



覃英灿, 容万韬, 李月妹, 陆桂红, 李晓东. 眼优角蚱两性成体转录组差异分析 [J]. 环境昆虫学报, 2022, 44 (4): 968–977.

眼优角蚱两性成体转录组差异分析

覃英灿, 容万韬, 李月妹, 陆桂红, 李晓东*

(河池学院化学与生物工程学院, 广西宜州 546300)

摘要: 为了解蚱类昆虫两性间基因转录水平上的整体差异, 本研究以眼优角蚱 *Eucriotettix oculatus* 为研究对象, 通过高通量转录组 (RNA-Seq) 测序和分析技术对其雌、雄成体的转录组进行了测定和分析。结果显示, 在雌、雄转录组中共获得 13 432 条转录本, 两性间差异表达基因共 3 597 个, 其中雌性相对于雄性显著上调基因 1 295 个, 显著下调基因 2 302 个。对其中 9 个差异基因进行实时荧光定量 PCR 验证, 其结果与 RNA-Seq 分析一致。差异基因显著富集的 GO 条目大多是与细胞的形成有关, 结合、细胞组分和细胞过程等条目相关基因显著高表达。KEGG 富集显示差异基因主要是与性腺发育、遗传信息加工、能量代谢和消化等通路有关。研究结果对从分子水平进一步研究眼优角蚱两性差异提供一定的理论基础。

关键词: 眼优角蚱; 转录组; 雌雄差异; 昆虫

中图分类号: Q963; S433

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2022) 04-0968-10

Differential analysis of female and male transcriptome in *Eucriotettix oculatus*

QIN Ying-Can, RONG Wan-Tao, LI Yue-Mei, LU Gui-Hong, LI Xiao-Dong* (College of Chemistry and Bioengineering, Hechi University, Zhuang Autonomous Region, Yizhou 546300, Guangxi Province, China)

Abstract: In order to understand the overall differences in gene transcription between the sexes of pygmy grasshoppers, *Eucriotettix oculatus* was determined and analyzed by high-throughput transcription group (RNA-Seq) sequencing and analysis techniques. The results showed that 13 432 transcriptions were obtained in females and males, and a total of 3 597 genes were differentially expressed between the sexes, of which 1 295 genes were significantly up-regulated and 2 302 genes were significantly down regulated in females compared with males. Real-time fluorescence quantitative PCR validation for nine of the different genes was consistent with RNA-Seq analysis. Most of the GO entries with significantly enrichment of differential genes were related to cell formation, and the genes related to binding, cellular component and cellular processes were significantly overexpressed. KEGG enrichment showed that differential genes were mainly related to pathways such as gonad development, genetic information processing, energy metabolism, and digestion. The results provided a theoretical basis for further study on the gender differences of *E. oculatus* at the molecular level.

Key words: *Eucriotettix oculatus*; transcriptome; sexual dimorphism; insect

基金项目: 国家自然科学基金 (31702049); 广西高等学校千名中青年骨干教师培育计划 (201912); 广西自然科学基金 (2020GXNSFAA159116); 广西壮族自治区大学生创新创业训练计划项目 (S202110605084)

作者简介: 覃英灿, 女, 1999 年生, 广西大化人, 本科, E-mail: qin_yingcan_753@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence: 李晓东, 博士, 教授, 研究方向为昆虫生态学, E-mail: lxdong_627@163.com

收稿日期 Received: 2021-05-27; 接受日期 Accepted: 2021-09-26

蚱类昆虫在分类上属于直翅目 Orthoptera 蝗亚目 Caelifera 蚱总科 Tetrigoidea, 由于其背板呈菱形, 旧称菱蝗。蚱类昆虫为不完全变态昆虫, 在整个昆虫纲中属于较为原始的类群, 约在 2.2 亿年前, 由一个共同祖先进化而来 (Song *et al.*, 2015)。大多数种类分布于热带和亚热带, 是生物多样性和动物区系的重要组成部分, 世界已知 9 科 270 属 1 880 多种, 我国已知 7 科 57 属 788 种, 占世界三分之一多 (邓维安, 2016)。由于蚱类昆虫既不是益虫也不是害虫, 所以国内外对蚱类昆虫的研究不多, 主要集中在分类学方面, 其它方面较少。但近年来发现, 由于蚱类昆虫多以苔藓、地衣或腐殖质为食, 属地栖昆虫, 运动能力不强, 与环境特征联系紧密, 可以作为重要的生态指示物种 (邓维安等, 2007; Tsurui *et al.*, 2010; Wennersten *et al.*, 2012)。因此有必要采用新的研究技术, 对这一古老的类群进行多方面的研究, 以挖掘该类群的科学和应用方面的研究价值。

眼优角蚱 *Eucrotettix oculatus* 属于刺翼蚱科 Scelimenidae 优角蚱属 *Eucrotettix*, 广泛分布于中国南部各省及南亚地区, 属于蚱类中的广布和常见种类 (郑哲民, 2005), 具有代表性。本研究基于转录组高通量测序技术, 对眼优角蚱 *E. oculatus* 雌雄两性虫体之间的转录差异进行研究, 以从转录组层面了解蚱总科昆虫雌雄分化的分子基础, 为昆虫分子生物学、发育生物学和进化生物学提供一定的基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料准备

为了尽可能避免不同环境因素和发育时期引起的雌、雄虫之间转录组的差异, 本研究所用的眼优角蚱是 2019 年 6-7 月分别在广西河池市宜州区和南丹县不同地点采集的雌性和雄性成虫带回实验室交配产卵后, 取其卵块在昆虫饲养室中孵化并在稳定的环境条件下从 1 龄饲养到成虫后收集的进入成虫期时间相近的雌、雄成虫样品。雌虫样品组 (编号 AF) 由 9 个生物学重复样品 (编号为 AF1-AF9) 组成, 且每个生物学重复样品均由 3 头雌虫组成。雄虫样品组 (编号 AM) 也是由 9 个生物学重复样品 (编号为 AM1-AM9) 组成, 每个样品也由 3 头雄虫组成。所有样品均为活虫

经 48 h 饥饿后用液氮冻存。

1.2 转录组测序

使用 QIAGEN 动物组织 RNA 提取试剂盒提取各样品总 RNA 并构建 cDNA 文库, 然后基于 Illumina 技术测序平台, 采用双末端测序 (Pair-End) 法, 完成 18 个样品二代转录组测序分析。

1.3 基因差异表达分析

本研究测定的所有二代转录组数据与本实验室前期已测定的眼优角蚱三代转录组数据 (由卵和各龄期雌、雄虫所组成的混合样品经 Pacbio Sequel II 技术测序平台利用单分子实时测序法获得的三代数据, 编号为 EO) 联合分析。首先使用二代转录组数据对三代转录组数据进行转录本的校正, 然后利用 CD-HIT 软件 (Fu *et al.*, 2012) 对校正后的 consensus 序列进行去冗余, 接着对去冗余的序列基于 Nr (Li *et al.*, 2002), Nt, Pfam (Finn *et al.*, 2008), KOG/COG (Tatusov *et al.*, 2003), Swiss-prot (Amos *et al.*, 2000), KEGG (Kanehisa *et al.*, 2004), GO (Ashburner *et al.*, 2000) 共 7 种数据库进行基因功能注释。同时以去冗余后得到的转录本作为基因的参考序列 (ref), 将 Illumina 测序得到的二代转录组测序数据中每个样品的 clean reads 比对到 ref 上。利用 RSEM 软件 (Li *et al.*, 2011) 对比对结果进行统计, 进一步得到每个样品比对到每个基因上的 readcount 值, 并对其进行 FPKM 转换。基于基因表达的 RPKM 值, 使用 DEseq 差异表达基因鉴定程序计算 AF 和 AM 样品组之间表达量不同的基因。差异基因筛选标准为 $|\log_2(\text{FoldChange})| > 0$ 和 $q\text{value} < 0.05$ 。

1.4 差异基因表达的 GO 和 KEGG 分析

采用 Goseq (Young *et al.*, 2010) 和 KOBAS 软件 (Chen *et al.*, 2011) 对差异基因集进行 GO 功能富集分析, KEGG 通路富集分析。富集分析基于超几何分布原理, 其中差异基因集为差异显著分析所得差异基因并注释到 GO 或 KEGG 数据库的基因集, 背景基因集为所有进行差异显著分析的基因并注释到 GO 或 KEGG 数据库的基因集。富集分析结果是对差异比较组合的所有差异基因集、上调基因集、下调基因集进行富集。

1.5 实时荧光定量 PCR 验证

从眼优角蚱雌性和雄性转录组中筛选出的差异表达基因中随机挑取 9 个, 以 $\beta\text{-actin}$ 作为内参基因, 采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 的方法

对转录组的准确性进行验证 (验证样品与转录组测序样品一致), 验证基因和对应的引物序列见表 1。使用反转录试剂盒将总 RNA 反转录合成 cDNA, 反转录体系为 40 μL (冰上配制): 5 \times PrimeScript^{RT} Master Mix (Perfect Real-time) 8 μL 和 RNA 模板 2 000 ng, 最后加入 RNase-free dH₂O 补全至 40 μL 。反应条件为: 37°C 15 min, 85°C 5 s,

置于 4°C 冰箱保存。采用 ChamQ™ SYBR[®] qPCR Master Mix 染料试剂盒进行实时荧光定量 PCR 扩增, PCR 反应体系 20 μL : SYBR Premix Ex Taq (2 \times) 10 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 上、下游引物各 1 μL , cDNA 模板 2 μL , ddH₂O 补全至 20 μL 。PCR 反应程序为: 95°C 预变性 30 s; 95°C 变性 5 s, 60°C 退火 34 s, 40 个循环。

表 1 实时荧光定量引物
Table 1 Primer sequences for Real-time quantitative PCR

基因 Genes	引物序列 Primer sequences (5'-3')	产物长度 (bp) Product size
β -肌动蛋白 <i>β-actin</i>	F: AAGTTGCTGCTCTCGTAGTCG R: ATGCCGTGTTCAATGGGATA	214
谷氨酸脱氢酶 <i>gdhA</i>	F: AACAGGGTCCACGGGATTCT R: TTCGCGCTTTGACTGGTAGC	151
卵黄蛋白原受体 <i>VgR</i>	F: GATGGAAAGGACCAGCGTA R: CCAAACCTGTGTCTAGTAGTAAGC	106
卵黄蛋白原 2 <i>VG2</i>	F: CCACACGCTGGATTACAGAG R: TGTGTGTGTAGACATCACCATTTTC	233
胰蛋白酶 <i>PRSSI_2_3</i>	F: CTGATGACAGCGACGCCTAT R: GCACTCGGAGAAGTCAACCA	204
α -微管蛋白 <i>TUBA</i>	F: ATTATCAACCTCTACCGCTG R: CAACATTGCCAAATCCTCTCT	218
丙酮酸激酶同工酶 R/L <i>PKLR</i>	F: GCTAAAGATGTAAATCCACCAGA R: CGAAGACAAGTAATGTGACAAGAA	246
泛素结合酶 E20 <i>UBE2O</i>	F: GCAGCACCCAACAGTCACAA R: GGAAGAGAAGTCCGAAGCAAT	110
碳酸酐酶 <i>CA</i>	F: ATGAACCTCGCCTTTGATGC R: GTAATGTGCGCCAACGAATGT	105
围脂滴蛋白 2 <i>PLIN2</i>	F: TTCAGAACCCTTCAGTCAGCC R: GAAATCAGGAATCCAGCCC	203

2 结果与分析

2.1 转录本校正和去冗余

通过本研究测定的二代转录组数据对三代转录组数据校正后, 三代 consensus 的碱基数目有所提升, 其它指标基本无变化 (表 2), 说明眼优角蚱转录组二代和三代数据整体质量较高。进一步按照序列之间 95% 的相似性对校正后的转录本序

列进行聚类去冗余, 最终得到 13 432 条 transcripts, 总长度 26 977 000 bp, 平均长度 2 009 bp, 最大长度 8 297 bp, N50 长度远大于 1 000 bp (表 3), 说明测序效果较好, 可以进行后续分析。

2.2 基因功能注释

对去冗余之后的序列进行基因功能注释, 通过七大数据库共有 12 074 条 transcripts 被注释, 占整个 transcripts 的 90%, 未成功注释的 transcripts 仅占比 10%, 说明注释成功率比较高 (图 1)。对

表 2 转录本校正前后长度分布统计表

Table 2 Statistical table of length distribution of transcripts before and after correction

样品 Sample	类型 Type	碱基数 Total_ nucleotides	序列数 Total_ number	平均长度 Mean_ length	最小长度 Min_ length	最大长度 Max_ length	不小于总长 50% 的序列长度 N50	不小于总长 90% 的序列长度 N90
编号 EO	校正前 Before_correct	40 137 865	21 726	1 848	124	8 296	2 286	999
编号 EO	校正后 After_correct	40 141 805	21 726	1 848	124	8 297	2 286	999

表 3 去冗余后序列长度分布统计表

Table 3 Statistical table of sequence length distribution after de-redundancy

样品 Sample	碱基数 Total_ nucleotides	转录本数目 Total_ number	平均长度 Mean_ length	最小长度 Min_ length	最大长度 Max_ length	不小于总长 50% 的转录本长度 N50	不小于总长 90% 的转录本长度 N90
编号 EO	26 977 000	13 432	2 009	238	8 297	2 490	1 111

NR 数据库所获得的基因注释与已公布的基因组信息的物种进行匹配, 其中被匹配最多的物种有 20 个 (图 2), 分别是内华达古白蚁 *Zootermopsis nevadensis*、亚利桑那沫蝉 *Clastoptera arizonana*、飞蝗 *Locusta migratoria*、麦茎蜂 *Cephus cinctus*、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 等皆为昆虫纲物种, 因此可证明本研究转录组注释结果的可靠性。

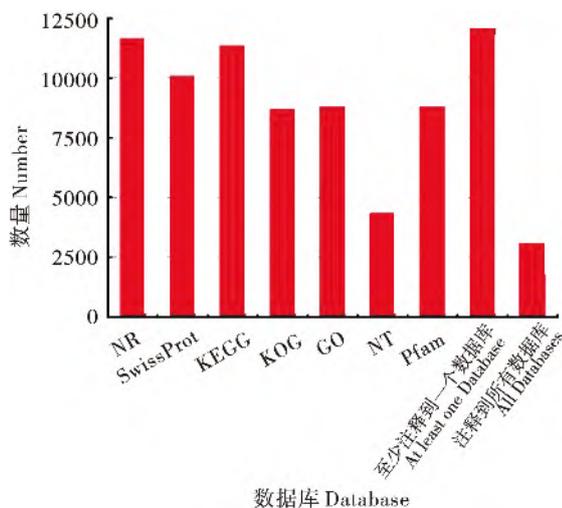


图 1 七大数据库注释结果统计图

Fig. 1 Statistical chart of annotation results of seven databases

2.3 差异表达基因筛选

为了获得雌性和雄性眼优角蚱的表达量不同的基因, 运用 FPKM 法对雌性组 (AF) 和雄性组

(AM) 的 transcripts 进行分析, 共获得两者之间的差异表达基因 3 597 个, 其中雌性组 (AF) 相对于雄性组 (AM), 共获得 1 295 个显著上调基因, 获得 2 302 个显著下调基因 (图 3)。

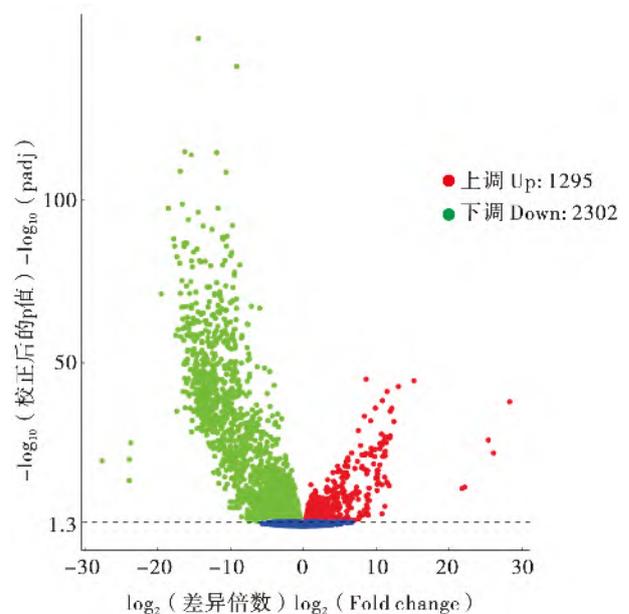


图 3 眼优角蚱雌性与雄性间差异表达基因的比较

Fig. 3 Comparison of differential expressed genes between male and female *Eucrietettix oculatus*

2.4 差异表达基因 GO 富集结果

对差异表达基因进行 GO 功能分析可以了解差

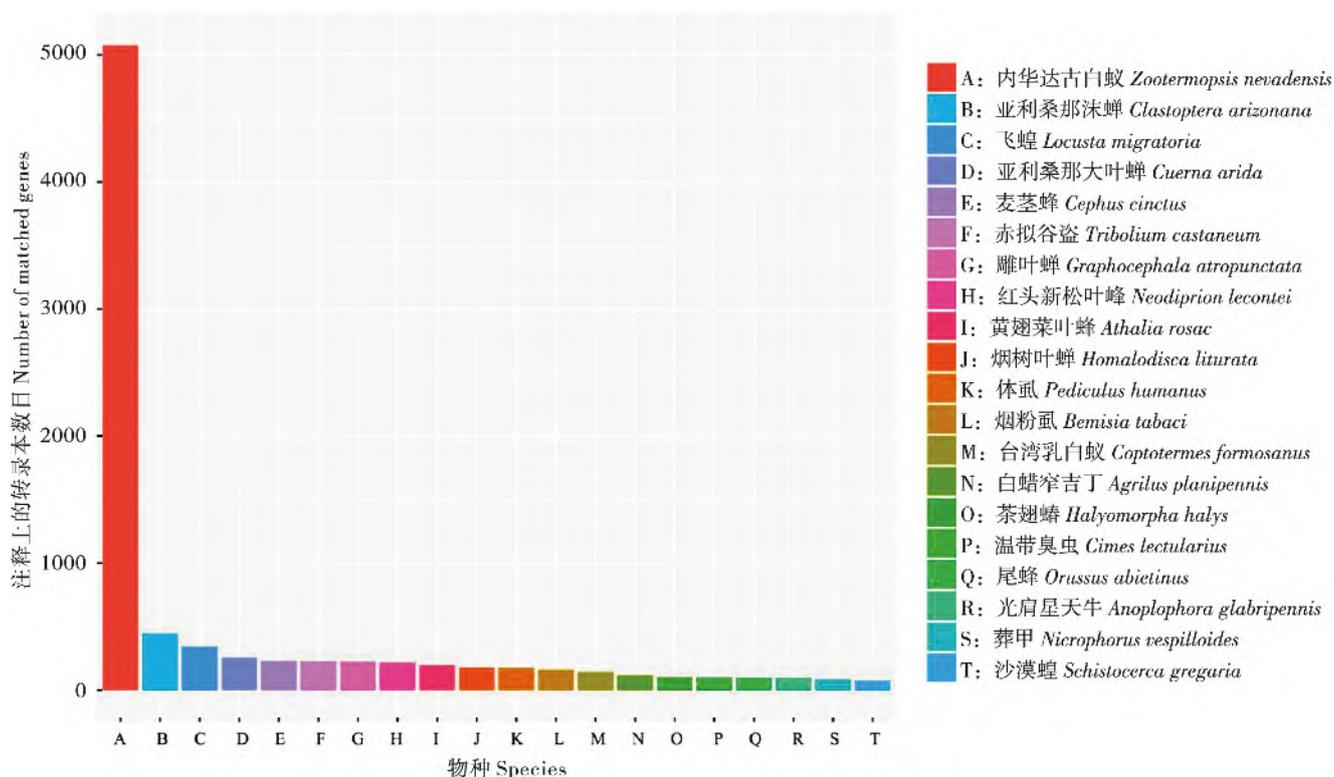


图2 Nr数据库物种注释统计图

Fig. 2 Statistical chart of species annotation in NR database

异表达基因的生物学意义。差异表达基因 GO 功能分类显示, 共有 2 344 条 transcripts 被 GO 注释, 并被显著富集到生物学过程 (Biological process)、细胞组分 (Cellular component) 和分子功能 (Molecular function) 三大类的主要 35 个亚类中。其中细胞成分组织或合成 (Cellular component organization or biogenesis)、细胞成分组织 (Cellular component organization)、细胞器组织 (Organelle organization)、细胞 (Cell)、细胞成分 (Cell part)、细胞内 (Intracellular)、细胞内成分 (Intracellular part)、有机环状化合物结合 (Organic cyclic compound binding)、杂环化合物结合 (Heterocyclic compound binding)、核酸结合 (Nucleic acid binding) 分别是三大类中显著富集差异基因数量最多的条目 (图 4)。

雌性相对于雄性, 表达上调的 1 295 个基因中, 被 GO 注释的有 922 个, 但没有显著富集的亚类。表达下调的 2 302 个基因中, 被 GO 注释的有 1 422 个, 显著富集到三大类的 47 个亚类。其中富集差异基因数目最多的是分子功能 (Molecular function) 大类中的蛋白质结合 (Protein binding)

亚类的 468 个。其次是细胞组分 (Cellular component) 大类中的细胞器组分 (Organelle part) 和细胞内细胞器组成 (Intracellular organelle part), 分别是 157 和 155 个。再次是生物过程 (Biological process) 中的细胞成分组织或生物发生 (Cellular component organization or biogenesis) 和细胞成分组织 (Cellular component organization), 分别是 140 个和 133 个 (图 5)。其余亚类富集到的基因数据均在 100 以下。

2.5 差异表达基因 KEGG 富集结果

雌性相对于雄性, 表达上调的 1 295 个基因经过 KEGG 注释, 共有 1 188 个基因被注释到 248 条通路, 富集显著的前 20 条通路 (图 6), 其中神经活性配体受体相互作用 (Neuroactive ligand-receptor interaction)、DNA 复制 (DNA replication)、蛋白质消化吸收 (Protein digestion and absorption)、错配修复 (Mismatch repair)、嘧啶代谢 (Pyrimidine metabolism) 和胰腺分泌 (Pancreatic secretion) 通路是富集最显著的 6 条通路 (q value < 0.05)。表达下调的 2 303 个基因中共有 1 886 个基因被注释到 264 条通路, 富集显著的前 20 条通路 (图 7),

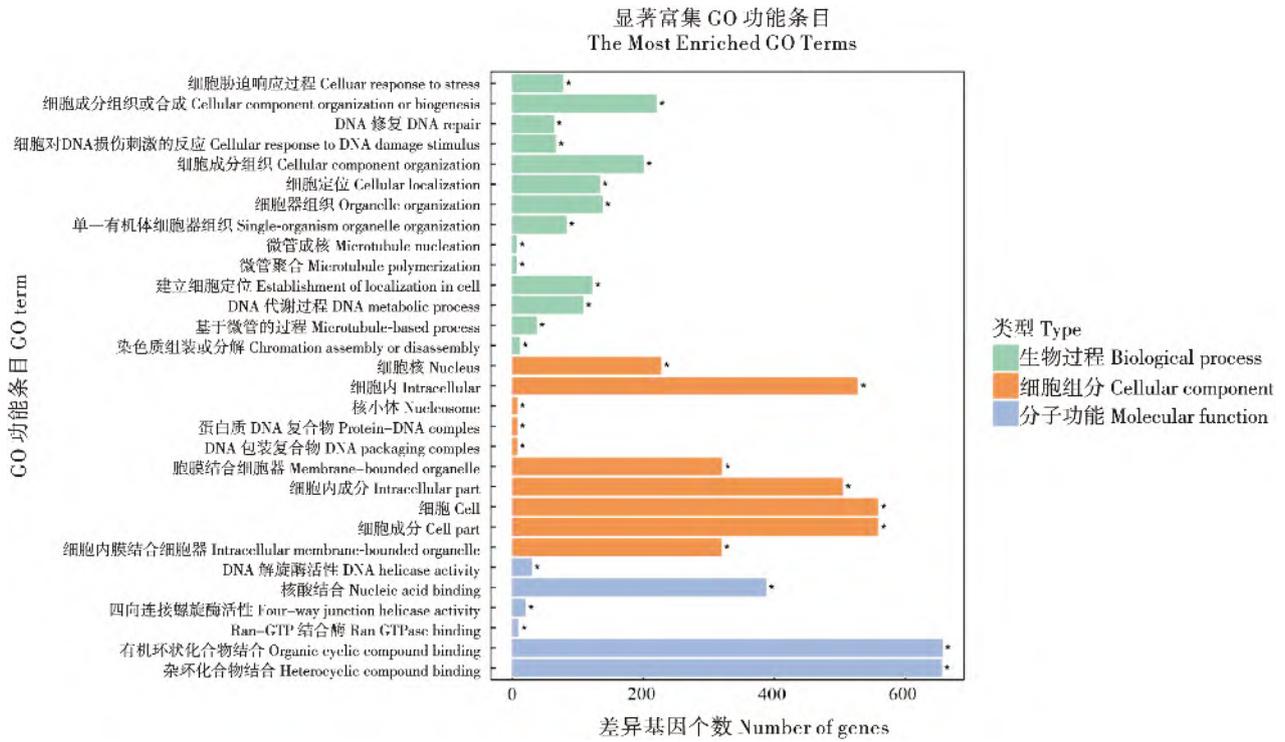


图 4 差异表达基因 GO 功能分类

Fig. 4 Go functional classification of differentially expressed genes

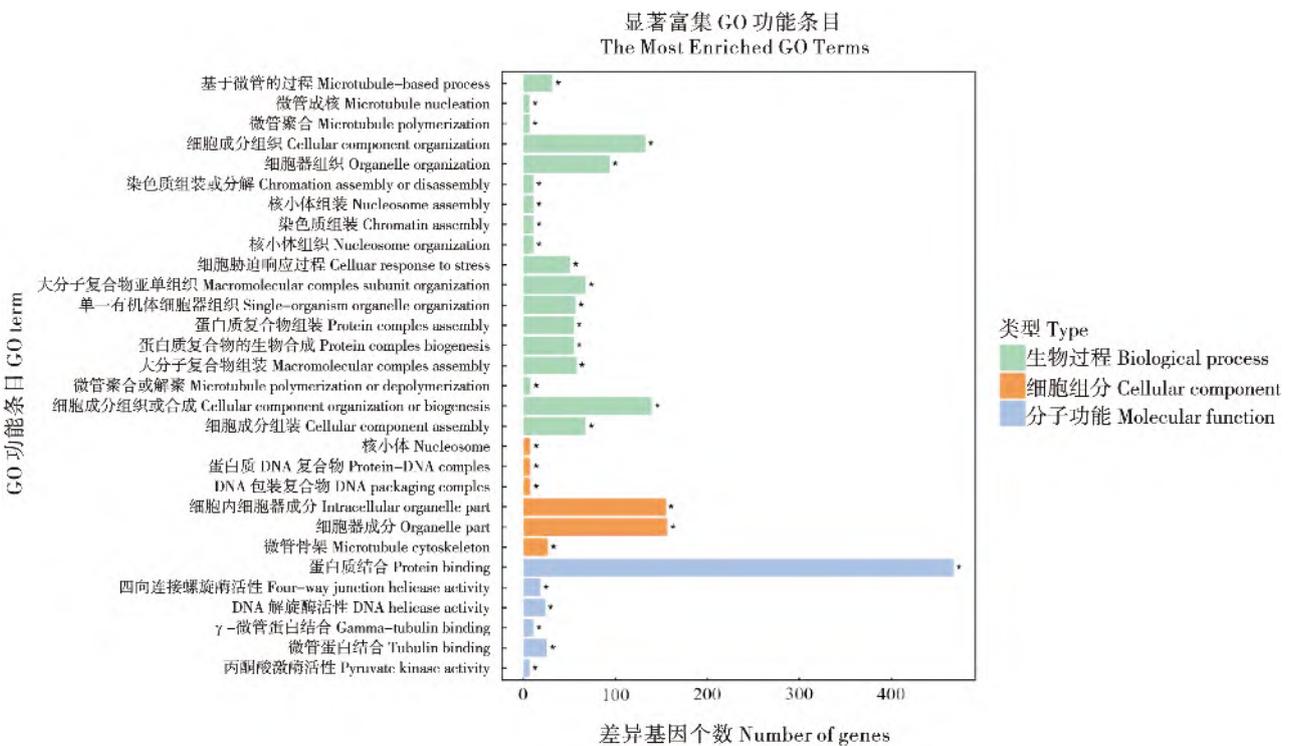


图 5 下调表达基因 GO 功能分类

Fig. 5 Go functional classification of down regulated expressed genes

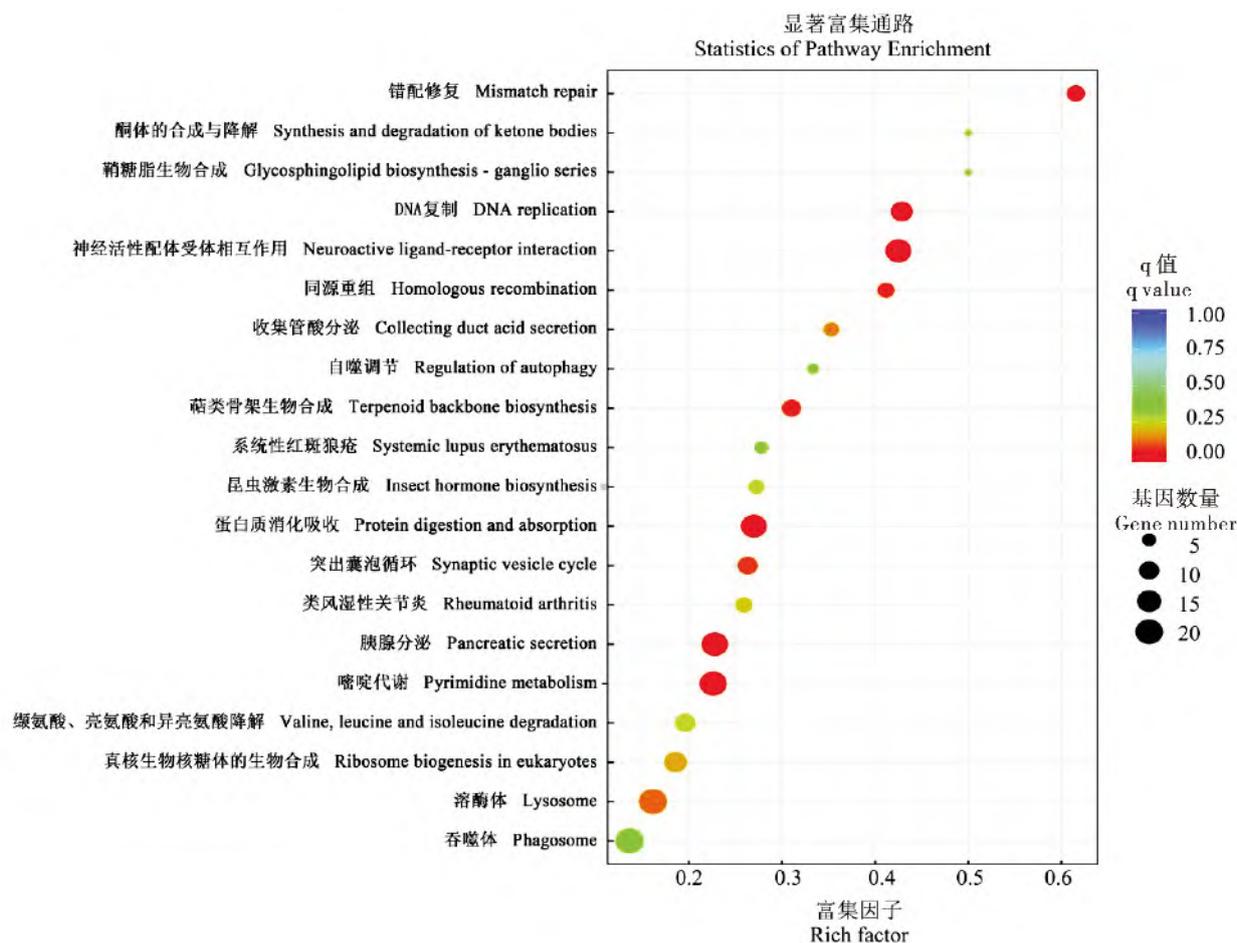


图6 雌性相对于雄性上调基因 KEGG 富集散点图

Fig. 6 Scatter plot of KEGG enrichment in females relative to males of up-regulated gene

其中蛋白酶体 (Proteasome)、氮代谢 (Nitrogen metabolism)、泛素介导的蛋白水解 (Ubiquitin mediated proteolysis)、糖酵解/糖异生 (Glycolysis/Gluconeogenesis)、丙酮酸代谢 (Pyruvate metabolism) 和 RNA 转运 (RNA transport) 通路是富集最显著的 6 条通路 (q value < 0.05)。

2.6 实时荧光定量 PCR 验证结果

qRT-PCR 验证结果显示, 上调表达的 5 个基因 (*VgR*、*VG2*、*PRSSI_2_3*、*TUBA*、*PLIN2*) 在转录组测序中的表达均是呈上调趋势, 下调表达的 4 个基因 (*gdhA*、*PKLR*、*UBE2O*、*CA*) 在转录组测序中的表达均是呈下调趋势, 其中 *gdhA* 和 *PKLR* 在 qRT-PCR 验证中均是下调 1 倍 (图 8)。

3 结论与讨论

动物的雌雄分化是进化的产物。昆虫作为生物多样性最丰富的动物类群, 大多数种类在形态

上都表现出了性别二态性, 即同种昆虫的雌、雄个体除生殖器官的结构差异外, 在大小、颜色、结构等方面也常有明显差异 (王孟卿等, 2005)。但是, 目前对昆虫雌雄性别在转录组层面的差异了解还不充分。

眼优角蚱雌、雄成虫在外部形态上也具有明显的差异, 雌虫腹部末端具有细长的产卵瓣, 体型较雄虫粗大, 前胸背板背面较雄性粗糙, 其它构造与体色与雄虫相似 (邓维安等, 2007)。作为昆虫中较古老的物种, 对眼优角蚱雌性和雄性成虫的转录差异开展研究, 可为揭示昆虫雌雄差异的分子机制提供一定的基础数据。本研究测定了 2 组 18 个样品的二代转录组, 并与本实验室已测定的三代转录本进行校正后, 最终得到 13 432 条转录本, 平均长度 2 009 bp, 最大长度 8 297 bp, N50 长度远大于 1 000 bp, 说明本研究所得到的转录本质量较高。本研究仅有 10% 的转录本没有

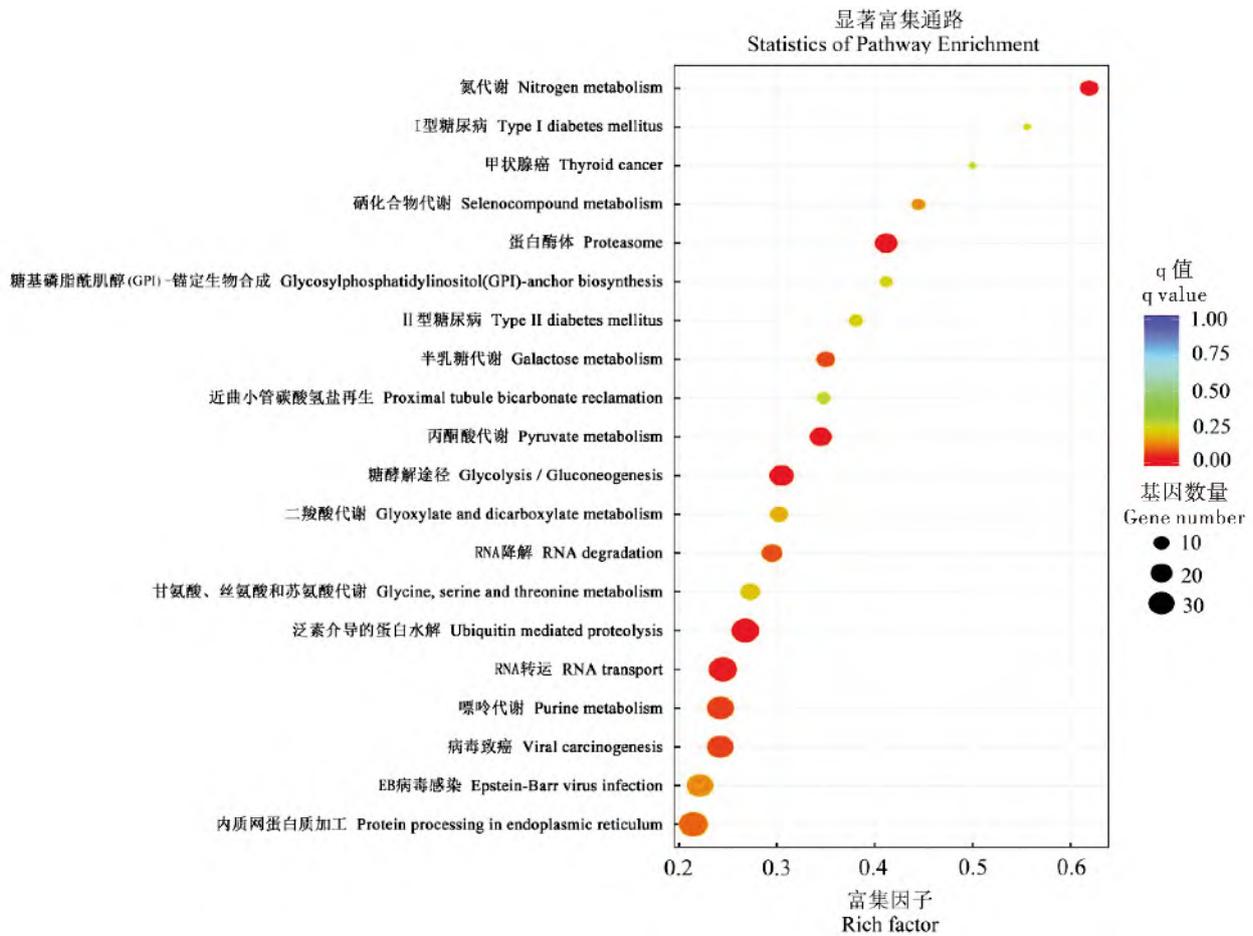


图 7 雌性相对于雄性下调基因 KEGG 富集散点图

Fig. 7 Scatter plot of KEGG enrichment in females relative to males of down-regulated gene

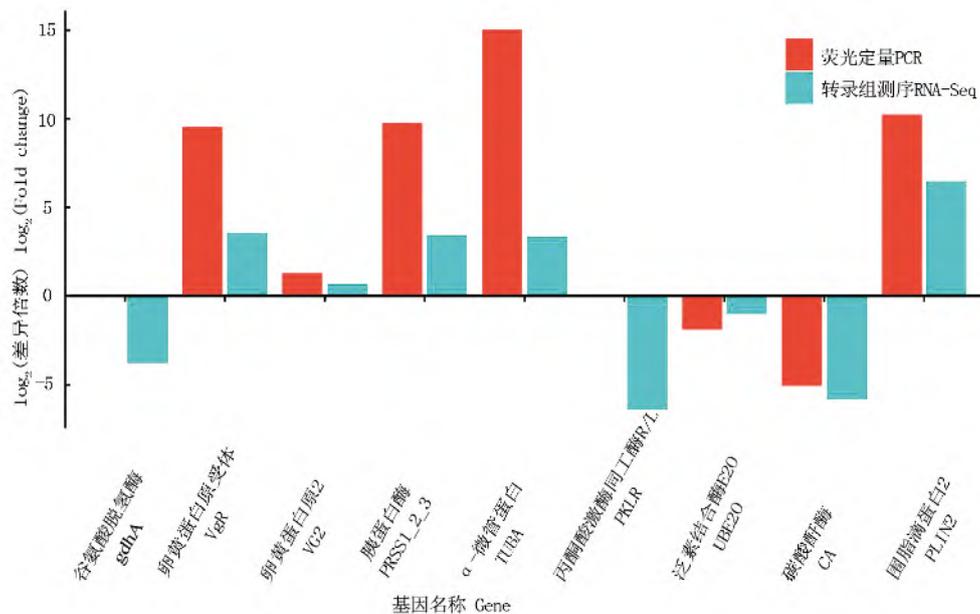


图 8 眼优角蚱雌性与雄性差异表达基因 qRT-PCR 与 RNA-Seq 分析结果

Fig. 8 Results of qRT-PCR and RNA-Seq analysis of differential expressed genes between male and female *Eucriotettix oculatus*

注释成功, 主要是因为数据库中有关直翅目昆虫的基因信息匮乏。

本研究对眼优角蚱雌性和雄性的转录组进行了基因差异表达分析, 共获得 1 295 个显著上调和 2 302 个显著下调基因。使用 qRT-PCR 方法验证了 9 个基因的表达情况, 虽然 qRT-PCR 结果与 mRNA 测序结果在倍数之间有稍许差异, 但是每个基因有同样的上下调趋势, 可以说明转录组数据分析的可靠性。在上调的基因中有与雌性发育有关的卵黄蛋白原受体 *VgR*、卵黄蛋白原 2 *VG2*、胰蛋白酶 *PRSSI_2_3*、围脂滴蛋白 2 *PLIN2* 等基因, 在下调的基因中有与雄性发育有关的碳酸酐酶 *CA* 等基因, 说明了差异表达基因与性别紧密联系。为了解差异基因的生物意义, 通过差异基因的 GO 富集可以发现, 差异基因显著富集的 GO 条目大多是与细胞的形成有关, 特别是雄性, 其相对于雌性来说, 结合 (Binding)、细胞组分 (Cellular component) 和细胞过程 (Cellular processes) 等条目相关基因显著高表达, 说明雌、雄个体在成虫后都有大量的细胞增殖活动, 雄性较雌性更加剧烈, 这应该是与雄性进入成虫期后要形成更多的精子为交配繁殖做好准备有关 (刘杰等, 2020)。同时, 基于整个基因组背景, 应用超几何检验对差异基因进行了 KEGG Pathway 富集分析, 发现在雌性成虫体内高表达的基因显著富集在主要的 6 条通路中。其中神经活性配体受体相互作用 (Neuroactive ligand-receptor interaction) 通路属于生殖相关通路, 该通路的基因能影响促性腺素合成和释放, 在性腺发育过程中主要是分别作用于脑和卵巢 (储明星等, 2009; Xu *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2019)。蛋白质消化吸收 (Protein digestion and absorption) 和胰腺分泌 (Pancreatic secretion) 通路属于消化系统, 说明雌性眼优角蚱相对雄性消化能力更强, 可能是由于雌性个体较大, 需要消化吸收更多的营养物质, 或者是雌性要储备更多营养物质以备后期生殖需要。而 DNA 复制 (DNA replication)、错配修复 (Mismatch repair) 和嘧啶代谢 (Pyrimidine metabolism) 通路均与遗传物质的复制和修复有关。雄性体内高表达的基因也是显著富集在主要的 6 条通路。其中蛋白酶体 (Proteasome) 通路可能与雄性眼优角蚱的生精过程有关, 因为已有研究发现敲除蛋白酶体 REG γ 基因可导致精原干细胞数目减少, 使雄性小鼠生殖能力降低 (Ali *et al.*, 2013; 李宁等,

2016)。氮源是昆虫生长发育和繁殖所必需的营养物质之一。由于食物中氮含量与蛋白质含量直接相关, 食物中的氮能直接影响昆虫的交配、取食速率和繁殖等 (张碧尧, 2019), 研究发现与氮代谢有关的精氨酸对精子发生发挥关键作用 (Morales *et al.*, 2003; O' Flaherty *et al.*, 2004; 徐学玉等, 2017), 因此雄性眼优角蚱氮代谢通路被富集。泛素介导的蛋白水解 (Ubiquitin mediated proteolysis) 属于信号通路, 参与卵发生、精子发生和性腺成熟等一系列生殖过程的调控活动 (Meng *et al.*, 2015; Peng *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2016; 董忠典等, 2021)。与能量代谢相关的糖酵解 (Glycolysis / Gluconeogenesis)、丙酮酸代谢 (Pyruvate metabolism) 通路在雄性中被显著富集, 可能是雄性眼优角蚱在交配前较雌性活动多, 需要消耗更多的能量 (肖舒晴等, 2019)。RNA 转运 (RNA transport) 通路显著富集, 可能是由于蛋白质合成与 RNA 转运密切相关, 雄性需要大量合成与精子形成有关的蛋白, 以完成精子储备, 这与雄性按蚊转录表达相似 (刘杰等, 2020)。综上所述, 眼优角蚱雌性和雄性成虫在转录水平的差异主要还是集中在与生殖细胞形成和生殖活动有关的基因表达方面。本研究对进一步深入解析昆虫雌雄分化的分子调控差异提供了一定的理论基础。

参考文献 (References)

- Ali A, Wang Z, Fu J, *et al.* Differential regulation of the REG γ -proteasome pathway by p53/TGF- β signalling and mutant p53 in cancer cells [J]. *Nature Communications*, 2013, 4: 2667.
- Amos B, Rolf A. The Swiss-Prot protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000 [J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28 (1): 45-48.
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, *et al.* Gene ontology: Tool for the unification of biology [J]. *Nature Genetics*, 2000, 25 (1): 25-29.
- Chen X, Mao X, Huang J, *et al.* KOBAS 2.0: A web server for annotation and identification of enriched pathways and diseases [J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39 (Web Server issue): 316-22.
- Chu MX, Feng T, Zhao YZ, *et al.* Polymorphism of neuropeptide Y-Y1 receptor gene (NPY-Y1R) and its relationship with reproductive performance in goats [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2009, 17 (6): 960-966. [储明星, 冯涛, 赵有璋, 等. 神经肽 Y-Y1 受体基因 (NPY-Y1R) 多态性及其与山羊繁殖性能关系 [J]. 农业生物技术学报, 2009, 17 (6): 960-966]
- Deng WA. Taxonomic Study of Tetrigoidea from China [D]. Hubei: Huazhong Agricultural University, 2016. [邓维安. 中国蚱总科

- 分类学研究 [D]. 湖北: 华中农业大学, 2016]
- Deng WA, Zheng ZM, Wei SH. Fauna of Tetrigoidea from Yunnan and Guangxi [M]. Nanning: Guangxi Science & Technology Publishing House, 2007: 1–458. [邓维安, 郑哲民, 韦仕珍. 滇桂地区蚱总科动物志 [M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2007: 1–458]
- Dong ZD, Li XY, Huang CQ, et al. Comparative transcriptome analysis of the gonad of the Lacustrine goby (*Gobiopsis lacustris*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45 (3): 365–380. [董忠典, 黎学友, 黄承勤, 等. 湖栖鳊鱼性腺转录组比较分析 [J]. 水产学报, 2021, 45 (3): 365–380.]
- Finn RD, Tate J, Mistry J, et al. The Pfam protein families database [J]. *Nucleic Acids Research*, 2008, 32 (1): D138.
- Fu L, Niu B, Zhu Z, et al. CD-HIT: Accelerated for clustering the next-generation sequencing data [J]. *Bioinformatics*, 2012, 28 (23): 3150.
- Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, et al. The KEGG resource for deciphering the genome [J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32 (Suppl. 1): D277–D280.
- Li B, Dewey CN. RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome [J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12 (1): 323.
- Li N, Li L, Zhao DP, et al. Effects of *REG γ* on spermatogenesis of male mouse [J]. *Journal of Reproductive Medicine*, 2016, 25 (3): 50–55. [李宁, 李磊, 赵登攀, 等. 蛋白酶体 *REG γ* 对雄性小鼠生精功能的影响 [J]. 生殖医学杂志, 2016, 25 (3): 50–55]
- Liu J, Li B, Chen B. Comparative transcriptome analysis of female and male *Anopheles sinensis* [J]. *Journal of Chongqing Normal University (Natural Science)*, 2020, 37 (3): 54–59. [刘杰, 李勃, 陈斌. 中华按蚊雌、雄蚊转录组比较分析 [J]. 重庆师范大学学报 (自然科学版), 2020, 37 (3): 54–59]
- Li W, Jaroszewski L, Godzik A. Tolerating some redundancy significantly speeds up clustering of large protein databases [J]. *Bioinformatics*, 2002, 18 (1): 77–82.
- Meng XL, Liu P, Jia FL, et al. De novo transcriptome analysis of *Portunus trituberculatus* ovary and testis by RNA-Seq: Identification of genes involved in gonadal development [J]. *PLoS ONE*, 2015, 10 (6): e0128659.
- Morales ME, Rico G, Bravo C, et al. Progressive motility increase caused by L-arginine and polyamines in sperm from patients with idiopathic and diabetic asthenozoospermia [J]. *Ginecol Obstet Mex*, 2003, 71: 297–303.
- O' Flaherty C, Rodriguez P, Srivastava S, et al. L-arginine promotes capacitation and acrosome reaction in cryopreserved bovine spermatozoa [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -General Subjects*, 2004, 1674 (2): 215–221.
- Peng JX, Wei PY, Zhang B, et al. Gonadal transcriptomic analysis and differentially expressed genes in the testis and ovary of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. *BMC Genom*, 2015, 16 (1): 1006.
- Song H, Amédégno C, Cigliano MM, et al. 300 million years of diversification: Elucidating the patterns of orthopteran evolution based on comprehensive taxon and gene sampling [J]. *Cladistics—the International Journal of the Willi Hennig Society*, 2015, 31 (6): 621–651.
- Tatusov RL, Fedorova ND, Jackson JD, et al. The COG database: An updated version includes eukaryotes [J]. *BMC Bioinformatics*, 2003, 4 (1): 41.
- Tsurui K, Honma A, Nishida T. Camouflage effects of various colour-marking morphs against different microhabitat backgrounds in a polymorphic pygmy grasshopper *Tetrix japonica* [J]. *PLoS ONE*, 2010, 5 (7): e11446.
- Wang MQ, Yang D. Sexual dimorphism in insects [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2005, 42 (6): 721–725. [王孟卿, 杨定. 昆虫的雌雄二型现象 [J]. 应用昆虫学报, 2005, 42 (6): 721–725]
- Wennersten L, Johansson J, Karpestam E, et al. Higher establishment success in more diverse groups of pygmy grasshoppers under seminatural conditions [J]. *Ecology*, 2012, 93 (12): 2519–2525.
- Xiao SQ, Cui P, Li XD, et al. Life history and biological characteristics of *Eucrotettix oculatus* [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2019, 41 (6): 1366–1374. [肖舒晴, 崔鹏, 李晓东, 等. 眼优角蚱生活史及其生物学特性 [J]. 环境昆虫学报, 2019, 41 (6): 1366–1374]
- Xu S, Wang D, Zhou D, et al. Reproductive hormone and transcriptomic responses of pituitary tissue in anestrus gilts induced by nutrient restriction [J]. *PLoS ONE*, 2015, 10 (11): e0143219.
- Xu XY, Luo RW, Wang K, et al. Effect of arginine on male reproductive performance [J]. *Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2017, 49 (9): 121–124. [徐学玉, 罗仁武, 王珂, 等. 精氨酸对雄性动物繁殖性能的影响 [J]. 畜牧与兽医, 2017, 49 (9): 121–124]
- Yang D, Yin C, Chang YQ, et al. Transcriptome analysis of male and female mature gonads of Japanese scallop *Patinopecten yessoensis* [J]. *Genes Genomics*, 2016, 38 (11): 1041–1052.
- Young MD, Wakefield MJ, Smyth GK, et al. Gene ontology analysis for RNA-seq: Accounting for selection bias [J]. *Genome Biology*, 2010, 11 (2): R14–R14.
- Zhang BY. Effects of Dietary Protein Levels on the Nutritional Utilization and Nitrogen Metabolism of Male Adults of *Blattella germanica* [D]. Fujian: Fujian Normal University, 2019. [张碧尧. 不同蛋白质水平饲料对德国小蠊雄成虫营养利用及氮代谢影响 [D]. 福建: 福建师范大学, 2019]
- Zhang T, Chen L, Han KP, et al. Transcriptome analysis of ovary in relatively greater and lesser egg producing Jinghai Yellow Chicken [J]. *Animal Reproduction Science*, 2019, 208: 106114.
- Zheng ZM. Fauna of Tetrigoidea from Western China [M]. Beijing: Science Press, 2005: 101–103. [郑哲民. 中国西部蚱总科志 [M]. 北京: 科学出版社, 2005: 101–103]