



Establishment of the Pea Aphid as a Developmental Model Organism: History, Significance, and Future Prospects 【Review article】

豌豆蚜成為發育模式物種之研究歷程、顯著性與未來展望【綜合論述】

Yi-min Hsiao^{1,2}, Gee-Way Lin^{1,4}, and Chun-che Chang^{1,2,3,4*}
蕭逸旻^{1,2}、林季璋^{1,4}、張俊哲^{1,2,3,4*}

*通訊作者E-mail: chunche@ntu.edu.tw

Received: 2013/09/07 Accepted: 2013/10/24 Available online: 2014/02/01

Abstract

Establishment of model organisms can greatly enrich the understanding of developmental diversity and the expansion of biological knowledge. The fruit fly *Drosophila melanogaster*, being an important model of developmental genetics, has become one of the notable examples among animal models. Aphids have a long history as a notorious insect pest, but they have not been considered as an insect model until the recent publication of whole genome sequence of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. This accessible genome has allowed studying developmental polyphenism, adaptation, aphid-bacterial symbiosis, and virus transmission—all of which are research problems difficult to access in existing model organisms—on a molecular and systematic level. Here, we review the progress of germline specification and anteroposterior axis development in the pea aphid, describing how the pea aphid has become an emerging insect model for developmental studies. In addition, we also argue for the urgent need of functional tools necessary for genetic analysis and propose future studies on both basic and applied agricultural sciences. Our ultimate goal is to establish aphids as a mature insect model.

摘要

模式物種之建立對於瞭解發育多樣性以及拓展生物學新知具有重大的貢獻。果蠅 (*Drosophila melanogaster*) 成為發育遺傳學之重要模式動物，已為最佳例證之一。長期以來蚜蟲雖為重要農業害蟲，然而直至近年豌豆蚜 (*Acyrtosiphon pisum*) 之全基因體序列解碼後，方始能躋身於模式昆蟲之列。此一全基因體序列可供科學家在探討蚜蟲的發育多型性、適應性、內共生菌、病毒傳遞等重要議題時，提升至分子和系統的層次。在本文我們以豌豆蚜為例，綜合論述其生殖細胞特化和前後體軸發育之研究進展，同時亦說明它如何成為新興發育模式昆蟲之歷程。對於發展關鍵技術以利基因功能分析，以及研究蚜蟲生長發育對未來基礎與應用農學之重要性，亦有進一步之評析與展望。未來，我們將致力於將蚜蟲提升為更成熟之模式物種。

Key words: aphids, embryo, model organism, developmental polyphenism, germ cells

關鍵詞: 蚜蟲、胚胎、模式物種、發育多型性、生殖細胞。

Full Text: [PDF\(1.74 MB\)](#)

下載其它卷期全文 Browse all articles in archive: <http://entsocjournal.yabee.com.tw>

豌豆蚜成爲發育模式物種之研究歷程、顯著性與未來展望

蕭逸旻^{1,2}、林季瑋^{1,4}、張俊哲^{1,2,3,4*}

¹ 國立臺灣大學生物資源暨農學院昆蟲學系 10617 台北市大安區羅斯福路 4 段 113 巷 27 號

² 國立臺灣大學生物資源暨農學院生物科技研究所 10672 台北市大安區長興街 81 號 4 樓

³ 國立臺灣大學基因體與系統生物學位學程 10617 台北市大安區羅斯福路 4 段 1 號

⁴ 國立臺灣大學發育生物學與再生醫學研究中心 10041 台北市中正區中山南路 8 號兒童醫療大樓 16 樓

摘 要

模式物種之建立對於瞭解發育多樣性以及拓展生物學新知具有重大的貢獻。果蠅 (*Drosophila melanogaster*) 成爲發育遺傳學之重要模式動物，已爲最佳例證之一。長期以來蚜蟲雖爲重要農業害蟲，然而直至近年豌豆蚜 (*Acyrtosiphon pisum*) 之全基因體序列解碼後，方始能躋身於模式昆蟲之列。此一全基因體序列可供科學家在探討蚜蟲的發育多型性、適應性、內共生菌、病毒傳遞等重要議題時，提升至分子和系統的層次。在本文我們以豌豆蚜爲例，綜合論述其生殖細胞特化和前後體軸發育之研究進展，同時亦說明它如何成爲新興發育模式昆蟲之歷程。對於發展關鍵技術以利基因功能分析，以及研究蚜蟲生長發育對未來基礎與應用農學之重要性，亦有進一步之評析與展望。未來，我們將致力於將蚜蟲提升爲更成熟之模式物種。

關鍵詞：蚜蟲、胚胎、模式物種、發育多型性、生殖細胞。

蚜蟲邁向新興模式昆蟲之路

蚜蟲爲半翅目 (Hemiptera) 昆蟲，分爲蚜總科 (Aphididae)、球蚜總科 (Adelgidae) 與根瘤蚜總科 (Phylloxeridae) (Ortiz-Rivas and Martinez-Torres, 2010; Davis, 2012)，已被命名之蚜蟲可達 4,700 種 (van Emden and Harrington, 2007)。蚜蟲體長介於 1~10

公釐 (mm)，具有刺吸式口器 (piercing-sucking proboscis)，可深入至寄主植株韌皮部 (phloem) 吸取植物汁液，而且其腹部具有一對特化的腹管 (siphunculi)，會分泌警戒費洛蒙 (alarm pheromones)，作爲其它蚜蟲之逃離警訊 (Bowers *et al.*, 1972)。當蚜蟲找到適合的寄主植株後，可在短時間內大量產生後代，後代常跟隨在母體附近形成聚落 (Stern,

*論文聯繫人

Corresponding email: chunche@ntu.edu.tw

豌豆蚜成爲發育模式物種 215

2008)。目前常見危害農園藝作物的蚜蟲約有 250 種，它們當中有許多為植物病毒之載體 (vectors)：可以想見，蚜蟲在植株間一邊吸食其汁液，一邊傳播植物病毒，造成重大的農損 (Oerke, 1994; Blackman and Eastop, 2000)。因此，針對蚜蟲此一重要農業害蟲之分類、分布、傳病、防治等研究已累積相當可觀之文獻資料 (Oerke, 1994; Blackman and Eastop, 2000; van Emden and Harrington, 2007; Miller and Footitt, 2009)。

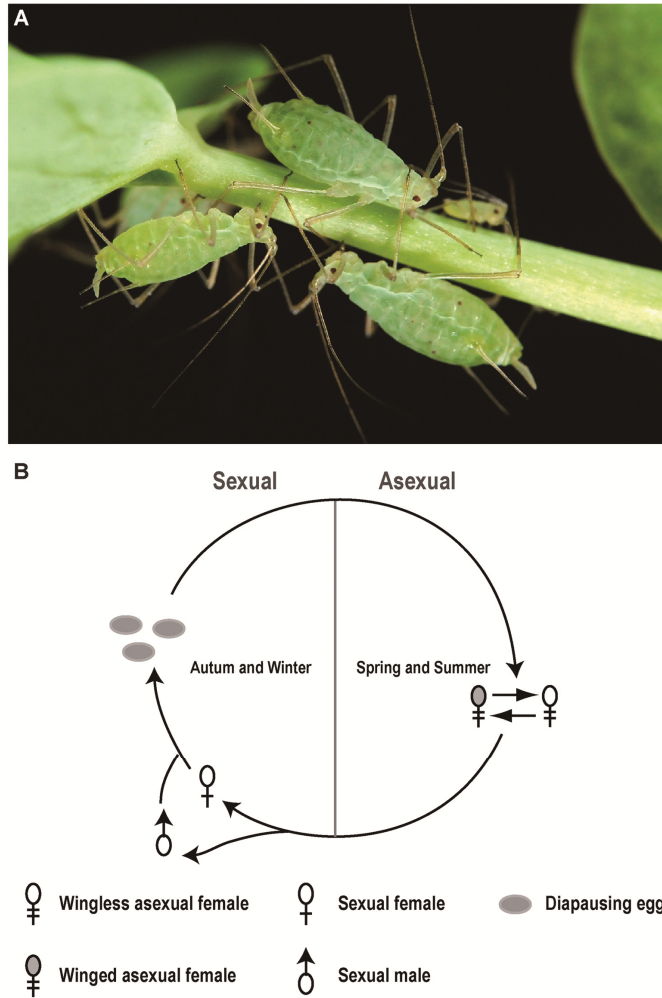
雖然蚜蟲為重要農業害蟲，但在 2010 年豌豆蚜 (*Acyrtosiphon pisum*) (圖一 A) 之全基因體序列公佈前，蚜蟲尚未能躋身模式昆蟲之列。然而，在擁有全定序、定徵 (annotation) 之基因體序列與數位化之蚜蟲基因體資料庫 (AphidBase) 後 (The International Aphid Genomics Consortium, 2010)，科學家方得以擺脫傳統單基因選殖之窘境，大幅進階至系統化探討基因網路的層次。近年豌豆蚜原位雜核技術 (*in situ hybridization*) 平台之建立 (Chang *et al.*, 2008)，亦進一步強化它成為發育模式昆蟲之角色。雖然許多昆蟲之全基因體定序已被陸續完成，可在 DNA 序列之累積和蚜蟲並駕齊驅，甚或超越，然而蚜蟲因具有迥異於現存模式動物之生物特性，使其在邁向新興模式昆蟲之路，仍深具研究價值 (Brisson and Stern, 2006; Srinivasan and Brisson, 2012; Bickel *et al.*, 2013)。蚜蟲備受矚目之生物特徵簡述如下：

(一) 蚜蟲生活史由有性世代及無性世代交替組成：這兩種生殖模式之輪替主要受光週期之調控 (Dixon, 1977; Miyazaki, 1987; Miura *et al.*, 2003)，在春夏之際 (長日照時節) 蚜蟲以孤雌胎生 (parthenogenetic and viviparous) 的方式大量繁衍後代 (Blackman, 1978)，但在秋盡冬初 (短日照時節)，其子代

開始轉變為有性生殖模式，產下配子行減數分裂的雌性和雄性個體，在交配後產下可抗凍過冬的受精卵。次年春天從卵中孵化的幹母 (fundatrix)，又回到孤雌生殖 (圖一 B) (Lees, 1989; Shingleton *et al.*, 2003; Le Trionnaire *et al.*, 2008)。

(二) 蚜蟲具有非遺傳之發育多型性 (developmental polyphenism)：目前已知，此類多型性之產生與環境因子之變化有關 (Lees, 1989; Braendle *et al.*, 2006)。例如，當母蚜偵測到環境之族群密度過高，或寄主植株之生長狀態不佳等環境因素時，無翅型母蚜將會產生有翅型後代，以利後代藉由翅膀展動移至臨近植株，或藉由風力推動翅膀，將蚜蟲飄行至更遠的農園森林，在新的寄主植株重新形成聚落 (圖一 B) (Braendle *et al.*, 2006)。在不同的生殖模式，蚜蟲亦會展現發育之多型性。最明顯的例證之一即為微卵管 (ovarioles) 結構之多型性：在孤雌胎生的蚜蟲，微卵管擁有體積較小、數目較多的蛋腔 (6 至 10 個)，而且早期蛋腔中的卵母細胞會在發育過程轉化為胚胎，毋需授精；在有性卵生蚜蟲的微卵管，蛋腔體積雖可達五倍之大，然數目明顯較少 (1 至 2 個)，蛋腔僅為卵母細胞之發育場所 (Le Trionnaire *et al.*, 2008; Davis, 2012) (圖三)。

(三) 蚜蟲具有多種內共生菌 (endosymbionts)：目前已知，蚜蟲主要之內共生菌 (*Buchnera aphidicola*) 可將蚜蟲體內的次級代謝物合成必需氨基酸，以利蚜蟲生殖與發育，形成互利共生關係 (Munson *et al.*, 1991; Douglas and Prosser, 1992; Hansen and Moran, 2011)。除了營養價值 (Douglas and Prosser, 1992)，共生菌對蚜蟲之免疫 (Laughton *et al.*, 2011; Oliver *et al.*, 2012; Schmitz *et al.*, 2012)、環境耐受性 (Montllor



圖一 豌豆蚜生活史。(A) 孤雌生殖胎生豌豆蚜 (*Acyrtosiphon pisum*)。圖示含全雌之三成蟲與一若蟲；出現於成蟲腹部紅點為子代胚胎之複眼 (攝影：吳士緯)。(B) 豌豆蚜生活史。無性和有性生殖週期之轉換受光週期長短所調控。在春、夏兩季，蚜蟲以孤雌胎生方式繁衍後代；大約 10~14 日為一代。在秋冬轉換之際，因受光週期變短之影響，無性生殖蚜蟲將產下有性生殖之蚜蟲僅維持一代。雄蟲與雌蟲交配後會產下滯育的卵來過冬。在初春，剛孵化之若蟲 (又被稱為幹母) 將在發育為成蟲後，繼續以孤雌胎生之方式繁衍後代。在無性世代，當蚜蟲受到高族群密度或獵食者之環境壓力時，無翅之成蟲會產下有翅之子代，以利遷徙。

Fig. 1. Life cycle of the pea aphid. (A) The parthenogenetic and viviparous pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*). Three adults plus one nymph of pea aphids (all females) are shown in the image. Red spots are compound eyes of the embryos harbored within the abdomens of the pregnant adults (photographer: Shipher Wu). (B) Life cycle of the pea aphid. Alteration of asexual and sexual reproductive cycles depends on the lengths of photoperiods. During spring and summer, aphids produce offspring parthenogenetically and viviparously and one generation takes about 10-14 days. In response to the decreasing photoperiod during autumn and winter, however, there is only one generation of the sexual morphs are produced. Males and females mate and lay diapausing eggs over winter. In early spring, nymphal aphids (called fundatrices or stem mothers) are hatched and will develop into adults for parthenogenetic and viviparous reproduction. When encountering environmental stresses such as high population density or predation in the asexual reproductive cycle, unwinged aphids can produce winged offspring for dispersing.

et al., 2002; Dunbar *et al.*, 2007) 以及體色改變 (Tsuchida *et al.*, 2010) 均有重要的貢獻，然而其分子機制仍待進一步之探究。已公佈的豌豆蚜全基因體序列不啻成為突破研究最關鍵之生物資訊來源。

蚜蟲發育之特色

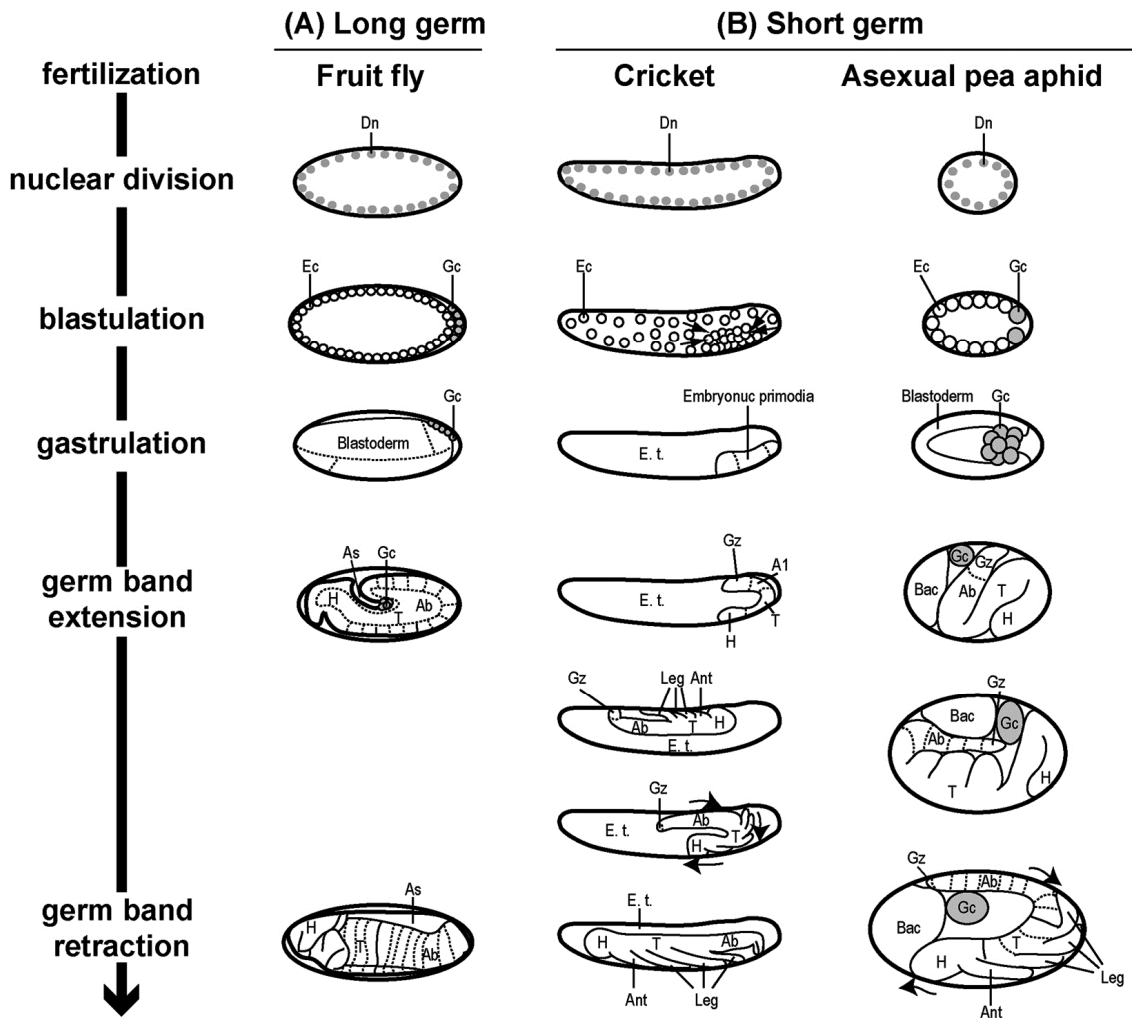
蚜蟲的卵巢形態與胚胎發育方式，在有性及無性世代呈現明顯的差異。行無性生殖（孤雌胎生）之蚜蟲，卵發育（oogenesis）與胚胎發育（embryogenesis）同時在微卵管內進行；而行有性生殖之蚜蟲，其微卵管僅是卵發育的場所 (Miura *et al.*, 2003; Le Trionnaire *et al.*, 2008)。因無性生殖蚜蟲的卵和胚胎齊聚於微卵管內，使得探究基因表現可從卵發育至胚胎發育進行連續觀察，對於研究母系基因（maternal genes）的發育角色，提供絕佳之觀測平台。此外，在無性生殖豌豆蚜胚胎發育的早期，胚胎細胞佔滿了大部分的蛋腔（egg chamber），具備長胚帶（long germ band）之形態特徵（圖二 A、C）；然而，在稍後體節發育（segmentation）之階段，其腹部體節的延展卻是循短胚帶（short germ band）模式 (Miura *et al.*, 2003)，意即腹部體節之增加採漸增模式（圖二 B、C），不像黃果蠅（*Drosophila melanogaster*，簡稱果蠅）之類的長胚帶昆蟲，將所有體節之特化畢其功於短暫之囊胚形成期（blastulation）（圖二 A）。

Shigenobu 等人已於 2010 年找出豌豆蚜基因體當中和其它模式昆蟲所共有之發育同源基因（homologs of developmental genes），發現豌豆蚜具備果蠅所擁有的大部分發育基因，僅缺少常見於雙翅目昆蟲特有的體軸基因，如 *bicoid* 和 *oskar*。但是豌豆蚜的某些和發育相關的基因卻有異常的重複（duplication）

現象，例如生殖基因 *vasa* (*vas*) 和 *nanos* (*nos*) 各有 4 個並系同源基因（paralogs），而另一生殖基因 *piwi* 的數目更高達 8 個 (Shigenobu *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2011) 相類似之高度基因重複並未見於其它模式動物，由此推測，蚜蟲可能需要較多之生殖基因，以因應有性與無性世代不同的生殖策略。

孤雌胎生豌豆蚜之生殖細胞發育

生殖細胞經過特化（specification）後即與胚胎體細胞分離，以維持其傳遞遺傳訊息之特性。目前已知動物生殖細胞特化之方式有兩種 (Saffman and Lasko, 1999; Extavour and Akam, 2003)，其一為藉由生殖漿（germ plasm）驅動生殖細胞特化之模式（germ-plasm driven mode），又被稱為預成（preformation）機制。例如在果蠅卵發育時，其生殖漿聚集於卵母細胞後端，因生殖漿含有生殖細胞決定物質（germline determinants），在生殖細胞（germ cells）進行「細胞化（cellularization）」的同時，甫生成之細胞膜會將生殖細胞決定物質納入細胞內，使之形成初始生殖細胞（primordial germ cells）（圖二 A） (Hay *et al.*, 1988; Lasko and Ashburner, 1988; Lasko, 1992)。另一種生殖細胞特化的方式為訊息誘導模式（signal induction mode），又被稱為後生（epigenesis）機制。已知，採用此機制之物種未形成母系遺傳（maternally-inherited）的生殖漿；反之，在受精後的胚胎中，藉由體細胞所釋放之分子訊息誘導相鄰之體細胞，使之進一步特化為初始生殖細胞。靠訊息誘導模式所特化的生殖細胞通常分離於原腸胚形成期（gastrulation），或之後的器官發育時期（organogenesis）。目前已知非洲沙漠飛蝗（*Schistocerca gregaria*）



圖二 昆蟲長、短胚帶發育模式之比較。(A) 長胚帶昆蟲。以果蠅 (*Drosophila melanogaster*) 為例，受精後進行分裂的細胞核會形成合胞囊胚；在合胞囊胚細胞化的過程，位在後端的生殖細胞（極細胞）會與其它體細胞分離，而在這段時間所有的體節（副節，形態尚無法辨識）已完成特化。稍後囊胚層之腹側會進一步分化為胚帶（即胚體本身）。由於其長度和蛋腔長度等量齊觀，因此在形態上成為長胚帶昆蟲之特徵。自原腸胚期開始，胚帶會向內轉折凹陷、展延長度、並進一步收縮，以形成體節。(B) 短胚帶昆蟲。以蟋蟀 (*Gryllus bimaculatus*) 為例，它會像果蠅一樣在蛋腔內形成一層均質的囊胚層，但僅有大約 30% 的囊胚細胞會進一步聚集形成胚帶。胚帶之彎曲會發生於胚帶長度延伸的過程，導致胚帶本身之體軸方向和蛋腔方向相反。但在胚帶收縮前，胚胎本身會翻轉而且其頭部會朝向蛋腔的前方。在形態上，無性生殖豌豆蚜早期發育較像果蠅，因兩者皆有長胚帶之構造。然而在原腸胚期開始之後，它的體節生成又循環像蟋蟀之短胚帶模式：腹部的體節數目隨胚帶之延展而逐漸增加。在本圖，左側為蛋腔前方。縮寫：A1—腹部體節 1；Ab—腹部；Ant—觸角；As—羊漿膜；Bac—內共生菌；Dn—分裂中的細胞核；Ec—胚胎細胞；Blastoderm—囊胚層；E. t.—胚外組織；Gc—生殖細胞；Gz—後端生長區；H—頭部；Leg—足；T—胸部。

Fig. 2. Comparison of long- and short-germ development in insects. (A) Long-germ insects. In the fruit fly *Drosophila melanogaster*, nuclear division occurs after fertilization and the cleaved nuclei form the syncytial blastoderm (syncytium). During blastulation (cellularization of the syncytium), germ cells (pole cells) are segregated at the posterior pole of the egg chamber, and within the same window of development all segments (parasegments) are specified. Later, ventral side of the blastoderm further differentiates into the germ band (embryonic proper). Owing to its equivalent length to the egg chamber, this has become a morphological signature of the long germ insects. From gastrulation onward, germ band invaginates, extends, and retracts to form morphological segments. (B) Short-germ insects. Like *Drosophila melanogaster*, a uniform cellular blastoderm also develops in the cricket *Gryllus bimaculatus*; however, only a proportion, about 30%, of the blastodermal cells will aggregate to form the germ band. Bending of the germ band occurs during germ band extension, leading to an opposite orientation of the embryo in relation to the egg chamber. Prior to germ band retraction, embryo flips and anterior region of the embryo migrates toward the egg anterior. Early embryogenesis of the asexual pea aphid resembles to that of *Drosophila melanogaster* – a long germ band forms within the egg chamber by gastrulation. However, from gastrulation onward, segmentation follows the short-germ mode like that in *Gryllus bimaculatus* – the number of abdominal segments increases during germ band extension. Anterior of egg chambers are to the left. Abbreviations: A1, abdominal segments 1; Ab, abdomen; Ant, antenna; As, amnioserosa; Bac, bacterial cells; Dn, divided nuclei; Ec, embryonic cells; E.t., extraembryonic tissue; Gc, germ cells; Gz, posterior growth zone; H, head; T, thorax.

(Chang *et al.*, 2002)、蜜蜂 (*Apis mellifera*) (Nelson, 1915; Dearden, 2006)、家蠶 (*Bombyx mori*) (Nakao, 1999; Nakao *et al.*, 2008)、擬穀盜 (*Tribolium castaneum*) (Schröder, 2006)、蟋蟀 (*Gryllus bimaculatus*) (Ewen-Campen *et al.*, 2013a)、椿象 (*Oncopeltus fasciatus*) (Ewen-Campen *et al.*, 2013b) 等昆蟲皆採用後生機制來特化生殖細胞。相較於黃果蠅 (Hay *et al.*, 1988; Lasko, 1992)、瘧蚊 (*Anopheles gambiae*) (Juhn and James, 2006)、寄生蜂 (*Nasonia vitripennis*) (Lynch and Desplan, 2010; Lynch *et al.*, 2011) 所使用的預成機制，後生機制被認為在演化過程中較為原始 (ancestral)。

針對蚜蟲生殖細胞特化之探討，我們已運用原位雜合和免疫染色 (immunostaining) 技術分別標定生殖基因 *vas* 與 *nos* 的信使核糖核酸 (messenger ribonucleic acid, mRNA) 及其基因產物之表現。在尚未選殖豌豆蚜 *vas* 與 *nos* 基因和製作 Vas 與 Nos 抗血清以前，我們先行利用蝗蟲的 Vas 抗體 (Formosa

antibody) (Chang *et al.*, 2002) 和果蠅的 Nos 抗體 (Hanyu-Nakamura *et al.*, 2004) 對無性豌豆蚜進行免疫染色，發現豌豆蚜的 Vas 與 Nos 訊號分布於生殖原區 (germaria) 當中的營養細胞 (nurse cells)，以及先驅卵母細胞 (prospective oocyte) 的細胞質；之後，當蛋腔進入胚胎發育的時期，Vas 與 Nos 會聚集表現於進行核分裂蛋腔 (又稱為合胞囊胚 (syncytium)) 的後端。直至胚胎細進入囊胚形成期，這兩個蛋白的染色訊號會被納入甫細胞化的後端細胞當中 (圖三 A) (Chang *et al.*, 2006)。

利用原位雜合技術，我們得以偵測到專一表現於胚胎生殖細胞的 *vas* (*Apvas*) mRNA，進一步證實最初含有 Vas 與 Nos 蛋白訊號的後端細胞，即為蚜蟲最早之初始生殖細胞。由於能追蹤、定位每一發育時期生殖細胞，我們發現蚜蟲生殖細胞在特化之後活躍地移動：在胚胎翻轉 (embryo flip, 又稱 katatrepsis) 前，生殖細胞處於“胚胎外部” (extra embryonic) 之狀態：它們由囊胚後端的區

域，移至原腸胚的背側，再遷徙到蛋腔的最前端；俟胚胎翻轉後，再進入至胚胎內，與性腺體細胞嵌合 (coalescence) (Chang *et al.*, 2007)。此一發現，改變過去對蚜蟲胚胎生殖細胞之論述，使得生殖細胞停滯於背側的原有結論獲得修正 (Will, 1888; Hagan, 1951; Büning, 1985)。有趣的是，我們發現另一生殖基因 *nos* (*Apnos*) 的 mRNA 僅在剛特化的初始生殖細胞和移至性腺的生殖細胞當中表現；在移動中的生殖細胞，*Apnos* 的表現並沒有被偵測到，此一結果顯示 *Apnos* 可能僅參與生殖細胞之特化，但卻與生殖細胞之移動沒有關聯 (Chang *et al.*, 2009)。在 8 個 *Appiwi* 基因當中，我們發現有 2 個並系同源基因 (*Appiwi2* 和 *Appiwi6*) 專一表現於生殖細胞，然而另 5 個 *Appiwi* 基因卻可在體細胞被偵測到 (Lu *et al.*, 2011)。相類似的生殖基因重複情形，亦見諸於甲殼綱的水蚤 (*Daphnia pulex*)：水蚤具有 6 個 *piwi/AUB* (*aubergine*) 基因，其中兩個並系同源基因 (*AUB-E* 和 *AUB-F*) 專一表現於卵巢，但另外的 4 個 (*AUB-A*、*AUB-B*、*AUB-C*、*AUB-D*) 則表現於雄蟲或是體細胞 (*soma*)。水蚤 *piwi/AUB* 基因在卵巢-體細胞和有性-無性世代的差異表現，被認為和調控減數分裂有關 (Schurko *et al.*, 2009)。由於 *Appiwi* 基因亦具有類似之差異性表現，因此亦不排除它們參與減數分裂調控的可能性。然而惟待 *Appiwi* 基因功能之解析，方能獲致較明確之結果。綜合上述，我們推測：

(一) 如同其它動物，孤雌胎生蚜蟲仍利用 *vas* (Chang *et al.*, 2007)、*nos* (Chang *et al.*, 2009)、*piwi* (Lu *et al.*, 2011) 這三個高度保守 (*highly-conserved*) 的生殖基因遂行生殖細胞特化和發育的任務：*vas* (*DEAD-box* 基因) 和 *nos* (*zinc finger* 基因) 可分別參與生殖細

胞決定物質之轉譯 (*translation*) 和抑制體細胞基因的表現 (Razs, 2000; Noce *et al.*, 2001; Extavour and Akam, 2003)；*piwi* 基因產物則參與 *piRNA* (*Piwi-interacting RNA*) 的分子網路，在生殖細胞中抑制跳躍子 (*transposons*) 的活性，以維持生殖細胞基因體的完整性 (Parker *et al.*, 2009; Senti and Brennecke, 2010; Czech and Hannon, 2011)。

(二) 偵測 *vas*、*nos*、*piwi* 並系同源基因在有性世代的表現，將有助於釐清蚜蟲為何須要高度複製生殖基因的原因。若能進一步解析每個並系同源基因的功能，對於蚜蟲生殖發育多型性的瞭解，必能有重大突破。

(三) 相較同屬半翅目又是短胚帶昆蟲的椿象 (Ewen-Campen *et al.*, 2013b)，孤雌胎生豌豆蚜不以訊息誘導模式，卻靠生殖漿之驅動來特化生殖細胞。因此，探究有性世代豌豆蚜的生殖細胞特化模式，將有助於釐清孤雌胎生豌豆蚜所採用的方式是否為半翅目昆蟲的特例。同時，對瞭解蚜蟲生殖細胞之發育全貌和半翅目昆蟲生殖細胞之特化，亦頗有助益。

孤雌胎生豌豆蚜之胚胎前後軸決定

除了生殖細胞特化，體軸決定 (*axis determination*) 亦為昆蟲早期胚胎發育之另一重要事件。在所有模式昆蟲當中，以果蠅的分子遺傳資料最為完備。科學家已可運用正向遺傳 (*forward genetics*) 與逆向遺傳 (*reverse genetics*) 之策略來解析果蠅基因功能。因此，在果蠅所累積有關基因如何調控體軸建立之研究成果，已成為瞭解其它昆蟲體軸決定機制最重要的參考資訊來源。目前已知，果蠅前後體軸之形成始於 *gurken* (*grk*) mRNA 在卵發育中期的不對稱表現：當細胞核移至卵母細

胞後端，旋即轉錄 (transcribe) *grk* mRNA，而被轉錄的 *grk* mRNA 則進一步供作合成 Grk 蛋白的模板。因 Grk 蛋白之屬性與轉化生長因子阿法 (Transform growth factor- α , TGF- α) 這類的蛋白相近，在 Grk 蛋白被送到細胞膜之後，會與包覆於卵母細胞外的濾泡細胞 (follicle cells) 上的表皮生長因子受器 (epidermal growth factor receptor，在果蠅之別名為 Torpedo 蛋白) 結合，致使濾泡細胞產生回饋信息，回傳至卵母細胞，驅動細胞骨架 (cytoskeleton) 極性之重組。藉由細胞骨架之重組，使得依附於細胞骨架之 *bicoid* (*bcd*) mRNA 與 *oskar* (*osk*) mRNA 分別聚集於卵母細胞之前、後端。如此一來，*bcd* mRNA 和 *osk* mRNA 之不對稱分布 (asymmetric localization)，確立了卵前後端的極性，同時 *bcd* 和 *osk* 亦將調控胚胎前後體軸 (anteroposterior axis) 的形成 (Berleth *et al.*, 1988; St Johnston and Nüsslein-Volhard, 1992; Gonzalez-Reyes *et al.*, 1995)。

在卵受精後，其聚集於前、後端之 *bcd* 和 *osk* mRNA 經由轉譯過程，分別合成 Bcd 和 Osk 蛋白 (Driever and Nüsslein-Volhard, 1989; Ephrussi and Lehmann, 1992; Macdonald and Smibert, 1996)。已知 Bcd 蛋白會促進 *hunchback* (*hb*) mRNA 之轉譯，因此 Hb 蛋白亦如同 Bcd 蛋白由濃度最高之前端，逐次遞減至濃度最低之後端，形成濃度梯度 (concentration gradient) (Driever and Nüsslein-Volhard, 1989)。類似之情形亦發生聚集於後端的 Osk 蛋白：因 Osk 蛋白會促使 *nos* mRNA 聚集於後端 (Ephrussi and Lehmann, 1992)，而 Nos 蛋白在轉譯後，形成了一個由後端到前端的濃度梯度，並促使 *caudal* (*cad*) mRNA 之轉譯強度亦隨 Nos 梯

度由後往前遞減，建立了相同趨勢之 Cad 蛋白濃度梯度。上述由 Bcd、Osk、Hb、Nos、Cad 等蛋白所形塑之濃度梯度加總，使得在胚胎前後軸的每個位點都具有獨特的分子濃度組合，而這樣的化學濃度已被證實為位置訊息 (positional information)，對於調控果蠅體節基因之表現至為關鍵 (Peel *et al.*, 2005)。

誠如前述，果蠅胚胎之發育不但在形態和分子層次都屬長胚帶模式 (圖二 A)，因此其體軸決定機制並不能完全套用至短胚帶、甚至是某些長胚帶昆蟲的發育。目前已知，*bcd* 同源基因僅出現在和果蠅和其近源之雙翅目昆蟲。因此在缺少 *bcd* 的長胚帶的寄生蜂 (*N. vitripennis*) 和短胚帶的擬穀盜 (*T. castaneum*)，它們皆運用 *hb* 與 *orthodenticle* (*otd*) 之協同作用 (synergistic interaction) 來取代 *bcd* 的角色，以主導前端的發育 (Schröder, 2003; Lynch *et al.*, 2006)。由於 *hb* 與 *otd* 之協同作用被發現於長、短胚帶之昆蟲，因其被推測為昆蟲決定前端發育之原始機制。有鑒於此，我們原欲以 *Aphb* 與 *Apotd* 之發育表現，作為瞭解孤雌胎生豌豆蚜前軸決定之基礎，然而原位雜合之實驗結果顯示：雖然 *Aphb* mRNA 之表現聚集於卵母細胞和早期胚胎之前端 (圖三 B)，顯示 *Aphb* 很可能參與前軸之決定；但另一方面 *Apotd* 的表現則在胚胎發育中期才出現，顯示利用 *hb* 與 *otd* 之協同作用來建立前軸之機制，並未被孤雌胎生豌豆蚜所採用 (Huang *et al.*, 2010)。

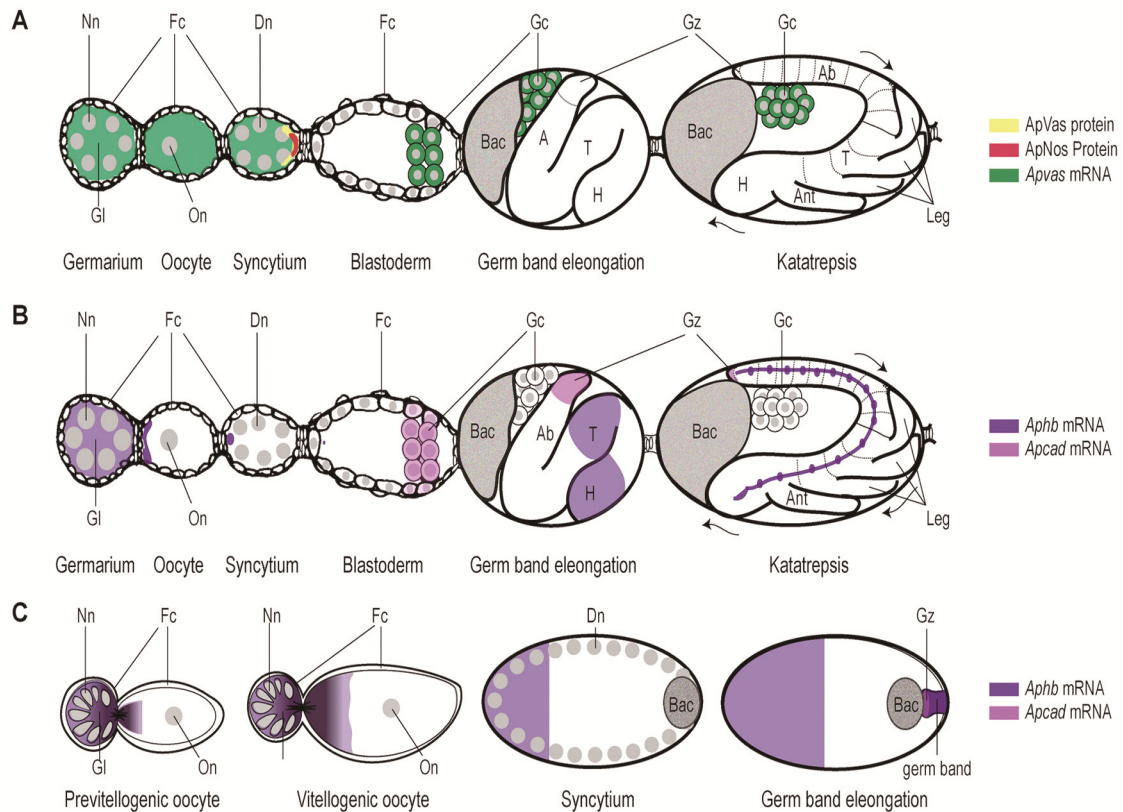
在後端發育方面，因豌豆蚜基因體不含 *osk* 同源基因序列，我們逕行研究 *nos* 與 *cad* 這兩個後端基因之表現，希望能藉由 *Apnos* 與 *Apcad* mRNA 之分布，作為瞭解後端發育之第一步。我們發現 *Apnos* (*Apnos1*) 並未於早期胚胎呈現由後至前的梯度分布，直到初始生殖細胞形成時，*Apnos1* 才專一地表現於其

中，其餘隨機分布在蛋腔中的 *Apnos1* 則被降解 (Chang *et al.*, 2009)。若結合 *Nos* 蛋白訊號聚集於蛋腔後端的事實 (Chang *et al.*, 2006)，我們推測：(一) *Apnos* 之基因產物透過不對稱分布的方式參與後端的發育；(二) 由於 *Apnos* 其它 3 個並系同源基因 (*Apnos2-4*) 的 mRNA 如何分布尚屬未知，很難論定 *Apnos* mRNA 是否藉由不對稱之聚集來直接參與後端的發育；(三) *Nos* 蛋白訊號可能是某一個或數個 *Apnos* 並系同源基因的產物，但唯有製作分屬 *ApNos1-4* 四種蛋白質之專一抗體，方能釐清 *ApNos1-4* 在後端發育所扮演的角色；(四) 比較 *Aphb* 和 *Apnos/ApNos* 分別在前後兩端聚集之時序，可讓我們明白孤雌胎生豌豆蚜之前後軸決定是否同步。

因 *cad* 基因已被證實參與果蠅 (Mlodzik *et al.*, 1985; Mlodzik and Gehring, 1987)、寄生蜂 (Olesnický *et al.*, 2006)、蟋蟀 (Shinmyo *et al.*, 2005) 等模式昆蟲早期胚胎之後端發育，我們原期待 *Apcad* mRNA 的不對稱表現能提供蚜蟲後端形成的重要線索，以彌補上述 *Apnos1* 表現資訊之不足。然而原位雜合的結果顯示：*Apcad* 反義核酸探針 (antisense riboprobe) 雖自囊胚期之後可標定胚胎的後端，證實 *Apcad* 確為孤雌胎生豌豆蚜的後端基因；然而 *Apcad* 的表現卻無法顯現在生殖原區、卵母細胞、囊胚期之前的胚胎 (圖三 B)。運用靈敏度較原位雜合高的反轉錄 PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 技術進行驗證，亦獲得相同之結果。相較於 *cad* 能表現在其它模式昆蟲的卵和早期胚胎，*Apcad* 在早期發育的缺席實屬非典型 (noncanonical) 案例。我們原以為只有在孤雌胎生豌豆蚜才能觀察到 *Apcad* 的非典型表現，然而在有性卵生的豌豆蚜，*Apcad* 的表現依舊無法受測於生殖原區和

卵母細胞 (Chang *et al.*, 2013)。然而根據 Duncan 等人對於有性生殖蚜蟲早期胚胎 *Apcad* 表現之研究顯示，母系 *Apcad* 亦不表現於合胞囊胚時期，直至胚胎體節開始延長時期才表現於胚帶後端 (圖三 C)。因此，不論在有性或無性生殖早期胚胎 (尚未細胞化之前)，豌豆蚜皆不以 *Apcad* 作為後端發育之上游因子 (Chang *et al.*, 2013; Duncan *et al.*, 2013)。

綜合 *Apnos* 與 *Apcad* 之研究成果，我們推測孤雌胎生豌豆蚜，甚至連其有性世代，都可能運用迥異於現有模式昆蟲之後端發育網路，來遂行其後端之發育 (Chang *et al.*, 2009, 2013; Duncan *et al.*, 2013)。或許在蚜蟲後端發育網路中的元件 (components)，不依循元件之間的典型上、下游調控關係，致使後軸的形成不再依賴 *Apnos* 和 *Apcad* 的後端聚集 (posterior localization)。最近有關蚜蟲末端發育 (terminal patterning) 的研究，亦支持此一推論：因為 *torso-like* 基因在豌豆蚜兩個生殖世代的差異性表現，直指在雙翅目和鱗翅目所發現的典型末端發育網路，並未獲孤雌胎生蚜蟲採用 (Bickel *et al.*, 2013)。綜覽參與動物後端發育之其它分子網路，我們認為投資 Wnt 訊息傳導路徑 (signaling pathway) 之研究，應有助於發現蚜蟲後端發育更多的線索，因為最近的研究顯示：在擬穀盜、蜚蠊與蜘蛛當中 *wnt* 基因會調控 *cad* 表現於後端生長區 (growth zone) (Bolognesi *et al.*, 2008; McGregor *et al.*, 2008; Chesebro *et al.*, 2012)。雖然這個調控關係被發現於出現在發育中後期的後端生長區，我們並不排除 *wnt* 基因參與蚜蟲早期後端發育的可能性。事實上，在後口動物 (deuterostomes；例如：蛙、魚、鼠) 和原口動物 (protostomes；例如：渦蟲、線蟲、水螅) 當中，Wnt 訊息傳導路徑已



圖三 豌豆蚜生殖基因和與發育基因之表現。(A) 生殖基因在無性生殖蚜蟲微卵管中的表現。*Apvas* mRNA 均勻地表現於生殖原區的營養細胞、發育中的卵母細胞以及合胞囊胚。從囊胚層形成之後到發育最後期，*Apvas* mRNA 始終專一地表現於生殖細胞。我們亦標示出在合胞囊胚後端聚集的 *ApVas* 和 *ApNos* 蛋白。然而這兩個蛋白與 *Appiwi2/Appiwi6* 在營養細胞、卵母細胞、生殖細胞的表現，因和 *Apvas* mRNA 的分佈類似，我們並不另行標示。生殖基因在有性世代胚胎的表現尚待進一步研究。(B) 發育基因在無性生殖蚜蟲微卵管中的表現。*Aphb* mRNA 均勻地表現於營養細胞，但是在卵母細胞卵和合胞囊胚 *Aphb* mRNA 卻聚集在前端。不過，在囊胚的前端 *Aphb* 的表現訊號已變得相當微弱。*Apcad* 的表現首度被偵測於囊胚的後端，合胞囊胚層細胞與生殖細胞，但是 *Apcad* 在生殖細胞僅屬暫時性的表現，稍後在移動的生殖細胞中便無法測得。在延展中的胚帶，*Aphb* 的表現較偏好出現於頭胸的位置；稍後，它會在歷經轉向之胚胎的中樞神經系統當中表現。*Apcad* 的表現則一直維持在胚帶的後端。(C) 發育基因在有性生殖蚜蟲的微卵管和胚胎當中的表現（註：有性生殖蚜蟲的微卵管並不含胚胎，僅有生殖原區和卵母細胞的構造）。如同 *Aphb* 在無性世代的表現，*Aphb* mRNA 均勻地表現於營養細胞而且會聚集於卵母細胞之前端。受精後，*Aphb* 的表現仍可維持在蛋腔前端。在剛剛陷入蛋腔中的胚帶，亦可觀察到 *Aphb* 的均勻表現，然而 *Apcad* mRNA 卻是集中於胚帶的後端。在本圖，左側為蛋腔前方。縮寫：Ab—腹部；Ant—觸角；Bac—內共生菌；Dn—分裂中的細胞核；Fc—濾泡細胞；Gc—生殖細胞；Gl—生殖原區空腔；Gz—後端生長區；H—頭部；Leg—足；T—胸部；Nn—營養細胞核；On—卵母細胞核。

Fig. 3. Expression of germline genes and developmental genes in the pea aphid. (A) Germline genes in the asexual ovariole. *Apvas* mRNA is evenly expressed in nurse cells of germaria, developing oocytes and syncytia. Specific expression of *Apvas* mRNA can be identified in germ cells from the blastoderm stage to the end of embryogenesis. Localization of ApVas and ApNos proteins is detected in the posterior region of syncytia. Distributions of proteins of ApVas/ApNos and transcripts of *Appiwi2/Appiwi6* in germaria, oocytes, syncytia, and developing germ cells are similar to that of *Apvas* mRNA. Therefore, they are not illustrated. Expression of germline genes in the sexual embryos requires further investigation. (B) Developmental genes in the asexual ovarioles. Universal expression of *Aphb* mRNA can be identified in nurse cells and anterior localization of *Aphb* can be identified in oocytes and syncytia. In blastula, signals of anteriorly localized *Aphb* mRNA become very weak. *Apcad* mRNA is first expressed in the posterior region of the blastula, including blastodermal cells and germ cells. However, germline expression of *Apcad* in the blastula is transient because it cannot be detected in migrating germ cells afterwards. In elongating germ band, *Aphb* is preferentially expressed in the head and thorax; from katrepsis onward, preferential expression of *Aphb* can be detected in the central nerve system. Transcripts of *Apcad* are restricted to the posterior end of the germ band throughout embryogenesis. (C) Developmental genes in the sexual ovarioles and embryos. Please note that the sexual ovarioles do not harbor embryos. Expression of *Aphb*, like that in the asexual ovarioles, is detected in nurse cells as well as the anterior region of developing oocytes. After fertilization, preferential expression of *Aphb* remains in the egg anterior. In the invaginating germ band, *Aphb* is uniformly expressed but expression of *Apcad* is located in the posterior region. Anterior of egg chambers is to the left. Abbreviations: Ab, abdomen; Ant, antenna; Bac, bacterial cells; Dn, divided nuclei; Fc, follicle cells; Gc, germ cells; Gl, germarium lumen; Gz, posterior growth zone; H, head; T, thorax; Nn, nurse cell nuclei; On, oocyte nuclei.

被發現參與調控後端屬性 (posterior identity) 之形塑 (Martin and Kimelman, 2009; Petersen and Reddien, 2009)。因此，以 *wnt* 基因高度演化保守的特性而言，它涉入蚜蟲後端發育應具有相當之可能性。

結論與展望：蚜蟲的基因功能解析、發育多樣性以及分子開關

然而，不論探究 *wnt* 基因是否為蚜蟲後端發育網路中最上游之調控因子，或是進一步檢視其它發育基因的角色，能否有效地運用或研發基因功能分析工具 (tools for gene function analysis)，將是關鍵所在。因蚜蟲有性世代須歷經長達至少一百天的滯育期 (diapause) (Shingleton *et al.*, 2003; Le Trionnaire *et al.*, 2008)，且產卵量少 (平均每隻母蟲約產 20 至 30 顆)，不適合在其中進行正向遺傳實驗

之突變株篩選，以及找到造成突變性狀之基因位址 (gene locus)。反之，在突變株資料較為薄弱的新興模式動物，基因功能之解析大多採逆向遺傳之策略，也就是將目標基因的表現抑制之後，再研析其性狀的改變，從而瞭解基因之功能，蚜蟲亦循此模式。毫無疑問，核醣核酸干擾術 (RNA interference, RNAi) 近年來已成為最有效、最普遍的基因抑制工具。雖目前已有數篇文獻報導運用 RNAi 來抑制蚜蟲基因表現之研究 (表一)，然不論是經由注射、餵食或藉由轉基因植物產生雙股 RNA (double-stranded RNA, dsRNA)，基因抑制實驗侷限於若蟲和成蟲，而且抑制效果僅達 40 ~ 60% (Jaubert-Possamai *et al.*, 2007; Pitino *et al.*, 2011; Pitino and Hogenhout, 2013)。至於 dsRNA 對表現於胚胎當中的基因抑制數據，目前仍付之闕如。經由國際合作之資訊交換，我們得知 dsRNA 目前尚未能有

表一 蚜蟲基因干擾技術之比較

Table 1. Comparison of RNAi technology in aphids

Species	Target gene	Location	Methods	Concentration	Efficiency of silencing	Lethality	Reference
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	<i>c002</i>	Salivary gland	Microinjection	50 ng	-	-	Mutti <i>et al.</i> , 2006, 2008
	<i>Calreticulin</i>	Whole body	Microinjection	276 ng	40%	15-45%	Jaubert-Possamai <i>et al.</i> , 2007
	<i>gus</i> & <i>vATPase</i>	Intestines	Artificial diet	3 µg/µL	-	-	Whyard <i>et al.</i> , 2009
	<i>Aquaporin</i>	Intestines	Artificial diet	1 µg/µL	-	-	Shakesby <i>et al.</i> , 2009
<i>Myzus persicae</i>	<i>c002</i>	Salivary gland	Transgenic plant	-	60%	-	Pitino <i>et al.</i> , 2011
	<i>serine protease</i>	Gut	Transgenic plant	-	-	-	Bhatia <i>et al.</i> , 2012
	<i>Mp1</i> and <i>Mp2</i>	Salivary gland	Transgenic plant	-	40%	-	Pitino and Hogenhout, 2013

- : no data

效地進入胚胎之中，以遂行其抑制的目的。當然，核醣核酸干擾術並非抑制蚜蟲基因表現的唯一考量工具，已經可在斑馬魚、海膽、擬穀盜等模式動物抑制基因轉譯 (gene translation) 和前驅 mRNA (pre-mRNA) 剪接 (splicing) 的「反義嗎啉基寡核苷酸 (antisense morpholino oligonucleotides, AMO)」(Ekker, 2000; Heasman, 2002; Bucher and Klingler, 2004; Coffman *et al.*, 2004)，亦可能具備抑制蚜蟲基因功能的潛力。然而 AMO 雖有通透性較佳的優點，但是它卻不若 dsRNA 可透過核醣核酸干擾反應機制來放大抑制效能；反之，其抑制效果會隨著胚胎細胞數目的增加而被稀釋 (Summerston and Weller, 1997; Draper *et al.*, 2001; Eisen and Smith, 2008)。不過由於 AMO 對於動物早期胚胎發育基因功能之抑制成效頗佳 (Nasevicius and Ekker, 2000; Eisen and Smith, 2008; Bill *et al.*, 2009; Bedell *et al.*, 2011)，它仍可能是解析蚜蟲早期發育機制可倚重的工具。

另一方面，拓展發育基因在有性世代的研

究，將使得蚜蟲提升為研究動物發育多型性最重要之模式物種。現有的模式動物雖有較成熟的基因分析工具，然而它們的大部分的生活史並不具無性和有性世代的交替，自然很難由其中探究為何可藉由同一組基因來體調控兩種生殖世代的嬗遞。蚜蟲對外在環境變化所產生之顯著調適改變，實為其研究最大優勢。我們之前所研究的 8 個 *piwi* 並系同源基因自長日照至短日照所產生的表現改變 (Lu *et al.*, 2011)，加上 *Aphb* 在無性 (圖三 B)、有性世代 (圖三 C) 卵胚的表現之差異，還有近期有關末端發育網路在無性和有性世代的報導 (Bickel *et al.*, 2013)，在在都顯示蚜蟲採用“兩種版本”的發育藍圖來調控這兩種生殖世代的發育。那麼，到底是什麼樣的“分子開關”能對環境的改變做出世代的切換？目前仍處於完全未知之階段。然而若能掌握這些調控序列，進一步以化學、物理或遺傳工具進行蚜蟲世代交替之切換，屆時將造成大發生的孤雌胎生方式轉變到必須歷經滯育之有性卵生模式 (圖一 B)，應可大幅降低危害農作物之蚜蟲族

群數量。因此，積極提升對蚜蟲生長發育基因之探究能量，將蚜蟲轉化為更成熟之基因體與發育學模式昆蟲，更益顯對基礎和應用農學之重要性。

誌 謝

我們非常感謝 Charles E. Cook 博士、李文志博士、呂曉鈴以及許多前任團隊成員對蚜蟲生殖細胞和生殖發育基因研究的貢獻；同時感謝現任團隊成員給予本篇文章中肯的建議與校正。中興大學郭美華老師慨允提供蚜蟲和相關生物學專業建議；國家科學委員會 (101-2313-B-002-059-MY3 和 101-2321-B-002-090-MY2)、行政院農業委員會動植物防疫檢疫局 (101.10.2.1-B3(4))、國立臺灣大學 (NTU-CESRP 101R4602D3 和 102R7602D3) 以及中央研究院等單位過去這十年對建立蚜蟲成為基因體學和發育學模式物種所給予之補助和協助，在此一並致謝。

引用文獻

- Bedell VM, Westcot SE, Ekker SC.** 2011. Lessons from morpholino-based screening in zebrafish. *Brief Funct Genomics* 10(4): 181-188.
- Berleth T, Burri M, Thoma G, Bopp D, Richstein S, Frigerio G, Noll M, Nüsslein-Volhard C.** 1988. The role of localization of *bicoid* RNA in organizing the anterior pattern of the *Drosophila* embryo. *EMBO J* 7: 1749-1756.
- Bhatia V, Bhattacharya R, Uniyal PL, Singh R, Niranjana RS.** 2012. Host generated siRNAs attenuate expression of serine protease gene in *Myzus persicae*. *PLoS One* 7(10): e46343.
- Bickel RD, Cleveland HC, Barkas J, Jeschke CC, Raz AA, Stern DL, Davis GK.** 2013. The pea aphid uses a version of the terminal system during oviparous, but not viviparous, development. *Evodevo* 4(1): 10.
- Bill BR, Petzold AM, Clark KJ, Schimmenti LA, Ekker SC.** 2009. A primer for morpholino use in zebrafish. *Zebrafish* 6(1): 69-77.
- Blackman RL.** 1978. Early development of parthenogenetic egg in three species of aphids (Homoptera Aphididae) *Int J Insect Morphol* 7: 33-44.
- Blackman RL, Eastop VF.** 2000. Aphids on the world's crops. an identification and information guide. New York: John Wiley & Sons, Inc. 476 pp.
- Bolognesi R, Beermann A, Farzana L, Wittkopp N, Lutz R, Balavoine G, Brown SJ, Schröder R.** 2008. *Tribolium* Wnts: evidence for a larger repertoire in insects with overlapping expression patterns that suggest multiple redundant functions in embryogenesis. *Dev Genes Evol* 218(3-4): 193-202.
- Bowers WS, Nault LR, Webb RE, Dutky SR.** 1972. Aphid alarm pheromone: isolation, identification, synthesis. *Science* 177(4054): 1121-1122.
- Braendle C, Davis GK, Brisson JA, Stern DL.** 2006. Wing dimorphism in aphids. *Heredity (Edinb)* 97(3): 192-199.

- Brisson JA, Stern DL.** 2006. The pea aphid *Acyrtosiphon pisum*: an emerging genomic model system for ecological developmental and evolutionary studies. *Bioessays* 28(7): 747-755.
- Bucher G, Klingler M.** 2004. Divergent segmentation mechanism in the short germ insect *Tribolium* revealed by *giant* expression and function. *Development* 131(8): 1729-1740.
- Büning, J.** 1985. Morphology, ultrastructure and germ-cell cluster formation in ovarioles of aphids. *J Morphol* 186: 209-221.
- Chesebro JE, Pueyo JI, Couso JP.** 2013. Interplay between a Wnt-dependent organiser and the Notch segmentation clock regulates posterior development in *Periplaneta americana*. *Biol Open* 2(2): 227-237.
- Chang C-c, Dearden P, Akam M.** 2002. Germ line development in the grasshopper *Schistocerca gregaria*: *vasa* as a marker. *Dev Biol* 252(1): 100-118.
- Chang C-c, Huang TY, Shih CL, Lin GW, Chang TP, Chiu H, Chang WC.** 2008. Whole-mount identification of gene transcripts in aphids: protocols and evaluation of probe accessibility. *Arch Insect Biochem Physiol* 68:186-196.
- Chang C-c, Hsiao Y-m, Huang TY, Cook CE, Shigenobu S, Chang TH.** 2013. Noncanonical expression of *caudal* during early embryogenesis in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*: maternal *cad*-driven posterior development is not conserved. *Insect Mol Biol* 22(4): 442-455.
- Chang C-c, Huang TY, Cook CE, Lin GW, Shih CL, Chen RP.** 2009. Developmental expression of *Apnanos* during oogenesis and embryogenesis in the parthenogenetic pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Int J Dev Biol* 53(1): 169-176.
- Chang C-c, Lee WC, Cook CE, Lin GW, Chang T.** 2006. Germ-plasm specification and germline development in the parthenogenetic pea aphid *Acyrtosiphon pisum*: *Vasa* and *Nanos* as markers. *Int J Dev Biol* 50(4): 413-421.
- Chang C-c, Lin GW, Cook CE, Horng SB, Lee HJ, Huang TY.** 2007. *Apvasa* marks germ-cell migration in the parthenogenetic pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphidoidea). *Dev Genes Evol* 217(4): 275-287.
- Coffman JA, Dickey-Sims C, Haug JS, McCarthy JJ, Robertson AJ.** 2004. Evaluation of developmental phenotypes produced by morpholino antisense targeting of a sea urchin *Runx* gene. *BMC Biol* 2: 6.
- Czech B, Hannon GJ.** 2011. Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nat Rev Genet* 12: 19-31.
- Davis GK.** 2012. Cyclical parthenogenesis and viviparity in aphids as evolutionary novelties. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 318(6): 448-459.
- Dearden PK.** 2006. Germ cell development in the Honeybee (*Apis mellifera*); *vasa*

- and *nanos* expression. *BMC Dev Biol* 6: 6.
- Dixon AFG.** 1977. Aphid ecology: life cycles, polymorphism, and population regulation. *Ann Rev Ecol Syst* 8: 329-353.
- Douglas AE, Prosser WA.** 1992. Synthesis of the essential amino acid tryptophan in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) symbiosis. *J Insect Physiol* 38(8): 565-568.
- Draper BW, Morcos PA, Kimmel CB.** 2001. Inhibition of zebrafish *fgf8* pre-mRNA splicing with morpholino oligos: a quantifiable method for gene knockdown. *Genesis* 30(3): 154-156.
- Dunbar HE, Wilson AC, Ferguson NR, Moran NA.** 2007. Aphid thermal tolerance is governed by a point mutation in bacterial symbionts. *PLoS Biol* 5(5): e96.
- Driever W, Nüsslein-Volhard C.** 1989. The bicoid protein is a positive regulator of *hunchback* transcription in the early *Drosophila* embryo. *Nature* 337(6203): 138-143.
- Duncan EJ, Leask MP, Dearden PK.** 2013. The pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) genome encodes two divergent early developmental programs. *Dev Biol* 377(1): 262-274.
- Eisen JS, Smith JC.** 2008. Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense. *Development* 135(10): 1735-1743.
- Ephrussi A, Lehmann R.** 1992. Induction of germ cell formation by *oskar*. *Nature* 358(6385): 387-392.
- Ekker SC.** 2000. Morphants: a new systematic vertebrate functional genomics approach. *Yeast* 17(4): 302-306.
- Ewen-Campen B, Donoughe S, Clarke DN, Extavour CG.** 2013a. Germ cell specification requires zygotic mechanisms rather than germ plasm in a basally branching insect. *Curr Biol* 23(10): 835-842.
- Ewen-Campen B, Jones TE, Extavour CG.** 2013b. Evidence against a germ plasm in the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus*, a hemimetabolous insect. *Biol Open* 2(6): 556-568.
- Extavour CG, Akam M.** 2003. Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: epigenesis and preformation. *Development* 130(24): 5869-5884.
- Gonzalez-Reyes A, Elliott H, St Johnston D.** 1995. Polarization of both major body axes in *Drosophila* by *gurken-torpedo* signalling. *Nature* 375(6533): 654-658.
- Hagan HR.** 1951. Embryology of the viviparous insects. New York: The Ronald Press. 472 pp.
- Hansen AK, Moran NA.** 2011. Aphid genome expression reveals host-symbiont cooperation in the production of amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(7): 2849-2854.
- Hay B, Ackerman L, Barbel S, Jan LY, Jan YN.** 1988. Identification of a component of *Drosophila* polar granules. *Development* 103(4): 625-640.

- Hanyu-Nakamura K, Kobayashi S, Nakamura A.** 2004. Germ cellautonomous Wunen2 is required for germline development in *Drosophila* embryos. *Development* 131: 4545-4553.
- Heasman J.** 2002. Morpholino oligos: making sense of antisense? *Dev Biol* 243(2): 209-214.
- Huang TY, Cook CE, Davis GK, Shigenobu S, Chen RP, Chang C-c.** 2010. Anterior development in the parthenogenetic and viviparous form of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*: *hunchback* and *orthodenticle* expression. *Insect Mol Biol* 19 Suppl 2: 75-85.
- Jaubert-Possamai S, Le Trionnaire G, Bonhomme J, Christophides GK, Risper C, Tagu D.** 2007. Gene knockdown by RNAi in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* *BMC Biotechnol* 7: 63.
- Juhn J, James AA.** 2006. *oskar* gene expression in the vector mosquitoes, *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol* 15(3): 363-372.
- Lasko PF.** 1992. Molecular movements in oocyte patterning and pole cell differentiation. *Bioessays* 14(8): 507-512.
- Lasko PF, Ashburner M.** 1988. The product of the *Drosophila* gene *vasa* is very similar to eukaryotic initiation factor-4A. *Nature* 335(6191): 611-617.
- Laughton AM, Garcia JR, Altincicek B, Strand MR, Gerardo NM.** 2011. Characterisation of immune responses in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *J Insect Physiol* 57(6): 830-839.
- Lees AD.** 1989. The photoperiodic responses and phenology of an English strain of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Ecol Entomol* 14: 69-78.
- Le Trionnaire G, Hardie J, Jaubert-Possamai S, Simon JC, Tagu D.** 2008. Shifting from clonal to sexual reproduction in aphids: physiological and developmental aspects. *Biol Cell* 100(8): 441-451.
- Lu HL, Tanguy S, Risper C, Gauthier JP, Walsh T, Gordon K, Edwards O, Tagu D, Chang C-c, Jaubert-Possamai S.** 2011. Expansion of genes encoding piRNA-associated argonaute proteins in the pea aphid: diversification of expression profiles in different plastic morphs. *PLoS One* 6(12): e28051.
- Lynch JA, Brent AE, Leaf DS, Pultz MA, Desplan C.** 2006. Localized maternal *orthodenticle* patterns anterior and posterior in the long germ wasp *Nasonia*. *Nature* 439(7077): 728-732.
- Lynch JA, Desplan C.** 2010. Novel modes of localization and function of *nanos* in the wasp *Nasonia*. *Development* 137(22): 3813-3821.
- Lynch JA, Ozuak O, Khila A, Abouheif E, Desplan C, Roth S.** 2011. The phylogenetic origin of *oskar* coincided with the origin of maternally provisioned germ plasm and pole cells at the base of the Holometabola. *PLoS Genet* 7(4): e1002029.

- Macdonald PM, Struhl G.** 1986. A molecular gradient in early *Drosophila* embryos and its role in specifying the body pattern. *Nature* 324(6097): 537-545.
- Martin BL, Kimelman D.** 2009. Wnt signaling and the evolution of embryonic posterior development. *Curr Biol* 19(5): R215-R219.
- McGregor AP, Pechmann M, Schwager EE, Feitosa NM, Kruck S, Aranda M, Damen WG.** 2008. Wnt8 is required for growth-zone establishment and development of opisthosomal segments in a spider. *Curr Biol* 18(20): 1619-1623.
- Miyazaki M.** 1987. Forms and morphs of aphids. pp 27-50. In: Minks AK, Harrewijn P (eds). *Aphids, Their Biology, Natural Enemies and Control*. Elsevier Science Ltd, Amsterdam, NL.
- Mlodzik M, Fjose A, Gehring WJ.** 1985. Isolation of *caudal*, a *Drosophila* homeo box-containing gene with maternal expression, whose transcripts form a concentration gradient at the pre-blastoderm stage. *EMBO J* 4(11): 2961-2969.
- Mlodzik M, Gehring WJ.** 1987. Expression of the *caudal* gene in the germ line of *Drosophila*: formation of an RNA and protein gradient during early embryogenesis. *Cell* 48(3): 465-478.
- Miller GJ, Foottit RG.** 2009. The taxonomy of crop pests: the aphids. pp 463-473. In: Foottit RG, Adler PH (eds). *Insect Biodiversity: Science and Society*, Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
- Miura T, Braendle C, Shingleton A, Sisk G, Kambhampati S, Stern DL.** 2003. A comparison of parthenogenetic and sexual embryogenesis of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphidoidea). *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 295(1): 59-81.
- Montllor CB, Maxman A, Purcell AH.** 2002. Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrtosiphon pisum* under heat stress. *Ecol Entomol* 27(2): 189-195.
- Munson MA, Baumann P, Clark MA, Baumann L, Moran NA, Voegtlin DJ, Campbell BC.** 1991. Evidence for the establishment of aphid-eubacterium endosymbiosis in an ancestor of four aphid families. *J Bacteriol* 173(20): 6321-6324.
- Mutti NS, Louis J, Pappan LK, Pappan K, Begum K, Chen MS, Park Y, Dittmer N, Marshall J, Reese JC, Reeck GR.** 2008. A protein from the salivary glands of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* is essential in feeding on a host plant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(29): 9965-9969.
- Mutti NS, Park Y, Reese JC, Reeck GR.** 2006. RNAi knockdown of a salivary transcript leading to lethality in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *J Insect Sci* 6: 1-7.
- Nakao H, Matsumoto T, Oba Y, Niimi T, Yaginuma T.** 2008. Germ cell

- specification and early embryonic patterning in *Bombyx mori* as revealed by nanos orthologues. *Evol Dev* 10(5): 546-554.
- Nakao H.** 1999. Isolation and characterization of a *Bombyx vasa*-like gene. *Dev Genes Evol* 209: 312-316.
- Nasevicius A, Ekker SC.** 2000. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish, *Nat Genet* 26(2): 216-220.
- Nelson JA.** 1915. The embryology of the honey bee. Princeton University Press, USA. 301 pp.
- Noce T, Okamoto-Ito S, Tsunekawa N.** 2001. Vasa homolog genes in mammalian germ cell development. *Cell Struct Funct* 26: 131-136.
- Oerke EC.** 1994. Crop production and crop protection: estimated losses in major food and cash crops. Elsevier, USA. 808 pp.
- Olesnicki EC, Brent AE, Tonnes L, Walker M, Pultz MA, Leaf D, Desplan C.** 2006. A *caudal* mRNA gradient controls posterior development in the wasp *Nasonia*. *Development* 133(20): 3973-3982.
- Oliver KM, Noge K, Huang EM, Campos JM, Becerra JX, Hunter MS.** 2012. Parasitic wasp responses to symbiont-based defense in aphids. *BMC Biol* 10: 11.
- Ortiz-Rivas B, Martinez-Torres D.** 2010. Combination of molecular data support the existence of three main lineages in the phylogeny of aphids (Hemiptera: Aphididae) and the basal position of the subfamily Lachninae. *Mol Phylogenet Evol* 55(1): 305-317.
- Parker JS, Parizotto EA, Wang M, Roe SM, Barford D.** 2009. Enhancement of the seed-target recognition step in RNA silencing by a PIWI/MID domain protein. *Mol Cell* 33: 204-214.
- Petersen CP, Reddien P.** 2009. Wnt signaling and the polarity of the primary body axis. *Cell* 139(6): 1056-1068.
- Peel AD, Chipman AD, Akam M.** 2005. Arthropod segmentation: beyond the *Drosophila* paradigm. *Nat Rev Genet* 6(12): 905-916.
- Pitino M, Coleman AD, Maffei ME, Ridout CJ, Hogenhout SA.** 2011. Silencing of aphid genes by dsRNA feeding from plants. *PLoS One* 6(10): e25709.
- Pitino M, Hogenhout SA.** 2013. Aphid protein effectors promote aphid colonization in a plant species-specific manner. *Mol Plant Microbe Interact* 26(1): 130-139.
- Raz E.** 2000. The function and regulation of *vasa*-like genes in germcell development. *Genome Biol* 1(3): reviews 1017.1-1017.6.
- Saffman EE, Lasko P.** 1999. Germline development in vertebrates and invertebrates. *Cell Mol Life Sci* 55(8-9): 1141-1163.
- Schmitz A, Anselme C, Ravallec M, Rebuf C, Simon JC, Gatti JL, Poirié M.** 2012. The cellular immune response of the

- pea aphid to foreign intrusion and symbiotic challenge. *PLoS One* 7(7): e42114.
- Schröder R.** 2003. The genes *orthodenticle* and *hunchback* substitute for *bicoid* in the beetle *Tribolium*. *Nature* 422(6932): 621-625.
- Schröder R.** 2006. *vasa* mRNA accumulates at the posterior pole during blastoderm formation in the flour beetle *Tribolium castaneum*. *Dev Genes Evol* 216(5): 277-283.
- Schurko AM, Logsdon JM Jr, Eads BD.** 2009. Meiosis genes in *Daphnia pulex* and the role of parthenogenesis in genome evolution. *BMC Evol Biol* 9: 78.
- Senti KA, Brennecke J.** 2010. The piRNA pathway: a fly's perspective on the guardian of the genome. *Trends Genet* 26: 499-509.
- Shakesby AJ, Wallace IS, Isaacs HV, Pritchard J, Roberts DM, Douglas AE.** 2009. A water-specific aquaporin involved in aphid osmoregulation. *Insect Biochem Mol Biol* 39(1): 1-10.
- Shigenobu S, Bickel RD, Brisson JA, Butts T, Chang C-c, Christiaens O, Davis GK, Duncan EJ, Ferrier DE, Iga M, Janssen R, Lin GW, Lu HL, McGregor AP, Miura T, Smagghe G, Smith JM, van der Zee M, Velarde RA, Wilson MJ, Dearden PK, Stern DL.** 2010. Comprehensive survey of developmental genes in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*: frequent lineage-specific duplications and losses of developmental genes. *Insect Mol Biol* 19 Suppl 2: 47-62.
- Shingleton AW, Sisk GC, Stern DL.** 2003. Diapause in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) is a slowing but not a cessation of development. *BMC Dev Biol* 3: 7.
- Shinmyo Y, Mito T, Matsushita T, Sarashina I, Miyawaki K, Ohuchi H, Noji S.** 2005. *caudal* is required for gnathal and thoracic patterning and for posterior elongation in the intermediate-germband cricket *Gryllus bimaculatus*. *Mech Dev* 122(2): 231-239.
- Srinivasan DG, Brisson JA.** 2012. Aphids: a model for polyphenism and epigenetics. *Genet Res Int* 2012: 431531.
- St Johnston D, Nüsslein-Volhard C.** 1992. The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell* 68: 201-219.
- Stern DL.** 2008. Aphids. *Curr Biol* 18(12): R504-R505.
- Summerton J, Weller D.** 1997. Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 7(3): 187-195.
- The International Aphid Genomics Consortium.** 2010. Genome sequence of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *PLoS Biol* 8(2): e1000313.
- Tsuchida T, Koga R, Horikawa M, Tsunoda T, Maoka T, Matsumoto S, Simon JC, Fukatsu T.** 2010. Symbiotic

- bacterium modifies aphid body color.
Science 330(6007): 1102-1104.
- van Emden HF, Harrington R.** 2007.
Aphids as crops pests. Wallingford,
Oxford, UK: CABI. 717 pp.
- Whyard S, Singh AD, Wong S.** 2009.
Ingested double-stranded RNAs can
act as species-specific insecticides.
Insect Biochem Mol Biol 39(11): 824-
832.
- Will L.** 1888. Entwicklungsgeschichte der
viviparen Aphiden. *Zool Jahrb Anat* 3:
201-286.
- 收件日期：2013年9月7日
接受日期：2013年10月24日

Establishment of the Pea Aphid as a Developmental Model Organism: History, Significance, and Future Prospects

Yi-min Hsiao^{1,2}, Gee-Way Lin^{1,4}, and Chun-che Chang^{1,2,3,4*}

¹ Department of Entomology, College of Bioresources and Agriculture, National Taiwan University, Taipei, Taiwan

² Institute of Biotechnology, College of Bioresources and Agriculture, National Taiwan University, Taipei, Taiwan

³ Research Center for Developmental Biology and Regenerative Medicine, National Taiwan University, Taipei, Taiwan

⁴ Genome and Systems Biology Degree Program, National Taiwan University, Taipei, Taiwan

ABSTRACT

Establishment of model organisms can greatly enrich the understanding of developmental diversity and the expansion of biological knowledge. The fruit fly *Drosophila melanogaster*, being an important model of developmental genetics, has become one of the notable examples among animal models. Aphids have a long history as a notorious insect pest, but they have not been considered as an insect model until the recent publication of whole genome sequence of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. This accessible genome has allowed studying developmental polyphenism, adaptation, aphid-bacterial symbiosis, and virus transmission—all of which are research problems difficult to access in existing model organisms—on a molecular and systematic level. Here, we review the progress of germline specification and anteroposterior axis development in the pea aphid, describing how the pea aphid has become an emerging insect model for developmental studies. In addition, we also argue for the urgent need of functional tools necessary for genetic analysis and propose future studies on both basic and applied agricultural sciences. Our ultimate goal is to establish aphids as a mature insect model.

Key words: aphids, embryo, model organism, developmental polyphenism, germ cells

* Corresponding email: chunche@ntu.edu.tw