



于昕,王玉哈,薛腾,等. 抗生素对马铃薯甲虫嗅觉基因的影响[J]. 黑龙江农业科学,2021(4):49-54.

抗生素对马铃薯甲虫嗅觉基因的影响

于昕^{1,2},王玉哈³,薛腾⁴,李红卫¹,郑超⁵,石旺鹏²,于艳雪¹

(1. 中国检验检疫科学研究院 植物检疫研究所,北京 100176; 2. 中国农业大学 植物保护学院,北京 100193; 3. 重庆微浪生物科技有限公司,重庆 400021; 4. 中华人民共和国大连海关,辽宁 大连 116000; 5. 哈尔滨海关技术中心,黑龙江 哈尔滨 150000)

摘要:为促进马铃薯甲虫嗅觉行为及生物防治研究,本文对马铃薯甲虫成虫饲喂抗生素后,利用转录组测序探究健康和取食抗生素后成虫头部的嗅觉基因差异。结果表明:通过 Illumina HiseqTM测序和差异基因的筛选富集,发现饲喂抗生素后,在代谢途径上的相关基因显著上调($q\text{-value} \leq 0.05$),并且筛选出 4 种差异显著的气味分子结合蛋白(OBP),分别是 *LdecOBP6*、*LdecOBP11*、*LdecOBP26* 和 *LdecOBP28*;利用实时荧光 PCR 和数字 PCR 验证了健康与饲喂抗生素的嗅觉基因表达量的变化,饲喂抗生素后 *LdecOBP6*、*LdecOBP11*、*LdecOBP26* 和 *LdecOBP28* 这 4 种基因的表达量确有显著变化。

关键词:马铃薯甲虫;嗅觉基因;肠道微生物;抗生素

马铃薯甲虫 [*Leptinotarsa decemlineata* (Say)], 属鞘翅目 (Coleoptera), 叶甲科 (Chrysomelidae), 是一种严重危害茄科植物的害虫。该虫主要以马铃薯叶片为食,能对马铃薯造成 20%~100% 的减产,是我国重要的外来入侵物种^[1-3],在《中华人民共和国进出境植物检疫有害生物名录》和“中国最具危险性的 20 种外来入侵物种”的名单中都有记载^[4-5]。该虫目前全球范围内其主要分布在美洲以及欧亚大陆^[6-7]。截止到 2019 年 6 月 20 日,根据我国农业农村部发布的植物检疫性害虫行政区分布 (http://www.hnagri.gov.cn/web/hnzbj/9794/9795/9796/content_296881.html),马铃薯甲虫在我国的吉林省、黑龙江省和新疆维吾尔自治区的 45 个县(区、市)有所分布。该虫具有极强的适应能力,对生物因素和非生物因素都有着极强的适应力^[8-9],并且对于已经注册的化学农药通常 2~3 年后就会产生抗性^[10]。

种类繁多的微生物以肠道菌群的形式在昆虫的消化道内定殖,这些共生菌参与了昆虫的物种形成及绝大多数的生命活动,并在其生长发育、营

养代谢、繁殖、免疫、农药抗性及其宿主间沟通等诸多生理功能上发挥重要作用^[11]。除此之外,还能抵御捕食者、寄生虫和病原体的入侵,直接或间接地影响昆虫的生理和健康。基于肠道微生物的重要功能和对寄主昆虫的重要作用,研究肠道微生物可以为害虫的绿色防控提供新的思路。近年来各国有关肠道微生物的研究已经越来越多,研究范围也越来越广。目前虽有关于马铃薯甲虫肠道微生物的相关报道,但鲜有肠道微生物与其嗅觉基因关系的相关研究,本文通过对马铃薯甲虫成虫饲喂抗生素后研究马铃薯甲虫的肠道微生物与嗅觉基因的关系,以期能为抗生素防治马铃薯甲虫及其他检疫性害虫提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试昆虫:采集于黑龙江省绥芬河市的健康马铃薯甲虫成虫,于黑龙江省绥芬河海关技术中心安全实验室养殖。温室的饲养条件为温度 26 ± 2 °C,相对湿度 40%~60%,光周期为 L/D=16 h/8 h。种植来自云南的新鲜马铃薯,用其叶片作为马铃薯甲虫的饲料。

供试叶片:实验室温室种植来自云南的马铃薯。

试验试剂:无菌水,吐温-20,四环素,青霉素,氧氟沙星,环丙沙星,氨苄西林。

1.2 方法

1.2.1 叶片处理 将新鲜马铃薯叶片浸泡在 5 种抗生素(环丙沙星、氧氟沙星、青霉素、四环

收稿日期:2020-12-15

基金项目:中国检验检疫科学研究院基本科研业务费项目(2019JK021)。

第一作者:于昕(1994—),女,在读硕士,从事农业昆虫与害虫防治研究。E-mail:yuxin19940604@163.com。

通信作者:于艳雪(1978—),女,博士,副研究员,从事检疫性昆虫监测技术及昆虫化学生态学和嗅觉分子机理研究。E-mail:yuyx@caiq.org.cn。

素、氨苄西林)按照 1:1 的比例配制的浓度为 1 mg·mL⁻¹ 的抗生素混合溶液里,加入 1% 的吐温-20,增加抗生素在叶片上的附着力,浸泡 1 h 后取出叶片进行饲喂试验。

1.2.2 马铃薯甲虫供试样本准备 从饲养笼中随机抓取健康马铃薯甲虫成虫 36 头,分两个培养盒,一个盒子 18 头在相同条件下饲养 7 d。抗生素培养盒,每天饥饿 12 h 后用上述浸泡后的马铃薯叶片饲喂 12 h,每天更换抗生素浸泡叶片,连续 7 d;对照培养盒,每天正常用新鲜马铃薯叶片饲喂。

1.2.3 马铃薯甲虫 RNA 提取及转录组测序分析 使用 PureLink™ RNA Mini Kit 试剂盒方法提取抗生素组和对照组马铃薯甲虫成虫头部的 RNA,将部分 RNA 送到测序公司进行转录组测序,对测序结果进行基因表达量统计与分析。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 验证 将 1.2.3 所得 RNA 按照 TransScript All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR 反转录试剂

盒的操作步骤进行反转录。

试验选定 RP18 作为内参基因^[12],本次试验的目的基因以及内参基因的引物序列详见表 1。实时荧光定量 PCR 的反应体系总体积为 20 μL,包括 1 μL 的 cDNA,10 μL 的 2×TransStart Green qPCR SuperMix,10 μmol·L⁻¹ 正反向引物各 1 μL,7 μL 的 Nuclease-free Water。反应程序为:第一阶段:预变性,94 ℃ 30 s;第二阶段:94 ℃ 5 s,60 ℃ 40 s,45 个循环;第三阶段:绘制溶解曲线。

1.2.5 数字 PCR 验证 将 1.2.3 所得 RNA 按照 TransScript All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR 反转录试剂盒的操作步骤进行反转录。数字 PCR 试验在 Bio-Rad 数字 PCR 仪器上进行。反应体系总体积为 20 μL,包括 10 μL 的 EvaGreen Supermix,10 μmol·L⁻¹ 正反向引物各 1 μL,1 μL 的 cDNA 和 7 μL 的 ddH₂O,其中所用引物与实时荧光定量 PCR 所用特异性引物相同(表 1)。

表 1 实时荧光定量 PCR 和数字 PCR 引物序列

基因	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
<i>OBP6</i>	CTCTTGAACCCATTTCCCTTTG	ACCATGTCTGTCTCCACATTC
<i>OBP11</i>	GGTATCGTGTTGGCTGTT	GTTTCTTGCACCTCGCTCT
<i>OBP26FIX</i>	CTGTAACGTAACGTCGCCTATTA	TTCCTCATCCATCCAACCATAC
<i>OBP28</i>	GCAACTATGCAGGCAGTAAATC	TCCGCAGTATTTCCCAATATCA
<i>RP18</i>	ACTTCGTGTCACTGAAACTGC	TATCCGCACGACTTCTCTGC

具体操作步骤为:将上述配好的 20 μL 反应体系加入微滴生成卡的 sample 孔位里,同时在微滴生成卡的 oil 孔位中加入 70 μL 微滴生成油,然后放入微滴生成仪中进行微滴生成。完成微滴生成后,转移 40 μL 生成的微滴体系至 96 孔板上封膜后放置于 PCR 仪上进行扩增。反应条件为:预变性,95 ℃ 10 min;变性,95 ℃ 10 s;退火及延伸,58 ℃ 45 s,40 个循环;固化微滴,98 ℃ 10 min。扩增反应完成后,将 96 孔板放入微滴读取仪中进行微滴荧光的读取和数据采集,随后通过分析微滴拷贝数来判断基因表达量的变化。

2 结果与分析

2.1 马铃薯甲虫 RNA 的测序结果及生物学信息分析

2.1.1 原始测序数据统计与质控 用统计学的方法对测序得到的 reads 进行碱基分布和质量波动的统计并对原始结果进行统计评估,去除低质

量的序列。经过显著性测定,若≥Q20% 的两种处理样本之间的结果无显著差异,则说明供试处理样本的前期生长条件基本一致。

2.1.2 原始测序数据的纯化 为了进行高质量的信息分析,对高质量数据进行统计,统计结果详见表 2。将质控后得到的高质量序列进行 *de novo* 拼装,总共得到了 236 706 条基因,479 178 条

表 2 高质量数据统计结果

样本	高质量序列数/条	高质量碱基数/bp
AH1	70499026	10169929748
AH2	80825648	11771169930
AH3	79562100	11646398604
HH1	75196458	10967609363
HH2	72841832	10667367888
HH3	83637066	12298113321

注:AH 抗生素组;HH 对照组。

转录本。其中最长基因为 28 939 bp,最短的为 201 bp。转录本在 200~300 bp 长度范围的数量是最多的,共 197 433 条,其次是 300~400 bp 长度的转录本的数量,共有 76 384 条(图 1)。

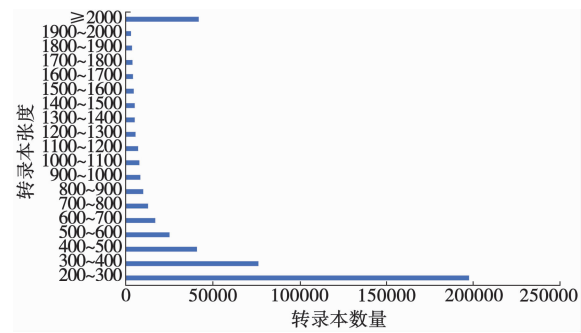
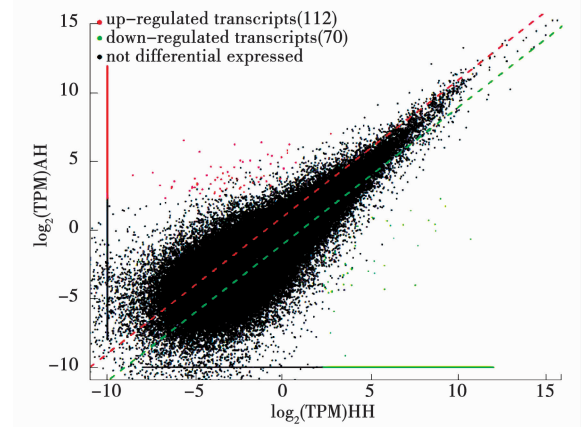


图 1 拼接结果长度分布图

将得到的 reads 与拼接结果进行比对后发现,抗生素处理组和对照组的 mapping 比率都较高,且两者之间无显著差异,再次说明了两种处理的样品前期生长条件基本一致,样品选取有效。

2.1.3 基因表达差异分析 依据所有样品与拼接的结果,将筛选条件设为:q-value<0.05 且差异倍数|FoldChange|>2,并将其可视化(图 2)。筛选出表达差异显著的基因 182 个,其中上调的有 112 个,下调的有 70 个。其中,参与代谢途径的基因有 6 个。当使用 BLASTx 比对,e-value 值设为 E-05,其他为默认参数,与数据库(<https://data.nal.usda.gov/dataset/leptinotarsa-decemlineata-official-gene-set-v11>)中结果进行了有参比对并将两者之间对应起来,发现处理组和对照组头部有差异显著性的基因一共 557 个,但是与



注:横纵轴分别为两组样本 log₂(TPM)值。图中每个点代表一个基因,越接近于原点的点表达量越低。其中红点表示上调基因,绿点表示下调基因,黑点表示非差异基因,上调/下调均是纵轴样本相对于横轴样本。

图 2 显著差异表达转录本可视化图

马铃薯甲虫嗅觉相关的差异显著性基因共有 4 个,其中上调的有 3 个,下调的有 1 个(表 3)。

2.2 实时荧光定量 PCR 验证

选取表 3 中的 4 个有显著差异的嗅觉基因进行实时荧光定量 PCR 验证,以 RP18 为内参基因,计算出 4 个基因的相对表达量。根据荧光定量 PCR 的扩增曲线和熔解曲线(图 3)特异性良好。将实时荧光定量 PCR 结果与转录组测序结果进行比较,两种分析方法下这 4 个基因的表达量变化趋势相一致(图 4),说明转录组测序结果可靠。

表 3 饲喂抗生素后差异表达显著性嗅觉基因

基因代号	氨基酸序列	Log ₂ (倍数)	上/下调
gene6255	LdecOBP26	-2.77	down
gene11353	LdecOBP11	2.63	up
gene15011	LdecOBP6	2.72	up
gene7275	LdecOBP28	3.13	up

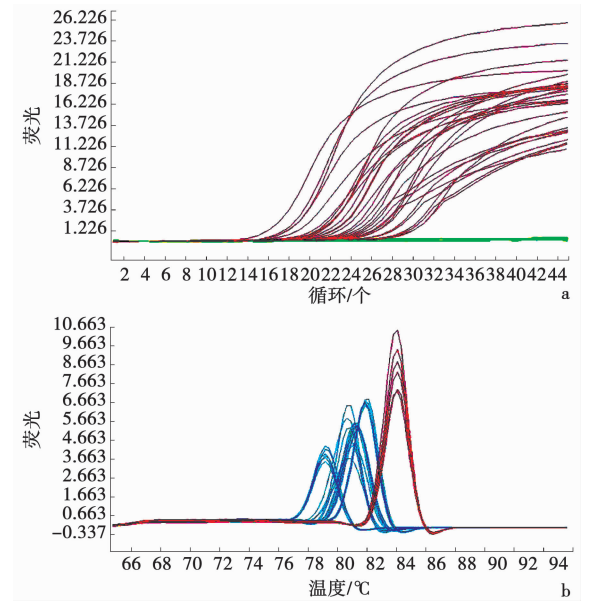


图 3 目的基因的荧光定量 PCR 扩增曲线(a)和熔解曲线(b)

2.3 数字 PCR 验证

在实时荧光定量 PCR 验证后,使用数字 PCR 再次验证了 4 个基因的表达量。根据数字 PCR 的扩增结果可以看出,微滴数的变化趋势明显,OBP6、OBP11、OBP28 均呈明显上调趋势,而 OBP26 呈明显下调趋势(图 5)。将数字 PCR 验证结果与转录组测序结果相比较,两种检测方法下这 4 个基因的表达量变化趋势相一致(图 4),这一结果再次说明转录组测序结果可靠。

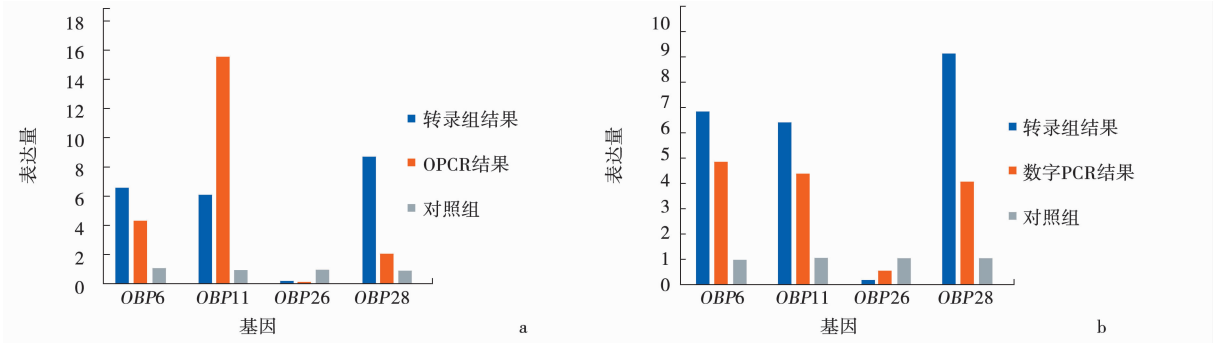
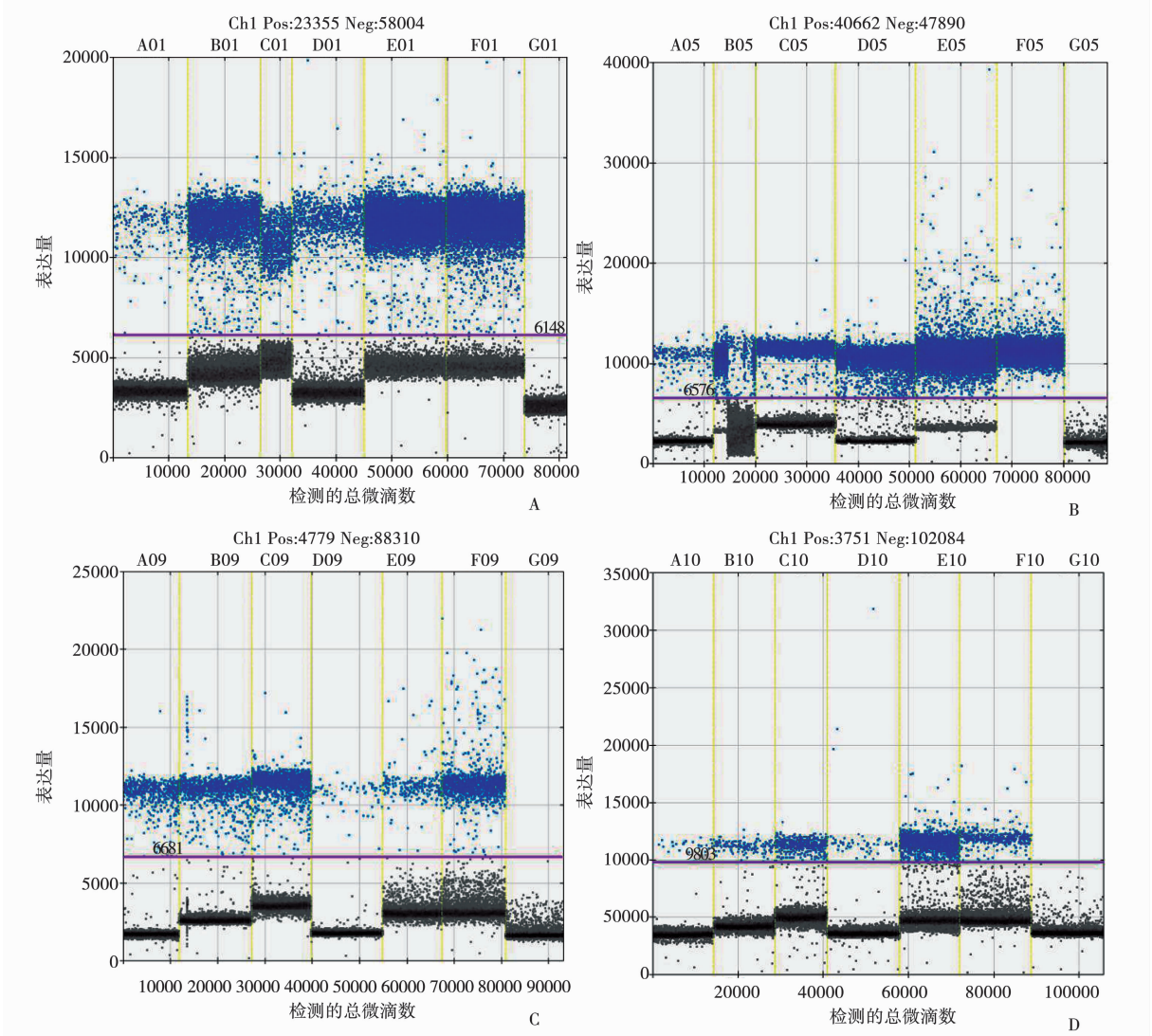


图 4 实时荧光定量 PCR 验证结果 (a) 和数字 PCR 验证结果 (b)



A: OBP6; B: OBP11; C: OBP26; D: OBP28

图 5 目的基因的数字 PCR 扩增结果

3 结论与讨论

昆虫肠道内的大量微生物经过长期的演变处于一个动态平衡的微环境,这个环境的稳定对昆虫的生长发育起着重要的作用,一旦这个环境的

动态平衡被打破,寄主昆虫的生理功能将出现紊乱,从而表现出异常状态。近年来,多种昆虫的肠道微生物研究均有报道,如经济昆虫蜜蜂、家蚕,以及常见的农作物害虫沙漠蝗、蚜虫等^[13-18]。但马

铃薯甲虫等检疫性昆虫肠道微生物与嗅觉基因关系的相关研究仍鲜见报道。

目前,利用高通量测序构建昆虫的转录文库已经成为了昆虫分子研究的重要手段,它能帮助获得差异表达基因,也能获取功能基因的信息,因此要研究昆虫在不同生境条件下的生理生化状态通常都采用该方法^[19]。本试验从肠道微生物的角度探究了抗生素组和野生型对照组的差异,通过转录水平探究两者的差别。通过 Illumina HiSeq™ 测序,检测了马铃薯甲虫在抗生素处理后的转录反应,通过比较嗅觉相关基因的表达量,筛选出 4 种差异显著的气味结合蛋白(Odorant Binding Protein, OBP),分别是 *LdecOBP6*、*LdecOBP11*、*LdecOBP26* 和 *LdecOBP28*,其中 *LdecOBP6*、*LdecOBP11* 和 *LdecOBP28* 呈显著上调,*LdecOBP26* 显著下调。

研究表明,德国蟑螂(*Blattella germanica*)的肠道微生物有助于产生包括挥发性羧酸(VCA)在内的化学信息素,能够有效地调节其粪便中的聚集剂,从而诱导德国蟑螂的聚集行为^[20]。果蝇(*Drosophila melanogaster*)在无菌条件或抗生素处理的条件下会出现过度活动现象,而在没有肠道微生物的情况下,通过果蝇肠道共生菌——短乳杆菌的处理后,能够提高其步行速度和日常活动^[21],并且,必需氨基酸和其肠道共生菌醋酸杆菌和乳酸杆菌能协同影响果蝇对食物的选择^[22]。除此之外,果蝇的肠道共生细菌还能影响其交配和产卵行为^[23-24]。本试验对马铃薯甲虫饲喂抗生素,进而研究嗅觉基因的表达量变化,为马铃薯甲虫的生物防治的基因筛选提供了基础资源,为今后进一步研究马铃薯甲虫的嗅觉行为相关分子机制提供一定的参考。在今后的试验中将进一步探究抗生素处理对马铃薯甲虫取食等行为的影响,进而探讨肠道共生菌与昆虫的嗅觉行为机制。

参考文献:

- [1] Hare J D. Ecology and management of the colorado potato beetle[J]. Annual Review of Entomology, 1990, 35(1): 81-100.
- [2] Alyokhin A, Baker M B, Molasanchez D, et al. Colorado potato beetle resistance to insecticides[J]. American Journal of Potato Research, 2008, 85(6): 395-413.
- [3] Alyokhin A. Colorado potato beetle management on potatoes: Current challenges and future prospects [J]. Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology, 2009, 3

- (1): 10-19.
- [4] 万方浩, 谢丙炎, 褚栋. 生物入侵, 管理篇[M]. 北京: 科学出版社, 2008.
- [5] 万方浩. 中国生物入侵研究[M]. 北京: 科学出版社, 2009.
- [6] 刘凯. 黑龙江省科罗拉多马铃薯甲虫的监测[J]. 中国马铃薯, 2010(2): 51-53.
- [7] 张润志, 刘宁, 李颖超. 危害茄科蔬菜的外来入侵害虫——马铃薯甲虫[J]. 生命科学, 2010, 22(11): 1118-1121.
- [8] Weber D. Colorado beetle: Pest on the move[J]. Pesticide Outlook, 2004, 14(6): 256-259.
- [9] 焦晓丹. 马铃薯甲虫的识别与防控[J]. 植物检疫, 2016, 30(1): 89-91.
- [10] Forgash A J. Insecticide resistance in the colorado potato beetle[J]. Massachusetts Agricultural Experiment Station Research Bulletin, 1985, 704: 33-52.
- [11] Crotti E, Balloi A, Hamdi C, et al. Microbial symbionts: a resource for the management of insect-related problems[J]. Microbial Biotechnology, 2011, 5(3): 307-317.
- [12] Shi X, Guo W, Wan P, et al. Validation of reference genes for expression analysis by quantitative real-time PCR in *Leptinotarsa decemlineata* (Say) [J]. BMC Research Notes, 2013, 6(1): 93-93.
- [13] Brauman A, Doré J, Eggleton P, et al. Molecular phylogenetic profiling of prokaryotic communities in guts of termites with different feeding habits[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2001, 35: 27-36.
- [14] Dillon R J, Charnley K. Mutualism between the desert locust *Schistocerca gregaria* and its gut microbiota[J]. Research in Microbiology, 2002, 153(8): 503-509.
- [15] Karley A J, Douglas A E, Parker W E, et al. Amino acid composition and nutritional quality of potato leaf phloem sap for aphids[J]. The Journal of Experimental Biology, 2002, 205(19): 3009-3018.
- [16] 相辉, 李木旺, 赵勇, 等. 家蚕幼虫中肠细菌群落多样性的 PCR-DGGE 和 16S rDNA 文库序列分析[J]. 昆虫学报, 2007, 50(3): 222-233.
- [17] Anderson K E, Sheehan T, Eckholm B J, et al. An emerging paradigm of colony health: microbial balance of the honey bee and hive(*Apis mellifera*) [J]. Insectes Sociaux, 2011, 58(4): 431-444.
- [18] Engel P, Martinson V G, Moran N A. Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(27): 11002-11007.
- [19] Xu Y, Zhou W W, Zhou Y J, et al. Transcriptome and comparative gene expression analysis of *Sogatella furcifera* (Horvath) in response to southern rice Black-Streaked Dwarf Virus[J]. PLoS ONE, 2012, 7(4): e36238.
- [20] Wadakatsumata A, Zurek L, Nalyanya G, et al. Gut bacteria mediate aggregation in the German cockroach[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(51): 15678-15683.

- [21] Schretter C E, Vielmetter J, Bartos I, et al. A gut microbial factor modulates locomotor behaviour in *Drosophila* [J]. Nature, 2018, 563(7731): 402-406.
- [22] Ricardo L G, Zita C S, Francisco A P, et al. Commensal bacteria and essential amino acids control food choice behavior and reproduction [J]. Plos Biology, 2017, 15(4): e2000862.
- [23] Sharon G, Segal D L, Ringo J, et al. Commensal bacteria play a role in mating preference of *Drosophila melanogaster* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(46): 20051-20056.
- [24] Liu W, Zhang K, Li Y, et al. Enterococci mediate the oviposition preference of drosophila melanogaster through sucrose catabolism [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 1-14.

Effects of Antibiotics on Olfactory Genes of *Leptinotarsa decemlineata* (Say)

YU Xin^{1,2}, WANG Yu-han³, XUE Teng⁴, LI Hong-wei¹, ZHENG Chao⁵, SHI Wang-peng², YU Yan-xue¹

(1. Institute of Plant Quarantine, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China; 2. Institute of Plant Protection, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 3. Chongqing BioWavelet Technology Limited, Chongqing 400021, China; 4. Dalian Customs of the People's Republic of China, Dalian 116000, China; 5. Harbin Customs Technology Center, Harbin 150000, China)

Abstract: In order to promote the study on olfactory behavior and biological control of potato beetles, after the potato beetle being fed with antibiotics, we used transcriptome sequencing to explore the differences of olfactory genes in the heads of healthy potato beetles and those fed antibiotics. The results showed that through Illumina HiSeq sequencing and screening of differential genes, we found that the related genes in the metabolic pathway were significantly up-regulated ($q\text{-value} \leq 0.05$) after feeding antibiotics. Besides, there were 4 types of odorant binding proteins (OBP) with significant differences were also screened, which were *LdecOBP6*, *LdecOBP11*, *LdecOBP26* and *LdecOBP28*. Real time PCR and digital PCR were used to verify the changes of olfactory gene expression in healthy and treated groups. There were significant changes in the expression levels of the four genes, *LdecOBP 6*, *LdecOBP 11*, *LdecOBP 26* and *LdecOBP 28* after feeding antibiotics.

Keywords: *Leptinotarsa decemlineata* (say); olfactory genes; intestinal microorganisms; antibiotics

(上接第 48 页)

Growth and Resource Allocation Strategies of Functional Leaves of Invasive Plant *Cenchrus incertus*

HUO Yan-li¹, TIAN Xun², LU Xuan³, ZHOU Li-ye¹

(1. College of Agriculture, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028000, China; 2. College of Life Science and Food, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028000, China)

Abstract: In order to prevent and control the spread of *Cenchrus incertus* M. A. Curtis in Horqin sandy land, the leaf functional and biological characteristics of *Cenchrus incertus*. at different growth stages in Horqin sandy land were determined by random sampling method, and the correlation analysis of each character was carried out. The results showed that the specific leaf area of *Cenchrus incertus*. reached the maximum at seedling stage, which was $333.43 \text{ cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$; the leaf area reached the maximum at flowering and fruiting stage, which was 8.03 cm^2 per piece; the leaf dry weight reached the maximum at tillering stage, which was 0.028 g per plant; the whole plant biomass reached the maximum at flowering stage, which was 7.34 g per plant; the contribution rate of leaves to the whole plant at tillering stage was the largest, which reached 40.12% . In the mature stage of *Cenchrus incertus*., the percentage of panicle biomass was significantly higher than that of leaf biomass; leaf area was the most important promoting factor to control the growth of whole plant biomass; leaf dry weight was the most important inhibiting factor to control the growth of panicle biomass.

Keywords: *Cenchrus incertus* M. A. Curtis; growth period; leaf blade functional traits; whole plant biomass; correlation