

青杨天牛幼虫响应低氧胁迫的转录组分析

汪莹^{1,2} 郑明歧¹ 罗布顿珠³ 韩献华⁴ 张有军⁵ 石娟^{1,2*}

(1. 北京林业大学林木有害生物防治北京市重点实验室, 北京 100083; 2. 北京林业大学中法欧亚森林入侵生物联合实验室, 北京 100083; 3. 萨迦县林业和草原局, 西藏 日喀则 857800; 4. 赤城县林业和草原局, 河北 张家口 075500; 5. 张家口市剪子岭林场, 河北 张家口 075599)

摘要: 为探究青杨天牛 *Saperda populnea* 幼虫低氧适应的分子机制, 分别对青杨天牛幼虫进行常氧(21% 氧浓度)、中度缺氧(14% 氧浓度)和重度缺氧(7% 氧浓度)处理, 采用高通量测序技术对低氧胁迫下青杨天牛进行转录组测序与组装、功能注释与分类、差异基因筛选与分析, 采用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 技术对转录组测序结果进行验证。结果表明, 与常氧处理相比, 14% 和 7% 氧浓度处理下青杨天牛幼虫显著差异表达基因数分别为 31 个和 1 525 个。低氧胁迫后青杨天牛幼虫的显著差异表达基因功能主要富集到跨膜转运蛋白活性、细胞或亚细胞组分运动、微管运动等。低氧胁迫后青杨天牛幼虫差异表达基因代谢通路主要富集到氮代谢、蛋白质消化吸收、昼夜节律和环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)信号通路等。qPCR 检测结果与转录组测序结果一致, 表明转录组测序结果可靠。

关键词: 青杨天牛; 低氧胁迫; 差异表达基因; 功能富集分析; 高通量测序

Transcriptome analysis of small poplar borer *Saperda populnea* larvae in response to hypoxic stress

Wang Ying^{1,2} Zheng Mingqi¹ Luobudunzhu³ Han Xianhua⁴ Zhang Youjun⁵ Shi Juan^{1,2*}

(1. Beijing Key Laboratory for Forest Pest Control, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2. Sino-France Joint Laboratory for Invasive Forest Pests in Eurasia, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 3. Forestry and Grassland Bureau of Sakya County, Shigatse 857800, Xizang Autonomous Region, China; 4. Forestry and Grassland Bureau of Chicheng County, Zhangjiakou 075500, Hebei Province, China; 5. Jianziling Forestry Farm of Zhangjiakou, Zhangjiakou 075599, Hebei Province, China)

Abstract: To explore the molecular mechanisms underlying the hypoxic adaptation of small poplar borer *Saperda populnea* larvae, the larvae were treated with normal oxygen (21% O₂ concentration), moderate hypoxia (14% O₂ concentration) and severe hypoxia (7% O₂ concentration). Transcriptome sequencing and assembly, functional annotation and classification, as well as screening and analysis of differentially expressed genes in *S. populnea* under hypoxic stress were conducted using high-throughput sequencing techniques. Quantitative real-time PCR (qPCR) was used to verify the sequencing accuracy of transcriptome data. The results indicated that the number of differentially expressed genes in *S. populnea* larvae treated with 14% O₂ concentration and 7% O₂ concentration was 31 and 1 525, respectively, compared to larvae in a normal oxygen environment. The functions of these differentially expressed genes in *S. populnea* larvae exposed to hypoxic stress were mainly enriched in transmembrane transporter activity, movement of cell or subcellular component, and microtubule-based movement. The dif-

ferentially expressed genes under hypoxic stress were mainly enriched in KEGG pathways such as nitrogen metabolism, protein digestion and absorption, circadian entrainment, and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) signaling pathway. Validation through qPCR revealed similar results in the RNA-seq data, affirming the accuracy of the sequencing data.

Key words: *Saperda populnea*; hypoxic stress; differentially expressed gene; functional enrichment analysis; high-throughput sequencing

青杨天牛 *Saperda populnea* 隶属鞘翅目天牛科沟胫天牛亚科楔天牛属 *Saperda*, 主要为害毛白杨 *Populus tomentosa*、银白杨 *Populus alba* 和加杨 *Populus canadensis* 等幼树。青杨天牛作为重要的蛀干害虫被列入青海省重点林木检疫对象, 同时也被列为全国林业危险性有害生物(王福维等, 2001; 索朗拉姆, 2018)。青杨天牛幼虫蛀食幼树主干髓部, 被害处会形成虫瘿, 阻碍树体养分运输, 以致树梢枯折或树干畸形, 严重时整株死亡(Eken et al., 2006; 王海香等, 2017)。在国外青杨天牛主要分布于韩国、保加利亚和芬兰等国家(Georgiev et al., 2004; Wallin et al., 2017), 在国内其只分布在东北和华北等地(李永福等, 2015)。2002年在西藏自治区(简称西藏)拉萨市曲水县聂当乡首次发现青杨天牛, 随后该虫对西藏杨树林的为害程度呈上升趋势, 为害范围逐渐扩大, 有由低海拔向高海拔扩散的趋势(左力等, 2004), 因此明确青杨天牛幼虫响应低氧胁迫的分子机制对于防控该害虫具有重要意义。

近年来, 国内外关于环境胁迫对昆虫影响的研究越来越多, 大多集中在低温胁迫对昆虫的影响方面(Bernardo et al., 2008; Garcia et al., 2009), 而关于低氧胁迫对昆虫影响的研究较少。昆虫在面临低氧胁迫时也会表现出一系列的适应性特征。如Murdock et al.(2012)研究发现, 当氧浓度低于4%时四纹豆象 *Callosobruchus maculatus* 的取食行为几乎停止; 德国小蠊 *Blattella germanica* 雌雄成虫在12%氧浓度下饲养一段时间后, 其体重较常氧环境下雌雄成虫体重分别降低约27%和23%(VandenBrooks et al., 2012); 在缺氧期间平原夜虎甲 *Amblycheila cylindriciformis* 将散热速率降低至常氧状态时的3%~14%(Hoback et al., 2000)。目前已发现一些编码呼吸蛋白、线粒体氧化酶c、热休克蛋白(heat shock protein, Hsp)、三羧酸(tricarboxylic acid, TCA)循环相关酶和铁氧还原蛋白等蛋白的低氧响应基因在生物适应低氧的过程中发挥着重要作用。如呼吸蛋白是一类负责氧气运输的蛋白, 低氧时编码该蛋白的基因在大多数脊椎动物以及水生昆虫体内表达量增

加, 而在果蝇体内其表达量则降低, 当恢复到常氧状态时编码该蛋白的基因表达量上调(Gleixner et al., 2016); Zhou et al.(2008)研究发现低氧品系果蝇会诱导编码TCA循环相关酶基因的表达量显著下调; 在抵抗低氧和热胁迫过程中果蝇体内Hsp70、Hsp22和Hsp23可能发挥着重要作用(Boardman et al., 2018); Zhang et al.(2017)对栖息于青藏高原的门源草原毛虫 *Gynaephora menyanensis* 和栖息于低海拔的其近亲黄斑草原毛虫 *G. alpherakii* 的转录组进行了比较, 发现正选择基因显著富集到与低氧相关的哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路, 富集到该通路的基因包括线粒体加工肽 β 亚基(mitochondrial-processing peptidase subunit beta, MPPB)和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白调节相关蛋白(regulatory associated protein of mTOR, RAPTOR)等。虽然上述研究明确了一些基因在昆虫响应低氧胁迫过程中发挥着重要作用, 但这些基因的具体功能和昆虫响应低氧胁迫的分子机制尚不清楚。

测序技术的不断改进和完善以及取得重大成果的人类基因组计划使得分子生物学步入后基因组时代, 基于物种整体RNA水平的基因表达备受青睐, 被广泛用于昆虫机体发育的分子机制、与植物互作的机理以及适应各种复杂环境的遗传进化机制的研究中(Etebari et al., 2011)。近年来一些学者利用组学技术研究了东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* (Zhao et al., 2013)、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* (Kharel et al., 2019)、烟草甲 *Lasioderma serricorne* (Imai & Fukazawa, 2012)和绿豆象 *Callosobruchus chinensis* (Cui et al., 2017)等昆虫的低氧适应机制, 但主要集中在农业害虫和种实害虫, 有关蛀干害虫类的低氧适应性研究较少。

为探究青杨天牛幼虫响应低氧胁迫的分子机制, 本研究分别对青杨天牛幼虫进行常氧(21%氧浓度)、中度缺氧(14%氧浓度)和重度缺氧(7%氧浓度)处理, 采用高通量测序技术对低氧胁迫下青杨天牛进行转录组测序与组装、功能注释与分类、差异基

因筛选与分析,采用实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)技术对转录组测序结果进行验证,以期为利用低氧胁迫机制防控青杨天牛提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试昆虫:2021年9月中旬自河北省张家口市赤城县大海陀乡(115°44'52"E,40°40'38"N)采集带有青杨天牛虫瘿的杨树枝条,带回实验室,置于长60 cm、宽40 cm、高40 cm的纸箱内,定期喷水保湿,当地氧浓度为21%。试验开始前,劈开枝条收集体表未受伤、生活力正常的青杨天牛老熟幼虫供试。

试剂和仪器:MolPure®Cell/Tissue Total RNA 试剂盒,翌圣生物科技(上海)股份有限公司;HiScript Q RT SuperMix for qPCR 试剂盒、ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix 试剂盒,南京诺唯赞生物科技股份有限公司;其他试剂均为国产分析纯。Smartor 118 移动式三气培养箱,宁波华仪宁创智能科技有限公司;MDF-U53V 超低温冰箱,日本三洋电机株式会社;Nanodrop 8000 超微量紫外分光光度计,美国赛默飞世尔科技公司;JY04S-3C 凝胶成像仪,北京君意东方电泳设备有限公司;Novaseq 6000 测序仪,美国 Illumina 公司;LineGene 9600 Plus 型荧光定量PCR仪,杭州博日科技股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 青杨天牛低氧胁迫处理及RNA提取

结合高原地区大气氧分压,拉萨市(海拔3 650 m)氧分压为平原地区的70%左右,因此本试验设置7%氧浓度(重度缺氧)、14%氧浓度(中度缺氧)以及21%氧浓度(常氧,对照)3个处理,即用高纯的氮气置换三气培养箱内部分氧气,使其氧浓度分别为7%、14%和21%。各取10头青杨天牛老熟幼虫将其分别置于不同氧浓度的三气培养箱中处理4 h,每个处理重复3次,取出后迅速将其置于液氮中,而后转移至-80 °C超低温冰箱中保存。

每种氧浓度各取3个样品,每个样品3头试虫,按照MolPure®Cell/Tissue Total RNA 试剂盒说明书提取青杨天牛幼虫总RNA,用超微量紫外分光光度计测定总RNA的浓度和纯度,用1%琼脂糖凝胶电泳检测总RNA的完整性。

1.2.2 低氧胁迫下青杨天牛转录组测序与组装

当总RNA浓度 ≥ 50 ng/ μ L、吸光度比值 $OD_{260\text{nm}}/OD_{280\text{nm}}$ 介于1.8~2.2之间时开始建库。基于HiSeq

平台构建常氧和低氧环境下青杨天牛幼虫的转录组数据库,并对原始测序数据进行质控;利用Trinity对质控reads进行组装,并根据GC比例和序列完整性对组装结果进行优化评估。质量分析、cDNA文库的构建及测序委托上海美吉生物医药科技有限公司完成。

1.2.3 低氧胁迫下青杨天牛转录组功能注释与分类

将拼接所得到的所有核苷酸序列与COG、KEGG、GO、Nr、Swiss-Prot和Pfam六大数据库进行比对,获得unigenes的功能注释信息(李亦松等,2021)。通过BLASTx比对获取在Nr和Swiss-Prot数据库中的同源基因(鲁艳辉等,2021)。利用Pfam数据库对组装的新转录本进行蛋白家族注释(张业猛等,2022)。利用GO和COG数据库进行功能分类,并利用KEGG数据库将基因按照参与的pathway通路或行使的功能进行分类(袁嘉雯等,2021)。

1.2.4 低氧胁迫下青杨天牛差异基因筛选与分析

使用RSEM软件对基因组的比对结果和注释文件进行表达定量分析,得到各个样本基因/转录本的read counts,对其进行每千个碱基的转录每百万映射读取的fragments (fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments, FPKM)或每千个碱基的转录每百万映射读取的transcripts (transcripts per kilobase of exon model per million mapped reads, TPM)转换,进一步获得标准化的基因表达水平(Gao et al., 2021)。为筛选显著差异表达的目标基因,使用DESeq2软件采用默认阈值($P < 0.05$ 且表达差异倍数(fold change, FC) ≥ 2)对各个样本基因的counts数目进行标准化处理。采用Fisher精确检验方法使用Goatools软件(<https://github.com/tanghaibao/goatools>)对差异表达基因进行GO富集分析,从中选出 $P < 0.01$ 的条目按照term三大类型进行GO分类,同时将差异表达基因比对至KEGG数据库,当 $P < 0.05$ 时,该代谢通路在基因集中显著富集(刘泰龙等,2021)。

1.2.5 低氧胁迫下青杨天牛差异基因的qPCR验证

为了验证青杨天牛幼虫转录组测序结果,筛选可能与抗低氧胁迫相关的血蓝蛋白(hemocyanin, Hc)、抑前胸腺肽(prothoracicostatic peptide, PTSP)、气味受体59a(odorant receptor 59a, OR59a)、磷脂酶A₁(phospholipase A₁, PLA₁)和幼虫表皮蛋白22(larval cuticle protein 22, LCP22)的编码基因进行qPCR分析,以 β -actin作为内参基因(张健等,2022)。利用Primer Premier 5.0软件设计特异性引物(表1),

引物均委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。不同氧浓度处理下青杨天牛幼虫总RNA各取1 μg ,按照HiScript Q RT SuperMix for qPCR试剂盒说明书反转录成cDNA,将其作为模板,按照ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix试剂盒说明书进行qPCR分析。20 μL 反应体系:SYBR Mix

10 μL 、上下游引物各0.4 μL 、cDNA模板2 μL 、ddH₂O 7.2 μL 。反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸40 s,循环40次。每个样品重复3次。采用2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 法计算各基因的相对表达量,以常氧处理为对照。

表1 青杨天牛幼虫差异表达基因的实时荧光定量PCR引物

Table 1 Primers used for quantitative real-time PCR of differentially expressed genes in *Saperda populnea* larvae

基因 Gene	引物序列 Primer sequence	
<i>β-actin</i>	F: 5'-TCGGTATGGGACAAAAGGAC-3'	R: 5'-CGACACGGAGTTCATTGTAG-3'
<i>Hc</i>	F: 5'-TCAGTCTCCAGCATATCCAG-3'	R: 5'-AGGGCTATCGACTGATTGAG-3'
<i>LCP22</i>	F: 5'-AGAGGAATTGAAAGGAATGC-3'	R: 5'-ATTGGTTGGTAAACCGTTCTC-3'
<i>OR59a</i>	F: 5'-TATGGCGGCTATGTGTTTTTC-3'	R: 5'-GCAAAATTTCCAGCAGTCAG-3'
<i>PLA₁</i>	F: 5'-TCAGGATGAATACGTACAGG-3'	R: 5'-GGTCTACTATTAGGTTGGCG-3'
<i>PTSP</i>	F: 5'-ATCCGGGGATGAAAATCTAC-3'	R: 5'-GTCATCAGACGGAGCGAATC-3'

2 结果与分析

2.1 低氧胁迫下青杨天牛转录组测序与组装结果

通过对对照组、中度缺氧组和重度缺氧组的转录组分析共得到65.98 Gb质控数据,9个样品的质控数据均达到6.00 Gb以上,Q30值均大于93.97%(表2),表明测序质量较高。利用Trinity对高质量

reads进行组装,得到68 673条转录本,N50为2 026 bp,其中长度介于200~500 bp之间的转录本数量最多,为32 712条,占转录本总数的48%。在转录本基础上组装得到47 173条unigenes,平均长度为948 bp,N50为1 898 bp,其中序列长度介于200~500 bp之间的unigenes数量最多,为25 891条,占unigenes总数的55%。

表2 不同氧浓度处理下青杨天牛幼虫的测序结果

Table 2 Sequencing results for *Saperda populnea* larvae under different oxygen concentration treatments

处理 Treatment	样品 Sample	原始测序数据 Raw reads	测序的总碱基数 Raw bases/Gb	过滤后测序数据 Clean reads	质控后的总碱基数 Clean bases/Gb	测序错误率 Error rate of sequencing/%	Q30/%	GC百分比 GC content/%
常氧 Normoxic environment (CK)	N21_1	53 407 068	8.06	51 516 848	7.33	0.0251	94.09	45.26
	N21_2	58 365 608	8.81	56 798 882	8.24	0.0249	94.26	45.03
	N21_3	54 881 564	8.29	53 494 528	7.75	0.0249	94.32	45.44
中度缺氧(14%氧浓度) Moderate hypoxia (14% O ₂ concentration)	H14_1	51 952 362	7.84	49 921 088	7.24	0.0250	94.16	45.36
	H14_2	50 103 888	7.57	48 296 920	7.02	0.0249	94.27	45.57
	H14_3	53 327 250	8.05	51 403 942	7.42	0.0249	94.29	45.24
重度缺氧(7%氧浓度) Severe hypoxia (7% O ₂ concentration)	H7_1	52 484 022	7.93	50 428 468	7.23	0.0248	94.39	45.00
	H7_2	54 975 040	8.30	53 179 082	7.74	0.0252	93.97	44.99
	H7_3	42 870 234	6.47	41 165 740	6.00	0.0251	94.14	45.10

Q30: 测序质量在99.9%以上的碱基占总碱基的百分比。Q30: The percentage of bases with sequencing quality above 99.9% in total bases.

2.2 低氧胁迫下青杨天牛转录组基因功能注释

在获得的青杨天牛幼虫47 173条unigenes中,能够用于已知生物学功能注释的序列共有20 883条,占有unigenes序列的44.27%,其中分别有20 295、

16 070、13 623、12 779、10 569和9 144条unigenes序列能与Nr、COG、GO、Pfam、Swiss-Prot和KEGG数据库中的unigenes序列比对上。与Nr数据库的序列比对结果显示,青杨天牛unigenes序列与光肩星

天牛 *Anoplophora glabripennis unigenes* 序列的相似性达到 54.62%，而 25.42% 的 unigenes 序列与数据库中其他物种几乎无相似性。Swiss-Prot 数据库比对显示有 6 112 条 unigenes 序列 (占比 57.83%) 与已知序列有较高的相似性。

2.3 低氧胁迫下青杨天牛转录组基因功能分类

GO 数据库基因功能分类结果显示,青杨天牛幼虫转录组 unigenes 的基因功能共分为分子功能、细胞组分和生物学过程三大类 54 个功能条目。生物学过程涉及的功能条目有 23 个,参与细胞过程和代谢过程的 unigenes 数量最多,其次是生物调控。细胞组分涉及的功能条目有 15 个,参与细胞部分和膜部分的 unigenes 数量最多,其次是细胞器。分子功能涉及的功能条目有 16 个,参与结合的 unigenes 数量最多,其次是催化活性和转运活性。

KEGG 数据库代谢通路分析结果显示,青杨天牛幼虫转录组 unigenes 中共有 9 144 条注释到了遗传信息处理、代谢、人类疾病、环境信息处理、生物体系统和细胞过程 6 类的 44 条代谢通路中,主要代谢通路为信号转导、病毒感染性疾病、运输和分解代谢、内分泌系统、氨基酸代谢及翻译等。在 44 条通路中,信号传导途径注释的基因数量最多,达 1 048 条。

2.4 低氧胁迫下青杨天牛差异表达基因

与常氧环境下青杨天牛幼虫相比,14% 氧浓度处理下青杨天牛幼虫显著差异表达的基因有 31 个,其中 14 个基因上调,17 个基因下调;7% 氧浓度处理下青杨天牛幼虫显著差异表达的基因有 1 525 个,其中 469 个基因上调,1 056 个基因下调。与 7% 氧浓度处理下青杨天牛幼虫相比,14% 氧浓度处理下青杨天牛幼虫显著差异表达的基因有 283 个,其中 163 个基因上调,120 个基因下调。

2.5 低氧胁迫下差异表达基因的功能富集分析

GO 功能富集分析结果显示,1 681 条差异表达基因富集到了 285 个功能条目下。 $P < 0.01$ 的 35 个条目的 GO 分类结果显示,在分子功能中,差异表达基因仅富集到转运活性和跨膜转运蛋白活性这 2 个条目中;在细胞组分中,差异表达基因富集到细胞膜固有组分和细胞膜组成部分这 2 个条目中的数量最多,均为 339 个;在生物学过程中,微管进程是差异表达基因最显著富集的条目,其次是细胞或亚细胞组分运动、微管运动、组织细胞投影等条目 (图 1),表明低氧胁迫对青杨天牛的跨膜转运蛋白活性、细胞或亚细胞组分运动、微管运动等影响较大。

在常氧对照组与 7% 氧浓度处理组的差异表达

基因中,分别有 339、991 和 179 个 unigenes 注释到生物学过程、细胞组分和分子功能,且在这 3 大类中差异表达基因的富集趋势与总差异表达基因的富集趋势相似,即在生物学过程中,参与细胞或亚细胞组分运动和微管运动的差异表达基因数较多;在细胞组分中,参与细胞膜组成部分和细胞膜固有组分的差异表达基因数最多,均为 312 个;在分子功能中,差异表达基因仅富集到转运活性和跨膜转运蛋白活性这 2 个功能条目中,差异表达基因数分别为 90 个和 89 个。常氧对照组和 14% 氧浓度处理组的差异表达基因及 14% 氧浓度处理组和 7% 氧浓度处理组的差异表达基因均未见显著富集。

2.6 低氧胁迫下差异表达基因的代谢通路富集分析

在富集程度排名前 20 的通路中,氮代谢、蛋白质消化吸收及昼夜节律通路显著富集,环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 信号通路、蛋白质消化吸收、胰腺分泌和辅因子生物合成等通路中富集到的差异表达基因数较多,这些通路可能参与了青杨天牛在耐低氧过程中的能量代谢、低氧信号传导和环境信息处理等过程 (图 2)。

14% 氧浓度处理组和 7% 氧浓度处理组的差异表达基因在蛋白质消化吸收、胰腺分泌、昼夜节律、多巴胺能突触、肾素分泌和促性腺激素释放激素信号通路等生物系统通路显著富集。常氧对照组和 7% 氧浓度处理组的差异表达基因仅在氮代谢和昼夜节律 2 条 KEGG 通路显著富集,此外还有 6 个差异表达基因在低氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 信号通路富集。常氧对照组和 14% 氧浓度处理组的差异表达基因未见显著富集。表明低氧胁迫程度不同可能激活的生物学反应和代谢途径也不同。

2.7 低氧胁迫下青杨天牛差异表达基因的验证

qPCR 检测结果显示,14% 氧浓度处理后青杨天牛体内 *PLA₁* 和 *LCP22* 基因相对表达量较对照上调, *Hc*、*PTSP* 和 *OR59a* 基因相对表达量较对照下调;7% 氧浓度处理后青杨天牛体内 *Hc*、*PLA₁* 和 *LCP22* 基因相对表达量较对照上调, *PTSP* 和 *OR59a* 基因相对表达量较对照下调,这 5 个差异表达基因的 qPCR 检测结果与转录组测序结果的表达水平变化趋势基本相同 (图 3),说明转录组测序数据可靠。

3 讨论

当氧浓度较低时,需氧生物会减慢代谢速度来满足该环境胁迫下所需的能量 (Zhou & Haddad,

2013)。如面临低氧胁迫时,赤拟谷盗会增强糖酵解与无氧呼吸,抑制有氧呼吸,进而导致己糖激酶、醛缩酶和甘油酸-3-磷酸脱氢酶基因表达上调(王磊, 2019)。本研究结果显示,在低氧状态下青杨天牛幼虫体内大量与代谢相关基因的表达与常氧状态下(对照)有差异,推测青杨天牛幼虫通过降低其合成代谢功能和增强无氧代谢——糖酵解通路来平衡虫体在低氧胁迫下的能量需求与消耗。低氧还会导致生物有机体免疫下降,进而降低其抵抗病原体的能力(田云梅等, 2010)。本研究的KEGG代谢通路富集结果显示,在低氧胁迫下青杨天牛幼虫的多个差异表达基因与免疫相关,表明在低氧状态下青杨天牛幼虫的免疫反应可能受到影响。此外,低氧也会影响青杨天牛幼虫的运动状态。如韦美泽(2020)研究发现在10%氧浓度下光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis* 爬行速率变慢,而2%氧浓度胁迫20 min后光肩星天牛运动静止。本研究通过GO功能富集分析筛选到细胞或亚细胞组分运动、微管运动、纤毛

运动等多个调控躯体运动的GO term,说明低氧状态可能对青杨天牛幼虫的运动有影响。

大量研究显示,在缺氧情况下机体会使得L型电压依赖性钙离子通道(voltage dependent calcium channel, VDCC)过度开放,大量Ca²⁺进入细胞激活蛋白激酶系统,进而引起神经元兴奋,从而导致细胞凋亡(Tang et al., 2017; Shen et al., 2018)。cAMP/PKA是一种调控细胞生物活动的环核苷酸系统,该通路对VDCC有调节作用,PKA可以促进VDCC磷酸化,使L型VDCC中的 *Cav1.3* 基因上调(Lapied et al., 2017);此外当神经元中L型VDCC被PKA激活后,VDCC能对胞外钙离子内流和神经元胞吐作用产生一定影响(Louiset et al., 2017)。本研究的KEGG代谢通路富集结果显示,富集到cAMP信号通路的unigenes数量最多,推测面临低氧胁迫时青杨天牛幼虫cAMP信号通路可能通过上调L型VDCC中的 *Cav1.3* 改变VDCC的活性,进而对青杨天牛幼虫产生神经保护作用。

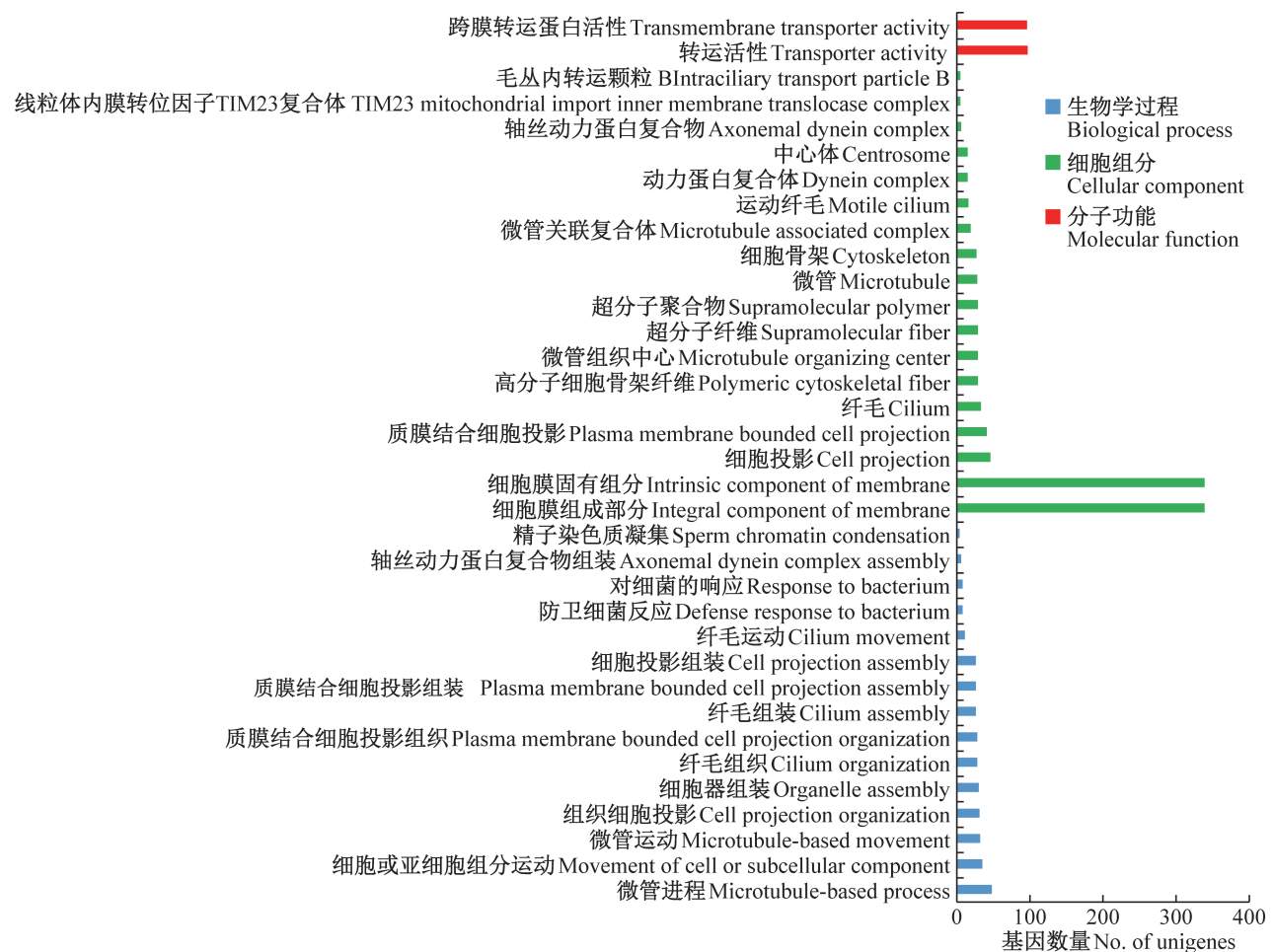


图1 低氧胁迫下青杨天牛差异表达基因的GO功能富集分类

Fig. 1 GO functional enrichment classification of differentially expressed genes of *Saperda populnea* under hypoxic stress

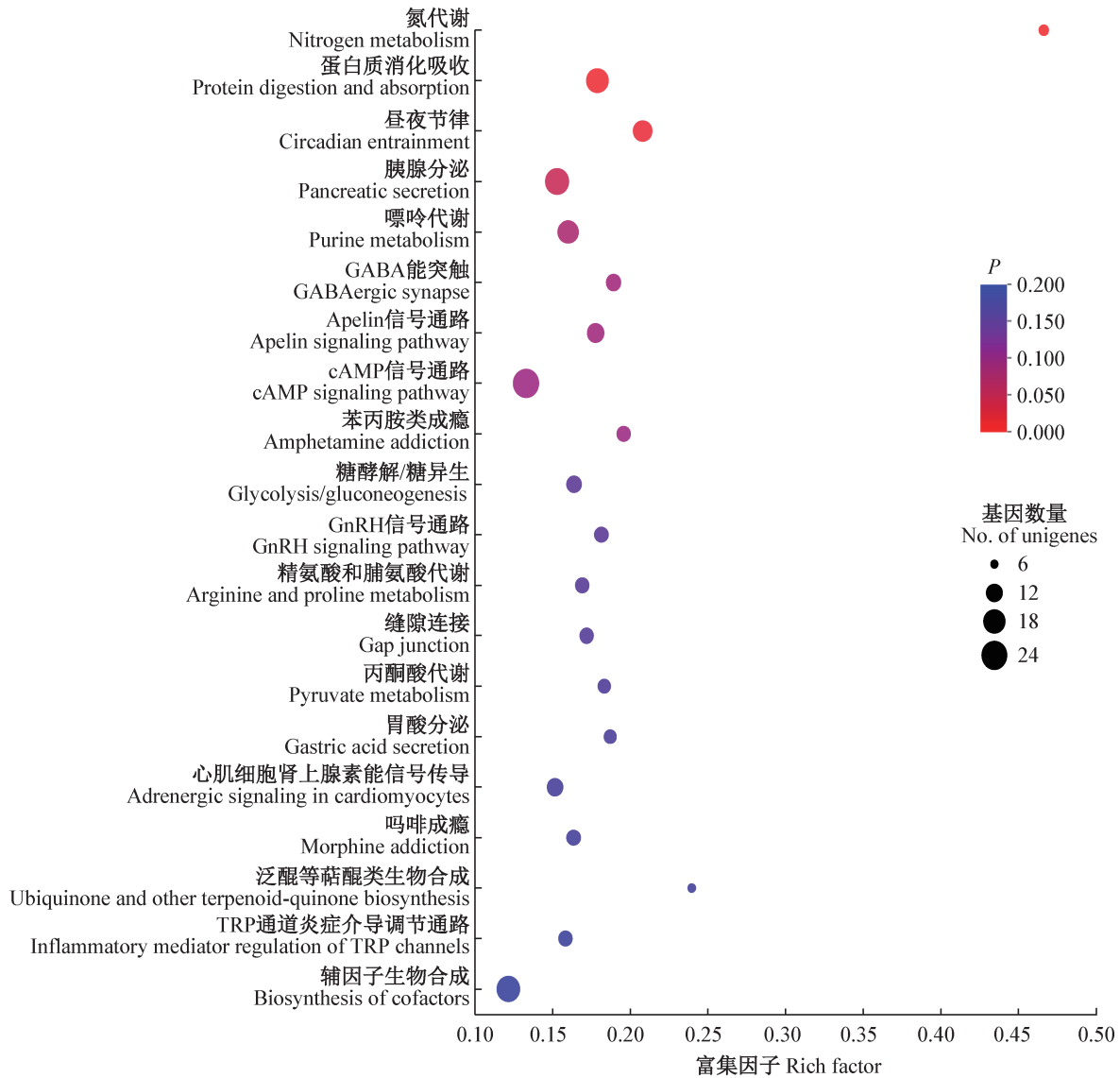


图2 低氧胁迫下青杨天牛差异表达基因前20名的KEGG代谢通路

Fig. 2 KEGG pathways of the top 20 differentially expressed genes of *Saperda populnea* under hypoxic stress

HIF是低氧条件下生物转录应答的关键调控因子,其在调节葡萄糖代谢、细胞增殖以及气管重塑等相关蛋白表达方面扮演着重要角色(Kim et al., 2006)。HIF-1 α 仅在细胞或组织暴露于极低的氧水平时才稳定,如在1.0%氧浓度下,秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 体内 HIF β 同源基因和 HIF-1 α 基因产物会形成一种类似于哺乳动物缺氧诱导因子的复合物,这使得秀丽隐杆线虫可以适应极低的氧气水平(Jiang et al., 2001);当氧浓度为1%~5%时会诱导黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 体内 HIF-1 α 同源基因表达,进而使其在极端低氧环境下存活(Gorr et al., 2006)。而低氧胁迫(13 kPa 氧分压)后东亚飞蝗胸部肌肉组织中 HIF-1 α 及其大多数

靶基因的表达未发生显著变化,表明4 km 高度缺氧还不足以诱导蝗虫肌肉中 HIF-1 α 和 HIF 靶基因的显著表达(Zhao et al., 2012)。HIF可能在缺氧后的再氧合过程中有重要作用,如Deng et al.(2018)研究表明,橘小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 体内 HIF-1 α 在缺氧恢复的早期阶段具有诱导性。在常氧对照组与7%氧浓度处理组的青杨天牛差异表达基因中,仅有6个差异表达基因富集到了HIF-1信号通路,且表达水平均不高,而在常氧对照组与14%氧浓度处理组的青杨天牛差异表达基因没有富集到该通路,推测在7%氧浓度以上的低氧环境下,HIF信号通路可能对青杨天牛幼虫不是必需的,该通路可能在特定范围的低氧浓度下才发挥作用。

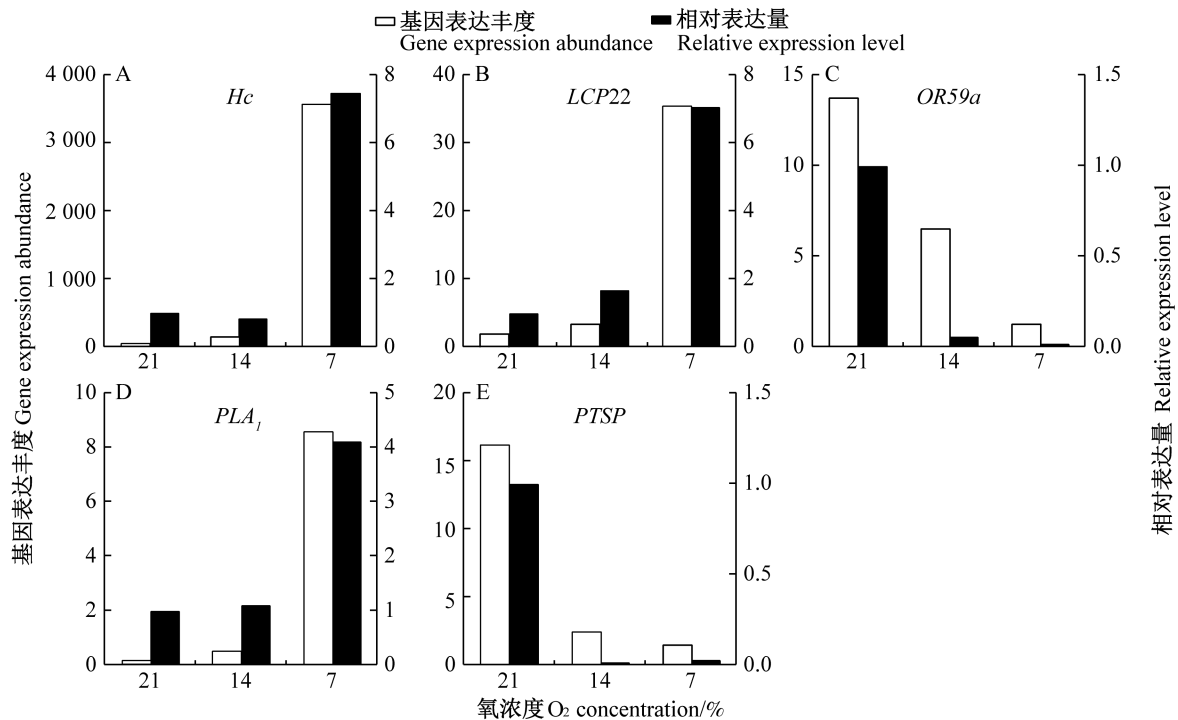


图3 低氧胁迫下青杨天牛差异表达基因的转录组测序结果与qPCR检测结果比较

Fig. 3 Comparison of the RNA-seq and qPCR results for differentially expressed genes in *Saperda populnea* under hypoxic stress

本研究选取了可能与青杨天牛幼虫抗低氧胁迫有关的 *Hc*、*PTSP*、*OR59a*、*PLA₁* 和 *LCP22* 五个显著差异表达基因进行 qPCR 验证, 结果表明转录组测序数据准确可靠。其中 *Hc* 的表达趋势有细微差异, 可能是因为 qPCR 检测与转录组试验时间间隔较长, 对保存的 RNA 样品造成了一些影响。*Hc* 是一种具有氧结合特性的呼吸蛋白, 能起到运输和储存氧气的作用, 在不完全变态昆虫中广泛存在(杜前丽等, 2021), Chen et al. (2017) 研究表明该蛋白与环境可获得氧有关, 在低氧环境下培养的东亚飞蝗胚胎内 *Hc* 基因表达量显著上调。本研究结果显示, 与常氧环境相比, 7% 氧浓度处理下青杨天牛幼虫 *Hc* 基因表达量显著上调, 表明在低氧环境下青杨天牛幼虫可能通过提高 *Hc* 表达来满足氧气供应需求。*PTSP* 是一种昆虫脑神经肽, 对前胸腺蜕皮激素合成有强烈的抑制作用, 从而延缓昆虫变态发育历程(刘新等, 2002), 如刘天生(2017)研究发现在低氧环境下培养的小菜蛾 *Plutella xylostella* 第 1 代各发育历期均明显变短, 但随着繁殖代数增加各发育历期会逐渐变长。本研究结果显示, 与常氧环境相比, 2 个低氧处理组中 *PTSP* 基因的表达量均显著下调, 推测在短时间低氧胁迫下青杨天牛幼虫体内 *PTSP* 对蜕皮激素合成的抑制作用降低, 进而可能使其变态发育历程缩短。

本研究发现常氧对照组和 14% 氧浓度处理组的差异表达基因数量最少, 且远远低于 7% 氧浓度胁迫后的差异表达基因数量, 推测这可能是青杨天牛幼虫对 14% 氧浓度的低氧胁迫敏感度较低所致。常氧对照组与 14% 氧浓度处理组和常氧对照组与 7% 氧浓度处理组的差异表达基因有重合, 如编码还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(reduced nicotinamide adenine dinucleotide, NADH)脱氢酶亚基 1、抑前胸腺肽和腺苷脱氨酶等的基因, 表明这些基因可能在青杨天牛幼虫适应低氧过程中起到重要作用, 下一步可以探究这些重合差异表达基因的功能。

参考文献 (References)

- Bernardo U, Iodice L, Sasso R, Pedata PA. 2008. Effects of cold storage on *Thripobius javae* (= *T. semiluteus*) (Hymenoptera: Eulophidae). *Biocontrol Science and Technology*, 18(9): 921-933
- Boardman L, Mitchell KA, Terblanche JS, Sørensen JG. 2018. A transcriptomics assessment of oxygen-temperature interactions reveals novel candidate genes underlying variation in thermal tolerance and survival. *Journal of Insect Physiology*, 106: 179-188
- Chen B, Ma R, Ding D, Wei L, Kang L. 2017. Aerobic respiration by haemocyanin in the embryo of the migratory locust. *Insect Molecular Biology*, 26(4): 461-468
- Cui SF, Wang L, Qiu JP, Liu ZC, Geng XQ. 2017. Comparative metabolomics analysis of *Callosobruchus chinensis* larvae under

- hypoxia, hypoxia/hypercapnia and normoxia. *Pest Management Science*, 73(6): 1267–1276
- Deng YF, Hu F, Ren LL, Gao XW, Wang YJ. 2018. Effects of anoxia on survival and gene expression in *Bactrocera dorsalis*. *Journal of Insect Physiology*, 107: 186–196
- Du QL, Huang XL, Chen B. 2021. Progress in research on the function of insect hemocyanin. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 58(4): 755–763 (in Chinese) [杜前丽, 黄贤亮, 陈兵. 2021. 昆虫血蓝蛋白功能研究进展. *应用昆虫学报*, 58(4): 755–763]
- Eken C, Tozlu G, Dane E, Çoruh S, Demirci E. 2006. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hypomycetes) to larvae of the small poplar longhorn beetle, *Saperda populnea* (Coleoptera: Cerambycidae). *Mycopathologia*, 162(1): 69–71
- Etebari K, Palfreyman RW, Schlipalius D, Nielsen LK, Glatz RV, Asgari S. 2011. Deep sequencing-based transcriptome analysis of *Plutella xylostella* larvae parasitized by *Diadegma semiclausum*. *BMC Genomics*, 12: 446
- Gao CL, Ren LL, Wang M, Wang ZT, Fu NN, Wang HY, Wang XC, Ao TG, Du WS, Zheng ZJ, et al. 2021. Proteo-transcriptomic characterization of *Sirex nitobei* (Hymenoptera: Siricidae) venom. *Toxins*, 13(8): 562
- Garcia PV, Pereira N, Oliveira LM. 2009. Side-effects of organic and synthetic pesticides on cold-stored diapausing prepupae of *Trichogramma cordubensis*. *BioControl*, 54(3): 451–458
- Georgiev G, Ljubomirov T, Raikova M, Ivanov K, Sakalian V. 2004. Insect inhabitants of old larval galleries of *Saperda populnea* (L.) (Coleoptera: Cerambycidae) in Bulgaria. *Journal of Pest Science*, 77(4): 235–243
- Gleixner E, Ripp F, Gorr TA, Schuh R, Wolf C, Burmester T, Hankeln T. 2016. Knockdown of *Drosophila* hemoglobin suggests a role in O₂ homeostasis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 72: 20–30
- Gorr TA, Gassmann M, Wappner P. 2006. Sensing and responding to hypoxia via HIF in model invertebrates. *Journal of Insect Physiology*, 52(4): 349–364
- Hoback WW, Podrabsky JE, Higley LG, Stanley DW, Hand SC. 2000. Anoxia tolerance of con-familial tiger beetle larvae is associated with differences in energy flow and anaerobiosis. *Journal of Comparative Physiology B*, 170(4): 307–314
- Imai T, Fukazawa N. 2012. Susceptibility of the cigarette beetle *Lasioderma serricorne* (Coleoptera: Anobiidae) to hypoxia. *Applied Entomology and Zoology*, 47(4): 429–432
- Jiang H, Guo R, Powell-Coffman JA. 2001. The *Caenorhabditis elegans* *hif-1* gene encodes a bHLH-PAS protein that is required for adaptation to hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(14): 7916–7921
- Kharel K, Mason LJ, Murdock LL, Baributsa D. 2019. Efficacy of hypoxia against *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) throughout ontogeny. *Journal of Economic Entomology*, 112(3): 1463–1468
- Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. 2006. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metabolism*, 3(3): 177–185
- Lapied B, Defaix A, Stankiewicz M, Moreau E, Raymond V. 2017. Modulation of low-voltage-activated inward current permeable to sodium and calcium by DARPP-32 drives spontaneous firing of insect octopaminergic neurosecretory cells. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 11: 31
- Li YF, Dong DB, Guo KK, Deng CP, Wang HX. 2015. Mating, incision and oviposition of *Saperda populnea*. *Forest Pest and Disease*, 34(3): 27–29 (in Chinese) [李永福, 董德北, 郭康康, 邓彩萍, 王海香. 2015. 青杨天牛成虫交配刻槽产卵习性初步研究. *中国森林病虫*, 34(3): 27–29]
- Li YS, Du XH, Zhang ZX, Cai DX. 2021. Comparative analysis of transcriptomes of male adult, pupa and the 4th-instar larva of the oriental peach moth *Grapholita molesta*. *Journal of Plant Protection*, 48(6): 1320–1330 (in Chinese) [李亦松, 杜兴辉, 张子旭, 蔡登鑫. 2021. 梨小食心虫雄成虫、蛹和幼虫的转录组比较分析. *植物保护学报*, 48(6): 1320–1330]
- Liu TL, Ji YL, Liu YX, Wu XF, Chen FF, Liu X. 2021. Study on the adaptive mechanisms of five plants to high-altitude light based on transcriptome sequencing in Maidica wetland of Tibet. *Plant Science Journal*, 39(6): 632–642 (in Chinese) [刘泰龙, 姬亚丽, 刘怡萱, 吴玄峰, 陈飞飞, 刘星. 2021. 基于转录组测序探讨西藏麦地卡湿地5种植物对高海拔光照的适应机制. *植物科学学报*, 39(6): 632–642]
- Liu TS. 2017. Responses of the diamondback moth, *Plutella xylostella*, to oxygen stress. Master thesis. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University (in Chinese) [刘天生. 2017. 氧胁迫对小菜蛾的影响. 硕士学位论文. 福州: 福建农林大学]
- Liu X, Hua YJ, Xu BJ, Tanaka Y. 2002. *In vivo* activity of prothoracostatic peptide in the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Entomologica Sinica*, 45(3): 301–306 (in Chinese) [刘新, 华跃进, 徐步进, 田中良明. 2002. 抑前胸腺肽在家蚕体内的活性作用. *昆虫学报*, 45(3): 301–306]
- Louiset E, Duparc C, Lenglet S, Gomez-Sanchez CE, Lefebvre H. 2017. Role of cAMP/PKA pathway and T-type calcium channels in the mechanism of action of serotonin in human adrenocortical cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 441: 99–107
- Lu YH, Yu FB, Guo JW, Tian JC, Zheng XS, Lü ZX. 2021. Analysis of transcriptomic differences between winged and wingless bird cherry-oat aphid *Rhopalosiphum padi* on wheat. *Journal of Plant Protection*, 48(6): 1303–1309 (in Chinese) [鲁艳辉, 虞飞博, 郭嘉雯, 田俊策, 郑许松, 吕仲贤. 2021. 有翅型和无翅型小麦禾谷缢管蚜转录组差异分析. *植物保护学报*, 48(6): 1303–1309]
- Murdock LL, Margam V, Baoua I, Balfe S, Shade RE. 2012. Death by desiccation: effects of hermetic storage on cowpea bruchids. *Journal of Stored Products Research*, 49: 166–170
- Shen CP, Romero M, Brunelle A, Wolfe C, Dobyns A, Francis M, Taylor MS, Puglisi JL, Longo LD, Zhang LB, et al. 2018. Long-term high-altitude hypoxia influences pulmonary arterial L-type calcium channel-mediated Ca²⁺ signals and contraction in fetal and adult sheep. *American Journal of Physiology-Regulatory, In-*

- tegrative and Comparative Physiology, 314(3): 433–446
- Suo LLM. 2018. Analysis on occurrence regularity and control measures of *Saperda populnea* in Tibet Autonomous Region. Tibet Science and Technology, (10): 67–68 (in Chinese) [索朗拉姆. 2018. 西藏自治区青杨天牛发生规律及防治对策分析. 西藏科技, (10): 67–68]
- Tang JQ, Li N, Chen XY, Gao QQ, Zhou XW, Zhang YY, Liu BL, Sun MA, Xu ZC. 2017. Prenatal hypoxia induced dysfunction in cerebral arteries of offspring rats. Journal of the American Heart Association, 6(10): e006630
- Tian YM, Nie HJ, Liu JY, Zan JP, Zhang YK, Zhang DX, Wang H. 2010. Study of hypoxia-induced immune injury and its intervention measure. Chinese Journal of Applied Physiology, 26(4): 404–410 (in Chinese) [田云梅, 聂鸿靖, 刘嘉瀛, 管俊平, 张延坤, 张东祥, 汪海. 2010. 高原低氧免疫损伤及其干预措施的研究. 中国应用生理学杂志, 26(4): 404–410]
- VandenBrooks JM, Munoz EE, Weed MD, Ford CF, Harrison MA, Harrison JF. 2012. Impacts of paleo-oxygen levels on the size, development, reproduction, and tracheal systems of *Blatella germanica*. Evolutionary Biology, 39(1): 83–93
- Wallin H, Kvamme T, Bergsten J. 2017. To be or not to be a subspecies: description of *Saperda populnea lapponica* ssp. n. (Coleoptera, Cerambycidae) developing in downy willow (*Salix lapponum* L.). ZooKeys, (691): 103–148
- Wang FW, Pi ZQ, Gao LJ, Chen YH, Cheng B, Li XY. 2001. Study on *Saperda populnea* harming *Populus xiao zhuarica* cv. 'Baicheng'. Forest Research, 14(6): 653–656 (in Chinese) [王福维, 皮忠庆, 高立军, 陈域横, 程彬, 李晓颖. 2001. 青杨楔天牛对杨树危害的研究. 林业科学研究, 14(6): 653–656]
- Wang HX, Tao M, Ji KX, Hao WG, Wang HW. 2017. Seasonal differences in the physiological activity and mating behaviour of *Saperda populnea* Linnaeus. Chinese Journal of Applied Entomology, 54(3): 462–467 (in Chinese) [王海香, 陶敏, 姬凯茜, 郝文贵, 王宏伟. 2017. 不同时期青杨楔天牛生理活性及交配特征的研究. 应用昆虫学报, 54(3): 462–467]
- Wang L. 2019. Response mechanisms of *Tribolium castaneum* and *Callosobruchus maculatus* exposure to hypoxia/hypercapnia, eBeam and methyl benzoate. PhD thesis. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University (in Chinese) [王磊. 2019. 赤拟谷盗和四纹豆象对低氧/高二氧化碳、电离辐照和苯甲酸甲酯的响应机制. 博士学位论文. 上海: 上海交通大学]
- Wei MZ. 2020. Study on the hypoxia adaptability of *Anoplophora glabripennis* in northern China. Master thesis. Beijing: Beijing Forestry University (in Chinese) [韦美泽. 2020. 中国北方光肩星天牛的低氧适应性研究. 硕士学位论文. 北京: 北京林业大学]
- Yuan JW, Qin J, Wei R, Xie HF, Du YZ. 2021. Transcriptome analysis of responses of western flower thrips *Frankliniella occidentalis* to high and low temperature stresses. Journal of Plant Protection, 48(6): 1400–1410 (in Chinese) [袁嘉雯, 秦晶, 魏然, 谢洪芳, 杜予州. 2021. 西花蓟马对高低温胁迫响应的转录组分析. 植物保护学报, 48(6): 1400–1410]
- Zhang J, Xie WY, Dong MY, Fu LB. 2022. Identification and expression profiling of olfactory-related genes in *Saperda populnea*. Jiangsu Agricultural Sciences, 50(4): 23–28 (in Chinese) [张健, 谢婉莹, 董曼羽, 付立波. 2022. 青杨天牛嗅觉相关基因的鉴定及表达谱分析. 江苏农业科学, 50(4): 23–28]
- Zhang QL, Zhang L, Yang XZ, Wang XT, Li XP, Wang JA, Chen JY, Yuan ML. 2017. Comparative transcriptomic analysis of Tibetan *Gynaephora* to explore the genetic basis of insect adaptation to divergent altitude environments. Scientific Reports, 7: 16972
- Zhang YM, Zhu LL, Chen ZG. 2022. Identification and expression analysis of NHX gene family in quinoa under salt stress. Biotechnology Bulletin, 38(12): 184–193 (in Chinese) [张业猛, 朱丽丽, 陈志国. 2022. 藜麦NHX基因家族鉴定及盐胁迫下表达分析. 生物技术通报, 38(12): 184–193]
- Zhao DJ, Zhang ZY, Cease AJ, Harrison J, Kang L. 2013. Efficient utilization of aerobic metabolism helps Tibetan locusts conquer hypoxia. BMC Genomics, 14: 631
- Zhao DJ, Zhang ZY, Harrison J, Kang L. 2012. Genome-wide analysis of transcriptional changes in the thoracic muscle of the migratory locust, *Locusta migratoria*, exposed to hypobaric hypoxia. Journal of Insect Physiology, 58(11): 1424–1431
- Zhou D, Haddad GG. 2013. Genetic analysis of hypoxia tolerance and susceptibility in *Drosophila* and humans. Annual Review of Genomics and Human Genetics, 14: 25–43
- Zhou D, Xue J, Lai JCK, Schork NJ, White KP, Haddad GG. 2008. Mechanisms underlying hypoxia tolerance in *Drosophila melanogaster*: hairy as a metabolic switch. PLoS Genetics, 4(10): e1000221
- Zuo L, Yang J, Liu QY. 2004. Investigation on the occurrence and damage of *Saperda populnea* in Lhasa. Forest Pest and Disease, 23(5): 34–35 (in Chinese) [左力, 杨静, 刘清元. 2004. 青杨楔天牛在拉萨发生危害情况的初步调查. 中国森林病虫, 23(5): 34–35]

(责任编辑:张俊芳)