

云杉花墨天牛转录组分析及其生物防治相关基因筛选

方思茗¹ 徐周策¹ 吴宗仁² 石娟^{1*}

(1. 北京林业大学林学院, 林木有害生物防治北京市重点实验室, 中法欧亚森林入侵生物联合实验室, 北京 100083; 2. 江西省林业有害生物防治检疫中心, 南昌 330006)

摘要: 为明确云杉花墨天牛 *Monochamus saltuarius* 的基因组功能信息, 并筛选其生物防治相关基因, 利用 Illumina Novaseq 6000 平台对云杉花墨天牛成虫进行转录组测序和生物信息学分析, 并在 NR、GO 和 KEGG 数据库进行基因功能注释。结果显示, 共获得 190.06 Gb 的云杉花墨天牛有效转录组数据, 得到 35 728 个 unigene, 平均长度为 1 270.83 bp, 组装得到 58 142 个转录本, N50 长度为 2 135 bp。所得 unigene 在 NR 数据库中比对注释到相似基因数量占比最高的物种为光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis*, 达到 63.83%, 在 GO 数据库中按功能注释分为生物学进程、细胞组分和分子功能 3 大类 60 个亚类, 在 KEGG 数据库注释到 44 条代谢通路中。根据基因注释信息进一步挖掘出具有生物防治潜力的嗅觉相关基因 43 个、蜕皮相关基因 149 个、几丁质代谢相关基因 35 个、飞行相关基因 6 个和木质纤维素相关基因 39 个, 可作为后期开发新的分子工具和云杉花墨天牛生物防治技术的备选靶标基因。

关键词: 云杉花墨天牛; 转录组; 靶标基因; 生物信息学分析; 生物防治

Transcriptome study and screening of biocontrol related genes in Sakhalin pine sawyer *Monochamus saltuarius*

Fang Siming¹ Xu Zhouce¹ Wu Zongren² Shi Juan^{1*}

(1. Sino-France Joint Laboratory for Invasive Forest Pests in Eurasia, Beijing Key Laboratory for Forest Pest Control, College of Forestry, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2. Jiangxi Forest Pests Control and Quarantine Center, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China)

Abstract: To clarify the functional information of the Sakhalin pine sawyer *Monochamus saltuarius* genome and identify the genes related to its biocontrol, transcriptome sequencing and bioinformatics analysis were performed on adult *M. saltuarius* by using the Illumina Novaseq 6000 platform. Functional annotation of the genes was carried out in the NR, GO and KEGG databases. The results revealed a total of 190.06 Gb of validated transcriptome data, yielding 35 728 unigenes for *M. saltuarius*. The average unigene length was 1 270.83 bp, with 58 142 transcripts and an N50 length of 2 135 bp. Comparison and annotation of the unigenes in the NR database showed the highest percentage of similar genes in *Anoplophora glabripennis* (63.83%). Functional annotation in the GO database classified unigenes into three major categories and 60 subcategories: biological processes, cellular components, and molecular functions. In the KEGG database, 44 KEGG metabolic pathways were annotated. Based on the gene annotation information, 43 olfaction-related genes, 149 molt-related genes, 35 genes related to chitin metabolism, six flight-related genes, and 39 genes related to lignocellulose were identified. These genes could serve as potential target genes for the development of new molecular tools and biocontrol technol-

基金项目: 江西省林业厅林业科技创新专项(201912), 中央高校基本科研业务费专项资金(QNTD202304)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: BJshijuan@bjfu.edu.cn

收稿日期: 2023-11-28

ogies for *M. saltuarius*.

Key words: *Monochamus saltuarius*; transcriptome; target gene; bioinformatics analysis; biological control

松材线虫病是由松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* 引起的系统侵染性病害,主要通过媒介昆虫进行传播。该病害自 1982 年在我国南京市中山陵首次被发现以来,已向西北扩散至甘肃省陇南县,向北扩散至吉林省通化市等地区,对森林资源和生态环境造成了严重破坏(叶建仁和吴小芹,2002)。松材线虫的媒介昆虫主要是墨天牛属 *Monochamus* 的昆虫(张建军等,2007),其中云杉花墨天牛 *Monochamus saltuarius* 是我国东北地区松科植物的主要蛀干昆虫,也是松材线虫的媒介昆虫,对媒介昆虫的有效防控是控制东北地区松材线虫病发生与扩散的重要环节。目前,控制媒介昆虫的方法有生物防治、化学防治、引诱剂(木)杀灭以及营林防治等,以上方法都能在一定程度上起到防治作用,但存在成本高、防治时间难控制和污染环境等问题(蔡榕玲,2018)。因此,针对媒介昆虫寻求一种安全、可靠、高效的防治方法迫在眉睫。

近年来,利用RNA干扰(RNA interference, RNAi) 技术进行害虫防治已成为研究热点,这种方法具有开发周期短、特异性高和对环境友好等优势。目前 RNAi 技术已经在鳞翅目和鞘翅目等害虫的防治中得到了良好的应用(Kumar et al., 2009; Fishilevich et al., 2016)。利用该方法防治害虫的关键是要找出能影响其正常生命活动的靶标基因,而目前对墨天牛属昆虫的研究多集中在松墨天牛 *Monochamus alternatus* 上(蔡榕玲,2018; Zhou et al., 2018),对云杉花墨天牛的生物防治相关基因表达和功能分析等尚缺乏系统研究。

本研究利用 Illumina 测序技术对云杉花墨天牛成虫转录组进行测序和分析,从中挖掘云杉花墨天牛生长发育关键基因,以期开发云杉花墨天牛绿色靶标农药提供靶标基因,也为有效控制松材线虫病的扩散蔓延提供新途径。

1 材料与方法

1.1 材料

供试昆虫:云杉花墨天牛幼虫收集于辽宁省抚顺市大伙房实验林场,带回后在温度 25 °C、相对湿度 60%~70%、黑暗的人工气候箱中用人工饲料饲养至羽化后,取成虫供试。人工饲料由中国林业科学研究院提供。

试剂和仪器:细胞/组织总 RNA 提取试剂盒,翌圣生物科技(上海)股份有限公司;反转录试剂盒,日本 TaKaRa 公司;SuperScript™ 双链 cDNA 合成试剂盒,美国赛默飞世尔公司;其余试剂均为国产分析纯。PRX-250A 人工气候箱,上海川昱实验仪器有限公司;NanoDrop 8000 超微量紫外分光光度计,美国赛默飞世尔公司;PowerPac Basic 基础型电泳仪,美国伯乐有限公司;Illumina Novaseq 6000,美国因美纳公司。

1.2 方法

1.2.1 云杉花墨天牛成虫转录组测序

利用细胞/组织总 RNA 提取试剂盒参照说明书提取 24 头云杉花墨天牛成虫的总 RNA,每组 4 头天牛(含 1~2 头雄成虫),共 6 组。利用超微量紫外分光光度计检测提取的总 RNA 浓度,以琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,保证 RNA 浓度 ≥ 50 ng/ μ L, $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 介于 1.8~2.2 之间。利用带有 Oligo (dT) 的磁珠从提取出的总 RNA 中分离并富集含 PolyA 的 mRNA,对其进行片段化,利用反转录试剂盒合成 cDNA 第一链。然后利用双链 cDNA 合成试剂盒参照说明书进行双链 cDNA 合成。利用 Illumina Novaseq 6000 对合成的双链 cDNA 进行高通量测序,并建立 cDNA 文库,计算质量值 Q30(碱基识别错误率为 0.1%),该值达到 85% 以上表示测序质量高,数据可用于进一步分析。测序和文库建立委托上海美吉生物医药科技有限公司完成。

在组装之前,去除低质量的原始 reads,过滤去除微生物(细菌、病毒、真菌)和线虫污染,获得的质控 reads 用于后续拼接。将短 reads 在 Trinity 2.8.5 软件中进行 *De novo* 组装,组装的 Contig 序列进一步通过 CD-HIT 4.5.7 软件进行聚类,以去除高度同源序列。将拼接得到的所有序列,根据大小从大到小进行排序,然后逐步开始累加,当加和长度超过总长一半时,加入的序列长度即为 N50 长度,该值越大说明组装的质量越好。

1.2.2 云杉花墨天牛转录组功能基因的注释

将 1.2.1 测序获得的云杉花墨天牛转录组所有转录本与各数据库进行比对,包括非冗余蛋白库(non-redundant protein sequence database, NR)、GO (gene ontology) 数据库和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)

数据库,获得在各数据库的注释信息。

2 结果与分析

2.1 云杉花墨天牛转录组测序质控数据

对云杉花墨天牛成虫进行转录组测序,共获得190.06 Gb质控数据,各样品的质控数据均达到6.36 Gb以上,Q30碱基百分比在93.11%以上,表明测序质量可靠,所得转录组数据质量较好,可满足后续数据分析的基本要求。对所有样本的质控数据进行从头组装,得到的unigene数量为35 728个,平均长度为1 270.83 bp(图1),转录本数量为58 142个,N50长度为2 135 bp。

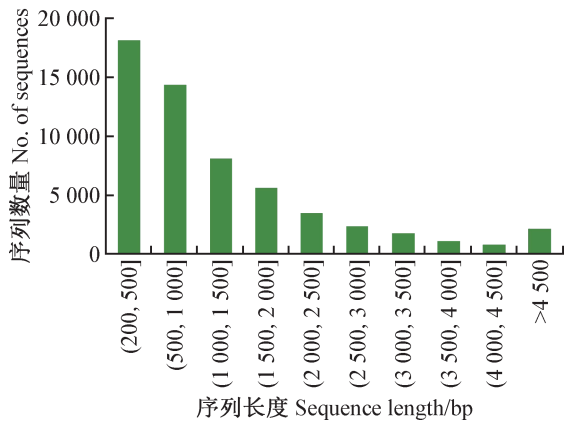


图1 云杉花墨天牛转录组 unigene 长度分布

Fig. 1 Distribution of unigene length in the transcriptome of *Monochamus saltuarius*

2.2 云杉花墨天牛转录组 NR 注释

将云杉花墨天牛转录组与NR数据库进行比对注释,共有19 316个unigene得到注释,其中与光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis* 转录组的相似基因数量最多,涉及12 330个unigene,占云杉花墨天牛转录组unigene总数的63.83%;其次为五斑角胫叶甲 *Gonioctena quinquepunctata*、东部光萤 *Photinus pyralis*、四纹豆象 *Callosobruchus maculatus* 和马铃薯叶甲 *Leptinotarsa decemlineata*, 分别涉及496、483、430和391个unigene,占比分别为2.57%、2.50%、2.23%和2.02%。

2.3 云杉花墨天牛转录组 GO 功能分类

对云杉花墨天牛转录组测序结果组装获得的58 142个unigene进行GO功能注释,共有53 899个unigene(92.70%)获得注释,属于生物学过程、细胞组分和分子功能3大类(60个亚类)的unigene分别有17 165、21 379和15 355个,占可注释unigene的比例分别为31.85%、39.66%和28.49%(图2)。其中,在生物学过程类别中,与细胞进程相关的unigene数量最多(5 974个),其次为代谢进程(4 592个)及生物学调控(2 564个);在细胞组分类别中,与细胞部分相关的unigene数量最多(6 811个),其次是膜部分(3 985个)和细胞器(3 763个);在分子功能类别中,与结合相关的unigene数量最多(7 065个),其次为催化活性(5 389个)。

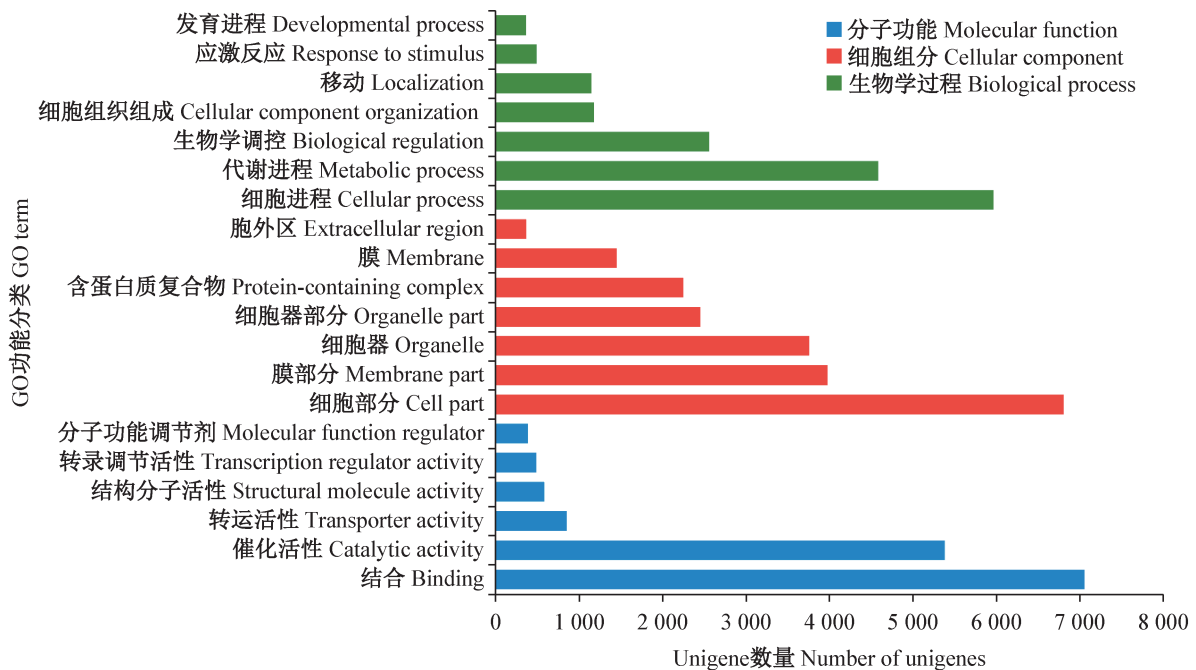


图2 云杉花墨天牛转录组 unigene 排名前20位的GO功能分类

Fig. 2 Top 20 GO function classification of unigenes in the transcriptome of *Monochamus saltuarius*

2.4 云杉花墨天牛转录组KEGG分析

将获得的云杉花墨天牛 unigene 与 KEGG 数据库进行比对,统计可能参与的代谢途径,共有 15 358 个 unigene 参与 44 条代谢通路。其中,包含 unigene 最多的前 10 条通路分别是信号转导(1 199 个)、病

毒性传染病(1 062 个)、癌症:总览(927 个)、运输和分解代谢(681 个)、翻译(653 个)、内分泌系统(644 个)、神经退行性疾病(616 个)、碳水化合物代谢(588 个)、免疫系统(537 个)和心血管疾病(512 个)(图 3)。

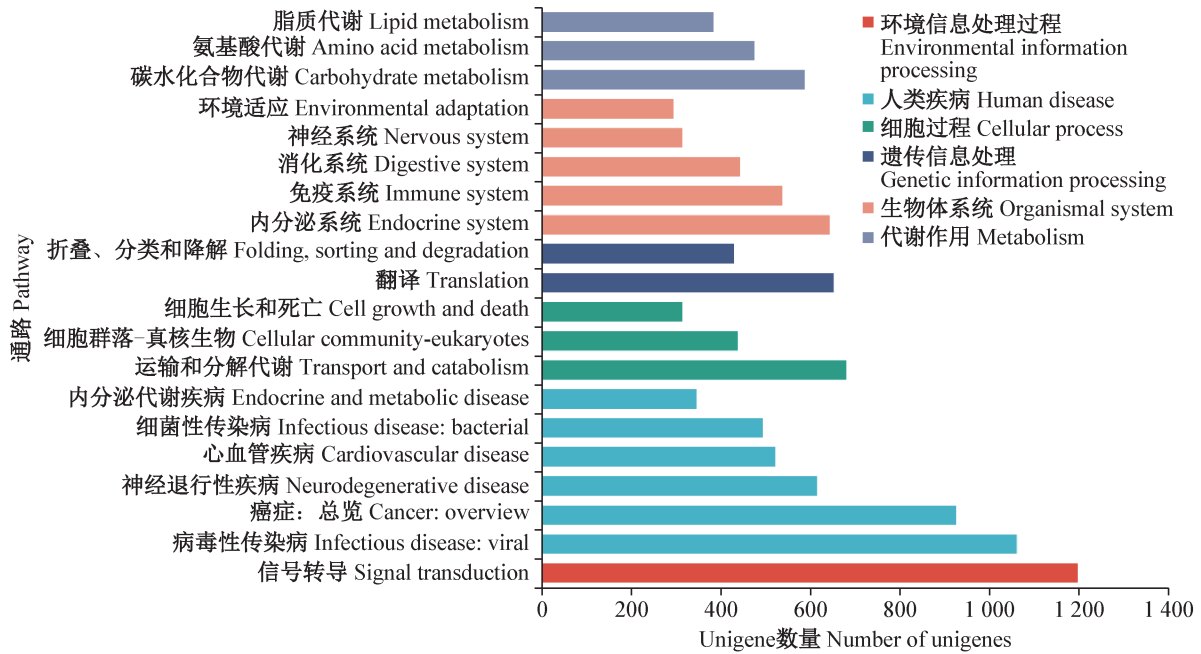


图3 云杉花墨天牛转录组 unigene 排名前 10 位的 KEGG 功能分类

Fig. 3 Top ten KEGG function classification of unigenes in the transcriptome of *Monochamus saltuarius*

2.5 云杉花墨天牛生物防治相关基因的筛选结果

从云杉花墨天牛的转录组中共筛选得到 5 类基因,第 1 类是与嗅觉相关的基因,共 43 个,包括 40 个气味结合蛋白基因和 3 个感觉神经元膜蛋白基因;第 2 类是与蜕皮相关的基因,共 149 个,包括 116 个细胞色素 P450 基因、26 个法尼醇脱氢酶基因、2 个羽化激素基因、2 个糅化激素基因、1 个蜕皮激素受体基因和 2 个保幼激素合成关键酶基因;第 3 类是与几丁质相关的基因,共 35 个,其中有 14 个是几丁质合成通路上的基因,包括 5 个海藻糖酶基因、3 个己糖激酶基因、2 个 UDP-N-乙酰氨基葡萄糖焦磷酸化酶基因、2 个几丁质合成酶基因、1 个葡萄糖胺-6-磷酸-N-乙酰转移酶基因和 1 个葡萄糖-6-磷酸异构酶基因,还有 21 个参与几丁质降解过程的基因,包括 4 个几丁质脱乙酰酶基因和 17 个几丁质酶基因;第 4 类是与飞行相关的基因,有 6 个,包括 1 个飞行肌蛋白基因、1 个 *Vestigial* 基因、1 个 *Apterous* 基因、1 个 *Decapentaplegic* 基因和 2 个酪氨酸激酶受体基因;第 5 类是与木质纤维素相关的基因,有 39 个,包括 8 个醇脱氢酶基因、8 个半乳糖苷基因、6 个糖苷水解酶

基因、5 个过氧化物酶基因、4 个纤维素酶基因、4 个漆酶基因、3 个醛酮还原酶基因和 1 个葡萄糖苷酶基因。

3 讨论

本研究采用 Illumina Novaseq 6000 高通量测序平台对云杉花墨天牛成虫转录组进行测序分析,共获得 190.06 Gb 有效转录组数据,各样本碱基 Q30 值均大于 93.11%,N50 长度为 2 135 bp,测序质量可靠,所得转录组数据质量较好,为相关重要功能基因发掘的准确性提供了保障。将云杉花墨天牛成虫转录组在 NR 数据库中进行比对,相似基因数量最多的物种为光肩星天牛,说明两者亲缘关系较近,这与 2 个物种同为天牛科的事实相符合。云杉花墨天牛 unigene 在 GO 数据库中共有 53 899 个获得功能注释,分别属于最顶层的生物学进程、分子功能和细胞组分 3 大分支,在这 3 大分支下面又分为 60 个亚类;有 15 358 个 unigene 在 KEGG 中比对注释到 44 条代谢通路。

利用 RNAi 技术进行害虫防治是近年的研究热

点,选择合适的靶标基因是提升防治效果的关键。本研究从云杉花墨天牛成虫转录组中挖掘到5类基因,这些基因在昆虫的生长发育中发挥着重要作用,具有作为靶标基因进行生物防治的潜力。在注释到的43个嗅觉相关基因中,气味结合蛋白基因能特异性识别环境中普通气味分子并做出相应的生理反应,还可以特异性结合脂溶性气味分子,识别性信息(Li et al., 2013);而感觉神经元膜蛋白基因则是一种在昆虫中特异性表达的膜蛋白,能同时参与嗅觉与味觉的识别(李杰, 2019)。昆虫在长期的进化过程中嗅觉系统得到高度特化,使昆虫能高效感受外界环境中的信息物质,并及时做出有利于自身生存和繁衍的行为反应,如果云杉花墨天牛嗅觉相关基因受到干扰,将对其繁殖、觅食以及趋避等行为造成严重影响,可从降低媒介昆虫密度的角度上控制松材线虫的传播。

蜕皮是昆虫必须经历的发育过程,该过程需要多种激素与受体的参与,本研究注释到149个参与云杉花墨天牛蜕皮的基因,其中细胞色素P450基因是数量最多的一类。已有大量研究证实抑制细胞色素P450基因的表达能影响昆虫正常的变态发育,如使沙漠蝗 *Schistocerca gregaria* 蜕皮激素的浓度显著降低,破坏幼虫蜕皮过程(Marchal et al., 2011);使小菜蛾 *Plutella xylostella* 幼虫发育时期延长,化蛹率降低(Peng et al., 2019);使果蝇 *Drosophila* 蜕皮延迟并造成蛹死亡(Petryk et al., 2003)。该类基因除了可调控昆虫生长发育外,还参与对外源物质的转化与降解,调节昆虫对毒性物质产生耐受性(谷峻等, 2022)。因此推测若干扰云杉花墨天牛的细胞色素P450基因表达,不仅会对其生长发育造成影响,还会增加松树中有毒物质或杀虫剂对其的影响。

几丁质的合成与降解是昆虫蜕皮过程的关键环节,本研究注释到14个几丁质合成相关基因和21个几丁质降解相关基因。在几丁质合成过程中,海藻糖酶的水解产物葡萄糖是形成几丁质的重要成分,也可为昆虫提供能量(Clegg & Evans, 1961),破坏海藻糖酶可使昆虫出现翅发育畸形、蜕皮困难、生长受阻、甚至死亡的现象(Zhang et al., 2017);UDP-N-乙酰氨基葡萄糖焦磷酸化酶的催化产物是合成几丁质的前体物质(Moussian, 2008),目前对该酶的研究主要集中在微生物和某些高等哺乳动物中,对昆虫的研究还很少,本研究在云杉花墨天牛中发现2个UDP-N-乙酰氨基葡萄糖焦磷酸化酶基因,其分子特

性及调控值得进一步深入研究;几丁质合成酶是昆虫几丁质代谢过程中的关键酶之一,几乎不存在于高等动物及植物体内(Ibrahim et al., 2000),是一种理想的杀虫剂靶标。在几丁质降解过程中,几丁质脱乙酰酶是关键酶之一,除了参与昆虫蜕皮和生长发育过程外,还参与免疫等生理活动(Arakane et al., 2009; Quan et al., 2013),因此可作为害虫防治的靶标基因;另一关键酶几丁质酶的功能涉及昆虫生长发育、蜕皮、食物消化和羽化等多个方面(Kzhyshkowska et al., 2006),对昆虫的生长发育至关重要,具有作为杀虫剂研发靶标的潜力。

媒介昆虫的扩散是松材线虫自然传播的基础,云杉花墨天牛作为松材线虫的媒介昆虫,虽然在野外主要以爬行为主,但也具备长距离飞行的能力(张建军等, 2007)。在本研究注释到的6个飞行相关基因中, *Vestigial* 基因作为调控翅发育的核因子,可影响果蝇背腹轴以及前后轴对翅发育,还可间接影响飞行肌的发育(Bernard et al., 2009); *Decapentaplegic (Dpp)* 基因在完全变态昆虫中调控翅的生长发育,具有高度保守性。 *Dpp* 在果蝇翅脉高表达,其功能丧失会导致脉序的部分缺失或不完全发育(Sotillos & de Celis, 2005; Yu et al., 1996),敲除黄翅菜叶蜂 *Athalia rosae* 的 *Dpp* 基因会导致其翅脉发育完全缺失(Matsuda et al., 2013)。因此,若选择飞行相关基因作为生物防治靶标基因,通过控制媒介昆虫飞行距离可以在一定程度上控制松材线虫病的发生范围。

蛀干害虫在树干中生活的前提条件是具备降解木质纤维素和半纤维素的能力。与反刍动物体内厌氧微生物产生的纤维素酶不同,天牛自身能分泌纤维素酶(Wei et al., 2006)。在本研究注释到的39个与木质纤维素相关基因中,纤维素酶是昆虫肠道内消化纤维素的重要消化酶类(索风梅等, 2006);漆酶(Laccase, Lac)是木质素酶系中一类重要的酶,在没有过氧化氢的情况可以通过溶解氧直接氧化底物(池玉杰和伊洪伟, 2007)。目前,虽然对天牛纤维素酶的研究还处于起步阶段,但基于媒介天牛在树干内生活的特点,阐明其使用纤维素的理化途径以及纤维素酶在天牛体内的分泌机制具有极大的研究价值。Lac可根据其分布、表达能力和功能的不同分为Lac1和Lac2, Lac1主要分布在昆虫的肠道、马氏管、唾液腺和脂肪体等部位,可能在食物消化、食物脱毒、离子代谢和自身免疫等方面发挥作用(Ditt-

mer et al., 2004; Amenya et al., 2010); Lac2广泛存在于昆虫的角质层中,并在蛹期和羽化阶段高表达(Hattori et al., 2010),可能在昆虫的表皮硬化、色素沉着中发挥了关键作用(Niu et al., 2008)。综上所述,应用RNAi技术靶向木质纤维素相关基因在防治云杉花墨天牛方面具有极大的潜力。

本研究通过对云杉花墨天牛转录组功能进行分析,进一步从分子层面对其生长发育相关基因进行了解析,为开发云杉花墨天牛新型生物防控靶标奠定了重要基础;也为发展松材线虫病新型控制策略提供了新途径。但目前仅对云杉花墨天牛转录组数据进行了功能分类,后续将对重要基因进行具体功能表达验证。

参 考 文 献 (References)

- Amenya DA, Chou W, Li JY, Yan GY, Gershon PD, James AA, Marinotti O. 2010. Proteomics reveals novel components of the *Anopheles gambiae* eggshell. *Journal of Insect Physiology*, 56(10): 1414–1419
- Arakane Y, Dixit R, Begum K, Park Y, Specht CA, Merzendorfer H, Kramer KJ, Muthukrishnan S, Beeman RW. 2009. Analysis of functions of the chitin deacetylase gene family in *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39(5/6): 355–365
- Bernard F, Kasherov P, Grenetier S, Dutriaux A, Zider A, Silber J, Lalouette A. 2009. Integration of differentiation signals during indirect flight muscle formation by a novel enhancer of *Drosophila vestigial* gene. *Developmental Biology*, 332(2): 258–272
- Cai RL. 2018. Identification of genes relevant to pesticides and biology from global transcriptome data of *Monochamus alternatus* Hope (Coleoptera: Cerambycidae) larvae. Master thesis. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University (in Chinese) [蔡榕玲. 2018. 松墨天牛转录组研究及其生物防治相关基因鉴定与分析. 硕士学位论文. 福州: 福建农林大学]
- Chi YJ, Yi HW. 2007. Lignin degradation mechanisms of ligninolytic enzyme system, manganese peroxidase, laccase and lignin peroxidase, produced by wood white rot fungi. *Mycosystema*, 26(1): 153–160 (in Chinese) [池玉杰, 伊洪伟. 2007. 木材白腐菌分解木质素的酶系统-锰过氧化物酶、漆酶和木质素过氧化物酶催化分解木质素的机制. 菌物学报, 26(1): 153–160]
- Clegg JS, Evans DR. 1961. Blood trehalose and flight metabolism in the blowfly. *Science*, 134(3471): 54–55
- Dittmer NT, Suderman RJ, Jiang HB, Zhu YC, Gorman MJ, Kramer KJ, Kanost MR. 2004. Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34(1): 29–41
- Fishilevich E, Vélez AM, Storer NP, Li HR, Bowling AJ, Rangasamy M, Worden SE, Narva KE, Siegfried BD. 2016. RNAi as a management tool for the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. *Pest Management Science*, 72(9): 1652–1663
- Gu J, Ye Y, Li SY, Yuan YF, Huang LH. 2022. Identification and expression profiling of CYP450 genes involved in the ecdysone synthesis pathway in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 65(12): 1606–1614 (in Chinese) [谷峻, 叶艳, 李时宇, 袁雅菲, 黄立华. 2022. 斜纹夜蛾蜕皮激素合成通路相关CYP450基因的鉴定及表达分析. 昆虫学报, 65(12): 1606–1614]
- Hattori M, Tsuchihara K, Noda H, Konishi H, Tamura Y, Shinoda T, Nakamura M, Hasegawa T. 2010. Molecular characterization and expression of laccase genes in the salivary glands of the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps* (Hemiptera: Cicadellidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40(4): 331–338
- Ibrahim GH, Smartt CT, Kiley LM, Christensen BM. 2000. Cloning and characterization of a chitin synthase cDNA from the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30(12): 1213–1222
- Kumar M, Gupta GP, Rajam MV. 2009. Silencing of acetylcholinesterase gene of *Helicoverpa armigera* by siRNA affects larval growth and its life cycle. *Journal of Insect Physiology*, 55(3): 273–278
- Kzhyshkowska J, Mamidi S, Gratchev A, Kremmer E, Schmuttermaier C, Krusell L, Haus G, Utikal J, Schledzewski K, Scholtze J, et al. 2006. Novel stabilin-1 interacting chitinase-like protein (SI-CLP) is up-regulated in alternatively activated macrophages and secreted via lysosomal pathway. *Blood*, 107(8): 3221–3228
- Li J. 2019. Identification and functional verification in host recognition of the olfactory co-receptor *orco* in *Monochamus alternatus* Hope. Master thesis. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University (in Chinese) [李杰. 2019. 松墨天牛嗅觉受体 *orco* 基因挖掘及其功能验证. 硕士学位论文. 福州: 福建农林大学]
- Li XH, Cui ZX, Liu Y, Song CW, Shi GH. 2013. Transcriptome analysis and discovery of genes involved in immune pathways from hepatopancreas of microbial challenged mitten crab *Eriocheir sinensis*. *PLoS ONE*, 8(7): e68233
- Marchal E, Badisco L, Verlinden H, Vandersmissen T, Van Soest S, Van Wielendaele P, Vanden Broeck J. 2011. Role of the Halloween genes, *spook* and *phantom* in ecdysteroidogenesis in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Journal of Insect Physiology*, 57(9): 1240–1248
- Matsuda S, Yoshiyama N, Künnapu-Vulli J, Hatakeyama M, Shimmi O. 2013. Dpp/BMP transport mechanism is required for wing venation in the sawfly *Athalia rosae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43(5): 466–473
- Moussian B. 2008. The role of GlcNAc in formation and function of extracellular matrices. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 149(2): 215–

- 226
- Niu BL, Shen WF, Liu Y, Weng HB, He LH, Mu JJ, Wu ZL, Jiang P, Tao YZ, Meng ZQ. 2008. Cloning and RNAi-mediated functional characterization of *MaLac2* of the pine sawyer, *Monochamus alternatus*. *Insect Molecular Biology*, 17(3): 303–312
- Peng L, Wang L, Zou MM, Vasseur L, Chu LN, Qin YD, Zhai YL, You MS. 2019. Identification of Halloween genes and RNA interference-mediated functional characterization of a Halloween gene *shadow* in *Plutella xylostella*. *Frontiers in Physiology*, 10: 1120
- Petryk A, Warren JT, Marqués G, Jarcho MP, Gilbert LI, Kahler J, Parvy JP, Li YT, Dauphin-Villemant C, O' Connor MB. 2003. Shade is the *Drosophila* P450 enzyme that mediates the hydroxylation of ecdysone to the steroid insect molting hormone 20-hydroxyecdysone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(24): 13773–13778
- Quan GX, Ladd T, Duan J, Wen FY, Doucet D, Cusson M, Krell PJ. 2013. Characterization of a spruce budworm chitin deacetylase gene: stage- and tissue-specific expression, and inhibition using RNA interference. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43(8): 683–691
- Sotillos S, de Celis JF. 2006. Regulation of *decapentaplegic* expression during *Drosophila* wing veins pupal development. *Mechanisms of Development*, 123(3): 241–251
- Suo FM, Wang HJ, Chen HB, Xu TS. 2006. Study on the character of cellulase in *Monochamus alternatus* II: effect of some ions on the *Monochamus alternatus* cellulase activity *in vitro*. *Forest Research*, 19(2): 205–210 (in Chinese) [索风梅, 王浩杰, 陈洪宝, 徐天森. 2006. 松墨天牛纤维素酶的研究 II: 离体条件下金属离子对松墨天牛纤维素酶活性的影响. *林业科学研究*, 19(2): 205–210]
- Wei YD, Lee KS, Zhong ZG, Yoon HJ, Kim I, Zhang GZ, Guo XJ, Sohn HD, Jin BR. 2006. Molecular cloning, expression, and enzymatic activity of a novel endogenous cellulase from the mulberry longicorn beetle, *Apriona germari*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 145(2): 220–229
- Ye JR, Wu XQ. 2022. Research progress of pine wilt disease. *Forest Pest and Disease*, 41(3): 1–10 (in Chinese) [叶建仁, 吴小芹. 2022. 松材线虫病研究进展. *中国森林病虫*, 41(3): 1–10]
- Yu K, Sturtevant MA, Biehs B, François V, Padgett RW, Blackman RK, Bier E. 1996. The *Drosophila* decapentaplegic and short gastrulation genes function antagonistically during adult wing vein development. *Development*, 122(12): 4033–4044
- Zhang JJ, Zhang RZ, Chen JY. 2007. Species and their dispersal ability of *Monochamus* as vectors to transmit *Bursaphelenchus xylophilus*. *Journal of Zhejiang Forestry College*, 24(3): 350–356 (in Chinese) [张建军, 张润志, 陈京元. 2007. 松材线虫媒介昆虫种类及其扩散能力. *浙江林学院学报*, 24(3): 350–356]
- Zhang L, Qiu LY, Yang HL, Wang HJ, Zhou M, Wang SG, Tang B. 2017. Study on the effect of wing bud chitin metabolism and its developmental network genes in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, by knockdown of *TRE* gene. *Frontiers in Physiology*, 8: 750
- Zhou J, Yu HY, Zhang W, Ahmad F, Hu SN, Zhao LL, Zou Z, Sun JH. 2018. Comparative analysis of the *Monochamus alternatus* immune system. *Insect Science*, 25(4): 581–603

(责任编辑:李美娟)