

小黑瓢虫雌成虫滞育基因的转录组测序分析

孟 佳^{1,2} 黄 建^{2*}

(1. 唐山师范学院生命科学系, 唐山 063000; 2. 福建农林大学植物保护学院, 福州 350002)

摘要: 为明确小黑瓢虫 *Delphastus catalinae* 滞育的分子机制, 使用 Illumina HiSeq2500 高通量测序平台分析小黑瓢虫雌成虫非滞育期、滞育期和滞育解除期的相对转录水平, 从转录组测序数据中选取碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)基因、过氧化氢酶(catalase, CAT)基因、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)基因、过氧化物酶(peroxidase, POD)基因、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)基因、海藻糖酶(trehalase, TRE)基因、促葡萄糖转运1蛋白亚基基因*Ref*和SCoAL琥珀酰辅酶连接酶基因*GDP-forming*, 采用实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)技术检测上述基因在小黑瓢虫雌成虫3个不同时期的表达特征。结果显示, 从9个样品中共筛选出67.86 Gb的clean data; 936 447条contig被组装成52 255条unigene, 所有的unigene都通过BLAST对Nr数据库进行了注释, 有23 539条unigene被匹配。通过对unigene进行COG、GO和KEGG分析, 发现在非滞育组和滞育组之间以及滞育解除组和滞育组之间分别有3 690条和4 662条差异表达基因, 其中571条差异表达基因在滞育期特异性表达, 涉及116条KEGG富集通路。qRT-PCR验证了转录组测序的准确性, 发现LDH基因在滞育期的表达量显著下降, 而其余7个基因的表达量均上升。

关键词: 小黑瓢虫; 转录组测序; 滞育关联基因; 实时荧光定量PCR

Using transcriptome sequencing to analyze the diapause-related genes of female adults of whitefly predatory lady beetle *Delphastus catalinae*

Meng Jia^{1,2} Huang Jian^{2*}

(1. Faculty of Life Sciences, Tangshan Normal University, Tangshan 063000, Hebei Province, China; 2. College of Plant Protection, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian Province, China)

Abstract: To clarify the molecular mechanism of whitefly predatory lady beetle *Delphastus catalinae* during diapause, Illumina HiSeq2500 high-throughput sequencing platform was used to reveal the relative transcriptional levels of non-diapause, diapause and termination of diapause (DT) of the female adults. The genes alkaline phosphatase (ALP), catalase (CAT), lactate dehydrogenase (LDH), peroxidase (POD), superoxide dismutase (SOD), trehalase (TRE), *Ref*, and *GDP-forming* were selected from the transcriptome database. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to determine the expression patterns of these genes in three different stages. The results showed that a total of 67.86 Gb clean reads were filtered from nine samples. Additionally, 936 447 contigs were assembled into 52 255 unigenes. All of the unigenes were annotated through BLAST alignment against the Nr database, and 23 539 unigenes were matched. Further analysis of unigenes using the COG, GO and KEGG databases was performed. Through pairwise comparisons of the non-diapause, diapause, and diapause-termination groups, 3 690 and 4 662 differentially expressed genes (DEGs) were identified between non-diapause and dia-

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(201103002), 福建农林大学科技创新专项(KFA18098A,KF2015067), 唐山师范学院博士基金项目(2023B13)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: jhuang1234@126.com

收稿日期: 2021-06-11

pause, and between diapause-termination and diapause groups, respectively. Moreover, 571 DEGs were specifically expressed during the diapause period, involving 116 KEGG enrichment pathways. In addition, qRT-PCR verified the accuracy of the transcriptome. It was found that the expression of LDH decreased significantly during the diapause stage, while the expression of the other seven genes increased.

Key words: *Delphastus catalinae*; transcriptome sequencing; diapause related gene; quantitative real-time PCR

小黑瓢虫 *Delphastus catalinae* 隶属鞘翅目 Coleoptera 瓢虫科 Coccinellidae 的 *Delphastus* 属 (Hoelmer et al., 1993), 原产于北美洲, 目前广泛分布美国中部、南部和秘鲁。小黑瓢虫是控制粉虱害虫的重要捕食性天敌 (Heinz et al., 1999), 1996 年底作为新的天敌资源被引入福建省 (黄建等, 1998)。小黑瓢虫具有捕食量大、攻击力强的特点, 可以捕食多种粉虱害虫, 如高桥瘤粉虱 *Aleurotuberculatus takashii*、温室白粉虱 *Trialeurodes vaporariorum* 和烟粉虱 *Bemisia tabaci* 等 (傅建炜等, 1999; Lucas et al., 2010; Kumar et al., 2020)。同时, 还可以和浅黄恩蚜小蜂 *Encarsia sophia* 等寄生蜂共同防控粉虱害虫 (Zang & Liu, 2007)。多年来, 国内外对小黑瓢虫的生物学和生态学特性、人工饲料、人工繁殖、田间释放和生物防治应用等方面进行了深入研究, 并取得了良好的研究成果 (黄建等, 1998; Simmons et al., 2008; Lee et al., 2014)。

滞育是昆虫为了适应环境, 在某种特定环境因素刺激下几乎停止生长发育 (表现出低代谢或发育停滞), 并且只能通过另外特定环境因素的刺激后重新发育的现象 (Tauber & Tauber, 1976)。滞育过程包括 3 个阶段, 即滞育前期、滞育期和滞育后期 (Ikeda et al., 1993)。昆虫进入滞育前, 虽然受到外界环境因素的刺激, 但是仍然可以继续发育; 随后个体发育逐渐缓慢, 并在滞育后期解除; 滞育后期, 即当有利的环境条件出现时, 昆虫会立即恢复发育 (Hodek, 1996)。研究人员已经对多种昆虫的滞育机理进行了研究 (Tatar & Yin, 2001; Denlinger & Armbruster, 2014), 包括生理和生态方面 (Koštál, 2006; Hahn & Denlinger, 2007)。王伟等 (2011) 对 29 种瓢虫的滞育进行研究, 发现成虫是瓢虫滞育的普遍虫态。其中, 生殖受到抑制是判断瓢虫成虫滞育的最明显且最易观察的特征, 具体观察瓢虫成虫是否不产卵。此外, 瓢虫成虫滞育可由特定的指数来反映, 如产卵前期时间、卵巢 (卵子) 发育状态和生殖活性等。

高通量测序具有测序成本低、时间短的特点 (Fullwood et al., 2009)。这种技术可同时对数百万条序列进行测序, 不仅丰富了物种的遗传数据库, 在

功能基因的筛选和鉴定中也可以发挥作用 (Ansorge, 2009)。此技术有助于探索发现昆虫等无脊椎动物免疫相关的新基因 (Zhao et al., 2013), 通过 de novo 转录组测序产生物种的遗传信息和预测可能的非编码 RNA (Etebari et al., 2011)。目前, 鞘翅目多种昆虫的转录本已经被测序和分析, 如 Zhang et al. (2012) 研究发现孟氏隐唇瓢虫 *Cryptolaemus montrouzieri* 体内存在与杀虫剂抗性相关的基因; Zhu et al. (2012) 挖掘了云南切梢小蠹 *Tomicus yunnanensis* 的抗性基因; Altincicek et al. (2013) 也发现了赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 参与甲虫触毒性损伤反应的基因; Tang et al. (2014) 确定了龟纹瓢虫 *Propylaea japonica* 与杀虫剂抗性关联的基因; Qi et al. (2015) 对七星瓢虫 *Coccinella septempunctata* 在滞育中扮演复杂角色的基因进行了分析。这些研究结果为开展昆虫滞育的研究提供了新的思维和方向。

本研究通过对小黑瓢虫雌成虫非滞育期、滞育期和滞育解除期的转录组测序对比, 鉴定 3 个不同时期表达的差异表达基因, 从转录组测序数据中筛选 8 个基因, 即碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 基因、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 基因、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 基因、过氧化物酶 (peroxidase, POD) 基因、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 基因、海藻糖酶 (trehalase, TRE) 基因、促葡萄糖转运 1 蛋白亚基基因 *Ref* 和 SCoAL 琥珀酰辅酶连接酶基因 *GDP-forming*, 通过实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 进行转录结果准确性的验证, 并预测其可能在能量代谢、激素调节和其他功能中发挥的重要作用, 以期为进一步研究小黑瓢虫滞育的分子调控机制提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试虫源及植物: 小黑瓢虫在福建农林大学经济昆虫实验室的养虫室饲养, 每日饲喂新鲜烟粉虱建立试验种群。养虫室设置温度 (26±2) °C、相对湿度 (75±10)%、光周期 14 L: 10 D (4 根 30 W 的荧光

灯)。寄主植物为盆栽4~5周龄的青梗花椰菜,品种为庆农65日,将花椰菜种子种在提前装好有机土直径9 cm的盆中,置于自然光照、温度(26±2) °C的温室内培育,浇水施肥,待长至4~5周时备用。

试剂:RNA提取试剂Trizol,美国Invitrogen公司;DNA Polymerase I、RNase H、Total RNA Extractor、第一链cDNA合成试剂盒AMV First Strand cDNA Synthesis Kit、qRT-PCR试剂盒SG Fast qPCR Master Mix(High Rox)(2×),生工生物工程(上海)股份有限公司;AMPure XP核酸纯化试剂盒,美国Agencourt公司;其余试剂均为国产分析纯。

仪器:SZM45型体视显微镜,舜宇光学科技有限公司;PRX-250B型人工气候箱,宁波赛福实验仪器有限公司;DYY-6C型稳压稳流电泳仪,北京六一仪器厂;H6-1微型电泳槽,上海精益有机玻璃制品仪器厂;FR-980凝胶成像系统,上海复旦科技有限公司;TU-1901紫外分光光度计,北京普析通用仪器有限公司;PCR反应扩增仪,美国Bio-Rad公司;StepOne型荧光定量PCR仪,美国ABI公司。

1.2 方法

1.2.1 总RNA提取及cDNA文库的构建

本研究对非滞育期、滞育期和滞育解除期3个时期的小黑瓢虫雌成虫的总RNA进行提取。非滞育样品饲养条件为温度(26±1) °C、相对湿度(75±10)%、光周期14 L:10 D,饲养至第1次产卵后取样;滞育样品饲养条件为温度(11±1) °C、相对湿度(75±10)%、光周期8 L:16 D,饲养40 d后取样;滞育解除样品饲养条件为将滞育40 d后的雌成虫转移到饲养条件与非滞育样品一致的饲养条件下,待其第1次产卵后取样。每处理得到的10头雌成虫均用毛笔清理后,迅速放入1.5 mL离心管中,然后立即在液氮中速冻,于-80 °C冰箱保存,每处理3个生物学重复,供后期提取RNA。采取Trizol法提取各处理小黑瓢虫的总RNA,共得到9管样品,RNA样品检测合格后用带有Oligo(dT)的磁珠富集真核mRNA;加入片段缓冲液随机打断mRNA;以mRNA为模板,用六碱基随机引物合成第一条cDNA链,加入缓冲液、dNTPs、RNase H和DNA polymerase I合成第二条cDNA链,用AMPure XP Beads纯化cDNA;纯化的双链cDNA再进行末端修复、加A尾并连接测序接头,用AMPure XP Beads进行片段大小选择;最后PCR富集得到cDNA文库。

1.2.2 Illumina测序和de novo组装

待1.2.1所得cDNA质检合格后使用Illumina

HiSeq2500测序平台进行高通量测序。基于边合成边测序技术,测序平台产出原始数据。为保证后续分析的准确,需要对测序产出小黑瓢虫转录组数据进行质量控制。评估测序碱基质量值,并通过去除测序接头以及引物序列和过滤低质量值数据得到高质量clean data。最后,通过Trinity_r20131110软件对转录组数据进行de novo组装,获得unigene序列。Trinity软件首先将测序碱基打断为短片段(k-mer),然后将这些小片段延伸成长片段contig,并利用这些片段间的重叠,得到片段集合,最后利用De Bruijn图的方法和测序碱基信息,在各片段集合中识别转录本序列。其中contig的N50是将contig长度由大到小排列,当长度累加到所测基因总长的50%时的contig长度。N50值越大,表明测序质量越好。

1.2.3 Unigene功能注释及差异基因筛选

将1.2.2获得的unigene序列用BLAST 2.2.26软件与数据库Nr、COG、GO、KEGG和Swiss-Prot进行比对,得到组装后unigene的注释信息。利用每千个碱基的转录每百万映射读取的fragments(fragments per kilobase of transcript per million mapped reads, FPKM)计算基因表达量,对各组样品中的基因进行差异表达量分析。使用Benjamini-Hochberg方法筛选差异表达基因,以阈值错误发现率(false discovery rate,FDR)<0.01和倍数变化(fold change,FC)≥2为筛选标准。其中,FC表示两样品间表达量的比值。通过比对筛选,将在与非滞育期样品相比,滞育期样品上调且在滞育解除期样品下调的基因筛选为滞育关联基因,并提取其对应序列。

1.2.4 qRT-PCR验证滞育关联基因

根据转录组测得数据,筛选出8个滞育关联基因(1个下调基因LDH和7个上调基因ALP、CAT、POD、SOD、TRE、Ref和GDP-forming),利用qRT-PCR对8条基因在滞育过程中的表达进行验证,并通过qRT-PCR进行定量分析。每处理选取10头雌成虫,并进行3次生物学重复,3次技术性重复。分别选取小黑瓢虫非滞育雌成虫(ND)、滞育初期40 d雌成虫(D40)、滞育期60 d雌成虫(D60)、滞育后期80 d雌成虫(D80)和滞育40 d解除雌成虫(DT)。利用RNA提取试剂Trizol提取以上不同处理的总RNA,然后用第一链cDNA合成试剂盒AMV First Strand cDNA Synthesis Kit进行第一链cDNA合成。利用Primer Premier 5.0软件设计引物(表1),引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。采用

qRT-PCR 试剂盒 SG Fast qPCR Master Mix (High Rox) ($2\times$) 进行 qRT-PCR, 20 μL 反应体系: SybrGreen qPCR $2\times$ Master Mix 10 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物各 0.4 μL 、ddH₂O 7.2 μL 、cDNA 2 μL 。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 7 s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 退火 10 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s, 共 40 个循环。分析 60 $^{\circ}\text{C}$ 至 95 $^{\circ}\text{C}$ 的

熔融曲线, 以检测非特异性产物扩增。以 *I8S* 基因为内参基因(表 1)。根据荧光定量仪的检测结果, 得到扩增、熔解曲线进行分析, 根据检测基因的原始数据导出并应用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行分析, 得到验证基因在不同时间点样品中的相对表达量, 绘制验证基因的相对表达量图。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列
Table 1 Primer sequences for qRT-PCR

基因名称 Gene name	引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ Annealing temperature	产物长度/bp Amplicon length
<i>I8S</i>	18S-F	AATGTCTGCCTTATCAACTGTCG	58.9	117
	18S-R	TGGATGTGGTAGCCGTTCT	57.9	
<i>ALP</i>	ALP-F	TCAGAACCCGAGAACATACAG	58.1	66
	ALP-R	TGATTCCATTATGTCGGTGTCT	57.0	
<i>CAT</i>	CAT-F	CTGAGATGAGTCACTGGTTCC	58.4	128
	CAT-R	TTGGTGGGCAACAATACTCC	58.1	
<i>LDH</i>	LDH-F	AAATTAAGCGGCCTACCACA	57.8	167
	LDH-R	ACTCCAGACCATAACAGCGACA	57.8	
<i>POD</i>	POD-F	GCCAGAACTGACCTGACGAA	58.2	135
	POD-R	TGAACCAGATGGCAGTAGGC	58.3	
<i>SOD</i>	SOD-F	TCTGAGCAACCCCTCCAAT	57.4	140
	SOD-R	TCCTGATGTCGCCCTTTTC	58.1	
<i>TRE</i>	TRE-F	AAGATGGCAAGCAGTTGTAGA	57.2	155
	TRE-R	TTCCAACCTCGTTACCTTCGTC	57.1	
<i>Ref</i>	REF-F	GTTGGTGGTATGTTGGGAGG	57.3	146
	REF-R	AGGAGTTGGATGGAAGAAAGC	57.7	
<i>GDP-forming</i>	GDP-FORMING-F	CTCGTCCCCATTGTGCT	58.1	152
	GDP-FORMING-R	TCATCGCTGGTGTCTGC	57.3	

1.3 数据分析

试验数据采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 利用单因素方差对各基因表达量进行分析, 并采用最小显著差数(LSD)法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 Illumina 测序和 de novo 组装

利用 Illumina HiSeq 2500 平台, 对 3 个不同时期小黑瓢虫雌成虫进行了转录组测序分析, 结果显示, 非滞育、滞育和滞育解除样品共有 9 个库, 产生了 269 374 609 条原始数据。本试验总共获得 67.86 Gb 的 clean data, 各样品 clean data 均达到 6.39 Gb。共得到 116 106 条 transcript 和 936 447 条 contig, 其中 contig 平均长度为 95.84 bp, 长度在 200~300 bp 区间内的 contig 数量和百分比分别为 896 630 条和 95.75%。Contig 的 N50 为 230 bp(表 2)。

使用 de novo 组装了 1 条或多条 contig 后, 共产生了 52 255 条 unigene, 所得基因的平均长度为 782 bp。结果显示, 约 79.89% 的 unigene(41 745 条)在 200~1 000 bp 范围内, 进一步观察发现有 32 894 条 unigene 分布在 200~500 bp 区间内(图 1)。

2.2 Unigene 功能注释

将获得的 unigene 序列用 BLAST 软件与数据库 Nr、COG、GO、KEGG、KOG、Pfam 和 Swiss-Prot 进行比对, 结果显示被注释到的小黑瓢虫雌成虫 unigene 总序列数目为 25 617 条, 占总序列数的比例为 49.02%。所有的 unigene 都通过 BLAST 对 Nr 数据库进行了注释, 有 23 539 条 unigene 被匹配(表 3)。

2.3 差异表达基因 COG 分类

小黑瓢虫雌成虫的 10 293 条 unigene 被注释到 COG 分类中, 并被分类到 25 个 COG 类别中。在 COG 功能分类中, 占比例最大的类别就是一般功能

预测。其次功能分类分别是复制、重组和修复;转录;翻译、核糖体结构和生物发生;氨基酸的运输和

代谢;能源生产和转换;翻译后修饰、蛋白质周转、分子伴侣;碳水化合物转运和代谢等(图2)。

表2 小黑瓢虫雌成虫转录组测序的数据组装结果统计表

Table 2 Statistics of transcriptome assembly in female adults of *Delphastus catalinae*

不同长度区间 Length range/bp	Contig数量(百分比) No. of contigs (percentage)	Transcript数量 No. of transcripts
(200,300]	896 630(95.75%)	23 495(20.24%)
(300,500]	16 102(1.72%)	17 790(15.32%)
(500,1 000]	11 548(1.23%)	19 126(16.47%)
(1 000,2 000]	7 347(0.78%)	21 972(18.92%)
>2 000	4 820(0.51%)	33 723(29.05%)
总数 Total number	936 447	116 106
总长度 Total length/bp	89 748 969	188 883 168
N50长度 N50 length/bp	230	3 053
平均长度 Mean length/bp	95.84	1 626.82

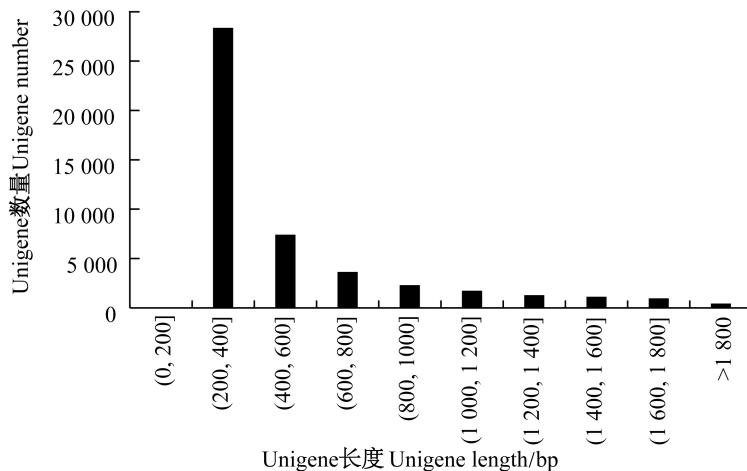


图1 小黑瓢虫雌成虫不同 unigene 长度的分布

Fig. 1 Distribution of different unigene lengths in female adults of *Delphastus catalinae*

表3 小黑瓢虫雌成虫转录组测序数据的 unigene 注释统计表

Table 3 Unigene annotation statistics of transcriptome sequencing data in female adults of *Delphastus catalinae*

各功能数据库 Database for annotation	注释 unigene 数 No. of annotated unigenes	注释≥300个碱基的 unigene 数 No. of annotated unigenes with≥300 bases	注释≥1 000个碱基的 unigene 数 No. of annotated unigenes with≥1 000 bases
Nr	23 539	18 984	9 417
COG	10 293	7 847	4 051
GO	9 980	7 977	4 571
KEGG	8 057	6 529	3 445
KOG	16 530	13 222	7 329
Pfam	17 254	14 337	8 031
Swiss-Prot	15 706	13 200	7 542
总数 Total	25 617	19 998	9 647

2.4 差异表达基因GO注释分析

差异表达基因GO注释分析结果显示,在生物学过程中,占比最大的是新陈代谢过程和细胞过程,而细胞杀伤是占比最少的类别;在分子功能中,占比最大的是催化活性和结合,受体调节剂活性、蛋白质标签和翻译调节剂活性是占比最少的类别;在细胞

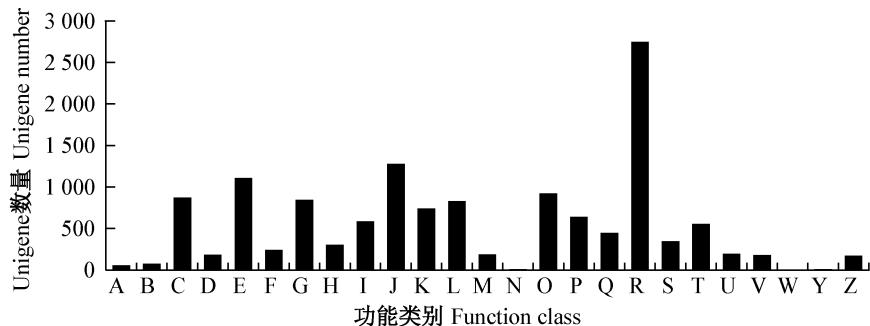
组分中,占比最大的是细胞部分和细胞,而病毒体部分是占比最少的类别(图3)。

2.5 差异表达基因KEGG通路

使用KEGG对获得的8 057条注释unigene进行分类,共5类,分别为细胞过程、有机体系统、环境信息处理、新陈代谢和遗传信息加工。滞育组小黑瓢

虫显著性富集的KEGG代谢通路共有116条,其中有571条注释的unigene被标识。其中,排名前6的通路依次是RNA转运通路(ko_ID:ko03013)、泛素介导的蛋白水解通路(ko_ID:ko04120)、剪接体通

路(ko_ID:ko03040)、氧化磷酸化通路(ko_ID:ko00190)、嘌呤代谢通路(ko_ID:ko00230)和内质网中的蛋白加工通路(ko_ID:ko04141)(图4)。



A: RNA 的加工和修饰; B: 染色质结构和动态; C: 能源生产和转换; D: 细胞周期控制、细胞分裂、染色体分化; E: 氨基酸的运输和代谢; F: 核苷酸的运输和代谢; G: 碳水化合物的运输和代谢; H: 辅酶的运输和代谢; I: 脂质的运输和代谢; J: 翻译、核糖体结构和生物生成; K: 转录; L: 复制、重组和修复; M: 细胞壁/膜/包膜的生物生成; N: 细胞运动; O: 翻译后修饰、蛋白质周转、伴侣蛋白; P: 无机离子的运输和代谢; Q: 次生代谢物的生物合成、运输和分解; R: 仅限一般功能预测; S: 功能未知; T: 信号转导机制; U: 细胞内贩运、分泌和囊泡运输; V: 防御机制; W: 细胞外结构; Y: 核结构; Z: 细胞骨架。A: RNA processing and modification; B: chromatin structure and dynamics; C: energy production and conversion; D: cell cycle control, cell division, chromosome partitioning; E: amino acid transport and metabolism; F: nucleotide transport and metabolism; G: carbohydrate transport and metabolism; H: coenzyme transport and metabolism; I: lipid transport and metabolism; J: translation, ribosomal structure and biogenesis; K: transcription; L: replication, recombination and repair; M: cell wall/membrane/envelope biogenesis; N: cell motility; O: posttranslational modification, protein turnover, chaperones; P: inorganic ion transport and metabolism; Q: secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism; R: general function prediction only; S: function unknown; T: signal transduction mechanisms; U: intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport; V: defense mechanisms; W: extracellular structures; Y: nuclear structure; Z: cytoskeleton.

图2 小黑瓢虫雌成虫转录组的COG功能分类

Fig. 2 Functional categories of the clusters of orthologous groups (COG) in the transcriptome of female adults of *Delphastus catalinae*

2.6 差异表达基因筛选

通过对unigene进行COG、GO和KEGG分析,发现在非滞育组和滞育组之间以及滞育解除组和滞育组之间分别有3 690条和4 662条差异表达基因(表4);分析3个不同时期小黑瓢虫雌成虫的差异表达基因发现,在滞育期中有1 937个上调基因,在滞育解除期中有2 639个下调基因,这2个部分基因有571个重叠基因(表4),因此从这些重叠基因中进一步筛选出滞育关联基因进行验证分析。

2.7 qRT-PCR验证滞育关联基因

熔解曲线显示,内参基因和8个滞育关联基因在60 °C至95 °C范围内具有特定峰,并且峰形相对均匀,并且未出现其他杂峰。样品中2对引物的扩增片段是特异性的,可用于实时荧光定量分析。

转录组测序结果显示,除了验证基因中的LDH

基因在滞育期间显著下调表达以外,其余的7个验证基因*ALP*、*GDP-forming*、*TRE*、*CAT*、*Ref*、*SOD*和*POD*都在滞育期间显著上调表达(图5)。具体表现为*ALP*、*GDP-forming*、*TRE*、*CAT*、*Ref*、*SOD*和*POD*基因的表达量在滞育样品中均最高,分别为其在非滞育样品中表达量的3.18倍、1.99倍、3.34倍、52.45倍、3.95倍、2.28倍和13.08倍,且分别为在滞育解除样品中表达量的2.28倍、1.71倍、3.08倍、4.50倍、2.64倍、1.40倍和2.78倍;而*LDH*基因的表达量在滞育样品中均最低,分别仅为在非滞育期和滞育解除期的雌成虫中表达量的26.04%和27.39%。此外,8个验证基因均表现为在非滞育和滞育解除样品之间无明显差异。虽然在滞育期基因表达含量最高的是*GDP-forming*基因,但是不同时期之间表达量变化最大的是*CAT*基因。

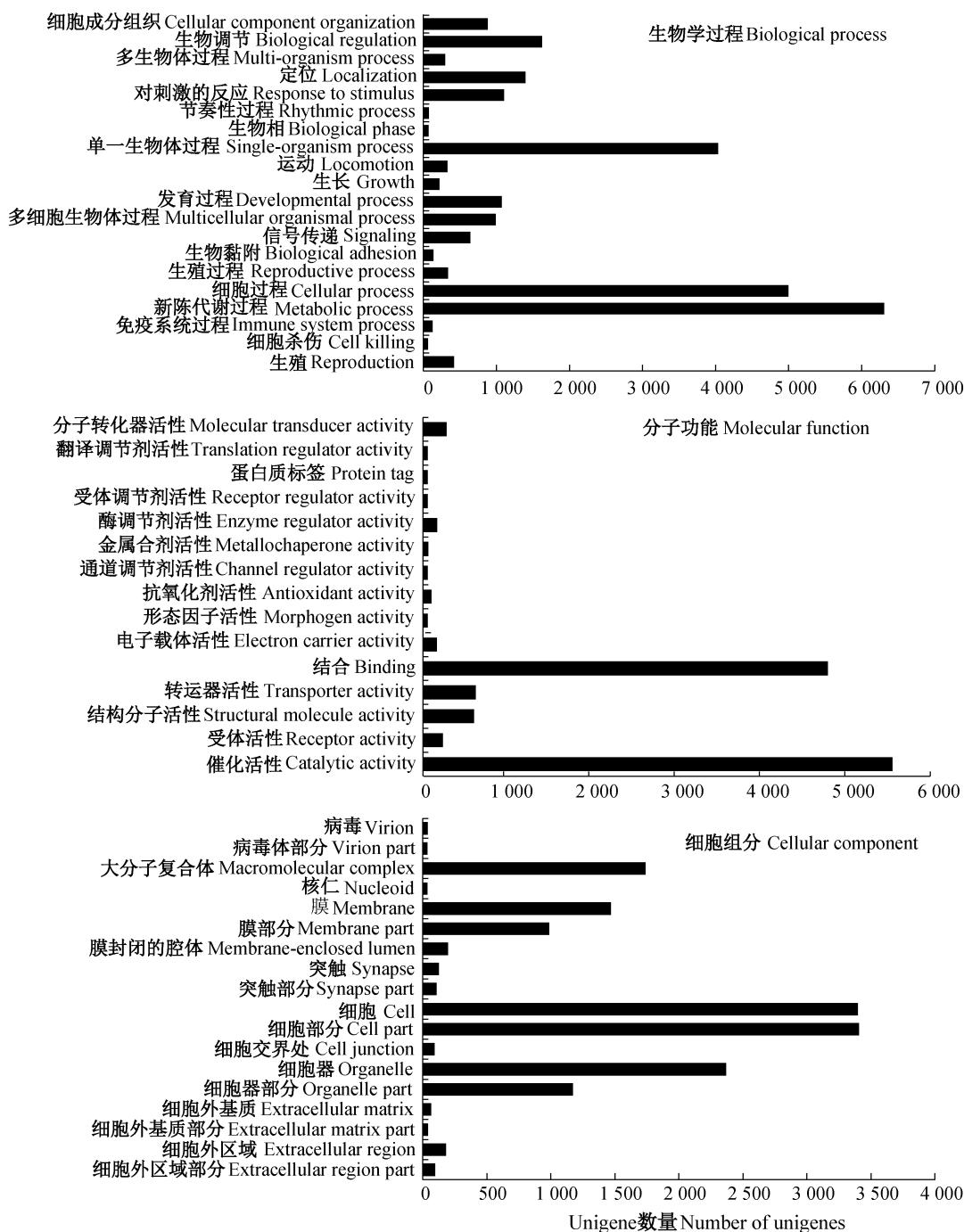


图3 小黑瓢虫雌成虫转录组的GO注释分析

Fig. 3 Gene ontology (GO) classifications of the transcriptome in female adults of *Delphastus catalinae*

对小黑瓢虫雌成虫5个不同时期的8个基因相对表达水平进行进一步分析,结果显示,在滞育第40天,*ALP*和*GDP-forming*基因量达到最高,在滞育第60天,*TRE*、*CAT*、*Ref*、*SOD*和*POD*基因的表达量均突然增加,并达到最高;但是滞育第80天,只有*LDH*基因表达量最低。具体表现为*ALP*和*GDP-forming*基因的表达量在滞育第40天分别是非滞育样品中基因表达量的19.15倍和16.26倍,且这2种基因在非滞育和滞育解除样品中的表达量没有显著

差异。*TRE*、*CAT*、*Ref*、*SOD*和*POD*基因的表达量在滞育第60天是非滞育样品中基因表达量的15.12倍、11.17倍、9.30倍、6.17倍和4.07倍,且这5种基因在非滞育样品和滞育解除样品中的表达量均无显著差异。*LDH*基因表达量在滞育第80天是非滞育样品中基因表达量的12.08%,且这些基因在非滞育样品和滞育解除样品中的表达量也无显著差异(图6)。综上所述,qRT-PCR的结果证实了小黑瓢虫雌成虫转录组测序的可靠性。

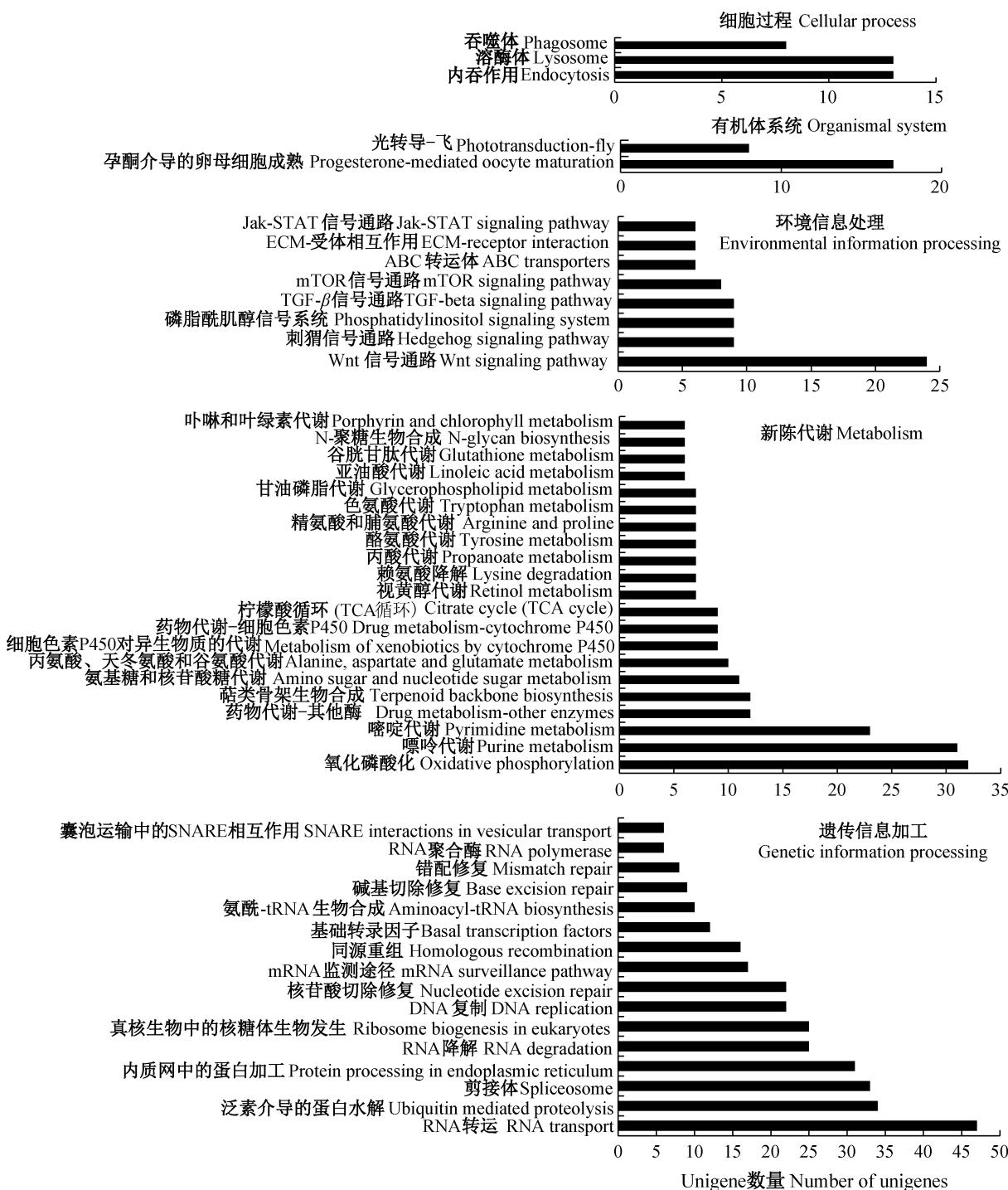


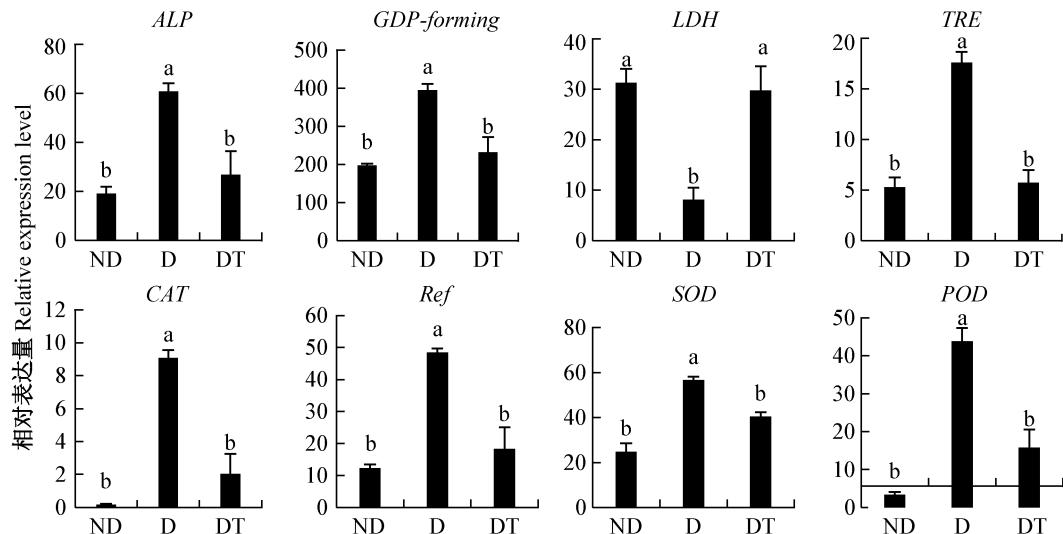
图4 小黑瓢虫雌成虫转录组差异表达基因的KEGG分类

Fig. 4 KEGG classification of the differentially expressed genes in female adults of *Delphastus catalinae*

表4 3个不同时期小黑瓢虫雌成虫的差异表达基因

Table 4 Differentially expressed genes during three different stages of female adults of *Delphastus catalinae*

样品间差异 Differentially expressed gene set	所有差异表达基因 All differentially expressed genes	上调基因 Up-regulated		下调基因 Down-regulated	
		上调基因 Up-regulated	下调基因 Down-regulated	上调基因 Up-regulated	下调基因 Down-regulated
非滞育期 vs 滞育解除期 Non-diapause vs termination of diapause	2	1	1		
非滞育期 vs 滞育期 Non-diapause vs diapause	3 690	1 937	1 753		
滞育解除期 vs 滞育期 Termination of diapause vs diapause	4 662	2 639	2 023		

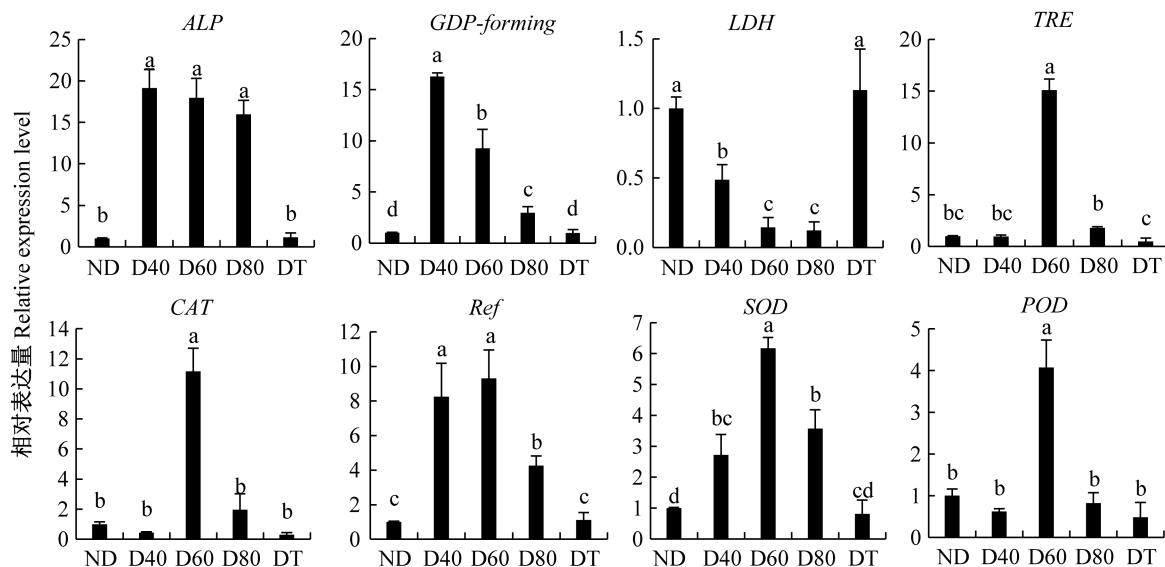


ND、D 和 DT: 非滞育期、滞育期和滞育解除期。ND, D and DT indicate the non-diapause, diapause and diapause-termination stages, respectively.

图5 3个不同时期小黑瓢虫雌成虫滞育关联基因转录组测序结果

Fig. 5 Transcriptome sequencing results of diapause-related genes in three different stages of female adults of *Delphastus catalinae*

图中数据均为平均数±标准差。柱上不同字母表示经 LSD 法检验差异显著 ($P < 0.05$)。Data are mean±SD. Different letters on the bars indicate significant difference by LSD test ($P < 0.05$).



ND、D40、D60、D80 和 DT 分别为非滞育, 滞育 40、60、80 和滞育解除。ND, D40, D60, D80, and DT indicate non-diapause, diapause 40, 60, 80 d and termination of diapause, respectively.

图6 3个不同时期小黑瓢虫雌成虫滞育关联基因的相对表达水平

Fig. 6 Relative expression levels of diapause-related genes in three different stages of female adults of *D. catalinae*.

图中数据均为平均数±标准差。柱上不同字母表示经 LSD 法检验差异显著 ($P < 0.05$)。Data are mean±SD. Different letters on the bars indicate significant difference by LSD test ($P < 0.05$).

3 讨论

滞育是昆虫适应环境的一种表现, 可发生于昆虫生长发育的各个阶段(Denlinger, 2002), 如松毛虫赤眼蜂 *Trichogramma dendrolimi* 从卵期到预蛹初期均可进入滞育, 其中以幼虫中期的诱导效果最佳(张

俊杰等, 2018), 茶足柄瘤蚜茧蜂 *Lysiphlebus testaceipes* 以蛹进入滞育(刘敏等, 2020)。小黑瓢虫以成虫进入滞育状态且属于短日照型, 在 11 °C 和光周期 8 L:16 D 诱导 40 d, 成虫进入稳定的滞育状态(孟佳和黄建, 2021)。本研究采用整头小黑瓢虫进行转

录组测序,选定11℃和光周期8 L:16 D诱导40 d后仍未产卵的雌成虫作为转录组测序的滞育组样品。对非滞育期、滞育期和滞育解除期小黑瓢虫雌成虫的取样主要依赖对温度和光周期处理的调控,在处理过程中引入的温差可能诱发基因差异表达,从而影响结果的分析和验证。因此,目前对于取样可能导致的基因表达差异还不能避免,期待在今后的研究中可以采取相对精准的方法进行解决。

转录组技术促进了昆虫滞育相关基因的研究,为揭示昆虫的生命活动提供理论基础(Poelchau et al., 2011; Dong et al., 2014; Kumar et al., 2014), Qi et al.(2015)对七星瓢虫北京种群的测序揭示了滞育的分子机制并筛选出滞育相关基因,如TRE基因,鉴定了443个差异表达基因;对差异表达基因进行GO功能和KEGG途径富集,结果表明RNA定向DNA聚合酶活性和脂肪酸代谢受到显著影响;本研究通过qRT-PCR验证了8个基因相对表达量与转录组测序结果一致。Hao et al.(2019)对飞蝗 *Locusta migratoria* 的测序鉴定了137个差异表达基因;通过qRT-PCR证实了24个基因表达谱与转录组测序结果一致;并通过RNA干扰技术验证了维甲酸诱导蛋白基因和叉头转录因子的功能。Jarwar et al.(2019)在长和短光周期条件下对飞蝗的中枢神经系统进行转录组学分析,发现了与滞育诱导的母代效应相关的基因,获得610个差异表达基因;通过qRT-PCR验证了12个基因mRNA表达水平与转录组分析结果一致;并通过RNA干扰技术验证了与昼夜节律有关的抽头基因,可能抑制了短光周期条件下的滞育诱导。本研究通过对小黑瓢虫雌成虫的转录组进行测序,发现了571个差异表达基因,涉及116条KEGG富集通路,利用qRT-PCR检测8个基因的表达情况,结果与转录组测序分析结果的变化趋势一致,未来可在结合qRT-PCR和RNA干扰方法的基础上再加上气相色谱法来分析与代谢相关的基因,掌握与滞育代谢相关基因的功能机制。大多数昆虫转录组测序得到的注释基因多与代谢、细胞、催化活性功能及通路相关(郭娜等,2021),这与本研究发现的小黑瓢虫差异表达基因的功能富集结果相似。由于缺乏对基因功能的掌握和相关特征信息的分析,本研究利用转录组技术对小黑瓢虫测序得到了仅占总数49.02%的注释unigene,然后从中筛选滞育相关基因并验证其功能,以揭示小黑瓢虫滞育调控的分子机理,如果取得更多的注释unigene,将更有利于阐明小黑瓢虫滞育的分子机理及其对环境的适应机制。

目前,昆虫滞育分子机制尤其是调控相关机制

的研究还面临诸多挑战。即使同一基因,在不同滞育类型或同种滞育类型的不同昆虫中的功能也存在差异,特定基因在滞育中的作用和机制还需进一步研究。本试验对滞育分子机制的初步研究不仅对明确小黑瓢虫的环境适应机制有重要理论意义,而且在粉虱害虫防控中也具有重要参考价值。通过人为诱导小黑瓢虫滞育,可以低温保存延长货架期,提高其抗逆性和繁殖力,也有助于规模化扩繁,同时还可以延长有效防控时间,更好地服务于粉虱害虫的生物防治。

参 考 文 献 (References)

- Altincicek B, Elashry A, Guz N, Grundler FMW, Vilcinskas A, Dehne HW. 2013. Next generation sequencing based transcriptome analysis of septic-injury responsive genes in the beetle *Tribolium castaneum*. PLoS ONE, 8(1): e52004
- Ansorge WJ. 2009. Next-generation DNA sequencing techniques. New Biotechnology, 25(4): 195–203
- Denlinger DL. 2002. Regulation of diapause. Annual Review of Entomology, 47(1): 93–122
- Denlinger DL, Armbruster PA. 2014. Mosquito diapause. Annual Review of Entomology, 59(1): 73–93
- Dong YC, Desneux N, Lei CL, Niu CY. 2014. Transcriptome characterization analysis of *Bactrocera minax* and new insights into its pupal diapause development with gene expression analysis. International Journal of Biological Sciences, 10(9): 1051–1063
- Etebari K, Palfreyman RW, Schlipalius D, Nielsen LK, Glatz RV, Asgari S. 2011. Deep sequencing-based transcriptome analysis of *Plutella xylostella* larvae parasitized by *Diadegma semiclausum*. BMC Genomics, 12(1): 446
- Fu JW, Huang J, Yao XR, Liu BY. 1999. Morphological and biological characteristics of ladybird. Entomological Journal of East China, 8(1): 85–89 (in Chinese) [傅建炜, 黄建, 姚向荣, 刘冰妍. 1999. 小黑瓢虫形态特征及生物学特性观察. 华东昆虫学报, 8(1): 85–89]
- Fullwood MJ, Wei CL, Liu ET, Ruan YJ. 2009. Next-generation DNA sequencing of paired-end tags (PET) for transcriptome and genome analyses. Genome Research, 19(4): 521–532
- Guo N, Yan F, Han HB, Gao SJ, Dong RW, Hu ZH. 2021. Transcriptomic analysis of phase change-associated genes in grasshopper *Oedaleus asiaticus*. Journal of Plant Protection, 48(1): 136–143 (in Chinese) [郭娜, 闫峰, 韩海斌, 高书晶, 董瑞文, 胡哲华. 2021. 亚洲小车蝗型变关联基因的转录组学分析. 植物保护学报, 48(1): 136–143]
- Hahn DA, Denlinger DL. 2007. Meeting the energetic demands of insect diapause: nutrient storage and utilization. Journal of Insect Physiology, 53(8): 760–773
- Hao K, Jarwar AR, Ullah H, Tu XB, Nong XQ, Zhang ZH. 2019. Transcriptome sequencing reveals potential mechanisms of the maternal effect on egg diapause induction of *Locusta migratoria*. International Journal of Molecular Sciences, 20(8): 1974
- Heinz KM, Brazzle JR, Parrella MP, Pickett CH. 1999. Field evaluations of augmentative releases of *Delphastus catalinae* (Horn)

- (Coleoptera: Coccinellidae) for suppression of *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (Homoptera: Aleyrodidae) infesting cotton. *Biological Control*, 16(3): 241–251
- Hodek I. 1996. Diapause development, diapause termination and the end of diapause. *European Journal of Entomology*, 93(3): 475–487
- Hoelmer KA, Osborne LS, Yokomi RK. 1993. Reproduction and feeding behavior of *Delphastus pusillus* (Coleoptera: Coccinellidae), a predator of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Biological and Microbial Control*, 86(2): 322–329
- Huang J, Xu LY, Fu JW. 1998. Commercialization of natural enemy products abroad and introduction of *Delphastus pusillus* (LeConte) (Coleoptera: Coccinellidae) into China. *Entomological Journal of Biosafety*, 7(1): 101–104 (in Chinese) [黄建, 徐离永, 傅建炜. 1998. 国外害虫天敌产品的商品化及小黑瓢虫的引种利用. 生物安全学报, 7(1): 101–104]
- Ikeda M, Su ZH, Saito H, Imai K, Sato Y, Isob M, Yamashita O. 1993. Induction of embryonic diapause and stimulation of ovary trehalase activity in the silkworm, *Bombyx mori*, by synthetic diapause hormone. *Journal of Insect Physiology*, 39(10): 889–895
- Jarwar AR, Hao K, Bitume EV, Ullah H, Cui DN, Nong XQ, Wang GJ, Tu XB, Zhang ZH. 2019. Comparative transcriptomic analysis reveals molecular profiles of central nervous system in maternal diapause induction of *Locusta migratoria*. *G3*, 9(10): 3287–3296
- Koštál V. 2006. Eco-physiological phases of insect diapause. *Journal of Insect Physiology*, 52(2): 113–127
- Kumar A, Congiu L, Lindström L, Piironen S, Vidotto M, Grapputo A. 2014. Sequencing, *de novo* assembly and annotation of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, transcriptome. *PLoS ONE*, 9(1): e86012
- Kumar V, Mehra L, Mckenzie CL, Osborne LS. 2020. Functional response and prey stage preference of *Delphastus catalinae* and *D. pallidus* (Coleoptera: Coccinellidae) on *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Biocontrol Science and Technology*, 30(6): 581–591
- Lee DH, Nyrop JP, Sanderson JP. 2014. Non-consumptive effects of the predatory beetle *Delphastus catalinae* (Coleoptera: Coccinellidae) on habitat use patterns of adult whitefly *Bemisia argentifolii* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Applied Entomology and Zoology*, 49(4): 599–606
- Liu M, Liu AP, Han HB, Sun CP, Huang HG, Chen GZ. 2020. Diapause induction and cold storage of parasitoid *Lysiphlebus testaceipes* in mummified aphids. *Journal of Plant Protection*, 47(5): 1071–1077 (in Chinese) [刘敏, 刘爱萍, 韩海斌, 孙程鹏, 黄海广, 陈国泽. 2020. 茶足柄瘤蚜茧蜂的滞育诱导及其寄生苜蓿蚜僵蚜的低温贮藏. 植物保护学报, 47(5): 1071–1077]
- Lucas É, Labrecque C, Coderre D. 2010. *Delphastus catalinae* and *Coleomegilla maculata lengi* (Coleoptera: Coccinellidae) as biological control agents of the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). Pest Management Science, 60(11): 1073–1078
- Meng J, Huang J. 2021. Effect of temperature and photoperiod on diapause regulation of *Delphastus catalinae* (Horn). *Chinese Journal of Biological Control*, 37(5): 927–935 (in Chinese) [孟佳, 黄建. 2021. 温度和光周期对小黑瓢虫滞育的调节作用. 中国生物防治学报, 37(5): 927–935]
- Poelchau MF, Reynolds JA, Denlinger DL, Elsik CG, Armbtster PA. 2011. A *de novo* transcriptome of the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*, to identify candidate transcripts for diapause preparation. *BMC Genomics*, 12(1): 619
- Qi XY, Zhang LS, Han YH, Ren XY, Huang J, Chen HY. 2015. *De novo* transcriptome sequencing and analysis of *Coccinella septempunctata* L. in non-diapause, diapause and diapause-terminated states to identify diapause-associated genes. *BMC Genomics*, 16: 1086
- Simmons AM, Legaspi JC, Legaspi BC. 2008. Responses of *Delphastus catalinae* (Coleoptera: Coccinellidae), a predator of whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae), to relative humidity: oviposition, hatch, and immature survival. *Annals of the Entomological Society of America*, 101(2): 378–383
- Tang LD, Wang XM, Jin FL, Qiu BL, Wu JH, Ren SX. 2014. *De novo* sequencing-based transcriptome and digital gene expression analysis reveals insecticide resistance-relevant genes in *Propylaea japonica* (Thunberg) (Coleoptera: Coccinellidae). *PLoS ONE*, 9(6): e100946
- Tatar M, Yin CM. 2001. Slow aging during insect reproductive diapause: why butterflies, grasshoppers and flies are like worms. *Experimental Gerontology*, 36(4): 723–738
- Tauber MJ, Tauber CA. 1976. Insect seasonality: diapause maintenance, termination, and post-diapause development. *Annual Review of Entomology*, 21(1): 81–107
- Wang W, Zhang LS, Chen HY, Li YY, Zhang J. 2011. Research progress of ladybug diapause. *Plant Protection*, 37(5): 27–33 (in Chinese) [王伟, 张礼生, 陈红印, 李玉艳, 张洁. 2011. 瓢虫滞育的研究进展. 植物保护, 37(5): 27–33]
- Zhang LS, Liu TX. 2007. Intraguild interactions between an oligophagous predator, *Delphastus catalinae* (Coleoptera: Coccinellidae), and a parasitoid, *Encarsia sophia* (Hymenoptera: Aphelinidae), of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Biological Control*, 41(1): 142–150
- Zhang JJ, Zhang X, Du WM, Ruan CH, Zang LS, Ren BZ. 2018. Effects of inducing initial stage, temperature and period on diapause induction and diapause termination of *Trichogramma dendrolimi*. *Journal of Plant Protection*, 45(6): 1308–1313 (in Chinese) [张俊杰, 张雪, 杜文梅, 阮长春, 阮连生, 任炳忠. 2018. 诱导始期、温度和历期对松毛虫赤眼蜂滞育诱导及解除滞育的影响. 植物保护学报, 45(6): 1308–1313]
- Zhang YH, Jiang RX, Wu HS, Liu P, Xie JQ, He Y, Pang H. 2012. Next-generation sequencing-based transcriptome analysis of *Cryptolaemus montrouzieri* under insecticide stress reveals resistance-relevant genes in ladybirds. *Genomics*, 100(1): 35–41
- Zhao ZY, Wu GQ, Wang J, Liu CL, Qiu LH. 2013. Next-generation sequencing-based transcriptome analysis of *Helicoverpa armigera* larvae immune-primed with *Photorhabdus luminescens* TT01. *PLoS ONE*, 8(11): e80146
- Zhu JY, Zhao N, Yang B. 2012. Global transcriptome profiling of the pine shoot beetle, *Tomicus yunnanensis* (Coleoptera: Scolytinae). *PLoS ONE*, 7(2): e32291

(责任编辑:王璇)