异色瓢虫与七星瓢虫细胞色素 P450、抗菌肽 和溶菌酶基因的鉴定及表达分析

张超维1 陈梦瑶1 王亚琴2 周 行1*

(1. 浙江大学昆虫科学研究所, 浙江省作物病虫生物学重点实验室, 杭州 310058; 2. 浙江大学生物技术研究所, 水稻生物学国家重点实验室, 杭州 310058)

摘要:为探究异色瓢虫Harmonia axyridis环境竞争力的来源,以七星瓢虫Coccinella septempunctata 为对照,采用同源比对法对两者细胞色素P450(cytochrome P450,CYP450)、抗菌肽和溶菌酶基因 进行鉴定,并对差异表达基因进行分析和荧光定量PCR验证。结果显示,在异色瓢虫中共发现89个 CYP450基因、25个抗菌肽基因和18个溶菌酶基因;在七星瓢虫中共发现127个CYP450基因、17个 抗菌肽基因和9个溶菌酶基因。异色瓢虫编码抗菌肽和溶菌酶的基因较七星瓢虫存在明显的扩 增,而CYP450基因的扩增少于七星瓢虫,表明抗菌肽家族在异色瓢虫环境竞争过程中有着更重要 的作用;通过转录组的差异表达分析以及荧光定量PCR验证,发现大部分抗菌肽和溶菌酶基因在 脂肪体中高表达,据此推测脂肪体为2种瓢虫抗菌肽等免疫因子的主要合成场所。 关键词:异色瓢虫;七星瓢虫;抗菌肽;溶菌酶;细胞色素P450;免疫

Identification and expression analysis of cytochrome P450, antimicrobial peptide and lysozyme genes in multicolored Asian lady beetle *Harmonia axyridis* and sevenspotted lady beetle *Coccinella septempunctata*

Zhang Chaowei¹ Chen Mengyao¹ Wang Yaqin² Zhou Hang^{1*}

(1. Key Laboratory of Biology of Crop Pathogens and Insects of Zhejiang Province, Institute of Insect Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang Province, China; 2. State Key Laboratory of Rice Biology, Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang Province, China)

Abstract: To explore the source of environmental competitiveness in multicolored Asian lady beetle *Harmonia axyridis*, sevenspotted lady beetle *Coccinella septempunctata* was selected as control, cytochrome P450 (CYP450), antimicrobial peptide (AMP), and lysozyme genes were identified by homology comparison and domain comparison, and the differentially expressed genes were analyzed and verified by qPCR. The results showed that total 89 CYP450, 25 AMPs, and 18 lysozyme genes were identified in *H. axyridis*, while 127, 17, and nine identified in *C. septempunctata*. The significantly more genes encoding AMPs and lysozymes were found in *H. axyridis* than in *C. septempunctata* suggested that AMPs might play a more important role in environmental competition of *H. axyridis*. Through transcriptome differential expression analysis and qPCR, the high expression level of AMPs and lysozymes in the fat body was found. All the results indicated that the fat body was probably the main synthesis site of immune factors such as AMPs.

Key words: *Harmonia axyridis*; *Coccinella septempunctata*; antimicrobial peptide; lysozyme; cytochrome P450; immune

基金项目:国家自然科学基金(32102271)

^{*} 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: zhouhang716@zju.edu.cn 收稿日期: 2021-10-02

异色瓢虫Harmonia axyridis 与七星瓢虫Coccinella septempunctata同为鞘翅目瓢虫科昆虫,取食习 性相近,能够捕食螨类、膜翅目、鳞翅目、双翅目蚜虫 和半翅目蚧虫等昆虫,均为我国重要的捕食性天敌。 七星瓢虫主要分布于非洲、欧洲及亚洲(Nikitsky & Ukrainsky, 2016), 而异色瓢虫则原产于中国、朝鲜、 日本和蒙古等亚洲国家,也被称为亚洲瓢虫(Obata & Johki et al., 1990; Brown et al., 2011; Robertson et al., 2015)。异色瓢虫在我国被广泛用于粮食作物如水 稻和小麦、园艺作物如蔬菜和果树的害虫防治中,因 其对吹绵蚧 Icerva purchasi 具有良好的防治效果而 在19世纪被引入欧洲、北美洲、南美洲及大洋洲进 行害虫防治(Tedders & Schaefer, 1994; Roy & Wajnberg, 2008; Brown et al., 2011)。然而,由于缺少天 敌的控制,经过近100年的发展,异色瓢虫逐渐成为 被引入地区的有害生物。作为多食性昆虫,异色瓢 虫通过直接取食和竞争行为威胁本地食蚜物种的多 样性(Majerus et al., 2006),并取食浆果类水果,对欧 美国家的葡萄酒及水果种植业造成重大损失(Koch et al., 2004; Kovach, 2004)。越冬期间异色瓢虫还 会侵入建筑(Kovach, 2004), 给人们生活带来不便, 在当地被认为是重要的外来入侵害虫。

异色瓢虫成为严重的入侵物种得益于其强大的 环境竞争力。相较于其他捕食性瓢虫,异色瓢虫食 性广,取食量大(宫庆涛,2020),其越冬代成虫具有 长时间飞行的能力(翟保平,1990),在种间捕食中被 其他瓢虫取食卵和幼虫的概率最低(赵静等, 2016)。此外,异色瓢虫具有强大的免疫系统,相较 于其他瓢虫对昆虫病原线虫和真菌有更强的抵抗力 (Cottrell & Shapiro-Ilan,2008),被寄生物感染的概 率更低,感染后存活率更高(Koch,2003; Roy & Wajnberg,2008)。如在注射相同剂量的真菌后,双 斑瓢虫 Adalia bipunctata 和七星瓢虫的死亡率显著 高于异色瓢虫(Roy et al.,2007)。

昆虫对诸如农药等有毒物质的解毒代谢依赖于 3大解毒酶系,即细胞色素P450(cytochrome P450, CYP450)、ABC转运蛋白和谷胱甘肽-S-转移酶(周 斌芬等,2008),而在病原真菌的体液免疫过程中,各 类抗菌肽、溶菌酶等效应分子起着重要作用(Rahnamaeian et al.,2009;Keehnen et al.,2017;曾令瑜等, 2019)。在昆虫受到微生物感染或意外伤害时,抗菌 肽和溶菌酶在生物体的各组织或器官中由各类免疫 应答信号通路调控转录合成并释放,发挥抗菌及其 他生物学功能,对细菌、真菌、寄生虫及病毒等病原物 有着广谱抗性(Papagianni,2003)。Vilcinskas et al. (2013a)对异色瓢虫进行细菌注射处理后,从其转录 组分析鉴定出10个攻击素编码基因、15个鞘翅素编 码基因、19个防御素编码基因、4个甜蛋白编码基因 以及10个溶菌酶编码基因,而Vogel et al.(2017)在 此基础上以相同方法从七星瓢虫中鉴定出的上述抗 菌肽编码基因分别仅有4、2、3、11和2个。异色瓢虫 和七星瓢虫在抗菌肽数量上的差异可能反映了免疫 适应性分子机制的不同,但由于该抗菌肽的预测方 法过于简单,分析结果缺乏基因组信息支持,尚需更 准确的分析预测手段支持。随着各种组学数据的公 布,昆虫科学的研究逐步进入到功能组学阶段。

异色瓢虫和七星瓢虫的基因组数据已公布(Kim et al., 2010; Ando et al., 2018; Chen et al., 2021), 为 探究 2种昆虫免疫适应性的分子机制提供了数据基 础。为此,本研究采用异色瓢虫和七星瓢虫最新的 基因组注释版本,从基因组水平对 CYP450 基因家 族、溶菌酶基因家族以及包括攻击素、鞘翅素、防御 素和甜蛋白的抗菌肽基因家族进行预测和进化分 析,结合其在4龄幼虫整虫和脂肪体的转录组数据 进行基因表达水平分析,同时分析抗菌肽、溶菌酶与 异色瓢虫环境适宜能力的相关性,以期为深入了解 两者在免疫策略上的异同点,揭示异色瓢虫强大环 境竞争力的来源提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试虫源:异色瓢虫和用于饲喂瓢虫的豌豆修 尾蚜*Megoura crassicauda*虫源由北京市农林科学院 提供,并于本实验室连续饲养10代以上,七星瓢虫 于野外采集,瓢虫成虫饲养于30 cm×30 cm×30 cm 的养虫笼中,每笼30头,将接入大量豌豆修尾蚜的 蚕豆植株置于笼内饲喂瓢虫成虫并获取卵块。瓢虫 幼虫饲养于10 cm×20 cm的塑料盒,开孔透气,每盒 30头,定期投放带有豌豆修尾蚜的蚕豆植株,当幼 虫生长至4龄时,虫体达到最大、脂肪体含量最丰富 时供试。饲养过程中要保持豌豆修尾蚜的供应,避 免瓢虫自残行为的发生。饲养环境中温度为(25± 1)℃、相对湿度为(60±10)%、光周期为16L:8D。

供试植物:蚕豆品种为云豆147,幼苗高度达到 5 cm左右接种豌豆修尾蚜供试。

试剂和仪器:TRIzol Regent、HiScript[®] III RT SuperMix for qPCR(+gDNA Wiper)反转录试剂盒、 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix荧光定量 试剂盒,南京诺唯赞生物科技股份有限公司;其余试 剂均为国产分析纯。Veriti[™] Dx PCR 仪、QunatStudio3[™]荧光定量 PCR 仪,美国 ABI公司;Fresco[™] 21 微量离心机、Nanodrop 2000 微量分光光度计,美国 Themo Fisher Scientific公司; NovaSeq 6000 高通量 测序平台,美国 Illumina公司;SZ810 体视显微镜,重 庆奥特光学仪器有限责任公司;DYCP-31DN 琼脂 糖凝胶电泳仪,北京六一仪器厂;HWS-436人工气 候箱,宁波江南仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 瓢虫免疫相关基因家族的鉴定

为探究异色瓢虫及七星瓢虫免疫适应性的分子 基础,对两者的抗菌肽和解毒代谢相关基因家族进 行鉴定。选取异色瓢虫(GenBank 登录号为 GCA) 011033045.1)、七星瓢虫(GenBank 登录号为 GCA 003568925.1) 以及鞘翅目模式昆虫赤拟谷盗 Tribolium castaneum (GenBank 登录号为 GCA 000002335.3)的基因组进行抗菌和解毒代谢相关基 因家族的注释与分析,包括CYP450、溶菌酶以及抗 菌肽家族中的攻击素、鞘翅素、防御素和甜蛋白共 6大基因家族。首先建立相应参考蛋白质序列库; 将昆虫基因组与CYP450、抗菌肽和溶菌酶参考序 列库进行 TBLASTN 比对, E-value 设为 1×10⁻⁵, 确定 全基因组中可能编码CYP450基因和抗菌肽基因的 区域;利用GeneWise 2.4.1 软件(Birney et al., 2004) 对获得的可能编码区域进行基因结构预测;利用 HMMER 3.3.2 软件(Potter et al., 2018) 对预测结果 进行结构域比对,蛋白质结构域信息来源于PFAM 数据库(http://pfam.xfam.org/), E-value设置为1× 10⁻⁵,过滤不含特征结构域的序列,获得属于该基因 家族的蛋白序列。

1.2.2 瓢虫CYP450基因系统发育树的构建

使用 MAFFT 7 软件(Katoh & Standley, 2013) 的-auto 模式对 1.2.1 预测得到的 CYP450 蛋白基因 序列进行多序列比对,利用 TrimAl 1.4 软件(Capella-Gutiérrez et al., 2009)自动模式去除多序列比对 结构中的低保守区域,最后采用 iqtree 1.6.7 软件 (Nguyen et al., 2015)中的 ModelFinder 程序预测最 佳模型构建系统发育树。使用在线工具iToL(https:// itol.embl.de/upload.cgi)(Letunic & Bork, 2021)输出 可视化进化树图。

1.2.3 转录组中抗菌肽基因的差异表达分析

为确定抗菌肽合成部位和基因表达情况,对七 星瓢虫和异色瓢虫的脂肪体及整虫转录组数据进行 分析。4龄为瓢虫幼虫脂肪体大量合成的阶段,为 方便后续脂肪体组织的提取,主要选取了4龄幼虫 作为研究对象。分别选择异色瓢虫和七星瓢虫虫势 相近的4龄幼虫7头,每种瓢虫3组重复,共6组,在 磷酸盐缓冲溶液中解剖得到脂肪体,并迅速收集于 装有500 mL TRIzol Regent的1.5 mL离心管中,置 于冰上对其充分研磨后补足至1 mL,再加入200 µL 体积的氯仿抽提,获得的上清液用等体积异丙醇沉 淀。利用琼脂糖凝胶电泳和分光光度计检测RNA 的纯度和浓度,电泳结果显示条带清晰明亮, OD_{260 mm}/OD_{230 mm}为1.8~2.2,OD_{260 mm}/OD_{230 mm}为1.8~2.2,OD_{260 mm}/OD_{230 mm}为1.8~2.2 时样品合格。选取质量检测合格的2种瓢虫脂肪体 总RNA进行文库的构建。使用Illumina NovaSeq 6000测序平台进行高通量测序,最终生成双末端的 150 bp 的原始测序数据,上传至 NCBI(登录号为 PRJNA749666)。

异色瓢虫和七星瓢虫4龄幼虫整虫的转录组数 据下载自NCBI中的SRA数据库(SRR9649791、 SRR9649792、SRR9649796、SRR9649801、SRR964-9802、SRR9649804)。所有转录组原始数据解压获 得 fastq 格式的序列文件。随后利用 FastQC 0.11.9 软件(Brown et al., 2017)和 MultiQC 4.5.4 软件 (Ewels et al., 2016)对其进行质量检测。根据质检 结果利用 Trimmomatic 0.38 软件 (Bolger et al., 2014) 过滤接头序列、引物序列以及低质量碱基序 列,得到高质量序列数据。基于由参考基因组中鉴 定得到的抗菌肽基因的位置信息,利用RSEM 1.3.3 软件(Li & Dewey, 2011)对高质量序列数据进行比 对和定量。最后以分析得到的抗菌肽基因 read count 为基础,利用DESeq2 1.35.0软件(Love et al., 2014) 进行抗菌肽基因的差异表达分析,以P-value<0.01、 |log,(差异倍数)|≥1为筛选条件,获得显著差异表达 基因。

1.2.4 异色瓢虫抗菌肽基因的实时荧光定量PCR验证

采用1.2.4方法分别获得异色瓢虫4龄幼虫整虫 和脂肪体的总RNA,参照HiScript[®]III RT SuperMix for qPCR(+gDNA Wiper)反转录试剂盒说明书合成 cDNA。从1.2.1鉴定得到的抗菌肽基因与溶菌酶基 因中随机挑选6个基因,并设计特异性引物(表1), 内参基因选用 *RPS18*(Zhou et al., 2021),所有引物 均由杭州擎科生物技术有限公司合成。使用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 在 PCR 仪 上进行实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR,qPCR)扩增。20 µL反应体系:cDNA1 µL、上下 游引物各 0.2 µL、2×SYBR qPCR Master Mix 10 µL、 ddH₂O 7.6 µL。反应条件:95℃预变性3 min;95℃变 性15 s,57℃退火15 s,72℃延伸30 s,共40个循环。 每组3次生物学重复,以异色瓢虫整虫为对照,采用 2-44公法计算脂肪体中抗菌肽基因的相对表达量。

表1	qPCR引物序列	
----	----------	--

Table 1 Primers used for qPCR in this study

基因 Gene	正向引物(5'-3') Forward sequence (5'-3')	反向引物(5'-3') Reverse sequence (5'-3')
Haxy_Coleoptericin2	CCGAAGAATCCCGAAACATA	TCTTTTTGCACCCTCACAGA
Haxy_Coleoptericin6	GCAGACATGTTCGGGACTCT	TCATGGTTCCCCAATTGTTT
Haxy_lysozyme1	GTTATTGGGCTTTTGCTGGA	TCAATCTGCTCAGCGCTCTA
Haxy_lysozyme5	AAAACAGCTGGCAGTCCAGT	CGTCACAATTGCAGTCCAGT
Haxy_Thaumatin1	AGGGCTGGACTTCTACGACA	AGGGTTGTCACATCCTGCTC
Haxy_Thaumatin2	GGCCTTCAACACAGACCAAT	GGCATCTGGACACCAATTCT
RPS18	GGCGAGTCCTGCTTATCAAC	TCCAGTAGCTATGATCCCAGC

1.3 数据分析

采用SPSS 21.0软件对试验数据进行统计分析, 针对不同组织的 qPCR 结果采用 Student's *t* 法进行 差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 2种瓢虫CYP450、抗菌肽和溶菌酶基因的注释

从异色瓢虫基因组中鉴定出CYP450基因89个, 抗菌肽基因25个,溶菌酶基因18个;从七星瓢虫基 因组中鉴定出CYP450基因127个,抗菌肽基因 17个,溶菌酶基因9个;从赤拟谷盗基因组中鉴定 出CYP450基因141个,抗菌肽基因16个,溶菌酶基 因8个(表2),符合先前已有赤拟谷盗P450基因研 究结果,表明本研究结果可靠。

2.2 CYP450基因家族的系统发育分析

进化分析结果显示,异色瓢虫和七星瓢虫的 CYP450基因可以很好的划分为4个簇,即线粒体 Mito簇、CYP2簇、CYP3簇和CYP4簇(图1)。鉴定 结果显示,异色瓢虫CYP450基因4个分支簇的基因 数量分别为9、11、41和28个,而七星瓢虫CYP450 基因4个分支簇的基因数量分别为14、19、52和42个。 CYP450基因总数在异色瓢虫、七星瓢虫和赤拟谷 盗3个物种间的差异较大(表2),但其在各分支簇中 的分布与数量仍存在一定规律,其中属于CYP2簇 和线粒体Mito簇的CYP450基因数量较少,且3个 物种间上述2簇的基因数量差异较小;属于CYP3簇 和CYP4簇的CYP450基因数量较多且差异较大,3个 物种均以CYP3簇中分布的基因数量最多(图1)。

表2 异色瓢虫和七星瓢虫免疫相关基因的鉴定

Table 2 Identification of immune-related genes in Harmonia axyridis and Coccinella septempunctata								
物种信息 Species	细胞色素 P450 抗菌肽 Antimicrobial peptide			nicrobial peptide		滚菌酶		
	Cytochrome P450	攻击素	防御素	鞘翅素	甜蛋白	1首四時 Lysozyme		
	(CYP450)	Attacin	Defensin	Coleoptericin	Thaumatin	Lysozyme		
异色瓢虫 H. axyridis	89	3	9	11	2	18		
七星瓢虫 C. septempunctata	127	3	6	4	4	9		
赤拟谷盗 T. castaneum	141	1	7	2	6	6		

2.3 异色瓢虫抗菌肽和溶菌酶基因的表达分析

从异色瓢虫、七星瓢虫和赤拟谷盗的基因组中 分别鉴定出25、17、16个抗菌肽编码基因和18、9、 6个溶菌酶编码基因,其中攻击素、防御素和甜蛋白 编码基因的数量基本相近,而鞘翅素编码基因数量 在异色瓢虫中为11条,远多于七星瓢虫的4条和赤 拟谷盗的2条,出现明显的扩增现象(表2)。为了验 证抗菌肽基因表达部位与水平,对异色瓢虫脂肪体 及整虫进行了转录组差异表达分析。

2.3.1 转录组差异表达分析

分析结果显示,异色瓢虫脂肪体及整虫转录组的所有差异表达基因为2235个,其中脂肪体内上调

表达基因为322个,下调表达基因为1913个(图2)。 2.3.2 抗菌肽基因表达情况与鉴定

在鉴定得到的25个异色瓢虫抗菌肽基因中,有 19个在4龄幼虫的整虫或脂肪体中有表达;而在鉴 定得到的18个溶菌酶基因中,有9个在4龄幼虫的 整虫或者脂肪体中有表达。鉴定得到的17个七星 瓢虫抗菌肽基因和9个溶菌酶基因均在4龄幼虫的 整虫或脂肪体中有表达。在2种瓢虫中,脂肪体中 免疫相关基因的表达水平显著高于在整虫中的表达 水平(图3)。随机挑选6个异色瓢虫免疫相关基因 进行 qPCR 验证,以异色瓢虫整虫为对照,6个基因 在脂肪体中均显著高表达(图4)。



图1 异色瓢虫(紫色)、七星瓢虫(红色)及赤拟谷盗(绿色)细胞色素 P450基因的系统发育进化树 Fig. 1 Phylogenetic tree of the CYP450 genes of *Harmonia axyridis* (purple), *Coccinella septempunctata* (red) and *Tribolium castaneum* (green)

3 讨论

本研究在异色瓢虫和七星瓢虫基因组中分别鉴 定得到了89个和127个CYP450基因,两者在CYP2 簇和线粒体Mito簇中的基因数量基本相同,CYP2 簇的基因多参与环境响应过程,因此又被称为环境 响应基因(Kubota et al.,2011);线粒体Mito簇的基 因具有高度特异性功能,如参与蜕皮激素的合成等 (Zhu et al.,2013),因而隶属于这2个簇的CYP450 基因数量较少且序列高度保守。而2种瓢虫中隶属 于 CYP3 簇和 CYP4 簇的 CYP450 基因差异较大, CYP3 簇的基因主要参与代谢如杀虫剂等外源性物 质,CYP4 簇的基因主要功能是代谢外源有毒化学 物质、参与脂肪酸羟基化、生物合成和代谢等(Feyereisen,2006; 王小青和刘婷,2012),隶属于 CYP3 簇与 CYP4 簇的 CYP450 基因功能多样且具有差异 性分化,由于瓢虫的生存环境、进化压力不同,导致 数量差异扩大。现已证明,大多数重要害虫对杀虫 剂产生高抗性的主要来源为 CYP450 酶系的解毒代 谢作用(Scott et al.,1998)。与七星瓢虫相比,异色

1355

瓢虫在CYP3 簇与CYP4 簇中并未表现出明显扩增现象,说明异色瓢虫在由CYP450 提供的解毒代谢能力方面与七星瓢虫相比并无明显优势。





异色瓢虫鞘翅素基因家族和溶菌酶类基因家族 存在明显扩增现象,这一结果与此前的转录组鉴定



结果相似(Vilcinskas et al., 2013a; Vogel et al., 2017)。 而这种免疫相关基因的扩增现象一直被认为是代价 高昂的,这些基因的扩增进化需要从其他与环境适 应性相关的代价更低的特征中转移资源,例如迁飞 能力、繁殖力、捕食力或适应不同食谱的能力等 (Schmid-Hempel, 2005; McKean et al., 2008)。表明 这种扩增所带来的竞争优势可能远大于目前的认 知,抗菌肽尤其是鞘翅素的扩增现象,不仅能够诱发 免疫反应,提高昆虫清除病原物感染的能力,还发挥 着其他作用,如鞘翅素在象甲的寄主-共生体互作 关系中起着核心作用,这种鞘翅素能特异性地靶向 昆虫体内垂直传播的内共生体,通过抑制其细胞分 裂的方式调节其生长,阻止共生体内的细菌扩散并 侵入昆虫组织中(Login et al., 2011)。结合异色瓢 虫独有的异色瓢虫-微孢子虫共生关系(Vilcinskas et al., 2013b), 这可能是异色瓢虫独特的进化策略, 即利用抗菌肽等免疫相关分子的扩增与特异性分化, 从而与病原微生物建立独特的共生关系,帮助其作 为多食性昆虫在自相残杀和竞争中取得优势,与微 孢子虫共生的分子基础也是后续研究的重点。



haxy_all_1~haxy_all_3、csep_all_1~csep_all_3: 分别为异色瓢虫和七星瓢虫整虫样品; haxy_ft_1~haxy_ft_3、csep_ft_ 1~csep_ft_3: 分别为异色瓢虫和七星瓢虫脂肪体样品 1~3。haxy_all_1-haxy_all_3, csep_all_1-csep_all_3: Whole bady samples 1-3 of *H. axyridis* and *C. septempunctata*, respectively; haxy_ft_1-haxy_ft_3, csep_ft_1-csep_ft_3: fat bady samples of *H. axyridis* and *C. septempunctata*, respectively.

图3 抗菌肽和溶菌酶基因在异色瓢虫(A)和七星瓢虫(B)整虫以及脂肪体中的表达情况

Fig. 3 Expression profiles of antimicrobial peptides & lysozymes genes in whole body and fat body of *Harmonia axyridis* (A) and *Coccinella septempunctata* (B)

通过转录组的分析发现,并非所有的抗菌肽都 能够在瓢虫幼虫虫体中被检测到。出现这一现象的 原因可能与虫态有关,也可能与诱导条件相关。而 这些未被检测到表达的抗菌肽可能需要病原微生物 的诱导才能合成。此外,被检测到的抗菌肽在2种瓢 虫的脂肪体中都存在大量表达,推测脂肪体可能是 这些免疫因子的主要合成场所。本研究通过对异色 瓢虫及七星瓢虫基因组的分析,鉴定出了CYP450、 抗菌肽和溶菌酶等解毒和免疫相关因子,通过系统 发育分析明确了抗菌肽家族在异色瓢虫环境适应和 种间竞争过程中的重要作用,根据转录组和试验数 据推测脂肪体为抗菌肽等相关免疫因子的主要合成 场所,为深入了解两者在免疫策略上的异同点,揭示 异色瓢虫强大环境竞争力的来源提供了证据,为天 敌昆虫的科学利用提供了有力的理论依据。



Col2和Col6为鞘翅素基因Haxy_Coleoptericin2和Haxy_Coleoptericin6, lyso1和lyso5为溶菌酶基因Haxy_lysozyme1和 Haxy_lysozyme5, Tha1和Tha2为甜蛋白基因Haxy_Thaumatin1和Haxy_Thaumatin2。Col2 and Col6 represent Haxy_Coleoptericin2 and Haxy_Coleoptericin6, lyso1 and lyso5 represent Haxy_lysozyme1 and Haxy_lysozyme5, Tha1 and Tha2 represent Haxy_Thaumatin1 and Haxy_Thaumatin2.

图4 6个抗菌肽/溶菌酶基因在异色瓢虫整虫 和脂肪体中的相对表达量

Fig. 4 Relative expression profile of six antimicrobial peptides/ lysozymes genes in whole body and fat body

of Harmonia axyridis

图中数据为平均数±标准差。*和**分别表示经 Student's t 检验法检验在 P<0.05 和 P<0.01 水平差异显著。 Data are mean±SD. * or ** indicates significant difference at P<0.05 or P<0.01 level by Student's t test.

参考文献(References)

- Ando T, Matsuda T, Goto K, Hara K, Ito A, Hirata J, Yatomi J, Kajitani R, Okuno M, Yamaguchi K, et al. 2018. Repeated inversions within a pannier intron drive diversification of intraspecific colour patterns of ladybird beetles. Nature Communications, 9: 3843
- Birney E, Clamp M, Durbin R. 2004. GeneWise and Genomewise. Genome Research, 14(5): 988–995

Bolger AM, Lohse M, Usadel B. 2014. Trimmomatic: a flexible trim-

mer for Illumina sequence data. Bioinformatics, 30(15): 2114-2120

- Brown J, Pirrung M, McCue LA. 2017. FQC Dashboard: integrates FastQC results into a web-based, interactive, and extensible FASTQ quality control tool. Bioinformatics, 33(19): 3137–3139
- Brown PMJ, Thomas CE, Lombaert E, Jeffries DL, Estoup A, Lawson Handley LJ. 2011. The global spread of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae): distribution, dispersal and routes of invasion. BioControl, 56(4): 623–641
- Capella-Gutiérrez S, Silla-Martínez JM, Gabaldón T. 2009. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. Bioinformatics, 25(15): 1972–1973
- Chen MY, Mei Y, Chen X, Chen X, Xiao D, He K, Li Q, Wu MM, Wang S, Zhang F, et al. 2021. A chromosome-level assembly of the harlequin ladybird *Harmonia axyridis* as a genomic resource to study beetle and invasion biology. Molecular Ecology Resources, 21(4): 1318–1332
- Cottrell TE, Shapiro-Ilan DI. 2008. Susceptibility of endemic and exotic North American ladybirds (Coleoptera: Coccinellidae) to endemic fungal entomopathogens. European Journal of Entomology, 105(3): 455–460
- Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Käller M. 2016. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. Bioinformatics, 32(19): 3047–3048
- Feyereisen R. 2006. Evolution of insect P450. Biochemical Society Transactions, 34(Pt6): 1252-1255
- Gong QT. 2020. Orchard natural enemies: *Harmonia axyridis*. Deciduous Fruits, 52(2): 61 (in Chinese) [宫庆涛. 2020. 果园天敌: 异 色瓢虫. 落叶果树, 52(2): 61]
- Katoh K, Standley DM. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. Molecular Biology and Evolution, 30(4): 772–780
- Keehnen NLP, Rolff J, Theopold U, Wheat CW. 2017. Insect antimicrobial defences: a brief history, recent findings, biases, and a way forward in evolutionary studies. Advances in Insect Physiology, 52: 1–33
- Kim HS, Murphy T, Xia J, Caragea D, Park Y, Beeman RW, Lorenzen MD, Butcher S, Manak JR, Brown SJ. 2010. BeetleBase in 2010: revisions to provide comprehensive genomic information for *Tribolium castaneum*. Nucleic Acids Research, 38(D): 437– 442
- Koch RL. 2003. The multicolored Asian lady beetle, *Harmonia axyridis*: a review of its biology, uses in biological control, and nontarget impacts. Journal of Insect Science, 3: 32
- Koch RL, Burkness EC, Burkness SJW, Hutchison WD. 2004. Phytophagous preferences of the multicolored Asian lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae) for autumn-ripening fruit. Journal of Economic Entomology, 97(2): 539–544
- Kovach J. 2004. Impact of multicolored Asian lady beetles as a pest of fruit and people. American Entomologist, 50(3): 159–161
- Kubota A, Stegeman JJ, Goldstone JV, Nelson DR, Kim EY, Tanabe S, Iwata H. 2011. Cytochrome P450 CYP2 genes in the common cormorant: evolutionary relationships with 130 diapsid CYP2 clan sequences and chemical effects on their expression. Com-

parative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 153(3): 280-289

- Letunic I, Bork P. 2021. Interactive Tree of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. Nucleic Acids Research, 49(W1): 293-296
- Li B, Dewey CN. 2011. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. BMC Bioinformatics, 12: 323
- Login FH, Balmand S, Vallier A, Vincent-Monégat C, Vigneron A, Weiss-Gayet M, Rochat D, Heddi A. 2011. Antimicrobial peptides keep insect endosymbionts under control. Science, 334 (6054): 362-365
- Love MI, Huber W, Anders S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biology, 15(12): 550
- Majerus M, Strawson V, Roy H. 2006. The potential impacts of the arrival of the harlequin ladybird, Harmonia axyridis (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae), in Britain. Ecological Entomology, 31(3): 207-215
- McKean KA, Yourth CP, Lazzaro BP, Clark AG. 2008. The evolutionary costs of immunological maintenance and deployment. BMC Evolutionary Biology, 8: 76
- Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ. 2015. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. Molecular Biology and Evolution, 32(1): 268-274
- Nikitsky NB, Ukrainsky AS. 2016. The ladybird beetles (Coleoptera, Coccinellidae) of Moscow Province. Entomological Review, 96 (6): 710-735
- Papagianni M. 2003. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. Biotechnology Advances, 21(6): 465-499
- Potter SC, Luciani A, Eddy SR, Park Y, Lopez R, Finn RD. 2018. HMMER web server: 2018 update. Nucleic Acids Research, 46 (W1): 200-204
- Rahnamaeian M, Langen G, Imani J, Khalifa W, Altincicek B, von Wettstein D, Kogel KH, Vilcinskas A. 2009. Insect peptide metchnikowin confers on barley a selective capacity for resistance to fungal ascomycetes pathogens. Journal of Experimental Botany, 60(14): 4105-4114
- Robertson JA, Ślipiński A, Moulton M, Shockley FW, Giorgi A, Lord NP, McKenna DD, Tomaszewska W, Forrester J, Miller KB, et al. 2015. Phylogeny and classification of Cucujoidea and the recognition of a new superfamily Coccinelloidea (Coleoptera: Cucujiformia). Systematic Entomology, 40(4): 745-778
- Roy H, Wajnberg E. 2008. From biological control to invasion: the ladybird Harmonia axyridis as a model species. BioControl, 53(1): 1-4
- Roy HE, Brown PMJ, Rothery P, Ware RL, Majerus MEN. 2007. Interactions between the fungal pathogen Beauveria bassiana and three species of coccinellid: Harmonia axyridis, Coccinella septempunctata and Adalia bipunctata.//Roy HE, Wajnberg E. From biological control to invasion: the ladybird Harmonia axyridis as a model species. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 265-276

Schmid-Hempel P. 2005. Evolutionary ecology of insect immune de-

fenses. Annual Review of Entomology, 50: 529-551

- Scott JG, Liu NN, Wen ZM. 1998. Insect cytochromes P450: diversity, insecticide resistance and tolerance to plant toxins. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 121(1/2/3): 147-155
- Obata S, Johki Y. 1990. Distribution and behaviour of adult ladybird, Harmonia axyridis Pallas (Coleoptera, Coccinellidae), around aphid colonies. Japanese Journal of Entomology, 58(4): 839-845
- Tedders WL, Schaefer PW. 1994. Release and establishment of Harmonia axyridis (Coleoptera: Coccinellidae) in the southeastern United States. Entomological News, 105(4): 228-243
- Vilcinskas A, Mukherjee K, Vogel H. 2013a. Expansion of the antimicrobial peptide repertoire in the invasive ladybird Harmonia axyridis. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 280(1750): 20122113
- Vilcinskas A, Stoecker K, Schmidtberg H, Röhrich CR, Vogel H. 2013b. Invasive harlequin ladybird carries biological weapons against native competitors. Science, 340(6134): 862-863
- Vogel H, Schmidtberg H, Vilcinskas A. 2017. Comparative transcriptomics in three ladybird species supports a role for immunity in invasion biology. Developmental & Comparative Immunology, 67:452-456
- Wang XQ, Liu T. 2012. Insect diversity and its evolution of the CYP4 gene family. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 40(5): 559-562 (in Chinese) [王小青, 刘婷. 2012. 昆虫 CYP4 基因家 族多样性和进化.山西农业科学,40(5):559-562]
- Zeng LY, Li ZH, Liu LJ. 2019. Research progress in the immunity of insects and the immune mechanisms of five important invasive insects. Journal of Plant Protection, 46(1): 6-16 (in Chinese)[曾 令瑜,李志红,柳丽君.2019.昆虫免疫及五种重要入侵昆虫免 疫机制研究进展. 植物保护学报, 46(1):6-16]
- Zhai BP. 1990. Flight ability of wintering generation lady birds Coccinella septempunctata L. and Harmonia axyridis Pall. Chinese Journal of Applied Ecology, 1(3): 214-220 (in Chinese) [翟保 平.1990. 越冬代七星瓢虫和异色瓢虫的飞翔能力. 应用生态 学报,1(3):214-220]
- Zhao J, Xiao D, Zhang F, Wang S. 2016. The intraspecific cannibalism and intraguild predation on eggs among three predacious ladybeetles (Coleoptera: Coccinellidae) adults. Journal of Environmental Entomology, 38(2): 299-304 (in Chinese) [赵静, 肖达, 张帆, 王甦. 2016. 三种捕食性瓢虫成虫对卵的种内自残及其 集团内捕食作用.环境昆虫学报, 38(2): 299-304]
- Zhou BF, Tang ZH, Gao JF. 2008. Advances in metabolic resistance to insecticides in insects. Agrochemicals, 47(5): 313-315, 323 (in Chinese) [周斌芬, 唐振华, 高菊芳. 2008. 昆虫代谢抗性的研 究进展.农药,47(5):313-315,323]
- Zhou H, Ma ZZ, Wang ZQ, Yan S, Wang D, Shen J. 2021. Hedgehog signaling regulates regenerative patterning and growth in Harmonia axyridis leg. Cellular and Molecular Life Sciences, 78(5): 2185-2197
- Zhu F, Moural TW, Shah K, Palli SR. 2013. Integrated analysis of cytochrome P450 gene superfamily in the red flour beetle, Tribolium castaneum. BMC Genomics, 14: 174