

熊蜂蜂王肠道代谢物与产卵的相关性研究*

刘福罡** 郭雨龙 张正义 李继莲***

(国家资源昆虫重点实验室, 中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100093)

摘要 【目的】肠道微生物通过直接或者间接影响宿主的健康, 有研究表明肠道微生物能够提高产卵量, 但是如何影响产卵具体还不清楚, 本研究通过肠道微生物代谢物角度去解释这个问题。【方法】采用非靶标代谢组学的方法对两种蜂王进行比较, 选择欧洲地熊蜂 *Bombus terrestris* 产卵蜂王 6 只、28 d 未产卵蜂王 6 只, 兰州熊蜂 *B. lantschouensis* 产卵蜂王 6 只, 28 d 未产卵蜂王 6 只, 对其肠道内容物进行代谢组学分析。【结果】产卵欧洲地熊蜂 (DQA1) 与产卵兰州熊蜂蜂王 (LQA1) 在脂代谢通路上显著富集; 产卵欧洲地熊蜂 (DQA1) 与 28 d 未产卵的欧洲地熊蜂 (LQW) 在半胱氨酸与蛋氨酸代谢通路上显著富集; 产卵兰州熊蜂 (LQA1) 与 28 d 未产卵的兰州熊蜂蜂王 (LQW) 在鞘脂代谢通路上显著富集; 28 d 未产卵的欧洲地熊蜂 (DQW) 和未产卵的兰州熊蜂蜂王 (LQW) 没有显著富集的代谢通路。【结论】在两种产卵蜂王之间, 在脂代谢通路上有显著差异。在两种未产卵的蜂王中, 欧洲地熊蜂蜂王缺少半胱氨酸与蛋氨酸代谢通路中的半胱氨酸和蛋氨酸两种代谢物质, 在未产卵兰州熊蜂蜂王中缺少脂代谢通路中的乙醇胺磷酸酯。

关键词 欧洲地熊蜂; 兰州熊蜂; 产卵; 蜂王; 代谢组学; 差异代谢物

The relationship between intestinal metabolites and oviposition in bumblebee queens

LIU Fu-Gang** GUO Yu-Long ZHANG Zheng-Yi LI Ji-Lian***

(State Key Laboratory of Resource Insects, Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100093, China)

Abstract [Aim] Gut microbes can directly and indirectly affect host health. Several studies have shown that gut microbes can improve egg production, but the mechanisms involved remains unclear. This study aims to determine how gut microbial metabolites influence oviposition in bumblebees. [Methods] Non-target metabolomics analysis was used to compare the relationship between intestinal metabolites and oviposition in *Bombus terrestris* and *B. lantschouensis* queen bees. Six laying queens and six females that were non-ovipositing for 28 d were selected from each species and metabolomics analysis was performed on their intestinal contents. [Results] Enrichment analysis indicated significant enrichment in the lipid metabolism pathways in queens from both the *Bombus terrestris* (DQA1) and *B. lantschouensis* (LQA1) ovipositing groups. The cysteine and methionine metabolic pathways were significantly enriched in the *Bombus terrestris* ovipositing (DQA1) and 28 d non-ovipositing (DQW) groups. Whereas, for *B. lantschouensis*, the sphingolipid metabolism pathway was significantly enriched in both the LQA1 and 28 d non-ovipositing (LQW) group. There were no significantly enriched metabolic pathways in the 28 d non-ovipositing *B. terrestris* (DQW) or *B. lantschouensis* (LQW) groups. [Conclusion] There was a significant difference in lipid metabolism pathways between *B. terrestris* and *B. lantschouensis* queen bees. Non-ovipositing *B. terrestris* lacked the L-Cysteine and L-Methionine metabolites in the Cysteine and methionine metabolism pathways. The O-Phosphoethanolamine metabolites in the Cysteine and methionine metabolism pathways were absent in non-ovipositing queen bumblebees.

Key words *Bombus terrestris*; *Bombus lantschouensis*; oviposition; queen; metabolomics; differential metabolites

*资助项目 Supported projects: 中国农业科学院创新工程 (CAAS-ASTIP-2016-IAR); 国家自然科学基金原创探索计划重点项目 (32350008)

**第一作者 First author, E-mail: lfg125998@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: bumblebeeljl@hotmail.com

收稿日期 Received: 2024-01-21; 接受日期 Accepted: 2024-02-23

肠道微生物对于维持人体的正常机制至关重要,它们不仅可以帮助培养机体的免疫力,促进营养的摄取,还可以控制机体的内分泌系统,激活神经系统的反应,促进药物的吸收与利用,清除体外的污染,并且可以形成多种对机体的影响(Lynch and Pedersen, 2016)。微生物群不只是自身对宿主产生作用,也可以通过产生或者转化一系列代谢物和分子来影响宿主代谢健康,这些分子可作用于多种宿主细胞受体,来调控宿主信号通路,影响肠腔环境、肠屏障和肠道激素分泌等生理功能(de Vos *et al.*, 2022)。微生物群的作用对于生殖内分泌系统来说至关重要,它们不仅能够与雌激素、雄激素、胰岛素等激素形成有效的互动,还能够调节细胞的功能(Qi *et al.*, 2021)。但是肠道微生物群的变化也会对宿主产生危害。当肠道菌群失衡时,会导致肠黏膜屏障受损、免疫系统紊乱、代谢紊乱,并且会影响脑-肠轴的功能,从而促进肠易激综合征(IBS)的发生和发展(Grabauskas *et al.*, 2022)。肠道微生物群参与维护宿主健康的各个方面,在其中扮演着重要角色。

熊蜂是一种群居昆虫,每年有一个群体周期,蜂王在交配、滞育到产卵和群体生产的过程中经历了许多生理和发育变化(Amsalem *et al.*, 2015)。大量研究证明,昆虫肠道中的共生菌可参与宿主的能量与代谢的平衡,为宿主昆虫的生长发育和繁殖提供所需要的营养成分,弥补昆虫自身代谢的缺陷(高欢欢等, 2020)。肠道菌群是人体健康的重要组成部分,它们不仅能够通过自我调节来改善人体的免疫力,还能够通过控制绿脓杆菌、斯氏普罗威登斯、*Providencia stuartii*、*Providencia vermicola* 等有毒菌的繁衍,从而增强人体的免疫力,从而保障人体免受疾病的侵害。科学研究表明,肠道菌群能够透过改变色氨酸的新陈代谢水平,以及特异性乳酸杆菌菌群能够利用吲哚衍生物的作用,刺激宿主的芳烃受体,以此来改变其记忆行为(Zhang *et al.*, 2022)。伯克霍尔德菌 *Burkholderia cepacia* 可以有效地促进半翅目宿主点蜂缘蝽 *Riptortus pedestris* Fabricius 的保幼激素Ⅲ双环氧化合物(Juvenile

hormone III skipped bisepoxide, JHSB3)的含量, hexamerin- α 和卵黄原蛋白都在 JHSB3 处理后的无共生菌的雌性点蜂缘蝽的血淋巴中大量增加(Lee *et al.*, 2019), 保幼激素是调控昆虫生理和生殖的重要激素,已经证明能够调控 2 种紧密关联的宿主的储存蛋白 hexamerin (Miura *et al.*, 1998) 和卵黄原蛋白(Riddiford, 2008, 2012), 从而激活其卵黄原蛋白和 hexamerin- α 的合成,显著提高其产卵量(Lee *et al.*, 2019)。hexamerin- α 由脂肪体合成,脂肪体产生的氮和氨基酸正是昆虫生长发育所需要的(Telfer and Kunkel, 1991)。

然而肠道微生物的代谢物在促进蜂王产卵中扮演着什么角色,产卵蜂王与 28 d 未产卵的蜂王之间在肠道代谢物是否存在差异,两种产卵蜂王之间在肠道微生物的代谢物是否存在差异。因此,本研究通过比较欧洲地熊蜂和本土的兰州熊蜂 *B. lantschouensis* 两种不同蜂王在产卵和 28 d 未产卵的两种状态下肠道代谢物的差异代谢物质,对于揭示昆虫生殖生态学调控机制、生理调节机制以及代谢网络运作规律具有重要意义,有助于推动昆虫生理生态学和代谢组学领域的研究进展,为昆虫保护和生态环境管理提供新的视角和理论支持。

1 材料与方法

1.1 实验样品

从中国农业科学院蜜蜂研究所取刚出房欧洲地熊蜂蜂王和兰州熊蜂蜂王,在饲养盒中饲养 7-8 d,然后放在 1 m×1 m×1 m 的交配笼内进行交配,将交配成功的蜂王,放到饲养盒中饲养 7-8 d,放到 4 °C 的冰箱内进行滞育,两个半月后,将滞育后的蜂王饲养在方形塑料盒中,单独饲养,将温度设置为(27±1)°C,相对湿度为 50%-60%,将糖水按照(1:1)的比例混合,杏树花粉提供给蜂王,每天观察记录产卵情况,将产卵的蜂王取样,每一种蜂王各取 6 只,将 28 d 未产卵的蜂王视为长时间未产卵的蜂王,各取 6 只。将样品储存在 - 80 °C 的冰箱内冷冻保存,

送样分析。

1.2 代谢物提取

称取 25 mg 样品, 加 500 μ L 提取液(甲醇: 乙腈: 水=2: 2: 1 (V/V) 含同位素标记内标混合物); 然后, 用 35 Hz 的频率对其进行 4 min 的研磨, 再用 5 min 的时间(冰水浴)的超声波处理, 并反复实施 2 到 3 次, 最后在 -40 $^{\circ}$ C 的环境下静止 1 h; 接着, 在 4 $^{\circ}$ C 的温度下, 以 12 000 r/min 的速度($\times g$)。(离心力 13 800($\times g$), 半径 8.6 cm) 离心 15 min; 取上清于进样瓶中上机检测; 所有样品另取等量上清混合成 QC 样品上机检测。

1.3 上机检测

本实验采用 VAnQuish (Thermo Fisher Scientific) 超高效液相色谱仪, 利用 Waters ACQUITY UPLC BEH Amide (2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7 μ m) 溶液色谱柱对目标物质开展色谱分割。溶液色谱 A 相为水相, 含 25 mmol/L 醋酸铵和 25 mmol/L 氨水, B 相为乙腈。试样盘温度: 4 $^{\circ}$ C, 进样容积: 3 μ L。Thermo Q Exactive HFX 质谱仪可以在质量控制系统软件(Xcalibur, Thermo) 监控下开展第 1、第 2 次质谱数据采集。详细参数如下: 气体流速: 30 Arb, 辅助气体流速: 25 Arb, 毛细管温度: 350 $^{\circ}$ C, 全 MS 分辨率: 60 000, MS/MS 分辨率: 7 500, 碰撞能量: 在 NCE 模式下为 10/30/60, 喷雾电压: 3.6 kV (正极) 或 -3.2 kV (负极)

1.4 数据处理

采用 PRoteoWizard 软件将原始数据转化至 mzXML 格式, 并采用开发的 r 程序包(内核 XCMS) 实行峰检测、峰提取、峰对齐以及积分的处理, 最终将结果输入 BiotreeDB (V2.1) 的二级质谱数据库中, 以便实现高精度的物质注释。

2 结果与分析

2.1 主成分分析

通过主成分分析 (Principal component

analysis, PCA), 我们可以清楚地观察到 4 组样本的排名情况, 如图 1 所示, 横轴表示第一组样本的得分[1], 纵轴表示第二组样本的得分[2], 而每个散点则代表一个样本, 其颜色和形状则反映出不同的分组。经过正交变换和 SIMCA 软件 (V16.0.2, Sartorius Stedim Data Analytics AB, Umea, Sweden) 的处理, 样本的置信区间达到 95% 以上, 而且这些变量之间没有相关性, 因此, 我们可以将数据转换成线性不相关变量, 并将其中心化, 以便更好地分析和研究。将使用自动建模技术来分析 (Wiklund *et al.*, 2008)。结果显示, 产卵的地熊蜂蜂王 (DQA1)、28 d 未产卵的地熊蜂蜂王 (DQW)、产卵的兰州熊蜂蜂王 (LDQ1) 和 28 d 未产卵的兰州熊蜂蜂王 (LDW) 每两组之间存在显著差异。

2.2 差异代谢物的筛选

我们对每两组之间的代谢物质进行分析, 通过观察图 2 (A-D), 可以清楚地看到两组之间的代谢物质, 其中, 每个点都是一个独立存在于此组内部, 而纵轴上则是两组相互比较时, 其倍增率(取值为 2), 而纵轴上表示以 10 为底 Student's *t*-test 的 *P*-value 的对数, 而这些散点的多少, 则反映了 OPLS-DA 模型的 VIP 值, 即随着散点值的增加, VIP 值也会增加。经过分析, 在 DQA1 组对 LQA1 组中我们筛选出 2 491 种差异代谢物, 其中 694 中代谢物显著下调, 1 797 中代谢物显著上调。DQW 组对 LQW 组中筛选出 1 622 种差异代谢物, 其中 823 种代谢物显著下调, 790 种代谢物显著上调。LQA1 组对 LQW 组中筛选出 1 426 种差异代谢物, 其中 308 中代谢物显著下调, 1 117 种代谢物显著上调。DQA1 组对 DQW 组中筛选出 1 791 中差异代谢物, 其中有 140 种代谢物显著下调, 1 650 种代谢物显著上调。

2.3 差异代谢物的层次聚类分析

经过 4 组不同的化合物的筛查, 我们采用了层次聚类的方法, 并利用欧氏距离矩阵 (Euclidean distance matrix) 来 ACK 它们之间的关系。通过实时的数据处理, 最终形成了一个有效的化合物群落。根据图表, 横轴表明了各个实

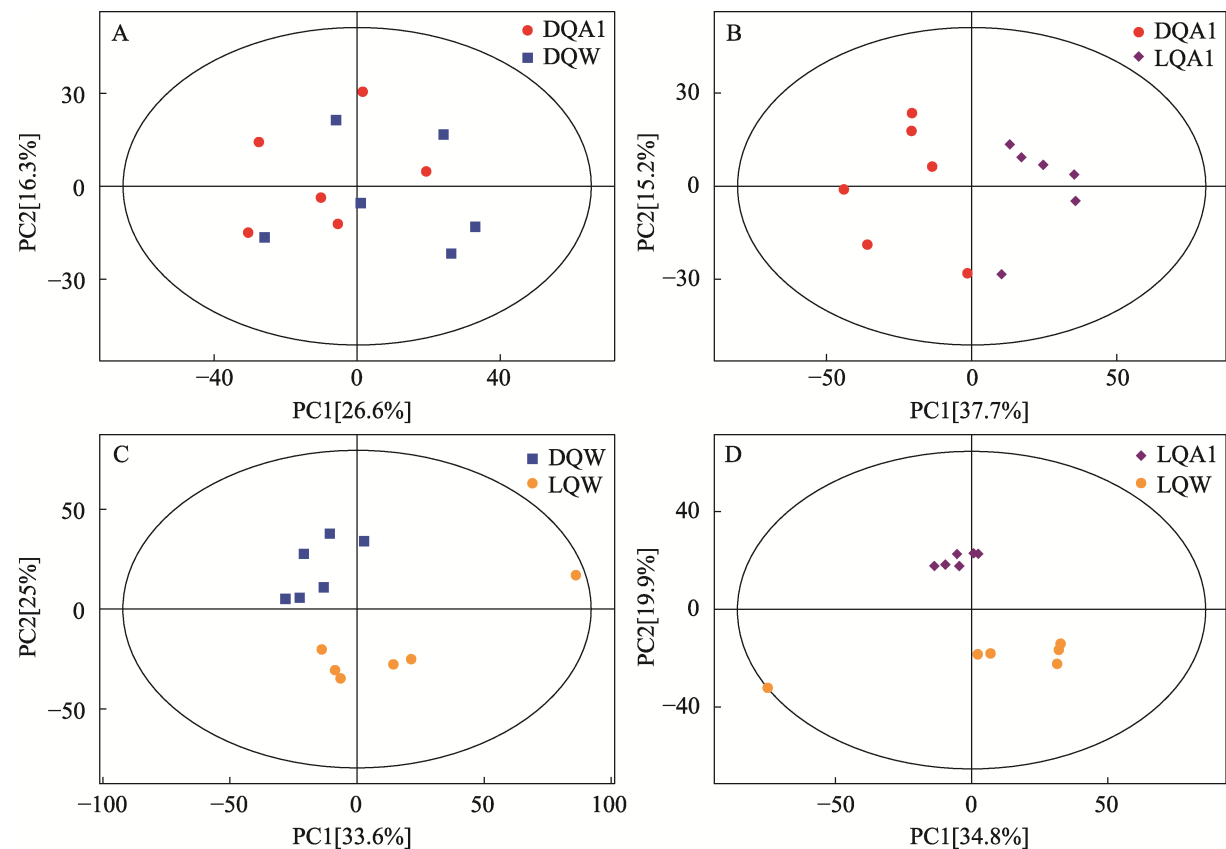


图 1 PCA 模型得分散点图
Fig. 1 Score scatter plot for PCA model

A. DQA1 组 vs DQW 组; B. DQA1 组 vs LQA1 组; C. DQW 组 vs LQW 组; D. LQA1 组 vs LQW 组。
A. DQA1 group vs DQW group; B. DQA1 group vs LQA1 group; C. DQW group vs LQW group;
D. LQA1 group vs LQW group

验对象的数量,而纵轴则表明了它们之间的相对表达量。其中,红色越深表示相对表达量越高,而蓝色越深表示相对表达量越低(图 3: A-D)。

2.4 差异代谢物的代谢通路分析

为了更好地研究不同的代谢途径,我们采用了扩展的方法来探索这些途径。这种方法使用了气泡图(图 4: A-D)来描述这些途径,其中每个气泡都是独立的。这些气泡的尺寸可以用来衡量它们在扩散分析中的作用。此外,这些气泡的颜色也可以用来反映它们的富集情况。当气泡的颜色变浅时,*P* 值就会变得更低,这意味着它们的富集更加明显。结果显示,在 LQA1 组对 LQW 组中共产生 282 个代谢产物,差异代谢物为 14 个,共富集到 12 个代谢通路,其中 Sphingolipid metabolism 富集程度显著,富集 18 个代谢物,

其中差异代谢物 3 个,为 Sphinganine、3-Dehydrosphinganine、O-Phosphoethanolamine。在 DQA1 组对 DQW 组中共产生 513 个代谢物,其差异代谢物为 41 个,富集到 23 个代谢通路,其中 Cysteine and methionine metabolism 代谢通路显著富集,共富集 25 个代谢物,其中差异代谢物为 4 个,为 5'-Methylthioadenosine、S-Adenosylmethionine、L-Methionine、L-Cysteine。在 DQW 组对 LQW 组中共产生 183 个代谢物,其差异代谢物为 7 个,富集到 6 个代谢通路,没有显著富集的代谢通路。DQA1 组对 LQA1 组中共产生 633 个代谢物,52 个差异代谢物,其差异代谢物富集到 28 个代谢通路,其 Glycerophospholipid metabolism 代谢通路显著富集,共富集 27 个代谢物,差异代谢物为 5 个,其差异代谢产物是 Phosphorylcholine、O-Phosphoethanolamine、CDP-

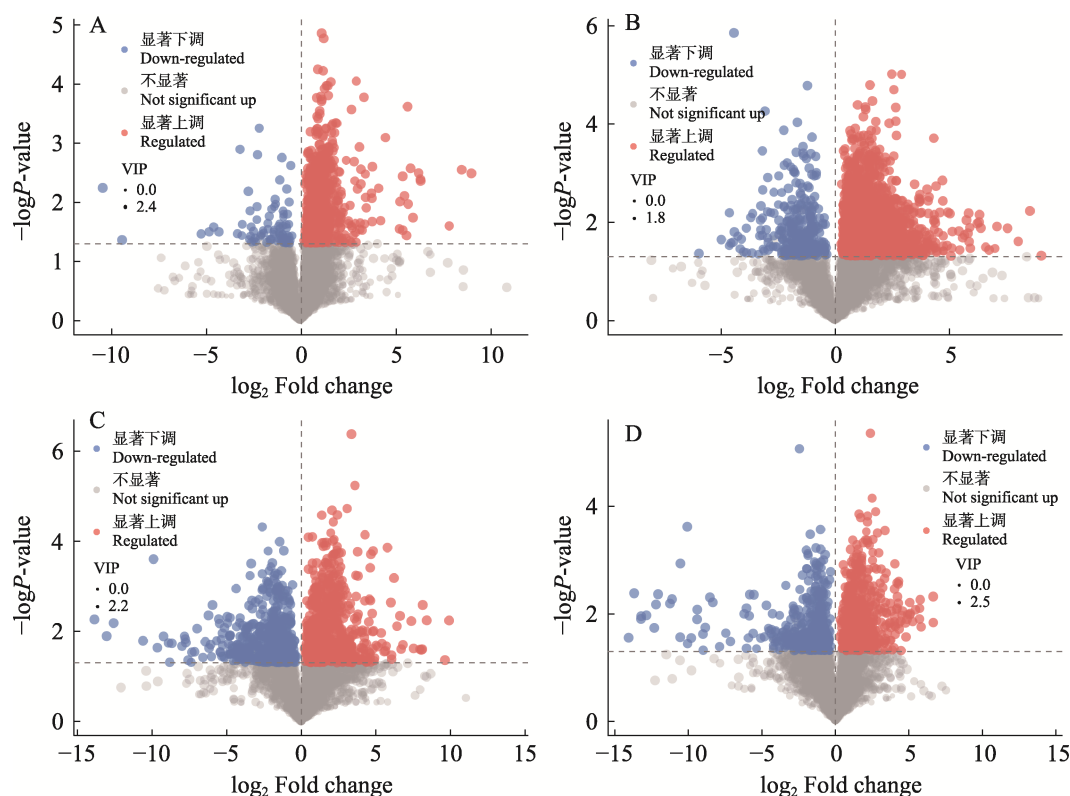


图2 差异代谢筛选火山图

Fig. 2 Differential metabolic screening volcano map

A. DQA1 组 vs DQW 组; B. DQA1 组 vs LQA1 组; C. DQW 组 vs LQW 组; D. LQA1 组 vs LQW 组。

A. DQA1 group vs DQW group; B. DQA1 group vs LQA1 group; C. DQW group vs LQW group;

D. LQA1 group vs LQW group.

Ethanolamine、Glycerolphosphorylethanolamine 和 Glycerophosphocholine。

其中在 LQA1 组对 LQW 组、LQA1 组对 DQA1 组中、DQW 组对 LQW 组 3 组中, 都存在 O-Phosphoethanolamine 这个差异代谢物, 在欧洲地熊蜂蜂王的差异代谢物中不存在这个代谢物, 这个代谢物可能与兰州熊蜂蜂王产卵密切相关, 在 DQA1 组对 DQW 组、LQA1 组对 DQA1 组、DQW 组对 LQW 组这 3 组中, L-Methionine 代谢物是差异代谢物, 在兰州熊蜂蜂王不存在 L-Methionine 这个差异代谢物, L-Cysteine 差异代谢物在 DQA1 组对 DQW 组和 LQW 组对 DQW 组中都是显著差异 ($P < 0.05$), 但 L-Cysteine 代谢物在 LQA1 组对 DQA1 中都存在, L-Cysteine 在两种蜂王产卵过程中都起着重要作用, 表明欧洲地熊蜂产卵与 L-Cysteine 和 L-Methionine 有关。

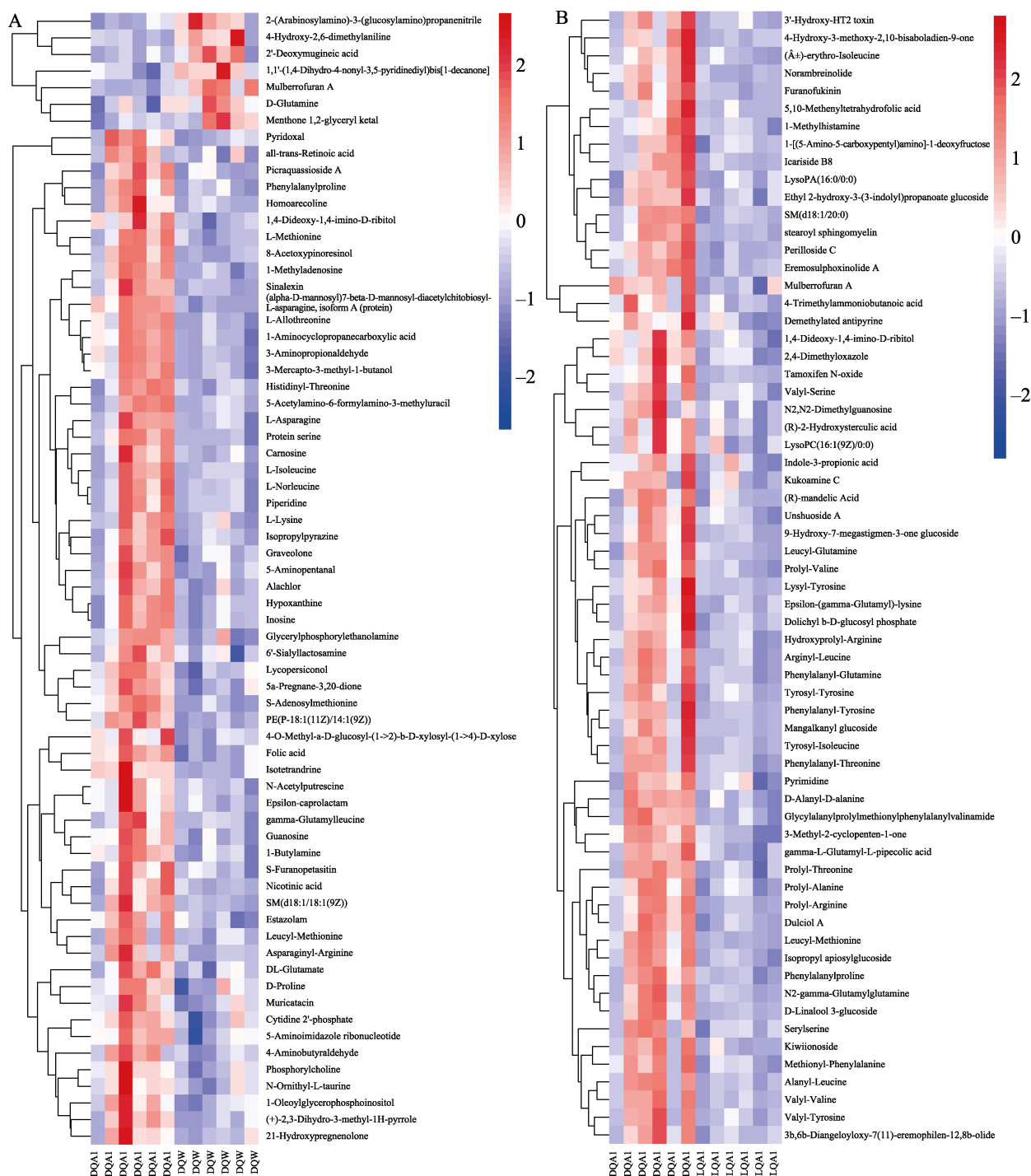
3 讨论

昆虫共生菌的产生次级代谢产物的重要来源, 是先行性化合物的重要来源并且具有丰富的生物活性 (徐晓等, 2018)。本研究通过比较两种蜂王在产卵和 28 d 未产卵的两种不同的生理状态, 比较其肠道微生物的代谢物质的差异。证明欧洲地熊蜂与兰州熊蜂在产卵和 28 d 未产卵的肠道代谢物质上存在显著差距。欧洲地熊蜂产卵和 28 d 未产卵的蜂王, 存在 33 个差异代谢通路。在昆虫生殖发育受营养状况的调节, 保幼激素介导卵子的发生以及卵黄蛋白的合成, 在这过程中包含新陈代谢途径 (HuangFu *et al.*, 2021)。褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 和蚊子的不自生研究表明, TOR 信号通路通过保幼激素调控氨基酸介导卵子发生和卵巢发育 (Hansen *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2016)。胰岛素样肽和 DNA/tRNA 甲

基转移酶参与了女性生殖的营养调节 (Lu *et al.*, 2018)。

早期褐飞虱若虫期获取氨基酸量减少的情况下, 若虫发育期缩短、短翅率明显增高, 氨基酸不足时导致褐飞虱生殖能力下降, 导致成虫卵巢发育不良, 产卵前期延长, 产卵量下降 (潘雪花, 2014)。当油橄榄果实蝇 *Bactrocera oleae* 的

消化系统受到损害时, 它们的蛋白质和必需氨基酸的摄入水平就会发生显著下降, 这将导致它们的生长发育受到严重影响, 从而大大削弱其生殖能力。给油橄榄实蝇提供富含恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* 的食物会使它们比仅饲喂蔗糖的油橄榄实蝇 *Bactrocera oleae* 产下更多卵 (Sacchetti *et al.*, 2014)。例如, 橄榄果蝇



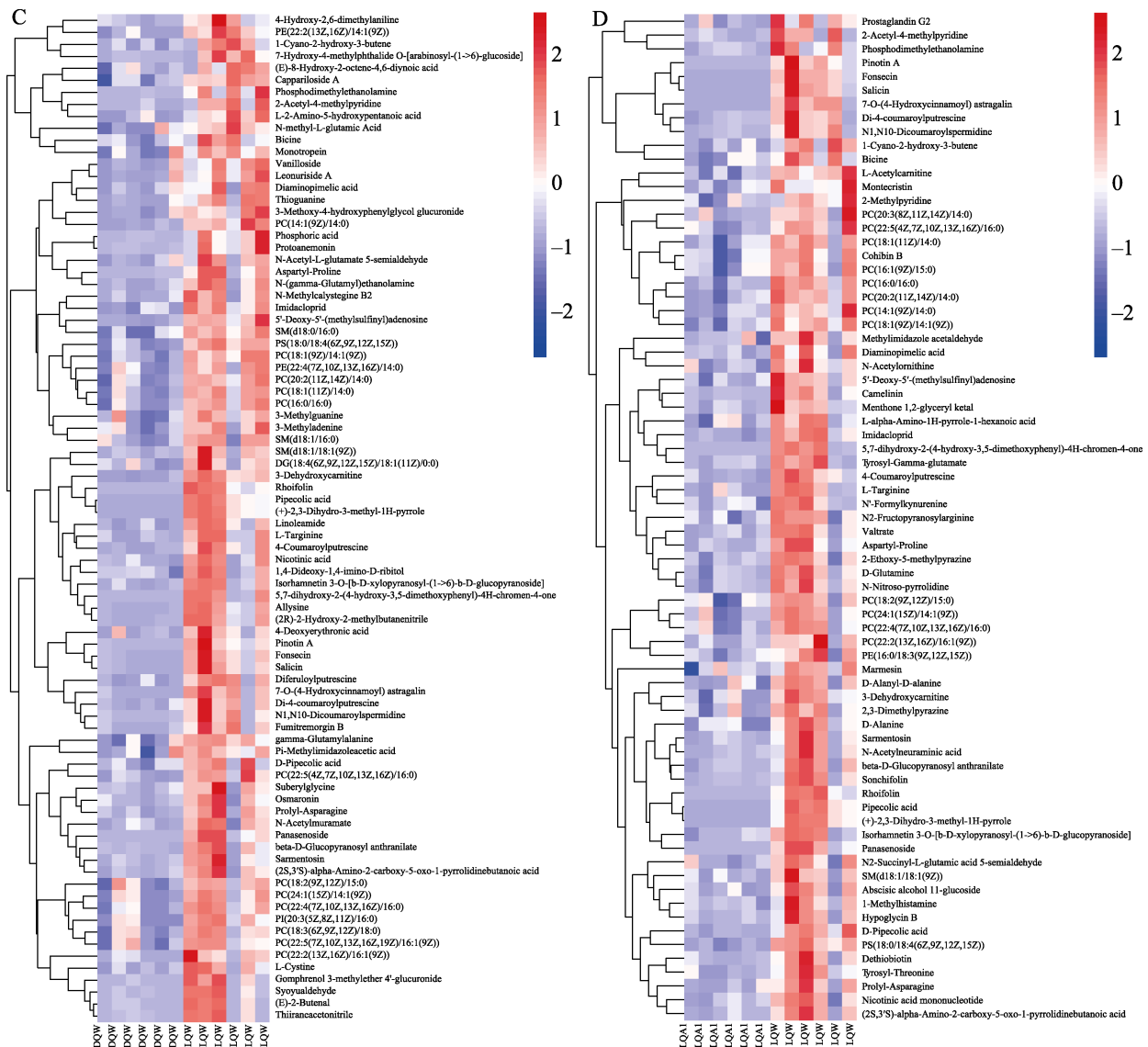


图 3 层次聚类分析热图

Fig. 3 Hierarchical clustering analysis heatmap

A. DQA1 组 vs DQW 组; B. DQA1 组 vs LQA1 组; C. DQW 组 vs LQW 组; D. LQA1 组 vs LQW 组。

A. DQA1 group vs DQW group; B. DQA1 group vs LQA1 group; C. DQW group vs LQW group; D. LQA1 group vs LQW group.

Bactrocera oleae 为了适应在发育过程中其蛋白质和游离氨基酸含量之间的不平衡,在消化系统增生了一种囊状结构,在食物中蛋白质含量较少时,可将储存的共生细菌释放至食道和中肠,通过相关代谢途径补充其发育繁殖所需要的游离氨基酸和蛋白质 (Ben-Yosef *et al.*, 2010)。宿主通过肠道微生物来弥补昆虫生长发育和繁殖过程中对氨基酸和蛋白质来维持宿主的生存需要,说明在昆虫繁殖过程中氨基酸在其过程中有着

重要作用。

在欧洲地熊蜂蜂王和兰州熊蜂蜂王之间,其产卵与 28 d 未产卵的蜂王之间的差异代谢物主要是在氨基酸代谢通路,以及鞘脂代谢途径上的不同。这些显著差异可能造成了一些重要的肠道代谢物的缺失,这些缺失的代谢物可能是蜂王产卵所需要的物质,这可能是导致蜂王 28 d 未产卵的因素。有研究表明,昆虫内分泌激素与营养信号之间的相互作用机制复杂,调控昆虫卵巢发

- bacteria *Citrobacter frei* and *Klebsiella acidogenes* on growth, development and metabolism of *Dromelanogila melanogila*. *Acta Entomologica Sinica*, 63(4): 462–469. [高欢欢, 覃冬云, 代晓彦, 刘洁, 于毅, 2020. 肠道细菌弗氏柠檬酸杆菌和产酸克雷伯氏菌对斑翅果蝇生长发育和物质代谢的影响. 昆虫学报, 63(4): 462–469.]
- Hansen IA, Attardo GM, Park JH, Peng Q, Raikhel AS, 2004. Target of rapamycin-mediated amino acid signaling in mosquito anautogeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(29): 10626–10631.
- HuangFu NB, Zhu XZ, Chang GF, Wang L, Li DY, Zhang KX, Gao XK, Ji JC, Luo JY, Cui JJ, 2021. Dynamic transcriptome analysis and methoprene-tolerant gene knockdown reveal that juvenile hormone regulates oogenesis and vitellogenin synthesis in *Propylea japonica*. *Genomics*, 113(4): 2877–2889.
- Lee J, Kim CH, Jang HA, Kim JK, Kotaki T, Shinoda T, Shinada T, Yoo JW, Lee BL, 2019. Burkholderia gut symbiont modulates titer of specific juvenile hormone in the bean bug *Riptortus pedestris*. *Developmental & Comparative Immunology*, 99: 103399.
- Li HW, Zhao CW, Yang Y, Zhou ZX, Qi JW, Li CR, 2021. The influence of gut microbiota on the fecundity of *Henosepilachna vigintioctopunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Journal of Insect Science*, 21(4): 15.
- Lu K, Chen X, Li WR, Li Y, Zhang ZC, Zhou Q, 2018. Insulin-like peptides and DNA/tRNA methyltransferases are involved in the nutritional regulation of female reproduction in *Nilaparvata lugens* (Stål). *Gene*, 639: 96–105.
- Lu K, Chen X, Liu WT, Zhang XY, Chen MX, Zhou Q, 2016. Nutritional signaling regulates vitellogenin synthesis and egg development through juvenile hormone in *Nilaparvata lugens* (Stal). *International Journal of Molecular Science*, 17(3): 269.
- Lynch SV, Pedersen O, 2016. The human intestinal microbiome in health and disease. *The New England Journal of Medicine*, 375(24): 2369–2379.
- Miura K, Shinoda T, Yura M, Nomura S, Kamiya K, Yuda M, Chinzei Y, 1998. Two hexameric cyanoprotein subunits from an insect, *Riptortus clavatus*, sequence, phylogeny and developmental and juvenile hormone regulation, *European Journal of Biochemistry*, 258(3): 929–940.
- Pan XH, 2014. Effects of early amino acid nutrition on growth, development and reproduction of brown planthopper. Master dissertation. Guangzhou: Sun Yat-sen University. [潘雪花, 2014. 早期氨基酸营养影响褐飞虱生长发育与繁殖. 硕士学位论文, 广州: 中山大学.]
- Qi XY, Yun CY, Pang YL, Qiao J, 2021. The impact of the gut microbiota on the reproductive and metabolic endocrine system. *Gut Microbes*, 13(1): 1–21.
- Riddiford LM, 2008. Juvenile hormone action: A 2007 perspective. *Journal of Insect Physiology*, 54(6): 895–901.
- Riddiford LM, 2012. How does juvenile hormone control insect metamorphosis and reproduction? *General and Comparative Endocrinology*, 179(3): 477–484.
- Sacchetti P, Ghiardi B, Granchietti A, Stefanini FM, Belcari A, 2014. Development of probiotic diets for the olive fly: Evaluation of their effects on fly longevity and fecundity. *Annals of Applied Biology*, 164(1): 138–150.
- Telfer WH, Kunkel JG, 1991. The function and evolution of insect storage hexamers. *Annual Review of Entomology*, 36: 205–228.
- Wiklund S, Johansson E, Sjöström L, Mellerowicz EJ, Edlund U, Shockcor JP, Gottfries J, Moritz T, Trygg J, 2008. Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models. *Analytical Chemistry*, 80(1): 115–122.
- Xu X, Sun FF, Yin CP, Wang Y, Zhang YL, 2018. Research progress on secondary metabolites of insect symbiotic bacteria. *Chinese Journal of Microbiology*, 58(6): 1126–1140. [徐晓, 孙飞飞, 尹彩萍, 王滢, 张应烙, 2018. 昆虫共生菌的次级代谢产物研究进展. 微生物学报, 58(6): 1126–1140.]
- Zhang ZJ, Mu XH, Cao QN, Shi Y, Hu XS, Zheng H, 2022. Honeybee gut *Lactobacillus* modulates host learning and memory behaviors via regulating tryptophan metabolism. *Nature Communications*, 13(1): 2037.