



茶银尺蠖触角转录组及相关嗅觉基因的分析

张方梅, 尤伟晨, 郭世保, 陈俊华, 史洪中, 耿书宝,

周 洲, 乔 利*

(信阳农林学院, 河南信阳 464000)

摘要: 本研究利用 Illumina HiSeq 4000 高通量测序平台对茶银尺蠖 *Scopula subpunctaria* (Herrich-Schaeffer) 雌雄成虫触角进行转录组测序, 共获得 93 335 条 unigenes, N50 长度为 1 151 bp。通过基因功能注释, 有 23 581 条 unigenes 注释到六大公共数据库中, 其中注释到 NR 数据库的 unigenes 最多, 占 39.96%, 且与家蚕 *Bombyx mori* 相似基因数目最多, 占 20.32%; 10 718 条 unigenes 注释到 GO 数据库的生物过程、细胞组分和分子功能 3 个大类 46 个亚类; 5 464 条 unigenes 注释到 KEGG 数据库的 38 个小类代谢通路, 其中注释在信号传导通路的 unigenes 最多, 占 10.64%。根据注释信息, 共筛选得到 60 个候选嗅觉基因, 包含 17 个气味结合蛋白基因 (Odorant binding protein genes, OBPs)、13 个化学感受蛋白基因 (Chemosensory protein genes, CSPs)、14 个嗅觉受体基因 (Olfactory receptor genes, ORs)、13 个离子型受体基因 (Ionotropic receptor genes, IRs) 和 3 个感觉神经膜蛋白基因 (Sensory neuron membrane protein genes, SNMPs)。利用 FPKM 值对 *SsubOBPs* 和 *SsubCSPs* 基因进行表达量分析发现, *SsubOBP2* 和 *SsubOBP3* 在茶银尺蠖雌雄成虫触角中均高丰度表达 (FPKM>2 000), *SsubCSP4*、*SsubCSP7* 和 *SsubCSP9* 在茶银尺蠖雌雄成虫触角中均高丰度表达 (FPKM>900)。本研究首次获得了茶银尺蠖触角转录组数据, 并鉴定出候选嗅觉相关基因, 结果为进一步研究茶银尺蠖的嗅觉感受机制提供分子基础。

关键词: 茶银尺蠖; 触角转录组; 嗅觉相关蛋白; 基因注释

中图分类号: Q968.1; Q963

文献标识码: A

Analysis of the antennal transcriptome and olfaction-related genes of *Scopula subpunctaria* (Herrich-Schaeffer)

ZHANG Fang-Mei, YOU Wei-Chen, GUO Shi-Bao, CHEN Jun-Hua, SHI Hong-Zhong, GENG Shi-Bao, ZHOU Zhou, QIAO Li* (Xinyang Agriculture and Forestry University, Xinyang 464000, Henan Province, China)

Abstract: In this study, the transcriptome of *Scopula subpunctaria* was sequenced using an Illumina HiSeq 4 000 platform. A total of 93 335 unigenes with N50 length of 1 151 bp were

基金项目: 河南省高等学校青年骨干教师培养计划 (2020GGJS260); 河南省中央引导地方科技发展资金项目 (Z20221341063); 信阳农林学院创新团队建设项目 (XNKJTD-007; KJCXTD-202001); 河南省高等学校重点科研项目 (24B210012), 信阳生态研究院开放基金 (2023XYQN08, 2023XYMS11); 河南省国际科技合作项目 (242102520042); 河南省科技攻关项目 (242102110178)

作者简介: 张方梅, 女, 博士, 副教授, 主要研究方向为昆虫生理与分子生物学, E-mail: Zhangfm@xyafu.edu.cn

*通讯作者 Author for correspondence: 乔利, 博士, 副教授, 主要研究方向为害虫生物防治, E-mail: 2017180004@xyafu.edu.cn

收稿日期 Received: 2023-11-17; 修回日期 Revision received: 2024-05-28; 接受日期 Accepted: 2024-05-30

obtained. After annotating for unigenes in gene function database, 23 581 unigenes were annotated across six databases. Of these, 39.96% unigenes were annotated in the NR database, which exhibited the highest similarity at 20.32% to those of *Bombyx mori*. A total of 10 718 unigenes were annotated in the GO database, which were categorized into three groups (biological process, cellular components and molecular function) and 46 subcategories. In the KEGG database, 5 464 unigenes were assigned to 38 known metabolic pathways. Among these, 10.64% unigenes were involved in the signal transduction pathway. Based on the annotation information, 60 olfaction-related genes from *S. subpunctaria* including 17 odorant binding protein genes (OBPs), 13 chemosensory protein genes (CSPs), 14 olfactory receptor genes (ORs), 13 ionotropic receptor genes (IRs) and 3 sensory neuron membrane protein genes (SNMPs) were obtained. The FPKM value was utilized to analyze the gene expression of *SsubOBPs* and *SsubCSPs*. The findings indicated that the gene expression of *SsubOBP2* and *SsubOBP3* were highly expressed in the adult antennae of females and males (FPKM>2 000), and *SsubCSP4*, *SsubCSP7* and *SsubCSP9* were expressed with high abundance in the adult antennae of both sexes (FPKM>900). This study obtained the antennal transcriptome data of *S. subpunctaria* and for the first time, identified olfaction-related genes, providing a molecular foundation for further research into the olfactory mechanisms of *S. subpunctaria*.

Key words: *Scopula subpunctaria*; antennal transcriptome; olfaction-related genes; gene annotation

茶银尺蠖 *Scopula subpunctaria* (Herrich-Schaeffer) 又称青尺蠖, 属鳞翅目 Lepidoptera 尺蛾科 Geometridae, 是茶树主要害虫之一 (Wang *et al.*, 2018)。该虫以幼虫取食叶片危害茶树, 多数为单独危害, 发生严重时, 则聚集进行危害, 会将茶树叶片吃光, 仅留主脉。其繁殖快, 发生代数多, 蔓延迅速, 易暴发成灾, 危害范围涉及福建、浙江、安徽、湖南等地, 对我国茶业发展造成相当严重的损失 (郭华伟和罗宗秀, 2019)。目前, 针对茶银尺蠖的研究主要集中在形态学 (洪子华等, 2019)、生物学特性 (郭华伟和罗宗秀, 2019)、性腺的超微结构 (胡文静等, 2011)、羽化和交配 (Ma *et al.*, 2019)、生殖发育 (耿书宝等, 2020, 2022; Geng *et al.*, 2021)、种群动态调查 (Yang *et al.*, 2022) 等方面, 还尚未有关其嗅觉基因相关的报道。

昆虫有着高度灵敏且特异的嗅觉感受系统, 在其寄主定位、取食、求偶、产卵、躲避敌害等各种行为活动中发挥重要作用, 也是其种群生存繁衍的重要基础 (Kang *et al.*, 2021)。研究表明, 在昆虫嗅觉系统中存在许多参与嗅觉传导的蛋白质, 它们可识别环境中不同的气味物质进而调控昆虫的行为活动。这些蛋白主要包括气味结合蛋白 (Odorant-binding proteins, OBPs)、化学感受蛋白 (Chemosensory proteins, CSPs)、嗅觉受体 (Olfactory receptors, ORs)、味觉受体 (Gustatory receptors, GRs)、离子型受体 (Ionotropic receptors, IRs) 和嗅觉神经元膜蛋白 (Sensory neuron membrane proteins, SNMPs) 等 (Sun *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2021)。其中 OBPs 和 CSPs 负责结合运输亲脂性的气味分子至神经元膜上的 ORs 受体, 进而将化学

信号刺激转化为电信号，昆虫的中枢神经系统对这些电信号进行整合和加工，引起昆虫对应的行为反应，所以这些蛋白都有可能成为未来无公害防治的潜在靶标 (Plettner, 2002)。

近年来，有关昆虫嗅觉基因及其功能的研究一直是人们关注的热点。随着高通量测序技术的快速发展，越来越多的非模式昆虫的基因组和转录组分析应用于昆虫嗅觉分子机制的研究。如在鞘翅目枣食芽象甲 *Pachyrhinus yasumatsui* (Hong *et al.*, 2023)、膜翅目中华蜜蜂 *Apis cerana* (Du *et al.*, 2022)、鳞翅目杨小舟蛾 *Micromelalopha troglodyta* (Zhang *et al.*, 2022)、双翅目柑橘大实蝇 *Bactrocera minax* (Cui *et al.*, 2022)、等翅目尖唇散白蚁 *Reticulitermes aculabialis* (Saba *et al.*, 2022) 等昆虫中都已鉴定出大量与嗅觉相关的基因，并对其数量、种类、组织表达谱及功能等进行了分析，这些都为深入研究嗅觉相关基因的功能奠定理论基础。然而，目前对茶银尺蠖的嗅觉系统如何在其寄主定位、寻找配偶、选择产卵场所等行为中发挥作用尚不清楚。而探讨茶银尺蠖触角转录组和嗅觉相关基因的类型和数量是开展其嗅觉分子机制方面研究的前提。

因此，本研究利用 Illumina HiSeq 4000 高通量测序平台对茶银尺蠖雌雄成虫触角进行转录组测序，采用生物信息学方法发掘嗅觉相关基因 OBPs、CSPs、ORs、IRs 和 SNMPs 的筛选和鉴定，并对这些基因功能进行注释。此外，还对两种嗅觉基因 OBPs 和 CSPs 的进化关系进行分析，并利用 FPKM 值对其在茶银尺蠖雌雄成虫触角中的表达量进行评估。研究结果为深入研究茶银尺蠖嗅觉系统阐明其化学通讯机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

茶银尺蠖成虫采自于河南省信阳市何家寨茶园，将其带回实验室内利用新生茶树枝条（含 4~5 叶）进行饲养，饲养条件：温度 $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，湿度 $60\% \pm 5\%$ 。待室内种群扩充后，选取初羽化 2 d 的雌、雄成虫各 100 头，分别切除其触角，立即放入漂浮于液氮中的离心管内，雌雄成虫各 3 个重复， -80°C 保存备用。

1.2 样品 cDNA 文库构建与测序

样品 RNA 提取、质检、文库构建及测序由杭州联川生物技术股份有限公司协助完成。取质检合格的 RNA 样品各 1.5 μg ，使用连接有 Oligo (dT) 的磁珠富集真核生物 mRNA，经抽提的 mRNA 被片段化试剂 (Fragmentation Buffer) 随机打断成短片段，以片段化的 mRNA 为模板；用六碱基随机引物 (Random hexamers) 合成一链 cDNA；随后加入缓冲液、dNTPs、RNaseH 和 DNA Polymerase I 合成二链 cDNA。AMPure XP beads 纯化双链产物，利用 T4 DNA 聚合酶和 Klenow DNA 聚合酶活性将 DNA 的粘性末端修复为平末端，3' 末端加碱基 A 并加接头，AMPure XP beads 进行片段选择，之后用 USER 酶降解含有 U 的 cDNA 第二链进行 PCR 扩增获得最终测序文库。文库质检合格后采用 Illumina HiSeq 4000 进行测序，测序读长为双端 2*150 bp (PE 150)。

1.3 转录组的拼接组装与注释

测序获得的原始图像数据文件经 CASAVA 碱基识别 (Base calling) 分析转化为原始测序序列 raw reads, 进行预处理。使用 cutadapt 去除带接头的 Reads、poly-A/T 和低质量 Reads, 得到 clean reads。采用 Trinity 软件对 clean reads 进行组装拼接 (Grabherr *et al.*, 2011), 获得高质量的茶银尺蠖触角的 unigenes 库, 并统计 Q20、Q30 和 GC 含量。

将组装完的 unigenes 使用 Blastx 软件在六大数据库 NCBI 蛋白数据库 (NCBI non-redundant protein sequences, NR)、基因本体论 (Gene ontology, GO)、京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)、Swiss-Prot 数据库 (A manually annotated and reviewed protein sequence database)、蛋白家族 (Protein family, Pfam)、直系同源基因簇 (Clusters of orthologous groups of proteins, KOG/COG) 中比对, 获得 unigenes 的注释信息。

1.4 嗅觉相关基因的鉴定与序列分析

根据 1.3 获得的 NR 数据库中最佳比对基因注释信息, 筛选注释到嗅觉相关基因 (OBPs、CSPs、ORs、IRs 和 SNMPs), 并根据得到的注释信息对嗅觉相关基因进行命名。同时利用 Jalview/ClustalX (v2.11.20) 软件 (Waterhouse *et al.*, 2009) 对候选 OBPs 和 CSPs 进行比对。利用 MEGA 11.0 软件邻接法 (Neighbor-Joining method) (Kumar *et al.*, 2018) 构建候选的 SsubOBPs 和 SsubCSPs 与其他鳞翅目昆虫的系统发育树。

1.5 SsubOBPs 和 SsubCSPs 基因表达量分析

为了比较嗅觉相关基因 SsubOBPs 和 SsubCSPs 在茶银尺蠖雌、雄成虫触角之间表达量的差异, 利用 FPKM 值对基因表达量进行评估 (Li and Dewey, 2011)。根据 FPKM 值使用 TBtools 绘制基因表达量热图。

2 结果与分析

2.1 茶银尺蠖触角转录组测序统计与数据组装

茶银尺蠖触角转录组测序统计如表 1 所示, 各样品生成的有效数据量 (Valid Bases) 均达到 5.37 Gb 以上, 有效 reads 所占比例 98.36% 以上, Q20 的碱基占比在 98.65% 以上, Q30 的碱基占比在 95.87% 以上, GC 含量在 45% 以上, 说明本次转录组测序质量较好, 可信度高, 可用于后续分析。

从茶银尺蠖雌蛾触角的 3 个生物学重复中分别获得了 37 058 362、45 801 592 和 45 137 528 条 raw reads, 去除接头 reads 和低质量的 reads, 得到有效 reads 数分别为 36 451 066、45 192 730 和 44 478 356 条, GC 含量占比在 46.39%~47.91%; 从茶银尺蠖雄蛾触角 3 个生物学重复中分别获得了 48 553 350、44 893 316 和 50 710 104 条 raw reads, 有效的 reads 数分别为 47 876 768、44 299 608 和 50 032 236 条, GC 含量占比在 45.09%~47.03% (表 1)。

有效 reads 经过 Trinity 软件拼接组装后, 得到 unigenes 数为 23 581 条, 平均长度为 525 bp, N50 值为 1 151 bp, GC 含量占比为 41.69%。其中长度在 200~500 bp 的 unigenes 有 11 338 条, 占比为 48.08%, 501~1 000 bp 的 unigenes 数为 6 361 条, 占比为 26.98%, 1 001~2 000 bp

的 unigenes 数为 4 371 条, 占比 18.53%, >2 001 bp 的 unigenes 数为 1 511 条, 占比为 6.41%, 表明本试验转录组数据组装完整性较好 (表 2)。

表 1 茶银尺蠖转录组测序统计

Table 1 Statistics of RNA-seq of antennae of *Scopula subpunctaria*

样品 Sample	原始读数 Raw reads	有效数据读数 Valid reads	有效数据量 (Gb) Valid bases	有效数据占比 (%) Valid	Q20 (%)	Q30 (%)	GC (%)
SS_F1	37 058 362	36 451 066	5.37	98.36	98.69	95.95	47.91
SS_F2	45 801 592	45 192 730	6.66	98.67	98.72	96.06	46.39
SS_F3	45 137 528	44 478 356	6.55	98.54	98.65	95.87	47.47
SS_M1	48 553 350	47 876 768	7.05	98.61	98.66	95.88	47.03
SS_M2	44 893 316	44 299 608	6.53	98.68	98.70	96.02	45.32
SS_M3	50 710 104	50 032 236	7.38	98.66	98.73	96.10	45.09

注: SS_F1、SS_F2 和 SS_F3 为茶银尺蠖雌蛾触角生物学重复样品编号; SS_M1、SS_M2 和 SS_M3 为茶银尺蠖雄蛾触角生物学重复样品编号; Q20 和 Q30 分别表示质量值 ≥ 20 和 ≥ 30 的碱基所占百分比。Note: SS_F1、SS_F2 and SS_F3 indicated biological replicate samples of female *S. subpunctaria*; SS_M1、SS_M2 and SS_M3 indicated biological replicate samples of male *S. subpunctaria*; Q20 and Q30 indicated the percentages of bases with the quality value ≥ 20 and ≥ 30 , respectively.

表 2 茶银尺蠖触角转录组组装结果

Table 2 Summary of the antennal transcriptome assembly of *Scopula subpunctaria*

长度范围 (bp) Length rang	单基因簇 Unigenes		转录本 Transcript	
	数量 (个) Number	百分比 (%) Proportion	数量 (个) Number	百分比 (%) Proportion
	200~500	11 338	48.08	52 221
501~1 000	6 361	26.98	25 724	27.56
1 001~2 000	4 371	18.53	12 398	13.27
≥ 2001	1 511	6.41	2 992	3.21
总数 (bp) Total number	23 581		93 335	
总长度 (bp) Total length	11 533		11 533	
平均长度 (bp) Mean length	525		443	
GC 含量 (%) GC content	41.69		41.05	
N50 长度 (bp) N50 length	1 151		845	

2.2 茶银尺蠖 unigenes 基因功能注释

将拼接后的 unigenes 序列分别在 NR、GO、KEGG、Swiss-Prot、Pfam 和 KOG/COG 等 6 个数据库中进行比对, 获得 unigenes 的功能注释 (表 3)。结果表明, 茶银尺蠖触角转录组数据注释到 NR 数据的 unigenes 数目最多, 为 9 424 条, 占 39.96%, 其次是 KOG/COG 和 Pfam, 占比分别为 37.99%和 27.88%, KEGG 数据库中注释到的 unigenes 数目最少, 为 4 328 条, 占 18.35%。

表 3 茶银尺蠖基因注释成功率统计

Table 3 Successful annotation rate of genes in *Scopula subpunctaria*

数据库 Annotated database	注释基因数量 (个) Number of annotated unigenes	注释基因所占比例 (%) Proportion of annotated unigenes
---------------------------	--	--

NR	9 424	39.96
GO	6 298	26.71
KEGG	4 328	18.35
Swiss-Prot	5 592	23.71
Pfam	6 574	27.88
KOG/COG	8 958	37.99

根据在 NR 数据库中的注释结果,进一步对这些注释序列的同源物种进行统计,结果表明茶银尺蠖触角注释的基因序列与家蚕相似基因数目最多,占 20.32%、其次是脐橙螟蛾 *Amyelois transitella* 占 18.54%、秋尺蛾 *Operoptera btumata* 占 11.85%、柑橘凤蝶 *Papilio xuthus* 占 10.94%、黑脉金斑蝶 *Danaus plexippus* 占 6.70%和棉红铃虫 *Pectinophora gossypiella* 占 5.88%,其他物种占 25.77%。

2.3 茶银尺蠖触角 unigenes 基因功能分类

将所有的 unigenes 比对到 GO 数据库中,结果显示共有 10 718 条 unigenes 注释到 3 大类和 46 个亚类,3 大类包括生物学过程 (Biological process)、分子功能 (Molecular function) 和细胞组分 (Cellular component) (图 1)。生物过程中参与神经发生 (Neurogenesis) 的 unigenes 数量最多,223 条,其次是氧化还原过程 (Oxidation-reduction process),211 条。分子功能中参与 ATP 结合 (ATP binding) 和蛋白结合 (Protein binding) 的 unigenes 数量最多,分别为 412 条和 360 条。在细胞组分中参与细胞质 (Cytoplasm) 的 unigenes 数量最多,918 条,其次是细胞核 (Nucleus) (890 条) 和膜组分 (Integral component of membrane) (484 条)。

将所有的 unigenes 比对到 KEGG 数据库中,结果显示共有 5 464 条 unigenes 参与了 5 大类代谢通路,分别是有机系统 (Organismal systems)、代谢 (Metabolism)、细胞过程 (Cellular process)、环境信息处理 (Environmental information processing) 和遗传信息处理 (Genetic information procession) (图 2)。这些 unigenes 参与了 30 个小类的代谢通路,其中获得注释最多的 4 个代谢通路是信号传导 (Signal transduction, 591 条, 10.64%)、运输和分解代谢 (Transport and catabolism, 569 条, 10.25%)、翻译 (Translation, 528 条, 9.51%)、折叠、排序和退化 (Folding, sorting and degradation, 504 条, 9.08%)。其中涉及到茶银尺蠖环境适应性的代谢通路有信号传导 (Signal transduction, 591 条)、信号分子互动 (Signaling molecules and interaction, 122 条)、膜传导 (Membrane transport, 66 条)、环境适应 (Environmental adaptation, 18 条) 和感觉系统 (Sensory system, 33 条)。

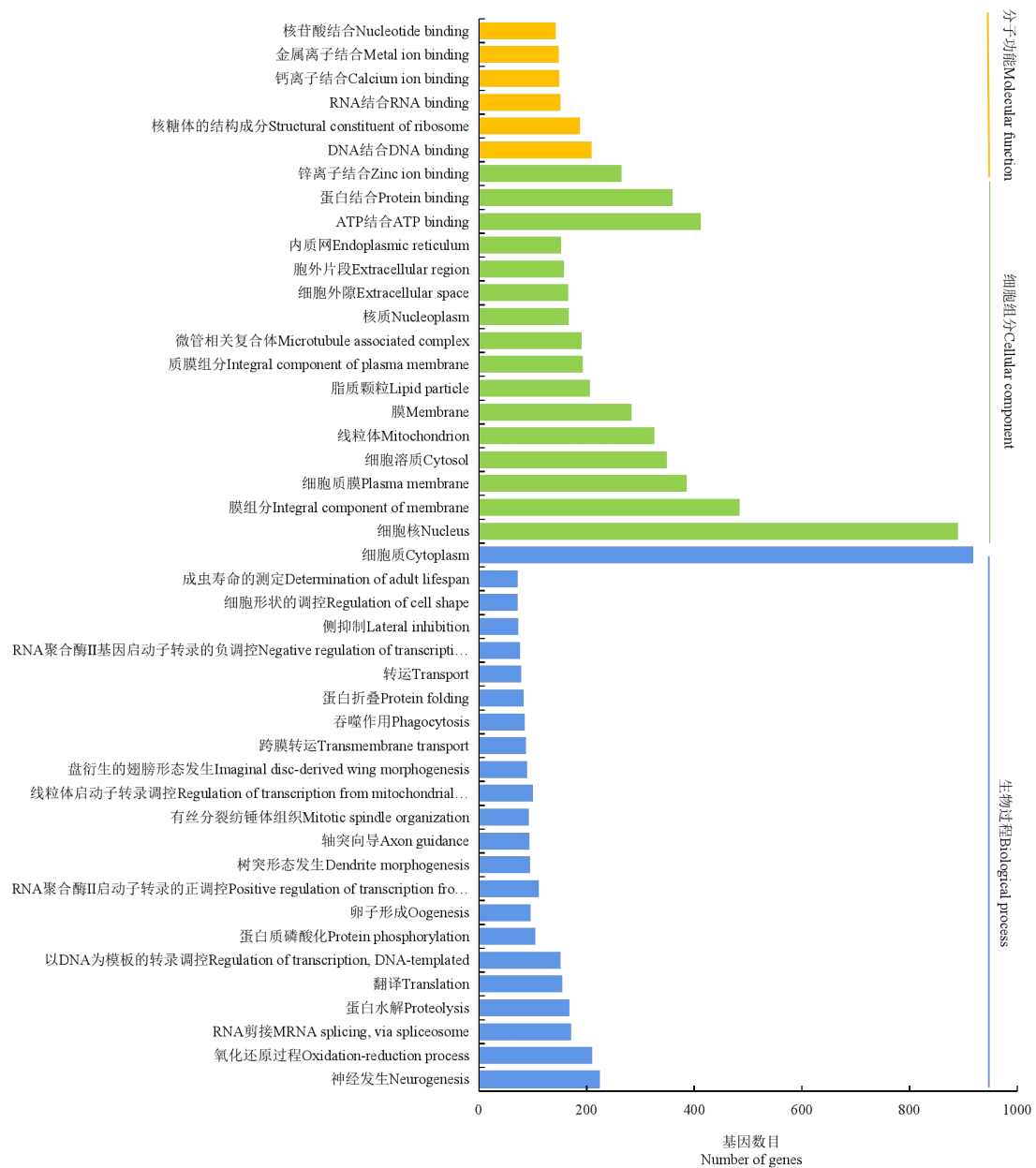


图1 茶银尺蠖触角 unigenes 的 GO 分类

Fig. 1 Gene ontology (GO) classification of *Scopula subpunctaria* antennal unigenes

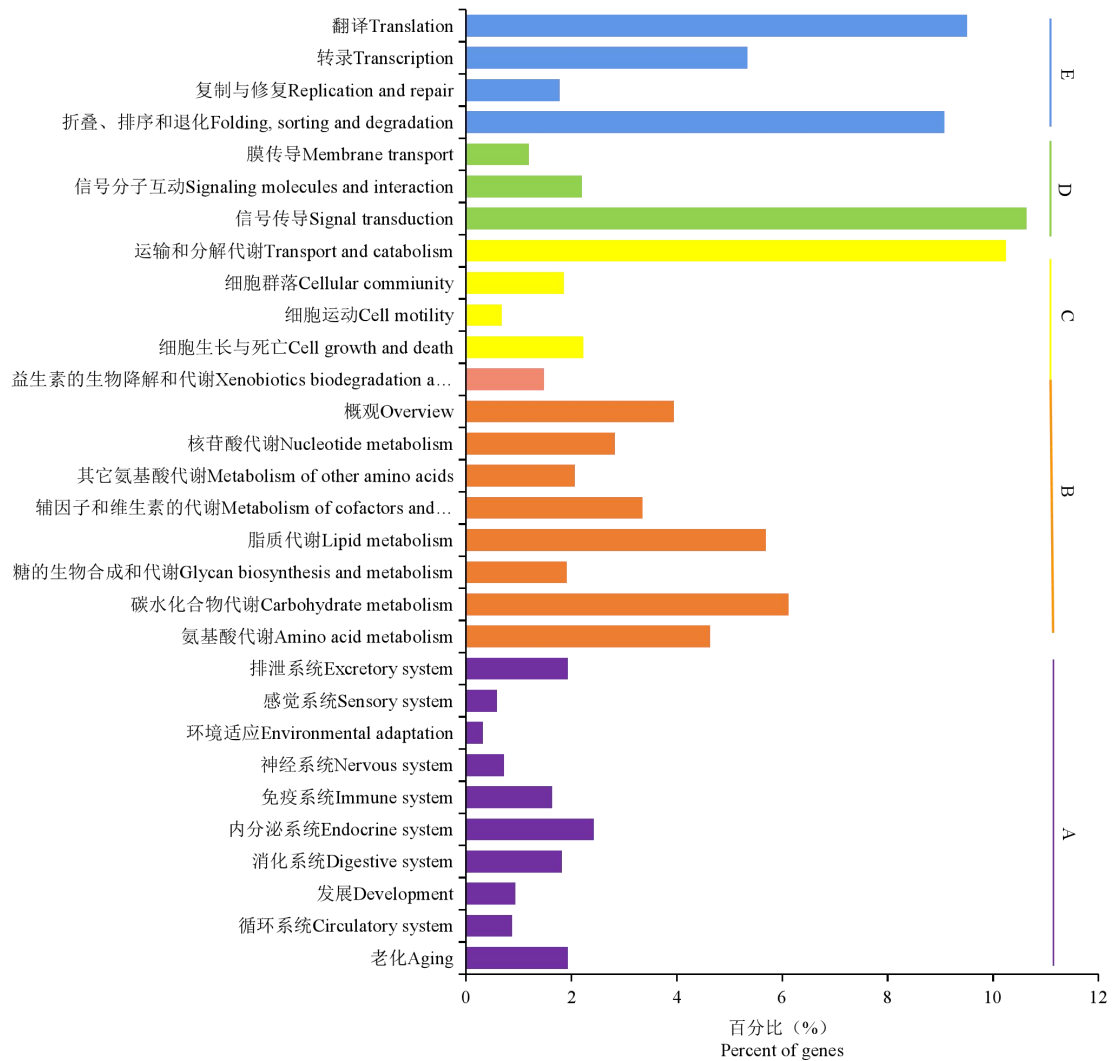


图 2 茶银尺蠖触角 unigenes 的 KEGG 分类

Fig. 2 KEGG categories of *Scopula subpunctaria* antennal unigenes

注：A，有机系统；B，代谢；C，细胞过程；D，环境信息处理；E，遗传信息处理。Note: A, Organismal systems; B, Metabolism; C, Cellular process; D, Environmental information processing; E, Genetic information procession.

2.4 茶银尺蠖嗅觉相关基因的筛选

通过 Blast 和同源比对，从茶银尺蠖触角转录组中共鉴定得到 60 个嗅觉相关的基因，包括 17 个气味结合蛋白基因 (Odorant binding protein genes, OBPs, 28.33%)、13 个化学感受蛋白基因 (Chemosensory protein genes, CSPs, 21.67%)、14 个嗅觉受体基因 (Olfactory receptor genes, ORs, 23.33%)、13 个离子型受体基因 (Ionotropic receptor genes, IRs, 21.67%) 和 3 个感觉神经膜蛋白基因 (Sensory neuron membrane protein genes, SNMPs, 5.00%) (表 4)。

表 4 茶银尺蠖触角嗅觉相关基因数量表

Table 4 The number of olfaction-related genes on antennae of *Scopula subpunctaria*

化学感受基因	总注释数 (个)	占比 (%)
Olfaction-related genes	Total number of annotated unigenes	Proportion
气味结合蛋白基因 Odorant binding protein genes (OBPs)	17	28.33

化学感受蛋白基因 Chemosensory protein genes (CSPs)	13	21.67
嗅觉受体基因 Olfactory receptor genes (ORs)	14	23.33
离子型受体基因 Ionotropic receptor genes (IRs)	13	21.67
感觉神经元膜蛋白基因 Sensory neuron membrane protein genes (SNMPs)	3	5.00

2.5 茶银尺蠖 OBPs 和 CSPs 的序列及进化分析

将鉴定到的 17 个茶银尺蠖 OBPs 基因命名为 SsubOBP1-17，其中除 SsubOBP1、7、8、10 和 17 以外，其余 OBP 均具有完整的开放阅读框，它们的序列一致性为 15.20%。其中 SsubOBP3、5、6、12、14 和 17 含有 6 个保守的 Cys，属于 Classic OBP。SsubOBP8 和 16 含有 4 个保守的 Cys，属于 Minus-C OBPs，其他 SsubOBPs 属于 Plus-C OBPs。基于 SsubOBPs 和其他 18 个鳞翅目昆虫 59 个 OBPs 基因序列构建系统发育树（图 3），发现茶银尺蠖的 17 个 OBPs 基因分布在各分支中，与其他鳞翅目昆虫形成亚家族 OBPs。其中 SsubOBP1/ScinPBP、SsubOBP2/AipsOBP2、SsubOBP4/AcinOBP5、SsubOBP5/EbolOBP5、SsubOBP6/AcinOBP10、SsubOBP7/CmedOBP4、SsubOBP8/EbolOBP8、SsubOBP11/SlittoOBP1、SsubOBP12/HarmOBP59a、SsubOBP13/SlitOBP17 和 SsubOBP16/GmelOBP56a 分别聚到一枝上；其余 6 个 SsubOBPs（SsubOBP3、SsubOBP9-10、SsubOBP14-15 和 SsubOBP17）单独聚到一枝上。

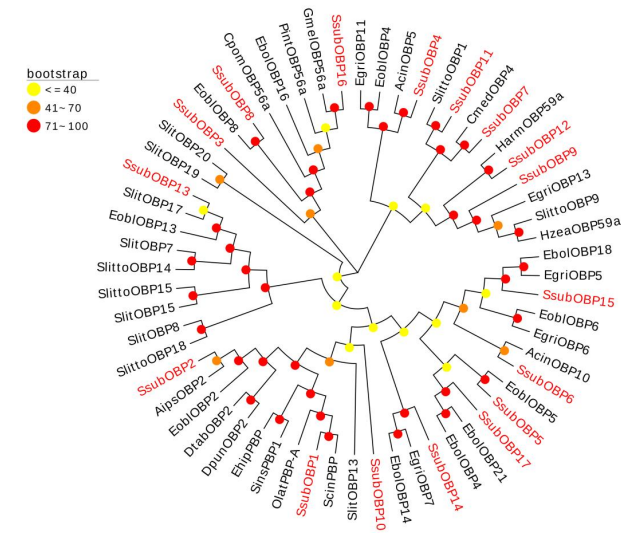


图 3 茶银尺蠖触角 OBP 的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of antennal OBPs in *Scopula subpunctaria*

注：Slitto, 海灰翅夜蛾 *Spodoptera littoralis*; Slit, 斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*; Eobl, 茶尺蠖 *Ectropis obliqua*; Cpom, 苹果蠹蛾 *Cydia pomonella*; Pint, 印度谷螟 *Plodia interpunctella*; Gmel, 大蜡螟 *Galleria mellonella*; Egri, 灰茶尺蠖 *Ectropis grisescens*; Acin, 梨尺蠖 *Apocheima cinerarius*; Cmed, 稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis*; Harm, 棉铃虫 *Helicoverpa armigera*; Hzea, 美洲棉铃虫 *Helicoverpa zea*; Scin, 槐尺蠖 *Semiothisa cineraria*; Olat, 虎杖螟 *Ostrinia latipennis*; Sins, 小线角木蠹蛾 *Streltzoviella insularis*; Ehip, 沙棘木蠹蛾 *Eogystia hippophaecolus*; Dpun, 马尾松毛虫 *Dendrolimus punctatus*; Dtab, 油松毛虫 *Dendrolimus tabulaeformis*; Aips, 小地老虎 *Agrotis ipsilon*。

将鉴定到的 13 个茶银尺蠖的 CSP 基因命名为 SsubCSP1-13，其中除了 SsubCSP2、7、13 外，其余 CSP 具有完整的开放阅读框。它们均具有 4 个保守的 Cys，序列一致性为 40.45%。基于 SsubCSPs 和其他 22 个鳞翅目昆虫 61 个 CSPs 基因序列构建系统发育树（图 4），发现

茶银尺蠖的 13 个 SsubCSPs 基因分布在各分支中，与其他昆虫形成亚家族 CSPs。其中 SsubCSP2/ScinCSP、SsubCSP9/AcinCSP4、SsubCSP10/AcinCSP12、SsubCSP11/EbolCSP11 和 SsubCSP13/AcinCSP13 分别聚到一枝上；其余 8 个 SsubCSPs（SsubCSP1、SsubCSP3-8、SsubCSP12）单独聚到一枝上。

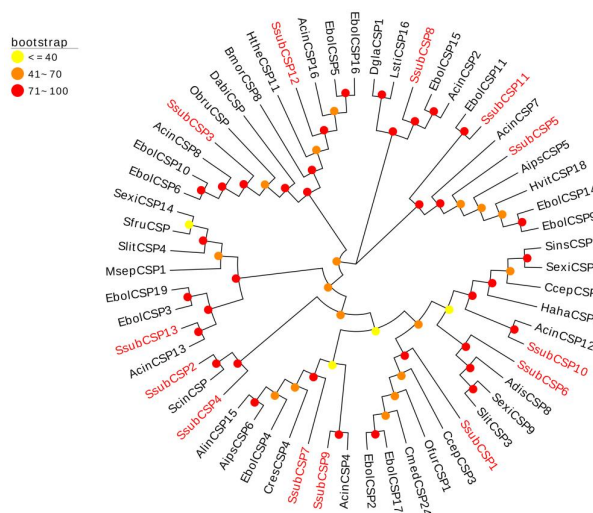


图 4 茶银尺蠖触角 CSPs 的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of antennal CSPs in *Scopula subpunctaria*

注: Eobl, 茶尺蠖 *Ectopis obliqua*; Acin, 梨尺蠖 *Apocheima cinerarius*; Obru, 冬尺蠖 *Operophtera brumata*; Dabi, 冷杉梢斑螟 *Dioryctria abietella*; Bmor, 家蚕 *Bombyx mori*; Hthe, 茶盲蝽 *Helopeltis theivora*; Dgla, 团花绢野螟 *Diaphania glauculalis*; Lsti, 草地螟 *Loxostege sticticalis*; Aips, 小地老虎 *Agrotis ipsilon*; Sins, 小线角木蠹蛾 *Streltzoviella insularis*; Sexi, 甜菜夜蛾 *Spodoptera exiguae*; Ccep, 米蛾 *Coryca cephalonica*; Adis, 双委夜蛾 *Athetis dissimilis*; Slit, 斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*; Ofur, 亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis*; Cmed, 稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis*; Cres, 仁扇舟蛾 *Clostera restituta*; Alin, 苜蓿盲蝽 *Adelphocoris lineolatus*; Scin, 槐尺蠖 *Semiothisa cinerearia*; Msep, 粘虫 *Mythimna separate*; Sfru, 草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda*; Hcha, 黄条袖蝶 *Heliconius charitonia*。

2.5 茶银尺蠖 OBP 和 CSP 表达量分析

对茶银尺蠖的 17 个 SsubOBPs 和 13 个 SsubCSPs 基因各样本表达量 FPKM 值进行均一化处理后，制作热图（图 5）。如图 5-A 所示，SsubOBP2 和 SsubOBP3 在茶银尺蠖雌雄触角中均高丰度表达（FPKM>2 000）。其次是 SsubOBP1、7、10、12 和 13 在雌雄虫均中量表达（FPKM>150），其余 SsubOBPs 在雌雄触角中表达量均较低（FPKM<50），其中 SsubOBP8 表达量最低（FPKM_♀=8.04, FPKM_♂=5.68）。如图 5-B 所示，SsubCSP4、SsubCSP7、SsubCSP9 在茶银尺蠖雌雄触角中均高丰度表达（FPKM>900）。其中 SsubCSP4（FPKM_♀=1457.15, FPKM_♂=2719.63）和 SsubCSP7（FPKM_♀=3272.20, FPKM_♂=5096.93）在雄性中的表达量高于雌性，SsubCSP9 在雌性中的表达量高于雄性（FPKM_♀=2691.12, FPKM_♂=903.57）。其次是 SsubCSP1、6、11 和 12 在雌雄虫均中量表达（FPKM>110），其余 SsubCSPs 在雌雄触角中表达量均较低（FPKM<30），其中 SsubCSP5 表达量最低（FPKM_♀=10.23, FPKM_♂=6.27）。

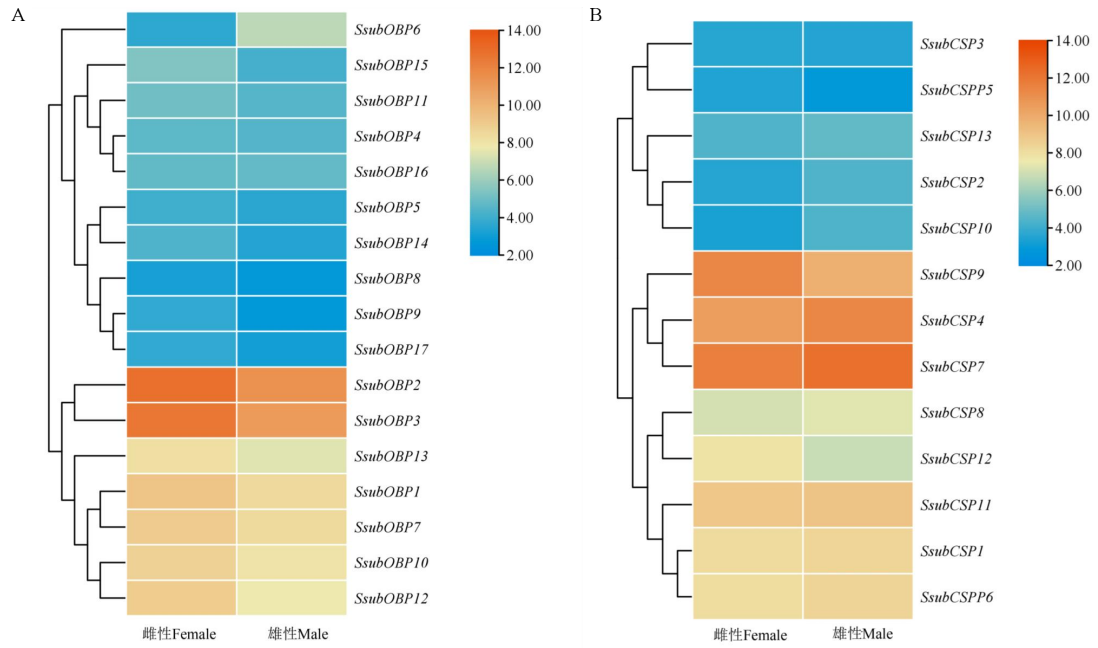


图5 茶银尺蠖 *SsubOBPs* (A) 和 *SsubCSPs* (B) 的表达模式热图

Fig. 5 The heat map of expression profiles of *SsubOBPs* and *SsubCSPs* in *Scopula subpunctaria*

3 结论与讨论

本研究首次通过 Illumina 高通量测序平台对茶银尺蠖雌雄成虫触角进行转录组测序和功能分析, 共获得了 93 335 条 unigenes, 有效 reads 所占比例 98.36% 以上。Q20 的碱基占比在 98.65% 以上, 平均长度为 525 bp, N50 值为 1 151 bp, 说明本次转录组测序质量较好, 可信度高, 可用于后续分析。通过对 unigenes 进行功能注释, 有 23 581 条 unigenes 被成功注释到 6 大数据库中, 其余未被成功注释, 可能由于 unigenes 的长度过短使基因功能注释结果受到影响 (Hou *et al.*, 2011)。其中在 NR 数据库中注释到的 unigenes 最多, 占 39.96%, 这与大多数研究结果相似 (杨爽等, 2019; 刘盼静等, 2022; 赵航等, 2022)。其中茶银尺蠖的 unigenes 序列与鳞翅目昆虫家蚕、脐橙螟蛾、秋尺蛾、柑橘凤蝶、黑脉金斑蝶和棉红铃虫等昆虫的基因序列相似度高, 表明茶银尺蠖触角基因与这些昆虫基因具有相似功能。

测序结果中有 10 718 条 unigenes 被 GO 注释到生物学过程、分子功能和细胞组分 3 个过程的 46 个亚类, 其中注释到 ATP 结合、蛋白结合的 unigenes 数量较多。5 464 条 unigenes 参与了 5 大类代谢通路有机系统、代谢、细胞过程、环境信息处理和遗传信息处理, 其中注释到信号传导的最多, 还涉及到信号分子互动、膜传导、环境适应、感觉系统等, 这些都是昆虫嗅觉行为调控中的关键步骤。以上注释结果在其他昆虫触角转录组分析中也有发现, 如烟粉虱 *Bemisia tabaci* MED (Wang *et al.*, 2017)、双委夜蛾 *Athetis dissimilis* (Song *et al.*, 2021) 和叉角厉蝻 *Eocanthecona furcellata* (赵航等, 2022), 这进一步证实注释的 unigenes 参与了茶银尺蠖的化学通讯调控。

通过 Blast 和同源检索, 从茶银尺蠖触角转录组中共鉴定得到 60 个嗅觉相关的基因,

包括 17 个 OBPs、13 个 CSPs、14 个 ORs、13 个 IRs 和 3 个 SNMPs。与其他尺蛾科昆虫触角转录组的研究结果相比，本研究所获得的嗅觉基因数量较少。例如，在灰茶尺蠖 *Ectropis grisescens* 中共鉴定出 153 个候选嗅觉基因，其中 40 个 OBPs、30 个 CSPs、59 个 ORs、24 个 IRs (Li *et al.*, 2017)，在槐尺蠖 *Semiothisa cinerearia* 中发现了 125 个候选嗅觉基因，其中 25 个 OBPs、15 个 CSPs、52 个 ORs、23 个 IRs、8 个 GRs、2 个 SNMPs (Liu *et al.*, 2020)。但也存在鉴定出的嗅觉基因数量少的鳞翅目昆虫种类，比如在黄野螟 *Heortia vitessoides* 的触角中鉴定得到 61 个嗅觉相关基因，9 个 OBPs、10 个 CSPs、28 个 ORs、12 个 IRs 和 2 个 SNMPs (Cheng *et al.*, 2019)；在草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 的触角中鉴定到 71 个嗅觉相关基因，25 个 OBPs、8 个 CSPs、27 个 ORs、8 个 IRs 和 3 个 SNMPs (Qiu *et al.*, 2020)；在椴蝙蛾 *Endoclita signifer* 中鉴定到 69 个嗅觉相关基因，22 个 OBPs、10 个 CSPs、19 个 ORs、12 个 IRs 和 2 个 SNMPs (Xiao *et al.*, 2023)，与本研究结果基本类似。在不同物种中鉴定出嗅觉基因数量的不同，可能由于不同昆虫物种适应各自独特的生境，导致嗅觉基因进化速度较快，导致数量多样性较高，或者化学感受相关基因存在的组织多样性导致的 (Engsontia *et al.*, 2008)。

由茶银尺蠖与其他鳞翅目昆虫构建的 OBPs 和 CSPs 系统发育树可见，有 11 个 SsubOBPs 和 5 个 SsubCSPs 基因与其他鳞翅目昆虫分别聚到一枝上形成亚家族，表明这些 OBPs 和 CSPs 间亲缘关系比较近，起着同源化学感受功能。但茶银尺蠖的 SsubOBPs 和 SsubCSPs 与其他鳞翅目昆虫也存在着差异。比如在两个系统发育树中，还发现 6 个 SsubOBPs 和 8 个 SsubCSPs 分别单独聚为一枝，说明这些 OBPs 和 CSPs 不仅在种间分化较大，与其他鳞翅目昆虫在进化上也存在一定的遗传距离。这种现象可能是嗅觉基因在进化过程中产生较高的遗传多样性导致，或许在茶银尺蠖嗅觉行为调控中发挥独特的作用。

利用 FPKM 对 17 个 SsubOBPs 和 13 个 SsubCSPs 基因的表达量进行分析显示，SsubOBP2 和 SsubOBP3 在茶银尺蠖雌雄触角中均高丰度表达，且在雌虫中的表达量均高于雄虫。SsubCSP4、SsubCSP7 和 SsubCSP9 在茶银尺蠖雌雄触角中也均高丰度表达。其中 SsubCSP4 和 SsubCSP7 在雄性中的表达量高于雌性，而 SsubCSP9 在雌性中的表达量高于雄性。这些特异表达的基因或许决定了触角功能的性别差异，如寄主定位、雌蛾产卵地识别或雄蛾的性信息素识别等 (曲浩等, 2024)，后期还需要明确其组织表达模式和生理生化功能进一步验证这些基因的功能。

本研究首次对茶银尺蠖的雌雄触角转录组进行测序，利用生物信息学方法注释了嗅觉相关的基因功能信息，筛选得到了不同数量的嗅觉相关功能基因，丰富了尺蛾科昆虫的基因数据库。并探讨了茶银尺蠖的 SsubOBPs 和 SsubCSPs 的系统进化关系以及在雌雄成虫触角中的表达情况，研究结果为茶银尺蠖嗅觉机制的研究提供理论基础，也为探讨新的综合防控措施提供新型的基因靶标。

参考文献 (References)

- Cheng J, Wang CY, Lyu ZH, *et al.* Candidate olfactory genes identified in *Heortia vitessoides* (Lepidoptera: Crambidae) by antennal transcriptome analysis [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2019, 29: 117-130.
- Cui ZY, Liu YP, Wang GR, *et al.* Identification and functional analysis of a chemosensory protein from *Bactrocera minax* (Diptera: Tephritidae) [J]. *Pest Management Science*, 2022, 78 (8): 3479-3488.
- Du HC, Su WT, Huang JX, *et al.* Sex-biased expression of olfaction-related genes in the antennae of *Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae) [J]. *Genes (Basel)*, 2022, 13 (10): 1771.
- Engsontia P, Sanderson AP, Cobb M, *et al.* The red flour beetle's large nose: An expanded odorant receptor gene family in *Tribolium castaneum* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, 38 (4): 387-397.
- Geng SB, Hou HL, He YJ, *et al.* Effects of nutrition supplementation on longevity and fecundity of *Scopula Subpunctaria* [J]. *Journal of Tea Science*, 2020, 40 (4): 501-509. [耿书宝, 侯贺丽, 贺雨婧, 等. 补充营养对茶银尺蠖成虫寿命和产卵量的影响 [J]. 茶叶科学, 2020, 40 (4): 501-509]
- Geng SB, Hou HL, Wang GJ, *et al.* Temperature-dependent oviposition model of *Scopula subpunctaria* (Lepidoptera: Geometridae) [J]. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 2021, 24 (3): 948-953.
- Geng SB, Hou HL, Zhang J, *et al.* Effects of temperature on longevity and fecundity of *Scopula Subpunctaria* [J]. *Plant Protection*, 2022, 48 (3): 118-125. [耿书宝, 侯贺丽, 张洁, 等. 温度对茶银尺蠖成虫寿命和产卵量的影响 [J]. 植物保护, 2022, 48 (3): 118-125]
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, *et al.* Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome [J]. *Nature Biotechnology*, 2011, 29 (7): 644.
- Guo HW, Luo ZX. Green arches in a tea garden: *Scopula subpunctaria* [J]. *Chinese Tea*, 2019, 41 (9): 15-16. [郭华伟, 罗宗秀. 茶园中的青色拱拱虫: 茶银尺蠖 [J]. 中国茶叶, 2019, 41 (9): 15-16]
- Hong B, Zhai YY, Yang YW, *et al.* Identification and sex-specific expression of chemosensory genes in the antennal transcriptomes of *Pachyrhinus yasumatsui* (Coleoptera: Curculionidae) [J]. *Journal Insect Science*, 2023, 23 (2): 15.
- Hong ZH, Yin KS, Zhou XG, *et al.* Identification of male and female of several tea pests [J]. *Chinese Tea*, 2016, 38 (9): 22-23. [洪子华, 殷坤山, 周孝贵, 等. 几种茶树害虫雌雄的识别 [J]. 中国茶叶, 2016, 38 (9): 22-23]
- Hou R, Bao ZM, Wang S, *et al.* Transcriptome sequencing and denovo analysis for *Yesso scallop* (*Patinopecten yessoensis*) using 454 GS FLX [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6 (6): e21560.
- Hu WJ, Chen WL, Wei W. Comparative studies on ultrastructure of sex pheromone gland in female *Scopula subpunctaria* at different developmental stages [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2011, 48 (6): 1786-1791. [胡文静, 陈文龙, 韦卫. 二个不同发育阶段茶银尺蠖雌蛾性腺超微结构的比较研究 [J]. 应用昆虫学报, 2011, 48 (6): 1786-1791]
- Kang ZW, Liu FH, Xu YY, *et al.* Identification of candidate odorant-degrading enzyme genes in the antennal transcriptome of *Aphidius gifuensis* [J]. *Entomologia Generalis*, 2021, 51 (1): 36-54.
- Kumar S, Stecher G, Li M, *et al.* MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2008, 35 (6): 1547-1549.
- Li B, Dewey CN. RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome [J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12: 323.
- Li ZQ, Luo ZX, Cai XM, *et al.* Chemosensory gene families in *Ectropis grisescens* and candidates for detection of Type-II sex pheromones [J]. *Frontiers in Physiology*, 2017, 8: 953.
- Liu HM, Tang Y, Wang QY, *et al.* Identification and characterization of an antennae-specific glutathione s-transferase from the Indian meal moth [J]. *Frontiers in Physiology*, 2021, 12: 727619.
- Liu PJ, Wei HY, Guo K, *et al.* Identification and expression profiling of genes of odorant-binding proteins and chemosensory proteins in adult antennae of *Lytta caraganae* (Coleoptera: Meloidae) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2022, 65 (8): 927-936. [刘盼静, 魏洪义, 郭坤, 等. 绿芜菁成虫触角中气味结合蛋白和化学感受蛋白基因的鉴定和表达分析 [J]. 昆虫学报, 2022, 65 (8): 927-936]
- Liu PJ, Zhang XF, Meng RJ, *et al.* Identification of chemosensory genes from the antennal transcriptome of *Semiothisa cinerearia* [J]. *PLoS ONE*, 2020, 15 (8): e0237134.
- Ma T, Shi XH, Lin N, *et al.* Temporal pattern of adult emergence and sexual behavior of *Scopula Subpunctaria* (Lepidoptera: Geometridae) [J]. *Phytoparasitica*, 2019, 47 (1): 17-29.
- Plettner E. Insect pheromone olfaction: New targets for the design of species-selective pest control agents [J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2002, 9 (10): 1075-1085.
- Qiu L, He L, Tan XP, *et al.* Identification and phylogenetics of *Spodoptera frugiperda* chemosensory proteins based on antennal transcriptome data [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2020, 34: 100680.
- Qu H, Wang XS, Luo ZW, *et al.* Transcriptome sequencing analysis of olfactory genes in antennae of *Agriophara rhombata* Meyr [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2024, 43 (1): 100-108. [曲浩, 王雪松, 罗梓文, 等. 茶谷蛾触角气味结合蛋白基因分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2024, 43 (1): 100-108]

- Saba NU, Ye C, Zhang W, *et al.* The *Antennal sensilla* and expression patterns of olfactory genes in the lower termite *Reticulitermes aculabialis* (Isoptera: Rhinotermitidae) [J]. *Journal Insect Science*, 2022, 22 (4): 11.
- Song YQ, Song ZY, Dong JF, *et al.* Identification and comparative expression analysis of odorant-binding proteins in the reproductive system and antennae of *Athetis dissimilis* [J]. *Science Report*, 11 (1): 13941.
- Sun DD, Huang Y, Qin ZJ, *et al.* Identification of candidate olfactory genes in the antennal transcriptome of the stink bug *Halyomorpha halys* [J]. *Frontiers in Physiology*, 2020, 11: 876.
- Wang R, Li FQ, Zhang W, *et al.* Identification and expression profile analysis of odorant binding protein and chemosensory protein genes in *Bemisia tabaci* MED by head transcriptome [J]. *PLoS ONE*, 2017, 12 (2): e0171739.
- Wang ZB, Ma T, Mao TF, *et al.* Application technology of the sex pheromone of the tea geometrid *Ectropis grisescens* (Lepidoptera: Geometridae) [J]. *International Journal of Pest Management*, 2018, 64 (4): 372-378.
- Waterhouse AM, Procter JB, Martin DM, *et al.* Jalview version 2-a multiple sequence alignment editor and analysis workbench [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25 (9): 1189-1191.
- Xiao GP, Lu JY, Yang ZD, *et al.* A study of adult olfactory proteins of primitive ghost moth, *Endoclita signifer* (Lepidoptera, Hepialidae) [J]. *Life (Basel)*, 2023, 13 (12): 2264.
- Yang S, Zhao HT, Xu K, *et al.* Analysis of the antennal transcriptome and olfaction-related genes of the greater wax moth *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2019, 56 (6): 1279-1291. [杨爽, 赵慧婷, 徐凯, 等. 大蜡螟触角转录组及嗅觉相关基因分析 [J]. *应用昆虫学报*, 2019, 56 (6): 1279-1291]
- Yang TB, Song XH, Zhong Y, *et al.* Field investigation- and dietary metabarcoding-based screening of arthropods that prey on primary tea pests [J]. *Ecology Evolution*, 2022, 12 (7): e9060.
- Zhang Y, Feng K, Mei RL, *et al.* Analysis of the antennal transcriptome and identification of tissue-specific expression of olfactory-related genes in *Micromelalopha troglodyta* (Lepidoptera: Notodontidae) [J]. *Journal Insect Science*, 2022, 22 (5): 8.
- Zhao H, Wu GX, Tang YY, *et al.* Analysis of the antennal transcriptome and olfaction-related genes of *Eocanthecona furcellata* [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2022, 44 (5): 1205-1217. [赵航, 吴国星, 汤永玉, 等. 叉角厉蝽触角转录组及嗅觉相关基因分析 [J]. *环境昆虫学报*, 2022, 44 (5): 1205-1217]