



李媛媛, 德力格尔, 张博, 林晨, 石凯. 伞裙追寄蝇滞育关联基因和滞育关联代谢物的联合分析 [J]. 环境昆虫学报, 2022, 44 (4): 956–967.

伞裙追寄蝇滞育关联基因和滞育关联代谢物的联合分析

李媛媛¹, 德力格尔¹, 张博², 林晨³, 石凯^{1*}

(1. 内蒙古民族大学农学院, 内蒙古通辽 028043; 2. 中国农业科学院草原研究所, 呼和浩特 010010;

3. 内蒙古师范大学生命科学与技术学院, 呼和浩特 010022)

摘要: 为探索伞裙追寄蝇滞育调控的分子机制, 本文对伞裙追寄蝇 *Exorista civilis* 滞育蛹和非滞育蛹进行转录组测序以及代谢组检测, 鉴定其关键的滞育关联基因 (diapause-associated genes, DEGs) 和滞育关联代谢物 (diapause-associated metabolites, DEMs)。本研究基于高通量测序以及液质联用技术, 通过筛选, 在转录组中获得了差异表达基因 7 513 个, 在代谢组中, 获得差异代谢物 501 个, 其中氨基酸占比最多。将所有差异表达基因与差异表达代谢物同时向 KEGG 映射, 获得两者共同的 pathway 信息, 明确差异表达基因与差异代谢物共同参与的主要生化途径和信号转导途径。本研究通过转录组和代谢组的联合分析, 在正、负离子模式下, 差异表达基因与差异代谢物共同富集到 70 条通路。在负离子模式下, 滞育关联因子主要参与氨基酸代谢和神经系统; 在正离子模式下, 滞育关联因子主要参与消化系统和信号转导途径。本研究重点分析了柠檬酸循环、cAMP 信号通路、氨酰-tRNA 的生物合成, 将为进一步深入研究伞裙追寄蝇滞育调控的分子机制奠定理论基础。

关键词: 伞裙追寄蝇; 滞育; 滞育关联基因; 滞育关联代谢物

中图分类号: Q963; S476

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2022) 04-0956-12

Combined analysis of diapause-associated genes and diapause-associated metabolites in *Exorista civilis*

LI Yuan-Yuan¹, Deligeer¹, ZHANG Bo², LIN Chen³, SHI Kai^{1*} (1. College of Agriculture, Inner Mongolia Minzu University, Tongliao 028043, Inner Mongolia, China; 2. Institute of Grassland Research, Chinese Academy of Agricultural Science, Hohhot 010010, China; 3. College of Life Science and Technology, Inner Mongolia Normal University, Hohhot 010022, China)

Abstract: To clarify the molecular mechanisms underlying the regulation of diapause regulation in the pupae of *Exorista civilis*, we performed transcriptome sequencing and metabolomic assays to identify key diapause-associated genes (DEGs) and diapause-associated metabolites (DEMs) in those diapause and non-diapause pupae. In this study, 7 513 differentially expressed genes in the transcriptome and 501 differential metabolites in the metabolome were obtained based on high-throughput sequencing and liquid chromatography mass spectrometry, with the largest proportion of amino acids. All the differentially expressed genes and differentially expressed metabolites were mapped to KEGG database simultaneously to obtain their common pathway information, in order to clarify the main biochemical pathways and signal

基金项目: 内蒙古自治区高等学校科学研究项目 (NJZY18163); 内蒙古自治区自然科学基金 (2018MS03038, 2022LHMS03016); 科技基础资源调查专项 (2019FY100404); 内蒙古自治区科技计划项目 (2022YFDZ0073); 内蒙古民族大学博士科研项目 (BS429)

作者简介: 李媛媛, 女, 1982 年生, 硕士, 副教授, 主要研究方向为草地昆虫与害虫防治, E-mail: liyuanyuan20131128@126.com

* 通讯作者 Author for correspondence: 石凯, 女, 博士, 教授, 主要研究方向为草地昆虫与害虫防治, E-mail: nmshikai@126.com

收稿日期 Received: 2021-04-06; 接受日期 Accepted: 2021-06-08

transduction pathways they were jointly involved. In this study, the differentially expressed genes were enriched to 70 pathways together with differential metabolites in positive and negative ion modes by combined transcriptome and metabolome analysis. In the negative ion mode, the diapause-associated factors were mainly engaged in amino acid metabolism and nervous system; in the positive ion mode, the diapause-associated factors were mainly involved in digestive system and signal transduction pathway. This study focused on the analysis of citric acid cycle, cAMP signaling pathway and aminoacyl-tRNA biosynthesis, which would provide the theoretical foundation for the further study of the molecular mechanism of diapausing regulation in *E. civilis*.

Key words: *Exorista civilis*; diapause; diapause-associated genes; diapause-associated metabolites

伞裙追寄蝇 *Exorista civilis* 隶属于双翅目寄蝇科,在我国北京、内蒙古、河北等地区都有分布(赵洪有等,1985),是一种牧草优势寄生性天敌,能寄生于多种鳞翅目害虫。但是该天敌产品的存放时间较短,并且运输也会对天敌产品造成一定的伤害。为了减少对天敌产品的损害,延长产品的货架期,人工诱导天敌滞育是解决以上问题的重要方式,能够帮助昆虫度过不利环境,维持个体生存,保证种群繁衍(徐卫华,2008)。滞育是一种应对不利环境出现之前的一种遗传性适应,滞育的发生受外界和内部环境因子的调控,固定在某一虫态发育停滞的现象,一旦昆虫进入滞育状态,即使给以适生条件亦不复苏(Denlinger and Armbruster,2014)。滞育为昆虫提供了巨大的适应性优势,允许昆虫在不适合的季节性环境中继续生存,使其生命周期与适合生长、发育和繁殖的周期同步,有助于发挥生物防治在害虫管控中的作用(Hand *et al.*,2016)。滞育过程包括诱导、准备、启动、维持、终止以及滞育后发育这6个阶段(Kostal,2006)。关于伞裙追寄蝇滞育调控,目前开展的研究主要集中于:滞育诱导的温光周期、低温贮藏条件、主要物质变化含量以及滞育关联蛋白等方面。韩海斌等对伞裙追寄蝇滞育诱导的温光周期、低温贮藏条件进行了相关研究,明确了伞裙追寄蝇的滞育虫态是蛹,温度 $11 \pm 1^\circ\text{C}$,光周期 L:D = 8:16(韩海斌等,2018)。孙程鹏等对伞裙追寄蝇滞育期间的主要物质变化做了研究,比较分析了滞育与非滞育虫态的糖原、海藻糖、蛋白质、甘油含量变化,认为糖原是滞育期间的主要抗寒物质(孙程鹏等,2017)。

转录组学是从 RNA 水平研究基因表达的情况,是研究细胞功能的重要手段(Griffiths and Wang,

2009); 代谢组学作为其延伸,是通过小分子代谢物的变化得出的规律来揭示其参与生命活动的机制。代谢组学为转录组学提供了更加表现显著的数据支持(Dunn *et al.*,2011)。对两者进行联合分析,是因为细胞内的生命活动由基因、蛋白质、以及小分子代谢产物来共同承担,大分子的功能性变化最终会体现于代谢层面,基因表达在功能水平上的微小变化会在代谢物上得到放大,从而使检测更容易(Teng *et al.*,2009)。除此之外,许多基因的非功能性变化不会在代谢物上反映出来,看不到上游信息向下游信息传递过程中的功能性变化。

目前对家蚕 *Bombyx mori*、七星瓢虫 *Coccinella septempunctata*、大豆食心虫 *Leguminivora glycinivorella*、白纹伊蚊 *Aedes albopictus*、葱蝇 *Delia antiqua* 等昆虫均开展了滞育相关的转录组学研究(Qi *et al.*,2015; 蒋涛,2017; 任爽,2018; 胡甜,2019; 李新畅,2020; 陈艳荣等,2021),而利用代谢组学开展的滞育研究相对较少,主要包括柑橘大实蝇 *Bactrocera minax*、丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis*(李玉艳,2015; 王攀,2020),但是尚缺乏结合多种组学对昆虫进行滞育的研究。本文通过转录组和代谢组对伞裙追寄蝇滞育蛹和非滞育蛹的差异表达基因和差异代谢物进行联合分析,为明确其滞育的分子机制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

伞裙追寄蝇是在中国农业科学院草原研究所沙尔沁基地采集获得的,以20%蜂蜜水喂养;寄主粘虫 *Mythimna separata* 为中国农业科学院草原所

实验室饲养,以人工饲料喂食,其幼虫主要在长为 20 cm,高为 10 cm 的塑料养虫盒中饲养,待粘虫长至 5 龄,转入长为 35 cm,宽为 30 cm,高为 10 cm 亚克力养虫盒饲养,同时放入交配好的寄蝇。每盒粘虫与交配后的寄蝇的释放比例为 50:1,在温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$,相对湿度 $70\% \pm 1\%$,光周期 16 L:8 D 的环境条件下进行饲养,在亚克力盒中放入适量人工饲料,在盒中悬挂 20% 蜂蜜水的棉球。待寄蝇成功寄生后,将获得寄生的末龄粘虫放入装有灭菌土的养虫圆盒中饲养,每日喷清水,保持灭菌土的水分。

1.2 样品收集

根据实验室前期的研究基础,获得了伞裙追寄蝇滞育诱导的温度 $11 \pm 1^\circ\text{C}$ 、光周期 8 L:16 D、滞育的敏感虫态为蛹。寄蝇成功寄生粘虫后,在温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$,光周期 16 L:8 D,相对湿度 $70\% \pm 10\%$ 环境条件下饲养,直至寄蝇 3 龄幼虫出现。将一定量的寄蝇 3 龄幼虫放入设置条件:温度 $11 \pm 1^\circ\text{C}$,光周期 8 L:16 D,相对湿度 $70\% \pm 10\%$ 、光照强度为 8 800 Lx 人工气候箱中持续诱导 40 d 获得滞育蛹,将滞育蛹经过液氮处理,放入 -80°C 冰箱保存;将另一部分寄蝇 3 龄幼虫放入:温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$,光周期 16 L:8 D,相对湿度 $70\% \pm 10\%$ 条件继续饲养,直至伞裙追寄蝇蛹出现,收集非滞育蛹作为对照组,将非滞育蛹经过液氮处理,放入 -80°C 冰箱保存。

1.3 转录组测序及差异表达基因的筛选

伞裙追寄蝇非滞育和滞育蛹的转录组测序工作由北京诺禾致源科技股份有限公司完成。采用 3 个生物学重复,每个生物学重复以 2 头蛹为样本。本研究为无参考基因组的转录组分析,测序完成后,过滤 raw reads,去掉低质量的 reads 后,将获得的 clean reads 采用 Trinity (Grabherr *et al.*, 2011) 拼接成转录本,利用 Corset 程序对转录本进行层次聚类,获得最长的 cluster 序列进行后续的分析 (Davidson and Oshlack, 2014)。

采用 DESeq2 对输入的 read count 数据进行分析,设置筛选域值为: (1) $\text{padj} < 0.05$; (2) $|\log_2 \text{FoldChange}| > 1$; 对大量的基因进行独立的统计假设检验,得到的 P value 进行校正, P -adjusted 为

校正后的 P value,最后获得转录组测序中的差异基因, P -adjusted 越小,表示基因表达差异越显著。

1.4 代谢组学检测及差异代谢物的筛选

伞裙追寄蝇非滞育和滞育蛹的代谢组测序采用 6 个生物学重复,每个生物学重复以 2 头蛹为样本。基于液质联用技术进行非靶向代谢组学研究,基于质谱检测得到的 Raw 文件,先将原始文件导入 CD 软件中,进行谱图处理并进行数据库搜索,然后对数据进行质控保证数据结果的准确性、可靠性,代谢物分子式预测使用 mzCloud 数据库进行比对。代谢物主要进行多元统计分析包括主成分分析 (Principal component analysis, PCA)、偏最小二乘法分析 (PLS-DA) 等揭示不同对比组别代谢物组成的差异。利用层次聚类和代谢物-代谢物相关性分析揭示了代谢物和样本之间的关系。最后,通过代谢通路等功能分析发现代谢物相关的生物学意义。

采用 PLS-DA 模型第一主成分的变量投影重要度 (Variable Importance in the Projection, VIP) 值,并结合 T-test 的 P 值来寻找差异性表达代谢物,设置阈值为 $\text{VIP} > 1.0$,差异倍数 $\text{FC} > 2.0$ 或 $\text{FC} < 0.5$ 且 P value < 0.05 。

1.5 转录组和代谢组联合分析

1.5.1 差异基因和差异代谢物的相关性分析

基于皮尔森相关系数对伞裙追寄蝇显著差异基因、差异代谢物进行相关性分析,以此来衡量差异基因与代谢物之间的关联程度。当相关系数 < 0 时,为负相关;当相关系数 > 0 时,为正相关。展示 Top 50 的差异代谢物 (按 P value 从小到大排序) 和 Top 100 的差异基因 (按 P value 从小到大排序);若差异代谢物数目 < 50 或差异基因数目 < 100 ,则展示所有的差异代谢物或所有的差异基因。

1.5.2 差异基因与差异代谢物的 KEGG 数据库映射

将所有差异表达基因与差异表达代谢物同时向 KEGG 映射,获得两者共同的 pathway 信息,明确差异表达基因与差异代谢物共同参与的主要生化途径和信号转导途径。

2 结果与分析

2.1 测序与组装

滞育组中的原始序列为 176 530 572, 非滞育

组中的原始序列为 169 609 048; 过滤后, 获得滞育组 171 785 530 clean reads, 获得非滞育组 165 045 546 clean reads。经过拼接, 共获得 137 725 转录本, 其平均长度为 1 367 bp, 然后转录本经过进一步组装, 共获得 58 050 unigenes (如图 1)。

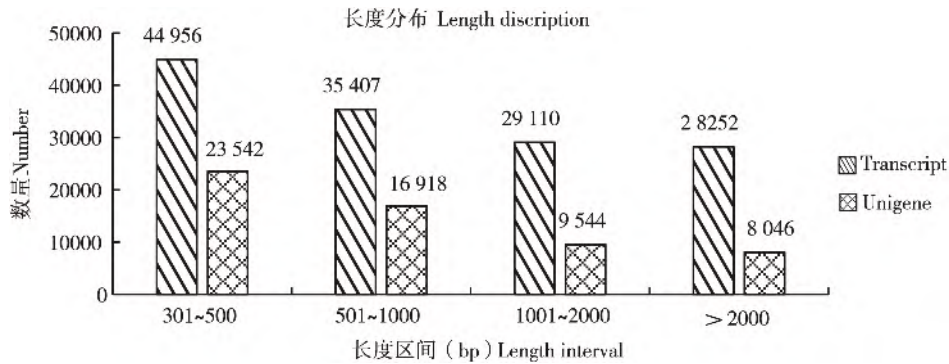


图 1 拼接转录本与基因序列长度分布图

Fig. 1 Transcripts with unigenes sequence length distribution

2.2 差异表达基因的筛选

通过筛选条件 $p_{adj} < 0.05$ 且 $|\log_2 \text{FoldChange}| > 1$, 确定了伞裙追寄蝇滞育蛹和非滞育蛹的差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 个数为 7 513 个, 其中 4 355 个上调表达, 3 158 个下调表达 (图 2)。而经过 KEGG 数据库注释成功的基因共有 2 642 个, 映射到 223 条通路中, 被分成代谢、遗传信息加工、环境信息处理、细胞过程和有机体系统这 5 个类别。

2.3 样品检测及差异代谢物筛选

经检测, 伞裙追寄蝇非滞育 (non-diapause, ND) 与滞育 (diapause, D) 蛹的总样品, 无论在正离子模式下还是在负离子模式下, 在 PCA 图上, 合格的质量控制 (quality control, QC) 样本, 用于测定进样前仪器状态及平衡色谱-质谱系统, 并用于评价整个实验过程中系统稳定性。差异较小, 呈现聚集分布, 说明对伞裙追寄蝇非滞育、滞育蛹样品的分析方法稳定性较好, 数据质量较高 (图 3-A, B)。

在两种模式下共检测获得差异代谢物 501 个, 在负离子模式下, 筛选出差异代谢物 169 个, 其中 99 个上调, 70 个下调。在正离子模式下, 筛选出 332 个差异代谢物, 其中 268 个上调, 64 个下调。

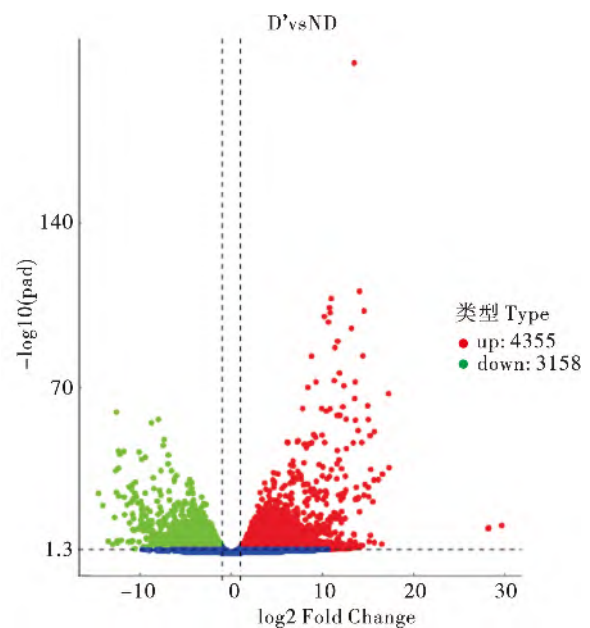


图 2 伞裙追寄蝇滞育和非滞育蛹的差异表达基因火山图

Fig. 2 Volcanoplot of differentially expressed gene between D and ND pupae of *Exorista civilis*

2.4 差异基因与差异代谢物表达相关性分析

图 4 中聚类枝越短表示差异表达基因或差异代谢物的相似性越高。蓝色表示负相关, 红色表示正相关。通过分析发现基因与代谢物是正相关的是: 在负离子模式下, 注释为肌动蛋白 $\beta/\gamma 1$, 肌球蛋白重链, 丙烯酸硫酸酶 B, 原肌球蛋白 1 等 80 个差异基因与注释为 L-组氨酸等 22 个差异代谢

物呈正相关, 注释为酪氨酸酶, 乙酰胆碱酯酶等 20 个差异基因和注释为 2-羟基戊二酸、6-羧基己酸、N-乙酰-DL-谷氨酸、高肌肽、肌肽等 28 个差异代谢物呈正相关。注释为肌动蛋白 $\beta/\gamma 1$, 肌球蛋白重链, 丙烯基硫酸酶 B, 原肌球蛋白 1 等 80 个差异基因和注释为 2-羟基戊二酸、6-羧基己酸、N-乙酰-DL-谷氨酸、高肌肽、肌肽等 28 个差异代谢物呈负相关, 注释为酪氨酸酶, 乙酰胆碱酯酶 20 个差异基因和注释为 2-羟基戊二酸、6-羧基己酸、N-乙酰-DL-谷氨酸、高肌肽、肌肽等 28 个差异代谢物呈负相关。

在正离子模式下, 肌球蛋白重链、丙烯基硫酸酶 B、肌动蛋白 $\beta/\gamma 1$, 钙调蛋白等 80 个差异基因和注释为 L-苯丙氨酸、5-甲基胞嘧啶、D-(+)-脯氨酸、1-甲基-L-组氨酸等 39 个差异代谢物呈正相关, 酪氨酸酶, 乙酰胆碱酯酶等 20 个差异基因和 DL-二棕榈酰磷脂酰胆碱等 11 个差异代谢物呈正相关, 酪氨酸酶, 乙酰胆碱酯酶等 20 个差异基因和 L-苯丙氨酸、5-甲基胞嘧啶、D-(+)-脯氨酸、1-甲基-L-组氨酸等 39 个差异代谢物呈负相关, 80 个差异基因和 DL-二棕榈酰磷脂酰胆碱等 11 个差异代谢物呈负相关。

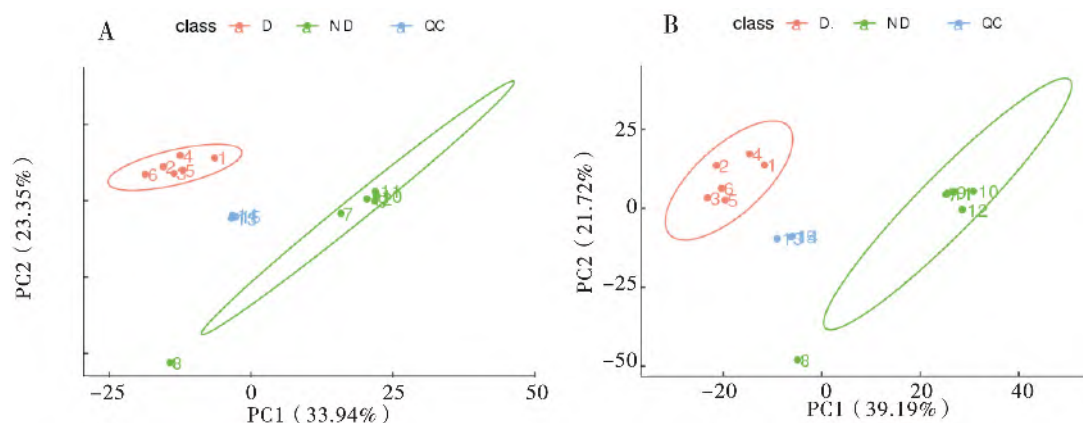


图 3 伞裙追寄蝇非滞育与滞育蛹总样品的主成分分析

Fig. 3 Principal component analysis of total samples of non-diapause and diapause pupae of *Exorista civilis*

注: A, 负离子模式; B, 正离子模式。图中横坐标 PC1 和纵坐标 PC2 分别表示排名第一和第二的主成分的得分, 散点颜色表示样本的实验分组, 置信椭圆为 95%。Note: A, Negative model; B, Positive model. In the figure, the abscissa PC1 and the ordinate PC2 represented the scores of the first and second principal components respectively, and the color of the scatter indicated the experimental groups of the samples, with a confidence ellipse of 95%.

2.5 差异基因与差异代谢物 pathway 分析

在负离子模式下, 差异表达基因与差异代谢物在氨基酸代谢、消化系统、免疫系统、神经系统方面关联性较高, 差异表达基因和差异表达代谢物共富集到 31 条通路, 其中差异基因和代谢物富集个数在 2 种以上的通路为 16 条, 富集的差异代谢物主要为: UDP-N-乙酰葡萄糖胺、D-葡萄糖胺-6-磷酸盐、肌肽、L-组氨酸、组胺、花生四烯酸、顺式乌头酸、柠檬酸、高肌肽、4-氧代脯氨酸、磷酸精氨酸、L-脯氨酸、L-苯丙氨酸、赤藓糖醇、UDP-N-乙酰葡萄糖胺、D-氨基葡萄糖 6-磷酸。其中, 柠檬酸循环中, 富集到 28 个差异表达基因, 2 种差异代谢物; 在氨基糖和核苷酸糖代谢 (Amino sugar and nucleotide sugar metabolism) 中, 富集到 17 个差异表达基因, 2 种差异代谢物; 在

精氨酸和脯氨酸代谢 (Arginine and proline metabolism) 中, 富集到 21 个差异表达基因, 5 种差异代谢物。

在正离子模式下, 差异表达基因与差异代谢物在消化系统、信号转导途径中关联性较高。DEGs 和 DEMs 共富集到 39 条通路, 其中差异基因和代谢物富集个数在 2 种以上的通路为 15 条。富集的差异代谢物主要为: L-苯丙氨酸、钙三醇、L-组氨酸、L-酪氨酸、乙酰胆碱、腺苷-5'-单磷酸盐、1-甲基组氨酸、苯甲酸。在两种离子模式下, 差异代谢物为氨基酸所占的比重最多。其中, 在叉头转录因子通路中, 富集了 11 个差异表达基因, 1 种差异代谢物; 在 cAMP 信号通路中, 富集到 31 个差异表达基因, 1 种差异代谢物 (如图 5)。

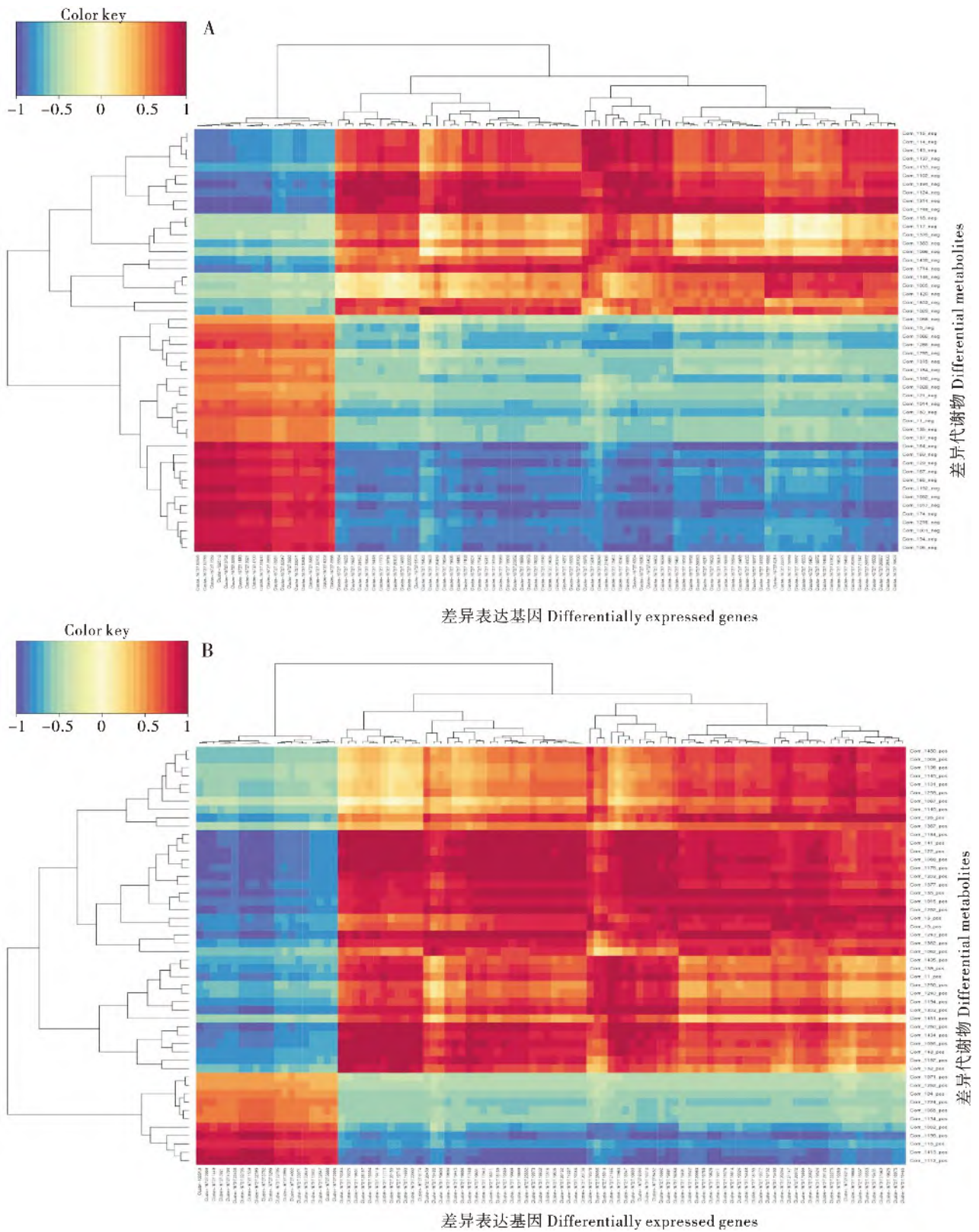


图4 伞裙追寄蝇滞育和非滞育蛹差异基因与差异代谢物表达相关性分析热图

Fig.4 Heat map of correlation analysis between DEMs and DEGs of *Exorista civilis*

注: A, 负离子模式; B, 正离子模式。纵向表示差异表达基因的聚类, 横向表示差异代谢物的聚类。Note: A, Negative ion mode; B, Positive ion mode. Vertical axis indicated clustering of differentially expressed genes and horizontal axis indicated clustering of differential metabolites.

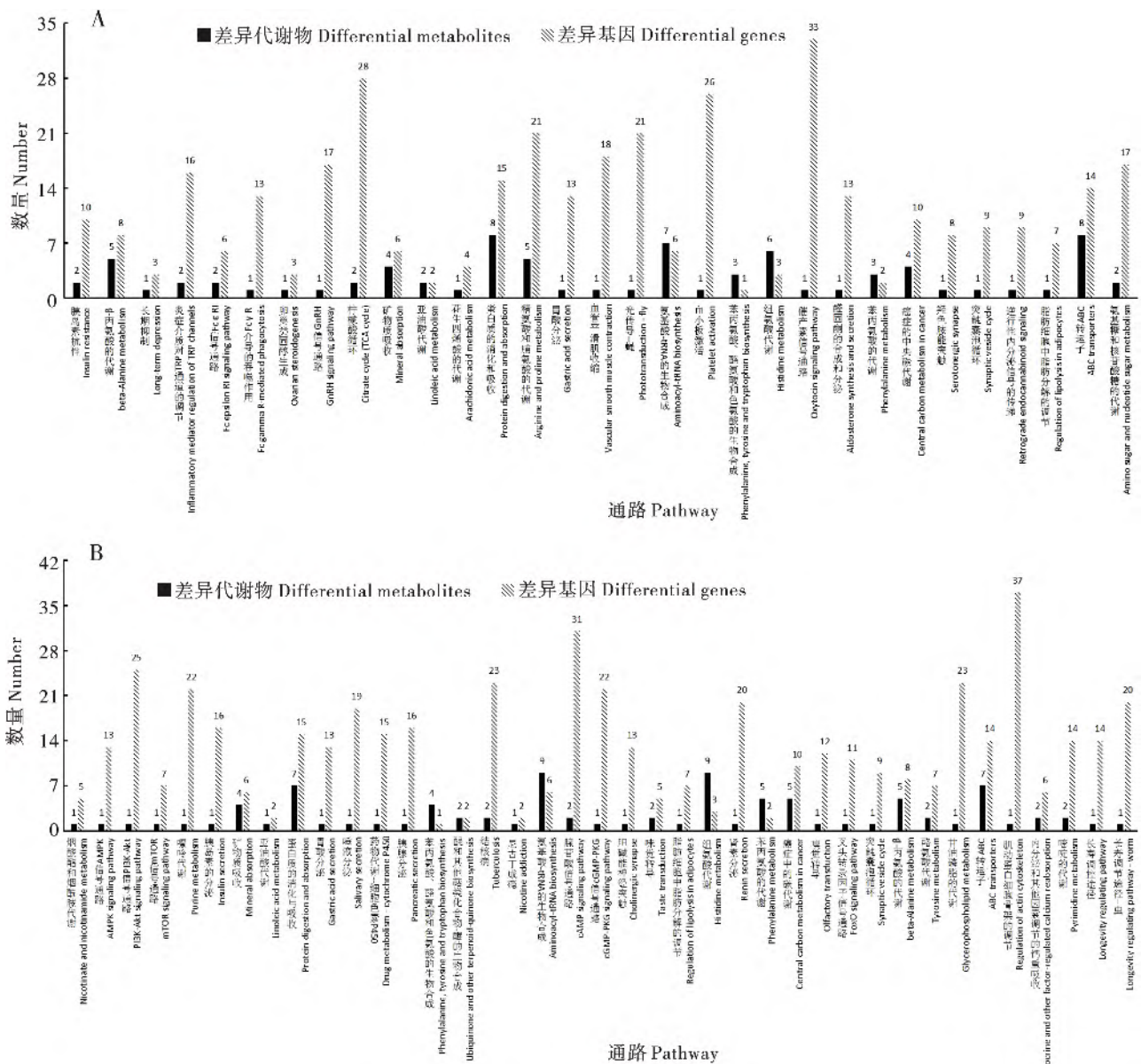


图 5 伞裙追寄蝇差异基因与差异代谢物 KEGG 通路关联分析

Fig. 5 Association analysis of differential genes and differential metabolite KEGG pathway in *Exorista civilis*

注: A, 负离子模式; B, 正离子模式。横坐标为该通路中富集到的差异代谢物或差异基因与该通路中注释到的代谢物或基因个数的比值 (Ratio), 纵坐标为代谢组-转录组共同富集到的 KEGG 通路。数量, 通路中富集的代谢物或基因的数量。Note: A, Negative ion mode; B, Positive ion mode. The horizontal coordinate was the ratio of differential metabolites or differential genes enriched in the pathway to the number of metabolites or genes annotated in the pathway, and the vertical coordinate was the metabolome-transcriptome co-enriched to the KEGG pathway. Count, the number of metabolites or genes enriched in the pathway.

通过对伞裙追寄蝇滞育关联基因和滞育关联代谢物的联合分析, 发现在正离子模式下, cAMP 通路包括的 31 个 DEGs, 其中 22 个 DEGs 上调表达, 主要有蛋白激酶 A、钙调蛋白; 9 个 DEGs 下调表达, 主要有 RAC1。DEMs 主要为腺苷-5'-单磷

酸, 乙酰胆碱。差异代谢物腺苷-5'-单磷酸 (Adenosine 5'-monophosphate, AMP) 还参与调控胰岛素信号途径、FOXO 信号通路、糖酵解, 进而影响到钙调蛋白、过氧化氢酶 (Catalase, CAT)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、磷

酸 烯 醇 式 丙 酮 酸 (phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK) 的表达 (如图 6)。在负离子模式下, 发现柠檬酸循环中, 获得 KEGG 成功注释的差异表达基因为 28 个, 上调的差异表达基因为 27 个, 下调表达的差异基因为 1 个, 即 PEPCK, 下调倍数为 9.43 倍, 在代谢组学中发现滞育关联代谢物为柠檬酸, 下调表达 2.97 倍。

在氨酰-tRNA 的生物合成中, 苯丙氨酸在正、负离子两种模式下均表达上调, 上调倍数最高约为 2.80 倍, 苯丙氨酰-tRNA 合成酶 α 链 (phenylalanyl-tRNA synthetase alpha chain, pheS) 表达上调, 上调倍数为 2.37 倍; 另外在正离子模式下, 酪氨酸表达上调, 上调倍数 2.44 倍。

但是在两种离子模式下, 未发现同时在转录组和代谢组中显著富集的通路, 在转录组和代谢组中任一存在显著性富集的通路见表 1。在负离子模式下, 显著性富集的通路主要有柠檬酸循环、矿物质吸收、癌症的中枢碳代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、蛋白质的消化和吸收、ABC 转运子、组氨酸代谢、精氨酸和脯氨酸代谢, 在正离子模式下, 主要有氨基乙酰-tRNA 的生物合成、组氨酸代谢、癌症的中枢碳代谢。

3 结论与讨论

在双翅目昆虫体内, 蜕皮激素的合成不以 cAMP 为第二信使, 而是依赖于钙离子, 钙离子和钙调蛋白结合, 在家蚕、烟草天蛾 *Manduca sexta* 的研究中发现, cAMP 是活化 PTH 的第二信使 (Hua and Koolman, 1995), 导致依赖于 cAMP 的蛋白激酶活化, 最终导致蜕皮激素的合成和分泌的增加 (王荫长等, 2004)。在正离子模式下, 在伞裙追寄蝇 cAMP 信号途径中, cAMP 转化为差异代谢物 AMP, AMP 上调表达, 其作为中间产物参与胰岛素信号途径、FoxO 信号通路、糖酵解途径的代谢过程。本研究中 AMP 通过调控 FoxO, FoxO 作为糖酵解的上游基因, 对 PEPCK 产生影响, PEPCK 活性主要反映在转录组水平上, 其表达水平直接对糖异生产生影响, 在调控机体代谢中发挥着重要的作用 (Hanson and Reshef, 1997)。研究表明胰岛素信号途径主要通过促进糖原或海藻糖的合成, 抑制糖异生的作用 (彭竹清和郝友进, 2019)。在伞裙追寄蝇的转录组测序中, 确实发现 PEPCK 表达下调, 作为糖异生重要限速酶, 抑制了糖异生的第一步, 说明糖异生途径受到抑制。但与之不同的是肉蝇 *Sarcophaga peregrina* 和果蝇 *Drosophila melanogaster* 在滞育期间, PEPCK 基因的表达显著增强; 滞育解除后, 其表达量明显下降 (Hahn and Denlinger, 2011)。在苹果实蝇 *Rhagoletis pomonella* 滞育后期, 代谢由抑制状态恢复的 24 h 内, PEPCK 表达量下降 (Ragland et al., 2011)。并且与白纹伊蚊、麻蝇 *Sarcophaga crassipalpis* 滞育期间的 PEPCK 表达趋势也不同, 其 PEPCK 在滞育期间表达量较为丰富 (Ragland et al., 2010; Poelchau et al., 2011)。然而伞裙追寄蝇 PEPCK 表达结果与丽蝇蛹集金小蜂在滞育期间的表达趋势相同 (高飞等, 2020)。胰岛素作为重要的内分泌激素, 其通路还能够参与果蝇等一些昆虫的滞育诱导调控。Tatar 等 (2001) 干扰果蝇胰岛素信号后, 发现果蝇繁殖停止、体内能量储备开始增加。在尖音库蚊 *Culex pipiens*、家蚕滞育的研究中发现, 胰岛素信号通路不独立对昆虫滞育调控产生作用, 而是作为中介接受上游通路信号, 或是将信号传递给下游内分泌通路 (梁瀚

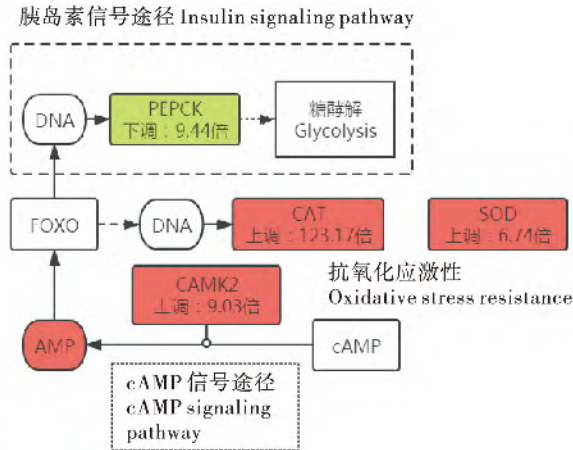


图 6 伞裙追寄蝇滞育关联基因和滞育关联代谢物富集通图

Fig. 6 Enrichment pathways for diapause-associated genes and diapause-associated metabolites of *Exorista civilis*

注: 红方框表示差异基因上调, 绿方框表示差异基因下调, 红色椭圆表示差异代谢物上调。Note: Red boxes indicated differential gene up-regulated, green boxes indicated differential gene down-regulated, and red ovals indicated differential metabolite up-regulated.

表 1 伞裙追寄蝇差异基因与差异代谢物 KEGG 通路关联分析
Table 1 Association analysis of differential genes and differential metabolite KEGG pathway in *Exorista civilis*

通路 Pathway	P 值 P value	差异表达基因 Differentially expressed genes	差异基因富集个数 Number of differentially expressed genes	差异代谢物 Differential metabolites	差异代谢物富集个数 Number of differential metabolites
负离子模式 Negative ion mode					
柠檬酸循环 Citrate cycle (TCA cycle)	转录组:0.002 代谢组:1	MDH2, SDHC, IDH3, MDH2, ACO, SDHB, PDHA, ACLY, OGDH, LSC1, CS, DLD, DLST, PDHB, DLST, PCK, ACO, SDHD, SDHA	28	顺式乌头酸 cis-Aconitic acid	2
矿物质吸收 Mineral absorption	转录组:0.320 代谢组:0.018	ATPIB, FTH1, ATOX1, CTRI, ATP1B, NHE3	6	苯丙氨酸 L-Phenylalanine	4
癌症的中枢碳代谢 Central carbon metabolism in cancer	转录组:0.651 代谢组:0.018	HK, SLC2A1, SIRT6, PDHB, PDHA, PGAM, PK, PIK3R1_2_3, PDHA	10	L-组氨酸 L-Histidine L-脯氨酸 L-Proline	4
精氨酸和脯氨酸代谢 Arginine and proline metabolism	转录组:0.020 代谢组:0.035	E2.7.3.3, ODC1, GOT1, ALDH, SMOX, OAT, LAP3, E1.2.1.88, PRODH, E1.2.1.88, P4HA, proC, ALDH18A1	21	高肌肽 Homocarnosine 4-羟脯氨酸 4-Oxoproline 磷酸精氨酸 Phosphoarginine L-脯氨酸 L-Proline	5
蛋白质的消化和吸收 Protein digestion and absorption	转录组:0.277 代谢组:0.025	PRCP, PRSS1_2_3, COL6A, SLC7A9, PEPT1, ATP1B, COL9A, COL2A, COL15A, COL6A, COL5AS, ATP1B, SLC9A3	15	L-组氨酸 L-Histidine L-苯丙氨酸 L-Phenylalanine 组胺 Histamine L-脯氨酸 L-Proline	8
ABC 转运子 ABC transporters	转录组:0.186 代谢组:0.034	ABCD2, ABCB1, ABCC4, ABCB1, ABCB1, ABCB8, ABCB10, ABCB7	14	L-苯丙氨酸 L-Phenylalanine L-组氨酸 L-Histidine 赤藓糖醇 Erythritol L-脯氨酸 L-Proline	8

续表 1 Continued table 1

通路 Pathway	P 值 P value	差异表达基因 Differentially expressed genes	差异基因富集个数 Number of differentially expressed genes	差异代谢物 Differential metabolites	差异代谢物富集个数 Number of differential metabolites
组氨酸代谢 Histidine metabolism	转录组:0.634 代谢组:0.035	HDC,ALDH	3	肌肽 carnosine 高肌肽 Homocarnosine L-组氨酸 L-Histidine 组胺 Histamine	6
精氨酸和脯氨酸代谢 Arginine and proline metabolism	转录组:0.035 代谢组:0.020	E2.7.3.3, ODC1, GOT1, ALDH, SMOX, OAT, LAP3, E1.2.1.88, PRODH, E1.2.1.88, P4HA, proC, ALDH18A1	21	羟脯氨酸 4-Oxoproline 磷酸精氨酸 Phosphoarginine L-脯氨酸 L-Proline	5
正离子模式 Positive ion mode					
氨基乙酰-tRNA 的生物合成 Aminoacyl-tRNA biosynthesis	转录组:0.955 代谢组:0.015	FARSA, LARS, RARS, MARS, MTFMT, WARS	6	L-组氨酸 L-Histidine L-苯丙氨酸 L-Phenylalanine L-酪氨酸 L-Tyrosine	9
组氨酸代谢 Histidine metabolism	转录组:0.633 代谢组:0.015	HDC,ALDH	3	L-组氨酸 L-Histidine 1-甲基组氨酸 1-Methylhistidine	9
癌症的中间碳代谢 Central carbon metabolism in cancer	转录组:0.650 代谢组:0.021	HK, SLC2A1, SIRT6, PDHB, PDHA, PGAM, PK, PIK3R1_2_3	10	L-组氨酸 L-Histidine	5

清等, 2014)。这些结果与本研究胰岛素信号通路参与的滞育调控方式具有一致性。

在负离子模式下, 柠檬酸循环中, 除了 PEPCK 表达下调外, 其他差异表达基因均表达上调, 在糖酵解中, 己糖激酶表达上调, 促进 6-磷酸葡萄糖进入糖酵解, 通过上调表达的丙酮酸脱氢酶促进丙酮酸转化为乙酰辅酶 A, 从而进入 TCA 循环。在该通路中, 差异代谢物顺式乌头酸、柠檬酸均为表达下调, 这个下调表达趋势与差异表达基因 PEPCK 一致, 虽然不能明确其下调原因, 但是可以推测 PEPCK 对糖异生起着抑制的作用, 而糖酵解途径是被激活的。

组成蛋白质分子的 20 种氨基酸在合成蛋白质之前, 均必须活化以获取能量。活化反应是在专门的氨酰-tRNA 合成酶催化下进行的。在氨酰-tRNA 的生物合成中, 苯丙氨酸表达上调, 在西藏飞蝗 *Locusta migratoria tibetensis* 抗寒物质的研究中发现, 低温驯化和短光照条件下, 其苯丙氨酸也出现累积的情况 (朱昱翰, 2014), 这与伞裙追寄蝇滞育期间苯丙氨酸的代谢组结果具有一致性。另外, 黑色素源于酪氨酸, 苯丙氨酸是合成酪氨酸的前体物质, 伞裙追寄蝇滞育期间酪氨酸表达上调, 表明伞裙追寄蝇滞育期间与苯丙氨酸相关的蛋白质合成在活化过程中是较为活跃的。在家蚕幼虫斑纹黑色素合成的主要来源是苯丙氨酸羟化酶催化苯丙氨酸生成的酪氨酸 (陈萍, 2011), 推测苯丙氨酸以及相关基因的上调表达, 可能对伞裙追寄蝇滞育期间蛹表皮黑色素沉积有着重要的影响。

然而目前对于伞裙追寄蝇滞育过程, 即诱导、准备、启动、维持、终止时期, 起到关键作用的特异性表达基因仍不清楚, 滞育中某一过程的滞育关联基因有待于进一步研究。

参考文献 (References)

- Chen P. Clone, Expression and Study on Function of Phenylalanine Hydroxylase (PAH) and Tryptophan Hydroxylase (TRH) in Silkworm, *Bombyx mori* [D]. Chongqing: Southwestern University Master Thesis, 2011. [陈萍. 家蚕苯丙氨酸羟化酶基因 (BmPAH) 和色氨酸羟化酶基因 (BmTRH) 克隆、表达及功能研究 [D]. 重庆: 西南大学硕士论文, 2011]
- Chen YR, Zhu J, Shen XJ. Progress of research on stunt-associated genes in the silkworm (Silkworm genus) [J]. *China Sericulture*, 2021, 42 (1): 36–45. [陈艳荣, 朱娟, 沈兴家. 家蚕滞育关联基因的研究进展 [J]. *中国蚕业*, 2021, 42 (1): 36–45]
- Davidson NM, Oshlack A. Corset: Enabling differential gene expression analysis for de novo assembled transcriptomes [J]. *Genome Biology*, 2014, 15 (7): 410–423.
- Denlinger DL, Armbruster PA. Mosquito diapause [J]. *Annual Review of Entomology*, 2014, 59 (1): 73–93.
- Dunn WB, Broadhurst D, Begley P, et al. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry [J]. *Nature Protocols*, 2011, 6 (7): 1060–1083.
- Gao F, Li YY, Wang MZ, et al. Research progress of biology and diapause regulation mechanism in the ectoparasitoid wasp *Nasonia vitripennis* [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2020, 42 (2): 355–363. [高飞, 李玉艳, 王曼姿, 等. 丽蝇蛹集金小蜂的生物学及其滞育调控机制研究进展 [J]. *环境昆虫学报*, 2020, 42 (2): 355–363]
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome [J]. *Nature Biotechnology*, 2011, 29 (7): 644–652.
- Griffiths WJ, Wang YQ. Mass spectrometry: From proteomics to metabolomics and lipidomics [J]. *Chemical Society Reviews*, 2009, 38 (7): 1882–1896.
- Hahn DA, Denlinger DL. Energetics of insect diapause [J]. *Annual Review of Entomology*, 2011, 56 (1): 103–121.
- Han HB, Jiang S, Wang JM, et al. Temperature-photoperiod conditions and low-temperature storage for diapause induction of *Exorista civilis* [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2018, 34 (3): 342–347. [韩海斌, 姜珊, 王建梅, 等. 伞裙追寄蝇滞育诱导的温光周期条件和低温贮藏 [J]. *中国生物防治学报*, 2018, 34 (3): 342–347]
- Hand SC, Denlinger DL, Podrabsky JE, et al. Mechanisms of animal diapause: Recent developments from nematodes, crustaceans, insects, and fish [J]. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2016, 310 (11): R1193–R1211.
- Hanson RW, Reshef L. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1997, 66 (1): 581–611.
- Hu T. RNA-seq Analyses of Photoperiodic Diapause in *Aedes albopictus* and Preliminary Identification of its Clock Gene Period [D]. Guangzhou: Southern Medical University Master Thesis, 2019. [胡甜. 白纹伊蚊光周期性滞育的 RNA-seq 分析及其生物钟基因 Period 的初步鉴定 [D]. 广州: 南方医科大学硕士论文, 2019]
- Hua YJ, Koolman J. An ecdysiotatin from flies [J]. *Regulatory Peptides*, 1995, 57 (3): 263–271.
- Jiang CY, Wu Q, Yang NW, et al. The molecular regulation of diapause induction in insects [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2021, 58 (1): 1–13. [姜春艳, 武强, 杨念婉, 等. 昆虫滞育诱导的分子调控机制 [J]. *应用昆虫学报*, 2021, 58 (1): 1–13]

- Jiang T. Analysis on Expression and Function of Several Diapause Related Genes in Pupal Stage of Silkworm (*Bombyx mori*) [D]. Zhenjiang: Jiangsu University of Science and Technology Master Thesis, 2017. [蒋涛. 家蚕若干滞育关联基因蛹期表达分析及功能研究 [D]. 镇江: 江苏科技大学硕士论文, 2017]
- Kostal V. Eco-physiological phases of insect diapause [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2006, 52 (2): 113-127.
- Li XC. Study on the Diapause Induction and Low Temperature Environment Adaptation Mechanism of *Leguminivora glycinivorella* (Mats) [D]. Jilin: Jilin Agricultural University Master Thesis, 2020. [李新畅. 大豆食心虫滞育诱导及其对低温环境适应机理研究 [D]. 吉林: 吉林农业大学硕士论文, 2020]
- Li YY. Effects of Diapause and Nutritional Transfer on Cold Tolerance of *Nasonia vitripennis* and its Molecular Mechanism [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences Doctor Thesis, 2015. [李玉艳. 滞育诱导和营养传递对丽蝇蛹集金小蜂耐寒性的影响及其分子机制 [D]. 北京: 中国农业科学院博士论文, 2015]
- Peng ZQ, Hao YJ. Progress in the regulation of insulin signaling in insect diapause [J]. *Journal of Shanghai Jiaotong University (Agricultural Science)*, 2019, 37 (6): 201-206. [彭竹清, 郝友进. 胰岛素信号调控昆虫滞育的研究进展 [J]. 上海交通大学学报 (农业科学版), 2019, 37 (6): 201-206]
- Poelchau MF, Reynolds JA, Denlinger DL, et al. A de novo transcriptome of the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*, to identify candidate transcripts for diapause preparation [J]. *BMC Genomics*, 2011, 12 (1): 619-637.
- Qi XY, Zhang LS, Han YH, et al. De novo transcriptome sequencing and analysis of *Coccinella septempunctata* L. in non-diapause, diapause and diapause-terminated states to identify diapause-associated genes [J]. *BMC Genomics*, 2015, 16 (1): 1086-1101.
- Ragland GJ, Denlinger DL, Hahn DA. Mechanisms of suspended animation are revealed by transcript profiling of diapause in the flesh fly [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107 (33): 14909-14914.
- Ragland GJ, Egan SP, Feder JL, et al. Developmental trajectories of gene expression reveal candidates for diapause termination: A key life-history transition in the apple maggot fly *Rhagoletis pomonella* [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2011, 214 (23): 3948-3960.
- Ren S. Study on the Induction Mechanism of Summer Diapause in the Onion Fly *Delia antiqua* (Diptera: Anthomyiidae) [D]. Chongqing: Chongqing University Doctor Thesis, 2018. [任爽. 葱蝇夏滞育诱导机理研究 [D]. 重庆: 重庆大学博士论文, 2018]
- Sun CP, Wang JM, Han HB, et al. Changes of essential substance contents in *Exorista civilis* Rondani during diapause stage [J]. *China Plant Protection*, 2017, 37 (4): 15-19. [孙程鹏, 王建华, 韩海斌, 等. 伞裙追寄蝇滞育期间主要物质含量变化研究 [J]. 中国植保导刊, 2017, 37 (4): 15-19]
- Tatar M, Kopelman A, Epstein D, et al. A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function [J]. *Science*, 2001, 292 (5514): 107-110.
- Teng Q, Huang WL, Collette TW, et al. A direct cell quenching method for cell-culture based metabolomics [J]. *Metabolomics*, 2009, 5 (2): 199-208.
- Wang P. Analysis of Expression Profiles and Metabolome Differences between Diapause Pupae and Non-diapause Pupae in *Bactrocera minax* [D]. Chongqing: Southwestern University Master Thesis, 2020. [王攀. 柑橘大实蝇滞育蛹与非滞育蛹蛹期表达谱与代谢组差异分析 [D]. 重庆: 西南大学硕士论文, 2020]
- Wang YZ. Insect Biochemistry [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2004: 309-311. [王荫长. 昆虫生物化学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 309-311]
- Xu WH. Advances in insect diapause research [J]. *Chinese Bulletin of Entomology*, 2008, 45 (4): 512-517. [徐卫华. 昆虫滞育研究进展 [J]. 昆虫知识, 2008, 45 (4): 512-517]
- Zhao HY, Pei DJ, Jin ZC, et al. Exploration of the biology of *Phryxe vulgaris* and its utilization pathway [J]. *Chinese Bulletin of Entomology*, 1985, 2: 81-84. [赵洪有, 裴德姬, 靳自成, 等. 普通怯寄蝇生物学特性及其利用途径的探讨 [J]. 昆虫知识, 1985, 2: 81-84]
- Zhu YH, Li Q, Yang G, et al. Influence of low temperature and photoperiod on the substances in *Locusta migratoria tibetensis* [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2016, 27 (2): 629-633. [朱昱翰, 李庆, 杨刚, 等. 低温和光周期对西藏飞蝗体内物质的影响 [J]. 应用生态学报, 2016, 27 (2): 629-633]