



昆虫滞育诱导的分子调控机制*

姜春艳^{1,2**} 武强^{2,3**} 杨念婉² 黄聪³ 刘万学² 钱万强³ 万方浩^{1,2,3***}

(1. 青岛农业大学植物医学学院, 青岛 266109; 2. 中国农业科学院植物保护研究所植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193; 3. 中国农业科学院农业基因组研究所, 农业农村部基因组分析实验室, 广东岭南现代农业科学与技术实验室, 深圳 518120)

摘要 滞育是昆虫长期适应不利环境的重要对策之一, 对昆虫的生存、繁衍和进化都具有重要意义。滞育一般分为滞育前期、滞育期和滞育后期 3 个阶段, 其中, 滞育前期包括滞育诱导期和滞育准备期, 是确保昆虫顺利进入滞育的重要时期。本文首先简要概括了光周期、温度、湿度、食料等外界环境因素在不同昆虫滞育诱导中的作用; 然后系统综述了滞育激素、保幼激素、蜕皮激素、促前胸腺激素和胰岛素等内分泌激素, 生物钟通路的节律基因, 以及 DNA 甲基化、小 RNA 和组蛋白修饰等表观遗传修饰在昆虫滞育过程, 尤其是滞育诱导调控中的作用, 并以黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的生殖滞育为例, 总结了昆虫滞育诱导调控的分子通路; 最后就目前昆虫滞育诱导调控研究中亟待解决的问题和后续重点研究方向进行了探讨, 展望了将昆虫滞育研究应用于害虫防控实践的主要策略和前景。

关键词 滞育诱导; 环境因素; 生物钟; 内分泌激素; 表观遗传修饰

The molecular regulation of diapause induction in insects

JIANG Chun-Yan^{1,2**} WU Qiang^{2,3**} YANG Nian-Wan² HUANG Cong³
LIU Wan-Xue² QIAN Wan-Qiang³ WAN Fang-Hao^{1,2,3***}

(1. College of Plant Health and Medicine, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China;

2. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 3. Guangdong Laboratory for Lingnan Modern Agriculture, Shenzhen, Genome Analysis Laboratory of the Ministry of Agriculture and Rural Area, Agricultural Genomics Institute at Shenzhen, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shenzhen 518120, China)

Abstract Diapause is a strategy used by insects to withstand adverse environmental conditions that is critical to the survival, propagation and evolution of many species. Diapause has three stages; pre-diapause, diapause and post-diapause. Pre-diapause is comprised of an induction and preparation period and is important to successful diapause. We here summarize the environmental factors related to diapause induction, review the function of different endocrine hormones and circadian genes, as well as epigenetic modifications including DNA methylation, small RNA and histone modifications, in the regulation of diapause induction. We also summarize the molecular pathways of diapause induction with reference to the reproductive diapause of *Drosophila melanogaster*. Finally, we discuss unresolved questions in the study of insect diapause induction and prospects for the application of diapause research in pest control.

Key words diapause induction; environment factors; circadian clock; endocrine hormone; epigenetic modifications

滞育是一种发育停滞现象, 也是一些昆虫长期适应不利环境的对策之一。通常, 在不利环境到来前, 昆虫会感受环境信号变化, 然后由中枢

神经系统接收信号并传递给内分泌调控系统, 最终诱导昆虫滞育, 导致生理生化指标发生变化 (Hahn and Denlinger, 2007, 2011)。滞育对昆

*资助项目 Supported projects: 国家重点研发计划 (2017YFC1200600)

**共同第一作者 Co-first authors, E-mail: 1593153924@qq.com; wuqiang@caas.cn

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: wangfanghao@caas.cn

收稿日期 Received: 2020-04-13; 接受日期 Accepted: 2020-07-24

虫种群自身的意义主要体现在三方面：一是使昆虫高度适应不良环境；二是使昆虫的生活史与季节变化相适应；三是使昆虫种群发育整齐（Denlinger, 2002；王满囤和李周直, 2004）。因此，滞育对昆虫的生存、繁衍和进化均具有重要作用。

昆虫滞育分为滞育前期、滞育期和滞育后期三个时期，滞育前期是确保昆虫顺利进入滞育的关键时期，包括滞育诱导期和滞育准备期两个阶段；滞育期包括滞育启动、滞育维持和滞育解除3个阶段；滞育后期是指滞育打破后时期，此时，当具备有利环境条件后，昆虫会出现继续发育现象（Kostal, 2006）。其中，昆虫滞育诱导期发生于不利环境到来前，此时，昆虫能够感受环境信号变化并做出反应；滞育准备期一般出现在昆虫滞育诱导期之后或者与滞育诱导期交叉出现，此时，昆虫体内基因水平发生改变致使代谢等生理活动出现变化，为进入滞育做准备。滞育诱导期是昆虫成功进入滞育不可或缺的重要阶段，也是目前滞育研究的热点之一。

昆虫滞育诱导主要是由环境因素和内分泌系统共同调控（Denlinger, 2002；王满囤和李周直, 2004；徐卫华, 2008）。当外界环境（如光周期、温度、湿度和食物等）出现变化时，昆虫可以经生物钟通路感受信号变化并进行传递，信号到达内分泌系统后会改变保幼激素、蜕皮激素和促前胸腺激素等内源激素的分泌量，进而调控下游相关基因的表达量，最终诱导昆虫进入滞育状态（Emerson *et al.*, 2009；梁辉等, 2010）。此外，近年来有一些研究表明DNA甲基化、小RNA和组蛋白修饰等表观遗传修饰也参与昆虫滞育诱导的调控（Reynolds *et al.*, 2013；Poupardin *et al.*, 2015；Pegoraro *et al.*, 2016）。本文对国内外有关昆虫滞育诱导的研究进行了归纳总结，简要概括了光周期、温度、湿度，食料等外界环境因素在不同昆虫滞育诱导中的作用，重点阐述了诱导昆虫滞育的分子调控机制，并就目前昆虫滞育诱导研究中存在的问题进行了讨论，以期为后续深入研究昆虫滞育诱导的理论和机制提供参考。

1 诱导昆虫滞育的环境因素

1.1 光周期在诱导昆虫滞育中的作用

光周期是指昼夜周期中光期和暗期长短的交替变化，具有季节性特点，是昆虫对未来一定时期内环境变化趋势进行预测的最可靠的信息来源，也是影响大多数昆虫滞育诱导的主导因素（Tauber and Kyriacou, 2001）。昆虫滞育诱导的光周期反应类型主要包括短日照滞育型、长日照滞育型、中间滞育型和长日照-短日照滞育型。短日照滞育型是指当日照长度低于临界光周期时，昆虫便会出现相应虫态的滞育，这也是最为常见的昆虫滞育类型；长日照滞育型昆虫在日照长度高于临界光周期时便会在相应虫态进入滞育；短日照-长日照滞育型昆虫则除了中间日照时长的光周期范围之外的其他光照时长均可以诱导其进入滞育；而中间滞育型昆虫恰好与短日照-长日照滞育型昆虫相反，这类昆虫的滞育仅发生在中间时长的光周期范围内，而在较长或较短日照条件下均正常发育（肖海军等, 2004）。

1.2 温度在诱导昆虫滞育中的作用

温度作为诱导昆虫滞育的重要环境因素，在改变光周期效应、调控滞育强度等方面都具有重要作用（朱涤芳等, 1992；马国兰等, 2015）。在一些昆虫的滞育诱导过程中，温度起主要调控作用。如广赤眼蜂 *Trichogramma evanescens* Westwood 在 15 °C 条件下的滞育率达 91%，且在此温度条件下光周期对其滞育率几乎没有影响（朱涤芳等, 1992）；飞蝗胚胎滞育是由孵化温度和母代效应共同决定的，马国兰等（2015）在低温和变温诱导对飞蝗胚胎发育影响的研究中发现，特定的低温和变温处理不仅没有诱导胚胎滞育的发生，反而促进后期胚胎在常温下的发育。

另外，在主要由光周期诱导滞育的昆虫中，温度也起到不同程度的影响。如草地螟 *Loxostege sticticalis* Linne 在光周期 L8 : D16、温度 18 °C 条件下，滞育率为 64.9%，在相同光周期，温度变为 22 °C 条件时，其滞育率则上升为

88.0% (黄少虹等, 2009); 苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* L. 在长光照 (L 16 : D 8)、20 °C 和 30 °C 的温度条件下, 滞育率分别为 99.6% 和 85.9% (刘月英等, 2015)。另外, 寄生性昆虫的滞育诱导效果还受寄主状态, 诱导时期和历期等影响, 如周淑香等 (2014) 研究发现, 松毛虫赤眼蜂 *Trichogramma dendrolimi* 的最佳滞育诱导条件为其寄主柞蚕 *Antheraea pernyi* 卵在 26 °C 培养 40 h 后, 转入 10 °C 连续低温诱导 31 d; 张俊杰等 (2018) 研究发现, 松毛虫赤眼蜂从卵期到预蛹初期均可被诱导滞育, 以幼虫中期诱导效果最佳, 且诱导温度和历期对其滞育诱导都有影响。

值得注意的是, 有些昆虫滞育特性更加复杂, 其不同的地理种群也可能表现出不同的光周期反应类型。如大猿叶虫 *Colaphellus bozoringi* Baly 江西种群在高温 (>20 °C) 条件下为典型的长日照滞育型昆虫, 在其他温度 (≤20 °C) 条件下却出现滞育与光周期无关的现象 (Xue *et al.*, 2002); 而泰安种群和哈尔滨种群的滞育则主要取决于日平均气温, 与光周期无关 (徐强, 2007; 周昱晨, 2007)。亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* (Guenée) 的不同地理种群也出现了不同的滞育类型, 郭建青等 (2013) 研究发现在吉林农安、河北衡水、广东惠州和海南海口等地该虫存在中间滞育型和短光照滞育型 2 种滞育类型, 而于洪春等 (2018) 研究发现哈尔滨的亚洲玉米螟种群则属于典型的短日照滞育型昆虫。

1.3 其他因素对昆虫滞育诱导的影响

对于有些昆虫而言, 食物、湿度和种群密度对其滞育诱导也发挥着一定作用, 一般是作为光周期和温度的协同或调节因子, 而非决定因素 (Usua, 1970; Wardhaugh, 1980; Bell, 1976)。如亚澳白裙夜蛾 *Busseola fusca* (Fuller) 取食生长期为 6-7 周的玉米时, 滞育率为 24%, 而取食生长期为 12-15 周的玉米时, 其滞育率则高达 91% (Usua, 1970); 大猿叶虫在 25 °C、光周期 L12 : D12 的条件下, 取食 9 种不同的食料时滞育率会有明显差异, 其中取食精半黄小白菜后滞

育率最低为 32.26%, 而其他 8 种食料间无显著差异, 滞育率均在 64.33%-70.63% 范围内 (周昱晨等, 2007)。在较低湿度条件下, 澳洲疫蝗 *Chortoicetes terminifera* (Walker) 的卵滞育率明显下降 (Wardhaugh, 1980); Bell (1976) 研究发现仓储害虫粉斑螟蛾 *Ephestia elutella* (Hübner) 幼虫在种群密度较高的条件下会发生滞育。

2 昆虫滞育诱导的分子调控机制

当光周期等环境因素发生改变时, 昆虫生物钟信号分子作为重要的输入模块可以感知环境变化, 而内源激素作为重要的中间模块在接受生物钟信号后, 以适当的速率和时间进行合成、分泌和降解, 最终诱导昆虫滞育, 出现一系列的生理变化 (Denlinger, 2002)。此外, 近期研究还发现 DNA 甲基化、小 RNA 和组蛋白甲基化和乙酰化修饰等表观修饰对昆虫滞育诱导的调控也发挥着不容忽视的作用。

2.1 昆虫滞育诱导的内分泌学研究

昆虫内分泌系统在接收上游信号后, 主要通过改变各种内源激素的分泌量来传递上游信息, 对下游相关信号通路进行调控 (Denlinger, 2002)。对于不同虫态的滞育昆虫, 其激素调控机理存在差异。相关综述已经对不同种激素在昆虫不同虫态滞育诱导和解除等过程中的调控作用进行了总结 (王满囤和李周直, 2004; 徐卫华, 2008; Denlinger *et al.*, 2012)。本文以模式昆虫黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 为例, 结合相关研究和综述 (Richard *et al.*, 2001; Wu and Brown, 2006; Emerson *et al.*, 2009), 对其生殖滞育诱导调控所涉及的主要分子通路进行了总结并绘制了其核心调控机制的示意图 (图 1)。

2.1.1 滞育激素

滞育激素 (Diapause hormone, DH) 是一种由昆虫咽下神经节分泌的肽类激素, 该激素是 20 世纪 50 年代初由 Fukuda (1952) 和 Hasegawa (1957) 各自独立在家蚕 *Bombyx mori* (L.) 中分离获得, 并分别将其命名为滞育因子和滞育激素 (龚椿营, 2017)。滞育激素主

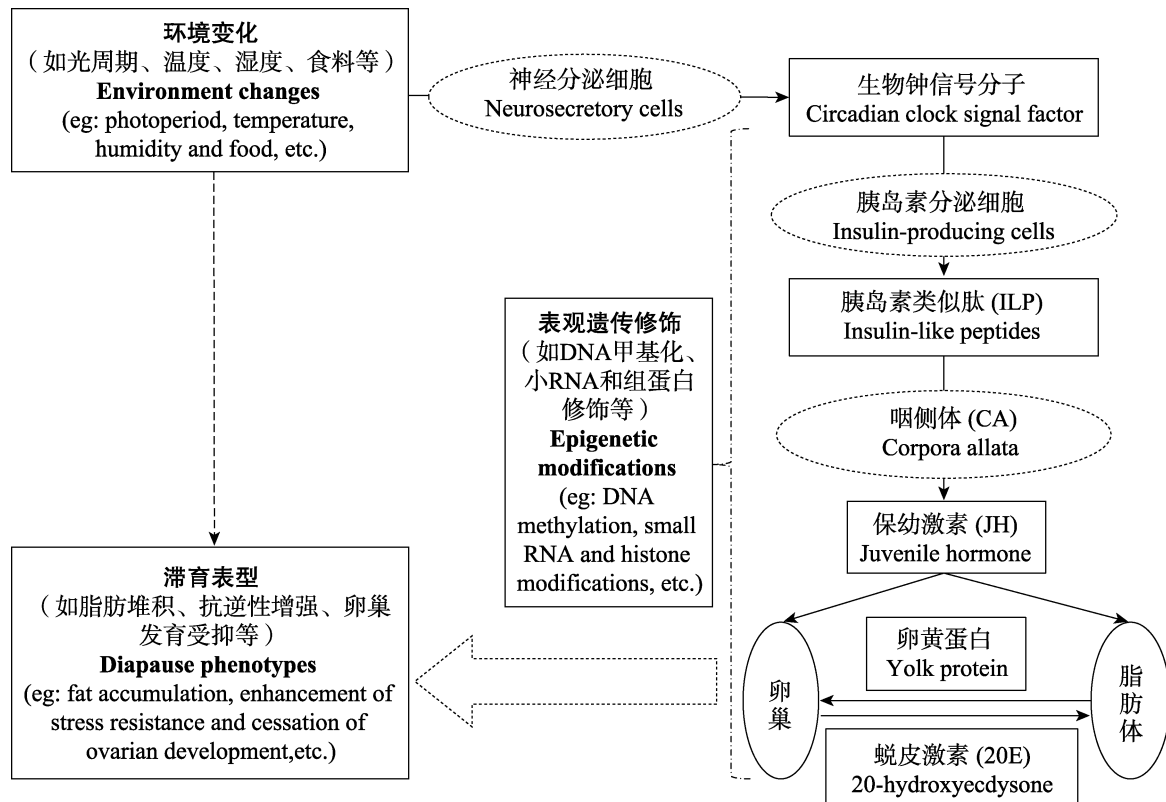


图 1 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 生殖滞育诱导的分子调控 (模式图)

Fig. 1 The molecular regulation of reproductive diapause induction in *Drosophila melanogaster*

要影响卵滞育型昆虫的滞育诱导,具有调控卵内生理生化代谢、推迟发育成熟时间的作用 (Yamashita, 1996)。滞育激素不仅参与诱导家蚕的卵滞育活动,还具有激活家蚕前胸腺合成蜕皮激素的作用 (Watanabe *et al.*, 2007)。

多化性家蚕品系滞育激素的研究中发现:过表达滞育激素基因能够影响滞育相关基因的表达,导致体内小分子物质海藻糖酶活性增强和山梨糖醇含量降低的生理现象,但不足以使其后代蚕卵全部表现为滞育 (吴大洋, 2002; 龚椿营, 2017);滞育激素对甜菜夜蛾 *Spodoptera exgu* Hübner 幼虫的滞育诱导也具有重要调控作用 (徐军, 2007)。另外,滞育激素对竹蠹 *Omphisa fuscidentalis* Hampson (幼虫滞育) 和棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) (蛹滞育) 的滞育解除起关键作用 (Zhang *et al.*, 2004; Suang *et al.*, 2019),可见滞育激素对不同滞育型的昆虫作用不同。

2.1.2 保幼激素 保幼激素 (Juvenile hormone,

JH)由咽侧体分泌,可以调控卵黄原蛋白的形成,并在昆虫的发育、变态和抗逆性等方面具有重要影响 (Riddiford, 2008)。保幼激素在昆虫生殖滞育中也起到重要的调控作用,高俏等 (2018) 对其调控机制及其上游信号和下游网络的相关研究进展进行了较系统的综述。

保幼激素的减少是成虫滞育的主要原因,将赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* (Herbst) 中保幼激素合成通路的关键基因保幼激素甲基转移酶 *JHAMT* 沉默后,其卵黄原蛋白的合成受抑,并出现生殖滞育现象;而且,滴加外源保幼激素可打破其生殖滞育 (Parthasarathy *et al.*, 2010)。Liu 等 (2016) 将大猿叶虫保幼激素受体 *Met* 基因沉默后,会出现卵巢发育受抑和脂肪堆积等生殖滞育表型。

2.1.3 蜕皮激素 蜕皮激素 (20-hydroxyecdysone, 20E)是由前胸腺分泌合成的一类甾醇类化合物,其除了对昆虫的发育、变态及其繁殖等生命活动具有重要作用,还常与保幼激素协同作用调控昆

虫变态等生命活动进程。蜕皮激素的作用方式是常与其受体 EcR 结合后再与关键蛋白 USP 结合形成转录复合体, 参与蜕皮激素信号途径, 进而调控昆虫的发育 (Iwema *et al.*, 2009)。大量研究显示蜕皮激素在幼虫和蛹滞育昆虫的滞育解除过程中发挥关键性作用。

在对麻蝇科昆虫 *Sarcophaga crassipalpis* Macquart 的研究中发现: *usp* 基因在滞育诱导期表达量持续降低, 直至滞育后期 *usp* 基因才重新开始上调, 此结果表明蜕皮激素对其蛹滞育的解除发挥关键性调控作用 (Rinehart *et al.*, 2001)。最新研究发现蜕皮激素参与调控柑橘大实蝇 *Bactrocera minax* (Enderlein) 的蛹滞育终止过程, 其具有增强昆虫个体代谢能力, 促进进一步发育的功能 (Dong *et al.*, 2019)。此外, 保幼激素的下降和蜕皮激素的增加还可以对鳞翅目害虫竹蠹幼虫的滞育终止进行调控 (Singtripop *et al.*, 2002)。

2.1.4 促前胸腺激素 促前胸腺激素 (Prothoracicotrophic hormone, PTTH) 由头部的脑神经分泌细胞产生, 具有激活前胸腺 (Prothoracic glands, PG) 分泌蜕皮激素的作用。脑释放促前胸腺激素发挥调控作用主要发生在昆虫滞育早期, 促前胸腺激素的缺乏被认为是目前导致蛹滞育出现的最主要原因 (王满囤和李周直, 2004)。

棉铃虫在滞育早期 (化蛹后不超过 12 h) 可以释放促前胸腺激素, 中后期则不再释放促前胸腺激素, 促前胸腺激素含量会出现明显下降 (王方海等, 2002)。因此, 滞育早期摘除棉铃虫蛹脑会导致昆虫促前胸腺激素含量降低, 昆虫出现发育停滞现象; 中后期其发育不受脑释放的促前胸腺激素控制, 即使此时进行脑的摘除也不会出现滞育现象 (王方海等, 2002)。在对甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* (L.) 的研究中发现, 在初滞育蛹中注入促前胸腺激素可以成功诱导其蛹发育, 这证明了促前胸腺激素含量的缺乏是导致其蛹滞育的关键因素 (Mizoguchi *et al.*, 2013)。

2.1.5 胰岛素 胰岛素是由胰岛 β 细胞分泌的蛋白质类激素, 具有调节昆虫体内糖、脂肪和蛋

白代谢的作用, 从而影响昆虫生长发育、衰老和行为等一系列生长发育过程 (Chistiakova, 2008; 谢鹏飞等, 2018)。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 (Tauber and Kyriacou, 2001; Sim and Denlinger, 2013)。

当环境因素发生改变时, 果蝇脑中的神经分泌细胞 (Neurosecretory cell, NSC) 受刺激会分泌类胰岛素蛋白 ILP, 促进胰岛素受体 (Insulin receptor, IR) 和胰岛素受体底物 (Insulin receptor substrate) 相结合, 进而调控咽侧体合成保幼激素, 作用于卵巢和脂肪体, 从而抑制卵黄蛋白的形成 (Rinehart *et al.*, 2001) (图 1)。研究发现胰岛素类似肽在秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 幼虫滞育过程中也发挥着重要调控作用 (Matsunaga *et al.*, 2016)。

另外, 在尖音库蚊 *Culex pipiens* 生殖滞育的研究中进一步发现, 胰岛素信号作为保幼激素的上游信号分子, 能够诱导昆虫出现滞育表型, 而且滴加外源激素 (如保幼激素) 可逆转干扰胰岛素受体 IR 或下游 *foxo* 基因后导致的滞育表型, 使其正常发育 (Sim and Denlinger, 2008)。蛋白激酶 B (Protein kinase B, PKB/AKT) 在胰岛素等因子的激活下能够参与昆虫众多的生命活动进程。AKT 磷酸化后可以激活磷脂酰肌醇-3 激酶 (Phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K), 从而导致胰岛素下游 FOXO 通路等多个下游基因被激活, 使昆虫出现细胞周期受抑、抗性增强、代谢减弱等滞育表型 (Williams *et al.*, 2006; Siddle, 2011; Manning and Toker, 2017)。最新研究发现, 家蚕中 AKT 信号通路作为胰岛素的上游调控基因参与其卵滞育诱导的调控 (Gu *et al.*, 2019)。由此可见, 胰岛素信号通路不是独立作用于昆虫滞育的调控, 其不仅接受上游生物钟通路信号还将信号传递给下游内分泌通路中的保幼激素通路。

2.2 生物钟通路在昆虫滞育诱导中的作用

生物钟对于昆虫而言, 能够准确计时其一系列的重要行为和生理进程, 对其细胞分化、型变、

交配, 迁徙和滞育等生命活动都具有重要意义 (Sakai and Ishida, 2001; Matsuo *et al.*, 2003; Ikeno *et al.*, 2010; Sauders, 2020)。昆虫的生物钟由三部分组成, 包括输入系统、核心时钟系统和输出系统。输入系统主要负责接受环境信号并将信号传递到振荡器; 核心时钟系统主要受振荡器的调控, 能够接受外界信号, 并引起节律基因的启动和表达; 输出系统主要功能是将振荡器中的信号传递到效应器, 调控昆虫的生理生化反应 (Cermakian and Sassonecorsi, 2000; 陈文峰等, 2011)。

昼夜节律基因对生物钟通路的调控起关键作用, 目前已发现的核心基因主要包括 *period* (*per*)、*timless* (*tim*)、*cycle* (*cyc*)、*clock* (*clk*)、*cryptochrome* (*cry*)和 *vri* (*vri*)等 (Sakai and Ishida, 2001; Ikeno *et al.*, 2010)。通过核心反馈环路调控昼夜节律生物钟的调控通路在果蝇中已研究地较为透彻, 其调控模式主要如下: CYC-CLK 异二聚体在细胞核中作为转录因子促进 *per* 和 *tim* 基因的表达; 细胞核中 *per* 和 *tim* 的 mRNA 在傍晚被运输到细胞质中, 分别翻译成 PER 和 TIM 蛋白, 之后, 形成 PER-TIM 二聚体; 一方面, PER-TIM 二聚体可以进入细胞核中发生降解, 造成其蛋白水平下降并且引发 *cyc* 和 *clk* 基因结合形成二聚体 CYC-CLK, 抑制 PER、TIM 蛋白的降解, 使 *per* 和 *tim* 继续在细胞核中发生转录; 另一方面, 在光照条件下, CRY 和 TIM 蛋白能够结合形成二聚体 CRY-TIM, 从而抑制二聚体 PER-TIM 发挥作用并导致其 TIM 蛋白的降解 (Emerson *et al.*, 2009)。

节律基因对昆虫滞育诱导的调控模式包括正反馈和负反馈 2 种, 以短光照滞育型昆虫为例, 正反馈调控是指昆虫该基因被沉默后, 无论光周期如何改变, 均会出现滞育现象; 负反馈调控机制是指昆虫该基因被沉默后, 则无论光周期条件如何, 均会出现不滞育现象 (Ikeno *et al.*, 2010)。因此, 对于短光照滞育昆虫的反馈调控基因的研究: 干扰昆虫该基因后放回原光照继续饲养, 若在长光照条件下观察到昆虫出现滞育现

象, 则证明该基因为正反馈调控基因; 若在短光照条件下观察到昆虫出现不滞育或者滞育率降低现象, 则证明该基因为负反馈调控基因。

通常情况下, 同一节律基因对不同昆虫的反馈作用也不尽相同。其中, 对于大多数滞育昆虫而言, *per* 基因都被认为是其重要的负反馈调控基因, 该基因被沉默后会使短光照滞育型昆虫在短光照下不能进入滞育状态, 如点蜂缘蝽 *Riptortus pedestris* (Fabricius) (Ikeno *et al.*, 2010; Ikeno *et al.*, 2011a, 2011b) 和尖音库蚊 *Culex pipiens* L.等 (Meuti *et al.*, 2015); 但是对于个别昆虫而言, 该基因也会起正反馈调控作用, 如将同样是短光照滞育型昆虫麻蝇 *Sarcophaga bullata* Parker 的 *per* 基因沉默后, 其在长光照条件下仍会出现滞育表型 (Han and Denlinger, 2009)。最新研究发现, 丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis* (Walker) 的 *per* 基因被干扰后, 不仅会出现蛹滞育推迟的现象, 还会引起其他基因表达量的变化 (Benetta *et al.*, 2019)。 *cyc* 基因调控昆虫滞育的反馈机制也存在差异。短光照滞育型昆虫点蜂缘蝽的 *cyc* 基因被沉默后, 即使在长光照条件下仍会出现雌虫卵巢发育受抑、雄虫附腺紧缩等生殖滞育表型 (Ikeno *et al.*, 2010)。但是, 干扰尖音库蚊的 *cyc* 基因后, 昆虫发育状态无显著变化 (Meuti *et al.*, 2015)。

另外, 节律基因与保幼激素在调控昆虫滞育方面也存在着紧密联系, Ikeno 等 (2010) 对点蜂缘蝽生殖滞育的研究中发现保幼激素的应用与可以打破在长光照条件下干扰 *cyc* 基因后出现的滞育现象, 诱导雌虫卵巢继续发育, 但是对短光照条件下干扰 *per* 基因后出现的非滞育现象起协同作用, 能够促进昆虫继续发育。

2.3 表观遗传修饰对昆虫滞育诱导的调控

表观遗传修饰是指在不改变基因核苷酸序列的情况下, 通过 DNA 甲基化、小 RNA 和组蛋白修饰等调控而导致基因表达水平的变化, 其对昆虫的生长、发育、繁殖及衰老等在内的整个生命过程都发挥着关键性作用, 具体表现在抗逆性、代谢调控和细胞增殖等多个方面 (Bonasio,

2015; Mukherjee *et al.*, 2015)。近年来, 表观遗传修饰在昆虫滞育诱导过程中的作用也已经在果蝇、麻蝇和丽蝇蛹集金小蜂等多种昆虫的研究中得到证实 (Reynolds, 2017)。

2.3.1 DNA 甲基化对昆虫滞育诱导的调控 DNA 甲基化是表观遗传修饰的重要形式, 它不仅对生物的生长发育具有重要的调控作用, 而且参与了生物对各种逆境胁迫的应答过程 (Bonasio, 2015; 陈玮等, 2015)。DNA 的甲基化主要通过 DNA 甲基转移酶来实现, 主要包括 Dnmt1、Dnmt2 和 Dnmt3 三种类型, 其中 Dnmt1 为维持甲基转移酶, 负责维持细胞分裂过程中已经存在的甲基化模式; Dnmt3 被称为从头甲基化酶, 负责建立新的甲基化模式; 而 Dnmt2 对 DNA 表现出较弱的甲基转移酶活性, 已被鉴定为属于一种活性 RNA 甲基转移酶。

近年来, 多项研究发现 DNA 甲基化参与昆虫滞育诱导的调控。Pegoraro 等 (2016) 对丽蝇蛹集金小蜂在不同光周期条件下 DNA 甲基化水平进行分析发现其 DNA 甲基化水平差异显著, 短光照条件 DNA 甲基化水平显著高于长光照。沉默 DNA 甲基转移酶 *Dnmt1a* 基因后, 不论长短光周期都会出现滞育表型且对短光照滞育诱导力更强, 干扰 *Dnmt3* 后结果与其相一致。除此之外, DNA 甲基化抑制剂 5-aza 处理丽蝇蛹集金小蜂后会出现短光照滞育率降低, 长光照滞育率增加且长短光照滞育差异不显著的现象。而对家蚕卵滞育的研究显示, 甲基化抑制剂 5-aza 对其滞育诱导无显著影响, 这可能与家蚕中甲基化水平较低或实验所用 5-aza 浓度太低等有关 (Egi *et al.*, 2016)。此外, DNA 甲基转移酶在家蚕的发育和繁殖过程中具有重要功能 (Li *et al.*, 2019)。因此, DNA 甲基化特别是 DNA 甲基转移酶诱导家蚕滞育的研究还待进一步实验探究证实。

2.3.2 小 RNA 对昆虫滞育诱导的调控 小 RNA (Small RNAs, sRNAs) 是维持细胞内稳态的一种表观修饰类型, 主要包括 miRNA、piRNA 和 siRNA 三种类型, 在不改变 DNA 序列的情况下, 它们可以通过对 mRNA 和 lncRNA 的修

来调控其表达量, 从而影响生物体的表型 (Bonasio, 2015)。关于小 RNA 调控昆虫滞育的研究已经在多种昆虫中得到证实。在麻蝇蛹滞育的研究中发现, 小 RNA 通路相关基因的丰富度在滞育和非滞育蛹中存在明显的差异, 这通过调控相关基因的表达进而参与滞育调控, 滞育诱导期 *piwi*、*spin-E*、*Ago2* 和 *R2D2* 基因的表达量升高, *piwi* 和 *spin-E* 变化尤为显著, 表明 piRNA 和 siRNA 通路都参与了麻蝇滞育诱导的整个过程 (Reynolds *et al.*, 2013); 此外, miRNA 基因中有 4 个基因在麻蝇非滞育蛹中高表达, 沉默上述基因后会促使麻蝇进入滞育, 8 个 miRNA 基因在滞育期间过表达, 能够提高热激蛋白和耐寒性基因的表达, 促进麻蝇滞育诱导的发生 (Reynolds *et al.*, 2017), 可见 3 种类型的小 RNA 通路都参与麻蝇滞育诱导的调控。在尖音库蚊成虫滞育的研究中发现, 非滞育雌虫的体内存在多种 miRNA 基因的表达量高于滞育雌虫现象, 但是各类基因的动态变化不一致。其中, 4 种 miRNA 在成虫早期出现基因表达上调显著, 2 种 miRNA 在成虫末期现基因表达量显著上调, 2 种 miRNA 基因在成虫前、后期均出现表达量显著上调现象 (Meuti *et al.*, 2018)。

2.3.3 组蛋白修饰对昆虫滞育诱导的调控 组蛋白修饰是指组蛋白在相关酶的作用下发生甲基化、乙酰化、磷酸化等修饰, 具有调控基因表达、维持基因组稳定性和染色体结构等重要作用。其中, 组蛋白甲基化和乙酰化已经证实对诱导昆虫滞育起关键性调控作用。对麻蝇蛹滞育的研究发现, *Dpy-30* 基因在短光照条件下出现下调是导致其滞育的主要原因 (Poupardin *et al.*, 2015), 麻蝇 3 龄幼虫前 3 d 对其 *Dpy-30* 基因干扰, 会导致组蛋白 H3 (H3K4) 甲基化活性下降, 同时组蛋白去甲基化酶基因 *LSD1*、*Su(var)3-9* 的表达量显著上调, 然后在 10-40 d 后会出现脂肪堆积、代谢减弱等一系列滞育表型 (Kostal *et al.*, 2000; Czernin, 2001)。昆虫常通过改变体内组蛋白修饰基因的表达量方式间接参与滞育诱导的调控, 如研究发现组蛋白乙酰化基因 *reptin* 在蟋蟀 *Allonemobius socius*

(Scudder) 不同发育阶段处于动态变化, 在滞育诱导期会出现显著上调, 而滞育后则出现急剧下调 (Reynolds and Hand, 2009)

2.4 昆虫滞育诱导调控其它的相关基因和信号通路

昆虫滞育诱导涉及多种通路, 是多个基因共同作用的结果 (Emerson *et al.*, 2009; Gu *et al.*, 2019)。除了上文已提到的分子调控机制外, 研究者们对昆虫滞育诱导的研究中还发现脂肪代谢基因和细胞周期基因也具有重要作用, 如干扰大猿叶虫脂肪代谢基因 *fas2* 后, 结果会出现 SOD 酶的表达量显著下调, 而 GST 则出现显著上调, 出现抗逆性减弱现象, 影响滞育诱导的发生 (Tan *et al.*, 2017); 丽蝇蛹集金小蜂幼虫滞育的研究过程中发现其管家基因 *RpL32* 和细胞周期调控基因 *pcna*、*cyclin E*、*P53* 下调都有利于细胞周期发生阻滞, 进而对其滞育的分子调控起重要作用 (Shimizu *et al.*, 2018)。另外, 比较组学的应用有利于进一步解析昆虫滞育的分子调控机制。比如, 对尖音库蚊 (Hickner *et al.*, 2015) 和麻蝇 (Reynolds *et al.*, 2016) 进行比较转录组分析, 结果发现其滞育前后组蛋白修饰相关基因的表达量存在显著差异, 从而进一步验证了组蛋白修饰对其滞育诱导的调控作用。此外, Zhou 等 (2019) 对柑橘大实蝇滞育和非滞育虫态不同发育阶段的比较转录组分析发现, 蜕皮激素的合成、胰岛素信号通路、细胞周期和代谢通路都可能参与其滞育的调控; 通过对飞蝗 *Locusta migratoria* (L.) 卵巢、脂肪体 (Hao *et al.*, 2019) 和中枢神经系统 (Jarwar *et al.*, 2019) 转录组数据的比较分析, 得到一系列与其卵滞育诱导的母代效应相关的基因, 为挖掘新的参与飞蝗卵滞育调控的关键基因和信号通路和进一步深入研究其分子机制提供了很好的线索。

3 总结与展望

滞育是很多昆虫应对逆境的重要策略, 滞育相关研究是探讨昆虫对不利环境的适应机制的重要方面之一。昆虫是如何感知光周期、温度和

湿度等外界信号及其变化并作出滞育决策, 然后又如何一步步传递该信息, 并从基因水平到生理水平进行准备并逐步进入滞育状态的, 这些问题都需要广泛而深入的研究来阐明。目前对昆虫滞育分子机制的研究取得了很大的进展, 然而, 仍有很多方面尤其是滞育诱导调控相关机制的研究还面临诸多挑战。生物钟通路调控滞育的研究目前主要明确了核心节律基因对少数昆虫滞育诱导的影响, 但其在不同滞育类型或同种滞育类型的不同昆虫中功能的异同, 以及其他节律基因在滞育诱导中的作用和机制还需进一步在更多昆虫中进行研究。由于很多昆虫基因组中甲基化程度较低, 仅在丽蝇蛹集金小蜂和家蚕等很少昆虫中有滞育相关研究的报导; 小 RNA 和组蛋白修饰对滞育的调控还需在更多昆虫中进一步探究其具体分子机制及其规律。

昆虫滞育诱导机制的研究不仅对明确昆虫对环境的适应机制有重要理论意义, 而且在生产实际的应用方面对害虫防控也具有重要的参考价值 (Denlinger, 2008; Khyati and Seth, 2017)。将滞育相关研究应用于害虫防控的技术和策略主要有以下几个方面: 一是根据不同昆虫滞育诱导或解除的具体调控机制, 研发相关激素类似物或其拮抗剂 (Denlinger, 1976; Yamashita, 1996), 以及 RNA 干扰制剂等, 反季节诱导或解除滞育, 进而降低昆虫种群数甚至致死; 二是通过改变环境条件, 如人为地延长或减少光照时长 (Hayes *et al.*, 1970, 1974) 或夜间使用光照脉冲进行干扰 (Ankersmit, 1968), 使田间昆虫不进入滞育, 随后暴露于不利环境进而导致昆虫死亡 (Denlinger, 2008); 三是通过转基因或基因编辑等技术建立非滞育突变体种群, 并将其引入野生种群, 通过交配繁殖产生非滞育后代, 进而无法抵抗逆境, 从而达到害虫防治的效果 (Bloem *et al.*, 2006; Goto *et al.*, 2006; Denlinger, 2008; Khyati and Seth, 2017); 四是通过人为诱导天敌昆虫滞育, 可通过低温保藏延长其货架期, 还可提高其抗逆性和繁殖力, 并延长有效防控的作用时间, 有助于天敌昆虫的商业化并降低其成本, 更加高效地利用天敌昆虫 (Foerster and Doetzer,

2006; 张洁等, 2013; 高飞等, 2019)。

随着基因组、转录组、小 RNA 组、翻译组、代谢组和蛋白组等各种组学测序和生物信息分析技术和平台的日趋成熟, 以及各种表观遗传相关修饰水平检测和修饰位点鉴定技术的发展和突破, 利用多组学联合分析方法, 结合 RNA 干扰和 CRISPR/Cas9 等基因功能验证技术手段, 将成为开展不同类型昆虫滞育相关系统研究的主要趋势: 首先从组学水平上解析昆虫滞育诱导的调控机制, 然后从中筛选鉴定关键信号通路和核心调控基因并验证其功能, 以揭示滞育诱导调控的具体分子机制, 这将有助于阐明昆虫滞育诱导的分子机理, 对进一步探明昆虫对环境的适应机制具有重要理论价值, 并可对害虫综合治理技术体系, 尤其是绿色防控技术的发展和完善提供重要的科学基础。相信昆虫滞育诱导、维持和解除等过程中的未解之谜将被进一步揭示, 并更好地应用于害虫防治以及天敌昆虫的保护和利用。

参考文献 (References)

- Ankersmit GW, 1968. The photoperiod as a control agent against *Adoxophyes reticulana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 11(2): 231–240.
- Bell CH, 1976. Factors governing the induction of diapause in *Ephestia elutella* and *Plodia interpunctella*. *Physiological Entomology*, 1(2): 83–91.
- Benetta ED, Beukeboom LW, De Zande LV, 2019. Adaptive differences in circadian clock gene expression patterns and photoperiodic diapause induction in *Nasonia vitripennis*. *The American Naturalist*, 193(6): 881–896.
- Bloem S, Carpenter JE, Dorn S, 2006. Mobility of mass-reared diapaused and nondiapaused *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae): Effects of mating status and treatment with gamma radiation. *Journal of Economic Entomology*, 99(3): 699–706.
- Bonasio R, 2015. The expanding epigenetic landscape of non-model organisms. *Journal of Experimental Biology*, 218(1): 114–122.
- Cermakian N, Sassonecorsi P, 2000. Multilevel regulation of the circadian clock. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(1): 59–67.
- Chen W, Xu XJ, Chen NJ, He WY, You MS, 2015. Review of research on insect DNA methylation. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 52(5): 1082–1093. [陈玮, 徐雪娇, 陈楠菁, 何玮毅, 尤民生, 2015. 昆虫 DNA 甲基化的研究进展. 应用昆虫学报, 52(5): 1082–1093.]
- Chen WF, He CX, An CJ, Zhao ZW, 2011. Advances in molecular regulation of insect circadian clock. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(6): 1586–1595. [陈文锋, 贺春霞, 安春菊, 赵章武, 2011. 昆虫生物钟分子调控研究进展. 应用昆虫学报, 48(6): 1586–1595.]
- Chistyakova OV, 2008. Signaling pathway of insulin and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) as a potential regulator of lifespan. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 44(1): 1–11.
- Czermin B, 2001. Physical and functional association of SU(VAR)3-9 and HDAC1 in *Drosophila*. *European Molecular Biology Organization Reports*, 2(10): 915–919.
- Denlinger DL, 1976. Preventing insect diapause with hormones and cholera toxin. *Life Sciences*, 19(10): 1485–1490.
- Denlinger DL, 2002. Regulation of diapause. *Annual Review of Entomology*, 47: 93–122.
- Denlinger DL, 2008. Why study diapause. *Entomological Research*, 38(1): 1–9.
- Denlinger DL, Yocum GD, Rinehart JP, 2012. Hormonal control of diapause. *Insect Endocrinology*, 8: 430–463.
- Dong YC, Chen ZZ, Clarke AR, Niu CY, 2019. Changes in energy metabolism trigger pupal diapause transition of *Bactrocera minax* after 20-hydroxyecdysone application. *Frontiers in Physiology*, 10: 1288.
- Emerson KJ, Bradshaw WE, Holzapfel CM, 2009. Complications of complexity: Integrating environmental, genetic and hormonal control of insect diapause. *Trends in Genetics*, 25(5): 217–225.
- Egi Y, Tsubouchi H, Sakamoto K, 2016. Does DNA methylation play a role in photoperiodic diapause of moths? *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 4(4): 458–460.
- Foerster LA, Doetzer AK, 2006. Cold storage of the egg parasitoid *Trissolcus basalis* (Wollaston) and *Telenomus podisi* Ashmead (Hymenoptera: Scelionidae). *Biological Control*, 36(2): 232–237.
- Fukuda S, 1952. Function of the pupal brain and subesophageal ganglion in the production of non-diapause and diapause eggs in the silkworm. *Annotationes Zoologicae Japonese*, 25(1): 149–155.
- Gao F, Li YY, Wang MZ, Zhang LS, Ai HM, 2019. Research progress of biology and diapause regulation mechanism in the ectoparasitoid wasp *Nasonia vitripennis*. *Journal of Environmental Entomology*, 42(2): 355–363. [高飞, 李玉艳, 王曼姿, 张礼生, 艾洪木, 2020. 丽蝇蛹集金小蜂的生物学及其滞育调控机制研究进展. 环境昆虫学报, 42(2): 355–363.]
- Gao Q, Feng S, Liu W, Wang XP, Wang JL, 2018. Research progress

- in juvenile hormone regulation mechanism in insect reproductive diapause, *Journal of Environmental Entomology*, 40(5): 988–994. [高俏, 丰硕, 刘文, 王小平, 王佳璐, 2018. 保幼激素调控昆虫生殖滞育的研究进展. 环境昆虫学报, 40(5): 988–994.]
- Gong CY, 2017. Transgenic overexpression of the DH and its receptor DHR1 in the silkworm, *Bombyx mori*. Master dissertation. Chongqing: Southwest University. [龚椿营, 2017. 家蚕滞育激素 DH 及其受体 DHR1 的转基因过表达研究. 硕士学位论文. 重庆: 西南大学.]
- Goto SG, Han B, Denlinger DL, 2006. A nondiapausing variant of the flesh fly, *Sarcophaga bullata*, that shows arrhythmic adult eclosion and elevated expression of two circadian clock genes, *period* and *timeless*. *Journal of Insect Physiology*, 52(11/12): 1213–1218.
- Guo JQ, Zhang HG, Wang ZY, He KL, 2013. Effects of photoperiod and temperature on diapause induction in *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Acta Entomologica Sinica*, 56(9): 996–1003. [郭建青, 张洪刚, 王振营, 何康来, 2013. 光周期和温度对亚洲玉米螟滞育诱导的影响. 昆虫学报, 56(9): 996–1003.]
- Gu SH, Lin PL, Hsieh HY, 2019. Bombyxin/Akt signaling in relation to the embryonic diapause process of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology*, 116: 32–40.
- Hahn DA, Denlinger DL, 2007. Meeting the energetic demands of insect diapause: Nutrient storage and utilization. *Journal of Insect Physiology*, 53(8): 760–773.
- Hahn DA, Denlinger DL, 2011. Energetics of insect diapause. *Annual Review of Entomology*, 56: 103–121.
- Han B, Denlinger DL, 2009. Length variation in a specific region of the period gene correlates with differences in pupal diapause incidence in the flesh fly, *Sarcophaga bullata*. *Journal of Insect Physiology*, 55(5): 415–418.
- Hao K, Jarwar AR, Ullah H, Tu XB, Nong XQ, Zhang ZH, 2019. Transcriptome sequencing reveals potential mechanisms of the maternal effect on egg diapause induction of *Locusta migratoria*. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8): 1974.
- Hasegawa K, 1957. The diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. *Nature*, 179(4573): 1300–1301.
- Hayes DK, Cawley BM, Sullivan WN, Adler VE, Schechter MS, 1974. The effect of added light pulses on overwintering and diapause, under natural light and temperature conditions, of four species of Lepidoptera. *Environmental Entomology*, 3(5): 863–865.
- Hayes DK, Sullivan WN, Oliver MZ, Schechter MS, 1970. Photoperiod manipulation of insect diapause: A method of pest control? *Science*, 169(3943): 382–383.
- Hickner PV, Mori A, Zeng E, Tan JC, Severson DW, 2015. Whole transcriptome responses among females of the filariasis and arbovirus vector mosquito *Culex pipiens* implicate TGF- β signaling and chromatin modification as key drivers of diapause induction. *Functional and Integrative Genomics*, 15(4): 439–447.
- Huang SH, Jiang XF, Luo LZ, 2009. Effects of photoperiod and temperature on diapause induction in the beet webworm *Loxostege sticticalis* Linnaeus (Lepidoptera: Pyralidae). *Acta Entomologica Sinica*, 52(3): 274–280. [黄少虹, 江幸福, 罗礼智, 2009. 光周期和温度对草地螟滞育诱导的影响. 昆虫学报, 52(3): 274–280.]
- Ikeno T, Tanaka SI, Numata H, Goto SG, 2010. Photoperiodic diapause under control of circadian clock genes in an insect. *BMC Biology*, 8(1): 116–116.
- Ikeno T, Numata H, Goto SG, 2011a. Circadian clock genes period and cycle regulate photoperiodic diapause in the bean bug *Riptortus pedestris* males. *Journal of Insect Physiology*, 57(7): 935–938.
- Ikeno T, Numata H, Goto SG, 2011b. Photoperiodic response requires mammalian-type cryptochrome in the bean bug *Riptortus pedestris*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 410(3): 394–397.
- Iwema T, Chaumo TA, Studer RA, Robinsonrechavi M, Billas IML, Moras D, Laudet V, Bonneton F, 2009. Structural and evolutionary innovation of the heterodimerization interface between USP and the ecdysone receptor ECR in insects. *Molecular Biology and Evolution*, 26(4): 753–768.
- Jarwar AR, Hao K, Bitume EV, Ullah H, Cui DN, Wang GJ, Tu XB, Zhang ZH, 2019. Comparative transcriptomic analysis reveals molecular profiles of central nervous system in maternal diapause induction of *Locusta migratoria*. *G3: Gene, Genomes, Genetics*, 9(10): 3287–3296.
- Khyati MI, Seth RK, 2017. Insect clocks: Implication in an effective pest management. *Biological Rhythm Research*, 48(5): 777–788.
- Kostal V, Shimada AK, Hayakawa Y, 2000. Induction and development of winter larval diapause in a drosophilid fly, *Chymomyza costata*. *Journal of Insect Physiology*, 46(4): 417–428.
- Kostal V, 2006. Eco-physiological phases of insect diapause. *Journal of Insect Physiology*, 52(2): 113–127.
- Liang H, Xu L, Song Y, Zhu XS, Han HH, Sima YH, Xu SQ, 2010. Effect of diapause-inducing temperature and photoperiod on expression of major circadian clock feedback loop genes in embryos of silkworm, *Bombyx mori*. *Science of Sericulture*, 36(5): 771–779. [梁辉, 徐丽, 宋艳, 朱晓苏, 韩慧慧, 司马杨虎, 徐世清, 2010. 诱发滞育的温度和光照条件对家蚕胚胎生物钟信号主要基因表达的影响. 蚕业科学, 36(5): 771–779.]
- Li B, Hu P, Zhang SZ, Toufeeq S, Wang J, Zhao K, Xu X, Xu JP,

- Huang SJ, 2019. DNA methyltransferase BmDnmt1 and BmDnmt2 in silkworm (*Bombyx mori*) and the regulation of silkworm embryonic development. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 100(3): e21529.
- Liu W, Li Y, Zhu L, Zhu F, Lei CL, Wang XP, 2016. Juvenile hormone facilitates the antagonism between adult reproduction and diapause through the methoprene-tolerant gene in the female *Colaphellus bowringi*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 74: 50–60.
- Liu YY, Luo JC, Zhou ZX, Zhang DW, Wei YH, 2015. Effects of photoperiod and temperature on diapause induction in the codling moth *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Olethreutidae). *Journal of Plant Protection*, 42(1): 39–44. [刘月英, 罗进仓, 周昭旭, 张大为, 魏玉红, 2015. 光周期和温度对苹果蠹蛾滞育诱导的影响. 植物保护学报, 42(1): 39–44.]
- Ma GL, Xu LL, Tang GW, Chen B, 2015. Effects of low and changing temperatures on embryonic development in the migratory locust. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 52(2): 419–427. [马国兰, 徐玲玲, 唐国文, 陈兵, 2015. 低温和变温诱导对飞蝗胚胎发育的影响. 应用昆虫学报, 52(2): 419–427.]
- Matsunaga Y, Honda Y, Honda S, Iwasaki T, Qadota H, Benian GM, Kawano T, 2016. Diapause is associated with a change in the polarity of secretion of insulin-like peptides. *Nature Communications*, 7(1): 10573.
- Manning BD, Toker A, 2017. AKT/PKB signaling: Navigating the network. *Cell*, 169(3): 381–405.
- Matsuo T, Yamaguchi S, Mitsui S, Emi A, Shimoda F, Okamura H, 2003. Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo. *Science*, 302(5643): 255–259.
- Meuti ME, Stone M, Ikeno T, Denlinger DL, 2015. Functional circadian clock genes are essential for the overwintering diapause of the Northern house mosquito, *Culex pipiens*. *Journal of Experimental Biology*, 218(3): 412–422.
- Meuti ME, Bautista-Jimenez R, Reynolds JA, 2018. Evidence that microRNAs are part of the molecular toolkit regulating adult reproductive diapause in the mosquito, *Culex pipiens*. *PLoS ONE*, 13(11): e0203015.
- Mizoguchi A, Ohsumi S, Kobayashi K, Okamoto N, Yamada N, Tateishi K, Fujimoto Y, Kataoka H, 2013. Prothoracicotropic hormone acts as a neuroendocrine switch between pupal diapause and adult development. *PLoS ONE*, 8(4): e60824.
- Mukherjee K, Twyman RM, Vilcinskis A, 2015. Insects as models to study the epigenetic basis of disease. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 118(1/2): 69–78.
- Parthasarathy R, Sun Z, Bai H, Palli SR, 2010. Juvenile hormone regulation of vitellogenin synthesis in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40(5): 405–414.
- Pegoraro M, Bafna A, Davies NJ, Shuker DM, Tauber E, 2016. DNA methylation changes induced by long and short photoperiods in *Nasonia*. *Genome Research*, 26(2): 203–210.
- Poupardin R, Schöttner K, Korbelova J, Provaznik J, Dolezel D, Pavlinic D, Benes V, Kostal V, 2015. Early transcriptional events linked to induction of diapause revealed by RNAseq in larvae of drosophilid fly, *Chymomyza costata*. *BMC Genomics*, 16(1): 720.
- Reynolds JA, Clark J, Diakoff SJ, Denlinger DL, 2013. Transcriptional evidence for small RNA regulation of pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga bullata*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43(10): 982–989.
- Reynolds JA, Bautista-jimenez R, Denlinger DL, 2016. Changes in histone acetylation as potential mediators of pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga bullata*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 76: 29–37.
- Reynolds JA, Hand SC, 2009. Embryonic diapause highlighted by differential expression of mRNAs for ecdysteroidogenesis, transcription and lipid sparing in the cricket, *Allonemobius socius*. *Journal of Experimental Biology*, 212(13): 2075–2084.
- Reynolds JA, Peyton JT, Denlinger DL, 2017. Changes in microRNA abundance may regulate diapause in the flesh fly, *Sarcophaga bullata*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 84: 1–14.
- Reynolds JA, 2017. Epigenetic influences on diapause. *Advances in Insect Physiology*, 53: 115–144.
- Richard DS, Jones JM, Barbarito MR, Cerula S, Detweiler JP, Fisher SJ, Scheswohl DM, Brannigan DM, 2001. Vitellogenesis in diapausing and mutant *Drosophila melanogaster*: Further evidence for the relative roles of ecdysteroids and juvenile hormones. *Journal of Insect Physiology*, 47(8): 905–913.
- Riddiford LM, 2008. Juvenile hormone action: A 2007 perspective. *Journal of Insect Physiology*, 54(6): 895–901.
- Rinehart JP, Cikra-ireland RA, Flannagan RD, Denlinger DL, 2001. Expression of ecdysone receptor is unaffected by pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*, while its dimerization partner, USP, is downregulated. *Journal of Insect Physiology*, 47(8): 915–921.
- Sakai T, Ishida N, 2001. Circadian rhythms of female mating activity governed by clock genes in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(16): 9221–9225.
- Sauders D, 2020. Dormancy, diapause, and the role of the circadian system in insect photoperiodism. *Annual Review of Entomology*, 65: 1–17.

- Shimizu Y, Mukai A, Goto SG, 2018. Cell cycle arrest in the jewel wasp *Nasonia vitripennis* in larval diapause. *Journal of Insect Physiology*, 106: 147–152.
- Siddle K, 2011. Signalling by insulin and IGF receptors: Supporting acts and new players. *Journal of Molecular Endocrinology*, 47(1): R1–R10.
- Sim C, Denlinger DL, 2008. Insulin signaling and FOXO regulate the overwintering diapause of the mosquito *Culex pipiens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(18): 6777–6781.
- Sim C, Denlinger DL, 2013. Insulin signaling and the regulation of insect diapause. *Frontiers in Physiology*, 4: 189.
- Singtripop T, Oda Y, Wanichacheewa S, Sakurai S, 2002. Sensitivities to juvenile hormone and ecdysteroid in the diapause larvae of *Omphisa fuscidentalis* based on the hemolymph trehalose dynamics index. *Journal of Insect Physiology*, 48(8): 817–824.
- Suang S, Hiruma K, Kaneko Y, Manaboon M, 2019. Diapause hormone directly stimulates the prothoracic glands of diapause larvae under juvenile hormone regulation in the bamboo borer, *Omphisa fuscidentalis*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*.
- Tan Q, Liu W, Zhu F, Lei C, Wang X, 2017. Fatty acid synthase 2 contributes to diapause preparation in a beetle by regulating lipid accumulation and stress tolerance genes expression. *Scientific Reports*, 7: 40509.
- Tauber E, Kyriacou BP, 2001. Insect photoperiodism and circadian clocks: Models and mechanisms. *Journal of Biological Rhythms*, 16(4): 381–390.
- Usua EJ, 1970. Diapause in the maize stemborer. *Journal of Economic Entomology*, 63(5): 1605–1610.
- Wang FH, Gong H, Qin JD, 2002. Role of brain in controlling diapause in *Helicoverpa armigera*. *Acta Entomologica Sinica*, 45(3): 416–418. [王方海, 龚和, 钦俊德, 2002. 棉铃虫脑在控制滞育中的作用. *昆虫学报*, 45(3): 416–418.]
- Wang MQ, Li ZZ, 2004. The research advance of insect diapause. *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition)*, 28(1): 71–76. [王满囤, 李周直, 2004. 昆虫滞育的研究进展. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 28(1): 71–76.]
- Wardhaugh KG, 1980. The effects of temperature and moisture on the inception of diapause in eggs of the Australian plague locust, *Chortoicetes terminifera* Walker (Orthoptera: Acrididae). *Australian Journal of Ecology*, 5(2): 187–191.
- Watamabe K, Hull JJ, Niimi T, Lmai K, MAtsumoto S, Yaginuma T, Kataoka H, 2007. FXPRL-amide peptides induce ecdysteroidogenesis through a G-protein coupled receptor expressed in the prothoracic gland of *Bombyx mori*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 273(1): 51–58.
- Williams KD, Busto M, Suster ML, So AKC, Ben-shahar Y, Leever SJ, Sokolowski MB, 2006. Natural variation in *Drosophila melanogaster* diapause due to the insulin-regulated PI3-kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(43): 15911–15915.
- Wu DY, 2002. Study on the Physiology of diapause in silkworm, *Bombyx mori*. Doctoral dissertation. Chongqing: Southwest University. [吴大洋, 2002. 家蚕滞育的生理学研究. 博士学位论文. 重庆: 西南大学.]
- Wu Q, Brown MR, 2006. Signaling and function of insulin-like peptides in insects. *Annual Review of Entomology*, 51: 1–24.
- Xiao HJ, Wei XT, Huang LL, Xue FS, 2004. The types of photoperiodic response for diapause induction insects. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 26(6): 867–873. [肖海军, 魏晓棠, 黄丽莉, 薛芳森, 2004. 昆虫滞育诱导的光周期反应类型. *江西农业大学学报*, 26(6): 867–873.]
- Xie PF, Li ZH, Huang Q, Wu JC, Liu JL, 2018. Advances in physiological functions of insects insulin. *Journal of Environmental Entomology*, 40(4): 834–839. [谢鹏飞, 李正辉, 黄茜, 吴进才, 刘井兰, 2018. 昆虫胰岛素生理功能的研究进展. *环境昆虫学报*, 40(4): 834–839.]
- Xu J, 2007. Cloning and expression analysis of diapause hormone pheromone synthesis activated peptide gene (DH-PBAN) and prothymotropic hormone (PTTH) gene of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. Doctoral dissertation. Hefei University of Science and Technology of China. [徐军, 2007. 甜菜夜蛾滞育激素—性信息素合成激活肽基因 (DH-PBAN) 和促前胸腺激素 (PTTH) 基因的克隆和表达分析. 博士学位论文. 合肥: 中国科学技术大学.]
- Xu Q, 2007. Studies on biology and diapause in the Ha Er-bin population of the cabbage beetle, *Colaphellus bowringi*. Doctoral dissertation. Nanchang: Jiangxi Agricultural University. [徐强, 2007. 大猿叶虫哈尔滨种群生物学特性及滞育的研究. 博士学位论文. 南昌: 江西农业大学.]
- Xue FS, Spieth HR, Li AQ, Hua A, 2002. The role of photoperiod and temperature in determination of summer and winter diapause in the cabbage beetle, *Colaphellus bowringi* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Insect Physiology*, 48(3): 279–286.
- Xu WH, 2008. Advances in insect diapause. *Chinese Bulletin of Entomology*, 45(4): 512–517. [徐卫华, 2008. 昆虫滞育研究进展. *昆虫知识*, 45(4): 512–517.]
- Yamashita O, 1996. Diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*: structure, gene expression and function. *Journal of Insect Physiology*, 42(7): 669–679.

- Yu HC, Zhao W, Hou YM, Song XD, Wang CR, Pei HY, Wang Z, Zhuang BL, Sun LF, 2018. Study on diapause of *Ostrinia furnacalis* Guenée population in Harbin. *Journal of Northeast Agricultural University*, 49(12): 1–8. [于洪春, 赵薇, 侯月敏, 宋显东, 王春荣, 裴海英, 王振, 庄宝龙, 孙苓芙, 2018. 亚洲玉米螟哈尔滨种群滞育研究. 东北农业大学学报, 49(12): 1–8.]
- Zhang JJ, Zhang X, Du WM, Luan CC, Zang LS, Ren BZ, 2018. Effects of inducing initial stage, temperature and period on diapause induction and diapause termination of *Trichogramma dendrolimi*. *Journal of Plant Protection*, 45(6): 126–131. [张俊杰, 张雪, 杜文梅, 阮长春, 臧连生, 任炳忠, 2018. 诱导始期、温度和历期对松毛虫赤眼蜂滞育诱导及解除滞育的影响. 植物保护学报, 45(6): 126–131.]
- Zhang J, Zhang LS, Chen HY, Li YY, Wang W, 2013. Progress in research on diapause of chalcidoids. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 50(6): 1706–1718. [张洁, 张礼生, 陈红印, 李玉艳, 王伟, 2013. 小蜂滞育的研究进展. 应用昆虫学报, 50(6): 1706–1718.]
- Zhang TY, Sun JS, Zhang QR, Xu J, Jiang RJ, Xu WH, 2004. The diapause hormone-pheromone biosynthesis activating neuropeptide gene of *Helicoverpa armigera* encodes multiple peptides that break, rather than induce, diapause. *Journal of Insect Physiology*, 50(6): 547–554.
- Zhou SX, Lu X, Zhang GH, Li LJ, Ding Y, 2014. Research on the induction and termination of diapause in *Trichogramma dendrolimi*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 51(1): 45–52. [周淑香, 鲁新, 张国红, 李丽娟, 丁岩, 2014. 松毛虫赤眼蜂滞育诱导及解除条件研究. 应用昆虫学报, 51(1): 45–52.]
- Zhou YC, He HM, Xue FC, 2018. The effects of photoperiod and temperature on diapause induction in the Taian population of cabbage beetle, *Colaphellus bowringi* Baly. *Journal of Environmental Entomology*, 40(1): 123–128. [周昱晨, 何海敏, 薛芳森, 2018. 光周期和温度对大猿叶虫泰安种群滞育诱导的影响. 环境昆虫学报, 40(1): 123–128.]
- Zhou YC, Yang ZC, Xue FC, 2007. The effects of food on diapause in the Shandong population and biological characteristics of cabbage beetle, *Colaphellus bowringi* Baly. *Jiangxi Plant Protection*, 30(2): 50–54. [周昱晨, 杨忠成, 薛芳森, 2007. 食料对大猿叶虫山东种群滞育和生物学特性的影响. 江西植保, 30(2): 50–54.]
- Zhou YC, 2007. Studies on biology and diapause in Shandong population of the cabbage beetle, *Colaphellus bowringi*. Doctoral dissertation. Nanchang: Jiangxi Agricultural University. [周昱晨, 2007. 大猿叶虫山东种群生物学和滞育特性的研究. 博士学位论文. 南昌: 江西农业大学.]
- Zhou Z, Dong X, Li C, 2019. Transcriptome characterization analysis and molecular profiles of obligatory diapause induction of the Chinese citrus fruit fly, *Bactrocera minax* (Diptera: Tephritidae). *BioRxiv*, doi: 10.1101/672642.
- Zhu DF, Zhang ML, Li LY, 1992. A study on the diapause and coldstorage technique of *Trichogramma evenescens*. *Natural Enemies of Insects*, 14(4): 173–176. [朱涤芳, 张敏玲, 李丽英, 1992. 广赤眼蜂滞育及贮存技术研究. 昆虫天敌, 14(4): 173–176.]