

草地贪夜蛾甲维盐敏感度下降品系与敏感品系的转录组和代谢组比较分析*

苏湘宁** 李传瑛 黄少华 廖章轩 刘伟玲 章玉苹***

(广东省农业科学院植物保护研究所, 农业农村部华南果蔬绿色防控重点实验室, 广东省植物保护新技术重点实验室农业, 广州 510640)

摘 要 【目的】为深入了解和探究明确草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 对杀虫剂甲维盐的解毒机制。

【方法】对草地贪夜蛾敏感度下降品系和敏感品系 3 龄幼虫进行转录组测序分析和代谢组学分析, 并对转录组与代谢组进行联合分析。【结果】转录组中鉴定出 222 个差异表达基因, 其中 76 个基因上调, 146 个基因下调 ($P < 0.05$)。其中草地贪夜蛾敏感度下降品系的 11 个代谢相关基因较敏感品系升高, 转录水平升高 2.0 倍以上。在差异代谢物中定位到尿苷二磷酸葡萄糖、L-谷氨酸、 γ -氨基丁酸、L-苏氨酸、L-半胱氨酸等代谢物, 其中 γ -氨基丁酸显著上调 ($P < 0.05$), 差异倍数为 2.47; L-谷氨酸显著下调 ($P < 0.05$), 差异倍数为 0.69。转录组与代谢组联合分析结果表明, 差异基因和差异代谢物主要共同富集于戊糖和葡萄糖酸盐的相互转化、氨基酸-tRNA 生物合成以及丙氨酸、天门冬氨酸和谷氨酸代谢等通路。谷氨酸代谢途径富集到 4 个差异表达基因编码 3 种关键酶, 包括谷氨酸合成酶、4-氨基丁酸转氨酶和谷氨酸脱羧酶。该途径富集到 4 种代谢产物, 其中天门冬氨酸、2-氧化戊二酸和 γ -氨基丁酸含量显著增加, L-谷氨酸含量显著降低。敏感度下降品系的谷氨酸脱羧酶活性升高, 催化 L-谷氨酸合成更多抑制性神经递质 γ -氨基丁酸。【结论】谷氨酸代谢途径可能在草地贪夜蛾对甲维盐的解毒过程中起到重要的作用。本研究结果为进一步研究草地贪夜蛾对杀虫剂的解毒机制提供了依据。

关键词 草地贪夜蛾; 甲维盐; 转录组; 代谢组; 解毒代谢

Comparative transcriptome and metabolome analysis of emamectin benzoate-hyposensitive, and susceptible, strains of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

SU Xiang-Ning** LI Chuan-Ying HUANG Shao-Hua
LIAO Zhang-Xuan LIU Wei-Ling ZHANG Yu-Ping***

(Plant Protection Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Green Prevention and Control of Fruits and Vegetables in South China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of High Technology for Plant Protection of Guangdong Province, Guangzhou 510640, China)

Abstract [Objectives] To investigate and clarify the mechanism used by *Spodoptera frugiperda* to detoxify the insecticide emamectin benzoate. [Methods] Transcriptome sequencing and metabolomic analysis were performed on 3rd instar *S. frugiperda* larvae from an emamectin benzoate-hyposensitive strain (EB-HS) and a sensitive strain (SS). The transcriptome and metabolome were analyzed jointly. [Results] Two hundred and twenty-two differentially expressed genes (DEGs) were detected in the transcriptome, of which 76 were up-regulated and 146 down-regulated ($P < 0.05$). Among these, eleven metabolism-related genes were more common in the EB-HS than in the SS, and transcript levels were more than 2.0-fold higher in the EB-HS. Identified differential metabolites include uridine diphosphate glucose, L-glutamic acid, gamma-

*资助项目 Supported projects: 广州市科技计划项目 (2023B03J1268); 广州市科技计划项目 (202201010190); 广东省现代农业产业共性关键技术研发创新团队 (2023KJ113); 广东省农业科学院科技创新战略专项 (R2019YJ-YB2003)

**第一作者 First author, E-mail: suxiangning@gdppri.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: zhangyp@gdppri.cn

收稿日期 Received: 2022-09-21; 接受日期 Accepted: 2023-03-24

aminobutyric acid, L-threonine and L-cysteine. Gamma-aminobutyric acid was significantly up-regulated with a time difference of 2.47 and L-glutamic acid was significantly down-regulated with a difference multiple of 0.69. The combined analysis of the transcriptome and metabolome indicates that DEGs and DMs are mainly enriched in pentose and glucuronate interconversion, aminoacyl-tRNA biosynthesis, alanine, aspartate and glutamate metabolism, and other pathways. The glutamate metabolic pathway was enriched to four DEGs encoding three key enzymes, including glutamate synthetase, 4-aminobutyrate aminotransferase and glutamate decarboxylase. Four metabolites were enriched by this pathway, which significantly increased aspartic acid, 2-oxoglutarate and gamma-aminobutyric acid content, whereas L-glutamic acid content significantly decreased. Glutamate decarboxylase activity increased in the EB-HS, catalyzing L-glutamate synthesis of the more inhibitory neurotransmitter gamma-aminobutyric acid. **[Conclusion]** The glutamate metabolism pathway may play an important role in the detoxification of emamectin benzoate by *S. frugiperda*. These findings provide a basis for further research on the mechanism responsible for insecticide detoxification in this species.

Key words *Spodoptera frugiperda*; emamectin benzoate; transcriptome; metabolome; detoxification metabolism

草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 是一种原产于美洲热带和亚热带地区的杂食性害虫 (Sparks, 1979), 其危害玉米、水稻、花生、高粱、大豆和甘蔗等作物 (Montezano *et al.*, 2018)。草地贪夜蛾是一种典型的远距离迁飞性害虫, 目前已传播至 100 多个国家, 2016 年入侵至非洲, 2018 年入侵亚洲, 2019 年入侵我国, 在云南普洱首次发现该虫 (Goergen *et al.*, 2016; Sharanabasappa *et al.*, 2018; Feldmann *et al.*, 2019; 王磊等, 2019)。草地贪夜蛾迁飞、繁殖和取食为害能力极强, 一旦未能采取及时有效的防控措施, 往往对当地农作物特别是玉米生产造成严重的经济损失 (王登杰等, 2020)。生产上针对该害虫的防治主要依赖化学农药的使用。由于杀虫剂的大量、重复使用, 草地贪夜蛾的抗药性问题日益严重, 国内外部分地区草地贪夜蛾已对包括毒死蜱、高效氯氟氰菊酯在内的多种化学农药产生抗性, 且对甲基对硫磷、茚虫威、氟虫双酰胺等药剂达到高抗水平 (Yu and McCord, 2007; Carvalho *et al.*, 2013; 吴超等, 2019)。例如, 在美国波多黎各田间采集到的草地贪夜蛾对氟虫双酰胺的抗性高达 500 倍, 且对茚虫威也表现出 160 倍的高抗性 (Gutiérrez-Moreno *et al.*, 2019)。草地贪夜蛾对氯虫苯甲酰胺 (Bolzan *et al.*, 2019)、乙基多杀菌素 (Lira *et al.*, 2020)、虱螨脲 (Nascimento *et al.*, 2016) 等新型农药也产生了抗性。我国广东茂名地区草地贪夜蛾田间种群对氯虫苯甲酰胺和甲维盐的抗性倍数分别达 23.17 和 14.37 倍 (苏湘宁等, 2020)。

甲氨基阿维菌素苯甲酸盐 (甲维盐, Emamectin benzoate), 是一种来自阿维菌素家族化合物的大环内酯杀虫剂, 普遍认为甲维盐对害虫的作用机制与阿维菌素相同, 以 γ -氨基丁酸受体 (GABA receptor) 和谷氨酸门控氯离子通道 (GluCl) 为作用靶标 (Madkour *et al.*, 2021)。尽管鳞翅目害虫对许多杀虫剂具有先天耐受性, 但甲维盐是防治鳞翅目害虫最有效的杀虫剂之一 (Che *et al.*, 2015)。然而, 由于大量频繁的使用甲维盐, 鳞翅目害虫对甲维盐的抗性演变使其对鳞翅目害虫的可持续防治面临重大挑战。在巴基斯坦和中国的部分地区甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 田间种群对该杀虫剂产生了高水平的抗性 (Ishtiaq *et al.*, 2014; Su and Sun, 2014; Che *et al.*, 2015; Ahmad *et al.*, 2018)。已有报道证实印度卡纳塔克邦不同地区小菜蛾 *Plutella xylostella* 田间种群对甲维盐的产生了 4-8 倍的抗性 (Biradar *et al.*, 2020)。巴西草地贪夜蛾田间种群对甲维盐的敏感性有所下降, 产生了田间进化抗性 (Muraro *et al.*, 2022)。华北棉区棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 甲维盐的抗性监测结果表明, 河北沧县、河南安阳、山西盐湖和山东夏津田间种群的抗性倍数分别为 8.2-40.4 倍、5.8-16.6 倍、5.5-23.4 倍和 11.0-36.6 倍 (胡红岩等, 2021)。

随着第三代测序技术的发展, 让全面了解杀虫剂长期胁迫下昆虫的基因表达成为了可能。通过转录组数据可以直观地观察抗性昆虫能量代谢的变化。有研究表明, 实验室汰选的草地贪夜蛾毒死蜱和高效氯氟氰菊酯抗性品系与敏感品

系的基因表达水平存在差异,大部分 CYP3 和 CYP6 家族的细胞色素 P450 基因表达量上调(do Nascimento *et al.*, 2023)。通过分析转录组测序比较草地贪夜蛾虱螨脲抗性和敏感品系幼虫的基因表达模式,共鉴定出 940 个差异表达转录本,其中 35 个差异表达转录本与解毒过程相关,包括 24 个 P450 单加氧酶基因,4 个谷胱甘肽-S 转移酶基因,6 个羧化酶基因,1 个磺基转移酶基因(do Nascimento *et al.*, 2015)。

代谢组学是一项新兴技术,可实时检测生物对环境变化、病理生理刺激和遗传修饰的适应性反应(Gao *et al.*, 2022)。近年来,代谢组学在害虫抗药性方面得到广泛应用,有助于筛选新的作用靶标,研发新型杀虫剂,为害虫的绿色防控技术提供新的突破口(崔艺琳等, 2022)。例如,经过氯菊酯处理后的果蝇 *Drosophila melanogaster* 体内发现了许多未知的代谢途径,并证实了色氨酸途径在果蝇对氯菊酯的解毒代谢过程具有重要作用(Brinzer, 2015)。氯虫苯甲酰胺胁迫下引起草地贪夜蛾代谢产物发生明显变化,草地贪夜蛾体内氨基酸代谢、能量代谢、嘌呤嘧啶代谢和脂肪酸代谢途径被大幅度调动,这些过程共同作用减少氯虫苯甲酰胺对草地贪夜蛾的毒性(苏湘宁等, 2023)。因此,代谢组可以提供昆虫所有代谢物的动态变化,并可以与其他组学,包括基因组、转录组和蛋白质组相互作用调节生物过程,代谢组学与转录组分析相结合有助于更准确地识别与某一生物过程相关的关键基因(Rinschen *et al.*, 2019)。

本研究以草地贪夜蛾敏感品系(Susceptible strain, SS)和草地贪夜蛾对甲维盐敏感度下降品系(Emamectin benzoate-hyposensitive strain, EB-HS)为供试虫源,采用高通量测序(RNA-seq)对两个草地贪夜蛾品系的转录组进行比较分析,以确定对草地贪夜蛾的基因应答。同时,利用液相色谱-质谱(LC-MS)进行代谢组学分析,探究两个品系的代谢模式。最后,对转录组和代谢组进行关联分析,以挖掘草地贪夜蛾抗性关键基因、关键酶及关键代谢通路。本研究为草地贪夜蛾抗药性治理提供理论技术支持。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

草地贪夜蛾敏感品系(Susceptible strain, SS)于 2019 年 5 月采自广东省广州市白云区钟落潭镇(113.38° E, 23.42° N)广东省农业科学院玉米试验田,在不接触任何药剂的情况下在室内连续饲养。室内饲养过程中卵块用 4%的甲醛溶液消毒,幼虫用人工饲料饲养至化蛹,成虫用 10%蜂蜜水喂食。养虫室或光照培养箱饲养条件:温度(27 ± 0.5) °C,湿度 $75\% \pm 5\%$,光周期 L:D = 16:8(李传瑛等, 2019)。

草地贪夜蛾甲维盐敏感度下降品系(Emamectin benzoate-hyposensitive strain, EB-HS),以敏感品系为材料,采用 LC₇₀ 甲维盐室内连续筛选所得,以抗性倍数的增长表示抗性发展速度,室内连续筛选 20 代,筛选期间做毒力测定,计算其 LC₅₀,监测抗药性发展趋势。

1.2 供试药品

94%甲氨基阿维菌素苯甲酸盐(甲维盐)原药(CAS 号: 155569-91-8):深圳诺普信股份有限公司;丙酮(广州牌化学试剂,分析纯 A.R):广州化学试剂厂;甲醇(CAS 号: 67-56-1, LC-MS 级)、乙腈(CAS 号: 75-05-8, LC-MS 级):美国 Merck 公司;甲酸(LC-MS 级):日本 TCI 公司;Triton X-100(X-100, 实验室级):美国 Amresco 公司;RNA 提取试剂(15596-026):美国 Invitrogen 公司;cDNA 反转录试剂盒(RR036A):TaKaRa 公司。

1.3 草地贪夜蛾对甲维盐敏感性的测定

草地贪夜蛾对杀虫剂敏感性的测定方法参考浸叶法(蒋兴川等, 2019),略有改动。供试甲维盐用丙酮溶解配制成 $1\ 000\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液,置低温避光保存备用。生物测定前将药剂母液用含 $1\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Triton X-100 的水溶液倍比稀释成所需浓度的悬浮液。选取室内种植、未使用任何杀虫剂的玉米叶片,清洗晾干后,剪成直径约 5 cm 叶段,在药液中浸泡 15 s,室温晾干,置于带有湿

润滤纸圆形培养皿中,以含 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Triton X-100 的丙酮溶液处理叶片作为空白对照。将饥饿 12 h 的 3 龄中期幼虫 (SS 和 EB-HS) 转入处理叶片的培养皿中,每皿 1 头幼虫,每处理 20 头幼虫,每个处理 6 次重复。培养条件同 1.1,饲养 48 h 后,计算抗性倍数。抗性倍数 = 供试种群的 LC_{50} / 敏感品系的 LC_{50}

1.4 转录组测序与分析

1.4.1 RNA 提取 用总 TRIzol 试剂盒分别提取 1 头 3 龄草地贪夜蛾 SS 和 EB-HS 的总 RNA,每个品系 6 个重复。使用 NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE) 测量 RNA 浓度和纯度。RNA 完整性使用 Agilent Bioanalyzer 2100 系统 (Agilent Technologies, CA, USA) 的 RNA Nano 6000 Assay Kit 进行评估。所有样本的 RNA 完整性 (RIN) > 9.7,纯化后的 RNA 溶解在 RNase-free 水中,并保存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,待后续分析。

1.4.2 转录组测序及数据整理 RNA 测序委托北京百迈客生物科技有限公司完成。通过 in-house perl scripts 对原始数据进行过滤,去除低质量序列,获得高质量的数据 (Clean data)。

1.4.3 基因表达水平定量和差异分析 将 SS 和 EB-HS 的高质量数据与草地贪夜蛾的参考基因组 (*Spodoptera frugiperda* GCF_011064685.1.genome.fa, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/search/all/?term=GCF_011064685.1.genome.fa) 进行比对,评价文库质量。比较分析后,用 StringTie 组装并量化 reads。基因表达水平用 FPKM (Fragments per kilobase of transcript per million fragments mapped) 值表示。使用 edgeR 3.8.6 中的 DESeq2 进行基因表达差异分析,筛选差异表达基因的标准为 FDR 小于 0.01 且差异倍数 (Fold change, FC) 大于 2。使用 TopGO 进行 GO 功能分类分析,使用 ClusterProfiler 进行 KEGG 通路分析。

1.4.4 候选基因的 qRT-PCR 验证 采用 qRT-PCR 比较候选基因的相对 mRNA 表达量。总 RNA 采用 TRIzol 试剂盒提取。在 NCBI 获得基因序列并在线设计引物 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>),以 GAPDH 作为内参基因,候选基因引物序列见表 1。以 $1.0\text{ }\mu\text{g}$ 总 RNA 合成 cDNA,利用 ABI 7500 Real-time PCR 系统进行 qRT-PCR 分析。qRT-PCR 反应程序如下: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 3 min, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 s, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 s, 共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算基因表达量。采用 3 个生物重复和 3 个技术重复进行 qRT-PCR 分析。采用 SPSS 22.0 对数据进行分析。

表 1 用于 qRT-PCR 的候选基因引物

Table 1 Primers of candidate genes used for qRT-PCR

候选基因 Candidate genes	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
<i>CYP6B6</i>	F: ATGTGGTGATTCCCCTGCAA R: CCAGGCGAAGCCCTATACAA
<i>CYP4C1</i>	F: GCTTGTAGTGTTACTCTGTGCTTT R: GACGATAAAAACTATTGCTTTGCTT
<i>GST1</i>	F: ACTATACACGACAGCCACGC R: GGAACATGACAGCTGCATTGAA
<i>ABCG23</i>	F: GGTATCTGCGGCATGTGCTA R: GAGGCCATAGGATACCACACA
<i>CarE6</i>	F: ACCAACACAGCCTACTATTTCGT R: CCTGTTGTTTCAAATCCCAAATGC
<i>CarEFE4</i>	F: ACTTTGCTAAATTTGGAAACCCG R: TGTGAGCGTATTCAAGAATGTCC

1.5 代谢组学分析

1.5.1 代谢组样品的收集和制备 收集草地贪夜蛾 SS 和 EB-HS 3 龄中期幼虫各 1 头, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存。称取以上样品 50 mg 于 EP 管中,加入含内标物 L-2-氯苯丙氨酸 (2-Chloro-L-phenylalanine) 的提取液 $1\text{ }000\text{ }\mu\text{L}$ (甲醇:乙腈:水体积比 = 2:2:1, 内标浓度 $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 加入小钢球涡旋 30 s。45 Hz 研磨机处理 10 min, 冰水浴超声提取 10 min。 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置 1 h 后对样品进行离心 ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $12\text{ }000\text{ r/min}$) 15 min, 取 $500\text{ }\mu\text{L}$ 上清于 EP 管中,在真空浓缩器中干燥提取物,向干燥后加入 $160\text{ }\mu\text{L}$ 提取液 (乙腈水体积比 1:1) 复溶,涡旋 30 s,冰水浴超声 10 min。在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下, $12\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 15 min, 取 $120\text{ }\mu\text{L}$

上清于 2 mL 进样瓶, 每个样本各取 10 μL 混合成 QC 样本上机检测, 每个处理 6 个重复。

1.5.2 UPLC-Q-TOF MS 样品分析 样品采用超高效液相色谱系统 (Waters acquity I-class plus) 和高分辨率质谱仪 (Waters Xevo G2-XS QTOF) 分析, 色谱柱为 Acquity UPLC HSS T3 色谱柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μm), 0.1% 甲酸 (A) 和含有 0.1% 甲酸的乙腈 (B) 为梯度流动相: 0-2% (v/v) B 持续 15 s, 2%-98% (v/v) B 持续 9 min 45 s, 98% B 持续 3 min, 2%-98% (v/v) B 持续 6 s, 2% B 持续 1 min 54 s。流速为 400 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 。采用电喷雾电离 (ESI) 正、负离子模式检测分析, 并利用采集软件 (MassLynx V4.2, Waters) 控制下的全信息串联质谱 (MSe) 模式进行一级、二级质谱数据采集。

1.5.3 代谢物定量分析 使用 MassLynx V4.2 采集的原始数据通过 Progenesis QI 软件做峰提取、峰对齐等数据处理操作, 基于 Progenesis QI 软件在线 METLIN 数据库及百迈客自建库进行鉴定, 同时进行理论碎片识别, 母离子质量数偏差 100 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 、碎片离子质量数偏差 50 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 以内。采取差异倍数的 P 值和 OPLS-DA 模型的变量投影重要度 (VIP, variable importance in the projection) 值与 t 检验相结合的方法筛选差异代谢物, 筛选的标准为 $\text{FC} > 1$ 、 $P < 0.05$ 和 $\text{VIP} > 1$ 。

1.5.4 γ -氨基丁酸含量及谷氨酸脱羧酶活性 草地贪夜蛾 γ -氨基丁酸含量的测定采用高效液相色谱 (System 515; Waters Technologies Co. Ltd., USA) 进行测定 (魏冬等, 2014)。收集草地贪夜蛾 SS 和 EB-HS 3 龄中期幼虫各 10 头, 加入预冷的 6% 磺基水杨酸 10 mL, 冰浴研磨, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 12 000 r/min 离心 10 min。取上清液经 0.22 μm 滤膜过滤待高效液相色谱检测。采用 3 个生物重

复和 3 个技术重复。

草地贪夜蛾谷氨酸脱羧酶活性的测定方法如下: 草地贪夜蛾 SS 和 EB-HS 3 龄中期幼虫各 10 头, 加入 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 PBS (0.05 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.0) 2 mL, 冰浴研磨匀浆, 取 1 mL 匀浆于 4 $^{\circ}\text{C}$, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液过 0.22 μm 滤膜, 酶液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。活力测定采用微量酶标板法, 以谷氨酸为底物, 6% 重蒸苯酚与 5.2% 次氯酸钠为显色剂, 加入稀释后的酶液在 630 nm 处测定 OD 值, 计算谷氨酸脱羧酶比活力。酶蛋白含量测定采用考马斯亮蓝 G-250 法 (魏冬等, 2014)。每次检测 3 个生物重复和 3 个技术重复。

1.5.5 代谢组和转录组关联分析 代谢组与转录组的关联分析是通过基于百迈客 BMKCloud (www.biocloud.net) 自建应用程序进行的, 根据本实验的差异代谢物分析结果, 结合转录组差异基因分析结果, 将相同分组的差异基因及差异代谢物同时映射到 KEGG 通路图上, 各个差异分组基于皮尔逊相关性 (Pearson) 方法计算所有基因和代谢物之间的相关性, 在计算相关性前用 z 值变换方法进行数据预处理, 然后按照相关性系数 (Correlation coefficient, CC) 和相关性的 P -value 进行筛选, 筛选阈值为 $|\text{CC}| > 0.80$ 且 $\text{CCP} < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 草地贪夜蛾敏感度下降品系对甲维盐的敏感性

草地贪夜蛾敏感品系的 LC_{50} 为 0.08 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 敏感品系室内连续筛选 20 代, 得到甲维盐敏感度下降品系, 其 LC_{50} 为 0.34 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 抗性倍数达到 4.25 倍 (表 2)。

表 2 草地贪夜蛾 2 个品系对甲维盐的敏感性

Table 2 The sensitivity of two strains of *Spodoptera frugiperda* to emamectin benzoate

药剂 Insecticide	品系 Strains	LC_{50} (mg/L) (95%置信区间) (95%FL)	斜率 (标准误) Slope (SE)	抗性倍数 Resistance ratio
甲维盐	敏感品系 SS	0.08 (0.03-0.82)	0.74 (0.25)	1.00
Emamectin benzoate	敏感度下降品系 EB-HS	0.34 (0.18-0.53)	1.33 (0.32)	4.25

SS: 草地贪夜蛾敏感品系 Susceptible strain; EB-HS: 甲维盐敏感度下降品系 Emamectin benzoate-hyposensitive strain. 下表和下图同。The same as the following tables and figures below.

2.2 草地贪夜蛾转录组学分析

2.2.1 RNA-Seq 测序结果 草地贪夜蛾 SS 和 EB-HS 的总 RNA 样本经转录组测序, 获得各样品高质量数据量达 6.04 Gb, Q30 碱基百分比在 94.22%以上, SS 和 EB-HS 的高质量数据与参考基因组的比对效率在 77.69%-81.56%。平均 GC 含量为 47.72%, 转录组数据获得良好 (表 3)。基因表达量分析, FPKM 值主要分布在 1-10 范围内, FPKM > 10 分布仍较多, 说明测序片段长度较好, 基因表达丰度高; FPKM > 5 的曲线达到饱和, 表明测序数据满足基因表达定量的要求。

2.2.2 差异表达基因功能分类 为了明确 SS 和 EB-HS 差异表达基因 (Differentially expressed genes, DEGs) 的生物学功能, 对差异表达基因进行了 GO 分析。差异表达基因被分为三类: “生物过程” (Biological process)、 “细胞成分” (Cellular component) 和 “分子功能” (Molecular

function) (图 1)。生物过程分类包括代谢过程 (Metabolic process, GO: 0008152)、单有机体过程 (Single-organism process, GO:0044699)、细胞过程 (Cellular process, GO:0009987)、生物调节 (Biological regulation, GO:0065007)、刺激反应 (Response to stimulus, GO:0050896)、

表 3 两个文库的 RNA-seq 测序数据输出结果
Table 3 Output data of RNA-seq reads in two libraries by RNA sequencing

品系 Strains	Clean reads	Clean bases	≥Q20 (%)	≥Q30 (%)	GC 含 量(%) GC content (%)
敏感品系	21 079 914	6 315 068 094	99.26	95.05	48.26
SS	20 161 967	6 038 938 236	99.31	95.38	47.73
	20 383 070	6 105 343 058	99.31	95.39	48.02
敏感度下	20 407 390	6 112 005 846	99.22	94.92	47.10
降品系	21 000 363	6 288 928 642	99.33	95.60	47.87
EB-HS	21 439 691	6 418 276 016	99.11	94.22	47.45

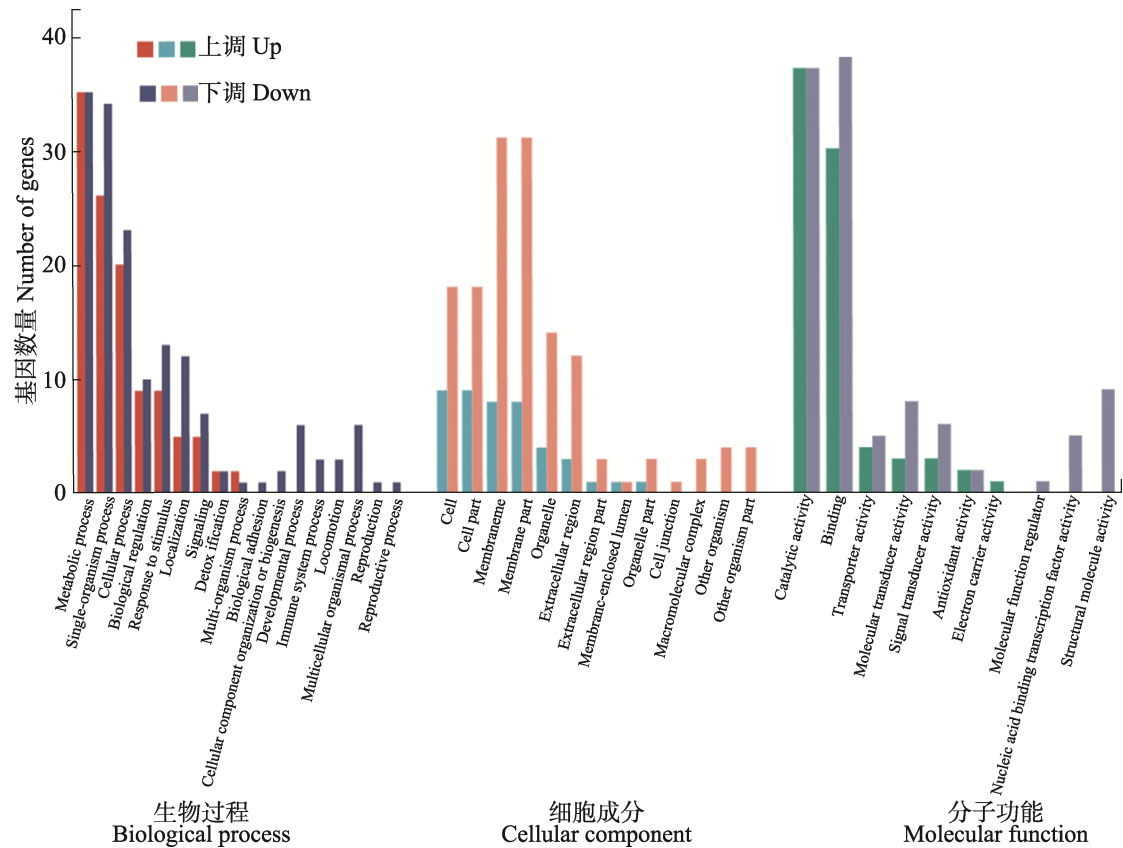


图 1 草地贪夜蛾两个品系差异表达基因 GO 分类

Fig. 1 Gene ontology (GO) classification of differentially expressed genes (DEGs) in two *Spodoptera frugiperda* strains

信号 (Signaling , GO:0023052)、解毒 (Detoxification, GO:0098754), 以及与抵抗应激相关的其他过程。在“细胞成分”分类中包括细胞 (Cell, GO:0005623)、细胞器 (Cell part, GO:0044464)、细胞外区域 (Extracellular region, GO:0005576) 等过程。与应激反应、解毒和运输相关的差异表达基因被归入“分子功能”, 包括催化活性 (Catalytic activity, GO:0003824)、转运活性 (Transporter activity, GO:0005215)、转录传递活性 (Signal transducer activity, GO:0004871) 和抗氧化活性 (Antioxidant activity, GO:0016209)。

2.2.3 差异表达基因 KEGG 通路富集分析 草

地贪夜蛾 SS 和 EB-HS 差异表达基因 KEGG 通路富集包括溶酶体 (Lysosome)、抗原加工与呈递途径 (Antigen processing and presentation)、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢途径 (Glycine, serine and threonine metabolism)、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢途径 (Alanine, aspartate and glutamate metabolism), 以及药物代谢-其他酶途径 (Drug metabolism-other enzymes) 等 (图 2)。其中, 7 个 KEGG 通路显著富集, 包括溶酶体、抗原加工与呈递途径、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢、药物代谢-其他酶及泛醌和其他萜类醌的生物合成 ($P < 0.05$)。

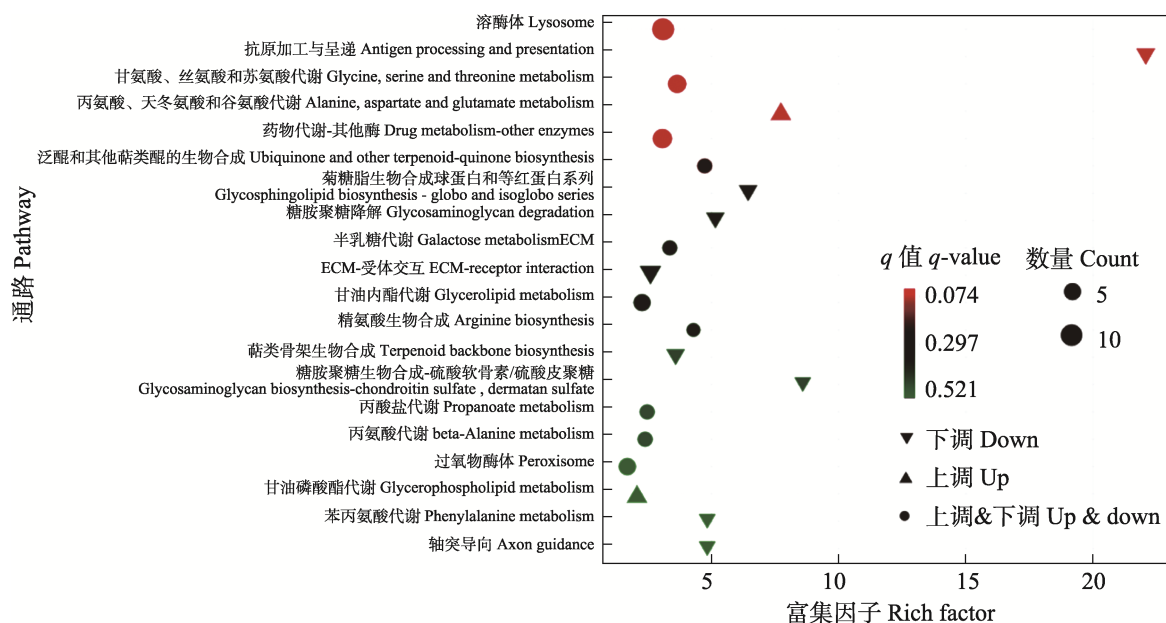


图 2 草地贪夜蛾两个品系差异表达基因的 KEGG 通路富集分析

Fig. 2 KEGG pathway enrichment analysis of the DEGs in two *Spodoptera frugiperda* strains

2.2.4 差异表达基因鉴定 为了探究草地贪夜蛾 EB-HS 基因表达的变化, 对 $|\log_2(FC)| \geq 1$ 和 $FDR < 0.01$ 的基因进行了分析。在草地贪夜蛾 EB-HS 和 SS 中共有 222 个差异表达基因, 其中上调的基因 76 个, 下调的基因 146 个 (图 3)。在 NCBI 中鉴定并注释了编码细胞色素 P450 (CYPs)、谷胱甘肽 S-转移酶 (GSTs)、尿苷二磷酸葡萄糖 (UGTs)、ATP-结合盒转运蛋白 (ABC) 和羧酸酯酶 (CarEs) 所有抗性相关的差异表达基因 (表 4)。与草地贪夜蛾 SS 相比, EB-HS 中共有 3 个细胞色素 P450 基因上调, 2 个谷胱甘肽 S-转移酶基因上调, 2 个尿苷二磷酸

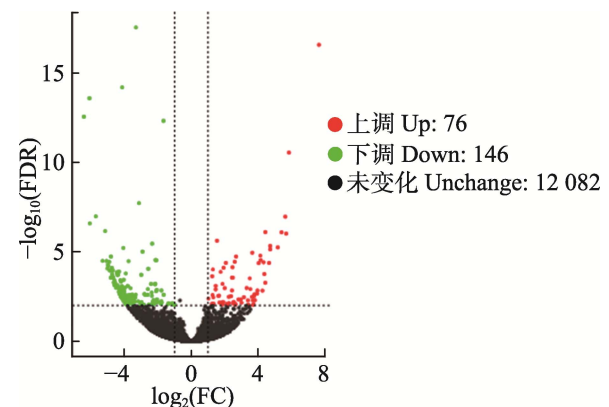


图 3 草地贪夜蛾两个品系差异表达基因统计分析

Fig. 3 Statistical analysis of DEGs in *Spodoptera frugiperda* between two strains

表 4 解毒酶和靶标受体的差异表达基因分析
Table 4 Analysis of detoxification enzyme and target receptor in DEGs

	基因号 Gene ID	log ₂ FC	调控 Regulation	注释 Annotation	NCBI Blast	基因登录号 GenBank no.
细胞色素 P450 CYP	118274094	4.72	上调 Up	<i>CYP6B6</i>	CYP6B6-like [<i>Spodoptera frugiperda</i>]	XM_035591457.2
	118275193	3.01	上调 Up	<i>CYP4D1</i>	CYP4C1-like [<i>Spodoptera frugiperda</i>]	XM_035593063.1
	118270862	5.18	上调 Up	<i>CYP4C1</i>	CYP4C1 [<i>Spodoptera frugiperda</i>]	XM_050697917.1
谷胱甘肽 S-转移酶 GST	118282243	4.15	上调 Up	<i>GST1-like</i>	GST1-like [<i>Spodoptera frugiperda</i>]	XM_035603228.1
	118261929	3.78	上调 Up	<i>GST1</i>	GST1 [<i>Spodoptera frugiperda</i>]	XM_035572977.2
尿苷二磷酸葡萄糖 UGT	118279190	3.32	上调 Up	<i>UGT1-7-like</i>	UGT1-7-like [<i>Spodoptera frugiperda</i>]	XM_035598750.1
	118277904	4.44	上调 Up	<i>UGT5-like</i>	UGT5-like	XM_035596917.2
ATP-结合盒转运蛋 白 ABC	118270767	- 3.46	下调 Down	<i>ABCG23</i>	ABCG23-like[<i>Spodoptera frugiperda</i>]	XM_035586537.1
羧酸酯酶 CarE	118275668	- 3.99	下调 Down	<i>CarE6</i>	Carboxylesterase-6 [<i>Spodoptera frugiperda</i>]	XM_035593721.2
	118276231	4.66	上调 Up	<i>CarEFE4</i>	Juvenile hormone esterase-like [<i>Spodoptera frugiperda</i>]	XM_050707430.1
γ-氨基丁酸门控氯 离子通道 GABAC1	118266945	- 1.78	下调 Down	<i>GABAI</i>	GABA receptor subunit delta [<i>Spodoptera frugiperda</i>]	XM_050702992.1
谷氨酸脱羧酶 GAD	118279848	2.27	上调 Up	<i>Gad1-like</i>	<i>GAD1-like</i> [<i>Spodoptera frugiperda</i>]	XM_035599667.1
	118279909	2.47	上调 Up	<i>Gad1</i>	<i>GAD1</i> [<i>Spodoptera frugiperda</i>]	XM_050702297.1
4-氨基丁酸转氨酶 gabT	118266957	3.27	上调 Up	<i>gabT</i>	4-aminobutyrate aminotransferase, mitochondrial-like [<i>Spodoptera frugiperda</i>]	XM_035580626.2

葡萄糖基因上调, 1 个 ATP-结合盒转运蛋白基因下调, 羧酸酯酶基因上调和下调各 1 个。另外, EB-HS 中 γ-氨基丁酸门控氯离子通道 (GABAC1) 有 1 个差异表达基因, 编码谷氨酸脱羧酶 (GAD) 的基因 *GAD1* 和 *GAD1-like* 显著上调, 编码 4-氨基丁酸转氨酶的基因 *gabT* 显著上调。

2.2.5 抗性相关基因 mRNA 表达验证 草地贪夜蛾抗性相关差异基因表达谱如图 4 (A)。其中, 细胞色素 P450 基因 *CYP4C1* 上调表达量最高 (5.18 倍), 其次是 *CYP6B6*、*CarbE FE4* 和 *UGT5-like* 分别上调 4.72、4.66 和 4.44 倍。随机选取 6 个差异表达基因, 利用 qRT-PCR 验证转录组数据可靠性。结果显示, 差异基因在 qRT-PCR 结果与转录组结果中有相同的表达趋势 (图 4: B-G), 转录组结果可用于下一步分析。

2.3 草地贪夜蛾代谢组学分析

2.3.1 代谢轮廓差异 采用非靶向代谢组学方

法分析草地贪夜蛾 SS 和 EB-HS, 以明确 EB-HS 代谢物的变化。图 5 中同一品系的样品聚集在一起, 说明 SS 和 EB-HS 样品的重复性较好, 而不同品系样品彼此离散, 说明 SS 和 EB-HS 代谢物轮廓存在差异。其中, PC1 在 x 轴上的贡献值为 76.51%, PC2 在 y 轴上的贡献值为 15.07% (图 5: A), 说明 SS 和 EB-HS 的代谢物能有效分离。OPLS-DA 分析图也显示 SS 和 EB-HS 离子分离良好 (图 5: B), 与 PCA 分析结果一致。

2.3.2 差异代谢物 草地贪夜蛾两个品系在正离子质谱采集模式下共鉴定差异代谢物 1 814 种 (946 个上调, 868 个下调) (VIP > 1 和 P < 0.05), 负离子质谱采集模式下共鉴定差异代谢物 2 501 种 (1 221 个上调, 1 280 个下调) (VIP > 1 和 P < 0.05)。综合草地贪夜蛾 SS 和 EB-HS 正、负离子检测结果, 筛选到关键的差异代谢物包括 L-谷氨酸 (L-Glutamic acid)、L-苏氨酸 (L-Threonine) 和 L-脯氨酸 (L-Proline) 等氨基酸及

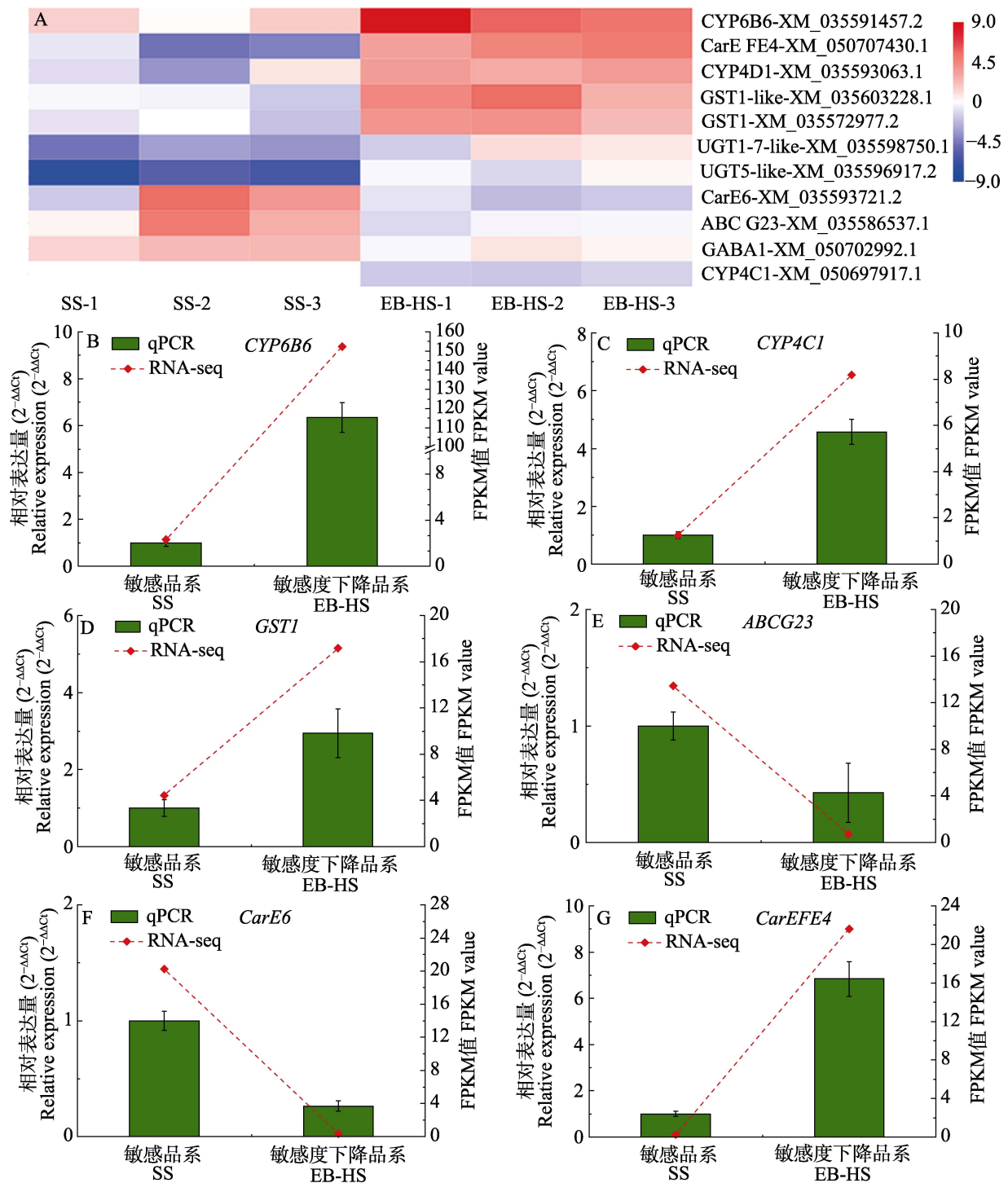


图 4 草地贪夜蛾抗性相关差异基因表达谱及 RNA-Seq 变化的定量 RT-PCR 验证
Fig. 4 Expression profiles of the resistance-related genes from *Spodoptera frugiperda*, and qRT-PCR validation of RNA-Seq changes

A. 草地贪夜蛾敏感品系和甲维盐敏感度下降品系抗性相关差异基因表达谱; B. 草地贪夜蛾两个品系 *CYP6B6* 基因的表达; C. *CYP4C1* 基因的表达; D. *GST1* 基因的表达; E. *ABCG23* 基因的表达; F. *CarE6* 基因的表达; G. *CarEFE4* 基因的表达。

A. Expression profiles of the resistance-related genes between SS and EB-HS of *S. frugiperda*; B. The expression of *CYP6B6* gene in two strains of *S. frugiperda*; C. The expression of *CYP4C1* gene; D. The expression of *GST1* gene; E. The expression of *ABCG23* gene; F. The expression of *CarE6* gene; G. The expression of *CarEFE4* gene.

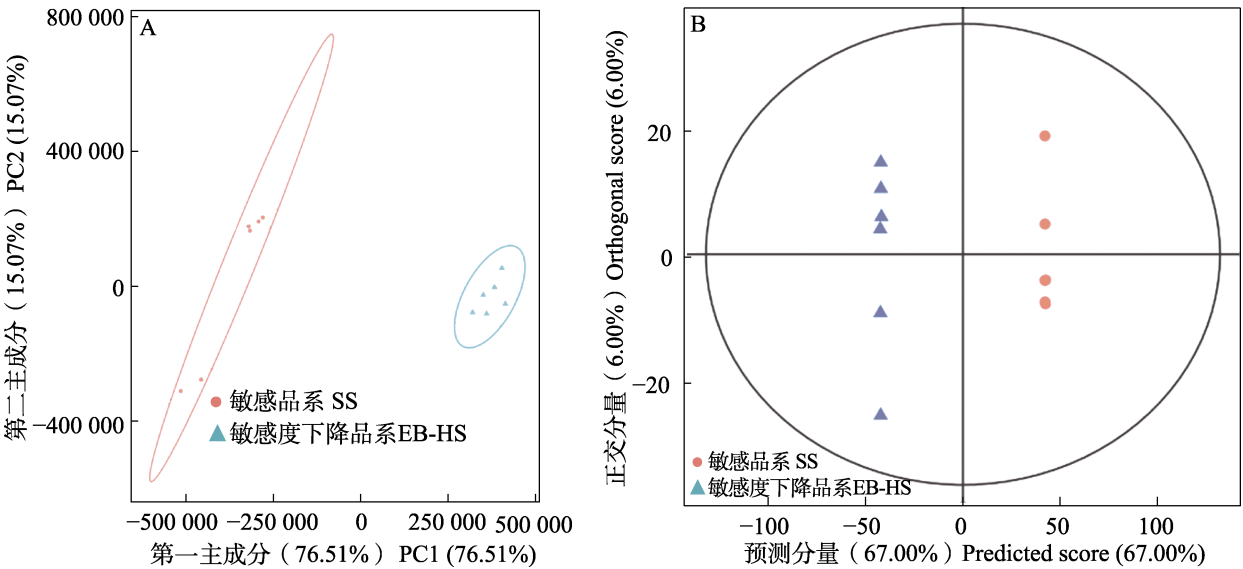


图 5 草地贪夜蛾 SS 和 EB-HS 中代谢物的主成分分析得分图 (A) 及
正交偏最小二乘判别分析得分图 (B)

Fig. 5 Principal component analysis score plot (A) and orthogonal partial least squares discriminant analysis score plot (B) of metabolites in SS and EB-HS of *Spodoptera frugiperda*

其衍生物, 泛酸 (Pantothenic acid) 和泛醇 (Pantothenol) 等有机化合物, 磷脂酰乙醇胺 (14 : 0/24 : 1(15Z)) (PE(14 : 0/24 : 1(15Z))) 和溶血磷脂酰胆碱 (16 : 1(9Z)/0 : 0) (LysoPC (16 : 1(9Z)/0 : 0)) 等甘油磷脂, 以及其它多种代谢物 (表 5)。其中, L-谷氨酸、 γ -氨基丁酸、天门冬氨酸和尿苷二磷酸葡萄糖差异倍数分别为 0.69、2.47、1.39 和 3.58 倍。结果表明, 与 SS 相比, EB-HS 中 L-谷氨酸含量降低, γ -氨基丁酸、天门冬氨酸和尿苷二磷酸葡萄糖含量升高。

表 5 草地贪夜蛾 SS 和 EB-HS 差异代谢物

Table 5 Summary of differential metabolites between SS and EB-HS of *Spodoptera frugiperda*

代谢物名称 Metabolite name	log ₂ FC	差异倍数 Times of difference (EB-HS/SS)	趋势 Trend	变量投影重要度 VIP
(R)-泛解酸盐 (R)-pantoate	- 0.71	0.61	下调 Down	1.21
泛酸 Pantothenic acid	0.31	1.24	上调 Up	1.17
泛醇 Pantothenol	0.38	1.30	上调 Up	1.12
泛酰硫氢乙胺 Pantetheine	- 2.49	0.18	下调 Down	1.19
尿苷 5'-二磷酸葡萄糖醛酸 Uridine 5'-diphosphoglucuronic acid	0.70	1.62	上调 Up	1.12
尿苷二磷酸葡萄糖 Uridine diphosphate glucose	1.84	3.58	上调 Up	1.18
α -酮戊二酸 Oxoglutaric acid	0.51	1.43	上调 Up	1.14
丙酮酸 Pyruvic acid	- 1.04	0.49	下调 Down	1.17
L-谷氨酸 L-Glutamic acid	- 0.53	0.69	下调 Down	1.15
天门冬氨酸 Aspartic acid	0.47	1.39	上调 Up	1.20
γ -氨基丁酸 Gamma-Aminobutyric acid	1.31	2.47	上调 Up	1.22
腺苷酸琥珀酸 Adenylosuccinate	0.38	1.30	上调 Up	1.13

续表 5 (Table 5 continued)

代谢物名称 Metabolite name	log ₂ FC	差异倍数 Times of difference (EB-HS/SS)	趋势 Trend	变量投影重要度 VIP
鸟氨酸 Ornithine	1.67	3.17	上调 Up	1.16
L-脯氨酸 L-Proline	0.53	1.44	上调 Up	1.16
4-氧络脯氨酸 4-Oxoproline	0.49	1.40	上调 Up	1.15
L-精氨酸 L-Arginine	0.56	1.47	上调 Up	1.18
N-谷酰胺脯氨酸 Linatine	0.97	1.96	上调 Up	1.17
L-缬氨酸 L-Valine	0.24	1.18	上调 Up	1.21
L-亮氨酸 L-Leucine	- 1.84	0.28	下调 Down	1.15
L-苏氨酸 L-Threonine	0.67	1.59	上调 Up	1.20
柠康酸 Citraconic acid	3.93	15.21	上调 Up	1.18
L-苯丙氨酸 L-Phenylalanine	0.35	1.27	上调 Up	1.21
L-组氨酸 L-Histidine	0.47	1.39	上调 Up	1.16
吡咯赖氨酸 L-Pyrrolysine	- 2.77	0.15	下调 Down	1.15
L-天冬酰胺 L-Asparagine	- 0.13	0.91	下调 Down	1.05
L-谷氨酰胺 L-Glutamine	0.56	1.48	上调 Up	1.18
2-苯乙醇 2-Phenylethanol	- 0.71	0.61	下调 Down	1.16
顺式-(羧基-乙基)-3,5-环己二烯基-1,2-二醇 cis-3-(Carboxy-ethyl)-3,5-cyclo-hexadiene-1,2-diol	0.70	1.62	上调 Up	1.19
2-羟基-3-苯并烯酸酯 2-Hydroxy-3-phenylpropenoate	- 0.41	0.75	下调 Down	1.10
苯乙酸 Phenylacetic acid	- 1.25	0.42	下调 Down	1.18
2-羟基肉桂酸 2-Hydroxycinnamic acid	- 1.30	0.41	下调 Down	1.18
溶血磷脂酰胆碱(16 : 1(9Z)/0 : 0) LysoPC(16 : 1(9Z)/0 : 0)	- 0.93	0.53	下调 Down	1.22
溶血磷脂酰胆碱(18 : 3(6Z,9Z,12Z)) LysoPC(18 : 3(6Z,9Z,12Z))	- 0.47	0.72	下调 Down	1.20
磷脂酰乙醇胺(14 : 0/24 : 1(15Z)) PE(14 : 0/24 : 1(15Z))	0.42	1.34	上调 Up	1.13
三乙醇胺 Triethanolamine	- 0.25	0.84	下调 Down	1.08
L-半胱氨酸 L-Cysteine	0.84	1.79	上调 Up	1.05
L-蛋氨酸 L-Methionine	0.67	1.59	上调 Up	1.20
S-腺苷-L-高半胱氨酸 S-Adenosyl-L-homocysteine	0.70	1.63	上调 Up	1.16
β-丙氨酸 beta-Alanine	0.92	1.89	上调 Up	1.16
苯酚 Phenol	- 0.26	0.84	下调 Down	1.08
2-甲基丁酸甲酯 2-Methylbutyrate	3.55	11.70	上调 Up	1.17
吲哚 Indole	0.43	1.35	上调 Up	1.11
哌啶 Piperidine	0.18	1.14	上调 Up	1.14

2.3.3 γ-氨基丁酸含量及谷氨酸脱羧酶活性分析 草地贪夜蛾两个品系中 γ-氨基丁酸含量的测定结果 (图 6: A) 显示, 草地贪夜蛾 SS 和 EB-HS 的 γ-氨基丁酸含量分别为每只幼虫 1.84

和 4.89 μg, EB-HS 中 γ-氨基丁酸含量升高, 是 SS 的 2.66 倍。草地贪夜蛾 SS 和 EB-HS 的谷氨酸脱羧酶活力分别为 1.25 和 5.39 μmol·min⁻¹·mg⁻¹, EB-HS 中谷氨酸脱羧酶活力是 SS 的 4.13 倍(图

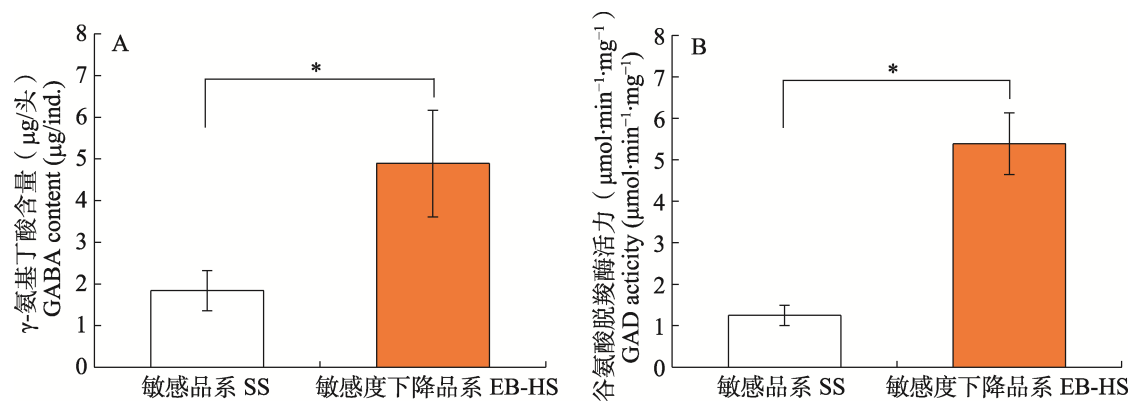


图 6 草地贪夜蛾 SS 和 EB-HS 体内 γ -氨基丁酸含量 (A) 和谷氨酸脱羧酶活力 (B) 差异分析
Fig. 6 Analysis of differences in GABA content and GAD activity in SS and EB-HS of *Spodoptera frugiperda*
*表示草地贪夜蛾敏感品系和敏感度下降品系差异显著 ($P < 0.05$)。
* indicates that there is a significant difference between SS and EB-HS of *S. frugiperda* ($P < 0.05$).

6: B)。表明草地贪夜蛾 EB-HS 体内谷氨酸脱羧酶活力和 γ -氨基丁酸含量均显著高于 SS, 验证了代谢组分析结果的准确性。

2.3.4 差异代谢物 KEGG 通路分析 对差异代谢物进行 KEGG 代谢通路分析, 差异代谢物较为富集的 10 条通路为: 泛酸和辅酶 A 生物合成 (Pantothenate and CoA biosynthesis)、戊糖和葡萄糖酸盐的相互转化 (Pentose and glucuronate interconversions)、丙氨酸、天门冬氨酸和谷氨酸代谢 (Alanine, aspartate and glutamate metabolism)、精氨酸和脯氨酸代谢途径 (Arginine and proline metabolism)、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成途径 (Valine, leucine and isoleucine biosynthesis)、氨酰基-tRNA 生物合成途径 (Aminoacyl-tRNA biosynthesis)、苯丙氨酸代谢途径 (Phenylalanine metabolism)、甘油磷脂代谢 (Glycerophospholipid metabolism)、半胱氨酸和蛋氨酸代谢 (Cysteine and methionine metabolism) 和

蛋白质消化吸收 (Protein digestion and absorption) (表 6)。

泛酸和辅酶 A 生物合成、戊糖和葡萄糖酸盐的相互转化和丙氨酸、天门冬氨酸和谷氨酸代谢通路显著富集 ($P < 0.05$)。其中, (R)-泛解酸钠盐 (R)-pantoate)、泛酸 (Pantothenic acid)、泛醇 (Pantothenol)、泛酰硫氢乙胺 (Pantetheine) 等差异代谢物参与泛酸和辅酶 A 生物合成通路。尿苷 5'-二磷酸葡萄糖醛酸 (Uridine 5'-diphosphoglucuronic acid)、尿苷二磷酸葡萄糖 (Uridine diphosphate glucose)、 α -酮戊二酸 (Oxoglutaric acid) 和丙酮酸 (Pyruvic acid) 等差异代谢物参与戊糖和葡萄糖酸盐的相互转化通路。L-谷氨酸 (L-Glutamic acid)、天门冬氨酸 (L-Aspartic acid)、 γ -氨基丁酸 (Gamma-Aminobutyric acid) 等差异代谢物参与丙氨酸、天门冬氨酸和谷氨酸代谢通路 (表 6)。

表 6 差异代谢物最富集的 10 条 KEGG 通路
Table 6 The top ten enriched KEGG pathways of differential metabolites

KEGG 通路 KEGG pathway	差异代谢物 Differential metabolites	P 值 P-value
泛酸和辅酶 A 生物合成 Pantothenate and CoA biosynthesis	(R)-泛解酸钠盐, 泛酸, 泛醇, 泛酰硫氢乙胺 (R)-pantoate, Pantothenic acid, Pantothenol, Pantetheine	0.012
戊糖和葡萄糖酸盐的相互转化 Pentose and glucuronate interconversions	尿苷 5'-二磷酸葡萄糖醛酸, 尿苷二磷酸葡萄糖, α -酮戊二酸, 丙酮酸 Uridine 5'-diphosphoglucuronic acid, Uridine diphosphate glucose, Oxoglutaric acid, Pyruvic acid	0.041
丙氨酸、天门冬氨酸和谷氨酸代谢 Alanine, aspartate and glutamate metabolism	L-谷氨酸, 天门冬氨酸, γ -氨基丁酸, 腺苷酸琥珀酸 L-Glutamic acid, Aspartic acid, Gamma-Aminobutyric acid, Adenylosuccinate	0.047

续表 6 (Table 6 continued)

KEGG 通路 KEGG pathway	差异代谢物 Differential metabolites	P 值 P-value
精氨酸和脯氨酸代谢 Arginine and proline metabolism	鸟氨酸, L-脯氨酸, 4-氧络脯氨酸, L-精氨酸, N-谷酰胺脯氨酸 Ornithine, L-Proline, 4-Oxoproline, L-Arginine, Linatine	0.066
缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成 Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	L-缬氨酸, L-亮氨酸, L-苏氨酸, 柠康酸 L-Valine, L-Leucine, L-Threonine, Citraconic acid	0.078
氨酰基-tRNA 生物合成 Aminoacyl-tRNA biosynthesis	L-缬氨酸, L-亮氨酸, L-苯丙氨酸, L-脯氨酸, L-组氨酸, L-吡咯赖氨酸, L-精氨酸, L-天冬酰胺, L-谷氨酰胺 L-Valine, L-Leucine, L-Phenylalanine, L-Proline, L-Histidine, L-Pyrrolysine, L-Arginine, L-Asparagine, L-Glutamine	0.132
苯丙氨酸代谢 Phenylalanine metabolism	L-苯基丙氨酸, 2-苯乙醇, 顺式-(羧基-乙基)-3,5-环己二烯基-1,2-二醇, 2-羟基-3-苯并烯酸酯, 苯乙酸, 2-羟基肉桂酸 L-Phenylalanine, 2-Phenylethanol, cis-3-(Carboxy-ethyl)-3,5-cyclohexadiene-1,2-diol, 2-Hydroxy-3-phenylpropenoate, Phenylacetic acid, 2-Hydroxycinnamic acid	0.132
甘油磷脂代谢 Glycerophospholipid metabolism	溶血磷脂酰胆碱(16 : 1(9Z)/0:0), 溶血磷脂酰胆碱(18 : 3(6Z,9Z,12Z)), 磷脂酰乙醇胺(14 : 0/24 : 1(15Z)), 三乙醇胺 LysoPC(16 : 1(9Z)/0 : 0), LysoPC(18 : 3(6Z,9Z,12Z)), PE(14 : 0/24 : 1(15Z)), Triethanolamine	0.168
半胱氨酸和蛋氨酸代谢 Cysteine and methionine metabolism	L-半胱氨酸, L-蛋氨酸, S-腺苷-L-高半胱氨酸 L-Cysteine, L-Methionine, S-Adenosyl-L-homocysteine	0.206
蛋白质消化吸收 Protein digestion and absorption	β -丙氨酸, 苯酚, 2-甲基丁酸甲酯, L-天冬酰胺, 吲哚, 哌啶 beta-Alanine, Phenol, 2-Methylbutyrate, L-Asparagine, Indole, Piperidine	0.271

2.4 转录组与代谢组关联分析

对差异代谢物与差异表达基因分别进行 KEGG 富集后获得二者的共有富集通路 (图 7), 可信度排名前 10 的代谢通路为戊糖和葡萄糖酸盐的相互转化、氨基酸-tRNA 生物合成、丙氨酸、天门冬氨酸和谷氨酸代谢、ABC 转运体、氨基酸合成、细胞色素 P450 对外源性药物的代谢作用、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成、精氨酸和脯氨酸代谢、药物代谢-细胞色素 P450 和氨基糖和核苷酸糖代谢。

丙氨酸、天门冬氨酸和谷氨酸代谢富集到 3 种编码酶: 谷氨酸合成酶 (EC 1.4.1.13, 4.13 倍)、4-氨基丁酸转氨酶 (EC 2.6.1.19, 2.47 倍) 和谷氨酸脱羧酶 (EC 4.1.1.15, 4.27 倍)。该途径共检测到 4 个差异代谢物, 除 L-谷氨酸外, 其余代谢物均在 EB-HS 中含量升高, 差异代谢物与差异表达基因的相关性均达到了显著水平 (图 8)。

3 讨论

草地贪夜蛾对杀虫剂的抗性机制主要包括靶向抗性和代谢性抗性 (Herrera-Mayorga *et al.*, 2018)。靶标突变是产生抗药性的原因之一, 如 I4790M 的兰尼碱受体 (RyR) 靶位突变导致草地贪夜蛾对二胺类杀虫剂产生抗药性 (Boaventura *et al.*, 2020)。除了靶标抗性外, 草地贪夜蛾解毒酶代谢活性的增加, 将杀虫剂代谢成无毒或毒性较低的产物是草地贪夜蛾抗性的另一个关键因素 (Gui *et al.*, 2020)。昆虫的解毒酶包括细胞色素 P450 酶系 (Cytochrome P450, CYP450)、谷胱甘肽-S-转移酶 (Glutathione transferases, GST) 和羧酸酯酶 (Carboxylesterase, CarE) 等。通过对斜纹夜蛾基因组测序、物理定位和转录组分析发现, 编码解毒酶相关的基因家族, 如细胞色素 P450、羧酸酯酶和谷胱甘肽-S-转移酶急剧扩张, 使其解毒许多化合物的能力显著增强 (Cheng *et al.*, 2017)。草地贪夜蛾田间种群的解毒酶活性

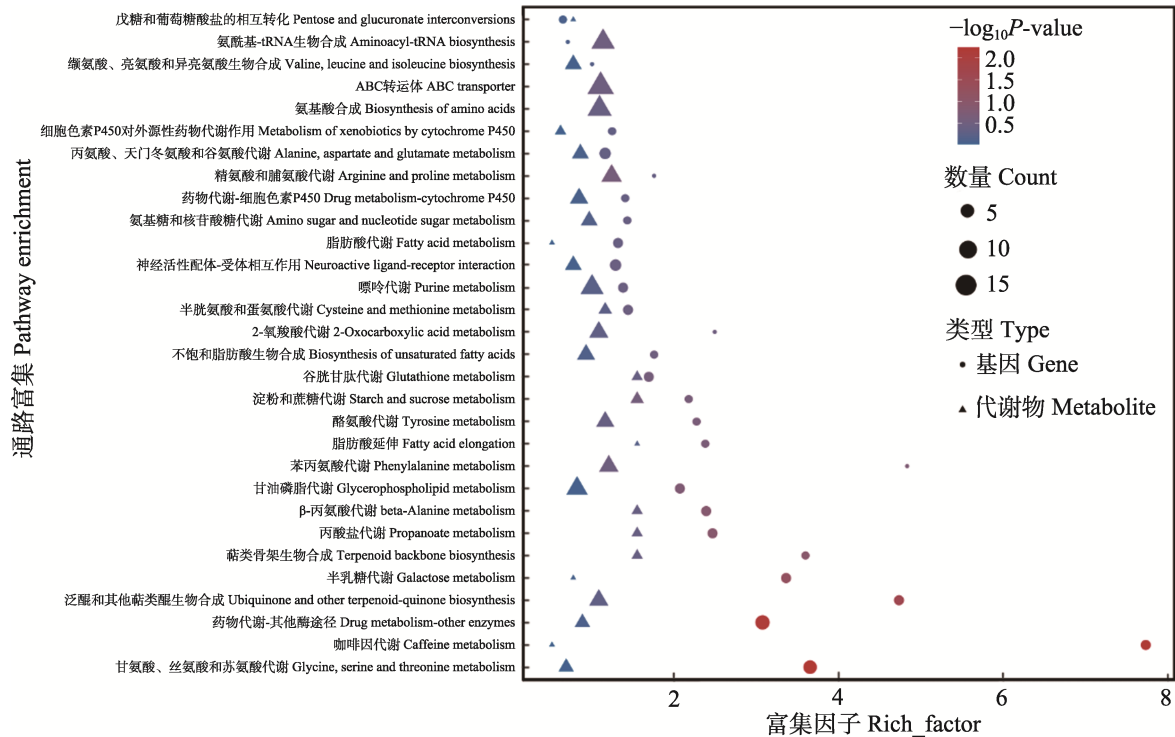


图 7 差异代谢物和差异表达基因的 KEGG 共有富集通路
Fig. 7 The KEGG pathways jointly enriched from DEGs and DMs

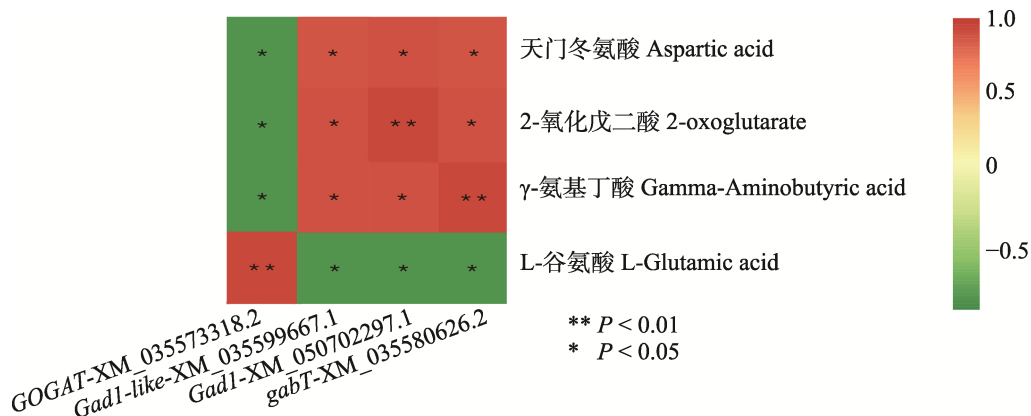


图 8 丙氨酸、天门冬氨酸和谷氨酸代谢途径差异代谢物与差异表达基因之间的相关性热图
Fig. 8 The correlation heatmap of the DMs and DEGs enriched in alanine, aspartate and glutamate metabolism pathway

显著升高, 据此推测草地贪夜蛾田间种群对杀虫剂的广谱抗性可能由多种机制共同引起, 包括微粒体多功能氧化酶系 (MFO)、谷胱甘肽-S-转移酶 (GSTs) 和酯酶 (AChE) 对杀虫剂解毒作用的增强 (Yu, 1992)。与其他鳞翅目相比, 草地贪夜蛾解毒相关的基因大量扩增 (Gouin *et al.*, 2017), 具有大量解毒代谢基因 (Chen *et al.*, 2022)。在本研究中, 草地贪夜蛾 SS 和 EB-HS

转录组中鉴定到部分解毒相关的差异表达基因发生了显著上调, 包括 *CYP6B6*、*CYP4D1*、*CYP4C1*、*GST1-like*、*GST1*、*UGT1-7-like*、*UGT5-like*、*CarE FE4*。

甲维盐是通过增强昆虫神经质如谷氨酸和γ-氨基丁酸 (GABA) 的作用, 从而使大量氯离子进入神经细胞, 使细胞功能丧失, 扰乱神经传导 (高庆远等, 2021)。本研究发现, 草地贪夜蛾

EB-HS 中大部分氨基酸代谢物含量显著增加,部分氨基酸及其衍生物含量显著减少,包括 L-亮氨酸和 L-谷氨酸。导致草地贪夜蛾 EB-HS 体内 L-谷氨酸含量下降可能是因为其体内 L-谷氨酸转化合成大量 GABA 造成的消耗,而 L-亮氨酸减少原因可能是参与了乙酰辅酶 A 的合成 (Christoffers *et al.*, 2002)。谷氨酸作为动物体内重要的氨基酸类神经递质之一,在昆虫的许多生理活动中发挥了重要作用,谷氨酸及其下游产物抑制性神经递质 GABA 与昆虫抗药性发展有密切联系 (Atif *et al.*, 2020)。GABA 作为神经递质抑制神经传递,造成突触后膜超极化,减少离子内流、降低细胞代谢及氧消耗等 (Nakao *et al.*, 2015)。张元等 (2016) 研究发现,通过荧光标记氟虫腈与家蝇 *Musca domestica* GABA 受体在体外进行结合的方法,发现家蝇脑内 GABA 受体和氟虫腈具有极高的亲和性,推测氟虫腈对昆虫 GABA 受体的强亲和性是导致氟虫腈对昆虫产生高毒性的重要原因。Zhu 等 (2010) 研究发现 GABA 含量的升高可能是朱砂叶螨 *Tetranychus cinnabarinus* 对阿维菌素产生抗药性的一种新机制。谷氨酸脱羧酶 (GAD) 是催化谷氨酸脱羧生成 GABA 的唯一酶。昆虫通过自身改变 GAD 活力而影响 GABA 含量,从而调节其正常的生理活动。有研究利用阿维菌素处理桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis*, 发现其体内 BdGAD1 表达水平上升,引起 GAD 活力增加促使虫体合成产生大量的 GABA,推测谷氨酸脱羧酶增加和 GABA 含量升高是桔小实蝇对阿维菌素产生抗性的重要原因 (魏冬等, 2014)。本研究通过对转录组与代谢组关联分析发现谷氨酸代谢通路中富集到 4 个基因编码 3 种关键酶,包括谷氨酸合成酶、4-氨基丁酸转氨酶和谷氨酸脱羧酶。该途径富集到 4 种代谢产物,其中天门冬氨酸、2-氧化戊二酸和 γ -氨基丁酸含量在 EB-HS 中显著增加, L-谷氨酸含量显著降低。该代谢途径中谷氨酸合成酶能将 2-氧化戊二酸转化为 L-谷氨酸,而谷氨酸脱羧酶可以将得到的 L-谷氨酸转化为 γ -氨基丁酸。通过测定草地贪夜蛾 SS 和 EB-HS 谷氨酸脱羧酶活性和 γ -氨基丁酸含量,发现

EB-HS 谷氨酸脱羧酶活性和 γ -氨基丁酸含量均显著高于 SS, 这与代谢组变化情况吻合。

本研究发现了草地贪夜蛾敏感度下降品系的 11 个代谢相关基因较敏感品系升高, 转录水平升高 2.0 倍以上, 其中包含 2 个编码谷氨酸脱羧酶的关键基因。代谢组与转录组联合分析发现, 4 种差异代谢物 (γ -氨基丁酸、L-谷氨酸、天门冬氨酸和 2-氧化戊二酸) 和 3 种关键酶 (谷氨酸合成酶、4-氨基丁酸转氨酶和谷氨酸脱羧酶) 参与到了丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢通路。草地贪夜蛾 EB-HS 中谷氨酸代谢通可能通过提高谷氨酸脱羧酶活力, 催化 L-谷氨酸合成更多抑制性神经递质 γ -氨基丁酸, 阻止信号传导, 起到保护作用。推测该代谢通路是草地贪夜蛾 EB-HS 对甲维盐敏感性降低重要代谢通路。

参考文献 (References)

- Ahmad M, Farid A, Saeed M, 2018. Resistance to new insecticides and their synergism in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) from Pakistan. *Crop Protection*, 107: 79–86.
- Atif M, Lynch JW, Keramidas A, 2020. The effects of insecticides on two splice variants of the glutamate-gated chloride channel receptor of the major malaria vector, *Anopheles gambiae*. *British Journal of Pharmacology*, 177(1): 175–187.
- Biradar R, Naik N, Kandpal K, Bheemanna M, Naik N, 2020. Emamectin benzoate resistance in diamondback moth in different locations of Karnataka. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 8(1): 712–714.
- Boaventura D, Bolzan A, Padovez FEO, Okum DM, Omoto C, Nauen R, 2020. Detection of a ryanodine receptor target-site mutation in diamide insecticide resistant fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Pest Management Science*, 76(1): 47–54.
- Bolzan A, Padovez FE, Nascimento AR, Kaiser IS, Lira EC, Amaral FS, Kanno RH, Malaquias JB, Omoto C, 2019. Selection and characterization of the inheritance of resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to chlorantraniliprole and cross-resistance to other diamide insecticides. *Pest Management Science*, 75(10): 2682–2689.
- Brinzer RA, 2015. *Drosophila*, metabolomics and insecticide action. Doctoral dissertation. Glasgow: University of Glasgow.
- Carvalho RA, Omoto C, Field LM, Williamson MS, Bass C, 2013. Investigating the molecular mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. *PLoS ONE*, 8(4): e62268.
- Che W, Huang J, Guan F, Wu Y, Yang Y, 2015. Cross-resistance

- and inheritance of resistance to emamectin benzoate in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 108(4): 2015–2020.
- Chen H, Xie M, Lin L, Zhong YZ, Zhang F, Su WH, 2022. Transcriptome analysis of detoxification-related genes in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Insect Science*, 22(1): 11.
- Cheng T, Wu J, Wu Y, Chilukuri RV, Huang L, Yamamoto K, Feng L, Li W, Chen Z, Guo H, Liu J, Li S, Wang X, Peng L, Liu D, Guo Y, Fu B, Li Z, Liu C, Chen Y, Tomar A, Hilliou F, Montagné N, Jacquin-Joly E, d'Alenon E, Seth RK, Bhatnagar RK, Jouraku A, Shiotsuki T, Kadono-Okuda K, Promboon A, Smagghe G, Arunkumar KP, Kishino H, Goldsmith MR, Feng Q, Xia Q, Mita K, 2017. Genomic adaptation to polyphagy and insecticides in a major East Asian noctuid pest. *Nature Ecology and Evolution*, 1(11): 1747–1756.
- Christoffers MJ, Berg ML, Messersmith CG, 2002. An isoleucine to leucine mutation in acetyl-CoA carboxylase confers herbicide resistance in wild oat. *Genome*, 45(6): 1049–1056.
- Cui YL, Yu XP, Li DT, 2022. Current progress and prospects for future research on the rice pest metabolomes. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 59(5): 950–959. [崔艺琳, 俞晓平, 李丹婷. 2022. 水稻害虫代谢组学研究概况与展望. 应用昆虫学报, 59(5): 950–959.]
- do Nascimento ARB, Fresia P, Cônsoli FL, Omoto C, 2015. Comparative transcriptome analysis of lufenuron-resistant and susceptible strains of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *BMC Genomics*, 16(1): 985.
- do Nascimento ARB, Rodrigues JG, Kanno RH, de Amaral FSAE, Malaquias JB, Silva-Brandão KL, Cônsoli FL, Omoto C, 2023. Susceptibility monitoring and comparative gene expression of susceptible and resistant strains of *Spodoptera frugiperda* to lambda-cyhalothrin and chlorpyrifos. *Pest Management Science*, 79(6): 2206–2219.
- Feldmann F, Rieckmann U, Winter S, 2019. The spread of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* in Africa: What should be done next?. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 126(5): 97–101.
- Gao QY, Yang SY, Zhang BB, 2021. Toxicities and field control efficacy of the mixtures of emamectin benzoate and tetrachlorantraniliprole to *Spodoptera frugiperda*. *Agrochemicals*, 60(4): 306–309. [高庆远, 杨石有, 张贝贝, 2021. 甲维盐与四氯虫酰胺复配对草地贪夜蛾的室内生物活性及田间防效. 农药, 60(4): 306–309.]
- Gao Z, Batool R, Xie W, Huang X, Wang Z, 2022. Transcriptome and metabolome analysis reveals the importance of amino-acid metabolism in *Spodoptera frugiperda* exposed to spinetoram. *Insects*, 13(9): 852.
- Goergen G, Kumar PL, Sankung SB, Togola A, Tamò M, Luthe DS, 2016. First report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a new alien invasive pest in west and central Africa. *PLoS ONE*, 11(10): e0165632.
- Gouin A, Bretaudeau A, Nam K, Gimenez S, Aury JM, Duvic B, Hilliou F, Durand N, Montagne N, Darboux I, 2017. Two genomes of highly polyphagous Lepidopteran pests (*Spodoptera frugiperda*, Noctuidae) with different host-plant ranges. *Scientific Report*, 7(1): 11816.
- Gui FR, Lan TM, Zhao Y, Guo W, Dong Y, Fang DM, Liu H, Li HM, Wang HL, Hao RS, 2020. Genomic and transcriptomic analysis unveils population evolution and development of pesticide resistance in fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. *Protein Cell*, 13(7): 513–531.
- Gutiérrez-Moreno R, Mota-Sanchez D, Blanco CA, Whalon ME, Terán-Santofimio H, Rodríguez-Maciél JC, DiFonzo C, 2019. Field-evolved resistance of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) to synthetic insecticides in Puerto Rico and Mexico. *Journal of Economic Entomology*, 112(2): 792–802.
- Herrera-Mayorga EV, Bello-Ruiz DG, Paredes-Sánchez FA, Segovia-Tagle V, García-Aguirre KK, Lara-Ramírez EE, Rivera G, 2018. Identification of SNP's in the ace-1 gene of *Spodoptera frugiperda* associated with resistance to organophosphorus insecticide. *Southwestern Entomologist*, 43(4): 855–865.
- Hu HY, Ren XL, Ma XY, Ma YJ, Song XP, Wang D, Li HH, Ma Y, 2021. Resistance monitoring of cotton bollworm *Helicoverpa armigera* to three insecticides in northern China. *Journal of Plant Protection*, 48(4): 900–906. [胡红岩, 任相亮, 马小艳, 马亚杰, 宋贤鹏, 王丹, 李欢欢, 马艳. 华北棉区棉铃虫对三种杀虫剂的抗性监测. 植物保护学报, 48(4): 900–906.]
- Ishtiaq M, Razaq M, Saleem MA, Anjum F, Ane MN, Raza AM, Wright DJ, 2014. Stability, cross-resistance and fitness costs of resistance to emamectin benzoate in a re-selected field population of the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Crop Protection*, 65: 227–231.
- Jiang XC, Shen YD, Sun JC, Li XX, Huang Y, Dong YC, Cao HQ, 2019. Effect of chlorantraniliprole and emamectin benzoate on toxicity and detoxification enzymes activity in *Spodoptera frugiperda* larva. *Journal of Environmental Entomology*, 41(5): 782–788. [蒋兴川, 沈怿丹, 孙劲超, 李秀霞, 黄勇, 董永成, 操海群, 2019. 氯虫苯甲酰胺和甲维盐对草地贪夜蛾幼虫的毒力及解毒酶活性的影响. 环境昆虫学报, 41(5): 782–788.]
- Li CY, Zhang YP, Huang SH, Liu WL, Su XN, Pan ZP, 2019. A study on artificial rearing technique of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) in the laboratory. *Journal of Environmental Entomology*, 41(5): 986–991. [李传瑛, 章玉苹, 黄少华, 刘伟玲, 苏湘宁, 潘志萍, 2019. 草地贪夜蛾室内人工饲养技术的研究. 环境昆虫学报, 41(5): 986–991.]

- Lira EC, Bolzan A, Nascimento AR, Amaral FS, Kanno RH, Kaiser IS, Omoto C, 2020. Resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to spinetoram: Inheritance and cross-resistance to spinosad. *Pest Management Science*, 76(8): 2674–2680.
- Madkour DA, Ahmed MM, Orabi SH, Sayed SM, Korany RMS, Khalifa HK, 2021. Nigella sativa oil protects against emamectin benzoate-Induced neurotoxicity in rats. *Environmental Toxicology*, 374(1767): 1–15.
- Montezano DG, Specht A, Sosa-Gómez DR, Roque-Specht VF, Hunt T, 2018. Host plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. *African Entomology*, 26(2): 286–301.
- Muraro DS, Salmeron E, Cruz JVS, Amaral FSA, Guidolin AS, Nascimento ARB, Malaquias JB, Bernardi O, Omoto C, 2022. Evidence of field-evolved resistance in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to emamectin benzoate in Brazil. *Crop Protection*, 162: 106071.
- Nakao T, Banba S, Hirase K, 2015. Comparison between the modes of action of novel meta-diamide and macrocyclic lactone insecticides on the RDL GABA receptor. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 120: 101–108.
- Nascimento AR, Farias JR, Bernardi D, Horikoshi RJ, Omoto C, 2016. Genetic basis of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to the chitin synthesis inhibitor lufenuron. *Pest Management Science*, 72(4): 810–815.
- Rinschen MM, Ivanisevic J, Giera M, Siuzdak G, 2019. Identification of bioactive metabolites using activity metabolomics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20: 353–367.
- Sharanabasappa D, Kalleshwaraswamy CM, Asokan R, Mahadeva Swamy HM, Goergen G, 2018. First report of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), an alien invasive pest on maize in India. *Pest Management in Horticultural Ecosystems*, 24(1): 23–29.
- Sparks A, 1979. A review of the Biology of the fall armyworm. *Florida Entomologist*, 62(2): 82–87.
- Su XN, Li CY, Huang SH, Liao ZX, Liu WL, Zhang YP, 2023. Metabolome analysis of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) larvae under chlorantraniliprole stress. *Journal of Southern Agriculture*, 54(1): 1–12. [苏湘宁, 李传瑛, 黄少华, 廖章轩, 刘伟玲, 章玉苹, 2023. 氯虫苯甲酰胺胁迫下草地贪夜蛾代谢组分析. 南方农业学报, 54(1): 1–12.]
- Su XN, Liao ZX, Li CY, Huang SH, Li FB, Li WL, Zhang YP, 2020. Research on two commonly used pesticides resistance of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* of Guangdong and the effects of auxiliaries or synergist on toxicity to pesticides. *Journal of Southern Agriculture*, 51(6): 1274–1281. [苏湘宁, 廖章轩, 李传瑛, 黄少华, 李峰博, 刘伟玲, 章玉苹, 2020. 广东草地贪夜蛾对 2 种常用农药的抗药性及助剂和增效剂对农药毒力的影响. 南方农业学报, 51(6): 1274–1281.]
- Su J, Sun XX, 2014. High level of metaflumizone resistance and multiple insecticide resistance in field populations of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) in Guangdong province, China. *Crop Protection*, 61: 58–63.
- Wang DJ, Ren MQ, Jiang JH, Bi SJ, Wu SY, 2020. Research progress on green control technology for management of *Spodoptera frugiperda*. *Plant Protection*, 46(1): 1–9. [王登杰, 任茂琼, 姜继红, 毕司进, 吴圣勇, 2020. 草地贪夜蛾绿色防控技术研究进展. 植物保护, 46(1): 1–9.]
- Wang L, Chen KW, Zhong GH, Xian JD, He XF, Lu YY, 2019. Progress for occurrence and management and the strategy of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Smith). *Journal of Environmental Entomology*, 41(3): 479–487. [王磊, 陈科伟, 钟国华, 冼继东, 何晓芳, 陆永跃, 2019. 重大入侵害虫草地贪夜蛾发生危害、防控研究进展及防控策略探讨. 环境昆虫学报, 41(3): 479–487.]
- Wei D, Wang T, Dou W, 2014. Biochemical and molecular characteristics of glutamic decarboxylase from *Bactrocera dorsalis*. *Scientia Agricultura Sinica*, 47(16): 3184–3194. [魏冬, 王涛, 豆威, 王进军, 2014. 橘小实蝇谷氨酸脱羧酶的生化及分子特性. 中国农业科学, 47(16): 3184–3194.]
- Wu C, Zhang L, Liao CY, Wu KM, Xiao YT, 2019. Research progress of resistance mechanism and management techniques of fall armyworm *Spodoptera frugiperda* to insecticides and Bt crops. *Journal of Plant Protection*, 46(3): 503–513. [吴超, 张磊, 廖重宇, 吴孔明, 萧玉涛, 2019. 草地贪夜蛾对化学农药和 Bt 作物的抗性机制及其治理技术研究进展. 植物保护学报, 46(3): 503–513.]
- Yu SJ, 1992. Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 85(3): 675–682.
- Yu SJ, Mccord JRE, 2007. Lack of cross-resistance to indoxacarb in insecticide-resistant *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Pest Management Science*, 63(1): 63–67.
- Zhang Y, Zhang B, Ren TR, 2016. Interactions between the fipronil and the insect γ -aminobutyric acid receptor. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 18(1): 49–56. [张元, 张博, 任天瑞, 2016. 氟虫腈与昆虫 γ -氨基丁酸受体相互作用研究. 农药学报, 18(1): 49–56.]
- Zhu XJ, Lu WC, Feng YN, He L, 2010. High γ -aminobutyric acid content, a novel component associated with resistance to abamectin in *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval). *Journal of Insect Physiology*, 56(12): 1895–1900.