Wolbachia 对土耳其斯坦叶螨生殖影响的转录组测序分析

张燕娜， 赵 倩， 赵伊英*

（石河子大学农学院，石河子 832000）

摘要 为进一步探索内共生菌 *Wolbachia* 对土耳其斯坦叶螨生殖调控的影响，本试验筛选出完全感染 *Wolbachia* 和完全不感染的土耳其斯坦叶螨品系进行转录组测序。结果表明：感染 *Wolbachia* 后，叶螨体内一些与生殖相关的基因发生明显变化，其中 3 810 个基因在雌成螨中受到影响，2 885 个基因在雄成螨中受到影响；其中一些参与脂质转运、氧化还原反应、消化及解毒作用的基因具有明显的性别特异性。这为内共生菌 *Wolbachia* 引起宿主生殖调控提供了新的理论依据。

关键词 土耳其斯坦叶螨； *Wolbachia*； 转录组； 生殖调控

中图分类号： S 476 **文献标识码**： A **DOI**： 10.16688/j.zwbh.2018389

Transcriptome sequencing and analysis of the effects of *Wolbachia* on the reproduction of *Tetranychus turkestani*

ZHANG Yanna， ZHAO Qian， ZHAO Yiying*

（*College of Agriculture*, *Shihezi University*, *Shihezi* 832000, *China*）

Abstract To further explore the effects of endosymbiotic bacteria *Wolbachia* on reproduction of *Tetranychus turkestani*, the completely single-infected and uninfected *T. turkestani* lines were established and their transcriptomes were sequenced. The results showed that after infection with *Wolbachia*, some genes related to reproduction in the mites showed significant change, in which 3 810 genes were affected in female adult mites and 2 885 genes were affected in male mites. Some of the genes involved in lipid transport, redox reaction, digestion and detoxification were closely related to gender specific. Our study provides a new theoretical basis for the host reproductive regulation by *Wolbachia*.

Key words *Tetranychus turkestani*； *Wolbachia*； transcriptome； reproductive regulation

内共生菌广泛分布于昆虫体内，如头、胸、腹、唾液腺、消化道等[1]；其分布受许多因素影响，胚胎发育过程是最主要的因素之一[2]。昆虫与体内共生菌形成密切的互利共生关系[3]，内共生菌不仅能为宿主昆虫提供多种必需营养物质[4-5]，保护宿主免受病原菌侵害，抵御病原微生物侵染[6]，还能通过调节宿主耐热性、抗药性及改变体色等途径提高昆虫对环境的适合度[7-9]。由此可见，内共生菌是调控宿主昆虫新陈代谢及生物学性状的重要因子。

Wolbachia 是自然界迄今为止分布最广泛的内共生菌，约有 65%的昆虫受其感染[10-11]。作为生殖调控因子，*Wolbachia* 可诱导胞质不亲和性(CI)，即被 *Wolbachia* 感染的雄性个体与未感染的雌性个体或感染不同株系 *Wolbachia* 的雌性个体交配后不能或很少产生后代，或者后代偏雄性的现象；或通过孤雌生殖或杀雄作用来提高后代雌虫比例，影响种群动态[12-14]。研究已经证实感染 *Wolbachia* 后，在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 幼虫睾丸中发现与生殖有关的基因发生了下调，*Wolbachia* 还可使黑腹果蝇产生对 RNA 病毒的抗性[15-16]。土耳其斯坦叶螨 *Tetranychus turkestani* 是新疆棉田的重要害螨[17-18]，其体内 *Wolbachia* 可以诱导宿主产生胞质不亲和作用[19-20]，还可以通过增加雌性繁殖力来影响土耳其斯坦叶螨的适合度[21]。

在本研究中，我们通过比较感染和未感染 *Wolbachia* 的雌成螨和雄成螨的转录组测序数据，探究 *Wolbachia* 对宿主生殖调控的影响。发现 *Wolbachia* 影响叶螨许多基因的表达，包括氧化还原、消化

收稿日期： 2018-09-06 **修订日期**： 2018-11-19
基金项目： 国家自然科学基金(31860508)
* 通信作者 E-mail：2235804670@qq.com

解毒和繁殖等的基因。研究结果为节肢动物和内共生菌之间复杂的相互作用提供了新的见解。

1 材料和方法

1.1 试验叶螨的饲养及样品收集

土耳其斯坦叶螨:2016 年 6 月采自石河子大学农学院试验站试验田,在石河子大学昆虫生理实验室光照培养箱(25℃,L//D=16 h//8 h,RH 60%)中用豇豆 *Vigna sinensis* 饲养至今,饲养过程中未接触任何药剂。

1.2 土耳其斯坦叶螨 *Wolbachia* 感染情况检测

土耳其斯坦叶螨总 DNA 的提取采用苗慧等[22]的方法:挑取单头健壮雌成螨置于装有 25 μL STE 缓冲液(100 mmol/L NaCl,10 mmol/L Tris-HCl,1 mmol/L EDTA,pH=8.0)的 1.5 mL 离心管内,用塑料碾槌充分碾碎,然后加入 2 μL 蛋白酶 K(10 mg/mL),以上过程均在冰上完成。然后将离心管于 37℃孵育 30 min,95℃初始变性 5 min,离心 1~2 min 后,-20℃保存或取 2 μL作为 PCR 反应的模板,立即进行 PCR 扩增。

设计 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因特异性引物 WSP/F236 (5′-GACAGTTTAACAGCATTTTCAGGA-3′)和 WSP/R44 (5′-GTTTGATTTCTGGAGTTACATCAT-3′),DNA 扩增条带为 211 bp。反应总体系为 25 μL:2 μL DNA 模板,14.8 μL ddH_2O,2.5 μL 10× buffer,1.5 μL $MgCl_2$,2.0 μL dNTPs,0.2 μL *Taq* DNA 聚合酶,上、下游引物各 1 μL;扩增条件:94℃预变性 2 min;94℃ 30 s,55℃ 45 s,72℃ 45 s,35 个循环;72℃延伸5 min。取 PCR 产物 15~20 μL,用0.5%的琼脂糖凝胶电泳检测,Bio-RadGel DocEQ 凝胶成像系统下观察结果。

1.3 土耳其斯坦叶螨品系筛选

采用苗慧等[22]的方法筛选感染 *Wolbachia* 的土耳其斯坦叶螨品系:在装有海绵的培养皿中(直径 9 cm)放入完整的新鲜四季豆叶片,根据叶片大小用湿润脱脂棉条将其划分成 3~5 个面积近似的小室。从实验室品系中挑取静Ⅲ态未经过交配的雌螨放入小室中单独培养,使其进行产雄孤雌生殖,待后代雄螨发育为成螨后,将母体与其雄螨后代回交。回交2 d 后,将母体转移到新的小室中产卵,7 d 后对母体进行 PCR 检测。将感染 *Wolbachia* 的雌螨所产的后代重复以上步骤3~5代后,挑取 50 头左右进行 PCR,检测 *Wolbachia* 感染率,达到全部感染用于后续测序试验。

抗生素处理筛选不感染 *Wolbachia* 的品系:挑取土耳其斯坦叶螨新孵化的幼螨(尚未进食,近白色)放在特制的玻璃皿里,用 0.3%的四环素溶液饲喂 48 h。在装有海绵的培养皿中(直径 9 cm)放入完整新鲜四季豆叶片,四周围上湿润的脱脂棉条防止叶螨逃逸。将处理后的幼螨挑到叶片上,使其自然生长并繁殖后代。以后每日向培养皿中加入蒸馏水以保持海绵的湿润,并及时更换新鲜的叶片。幼螨成熟后,挑取 50 头左右进行 PCR,检测 *Wolbachia* 的感染情况,若全部个体均不感染 *Wolbachia*,则将该品系后代继续培养 3 至 5 代,用于后续测序试验。

1.4 供试样品转录组测序

收集感染和不感染 *Wolbachia* 的土耳其斯坦叶螨雌螨(分别编号为 A_W_F 和 A_F,F 表示雌性;W 代表*Wolbachia*)及雄螨(编号为 A_W_M 和 A_M,M 表示雄性),3 次重复。样品收集好后,快速置于液氮中,用于后续试验。采用天根 TRNzol Universal 总 RNA 提取试剂(DP431)提取供试土耳其斯坦叶螨总 RNA,步骤参考说明书。转录组测序工作委托北京诺禾致源生物科技有限公司完成。

1.5 实时荧光定量 PCR 鉴定

为了检测 RNA-Seq 分析的准确性,根据转录组测序数据筛选基因序列,利用 Primer Premier 5 进行引物设计及验证(表 1),将提取的供试材料 RNA 通过 TaKaRa 公司 Prime Script™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录获得 cDNA 第一链,取 5 μL 合成产物稀释 10 倍用于试验,根据 TaKaRa 公司 SYBR® Premix Ex *Taq*™(商品编号为 DRR420S)说明书进行荧光定量 PCR 反应(ABI 7300),每个反应重复 3 次。使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算相对表达量[23]。

表 1 *Wolbachia* 感染后土耳其斯坦叶螨雌雄螨基因 qRT-PCR 引物

Table 1 qRT-PCR primers for female and male *Tetranychus turkestani* after *Wolbachia* infection

性别 Sex	引物名称 Primer name	引物序列(5′-3′) Primer sequence	片段长度/bp Length of fragment
雌性 Female	107372304-F	TCCACTTTGCCTTTCTCACA	93
	107372304-R	CTGGCAAGTGCGGTAAGT	
	107367239-F	ACGCCAGCACATGGAC	89
	107367239-R	TCACCAGGAAGAA	
	107359874-F	ATTAACCCTCACTAAAGG	121
	107359874-R	ACCAATTCACCAGGAAGAAGATC	
	107361808-F	GACTTTCCAAAATGTCGTAA	87
	107361808-R	ATTTCATTCCATCGTCGTCACC	
	107369744-F	CGTTTTAAAACCTAAGAGTCAC	93
	107369744-R	TCTCCGCCATCAAATGTGGTTCG	
	107360201-F	TCTTTCGCACCTGGCGATTTGTT	105
	107360201-R	GCGTGATATGCCACAAGCTATGC	
	107367654-F	ATTAACCCTCACTAAAGGGA	97
	107367654-R	CTTCATAGCCATCAGATTGACCT	
	107363160-F	TGCTAGTTATTGCTCAGCGG	105
	107363160-R	GCAACAGATACCTTTGATTCAGT	

续表 1　Table 1(Continued)

性别 Sex	引物名称 Primer name	引物序列(5′-3′) Primer sequence	片段长度/bp Length of fragment
雄性 Male	107361067-F	CACACTCTGCCAACACAAGC	89
	107361067-R	ACCAACCATCAAATCTGCTCC	
	107362499-F	GGGCACGGTTTTCAATGTTTACT	101
	107362499-R	AGAGCTGAGCACAATACTAACGA	
	107364853-F	GCAGCATTCCGTTCACTGAC	83
	107364853-R	TCCCATGCATAGCCTCTGGA	
	107366335-F	CTACTGCTGTCGTTGAACCT	149
	107366335-R	GAGATTAGTATAAGTTGGCCGCTCA	
	107360662-F	CTTCAAGCGGCATCAGAGC	105
	107360662-R	CGCATCTGACCCTTGAACTTC	
	107364811-F	CGGTTTGCTCACTCATGTTTCA	97
	107364811-R	ATTAGCCACAAGACGTCCCA	
	107369943-F	GTCTCCGTGGTGGAATGC	107
	107369943-R	TTGGATTTTGGCTTTCACG	
	107367654-F	AGCTGCCGCACTCGTTC	121
	107367654-R	AGCATAAGCAGGAGCAAT	

2　结果与分析

2.1　有参转录组测序结果分析

利用 Illumina 测序技术对感染 *Wolbachia* 和未感染 *Wolbachia* 的土耳其斯坦叶螨的雌成螨和雄成螨分别进行转录组测序。感染 *Wolbachia* 的雌成螨平均获得 24 117 129 clean reads,比对到参考基因组的 reads 数目为 40 957 849,占 clean reads 的 84.91%,比对到参考基因组唯一位置的 reads 数目为 39 924 187,占所有 reads 的 82.78%, GC 平均含量为 36.93%。感染 *Wolbachia* 的雄成螨平均获得 21 783 386 clean reads,比对到参考基因组的 reads 数目为 35 671 706,占 clean reads 的 81.89%,比对到参考基因组唯一位置的 reads 数目为 34 743 136,占所有 reads 的 79.75%, GC 平均含量为 36.24%(表 2)。

表 2　土耳其斯坦叶螨样品测序数据质量评估[1)]

Table 2　Summary of transcriptome sequencing results of *Tetranychus turkestani*

样本 Sample	Clean reads	Q30	GC/%	Total reads	Total map	Unique map
A_W_F1	24 675 796	93.38	37.39	49 351 592	41 989 474(85.08%)	40 897 384(82.87%)
A_W_F2	25 505 369	93.30	37.32	51 010 738	43 236 872(84.76%)	42 083 943(82.50%)
A_W_F3	22 170 221	89.84	36.08	44 340 442	37 647 200(84.90%)	36 791 235(82.97%)
平均值 Mean	24 117 129	92.17	36.93	48 234 257	40 957 849(84.91%)	39 924 187(82.78%)
A_W_M1	21 723 614	93.15	36.02	43 447 228	35 127 231(80.85%)	34 235 001(78.80%)
A_W_M2	20 967 579	93.45	36.72	41 935 158	34 643 283(82.61%)	33 674 218(80.30%)
A_W_M3	22 658 966	90.01	35.97	45 317 932	37 244 604(82.19%)	36 320 190(80.15%)
平均值 Mean	21 783 386	92.20	36.24	43 566 773	35 671 706(81.89%)	34 743 136(79.75%)

1) A_W_F 感染 *Wolbachia* 的雌成螨, A_W_M 感染 *Wolbachia* 的雄成螨; Total map:能定位到基因组上的测序序列的数量统计; Unique map: 在参考序列上有唯一比对位置的测序序列的数量统计。
A_W_F: Female adult infected with *Wolbachia*; A_W_M: Male adult infected with *Wolbachia*; Total map: Statistics of the number of sequences against the genome sequence; Unique map: The number of sequences with unique alignment positions on the reference sequence.

2.2　差异表达基因的 GO 分析

GO 功能分类发现,在雌成螨中感染 *Wolbachia* 品系变化明显的主要有以下几个方面:生物过程中的细胞蛋白质代谢过程、病毒-宿主交互作用、磷酸盐化合物代谢过程及应激反应;分子功能中的氧化还原酶活性、RNA 结合、转移酶活性及核苷酸结合蛋白(图 1a)。在感染 *Wolbachia* 的雄成螨中包括生物过程中的有机氮化合物代谢过程、转运和肽生物合成;分子功能中为参与氧化还原过程的 GTP 酶活性、锌离子结合及核苷酸结合(图 1b)。在整个感染过程中,雌成螨和雄成螨都做出了相应的应激反应。

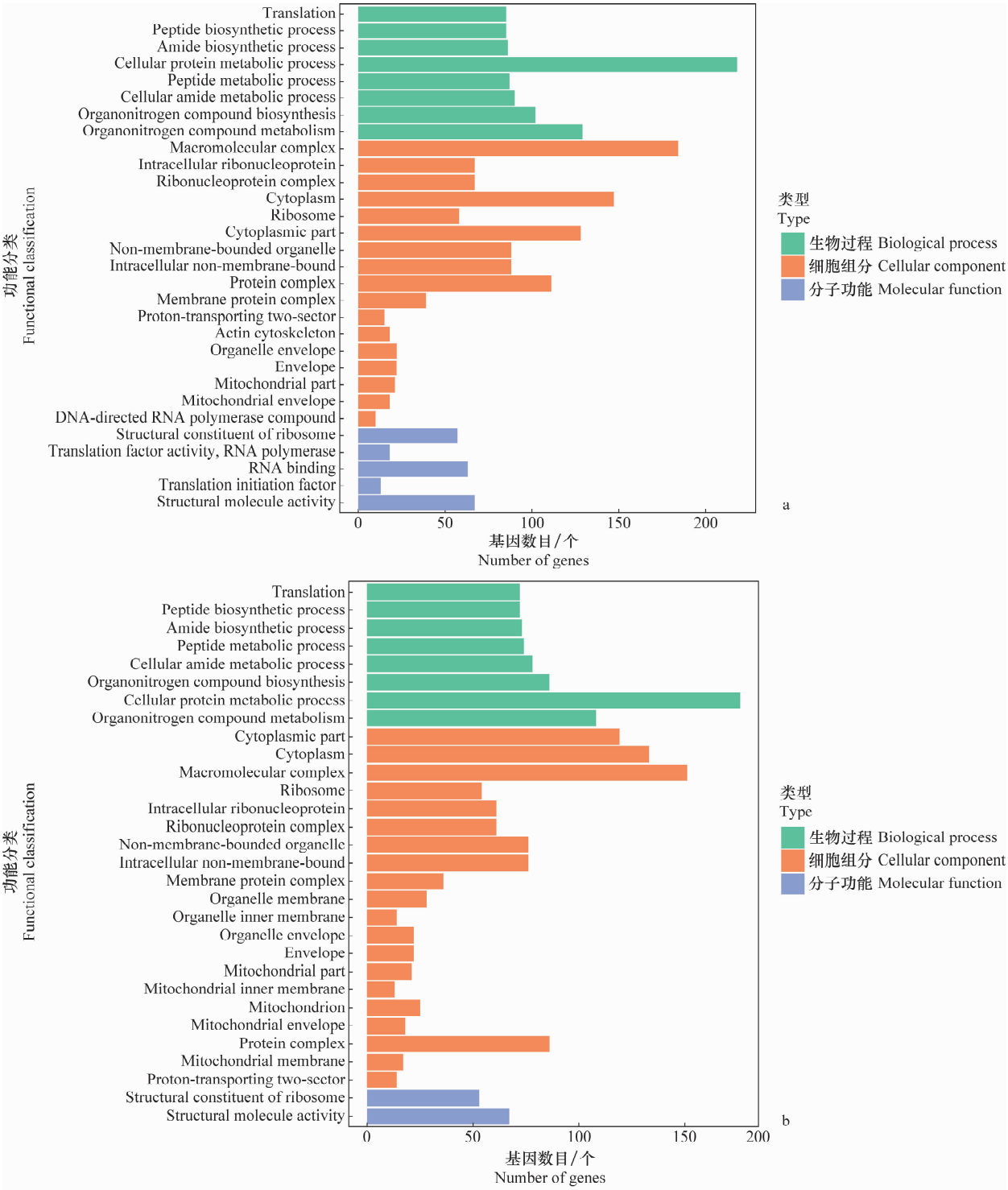
2.3　差异表达基因 KEGG 富集分析

对差异表达基因进行 KEGG 通路分类注释,并对感染 *Wolbachia* 的雌雄螨的差异表达基因富集度最高的 10 个通路进行比较,结果表明:在雌成螨中,*Wolbachia* 感染品系中的差异表达基因主要集中到 80 个 KEGG 途径,其中显著富集的代谢途径主要涉及核糖体、氧化磷酸化、吞噬和 RNA 转运等(图 2a)。在雄成螨中,差异表达基因主要集中到 81 个 KEGG 途径,其中显著富集的代谢途径主要涉及蛋白酶体、吞噬、RNA 转运、蛋白质输出、MAPK 信号通路及 mRNA 监测途径(图 2b)。

2.4　差异表达基因筛选

以不同试验条件下的差异表达基因的 FPKM 值为表达水平,进行层次聚类(hierarchical clustering)分析,不同颜色的区域代表不同的聚类分组信息,同组内的基因表达模式相近,可能具有相似的功能或参与相同的生物学过程,结果显示,基因表达都是特异性的,A_W_M 与 A_M 及 A_W_F 与 A_F 之间的比较表明,每一个文库都有独特的

转录变化(图 3),这表明有许多基因受到了内共生菌 *Wolbachia* 的影响,尽管不能排除在筛选完全不感染 *Wolbachia* 品系过程中残留的抗生素引起的基因差异。



雌性(a)和雄性(b)的差异表达基因的GO功能富集图。绿色代表生物过程，橙色代表细胞组分，蓝色代表分了功能。按生物过程、细胞组分和分子功能三大类别及差异表达基因上下调分类作柱状图

GO functional enrichment map of differential expressed gene in female (a) and male (b). Green represents biological processes; orange represents cellular composition, and blue represents molecular function. Histograms are drawn according to the three categories, biological processes, cell components, and molecular functions, and up- and down-regulated genes

图 1　土耳其斯坦叶螨差异表达基因的 GO 富集分析

Fig. 1　Gene ontology (GO) enrichment analysis of differentially expressed genes of *Tetranychus turkestani*

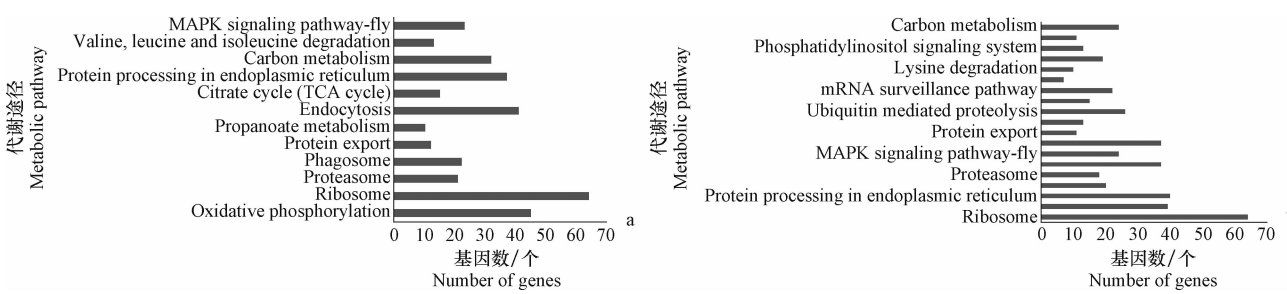
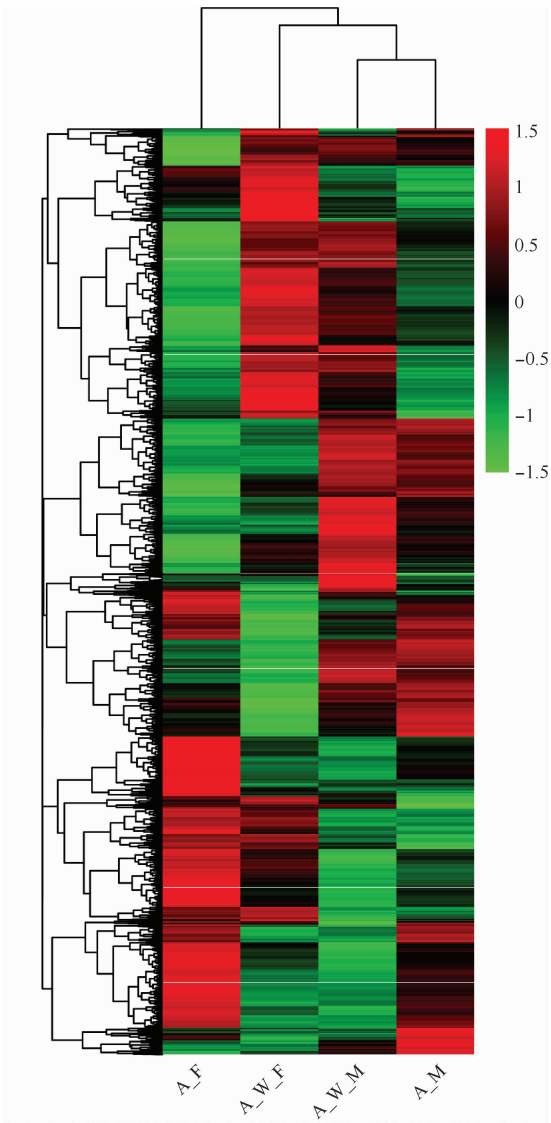


图 2　土耳其斯坦叶螨雌性(a)和雄性(b)差异表达基因的 KEGG 富集分析

Fig. 2　KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes between female (a) and male (b) *Tetranychus turkestani*



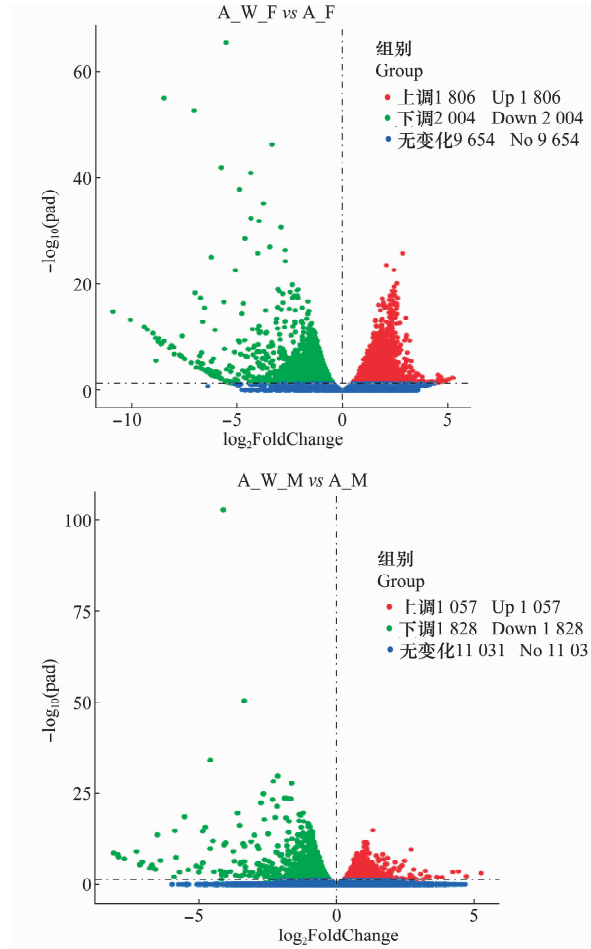
红色表示高表达基因，绿色表示低表达基因。颜色从红到绿，表示 $\log_{10}$(FPKM+1)从大到小

Red indicates highly expressed genes and green indicates low expressed genes. The color ranges from red to green, indicating that $\log_{10}$ (FPKM+1) is decreasing

图 3　土耳其斯坦叶螨差异表达基因聚类热图

Fig. 3　Hierarchical clustering heat of the differentially expressed genes of *Tetranychus turkestani*

对样本 cluster 后的 unigene 进行差异表达分析。以 $\log_2$FoldChange＞1 且 P＜0.05 为标准进行样本间的差异表达基因筛选，完全单感染 *Wolbachia* 的雌成螨和完全不带菌的雌成螨相比上调表达的基因有 1 806 个，下调表达基因有 2 004 个；完全单感染 *Wolbachia* 和完全不带菌的雄成螨相比有 1 057 个基因上调表达，1 828 个基因下调表达(图 4)。



红色散点代表上调基因，绿色散点代表下调基因，A_W_F为感染*Wolbachia*的雌成螨；A_F为完全不感染*Wolbachia*的雌成螨；A_W_M为感染*Wolbachia*的雄成螨；A_M为完全不感染*Wolbachia*的雄成螨

Red scatters represent up-regulated genes, and green scatters represent down-regulated genes. A_W_F: Female adult infected with *Wolbachia*; A_F: Female adult uninfected with *Wolbachia*; A_W_M: Male adult infected with *Wolbachia*; A_M: Male adult uninfected with *Wolbachia*

图 4　土耳其斯坦叶螨差异表达基因火山图

Fig. 4　Volcano diagrams of the differentially expressed genes of *Tetranychus turkestani*

为深入了解内共生菌 *Wolbachia* 对叶螨的影响，我们将变化明显的差异表达基因列表分析（表 3）。已知细胞色素 P450、谷胱甘肽 *S*-转移酶及 ABC 转运蛋白是叶螨体内最常见的几种解毒代谢基因，受 *Wolbachia* 感染后的雌成螨中有 4 种 P450，雄成螨中有 6 种 P450，它们大多数为上调表达。3 个谷胱甘肽 *S*-转移酶基因在雌成螨中全部为上调表达，而在雄成螨中编码谷胱甘肽 *S*-转移酶基因（107360606）为下调表达。4 个 ABC 转运蛋白基因在雌（novel. 5873、novel. 11318、107366618 和 107362311）、雄螨（107366618 和 107362311）中均为下调表达。

表 3 感染 *Wolbachia* 的土耳其斯坦叶螨的差异表达基因[1)]

Table 3 Differentially expressed genes in response to *Wolbachia* infection in *Tetranychus turkestani*

基因类别 Gene category	基因 ID Gene ID	描述 Description	雌成螨 Female		雄成螨 Male	
			$\log_2$(FC)	*P* value	$\log_2$(FC)	*P* value
解毒代谢 Detoxification	107359215	cytochrome P450 2J6-like	2.40	2.79E-22	—	—
	novel. 6027	PF00067: cytochrome P450	1.52	1.69E-13	—	—
	107360960	cytochrome P450 2J2-like	1.54	0.000 24	—	—
	107360212	cytochrome P450 4C1-like	—	—	1.62	0.000 8
	107365376	cytochrome P450 4C1-like	—	—	1.44	3.71E-07
	107368633	cytochrome P450 18a1-like	—	—	1.18	0.0010 0
	107371796	cytochrome P450 2C31-like	—	—	1.05	0.0010 0
	107370208	cytochrome P450 3A8-like	−2.89	6.64E-10	−1.02	2.90E-07
	107360159	ABC transporter G family member 23-like	—	—	1.56	0.010 0
	107369561	ABC transporter G family member 20-like	—	—	1.22	3.09E-07
	novel. 11641	PF00005: ABC transporter	—	—	1.08	0.010 0
	novel. 5791	PF00005: ABC transporter|PF00664: ABC transporter transmembrane region	−6.63	1.18E-15	−7.06	2.63E-08
	novel. 5873	PF00005: ABC transporter	−6.05	2.38E-11	—	—
	novel. 11318	PF12698: ABC-2 family transporter protein	−4.95	3.82E-06	—	—
	107366618	ABC transporter G family member 23-like	−3.56	9.33E-05	−2.00	0.001 0
	107362311	ABC transporter B family member 7-like	−1.26	0.000 38	—	—
	107364600	*S*-formylglutathione hydrolase-like	1.88	4.68E-16	—	—
	novel. 613	PF13417: glutathione *S*-transferase	1.34	5.19E-05	—	—
	107360789	glutathione *S*-transferase Mu 1	1.38	0.001585	—	—
	107360606	glutathione *S*-transferase Mu 1-like	—	—	−1.30	0.000 3
生殖相关 Reproduction-related	107372239	histone H3.3-like	2.07	2.61E-12	—	—
	107372222	histone H3.3-like	1.80	9.96E-06	—	—
	107360331	histone H2A	1.05	5.85E-05	—	—
	107362196	innexin inx2-like	1.32	2.53E-05	—	—
	107370220	vitellogenin-4-like	−3.00	0.010 0	—	—
	107360201	histone H2B-like	−7.61	1.06E-12	−5.10	3.89E-07
	novel. 9493	PF16211: C-terminus of histone H2A|PF00125: core histone H2A/H2B/H3/H4	−4.35	8.04E-45	−3.36	6.56E-55
	novel. 114	PF00850: histone deacetylase domain	−3.38	8.00E-05	—	—
	novel. 6374	PF08214: histone acetylation protein	−2.28	0.000 1	—	—
	107366746	histone acetyltransferase KAT7-like	−1.07	8.29E-05	—	—
	107359821	histone H3.3	−1.06	6.13E-09	—	—
	107365091	epididymal secretory protein E1-like	3.05	7.62E-13	—	—
	107365137	epididymal secretory protein E1-like	1.81	9.68E-05	—	—
	107369361	epididymal secretory protein E1-like	1.65	2.12E-09	—	—
	107365136	epididymal secretory protein E1-like	1.59	0.000 5	—	—
	107366133	innexin inx2-like	−1.59	0.000 1	—	—
	107365265	innexin inx2-like	−1.44	0.012 0	—	—
	107366816	innexin inx2-like	−1.05	3.89E-08	—	—
	107364383	cathepsin L1-like	—	—	1.38	0.010 0
	107371849	cathepsin L1-like	—	—	1.30	0.009 0
	107371482	cathepsin B-like	—	—	1.04	0.006 0
	107364338	cathepsin L-like	—	—	1.00	4.62E-05

续表 3　Table 3(Continued)

基因类别 Gene category	基因 ID Gene ID	描述 Description	雌成螨 Female		雄成螨 Male	
			log_2(FC)	*P* value	log_2(FC)	*P* value
	novel. 5290	PF13857: ankyrin repeats (many copies)	2.03	1.19E-05	—	—
	novel. 15743	PF12796: ankyrin repeats (3 copies)	—	—	−3.30	1.22E-05
	novel. 2605	PF12796: ankyrin repeats (3 copies)	—	—	—	—
	107370028	SOX domain-containing protein dichaete-like	−1.88	0.002 0	—	—
	novel. 8471	PF06585: haemolymph juvenile hormone binding protein (JHBP)	—	—	−2.34	8.45E-08
	107362682	protein kinase C-binding	−1.81	6.90E-05	—	—
细胞凋亡 Apoptosis	novel. 7788	PF00102: protein−tyrosine phosphatase	4.52	0.002 0	—	—
	novel. 6235	PF07525: SOCS box	3.79	0.003 0	—	—
	107368235	protein D2-like	2.83	0.010 0	—	—
	107372304	heat shock protein 105 kDa-like	2.81	0.005 0	—	—
	107367239	protein argonaute-1-like	2.54	0.010 0	—	—
	107359874	protein argonaute-4-like	2.25	6.10E-21	1.01	2.78E-14
	107365809	zinc finger protein 271-like	1.92	2.23E-08	—	—
	107369599	apoptosis regulator BAX-like	2.44	6.35E-06	1.16	0.000 7
	107359187	cholinesterase 2-like	2.15	2.22E-10	—	—
	107361446	acetylcholinesterase-like	−6.67	8.15E-07	−7.72	2.58E-09
	107362926	acetylcholine receptor subunit beta-like 1	−2.04	0.001 0	—	—
	107364800	acyl-protein thioesterase 2-like	−1.84	2.00E-13	−1.35	8.28E-11
	107362928	acetylcholine receptor subunit beta-like 2	−1.63	0.007 0	—	—
	107363807	chymotrypsin-2-like	—	—	2.68	0.002 0
	107362797	chymotrypsin-1-like	−4.89	2.22E-11	−2.10	1.12E-05
	107363691	multidrug resistance-associated protein 1-like	−1.74	8.68E-08	−1.13	2.58E-07
	107361599	multidrug resistance-associated protein 1-like	−1.66	1.14E-10	—	—
	107365725	down syndrome cell adhesion molecule-like	−2.12	0.008 0	−1.17	0.005 0
	107366084	down syndrome cell adhesion molecule-like	−2.09	0.000 2	−1.00	0.000 4
	107366690	down syndrome cell adhesion molecule-like	−2.05	0.002 0	−1.16	4.71E-06
	107361954	down syndrome cell adhesion molecule-like	−1.85	8.21E-05	−1.07	3.51E-05
	107364695	down syndrome cell adhesion molecule-like	−1.76	0.000 2	—	—
	novel. 7521	PF07679: immunoglobulin I-set domain	—	—	−1.27	0.006 0
载脂蛋白 Apolipoprotein	107359538	apolipoprotein D-like	−4.48	0.000 2	−1.90	0.001 0
	107369351	apolipoprotein D-like	−3.22	0.000 3	—	—
	107359541	apolipoprotein D-like	−2.54	0.001 6	—	—
	107369114	apolipoprotein D-like	−1.78	0.002 0	—	—
	107367815	apolipoprotein D-like	—	—	1.58	0.005 0
体液免疫	107369405	cystatin-B-like	1.42	4.82E-09	—	—
Humoral immunity	novel. 5543	PF00031: cystatin domain	−1.58	0.002 0	—	—
结构蛋白	novel. 764	PF00379: insect cuticle protein	1.75	0.000 10	—	—
Structural protein	107362770	pupal cuticle protein 36-like	−2.90	3.79E-18	—	—
	107362526	adult-specific rigid cuticular protein 15.7-like	−2.29	1.65E-05	−1.37	0.001 0
	107360092	cuticle protein 38-like	−2.27	8.71E-16	—	—
	107361067	cuticle protein 16.8-like	—	—	3.83	0.002 0
	107370378	cuticle protein 16.8-like	—	—	2.50	0.010 0
	novel. 6457	PF00379: insect cuticle protein	—	—	1.74	0.008 0
	107360454	keratin-associated protein 21-1-like	—	—	−2.09	6.94E-06

1) 基因按生物过程或分子功能排序,FC 代表倍数变化。
Genes are ranked by biological process and/or molecular function. FC indicates fold change.

脂质运载蛋白(lipocalin)是能够结合疏水性的小分子蛋白质,受 *Wolbachia* 感染后雌雄螨中全部表现为下调表达(雌性中 4 个,雄性中 2 个; 表 3)。一些与生殖功能相关的基因如组蛋白基因、编码卵黄蛋白的基因(107370220)、innexin inx2(107366133、107365265 等)、附睾分泌蛋白(107365091、107365137 等)、cathepsin(107371482、107364383 等)等受内共生菌 *Wolbachia* 感染后发生了明显的上调或下调变化,这可能影响了

卵子或胚胎的形成。

2.5 差异表达基因的 qRT-PCR 荧光定量分析

随机筛选雌雄螨各 8 个差异表达基因(上调 5 个,下调 3 个)采用荧光定量 PCR 验证 RNA-Seq 测序结果。结果显示,实时荧光定量 PCR 与转录组测序的结果在基因表达变幅上有一定的差异,但基因的表达趋势是一致的(图 5),验证了转录组测序结果的可靠性。

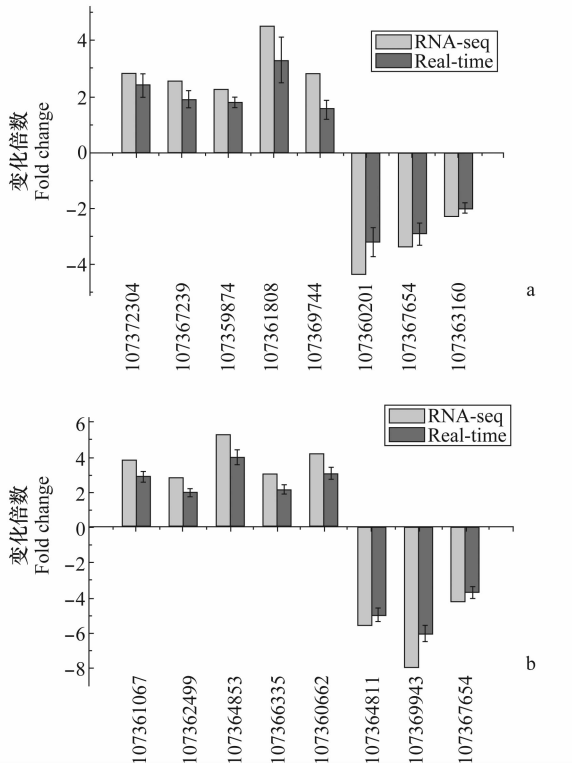


图 5 土耳其斯坦叶螨雌性(a)和雄性(b)差异基因的 qRT-PCR 验证

Fig. 5 Validation of RNA-sequencing data by real-time quantitative-PCR analysis in females (a) and males (b) of *Tetranychus turkestani*

3 讨论

Wolbachia 是广泛存在于节肢动物体内的共生细菌,可通过宿主卵的细胞质进行母系遗传,并且能够通过不同的方法调控寄主的生殖,实现其在宿主种群中的稳定存在和传播。有研究表明 *Wolbachia* 可以在分子水平和细胞水平上与其宿主之间进行相互作用,诱导宿主强胞质不亲和性,并提高雌性的繁殖力[21-24]。*Wolbachia* 增加了 *D. mauritiana* 的繁殖力和生殖系干细胞的有丝分裂活性,并减少了卵巢中的程序性细胞死亡[25],*Wolbachia* 诱导的胞质不亲和性强度随着雄性年龄和幼虫阶段发育显著降低[26]。本研究中,我们选取完全感染 *Wolbachia* 和完全不感染 *Wolbachia* 的土耳其斯坦叶螨作为试验材料,挑选 1 日龄的雌成螨和雄成螨进行转录组测序,结果显示:与卵子或精子形成相关的基因,如组蛋白基因、卵黄蛋白基因、组织蛋白酶 B 等发生了明显的变化。卵黄原蛋白(vitellogenin, Vtg)作为卵黄蛋白(yolk protein, YP)的前体参与卵生动物的卵子发生。卵黄蛋白对于卵母细胞的生长和分化以及将金属离子、脂质和维生素运送到卵母细胞中起重要作用[27-28]。受 *Wolbachia* 感染之后,雌成螨中编码卵黄原蛋白的基因(107370220)发生了明显的下调,推测其可能在增强雌性的生殖力方面起作用。

组蛋白磷酸化是组蛋白氨基酸残基的磷酸化修饰,是一类重要的翻译后修饰,与有丝分裂和减数分裂的染色质压缩、染色质功能调节、转录的激活与抑制、DNA 损伤修复以及物质代谢等多种机制相关[29]。本研究发现,感染 *Wolbachia* 的雄成螨中编码组蛋白 H2B 的基因(107360201, $\log_2$FC-5.10)发生了显著下调。组蛋白 H2B 主要以变异体 TH2B 和 H2BFW 形式特异地存在于雄性生殖细胞系中,体细胞系中没有变异体,其可能参与调控特殊染色质区域的基因转录。潘晓燕等[30]和 Lu 等[31]在小鼠精子发生不同阶段检测到了睾丸特异组蛋白 TH2B 的第 116 位苏氨酸的磷酸化。研究证实,TH2B 磷酸化在减数分裂后染色质折叠和压缩过程中发挥了直接的调控作用。而感染 *Wolbachia* 的雄成螨,编码组蛋白 H2B 的基因表达量大幅下调,可能会影响雄性精子的生成。H3.3 是重要的母源因子,在正常受精后精子的重编程以及体细胞核移植后供体细胞核的重编程过程中起重要作用。在正常受精过程中,H3.3 能替换精子中的鱼精蛋白,将其重编程为雄原核[32]。感染 *Wolbachia* 的雌雄成螨中编码组蛋白 H3.3 的基因发生了明显的变化,也有可能引起雄性不育现象的发生。

Inx 基因在动物体内的分布比较广,Inx2 在控制果蝇胚胎前肠的发育等方面发挥着重要作用[33]。Lehmann 等[34]的研究表明,Inx2 蛋白和 Inx3 蛋白在膜上的分布和定位相互影响,当沉默 *Inx2* 基因的表达时,Inx3 蛋白会在细胞中积累并分布紊乱,反之亦然。*Inx2* 和 *Inx3* 基因协同表达后通过细胞内的 C 端功能域相互作用形成异聚化的 Inx2∶Inx3 通道,这对果蝇胚胎上皮组织发育和胚胎表皮极性形成起着关键作用。如果 *Inx2* 或 *Inx3* 发生突变,会

导致表皮上有大的皮孔形成,极端情况下甚至导致外皮的缺失。感染了 *Wolbachia* 后,雌雄成螨中 *Inx*2 发生了不同程度的上调或下调变化,而 *Inx*3 都趋于稳定,这将导致 Inx2:Inx3的比例不平衡,影响胚胎的正常发育。

锚蛋白重复序列(ankyrin repeat,ANK)是普遍存在于生物体中的一种蛋白质序列模体(motif)。这类蛋白质数量众多,形成了一个大的家族,包括 CDK (cyclin-dependent kinase)抑制剂、转录调控因子、细胞骨架形成体(cytoskeletal organizers)、发育调控子、膜蛋白和毒素等。ANK 结构域的主要生物功能是介导蛋白质与蛋白质之间的相互作用,ANK 结构域可以特异性地抑制 CDK4 和 CDK6 的激酶活性,对哺乳动物细胞周期 G1 后期的调控产生影响[35]。本试验中,受内共生菌 *Wolbachia* 感染后,雌雄螨中编码 ANK 结构域的基因(novel. 5290, log2FC2. 03; novel. 15743,log2FC-3. 30)均发生了明显的变化。

土耳其斯坦叶螨 *T. turkestani* 体内含有大量的解毒代谢基因,主要包括昆虫细胞色素 P450 酶系(P450s)、谷胱甘肽-S 转移酶(GSTs)及 ABC 转运蛋白等,在对植物次生物质的解毒代谢及对寄主植物的适应性中发挥了重要作用。本试验发现,受 *Wolbachia* 感染之后,雌雄叶螨中大量的编码解毒代谢的基因发生了显著的变化,表明 *Wolbachia* 影响了叶螨的摄食行为和解毒代谢,这对了解螨虫的抗药性机制具有重要参考意义。氧化还原酶能够参与能量代谢和氧化还原平衡。破坏氧化还原稳态的一个后果是 DNA 损伤,包括单链和双链断裂,碱基和脱氧核糖修饰以及 DNA 交联[36]。感染 *Wolbachia* 之后,叶螨有多个基因参与氧化还原反应,*Wolbachia* 能够诱导叶螨的抗氧化剂相关基因上调表达,来降低活性氧水平从而维持 *Wolbachia*-宿主共生关系的可能性;有研究表明在二斑叶螨 *T. urticae* 中氧化还原酶活性与其寄主植物转移和滞育有关[37],这证明了叶螨有通过调节氧化还原酶活性来响应应激反应的可能性。

受 *Wolbachia* 感染之后,土耳其斯坦叶螨体内影响细胞凋亡的基因发生了显著的变化,如编码胰凝乳蛋白酶(107362797)、乙酰胆碱酯酶(107361446、107362926、107364800)的基因。研究发现,小菜蛾 *Plutella xylostella* 幼虫中肠类胰蛋白酶能够激活 Bt 原毒素,印度谷螟 *Plodia interpunctella* 幼虫中肠内的类胰凝乳蛋白酶对 Bt 原毒素也具有一定的激活作用[38]。这些蛋白酶可以通过各种昆虫种群的中肠蛋白酶水解活性的差异而呈现一定的特异性。Heckel 等认为,昆虫对 Bt 杀虫蛋白产生抗性有可能依赖于昆虫肠道中蛋白酶水平或类型的变化[39]。乙酰胆碱酯酶(ACh E)作为有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的作用靶标,其对杀虫剂的敏感性下降是导致害虫抗药性形成的重要机制之一。受 *Wolbachia* 感染之后,编码 chymotrypsin-1 蛋白的基因(107362797, $\log_2$FC-4. 89; $\log_2$FC-2. 10);编码 acetylcholinesterase 的基因(107361446, $\log_2$FC-6. 67; $\log_2$FC-7. 72)在雌雄成螨中发生了显著下调变化,这可能降低了 Bt 抗性,为转 Bt 基因作物靶标昆虫抗性治理提供了一个新的方向。

4　结论

本试验发现,内共生菌 *Wolbachia* 感染影响了宿主土耳其斯坦叶螨的基因表达,并具有性别特异性。叶螨的多种代谢途径受 *Wolbachia* 感染影响,尤其是解毒代谢过程、氧化还原过程、生殖及免疫相关基因表达的显著差异,以及脂质运载蛋白和其他功能途径。研究结果有助于我们理解宿主与共生菌的相互作用关系,为全面探究内共生菌对宿主生殖调控的影响奠定基础。

参考文献

[1] HILGENBOECKER K, HAMMERSTEIN P, SCHLATTMANN P, et al. How many species are infected with *Wolbachia*—A statistical analysis of current data, FEMS [J]. Microbiology Letters, 2008, 281:215 - 220.

[2] SALZBERG S L, PUIU D, SOMMER D D, et al. Genome sequence of the *Wolbachia* endosymbiont of *Culex quinquefasciatus* [J/OL]. Journal of Bacteriology, 2009, 191: 1725. DOI: 10. 1128/JB. 01731 - 08.

[3] 吕仲贤,俞晓平,陈建明,等. 共生菌对褐飞虱生长发育和生殖的影响[J]. 植物保护学报, 2001,28(3): 193 - 197.

[4] BIRKLE L M, MINTO L B, DOUGLAS A E. Relating genotype and phenotype for tryptophan synthesis in an aphid-bacterial symbiosis [J]. Physiological Entomology, 2002, 27(4): 302 - 306.

[5] DOUGLAS A E. The microbial dimension in insect nutritional ecology [J]. Functional Ecology, 2009, 23: 38 - 47.

[6] SU Qi, OLIVER K M, XIE Wen, et al. The whitefly-associated facultative symbiont *Hamiltonella defensa* suppresses induced plant defences in tomato [J]. Functional Ecology, 2015, 29(8): 1007 - 1018.

[7] CHEN Deqiao, MONTLLOR C B, PURCELL A H. Fitness effects of two facultative endosymbiotic bacteria on the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum* and the blue alfalfa aphid, *A. kondoi* [J]. Entomologia Experimentalis et Applicata, 2000, 95(3): 315 - 323.

[8] OLIVER K M, DEGNAN P H, BURKE G R, et al. Facultative symbionts in aphids and the horizontal transfer of ecologically important traits [J]. Annual Review of Entomology, 2010, 55: 247 - 266.

[9] TSUTOMU T, KOGA R, HORIKAWA M, et al. Symbiotic bacterium modifies aphid body color [J]. Science, 2010, 330 (6007): 1102 - 1104.

[10] DURON O, BOUCHON D, BOUTIN S, et al. The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone [J/OL]. BMC Biology, 2008, 6: 27. DOI: 10.1186/1741 - 7007 - 6 - 27.

[11] HILGENBOECKER K, HAMMERSTEIN P, SCHLATTMANN P, et al. How many species are infected with *Wolbachia*? -A statistical analysis of current data [J]. FEMS Microbiology Letters, 2008, 281(2): 215 - 220.

[12] CLARK M E, BAILEY-JOURDAIN C, SULLIVAN W, et al. *Wolbachia* modification of sperm does not always require residence within developing sperm [J]. Heredity, 2008, 101(5): 420 - 428.

[13] DEDEINE F, BOULETREAU M, VAVRE F. *Wolbachia* requirement for oogenesis: occurrence within the genus *Asobara* (Hymenoptera, Braconidae) and evidence for intraspecific variation in *A. tabida* [J]. Heredity, 2005, 95: 394 - 400.

[14] KREMER N CHARIF D HENRI H et al. Influence of *Wolbachia* on host gene expression in an obligatory symbiosis [J/OL]. BMC Microbiology, 2012, 12(S1): S7. DOI: 10.1186/1471 - 2180 - 12 - S1 - S7.

[15] HEDGES L M, BROWNLIE J C, O'NEILL S L, et al. *Wolbachia* and virus protection in insects[J]. Science, 2008, 322 (5902): 702.

[16] TEIXEIRA L, FERREIRA A, ASHBURNER M. The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster* [J/OL]. PLoS Biology, 2008, 6(12): e1000002. DOI: 10.1371/journal.pbio.1000002.

[17] 张艳璇，季洁，王福堂，等. 土耳其斯坦叶螨的生殖潜能[J]. 植物保护学报，2006，33(4)：379 - 383.

[18] 王旭疆，袁丽萍，王永卫，等. 土耳其斯坦叶螨的生物学特性及其综合防治[J]. 蛛形学报，1999(1)：16 - 19.

[19] BREEUWER J A J. *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in the spider mites *Tetranychus urticae* and *T. turkestani* [J]. Heredity, 1997, 79: 41 - 47.

[20] GOTOH T, SUGASAWA J, NODA H, et al. *Wolbachia* induced cytoplasmic incompatibility in Japanese populations of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) [J]. Experimental Applied Acarology, 2007, 42: 1 - 16.

[21] XIE J, BUTLER S, SANCHEZ G, et al. Male killing *Spiroplasma* protects *Drosophila melanogaster* against two parasitoid wasps [J]. Heredity, 2014, 112: 399 - 408.

[22] 苗慧，洪晓月，谢霖，等. 朱砂叶螨体内感染的 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列测定与分析[J]. 昆虫学报，2004，47(6)：738 - 743.

[23] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402 - 408.

[24] KREMER N, VORONIN D, CHARIF D, et al. *Wolbachia* interferes with ferritin expression and iron metabolism in insects [J/OL]. PLoS Pathogens, 2001, 5: e1000630. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000630.

[25] FAST E M, TOOMEY M E, PANARAM K, et al. *Wolbachia* enhance *Drosophila* stem cell proliferation and target the germline stem cell niche [J]. Science, 2011, 334(6058): 990 - 992.

[26] REYNOLDS K T, HOFFMANN A A. Male age, host effects and the weak expression or non-expression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* strains infected by maternally transmitted *Wolbachia* [J]. Genetics Research, 2002, 80(2): 79 - 87.

[27] RAIKHEL A, DHADIALLA T. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes [J]. Annual Review Entomology, 1981, 37: 217 - 251.

[28] 朱路雨. 共生菌 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 对中国截形叶螨和皮氏叶螨生殖调控作用的研究[D]. 南京：南京农业大学，2012.

[29] 葛少钦，李建忠，张晓静. 精子发生过程中组蛋白甲基化和乙酰化[J]. 遗传，2011，33(9)：939 - 946.

[30] 潘晓燕，李质馨，王正朝，等. 精子发生过程中的组蛋白变化与雄性不育[J]. 中国医学科学院学报，2014，36(1)：108 - 113.

[31] LU Xu, HANSEN J C. Identification of specific functional subdomains within the linker histone $H1^0$ C-terminal domain [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(10): 8701 - 8707.

[32] 黄星卫，程香荣，王楠，等. 组蛋白 H3 变体 H3.3 及其在细胞重编程中的作用[J]. 遗传，2018，40(3)：186 - 196.

[33] BAUER R, LEHMANN C, FUSS B, et al. The *Drosophila* gap junction channel gene innexin 2 controls foregut development in response to wingless signalling [J]. Journal of Cell Science, 2002, 115(Pt9): 1859 - 1867.

[34] LEHMANN C, LECHNER H, LÖER B, et al. Heteromerization of innexin gap junction proteins regulates epithelial tissue organization in *Drosophila* [J]. Molecular Biology Cell, 2006, 17(4): 1676 - 1685.

[35] 杜海宁，胡红雨. 锚蛋白重复序列介导的蛋白质-蛋白质相互作用[J]. 生物化学与生物物理进展，2002(1)：6 - 9.

[36] BRENNAN L J, HAUKEDAL J A, EARLE J C, et al. Disruption of redox homeostasis leads to oxidative DNA damage in spermatocytes of *Wolbachia*-infected *Drosophila simulans* [J]. Insect Molecular Biology, 2012, 21: 510 - 520.

[37] GRBIĆ M, VAN LEEUWEN T, CLARK R M, et al. The genome of *Tetranychus urticae* reveals herbivorous pest adaptations [J]. Nature, 2011, 479(7374): 487 - 492.

[38] MOHAN M, GUJAR G T. Characterization and comparison of midgut proteases of *Bacillus thuringiensis* susceptible and resistant diamondback moth (Plutellidae: Lepidoptera) [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2003, 82(1): 1 - 11.

[39] HECKEL D G. The complex genetic basis of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin insects [J]. Biocontrol Science & Technology, 1994, 4(4): 405 - 417.

（责任编辑：田 喆）