

DOI: 10.20103/j.stxb.202402280410

石林云,张亚宁,江廷磊,杨采青,孙成,Alice Catherine Hughes,张爱兵.草地贪夜蛾对新入侵地区蝙蝠超声波胁迫的行为反应和转录组分析.生态学报,2024,44(20):8984-8995.

Shi L Y, Zhang Y N, Jiang T L, Yang C Q, Sun C, Alice Catherine Hughes, Zhang A B. Behavioral response and transcriptome analysis of *Spodoptera frugiperda* to ultrasonic stress from bats in newly invaded areas. Acta Ecologica Sinica, 2024, 44(20): 8984-8995.

草地贪夜蛾对新入侵地区蝙蝠超声波胁迫的行为反应和转录组分析

石林云¹,张亚宁¹,江廷磊²,杨采青¹,孙成¹,Alice Catherine Hughes³,张爱兵^{1,*}

1 首都师范大学生命科学学院,北京 100048

2 东北师范大学吉林省动物资源保护与利用重点实验室,长春 130117

3 香港大学生物科学学院,中国香港特别行政区 999077

摘要:草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 是一种极具破坏性的入侵物种,对粮食作物构成重大威胁。蝙蝠是鳞翅目昆虫的重要天敌之一,控制着鳞翅目昆虫的生存和数量。为探究草地贪夜蛾在到达新的入侵地区后,是否以及如何对入侵地的食虫蝙蝠发出的超声波做出响应,研究首先观察并记录了草地贪夜蛾在暴露于入侵地蝙蝠超声波前后的行为变化,然后以正常环境中的成虫作为对照,对暴露于蝙蝠超声 0.5、3、12、24、48 小时和 72 小时的一日龄雄性草地贪夜蛾转录组进行比较分析。转录组的综合分析为研究蝙蝠超声信号对草地贪夜蛾产生的分子变化提供有价值的信息。行为结果表明,在草地贪夜蛾听觉范围内的入侵地蝙蝠超声波可以显著降低蛾类的行为活动,表明这些信号可能在成虫的行为中起着至关重要的作用。转录组分析表明,蝙蝠超声胁迫诱导了草地贪夜蛾体内广泛的基因表达变化,与对照组相比,不同时长的超声刺激下共鉴定出 2389 个显著上调基因和 2491 个显著下调基因,将在多个时间点均显著上调或下调的 521 个基因定义为草地贪夜蛾对蝙蝠超声响应的关键基因。对这些关键基因的 GO 和 KEGG 富集分析进一步揭示了蝙蝠超声胁迫对草地贪夜蛾的不同影响过程,结果显示 215 个上调基因与神经信号传递、声音感知、听觉受体细胞发育、氧化应激和恐惧反应等过程高度相关,306 个下调基因主要富集在各种能量代谢途径和生物合成过程中。通过 qRT-PCR 实验验证了转录组分析结果的可靠性。研究为草地贪夜蛾应对蝙蝠超声胁迫的生物学和分子机制提供了新的见解,并为今后开发更有效、更环保的方法控制鳞翅目害虫提供更多依据。

关键词:草地贪夜蛾;入侵物种;超声波胁迫;行为活动;转录组

Behavioral response and transcriptome analysis of *Spodoptera frugiperda* to ultrasonic stress from bats in newly invaded areas

SHI Linyun¹, ZHANG Yaning¹, JIANG Tinglei², YANG Caiqing¹, SUN Cheng¹, Alice Catherine Hughes³, ZHANG Aibing^{1,*}

1 College of Life Sciences, Capital Normal University, Beijing 100048, China

2 Jilin Provincial Key Laboratory of Animal Resource Conservation and Utilization, Changchun 130117, China

3 School of Biological Sciences, University of Hong Kong, Hong Kong Special Administrative Region 999077, China

Abstract: The fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, is an invasive species of significant concern due to its highly destructive nature and the substantial threat it poses to food crops. Bats are one of the important natural enemies of lepidopteran insects, controlling their survival and quantity. To investigate whether and how *S. frugiperda* responds to the

基金项目:国家自然科学基金(32170421,32200343);北京市自然科学基金项目(5232001);北京市属高校“十四五”高层次教师支持项目(BPHR220114)

收稿日期:2024-02-28; 网络出版日期:2024-06-21

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zhangab2008@cnu.edu.cn

ultrasound emitted by insectivorous bats in newly invaded areas after arriving at a new invasion area, this study first observed and recorded the behavioral changes of *S. frugiperda* both before and after exposure to ultrasound emitted by local bats. Then, the transcriptomes of one-day-old male adults of *S. frugiperda* being exposed to bat ultrasound for 0.5, 3, 12, 24, 48 and 72 hours were compared and analyzed with those in normal environment as controls. The comprehensive analysis of the transcriptomes provided valuable information into the molecular changes that occur in *S. frugiperda* in response to bat ultrasonic signals. The behavioral results indicated that local bats ultrasound which were within the hearing range of *S. frugiperda* could significantly reduce the behavioral activity of moths, suggesting that these signals may play a crucial role in the moths behavior. The transcriptome analysis showed that bats ultrasonic stress induced extensive changes in gene expression in the body of *S. frugiperda*. Compared with the control group, a total of 2389 significantly up-regulated genes and 2491 significantly down-regulated genes were identified under different durations of ultrasound stimulation. The 521 genes that were significantly up-regulated or down-regulated at multiple time points were defined as key genes in response to bat ultrasound. GO and KEGG enrichment analyses of these key genes further revealed the different processes affected by bat ultrasonic stress in *S. frugiperda*. The results showed that 215 up-regulated genes were highly correlated with processes such as neural signal transmission, sound perception, auditory receptor cell development, oxidative stress and fear response, while 306 down-regulated genes were mainly enriched in various energy metabolism pathways and biosynthesis processes. These findings suggest that bat ultrasonic signals may have a profound impact on the physiology and behavior of *S. frugiperda*. To further validate the reliability of the transcriptome analysis results, qRT-PCR experiments were conducted. The study provides new insights into the biological and molecular mechanisms of *S. frugiperda* in response to bat ultrasonic stress, and could provide greater support for developing more effective and environmentally friendly methods for controlling *S. frugiperda* and other lepidopteran pest species in the future.

Key Words: *Spodoptera frugiperda*; invasive species; ultrasonic stress; behavioral activities; transcriptome

草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 隶属于鳞翅目夜蛾科, 是一种原产于美洲的主要农业害虫, 具有适生区域广、迁飞速度快、繁殖能力强等特点^[1], 其幼虫食性广泛, 可取食 76 个科、超过 350 种植物, 包括玉米、水稻、蔬菜等主要经济作物^[2], 在许多国家造成了重大经济损失^[3-5]。它已于 2019 年 1 月入侵中国云南省^[6], 并迅速向北扩散至多个省。考虑到其入侵范围可能会继续扩大, 开发有效控制草地贪夜蛾发生的方法至关重要。

捕食者是影响动物空间分布和种群丰度的重要生物因素之一。鳞翅目昆虫是蝙蝠的主要饮食成分之一, 食虫蝙蝠可以为农业地区提供重要的害虫防治服务功能^[7-8]。然而, 蝙蝠捕食对害虫控制的重要贡献常常被忽视或低估。一只蝙蝠每晚最多可能吃掉上千只小昆虫, 相当于自身体重的 25%—50%^[9]。蝙蝠的捕食作用很大程度上降低了人工控制措施的成本。例如, 在美国得克萨斯州, 巴西无尾蝙蝠 (*Tadarida brasiliensis*) 的捕食每年可以减少相当于 741000 美元的农药使用和棉花受损造成的损失^[10]。相似地, 泰国的皱唇犬吻蝠 (*Tadarida plicata*) 的捕食行为降低了因害虫侵扰导致的数千吨水稻的损耗, 这些水稻每年能够为大约 26200 人提供食物, 其价值超过 120 万美元^[11]。据估计, 在全球玉米生产中, 蝙蝠捕食对害虫的控制在经济价值上超过 10 亿美元^[12]。总体而言, 食虫蝙蝠是农业生态系统中的重要害虫抑制器^[13]。

除了对昆虫直接的捕食作用, 蝙蝠的存在还可以对害虫产生非消耗效应。例如, 研究发现, 在田间播放蝙蝠发出的超声波可以对粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 和棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*) 起到驱赶作用并使蛾类的产卵量降低^[14-15]。同样, 蝙蝠发出的回声定位叫声也会抑制甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*) 的繁殖行为和发育^[16]。长期暴露于美洲本土蝙蝠物种叫声的草地贪夜蛾在大脑中诱导了广泛的转录反应^[17]。但是, 当昆虫从其长期生活的地方入侵到一个新的地区时, 入侵地和原产地蝙蝠物种的组成常存在较大差异, 在没有了原产地传统捕食者存在的情况下, 入侵地的昆虫是否能够逃脱入侵地蝙蝠的控制, 还是仍会受到当地新的潜在

捕食蝙蝠的调控,目前尚不清楚。

本研究将一日龄雄性草地贪夜蛾成虫暴露于分布在中国南方(草地贪夜蛾主要入侵地)的三种食虫蝙蝠的超声波下,观察它们的行为变化,并获得暴露于蝙蝠超声波 0.5、3、12、24、48、72 小时的转录组,与正常环境(无超声)中草地贪夜蛾的转录组进行比较分析。基于获得的转录组数据鉴定差异表达基因(DEG),并对这些 DEG 进行功能注释和富集分析。本研究旨在为草地贪夜蛾应对蝙蝠超声胁迫的生物学和分子机制提供新的见解,并为利用蝙蝠超声控制鳞翅目害虫提供更多支持。

1 材料与方法

1.1 供试材料与试验设计

草地贪夜蛾的虫卵于河南省济源白云实业有限公司购买,并在实验室内累代饲养,通过文献查阅结合实验室饲养经验,确定饲养条件为在温度(26 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度(65 ± 5)%以及光周期为 16 L:8D 的培养箱中进行饲养^[18]。幼虫饲喂人工饲料,成虫饲喂质量分数为 10%的蔗糖水。选取一日龄雄性成虫进行实验,实验开始前在实验室内饲养了 3 代。

实验设置如图 1 所示,将 18 只一日龄雄性成虫放入 40 cm \times 40 cm \times 40 cm 的养虫笼中,在养虫笼 4 个角落放有质量分数为 10%的蔗糖水,以保证在实验过程中成虫的饮食充足。超声回放过程中,扬声器距离养虫笼 40 cm。实验过程中利用摄像机(FDR-A60,日本索尼)拍摄记录蝙蝠超声刺激前和开始播放蝙蝠超声后 30 分钟内成虫的行为变化。分别在成虫暴露于蝙蝠超声波下 0.5、3、12、24、48 小时和 72 小时后进行取样,以在无超声刺激的正常环境中的成虫作为对照。每次取样从养虫笼中随机取出 3 只草地贪夜蛾,处理后立即放到液氮中速冻,并储存在 -80°C 的冰箱中等待后续进行 RNA 提取。将每只草地贪夜蛾的全身(无腹部和翅)用于 RNA 提取,共计 21 个样本。

实验中使用的蝙蝠超声波是由三种食虫蝙蝠随机循环播放组成的,分别为南蝠(*Ia io*)、大耳菊头蝠(*Rhinolophus macrotis*)和大蹄蝠(*Hipposideros armiger*)。这三种蝙蝠主要分布在中国南方,与草地贪夜蛾的入侵地区重叠。在它们的食物组成中,包括夜蛾科在内的鳞翅目昆虫均占有较大比例^[19-21],因此是草地贪夜蛾的潜在捕食者。回声定位声波通过 UltraSoundGate Player 116H(Avisoft Bioacoustics,德国)录制,采样频率为 375 kHz,分辨率为 16 位。录制好的声波通过 Avisoft SASLab Pro 软件(Avisoft Bioacoustics,德国)进行分析得到其回声定位声波参数。三种蝙蝠的峰值频率在 21.9—68.2 kHz 之间,与夜蛾的听力敏感范围重叠^[22]。回放时将超声波扬声器 Vifa 与 UltraSoundGate 116H 播放器连接,并通过计算机上的 Avisoft RECORDER USGH

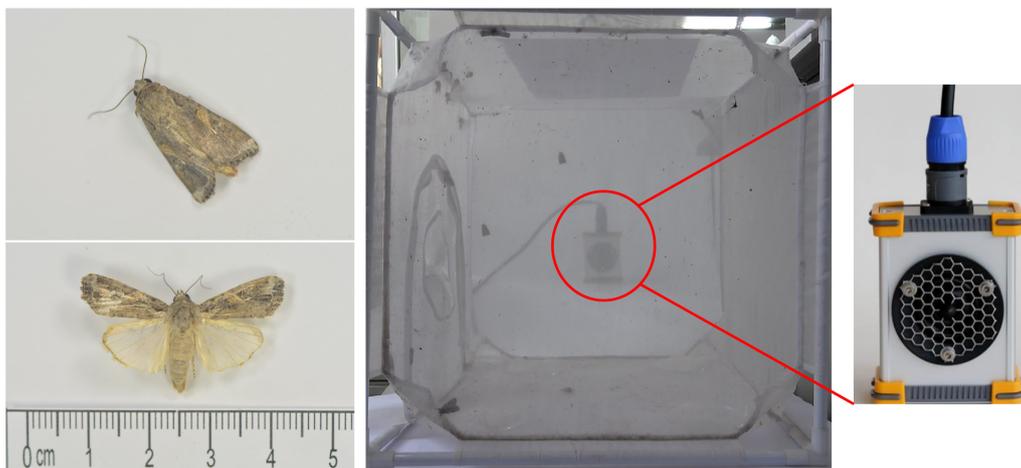


图 1 草地贪夜蛾的雄性成虫和实验装置

Fig.1 Male adults of *Spodoptera frugiperda* and experimental setup

软件播放录制好的蝙蝠超声波。

1.2 行为学实验和数据统计分析

为进一步量化草地贪夜蛾在入侵地蝙蝠超声刺激下的行为变化,本研究分别统计了草地贪夜蛾在正常环境中超声刺激下放入养虫笼中后由活跃到静止的时间(t_1),以及在静止后用钢尺敲打养虫笼给予刺激,草地贪夜蛾从静止到活跃再到静止的时间(t_2),两种环境每组各有 16 只生物学重复。每只成虫重复敲打刺激 20 次记录其从静止到活跃再到静止的时间,取平均值后作为该只成虫的 t_2 。对两组草地贪夜蛾成虫的 t_1 和 t_2 ,分别用曼-惠特尼秩和检验(Mann-Whitney U test)的方法进行统计性检验,检测两组数据是否存在显著差异。

1.3 转录组测序数据处理

首先对得到的原始测序数据进行质量控制,得到高质量的干净数据,然后使用 HISAT2 软件^[23](<http://ccb.jhu.edu/software/hisat2/index.shtml>)以定向模式将每个样本质控后的干净数据分别与草地贪夜蛾的参考基因组进行比对,根据比对结果对转录组测序质量进行评估。草地贪夜蛾的参考基因组序列文件和相关的基因注释文件从 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)下载,版本号为 assembly AGI-APGP_CSRO_Sfru_2.0,GCF_023101765.2。

1.4 差异表达分析和功能富集

为了鉴定不同样本之间的差异表达基因(DEG),使用 featureCounts 软件(<https://subread.sourceforge.net/>)来量化基因丰度。每个转录物的表达水平根据每千碱基每百万映射读取的转录物(TPM)方法计算。使用 DESeq2 R 软件包^[24]进行差异表达分析。筛选显著差异表达基因的阈值被设置为 $|\log_2$ 差异倍数(Fold change, FC) > 1 ,即两组样本之间该基因表达量的差异倍数在 2 倍以上,以及错误发现率(FDR) < 0.05 ,即校正后的 P 值表明两组样本差异显著。使用 eggNOG 网站(<http://eggnog-mapper.embl.de/>)对参考基因组进行 GO 和 KEGG 注释。使用 clusterProfiler R 软件包进行 GO 功能和 KEGG 通路的富集分析,将参数设置为 pAdjustMethod="BH",pvalueCutoff=0.05,以确定与整个基因组背景相比,差异表达基因在哪些 GO 条目和代谢途径方面显著富集。用 enrichplot R 软件包进行可视化绘图,在绘图时设置显示前 20 个结果。

1.5 qRT-PCR 实验验证

为了验证转录组差异表达分析结果的准确性,本实验共选择了 11 个显著富集的 DEG 进行 qRT-PCR 实验,核糖体蛋白 L32(*RPL32*)用作对照的内参基因^[25]。引物由 Primer BLAST 设计,通过筛选和预实验验证引物对目标基因的特异性扩增效果,最终使用的引物序列如表 1 所示。qRT-PCR 过程在 ABI QuantStudio™ 6 (Applied Biosystems) 荧光定量 PCR 仪中进行,每组 6 个重复,结果通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算每个所选基因相对于对照组的相对表达水平^[26]。

表 1 用于 qRT-PCR 验证的差异表达基因引物

Table 1 Primers of differentially expressed genes used for qRT-PCR validation

基因号 Gene ID	引物 Primers	基因号 Gene ID	引物 Primers
<i>LOC118273226</i>	F: GGTTCGTTCTTGAGTTGTGCG R: CTGCATCTTACGTTGCGGTG	<i>LOC118277306</i>	F: CAACCAGCTGAAGGTCCACT R: CTCGCTACGGTCTGATGGAT
<i>LOC118265137</i>	F: GACATGGCTCCGTGGTACAT R: GAAGAATGCTGCGACCTGT	<i>LOC118268077</i>	F: GGAATCTCCGAAGCACCCAA R: TAACACGATGGTTGTGCGGG
<i>LOC118270569</i>	F: AATAAGCAGTGGAGGGAGCG R: CACCTCGCAGCTCTGACTC	<i>LOC118262833</i>	F: CGCCTGTACCTCACCATTCA R: CAACCAAATGAGCACCTCCTG
<i>LOC118278833</i>	F: CATACTGCTCGGAAAGGTGG R: TATACATGCGGTAGCGGC	<i>LOC118273150</i>	F: TCTACTACGCCAAGAGAAAAGAG R: TTATTGCGAAGTTCCAGCAAATC
<i>LOC118264070</i>	F: TTAGAGCGTAGACGGTAGC R: GTCCATCGCGCAGAATCTCTT	<i>LOC118280071</i>	F: GGTCTTGGAGGCGTTATGGT R: GAGCCTACTTGGTTACATCAGG
<i>LOC118269493</i>	F: AAGGATCGGCCACAGTACAC R: TTGGCTCTGAAGACCTGCTG		

F:正向引物 Forward primer;R:反向引物 Reverse primer

2 结果与分析

2.1 行为记录结果

根据观察和视频记录结果可以看出,蝙蝠超声波回放前后草地贪夜蛾成虫的行为变化明显。在播放蝙蝠超声波之前,成虫在养虫笼里比较活跃,敲打养虫笼后成虫会立即飞走。而在开始播放超声波之后,成虫的活动逐渐减弱,30分钟之内已经基本在笼中静止,即使用力敲打养虫笼它们也很少移动。此外,在实验过程中也观察到,在持续的超声胁迫下,尽管提供了蔗糖水作为草地贪夜蛾的食物来源,但成虫很少去吸食,这表明草地贪夜蛾确实对其潜在捕食蝙蝠的超声波有响应。

通过进一步的行为实验统计分析,发现草地贪夜蛾在超声胁迫下从活跃到静止的时间(t_1)显著低于在正常环境中的时间($P<0.05$) (图2),在成虫静止后再次用钢尺敲打刺激其活跃,草地贪夜蛾在超声胁迫下从静止到活跃再到静止的时间(t_2)同样显著低于在正常环境中的时间,且显著性达到极显著水平($P<0.001$) (图3),说明草地贪夜蛾入侵地的蝙蝠超声显著降低了草地贪夜蛾的活动。

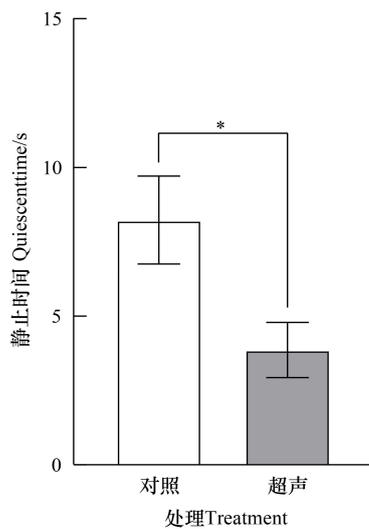


图2 草地贪夜蛾在正常环境中和超声刺激下从活跃到静止的时间

Fig.2 Time from active to stationary state of *Spodoptera frugiperda* in a normal environment and under ultrasonic stimulation

* : $P<0.05$

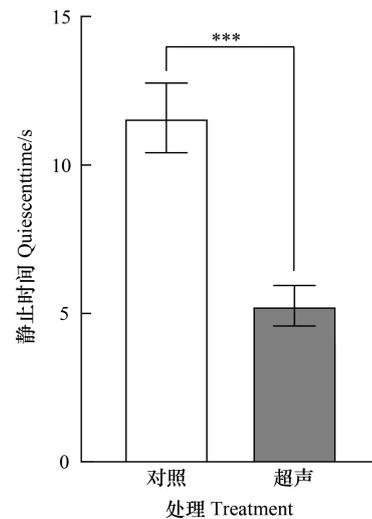


图3 草地贪夜蛾在正常环境中和超声刺激下从静止到活跃再到静止的时间

Fig.3 Time from stationary to active and then to another stationary state of *Spodoptera frugiperda* in a normal environment and under ultrasonic stimulation

*** : $P<0.001$

2.2 转录组数据质控和与参考基因组比对结果

本研究分别对正常环境下和受到0.5—72小时蝙蝠超声胁迫的草地贪夜蛾进行转录组双端测序。在对原始测序数据进行质控后,21个样本总共获得了163.8 Gb的干净数据,每个样本的干净读段范围为20761304至34445138,GC含量范围在45.93%到49.51%之间,Q30(碱基测序正确率为99.9%)百分比不低于93.6%(表2)。将各样本质控后得到的干净数据分别与草地贪夜蛾的参考基因组进行比对,各样本和参考基因组之间的总体比对率在88.38%到94.04%之间,表明各样本具有良好的比对率,本实验的测序结果可靠,满足后续分析需要。

2.3 差异表达分析结果

基于 $|\log_2 FC|>1$ 和 $FDR<0.05$ 的筛选标准,与对照组相比,在持续超声刺激0.5—72小时后显著上调的基因数量分别为287、138、1202、133、277、1605个,而显著下调的基因数量分别为114、367、1191、230、756、

1488 个(图 4)。总共鉴定出 2389 个显著上调基因和 2491 个显著下调基因,各时间段与对照组相比的差异表达基因的火山图如图 5 所示。本研究统计了所有 2389 个上调基因和 2491 个下调基因在 6 个时间段与对照组的比较中出现的频率分布情况(表 3),将在多个时间段(频次 ≥ 3)都显著上调或下调的 521 个基因作为响应超声胁迫的重点关注基因进行功能富集分析,共计 215 个上调基因和 306 个下调基因。

表 2 样本测序质量统计

Table 2 Sample sequencing quality statistics

样本号 Sample ID	原始读段 Raw reads	原始测序量 Raw bases	干净读段 Clean reads	过滤后数据量 Clean bases	Q30 比例 Q30/%	GC 比例 GC/%	比对率/% Mapped ratio
S_001	29446125	8892729750	29244671	8718567970	94.66	48.32	91.70
S_002	29289836	8845530472	29073631	8701136832	94.38	49.51	93.82
S_003	24856289	7506599278	24650441	7381048425	94.66	47.12	92.29
Uh_001	26197539	7911656778	25952600	7780361625	94.2	47.27	93.60
Uh_002	23394600	7065169200	23140765	6938595843	93.6	48.8	92.59
Uh_003	21484257	6488245614	20761304	6123221648	94.97	45.93	93.59
U3_001	27387378	8270988156	27100197	8122464633	94.24	47.98	91.58
U3_002	30167339	9110536378	29946298	8936152329	94.53	47.64	92.10
U3_003	28344052	8559903704	28173984	8434879980	94.25	47.34	91.08
U12_001	23942722	7230702044	23544238	7033132274	94.52	46.65	93.61
U12_002	21888394	6610294988	21626507	6460390540	93.67	46.46	93.15
U12_003	25531312	7710456224	24589325	7369460474	95.03	47.02	94.04
U24_001	34690692	10476588984	34445138	10183651029	94.61	46.87	92.60
U24_002	27871560	8417211120	27575149	8233314636	94.32	48.16	91.10
U24_003	21776178	6576405756	21324293	6413626824	93.84	47.18	92.23
U48_001	30815410	9306253820	30543235	9088172870	94.3	48.84	90.19
U48_002	25853617	7807792334	25613885	7590513359	94.25	48.53	90.00
U48_003	27123066	8191165932	26897580	8004648911	94.65	49.13	90.26
U72_001	22929083	6924583066	22655951	6788684622	94.07	47.55	88.38
U72_002	23607132	7129353864	22931398	6870203963	94.16	48.06	89.39
U72_003	30086578	9086146556	28882893	8683396141	94.61	47.51	90.18

Q30 具体意思为碱基质量值达到 30(即碱基正确率达 99.9%)的碱基所占的百分比

2.4 差异表达基因功能富集分析

对上述选定的重点关注基因进行功能富集分析,以探索草地贪夜蛾在长时间蝙蝠超声胁迫下发生的转录调控模式。GO 富集结果表明,215 个上调基因显著富集到 243 个 GO 条目中,前 20 条结果如图 6 左图所示。GO 条目可分为三类,分别为生物过程(Biological Process, BP)、分子功能(Molecular Function, MF)和细胞成分(Cell Component, CC),表 4 展示了每个类别中除前 20 个结果外其他一些值得关注的 GO 条目。306 个下调基因显著富集至 233 个 GO 条目中,前 20 条结果如图 6 右图所示,主要与各种代谢过程和生物合成过程相关。KEGG 富集分析结果表明,上调基因显著富集在 14 个信号通路中,下调基因显著富集在 25 个通路中,前 20 条结果详见图 7。

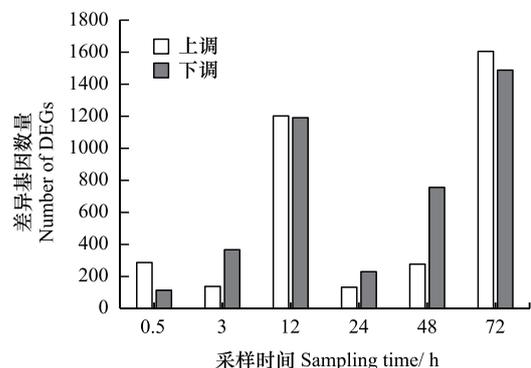


图 4 不同采样时间与对照组相比显著上调和下调的基因数量($\log_2 FC|>1, FDR<0.05$)

Fig.4 The number of significantly up-regulated and down-regulated genes compared to the control group at different sampling times

DEG: 差异表达基因; FC: 两样本间表达量的差异倍数; FDR: 错误发现率

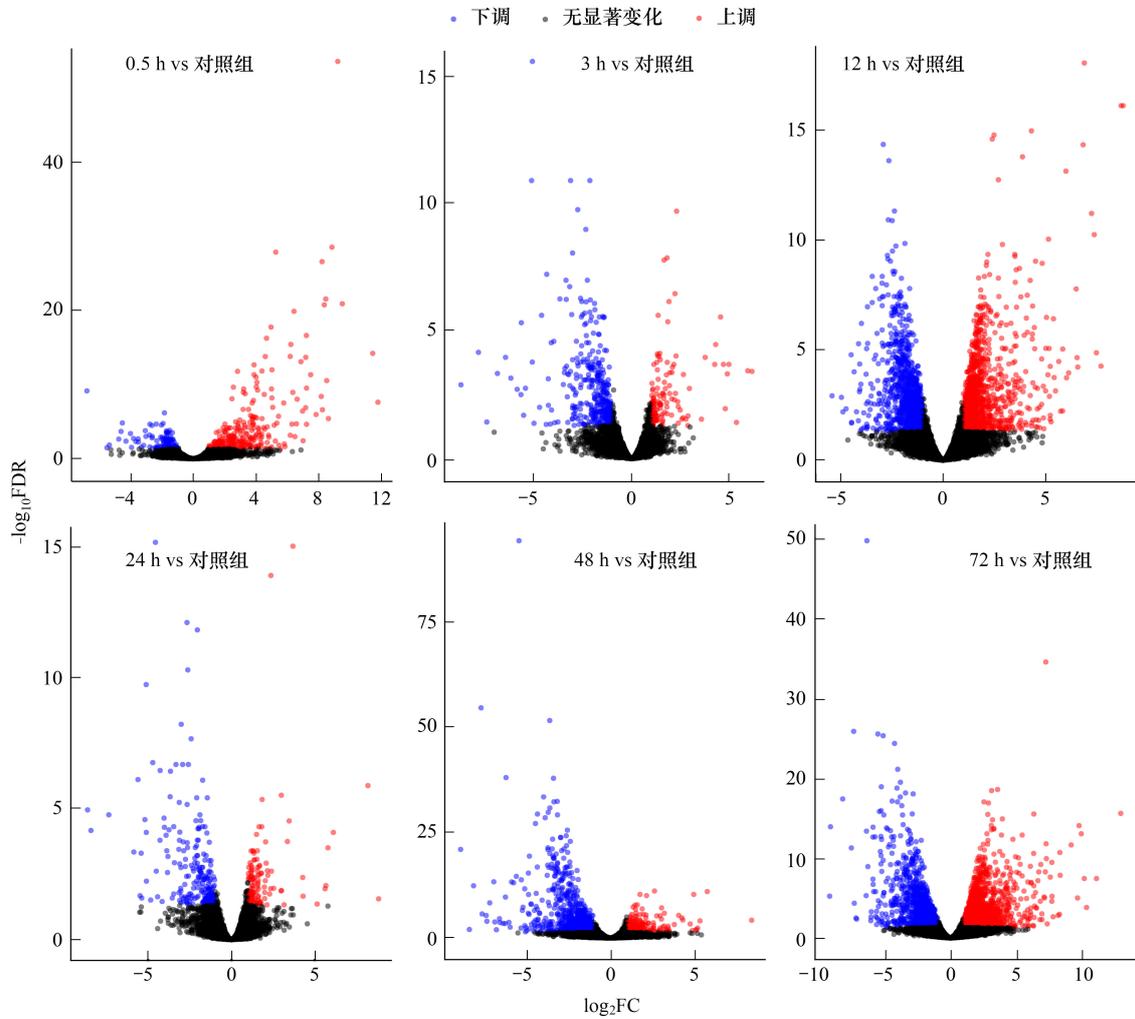


图 5 差异表达基因火山图

Fig.5 Volcano plot of differentially expressed genes

表 3 与对照组相比 6 个时间段内上调和下调基因的频率分布情况

Table 3 Frequency distribution of up-regulated and down-regulated genes in 6 time periods compared with the control group

频次 Frequency	上调基因数量 Number of up-regulated genes	下调基因数量 Number of down-regulated genes	频次 Frequency	上调基因数量 Number of up-regulated genes	下调基因数量 Number of down-regulated genes
6	0	1	2	804	934
5	3	15	1	1370	1251
4	13	76	合计 Total	2389	2491
3	199	214	≥3	215	306

2.5 qRT-PCR 实验验证结果

本研究发现,大多数上调基因(120/215,55.8%)在超声刺激0.5小时的时候表达量存在一个峰值,而大多数下调基因(218/306,71.2%)在超声刺激72小时的时候表达水平处于谷值。为了验证本研究中转录组测序分析鉴定出的差异表达基因的准确性,本研究选择了5个在0.5小时显著上调的基因和6个在72小时显著下调的基因进行qRT-PCR实验验证。这些差异表达基因主要从显著富集的GO条目中随机选取。11个差异表达基因的qRT-PCR结果如图8所示。从图8中可以看出,虽然qRT-PCR的结果相较于转录组分析得到的差异倍数较低,但总体变化趋势与转录组数据分析结果完全一致,表明转录组分析的结果是可靠的。

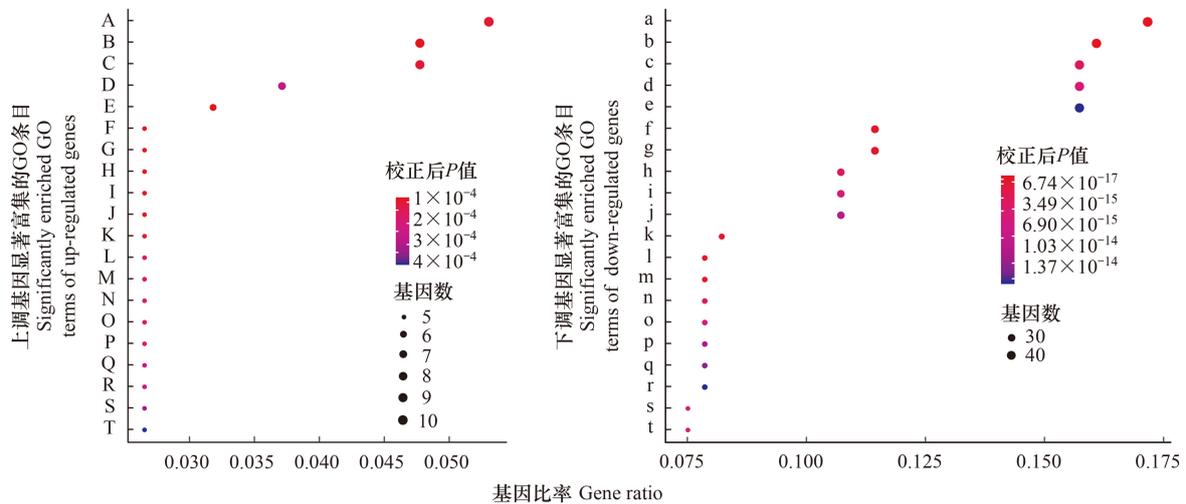


图 6 上调基因和下调基因的 GO 功能富集 ($P_{\text{adjust}} < 0.05$, 显示前 20 个结果)

Fig.6 GO functional enrichment of up-regulated genes and down-regulated genes ($P_{\text{adjust}} < 0.05$, display the top 20 results)

GO: 基因本体论; A: 光刺激检测; B: 可见光探测; C: 光信号转导; D: 可见光光电转换; E: 对血管紧张素的反应; F: 顺行轴突蛋白转运; G: 淀粉样蛋白原纤维形成的负调控; H: 晶状体的结构成分; I: 蛋白激酶 C 抑制剂活性; J: VEGF 激活的血管内皮生长因子受体信号通路对内皮细胞趋化性的正向调节; K: 心肌纤维; L: 血管内皮生长因子信号通路对细胞迁移的正调控; M: 突触前蛋白定位; N: 微管蛋白复合体; O: 淀粉样原纤维形成的调控; P: 内皮细胞趋化性的正调控; Q: 轴-树突蛋白转运; R: 内皮细胞趋化性的调控; S: 突触后密度膜; T: 倒钩端肌动蛋白丝帽; a: 核糖磷酸代谢过程; b: 前体代谢产物和能量的产生; c: 嘌呤核糖核苷酸代谢过程; d: 核糖核苷酸代谢过程; e: 嘌呤核苷酸代谢过程; f: 核糖磷酸生物合成过程; g: 含嘌呤化合物的生物合成过程; h: 嘌呤核糖核苷酸生物合成过程; i: 嘌呤核苷酸生物合成过程; j: 核糖核苷酸生物合成过程; k: 核苷单磷酸生物合成过程; l: 嘌呤核苷单磷酸生物合成过程; m: 嘌呤核糖核苷单磷酸生物合成过程; n: 核糖核苷单磷酸生物合成过程; o: ATP 生物合成过程; p: 嘌呤核糖核苷三磷酸生物合成过程; q: 嘌呤核苷三磷酸生物合成过程; r: 核糖核苷三磷酸生物合成过程; s: 吡啶核苷酸代谢过程; t: 烟酰胺核苷酸代谢过程

表 4 每个类别中一些重要的被富集的 GO 条目

Table 4 Some important enriched GO terms in each category

GO 号 GO ID	描述 Description	类别 Category	差异基因数量 Number of DEGs
GO:0007600	感官感知	生物过程	20
GO:0060117	听觉受体细胞发育	生物过程	5
GO:1902176	氧化应激诱导的内在凋亡信号通路的负调控	生物过程	5
GO:0009581	外部刺激的检测	生物过程	10
GO:0006836	神经递质转运	生物过程	13
GO:0042595	对饥饿的行为反应	生物过程	4
GO:0001662	行为恐惧反应	生物过程	4
GO:0042490	机械感受器分化	生物过程	5
GO:0030424	轴突	细胞成分	21
GO:0097060	突触膜	细胞成分	10
GO:0043025	神经元细胞体	细胞成分	17
GO:0032421	立体纤毛束	细胞成分	5
GO:0005080	蛋白激酶 C 结合	分子功能	7
GO:0051082	未折叠蛋白结合	分子功能	7
GO:0003779	肌动蛋白结合	分子功能	9

GO: 基因本体论 Gene ontology

3 讨论

草地贪夜蛾成虫后胸处有一对鼓膜听器, 可以感知到蝙蝠发出的超声波。超声听觉对于鳞翅目昆虫躲避

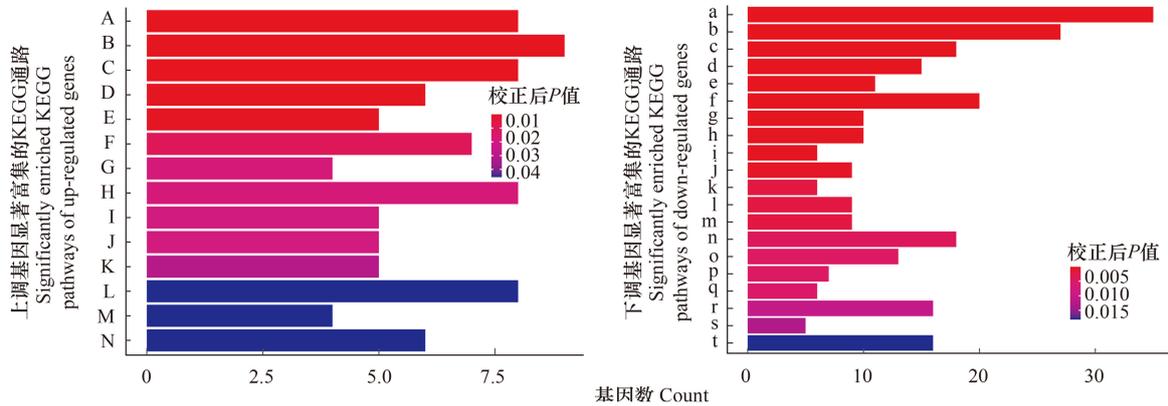


图7 上调基因和下调基因的 KEGG 通路富集 ($P_{adjust} < 0.05$, 显示前 20 个结果)

Fig.7 KEGG pathway enrichment of up-regulated genes and down-regulated genes ($P_{adjust} < 0.05$, display the top 20 results)

KEGG: 京都基因与基因组百科全书; A: 光转导-蝇; B: 血清素能突触; C: 阿米巴病; D: VEGF 信号通路; E: 促性腺激素释放激素分泌; F: 长寿调节途径-多种; G: 味觉传导; H: MAPK 信号通路; I: 谷氨酸能突触; J: 胃酸分泌; K: 胰岛素分泌; L: 胰腺分泌; M: 吗啡成瘾; N: 逆行内源性大麻素信号传导; a: 不同环境中的微生物代谢; b: 碳代谢; c: 氨基酸的生物合成; d: 糖酵解/糖异生; e: 柠檬酸 (TCA) 循环; f: 糖尿病性心脏病; g: 氨基糖与核苷酸糖代谢; h: 丙酮酸代谢; i: 甲烷代谢; j: 磷酸戊糖途径; k: 光合生物的固碳作用; l: 胰高血糖素信号通路; m: HIF-1 信号通路; n: 化学致癌作用-活性氧; o: 氧化磷酸化; p: 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢; q: 果糖和甘露糖代谢; r: 产热; s: 核苷酸糖的生物合成; t: 抗病毒病

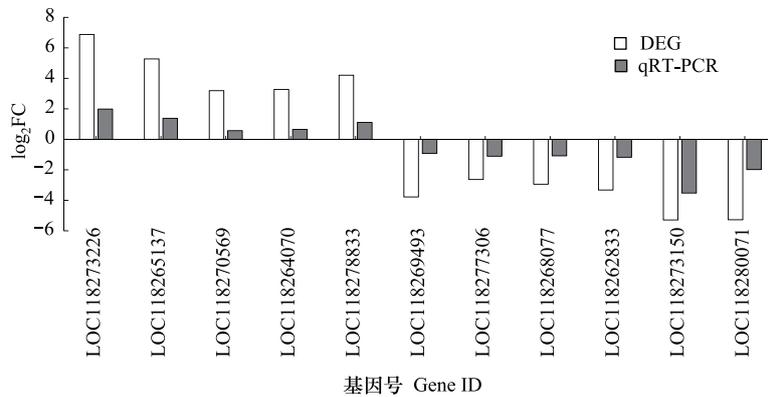


图8 通过 qRT-PCR 实验验证差异表达基因

Fig.8 Validation of differentially expressed genes by qRT-PCR

qRT-PCR: 实时荧光定量 PCR

蝙蝠天敌具有重要作用,然而,昆虫听觉相关基因的研究目前还相对较少。在本研究中,草地贪夜蛾在蝙蝠超声胁迫下激活了听觉相关通路,鉴定到一些差异基因被显著富集在感官感知(GO0007600)和听觉受体细胞发育(GO0060117)过程。*LOC118264960* 是钙粘蛋白-23 (CDH23) 的编码基因。钙粘蛋白是钙依赖性细胞粘附蛋白。在哺乳动物中,CDH23 对于在胚胎晚期或出生后早期发育过程中建立和维持耳蜗和前庭中毛细胞的立体纤毛束的适当组织是必需的。它是由 USH1C、USH1G、CDH23 和 MYO7A 形成的功能网络的一部分,介导正常听力所需的耳蜗毛细胞中的机械传导^[27-28]。*LOC118272660* 编码肌球蛋白 IIIb (myosin-IIIb),对小鼠正常耳蜗毛束发育和听力至关重要。它在耳蜗毛束形态发生的早期阶段发挥着重要作用,影响要产生的立纤毛的数量和长度,并限制形成的听觉毛束内微绒毛的生长,从而有助于毛束的结构,包括其阶梯模式^[29]。*LOC118273731* 是 whirlin 蛋白的编码基因,whirlin 蛋白作为 USH2 复合体的一员参与听觉和视觉^[30]。它对于延长和维持小鼠内耳 Corti 器官中的内外毛细胞立体纤毛是必要的^[31]。*LOC118266773* 是跨膜蛋白 132E

(transmembrane protein 132E)的编码基因,该蛋白是人类正常内耳毛细胞功能和听力所必需的^[32]。这些基因在草地贪夜蛾受到蝙蝠超声波刺激后表达量显著上调,在未来的研究中可以通过基因编辑技术进一步探索这些基因在蛾类听器发育和超声听觉中的具体作用。

当生物体受到有害刺激时,体内活性氧(Reactive oxygen species, ROS)的过度积累会导致氧化应激(Oxidative stress, OS),从而损害听觉系统^[33-34]。热休克蛋白(Heat shock proteins, HSP)是在应激状态下被诱导表达并在细胞内合成的蛋白质,具有保守的氨基酸序列^[35]。小热休克蛋白(Small heat shock protein, sHSP)是热休克家族的一员,也是抵抗外部不良刺激的重要物质^[36]。研究表明,作为分子伴侣的小热休克蛋白可以将变性蛋白维持在折叠能力状态^[37],它在应激抵抗和肌动蛋白组织中发挥作用^[38]。在本研究中,蝙蝠超声胁迫诱导了草地贪夜蛾体内的氧化应激,氧化应激诱导的内在凋亡信号通路的负调控(GO1902176)被显著富集,HSP 基因家族的基因表达显著上调,这可能增强蛾类对蝙蝠超声刺激的应激抵抗能力。本研究结果与 Armenta 等^[39]对黄腹旱獭暴露于捕食者诱导的转录组反应的结果一致。当面临捕食者威胁时,HSP 基因可能在蛾类对超声胁迫的反应中发挥重要作用。

研究表明,蝙蝠发出的回声定位叫声创造了一种恐惧的声音景观,无论蝙蝠是否真的捕食飞蛾,这些叫声都会通过非消耗效应对蛾类的行为和生活史产生负面影响。在对甜菜夜蛾的研究中表明,蝙蝠的超声波会减少甜菜夜蛾的飞行、求偶和交配等活动频率,以及减少食物摄入^[16]。在本研究中,草地贪夜蛾在受到入侵地蝙蝠超声胁迫后的行为反应与甜菜夜蛾相似,同样表现为飞行活动的显著降低,并且减少摄食。在转录水平上,与各种代谢过程和生物合成过程相关的基因表达显著降低,这与行为学观察结果一致。本研究中检测到两个章鱼胺受体基因的表达显著下调,即 *LOC118270565* (章鱼胺受体 *Oamb*) 和 *LOC118270382* (章鱼胺受体 β -2R)。章鱼胺是无脊椎动物的神经递质、神经激素和神经调节剂^[40]。在果蝇中, β -2R 是章鱼胺的自受体^[41],正向调节突触生长^[42]。*Oamb* 是蘑菇体内的一种章鱼胺受体^[43],通过作用于脑间部的神经元来调节睡眠/觉醒行为,以促进觉醒^[44]。章鱼胺对昆虫的生长、取食、飞行、代谢等多种生理过程具有重要作用,蝙蝠超声可能通过对章鱼胺受体表达的影响调控草地贪夜蛾成虫的行为。

广泛使用杀虫剂防治草地贪夜蛾会引起蛾类抗性,危害田间有益昆虫,对农业生态系统的健康发展构成严重威胁^[45]。使用蝙蝠超声波驱逐飞蛾是一种物理驱虫方法,对具听器害虫具有选择性,而对作物或无听器昆虫没有影响。先前的研究表明,蝙蝠超声波对驱除飞蛾和减少产卵有一定作用^[14-16]。草地贪夜蛾作为入侵昆虫,分布范围广泛,其入侵地蝙蝠和原产地蝙蝠物种组成有很大不同,原产地美洲的常见蝙蝠包括獾蝠(*Molossus molossus*)、黑鼠耳蝠(*Myotis nigricans*)、大银线蝠(*Saccopteryx bilineata*)^[17],其回声定位频率分别为獾蝠 20—50 kHz,黑鼠耳蝠 50—85 kHz,大银线蝠 45—55 kHz。这三种蝙蝠均仅在美洲分布,中国没有分布。本研究使用的三种蝙蝠是在中国南方常见的蝙蝠,且仅在亚洲分布,其回声定位主频分别为南蝠(*I. io*) 21.9 kHz,大耳菊头蝠(*R. macrotis*) 36 kHz,大蹄蝠(*H. armiger*) 68.2 kHz。虽然两地的蝙蝠组成完全不同,但它们发出的超声波频率都在草地贪夜蛾的听觉敏感范围内,因此具有相似的抑制作用。这表明草地贪夜蛾在入侵中国后没有逃脱蝙蝠捕食者的控制,这为未来蝙蝠超声波作为一种无害的物理方法控制草地贪夜蛾以及其它入侵昆虫提供了更多依据。

4 结论

本研究观察了草地贪夜蛾受到入侵地蝙蝠超声胁迫后的行为变化,并对不同持续时间蝙蝠超声胁迫后的草地贪夜蛾进行转录组比较分析,215 个上调基因和 306 个下调基因被鉴定为草地贪夜蛾响应蝙蝠超声波的关键基因。功能富集分析显示,上调基因与神经信号传递、听觉受体细胞发育、氧化应激和恐惧反应高度相关,下调基因主要富集在各种能量代谢途径和生物合成过程中。行为结果显示,入侵地的蝙蝠超声波仍对草地贪夜蛾有明显的抑制作用,可以显著降低草地贪夜蛾成虫的活跃程度和取食频率,这表明草地贪夜蛾在入侵中国后没有逃脱蝙蝠捕食者的控制。

参考文献 (References):

- [1] Sparks A N. A review of the biology of the fall armyworm. *The Florida Entomologist*, 1979, 62(2): 82.
- [2] Montezano D G, Specht A, Sosa-Gómez D R, Roque-Specht V F, Sousa-Silva J C, Paula-Moraes S V, Peterson J A, Hunt T E. Host plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. *African Entomology*, 2018, 26(2): 286-300.
- [3] Lima M S, Silva P S L, Oliveira O F, Silva K M B, Freitas F C L. Corn yield response to weed and fall armyworm controls. *Planta Daninha*, 2010, 28(1): 103-111.
- [4] Ayala O R, Navarro F, Virla E. Evaluation of the attack rates and level of damages by the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), affecting corn-crops in the northeast of Argentina. *Revista De La Facultad De Ciencias Agrarias*, 2013, 45: 1-12.
- [5] Day R, Abrahams P, Bateman M, Beale T, Clotey V, Cock M, Colmenarez Y, Corniani N, Early R, Godwin J, Gomez J, Moreno P G, Murphy S T, Oppong-Mensah B, Phiri N, Pratt C, Silvestri S, Witt A. Fall armyworm: impacts and implications for Africa. *Outlooks on Pest Management*, 2017, 28(5): 196-201.
- [6] 张磊, 靳明辉, 张丹丹, 姜玉英, 刘杰, 吴孔明, 萧玉涛. 入侵云南草地贪夜蛾的分子鉴定. *植物保护*, 2019, 45(2): 19-24, 56.
- [7] Krauel J J, Brown V A, Westbrook J K, McCracken G F. Predator-prey interaction reveals local effects of high-altitude insect migration. *Oecologia*, 2018, 186(1): 49-58.
- [8] Taweesub C, Cejuela Tanalgo K, Sritongchuay T, Catherine Hughes A. Understanding global patterns of insectivorous bat dietary research. *Barbastella*, 2022, 14(1): 134-144.
- [9] Eklöf J, Rydell J. *Hunting and feeding. Bats*. Cham: Springer, 2017: 55-74.
- [10] Cleveland C J, Betke M, Federico P, Frank J D, Hallam T G, Horn J, López J D Jr, McCracken G F, Medellín R A, Moreno-Valdez A, Sansone C G, Westbrook J K, Kunz T H. Economic value of the pest control service provided by Brazilian free-tailed bats in south-central Texas. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2006, 4(5): 238-243.
- [11] Wanger T, Darras K, Bumrungsri S, Tschamtker T, Klein A. Bat pest control contributes to food security in Thailand. *Biological Conservation*, 2014, 171(1): 220-223.
- [12] Maine J J, Boyles J G. Bats initiate vital agroecological interactions in corn. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(40): 12438-12443.
- [13] Russo D, Bosso L, Ancillotto L. Novel perspectives on bat insectivory highlight the value of this ecosystem service in farmland: research frontiers and management implications. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 2018, 266: 31-38.
- [14] Payne T L, Shorey H H. Pulsed ultrasonic sound for control of oviposition by cabbage looper moths. *Journal of Economic Entomology*, 1968, 61(1): 3-7.
- [15] Agee H R, Webb J C. Ultrasound for control of bollworms on cotton. *Journal of Economic Entomology*, 1969, 62(6): 1322-1326.
- [16] Zhou R Z, Li X, Zhu Y, Wang Q Y, Wu H, Feng J. Behavioral response of *Spodoptera exigua* under bat echolocation call stress. *Biological Control*, 2023, 182: 105236.
- [17] Cinel S D, Taylor S J. Prolonged bat call exposure induces a broad transcriptional response in the male fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*; Lepidoptera: Noctuidae) brain. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 2019, 13: 36.
- [18] 王世英, 朱启旋, 谭煜婷, 马千里, 王瑞飞, 张美芳, 徐汉虹, 张志祥. 草地贪夜蛾室内人工饲料群体饲养技术. *环境昆虫学报*, 2019, 41(4): 742-747.
- [19] 韩宝银, 贺红早. 南蝠捕食行为及其对稻田虫害发生的影响. *贵州农业科学*, 2012, 40(4): 115-117.
- [20] Shi L M, Feng J, Liu Y, Ye G X, Zhu X. Is food resource partitioning responsible for deviation of echolocation call frequencies from allometry in *Rhinolophus macrotis*? *Acta Theriologica*, 2009, 54(4): 371-382.
- [21] 韩宝银, 贺红早. 大蹄蝠的食物组成及对森林虫害发生的影响. *安徽农业科学*, 2012, 40(26): 12884-12885.
- [22] Nakano R, Takanashi T, Surlykke A. Moth hearing and sound communication. *Journal of Comparative Physiology A*, 2015, 201(1): 111-121.
- [23] Kim D, Langmead B, Salzberg S L. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods*, 2015, 12(4): 357-360.
- [24] Love M I, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 2014, 15(12): 550.
- [25] Zhou L, Meng J Y, Ruan H Y, Yang C L, Zhang C Y. Expression stability of candidate RT-qPCR housekeeping genes in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2021, 108(1): e21831.
- [26] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.

- [27] Bolz H, von Brederlow B, Ramírez A, Bryda E C, Kutsche K, Nothwang H G, Seeliger M, del C-Salcedó Cabrera M, Vila M C, Molina O P, Gal A, Kubisch C. Mutation of *CDH23*, encoding a new member of the cadherin gene family, causes Usher syndrome type 1D. *Nature Genetics*, 2001, 27(1): 108-112.
- [28] Roux A F, Faugère V, Le Guédard S, Pallares-Ruiz N, Vielle A, Chambert S, Marlin S, Hamel C, Gilbert B, Malcolm S, Claustres M, Collaboration F U S. Survey of the frequency of *USH1* gene mutations in a cohort of Usher patients shows the importance of cadherin 23 and protocadherin 15 genes and establishes a detection rate of above 90%. *Journal of Medical Genetics*, 2006, 43(9): 763-768.
- [29] Lelli A, Michel V, Boutet de Monvel J, Cortese M, Bosch-Grau M, Aghaie A, Perfettini I, Dupont T, Avan P, El-Amraoui A, Petit C. Class III myosins shape the auditory hair bundles by limiting microvilli and stereocilia growth. *The Journal of Cell Biology*, 2016, 212(2): 231-244.
- [30] Yang J, Liu X Q, Zhao Y, Adamian M, Pawlyk B, Sun X, McMillan D R, Liberman M C, Li T S. Ablation of whirlin long isoform disrupts the *USH2* protein complex and causes vision and hearing loss. *PLoS Genetics*, 2010, 6(5): e1000955.
- [31] Kikkawa Y, Mburu P, Morse S, Kominami R, Townsend S, Brown S D M. Mutant analysis reveals whirlin as a dynamic organizer in the growing hair cell stereocilium. *Human Molecular Genetics*, 2005, 14(3): 391-400.
- [32] Li J X, Zhao X H, Xin Q, Shan S, Jiang B C, Jin Y C, Yuan H J, Dai P, Xiao R, Zhang Q Y, Xiao J J, Shao C S, Gong Y Q, Liu Q J. Whole-exome sequencing identifies a variant in *TMEM132E* causing autosomal-recessive nonsyndromic hearing loss DFNB99. *Human Mutation*, 2015, 36(1): 98-105.
- [33] Mittal R, Debs L H, Nguyen D, Patel A P, Grati M, Mittal J, Yan D, Eshraghi A A, Liu X Z. Signaling in the auditory system: implications in hair cell regeneration and hearing function. *Journal of Cellular Physiology*, 2017, 232(10): 2710-2721.
- [34] Varela-Nieto I, Murillo-Cuesta S, Calvino M, Cediél R, Lassaletta L. Drug development for noise-induced hearing loss. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2020, 15(12): 1457-1471.
- [35] Takayama S, Reed J C, Homma S. Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. *Oncogene*, 2003, 22(56): 9041-9047.
- [36] Sun Y, MacRae T H. Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 2005, 62(21): 2460-2476.
- [37] Almeida-Souza L, Goethals S, de Winter V, Dierick I, Gallardo R, Van Durme J, Irobi J, Gettemans J, Rousseau F, Schymkowitz J, Timmerman V, Janssens S. Increased monomerization of mutant *HSPB1* leads to protein hyperactivity in Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(17): 12778-12786.
- [38] Kostenko S, Johannessen M, Moens U. PKA-induced F-actin rearrangement requires phosphorylation of Hsp27 by the MAPKAP kinase MK5. *Cellular Signalling*, 2009, 21(5): 712-718.
- [39] Armenta T C, Cole S W, Wayne R K, Blumstein D T. Adaptive gene regulation in wild mammals exposed to high predator abundance. *Animal Behaviour*, 2019, 152: 53-61.
- [40] Orchard I. Octopamine in insects: neurotransmitter, neurohormone, and neuromodulator. *Canadian Journal of Zoology*, 1982, 60(4): 659-669.
- [41] Maqueira B, Chatwin H, Evans P D. Identification and characterization of a novel family of *Drosophila* beta-adrenergic-like octopamine G-protein coupled receptors. *Journal of Neurochemistry*, 2005, 94(2): 547-560.
- [42] Koon A C, Budnik V. Inhibitory control of synaptic and behavioral plasticity by octopaminergic signaling. *The Journal of Neuroscience*, 2012, 32(18): 6312-6322.
- [43] Han K A, Millar N S, Davis R L. A novel octopamine receptor with preferential expression in *Drosophila* mushroom bodies. *The Journal of Neuroscience*, 1998, 18(10): 3650-3658.
- [44] Crocker A, Shahidullah M, Levitan I B, Sehgal A. Identification of a neural circuit that underlies the effects of octopamine on sleep: wake behavior. *Neuron*, 2010, 65(5): 670-681.
- [45] Lyu B Q, Wang S C, Wyckhuys K A G, Liu Z. Biological pest control protects pollinators. *Science*, 2023, 380(6642): 251.