

doi:10.11733/j.issn.1007-0435.2026.05.004

引用格式:刘利,高丽,琪勒莫格,等.沙葱萤叶甲幼虫对蜕皮激素响应的转录组学分析[J].草地学报,2026,34(5):1597—1609

LIU Li, GAO Li, QILEMOGE, et al. Transcriptome Analysis of *Galeruca daurica* Larval Response to 20-Hydroxyecdysone[J]. Acta Agrestia Sinica, 2026, 34(5):1597—1609

沙葱萤叶甲幼虫对蜕皮激素响应的转录组学分析

刘利¹, 高丽¹, 琪勒莫格¹, 郭宁¹, 邢颖¹, 李晓海², 段天凤^{1*}

(1. 包头师范学院生态环境学院, 内蒙古包头 010030; 2. 内蒙古自治区民航机场集团有限责任公司
包头分公司, 内蒙古包头 010040)

摘要:沙葱萤叶甲(*Galeruca daurica*)幼虫是严重危害内蒙古草原的主要害虫。为探究蜕皮激素(20-hydroxyecdysone, 20E)调控其幼虫发育的分子机制,本研究采用 Illumina HiSeqTM 4000 平台对 20E 处理 48 小时的 3 龄幼虫进行转录组测序。共获得 75 536 条 Unigene, 其中 40 161 条获得功能注释。与对照组相比,共获得 500 个差异表达基因(Differentially expressed genes, DEGs), 其中 258 个上调, 242 个下调。GO 与 KEGG 分析显示, 差异基因显著富集于离子转运(Ion transport)、催化活性(Catalytic activity)、多物种长寿调控通路(Longevity regulating pathway-multiple species)及 FOXO 信号通路(FOXO signaling pathway)等。进一步筛选出 11 个蜕皮激素相关基因。qRT-PCR 验证结果证实测序数据可靠。结果表明, 20E 可能通过影响多种代谢通路调控沙葱萤叶甲幼虫的生长发育。本研究首次系统解析了 20E 调控沙葱萤叶甲幼虫的转录组特征, 为阐明其发育机制及绿色防控靶点筛选提供了理论依据。

关键词:沙葱萤叶甲; 幼虫; 蜕皮激素; 转录组分析; 蜕皮相关基因; FOXO 信号通路

中图分类号:S812.6

文献标识码:A

文章编号:1007-0435(2026)05-1597-13

Transcriptome Analysis of *Galeruca daurica* Larval Response to 20-Hydroxyecdysone

LIU Li¹, GAO Li¹, QILEMOGE¹, GUO Ning¹, XIN Ying¹, LI Xiao-hai², DUAN Tian-feng^{1*}

(1. College of Ecology and Environment, Baotou Teachers College, Baotou, Inner Mongolia 010030, China; 2. Inner Mongolia Autonomous Region Civil Aviation Airport Group Co., Ltd. Baotou Branch, Baotou, Inner Mongolia 010040, China)

Abstract: Larvae of *Galeruca daurica* are the major pest that severely damages the grasslands of Inner Mongolia. To explore the molecular mechanisms by which 20-hydroxyecdysone (20E) regulates the development of its larval, transcriptome sequencing was conducted on 3rd-instar larvae treated with 20E for 48 hours by using the Illumina HiSeqTM 4000 platform. A total of 75 536 Unigenes were obtained, among which 40 161 were functionally annotated. Compared with the control group, a total of 500 differentially expressed genes (DEGs) were identified, including 258 upregulated and 242 downregulated ones. GO and KEGG analyses revealed that the DEGs were significantly enriched in terms/pathways such as ion transport, catalytic activity, longevity regulating pathway-multiple species, and FOXO signaling pathway. Furthermore, 11 ecdysone-related genes were screened out. The qRT-PCR verification results confirmed the reliability of the sequencing data. The results indicated that 20E may regulate the growth and development of *G. daurica* larvae by affecting multiple metabolic pathways. This study systematically analyzed the transcriptomic characteristics of *G. daurica* larvae in response to 20E regulation, providing a theoretical basis for clarifying its developmental mechanism and screening green control targets.

Key words: *Galeruca daurica*; Larvae; 20-hydroxyecdysone; Transcriptome analysis; Ecdysis-related genes;

收稿日期:2025-06-12;修回日期:2025-10-09

基金项目:内蒙古自治区自然科学基金(2023QN03059);内蒙古自治区高等学校科学研究项目(NJZZ23109);包头师范学院高层次人才引进科研启动基金(BTTCRCQD2023-013);内蒙古自治区高校科技研究项目(NJZY23005);包头师范学院高水平研究成果培育自然科学类青年项目(BSYKJ2023-ZQ02)资助

作者简介:刘利(1978-),男,蒙古族,内蒙古赤峰人,教授,博士,主要从事害虫生态治理研究, E-mail:liuli4304842@126.com; *通信作者 Author for correspondence, E-mail:duantianfeng70322@163.com

FOXO signaling pathway

沙葱萤叶甲(*Galeruca daurica*)属鞘翅目,叶甲科。该虫一年一代,一生经历卵、幼虫、蛹及成虫四个时期^[1],是近年来严重危害内蒙古草原的主要害虫之一。该虫幼虫与成虫均能造成危害,且幼虫时期危害最为严重^[2]。沙葱萤叶甲以葱属牧草的叶片与茎秆为主要取食对象,导致牧草遭受大面积损害。过去十年间,该害虫在内蒙古草原呈暴发态势,其危害范围已蔓延至20余个旗县,累计受害面积达106万ha,局部区域种群密度峰值高达3400头·m⁻²。这些区域原生植被覆盖度较低,土壤荒漠化问题突出,生态系统生产力本就薄弱。沙葱萤叶甲的连年肆虐,不仅显著制约了当地畜牧业生产,造成牧民经济收益下滑,更对我国北方生态屏障的稳定性构成严峻挑战^[3-4]。因此,急需加强沙葱萤叶甲幼虫发育调控作用的研究,以便更全面、深入地揭示沙葱萤叶甲幼虫时期发育的分子机理,为绿色生态防治奠定基础。

昆虫蜕皮激素(20-hydroxyecdysone, 20E)作为一类在昆虫前胸腺(Prothoracic gland, PG)合成的类固醇激素^[5],其功能实现依赖于与蜕皮素受体(ecdysonereceptor, EcR)及超气门蛋白(Ultraspiracle, USP)形成的异源二聚体复合物,该复合物通过激活早期响应基因(*BR-C*, *E74*, *E93*和*E75*)调控昆虫的生理活动^[6-8]。研究表明该激素在昆虫胚胎发育、蜕皮、变态、生殖调控及环境适应等多重生命活动中具有核心调控作用^[9]。目前,已有相关研究对20E作用的分子机制进行报道:20E通过调控二化螟(*Chilo suppressalis*)蛹期脂肪酸代谢来维持脂质稳态^[10];20E可调控叉头转录因子(Forkhead box, FOXO)的活性,进而使脂代谢相关基因*brummer*和*acid lipase-1*的表达水平升高,在家蚕(*Bombyx mori*)蜕皮及化蛹阶段,诱导其脂肪体内的脂质发生降解^[11];同时FOXO通路还被证实参与调控蛋氨酸亚砷还原酶(Methionine sulfoxide reductase, Msr)的表达,该酶在抗氧化应激中起关键作用^[12]。有研究通过转录组学方法探究了20E对家蚕幼虫脂肪体基因表达的影响^[13]。我们前期研究显示,20E注射处理可降低沙葱萤叶甲成虫体内脂质含量,并延缓其滞育进程,于是通过转录组测序技术,揭示了20E对沙葱萤叶甲成虫基因表达谱的调控特征^[14],为解析该激素调控成虫夏滞育的分子通路奠定了理论基础。然而,关于20E在其幼虫阶段的分子作用机制,尤其是信号转导与基因互作网

络,迄今尚未见文献报道。

为深入剖析沙葱萤叶甲幼虫对20E的分子应答机制,本研究采用第二代高通量测序技术,系统检测20E处理下幼虫全基因组的表达谱变化。通过解析差异表达基因及其功能,旨在挖掘20E调控沙葱萤叶甲幼虫生长发育进程的关键分子路径,为阐明其调控机制提供理论支撑与数据基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

沙葱萤叶甲2龄幼虫于2023年5月初采自内蒙古乌兰察布市四子王旗草原,将幼虫转移至自然条件下,以野韭饲喂至3龄幼虫供试。

1.2 cDNA文库构建和转录组测序

20E母液通过二甲基亚砷(Dimethyl sulfoxide, DMSO)溶解配制成10 mg·mL⁻¹的母液,于-80℃冰箱储存备用。使用前取母液以生理盐水稀释至1.0 mg·mL⁻¹的浓度。采用显微注射仪将1 μL浓度为1.0 mg·mL⁻¹的20E溶液从腹部第3~4节注入3龄第3天的幼虫体内,阴性对照组注射等体积经生理盐水稀释的DMSO溶液。处理48 h后,样本经液氮速冻,保存于-80℃冰箱备用。设3个生物学重复,每个重复包含20头幼虫,总计180头样本。转录组测序分析工作由北京奥维森基因科技有限公司承担,基于Illumina HiSeq™ 4000高通量平台完成文库构建与测序。研究共构建6个cDNA文库,原始数据经质量控制,去除接头序列及低质量片段后获得高质量测序序列。利用Trinity软件对高质量序列进行拼接组装,生成Unigene库用于后续生物信息学分析。

1.3 基因功能注释和分类

统计转录本和Unigene的总数、总长度、N50长度和平均长度。使用BLAST软件将Unigene序列与NR, NT, Swiss-Prot, GO, KEGG, Pfam和KOG数据库比对,并获得功能注释信息。通过BLASTx比对沙葱萤叶甲Unigene在NR数据库中的同源基因,利用软件GOseq(v1.22.0)进行GO注释,通过KOBAS(v3.0)软件进行KEGG富集通路分析。采用NCBI blast(2.2.28+)进行KOG注释。

1.4 差异表达基因筛选与注释

本研究运用 DESeq 软件对沙葱萤叶甲幼虫 20E 处理组与 DMSO 对照组的基因表达数据进行分析,识别差异表达基因(Differentially expressed genes,DEGs)。采用 Benjamini Hochberg 方法对原始 P 值进行校正,将错误发现率(False discovery rate,FDR)作为差异基因筛选的核心标准。通过计算 20E 处理组与对照组的基因表达差异倍数(Fold change,FC),筛选出 $FDR < 0.05$ 且 $|\log_2 FC| > 1$ 的基因,将其认定为显著差异表达基因。进一步利用 GOseq 软件开展基因本体(GO)富集分析,将校正后 P 值 < 0.05 的条目判定为显著富集。同时,运用 KOBAS 软件进行 KEGG 通路富集分析,以校正后 P 值 < 0.05 作为显著富集的 KEGG 通路筛选阈值。

1.5 差异表达基因的 qRT-PCR 验证

为进一步验证转录组数据的准确性,随机选取 10 个差异表达基因进行 qRT-PCR 验证,包括:表皮蛋白 3(Cuticular protein 3,CP3)、脂肪酸合酶(Fatty acid synthase,FAS)、类胰岛素多肽(Insulin-

like peptide,ILP)、几丁质脱乙酰酶(Chitin deacetylase,CDA)、丝氨酸水解酶(Serine hydrolase,SH)、酪氨酸激酶 2(Tyrosine kinase 2,TYK2)、细胞色素 P450(Cytochrome P450,CYP450)、糖苷水解酶(Glycoside hydrolase,GH)、气味结合蛋白(Odorant binding protein,OBP)和海藻糖转运蛋白 1(Trehalose transporter1,Tret1),SDHA 作为内参基因^[15]。在引物设计环节,运用 Primer Premier 5.0 软件完成目的基因与内参基因的引物设计(表 1),合成工作委托上海生工生物有限公司完成。以测序样本的 cDNA 作为反应模板,在 FTC-3000 实时荧光定量仪(Funglyn Biotech,加拿大)上开展 qRT-PCR 实验。反应体系为 20 μ L,包含 2 $\times$ GoTaq qPCR Master Mix 10 μ L、正反向引物各 0.4 μ L、cDNA 模板 2 μ L 以及 7.2 μ L ddH₂O。反应程序分阶段进行:95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min;随后进入 40 个循环,每个循环包括 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,60 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s;最后生成熔解曲线,依次经过 95 $^{\circ}$ C 15s,65 $^{\circ}$ C 15 s,95 $^{\circ}$ C 15 s 的温度变化。为保障实验可靠性,每组处理均设置 3 个生物学重复与 4 次技术重复,采用经典的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法^[16]计算基因相对表达量。

表 1 qRT-PCR 引物信息

Table 1 Primer information for qRT-PCR

基因名 Gene name	正向引物(5'-3') Forward primer (5'-3')	反向引物(5'-3') Reward primer (5'-3')
CP3	ACGCTTGGGGTTACGATACA	GAGGCTGGAATCCATTTTCA
FAS	AACCAAAGGCAAAGGTGTTG	CCATGGAAGCTGCAATTTTT
ILP	TTTCGATTGTTCTCCGTATCG	AATCGTTGTCAAAGCTCGAA
CDA	TATTGCTAGCGCAGTTGGTG	ACGGCTTCGTCAAAAGCTAA
SH	TCTTCCCAATGGAGATTTTCG	CGAGGTACGGAGCCAATTTA
TYK2	ATAGTGACAAACGCCCAAG	AGCAGGTGGACAAATTGGAG
CYP450	CGGAGCAAGAGCTTATTTGC	GAAAGCTGTGAGTGCGATGA
GH	TGGATACGCTGATGATGGAA	CCGTTGTTCCATTTCGAAGTT
OBP	AGGAAGACGCGGACAAAGTA	TCTGGAGTAACCCCATTTCG
Tret1	AGCAATCAACCGTACCGAAC	TTGTTATTGGTTCCCCCAAA
SDHA	GGGAGACCACAATCTCCTCA	AGCTGGTGCTCCTAAGTCCA

2 结果与分析

2.1 沙葱萤叶甲幼虫转录组测序及组装结果

共完成沙葱萤叶甲 6 个样品的转录组测序,包括 3 个处理组和 3 个对照组,共获得 39.07 Gb 的质控数据,各样品 Q30 碱基质量均大于 92.24%,G+C 含量为 35.50%~36.15%,表明测序质量良好,数

据可用于后续分析(表 2)。组装后共获得 105 417 个转录本,总长度为 112 377 066 bp,平均长度为 1066 bp,N50 长度为 1640 bp;共获得 75 536 条 Unigene,总长度为 75 669 491 bp,平均长度为 1002 bp,N50 长度为 1531 bp(表 3)。转录本和 Unigene 的 N50 长度均大于其平均长度,说明组装效果较好,可用于后续分析。

表 2 20E 处理后沙葱萤叶甲幼虫转录组测序数据评估统计表

Table 2 Statistical analysis table of transcriptome sequencing data of *Galeruca daurica* larvae treated with 20E

样品 Sample	Read 总数 Read number	碱基质量值 Q30 Base quality score Q30/%	G+C 含量 G+C content/%
E20_1	52 111 170	92.29	36.15
E20_2	43 566 774	92.24	35.54
E20_3	44 892 736	92.73	35.69
DMSO_1	39 284 916	93.61	35.85
DMSO_2	40 910 880	92.41	35.50
DMSO_3	42 679 164	93.52	35.81

注: E20_1~E20_3 代表 20E 处理组的 3 个生物学重复; DMSO_1~DMSO_3 代表 DMSO 对照组的 3 个生物学重复

Note: E20_1-E20_3 represent three biological replicates of the 20E-treated group; DMSO_1-DMSO_3 represent three biological replicates of the DMSO control group

表 3 20E 处理后沙葱萤叶甲幼虫 Unigene 组装结果统计表

Table 3 Statistical table of Unigene assembly results of *Galeruca daurica* larvae treated with 20E

参数 Parameter	转录本 Transcript	单基因簇 Unigene
300 ~500 bp	41 048 (38.94%)	31 960 (42.31%)
500 ~1000 bp	30 514 (28.95%)	21 971 (29.09%)
1000 ~2000 bp	19 988 (18.96%)	12 746 (16.87%)
>2000 bp	13 867 (13.15%)	8 859 (11.73%)
总数 Total number	105 417	75 536
总长度 Total length/bp	112 377 066	75 669 491
N50 长度 N50 length/bp	1640	1531
平均长度 Mean length/bp	1066	1002

注: 括号内百分比表示对应长度区间的转录本 (Transcript) 或单基因簇 (Unigene) 数量占其总数量的比例

Note: Percentages in parentheses indicate the proportion of transcripts or Unigenes within the corresponding length intervals relative to their total numbers

2.2 沙葱萤叶甲幼虫 Unigene 功能注释

为了全面注释 Unigene 序列的功能和特征, 本研究将所获得的 Unigene 序列分别与 NCBI 非冗余蛋白质序列数据库 (NCBI non-redundant protein sequences database, NR)、NCBI 非冗余核苷酸序列数据库 (NCBI nucleotide sequences database, NT)、高质量蛋白质序列数据库 (A manually annotated and reviewed protein sequence database, Swiss-Prot)、基因本体数据库 (Gene Ontology database, GO)、京都基因与基因组百科全书数据库 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes database, KEGG)、蛋白质家族数据库 (Protein family database, Pfam) 以及真核直系同源组数据库 (euKaryotic Ortholog Groups database, KOG) 进行了细致的比对分析。有 40 161 个 Unigenes 获得了至少来自一个数据库的功能注释。其中 33 836 个 Unigene 注

释到 NR 数据库, 占 Unigene 总数的 44. 79%; 8657 个 Unigene 注释到 NT 数据库, 占 Unigene 总数的 11. 46%; 15 670 个 Unigene 注释到 SwissProt 数据库, 占 Unigene 总数的 20. 75%; 10 241 个 Unigene 注释到 GO 数据库, 占 Unigene 总数的 13. 56%; 2022 个 Unigene 注释到 KEGG 数据库, 占 Unigene 总数的 2. 68%; 28 295 个 Unigene 注释到 Pfam 数据库, 占 Unigene 总数的 37. 46%; 14 429 个 Unigene 注释到 KOG 数据库, 占 Unigene 总数的 19. 1%(表 4)。

与 NR 数据库的比对结果明确了沙葱萤叶甲幼虫 Unigene 序列与近缘物种的同源性匹配情况。匹配最多的物种是赤拟谷盗 (*Tribolium castaneum*) (22. 22%), 其次为山松大小蠹 (*Dendroctonus ponderosae*) (6. 42%)、豌豆蚜 (*Acyrtosiphon pisum*) (6. 39%)、黑毛蚁 (*Lasius niger*) (4. 39%) 和海蠕虫 (*Capitella teleta*) (2. 99%)。

表 4 20E 处理后沙葱萤叶甲幼虫的 Unigene 注释结果

Table 4 Unigene annotation results of *Galeruca daurica* larvae treated with 20E

数据库 Database	NR	NT	SwissProt	GO	KEGG	Pfam	KOG
注释 Unigene 数目 Number of Unigenes	33 836	8657	15 670	10 241	2022	28 295	14 429
所占比例 Percentage/%	44.79	11.46	20.75	13.56	2.68	37.46	19.1

2.3 沙葱萤叶甲幼虫 Unigene 功能分类

注释到 GO 数据库的 Unigene 可划分为 3 大类, 47 个功能区, 分别为生物学过程(25 个)、细胞组分(16 个)和分子功能(12 个)。其中, 生物学过程的 Unigenes 最多(14 160 条), 细胞过程和代谢过程的注释序

列数占主导地位, 分别为 4257 和 4221 条; 细胞组分类别中注释到 11 816 条 Unigenes, 细胞和细胞成分的注释序列最多, 分别为 2367 条和 2361 条; 分子功能类别中注释到 8919 条 Unigenes, 结合和催化活性注释序列数最多, 分别为 4119 条和 3609 条(图 1)。

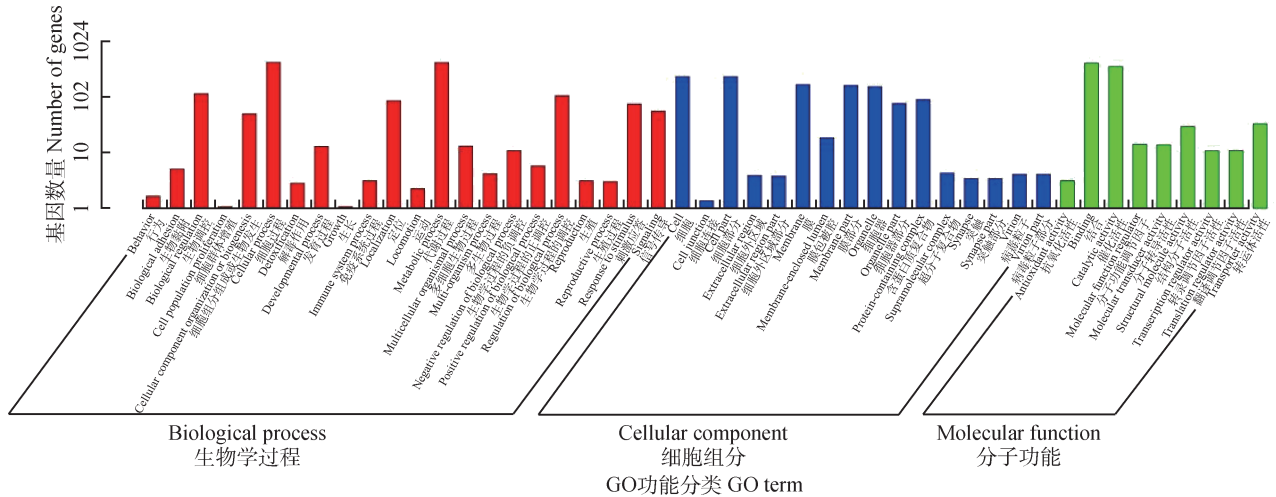


图 1 沙葱萤叶甲幼虫 20E 注射处理后 Unigene 的 GO 功能富集分析

Fig. 1 GO enrichment analysis of Unigenes in *Galeruca daurica* larvae following 20E injection

注释到 KEGG 数据库的 941 条 Unigene 可归为 5 个主要功能类别, 包括细胞过程(114 条)、环境信息处理(68 条)、遗传信息处理(390 条)、新陈代谢(239 条)和有机体系统(130 条)。其中, 遗传信息处理通路注释到翻译的最多, 有 205 个; 细胞进程通路注释到运输和分解代谢的最多, 有 64 条; 环境信息处理通路注释到信号转导的最多, 有 57 条; 新陈代谢通路注释到碳水化合物代谢的最多, 有 45 条; 有机体系统通路注释到内分泌系统的最多, 有 93 条(图 2)。

与 KOG 数据库进行比对发现, 获得的 Unigenes 包含 RNA 加工与修饰、脂类转运、信号转导等 26 个蛋白类群。其中一般功能预测和信号转导机制的 Unigenes 较多, 分别为 5529 个和 1271 个, 另外参与蛋白质翻译后修饰、蛋白质转运、分子伴侣(996 个), 复制、重组和修复(820 个), 转录(671 个)的 Unigenes 较为丰富(图 3)。

2.4 差异表达基因分析

在处理 48 h 后, 20E 处理组相较于 DMSO 对照组共鉴定出 500 个差异表达基因, 包含 258 个显著上调和 242 个明显下调的基因(图 4)。上述差异基因在 7 个主要数据库中获得功能注释, 其中: NR 数据库注释基因数量最多(275 条); Pfam(236

条)、Swiss-Prot(117 条)、KOG(111 条)、GO(69 条)、NT(58 条)和 KEGG(10 条)依次递减。值得注意的是, NR 数据库中鉴定到多个与蜕皮调控及多种代谢通路相关的关键基因(表 5)。

2.5 差异表达基因的 GO 功能注释

GO 富集分析显示, 500 个差异表达基因(DEGs)显著富集于 293 个 GO 条目, 具体分布为: 生物学过程 156 条、细胞组分 37 条、分子功能 100 条。在生物学过程类别中, 富集程度最显著的三个 GO 条目依次为离子转运(Ion transport)、药物分解代谢过程(Drug catabolic process)和毒性物质响应(Response to toxic substance); 细胞组分类别的核心条目包括突触(Synapse)、细胞连接(Cell junction)和乙酰胆碱门控通道复合体(Acetylcholine-gated channel complex); 分子功能类别的前三位分别是催化活性(Catalytic activity)、水解酶活性(Hydrolase activity)和氧化还原酶活性(Oxidoreductase activity)。前 30 个显著富集的 GO 条目详见图 5。

2.6 差异表达基因的 KEGG 富集分析

KEGG 通路富集分析结果(图 6)表明, 共有 500 个差异表达基因(DEGs)显著富集于 36 条代谢通路。经统计检验, 以 $P < 0.05$ 作为显著性阈值, 富集

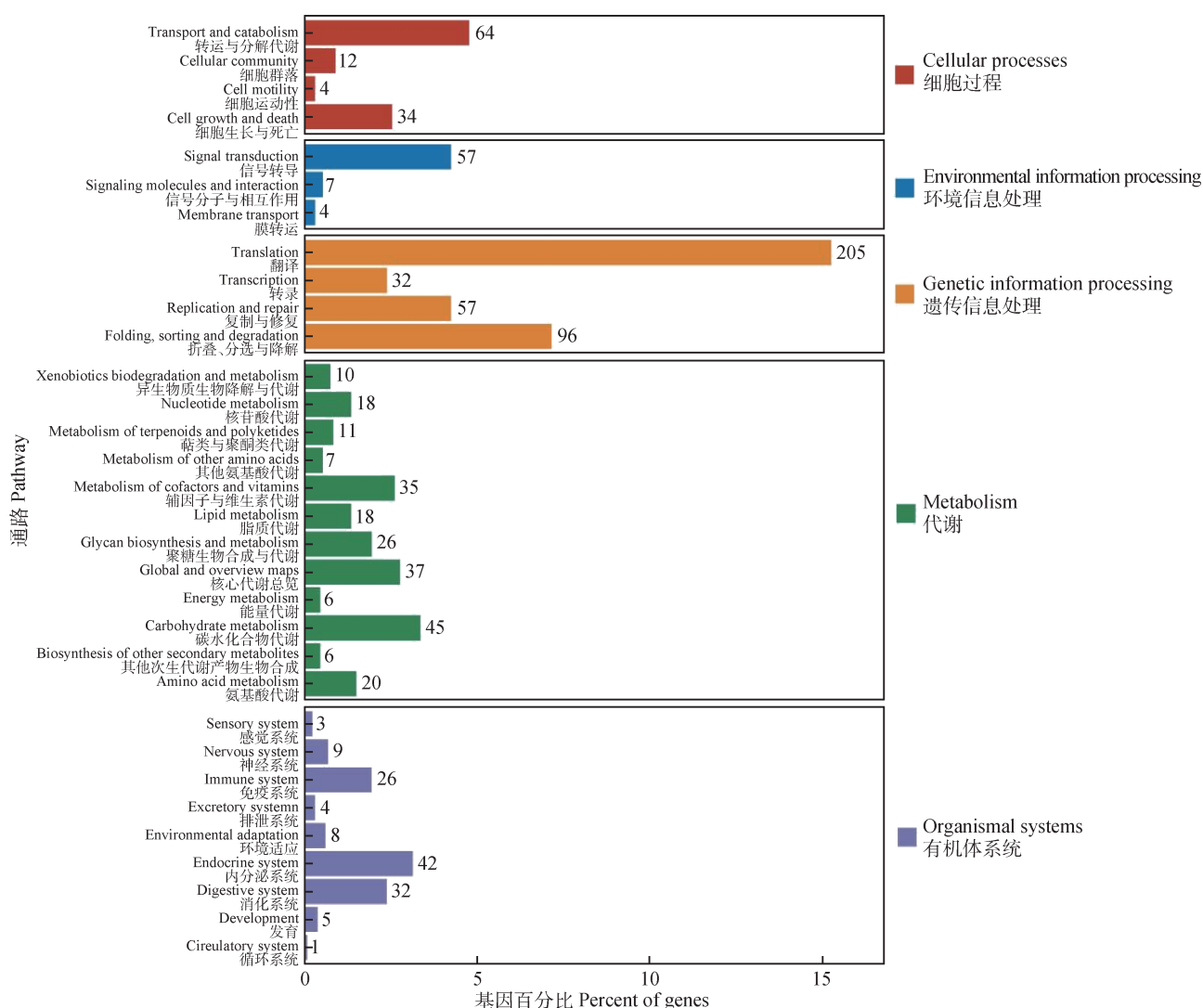


图 2 沙葱萤叶甲幼虫 20E 注射处理后 Unigene 的 KEGG 功能富集分析

Fig. 2 KEGG enrichment analysis of Unigenes in *Galeruca daurica* larvae following 20E injection

程度最高的前 5 条通路为:多物种长寿调控通路 (Longevity regulating pathway-multiple species)、FOXO 信号通路 (FOXO signaling pathway)、氨基酸糖与核苷酸糖代谢 (Amino sugar and nucleotide sugar metabolism)、 α -亚麻酸代谢 (Alpha-Linolenic acid metabolism) 及脂肪酸代谢 (Fatty acid metabolism)。值得注意的是,代谢通路 (Metabolic pathways) 包含的差异基因数量最多 (1092 个 DEGs), 其次是溶酶体通路 (Lysosome) (148 个 DEGs)。

2.7 蜕皮激素相关基因筛选

从沙葱萤叶甲幼虫转录组中筛选与蜕皮激素相关的基因,共 11 个,包括 1 个蜕皮激素受体 (Ecdysone receptor, *ECR*)、2 个广谱复合物基因 (Broad-Complex, *Br-C*)、1 个超气门蛋白 (Ultraspiracle,

USP)、2 个蜕皮激素调节蛋白 (Ecdysteroid-regulated protein, *ERP*)、1 个蜕皮激素诱导蛋白 E75 (Ecdysone-induced protein 75, *E75*)、1 个蜕皮激素诱导蛋白 E74 (Ecdysone-induced protein 74EF, *E74*)、1 个促前胸腺激素 (Prothoracicotropic hormone, *PTTH*) 和 2 个蜕皮酮诱导的转录因子 (Fushi-tarazu factor 1, *FTZ-F1*) (表 6)。

2.8 差异表达基因的 qRT-PCR 验证

基于转录组测序结果,随机选取 10 个差异表达基因 (*CP3*, *FAS*, *ILP*, *CDA*, *SH*, *TYK2*, *CYP450*, *GH*, *OBP*, *Tret1*) 进行 qRT-PCR 验证,其中 5 个基因上调,5 个基因下调。结果显示所检测基因的表达趋势与 RNA-Seq 数据完全吻合 (图 7),说明转录数据结果真实且可靠,可用于后续研究。

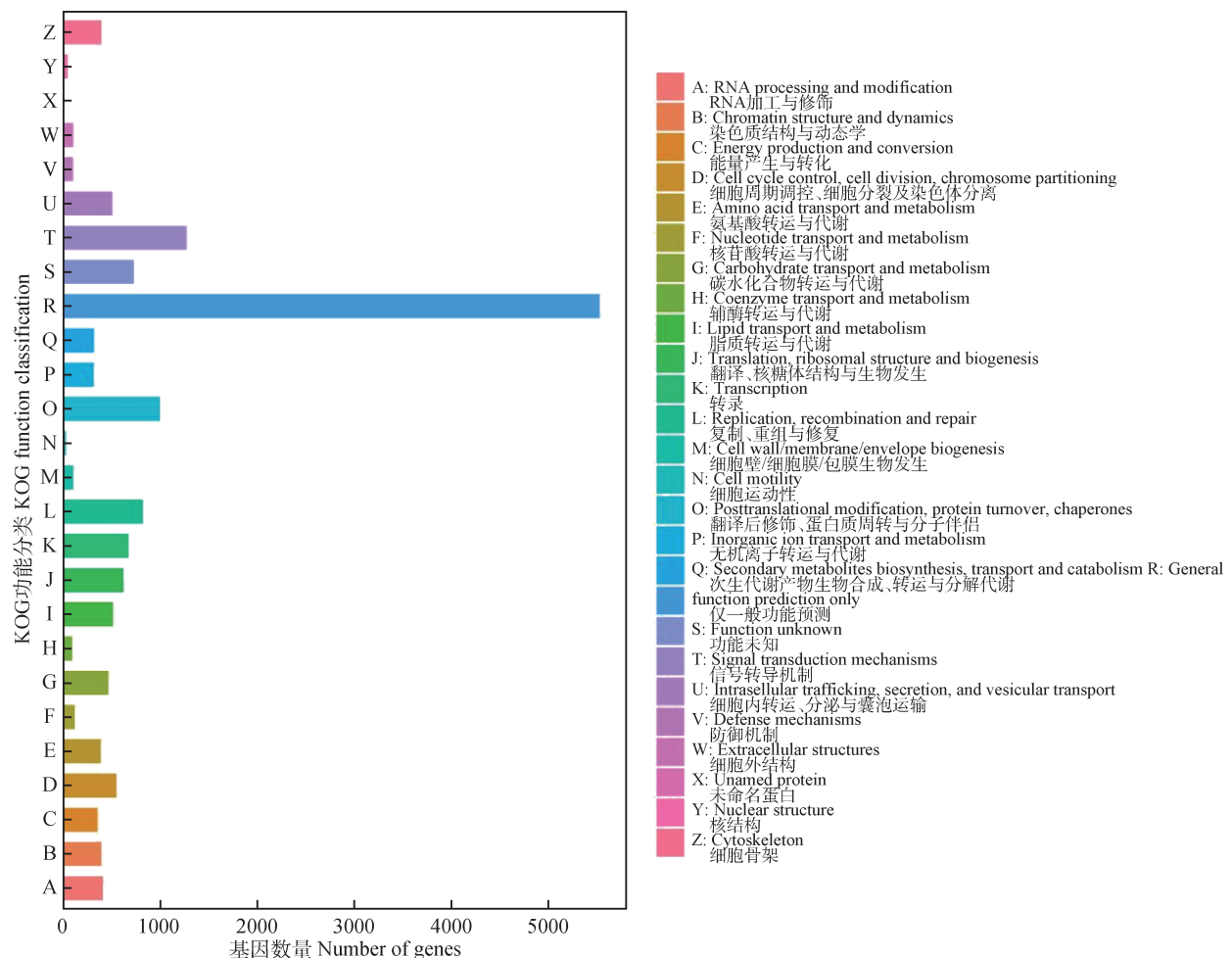


图3 沙葱萤叶甲幼虫 20E 注射处理后 Unigene 的 KOG 功能富集分析

Fig. 3 KOG enrichment analysis of Unigenes in *Galeruca daurica* larvae following 20E injection

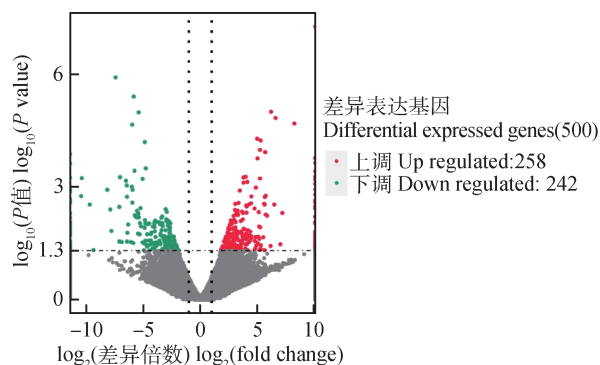


图4 沙葱萤叶甲幼虫 20E 注射处理后差异表达基因的火山图

Fig. 4 Volcano plot of differentially expressed genes in *Galeruca daurica* larvae following 20E injection

3 讨论

在本研究中,沙葱萤叶甲成虫经 20E 处理 48 小时后,筛选出 500 个差异表达基因;KEGG 通路分析显示,富集程度最高的前三条通路分别为多物种长

寿调控通路、FOXO 信号通路以及氨基糖与核苷酸糖代谢通路。对比相关研究,Huang 等人^[13]针对家蚕幼虫开展的 20E 处理实验(处理时间 24 小时)显示,差异表达基因数量达 606 个,显著富集的前三个通路依次为甘油酯代谢(Glycerolipid metabolism)、昆虫激素合成(Insect hormone biosynthesis)和脂肪酸代谢通路。而姚知含等人^[14]对沙葱萤叶甲成虫进行 48 小时 20E 处理后,仅检测到 201 个差异表达基因,其 KEGG 通路富集结果中排名前三位的是核黄素代谢(Riboflavin metabolism)、溶酶体(Lysosome)以及泛酸与乙酰辅酶 A 合成(Pantothenate and CoA biosynthesis)通路。三项研究结果差异较大,主要由于研究对象的发育阶段(幼虫/成虫)、物种遗传背景、20E 处理时间及检测组织(全虫体/脂肪体)不同。尽管如此,三项研究均发现,大量的差异表达基因在脂肪酸代谢、氨基糖与核苷酸糖代谢以及药物代谢(Drug metabolism-other enzymes)等多种代谢通路中呈现显著富集特征,这表明 20E 对

表 5 20E 处理后沙葱萤叶甲幼虫的主要差异表达基因

Table 5 Main differentially expressed genes of *Gauleruca daurica* larvae treated with 20E

基因代码 Gene ID	差异倍数对数值 log ₂ FC	FDR	变化趋势 Variation trend	功能注释 Functional annotation
TRINITY_DN15362_c0_g1	2.5613	0.0409	上调 Up	表皮蛋白 Cuticular protein Ld-CP3, 马铃薯甲虫 <i>Leptinotarsa decemlineata</i>
TRINITY_DN25896_c0_g1	1.9585	0.0387	上调 Up	几丁质脱乙酰酶 Chitin deacetylase 1, 杨叶甲 <i>Chrysomela tremula</i>
TRINITY_DN21867_c0_g1	4.8913	0.0010	上调 Up	胰岛素样肽 Insulin-like peptide-1a, 马铃薯甲虫 <i>Leptinotarsa decemlinea</i>
TRINITY_DN27140_c0_g1	4.2014	0.0213	上调 Up	海藻糖转运蛋白 Tret1facilitated trehalose transporter Tret1, 赤拟谷盗 <i>Tribolium castaneum</i>
TRINITY_DN25323_c0_g1	2.543	0.013	上调 Up	酯酶 Esterase, 马铃薯甲虫 <i>Leptinotarsa decemlinea</i>
TRINITY_DN23958_c0_g1	-2.2433	0.0410	下调 Down	UDP-葡萄糖醛酸转移酶 UDP-glucuronosyltransferase-like, 赤拟谷盗 <i>Tribolium castaneum</i>
TRINITY_DN35760_c0_g1	-2.8409	0.0439	下调 Down	醛糖还原酶 Aldose reductase isoform X2, 赤拟谷盗 <i>Tribolium castaneu</i>
TRINITY_DN13800_c0_g1	-2.6895	0.0448	下调 Down	转座子相关蛋白 Transposable element Tc3 transposase-like, 佛罗里达弓背蚁 <i>Camponotus floridanus</i>
TRINITY_DN24400_c0_g3	-2.9457	0.0312	下调 Down	钠/钾/钙交换蛋白 Sodium/potassium/calcium exchanger CG1090, 麦双尾蚜 <i>Diuraphis noxia</i>
TRINITY_DN25828_c3_g1	-5.9827	0	下调 Down	细胞色素 P450 Cytochrome P450, 马铃薯甲虫 <i>Leptinotarsa decemline0</i>

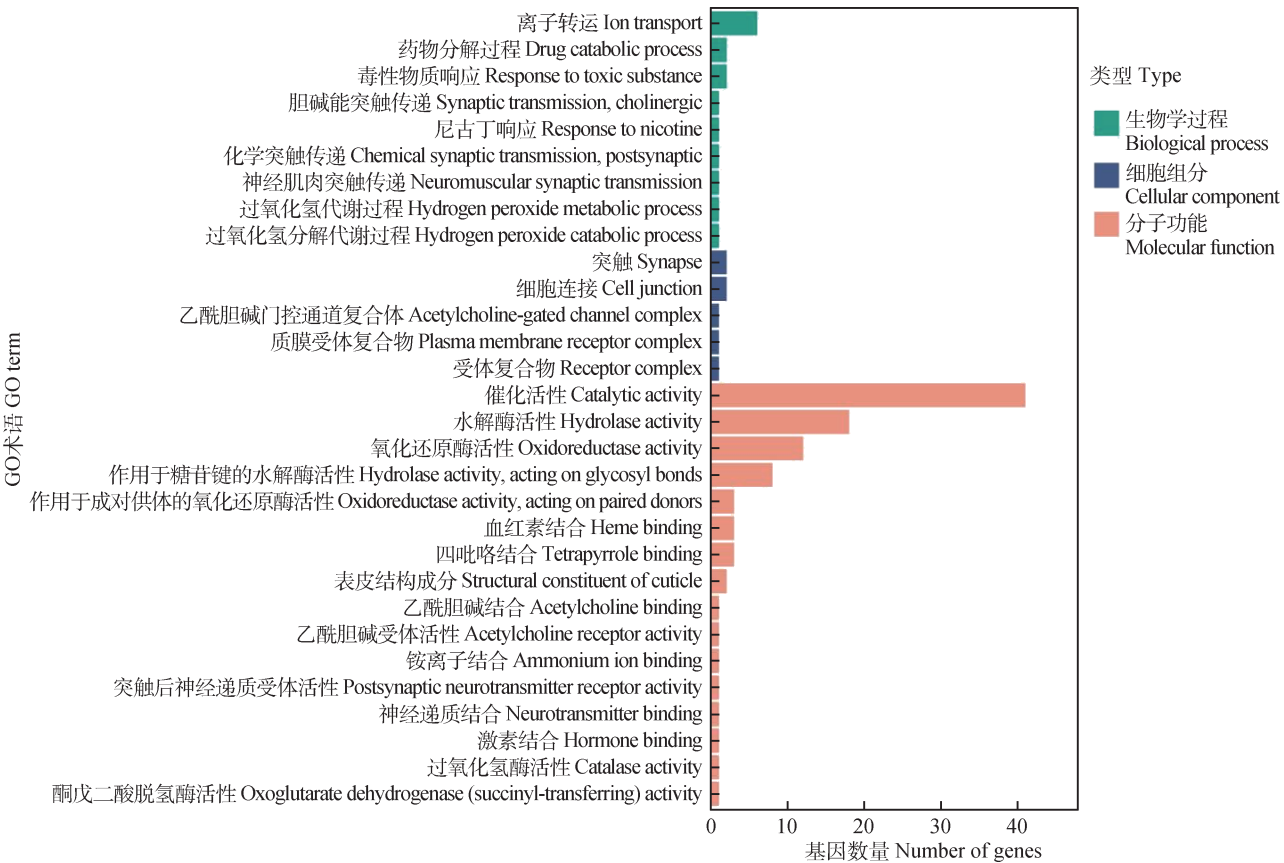


图 5 沙葱萤叶甲幼虫 20E 注射处理后差异基因的 GO 富集分析

Fig. 5 GO enrichment analysis of differentially expressed genes in *Galeruca daurica* larvae following 20E injection

昆虫的物质代谢过程具有广泛且显著的调控作用。与成虫研究相比^[14], 幼虫对 20E 的响应更集中于表皮发育与基础代谢调控, 而非生殖滞育相关通路,

这与其发育阶段特异性需求相符。通过对沙葱萤叶甲幼虫与成虫 20E 响应转录组的系统比较, 我们从基因表达规模、通路富集和关键基因功能三个维

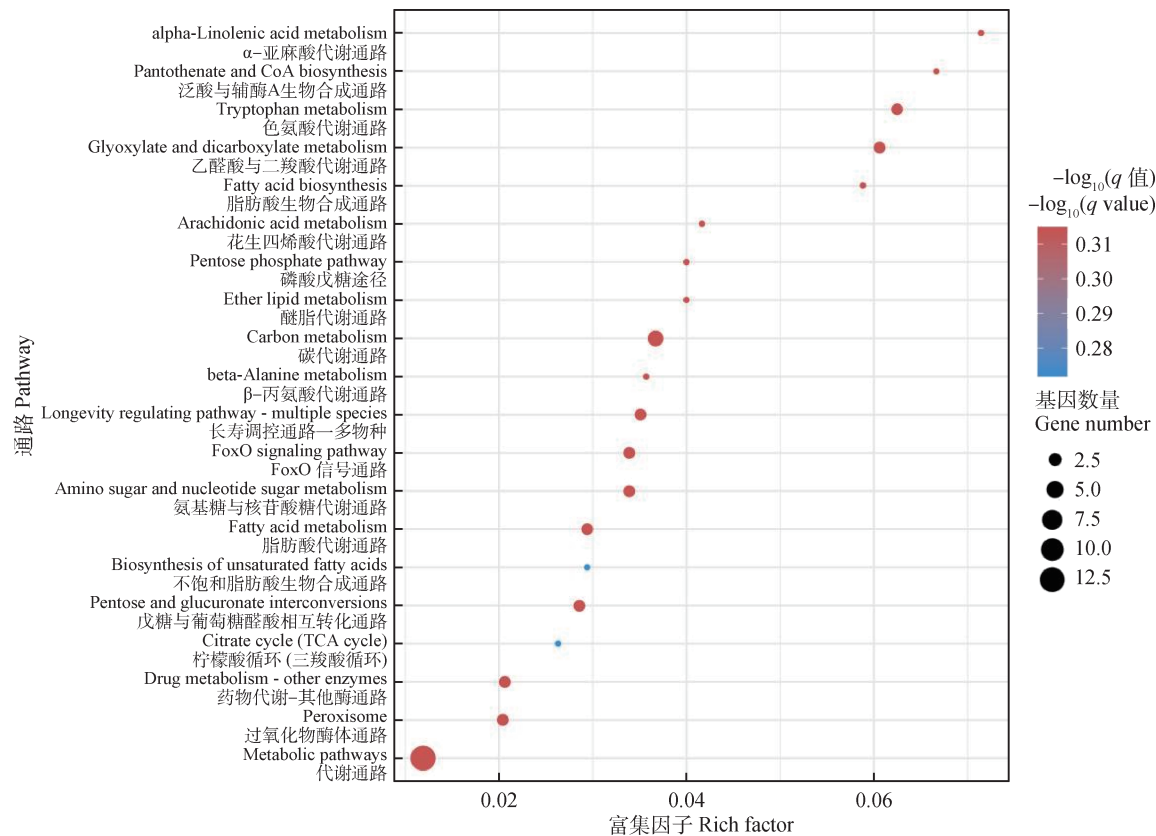


图 6 沙葱萤叶甲幼虫 20E 注射处理后差异基因的 KEGG 富集分析

Fig. 6 KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes in *Galeruca daurica* larvae following 20E injection

表 6 20E 处理后沙葱萤叶甲幼虫的蜕皮激素相关基因

Table 6 Differential expression of ecdysone-related genes in *Galeruca daurica* larvae after 20E treatment

基因代码 Gene ID	基因名称 Gene designation	基因全称 Full name of gene	变化趋势 Variation trend	同源物种 Homologous species
TRINITY_DN28745_c0_g1	ECR	蜕皮激素受体 Ecdysone receptor	下调 Down	大猿叶虫 <i>Colaphellus bowringi</i>
TRINITY_DN28859_c1_g1	Br-C	广谱复合物基因 Broad-Complex	上调 Up	桑树黄星天牛 <i>Psacothea hilaris</i>
TRINITY_DN37791_c0_g1	Br-C	广谱复合物基因 Broad-Complex	无显著差异 No significant difference	赤拟谷盗 <i>Tribolium castaneum</i>
TRINITY_DN25403_c2_g1	USP	超气门蛋白 Ultraspiracle	下调 Down	松斑天牛 <i>Monochamus alternatus</i>
TRINITY_DN20002_c0_g1	ERP	蜕皮激素调节蛋白 Ecdysteroid-regulated protein	上调 Up	赤拟谷盗 <i>Tribolium castaneum</i>
TRINITY_DN20224_c0_g1	ERP	蜕皮激素调节蛋白 Ecdysteroid-regulated protein	上调 Up	茶翅蜡 <i>Halyomorpha halys</i>
TRINITY_DN29403_c0_g1	E75	蜕皮激素诱导蛋白 E75 Ecdysone-induced protein 75	下调 Down	赤拟谷盗 <i>Tribolium castaneum</i>
TRINITY_DN26916_c0_g2	E74	蜕皮激素诱导蛋白 E74 Ecdysone-induced protein 74EF	下调 Down	赤拟谷盗 <i>Tribolium castaneum</i>
TRINITY_DN37918_c0_g1	PTTH	促前胸腺激素 Prothoracicotropic hormon	上调 Up	马铃薯甲虫 <i>Leptinotarsa decemlineata</i>
TRINITY_DN40911_c0_g1	FTZ-F1	蜕皮酮诱导的转录因子 Fushi-tarazu factor 1	上调 Up	马铃薯甲虫 <i>Leptinotarsa decemlineata</i>
TRINITY_DN27482_c2_g2	FTZ-F1	蜕皮酮诱导的转录因子 Fushi-tarazu factor 1	下调 Down	赤拟谷盗 <i>Tribolium castaneum</i>

度揭示了其深刻的发育阶段特异性调控策略。这些差异并非偶然,而是与幼虫和成虫截然不同的生理使命和生存需求直接相关。从基因表达规模上

看,幼虫阶段 500 个差异基因的广泛响应,远超成虫的 201 个,这从本质上反映了幼虫组织正处于快速生长与分化时期,细胞活动旺盛,对激素信号更为

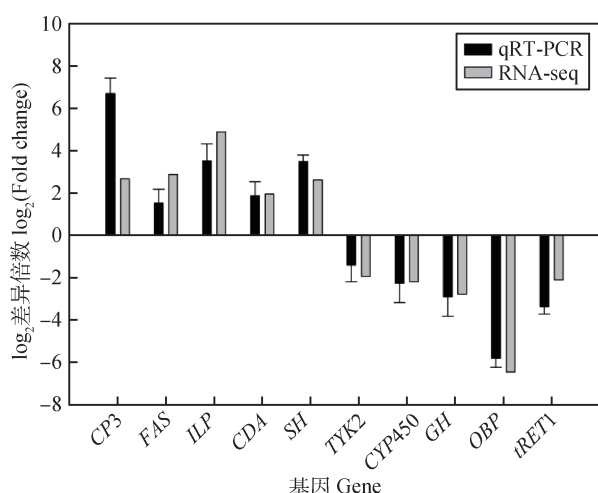


图7 沙葱萤叶甲幼虫注射20E后差异表达基因RNA-Seq测序数据的qRT-PCR验证

Fig. 7 Verification of RNA-Seq data of differentially expressed genes in the *Galeruca daurica* larvae after 20E-injection by qRT-PCR

敏感。而成虫组织相对稳定,其响应更侧重于精细调整特定生理状态(如滞育)。从通路富集特征来看,幼虫显著富集的FOXO信号通路、长寿调控通路等,表明20E的核心作用是协调“生长与生存”的平衡:一方面调动能量(如脂解)以支持蜕皮等耗能过程,另一方面增强抗氧化应激以维持细胞稳态。相反,成虫中富集的核黄素代谢、溶酶体通路,则更偏向于“维护与准备”,即通过辅酶代谢和细胞清理来优化能量状态,为生殖滞育的启动或终止做准备。从关键基因功能分析,这一结论得到进一步印证。幼虫中表皮蛋白与几丁质代谢基因(CP3, CDA)的上调,是直接服务于蜕皮这一核心任务的分子体现;而类胰岛素肽(ILP)的差异表达,则揭示了20E与胰岛素信号通路的复杂交互,以精确调控幼虫的生长速率。相比之下,成虫中保幼激素结合蛋白(JHBP)的显著下调,则清晰地指向20E通过拮抗JH信号来调控生殖滞育这一关键生理转换。综上所述,本研究清晰地表明:20E在沙葱萤叶甲中扮演着一个“多任务调控者”的角色。在幼虫期,其转录调控网络以支持生长发育和蜕皮为核心,呈现出广泛而基础的特点;而在成虫期,则转向以调控生殖滞育相关的能量代谢为核心,表现出专一而特化的特征。这种根本性的差异,深刻体现了昆虫激素调控的发育阶段特异性,也为针对不同虫态设计精准绿色防控策略提供了关键的理论依据和潜在的分子靶点。

FOXO作为胰岛素信号通路中的重要转录因

子,在昆虫蜕皮及变态发育进程中扮演关键角色。本研究中,FOXO信号通路的显著富集表明,20E可能通过激活FOXO转录因子调控脂质分解与抗氧化应激。这一推测与已有研究结果形成呼应:在意大利蜜蜂(*Apis mellifera Ligustica*)中,20E通过ECR上调FOXO转录活性,进而升高幼虫血淋巴葡萄糖含量并推动脂肪体组织重塑,最终促进工蜂幼虫向蛹期的变态发育^[8];在家蚕和棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)中,20E可通过FOXO诱导脂解酶表达^[11,17];在赤拟谷盗中,20E则通过FOXO调节蛋氨酸亚砷还原酶表达^[12]。这些跨物种研究结果共同提示,FOXO通路在昆虫能量代谢调控中具有保守性。此外,FOXO转录因子还参与调节与衰老相关的途径并影响寿命^[18-19]。在家蚕、秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)、黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)等多物种中研究揭示FOXO可以靶标氧化应激响应性富含丝氨酸蛋白1(Oxidative stress-responsive serine-rich protein 1, OSER1),而OSER1在应对过氧化氢引发的氧化应激过程中扮演关键角色^[20]。该蛋白可通过激活细胞内抗氧化防御机制,增强机体对氧化损伤的抵抗能力,进而延缓细胞衰老进程,最终实现延长寿命的作用^[20]。本研究中多物种长寿调控通路的富集,提示20E可能通过调控FOXO影响幼虫发育速率和寿命,这为解析沙葱萤叶甲世代周期调控提供了新视角。除FOXO这一核心枢纽外,该通路还富集了其他多个关键组分,共同构成一个精细的调控系统。该通路的核心机制之一是胰岛素/类胰岛素生长因子信号通路(IIS)的抑制可促进长寿。在本研究中,与胰岛素信号相关的分子(如胰岛素受体底物、PI3K-Akt通路组分)的表达变化,与FOXO的激活状态相呼应。研究表明,抑制胰岛素信号可以延缓衰老并延长多种动物的寿命^[21]。这表明20E可能通过调节昆虫自身的胰岛素信号活性,形成一个“激素-胰岛素”交叉对话,共同决定幼虫的能量分配策略,从而影响其发育节奏与寿命潜能^[22]。mTOR是另一个调控细胞生长、自噬和寿命的关键激酶。长寿通路中mTOR信号的抑制通常与寿命延长相关^[21]。本研究中该通路的富集提示,20E处理可能同时影响了mTOR信号的活性。其与FOXO通路相互拮抗或协同,共同调控幼虫在蜕皮这一关键时期的合成代谢与分解代谢的平衡,确保在停止取食后,细胞能有效利用储存的能量并清除损伤组分,顺利完成

组织重塑。AMPK作为细胞能量状态的传感器,其激活可抑制mTOR并促进FOXO的转录活性^[23]。它在长寿通路中扮演着起始信号的角色。本研究数据提示,20E可能通过感知能量状态变化,激活AMPK,进而联动FOXO与mTOR,启动一套旨在维持能量稳态和增强应激抵抗的转录程序,以保障幼虫在发育关键期的生存能力。Yuan等研究表明,20E通过激活脂肪体中AMPK来拮抗胰岛素信号和抑制个体生长^[22]。综上所述,20E可能通过激活“AMPK-胰岛素信号-mTOR-FOXO”这一顶层调控网络,将外源激素信号与内部能量状态整合,促使幼虫从快速生长转向保障发育质量的稳态维持模式。这为理解20E调控发育进程提供了新的系统性框架。

本研究观察到,在20E处理干预下,沙葱萤叶甲幼虫体内多个参与蜕皮调控的基因呈现显著表达差异。这些基因的表达变化提示,20E可能通过调控相关基因的转录活性,参与调节幼虫的蜕皮进程。如表皮蛋白(*CP3*)和几丁质脱乙酰酶(*CDA*)的显著上调,暗示20E可能通过促进表皮重塑与几丁质代谢介导幼虫蜕皮过程,这与20E在昆虫蜕皮中的经典功能一致^[7]。利用20E处理家蚕幼虫后,*cuticle protein 3*, *chitinase-like protein*以及*cuticular protein RR-1 motif-21*等多个蜕皮相关基因表达量发生显著变化^[13]。这些基因在其他昆虫蜕皮进程中同样扮演关键角色:如亚洲玉米螟幼虫体内的几丁酶*OfChtII*,能够促进其蜕皮化蛹阶段几丁质的降解^[24];美国白蛾(*Hyphantria cunea*)幼虫的几丁酶5基因通过RNAi技术被沉默后,其蜕皮会受到明显抑制^[25];暗黑鳃金龟(*Holotrichia parallela*)的*HCDA*基因若被沉默,会严重破坏表皮结构的完整性,进而导致个体发育畸形甚至死亡^[26];褐飞虱(*Nilaparvata lugens*)的*NlugCpr*表皮蛋白基因与*NCHS1*几丁合成酶基因,共同参与了早期胚胎发育阶段卵膜表皮的形成过程^[27]。

细胞色素P450家族成员在蜕皮激素合成中也扮演关键角色^[28]。研究表明,沉默*Spook*基因可诱导蜕皮的停止^[29],沉默*Phantom*基因会抑制蜕皮激素滴度的产生并导致变态异常^[30]。故本研究中细胞色素P450(*CYP450*)的显著下调可能与20E的负反馈调节相关。多项研究指出,20E对生长速率的调控机制与其拮抗胰岛素/胰岛素样生长因子信号转导通路(IIS)密切相关^[31-33]。在家蚕、果蝇等物

种中,20E能够作用于脂肪体组织,通过抑制IIS通路活性,实现对幼虫生长速度的有效调控^[22]。本研究中ILP(类胰岛素多肽)的差异表达,提示胰岛素信号与蜕皮激素通路可能存在交叉调控,这一现象在棉铃虫^[34-35]和褐飞虱中已有类似报道^[36],但其在鞘翅目昆虫中的功能仍需深入探究。

本研究发现了大量代谢通路的差异基因,其中脂肪酸合酶(*FAS*)在20E处理后显著上调,这与前期成虫研究中20E减少脂质含量的结果^[14]看似矛盾,但可能反映了幼虫与成虫阶段代谢需求的差异。幼虫处于快速生长和蜕皮周期,*FAS*上调或促进脂肪酸合成,为表皮构建和能量储备提供原料;而成虫滞育期需要抑制脂质消耗,故20E对*FAS*的调控可能具有发育阶段特异性。这一现象暗示20E可能通过动态调节脂代谢通路,适应不同发育阶段的生理需求。此外,蜕皮激素受体(*EcR*)、超气门蛋白(*USP*)等20E信号通路关键基因在转录组中被鉴定,进一步支持20E通过经典*EcR/USP*异源二聚体激活下游基因表达的机制^[6-7]。这种激素-受体互作模式已被证实对昆虫幼虫滞育具有重要调控作用^[37]。提示20E可能也通过该通路进而调控幼虫发育进程。然而,沙葱萤叶甲幼虫中*EcR*与*USP*的具体互作机制及其对靶基因的调控网络仍需进一步验证。

本研究首次系统揭示了20E调控沙葱萤叶甲幼虫发育的转录组特征,为阐明其分子机制奠定了理论基础。FOXO通路与代谢相关基因的富集提示,干扰能量代谢或抗氧化系统可能成为控制该虫种群的新靶点。然而,研究仍存在局限性:例如,部分差异基因的功能注释依赖于近缘物种,需通过RNAi等技术进一步验证其功能。未来研究可结合多组学分析与基因编辑技术,解析关键基因(如*EcR*, *FOXO*)的功能及其调控网络,并开发基于20E信号干扰的生态友好型杀虫剂,为内蒙古草原生态安全与害虫可持续治理提供科学依据。

4 结论

本研究通过转录组测序,获得沙葱萤叶甲幼虫75 536条Unigene序列,鉴定出500个20E响应差异基因,显著富集于FOXO信号通路、代谢调控等关键通路,筛选出*EcR*, *USP*, *FOXO*等核心候选基因,qRT-PCR验证证实数据可靠,首次揭示了20E

调控沙葱萤叶甲幼虫发育的分子网络,为绿色防控提供了数据支撑。鉴于候选基因功能及调控机制尚需验证,下一步将聚焦20E信号通路核心元件及差异基因,通过合成特异性dsRNA并显微注射干扰幼虫内源表达,系统检测蜕皮成功率、发育历期等表型及下游基因表达,明确基因功能并构建完整调控网络,为精准防控技术研发奠定基础。

参考文献

- [1] 杨星科,黄顶成,葛斯琴,等. 内蒙古百万亩草场遭受沙葱萤叶甲暴发危害[J]. 昆虫知识,2010,47(4):812
YANG X K, HUANG D C, GE S Q, et al. Millions of acres of grassland in Inner Mongolia suffered from the outbreak of *Galeruca daurica* [J]. Chinese Bulletin of Entomology, 2010, 47(4):812
- [2] 昊翔,周晓榕,庞保平,等. 寄主植物对沙葱萤叶甲幼虫生长发育及取食的影响[J]. 草地学报,2014,22(4):854-858
HAO X, ZHOU X R, PANG B P, et al. Effects of host plants on feeding amount, growth and development of *Galeruca daurica* joannis larvae (Coleoptera: Chrysomelidae) [J]. Acta Agrestia Sinica, 2014, 22(4):854-858
- [3] 马崇勇,伟军,李海山,等. 草原新害虫沙葱萤叶甲的初步研究[J]. 应用昆虫学报,2012,49(3):766-769
MA C Y, WEI J, LI H S, et al. Preliminary studies on leaf beetle, *Galeruca daurica* on grassland [J]. Chinese Journal of Applied Entomology, 2012, 49(3):766-769
- [4] 段天凤. MicroRNA在沙葱萤叶甲生殖滞育中的调控作用[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2022:1
DUAN T F. Function of microRNAs in the regulation of reproductive diapause in *Galeruca daurica* [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2022:1
- [5] 刘鸿. 桔小实蝇JH信号通路BdTaiman基因生理功能研究[D]. 重庆:西南大学,2018:4
LIU H. Physiological function of *BdTaiman* in JH signaling pathway of *Bactrocera dorsalis* (Hendel) [D]. Chongqing: Southwest University, 2018:4
- [6] YAO T P, FORMAN B M, JIANG Z, et al. Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes[J]. Nature, 1993, 366(6454):476-479
- [7] YAMANAKA N, ROMERO N M, MARTIN F A, et al. Neuroendocrine control of *Drosophila* larval light preference [J]. Science, 2013, 341(6150):1113-1116
- [8] 于静. 20-羟基蜕皮酮通过核受体EcR和转录因子FoxO调控意大利蜜蜂幼虫化蛹的研究[D]. 泰安:山东农业大学,2023:7-16
YU J. 20-hydroxyecdysone regulates pupation of *Apis mellifera ligustica* larvae through nuclear receptor EcR and transcription factor FoxO [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2023:7-16
- [9] YAMANAKA N. Ecdysteroid signalling in insects-From biosynthesis to gene expression regulation [J]. Advances in Insect Physiology, 2021, 60:1-36
- [10] GONG Y W, SUN Y J, KUANG S J, et al. 20-Hydroxyecdysone regulates pupal fatty acid metabolism, maintaining lipid metabolic homeostasis in *Chilo suppressalis* [EB/OL]. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.70053>, 2025-04-18/2025-06-11
- [11] HOSSAIN M S, LIU Y, ZHOU S, et al. 20-Hydroxyecdysone-induced transcriptional activity of FoxO upregulates brummer and acid lipase-1 and promotes lipolysis in *Bombyx* fat body [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2013, 43(9):829-838
- [12] JI C H, ZHANG N, JIANG H, et al. 20-hydroxyecdysone regulates expression of methionine sulfoxide reductases through transcription factor FOXO in the red flour beetle, *Tribolium castaneum* [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2021, 131:103546
- [13] HUANG S H, YANG H H, CHEN X X, et al. Genomic transcriptional response to 20-hydroxyecdysone in the fat body of silkworm, *Bombyx mori* [J]. Gene Reports, 2018, 13:134-140
- [14] 姚知含,李玲,庞保平,等. 沙葱萤叶甲对蜕皮激素响应的转录组分析[J]. 环境昆虫学报,2023,45(1):155-162
YAO Z H, LI L, PANG B P, et al. Transcriptome analysis of the adult *Galeruca daurica* (Coleoptera: Chrysomelidae) in response to 20-hydroxyecdysone [J]. Journal of Environmental Entomology, 2023, 45(1):155-162
- [15] TAN Y, ZHOU X R, PANG B P. Reference gene selection and evaluation for expression analysis using qRT-PCR in *Galeruca daurica* (Joannis) [J]. Bulletin of Entomological Research, 2017, 107(3):359-368
- [16] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4):402-408
- [17] CAI M J, ZHAO W L, JING Y P, et al. 20-Hydroxyecdysone activates Forkhead box O to promote proteolysis during *Helicoverpa armigera* molting [J]. Development, 2016, 143(6):1005-1015
- [18] VAN DER HORST A, BURGERING B M T. Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2007, 8(6):440-450
- [19] MARTINS R, LITHGOW G J, LINK W. Long live FOXO: unraveling the role of FOXO proteins in aging and longevity [J]. Aging Cell, 2016, 15(2):196-207
- [20] SONG J B, LI Z Q, ZHOU L, et al. FOXO-regulated OSER1 reduces oxidative stress and extends lifespan in multiple species [J]. Nature Communications, 2024, 15:7144
- [21] DEBÈS C, PAPADAKIS A, GRÖNKE S, et al. Ageing-associated changes in transcriptional elongation influence longevity [J]. Nature, 2023, 616(7958):814-821
- [22] YUAN D W, ZHOU S, LIU S N, et al. The AMPK-PP2A axis in insect fat body is activated by 20-hydroxyecdysone to antagonize insulin/IGF signaling and restrict growth rate [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2020, 117(17):9292-9301

- [23] 赵金波,刘盈序,黄合特,等. AMPK/mTOR信号通路交叉调控在动物细胞营养代谢的作用[J]. 中国饲料,2023(17):1-6
ZHAO J B, LIU Y X, HUANG H T, et al. Cross-talking of mTOR and AMPK signaling pathway in nutrient metabolism of animal cells[J]. China Feed, 2023(17):1-6
- [24] QU M B, SUN S P, LIU Y S, et al. Insect group II chitinase OfChtII promotes chitin degradation during larva - Pupa molting[J]. Insect Science, 2021, 28(3):692-704
- [25] ZHANG X, WANG Y, ZHANG S F, et al. RNAi-mediated silencing of the chitinase 5 gene for fall webworm (*Hyphantria cunea*) can inhibit larval molting depending on the timing of dsRNA injection[J]. Insects, 2021, 12(5):406
- [26] ZHAO D, LIU Z R, WU H, et al. RNA interference-mediated functional characterization of Group I chitin deacetylases in *Holotrichia parallela* Motschulsky[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2021, 173:104770
- [27] LU J B, GUO J S, CHEN X, et al. Chitin synthase 1 and five cuticle protein genes are involved in serosal cuticle formation during early embryogenesis to enhance eggshells in *Nilaparvata lugens*[J]. Insect Science, 2022, 29(2):363-378
- [28] NIWA R, NIWA Y S. Enzymes for ecdysteroid biosynthesis: their biological functions in insects and beyond[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2014, 78(8):1283-1292
- [29] ONO H, MORITA S, ASAKURA I, et al. Conversion of 3-oxo steroids into ecdysteroids triggers molting and expression of 20E-inducible genes in *Drosophila melanogaster*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2012, 421(3):561-566
- [30] MARCHAL E, BADISCO L, VERLINDEN H, et al. Role of the *Halloween* genes, *Spook* and *Phantom* in ecdysteroidogenesis in the desert locust, *Schistocerca gregaria*[J]. Journal of Insect Physiology, 2011, 57(9):1240-1248
- [31] RUSTEN T E, LINDMO K, JUHÁSZ G, et al. Programmed autophagy in the *Drosophila* fat body is induced by ecdysone through regulation of the PI3K pathway[J]. Developmental Cell, 2004, 7(2):179-192
- [32] COLOMBANI J, BIANCHINI L, LAYALLE S, et al. Antagonistic actions of ecdysone and insulins determine final size in *Drosophila*[J]. Science, 2005, 310(5748):667-670
- [33] KESHAN B, THOUNAOJAM B, KH S D. Insulin and 20-hydroxyecdysone action in *Bombyx mori*: glycogen content and expression pattern of insulin and ecdysone receptors in fat body[J]. General and Comparative Endocrinology, 2017, 241:108-117
- [34] LI Y X, SHAO B Y, HOU M Y, et al. Succinylation enables IDE to act as a hub of larval tissue destruction and adult tissue reconstruction during insect metamorphosis [J]. Science Advances, 2025, 11(6):eads0643
- [35] 李艳丽. 20-羟基蜕皮激素调控G蛋白偶联受体及胰岛素途径促进昆虫变态发育的研究[D]. 济南:山东大学, 2021:46-74
LI Y L. Regulation of G protein-coupled receptors by 20-hydroxyecdysone and promotion of insect metamorphosis through insulin pathway [D]. Jinan: Shandong University, 2021:46-74
- [36] CHEN W W, CHEN L E, LI D, et al. Two alternative splicing variants of a sugar gustatory receptor modulate fecundity through different signalling pathways in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* [J]. Journal of Insect Physiology, 2019, 119:103966
- [37] DENLINGER D L. Regulation of diapause [J]. Annual Review of Entomology, 2002, 47:93-122

(责任编辑 闵芝智)