

球孢白僵菌诱导的柑橘木虱免疫应答转录组分析*

宋晓兵^{1, 2**} 彭埃天^{1***} 崔一平¹ 凌金锋¹ 程保平¹ 张炼辉²

(1. 广东省农业科学院植物保护研究所, 广东省植物保护新技术重点实验室, 广州 510640;

2. 华南农业大学农学院, 广东省微生物信号与作物病害防控重点实验室, 广州 510640)

摘要 【目的】筛选柑橘木虱 *Diaphorina citri* Kuwayama 应对球孢白僵菌侵染的免疫应答及其网络调控基因, 以进一步探讨柑橘木虱对球孢白僵菌的免疫防御机制。【方法】采用 Illumina 高通量测序平台对感染球孢白僵菌 24、48、72 h 与健康的柑橘木虱转录组进行了测序, 利用生物信息学软件对筛选到的差异表达基因进行了功能注释、分类以及参与的信号通路分析。【结果】组装得到 138 313 条不可延长的非冗余 Unigene, 其 N50 和 N90 分别为 2 532 bp 和 413 bp, 平均长度为 1 191.26 bp。在 CK vs. S24h、CK vs. S48h 和 CK vs. S72h 3 个转录组里分别获得了 971、1 671 和 752 个显著差异表达基因 (DEGs), GO 富集分析表明分别有 405、614 和 542 个 DEGs 显著富集到 56、83 和 60 个 GO terms 中, KEGG pathway 分析结果显示分别有 98、333 和 247 个 DEGs 显著富集到 10、27 和 25 条代谢通路里。【结论】差异表达基因主要富集在能量代谢、离子运输、转录和翻译调控、生殖和发育调控以及免疫防御反应等相关通路, 大部分编码潜在的与免疫识别及调控相关的基因, 并从中筛选到 5 个显著上调表达的免疫相关基因, 为开展柑橘木虱免疫应答虫生真菌的研究奠定理论基础。下一步将进行免疫相关基因的 q-PCR 验证及表达量分析, 研究其在柑橘木虱应对球孢白僵菌侵染过程中的作用。

关键词 柑橘木虱, 球孢白僵菌, 侵染, 转录组

Transcriptome analysis of immune responses of *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae) infected with *Beauveria bassiana*

SONG Xiao-Bing^{1, 2**} PENG Ai-Tian^{1***} CUI Yi-Ping¹ LING Jin-Feng¹
CHENG Bao-Ping¹ ZHANG Lian-Hui²

(1. Plant Protection Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangdong Provincial Key Laboratory of High Technology for Plant Protection, Guangzhou 510640, China; 2. Agricultural College of South China Agricultural University, Guangdong Province Key Laboratory of Microbial Signals and Disease Control, Guangzhou 510640, China)

Abstract 【Objectives】To identify the network of regulatory genes involved in the immune response of *Diaphorina citri* to infection with *Beauveria bassiana*, and to further investigate the immune defense mechanism of *D. citri* to *B. bassiana*. 【Methods】An Illumina high-throughput sequencing platform was used to analyze the transcriptomes of infected and uninfected *D. citri* 24, 48 and 72 h after treatment. Differentially expressed genes and their functions, classifications and signaling pathways were analyzed using bioinformatic tools. 【Results】138 313 non-redundant Unigenes were identified, among which N50 and N90 were 2 532 bp and 413 bp in length, respectively. The average length of all Unigenes was 1 191.26 bp. 971, 1 671, 752 differentially expressed genes (DEGs) were obtained from the transcriptome data of CK vs. S24h, CK vs. S48h, and CK vs. S72h. 405, 614 and 542 DEGs were significantly differentially enriched in 56, 83 and 60 GO terms, respectively.

*资助项目 Supported projects: 国家重点研发计划项目 (2017YFD0202005、2018YFD0201500); 广东省公益研究与能力建设基金项目 (2014B020203003); 广东省现代农业产业技术体系建设专项 (2017LM1077); 广东省现代农业柑橘黄龙病检测与综合防控产业技术研发中心 (粤农[2017]168号)

**第一作者 First author, E-mail: xbsong@126.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: pengait@163.com

收稿日期 Received: 2018-04-20, 接受日期 Accepted: 2018-07-24

KEGG pathway analysis indicated that 98, 333, and 247 expressed genes were significant differentially enriched in 10, 27, and 25 metabolic pathways, respectively. **[Conclusion]** Differentially expressed genes are mainly enriched in related pathways, such as energy metabolism, ion transport, transcription and translation regulation, reproduction and development regulation, and immune defence response, and most encode potential genes related to immune recognition and regulation. We identified 5 significant up-regulations of these immune-related genes. These findings provide a theoretical foundation for the study of the immune response of *D. citri* to entomogenous fungi. We plan to next use q-PCR to verify the expression analysis of immune-related genes to further investigate their role in the immune response of *D. citri* to *Beauveria bassiana*.

Key words *Beauveria bassiana*, *Diaphorina citri*, infection, transcriptome

柑橘木虱 *Diaphorina citri* Kuwayama 是柑橘上的重要害虫,也是毁灭性病害柑橘黄龙病 (Huanglongbing) 的主要传播媒介 (Halbert and Manjunath, 2004; Bové, 2006; Cen, 2012)。针对柑橘木虱的防治长期以来依赖于施用化学药剂,鉴于当前农药频繁使用造成了农业“3R”等诸多问题,利用虫生真菌等生物农药防治柑橘木虱被认为是最具应用前景的防治途径之一(宋晓兵等, 2016)。

球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 是真菌杀虫应用最多的一个种类,可寄生 6 个目 15 个科的 200 余种昆虫和螨类,致病性强,适应性广(李荣森, 1983),研究认为球孢白僵菌对柑橘木虱这类刺吸式口器害虫有着较好的毒力效果(张艳璇等, 2013; 宋晓兵等, 2017)。虫生真菌侵染昆虫的过程主要包括:识别寄主、机械破坏、分泌毒素、干扰代谢等,各种因素的共同作用导致寄主昆虫死亡(Clarkson and Charnley, 1996)。在虫生真菌侵染昆虫的过程中,昆虫的先天免疫防御系统构成了第一道防线,昆虫通过识别侵入的真菌,从而触发复杂的信号转导途径。深入了解昆虫在真菌侵染过程中的模式识别、信号转导、调制和防御反应等免疫应答相关基因信息,对揭示昆虫和虫生真菌的互作机制,通过基因修饰提高虫生真菌对昆虫的侵染效率具有重要意义。

转录组分析是基因功能及结构研究的基础,是发掘功能基因的重要途径。目前柑橘木虱的转录组学研究主要集中在序列分析、基因表达分析、基因功能研究、免疫途径等方面。Hunter 等(2009)通过测序获得了柑橘木虱成虫首个

EST 序列数据,拼接得到了 636 条序列,包括 544 个 contig 和 92 个 singlet; Ramos (2014) 利用 RNAi 筛选技术获得超过 50 个的柑橘木虱致死基因,其中有 7 个导致高显著性的柑橘木虱死亡率,使用 qRT-PCR 和 Ion Torrent RNA Seq 进行了转录组分析,以定量柑橘木虱中肠组织的表达谱并鉴定“脱靶效应”; Reese 等(2014)运用 Illumina GAIIX 测序系统获得了柑橘木虱的卵、若虫、成虫这 3 个发育阶段的转录组数据,分别有 45.20%、46.29%和 40.00%的序列成功注释到 GO 数据库。本研究利用 Illumina 高通量测序平台开展球孢白僵菌侵染柑橘木虱过程中的转录组学研究,一方面分析柑橘木虱对球孢白僵菌侵染的免疫应答基因,深入研究其免疫防御机制;另一方面寻找球孢白僵菌侵染柑橘木虱的重要靶标基因,为提高球孢白僵菌对柑橘木虱的侵染效率提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株:球孢白僵菌 QB-28 由广东省植物保护新技术重点实验室保存,在室内用 PDA 培养基培养获得分生孢子粉,以灭菌水制备成浓度为 1.0×10^8 spores/mL 的分生孢子悬浮液,并向其中加入终浓度为 0.1%的吐温 80。

供试虫源:柑橘木虱为实验室温室中九里香植株上常年继代饲养的种群。

PDA 培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 15 g、蒸馏水 1 L。

RNA 提取试剂盒:购自美国 Omega 公司。

1.2 方法

1.2.1 转录组测序样品制备 取健康柑橘木虱成虫浸于 1.0×10^8 spores/mL 的分生孢子悬浮液中 10-15 s, 挑取处理后仍能活动自如的柑橘木虱放置于九里香幼嫩叶片上, 然后置于 27 °C 光照培养箱中 (L:D=14:10, RH>90%) 培养。24、48、72 h 后分别收集被球孢白僵菌 QB-28 侵染的柑橘木虱各 3 头, 对照组选取未处理的健康木虱 3 头, 将存有样品的离心管置于液氮中速冻, 然后保存于 -80 °C 防止 RNA 降解, 提取基因组 RNA 用于测序。

1.2.2 RNA 的提取和检测 按照生产厂商的操作说明, 利用 RNA 提取试剂盒提取上述 12 个样品的基因组 RNA。采用 Agilent 2100 生物芯片分析系统, 对提取的 RNA 进行浓度和质量检测。

1.2.3 cDNA 文库构建和测序 样品总 RNA 经 DNase I 处理后, 用带有 Oligo (dT) 的磁珠富集真核生物 mRNA。加入打断试剂将 mRNA 打断成短片段, 并以打断后的 mRNA 为模板用六碱基随机引物 (Random hexamers) 合成一链 cDNA, 然后加入缓冲液、dNTPs 和 DNA polymerase I 合成 cDNA 第二链, 经试剂盒纯化回收、粘性末端修复、3'末端加上碱基 "A" 和连接测序接头后, 得到的目的片段进行 PCR 扩增富集。构建好的 cDNA 文库经 Agilent 2100 Bioanalyzer 和 ABI StepOnePlus Real-Time PCR System 质检合格后使用 Illumina 测序平台进行测序 (测序由深圳市恒创基因科技有限公司完成)。

1.2.4 测序评估及 Unigene 功能注释 通过数据质控和过滤后得到高质量的 clean reads, 对每个样品的 raw reads、clean reads、clean bases 等指标进行统计, 从而对测序质量进行评估。通过 De novo 组装软件 Trinity 将 clean reads 进行组装 (Hansen *et al.*, 2010), 将组装得到的序列通过软件 TGICL 去除冗余和拼接, 得到尽可能长的非冗余的 Unigene 集, 并对 Unigene 集进行统计和质控 (Kim *et al.*, 2015)。通过 Blast 比对数据库进行功能注释 (Yu *et al.*, 2006), 注释数据库包括: NT、NR、COG、KEGG、SwissProt

等, 并基于 NR 注释结果对 Unigene 集通过 Blast2 GO 进行 GO 功能注释 (Anders *et al.*, 2015)。

1.2.5 差异表达基因 (DEG) 筛选及 GO、Pathway 富集分析 利用差异分析软件 DESeq 和 DESeq2 (Wang *et al.*, 2010; Love *et al.*, 2014), 将对照组文库与处理组文库中的基因表达水平进行比较, 以 $P < 0.05$ 为条件, 筛选出差异表达基因。将所有差异表达基因与 GO、KEGG 数据库对比, 用超几何分布法确定 GO 和 Pathway 在差异表达基因中是否有显著富集 ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 测序数据评估

从健康和感菌柑橘木虱转录组中得到的原始数据 (Raw reads), 通过数据质控和过滤后得到高质量的 clean reads, 对每个样品的 raw reads、clean reads、clean bases 等指标进行统计, 各处理样品的 clean reads 均超过 4 000 万条, total clean reads ratio 接近或等于 100%, total clean bases 均超过 6 G (表 1), 说明各样品处理的数据测序总量充分, 能满足后续数据分析的需求。对样品中的柑橘木虱 clean reads 进行 Denovo 混合拼接, 获得了 138 313 条不可延长的非冗余 Unigene, 其 N50 和 N90 分别为 2 532 bp 和 413 bp, 平均长度为 1 191.26 bp (表 1)。

2.2 Unigene 功能注释及 GO 分类

通过 De novo 组装聚类得到的 Unigene 集总计 138 313 条 Unigene, 利用 Blast 分别与 NT、NR、COG、KEGG、SwissProt 等数据库进行比对。统计结果显示注释到数据库的 Unigene 共计 74 658 条, 其中在 NT、NR 数据库注释到的 Unigene 最多, 分别为 63 760 条和 56 093 条。Gene Ontology (简称 GO) 是一个国际化的基因功能分类体系, 用来全面描述生物体中基因和基因产物的属性。Unigene 的 GO 分类结果显示, 以归类于生物过程 (Biological process) 的基因和基因产物居多, 而归类于基因的分子功能 (Molecular function) 和细胞组分 (Cellular component) 的基因和基因产物相对较少 (图 1)。

表 1 柑橘木虱各处理样品测序数据概要
Table 1 Data of each sample sequencing

样品名称 Sample	总原始读 数 Total raw reads	总净读数 Total clean reads	总净读 数比率 Total clean reads ratio (%)	总净碱基数 Total clean bases	组装聚类后的净读数 Mixed assembled clean reads			
					Unigene 总数 Total number of Unigene	Unigene 的 N50 长度 N50 of Unigene	Unigene 的 N90 长度 N90 of Unigene	Unigene 平均 长度 Average length of Unigene
CK_1	46 904 680	46 806 054	99.79	7 020 908 100	138 313	2 532	413	1 191.26
CK_2	47 302 232	47 196 304	99.78	7 079 445 600				
CK_3	54 576 720	54 443 248	99.76	8 166 487 200				
S24h_1	52 763 356	52 763 356	100	7 914 503 400				
S24h_2	46 340 138	46 340 138	100	6 951 020 700				
S24h_3	54 303 906	54 303 906	100	8 145 585 900				
S48h_1	61 759 410	61 759 410	100	9 263 911 500				
S48h_2	60 715 684	60 715 684	100	9 107 352 600				
S48h_3	49 679 098	49 679 098	100	7 451 864 700				
S72h_1	50 213 346	50 213 346	100	7 532 001 900				
S72h_2	59 947 224	59 947 224	100	8 992 083 600				
S72h_3	47 588 396	47 588 396	100	7 138 259 400				

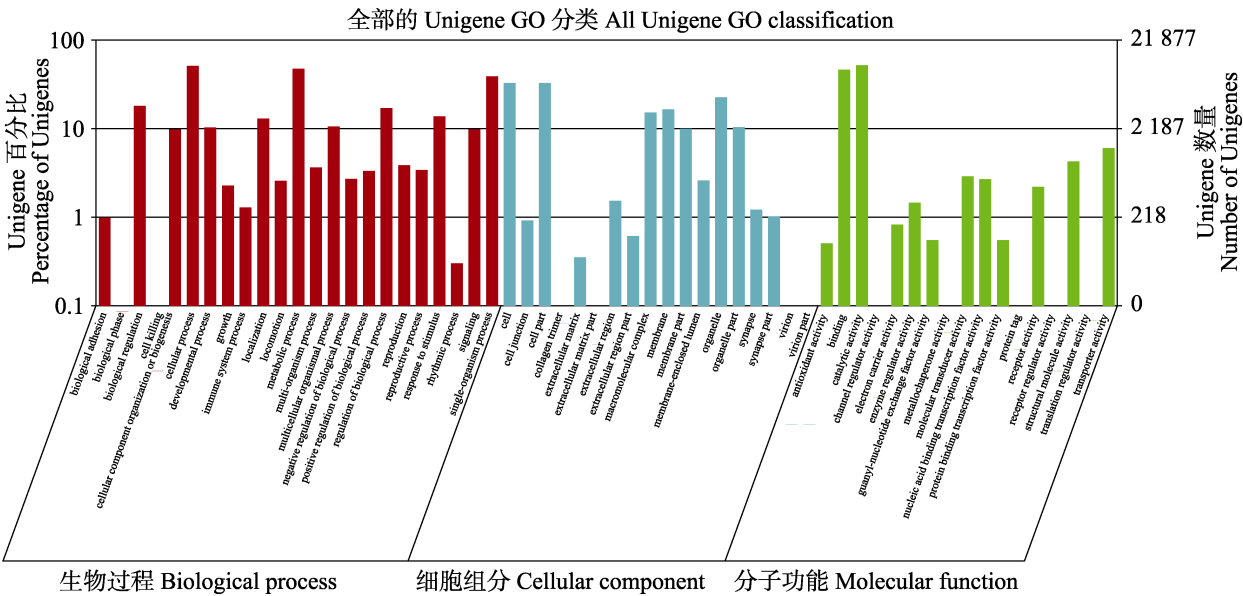


图 1 全部的 Unigene GO 分类
Fig. 1 All-Unigene GO classification

2.3 显著差异表达基因筛选

为筛选可能在柑橘木虱抵御球孢白僵菌感染的防御反应中发挥重要作用的显著差异表达基因(DEGs),以未处理的健康柑橘木虱为对照,与柑橘木虱在球孢白僵菌侵染 24、48、72 h 的处理组数据进行比对分析。对 12 个测序样品的差异表达基因进行聚类分析发现, 12 个样品可

以聚类为 3 组(图 2), CK_1、CK_2 和 CK_3 聚为一组, S24h_1、S24h_2 和 S72h_1、S72h_2 聚为一组, S48h_1、S48h_2、S48h_3 和 S24h_3、S72h_3 聚为一组, 表明相同时间段的测序样品处理较好地聚合在一起。图 2 中每一行代表一个实验条件, 每一列代表一个基因; 颜色表示基因在样品间比较的差异倍数(取对数), 颜色越红

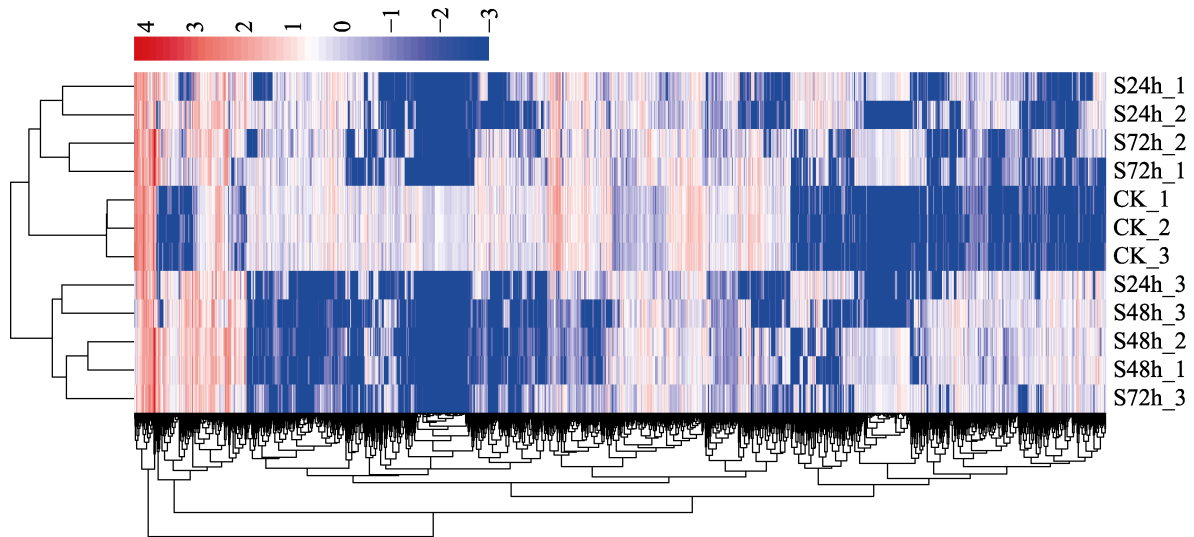


图 2 12 个测序样品的差异表达基因聚类分析

Fig. 2 Cluster of differentially expressed genes in 12 sequencing samples

表示差异倍数越大,反之,颜色越蓝。

进一步的统计分析结果显示,CK vs. S24h 中获得了 971 个 DEGs,其中上调表达 432 个,下调表达 539 个;CK vs. S48h 中获得了 1 671 个 DEGs,其中上调表达 672 个,下调表达 999 个;CK vs. S72h 中获得了 752 个 DEGs,其中上调表达 469 个,下调表达 283 个。对 CK vs. S24h、CK vs. S48h 和 CK vs. S72h 三者的差异表达基因取交集,三者共有的 DEGs 有 172 个(图 3)。对 3 组数据的显著差异表达基因统计分析发现,

在球孢白僵菌侵染 48 h 时,柑橘木虱的免疫应答活动最为显著,其中 $|\log_2\text{Ratio}|$ 达到 10 以上的 DEGs 有 42 个,其中上调表达 22 个,下调表达 20 个,上调表达的 DEGs 中涉及“鞘氨醇-1-磷酸裂解酶”(Sphingosine-1-phosphate lyase)、“丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶”(Serine/threonine-protein phosphatase)、“ATP 依赖性 RNA 解旋酶”(ATP-dependent RNA helicase)和“苏氨酸-tRNA 连接酶”(Threonine-tRNA ligase)等可能与免疫防御反应相关的注释。

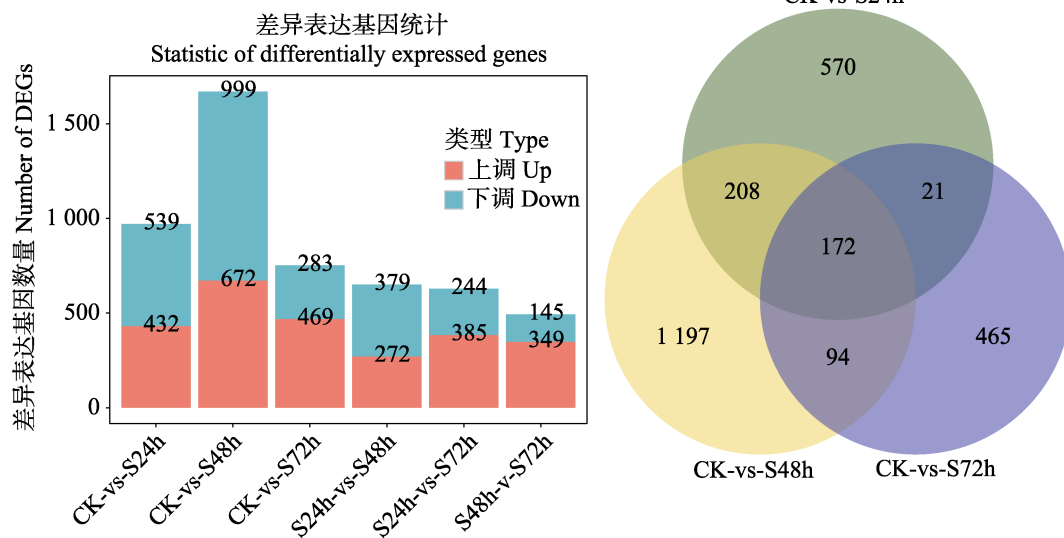


图 3 Unigene 显著差异表达基因数目统计

Fig. 3 Statistic of significantly differentially expressed genes

2.4 差异表达基因 GO 功能显著性富集分析

对差异表达基因进行 GO 功能注释分析, 归类到生物学过程 (Biological processes)、细胞组分 (Cellular component) 和分子功能 (Molecular function) 3 个本体 (Ontology) 中。CK vs. S24h、CK vs. S48h 和 CK vs. S72h 3 组数据中分别有 405、614、542 个 DEGs 显著性富集到 56、83、60 个 GO terms 中 ($P < 0.05$)。

为鉴别柑橘木虱在球孢白僵菌侵染过程中的免疫应答相关基因, 对生物学过程中的 DEGs 进行汇总分析, 3 组数据显著性富集在生物学过程的 GO terms 分别有 18、24、19 个, 差异表达基因主要富集在能量代谢、离子运输、转录和翻译调控、生殖和发育调控以及免疫防御反应等方面 (表 2)。其中与免疫相关的有“对乙醇的反应”(Response to ethanol)(GO:0045471)、“保幼激素介导的信号传导途径”(Juvenile hormone mediated signaling pathway)(GO:0035626)、“对蜕皮激素的反应”(Response to ecdysone)(GO:0035075)、“唾液腺细胞自噬性细胞死亡”(Salivary gland cell autophagic cell death)(GO:0035071)、“对气味的行为反应”(Olfactory behavior)(GO:0042048)、“免疫反应”(Immune response)(GO:0006955)、“抗原加工与递呈”(GO:0019882) 等。上述结果表明, 柑橘木虱被球孢白僵菌侵染之后, 体内产生了一系列的生理生化反应, 主要涉及能量代谢、转录和翻译调控以及免疫防御反应等方面的变化, 可能在木虱对真菌的防御反应中起着重要作用。

2.5 差异表达基因的 Pathway 富集分析

为明确哪些通路在球孢白僵菌侵入期间被显著调控, 将差异表达基因 DEGs 映射到 KEGG 路径库里富集分析。CK vs. S24h、CK vs. S48h 和 CK vs. S72h 3 组数据的比对结果显示, 分别有 677、1 226、713 个 DEGs 比对到 KEGG 中的 196、230、192 条不同的代谢通路中。对这些通路进行显著性分析发现, 10、27、25 条通路有显著富集现象 ($P < 0.05$), 各有 98、333 和 247 个 DEGs 显著富集到这些代谢通路中 (表 3),

说明这些通路在真菌侵染的诱导下被显著调控。进一步分析表明, 这些显著富集的通路主要涉及能量代谢、遗传信息处理、环境信息处理、免疫系统、免疫性疾病以及传染性疾病等方面, 如涉及免疫系统的“细胞色素 P450 代谢外源性物质”(Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450)(ko00980)、“NOD 样受体信号通路”(NOD-like receptor signaling pathway)(ko04621)、“MAPK 信号传导途径”(MAPK signaling pathway)(ko04010)、“抗原加工提呈”(Antigen processing and presentation)(ko04612)和“吞噬体”(Phagosome)(ko04145)等。

3 讨论

白僵菌对昆虫寄主的侵染是机械压力和酶共同作用的结果 (季香云等, 2003), 伴随白僵菌素 (Beauvericin)、白僵菌交酯 (Beauverolide)、球孢交酯 (Bassianolide) 等毒素作用导致昆虫的最终死亡 (付志坚等, 2000), 真菌毒素可能是通过干扰寄主细胞的免疫系统而起作用。虫生真菌在寄主表皮定殖和侵入昆虫血腔增殖的过程中, 一方是昆虫免疫识别与防御, 另一方是虫生真菌对抗寄主的免疫反应, 昆虫与虫生真菌之间的识别与反识别、免疫与抗免疫的动态互作影响着真菌的侵染效率 (雷妍圆等, 2016)。

本文利用 Illumina 测序平台测定了柑橘木虱被球孢白僵菌侵染 24、48、72 h 的转录组, 并与未被处理的柑橘木虱相比对, 筛选出大量的差异表达基因, 并挖掘了一批与柑橘木虱应对球孢白僵菌侵染的免疫相关基因及相关调控网路。CK vs. S24h、CK vs. S48h 和 CK vs. S72h 3 组数据分别获得了 971、1 671、752 个显著差异表达基因; GO 富集分析发现分别有 405、614、542 个 DEGs 显著富集在 56、83、60 个 GO terms 中; KEGG pathway 富集分析结果显示分别有 10、27、25 条通路有显著富集现象, 富集通路中包含着大量潜在的与免疫调控相关的基因。例如, 与降解外源毒素有关的基因: 谷胱甘肽 S-转移酶 (GSTs)(CL2369.Contig8_All), 免疫激活蛋白基因 Tak1 结合蛋白 (TAB1)(CL3050.Contig5_All),

表 2 部分富集在生物学过程中的 GO terms
Table 2 Parts of GO terms which enriched in biological processes

GO 号 GO ID	GO 条目 GO term	基因总数 Total genes	差异表达 基因 DEGs	P 值 P-value
	能量代谢 Energy metabolism			
GO : 0055114	氧化还原过程 Oxidation-reduction process	817	28	2.74×10^{-4}
GO : 0043647	肌醇磷酸代谢过程 Inositol phosphate metabolic process	2	2	1.77×10^{-2}
GO : 0006562	脯氨酸分解代谢过程 Proline catabolic process	3	2	4.17×10^{-2}
GO : 0022904	呼吸电子传输链 Respiratory electron transport chain	11	7	2.04×10^{-11}
GO : 0022900	电子传输链 Electron transport chain	55	7	5.09×10^{-6}
GO : 0055114	氧化还原过程 Oxidation-reduction process	817	18	1.53×10^{-4}
	离子运输 Ion transport			
GO : 0055085	跨膜运输 Transmembrane transport	350	11	8.92×10^{-3}
GO : 0015672	单价无机阳离子运输 Monovalent inorganic cation transport	17	3	3.13×10^{-2}
GO : 0022904	呼吸电子传输链 Respiratory electron transport chain	11	5	3.66×10^{-5}
GO : 0006810	运输 Transport	470	16	2.70×10^{-2}
GO : 0042777	质膜 ATP 合成耦合质子传输 Plasma membrane ATP synthesis coupled proton transport	7	6	6.77×10^{-11}
GO : 0015991	水解耦合质子运输 ATP hydrolysis coupled proton transport ATP 转录和翻译 Transcription and translation	94	5	2.25×10^{-2}
GO : 0006398	组蛋白 mRNA 3'末端加工 Histone mRNA 3'-end processing	5	4	3.66×10^{-5}
GO : 0006357	通过 RNA 聚合酶 II 调节转录 Regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	144	8	3.96×10^{-2}
GO : 0006412	翻译 Translation	746	38	2.35×10^{-21}
GO : 0006334	核小体装配 Nucleosome assembly	84	11	4.87×10^{-1}
GO : 0008033	tRNA 加工 tRNA processing	20	3	2.25×10^{-2}
	生殖和发育 Reproductive and development			
GO : 0007527	成年躯体肌肉发育 Adult somatic muscle development	20	4	3.08×10^{-3}
GO : 0001700	胚胎发育通过合胞体胚盘 Embryonic development via the syncytial blastoderm	43	5	3.33×10^{-3}
GO : 0045214	肌节组织 Sarcomere organization	30	4	1.01×10^{-2}
GO : 0008360	细胞形状的调节 Regulation of cell shape	72	5	2.46×10^{-2}
GO : 0035074	化蛹 Pupation	5	4	3.66×10^{-5}
GO : 0007365	定期分区 Periodic partitioning	6	4	8.99×10^{-5}
GO : 0035073	蛹形成 Pupariation	8	4	2.74×10^{-4}
GO : 0040034	发育时间调节 Regulation of development, heterochronic	8	4	2.74×10^{-4}
GO : 0030239	肌原纤维组装 Myofibril assembly	9	4	4.19×10^{-4}
GO : 0055088	脂质体内平衡 Lipid homeostasis	9	4	4.19×10^{-4}
GO : 0007480	成像盘衍生的腿形态发生 Imaginal disc-derived leg morphogenesis	18	4	7.26×10^{-3}
GO : 0051298	中心体复制 Centrosome duplication	45	5	7.87×10^{-4}
	免疫反应 Immune response			
GO : 0045471	对乙醇的反应 Response to ethanol	18	4	2.25×10^{-3}
GO : 0035626	保幼激素介导的信号传导途径 Juvenile hormone mediated signaling pathway	5	4	3.66×10^{-5}
GO : 0035075	对蜕皮激素的反应 Response to ecdysone	7	4	1.85×10^{-4}
GO : 0035071	唾液腺细胞自噬性细胞死亡 Salivary gland cell autophagic cell death	58	7	1.00×10^{-3}
GO : 0042048	对气味的行为反应 Olfactory behavior	44	5	2.16×10^{-2}
GO : 0006955	免疫反应 Immune response	7	4	6.27×10^{-6}
GO : 0019882	抗原加工与递呈 Antigen processing and presentation	4	3	1.22×10^{-4}
GO : 0009635	对除草剂的反应 Response to herbicide	2	2	4.53×10^{-3}

表 3 部分 KEGG 分析中富集的通路
Table 3 Parts of enriched pathway in KEGG analysis

	途径 ID Pathway ID	描述 Description	基因总数 Total genes	差异表达基因 DEGs	P 值 P-value
CK vs. S24h	ko03010	核糖体 Ribosome	850 (3.46%)	26 (8.07%)	6.28×10^{-5}
	ko02010	转运器 ABC transporters ABC	153 (0.62%)	8 (2.48%)	9.62×10^{-4}
	ko00190	氧化磷酸化 Oxidative phosphorylation	483 (1.97%)	15 (4.66%)	1.94×10^{-3}
	ko04745	光传导-飞 Phototransduction - fly	145 (0.59%)	6 (1.86%)	1.24×10^{-2}
	ko04530	紧密连接 Tight junction	283 (1.15%)	9 (2.8%)	1.29×10^{-2}
	ko04740	嗅觉转导 Olfactory transduction	120 (0.49%)	5 (1.55%)	2.12×10^{-2}
	ko04711	昼夜节律-飞 Circadian rhythm - fly	51 (0.21%)	3 (0.93%)	2.93×10^{-2}
	ko00860	卟啉和叶绿素代谢 Porphyrin and chlorophyllmetabolism	183 (0.75%)	6 (1.86%)	3.41×10^{-2}
CK vs. S48h	ko02010	转运器 ABC transporters ABC	153 (0.62%)	11 (2.05%)	5.60×10^{-4}
	ko00980	细胞色素 P450 代谢外源性物质 Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	159 (0.65%)	11 (2.05%)	7.71×10^{-4}
	ko00190	氧化磷酸化 Oxidative phosphorylation	483 (1.97%)	22 (4.1%)	1.05×10^{-3}
	ko00982	药物代谢-细胞色素 P450 Drug metabolism-cytochrome P450	153 (0.62%)	10 (1.87%)	2.02×10^{-3}
	ko00860	卟啉和叶绿素代谢 Porphyrin and chlorophyllmetabolism	183 (0.75%)	10 (1.87%)	7.16×10^{-3}
	ko00140	类固醇激素生物合成 Steroid hormone biosynthesis	106 (0.43%)	7 (1.31%)	8.68×10^{-3}
	ko04976	胆汁分泌 Bile secretion	234 (0.95%)	11 (2.05%)	1.43×10^{-2}
	ko04064	NF-κB 信号通路 NF-κappa B signaling pathway	68 (0.28%)	5 (0.93%)	1.65×10^{-2}
	ko00480	谷胱甘肽代谢 Glutathione metabolism	212 (0.86%)	10 (1.87%)	1.86×10^{-2}
	ko04022	cGMP-PKG 信号通路 cGMP-PKG signaling pathway	412 (1.68%)	16 (2.99%)	1.98×10^{-2}
	ko04260	心肌收缩 Cardiac muscle contraction	187 (0.76%)	9 (1.68%)	2.21×10^{-2}
	ko00261	单环内酰胺生物合成 Monobactam biosynthesis	11 (0.04%)	2 (0.37%)	2.30×10^{-2}
	ko03022	基础转录因子 Basal transcription factors	132 (0.54%)	7 (1.31%)	2.61×10^{-2}
	ko00030	磷酸戊糖途径 Pentose phosphate pathway	134 (0.55%)	7 (1.31%)	2.80×10^{-2}
	ko03015	mRNA 监视通路 mRNA surveillance pathway	331 (1.35%)	13 (2.43%)	3.10×10^{-2}
	ko00053	抗坏血酸和 aldarate 代谢 Ascorbate and aldarate metabolism	142 (0.58%)	7 (1.31%)	3.67×10^{-2}
	ko04621	NOD 样受体信号通路 NOD-like receptor signaling pathway	86 (0.35%)	5 (0.93%)	4.02×10^{-2}
	ko04010	MAPK 信号传导途径 MAPK signaling pathway	457 (1.86%)	16 (2.99%)	4.46×10^{-2}
CK vs. S72h	ko03010	核糖体 Ribosome	850 (3.46%)	43 (15.99%)	4.84×10^{-17}
	ko00190	氧化磷酸化 Oxidative phosphorylation	483 (1.97%)	23 (8.55%)	4.46×10^{-9}
	ko04612	抗原加工提呈 Antigen processing and presentation	193 (0.79%)	10 (3.72%)	5.70×10^{-5}
	ko04514	细胞粘附分子 Cell adhesion molecules (CAMs)	57 (0.23%)	5 (1.86%)	4.01×10^{-4}
	ko04145	吞噬体 Phagosome	273 (1.11%)	9 (3.35%)	3.32×10^{-3}
	ko00030	磷酸戊糖途径 Pentose phosphate pathway	134 (0.55%)	6 (2.23%)	3.66×10^{-3}
	ko04672	产生 IgA 抗体的肠道免疫网络 Intestinal immune network for IgA production	13 (0.05%)	2 (0.74%)	8.62×10^{-3}
	ko00562	肌醇磷酸盐代谢 Inositol phosphate metabolism Inositol phosphate metabolism	198 (0.81%)	6 (2.23%)	2.23×10^{-2}
	ko02010	ABC 转运器 ABC transporters	153 (0.62%)	5 (1.86%)	2.70×10^{-2}
	ko04650	自然杀伤细胞介导的细胞毒性 Natural killer cell mediated cytotoxicity	105 (0.43%)	4 (1.49%)	2.85×10^{-2}

应急蛋白基因：热休克蛋白（HSPs）（CL1136.Contig10_All、CL1074.Contig2_All），抗原基因：MHC I 类抗原（MHC I）（CL5729.Contig6_All）和 MHC II 类抗原（MHC II）（CL3530.Contig2_All）等经诱导显著上调表达。

KEGG pathway 富集分析涉及到多个与免疫系统相关的通路，“MAPK 信号传导通路”在昆虫免疫防御中是相当保守的，MAPK 通路中关键组分的缺失会导致宿主对病原体侵染的更加敏感（Chen *et al.*, 2003, 2010），研究发现表明 MAPK 免疫信号转导通路可以激活烟粉虱对真菌感染的反应（Xia *et al.*, 2013），同样可能在柑橘木虱受侵染过程中发挥作用；“NOD 样受体信号通路”的 NOD 样受体（NOD-like receptors, NLRs）是一类新型胞浆内的固有免疫模式识别受体，在自身免疫调节中起重要作用，一旦被激活，这些分子触发细胞内信号通路，导致激活转录反应，从而启动固有免疫和获得性免疫（郑媛等，2015）。“细胞色素 P450 代谢外源性物质”中的细胞色素 P450 在昆虫生长发育和适应环境过程中发挥着重要作用，如褐飞虱若虫中的 P450 基因受抗性水稻诱导，P450 单加氧酶的合成量增加可以增强褐飞虱代谢水稻中有毒次生物质的能力（Yang *et al.*, 2011；孙海霞等，2014），推测柑橘木虱可能通过 P450 基因的高表达以代谢球孢白僵菌产生的毒素。

本研究获得的柑橘木虱免疫应答球孢白僵菌侵染的转录组数据库，为研究两者互作机制提供了大量的免疫候选基因，对于筛选柑橘木虱生物学途径的关键基因、球孢白僵菌侵染昆虫的重要靶标基因提供了丰富的数据基础。对于获得的免疫候选基因，有待一步深入研究它们的功能、参与途径及其在柑橘木虱对抗球孢白僵菌侵染时的免疫应答作用。

参考文献 (References)

- Anders S, Pyl PT, Huber W, 2015. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 31(2): 166–169.
- Bové JM, 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, 88(1): 7–37.
- Cen YJ, Zhang LN, Xia YL, Guo J, Deng XL, Zhou WJ, Sequeira R, Gao JY, Wang ZR, Yue JQ, Gao YQ, 2012. Detection of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in *Cacopsylla* (Psylla) *citrisuga* (Hemiptera: Psyllidae). *Florida Entomologist*, 95(2): 303–309.
- Chen D, Davis RJ, Flavell RA, 2003. MAP kinases in the immune response. *Annual Review of Immunology*, 20(1): 55–72.
- Chen JM, Xie CC, Tian LL, Hong LX, Wu XR, Han JH, 2010. Participation of the p38 pathway in *Drosophila* host defense against pathogenic bacteria and fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(48): 20774–20779.
- Clarkson JM, Charnley AK, 1996. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in Microbiology*, 4(5): 197–203.
- Fu ZJ, Chen JX, Fu LJ, 2000. A review of studies on the pathogenesis of *Beauveria bassiana* to insects. *Wuyi Science Journal*, 16: 105–109. [付志坚, 陈建新, 付丽君, 2000. 白僵菌对昆虫的致病机理研究综述. 武夷科学, 16: 105–109.]
- Halbert SE, Manjunath KL, 2004. Asian citrus psyllids (Stemorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: A literature review and assessment of risk in Florida. *Florida Entomologist*, 87(3): 330–353.
- Hansen KD, Brenner SE, Dudoit S, 2010. Biases in Illumina transcriptome sequencing caused by random hexamer priming. *Nucleic Acids Research*, 38(12): e131.
- Hunter WB, Dowd SE, Katsar CS, Shatters RG, McKenzie CL, Hall DG, 2009. Psyllid biology: expressed genes in adult asian citrus psyllids, *diaphorina citri* Kuwayama. *Open Entomology Journal*, (12): 18–29.
- Ji XY, Yang CJ, 2003. Infection and application of *Beauveria* spp. *Chinese Journal of Biological Control*, 19(2): 82–85. [季香云, 杨长举, 2003. 白僵菌的致病性与应用. 中国生物防治, 19(2): 82–85.]
- Kim D, Langmead B, Salzberg SL, 2015. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods*, 12(4): 357–360.
- Lei YY, He YR, Xie MQ, Lv LH, Gu JR, 2016. Transcriptome analysis of immune responses of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) infected by the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea*. *Acta Entomologica Sinica*, 59(9): 956–964. [雷妍圆, 何余容, 谢梅琼, 吕利华, 顾家睿, 2016. 玫烟色棒束孢诱导的小菜蛾免疫响应表达谱分析. 昆虫学报, 59(9): 956–964.]

- Li RS, Luo SB, 1983. Microbial Control Pests. Beijing: Science Press. 27–45.[李荣森, 罗绍彬, 1983. 微生物防治害虫. 北京: 科学出版社. 27–45.]
- Love MI, Huber W, Anders S, 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12): 550.
- Ramos J, 2014. Transcriptome analysis of Asian citrus psyllid RNAi induced mortality by Quantitative real-time PCR and next generation sequencing. *Plant and Animal Genome*. 659.
- Reese J, Christenson MK, Leng N, Saha S, Cantarel B, Lindeberg M, Tamborindeguy C, MacCarthy J, Weaver D, Trease AJ, Ready SV, Davis VM, McCormick C, Haudenschild C, Han S, Johnson SL, Shelby KS, Huang H, Bextine BR, Shatters RG, Hall DG, Davis PH, Hunter WB, 2014. Characterization of the Asian citrus psyllid transcriptome. *Journal of Genomics*, 2(s 5/7): 54–58.
- Song XB, Peng AT, Cheng BP, Chen X, Ling JF, Zhang LH, 2016. Review of biological controls of *Diaphorina citri* using entomopathogenic fungi. *Journal of Biosafety*, 25(4): 255–260. [宋晓兵, 彭埃天, 程保平, 陈霞, 凌金锋, 张炼辉, 2016. 利用虫生真菌生物防治柑橘木虱的研究进展. *生物安全学报*, 25(4): 255–260.]
- Song XB, Peng AT, Cheng BP, Ling JF, Chen X, Zhang LH, 2017. Isolation and identification of a *Beauveria bassiana* strain infected *Diaphorina citri*. *Plant Protection*, 43(4): 139–144. [宋晓兵, 彭埃天, 程保平, 凌金锋, 陈霞, 张炼辉, 2017. 一株侵染柑橘木虱的球孢白僵菌的分离及鉴定. *植物保护*, 43(4): 139–144.]
- Sun HX, Chen J, Yang ZF, 2014. Prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation of cytochromeP450 gene CYP4C62 from *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). *Acta Entomologica Sinica*, 57(6): 656–662. [孙海霞, 陈俊, 杨之帆, 2014. 褐飞虱细胞色素 P450 基因 CYP4C62 的原核表达及多克隆抗体的制备. *昆虫学报*, 57(6): 656–662.]
- Wang LK, Feng ZX, Wang X, Wang XW, Zhang XG, 2010. DEGseq: an R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data. *Bioinformatics*, 26(1): 136–138.
- Xia J, Zhang CR, Zhang S, Li FF, Feng MG, Wang XW, Liu SS, 2013. Analysis of whitefly transcriptional responses to *Beauveria bassiana* infection reveals new insights into insect-fungus interactions. *PLoS ONE*, 8(7): e68185.
- Yang ZF, Zhang YY, Liu XL, Wang XX, 2011. Two novel cytochrome P450 genes CYP6CS1 and CYP6CW1 from *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae): cDNA cloning and induction by host resistant rice. *Bulletin of Entomological Research*, 101(1): 73–80.
- Yu XP, Lin J, Zack DJ, Qian J, 2006. Computational analysis of tissue-specific combinatorial gene regulation: predicting interaction between transcription factors in human tissues. *Nucleic Acids Research*, 34(17): 4925–4936.
- Zhang YX, Sun L, Lin JZ, Chen X, Ji J, 2013. Virulence of *Beauveria bassiana* CQBb111 strain to *Diaphorina citri* and *Neoseiulus cucumeris*. *Chinese Journal of Biological Control*, 29(1): 56–60. [张艳璇, 孙莉, 林坚贞, 陈霞, 季洁, 2013. 白僵菌 CQBb111 菌株对柑橘木虱和胡瓜新小绥螨的毒力差异. *中国生物防治学报*, 29(1): 56–60.]
- Zheng Y, An L, Qiu J, Shi W, 2015. Insights into the research progress of the NOD1 and NOD2 signaling pathways. *China Medicine and Pharmacy*, 5(23): 49–52. [郑媛, 安丽, 仇杰, 施玮, 2015. NOD1 和 NOD2 介导的信号通路研究进展. *中国医药科学*, 5(23): 49–52.]