参赛队员姓名：付子睿，王子

中学：北京市十一学校

省份：北京

国家/地区：北京

指导教师姓名：窦向梅

指导教师单位：北京市十一学校

论文题目：亚致死杀虫剂胁迫下豆蚜性别分化和繁殖行为研究

2021 S.-T. Yau High School Science Award

本参赛团队郑重声明：

1. 参赛团队提交的参赛队员和指导老师信息完整且属实无误。

2. 所提交的研究报告是在指导老师指导下进行的研究工作和取得的研究成果。

3. 本团队严格遵循实验室安全及相关生物技术、伦理道德规范要求。实验过程中对生物实验体进行了合规培养，也对实验用品、实验废物进行了妥善处理。

4. 尽本团队所知，除文中加以标注和致谢中所罗列的内容外，研究中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，不存在代写或其他违规行为。

以上，若有不实之处，团队愿意承担一切相关责任，并服从丘成桐中学科学奖组织委员会的裁决。

2021 S.-T. Yau High School Science Award

摘要

筛选不同浓度 1.8%阿维菌素并构建逆境亚致死环境，观察 LC10 和 LC20 浓度处理后三零期豆蚜产生雄蚜个数与有性生殖倾向。提取实验体蚜虫 RNA，用 GO、KEGG 数据库分析基因表达量出现变化的通路，发现 SNP 突变位点、分析可变剪接基因。从生物学、分子生物学多角度明确亚致死杀虫剂胁迫下豆蚜性别分化趋势和繁殖行为倾向。挑战传统防治理论，提出保持豆蚜孤雌行为才是未来防治工作关键的新观点。为未来学者利用 DSRNA 干扰技术制作新型农药提供了理论基础。

关键词：豆蚜孤雌行为，性别分化，亚致死，GO、KEGG 分析，DSRNA 干扰技术

2021 S.-T. Yau High School Science Award

目录

引言 6

第一章 实验研究背景、基本原理与目的 8

1.实验研究背景 8

1.1 豆蚜的孤雌伴两性生殖 8

1.2 实验所需基本原理 8

1.3 实验目的 9

第二章 阿维菌素对豆蚜的毒力测定及亚致死剂量的确定 10

1. 材料与方法 10

1.1 供试昆虫 10

1.2 供试药剂和器材 10

1.3 阿维菌素对豆蚜的室内毒力测定 10

2. 结果与分析 12

2.1 阿维菌素对豆蚜的毒力测定结果 12

第三章 亚致死剂量阿维菌素对豆蚜胁迫下的翅型和性别分化特点 13

1. 材料与方法 13

1.1 供试昆虫 13

1.2 供试药剂和器材 13

1.3 亚致死浓度阿维菌素处理豆蚜 13

2. 结果与分析 14

2.1 阿维菌素处理后蚜虫的存活状况 14

2.2 阿维菌素处理后蚜虫的翅型分化情况 14

2.3 阿维菌素处理后蚜虫性别分化情况 15

第四章 亚致死剂量阿维菌素对豆蚜胁迫下的机制研究 16

1. 材料与方法 16

1.1 供试昆虫 16

1.2 供试药剂和器材 16

1.3 亚致死浓度阿维菌素处理豆蚜 16

1.4 总 RNA 提取 16

2. 结果与分析 17

2.1 数据质量检测 17

2.2 PCA 数据分析 18

2.3 表达定量分析 19

2.4 GO 分析 21

2.5 KEGG 数据分析 31

2.6 SNP 突变位点分析 34

2.7 可变剪接分析 35

讨论 36

REFERENCE 38

2021 S.T. Yau High School Science Award

选题灵感来源.....39
团队分工.....40
答谢.....41

2021 S.-T. Yau High School Science Award

引言

孤雌生殖(parthenogenesis)也称单性生殖，即卵不经过受精也能发育成功能正常的新个体。相较于有性生殖，具有耗能低、效率高的繁殖优势。

豆蚜作为一类重要的农林害虫，其具有孤雌伴两性交替的繁殖特征。蚜虫通过孤雌生殖迅速扩大种群，通过两性生殖扩大种群基因池。这样独特的生殖方式成为困扰农业工作者的难题。

在实际生产中，农药造成的选择压力会给蚜虫种群的性别分化、繁殖行为和基因表达造成什么样的影响成为了需要解决的生物学问题。

传统防治思路是建立在“蚜虫主要进行孤雌生殖，只在每年特定繁殖时期中频繁进行有性生殖”的理论基础上。所以将防治重点放在了抑制蚜虫孤雌行为的措施上。【9】现有研究表明，蚜虫的性别分化和繁殖策略与其对环境的适应程度有关。这说明传统防治思路没有充分考虑到在实际生产中，农民一年中多次播撒农药对蚜虫繁殖倾向与种群进化的影响【8】。

本研究则选择通过以下两部分实验，明确在农业毒理逆境下，蚜虫的繁殖策略转化及所带来的影响：

第一部分：生物观察实验

实验一，以 1.8%阿维菌素构建毒理逆境处理豆蚜，建立毒力回归方程，筛选亚致死浓度

实验二，观察不同浓度农药处理后，豆蚜种群的性别分化情况和繁殖行为倾向

（在本实验中，研究人员改进了判断蚜虫性别的方法，通过多点位全方面的生理结构更精准地判断雄性个体数量，并非像过去实验中仅依靠有无翅膀来判断性别。）

第二部分：基因数据分析

实验三，提取不同浓度农药处理后的豆蚜 mRNA，检测并分析染色体减数分裂、翅膀合成、解毒代谢、迁徙冲动等基因通路基因表达量的变化。

2021 S.T. Yau High School Science Award

第一部分实验结果证明，蚜虫种群因外界生存压力增大而分化出更多雄（有翅）蚜，并倾向进行两性生殖。受到农药打击的豆蚜利用有性生殖产生的多样个体“保存火种”，并通过孤雌生殖达成迅速“灾后重建”的目的。

第二部分实验结果证明，除可以直接观察到的有性生殖倾向增加外，蚜虫的基因表达出现了明显变化。DNA 更加复杂、雌性体内细胞开始减数分裂、树突轴突神经变长、分化翅膀所需几丁质合成增加，荷尔蒙催产素增加，迁徙冲动增加。上述相关基因通路存在大量交集基因，各通路之间有明显相互作用。

通过以上实验及分析结果，团队认为抑制蚜虫的有性生殖，利用其孤雌行为结果下稳定的基因库，把害虫自身的生殖优势作为防治它的武器才是未来防治工作的关键。设想以全新的角度看待孤雌生殖，挑战了传统防治理论。为农林害虫防治研究提供了新的、科学的、可持续的思路。

未来实验中，可以将敲除翅型、性别分化基因的个体放归种群，使野生蚜虫无法自然产生雄性有翅蚜，在环境适应的情况下，只进行孤雌行为降低种群的适应能力。以此控制种群基因池，降低基因突变概率，减小种群对农药的抗性。或者利用 DSRNA 基因干扰技术，设计特定农药，在 RNA 转录过程中切断解毒酶，多巴胺等蛋白质合成通路，从而降低蚜虫两性交配概率，最终显著降低蚜虫对农药的抗性。

2021 S.-T. Yau High School Science Award

第一章 实验研究背景、基本原理与目的

1.实验研究背景

1.1 豆蚜的孤雌伴两性生殖

豆蚜在适宜的环境条件下，每头雌蚜寿命可长达 10 天以上，平均胎生若蚜 100 多头。新生的雌蚜可继续进行孤雌生殖。蚜虫的卵形成极早，当它本身还孕育在上一代母体内为幼胚时就已在自己幼胚的卵巢管内，卵母细胞成熟进行分裂，以准备形成下一代卵细胞了。【1】这种繁殖方式犹如复制粘贴，在保存适应环境（fitness）性状（trait）的同时快速增长数量，非常高效。经孤雌生殖产生的子代具有和母体基本相同的基因组成，为避免歧义，下文统称孤雌行为产生的后代为类克隆体。类克隆体若虫进入 3 零期后会根据环境产生翅型和性别分化【6】。分化出的雄性（多为有翅蚜），可以和雌性交配进行有性生殖。豆蚜全年有 2 个繁殖高峰期，春季 5—6 月、秋季 10—11 月。

有性生殖产生的个体经过减数分裂、有丝分裂，经历了染色体交换（crossing over）的过程，产生了和亲代不同的基因。

1.2 实验基本原理

1.2.1 判断蚜虫性别的方法

与雌性相比，雄性蚜虫体型纤细，在触角 III 和 IV 节上有大量的毛，尾部较短，腹部有明显的硬化和硬化的生殖器结构。雄性，有翅或无翅，相比雌性体型较小。【1】

（图左，雄性；图右，雌性）

2021 C-T. Yau High School Science Award

1.2.2 判断蚜虫龄期的基本方法【2】

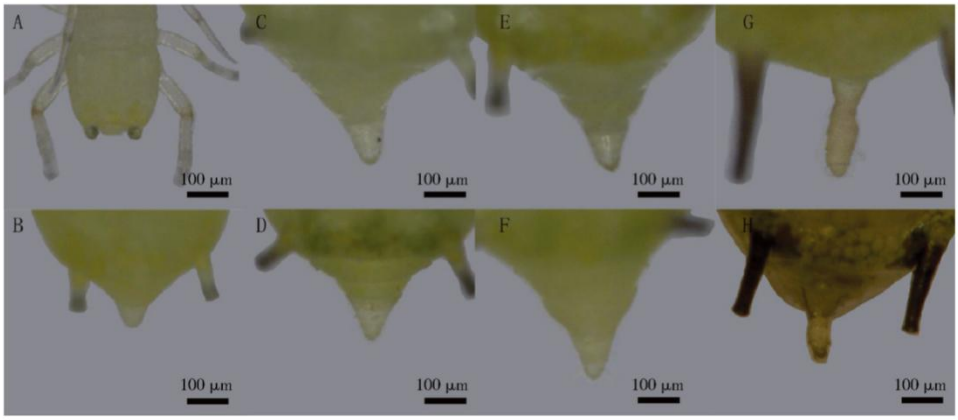


表 1　无翅型和有翅型大豆蚜各龄期形态测量特征比较

Table 1　Comparison of morphometric characteristics among different instars of wingless and winged *Aphis glycines*

翅型 Wing morph	形态测量特征(mm) Morphometric characteristics		龄期 Instars 1 龄若蚜 1st instar nymph	2 龄若蚜 2nd instar nymph	3 龄若蚜 3rd instar nymph	4 龄若蚜 4th instar nymph	成蚜 Adult
无翅型 Wingless	体长 Body length	平均值 Mean	0.565 ± 0.013 e	0.814 ± 0.014 d	1.081 ± 0.030 c	1.231 ± 0.019 b	1.313 ± 0.016 a
		变化幅度 Range	0.443 – 0.703	0.709 – 1.135	0.810 – 1.415	1.029 – 1.438	1.103 – 1.453
	体宽 Body width	平均值 Mean	0.286 ± 0.008 e	0.412 ± 0.008 d	0.585 ± 0.013 c	0.667 ± 0.010 b	0.757 ± 0.013 a
		变化幅度 Range	0.205 – 0.388	0.338 – 0.541	0.443 – 0.720	0.570 – 0.780	0.538 – 0.867
	头宽 Head width	平均值 Mean	0.186 ± 0.003 e	0.227 ± 0.003 d	0.247 ± 0.003 c	0.254 ± 0.002 b	0.271 ± 0.002 a
		变化幅度 Range	0.150 – 0.211	0.185 – 0.256	0.208 – 0.274	0.236 – 0.277	0.243 – 0.294
	触角长 Antenna length	平均值 Mean	0.339 ± 0.010 e	0.526 ± 0.015 d	0.698 ± 0.019 c	0.802 ± 0.014 b	1.042 ± 0.022 a
		变化幅度 Range	0.254 – 0.397	0.405 – 0.705	0.511 – 0.879	0.648 – 0.945	0.727 – 1.264
	腹管长 Cornicle length	平均值 Mean	0.048 ± 0.002 e	0.084 ± 0.004 d	0.137 ± 0.004 c	0.157 ± 0.004 b	0.257 ± 0.007 a
		变化幅度 Range	0.029 – 0.066	0.052 – 0.114	0.101 – 0.182	0.114 – 0.198	0.182 – 0.321
	尾片长 Cauda length	平均值 Mean	0.028 ± 0.001 e	0.047 ± 0.001 d	0.079 ± 0.003 c	0.096 ± 0.002 b	0.174 ± 0.004 a
		变化幅度 Range	0.011 – 0.034	0.034 – 0.057	0.059 – 0.100	0.078 – 0.111	0.130 – 0.217
	后足胫节长 Hind tibia length	平均值 Mean	0.227 ± 0.003 e	0.304 ± 0.006 d	0.457 ± 0.005 c	0.564 ± 0.005 b	0.746 ± 0.006 a
		变化幅度 Range	0.199 – 0.255	0.259 – 0.351	0.417 – 0.505	0.508 – 0.605	0.716 – 0.828
有翅型 Winged	体长 Body length	平均值 Mean	0.565 ± 0.013 d	0.814 ± 0.014 c	1.046 ± 0.016 b	1.336 ± 0.025 a	1.327 ± 0.017 a
		变化幅度 Range	0.443 – 0.703	0.709 – 0.935	0.939 – 1.166	1.176 – 1.582	1.155 – 1.527
	体宽 Body width	平均值 Mean	0.286 ± 0.008 d	0.412 ± 0.008 c	0.507 ± 0.010 b	0.644 ± 0.009 a	0.624 ± 0.007 a
		变化幅度 Range	0.205 – 0.388	0.338 – 0.541	0.392 – 0.640	0.560 – 0.738	0.546 – 0.724
	头宽 Head width	平均值 Mean	0.186 ± 0.003 e	0.227 ± 0.003 d	0.251 ± 0.002 c	0.275 ± 0.002 a	0.258 ± 0.002 b
		变化幅度 Range	0.150 – 0.211	0.185 – 0.256	0.226 – 0.278	0.246 – 0.298	0.240 – 0.290
	触角长 Antenna length	平均值 Mean	0.339 ± 0.010 e	0.526 ± 0.015 d	0.672 ± 0.008 c	0.926 ± 0.012 b	1.165 ± 0.018 a
		变化幅度 Range	0.254 – 0.397	0.405 – 0.705	0.585 – 0.773	0.793 – 1.030	1.036 – 1.374
	腹管长 Cornicle length	平均值 Mean	0.048 ± 0.002 e	0.084 ± 0.004 d	0.119 ± 0.002 c	0.171 ± 0.003 b	0.198 ± 0.003 a
		变化幅度 Range	0.029 – 0.066	0.052 – 0.114	0.095 – 0.141	0.147 – 0.209	0.167 – 0.230
	尾片长 Cauda length	平均值 Mean	0.028 ± 0.001 e	0.047 ± 0.001 d	0.061 ± 0.001 c	0.087 ± 0.001 b	0.125 ± 0.002 a
		变化幅度 Range	0.011 – 0.034	0.034 – 0.057	0.048 – 0.068	0.070 – 0.091	0.109 – 0.147
	后足胫节长 Hind tibia length	平均值 Mean	0.227 ± 0.003 e	0.304 ± 0.006 d	0.500 ± 0.006 c	0.574 ± 0.005 b	0.791 ± 0.010 a
		变化幅度 Range	0.199 – 0.255	0.259 – 0.351	0.425 – 0.542	0.547 – 0.620	0.735 – 0.871

表中数据为平均值 ± 标准误;表中同行数据后不同字母表示经 LSD 多重比较差异显著($P < 0.05$)。Data in the table are means ± *SE*. Different letters following the data within a row indicate significant difference ($P < 0.05$) by LSD multiple range test.

1.3 实验目的

探究在逆境环境中豆蚜的性别分化与生殖策略倾向；寻找基因表达量存在变化的通路；明确保持孤雌行为不利于害虫种群延续，可以作为未来防治工作的重心。

第二章 阿维菌素对豆蚜的毒力测定及亚致死剂量的确定

1. 材料与方法

1.1 供试昆虫

豆蚜（*Aphis craccivora* Koch）由北京市农林科学院植物保护研究所提供（xiao et al., 2020），在 35 cm × 40 cm × 50 cm 养虫笼内使用蚕豆苗饲养，养虫室气候由自动化控制，条件为温度（25±1）℃，相对湿度 65%±5%，光周期 16L：8D。期间不接触任何农药，在养虫室形成稳定种群备用。

1.2 供试药剂和器材

1.8 %乳油阿维菌素为河北威远生物化工有限公司产品，人工气候箱，电子天平，纱布，量筒，容量瓶，移液枪，培养皿，滤纸，镊子，毛笔。

1.3 阿维菌素对豆蚜的室内毒力测定

采用带虫叶片浸渍法测定阿维菌素对豆蚜成虫的毒力。将所选药剂稀释为 5 个浓度梯度，

2021 S.-T. Yau Science Award

阿维菌素依次为 1，0.5，0.25，0.125 和 0.0625mg/L。将带有无翅型若蚜的蚕豆叶片在阿维菌素药剂的各浓度中浸渍 5s 后取出，置于有保湿滤纸的培养皿中，让其自然风干，然后置于条件为(22-24)℃，光照周期 L:D=16h:8h，相对湿度 RH70%-80%的培养箱中，24h 后统计蚜虫死亡情况，死亡标准为用毛笔轻触其腹部，足不动者视为死亡。每种药剂浓度处理 20 头，重复 3 次，以清水作为对照。【3】

所用数据均在 Excel 中统计整理，用 SPSS26.0 计算毒力回归方程和 LC50，LC20 及 LC10 值；用 F 检验判定毒力回归方程线性关系；用卡方检验评价毒力回归方程与 LC 50 可靠性。

Confidence Limits

	Probability	95% Confidence Limits for C			95% Confidence Limits for log(C)[a]		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
LOGIT	.010	.047	.014	.083	-1.330	-1.859	-1.079
	.020	.063	.022	.104	-1.202	-1.658	-.983
	.030	.075	.029	.119	-1.126	-1.539	-.926
	.040	.085	.035	.130	-1.072	-1.455	-.884
	.050	.093	.041	.141	-1.030	-1.388	-.852
	.060	.101	.046	.150	-.994	-1.334	-.825
	.070	.109	.052	.158	-.964	-1.288	-.801
	.080	.115	.057	.166	-.938	-1.247	-.781
	.090	.122	.062	.173	-.915	-1.211	-.762
	.100	.128	.066	.180	-.893	-1.179	-.746
	.150	.155	.089	.210	-.809	-1.051	-.678
	.200	.180	.111	.237	-.746	-.956	-.625
	.250	.203	.132	.263	-.693	-.879	-.580
	.300	.225	.153	.289	-.648	-.814	-.539
	.350	.248	.175	.316	-.606	-.757	-.500
	.400	.271	.198	.345	-.567	-.704	-.462
	.450	.295	.221	.377	-.530	-.656	-.423
	.500	.321	.245	.413	-.493	-.611	-.384
	.550	.349	.270	.455	-.457	-.568	-.342
	.600	.381	.297	.505	-.419	-.527	-.297
	.650	.417	.327	.566	-.380	-.486	-.247
	.700	.458	.360	.642	-.339	-.444	-.192
	.750	.509	.397	.742	-.293	-.401	-.129
	.800	.575	.443	.882	-.241	-.354	-.055
	.850	.665	.502	1.092	-.177	-.299	.038
	.900	.807	.589	1.460	-.093	-.230	.164
	.910	.848	.612	1.573	-.072	-.213	.197
	.920	.895	.639	1.708	-.048	-.194	.232
	.930	.951	.671	1.873	-.022	-.173	.273
	.940	1.019	.708	2.083	.008	-.150	.319
	.950	1.105	.754	2.360	.043	-.122	.373
	.960	1.218	.814	2.747	.086	-.090	.439
	.970	1.381	.896	3.336	.140	-.048	.523
	.980	1.644	1.023	4.380	.216	.010	.642
	.990	2.208	1.277	6.958	.344	.106	.842

2021 S.T School Science Award

2. 结果与分析

2.1 阿维菌素对豆蚜的毒力测定结果

1.8 %乳油阿维菌素配制成 1，0.5，0.25，0.125 和 0.0625 mg/L 浓度的药剂处理豆蚜的无翅若蚜，根据各处理死亡虫口数，毒力回归方程存在极显著的线性关系（图 1），LC 50 值为 0.321mg/L。根据 SPSS 分析计算结果，选用 LC 20 和 LC 10 作为亚致死浓度，对应的浓度为 0.180 mg/L 和 0.128 mg/L（表 1）。

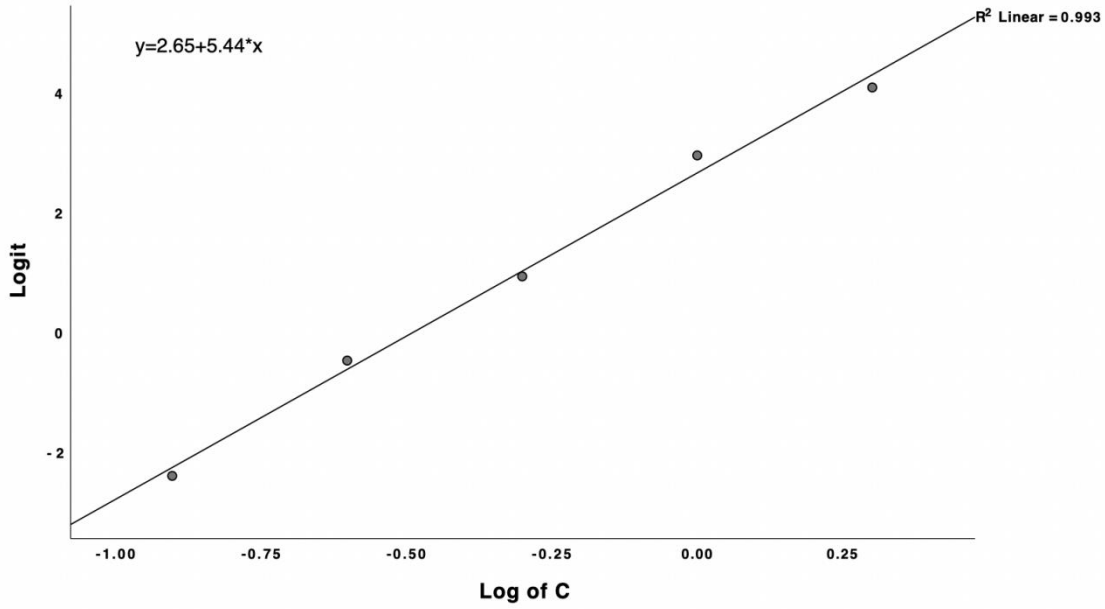


图 1. 1.8 %乳油阿维菌素对豆蚜的毒立测定结果

Figure 1. Determination toxicity of 1.8 % abamectin to *Aphis craccivora*

表 1. 阿维菌素对豆蚜的毒力测定结果

Table 1. Determination of the toxicity of abamectin to *Aphis craccivora*

毒力方程 LC-P Line	相关系数 Correlation coefficient	X^2	LC50 (mg/L) (95%CL)	LC20 (mg/L) (95%CL)	LC10 (mg/L) (95%CL)
$Y = 5.44x + 2.65$	0.993	0.249	0.321 (0.245 - 0.413)	0.180 (0.111 - 0.237)	0.128 (0.066 - 0.180)

注：表中缩写 CL 表示置信区间。

Note: The CL indicated Confidence interval.

2021 S.T. Yau ... e Award

第三章 亚致死剂量阿维菌素对豆蚜胁迫下的翅型和性别分化特点

1. 材料与方法

1.1 供试昆虫

同第二章 1.1

1.2 供试药剂和器材

同第二章 1.2

1.3 亚致死浓度阿维菌素处理豆蚜

根据第二章实验结果，取 LC10 对应浓度 0.128 mg/L 的阿维菌素处理豆蚜，记做 team-1 和 LC20 对应浓度 0.180 mg/L 的阿维菌素处理豆蚜，计作 team-2，对照用清水处理，计作 Control。均采用带虫浸叶法（同第一章中的处理方法），每个处理 60 头三龄期蚜虫，3 个重复。三个处理统一放置 24h 后，观察记录蚜虫存活和翅型分化情况，统计制表。【4】

2021 S.T. School Science Award

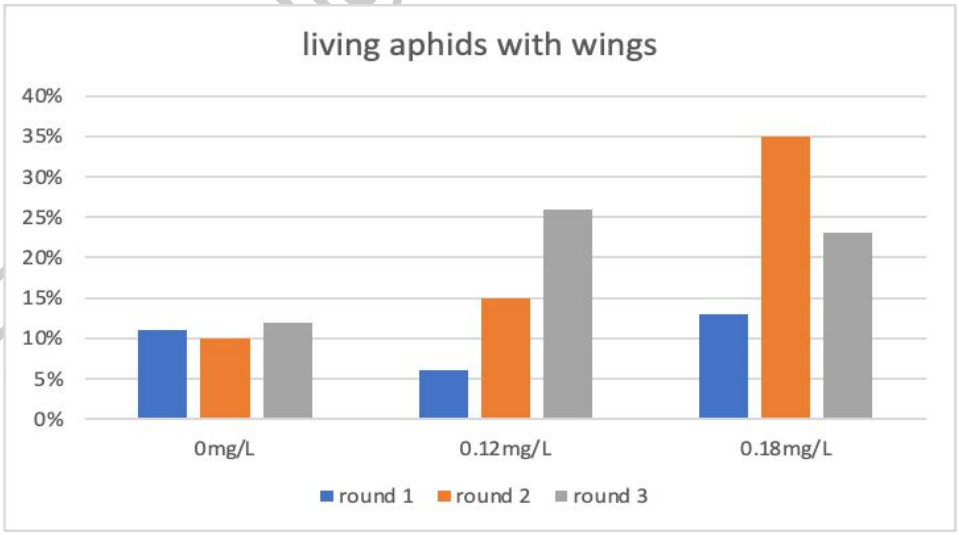
2. 结果与分析

2.1 阿维菌素处理后蚜虫的存活状况

Experiment 2				
	concentration mg/L	0.00	0.12	0.18
	estimate living aphids	60	54	48
	estimate dead rate	0%	10%	20%
actual living aphids	trial 1	53	32	25
	rate	88%	53%	42%
	trial 2	48	25	24
	rate	80%	42%	40%
	trial 3	46	28	19
	rate	77%	47%	32%

毒力回归方程的死亡比例和数量预测和实验数据差异较明显，主要归咎于龄期。毒力回归方程中使用豆蚜为若虫，而本实验中具体使用三龄期豆蚜。豆蚜在三龄期之后逐渐分化为有翅蚜和无翅蚜。农药浓度和存活率存在显著线性关系。

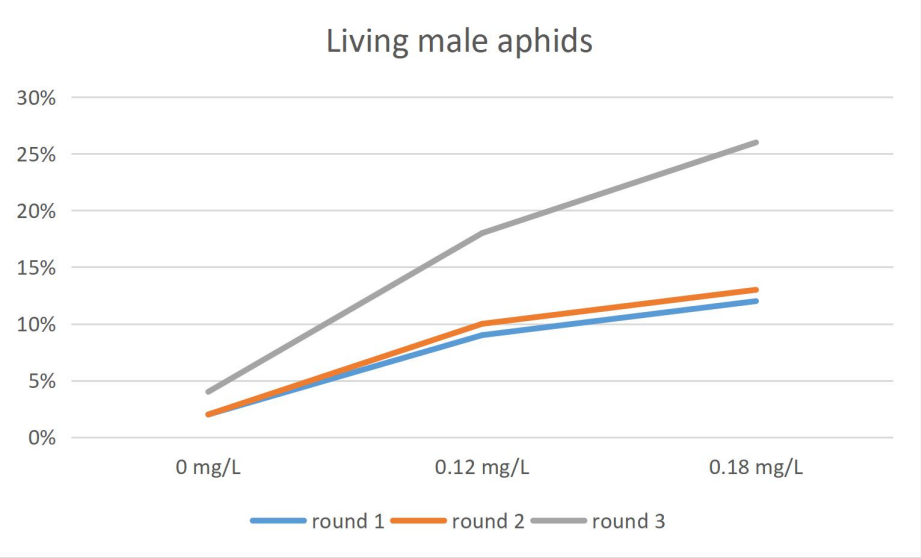
2.2 阿维菌素处理后蚜虫的翅型分化情况



三轮实验中，对照组和实验组翅型分化差异明显。逆境环境下存活的蚜虫约 20%为有翅蚜。适宜环境下约 10%为有翅蚜。两种梯度农药对比中，有翅蚜占比无明显差异。

2021 S.T... High School Sci... Award

2. 3 阿维菌素处理后蚜虫性别分化情况



随着农药浓度增加，雄性豆蚜数量占比逐渐增多。农药浓度和种群中雄性占比呈现明显线性关系。

2021 S.-T. Yau High School

第四章 亚致死剂量阿维菌素对豆蚜胁迫下的机制研究

1. 材料与方法

1.1 供试昆虫

同第二章 1.1

1.2 供试药剂和器材

组织匀浆器、高速冷冻离心机（Eppendorf）、Power/PAC3000 型电泳仪（Bio-Rad Laboratories, Inc.）、Nanodrop one 分光光度计（Thermo Fisher Scientific Inc.）、TRIzol 试剂（Invitrogen Inc. USA）、氯仿、异丙醇、75%乙醇（无酶无菌水配置），RNase-free water

1.3 亚致死浓度阿维菌素处理豆蚜

根据第二章试验结果，取 LC10 对应浓度 0.128 mg/L 的阿维菌素处理豆蚜，计作 Treat_0.12 和 LC20 对应浓度 0.180 mg/L 的阿维菌素处理豆蚜，计作 Treat_0.20，对照用清水处理，计作 Control。均采用带虫浸叶法，每个处理 50 头蚜虫，3 个重复。三个处理统一放置 24h 后，取存活的蚜虫提取 RNA 进行转录组测序分析。

1.4 总 RNA 提取

1） 每个处理取存活下的蚜虫，加 1 mL TRIzol 研磨 2min。

2） 室温孵育均质化样品 5 min 以完全分离核酸蛋白复合物。

3） 加入 0.2 mL 氯仿（氯仿：TRIzol = 1: 5），盖紧盖子，手持剧烈晃动 15 s.

4） 室温孵育 2-3 min 后离心，4℃, 12000×g 离心 15 min.

5） 取 1/3 ～1/2 上清液（水相）至新的离心管中。

6） 向装有上清液的新离心管中加入 0.5 mL 异丙醇（异丙醇：TRIzol = 1: 2），混匀。

7） 室温孵育 10min 后离心，4℃, 12000×g 离心 10 min，此时可见白色沉淀（或透明絮状物）。

8） 移除上清液，只留下 RNA 沉淀。

9） 使用 75%乙醇清洗沉淀，加入 1mL 75%乙醇（75%乙醇：TRIzol = 1: 1），轻微涡旋，4℃,

2021 S.T.Yau High School Science Award

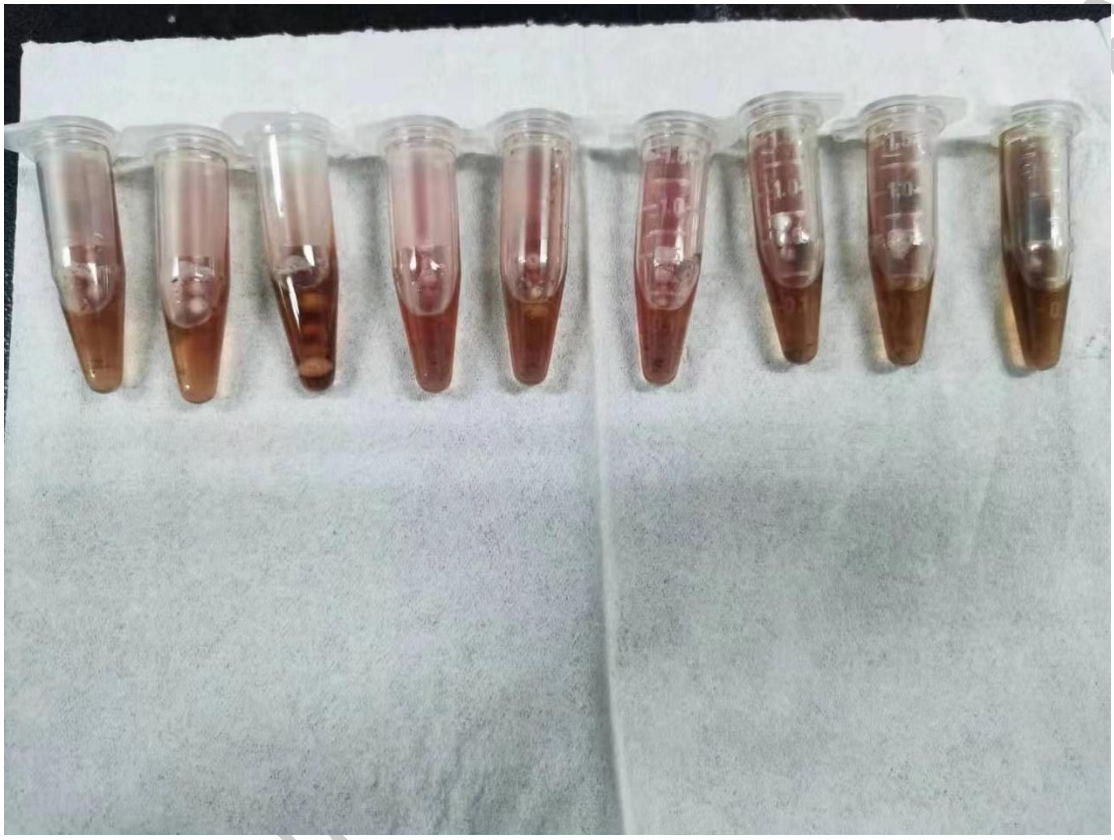
7500×g 离心 5min，弃漂洗液，重复步骤一次。

10）空气干燥沉淀 5-10min.

11）加入 30～50 μL RNase-free water 重悬浮沉淀。

12）56℃水浴 10 - 15 min.

进行后续实验或者存放于-80℃冰箱中。



2. 结果与分析

2.1 数据质量检测

对原始数据和过滤处理得到高质量的数据进行数据统计，得到数据基本信息。

2021 S.-T. Yau Award

表 1.1: cleandata 数据统计表

Sample	RawReads	RawBases	CleanReads	CleanBases	CleanRatio	Q20	Q30	GC
Control_1	37804558	5670683700	37362744	5507937238	98.83 %	97.61 %	93.38 %	41.38 %
Control_2	41874620	6281193000	41413034	6101682426	98.90 %	97.66 %	93.45 %	42.51 %
Control_3	40026232	6003934800	39545904	5847008791	98.80 %	97.68 %	93.52 %	42.21 %
Treat_0.12_1	44246656	6636998400	43603186	6228686283	98.55 %	97.25 %	92.62 %	49.60 %
Treat_0.12_2	39246250	5886937500	38715260	5775584046	98.65 %	97.67 %	93.49 %	43.57 %
Treat_0.12_3	37694056	5654108400	37175626	5550268393	98.62 %	97.67 %	93.51 %	43.64 %
Treat_0.20_1	36996160	5549424000	36491260	5441780997	98.64 %	97.63 %	93.46 %	44.85 %
Treat_0.20_2	39004276	5850641400	38439046	5737736279	98.55 %	97.65 %	93.45 %	45.12 %
Treat_0.20_3	38356334	5753450100	37877882	5656747742	98.75 %	97.73 %	93.68 %	45.52 %

统计说明:

Sample： 样品名称
Raw reads： 原始测序 reads 数量
Raw Bases： 原始测序数据的总碱基数
Clean reads： 将 Raw Reads 过滤得到的 reads 数量
Clean Bases： 过滤得到的数据的总碱基数
CleanRatio： clean reads 所占比例
Q20： 测序错误率小于 1% 的碱基数目占总碱基数比例
Q30： 测序错误率小于 0.1% 的碱基数目占总碱基数比例
GC content： 碱基 G 和 C 的数量占总的碱基数量的百分比

图表数据显示超过97%的碱基数目测序错误小于1%,超过93%的碱基数目测序错误小于0.1%。数据质量优良。

2.2 PCA 数据分析

在高通量在高通量测序的分析中,样品之间的关系由众多变量(基因的表达量,reads 的分布特征等)决定。主成分分析是设法将原来众多具有一定相关性的指标(reads 的分布特征)，重新 组合成一组新的互相无关的综合指标，从而降低问题的复杂性，来研究样品间的主成分关系。

二维 PCA 分析结果中，会展示主成分 1(PC1)和主成分 2(PC2)分别作为 X 轴和 Y 轴的散点图,每个点代表 1 个样本。图中,如果两个样本距离越远,则说明两个样本 reads 分布的差异越大。反之,则说明相应样本 reads 整体分布模式越接近。所以,PCA 分析常用 于评估样本重复性的好坏。理想情况下，生物学重复的样本应该聚类在一起，而处理组间应该可以清晰区分开。

2021 S.T. Yau High School Science Award

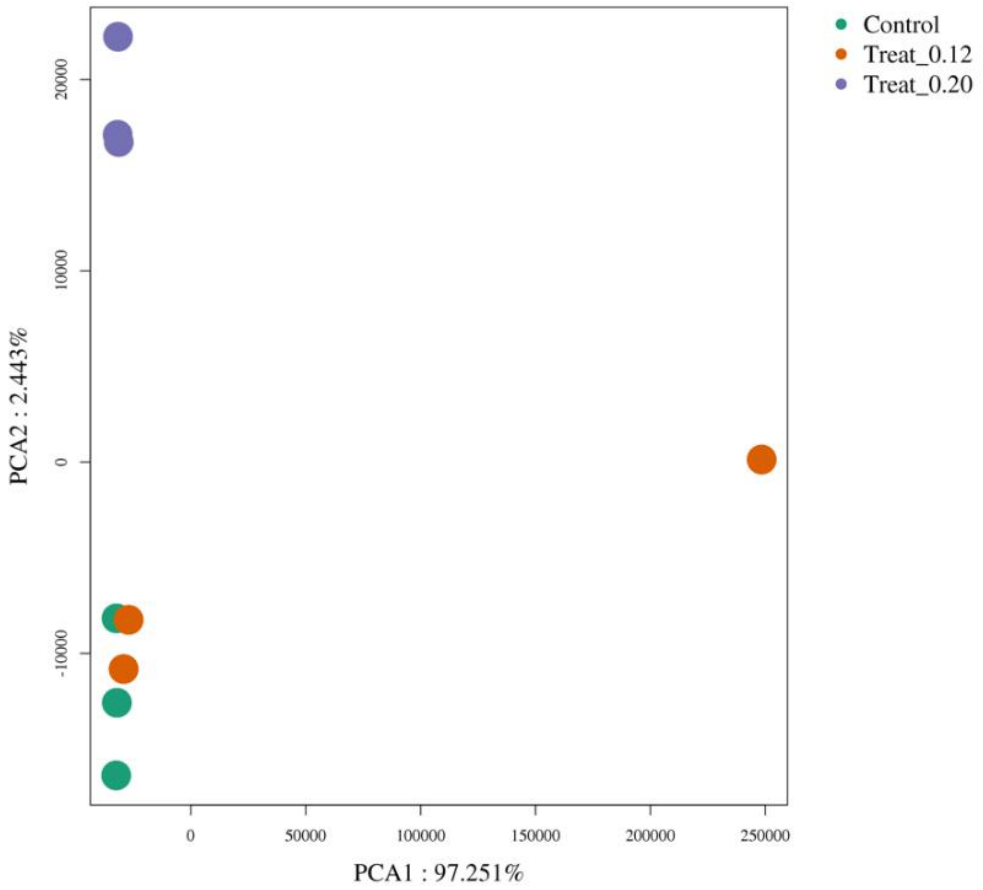


图 2.2: PCA 图

根据上图分析，实验结果基本符合预期，LC20 和 LC10 与对照组在表达量上具有比较明显的差异性。但是 LC10 与对照组之间差异不明显，可能是选用计量较小的缘故。

2.3 表达定量分析

在得到有效 reads 之后，我们使用 featureCounts 软件（version: v1.6.0）根据基因组的注释文件统计出 reads 落在基因上的数目，由于每个样本的测序量不一样，为了能横向比较同一基因不同样本间的表达量差异，我们需要对基因的 reads 数进行标准化，这里采用的标 准化方式为 FPKM(Fragments per kilobase of exon per million reads mapped)

$$FPKM = 10^9 \frac{C}{NL}$$

C：某一基因比对上的 Fragment 数目；N：所有比对上的 Fragment 数目；L：基因的长度

2021 S-T. Yau High... Award

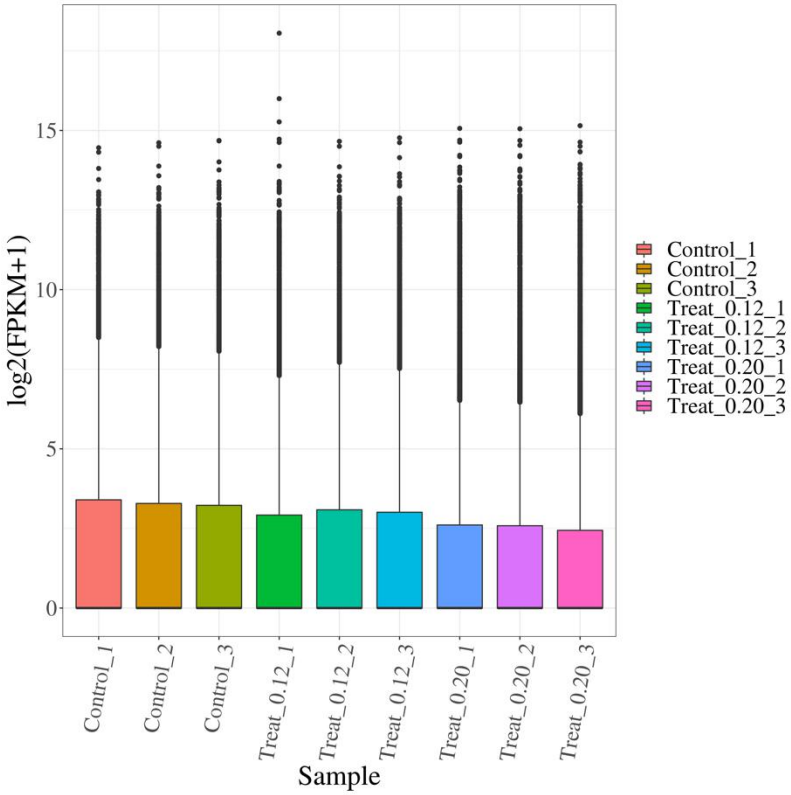


表 2.3: 表达定量结果表

Gene	Control_1	Control_2	Control_3	Treat_0.12_1	Treat_0.12_2	Treat_0.12_3
FWK35_00000243	35.71	37.09	33.36	35.50	45.93	49.98
FWK35_00000244	0.26	0.92	0.00	0.40	0.24	0.52
FWK35_00000245	24.93	27.37	22.67	26.87	37.34	55.42
FWK35_00000249	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
FWK35_00000250	0.07	0.00	0.00	1.01	0.14	0.07
FWK35_00000253	66.47	62.57	54.14	42.40	44.16	37.02
FWK35_00000254	297.61	273.32	272.28	228.04	295.32	263.42
FWK35_00000255	40.50	32.33	30.28	22.69	27.32	26.48
FWK35_00000256	0.00	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
FWK35_00000257	21.24	24.19	20.03	16.41	21.02	17.38
FWK35_00000258	310.41	292.49	292.76	281.38	275.77	270.63
FWK35_00000259	16.73	12.49	13.20	5.51	10.98	8.46

统计说明：

第一列是基因名称

第二列之后是每个样本的基因表达量（本表格中保留 3 位小数，且部分结果未展示，详细见结果文件）

注：由于页面展示有限，本表仅展示部分样本结果，全表请以结果表格为准

在实验处理的 32，006 个基因中，很多基因的表达量随农药处理浓度变化而相应上调或下降，（如箱线图所示）。因篇幅问题，无法展示所有结果，上表仅展示前十二个变化基因。在后文的 GO、KEGG 分析中，会选取实验所需基因进行重点分析。

2021 Science Award

2.4 GO 分析

将 GO 注释对应的 gene 数目进行富集分析，然后按照分子功能（Molecular Function）、细胞组分（Cellular Component）和生物学过程（Biological Process）分类绘图。按照矫正后 P 值 AdjustedPv<0.05，富集特征 EnrichDirect 为 Over 筛选出显著性富集结果。

ID	Description	GeneRatio	BgRatio	pvalue	p.adjust	qvalue	...	Count
GO:0000786	CC nucleosome	6/24	41/9139	0.000	0.000	0.000	...	6
GO:0035059	CC RCAF complex	5/24	19/9139	0.000	0.000	0.000	...	5
GO:0044815	CC DNA packaging complex	6/24	49/9139	0.000	0.000	0.000	...	6
GO:0016321	BP female meiosis chromosome s...	5/24	24/9139	0.000	0.000	0.000	...	5
GO:0032993	CC protein-DNA complex	6/24	109/9139	0.000	0.000	0.000	...	6
GO:0006334	BP nucleosome assembly	5/24	68/9139	0.000	0.000	0.000	...	5
GO:0007143	BP female meiotic nuclear divi...	5/24	82/9139	0.000	0.000	0.000	...	5
GO:0031497	BP chromatin assembly	5/24	93/9139	0.000	0.001	0.000	...	5
GO:0006333	BP chromatin assembly or disas...	5/24	111/9139	0.000	0.001	0.001	...	5
GO:0045132	BP meiotic chromosome segregat...	5/24	112/9139	0.000	0.001	0.001	...	5
GO:0034728	BP nucleosome organization	5/24	116/9139	0.000	0.001	0.001	...	5
GO:0003677	MF DNA binding	11/24	1099/9139	0.000	0.004	0.004	...	11

统计说明：

ID： GO ID

Description： GO ID 的描述

GeneRatio： 本次富集实验注释到该 GO 功能的基因数 / 本次富集实验注释到 GO 功能数据库的基因总数

BgRatio： 基因组中能注释到该 GO 功能的基因数 / 基因组中能注释到 GO 功能数据库的基因总数

pvalue： 富集 P value (本表格中保留 3 位小数，详细见结果文件)

p.adjust： 校正后的 P value (本表格中保留 3 位小数，详细见结果文件)

qvalue： 富集 Q value (本表格中保留 3 位小数，详细见结果文件)

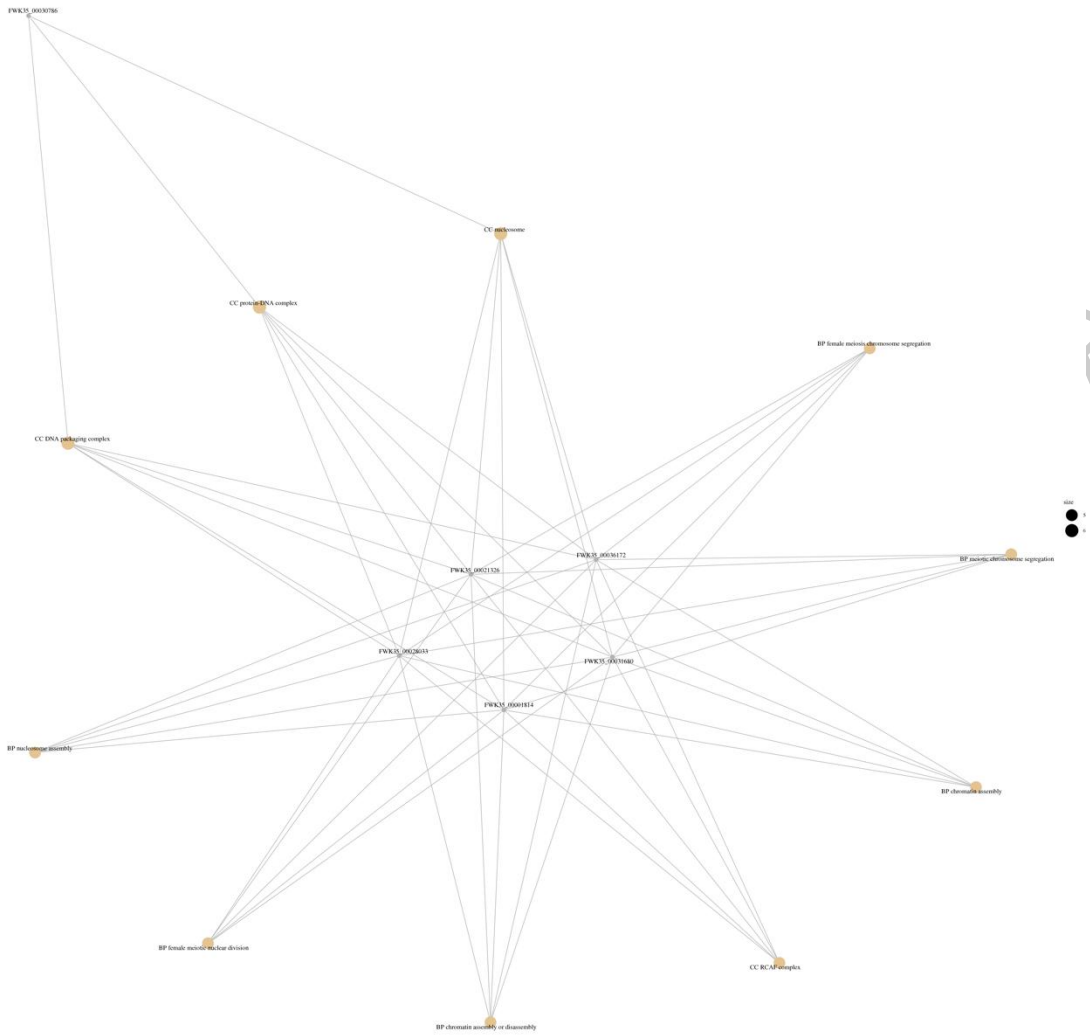
geneID： 富集的基因名称

Count： 富集的基因个数

2.4.1 差异基因的 GO 富集网络图

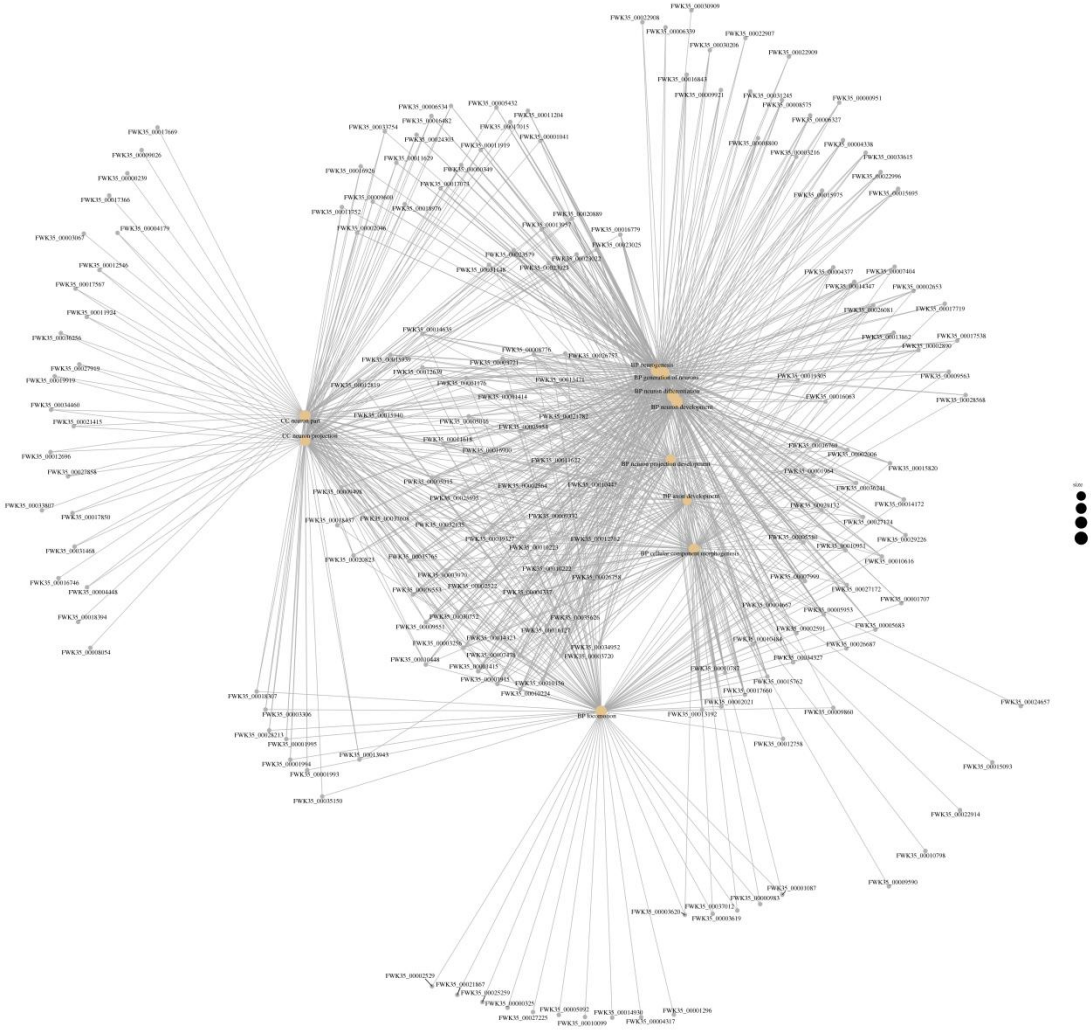
因蚜虫的单个基因可能对应上百种不同的基因通路，实验分析并不会针对单个基因进行分析。实验将选取变化最为显著的多个基因，绘制富集网络图，多个基因的焦点为它们共同对应的有关通路。通路所在焦点越密集，证明在数据中越重要。

2021 S.-T. Yau High School Science Award



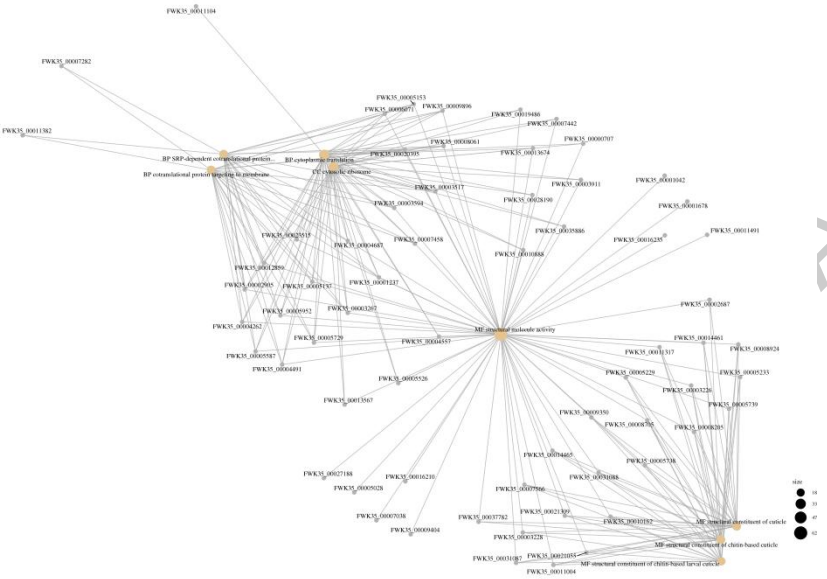
上图为 LC10 vs 对照组的上调表达。主要包括雌性减数分裂染色体分离（female meiosis chromosome segregation），DNA 包装（DNA packaging complex）等基因通路变化。探究其背后所对应的具体生理功能后发现，对比对照组，LC10 组中蚜虫的细胞分裂更加迅速，为有性生殖进行前期准备。

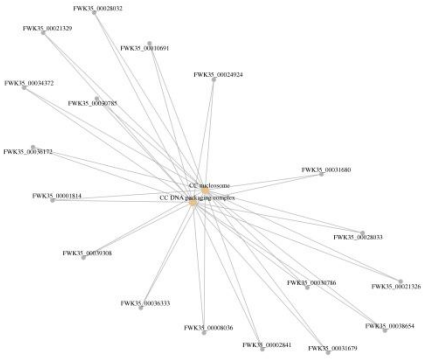
2021 S.-T. Yau



上图为 LC10 vs LC20 组的上调表达。主要包括树突轴突增加（neuron projection），轴突发展（axon development），神经形成（neurogenesis），迁徙冲动（locomotion），细胞形态发生（cellular morphogenesis）等基因通路变化。 探究其相关的具体生理功能发现，对比 LC10 组，LC20 组产生了更多的神经树突、轴突，以及更强的迁徙倾向。

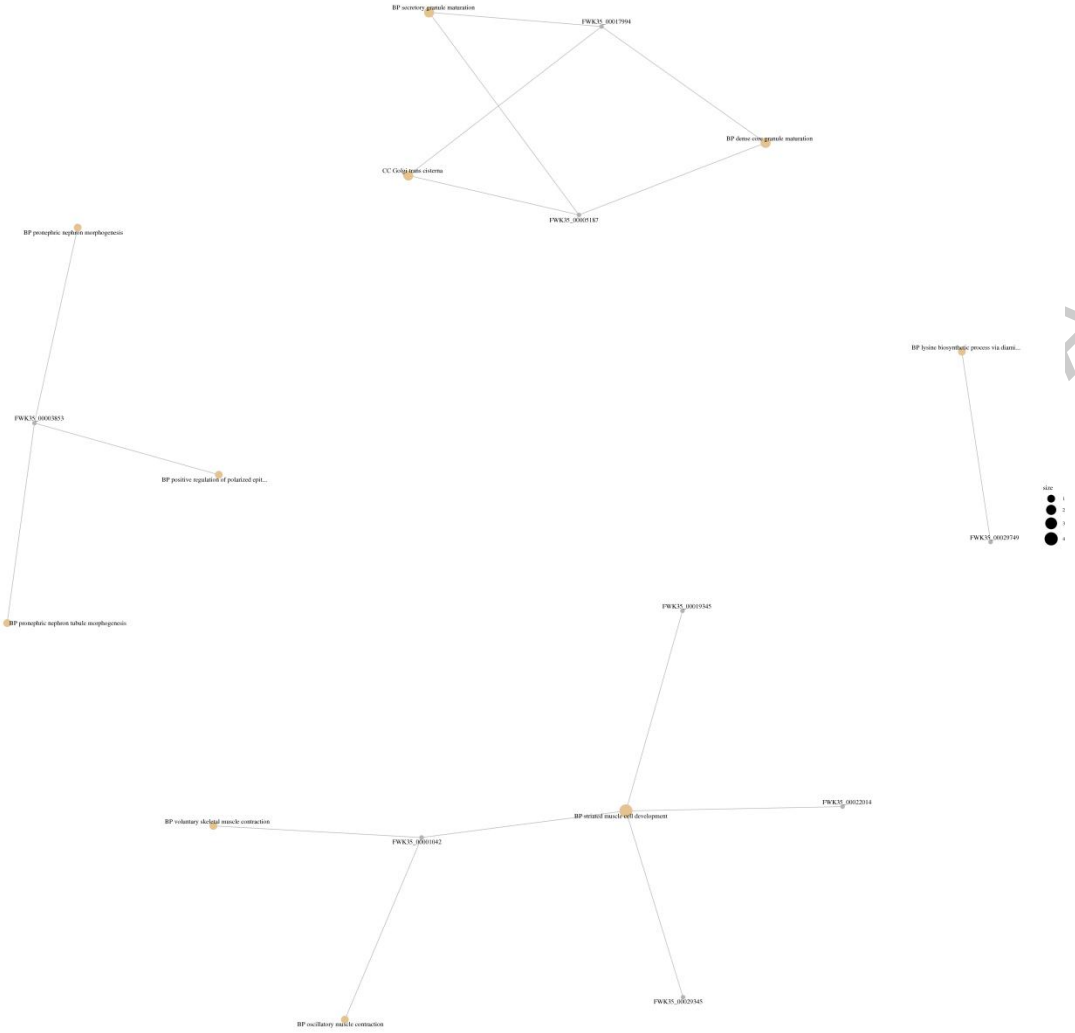
2021 S.-T. Yau





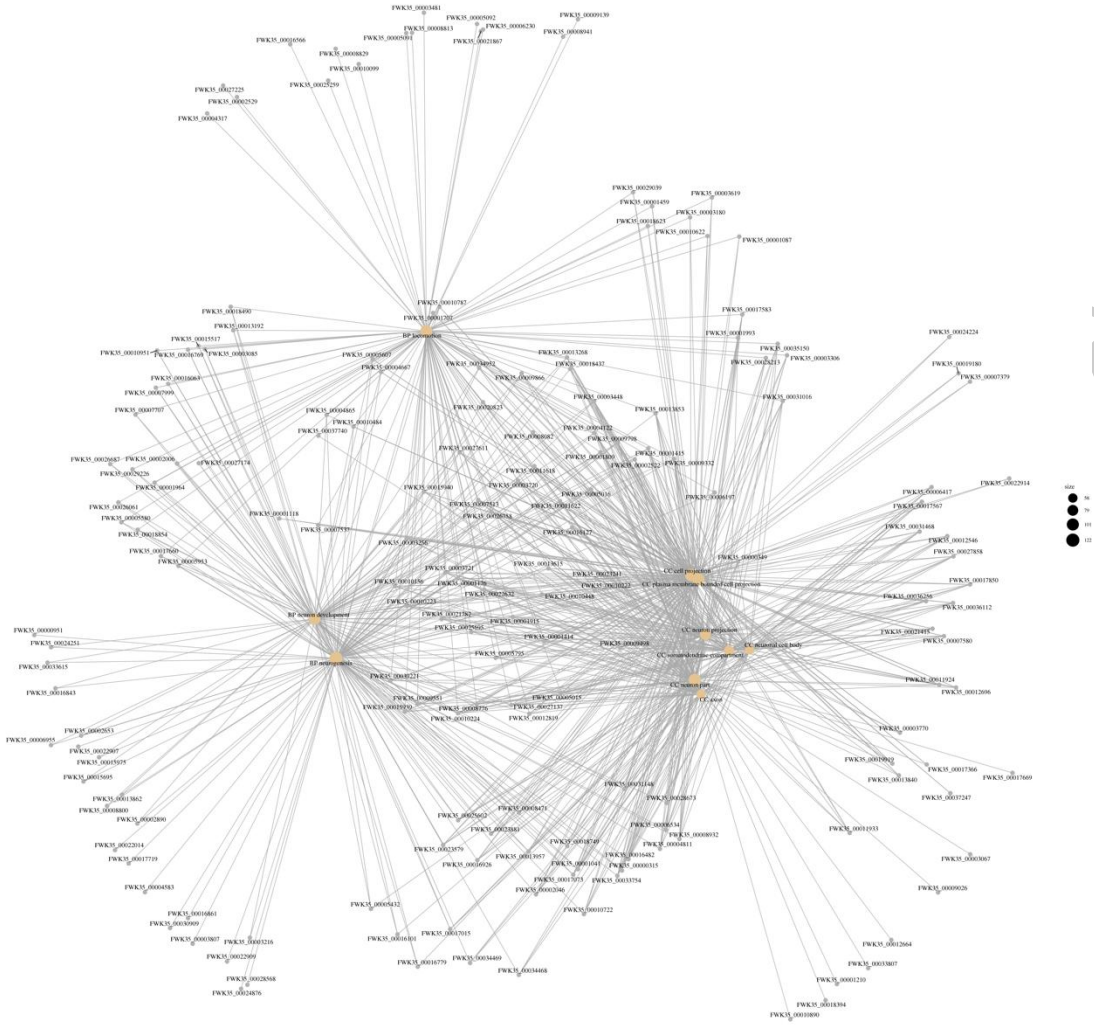
上图为 LC20 vs 对照组的上调表达。主要包括 DNA 包装/核小体相关（DNA packaging/nucleosome），细胞质中蛋白质生成（cytoplasmic translation），结构分子活性（structural molecule）等基因通路变化。探究其对应的具体生理功能发现，对比对照组，LC20 组产生了更频繁的细胞分裂，导致更快的新陈代谢，开始关注对细胞膜的建造。

2021 S.T.Yau Award



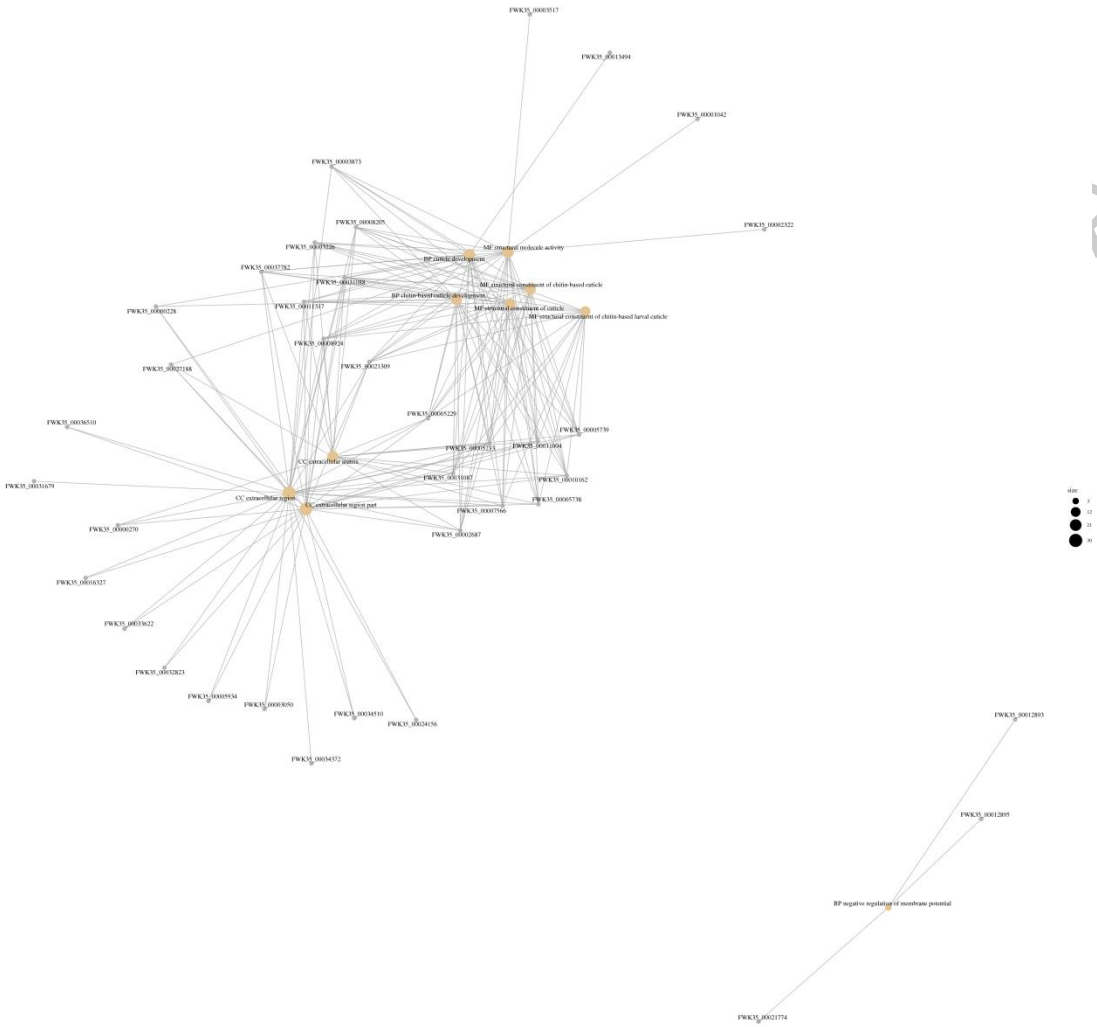
上图为 LC10 vs 对照组的下调表达。主要包括肌肉收缩（muscle contraction），赖氨酸（lysine），密集中心粒成熟（dense core granule maturation）等基因通路。探究其所对应的具体功能表明，对比对照组，LC10 组面对农药环境有更多的机体反应和荷尔蒙分泌，使昆虫产生性冲动，刺激有性生殖发生。

2021 S.T. Yau ... Award



上图为 LC20 vs 对照组的下调表达。主要包括迁徙冲动（locomotion），神经发育（neuron development）等基因通路变化。探究其对应的具体生理功能发现，对比对照组，LC20 组有更强的迁徙倾向，促使蚜虫进行翅型分化离开原栖息地。此外，LC20 组的神经分化也有显著提高，可以解读为蚜虫对外界的感知能力变强。

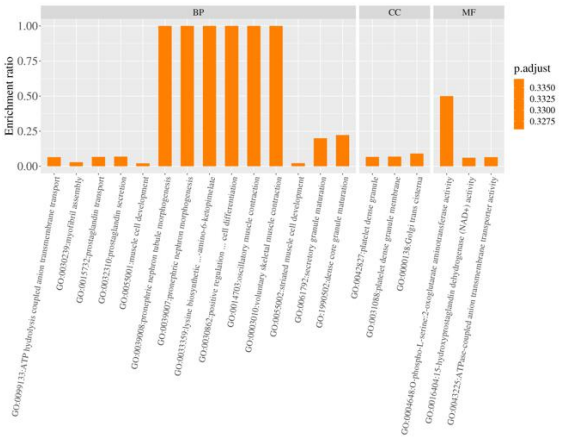
2021 S.-T. Yau

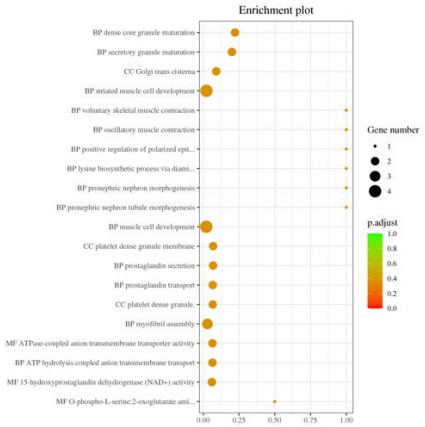


上图为 LC10 vs LC20 组的下调表达。主要包括细胞外基质相关（extracellular region/matrix），几丁质角质层合成（ Chitin-based cuticle development），结构分子活性（ structural molecule activity）等基因通路变化。探究现其所对应的相关生理功能发现，对比 LC20，LC10 组有更少的细胞间距离，同时有更少的几丁质外壳。能更好地在毒逆境环境下保护生物。

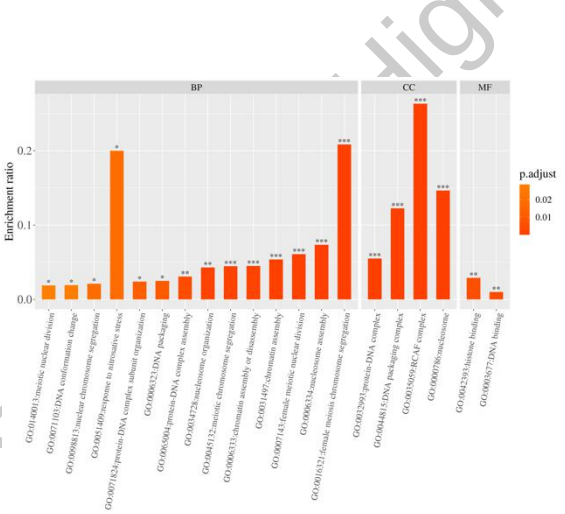
2021 S.T. Yo Award

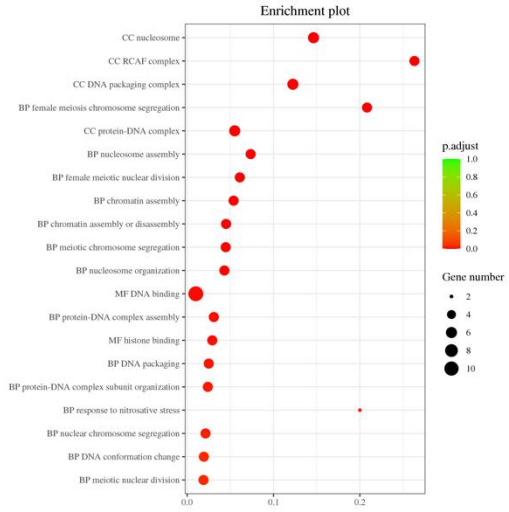
2.4.2 差异基因的 GO 条形统计图与气泡图





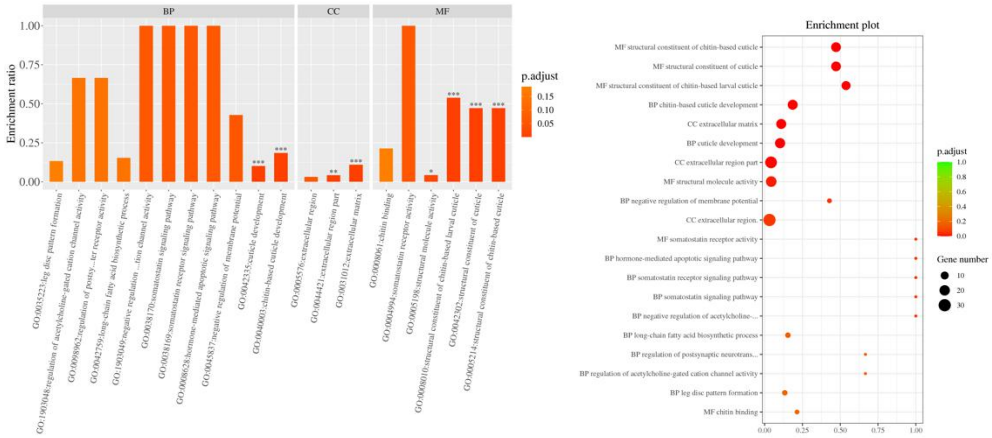
上图为 LC10 vs 对照组的下调表达条形图与气泡图。可以更直观地看出不同基因通路的下调数据与其他通路的对比。



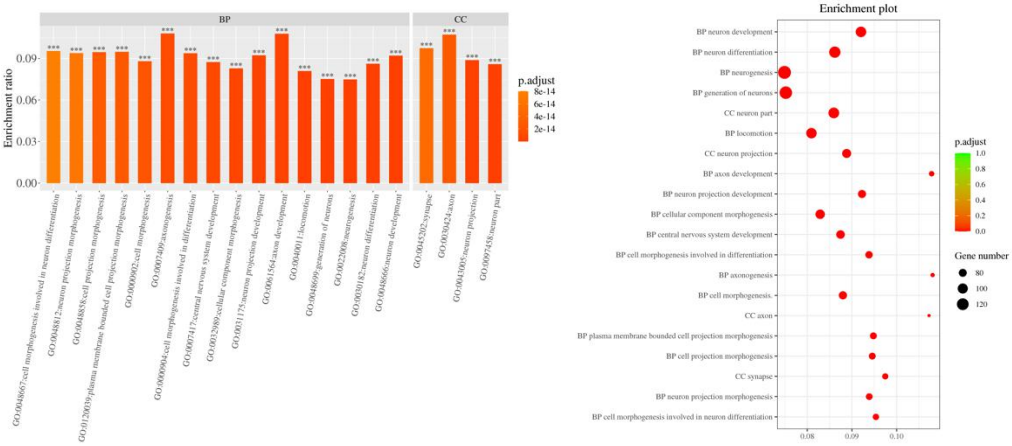


上图为 LC10 vs 对照组的上调表达条形图与气泡图。可以更直观地看出不同基因通路的上调数据与其他通路的对比。

2021 High School Science Award

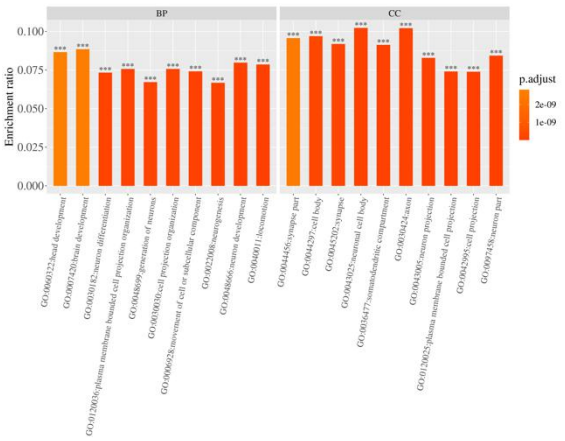


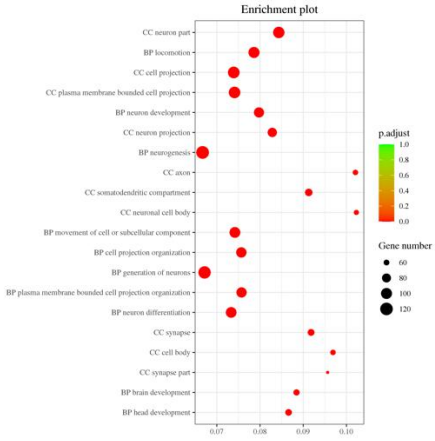
上图为 LC10 vs LC20 组的下调表达条形图与气泡图。可以更直观地看出不同基因通路的下调数据与其他通路的对比。



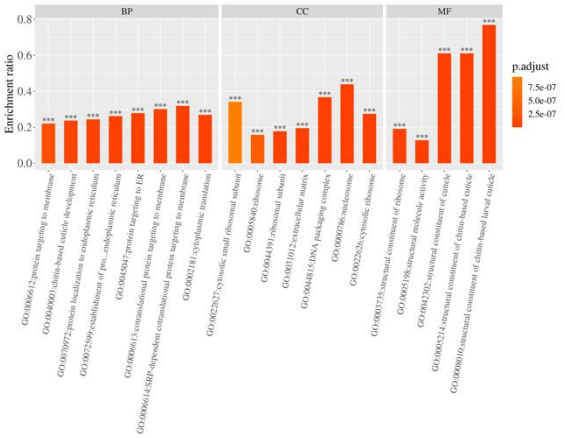
上图为 LC10 vs LC20 组的上调表达条形图与气泡图。可以更直观地看出不同基因通路的上调数据与其他通路的对比。

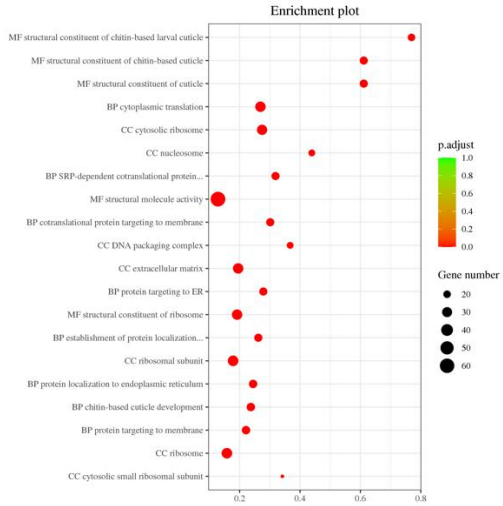
2021 S-T. ... ool Science Award





上图为 LC20 vs 对照组的下调表达条形图与气泡图。可以更直观地看出不同基因通路的下调数据与其他通路的对比。



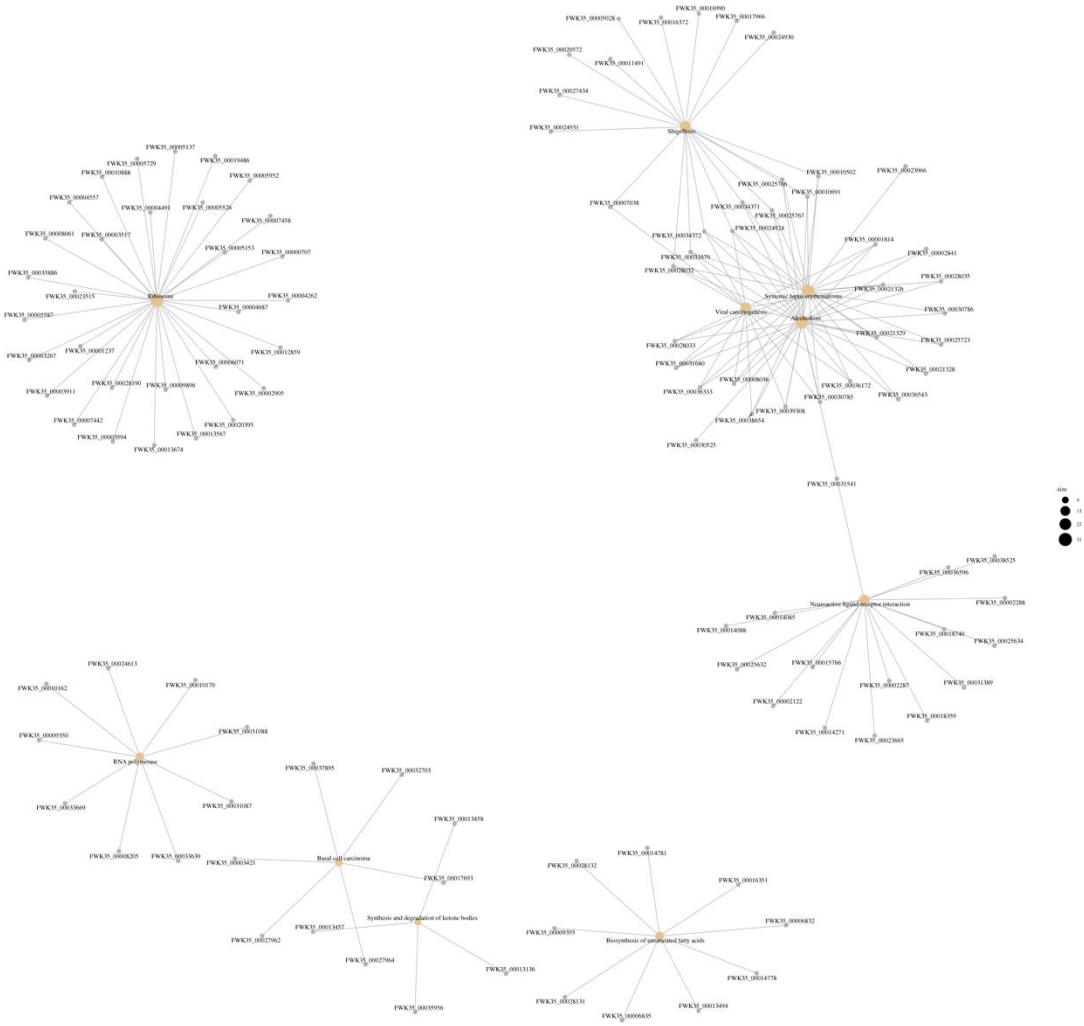


上图为 LC20 vs 对照组的上调表达条形图与气泡图。可以更直观地看出不同基因通路的上调数据与其他通路的对比。

2021 S.T. Y Science Award

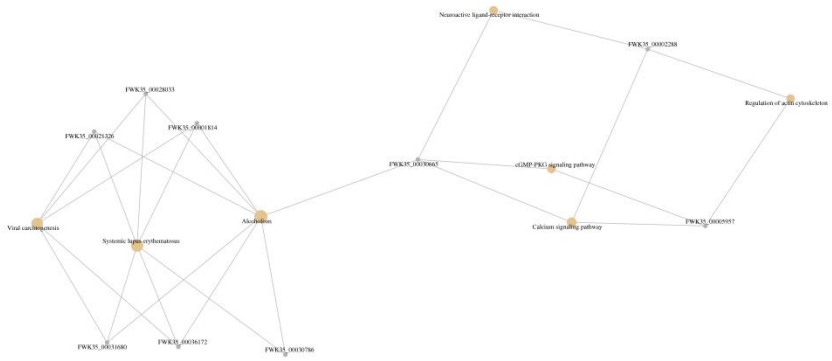
2.5 KEGG 数据分析

将所有 KEGG 富集结果，按照 p.adjust 从小到大排序，取前 10 个富集通路绘制网络图。



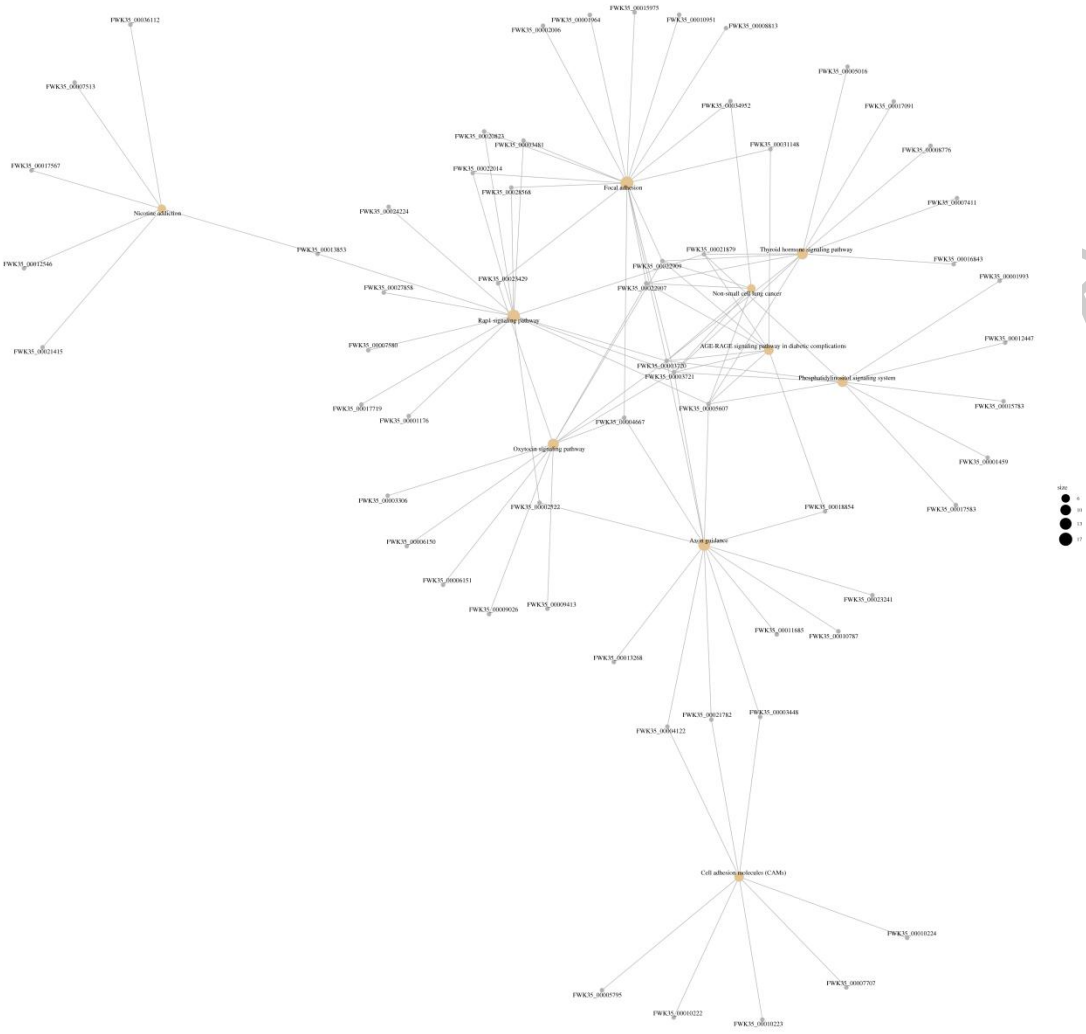
上图为 LC20 vs 对照组的上调基因富集。灰色点为上调基因序号，黄色点为直接相关的通路。对比对照组，LC20 组大量与核糖体（ribosome）相关的基因显著上调，意味着 LC20 组大量的产生功能性蛋白质，同时 RNA 聚合酶（polymerase）和不饱和脂肪酸生物合成途径（biosynthesis of unsaturated）的剧烈活动代表陈代谢速度明显更快。酒精中毒（alcoholism）和致癌（viral carcinogenesis）案例增多，神经分化频率增多。

Award
2021



上图为 LC10 vs 对照组的上调基因富集。对比对照组，LC10 组的解毒通路有明显变化。解毒相关基因表达频率上升。主要是：酒精中毒, 致癌物积累等。同时有简单的树突轴突增多迹象。

2021 S.-T. Yau



上图为 LC20 vs 对照组的下调基因富集。对比对照组，鉴于粘着斑（focal adhesion）和细胞粘部分子（cell adhesion molecule）的减少表达，推断 LC20 组细胞间隔明显增大，细胞间联系减少。此外，LC20 组中突出表现的磷脂酰肌醇信号系统（phosphatidylinositol signaling）体现生物体中细胞的细胞膜更新更加频繁。

2021 S.-T. Yau Award

2.6 SNP 突变位点分析

SNP 突变位点数据过于庞大，因此下图只做示例。

CHr	Pos	REF	ALT	Gene	Control_1	Control_2	Control_3
VUJU01000001.1	119695	G	A	FWK35_00000250	1/1	./.	./.
VUJU01000001.1	176834	A	G	FWK35_00000250	0/1	1/1	1/1
VUJU01000001.1	177163	A	C	FWK35_00000250	1/1	./.	1/1
VUJU01000001.1	177176	T	A	FWK35_00000250	1/1	./.	1/1
VUJU01000001.1	177220	G	A	FWK35_00000250	1/1	./.	1/1
VUJU01000001.1	177991	T	C	FWK35_00000253	1/1	1/1	1/1
VUJU01000001.1	178481	C	A	FWK35_00000253	1/1	1/1	1/1
VUJU01000001.1	179796	A	T	FWK35_00000253	1/1	1/1	1/1
VUJU01000001.1	180530	C	T	FWK35_00000253	1/1	1/1	./.
VUJU01000001.1	180768	G	A	FWK35_00000253	1/1	1/1	./.
VUJU01000001.1	181192	A	G	FWK35_00000253	1/1	1/1	1/1
VUJU01000001.1	181297	T	C	FWK35_00000253	1/1	1/1	./.

统计说明：

CHr：SNP 位点所在染色体

POS：SNP 位点坐标

REF：参考序列在该位点的基因型

ALT：该位点的其它基因型

Gene_id：SNP 所在基因 ID

other coloums：每个样本该位点的基因型 (./. 代表没有 reads 覆盖，0/0 代表样本在该位点没有突变，1/1 代表样本的该位点为纯合突变，0/1 代表样本的该位点为杂合突变)

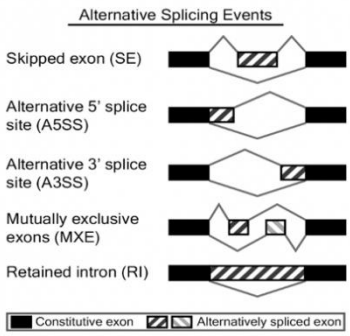
对 32，006 个数据进行统计和整理后，SNP 的具体突变统计如下表所示：

Sample	A->C	A->G	A->T	C->A	C->G	C->T	G->A	G->C	G->T
Control_1	2619	11866	5272	3038	1184	12341	12360	1108	3078
Control_2	2553	11543	4901	2935	1177	12021	12034	1093	2960
Control_3	2492	11317	4952	2907	1166	11828	11770	1070	2892
Treat_0.12_1	1846	8565	3451	2207	884	9196	9336	828	2218
Treat_0.12_2	2205	10116	4315	2616	1037	10857	10789	966	2642
Treat_0.12_3	2197	9908	4152	2521	983	10587	10618	969	2576
Treat_0.20_1	1857	8701	3574	2212	886	9256	9333	823	2204
Treat_0.20_2	1890	8615	3658	2261	895	9481	9393	824	2260
Treat_0.20_3	1831	8182	3440	2154	868	8932	8970	777	2156

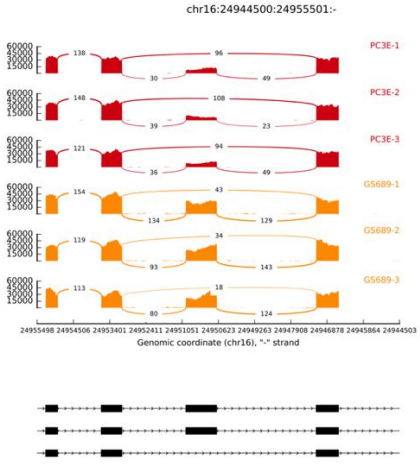
2021 S. High Award

2.7 可变剪接分析

可变剪接是调节基因表达和产生蛋白质组多样性的重要机制，也是 RNA-seq 的重要分析 内容，我们使用 rMATS 软件进行可变剪接分析，主要包括 SE、RI、MXE、A5SS、A3SS 五种可变剪接事件，如下图所示:



对于表达差异显著性的可变剪接事件，进行可视化展示，SE 类型可变剪接事件的可视化展示如下图所示:图中标题为可变剪接事件三个外显子所在的染色体坐标及正负链信息，跨 外显子比对的 reads 使用连接外显子 junction 边界的弧线表示。弧线的粗细和比对到 junction 上的 reads 数成正比，同时弧线上的数字指出了 junction reads 的数目，右上方标注了各个样本可变剪接事件所在的基因及 IncLevel 值。



2021 S.-T. Yau High School Science Award

讨论

实验一和实验二统称为第一部分生物观察实验。实验一所构建的毒力回归方程为后续实验提供了重要的数据支持。实验二选取 LC10、LC20 两个浓度，并对豆蚜进行处理。【7】24 小时后观察结果表明随着环境选择压力增加，蚜虫种群倾向分化出更多有翅雄蚜。数据呈现明显线性关系。有性交配次数随之增多。根据生物观察实验结果推断，在逆境环境胁迫下，蚜虫倾向于分化为有翅蚜，便于逃离不再适宜其生存的栖息地；同时，蚜虫倾向于有性生殖，导致种群基因多样化，对环境适应能力增加。

华北地区冬季较冷，蚜虫需依靠卵越冬，所以学者普遍认为秋季是发生有性生殖的高峰期。也正因如此，传统的研究重点在限制全年大部分时间发生的孤雌生殖。但是忽视了农药处理对昆虫行为的影响。经团队考察，华北平原的农作物以玉米、小麦、大蒜、土豆、花生、西瓜为主。【8】如果同时种植这六种作物，农民一年需要至少喷洒 23 次农药。本实验利用 1.8% 阿维菌素乳油构建亚致死逆境环境，科学地还原了实际生产中喷洒农药后，对蚜虫种群性别分化和繁殖行为的影响。

实验三提取了 LC10 和 LC20 浓度处理过后的蚜虫 mRNA 并送至武汉爱基百客进行数据处理。根据收到的数据，确定样本完好。且各组间有明显基因表达量差异。团队利用 GO，KEGG 分析富集基因差异，得到具体通路变化。根据 DNA 复杂包装和雌性减数分裂染色体分离基因表达量增加，得出蚜虫细胞在逆境环境下为有性生殖做准备。根据几丁质合成和细胞间间隙增加，得出蚜虫细胞在逆境环境下为翅型分化做准备。根据荷尔蒙和催产素增加，得出蚜虫进行有性生殖的倾向增加。同时，显著表达的多个基因指向迁徙冲动通路，促使蚜虫迁徙。蚜虫解毒酶表达频率显著提升，蚜虫会有更强的农药抗性。此外，小组发现了蚜虫神经系统的巨大变化，具体表现为树突轴突增加，突起发育，神经元分化等。目前团队对其没有明确的科学解释，推测可能表现为蚜虫对所处环境的感知力增加。

根据实验三富集网络图的交点显示，和有性生殖相关的基因通路有大量交集基因。如神经系统，交配冲动，有性生殖准备，解毒能力等都由几个关键基因链接起来。因此，团队在后续实验中可以尝试通过 DSRNA 干扰技术，切断这几个关键基因，就可以大幅抑制有性生殖及其相关的繁殖、生存优势。

2021 S. T. Yau High School Science Award

通过对以上实验数据的观测、整理、统计和分析，团队从理论角度为未来防治工作选择抑制蚜虫有性生殖的行为做背书。为现有防治措施提供新的执行思路。【9】

前人的理论和经验是在过去有限条件下得到的最好结果。本团队能够得到足够证明最初猜想的数据来自先进的 GO、KEGG 数据库和其他运算数据软件提供的帮助。DSRNA 技术近年来在农药中的应用也肯定了我们的研究方向。希望团队利用这些新型手段得到的结论能为害虫防治未来发展事业提供有价值的信息。也希望随着技术的更新迭代，能有更先进完善的理论出现。【10】

2021 S.-T. Yau High School Science Award

Reference

【1】吴一民.蚜虫性别的决定[N]，昆虫知识，1982,(01)

【2】Zhang J， Zhang GX， He FG， Qu GM， 1990. Morphological characteristics and index of identification of the instars of Rhopalosiphumpadi(L.). Entomol. Knowl.，27(4): 204-206.

[张军，张广学，何富刚，曲国民，1990. 禾谷缢管蚜虫龄鉴别 特征及标准的研究. 昆虫知识，27(4)：204 - 206]

【3】 Hui Li, Xiaoxia Liu, Haijian Z, Kai Li, QIngwen Z, Zhen Li 昆虫学报 ActaEntomologicaSinica, July2018，61(7): 877-884

【4】Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, & Cherry JM, et al. (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. the gene ontology consortium.?Nature Genetics,?25(1), 25-9.

【5】Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. Nucleic acids research, 28(1), 27-30.

【6】李慧，刘小侠，智海剑，李凯，张青，李贞.大豆蚜虫龄鉴别特征[N]，昆虫学报，2018.7.7 61卷

【7】Xiao, D.; Chen, X.; Tian, R.; Wu, M.; Zhang, F.; Zang, L.; Harwood, J.D.; Wang, S. Molecular and Potential Regulatory Mechanisms of Melanin Synthesis in Harmonia axyridis. Int. J. Mol. Sci. 2020, 21, 2088.

【8】蒋高明.农民一年往地里打多少农药[J].养猪 2012（000）005

【9】唐平华，陈国平，朱明库，任丽军，胡宗利.蚜虫防治技术研究进展[N].植物保护，2013 39（2）：5-12

【10】Jean-Christophe Simon, Claude Rispe and Paul Sunnucks.Ecology and evolution of sex in aphids[J].TRENDS in Ecology & Evolution，2002，Vol.17 No.1：34-39

备注：

Reference【2】【3】【4】【5】【7】【10】并未直接引用，多为前期查询文献工作时对团队思路有重大启发的论文。

2021 S.-T. Yau High School Science Award

选题灵感来源

2020 年，团队成员选修的 AP Biology 课程教室中饲养了一只蜥蜴。一次课后闲聊，小组成员对蜥蜴的生殖方式产生了疑惑,不知该品种蜥蜴是卵生还是卵胎生。在查询资料的过程中，意外看到一篇最新论文，探究的是某个蜥蜴种群的孤雌行为。在查询有关孤雌行为的相关论文的时候，看到了如下介绍“孤雌行为大多发生在结构简单的生命体中，如昆虫。”

根据小组成员对进化学的理解，认为孤雌行为没有经历过 crossing over 的过程会产生相对稳定、较小的基因库，会让种群变得脆弱。也许可以用来防治害虫。这在当时只是一个灵光乍现的念头。

2021 年初，小组决定参加丘成桐竞赛，学校的参赛流程要求在最初阶段提交十份选题进行开题答辩。于是，想用孤雌行为解决害虫防治问题的念头又一次被唤醒。经过调查，北方地区最为常见、可控且可获得的实验体是蚜虫。于是我们将“蚜虫的孤雌行为”作为一个选题加入了所有的开题报告中。

在学校窦向梅老师的帮助下,我们带着开题报告成功联系到了北京市农林科学院的王甦老师，并和他进行了简单的交流。王老师肯定了我们的想法，认为在理论上是可行的，在实践中是创新、有价值的。这鼓励我们在后续的选题过程中确定了这个主题，为之努力。

2021 S.-T. Yau High School Science Award

团队分工

第一作者：付子睿，王子（对本文贡献相同，以姓氏拼音排序）

具体分工如下：

前期查阅资料、实验体培养与收集由团队共同完成。和指导老师对接主要由付子睿完成，开题报告撰写主要由王子完成。实验过程中对实验体的照片主要由王子记录，团队的实验过程和步骤由付子睿记录。摘要、引言、第一章为付子睿撰写，王子修改。第二章至第三章由王子撰写，付子睿修改。第四章数据分析第一部分为王子撰写，第四章数据 PAC 及 GO 部分分析由付子睿撰写，王子补充。GO 分析、KEGG 部分分析由王子撰写，付子睿补充。结论为两人共同撰写。引用部分由团队成员分别将自己使用文献陈列。团队分工为付子睿撰写。答谢由两人共同撰写。

2021 S.-T. Yau High School Science Award

答谢

感谢丘成桐竞赛给了我们在高中阶段一个深入探索自己科研兴趣的机会。感谢我们优秀的窦向梅老师给予悉心指导和鼓励。同时，也感谢许多十一学校的其他老师，从竞赛选题到进行实验、撰写论文，一直以各种形式支持团队、以积极正向的态度肯定我们的科研梦想。我们还要感谢父母对实验的精神鼓励及资金支持。最后，团队成员也想感谢彼此一年多来的相互尊重、坚定信任和彼此支持。在繁忙的申请季，我们共同克服重重困难，一直向既定目标不懈努力，愿我们在未来的科研路上，牢记今日感动，不忘初心，不怕困难，方得始终。

2021 S.-T. Yau High School Science Award