



刘敏, 刘爱萍, 韩海斌, 甘霖, 陈国泽, 黄海广. 茶足柄瘤蚜茧蜂碳水化合物代谢相关的滞育关联基因差异表达分析 [J]. 环境昆虫学报, 2021, 43 (1): 147–157.

茶足柄瘤蚜茧蜂碳水化合物代谢相关的滞育关联基因差异表达分析

刘 敏¹, 刘爱萍^{1*}, 韩海斌¹, 甘 霖², 陈国泽³, 黄海广⁴

(1. 中国农业科学院草原研究所, 呼和浩特 010010; 2. 阿拉善科技信息研究所, 内蒙古阿拉善左旗, 750399;

3. 阿拉善右旗曼德拉苏木农牧业综合站, 内蒙古阿拉善右旗, 750300; 4. 内蒙古自治区林业科学研究院, 呼和浩特 010010)

摘要: 为明确糖代谢相关途径在茶足柄瘤蚜茧蜂 *Lysiphlebus testaceipes* 蛹滞育过程中的作用, 揭示滞育调控的分子机制, 本试验利用转录组测序技术, 对滞育组与非滞育组的茶足柄瘤蚜茧蜂蛹进行转录组测序, 并结合生物信息学方法对糖代谢相关途径中的差异表达基因进行了筛选与分析。GO 注释到的与碳水化合物代谢条目相关的差异基因共 1 050 个, KEGG 注释到的与碳水化合物代谢相关的差异表达基因共 149 个, 糖酵解/糖异生、淀粉与蔗糖代谢及柠檬酸循环三条途径的差异表达基因分别为 18 个、10 个和 18 个。这些在滞育过程中与碳水化合物代谢相关的差异基因呈现不同程度的上调或下调表达, 发现 *PFK*, *PGK*, *ALDO*, *GAPDH*, *PGAM*, *PEPCK*, *GYS*, *TreS*, *TreH*, *MDH*, *IDH* 等基因与茶足柄瘤蚜茧蜂滞育密切相关, 共同影响茶足柄瘤蚜茧蜂的滞育。碳水化合物代谢相关途径可能对茶足柄瘤蚜茧蜂的滞育起着非常重要的作用, 糖类物质的合成与分解为昆虫在滞育过程中提供能量。

关键词: 茶足柄瘤蚜茧蜂; 滞育; 差异表达基因; 碳水化合物代谢

中图分类号: Q968.1; S433

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2021) 01-0147-11

Differential expression of genes associated with carbohydrate metabolism in diapausing *Lysiphlebus testaceipes* Cresson

LIU Min¹, LIU Ai-Ping^{1*}, HAN Hai-Bin¹, GAN Lin², CHEN Guo-Ze³, HUANG Hai-Guang⁴

(1. Institute of Grassland Research, Chinese Academy of Agricultural Science, Hohhot 010010, China;

2. Alxa Institute of Science and Technology Information, Alxa Left Banner 750399, Inner Mongolia, China;

3. Nelson Sumu Agriculture and Animal Husbandry Comprehensive Station, Alashan 750300, Inner Mongolia, China;

4. Inner Mongolia Autonomous Region Forestry Science Research Institute, Hohhot 010010, China)

Abstract: To clarify the role of carbohydrate metabolism in *Lysiphlebus testaceipes* Cresson can help us to reveal the molecular mechanism in diapause process, we took advantage of transcriptome sequencing technology to sequence the pupae of the diapause group and the non-diapause group, and combined with the Bioinformatics Method to screen and analyze the differentially expressed genes (DEGs) in carbohydrate metabolism. 1 050 DEGs related to carbohydrate metabolism items annotated in GO database. KEGG database annotated a total of 149 DEGs related to carbohydrate metabolism, focusing on glycolysis/

基金项目: 国家重点研发项目 (2017YFD02010000); 国家重点研发项目政府间国际科技创新合作重点专项 (2017YFE0104900)

作者简介: 刘敏, 女, 1994 年生, 硕士研究生, 研究方向为植物保护, E-mail: lm18883338543@163.com

* **通讯作者** Author for corresponding: 刘爱萍, 研究员, 研究方向为植物保护, E-mail: liuaiping806@sohu.com

收稿日期 Received: 2020-01-11; **接受日期** Accepted: 2020-11-02

gluconeogenesis, starch and sucrose metabolism, citric acid cycle. DEGs were 18, 10 and 18, respectively. These DEGs associated with carbohydrate metabolism during diapause exhibited different levels of up-regulation or down-regulation expression, and it was found that *PFK*, *PGK*, *ALDO*, *GAPDH*, *PGAM*, *PEPCK*, *GYS*, *TreS*, *TreH*, *MDH*, *IDH* genes were closely related to the diapause of *L. testaceipes*, which affected the diapause of the insect. Carbohydrate metabolism played an important role in the diapause of *L. testaceipes*, and the synthesis and decomposition of the carbohydrate substances provided energy for the insect in diapause process, and also took part in the aspects of antifreeze, protein protection, reducing osmotic pressure or supercooling point.

Key words: *Lysiphlebus testaceipes* Cresson; diapause; differentially expressed genes; carbohydrate metabolism

近几年内蒙古地区的田间调查发现,茶足柄瘤蚜茧蜂 *Lysiphlebus testaceipes* Cresson 是苜蓿蚜 *Aphis craccivora* Koch 的优势寄生性天敌,对控制苜蓿蚜有重要作用(郑永善和唐保善,1989;刘爱萍等,2012)。滞育并不是简单的发育停止,而是由环境与遗传因素决定的、程序化启动的极其缓慢的发育过程。昆虫在滞育期间,体内会发生一系列生理生化变化,如脂类、碳水化合物和氨基酸等内源营养物质特异性地积累或转化,以确保滞育个体在逆境中存活及滞育解除后发育的能量需求(任小云等,2016)。对茶足柄瘤蚜茧蜂等天敌昆虫来说,阐明滞育的分子调控机理,有可能通过遗传信息调控实现昆虫滞育的人工控制,从而延长天敌昆虫的寿命,保证天敌昆虫产品的货架期,最终发挥生物防治的最佳效果。

糖类作为昆虫生命活动过程的中间代谢产物和重要的能源物质,与昆虫滞育有密切的关系(刘流等,2010),葡萄糖是大部分生命体的主要供能分子,在新陈代谢中起着重要作用。当机体能量充足时,葡萄糖可以以淀粉或糖原等聚合物形式进行储备;对能量需求增加时,葡萄糖又可以迅速从细胞内贮存的聚合物中释放,通过有氧或者无氧呼吸提供能量。葡萄糖不仅是供能分子,同时也可以提供氨基酸、核苷酸、脂肪等生物合成反应的代谢中间物质。

昆虫滞育期间变化明显的糖类物质主要有糖原、海藻糖。在昆虫体内,海藻糖(trehalose)主要是由脂肪体合成并分泌到血淋巴,被其他的组织吸收后被利用(Bounias *et al.*, 1993),是昆虫血糖的主要组成,海藻糖的含量与海藻糖酶(trehalase, Treh)活力的变化影响着昆虫的滞育、滞育解除和发育(仵均祥等,2004)。糖原是昆虫滞育期间主要的能源物质,也是抗冻保护剂(糖、

醇类)的主要来源之一。已知滞育昆虫的糖原代谢分为糖—醇积累型和海藻糖积累型,两类物质都在滞育昆虫的抗冻、蛋白质保护、降低渗透压或过冷点等方面发挥着重要的作用。鞭角华扁叶蜂 *Chinolyda flagellicornis* 在滞育期间,血淋巴中的糖原逐渐减少,海藻糖含量逐渐增加,在滞育前期,海藻糖与糖原相互转化,同时发现滞育阶段及温度与这种转化关系有关(任小云等,2016)。斑蛾 *Zygaena trlfolii* 进入滞育后糖原是最重要的能源物质,在滞育个体中糖原含量是非滞育个体的2倍多(任小云等,2016)。有研究表明,糖原是棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 滞育蛹生命活动的主要能量来源,随着滞育强度的深入,糖原含量逐渐减少(李玉艳,2011)。

过去人们认为滞育是由滞育激素导致的,但越来越多的研究证明,海藻糖在两者之间发挥重要作用。在对家蚕 *Bombyx mori* 的研究中发现,进入滞育前,滞育激素通过调控海藻糖酶的活性,促使海藻糖被分解成葡萄糖进入卵细胞,葡萄糖再转化为糖原诱导卵滞育(Okitsugu, 1996)。海藻糖酶由海藻糖酶基因编码调控,干扰海藻糖酶基因会影响昆虫的生长发育,表明 Treh 在糖代谢通路中发挥重要作用,参与昆虫重要的生理过程(Chen *et al.*, 2010; 张倩等,2012; Zhao *et al.*, 2016)。

目前对于茶足柄瘤蚜茧蜂的滞育研究中,涉及分子机理的研究较少,究竟在茶足柄瘤蚜茧蜂蛹中,碳水化合物代谢与滞育过程有怎样的关系尚不清楚。本试验对茶足柄瘤蚜茧蜂滞育蛹与非滞育蛹进行了转录组测序,重点分析了与糖代谢相关的差异表达基因,结合糖酵解,淀粉与蔗糖代谢,柠檬酸循环及茶足柄瘤蚜茧蜂具体的生理学和环境调控在转录组水平的研究等,从整体上

和细节上为茶足柄瘤蚜茧蜂滞育相关的环境调控、物质能量的代谢机理提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试虫源、供试寄主植物与滞育诱导

茶足柄瘤蚜茧蜂、寄主蚜虫苜蓿蚜来自中国农业科学院草原研究所沙尔沁基地, 供试寄主植物为蚕豆 *Vicia faba*。

苜蓿蚜采自基地的羊柴 *Hedysarum mongolicum* 植株上, 并转接在室内的水培蚕豆苗上繁殖, 接虫后对蚕豆苗进行笼罩 (100 目防虫网笼, 55 cm × 55 cm × 55 cm), 确保苜蓿蚜未被天敌寄生, 试验用 2~3 龄的苜蓿蚜若蚜作为寄主, 在温室内饲养 5 代以上作为供试虫源。

从基地采集被寄生的苜蓿蚜僵蚜, 从中挑取未羽化破壳的僵蚜置于人工气候箱 (上海一恒公司 MGC-HP 系列) 温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 相对湿度 $70\% \pm 5\%$, 光周期 L:D = 14 h: 10 h 条件下培养, 待蜂羽化后, 挑选茶足柄瘤蚜茧蜂转移至试管 (10 cm × 3 cm) 内, 用 20% 蜂蜜水作为补充营养, 接入具有苜蓿蚜的蚕豆苗上, 建立茶足柄瘤蚜茧蜂种群作为供试虫源, 并在室温下用苜蓿蚜有效扩繁 10 代以上。

在室温下养虫笼中将刚羽化成蜂按 1:100 的蜂蚜比释放成对茶足柄瘤蚜茧蜂, 根据实验室前期研究基础可知, 苜蓿蚜若蚜被茶足柄瘤蚜茧蜂寄生后, 寄生蜂卵继续发育 120 h, 此时僵蚜体内寄生蜂处于高龄幼虫 (3~4 龄) 阶段, 高龄幼虫为茶足柄瘤蚜茧蜂感受滞育信号的敏感虫态, 将此时的僵蚜放入人工气候箱中进行滞育诱导。高龄幼虫处于滞育环境条件时, 并不会立刻停止发育, 而是继续发育一段时间, 经试验验证, 当发育至蛹时, 便不再继续发育 (孙程鹏, 2018)。本实验中, 诱导茶足柄瘤蚜茧蜂滞育的温光组合为, 温度 8°C 、光周期 L:D = 8 h: 16 h, 诱导时长为 30 d。选取经过 30 d 滞育诱导的僵蚜进行解剖, 选择虫态是蛹的茶足柄瘤蚜茧蜂进行收集, 以获得滞育组样品; 苜蓿蚜若蚜被茶足柄瘤蚜茧蜂寄生后, 放置在 $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、RH70% $\pm 5\%$ 、光周期 L:D = 14 h: 10 h、光照强度 8 800 Lx (人工气候箱, 上海一恒公司 MGC-HP 系列) 条件下, 寄生蜂卵继续发育 168 h (此时蚜茧蜂处于蛹态), 对僵蚜进行解剖, 挑选饱满, 有活力的蛹作为正常发育组样品。

1.2 测序和组装

茶足柄瘤蚜茧蜂正常发育组、滞育组转录组的测序工作由北京诺禾致源科技股份有限公司完成。测序进行 3 个生物学重复, 每个重复需 100 头, 共构建 6 个文库。测序完成后, 经数据预处理, 采用 Trinity (Grabherr, 2011) 对 clean reads 进行拼接。

1.3 序列筛选

1) 拼接得到的茶足柄瘤蚜茧蜂转录组测序结果与 Nr 数据库进行 Blastx 比对 (将核酸序列翻译为蛋白, 再进行比对), 筛选条件 E-value $< 1e-5$, 得到注释基因。

2) 应用每个样本的 RPKM (reads per kilo base of exon model per million mapped reads), 以每个样本的总表达量为内标进行 Fisher-test 差异检验, 将正常发育组和滞育组转录组结果进行比较, 采用 FDR 与表达差异倍数 Fold-Change 方法进行差异基因挑选, 筛选条件为: $FDR \leq 0.05$, $Fold\text{-}change \geq 2$ 。

3) 筛选的差异基因中, 与正常发育组和滞育组相比, 被注释成功的差异基因定义为滞育关联基因, 并提取序列。

2 结果与分析

2.1 测序及组装

正常发育蛹与滞育蛹经 Illumina HiSeq 平台测序, 将 Trinity 拼接得到的转录本序列, 作为后续分析的参考序列。以 Corset 层次聚类后得到最长 Cluster 序列进行后续的分析。对转录本及聚类序列长度分别进行统计, 结果见表 1 和图 1。

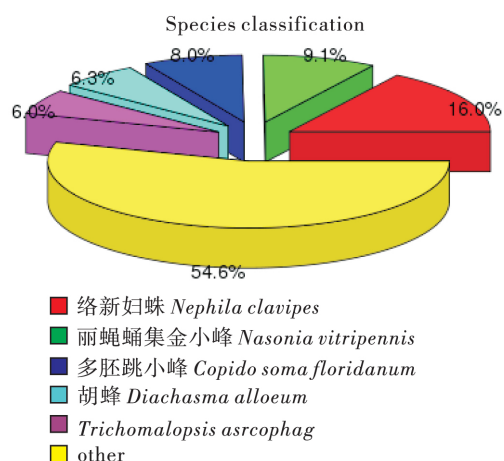


图1 Nr 比对上的物种分布图

Fig. 1 Homology search against Nr database for *Lysiphlebus testaceipes* transcriptome unigenes

表 1 拼接长度分布情况一览表
Table 1 List of splicing length distribution

	最小长度 Min length	平均长度 Mean length	中线长度 Median length	最大长度 Max length	N50	N90	总核苷酸 Total nucleotides
转录本 Transcripts	301	1377	683	97970	2555	495	417336822
基因 Genes	301	1107	572	97970	1898	429	196108682

注: N50/N90 的定义为, 将拼接转录本按照长度从长到短排序, 累加转录本的长度, 到不小于总长 50% / 90% 的拼接转录本的长度就是 N50/N90, 可用于评估拼接效果。Note: N50/ N90 was defined as N50/ N90, which could be used to evaluate the splicing effect by sorting the splicing transcripts from long to short, accumulating the length of transcripts to not less than 50% / 90% of the total length.

2.2 Unigenes 在其他物种中的分布情况

通过 Nr 库比对注释的结果, 可以统计并绘制比对上的物种分布图。因为目前还没有报道茶足柄瘤蚜茧蜂的基因组序列, 所以利用其他物种的已知基因组对实验中的 unigene 序列进行了比对。在种间分布上, 络新妇蛛 *Nephila clavipes* (16.0%)、丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis* (9.1%)、多胚跳小蜂 *Copidosoma floridanum* (8.0%)、胡蜂 *Diachasma alloeum* (6.3%)、*Trichomalopsis sarcophag* (6.0%) 和其他种 others (图 1)。

2.3 差异基因 GO 富集分析

在非滞育组与滞育组茶足柄瘤蚜茧蜂差异表达的基因中, GO 注释到 25 666 个差异基因 (图 3), 总共分为生物过程 (BP), 细胞成分

(CC), 分子功能 (MF) 三部分。差异基因的 GO 功能富集主要集中于代谢过程 (metabolic process), 包括脂代谢、氨基酸代谢、碳水化合物代谢等, 信号转导 (signal transduction), 结合 (binding) 功能、催化活性 (catalytic activity)。其中 GO 注释到碳水化合物代谢 (carbohydrate metabolic process) 条目的差异基因数为 1 050。

2.4 差异基因 KEGG 富集分析

将茶足柄瘤蚜茧蜂非滞育组与滞育组差异表达基因序列进行 KEGG 在线分析, 通过 KEGG pathway 数据库分析, 共分为新陈代谢、遗传信息加工、环境信息处理、细胞过程和有机体系统五大类。7 944 个差异表达基因共映射到 228 个通路, 分析发现这些基因主要集中在碳水化合物代谢、脂质代谢、信号转导等途径中。

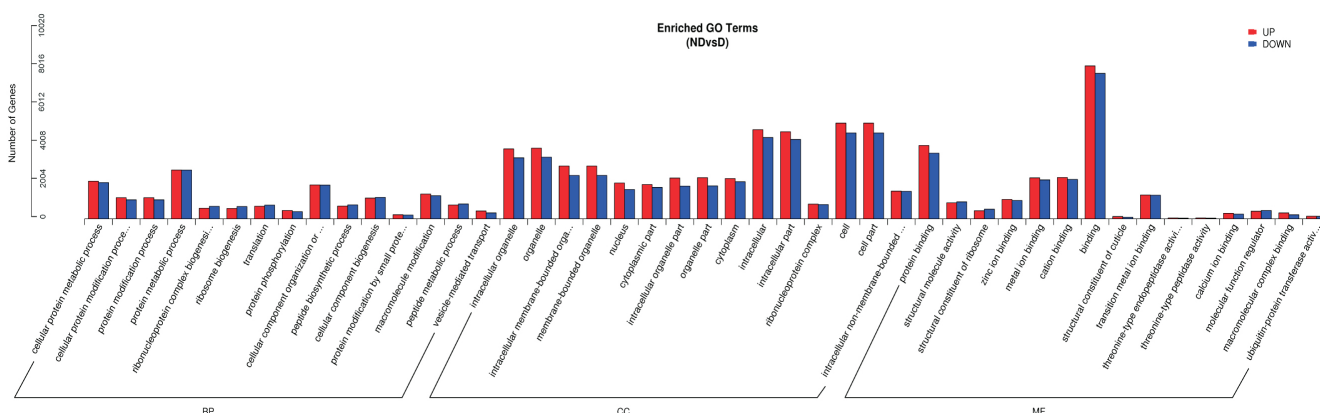


图 2 差异基因 GO 富集条目录

Fig. 2 GO enrichment map of differentially expressed genes for *Lysiphlebus testaceipes*

对茶足柄瘤蚜茧蜂滞育蛹与非滞育蛹进行转录组测序, KEGG 注释到的与糖代谢相关的差异表达基因共 149 个, 此次重点分析糖酵解/糖异生 (glycolysis/gluconeogenesis), 淀粉与蔗糖代谢

(starch and sucrose metabolism), 柠檬酸循环三条途径 (citrate cycle), 差异表达基因分别为 18, 10 和 18 个。图 3 – 图 5 展示了三条代谢途径的 KEGG 富集通路图, 明确代谢路径。在表 2 中, 糖酵解/

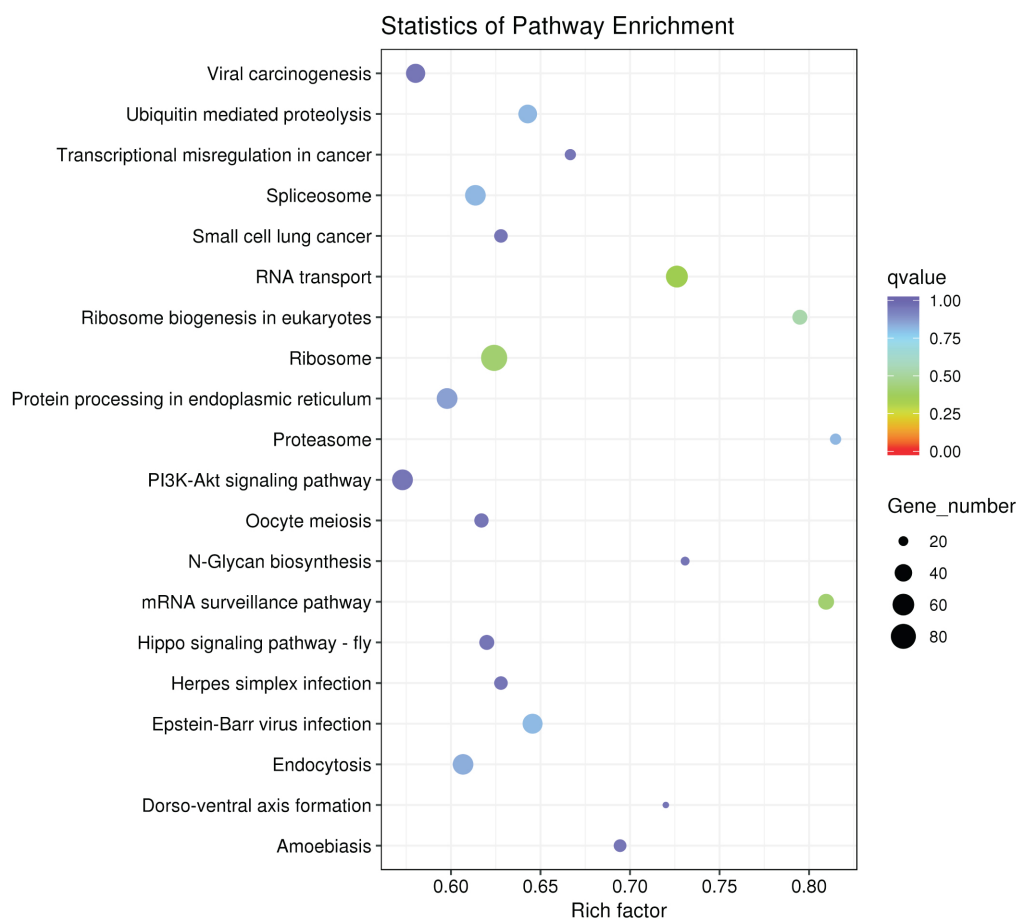


图3 茶足柄瘤蚜茧蜂滞育蛹与非滞育蛹差异表达基因 KEGG 富集气泡图

Fig.3 Scatter plot of KEGG enrichment of differentially expressed genes in diapause and non-diapause pupae of *Lysiphlebus testaceipes*

注: 图中横坐标轴为相应通路中差异基因的数目与鉴定出的总基因数目的比值, 值越大, 说明在该通路中差异基因富集程度越高。点的颜色代表超几何检验的 P 值, 值越小, 说明检验的可靠性越大、越具统计学意义。点的大小代表相应通路中差异基因的数目, 值越大, 该通路内差异基因越多。Note: The abscissa in the figure is the ratio of the number of differentially expressed genes in the corresponding pathway to the number of total proteins identified. The larger the value is, the higher the concentration of genes in this pathway is. The color of points represents the P -value of hypergeometric test. The smaller the value is, the more reliable and statistically significant the test is. The size of the dots represents the number of genes in the corresponding pathway. The larger the dot, the more genes in the pathway.

糖异生 (glycolysis/ Gluconeogenesis) 途径中, 磷酸果糖激酶 (phosphofructo kinase, PFK) 基因、磷酸甘油酸激酶 (phosphoglycerate kinase, PGK) 基因、醛缩酶 (aldolase, ALDO) 基因上调表达, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 基因、磷酸甘油酸变位酶 (phosphoglycerate mutase, PGAM) 基因、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (Phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK) 基因下调表达。PFK 和 PGK 是糖酵解途径中的关键酶, 基因上调表达, 两种酶含量增加, 导致的结果是糖酵解途径活跃表达。GAPDH 和 PGAM 是糖酵解和糖异生途径中共有的酶, 同时 PEPCK 是糖异生途径中的关键酶。

在茶足柄瘤蚜茧蜂淀粉和蔗糖代谢 (Starch and sucrose) 途径中, 与非滞育组相比, 滞育组糖原合酶 (glycogen synthase, GYS) 基因、海藻糖合酶 (Trehalose 6-phosphate synthase, TreS) 基因上调表达, 海藻糖酶 (trehalase, TreH) 基因下调表达。

在柠檬酸循环 (citric acid cycle) 途径中, 苹果酸脱氢酶 (malate dehydrogenase, MDH) 基因上调表达, 异柠檬酸脱氢酶 (isocitrate dehydrogenase, IDH) 基因下调表达。MDH 基因上调表达, MDH 增加, 推测其与滞育状态下的生理需求相关。IDH 是柠檬酸循环中重要的限速酶, IDH 基因下调表达, IDH 合成减少, 导致柠檬酸循环反应速率降低。

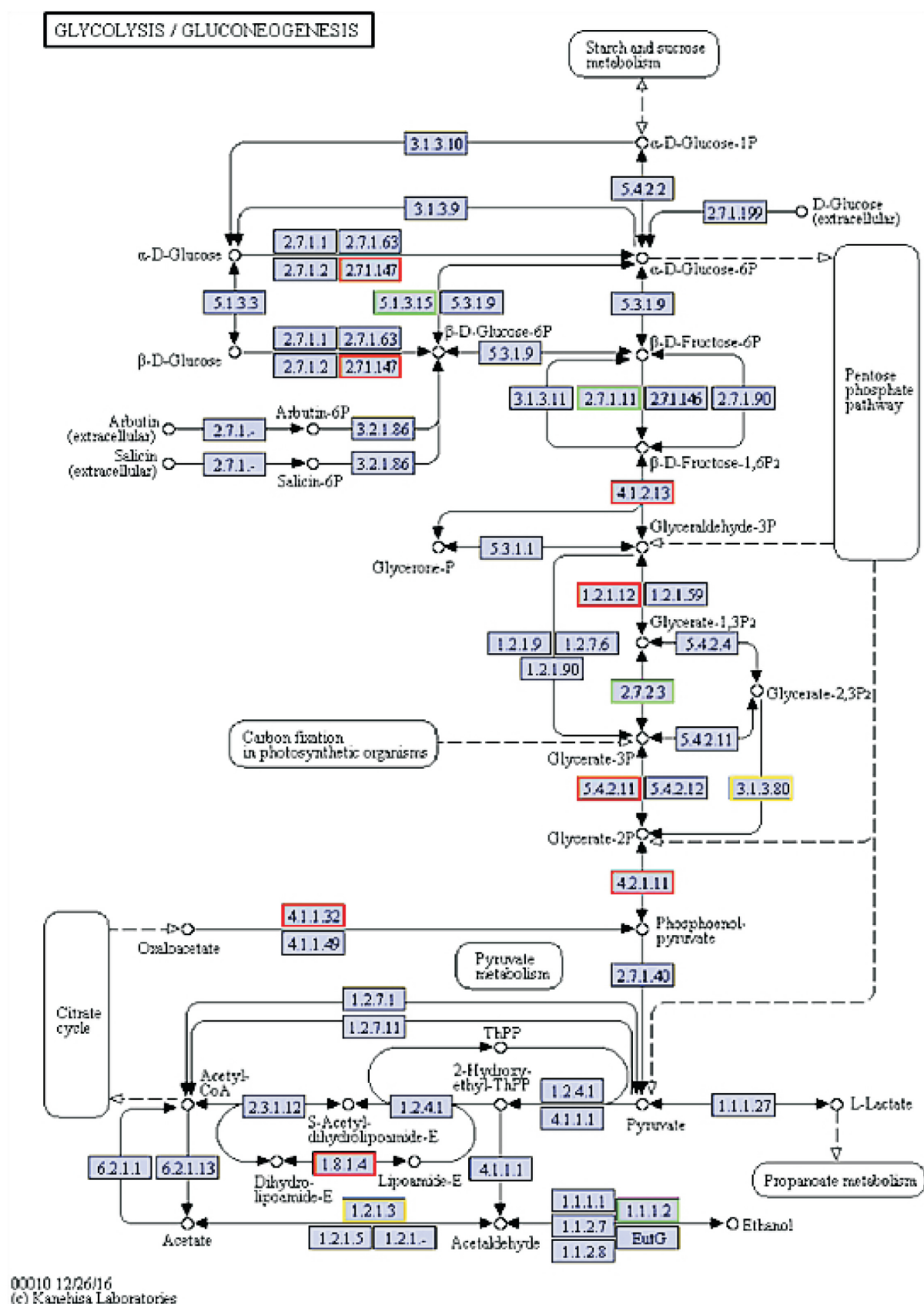


图4 差异基因在糖酵解/糖异生途径的富集通路图

Fig. 4 Pathway map of differentially expressed genes enrichment in glycolysis/ gluconeogenesis

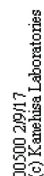


图 5 差异基因在淀粉和蔗糖代谢途径中的富集通路图

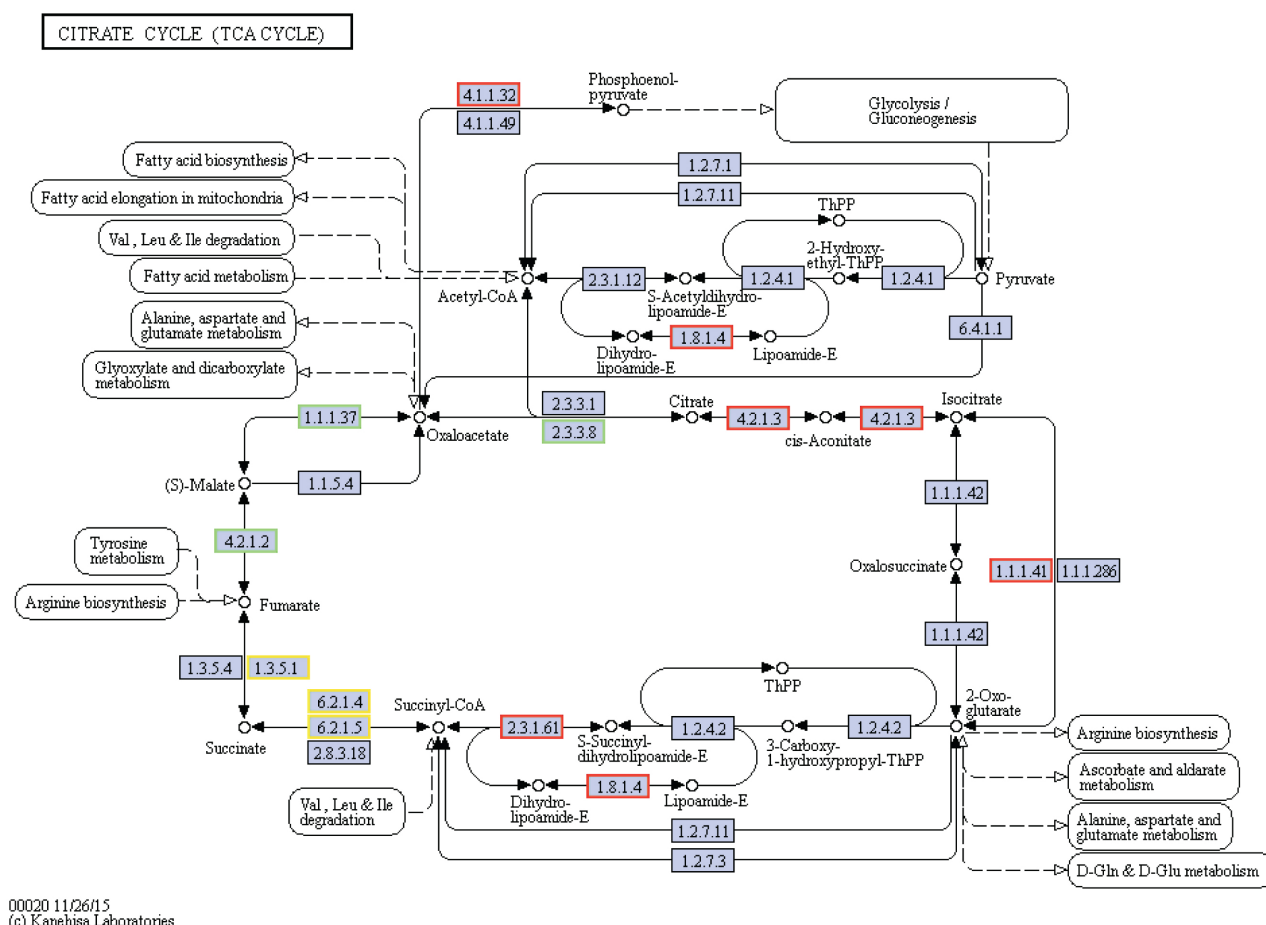


图6 差异基因在柠檬酸循环途径中的富集通路图

Fig. 6 Pathway map of differentially expressed genes enrichment in citrate cycle

注: 包含上调基因的 KO 节点边框标红色, 包含下调基因的 KO 节点边框标绿色, 包含上下调的边框标黄色。实心箭头代表分子间的相互作用或关系, 圆圈代表化学分子。方框 - 实心箭头 - 圆圈相连, 代表表达; 方框 - 实心箭头 - 竖线 - 圆圈相连, 代表抑制; 方框 - 虚线箭头 - 圆圈相连, 代表间接作用; 直线 - 方框 - 实心箭头 - 圆圈 - 直线 - 方框 - 实心箭头相连, 代表两个连续的反应步骤。带箭头的直线上标有 “+P” 代表磷酸化, 标有 “-P” 代表去磷酸化。

Note: The KO node border containing the up-regulated genes is red, containing the down-regulated genes is green, and the border containing up- and - down regulated genes is yellow. A solid arrow represents an interaction or relationship between molecules, and a circle represents a chemical molecule. Box - solid arrow - circle linked, representing expression; Box - solid arrow - vertical line - circle linked, representing inhibition; Box - dashed arrow - circle linked, representing indirect action; Straight - box - solid arrow - circle - straight line - box - solid arrow linked, representing two consecutive reaction steps; Lines with arrows are marked “p” for phosphorylation and “-p” for dephosphorylation.

3 结论与讨论

在本研究中, 重点分析了与茶足柄瘤蚜茧蜂滞育过程中糖代谢相关的三条途径, 分别是糖酵解/糖异生, 淀粉和蔗糖代谢和柠檬酸循环。涉及到的基因主要有 *PFK*, *PGK*, *ALDO*, *GAPDH*, *PGAM*, *PEPCK*, *GYS*, *TreS*, *TreH*, *MDH*, *IDH* 等。

糖酵解途径是葡萄糖的主要代谢途径, 为线

粒体 TCA 循环提供中间代谢产物, 从而为机体提供大部分生存所需的能量。PFK 和 PGK 这两种酶是糖酵解途径中的关键酶, 在滞育的茶足柄瘤蚜茧蜂蛹中, 磷酸果糖激酶基因和磷酸甘油酸激酶基因较非滞育蛹上调表达, 表明在茶足柄瘤蚜茧蜂滞育过程中糖酵解途径活跃进行, 因此推测茶足柄瘤蚜茧蜂在滞育过程中依赖糖酵解途径转换能量, 供生物体维持生命活动。

糖异生指的是以非糖物质作为前体合成葡萄糖的作用, *GAPDH*, *PGAM*, *ALDO* 为糖酵解与糖

表 2 糖代谢重要途径差异基因表达情况
Table 2 Differentially expressed genes in Carbohydrate metabolism

KEGG 通路 KEGG pathway	通路识别号 ID	上调表达 基因数量 Number of up regulated genes	上调表达基因名称 Name of up regulated genes	下调表达 基因数量 Number of down regulated genes	下调表达基因名称 Name of up regulated genes
糖酵解/糖异生 Glycolysis/ Gluconeogenesis	ko00010	10	<i>GAPDH</i> , <i>gapA</i> , <i>ALDO</i> , <i>E1. 2. 1. 3</i> <i>MINPP1</i> , <i>ADPGK</i> <i>E4. 1. 1. 32</i> , <i>PEPCK</i> <i>ENO</i> , <i>gpmA</i> , <i>lpd</i> , <i>pdhD</i> <i>PGAM</i> , <i>DLD</i>	8	<i>PGK</i> , <i>adh</i> <i>E5. 1. 3. 15</i> <i>AKR1A1</i> , <i>E1. 2. 1. 3</i> , <i>pgk</i> <i>pfkA</i> , <i>PFK</i> , <i>MINPP1</i>
淀粉和蔗糖代谢 Starch and sucrose metabolism	ko00500	5	<i>UXS1</i> , <i>uxs</i> , <i>E3. 2. 1. 28</i> , <i>treA</i> , <i>treF</i> , <i>E2. 4. 1. 1</i> , <i>PYG</i> , <i>glgP</i> , <i>AGL</i>	5	<i>AGL</i> , <i>E3. 2. 1. 1</i> , <i>amyA</i> , <i>malS</i> , <i>E2. 4. 1. 1</i> , <i>glgP</i> , <i>PYG</i> <i>GYS</i> , <i>UGT</i>
柠檬酸循环 Citrate cycle (TCA cycle)	ko00020	11	<i>SDHA</i> , <i>SDH1</i> , <i>IDH3</i> , <i>acnA</i> , <i>LSC2</i> <i>E4. 1. 1. 32</i> , <i>pckA</i> , <i>PEPCK</i> , <i>SDHB</i> , <i>SDH2</i> , <i>DLST</i> , <i>sucB</i> <i>DLD</i> , <i>lpd</i> , <i>ACO</i> , <i>pdhD</i>	7	<i>SDHA</i> , <i>SDH1</i> , <i>E4. 2. 1. 2B</i> , <i>fumC</i> , <i>ACLY</i> , <i>LSC2MDH2</i> , <i>MDH1</i>

异生途径共有的酶，磷酸甘油酸变位酶基因，甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因和醛缩酶基因下调表达，可以认为是糖异生途径表达受到抑制或糖酵解途径不能顺利进行下去。PEPCK 是糖异生途径中的关键酶，而磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶基因在滞育过程中下调表达，因此推测在茶足柄瘤蚜茧蜂蛹滞育过程中 *GAPDH* 基因、*PGAM* 基因、*PEPCK* 基因的下调表达共同抑制了糖异生途径的进行。

海藻糖是昆虫的血糖，是昆虫的能量来源，在海藻糖酶的作用下，分解成为两分子葡萄糖，再进一步通过糖酵解为昆虫提供能量 (Chen *et al.*, 2010; Shukla *et al.*, 2015; Xiong *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2017)。另一方面，海藻糖在应对逆境胁迫时可作为应激代谢反应的主要产物发挥作用 (Wharton, 2011; Shi *et al.*, 2016)，是昆虫重要的储能物质，也是应激代谢产物之一。海藻糖酶能够分解海藻糖，通过基因的表达，影响酶活性，进而对昆虫蜕皮、变态、发育及繁殖等生命过程造成影响 (唐斌等, 2012)，海藻糖酶是滞育激素调控代谢过程中的关键酶 (徐卫华, 1999)。在滞育的茶足柄瘤蚜茧蜂蛹中，海藻糖酶基因下调表达，海藻糖合酶基因上调表达，说明海藻糖分解少，合成多，导致海藻糖积累。糖原是主要的能量物质，其作用与脂肪类似 (丁惠梅等, 2011)。滞育的茶足柄瘤蚜茧蜂蛹中，糖原合酶基因上调表达，糖原积累，

糖原经水解转变为葡萄糖，进入糖酵解途径，糖酵解的产物经柠檬酸循环后释放出大量能量，供生物进行正常的生命活动，这说明糖原可能与脂肪一样作为储备能源物质，参与茶足柄瘤蚜茧蜂体内能量代谢。而海藻糖则可能作为保护剂与糖原相互转化，参与了茶足柄瘤蚜茧蜂的滞育调节。

在需氧生物中，柠檬酸循环是普遍存在的一种获取能量的代谢方式，是联系糖类、脂质、蛋白质三大主要营养物质的枢纽及最终代谢通路 (王荫长, 2001)。研究发现，滞育过程中昆虫代谢水平显著下调，有些甚至代谢抑制达到 90% (Ragland, 2009)。本试验结果显示，参与柠檬酸循环的异柠檬酸脱氢酶基因在滞育个体中下调表达，苹果酸脱氢酶基因上调表达。异柠檬酸脱氢酶作为催化异柠檬酸氧化形成 α -酮戊二酸反应中的限速酶，此反应不可逆，是柠檬酸循环中重要的限速步骤。已有研究表明，柠檬酸循环在昆虫滞育期间受到抑制 (Michaud and Denlinger, 2007; Xu *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2014)。在调节能量释放速率中起到关键作用，在茶足柄瘤蚜茧蜂滞育蛹中基因下调表达，也反应出能量供应的关键循环之一——柠檬酸循环整体反应速率的降低，表现在滞育茶足柄瘤蚜茧蜂体内维持了低能量代谢，与茶足柄瘤蚜茧蜂蛹在滞育条件下整体呈现的低水平代谢相符。

在研究中发现，甘油、山梨醇等醇类物质在

低温环境中对苹果酸活性保持具有重要作用,而在滞育个体中,已知甘油、山梨醇、甘露醇等多元醇是不断积累增加的,它们可以降低生物体的过冷却点,保护细胞膜免受结冰损伤 (Mansingh and Smallman, 1972; Zachariassen, 1985; Jaindl and Popp, 2006)。苹果酸脱氢酶为 NAD-依赖型,定位于线粒体基质中,催化柠檬酸循环中 L-苹果酸羟基氧化形成羰基,生成 NADH 并与草酰乙酸相互转化,以此调节生物体内的物质能量代谢 (Goward and Nicholls, 1994)。在茶足柄瘤蚜茧蜂滞育蛹中,苹果酸脱氢酶基因上调表达,苹果酸脱氢酶增加,在滞育过程中苹果酸脱氢酶的主要作用是参与 NAD (烟酰胺腺嘌呤二核苷酸, nicotinamide adenine dinucleotide) 的循环利用及物质循环 (王启龙等, 2012), 推测其与滞育状态下的生理需求相关,一方面与茶足柄瘤蚜茧蜂对 NAD 的合成和利用有关,另一方面或许是应对滞育环境条件的一种应激方式,与正常个体的代谢通路相比,滞育个体开启了另外的代谢通路以适应环境条件的改变。苹果酸脱氢酶和异柠檬酸脱氢酶作为糖代谢中重要的酶类,它们的含量变化与滞育期间昆虫的能量调节及代谢密切相关 (Hayakawa and Chino, 1981, 1982; Hahn and Denlinger, 2011)。

本实验重点研究糖代谢在茶足柄瘤蚜茧蜂滞育中的作用,糖类物质在滞育过程中的变化对昆虫有着怎样的影响。从整体上和细节上为茶足柄瘤蚜茧蜂滞育相关的环境调控、物质能量的代谢机理提供参考。研究糖代谢对揭示滞育过程的分子机制至关重要,阐明分子机理有可能通过遗传信息调控实现人工控制昆虫滞育,丰富常规的温光互作滞育诱导技术,从而延长天敌昆虫的寿命,保证天敌昆虫产品的货架期,最终发挥生物防治的最佳效果。

参考文献 (References)

- Boumias M, Bahjou A, Gourdeaux L, *et al.* Molecular activation of a trehalase purified from the fat body of a coleopteran insect (*Tenebrio molitor*), by an endogenous insulin-like peptide [J]. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 1993, 31 (2).
- Chen J, Tang B, Chen H, *et al.* Different functions of the insect soluble and membrane-bound trehalase genes in chitin biosynthesis revealed by RNA interference [J]. *PLoS ONE*, 2010, 5 (4): E10133.
- Ding HM, Ma G, Wu SA, *et al.* A literature review on changes of small molecules of diapause insects during overwintering period [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2011, 48 (4): 1060 - 1070.
- 丁惠梅, 马罡, 武三安, 等. 滞育昆虫小分子含量变化研究进展 [J]. *应用昆虫学报*, 2011, 48 (4): 1060 - 1070.
- 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): 130 - 144.
- Goward CR, Nicholls DJ. Malate dehydrogenase: A model for structure, evolution, and catalysis [J]. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 1994, 3 (10).
- Hahn DA, Denlinger DL. Energetics of insect diapause [J]. *Annual Review of Entomology*, 2011, 56: 103 - 121.
- Hayakawa Y, Chino H. Phosphofructokinase as a possible key enzyme regulating glycerol or trehalose accumulation in diapausing insects [J]. *Insect Biochemistry*, 1982, 12 (6): 639 - 642.
- Hayakawa Y, Chino H. Temperature-dependent interconversion between glycogen and trehalose in diapausing pupae of *Philosamia cynthia ricina* and *pryeri* [J]. *Insect Biochemistry*, 1981, 11 (1): 43 - 47.
- Jaindl M, Popp M. Cyclitols protect glutamine synthetase and malate dehydrogenase against heat induced deactivation and thermal denaturation [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 345 (2): 761 - 765.
- Li YY. Temperature and Photoperiodic Response of Diapause Induction and Diapause Physiology in *Aphis gifuensis* Ashmead [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences Master Thesis, 2011.
- 李玉艳. 烟蚜茧蜂滞育诱导的温光周期反应及滞育生理研究 [D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2011.
- Liu AP, Huang HG, Xu LB, *et al.* Parasitic functional response of *Lysiphlebus testaceipes* (Cresson) to *Aphis craccivora* (Koch) [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2012, 41 (1): 69 - 74.
- 刘爱萍, 黄海广, 徐林波, 等. 茶足柄瘤蚜茧蜂对苜蓿蚜的寄生功能反应 [J]. *环境昆虫学报*, 2012, 34 (1): 69 - 74.
- Liu L, He LF, Liu H, *et al.* Research progress of insects diapause [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2010, 38 (14): 7409 - 7411.
- 刘流, 贺莉芳, 刘晖等. 昆虫滞育的研究进展 [J]. *安徽农业科学*, 2010, 38 (14): 7409 - 7411.
- Lu YX, Zhang Q, Xu WH. Global metabolomic analyses of the hemolymph and brain during the initiation, maintenance, and termination of pupal diapause in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9 (6): E99948.
- Mansingh A, Smallman BN. Variation in polyhydric alcohol in relation to diapause and cold-hardiness in the larvae of *Isia isabella* [J]. *Journal of Insect Physiology*, 1972, 18 (8).
- Michaud MR, Denlinger DL. Shifts in the carbohydrate, polyol, and amino acid pools during rapid cold-hardening and diapause-associated cold-hardening in flesh flies (*Sarcophaga crassipalpis*): A metabolomic comparison [J]. *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology*, 2007, 177 (7): 753 - 763.
- Ragland GJ, Fuller J, Feder JL, *et al.* Biphasic metabolic rate trajectory of pupal diapause termination and post-diapause development in a tephritid fly [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2009, 55 (4): 1060 - 1070.

- 344–350.
- Ren XY, Qi XY, An T, *et al.* Research on the accumulation, transformation and regulation of nutrients in diapause insects [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2016, 53 (4): 685–695.
- 任小云, 齐晓阳, 安涛, 等. 滞育昆虫营养物质的积累、转化与调控 [J]. *应用昆虫学报*, 2016, 53 (4): 685–695]
- Shi Z, Liu X, Xu Q, *et al.* Two novels soluble trehalase genes cloned from *Harmonia axyridis* and regulation of the enzyme in a rapid changing temperature [J]. *Biochemistry and Molecular Biology*, 2016, 198: 10–18.
- Shukla E, Thorat LJ, Nath BB, *et al.* Insect trehalase: Physiological significance and potential applications [J]. *Glycobiology*, 2015, 25 (4): 357–367.
- Sun CP. Studies on Artificial Rearing and Characteristics of Diapause of *Lysiphlebus testaceipes* Cresson [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University Master Thesis, 2018. [孙程鹏. 茶足柄瘤蚜茧蜂的人工繁育及滞育特性研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018]
- Tang B, Wei P, Chen J, *et al.* Progress in gene features and functions of insect trehalases [J]. *Acta Entomol. Sin.*, 2012, 55 (11): 1315–1321. [唐斌, 魏苹, 陈洁, 等. 昆虫海藻糖酶的基因特性及功能研究进展 [J]. *昆虫学报*, 2012, 55 (11): 1315–1321]
- Thompson SN. Trehalose – The insect ‘blood’ sugar. *Advances in Insect Physiology* [J]. Simpson SJ. 2003, 31205–285.
- Wang QL, Wan HX, Yao JM, *et al.* Chilling enhances the NAD levels and cytosolic malate dehydrogenase activity in diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2012, 55 (9): 1031–1036. [王启龙, 万华星, 姚金美, 等. 低温冷藏提高家蚕滞育卵 NAD 含量和胞质苹果酸脱氢酶活性 [J]. *昆虫学报*, 2012, 55 (9): 1031–1036]
- Wang YC. *Insect Biochemistry* [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2001, 2. [王荫长. *昆虫生物化学* [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001, 2]
- Wharton DA. Cold tolerance of New Zealand alpine insects [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2011, 57 (8): 1090–1095.
- Wu JX, Yuan F, Su L. Change of carbohydrate contents in larvae of the wheat midge, *Sitodiplosis mosellana* (Gehin) during mature and diapause stage [J]. *Acta Entomol. Sin.*, 2004, 47 (2): 178–183. [许均祥, 袁锋, 苏丽. 麦红吸浆虫幼虫滞育期间糖类物质变化 [J]. *昆虫学报*, 2004, 47 (2): 178–183]
- Xiong KC, Wang J, Li JH, *et al.* RNA interference of a trehalose – 6 – phosphate synthase gene reveals its roles during larval – pupal metamorphosis in *Bactrocera minax* (Diptera: Tephritidae) [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2016, 91–92: 84–92.
- Xu WH, Lu YX, Denlinger DL. Cross – talk between the fat body and brain regulates insect developmental arrest [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109 (36): 14687–14692.
- Xu WH. Progress in insect diapause research [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 1999 (1): 102–109. [徐卫华. 昆虫滞育的研究进展 [J]. *昆虫学报*, 1999 (1): 102–109]
- Yang M, Zhao L, Shen Q, *et al.* Knockdown of two trehalose – 6 – phosphate synthases severely affects chitin metabolism gene expression in the brown planthopper *Nilaparvata lugens* [J]. *Pest Management Science*, 2017, 73 (1): 206–216.
- Yamashita O. Diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*: Structure, gene expression and function [J]. *Journal of Insect Physiology*, 1996, 42 (7).
- Zachariassen K E. Physiology of cold tolerance in insects [J]. *Physiological Reviews*, 1985, 65 (4).
- Zhang Q, Lu DH, Pu J, *et al.* Cloning and RNA interference effects of trehalase genes in *Laodelphax striatellus* (Homoptera: Delphacidae) [J]. *Acta Entomol. Sin.*, 2012, 55 (8): 911–920. [张倩, 鲁鼎浩, 蒲建, 等. 灰飞虱海藻糖酶基因的克隆及 RNA 干扰效应 [J]. *昆虫学报*, 2012, 55 (8): 911–920]
- Zhao LN, Yang MM, Shen QD, *et al.* Functional characterization of three trehalase genes regulating the chitin metabolism pathway in rice brown planthopper using RNA interference [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 27841.
- Zheng YS, Tang BS. Field release and recovery of an introduced aphid parasitoid, *Lysiphlebus testaceipes* [Hym.: Braconidae] in Shaanxi [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 1989, 2: 68–70. [郑永善, 唐保善. 茶足柄瘤蚜茧蜂引种研究 [J]. *生物防治通报*, 1989, 2: 68–70]