Winter (2022) 12(40): 1-14
DOI: 10.30473/cb.2023.68326.1913
Received: 22 Nov 2022 Accepted: 14 Mar 2023

Crop Biotechnology Open Access

ORIGINAL ARTICLE

Identification of allatostatin neuropeptides family and their receptors in Sunn pest (*Eurygaster integriceps*) using transcriptome wide analysis

Mehrbano Kazemi Alamouti[1,2], Mohammad Majdi[3*], Ghasem Hossini Salekdeh[4], Mohammad Reza Ghaffari[4*]

[1] Ph.D. Student, Department of Plant Genetics and Production, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.
[2] Department of Systems and Synthetic Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
[3] Associate Professor, Department of Plant Genetics and Production, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.
[4] Prof. Department of Molecular Sciences, Macquarie University, North Ryde, NSW. Australia.
[5] Assistant Prof. Department of Systems and Synthetic Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Correspondence
Mohammad Majdi & Mohammad Reza Ghaffari
Email: majdi60@gmail.com
Email: mrghaffari52@gmail.com

How to cite
Kazemi Alamouti, M., Majdi, M., Hossini Salekdeh, G. & Ghaffari, M.R. (2022). Identification of allatostatin neuropeptides family and their receptors in Sunn pest (*Eurygaster integriceps*) using transcriptome wide analysis. *Crop Biotechnology*, 12(40), 1-14.

ABSTRACT

Eurygaster integriceps is one of the known pests of wheat fields in Iran and West Asia. The role of neuropeptides in the stages of insect's growth has led to a promising perspective for the production of a new generation of bio-insecticides based specific application. Insect's neuropeptides along with their specific receptors are one of the most diverse proteins that control physiological and behavioral activities in insects. Allatostatin is one of the important neuropeptides in insects which, by inhibiting the youth hormone, plays a role in regulating physiological processes such as feed and metabolism in some insects. In this study, using the information obtained from adult *Eurygaster integriceps* transcriptome, neuropeptides and specific receptors of the allatostatin family were investigated. Bioinformatics and phylogenetic studies of the data led to identify four neuropeptides A, B and C allatostatin family, as well as the neuropeptide receptors of A and C allatostatin. The results showed that the neuropeptides of the allatostatin family identified in *Eurygaster integriceps* are involved in various physiological processes. Considering the important role of neuropeptides in insects, these neuropeptides can be used to design specific insecticides compatible with the environment for managing control *Eurygaster integriceps* in future.

KEYWORDS
Allatostatin, GPCR, Neuropeptide, RNA-Seq.

© 2023, by the author(s). Published by Payame Noor University, Tehran, Iran.
This is an open access article under the CC BY 4.0 license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

سال دوازدهم، شماره دوم، پیاپی چهلم، اسفند ۱۴۰۱ (۱۴-۱)

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۴

DOI: 10.30473/cb.2023.68326.1913

نشریه علمی

زیست‌فناوری گیاهان زراعی

«مقاله پژوهشی»

شناسایی نوروپپتیدهای خانواده آلاتواستاتین و گیرنده‌های نوروپپتیدی آن در سن گندم (*Eurygaster integriceps*) با استفاده از راهکار کاوش ترانسکریپتوم

مهربانو کاظمی‌الموتی[۱،۲]، محمد مجدی[۳]*، قاسم حسینی‌سالکده[۴]، محمدرضا غفاری[۵]*

[۱] دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه ژنتیک و تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.

[۲] بخش زیست‌شناسی سامانه‌ها، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

[۳] دانشیار گروه ژنتیک و تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.

[۴] استاد گروه علوم مولکولی، دانشگاه مک کواری، نورث رایدِ، ملبورن، استرالیا.

[۵] استادیار بخش زیست شناسی سامانه‌ها، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

نویسنده مسئول:
محمد مجدی
رایانامه: majdi60@gmail.com
محمدرضا غفاری
رایانامه: mrghaffari52@gmail.com

چکیده

سن گندم با نام علمی *Eurygaster integriceps* یکی از آفات شناخته شده مزارع گندم در ایران و غرب آسیا است. نقش نوروپپتیدها در مراحل رشد و نمو حشرات منجر به ایجاد چشم‌انداز امیدوارکننده‌ای جهت تولید نسل جدیدی از حشره‌کش‌های زیستی مبتنی بر کاربرد اختصاصی شده است. نوروپپتیدهای حشرات به همراه گیرنده‌های اختصاصی آن‌ها یکی از متنوع‌ترین پروتئین‌هایی هستند که فعالیت‌های فیزیولوژیکی و رفتاری را در حشرات کنترل می‌کنند. آلاتواستاتین یکی از نوروپپتیدهای مهم در حشرات می‌باشد که با مهار هورمون جوانی، در تنظیم فرآیندهای فیزیولوژیکی نظیر تغذیه و متابولیسم در برخی از حشرات نقش دارد. در این مطالعه با استفاده از اطلاعات حاصل از ترانسکریپتوم حشره بالغ سن گندم، نوروپپتیدها و گیرنده‌های اختصاصی خانواده آلاتواستاتین در سن گندم مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز بیوانفورماتیکی و بررسی‌های فیلوژنتیکی داده‌ها منجر به شناسایی چهار نوروپپتید از خانواده آلاتواستاتین A، B و C و همچنین گیرنده‌های نوروپپتیدی آلاتواستاتین A و C شد. نتایج نشان داد که نوروپپتیدهای خانواده آلاتواستاتین شناسایی شده سن گندم در فرایندهای فیزیولوژیک متنوعی دخیل می‌باشند. با توجه به نقش مهم نوروپپتیدها در حشرات، این نوروپپتیدها می‌توانند امکان طراحی حشره‌کش‌های اختصاصی سازگار با محیط زیست به منظور مدیریت کنترل سن گندم را برای آینده فراهم آورند.

واژه‌های کلیدی

آلاتواستاتین، نوروپپتید، GPCR، RNA-Seq.

استناد به این مقاله:

کاظمی‌الموتی، مهربانو، مجدی، محمد، قاسم، حسینی سالکده و غفاری، محمدرضا (۱۴۰۱). شناسایی نوروپپتیدهای خانواده آلاتواستاتین و گیرنده‌های نوروپپتیدی آن در سن گندم (*Eurygaster integriceps*) با استفاده از راهکار کاوش ترانسکریپتوم. فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی, ۱۲(۳۹), ۱۴-۱.

https://cropbiotech.journals.pnu.ac.ir/

مقدمه

سن گندم با نام علمی Puton (Hemiptera: Scutelleridae) *Eurygaster integriceps* یکی از آفات شناخته‌شده و خسارت‌زای مزارع گندم و جو در ایران و خاورمیانه است. این آفت در ۱۲ کشور آسیا از جنوب ایران تا شمال قزاقستان، از شرق پاکستان و افغانستان تا غرب لبنان گسترش دارد (Parker *et al*., 2011). میزان خسارت آن در مزارع گندم بیشتر از جو بوده و در صورت عدم کنترل می‌تواند صد درصد محصول گندم را از بین ببرد (Kivan *et al*., 2005). سطح سم‌پاشی سالانه در آسیای جنوب غربی علیه سن گندم، حدود ۴ میلیون هکتار و هزینه آن معادل ۱۵۰ میلیون دلار می‌باشد. در ایران در طی سال ۲۰۱۸ برای ۲ میلیون هکتار از مزارع جو و گندم حدود ۱۳۰ میلیون دلار هزینه شده است (علیزاده و همکاران،. ۱۴۰۰).

نوروپپتیدها[1] پپتیدهای کوچک در حدود ۵ تا ۸۰ اسید آمینه هستند (Agrawal *et al*., 2019) و یکی از متنوع‌ترین گروه‌های انتقال‌دهنده عصبی هستند که توسط سیستم عصبی مرکزی ترشح‌شده و فعالیت‌های رفتاری و فیزیولوژیکی مختلف را تنظیم می‌کنند (Schoofs *et al*., 2017). در حشرات، نوروپپتیدها با اتصال به گیرنده‌های مربوطه، که معروف‌ترین آن‌ها گیرنده‌های پروتئینی جی[2] (GPCR) هستند، نقش مهمی در تنظیم فرآیندهای فیزیولوژیکی متعدد دارند (Xu *et al*., 2016). GPCRها یک ساختار مارپیچی هفت‌تایی انتقال غشایی[3] دارند که به اختصار 7tm نامیده شده و برخی از فرآیندهای زیستی و فیزیولوژیکی را در جانوران اداره می‌کنند. وظیفه اصلی GPCRها، انتقال سیگنال‌های خارج سلولی و محیطی و تنظیم پیام‌رسان‌های ثانویه درون‌سلولی از طریق اتصال به پروتئین‌های جی و عوامل پایین‌دستی آن‌ها است (Hilger *et al*., 2018). این گیرنده‌ها در شناسایی پیام‌رسان‌های خارج سلولی، انتقال سیگنال به سیتوزول و همچنین در پاسخ ضروری سلولی جهت عملکرد فیزیولوژیکی طبیعی موجودات نقش دارند (Liu *et al*., 2021).

آلاتواستاتین[4] (Ast) نوروپپتیدهایی هستند که با اثر روی اجسام آلاتا[5] سنتز هورمون جوانی[6] (JH) را متوقف می‌کنند. اجسام آلاتا وظیفه تولید هورمون جوانی را برعهده دارند که در تنظیم دگردیسی در پوره یا لارو حشرات نقش اصلی را دارد) (Stay *et al*., 2007). اولین عضو از خانواده آلاتواستاتین، آلاتواستاتین A (Ast-A) نام دارد که برای اولین‌بار در سال ۱۹۸۹ از بافت مغز سوسک *Diploptera punctata* جداسازی شد (Woodhead *et al*., 1989). مهم‌ترین نقش این نوروپپتید مهار هورمون جوانی می‌باشد و همچنین درتنظیم فرآیندهای فیزیولوژیکی نظیر تغذیه و متابولیسم در برخی از حشرات نقش دارد (Hentze *et al*., 2015). دومین عضو این خانواده، آلاتواستاتین B (Ast-B) نام دارد که اولین‌بار در سیستم عصبی مرکزی *Locusta migratoria* شناسایی شد. (Schoofs *et al*., 1991). این نوروپپتید نیز علاوه بر نقش مهارکنندگی سنتز هورمون جوانی، در رفتارهای فیزیولوژیکی نظیر پوست‌اندازی و سیری در برخی از حشرات ازجمله مگس سرکه نقش دارد (Min *et al*., 2016). سومین عضو این خانواده آلاتواستاتین C (Ast-C)، در سال ۱۹۹۱ در *Manduca sexta* شناسایی شد. نوروپپتید Ast-C عملکردهای متفاوتی در حشرات مختلف نشان می‌دهد، به‌عنوان مثال در *Lacanobia oleracea* نقش مهارکننده انقباضات معده را برعهده دارد و در *Tribolium castaneum* باعث تحریک آزادسازی آنزیم‌های پروتئازی در معده می‌شود (Liu *et al*., 2021). این نوروپپتید در ساختار خود داری یک پل دی‌سولفیدی است و همچنین از ویژگی بارز آن معمولا وجود یک توالی پنج پپتیدی به‌ترتیب از راست به چپ فنیل آلانین- سیستئین- سرین- ایزولوسین- پرولین (PISCF) در انتهای کربوکسیلی آن است.

مدیریت آفت سن به‌طور سنتی بر استفاده گسترده از حشره‌کش‌های شیمیایی متکی بوده است. با این‌حال، ظهور مقاومت در جمعیت آفات و نگرانی‌های فزاینده در مورد اثرات زیست‌محیطی این مواد شیمیایی، منجر شده است تا امروزه محققین به فکر یافتن راه‌های جایگزین برای کنترل آفات باشند (Davari & Parker., 2018). استفاده از حشره‌کش‌های شیمیایی می‌تواند منجر به عواقب زیان‌باری ازجمله ایجاد مقاومت در برابر آفات آلودگی مواد غذایی و محیطزیست شود (Critchley., 1998; Angelo *et al*., 2010). برای پرداختن به این مسائل، محققان استفاده از تکنیک‌های جدید مانند تداخل RNA، اصلاح ژنومی و مطالعات میکروبیومی را با توجه به تاثیرات مثبت در کنترل آفات مختلف برای کنترل مؤثر آفت سن گندم جهت جایگزینی با روش‌های سنتی پیشنهاد کرده‌اند (Kazemi *et al*., 2021). نوروپپتید حشرات یک هدف

1. Neuropeptide
2. Protein Coupled Receptors
3. seven α-helicaltransmembrane
4. Allatostatin
5. Corpora Allata
6. Juvenile hormone

امیدوارکننده جهت تولید نسل جدیدی از حشره‌کش‌ها با سازگاری بیشتری در برابر با محیط‌زیست هستند (Scherkenbeck & Zdobinsky., 2009). شناسایی نوروپپتیدها و درک عملکرد، ترکیبات فعال و تعاملات آن‌ها منجر به طراحی شبه پپتیدها یا مولکول‌های کوچکی می‌شود که با کمک مولکول‌های سیگنال‌دهنده و گیرنده‌های اختصاصی آن‌ها قادر به مختل‌کردن فرآیندهای فیزیولوژیکی حشرات می‌باشند. بنابراین شناخت خصوصیات ساختاری و عملکردی نوروپپتیدهای حشرات، اولین گام جهت توسعه استراتژی‌های جایگزینی با حشره‌کش‌های معمولی می‌باشد (Ons *et al*., 2011). از میان نوروپپتیدهای شناسایی شده در حشرات، پروکتولین، کینین، نوروپپتید فعال‌کننده بیوسنتز فورمون و آلاتواستاتین در ارتباط با کنترل‌کننده‌های اختصاصی بیشتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. این مطالعات راه را برای تولید عوامل جدید کنترل حشرات بر اساس آنتاگونیست‌های پپتیدی نوروپپتیدهای حشرات هموار می‌کند (Zhang *et al*., 2023). یکی از مهم‌ترین نقش‌های آلاتواستاتین مهار هورمون جوانی می‌باشد، در شرایط آزمایشگاهی استفاده از آنالوگ آلاتواستاتین بیش از ۴۰ درصد خاصیت مهارکنندگی هورمون جوانی در *Periplaneta americana* را نشان داد (Elakkiya *et al*., 2019). در مطالعه دیگری آنالوگ‌های آلاتواستاتین FGLa به‌عنوان کاندیدای حشره‌کش احتمالی در نظر گرفته شدند. نتایج نشان داد که این ترکیبات به‌طور قابل‌توجهی بیوسنتز هورمون جوانی را پس از تزریق مهار کرده است، و همچنین اثرات لاروکشی پس از تزریق را نیز از خود نشان دادند، بنابراین می‌توانند پتانسیل قابل توجهی در مدیریت کنترل آفات داشته باشند (Huang *et al*., 2018). نوروپپتیدهای متعدد و گیرنده‌های آن‌ها در حشرات مختلف از جمله *Tribolium castaneum*، *Bombyx mori*، *Drosophila melanogaster*، *Locusta migratoria*، *Habrobracon hebetor*، *Rhynchophorus ferrugineus* و *Phauda flammans* مشخص شده‌اند (Li *et al*., 2008; Hauser *et al*., 2008; Roller *et al*., 2008; Nässel & Winther., 2010; Veenstra., 2014; Hou *et al*., 2015; Yu *et al*., 2020; Wu *et al*., 2022). با این‌حال، هیچ مطالعه‌ای در مورد نوروپپتیدها و گیرنده‌های آن‌ها در سن گندم انجام نشده است. توالی‌یابی ژنوم و ترانسکریپتوم به شکل راه جدیدی برای مطالعات ژنتیکی و عملکردی با سرعت بالا و در مقیاس وسیع ایجاد کرده است. با توالی‌یابی RNA محققین قادر به مطالعه ساختار رونوشت از قبیل پیرایشRNA ، اطلاعات آللی (SNPs)، بررسی بیان با دقت بالا و شناسایی ژن‌های مختلف می‌باشند. این مزایا تحقیق پیرامون ژنومیکس عملکردی را در گونه‌هایی که اطلاعات کاملی از ژنوم آن‌ها در دسترس نیست را مقدور می‌سازد (Haas *et al*., 2013).

هدف از مطالعه حاضر پویش ترانسکریپتوم سن گندم به‌منظور شناسایی نوروپپتیدهای آلاتواستاتین و گیرنده‌های آن است. ازآنجایی‌که ژنوم سن گندم تاکنون توالی‌یابی نشده است برای این منظور از فناوری RNA-Seq استفاده شد. با توجه به نقشی که این نوروپپتیدها در کنترل مراحل مهم فیزیولوژیکی و رفتاری نظیر تغذیه، رشد ونمو، پوست‌اندازی و ... دارند، شناسایی نوروپپتیدها و گیرنده‌های اختصاصی این خانواده می‌تواند در امکان تولید نسل جدیدی از حشره‌کش‌های اختصاصی سازگار با محیط‌زیست به‌منظور مدیریت کنترل سن گندم موثر واقع شود.

مواد و روش‌ها

پرورش سن گندم، نمونه برداری و استخراجRNA

پوره‌های سن چهارم و پنجم سن گندم در خردادماه از مزارع جو موسسه تحقیقات ورامین که سم‌پاشی علیه پوره انجام نشده بود جمع‌آوری شدند. حشرات روزانه بازدید و هم‌سن‌سازی انجام گرفت. حشرات هم‌سن تا زمان ظهور حشرات کامل، در اتاقک رشد با شرایط دمایی ۱±۲۶ رطوبت ۱۰±۶۰ و رژیم نوری (D8:L16) نگهداری و توسط خوشه‌های تازه گندم تغذیه شدند. حشرات کامل سن، نمونه‌برداری شده و سریعا در ازت مایع قرار داده شدند و به محض ورود به آزمایشگاه به دمای ۸۰- منتقل شدند.

استخراج RNA کل و توالی یابی ترانسکریپتوم

RNA کل با استفاده از محلول (Trizol (Invitrogen, CA, USA مطابق با روش شرکت سازنده، استخراج شد. RNA کل از مخلوطی از حشرات بالغ در دو تکرار استخراج شد. کیفیت و خلوص نمونه‌های RNA با تعیین نسبت جذب در طول موج nm/280nm۲۶۰ و nm/230nm۲۶۰ با استفاده از پیکودراپ و الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد تعیین شد. کتابخانه‌های توالی‌یابی ترانسکریپتوم مطابق دستورالعمل Illumina RNA-Seq ساخته شد و با استفاده ار فناوری خوانش دوطرفه طبق دستورالعمل (Illumina HiSeq 2500 ((Shenzhen,

((China توالی‌یابی شدند. نتیجه توالی‌یابی در مجموع ۳۲۰ میلیون جفت باز با طول توالی ۱۵۰ جفت باز بود. حذف آداپتور و دورانداختن خوانش‌های با کیفیت پایین توسط موسسه بیجینگ (Beijing Genome Institute) انجام شد.

مونتاژ ترانسکریپتوم به روش از نو[1]

کیفیت توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار FASTQC کنترل شد. نتیجه کنترل کیفیت خوانش‌ها فاقد آلودگی به آداپتور، فاقد توالی‌های بی‌کیفیت (Sequences flagged as poor quality) و نزدیک به ۴۰ درصد محتوای GC بودند. خوانش‌های خام در مرحله بعد با استفاده از نرم‌افزار Trinity در K-mer 32 برای مونتاژ به صورت de novo مورد استفاده قرار گرفتند (Haas *et al*., 2013). نرم‌افزار ترینیتی از سه زیر نرم‌افزار مستقل به نام‌های Inchworm، Chrysalis، Butterfly به صورت متوالی، برای مونتاژ خوانش‌ها استفاده می‌کند. پس از مونتاژ توالی‌ها به وسیله نرم‌افزار، فایل خروجی، یک فایل منفرد با نام Trinity.fasta قابل دستیابی بود. جهت بررسی ترانسکریپتوم حاصل، تعداد و میانگین کانتیگ‌های مونتاژ شده و N50، از برنامه Trinitystat.pl استفاده شد.

شناسایی نوروپپتیدهای خانواده آلاتواستاتین و گیرنده‌های نوروپپتیدی آن

توالی پروتئینی نوروپپتیدها و گیرنده‌های آلاتواستاتین دیگر حشرات با استفاده از روش (Pandit *et al*., 2018) جمع‌آوری گردید. در ادامه بلاست X توالی‌های نوکلئوتیدی حاصل از مونتاژ از نو با توالی‌های پروتئینی مربوط به نوروپپتید حشرات با مقدار انتظاری یا امید ریاضی[2] ۴-۱۰ و تشابه[3] ۳۰ درصد انجام شد. نتیجه حاصل از بلاست مربوطه در فایل اکسل جمع‌آوری گردید. چارچوب خواندن باز (ORF[4])، توالی‌های حاصل از بلاست، با استفاده از نرم‌افزار ORF Finder مربوط به پایگاه داده NCBI به‌دست آمد (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/). توالی پروتئین‌های حاوی ORF جهت تایید همپوشانی[5] در پایگاه داده NCBA مجددا بلاست شدند و نوروپپتیدهای کاندید شده مشخص شدند. در مرحله بعد پپتید سیگنال این نوروپپتیدها با استفاده از نرم‌افزار SignalP v6 (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) به‌دست آمد (Petersen *et al*., 2011). برای بررسی حفاظت‌شدگی[6] مربوط به گیرنده‌های نوروپپتیدی شناسایی شده، از نرم‌افزار CD Search مربوط به پایگاه داده NCBI استفاده شد (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi). همچنین تعداد دمین‌های انتقالی غشایی آن‌ها نیز با استفاده از نرم‌افزار TMHMM 2.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/) محاسبه گردید.

آنالیز فیلوژنتیکی

جهت بررسی فیلوژنتیکی گیرنده‌های نوروپپتیدی فایل حاوی توالی پروتئینی گیرنده‌های شناسایی شده به‌همراه توالی گیرنده‌های نوروپپتیدی حشرات گونه‌های نزدیک مانند *B. mori*، *T. castaneum*، *D. melanogaster*، *L. migratoriat*، *H. hebetor*، *R. ferrugineus* و... جمع‌آوری شدند و با استفاده از ClustalW در نرم‌افزار MEGA4 هم‌ردیف شدند. سپس، درخت فیلوژنتیکی با استفاده از روش حداکثر درشت نمای[7] و بوت استرپ ۱۰۰۰ رسم شد. درخت رسم‌شده در نرم‌افزار Tree Of Life (iTOL) مصورسازی گردید (Letunic & Bork, 2007).

نتایج و بحث

نوروپپتیدها و هورمون‌های پپتیدی، به دلیل ساختار حفاظت‌شده در طی تکامل، در ارتباطات بین سلولی نقش مهمی دارند و به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های حیاتی فرآیندهای فیزیولوژیکی ضروری عمل می‌کنند (Li *et al*., 2008; Yu *et al*., 2020; Veenstra., 2011). مطالعات مختلف نشان داده است که نوروپپتیدها در رویدادهای مهمی مانند تغذیه، تولید مثل، رشد و رفتار در حشرات نقش دارند و به همین دلیل به اهداف مناسبی برای توسعه حشره‌کش‌های جدید تبدیل شده‌اند (Veenstra., 2011).

نتایج عمومی مونتاژ به روش از نو

به دنبال فیلتر کردن و تصحیح داده‌های حاصل از توالی‌یابی، ۲۵ گیگابایت خوانش تولید شد، فرآیند مونتاژ اولیه منجر به تولید ۵۸۲۳۹۸ کانتیگ با طول متوسط ۵۵۷.۶ باز شد. برای از بین بردن کانتیگ‌ها با بیان کم، آستانه ۱ برای قطعه در هر کیلو باز میلیون[8] (FPKM) اعمال شد. در نتیجه، ۷۰۹۸۱ کانتیگ باقی

1. De novo
2. Expected value
3. Identity
4. Open Reading Frame
5. Hemology
6. Conserved Domain Search Service (CD Search)
7. Maximum Likelihood
8 .Fragments Per Kilo Base Million

ماند که با میانگین طول ۹۱۶.۹۷ جفت باز مشخص شد. این رونوشت فیلتر شده متعاقباً در مراحل بعدی حاشیه‌نویسی و تجزیه و تحلیل مورد استفاده قرار گرفت.

نوروپپتید آلاتواستاتین و گیرنده های اختصاصی آن

در این مطالعه چهار نوروپپتید و گیرنده آلاتواستاتین شناسایی گردید که نوروپپتیدها مربوط به هر سه گروه آلاتواستاتین A، B و C و گیرنده‌ها مربوط به آلاتواستاتین A و C بودند، برای گروه B گیرنده‌ای شناسایی نشد. جدول ۱ مشخصات کامل نوروپپتیدها و گیرنده‌های مربوطه را نشان می‌دهد. همان‌طور که در جدول نشان داده شده است، بیشترین تشابه نوروپپتیدها با *P. stali* می‌باشد که همانند سن گندم از راسته نیم بالان محسوب می‌شود. در مورد گیرنده‌های نوروپپتیدی آلاتواستاتین همچنین بیشترین شباهت با *H. halys* است که این حشره نیز شباهت ظاهری زیادی با سن گندم داشته و از راسته نیم‌بالان می‌باشد.

جدول ۱. مشخصات نوروپپتیدها و گیرنده‌های اختصاصی خانواده آلاتواستاتین شناسایی شده در سن گندم

جستجوی همولوژی با پروتئین‌های شناخته شده								
نوروپپتید/ گیرنده نوروپپتیدی	کد Unigene	نام اختصاری	ORF (اسید آمینه)	پپتید سیگنال/تعداد های انتقال غشایی	گونه	کد شناسایی پروتئین	E-Value	میزان تشابه(٪)
Allatostatin A	TRINITY_DN53332_c0_g1_i1	Ast-A	۲۱۲	~	*Plautia stali*	BAV78789.1	۴E-۱۰۳	۸۳
Allatostatin B	TRINITY_DN1251_c1_g1_i1	Ast-B	۱۷۴	۲۱	*Plautia stali*	BAU88428.1	۶E-۶۴	۸۰
Allatostatin C	TRINITY_DN208820_c0_g1_i1	Ast-C-1	۶۳	~	*Plautia stali*	BAV78790.1	۶E-۱۶	۹۴
Allatostatin C	TRINITY_DN47225_c0_g1_i1	Ast-C-2	۸۲	~	*Plautia stali*	BAV78790.1	۳E-۱۰	۱۰۰
AllatostatinA receptor-1	TRINITY_DN178360_c0_g1_i1	Ast-AR-1	۱۳۰	۳	*Nilaparvata lugens*	XP_039290143.1	۷E-۷۰	۸۵
AllatostatinA receptor-2	TRINITY_DN148600_c0_g1_i1	Ast-AR-2	۲۷۶	۴	*Halyomorpha halys*	XP_014294757.1	۶E-۱۲۰	۸۴
AllatostatinC receptor	TRINITY_DN107796_c0_g1_i1	Ast-CR	۴۴۲	۷	*Halyomorpha halys*	XP_014285192.1	۰	۹۶

~ فاقد پپتید سیگنال

توالی پیش‌بینی شده برای پیش‌ساز Ast-A از ۲۱۲ اسیدآمینه تشکیل شده است که دارای ORF کامل بوده و فاقد پپتید سیگنال می‌باشد. این توالی دارای هشت پپتید فرضی[1] می‌باشد که با استفاده از جایگاه شکاف دوتایی از یکدیگر جدا شده و همچنین انتهای کربوکسیلی آن‌ها آمیداسیون صورت گرفته و اسیدآمینه گلایسین قبل از جایگاه شکاف قرار دارد (شکل ۱).

توالی‌های شش پپتید فرضی رسیده[2] شامل XYXFGLamide (که در جایگاه X اسیدآمینه متغیر قرار می‌گیرد) می‌باشد که یک موتیف[3] با حفاظت‌شدگی بالا در انتهای کربوکسیلی می‌باشد. هر یک از پپتیدهای فرضی رسیده تعداد اسیدآمینه متفاوتی دارند. موتیف توالی حفاظت شده در این نوروپپتید همانند توالی‌های حفاظت شده در *Scylla paramamosain* می‌باشد (Bao *et al*., 2015).

1. predicted peptide

2. predicted mature peptides
3. Motif

MLVHLCQAKLGQKDGNYQGQQHVSQSSLSSQQGNMLLTLIISIFLAQFCLAEVDK

DSQKRLYDFGLGKRAAYTYLSEYKRLPIYNFGLGKRSDDSSFYGKRFNDMDLVYDD

ESMKDDFKRMKQYSFGLGKRLPLKTYNFGLGKRSQYDDSDAFFIDGFDEDKRSNN

GHRFSFGLGKRDGAKQELPGRRSMQYNFGLGKRSQTKDEANPSFNF

شکل ۱. پیش‌ساز آلاتواستاتین A شناسایی شده در سن گندم.

مکان‌های پیش‌بینی شده برای جایگاه شکاف، با سایه قرمز مشخص شده است. بقایای اسیدآمینه گلایسین قبل از جایگاه شکاف که نشان‌دهنده فرایند آمیداسیون (یکی از تغییرات بعد از ترجمه) می‌باشد به رنگ قرمز مشخص شده است. پس‌زمینه آبی نشان‌دهنده اسیدآمینه‌های حفاظت‌شده در بین حشرات است که پپتید بالغ نیز نام دارد.

در این مطالعه یک رونوشت برای پیش‌ساز Ast-B شناسایی شد که دارای ۱۷۴ اسیدآمینه می‌باشد. این پیش‌ساز با پپتید سیگنال به طول ۲۱ اسید آمینه شروع شده و نوروپپتید پیش‌ساز کامل با هفت پپتید بالغ را شامل می‌شود . پپتیدهای کامل پیش‌بینی شده در این پیش‌ساز نوروپپتیدی فرضی دارای جایگاه شکاف دوتایی و همچنین اسید آمینه گلایسین در انتهای کربوسیلی هستند که نشان از آمیداسیون می‌باشد که در حقیقت نوعی تغییرات پس ترجمه برای افزایش کارایی پپتید مورد نظر محسوب می‌شود. موتیف حفاظت شده این پپتیدها به صورت XWXXXXGXWamide می‌باشد (شکل ۲).

MHKMKLLYLVLVVGFAALTFGDDSQDNSMSPMQQLEDTIMMENEEKRAWRDL

TKSWGKRGWSDLQSGWGKRAWGSLHSSGWGKRGWADLQSAGWGKRSHPQ

QVDEMEMDKKSWDSLHGGWGKRAADWGSFRGSWGKRDPAWQNLKGLWG

KRSFPHSESFEPGLNNLEEEMRRGL

شکل ۲. پیش ساز آلاتواستاتین B شناسایی شده در سن گندم.

اسیدآمینه‌هایی که با سایه زرد مشخص شده‌اند توالی پپتید سیگنال را نشان می‌دهند. مکان‌های پیش‌بینی شده برای جایگاه شکاف، باسایه قرمز مشخص شده است. بقایای اسیدآمینه گلایسین قبل از جایگاه شکاف که نشان‌دهنده فرایند آمیداسیون (یکی از تغییرات بعد از ترجمه) می‌باشد به رنگ قرمز مشخص شده است. پس زمینه آبی نشان‌دهنده اسید آمینه‌های حفاظت شده در بین حشرات است که پپتید بالغ نیز نام دارد.

نوروپپتید Ast-C شامل دو رونوشت با ۶۳ و ۸۲ اسیدآمینه، فاقد پپتید سیگنال و دارای ORF کامل می‌باشد. Ast-C-1 دارای یک پپتید کامل با ۱۵ اسیدآمینه که ابتدا و انتهای آن جایگاه برشی دوگانه دارد و در قسمت کربوکسیل انتهایی شامل گلایسین می‌باشد که نشان از آمیداسیون و تغییرات پس ترجمه است. ویژگی بارز این نوع آلاتواستاتین دارا بودن پل دی سولفیدی سیستئین است که در این پپتید کامل در جایگاه ۶ و ۱۳ واقع شده است. شکل ۳ توالی پپتید کامل، پل دی سولفیدی، جایگاه شکاف دو تایی و آمیداسیون را نشان می‌دهد.

الف

VVNRLRSQVDVTDLQRKRSYWKQCAFNAVSCFGQKREGGGRGRNLNPQKDLGK

WSFFTHLFSF

ب

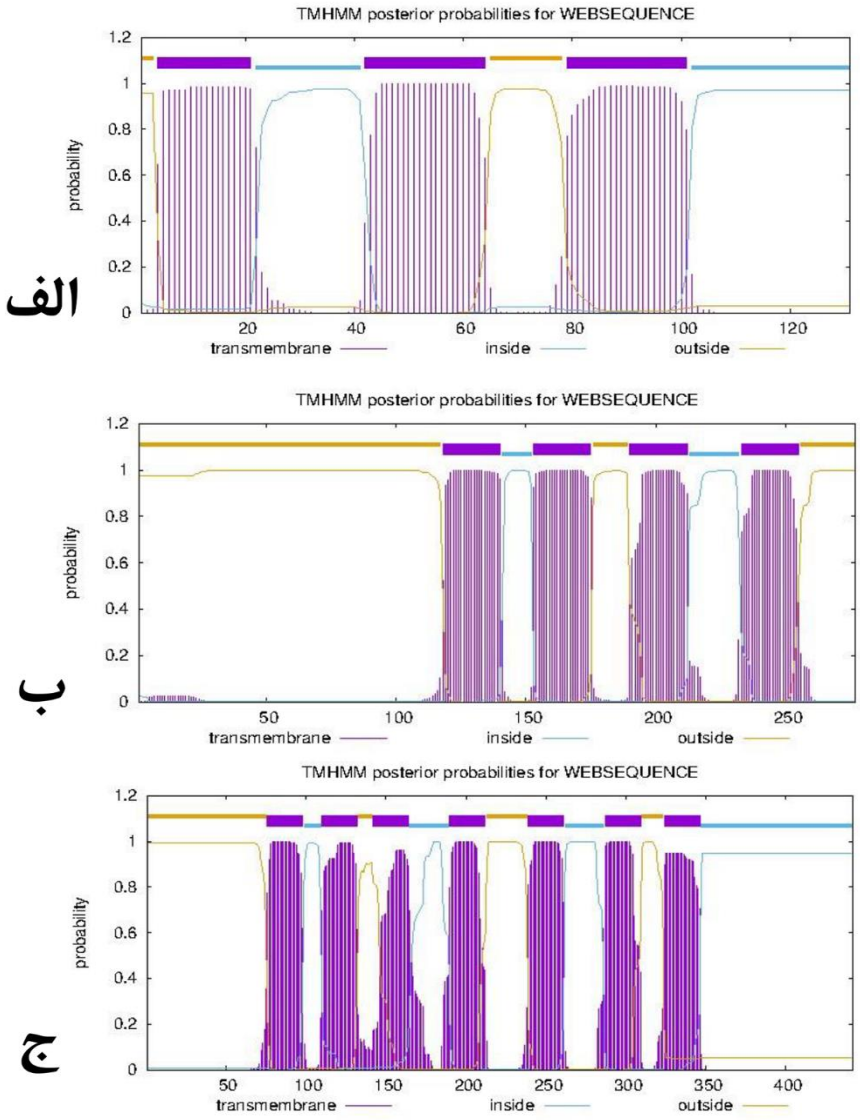
MFFFFLALRSLCPATLQLLISILSLYNNLSSLFPQGRLTTLYFLFTNRQNPPLFQKLVD

DDGSIETALMNYLFAKQVVNRLRS

شکل ۳. پیش ساز آلاتواستاتین C شناسایی شده در سن گندم.

دو پیش‌ساز برای آلاتواستاتینC در سن گندم شناسایی شده است که توالی آن‌ها در شکل الف و ب مشاهده می‌شود. ساختار پل دی سولفیدی با سایه سبز مشخص شده است، که در جایگاه ۶ و ۱۳ قرار گرفته‌اند. مکان‌های پیش‌بینی شده برای جایگاه شکاف، با سایه قرمز مشخص شده است. بقایای اسیدآمینه گلایسین قبل از جایگاه شکاف که نشان‌دهنده فرآیند آمیداسیون (یکی از تغییرات بعد از ترجمه) می‌باشد، به رنگ قرمز مشخص شده است. پس‌زمینه آبی نشان‌دهنده اسید آمینه‌های حفاظت‌شده در بین حشرات است که پپتید بالغ نیز نام دارد.

گیرنده‌های نوروپپتیدی اختصاصی آلاتواستاتین به‌دست آمده در این مطالعه شامل دو گیرنده از نوع Ast-A و یک گیرنده مربوط به Ast-C می‌باشد. توالی نوکلئوتیدی Ast-AR-1 دارای ۳۹۶ جفت باز و ORF آن دارای ۱۳۰ اسید آمینه می‌باشد. این گیرنده حاوی ۳ دمین انتقال غشایی که در شکل ۴ الف نشان داده شده است. Ast-AR-1 شامل ۱۰۱۲ باز و ORF آن دارای ۲۷۶ اسیدآمینه می‌باشد. این گیرنده نیز دارای چهار دمین انتقال غشایی است (شکل ۴ ب). گیرنده مربوط به آلاتواستاتین C شامل ۲۰۴۱ باز و ORF آن شامل ۴۴۲ اسید آمینه می‌باشد در بررسی دمین‌های این گیرنده تعداد ۷ دمین انتقال غشایی مشاهده شد که نشان می‌دهد این گیرنده کامل‌ترین تعداد دمین‌های غشایی را دارد که از ویژگی‌های بارز GPCRها می‌باشد (شکل ۴ ج).



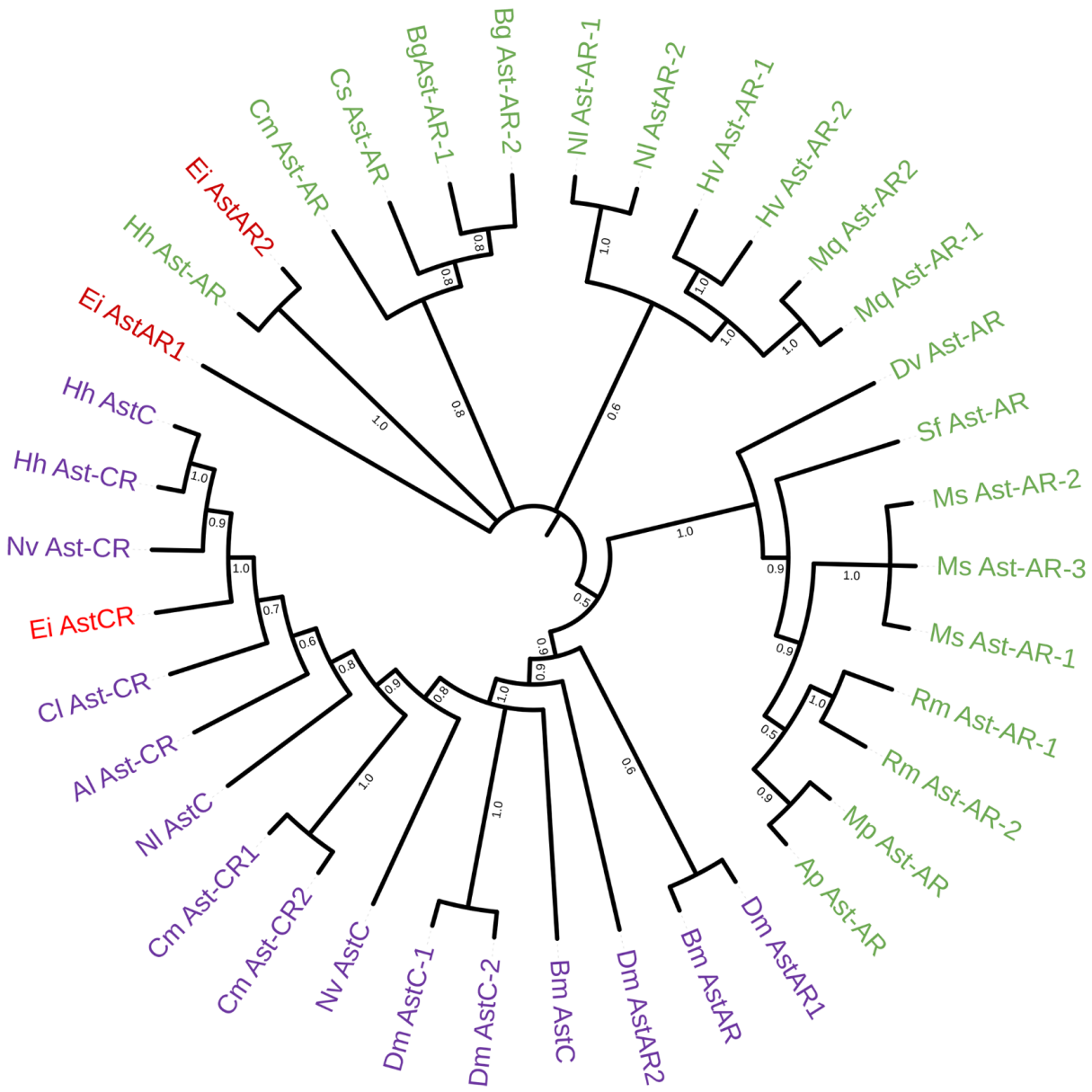
شکل ٤. جایگاه دمین‌های انتقال غشایی در گیرنده نوروپپتیدی.

الف. گیرنده نوروپپتیدی A. که به اختصار Ei_Ast-AR-1 نامیده شده است. همان‌طور که شکل نشان می‌دهد این گیرنده دارای ۳ دمین انتقال غشایی می‌باشد که هرکدام شامل ۲۰ اسید آمینه در جایگاه انتقال غشایی هستند و در جایگاه‌های ۱، ۴۰ و ۸۰ قرار گرفته‌اند. ب. دومین گیرنده نوروپپتیدی A که به اختصار Ei_Ast-AR-2 نامیده شده است. همان‌طور که شکل نشان می‌دهد این گیرنده دارای ۴ دمین انتقال غشایی می‌باشد که هرکدام شامل ۲۰ اسید آمینه در جایگاه انتقال غشایی هستند و در جایگاه‌های ۱۲۰، ۱۹۰، ۱۵۰ و ۲۳۰ قرار گرفته‌اند. ج. در گیرنده نوروپپتیدی C که به اختصار Ei_Ast-CR نامیده شده است. همان‌طور که شکل نشان می‌دهد این گیرنده دارای ۷ دمین انتقال غشایی می‌باشد که هرکدام شامل ۲۰ اسید آمینه در جایگاه‌های انتقال غشایی هستند و جایگاه‌های ۸۰، ۱۱۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰ و ۳۵۰ قرار گرفته‌اند. این گیرنده دارای ۷ دمین انتقال غشایی می‌باشد که نشان‌دهنده یک گیرنده کامل با کارایی بالا است.

نتایج مطالعات ما وجود نوروپپتیدهای A، B و C خانواده آلاتواستاتین در این حشره را نشان می‌دهد. آلاتواستاتین A تغذیه و متابولیسم را در گونه‌های مختلف حشرات تنظیم می‌کند (Lwalaba *et al*., 2010; Zandawala & Orchard., 2013; Hentze *et al*., 2015). بیان ژن آلاتواستاتین A در مگس سرکه باعث افزایش رژیم پروتئینی، افزایش انتقال یونی، کاهش رژیم قندی، کاهش رفتارهای شبه‌خواب و افزایش تحرکات معده می‌شود و همچنین با مهار گرسنگی باعث افزایش رفتارهای تغذیه‌ای در این حشره می‌شود. در مقابل با غیرفعال شدن این نوروپپتید مصرف غذا افزایش یافته و رفتارهای جستجوی غذا در مگس سرکه کاهش می‌یابد (Christ *et al*., 2018; Toprak., 2020). خانواده B نقش مهمی در پوست‌اندازی حشرات دارد (Kim *et al*., 2006; Yamanaka *et al*., 2010). آلاتواستاتین B با مهار هورمون جوانی باعث افزایش نوروپپتید شبه‌انسولین شده و این امر باعث تقویت سیستم ایمنی در سوسک *Tenebrio molitor* می‌شود (Lubawy & Hornik., 2022). خانواده C خواص مهار ممانعت‌کنندگی در حشرات را دارد (Matthews *et al*., 2007; Price *et al*., 2002). آلاتواستاتین C با مهار سنتز هورمون جوانی باعث انتقال حشره به فاز متامورفوز می‌شود. همچنین با مهار واکنش‌های کاهش ایمنی در هنگام مواجهه حشره با پاتوژن‌ها باعث افزایش بقای میزبان می‌شود (Bachtel *et al*., 2018). در حالی که حشرات Bugدار مانند *H. halys* و *E. integriceps* دارای آلاتواستاتین C هستند، پارالوگ‌های دوگانه و سه‌گانه نوع C در اکثر رده نیم بالان گزارش شده است (Lavore *et al*., 2018) اما در سن گندم این پارالوگ‌ها یافت نشد.

آنالیز فیلوژنتیک گیرنده‌های نوروپپتیدی خانواده آلاتواستاتین

گیرنده‌های پوشیده شده با پروتیین جی (GPCR) یکی از بزرگترین گروه‌های پروتئینی هستند که به سه خانواده تقسیم می‌شوند. خانواده A که به خانواده ردوپسین معروف هستند (Jung *et al*.,2014)، بزرگترین خانواده GPCR در حشرات می‌باشند. این رده نقش‌های مهمی را در مراحل فیزیولوژیکی مختلف نظیر تنظیم متابولیسم (Sano *et al*., 2015)، تغییر رفتارها (Birgul *et al*., 2020)، متامورفیز (Wu *et al*., 2020) و تغذیه(Kang *et al*., 2019) برعهده دارند. گیرنده‌های آلاتواستاتین از رده A می‌باشند که نقش مهمی در متابولیسم و تغذیه دارند (Hentze *et al*., 2015). شکل ۵ خوشه‌بندی گیرنده‌های آلاتواستاتین را با گیرنده‌های مشابه از این خانواده در حشرات مختلف نشان می‌دهد. همان‌طور که شکل نشان می‌دهد گیرنده‌های نوروپپتیدی آلاتواستاتین A و C با این گیرنده‌ها در حشرات مختلف به خوبی دسته‌بندی شده‌اند و این گیرنده‌ها بیشترین شباهت را به گیرنده‌های آلاتواستاتینی رده نیم‌بالان دارند. با توجه به اینکه گیرنده‌های نوروپپتیدی دارای شاخص حفاظت‌شدگی هستند (Yu *et al*., 2020)، قرار گرفتن گیرنده‌های آلاتواستاتین A در کنار گیرنده‌های مشابه خود در حشرات دیگر و همچنین قرار گرفتن گیرنده‌های آلاتواستاتین C سن گندم و حشرات دیگر در کنار هم نشان از اشتراکات زیاد نقاط حفاظت‌شدگی گیرنده‌های شناسایی شده در سن گندم با گیرنده‌های دیگر حشرات دارد.



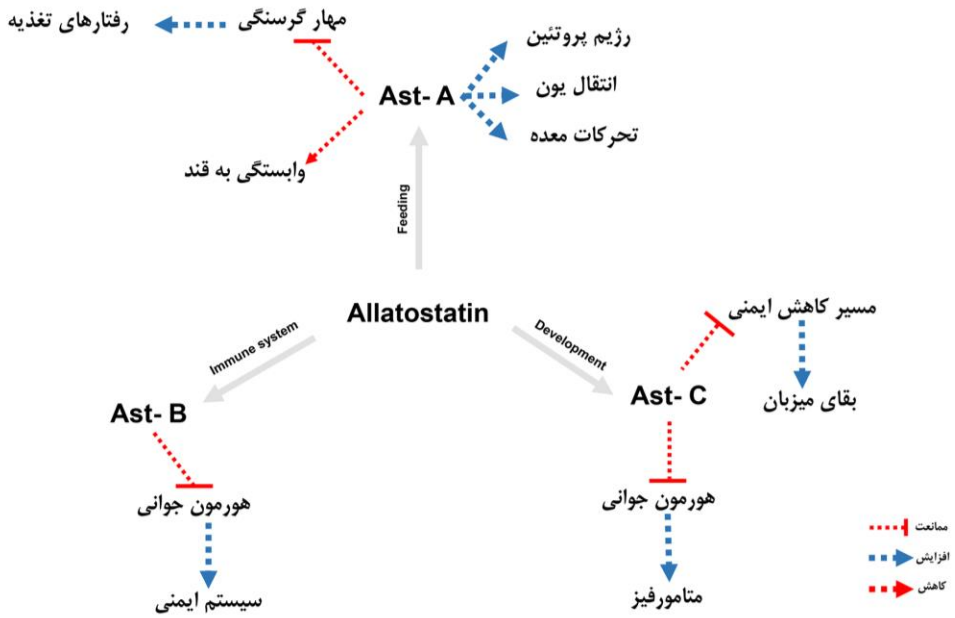
شکل ۵. آنالیز فیلوژنتیکی گیرنده‌های نوروپپتیدی آلاتواستاتین در سن گندم.

Eurygaster integriceps (Ei), Halyomorpha halys (Hh), Bombyx mori (Bm), Drosophila melanogaster (Dm), Nilaparvata lugens (Nl), (Nl)،*Rhopalosiphum maidis* (Rm) ،*Myzus persicae* (Mp) ،*Acyrthosiphon pisum* (Ap)*Nezara viridula (Ni), and Tribolium castaneum (Tc).* ،*Blattella germanica* (Bg) ،*Carausius morosus* (Cm) ،*Macrosteles quadrilineatus* (Mq)،*Melanaphis sacchari* (Ms)،*Nilaparvata lugens* ،*Cryptotermes secundus* (Cs) ،*Nezara viridula (Nv)*. گیرنده‌های آلاتواستاتین شناسایی شده در سن گندم به رنگ قرمز در شکل مشخص شده است. گیرنده‌های آلاتواستاتین A به رنگ آبی و گیرنده های آلاتواستاتین C به رنگ سبز نشان داده شده است.

نتیجه‌گیری

شکل ۶ مدل پیشنهادی برای نقش نوروپپتیدهای خانواده آلاتواستاتین نشان می‌دهد. آلاتواستاتین A با مهار گرسنگی باعث افزایش رفتارهای تغذیه و همچنین کاهش وابستگی به قند می‌شود و از طرف دیگر باعث افزایش رژیم پروتئین، انتقال یون و افزایش تحرکات معده می‌شود. آلاتواستاتین B با مهار سنتز هورمون جوانی باعث افزایش سیستم ایمنی می‌گردد. آلاتواستاتین C نیز با مهار هورمون جوانی باعث انتقال حشره به مرحله متامورفیز و همچنین با کاهش واکنش‌های مسیر ایمنی، باعث افزایش بقای میزبان می‌شود. در این مطالعه، نوروپپتید خانواده آلاتواستاتین به همراه گیرنده‌های اختصاصی آن‌ها در سن گندم (مهم‌ترین آفت مزارع گندم در ایران و خاورمیانه) شناسایی

و با استفاده از آنالیزهای فیلوژنتیک و شباهت‌های آمینواسیدی، مورد بررسی قرار گرفت. ازآنجایی‌که نوروپپتیدهای خانواده آلاتواستاتین نقش کلیدی و مهمی را در تنظیم متابولیسم و تغذیه در حشرات برعهده دارند می‌توانند به عنوان یک کاندید در طراحی حشره‌کش‌های اختصاصی سازگار با محیطزیست در حشرات مخصوصا سن گندم مورد استفاده قرار گیرند.



شکل ٦. مدل پیشنهادی نقش نوروپپتیدهای خانواده آلاتواستاتین در سن گندم

References

Agrawal, P., Kumar, S., Singh, A., Raghava, G. P., & Singh, I. K. (2019). NeuroPIpred: a tool to predict, design and scan insect neuropeptides. *Scientific Reports*, *9*(1), 5129.

Alizadeh, M., Sheikhi Garjan, A., Ma'mani, L., Bandehhagh, A., & Hosseini Salekdeh, G. (2022). Control of Sunn-Pest, Eurygaster integriceps Puton, using Deltamethrin Nanopesticide. *Applied Entomology and Phytopathology*, *89*(2), 213-223. (in Persian)

Angelo, M. J. (2010). Corn, Carbon and Conservation: Rethinking US Agricultural Policy in a Changing Global Environment. *University of Florida Levin College of Law Research Paper*, (2010-03), 17.

Bachtel, N. D., Hovsepian, G. A., Nixon, D. F., & Eleftherianos, I. (2018). Allatostatin C modulates nociception and immunity in Drosophila. *Scientific reports*, *8*(1), 7501.

Christ, P., Hill, S. R., Schachtner, J., Hauser, F., & Ignell, R. (2018). Functional characterization of the dual allatostatin-A receptors in mosquitoes. *Peptides*, *99*, 44-55.

Critchley, B. R. (1998). Literature review of sunn pest *Eurygaster integriceps* Put. (Hemiptera, Scutelleridae). *Crop protection*, *17*(4), 271-287.

Davari, A., & Parker, B. L. (2018). A review of research on Sunn Pest {Eurygaster integriceps Puton (Hemiptera: Scutelleridae)} management published 2004–2016. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, *21*(1), 352-360.

Elakkiya, K., Yasodha, P., Leo Justin, C. G., & Kumar, V. A. (2019). Neuropeptides as novel insecticidal agents. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, *8*(02), 2019.

Hauser, F., Cazzamali, G., Williamson, M., Park, Y., Li, B., Tanaka, Y., ... & Grimmelikhuijzen, C. J. (2008). A genome-wide inventory of neurohormone GPCRs in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Frontiers in neuroendocrinology*, *29*(1), 142-165.

Hentze, J. L., Carlsson, M. A., Kondo, S., Nässel, D. R., & Rewitz, K. F. (2015). The neuropeptide allatostatin A regulates metabolism and feeding decisions in.

Hilger, D., Masureel, M. and Kobilka, B.K., 2018. Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nature structural & molecular biology*, *25*(1), pp.4-12.

Hou, L., Jiang, F., Yang, P., Wang, X., & Kang, L. (2015). Molecular characterization and expression profiles of neuropeptide precursors in the migratory locust. *Insect biochemistry and molecular biology*, *63*, 63-71.

Huang, S. S., Chen, S. S., Zhang, H. L., Yang, H., Yang, H. J., Ren, Y. J., & Kai, Z. P. (2018). Structure-Based Discovery of Nonpeptide Allatostatin Analogues for Pest Control. *Journal of agricultural and food chemistry*, *66*(14), 3644-3650.

Iyison, N. B., Sinmaz, M. G., Sahbaz, B. D., Shahraki, A., Aksoydan, B., & Durdagi, S. (2020). In silico characterization of adipokinetic hormone receptor and screening for pesticide candidates against stick insect, Carausius morosus. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 101, 107720.

Jung, S. H., Lee, J. H., Chae, H. S., Seong, J. Y., Park, Y., Park, Z. Y., & Kim, Y. J. (2014). Identification of a novel insect neuropeptide, CNMa and its receptor. *FEBS letters*, *588*(12), 2037-2041.

Kang, X. L., Zhang, J. Y., Wang, D., Zhao, Y. M., Han, X. L., Wang, J. X., & Zhao, X. F. (2019). The steroid hormone 20-hydroxyecdysone binds to dopamine receptor to repress lepidopteran insect feeding and promote pupation. *PLoS Genetics*, *15*(8), e1008331.

Kazemi Alamuti, M., Majdi, M., & Hossini Salekdeh, G. (2021). A Historical Perspective to Sunn Pest (*Eurygaster Integriceps*) Management of Wheat from Traditional to Modern Methods. *Journal of Biosafety*, *14*(3), 101-116.

Kim, Y. J., Žitňan, D., Galizia, C. G., Cho, K. H., & Adams, M. E. (2006). A command chemical triggers an innate behavior by sequential activation of multiple peptidergic ensembles. *Current Biology*, *16*(14), 1395-1407.

Kivan, M., & Kilic, N. (2005). Effects of storage at low-temperature of various heteropteran host eggs on the egg parasitoid, *Trissolcus semistriatus*. *BioControl*, *50*(4), 589-600.

Lavore, A., Perez-Gianmarco, L., Esponda-Behrens, N., Palacio, V., Catalano, M. I., Rivera-Pomar, R., & Ons, S. (2018). *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae) transcriptomic analysis and neuropeptidomics. *Scientific Reports*, *8*(1), 1-15.

Letunic, I. and Bork, P., 2007. Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. Bioinformatics, *23*(1), pp.127-128.

Li, B., Predel, R., Neupert, S., Hauser, F., Tanaka, Y., Cazzamali, G., ... & Park, Y. (2008). Genomics, transcriptomics, and peptidomics of neuropeptides and protein hormones in the red flour beetle Tribolium castaneum. *Genome research*, *18*(1), 113-122.

Liu, A., Shi, W., Lin, D., & Ye, H. (2021). A Possible Role of Allatostatin C in Inhibiting Ecdysone Biosynthesis Revealed in the Mud Crab Scylla paramamosain. *Frontiers in Marine Science*, *8*, 740251.

Liu, N., Li, T., Wang, Y. and Liu, S., 2021. G-protein coupled receptors (GPCRs) in insects—A potential target for new insecticide development. *Molecules*, *26*(10), p.2993.

Lubawy, J., & Hornik, J. (2022). The effect of B-type allatostatin neuropeptides on crosstalk between the insect immune response and cold tolerance. *Scientific Reports*, *12*(1), 20697.

Lwalaba, D., Hoffmann, K. H., & Woodring, J. (2010). Control of the release of digestive enzymes in the larvae of the fall armyworm, Spodoptera frugiperda. Archives of Insect Biochemistry and Physiology: *Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, *73*(1), 14-29.

Matthews, H. J., Audsley, N., & Weaver, R. J. (2007). Interactions between allatostatins and allatotropin on spontaneous contractions of the foregut of larval *Lacanobia oleracea*. *Journal of insect physiology*, 53(1), 75-83.

Nygaard, S., Zhang, G., Schiøtt, M., Li, C., Wurm, Y., Hu, H., ... & Boomsma, J. J. (2011). The genome of the leaf-cutting ant Acromyrmex echinatior suggests key adaptations to advanced social life and fungus farming. *Genome research*, *21*(8), 1339-1348.

Ons, S., Sterkel, M., Diambra, L., Urlaub, H. and Rivera-Pomar, R., 2011. Neuropeptide precursor gene discovery in the Chagas disease vector Rhodnius prolixus. *Insect molecular biology*, *20*(1), pp.29-44.

Pandit, A. A., Ragionieri, L., Marley, R., Yeoh, J. G., Inward, D. J., Davies, S. A., ... & Dow, J. A. (2018). Coordinated RNA-Seq and peptidomics identify neuropeptides and G-protein coupled receptors (GPCRs) in the large pine weevil Hylobius abietis, a major forestry pest. *Insect biochemistry and molecular biology*, *101*, 94-107.

Parker, B. L., Amir-Maafi, M., Skinner, M., Kim, J. S., & El Bouhssini, M. (2011). Distribution of sunn pest, *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae), in overwintering sites.

Journal of Asia-Pacific Entomology, *14*(1), 83-88.

Posnien, N., Hopfen, C., Hilbrant, M., Ramos-Womack, M., Murat, S., Schönauer, A., ... & McGregor, A. P. (2012). Evolution of eye morphology and rhodopsin expression in the Drosophila melanogaster species subgroup. *PloS one*, *7*(5), e37346.

Price, M. D., Merte, J., Nichols, R., Koladich, P. M., Tobe, S. S., & Bendena, W. G. (2002). Drosophila melanogaster flatline encodes a myotropin orthologue to *Manduca sexta* allatostatin. *Peptides*, *23*(4), 787-794.

Roller, L., Yamanaka, N., Watanabe, K., Daubnerová, I., Žitňan, D., Kataoka, H., & Tanaka, Y. (2008). The unique evolution of neuropeptide genes in the silkworm *Bombyx mori*. *Insect biochemistry and molecular biology*, *38*(12), 1147-1157.

Sano, H., Nakamura, A., Texada, M. J., Truman, J. W., Ishimoto, H., Kamikouchi, A., ... & Kojima, M. (2015). The nutrient-responsive hormone CCHamide-2 controls growth by regulating insulin-like peptides in the brain of Drosophila melanogaster. *PLoS genetics*, *11*(5), e1005209.

Scherkenbeck, J. and Zdobinsky, T., 2009. Insect neuropeptides: structures, chemical modifications and potential for insect control. *Bioorganic & medicinal chemistry*, *17*(12), pp.4071-4084.

Schoofs, L., De Loof, A., & Van Hiel, M. B. (2017). Neuropeptides as regulators of behavior in insects. *Annual review of entomology*, *62*, 35-52.

Toprak, U. (2020). The role of peptide hormones in insect lipid metabolism. *Frontiers in Physiology*, *11*, 434.

Veenstra, J. A. (2014). The contribution of the genomes of a termite and a locust to our understanding of insect neuropeptides and neurohormones. *Frontiers in Physiology*, *5*, 454.

Veenstra, J. A. (2019). Coleoptera genome and transcriptome sequences reveal numerous differences in neuropeptide signaling between species. *PeerJ*, *7*, e7144.

Wu, F., Deng, B., Xiao, N., Wang, T., Li, Y., Wang, R., ... & Zhou, C. (2020). A neuropeptide regulates fighting behavior in *Drosophila melanogaster*. *Elife*, *9*, e54229.

Wu, H. P., Wang, X. Y., Hu, J., Su, R. R., Lu, W., & Zheng, X. L. (2022). Identification of neuropeptides and neuropeptide receptor genes in *Phauda flammans* (Walker). *Scientific Reports*, *12*(1), 1-13.

Xu, G., Gu, G.X., Teng, Z.W., Wu, S.F., Huang, J., Song, Q.S., Ye, G.Y. and Fang, Q., 2016. Identification and expression profiles of neuropeptides and their G protein-coupled receptors in the rice stem borer Chilo suppressalis. *Scientific Reports*, *6*(1), pp.1-15.

Yamanaka, N., Hua, Y. J., Roller, L., Spalovská-Valachová, I., Mizoguchi, A., Kataoka, H., & Tanaka, Y. (2010). Bombyx prothoracicostatic peptides activate the sex peptide receptor to regulate ecdysteroid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(5), 2060-2065.

Yu, K., Xiong, S., Xu, G., Ye, X., Yao, H., Wang, F., ... & Ye, G. (2020). Identification of neuropeptides and their receptors in the ectoparasitoid, Habrobracon hebetor. *Frontiers in Physiology*, *11*, 575655.

Yu, K., Xiong, S., Xu, G., Ye, X., Yao, H., Wang, F., ... & Ye, G. (2020). Identification of neuropeptides and their receptors in the ectoparasitoid, Habrobracon hebetor. *Frontiers in Physiology*, *11*, 575655.

Zandawala, M., & Orchard, I. (2013). Post-feeding physiology in *Rhodnius prolixus*: The possible role of FGLamide-related allatostatins. *General and Comparative Endocrinology*, *194*, 311-317.

Zhang, Y. M., Ye, D. X., Liu, Y., Zhang, X. Y., Zhou, Y. L., Zhang, L., & Yang, X. L. (2023). Peptides, new tools for plant protection in eco-agriculture. *Advanced Agrochem*.