

小线角木蠹蛾幼虫适应不同寄主的 转录组学分析*

王秀吉^{1**} 冯宇倩² 续亚贝¹ 宗世祥^{1***}

(1. 林业有害生物防治北京市重点实验室, 北京 100083; 2. 中国林业科学研究院林业新技术研究所, 森林病原整合生物学研究室, 北京 100091)

摘要 【目的】 通过比较小线角木蠹蛾 *Steltzoviella insularis* Staudinger 幼虫取食不同寄主后的肠道转录组, 旨在挖掘幼虫对寄主适应的相关基因, 为探究小线角木蠹蛾幼虫对寄主的适应机制提供分子生物学数据。【方法】 采用 Illumina 二代测序技术, 测定小线角木蠹蛾幼虫取食 3 种不同寄主树种 (洋白蜡、银杏和国槐) 15 d 后的肠道转录组, 使用 BLAST 软件对 unigene 序列进行 GO 和 KEGG 富集, 通过比较分析筛选出幼虫对寄主适应的相关基因。【结果】 取食国槐与取食洋白蜡的小线角木蠹蛾幼虫的差异表达基因数量有 916 个, 取食银杏与取食洋白蜡的小线角木蠹蛾幼虫的差异表达基因数量为 1 163 个, 取食银杏与国槐的小线角木蠹蛾幼虫的差异表达基因数量为 1 621 个; 其中, 上调表达的差异基因与解毒代谢、水解酶和转运蛋白等密切相关; 取食不同寄主的幼虫肠道差异基因中, 解毒酶 (17 个) 和消化酶 (20 个) 的差异基因数量都明显多于保护酶 (5 个)。本研究筛选出 2 个解毒酶基因、3 个消化酶基因和 1 个保护酶基因, 可作为小线角木蠹蛾幼虫对寄主适应机制的重点研究对象。【结论】 本研究初步揭示了小线角木蠹蛾幼虫响应不同寄主的差异表达基因, 为进一步探究小线角木蠹蛾对寄主的适应机制提供了基础依据。

关键词 小线角木蠹蛾; 寄主适应性; 转录组; 酶

Transcriptomics analysis of *Steltzoviella insularis* staudinger larvae (Lepidoptera, Cossidae) adapting to different hosts

WANG Xiu-Ji^{1**} FENG Yu-Qian² XU Ya-Bei¹ ZONG Shi-Xiang^{1***}

(1. Beijing Key Laboratory of Forest Pest Control, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2. Laboratory of Forest Pathogen Integrated Biology Research Institute of Forestry New Technology, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract 【Objectives】 By comparing the gut transcriptome of *Steltzoviella insularis* Staudinger larvae feeding on different hosts, the aim is to explore the genes related to the host adaptation of *S. insularis* larvae. It will provide molecular biological data for exploring the adaptation mechanism of *S. insularis* larvae to the host. 【Methods】 The Illumina second-generation sequencing technology was used to determine the transcriptome of the *S. insularis* gut, after the larvae were fed on three different hosts (*Fraxinus pennsylvanica*, *Ginkgo biloba*, *Sophora japonica*) 15 days. BLAST software were performed GO and KEGG enrichment on unigene sequences. The genes related to host adaptation of larvae were screened by comparative analysis. 【Results】 There were 916 differentially expressed genes between the larvae feeding on *S. japonica* and the larvae feeding on *F. pennsylvanica*, 1 163 differentially expressed genes between the larvae feeding on *G. biloba* and the larvae feeding on *F. pennsylvanica*, and 1 621 differentially expressed genes between the larvae feeding on *G. biloba* and the larvae feeding on *S. japonica*. The up-regulated differential genes were closely related to detoxification metabolism, hydrolase and transporter proteins. The number of differentially expressed genes annotated to detoxification enzymes (17 genes) and digestive enzymes (20 genes) was significantly higher than those to protective enzymes (5 genes) in larvae fed on different

*资助项目 Supported projects: 自然科学基金委面上项目 (31470651)

**第一作者 First author, E-mail: 13020035423@163.com

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

收稿日期 Received: 2021-09-05; 接受日期 Accepted: 2021-11-29

hosts. Two detoxification enzymes genes, three digestive enzyme genes and a protective enzyme gene were screened out as the key genes for the study of *S. insularis* larval adaptation to hosts. **[Conclusion]** This study initially revealed the differentially expressed genes of *S. insularis* larvae in response to different hosts. It will provide a basis for further exploration of the adaptation mechanism of *S. insularis* larvae to hosts.

Key words *Steltzoviella insularis*; host adaptation; transcriptome; enzymes

昆虫转录组水平的可塑性与取食的食物密切相关, 取食不同寄主植物的昆虫, 转录组水平在长期进化中会发生明显分化 (Whitman and Ananthkrishnan, 2009), 其中昆虫消化酶、解毒酶和保护酶基因的表达差异是非常重要的部分。De la Paz Celorio-Mancera 等 (2013) 认为消化酶、解毒酶和核糖体蛋白的表达可塑性是昆虫中的常见现象。一些学者通过检测昆虫对新寄主在转录组水平上的响应, 研究昆虫对寄主的适应性进化。例如, Matzkin (2012) 研究发现当果蝇 *Drosophila mojavensis* 取食不适宜的寄主后, 有超过 20% 的基因发生了差异表达, 其中与 mRNA 结合和毒素反应有关的基因上调表达, 而与能量和碳水化合物代谢及结构组成相关的基因下调表达。突尾钩蛱蝶 *Polygonia calbum* 是一种分布范围较广的多食性昆虫, 通过比较分别取食原寄主和新适应寄主的幼虫转录组, 发现编码转运蛋白和膜结合蛋白的基因高水平表达, 这可能有助于强化虫体机能, 防止植物毒素进入体内 (De la Paz Celorio-Mancera et al., 2013)。Fescemyer 等 (2013) 研究草地夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 对玉米中毒素的响应, 发现与中肠成分和消化酶有关的基因上调表达。将蚕豆上的豌豆蚜虫 *Acyrtosiphon pisum* 转移到蒺藜首蓿上后, 发现有 3 个 P450 酶基因上调表达, 说明豌豆蚜转移到新寄主上后可能不适应新的寄主, 从而增强解毒防御反应 (卢红, 2016)。Li 和 Smigocki (2018) 探究了甜菜根蛆 *Tetanops myopaeformis* 取食不同品系甜菜寄主后的基因表达情况, 筛选出虫体在应激反应中发挥重要作用的基因。小蔗螟 *Diatraea saccharalis* 分别取食甘蔗和人工饲料后, 体内与消化、解毒和防御等相关的基因高度差异表达, 筛选出 7 个氨基酸酶基因为编码 Cry 蛋白受体的候选基因 (Noriega

et al., 2020)。

小线角木蠹蛾 *Steltzoviella insularis* Staudinger, 曾用拉丁学名为 *Holcocerus insularis* Staudinger, 属鳞翅目 (Lepidoptera) 木蠹蛾科 (Cossidae), 广泛分布于我国, 尤其在北方地区危害较为严重 (Yakovlev, 2005)。小线角木蠹蛾寄主范围广, 可危害国槐 *Sophora japonica*、榆树 *Ulmus pumila*、苹果 *Malus pumila*、栎树 *Koelreuteria paniculata*、银杏 *Ginkgo biloba*、香椿 *Toona sinensis*、毛桃 *Amygdalus persica* 和洋白蜡 *Fraxinus pennsylvanica* 等 12 目 16 个科的 20 余种植物 (杨爽等, 2014; 桂炳中和赵国晨, 2018)。小线角木蠹蛾是我国重要的蛀干害虫, 由于缺乏有效的防治措施, 近年来其在我国危害范围不断扩大, 危害程度也逐年加重 (桂炳中和赵国晨, 2018; 李霞, 2020; 杨宇超, 2020)。目前, 国内外对于小线角木蠹蛾的研究还较为薄弱, 多集中在性信息素通讯机制、生物学特性和防治方法 (张金桐和孟宪佐, 2001; 白瑞霞, 2012; 李霞, 2020; 杨宇超, 2020), 而其对寄主适应转录组水平的研究还未见报道。本文以小线角木蠹蛾为研究对象, 对取食 3 种寄主的幼虫肠道进行转录表达差异性分析, 深入挖掘差异表达基因中与消化酶、解毒酶及保护酶有关的基因, 旨在揭示小线角木蠹蛾幼虫对不同寄主树种转录组水平的适应机制, 为明确小线角木蠹蛾幼虫与不同寄主树种之间的互作机制提供了理论基础。

1 材料与方法

1.1 测序样品

小线角木蠹蛾幼虫均采自北京市海淀区北清路行道旁的银杏受害木 (40°05'N, 116°16'E), 将受害木带回实验室内解剖, 选择体长及体型一

致的 10 龄幼虫作为供试幼虫。供试寄主选择小线角木蠹蛾喜食的洋白蜡、国槐和银杏, 3 种树种的树枝均采伐于北京林业大学校园内 (116°35'N, 40°02'E), 选取粗细为 10-15 cm (20-30 年树龄) 的枝干, 带回室内用自来水冲洗干净, 并在室温下晾干。将洋白蜡、国槐和银杏的枝段锯成长 6 cm 的木段, 在木段上挖多个小洞穴, 用毛笔将小线角木蠹蛾幼虫移至洞穴中, 并将木段放入塑料盒 (顶部直径 15.5 cm, 底部直径 10.0 cm, 高 9.0 cm) 中, 盒盖上扎孔透气。每个塑料盒中放入 1 个木段, 每个木段接入 7 头幼虫, 每个树种的 10 个木段共接种 70 头供试幼虫。试验期间, 每天检查木段, 如幼虫跑出洞穴则再次接入。待幼虫取食洋白蜡、国槐和银杏 15 d 后, 分别选择 1 头幼虫, 并解剖获取幼虫肠道, 作为测序样品, 样品重复 3 次。

1.2 总 RNA 提取及转录组测序

采用 Trizol 法提取小线角木蠹蛾幼虫肠道样品的 RNA, 检测 RNA 样品质量, 完成 cDNA 构建文库, 将不同文库进行 Illumina HiSeq 高通量测序, 建库和测序均由上海美吉生物医药科技有限公司完成。测序平台得到 Raw Data, 使用 Fastx 软件对样本的碱基质量、碱基错误率以及碱基分布进行原始测序数据统计, 使用 SeqPrep 和 Sickle 软件, 去除测序接头序列、低质量读段、N (N 表示不确定碱基信息) 率较高序列及长度过短序列, 最终获得过滤后的测序数据 Clean data。

1.3 转录本拼接、差异表达分析及基因功能注释

小线角木蠹蛾幼虫样品的测序为无参考基因序列测序, 获得 Clean data 后, 需对 Clean data 进行拼接从而获得参考序列。采用 Trinity 拼接获得的所有 Clean reads (Grabherr *et al.*, 2011), 使用 TransRate 和 CD-HIT 软件对获得的初始组装序列进行优化过滤, 并使用 Busco 软件评估组装的完整性, 最终获得拼接结果文件 (TRINITY.fasta)。每一条基因中最长的转录本, 即 unigene, 以此作为基础进行生物学分析。

采用 DEseq2 筛选差异表达基因 (Michael

et al., 2014), 筛选标准为差异倍数大于 2 且经过 FDR 校正的 P 值 (Adjusted P -value, P_{adjust}) 小于 0.05。为了获得差异基因全面的注释信息, 使用 Blast2 GO 软件与基因本体论 (Gene ontology, GO) 数据库进行比对, 然后采用 Goatools 软件进行富集分析; 使用 Kobas 软件与京都基因和基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 数据库进行比对, 采用 R 语言编写脚本进行 KEGG Pathway 富集分析。根据 P -value < 0.05, 筛选出差异表达基因显著性富集的功能通路。

2 结果与分析

2.1 测序结果质量分析

使用统计学方法, 将所有测序 reads 的 circles 进行质量波动和碱基分布的统计, 最终小线角木蠹蛾幼虫肠道得到 73.61 Gb 的 Clean data, 各样品 Clean data 均达到 6.71 Gb, 肠道的 Q30 碱基百分比均不小于 94.88%, GC 含量 (%) 均大于 45% (表 1)。

2.2 取食不同寄主的幼虫差异基因数量

对取食银杏、洋白蜡和国槐的小线角木蠹蛾幼虫肠道基因表达进行两两比较 (表 2), 结果表明, 取食国槐与取食洋白蜡的幼虫相比, 有 242 个差异基因上调表达, 674 个差异基因下调表达; 取食银杏与取食洋白蜡的幼虫相比, 有 445 个差异基因上调表达, 718 个差异基因下调表达; 取食银杏与取食国槐的幼虫相比, 有 923 个差异基因上调表达, 698 个差异基因下调表达。

2.3 取食不同寄主的幼虫差异基因功能注释及富集

本研究将取食不同寄主的幼虫差异基因序列分别进行 GO 和 KEGG 富集分析, 以确定不同寄主对小线角木蠹蛾幼虫基因转录水平的影响。

2.3.1 差异基因的 GO 功能分析 取食国槐与取食洋白蜡的幼虫肠道相比, 共注释到 289 个差异基因, 其中 30 个上调, 259 个下调 ($P < 0.05$)

表 1 测序结果评估统计表
Table 1 The statistical table for evaluation of sequencing data

样品 Sample	Read 数量 Read number	总碱基数 Clean data	GC 含量 (%) GC content (%)	Q30 碱基比率 Q30 base ratio
取食洋白蜡的幼虫肠道 The guts of larvae fed on <i>Fraxinus pennsylvanica</i>	52 780 304.00±5 526 355.70	7 790 509 564.67±841 854 683.85	47.50±1.95	95.96±0.04
取食国槐的幼虫肠道 The guts of larvae fed on <i>Sophora japonica</i>	58 670 890.67±5 044 877.02	8 665 904 629.67±744 906 314.98	46.18±0.40	95.80±0.13
取食银杏的幼虫肠道 The guts of larvae fed on <i>Ginkgo biloba</i>	54 754 927.33±2 077 894.32	8 081 698 954.67±310 643 706.74	46.33±0.23	95.56±0.48

表中数据为平均值±标准误差。Data are mean±SE.

表 2 取食不同寄主的小线角木蠹蛾差异基因及注释的差异基因数量统计表
Table 2 The number of differentially expressed genes and annotated differentially expressed genes
of *Streltzoviella insularis* feeding on different hosts

寄主植物比较 Host plant comparison	总差异基因数量 Number of differentially expressed genes	上调基因数量 Number of up-regulated genes	下调基因数量 Number of down-regulated genes	GO 注释 GO annotation	KEGG 注释 KEGG annotation
国槐 vs 洋白蜡 <i>Sophora japonica</i> vs <i>Fraxinus pennsylvanica</i>	916	242	674	289	159
银杏 vs 洋白蜡 <i>Ginkgo biloba</i> vs <i>Fraxinus pennsylvanica</i>	1 163	445	718	185	324
银杏 vs 国槐 <i>Ginkgo biloba</i> vs <i>Sophora japonica</i>	1 621	923	698	511	308

(表 2)。对这些差异基因进行 GO 富集, 结果表明, 上调的 GO 条目功能主要包括 DNA 整合、血红素结合、催化活性、锌离子结合、氧化还原酶、铁离子结合和脂质代谢过程等; 下调的 GO 条目功能主要包括核苷酸结合翻译、合成耦合质子输运、碳水化合物代谢过程、胞外间隙、核糖体和氢离子跨膜转运蛋白活性等(图 1)。

取食银杏与取食洋白蜡的幼虫肠道相比, 共注释到 185 个差异基因, 其中 80 个上调, 105 个下调(表 2)。对此进行 GO 富集, 上调的 GO 条目功能主要包括: 核酸结合、铁离子结合、血红素结合、氧化还原酶活性、单加氧酶活性和气味结合等。下调的条目功能主要包括: 膜组分、核酸结合、嗅觉受体活性、核酸内切酶活性、葡糖醛酸基转移酶活性和转移酶活性等(图 2)。

取食银杏与取食国槐的幼虫肠道相比, 共注释到 511 个差异基因, 其中 308 个上调, 203 个下调(表 2)。对这些差异基因进行 GO 富集, 上调的 GO 条目功能主要包括: 跨膜转运蛋白活性、金属肽酶活性、脂质代谢过程、GTP 结合、钙离子结合和糖酵解过程等。下调的 GO 条目功能主要包括: 核苷酸结合翻译、三磷酸腺苷结合和蛋白质折叠等(图 3)。

2.3.2 差异表达基因的 KEGG 通路分析 取食国槐与取食洋白蜡的幼虫肠道相比, 注释到 159 个差异基因, 其中 17 个上调表达, 142 个下调表达(表 2)。对这些差异基因进行 KEGG 通路分析, 上调基因参与的代谢通路主要包括昆虫激素生物合成、半胱氨酸与蛋氨酸代谢、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢和寿命调节途径等。下调基因参

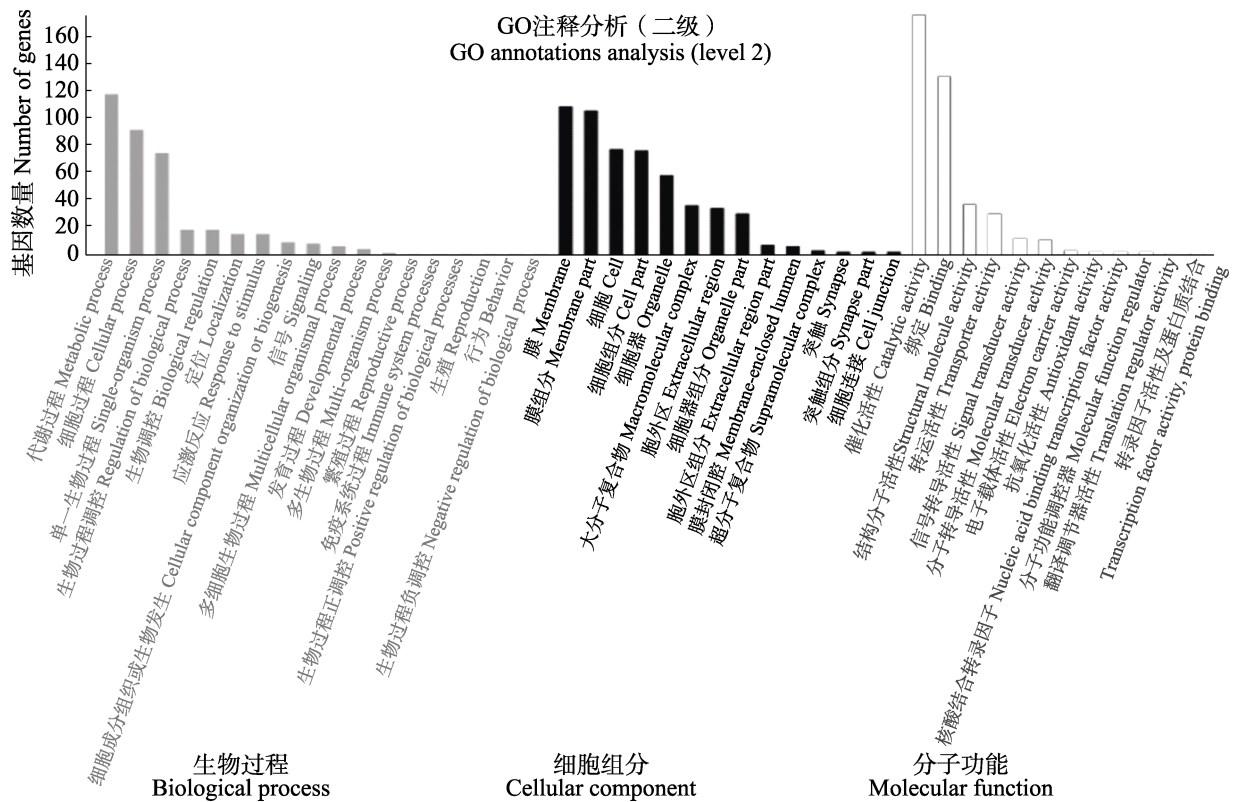


图 1 取食国槐与取食洋白蜡的幼虫肠道差异表达基因的 GO 注释

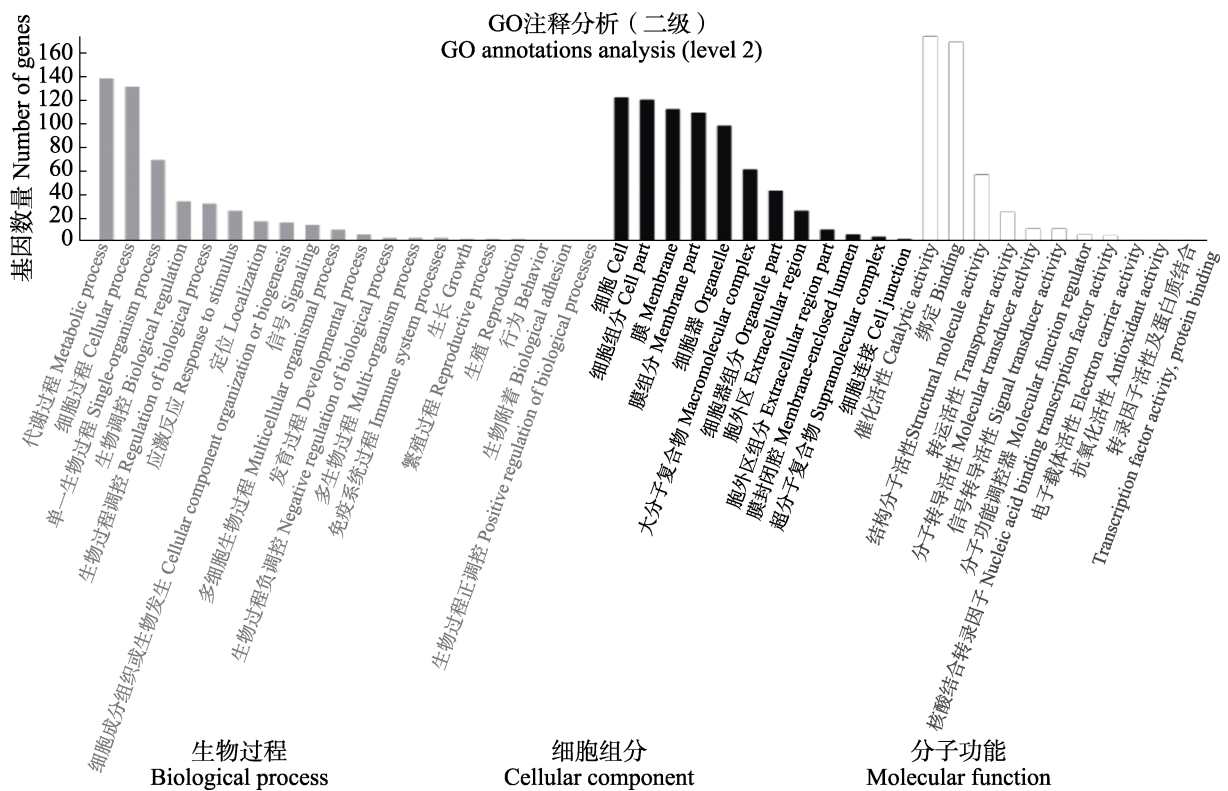
Fig. 1 GO annotation of differentially expressed genes in larval gut feeding on *Sophora japonica* and *Fraxinus pennsylvanica*

图 2 取食银杏与取食洋白蜡的幼虫肠道差异表达基因的 GO 注释

Fig. 2 GO annotation of differentially expressed genes in larval gut feeding on *Ginkgo biloba* and *Fraxinus pennsylvanica*

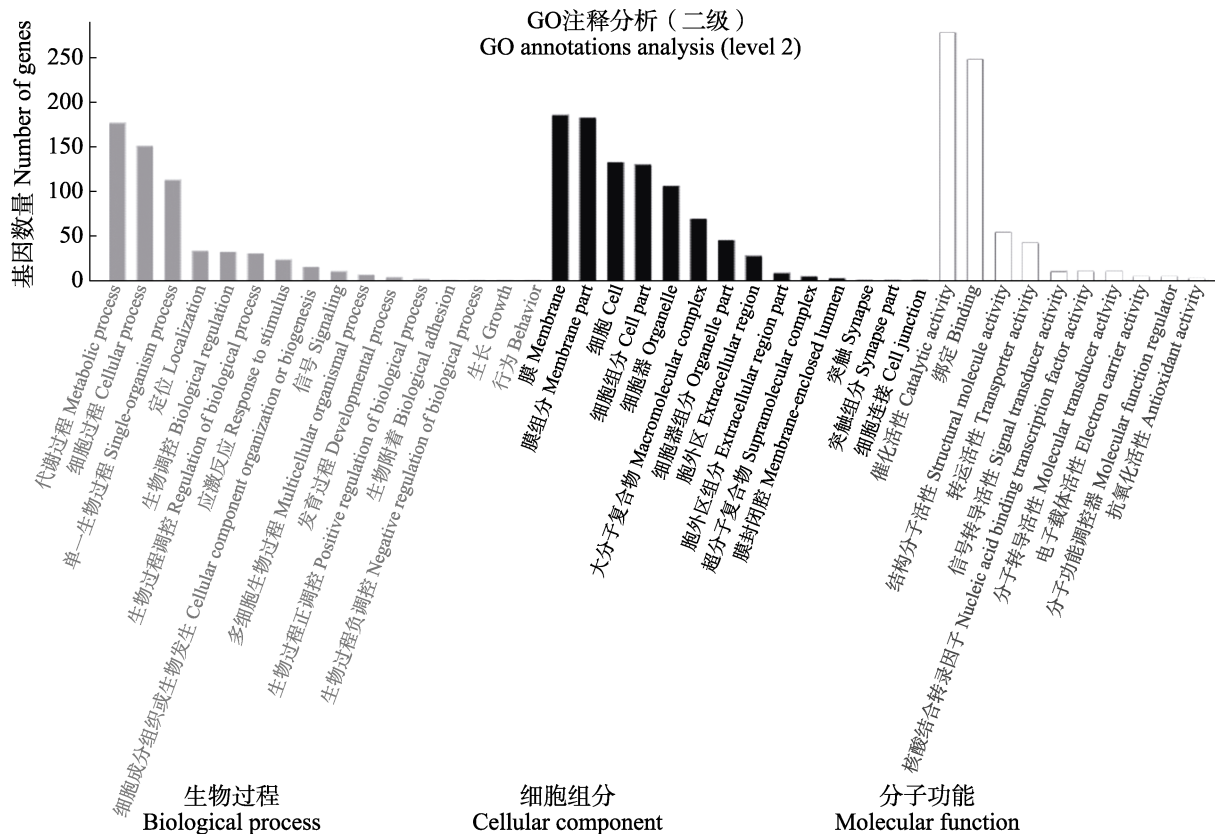


图 3 为取食银杏与取食国槐的幼虫肠道差异表达基因的 GO 注释

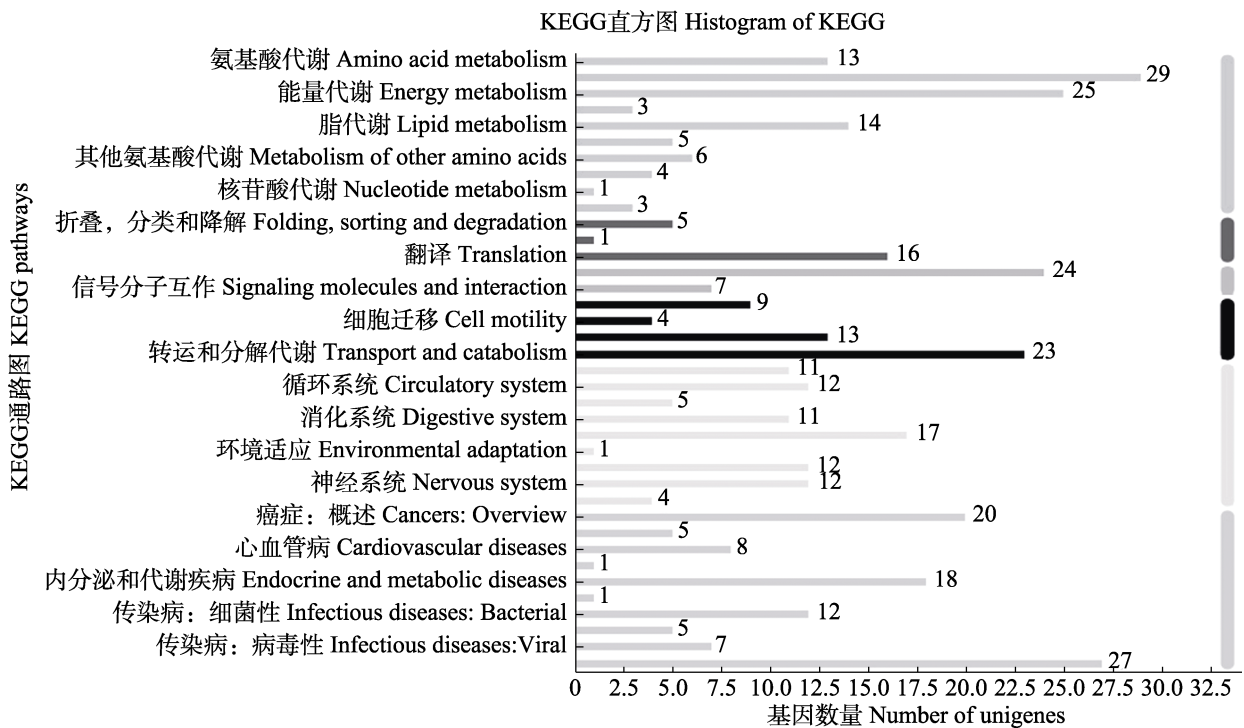
Fig. 3 GO annotation of differentially expressed genes in larval gut feeding on *Ginkgo biloba* and *Sophora japonica*

图 4 取食国槐与取食洋白蜡的幼虫肠道差异表达基因的 KEGG 注释

Fig. 4 KEGG annotation of differentially expressed genes in larval gut feeding on *Sophora japonica* and *Fraxinus pennsylvanica*

与的代谢通路主要包括吞噬体、氨基糖和核苷酸糖代谢、过氧化物酶体和甘油酯代谢等(图4)。

取食银杏与取食洋白蜡的幼虫肠道相比,共注释到142个上调基因,182个下调基因(表2)。对这些差异基因进行KEGG通路分析,上调基因参与的代谢通路主要包括:戊糖与葡萄糖醛酸

相互转化、过氧化物酶体、核糖体氨基糖与核苷酸糖代谢、过氧化物酶体、丙酮酸代谢等。下调基因参与的代谢通路主要包括:甘油酯代谢、果糖及甘露糖代谢、半乳糖代谢、戊糖和葡萄糖醛酸相互转化、氧化磷酸化、谷胱甘肽代谢和细胞凋亡等(图5)。

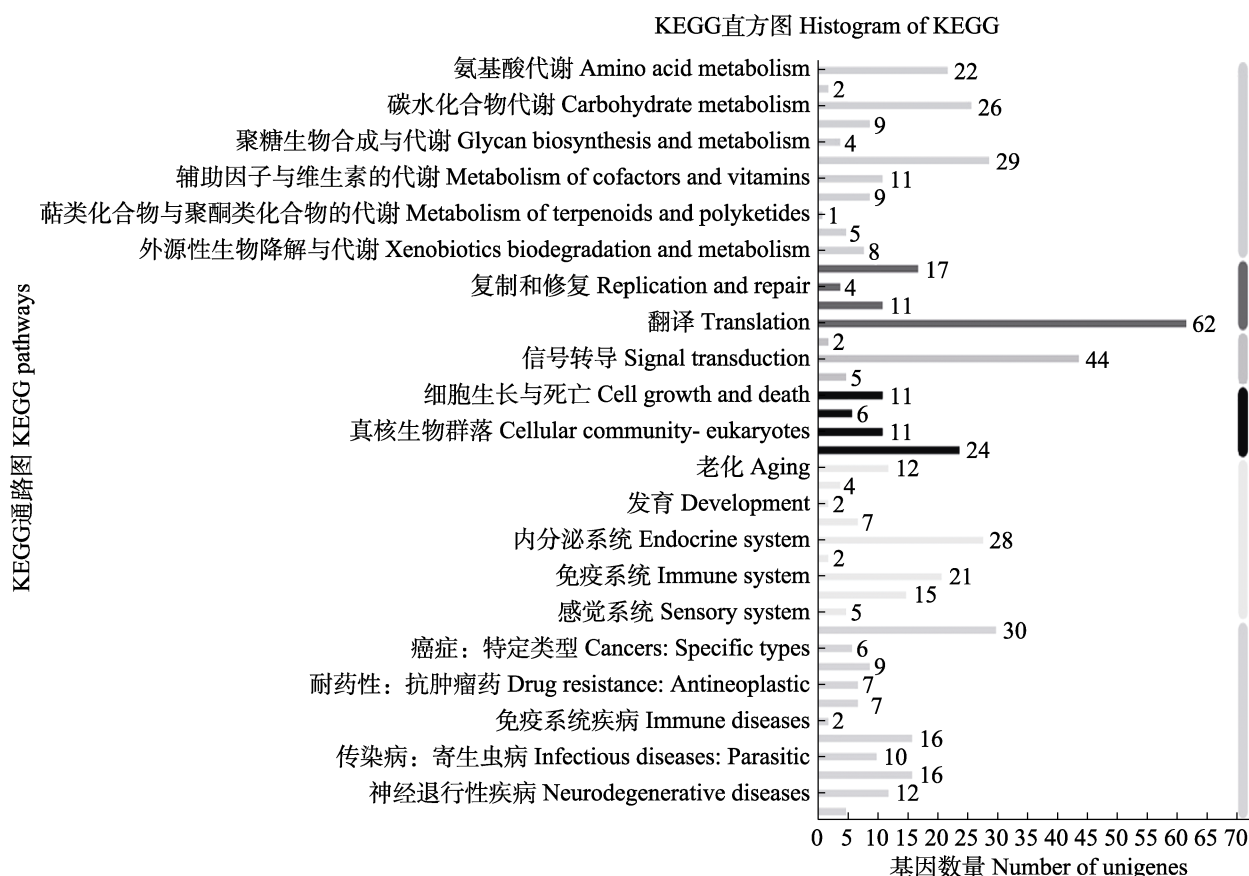


图5 取食银杏与洋白蜡的幼虫肠道差异表达基因的KEGG注释

Fig. 5 KEGG annotation of differentially expressed genes in larval gut feeding on *Ginkgo biloba* and *Fraxinus pennsylvanica*

取食银杏与取食国槐的幼虫肠道相比,注释到168个上调基因,140个下调基因(表2)。对这些差异基因进行KEGG通路分析,上调基因参与的代谢通路主要包括:细胞色素P450、谷胱甘肽代谢、半乳糖代谢甘油酯代谢、果糖及甘露糖代谢、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解等。下调基因参与的代谢通路主要包括:甘油酯代谢、过氧化物酶体、半乳糖代谢、脂肪酸降解、果糖和甘露糖代谢、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解等(图6)。

2.4 幼虫在寄主适应过程中重要基因的筛选和比较

本研究重点筛选了取食不同寄主的小线角木蠹蛾幼虫差异基因中与消化酶、解毒酶及保护酶有关的基因,以明确消化酶、解毒酶及保护酶在幼虫寄主适应过程中基因转录水平的表达差异。研究表明,取食国槐与取食洋白蜡的幼虫相比,注释到肠道内关于消化酶、解毒及保护酶的差异基因总共有13个,其中9个消化酶基因(3个淀粉酶和6个脂肪酶),2个解毒酶基因

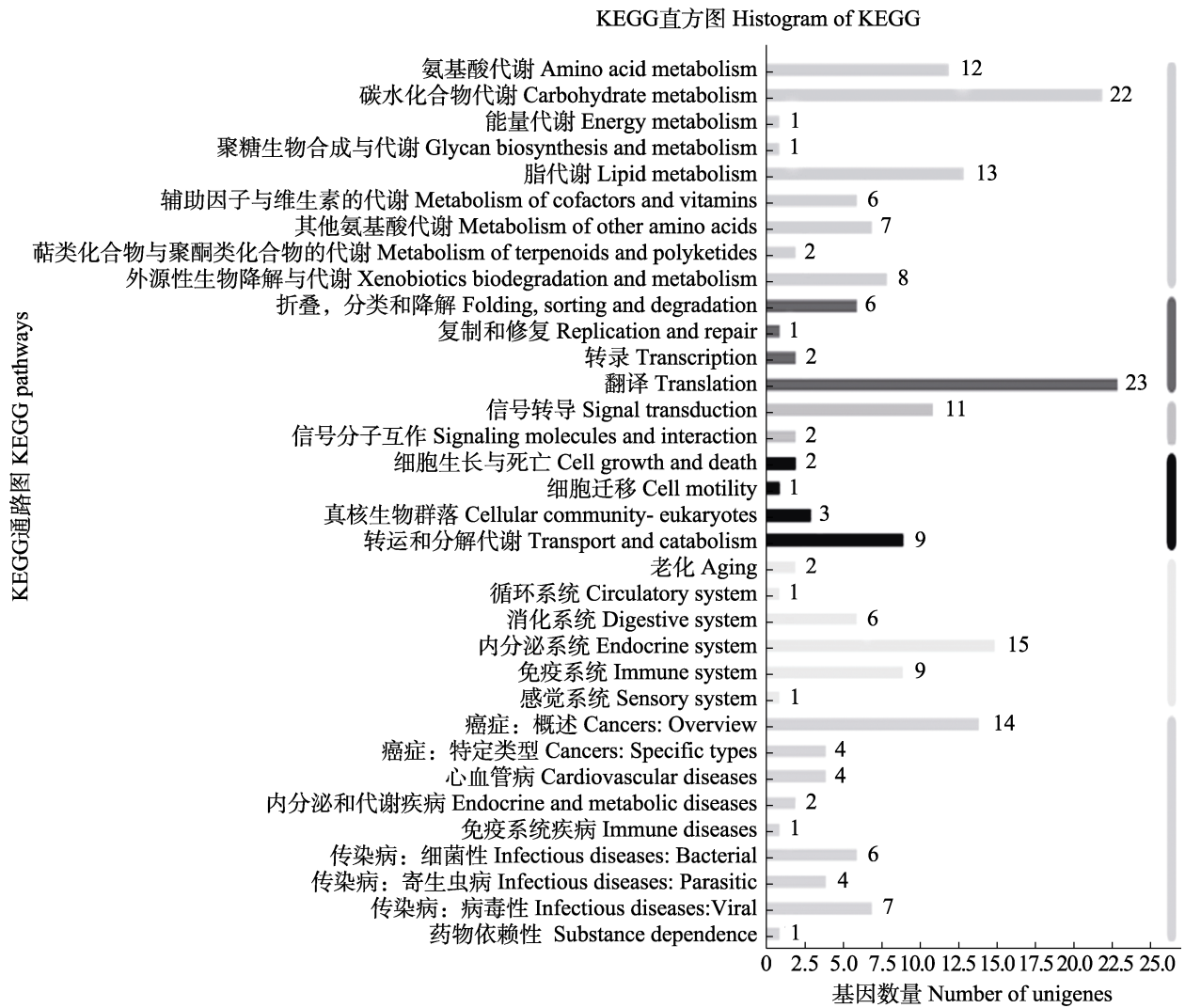


图 6 取食银杏与国槐的幼虫肠道差异表达基因的 KEGG 注释
Fig. 6 KEGG annotation of differentially expressed genes in larval gut feeding on *Ginkgo biloba* and *Sophora japonica*

(均为 P450 酶), 2 个保护酶基因 (1 个 CAT 和 1 个 POD), 6 个差异基因上调表达, 7 个下调表达 (表 3)。

如表 4 所示, 取食银杏与取食洋白蜡的幼虫相比, 注释到关于消化酶、解毒酶及保护酶的肠道差异基因有 6 个, 其中 3 个消化酶 (2 个胰蛋白酶, 1 个脂肪酶), 3 个解毒酶 (1 个 P450 酶和 2 个 CarE 酶), 2 个差异基因上调表达, 4 个下调表达。

取食银杏与取食国槐的幼虫相比, 注释到消化、解毒及保护酶的肠道差异基因共有 29 个, 其中 11 个消化酶 (1 个淀粉酶和 10 个脂肪酶),

14 个解毒酶 (7 个细胞色素酶, 3 个 GST 酶和 4 个 CarE 酶), 4 个保护酶 (1 个 SOD 酶, 1 个 POD 酶, 1 个 PO 酶和 1 个 CAT 酶), 23 个差异基因上调表达, 6 个下调表达 (表 5)。

3 讨论

本研究根据测序结果, 分析了小线角木蠹蛾幼虫对不同寄主植物的转录组水平适应机制。已有大量研究表明不同寄主植物会显著影响昆虫体内的基因转录水平, Roy 等 (2016) 发现取食不同食物的草地夜蛾, 其肠道转录组存在显著差异。但 Govind 等 (2010) 发现多食性绿棉铃虫

Heliothis virescens 虽然取食不同寄主的植物, 其转录水平基本相同。取食不同寄主树种的小线角木蠹蛾幼虫转录组存在的差异可以用表型可塑性来解释, 即生物在感受到环境发生改变时, 表型等随之改变的一种适应机制 (Dewitt and Scheiner, 2004), 在广义上的表型可塑性包括生理、生化代谢、行为、生物学特性、生活史以及生长发育等发生变化。同种生物的转录组差异可以阐释表型的可塑性, 即表型上的改变来源于基因表达的变化, 反之, 基因表达差异也很可能会影响到昆虫的表型 (Whitman and Ananthkrishnan, 2009)。

表 3 取食国槐与取食洋白蜡的幼虫差异基因注释表
Table 3 Annotation table of differential expressed genes in larvae feeding on *Sophora japonica* and *Fraxinus pennsylvanica*

酶 Enzyme	序号 No.	基因 ID Gene ID	上调/下调 (log ₂ FC) Up/Down	注释 Annotation
消化酶 Digestive enzyme	1	DN10752_c2_g6	上调 Up (+3.84)	淀粉酶 Amylase
	2	DN5360_c0_g1	上调 Up (+3.81)	淀粉酶 Amylase
	3	DN9547_c3_g2	下调 Down (+1.28)	淀粉酶 Amylase
	4	DN6859_c0_g1	上调 Up (+1.96)	脂肪酶 Lipase
	5	DN10490_c0_g3	下调 Down (-2.85)	脂肪酶 Lipase
	6	DN10601_c1_g1	下调 Down (-2.58)	脂肪酶 Lipase
	7	DN11427_c4_g1	下调 Down (-2.80)	脂肪酶 Lipase
	8	DN4813_c0_g1	下调 Down (-3.87)	脂肪酶 Lipase
	9	DN6625_c0_g1	下调 Down (-1.98)	脂肪酶 Lipase
解毒酶 Detoxification enzyme	1	DN10644_c1_g3	上调 Up (+1.86)	细胞色素 P450 314A1 Cytochrome P450 314A1
	2	DN5796_c0_g1	上调 Up (+2.74)	细胞色素 P450 314A1 Cytochrome P450 314A1
保护酶 Protective enzyme	1	DN9213_c1_g1	上调 Up (+3.84)	过氧化氢酶 Catalase
	2	DN9943_c2_g5	下调 Down (-2.71)	过氧化物酶 Peroxidase

表 4 取食银杏与取食洋白蜡的幼虫差异基因注释表
Table 4 Annotation table of differential expressed genes in larvae feeding on *Ginkgo biloba* and *Fraxinus pennsylvanica*

酶 Enzyme	序号 No.	基因 ID Gene ID	上调/下调 (log ₂ FC) Up/Down	注释 Annotation
消化酶 Digestive enzyme	1	DN2949_c0_g1	下调 Down (-3.55)	胰蛋白酶 Trypsin
	2	DN8907_c1_g7	下调 Down (-1.01)	胰蛋白酶 Trypsin
	3	DN7905_c4_g1	上调 Up (+3.80)	三酰甘油脂肪酶 Triacylglycerol lipase
解毒酶 Detoxification enzyme	1	DN11993_c1_g1	上调 Up (+3.72)	细胞色素 P450 6B7 Cytochrome P450 6B7
	2	DN8852_c0_g4	下调 Down (-6.93)	羧酸酯酶家族 Carboxylesterase family
	3	DN5424_c0_g1	下调 Down (-3.73)	羧酸酯酶家族 Carboxylesterase family

表 5 取食银杏与取食国槐的幼虫差异基因注释表

Table 5 Annotation table of differential genes in larvae feeding on *Ginkgo biloba* and *Sophora japonica*

酶 Enzyme	序号 No.	基因 ID Gene ID	上调/下调 (log ₂ FC) Up/down	注释 Annotation
消化酶 Digestive enzyme	1	DN5360_c0_g1	下调 Down (- 2.68)	淀粉酶 Amylase
	2	DN9537_c2_g1	上调 Up (+2.26)	脂肪酶 Lipase
	3	DN6252_c0_g1	上调 Up (+1.97)	脂肪酶 Lipase
	4	DN7060_c0_g1	上调 Up (+2.72)	脂肪酶 Lipase
	5	DN7234_c0_g1	上调 Up (+2.16)	脂肪酶 Lipase
	6	DN7905_c4_g1	上调 Up (+3.29)	脂肪酶 Lipase
	7	DN8267_c2_g2	上调 Up (+2.92)	脂肪酶 Lipase
	8	DN8559_c1_g10	上调 Up (+3.82)	三酰甘油脂肪酶 Triacylglycerol lipase
	9	DN6625_c0_g1	上调 Up (+1.37)	三酰甘油脂肪酶 Triacylglycerol lipase
	10	DN10445_c6_g1	下调 Down (- 2.80)	脂肪酶 Lipase
解毒酶 Detoxification enzyme	11	DN10749_c1_g2	下调 Down (- 1.99)	脂肪酶 Lipase
	1	DN7520_c3_g1	上调 Up (+1.40)	细胞色素 P450 9F2 Cytochrome P450 9F2
	2	DN7778_c4_g4	上调 Up (+1.99)	细胞色素 P450 9A19 Cytochrome P450 9A19
	3	DN7945_c1_g2	上调 Up (+1.66)	细胞色素 CBB3 Cytochrome_CBB3
	4	DN9148_c2_g1	上调 Up (+6.21)	细胞色素 P450 6B46 Cytochrome P450 6B46
	5	DN9424_c4_g1	上调 Up (+1.19)	细胞色素 P450 4C1 Cytochrome P450 4C1
	6	DN9714_c1_g3	上调 Up (+2.26)	细胞色素 P450 4C1 Cytochrome P450 4C1
	7	DN10644_c1_g3	下调 Down (- 3.20)	细胞色素 P450 314A1 Cytochrome P450 314A1
	8	DN6526_c0_g1	上调 Up (+1.50)	谷胱甘肽 S-转移酶 Glutathione S-transferase
	9	DN7089_c2_g3	上调 Up (+4.45)	谷胱甘肽 S-转移酶 Glutathione S-transferase
	10	DN7624_c2_g1	上调 Up (+2.19)	谷胱甘肽 S-转移酶 Glutathione S-transferase
	11	DN5424_c0_g1	上调 Up (+7.92)	羧酸酯酶 Carboxylesterase
	12	DN5424_c0_g2	上调 Up (+6.74)	羧酸酯酶 Carboxylesterase
	13	DN9409_c1_g2	上调 Up (+1.20)	羧酸酯酶 Carboxylesterase
	14	DN7957_c0_g9	下调 Down (- 1.48)	羧酸酯酶 Carboxylesterase
保护酶 Protective enzyme	1	DN11263_c0_g2	上调 Up (+1.12)	超氧化物歧化酶 Superoxide dismutase
	2	DN9601_c0_g1	上调 Up (+1.85)	过氧化物酶 Peroxidase
	3	DN6430_c0_g1	上调 Up (+1.07)	酚氧化酶 Phenol oxidase
	4	DN9213_c1_g1	下调 Down (- 3.44)	过氧化氢酶 Catalase

Roy 等 (2016) 还发现取食不同食物的草地夜蛾肠道转录组中, 与营养代谢、解毒酶和转运蛋白相关的基因表达增强。在本研究中也出现了相似的结果, 对差异基因进行 GO 和 KEGG 功能分析, 发现上调表达的基因主要与解毒代谢 (如 P450 酶)、水解酶、转运蛋白及氧化还原过程等相关, 下调表达的主要是与三磷酸腺苷结合、核酸结合、DNA 结合、内质网合成及代谢相关的基因, 说明取食不同寄主的小线角木蠹蛾体内与解毒代谢相关的途径 (如外源物质分解代谢途径等) 在加强, 而与物质合成以及能量代谢相关过程 (如碳水化合物代谢) 在减弱。郑瑜 (2016) 发现取食抗性品种与感虫品种的褐飞虱相比, 有 54 个差异基因上调表达, 7 个基因发生下调, 且这些基因主要与解毒代谢和应激反应等密切相关。在昆虫长期进化过程, 对某些寄主的适应性是其逐步形成应对外部环境不可或缺的方式 (Roy *et al.*, 2016)。小线角木蠹蛾与解毒代谢、消化和营养代谢及生物学过程相关基因上调表达, 表明小线角木蠹蛾体内逐渐形成了较为稳定的适应机制。

对取食 3 种不同寄主的小线角木蠹蛾幼虫进行两两比较, 取食银杏与国槐的幼虫解毒酶差异基因中, 有 6 个 P450 酶基因, 4 个羧酸酯酶基因和 3 个谷胱甘肽 S-转移酶; 取食银杏与洋白蜡的幼虫解毒酶差异基因中, 有 2 个羧酸酯酶基因, 1 个 P450 酶基因; 取食国槐与洋白蜡的幼虫 2 个解毒酶差异基因均为 P450 酶基因。本团队之前的研究发现, 取食银杏与国槐的幼虫 P450 酶活性存在显著差异, 取食银杏与洋白蜡的幼虫羧酸酯酶活性存在显著差异, 取食国槐与洋白蜡的幼虫 P450 酶活性存在显著差异 (王秀吉等, 2020)。通过对比以上结果, 发现取食这 3 种寄主的幼虫解毒酶活性差异和基因表达差异情况较为一致。之前的研究还发现 (王秀吉等, 2020), 相较于银杏, 国槐与洋白蜡的次生代谢物含量并不相近, 但本研究中取食国槐与洋白蜡的肠道解毒酶差异基因数量最少, 这可能是由于幼虫从银杏分别转移到国槐和洋白蜡后, 取食这

两种寄主的幼虫在适应新寄主过程中, 解毒酶差异基因数量均增加导致。肠道筛选出 17 个解毒酶差异基因, 大部分为 P450 酶基因。Yang 等 (2011) 发现抗性品种寄主可以诱导褐飞虱体内 P450 家族中的 *CYP6CS1* 和 *CYP6CW1* 基因。Mathers 等 (2017) 通过对桃蚜转录组学及基因组学的研究发现, 在取食不同寄主后, 桃蚜的转录组可以迅速做出响应, 且 P450 酶基因在虫体转移寄主后上调表达。本研究共发现 8 个 P450 酶差异基因, 其中有 2 个 CYP6 亚家族、2 个 CYP9 亚家族和 2 个 CYP4 亚家族基因。已有大量研究表明 CYP4 亚家族 (Yamamoto *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2018)、CYP6 亚家族 (Chien-Fu *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2018) 和 CYP9 亚家族 (Feyereisen, 1999; Yang *et al.*, 2006) 与鳞翅目昆虫体内的解毒代谢过程密切相关。此外, 本研究还发现 2 个解毒酶基因, 其中 *DN5424_c0_g1* 是羧酸酯酶家族基因, *DN10644_c1_g3* 是 P450 314A1 基因, 该基因与昆虫蜕皮激素合成密切相关, 它们在取食不同寄主的幼虫中重复出现表达差异, 说明羧酸酯酶的解毒作用和蜕皮激素的合成是小线角木蠹蛾幼虫对寄主适应的重要过程, 以上 2 个基因可以作为小线角木蠹蛾幼虫对寄主解毒代谢机制的重点研究对象。

纤维素和半纤维素是小线角木蠹蛾幼虫寄主的主要成分, 但取食 3 种不同寄主的幼虫肠道筛选的 20 个消化酶差异基因, 均没有纤维素酶或木聚糖酶基因。本团队之前的研究 (王秀吉等, 2020) 结果表明, 3 种寄主的纤维素和半纤维素含量均没有显著差异, 取食 3 种寄主的幼虫内切- β -1,4-葡聚糖酶和外切- β -1,4-纤维二糖水解酶活性也没有差异, 但取食银杏和国槐的幼虫 β -葡萄糖苷酶和木聚糖酶活性显著高于取食洋白蜡的幼虫。本研究未发现纤维素酶或木聚糖酶差异基因, 可能是因为取食不同寄主的幼虫体内纤维素酶和木聚糖酶基因表达差异不显著, 也可能是因为数据库中纤维素酶或木聚糖酶基因的注释信息有限。取食 3 种不同寄主的幼虫差异基因主要是蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶基因, 其中,

DN5360_c0_g1 (淀粉酶基因)、DN6625_c0_g1 (脂肪酶基因)和 DN7905_c4_g1(脂肪酶基因), 这 3 个基因在取食不同寄主的幼虫中重复出现表达差异, 可能与寄主的脂肪和淀粉含量或成分有关, 它们可以作为小线角木蠹蛾幼虫对寄主适应机制的重点研究基因。

取食 3 种不同寄主的幼虫差异基因中, 取食银杏与国槐的幼虫肠道有 4 个保护酶差异基因, 取食国槐与洋白蜡的幼虫肠道有 2 个保护酶差异基因, 且 DN9213_c1_g1 (过氧化氢酶) 基因重复出现表达差异。相比于解毒酶和消化酶, 取食不同寄主的小线角木蠹蛾幼虫的保护酶差异基因明显较少。

综上所述, 取食不同寄主食物的小线角木蠹蛾幼虫体内的转录组会出现差异性表达, 其中上调表达的差异基因与解毒代谢、水解酶和转运蛋白等密切相关, 通过筛选确定了 2 个解毒酶基因、3 个消化酶基因和 1 个保护酶基因作为幼虫对寄主适应机制的下一步重点研究对象。该研究结果为进一步揭示小线角木蠹蛾对寄主的适应机制提供了重要参考价值。

参考文献 (References)

- Bai RX, 2012. The occurrence and prevention measures of *Holcocerus insularis* of *Sophora japonica*. *Chinese Horticulture Abstracts*, 28(8): 74–75. [白瑞霞, 2012. 国槐小线角木蠹蛾的发生及防治措施. 中国园艺文摘, 28(8): 74–75.]
- Chien-Fu H, Harrison TL, Berenbaum MR, Schuler MA, 1995. CYP6B3: A second furanocoumarin-inducible cytochrome P450 expressed in *Papilio polyxenes*. *Molecular Biology*, 4(3): 149–160.
- De la Paz Celorio-Mancera M, Wheat CW, Vogel H, Söderlind L, Janz N, Nylin S, 2013. Mechanisms of macroevolution: Polyphagous plasticity in butterfly larvae revealed by RNA-Seq. *Molecular Ecology*, 22(19): 4884–4895.
- Dewitt TJ, Scheiner SM, 2004. Phenotypic Plasticity: Functional and Conceptual Approaches. Oxford: Oxford University Press. 50–63.
- Fescemyer HW, Sandoya GV, Germán V, Gill TA, Ozkan S, Marden JH, Luthe DS, 2013. Maize toxin degrades peritrophic matrix proteins and stimulates compensatory transcriptome responses in fall armyworm midgut. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 43(3): 280–291.
- Feyereisen R, 1999. Insect P450 enzymes. *Annual Review of Entomology*, 44: 507–533.
- Govind G, Mittapalli O, Griebel T, Allmann S, Böcker S, Baldwin IT, 2010. Unbiased transcriptional comparisons of generalist and specialist herbivores feeding on progressively defenseless *Nicotiana attenuata* plants. *PLoS ONE*, 5(1): e8735.
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Lindblad-Toh K, Friedman N, Regev A, 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, 29(7): 644–652.
- Gui BZ, Zhao GC, 2018. *Holcocerus insularis* control. *China Flowers & Horticulture*, 2018(2): 47. [桂炳中, 赵国晨, 2018. 小线角木蠹蛾防治. 中国花卉园艺, 2018(2): 47.]
- Li HY, Smigocki AC, 2018. Transcriptome analysis of sugar beet root maggot (*Tetanops myopaeformis*) genes modulated by the *Beta vulgaris* host. *Insect Science*, 25(2): 222–234.
- Li X, 2020. Biological control of stem borers in Cangzhou. *Journal of Green Science and Technology*, 2020(17): 104–107. [李霞, 2020. 沧州蛀干害虫生物防治技术研究. 绿色科技, 2020(17): 104–107.]
- Liu XG, Zhang YX, Wang WL, Cao Y, Li S, Zhang BX, Li SG, 2018. Identification of putative cytochrome P450 monooxygenase genes from the small white butterfly, *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae), and their response to insecticides. *Archives of Insect Biochemistry & Physiology*, 98(1): e21455.
- Lu H, 2016. Effect of host alteration on life cycle, feeding behavior and salivary gland gene expression of pea aphid. Doctoral dissertation. Taian: Shandong Agricultural University. [卢红, 2016. 寄主转换对豌豆蚜生命周期、取食行为和唾液腺基因表达的影响. 博士学位论文. 泰安: 山东农业大学.]
- Mathers TC, Chen YZ, Kaithakottil GG, Van Oosterhout C, Swarbreck D, Hogenhout SA, 2017. Rapid transcriptional plasticity of duplicated gene clusters enables a clonally reproducing aphid to colonise diverse plant species. *Genome Biology*, 18(1): 27.
- Matzkin LM, 2012. Population transcriptomics of cactus host shifts in *Drosophila mojavensis*. *Molecular Ecology*, 21(10): 2428–2439.
- Michael L, Simon A, Wolfgang H, 2014. Differential analysis of count data-the DESeq2 package. *Genome Biology*, 15(12): 550.
- Noriega DD, Arraes F, Antonino JD, Macedo L, Grossi-De-Sa MF,

2020. Comparative gut transcriptome analysis of *Diatraea saccharalis* in response to the dietary source. *PLoS ONE*, 15(8): e0235575.
- Roy A, Walker WB, Vogel H, Chattingtop S, Larsson MC, Anderson P, Heckel DG, Schlyter F, 2016. Diet dependent metabolic responses in three generalist insect herbivores *Spodoptera* spp. . *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 71: 91–105.
- Wang XJ, Lu H, Feng YQ, Zong SX, 2020. Detoxification and digestive enzyme activities in *Streltzoviella insularis* (Staudinger) larvae (Lepidoptera: Cossidae) in response to host trees. *Journal of Environmental Entomology*, 42(2): 480–492. [王秀吉, 路浩, 冯宇倩, 宗世祥, 2020. 不同寄主对小线角木蠹蛾幼虫消化解毒酶的影响. 环境昆虫学报, 42(2): 480–492.]
- Whitman DW, Ananthkrishnan TN, 2009. Phenotypic Plasticity of Insects: Mechanisms and Consequences. Enfield: Science Publishs. 841–864.
- Yakovlev RV, 2005. Carpenter-moths (Lepidoptera: Cossidae) of the Korean. *Eurasian Entomological Journal*, 4(4): 341–344.
- Yamamoto K, Ichinose H, Aso Y, Fujii H, 2010. Expression analysis of cytochrome P450s in the silkworm, *Bombyx mori*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 97(1): 1–6.
- Yang S, Li J, Li HP, Yang PJ, Yao Y, Meng FZ, Zhang JF, Mao R, 2014. The occurrence and prevention methods of *Holcocerus insularis* of papermulberry. *The Global Seabuckthorn Research and Development*, 12(2): 35–38. [杨爽, 李婧, 李海鹏, 杨培鑑, 姚勇, 孟繁增, 张俊峰, 毛瑞嫔, 2014. 构树小线角木蠹蛾的发生及防治方法. 国际沙棘研究与开发, 12(2): 35–38.]
- Yang Y, Chen S, Wu S, Yue L, Wu Y, 2006. Constitutive overexpression of multiple cytochrome P450 genes associated with pyrethroid resistance in *Helicoverpa armigera*. *Journal of Economic Entomology*, 99(5): 1784–1789.
- Yang YC, 2020. Molecular mechanism of sex communication in *Streltzoviella insularis*. Doctoral dissertation. Beijing: Beijing Forestry University. [杨宇超, 2020. 小线角木蠹蛾性信息素通讯的分子机制. 博士学位论文. 北京: 北京林业大学.]
- Yang Z, Zhang Y, Liu X, Wang X, 2011. Two novel cytochrome P450 genes *CYP6CS1* and *CYP6CW1* from *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae): cDNA cloning and induction by host resistant rice. *Bulletin of Entomological Research*, 101(1): 73–80.
- Zhang JT, Meng XZ, 2001. Sexual behavior of *Holcocerus insularis* and circadian rhythm of its sex pheromone production and release. *Acta Entomologica Sinica*, 44(4): 428–432. [张金桐, 孟宪佐, 2001. 小木蠹蛾性行为 and 性信息素产生与释放的时辰节律. 昆虫学报, 44(4): 428–432.]
- Zheng Y, 2016. Studies on the virulence and midgut transcriptome of *Nilaparvata lugens* (Stål) population reared on rice resistant variety IR56. Master dissertation. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences Dissertaion. [郑瑜, 2016. 褐飞虱 IR56 种群致害性及中肠转录组的研究. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院.]