



不同色型异色瓢虫转录组差异表达基因分析

陈旭^{1,2} 陈梦瑶³ 王甦² 臧连生^{1*} 肖达^{2*}

(1. 贵州大学, 绿色农药与农业生物工程教育部重点实验室, 贵阳 550025; 2. 北京市农林科学院植物保护环境保护研究所, 北京 100097; 3. 浙江大学昆虫科学研究所, 浙江省作物病虫害生物学重点实验室, 杭州 310030)

摘要: 为探究不同色型异色瓢虫 *Harmonia axyridis* 之间产生生理学差异的机制, 通过 Illumina HiSeq 测序平台对黄底多窗型、黑底两窗型和黑底四窗型 3 种不同色型异色瓢虫雌雄成虫的 18 个转录组进行高通量测序, 比较不同色型间的差异表达基因, 并结合 GO 和 KEGG 数据库对差异表达基因进行注释分析。结果表明: 通过对差异表达基因进行定量比较发现, 与黄底多窗型相比, 2 种黑底型异色瓢虫雌雄成虫的下调基因明显更多; GO 功能分类结果显示, 不同色型的异色瓢虫雄成虫和雌成虫差异表达基因所属分类基本相似, 并未见显著富集现象, 且主要属于细胞过程、单组织活动和细胞等类别; 通过 KEGG 数据库比对分析发现不同色型异色瓢虫中的差异表达基因功能主要与环境适应和能量代谢通路相关。其中, 与氧化磷酸化过程相关的基因在 2 种黑底型异色瓢虫中的表达量显著低于黄底多窗型异色瓢虫, 这种差异在雌成虫中更为显著。

关键词: 异色瓢虫; 色型多样性; 转录组; 能量代谢; 氧化磷酸化

Analyses of differentially expressed genes in transcriptomes of multicolored Asian lady beetle *Harmonia axyridis* with different color patterns

Chen Xu^{1,2} Chen Mengyao³ Wang Su² Zang Liansheng^{1*} Xiao Da^{2*}

(1. Key Laboratory of Green Pesticide and Agricultural Bioengineering of Ministry of Education, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou Province, China; 2. Institute of Plant and Environment Protection, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China; 3. Key Laboratory of Crop Pest Biology of Zhejiang Province, Institute of Insect Sciences of Zhejiang University, Hangzhou 310030, Zhejiang Province, China)

Abstract: In order to explore the mechanism of physiological differences among different color patterns of multicolored Asian lady beetle *Harmonia axyridis*, 18 transcriptomes of three color (yellow, black-with-two-plot and black-with-four-plot) patterns were sequenced by Illumina HiSeq platform. The differentially expressed genes between different color patterns were compared and annotated against GO and KEGG databases. The results showed that two black patterns had higher number of down-regulated genes than the yellow pattern. The results of GO functional classification showed that the differentially expressed genes of male and female ladybirds with different color patterns were basically similar, and there was no significant enrichment, which were mainly related with cell processes, single tissue activities and cells. Through comparison and analysis against the KEGG database, the differentially expressed genes of different color patterns of *H. axyridis* were mainly related to environmental adaption and energy metabolism. Among them, the number of genes related to oxidative phosphorylation in two black patterns were significantly lower than that of the yellow pattern, with a more significant difference in female.

基金项目: 国家自然科学基金(31801794), 贵州大学自然科学专项科研基金(贵大专基合字(2021)1号), 北京市农林科学院科技创新能力建设专项(KJCX20200110), 北京市科技计划课题(Z201100008020014)

* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: lsz0415@163.com, xiaoda@ipepbaafs.cn

收稿日期: 2021-09-25

Key words: *Harmonia axyridis*; phenotypic diversity; transcriptome; energy metabolism; oxidative phosphorylation

异色瓢虫 *Harmonia axyridis* 属于鞘翅目瓢虫科, 是重要的捕食性天敌昆虫, 可以取食蚜虫、螨和介壳虫等多种农林害虫 (Koch, 2003; 王甦等, 2007)。异色瓢虫具有极高的色型多样性, 有超过 200 种的色型变化 (Ando et al., 2018)。异色瓢虫成虫鞘翅的色型主要分为 2 种, 黑底型和黄底型, 即鞘翅分别以黑色或黄色作为底色, 并且具有大小和数量不一的黄色或黑色圆点状色斑 (庚镇城和谈家桢, 1980)。不同色型异色瓢虫在生物学和生态学等方面都存在一定差异性 (Ando & Niimi, 2019)。如不同色型的异色瓢虫取食具有不同的偏好性, 在不同环境条件中对猎物的取食能力也具有差异 (Chen et al., 2019a); 而不同季节和地理位置的异色瓢虫野外种群中不同色型个体的比例存在极显著差异, 还具有选型交配的现象, 充分说明其表型差异与环境适应性之间存在相关性 (Wang et al., 2013; 郭长飞等, 2016)。近年来, 随着基因组测序技术的发展, 异色瓢虫色斑形成的机制成为表型多样性研究的热点。Ando et al. (2018) 通过基因组测序挖掘出 *pannier* 转录因子的序列变异是异色瓢虫不同色斑形成的原因; Chen et al. (2019b) 和 Xiao et al. (2020) 研究证明多巴胺黑色素是异色瓢虫鞘翅黑色素的主要成分。但对于异色瓢虫不同色型间的基因表达差异分析缺乏系统研究, 且不同色型之间的生理学分子机制研究尚未见报道。

能量代谢是昆虫通过能源物质的氧化代谢为其提供能量的过程。昆虫的能源物质主要有糖类、脂肪和氨基酸, 不同的能量物质具有不同的代谢途径, 糖酵解、脂肪酸氧化、氨基酸氧化脱氢、三羧酸循环、呼吸链电子传递和氧化磷酸化是昆虫能量代谢的基本生化过程 (Downer, 1981; 王荫长, 2004; 魏琪和苏建亚, 2016)。糖酵解和脂肪酸氧化代谢等过程释放出的能量, 只有少部分经底物水平磷酸化产生 ATP, 多数储存在还原辅酶中, 经呼吸链偶联的氧化磷酸化缓慢释放 ATP, 昆虫和其他动物相同, 主要通过这种方式完成能量转化 (刘树森和钦俊德, 1964; 王荫长, 2004)。因此, 氧化磷酸化是昆虫获取能量来完成正常生长发育及生理反应所必需的生化过程之一。有研究表明, 氧化磷酸化可为昆虫滞育过程提供正常生命活动所需能量和热量 (刘敏等, 2020)。而对于黑底型和黄底型异色瓢虫在能量代谢方面的差异, 尤其是氧化磷酸化过程还缺少研究。

随着测序技术的发展和成本的降低, 转录组高

通量测序技术被广泛用于昆虫生物学相关基因功能研究。本研究通过对不同色型的异色瓢虫雌雄成虫进行转录组高通量测序, 对异色瓢虫不同色型雌雄成虫差异表达基因进行分类及功能分析, 初步探究氧化磷酸化相关基因在不同色型异色瓢虫中的差异表达情况, 以期为进一步研究异色瓢虫表型多样性与能量代谢之间的关系提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试昆虫: 黄底多窗型 (简称黄底型)、黑底两窗型和黑底四窗型异色瓢虫为北京市农林科学院植物保护环境保护研究所应用昆虫研究室室内饲养种群, 在温度 (25 ± 1) °C、相对湿度 (70 ± 5) %、16 h 光照/8 h 黑暗条件下利用蚕豆蚜 *Aphis curviness* 作为饲料对异色瓢虫室内种群进行扩繁 (Chen et al., 2019a)。蚕豆蚜同为该单位提供的室内饲养种群, 饲养条件同异色瓢虫。

试剂和仪器: RNeasy Plus Mini Kit 试剂盒, 德国 Qiagen 公司; 琼脂糖, 美国 Invitrogen 公司; TAE 电泳缓冲液, 北京索莱宝科技有限公司; 其余试剂均为国产分析纯。Power/PAC 3000 型电泳仪, 美国 Bio-Rad 公司; NanoDrop One 超微量紫外分光光度计, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; JS-3000 凝胶成像仪, 上海培清科技有限公司; Centrifuge 5430 R 高速冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; Illumina HiSeq 测序仪, 美国 Illumina 公司。

1.2 方法

1.2.1 不同色型异色瓢虫转录组的测序评估

收集黄底型、黑底两窗型和黑底四窗型异色瓢虫羽化第 1 天雌雄成虫各 10 头, 设 3 个重复。饥饿处理 12 h 后, 用 PBS 缓冲液洗涤后浸入液氮处理 10 min, 之后置于 -80 °C 超低温冰箱保存。使用 RNeasy Plus Mini Kit 试剂盒参照说明书提取上述各色型异色瓢虫的总 RNA, 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。

利用 Illumina HiSeq 测序平台对 3 种色型异色瓢虫的转录组进行测序, 测序读长为 150 bp。为保证信息分析数据的质量, 测序所得原始序列去除接头污染的 reads、低质量的 reads 和含 N 比例大于 5% 的 reads, 过滤后得到高质量的测序数据。从过滤后的高质量数据中随机抽取 10 000 条 reads 数据, 通过

与NT库进行BLAST比对,检测测序结果的准确性。

1.2.2 不同色型异色瓢虫的差异表达基因分析

为了比较不同色型异色瓢虫雌雄成虫的差异表达基因,将3种异色瓢虫雌雄成虫转录组分为雌雄2组,每组9个样本。通过RSEM 1.3.3软件(Li & Dewey, 2011)对18个转录本建立索引,然后利用bowtie2 1.34.0软件进行有参比对以及表达水平的定量(Chen et al., 2021),其中对照组为黄底型或黑底两窗型的异色瓢虫。利用DEseq2 1.0软件对上一步所得表达矩阵进行差异表达基因的显著性分析,筛选差异表达基因的标准为 $P<0.01$ 及 $|\log_2(\text{差异倍数})|$ 大于1。将各处理组的差异表达基因取交集进行比较分析并绘制韦恩图。

1.2.3 不同色型异色瓢虫差异表达基因的功能注释

利用clusterProfiler 4.2.0软件的R包结合最新

的GO数据库对1.2.2鉴定的不同色型异色瓢虫的差异表达基因进行分类富集分析,并通过KEGG数据库对差异表达基因所在的代谢通路进行注释。

2 结果与分析

2.1 不同色型异色瓢虫转录组测序与组装结果分析

利用Illumina测序平台对不同色型异色瓢虫雌雄成虫的总RNA进行测序,对过滤后的高质量数据随机抽取10 000条reads数据,经BLAST比对显示均为异色瓢虫。经bcl2fastq2软件对高质量测序数据进行序列碱基识别后转化为原始测序序列,共获得18个转录组(SRA: PRJNA579455),测序结果共获得143.2 Gb数据,质量值大于30的碱基占总碱基数的比例Q30介于94.03%~94.45%之间,表明测序数据质量好,可信度高,可用于后续分析(表1)。

表1 不同色型异色瓢虫雌雄成虫转录组测序数据评估统计表

Table 1 Evaluation of transcriptome sequencing data in female and male adults of *Harmonia axyridis* with different color patterns

性别 Gender	色型 Color pattern	样本编号 Sample ID	Reads总数 Total no. of reads/Mb	碱基总数 Total no. of bases/Gb	Q30/%
雄 Male	黄底型 Yellow pattern	1	45.3	6.7	94.42
		2	42.9	6.4	94.32
		3	51.9	7.7	94.20
	黑底两窗型 Black-with-two-plot pattern	1	75.6	11.3	94.31
		2	39.8	5.9	94.45
		3	42.8	6.4	94.25
	黑底四窗型 Black-with-four-plot pattern	1	54.5	8.1	94.42
		2	66.5	9.9	94.31
		3	62.6	9.3	94.17
雌 Female	黄底型 Yellow pattern	1	51.3	7.6	94.19
		2	50.4	7.5	94.18
		3	51.8	7.7	94.43
	黑底两窗型 Black-with-two-plot pattern	1	44.2	6.6	94.24
		2	49.7	7.4	94.19
		3	61.0	9.1	94.22
	黑底四窗型 Black-with-four-plot pattern	1	56.7	8.5	94.18
		2	66.8	10.0	94.03
		3	47.3	7.1	94.16
总计Total	—	—	961.1	143.2	—

2.2 不同色型异色瓢虫的差异表达基因分析

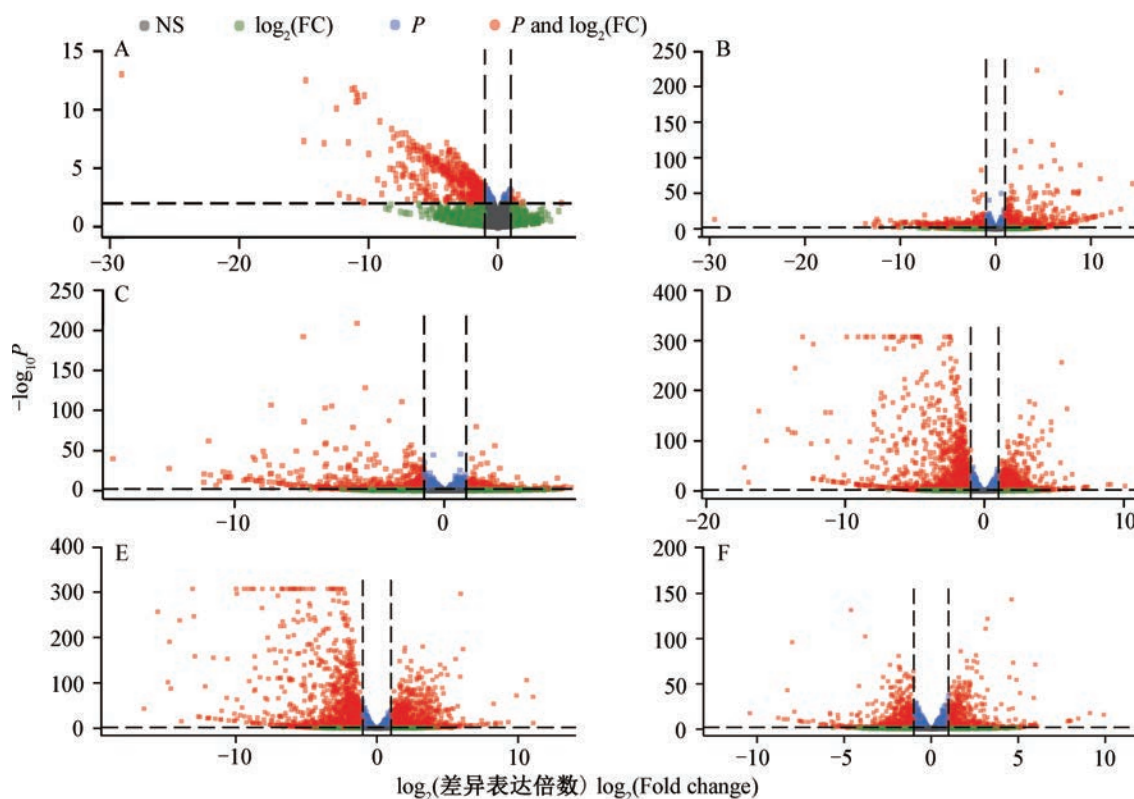
以异色瓢虫黄底型雄成虫的转录组数据为对照,黑底两窗型雄成虫共有差异表达基因274个,均为下调表达基因(图1-A);黑底四窗型雄成虫共有差异表达基因1 046个,其中上调表达基因409个,下调表达基因637个(图1-B)。以黑底两窗型雄成虫的转录组数据为对照,黑底四窗型雄成虫共有差异表达基因659个,其中上调表达基因212个,下调表达基因447个(图1-C)。表明黑底型和黄底型异色瓢虫雄成虫表达的基因具有显著差异,相较于黄

底型,黑底型雄成虫具有较多的下调表达基因,且黑底四窗型的下调基因多于黑底两窗型。

以异色瓢虫黄底型雌成虫的转录组数据为对照,黑底两窗型雌成虫共有差异表达基因2 209个,其中上调表达基因830个,下调表达基因1 379个(图1-D);黑底四窗型雌成虫共有差异表达基因2 747个,其中上调表达基因1 158个,下调表达基因1 589个(图1-E)。以黑底两窗型雌成虫的转录组数据为对照,黑底四窗型雌成虫共有差异表达基因987个,其中上调表达基因487个,下调表达基因500个(图1-F)。

表明黑底型和黄底型异色瓢虫雌成虫表达的基因有显著差异,相较于黄底型,黑底型雌成虫具有较多的下调表达基因,且黑底四窗型的下调表达基因比黑

底两窗型多。综合分析发现异色瓢虫雌成虫不同色型间的差异表达基因数要明显高于雄成虫,且雌雄成虫均具有黑底型基因显著下调表达的偏向性。



A: 黄底型雄成虫 vs 黑底两窗型雄成虫; B: 黄底型雄成虫 vs 黑底四窗型雄成虫; C: 黑底两窗型雄成虫 vs 黑底四窗型雄成虫; D: 黄底型雌成虫 vs 黑底两窗型雌成虫; E: 黄底型雌成虫 vs 黑底四窗型雌成虫; F: 黑底两窗型雌成虫 vs 黑底四窗型雌成虫; NS: 无差异表达基因; $\log_2(\text{FC})$: $|\log_2(\text{差异表达倍数})| > 1$ 的基因; P : $P < 0.01$ 的基因; P and $\log_2(\text{FC})$: $P < 0.01$ 且 $|\log_2(\text{差异表达倍数})| > 1$ 的基因。A: Yellow pattern male vs black-with-two-plot pattern male; B: yellow pattern male vs black-with-four-plot pattern male; C: black-with-two-plot pattern male vs black-with-four-plot pattern male; D: yellow pattern female vs black-with-two-plot pattern female; E: yellow pattern female vs black-with-four-plot pattern female; F: black-with-two-plot pattern female vs black-with-four-plot pattern female; NS: genes with no significant difference; $\log_2(\text{FC})$: genes with $|\log_2(\text{fold change})| > 1$; P : genes with $P < 0.01$; P and $\log_2(\text{FC})$: genes with $P < 0.01$ and $|\log_2(\text{fold change})| > 1$.

图1 异色瓢虫不同色型雄成虫(A~C)和雌成虫(D~F)的差异表达基因火山图

Fig. 1 Volcano plots of differentially expressed genes in male (A~C) and female (D~F) adults of *Harmonia axyridis* with different color patterns

黄底型雄成虫 vs 黑底两窗型雄成虫和黄底型雄成虫 vs 黑底四窗型雄成虫的差异表达基因与黑底两窗型雄成虫 vs 黑底四窗型雄成虫的差异表达基因没有交集;黄底型雄成虫 vs 黑底两窗型雄成虫与黄底型雄成虫 vs 黑底四窗型雄成虫中有交集的差异表达基因为232个(图2-A),表明黄底型雄成虫和黑底型雄成虫的差异表达基因与黑底两窗型和黑底四窗型雄成虫的差异表达基因存在较大差异。

黄底型雌成虫 vs 黑底两窗型雌成虫与黄底型雌成虫 vs 黑底四窗型雌成虫中有交集的差异表达基因为1 410个;黄底型雌成虫 vs 黑底两窗型雌成虫与黑底两窗型雌成虫 vs 黑底四窗型雌成虫中有

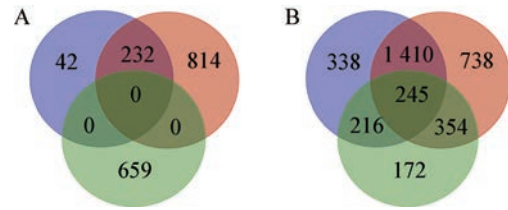
交集的差异表达基因为216个;黄底型雌成虫 vs 黑底四窗型雌成虫与黑底两窗型雌成虫 vs 黑底四窗型雌成虫中有交集的差异表达基因为354个;黄底型雌成虫 vs 黑底两窗型雌成虫、黄底型雌成虫 vs 黑底四窗型雌成虫与黑底两窗型雌成虫 vs 黑底四窗型雌成虫三者交集共有的差异表达基因为245个(图2-B),表明不同色型异色瓢虫雌成虫的差异表达基因有交集,且以黄底型为对照的雌成虫之间的差异表达基因交集较多。

2.3 不同色型异色瓢虫差异基因功能注释

2.3.1 GO功能注释分析结果

对不同色型异色瓢虫雄成虫的差异表达基因分

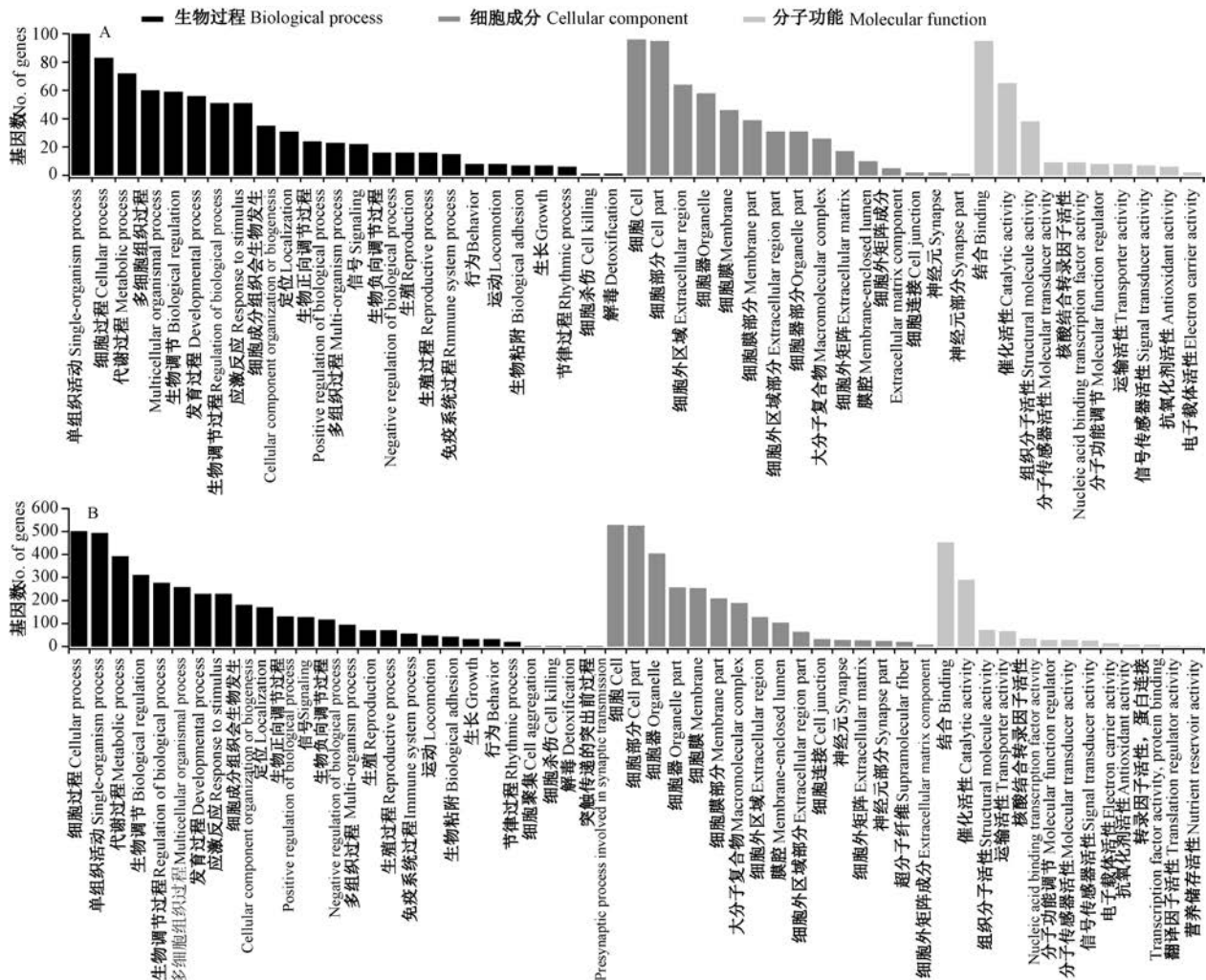
别进行GO功能注释,结果显示并未有明显的富集现象,且黑底两窗型雄成虫 vs 黑底四窗型雄成虫的差异表达基因并未得到显著的注释结果。对同色型异色瓢虫雄成虫的差异表达基因分别进行GO功能注释,发现黄底型雄成虫 vs 黑底两窗型雄成虫的差异表达基因属于生物过程分类的主要有单组织活动、细胞过程和代谢过程等相关基因;属于细胞成分分类的主要有细胞和细胞部分等相关基因;属于分子功能分类的主要有结合、催化活性和组织分子活性等相关基因(图3-A)。黄底型雄成虫 vs 黑底四窗型雄成虫的差异表达基因分类与黄底型雄成虫 vs 黑底两窗型雄成虫的差异表达基因分类基本相同(图3-B)。



紫色: 黄底型 vs 黑底两窗型; 红色: 黄底型 vs 黑底四窗型; 绿色: 黑底两窗型 vs 黑底四窗型。Purple: Yellow pattern vs black-with-two-plot pattern; red: yellow pattern vs black-with-four-plot pattern; green: black-with-two-plot pattern vs black-with-four-plot pattern.

图2 不同色型异色瓢虫雄成虫(A)和雌成虫(B)之间差异表达基因的韦恩图

Fig. 2 Venn diagrams of differentially expressed genes in *Harmonia axyridis* male (A) and female (B) adults with different color patterns



A: 黄底型 vs 黑底两窗型; B: 黄底型 vs 黑底四窗型。A: Yellow pattern vs black-with-two-plot pattern; B: yellow pattern vs black-with-four-plot pattern.

图3 异色瓢虫不同色型雄成虫差异表达基因的GO功能分类

Fig. 3 GO classification of transcriptomes of male adults of *Harmonia axyridis* with different color patterns

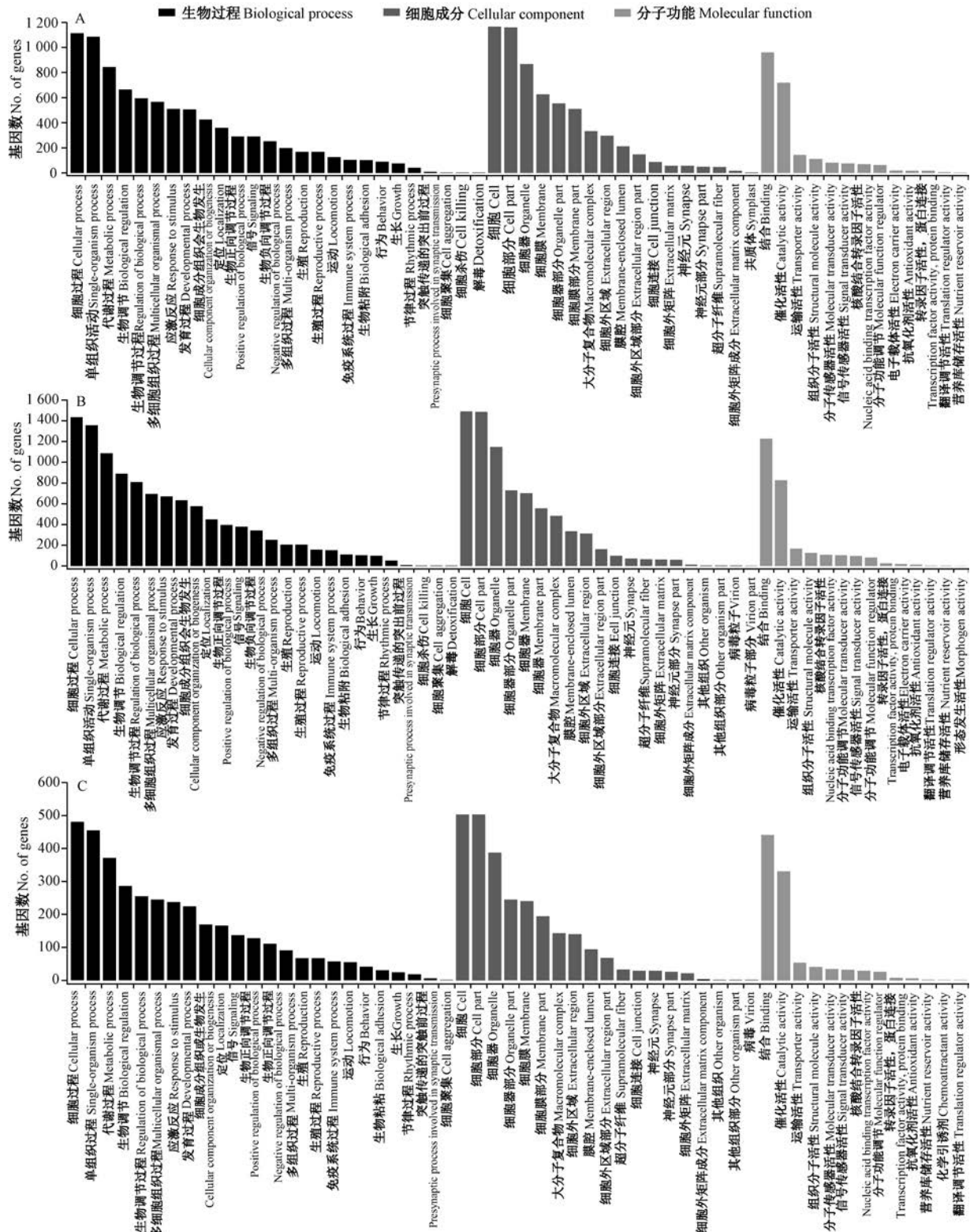
GO功能注释结果显示,黄底型雌成虫 vs 黑底两窗型雌成虫的差异表达基因属于生物学过程分类

的主要有细胞过程、单组织活动和代谢过程等相关基因;属于细胞成分分类的主要有细胞和细胞部分

等相关基因;属于分子功能分类的主要有结合、催化活性和组织分子活性等相关基因(图4-A)。

黄底型雌成虫 vs 黑底四窗型雌成虫和黑底两

窗型雌成虫 vs 黑底四窗型雌成虫的差异表达基因分类均与黄底型雌成虫 vs 黑底两窗型雌成虫的差异表达基因分类基本相同(图4-B~C)。



A: 黄底型 vs 黑底两窗型; B: 黄底型 vs 黑底四窗型; C: 黑底两窗型 vs 黑底四窗型。A: Yellow pattern vs black-with-two-plot pattern; B: yellow pattern vs black-with-four-plot pattern; C: black-with-two-plot pattern vs black-with-four-plot pattern.

图4 异色瓢虫不同色型雌成虫差异表达基因的GO功能分类

Fig. 4 GO classification of transcriptomes of female adults of *Harmonia axyridis* with different color patterns

GO 功能注释结果表明,不同色型异色瓢虫雄成虫和雌成虫的差异表达基因所属分类基本相似,并未见显著富集现象,且主要属于细胞过程、单组织活动、细胞、细胞部分、结合和催化活性等分类。

2.3.2 KEGG 通路富集分析结果

对不同色型异色瓢虫雄成虫的差异表达基因分别进行 KEGG 功能注释,结果表明并未有明显的富集现象,且黑底两窗型雄成虫 vs 黑底四窗型雄成虫的差异表达基因并未得到注释结果。黄底型雄成虫 vs 黑底两窗型雄成虫和黄底型雄成虫 vs 黑底四窗型雄成虫的差异表达基因均注释到了代谢、遗传信息处理、环境信息处理、细胞过程、生物系统以及人类疾病 6 个相关通路,且在各通路注释到的基因数占生物系统注释总基因数的比例比较平均,除了生物系统相关通路,黄底型雄成虫 vs 黑底两窗型雄成虫的差异表达基因中注释到环境适应通路的基因数最少,占生物系统数注释总基因数的 2.94%,且均为下调表达基因(图 5-A);黄底型雄成虫 vs 黑底四窗型雄成虫的差异表达基因中注释到环境适应通路的基因数最多,占生物系统注释总基因数的 22.34%,且均为下调表达基因(图 5-B)。除此之外,黄底型雄成虫 vs 黑底两窗型雄成虫中并未注释到能量代谢通路相关的基因,而黄底型雄成虫 vs 黑底四窗型雄成虫中注释到代谢通路相关的基因数占生物系统注释总基因数的 14.80%(图 5),表明与黄底型异色瓢虫雄成虫相比,黑底型的环境适应通路相关基因有明显下调的偏向性;且黑底两窗型和黑底四窗型异色瓢虫雄成虫在能量代谢通路中的差异表达基因具有较大差异。

对不同色型异色瓢虫雌成虫的差异表达基因分别进行 KEGG 功能注释,结果并未见明显的富集现象。黄底型雌成虫 vs 黑底两窗型雌成虫、黄底型雌成虫 vs 黑底两窗型雌成虫和黑底两窗型雌成虫 vs 黑底四窗型雌成虫的差异表达基因均注释到了代谢、遗传信息处理、环境信号处理、细胞过程、生物系统和人类疾病 6 个相关通路,且在各通路注释到的基因数占生物系统注释总基因数的比例比较平均,除了代谢相关通路中有关能量代谢的基因,该类基因在黄底型雌成虫 vs 黑底两窗型雌成虫和黄底型雌成虫 vs 黑底四窗型雌成虫的差异表达基因中所占比例分别为 9.66% 和 8.22%(图 6-A~B),而在黑底两窗型雌成虫 vs 黑底四窗型雌成虫的差异表达基因中所占比例仅为 1.16%(图 6-C)。表明与能量代谢有关的基因表达量在黑底型和黄底型异色瓢虫雌

成虫间的差异较大,而在 2 个黑底型雌成虫之间的差异较小。

2.4 不同色型异色瓢虫能量代谢相关基因的表达差异

在能量代谢通路的差异表达基因中,氧化磷酸化差异表达基因占较大比例,如黄底型雌成虫 vs 黑底两窗型雌成虫中 64 个与能量代谢通路相关的差异表达基因中有 42 个氧化磷酸化差异表达基因,因此对其在不同色型雌雄成虫中的差异表达进行进一步分析。结果显示,在雄成虫中,仅黑底两窗型雄成虫 vs 黑底四窗型雄成虫中有 31 个氧化磷酸化差异表达基因,且均为下调表达基因;在雌成虫中,黄底型雌成虫 vs 黑底两窗型雌成虫和黄底型雌成虫 vs 黑底四窗型雌成虫中均有 42 个氧化磷酸化差异表达基因,在黄底型雌成虫 vs 黑底四窗型雌成虫中均为上调表达基因,而在黄底型雌成虫 vs 黑底两窗型雌成虫中显示为 41 个基因下调表达,仅有 1 个基因上调表达;在黑底两窗型雌成虫 vs 黑底四窗型雌成虫中仅有 1 个氧化磷酸化差异表达基因,且为上调表达基因,该基因编码泛醌细胞色素 c 还原酶铁硫亚基。表明与能量代谢密切相关的基因,尤其是涉及氧化磷酸化的差异表达基因在异色瓢虫黑底型和黄底型间的差异明显,但在黑底型之间差异较小。

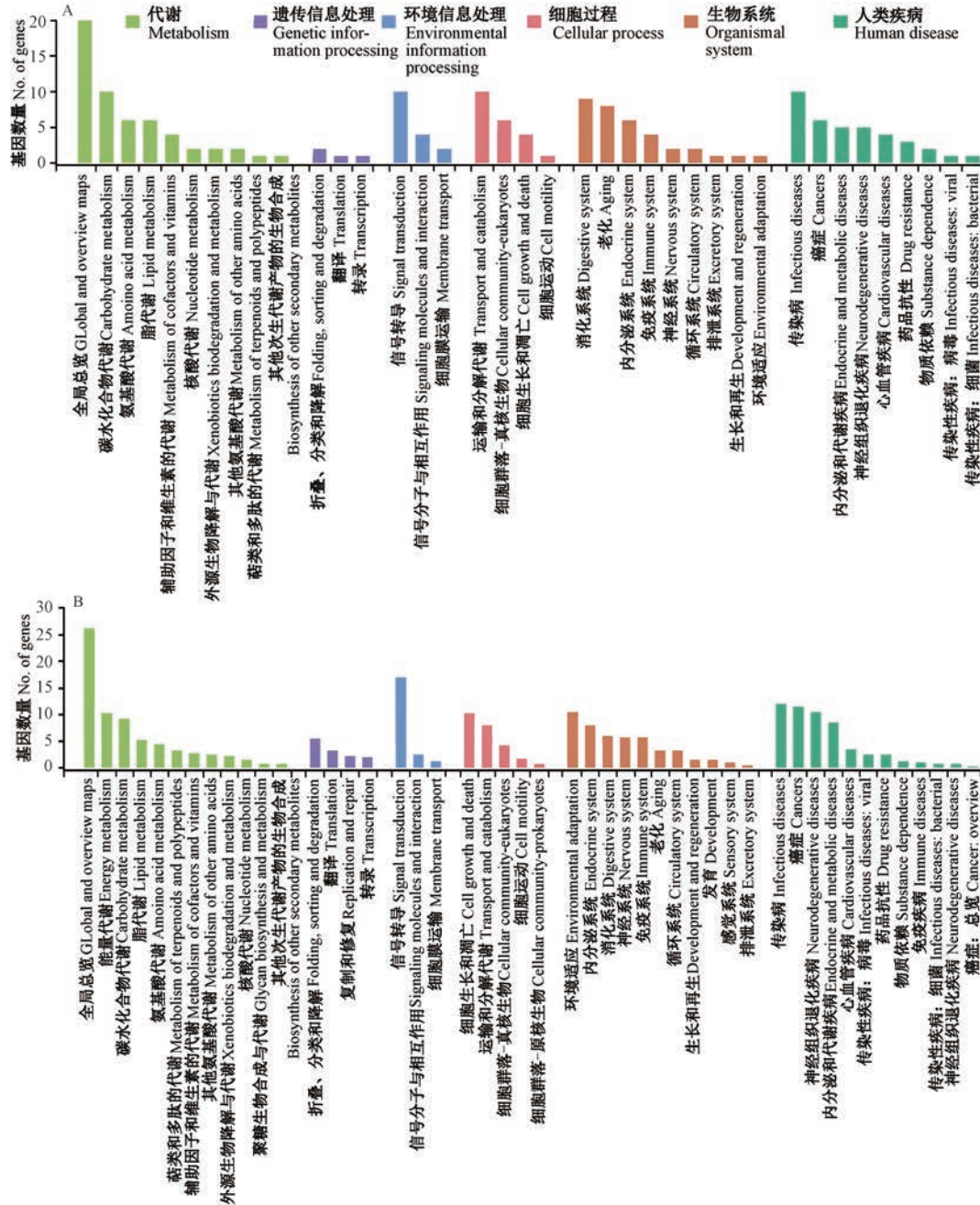
3 讨论

异色瓢虫因其对蚜虫等农林害虫具有高效的控害作用而为被广泛关注。近年来,随着其种群在全球范围的扩张,逐渐演变成为了入侵物种,对入侵地的生态环境和生物多样性造成了潜在的威胁(Brown & Miller, 1998; Goetz, 2008),因此人们对于异色瓢虫生物学以及生态学特性的关注与研究与日俱增。与此同时,基于异色瓢虫表型差异分析的基因组获得破译,且染色体水平的基因组注释分析也为深入解析异色瓢虫高表型差异与生态环境适应性之间的关系奠定了基础(Ando et al., 2018; Chen et al., 2021)。

本研究结果显示,不同色型异色瓢虫雌成虫之间的差异表达基因数明显高于雄成虫。异色瓢虫的雌成虫个体一般大于雄成虫,寿命长于雄成虫(Nalepa et al., 1996),且雌成虫需要产卵并繁育后代,生殖调控机制更为复杂。在异色瓢虫种群中存在着选型交配现象,这种现象往往主要是由雌成虫主导,雌成虫会选择喜欢的色型雄成虫进行交配(Obata, 1988; Wang et al., 2013)。因此,雌雄成虫之间的差异在不同色型的成虫之间会被放大,体现得更加明

显。本研究中无论是异色瓢虫雌成虫还是雄成虫,黄底型与黑底型之间的差异表达基因数要远高于黑底型与黑底型之间,说明与黄底型相比,黑底型之间在进化过程中可能关系更近;而黄底型与黑底两窗型的

差异表达基因数处于中间,推测黑底两窗型在进化层面可能是黄底型和黑底四窗型之间的中间体。Dobzhansky(1933)同样曾提出假设,异色瓢虫种群中存在的许多色型可能处于黄底型和黑底型的过渡态。



A: 黄底型 vs 黑底两窗型; B: 黄底型 vs 黑底四窗型。A: Yellow pattern vs black-with-two-plot pattern; B: yellow pattern vs black-with-four-plot pattern.

图5 异色瓢虫不同色型雄成虫转录组KEGG通路的比较

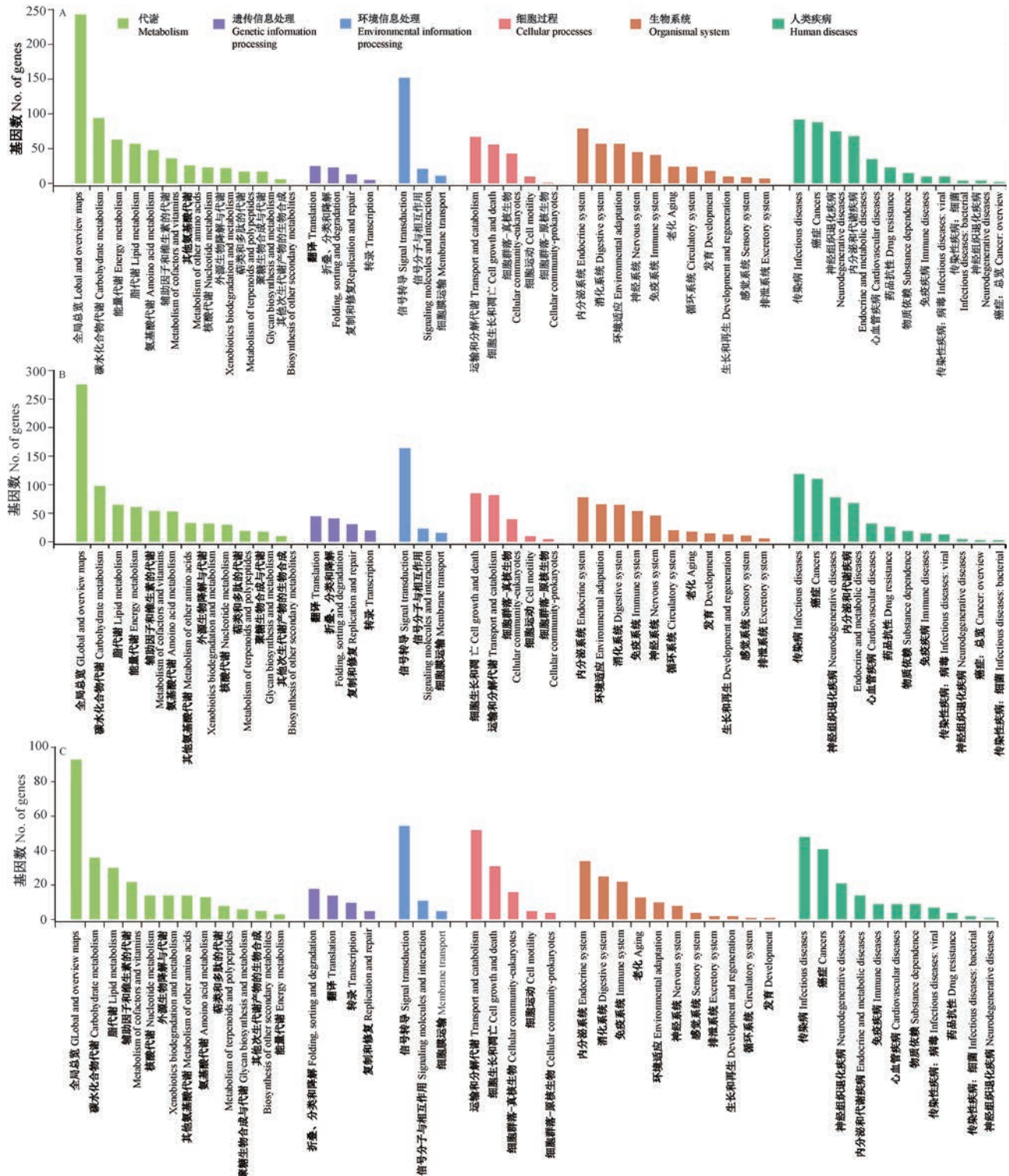
Fig. 5 Comparison of KEGG pathways of *Harmonia axyridis* male adults with different color patterns

利用GO和KEGG数据库对不同色型异色瓢虫差异基因进行功能注释和分类,结果显示并未存在显著的富集现象,黑底两窗型雄成虫vs黑底四窗型雄成虫的差异表达基因并未得到GO功能和KEGG

通路的注释结果,可能是差异基因数太少,或昆虫相关基因数据有限。在KEGG注释到的通路中,雄成虫组别中黄底型雄成虫vs黑底两窗型雄成虫和黄底型雄成虫vs黑底四窗型雄成虫在环境适应和能

量代谢相关通路的基因数具有较大差异,这部分结果和雌成虫组别一致,即环境适应通路相关基因无明显差异,但能量代谢通路相关基因有显著差异,且黄底型之间的差异更大。且这些差异表达基因多为

下调基因,表明与黄底型相比,黑底型对环境适应和能量代谢的响应基因均较少,这可能是由于黄底型对环境变化响应的调控网络更为复杂。



A: 黄底型 vs 黑底两窗型; B: 黄底型 vs 黑底四窗型; C: 黑底两窗型 vs 黑底四窗型。A: Yellow pattern vs black-with-two-plot pattern; B: yellow pattern vs black-with-four-plot pattern; C: black-with-two-plot pattern vs black-with-four-plot pattern.

图6 异色瓢虫不同色型雌成虫转录组KEGG代谢通路的比较

Fig. 6 Comparison of KEGG metabolic pathways of *Harmonia axyridis* female adults with different color patterns

对不同色型异色瓢虫能量代谢通路差异基因进行分析,发现氧化磷酸化过程占有较大比例。与呼吸链偶联的氧化磷酸化是生物体产生ATP的主要生化过程,通过氧化磷酸化过程储存在辅酶中的能量得到缓慢释放。因此,本研究主要分析了氧化磷酸化相关基因在不同色型异色瓢虫间的差异表达情况,结果表明异色瓢虫成虫中黑底型的氧化磷酸化基因表达量要比黄底型低。Wang et al.(2013)研究发现,越冬的黄底型异色瓢虫成虫在野外观测到的频率要高于黑底型。结合本研究结果,推测黄底型异色瓢虫成虫氧化磷酸化相关能量代谢的基因表达量较高,可能有助于其完成生命活动并顺利越冬。

本研究通过对不同色型异色瓢虫雌雄成虫进行转录组高通量测序,并对不同色型异色瓢虫雌雄成虫的差异表达基因进行了分类及功能分析,初步探究了氧化磷酸化相关基因在不同色型异色瓢虫中的差异表达。后续将对本研究中涉及的氧化磷酸化相关基因进行分析,更全面深入地探究不同色型异色瓢虫之间生物学差异的分子机制。

参 考 文 献 (References)

- Ando T, Matsuda T, Goto K, Hara K, Ito A, Hirata J, Yatomi J, Kajitani R, Okuno M, Yamaguchi K, et al. 2018. Repeated inversions within a pannier intron drive diversification of intraspecific colour patterns of ladybird beetles. *Nature Communications*, 9: 3843
- Ando T, Niimi T. 2019. Development and evolution of color patterns in ladybird beetles: a case study in *Harmonia axyridis*. *Development, Growth & Differentiation*, 61(1): 73–84
- Brown MW, Miller SS. 1998. Coccinellidae (Coleoptera) in apple orchards of eastern West Virginia and the impact of invasion by *Harmonia axyridis*. *Entomological News*, 109(2): 143–151
- Chen MY, Mei Y, Chen X, Chen X, Xiao D, He K, Li Q, Wu MM, Wang S, Zhang F, et al. 2021. A chromosome-level assembly of the harlequin ladybird *Harmonia axyridis* as a genomic resource to study beetle and invasion biology. *Molecular Ecology Resources*, 21(4): 1318–1332
- Chen X, Xiao D, Du XY, Guo XJ, Zhang F, Desneux N, Zang LS, Wang S. 2019b. The role of the dopamine melanin pathway in the ontogeny of elytral melanization in *Harmonia axyridis*. *Frontiers in Physiology*, 10: 1066
- Chen X, Xiao D, Du XY, Zhang F, Zang LS, Wang S. 2019a. Impact of polymorphism and abiotic conditions on prey consumption by *Harmonia axyridis*. *Entomologia Generalis*, 39(3/4): 251–258
- Dobzhansky TH. 1933. Geographical variation in lady-beetles. *American Naturalist*, 67(709): 97–126
- Downer RGH. 1981. *Energy metabolism in insects*. Boston, MA: Springer
- Geng ZC, Tan JZ. 1980. Some genetic problems of *Harmonia axyridis*. *Nature Magazine*, 2(7): 34–40 (in Chinese) [庚镇城, 谈家桢. 1980. 异色瓢虫的几个遗传学问题. *自然杂志*, 2(7): 34–40]
- Goetz DW. 2008. *Harmonia axyridis* ladybug invasion and allergy. *Allergy and Asthma Proceedings*, 29(2): 123–129
- Guo CF, Xu WM, He Z, Li YH, Ren SX, Qiu BL. 2016. Color variations of *Harmonia axyridis* and phylogenetic analysis of 19-spot *H. axyridis* based on their COI genes. *Journal of Plant Protection*, 43(1): 155–161 (in Chinese) [郭长飞, 许伟明, 何瞻, 李翌菡, 任顺祥, 邱宝利. 2016. 异色瓢虫色斑多样性调查及各地十九斑变型COI基因系统进化分析. *植物保护学报*, 43(1): 155–161]
- Koch RL. 2003. The multicolored Asian lady beetle, *Harmonia axyridis*: a review of its biology, uses in biological control, and non-target impacts. *Journal of Insect Science*, 3: 32
- Li B, Dewey CN. 2011. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, 12: 323
- Liu M, Han HB, Liu AP, Gao SJ, Xu LB, Yue FZ, Huang HG. 2020. Differentially expressed proteins associated with energy metabolism in diapause and non-diapause pupae of *Lysiphlebus testaceipes* (Hymenoptera: Braconidae). *Acta Entomologica Sinica*, 63(6): 708–716 (in Chinese) [刘敏, 韩海斌, 刘爱萍, 高书晶, 徐林波, 岳方正, 黄海广. 2020. 茶足柄瘤蚜茧蜂滞育和非滞育蛹中与能量代谢相关的差异表达蛋白. *昆虫学报*, 63(6): 708–716]
- Liu SS, Qin JD. 1964. Oxidative phosphorylation and respiratory control in the mitochondria isolated from the flight muscle of the armyworm moth *Leucania separata* Walker. *Acta Entomologica Sinica*, 7(3): 461–465 (in Chinese) [刘树森, 钦俊德. 1964. 粘虫 *Leucania separata* Walker 蛾飞翔肌线粒体的氧化磷酸化作用和呼吸控制. *昆虫学报*, 7(3): 461–465]
- Nalepa CA, Kidd KA, Ahlstrom KR. 1996. Biology of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) in winter aggregations. *Annals of the Entomological Society of America*, 89(5): 681–685
- Obata S. 1988. Mating refusal and its significance in females of the ladybird beetle, *Harmonia axyridis*. *Physiological Entomology*, 13(2): 193–199
- Wang S, Michaud JP, Tan XL, Murray L, Zhang F. 2013. Melanism in a Chinese population of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae): a criterion for male investment with pleiotropic effects on behavior and fertility. *Journal of Insect Behavior*, 26(5): 679–689
- Wang S, Zhang RZ, Zhang F. 2007. Research progress on biology and ecology of *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae). *Chinese Journal of Applied Ecology*, 18(9): 2117–2126 (in Chinese) [王甦, 张润志, 张帆. 2007. 异色瓢虫生物生态学研究进展. *应用生态学报*, 18(9): 2117–2126]
- Wang YC. 2004. *Insect physiology*. Beijing: China Agriculture Press (in Chinese) [王荫长. 2004. *昆虫生理学*. 北京: 中国农业出版社]
- Wei Q, Su JY. 2016. Research advances in carbohydrate and lipid metabolism in insects. *Acta Entomologica Sinica*, 59(8): 906–916 (in Chinese) [魏琪, 苏建亚. 2016. 昆虫糖脂代谢研究进展. *昆虫学报*, 59(8): 906–916]
- Xiao D, Chen X, Tian RB, Wu MM, Zhang F, Zang LS, Harwood JD, Wang S. 2020. Molecular and potential regulatory mechanisms of melanin synthesis in *Harmonia axyridis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6): 2088

(责任编辑:李美娟)