

# 瓜实蝇蜕皮激素合成通路 Halloween 基因鉴定 及 *Shade* 的功能分析



王 韵<sup>1</sup> 马 梦<sup>1</sup> 李伟军<sup>2</sup> 王进军<sup>1</sup> 魏 冬<sup>1\*</sup>

(1. 西南大学植物保护学院, 昆虫学及害虫控制工程重庆市重点实验室, 长江上游农业生物安全与绿色生产教育部重点实验室, 重庆 400715; 2. 江西农业大学农学院, 南昌 330045)

**摘要:** 为明确世界检疫性害虫瓜实蝇 *Zeugodacus cucurbitae* 蜕皮激素合成通路中 Halloween 基因的功能, 采用反转录聚合酶链式反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 技术克隆鉴定 Halloween 基因, 通过实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 技术分析其在瓜实蝇中的时空表达模式, 并利用 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术解析蜕皮激素合成通路基因 *Shade* 对瓜实蝇变态发育的影响。结果表明, 共鉴定到 5 个瓜实蝇蜕皮激素合成通路相关 Halloween 基因, 即 *ZcSpook* (缩写为 *ZcSpo*)、*ZcPhantom* (*ZcPhm*)、*ZcDisembodied* (*ZcDib*)、*ZcShadow* (*ZcSad*) 和 *ZcShade* (*ZcShd*), 这 5 个 Halloween 基因均具有细胞色素 P450 家族特有的保守结构域; 系统发育分析显示瓜实蝇 Halloween 基因与橘小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 的同源基因亲缘关系较近。这 5 个基因主要在瓜实蝇幼虫前胸腺复合体中高表达, 且在幼虫化蛹前和性成熟的成虫中表达量较高。利用 RNAi 沉默瓜实蝇 *ZcShd* 基因 24 h 和 48 h 后, 该基因表达量分别下调 80.54% 和 60.59%, 且在蜕皮化蛹过程中有 16.66% 的幼虫出现不同程度的皱缩、变色表型, 有 33.33% 的幼虫死亡, 有 33.33% 的幼虫表现出不同程度的化蛹受阻, 表明该基因参与调控瓜实蝇蜕皮过程, 具有成为实蝇新型控制剂防控靶标的潜力。

**关键词:** 瓜实蝇; Halloween 基因; 细胞色素 P450; 蜕皮激素; 发育; 时空表达

## Identification of Halloween genes involved in ecdysone synthesis and functional analysis of *shade* in melon fruit fly *Zeugodacus cucurbitae*

Wang Yun<sup>1</sup> Ma Meng<sup>1</sup> Li Weijun<sup>2</sup> Wang Jinjun<sup>1</sup> Wei Dong<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Agricultural Biosafety and Green Production of Upper Yangtze River (Ministry of Education), Chongqing Key Laboratory of Entomology and Pest Control Engineering, College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. School of Agricultural Sciences, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, Jiangxi Province, China)

**Abstract:** To clarify the role of Halloween genes in the ecdysone synthesis pathway of melon fruit fly *Zeugodacus cucurbitae*, a globally significant quarantine pest, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was employed for cloning the Halloween genes. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to analyze their spatio-temporal expression patterns, and RNA interference (RNAi) was employed to investigate the effect of the ecdysone synthesis pathway gene *Shade* on the metamorphic development of *Z. cucurbitae*. The results showed that five Halloween genes in the ecdysone synthesis pathway were identified: *ZcSpook* (abbr. *ZcSpo*), *ZcPhantom* (*ZcPhm*), *ZcDisembodied* (*ZcDib*), *ZcShadow* (*ZcSad*), and *ZcShade* (*ZcShd*). All five Halloween genes possess the conserved domain of the cytochrome P450 family. Phylogenetic analysis showed that the Halloween genes of *Z. cucurbitae* are closely related to those of *Bactrocera dorsalis*. These five genes were highly expressed in the prothoracic gland complex of *Z. cucurbitae* larvae and in sexually mature adults. After silencing the *ZcShd* gene of *Z. cucurbitae* for 24 h and 48 h using RNAi, the expression of the gene was downregulated by 80.54% and 60.59%, respectively. In the process of molting, 16.66% of larvae showed different degrees of wrinkling and color change, 33.33% of larvae died, and 33.33% of larvae showed different degrees of molting delay, indicating that the gene is involved in regulating the molting process of *Z. cucurbitae* and has the potential to become a target for the development of a new control agent for real fly.

基金项目: 国家自然科学基金(32272527), 教育部 111 学科创新引智基地资金(B18044)

\* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: dongwei08@swu.edu.cn

收稿日期: 2023-03-05

*Shadow* (*ZcSad*) and *ZcShade* (*ZcShd*). Amino acid sequence alignment exhibited a conserved cytochrome P450 domain in all five P450 enzymes. Phylogenetic analysis showed that these genes were closely related to homologs in *Bactrocera dorsalis*. These genes were highly expressed in the prothoracic gland complex in both larvae and adults before sexual maturity. Following RNAi-mediated silencing of *ZcShd* for 24 h and 48 h, gene expression was down-regulated by 80.54% and 60.59%, respectively. Statistical analysis of *Z. cucurbitae* pupation showed that 16.66% of larvae exhibited shrinkage and discoloration, 33.33% died, and 33.33% displayed various malformations during pupation, indicating their involvement in regulating ecdysis, which could be used as a new target for controlling Tephritidae insects.

**Key words:** melon fly; Halloween genes; cytochrome P450; ecdysone; development; spatio-temporal expression

瓜实蝇 *Zeugodacus cucurbitae* 隶属于双翅目实蝇科, 是一种世界检疫性害虫(邓金奇等, 2021), 主要为害葫芦科植物, 包括黄瓜、西葫芦、丝瓜、苦瓜、南瓜和冬瓜等多种蔬菜, 目前已记录的寄主超过130种(McQuate et al., 2017)。该虫主要以幼虫为害, 雌成虫产卵于幼嫩瓜果内, 幼虫孵化后在瓜果内部取食为害(Koyama et al., 2004); 为害后果实先局部变黄, 然后整体腐烂发臭, 造成大量落果, 严重影响瓜果的品质和产量, 造成重大经济损失(肖伏莲和胡成, 2021)。目前对瓜实蝇的防治仍然以化学防治为主, 但长期大量使用化学杀虫剂易导致其产生抗药性(李欣莲等, 2022), 而且严重污染自然环境, 目前瓜实蝇已经对马拉硫磷、二嗪农和氯化物等农药产生了不同程度的抗性(Diksha et al., 2022)。因此, 探索、开发瓜实蝇新型控制剂尤为重要。

蜕皮激素在昆虫的生长发育过程中扮演着重要角色, 它是一种脂溶性生物活性分子, 会影响昆虫蜕皮、变态和滞育等发育过程(Rewitz et al., 2007)。结合RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术研究蜕皮激素合成通路基因及其功能对害虫防治有实践意义, 可为新型害虫绿色防控性靶标研发提供备选靶标。在昆虫体内, 蜕皮激素主要以20-羟基蜕皮激素(20-hydroxyecdysone, 20E)的形式存在, 昆虫从食物中摄取胆固醇或其他甾体激素后, 以这些蜕皮甾体为前体, 经细胞色素P450家族的一系列细胞色素单加氧酶作用后形成有活性的20E, 介导昆虫的蜕皮和变态过程中的形态变化(Feyereisen, 2012)。编码这些酶的细胞色素P450家族基因, 又称为Halloween基因。在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 和烟草天蛾 *Manduca sexta* 中, 合成20E的第一步是胆固醇脱氢生成7-脱氢胆固醇, 该过程发生在前胸腺, 由Rieske加氧酶Neverland(Nvd)催化(Warren

et al., 2006; Yoshiyama-Yanagawa et al., 2011)。随后, 在Halloween基因 *spook* (*Spo*, 国际通用名称为 *Cyp307a1*)、*phantom* (*Phm*, *Cyp306a1*)、*disembodied* (*Dib*, *Cyp302a1*) 和 *shadow* (*Sad*, *Cyp315a1*) 基因编码的细胞色素单加氧酶作用下, 碳原子依次发生羟基化反应, 生成蜕皮激素(Rewitz et al., 2007), 蜕皮激素释放到血淋巴中被 *shade* (*Shd*, *Cyp314a1*) 编码的单加氧酶进一步修饰, 最终生成活性蜕皮激素20E(Petryk et al., 2003), 至此蜕皮激素合成通路完成。负责合成蜕皮激素的相关通路基因已在多种昆虫中被鉴定和分析。Zhang et al. (2022) 在东亚飞蝗 *Locusta migratoria* 中鉴定到5个Halloween基因, 通过RNAi技术其中的 *LmCyp307a2* 基因导致东亚飞蝗蜕皮严重延迟甚至失败, 组织染色结果表明在抑制 *LmCyp307a2* 表达后, 旧角质层的断裂和降解也受到抑制, 同时也抑制新角质层合成, 最终导致蜕皮失败。蜕皮激素还参与调节这些昆虫成虫阶段的生物过程, 即衰老、生殖细胞发育、先天免疫以及控制行为的神经元功能(Niwa & Niwa, 2014)。在鳞翅目鹿眼蛱蝶 *Junonia coenia* 成虫翼状盘的形成过程中, 蜕皮激素是维持有丝分裂所必需的, 能刺激DNA合成和有丝分裂, 通过增加细胞数量来刺激生长(Nijhout et al., 2018)。蜕皮激素的合成过程是相互联系的, 每一个过程都不可或缺, 任何一个过程异常都可能导致昆虫蜕皮激素合成受阻, 阻碍其发育或导致畸形(Gilbert & Warren, 2005)。例如, 果蝇 *Nvd* 的突变导致幼虫长出双口钩并停止取食, 在进入下一龄期前死亡(Yoshiyama et al., 2006); 而果蝇 *Phm*、*Dib*、*Sad* 和 *Shd* 的突变则可能导致幼虫出现胚胎发育停滞、表皮不分化、背侧功能不全、后肠环化不良、体内20E水平显著降低和死亡等现象(Gilbert, 2004; Warren et al., 2002)。综上, 研究蜕皮激

素合成通路基因对于昆虫发育和害虫防治都有重要意义。

*Shd* 是编码蜕皮激素-20-单加氧酶的关键基因。蜕皮激素-20-单加氧酶主要在内质网或线粒体将蜕皮激素转化为具有活性的20E (Petryk et al., 2003)。与其他2个Halloween基因 *Dib* 和 *Sad* 不同, *Shd* 不在前胸腺表达, 而是在表皮、中肠、马氏小管和脂肪体等外周组织中表达, 这些组织是多种昆虫蜕皮激素-20-单加氧酶的主要活性部位 (Petryk et al., 2003)。在烟草天蛾中 *Shd* 主要表达于中肠、马氏小管、脂肪体和表皮, 在前胸腺和神经系统表达水平极低, 该基因可介导蜕皮激素向20E的转化, 并调控烟草甲 *Lasioderma serricorne* 蜕皮酮-20-单加氧酶的水平, 从而控制其活性 (Rewitz et al., 2006a)。这些研究均表明 *Shd* 与其他几个Halloween基因在昆虫体内的表达模式截然不同, 鉴于 *Shd* 在瓜实蝇幼虫中也有与其他昆虫类似的表达模式, 本研究拟利用瓜实蝇基因组数据鉴定其蜕皮激素合成通路相关的Halloween基因, 明确其时空表达模式, 并分析其中的 *Shd* 基因的生物学功能, 以期评估其作为瓜实蝇防治靶标的潜力。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试昆虫: 瓜实蝇于2016年采自海南省海口市, 以蛹的形式带回实验室, 饲养多代后形成稳定的实验室种群。成虫在温度 (27±0.5) °C、相对湿度 (70±5)%、光周期 14 L: 10 D 条件下饲养; 幼虫在温度 (27±0.5) °C、相对湿度 (70±5)%、黑暗条件下饲养。采用人工饲料进行饲养, 成虫饲料主要包括酵母、白糖和蜂蜜, 按照一定比例加水搅拌均匀即得; 幼虫饲料主要包括嫩南瓜、玉米粉、麦麸、琼脂条、酵母粉、蔗糖和亚油酸等, 加水混匀煮成熟食即得 (Wei et al., 2020)。

试剂: TRIzol, 美国 Invitrogen 公司; RQ1 RNase-Free DNase Kit PrimeScript<sup>®</sup> RT、RQ1 RNase-Free Dnase、RNase-free Water 和 pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Systems, 美国 Promega 公司; 大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞, 北京擎科生物科技股份有限公司; Reagent Kit Instructions NovoStart<sup>®</sup> SYBR、PrimeScript<sup>®</sup> RT Reagent Kit、Agarose Gel DNA Extraction Mini Kit 和 6×Loading Buffer, 宝生物工程 (大连) 有限公司; NovoStart SYBR qPCR Super Mix, 上海近岸蛋白公司; GoldenView<sup>™</sup> 核酸染料、

BM 2000 DNA Marker 和 2×Taq PCR Master Mix, 美国 Bio-Rad 公司; QIAGEN<sup>®</sup> Plasmid Plus Midi Kit, 德国 QIAGEN GmbH 公司; 其余试剂均为国产分析纯。

仪器: SZ760 体视显微镜, 重庆奥特光学仪器有限公司; MJ-70-I 霉菌培养箱, 上海齐欣科学仪器有限公司; Fresco 17 高速冷冻离心机、Nanodrop One 核酸浓度分析仪, 美国 Thermo Scientific 公司; Power Pac Basic 水平电泳系统、Universal Hood II 凝胶成像系统、CFX Connect Real-Time System、CFX384 荧光定量 PCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司; 5415D 台式离心机, 德国 Eppendorf 公司; UMP3 型显微注射仪, 美国 WPI 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 瓜实蝇 Halloween 基因分子的克隆

为验证瓜实蝇 Halloween 基因序列, 基于 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库中瓜实蝇基因组数据 (NCBI 序列登录号 PRJNA259565) 鉴定 Halloween 基因序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件针对鉴定到的 Halloween 基因设计全长序列验证引物 (表 1), 本研究所用引物均由北京六合华大基因科技有限公司合成。取 20 头 5 日龄幼虫的前胸腺复合体组织, 收集 3 个重复, 利用 TRIzol 参照说明书提取总 RNA。通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性, 利用核酸浓度分析仪测定总 RNA 浓度,  $1.8 < OD_{260\text{nm}}/OD_{280\text{nm}} < 2.0$  和  $OD_{260\text{nm}}/OD_{230\text{nm}} > 2.0$  的总 RNA 样品即为合格。利用 RQ1 RNase-Free DNase Kit 去除样品中基因组 DNA 残留, 通过 PrimeScript<sup>®</sup> RT Reagent Kit 合成第一链 cDNA, 于 -20 °C 保存备用。以瓜实蝇 5 日龄幼虫前胸腺复合体组织 cDNA 为模板, 克隆 Halloween 基因的开放阅读框序列。25  $\mu\text{L}$  PCR 反应体系: Primer STAR Max Premix (2×Taq) 12.5  $\mu\text{L}$ 、ddH<sub>2</sub>O 9.5  $\mu\text{L}$ 、cDNA 1  $\mu\text{L}$ 、上下游引物各 1  $\mu\text{L}$ 。反应程序: 98 °C 预变性 3 min; 98 °C 变性 10 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72 °C 再延伸 10 min。PCR 扩增后, 利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测产物, 利用 Agarose Gel DNA Extraction Mini Kit 回收目的条带, 利用 pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Systems 将胶回收产物连接至 pGEM-T Easy 载体上, 将连接产物转化至大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞, 在 37 °C 霉菌培养箱培养 12 h。经过蓝白斑筛选及 PCR 验证, 反应体系和程序同上。挑选 PCR 检测结果为阳性的单克隆菌液进行 Sanger 测序, 并与基因组序列进行比对验证。利用 QIAGEN<sup>®</sup> Plasmid Plus Midi Kit 参照说

明书对测序正确的菌液进行质粒提取,并于-20 ℃ 保存备用。

表1 瓜实蝇Halloween基因鉴定与分析所用引物序列信息

Table 1 Primer sequences used for identification and analysis of Halloween genes in *Zeugodacus cucurbitae*

目的 Purpose	基因 Gene	引物序列 Primer sequence		产物长度 Product size/bp	退火温度 Melting temperature/℃
		上游引物(5'-3') Forward primer (5'-3')	下游引物(5'-3') Reverse primer (5'-3')		
PCR	<i>ZcSpo</i>	CCTACATTCTTTCAGCAAGTTT	TAAAACAATATGATAACCGACAT	1 755	54
	<i>ZcPhm</i>	CGCCAGATAAAAATGTTGAC	TTCATATTGTGTTTGATTGATG	1 626	55
	<i>ZcDib</i>	ATTCTACAATGTAAAGCGGTCT	CCGTAATCAATTCCGTTA	1 644	54
	<i>ZcShd</i>	CGATCAAATAGTAAATAAGCGT	AAGATGTGTGTTCGTGTTC	1 761	55
	<i>ZcSad</i>	AACTGCCACTTGAATTTCG	TATTAATAAGGCTATGCGATG	1 731	54
RT-qPCR	<i>ZcSpo</i>	TTATGAGCAAGCACCTGGACC	ATTTGGCCGTCCTCCGAAAA	233	60
	<i>ZcPhm</i>	TTTGGCGTGAAATACGCACG	GCCTTGCCGTCGAGTAGAAA	167	60
	<i>ZcDib</i>	AGGAGGAAGCTTGTCGTGTG	TGATAACCGCTCAGCACCAG	172	60
	<i>ZcSad</i>	TGCGTTTGCTGCTGATATGC	GTGACGTTGATTGTAGCGCC	176	60
	<i>ZcShd</i>	GGTTTTCTGACAAAAGCGGT	GCCATTCGACCATCTCGGA	197	60
	<i>Rps3</i>	TAAGTTGACCGGAGGTTTGG	TGGATCACCAGAGTGGATCA	169	60
	<i>αTub</i>	CGCATTTCATGGTTGATAACG	GGGCACCAAGTTAGTCTGGA	184	60
	<i>βTub</i>	GAATTGATGCGACTGGTGCC	CTGAATCCATGGTGCCAGGT	141	60
	<i>Rpl13</i>	GTTGTGCGTTGCGAGGAATT	GCTTGTCGTATGGTGGTGA	241	60
	RNAi	<i>ZcShd</i>	taatacgactactataggTCCCGATC- GATATTCCAGTT	taatacgactactataggATCAGATTG- GCGATGTCCTC	542
<i>ZcGFP</i>		taatacgactactataggCTTCTTCA- AGTCCGCCATGC	taatacgactactataggATGTGATCG- CGCTTCTCGTT	408	68

小写字母表示T7启动子序列。Lowercase letters indicate T7 promoter sequence.

### 1.2.2 瓜实蝇Halloween基因生物信息学分析

利用DNAMAN 7.0软件拼接1.2.1测序结果。从NCBI数据库搜寻其他昆虫同源的蜕皮激素合成通路基因氨基酸序列,与瓜实蝇的序列整合在一起,使用MEGA 7软件采用邻接法进行系统发育分析(Kumar et al., 2016),bootstrap重复次数为1 000次。使用Jalview软件对上述搜寻序列进行多序列比对。利用NCBI CD-search程序(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>)分析瓜实蝇Halloween蛋白的氨基酸保守结构域。利用德泰生物在线网站(<http://www.detaibio.com/tools/transmembrane.html>)进行Halloween蛋白的跨膜结构域预测,并使用SignalP 6.0软件(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP>)预测瓜实蝇Halloween蛋白的信号肽。

### 1.2.3 瓜实蝇中Halloween基因表达量的测定

为明确Halloween基因在瓜实蝇不同发育阶段和不同组织中的表达模式,收集瓜实蝇不同发育阶段样品,包括卵100粒(初产8 h内)、1日龄幼虫100头、3日龄幼虫20头、7日龄幼虫10头、1、5、9日龄蛹各3头和1、5、9日龄未交配雌雄成虫各3头;同

时收集5龄幼虫的不同组织,包括脂肪体、中肠、马氏管、表皮、气管和前胸腺复合体,以及7日龄成虫的不同组织,包括脂肪体、中肠、马氏管、卵巢和精巢,每20头为1个组织重复。每组样品收集3个重复,并利用1.2.1方法合成cDNA。

利用在线网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINKLOC=BlastHome>)设计Halloween基因的实时荧光定量PCR(real-time quantitative PCR, RT-qPCR)引物(表1)。使用NovoStart® SYBR qPCR SuperMix Plus试剂和CFX384 Optics Module荧光定量仪进行Halloween基因的时空表达模式解析。10 μL RT-qPCR反应体系:2×NovoStart® SYBR qPCR SuperMix Plus 5 μL、ddH<sub>2</sub>O 3.5 μL、cDNA 0.5 μL、上下游引物各0.5 μL。反应程序:95 ℃预变性10 min;95 ℃变性15 s,60 ℃退火30 s,共40个循环;熔解曲线阶段温度设定为60~95 ℃,每5 s升高0.5 ℃,每30 s收集1次荧光值(赵萌萌等,2023)。以Ribosomal protein S3(*Rps3*)和Ribosomal protein L13(*Rpl13*)为内参基因分析Halloween基因在不同发育阶段的表达模式,以Alpha tubulin(*αTub*)和Beta tubulin 1(*βTub*)为内参基因分

析 Halloween 基因在不同组织中的表达模式(Li et al., 2020)。利用 qBase Plus 软件计算 Halloween 基因的相对表达量。

#### 1.2.4 瓜实蝇 *Shd* 基因的 dsRNA 合成及功能分析

为明确瓜实蝇 Halloween 基因中 *Shd* 的功能, 设计 *Shd* 和维多利亚多管发光水母 *Aequorea victoria* 绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 编码基因 (GenBank 登录号 CAA58789.1) 的特异性引物 (表 1) 扩增目的片段, PCR 反应体系同 1.2.1。反应程序: 98 °C 预变性 3 min; 98 °C 变性 10 s, 68 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 35 个循环; 72 °C 再延伸 10 min。其余步骤同 1.2.1。利用 Transcript Aid T7 High Yield Transcription Kit 对提取到的质粒参照说明书合成并纯化 dsRNA。利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 dsRNA 的完整性, 利用核酸浓度分析仪测定 dsRNA 的浓度, 根据  $1.8 < OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}} < 2.0$  和  $OD_{260\text{ nm}}/OD_{230\text{ nm}} > 2.0$  的标准判断 dsRNA 样品的纯度。纯化后的 dsRNA 于 -80 °C 保存备用。

选取瓜实蝇 5 日龄幼虫注射 dsRNA, 每头注射 2.0  $\mu\text{g}$ , 以注射等量 dsGFP 作为阴性对照。注射 24 h 和 48 h 后收集样品, 每组样品收集 3 个生物学重复, 参照 1.2.1 方法进行样品的总 RNA 提取以及 cDNA 合成。选择  *$\alpha\text{Tub}$*  和 *Rps3* 作为内参基因进行 *Shd* 和 GFP cDNA 的 RT-qPCR 扩增, 基因的相对表达量测定方法同 1.2.3。同时, 注射后每隔 8 h 统计正常幼虫、畸形幼虫、死亡幼虫、正常蛹和畸形蛹的数量以及化蛹时间, 共统计 9 次, 并计算沉默效率; 同时观察记录注射 48 h 后幼虫和蛹的形态特征。

#### 1.3 数据分析

利用 SPSS 22.0 软件对 Halloween 基因在不同发育阶段和幼虫及成虫不同组织中的相对表达量进行单因素方差分析, 采用最小显著差数 (least significant difference, LSD) 法进行差异显著性检验; 利用独立样本 *t* 测验法检验靶基因干扰效率、其他 Halloween 基因相对表达量和幼虫化蛹数的差异显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 瓜实蝇 Halloween 序列分析

基于瓜实蝇基因组共鉴定获得 5 个 Halloween 家族基因, 并分别命名为 *ZcSpo*、*ZcPhm*、*ZcDib*、*ZcSad* 和 *ZcShd*, 上传 GenBank 获得登录号分别为 XM\_011189903.3、XM\_011183433.3、XM\_054230302.1、XM\_011193053.3 和 XM\_011193750.3。利用分子克隆技术获得其开放阅读框, 大小分别为 1 755、1 614、1 584、1 701 和 1 653 bp, 分别编码 545、537、

515、566 和 551 个氨基酸, 分子量分别为 62.96、62.51、58.82、64.06 和 60.11 kD, 等电点分别为 8.99、8.06、9.19、8.18 和 9.41。5 个 Halloween 家族蛋白均无信号肽, *ZcSpo* 在第 2~19 位氨基酸处有 1 个跨膜结构域, *ZcPhm* 在第 4~26 位和第 98~120 位氨基酸处有 2 个跨膜结构域, *ZcShd* 在第 2~24 位氨基酸处有 1 个跨膜结构域。

氨基酸序列分析结果表明, 5 个 Halloween 基因编码的氨基酸大多具有细胞色素 P450 家族的 5 个保守结构域, 分别是 WxxxR (Helix-C)、GxE/DTT/S (Helix-I)、ExxR (Helix-K)、PxxFxPE/DRF (PERF motif) 和 PFxxGxRxCxG/A (Heme-binding domain)。不同的是, *ZcSpo* 的 Helix-C 结构域是 LxxxR 而不是 WxxxR, *ZcPhm* 无 Helix-C 结构域。 *ZcSpo*、*ZcPhm*、*ZcDib*、*ZcSad* 和 *ZcShd* 分别在第 77~533、64~503、68~520、126~557 和 109~304 位氨基酸处具有保守结构域, 其中 *ZcSpo* 属于 CYP1-2-like 家族, *ZcPhm* 和 *ZcShd* 属于 Cytochrome-P450 超家族, *ZcDib* 和 *ZcSad* 属于 CYP24A1-like 超家族。此外, 5 个 Halloween 基因的 N 端具有独特的线粒体输入序列, 由疏水残基和脯氨酸-甘氨酸 (proline/glycine, P/G) 丰富区域组成 (图 1)。

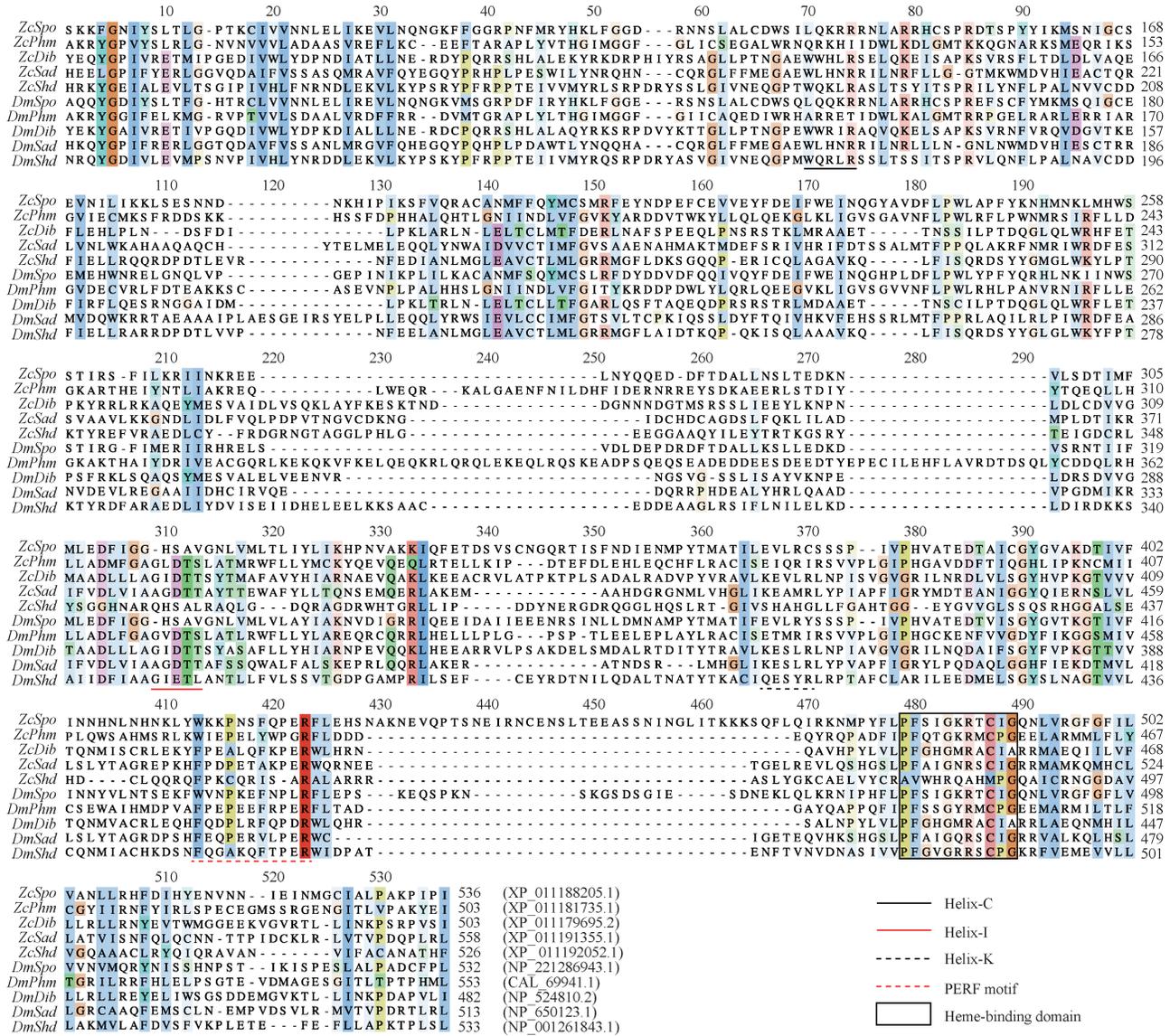
系统发育分析显示, *ZcSpo*、*ZcPhm*、*ZcDib*、*ZcSad* 和 *ZcShd* 都能很好的各自聚成一支, 并且遵循昆虫进化分类关系, 即瓜实蝇与橘小实蝇 *B. dorsalis* 和地中海实蝇 *Ceratitis capitata* 的 Halloween 基因编码的氨基酸序列聚为一簇, 三者均属于双翅目实蝇科昆虫, 具有较高的同源性, 而与鳞翅目和鞘翅目昆虫亲缘关系较远 (图 2)。

### 2.2 瓜实蝇 Halloween 基因的时空表达模式

Halloween 基因在瓜实蝇不同发育阶段的表达不同, 其在成虫期的相对表达量最高, 且在雌成虫中的相对表达量显著高于雄成虫中的。其中, *ZcDib*、*ZcSad* 和 *ZcShd* 基因在 9 日龄雌成虫中的相对表达量最高, *ZcSpo* 和 *ZcPhm* 基因在 5 日龄雌成虫中的相对表达量最高 (图 3)。

Halloween 基因在瓜实蝇幼虫不同组织中的表达也不同, 其中 *ZcSpo*、*ZcPhm*、*ZcDib* 和 *ZcSad* 基因在前胸腺复合体中高表达, 且 *ZcShd* 基因在中肠、脂肪体和马氏管中也高表达, 而 *ZcDib* 基因在脂肪体的相对表达量最高。Halloween 基因在成虫不同组织中的表达亦不同, *ZcSpo* 基因在卵巢和精巢中高表达, *ZcPhm* 基因在雌成虫脂肪体中高表达, *ZcDib* 基因在雌成虫中肠中和雄成虫脂肪体中高表达, *ZcSad* 基因在各个组织中的相对表达量无显著差异,

ZcShd 基因在雄成虫中肠中和雌雄成虫马氏管中高 表达(图4)。



Zc: 瓜实蝇; Dm: 黑腹果蝇。图中仅展示P450保守域的序列比对结果,同列字母的底色代表同源性,颜色越深,同源性越高,并标记出5个保守基序 Helix-C、Helix-I、Helix-K、PERF motif 和 Heme-binding domain。Zc: *Zeugodacus cucurbitae*; Dm: *Drosophila melanogaster*。Only the conservative domains of P450 are aligned in the figure. The background of a column of letters indicates homology, the darker the color, the higher the homology. Five conservative motifs, Helix-C, Helix-I, Helix-K, PERF motif and Heme-binding domain, are marked.

图1 瓜实蝇与黑腹果蝇的Halloween基因氨基酸序列比对

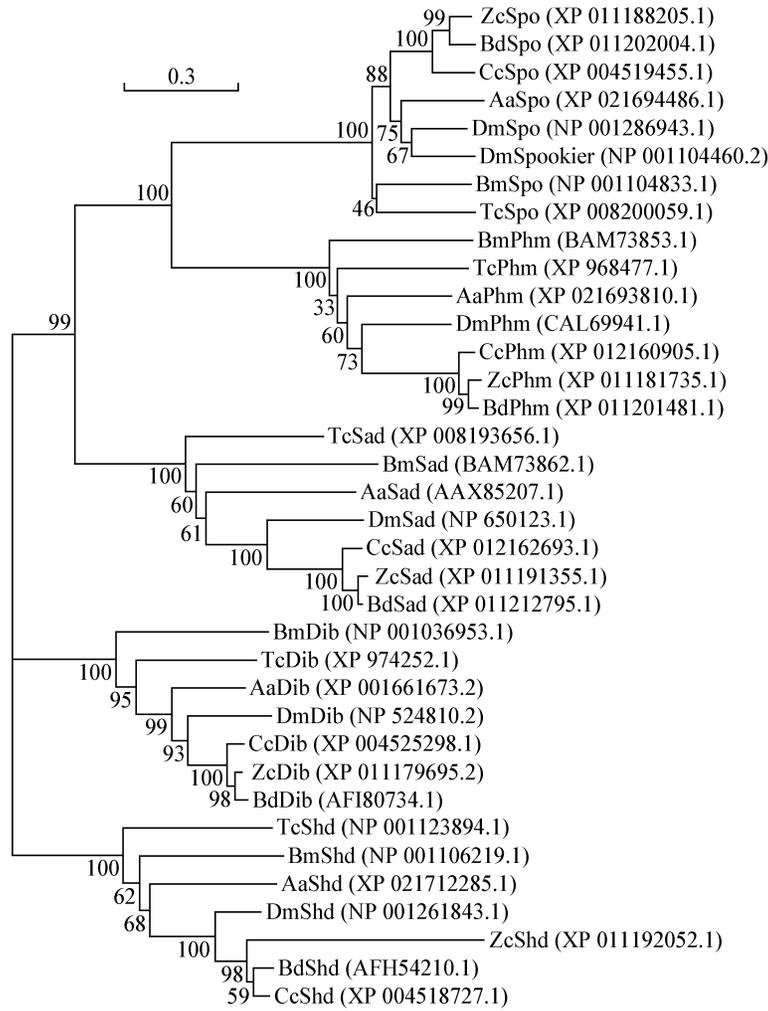
Fig. 1 Alignment of the Halloween gene-derived amino acid sequences between *Zeugodacus cucurbitae* and *Drosophila melanogaster*

2.3 ZcShd 功能分析

注射 dsShd 后 24 h 和 48 h, 靶基因 ZcShd 的相对表达量显著下调, 沉默效率分别为 80.54% (P=0.005) 和 60.59% (P=0.042) (图 5-A~B)。注射 dsShd 后检测其余 4 个基因的相对表达量, 发现 ZcPhm (P=0.016) 和 ZcDib (P=0.027) 基因在干扰 ZcShd 后 24 h 显著下调, ZcSpo 和 ZcSad 基因的相对表达量无显著变化 (图 5-A); 而 ZcSpo (P=0.048) 和 ZcSad (P=0.013) 基因在干扰 ZcShd 后 48 h 显著下调, 其余 2 个

基因的相对表达量无显著变化 (图 5-B)。

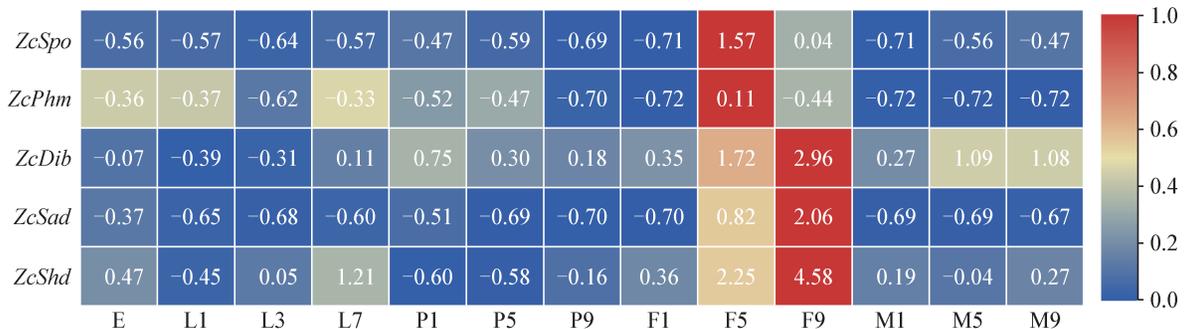
基于累积化蛹数量可知, 与对照组相比, 注射 dsShd 后 16、24、32、40、48 和 56 h, 幼虫的化蛹时间均显著延长 (P<sub>16h</sub>=0.044, P<sub>24h</sub>=0.012, P<sub>32h</sub>=0.008, P<sub>40h</sub>=0.004, P<sub>48h</sub>=0.005, P<sub>56h</sub>=0.015) (图 5-C)。注射 48 h 后观察瓜实蝇幼虫的形态特征, 发现注射 dsShd 后有 16.66% 的幼虫出现不同程度的皱缩、变色表型, 有 33.33% 的幼虫死亡, 并有 33.33% 的幼虫出现不同程度的化蛹困难 (图 5-D)。



Cc: 地中海实蝇; Aa: 埃及伊蚊; Dm: 黑腹果蝇; Bm: 家蚕; Tc: 赤拟谷盗; Bd: 橘小实蝇; Zc: 瓜实蝇。Cc: *Ceratitits capitata*; Aa: *Aedes aegypti*; Dm: *Drosophila melanogaster*; Bm: *Bombyx mori*; Tc: *Tribolium castaneum*; Bd: *Bactrocera dorsalis*; Zc: *Zeugodacus cucurbitae*.

图2 基于Halloween基因氨基酸序列采用邻接法构建的瓜实蝇及其他昆虫的系统发育树

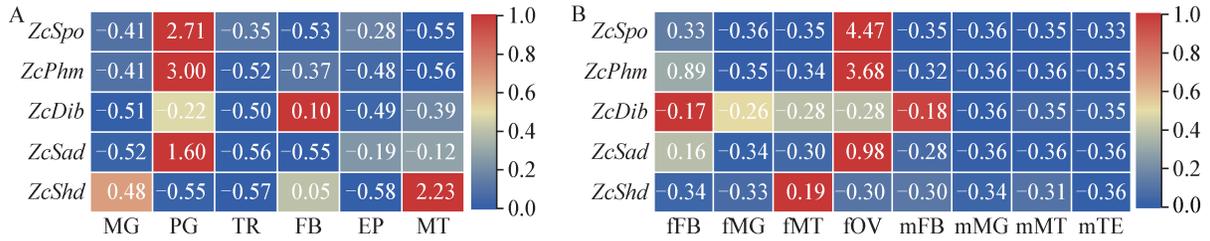
Fig. 2 Phylogenetic tree of *Zeugodacus cucurbitae* and other insects based on Halloween genes-derived amino acid sequences by neighbor-joining method



热图中数字代表基因mRNA相对表达量的RT-qPCR定量值,颜色从蓝色到红色表示相对表达量从低到高。E: 卵; L1、L3、L7: 1、3和7日龄幼虫; P1、P5、P9: 1、5和9日龄蛹; F1、F5、F9: 1、5和9日龄雌成虫; M1、M5、M9: 1、5和9日龄雄成虫。The numbers in the heatmap represent the mean values of quantitative results of RT-qPCR for gene mRNA relative expression, with colors ranging from blue to red indicating relative expression levels from low to high. E: Egg; L1, L3, L7: 1-, 3- and 7-day-old larva; P1, P5, P9: 1-, 5- and 9-day-old pupa; F1, F5, F9: 1-, 5- and 9-day-old female; M1, M5, M9: 1-, 5- and 9-day-old male.

图3 瓜实蝇Halloween基因在不同发育阶段的表达模式

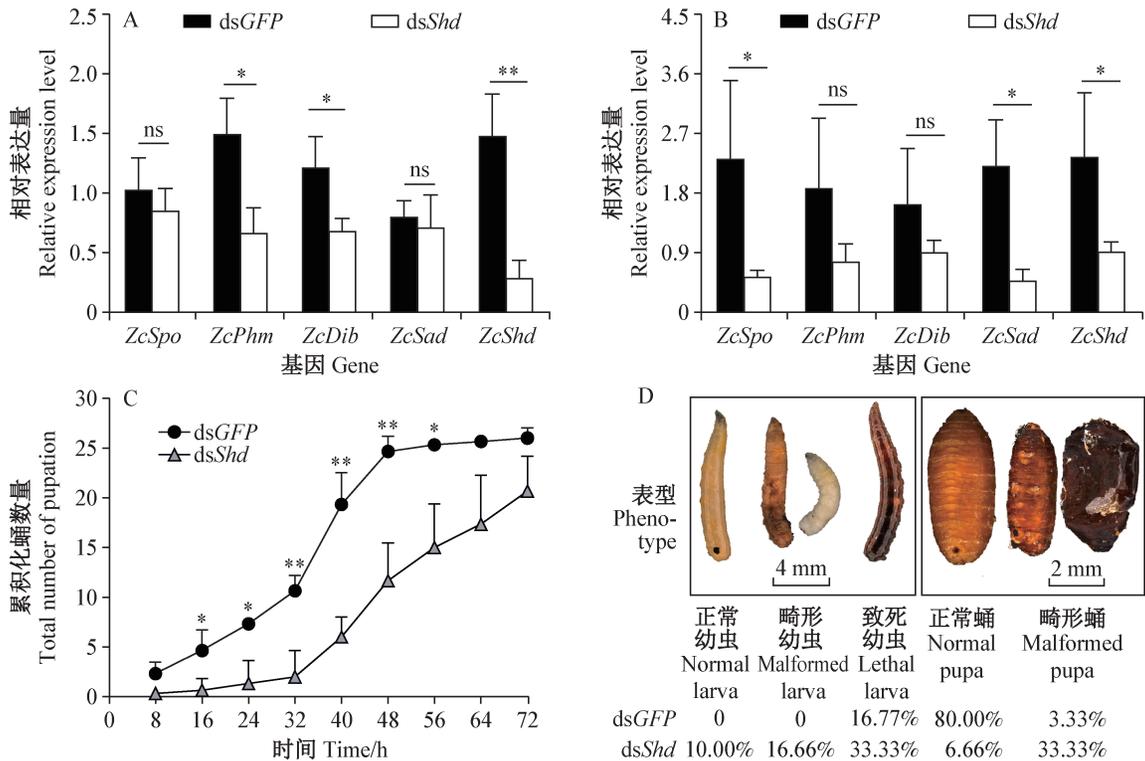
Fig. 3 Expression patterns of Halloween genes in different developmental stages of *Zeugodacus cucurbitae*



热图中的数字代表基因 mRNA 相对表达量的 RT-qPCR 定量值, 颜色从蓝色到红色表示相对表达量从低到高。MG: 中肠; PG: 前胸腺复合体; TR: 气管; FB: 脂肪体; EP: 表皮; MT: 马氏管; OV: 卵巢; TE: 精巢; f: 雌成虫; m: 雄成虫。The numbers in the heatmap represent the mean values of quantitative results of RT-qPCR for gene mRNA relative expression, with colors ranging from blue to red indicating relative expression levels from low to high. MG: Midgut; PG: prothoracic glands; TR: trachea; FB: fat body; EP: epidermis; MT: Malpighian tubules; OV: ovary; TE: testis; f: female; m: male.

图 4 瓜实蝇 Halloween 基因在 7 日龄幼虫(A)和 5 日龄成虫(B)不同组织中的表达模式

Fig. 4 Expression patterns of Halloween genes in different tissues of 5-day-old *Zeugodacus cucurbitae* larva (A) and 7-day-old *Z. cucurbitae* adult (B)



A~B: 注射 dsShd 后 24 h 和 48 h 时 Halloween 基因的相对表达量; C: 注射 dsShd 后 72 h 内的幼虫化蛹数; D: 注射 dsShd 后 48 h 各虫态表型及比例。A~B: Relative expression levels of Halloween genes at 24 h and 48 h after injection of dsShd; C: pupation number of *Z. cucurbitae* larvae after dsShd injection within 72 h; D: phenotypes and percentages of tested insects after 48 h of dsShd injection.

图 5 瓜实蝇 ZcShd 功能分析

Fig. 5 Functional analysis of *ZcShd* in *Zeugodacus cucurbitae*

图中数据为平均数±标准差。\*和\*\*表示经独立样本 t 检验法检验差异显著 ( $P < 0.05$  和  $P < 0.01$ ); ns 表示无显著差异。Data are mean±SD. \* or \*\* indicates significant difference by independent samples t test ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ); ns indicates no significant difference.

### 3 讨论

昆虫蜕皮过程主要由蜕皮激素调节完成(Feyereisen, 2012)。细胞色素 P450 家族酶是昆虫蜕皮

激素合成过程中的关键调控因子, 能将植物甾醇和动物脂肪醇氧化为具有活性的 20E, 进而调节昆虫的蜕皮生长、变态发育乃至生殖交配等生命活动 (Kamiyama & Niwa, 2022)。本研究基于瓜实蝇基

基因组数据鉴定到5个Halloween基因并进行了全长序列验证,氨基酸序列比对分析显示不同昆虫的Halloween基因具有较高的保守性,表明此类基因在进化过程中具有功能保守性,也暗示了蜕皮激素合成与调控机制的保守性(Rewitz et al., 2006b)。保守结构域分析发现,ZcSpo的Helix-C结构域不符合WxxxR的原因可能是Spook不是单一直系同源基因,其有Spookier和Spookiest两个旁系基因,在双翅目昆虫中存在Spook和Spookier,所以Helix-C未必都具有WxxxR结构(Ono et al., 2006)。基于氨基酸序列的系统发育分析发现瓜实蝇Halloween基因编码的序列均能与各自的家族基因成员聚为一支,与橘小实蝇Halloween基因的关系最密切。在家蚕*Bombyx mori* Halloween基因的鉴定分析中也发现鳞翅目与双翅目的Halloween基因在进化过程中有较高的保守性,其序列相似性关系与昆虫分类进化关系相一致(程道军等, 2014)。

分析Halloween基因在瓜实蝇不同发育阶段的表达模式,发现ZcPhm和ZcShd在末龄幼虫,即7日龄幼虫中的表达量上升,随后在1日龄蛹中下降,其表达水平与蜕皮激素阶段性表达相关(Warren et al., 2002)。这种表达模式最初在果蝇中被发现,Phm、Dib和Sad在果蝇环腺中的表达进入3龄幼虫期后开始下调,然后在高龄幼虫期上升(Warren et al., 2002)。Phm、Dib和Sad在烟草甲前胸腺中的表达进入5龄期的第2天也较低,蜕皮后血淋巴蜕皮激素水平明显下降(Rewitz et al., 2006a)。灰翅夜蛾*Spodoptera littoralis*中Spo、Phm、Dib、Sad和Shd在6龄幼虫前胸腺中的表达趋势均为先增加后减小,说明上述基因在昆虫蜕皮化蛹阶段具有重要功能(Iga & Smaghe, 2010)。ZcPhm和ZcShd在瓜实蝇末龄幼虫期的表达量增加,随后在1日龄蛹中的表达量降低,这种表达模式与对上述其他昆虫的研究结果一致,虽然ZcPhm和ZcShd的表达时间与上述其他昆虫有一定的差异,但总体上ZcPhm和ZcShd在瓜实蝇幼虫-蛹变态过程中前胸腺蜕皮激素生物合成和脂肪体蜕皮激素转化为20E的过程中具有保守性,说明Halloween基因在前胸腺蜕皮激素生物合成和脂肪体蜕皮激素转化过程中发挥着重要作用。另外,本研究鉴定到的5个Halloween基因均在瓜实蝇5日龄和9日龄雌成虫中高表达,暗示了20E的合成可能与瓜实蝇的性成熟或生殖相关组织的功能有关,例如调控雌成虫卵巢发育。草地贪夜蛾*Spodoptera frugiperda*雌成虫蜕皮激素滴度在卵巢始

期出现高峰,在产卵后第3天下降,随后又上升(Sorge et al., 2000)。赤拟谷盗*Tribolium castaneum*中Phm和Shd的表达量在羽化后也出现先降低后升高的趋势,干扰赤拟谷盗Phm基因表达并不影响卵巢成熟和卵子发生,但导致卵巢蜕皮激素含量急剧下降,而干扰Shd后赤拟谷盗卵巢生长和成熟明显停滞(Parthasarathy et al., 2010)。本研究中5个Halloween基因表达量均在瓜实蝇蛹末龄期升高,羽化后降低随后又升高,ZcSpo和ZcPhm在5日龄雌成虫中的表达量最高,ZcDib、ZcSad和ZcShd的表达量在9日龄雌成虫中最高,与这些基因在赤拟谷盗中的表达模式相似。在棉铃虫中,4个20E合成通路的细胞色素P450基因在卵巢中高表达,说明卵巢也是鳞翅目昆虫雌成虫20E的主要合成位点,该结果与Halloween基因在瓜实蝇中的表达模式类似,也与Dubrovsky(2005)研究结果一致,即成虫期蜕皮激素主要在性腺等组织中合成。

本研究结果表明,ZcSpo、ZcPhm、ZcDib和ZcSad在瓜实蝇幼虫前胸腺中高表达,ZcShd在马氏管、卵巢和脂肪体中高表达,这与Halloween基因在其他昆虫的表达模式非常相似,如在小菜蛾*Plutella xylostella*中,Spo、Dib和Sad在前胸腺中的表达量均很高,但Shd在前胸腺中的表达量却很低;相反,Shd在脂肪体中的表达量很高,而Spo、Dib和Sad在脂肪体中的表达量均很低(Peng et al., 2019);在灰翅夜蛾中,Spo、Phm、Dib和Sad在前胸腺中的表达量也很高,但Shd在前胸腺中的表达量很低(Iga & Smaghe, 2010)。这与Zhou et al.(2022)报道柑橘大实蝇*Bactrocera minax*的前胸腺是蜕皮激素产生的主要部位相吻合,而Shd则在脂肪体、中肠和马氏小管等外周组织中催化蜕皮酮向活性20E的转化。Halloween基因在瓜实蝇成虫组织中的表达谱显示,除ZcSpo在卵巢和精巢高表达外,其余基因主要在脂肪体、中肠和马氏管等外周组织中表达。卵巢与蜕皮激素的产生有关,其作用是参与卵子的发生和影响衰老,但蜕皮激素对昆虫生殖和衰老的影响非常复杂,目前尚未完全解析(Kozlova & Thummel, 2000; Tu et al., 2002)。这些例子说明前胸腺是幼虫中早期合成蜕皮激素的主要场所,而卵巢可能是成虫后期合成蜕皮激素的主要场所,并在合成蜕皮激素后转移至外周组织,推测蜕皮激素前期主要调控蜕皮发育,后期主要调控生长发育过程,暗示了Halloween基因在成虫体内除了参与调控生殖繁衍外,可能还参与调控其他生命活动,如营养代谢和废物排

泄等。

RNAi可以特异性地抑制靶标基因的表达水平,被广泛用于昆虫基因功能研究中。Shd是蜕皮激素合成通路中的最后一步关键酶,将蜕皮激素转化为具有活性的20E(Zhou et al., 2022)。当其表达受抑制时,蜕皮激素不再转化成20E,继而影响昆虫蜕皮过程,导致虫体异常甚至死亡(Kong et al., 2014)。在柑橘大实蝇中,干扰Shd表达可导致幼虫死亡或化蛹异常,且幼虫中20E滴度显著降低,能量代谢发生改变,幼虫在注射外源20E或喂食20E后可纠正这种缺陷(Zhou et al., 2022)。敲除烟草甲蜕皮激素合成基因Dib、Phm、Shd和20E信号通路基因E74、E78、FTZ-F,可显著抑制几丁质脱乙酰酶基因CDA1的表达,表明CDA1在幼虫化蛹过程中起着重要作用,可作为防治烟草甲的潜在靶点(Kong et al., 2014)。在蜕皮激素合成过程中,昆虫摄取的植物甾醇经Nvd编码的7,8-脱氢酶脱氢转化为7-脱氢胆固醇,随后经Spo所在的“黑匣子”产生5 $\beta$ -酮二醇,5 $\beta$ -酮二醇通过Phm、Dib和Sad分别编码的单加氧酶依次产生5 $\beta$ -酮三醇、2-脱氧蜕皮酮和蜕皮激素,最后蜕皮激素在Shd单加氧酶的作用下生成具有活性的20E(Rewitz et al., 2007)。本研究利用RNAi抑制ZcShd的表达后,引起瓜实蝇蜕皮变态发育滞后,ZcPhm、ZcDib、ZcSpo和ZcSad的相对表达量分别在24 h和48 h也随之显著下调,推测可能是由于Shd的表达受到抑制,蜕皮酮不能正常转化为20E,进而引起上游物质的堆积,机体不再需要这些物质的产生进而下调相关基因的表达,所以合成通路上的基因表达量显著下调。沉默家蚕Cyp314a1基因后导致化蛹及卵巢发育异常,并引起蜕皮激素信号通路基因下调表达(程道军等, 2014)。在松墨天牛Monochamus alternatus中干扰Cyp314a1的表达后导致幼虫死亡率增高,化蛹率和羽化率降低,酶联免疫吸附分析显示注射dsCyp314a1后松墨天牛的蜕皮激素含量降低(Yang et al., 2023)。类似地,ZcShd的RNAi结果表明该基因在瓜实蝇蜕皮变态发育过程中发挥着重要作用,干扰ZcShd的表达能增加幼虫死亡率,延长幼虫蜕皮化蛹时间并使幼虫和蛹出现不同程度的皱缩和变色现象,且化蛹困难,暗示ZcShd可作为瓜实蝇绿色防控的潜在靶标基因。

#### 参 考 文 献 (References)

Cheng DJ, Li ZQ, Meng M, Peng J, Qian WL, Kang LX, Xia QY. 2014. Characterization of cytochrome P450 genes involving in

ecdysteroidogenesis in silkworm (*Bombyx mori*). *Scientia Agricultura Sinica*, 47(3): 594–604 (in Chinese) [程道军, 李志清, 孟劭, 彭健, 钱文良, 康丽霞, 夏庆友. 2014. 家蚕蜕皮激素合成相关的细胞色素P450基因的鉴定分析. *中国农业科学*, 47(3): 594–604]

Deng JQ, Zhu XM, Han P, Yang GP, Li ZC. 2021. Research progress of the melon fly, *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae) in China. *Plant Quarantine*, 35(4): 1–7 (in Chinese) [邓金奇, 朱小明, 韩鹏, 杨国萍, 李忠彩. 2021. 我国瓜实蝇研究进展. *植物检疫*, 35(4): 1–7]

Diksha, Mahajan E, Singh S, Sohal SK. 2022. Potential biological control agents of *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett): a review. *Journal of Applied Entomology*, 146(8): 917–929

Dubrovsky EB. 2005. Hormonal cross talk in insect development. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 16(1): 6–11

Feyereisen R. 2012. Insect CYP genes and P450 enzymes.//Gilbert LI. *Insect molecular biology and biochemistry*. Amsterdam: Elsevier, pp. 236–316

Gilbert LI. 2004. Halloween genes encode P450 enzymes that mediate steroid hormone biosynthesis in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 215(1/2): 1–10

Gilbert LI, Warren JT. 2005. A molecular genetic approach to the biosynthesis of the insect steroid molting hormone. *Vitamins & Hormones*, 73: 31–57

Iga M, Smagghe G. 2010. Identification and expression profile of Halloween genes involved in ecdysteroid biosynthesis in *Spodoptera littoralis*. *Peptides*, 31(3): 456–467

Kamiyama T, Niwa R. 2022. Transcriptional regulators of ecdysteroid biosynthetic enzymes and their roles in insect development. *Frontiers in Physiology*, 13: 823418

Kong Y, Liu XP, Wan PJ, Shi XQ, Guo WC, Li GQ. 2014. The P450 enzyme Shade mediates the hydroxylation of ecdysone to 20-hydroxyecdysone in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Insect Molecular Biology*, 23(5): 632–643

Koyama J, Kakinohana H, Miyatake T. 2004. Eradication of the melon fly, *Bactrocera cucurbitae*, in Japan: importance of behavior, ecology, genetics, and evolution. *Annual Review of Entomology*, 49: 331–349

Kozlova T, Thummel CS. 2000. Steroid regulation of postembryonic development and reproduction in *Drosophila*. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 11(7): 276–280

Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7): 1870–1874

Li XL, Qi YX, Lu YY. 2022. Advances for the metabolic detoxification genes in major Tephritidae species. *Journal of Plant Protection*, 49(1): 351–365 (in Chinese) [李欣莲, 齐易香, 陆永跃. 2022. 重大实蝇类昆虫解毒代谢基因的研究进展. *植物保护学报*, 49(1): 351–365]

Li WJ, Song YJ, Han HL, Xu HQ, Wei D, Smagghe G, Wang JJ. 2020. Genome-wide analysis of long non-coding RNAs in adult tissues of the melon fly, *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett). *BMC Ge-*

- nomics, 21(1): 600
- McQuate GT, Liquido NJ, Nakamichi KAA. 2017. Annotated world bibliography of host plants of the melon fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae). *Insecta Mundi*, (527): 1–339
- Nijhout HF, Laub E, Grunert LW. 2018. Hormonal control of growth in the wing imaginal disks of *Junonia coenia*: the relative contributions of insulin and ecdysone. *Development*, 145(6): dev160101
- Niwa R, Niwa YS. 2014. Enzymes for ecdysteroid biosynthesis: their biological functions in insects and beyond. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 78(8): 1283–1292
- Ono H, Rewitz KF, Shinoda T, Itoyama K, Petryk A, Rybczynski R, Jarcho M, Warren JT, Marqués G, Shimell MJ, et al. 2006. *Spook* and *Spookier* code for stage-specific components of the ecdysone biosynthetic pathway in Diptera. *Developmental Biology*, 298(2): 555–570
- Parthasarathy R, Sun ZY, 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
- Peng L, Wang L, Zou MM, Vasseur L, Chu LN, Qin YD, Zhai YL, You MS. 2019. Identification of Halloween genes and RNA interference-mediated functional characterization of a Halloween gene *shadow* in *Plutella xylostella*. *Frontiers in Physiology*, 10: 1120
- Petryk A, Warren JT, Marqués G, Jarcho MP, Gilbert LI, Kahler J, Parvy JP, Li YT, Dauphin-Villemant C, O'Connor MB. 2003. Shade is the *Drosophila* P450 enzyme that mediates the hydroxylation of ecdysone to the steroid insect molting hormone 20-hydroxyecdysone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(24): 13773–13778
- Rewitz KF, O'Connor MB, Gilbert LI. 2007. Molecular evolution of the insect Halloween family of cytochrome P450s: phylogeny, gene organization and functional conservation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(8): 741–753
- Rewitz KF, Rybczynski R, Warren JT, Gilbert LI. 2006a. Developmental expression of *Manduca shade*, the P450 mediating the final step in molting hormone synthesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 247(1/2): 166–174
- Rewitz KF, Rybczynski R, Warren JT, Gilbert LI. 2006b. The Halloween genes code for cytochrome P450 enzymes mediating synthesis of the insect moulting hormone. *Biochemical Society Transactions*, 34(Pt6): 1256–1260
- Sorge D, Nauen R, Range S, Hoffmann KH. 2000. Regulation of vitellogenesis in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Insect Physiology*, 46(6): 969–976
- Tu MP, Yin CM, Tatar M. 2002. Impaired ovarian ecdysone synthesis of *Drosophila melanogaster* insulin receptor mutants. *Aging Cell*, 1(2): 158–160
- Warren JT, Petryk A, Marques G, Jarcho M, Parvy JP, Dauphin-Villemant C, O'Connor MB, Gilbert LI. 2002. Molecular and biochemical characterization of two P450 enzymes in the ecdysteroidogenic pathway of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(17): 11043–11048
- Warren JT, Yerushalmi Y, Shimell MJ, O'Connor MB, Restifo LL, Gilbert LI. 2006. Discrete pulses of molting hormone, 20-hydroxyecdysone, during late larval development of *Drosophila melanogaster*: correlations with changes in gene activity. *Developmental Dynamics*, 235(2): 315–326
- Wei D, Xu HQ, Chen D, Zhang SY, Li WJ, Smagghe G, Wang JJ. 2020. Genome-wide gene expression profiling of the melon fly, *Zeugodacus cucurbitae*, during thirteen life stages. *Scientific Data*, 7: 45
- Xiao FL, Hu C. 2021. Integrated control of the melon fly, *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae). *Hunan Agriculture*, (4): 20 (in Chinese) [肖伏莲, 胡成. 2021. 瓜实蝇的综合防治. 湖南农业, (4): 20]
- Yang MJ, Li GQ, Yu L, Du SJ, Jiang D, Chu X, Wang K, Wu SQ, Wang R, Zhang FP, et al. 2023. Temperature and metal ions regulate larval diapause termination via the 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone pathways in *Monochamus alternatus*. *Pest Management Science*, 79(1): 437–446
- Yoshiyama T, Namiki T, Mita K, Kataoka H, Niwa R. 2006. Neverland is an evolutionally conserved Rieske-domain protein that is essential for ecdysone synthesis and insect growth. *Development*, 133(13): 2565–2574
- Yoshiyama-Yanagawa T, Enya S, Shimada-Niwa Y, Yaguchi S, Hara-moto Y, Matsuya T, Shiomi K, Sasakura Y, Takahashi S, Asashima M, et al. 2011. The conserved rieske oxygenase DAF-36/Neverland is a novel cholesterol-metabolizing enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 286(29): 25756–25762
- Zhang XY, He QH, Zhang TT, Wu HH, Zhang JZ, Ma EB. 2022. Characteristics of Halloween genes and RNA interference-mediated functional analysis of *LmCYP307a2* in *Locusta migratoria*. *Insect Science*, 29(1): 51–64
- Zhao MM, Jiao LYL, Niu Y, Wang M, Zhang XC, Li R. 2023. Cloning and expression pattern analysis of NPC2 gene family in a wolf spider *Pardosa astrigera* (Araneae: Lycosidae). *Journal of Plant Protection*, 50(5): 1289–1296 (in Chinese) [赵萌萌, 焦丽亚琳, 牛越, 王美, 张晓晨, 李锐. 2023. 星豹蛛NPC2基因家族克隆及表达模式分析. 植物保护学报, 50(5): 1289–1296]
- Zhou ZX, Dou W, Li CR, Wang JJ. 2022. CYP314A1-dependent 20-hydroxyecdysone biosynthesis is involved in regulating the development of pupal diapause and energy metabolism in the Chinese citrus fruit fly, *Bactrocera minax*. *Pest Management Science*, 78(8): 3384–3393

(责任编辑:李美娟)