植物保护学报 Journal of Plant Protection，2022，49(2)：705-706　　DOI：10.13802/j.cnki.zwbhxb.2021.2020228

基于液相色谱-质谱联用技术的伞裙追寄蝇滞育关联代谢物代谢组学分析

Metabolomic analysis of diapause-associated metabolites in tachinid parasite *Exorista civilis* based on liquid chromatograph mass spectrometry

张　博[1]　韩海斌[1*]　徐林波[1]　陈国泽[2]　李彦如[3]　刘爱萍[1]

（1. 中国农业科学院草原研究所，呼和浩特 100010；2. 阿拉善盟右旗曼德拉苏木农牧业服务中心，内蒙古 阿拉善 750000；3. 内蒙古农业大学园艺与植物保护学院，呼和浩特 100010）

Zhang Bo[1]　Han Haibin[1*]　Xu Linbo[1]　Chen Guoze[2]　Li Yanru[3]　Liu Aiping[1]

（1. Institute of Grassland Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Huhhot 100010, Inner Mongolia Autonomous Region, China; 2. Mandela Sumu Service Center for Agriculture and Animal Husbandry, Right Banner, Alxa League 750000, Inner Mongolia Autonomous Region, China; 3. College of Horticulture and Plant Protection, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 100010, Inner Mongolia Autonomous Region, China）

草地螟 *Loxostege sticticalis* 是一种世界性农牧业迁飞害虫，可为害300多种植物，包括大豆、玉米等重要农作物，具有间歇暴发和毁灭性的特点，已经成为我国农牧业生产重点关注的害虫之一。伞裙追寄蝇 *Exorista civilis* 属双翅目寄蝇科，是草地螟优势寄生性天敌，对田间草地螟种群有较好的防控效果，但人工扩繁贮藏期较短，传统的低温冷藏技术易使其受到低温伤害。滞育是一种能帮助昆虫度过不利环境、维持个体生存和保证种群繁衍的重要行为。人工调控伞裙追寄蝇蛹滞育，可以极大延长产品货架期。已有关于伞裙追寄蝇滞育的研究主要集中在滞育诱导的温度及光周期条件、主要能源物质含量变化和滞育关联蛋白，而关于滞育相关机理的研究未见报道。代谢组学技术可反映基因组下游小分子化合物在细胞代谢层面的生命活动（Hayward et al.，2014），液相色谱-质谱联用（liquid chromatograph mass spectrometer，LC-MS）技术作为代谢组学技术的主要研究方法，具有高灵敏度和高稳定度的双重优势。为反映转录组和蛋白组下游的表达水平，本研究采用LC-MS技术对伞裙追寄蝇滞育蛹的差异代谢物进行分析，以期为阐明伞裙追寄蝇的滞育调控机理提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试昆虫：供试伞裙追寄蝇蛹由中国农业科学院草原研究所饲养。非滞育蛹置于温度（25±1）℃、光周期16 L∶8 D、相对湿度（70±10）%的室内培养1 d，液氮处理后放入-80℃冰箱保存。滞育蛹置于温度（11±1）℃、光周期8 L∶16 D、相对湿度（70±10）%的人工气候箱内经过40 d诱导而获得，液氮处理后放入-80℃冰箱保存；40 d后选取质量与非滞育蛹一致的滞育蛹进行试验。

试剂及仪器：试剂均为进口或者国产分析纯。QE HF-X质谱仪、Vanqyish UHPLC色谱仪，美国Thermo Fisher Scientific公司；MGC-HP人工气候箱，上海一恒科学仪器有限公司。

1.2 方法

伞裙追寄蝇非滞育蛹和滞育蛹各取0.1 mg，液氮研磨后，取100 μL置于EP管中，加入400 μL 80%甲醇水溶液，涡旋振荡，于-20℃静置60 min，于4℃、14 000 *g* 条件下离心20 min，取1 mL上清液置于1.5 mL离心管中，真空冷冻干燥，残留物用100 μL 10%甲醇水溶液溶解，涡旋振荡，于4℃、14 000 *g* 条件下离心15 min，取上清液进样LC-MS分析，共6个生物学重复。将质谱检测得到的原始数据导入Compound Discoverer 3.0软件中进行预处理，首先进行保留时间、质荷比等参数的简单筛选，然后对滞育和非滞育样品进行峰对齐，同时对峰面积进行定量分析、整合目标离子和预测分子式，运用数据库mzCloud进行鉴定及定量结果比对。

将所有试验样本和质量控制样本提取得到的峰经Pareto-scaling处理后进行主成分分析。采用偏最

基金项目：国家重点研发计划（2017YFD0201000，2017YFE0104900），内蒙古自然科学基金（2019BS03011）

* 通信作者（Author for correspondence），E-mail：hhb.25@163.com；收稿日期：2020-08-31

小二乘判别分析模型第1主成分的*VIP*值、*t*检验的*P*值以及差异倍数(fold change,FC)来寻找滞育差异代谢物,当*VIP*>1.0、*P*<0.05、*FC*>2.0或*FC*<0.5即为滞育关联代谢物。采用KEGG pathway显著性富集分析方法筛选伞裙追寄蝇非滞育蛹与滞育蛹差异代谢物中显著性富集的通路。

2 结果与分析

2.1 代谢组样品检测结果

正离子和负离子模式下,伞裙追寄蝇非滞育蛹与滞育蛹代谢组质量控制样本之间的皮尔森相关系数分别均在0.988以上和0.989以上,表明数据质量良好,可用于后续分析。

2.2 伞裙追寄蝇非滞育蛹和滞育蛹差异代谢物注释

伞裙追寄蝇非滞育蛹和滞育蛹的差异代谢物代谢途径为细胞过程、环境信息处理、遗传信息加工、新陈代谢和有机体系统5类,负离子模式下,差异代谢物169个,其中99个上调,70个下调;正离子模式下,差异代谢物332个,其中268个上调,64个下调。

2.3 非滞育蛹和滞育蛹差异代谢物富集分析

在负离子模式下,伞裙追寄蝇非滞育蛹和滞育蛹的差异代谢物在7条通路中显著富集,参与其中的L-脯氨酸、L-苯丙氨酸、L-组氨酸均上调表达;在正离子模式下,差异代谢物只在3条通路显著富集,包括组氨酸代谢、氨酰基-tRNA生物合成及氨基酸生物合成,其中参与的L-组氨酸、L-苯丙氨酸、L-酪氨酸和1-甲基组氨酸均上调表达;2种离子模式下,组氨酸代谢和氨基酸生物合成通路均显著富集,但2种离子模式下富集的物质不同(表1)。

表1 伞裙追寄蝇非滞育蛹和滞育蛹差异代谢物的KEGG通路富集

Table 1 KEGG pathway enrichment of diapause-associated metabolites in non-diapause and diapause pupae of *Exorista civilis*

模式 Mode	通路 Pathway	*P*	差异代谢物种类 Type of metabolite	差异代谢物 Differential metabolite
负离子 Negative	精氨酸和脯氨酸代谢 Arginine and proline metabolism	0.035	4	高肌肽、4-氧脯氨酸、磷酸精氨酸、L-脯氨酸 Omocarnosine, 4-oxoproline, phosphoarginine, L-proline
	组氨酸代谢 Histidine metabolism	0.035	3	肌肽、L-组氨酸、组胺 Carnosine, L-histidine, histamine
	ABC转运子 ABC transporters	0.035	4	L-组氨酸、L-苯丙氨酸、赤藓糖醇、L-脯氨酸 L-histidine, L-phenylalanine, erythritol, L-proline
	2-氧代羧酸代谢 2-oxocarboxylic acid metabolism	0.035	3	L-苯丙氨酸、顺式乌头酸、柠檬酸 L-phenylalanine, *cis*-aconitic acid, citric acid
	蛋白质消化吸收 Protein digestion and absorption	0.025	4	L-组氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、组胺 L-histidine, L-phenylalanine, L-proline, histamine
	矿物质吸收 Mineral absorption	0.018	2	L-苯丙氨酸、L-脯氨酸 L-phenylalanine, L-proline
	氨基酸生物合成 Biosynthesis of amino acids	0.018	4	L-组氨酸、L-脯氨酸、L-苯丙氨酸、柠檬酸 L-histidine, L-proline, L-phenylalanine, citric acid
正离子 Positive	氨基酸生物合成 Biosynthesis of amino acids	0.033	3	L-组氨酸、L-苯丙氨酸、N-乙酰-L-谷氨酸 L-histidine, L-phenylalanine, N-acetyl-L-glutamic acid
	组氨酸代谢 Histidine metabolism	0.015	2	L-组氨酸、1-甲基组氨酸 L-histidine, 1-methylhistidine
	氨酰-tRNA生物合成 Aminoacyl-tRNA biosynthesis	0.015	3	L-组氨酸、L-苯丙氨酸、L-酪氨酸 L-histidine, L-phenylalanine, L-tyrosine

3 讨论

KEGG通路富集分析显示在伞裙追寄蝇滞育蛹和非滞育蛹差异代谢物中氨基酸数量最多。低温是诱导昆虫滞育的重要环境条件,昆虫冷应激反应的主要特征是通过血淋巴中的游离氨基酸来增加细胞质的浓度,维持细胞的稳定性。氨基酸中的脯氨酸是一种重要的低温保护剂(Teets & Denlinger,2014)。黑腹果蝇*Drosophila melanogaster*低温驯化后,其脯氨酸含量随温度降低而升高,并对其耐寒能力有促进作用(Koštál et al.,2011)。推测在伞裙追寄蝇蛹滞育期间,相关脯氨酸可能通过正、负2种离子模式参与调控多种通路,从而实现抵抗低温胁迫的作用。下一步结合转录组学、蛋白组学对滞育关联基因、蛋白对滞育关联代谢物产生的作用进行联合分析。

参 考 文 献(References)

Hayward SAL, Manso B, Cossins AR. 2014. Molecular basis of chill resistance adaptations in poikilothermic animals. The Journal of Experimental Biology, 217(Pt1): 6–15

Koštál V, Korbelová J, Rozsypal J, Zahradníčková H, Cimlová J, Tomčala A, Šimek P. 2011. Long-term cold acclimation extends survival time at 0℃ and modifies the metabolomic profiles of the larvae of the fruit fly *Drosophila melanogaster*. PLoS ONE, 6(9): e2502

Teets NM, Denlinger DL. 2014. Surviving in a frozen desert: environmental stress physiology of terrestrial Antarctic arthropods. The Journal of Experimental Biology, 217(Pt1): 84–93

(责任编辑:张俊芳)