

## تجزیه پروتئوم: شناسایی پروتئینهای گیاهی تجمع یافته در روده حشرات کامل

*Aelia acuminata*

محمد سعادت

ایران، بیرجند، دانشگاه بیرجند، دانشکده کشاورزی، گروه گیاهپزشکی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۱/۲۸

## چکیده

برهمکنش حشره-گیاه وارد فاز مطالعات مولکولی گردیده است. پروتئومیکس یک تکنیک نسبتاً جدید در این زمینه می‌باشد که می‌تواند تفاوت بیان پروتئینها در بافتهای مختلف را اندازه‌گیری نماید. شناسایی پروتئینهای گیاهی وارد شده به دستگاه گوارش حشرات یکی از مهمترین چالشها در اکولوژی تکاملی می‌باشد. در این مطالعه تعدادی از پروتئینهای گیاهی گندم تجمع یافته در روده حشرات کامل سنهای *Aelia acuminata* با استفاده از پروتئومیکس مورد ردیابی و شناسایی قرار گرفتند. مهارکننده‌های آنزیمی شامل سرپین و مهارکننده آلفا-آمیلاز، پروتئینهای آنتی‌اکسیدانت شامل پراکسیداز و دهیدرواسکوربات ردوکتاز و پروتئینهای ذاتی مانند کالمودولین، بتا-آمیلاز، داکسی میوژنیک اسید سنتاز، سیتوکروم C، آگلوتینین ایزولستین ۳ و هیپوتیکال پروتئین (پروتئین فرضی) (Hypothetical protein) شناسایی گردیدند. نتایج پیشنهاد می‌کنند که برای شناسایی پروتئینهای مؤثر در برهمکنشهای گیاه و گیاهخوار می‌توان از پروتئومیکس استفاده نمود و نقش هریک از پروتئینهایی که شناسایی می‌شوند را در فرایندهای فیزیولوژی مورد بحث قرار داد.

واژه‌های کلیدی: پروتئومیکس، بیوشیمی، دستگاه گوارش، مهارکننده، آنتی‌اکسیدانت.

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۵۶۳۲۴۵۶۶۳۰، پست الکترونیکی: M-saadati@birjand.ac.ir

## مقدمه

قسمتی از بافت گیاه به شکل مایع درآمده و سپس از طریق کانال غذایی به درون روده پمپ می‌شوند (۱۲). ترشحات بزاقی بیشتر شامل پروتئینهایی می‌شوند که باعث هیدرولیز پروتئین ذخیره‌ای گندم به نام گلوتن می‌گردند (۸ و ۱۳). مرحله هضم نهایی نیز در روده انجام شده که در طی آن مواد غذایی به ذرات قابل جذب از طریق دیواره روده میانی تبدیل می‌گردند (۲۱ و ۴۶).

فرآیند تغذیه در حشرات مانند سایر جانوران وابسته به پروتئینهای موجود در دستگاه گوارش می‌باشد. نوع و فراوانی پروتئینهای موجود در دستگاه گوارش اطلاعات مفیدی در زمینه تغذیه حشره شامل وابستگی به سوبسترای خاص یا میزان استفاده از بعضی مواد غذایی را ارائه می‌نماید (۱۵ و ۴۴). استفاده از مهارکننده‌های

تکامل قسمتهای مختلف دستگاه گوارش حشرات نقش ویژه‌ای در تعیین روش تغذیه از میزبانان متنوع و در نتیجه وقوع خسارتهای احتمالی در گیاهان را دارد (۱۳). بطور کلی این دستگاه وظیفه اصلی در جذب مواد غذایی مورد نیاز برای سایر فرآیندهای متابولیکی بدن را به عهده دارد (۸ و ۱۲). از اینرو هر گونه اختلالی در روند جذب مواد غذایی یا ایجاد صدمه‌ای به ساختمان دستگاه گوارش باعث توقف جریان کسب انرژی از مواد غذایی گردیده و هموستازی بدن مختل گردیده و حشره پس از مدتی از بین خواهد رفت (۲۳). حشرات راسته ناجوربالان دارای هضم خارج دهانی (Extra oral digestion) می‌باشند (۷) که در این روش ابتدا غده بزاقی از طریق کانال بزاقی ترشحات پروتئینی خود را به بافت گیاه تزریق کرده که در نتیجه آن

دستگاه گوارش سن‌گندم *Eurygaster integriceps* شامل غده بزاقی و کانال گوارش به طور نسبی تحت مطالعه تجزیه پروتئوم قرار گرفته است (۴۰ و ۴۱). نقشه پروتئینی غده بزاقی و روده میانی در حشرات کامل سن‌گندم زمستان گذران و همچنین حشرات کامل نسل جدید، تعیین اختلافات پروتئینی موجود بین حشرات کامل و پوره‌های سن پنجم و همچنین شناسایی چند پروتئین گیاهی در روده حشرات کامل از جمله مهمترین آنها می‌باشند (۴۲).

در مطالعات اکوفیزیولوژی، برهمکنش حشره-گیاه به عنوان یک سیستم پویا که دائماً در حال تغییر است در نظر گرفته می‌شود (۲۲، ۲۷ و ۳۱). گیاهان سازوکارهای مختلفی را برای کاهش خسارت حشرات توسعه داده اند. از طرفی حشرات نیز از راهکارهای مختلفی جهت غلبه بر دفاع گیاهان استفاده می‌کنند تا بتوانند از میزبان تغذیه و روی آن رشد و تولید مثل نمایند. از جمله سازوکارهای مورد استفاده حشرات عبارتند از غیر سمی کردن ترکیبات سمی گیاه، اجتناب از گیاه، ذخیره سموم در بدن و مهمترین آن تغییر الگوی بیان ژن در دستگاه گوارش حشرات (۲۰، ۲۶ و ۳۳). تجزیه پروتئوم روده حشرات کامل سن‌گندم نشان داد که سرپین گندم در روده حشرات کامل سن‌گندم تجمع یافته و در واقع سن‌گندم توانسته است بر این مهارکننده پروتئازی غلبه کند. در این تحقیق برای اولین بار دستگاه گوارش سن *A. acuminata* مورد بررسی پروتئوم قرار گرفته و تعدادی از پروتئینهای گیاهی در آن را ۷۲ ساعت پس از توقف تغذیه مورد شناسایی قرار خواهد گرفت. ردیابی پروتئینهای گیاهی در روده حشرات گیاهخوار نقش اساسی در روشن شدن راهکارهای تغذیه ای، موانع احتمالی تغذیه ای و همچنین روشن شدن مسیرهای بیوشیمیایی تغذیه در برهمکنشهای گیاه-گیاهخوار در حشره شناسی مولکولی بر عهده دارد.

## مواد و روشها

جمع آوری و تشریح حشرات: حشرات کامل

پروتئینی برای ایجاد اختلال در برهمکنش پروتئینهای دستگاه گوارش با موادغذایی از راهکارهای جدید و مورد علاقه پژوهشگران برای کاهش تغذیه در حشرات می‌باشد (۴۶). این پروتئینهای سمی که دارای ساختمان سه بعدی ویژه‌ای می‌باشند به صورت نسبتاً اختصاصی بر علیه حشرات عمل می‌کنند و در نتیجه آلودگی زیست محیطی کمتری را نیز در مقایسه با آفت‌کشهای شیمیایی خواهند داشت (۲۲، ۳۲).

از مهمترین پروتئینهای حشره‌کش، مهارکننده‌های آنزیمهای گوارشی می‌باشند که باعث بلوکه کردن فعالیت کاتالیتیکی آنزیمها شده و در نتیجه سوبستراهای زیستی تجزیه نشده و حشره توانایی خود را در بهره برداری از موادغذایی از دست داده و در اثر گرسنگی از بین می‌رود. مهارکننده‌هایی که به صورت کاربردی بر علیه پروتئینهای گوارشی حشرات استفاده شده‌اند در دو گروه مهارکننده‌های آلفا-آمیلاز ( $\alpha$ -amylase inhibitors) و مهارکننده‌های پروتئازی (Protease inhibitors) قرار می‌گیرند (۱۶ و ۲۴). از مهارکننده‌های آلفا-آمیلاز در کنترل عملی تعدادی از حشرات خانواده Bruchidae مانند سوسک نخود و سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات استفاده شده است (۱۶ و ۲۹). همچنین مهارکننده‌های پروتئازی به دلیل تنوع بیشتر نسبت به سایر مهارکننده‌ها به طور گسترده‌تری در کنترل حشرات آفت مانند کرم قوزه پنبه و کرم ساقه‌خوار سویا و کرم خوشه خوارذرت مورد آزمایش قرار گرفتند (۳۰). علاوه بر مهارکننده‌های آنزیمهای گوارشی، استفاده از لکتین در کنترل بالپولک‌داران و جوربالان، کیتیناز در، گاما آندوتوکسین در کنترل سخت‌بالپوشان، دوبالان و نیم‌بالپوشان و دو پروتئین جدید IPD083Cb و IPD083Aa در کنترل بالپولک‌داران مقاوم به گیاهان تراریخت حاوی ژن باکتری *Bacillus thuringiensis* نیز به عنوان پروتئینهای حشره‌کش گزارش شده اند (۱۷، ۲۵، ۲۹، ۳۳ و ۳۷).

(شستشو با استون) دو بار تکرار گردید. در نهایت ۲۰۰ میکرو لیتر بافر لیز (Lysis buffer (Urea 7M, Thiourea 2M, CHAPS 2%, DTT 6mM, Ampholyte 1%) به رسوب پروتئینی افزوده و با استفاده از هموژنایزر محلول گردید. بالاخره محلول پروتئینی حاصل در ۱۵۰۰۰ g، ۱۰ دقیقه و دمای اتاق دو بار سانتریفیوژ شد و سوپ رویی نهایی که پروتئین خام بود حاصل گردید. برای تعیین غلظت پروتئین از روش برادفورد و پروتئین سرم آلبومین گاوی به عنوان استاندارد استفاده گردید. مجموعه غلظت‌های استاندارد ۰،۱،۲،۳،۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بودند و بعد از ترسیم نمودار استاندارد در هر سه تکرار و تعیین معادله خطی مربوطه، غلظت پروتئین در نمونه‌های مورد آزمایش محاسبه گردید (۲۰، ۳۹، ۴۰ و ۴۱).

**الکتروفورز دوبعدی:** الکتروفورز دوبعدی بر اساس جداسازی پروتئینها با نقطه ایزوالکتریک در بعد اول و وزن مولکولی در بعد دوم طراحی گردیده است. ایزوالکترئوفوکسینگ (بعد اول) با روش ژل لوله‌ای صورت پذیرفت. در این روش از لوله‌هایی به طول ۱۱ سانتیمتر و قطر ۳ میلی متر برای تهیه ژلهای بعد اول استفاده گردید. برنامه تنظیم شده برای انجام بعد اول ۱۷/۵ ساعت زمان نیاز داشت که شامل ۳۰ دقیقه در ۲۰۰ ولت، ۱۶ ساعت در ۴۰۰ ولت و یک ساعت انتهایی ۶۰۰ ولت بود. لوله های حاصل از بعد اول الکتروفورز، برای بارگذاری بعد دوم (SDS-PAGE) مورد استفاده واقع شدند (۲). بعد از اتمام الکتروفورز بعد دوم، ژل به ظرف حاوی محلول رنگی کوماسی منتقل و برای یک ساعت با دور کم تکان داده شد. سپس ژل با دستگاه خشک‌کن مخصوص خشک گردید. برای اینکار ابتدا ژل را در یک لایه از نایلون سفون قرار داده و پس از خارج نمودن حبابهای هوای موجود بین لایه‌های پلاستیک و ژل، دستگاه به مدت ۲ ساعت حرارت ۷۰ درجه سانتی گراد و ۳ ساعت مکش هوا جهت خشک کردن ژل تنظیم گردید. ژلهای خشک شده یا مرطوب با

*A.acuminata* برگشتی از مزارع گندم حومه تربت جام جمع آوری شدند و به اتاقک رشد منتقل شدند. این حشرات از دانه‌های گندم رقم الوند تغذیه کرده و به آنها اجازه داده شد که جفتگیری کنند و حشرات نسل جدید را به وجود آورند. شرایط رشد ۲۷ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی ۶۰ درصد بود. بعد از تخم گذاری حشرات کامل والد از ظروف پرورش حذف شدند. حشرات کامل نسل جدید که ۷۲ ساعت و حشرات شاهد که ۲۴ ساعت تغذیه نکرده بودند برای تشریح دستگاه گوارش انتخاب شدند. چون هدف آزمایش ردیابی پروتئینهای گیاهی بود نیاز است تا حشره زمان مشخصی را گرسنه بماند تا پروتئینهای تجمع یافته گیاهی در روده این حشرات مشخص گردد (۲۲) و (۳۹).

ابتدا سر و بالهای حشره قطع و یک طرف بدن آن در ظرف تشریح ثابت گردید و از طرف مقابل آن با استفاده از قیچی تشریح ارتباط قسمت پشتی و شکمی قطع شد. سپس قسمت پشتی با استفاده از پنس به صورت کتابی باز شده و روده آن به میکروتیوب حاوی بافر فسفات منتقل گردید و بلافاصله برای انجماد سریع به ازت مایع منتقل و تا قبل از استفاده در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

**استخراج پروتئین:** سه عدد روده در میکروتیوب حاوی بافر فسفات و مهارکننده کامل پروتئاز (Cocktail of protease inhibitors (Roche Applied Science, Manneheim, Germany) هموژنیزه شدند، سپس در ۳۰۰۰۰ g به مدت ۳۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. سوپ رویی حاصل مجدداً در ۳۰۰۰۰ g، ۱۰ دقیقه و ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردید. سپس ۶ درصد تری کلرو استیک اسید (TCA) به روشناور قبلی اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در یخ انکوبه شدند. بعد از آن نمونه‌ها مجدداً در ۱۵۰۰۰ g، ۱۰ دقیقه و ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. در این مرحله سوپ رویی حذف، ۲۰۰ میکرو لیتر استون مطلق به رسوب اضافه و در ۱۵۰۰۰ g، ۲ دقیقه و ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. این مرحله

استفاده از دانسیتومتر (Densitometer (GS-800, Bio-Rad)) اسکن شده و به فرمت مورد نیاز برای تجزیه نرم‌افزاری ژل (tiff) و فایل‌های نوشتاری (jpg) تبدیل شدند. سه تکرار از هر ژل برای مقایسه کیفیت ژلها با استفاده از نرم افزار پی دی کوئست (PDQuest software (ver. 8.0.1, Bio-Rad)) استفاده شد. تجزیه ژل شامل چندین مرحله است که در ابتدا تصویر بهترین ژل مربوط به حشراتی که ۲۴ ساعت از تغذیه محروم بودند را به عنوان ژل پایه انتخاب و سپس تصویر ژل‌های دیگر تکرارها که مربوط به حشراتی بود که ۷۲ ساعت تغذیه نکرده بودند همراه با ژل پایه وارد نرم افزار شده و لکه‌های روی همه ژلها بصورت دستی متناظر گردید. نرم افزار یک فایل به فرمت اکسل که حاوی میزان شدت عبور نور از لکه‌های پروتئینی بر اساس درصد حجمی هر لکه می‌باشد برای تمام ژلها محاسبه و ارائه می‌کند. با استفاده از این اعداد کمی و باروش تی تست می‌توان لکه‌های پروتئینی که دارای اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد بودند را برای برش نهایی انتخاب کرد (۳۹، ۴۰ و ۴۱).

**هضم:** در این فرایند لکه‌های پروتئینی با استفاده از آنزیم تریپسین توسط ماشین تمام اتومات (Digest Pro 96; Intavis, koeln, Germany) هضم و به پپتیدهای کوچکتر تبدیل شدند. برنامه دستگاه شامل سه مرحله متوالی بود. ابتدا مرحله احیای پیوندهای دی‌سولفیدی است که با کمک مشتقات DDT (Reduction solution) انجام می‌گیرد، سپس مرحله الکیل‌کردن است که به وسیله ترکیبات یدواستاماید انجام می‌پذیرد. مرحله سوم هضم با تریپسین می‌باشد (۳۹، ۴۰ و ۴۱).

**تعیین نسبت وزن مولکولی به بار هر پپتید با استفاده از Nano liquid chromatography- mass spectrometry/mass spectrometry):** این دستگاه از دو قسمت اصلی تشکیل شده است. قسمت اول یک کروماتوگرافی با کارایی بالاست که به طور مستقیم به

اسپکترومتری جرمی پی‌پی (MS/MS) متصل گردیده است. به طور خلاصه به این صورت عمل شد که یک میکرولیتر پپتیدهای حاصل از هضم پروتئینی با استفاده از نمونه بردار خودکار به ستون C18 PepMap trap (۳۰۰ میکرومتر قطر درونی  $5 \times$  میلی متر طول) با جریان ۲۵ میکرولیتر بر دقیقه در نانوکروماتوگرافی (Ultimate 3000 nano LC (Dionex, Germering, Germany) تزریق شدند. سپس پپتیدها با استفاده از فرمیک اسید ۰/۱ درصد در استونیتریل رقیق شده و در ستون C18 (Nikkyo Technos, Tokyo, Japan) (۷۵ میکرولیتر قطر درونی و ۱۲ سانتیمتر طول) بر اساس حرکت در فاز معکوس و با جریان ۲۰۰ نانولیتربر دقیقه از یکدیگر جدا شدند. بعد از آن پپتیدها در ولتاژ ۱٫۸ کیلوولت به اسپکترومتری جرمی (LTQ XL Orbitrap MS (Thermo Fisher, San Jose, CA, USA)) پاشیده شدند. نرم افزار نصب شده برای تعیین تنظیمات اسپکترومتری پی‌پی ایکس کالیبر (Xcalibur software (ver. 1.4, Thermo Fisher)) نام داشت و محدوده کسب داده بر اساس نسبت جرم بر بار ( $m/z$ ) بین ۱۰۰ تا ۲۰۰۰ در نظر گرفته شد. دستگاه محتویات پپتیدها را سه بار متوالی در ۶۰ دقیقه برای هر نمونه اسکن کرد. داده حاصل از اسپکترومتری با نرم‌افزار بیوورکس (Bioworks software (ver. 3.3.1, Thermo Fisher)) قابل استفاده با موتورهای جستجوگر مثل مسکات (Mascot search engine (ver. 2.3.02, Matrix Science, London, UK)) (MGF= Mascot generic format) تبدیل شدند (۳۹، ۴۰، ۴۱ و ۴۲).

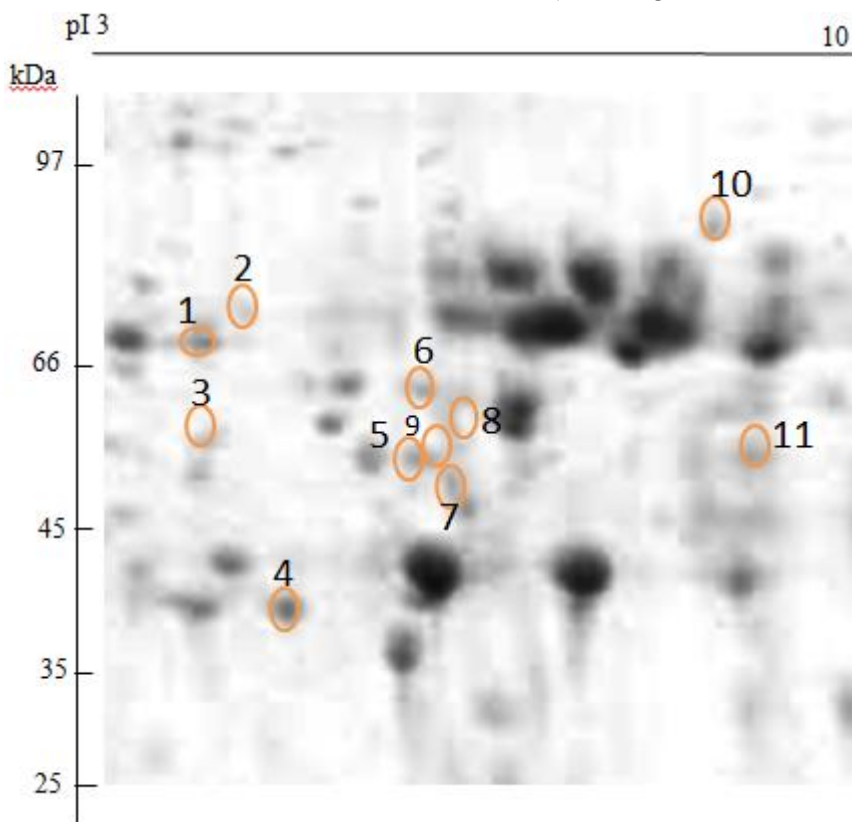
**جستجو پروتئین هدف در پایگاه‌های بیوانفورماتیکی:** موتور جستجوگر مسکات قابلیت جستجو در پایگاه‌های بیوانفورماتیکی مختلفی را دارد. در مورد سن *Aelia acuminata* چون پایگاه اختصاصی برای پروتئوم این حشره وجود نداشت از پایگاه اطلاعاتی مرکز ملی اطلاعات زیست فناوری (NCBI) (National Center of Biotechnology Information) استفاده شد. برای استفاده از مسکات پارامترهای مورد استفاده در شناسایی پروتئین

در نظر گرفته شدند. در این مطالعه حداقل پپتیدهای مشابه پنج و حداقل همپوشانی هفت درصد لحاظ گردیدند و پروتئین‌هایی که این شاخصها را نداشتند به عنوان پروتئین ناشناخته محسوب گردیدند (۳۳، ۳۴ و ۳۵).

### نتایج و بحث

الگوی پروتئینی روده حشرات کامل سنهای *A. acuminata* با استفاده از الکتروفورز دوبعدی تعیین گردید (شکل ۱). مرکز ملی اطلاعات زیست‌فناوری استفاده شد تا پروتئین‌های احتمالی با منشاء غیر جانوری (گیاهی، باکتریایی و ...) مورد شناسایی قرار بگیرند. نتایج همانطور که در جدول ۱ نشان داده شده است بیان می‌دارد که ۱۰ لکه پروتئینی از مجموع ۱۱ لکه ناشناخته منشا گیاهی داشته و از گیاه گندم وارد روده حشره کامل شده بودند و یک لکه نیز (لکه شماره ۱۰) ناشناخته باقی ماند.

شامل حداکثر تغییرات وزن ۰/۵ دالتون، حداکثر تعداد پیوندهای از دست رفته (Maximum number missed cleavages) ۱ عدد، صحت وزن هر پپتید (Accuracy of peptide mass) ۱۰ پی‌پی‌ام در نظر گرفته شد. کربوآمیدلاسیون سیستمین‌ها به عنوان پارامتر ثابت و اکسیداسیون متیونین به عنوان پارامتر متغیر تعیین شدند. برای جستجو در پایگاه NCBI دو زیر مجموعه در نظر گرفته شد، بدین طریق که ابتدا کلیه داده‌های اسپکترومتری در بخش جانوران جستجو گردیدند و برای بار دوم کل داده‌های پایگاه مورد جستجو قرار گرفتند. درجه مورد قبول برای این دو جستجو به ترتیب عبارت بودند از ۵۵ و ۴۸. نتایج مسکات شامل چند پروتئین در قسمت نتایج نمایش داده می‌شود. بالاترین درجه نتیجه حاصل از مسکات و همچنین بالاترین میزان همپوشانی و داشتن حداکثر پپتیدهای مشابه با پروتئین‌های موجود در نتیجه مسکات به عنوان شاخصهای اصلی انتخاب پروتئین



شکل ۱- الگوی پروتئینی بیان شده از روده حشرات کامل *Aelia acuminata* حلقه‌ها نشان دهنده تجمع پروتئین‌های گیاهی در روده حشرات کامل می‌باشند.

نبرد بین گیاه و حشره برای چندین سال ادامه خواهد یافت (۱۰، ۱۴ و ۲۰). تجمع این پروتئین در روده حشرات کامل سنها دلالت بر این موضوع دارد که این مهارکننده طی فرایند تکامل متقابل در رابطه سن-گندم کارآبی خود را از دست داده و اگر چه غلظت بالایی از آن در روده تجمع یافته ولی هیچگونه اثر منفی روی تغذیه و در نتیجه خسارت این حشره ندارد (۶ و ۳۹). مکانیسم دقیق اینکه سرنوشت نهایی این مهارکننده‌ها در روده حشرات به کجا می‌انجامد نیاز به مطالعات تکمیلی دارد ولی اینکه حتی ۲۴ ساعت پس از تغذیه هنوز این پروتئین سمی در روده حشرات کامل به صورت تجمع یافته موجودند قویاً تأیید می‌کند که در رقابت گندم و سن، سن توانسته بر این مکانیسم دفاع بیوشیمیایی گیاه غلبه کند.

مهارکننده آلفا-آمیلاز موجود در گیاه گندم به عنوان یک پروتئین سمی بر علیه تعدادی از حشرات مانند سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات، شپشه آرد و شپشه برنج گزارش گردیده است (۱۰ و ۳۰). همچنین عدم تأثیر آن بر علیه حشرات راسته بالپولک‌داران و نیم بالپوشان تأیید گردد (۹ و ۴۵). مشابه سرپین، این مهارکننده نیز نتوانسته است مانع کارآبی در مقابل تغذیه سن *A. acuminata* باشد. در شباهت با نتیجه این تحقیق، در پروتئوم روده حشرات کامل سن-گندم *E. integriceps* نیز این مهارکننده تجمع یافته بود (۳۹).

دهیدرواسکوربات ردوکتاز و پراکسیداز دو آنزیم مهم آنتی‌اکسیدان گیاهی در مقابله با رادیکالهای آزاد اکسیژن می‌باشند (۳، ۲۸ و ۳۳). دهیدرواسکوربات ردوکتاز در تنظیم فعالیت اسکوربیک اسید نقش اساسی داشته و پر اکسیداز نیز علاوه بر مقابله با اکسیژنهای آزاد نقش حیاتی در تولید لیگنین در دیواره سلولی گیاهان به عهده دارد (۱۸). بتا-آمیلاز یک آنزیم اختصاصی در گیاهان است که وظیفه آن هیدرولیز پیوندهای ثانوی گلیکوزیدی از انتهای غیر احیاکننده نشاسته و ترکیبات مشابه می‌باشد (۱۶).

اکثر لکه‌های پروتئینی در این الگو مربوط به پروتئینهای ذاتی دستگاه گوارش حشره بودند. یازده لکه پروتئینی در پایگاه داده جانوران شناسایی نگردید، از این رو در جستجو دوم به جای جانوران از گزینه کل موجودات و داده‌ها در پایگاه اطلاعاتی لکه‌های شناسایی شده به ترتیب عبارت بودند از سرپین، دهیدرواسکوربات ردوکتاز، بتا-آمیلاز، داکسی میوزنیک سنتاز، مهارکننده آلفا-آمیلاز، پراکسیداز، سیتوکروم C، آگلوتینین ایزولسیتین ۳، هیپوتیتیکال پروتئین و کالمودولین. سعادت و تورچی در سال ۲۰۱۷ (۳۹) دستگاه گوارش حشرات کامل سن-گندم را مورد تجزیه پروتئوم قرار دادند و شش پروتئین گیاهی شامل تریپسین، سرپین، مهارکننده آلفا-آمیلاز، بتا-آمیلاز، دهیدرواسکوربات ردوکتاز و آلفا-آرابینوفورینادوز را با منشا گیاه گندم مورد ردیابی و شناسایی قرار دادند. در پژوهش جاری نیز مشابه سن گندم چهار پروتئین سرپین، مهارکننده آلفا-آمیلاز، بتا-آمیلاز و دهیدرواسکوربات ردوکتاز در روده *A. acuminata* مورد شناسایی واقع گردید.

فراوانی مهارکننده‌های پروتئازی کوچک در ساختار گیاهان می‌تواند به طور بالقوه بر علیه حشرات گیاهخوار موثر باشد (۱۹). سرپین یکی از مهارکننده پروتئازی در گندم است که بیشتر آنزیم کیموتریپسین را هدف قرار می‌دهد (۱۱، ۳۶، ۳۸). سرپین دارای یک توالی کاملاً حفاظت شده اسیدآمینو ای پرولین- فنیل آلانین- لوسین- فنیل آلانین- لوسین می‌باشد که در تمام موجودات حامل آن مشترک می‌باشد (۱، ۱۱، ۳۱). بیشتر مطالعات انجام شده مربوط به سرپینهای جانوری بوده و اطلاعات کمی در مورد سرپینهای گیاهی موجود می‌باشد. پروتئوم روده حشرات برای مقابله با سرپینهای گیاهی اقدام به تولید بیش از اندازه پروتئازهای موجود کرده و در صورت عدم تأثیر، اقدام به تولید ایزوفرم‌های جدیدی از پروتئاز کرده که حساسیت کمتری نسبت به مهارکننده‌های گیاهی داشته باشند (۳۳ و ۳۵). گیاهان نیز برای غلبه بر این پدیده در طی فرایند تکامل متقابل اقدام به تغییر سرپین گیاهی خود کرده و این

جدول ۱- شناسایی پروتئین‌های گیاهی تجمع یافته در روده حشرات کامل با استفاده از کل داده‌ها در پایگاه داده

Spot. no. <sup>a</sup>	Description	Acc. no. <sup>b</sup>	Organism	Theo. <sup>c</sup> Mr(kDa)/PI	Exp. <sup>d</sup> Mr(kDa)	M.P. <sup>e</sup>	Score <sup>f</sup>	Cov. <sup>g</sup> %	p-value <sup>h</sup>
1	Serp	gi 75282265	<i>T.aestivum</i>	43.2 5.6	40.2	8	67	24	0.032
2	Dehydroascorbate reductase	gi 259017810	<i>T.aestivum</i>	23.4 5.88	32.7	11	59	21	0.0411
3	beta-Amylase	gi 32400764	<i>T.aestivum</i>	31.1 8.6	97	28	180	37	0.0436
4	Deoxymugineic acid synthase	gi 1279751535	<i>T.aestivum</i>	39.9 5.8	65.2	15	72	14	0.0457
5	Alpha-amylase inhibitor	gi 229615203	<i>T.aestivum</i>	16.5 8.3	57.5	19	81	28	0.0476
6	Peroxidase	gi 730298	<i>T.aestivum</i>	32.8 8.4	64.4	13	74	17	0.0388
7	Cytochrome c	gi 118040	<i>T.aestivum</i>	120.1 9.3	48.2	21	89	35	0.0342
8	Agglutinin isolectin	gi 113507	<i>T.aestivum</i>	18.7 6.7	62.1	26	135	25	0.0380
9	Hypothetical protein	gi 1894567517	<i>T.aestivum</i>	16.7 6.1	57.7	11	63	12	0.0372
10	Not identified								
11	Calmodolin	gi 122063219	<i>T.aestivum</i>	16.8 4.1	54.2	9	56	15	0.0404

a) Spot no., the spot number as given in figure 1.

b) Acc no., accession number according to the NCBI (all entries) database.

c) Theo., theoretical;  $M_r$ , molecular weight,  $pI$ , isoelectric point.

d) Exp., experimental.

e) M.P., number of query matched peptides; the proteins with more than 5 matched peptides were included.

f) Score, ion score of identified protein using NCBI (all entries) database.

g) Cov., Sequence coverage, the proteins with more than 7 % sequence coverage were included.

h) p-value, indicates the significant of accumulation regulation of spots according to the t-test ( $p < 0.05$ ).

سرنوشت آنها اطلاع کسب شود. به نظر می‌رسد حشرات نتوانند از پروتئین‌های موجود در روده گیاهی به عنوان منبع اسید آمینه ای تغذیه کنند چون علی‌رغم گذشت ۷۲ ساعت از آخرین تغذیه حشرات، این پروتئین‌ها هنوز به صورت دست نخورده در آنجا تجمع یافته می‌باشند. اگر چه این احتمال نیز وجود دارد که این پروتئین‌ها خود محصول کاتابولیسم پروتئین‌های بزرگتری نیز باشند که در حال حاضر نمی‌توان با قاطعیت این فرضیه را نیز رد نمود.

شناسایی پروتئین‌های گیاهی در روده حشرات اولین مرحله برای شروع مطالعات برهمکنش گیاه-گیاهخوار در سطح مولکولی می‌باشد. تجمع پروتئین‌های گیاهی در روده این حشره نیز نشان داد که ستیز حشره و گیاه در غالب فرایند تکامل متقابل بسیار پویا بوده، چون علی‌رغم وجود بعضی از مهارکننده‌های آنزیمی که می‌توانند بطور بالقوه پروتئین حشره‌کش محسوب گردند، تغذیه و در نتیجه آن خسارت این حشره روی گندم بطور پیوسته و مداوم تکرار می‌گردد. در مطالعات پروتئومیکس جهت کلی روند تحقیقات مشخص می‌شود و برای مطالعه هر پروتئین بصورت موردی نیاز به خالص سازی، تعیین ساختار و نقش فیزیولوژیکی اختصاصی آن در بافت مورد نظر می‌باشد.

### سپاسگزاری

نویسنده مراتب تشکر صمیمانه خود را از همکار گرامی جناب مهندس اسماعیل جامی و جناب مهندس نادری بابت کمک در جمع آوری نمونه‌ها اعلام کرده و همچنین مراتب قدردانی خود را حضور مهندس سعید اسفهرودی بابت کمک در ویرایش ادبی و ساختاری نوشتار حاضر تقدیم می‌کند.

داکسی میوژنیک اسید سنتاز آنزیم کلیدی در ساخت یک حدواسط مهم گیاهی در تغذیه غلات به نام داکسی میوژنیک اسید می‌باشد. این مولکول واسطه نقش کلیدی در جذب آهن برای گیاهان داشته و به طور مستقیم روی تمام فعالیتهای مربوط به نقش فیزیولوژیکی آهن مثل تنفس و فتوسنتز تأثیرگذار می‌باشد (۴). سیتوکروم C یک پروتئین کلیدی در زنجیره انتقال الکترون است که در غشای داخلی میتوکندریها قرار داد (۵). نقش اصلی این پروتئین انتقال الکترون از کمپلکس شماره سه به کمپلکس شماره چهار می‌باشد. کالمودلین پروتئین تنظیم‌کننده یون کلسیم در موجودات زنده بوده که در گیاهان بیش از چهار ایزوفرم مختلف دارد که بین ۹۷ تا ۹۹ درصد با کالمودلین جانوران به خصوص مگس سرکه شباهت در توالی دارد. علاوه بر این کالمودلین گیاهی نقشهای فیزیولوژیک ویژه ای در گیاهان دارد (۳۴). کالمودلین گیاهی می‌تواند با اتصال به آنزیم سیتوکروم P-450 در روند رشد و نمو تأثیر-گذار باشد. کالمودلین همچنین می‌تواند با اتصال به کینازها در گرده افشانی و بارور کردن گیاهان نقش داشته باشد (۲۹). آگلوتینین ایزولستین ۳ یک پروتئین باند شده به ترکیبات قندی مونوساکارید، دی ساکارید و الیگوساکارید است که نقش ویژه فیزیولوژیک آن به خوبی شناخته نشده است. هیپوتیتیکال پروتئین‌های ناشناخته‌ای هستند که اگر چه منشاء ژنی آنها شناخته شده است ولی درک درستی از نقش فیزیولوژیک آنها موجود نیست (۴۳). در حین مطالعات پروتئوم ممکن است پروتئین‌های زیادی در پایگاه داده‌ها به صورت هیپوتیتیکال یا فرضی شناسایی گردند که نیاز است برای هر یک به طور موردی مطالعه جداگانه ای صورت پذیرد تا بیشتر در مورد منشاء و

### منابع

1. Alvarez-afageme. F. Maharramove. J. Carrillio. L. Vandenabeela. S. Vercammen. D. Breusegem. F. and Smaggehe. G. 2011. Potential use of a serpin from *Arabidopsis* for pest control. PLOS ONE 6: 1-9.
2. Baggerman. G. Vierstraete. E. Deloof. A. and Schoofs, L. 2005. Gel-based versus gel-free proteomics. Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening 8: 669-677.
3. Barbehenn. R. V. 2002. Gut-based antioxidant enzymes in a polyphagous and a graminivorous

- grasshopper. *Journal of Insect Physiology* 22: 89-94.
4. Bashir. K. and Nishizawa. N. 2006. Deoxy mugenic synthase. *Plant signaling and Behavior* 1:290- 292.
  5. Chandra. S. B. C. Vik. J. L. and Kapatral. V. 2006. Comparative insect mitochondrial genomes: Differences despite conserved genome synthetic. *African Journal of Biotechnology* 5: 1308-1318.
  6. Chen. H. Wilkerson. C. G. Kuchar. J. A. Phinney. B. S. and Howe. G. A. 2005. Jasmonate-inducible plant enzymes degrade essential amino acid in the herbivore midgut. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 19237-19242.
  7. Cohen. A. C. 1995. Extra-oral digestion in predatory Arthropoda. *Annual Review of Entomology* 40: 85-103.
  8. Every. D. 1992. Relationship of bread baking quality to levels of visible wheat-bug damage and insect proteinase activity in wheat. *Journal of Cereal Science* 16: 183-193.
  9. Fürstenberg-Hägg. J. Zagrobelny.M. and Bak.S. 2013. Plant defense against insect herbivores. *Molecular Scienc* 14: 10242-10297.
  10. Gatehouse. G.A. 1991. Breeding for resistance to insects. Murray. D. R (Ed.), *Advanced Methods in Plant Breeding and Biotechnology*, CAB International, Wallingford, UK. pp. 250-276
  11. Guo. G. Ly. D. Yan. X. Subbraj. S. Ge. P. Li.X. and Yan.H. 2012. Proteome characterization of developing grains in bread wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.). *Plant Biology* 12: 147-171.
  12. Habibi. H. and Fazili. K. M. 2007. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. *Biotechnology and Molecular Biology Review* 2: 68-85.
  13. Habibi. J. Coudron. T. A. Backus. E. A. Brandt. S. L. Wagner. R. M. Wright. M. K. and Huesing. J. E. 2008. Morphology and histology of the alimentary canal of *Lygus hesperus* (Heteroptera: Cimicimorpha: Miridae). *Annals of the Entomologica Society of America* 101: 159-171.
  14. Hagimam. I. 1998. Electrophoretic study of glutenins and  $\beta$ -amylase in wheat recombinants lines. *Romanian Agriculture Research* 9: 25-28.
  15. Hou. Y. Zou. Y. Wang. F. Gong. J. Zhong. X. Xia. Q. and Zhao. P. 2010. Comparative analysis of proteome maps of silkworm hemolymph during different developmental stages. *Proteome Science* 8: 45-55.
  16. Jouanin. I. Bonade-bottino. M. Girad. C. Morrot. G. and Giband. M. 1998. Transgenic plants for insect resistance. *Plant Science* 131: 1-11.
  17. Kaiser-Alexnat. R. Wagner. W. Langenbruch. A. Kleespies. R. G. Keller. B. and Hommel. B. 2004. European corn borer (*Ostrinia nubilalis*): Studies on proteinase activity and proteolytical processing of the Bt-toxin Cry1Ab in transgenic corn. *IOBC WPRS Bulletins* 27: 97-102.
  18. Kato. Y. Urano. J. Maki. Y. and Ushimaru. T. 1997. Purification and characterization of dehydroascorbate reductase from rice. *Plant Cell Physiology* 38: 173-178.
  19. Kansal. R. Kumar.M. Kuhar.K. Gupta.R.N. Subrahmanyam.B. Koundal.K.R. and Gupt. A. 2008. Purification and characterization of trypsin inhibitor from *Cicer arietinum* L. and its efficacy against *Helicoverpa armigera*. *Brazilian Society OF Plant Physiology* 20:313-322.
  20. Khajepour-Zaveh A. Asoodeh A. Naderi-Manesh. H. 2019. Extraction and identification a novel bioactive peptide from white grub larvae hydrolysate. *Molecular and Cellular Researches (Iranian Journal of Biology)* In press.
  21. Kunieda. T. Fujiyuki. T. Kucharski. R. Foret. S. Ament. S. A. Toth. A. L. Ohashi. K. Takeushi. H. Kamikuochi. A. Kage. E. Morioka. A. Bey. M. Kubo. T. Robinson. G. E. and Malaeszka. R. 2006. Carbohydrate metabolism genes and pathways in insects: insights from the honey bee genome. *Insect of Molecular Biology* 15: 563-576.
  22. Konarev. A. V. 1996. Interaction of insect digestive enzymes with plant protein inhibitors and host-parasitic coevolution. *Euphytica* 92:89-94.
  23. Krishnan. N. and Kodrik. D. 2006. Antioxidant enzymes in *Spodoptera littoralis* (Boisduval): Are they enhanced to protect gut tissues during oxidative stress? *Journal of Insect Physiology* 52: 11-20.
  24. Liu. J. Zheng. S. Liu. L. Li. L. and Feng. Q. 2010. Protein profiles of the midgut of *Spodoptera litura* larvae at the sixth instar feeding stage by shotgun ESI-MS. *Journal of Proteome Research* 9: 2117-2147.
  25. Liu L. Schepers E. Lum A. Rice J. Yalpani N. Gerber R. Jiménez-Juárez N. Haile F. Pascual A. Barry J. Qi X. Kassa A. Heckert MJ. Xie W. Ding C. Oral J. Nguyen M. Le J. Procyk L. Diehn SH. Crane VC. Damude H. Pilcher C. Booth R. Liu L. Zhu G. Nowatzki TM. Nelson ME. Lu AL. and Wu G. 2019. Identification and Evaluations of Novel Insecticidal Proteins from

- Plants of the Class Polypodiopsida for Crop Protection against Key Lepidopteran Pests. *Toxins*. 11(7):383. <https://doi.org/10.3390/toxins11070383>.
26. Lukasik. I. Golawska.S. Wojcicka.A. and Golawski.A. 2011. Effect of host plants on antioxidant system of pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Bulltein of Insectology* 64: 153-158.
  27. Mello. M. O. and silva-filho. M. C. 2002. Plant-insect interaction: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanism. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 14: 71-81.
  28. Meng. J. Zhang. C. Zhu. F. Wang. X. and Lei. C. 2009. Ultraviolet light-induced oxidative stress: Effects on antioxidant response of *Helicoverpa armigera* adults. *Journal of Insect Physiology* 55: 588-592.
  29. Mortazavi M. Aminzadeh S. Ghanbari A. Farrokhi N. Karkhane A. Javaheri Z. 2017. Recombinant Chitinase produced from a thermophilic *Paenibacillus ehimensis*, *Molecular and Cellular Researches (Iranian Journal of Biology)* 30:188-197.
  30. Oda. Y. Matsunaga. T. Fukuyama. K. Miyazaki. T. and Morimoto. T. 1997. Tertiary and quaternary structures of 0.19  $\alpha$ -Amylase inhibitor from wheat kernel determined by X-ray analysis at 2.06 Å resolution. *Biochemistry* 36: 13503-13511.
  31. Pauchet. Y. Muck. A. Heckel. D. G. and Preiss. S. 2008. Mapping the larval midgut lumen proteome of *Helicoverpa armigera*, a generalist herbivorous insect. *Journal of Proteome Research* 7: 1629-1639.
  32. Pirian K. Piri K. 2018. Evaluation of antioxidant and a-amylase inhibitory activity of two species *Sargassum angostifolium* and *Palisada perforata*, *Molecular and Cellular Researches (Iranian Journal of Biology)* 31:158-171.
  33. Priya S. Kumar S. Kaur N. Gupta AK. 2013. Specificity of  $\alpha$ -amylase and trypsin inhibitor proteins in wheat against insect pests. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 41:49-56.
  34. Ranty B. Aldon D. Galaud JP. 2006. Plant calmodulins and calmodulin-related proteins *Plant signaling and behavior* 1: 96-104.
  35. Rauf I. Javaid S. Naqvi R.Z. 2019. *In-planta* expression of insecticidal proteins provides protection against lepidopteran insects. *Scientific Reports* 9: 6745 <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41833-7>
  36. Roberts. T. H. and Hejgaard. J. 2008. Serpins in plants and green algae. *Functional & Integrative Genomics* 8: 1-27.
  37. Rodrigues da Silva R. and Couto Santos R. 2019. Pest control: can chitinases help to reduce pesticide use? *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67: 8071-8073.
  38. Rosenkrands. I. Hejgarrd.J. Rasmussen.S.K. and Bjorn.S.B. 1994. Serpins from wheat grain. *FEBS Letters* 343: 75-80.
  39. Saadati. M. and Toorchi. M. 2017. The study of plant protein accumulation in gut of insect using proteomics technique: Wheat-sunn pest interaction. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 16: 205-209.
  40. Saadati Bezdi. M. Farshbaf Pourabad. R. Toorchi. M. Zarghami. N. and Komatsu. S. 2012a. Protein patterns in salivary gland of sunn pest, *Eurygaster integriceps* (put.) (Hem: Scutelleridae). *Turkish Journal of Entomology* 36: 71-80.
  41. Saadati Bezdi. M. Toorchi. M. Farshbaf Pourabad. R. and Zarghami. N. 2012b. Protein map of gut in adult sunn pest, *Eurygaster integriceps* (Put.) (Hem: Scutelleridae): Two-dimensional electrophoresis technique. *Munis Entomology and Zoology* 7: 229-237.
  42. Saadati Bezdi. M. Toorchi. M. Farshbaf Pourabad. R. Zarghami. N. Nouri. MZ. And Komatsu. S. 2012c. Proteome analysis of gut and salivary gland proteins of fifth-instar nymphs and adults of the sunn pest. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 81: 105-119.
  43. Sivashankari. S. and Shanmughavel. P. 2006. Functional annotation of hypothetical proteins- A review. *Biomedical Informatics Publishing Group* 1: 335-338.
  44. Yao. H. Xiang. X. Chen. L. Guo. A. He. F. Lan. L. Lu. X. and Wu. X. 2009. Identification of the proteome of the midgut of silkworm, *Bombyx mori* L. by multidimensional liquid chromatography LTQ-Orbitrap mass spectrometry. *Bioscience Reports* 29: 363-373.
  45. Zhu-Salzman. K. Luthe. D.S. and Felton. G. w. 2008. Arthropod-inducible proteins: Broad spectrum defenses against multiple herbivores. *Plant Physiology* 146: 852-858.
  46. Zhang. S. Xu. Y. Fu. Q. Jia. L. Xiang. Z. and He. N. 2011. Proteomic analysis of larval midgut from silkworm (*Bombyx mori*). *International Journal of Genomics* 13: 1-13.

## Proteome analysis: identification of accumulated plant proteins in the gut of adults *Aelia acuminata*

Saadati M.

Dept. of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, I.R. of Iran

### Abstract

Proteomics is a new technique in plant-insect interaction studies. Identification of effective proteins in the insect-plant systems is main challenge in the evolutionary ecology. In this study, accumulated plant proteins in the gut of *Aelia acuminata* were visualized using two dimensional electrophoresis. Targets spots were selected to cut, digest and blast in the mascot software using the National Center of Biotechnology Information database, respectively. Results showed that accumulated proteins were serpin, alpha-amylase inhibitors as plant inhibitors; peroxidase, dehydroascorbate reductase and deoxymuogenic acid synthase as antioxidant proteins; beta-amylase and agglutinin lecithin 3 as stored proteins; calmodulin as regulation protein and hypothetical protein as unknown protein. Accumulation of plant inhibitor proteins in the gut of adults proved that gut proteases of insect can be overcome to these toxic proteins. Results suggest that proteomics is effective technique to identify changed proteins in the insect and plants tissues and it will be helpful to discuss their physiological roles in the biochemical process.

**Keywords:** Proteomics, Biochemistry, Digestive system, Inhibitor, Antioxidant.