

萝卜蚜有翅型和无翅型转录组差异分析

张秋圆 李 昭 张慧杰 王小平 朱智慧

华中农业大学植物科学技术学院/湖北省昆虫资源利用与害虫可持续治理重点实验室, 武汉 430070

摘要 采用 Illumina 测序平台获得了萝卜蚜转录组数据, 有翅蚜和无翅蚜混合样本共得到 107 992 806 条 Cleaning Reads, 组装得到 69 588 条 Unigene 序列, 平均长度为 716 bp。有翅蚜测序结果共得到 44 620 184 条 Cleaning Reads; 无翅萝卜蚜测序结果共得到 47 113 716 条 Cleaning Reads。2 组样品差异表达基因的分析表明共有显著性差异表达基因 104 个, 其中表达上调基因有 74 个, 表达下调基因有 30 个。对差异表达基因进行 GO 注释及 KEGG 富集分析显示, Hippo 信号通路、甲状腺激素信号通路和催产素信号通路与翅型分化及与之紧密联系的生殖率差异相关性较强。

关键词 萝卜蚜; 转录组; 生物信息学分析; 差异表达基因

中图分类号 S 433.39 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2019)04-0040-05

萝卜蚜 *Lipaphis erysimi* (Kaltenbach) 属于同翅目蚜科, 又称菜缢管蚜, 是十字花科蔬菜上的一种重要害虫, 常与桃蚜 *Myzus persicae* (Sulzer) 混合发生。与其他蚜虫类似, 萝卜蚜对十字花科蔬菜的为害可分为直接为害和间接为害。直接为害是以成虫、若虫群聚在蔬菜嫩茎和叶背直接刺吸汁液, 导致被害植株生长速率低、发育不良、产量降低、枯萎甚至死亡, 留种菜不能正常抽薹; 间接为害是其产生蜜露诱发霉污病, 影响光合作用, 更严重的是会传播多种蔬菜病毒病, 造成蔬菜严重经济损失。在萝卜蚜的防治中, 化学防治是比较有效和迅速的手段, 但由于农药的不合理使用, 包括萝卜蚜在内的多种蔬菜蚜虫对有机磷、拟除虫菊酯、氨基甲酸酯、新烟碱等多种类型杀虫药剂已产生了不同程度的抗性^[1], 如陈根等^[2]对福州市萝卜蚜农药抗性的监测发现, 福州市萝卜蚜对阿维菌素产生了高水平抗性。

萝卜蚜营孤雌生殖和两性生殖, 存在无翅型和有翅型 2 种生物型^[3]。无翅型能够大量繁殖后代, 而有翅型则能够迁移到适合生存的寄主植物上, 并可能介导植物病毒病的大范围传播。萝卜蚜的生殖方式、翅型分化的转换以及对杀虫剂的抗性分子机制的研究尚不清晰, 明确这些机制对开发新的萝卜蚜防治方式具有重要意义。笔者利用二代测序

Illumina 技术^[4], 获得了无参考的萝卜蚜转录组以及有翅蚜和无翅蚜的转录组信息, 对筛选得到的差异表达基因进行了 GO 富集与 KEGG 富集分析, 旨在为深入探究萝卜蚜的生殖方式、翅型分化的转换以及对杀虫剂的抗性分子应答机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试昆虫为萝卜蚜 *L. erysimi*, 采集于湖北省武汉市华中农业大学内的蔬菜地 (114° 35' E, 30° 47' N)。使用毛笔尖将拔出口针后的萝卜蚜移至新鲜的白菜叶片上, 随后将带有蚜虫的白菜置于大棚温室内进行饲养, 且放置于防虫网内。饲养条件: 光周期 (L : D = 14 h : 10 h), 温度 (25 ± 1) °C, 湿度 70% ± 5%。在此条件下处理得到的 F1 代即为样品, 收集以上萝卜蚜样品: ①不同龄期混合样品: 60 头 1 龄若虫、40 头 2 龄若虫、20 头 3 龄有翅蚜 (在体视镜下观察有明显翅芽)、20 头 3 龄无翅蚜 (在体视镜下观察无明显翅芽)、15 头 4 龄有翅蚜、15 头 4 龄无翅蚜、10 头有翅成虫、10 头无翅成虫 (其中成虫均未产仔); ②有翅样品: 200 头 2 龄末期有翅若虫 (在体视镜下观察有明显翅芽); ③无翅样品: 200 头 2 龄末期无翅若虫 (在体视镜下观察无明显翅芽); 以

收稿日期: 2019-01-05

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31572329); 公益性行业 (农业) 科研专项 (201303028)

张秋圆, 硕士研究生, 研究方向: 昆虫分子生物学. E-mail: zhangqiuyuan@webmail.hzau.edu.cn

通信作者: 朱智慧, 博士, 副教授, 研究方向: 昆虫分子生物学. E-mail: zhihui@mail.hzau.edu.cn

上样品经饥饿处理 2 h 后,收集于 1.5 mL 冻存管,液氮速冻后置于-80 ℃保存。

1.2 总 RNA 提取及转录组测序

RNA 提取采用 Promega 公司以及 TaKaRa 公司的总 RNA 提取试剂盒(SV total RNA isolation system)和 RNAliso Plus 试剂;萝卜蚜转录组的建库测序和拼接组装委托武汉未来组生物科技有限公司完成,利用 Trinity 软件对测序得到的短 Reads 进行拼接^[5]。

1.3 转录组注释及生物信息学分析

首先,将获得的 Unigene 序列通过 Blastx 和 Blastn 与蛋白数据库 Nr、KEGG Pathways、Swiss-Prot、COG 以及核酸数据库 Nt($E\text{-value}<10^{-5}$)进行比对,获得与给定的 Unigene 存在最高相似度序列的蛋白,从而对该 Unigene 进行蛋白功能注释。使用 WEGO 软件对所有 Unigene 的 GO 注释做 GO 功能分类统计,全面了解萝卜蚜的基因功能分布特征;使用 KAAS 注释系统得到 Unigene 的

Pathway 的注释,系统分析转录组中的基因产物在细胞内的代谢途径(Pathway)和这些基因产物功能的主要公共数据库,可利用 KEGG 更加深入地探究基因的分子学功能。

2 结果与分析

2.1 转录组测序结果分析

为了获得更为完整的萝卜蚜转录组文库,分别提取不同发育阶段的混合样品、有翅样品、无翅样品的 RNA,3 组样品的 Q30 碱基百分比均不小于 89%,各项指标均符合转录组测序要求。通过 Illumina 技术测序,混合样品萝卜蚜的测序结果共得到 107 992 806 条 Cleaning Reads;有翅萝卜蚜的测序结果共得到 44 620 184 条 Cleaning Reads;无翅萝卜蚜的测序结果共得到 47 113 716 条 Cleaning Reads。通过 Trinity 软件组装,混合样品萝卜蚜的测序结果共获得平均长度为 903 bp 的 Contig 87 479 条和平均长度为 716 bp 的 Unigene 69 588 条(表 1)。

表 1 混合样萝卜蚜转录组数据统计

Table 1 Summary for the *Lipaphis erysimi* (Kaltenbach) transcriptome

样品 Sample	基因总长度 Total length	总基因数 Total gene	平均长度/bp Average length	中位长度/bp Median length	N50 长度/bp N50 length
Unigene	49 871 355	69 588	716.67	338	1 433
Trinity	78 993 818	87 479	903.00	387	2 030

2.2 差异表达基因的筛选

为了探究有翅蚜和无翅蚜之间基因的差异表达,对有翅蚜和无翅蚜两组样品数据做了差异表达分析。利用 Benjamini-Hochberg^[6]方法对差异检验的 P 值作多重假设检验校正,通过控制校正后的 P 值即 FDR(false discovery rate)作为差异表达基因筛选的关键指标, $FDR<0.01$ 且 $\log_2(\text{Fold-Change})\geq|1|$ 作为差异表达基因的筛选标准。通过筛选得到有翅蚜和无翅蚜之间有 104 个显著性差异表达基因,其中 74 个基因上调表达,30 个基因下调表达。图 1 为火山图,表示的是基因差异表达显著性变化的分布情况。从图 1 可以看出,其中一些上调基因的纵坐标值很大,说明了这些上调基因的表达量变化差异十分显著,而且上调基因比下调基因表达量差异变化显著。

2.3 差异表达基因 GO 富集分析

GO 富集分析是用来系统性地描述生物体内基因和基因产物的属性的。GO 分为 3 个 ontology (本体),其中包括描述基因的分子功能(molecular

function)、参与的生物过程(biological process)以及所处的细胞位置(cellular component)。本研究将通过差异表达基因进行 GO 功能聚类分析,获得 9 条差异显著基因:差异基因在分子功能中富集在结合(binding);在生物学过程中富集在免疫系统反应(immune system process)、多细胞有机体过程(multicellular organismal process)、单有机体过程(single-organism process)、生物调节(biological regulation)和刺激反应(response to stimulus)。

2.4 差异表达基因 KEGG 富集分析

对有翅蚜和无翅蚜差异基因进行 KEGG 富集分析。差异基因 KEGG 富集中 q 值的取值范围是 $[0,1]$,在散点图(图 3)中,富集因子(rich factor)越大, q 值越接近于零则表示富集越明显。通过 KEGG 富集分析得到:致心律失常性右室心肌病(arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy)、扩张型心肌病(dilated cardiomyopathy)、肥大型心肌病(hypertrophic cardiomyopathy)等通路,这些均与疾病、免疫过程相关;还发现Hippo信号

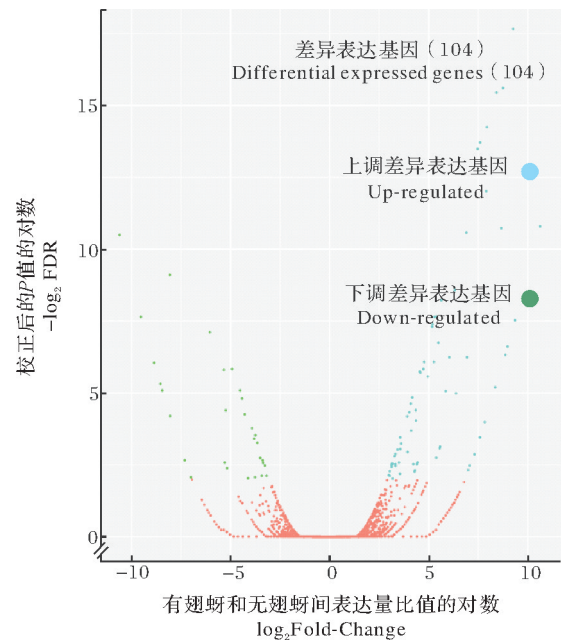
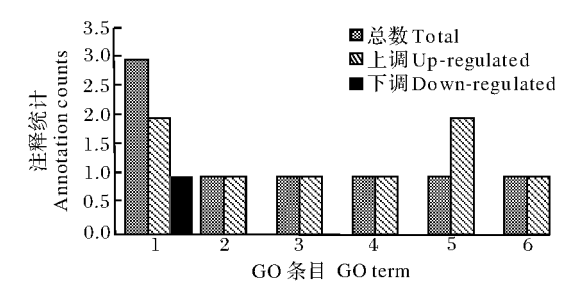


图 1 萝卜蚜有翅型和无翅型差异表达基因火山图
Fig.1 Volcano plots of differentially expressed genes between winged and wingless *Lipaphis erysimi*

图 1 萝卜蚜有翅型和无翅型差异表达基因火山图
Fig.1 Volcano plots of differentially expressed genes between winged and wingless *Lipaphis erysimi*



1.结合 Binding; 2.免疫系统过程 Immune system process; 3.多细胞生物过程 Multicellular organismal process; 4.单个组织过程 Single-organism process; 5.刺激反应 Response to stimulus; 6.生物调节 Biological regulation.

图 2 萝卜蚜有翅型和无翅型差异表达基因 GO 富集柱状图
Fig.2 GO enrichment histogram of differentially expressed genes between winged and wingless *Lipaphis erysimi*

通路(Hippo signaling pathway -fly)、甲状腺激素信

号通路(thyroid hormone signaling pathway)、调节肌动蛋白细胞骨架(vibrio cholerae infection)等途径的差异显著,说明这些代谢途径极有可能与萝卜蚜翅型分化相关;同时,2 组样品差异表达基因 KEGG 富集分析中催产素信号通路(oxytocin signaling pathway)的差异显著,此代谢途径与生殖相关。

3 讨 论

本研究利用 Illumina 测序技术,对萝卜蚜全虫进行转录组测序,构建了 Unigene 数据库,为研究萝卜蚜生理生化过程中的分子机制及萝卜蚜的基因工程防治提供有效基础资源。为了得到萝卜蚜全面的转录组信息,我们收集了萝卜蚜 1 龄若虫、2 龄若虫、3 龄有翅若虫、3 龄无翅若虫、4 龄有翅若虫、4 龄无翅若虫及有翅成虫和无翅成虫,等量 RNA 混合后,构建了萝卜蚜 Unigene 数据库,获得了 87 479 条 Contig 序列,平均长度为 903 bp;获得了 69 588 条 Unigenes 序列,平均长度为 716 bp;有翅萝卜蚜共获得了 44 620 184 条 Cleaning Reads;无翅萝卜蚜共获得了 47 113 716 条 Cleaning Reads。萝卜蚜全虫转录组的丰富度高于大猿叶甲 *Colaphellus bowringi* 全虫转录组^[7]和二化螟 *Chilo suppressalis* 中肠转录组^[8],但是低于黑翅土白蚁 *Odontotermes formosanus* 头部转录组^[9]和中黑盲蝽 *Adelphocoris suturalis* 后胸臭腺转录组^[10]。按照差异基因表达变化 $FDR \leq 0.01$ 、 $\log_2(\text{FoldChange}) \geq |1|$ 的原则,有翅型萝卜蚜和无翅型萝卜蚜之间共筛选出 104 个显著性差异表达基因,其中 74 个基因上调表达,30 个基因下调表达。

Hippo 信号通路在调节细胞增殖、细胞存活、分化、器官发育、细胞再生、干细胞生物学中起着关键的作用^[11-14]。已经证明,Hippo 信号的缺失会影响细胞增殖和细胞凋亡的阻断,从而导致细胞数量的急剧增加和组织过度生长^[11-19]。Hippo 信号通路能够使下游转录激活因子 Yki 磷酸化,在果蝇的翅膀发育过程中,Dpp 下游的转录因子 Mad (mother against dpp)能作为 Yki 结合的一个重要的转录因子,从而引起相关基因的转录^[20-21]。甲状腺激素信号通路(thyroid hormone signaling pathway)中产生甲状腺激素(thyroid hormones, THs)对促进机体细胞生长、组织分化、发育和成熟起着重要的作用。有翅型萝卜蚜和无翅型萝卜蚜差异基因KEGG代

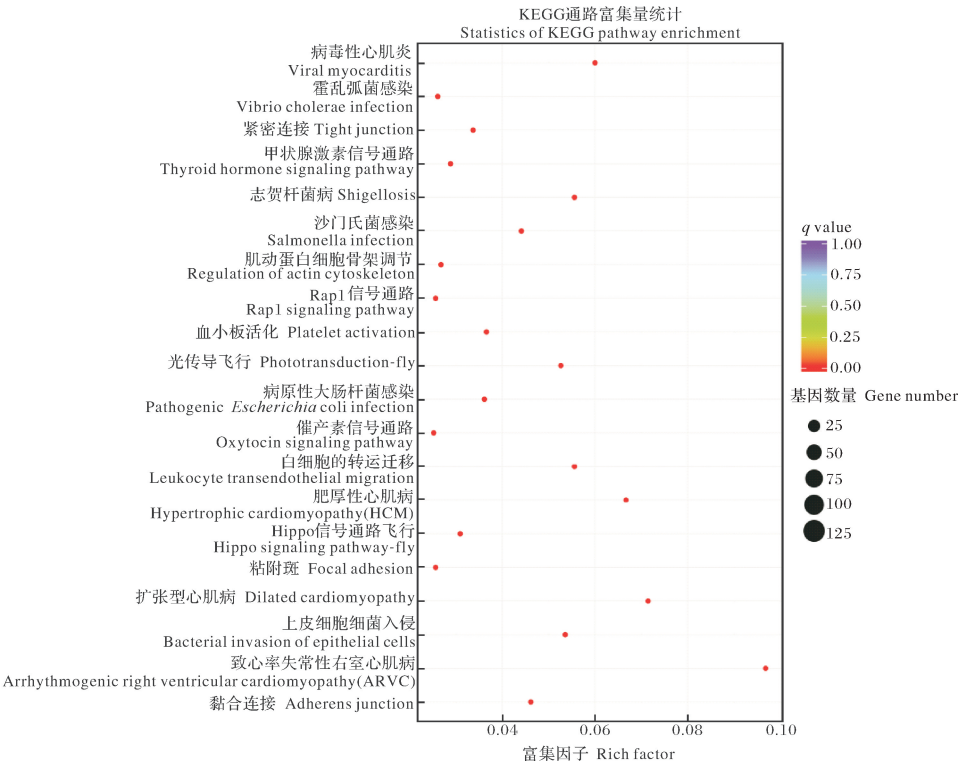


图 3 萝卜蚜有翅型和无翅型差异表达基因 KEGG 富集散点图

Fig.3 KEGG enrichment scatter plot of differentially expressed genes between winged and wingless *Lipaphis erysimi*

谢通路中显著富集的信号通路有 Hippo 信号通路 (hippo signaling pathway-fly)和甲状腺激素信号通路 (thyroid hormone signaling pathway),研究结果为进一步分析萝卜蚜的翅型分化提供了科学依据。

催产素是一种神经肽,在大多数哺乳动物分娩、鱼、两栖动物、爬行动物和鸟类产卵以及奶牛分泌牛奶时均起着关键性的作用^[22]。在无翅蚜和有翅蚜中,无翅型能大量繁殖后代,而有翅型能迁移到更适合的寄主植物上,2 种翅型的萝卜蚜在群体中的分工不同,且有翅蚜和无翅蚜差异表达基因 KEGG 富集分析中催产素信号通路(oxytocin signaling pathway)的差异显著,目前萝卜蚜的生殖相关分子机制还很不清楚,本研究结果为进一步分析萝卜蚜与翅型分化相关的生殖率差异提供了参考,后续需要通过荧光定量 PCR 等方式,进一步进行定量验证,以证明差异基因在翅型分化机制及生殖相关分子机制中的作用。

参 考 文 献

[1] 汤秋玲,马康生,高希武.蔬菜蚜虫抗药性现状及抗性治理策略[J].植物保护,2016,42(6):11-20.

[2] 陈根,吴刚.福州地区菜缢管蚜抗药性监测及其生化机制[J].福建农林大学学报(自然科学版),2005,34(2):204-207.

[3] 洪晓月,丁锦华.农业昆虫学[M].2 版.北京:中国农业出版社,2007:245-246.

[4] KUMAR A, CONGIU L, LINDSTRÖM L, et al. Sequencing, de novo assembly and annotation of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, transcriptome [J/OL]. PLoS One, 2014, 9 (1): e86012 [2019-01-05]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086012>.

[5] GRABHERR M G, HAAS B J, YASSOUR M, et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome [J]. Nature biotechnology, 2011, 29(7): 644-652.

[6] ASHBURNER M, BALL C A, BLAKE J A, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology [J]. Nature genetics, 2000, 25(1): 25-29.

[7] TAN Q Q, ZHU L, LI Y, et al. A de novo transcriptome and valid reference genes for quantitative real-time PCR in *Colaphellus bowringi* [J/OL]. PLoS One, 2015, 10 (2): e0118693 [2019-01-05]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118693>.

[8] MA W H, ZHANG Z, PENG C H, et al. Exploring the midgut transcriptome and brush border membrane vesicle proteome of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Walker) [J/OL]. PLoS One, 2012, 7: e38151 [2019-01-05]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038151>.

[9] HUANG Q Y, SUN P D, ZHOU X G, et al. Characterization of head transcriptome and analysis of gene expression involved in

caste differentiation and aggression in *Odontotermes formosanus* (Shiraki) [J/OL]. PLoS One, 2012, 7(11): e50383[2019-01-05]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050383>.

[10] 罗静. 中黑盲蝽信息素合成相关基因的筛选及功能分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2017.

[11] BARRY E R, CAMARGO F D. The Hippo superhighway: signaling crossroads converging on the Hippo/Yap pathway in stem cells and development [J]. Current opinion in cell biology, 2013, 25(2): 247-253.

[12] JOHNSON R, HALDER G. The two faces of Hippo: targeting the Hippo pathway for regenerative medicine and cancer treatment [J]. Nature reviews drug discovery, 2014, 13(1): 63-79.

[13] MO J S, PARK H W, GUAN K L. The Hippo signaling pathway in stem cell biology and cancer [J]. EMBO reports, 2014, 15(6): 642-656.

[14] PICCOLO S, DUPONT S, CORDENONSI M. The biology of YAP/TAZ: Hippo signaling and beyond [J]. Physiological reviews, 2014, 94(4): 1287-1312.

[15] CHAN S W, LIM C J, CHEN L, et al. The Hippo pathway in biological control and cancer development [J]. Journal of cellular physiology, 2011, 226(4): 928-939.

[16] HARVEY K F, PFLEGER C M, HARIHARAN I K. The *Drosophila* mst ortholog, Hippo, restricts growth and cell proliferation and promotes apoptosis [J]. Cell, 2003, 114(4): 457-467.

[17] OLDHAM S, HAFEN E. Insulin/IGF and target of rapamycin signaling: a TOR de force in growth control [J]. Trends in cell biology, 2003, 13(2): 79-85.

[18] PAN D. The Hippo signaling pathway in development and cancer [J]. Developmental cell, 2010, 19(4): 491-505.

[19] ZHAO B, LI L, LEI Q Y, et al. The Hippo-YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: an updated version [J]. Genes & development, 2010, 24(9): 862-874.

[20] OH H, IRVINE K D. *In vivo* analysis of Yorkie phosphorylation sites [J]. Oncogene, 2009, 28(17): 1916-1927.

[21] OH H, IRVINE K D. Cooperative regulation of growth by Yorkie and Mad through bantam [J]. Developmental cell, 2011, 20(1): 109-122.

[22] YANG H P, WANG L, HAN L, et al. Nonsocial functions of hypothalamic oxytocin [J]. ISRN neuroscience, 2013, 2013: 1-13.

Transcriptomic analysis of winged and wingless
Lipaphis erysimi (Kaltenbach)

ZHANG Qiuyuan LI Zhao ZHANG Huijie WANG Xiaoping ZHU Zhihui

*Hubei Insect Resources Utilization and Sustainable Pest Management Key Laboratory,
College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*

Abstract In this study, the transcriptome of winged and wingless *Lipaphis erysimi* was obtained with Illumina sequencing platform. A total of 107 992 806 cleaning reads were obtained from the mixed samples, and were assembled into 69 588 unigenes with the average length of 716 bp. A total of 44 620 184 and 47 113 716 Cleaning Reads were obtained from the winged and wingless aphid samples, respectively. Analysis of gene expression between the winged and wingless samples showed 104 significantly differentially expressed genes, of which 74 genes were up-regulated and 30 genes were down-regulated. Subsequently, GO annotation and KEGG pathway enrichment analysis showed that among those differentially expressed genes, Hippo signaling pathway, Thyroid hormone signaling pathway and Oxytocin signaling pathway were strongly related to the wing dimorphism and its related reproduction.

Keywords *Lipaphis erysimi*; transcriptome; bioinformatics analysis; differential expressed genes

(责任编辑: 边书京)