

取食人工饲料和豆蚜的七星瓢虫转录组比较分析

程英, 周宇航, 金剑雪, 李凤良*

(贵州省农业科学院植物保护研究所, 贵阳 550006)

摘要: 为明确七星瓢虫 *Coccinella septempunctata* L. 取食人工饲料和豆蚜 *Aphis craccivora* 的生物特性分子机制和营养代谢通路, 利用高通量测序技术分析七星瓢虫4龄幼虫和成虫的相对转录水平。结果显示, 从18个样本中共筛选出1 234 640 650条clean reads, 与参考基因组比对到813 335 465条序列。通过DESeq2软件分析, 其中有11 120个差异基因 (DEGs) 表达水平发生了显著的变化, 总共有2 280条DEGs被注释到KEGG通路中。在取食人工饲料的七星瓢虫中, 与生物学特性相关的细胞色素P450 (Cytochrome P450)、保幼激素环氧水解酶 (Juvenile hormone epoxide hydrolase, JHEH)、保幼激素酯酶 (Juvenile-hormone esterase, JHE)、保幼激素III合成酶 (Juvenile hormone-III synthase, JHAMT)、多巴脱羧酶 (Dopa decarboxylase, DDC) 和几丁质酶 (Chitinase) 大部分DEGs在4龄幼虫、雌雄成虫中下调, 精液蛋白基因 α -酮戊二酸脱氢酶 (2-oxoglutarate dehydrogenase, sucA) 和胰岛素样生长因子2 (Insulin-like growth factor 2) DEGs在雌、雄成虫中均上调, 脂蛋白 (Lipoprotein) DEGs在雌虫中大部分上调, 蜕皮诱导蛋白 (Ecdysone-induced protein) 基因在幼虫中下调。DEGs在KEGG中富集到6个氨基酸、7个脂类代谢、2个淀粉和糖代谢、7个维生素相关代谢通路。其中取食人工饲料的七星瓢虫大部分氨基酸代谢通路基因下调; 脂类代谢在成虫中大部分下调, 而在幼虫中大部分上调; 淀粉和糖代谢在成虫中大部分上调, 但在幼虫中大部分下调; 维生素在幼虫中大部分下调。qRT-PCR验证证明了转录组测序获得序列质量的可靠性, 可作为后续试验的研究基础。这些转录组数据为进一步优化人工饲料提供了参考依据, 促进人工饲料配方的改良。

关键词: 七星瓢虫; 转录组测序; 差异表达基因; 代谢通路; 实时荧光定量PCR

中图分类号: Q968.1;S433

文献标识码: A

Transcriptome analysis of *Coccinella septempunctata* fed on artificial diets and *Aphis craccivora*

CHENG Ying, ZHOU Yu-Hang, JIN Jian-Xue, LI Feng-Liang* (Institute of Plant Protection, Guizhou Provincial Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550006, China)

Abstract: The biological characteristics and metabolic pathways of *Coccinella septempunctata* were analyzed on beetles supplied with artificial diets and *Aphis craccivora*. High-throughput sequencing technology was used to analyze relative transcription levels of *C. septempunctata* in 4th instar larvae and adults. A total of 1 234 640 650 clean reads were screened from 18 samples and compared with 813 335 465 sequences in the reference genome. DESeq2 analysis indicated

基金项目: 国家自然科学基金 (31960562); 黔农科院国基后补助项目 ([2021]45号)

作者简介: 程英, 女, 博士, 副研究员, 研究方向为天敌昆虫应用及害虫综合治理, E-mail: chying2000@126.com

*通讯作者 Author for corresponding: 李凤良, 男, 研究员, 研究方向为昆虫抗性机理及综合治理, E-mail: LFL0851@126.com

收稿日期 Received: 2023-11-16; 接受日期 Accepted: 2024-04-07

that the expression levels of 11 120 differentially expressed genes (DEGs) were significantly changed, and a total of 2 280 DEGs were annotated in the KEGG pathway. Among *C. septempunctata* fed on artificial diets, Cytochrome P450, Juvenile hormone epoxide hydrolase (JHEH), Juvenile hormone esterase (JHE), Juvenile hormone III synthase (JHAMT), Dopa decarboxylase (DDC), and many DEGs were down-regulated in 4th instar larvae and male and female adults. Semen protein gene, 2-oxoglutarate dehydrogenase (sucA) and Insulin-like growth factor 2 were upregulated in both male and female adults, and lipoprotein DEGs were upregulated in females; Ecdysone-induced protein genes were downregulated in larvae. Enriched DEGs included pathways encoding amino acids, fat metabolism, starch and sugar metabolism, and vitamin-related metabolism. In *C. septempunctata* fed on artificial diets, the DEGs involved in amino acid metabolism were generally down-regulated; whereas DEGs involved in fat metabolism were downregulated in adults and upregulated in larvae. DEGs involved in starch and sugar metabolism were upregulated in adults and downregulated in larvae, and vitamin-related DEGs were downregulated in larvae. Quantitative real-time PCR verification showed that the sequence quality of transcriptome met the basic requirements for transcriptome data analysis. These transcriptome data provide reference for further optimization of artificial diet and promote the improvement of artificial diet formula.

Key words: *Coccinella septempunctata*; transcriptome sequencing; differentially expressed genes; metabolic pathways; quantitative real-time PCR

七星瓢虫 *Coccinella septempunctata* L.属鞘翅目 Coleoptera 瓢虫科 Coccinellidae 瓢虫属 *Coccinella*, 具有食量大、产卵多、适应性强、年发生代数多等特点, 是蚜虫、叶蝉和粉虱等重要害虫的捕食性天敌(郭在彬等, 2016; Chatha *et al.*, 2020; 晁文娣等, 2021; Bajracharya *et al.*, 2023)。至 20 世纪 50 年代以来(Smirnoff, 1958), 国内外学者对瓢虫人工饲料做了大量的研究, 但到目前为止仍然没有一种理想的、可以规模化繁殖瓢虫的人工饲料(Cheng *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2020; Aalaoui and Sbaghi, 2023)。昆虫需要一些必须营养来满足自身的生长、发育和繁殖, 昆虫人工饲料中一种或多种营养成分过低或过高都不利于昆虫生长发育。人工饲料中的蛋白质含量过高, 会增加甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 的代谢负担(李广宏等, 1998); 含糖量低于 10%将导致棉铃虫 *Heliothis armigera* 蛹的脂肪含量下降, 成虫寿命缩短, 产卵量显著减少, 含糖量超过 28%会使幼虫代谢负担加重, 成虫繁殖力下降(吴坤军和李明辉, 1993); 营养不平衡的昆虫人工饲料减少古毒蛾追寄蝇 *Exorista larvarum* 的产卵量(Dindo *et al.*, 2006); 黄粉虫 *Tenebrio molitor* 饲料中蛋白质含量在 14%时川硬皮肿腿蜂 *Scleroderma sichuanensis* 寄生能力最强(黄雄等, 2016)。昆虫生长、发育和生殖等生物学特性还受到保幼激素酶(李胜等, 2004), 蜕皮激素相关的细胞色素 P450(Wooded *et al.*, 1994)、几丁质酶(Yocum *et al.*, 2006)、蜕皮诱导蛋白和卵黄原蛋白基因(沈关望等, 2014), 雄性生殖蛋白基因 α -酮戊二酸脱氢酶和胰岛素样生长因子(陈广梅等, 2020)等相关基因的调控。

研究昆虫人工饲料的困难在于对调控一种昆虫种群适切性的生理生化过程缺乏了解,并且缺少能用来评价昆虫对特殊营养源适合性的生理或生化标记(邹德玉, 2013)。目前,人们对动物营养学的研究已从传统的剂量——功能效应研究模式向基因水平上研究营养物质对基因结构和基因表达调控影响方面转变。高通量测序和生物信息学的发展使得昆虫基因组和转录组等数据信息的获取更加方便,基因功能的注释、差异基因的比较和基因表达情况的分析都能给基因功能的研究提供极大的便利(张棋麟和袁明龙, 2013)。本研究通过对取食人工饲料和豆蚜 *Aphis craccivora* 的七星瓢虫 4 龄幼虫和成虫转录组测序比对,分析生物学特性相关基因的差异表达和营养相关代谢通路的差异性,为七星瓢虫人工饲料的改良提供科学指导。

1 材料与方法

1.1 材料

供试虫源:本研究所用的虫源采至贵州省农业科学院试验田。在室内用豆蚜饲养 10 代后,将初孵化的幼虫和初羽化的成虫置于人工气候箱用人工饲料饲养;对照处理成虫和幼虫均用豆蚜饲养。人工气候箱参数设置分别为:相对湿度 70%±5%、温度 25±1°C、光周期 14 L:10 D。每天更换新鲜豆蚜和人工饲料。

人工饲料成分:猪肝 105 g、奶粉 15 g、蔗糖 45 g、橄榄油 2 g、鸡蛋 10 g、玉米油 2 g、酵母粉 7.5 g、胆固醇 0.5 g、干酪素 5 g、65%保幼激素 III 4.8 μL、蛋白粉 4.5 g、维生素 E 1 g、维生素 C 1 g、虾仁 72 g、花粉 12 g、猪油 15 g、蜂蜜 22 g、琼脂 9.6 g、纯净水 575.0 g、山梨酸(有效含量 99.0%) 1.6 g。

饲料配制:先将生猪肝和虾仁(去掉虾壳、头、胸和尾部)用 JJ-2 组织捣碎机捣碎成泥状,然后称取各种饲料成分,放入 1 000 mL 烧杯中混匀。再称取琼脂,放入盛有纯净水的烧瓶中,加热融解后加入山梨酸,搅拌均匀并使温度下降到 40~50°C 时,迅速倒入饲料烧杯中,快速搅拌均匀,分装至培养皿(d=9 cm, h=1.5 cm)待冷却至室温即可得到用以饲养七星瓢虫的半固态人工饲料,放入 4°C 冰箱保存备用。

试剂:RNA 提取试剂 Tizol, 美国 Ambion 公司; Hieff NGS® mRNA Isolation Master Kit (Yeasen Cat#12603) 试剂盒、Hieff NGS® DNA Selection Beads 磁珠, Yeasen Biotechnology 上海; HiScript® Q RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper), 诺唯赞; ChamQ SYBR qPCR Master Mix, 诺唯赞; Optically Clear Adhesive Seal Sheets, ABI; 其余试剂均为国产分析纯。

仪器:台式离心机 CR4i、NanoDrop 8000 分光光度计、Qubit 4.0, Thermo Fisher Scientific; 冷冻离心机 5515R, 德国 OHAUS; 荧光定量 PCR 仪 QuantStudio™5 Real-Time PCR System, Applied Biosystems; 凝胶成像系统 GelDoc™XR+, BIO-RAD。水浴锅, 上海合恒; DNBSEQ-T7 测序平台, MGI 华大智造。

1.2 方法

1.2.1 cDNA 文库构建和转录组测序

本研究分别对取食人工饲料和豆蚜的七星瓢虫4龄幼虫和雌、雄成虫按照 TRIzol[®] Reagent 试剂盒的要求提取总 RNA，每处理 3 个生物学重复，共得到 18 管样品。

测序工作经由武汉百易汇能生物科技有限公司完成。提取样品总RNA后，分别采用Qubit 4.0、Agilent 2100和NanoDrop分光光度计对样本进行浓度、完整性和纯度质控。选用Hieff NGS[®] mRNA Isolation Master Kit Yeasen Cat#12603) 试剂盒，用带有Oligo (dT) 的磁珠通过 A-T互补配对与mRNA的polyA结合的方式从Total RNA中富集mRNA。随后加入fragmentation buffer将mRNA打断成短片段，以mRNA为模板，用六碱基随机引物 (random hexamers) 合成第一条cDNA链，然后加入缓冲液、dNTPs、RNase H和DNA polymerase I合成第二条cDNA链，接下来对双链cDNA进行末端修复和3'末端加poly (A)，连接测序接头，使用Hieff NGS[®] DNA Selection Beads磁珠进行纯化及片段选择，最后进行PCR扩增，获得文库。使用Qubit进行定量质控，文库质量合格后采用DNBSEQ-T7进行上机测序。

1.2.2 Unigene 功能注释及差异基因表达和富集

利用 fastp (v0.21.0) 软件对测序得到的原始数据 (raw data) 进行过滤，去除接头序列以及低质量 reads，获得高质量的数据 (clean data)。其中七星瓢虫参考基因组下载自 NCBI (icCocSept1.1)，具体步骤：(1)去除 3'端带接头的序列；(2)去除平均质量分数低于 Q20 的 Reads。使用 HISAT2 (v2.1.0) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Coccinella%20septempunctata%20>) 构建七星瓢虫参考基因组 (GCF-907165205.1) 的索引，并使用 HISAT2 (v2.1.0) 将配对末端 clean reads 与参照基因组比对。使用 StringTie (V2.1.5) 统计比对到每一个基因上 Read Count 值，作为基因的原始表达量。为了使不同基因、不同样本间的基因表达水平具有可比性，采用 FPKM 对表达量进行标准化(Normalization)。然后使用 DESeq2 (v1.30.1) 软件进行两个比较组合之间的差异表达分析。使用 DESeq2 (v1.30.1) 软件进行两个比较组合之间的差异表达分析，筛选差异表达基因条件为：表达差异倍数 $|\log_2\text{FoldChange}| > 1$ ，显著性 $\text{padj} \leq 0.05$ 。使用 Cluster Profiler 软件进行 GO 富集分析，通过超几何分布方法计算 P-value (显著富集的标准为 $\text{padj} < 0.05$)，找出差异基因显著富集的 GO term，从而确定差异基因行使的主要生物学功能。使用 Cluster Profile (v3.18.1) 软件进行 KEGG 通路富集分析。

1.2.3 荧光定量PCR检测基因表达

基于上述GO富集分析筛选出来的在七星瓢虫幼虫和成虫中表达量高且具有统计学显著性的生物特性相关基因，使用软件Primer 5.0设计荧光定量引物 (表1)，引物由武汉百易汇能生物科技有限公司合成，参照刘梦姚等 (2019) 设计的ACTIN作为内参基因。取1.2.1节提取的七星瓢虫幼虫和成虫RNA进行反转录合成cDNA，反转录过程按照HiScript[®] Q RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)反转录试剂盒使用说明书进行。qRT-PCR体系 (10 μL): 2xqPCRmix混合物5 μL ，模板cDNA 2 μL ，上下游引物各0.25 μL ，ddH₂O 2.5 μL 。反应程序为95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，共40个循环；95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s、95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。实验包

含3次生物学重复，每次生物学重复进行3次技术重复。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Pfaffl, 2001) 方法来分析相对基因表达。

表 1 qRT-PCR 所用引物序列
Table 1 Primers used in qRT-PCR

验证的目的基因 Genes for qRT-PCR	基因编号 Gene ID	引物 (5'-3') Primer sequence(5'-3')
<i>CYP450</i>	LOC123309713	Forward: TCGGTTTCCAGCAGTCAGT Reverse: GATGTAGAGCAGCACCAATAGG
<i>JHE</i>	LOC123310753	Forward: TTTGGAGGCAGCAGTCGT Reverse: CAGGTGTGCCATAAAGC
<i>JHAMT</i>	LOC123310042	Forward: ATGTTGGCTGTGGTTCTGG Reverse: TCTTCGGTATGACCTCTTGCT
<i>Vg</i>	LOC123308220	Forward: AGTGGTGTGGTCATGCGTG Reverse: TTCTGCTGAGGTTGAGTCTGTC
<i>DDC</i>	LOC123310894	Forward: AGGATAAACGCCAGGGGT Reverse: TCAGCAGATTCTCGCACTTC
<i>sucA</i>	LOC123310801	Forward: TTAGGCGATAGGAAAGGAGAC Reverse: AAAGCAGGTGAAATGAGGC
<i>IGF2</i>	LOC123312538	Forward: CTAACGAGAACGATCTGCGA Reverse: CAATAGCCCTGTCTGCGG
<i>JHEH</i>	LOC123313454	Forward: CCGTTCAAGGAAGGATGG Reverse: CCTCTCACGCAGGCAGTT
<i>EP93F</i>	LOC123314513	Forward: ACAGCATTGAAAACAGAGCTTT Reverse: CTATGTGCCATCACCAGGAA
<i>Chitinase</i>	LOC123312858	Forward: ACCTTCGGTTCCTTCTACTA Reverse: CGGATGACAGACGGTGTTT
<i>ACTIN</i>	ACTIN	Forward: GATTCGCCATCCAGGACATCTC Reverse: TCCTTGCTCAGCTTGTTGTAGTC

注: CYP450, 细胞色素P450; JHE, 保幼激素酯酶; JHAMT, 保幼激素III合成酶; Vg, 卵黄原蛋白; DDC, 多巴脱羧酶; sucA, α -酮戊二酸脱氢酶; IGF2, 胰岛素样生长因子2; JHEH, 保幼激素环氧水解酶; EP93F, 蜕皮激素诱导蛋白93F; Chitinase, 几丁质; *ACTIN*, 内参基因。Note: CYP450, Cytochrome P450; JHE, Juvenile-hormone esterase; JHAMT, Juvenile hormone-III synthase; Vg, Vitellogenin; DDC, Dopa decarboxylase; sucA, 2-oxoglutarate dehydrogenase; IGF2, Insulin-like growth factor 2; JHEH, Juvenile hormone epoxide hydrolase; EP93F, Ecdysone-induced protein 93F; Chitinase; *ACTIN*, Internal reference gene.

1.3 数据分析

采用 DPS 17.0 软件 (Tang and Zhang, 2013) 对试验数据进行单因素方差分析, 应用两样本 Student t 检验进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 七星瓢虫转录组测序序列分析

测序共获得原始序列片段 1 235 435 942 (Total number of reads), 去除由于接头自连等原因导致没有插入片段的 reads、序列末端 (3'端) 低质量 (质量值小于 20) 的碱基占比大于 50%、含 N 比率超过 10% 的 reads 的序列, 从七星瓢虫的文库中一共得到 1 234 640 650 个高质量 clean reads (表 2)。所有这些高质量的 reads 应用 hisat2 软件 (Kim *et al.*, 2015) 与参考基因组比对, 比对到参考序列上的序列总数为 813 335 465, 其中在参考序列上有唯一

比对位置的序列数目为 791 338 703。采用 FPKM 对表达量进行标准化分析, 276 787 个基因中低丰度表达基因为 76 149, 中等丰富度表达基因为 64 359, 高丰富度表达基因为 81 353。

表 2 七星瓢虫转录组的概要

Table 2 Summary of the *Coccinella septempunctata* transcriptome

概要 Summary	数目 Number
原始序列读取片段 Total number of reads	1 235 435 942
纯净读取片段总数 Number of clean reads	1 234 640 650
maps 总数 Total number of maps	813 335 465
uniquely maps 总数 Total number of uniquely maps	791 338 703
表达基因总数 Total number of genes	276 787
低丰度表达基因(FPKM: 0.1~3.75) Total number of genes	76 149
中等丰度表达基因(FPKM: 3.75~15) Total number of genes	64 359
高丰度表达基因(FPKM: > 15) Total number of genes	81 353

2.2 差异表达基因 (DEGs) 分析

在两种不同的食物处理中, 为了识别重要基因的表达变化, 本研究使用 DESeq2 软件 (Love *et al.*, 2014) 做了不同的基因表达分析, 其中有 11 120 个 DEGs 表达水平发生了显著的变化 ($FDR < 0.05$, $|\log_2FC| \geq 1$)。人工饲料饲养的雌虫 (ZSC) 与豆蚜饲养的雌虫 (CKC) 相比共计有 5 068 个 DEGs, 其中 2 880 个基因上调, 2 186 个基因下调 (图 1-a)。人工饲料饲养的雄虫 (ZSX) 与豆蚜饲养的雄虫 (CKX) 相比共计有 3 188 个 DEGs, 其中 1 084 个基因上调, 2 104 个基因下调 (图 1-b)。人工饲料饲养的幼虫 (ZSY) 与豆蚜饲养的幼虫 (CKY) 相比共计有 2 864 个 DEGs, 其中 1 593 个基因上调, 1 271 个基因下调 (图 1-c)。

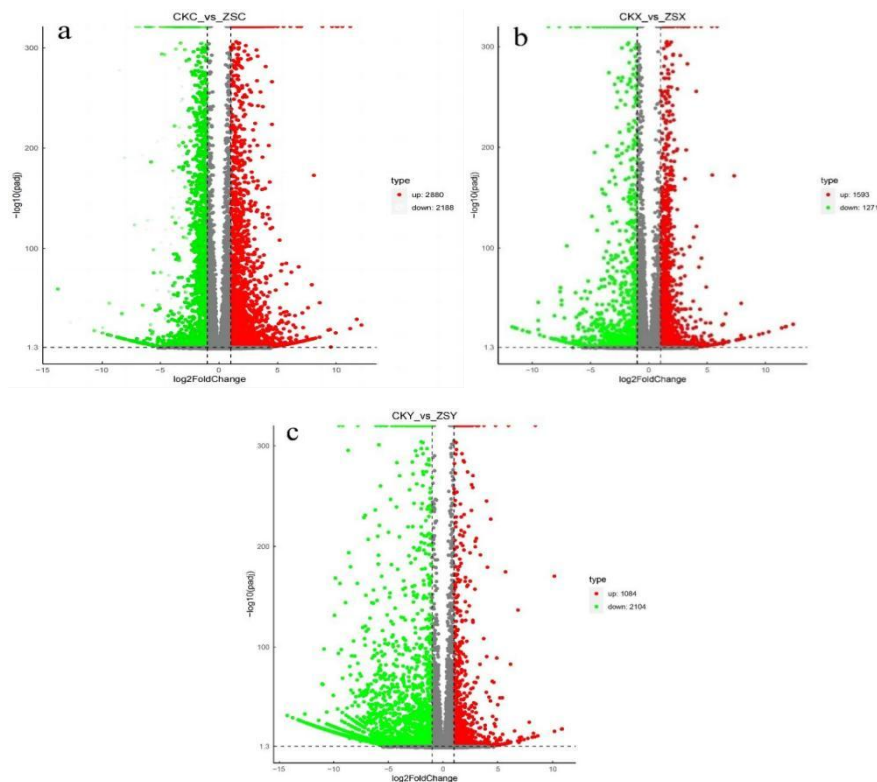


图 1 取食人工饲料和豆蚜的七星瓢虫差异表达基因 (DEGs) 的表达水平

Fig. 1 Expression level of the differentially expressed genes (DEGs) of *Coccinella septempunctata* in artificial

diet-fed-vs prey-fed treatments

注: a, 雌虫; b, 雄虫; c, 幼虫; ZSC, 取食人工饲料雌虫; CKC, 取食豆蚜雌虫; ZSX, 取食人工饲料雄虫; CKX, 取食豆蚜雄虫; ZSY, 取食人工饲料幼虫; CKY, 取食豆蚜幼虫。Note: a, Female; b, Male; c, Larva; ZSC, Female fed on artificial diets; CKC, Female fed on *Aphis craccivora*; ZSX, Male fed on artificial diets; CKX, Male fed on *Aphis craccivora*; ZSY, Larva fed on artificial diets; CKY, Larva fed on *Aphis craccivora*.

2.3 差异基因的 GO 功能分析和 KEGG 富集

共有 2 573 条 DEGs 序列被注释到 GO 中(图 2), GO 注释中最多的是生物过程(1 168, 45.39%), 然后是细胞成分(595, 23.12%)和分子功能(810, 31.48%)。5 个主要的亚类是分子功能的结合(422)和催化活性(283), 生物学过程中的代谢过程(310)、细胞过程(297)和单体过程(149)。在 DEGs 序列 GO 注释中, 下调基因明显多于上调基因, 在 5 个主要的亚类中下调基因也明显多于上调基因。在 GO 注释中分别富集到脂质代谢过程、脂肪酶活性、核糖核苷二磷酸还原酶活性、细胞氨基酸代谢过程、氨基酰化酶活性、碳水化合物代谢过程、跨膜转运蛋白活性等营养代谢相关的 DEGs。

共有 2 280 条 DEGs 被注释到 KEGG 通路中, 数目最多的前 20 个通路主要集中在代谢、细胞过程和有机系统, 其中次生代谢产物的生物合成最高(50), 其次是溶酶体(39)和细胞凋亡(18)(图 3)。在 DEGs 的 KEGG 中富集到 6 个氨基酸的相关代谢通路(表 3), 6 个通路中在取食人工饲料的七星瓢虫中除谷胱甘肽代谢酶基因的代谢通路大部分上调外, 其余代谢通路基因大部分下调。在脂类代谢的 7 个 KEGG 通路中, 取食人工饲料雌成虫脂肪的消化和吸收通路的上调基因多于下调基因, 雄成虫丙酮酸代谢通路的上调基因多于下调基因, 其余通路下调基因均多于上调基因; 取食人工饲料幼虫只有脂肪细胞因子信号通路和丙酮酸代谢通路的下调基因多于上调基因, 其余通路下调基因均少于上调基因。在淀粉和糖代谢中富集到 2 个通路, 取食人工饲料成虫的淀粉和蔗糖代谢、碳水化合物的消化和吸收代谢通路上调基因均多于下调基因, 而取食人工饲料的幼虫糖代谢通路基因基本下调。与维生素相关的代谢中富集到 6 个通路, 维生素代谢通路的绝大部分差异基因发生了下调。在上述的几类代谢通路中, 取食人工饲料的雌虫差异基因发生下调比雄虫多, 可能是雌虫产卵需要消耗大量的营养; 而雄虫只需维持生命消耗营养, 剩余的大量营养储存在体内。

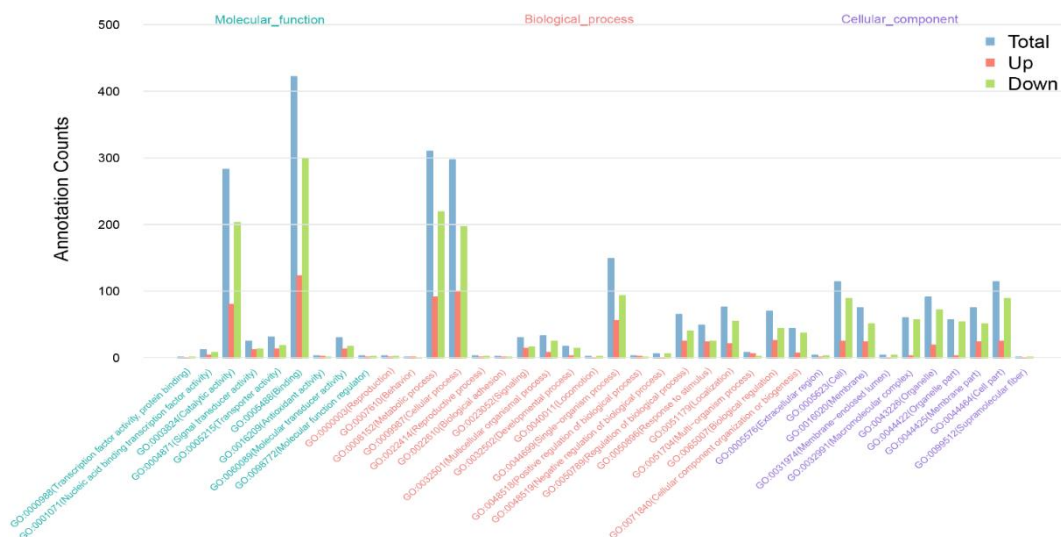


图2 七星瓢虫差异基因 (DEGs) 的 GO 注释分析

Fig. 2 Gene Ontology categories of the differentially expressed genes of *Coccinella septempunctata*

注: Annotation Counts, 注释数; Molecular function, 分子功能; Biological process, 生物过程; Cellular component, 细胞成分; Transcription factor activity, protein binding, 转录因子活性, 蛋白质结合; Nucleic acid binding transcription factor activity, 核酸结合转录因子活性; Catalytic activity, 催化活性; Signal transducer activity, 信号传感器活性; Transporter activity, 转运活性; Binding, 结合; Antioxidant activity, 抗氧化活性; Molecular transducer activity, 分子传感器活性; Molecular function regulator, 分子功能调节; Reproduction, 生殖; Behavior, 行为; Metabolic process, 代谢过程; Cellular process, 细胞过程; Reproductive process, 生殖过程; Biological adhesion, 生物粘附; Signaling, 信号; Multicellular organismal process, 多细胞生物过程; Developmental process, 发育过程; Locomotion, 运动; Single-organism process, 单体过程; Positive regulation of biological process, 生物过程正向调控; Negative regulation of biological process, 生物过程负向调控; Regulation of biological process, 生物过程调节; Response to stimulus, 刺激反应; Localization, 定位; Multi-organism process, 多生物过程; Biological regulation, 生物调节; Cellular component organization or biogenesis, 细胞成分组织或生物发生; Extracellular region, 细胞外区; Cell, 细胞; Membrane, 膜; Membrane-enclosed lumen, 膜-封闭腔; Macromolecular complex, 大分子复合物; Organelle, 细胞器; Organelle part, 细胞器部分; Membrane part, 膜部分; Cell part, 细胞部分; Supramolecular fiber, 超分子纤维。

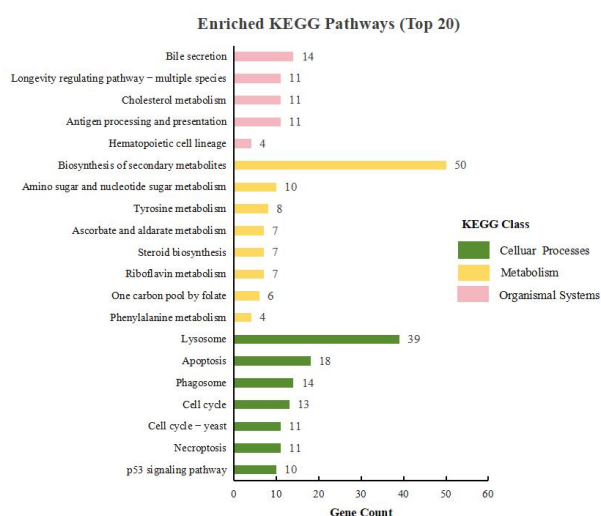


图3 KEGG 代谢前 20 个通路

Fig. 3 Top 20 pathways for Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes metabolism

注: Enriched KEGG pathway, KEGG 富集通路; KEGG Class, KEGG 分类; Cellular Processes, 细胞过程; Metabolism, 新陈代谢; Organismal Systems, 有机系统; Bile secretion, 胆汁分泌; Longevity regulating pathway - multiple species, 长寿调节途径—多物种; Cholesterol metabolism, 胆固醇代谢; Antigen processing and presentation, 抗原加工提呈; Hematopoietic cell lineage, 造血细胞谱系; Biosynthesis of secondary metabolites, 次生代谢产物的生物合成; Amino sugar and nucleotide sugar metabolism, 氨基糖和核苷酸糖代谢; Tyrosine metabolism, 酪氨酸代谢; Ascorbate and aldarate metabolism, 抗坏血酸和醛酸盐代谢; Steroid biosynthesis, 类固醇生物合成; Riboflavin metabolism, 核黄素代谢; One carbon pool by folate, 叶酸碳库; Phenylalanine metabolism, 苯丙氨酸代谢; Lysosome, 溶酶体; Apoptosis, 细胞凋亡; Phagosome, 吞噬体; Cell cycle, 细胞周期; Cell cycle-yeast, 细胞周期-酵母; Necroptosis, 坏死; p53 signaling pathway, p53 信号通路。

表 3 与人工饲料营养相关的差异表达基因的代谢通路

Table 3 KEGG of DEG related to nutrients of artificial diets

营养物质 Nutrients	代谢路径 Path-way	代谢 Id Pathway Id	差异表达基因数 Number of DEGs		
			ZSC vs. CKC	ZSX vs. CKX	ZSY vs. CKY
氨基酸 Amino acid	甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢 Glycine, serine and threonine metabolism	map00260	1↑ 14↓	5↑ 11↓	1↑ 9↓
	半胱氨酸和蛋氨酸代谢 Cysteine and methionine metabolism	map00270	2↑ 8↓	6↑ 7↓	11↓
	色氨酸代谢 Tryptophan metabolism	map00380	5↑ 11↓	5↑ 5↓	5↑ 7↓
	谷胱甘肽代谢 Glutathione metabolism	map00480	11↑ 5↓	14↑ 2↓	7↑ 9↓
	赖氨酸降解 Lysine degradation	map00310	9↑ 10↓	1↑ 7↓	1↑ 4↓
	氨基酸的生物合成 Biosynthesis of amino acids	map01230	3↑ 19↓	12↑ 11↓	4↑ 15↓
脂肪 Fat	脂肪细胞因子信号 Adipocytokine signaling pathway	map04920	3↑ 7↓	1↑ 1↓	2↑ 3↓
	丙酮酸代谢 Pyruvate metabolism	map00620	2↑ 10↓	12↑ 4↓	2↑ 13↓
	脂肪酸生物合成 Fatty acid biosynthesis	map00061	1↑ 4↓	2↑	6↑
	甘油酯新陈代谢 Glycerolipid metabolism	map00561	11↑ 17↓	5↑ 5↓	10↑ 8↓
	脂肪的消化和吸收通路 Fat digestion and absorption	map04975	12↑ 8↓	3↑ 6↓	13↑ 7↓
	脂肪酸代谢 Fatty acid metabolism	map01212	5↑ 18↓	3↑ 9↓	18↑ 3↓
淀粉和糖 Starch and sugar	不饱和脂肪酸的生物合成 Biosynthesis of unsaturated fatty acids	map01040	4↑ 6↓	1↑ 3↓	10↑ 2↓
	淀粉和蔗糖代谢 Starch and sucrose metabolism	map00500	6↑ 5↓	6↑ 5↓	1↑ 12↓
维生素 Vitamin	碳水化合物的消化和吸收 Carbohydrate digestion and absorption	map04973	8↑ 2↓	5↑ 2↓	9↓
	抗坏血酸盐和 aldarate 代谢 Ascorbate and aldarate metabolism	map00053	6↑ 9↓	2↑ 4↓	1↑ 6↓
	维生素的消化和吸收 Vitamin digestion and absorption	map04977	10↑ 6↓	3↑ 4↓	4↑ 7↓
	叶酸生物合成 Folate biosynthesis	map00790	4↑ 2↓	1↑ 2↓	2↑ 1↓
	视黄醇的新陈代谢 Retinol metabolism	map00830	7↑ 6↓	2↑ 5↓	5↑ 4↓
	叶酸碳库 One carbon pool by folate	map00670	2↑ 5↓	5↑ 3↓	1↑ 9↓
	卟啉和叶绿素代谢 Porphyrin and chlorophyll metabolism	map00860	6↑ 3↓	2↑ 2↓	1↑ 4↓

2.4 与生物学特性相关的 DEGs

本研究发现一些与生物学特性相关的差异表达基因 DEGs (表 4), 其中细胞色素 P450 的大部分基因在人工饲料饲养的七星瓢虫中下调, 精液蛋白基因 α -酮戊二酸脱氢酶和胰岛素样生长因子 2 在雌、雄成虫中均上调, 在幼虫中有一个胰岛素样生长因子 2 基因上调。保幼激素环氧水解酶、保幼激素酯酶和保幼激素 III 合成酶大部分基因下调。取食人工饲料的七星瓢虫脂蛋白基因在雌虫中有 5 个上调、2 个下调, 雄虫中 1 个上调、2 个下调, 幼虫中 2 个上调。多巴脱羧酶和几丁质酶基因在取食人工饲料的七星瓢虫中基本上都是下调基因。蜕皮诱导蛋白基因在幼虫中下调。通过 GO 富集分析发现, 细胞色素 P450 的部分基因富集在单加氧酶活性、铁离子结合、氧化还原酶活性、血红素结合 4 个 GO term 下, 胰岛素样生长因子 2 基因富集在镁离子结合、酸还原酮合成酶活性 2 个 GO term 下, 保幼激素环氧水解酶基因富集在醚水解酶活性和催化活性 2 个 GO term 下, 多巴脱羧酶基因富集在羧酸代谢过程、细胞氨基酸代谢过程、碳-碳裂解酶活性、磷酸吡哆醛结合、羧裂解酶活性 5 个 GO term 下, 几丁质酶基因富集在碳水化合物代谢过程、水解酶活性和水解 o-糖基化合物、甲壳素结合 3 个 GO term 下。

表4 饲喂人工饲料和蚕豆蚜的七星瓢虫中与生物学特性相关的差异表达基因

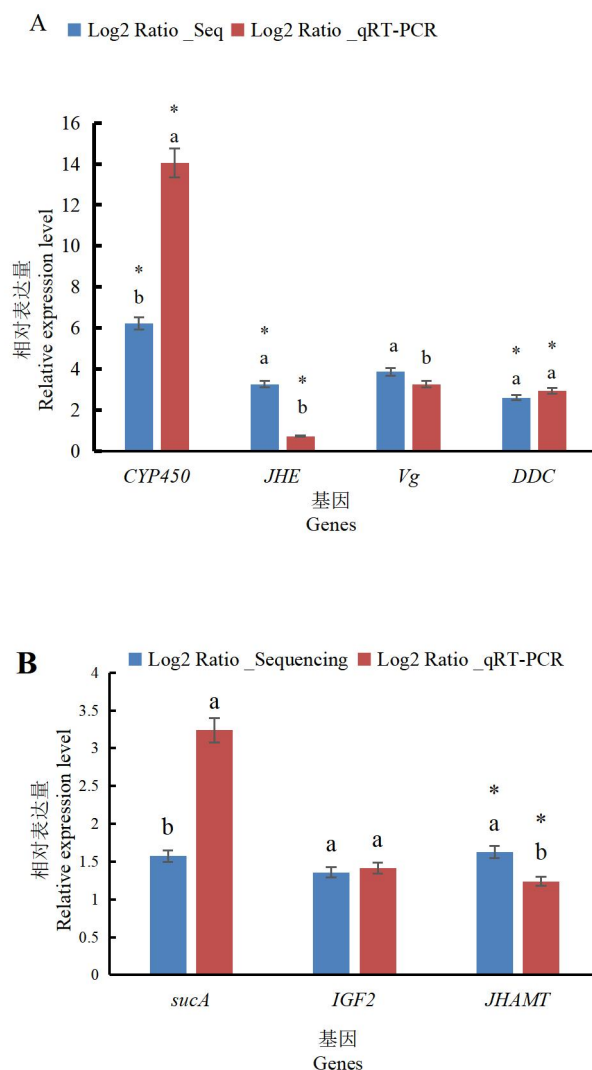
Table 4 Differentially expressed genes related to biological characteristics in libraries of *Coccinella septempunctata* fed on artificial diet compared to *Aphis craccivora*

基因名称 Gene name	DEGs genes					
	ZSC vs CKC		ZSX vs CKX		ZSY vs CKY	
细胞色素 P450 Cytochrome P450, <i>CYP450</i>	7↑	13↓	3↑	7↓	3↑	6↓
α -酮戊二酸脱氢酶 2-oxoglutarate dehydrogenase, <i>sucA</i>	1↑		1↑			1↓
烯醇化酶 Enolase, <i>ENO</i>		1↓				
胰岛素样生长因子 2 Insulin-like growth factor 2	1↑		1↑		1↑	1↓
保幼激素环氧水解酶 Juvenile hormone epoxidehydrolase, <i>JHEH</i>	2↑	3↓	1↑	1↓	1↑	2↓
保幼激素酯酶 Juvenile-hormone esterase, <i>JHE</i>		1↓		1↓		1↓
保幼激素 III 合成酶 Juvenile hormone-III synthase, <i>JHAMT</i>	1↑	4↓		4↓		4↓
脂蛋白 Lipoprotein	5↑	2↓	1↑	2↓	2↑	
多巴脱羧酶 Dopa decarboxylase, <i>DDC</i>		1↓		1↓	1↑	1↓
几丁质酶 Chitinase	1↑	5↓		5↓	1↑	11↓
蜕皮诱导蛋白 Ecdysone-induced protein						1↓

2.5 qRT-PCR验证

熔解曲线显示，内参基因和10个差异表达基因在70~90°C范围内具有单一峰，并且峰形相对均匀，未出现其他杂峰。样品中引物的扩增片段是特异性的，可用于实时荧光定量分析。

将qRT-PCR和转录组RNA-Seq结果比较，发现两种方法表达趋势是一致的，证明了所用RNA-Seq结果的可靠性。两种方法都证明，人工饲料饲养的七星瓢虫与蚜虫饲养的七星瓢虫相比，在雌虫中细胞色素P450 (*CYP450*)、保幼激素酯酶 (*JHE*) 和多巴脱羧酶 (*DDC*) 基因均下调，而卵黄原蛋白 (*Vg*) 上调 (图4-A)；在雄虫中 α -酮戊二酸脱氢酶 (*sucA*) 和胰岛素样生长因子2 (*IGF2*) 上调，保幼激素III合成酶 (*JHAMT*) 基因下调 (图4B)；在幼虫中，保幼激素环氧水解酶 (*JHEH*) 基因上调，蜕皮激素诱导蛋白93F (*EP93F*) 和几丁质 (*Chitinase*) 下调 (图4C)。在10个检测基因中，上调或下调的值在qRT-PCR中与转录组测序中的值偏离差异不大，qRT-PCR的验证结果证实了转录组测序的可靠性。



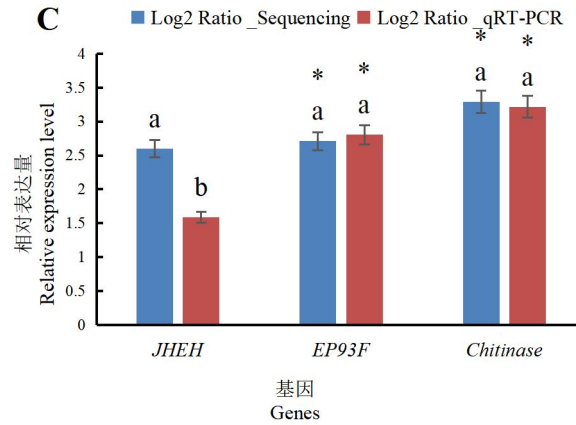


图4 差异表达基因 (DEGs) 的qRT-PCR 验证

Fig. 4 Verification of differentially expressed genes (DEGs) by qRT-PCR

注: A, 雌虫; B, 雄虫; C, 幼虫; *, 下调基因; *CYP450*, 细胞色素P450; *JHE*, 保幼激素酯酶; *JHAMT*, 保幼激素III合成酶; *Vg*, 卵黄原蛋白; *DDC*, 多巴脱羧酶; *sucA*, α -酮戊二酸脱氢酶; *IGF2*, 胰岛素样生长因子2; *JHEH*, 保幼激素环氧水解酶; *EP93F*, 蜕皮激素诱导蛋白93F; Chitinase, 几丁质。Note: A, Female; B, Male; C, Larva; *, Down-regulated gene; *CYP450*, Cytochrome P450; *JHE*, Juvenile-hormone esterase; *JHAMT*, Juvenile hormone-III synthase; *Vg*, Vitellogenin; *DDC*, Dopa decarboxylase; *sucA*, 2-oxoglutarate dehydrogenase; *IGF2*, Insulin-like growth factor 2; *JHEH*, Juvenile hormone epoxide hydrolase; *EP93FE*, cdysonc-induced protein 93F; Chitinase.

3 结论与讨论

在利用转录组学研究昆虫饲料方面,国内外学者已做了大量的研究。王晗等(2021)采用转录组测序比较桑叶育和人工饲料育家蚕蛹发现,人工饲料喂养组中雌蛹的谷胱甘肽-S-转移酶基因表达显著下调,可能影响雌蚕体内激素的合成,从而影响生殖;而雄蛹中丙酮酸激酶基因的表达显著下调,可能影响正常的能量代谢,从而导致雄蛾活力不高。Yocum *et al.*

(2006)应用抑制性消减杂交的方法,在二点益蝽 *Perillus bioculatus* 上发现了两个人工饲料上调和两个猎物上调转录本片段,并且应用 BLASTx 搜索发现了两个人工饲料上调克隆的相似物,即酪氨酸-3-单氧酶 (Tyrosine-3-monooxygenase) 基因和几丁质结合蛋白 (Chitin binding protein) 基因 *Gasp*。Alaux *et al.* (2011)比较了取食花粉和糖的蜜蜂及取食缺少糖的饲料的蜜蜂的转录组的差异,发现花粉激活了对营养敏感的代谢通路。Zou *et al.* (2013)对取食无昆虫成分人工饲料蠨螋的转录组研究发现了与差异生理特性相关的差异表达基因,如热激蛋白 90、精液蛋白、保幼激素酯酶、*SOD*、触角酯酶 CXE19 和气味结合蛋白 15 和一些与营养相关的代谢通路及营养调控差异表达基因。Li *et al.* (2016)比较孟氏隐唇瓢虫 *Cryptolaemus montrouzieri* 取食蚶壳虫和蚜虫食物转换的转录组差异分析,发现 4 龄幼虫的上调基因与核糖体转化有关,另外一些与生物运输、代谢和解毒作用相关的基因发生了上调。

本研究结果显示,在取食人工饲料的七星瓢虫 4 龄幼虫中,参与蜕皮激素合成的细胞色素 P450 基因 (Zhu *et al.*, 2013),蜕皮激素相关的几丁质酶和蜕皮诱导蛋白的差异表达基因下调,这些下调基因可能导致七星瓢虫幼虫历期的延长。这一研究结果为今后七星瓢虫幼虫人工饲料改良中,适当添加蜕皮激素缩短幼虫历期提供了参考。在取食人工饲料的雌成虫中,

保幼激素环氧水解酶、保幼激素酯酶和保幼激素 III 合成酶的差异表达基因大部分下调。保幼激素是昆虫重要的生长激素和促性腺激素，具有调控昆虫生长、变态和生殖等生理功能作用（Nouzovaet *al.*, 2021; Shpigleret *al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2022）。保幼激素的代谢由保幼激素酯酶、保幼激素环氧水解酶和保幼激素二醇激酶等催化完成。本研究取食人工饲料的雌成虫保幼激素代谢和合成酶基因下调，可能是人工饲料中添加的保幼激素剂量不足引起的，从而影响了雌虫的生殖调控，导致产卵量降低。在取食人工饲料的雄成虫中，雄性生殖蛋白基因 α -酮戊二酸脱氢酶和胰岛素样生长因子 2 差异表达上调，而保幼激素酯酶和保幼激素 III 合成酶的差异表达基因下调。保幼激素在许多雄性成虫中能促进生殖腺体的生长、发育和成熟以及腺体分泌物的产生（Parthasarathy *et al.*, 2010; Adnan *et al.*, 2020），七星瓢虫雄性生殖蛋白基因是否受保幼激素的调控，还需下一步的研究证实。

在代谢通路富集中，取食人工饲料的七星瓢虫 4 龄幼虫氨基酸和糖代谢通路的差异表达基因大部分下调，证明人工饲料中添加的蛋白质和糖类物质还不能满足幼虫的营养需求，需要增加剂量或者寻求其他含蛋白质和糖类物质。取食人工饲料的七星瓢虫成虫氨基酸和脂肪酸代谢通路中，只有谷胱甘肽代谢通路和雌虫脂肪消化吸收通路的基因上调，其余代谢通路多数基因下调，说明人工饲料中的蛋白质和脂肪酸含量还不能满足成虫的营养需求，需要增加蛋白质和脂肪酸含量。但是成虫中的糖代谢通路上调差异基因多于下调基因，证明人工饲料中的糖能满足七星瓢虫成虫的需求。从各代谢通路看，幼虫和成虫对蛋白质和维生素的需求是一直的，幼虫对脂肪酸的需求低于成虫，但是对糖的需求高于成虫。

本研究对取食蚜虫和人工饲料的七星瓢虫进行转录组测序分析差异表达基因与营养差异的相关性，能为进一步优化人工饲料提供参考依据，加速人工饲料配方的改良，同时也能提供丰富的七星瓢虫基因组信息。目前，昆虫人工饲料的改良还面临诸多挑战，即使明确昆虫需要相关的营养物质后，但是对不同营养物质的剂量、储存形式（化合物或天然营养物质）和消化吸收利用率也存在差异，因此，七星瓢虫人工饲料的改良还需要不断的摸索前行。

参考文献（References）

- Aalaoui ME, Sbaghi M. Comparative study of development, survival and reproductive performances of *Coccinella septempunctata* and *Hippodamia convergens* feeding on artificial diets [J]. *International Journal of Tropical Insect Science*, 2023, 43: 1957-1966.
- Adnan SM, Farhana I, Rempoulakis P, *et al.* Methoprene-induced matings of young *Queensland* fruit fly males are effective at inducing sexual inhibition in females [J]. *Journal of Applied Entomology*, 2020, 144: 500-508.
- Alaux C, Dantec C, Parrinello H, *et al.* Nutrigenomics in honey bees: Digital gene expression analysis of pollen's nutritive effects on health and *Varroa* -parasitized bees [J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 496-508.
- Bajracharya S, Budha PB, Baral S. Feeding efficiency of *Coccinella septempunctata* Linnaeus and *Propylea luteopustulata* (Mulsant) against Mustard aphid *Lipaphis erysimi* (Kaltenbach) [J]. *Nepalese Journal of Zoology*, 2023, 7: 1-6.
- Chao WD, Lu ZZ, Zhao L, *et al.* Regulation of *Coccinella septempunctata* and *Aphis gossypii* with different initial density on cotton aphid population [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2021, 43 (1): 206-213. [晁文娣, 吕昭智, 赵莉, 等. 七星瓢虫对不同初始密度棉蚜种群的调控作用 [J]. *环境昆虫学报*, 2021, 43 (1): 206-213]
- Chatha A, Naz S. Effect of parasitized prey on prey consumption, survival, growth, and development of *Coccinella septempunctata* L. (coleoptera: Coccinellidae) under laboratory conditions [J]. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 2020, 30: 611-617.

- Chen GM, Gao XY, Zhang Y, *et al.* Screening and expression analysis of seminal fluid protein genes specific to the male reproductive tract in ragweed leaf beetle *Ophraella communa* [J]. *Journal of Plant Protection*, 2020, 47 (6): 1202-1209. [陈广梅, 高旭渊, 张燕, 等. 广聚萤叶甲雄虫生殖系统特异性精液蛋白基因的筛选及表达分析 [J]. 植物保护学报, 2020, 47 (6): 1202-1209]
- Chen P, Liu J, Chi B, *et al.* Effect of different diets on the growth and development of *Harmonia axyridis* (Pallas) [J]. *Journal of Applied Entomology*, 2020, 144 (10): 911-919.
- Cheng Y, Zhi J, Li F, *et al.* An artificial diet for continuous maintenance of *Coccinella septempunctata* adults (Coleoptera: Coccinellidae) [J]. *Biocontrol Science Technology*, 2018, 28 (3): 242-252.
- Dindo ML, Grenier S, Sighinolfi L, *et al.* Biological and biochemical differences between in vitro- and in vivo-reared *Exorista larvarum* [J]. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 2006, 120: 167-174.
- Guo ZB, Cui JX, Li SS, *et al.* Adult morphology of *Coccinella septempunctata* [J]. *Journal of Henan Forestry Science and Technology*, 2016, 36 (2): 1-5. [郭在彬, 崔建新, 李闪闪, 等. 七星瓢虫成虫形态学研究 [J]. 河南林业科技, 2016, 36 (2): 1-5]
- Huang X, Ye M, Zhou ZJ, *et al.* Effects of feeding foods with different protein contents on the growth of *Tenebrio molitor* and its parasitism by *Scleroderma sichuanensis* Xiao [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2016, 53 (1): 207-212. [黄雄, 叶萌, 周祖基, 等. 饲料蛋白质含量对黄粉虫生长繁殖及川硬皮肿腿蜂寄生能力的影响 [J]. 2016, 53 (1): 207-212]
- Kim D, Langmead B, Salzberg SL. HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements [J]. *Nature Methods*, 2015, 12 (4): 357-360.
- Li GH, Chen QJ, Pang Y. Studies of artificial diets for the beet armyworm, *Spodoptera exigua* [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 1998, 37 (4): 1-5. [李广宏, 陈其津, 庞义. 甜菜夜蛾人工饲料的研究 [J]. 中山大学学报, 1998, 37 (4): 1-5]
- Li HS, Pan C, Clercq PD, *et al.* Variation in life history traits and transcriptome associated with adaptation to diet shifts in the ladybird *Cryptolaemus montrouzieri* [J]. *BMC Genomics*, 2016, 17 (1): 1-9.
- Li S, Jiang RJ, Cao MX. Metabolism of juvenile hormone [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2004, 47 (3): 389-393. [李胜, 蒋容静, 曹梅讯. 保幼激素的代谢 [J]. 昆虫学报, 2004, 47 (3): 389-393]
- Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 [J]. *Genome Biology*, 2014, 15 (12): 550.
- Nouzova M, Edwards MJ, Michalkova V, *et al.* Epoxidation of juvenile hormone was a key innovation improving insect reproductive fitness [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2021, 118: 45e2109381118.
- Parthasarathy R, Sheng ZT, Sun ZY, *et al.* Ecdysteroid regulation of ovarian growth and oocyte maturation in the red flour beetle, *Tribolium castaneum* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 40 (6): 429-439.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29 (9): e45.
- Sheng GW, Ling Y, Lu YH, *et al.* Regulation of ecdysone on vitellogenin gene expression in *Silkworm bombyx mori* [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, 30 (11): 1106-1112. [沈关望, 林英, 吕毅华, 等. 蜕皮激素对家蚕卵黄原蛋白基因表达的调控 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2014, 30 (11): 1106-1112]
- Shpigler HY, Cohen TM, Ben-Shimol E, *et al.* Juvenile hormone functions as a metabolic rate accelerator in bumble bees (*Bombus terrestris*) [J]. *Hormones and Behavior*, 2021, 136: 105073.
- Smirnoff WA. An artificial diet for rearing *Coccinellid* beetles [J]. *Canadian Entomologist*, 1958, 90 (9): 563-565.
- Tang QY, Zhang CX. Data Processing System (DPS) software with experimental design, statistical analysis and data mining developed for use in entomological research [J]. *Insect Science*, 2013, 20 (2): 254-260.
- Wang H, Yu XB, Zha XL, *et al.* Analysis on transcriptome difference of pupae between silkworms reared on mulberry leaf and artificial diet [J]. *Science of Sericulture*, 2021, 47 (1): 16-23. [王晗, 于新波, 查绪乐, 等. 桑叶育和人工饲料育家蚕蛹期转录组的差异分析 [J]. 蚕业科学, 2021, 47 (1): 16-23]
- Wooded CL, Baehrecke EH, Thummel CS. A molecular mechanism for the stage specificity of the *Drosophila prepupal* genetic response to ecdysone [J]. *Cell*, 1994, 79 (4): 607-615.
- Wu KJ, Li MH. Nutritional ecology of the cotton bollworm, *Heliothis armigera* (Hubner): Life tables of the population on the artificial diets with different protein levels [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 1993, 36 (1): 21-28. [吴坤君, 李明辉. 棉铃虫营养生态学研究: 取食不同蛋白质含量饲料时的种群生命表 [J]. 昆虫学报, 1993, 36 (1): 21-28]
- Yocum GD, Coudron TA, Brandt SL. Differential gene expression in *Perillus bioculatus* nymphs fed a suboptimal artificial diet [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2006, 52: 586-592.
- Zhang QL, Yuan ML. Progress in insect transcriptomics based on the next-generation sequencing technique [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2013, 56 (12): 1489-1508. [张麒麟, 袁明龙. 基于新一代测序技术的昆虫转录组学研究进展 [J]. 昆虫学报, 2013, 56 (12): 1489-1508]
- Zhang XS, Li S, Liu SN. Juvenile hormone Studies in *Drosophila melanogaster* [J]. *Frontiers in Physiology*, 2022, 12: 785320.

- Zhu F, Moural TW, Shah K, *et al.* Integrated analysis of cytochrome P450 gene superfamily in the red flour beetle, *Tribolium castaneum* [J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 174.
- Zou DY, Coudron TA, Zhang LS, *et al.* Nutrigenomics in *Arma chinensis*: Transcriptome analysis of *Arma chinensis* fed on artificial diet and Chinese Oak silk moth *Antheraea pernyi* pupae [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8 (4): e60881.
- Zou DY. Transcriptome and Cost Analysis of *Arma chinensis* Reared on Insect-free Artificial Diet [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences Dissertation Doctoral Thesis, 2013. [邹德玉. 取食无昆虫成分人工饲料蠨螋的转录组研究及饲养成本分析 [D]. 北京: 中国农业科学院博士论文, 2013]