

研究报告

Research Reports

取食不同牧草对亚洲小车蝗发育速率和类胰岛素信号通路的影响

黄训兵^{1*}, 陈德霞¹, 罗林华¹, 吕慎金¹, 李广阅¹, 张泽华^{2*}

(1. 临沂大学农林科学学院, 临沂 276000; 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)

摘要 亚洲小车蝗是重要的草地生物灾害, 对不同牧草的食物适应存在差异。为揭示不同牧草对亚洲小车蝗生长发育的影响机理, 本研究定量分析了取食不同牧草条件下亚洲小车蝗的发育速率和类胰岛素信号通路(ISP)基因表达。结果表明, 西北针茅饲喂的亚洲小车蝗发育速率最高, ISP 通路中 *gIGF1*、*gINSR*、*gIRS1*、*gPI3K*、*gAKT* 及 *gmTor* 基因表达显著上调($P < 0.05$), 调控下游发育和代谢相关的表皮蛋白(cuticle protein, *gLCP*)、胰凝乳蛋白酶(chymotrypsin, *gCHY*)及 α -葡萄糖苷酶(α -glucosidase, *gALP*)基因表达上调。相反, 冷蒿饲喂的蝗虫发育速率显著降低($P < 0.05$), 上述基因显著下调($P < 0.05$), 调控下游解毒相关的 *gP450s 6K1*、*gUDP 2C1* 及 *gCarE* 基因表达上调。亚洲小车蝗 ISP 通路响应食物差异, 调控发育速率, 以适应更广泛的生态区域, 这可能是其分布广、易暴发成灾的原因之一。

关键词 亚洲小车蝗; 发育速率; 牧草; 类胰岛素信号通路; 基因

中图分类号: S 433.2 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2019327

Effects of feeding different plant species on the phenotype and insulin-like signaling pathway of *Oedaleus asiaticus*

HUANG Xunbing^{1*}, CHEN Dexia¹, LUO Linhua¹, LÜ Shenjin¹, LI Guangyue¹, ZHANG Zehua^{2*}

(1. College of Agricultural and Forestry Science, Linyi University, Linyi 276000, 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)

Abstract *Oedaleus asiaticus* Bey-Bienko, a grasshopper pest occurring in North China, has evolved a food-specific adaptation to different plants. In this study, we analyzed the growth rate and gene expression of insulin-like signaling pathway (ISP) in *O. asiaticus* with different plant species. The results showed that the growth rate of *O. asiaticus* was significantly increased ($P < 0.05$) when presented with *Stipa sareptana* var. *krylovii*. The expressions of *gIGF1*, *gINSR*, *gIRS1*, *gPI3K*, *gAKT*, *gmTor* in the ISP pathway were significantly up-regulated ($P < 0.05$). The downstream genes *gLCP*, *gCHY* and *gALP* were also significantly up-regulated ($P < 0.05$). In contrast, the growth rate of grasshoppers feeding on *Artemisia frigida* and the gene expression in the ISP pathway were significantly decreased ($P < 0.05$), while the downstream genes *gP450s 6K1*, *gUDP 2C1*, *gCarE* were significantly up-regulated ($P < 0.05$). These results suggested that *O. asiaticus* has evolved an active mechanism using ISP pathway to regulate its growth rate and adapt to wider ecological area comprising different plant species. This explains why *O. asiaticus* is the most widely distributed and easy-to-outbreak species in Inner Mongolia, China.

Key words *Oedaleus asiaticus*; growth rate; grass species; insulin-like signaling pathway; gene

亚洲小车蝗 *Oedaleus asiaticus* 是分布于我国北方草原的重要害虫, 经常性发生, 严重破坏草地生态和畜

牧业生产, 是重要的草地生物灾害^[1-3]。已有研究表明, 其对典型草原植物西北针茅 *Stipa sareptana* var. *kry-*

收稿日期: 2019-06-29

修订日期: 2019-10-28

基金项目: 山东省自然科学基金博士基金(ZR2019BC030); 国家自然科学基金(31672485); 山东省现代农业产业技术体系牧草创新团队项目(SDAIT-23-10)

* 通信作者 E-mail: 黄训兵 xunbingh@163.com; 张泽华 zhangzehua@caas.cn

lovii Roshev P. C. Kuo et Y. H. S(又称克氏针茅)、糙隐子草 *Cleistogenes squarrosa* (Trin.) Keng、羊草 *Leymus chinensis* (Trin.) Tzel. 及冷蒿 *Artemisia frigida* Willd 的食物适应性存在显著差异,食物选择顺序为针茅>糙隐子草>羊草>冷蒿;针茅最利于亚洲小车蝗的发生,羊草和冷蒿不利于其发生^[4-7]。尽管在亚洲小车蝗对牧草的生态适应方面已开展了许多研究,但亚洲小车蝗对不同牧草的分子适应机理仍不清楚,是草地植物保护研究中需要不断探索解决的重要科学问题。

类胰岛素信号通路(insulin-like signaling pathway, ISP),是调控昆虫发育的重要信号通路,其主要功能是调节昆虫新陈代谢、细胞大小和生长、生殖和滞育等,在昆虫-植物协同进化、食物选择和适应过程中发挥了重要作用^[8-9]。昆虫 ISP 信号通路受食物影响显著,食物资源适合条件下,类胰岛素途径上调,促进昆虫发育;反之,则会抑制昆虫正常发育^[10-11]。昆虫取食后,脂肪体能够快速反应食物资源状况,将信号传递给大脑,调控体内类胰岛素的合成与分泌,从而影响昆虫发育^[12]。类胰岛素是调控 ISP 通路的关键因子,其存在 3 种不同的同型异构体,包括胰岛素(INS)、类胰岛素生长因子 1(IGF1)和类胰岛素生长因子 2(IGF2),可磷酸化激活胰岛素受体(INSR),进而磷酸化类胰岛素受体底物(IRS),传递发育信号^[13]。激活的 IRS 可通过 PI_3K (磷脂酰肌醇 3-激酶)→PDK(3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶)→AKT(蛋白激酶 B)→FOXO(叉头转录因子)途径,调控细胞发育、凋亡、抗氧化、DNA 修复、细胞周期和葡萄糖代谢等^[14];也可激活 mTOR(雷帕霉素靶蛋白),调控营养代谢,蛋白质合成,细胞生长、增殖等^[15]。在 ISP 通路中,多基因同时发挥作用调控了昆虫的生长发育。

为揭示亚洲小车蝗对不同牧草适应性差异的分子机制,本研究定量分析了取食不同牧草的亚洲小车蝗 ISP 通路关键基因表达和蛋白磷酸化水平,以及下游调控的关键代谢基因表达,以期从基因水平分析亚洲小车蝗食物适应的分子机制,进一步解释其对不同牧草表现出的种群动态和表型差异,揭示食物驱动亚洲小车蝗种群发生的分子生物学原理。

1 材料与方法

1.1 研究区域概况

试验地点位于内蒙古锡林浩特市西郊,农业农村部锡林郭勒草地有害生物野外观测试验站内(42°15′—42°35′N, 113°45′—114°21′E),平均海拔 1 300 m,年均降水量 267 mm,属典型草原,土壤类型为栗钙

土,主要植被有西北针茅、羊草、糙隐子草、冷蒿和少量杂类草。试验区 100 m²,地势平坦,2017 年试验开展前于 5 月份将地面植被完全清除以方便罩笼。

1.2 试验仪器与试剂

笼罩(材料为纱网,无底,大小:1 m×1 m×1 m)、捕虫网(直径 40 cm)、电子天平(万分之一)、匀浆器、Sigma 3K15 冷冻离心机、THZ-D 台式恒温振荡器、东胜 ETC-811 PCR 仪,凝胶成像分析系统 2X-2020D、实时荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad iQ5)、VER-SA max 型酶标仪;PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒、Bestar™ qPCR MasterMix (SYBRGreen)、总 RNA 提取试剂盒(Cat: R6934-01, 美国 OMEGA)、RNase-Free DNase I(Cat: E1091, 美国 OMEGA);昆虫胰岛素受体(ISR)、胰岛素受体磷酸化(P-ISR)、胰岛素受体底物(IRS)、胰岛素受体底物磷酸化(P-IRS)、蛋白激酶 B(AKT)、磷酸化蛋白激酶 B(P-Akt)、叉头转录因子(FOXO)、叉头转录因子磷酸化(P-FOXO)酶联免疫分析(ELISA, GTX)试剂盒。

1.3 供试虫源

在内蒙古锡林郭勒盟西乌旗(44°29′38″ N, 116°50′35.8″ E)网捕亚洲小车蝗 4 龄蝗蛹,挑选健康的 4 龄雌性蝗蛹,置于袖笼(直径 30 cm)中饥饿处理 12 h。

1.4 亚洲小车蝗饲喂试验

试验前随机取 30 头 4 龄雌性蝗蛹称取鲜重后,90℃烘干 38 h,用电子天平分别称取干重,以便后续分析蝗虫体重变化。在已清理的试验区域分 4 排固定罩笼 20 个,每罩笼放入亚洲小车蝗 4 龄雌性蝗蛹 16 头,根据饲喂植物种类设 4 个处理,分别为羊草处理、西北针茅处理、糙隐子草处理和冷蒿处理,采用随机区组试验设计。每处理称取新鲜植物 90 g 放入盛有 100 mL 蒸馏水的自封袋中,袋口以橡皮筋扎紧,埋入养虫笼土壤中,袋口与地面持平。每天早上 8:00 更换一次植物,观察并记录罩笼内亚洲小车蝗龄期变化及存活数。在亚洲小车蝗 5 龄期末,每罩笼取出 2 头,放入冻存管,液氮快速冷冻,置于一 80℃ 超低温冰箱保存,以备后续试验。直到罩笼内个体进入到成虫阶段,取出所有存活成虫,放入信封内,称取鲜重后于 90℃烘干 38 h,用电子天平分别称取干重。

1.5 RNA 提取

亚洲小车蝗虫体总 RNA 提取用 TRIzol® RNA 分离试剂提取,具体操作过程如下:

1)将准备好的亚洲小车蝗放入匀浆器中,加入

1 mL TRIzol,充分研磨,转入离心管中,室温静置 5 min。

2)4℃,13 000 r/min 离心 5 min,弃沉淀,上清转入干净的离心管中。

3)加入 250 μL 氯仿,振荡器剧烈振荡 15 s,室温静置 5 min,4℃,13 000 r/min 离心 10 min,弃沉淀,吸取 400 μL 上清液转入新的离心管中。

4)加入 200 μL 氯仿,振荡器剧烈振荡 15 s,室温静置 5 min,4℃,13 000 r/min 离心 10 min,弃沉淀,吸取 300 μL 上清液转移到 RNA spin column 中。

5)加入 300 μL 等体积的异丙醇,振荡 30 s,过滤柱冰上静置 10 min。

6)4℃,12 000 r/min 离心 2 min,弃滤液。

7)加入 400 μL RNA washing solution,4℃,12 000 r/min 离心 2 min。

8)重复步骤 7),12 000 r/min 离心 2 min,弃滤液,离心去除残液。

9)向 RNA spin column 中加入 100 μL DEPC 处理水,温育 3 min,13 000 r/min 离心 2 min。

10)PCR 检测 RNA 提取效果均合格(1.9<OD_{260/280}<2.1),滤液-80℃保存,备用。

1.6 RNA 反转录

按照 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒的说明对亚洲小车蝗总 RNA 进行反转录。具体方法如下:

反转录体系 I (10 μL):1 μL OligodT Primer (5 μmol/L),1 μL dNTP Mixture (10 mmol/L),8 μL RNA 模板(5 ng),将反应体系 I 放入 65℃金属浴 5 min,迅速置于冰上冷却。

反转录体系II(20 μL):10 μL 反转录体系I,0.5 μL RNase Inhibitor (40 U/μL),4 μL 5×PrimeScript II Buffer,1 μL PrimeScript RTase (200 U/μL),4.5 μL 无核酸酶的去离子水。

将上述反转录体系 II 缓慢混匀,42℃下水浴 60 min,95℃金属浴 5 min 使酶失活。使用 Nano-Photometer 微量分光光度计检测 cDNA 浓度,-20℃保存样品。

1.7 引物设计

依据已测亚洲小车蝗转录组(NCBI:SRP072969),获取 ISP 通路的关键基因(类胰岛素生长因子 1,insulin-like growth factor,gIGF1、类胰岛素受体:homologous insulin receptor,gINSR、类胰岛素受体底物:insulin receptor substrate,gIRS1、磷脂酰肌醇 3-激酶:phosphoinositide 3-kinase,gPI₃K、3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶:phosphoinositide-dependent ki-

nase,gPDK、蛋白激酶 B:protein kinase B,gAKT、雷帕霉素靶蛋白:mammalian target of rapamycin,gmTOR、叉头转录因子:forkhead transcription factor,gFOXO)片段序列。同时,选择 ISP 通路下游调控的代谢和发育相关的关键基因,表皮合成蛋白:cuticle protein,gLCP、胰凝乳蛋白酶 2:chymotrypsin,gCHY、α-葡萄糖苷酶:alpha-glucosidase,gALP、细胞色素 P450 6K1:cytochrome P450 6K1,gP450s 6K1、尿苷二磷酸葡萄糖醛基转移酶 2C1:UDP-glucuronosyltransferase 2C1,gUDP 2C1、羧酸酯酶:carboxylesterase,gCarE 的片段序列。利用 DNAMAN 8 软件设计 PCR 引物(表 1),并验证特异性。

表 1 基因引物设计

Table 1 Design of PCR primers

基因名称 Gene name	引物 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence
<i>βactin</i>	上游引物	CCCATCTATGAAGGTTACGC
	下游引物	CTTGATGTCACGGACGATTT
<i>gIGF1</i>	上游引物	AAACCCGGAGAACTGCACAAATGC
	下游引物	TGCCGATAAGATTGTTATGAGCAAGG
<i>gINSR</i>	上游引物	TTATTATCGGAAAGGCTCCAAAGG
	下游引物	CACTACACCGTAACCTCCAGACATCG
<i>gIRS1</i>	上游引物	ATCCCAGATCCAGAACCCAGATGC
	下游引物	AAGACGATGCCGACAAAGAGCC
<i>gPI₃K</i>	上游引物	TATACAAGTCTGTAACATCCCACG
	下游引物	ACATCTCCTGCTTTGAGTCCTT
<i>gPDK</i>	上游引物	GGAGTTTAGGGTGCATCTTGTA
	下游引物	GTATTGCCACCTCTTGTTAGT
<i>gAKT</i>	上游引物	GGTAATGCCTCGTAATTTCTGT
	下游引物	AACTCTTTATGATGGGTCTTCT
<i>gmTOR</i>	上游引物	TAGGATGGCACCAGATTATGAC
	下游引物	ATACTTCTGATGATGGCGATTT
<i>gFOXO</i>	上游引物	CATCACGCAGGCCATCCAG
	下游引物	GCTGTTGTGTCGCCCTTG
<i>gLCP</i>	上游引物	AGTGTACTGAGCGCTCTGG
	下游引物	GTCTCCATCTCTTCGCAGT
<i>gCHY</i>	上游引物	ACGCCAACATCGCCAACTA
	下游引物	ACGGTGTGCTGTTGTAGGA
<i>gP450s 6K1</i>	上游引物	CCTTCTTGCTGGCTATGAAAC
	下游引物	CCACATCAATGGTCACTTCTG
<i>gUDP 2C1</i>	上游引物	TGATACCACCGCCACATTC
	下游引物	AACCCACTGAGGTCCGTCAT
<i>gCarE</i>	上游引物	ACAGTGGCATCTCGGATG
	下游引物	TCAGTCGGCGATGTGGAG
<i>gALP</i>	上游引物	CCATCATTCAGCAGTTCCG
	下游引物	CAATCACCCAGTTGGACCAC

1.8 荧光定量 PCR 测定基因表达量

以亚洲小车蝗 *βactin* 基因作为内参基因(表 1),对上述 14 个基因进行荧光定量 PCR 分析,每样品重

复 3 次,并设水为阴性对照,PCR 反应体系(10 μ L)如下:5 μ L Bestar™ qPCR MasterMix (SYBRGreen), 3.4 μ L 超纯水,0.3 μ L 上游引物 F,0.3 μ L 下游引物 R,1 μ L 模板 cDNA。反应条件:95℃ 2 min;95℃ 10 s,60℃ 15 s,40 个循环,熔解曲线为默认值。

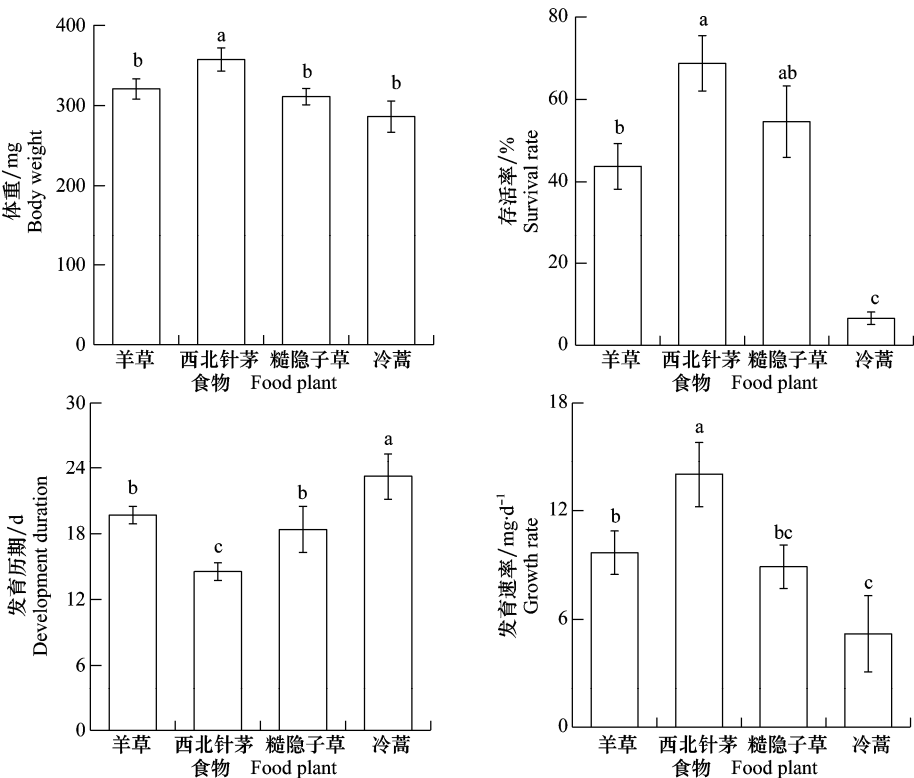
1.9 蛋白磷酸化水平检验

采用抗体一步夹心法酶联免疫吸附试验(ELISA)分别测定磷酸化和非磷酸化胰岛素受体蛋白 INSR、胰岛素受体底物 IRS、蛋白激酶 B AKT 和叉头转录因子 FOXO 含量,重复 3 次,虫体事先溶于 PBS 溶液。蛋白磷酸化水平检验严格按照 ELISA 试剂盒操作说明进行。

1.10 数据分析

亚洲小车蝗存活率 SR(%)为各笼罩内蝗虫成虫存活数与起始 4 龄蝗蛹数目比值,体重增加量=成虫体重-4 龄起始蝗蛹体重,蝗虫从 4 龄蝗蛹到成虫发育历期(days)计算采用加权平均数方法:

$$\bar{L} = (\sum_{i=1}^n i \times N_i) / N_i;$$



不同小写字母代表亚洲小车蝗发育指标在0.05 水平差异显著
Bars marked by different lowercase letters indicate significant difference based on Tukey's HSD analysis at 0.05 level

图 1 取食不同牧草的亚洲小车蝗发育指标差异

Fig. 1 Growth variables of *Oedaleus asiaticus* feeding different food plants

2.2 亚洲小车蝗 ISP 通路基因表达分析

实时荧光定量 PCR 结果显示,不同食物饲喂的亚

其中, i 为个体从 4 龄蝗蛹到成虫的历期天数, N_i 为历期为 i 天的个体数, N_t 为蝗虫实验种群中存活到成虫的个体总数。

发育速率 GR=体重增加量/发育历期。

蛋白磷酸化水平=磷酸化蛋白含量/磷酸化蛋白含量+非磷酸化蛋白含量。

亚洲小车蝗测定的发育指标、基因表达量及磷酸化水平差异比较采用 Tukey's HSD 方差分析(One-Way ANOVA,SAS 8.0)。

2 结果与分析

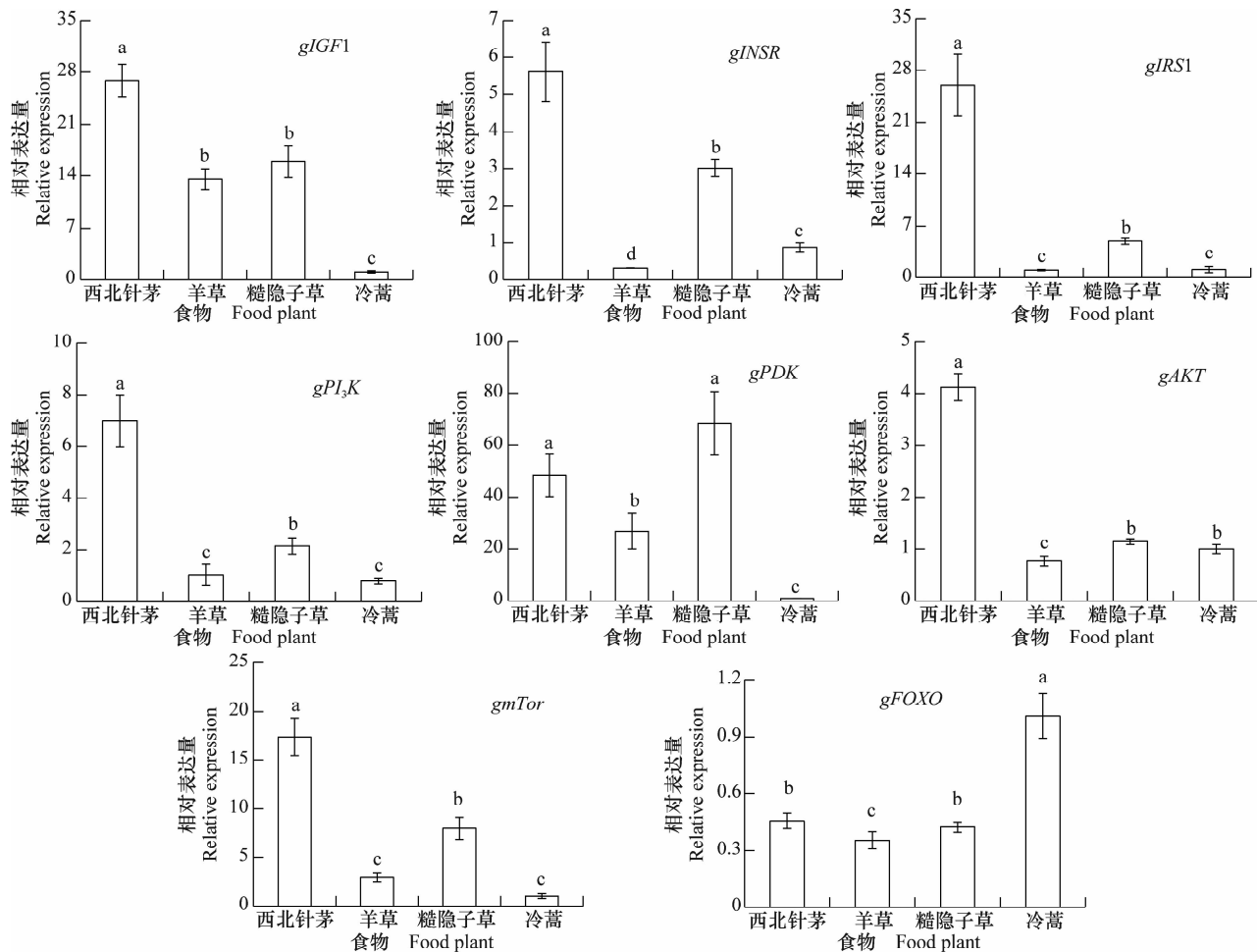
2.1 亚洲小车蝗生长发育分析

比较不同食物饲喂下亚洲小车蝗发育指标发现(图 1),西北针茅饲喂的亚洲小车蝗体重和发育速率显著高于($P<0.05$)其他食物处理,发育历期最短($P<0.05$);冷蒿饲喂的亚洲小车蝗发育历期最长($P<0.05$),存活率和发育速率最低($P<0.05$)。

洲小车蝗关键基因相对表达量变化显著(图 2)。西北针茅处理的亚洲小车蝗类胰岛素生长因子 1(gIGF1)、

类胰岛素受体(*gINSR*)、类胰岛素受体底物(*gIRS1*)、磷脂酰肌醇 3-激酶(*gPI₃K*)、蛋白激酶 B(*gAKT*)及雷帕霉素靶蛋白(*gmTor*)基因相对表达量最高($P<0.05$);糙隐子草处理的亚洲小车蝗 *gINSR*、*gIRS1*、*gPDK*、*gPI₃K*、*gmTor* 基因表达显著高于羊草和冷蒿处理(P

<0.05);冷蒿处理的亚洲小车蝗 *gIGF1*、*gPDK* 基因表达量最低。而冷蒿处理的亚洲小车蝗 Forkhead 转录因子(*gFOXO*)基因表达量显著高于($P<0.05$)其他寄主植物处理($P<0.05$)。可见,不同寄主植物处理显著影响了亚洲小车蝗 ISP 通路基因表达量。



冷蒿处理的亚洲小车蝗基因qPCR值为1,不同小写字母代表亚洲小车蝗基因表达量在0.05水平差异显著
The qPCR values of grasshoppers feeding on *A. frigida* are set to one to calibrate the relative gene expression levels. Bars marked by different lowercase letters indicate significant difference based on Tukey's HSD analysis at 0.05 level

图 2 不同牧草对亚洲小车蝗 ISP 通路基因表达量的影响

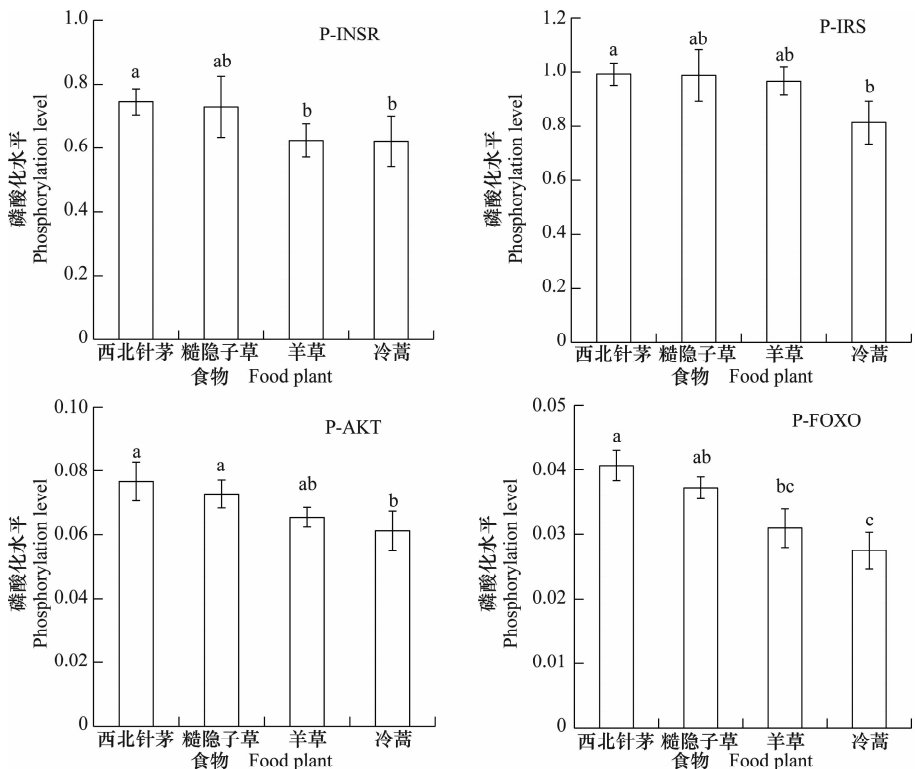
Fig. 2 The relative gene expression levels ($\pm$ SD) in the insulin-like signaling pathway of *Oedaleus asiaticus* when fed with *Leymus chinensis*, *Stipa sareptana* var. *krylovii*, *Cleistogenes squarrosa* and *Artemisia frigida*

2.3 亚洲小车蝗 ISP 通路蛋白磷酸化水平分析

ISP 通路可通过蛋白磷酸化水平调控下游信号转导(图 3)。与西北针茅相比,冷蒿处理的亚洲小车蝗胰岛素受体磷酸化(P-INSR)、胰岛素受体底物磷酸化(P-IRS)、蛋白激酶 B 磷酸化(P-AKT)和叉头转录因子磷酸化(P-FOXO)水平显著下降($P<0.05$),羊草处理的 P-INSR 和 P-FOXO 磷酸化水平显著降低(图 3)。可见,不同牧草影响了亚洲小车蝗 ISP 通路蛋白的磷酸化水平。

2.4 亚洲小车蝗 ISP 通路调控的下游关键基因表达
不同植物处理的亚洲小车蝗实时荧光定量

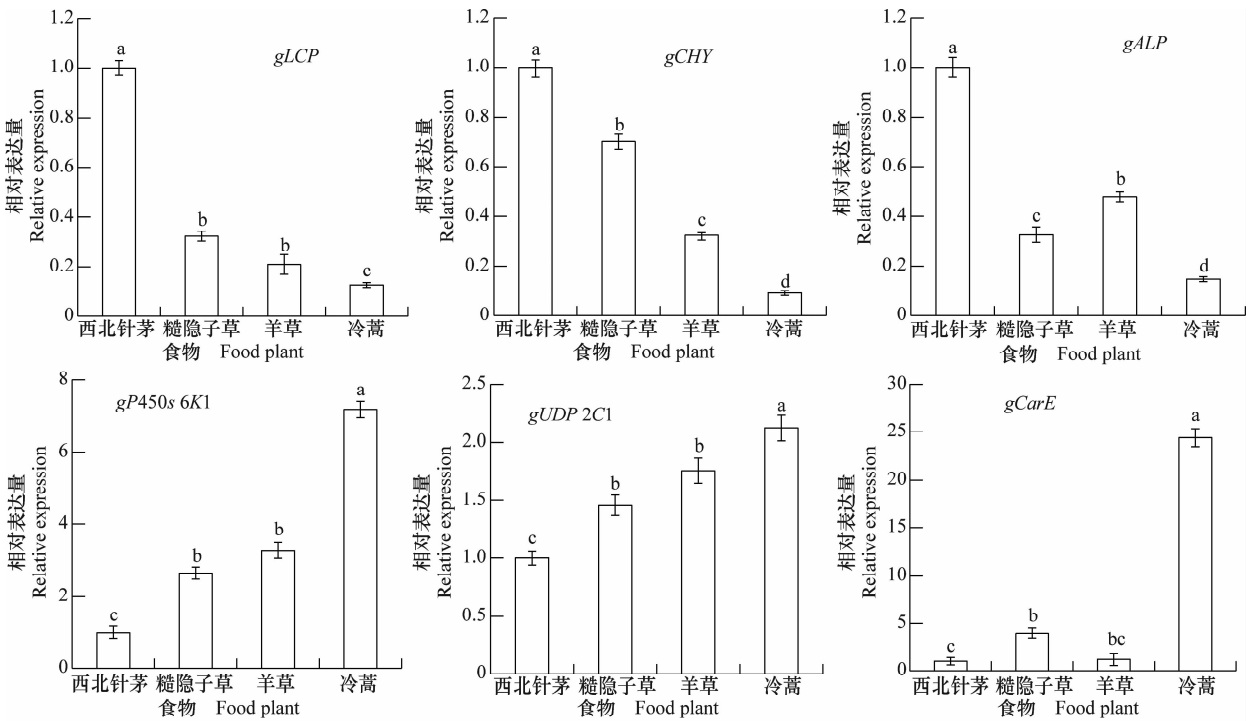
PCR 结果显示(图 4),西北针茅处理的亚洲小车蝗生长发育和营养代谢相关的表皮蛋白 6(*gLCP*)、胰凝乳蛋白酶 2(*gCHY*)及 α -葡萄糖苷酶(*gALP*)基因相对表达量最高($P<0.05$),冷蒿处理最低($P<0.05$)。冷蒿处理的亚洲小车蝗解毒代谢相关的细胞色素 P450 6K1(*gP450s 6K1*)、尿苷二磷酸葡萄糖醛基转移酶 2C1(*gUDP 2C1*)及羧酸酯酶(*gCarE*)基因的相对表达量显著高于其他处理($P<0.05$),西北针茅处理最低($P<0.05$)。



不同小写字母代表亚洲小车蝗蛋白磷酸化在0.05水平差异显著
Bars marked by different lowercase letters indicate significant difference based on Tukey's HSD analysis at 0.05 level

图 3 食物对亚洲小车蝗类胰岛素途径蛋白磷酸化的影响

Fig. 3 Protein phosphorylation levels ($\pm$ SD) in the insulin-like pathway of *Oedaleus asiaticus* when fed with *Leymus chinensis*, *Stipa sareptana* var. *krylovii*, *Cleistogenes squarrosa*, and *Artemisia frigida*



不同小写字母代表亚洲小车蝗基因表达量在0.05 水平差异显著
Bars marked by different lowercase letters indicate significant difference based on Tukey's HSD analysis at 0.05 level

图 4 ISP 通路下游调控的基因表达量

Fig. 4 The downstream gene expression levels ($\pm$ SD) of ISP in *Oedaleus asiaticus* when fed with *Leymus chinensis*, *Stipa sareptana* var. *krylovii*, *Cleistogenes squarrosa*, and *Artemisia frigida*

3 结论与讨论

ISP 通路能够响应食物营养状态,通过基因表达和蛋白磷酸化差异调控昆虫新陈代谢、细胞大小和生长、生殖和滞育、解毒代谢等重要过程,影响昆虫对不同食物的适应性^[9]。本文结果也表明取食不同牧草能够显著影响亚洲小车蝗 ISP 通路基因表达和蛋白磷酸化水平,进而调控下游生长发育和解毒代谢相关基因表达发生差异,影响亚洲小车蝗的生长发育和食物适应性。

昆虫 ISP 通路受胰岛素生长因子(IGF)调控^[8],通过 INSR→IRS→AKT→FOXO(或 mTor)的蛋白磷酸化过程调控生长发育或解毒代谢等相关基因的表达^[9,16],在昆虫食物适应中发挥了重要作用(图 5)。取食冷蒿的亚洲小车蝗 *gIGF1* 基因表达最低,导致信号转导途径下游类胰岛素受体(*gINSR*)、类胰岛素受体底物(*gIRS1*)、磷脂酰肌醇 3-激酶(*gPI3K*)、蛋白激酶 B(*gAKT*)、雷帕霉素靶蛋白(*gmTor*)基因表达显著下调,同时 P-INSR、P-IRS、P-AKT、P-FOXO 蛋白水平磷酸化下调,说明亚洲小车蝗 ISP 通路信号转导减弱,下游调控生长发育、能量代谢相关的表皮蛋白 6(*gLCP*)、胰凝乳蛋白酶 2(*gCHY*)、 α -葡萄糖苷酶(*gALP*)基因下调,而由 *gFOXO* 转录调控的解毒代谢相关的细胞色素 P450 6K1(*gP450s 6K1*)、尿苷二磷酸葡萄糖醛基转移酶 2C1(*gUDP 2C1*)、羧酸酯酶(*gCarE*)等基因上调。这些基因的变化可以解释为什么取食冷蒿的蝗虫发育速率显著降低。而取食西北针茅的亚洲小车蝗 ISP 途径关键基因表达上调,并且 P-INSR→P-FOXO 过程蛋白磷酸化水平升高,说明亚洲小车蝗 ISP 通路信号转导增强,下游调控生长发育、营养代

谢的基因表达升高,而解毒代谢相关基因表达下调。这些基因的表达趋势与测定的取食 4 种牧草的亚洲小车蝗转录组中的对应基因表达量趋势基本一致^[17],更好地说明了取食不同牧草显著影响了蝗虫 ISP 通路及其调控的下游基因。同样,这些基因的变化能够很好地解释为什么取食西北针茅的亚洲小车蝗存活率高、发育速率快,并选择栖居于针茅型草地^[4-6]。

FOXO(forkhead 转录因子)主要调控昆虫细胞凋亡、抗氧化、DNA 修复、细胞周期和抗逆过程等,通过磷酸化和去磷酸的过程发挥作用^[14,18]。ISP 通路下调导致 INSR→FOXO 去磷酸化,而去磷酸化的 P-FOXO 转录因子能够跨过核膜进入细胞核启动下游基因转录^[18]。取食冷蒿的亚洲小车蝗 ISP 途径下调,导致 P-FOXO 去磷酸化,其转录调控的解毒酶基因表达显著上调。解毒酶高表达意味着昆虫需要损耗大量的能量来维持生存,能更好地适应食物胁迫^[19-20]。因此,取食冷蒿、羊草的亚洲小车蝗发育速率降低,这是生物体一种及时主动的适应机制,当受到食物胁迫时可以通过消耗表型以维持个体生存^[21]。mTor(雷帕霉素靶蛋白),主要调控蛋白质合成,细胞生长、增殖等^[22]。取食西北针茅的亚洲小车蝗 ISP 信号途径上调,促进 *gmTor* 上调表达,激活下游转录因子,导致生长发育、营养代谢相关的 *gLCP*、*gCHY*、*gALP* 等基因表达显著升高。正是 ISP 通路对这些关键基因表达的调控,导致了亚洲小车蝗对不同食物的适应性差异,决定了其对不同食物的生态适应、生理适应和基因适应。

不同牧草显著影响着亚洲小车蝗的发生、发育表型、信号转导和基因表达,其中起最关键作用的是牧草的化学特性,主要包括蛋白质、脂肪、糖类等营养物质,以及众多的次生代谢物^[23-24]。前期研究表明,4 种牧草中主要营养物质和次生代谢物含量存在显著差异^[17],营养物质含量西北针茅>羊草>糙隐子草>冷蒿;次生代谢物含量冷蒿>羊草>糙隐子草>西北针茅。因此,结合本研究结果,推断冷蒿“低营养,高次生代谢物”的化学属性,导致 ISP 通路信号传递下调,下游调控的营养代谢相关基因表达降低,解毒代谢相关基因表达升高;低营养物质和高次生代谢物造成的食物胁迫不利于亚洲小车蝗种群发育和发生。相反,对于取食西北针茅的亚洲小车蝗,西北针茅“高营养,低次生代谢物质”的化学属

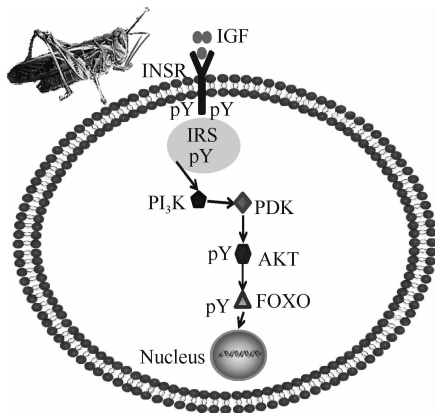


图 5 ISP 通路 IGF-PI₃K-AKT-FOXO 过程信号传递

Fig. 5 The IGF-PI₃K-AKT-FOXO cascade of ISP pathway

性,激活 ISP 通路信号传递,营养代谢相关基因上调表达,解毒代谢相关基因下调表达,利于亚洲小车蝗发育和种群发生。由此可见,牧草化学属性差异,决定了蝗虫对不同牧草的适应性差异,从而影响了蝗虫的发生规律。不同化学特性的牧草通过介导蝗虫 ISP 通路信号传递调控了亚洲小车蝗关键基因的表达,这是不同食物驱动亚洲小车蝗发生的本质。同时,也表明亚洲小车蝗进化出了主动适应机制,可根据植物营养、次生代谢物差异调控发育进度,以适应更广泛的生态区域,这可能是其分布广、易暴发成灾的根本原因。

参考文献

- [1] CEASE A J, ELSER J J, FORD C F, et al. Heavy livestock grazing promotes locust outbreaks by lowering plant nitrogen content [J]. *Science*, 2012, 335(6067): 467–469.
- [2] 张未仲, 吴惠惠, 刘朝阳, 等. 亚洲小车蝗在不同生境中的群落动态研究[J]. *植物保护*, 2013, 39(2): 25–30.
- [3] 杜桂林, 赵海龙, 涂雄兵, 等. 亚洲小车蝗在内蒙古草原宜生区划分研究[J]. *植物保护*, 2018, 44(6): 24–31.
- [4] HUANG X, MCNEILL M, ZHANG Z. Quantitative analysis of plant consumption and preference by *Oedaleus asiaticus* (Acrididae: Oedipodinae) in changed plant communities consisting of three grass species [J]. *Environmental Entomology*, 2016, 45(1): 163–170.
- [5] QIN Xinghu, HAO Kun, MA Jingchuan, et al. Molecular ecological basis of grasshopper (*Oedaleus asiaticus*) phenotypic plasticity under environmental selection [J/OL]. *Frontiers in Physiology*, 2017, 8: 770. DOI: 10.3389/fphys.2017.00770.
- [6] 吴惠惠, 徐云虎, 曹广春, 等. 内蒙古典型草原草地类型对蝗虫群落优势种群的生态效应[J]. *中国农业科学*, 2012, 45(20): 4178–4186.
- [7] 卢辉, 余鸣, 张礼生, 等. 不同龄期及密度亚洲小车蝗取食对牧草产量的影响[J]. *植物保护*, 2005, 31(4): 55–58.
- [8] TAGUCHI A, WHITE M F. Insulin-like signaling, nutrient homeostasis, and life span [J]. *Annual Review of Physiology*, 2008, 70(1): 191–212.
- [9] BADISCO L, VAN W P, VANDEN B J. Eat to reproduce: a key role for the insulin signaling pathway in adult insects [J/OL]. *Frontiers in Physiology*, 2013, 4: 202. DOI: 10.3389/fphys.2013.00202.
- [10] BROUGHTON S J, PIPER M D, IKEYA T, et al. Longer lifespan, altered metabolism, and stress resistance in *Drosophila* from ablation of cells making insulin-like ligands [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(8): 3105–3110.
- [11] COLE G M, FRAUTSCHY S A. The role of insulin and neurotrophic factor signaling in brain aging and alzheimer's disease [J]. *Experimental Gerontology*, 2007, 42(1/2): 10–21.
- [12] LIBERT S, ZWIENER J, CHU Xiaowen, et al. Regulation of *Drosophila* life span by olfaction and food-derived odors [J]. *Science*, 2007, 315(5815): 1133–1137.
- [13] OGG S, PARADIS S, GOTTLIEB S, et al. The fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans* [J]. *Nature*, 1997, 389(6654): 994–999.
- [14] WOLKOW C A, MUNOZ M J, RIDDLE D L, et al. Insulin receptor substrate and p55 orthologous adaptor proteins function in the *Caenorhabditis elegans* daf-2/insulin-like signaling pathway [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(51): 49591–49597.
- [15] DELALIO L J, DION S M, BOOTES A M, et al. Direct effects of hypoxia and nitric oxide on ecdysone secretion by insect prothoracic glands [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2015, 76: 56–66.
- [16] FRASER H B, KHAITOVICH P, PLOTKIN J B, et al. Aging and gene expression in the primate brain [J/OL]. *PLoS Biology*, 2005, 3(9): e274. DOI: 10.1371/journal.pbio.0030274.
- [17] HUANG Xunbin, WHITMAN D W, MA Jingchuan, et al. Diet alters performance and transcription patterns in *Oedaleus asiaticus* (Orthoptera: Acrididae) grasshoppers [J/OL]. *PLoS ONE*, 2017, 12(10): e0186397. DOI: 10.1371/journal.pone.0186397.
- [18] WU Qi, BROWN M R. Signaling and function of insulin-like peptides in insects [J]. *Annual Review of Entomology*, 2006, 51(1): 1–24.
- [19] KARBAN R, AGRAWAL A A. Herbivore offense [J]. *Annual Review of Ecology & Systematics*, 2002, 33: 641–664.
- [20] CASTANEDA L E, FIGUEROA C C, FUENTES-CONTRERAS E, et al. Physiological approach to explain the ecological success of 'superclones' in aphids: Interplay between detoxification enzymes, metabolism and fitness [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2010, 56(9): 1058–1064.
- [21] FRANZKE A, UNSICKER S B, SPECHT J, et al. Being a generalist herbivore in a diverse world: how do diets from different grasslands influence food plant selection and fitness of the grasshopper, *Chorthippus parallelus*? [J]. *Ecological Entomology*, 2010, 35(2): 126–138.
- [22] HUGHES K A, REYNOLDS R M. Evolutionary and mechanistic theories of aging [J]. *Annual Review of Entomology*, 2005, 50: 421–445.
- [23] 李新岗, 刘惠霞, 黄建. 虫害诱导植物防御的分子机理研究进展[J]. *应用生态学报*, 2008, 19(4): 893–900.
- [24] 张文辉, 刘光杰. 植物抗性次生物质的研究概况[J]. *植物学报*, 2003, 20(5): 522–530.