

小象甲取食处理下甘薯‘广薯87’的转录组分析

饶顺发^{1,2}, 刘旭², 廖茵茵^{2,3}, 王亚如^{2,3}, 朱宏波⁴, 杨子银², 胡博^{1,*}, 侯兴亮^{2,*}

¹华南师范大学生命科学学院, 广东省植物发育生物工程重点实验室, 广州510631

²中国科学院华南植物园, 华南农业植物分子分析与遗传改良重点实验室&广东省应用植物学重点实验室, 广州510650

³中国科学院大学, 北京100049

⁴广东海洋大学滨海农业学院, 广东湛江524088

摘要: 甘薯(*Ipomoea batatas*)是世界重要农作物, 我国华南地区是主要甘薯产地, 却常年遭受甘薯小象甲(*Cylas formicarius*)的虫害威胁。发掘甘薯小象甲抗性基因资源及其抗性机理具有重要意义。本研究基于广东省主栽甘薯品种‘广薯87’(G87)的小象甲取食时间与侵害程度的关系, 选取取食处理4 h的G87薯叶和块根进行转录组分析, 分别获得了1 395和1 176个差异基因, 主要分属于物质代谢和转录信号等生物学途径, 并验证了如水杨酸甲酯代谢、胰蛋白酶抑制剂、转录调控因子以及甘薯贮藏蛋白等多个与小象甲抗性相关的甘薯基因, 且部分基因呈现组织特异性表达模式。本文将为甘薯小象甲抗性分子机制研究提供数据支持, 并对甘薯抗虫分子育种及相关农业技术实践提供理论指导。

关键词: 甘薯; ‘广薯87’; 小象甲; 转录组; 抗性基因

甘薯(*Ipomoea batatas*)是世界重要的粮食和能源作物, 富含糖、蛋白质、维生素及膳食纤维等丰富营养, 全球年产量约1亿吨(Loebenstein等2009)。我国是甘薯种植面积最大的国家(年产超5 000万吨), 华南地区是我国重要的甘薯产地(Zhang等2009; Yang等2017; FAO 2020)。然而我国南方气候温暖, 广东、福建、广西等地区以甘薯小象甲(*Cylas formicarius*)为主的虫害频繁发生(黄立飞等2011)。甘薯小象甲主要通过啮咬叶片、蛀食块根等方式为害甘薯, 并有逐年加重的趋势, 严重影响甘薯品质, 已成为制约甘薯产量的主要因素(Reddy 2015; Johnson和Gurr 2016)。

近年来, 对植物生物防御的分子机制研究已有报道, 如病害、虫害等生物胁迫(Zhang等2017; Miller等2017)及其与植物激素或非生物胁迫之间的相互作用(Nguyen等2016)。当遇到植食性昆虫攻击时, 植物会激活一系列的分子信号启动生物防御反应(Howe和Jander 2008)。在植物诱导型防御中, 昆虫侵食经信号转导途径激活相关转录因子如MYC、MYB、WRKY等家族蛋白, 以启动下游基因表达来调控胁迫响应(Erb和Reymond 2019)。此外, 最近研究表明, 植物受植食性昆虫侵食后可通过释放挥发性有机化合物以应对昆虫的进一步

伤害, 且邻近植物也能通过识别这些化合物信号来启动自身防御系统, 从而降低损害(Kalske等2019; Meents等2019)。目前有关植物抗虫机制的研究多集中于模式植物, 对甘薯的虫害防御机理报道较少, 主要集中于抗虫化合物和转录调控等方面(Anyanga等2017; Chen等2016; Meents等2019)。但对甘薯小象甲抗性基因的调节及应答等分子机制的研究匮乏。目前针对甘薯小象甲这一危害华南地区甘薯生产最严重的害虫, 较为有效的措施主要是农药化学防治。而农药类化学杀虫剂的长期使用易引起生境污染, 因此, 对甘薯自身抗性基因资源的挖掘、小象甲抗性机理及抗虫关键基因功能的研究和应用愈加重要。

新一代RNA测序(RNA-seq)和高通量分析技术的引入, 使基因表达检测在非模式作物中得到广泛应用, 即在没有预先已知基因组信息的前提下, 在转录组水平上研究基因差异和特征(Wang等2009; Ward等2012)。RNA-seq技术已经成功地应

收稿 2020-03-05 修定 2020-03-25

资助 国家自然科学基金(U1701234)和广州市科技计划项目(201804010158)。

* 共同通讯作者: 胡博(hubo0610@126.com)、侯兴亮(houxl@scib.ac.cn)。

用于鉴定昆虫取食胁迫条件下的基因表达研究(Tassone等2017; Müller等2019; Xi等2019)。目前,已有报道通过转录组分析研究了甘薯块根发育、淀粉合成、低温贮藏等相关基因的表达水平变化,揭示了非模式植物甘薯的大量生物基因资源及其相关基因调控网络(Firon等2013; Wang等2015; 颜朗等2017; Ji等2017, 2019)。而关于小象甲取食应答相关转录组研究还未见报道。

本课题组于2014~2017年期间持续对湛江试验基地田间甘薯品种‘广薯87’(广东省主栽品种,简称为G87)进行抗虫性鉴定,并建立了甘薯小象甲抗性分级评价体系。为了发掘甘薯抗虫相关基因,我们对前期大田实验材料进行室内恒温条件下同龄小象甲幼虫随机取食的抗虫鉴定,对相同条件下小象甲取食G87的叶片和块根进行不同时间点和不同组织取食程度的比较,进一步验证了G87被取食时间和取食程度的关系。基于此,我们对G87在小象甲取食4 h的叶片和块根进行了转录组分析,为甘薯小象甲抗性相关基因的发掘和甘薯抗虫育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料培养

甘薯[*Ipomoea batatas* (L.) Lam.]品种‘广薯87’(‘Guangshu 87’, G87)由广东海洋大学滨海农业学院朱宏波提供。选取长势较好的甘薯幼苗,分别栽种于中国科学院华南植物园室内及室外田间培养,即室内部分栽种于盛有泥炭土的直径30 cm的圆形花盆中,置于植物生长培养室(室温28℃,光周期为8 h光照/16 h黑暗)中稳定培养3~4周;室外部分栽种于中国科学院华南植物园试验田。

1.2 甘薯小象甲饲养

甘薯小象甲(*Cylas formicarius* Fab., 鞘翅目, 蚁象虫科)幼虫由广东海洋大学滨海农业学院甘薯种植试验基地被小象甲侵害的甘薯块根内虫卵孵化而来,置于人工定制饲养笼中并添加‘广薯87’品种甘薯块根饲养,饲养温度28℃,湿度60%,饲养笼置于纸箱保持避光环境以适宜小象甲生存。在进行小象甲取食甘薯叶片(离体、活体)、甘薯块根(离体)试验前,选择45日龄且大小相近的小象甲分

装于一次性无菌培养皿(每皿10只)或PET纤维抽线袋(每袋10只)中,置于恒温恒湿培养箱中黑暗条件饥饿处理24 h,温度28℃,湿度60%。

1.3 小象甲取食甘薯处理

1.3.1 小象甲取食甘薯块根处理

分别挑选田间同一批次收获且大小相近的新鲜甘薯块根12个,在每个甘薯块根的中心部位均匀横切出一块大小约5 cm×2.5 cm×0.5 cm的方块根;各取6块分别置于6个培养皿中进行小象甲离体块根取食试验,各培养皿放置10只已预先饥饿处理24 h的小象甲;分别在小象甲取食3、6、9、12、15和18 h时对甘薯块根的侵害程度(虫洞总数)进行统计;再取6块块根分别置于6个无菌空培养皿中作为对照组(Mock)。

1.3.2 小象甲取食离体甘薯叶片处理

分别挑选生长室内长势相同的3~4周龄且大小相近的新鲜幼嫩叶片各12片,叶柄顶端均保留约10 mm,并用湿润纸巾包裹叶柄顶端以免干燥,取6片叶片分别置于含10只饥饿处理的小象甲的6个培养皿中进行小象甲离体叶片取食试验,分别在小象甲取食2、4、6和8 h时统计叶片被侵害程度(虫洞总数);再取6片叶片分别置于6个无菌空白培养皿中作为对照组(Mock)。

1.3.3 小象甲取食非离体甘薯叶片处理

分别挑选田间3~4周龄且长势相近的甘薯植株各6株,每株剪取顶端长约20 cm的枝条,并插入含水的锥形瓶中正常培养3 d,每株选取2片大小相近的新鲜幼嫩甘薯叶片,用6个规格为12 cm×16 cm的PET纤维抽线袋(含10只已预饥饿处理的甘薯小象甲)分别套紧6片叶片进行小象甲活体叶片取食试验,分别在小象甲取食2、4、6和8 h对叶片的取食程度(虫洞总数)进行统计;再用6个空白PET纤维抽线袋分别套紧6片叶片作为对照组。

1.4 甘薯抗虫分级评价体系建立

根据前期建立的田间抗虫评价体系分析方法,按甘薯叶片或块根被小象甲侵害程度大小建立甘薯抗虫分级评价体系(虫洞总数=1级虫洞数+2级虫洞数×2),即以虫洞总数指标分析抗虫性,其中,1级虫洞以虫洞直径约1~2 mm为准,2级虫洞以虫洞直径约3~4 mm为准。

1.5 甘薯RNA提取

参照E.Z.N.A. Total RNA Kit I (Omega)试剂盒(R6827)植物总RNA提取说明方法提取小象甲取食处理4 h的离体甘薯叶片、块根样品(对照组为相同时间条件下小象甲未取食处理)的RNA, 使用岛津紫外可见分光光度计BioSpec-nano测定RNA浓度及其OD值。

1.6 甘薯RNA转录组分析

小象甲食处理与对照的离体甘薯叶片及块根RNA经纯度和完整性检测合格后, 由百迈客生物科技有限公司(北京, 中国)使用Ultra RNA样品制备试剂盒(Illumina)构建RNA-Seq文库, 并使用Illumina HiSeq 2000平台进行测序。三个有效生物学重复作相关性分析后被用于转录组差异分析, 以错误发生率(False Discovery Rate, FDR)<0.05且表达比>2为基准, 用Cuffdiff程序对差异表达基因(Different Expression Genes, DEGs)进行鉴定。使用具有默认参数的topGO R软件包进行基因本体(Gene Ontology, GO)富集分析。基因功能注释基于以下数据库进行: NR (NCBI非冗余蛋白序列), Pfam (蛋白质家族), KOG/COG/eggnoG (蛋白质直系同源基因簇), Swiss-PROT (人工审阅和注释的蛋白质序列数据库), KEGG (京都基因与基因组百科全书)和GO (基因本体)。使用KOBAS 2.0软件检验差异表达基因(DEGs)的注释和富集通路(Xie等2011)。

1.7 实时荧光定量PCR检测基因表达水平

参照Promega反转录试剂盒说明书方法使用MMLV-RTase (Promega, M531A)将Total RNA逆转录成cDNA。使用KAPA SYBR Fast qPCR Kit Master Mix (KAPA BIO)和LightCycler 480荧光定量PCR仪(Roche)进行实时荧光定量(qRT-PCR)试验检测基因转录水平; 每个样本至少三个生物学重复, 使用*IbTUB*作为内参基因, 并根据二阶导数算法($2^{-\Delta\Delta C_T}$)计算基因的表达量。相关基因表达所用的引物如表1所示。

1.8 数据统计

使用Microsoft Excel 2010软件对所有数据进行统计, 使用SPSS Statistics 25.0统计软件对数据进行方差分析(ANOVA), 所有数据以均值±标准差

表1 检测甘薯候选基因表达的引物

Table 1 The primers used for expression analysis of the selected genes in sweetpotato

基因名	引物序列(5'→3')
<i>IbTUB</i>	F: GTGTTACCTGCTGCCTGAG R: ACCGACCATGAAGAAGTGAAG
<i>IbSAMT1</i>	F: GTGCTTCACATGAATGGAGGAA R: GATTGTTGAGGCTGGTGTAGAG
<i>IbSAMT2</i>	F: CTTCTCCGCACCCTATCCA R: GCCTCTACACCTCCAACCTAA
<i>IbMYB74</i>	F: CTGTGAAGCTGGATGATGGTT R: GCAGGTCTTAATAGGTGTGGAA
<i>IbSporamin</i>	F: GTAGTATCTGCCAACGCTGTAG R: CGAGTTTGTCTCCAACCTTAGC
<i>IbHHO3</i>	F: CGCCGCAAGATTCAGGTT R: GCTCCGAACACTCCGATTG
<i>IbKT12</i>	F: CCTTATCTCCACCCTCAACA R: CGTCGTGTTCTCTGGCTCAA
<i>IbCYP79D3</i>	F: TCTTACCTCTCATGTGCTCTCG R: CATCCACTACTCCGCAACCT
<i>IbZEP</i>	F: CGGAGCACTGTGGTTGAC R: GATGACTACGAGAAGCGATGG
<i>IbNAC59</i>	F: CGTGCCGTCCTTCATATCC R: AACTTCTTGACAACAGCCATTG

表示, 多组数据之间进行方差齐性检验后, 进行方差分析, $P<0.05$ 表示有显著性差异。使用Microsoft Excel 2010软件作图。

2 实验结果

2.1 小象甲取食G87叶片和块根的侵害程度变化

前期通过随机对田间甘薯材料G87进行小象甲虫害程度的调查, 发现甘薯植株地上部与地下部存在不同程度的取食侵害。为了确定不同甘薯部位的小象甲取食处理条件, 我们分别选取3~4周龄G87的枝条或叶片(地上部)与新鲜收获的块根(地下部)进行室内取食实验(图1-A, C和E)。结果表明, 甘薯块根在小象甲取食处理下, 在3和6 h的虫洞总数均显著增加, 而在6~15 h间虫洞总数增长变缓(图1-B); 叶片在离体条件的小象甲取食处理下, 在2和4 h虫洞总数均显著增长, 而在6和8 h的虫洞总数增长变缓(图1-D); 叶片在非离体条件的小象甲取食处理下, 在2和4 h虫洞总数变化显著, 而在6 h之后虫洞总数的差异不明显(图1-F), 非离体

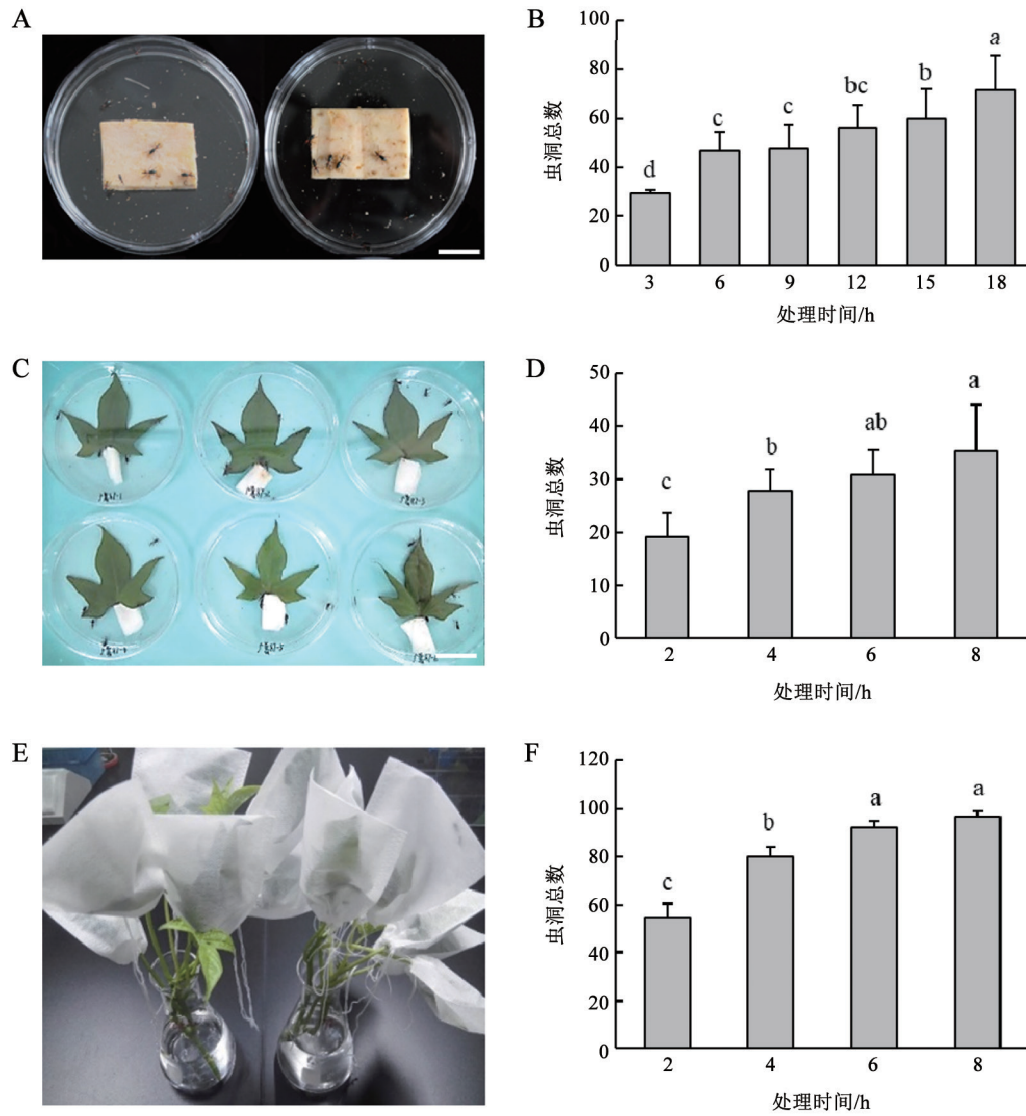


图1 小象甲取食G87块根和叶片不同时间的损伤程度统计

Fig.1 Statistics on injure degrees of the storage roots and leaves in sweetpotato G87 under weevil feeding treatment at different times

A和B: 小象甲取食甘薯块根于平皿及不同时间点虫洞数统计; C和D: 小象甲取食甘薯离体叶片于平皿及不同时间点虫洞数统计; E和F: 小象甲取食套袋甘薯非离体叶片及不同时间点虫洞数统计。柱状图中的小写字母代表不同时间点虫洞数存在显著差异, 即 $P < 0.05$, 相同小写字母代表无显著差异。

条件的叶片结果与离体条件下的变化情况一致。综上所述, 所有材料处理统计的虫洞总数随着取食时间延长而增加, 且均在小象甲取食6 h内虫洞总数显著增长(40%以上), 无论是叶片或块根都存在较大的取食程度变化; 而在小象甲取食6 h后虫洞数增长较缓慢, 取食程度变化较小。根据以上结果, 我们选择取食处理4 h的G87离体叶片和块根作为后续转录组的取材条件。

2.2 小象甲取食G87叶片和块根的转录组比较分析

为了研究潜在的甘薯小象甲抗性基因及其调控, 我们分别选取了小象甲取食处理的叶片和块根进行了转录组分析。

由图2-A可知, 在叶片取食处理的转录组比较分析中, 共筛选到叶片取食(叶片T)与叶片对照(叶片M)之间的1 395个差异基因, 其中诱导上调基因1 066个, 下调基因329个; 而在块根取食处理的转

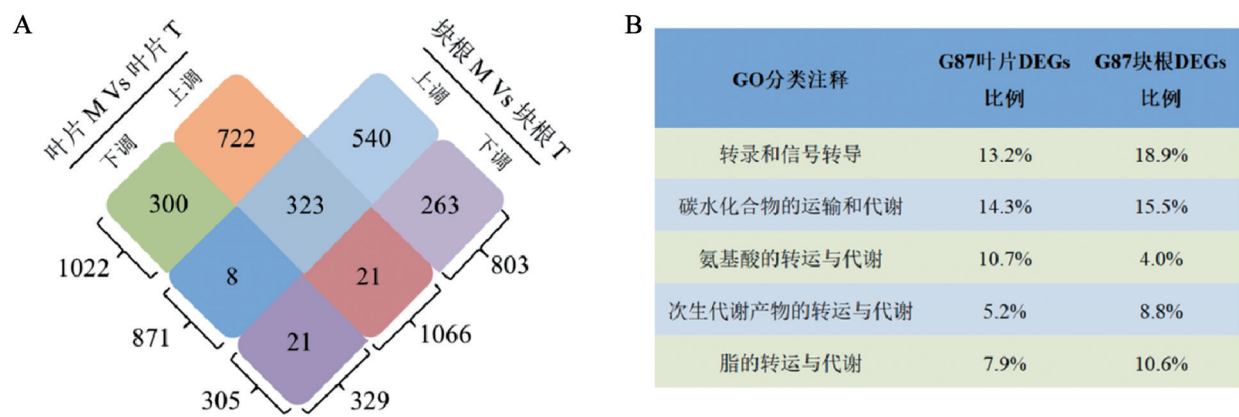


图2 甘薯G87叶片和块根小象甲取食处理的转录组分析

Fig.2 Transcriptomic analysis in the leaves and storage roots of sweetpotato G87 by weevil feeding treatment

A: G87叶片和块根响应小象甲取食的差异基因韦恩分析, M表示Mock对照, T表示小象甲取食处理; B: 叶片和块根响应小象甲取食差异基因主要GO分类的百分占比(目的GO类型基因数/所有GO注释的基因数×100%)。

录组比较分析中, 共筛选到块根取食(块根T)与块根对照(块根M)之间的1 176个差异基因, 其中诱导上调基因871个, 下调基因305个; 叶片与块根共同存在差异基因373个, 其中在叶片与块根均诱导上调基因323个, 均诱导下调基因21个; 叶片与块根相反调节的基因较少, 在叶片上调而块根下调的基因21个, 在叶片下调而块根上调的基因8个。叶片与块根特异存在的差异基因分别为1 022个和803个, 均多于共同存在差异基因, 预示着叶片与块根更多地表现为组织特异性调节。由图2-B可知, 基于叶片和块根转录组差异基因Unigenes的GO分类富集分析表明, 叶片与块根诱导的差异基因GO类型相似, 主要富集在碳水化合物的转运与代谢(carbohydrate transport and metabolism)、氨基酸的转运与代谢(amino acid transport and metabolism)、脂的转运与代谢(lipid transport and metabolism)、次生代谢产物的转运与代谢(secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism)、转录与信号转导(transcription and signal transduction)等多个与代谢和转录信号相关的生物学途径。

以上结果说明, 在小象甲取食处理下甘薯G87叶片和块根的取食响应基因均具有高水平诱导表达, 转录被大规模调控, 以基因上调诱导为主, 其中代谢相关和转录信号相关基因可能在甘薯取食响应中发挥主要作用。另外, 甘薯叶片和块根中特定存在的

调节基因数量多于共同存在的调节基因, 预示可能存在多种组织特异性表达的甘薯小象甲抗性基因。

2.3 甘薯响应小象甲取食相关候选基因的表达分析

为了进一步验证甘薯响应小象甲取食的相关基因, 我们从G87叶片的转录组中选取了5个与植物代谢和病虫害防御相关的基因: *IbCYP79D3*、*IbZEP*、*IbSporamin*、*IbMYB74*、*IbSAMT1*, 以及1个不包括在叶片转录组的差异基因*IbKTI2*, 并通过特异引物及定量PCR验证基因表达。结果显示, 除*IbKTI2*外, 其他5个基因的表达水平相比对照处理均诱导上调表达, 其中*IbCYP79D3*和*IbSporamin*诱导程度较高(图3-A和C), 比对照组高30倍; *IbZEP*、*IbMYB74*和*IbSAMT1*的诱导程度均在3倍以上(图3-B, D和F), 而*IbKTI2*无诱导表达(图3-E), 这与叶片转录组分析数据一致。同时, 我们也从G87块根转录组数据中选取了5个相关基因: *IbNAC59*、*IbHHO3*、*IbSAMT2*、*IbMYB74*、*IbKTI2*以及1个不包括在块根转录组的差异基因*IbSAMT1*, 并进行了基因表达验证。结果发现, 与对照相比, *IbNAC59*、*IbHHO3*、*IbSAMT2*、*IbMYB74*、*IbKTI2*的基因表达水平上调(图3-G, H~K), 均比对照组高2倍以上, 而*IbSAMT1*表达水平与对照组相比无差异(图3-L), 这与块根转录组分析数据一致。综合比较可见, *IbMYB74*在叶片和块根中都可被诱导表达, 而*IbSAMT1*和*IbKTI2*基因只在其中一个组织器官中被

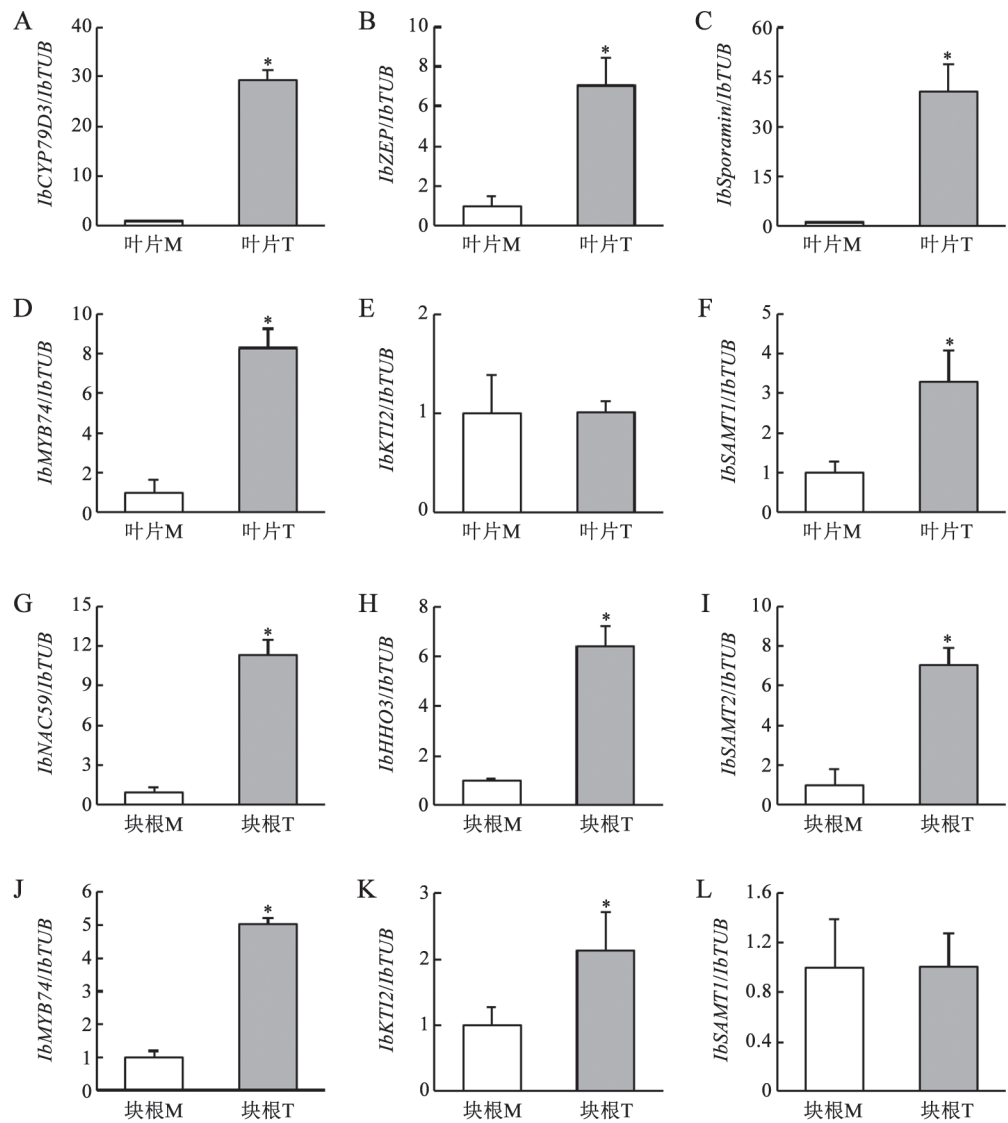


图3 小象甲取食甘薯G87叶片和块根转录组的候选基因表达分析

Fig.3 Expression analysis of the selected genes from the leaves and storage roots transcriptomes in sweetpotato G87 under weevil feeding treatment

A~L: 叶片和块根响应小象甲取食的差异基因定量PCR检测, M表示Mock对照, T表示小象甲取食处理; *IbTUB*作为内参基因计算相对表达量, 对照处理的表达值归一。图中*代表处理与对照之间相对表达量存在显著差异, 即 $P < 0.05$ 。

诱导表达, 这进一步暗示在叶片和块根中, 取食应答相关基因可被组织特异性调控。

以上结果进一步验证了小象甲取食G87叶片和块根的相关响应基因表达, 这些基因可能在甘薯诱导防御小象甲侵害过程中发挥重要作用。

3 讨论

我国是甘薯种植大国, 华南地区是我国重要的

甘薯产地, 而地区气候导致甘薯小象甲虫害频发。针对小象甲虫害, 甘薯自身抗性相关基因筛选、抗性基因克隆和抗虫机理研究应用愈加重要。

植物响应外界环境的基因表达调控多为早期事件, 草食昆虫侵食植物后激活一系列的分子和生化信号以启动诱导型防御反应(Howe和Jander 2008; Erb和Reymond 2019)。小象甲取食甘薯组织的控制实验发现, 取食程度的变化主要发生在处

理早期,即叶片和块根组织都表现为早期虫洞总数增长快。考虑到植物中取食响应基因的诱导表达模式,我们选取早期作为小象甲取食响应基因表达分析的取材时期。小象甲取食叶片和块根的转录组分析分别获得了1 395和1 176个差异基因,且诱导上调表达基因数分别为1 066个和871个,说明取食早期的基因激活诱导活跃,结合叶片和块根不同组织的取材,全面地反映了甘薯小象甲取食响应基因的诱导表达情况,涵盖到整个基因组层面。同时GO分类和Unigenes注释显示,这些诱导变化基因,如*IbNAC59*、*IbHHO3*、*IbMYB74*、*IbSAMT1*和*IbSAMT2*等,主要属于化合物代谢和转录信号途径,说明化合物代谢调控和转录调控在甘薯小象甲抗性中发挥主要作用。最近研究报道发现,甘薯*IbNAC1*转录调控*Sporamin*基因以响应幼虫取食伤害(Chen等2016),以及抗虫化合物DMNT (4,8-dimethyl-1,3,7-nonatriene)作为挥发性化合物诱导甘薯系统性抗虫反应(Meents等2019)。虽然本转录组分析中没有验证*IbNAC1*或DMNT代谢相关基因的差异表达,但甘薯对小象甲和斜纹夜蛾是否存在广谱性的抗虫调控机制,值得深入探讨。

已知水杨酸甲酯(methyl salicylic acid, MeSA)是植物系统获得性抗性(systemic acquired resistance, SAR)的关键移动信号(Park等2007)。水杨酸羧基甲基转移酶基因*SAMT*在植物病虫害防御反应中发挥重要作用(Chen等2003; Lin等2013)。在植物生物防御过程中, *SAMT*不仅能催化SA为挥发性的MeSA,同时,散发至空气中的MeSA亦可再转化为SA,进而使植株产生SAR,从而启动植物的全株系统性防御(Shulaev等1997)。在甘薯G87响应小象甲取食的转录组分析中发现MeSA合成基因的上调, *IbSAMT1*和*IbSAMT2*分别在叶片和块根中被诱导,这不仅说明MeSA的诱导合成可能与小象甲抗性有关,也暗示在甘薯叶片和块根中存在组织特异性MeSA代谢调节,其可能由其他*SAMT*同源基因作用。*SAMT*基因是否在甘薯小象甲抗性中发挥主要作用,待进一步研究。

在植物虫害防御中,蛋白酶抑制剂(protease inhibitors)通过干扰草食昆虫的生理活动对其产生

直接影响,其中Kunitz型胰蛋白酶抑制剂发挥重要抗虫作用(Ryan 2003; Lee等1999)。小象甲取食处理后,甘薯Kunitz型胰蛋白酶抑制剂基因*IbKTI2*在块根中上调表达,但其不在叶片中被诱导。推测*IbKTI2*介导的Kunitz型胰蛋白酶的抑制作用主要在块根中发挥抗虫性。另外,甘薯贮藏蛋白*Sporamin*也具有胰蛋白酶抑制活性,可增强植物的抗虫性。研究发现*Sporamin*基因在块根中组成型表达,在叶片中被伤害诱导表达(Yeh等1997; Wang等2002)。本转录组分析和表达检测也证实*IbSporamin*仅在G87叶片中被激活并高表达,而不在处理的块根的差异基因分析中,这与Wang等(2002)的研究结果一致。由此可见, *Sporamin*为一种重要的甘薯抗虫蛋白,发挥抗小象甲等植食性昆虫的广谱抗性。

在甘薯响应小象甲取食处理的转录组分析中,转录与信号转导相关基因占比为13%~18%。基于转录调控在抗虫应答中的重要性,我们检测了多个转录因子基因的表达。其中, *IbNAC59*、*IbHHO3*、*IbMYB74*基因在块根中被激活并高表达,在叶片只有*IbMYB74*基因存在诱导表达。这也说明了不同转录调控基因的组织特异性。同时,我们也在叶片的转录组分析中检测到*IbCYP79D3*和*IbZEP*两个受诱导并高表达的基因,它们分别属于异亮氨酸-N-单加氧酶类和玉米黄质环氧酶类的基因,暗示着甘薯小象甲抗性可能与氨基酸代谢或脱落酸合成有关。这些转录调控基因和代谢基因是否在甘薯小象甲抗性中发挥主要作用,尚需进一步研究。

参考文献(References)

- Anyanga MO, Yada B, Yencho GC, et al (2017). Segregation of hydroxycinnamic acid esters mediating sweetpotato weevil resistance in storage roots of sweetpotato. *Front Plant Sci*, 8: 1011–1011
- Chalfant RB, Jansson RK, Seal DR, et al (1990). Ecology and management of sweet potato insects. *Annu Rev Entomol*, 35: 157–180
- Chen F, D'Auria JC, Tholl D, et al (2003). An *Arabidopsis thaliana* gene for methylsalicylate biosynthesis, identified by a biochemical genomics approach, has a role in defense. *Plant J*, 36: 577–588

- Chen SP, Lin IW, Chen X, et al (2016). Sweet potato NAC transcription factor, IbNAC1, upregulates sporamin gene expression by binding the SWRE motif against mechanical wounding and herbivore attack. *Plant J*, 86: 234–248
- Erb M, Reymond P (2019). Molecular interactions between plants and insect herbivores. *Annu Rev Plant Biol*, 70 (1): 527–557
- Firon N, LaBonte D, Villordon A, et al (2013). Transcriptional profiling of sweetpotato (*Ipomoea batatas*) roots indicates down-regulation of lignin biosynthesis and up-regulation of starch biosynthesis at an early stage of storage root formation. *BMC Genomics*, 14: 460
- Howe GA, Jander G (2008). Plant immunity to insect herbivores. *Annu Rev Plant Biol*, 59: 41–66
- Huang L, Huang S, Fang B, et al (2011). Research development of the control of sweetpotato weevil. *Guangdong Agric Sci*, (S1): 77–79 (in Chinese with English abstract) [黄立飞, 黄实辉, 房伯平等(2011). 甘薯小象甲的防治研究进展. *广东农业科学*, (S1): 77–79]
- Ji CY, Chung WH, Kim HS, et al (2017). Transcriptome profiling of sweetpotato tuberous roots during low temperature storage. *Plant Physiol Biochem*, 112: 97–108
- Ji CY, Bian X, Lee CJ, et al (2019). *De novo* transcriptome sequencing and gene expression profiling of sweet potato leaves during low temperature stress and recovery. *Gene*, 700: 23–30
- Johnson AC, Gurr GM (2016). Invertebrate pests and diseases of sweetpotato (*Ipomoea batatas*): a review and identification of research priorities for smallholder production. *Ann Appl Biol*, 168: 291–320
- Kalske A, Shiojiri K, Uesugi A, et al (2019). Insect herbivory selects for volatile-mediated plant-plant communication. *Curr Biol*, 29: 3128–3133
- Yan L, Wei CH, Zhang YZ (2017). Transcriptomic analyses in sweetpotato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam. cv. 'xushu 18']. *Plant Physiol J*, 53: 772–780 (in Chinese with English abstract) [颜朗, 魏昌赫, 张义正(2017). 甘薯‘徐薯18’薯转录组分析. *植物生理学报*, 53: 772–780]
- Lee IS, Lee SH, Choon KJ, et al (1999). Soybean Kunitz trypsin inhibitor (SKTI) confers resistance to the brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål) in transgenic rice. *Mol Breeding*, 5: 1–9
- Lin J, Mazarei M, Zhao N, et al (2013). Overexpression of a soybean salicylic acid methyltransferase gene confers resistance to soybean cyst nematode. *Plant Biotechnol J*, 11: 1135–1145
- Loebenstein G (2009). Origin, distribution and economic importance. In: Loebenstein G, Thottappilly G (eds). *The Sweetpotato*. Dordrecht: Springer Press, 9–12
- Meents AK, Chen SP, Reichelt M, et al (2019). Volatile DMNT systemically induces jasmonate-independent direct anti-herbivore defense in leaves of sweet potato (*Ipomoea batatas*) plants. *Sci Rep*, 9: 17431
- Miller RNG, Costa Alves GS, van Sluys MA (2017). Plant immunity: unravelling the complexity of plant responses to biotic stresses. *Ann Bot*, 119: 681–687
- Müller NA, Kersten B, Fladung M, et al (2019). RNA-seq of eight different poplar clones reveals conserved up-regulation of gene expression in response to insect herbivory. *BMC Genomics*, 20: 1–10
- Nguyen D, Rieu I, Mariani C, et al (2016). How plants handle multiple stresses: hormonal interactions underlying responses to abiotic stress and insect herbivory. *Plant Mol Biol*, 91: 727–740
- Park SW, Kaimoyo E, Kumar D, et al (2007). Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science*, 318: 113–116
- Ryan CA (2003). Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu Rev Phytopathol*, 28: 425–449
- Reddy PP (2015). Sweet potato: *Ipomoea batatas*. In: plant protection in tropical root and tuber crops. India: Springer Press, 83–141
- Shulaev V, Silverman P, Raskin I (1997). Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature*, 385: 718–721
- Tassone EE, Cowden CC, Castle SJ (2017). *De novo* transcriptome assemblies of four xylem sap-feeding insects. *Gigascience*, 6: 1–4
- Wang SJ, Lan YC, Chen SF, et al (2002). Wound-response regulation of the sweet potato sporamin gene promoter region. *Plant Mol Biol*, 48: 223–231
- Wang Z, Fang B, Chen X, et al (2015). Temporal patterns of gene expression associated with tuberous root formation and development in sweetpotato (*Ipomoea batatas*). *BMC Plant Biol*, 15 (1): 180
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*, 10 (1): 57–63
- Ward JA, Ponnala L, Weber CA (2012). Strategies for transcriptome analysis in nonmodel plants. *Am J Bot*, 99 (2): 267–276
- Xi G, Wang Y, Yin L, et al (2019). *De novo* transcriptome analysis of gene responses to pest feeding in leaves of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Mol Med Rep*, 20 (1): 433–444
- Xie C, Mao X, Huang J et al. (2011). KOBAS 2.0: a web server for annotation and identification of enriched pathways and diseases. *Nucleic Acids Res*, 39: W316–W322
- Yang J, Moeinzadeh MH, Kuhl H, et al (2017). Haplotype-re-

- solved sweet potato genome traces back its hexaploidization history. *Nat Plants*, 3: 696–703
- Yeh KW, Chen JC, Lin MI, et al (1997). Functional activity of sporamin from sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.): a tuber storage protein with trypsin inhibitory activity. *Plant Mol Bio*, 33: 565–570
- Zhang L, Wang Q, Liu Q, et al (2009). Sweetpotato in China. In: Loebenstein G, Thottappilly G (eds). *The Sweetpotato*. Dordrecht: Springer Press, 325–358
- Zhang L, Zhang F, Melotto M, et al (2017). Jasmonate signaling and manipulation by pathogens and insects. *J Exp Bot*, 68: 1371–1385

Transcriptomic analysis of the sweetpotato ‘Guangshu 87’ under the feeding treatment by weevil

RAO Shunfa^{1,2}, LIU Xu², LIAO Yinyin^{2,3}, WANG Yaru^{2,3}, ZHU Hongbo⁴, YANG Ziyin², HU Bo^{1,*}, HOU Xingliang^{2,*}

¹Guangdong Provincial Key Laboratory of Biotechnology for Plant Development, School of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China

²Key Laboratory of South China Agricultural Plant Molecular Analysis and Genetic Improvement & Guangdong Provincial Key Laboratory of Applied Botany, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China

³University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

⁴Binhai Agricultural College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524088, China

Abstract: Sweetpotato (*Ipomoea batatas*) is an important crop worldwide, but usually subject to infestation from weevil (*Cylas formicarius*) in South China, the main producing area of sweetpotato. Given this situation, it is worth to investigate the gene resources of weevil-resistance and resistance mechanism in sweetpotato. In this study, based on the relationship between the weevil feeding time and injury degree of ‘Guangshu 87’ (G87), a major sweetpotato cultivar in Guangdong Province, transcriptomic analyses in the leaves and storage roots of G87 were conducted under feeding treatment by weevil for 4 h, then 1 395 and 1 176 of different expression genes (DEGs) were obtained respectively, most of which belong to substance metabolism and transcription signaling pathways. Besides, we selected and verified several potential sweetpotato weevil-resistance genes, relating to methyl salicylate metabolism, trypsin inhibitor, transcription regulatory factor and sweetpotato storage protein, and some of them showed tissue-specific expression patterns. These results will contribute to the function research of the weevil-resistance genes from sweetpotato, make our data available for the understanding of the molecular mechanism in sweetpotato resistance to weevil, and provide theory instructions for sweetpotato insect-resistant molecular breeding and relevant agricultural technique application.

Key words: sweetpotato; ‘Guangshu 87’; weevil; transcriptome; resistance gene

Received 2020-03-05 Accepted 2020-03-25

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (U1701234) and the Guangzhou Science and Technology Plan Project (201804010158).

*Co-corresponding authors: Hu B (hubo0610@126.com), Hou XL (houxl@scib.ac.cn).