

象甲科昆虫转录组研究进展

杨红军^{1,2}, 徐丹萍¹, 胡佳萌², 卓志航^{1,2,3*}, 陈 彧⁴

¹ 西华师范大学生命科学学院, 四川 南充 637002; ² 海南大学林学院, 海南 海口 570228;

³ 农业部华南作物有害生物综合治理重点实验室, 广东 广州 510642;

⁴ 海南省林业科学研究院(海南省红树林研究院), 海南 海口 571100

摘要: 转录组是细胞在特定发育阶段或生理条件下的全部转录本及其数量总和,并能揭示特定状态下的基因表达模式及分子机理。象甲科昆虫拥有动物界中最多的物种种类,该科许多昆虫也是我国粮食仓储和农林产业上的重大害虫。通过研究象甲科昆虫转录组,从分子水平揭示其生命过程中相关的基因及其功能,对寻找害虫防治的新方法具有重要意义。本文对象甲科昆虫转录组研究现状进行了浅析,涉及象甲科不同发育阶段基因差异、昆虫触角、与植物互动、防治、免疫机制、进化、基因沉默7个方面的分析,可在理论上丰富对象甲科昆虫遗传发育、免疫、潜在 RNA 干扰靶点筛选等方面的理解,并在此基础上提出了象甲科转录组今后的研究热点与应用前景,为害虫防控提供理论指导。

关键词: 象甲科; 转录组; 研究概况; 基础应用



开放科学标识码
(OSID 码)

Superficial analysis of the transcriptome in Curculionidae

YANG Hongjun^{1,2}, XU Danping¹, HU Jiameng², ZHUO Zhihang^{1,2,3*}, CHEN Yu⁴

¹ College of Life Science, China West Normal University, Nanchong, Sichuan 637002, China; ² College of Forestry, Hainan

University, Haikou, Hainan 570228, China; ³ Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops in South China,

Ministry of Agriculture, P. R. China, Guangzhou, Guangdong 510642, China; ⁴ Hainan Academy of Forestry

(Hainan Academy of Mangrove), Haikou, Hainan 571100, China

Abstract: Analysis of the transcriptome, which is a snapshot of the total transcription in a cell at a particular developmental stage or condition, can reveal the gene expression patterns and molecular mechanisms in a specific state. Curculionidae is the largest family in the kingdom Animalia, and many species of Curculionidae are pests that affect grain storage, agriculture, and forestry in China. To determine the gene functions related to life processes, to search for novel pest control targets, and above all, to understand the genetics of insect development and immunity and screen potential RNA interference (RNAi) targets, it is important to study the transcriptome of Curculionidae. In this work, the transcriptome of Curculionidae was superficially analyzed, and the differentially expressed genes at different developmental stages, in insect antennae, during interaction with plants, and related to prevention and control, immune mechanisms, evolution, and RNAi were identified. In addition, the prospects for in-depth research of Curculionidae insects and potential applications are discussed, and theoretical guidance for pest control is provided.

Key words: Curculionidae; transcriptome; research overview; basic application

象甲科 Curculionidae 是鞘翅目 Coleoptera 中最大的科,也是动物界中物种数量最丰富的科,目前全世界记录有超过 5 万种象甲科昆虫,其中我国超过 1200 种(杨毅等,2012)。然而,象甲科昆虫作为

害虫时,由于其具有钻蛀性、隐蔽性等特点,防治效果往往不佳(李成教,2013)。随着高通量测序平台的发展,获取细胞过程的生物学视角已成为现实,通过转录组测序分析,可以有效地识别生物中特定

收稿日期(Received): 2020-10-04 接受日期(Accepted): 2020-12-30

基金项目: 海南省自然科学基金(319QN163); 农业部华南作物有害生物综合治理重点实验室 2017/2018 年度开放基金(SCIPM2018-04); 海南大学科研启动项目[KYQD(ZR)1823]; 四川省第二批地方普通本科高校应用型示范专业(川教函[2019]31 号)

作者简介: 杨红军,男,硕士研究生。研究方向: 昆虫分子生物学。E-mail: yanghongjun92@foxmail.com

* 通信作者(Corresponding author), E-mail: zhuozhihang@foxmail.com

时空的基因表达模式 (Ozsolak & Milos, 2011)。目前,二代高通量测序分析已广泛应用于昆虫学研究,如揭示各种生物学现象、基因挖掘以及基因表达谱构建等(许佳丹等,2019)。此外,转录组也常用于识别 RNA 干扰(RNA interference)目标,进而为害虫控制提供策略(Wang *et al.*, 2011)。综上,通过对象甲科昆虫转录组数据的深入剖析,准确鉴定相关靶向基因,可在理论上为象甲科昆虫免疫、生长发育、抗药性等方面的研究奠定分子生物学基础,进而为探究昆虫转录组在害虫防治中的作用提供新思路。

本文通过对象甲科昆虫转录组的浅析,旨在探索细胞表达与调控之间的联系,为进一步揭示象甲科昆虫的遗传发育、免疫、潜在 RNA 干扰靶点筛选等方面提供参考依据,也为害虫分子生物学研究和防治提供新的策略与思路。

1 象甲科昆虫转录组研究概述

基于转录组测序技术的飞速发展,非模式生物的基因挖掘速度和效率显著提高。许多与昆虫组织(Keeling *et al.*, 2016)和杀虫剂相关的基因(如杀虫剂靶标、解毒酶和代谢)(He *et al.*, 2012; Zimmer *et al.*, 2014)已在多种象甲科昆虫中通过高通量测序进行了鉴定。转录组还可用于推断与象甲科昆虫机体发育及其他进化过程相关的信息。Keeling *et al.* (2013a)首次对象甲科昆虫山松甲虫 *Dendroctonus ponderosae* Hopkins 进行了基因组报道,此项研究给其他象甲科物种转录组测序提供了依据。之后,转录组学在象甲科多个方面均取得一些重要进展,但主要集中在生长发育差异、触角分析、与植物互作、昆虫防治、进化、RNAi、免疫 7 个方面,测序平台主要涉及 Illumina HiSeq 2000、罗氏 454 FLX Titanium 以及 PacBio Iso-Seq 等。

2 转录组在象甲科昆虫上的应用

2.1 象甲科昆虫不同发育阶段基因的差异分析

深入了解调节象甲科昆虫生命周期和发育各阶段的分子机制,将有助于开发更容易获得和环境相契合的方法来控制害虫。转录测序结果将为多种象甲科害虫的研究提供丰富的分子资源,并为理解象甲科昆虫发育过程中基因表达水平的变化提供框架,同时,该转录数据也将阐明昆虫发育的分子机理。如, Yang *et al.* (2020)首次利用 PacBio

Iso-Seq 和 Illumina RNA-seq 对红棕象甲 *Rhyncophorus ferrugineus* (Oliver) 的 3 个发育阶段(蛹、幼虫、雌性和雄性成虫)进行转录组测序,共生成 63801 个非冗余的全长转录本,平均长度 2964 bp。Wang *et al.* (2012)利用 Roche/454 GS FLX 平台捕获了红棕象甲不同发育阶段的 500 万条测序 reads,同时经基因表达分析显示,蛹期表达量最高,幼虫期表达量最低。此外,该研究还鉴定了超过 60000 个单核苷酸多态性和 1200 个简单序列重复标记。Yin *et al.* (2015)对红棕象甲的胚胎发生系统转录组进行了研究,报道了该虫 5 个发育阶段的转录组,包括 4 个胚胎阶段和 1 个幼虫阶段,共收集了 22532 个在不同胚胎阶段表达的基因;该研究还分析了几种保守信号通路(如 Hedgehog、JAK-STAT、Notch、TGF-、Ras/MAPK 和 Wnt)的表达动态,以及与细胞凋亡、神经发生和分割相关的关键发育基因。另外, Antony *et al.* (2017)通过分析红棕象甲肠道特异性和不同发育阶段的特异性差异表达,发现红棕象甲在成虫期纤维素酶和果胶酶显著上调,半纤维素酶 RferGH16c4170 特异性高表达,表明红棕象甲的植物细胞壁降解酶的潜力较大。

此外,通过转录组学来筛选不同发育阶段的表达基因,有助于研究和挖掘昆虫免疫及应激反应的关键基因。Liu & Wen (2016)利用 Roche 454 FLX Titanium 平台获得不同发育阶段的沟眶象 *Eucryptorrhynchus chinensis* (Oliver) (卵、幼虫、蛹和成虫)转录组数据,预测了 294 条涉及生长、繁殖和应激或免疫反应的生化途径,并检测到 659026 个单核苷酸变异、6112 个简单重复序列。Yang *et al.* (2017)通过构建长足大竹象 *Cyrtotrachelus buqueti* Guer 从卵、幼虫、蛹和成虫的发育转录组,获得了高质量的综合序列资源。此外,为了评估了长足大竹象降解竹子木质纤维素的能力,探索该虫利用竹子生物量的潜在途径, Luo *et al.* (2018)通过转录组研究,认为长足大竹象碳水化合物活性酶家族基因在不同发育阶段的表达存在差异。相关研究还表明,长足大竹象成虫对纤维素降解更有效,幼虫对木质素降解更有效,并且降解能力在肠道的不同部位也存在差异,中肠对纤维素的降解作用强于后肠,且长足大竹象的肠内消化酶在体内和体外均可降解竹笋木质纤维素(Luo *et al.*, 2018, 2019)。Noriega *et al.* (2019)通过 Illumina Hiseq 平台对咖啡果小蠹

Hypothenemus hampei (Ferrari) 2个发育阶段(幼虫、雌性和雄性成虫)转录组进行测序并重新组装,发现在不同发育阶段中4664个转录本呈现差异表达。另外,Pandita *et al.* (2018)通过转录组测序方法,鉴定了大松象甲 *Hylobius abietis* L.编码神经肽、肽激素以及推定的G蛋白偶联受体(GPCR)的基因,进一步阐述了神经肽调节的过程。综上,随着测序技术的发展,昆虫转录组学的研究取得极大进步,为全方位揭示昆虫学相关研究提供了技术支持。通过转录组技术对不同发育阶段象甲科昆虫基因表达水平的评估,将为象甲科昆虫生长发育的研究提供分子基础。

2.2 象甲科昆虫触角转录组分析

象甲科昆虫触角是感受外界环境的重要器官,能够感知信息素、二氧化碳及水分等环境因子,而象甲通过识别不同环境因子,进一步产生取食、交配、产卵等行为。近几年,转录组在象甲科昆虫触角的研究发展迅速,这对昆虫化学生态学及行为学等研究有重要意义。例如,Andersson *et al.* (2013)通过对云杉树皮甲虫 *Ips typographus* L.与山松甲虫的触角进行转录组测序,发现了与嗅觉功能相关的转录本;针对化学感觉基因家族,从云杉树皮甲虫中鉴定了15个气味结合蛋白(odorant binding proteins, OBP)、6个化学感觉蛋白(chemosensory proteins, CSP)、6个味觉受体(gustatory receptors, GR)、3个感觉神经元膜蛋白(sensory neuron membrane proteins, SNMP)、7个离子性受体(ionotropic receptors, IR)和43个气味受体(odorant receptors, OR);在山松甲虫中鉴定了31个OBPs、11个CSPs、3个SNMPs、49个ORs、2个GRs、15个IRs。Keeling *et al.* (2013b)分析了山松甲虫触角的细胞色素P450(cytochrome P450) DponCYP345E2转录本功能表征,结果表明,细胞色素P450在山松甲虫嗅觉、萜烯解毒和信息素生物合成中发挥作用。Chiu *et al.* (2018)在山松甲虫触角转录组中也发现了大量的P450,且对雌性和雄性山松甲虫不同生命阶段和组织的转录水平分析显示,P450s在中肠或脂肪体中有额外表达。更重要的是,山松甲虫可以使用P450s来解毒松树防御系统中的其他单萜烯(Chiu *et al.*, 2019)。与此同时,陆续分析了大量象甲科昆虫触角转录组,如红棕象甲(Yan *et al.*, 2015)、红脂大小蠹 *Dendroctonus valens* LeConte (Gu *et al.*,

2015)、稻水象甲 *Lissorhoptrus oryzophilus* Kuschel (Yuan *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2019)、甘薯象虫 *Cylas formicarius* Fabr. (Bin *et al.*, 2017)、玉米象甲 *Sitophilus zeamais* (Motchulsky) (Tang *et al.*, 2019a, 2019b)、棉铃象甲 *Anthonomus grandis* Boheman (Paula *et al.*, 2018)等。综上,对象甲科昆虫触角转录组的分析将会发掘大量的具有潜在应用价值的基因,特别是气味识别、传导及降解相关的基因,这些基因将为象甲科触角基因功能的研究奠定基础。

2.3 象甲科昆虫与植物互作的研究

由于寄主植物通常具有多种防御机制,象甲科昆虫对寄主的选择和随后的成功定殖充满了不确定性。寄主植物通常含有大量潜在毒性的特殊代谢物,象甲科昆虫必须忍受这些代谢物或具有解毒能力才能成功生存和繁殖(Keeling & Bohlmann, 2006),而转录组基因表达分析(RNA-seq)能够有效解释象甲科昆虫的解毒机理以及寄主植物的免疫应答机制。Robert *et al.* (2013)鉴定了山松甲虫在寄主定殖早期与其解毒有关的转录本,该研究表明,在以寄主组织为食的昆虫中,发挥潜在解毒作用的转录本为醇脱氢酶。Pitt *et al.* (2014)建立了山松甲虫在寄主定殖的蛋白质组图谱,并在对雌虫与雄虫进行蛋白质组监测过程中发现雌虫发生了重大且快速的生理变化,该变化在伴随蛋白(chaperone proteins)、细胞色素P450和谷胱甘肽S-转移酶(glutathione S-transferase)具有大量积累,表明次级代谢物诱导的应激生理与早期寄主定殖过程中的化学排毒有关;该研究还发现,山松甲虫雌虫只有在遇到宿主后才激活卵黄蛋白原,这一现象表明资源的分配和分散与繁殖相关。虽然山松甲虫的信息素生物合成途径所涉及的酶还没有全部被识别或鉴定出来,但Nadeau *et al.* (2017)通过转录组已经鉴定了一种细胞色素P450单加氧酶CYP6DE3,并确定了其功能特征是参与树脂解毒而非信息素生物合成。

植物在受到昆虫危害后,会改变其防御相关基因的转录表达水平。如Artico *et al.* (2014)利用Illumina HiSeq 2000平台对受棉铃象甲幼虫感染的棉花转录组进行测序,结果表明,大量棉花的转录本在幼虫取食后发生显著改变,且在基因表达的变化中,该研究识别了几丁质或昆虫口腔分泌物的受体/传感器的转录本,同时转录因子Ca²⁺和活性氧

有关以及编码植物激素信号通路的酶转录物调控发生了改变。Giovino *et al.* (2015) 通过转录组分析了红棕象甲对加拿利海枣 *Phoenix canariensis* Chabaud 攻击的基因调控网络, 该研究发现, 在攻击的中间阶段共有 54 个基因发生显著变化, 且途径富集分析表明, 此阶段诱导了与苯丙烷相关的途径; 而在攻击后期, 超过 3300 个基因受到了影响, 其中脂质脂肪酸代谢 (脂肪酸和甘油酯)、色氨酸代谢、苯丙氨酸代谢的转录本丰度更高。综上, 转录组在象甲科昆虫与植物互作方面, 特别是解毒机理与代谢机制的研究, 将为象甲科昆虫的可持续治理提供参考依据。

2.4 象甲科昆虫防治的研究

为了更好地了解异源化合物的杀虫机理, 转录组技术广泛运用于杀虫剂施用对象甲科昆虫酶活性影响的研究 (Francis *et al.*, 2010)。此外, 相关研究也证实, 象甲科昆虫基因表达的转录调控在各种应激源中起重要作用 (Chen *et al.*, 2016)。例如, Liao *et al.* (2016) 通过分析互生叶白千层 *Melaleuca alternifolia* L. 叶油处理后的玉米象甲 *Sitophilus oryzae* (L.) 转录组数据, 共鉴定出 3562 个差异表达基因, 其中大部分的差异表达基因参与了杀虫剂解毒和线粒体功能, 这为开发新型且对环境友好的植物精油害虫熏蒸剂奠定了良好的基础。Zhang *et al.* (2017) 利用异硫氰酸烯丙酯 (allyl isothiocyanate) 熏蒸玉米象甲, 通过转录组测定并分析差异基因表达, 结果表明, 细胞骨架崩溃和线粒体功能障碍是异硫氰酸烯丙酯的重要致死机制。Huang *et al.* (2018) 使用 RNA-seq 方法评估了二烯醇 (terpene-4-ol) 熏蒸玉米象甲的整体基因表达情况, 结果表明, 玉米象甲解毒基因尤其是 P450s 的表达水平发生了改变, 这为研究象甲科昆虫对二烯醇的全身代谢反应提供了候选基因。综上, 利用转录组技术对象甲科昆虫的防治研究将为其生态可持续防治提供新思路。

2.5 象甲科昆虫免疫机制的研究

为适应外界环境, 节肢动物 (如昆虫) 已进化出多种解毒机制, 进而减少病原对个体的毒性作用, 从而达到免疫的目的 (蒲宇辰等, 2017)。在转录组水平上加强对象甲科昆虫和外源刺激之间免疫相互作用的研究, 将为今后的昆虫学研究提供丰富的免疫遗传学信息。Xu *et al.* (2018) 通过鉴定红脂

大小蠹在不同病原菌下的基因表达差异, 发现球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 比吐温菌 *Leptographium procerum* (Kendr) 能有效地杀灭大多数供试幼虫, 研究还表明, 昆虫病原真菌能在转录组水平上比共生真菌引起更强的响应; 同时, 该研究还鉴定了 185 个免疫相关基因, 包括模式识别受体、信号调节因子、免疫通路成员 (Toll、IMD 和 JAK/STAT) 和免疫效应因子等。转录组与生理实验相结合的研究证实, 与无菌环境的昆虫相比, 传统饲养的昆虫具有更强的抗菌活性和更高的酚氧化酶活性, 说明无菌昆虫的系统免疫应答明显受损, 相关研究结果还揭示了肠道共生菌对红棕象甲幼虫具有更强的免疫刺激作用 (Muhammad *et al.*, 2019)。Valencia *et al.* (2016) 通过罗氏 454 测序法对香蕉象甲 *Cosmopolites sordidus* (Germar) 幼虫中肠进行了转录组测定, 确定了可能涉及免疫相关功能和杀虫剂抗性的基因。由于先天免疫反应是害虫对抗病原体的唯一途径, 利用肠道菌群影响宿主免疫被认为是一种很有前途的害虫防控策略 (Muhammad *et al.*, 2019)。在全球环境变化的情形下, 转录组测序技术能够高效且经济地研究昆虫种群变化及其对农业的破坏情况 (Clark *et al.*, 2001)。低温致死是象甲科昆虫通过免疫调控种群数量的一个重要方面, 而转录组在其中的应用颇为广泛。Robert *et al.* (2016) 分别对山松甲虫幼虫越冬的早秋、晚秋、早春、晚春 4 个时间点的基因表达规律进行了转录研究, 结果表明, 随着冬季转录谱的变化, 幼虫产生了多种生理反应, 其主要特征是在秋季参与昆虫免疫反应和解毒的基因转录。

象甲科昆虫分泌外部免疫物的转录组的遗传和分子机制也有大量的研究。例如, Pu *et al.* (2020) 根据转录组数据筛选了红棕象甲苯醌合成所需的基因, 分离了 3 个新的 *ARSB* 基因, 即 *Rf-ARSB-0311*、*RfARSB-11581* 和 *RfARSB-14322*, 通过组织/器官特异性表达谱分析, 证实 *ARSB* 基因家族可以通过参与醌的生物合成来调节对苯醌的分泌量, 从而改变宿主的外部免疫抑制效率。Gagnon *et al.* (2019) 通过转录组评估了不同生命阶段的胡萝卜象甲 *Listronotus oregonensis* (LeConte) 感染寄生线虫 *Bradydema listronoti* 后繁殖力和死亡率的变化, 发现幼虫更易受感染, 且被感染的雌性胡萝卜象甲的繁殖力显著降低, 其原因可能是生殖激素的产生

被抑制。综上,象甲科昆虫免疫机制的研究,将改善甚至推动新的象甲科昆虫控制策略。

2.6 象甲科昆虫进化的应用

转录组测序能够获得多个基因片段数据并且可以消除单基因信息不足的劣势,利用该优势能重现昆虫的进化史并且提供其系统发育关系的可靠信息(Zou *et al.*, 2008)。此外,植物细胞壁是地球上最大的有机碳贮存库,为了充分和有效地利用这一富含碳水化合物的巨大资源,微生物进化出了先进酶解系统,该系统可以分泌以果胶、纤维素和半纤维素为靶点的植物细胞壁降解酶,而象甲科昆虫在进化方面也有类似的系统。例如, Roy *et al.* (2014)利用转录组对10种叶甲总科和象甲科的甲虫进行测序,结果表明,叶甲总科和象甲科均有一个大家族的PG编码基因共享一个共同的祖先,最类似于子囊菌真菌的PG基因;此外,该研究还鉴定了象甲科甲虫消化系统的50个PG,证实了象甲科昆虫具有一套特异性连续的果胶降解酶以及保守但酶活性不高的PG蛋白。研究还发现,一些食草昆虫的基因组也可以编码植物细胞壁降解酶。Neupert *et al.* (2018)则通过转录组学和多肽组学技术,分析了大黑甲 *Zophobas atratus* (Fabricius)和棉铃象甲中的基因产物,结果表明,即使在具有代表性的一组鞘翅目昆虫中,神经肽能系统也发生了截然不同的进化过程。综上,转录组在象甲科昆虫进化研究中的应用将为研究其进化与起源提供丰富的数据资源。

2.7 象甲科基因沉默的应用

“转录组学”不仅是研究昆虫的分子、遗传和细胞的重要工具,也是鉴定和选择RNAi目标基因的重要工具(Zhang *et al.*, 2017a)。如,高特异性RNAi机制显示出对鞘翅目害虫管理的良好效果(Zhang *et al.*, 2017b)。Garcia *et al.* (2017)在棉铃象甲的转录组中鉴定了3种核酸酶(AgraNuc1、AgraNuc2和AgraNuc3),并评估了这些核酸酶对几丁质合成酶II(AgraChSII)基因沉默的影响,结果证实,这些核酸酶主要在后中肠区表达,而棉铃象甲中肠核酸酶是双链核糖核酸dsRNA传递的主要障碍之一,因此需要开发新的RNAi传递策略,保护dsRNA不受肠道核酸酶的影响,进而有效控制棉铃象甲。相关研究也表明,将几丁质合酶基因(*AntgCHS1*)用dsRNA微注射到棉铃象甲雌成虫体内,

会导致卵无法存活和后代幼虫畸形(Firmino *et al.*, 2013)。另外,通过构建OBPs文库,选择具有特异性的高表达OBPs,通过RNAi进行沉默,也能达到生态防治象甲科昆虫的目的。Antony *et al.* (2018)发现,特异性RferOBP1768有助于红棕象甲捕获和转运气味受体,当负责信息素结合的RferOBP1768被沉默后,信息素的交流将中断。Hassan *et al.* (2016)以不同的dsRNA敲除了红棕象甲5龄和10龄幼虫的过氧化氢酶基因,结果红棕象甲幼虫的死亡率显著提高并且生长受到抑制。Francesca *et al.* (2017)通过沉默红棕象甲3种基因(α -淀粉酶、V-ATPase、蜕皮激素受体)评估死亡率,结果表明, α -淀粉酶和蜕皮激素受体基因更具开发RNAi靶标的潜力,即显著的害虫死亡率和幼虫生长抑制作用突显了使用该技术对红棕象甲种群控制的可能性。综上,转录组在象甲科基因沉默研究中的应用将为作物保护提供新的思路。

3 展望

尽管象甲科昆虫转录组研究已取得了较多进展,但明确象甲科昆虫与植物互作的机理、免疫机制等仍需要更深入的研究。因此,基于现有象甲科昆虫的研究现状及其防治要求,今后象甲科昆虫转录组研究中的热点和难点可能体现在以下几个方面:(1)在基因组和转录组资源的开发过程中,可以利用第三代测序平台捕获全长转录组;与第二代测序平台转录组相比,全长的转录本可以极大提高基因组注释和转录组表征的准确性(Dong *et al.*, 2015)。同时,第三代测序技术具有准确性高、序列读取长、偏差程度低等优势(Roberts *et al.*, 2013),该优势将为象甲科昆虫的分子生物学研究提供更可靠的数据支撑。(2)加强多组学间结合(如基因组、代谢组、蛋白组等),利用多组学对象甲科昆虫进行更全面和更深层次的研究,多组学的结合对基因功能研究更准确、更快速,如利用RNA干扰技术与CRISPR-Cas9介导的基因组定点编辑技术相结合,将害虫的高效防治提供更新、更有效的思路(侯丽等, 2017)。(3)对象甲科昆虫开展非编码RNA的研究,该研究方向已成为昆虫毒理学研究的一个新兴领域(朱斌等, 2016)。与此同时,非编码RNA作为表观遗传学调控的新机制是细胞内一种内源的控制因子,能行使多重功能(薛娟, 2012)。随着转录技术的发展,未来昆虫学在转录组的研究

将会进入更新更全面的阶段,该阶段将致力于探究和解决更多更重要的科学问题,这些问题将不局限于基因的表达丰度与动态变化,而是更多地涉及基因功能及其作用机理,进而为昆虫遗传发育、免疫、潜在 RNA 干扰靶点筛选等的研究提供参考依据。

参考文献

- 侯丽,詹帅,周欣,李飞,王宪辉,2017. 中国昆虫基因组学的研究进展. *应用昆虫学报*, 54(5): 693-704.
- 李成教,2013. 林业发展中林木蛀干害虫的发生与防治. *民营科技* (12): 94.
- 蒲宇辰,侯有明,石章红,梁馨予,2017. 昆虫防御分泌物及体内体外免疫权衡. *昆虫学报*, 60(8): 962-974.
- 薛娟,2012. 基于转录组数据的昆虫特异性序列及非编码 RNA 基因的发现. 硕士学位论文. 南京: 南京农业大学.
- 许佳丹,王书平,蒋费涛,朱雅君,叶军,李飞,2019. 我国口岸瓜实蝇监测样本的 SSR 分子标记分析. *生物安全学报*, 28(4): 259-268.
- 杨毅,梁潇予,杨春平,杨桦,杨伟,2012. 象甲科昆虫信息素研究概况. *浙江农林大学学报*, 29(1): 125-129.
- 朱斌,沛梁,高希武,2016. 长链非编码 RNA (lnc RNA) 及其在昆虫学研究中的进展. *昆虫学报*, 59(11): 1272-1281.
- ANDERSSON M N, GROSSE-WILDE E, KEELING C I, BENGTSOON J M, YUEN M M, LI M, HILLBUR Y, BOHLMANN J, HANSSON B S, SCHLYTER F, 2013. Antennal transcriptome analysis of the chemosensory gene families in the tree killing bark beetles, *Ips typographus* and *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *BMC Genomics*, 14: 198.
- ANTONY B, JOHNY J, ALDOSARI S A, 2018. Silencing the odorant binding protein RferOBP1768 reduces the strong preference of palm weevil for the major aggregation pheromone compound ferrugineol. *Frontiers in Physiology*, 9: 252.
- ANTONY B, JOHNY J, ALDOSARI S A, ABDELAZIM M M, 2017. Identification and expression profiling of novel plant cell wall degrading enzymes from a destructive pest of palm trees, *Rhynchophorus ferrugineus*. *Insect Molecular Biology*, 26(4): 469-484.
- ARTICO S, RIBEIRO-ALVES M, OLIVEIRA-NETO O B, DE MACEDO L L P, SILVEIRA S, GROSSI-DE-SA M F, MARTINELLI A P, ALVES-FERREIRA M, 2014. Transcriptome analysis of *Gossypium hirsutum* flower buds infested by cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) larvae. *BMC Genomics*, 15: 854.
- BIN S Y, QU M Q, PU X H, WU Z Z, LIN J T, 2017. Antennal transcriptome and expression analyses of olfactory genes in the sweetpotato weevil *Cylas formicarius*. *Scientific Reports*, 7: 11073.
- CHEN Y, HE M, LI Z Q, ZHANG Y N, HE P, 2016. Identification and tissue expression profile of genes from three chemoreceptor families in an urban pest, *Periplaneta americana*. *Scientific Reports*, 6: 27495.
- CHIU C C, KEELING C I, BOHLMANN J, 2018. Cytochromes P450 preferentially expressed in antennae of the mountain pine beetle. *Journal of Chemical Ecology*, 45(2): 178-186.
- CHIU C C, KEELING C I, BOHLMANN J, 2019. The cytochrome P450 CYP6DE1 catalyzes the conversion of alpha-pinene into the mountain pine beetle aggregation pheromone trans-verbenol. *Scientific Reports*, 9: 1477.
- CLARK J S, CARPENTER S R, BARBER M, COLLINS S, DOBSON A, FOLEY J A, LODGE D M, PASCUAL M, PIELKE R, PIZER W, PRINGLE C, REID W V, ROSE K A, SALA O, SCHLESINGER W H, WALL D H, WEAR D, 2001. Ecological forecasts: an emerging imperative. *Science*, 293: 657-660.
- DONG L L, LIU H F, ZHANG J C, YANG S J, KONG G Y, CHU J S C, CHEN N S, WANG D W, 2015. Single-molecule real-time transcript sequencing facilitates common wheat genome annotation and grain transcriptome research. *BMC Genomics*, 16: 1039.
- FIRMINO A A P, DE ASSIS FONSECA F C, DE MACEDO L L P, COELHO R R, DE SOUZA-JR J D A, TOGAWA R C, SILVA-JUNIOR O B, PAPPAS-JR G J, SILVA M, ENGLER G, GROSSI-DE-SA M F, 2013. Transcriptome analysis in cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) and RNA interference in insect pests. *PLoS ONE*, 8(12): e85079.
- FRANCIS F, VANHAELEN N, HAUBRUGE E, 2010. Glutathione S-transferases in the adaptation to plant secondary metabolites in the *Myzus persicae* aphid. *Archives of Insect Biochemistry & Physiology*, 58(3): 166-174.
- FRANCESCA L, CINZIA P S, MARTIN G E, ANTONINO M, ORLANDO C, HESHAM M A E, ANGHARAD M R G, VINCENZO P, 2017. RNAi-mediated gene silencing in *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae). *Open Life Sciences*, 12: 214-222.
- GAGNON A, BOIVIN G, BELAIR G, MIMÉE B, 2019. Prevalence of a nematode castrator of the carrot weevil and impact on fecundity and survival. *Parasitology*, 146(6): 702-707.
- GARCIA R A, MACEDO L L P, NASCIMENTO D C D, GILLET F, MOREIRA-PINTO C E, FAHEEM M, BASSO A M M, SILVA M C M, GROSSI-DE-SA M F, 2017. Nucleases as a barrier to gene silencing in the cotton boll weevil, *Anthonomus grandis*. *PLoS ONE*, 12(12): e189600.
- GIOVINO A, BERTOLINI E, FILECCIA V, HASSAN M A, LABRA M, MARTINELLI F, 2015. Transcriptome analysis of *Phoenix canariensis* Chabaud in response to *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier attacks. *Frontiers in Plant Science*, 6: 817.
- GU X C, ZHANG Y N, KANG K, DONG S L, ZHANG L W, 2015. Antennal transcriptome analysis of odorant reception

- genes in the red turpentine beetle (RTB), *Dendroctonus valens*. *PLoS ONE*, 10(5): e125159.
- HASSAN A, MUHAMMAD R, ABID H, AHMED M A, 2016. Insecticidal potency of RNAi-based catalase knockdown in *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae). *Pest Management Science*, 72: 2118–2127.
- HE W Y, YOU M S, VASSEUR L, YANG G, XIE M, CUI K, BAI J L, LIU C H, LI X J, XU X F, HUANG S G, 2012. Developmental and insecticide-resistant insights from the de novo assembled transcriptome of the diamondback moth. *Genomics*, 99(3): 169–177.
- HUANG Y, LIAO M, YANG Q Q, XIAO J J, HU Z Y, ZHOU L J, CAO H Q, 2018. Transcriptome profiling reveals differential gene expression of detoxification enzymes in *Sitophilus zeamais* responding to terpinen-4-ol fumigation. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 149: 44–53.
- KEELING C I, BOHLMANN J, 2006. Genes, enzymes and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defence of conifers against insects and pathogens. *New Phytologist Trust*, 170(4): 657–675.
- KEELING C I, HENDERSON H, LI M, DULLAT H K, OHNISHI T, BOHLMANN J, 2013b. CYP345E2, an antenna-specific cytochrome P450 from the mountain pine beetle, *Dendroctonus ponderosae* Hopkins, catalyses the oxidation of pine host monoterpene volatiles. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43(12): 1142–1151.
- KEELING C I, LI M, SANDHU H K, HENDERSON H, YUEN M M S, BOHLMANN J, 2016. Quantitative metabolome, proteome and transcriptome analysis of midgut and fat body tissues in the mountain pine beetle, *Dendroctonus ponderosae* Hopkins, and insights into pheromone biosynthesis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 70: 170–183.
- KEELING C I, YUEN M M, LIAO N Y, RODERICK DOCKING T, CHAN S K, TAYLOR G A, PALMQUIST D L, JACKMAN S D, NGUYEN A, LI M, HENDERSON H, JANES J K, ZHAO Y, PANDOH P, MOORE R, SPERLING F A, W HUBER D P, BIROL I, JONES S J, BOHLMANN J, 2013a. Draft genome of the mountain pine beetle, *Dendroctonus ponderosae* Hopkins, a major forest pest. *Genome Biology*, 14(3): 27.
- LIAO M, XIAO J J, ZHOU L J, LIU Y, WU X W, HUA R M, WANG G R, CAO H Q, QIU X H, 2016. Insecticidal activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil and RNA-Seq analysis of *Sitophilus zeamais* transcriptome in response to oil fumigation. *PLoS ONE*, 11(12): e167748.
- LIU Z K, WEN J B, 2016. Transcriptomic analysis of *Eucryptorhynchus chinensis* (Coleoptera: Curculionidae) using 454 pyrosequencing technology. *Journal of Insect Science*, 16(1): 82.
- LUO C B, LI Y Q, CHEN Y, FU C, NONG X, YANG Y J, 2019. Degradation of bamboo lignocellulose by bamboo snout beetle *Cyrtotrachelus buqueti* in vivo and vitro: efficiency and mechanism. *Biotechnology for Biofuels*, 12: 75.
- LUO C B, LI Y Q, LIAO H, YANG Y J, 2018. De novo transcriptome assembly of the bamboo snout beetle *Cyrtotrachelus buqueti* reveals ability to degrade lignocellulose of bamboo feedstock. *Biotechnology for Biofuels*, 11: 292.
- MUHAMMAD A, HABINEZA P, JI T L, HOU Y M, SHI Z H, 2019. Intestinal microbiota confer protection by priming the immune system of red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Coleoptera: Dryophthoridae). *Frontiers in Physiology*, 10: 1212.
- NADEAU J A, PETEREIT J, TILLET R L, JUNG F, FOOTOHI M, MACLEAN M, YOUNG S, SCHLAUCH K, BLOMQUIST G J, TITTIGER C, 2017. Comparative transcriptomics of mountain pine beetle pheromone-biosynthetic tissues and functional analysis of CYP6DE3. *BMC Genomics*, 18: 311.
- NEUPERT S, MARCINIAK P, KOEHLER R, NACHMAN R J, SUH C P C, PREDEL R, 2018. Different processing of CAPA and pyrokinin precursors in the giant mealworm beetle *Zophobas atratus* (Tenebrionidae) and the boll weevil *Anthonomus grandis* (Curculionidae). *General & Comparative Endocrinology*, 258: 53–59.
- NORIEGA D D, ARIAS P L, BARBOSA H R, ARRAES F, OSSA G A, VILLEGAS B, COELHO R R, ALBUQUERQUE E, TOGAWA R C, GRYNBERG P, WANG H, VELEZ A M, ARBOLEDA J W, GROSSI-DE-SA M F, SILVA M, VALENCIA-JIMENEZ A, 2019. Transcriptome and gene expression analysis of three developmental stages of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. *Scientific Reports*, 9(1): 12804.
- OZSOLAK F, MILOS P M, 2011. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nature Reviews Genetics*, 12(2): 87–98.
- PANDITA A A, RAGIONIERI L, MARLEY R, YEOH J G C, INWARD D J G, DAVIES S, PREDEL R, DOW J A T, 2018. Coordinated RNA-Seq and peptidomics identify neuropeptides and G-protein coupled receptors (GPCRs) in the large pine weevil *Hylobius abietis*, a major forestry pest. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 101: 94–107.
- PAULA D P, TOGAWA R C, COSTA M M D C, GRYNBERG P, MARTINS N F, ANDOW D A, 2018. Systemic and sex-biased regulation of OBP expression under semiochemical stimuli. *Scientific Reports*, 8(1): 6035.
- PITT C, ROBERT J A, BONNETT T R, KEELING C I, BOHLMANN J, HUBER D P W, 2014. Proteomics indicators of the rapidly shifting physiology from whole mountain pine beetle, *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Curculionidae), adults during early host colonization. *PLoS ONE*, 9(10): e110673.
- PU Y C, LIANG X Y, ZHANG H, ZHANG H J, XU L N, JI Y N, HUANG S N, BAI J, HOU Y M, 2020. Identification of novel ARSB genes necessary for p-benzoquinone biosynthesis in the larval oral secretion participating in external

- immune defense in the red palm weevil. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5): 1610.
- ROBERT J A, BONNETT T, PITT C, SPOONER L J, FRASER J, YUEN M M S, KEELING C I, BOHLMANN J, HUBER D P W, 2016. Gene expression analysis of overwintering mountain pine beetle larvae suggests multiple systems involved in overwintering stress, cold hardiness, and preparation for spring development. *PeerJ*, 4: e2109.
- ROBERT J A, PITT C, BONNETT T R, YUEN M M S, KEELING C I, BOHLMANN J, HUBER D P W, 2013. Disentangling detoxification: gene expression analysis of feeding mountain pine beetle illuminates molecular-level host chemical defense detoxification mechanisms. *PLoS ONE*, 8(11): e77777.
- ROBERTS R J, CARNEIRO M O, SCHATZ M C, 2013. The advantages of SMRT sequencing. *Genome Biology*, 14(6): 405.
- ROY K, LYDIA G, GUENTER T, SIEGFRIED D B, FFRENCH-CONSTANT R H, HECKEL D G, PAUCHET Y, 2014. Horizontal gene transfer and functional diversification of plant cell wall degrading polygalacturonases: key events in the evolution of herbivory in beetles. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 52: 33–50.
- TANG Q, ZHANG Y, SHEN C, XIA D, 2019a. Identification and expression profiling of odorant receptor protein genes in *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) using RT-qPCR. *Neotropical Entomology*, 48(4): 538–551.
- TANG Q F, SHEN C, ZHANG Y, YANG Z P, HAN R R, WANG J, 2019b. Antennal transcriptome analysis of the maize weevil *Sitophilus zeamais*: identification and tissue expression profiling of candidate odorant-binding protein genes. *Archives of Insect Biochemistry & Physiology*, 101: e21542.
- VALENCIA A, WANG H, SOTO A, ARISTIZABAL M, ARBOLEDA J W, EYUN S, NORIEGA D D, SIEGFRIED B, 2016. Pyrosequencing the midgut transcriptome of the banana weevil *Cosmopolites sordidus* (Germar) (Coleoptera: Curculionidae) reveals multiple protease-like transcripts. *PLoS ONE*, 11(3): e151001.
- WANG L, ZHANG X W, PAN L L, LIU W F, WANG D P, ZHANG G Y, YIN Y X, YIN A, JIA S G, YU X G, SUN G Y, HU S N, MSSALLEM I S A, YU J, 2012. A large-scale gene discovery for the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae). *Insect Science*, 20(6): 689–702.
- WANG Y B, ZHANG H, LI H C, MIAO X X, 2011. Second-generation sequencing supply an effective way to screen RNAi targets in large scale for potential application in pest insect control. *PLoS ONE*, 6(4): e18644.
- XU L T, ZHANG Y Q, ZHANG S H, DENG J D, LU M, ZHANG L W, ZHANG J, 2018. Comparative analysis of the immune system of an invasive bark beetle, *Dendroctonus valens*, infected by an entomopathogenic fungus. *Developmental & Comparative Immunology*, 88: 65–69.
- YAN W, LIU L, QIN W Q, LI C X, PENG Z Q, 2015. Transcriptomic identification of chemoreceptor genes in the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus*. *Genetics & Molecular Research*, 14(3): 7469–7480.
- YANG H, SU T, YANG W, YANG C P, LU L, CHEN Z M, 2017. The developmental transcriptome of the bamboo snout beetle *Cyrtotrachelus buqueti* and insights into candidate pheromone-binding proteins. *PLoS ONE*, 12(6): e179807.
- YANG H J, XU D P, ZHUO Z H, HU J M, LU B Q, 2020. SMRT sequencing of the full-length transcriptome of the *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae). *PeerJ*, 8: e9133.
- YIN A, PAN L L, ZHANG X W, WANG L, YIN Y X, JIA S G, LIU W F, XIN C Q, LIU K, YU X G, SUN G Y, AL-HUDAIB K, HU S N, AL-MSSALLEM I S, YU J, 2015. Transcriptomic study of the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* embryogenesis. *Insect Science*, 22(1): 65–82.
- YUAN X, JIANG Y D, WANG G Y, YU H, ZHOU W W, LIU S, YANG M F, CHENG J, GURR G M, WAY M O, ZHU Z, 2016. Odorant-binding proteins and chemosensory proteins from an invasive pest *Lissorhoptrus oryzophilus* (Coleoptera: Curculionidae). *Environmental Entomology*, 45(5): 1276–1286.
- ZHANG C, MA Z Q, ZHANG X, WU H, 2017a. Transcriptomic alterations in *Sitophilus zeamais* in response to allyl isothiocyanate fumigation. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 137: 62–70.
- ZHANG J, AFZALKHAN S, HECKEL D G, BOCK R, 2017b. Next-generation insect-resistant plants: RNAi-mediated crop protection. *Trends in Biotechnology*, 35(9): 871–882.
- ZHANG X X, YANG S, ZHANG J H, WANG X, WANG S, LIU M N, XI J H, 2019. Identification and expression analysis of candidate chemosensory receptors based on the antennal transcriptome of *Lissorhoptrus oryzophilus*. *Comparative Biochemistry & Physiology Part D Genomics & Proteomics*, 30: 133–142.
- ZIMMER C T, MAIWALD F, SCHORN C, BASS C, OTT M, NAUEN R, 2014. A de novo transcriptome of European pollen beetle populations and its analysis, with special reference to insecticide action and resistance. *Insect Molecular Biology*, 23(4): 511–526.
- ZOU Z, NAJAR F, WANG Y, ROE B, JIANG H, 2008. Pyrosequence analysis of expressed sequence tags for *Manduca sexta* hemolymph proteins involved in immune responses. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(6): 677–682.