

LncRNA在柑橘木虱与黄龙病病原菌互作中的差异表达分析及验证

陈梦瑶^{1,2} 曹征鸿² 贺康² 梅洋² 魏圣飞² 肖花美^{1,2*}

(1. 宜春学院生命科学与资源环境学院, 江西省作物生长发育调控重点实验室, 宜春 336000;

2. 浙江大学昆虫科学研究所, 农业农村部作物病虫分子生物学重点实验室, 杭州 310058)

摘要: 为明确柑橘黄龙病的唯一自然传播媒介——柑橘木虱 *Diaphorina citri* 的长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是否参与调控黄龙病病原菌 *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) 的侵染及复制, 采用生物信息学预测及 PCR 扩增方法进行 lncRNA 的预测、特征分析、验证及差异表达分析。结果显示, 柑橘木虱的 13 个转录组 RNA-Seq 数据中共有 10 192 个 lncRNA 基因, 对应 15 747 条 lncRNA 转录本; 与蛋白质编码基因相比, 柑橘木虱 lncRNA 具有更少的外显子数量和更短的转录本长度; 随机选取的 10 条 lncRNA 基因中, 有 7 条 lncRNA 基因在无菌柑橘木虱广州品系或赣州品系中有表达, 其中 1 条 lncRNA 基因 TCONS_00034665 在无菌广州品系和无菌赣州品系中存在差异表达; 带菌和无菌柑橘木虱成虫中预测获得 2 个差异表达的 lncRNA 基因 TCONS_00096118 和 TCONS_00234564, 实时荧光定量 PCR 验证发现 TCONS_00234564 与预测结果一致, 在带菌柑橘木虱成虫中高表达。表明 lncRNA 参与了黄龙病病原菌与寄主柑橘木虱的互作。

关键词: 长链非编码 RNA; 柑橘木虱; 黄龙病病原菌; RNA-Seq; 验证

Differential expression analysis and validation of lncRNA between Asian citrus psyllid and *Candidatus Liberibacter asiaticus* interaction

Chen Mengyao^{1,2} Cao Zhenghong² He Kang² Mei Yang² Wei Shengfei² Xiao Huamei^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Crop Growth and Development Regulation of Jiangxi Province, College of Life Sciences and Resource Environment, Yichun University, Yichun 336000, Jiangxi Province, China; 2. Ministry of Agriculture and Rural Affairs Key Laboratory of Molecular Biology of Crop Pathogens and Insects, Institute of Insect Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang Province, China)

Abstract: Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* was the only natural vector of Huanglongbing (HLB). In order to clarify whether long non-coding RNA (lncRNA) engaged in regulating infection and replication of *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs), the causal pathogen of HLB *in vivo*, the bioinformatics, RT-PCR and qPCR amplification technology were used to conduct lncRNA prediction, characteristic analysis, validation and differential expression analysis. The result showed that 10 192 lncRNA genes corresponding to 15 747 lncRNA transcripts were predicted from 13 Asian citrus psyllid RNA-Seq datasets. Asian citrus psyllid lncRNA genes had less exons and shorter transcripts comparing to protein-coding genes. Ten lncRNA genes were randomly selected for RT-PCR validation and seven lncRNAs expressed in both CLAs-free Guangzhou strain and CLAs-free Ganzhou strain except another lncRNA only expressed in CLAs-free Ganzhou strain. The lncRNA differential expression analysis predicted two lncRNAs:

基金项目: 国家自然科学基金(31760514, 31701785), 江西省自然科学基金(20181BAB214012)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: xiaohuamei625@163.com

收稿日期: 2018-10-30

TCONS_00096118 and TCONS_00234564 were expressed differentially in CLas-infected and CLas-free adults. qPCR was used to validate the prediction result: TCONS_00234564 matched the result and highly expressed in CLas-infected adults. It indicated that lncRNA involved in the interaction of pathogen CLas and its host Asian citrus psyllid.

Key words: lncRNA; *Diaphorina citri*; *Candidatus Liberibacter asiaticus*; RNA-Seq; validation

柑橘黄龙病是一种柑橘生产上的毁灭性病害,被称为“柑橘癌症”(Bové, 2006),已在亚洲、美洲、非洲等大洲的40多个国家发生和流行,我国亦是柑橘黄龙病的重病区(范国成等, 2009; 程春振等, 2013)。柑橘黄龙病的自然传播主要是由取食带病植株后的柑橘木虱 *Diaphorina citri* 再取食健康植株来实现的(许长藩等, 1998; 范国成等, 2009)。控制柑橘木虱以减少其传播黄龙病病原菌已成为世界范围内防治柑橘黄龙病的重要方法(Grafton-Cardwell et al., 2013)。El-Shesheny et al. (2013) 研究结果表明,通过RNA干扰敲除柑橘木虱翅发育基因 *abnormal wing disc (awd)*,可造成5龄若虫的死亡和成虫的翅畸变。但受条件限制,在实际病虫害防治中RNA干扰尚未能广泛推广运用(Yu et al., 2013)。目前的主要防治手段仍然依赖于杀虫剂来遏制柑橘木虱的繁衍扩散(Setamou et al., 2010; Tiwari et al., 2011a)。因此,探寻高效防治柑橘黄龙病的措施具有重要的现实意义。

病原菌与介体寄主之间是协同进化关系,柑橘木虱获菌后,成虫对杀虫剂的耐受性降低,体内解毒酶活性水平下降(Tiwari et al., 2011b, c)。与豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum*、普热猎蝽 *Rhodnius prolixus*、体虱 *Pediculus humanus* 等昆虫一样,柑橘木虱拥有相对弱化的先天性免疫系统,黄龙病病原菌 *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) 能在其体内持续性繁殖(Arp et al., 2016)。同时,饲喂柑橘黄龙病病原菌的柑橘木虱对杀虫剂的敏感度远高于未饲喂的个体,表明细菌侵染能通过调控基因表达进而引起寄主昆虫的生理改变(Tiwari et al., 2010; 2011d)。研究发现,细菌和病毒侵染寄主后会诱导长链非编码RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 特异性高表达,参与寄主的抗菌、抗病毒反应(Ding et al., 2016; Zhang et al., 2013)。Etebari et al. (2016) 发现埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 感染II型登革病毒(dengue virus)后,体内Aa20细胞中的lncRNA表达丰度会上调,进而抑制病毒的复制;通过基因干扰技术沉默 lincRNA-1317 基因后,II型登革病毒的复制增强;且在感染沃尔巴克氏体 *Wolbachia* 的埃及伊蚊中, lin-

cRNA-1317 的表达量亦显著上升,该结果表明 lncRNA 参与了埃及伊蚊体内的抗菌、病毒免疫反应。对感染囊仔病毒(sacbrood virus, SBV)和残翅病毒(deformed wing virus, DWV)的意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 的研究发现,其体内 lncRNA 也呈现差异表达(Jayakodi et al., 2015)。

LncRNA 是一类长度大于200 nt且不编码蛋白质的RNA基因,无长开放阅读框,由RNA聚合酶II转录,发生剪接,具有5'帽子结构和3' PolyA尾巴,最终形成的基因结构类似于信使RNA(messenger RNA, mRNA) (Guttman et al., 2009; 肖花美等, 2017)。由于 lncRNA 的低表达及物种间的序列不保守,一度被认为是不具有生物学功能的“转录噪音”(Huttenhofer et al., 2005)。但近年的研究表明 lncRNA 在昆虫体内具有重要功能,参与调控昆虫的变态发育、抗药性的形成以及繁殖力的高低等。如 Chen et al. (2016a) 分析了黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 自胚胎至成虫共27个不同发育时间点的RNA-Seq数据,发现 lncRNA 可能参与果蝇的变态发育过程;Etebari et al. (2015) 对小菜蛾 *Plutella xylostella* 抗性品系与敏感品系共7个RNA-Seq数据进行分析,发现3个 lncRNA 在毒死蜱、氟虫腈、苏云金芽胞杆菌 *Bacillus thuringiensis* (Bt) 这3类杀虫剂抗性品系中均高表达。Xiao et al. (2015) 分析了褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 的12个转录组数据,发现有3个 lncRNA 基因与其生殖能力密切相关。同时,随着高通量测序技术的发展,通过不同的测序数据,大量的昆虫 lncRNA 基因被挖掘。Young et al. (2012) 分析了黑腹果蝇30个不同发育时间点的转录组测序数据,共发现1 119个 lncRNA 基因;Chen et al. (2016a) 利用黑腹果蝇的RNA-Seq和ChIP-Seq数据,共发现3 816个 lncRNA 基因;Jayakodi et al. (2015) 在中华蜜蜂 *Apis cerana* 中发现了2 407个 lncRNA 基因,在意大利蜜蜂中发现了1 514个 lncRNA 基因;Wu et al. (2016) 利用链特异性与非链特异性RNA-Seq数据,在家蚕 *Bombyx mori* 中发现了5 556个 lncRNA 基因,Zhou et al. (2016) 利用新的转录组数据,并整合Wu et al. (2016) 的预测结果,在家

蚕中获得了更为可靠的4 856个lncRNA基因。

为明确lncRNA在柑橘木虱对黄龙病病原菌互作中的作用,本研究利用柑橘木虱RNA-Seq数据构建生物信息学预测流程,分析柑橘木虱lncRNA基因的表达特征及其在不同地理种群、带菌与无菌成虫体内的表达差异,以期研发安全有效的黄龙病绿色防治方法提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

供试昆虫:携带黄龙病病原菌的柑橘木虱(带菌柑橘木虱)和未携带黄龙病病原菌的柑橘木虱(无菌柑橘木虱)广州品系由华南农业大学昆虫系邱宝利教授馈赠,无菌柑橘木虱赣州品系由江西省赣州市柑橘研究所谢秀挺老师馈赠。

试剂:RNA提取试剂Trizol® Reagent,美国Invitrogen公司;反转录试剂盒HiScript® Q RT Super Mix for qPCR、荧光定量PCR试剂盒ChamQ™ SYBR® qPCR Green Master Mix,南京诺唯赞生物科技有限公司;PCR所用DNA聚合酶预混液Premix Ex Taq,宝日医生物技术(北京)有限公司;其它试剂均为国产分析纯。

仪器:JXFSTPRP-48型组织研磨仪,上海净信实业发展有限公司;ABI Veriti 96孔型梯度PCR仪、ABI 7500定量PCR仪、实时荧光定量PCR系统,美国Applied Biosystems公司。

1.2 方法

1.2.1 柑橘木虱lncRNA预测流程的构建

自NCBI SRA数据库下载了13个柑橘木虱转录组信息:(1)无菌品系:包括若虫(SRS597121)和成虫(SRS597122);(2)带菌品系:包括成虫(SRS597123)和若虫(SRS597124);(3)无菌不同组织:包括雄虫触角(SRS1111877)、雌虫触角(SRS1111878)、雄虫腹末端(SRS1111879)、雌虫腹末端(SRS1111880);(4)无菌地理种群:中国种群(SRS1044999)、美国佛罗里达种群(SRS1045002)、巴西种群(SRS1044979);(5)无菌雌虫整虫(SRS1349278);(6)雌虫含菌细胞(SRS1349285)。

lncRNA预测参考Xiao et al.(2015)的流程并作部分修改。首先,采用Trimmomatic 0.36软件(Bolger et al., 2014)过滤柑橘木虱RNA-Seq数据中低质量reads后,利用Tophat 2.2.1软件(Trapnell et al., 2009)将13个转录组reads(数据下载自NCBI SRA数据库)分别映射至柑橘木虱基因组,柑橘木虱基因组数据和基因组注释文件下载自InsectBase数据库

(Yin et al., 2016);其次,基于柑橘木虱基因组注释信息,利用Cufflinks 2.2.1软件(Trapnell et al., 2012)对转录组进行拼接并整合,筛选长度大于200 nt且外显子数量大于或等于2的转录本;再次,利用EMBOSS 6.6.0(Rice et al., 2000)、CPAT 1.2.4(Wang et al., 2013)、HMMER 3.1b2(Nawrocki, 2014)以及Infernal 1.1.2(Potter et al., 2018)软件过滤蛋白质编码基因和已知的非编码RNA;最后,采用Cufflinks 2.2.1软件(Trapnell et al., 2012)分析带菌与无菌柑橘木虱样本中差异表达的lncRNA,若满足 $|\log_2 \text{FPKM} [\text{CLas-infected}/\text{CLas-free}]| > 1$ 且 $P < 0.05$,则认为2个lncRNA之间存在差异表达。式中,FPKM(fragments per kilobase of exon model per million mapped reads)是指每千个碱基的转录每百万映射读取的碎片;预测分析在曙光A840服务器上完成,Redhat 6.0系统,64核AMD处理器6378*4,内存1 T。

1.2.2 柑橘木虱lncRNA的特征分析

对lncRNA的特征分析主要分析其与蛋白质编码基因在外显子数量、转录本长度、外显子长度、内含子长度的区别以及lncRNA选择性剪切情况。本研究对1.2.1结果进行统计,分析lncRNA与蛋白质编码基因外显子、内含子、转录本长度、外显子数量以及lncRNA的选择性剪切情况。利用Geneious 11.1软件(Kearse et al., 2012)展示lncRNA及蛋白质编码基因转录本结构。

1.2.3 柑橘木虱RNA提取及lncRNA预测结果验证

取广州品系或赣州品系柑橘木虱成虫5头,置于冰上预冷的1 mL玻璃匀浆器中,加入500 μL Trizol试剂,依据说明书进行总RNA抽提。分别取1 μg 不同品系总RNA作为模版,利用反转录试剂盒HiScript® Q RT SuperMix进行反转录,获得cDNA模板。为验证生物信息预测lncRNA的准确性并检测lncRNA在广州品系和赣州品系中的差异表达,随机选取10条lncRNA序列,利用Primer Premier 5.0设计引物(表1),目标产物大小介于150~400 bp之间,得到相应RT-PCR验证结果(林亚玉等, 2012)。引物均由北京擎科新业生物技术有限公司合成。25 μL PCR反应体系:Premix Ex Taq 12.5 μL 、cDNA模板0.5 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物各1 μL ,加灭菌蒸馏水补足至25 μL 。PCR扩增条件:95℃预变性3 min;95℃变性30 s,53~58℃退火30 s,72℃延伸30 s,30个循环;最终72℃延伸7 min。取10 μL PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳,并在普通凝胶成像系统下拍照,验证所预测lncRNA的准确性并比较lncRNA在不同地理种群中的表达差异。

1.2.4 柑橘木虱lncRNA 差异表达的验证

为验证生物信息预测的带菌与无菌成虫中 lncRNA 的差异表达,选取赣州品系带菌与无菌成虫采用相应引物(表 1)进行实时荧光定量 PCR(real-time fluorescence quantitative PCR,qPCR)扩增,以验证 lncRNA 的表达。20 μL qPCR 反应体系:2×ChamQ™ SYBR® qPCR Green Master Mix 10 μL、10 μmol/L 上下游引物各 0.4 μL、ROX II 0.4 μL、cDNA 模板 2 μL、

灭菌双蒸水 6.8 μL。采用两步法反应程序:95℃预变性 3 min;95℃变性 5 s,60℃退火并延伸 31 s,共 40 个循环。结束后进行熔解曲线分析,采用比较 C_t 值的相对定量法($2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法), $\Delta C_t=C_{t-目的基因}-C_{t-内参基因}$; $\Delta\Delta C_t=(C_{t-目的基因}-C_{t-内参基因})_{试验组}-(C_{t-目的基因}-C_{t-内参基因})_{对照组}$ (Livak & Schmittgen,2001)。所有试验均设 3 次生物学重复。

表 1 本研究中所用 PCR 引物信息
Table 1 Primer sequences for PCR in this study

目的 Purpose	引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	产物长度 Production length (bp)
RT-PCR	TCONS_00000506-F	TGATCCTGGGTCTACAAGCC	290
	TCONS_00000506-R	ATCGGGGAGCCTTTTCCTCT	
	TCONS_00001671-F	TTATCTTCGGTGGCTCATCG	209
	TCONS_00001671-R	CACCTGAGATAACGGGATGC	
	TCONS_00008697-F	AGCAGCAGATTTCGTTTGTG	254
	TCONS_00008697-R	GGATAGGTGAACAATACCACCA	
	TCONS_00034665-F	GATGGGTGACCATCCAGGTT	216
	TCONS_00034665-R	GCCTTGTAACAACCGGCAAAT	
	TCONS_00163124-F	TGAGGTAGAAACACTCCGTG	308
	TCONS_00163124-R	CTGCAATCCAAGCTAGTCAT	
	TCONS_00168701-F	TGGTTTGGAGTTTGATGGAGGT	317
	TCONS_00168701-R	GTTACGACACAGACCACACG	
	TCONS_00164787-F	ATCGTTATCTCCCCCACTGGA	104
	TCONS_00164787-R	GTCACGTGCAGTTACCTCGG	
	TCONS_00142816-F	CCACGGTACTTTTTGGGGGA	390
	TCONS_00142816-R	ACACTTCCCGGTTTCTACGG	
	TCONS_00047304-F	GCAGAAGGTCCGAGGTTGAT	186
	TCONS_00047304-R	ATCGTGATTTTCGAAGCGCC	
	TCONS_00204662-F	GGTGACGTCCTGTTCTCGTT	314
	TCONS_00204662-R	ACGAGTACCTACAAGCTGCG	
qPCR	actin-F	TGTGACGAAGAAGTTGCTGC	211
	actin-R	TGGGGTATTTCAGGGTCAGG	
	TCONS_00234564-F	CGGTCATGGAACCCCTACTT	253
	TCONS_00234564-R	GTGGCGTGAGATTGGTATTG	
	TCONS_00096118-F	GGTGTTCTGAGGATGTTTGTTC	126
	TCONS_00096118-R	AACGCCTTCTCCAGTTCTTC	

1.3 数据分析

利用 Graphpad Prism 5 软件分析基因的相对表达量,应用 t 测验法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 柑橘木虱lncRNA 的预测流程及结果

利用所构建的 lncRNA 预测流程,从 13 组柑橘木虱转录组中共预测获得 10 192 个 lncRNA 基因,对应 15 747 条 lncRNA 转录本(图 1)。根据 lncRNA 在基因组的位置信息,将 lncRNA 分为 7 类:基因间区 lncRNA、内含子区 lncRNA、与参考基因内含子反

义链有重叠的 lncRNA、与参考基因外显子正义链有重叠的 lncRNA、与参考基因外显子反义链有重叠的 lncRNA、与参考基因剪切位点重叠的 lncRNA 及未知类的 lncRNA。其中,基因间区 lncRNA 数量最多,共 3 416 条,占总数的 33.52%;与内含子反义链重叠的 lncRNA 数量最少,仅占 0.25%(表 2)。为研究黄龙病病原菌对柑橘木虱 lncRNA 的影响,重点分析了带菌和无菌样本中发现的 lncRNA。在无菌成虫和无菌若虫中,分别发现了 7 511 个和 7 057 个 lncRNA 基因;带菌成虫和带菌若虫中发现的 lncRNA 数量更少,分别为 7 263 个和 5 737 个 lncRNA 基因(表 2)。

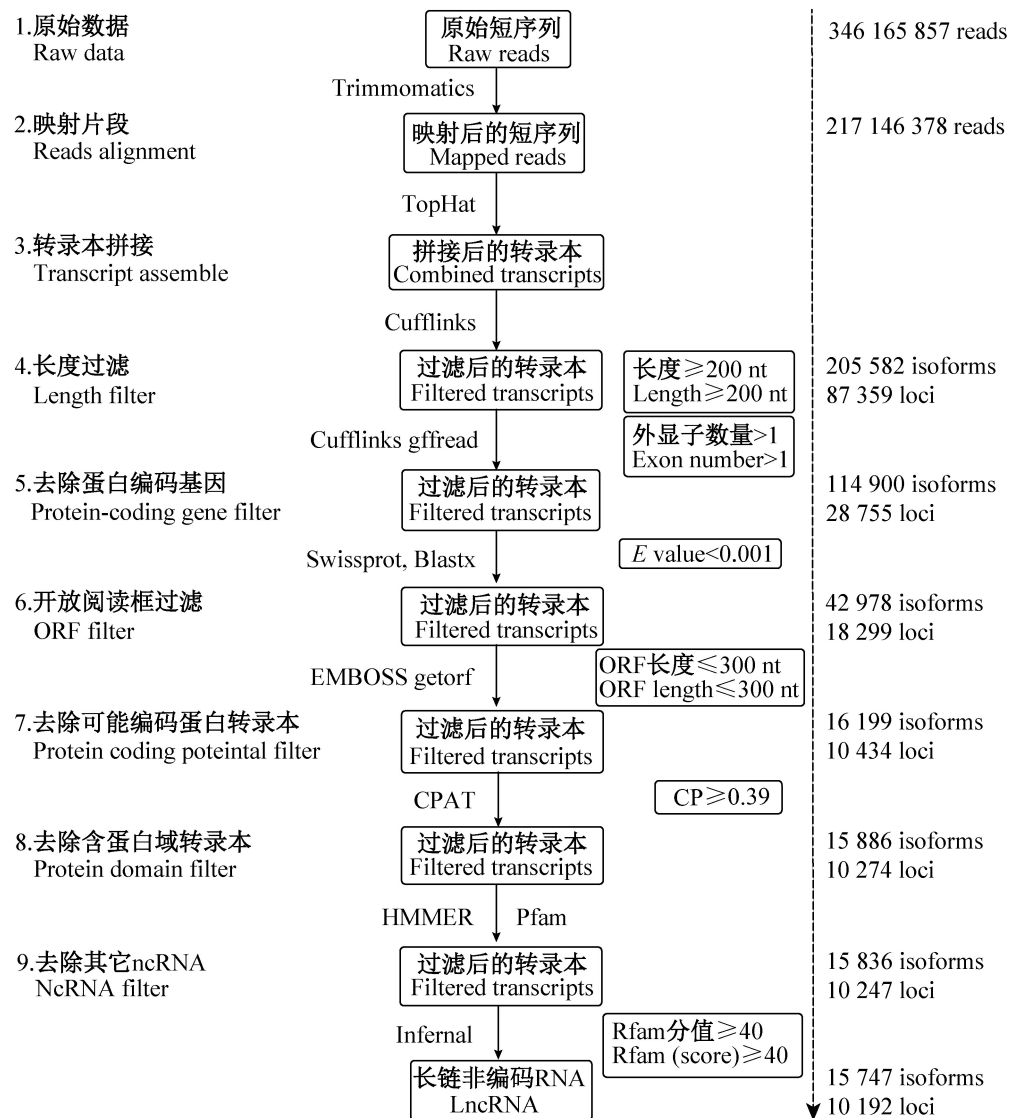


图 1 柑橘木虱 lncRNA 预测流程

Fig. 1 lncRNA prediction pipeline of *Diaphorina citri*

表 2 不同柑橘木虱转录组中 lncRNA 分布总数

Table 2 The number of lncRNAs in individual RNA-Seq datasets of different *Diaphorina citri* samples

LncRNA 种类 LncRNA type	13 个转录组 lncRNA		无菌/带菌品系			
	LncRNA in 13 samples		CLas-free/infected strain			
	LncRNA 总数 No. of lncRNA	百分比 (%) Percentage	无菌成虫 CLas-free adult	带菌成虫 CLas-infected adult	无菌若虫 CLas-free nymph	带菌若虫 CLas-infected nymph
基因间区 Intergenic	3 416	33.52	2 677	1 228	2 517	1 099
内含子区 Intronic	1 551	15.22	1 134	1 484	1 034	1 080
与内含子反义链重叠 Intronic overlap (-)	25	0.25	20	25	22	21
与外显子正义链重叠 Exonic overlap (+)	1 370	13.44	1 081	1 306	1 045	1 053
与外显子反义链重叠 Exonic overlap (-)	1 365	13.39	1 121	1 327	1 063	1 097
与剪切位点重叠 Splice junction overlap	1 206	11.83	904	1 167	842	850
未知类 Unclassified	1 259	12.35	574	726	534	537
总数 Total	10 192	100.00	7 511	7 263	7 057	5 737

2.2 柑橘木虱lncRNA的特征分析

通过比较分析柑橘木虱lncRNA基因与蛋白质编码基因的特性差异,发现lncRNA的外显子数量为2~7个,而蛋白编码基因的外显子数量最多可达到16个;80.5%的lncRNA含有2个外显子,而含有2个外显子的蛋白质编码基因仅占23.3%(图2-A)。柑橘木虱lncRNA的外显子平均长度为340 bp,蛋白质编码基因的外显子平均长度为254 bp,前者显著长于后者(图2-B)。而lncRNA的内含子平均长度为

3 452 bp,蛋白编码基因内含子平均长度为1 838 bp,前者显著长于后者(图2-C)。由于lncRNA外显子数量更少,lncRNA转录本总体长度为760 bp,显著短于蛋白质编码基因转录本长度1 289 bp(图2-D)。基因选择性剪切分析发现柑橘木虱中约29.7%的lncRNA基因发生了选择性剪切(图2-E),其中选择性剪切转录本数量最多的基因为XLOC_002869,具有19个lncRNA转录本(图3)。

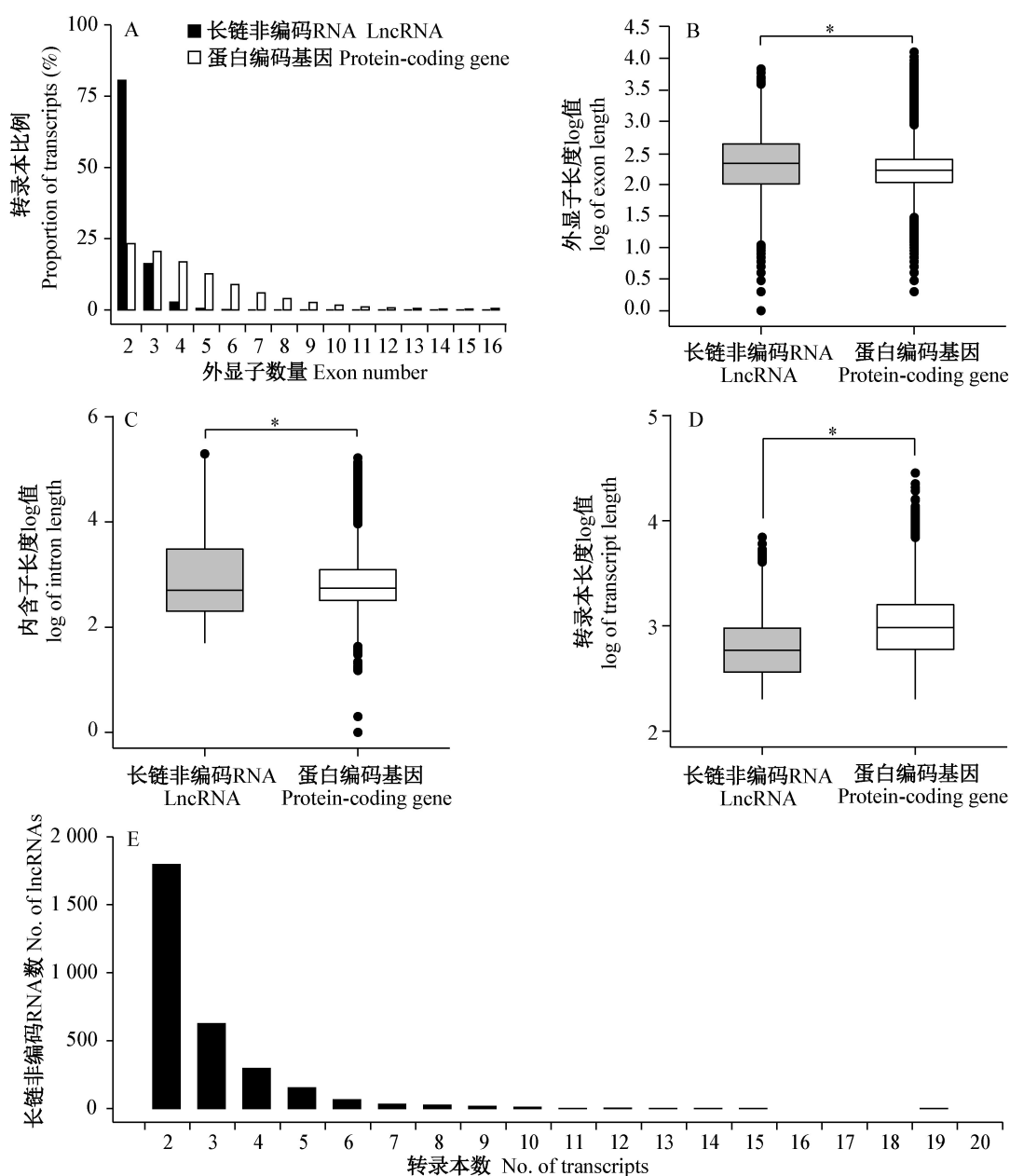


图2 柑橘木虱的lncRNA特征

Fig. 2 The characteristic of lncRNAs in *Diaphorina citri*

图B~D中数据为平均数±标准差。*表示经 t 测验法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean $\pm$ SE in Fig. B~D. * indicates significant difference at $P<0.05$ level by t test.

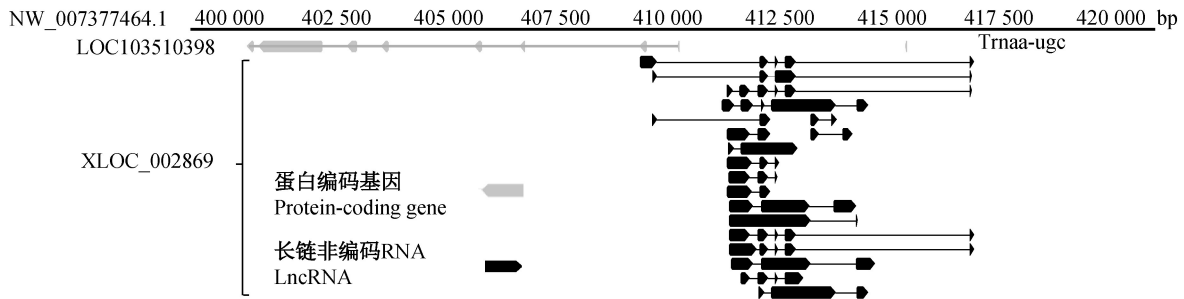


图3 柑橘木虱长链非编码RNA XLOC_002869基因的19个转录本结构

Fig. 3 The gene structure of 19 transcripts of lncRNA XLOC_002869 in *Diaphorina citri*

2.3 柑橘木虱lncRNA在不同地理种群中的表达差异

以广州品系无菌成虫和赣州品系无菌成虫的cDNA为模板进行RT-PCR检测,发现在随机选取的10条lncRNA序列中,除TCONS_00163124、TCONS_00168701及TCONS_00142816外,其余7条lncRNA均能在无菌广州品系或无菌赣州品系中

被扩增到,表明预测流程所发现的lncRNA具有可靠性。其中仅TCONS_00034665在无菌广州品系中未检测到表达,而在无菌赣州品系中高表达,存在明显差异,表明lncRNA在昆虫体内的表达可能存在种群差异性(图4)。

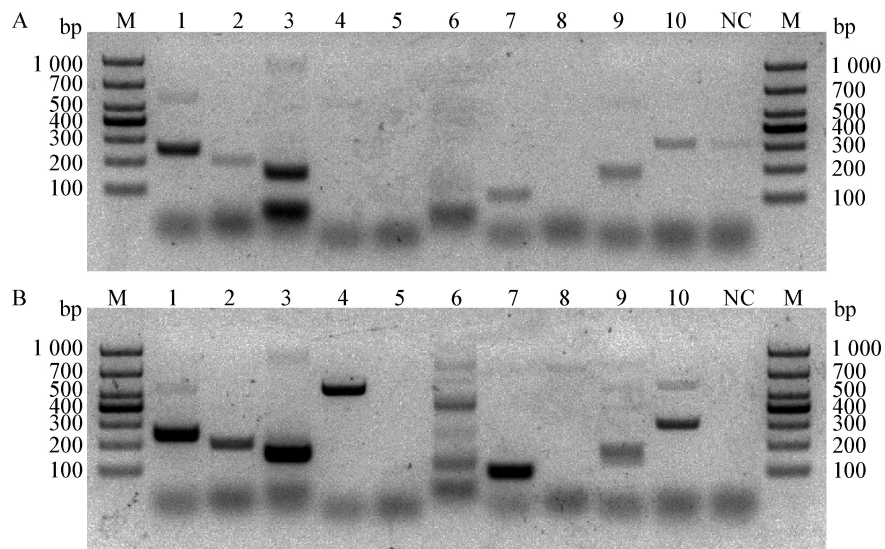


图4 柑橘木虱不同地理种群无菌成虫的lncRNA基因RT-PCR检测结果

Fig. 4 RT-PCR result for lncRNA in the different strains of *Diaphorina citri* CLas-free adult

M: DL 1000 DNA marker; 1-10: lncRNA TCONS_00000506, TCONS_00001671, TCONS_00008697, TCONS_00034665, TCONS_00163124, TCONS_00168701, TCONS_00164787, TCONS_00142816, TCONS_00047304 and TCONS_00204662. A: 广州品系; B: 赣州品系; NC: 阴性对照。A: Guangzhou strain; B: Ganzhou strain; NC: negative control.

2.4 LncRNA的差异表达及荧光定量PCR验证

分析带菌和无菌柑橘木虱成虫lncRNA的差异表达情况,发现2个差异表达的lncRNA基因TCONS_00234564和TCONS_00096118,均在带菌柑橘木虱成虫体内显著高表达。利用qPCR验证这2条lncRNA的表达量,结果显示TCONS_00234564在带菌成虫体内有较高表达量(t 检验, $P=0.06$),与预测结果一致(图5-A),表明黄龙病病原菌的侵染可能诱导了TCONS_00234564基因的高表达,抑制

病原菌的繁殖,其协同作用机制有待进一步研究。而TCONS_00096118基因在无菌成虫体内有较高表达量(t 检验, $P=0.09$;图5-B),与预测结果相反。

3 讨论

本研究以柑橘黄龙病病原菌的唯一自然传播媒介——柑橘木虱为对象,构建了柑橘木虱lncRNA的预测流程,分析了13个柑橘木虱转录组,共发现10 192个lncRNA基因。在对lncRNA的特征分析

中发现, 80.5%的lncRNA具有2个外显子, 转录本长度显著短于蛋白编码基因, 与褐飞虱(Xiao et al., 2015)、小菜蛾(Etebari et al., 2015)、家蚕(Wu et al.,

2016)等昆虫的lncRNA结构特征一致, 表明昆虫的lncRNA结构特征具有一定的保守性。

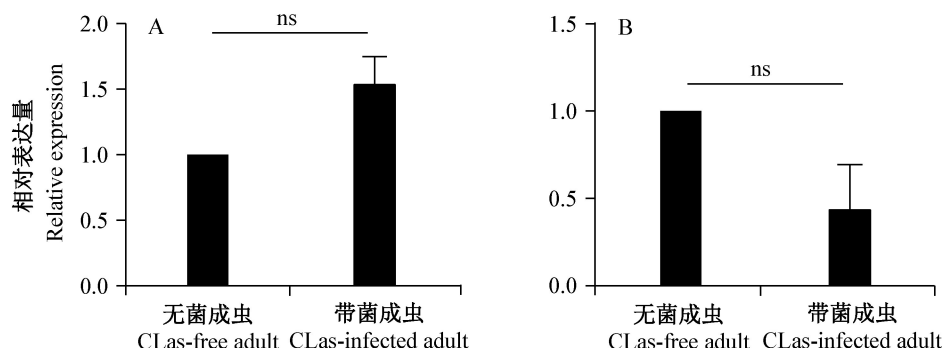


图5 柑橘木虱lncRNA基因TCONS_00234564(A)和TCONS_00096118(B)差异表达的qPCR验证结果

Fig. 5 qPCR validation of differentially-expressed lncRNA gene TCONS_00234564 (A) and TCONS_00096118 (B) in *Diaphorina citri*

图中数据为平均数±标准差。ns表示经t测验法检验在0.05水平无差异显著。Data are mean±SE. ns indicates no significant difference at 0.05 level by t test.

近年来, 对黑腹果蝇(Young et al., 2012; Chen et al., 2016b)、意大利蜜蜂(Jayakodi et al., 2015)、埃及伊蚊(Etebari et al., 2016)和家蚕(Wu et al., 2016; Zhou et al., 2016)等昆虫体内lncRNA的研究发现, lncRNA在昆虫不同发育时期、不同组织、感染和未感染病原菌或病毒的样本之间显示出较大差异性表达。在其它物种或细胞中, 感染病原体后也能观察到宿主lncRNA差异表达的情况, 如Zhang et al. (2013)发现在感染艾滋病病毒1型(human immunodeficiency virus type 1, HIV-1)的T细胞中, lncRNA NEAT1的表达量显著升高, 敲除NEAT1后, 病毒的复制会增强; 在感染腺病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV)的人类原发性肺成纤维细胞中, 超过80%的细胞lncRNA表达上调(Zhao et al., 2016); 而感染冠状病毒(adenovirus)的小鼠体内也检测到大约500个差异表达的lncRNA基因(Peng et al., 2010)。本研究随机选取10条lncRNA进行PCR验证, 其中7条在柑橘木虱2个地理种群中能检测到表达; 同时, 发现1条lncRNA基因TCONS_00234564在柑橘木虱2个地理种群中差异表达, 表明lncRNA的表达存在地理种群差异。但lncRNA在柑橘木虱不同地理种群中差异表达的作用目前仍未有相关研究报道, 值得今后进一步研究探讨。

大量研究已经证明了lncRNA在病原菌侵染过程中具有重要作用。例如, 在感染沃尔巴克氏体的埃及伊蚊中, 发现大量的lncRNA基因显著高表达;

同时, 高等动物受侵染细胞或个体内lncRNA的表达上调或下调, 激活宿主的先天性免疫反应, 导致免疫应答的紊乱及相关蛋白编码基因表达异常(Etebari et al., 2016)。Guttman et al. (2009)首次报道了lncRNA可能参与先天性免疫反应。通过分析基因芯片和RNA-seq数据, 目前已发现多个lncRNA基因与先天性免疫反应相关, 如Lethe(Rapicavoli et al., 2013)、PACER(Krawczyk & Emerson, 2014)、THRIL(Li et al., 2014)和NEAT1(Imamura et al., 2014)均参与调控免疫反应基因的表达。本研究发现2个lncRNA基因在带菌柑橘木虱成虫中高表达, qPCR验证发现TCONS_00234564与生物信息学预测结果一致, 表明感染黄龙病病原菌能诱导柑橘木虱体内lncRNA的高表达。由于本试验所用带菌与无菌柑橘木虱转录组无重复样本, 发现的差异表达lncRNA基因较少, 且差异表达分析结果是基于生物信息学方法预测获得, 随着转录组测序的普及将会有越来越多的带菌和无菌柑橘木虱转录组被报道, lncRNA的发现会更多, 其在黄龙病病原菌与柑橘木虱互作中的功能将会进一步被挖掘。综上所述, 黄龙病病原菌侵染诱导了柑橘木虱体内的lncRNA基因高表达或低表达, 表明lncRNA基因可能参与调控柑橘木虱的抗菌反应, 其作用机制有待进一步深入研究。

致谢: 江西省农业科学院黄水金研究员提供柑橘木虱材料, 特此致谢!

参考文献 (References)

- Arp AP, Hunter WB, Pelz-Stelinski KS. 2016. Annotation of the Asian citrus psyllid genome reveals a reduced innate immune system. *Frontiers in Physiology*, 7: 570
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15): 2114–2120
- Bové JM. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, 88(1): 7–37
- Chen B, Zhang Y, Zhang X, Jia SL, Chen S, Kang L. 2016b. Genome-wide identification and developmental expression profiling of long noncoding RNAs during *Drosophila* metamorphosis. *Scientific Reports*, 6: 23330
- Chen MJ, Chen LK, Lai YS, Lin YY, Wu DC, Tung YA, Liu KY, Shih HT, Chen YJ, Lin YL, et al. 2016a. Integrating RNA-seq and ChIP-seq data to characterize long non-coding RNAs in *Drosophila melanogaster*. *BMC Genomics*, 17: 220
- Cheng CZ, Zeng JW, Zhong Y, Yan HX, Jiang B, Zhong GY. 2013. Research progress on citrus Huanglongbing disease. *Acta Horticulturae Sinica*, 40(9): 1656–1668 (in Chinese) [程春振, 曾继吾, 钟云, 闫化学, 姜波, 钟广炎. 2013. 柑橘黄龙病研究进展. 园艺学报, 40(9): 1656–1668]
- Ding YZ, Zhang ZW, Liu YL, Shi CX, Zhang J, Zhang YG. 2016. Relationship of long noncoding RNA and viruses. *Genomics*, 107(4): 150–154
- El-Shesheny I, Hajeri S, El-Hawary I, Gowda S, Killiny N. 2013. Silencing abnormal wing disc gene of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* disrupts adult wing development and increases nymph mortality. *PLoS ONE*, 8(5): e65392
- Etebari K, Asad S, Zhang G, Asgari S. 2016. Identification of *Aedes aegypti* long intergenic non-coding RNAs and their association with *Wolbachia* and dengue virus infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(10): e0005069
- Etebari K, Furlong MJ, Asgari S. 2015. Genome wide discovery of long intergenic non-coding RNAs in diamondback moth (*Plutella xylostella*) and their expression in insecticide resistant strains. *Scientific Reports*, 5: 14642
- Fan GC, Liu B, Wu RJ, Li T, Cai ZJ, Ke C. 2009. Thirty years of research on citrus Huanglongbing in China. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 24(2): 183–190 (in Chinese) [范国成, 刘波, 吴如健, 李韬, 蔡子坚, 柯冲. 2009. 中国柑橘黄龙病研究30年. 福建农业学报, 24(2): 183–190]
- Grafton-Cardwell EE, Stelinski LL, Stansly PA. 2013. Biology and management of Asian citrus psyllid, vector of the huanglongbing pathogens. *Annual Review of Entomology*, 58: 413–432
- Guttman M, Amit I, Garber M, French C, Lin MF, Feldser D, Huarte M, Zuk O, Carey BW, Cassady JP, et al. 2009. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature*, 458(7235): 223–227
- Huttenhofer A, Schattner P, Polacek N. 2005. Non-coding RNAs: hope or hype? *Trends in Genetics*, 21(5): 289–297
- Imamura K, Imamachi N, Akizuki G, Kumakura M, Kawaguchi A, Nagata K, Kato A, Kawaguchi Y, Sato H, Yoneda M, et al. 2014. Long noncoding RNA NEAT1-dependent SFPQ relocation from promoter region to paraspeckle mediates IL8 expression upon immune stimuli. *Molecular Cell*, 53(3): 393–406
- Jayakodi M, Jung JW, Park D, Ahn YJ, Lee SC, Shin SY, Shin C, Yang TJ, Kwon HW. 2015. Genome-wide characterization of long intergenic non-coding RNAs (lincRNAs) provides new insight into viral diseases in honey bees *Apis cerana* and *Apis mellifera*. *BMC Genomics*, 16: 680
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, et al. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12): 1647–1649
- Krawczyk M, Emerson BM. 2014. p50-associated COX-2 extragenic RNA (PACER) activates *COX-2* gene expression by occluding repressive NF-kappaB complexes. *eLife*, 3: e01776
- Li Z, Chao TC, Chang KY, Lin N, Patil VS, Shimizu C, Head SR, Burns JC, Rana TM. 2014. The long noncoding RNA *THRIL* regulates TNF α expression through its interaction with hnRNPL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(3): 1002–1007
- Lin YY, Yin YP, Chen SQ, Wang ZK. 2012. Comparative of citrus Huanglongbing molecular detection approaches and monitoring of the orchards. *Journal of Plant Protection*, 39(6): 503–507 (in Chinese) [林亚玉, 殷幼平, 陈世钦, 王中康. 2012. 三种分子检测体系的比较及柑橘果园黄龙病监测. 植物保护学报, 39(6): 503–507]
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4): 402–408
- Nawrocki EP. 2014. Annotating functional RNAs in genomes using Infernal. *Methods in Molecular Biology*, 1097: 163–197
- Peng X, Gralinski L, Armour CD, Ferris MT, Thomas MJ, Prohl S, Bradel-Tretheway BG, Korth MJ, Castle JC, Biery MC, et al. 2010. Unique signatures of long noncoding RNA expression in response to virus infection and altered innate immune signaling. *mBio*, 1(5): e00206-10
- Potter SC, Luciani A, Eddy SR, Park Y, Lopez R, Finn RD. 2018. HMMER web server: 2018 update. *Nucleic Acids Research*, 46(W1): 200–204
- Rapicavoli NA, Qu K, Zhang J, Mikhail M, Laberge RM, Chang HY. 2013. A mammalian pseudogene lncRNA at the interface of inflammation and anti-inflammatory therapeutics. *eLife*, 2: e00762
- Rice P, Longden I, Bleasby A. 2000. EMBOSS: the European molecular biology open software suite. *Trends in Genetics*, 16(6): 276–277
- Setamou M, Rodriguez D, Saldana R, Schwarzlose G, Palrang D, Nelson SD. 2010. Efficacy and uptake of soil-applied imidacloprid in the control of Asian citrus psyllid and a citrus leafminer, two foliar-feeding citrus pests. *Journal of Economic Entomology*, 103

- (5): 1711–1719
- Tiwari S, Gondhalekar AD, Mann RS, Scharf ME, Stelinski LL. 2011b. Characterization of five *CYP4* genes from Asian citrus psyllid and their expression levels in *Candidatus* Liberibacter asiaticus-infected and uninfected psyllids. *Insect Molecular Biology*, 20(6): 733–744
- Tiwari S, Lewis-Rosenblum H, Pelz-Stelinski K, Stelinski LL. 2010. Incidence of *Candidatus* Liberibacter asiaticus infection in abandoned citrus occurring in proximity to commercially managed groves. *Journal of Economic Entomology*, 103(6): 1972–1978
- Tiwari S, Mann RS, Rogers ME, Stelinski LL. 2011a. Insecticide resistance in field populations of Asian citrus psyllid in Florida. *Pest Managant Science*, 67(10): 1258–1268
- Tiwari S, Pelz-Stelinski K, Mann RS, Stelinski LL. 2011c. Glutathione transferase and cytochrome P450 (general oxidase) activity levels in *Candidatus* Liberibacter asiaticus-infected and uninfected Asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 104(2): 297–305
- Tiwari S, Pelz-Stelinski K, Stelinski LL. 2011d. Effect of *Candidatus* Liberibacter asiaticus infection on susceptibility of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, to selected insecticides. *Pest Managant Science*, 67(1): 94–99
- Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL. 2009. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics*, 25(9): 1105–1111
- Trapnell C, Roberts A, Goff L, Pertea G, Kim D, Kelley DR, Pimentel H, Salzberg SL, Rinn JL, Pachter L. 2012. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature Protocols*, 7(3): 562–578
- Wang L, Park HJ, Dasari S, Wang S, Kocher JP, Li W. 2013. CPAT: coding-potential assessment tool using an alignment-free logistic regression model. *Nucleic Acids Research*, 41(6): e74
- Wu Y, Cheng T, Liu C, Liu D, Zhang Q, Long R, Zhao P, Xia Q. 2016. Systematic identification and characterization of long non-coding RNAs in the silkworm, *Bombyx mori*. *PLoS ONE*, 11(1): e0147147
- Xiao H, Yuan Z, Guo D, Hou B, Yin C, Zhang W, Li F. 2015. Genome-wide identification of long noncoding RNA genes and their potential association with fecundity and virulence in rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *BMC Genomics*, 16(1): 749
- Xiao HM, Li MZ, Li F. 2017. Progress in research on long, non-coding, insect RNA. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 54(1): 1–12 (in Chinese) [肖花美, 李美珍, 李飞. 2017. 昆虫长链非编码RNA的研究进展. *应用昆虫学报*, 54(1): 1–12]
- Xu CF, Lin XZ, Wei XX, Ke C. 1998. Integeated control program of citrus Huanglongbing disease. *Journal of Plant Protection*, 25(2): 108–110 (in Chinese) [许长藩, 林先沾, 韦晓霞, 柯冲. 1998. 柑桔黄龙病综合防治研究. *植物保护学报*, 25(2): 108–110]
- Yin C, Shen G, Guo D, Wang S, Ma X, Xiao H, Liu J, Zhang Z, Liu Y, Zhang Y, et al. 2016. InsectBase: a resource for insect genomes and transcriptomes. *Nucleic Acids Research*, 44(D1): 801–807
- Young RS, Marques AC, Tibbit C, Haerty W, Bassett AR, Liu JL, Ponting CP. 2012. Identification and properties of 1,119 candidate lincRNA loci in the *Drosophila melanogaster* genome. *Genome Biology and Evolution*, 4(4): 427–442
- Yu N, Christiaens O, Liu J, Niu J, Cappelle K, Caccia S, Huvenne H, Smaghe G. 2013. Delivery of dsRNA for RNAi in insects: an overview and future directions. *Insect Science*, 20(1): 4–14
- Zhang Q, Chen CY, Yedavalli VS, Jeang KT. 2013. NEAT1 long non-coding RNA and paraspeckle bodies modulate HIV-1 posttranscriptional expression. *mBio*, 4(1): e00596-12
- Zhao H, Chen M, Lind SB, Pettersson U. 2016. Distinct temporal changes in host cell lncRNA expression during the course of an adenovirus infection. *Virology*, 492: 242–250
- Zhou QZ, Zhang B, Yu QY, Zhang Z. 2016. BmncRNAdb: a comprehensive database of non-coding RNAs in the silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Bioinformatics*, 17(1): 370

(责任编辑:李美娟)