

龟纹瓢虫视蛋白基因 *pj-lw* 和 *pj-uv1* 的克隆及表达谱分析

葛亚菲 万岩然 胡雪娇 董丽萍 张煜人 王亚超 范 凡* 魏国树*

(河北农业大学植物保护学院, 保定 071000)

摘要: 为深入研究龟纹瓢虫 *Propylea japonica* 视蛋白在视觉系统中的作用, 从该虫头部转录组中筛选视蛋白基因进行序列测定及蛋白序列特征分析, 并运用实时荧光定量PCR技术分析其在龟纹瓢虫不同发育阶段及成虫不同组织中的表达谱。结果显示: 克隆得到龟纹瓢虫的长波敏感视蛋白基因和紫外敏感视蛋白基因序列 (GenBank 登录号分别为 PP356594 和 PP356595), 分别命名为 *pj-lw* 和 *pj-uv1*, 开放阅读框分别为 1 122 bp 和 1 089 bp, 分别编码 373 个和 362 个氨基酸, 均具有 7 个跨膜拓扑结构, 是典型的视觉蛋白。龟纹瓢虫的视蛋白 PJ-LW 和 PJ-UV1 分别与鞘翅目瓢甲科昆虫的视蛋白聚集在一个分支, 具有高度保守性。龟纹瓢虫 *pj-lw* 和 *pj-uv1* 基因主要在成虫期表达, 其表达量均在雌成虫体内最高, 分别是雄成虫体内表达量的 1.18 倍和 1.20 倍; 且均在成虫头部高表达。表明视蛋白基因在龟纹瓢虫成虫视觉系统中具有重要作用, 头部和复眼是其发挥视觉功能的关键部位。

关键词: 龟纹瓢虫; 视蛋白基因; 基因克隆; 序列分析; 表达分析

Molecular cloning and expression profiling of opsin genes *pj-lw* and *pj-uv1* in the ladybird *Propylea japonica*

Ge Yafei Wan Yanran Hu Xuejiao Dong Liping Zhang Yuren Wang Yachao Fan Fan* Wei Guoshu*

(College of Plant Protection, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei Province, China)

Abstract: To further investigate the role of opsins in the visual system of the ladybird *Propylea japonica*, opsin genes were identified from the head transcriptome, and protein sequences were analyzed. The expression profiles of the opsin genes in different developmental stages and adult tissues were analyzed using real-time quantitative PCR. The results indicated that the long wavelength-sensitive opsin gene and ultraviolet-sensitive opsin gene (GenBank accession numbers PP356594 and PP356595, respectively) of *P. japonica* were successfully cloned and named *pj-lw* and *pj-uv1*, respectively. The open reading frames of *pj-lw* and *pj-uv1* were 1 122 bp and 1 089 bp, encoding 373 and 362 amino acids, respectively, with seven transmembrane topological domains, indicating they are typical visual proteins. Phylogenetic analysis showed that PJ-LW and PJ-UV1 of *P. japonica* clustered in the same branch as opsins from other species in Coccinellidae, showing high conservation. The *pj-lw* and *pj-uv1* genes were mainly expressed in the adult stage of *P. japonica*, with expression levels highest in adult female (1.18-fold and 1.20-fold higher than in adult males, respectively). Both genes were most highly expressed in the adult head. These findings suggest that the opsin genes play an essential role in the visual system of *P. japonica*, with the head and compound eyes being the key regions for visual function.

Key words: *Propylea japonica*; opsin gene; gene cloning; sequence analysis; expression analysis

基金项目: 国家现代农业产业技术体系(CARS-24-C-02)

* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: auhff@hotmail.com, weiguoshu03@aliyun.com

收稿日期: 2024-02-23

龟纹瓢虫 *Propylea japonica* 属于鞘翅目瓢虫科,主要分布在中国、俄罗斯、日本、朝鲜以及印度等国家(桂承明和曹义山,1984;刘鹏远,2020)。其幼虫、成虫均可捕食多种蚜虫、粉蚧、飞虱和叶蝉等半翅目害虫的若虫、成虫及一些鳞翅目害虫的卵、低龄幼虫等,是棉田、玉米田、蔬菜田、果园以及林地等的重要优势捕食性天敌昆虫(张世泽等,2004;刘鹏远,2020;周军辉等,2020),也是我国农业害虫中种群数量较大的天敌昆虫之一,具有良好的生物防治应用前景。因此,深入研究龟纹瓢虫视蛋白在视觉系统中的作用,揭示龟纹瓢虫的视觉机制,对制订科学、合理的天敌保护措施具有重要意义。

趋光性是昆虫在长期进化过程中形成的固有行为习性(徐练,2016;桑文等,2019)。害虫综合防治中的物理灯光及色板防治就是基于昆虫的趋光行为而开发应用的(李智深等,2013;李超峰等,2019)。复眼是昆虫感受外界光环境的主要视觉器官,其在定位寄主、寻找配偶、取食、交配和学习记忆等方面发挥着重要作用(Leonard et al., 2010; 沈颖等, 2012; 刘军和和赵紫华, 2017)。昆虫视觉的形成主要是通过复眼中光感受器接收、整合和高阶大脑处理来完成的。视蛋白是光感受器中感光色素的核心成分,是具有7个跨膜结构区的G蛋白偶联受体超家族成员(Spaethe & Briscoe, 2004),根据光谱吸收范围分为紫外敏感视蛋白、蓝波敏感视蛋白及长波敏感视蛋白3种类型,分别对300~400、400~500、480~630 nm的波长范围最敏感(Briscoe & Chittka, 2001)。昆虫种类及生态位的多样性造就了昆虫视蛋白种类的多样性,如蝴蝶、蜻蜓中存在几种至几十种视蛋白基因;一些鞘翅目昆虫在长期进化过程中失去了短波视蛋白基因,如甲虫通过紫外敏感视蛋白基因或长波视蛋白基因的复制来扩大其光谱灵敏性(Sharkey et al., 2023)。

目前,鳞翅目的蝶类和蛾类(Frentiu et al., 2007; Perry et al., 2016; Chen et al., 2021)、膜翅目的蜜蜂(Leboulle et al., 2013; Wang et al., 2013)和双翅目的果蝇(Salcedo et al., 1999)等昆虫视觉系统的光传导分子机制研究较深入,而鞘翅目作为昆虫纲中最大的目,仅对赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 和杂拟谷盗 *T. confusum* 的视蛋白基因有所研究(Jackowska et al., 2007; 沈加飞, 2016),关于瓢甲科昆虫视觉基因的研究更少。因此,本研究对龟纹瓢虫视蛋白基因进行克隆、鉴定和生物信息学分析,测定其在龟纹瓢虫不同发育阶段、不同组织中的时空表达

谱,明确龟纹瓢虫长波敏感视蛋白和紫外敏感视蛋白基因的序列及表达特征,以期为深入了解龟纹瓢虫视蛋白在视觉系统中的作用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试虫源和植物:龟纹瓢虫成虫于2021年6月采自河北农业大学农科教学实习基地,置于温度(26±1)℃、相对湿度(70±5)%、光周期15 L:9 D的人工气候箱中用豆蚜 *Aphis craccivora* 和豌豆修尾蚜 *Megoura crassicauda* 饲养,取龟纹瓢虫卵、1~4龄幼虫、蛹、3日龄雌雄成虫供试。豆蚜和豌豆修尾蚜购自北京阔野田园生物科技有限公司,在温度(25±1)℃、相对湿度(60±5)%、光周期15 L:9 D的人工气候箱中以蚕豆苗饲养。蚕豆品种为云蚕一号,种子购自中蔬种业科技(北京)有限公司,在温室于25℃下培养10 d左右用于饲喂蚜虫。

培养基:LB(Luria-Bertani)液体培养基成分为胰蛋白胨10 g、酵母提取物5 g、氯化钠10 g,蒸馏水定容至1 L,5 mol/L氢氧化钠调节pH值至7.0;LB固体培养基即在LB液体培养基中加入15 g琼脂制得,121℃高压灭菌20 min,冷却至55℃以下加入5-溴-4-氯-3-吡啶-β-D半乳糖苷、异丙基硫代半乳糖苷和氨苄青霉素,以防失活。

试剂和仪器:RNAprep Pure Micro Kit,天根生化科技(北京)有限公司;M5 Sprint qPCR RT Kit with gDNA Remover、2×M5 Hiper Realtime PCR Super Mix with Low Rox、M5 Gel Extraction Kit、DL2000 DNA Marker 和大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α感受态细胞,北京聚合美生物科技有限公司; *pEASY*[®]-T1 克隆载体,北京全式金生物技术股份有限公司;2×Es Taq MasterMix,康为世纪生物科技有限公司;其余试剂均为国产分析纯。RXZ-300C人工气候箱,宁波江南仪器厂;CFX duet 荧光定量PCR仪,美国Bio-Rad公司;TC-96/G/H/(b)C PCR仪,杭州博日科技股份有限公司;SIGMA 3K15 台式冷冻离心机,德国Sigma(中国)有限公司;KAI AO K5600/C 超微量分光光度计,凯奥科技(北京)有限公司;Gel-View 5000 Plus 智能凝胶成像系统,广州博鹭腾生物科技有限公司;DYCP-31DN 琼脂糖水平电泳仪,北京六一生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 龟纹瓢虫视蛋白基因的克隆

选取健康的龟纹瓢虫成虫60头(不分雌雄),收

集头部作为样品,置于无RNA酶的离心管中,液氮处理后于-80℃保存备用。按照RNAprep Pure Micro Kit说明书提取龟纹瓢虫头部总RNA。使用1%琼脂糖凝胶电泳及超微量分光光度计检测RNA的完整性和浓度。以检测合格的总RNA样品为模板,使用M5 Sprint qPCR RT Kit with gDNA Remover获得cDNA第一链,-20℃保存备用。

根据本课题组前期所得龟纹瓢虫头部转录组数据,获得龟纹瓢虫的长波视蛋白基因和紫外敏感视蛋白基因序列,在NCBI网站进行比对鉴定。基于所得序列利用Primer Premier 5.0软件设计特异性引物 *pj-lw-F/pj-lw-R* 和 *pj-uv1-F/pj-uv1-R*(表1),引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,以头部cDNA为模板进行PCR扩增。25 μL反应体系:2×Es Taq MasterMix 12.5 μL、正反向引物各1 μL、cDNA模板1 μL、ddH₂O 9.5 μL。扩增条件:94℃预变性1 min;94℃变性30 s,55℃退火1 min,72℃延伸2 min,35个循环;72℃终延伸10 min,4℃终止反应。产物经1%琼脂糖凝胶电泳,用M5 Gel Extraction Kit切胶回收目的DNA片段,连接到*pEASY*[®]-T1克隆载体并转化到大肠杆菌DH5α感受态细胞中,于37℃在LB固体平板上培养过夜,挑取单克隆菌落,经菌液PCR检测后进行1%琼脂糖凝胶电泳。20 μL反应体系:2×Es Taq MasterMix 10 μL、M13正反向

引物各0.5 μL、菌液1 μL、ddH₂O 8 μL。扩增条件:94℃预变性5 min;95℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸1 min,30个循环;72℃终延伸10 min,4℃终止反应。选取阳性克隆菌液委托生工生物工程(上海)股份有限公司测序验证。

1.2.2 龟纹瓢虫视蛋白基因的序列分析

将1.2.1所得龟纹瓢虫视蛋白基因序列在NCBI进行BLAST比对(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>),分析其核苷酸序列的同源性。利用NCBI ORF finder在线程序(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)查找并翻译视蛋白基因的开放阅读框。利用ExPasy Prot-Param tool在线程序(<https://web.expasy.org/protparam/>)分析视蛋白的基本理化性质。利用SignalP 3.0软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/>)分析视蛋白的信号肽,利用TMHMM(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)工具预测其跨膜区。采用Predictprotein在线程序(<https://www.predictprotein.org/>)预测视蛋白的功能位点。通过PSIPRED 4.0软件(<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>)预测视蛋白的二级结构。将获得的龟纹瓢虫视蛋白氨基酸序列和从NCBI下载的鞘翅目、鳞翅目、双翅目16种昆虫的相关视蛋白氨基酸序列进行多序列比对,利用MEGA X软件以邻接法构建系统发育树,bootstrap设为1 000。

表1 本试验所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	引物长度 Primer length/bp	引物用途 Primer usage
<i>pj-lw-F</i>	GCAAACCTTAGCGACTACCT	20	基因克隆
<i>pj-lw-R</i>	ACATCGCCTTTAGTCACGTT	20	Molecular cloning
<i>pj-uv1-F</i>	CTTACAAAGCAGAGCGGTGG	20	
<i>pj-uv1-R</i>	TCAAGTTTGCAGATCATTACGCT	23	
<i>pj-lw-qF</i>	TCGGCGGTATCTCACAGTCGTAG	23	实时荧光定量PCR
<i>pj-lw-qR</i>	ACCCTAGAAGTCCGTGCCACAG	22	Real-time quantitative PCR
<i>pj-uv1-qF</i>	TTCGTGCGCATCTTGACACCTTATG	25	
<i>pj-uv1-qR</i>	GTACAGGCGGTATCATCGAAACTC	25	
<i>β-actin-F</i>	GTTACTCTTTCACCACCACA	20	
<i>β-actin-R</i>	GGGCAACGGAATCTTTT	17	

1.2.3 龟纹瓢虫视蛋白基因的表达量分析

收集不同发育阶段的龟纹瓢虫,其中,卵200粒,1~4龄幼虫分别为20、15、7和4头,蛹4头,3日龄雌雄成虫分别为4头和6头;同时收集3日龄雌雄成虫各60头,分别取其头、胸、腹3个部位组织。将收集的样品分别置于无RNA酶的离心管中,液氮处理后于-80℃保存备用。采用1.2.1方法提取各样品总RNA并合成cDNA。利用实时荧光定量PCR(re-

al-time quantitative PCR, RT-qPCR)技术检测龟纹瓢虫视蛋白基因的相对表达量。每个样品设3次生物学和3次技术重复。RT-qPCR特异性引物(表1)由生工生物工程(上海)股份有限公司设计并合成,以龟纹瓢虫 *β-actin* 为内参基因。20 μL反应体系:2×M5 HiPer Realtime PCR Super Mix with Low Rox 10 μL、ddH₂O 7 μL、上下游引物各1 μL、cDNA模板1 μL。反应程序:95℃预变性60 s;95℃变性15 s,

50 °C退火 15 s, 72 °C延伸 15 s, 共 40 个循环; 最后以每 5 s 升高 0.5 °C 的速度从 65 °C 升温到 95 °C, 记录熔解曲线, 采用荧光定量 PCR 仪进行数据分析, 应用 2^{-ΔΔCt} 法计算龟纹瓢虫视蛋白基因的相对表达量。

1.3 数据分析

利用 SPSS 26.0 软件对试验数据进行单因素方差分析, 采用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 龟纹瓢虫视蛋白基因的克隆和序列分析

以龟纹瓢虫头部的 cDNA 为模板, 利用特异性引物 *pj-lw-F/pj-lw-R* 和 *pj-uvl-F/pj-uvl-R* 对视蛋白

基因进行克隆, 所得基因的完整编码序列分别命名为 *pj-lw* 和 *pj-uvl* (GenBank 登录号分别为 PP356594 和 PP356595)。*pj-lw* 基因序列的完整开放阅读框全长 1 122 bp, GC 含量为 45.01%, 编码 373 个氨基酸 (图 1-A); *pj-uvl* 基因序列的完整开放阅读框全长 1 089 bp, GC 含量为 40.86%, 编码 362 个氨基酸 (图 1-B)。视蛋白 PJ-LW 和 PJ-UV1 均具有 7 个跨膜拓扑结构。PJ-LW 的氨基酸序列包含 3 个 N-糖基化位点, 4 个蛋白激酶 C 磷酸化位点, 4 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点, 5 个 N-豆蔻酰化位点, 1 个 G 蛋白偶联受体家族, 1 个视网膜结合位点 (图 1-A); PJ-UV1 的氨基酸序列包含 4 个蛋白激酶 C 磷酸化位点, 1 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点, 5 个 N-豆蔻酰化位点, 1 个 G 蛋白偶联受体家族 (图 1-B)。

```

A
1 ATGGGAGATCCGAGCTTTGTATCATGGTCCGCCCAAAGAGGTGGCAGCTTCGGCGGTAAT
1 M G D P S F V S W S A Q R [G G S F G G] N
61 CTCACAGTCGTAGACAAGGTCCTCTCTGACATGTCCACATGGTGACCACCACCTGGTAT
21 L T V V D K V L P D M L H M V H H W Y
121 CAGTTTCCACCAATGAACCCCTGTGGCAGCGACTTCTAGGGTTCATGATCGGTGTTTGG
41 Q F P P M N P L W H G L [L G F M I G V I]
181 GGCTTCGTTCCGTTGGTAATGGCATGTAATCAACATCTTTGCGGCGCTAAATCT
61 [G F V S V V G N] [G M V I N I] [F C G A K S]
241 TTGCGGACTCCTTCTACTGCTGGTGAATTTGGCTTTTCTGATTTCTGATGATG
81 [L R] T P S N [L L V V N L A F S D F L M M]
301 TTTACAATGGCGGCTCCGATGGTATCACTGCTACTATGAAACATGGTACTAGTCCCA
101 [F T M A A P M V I] N C Y Y E T W V L G P
361 CTATTTCGGAATCTATGGAATCTGGGTGACTTTTGGCTGTGCATCCGACGACC
121 L F C [E I Y] [G M F G S L] [F G C A S I W T]
421 ATGACITTCATCGCCCTGGATAGATATAACGTTATTGTCAAAGGATTAAGTCTCAACCT
141 [M T F I A L D R Y N Y I] V K G L S A Q P
481 CTCACAAAGAAAACAGCAATGCTCAGAATTTGATCATTTGGGCCATGCTGTGTGCTGG
161 L [T K K] T A M L R I L I I W A M S V A W
541 ACAATCGCACCTATGTTGGATGGAACAGGTACGTTCCAGAAGGAAACATGACAGCATG
181 [T I A P M F G W] N R Y V P E [G N M T A C]
601 GGAAGTGAATCACTCAACATGAGGAGCAAGCAAGCAATTTGGTGTATGCAAGCTC
201 G T D Y L T Q T W L S K S [Y I L V Y A V]
661 TTTGATATTTCTCTCTCTTTTCCAAATCATCTACTCTTATTGGTTCATGCTACAGGCT
221 [F V Y F L P L F T I I Y S Y W F] I V Q A
721 GTGTGTGCTCAGAAAATCCATGAGGAAACAGCAAGAAAATGAATGTGGCATCTTG
241 V C A H E K [S M R] E Q A K K M N V A [S L]
781 AGTCTTCTGAAGCTGCTCAAAAGGCGAGAATGCAAACTGGCTAAAATGGCTTGATG
261 [R] S S E A A Q T S A E C K L A K [I A L M]
841 ACCATCACCTTGTGGTCTTCGATGGACTCTTACCTCGTACAAAATCACTGGCATG
281 [T I T L W F F A W T P Y L V T N F T] [G T]
901 TTCGAAGTGCCAAAATAAGCCCGTTGGCAACCATCTGGTGTCTCTTTTCGTTAAAGCT
301 [F E G A] K I S P [L A T I W C S L F A K A]
961 AACGCTGTTTACAACCAATAGTTTATGGAATCAGCCATCCAAAATACAGACAAGAACTC
321 [N A V Y N P I V Y Y G I] S H P K Y R Q E L
1 021 CAAAAGAAATATCCATCCTTGGTATGTGTGCTCCACAGATGAAACAGCGCTGTGCAGCA
341 Q K K Y P S L V C A A P P D E T A S A A
1 081 TCTGGTGTACGAATGTGGAAGAAAACAAGTACCTGCATAA
361 S G A T N V E E K Q V P A *

```

```

B
1 ATGGAAGAACAGAAGTCTCCATCGACTAGGATGGAATGTTCTAAGGAAGAATAAAT
1 M E G T E V L H R L G W N V P K E E L I
61 CATATACAAGAACACTGGCTCCATTTACGGAACCACCAGCATCTATGCATTTTTTATTA
21 H I Q E H W L H F T E P P A S M H F L
121 GGTGGTATACATAGGTTCTTCTCATGGCAATATTGGAAACGGACTCGTACTTTGG
41 [G L V Y I G F F L M A I I G N G L V L W]
181 ATTTTTCGTCAGAAAAGCTTGGAGCAGCATCAACATGTTGCTAGTCAACCTGGCC
61 [I F S] [S A K] [S L R] T A S N M F [V V N L A]
241 TTTTGGGATTTTCATGATGCTGAAAACCCCAATTTTCATATAACAACCTCTTCTCAGA
81 [F C D F M M M L K T P I F I] Y N S F Y R
301 GGCTTTCGTTGGGCGAGTTTGGATGCCAGATATTTGCTTTATGGGCTCTCTTCTGGC
101 G F A L [G Q F G C Q] I F A F M [G S L S G]
361 ATGGTGTGGAATGACAAATGCTTTCATGCATACGATAGATATAACAATAAATAA
121 [I G A G M T N] A F I A Y D R Y T T I T K
421 CCATTCGATGGCAACTGACGAGAACCAAGCTTTTGAATAATTTGGGATATGGATT
141 P F D G K L T R T K A F V I I L G I W I
481 TATACAGTTCATGGGCTGTATTGCTCTAACTAGGTTTGGGGAAGTTTGGGCGAGG
161 [Y T V P W A V L P L T E V W] G R F G P E
541 GGTTTTTGACGGCTGTACCTCGATTATCTAACACAACGTTGCAATAAAATGTTT
181 G F L T A C T F D Y L T T T F D N K M F
601 GTTGGTCCATTTCTTTGCTCATACGATCCCAATGCAATGATCATATTTTACTAT
201 [V G A I F F C S Y C I P M S M I I F Y Y]
661 AGTAAAATAGTTAGTACTGTATTCAATCATGAGAAGGCTCTACGTGAACAGGCTAAA
221 [S K I V S T V F N H E K A L R E Q A K K]
721 ATGAACGTGGATCTTTACGAAAGTAAACAAAATCAAGGGAGTCAACAGCAGTACAGA
241 M N V D [S L R] S N Q N Q [G S Q T A E] V R
781 ATAGCGAAAGCAGCAATCACTATTGCTTTTATTGCTGCGATCTTGGACACCTTAGCT
261 I A K A A [I T I C F L F V A S W T P Y A]
841 GTTCTAGCCCTCATTTGGGCTTTTGGGATCAGAAATGCTTAACACCAAGAGTTTCGATG
281 [V L A L I G A F] G D G K L L T P G [V S M]
901 ATACCCGCTGTACGTGCAAGTTTGGGATGTTGGATCCTTACGTTTACGCTATCAGT
301 [I P A C T C K] F V A C L D P Y V Y A I S
961 CATCCAAGATACAGACAAGAACTGCAAAAAGGCTTCCATGTTAGCTATCAATGAACCT
321 H P R Y R Q E L Q K R L P W L A I N E P
1 021 GCCAAGACTAAATCTGTGGAACAGCTGCGTCCGCAATGAACAGAAATCAAGAACA
341 A E D T K S V [G T A A S T] N E Q N Q E Q
1 081 AAAGCGTAA
361 K A *

```

ATG 为起始密码子, TAA 为终止密码子标以*, 灰色背景所示为跨膜拓扑结构, 带点虚线所示为视网膜结合位点, 虚线所示为 G 蛋白偶联受体家族, 波浪线所示为 N-糖基化位点, 虚线框所示为蛋白激酶 C 磷酸化位点, 直线所示为酪蛋白激酶 II 磷酸化位点, 实线框所示为 N-豆蔻酰化位点。ATG is the start codon, an asterisk (*) indicates the stop codon TAA, transmembrane topology is outlined in gray background, the retinal binding site is shown in dotted lines, G-protein receptor family is indicated by dashed lines, N-glycosylation site is marked with wavy lines, protein kinase c phosphorylation site is shown in dashed frames, casein kinase II phosphorylation site is solid lines, N-myristoylation site is enclosed in solid boxes.

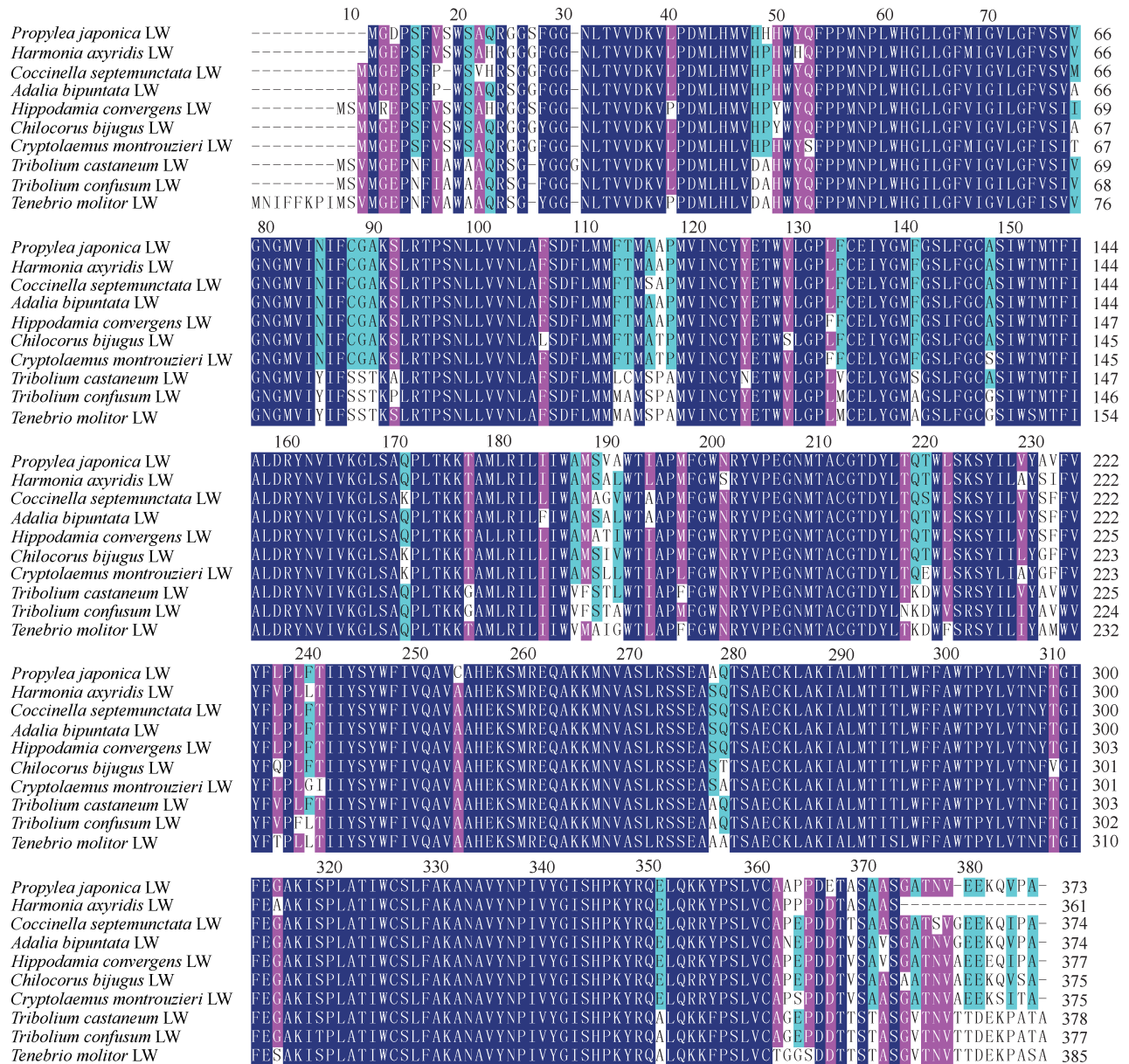
图 1 龟纹瓢虫 *pj-lw*(A) 和 *pj-uvl*(B) 基因的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *pj-lw* (A) and *pj-uvl* (B) genes of *Propylea japonica*

2.2 龟纹瓢虫视蛋白氨基酸序列比对及系统发育分析

龟纹瓢虫的PJ-LW与其他9种昆虫的长波敏感视蛋白氨基酸序列一致性均达80.00%以上,其中与二星瓢虫 *Adalia bipunctata* 和斑长足瓢虫 *Hippodamia convergens* 的长波敏感视蛋白氨基酸序列一致性最高,分别为90.44%和88.37%(图2)。龟纹瓢虫的PJ-UV1与其他9种昆虫的紫外敏感视蛋白氨基酸序列一致性均在58.00%以上,其中与七星瓢虫

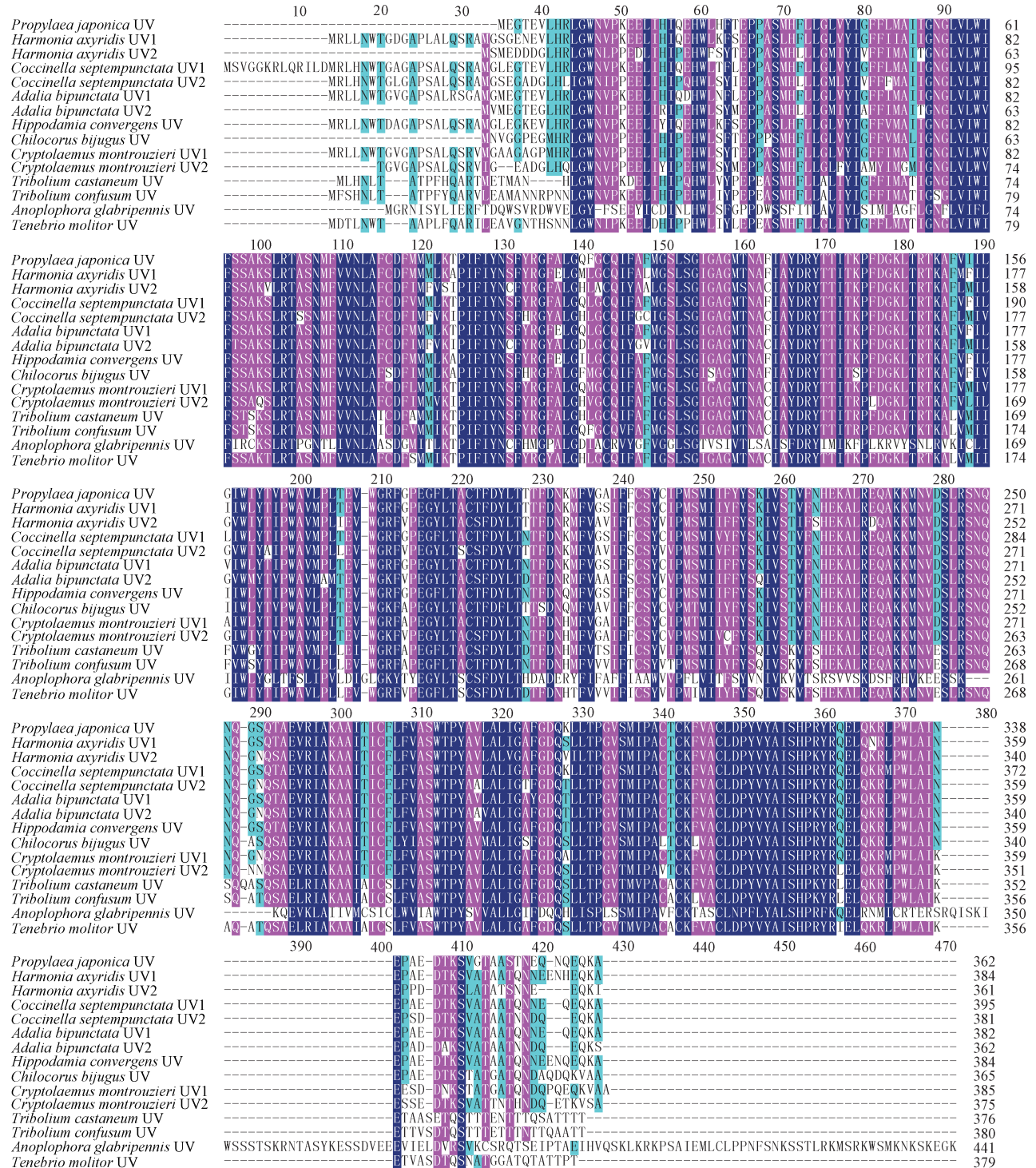
Coccinella septempunctata 和二星瓢虫的紫外敏感视蛋白氨基酸序列一致性最高,分别为72.03%和71.40%,仅与光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis* 的紫外敏感视蛋白氨基酸序列一致性较低,为25.85%(图3)。系统发育树显示,龟纹瓢虫的PJ-LW和PJ-UV1与鞘翅目的七星瓢虫、异色瓢虫 *Harmonia axyridis*、二星瓢虫、斑长足瓢虫聚在一个分支,而鳞翅目、双翅目、鞘翅目昆虫分属不同的分支(图4)。



Propylea japonica: 龟纹瓢虫; *Harmonia axyridis*: 异色瓢虫; *Coccinella septempunctata*: 七星瓢虫; *Adalia bipunctata*: 二星瓢虫; *Hippodamia convergens*: 斑长足瓢虫; *Chilocorus bijugus*: 二双斑唇瓢虫; *Cryptolaemus montrouzieri*: 孟氏隐唇瓢虫; *Tribolium castaneum*: 赤拟谷盗; *Tribolium confusum*: 杂拟谷盗; *Tenebrio molitor*: 黄粉虫。深蓝色、紫色、青绿色背景分别代表序列一致性为100%、75%和50%,虚线代表在比对氨基酸序列中不存在。Dark blue, purple and turquoise areas represent 100%, 75% and 50% sequence identity, respectively. The dotted line represents that the amino acid does not exist in alignment comparison.

图2 龟纹瓢虫与其他昆虫的长波敏感视蛋白氨基酸序列比对

Fig. 2 Comparison of long-wavelength (LW) sensitive opsin sequence of *Propylea japonica* and other insects



Propylea japonica: 龟纹瓢虫; *Harmonia axyridis*: 异色瓢虫; *Coccinella septempunctata*: 七星瓢虫; *Adalia bipunctata*: 二星瓢虫; *Hippodamia convergens*: 斑长足瓢虫; *Chilocorus bijugus*: 二双斑唇瓢虫; *Cryptolaemus montrouzieri*: 孟氏隐唇瓢虫; *Tribolium castaneum*: 赤拟谷盗; *Tribolium confusum*: 杂拟谷盗; *Tenebrio molitor*: 黄粉虫。深蓝色、紫色、青绿色背景分别代表序列一致性为 100%、75% 和 50%，虚线代表在比对氨基酸序列中不存在。Dark blue, purple and turquoise areas represent 100%, 75% and 50% sequence identity, respectively. The dotted line represents that the amino acid does not exist in alignment comparison.

图3 龟纹瓢虫与其他昆虫的紫外敏感视蛋白氨基酸序列比对

Fig. 3 Comparison of ultraviolet (UV) sensitive opsin sequences of *Propylea japonica* and other insects

2.3 龟纹瓢虫视蛋白基因的时空表达模式

龟纹瓢虫视蛋白基因主要在成虫期表达, *pj-lw* 和

pj-uv1 基因的相对表达量显著高于其他发育阶段, 且两者在雌成虫中的相对表达量均高于在雄成虫中的相

对表达量,分别为雄成虫中表达量的1.18倍和1.20倍,但两者无显著差异,而在卵期、幼虫期和蛹期的相对表达量很低(图5-A、C)。*pj-lw*和*pj-uv1*基因均在龟纹瓢虫雌、雄成虫头部的相对表达量最高,显著高于在其余组织中的相对表达量;在雌成虫中,*pj-lw*基因在头部的相对表达量分别为在胸部和腹部相对表达量的4 798.5倍和4 606.6倍,*pj-uv1*基因在头部的相对

表达量分别为在胸部和腹部相对表达量的977.5倍和312.8倍;在雄成虫中,*pj-lw*基因在头部的相对表达量分别为在胸部和腹部相对表达量的2 842.2倍和5343.4倍,*pj-uv1*基因在头部的相对表达量分别为在胸部和腹部相对表达量的221.6倍和150.7倍;这2个基因在龟纹瓢虫成虫胸部和腹部中的相对表达量很低,其表达均具有组织特异性(图5-B、D)。

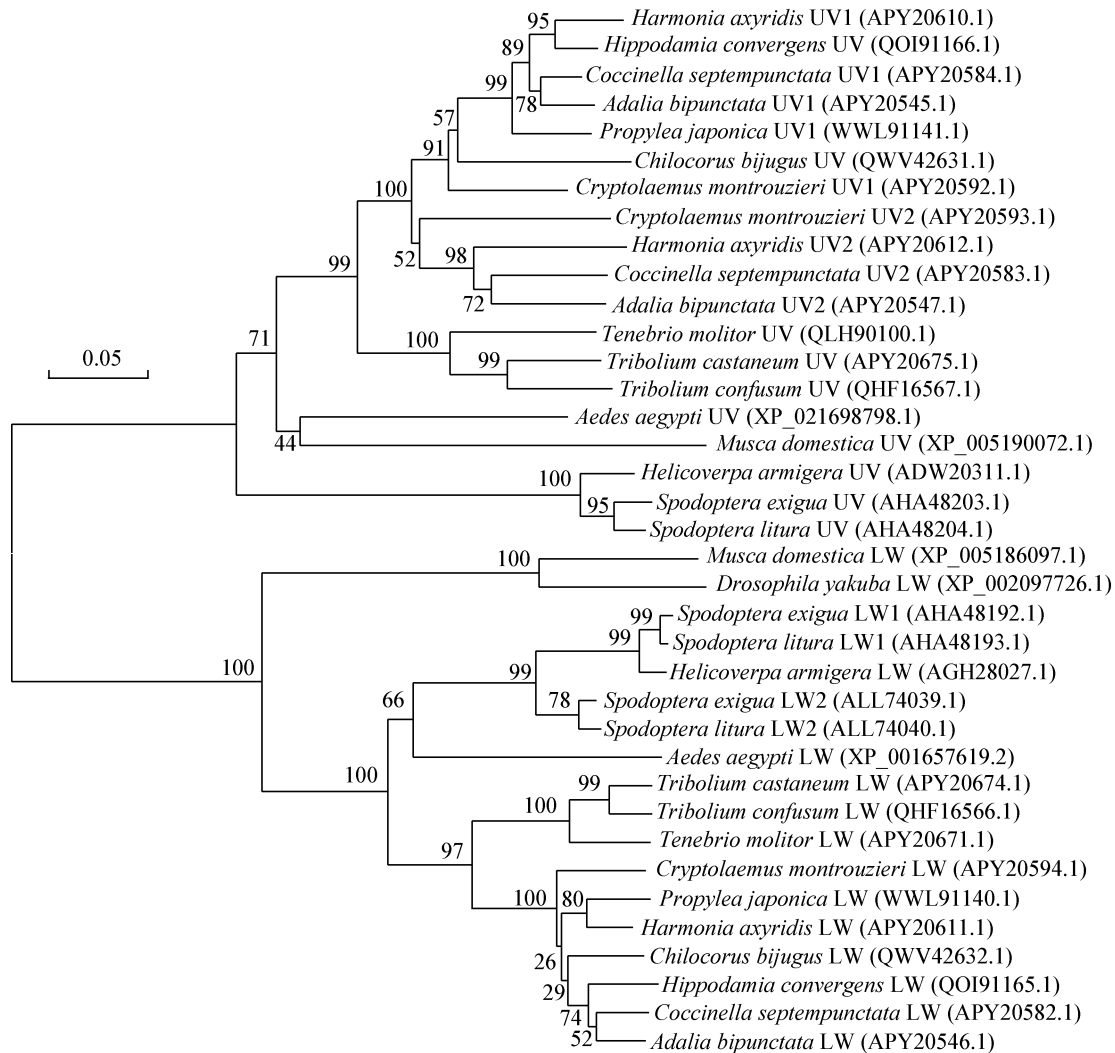


图4 采用邻接法构建龟纹瓢虫与其他昆虫视蛋白的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of opsins from *Propylea japonica* and other insects constructed using neighbor-joining method

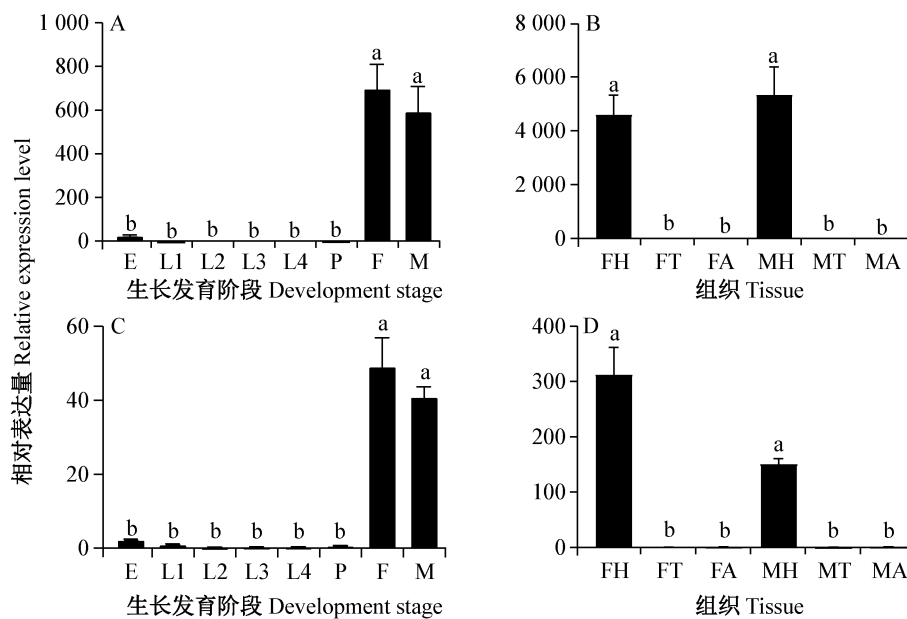
3 讨论

昆虫具有发达的视觉感受器官,视蛋白是昆虫趋光性的内在分子蛋白(段云等,2020)。本研究首次从龟纹瓢虫中克隆得到2个视蛋白基因*pj-lw*和*pj-uv1*,cDNA序列全长分别为1 122 bp和1 089 bp,分别编码373个和362个氨基酸。这与同属鞘翅目瓢虫科的异色瓢虫*Lw*基因编码361个氨基酸、七星瓢虫和二星瓢虫的*Lw*基因均编码374个氨基酸、异

色瓢虫*Uv1*和*Uv2*基因分别编码384个和361个氨基酸、七星瓢虫*Uv1*和*Uv2*基因分别编码395个和381个氨基酸、二星瓢虫*Uv1*和*Uv2*基因分别编码382个和362个氨基酸(Sharkey et al., 2017)的数量相似。同源性分析显示,龟纹瓢虫的2个视蛋白基因与其他鞘翅目瓢虫科昆虫的视蛋白基因具有很高的相似性,均达88.00%以上。龟纹瓢虫2个视蛋白序列分析结果显示,氨基酸序列中均包含7个跨膜拓扑结构和1个G蛋白偶联受体家族,是典型的视

蛋白结构特征(闫硕,2015)。还包含视蛋白中所具有的多个保守位点,如长波敏感视蛋白中具有N-糖基化位点、蛋白激酶C磷酸化位点、酪蛋白激酶II磷酸化位点、N-豆蔻酰化位点和视网膜结合位点;紫外敏感视蛋白中具有蛋白激酶C磷酸化位点、酪蛋白激酶II磷酸化位点和N-豆蔻酰化位点。在G蛋白偶联受体超家族中,视蛋白第7个跨膜拓扑结构上的赖氨酸残基K是绑定视网膜发色团的重要保守位点,以Schiff方式结合(Porter et al.,2012),其中G蛋白偶联受体的活化作用与长波敏感视蛋白147~148位和紫外敏感视蛋白133~134位的氨基酸基序

DR有关(Baldwin et al.,1997)。在长波敏感视蛋白和紫外敏感视蛋白中,细胞质膜第2个环内的147~149位和133~135位均含有1个保守氨基酸基序DRY(Franke et al.,1992);第3个环内的251~254位和237~240位均含有1个保守的氨基酸基序QAKK,这2个保守基序在视蛋白与G-蛋白互作过程中发挥着作用(Senthilan & Helfrich-Förster,2016;段云等,2020)。本研究中的2个视蛋白均具有视蛋白的典型特征,表明不同种类的视蛋白可能发挥着不同的生物学作用。



E: 卵; L1: 1龄幼虫; L2: 2龄幼虫; L3: 3龄幼虫; L4: 4龄幼虫; P: 蛹; F: 雌成虫; M: 雄成虫; FH: 雌成虫头部; FT: 雌成虫胸部; FA: 雌成虫腹部; MH: 雄成虫头部; MT: 雄成虫胸部; MA: 雄成虫腹部。E: Egg; L1: 1st instar larvae; L2: 2nd instar larvae; L3: 3rd instar larvae; L4: 4th instar larvae; P: pupae; F: female adult; M: male adult; FH: female adult head; FT: female adult thorax; FA: female adult abdomen; MH: male adult head; MT: male adult thorax; MA: male adult abdomen.

图5 龟纹瓢虫 *pj-lw* (A~B) 和 *pj-uv1* (C~D) 基因的时空表达分析

Fig. 5 Spatial and temporal expression profiles of *pj-lw* (A~B) and *pj-uv1* (C~D) genes in *Propylea japonica*

图中数据为平均数±标准误。不同小写字母表示经Duncan氏新复极差法检验差异显著($P<0.05$)。Data are mean±SE. Different lowercase letters indicate significant difference by Duncan's new multiple range test ($P<0.05$).

系统发育树显示,龟纹瓢虫长波敏感视蛋白和紫外敏感视蛋白均与瓢虫科其他昆虫的视蛋白聚为一个分支,与小地老虎 *Agrotis ipsilon* (闫硕等,2012)、白纹伊蚊 *Aedes albopictus* (郭秀霞等,2021)、粗胫翠尺蛾 *Thalassodes immissaria* (姚琼等,2022) 和普通大蓟马 *Megalurothrips usitatus* (金海峰等,2023) 等进化分析结果一致;其中长波敏感视蛋白与鳞翅目昆虫的长波敏感视蛋白形成的分支合并,紫外敏感视蛋白与双翅目昆虫的紫外敏感视蛋白形成的分支合并,其他目昆虫均各自形成一个单独的分支,说明

视蛋白在长期进化过程中,在不同物种之间高度保守,推测其在昆虫视觉系统中发挥的功能基本相同。

视蛋白基因在不同发育阶段和不同组织中的表达特征在一定程度上代表了基因的功能。粗胫翠尺蛾紫外敏感视蛋白基因在卵期和成虫期的相对表达量较高,长波敏感视蛋白基因在幼虫期和成虫期的相对表达量较高,且在雌成虫中的相对表达量较在雄成虫中的相对表达量高(姚琼等,2022)。韭菜迟眼蕈蚊 *Bradysia cellarum* 长波敏感视蛋白和紫外敏感视蛋白基因在蛹期就有表达,且其表达量随着发

育逐渐增加,在成虫期达到最高(安立娜等,2019)。本研究中龟纹瓢虫的 *pj-lw* 和 *pj-uv1* 基因均在成虫期高表达,在卵期、幼虫期和蛹期表达量很低,与鞘翅目中赤拟谷盗和杂拟谷盗视蛋白基因主要在成虫期表达的结果相似(沈加飞,2016)。龟纹瓢虫视觉基因的表达具有生长发育阶段特异性,龟纹瓢虫作为捕食性天敌昆虫,幼虫期和成虫期均需要捕食猎物,幼虫期短,可能依靠嗅觉等功能捕食猎物,成虫期较长,为更好地捕食猎物,成虫可能需要高效的视觉机制来寻找适宜的光环境进行觅食、产卵等行为,推测成虫期是其感受光刺激的关键阶段。头部的复眼是昆虫的主要光感受器官(Briscoe & Chittka,2001),龟纹瓢虫的 *pj-lw* 和 *pj-uv1* 基因在头部的相对表达量最高,在胸部和腹部的相对表达量很低,这与马尾松毛虫 *Dendrolimus punctatus* 中视蛋白基因 *LW* 在成虫期高表达(Zhang et al., 2020); 瓜实蝇 *Zeugodacus cucurbitae* 和亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 雌成虫中视蛋白基因 *LW* 和 *UV* 主要在头部和复眼高表达的结果基本一致(黄梅,2023; Huang et al., 2024),表明头部和复眼是发挥视觉功能的关键部位。视蛋白基因的组织和区域特异性表达可能是昆虫行为、生态和适应的基础(Futahashi et al., 2015)。

龟纹瓢虫作为我国重要的优势捕食性天敌昆虫,成虫期较长,因此视觉在寻找配偶、产卵、捕食等生物学方面的作用至关重要。本研究克隆了龟纹瓢虫2个视蛋白基因 *pj-lw* 和 *pj-uv1*,分析了其在物种间和物种内的同源进化关系,明确了其在龟纹瓢虫中的时空及组织表达特异性,为进一步研究龟纹瓢虫视蛋白基因功能提供了参考依据。关于视蛋白基因如何调控视觉功能的光敏感特性及非视觉功能的生物节律等内容今后仍需进一步研究探索,可利用RNA干扰技术降低视蛋白基因在复眼中的表达,干扰视觉功能反应,分析龟纹瓢虫视觉系统的作用机制。

参 考 文 献 (References)

- An LN, Fan F, Yang XF, Li MY, Liu XX, Wei GS. 2019. Molecular cloning of an ultraviolet wavelength-sensitive opsin gene in Chinese chive gnat *Bradysia odoriphaga* and gene expression in different light intensities. *Journal of Plant Protection*, 46(5): 971-979 (in Chinese) [安立娜, 范凡, 杨小凡, 李梦瑶, 刘小侠, 魏国树. 2019. 韭菜迟眼蕈蚊紫外敏感视蛋白基因的克隆及光强度对其表达量影响. *植物保护学报*, 46(5): 971-979]
- Baldwin JM, Schertler GFX, Unger VM. 1997. An alpha-carbon template for the transmembrane helices in the rhodopsin family of G-protein-coupled receptors. *Journal of Molecular Biology*, 272(1): 144-164
- Briscoe AD, Chittka L. 2001. The evolution of color vision in insects. *Annual Review of Entomology*, 46: 471-510
- Chen SP, Liu ZX, Chen YT, Wang Y, Chen JZ, Fu S, Ma WF, Xia S, Liu D, Wu T, et al. 2021. CRISPR/Cas9-mediated knockout of LW-opsin reduces the efficiency of phototaxis in the diamond-back moth *Plutella xylostella*. *Pest Management Science*, 77(7): 3519-3528
- Duan Y, Wu RH, Miao J, Gong ZJ, Li T, Jiang YL, Wu YQ. 2020. Research progress in insect opsin. *Plant Protection*, 46(1): 93-100 (in Chinese) [段云, 吴仁海, 苗进, 巩中军, 李彤, 蒋月丽, 武予清. 2020. 昆虫视蛋白的研究进展. *植物保护*, 46(1): 93-100]
- Franke RR, Sakmar TP, Graham RM, Khorana HG. 1992. Structure and function in rhodopsin: studies of the interaction between the rhodopsin cytoplasmic domain and transducin. *Journal of Biological Chemistry*, 267(21): 14767-14774
- Frentiu FD, Bernard GD, Cuevas CI, Sison-Mangus MP, Prudic KL, Briscoe AD. 2007. Adaptive evolution of color vision as seen through the eyes of butterflies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(Suppl. 1): 8634-8640
- Futahashi R, Kawahara-Miki R, Kinoshita M, Yoshitake K, Yajima S, Arikawa K, Fukatsu T. 2015. Extraordinary diversity of visual opsin genes in dragonflies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(11): 1247-1256
- Gui CM, Cao YS. 1984. A brief introduction to the classification and external morphology of ladybug and ladybug. *Plant Protection*, 10(3): 42-43 (in Chinese) [桂承明, 曹义山. 1984. 关于龟纹瓢虫与方斑瓢虫分类略历及其外部形态简介. *植物保护*, 10(3): 42-43]
- Guo XX, Cheng P, Liu LJ, Wang HF, Zhang CX, Wang HW, Gong MQ. 2021. Cloning and sequence features of ultraviolet sensitive opsin gene in *Aedes albopictus*. *Chinese Journal of Vector Biology and Control*, 32(5): 553-559 (in Chinese) [郭秀霞, 程鹏, 刘丽娟, 王海防, 张崇星, 王怀位, 公茂庆. 2021. 白纹伊蚊紫外光敏感视蛋白基因的克隆及序列特征. *中国媒介生物学及控制杂志*, 32(5): 553-559]
- Huang M. 2023. Cloning and functional study of opsin gene in *Zeugodacus cucurbitae* Coquillett (Diptera: Tephritidae). Master thesis. Guiyang: Guizhou University (in Chinese) [黄梅. 2023. 瓜实蝇视蛋白基因的克隆与功能研究. 硕士学位论文. 贵阳: 贵州大学]
- Huang M, Meng JY, Tang X, Shan LL, Yang CL, Zhang CY. 2024. Identification, expression analysis, and functional verification of three opsin genes related to the phototactic behaviour of *Ostrinia furnacalis*. *Molecular Ecology*: e17323
- Jackowska M, Bao RY, Liu ZY, McDonald EC, Cook TA, Friedrich M. 2007. Genomic and gene regulatory signatures of cryptozoic adaptation: loss of blue sensitive photoreceptors through expansion of long wavelength-opsin expression in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Frontiers in Zoology*, 4: 24
- Jin HF, Wang CZ, Hou QF, Xian LM, Zhang HJ, Wu SY. 2023. Cloning and bioinformatics analysis of *MuRhodopsin* gene in *Megalurothrips usitatus*. *Journal of Tropical Biology*, 14(6): 651-659 (in Chinese) [金海峰, 王朝政, 侯清芳, 咸利民, 张华剑, 吴少英. 2023. 普通大蓟马 *MuRhodopsin* 基因的全长克隆及生物信息学分析. *热带生物学报*, 14(6): 651-659]

- Leboulle G, Niggebrügge C, Roessler R, Briscoe AD, Menzel R, Hempel de Ibarra N. 2013. Characterisation of the RNA interference response against the long-wavelength receptor of the honeybee. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43(10): 959–969
- Leonard JL, Córdoba-Aguilar A. 2010. The evolution of primary sexual characters in animals. Oxford: Oxford University Press
- Li CF, Liu JL, Zeng XN. 2019. Phototactic behavior and compound eye structure of *Diaphorina citri*. *Journal of South China Agricultural University*, 40(2): 53–59 (in Chinese) [李超峰, 刘家莉, 曾鑫年. 2019. 柑橘木虱趋光行为及复眼结构分析. *华南农业大学学报*, 40(2): 53–59]
- Li ZS, Liu FJ, Lu YJ, Wang ZY. 2013. Advances of prediction and control of pests by the insect electrocutor-light traps. *Grain Storage*, 42(6): 6–9 (in Chinese) [李智深, 刘凤杰, 鲁玉杰, 王争艳. 2013. 利用光波测控储粮害虫研究进展. *粮食储藏*, 42(6): 6–9]
- Liu JH, Zhao ZH. 2017. Roles of insect vision in host plant finding and locating. *Journal of Plant Protection*, 44(3): 353–362 (in Chinese) [刘军和, 赵紫华. 2017. 昆虫视觉在寄主寻找及定位过程中的作用. *植物保护学报*, 44(3): 353–362]
- Liu PY. 2020. Research on artificial breeding of *Propylaea japonica* and the control techniques of *Propylaea japonica* combined with *Encarsia formosa* release for *Bemisia tabaci*. Master thesis. Tai'an: Shandong Agricultural University (in Chinese) [刘鹏远. 2020. 龟纹瓢虫人工繁育及其与丽蚜小蜂联合防控烟粉虱技术研究. 硕士学位论文. 泰安: 山东农业大学]
- Perry M, Kinoshita M, Saldi G, Huo L, Arikawa K, Desplan C. 2016. Molecular logic behind the three-way stochastic choices that expand butterfly colour vision. *Nature*, 535(7611): 280–284
- Porter ML, Blasic JR, Bok MJ, Cameron EG, Pringle T, Cronin TW, Robinson PR. 2012. Shedding new light on opsin evolution. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1726): 3–14
- Salcedo E, Huber A, Henrich S, Chadwell LV, Chou WH, Paulsen R, Britt SG. 1999. Blue- and green-absorbing visual pigments of *Drosophila*: ectopic expression and physiological characterization of the R8 photoreceptor cell-specific Rh5 and Rh6 rhodopsins. *Journal of Neuroscience*, 19(24): 10716–10726
- Sang W, Huang QY, Wang XP, Guo SH, Lei CL. 2019. Progress in research on insect phototaxis and future prospects for pest light-trap technology in China. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 56(5): 907–916 (in Chinese) [桑文, 黄求应, 王小平, 郭墅濠, 雷朝亮. 2019. 中国昆虫趋光性及灯光诱虫技术的发展、成就与展望. *应用昆虫学报*, 56(5): 907–916]
- Senthilan PR, Helfrich-Förster C. 2016. Rhodopsin 7: the unusual rhodopsin in *Drosophila*. *PeerJ*, 4: e2427
- Sharkey CR, Blanco J, Lord NP, Wardill TJ. 2023. Jewel beetle opsin duplication and divergence is the mechanism for diverse spectral sensitivities. *Molecular Biology and Evolution*, 40(2): msad023
- Sharkey CR, Fujimoto MS, Lord NP, Shin S, McKenna DD, Suvorov A, Martin GJ, Bybee SM. 2017. Overcoming the loss of blue sensitivity through opsin duplication in the largest animal group, beetles. *Scientific Reports*, 7(1): 8
- Shen JF. 2016. Evolutionary analysis of compound eyes and opsin genes in *Tribolium castaneum* and *T. confusum*. Master thesis. Xuzhou: Jiangsu Normal University (in Chinese) [沈加飞. 2016. 赤拟谷盗与杂拟谷盗复眼和视蛋白基因的进化分析. 硕士学位论文. 徐州: 江苏师范大学]
- Shen Y, Yu JQ, Mo JC, Wang DZ, Zhang LL. 2012. Advance on study of insect phototactic behavior. *Journal of Henan Institute of Science and Technology (Natural Sciences Edition)*, 40(5): 19–23 (in Chinese) [沈颖, 尉吉乾, 莫建初, 王道泽, 张莉丽. 2012. 昆虫趋光行为研究进展. *河南科技学院学报(自然科学版)*, 40(5): 19–23]
- Spaethe J, Briscoe AD. 2004. Early duplication and functional diversification of the opsin gene family in insects. *Molecular Biology and Evolution*, 21(8): 1583–1594
- Wang B, Xiao JH, Bian SN, Niu LM, Murphy RW, Huang DW. 2013. Evolution and expression plasticity of opsin genes in a fig pollinator, *Ceratosolen solmsi*. *PLoS ONE*, 8(1): e53907
- Xu L. 2016. Research on the phototaxis of *Harmonia axyridis*, *Ostrinia furnacalis* and *Bemisia tabaci*. Master thesis. Changsha: Hunan Agricultural University (in Chinese) [徐练. 2016. 异色瓢虫、玉米螟和烟粉虱的趋光性研究. 硕士学位论文. 长沙: 湖南农业大学]
- Yan S. 2015. Expression pattern and function study of opsin genes in *Helicoverpa armigera*. PhD thesis. Beijing: China Agricultural University (in Chinese) [闫硕. 2015. 棉铃虫视觉基因的表达模式及功能研究. 博士学位论文. 北京: 中国农业大学]
- Yan S, Zhang QW, Xiong XF, Han NN, Wang Q, Zhang J, Liu XX. 2012. Molecular cloning and sequence analysis of UV opsin in *Agrotis ypsilon*. *Chinese Journal of Zoology*, 47(1): 1–8 (in Chinese) [闫硕, 张青文, 熊晓菲, 韩娜娜, 王琼, 张璟, 刘小侠. 2012. 小地老虎UV视蛋白基因的克隆及序列分析. *动物学杂志*, 47(1): 1–8]
- Yao Q, Quan LF, Xu S, Dong YZ, Li WJ, Chi YY, Chen BX. 2022. Identification and characterization of opsin genes from *Thalassodes immissaria* and gene expression after white LED treatment. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 38(16): 103–109 (in Chinese) [姚琼, 全林发, 徐淑, 董易之, 李文景, 池艳艳, 陈炳旭. 2022. 粗胫翠尺蛾视蛋白基因的克隆及灯光对其表达量的影响. *中国农学通报*, 38(16): 103–109]
- Zhang SZ, Wu JX, Zhang Q, Jiang JX, Xu XL, Chen JA. 2004. Research advances of *Propylaea japonica* (Thunberg) in biology, ecology and utilization. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 22(4): 206–210 (in Chinese) [张世泽, 仵均祥, 张强, 姜军侠, 许向利, 陈继安. 2004. 龟纹瓢虫生物生态学特性及饲养利用研究进展. *干旱地区农业研究*, 22(4): 206–210]
- Zhang SF, Kong XB, Liu F, Zhang Z. 2020. Identification and expression patterns of opsin genes in a forest insect, *Dendrolimus punctatus*. *Insects*, 11(2): 116
- Zhou JH, Li PL, Zunong N, Zheng HN, Huang J, Wang ZH. 2020. Functional response and predation preference of ladybeetle *Propylaea japonica* to Asian citrus psyllid *Diaphorina citri*. *Journal of Plant Protection*, 47(5): 1062–1070 (in Chinese) [周军辉, 李鹏雷, 乃吾扎提·祖农, 郑青娜, 黄建, 王竹红. 2020. 龟纹瓢虫对柑橘木虱的捕食功能反应及猎物偏好性. *植物保护学报*, 47(5): 1062–1070]