

doi: 10.3969/j.issn.1674-0858.2016.02.3

七星瓢虫滞育关联基因的转录组学分析

齐晓阳^{1,2}, 任小云², 安涛², 陈红印², 黄建^{1*}, 张礼生^{2*}

(1. 福建农林大学植物保护学院, 农业部闽台作物有害生物综合治理重点实验室, 福州 350002;

2. 中国农业科学院植物保护研究所, 中美生物防治实验室, 北京 100081)

摘要: 对七星瓢虫正常发育、滞育以及滞育解除的雌成虫进行 RNA 测序, 并对筛选出来的滞育相关基因进行 KEGG 通路富集分析, 从分子水平解析七星瓢虫滞育发机理。本研究以正常发育产卵、滞育 30 d 以及滞育贮存 30 d 后解除产卵的七星瓢虫雌成虫为研究对象, 分别抽提 RNA, 合成 cDNA, 构建 cDNA 文库, 文库检测合格后在 Illumina HiSeq 2500 测序仪上进行双向测序。根据测序结果, 共获取 unigene 82820 个。采用两两两比较法对正常发育组和滞育组、滞育组和滞育解除组进行差异表达分析, 分别获得差异表达基因 3501 个和 1427 个。深入分析两组比对结果, 将在滞育组上调且滞育解除组下调的 unigene 定义为滞育关联基因, 共有 443 个基因为滞育关联基因。应用 KEGG KAAS 在线 pathway 比对分析工具对滞育关联基因进行通路富集分析, 结果发现这些基因主要集中在碳水化合物代谢、脂质代谢以及信号转导等途径中。

关键词: 七星瓢虫; 滞育; 转录组测序; 滞育关联基因; KEGG 分析; 碳水化合物代谢

中图分类号: Q963; S476

文献标志码: A

文章编号: 1674-0858 (2016) 02-0238-11

Transcriptome analysis of diapause-associated genes of *Coccinella septempunctata* L.

QI Xiao-Yang^{1,2}, REN Xiao-Yun², AN Tao², CHEN Hong-Yin², HUANG Jian^{1*}, ZHANG Li-Sheng^{2*}

(1. Key Laboratory of Integrated Pest Management for Fujian-Taiwan Crops, Ministry of Agriculture, College of Plant Protection, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Sino-American Biological Control Laboratory, USDA-ARS, Beijing 100081, China)

Abstract: To understand the diapause mechanism of *Coccinella septempunctata* L. at molecular level, transcriptome sequencing was carried out for female adults in three different states, i. e., non-diapause (ND), diapause (D) and diapause terminated (DT), and KEGG pathway enrichment analysis was performed on the up-regulated expressed genes. In research, total RNA was respectively extracted from the female adults with normal development after oviposition, diapause 30 days, and diapause-terminated after diapause 30 days, and cDNA samples were synthesized to generate cDNA libraries. After quality inspection, two pair sequencing was performed with the Illumina HiSeq 2500 system. Total of 82820 unigenes were yielded according to sequencing results. When ND and D were compared, 3501 differentially expressed genes (DEGs) were revealed, and 1427 DEGs were detected between D and DT. The DEGs which was highly expressed in the diapause stage compared to non-diapause and diapause-terminated stages was defined as diapause-associated genes. In results, total of 443 unigenes were found to be diapause-associated genes. The analysis of KEGG enriched pathways were performed on diapause-associated genes

基金项目: 国家自然科学基金 (31572062); 国家重点基础研究发展计划 (973) 项目 (2013CB127602); 公益性行业 (农业) 科研专项 (201103002)

作者简介: 齐晓阳, 女, 硕士研究生, 主要从事七星瓢虫的滞育研究, E-mail: qixiaoyang1024@163.com

* 通讯作者 Author for first correspondence, E-mail: jhuang1234@126.com; zhangleesheng@163.com

收稿日期 Received: 2016-02-05; 接受日期 Accepted: 2016-03-25

using KAAS (KEGG Automatic Annotation Server) and found that these genes were mainly involved in carbohydrate metabolism, lipid metabolism and signal transduction.

Key words: *Coccinella septempunctata* L.; diapause; transcriptome sequencing; diapause-associated genes; KEGG analysis; Carbohydrate metabolism

七星瓢虫 *Coccinella septempunctata* L. 是一种优良的捕食性天敌昆虫, 隶属于鞘翅目 Coleoptera 瓢甲科 Coccinellidae, 可取食多种蚜虫。因其捕食量大、环境适应性强等特点, 相继被多个国家大规模扩繁和应用 (Hodek, 1956; 荆英和黄建, 2002)。昆虫滞育是一种遗传现象, 指昆虫在特定环境刺激下发育停滞、又在另一种特定刺激下继续发育的现象, 它是昆虫适应环境的一种表现 (Renfree and Shaw, 1976; Tauber *et al.*, 1986)。对七星瓢虫等天敌昆虫来说, 阐明滞育的分子调控机理, 有可能通过遗传信息调控实现昆虫滞育的人工控制, 从而延长七星瓢虫等天敌昆虫的寿命, 保证天敌昆虫产品的货架期, 最终发挥生物防治的最佳效果。

近年来, 国内外关于七星瓢虫滞育类型、滞育光周期的调控以及滞育关联蛋白的研究取得了一定的成果 (Okuda and Hodek, 1994; 王伟等, 2013; 张礼生等, 2014; 任小云等, 2015)。王伟等 (2013) 对七星瓢虫雌成虫的滞育光周期研究结果表明, 北京地区的七星瓢虫滞育类型属于低温短日照, 温度和光周期二者均对其有显著影响, 其中温度起主导作用, 且在 18℃、光周期为 10L:14D 时, 七星瓢虫雌虫滞育率最高。刘遥等 (2014) 在七星瓢虫滞育相关蛋白类别和功能的研究中指出, 苹果酸脱氢酶和异柠檬酸脱氢酶均在滞育期差异表达, 其中苹果酸脱氢酶上调表达, 异柠檬酸脱氢酶下调表达。通过对七星瓢虫滞育相关分子机理的研究, 有可能为利用滞育延长七星瓢虫产品货架期提供途径和技术。下一代测序技术 (Next-generation sequencing technology), 也被称为高通量测序技术, 能够同时鉴定和定量高丰度转录本和低丰度转录本, 且单次运行产出序列数据量大 (Garg *et al.*, 2011)。下一代测序技术的出现极大地推动了昆虫转录组的研究。在防治云南省境内的特有重大害虫云南切梢小蠹 *Tomicus yunnanensis* 的过程中, 过多使用化学药剂而使昆虫产生了抗药性, 利用高通量转录组测序技术对其与抗药性相关的基因进行了鉴定, 共得到 219 个基因, 对于昆虫抗性的分子机制与杀虫剂或

环境压力之间的相互作用有了一定的了解, 同时也为今后该种昆虫功能基因组的研究奠定了基础 (Zhu *et al.*, 2011)。而对孟氏隐唇瓢虫 *Cryptolaemus montrouzieri* Muls. 使用杀虫剂过后, 通过转录组测序发现共有 993 个基因发生显著变化, 这为结合化学药剂防治其寄主昆虫如柑橘粉蚧的研究起到指导作用 (Zhang *et al.*, 2012)。新一代转录组测序技术为从转录组水平上开展对昆虫滞育的研究提供技术支撑。利用高通量转录组技术对柑橘大实蝇 *Bactrocera min*a 进行测序, 不仅为揭露柑橘大实蝇蛹滞育解除的分子机制奠定基础, 还为从分子层面上来采取措施来防治柑橘大实蝇提供帮助 (Dong *et al.*, 2014)。

滞育关联蛋白 (Diapause Associated Protein, DAP) 是昆虫在滞育期合成、在滞育结束后被利用并消失了一类蛋白, 其对昆虫滞育状态的维持非常重要。近年来, 昆虫滞育关联蛋白及其参与滞育调控的机理研究十分活跃, 并取得了阶段性进展 (Denlinger, 2002)。迄今为止, 国内外已对棉红铃虫 *Pectinophora gossypiella*、马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata*、玉米蛀茎夜蛾 *Helotropha leucostigma*、酸模叶甲 *Gastrophysa atrocyanea*、西南玉米秆草螟 *Diatraea grandiosella*、亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 和七星瓢虫等昆虫的滞育关联蛋白进行了研究 (赵章武和黄永平, 1996; Hodek, 1997; 毛文富和曹梅讯, 2001; 刘遥, 2014)。目前, 多数 DAP 在滞育昆虫体内的作用方式仍无定论, 一般认为滞育关联蛋白可能发挥着贮存蛋白和抗冻蛋白的作用, 为昆虫抵御逆境胁迫提供保护。如西南玉米秆草螟幼虫、棉红铃虫幼虫, 其 DAP 积累在脂肪体中, 直接与靶组织联系, 在血淋巴中含量甚微; 在棉红铃虫中, DAP 除在脂肪体外, 主要积累在血淋巴, 通过血淋巴传送到靶器官中 (赵章武和黄永平, 1996)。当昆虫感受逆境胁迫后, 引发保幼激素等内分泌异动, 当这些激素的浓度变化适合于 DAP 的产生, 则引起昆虫的滞育, 反之终止滞育。故此, 有学者认为 DAP 的调控涉及到机体内部的中枢神经内分泌系统以及体内相应的代谢变化, 在滞育期间具有较高的

保幼激素浓度和低的蜕皮酮浓度。保幼激素除影响促前胸腺激素外,其浓度上升一方面引起甘油的增加,作为抗冻保护物而发挥抗寒作用,使滞育昆虫适应低温环境,另一方面,还促使滞育关联蛋白在脂肪体中大量出现,并在整个滞育过程中维持高的浓度,维系滞育昆虫的存活。随着滞育的结束,保幼激素浓度下降促使滞育关联蛋白逐渐消失 (Fan *et al.*, 2013)。与之相对应的滞育关联基因,即在滞育期间特异性上调、在滞育解除后下调的一类基因,对研究滞育调控机理至关重要。

为此,本文对七星瓢虫正常发育、滞育以及滞育解除的昆虫进行 RNA 测序,对筛选出的滞育关联基因进行 KEGG 通路富集分析,了解滞育关联基因所主要参与的代谢路径和信号转导机制等,进而从宏观上来分析七星瓢虫滞育发生的基因调控机理。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫及饲养方法

七星瓢虫成虫为中国农业科学院植物保护研究所中美生物防治实验室所饲养。正常发育组成虫饲养条件为温度 $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 $70\% \pm 10\%$ 、光周期 16L:8D; 滞育组成虫饲养条件为温度 $18^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 $70\% \pm 10\%$ 、光周期 10L:14D; 滞育解除组成虫饲养条件为将滞育 30 d 后的七星瓢虫成虫转移到饲养条件与正常发育组一致,每日饲喂新鲜的大豆蚜 *Aphis glycyines* (王伟等, 2013; 刘遥等, 2014), 具体饲养方法参考王伟 (2013)。大豆蚜为实验室保种留存,具体饲养方法参照忻亦芬 (1982)。

1.2 测序和组装

七星瓢虫正常发育组、滞育组以及滞育解除组成虫转录组的测序工作由上海伯豪生物技术有限公司完成。测序进行三个生物学重复,共构建 9 个文库。测序完成后,经数据预处理,分别应用 CLC Genomics Workbench (version: 6.0.4) (Br Utigam *et al.*, 2011) 的 scaffolding contig 算法对数据进行 de novo 拼接组装。转录组数据已另文发表 (Qi *et al.*, 2015)。

1.3 序列筛选

1) 拼接得到的七星瓢虫转录组测序结果与 UniProt 或者 Nr 数据库进行 Blastx 比对 (将核酸序

列翻译为蛋白,再进行比对), 筛选条件 $E\text{-value} < 1e-5$, 得到注释基因。2) 应用每个样本的 RPKM (reads per kilo base of exon model per million mapped reads), 以每个样本的总表达量为内标进行 Fisher-test 差异检验,将正常发育组、滞育组和滞育解除组三组转录组结果进行两两比较,采用 FDR 与表达差异倍数 Fold-Change 方法进行差异基因挑选,筛选条件为: $FDR \leq 0.05$, $Fold\text{-change} \geq 2$ 。3) 筛选的差异基因中,与正常发育组和滞育解除组相比,在滞育组中均表达上调的基因定义为滞育关联基因。并提取序列。

1.4 滞育关联基因 KEGG 通路分析

将滞育关联基因序列制成 FASTA 格式文件,应用 KEGG KAAS 在线 pathway 比对分析工具 (KEGG Automatic Annotation Server. <http://www.genome.jp/tools/kaas/>) 进行 KEGG 通路分类分析。

2 结果与分析

2.1 正常发育、滞育及滞育解除七星瓢虫转录组测序结果

本研究测序共拼接得到 82820 个基因,通过比对并注释得到 37872 个基因。将正常发育组、滞育组以及滞育解除组分别命名为 Group 1, 2, 3。通过比较 Group 1 和 Group 2 得到,差异表达倍数两倍以上基因共有 3519 个,其中滞育期上调表达基因有 2125 个。相同方法将 Group 2 和 Group 3 比较,得到差异倍数两倍以上基因有 1427 个,其中滞育期上调表达基因有 678 个。通过比对筛选,均在滞育组中表达上调的基因共有 443 个。

2.2 滞育关联基因 KEGG 通路分析

将七星瓢虫滞育关联基因序列进行 KEGG 在线分析,通过 KEGG pathway 数据库分析,共分为新陈代谢、遗传信息加工、环境信息处理、细胞过程和有机体系统五大类,结果如表 1 所示。443 个上调表达基因共映射到 141 个通路,分析发现这些基因主要集中在碳水化合物代谢、脂质代谢、信号转导等途径中 (图 1)。

2.2.1 新陈代谢

根据 KEGG 直系同源系统 (KEGG Orthology) 分类,滞育关联基因共参与新陈代谢 (metabolism) 分类中的碳水化合物代谢、能量代谢 (energy metabolism)、脂质代谢 (lipid

metabolism)、核苷酸代谢 (nucleotide metabolism)、氨基酸代谢 (amino acid metabolism) 等 11 个途径, 涉及 70 个通路 (见表 1)。

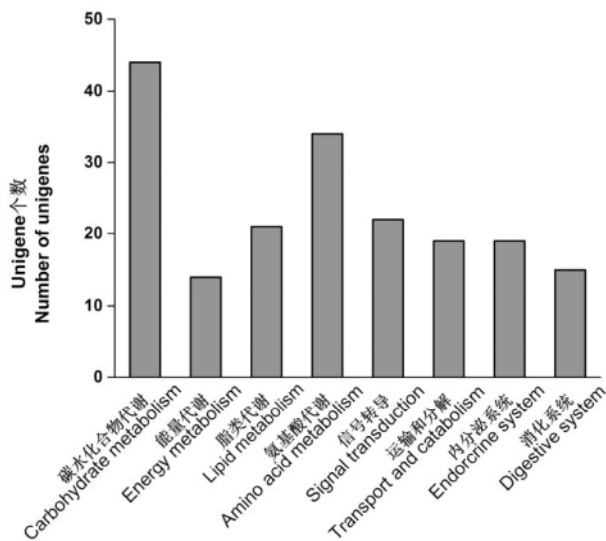


图 1 七星瓢虫滞育期间滞育关联基因显著富集通路分布

Fig. 1 Distribution of significantly enriched pathways of diapause-associated genes

分析结果显示, 参与碳水化合物代谢的滞育关联基因个数最多, 其中 15 个基因参与三羧酸循环, 主要有柠檬酸合成酶 (citrate synthase, CS) 基因、乌头酸水合酶 (aconitate hydratase, ACO) 基因、异柠檬酸脱氢酶 (isocitrate dehydrogenase, IDH1) 基因、2-酮戊二酸脱氢酶的 E1 组分 (2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component, OGDH) 基因、二氢硫辛酰琥珀酰转移酶 [2-oxoglutarate dehydrogenase E2 component (dihydrolipoamide succinyltransferase), DLST] 基因、琥珀酰辅酶 A 合成酶 β 亚基 (succinyl-CoA synthetase beta subunit, LCS2) 基因、琥珀酸脱氢酶 (泛醌) 细胞色素亚基 b560 [succinate dehydrogenase (ubiquinone) cytochrome b560 subunit, SDHC] 基因和丙酮酸羧化酶 (pyruvate carboxylase, PC) 基因。其中, CS、IDH1 以及由 OGDH 和 DLST 基因所组成的 α -酮戊二酸脱氢酶复合体是三羧酸循环途径的关键调节基因, 丙酮酸是三羧酸循环的上游底物, 由 PC 基因所编码的丙酮酸羧化酶催化丙酮酸不可逆地转化为草酰乙酸参与三羧酸循环, PC 基因在滞育期间显著上调, 表明七星瓢虫雌成虫在滞育期间三羧酸循环可能并不是维持在一个低水平。

表 1 七星瓢虫滞育关联基因的 KEGG 通路分析

Table 1 KEGG pathway analysis of diapause-associated genes

一级代谢 Primary metabolism	二级代谢 Secondary metabolism	三级代谢 Tertiary metabolism	参与基因对应 KO 号 KO number of involved genes
		糖酵解/糖异生 Glycolysis /Gluconeogenesis	K01623, K00873, K00002, K00128
		柠檬酸循环 (TCA 循环) Citrate cycle (TCA cycle)	K01647, K01681, K00031, K00164, K00658, K01900, K00236, K01958
		戊糖磷酸途径 Pentose phosphate pathway	K00115, K01623
新陈代谢 Metabolism	碳水化合物代谢 Carbohydrate metabolism	果糖和甘露糖代谢 Fructose and mannose metabolism	K00008, K01623
		淀粉和蔗糖代谢 Starch and sucrose metabolism	K01187, K16055, K00699, K01195
		氨基糖和核苷酸糖的代谢 Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	K01183, K12373, K00849
		丙酸代谢 Propanoate metabolism	K01900, K00626

续上表

一级代谢 Primary metabolism	二级代谢 Secondary metabolism	三级代谢 Tertiary metabolism	参与基因对应 KO 号 KO number of involved genes
	能量代谢 Energy metabolism	氧化磷酸化 Oxidative phosphorylation	K03878 , K03936 , K00236 , K00411 , K02268 , K02132
		甲烷代谢 Methane metabolism	K01623
		脂肪酸生物合成 Fatty acid biosynthesis	K00665 , K01897
		类固醇的生物合成 Steroid biosynthesis	K12298
新陈代谢 Metabolism	脂类代谢 Lipid metabolism	类固醇激素的生物合成 Steroid hormone biosynthesis	K10251 , K07424 , K00699
		甘油酯代谢 Glycerolipid metabolism	K00128 , K00002 , K12298
		不饱和脂肪酸的生物合成 Biosynthesis of unsaturated fatty acids	K10251
	核苷酸代谢 Nucleotide metabolism	嘌呤代谢 Purine metabolism	K03783 , K12304 , K00873 , K13485
		嘧啶代谢 Pyrimidine metabolism	K12304 , K00207 , K01431 , K03783
		丙氨酸, 天冬氨酸和谷氨酸代谢 Alanine , aspartate and glutamate metabolism	K00814
		精氨酸和脯氨酸代谢 Arginine and proline metabolism	K12259 , K00128 , K00934 , K00286 , K12657
新陈代谢 Metabolism	氨基酸代谢 Amino acid metabolism	甘氨酸, 丝氨酸和苏氨酸代谢 Glycine , serine and threonine metabolism	K00108 , K00314 , K00552
		半胱氨酸和甲硫氨酸代谢 Cysteine and methionine metabolism	K00815
		酪氨酸代谢 Tyrosine metabolism	K00815 , K00457 , K00451 , K01555 , K00501
遗传信息加工 Genetic Information Processing	翻译 Translation	核糖体 Ribosome	K02953
	复制和修复 Replication and repair	碱基切除修复 Base excision repair	K10800
环境信息 处理 Environmental Information Processing	信号转导 Signal transduction	双组分体系 Two-component system	K00626 , K00411
		MAPK 信号通路 MAPK signaling pathway	K04372
		HIF-1 信号传导途径 HIF-1 signaling pathway	K04372

续上表

一级代谢 Primary metabolism	二级代谢 Secondary metabolism	三级代谢 Tertiary metabolism	参与基因对应 KO 号 KO number of involved genes
		FOXO 信号通路 FOXO signaling pathway	K03781
		钙信号转导通路 Calcium signaling pathway	K05863 , K02183
		PI3K-Akt 信号传导途径 PI3K-Akt signaling pathway	K10159
		AMPK 信号通路 AMPK signaling pathway	K00665
	信号分子及其相互作用 Signaling molecules and interaction	神经活性配体 - 受体相互作用 Neuroactive ligand-receptor interaction	K01312
		细胞粘附分子 (凸轮) Cell adhesion molecules (CAMs)	K07378
	运输及分解代谢 Transport and catabolism	吞噬小体 Phagosome	K05692 , K01365 , K10159 , K06560 , K13885
		溶酶体 Lysosome	K01363 , K01379 , K01371 , K01365 , K01195 , K12373 , K01137 , K14410 , K12382
		过氧化物酶体 Peroxisome	K08764 , K01897 , K13356 , K00031 , K03781
细胞过程 Cellular Processes	细胞运动 Cell motility	肌动蛋白骨架的调节 Regulation of actin cytoskeleton	K05692 , K08007 , K05768
		粘着 Focal adhesion	K05692
	细胞通讯 Cellular communication	粘着连接 Adherens junction	K05692
		紧密连接 Tight junction	K05692 , K10352 , K17751
		血小板活化 Platelet activation	K05692
	免疫系统 Immune system	Toll 样受体信号通路 Toll-like receptor signaling pathway	K10159 , K10168 , K01371
有机体系统 Organismal system		抗原加工和呈递 Antigen processing and presentation	K01363 , K01365
		胰岛素信号通路 Insulin signaling pathway	K07189 , K02183 , K00665 , K04372
	内分泌系统 Endocrine system	胰高血糖素信号通路 Glucagon signaling pathway	K02183 , K00873
		促性腺激素释放激素信号通路 GnRH signaling pathway	K02183

续上表

一级代谢 Primary metabolism	二级代谢 Secondary metabolism	三级代谢 Tertiary metabolism	参与基因对应 KO 号 KO number of involved genes
		黑色素生成 Melanogenesis	K02183
	循环系统 Circulatory system	心脏肌肉收缩 Cardiac muscle contraction	K10373, K10374, K17751, K00411, K02268
		血管平滑肌收缩 Vascular smooth muscle contraction	K02183, K10373, K10374, K17751
	消化系统 Digestive system	蛋白质的消化吸收 Protein digestion and absorption	K01312, K01389
		脂肪的消化和吸收 Fat digestion and absorption	K12298, K13885
	神经系统 Nervous system	多巴胺能突触 Dopaminergic synapse	K00501, K02183
		神经营养因子信号通路 Neurotrophin signaling pathway	K12460, K02183
	感觉系统 Sensory system	光转导 Phototransduction	K02183
		嗅觉转导 Olfactory transduction	K02183
	环境适应 Environmental adaptation	昼夜夹带 Circadian entrainment	K02183

涉及能量代谢的基因有 21 个, 其中参与氧化磷酸化的基因有 6 个, 分别为 NADH - 泛醌氧化还原酶链 1 (NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1, ND1) 基因、NADH 脱氢酶 (泛醌) 铁硫蛋白 3 [NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 3, NDUFS3] 基因、琥珀酸脱氢酶 (泛醌) 细胞色素 b560 亚基 [succinate dehydrogenase (ubiquinone) cytochrome b560 subunit, SDHC] 基因、泛醌细胞色素 C 还原酶 - Rieske 铁硫肽样 1 (ubiquinol-cytochrome c reductase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1, UQCRC1) 基因、细胞色素 C 氧化酶亚基 6C (cytochrome c oxidase subunit 6c, COX6C) 基因和 F 型 H⁺ 转运 ATP 酶亚基 α (F-type H⁺-transporting ATPase subunit alpha, ATP6F1A) 基因。这 6 个基因所编码的蛋白分别参与电子呼吸链传递的 4 个复合体以及 ADP 和 Pi 合成 ATP 的过程, 在上调差异基因中未发现与底物水平磷酸化有关的基因, 因此推测滞育过程中起主要的供能作用的反应是氧化磷酸化。滞育关联基因中, 有 32 个 unigene

涉及脂质代谢, 包括脂肪酸合酶 (fatty acid synthase, FAS)、长链酰基辅酶 A 合酶 (long-chain acyl-CoA synthetase, ACSL)、尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 (UDP-glucuronosyltransferase, UGT) 等在内的 13 个基因, 参与了脂肪酸合成与降解、类固醇的生物合成、甘油代谢等 11 个通路。

2.2.2 遗传信息加工

根据 KEGG orthology 分类结果, 滞育关联基因主要参与遗传信息加工中翻译 (translation) 和复制与修复 (replication and repair) 两个途径, 涉及核糖体和碱基切除修复两个通路。40S 核糖体蛋白 S13 (40S ribosomal protein S13, RPS13) 为小亚基核糖体蛋白, 参与核糖体途径负责识别信息。在滞育关联基因中, 共有两个 unigene 被注释为单链选择性单功能尿嘧啶 DNA 糖基化酶 (single-strand selective monofunctional uracil DNA glycosylase, SMUG1), 由于胞嘧啶残基脱氨所产生的尿嘧啶会引起基因突变, 该基因编码的蛋白质识别诱变损伤, 并去除单链或双链上的尿嘧啶来参与碱基切

除修复 (Haushalter *et al.*, 1999; Nilsen *et al.*, 2001)。同时有三个 unigene 被注释为二氢嘧啶脱氢酶 [dihydropyrimidine dehydrogenase (NADP+), DPYD], 该基因编码的蛋白是嘧啶分解过程中最初的限速酶, 催化尿嘧啶和胸腺嘧啶的降解 (Diasio and Johnson, 1999; 王晓云, 2003)。这两个基因表达量同时升高说明七星瓢虫处于滞育状态下可能导致生物体内尿嘧啶的含量升高, 进而影响 DNA 复制, 引起碱基错配, 造成诱变损伤。

2.2.3 环境信息处理

昆虫滞育是在外部不利环境到来时, 昆虫感受外界信号, 从而引起体内一系列变化的过程。滞育关联基因的 KO 比对结果显示, 环境信息处理共涉及到信号转导 (signal transduction)、信号分子及其相互作用 (signaling molecules and interaction) 两个途径, 23 个基因共参与包括双组分系统 (Two-component system)、FOXO 信号通路 (FOXO signaling pathway)、钙信号通路 (Calcium signaling pathway) 以及 PI3K-Akt 信号转导途径等在内的 17 个通路。双组分系统广泛存在于生物体中, 由组氨酸激酶 (histidine kinase) 和反应调控蛋白 (response regulator) 组成, 通过感受外部刺激来调节生物体代谢和行为的信号转导系统。滞育期间上调表达差异的泛醌细胞色素 C 还原酶, Rieske 铁硫肽样 (UQCRFS1) 基因作为泛醌-细胞色素 C 还原酶复合物的组成部分, 通过电子传递链参与氧化磷酸化途径来释放 ATP。MAP 相互作用丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (MAP kinase interacting serine/threonine kinase, MNK) 基因在七星瓢虫滞育期上调表达, 参与了 MAPK 信号通路 (MAPK signaling pathway) 以及 HIF-1 信号通路 (HIF-1 signaling pathway), 影响下游多种效应分子的磷酸化状态。过氧化氢酶 (catalase, CAT) 基因参与了 FOXO 信号通路, 其表达受到 FOXO 转录因子的调控, 主要功能是参与活性氧代谢过程。

2.2.4 细胞进程

根据 KEGG orthology 分析结果, 滞育关联基因主要参与转运和分解代谢、细胞运动、细胞生长和死亡以及细胞通讯。41 个 unigene 共参与包括吞噬体、溶酶体、过氧化物酶体以及焦点连接等在内的 8 个通路。在溶酶体中组织蛋白酶表达占比最高, 共有 5 个基因分别被注释为组织蛋白酶 L (cathepsin L, CTSL)、组织蛋白酶 B (cathepsin B, CTSB) 和组织蛋白酶 D (cathepsin D, CTSD)。

CTSL 是类木瓜蛋白酶半胱氨酸蛋白酶家族的一员, 不仅参与溶酶体内蛋白质降解, 还参与多种其他生理过程, 行使肽链内切酶的功能 (杨东辉等, 2012)。微丝结合蛋白 (villin2) 参与细胞运动中的肌动蛋白细胞骨架调控, 通过动态变化来调节众多细胞学过程。肌动蛋白 $\beta/\gamma 1$ (actin beta/gamma 1, ACTB_G1) 在溶酶体、细胞的焦点连接、黏着连接以及紧密连接等多个途径中发挥作用。5 个滞育关联基因被注释为肌球蛋白重链 (myosin heavy chain, MHC), 该基因在保证肌细胞正常工作中发挥着重要的作用。

2.2.5 有机体系统

根据 KEGG 直系同源分类, 有机体系统主要有免疫系统、内分泌系统、循环系统以及消化系统等 9 个系统, 滞育关联基因中共有 55 个参与有机体系统, 除排泄系统外, 其他 8 个系统均有涉及。有 10 个基因参与免疫系统, 其中, ACTB-G1 参与血小板活化和白细胞跨内皮迁移, toll 样受体 2 (toll-like receptor 2, TLR2) 和 TLR5 参与 Toll 样受体信号通路, 在免疫系统中发挥重要作用, CTSL 和 CTSB 参与抗原加工与提呈; 有 13 个基因涉及内分泌系统中的 14 个通路, 蛋白磷酸酶 1 糖原结合亚基 3 (protein phosphatase 1 regulatory subunit 3A/B/C/D, PPP1R3) 基因、钙调蛋白 (calmodulin, CALM) 基因、FAS 基因和 MAP 激酶相互作用丝氨酸/苏氨酸激酶 (MAP kinase interacting serine/threonine kinase) 基因作为胰岛素信号通路的下游基因参与反应, 其中, CALM 基因还涉及包括胰高血糖素信号通路、促性腺激素释放激素信号通路以及黑素生成在内的其他 7 个通路, 通过利用钙调素来作为钙感应器和信号传导分子; 此外, CALM 基因还涉及消化系统、神经系统、感觉系统以及环境适应中的多个通路, 如多巴胺能突触, 光转导, 嗅觉转导等。

3 结论与讨论

滞育是昆虫适应环境的一种表现, 这一特性既给天敌昆虫扩繁增加了难度, 也给延长天敌昆虫产品货架期提供了可能。国内外学者对七星瓢虫的生活习性 (Hagen, 2003)、捕食功能反应 (李定旭, 1991; 郝丹青和郝丹东, 2005)、人工饲料及大规模饲养 (孙毅和万方浩, 1999)、滞育诱导 (王伟等, 2013)、滞育后生物学 (王伟, 2012)

等进行了大量深入细致的研究,为七星瓢虫滞育的深入研究奠定了基础。近年来,在七星瓢虫滞育关联蛋白的研究上有了一定的突破,利用全蛋白双向电泳技术鉴定出了在滞育期差异表达的包括伴侣蛋白、三羧酸循环相关蛋白、脂代谢相关蛋白在内的7类蛋白质(刘遥,2014)。本研究通过对比七星瓢虫正常发育、滞育以及滞育解除三个不同时期基因的表达量来筛选滞育关联基因,其中滞育期上调表达基因有443个。通过KEGG Orthology分析显示,443个滞育关联基因共涉及到141个通路,主要集中在碳水化合物、脂质代谢、信号转导等途径。

昆虫滞育会导致一系列生理生化变化。生殖系统受到抑制、体内脂肪含量增加是七星瓢虫滞育最显著的特征(Okuda and Hodek,1994;王伟,2012)。通过对判定为滞育的七星瓢虫雌成虫解剖发现,滞育雌成虫体内卵巢小管中无卵黄沉积且未出现明显分化,腹部脂肪体堆积明显(王伟,2012)。脂肪体既是昆虫类脂物的贮存场所,也是昆虫生长、发育、变态以及生殖的代谢中心。在七星瓢虫滞育关联基因中,共有13个基因涉及脂代谢,其中脂肪酸合成酶以及长链脂肪酸合成酶基因参与了脂肪酸的生物合成。

FOXO信号通路(foxo signaling pathway)以叉头转录因子(forkhead transcription factor,FOXO)为中间调控因子来参与细胞凋亡、细胞周期控制、葡萄糖代谢、氧化应激抗性以及寿命相关基因的表达调控。进一步研究FOXO与过氧化氢酶基因所编码的过氧化氢酶之间的关联性时发现,该酶是FOXO调控的一个重要基因网络的组成部分,其表达受到FOXO的调控。当FOXO基因被沉默时,编码过氧化氢酶的基因表达也相应受到抑制(Cheolho and Denlinger,2011)。在七星瓢虫滞育关联基因中,过氧化氢酶(catalase,CAT)基因作为FOXO信号通路的下游效应分子在滞育期表达量显著上调。过氧化氢酶催化体内过氧化物分解,防止氧化。当生物体处于不利环境下时,体内自由基增多,使细胞膜过氧化进而导致细胞膜的破坏和损伤。因此,可以推测FOXO蛋白在七星瓢虫滞育期间脂肪积累的调控以及胁迫抗性方面发挥着重要作用。

脂肪体在昆虫代谢方面起到了重要的作用,同时也是组织蛋白酶的合成和储存器官,多种组织蛋白酶以及卵黄蛋白的合成都是在脂肪体进行。

大量的研究表明,组织蛋白酶除与昆虫的消化作用有关以外,还和昆虫的个体发育、组织分化以及变态反应密切相关。组织蛋白酶D(CTSD)属于天冬氨酸蛋白酶家族,有研究发现,组织蛋白酶D特异性降解卵黄原蛋白合成的组织和器官(Cho and Raikhel,1992)。同时,在棉铃虫*Helicoverpa armigera* Hubner中,组织蛋白酶B基因体外表达研究证实该酶参与了棉铃虫胚胎发育过程中的卵黄原蛋白水解等生理活动(Yang *et al.*,2006),因此,组织蛋白酶类基因可能参与了滞育七星瓢虫卵黄原蛋白合成的抑制过程。

麻蝇*Sarcophagidae crassipalpis* 蛹滞育过程中的基因表达研究表明,60S核糖体蛋白的表达明显上调(Flannagan *et al.*,1998),同时发现这一基因并非持续上调表达,而是与昆虫的耗氧水平有关,即耗氧速率快则基因表达量低,相反,耗氧速率低则表达量维持较高水平。在本研究中,被注释为40S核糖体蛋白S13的七星瓢虫滞育关联基因表达量明显上调,说明七星瓢虫处于滞育状态时,其氧耗水平可能较低。而另一个滞育关联基因细胞色素C氧化酶亚基6C在七星瓢虫滞育期表现为上调表达,该基因参与了线粒体中的氧化磷酸化过程,细胞色素C氧化酶所参与反应占细胞内耗氧量的90%左右。在日本甲虫*Popillia japonica*和淡色库蚊*Culex pipiens*滞育期间,细胞色素C氧化酶活性也明显增强(Ludwig,1953;Robich *et al.*,2007)。

从结果看出,七星瓢虫滞育过程中,多个通路中的基因表达量均有明显变化,说明在滞育过程中基因表达量的变化涉及昆虫生理生化多个方面,但KEGG代谢通路分析是通过整合数据来对基因更高层次的生物体形为和细胞活动进行预测,主要起到指导作用,因此,本文中所筛选出来的滞育关联基因在各个通路中的具体功能还需要通过进一步实验来验证。

参考文献 (References)

- Brautigam A, Mullick T, Schliesky S, *et al.* Critical assessment of assembly strategies for non-model species mRNA-Seq data and application of next-generation sequencing to the comparison of C3 and C4 species [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62 (9): 3093 - 3102.
- Cheolho S, Denlinger DL. Catalase and superoxide dismutase-2 enhance survival and protect ovaries during overwintering diapause in the mosquito *Culex pipiens* [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2011,

- 57 (5): 628–634.
- Cho WL, Raikhel AS. Cloning of cDNA for mosquito lysosomal aspartic protease. Sequence analysis of an insect lysosomal enzyme similar to cathepsins D and E [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267 (30): 21823–21829.
- Denlinger DL. Regulation of diapause [J]. *Annual Review of Entomology*, 2002, 47: 93–122.
- Diasio RB, Johnson MR. Dihydropyrimidine dehydrogenase: Its role in 5-fluorouracil clinical toxicity and tumor resistance [J]. *Clinical Cancer Research*, 1999, 5 (10): 2672–2673.
- Dong YC, Desneux N, Lei CL, et al. Transcriptome characterization analysis of *Bactrocera minax* and new insights into its pupal diapause development with gene expression analysis [J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2014, 10 (9): 1051–1063.
- Fan L, Lin J, Zhong Y, et al. Shotgun proteomic analysis on the diapause and non-diapause eggs of domesticated silkworm *Bombyx mori* [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8 (4): 60386.
- Flannagan RD, Tammariello SP, Joplin KH, et al. Diapause-specific gene expression in pupae of the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95 (10): 5616–5620.
- Garg R, Patel RK, Tyagi AK, et al. De novo assembly of chickpea transcriptome using short reads for gene discovery and marker identification? [J]. *DNA Research*, 2011, 18 (1): 53–63.
- Hagen KS. Biology and ecology of predaceous Coccinellidae [J]. *Annual Review of Entomology*, 2003, 7 (12): 289–326.
- Hao DQ, Hao DD. Study on the functional response of *Coccinella septempunctata* L. to *Myzus persicae* [J]. *Journal of Agricultural Sciences*, 2005, 26 (2): 18–20. [郝丹青, 郝丹东. 七星瓢虫对桃蚜的捕食功能反应研究 [J]. 农业科学研究, 2005, 26 (2): 18–20]
- Haushalter KA, Stukenberg MWT, Kirschner MW, et al. Identification of a new uracil-DNA glycosylase family by expression cloning using synthetic inhibitors [J]. *Current Biology*, 1999, 9 (4): 174–185.
- Hodek I. The influence of *Aphis sambuci* L. as prey of the ladybird beetle *Coccinella septempunctata* L. [J]. *Vest. Cs. Spol. Zool*, 1956, 20: 62–74.
- Jing Y, Huang J. Study progress on *Coccinella septempunctata* L. [J]. *Wuyi Science Journal*, 2002, 18 (1): 218–221. [荆英, 黄建. 七星瓢虫的研究概况 [J]. 武夷科学, 2002, 18 (1): 218–221]
- Li DX. Effect of temperature on the functional response of *Coccinella septempunctata* [J]. *Natural Enemies of Insects*, 1991, 13 (3): 130–132. [李定旭. 温度对七星瓢虫功能反应的影响 [J]. 昆虫天敌, 1991, 13 (3): 130–132]
- Liu Y, Zhang LS, Chen HY, et al. Differential expression of malate dehydrogenase and isocitrate dehydrogenase in diapaused ladybird, *Coccinella septempunctata* L. [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2014, 5: 593–599. [刘遥, 张礼生, 陈红印, 等. 苹果酸脱氢酶与异柠檬酸脱氢酶在滞育七星瓢虫中的差异表达 [J]. 中国生物防治学报, 2014, 5: 593–599]
- Liu Y. Studies on Differential Expression of Diapause Related Proteins in the Female Ladybird, *Coccinella septempunctata* L. [D]. Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2014. [刘遥. 七星瓢虫雌成虫滞育相关蛋白差异表达的研究 [D]. 中国农业科学院, 2014]
- Ludwig D. Cytochrome oxidase activity during diapause and metamorphosis of the Japanese beetle, *Popillia japonica* Newman [J]. *Journal of General Physiology*, 1953, 36 (6): 751–757.
- Mao WF, Cao MX. Isolation and purification of diapause-associated proteins from hemolymph in *Ostrinia furnacalis* [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2001, 44 (4): 389–394. [毛文富, 曹梅. 亚洲玉米螟滞育关联蛋白的分离和纯化 [J]. 昆虫学报, 2001, 44 (4): 389–394]
- Nilsen H, Haushalter KA, Robins P, et al. Excision of deaminated cytosine from the vertebrate genome: Role of the SMUG1 uracil–DNA glycosylase [J]. *Embo Journal*, 2001, 20 (15): 4278–4286.
- Okuda T, Hodek I. Diapause and photoperiodic response in *Coccinella septempunctata* brucki Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae) in Hokkaido, Japan [J]. *Applied Entomology & Zoology*, 1994, 29: 549–554]
- Renfree MB, Shaw G. Insect seasonality: Diapause maintenance, termination and postdiapause development [J]. *Annual Review of Entomology*, 1976, 21 (6): 81–107.
- Ren XY, Zhang LS, Qi XY, et al. Metabolic adaptation and evaluation of cold hardiness on diapausing ladybird, *Coccinella septempunctata* L. [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2015, 37 (6): 1195–1202. [任小云, 张礼生, 齐晓阳, 等. 滞育七星瓢虫的代谢适应与抗寒性评价 [J]. 环境昆虫学报, 2015, 37 (6): 1195–1202]
- Robich RM, Rinehart JP, Kitchen LJ, et al. Diapause-specific gene expression in the northern house mosquito, *Culex pipiens* L., identified by suppressive subtractive hybridization [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2007, 53 (3): 235–245.
- Sun Y, Wan FH. Mass Rearing *Coccinella septempunctata* L. (Col.: Coccinellidae) with artificial diets: Problems and substitute diets [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 1999, 15 (4): 169–173. [孙毅, 万方浩. 七星瓢虫人工饲料的研究现状及发展对策 [J]. 中国生物防治, 1999, 15 (4): 169–173]
- Tauber MJ, Tauber CA, Masaki S. Seasonal Adaptations of Insects [M]. Oxford: Oxford University Press, 1986, 37.
- Wang W, Zhang LS, Chen HY, et al. Research progress in diapause of the lady beetles [J]. *Plant Protection*, 2011, 37 (5): 27–33. [王伟, 张礼生, 陈红印, 等. 瓢虫滞育的研究进展 [J]. 植物保护, 2011, 37 (5): 27–33]
- Wang W. Effects of Temperature and Photoperiod on Regulation of Diapause and Post-diapause Biology in *Coccinella septempunctata* [D]. Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2012. [王伟. 七星瓢虫滞育调控的温光周期效应及滞育后生物学研究 [D]. 中国农业科学院, 2012]
- Wang W, Zhang LS, Chen HY, et al. Effects of temperature and light on diapause induction in lady beetle *Coccinella septempunctata* in

- Beijing, China [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2013, 1: 24–30. [王伟, 张礼生, 陈红印, 等. 北京地区七星瓢虫滞育诱导的温光效应 [J]. 中国生物防治学报. 2013, 1: 24–30]
- Wang XY. Study progress on relationship of 5-fluorouracil toxicity and dihydropyrimidine dehydrogenase gene polymorphism [J]. *Foreign Medical Sciences Section on Pharmacy*, 2003, 30 (3): 178–181. [王晓云. 5-氟尿嘧啶的毒副作用与二氢嘧啶脱氢酶基因多态性关系的研究进展 [J]. 国外医学: 药学分册, 2003, 30 (3): 178–181]
- Xin YF. A study on artificial method of rearing soybean aphids [J]. *Journal of Shenyang Agricultural College*, 1982, 1: 77–80. [忻亦芬. 大豆蚜简易人工饲养 [J]. 沈阳农业大学学报, 1982, 1: 77–80]
- Yang DH, Liu Y, Xiao R, et al. The structure and function of cathepsin L [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2012, 28 (12): 1093–1099. [杨东辉, 刘宇, 肖蓉, 等. 组织蛋白酶 L 的结构与功能 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2012, 28 (12): 1093–1099]
- Yang XM, Hou LD, Shao HL, et al. Cathepsin B-like proteinase is involved in the decomposition of the adult fat body of *Helicoverpa armigera* [J]. *Archives of Insect Biochemistry & Physiology*, 2006, 62 (1): 1–10.
- Zhang LS, Liu Y, Jiang S, et al. The categories and regulatory mechanisms of diapause-related proteins on *Coccinella septempunctata* L. In: Construction of Ecological Civilization and Green Plant Protection [C]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2014, 538–539. [张礼生, 刘遥, 蒋莎, 等. 七星瓢虫滞育相关蛋白的类别及调控机理. 见: 生态文明建设与绿色植保 [C]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2014, 538–539]
- Zhang Y, Jiang R, Wu H, et al. Next-generation sequencing-based transcriptome analysis of *Cryptolaemus montrouzieri* under insecticide stress reveals resistance-relevant genes in ladybirds [J]. *Genomics*, 2012, 100 (1): 35–41.
- Zhao ZW, Huang YP. Research advances on diapause-associated proteins of insect [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 1996, 3: 187–189. [赵章武, 黄永平. 昆虫滞育关联蛋白的研究进展 [J]. 应用昆虫学报, 1996, 3: 187–189]
- Zhu JY, Zhao N, Yang B. Global transcriptome profiling of the pine shoot beetle, *Tomicus yunnanensis* (Coleoptera: Scolytinae) [J]. *PLoS ONE*, 2011, 7 (2): 476.