

伞裙追寄蝇滞育和非滞育蛹在脂代谢中的差异表达基因分析*

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, 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 【目的】 为了分析脂代谢相关的差异表达基因和代谢通路在伞裙追寄蝇 *Exorista civilis* 滞育调控过程中的作用。【方法】 本研究利用高通量测序对伞裙追寄蝇滞育和非滞育蛹进行转录组学分析, 通过生物信息学方法筛选出与脂代谢相关的差异表达基因, 并进行了 GO 和 KEGG 富集分析。【结果】 在 GO 富集分析中, 差异表达基因共富集到 48 个 GO 条目中, 而生物过程富集的差异表达基因数量最多。在 KEGG 富集分析中, 成功注释的 112 个差异表达基因, 其中 48 个上调表达, 64 个下调表达, 涉及 15 条通路, 主要包括甘油磷脂代谢、脂肪酸降解及甘油磷脂代谢等通路, 富集在这些通路中的差异表达基因呈现不同的表达趋势。【结论】 在脂代谢中脂酰辅酶 A 还原酶、硬脂酰辅酶 A 脱氢酶和磷酸甘油脱氢酶的差异表达分析可能对伞裙追寄蝇滞育期间的表皮形成、抗寒性提高及能量传递有着重要的影响。

关键词 伞裙追寄蝇; 差异表达基因; 脂代谢; 转录组

Analysis of differentially expressed genes in the lipid metabolism between diapausing and non-diapausing pupae of *Exorista civilis*

LI Yuan-Yuan^{1**} DELIGEER¹ ZHANG Bo² LIN Chen³ SHI Kai^{1***}

(1. College of Agriculture, Inner Mongolia Minzu University, Tongliao 028043, 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 【Objectives】 To analyze the roles of differentially expressed genes and metabolic pathways related to lipid metabolism in the diapause of *Exorista civilis*. 【Methods】 High-throughput sequencing was used to complete the transcriptomic analysis of diapausing and non-diapausing pupae. Differentially expressed genes related to lipid metabolism were screened with bioinformatic methods and analyzed using GO and KEGG enrichment. 【Results】 GO enrichment analysis indicates that differentially expressed genes were enriched to 48 GO terms and that the largest number were enriched by biological processes. KEGG enrichment analysis successfully annotated 112 differentially expressed genes involved in 15 pathways, of which 48 were up-regulated and 64 down-regulated. Differentially expressed genes were mainly involved in the glycerophospholipid metabolism, fatty acid degradation and the glycerolipid metabolism. Differentially expressed genes enriched in these pathways showed different expression trends. 【Conclusion】 Fatty acyl-CoA reductase, stearoyl-CoA desaturase (delta-9 desaturase), and glycerol-3-phosphate dehydrogenase are differentially expressed in the lipid metabolism of *E. civilis*, and may therefore play an important role in formation of the epidermis, cold resistance and energy transfer, during diapause.

Key words *Exorista civilis*; differentially expressed genes; lipid metabolism; transcriptome

*资助项目 Supported projects: 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项目 (2018MS03038, 2019MS03073, 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)

**第一作者 First author, E-mail: liyuanyuan20131128@126.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: nmshikai@126.com

收稿日期 Received: 2021-07-30; 接受日期 Accepted: 2021-12-09

滞育是昆虫抵御不良环境, 延续种群生存的重要遗传适应策略(徐卫华, 2008)。在昆虫滞育维持阶段, 脂类、碳水化合物和甘油水平逐渐下降(Hahn and Denlinger, 2011)。脂类, 尤其是甘油三酯, 作为昆虫生命活动过程中重要的能源物质和代谢水的提供物, 与昆虫滞育的发生、维持和终止有密切的关系。在家蚕 *Bombyx mori* 滞育卵中发现, 积累的大量脂质会随着胚胎发育逐渐分解成甘油和脂肪酸, 脂肪酸氧化可以为胚胎发育提供能量(吴大洋, 2002); 由此可见脂类对昆虫滞育期间保持能量平衡至关重要(Batz and Armbruster, 2018)。

近年来, 高通量技术的迅速发展促进了非模式昆虫转录组学方面的研究, 转录组是昆虫在一定生理状态下全部转录产物的集合, 包括 mRNA, rRNA, tRNA(岳桂东等, 2012)。可以将昆虫在不同条件下的基因信息与表型建立联系, 从而促进了关于基因功能、生长发育、系统发育和生理生化等研究内容的发展(David et al., 2006)。目前, 对天敌昆虫进行转录组学的研究主要集中在寄生蜂。安涛等(2017)通过转录组测序比较分析了烟蚜茧蜂 *Aphidius gifuensis* 滞育相关的差异表达基因, 结果表明这些滞育关联的基因与自身防御、表皮黑化、耐寒性、脂类代谢和转录调控密切相关。刘敏等(2020)通过对茶足柄瘤蚜茧蜂 *Lysiphlebus testaceipes* 测序转录组分析, 发现脂代谢相关差异表达基因可能与提高其在滞育期间的免疫力有关, 而与激素合成相关的差异基因上调表达可能抑制该蜂卵巢的发育。因此, 探讨昆虫脂代谢相关的差异基因及其代谢途径具有重要意义。

伞裙追寄蝇 *Exorista civilis* 隶属于双翅目, 寄蝇科, 是多种鳞翅目害虫的优势寄生性天敌, 具有野外寄生率高, 寄主范围广泛等特点。目前对伞裙追寄蝇滞育相关的脂代谢研究主要集中在生理生化方面, 相关报道表明伞裙追寄蝇滞育蛹中的脂类物质——甘油显著低于非滞育蛹, 这可能是由于脂类物质是伞裙追寄蝇维持滞育的重要消耗物(孙程鹏, 2017)。然而对于从分子水平探究寄蝇滞育关联基因的相关研究仍较为

缺乏, 本研究通过使用高通量测序对伞裙追寄蝇滞育和非滞育蛹进行转录组分析, 通过生物信息学分析探讨与脂代谢相关的滞育调控基因, 为今后进一步研究伞裙追寄蝇滞育调控的分子机制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫及饲养

伞裙追寄蝇采自于内蒙古自治区呼和浩特市沙尔沁, 带回室内, 以 20% 的蜂蜜水喂养; 寄主粘虫为实验室饲养, 幼虫饲养于预先放有人工饲料的塑料养虫盒中(20 cm×10 cm)饲养至 5 龄后, 转入亚克力养虫盒(35 cm×30 cm×10 cm)中饲养, 同时放入已交配的伞裙追寄蝇, 在亚克力盒中放入适量的人工饲料, 并在盒中悬挂 20% 蜂蜜水的棉球。每盒粘虫与伞裙追寄蝇的释放比例为 50:1, 置于温度为(25±1)℃, 相对湿度为 70%±10%, 光周期为 16L:8D 的人工气候箱中饲养。待伞裙追寄蝇成功寄生后, 将末龄获得寄生的粘虫放入装有灭菌土的养虫圆盒中饲养, 每日喷水, 保持灭菌土的水分。

1.2 样品收集

前期的研究表明, 伞裙追寄蝇滞育诱导的温度为(11±1)℃, 光周期为 8L:16D, 滞育虫态为蛹。伞裙追寄蝇成功寄生的粘虫置于温度为(25±1)℃, 光周期为 16L:8D, 湿度为 70%±10% 的环境条件下饲养, 直至伞裙追寄蝇的 3 龄幼虫出现。将一部分伞裙追寄蝇 3 龄幼虫置于人工气候箱温度为(11±1)℃, 光周期 8L:16D, 湿度为 70%±10%、光照强度为 8 800 lx 的滞育诱导条件下持续诱导 40 d, 待伞裙追寄蝇化蛹后, 将滞育蛹经过液氮处理, 放入 -80℃ 冰箱保存; 将另一部分寄蝇 3 龄幼虫放入温度为(25±1)℃, 光周期 16L:8D, 湿度为 70%±10% 的人工气候箱中继续饲养, 直至伞裙追寄蝇蛹出现, 收集非滞育蛹作为本实验的对照组。将非滞育蛹经过液氮处理, 放入 -80℃ 冰箱保存。每组 3 个生物学重复, 每个生物学重复以 2 头蛹为

样本。

1.3 样品总 RNA 的提取

将伞裙追寄蝇滞育 (Diapause, D) 和非滞育 (Non-diapause, ND) 组的蛹进行总 RNA 提取, 每组收集两头蛹, 每组 3 个生物学重复, 每头蛹的重量平均为 0.6 g。

将 50-100 mg 冰冻伞裙追寄蝇滞育蛹和非滞育蛹放入消毒过的研钵内, 倒入液氮, 研碎, 并加入 1 mL 的 TRIZOL 匀浆, 注意避免 DNA 污染。将样本转移至 1.5 mL 的 EP 管中, 在温度为 15-30 °C 下静置 5 min, 取上层的无色的水相置于干净的 EP 管中, 加入 0.5 mL 异丙醇, 在 15-30 °C 条件下静置 10 min, 然后在 12 000 g 的条件下离心 10 min, 去除上清液, 加入 1 mL 75% 乙醇洗涤 RNA 沉淀, 摇匀, 在 2-8 °C 下离心。弃除乙醇液体, 静置 5-10 min, 对 RNA 沉淀进行干燥处理。重悬 RNA 沉淀时, 使用无 RNA 酶的水或 0.5% SDS 溶液, 对沉淀进行再溶解。

RNA 样品质量检测使用 Nanodrop 进行, 首先用无 RNA 酶的水作为空白对照, 测出 OD_{260/280} 值; 然后将在含 2 µL 储存液的 EP 管中加入 98 µL 无 RNase 水, 离心混匀后测出 OD_{260/280} 值。最后为了确定抽提 RNA 完整性和 DNA 污染状况, 使用甲醛变性琼脂糖电泳。

1.4 文库构建与测序

检测伞裙追寄蝇 D 和 ND 组样品, 质检合格后, 首先使用反转录引物 Oligo dT, 然后打断 mRNA, 以它的片段作为模板, 碱基配对合成第一链 cDNA, 然后继续合成二链, 合成后进行纯化双链、修复和加 poly (A) 尾。最后进行 PCR 扩增, 纯化获得的产物, 得到最终的文库。在文库构建完成之后, 进行文库的质量检验。

之后上机测序, 过滤 raw reads, 去掉低质量的 reads 后, 将获得的 clean reads 采用 Trinity 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。

1.5 生物信息学分析

测序得到的原始测序序列 raw reads, 需要去

除带接头 (adapter) 的 reads, 去除 N (N 表示无法确定碱基信息的比例大于 10% 的 reads); 去除低质量 reads (质量值 Qphred ≤ 20 的碱基数占整个 reads 的 50% 以上的 reads)。

获得 clean reads 后, 采用 Trinity 对 clean reads 进行拼接以获取后续分析的参考序列。将拼接得到的转录本序列, 将每个样品的 clean reads 往 ref 上做 mapping。该过程采用了 RSEM 软件, 进一步得到了每个样品比对到每个基因上的 readcount 数目, 并对其进行 FPKM (Expected number of fragments per kilobase of transcript sequence per millions base pairs sequenced) 转换, 进而分析基因的表达水平。

最后根据域值 $P_{adj} < 0.05$, 且 $|\log_2 \text{fold change}| > 1$ 的条件筛选出差异表达基因 [(Differentially expressed genes, DEGs); fold change (FC)] 为差异倍数, P_{adj} 为校正后的 P value, P_{adj} 越小, 表示差异越显著。

运用 GOseq 方法对差异表达基因进行 GO 富集分析 (Young *et al.*, 2010), 首先将 DEGs 映射到 GO 数据库的条目中, 将得到的每个条目的基因数量, 与全部基因进行对比, 确定 DEGs 显著富集的条目。

利用 KEGG Pathway 的数据库, 基于超几何检验, 将 DEGs 映射到 pathway, 然后进行显著性富集分析, 在这里 N 为所有基因中具有 Pathway 注释的基因数目; n 为 N 中差异表达基因的数目; M 为所有基因中注释为某特定 Pathway 的基因数目; m 为注释为某特定 Pathway 的差异表达基因数目, 所运用的计算公式为:

$$P = 1 - \sum_{i=0}^{m-1} \frac{\binom{M}{i} \binom{n-M}{n-i}}{\binom{N}{n}}。$$

2 结果与分析

2.1 转录本拼接

转录组测序经 Trinity 拼接, 共得到 137 725 个转录本序列, 转录本的拼接长度主要分布在 200-500 bp, 占转录本总数的 32.64%; 其次是拼

接长度分布在 500-1 000 bp, 占转录本总数的 25.71%; 拼接长度分布在 1 000-2 000 bp 的数量

占转录本总数的 21.14%; 拼接长度大于 2 000 bp 的数量占转录本总数的 20.51% (图 1)。

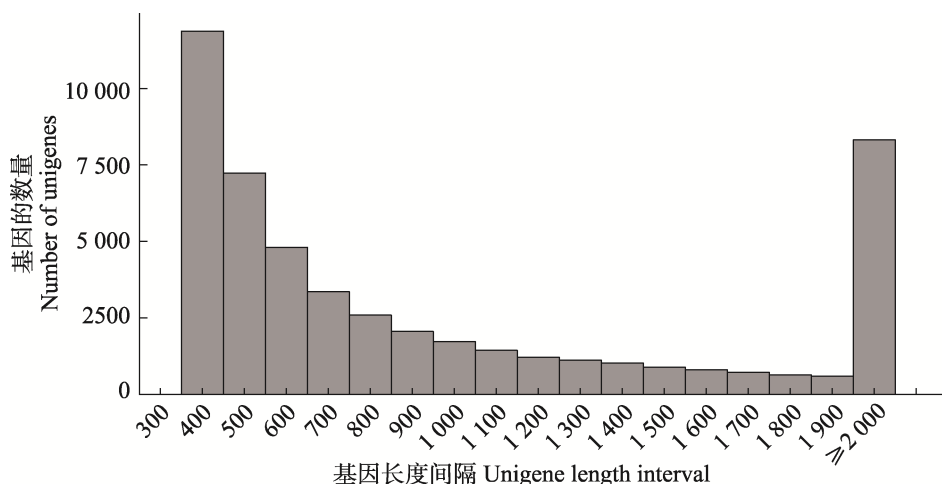


图 1 拼接转录本长度分布图

Fig. 1 Distribution of spliced transcript length

2.2 差异表达基因的 GO 富集分析

在伞裙追寄蝇非滞育和滞育蛹中, 脂代谢相关的差异表达基因共富集到 48 个 GO 条目中, 分为生物过程、细胞成分和分子功能三部分, 差异表达基因富集前 10 位的如图 2 中所示。其中

36 种代谢途径属于生物过程, 9 种代谢途径属于分子功能, 3 种代谢途径属于细胞成分。脂代谢相关的差异表达基因在脂质代谢过程富集的数量最多, 共计 136 个, 其次是脂质生物合成, 含 87 个 DEGs; 在细胞脂质代谢过程, 含 86 个 DEGs。

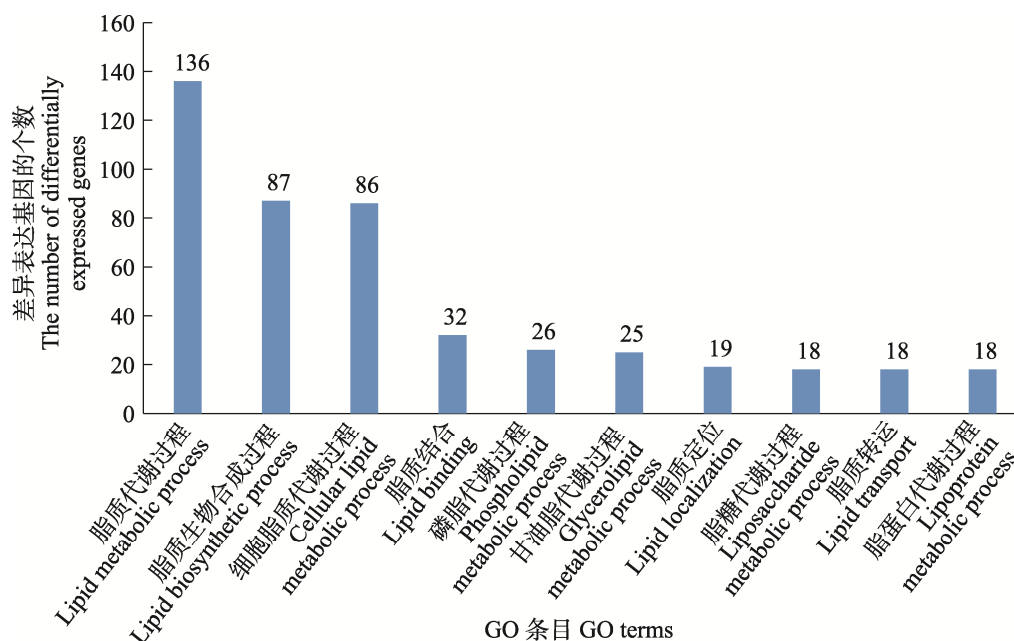


图 2 伞裙追寄蝇滞育和非滞育蛹在脂代谢中的差异表达基因 GO 富集分析

Fig. 2 Analysis of GO enrichment of differentially expressed genes in the lipid metabolism between diapausing and non-diapausing pupae of *Exorista civilis*

2.3 差异表达基因的 KEGG 富集分析

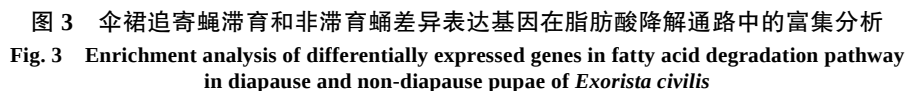
通过筛选阈值,成功获得 KEGG 注释的脂代谢相关的差异表达基因共 112 个,其中上调个数为 48 个,下调的个数为 64 个。在伞裙追寄蝇滞育期间,对差异表达基因进行 KEGG 通路富集分析中,结果表明差异表达基因富集于 15 条通路中,分别为 α -亚麻酸代谢、花生四稀酸代谢、不饱和脂肪酸的生物合成、醚类脂质代谢、脂肪酸的生物合成、脂肪酸降解、脂肪酸伸长、甘油脂代谢、甘油磷脂代谢、亚油酸代谢、原生胆汁酸的生物合成、鞘磷脂代谢、类固醇生物合成、类固醇激素生物合成及酮体的合成和降解。其中在甘油磷脂代谢通路中,差异表达基因富集的数量最多,含 23 个 DEGs;其次是脂肪酸降解,含 16 个 DEGs;甘油脂代谢,含 13 个 DEGs (表 1)。

在脂肪酸降解通路中,脂酰辅酶 A 还原酶 (Fatty acyl-CoA reductase, FAR) 呈现了不同程度的上调和下调,差异倍数最高可达 146.49 倍。超长链酰基辅酶 A 脱氢酶仅为上调表达,这是催化超长链脂肪酸生成脂肪醇过程中的关键酶 (图 3)。在脂肪酸合成通路中,脂肪酸合成酶既有上调表达,也有下调表达,上调倍数最高可为 41.26 倍,下调倍数为 116.58 倍,脂肪酸合成酶在昆虫中的主要作用为影响脂质积累、生殖能力以及表皮的正常功能。在脂肪酸延长通路中,超长链脂肪酸蛋白质的延伸 (Elongation of very long chain fatty acids protein),既有上调表达,也有下调表达。

在类固醇生物合成通路中,差异表达基因甾醇 O-酰基转移酶 (Sterol O-acyltransferase, SOA) 及溶酶体酸脂酶/胆固醇酯水解酶

表 1 伞裙追寄蝇滞育和非滞育蛹的差异表达基因在脂代谢相关通路的富集分析
Table 1 KEGG pathway analysis of diapause-associated genes related to lipid metabolism in *Exorista civilis*

通路 Pathway	编号 ID	差异表达基因 的数量 Number of differentially expressed genes	上调差异 表达基因 Up-regulation of differentially expressed genes	下调差异 表达基因 Down-regulation of differentially expressed genes
α -亚麻酸代谢 Alpha-Linolenic acid metabolism	ko00592	2	1	1
花生四稀酸代谢 Arachidonic acid metabolism	ko00590	4	1	3
不饱和脂肪酸的生物合成 Biosynthesis of unsaturated fatty acids	ko01040	5	5	0
醚类脂质代谢 Ether lipid metabolism	ko00565	7	4	3
脂肪酸的生物合成 Fatty acid biosynthesis	ko00062	4	2	2
脂肪酸降解 Fatty acid degradation	ko00071	16	9	7
脂肪酸伸长 Fatty acid elongation	ko00062	8	2	6
甘油脂代谢 Glycerolipid metabolism	ko00561	13	6	7
甘油磷脂代谢 Glycerophospholipid metabolism	ko00564	23	8	15
亚油酸代谢 Linoleic acid metabolism	ko00591	2	0	2
原生胆汁酸的生物合成 Primary bile acid biosynthesis	ko00120	1	0	1
鞘磷脂代谢 Sphingolipid metabolism	ko00600	8	1	7
类固醇生物合成 Steroid biosynthesis	ko00100	2	0	2
类固醇激素生物合成 Steroid hormone biosynthesis	ko00140	9	4	5
酮体的合成和降解 Synthesis and degradation of ketone bodies	ko00072	8	5	3



Red boxes indicate differential gene up-regulated, green boxes indicate differential gene down-regulated, and red ovals indicate differential metabolite up-regulated.

通过比较滞育和非滞育蛹的差异表达基因,发现脂代谢在伞群追寄蝇的滞育进程中有重要影响。在昆虫滞育期间,脂质是其最丰富的能量准备,可以满足长期能量需求,并且大多数在滞

育期间非取食的昆虫主要消耗脂质 (Sinclair, 2015; Sinclair and Marshall, 2018), 滞育期间的脂质保护是昆虫成功越冬和提高越冬后种群适应度的关键因素 (Gomi, 2000)。因此, 明确伞裙追寄蝇滞育过程中的脂代谢有助于进一步探究其滞育调控的分子机制。

在伞裙追寄蝇滞育期间, 脂代谢相关的差异表达基因数量较多, 涉及 15 条 KEGG 代谢通路, 主要包括脂肪酸降解、不饱和脂肪酸的生物合成及甘油磷脂代谢等通路。滞育和非滞育蛹的差异表达基因差异倍数最显著的是 FAR, FAR 在伞裙追寄蝇滞育期间呈现不同程度的表达水平, 既有上调表达, 也有下调表达。目前关于 FAR 在昆虫生理活动中的作用主要表现为参与信息素以及表皮醇类及蜡酯的合成 (郑天祥等, 2017)。在意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 研究中表明 FAR 在头部大量表达, 并能合成脂肪醇 (Teerawanichpan et al., 2010)。在果蝇 *Drosophila* FAR 研究中表明该基因可将长链脂肪酸转化为相应脂肪醇, 形成内壁疏水性物质 (Jaspers et al., 2014)。在白蜡虫 *Ericerus pela* 泌蜡的相关基因中, 发现 FAR3 参与蜡脂合成 (赵遵岭等, 2019)。这些研究为伞裙追寄蝇 FAR 的功能研究奠定了基础, FAR 在脂肪酸降解通路中将脂肪酸转化为脂肪醇, 脂肪醇作为昆虫表皮形成的重要物质之一, FAR 因滞育而差异表达可能对伞裙追寄蝇滞育期间的蛹表皮形成产生重要影响。

在低温诱导滞育的昆虫中, 抗寒能力对维持生命具有重要的作用, 而滞育中的脂质积累有助于提高耐寒性。在滞育和非滞育昆虫体内, 脂肪酸组成存在明显差异 (任小云等, 2016)。改变 SCD 的表达量或者酶活性会改变细胞内单不饱和脂肪酸和饱和脂肪酸的比例, 尤其是占比最大的单不饱和脂肪酸油酸和饱和脂肪酸棕榈酸的比例 (Michaud and Denlinger, 2006)。在伞裙追寄蝇滞育的不饱和脂肪酸的生物合成通路中, SCD 作为催化饱和脂酰辅酶 A 生成单不饱和脂酰辅酶 A 的关键酶, 全部上调表达, 这有助于催化饱和脂肪酸形成不饱和脂肪酸, 进而促进了

不饱和脂肪酸的积累。在寄蝇 *Pseudosarcophaga affinis* 研究中发现摄入高饱和脂肪酸食物之后, 可以更好地在高温环境中生存。但昆虫在越冬环境中则会积累更多的不饱和脂肪酸以抵抗低温胁迫 (苏天运和苏天增, 1995)。这与本研究结果具有一致性, 由此可以说明 SCD 上调表达, 是激活不饱和脂肪酸合成的重要因子, 这可能对伞裙追寄蝇在滞育期间抵抗低温环境胁迫发挥着重要的作用。另外, 在伞裙追寄蝇滞育期间, 甘油磷脂代谢通路中的 GPDH 显著上调, 从果蝇 *Drosophila* 的研究中发现, GPDH 具有传递能量, 维持组织的 NAD⁺/NADH 比例 (White and Kaplan, 1969), 为脂质的生物合成产生底物 (Gilbert and Chino, 1974)。而且 GPDH 是油脂合成前体——3-甘油磷酸合成的限速酶, 在葱蝇 *Delia antiqua* 滞育研究中发现, GPDH 可能在抗寒性中发挥辅助作用 (Guo et al., 2015)。在烟青虫 *Helicoverpa assulta* 经快速冷驯化诱导后, 血淋巴中甘油含量增加, 在 4 °C 下诱导 6 h 后, GPDH 的表达水平增加, 结果表明 GPDH 通过提高甘油生物合成提高抗寒性 (Cha and Lee, 2022)。这使我们有理由推测伞裙追寄蝇在滞育中的 GPDH 上调表达, 与抵抗低温胁迫, 提高耐寒性密切相关。

另外, GPDH 还在脂类和碳水化合物合成代谢途径中起关键作用, 在昆虫滞育中, 脂代谢和碳水化合物代谢是非常重要的代谢途径, 但在不同昆虫中, 这两者的启动顺序不尽相同, 如麻蝇 *Sarcophaga crassipalpis* 在滞育初期主要消耗脂质, 然后随着滞育的发展, 将其能量消耗从脂质转变为碳水化合物和其他能量物质 (Arrese and Soulages, 2010)。在葱蝇的滞育研究中表明, 海藻糖和葡萄糖的积累在蛹滞育前已完成 (徐燕玲等, 2018)。那么伞裙追寄蝇滞育进程中的脂代谢和碳水化合物代谢是如何进行的呢? GPDH 上调表达可能提供了关键信息, 有助于进一步探讨伞裙追寄蝇脂代谢和碳水化合物代谢转化中的能量传递。

然而, 目前通过转录组学分析得到的相关基

因可以借助 RNA 干扰及基因编辑等方式进一步完成功能验证, 关于甘油三酯和不饱和脂肪酸等脂类物质对伞裙追寄蝇滞育调控产生的作用仍有待于进一步研究。

参考文献 (References)

- Arrese EL, Soulages JL, 2010. Insect fat body: Energy, metabolism, and regulation. *Annual Review of Entomology*, 55: 207–225.
- An T, Zhang HZ, Han YH, Chen HY, Zhang LS, 2017. Transcriptome analysis of diapause-associated genes of *Aphidius gifuensis* Ashmead. *Chinese Journal of Biological Control*, 33(5): 604–611. [安涛, 张洪志, 韩艳华, 陈红印, 张礼生, 2017. 烟蚜茧蜂滞育关联基因的转录组学分析. 中国生物防治学报, 33(5): 604–611.]
- Batz ZA, Armbruster PA, 2018. Diapause-associated changes in the lipid and metabolite profiles of the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*. *Journal of Experimental Biology*, 221(24): jeb189480.
- Cha WH, Lee D, 2022. Suppression of glycerol biosynthesis-related genes decreases the effect of rapid cold hardening in *Helicoverpa assulta*. *Entomological Research*, 52(1): 24–32.
- David L, Huber W, Granovskaia M, Toedling J, Palm CJ, Bofkin L, Jones T, Davis RW, Steinmetz LM, 2006. A high-resolution map of transcription in the yeast genome. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(14): 5320–5325.
- Gilbert LI, Chino H, 1974. Transport of lipids in insects. *Journal of Lipid Research*, 15(5): 439–456.
- Gomi T, 2000. Effects of timing of diapause induction on winter survival and reproductive success in *Hyphantria cunea* in a transition area of voltinism. *Entomological Science*, 3(3): 433–438.
- Guo Q, Hao YJ, Li Y, Zhang YJ, Ren S, Si FL, Chen B, 2015. Gene cloning, characterization and expression and enzymatic activities related to trehalose metabolism during diapause of the onion maggot *Delia antiqua* (Diptera: Anthomyiidae). *Gene*, 565(1): 106–115.
- Hahn DA, Denlinger DL, 2011. Energetics of insect diapause. *Annual Review of Entomology*, 56: 103–121.
- Jaspers MHJ, Pflanz R, Riedel D, Kawelke S, Feussner I, Schuh R, 2014. The fatty acyl-CoA reductase waterproof mediates airway clearance in *Drosophila*. *Development Biology*, 385(1): 23–31.
- Liu M, Liu AP, Han HB, Gao SJ, Xu LB, Yue FZ, Huang HG, 2020. Differential expression of genes associated with lipid metabolism in diapausing *Lysiphlebus testaceipes* Cresson. *Chinese Journal of Biological Control*, 36(4): 632–636. [刘敏, 刘爱萍, 韩海斌, 高书晶, 徐林波, 岳方正, 黄海广, 2020. 茶足柄瘤蚜茧蜂脂代谢相关的滞育关联基因差异表达分析. 中国生物防治学报, 36(4): 632–636.]
- Michaud MR, Denlinger DL, 2006. Oleic acid is elevated in cell membranes during rapid cold-hardening and pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Journal of Insect Physiology*, 52(10): 1073–1082.
- Ren XY, Qi XY, An Tao, Han YH, Chen HY, Zhang LS, 2016. Research on the accumulation, transformation and regulation of nutrients in diapause insects. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 53(4): 685–695. [任小云, 齐晓阳, 安涛, 韩艳华, 陈红印, 张礼生, 2016. 滞育昆虫营养物质的积累、转化与调控. 应用昆虫学报, 53(4): 685–695.]
- Sinclair BJ, 2015. Linking energetics and overwintering in temperate insects. *Journal of Thermal Biology*, 54(1): 5–11.
- Sinclair BJ, Marshall KE, 2018. The many roles of fats in overwintering insects. *Journal of Experimental Biology*, 221(1): jeb.161836.
- Su TY, Su TZ, 1995. Overview of research on biochemical mechanisms of insect diapause. *Sichuan Animals*, 14(3): 113–116. [苏天运, 苏天增, 1995. 昆虫滞育生化机制研究概况(上). 四川动物, 14(3): 113–116.]
- Sun CP, Wang JM, Han HB, Liu AP, Gao SJ, Guo JM, 2017. Changes of essential substance contents in *Exorista civilis* Rondani during diapause stage. *China Plant Protection*, 37(4): 15–19. [孙程鹏, 王建梅, 韩海斌, 刘爱萍, 高书晶, 郭俊梅, 2017. 伞裙追寄蝇滞育期间主要物质含量变化研究. 中国植保导刊, 37(4): 15–19.]
- Teerawanichpan P, Robertson AJ, Qiu X, 2010. A fatty acyl-CoA reductase highly expressed in the head of honey bee (*Apis mellifera*) involves biosynthesis of a wide range of aliphatic fatty alcohols. *Insect Biochem Molecular Biology*, 40(9): 641–649.
- White HR, Kaplan NO, 1969. Purification and properties of two types of diphosphopyridine nucleotide-linked glycerol 3-phosphate dehydrogenases from chicken breast muscle and chicken liver. *Journal of Biological Chemistry*, 244(21): 6031–6039.
- Wu DY, 2002. Physiological studies on the diapause of domestic

- silkworm. Doctoral dissertation. Chongqing: Southwest Agricultural University. [吴大洋, 2002. 家蚕滞育的生理学研究. 博士学位论文. 重庆: 西南农业大学.]
- Xu WH, 2008. Advances in diapause research of insects. *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.]
- Xu YL, Peng ZQ, Si FL, Hao YJ, 2018. Characterization of fork head transcription factor 1 gene FOXO1 and its role in sugar and lipid metabolism in the summer prediapause pupae of *Delia antiqua* (Diptera: Anthomyiidae). *Acta Entomologica Sinica*, 61(12): 1384-1392. [徐燕玲, 彭竹清, 司风玲, 郝友进, 2018. 叉头转录因子 1 基因 FOXO1 的特征及其在葱蝇夏滞育前期蛹体内糖脂代谢中的作用(英文). 昆虫学报, 61(12): 1384-1392.]
- Young MD, Wakefield MJ, Smyth GK, Oshlack A, 2010. Gene ontology analysis for RNA-seq: Accounting for selection bias. *Genome Biology*, 11(2): R14.
- Yue GD, Gao Q, Luo LH, Wang JY, Xu JH, Yin Y, 2012. Application of high-throughput sequencing technology in the field of plant and animal research. *Science of China: Life Sciences*, 42(2): 107-124. [岳桂东, 高强, 罗龙海, 王军一, 许姣卉, 尹烨, 2012. 高通量测序技术在动植物研究领域中的应用. 中国科学: 生命科学, 42(2): 107-124.]
- Zhao ZI, Wu GX, Gao X, Yu SH, Yang B, Zhu P, Yang P, 2019. Full-length transcriptome sequencing of *Ericerus pela* at the early stage of wax secretion and protein expression analysis of FAR in males and females. *Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Sciences)*, 34(5): 762-771. [赵遵岭, 吴国星, 高熹, 于淑惠, 杨斌, 朱家颖, 杨璞, 2019. 白蜡虫泌蜡初期全长转录组测序及 FAR 在雌雄虫中蛋白表达分析. 云南农业大学学报(自然科学), 34(5): 762-771.]
- Zheng TX, Qian YN, Zhang DY, 2017. Progress in the study of key genes of fatty acid synthesis pathway in insects. *China Journal of Biological Engineering*, 37(11): 19-27. [郑天祥, 钱雨农, 张大羽, 2017. 昆虫脂肪酸合成通路关键基因的研究进展. 中国生物工程杂志, 37(11): 19-27.]