松墨天牛对共生真菌和病原真菌的差异性免疫响应

张伟^{1,2†}, 孟洁^{1,2†}, 宁静^{1,4†}, 秦培君^{1,2}, 周娇¹, 邹振^{1,2}, 王燕红¹, 江红¹, Faheem Ahmad^{1,3}, 赵莉茵^{1*}, 孙江华^{1,2*}

1. 中国科学院动物研究所, 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100101;

2. 中国科学院大学, 北京 100049;

3. Department of Biosciences, COMSATS Institute of Information Technology, Islamabad 45550, Pakistan;

4. 河北大学生命科学学院, 保定 071002

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: sunjh@ioz.ac.cn; zhaoll@ioz.ac.cn

收稿日期: 2017-08-15; 接受日期: 2017-08-23; 网络发表日期: 2017-09-05

中国科学院战略性先导科技专项(批准号: XDB11050000)、林业公益性行业科研专项(批准号: 201204501)、国家重点研发计划(批准号: 2016YFC1200604, 2016YFD0500300)、国家高技术研究发展计划(批准号: 2014AA020529)、国家自然科学基金(批准号: 31572272, 31370650, 31402013, 31221091, 31672291, L1524009)、中国科学院前沿科学重点研究项目(批准号: QYZDB-SSW-SMC014)和中国科学院学科发展战略研究(批准号: 2015-SM-C-02)资助

摘要 在中国, 入侵生物松材线虫进行传播的主要媒介昆虫松墨天牛(*Monochamus alternatus*)可与一种中国本地蓝变真菌*Sporothrix* sp. 1建立体外共生关系。然而在天牛和真菌共生互作过程中, 松墨天牛对蓝变菌*S. sp. 1*的免疫响应却未见报道。因此, 本文通过比较体外共生真菌*S. sp. 1*和昆虫病原真菌球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)感染松墨天牛蛹所产生的免疫反应, 发现天牛对两种菌的免疫应答方式具有显著性差异。将真菌注射到刚化蛹的天牛体内, *S. sp. 1*感染的天牛不会死亡, *B. bassiana*感染的天牛则全部死亡。转录组测序结果显示, *B. bassiana*感染48 h后的松墨天牛的差异表达基因数量是*S. sp. 1*感染的2倍。值得注意的是, 在体外共生真菌感染的松墨天牛免疫系统中起主导作用的是Toll和IMD信号通路; 而在昆虫病原真菌感染松墨天牛后, 只有Toll信号通路上调表达。此外, 体外共生真菌*S. sp. 1*在感染天牛48 h后可通过下调天牛的Toll通路和IMD通路来产生免疫逃避。本研究提供了松墨天牛转录组全测序数据, 为后续松墨天牛和其相关真菌互作研究提供了基础。

关键词 松墨天牛, 共生真菌, 球孢白僵菌, 转录组测序, 免疫信号通路

松墨天牛(*Monochamus alternatus* (Cerambycidae: Coleoptera))是一种危害松树的蛀干害虫^[1,2], 也是导致松树枯萎病(PWD)的致病生物松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus*)的主要传播媒介^[3]。松墨天牛可与

一种中国本地体外共生蓝变菌*Sporothrix* sp. 1发生共生关系, 从而使*S. sp. 1*通过附着于松墨天牛体表来进行传播^[4,5]。不同于昆虫病原真菌, *S. sp. 1*不仅可与松墨天牛共生, 还能促进天牛的发育、提升天牛的存

引用格式: 张伟, 孟洁, 宁静, 等. 松墨天牛对共生真菌和病原真菌的差异性免疫响应. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 988–996, doi: [10.1360/N052017-00162](https://doi.org/10.1360/N052017-00162)
英文版见: Zhang W, Meng J, Ning J, et al. Differential immune responses of *Monochamus alternatus* against symbiotic and entomopathogenic fungi. Sci China Life Sci, 2017, 60: 902–910, doi: [10.1007/s11427-017-9102-y](https://doi.org/10.1007/s11427-017-9102-y)

活率^[5]. 在自然界中, 许多昆虫与*ophiostomatoid*蓝变菌发生共生关系^[6-9]. 与昆虫病原真菌不同的是, 大多数体外共生真菌不但不会杀死它的寄主, 反而对寄主的生长发育是有利的^[10]. 就共生关系而言, 昆虫允许体外共生真菌在其表面共生的分子机制还有待阐明.

昆虫与微生物的共生关系包括体内共生和体外共生^[10]. 相较于体内共生, 体外共生真菌由于不需应对昆虫体内产生的免疫防御, 且外部环境更适于其生长, 故而更为常见. 例如, 一种以真菌为食的蚂蚁与其体外共生真菌为互利共生关系: 蚂蚁以取食真菌为生, 真菌则以蚂蚁的体表为其生长、扩散和自我保护的基质^[11]. 同样的, 红脂大小蠹的伴生真菌*Leptographium procerum*具有很强的生物降解活性, 可以降低松树对虫菌共生体的抗性^[7,12]. 一般来说, 大部分对于体外共生真菌的研究都集中于其共生关系的阐明, 很少有侧重于昆虫对体外共生真菌免疫反应的研究.

为抵抗病原微生物感染, 昆虫进化出由体液免疫和细胞免疫组成的先天性免疫系统. 感染后, 免疫系统可启动针对病原体的细胞免疫或体液免疫. 细胞免疫由血细胞介导, 包括吞噬作用、包被作用和结节作用^[13,14]; 体液免疫主要依靠合成大量抗菌肽(antimicrobial peptides, AMPs)、血淋巴凝集反应和黑化反应^[15-17]. 免疫信号通路在识别微生物表面的病原相关模式分子(pathogen associated molecular patterns, PAMPs)后被激活^[18], 主要包括Toll信号通路^[19]、IMD信号通路^[20]、JNK信号通路^[21]和JAK/STAT^[22]信号通路. Toll信号通路和IMD信号通路是免疫应答的主要调节因子^[23,24]. 抗菌肽基因主要通过两种不同的NF- κ B转录因子依赖型信号通路: Toll信号通路和IMD信号通路的激活被诱导表达^[25]. Toll信号通路被真菌和革兰氏阴性细菌激发, 由细胞外丝氨酸蛋白酶(serine protease, SP)级联介导. 感染后, Toll信号通路在血淋巴中被激活, 导致Toll受体与其相应配体Spätzle结合, 从而激活dMyD88和激酶Pelle. 这会导致Cactus的降解和NF- κ B同源物Dif/Dorsal因子的释放. 而IMD途径主要是由革兰氏阴性菌激发的, IMD途径的最终目标是一种Rel/NF- κ B反式激活因子——Relish, 它被半胱氨酸激酶Dredd和IKK切割, TAK是一种MAPKK激酶(MAPKKK), 是一种受体相互作用蛋白, 在IKK的上游和IMD的下游起作用^[23,26]. 通常, JNK和JAK/STAT通路也可调节抗菌肽产生^[27,28].

球孢白僵菌是一种广泛存在且研究较为透彻的昆虫病原真菌^[29]. 作为农林害虫生物防治的经典昆虫病原真菌, 球孢白僵菌对各种农林害虫具有较高的致病活性, 对脊椎动物则基本上无毒性和传染性^[30]. 当球孢白僵菌感染昆虫时, 会引起昆虫的细胞免疫和体液免疫并激活寄主的Toll信号通路^[31,32]. 最终, 球孢白僵菌会克服宿主的免疫反应并杀死宿主. 因此, 为了解松墨天牛对体外共生真菌免疫耐受的潜在机制, 本实验比较了松墨天牛蛹对*S. sp. 1*和球孢白僵菌的免疫响应. 本课题组还采用了无参考基因组的高通量RNA-seq技术, 来探寻感染两种不同真菌的松墨天牛的免疫反应的性质. 本研究旨在揭示感染外共生真菌和昆虫病原真菌的松墨天牛蛹所产生的不同免疫反应, 为进一步研究宿主和共生真菌之间的免疫相互作用提供有价值的参考信息.

1 材料与方法

1.1 天牛饲养和真菌培养

实验室所用松墨天牛为采自浙江的种群, 在室内饲养多代. 幼虫在无光照25℃培养条件下以人工饲料喂养, 使用刚化蛹天牛进行生物测定.

真菌在马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar, PDA)上以25℃和80%相对湿度条件培养1周. 本实验所用的蓝变菌(CMW29982)是一种中国本地产真菌, 标本保存于南非比勒陀利亚林业与农业生物技术研究所(Forestry and Agricultural Biotechnology Institute, FABI). 球孢白僵菌的菌株号是ARSEF2860.

1.2 真菌感染天牛存活率测定

为使共培养试验条件更接近野外, 使用韧皮细粉与MEA混合制成树皮粉培养基培养*S. sp. 1*和球孢白僵菌. 将刚化蛹第一天的松墨天牛(10头一组)放置于长有*S. sp. 1*或球孢白僵菌的培养基上; 然后在25℃无光照条件下培养平板, 并观察天牛每天的生长状况, 记录感染真菌的死亡天牛数, 计算其死亡率. 本实验重复3次, 使用GraphPad软件进行数据分析.

1.3 真菌注射天牛的生存分析以及RNA样品制备

在化蛹第1天, 将同一批天牛随机分为3组, 每组10个重复. 对照组在腹部第二体节处注射2 μ L 无菌

PBST, 处理组注射2 μ L稀释的真菌(*S. sp. 1*/球孢白僵菌)悬浮液(3×10^6 分生孢子/ μ L). 蛹培养于25℃条件下, 分别培养24, 48和72 h, 并统计每组蛹的死亡率. 在体式显微镜下解剖被*S. sp. 1*和球孢白僵菌感染24和48 h的蛹的脂肪体组织用于RNA样本制备. 注射PBST的对照组选取注射48 h的蛹, 用同样的方法制备样品. 将RNA组织样品置于1 mL TRizol Reagent (Invitrogen, 美国)中按试剂说明书进行总RNA提取. 使用ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc., 美国)进行RNA浓度测定. 每个样品为3头天牛脂肪组织的混样.

1.4 文库构建和Illumina测序

用磁珠Dynabeads®对总RNA进行纯化, 其原理为大多数mRNA的poly(A)尾与磁珠表面的oligo (dT)按照碱基互补配对原则进行结合. 使用RNA-Seq Library Preparation Kit for Whole Transcriptome Discovery试剂盒进行转录组文库构建^[33]. 在中国科学院北京基因组研究所 Illumina HiSeq 2000平台上对实验组和对照组进行文库测序.

1.5 转录组组装和功能基因注释

cDNA文库测序得到的原始序列经过包括去除低质量reads、微生物序列污染(真菌/细菌/病毒)和修剪接头序列的质量检测和数据再加工后使用短reads组装软件Trinity (version 2013)按照默认参数进行转录组 *de novo* 组装产生contigs. 随后组装好的序列通过Cd-hit聚类软件被进一步聚类和去除冗余序列. 筛除掉细菌蛋白和真菌蛋白序列后所有unigenes与NCBI的非冗余蛋白数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)和Swiss-prot数据库进行BLASTX比对(E -value $<10^{-5}$). 此外, 为了确认富集的GO terms, 所有的unigenes都使用BLAST2GO对GO数据库进行了基因本体(GO)富集分析. 最后, 使用KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes database)构建富集通路和代谢网络^[34]. 用RSEM计算FPKM值获得表达量数据(网络版附表1)^[35]. 差异表达基因(DEGs)由临界 $P<0.001$ 的R包差异表达基因序列筛选出^[36]. 如果这些基因的 $P<0.05$ 且表达量为对照组的2倍以上或1/2以下, 则可认为这些基因为差异表达基因^[37].

1.6 主要差异表达转录物(DETs)的实时荧光定量PCR分析和聚类分析

为确认转录组测序的表达谱结果, 从中选取了几个主要的免疫相关基因, 设计了特异性引物(网络版附表2), 并对其进行实时荧光定量PCR分析. 使用FastQuant RT Kit (Tiangen, 北京)试剂盒加1 μ g总RNA对其进行cDNA合成. 使用SYBR green PCR Master Mix在MX3000P系统上进行定量实时PCR; 热循环条件为: 95℃, 5 s; 55℃, 30 s; 72℃, 30 s (40个循环). 用R语言环境中的gplots工具包里的heatmap.2功能对qPCR数据进行聚类分析.

2 结果与分析

2.1 感染不同真菌的松墨天牛的死亡率

在注射和接触试验中感染*S. sp. 1*和球孢白僵菌的松墨天牛蛹均呈现不同的反应. 结果表明, 注射*S. sp. 1*的蛹对真菌的免疫应答和发育情况与对照组无明显差异. 这两种处理条件下的蛹均可继续发育成成虫. 然而, 注射球孢白僵菌的蛹在感染24 h内伤口周围变黑, 在感染48 h后蛹的存活率只有23%. 感染72 h, 所有蛹全部变黑并死亡. 1个月后, 蛹被完全包裹在真菌菌丝体和分身孢子中(图1A和B). 在接触试验中也可观察到相似的结果. 5天后, *S. sp. 1*和球孢白僵菌菌丝体开始入侵蛹体. 在第10天, 球孢白僵菌培养皿中的蛹全部死亡, 并被完全包裹在菌丝体内. 与之相反, *S. sp. 1*培养皿中的蛹均存活并可正常发育直至羽化为成虫.

2.2 注射不同真菌后松墨天牛转录组差异表达的鉴定和功能分析

为研究感染不同真菌的松墨天牛死亡率差异产生的原因, 本实验构建了感染真菌的松墨天牛cDNA文库, 并进行了基因差异表达分析. 根据BLASTX搜索比对非冗余(nonredundant, NR)序列数据库, 注释了55059条unigenes. 试验表明, 感染*S. sp. 1*的天牛与未注射真菌的天牛(对照组)具有相似的表达模式, 表示天牛蛹可适应共生菌*S. sp. 1*并保持正常生理状态. 此外, 鉴定出5个主要的基因簇, 这5个基因簇随时间呈现出不同的表达模式(图2A). 感染球孢白僵菌的天牛, 第

图 1 感染球孢白僵菌和 *S. sp. 1* 的松墨天牛的不同存活响应

A: 感染 *S. sp. 1* 和球孢白僵菌的天牛的不同表型. 感染 *S. sp. 1* 的天牛不会死亡且可正常发育成成虫, 而感染球孢白僵菌的天牛会在注射 24 h 后死亡; B: 松墨天牛感染 *S. sp. 1* (蓝线)、球孢白僵菌 (红线) 与对照组 (黑线) 的生存曲线; C: *S. sp. 1* 和球孢白僵菌接触试验中松墨天牛的表型

1 基因簇在注射 24 h 时有 19151 个 unigenes 上调; 第 3 基因簇在注射 48 h 后 11969 个 unigenes 上调. 感染 *S. sp. 1* 的天牛, 第 2 基因簇中的大量基因 (9576 个 unigenes) 主要在注射 24 h 后表达; 然而, 除了第 4 基因簇 (6702 个 unigenes), 大多数基因在感染 48 h 后趋于正常表达. 这些结果表明, 刚感染 *S. sp. 1* 与注射 *S. sp. 1* 48 h 后天牛的基因表达规律不同, 注射 48 h 后基因表达规律更接近于对照组样本.

与对照组相比, 注射球孢白僵菌 24 h 后 10122 个转录本受到显著调控 (5453 个上调转录本和 4669 个下调转录本), 而注射 48 h 后更多转录本被显著调控 (8406 个上调转录本和 5309 个下调转录本). 随着感染时间的增加, 天牛的基因表达变得更为活跃. 在球孢白僵菌注射的 2 个时间点, 共有 5967 个共同差异表达基因 (2605+239+298+2825) (图 2B). *S. sp. 1* 感染的松墨天牛蛹, 注射 24 h 后共有 5111 个转录本上调, 4179 个下调, 注射 48 h 后共有 2493 个转录本上调, 4267 个下调, 发生显著改变 (图 2C). 这些结果表明, 球孢白僵菌和 *S. sp. 1* 感染天牛 24 h 后基因表达水平平均明显上调; 而两种真菌感染 48 h 后, 天牛则表现出显著的基因差异表

达: 球孢白僵菌感染 48 h 时松墨天牛的基因表达调控 (5503+2605+298 个基因上调表达, 2245+239+2825 个基因下调表达) 明显较 *S. sp. 1* 感染 48 h 的基因表达调控 (1045+1309+139 个基因上调表达, 1852+281+2134 个基因下调表达) 更为活跃. 这些结果与转录 FPKM 值的聚类热图相对应. 在 24 h 时 Bb 和 Ss 组的数据聚成一类, 在 48 h 时与基因表达最活跃的 Bb 组聚成一类; 与此同时, 在 48 h 时 Ss 组和对照组聚成一类 (图 2A).

为进一步了解 DETs 的潜在功能和所涉通路, 对 DETs 进行了基因本体 (GO) 富集和 KEGG 分析. GO 功能注释有 3 个部分, 包括细胞成分、分子功能和生物过程. 结果表明, 大部分 DETs 具有分子功能 (催化活性、结合) 和生物过程 (代谢过程、细胞过程) (图 2D). 在 Ss 和 Bb 组中上调 DETs 的 KEGG 通路结果表明, 大部分 DETs 主要参与转录、折叠、分选和降解、复制和修复、碳水化合物代谢、酶家族、信号转导、信号分子和相互作用 (图 2E). GO 和 KEGG 分析结果表明, 真菌感染影响了昆虫的总代谢活动和相应细胞反应. 在球孢白僵菌感染松墨天牛 48 h 时其基因表达调控最为活跃, 而 *S. sp. 1* 感染 48 h 时, 松墨天牛的基因表达最不

图 2 松墨天牛感染*S. sp. 1*和球孢白僵菌的转录组差异

A: 感染*S. sp. 1*和球孢白僵菌24和48 h的松墨天牛转录组的差异表达转录物(DETs)的聚类分析; B: 球孢白僵菌感染天牛24和48 h的DETs数据的维恩图; C: *S. sp. 1*感染天牛24和48 h的DETs数据的维恩图; D: 感染*S. sp. 1*和球孢白僵菌的天牛的差异表达基因GO功能分类; E: 感染*S. sp. 1*和球孢白僵菌的天牛差异表达上调基因的KEGG功能分类

活跃, 处于非感染阶段.

2.3 松墨天牛免疫相关基因的分类和表达谱

转录组测序共得到55059个unigenes, 通过BLASTX比对, 共注释出197个松墨天牛免疫相关基因. 这些基因包括病原体识别分子、信号调节分子、细胞内

信号转导分子、免疫应答效应分子和细胞免疫基因. 约32.49%的细胞内信号转导分子组与Toll, IMD, JNK和JAK/STAT通路有关. 在该组中, Toll通路中鉴定出20个免疫相关基因, IMD通路中鉴定出22个免疫相关基因, 这两个信号通路是昆虫免疫中的主要信号通路(图3A).

图3 松墨天牛免疫相关基因特征描述

A: 松墨天牛免疫相关基因功能的主要类别包括: 病原识别、信号调控、胞内信号转导、免疫应答和细胞免疫; B: 松墨天牛感染*S. sp. 1*和球孢白僵菌24和48 h后胞内信号通路中DETs分配情况; C: 松墨天牛主要差异表达基因的聚类分析, 脂肪体样本分为3组: *S. sp. 1*组、球孢白僵菌组和对照组. 蓝色、白色、红色代表mRNA相对表达量的低、中、高水平

因此, 从转录组差异表达基因中筛选出包括Toll和IMD通路基因在内的细胞内信号转导分子进行进一步的分析. *S. sp. 1*感染24 h后, 从松墨天牛DETs中检测到14个主要参与Toll和IMD通路的基因. 经*S. sp. 1*感染48 h后, DETs的数量快速下降, 尤其是参与Toll和IMD通路的基因. 相比之下, 球孢白僵菌感染24 h后的DETs数量较高, 有16个. 但48 h后, Ss组(6个)的细胞内信号转导DETs比Bb组(15个)少. 球孢白僵菌感染24 h后天牛的细胞内信号转导DETs与感染48 h后数量相似, 均以Toll通路占主导地位(图3B).

2.4 所选免疫相关基因的实时定量PCR分析

此外, 本研究对选定的免疫相关基因进行实时定量PCR分析, 以验证对照组和实验组间的免疫应答变化. 结果表明, *S. sp. 1*感染的天牛Toll (Toll, MyD88, Pelle, Cactus)和IMD (IMD, Tab, Tak, Ikkb, Rel)信号通路在感染24 h后高水平表达, 但是这些免疫相关基因的表达在感染48 h后恢复正常水平, 表明松墨天牛对*S. sp. 1*产生免疫耐受. 然而, 在球孢白僵菌感染的蛹中, 免疫相关基因的表达水平在24 h时变化不明显. 值得注意的是, 免疫识别和Toll信号通路相关基因随时

间推移明显活跃, 而IMD途径中的基因在48 h几乎没有被激活(图3C)。

3 讨论

共生微生物与其宿主的相互作用有利于保持宿主的生理、代谢和免疫稳态^[38]。宿主的先天免疫也可以保持共生体系中免疫耐受的微妙平衡。虽然共生关系存在于大多数后生动物中, 但体外共生关系中寄主的免疫机制尚不明确。本研究发现, 松墨天牛对外共生真菌*S. sp. 1*引发的感染具有免疫耐受性。根据感染*S. sp. 1*不同时间段的松墨天牛免疫相关基因表达谱, 天牛在感染蓝变菌早期会引发急性免疫反应, 但随时间延长松墨天牛通过抑制对蓝变菌的免疫反应产生免疫耐受并保持正常发育; 松墨天牛免疫相关基因表达的热图也与对照组非常相似。巧合的是, 这种模式的共生关系在肠道微生物中也非常常见, 即宿主形成一套复杂的免疫机制以耐受共生关系中的微生物^[39,40]。PGRP-LC抑制子(PIMS)是果蝇(*Drosophila melanogaster*) IMD信号通路的一种调控子, 可减少质膜中肽聚糖识别蛋白(PGRP-LC)的释放, 从而阻断果蝇的IMD信号通路, 使果蝇对共生细菌产生免疫耐受^[41]。以前的研究发现, 在昆虫和内共生真菌互作时也产生类似的免疫耐受机制。小金蝠蛾(*Hepialus xiaojinensis*)幼虫对内共生真菌冬虫夏草(*Ophiocordyceps sinensis*)具有免疫耐受, 感染时间越长小金蝠蛾的免疫基因表达越趋于正常水平^[42]。然而, 大多数有关免疫逃避的研究都着眼于内共生系统, 本研究则更侧重宿主感染外共生真菌时产生的免疫反应。

大多数共生真菌在感染早期不仅不会杀死宿主, 反而对宿主有一定益处^[10]。这与昆虫病原真菌(如球孢白僵菌)是不同的。本研究表明, 感染24 h时, 松墨天

牛对球孢白僵菌的免疫反应是无活性的。而感染48 h时, Toll信号通路的基因迅速激活, 使天牛在感染几天内死亡。类似地, 以前的研究表明球孢白僵菌自然感染状态下的果蝇会选择性激活Toll通路中编码抗菌活性物质的基因, 使其表达^[43]。然而对共生真菌感染, 宿主显示出不同的免疫反应: 感染蓝变菌*S. sp. 1*的松墨天牛在24 h时主要激活IMD信号通路和Toll信号通路。在48 h时这些免疫基因便失去活性, 使得宿主与共生微生物能够维持二者之间的共生关系。

许多研究报道, 两种共生ophiostomatoid蓝变菌*Ophiostoma minus*和*Trichoderma sp.*可明显提升宿主松墨天牛携带PWN的数量^[44], *S. sp. 1*也对天牛的生长发育有积极的影响^[5]。在转录组水平, 本实验发现在*S. sp. 1*感染松墨天牛24 h后有9290个转录本被激活。大部分DETs具有分子功能和生物过程, 多数上调表达基因主要表现为转录、折叠、分选和降解、复制和修复、碳水化合物代谢、信号转导、信号分子和相互作用等。简单来说, 可推测*S. sp. 1*可能加速了松墨天牛的新陈代谢且*S. sp. 1*感染可能导致天牛的免疫反应和生理新陈代谢。松墨天牛的免疫耐受可能与*S. sp. 1*对天牛发育的积极影响有关, 还有待日后研究阐明。

松墨天牛与本地共生真菌*S. sp. 1*的互作研究是“松材线虫-松墨天牛-蓝变菌”共生体系的重要组成部分。但松墨天牛基因组序列的缺少是研究“松材线虫-松墨天牛-蓝变菌”互作的分子生物学的巨大障碍。本实验通过转录组测序得到55059个unigenes, 通过BLASTX比对注释出197个免疫相关基因, 其中包括Toll和IMD途径中的许多关键基因。功能基因的鉴定和注释将为未来研究天牛对其共生真菌免疫作用的分子机制提供基础, 为研究松材线虫病系统提供一个新的方向, 以更好地了解林业害虫与真菌的相互作用。

参考文献

- 1 Alves M, Pereira A, Matos P, et al. Bacterial community associated to the pine wilt disease insect vectors *Monochamus galloprovincialis* and *Monochamus alternatus*. *Sci Rep*, 2016, 6: 23908
- 2 Vicente C, Espada M, Vieira P, et al. Pine Wilt Disease: a threat to European forestry. *Eur J Plant Pathol*, 2012, 133: 89–99
- 3 Enda N, Mamiya Y. Transmission of *Bursaphelenchus lignicolus* (Nematoda: Aphelenchoididae) by *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Nematologica*, 1972, 18: 159–162
- 4 Suh D Y, Hyun M W, Kim J J, et al. *Ophiostoma ips* from Pinewood Nematode Vector, Japanese Pine Sawyer Beetle (*Monochamus alternatus*), in Korea. *Mycobiology*, 2013, 41: 59–62
- 5 Zhao L, Zhang S, Wei W, et al. Chemical signals synchronize the life cycles of a plant-parasitic nematode and its vector beetle. *Curr Biol*, 2013,

- 23: 2038–2043
- 6 Dori-Bachash M, Avrahami-Moyal L, Protasov A, et al. The occurrence and pathogenicity of *Geosmithia* spp. and common blue-stain fungi associated with pine bark beetles in planted forests in Israel. *Eur J Plant Pathol*, 2015, 143: 627–639
- 7 Lu M, Hulcr J, Sun J. The role of symbiotic microbes in insect invasions. *Annu Rev Ecol Evol Syst*, 2016, 47: 487–505
- 8 Repe A, Kirisits T, Piškur B, et al. *Ophiostomatoid* fungi associated with three spruce-infesting bark beetles in Slovenia. *Ann For Sci*, 2013, 70: 717–727
- 9 Zhao L, Mota M, Vieira P, et al. Interspecific communication between pinewood nematode, its insect vector, and associated microbes. *Trends Parasitol*, 2014, 30: 299–308
- 10 Hartley S E, Gange A C. Impacts of plant symbiotic fungi on insect herbivores: mutualism in a multitrophic context. *Annu Rev Entomol*, 2009, 54: 323–342
- 11 Currie C R, Wong B, Stuart A E, et al. Ancient tripartite coevolution in the attine ant-microbe symbiosis. *Science*, 2003, 299: 386–388
- 12 Xu L, Lou Q, Cheng C, et al. Gut-associated bacteria of *Dendroctonus valens* and their involvement in verbenone production. *Microb Ecol*, 2015, 70: 1012–1023
- 13 Schmidt O, Theopold U, Strand M. Innate immunity and its evasion and suppression by hymenopteran endoparasitoids. *Bioessays*, 2001, 23: 344–351
- 14 Strand M R, Pech L L. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. *Annu Rev Entomol*, 1995, 40: 31–56
- 15 Gillespie J P, Kanost M R, Trenczek T. Biological mediators of insect immunity. *Annu Rev Entomol*, 1997, 42: 611–643
- 16 Lowenberger C. Innate immune response of *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2001, 31: 219–229
- 17 Muta T, Iwanaga S. The role of hemolymph coagulation in innate immunity. *Curr Opin Immunol*, 1996, 8: 41–47
- 18 Baeg G H, Zhou R, Perrimon N. Genome-wide RNAi analysis of JAK/STAT signaling components in *Drosophila*. *Genes Dev*, 2005, 19: 1861–1870
- 19 Valanne S, Wang J H, Rämet M. The *Drosophila* Toll signaling pathway. *J Immunol*, 2011, 186: 649–656
- 20 Silverman N, Maniatis T. NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev*, 2001, 15: 2321–2342
- 21 Rämet M, Lanot R, Zachary D, et al. JNK signaling pathway is required for efficient wound healing in *Drosophila*. *Dev Biol*, 2002, 241: 145–156
- 22 Agaisse H, Petersen U M, Boutros M, et al. Signaling role of hemocytes in *Drosophila* JAK/STAT-dependent response to septic injury. *Dev Cell*, 2003, 5: 441–450
- 23 De Gregorio E, Spellman P T, Tzou P, et al. The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*. *EMBO J*, 2002, 21: 2568–2579
- 24 Zou Z, Evans J D, Lu Z, et al. Comparative genomic analysis of the *Tribolium* immune system. *Genome Biol*, 2007, 8: R177
- 25 Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, et al. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle*/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 1996, 86: 973–983
- 26 Lemaitre B. Landmark: the road to Toll. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4: 521–527
- 27 Garver L S, de Almeida Oliveira G, Barillas-Mury C. The JNK pathway is a key mediator of *Anopheles gambiae* antiplasmodial immunity. *PLoS Pathog*, 2013, 9: e1003622
- 28 Park J M, Brady H, Ruocco M G, et al. Targeting of TAK1 by the NF-kappaB protein Relish regulates the JNK-mediated immune response in *Drosophila*. *Genes Dev*, 2004, 18: 584–594
- 29 Ferron P. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Annu Rev Entomol*, 1978, 23: 409–442
- 30 Wraight S P, Carruthers R I, Jaronski S T, et al. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for microbial control of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Biol Control*, 2000, 17: 203–217
- 31 Gottar M, Gobert V, Matskevich A A, et al. Dual detection of fungal infections in *Drosophila* via recognition of glucans and sensing of virulence factors. *Cell*, 2006, 127: 1425–1437
- 32 Yassine H, Kamareddine L, Osta M A. The mosquito melanization response is implicated in defense against the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *PLoS Pathog*, 2012, 8: e1003029
- 33 Wang Y H, Hu Y, Xing L S, et al. A critical role for CLSP2 in the modulation of antifungal immune response in mosquitoes. *PLoS Pathog*, 2015, 11: e1004931
- 34 Hou Y, Wang X L, Saha T T, et al. Temporal coordination of carbohydrate metabolism during mosquito reproduction. *PLoS Genet*, 2015, 11: e1005309
- 35 Tu Q, Cameron R A, Worley K C, et al. Gene structure in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* based on transcriptome analysis. *Genome Res*, 2012, 22: 2079–2087

- 36 Wang L, Feng Z, Wang X, et al. DEGseq: an R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data. *Bioinformatics*, 2010, 26: 136–138
- 37 Xiong G H, Xing L S, Lin Z, et al. High throughput profiling of the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* immunotranscriptome during the fungal and bacterial infections. *BMC Genomics*, 2015, 16: 321
- 38 Bäckhed F, Ley R E, Sonnenburg J L, et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, 2005, 307: 1915–1920
- 39 Müller C, Autenrieth I, Peschel A. Intestinal epithelial barrier and mucosal immunity. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62: 1297–1307
- 40 Macdonald T T, Monteleone G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science*, 2005, 307: 1920–1925
- 41 Lhocine N, Ribeiro P S, Buchon N, et al. PIMS modulates immune tolerance by negatively regulating *Drosophila* innate immune signaling. *Cell Host Microbe*, 2008, 4: 147–158
- 42 Meng Q, Yu H Y, Zhang H, et al. Transcriptomic insight into the immune defenses in the ghost moth, *Hepialus xiaojinensis*, during an *Ophiocordyceps sinensis* fungal infection. *Insect Biochem Mol Biol*, 2015, 64: 1–15
- 43 Lemaitre B, Reichhart J M, Hoffmann J A. *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 14614–14619
- 44 Maehara N, Futai K. Population changes of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae), on fungi growing in pine-branch segments. *Appl Entomol Zool*, 2000, 35: 413–417