

短星翅蝗转录组分析和免疫相关通路及基因的鉴定*

李雪娟^{1**} 任倩俐^{1,2} 袁浩¹ 张克瑶¹ 林立亮^{1***}

(1. 陕西师范大学生命科学学院, 西安 710062; 2. 太原动物园, 太原 030000)

摘 要 【目的】短星翅蝗 *Calliptamus abbreviatus* 隶属于直翅目、星翅蝗亚科, 是草原及半农牧区的主要害虫之一, 其相关分子生物学信息研究相对较少。本研究拟测序短星翅蝗的转录组数据, 基于组装和注释结果, 鉴定并挖掘该类群与免疫相关的信号通路和基因。【方法】本研究采用 Illumina 高通量测序平台, 对短星翅蝗雌雄成虫个体进行了转录组测序, 对测序数据进行组装和注释等生物信息学分析, 并鉴定与免疫相关的通路及基因。【结果】短星翅蝗转录组数据总计获得 36 804 个 unigenes, 对 unigenes 进行 Nr、Nt、GO、COG、KEGG、Swissprot 和 Interpro 七大功能数据库注释, 最终 21 137 个 unigenes 被成功注释。在 Toll 通路、IMD 通路和 JAK-STAT 信号通路中共鉴定了 160 个与天然免疫相关的 unigenes; 在 MAPK、TLR 等与免疫相关的通路中鉴定出 166 个 unigenes, 在解毒代谢相关的通路中鉴定出 457 个 unigenes。短星翅蝗的雌雄分组中 (C_abbreviatus_M VS C_abbreviatus_F), 总计获得 8 125 个差异表达基因, 其中 6 326 个为上调表达基因, 而 1 799 个为下调表达基因。差异表达基因 KEGG 注释中, 有 22 个 unigenes 注释到 JAK-STAT 信号通路上, 6 个 unigenes 注释到 MAPK 通路中。另外, 还检测到 6 227 个 SSR。【结论】本研究获得了短星翅蝗转录组数据, 并对其与免疫相关的通路及基因进行了鉴定分析, 为该类群基因功能注释、免疫基因筛选及分子标记开发等研究提供了分子基础。

关键词 短星翅蝗; 转录组; 高通量测序; 免疫相关的通路和基因

Transcriptome of *Calliptamus abbreviatus* and identification of immune related pathways and genes in this species

LI Xue-Juan^{1**} REN Qian-Li^{1, 2} YUAN Hao¹ ZHANG Ke-Yao¹ LIN Li-Liang^{1***}

(1. College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China; 2. Taiyuan Zoo, Taiyuan 030000, China)

Abstract 【Objectives】To analyze the transcriptome of *Calliptamus abbreviatus* (Calliptaminae, Orthoptera), one of the main pests of grassland and semi-rural pastoral areas, in order to identify immune related signal pathways and genes in this pest. 【Methods】Transcriptome data of female and male adults were sequenced on an Illumina high-throughput platform. Bioinformatics analysis of sequencing data, such as assembly and annotation, were implemented, and immune related pathways and genes were identified. 【Results】A total of 36 804 unigenes were obtained, of which 21 137 were successfully annotated using the seven functional databases (Nr, Nt, GO, COG, KEGG, Swissprot and Interpro). 160 unigenes associated with innate immunity were identified in the Toll, IMD and JAK-STAT signaling pathways. 166 unigenes are associated with other immune related pathways (such as the MAPK and TLR signaling pathway), and 457 are associated with detoxification metabolism related pathways. In total 8 125 genes that are differentially expressed in males and females were identified, of which 6 326 were up-regulated and 1 799 down-regulated, respectively. Based on KEGG annotation, a total of 22 unigenes

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金项目 (31801993); 中央高校基本科研业务费专项资金项目 (GK202003052、GK202304021); 陕西省博士后科研项目 (2017BSHEDZZ99)

**第一作者 First author, E-mail: lixuejuan@snnu.edu.cn

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

收稿日期 Received: 2021-12-23; 接受日期 Accepted: 2022-08-01

were annotated in the JAK-STAT signaling pathway, and six were annotated in the MAPK pathway. In addition, 6 227 SSRs were detected. **[Conclusion]** Transcriptome data on *C. abbreviates* was successfully obtained and immune related pathways and genes identified. These findings provide a molecular basis for gene function annotation, the identification of immune genes, and molecular marker development, in this species.

Key words *Calliptamus abbreviatus*; transcriptome; high-throughput sequencing; immune-related pathway and gene

转录组是指特定细胞或组织中的全部转录产物, 包括 mRNA、rRNA、tRNA 和非编码 RNA (崔凯等, 2019)。二代测序具有测序通量高、单碱基平均测序成本低等优点, 用来获得物种多种类型的数据。基于二代测序技术, 人们越来越容易获得物种的转录组序列, 并由此展开多方面的科学研究。例如 Li 等 (2013) 从中华绒螯蟹 *Eriocheir sinensis* 转录组中筛选到与免疫相关的 Toll、IMD、JAK-STAT 和 MAPK 信号通路。云斑天牛 *Batocera horsfieldi* 成虫触角转录组数据为嗅觉相关基因的筛选和分析提供了参考 (胡佳萌等, 2019)。三叶斑潜蝇 *Liriomyza trifolii* 转录组数据为该物种应对温度胁迫提供了有价值的信息 (Chang *et al.*, 2020)。就直翅目昆虫而言, 目前多个物种的转录组数据被测序, 其中包括飞蝗 *Locusta migratoria*、华阴腹露蝗 *Fruhstorferiola huayinensis*、日本蚱 *Tetrix japonica*、沙蟋 *Gryllus firmus* 和中华螽斯 *Tettigonia chinensis* 等 (韩媛吕等, 2020), 这为直翅目昆虫色素相关基因、昼夜节律等研究提供了参考。此外, 李氏大足蝗 *Gomphocerus licenti*、日本鸣蝗 *Mongolotettix japonicus* 和秦岭束颈蝗 *Sphingonotus tsinlingensis* 的全长转录组数据为直翅目昆虫的功能注释和环境适应等提供了可用的数据资料 (Yuan *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2021)。

昆虫主要依靠先天免疫进行防御保护, 以确保其在复杂环境下的正常生活 (Kleino and Silverman, 2014; 杨静等, 2019)。昆虫的先天免疫反应包括体液免疫和细胞免疫, 体液免疫主要涉及到 Toll、IMD 和 JAK-STAT 信号通路 (刘小民和袁明龙, 2018; Wu and Yi, 2018; 杨静等, 2019)。体液反应在昆虫免疫防御系统中起着重要作用 (Wu and Yi, 2018)。许多学者基于转录组数据对昆虫免疫相关通路和基因展开了研究。其中, Bao 等 (2013) 在褐飞虱 *Nilaparvata*

lugens 转录组中鉴定了大量编码模式识别蛋白的基因、酚氧化酶原 (proPO) 激活级联反应中的调节蛋白、免疫效应器和参与免疫途径的信号转导分子 (包括 Toll、IMD 和 JAK-STAT 信号通路)。Zhang 等 (2015) 探索了东亚飞蝗关键免疫组织 (脂肪体和血细胞) 应对绿僵菌 *Metarhizium acridum* 真菌感染的转录反应, 转录组数据中鉴定出 470 个与免疫相关的 unigenes, 包括昆虫免疫通路 Toll、IMD 和 JAK-STAT 中的组分。邱忠营等 (2016) 从疣蝗 *Trilophidia annulata* 转录组中获得了 319 个天然免疫信号通路相关的 unigenes, 这些 unigenes 参与 Toll、IMD、JAK-STAT、MAPK-fly 和黑化通路。Zhao 等 (2018) 基于短角外斑腿蝗 *Xenocatantops brachycerus* 转录组数据获得了 3 种信号转导通路: Toll 样受体 (Toll-like receptor)、NOD 样受体 (NOD-like receptor) 和 RIG-I 样受体 (RIG-I-like receptor) 通路, 这些通路在激活免疫防御机制中起着至关重要的作用。为研究灰飞虱 *Laodelphax striatellus* IMD 通路相关基因在抗水稻条纹病毒中的作用, 鲁燕华 (2019) 鉴定并克隆获得了 5 个 IMD 通路相关基因 (PGRP-LC、Duox、Relish、IKK α 和 TBK1) 的开放阅读框。这些研究结果为人们进一步研究昆虫免疫相关通路和基因提供了数据支持。

免疫反应和生殖成功是生物体中两个重要的耗能过程。雌雄个体的免疫能力有所不同, 大多数情况下, 雌性比雄性免疫能力强 (Nunn *et al.*, 2009)。雌性受益于长寿投资的增加, 从而提高了免疫力, 而雄性则将资源投资于繁殖 (Belousova *et al.*, 2021)。例如, 对于参与伤口愈合和抵抗寄生虫感染的酚氧化酶 (PO) 而言, 研究发现, 雌性昆虫的 PO 活性高于雄性 (Schwarzenbach *et al.*, 2005; Bagchi *et al.*, 2021); 雌性大红葬甲 *Nicrophorus vespilloides*

能够通过外部及内部免疫和繁殖之间的直接生理权衡来捍卫其随后的终生繁殖成功 (Cotter *et al.*, 2013)。此外, 昆虫雌雄个体的免疫能力不仅在成虫阶段存在差异 (Schwarzenbach *et al.*, 2005), 在幼虫阶段也有所不同 (Belousova *et al.*, 2021)。例如, 在昆虫病原细菌苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* 感染前后, Belousova 等 (2021) 比较了鳞翅目舞毒蛾 *Lymantria dispar* 幼虫期雌、雄虫的中肠组织和细胞游离血淋巴的抗菌活性, 结果发现, 中肠的抗菌活性仅在雌性个体中被感染激活, 因此, 即使在性别分化之前, 免疫过程中性别的差异也会有重要影响。在处理免疫和生殖过程中, 飞蝗通过增加免疫反应来分配能量和资源以维持自身的生存 (Wang *et al.*, 2019)。与蝗虫雌雄个体相关的转录组数据多数筛选的是与性别、生殖等方面相关的通路或基因 (覃英灿等, 2022), 较少涉及到雌雄不同分组的免疫能力。

短星翅蝗 *Calliptamus abbreviatus* Ikonnikov, 1913 隶属于直翅目、星翅蝗亚科 (Orthoptera Species File, Version 5.0), 是草原及半农牧区的主要害虫之一, 在我国主要分布于东北、华北、西北等地区 (郑哲民, 1993)。目前, 短星翅蝗的研究主要集中于卵子发生过程中原癌基因 *c-kit* 特异性表达 (赵卓等, 2008)、生物学与生态学特性 (魏淑花等, 2015)、线粒体基因组测序及系统发育关系 (Han *et al.*, 2016)、与寄主植物或植物衍生化合物的关系 (Huang *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020)、基因组大小和进化 (Mao *et al.*, 2020; Majid and Yuan, 2021) 等方面。其中, 基于流式细胞术, Mao 等 (2020) 测定了短星翅蝗基因组大小, 雌性个体为 9 813 Mb, 雄性个体为 9 424 Mb。目前关于短星翅蝗分子生物学方面的研究还相对较少, 尤其是基于转录组数据的分析研究。

本研究基于 Illumina 平台对短星翅蝗雌雄成虫个体转录组进行测序, 并开展功能注释和通路分析, 筛选出多种天然免疫信号通路的相关基因。本研究结果不仅可丰富短星翅蝗分子数据, 还可为后续天然免疫信号通路相关基因的功能研究提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

短星翅蝗样本于 2015 年 9 月采集自陕西省西安市南五台山, 选取雌雄成虫分别用于转录组测序, 其中, 雌虫组命名为 C_abbreviatus_F, 雄虫组命名为 C_abbreviatus_M。活体去除肠道后用 1% DEPC 水清洗数遍, 液氮速冻, 保存于 -80 °C 冰箱备用。

1.2 RNA 提取和高通量测序

选取上述短星翅蝗雌雄成虫各 1 只, 分别提取总 RNA。QIAGEN miRNeasy Mini Kit 用于提取总 RNA, 提取的 RNA 用 RNase Free 水溶解, 并使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测样品的浓度、纯度及完整性。提取合格的 RNA 样品用于高通量测序获得转录组数据, 测序平台为 Illumina HiSeq 4000。文库构建步骤为: 总 RNA 使用 DNase I 消化 DNA 后, 利用带 Oligo (dT) 的磁珠对 mRNA 进行富集。mRNA 被打断成短的片段, 以打断后的 mRNA 为模板合成一链 cDNA, 继而合成二链 cDNA。纯化回收、粘性末端修复、cDNA 的 3' 末端加上碱基 “A” 连接接头, 选择片段, 并进行 PCR 扩增。文库使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 和 ABI StepOnePlus Real-Time PCR System 进行质检。cDNA 文库构建和测序由测序公司完成。

1.3 转录组组装

使用 SOAPnuke v1.5.2 软件对 raw reads 进行过滤, 包括去除低质量、接头污染以及未知碱基 N 含量过高的 reads, 获得 clean reads。其中, 低质量 reads 定义为质量值低于 10 的碱基占该 reads 总碱基数的比例大于 20%; 未知碱基 N 含量过高 reads 定义为 N 含量大于 5%。使用 Trinity 软件 (Grabherr *et al.*, 2011) 对 clean reads 进行组装。使用 Tgicl 软件 (Pertea *et al.*, 2003) 对转录本进行聚类并去冗余得到 unigenes。本研究先把短星翅蝗雌雄个体分别组装得到各自的 unigenes, 再利用 Tgicl 将这两个样本的 unigenes 聚类并去冗余获得最终的 unigenes, 命名为

“All-unigene”。基于 *arthropoda_odb9* 数据库, 使用 BUSCO v3.0.2 软件检测转录组数据的完整性 (Waterhouse *et al.*, 2018)。

1.4 基因功能注释

使用 Blast (Altschul *et al.*, 1990) 对 unigenes 进行 Nr、Nt、KEGG、COG 及 SwissProt 注释, 基于 Blast2GO (Conesa *et al.*, 2005) 和 Nr 结果进行 GO 注释, 使用 InterProScan5 (Quevillon *et al.*, 2005) 进行 InterPro 注释。

1.5 CDS 预测、SSR 和 SNP 检测

参考功能注释结果, 按照 Nr、SwissProt、KEGG 和 COG 数据库的优先顺序, 挑选 unigenes 的最佳比对片段作为该 unigenes 的 CDS。对于未注释到的 unigenes, 以预测的 CDS 为模型建模, 利用 ESTScan 软件 (Iseli *et al.*, 1999) 预测 CDS。使用 MISA 软件 (Thiel *et al.*, 2003)

对 unigenes 进行 SSR 检测。使用 HISAT (Kim *et al.*, 2015) 将 clean reads 比对到 unigenes, 再使用 GATK (McKenna *et al.*, 2010) 检测 SNP。

1.6 差异基因表达筛选及功能富集分析

Bowtie2 (Langmead and Salzberg, 2012) 用于将 clean reads 比对到 unigenes 上, RSEM (Li and Dewey, 2011) 用于计算每个样品的基因表达水平。使用 PossionDis 方法进行差异基因检测。根据 Audic 和 Claverie (1997) 描述的方法检测 DEG, 参数设置为 Fold Change $\geq$ 2.00, FDR $\leq$ 0.001。针对差异基因, 根据 GO 注释结果进行功能分类, 依据 KEGG 注释结果进行生物通路分类, R 软件中的 phyper 函数用于富集分析。并对 *P*-value 进行 FDR 校正, FDR $\leq$ 0.01 的通路视为显著富集。为了验证差异基因的表达情况, 本研究使用 qRT-PCR 实验验证了短星翅蝗雌雄分组与免疫相关基因的表达量, 引物序列见表 1。

表 1 短星翅蝗与免疫相关的差异表达基因 qRT-PCR 验证引物
Table 1 Primers sets for qRT-PCR analysis of differentially expressed genes related to immune in *Calliptamus abbreviatus*

Unigene 名称	Unigene name	方向	Direction	引物序列	Primer sequences
CL1384.Contig1_All		F		GTGGAGCAGTTCACAGCAGA	
		R		TACTGGACAAGTGCGAGCAG	
CL1384.Contig2_All		F		CATCAGCAGCAGGTGACTGT	
		R		GGAAAGAGTGCTTCGCAGTT	
Unigene17008_All		F		TCTGGGACACTCATTACCA	
		R		GGGGATCTGTGAAGATGAGG	
CL2020.Contig1_All		F		GCGTGTCTCTCTCATTGCGTA	
		R		GCAGTGGGAGCTACAGAAGG	
Unigene2736_All		F		AGGTGCCTCCTATGTGATGG	
		R		CACCATGGGAACAAATAGGG	
Unigene30267_All		F		CTTCCTTGCCGTAAGCTGTC	
		R		GAAGGTAGTCGAGGCGTTCA	
Unigene30438_All		F		CTTCCTTGCCGTAAGCTGTC	
		R		GAAGGTAGTCGAGGCGTTCA	
Unigene4564_All		F		GCCACTGAAACAAGCTGACA	
		R		CTGTCCAACACCAACACCAG	

2 结果与分析

2.1 转录组数据分析和组装

短星翅蝗两组样本 C_abbreviatus_F 和 C_abbreviatus_M 各生成了 4.46 Gb 的高质量数据,共 8.92 Gb。两组样本数据的 Q20 碱基百分比均大于 96.47%,Q30 大于 91.55% (表 2)。C_abbreviatus_F 和 C_abbreviatus_M 组装分别得到 29 868 和 45 551 条转录本,总长度分别为 18 305 116 bp 和 29 015 375 bp,平均长度分别为 612 bp 和 636 bp,N50 长度分别为 995 bp 和 1 104 bp(表 3)。对 C_abbreviatus_F 和 C_abbreviatus_M

样品的转录本进行聚类去冗余分别得到 22 708 和 33 334 个 unigenes,总长度分别为 15 669 494 bp 和 24 598 838 bp,平均长度分别为 690 bp 和 737 bp,N50 长度分别为 1 074 bp 和 1 231 bp (表 3)。最终的 All-unigene 总共 36 804 个,总长度为 28 209 897 bp,N50 长度为 766 bp(表 3)。BUSCO 结果共找到 761 个完整 BUSCOs (C),占比 71.4% (表 4),低于短角外斑腿蝗转录组结果(完整 BUSCOs 占比 93.4%) (Zhao *et al.*, 2018),略高于异色雏蝗 *Chorthippus biguttulus* 转录组数据(完整 BUSCOs 占比 65%) (Berdan *et al.*, 2017)。

表 2 短星翅蝗雌雄两组样品测序数据

Table 2 Reads information of female and male samples of *Calliptamus abbreviatus*

样品 Sample	原始读取片段总 数 (Mb) Total raw reads (Mb)	高质量读取片段 总数 (Mb) Total clean reads (Mb)	高质量碱基总数 (Gb) Total clean bases (Gb)	高质量读取片 段 Q20 (%) Clean reads Q20 (%)	高质量读取片 段 Q30 (%) Clean reads Q30 (%)	高质量读取片 段占比 (%) Clean reads ratio (%)
短星翅蝗雌虫组 C_abbreviatus_F	45.24	44.61	4.46	96.47	91.55	98.60
短星翅蝗雄虫组 C_abbreviatus_M	45.24	44.59	4.46	96.47	91.59	98.56

表 3 短星翅蝗转录组组装统计

Table 3 Summary of transcriptome assembly of *Calliptamus abbreviatus*

样品 Sample	总数 Total number	总长度 (bp) Total length (bp)	平均长度 (bp) Mean length (bp)	N50	GC 含量 (%) GC(%)
转录本 Transcript					
短星翅蝗雌虫组 C_abbreviatus_F	29 868	18 305 116	612	995	43.66
短星翅蝗雄虫组 C_abbreviatus_M	45 551	29 015 375	636	1 104	43.62
unigene					
短星翅蝗雌虫组 C_abbreviatus_F	22 708	15 669 494	690	1 074	43.56
短星翅蝗雄虫组 C_abbreviatus_M	33 334	24 598 838	737	1 231	43.50
总数 All	36 804	28 209 897	766	1 315	43.62

表 4 短星翅蝗转录组 BUSCO 结果统计表

Table 4 Statistics of BUSCOs in assembled transcriptome of *Calliptamus abbreviatus*

完整的 BUSCOs Complete BUSCOs (C)	完整和单一拷贝 的 BUSCOs Complete and single-copy BUSCOs (S)	完整和加倍的 BUSCOs Complete and duplicated BUSCOs (D)	片段的 BUSCOs Fragmented BUSCOs (F)	丢失的 BUSCOs Missing BUSCOs (M)	总的 BUSCOs Total Lineage BUSCOs
761 (71.4%)	674 (63.2%)	87 (8.2%)	164 (15.4%)	141 (13.2%)	1 066

2.2 功能注释

对组装得到的 unigenes 在 Nr、Nt、GO、COG、KEGG、Swissprot 和 Interpro 七大功能数据库中进行注释 (表 5)。共 21 137 个 unigenes 成功获得注释, 占 unigenes 总数的 57.43%, 其中, Nr 注释到 18 687 个 (占比 50.77%), Nt 注释到 10 191 个 (占比 27.69%), Swissprot 注释到 15 026 个 (占比 40.83%), KEGG 注释到 13 354 个 (占比 36.28%), COG 注释到 7 553 个 (占比 20.52%), Interpro 注释到 12 795 个 (占比 34.77%), GO 注释到 3 269 个 (占比 8.88%)。

在 GO 数据库中, 生物学过程 (Biological process) 的代谢过程 (Metabolic process)、细胞过程 (Cellular process) 和单组织过程 (Single-organism process) 注释到的 unigenes 最多, 分别为 1 531、1 516 和 1 123 个。细胞组分 (Cellular component) 的细胞 (Cell) 和细胞部分 (Cell part) 注释到的 unigenes 最多, 均为 968 个。分子功能 (Molecular function) 的催化活性 (Catalytic activity) 和结合 (Binding) 注释到的 unigenes 最多, 分别为 1 808 和 1 491 个 (图 1: A)。

在 COG 数据库中, 共有 13 903 个 unigenes 得到注释, 被划分为 25 类。其中, 一般功能预测 (General function prediction only) 的 unigenes 有 2 156 个, 翻译、核糖体结构和生物合成条目 (Translation, ribosomal structure and biogenesis) 有 1 270 个, 碳水化合物运输和代谢 (Carbohydrate transport and metabolism) 有 1 010 个, 蛋白质翻译后修饰、折叠、分子伴侣 (Posttranslational modification, protein turnover, chaperones) 有 996 个, 复制重组和修复 (Replication, recombination and repair) 有 922 个, 翻译

(Translation) 有 909 个 (图 2)。此外, 未知功能的 unigenes 共 865 个, 占比 6.22%。

在 KEGG 数据库中, 共有 23 543 个 unigenes 参与到细胞进程 (Cellular processes)、环境信息处理 (Environmental information processing)、遗传信息处理 (Genetic information processing)、人类疾病 (Human diseases)、代谢 (Metabolism) 及有机系统 (Organismal systems) 这六大类代谢通路中 (图 1: B)。其中, 代谢通路中的 unigenes 最多 (6 308 个, 占比 26.8%), 环境信息处理通路中 unigenes 最少 (1 885 个, 占比 8.0%)。在 42 组代谢通路子类别中, 含有 900 个 unigenes 以上的类别是: 全局代谢 (Global map) 有 2 092 个, 翻译 (Translation) 有 1 252 个, 信号转导 (Signal transduction) 有 1 135 个, 细菌传染病 (Infectious diseases: Bacterial) 有 1 048 个, 病毒传染病 (Infectious diseases: Viral) 有 1 037 个, 消化系统 (Digestive system) 有 1 030 个, 转运和代谢 (Transport and catabolism) 有 950 个, 免疫系统 (Immune system) 有 932 个 (图 1: B)。

2.3 CDS 预测

unigenes 的 CDS 预测结果见表 6。其中, blast 预测到的 CDS 共有 18 696 个, 总长度为 12 610 176 bp, 平均长度 674 bp, N50 为 1 023 bp。ESTScan 预测到 CDS 有 3 560 个, 总长度为 1 179 609 bp, 平均长度为 331 bp, N50 为 330 bp。总共预测的 CDS 有 22 256 个, 总长度为 13 789 785 bp, 平均长度为 619 bp, N50 为 927 bp, GC 含量为 49.14%。

2.4 免疫信号通路及相关基因的筛选

参考 Nr 注释信息, 在短星翅蝗转录

表 5 短星翅蝗转录组七大功能数据库注释统计表

Table 5 Statistics of seven functional annotation databases of <i>Calliptamus abbreviatus</i> transcriptome										
数值 Values	总数 Total	Nr	Nt	Swissprot	KEGG	COG	Interpro	GO	Overall	
数目 Number	36 804	18 687	10 191	15 026	13 354	7 553	12 795	3 269	21 137	
百分比 (%)	100.00	50.77	27.69	40.83	36.28	20.52	34.77	8.88	57.43	
Percentage (%)										

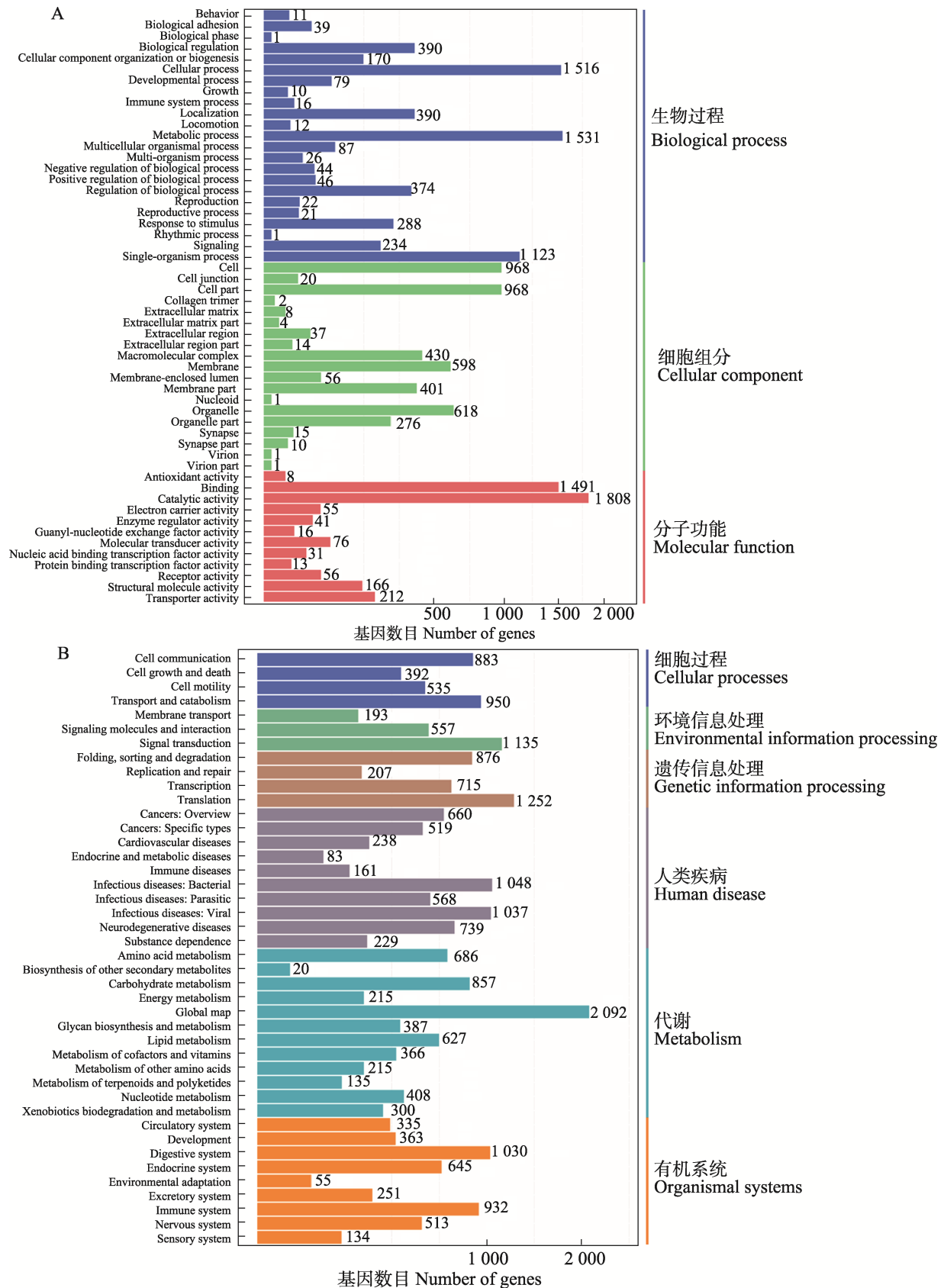


图 1 短星翅蝗转录组 GO (A) 和 KEGG (B) 通路分析

Fig. 1 GO (A) and KEGG (B) pathways of *Calliptamus abbreviatus* transcriptome

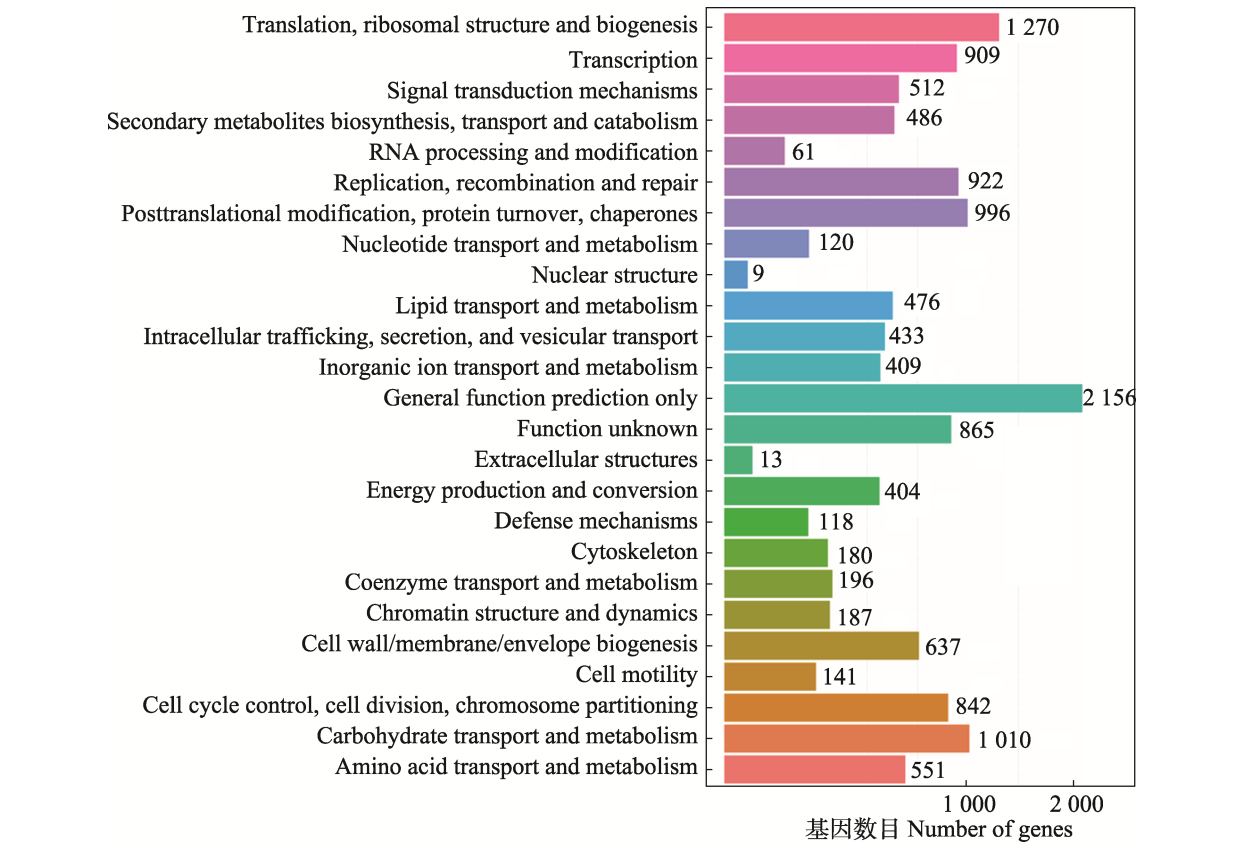


图 2 短星翅蝗转录组 COG 注释结果

Fig. 2 COG result of *Calliptamus abbreviatus* transcriptome

表 6 短星翅蝗转录组 unigene 的 CDS 预测结果

Table 6 CDS prediction results of *Calliptamus abbreviatus* unigenes

软件	总数目	总长度 (bp)	平均长度 (bp)	N50	N70	N90	GC 含量 (%)
Software	Total number	Total length (bp)	Mean length (bp)				GC (%)
Blast	18 696	12 610 176	674	1 023	603	288	49.01
ESTScan	3 560	1 179 609	331	330	261	216	50.52
Overall	22 256	13 789 785	619	927	522	261	49.14

组数据中查找了跟免疫相关的信号通路和基因。共计 114 个基因条目注释到 Toll 通路 (包含 97 个 unigenes), 其中, 9 个 unigenes 为 MyD88, 5 个 unigenes 为 Pelle, 2 个 unigenes 为 Cactus, 1 个 unigene 为 Dorsal/Dif, 1 个 unigene 为 tube, 1 个 unigene 为 TRAF6, 78 个 unigenes 为 Toll (表 7)。共计 14 个基因条目注释到 IMD 通路 (包含 9 个 unigenes), 这些 unigenes 均注释到 IKK 上 (表 7)。

KEGG 注释信息显示, 共计 70 个基因条目注释到 JAK-STAT 信号通路 (ko04630) (包含 54 个 unigenes) (图 3), 其中包括 EPO、

CytokineR、JAK 和 Cb1 等。此外, 有 29 个基因条目注释到 MAPK 通路 (ko04013) (包含 21 个 unigenes) (图 4); 74 个基因条目注释到 Toll 样受体[Toll-like receptor (TLR)]通路 (ko04620) (包含 66 个 unigenes), 51 个基因条目注释到 NOD 样受体 (NOD-like receptor) 通路 (ko04621) (包含 41 个 unigenes), 46 个基因条目注释到 RIG-I 样受体 (RIG-I-like receptor) 通路 (ko04622) (包含 38 个 unigenes)。多个解毒代谢相关的通路也同样被注释到, 其中包括 173 个基因条目与药物代谢-细胞色素 P450 (Drug metabolism-cytochrome P450, ko00982) 通路相

表 7 短星翅蝗转录组筛选得到的免疫通路
Table 7 Immune pathways obtained in *Calliptamus abbreviatus* transcriptome

通路 Pathway	信号分子 Signaling molecular	被 Nr 数据库注释 到的基因数目 Numbers of genes annotated by the Nr database	被 Nr 数据库注 释到的 unigenes 数目 Numbers of unigenes annotated by the Nr database
Toll	MyD88	9	9
	Pelle	5	5
	Cactus	2	2
	Dorsal/Dif	1	1
	tube	1	1
	TRAF6	1	1
	Toll	95	78
IMD	IMD	4	0
	IKK	9	9
	Relish	1	0

关(包含 117 个 unigenes), 174 个基因条目与细胞色素 P450 参与的外源性物质代谢(Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450, ko00980)通路相关(包含 115 个 unigenes), 228 个基因条目与酶的代谢(Drug metabolism of other enzymes, ko00983)通路相关(包含 159 个 unigenes), 115 个基因条目与谷胱甘肽代谢(Glutathione metabolism, ko00480)通路相关

(包含 66 个 unigenes)。短星翅蝗中跟解毒代谢相关的通路在其他昆虫转录组数据中也有报道(Zhao *et al.*, 2018; 孙丽娜等, 2020)。

2.5 差异基因表达分析

通过比较短星翅蝗雄性和雌性成虫的转录组数据(C_abbreviatus_M VS C_abbreviatus_F), 获得 8 125 个差异表达基因, 其中, 6 326 个为上调表达基因, 而 1 799 个为下调表达基因(图 5)。利用 GO 数据库对差异表达基因进行功能注释, 且对差异表达基因进行功能分类统计(图 6)。GO 数据库中, 生物学过程中代谢过程(Metabolic process)、细胞过程(Cellular process)和单一有机体过程(Single-organism process)注释到的基因最多, 分别为 412、393 和 297 个; 细胞组分中细胞(Cell)和细胞部分(Cell part)注释到的 unigenes 最多, 均为 255 个; 分子功能中催化活性(Catalytic activity)和结合(Binding)注释到的 unigenes 最多, 分别是 497 和 385 个。利用 KEGG 数据库对差异表达基因进行了注释(图 6: A)。KEGG 数据库, 含有基因最多的 5 个通路分别是: 全局代谢(Global map)有 762 个, 消化系统(Digestive system)有 465 个, 细菌传染病(Infectious diseases: Bacterial)有 449 个, 信号转导(Signal transduction)有 413 个, 翻译(Translation)有 408 个(图 6: B)。差异表达基

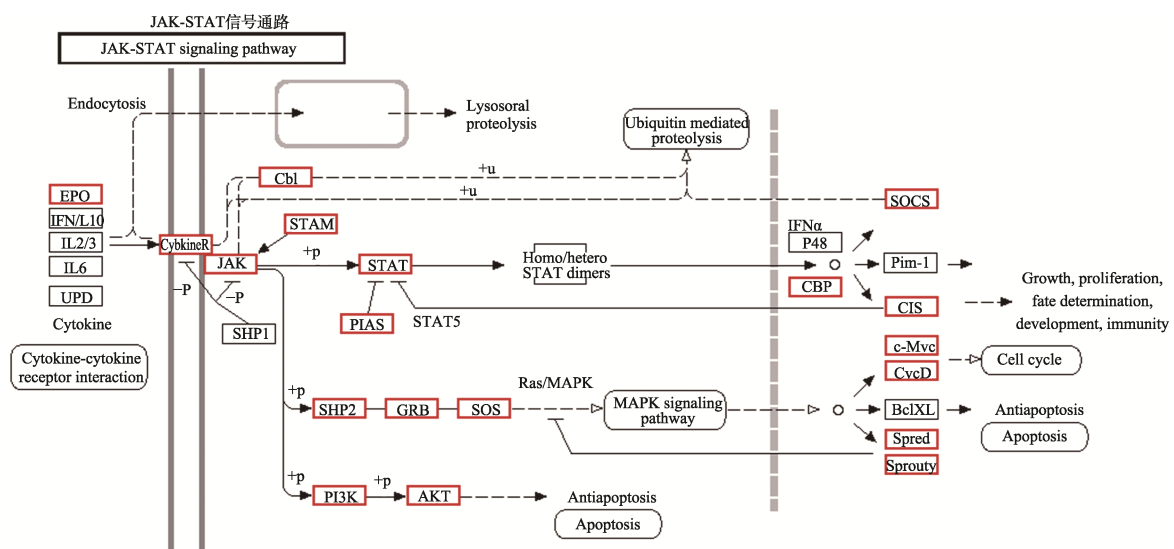


图 3 短星翅蝗转录组 JAK-STAT 信号通路

Fig. 3 JAK-STAT signaling pathway of *Calliptamus abbreviatus* transcriptome

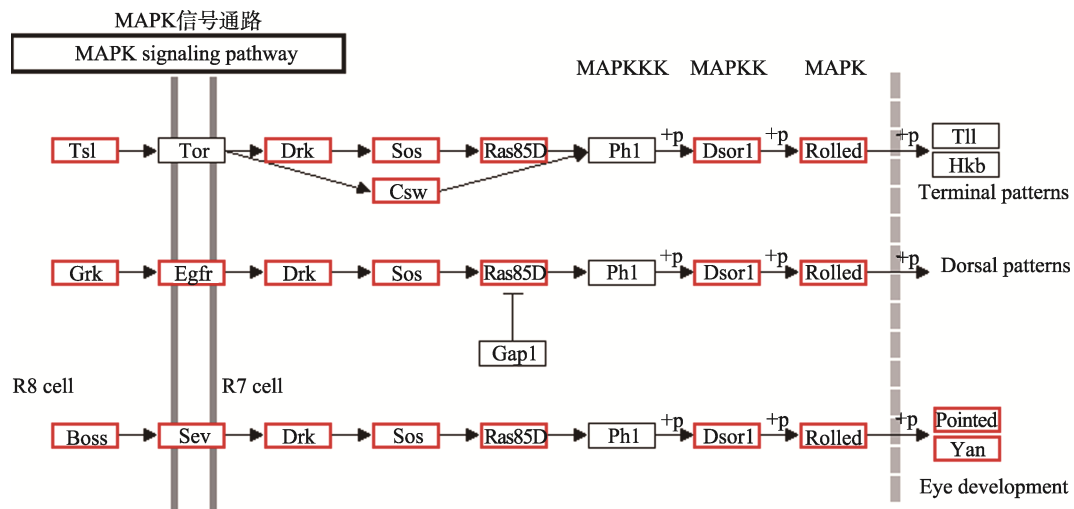


图4 短星翅蝗转录组 MAPK 信号通路

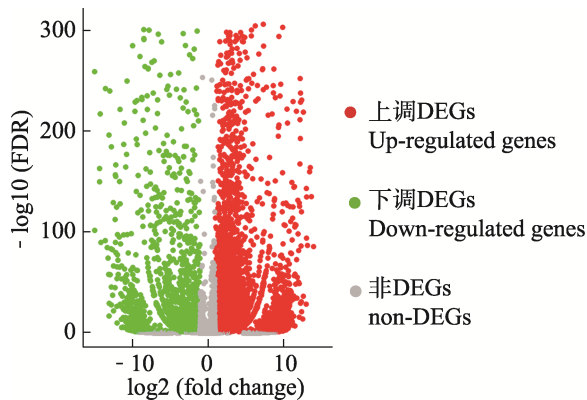
Fig. 4 MAPK signaling pathway of *Calliptamus abbreviatus* transcriptome

图5 短星翅蝗转录组差异表达基因图

Fig. 5 Differentially expressed genes (DEGs) of *Calliptamus abbreviatus* transcriptome (C_abbreviatus_F vs. C_abbreviatus_M)

因 KEGG 注释中, 22 个 unigenes 注释到跟免疫相关的 JAK-STAT 信号通路上, 其中, EPO、JAK、SH2、SOCS 和 CBP 等在雄性个体中上调, 而 EPO、Cb1 和 CBP 在雌性个体中下调。6 个 unigenes 注释到 MAPK 信号通路上, 其中, Tsl、Csw、Pointed 和 Yan 在雄性个体中上调, 而 Boss 和 Sev 在雌性个体中下调。跟免疫相关基因的差异表达基因 qRT-PCR 实验结果表明, 8 个差异表达基因的 qRT-PCR 结果和转录组测序结果基本一致 (图 7), 表明转录组测序结果可靠, 可对功能富集得到的差异表达基因做出合理的推测。

2.6 SNP 和 SSR 检测

分别在 C_abbreviatus_F 和 C_abbreviatus_M

中鉴定了 36 508 和 39 531 个 SNP 位点 (表 8)。C_abbreviatus_F 中包含 22 271 个转换 (11 272 个 A-G 和 10 999 个 C-T) 和 14 237 个颠换 (3 457 个 A-C、3 536 个 A-T、3 679 个 C-G 和 3 565 个 G-T)。C_abbreviatus_M 中包含 24 028 个转换 (12 292 个 A-G 和 11 736 个 C-T) 和 15 503 个颠换 (3 865 个 A-C、3 729 个 A-T、3 987 个 C-G 和 3 922 个 G-T)。C_abbreviatus_M 中的转换和颠换均高于 C_abbreviatus_F。

SSR 序列总长度为 28 209 897 bp, 共 6 227 个, 包含 SSR 的序列数目为 4 957 个 (表 9)。其中, 包含 1 个以上 SSR 为 924 个, 以复合物存在的 SSR 有 564 个。单碱基重复 SSR 有 1 335 个, 双碱基重复 SSR 有 2 634 个, 三碱基重复 SSR 有 1 978 个, 四碱基重复 SSR 有 131 个, 五碱基和六碱基重复 SSR 分别有 75 个和 74 个 (图 8)。双碱基重复 SSR 最丰富的为 AC/GT 重复类型, 共 1 522 个, 其次是 AG/CT、AT/AT、CG/CG 类型。三碱基重复 SSR 最丰富类型为 AGC/CTG, 其次为 CCG/CGG。

3 讨论

本研究使用 Illumina 高通量测序平台对短星翅蝗雌雄个体的转录组进行了测序, 共获得 8.92 Gb 的高质量数据, 组装获得 36 804 个 unigenes, 平均长度 766 bp, N50 长度 1 315 bp。组装获得的 unigenes 数目略少于其他已测序的蝗虫, 例如

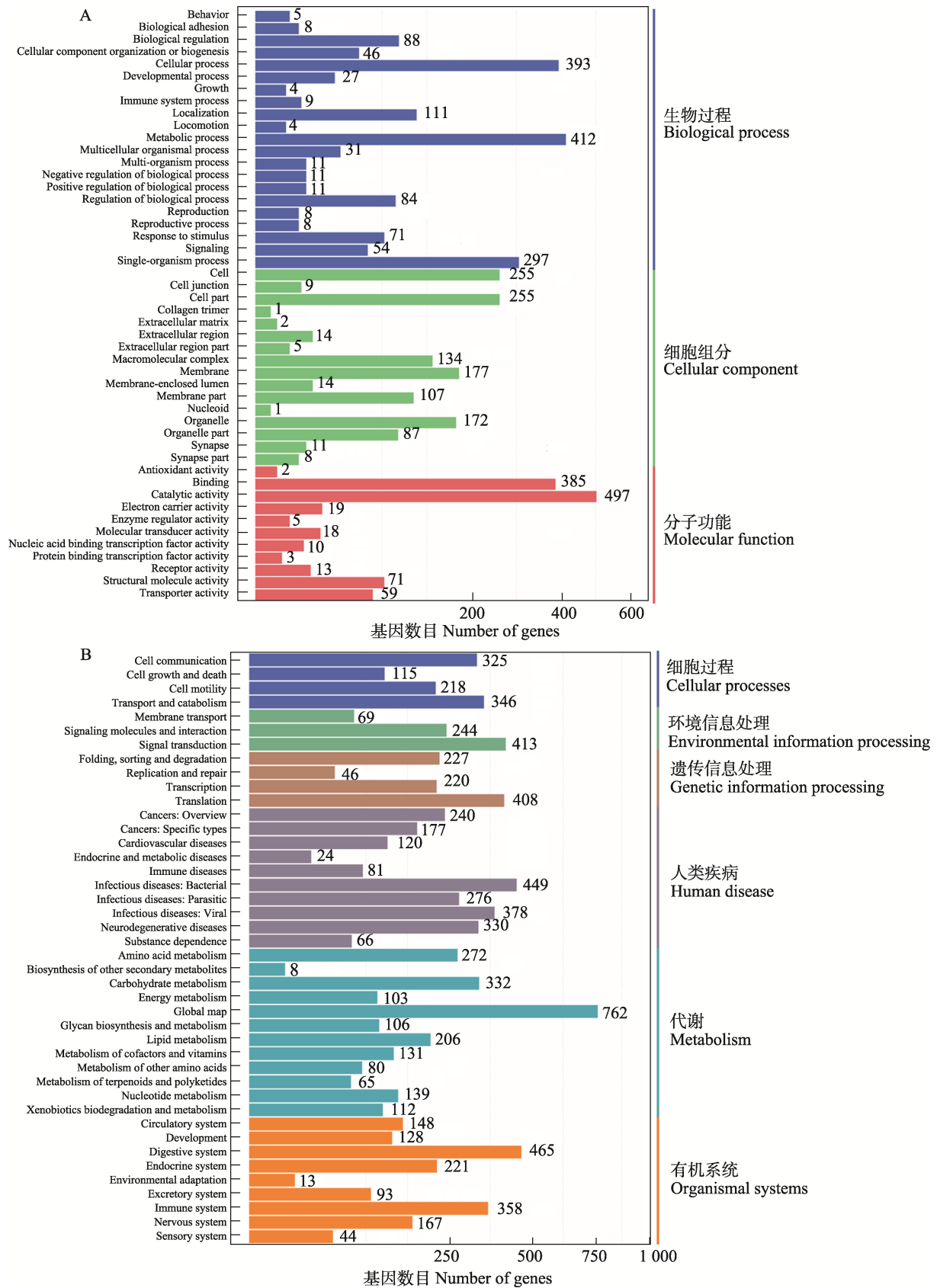


图 6 短星翅蝗转录组差异表达基因的 GO (A) 和 KEGG (B) 通路分析

Fig. 6 GO (A) and KEGG (B) pathways of DEGs of *Calliptamus abbreviatus* transcriptome

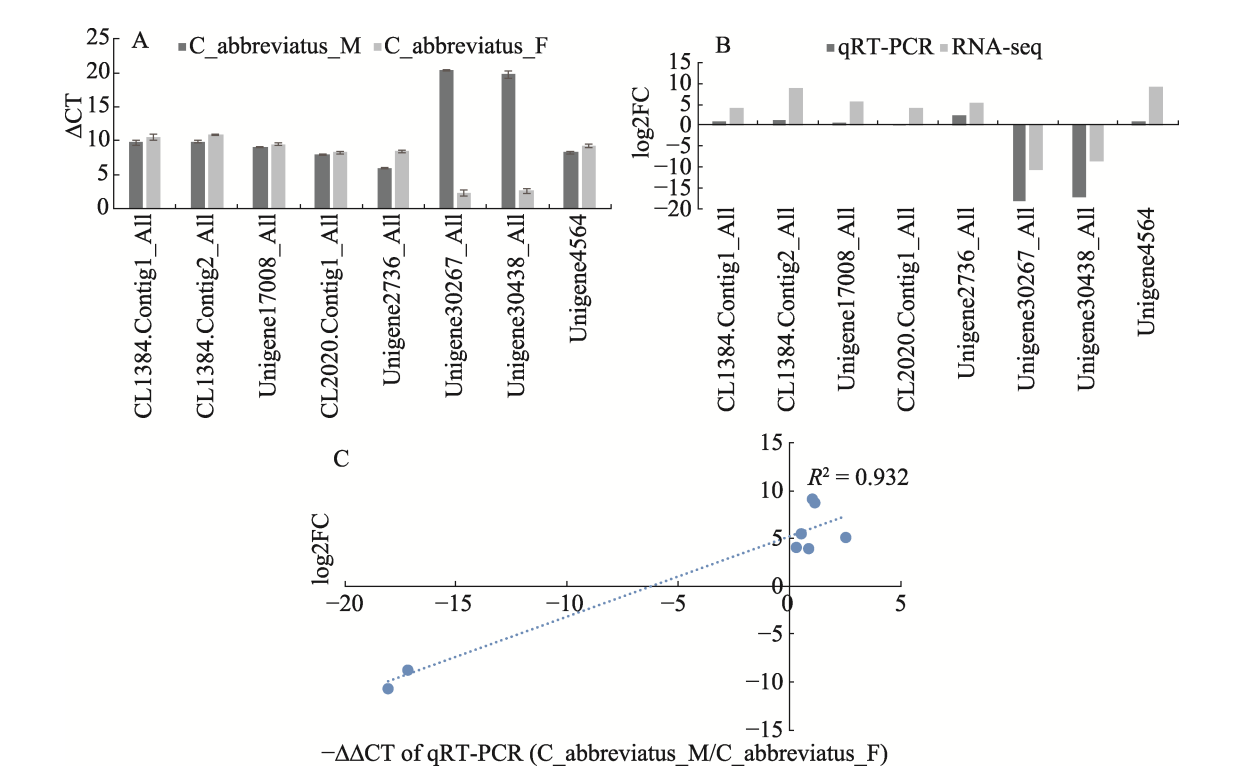


图 7 短星翅蝗转录组与免疫相关的差异表达基因 qRT-PCR 验证

Fig. 7 The qRT-PCR of differentially expressed genes (DEGs) related to immune in *Calliptamus abbreviatus* transcriptome

A. qRT-PCR 基因表达结果; B. qRT-PCR 和 RNA-seq 结果; C. qRT-PCR 和 RNA-seq 的相关性。
A. Gene expression results of qRT-PCR; B. The results of qRT-PCR and RNA-seq;
C. The correlation between qRT-PCR and RNA-seq.

表 8 短星翅蝗转录组 SNP 变异类型统计

Table 8 SNP variant type summary of *Calliptamus abbreviatus* transcriptome

样品 Sample	A-G	C-T	转换 Transition	A-C	A-T	C-G	G-T	颠换 Transversion	Total
短星翅蝗雌虫组 C_abbreviatus_F	11 272	10 999	22 271	3 457	3 536	3 679	3 565	14 237	36 508
短星翅蝗雄虫组 C_abbreviatus_M	12 292	11 736	24 028	3 865	3 729	3 987	3 922	15 503	39 531

表 9 短星翅蝗转录组 unigene 的 SSRs 统计

Table 9 SSRs summary of unigenes of *Calliptamus abbreviatus* transcriptome

条目 Item	数量 Number
评估的序列总数 Total number of sequences examined	36 804
评估的序列总大小 Total size of examined sequences (bp)	28 209 897
识别的 SSR 总数 Total number of identified SSRs	6 227
包含 SSR 的序列数目 Number of SSR containing sequences	4 957
包含 1 个以上 SSR 的序列数目 Number of sequences containing more than 1 SSR	924
以复合物存在的 SSR 数目 Number of SSRs present in compound formation	564

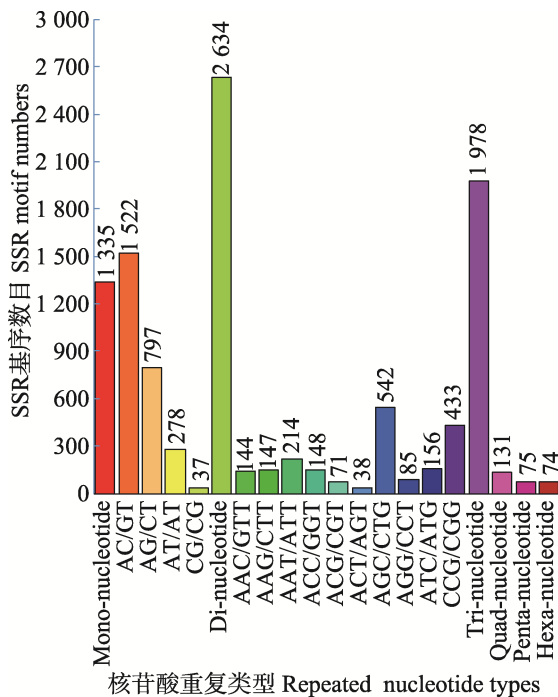


图8 短星翅蝗转录组 SSR 统计结果

Fig. 8 SSR result in *Calliptamus abbreviatus* transcriptome

华阴腹露蝗 37 840 个 unigenes (刘菲等, 2016)、短角外斑腿蝗 43 187 个 unigenes (Zhao *et al.*, 2018)。共计 21 137 个 unigenes 被七大数据库成功注释, 占 unigenes 总数的 57.43%。

GO 数据库的 3 个主要类别中, 短星翅蝗转录组序列的表达丰度与疣蝗 (邱忠营等, 2016)、短角外斑腿蝗 (Zhao *et al.*, 2018)、日本蚱 (Qiu *et al.*, 2017) 和中华螽斯 (韩媛吕等, 2020) 和青脊竹蝗 *Ceracris nigricornis* (Yuan *et al.*, 2019) 等蝗虫转录组数据结果相似, 均在代谢过程、细胞过程、细胞、细胞部分、催化活性、结合等子类别注释到较多序列。细胞组分中, 病毒体 (Virion) 和病毒体部分 (Virion part) 各自仅有 1 个 unigene 注释到, 这与日本蚱 GO 分类一致 (Qiu *et al.*, 2017); 类核 (Nucleoid) 也仅有 1 个 unigene 注释到, 这与短角外斑腿蝗和中华螽斯结果一致 (Zhao *et al.*, 2018; 韩媛吕等, 2020)。COG 类别中, 短星翅蝗未知功能的 unigenes 占到 6.22%, 小于其他已测序的直翅目昆虫, 例如长翅素木蝗 *Shirakiacris shirakii* (Qiu *et al.*, 2016) 的 23.1%, 日本蚱的 20.2% (Qiu *et al.*, 2017), 中华螽斯的 8.7% (韩媛吕等, 2020)。虽然目前

对直翅目昆虫转录组数据的研究分析越来越多, 然而, 很多序列搜索不到同源基因序列, 这仍需要补充大量的转录组相关数据。KEGG 通路中, 短星翅蝗含有 900 个 unigenes 以上的类别与华阴腹露蝗类似 (刘菲等, 2016)。26.8% 的 unigenes 参与代谢途径中, 少于中华螽斯转录组的 35.1% (韩媛吕等, 2020)。9% 的 unigenes 参与蛋白质的翻译、折叠、分类和降解中, 同样少于中华螽斯的 19.56% (韩媛吕等, 2020)。

短星翅蝗转录组中, Toll 通路、IMD 通路和 JAK-STAT 信号通路中鉴定了 160 个与天然免疫相关的 unigenes。果蝇中, Toll 受体对胚胎发育和免疫至关重要, 其基因组中总共编码了 9 种 Toll 受体 (Valanne *et al.*, 2011)。果蝇 Toll 通路在革兰氏阳性菌和真菌感染中起着关键作用 (Lemaitre and Hoffmann, 2007)。Toll 途径主要由 Spatzle、Toll、MyD88、Tube、Pelle、TRAF6、Cactus 和 Dorsal/Dif 等组分组成 (Li *et al.*, 2013)。其中, MyD88 是 Toll-IMD 信号通路的关键衔接分子 (Dai *et al.*, 2021), 该组分同样在短星翅蝗中被注释到 (包括 9 个 unigenes)。果蝇中, Toll 信号在 Toll 激活之前由活化的 Spatzle 蛋白触发 (Shmueli *et al.*, 2018), 此 Spatzle 组分在东亚飞蝗和疣蝗转录组数据中被注释到 (Zhang *et al.*, 2015; 邱忠营等, 2016), 但在短星翅蝗数据中未被注释到。

IMD 途径主要负责抵御革兰氏阴性菌和少数革兰氏阳性菌, 可通过 NF- κ B 蛋白 Relish 来抵御这些细菌。该途径主要由 IMD、dFADD、dTAK1、Dredd、IKK 和 Relish 等组分组成 (Li *et al.*, 2013)。Nr 数据库注释结果发现短星翅蝗中 9 个 unigenes 均注释到了 IMD 通路上的 IKK 组分, 注释到的 IMD 通路组分略少于其他蝗虫。例如疣蝗转录组数据中, 共有 13 个 unigenes 注释到 IMD 通路中, 包括 1 个 unigene 注释到 IMD 上, 1 个 unigene 注释到 dTAK1 上, 1 个 unigene 注释到 IKK 上, 9 个 unigenes 注释到 Dredd 上, 1 个 unigene 注释到 Relish 上。东亚飞蝗转录组数据中, IMD 通路注释到 IMD、FADD、Dredd、IAP2、Tak1、IKK、Relish 和 caspar 组分 (Zhang *et al.*, 2015)。然而, 半翅目昆虫豌豆蚜

Acyrtosiphon pisum 基因组却显示, 数据中似乎缺少 IMD 信号通路的许多关键成分, 其中包括 PGRP、IMD、dFADD、Dredd 和 Relish (Gerardo *et al.*, 2010)。

JAK-STAT 信号通路是一种高度保守的昆虫先天免疫信号通路, 由 STAT、Hopscotch、Domeless 和 3 个未配对的相关配体组成 (Kingsolver *et al.*, 2013)。短星翅蝗中有 54 个 unigenes 注释到了 JAK-STAT 信号通路上, 其中许多蛋白分子(例如 CytokineR、JAK、Cb1、SHP2 和 PI3K)在疣蝗中同样被注释到(邱忠营等, 2016)。

MAPK 信号通路广泛存在于真核生物中, 人们在多种昆虫的转录组数据中识别到 MAPK 信号通路, 例如直翅目 (Qiu *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2018)、鳞翅目 (Cao *et al.*, 2015)、膜翅目 (Dai *et al.*, 2021) 和鞘翅目 (Li *et al.*, 2020) 等。短星翅蝗中有 21 个 unigenes 注释到 MAPK 信号通路中, 相关蛋白分子 Drk、Ras85D、Dsor1 和 Rolled 等同样在疣蝗转录组中被注释到(邱忠营等, 2016)。

短星翅蝗转录组数据跟免疫相关基因的差异表达基因中, JAK-STAT 和 MAPK 信号通路在雄性成虫分组上调的 unigenes 高于雌性成虫分组, 初步分析结果显示雄性个体的免疫能力可能高于雌性个体。然而, 鉴于多数情况下, 雌性个体的免疫能力比雄性强, 故有关短星翅蝗雌雄个体之间免疫强弱研究有待增加重复取样来进一步进行分析和验证。此外, 红棕象甲 *Rhynchophorus ferrugineus* 的免疫相关权衡和生理调控机制研究中, 发现交配活动可能提高免疫相关的成本, 且免疫功能适应性的最终结果可能会在生理上与其他适应性方面(包括生长、发育、交配、繁殖和寿命)进行权衡 (Pu *et al.*, 2021)。可见, 昆虫免疫是一系列相对复杂的过程, 因此, 短星翅蝗雌雄分组之间的免疫能力强弱可能受多方面的因素影响, 有待进一步研究。

SSRs 序列广泛分布于真核生物和原核生物基因组中, 是遗传学和进化生物学上广泛使用的分子标记。例如, 荆胜利等 (2021) 基于 SSR

分子标记研究了褐飞虱的交配次数及性选择。甘丽萍等 (2021) 研究了 6 种鳞翅目昆虫全基因组的 SSRs 序列, 发现每种昆虫表现出物种特有的碱基类型丰度及优势碱基序列。短星翅蝗中共检测到 6 227 个 SSRs, 少于疣蝗的 9 287 个 (邱忠营等, 2016), 但多于华阴腹露蝗的 4 847 个 (刘菲等, 2016) 和大垫尖翅蝗 *Epacromius coerulipes* 的 5 696 个 (金永玲等, 2015), 这可为后续分子标记的开发提供数据支持。

本研究是对短星翅蝗雌雄个体转录组数据的系统性研究, 注释获得的与天然免疫相关的通路和基因为进一步研究天然免疫通路提供了基础。本研究获得的短星翅蝗与免疫相关的通路及基因后续可做为相应靶标基因进行 RNAi。这些转录组数据可为短星翅蝗功能基因的预测及分子标记的开发等方面提供有用的数据资源, 也可为后续深入研究昆虫发育及害虫防治提供参考。

参考文献 (References)

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ, 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3): 403–410.
- Audic S, Claverie JM, 1997. The significance of digital gene expression profiles. *Genome Research*, 7(10): 986–995.
- Bagchi B, Corbel Q, Khan I, Payne E, Banerji D, Liljestrand-Rönn J, Martinossi-Alilbert I, Baur J, Sayadi A, Immonen E, Arnqvist G, Söderhäll I, Berger D, 2021. Sexual conflict drives micro- and macroevolution of sexual dimorphism in immunity. *BMC Biology*, 19(1): 114.
- Bao YY, Qu LY, Zhao D, Chen LB, Jin HY, Xu LM, Cheng JA, Zhang CX, 2013. The genome- and transcriptome-wide analysis of innate immunity in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *BMC Genomics*, 14: 160.
- Belousova I, Pavlushin S, Subbotina A, Rudneva N, Martemyanov V, 2021. Sex specificity in innate immunity of insect larvae. *Journal of Insect Science*, 21(6): 15.
- Berdan EL, Finck J, Johnston PR, Waurick I, Mazzoni CJ, Mayer F, 2017. Transcriptome profiling of ontogeny in the acridid grasshopper *Chorthippus biguttulus*. *PLoS ONE*, 12(5): e0177367.
- Cao X, He Y, Hu Y, Wang Y, Chen YR, Bryant B, Clem RJ, Schwartz LM, Blissard G, Jiang H, 2015. The immune signaling pathways of *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 62: 64–74.

- Chang YW, Zhang XX, Lu MX, Gong WR, Du YZ, 2020. Transcriptome analysis of *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) in response to temperature stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 34: 100677.
- Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M, 2005. Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21(18): 3674–3676.
- Cotter SC, Littlefair JE, Grantham PJ, Kilner RM, 2013. A direct physiological trade-off between personal and social immunity. *The Journal of Animal Ecology*, 82(4): 846–853.
- Cui K, Wu WW, Diao QY, 2019. Application and research progress on transcriptomics. *Biotechnology Bulletin*, 35(7): 1–9. [崔凯, 吴伟伟, 刁其玉, 2019. 转录组测序技术的研究和应用进展. 生物技术通报, 35(7): 1–9.]
- Dai J, Shu R, Liu J, Xia J, Jiang X, Zhao P, 2021. Transcriptome analysis of *Apis mellifera* under benomyl stress to discriminate the gene expression in response to development and immune systems. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 56(6): 594–605.
- Gan LP, Tang H, Tang H, Li H, 2021. Distribution regularities of SSR in the whole genomes of the six lepidoptera insects. *Genomics and Applied Biology*, 40(3): 1022–1030. [甘丽萍, 田辉, 唐恒, 李豪, 2021. 6种鳞翅目昆虫全基因组 SSR 分布规律. 基因组学与应用生物学, 40(3): 1022–1030.]
- Gerardo NM, Altincicek B, Anselme C, Atamian H, Barribeau SM, de Vos M, Duncan EJ, Evans JD, Gabaldón T, Ghanim M, Heddi A, Kaloshian I, Latorre A, Moya A, Nakabachi A, Parker BJ, Pérez-Brocail V, Pignatelli M, Rahbé Y, Ramsey JS, Spragg CJ, Tamames J, Tamarit D, Tamborindeguy C, Vincent-Monegat C, Vilcinskis A, 2010. Immunity and other defenses in pea aphids, *Acyrtosiphon pisum*. *Genome Biology*, 11(2): R21.
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng Q, Chen Z, Mauceli E, Hacohen N, Gnirke A, Rhind N, di Palma F, Birren BW, Nusbaum C, Lindblad-Toh K, Friedman N, Regev A, 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, 29(7): 644–652.
- Han H, Wang N, Xu L, Gao S, Liu A, 2016. The complete mitochondrial genome of *Calliptamus abbreviatus* Ikonnikov (Orthoptera: Acridoidea). *Mitochondrial DNA B Resources*, 1(1): 770–771.
- Han YL, Chang YL, Zhou ZJ, 2020. Analysis of the transcriptome of *Tettigonia chinensis*. *Genomics and Applied Biology*, 39(10): 4531–4540. [韩媛吕, 常岩林, 周志军, 2020. 中华螞蟥转录组分析. 基因组学与应用生物学, 39(10): 4531–4540.]
- Hu JM, Xu DP, Zhou ZH, Yang W, Yang H, Zheng YR, 2019. Analysis of antennal transcriptome and olfaction-related genes of adult *Batocera horsfieldi* (Hope). *Chinese Journal of Applied Entomology*, 56(5): 1037–1047. [胡佳萌, 徐丹萍, 卓志航, 杨伟, 杨桦, 郑奕然, 2019. 云斑天牛成虫触角转录组及嗅觉相关基因分析. 应用昆虫学报, 56(5): 1037–1047.]
- Huang X, Ullah H, Zhang Z, Lv S, 2020. *Artemisia frigida* (Asterales: Asteraceae) improves the growth of grasshopper *Calliptamus abbreviatus* and increases the risk of damaging populations. *Journal of Economic Entomology*, 113(3): 1195–1201.
- Iseli C, Jongeneel CV, Bucher P, 1999. ESTScan: A program for detecting, evaluating, and reconstructing potential coding regions in EST sequences. Proceeding of the seventh International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology Heidelberg, Germany, August 6–10. 138–148.
- Jin YL, Cong B, Wang LY, Zhang HY, Dong H, 2015. An analysis of the transcriptome of *Epacromius coerulipes* (Orthoptera: Acrididae). *Acta Entomologica Sinica*, 58(8): 817–825. [金永玲, 丛斌, 王丽艳, 张海燕, 董辉, 2015. 大垫尖翅蝗转录组分析. 昆虫学报, 58(8): 817–825.]
- Jing SL, Zheng XJ, Li YN, Zhang L, Yu QQ, Huang XY, Du B, Yang F, Liu QS, 2021. Detection of mating times and sexual selection of brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål) based on SSR molecular markers. *Journal of Xinyang Normal University*, 34(1): 42–49. [荆胜利, 郑新静, 李亚楠, 张丽, 余青青, 黄小燕, 杜波, 杨芳, 刘青松, 2021. 基于 SSR 分子标记检测褐飞虱交配次数及性选择. 信阳师范学院学报(自然科学版), 34(1): 42–49.]
- Kim D, Langmead B, Salzberg SL, 2015. HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods*, 12(4): 357–360.
- Kingsolver MB, Huang Z, Hardy RW, 2013. Insect antiviral innate immunity: Pathways, effectors, and connections. *Journal of Molecular Biology*, 425(24): 4921–4936.
- Kleino A, Silverman N, 2014. The *Drosophila* IMD pathway in the activation of the humoral immune response. *Developmental and Comparative Immunology*, 42(1): 25–35.
- Langmead B, Salzberg SL, 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9(4): 357–359.
- Lemaitre B, Hoffmann J, 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology*, 25: 697–743.
- Li B, Dewey CN, 2011. RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, 12: 323.
- Li H, Zhao X, Qiao H, He X, Tan J, Hao D, 2020. Comparative

- transcriptome analysis of the heat stress response in *Monochamus alternates* Hope (Coleoptera: Cerambycidae). *Frontiers in Physiology*, 10: 1568.
- Li X, Cui Z, Liu Y, Song C, Shi G, 2013. Transcriptome analysis and discovery of genes involved in immune pathways from hepatopancreas of microbial challenged mitten crab *Eriocheir sinensis*. *PLoS ONE*, 8(7): e68233.
- Liu F, Qiu ZY, Huang Y, 2016. Analysis of the transcriptome of *Fruhstorferiola huayinensis*. *Genomics and Applied Biology*, 35(7): 1715–1724. [刘菲, 邱忠营, 黄原, 2016. 华阴腹露蝗转录组分析. 基因组学与应用生物学, 35(7): 1715–1724.]
- Liu XM, Yuan ML, 2018. Progress in innate immunity-related genes in insects. *Hereditas*, 40(6): 451–466. [刘小民, 袁明龙, 2018. 昆虫天然免疫相关基因研究进展. 遗传, 40(6): 451–466.]
- Lu XH, 2019. Identification of IMD immune pathway related genes in *Laodelphax striatellus* and preliminary study of its antiviral roles in response to rice stripe virus infection. Master dissertation. Hangzhou: Zhejiang A&F University. [鲁燕华, 2019. 灰飞虱 IMD 免疫通路相关基因的鉴定及其在水稻条纹病毒侵染中的功能初探. 硕士学位论文. 杭州: 浙江农林大学.]
- Majid M, Yuan H, 2021. Comparative analysis of transposable elements in genus *Calliptamus* grasshoppers revealed that satellite DNA contributes to genome size variation. *Insects*, 12(9): 837.
- Mao Y, Zhang N, Nie Y, Zhang X, Li X, Huang Y, 2020. Genome size of 17 species from Caelifera (Orthoptera) and determination of internal standards with very large genome size in Insecta. *Frontiers in Physiology*, 11: 567125.
- McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernysky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M, DePristo MA, 2010. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research*, 20(9): 1297–1303.
- Nunn CL, Lindenfors P, Pursall ER, Rolff J, 2009. On sexual dimorphism in immune function. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 364(1513): 61–69.
- Perlea G, Huang X, Liang F, Antonescu V, Sultana R, Karamycheva S, Lee Y, White J, Cheung F, Parvizi B, Tsai J, Quackenbush J, 2003. TIGR Gene Indices clustering tools (TGICL): A software system for fast clustering of large EST datasets. *Bioinformatics*, 19(5): 651–652.
- Pu YC, Wang R, Liu HH, Lu SP, Tang FX, Hou YM, 2021. Immunosenescence along with direct physiological allocation trade-offs between life history and immunity in the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus*. *Developmental and Comparative Immunology*, 123: 104143.
- Qiu Z, Liu F, Lu H, Huang Y, 2017. Characterization and analysis of a de novo transcriptome from the pygmy grasshopper *Tetrix japonica*. *Molecular Ecology Resources*, 17(3): 381–392.
- Qin YC, Rong WT, Li YM, Lu GH, Li XD, 2022. Differential analysis of female and male transcriptome in *Eucrotettix oculatus*. *Journal of Environmental Entomology*, 44(4): 968–977. [覃英灿, 容万韬, 李月妹, 陆桂红, 李晓东, 2022. 眼优角蚱两性成体转录组差异分析. 环境昆虫学报, 44(4): 968–977.]
- Qiu Z, Liu F, Lu H, Yuan H, Zhang Q, Huang Y, 2016. De novo assembly and characterization of the transcriptome of grasshopper *Shirakiacris shirakii*. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7): 1110.
- Qiu ZY, Liu F, Zhang KY, Huang Y, 2016. De novo assembly and analysis of the *Trilophidia annulata* transcriptome. *Genomics and Applied Biology*, 35(8): 1989–1998. [邱忠营, 刘菲, 张克瑶, 黄原, 2016. 疣蝗转录组分析. 基因组学与应用生物学, 35(8): 1989–1998.]
- Quevillon E, Silventoinen V, Pillai S, Harte N, Mulder N, Apweiler R, Lopez R, 2005. InterProScan: Protein domains identifier. *Nucleic Acids Research*, 33: W116–W120.
- Schwarzenbach GA, Hosken DJ, Ward PI, 2005. Sex and immunity in the yellow dung fly *Scathophaga stercoraria*. *Journal of Evolutionary Biology*, 18(2): 455–463.
- Shmueli A, Shalit T, Okun E, Shohat-Ophir G, 2018. The Toll pathway in the central nervous system of flies and mammals. *Neuromolecular Medicine*, 20(4): 419–436.
- Sun LN, Zhang HJ, Liu XH, Qiu GS, 2020. Transcriptomic analysis of insecticide target and detoxification related genes in *Adoxophyes orana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Acta Entomologica Sinica*, 63(4): 470–481. [孙丽娜, 张怀江, 刘孝贺, 仇贵生, 2020. 基于转录组的苹小卷叶蛾杀虫剂靶标及解毒代谢相关基因分析. 昆虫学报, 63(4): 470–481.]
- Thiel T, Michalek W, Varshney RK, Graner A, 2003. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 106(3): 411–422.
- Valanne S, Wang JH, R  met M, 2011. The *Drosophila* Toll signaling pathway. *The Journal of Immunology*, 186(2): 649–656.
- Wang S, Liu X, Xia Z, Xie G, Tang B, Wang S, 2019. Transcriptome analysis of the molecular mechanism underlying immunity- and reproduction trade-off in *Locusta migratoria* infected by *Micrococcus luteus*. *PLoS ONE*, 14(8): e0211605.
- Wang Y, Huang X, Chang BH, Zhang Z, 2020. Growth performance and enzymatic response of the grasshopper, *Calliptamus abbreviatus* (Orthoptera: Acrididae), to six plant-derived

- compounds. *Journal of Insect Science*, 20(3): 14.
- Waterhouse RM, Seppey M, Simão FA, Manni M, Ioannidis P, Klioutchnikov G, Kriventseva EV, Zdobnov EM, 2018. BUSCO applications from quality assessments to gene prediction and phylogenomics. *Molecular Biology and Evolution*, 35(3): 543–548.
- Wei SH, Huang WG, Zhang R, Gao LY, Yu Z, Zhu MM, 2015. Biological and ecological characteristics of *Calliptamus abbreviatus* Ikonnikov (Orthoptera: Catantopidae). *Chinese Journal of Applied Entomology*, 52(4): 998–1005. [魏淑花, 黄文广, 张蓉, 高立原, 于钊, 朱猛蒙, 2015. 短星翅蝗生物学与生态学特性研究. 应用昆虫学报, 52(4): 998–1005.]
- Wu G, Yi Y, 2018. Transcriptome analysis of differentially expressed genes involved in innate immunity following *Bacillus thuringiensis* challenge in *Bombyx mori* larvae. *Molecular Immunology*, 103: 220–228.
- Yang J, Ma YK, Fu HY, Liu CG, Yang FS, 2019. The progress of IMD signaling pathway in insect immune system. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 35(24): 100–108. [杨静, 马玉堃, 付海燕, 刘春光, 杨峰山, 2019. 昆虫免疫系统中 IMD 信号通路的研究进展. 中国农学通报, 35(24): 100–108.]
- Yuan H, Chang H, Zhao L, Yang C, Huang Y, 2019. Sex- and tissue-specific transcriptome analyses and expression profiling of olfactory-related genes in *Ceracris nigricornis* Walker (Orthoptera: Acrididae). *BMC Genomics*, 20(1): 808.
- Yuan H, Zhang X, Zhao L, Chang H, Yang C, Qiu Z, Huang Y, 2020. Characterization and analysis of full-length transcriptomes from two grasshoppers, *Gomphocerus licenti* and *Mongolotettix japonicus*. *Scientific Reports*, 10(1): 14228.
- Zhang W, Chen J, Keyhani NO, Zhang Z, Li S, Xia Y, 2015. Comparative transcriptomic analysis of immune responses of the migratory locust, *Locusta migratoria*, to challenge by the fungal insect pathogen, *Metarhizium acridum*. *BMC Genomics*, 16: 867.
- Zhao L, Wang H, Li P, Sun K, Guan DL, Xu SQ, 2021. Genome size estimation and full-length transcriptome of *Sphingonotus tsinlingensis*: Genetic background of a drought-adapted grasshopper. *Frontiers in Genetics*, 12: 678625.
- Zhao L, Zhang X, Qiu Z, Huang Y, 2018. De novo assembly and characterization of the *Xenocatantops brachycerus* transcriptome. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2): 520.
- Zhao Z, Ren BZ, Hao XL, Yuan HB, 2008. Special expression of proto-oncogene c-kit in oogenesis of *Calliptamus abbreviatus*. *Journal of Jilin Agricultural University*, 30(2): 138–141. [赵卓, 任炳忠, 郝锡联, 袁海滨. 2008. 短星翅蝗卵子发生过程中原癌基因 c-kit 特异性表达. 吉林农业大学学报, 30(2): 138–141.]
- Zheng ZM, 1993. Taxonomy of Acridoidea. Xi'an: Shaanxi Normal University Press. 176–177. [郑哲民, 1993. 蝗虫分类学. 西安: 陕西师范大学出版社. 176–177.]