研究论文

阿尔泰蝠蛾（鳞翅目：蝙蝠蛾科）幼虫低温胁迫转录组分析*

孙 涛[1,2**] 张示渊[2] 张婷婷[2] 王 岩[1,3,4***]

（1. 石河子大学医学院，石河子 832000；2. 八师石河子市总医院（石河子大学第三附属医院，石河子市人民医院），石河子 832000；3. 石河子大学动物科技学院，石河子 832000；4. 石河子大学畜牧学博士后流动站，石河子 832000）

摘 要 **【目的】** 本研究旨在通过转录组测序技术分析低温胁迫引起的阿尔泰蝠蛾 *Hepialus altaicola* Wang 幼虫基因转录差异及上调表达基因的主要功能类群和参与的主要代谢通路。**【方法】** 采用 Illumina HiSeq ™ 2500 测序平台对阿尔泰蝠蛾幼虫进行转录组测序、组装，利用 Blast 软件进行数据库比对和基因功能注释，用 DEGSeq R 软件包分析 4 ℃低温处理与室内适温饲养试虫的差异表达基因，并对上调表达基因进行 GO 和 KEGG 代谢途径富集分析。**【结果】** 经序列拼接后共获得 100 300 个 unigenes，总长度 81 600 309 bp，平均长度 813 bp，N50 长度 1 719 bp。与 7 大数据库同源比对，共获得 34 691（34.59%）条 unigenes。低温胁迫转录组分析得到 11 569 个差异表达基因（DEGs），7 158 条基因上调，4 411 条基因下调。富集到 47 个 GO 类群，217 个 KEGG 途径。其中代谢过程、催化、结合活性类群占有重要比例，核糖体、碳代谢、剪接体等途径显著富集。另外，热激蛋白、昆虫表皮蛋白、海藻糖酶、超氧化物歧化酶等非生物胁迫相关基因显著上调表达。**【结论】** 阿尔泰蝠蛾幼虫低温胁迫转录组分析揭示，代谢过程、细胞过程、生物调节、对刺激的反应等生物学过程相关基因和部分非生物胁迫响应基因显著上调表达，提示蝠蛾幼虫可能从抗氧化防御、分子伴侣、体温调节和维持细胞的渗透平衡等多方面应对低温胁迫。

关键词 阿尔泰蝠蛾；转录组；基因注释；低温胁迫；差异表达基因

Gene transcription in *Hepialus altaicola* (Lepidoptera: Hepialidae) larvae subject to cold stress

SUN Tao[1,2**] ZHANG Shi-Yuan[2] ZHANG Ting-Ting[2] WANG Yan[1,3,4***]

(1. Medical College of Shihezi University, Shihezi 832000, China; 2. The Third Affiliated Hospital of Shihezi University (Shihezi People's Hospital), Shihezi 832000, China; 3. College of Animal Science and Technology, Shihezi 832000, China; 4. Animal Husbandry Post-doctoral Station of Shihezi University, Shihezi 832000, China)

Abstract **[[Objectives]** To use transcriptome sequencing to identify the main functional groups of up-regulated genes, and the main metabolic pathways of *Hepialus altaicola* larvae, and investigate the effects of cold stress differences on gene transcription. **[Methods]** The transcriptome of *H. altaicola* larvae was sequenced and assembled on the Illumina HiSeq™ 2500 sequencing platform. Database comparison and gene annotation were conducted using Blast software. The DEGSeq R software package was used to analyze differentially expressed genes of larvae kept at 4 ℃ and GO term enrichment and KEGG metabolic pathway analysis were performed on the up-regulated genes. [**Results**] After sequence splicing, a total of 100 300 genes were obtained with a total length of 81 600 309 bp, a mean length of 813 bp and an N50 length of 1 719 bp. Comparison with seven major databases identified 34 691 (34.59%) unigenes. Transcriptome analysis revealed 11 569 genes

*资助项目 Supported projects：国家自然科学基金项目（32060125，81560614）；中国博士后科学基金资助项目（2016M602907）

**第一作者 First author，E-mail：526428326@qq.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：xueshengwangyan@126.com

收稿日期 Received：2020-09-23；接受日期 Accepted：2021-04-06

that were differentially expressed in response to cold stress (DEGs), 7 158 of which were up-regulated and 4 411 down-regulated. The up-regulated genes were enriched to 47 GO terms and 217 KEGG pathways. An important proportion of these were involved in the metabolic process, catalysis and binding activity teams. Ribosome, carbon metabolism, spliceosome and other pathways were also significantly enriched. In addition, abiotic stress-related genes, such as heat shock protein, insect cuticle protein, trehalase and superoxide dismutase, were up-regulated. [**Conclusion**] The transcriptomic data of *H. altaicola* larvae reveal that the expression of genes related to metabolic processes, cellular processes, biological regulation, response to stimuli, as well as some abiotic stress response genes, are significantly up-regulated in response to cold stress. This suggests that *H. altaicola* larvae use a range of strategies to cope with cold stress, including antioxidant defense, molecular chaperones, body temperature regulation and maintenance of cell osmotic balance.

Key words *Hepialus altaicola*; transcriptome; gene annotation; low temperature stress; differential expressed genes

阿尔泰蝠蛾 *Hepialus altaicola* Wang 隶属于鳞翅目 Lepidoptera 蝙蝠蛾科 Hepialidae 蝠蛾属 *Hepialus*，是新疆特有昆虫，仅分布于新疆阿尔泰山（海拔 1 000-3 000 m）。蝠蛾幼虫生长于地下 5-20 cm 的土壤层中，微环境的日平均温度在 -5-15 ℃范围（赵恒等，1998）。野外和实验室观察发现在 0-5 ℃，幼虫还能维持取食和运动能力，具有很强的低温适应能力。阿尔泰蝠蛾是新疆虫草菌 *Ophiocordyceps gracilis* 的寄主昆虫，其幼虫受真菌感染后形成的虫菌复合体即新疆虫草，具有很高的药用价值和经济意义（索菲娅等，2008）。目前，关于蝠蛾基因方面的研究相对较少，对阿尔泰蝠蛾的研究主要在分类、饲养（赵恒等，1998），幼虫食性（王岩等，2020）和蛹的雌雄鉴别等方面（王岩等，2018），尚缺少关于该昆虫低温胁迫响应分子机制方面的研究，然而其低温偏好及敏感性特征又是饲养周期和存活率的主要限制因素之一。因此，有必要从转录组和生物信息学的方法分析其低温胁迫的差异表达基因，从分子水平上了解蝠蛾幼虫的耐寒机制。

目前，人们对昆虫抗寒的生理生化机制进行了大量研究（Goto *et al.*，2001；陈永杰等，2005；Lachenicht *et al.*，2010）。基因组和蛋白组的筛选方法也促进了越冬昆虫新基因和蛋白的发掘和鉴定。目前已知的低温响应的基因多为保护性效应分子，是具有直接的低温保护功能的蛋白，包括热激蛋白（Heat shock proteins，HSPs）、抗冻蛋白（Antifreeze proteins，AFPs）等（Lu *et al.*，2014）。热激蛋白是参与蛋白质折叠、降解和细胞物质运输的重要分子伴侣，在耐寒性和应答其他胁迫因子中起作用（Clark and Worland，2008；Storey and Storey，2011）。抗冻蛋白通过促进过冷和抑制结冰，在保护变温生物免受冰冻方面发挥着重要作用（Zachariassen and Husby，1982），具有热滞活性、重结晶抑制效应、修饰冰晶形态 3 种重要特性（Bar *et al.*，2016）。

温度是影响昆虫的生存、繁殖和分布的重要环境因素之一，大多数昆虫会经历周期性或地理性的低温暴露（Sinclair *et al.*，2003）。昆虫为了抵御恶劣环境温度的变化和病原微生物的入侵，在进化过程中形成了快速反应机制，冷应激往往导致昆虫能量消耗、代谢率、发育和免疫反应的改变（Sinclair *et al.*，2013）。对低温适应的研究，有助于揭示昆虫在环境适应过程中普遍性的调节机制。近年来，气候变化以及虫草的过度采挖严重影响了阿尔泰蝠蛾及新疆虫草的分布和种群大小。因此，出于对其低温生态适应性的研究需要，进行其低温转录组的生物信息学分析研究尤为重要。有研究者从冷驯化幼虫的代谢调节差异和热补偿机制等方面研究了小金蝠蛾 *Hepialus xiaojinensis* 幼虫潜在的调控策略（Zhu *et al.*，2016）。对鳞翅目其它昆虫温度胁迫引起的差异表达基因的转录组研究还包括沙棘蠹木蛾 *Eogystia hippophaecolus*（Cui *et al.*，2017）、家蚕 *Bombyx mori*（Guo *et al.*，2018）、大蜡螟 *Galleria mellonella* Linnaeu（杨爽等，2019）、亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis*（Chen *et al.*，2019）等。由于长期适应于高海拔的寒冷环境，阿尔泰蝠蛾幼虫对低温具有较强的耐受能力，其独特的

温度适应性使之成为研究昆虫低温适应机制的良好材料。

基于二代测序的转录组分析是非模式物种基因发掘的有效手段（Marioni *et al.*，2008）。本研究采用 Illumina HiSeq ™ 2500 测序平台对常规饲养和低温处理的阿尔泰蝠蛾幼虫进行转录组测序，将获得的序列信息进行拼接和组装，对得到的 unigenes 进行功能注释、分类及代谢途径的分析，并对 4 ℃低温处理试虫差异上调表达基因进行了 GO 和 KEGG 功能分类和富集分析，特别关注与冷适应相关的表达基因，以期发掘阿尔泰蝠蛾低温胁迫转录组中的关键基因和代谢通路，为从分子水平开展阿尔泰蝠蛾耐寒机制的研究奠定基础。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

阿尔泰蝠蛾幼虫采自新疆阿勒泰地区布尔津县林场的新疆芍药 *Paeonia sinjiangensis* 丛下（海拔 1 260 m），与周围栖息土壤一并收集。回到实验室后，将采集的幼虫分别进行体重、头壳宽度的测量。选择个体大小一致的健康活虫分为两组用于转录组研究；一组饲养于光照培养箱（MGC-250P 型，上海一恒）中，饲养温度设置为（12±1）℃，相对湿度 50%-60%，光周期为 16L：8D，饲养一周后直接放入液氮保存；另一组试虫置于 4 ℃低温条件下处理一周后，放入昆虫饲养瓶中，外包棉花，置于保温泡沫盒中，放入冰箱中让其缓慢冷冻，最后置于液氮中保存。将光照培养箱常规饲养的命名为 SHW，4 ℃低温冷处理的命名为 SDWC。

1.2　RNA 提取、cDNA 文库构建和 Illumina 测序

分别从两组冻存的阿尔泰蝠蛾试虫中取出 2 头（近 5 龄），用 TRIzol 试剂提取 RNA。总 RNA 的提取、cDNA 文库构建及测序工作由北京百迈克生物科技有限公司协助完成。采用 Illumina HiSeq™ 2500（Illumina, San Diego, CA, USA）系统进行测序，测序读长为 PE125。

1.3　转录组组装

测序得到的原始数据（Raw reads）含有序列接头（接头污染）和低质量的 reads，需要对原始测序数据处理，过滤和清除低质量测序序列，得到过滤后的测序数据（Clean reads），再进行后续分析。包括 1）去除包含接头的 reads；2）去除未知碱基 N 大于 10%的 reads；3）去除低质量 reads（质量值 Qphred≤20 的碱基数占整个 reads 的 50%以上的 reads）。过滤后的测序数据保存为 FASTQ 格式。在高质量的测序数据基础上计算 Q20（Phred>20 碱基占总碱基的百分比）、Q30（Phred>30 碱基占总体碱基的百分比）、GC 含量（碱基 G 和 C 的总和占总的碱基数的百分比）。

1.4　Trinity 拼接

利用 Trinity 软件对获得的高质量测序数据进行拼接组装（Grabherr *et al.*，2011）。首先将测序 reads 打断成较短的片段（K-mers），提取全长的转录本（Transcript）剪切亚型；其次将这些短片段扩展为长片段（Contigs），并利用这些片段之间的重叠形成片段集合（Component）；然后使用 De Bruijn 对读取信息进行映射和排序，对每个片段集的转录序列进行识别；最后使用 Tgicl 对组装结果进行聚类去冗余得到最终的单基因簇 unigenes 用于后续分析。

1.5　基因功能注释和分类

使用 Blast 将 unigenes 与数据库（Nr，COG，SwissProt，KEGG 和 GO）比对进行功能注释。然后用 Blast2GO 进行 GO（Gene Ontology）条目和功能分类统计（Conesa *et al.*, 2005）。利用 KOBAS 2.0（Xie *et al.*, 2011）获得 KEGG（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes）中 unigenes 的直系同源结果。预测完 unigenes 的氨基酸序列之后使用 HMMER（Finn *et al.*，2011）软件与 Pfam 数据库（Finn *et al.*，2014）进行比较，获得 unigenes 的注释信息。

1.6 低温转录组差异表达基因功能分类和通路富集分析

为了鉴定两个文库之间的差异基因，使用基因转录的每千碱基片段数/百万片段测序（FPKM）方法计算单基因表达。用 RSEM 软件包（Li and Dewey，2011）将每个样品的测序数据在组装好的转录组中进行比对，从比对结果中获得每个基因在不同处理条件下的读数（Read count）。在进行差异表达基因（DEGs）分析之前，对每个测序的文库，使用 edgea R 程序包调整读数，将其作为收入文件，使用 DEGSeq R 软件包分析低温处理数据的差异表达转录本（Anders and Huber，2010）。使用错误发现率（FDR）校正 *P* 值，将 FDR<0.01 和 $|\log_2(\text{Fold change})|\geqslant 2$ 设置为显著差异表达的阈值，其中 FC 表示两样品间表达量的比值。并将差异表达基因与 COG、GO、KEGG 数据库比对，分别使用 Blast2 GO 和 KOBAS 进行 DEGs 的 GO 功能富集和 KEGG 通路分析。对差异表达相关基因的功能、类别、代谢通路富集情况等进行注释和预测。

2 结果与分析

2.1 阿尔泰蝠蛾转录组数据的组装

采用 Illumina 测序平台对阿尔泰蝠蛾幼虫转录组进行测序，每个样本生成超过 7.1 Gb 的高质量数据。经过分析，共组装获得 151 924 个转录本，在此基础上进行聚类和组装分析得到 100 300 个 unigenes，总长度 81 600 309 bp，平均长度 813 bp，N50（覆盖 50% 所有核苷酸的最大序列重叠群长度）长度为 1 719 bp。SHW 组和 SDWC 组序列的质量参数 Q20 的百分比在 97%以上；Q30 的百分比在 92%以上（表 1），可对转录组质量进行评价。

表 1 阿尔泰蝠蛾 cDNA 样品测序数据评估统计表

Table 1 Summary for raw reads of cDNA samples of *Hepialus altaicola*

样品 Sample	总 reads 数 Number of reads	数据大小（Gb） Size of clean bases	GC 含量（%） GC content	Q20（%）	Q30（%）
SHW1	27 380 315	8.17	45.92	97.85	94.14
SHW2	23 856 525	7.11	45.30	97.39	92.95
SDWC1	30 982 643	9.23	49.12	97.92	94.33
SDWC2	25 002 321	7.47	46.65	97.43	93.11

Q20，Q30：分别表示质量值≥20 和≥30 的碱基所占百分比。

Q20, Q30: Percentages of bases with the quality value≥20 and ≥30, respectively.

2.2 unigene 的功能注释和分类

将获得的 100 300 个 unigenes 分别在 7 个主要功能数据库中进行比对，取阈值 $e\leqslant 10^{-10}$，共有 34 691 条 unigenes 获得注释，占 34.59%（表 2）；其中占比最高的是 Nr 数据库，注释 29 865 条 unigenes（29.78%），与其他生物的已知蛋白具有不同程度的同源性。

在已注释序列中，有 4 522 个 e-value> 1×10^{-11}，占注释序列的 15.14%；高度匹配的 e 值（e-value<1×10^{-50}）的有 12 788 个（占 42.82%）（图 1：A）。大多数 unigenes 比对相似性在 50%以上（图 1：B）。从所注释到的物种分布来看，有 1 587 个（占 5.32%）基因与斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 同源；有 1 404 个（占 4.7%）基因与脐橙螟蛾 *Amyelois transitella* 同源；1 223 个（占 4.1%）基因与甜菜夜蛾 *Plutella xylostella* 同源；其他物种占 57.99%（图 1：C）。

2.3 低温胁迫差异表达分析

根据差异表达分析，常温饲养组和低温处理组在错误发现率（FDR）小于 0.01 条件下，利用 DESeq 分析得到 11 569 个显著差异表达基因（DEG），其中 7 158 个上调，4 411 个下调。差

异表达基因的差异表达倍数均≥3.4，即 |log2(SDWC/SHW)|≥3.4，其中 SDWC 是低温处理组的表达量，SHW 是常规饲养组的表达量。

2.3.1　低温胁迫后阿尔泰蝠蛾转录组上调表达基因的 COG 功能注释　将上调表达的 unigenes 经过 COG 数据库功能预测和分类，共注释到

表 2　阿尔泰蝠蛾转录组功能注释

Table 2　Functional annotation of *Hepialus altaicola* transcriptome

注释数据库 Annotated database	被注释基因数量 Number of annotated unigenes	长度（bp）Length		百分比（%）Percentage
		300-1 000	≥1 000	
COG	9 501	2 357	5 427	9.47
GO	12 671	4 081	5 376	12.63
KEGG	13 827	3 964	7 035	13.79
KOG	19 290	5 153	10 064	19.23
Pfam	21 002	5 618	11 959	20.94
Swissport	15 371	4 136	8 569	15.33
NR	29 865	9 746	13 755	29.78
Over all	34 691	11 345	15 120	34.59

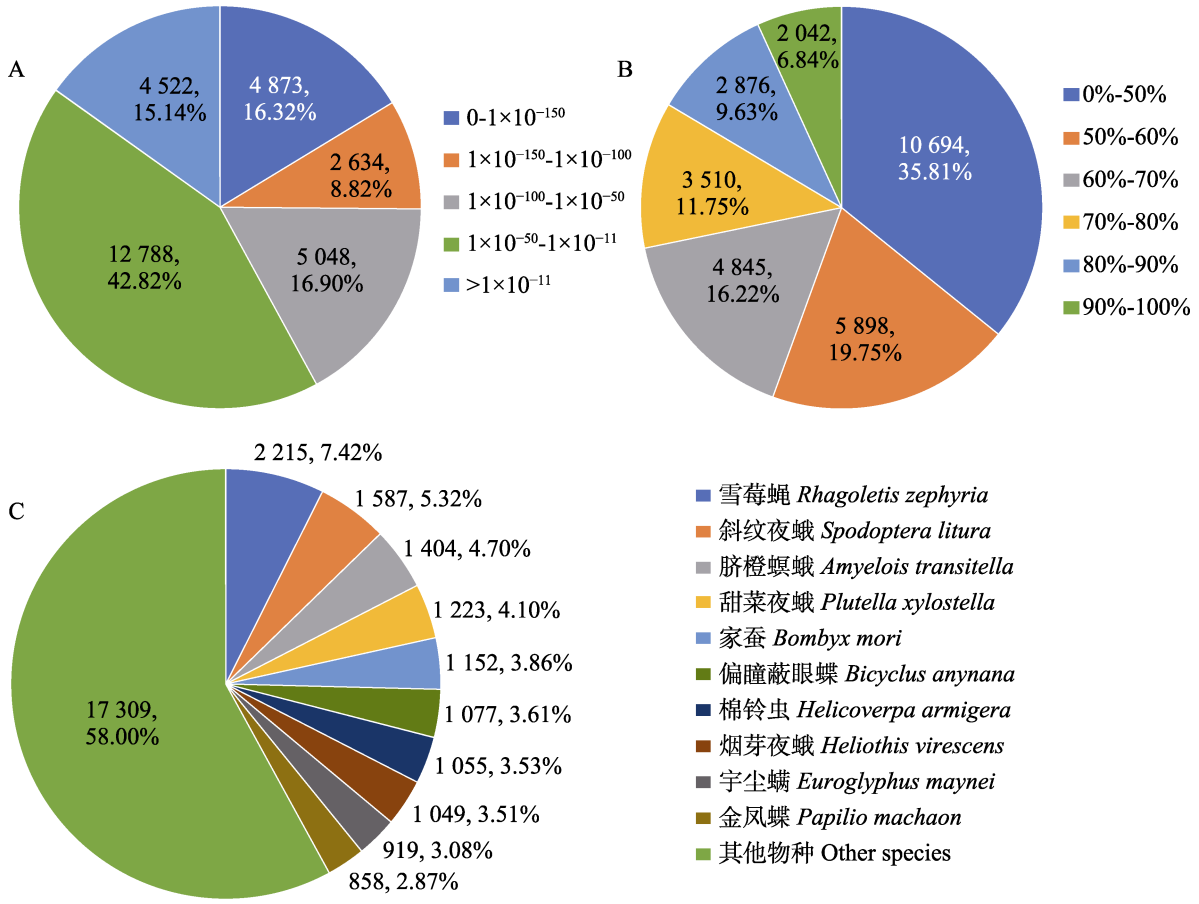


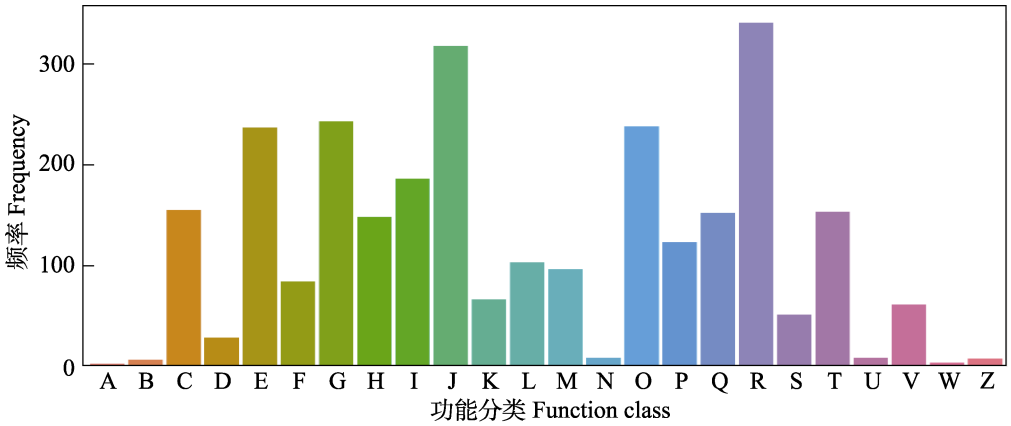
图 1　阿尔泰蝠蛾 unigenes 与 Nr 数据库比对结果

Fig. 1　Alignment of the unigenes from *Hepialus altaicola* against Nr database

A. e 值分布；B. 相似性分布；C. 同源序列物种分布。

A. e-value distribution; B. Similarity distribution; C. Species distribution of unigene homologs.

2 817 条，分为 24 类（图 2），图中数字代表基因数量和所占功能分类的百分比。其中，一般功能预测（R）的 unigenes 数量最多，为 341 条（占 12.11%）；其次是翻译，核糖体结构和生物合成（J），318 条（占 11.29%）；碳水化合物的转运和代谢（G），243 条（占 8.63%）；翻译后修饰、蛋白质转换、分子伴侣（O），238（占 8.45%）和氨基酸转运和代谢（E），237（占 8.41%）。而注释到最少的是与 RNA 加工和修饰（A）相关，仅 2 个（占 0.07%）。所注释的功能涉及到阿尔泰蝠蛾幼虫绝大多数生命活动。



A: RNA加工和修饰 RNA processing and modification [2, 0.07%]
B: 染色质的结构和动力学 Chromatin structure and dynamics [6, 0.21%]
C: 能量生产与转化 Energy production and conversion [155, 5.5%]
D: 细胞周期控制，细胞分裂，染色体分配 Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning [28, 0.99%]
E: 氨基酸转运和代谢 Amino acid transport and metabolism [237, 8.41%]
F: 核苷酸转运和代谢 Nucleotide transport and metabolism [84, 2.98%]
G: 碳水化合物的转运和代谢 Carbohydrate transport and metabolism [243, 8.63%]
H: 辅酶转运和代谢 Coenzyme transport and metabolism [148, 5.25%]
I: 脂类转运和代谢 Lipid transport and metabolism [186, 6.60%]
J: 翻译，核糖体结构和生物发生 Translation, ribosomal structure and biogenesis [318, 11.29%]
K: 转录 Transcription [66, 2.34%]
L: 复制，重组和修复 Replication, recombination and repair [103, 3.66%]
M: 细胞壁/膜/被膜生物合成 Cell wall/membrane/envelope biogenesis [96, 3.41%]
N: 细胞运动 Cell motility [8, 0.28%]
O: 翻译后修饰，蛋白质转换，分子伴侣 Posttranslational modification, protein turnover, chaperones [238, 8.45%]
P: 无机离子的转运与代谢 Inorganic ion transport and metabolism [123, 4.37%]
Q: 次级代谢产物生物合成，运输和分解 Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism [152, 5.4%]
R: 一般功能预测 General function prediction only [341, 12.1 1%]
S: 功能未知 Function unknown [51, 1.81]
T: 信号转导机制 Signal transduction mechanisms [153, 5.43%]
U: 细胞内运输，分泌和囊泡转运 Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport [8, 0.28%]
V: 防御机制 Defense mechanisms [61, 2.17%]
W: 细胞外结构 Extracellular structures [3, 0.11%]
Z: 细胞骨架 Cytoskeleton [7, 0.25%]

图 2　上调表达基因的 COG 功能注释

Fig. 2　COG function annotation of the up-regulated unigenes

图中括号内数字代表 unigenes 的数量，百分数代表其所占比例。

The numbers in brackets in the figure represent the number of unigenes, and the percentage represents its proportion.

2.3.2　低温胁迫后上调表达基因的 GO 功能分类　低温胁迫上调表达基因的 GO 功能富集分析显示，涉及生物学过程、分子功能、细胞成分 3 大类，47 个功能小类（图 3）。共有 1 792 条上调表达基因，得到了 8 207 个功能注释。其中，1 896 条注释归属于分子功能；2 893 条注释归属于细胞成分；3 418 条归属于生物学过程。在分子功能这一类中，以催化活性（52.32%）和结合活性（35.02%）最为显著，两者共占 87.34%。在细胞成分方面，富集到细胞的最多（23.47%），其次为细胞部分（23.43%）、细胞器（15.59%）、

高分子复合物（12.2%）等部位。在生物学过程方面，以代谢过程为主（29.34%），其次为细胞内过程（27.71%）和单一有机体过程（15.68 %），此外，定位（5.85%）、细胞成分的组织或生物合成（5.44%）、生物调节（4.97%）、对刺激的反应（3.42%）也都占有较多的比例。这些注释结果表明，阿尔泰蝠蛾的低温胁迫是生物学过程的多方位响应，其中以代谢过程的改变为主。

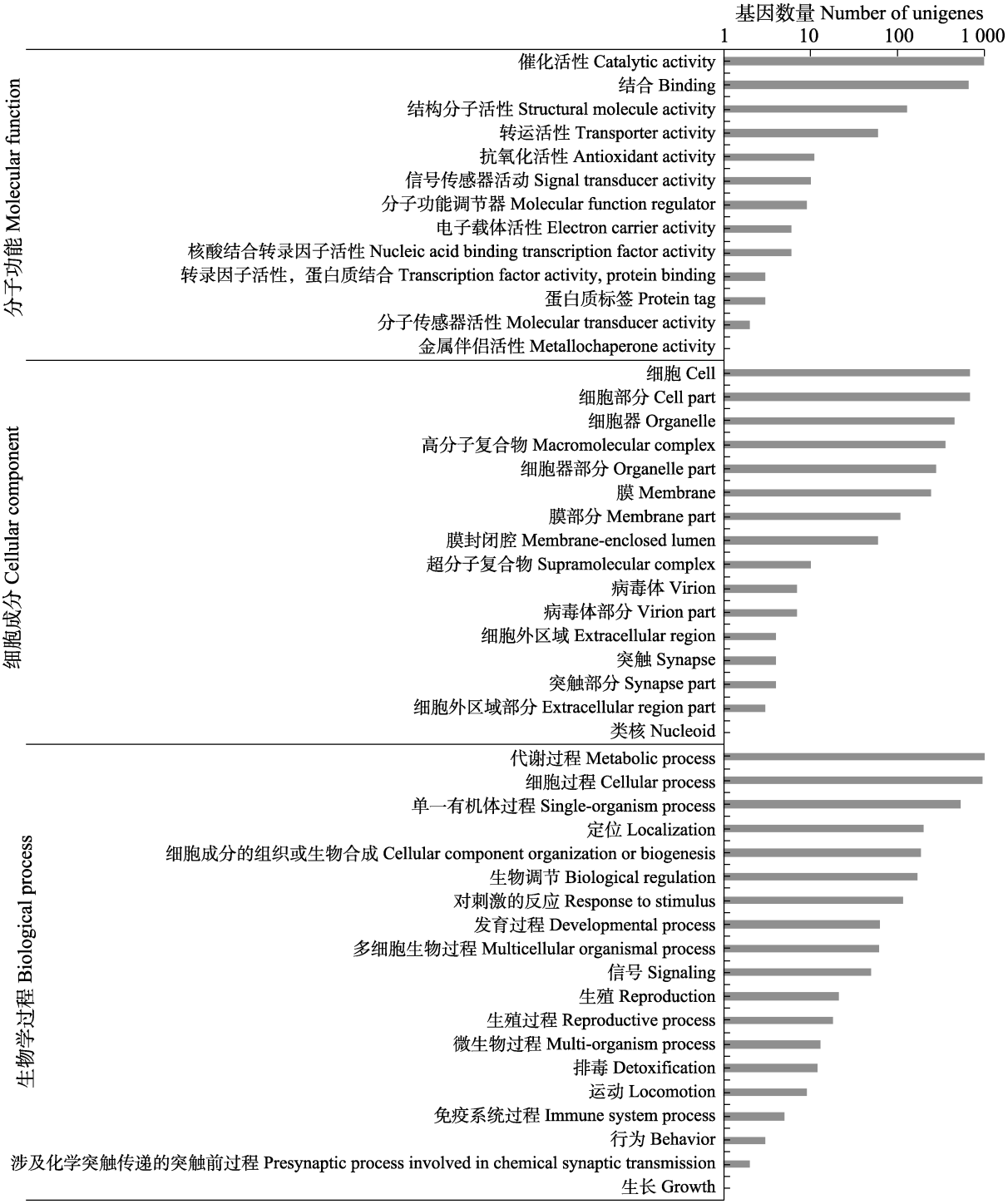


图 3　阿尔泰蝠蛾低温处理转录组上调表达基因的 GO 功能分类

Fig. 3　GO terms alignment of the up-regulated unigenes from the transcriptome of *Hepialus altaicola* at low temperature

2.3.3 低温胁迫后阿尔泰蝠蛾转录组上调表达基因的 KEGG 代谢通路分析 阿尔泰蝠蛾转录组低温胁迫上调表达基因映射到 KEGG 数据库，得到 2 953 个基因，富集到 217 个代谢通路。图 4 为注释序列最多的 50 条代谢通路。其中最显著的是核糖体通路（122），核糖体蛋白是参与此通路的重要蛋白。其次富集前 10 位的还有碳代谢（89）、剪接体（89）、内质网蛋白质加工（86）、

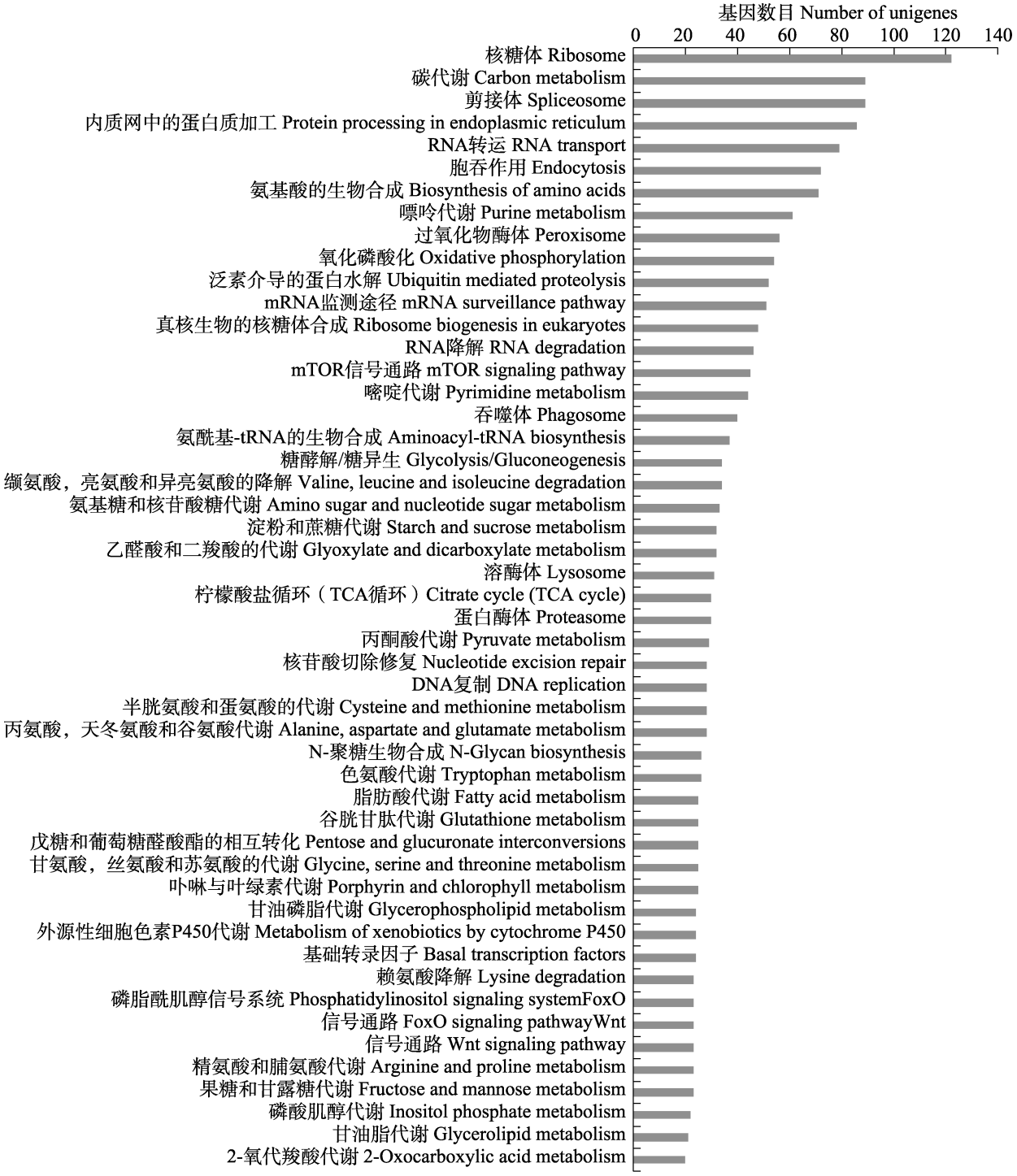


图 4 阿尔泰蝠蛾低温处理转录组上调表达基因的 KEGG 通路分析

Fig. 4 KEGG pathway analysis of the up-regulated unigenes in transcriptome of *Hepialus altaicola* at low temperature

RNA 转运（79）、氨基酸生物合成（71），嘌呤代谢（61）、过氧化物酶体（56）、氧化磷酸化（54）、泛素介导的蛋白水解（52）等代谢途径。

2.3.4　阿尔泰蝠蛾低温响应转录组中与非生物胁迫相关的显著上调表达基因　在低温胁迫转录组分析中，部分与非生物胁迫相关的基因显著上调表达，包括热激蛋白 70（HSP70）、热激蛋白 90（HSP90）、昆虫表皮蛋白（Insect cuticle protein）、海藻糖酶（Trehalase）、铜/锌超氧化物歧化酶（Copper/zinc superoxide dismutase，SODC）、细胞色素 P450（Cytochrome P450）、水通道蛋白 9（Aquaporin-9）和烯醇化酶（Enolase）基因等，上调表达倍数均大于 4.0（表 3）。

表 3　阿尔泰蝠蛾转录组中非生物胁迫响应 GO 类群上调表达基因信息

Table 3　Unigenes in the abiotic stress response GO term in *Hepialus altaicola* transcriptome

Gene ID	FDR 值 FDR value	log_2FC 值 log_2 FC value	基因功能描述 Gene function description
c101516.graph_c0	8.21×10^{-10}	9.090 566 956	热激蛋白 70 Heat shock protein 70
c40782.graph_c0	1.15×10^{-12}	10.759 013 13	同源型热激蛋白 70 Heat shock protein cognate 70
c110722.graph_c0	5.84×10^{-13}	10.929 180 07	热激蛋白 90 Heat shock protein 90
c108391.graph_c0	1.29×10^{-3}	4.066 870 807	海藻糖酶 Trehalase
c110146.graph_c0	0	13.458 979 89	铜/锌超氧化物歧化酶 Copper/zinc superoxide dismutase
c92448.graph_c0	7.48×10^{-11}	9.701 522 336	细胞色素 P450 Cytochrome P450
c79839.graph_c0	2.51×10^{-8}	8.207 914 132	烯醇化酶 Enolase
c110115.graph_c0	1.11×10^{-16}	12.575 742 19	昆虫表皮蛋白 Insect cuticle protein
c94268.graph_c0	9.34×10^{-4}	4.307 447 121	水通道蛋白 Aquaporin

3　讨论

本研究对室内常规饲养和低温处理的阿尔泰蝠蛾幼虫进行转录组测序和分析，共获得 100 300 条 unigenes，其中有 34 691 条（占 34.59%）unigenes 被 Nr、Swiss-Prot、Pfam、GO、COG/KOG 和 KEGG 等数据库注释。通过与 Nr 数据库进行同源序列比对，阿尔泰蝠蛾转录组有 29 865 条基因与已知蛋白质序列同源，占 29.78%，表明转录组中尚有大量功能未知的新基因，这些基因可能与昆虫所处的生活环境和独特的生物学特性有关。已注释的基因中亲缘关系最近的鳞翅目昆虫斜纹夜蛾的同源性仅占 5.32%，其余也多在 3%-5%之间，绝大多数注释的为其他物种，可能是由于数据库中关于鳞翅目蝙蝠蛾科的基因序列报道较少，或存在一些昆虫特有的新基因。

在对上调表达基因进行 GO 功能分析中，富集到生物学过程类群占绝大多数。其中以代谢过程（29.34%）所占比例最高，这与低温下昆虫的代谢过程首先发生变化相一致（Zhang *et al.*，2011）。另外，在低温下生物调节、对刺激的反应和免疫系统等相关基因的上调表达，说明昆虫的免疫反应与环境密切相关，极端温度也是昆虫先天免疫反应的触发因素（Wojda，2017）。在分子功能类群中，催化活性和结合活性共占 87.34%，这与其它昆虫在低温胁迫下分子功能的分类结果类似（库尔班·吐松等，2016；Chang *et al.*，2020），表明这些途径在温度调节中起关键作用。阿尔泰蝠蛾 GO 分类在分子功能组分比小胸鳖甲 *Microdera punctipennis* 转录组多出了诸如电子载体活性、蛋白质结合转录活性等类群（库尔班·吐松等，2016）。表明耐寒昆虫虽然在低温胁迫响应的生物学过程、分子功能和细胞组分的类群大致相同，但也有显著不同的上调表达基因和功能分类。因此，昆虫对低温的响应存在物种的差异性，可能与生存环境和生活习性相关（Parker *et al.*，2015）。

在上调表达基因富集的 217 个 KEGG 途径中，核糖体、碳代谢、剪接体、内质网中的蛋白质加工、氧化磷酸化等富集程度相对较高。表明阿尔泰蝠蛾幼虫在应对低温胁迫时需要更多的能源消耗。其中，包含 unigenes 最多的是“核糖体”代谢通路（ko03010），共 122 条，这可能与生物体对冷刺激做出的反应和行为调控与核糖体代谢相关（Zhang *et al.*，2011）。该代谢通路由核糖体蛋白主导，能够影响生物整体的生命活动（Uechi *et al.*，2001）。“碳代谢”与冷适应的程度相关，在冷适应过程中可以合成碳水化合物类低温保护剂（Zhang *et al.*，2011）。在“剪接体”途径中，主要存在热激蛋白 HSP70、RNA 结合蛋白和 ATP 依赖的 RNA 解旋酶；HSP70 和环磷酸腺苷依赖的转录因子 ATF-4 参与了“内质网中的蛋白质加工途径”；在“氧化磷酸化”途径中，主要存在细胞色素氧化酶亚基、NADH 脱氢酶亚基和 ATP 合酶亚基，这类代谢酶与果洛蝠蛾（*Hepialus* sp.）在 4 ℃低温驯化后相比对照组（15 ℃）转录水平的上调表达相一致（朱未，2016），提示可能存在受低温诱导的转录调节机制。这类有氧代谢酶基因转录水平的选择性增强，有利于低温下机体的能量供应和维持必要的生命活动，也一定程度上解释了为何蝠蛾幼虫能在低温下维持进食。

阿尔泰蝠蛾幼虫大多生活在海拔 1 000 m 以上的林间空地，冬季积雪厚度可达 1.5 m 以上，气温可降至 - 30 ℃以下。在幼虫生长过程中，每年要经历长达半年的冻土期，体内的生理生化的改变可能涉及到大量基因的表达变化。研究表明，一些昆虫通过控制促进耐寒性物质的基因表达来响应低温环境，促使蛋白质间接在昆虫抗寒性方面提供帮助，包括热激蛋白、海藻糖、抗氧化酶和参与低温保护剂合成和降解的酶（Elbein *et al.*，2003；Storey and Storey，2012）。在阿尔泰蝠蛾幼虫低温胁迫转录组分析中，部分非生物胁迫相关基因如 HSP70、HSP90、昆虫表皮蛋白、水通道蛋白、SODC、海藻糖酶、细胞色素 P450 等基因上调表达。研究表明，HSP 70 对机体耐受低温至关重要（Rinehart *et al.*，2007）。低温驯化激发了二化螟 *Chilo suppressalis* 非滞育幼虫的 HSP90 表达（Sonoda *et al.*，2006）。阿尔泰蝠蛾在 4 ℃冷适应转录组中有 15 个 HSP70 和 2 个 HSP90 基因显著上调表达，且 $\log_2$FC 均值 >8.5，表明 HSP70 和 HSP90 对冷诱导温度很敏感。另外，COG 分类表明，大量响应低温胁迫的 DEGs 被归类为“翻译后修饰、蛋白周转、伴侣蛋白”，这与编码 HSPs 的基因丰度一致。在低温转录组中有 28 个昆虫表皮蛋白基因上调表达。研究表明一些昆虫会上调表皮蛋白基因来抵抗寒冷和一些不利的环境因素（Dunning *et al.*，2013；Dennis *et al.*，2015）。这些表皮蛋白在昆虫表皮形成，是昆虫的身体结构及器官发育过程中必不可少的。它的产生是一种细胞保护策略，以应对环境挑战（Zhang *et al.*，2008）。水通道蛋白作为低温保护剂参与体内渗透压的调节，控制水在细胞的进出，使细胞快速膨胀和收缩以适应细胞间渗透性的变化，其转运体与耐寒能力具有相关性（Philip *et al.*，2008）。阿尔泰蝠蛾幼虫低温响应过程中有吐水的现象发生，可能与此蛋白基因上调表达相关，从而维持细胞的渗透平衡。超氧化物歧化酶（SOD）属于金属酶，能与不同的金属离子相结合，含铜和锌离子的称为铜/锌超氧化物歧化酶。有报道通过 SOD 等抗氧化基因的上调，有助于尖音库蚊 *Culex pipiens* 越冬（Sim and Denlinger，2011）。在本研究中，发现在低温胁迫下，SODC 基因的显著上调表达（$\log_2$FC 值=13.459）。推测 SOD 在冷应激阿尔泰蝠蛾幼虫的抗氧化过程中起重要作用。海藻糖是昆虫血淋巴的重要组成部分，存在于幼虫、蛹和成虫阶段，能够储存昆虫生长、发育和代谢活动所需的能量（Elbein *et al.*，2003）。海藻糖酶是启动海藻糖分解代谢的关键酶，昆虫在冷应激下可以通过自身调节来合成海藻糖，提供能量来抵御外界寒冷刺激（Shi *et al.*，2016）。有研究者在对异色瓢虫 *Harmonia axyridis* 的耐寒性转录组研究中也发现有海藻糖酶的差异表达基因（Tang *et al.*，2017）。在低温胁迫下，海藻糖酶基因显著上调表达（$\log_2$FC 值=4.067），表明其是蝠蛾幼虫低温冷驯化响应的机制之一。据报道

细胞色素 P450 与体温调节有关（Nakashima *et al.*，1996）。阿尔泰蝠蛾幼虫低温冷诱导转录组中有28个与细胞色素P450途径相关的基因上调表达，表明其可能触发体温调节机制来应对低温胁迫。另外，烯醇化酶是一种多功能蛋白，是糖酵解中的关键酶之一，也是纤维蛋白溶酶原结合蛋白，还参与寄生虫在宿主体内的侵染和转移过程（Nguyen *et al.*，2013）。与 NCBI 和 Nr 数据库比对结果显示，有 7.42%的同源相似性来自于一种雪莓蝇 *Rhagoletis zephyria*，并且在野外采样时，偶可见被寄生蝇所感染的蝠蛾幼虫。

通过序列相似性搜索方法未能获得抗冻蛋白基因的注释，但是通过冰晶观测平台对低温诱导的蝠蛾幼虫血淋巴中确实观测到有冰晶修饰作用，并检测到热滞值，证实其确有抗冻蛋白的存在。分析原因可能是：（1）由于 GenBank 中登记注册的鳞翅目昆虫抗冻蛋白基因较少，阿尔泰蝠蛾抗冻蛋白与已报道的其他昆虫抗冻蛋白缺少同源性，未比对到与 AFP 模体相似的序列；（2）mRNA 转录水平和蛋白质表达水平之间的不对等性（Sharabiani *et al.*，2005）；（3）在低温响应阶段可能有更多的与代谢调节和热补偿相关的基因/蛋白表达，通过核糖体代谢、糖酵解途径和氧化磷酸化产生的能量足以抵御寒冷刺激。

综上，低温诱导下阿尔泰蝠蛾基因的差异性表达说明幼虫可能通过代谢相关基因在转录水平的补偿维持低温下的代谢平衡及生命活动。其低温胁迫转录组数据分析揭示，代谢过程、细胞过程、生物调节、对刺激的反应等生物学过程相关基因表达显著上调，部分非生物胁迫响应基因提示阿尔泰蝠蛾幼虫可能从分子伴侣、抗氧化防御、体温调节、维持细胞的渗透平衡等多方面应对低温胁迫。本研究获得的转录组信息及分析结果，为发掘阿尔泰蝠蛾幼虫关键基因及揭示其耐寒机制提供了基础数据和信息资源，为后续室内饲养、分子鉴定和低温适应性的研究提供一定的参考价值。

参考文献 (References)

Anders S, Huber W, 2010. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.*, 11(10): R106.

Bar DM, Braslavsky I, Davies PL, 2016. Ice-binding proteins and their function. *Annu. Rev. Biochem.*, 85(23): 515–542.

Chang YW, Zhang XX, Lu MX, Wei RR, Du YZ, 2020. Transcriptome analysis of *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) in response to temperature stress. *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics*, 34: 100677.

Chen KK, Tang T, Song QS, Wang ZY, He KL, Liu X, Song JH, Wang LB, Yang YZ, Feng CJ, 2019. Transcription analysis of the stress and immune response genes to temperature stress in *Ostrinia furnacalis*. *Front. Physiol.*, 10: 1289.

Chen YJ, Sun XG, Zhang WG, Mu ZG, Guo GZ, 2005. Relation between variation of water, fat, glycerol in *vivo* of over-wintering *Diaphania pyloalis* Walker larvae and cold-hardiness. *Science of Sericulture*, 31(1): 22–25. [陈永杰, 孙绪艮, 张卫光, 牟志刚, 郭光智, 2005. 桑螟越冬幼虫体内水分、脂肪、甘油的变化与抗寒性的关系. 蚕业科学, 31(1): 22–25.]

Clark MS, Worland MR, 2008. How insects survive the cold: Molecular mechanisms-a review. *J. Comp. Physiol. B*, 178(8): 917–933.

Conesa A, Gotz S, Garcia-Gomez JM, Terol J, Talon M, Robles M, 2005. Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21(18): 3674–3676.

Cui MM, Hu P, Wang T, Tao J, Zong SX, 2017. Differential transcriptome analysis reveals genes related to cold tolerance in seabuckthorn carpenter moth, *Eogystia hippophaecolus*. *PLoS ONE*, 12(11): e0187105.

Dennis AB, Dunning LT, Sinclair BJ, Buckley TR, 2015. Parallel molecular routes to cold adaptation in eight genera of New Zealand stick insects. *Sci. Rep.*, 5: 13965.

Dunning LT, Dennis AB, Park D, Sinclair BJ, Newcomb RD, Buckley TR, 2013. Identification of cold-responsive genes in a New Zealand alpine stick insect using RNA-Seq. *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics*, 8(1): 24–31.

Elbein AD, Pan YT, Pastuszak I, Carroll D, 2003. New insights on trehalose: A multifunctional molecule. *Glycobiology*, 13(4): 17R–27R.

Finn RD, Bateman A, Clements J, Penelope C, Eberhardt RY, Eddy SR, Heger A, Hetherington K, Holm L, Mistry J, Sonnhammer ELL Tate J, Punta M, 2014. Pfam: The protein families database. *Nucleic. Acids. Res.*, 42(D1): D222–D230.

Finn RD, Clements J, Eddy SR, 2011. HMMER web server: Interactive sequence similarity searching. *Nucleic. Acids. Res.*, 39(Suppl. 2): 29–37.

Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Lin F, Raychoedhury R, Zeng QD, Chen ZH, Mauceli E, Haconhen N, Gnirke A, Rhind N, Palma F, Birren BW, Nusbaum C, Lindblad-Toh K, Friedman N, Regev A, 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat. Biotechnol.*, 29(7): 644–652.

Guo HZ, Huang CL, Jiang L, Cheng TC, Feng TS, Xia QY, 2018. Transcriptome analysis of the response of silkworm to drastic changes in ambient temperature. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 102(23): 10161–10170.

Goto M, Sekine Y, Outa H, Hujikura M, Suzuki K, 2001. Relationships between cold hardiness and diapause, and between glycerol and free amino acid contents in overwintering larvae of the oriental corn borer, *Ostrinia furnacalis*. *Journal of Insect Physiology*, 47(2): 157–165.

Lachenicht MW, Clusella-Trullas S, Boardman L, Le Roux C, Terblanche JS, 2010. Effects of acclimation temperature on thermal tolerance, locomotion performance and respiratory metabolism in *Acheta domesticus* L. (Orthoptera: Gryllidae). *Journal of Insect Physiology*, 56(7): 822–830.

Li B, Dewey CN, 2011. RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, 12: 323.

Lu XY, Li JQ, Yang JH, Liu XN, Ma J, 2014. De novo transcriptome of the desert beetle *Microdera punctipennis* (Coleoptera: Tenebrionidae) using Illumina RNA-seq technology. *Mol. Biol. Rep.*, 41(11): 7293–7303.

Marioni JC, Mason CE, Mane SM, Stephens M, Gilad Y, 2008. RNA-seq: An assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome Research*, 18(9): 1509–1517.

Nakashima T, Harada Y, Miyata S, Kiyohara T, 1996. Inhibitors of cytochrome P-450 augment fever induced by interleukin-1 beta. *American Journal of Physiology*, 271(5): R 1274–1277.

Nguyen TT, Magnoli I, Cloutier C, Michaud D, Muratori F, Hance T, 2013. Early presence of an enolase in the oviposition injecta of the aphid parasitoid *Aphidius ervi* analyzed with chitosan beads as artificial hosts. *J. Insect Physiol.*, 59(1): 11–18.

Parker DJ, Vesala L, Ritchie MG, Laiho A, Hoikkala A, Kankare M, 2015. How consistent are the transcriptome changes associated with cold acclimation in two species of the *Drosophila virilis* group? *Heredity* (*Edinb*), 115(1): 13–21.

Philip BN, Yi SX, Elnitsky MA, Lee RE, 2008. Aquaporins play a role in desiccation and freeze tolerance in larvae of the goldenrod gall fly, *Eurosta solidaginis*. *J. Exp. Biol.*, 211(Pt 7): 1114–1119.

Rinehart JP, Li A, Yocum GD, Robich RM, Hayward SAL, Denlinger D, 2007. Up-regulation of heat shock proteins is essential for cold survival during insect dia-pause, *P. Natl. Acad. Sci.*, 104(27): 11130–11137.

Sharabiani MT, Siermala M, Lehtinen TO, Vihinen M, 2005. Dynamic covariation between gene expression and proteome characteristics. *BMC Bioinformatics*, 6(1): 215–232.

Shi ZK, Liu XJ, Xu QY, Qin Z, Wang S, Zhang F, Wang SG, Tang B, 2016. Two novel soluble trehalase genes cloned from *Harmonia axyridis* and regulation of the enzyme in a rapid changing temperature. *Comparative Biochemistry and Physiology*, *Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 198: 10–18.

Sim C, Denlinger DL, 2011. Catalase and superoxide dismutase-2 enhance survival and protect ovaries during overwintering diapause in the mosquito *Culex pipiens*. *J. Insect Physiol.*, 57(5): 628–634.

Sinclair BJ, Vernon P, Jaco Klok C, Chown SL, 2003. Insects at low temperatures: An ecological perspective. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(5): 257–262.

Sinclair BJ, Ferguson LV, Salehipour-shirazi G, MacMillan HA, 2013. Cross-tolerance and cross-talk in the cold: Relating low temperatures to desiccation and immune stress in insects. *Integr. Comp. Biol.*, 53(4): 545–556.

Sonoda S, Fukumoto K, Lzumi Y, Yoshida H, Tsumuki H, 2006. Cloning of heat shock protein genes (*hsp90* and *hsc70*) and their expression during larval diapause and cold tolerance acquisition in the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 63(1): 36–47.

Storey KB, Storey JM, 2011. Heat shock proteins and hypometabolism: Adaptive strategy for proteome preservation. *Research and Reports in Biology*, 2(1): 57–68.

Storey KB, Storey JM, 2012. Insect cold hardiness: Metabolic, gene, and protein adaptation. *Canadian Journal of Zoology*, 90(4): 456–475.

Suo FY, Su J, Jiang YC, Xue-He RT, Chen SZ, 2008. Comparative study on mannitol, polysaccharide and amino acid of Xinjiang *Cordyceps* and other *Cordyceps sinensis*. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 45(3): 517–521. [索菲娅, 苏俊, 姜彦成, 雪合热提, 陈世忠, 2008. 新疆虫草与冬虫夏草中甘露醇、多糖和氨基酸的含量比较研究. 新疆农业科学, 45(3): 517–521.]

Tang B, Liu XJ, Shi ZK, Shen QD, Xu YX, Wang S, Zhang F, Wang SG, 2017. Transcriptome analysis and identification of induced genes in the response of *Harmonia axyridis* to cold hardiness. *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics*, 22: 78–89.

Tusong K, Lu XY, Liu XN, Ma J, 2016. Transcriptomic analysis of the desert beetle *Microdera punctipennis* in response to short time cold stress. *Acta Entomologica Sinica*, 59(6): 581–591. [库尔班·吐松, 陆雪莹, 刘小宁, 马纪, 2016. 准噶尔小胸鳖甲短时间低温胁迫响应的转录组分析. 昆虫学报, 59(6): 581–591.]

Uechi T, Tanaka T, Kenmochi N, 2001. A complete map of the human ribosomal protein genes: Assignment of 80 genes to the cytogenetic map and implications for human disorders. *Genomics*, 72(3): 223–230.

Wang Y, Tao CC, Li Q, Pang H, Mi KY, Sun-bing WY, Song GL, 2018. Non-destructive methods for sex determination of the live pupae of *Hepialus altaicola* Wang (Lepidoptera: Hepialidae). *Journal of Environmental Entomology*, 40(1): 30–35. [王岩, 陶常诚, 李琪, 庞槐, 米凯玉, 孙冰婉玉, 宋关玲, 2018. 阿尔泰蝠蛾(鳞翅目: 蝠蛾科)活蛹性别的无损鉴别方法. 环境昆虫学报, 40(1): 30–35.]

Wang Y, Lan WX, Sun JZ, Jing B, Chen CF, 2020. Observations on the feeding habits of larvae of *Hepialus altaicola* Wang (Lepidoptera: Hepialidae). *Journal of Environmental Entomology*, 42(5): 1210–1215. [王岩, 兰文旭, 孙吉舟, 敬波, 陈创夫, 2020. 阿尔泰蝠蛾(鳞翅目: 蝙蝠蛾科) 幼虫食的观察. 环境昆虫学报, 42(5): 1210–1215.]

Wojda I, 2017. Temperature stress and insect immunity. *J. Therm. Biol.*, 68(Pt A): 96–103.

Xie C, Mao XZ, Huang JJ, Ding Y, Wu JM, Dong S, Kong L, Gao G, Li CY, Wei LP, 2011. KOBAS 2.0: A web server for annotation and identification of enriched pathways and diseases. *Nucleic Acids. Res.*, 39(Suppl. 2): W316–W322.

Yang S, Zhao HT, Xu K, Guo LN, Du YL, Li XY, Su WT, Feng YJ, Long DL, Jiang YS, 2019. Analysis of the antennal transcriptome and olfaction-related genes of the greater wax moth *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Chinese Journal of Applied Entomology*, 56(6): 1279–1291. [杨爽, 赵慧婷, 徐凯, 郭丽娜, 杜亚丽, 李新宇, 苏文婷, 冯宇佳, 龙登隆, 姜玉锁, 2019. 大蜡螟触角转录组及嗅觉相关基因分析. 应用昆虫学报, 56(6): 1279–1291.]

Zachariassen KE, Husby JA, 1982. Antifreeze effect of thermal hysteresis agents protects highly supercooled insects. *Nature*, 298(5877): 865–867.

Zhang J, Goyer C, Pelletier Y, 2008. Environmental stresses induce the expression of putative glycine-rich insect cuticular protein genes in adult *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Insect Mol. Biol.*, 17(3): 209–216.

Zhang J, Marshall KE, Westwood JT, Clark MS, Sinclair BJ, 2011. Divergent transcriptomic responses to repeated and single cold exposures in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.*, 214 (23): 4021–4029.

Zhao H, Qu XL, Huang JH, 1998. Feeding of the larvae of *Hepialus altaicola* Wang. *Special Economic Animals and Plants*, (5): 17–18. [赵恒, 屈新兰, 黄吉海, 1998. 阿尔泰蝠蛾幼虫的饲养. 特种经济动植物, (5): 17–18.]

Zhu W, Zhang H, Li X, Meng Q, Shu RH, Wang ML, Zhou GL, Wang HT, Miao L, Zhang JH, Qin QL, 2016. Cold adaptation mechanisms in the ghost moth *Hepialus xiaojinensis*: Metabolic regulation and thermal compensation. *J. Insect Physiol.*, 85: 76–85.

Zhu W, 2016. A study on the mechanisms underlying the thermal adaptation of ghost moth (Lepidoptera: Hepialidae) larvae. Doctoral dissertation. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences. [朱未, 2016. 蝙蝠蛾(Lepidoptera: Hepialidae)幼虫温度适应性研究. 博士学位论文. 北京: 中国科学院大学.]