPDYQKSNHEG AMAFKALFDSMAKK	EURIN-24360_DN170012
MTIDLYMVPGSSPCRAALLAARAVGVDVNIKLTDLMKGEHLTPEFLKMNP QHNIPTMNDNGFVINESRAIMCYLADQYGKDDSLYPKDPKKRAIVNQRLY FDMGTLYLRFGELYYPMIFGGAPYDEEKAKKLHEALGFLEGFLGNSTYAA GENLTLADLALVASLSTMEVIGCDISKYPKIIKWFNKCKETIPDYQKSNHEG AMAFKALFDSMAKK	EURIN-24358_DN167473
SPASFGLTSEINNKMTITLYYLPASPPCRAVLLTARALGIELDLRLTNLRKGE HLTPEYLKLNPQHTIPTMDDDGFVINESRAIICYLADQYGKDDSLYPKDPK	EURIN-24385_DN181475

KRALIHQRLYFDMGTLHIRHAELNRPILFAGAPYDEEKAKKLDEALGYLDG YLSKSTYAAGDTLTLADLSLVATVSTLELIGFNISKHANVTRWLQRCKETIP DYEKYNHEGALEYKAMYDAAKKKK	
TTIENNKRENINQLSKNHHVFYPKTSRLHWKSMAAELKETPKLKLYSYWR SSCSQRVRIALNLKGLEYEYKAVNLLKGEQFTPEFEKLNPLKYVPVLVDGD VAVSDSFAILLYLEDKYPEHPLLPTDLQKKALNIQAASIVGSSIQPLLNLAVL KYIEEKISSDEKLAWVQHHISKGFEALEKLLKGCAGRYATGDEVQLADVFL APQIEGGIKRFQLDMSPFPTLARLHEAYCEHPAFQASHPDRQPDSPSSS	EURIN-42108_DN180315
CDGDCHLFYLGLAYLLIMSSVGKPLLYSYWRSSCAWRVRLALNIKEMQYD IKPINLMKDGGEQNSEEFKNVNPMKRVPALFIDGHTLIESMNIMYYLEETRP ERPLMPNDVFKRTQVRTICEIITSGIQPLQNVTVLNEIGEKKLDWAQRWINK GFEAIEKLLAISSGKYCVGNEITLADCCLVPQVYNAKRFKVDMLPYPTILKI EKELEMVPAFQSAHPLNQPDCPEEAKK	EURIN-42086_DN160884
KMTLKYYYDLFSQPSRAVYIFLKINSIPFESHFVNLMTGEHRKKEFKKINPL SLVPVIDDNGFILRESVGILRYLVREKNLPDHWYPKESKAQARFDEFIEWQ HLGLRVPLALYFRILKLEPMLKGKPPLEHDIKRWTDAVVYSCNIFEKVWLN NDKKFLFGDLMSIADLLAAMELEQPRMAGYDPRIGRPVLASYMDRVRNET NPFYDEACQMVYTSIDS	EURIN-2534_DN184627
EGKLRLYSMRFCPYAQRIHLVLNAKNILHDVVNINLKDKPEWYLEKVPRG KVPAIHVDGVNLYESLIIADYIDEKYPQRPLFPRDPLRKALDRILIDTFSRVIT VLHKLYVNPVMDAQHLGPVLDEMDFFEKELASRGTPFFSGDQPGMVDYM IWPWCERLEMVRVLGGDQFRVPKERFQRLFQWTKGMFEDPAVKLHYCTP EQHAKFLISHRA	EURIN-241433_DN173908
EGKLRLYSMRFCPYAQRIHLVLNAKNILHDVVNINLKDKPEWYLEKVPRG KVPAIHVDGVNLYESLIIADYIDEKYPQRPLFPRDPLRKALDRILIDTFSRVIT VLHKLYVNPVMDAQHLGPVLDEMDFFEKELASRGTPFFSGDQPGMVDYM IWPWCERLEMVRVLGGDQFRVPKERFQRLFQWTKGMFEDPAVKLHYCTP EQHAKFLISHRA	EURIN-241425_DN167279
PFLVDEEFSLSESGAILIYLAEAYGNGDYLYPKDHKQRAIINQRIMFDVGTL WMRLFQCYFLPVFHQNMGINDLIIERVNDAFTTLDAFLDGKEWAAGDEIT VADFCLITTVAASEAVGYEVSKYENVSEWFKRCKEAMVDYGELIQTPMDT LNEYFMAKLSK	EURIN-2503_DN169295
KMTITLYYLPASPPCRAVLLTARALGIELDLRLTNLRKGEHLTPEYLKLNPQ HTIPTMDDDGFVINESRAIICYLADQYGKDDSLYPKDPKKRALIHQRLYFD MGTLHIRHAELNRPILFAGAPYDEEKAKKLDEALGYLDGYLSKSTYAAGD TLTLADLSLVATVSTLELIGFNISKHANVTRWLQRCKETIPDYEKYNHEGA LEYKAMYDAAKKK	EURIN-2529_DN181475
MTIDLYMVPGSSPCRAALLAARAVGVDVNIKLTDLMKGEHLTPEFLKMNP QHNIPTMNDNGFVINESRAIMCYLADQYGKDDSLYPKDPKKRAIVNQRLY FDMGTLYLRFGELYYPMIFGGAPYDEEKAKKLHEALGFLEGFLGNSTYAA GENLTLADLALVASLSTMEVIGCDISKYPKIIKWFNKCKETIPDYQKSNHEG AMAFKALFDSMAKK	EURIN-2504_DN170012
MTIDLYMVPGSSPCRAALLAARAVGVDVNIKLTDLMKGEHLTPEFLKMNP QHNIPTMNDNGFVINESRAIMCYLADQYGKDDSLYPKDPKKRAIVNQRLY FDMGTLYLRFGELYYPMIFGGAPYDEEKAKKLHEALGFLEGFLGNSTYAA GENLTLADLALVASLSTMEVIGCDISKYPKIIKWFNKCKETIPDYQKSNHEG AMAFKALFDSMAKK	EURIN-2502-DN167473
TDISELMSLKNPVFRAYIFYNSVLVLKMLSMSVLTGRMRFAKKVFTSPEDT SLLKGSKVGANDPDVERVRRAHRNDMENILVYFVAAFGYLLTNPAATTAI MLMRLFTVARIVHTLVYAVVVIPQPTRAIAFGVAYFITGYMAVNTILTFI	EURIN-48898

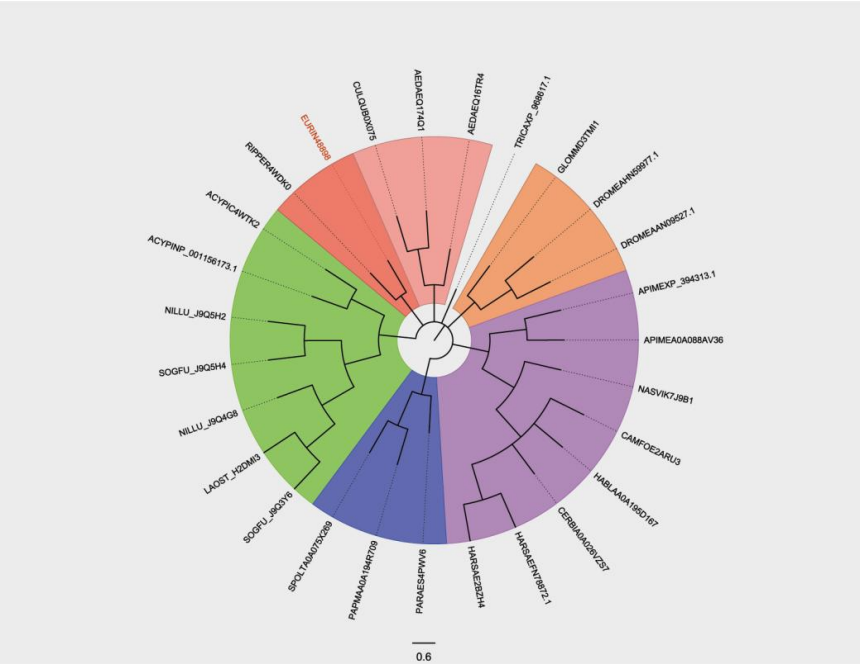
دسته امگا با وجود دو ژن، دسته GST دیگر غیراختصاصی حشرات استکه از ترانسکریپتوم سن گندم شناسایی شد (شکل ۲). وجود GST امگا از سایر حشرات مانند *A. mellifera*، *A. pisum* و *T. castaneum* که به‌ترتیب دارای یک، دو و سه ژن کدکننده GST امگا هستند نیز گزارش‌شده است. در کرم ابریشم بیان ژن‌های دسته امگا در پاسخ به تنش‌های محیطی از قبیل باکتری، اشعه ماورای بنفش و سه آفت‌کش تجاری القا شد (Yamamoto *et al.*, 2011).



شکل ۲- درخت Neighbor-joining گلوتاتیون اس ترانسفراز سیتوسولی در سن گندم و سه زنجرک برنج *Eurygaster integreiceps* (پیشوند EURIN)، *Nilaparvata lugens* (پیشوند NILU)، *Sogatella furcifera* (پیشوند SOGFU) و *Laodelphax striatellus* (پیشوند LAOST).

Fig. 2. Neighbor-joining tree of glutathione S-transferase (GST) genes of sunn pest and three rice planthoppers. *Eurygaster integreiceps* (EURIN prefix), *Nilaparvata lugens* (NILLU prefix), *Sogatella furcifera* (SOGFU prefix) and *Laodelphax striatellus* (LAOST prefix).

GST دسته تتا، به شکل کلی در مکانیسم‌های دفاعی علیه استرس‌های اکسیداتیو و در متابولیسم محصولات پراکسید شدن چربی به وجود می‌آید نقش دارند. این دسته از گلوتاتیون ترانسفراز به نظر می‌رسد بیشتر در جلوگیری از خسارت به پروتئین‌ها و نوکلئویک اسید و چربی نقش داشته باشد. نه ژن از این دسته در ترانسکریپتوم سن گندم شناسایی‌شده است (شکل ۲). در حشراتی مانند ملخ‌ها، *D. melanogaster*، *A. gambiae*، *T. castaneum*، *N. vitripennis*، *A. mellifera*، *C. quinquefasciatus*، *A. aegypti*، *M. persicae*، *A. pisum*، نیز گزارش‌شده است (Hayes *et al.*, 2005; Richards *et al.*, 2008; Oakeshott *et al.*, 2010; Ramsey *et al.*, 2010).

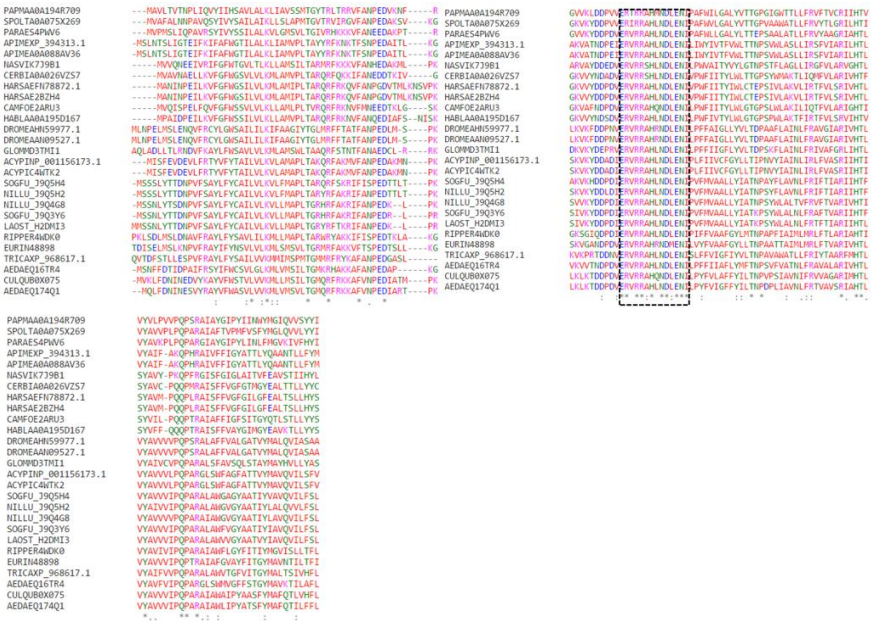


شکل ۳- رابطه فیلوژنتیک گلوتاتیون اس ترانسفراز میکروزومی در حشرات مختلف. GST میکروزومی درمجموع در هفت گروه مختلف که بارنگ‌های متفاوت نشان داده‌شده است دسته‌بندی شد. *Drosophila melanogaster* (DROME)، (GLOMM) *Glossina morsitans* morsitans، (CULQU) *Culex quinquefasciatus*، (TRICA) *Tribolium castaneum*، (RIPPE) *Riptortus pedestris*، (EURIN) *Eurygaster inegriceps*، (APIME) *Apis melifera*، (HYME) *Habropoda laboriosa*، (CERBI) *Cerapachys biroi*، (CAMFO) *Camponotus floridanus*، (SPOLT) *Spodoptera litura*، (PAPMA) *Papilio machaon*، (NILLU) *Nilaparvata lugens*، (SOGFU) *Sogatella furcifera*، (LAOST) *Laodelphax striatellus*، (HARSA) *Harpegnathos saltator*، (AEDAE) *Aedesaegypti*.

Fig. 3. Phylogenetic relationships of microsomal GST proteins from different insect species. Microsomal GST cluster in 7 different which present with different color. *Drosophila melanogaster* (DROME), *Glossina morsitans* morsitans (GLOMM), *Culex quinquefasciatus* (CULQU), *Tribolium castaneum*(TRICA), *Riptortus pedestris* (RIPPE), *Eurygaster inegriceps* (EURIN), *Apis melifera* (APIME), *Habropoda laboriosa* (HYME), *Cerapachy sbiroi* (CERBI), *Camponotus floridanus* (CAMFO), *Spodoptera litura* (SPOLT), *Papilio machaon* (PAPMA), *Nilaparvata lugens*(NILLU), *Sogatella furcifera* (SOGFU), *Laodelphax striatellus* (LAOST), *Harpegnathos saltator* (HARSA), *Aedesaegypti* (AEDAE).

آنالیز فیلوژنی neighbor-joining پروتئین GST میکروزومی حشرات مختلف حاکی از این بود که آن‌ها در ٦ گروه دسته‌بندی می‌شوند. از میان GSTشناسایی‌شده، یک ژن اختصاص به GST میکروزومی در ترانسکریپتوم سن گندم دارد (شکل ۳). تعداد GST میکروزومی در سایر حشرات نیز مشابه با سن گندم است. ناحیه حفاظت‌شده‌ی با ترکیب آمینواسیدی ERVRRAHLNDLENI در تمام GST میکروزومی حشرات وجود دارد که نشان‌دهنده پتانسیل این دومین به‌عنوان دومین عملکردی هست (شکل ٤). در *A. gambiae*، *D. melanogaster* و *A. pisum* به ترتیب، یک، دو و سه ژن GST میکروزومی شناسایی‌شده است (Fang, 2012). این دسته GST در حفاظت سلولی در برابر خسارت‌های اکسیداتیو و عوامل خارجی مؤثر است. طول عمر *D.*

melanogaster موتانت در ژن MGGST که GST میکروزومی است در مقایسه با نوع غیر موتانت به شکل معنی‌داری کاهش یافت که منعکس‌کننده نقش مهم این ژن در بیولوژیک حشره است (Toba & Aigaki 2000).



شکل ٤- هم‌ردیفی توالی اسیدآمینه ژن GST میکروزومی سن گندم با سایر حشرات با Clustal Omega. نقطه‌چین نشان‌دهنده ناحیه حفاظت‌شده با ترکیب آمینواسیدی ERVRRAHLNDLENI است. *Drosophila melanogaster* (DROME)، *Glossina morsitans* morsitans (GLOMM)، *Culexquin quefasciatus* (CULQU)، (TRICA) *Tribolium castaneum*، *Riptortus pedestris* (RIPPE)، *Eurygaster inegriceps* (EURIN)، *Apis melifera* (APIME)، *Habropoda laboriosa* (HYME)، *Cerapachys biroi* (CERBI)، *Camponotus floridanus* (CAMFO)، *Spodoptera litura* (SPOLT)، *Papilio machaon* (PAPMA)، *Nilaparvata lugens* (NILLU)، *Sogatella furcifera* (SOGFU)، *Laodelphax striatellus* (LAOST)، *Harpegnathos saltator* (HARSA)، *Aedes aegypti* (AEDAE)، *Acyrthosiphon pisum* (ACYPI)، *Nasonia vitripennis* (NASVI)، *Pararge aegeria* (PARAE).

Fig. 4. Sequence alignment of microsomal GST with other insect microsomal GST using clustal omega. Dotted box indicate highly conserved region with the amino acids ERVRRAHLNDLENI. *Drosophila melanogaster* (DROME), *Glossina morsitans* morsitans (GLOMM), *Culexquin quefasciatus* (CULQU), *Tribolium castaneum*(TRICA), *Riptortus pedestris* (RIPPE), *Eurygaster inegriceps* (EURIN), *Apis melifera* (APIME), *Habropoda laboriosa* (HYME), *Cerapachys biroi* (CERBI), *Camponotus floridanus* (CAMFO), *Spodoptera litura* (SPOLT), *Papilio machaon* (PAPMA), *Nilaparvata lugens* (NILLU), *Sogatella furcifera* (SOGFU), *Laodelphax striatellus*(LAOST), *Harpegnathos saltator* (HARSA), *Aedes aegypti* (AEDAE), *Acyrthosiphon pisum* (ACYPI), *Nasonia vitripennis* (NASVI), *Pararge aegeria* (PARAE).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، تمام ژن‌های خانواده بزرگ GST، در سن گندم که به‌عنوان مهم‌ترین آفت مزارع گندم ایران و خاورمیانه محسوب می‌شود شناسایی شد. با استفاده از آنالیز فیلوژنتیک و شباهت‌های آمینواسیدی، این خانواده ژنی در سن گندم موردمطالعه قرار گرفت. نتایج این مطالعه پروفایل GST در سن گندم را به‌خوبی آشکار کرده که به‌نوبه خود می‌تواند منجر به کنترل شیمیایی پایدارتر و مدیریت

مقاومت در برنامه کنترلی سن گندم شود. در نهایت این ژن‌هامی‌توانندبه‌عنوان بیومارکرهای مقاومت متابولیکی معرفی‌شده تا با بررسی بیان آن‌ها به کمک کشف مقاومت و در صورت تأیید در سرکوب مقاومت در سن گندم استفاده شوند. در ادامه این پروژه مطالعات عملکردی ژن‌های شناسایی‌شده در زیست‌شناسی سن گندم و همچنین بررسی نقش متابولیکی آنزیم‌های GST برای دفاع علیه اللوکمیکال‌های گیاهی و برهمکنش‌های گیاه- حشره در مطالعات آینده پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور به دلیل همکاری در جمع‌آوری و پرورش سن گندم صمیمانه تشکر می‌نماییم. از سرکار خانم مهندس آثاری کارشناس بیوانفورماتیک بخش زیست‌شناسی سامانه‌های پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی به خاطر همکاری در آنالیز داده‌های ترانسکریپتوم، سپاسگزاری می‌شود.این تحقیق با حمایت مالی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی انجام‌شده است.

References

Claudianos, C., Ranson, H., Johnson, R.M., Biswas, S., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R., Feyereisen, R. & Oakeshott, J.G. (2006) A deficit of detoxification enzymes: Pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Molecular Biology*15, 615–636.

Critchley, B.R. (1998) Literature review of sunn pest *Eurygaster integriceps* Put. (Hemiptera, Scutelleridae). *Crop Protection* 17, 271–287.

Ding, Y., Ortelli, F., Rossiter, L.C., Hemingway, J. & Ranson, H. (2003) The *Anopheles gambiae* glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles. *BMC Genomics* 4, 35.

Fang, S. (2012) Insect glutathione Stransferase: a review of comparative genomic studies and response to xenobiotics. *Bulletin of Insectology* 65, 265–271.

Haas, B.J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P.D., Bowden, J., Couger, M.B., Eccles, D., Li, B., Lieber, M., Macmanes, M.D., Ott, M., Orvis, J., Pochet, N., Strozzi, F., Weeks, N., Westerman, R., William, T., Dewey, C.N., Henschel, R., Leduc, R.D., Friedman, N. & Regev, A. (2013) De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocol* 8, 1494–1512.

Hayes, J.D., Flanagan, J.U.& Jowsey, I.R. (2005). Glutathione Transferases. *Annual Reviewof Pharmacology Toxicology* 51–88.

Hewes, R.S.& Taghert, P.H. (2001) Neuropeptides and neuropeptide receptors in the *Drosophila melanogaster* genome. *Genome Research* 11, 1126–1142.

Hsu, J.C., Chien, T.Y., Hu, C.C., Chen, M.J.M., Wu, W.J., Feng, H.T., Haymer, D.S.& Chen, C.Y. (2012) Discovery of genes related to insecticide resistance in *Bactrocera dorsalis* by functional genomic analysis of a De novo assembled transcriptome. *PLoS One* 7.

Iranipour, S., Kharrazi Pakdel, A.& Radjabi, G. (2010) Life history parameters of the Sunn pest, *Eurygaster integriceps*, held at four constant temperatures. *Journal of Insect Science* 10, 1–9.

Karatolos, N., Pauchet, Y., Wilkinson, P., Chauhan, R., Denholm, I., Gorman, K., Nelson, D.R., Bass, C., Richard, H. & Williamson, M.S. (2011) Pyrosequencing the transcriptome of the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* reveals multiple transcripts encoding insecticide targets and detoxifying enzymes. *BMC Genomics* 12, 56.

Li, X., Zhang, X., Zhang, J., Zhang, X., Starkey, S.R.& Zhu, K.Y.(2009) Identification and characterization of eleven glutathione S-transferase genes from the aquatic midge Chironomus tentans (Diptera: Chironomidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39, 745–754.

Oakeshott, J.G., Johnson, R.M., Berenbaum, M.R., Ranson, H., Cristino, A.S. & Claudianos, C. (2010) Metabolic enzymes associated with xenobiotic and chemosensory responses in *Nasonia vitripennis*. *Insect Molecular Biology* 19, 147–163.

Qin, G., Jia, M., Liu, T., Xuan, T., Yan Zhu, K., Guo, Y., Ma, E.& Zhang, J. (2011). Identification and characterisation of ten glutathione S-transferase genes from oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen). *Pest Management Science* 67, 697–704.

Ramsey, J.S., Rider, D.S., Walsh, T.K., De Vos, M., Gordon, K.H.J., Ponnala, L., MacMil, S.L., Roe, B.A.& Jander, G. (2010) Comparative analysis of detoxification enzymes in *Acyrthosiphon pisum* and *Myzus persicae*. *Insect Molecular Biology* 19, 155–164.

Ranson, H., Claudianos, C., Ortelli, F., Abgrall, C., Hemingway, J., Sharakhova, M. V, Unger, M.F., Collins, F.H.& Feyereisen, R. (2002) Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science* 298, 179–81.

Ranson, H., Rossiter, L., Ortelli, F., Jensen, B., Wang, X., Roth, C.W., Collins, F.H. & Hemingway, J. (2001) Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *The Biochemical journal* 359, 295–304.

Richards, S., Gibbs, R.A., Weinstock, G. M., Brown, S.J., Denell, R., Beeman, R. W. & Gibbs, R. (2008) The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature* 452, 949–55.

Samra, A.I., Kamita, S.G., Yao, H.W., Cornel, A.J.& Hammock, B.D. (2012) Cloning and characterization of two glutathione S-transferases from pyrethroid-resistant *Culex pipiens*. *Pest Management* Science 68, 764–772.

Shi, H., Pei, L., Gu, S., Zhu, S., Wang, Y., Zhang, Y. & Li, B. (2012) Glutathione Stransferase (GST) genes in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, and comparative analysis with five additional insects. Genomics 100, 327–335.

Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J.D.& Higgins, D.G. (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology* 7, 539.

Toba, G.& Aigaki, T.(2000) Disruption of the Microsomal glutathione S-transferase-like gene reduces life span of *Drosophila melanogaster*. *Gene* 253, 179–187.

Yamamoto, K., Teshiba, S., Shigeoka, Y., Aso, Y., Banno, Y., Fujiki, T. & Katakura, Y. (2011) Characterization of an omega-class glutathione S-transferase in the stress response of the silkmoth. *Insect Molecular Biology* 20, 379–386.

Yandamuri, R.C., Gautam, R., Darkoh, C., Dareddy, V., El-bouhssini, M. & Clack, B.A. (2014) Cloning, Expression, Sequence Analysis and Homology Modeling of the Prolyl Endoprotease from *Eurygaster integriceps* Puton. *Insects* 762–782.