



李根层, 赵昱杰, 赵宁, 刘乃勇. 基于转录组学的管纹艳虎天牛表皮蛋白基因家族的鉴定及特征分析 [J]. 环境昆虫学报, 2021, 43 (1): 1-14.

基于转录组学的管纹艳虎天牛表皮蛋白基因家族的鉴定及特征分析

李根层, 赵昱杰, 赵宁, 刘乃勇*

(西南林业大学云南省森林灾害预警与控制重点实验室, 昆明 650224)

摘要: 表皮蛋白 (cuticular protein, CP) 在昆虫生长发育、抵御外界不良环境等方面具有重要作用, 但在管纹艳虎天牛 *Rhaphuma horsfieldi* 中关于 CP 基因的研究尚属空白。本研究基于已测序的转录组, 通过生物信息学技术从管纹艳虎天牛中一共鉴定到 108 个 CP 基因, 包括 41 个 CP-RR1、30 个 CP-RR2、8 个 CPAP1、7 个 CPAP3、3 个 CPCFC、14 个 CPU 和 5 个 TWDL 基因, 其中 39 个基因具有全长序列。结构域及保守基序分析表明, 管纹艳虎天牛的 CP-RR1 和 CP-RR2 家族均具有 1 个保守的 Chitin_bind_4 结构域, 其中 CP-RR1 家族完全符合昆虫经典的 R&R 基序 (G-X(8)-G-X(6)-Y), 而 CP-RR2 家族的保守基序 (G-X-Y-X(5)-D-G-X(6)-Y) 出现了变化。进化分析表明, 管纹艳虎天牛 RhorCPs 可划分为 7 个家族: CP-RR1、CP-RR2、CPAP1、CPAP3、CPCFC、CPU 和 TWDL。表达谱结果表明, RhorCPs 基因的表达谱具有多样性, 部分基因在检测的组织中表达量均较低; 部分基因在触角和跗节中特异或高表达, 可能具有化学感受功能; 部分基因在不含触角和跗节的身体中有表达, 可能与成虫表皮的发育和形成有关。研究结果不仅可为后续管纹艳虎天牛 RhorCPs 基因的功能研究奠定基础, 还可筛选到害虫防治的潜在分子靶标。

关键词: 管纹艳虎天牛; 表皮蛋白; 结构域; 保守基序; 进化树; 表达谱

中图分类号: Q963; S433.5

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2021) 01-0001-14

Identification and characterization of cuticular protein gene families of *Rhaphuma horsfieldi* based on transcriptomics

LI Gen-Ceng, ZHAO Yu-Jie, ZHAO Ning, LIU Nai-Yong* (Key Laboratory of Forest Disaster Warning and Control of Yunnan Province, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China)

Abstract: Cuticular proteins (CPs) in insects are of particular importance for the development and against adverse environmental conditions. However, no information for CP genes of *Rhaphuma horsfieldi* is available to date. Based on the transcriptome of *R. horsfieldi*, here totally 108 CP genes were identified using a bioinformatics approach including 41 CPs with a Rebers and Riddiford motifs (CP-RR1), 30 CP-RR2, 8 CPs analogous to peritrophins (CPAP1), 7 CPAP3, 3 CPs with two to three copies of a C-x(5)-C motifs (CPCFC), 14 CP unclassified (CPU) and 5 tweedles (TWDL) genes. Of these, 39 CP genes had full-length open reading frames. Structural domain and conserved motif analyses showed that both RhorCP-RR1 and RhorCP-RR2 families had a conserved Chitin_bind_4 domain, in which the CP-RR1

基金项目: 云南省教育厅科学研究基金 (2020Y398); 云南省科技厅青年项目 (2017FD101); 云南省“高层次人才培养支持计划”青年拔尖人才项目 (YNWR-QNBJ-2019-057)

作者简介: 李根层, 男, 1994 年生, 云南省腾冲人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫化学生态, E-mail: 1846238287@qq.com

* 通讯作者 Author for correspondence: 刘乃勇, 男, 博士, 副教授, 主要研究方向为昆虫化学生态及其分子生物学, E-mail: Naiyong.liu@swfu.edu.cn

收稿日期 Received: 2019-12-13; 接受日期 Accepted: 2020-02-07

family completely matched insect classical R&R motif (G-X (8) -G-X (6) -Y), while that of the CP-RR2 family was changed into G-X-Y-X(5) -D-G-X(6) -Y. Phylogenetic analysis showed that RhorCPs were classified into 7 families: CP-RR1, CP-RR2, CPAP1, CPAP3, CPCFC, CPU and TWDL. Expression profiling analysis revealed that *RhorCP* genes were broadly expressed in various tissues. Some of *RhorCPs* were detected in all tested tissues at low levels. Parts of *RhorCPs* were highly expressed in antennae and tarsi, suggesting their chemosensory roles. Some were detected in the bodies without the antennae and tarsi, possibly associated with the formation and development of adult cuticle. Together, this study provides reference data for subsequent functional studies of *R. horsfieldi* CP genes, and meanwhile identifies candidate molecular targets for pest control of this beetle.

Key words: *Rhaphuma horsfieldi*; cuticular protein; structural domain; conserved motif; phylogenetic tree; expression profile

昆虫的表皮覆盖其整个体躯,不仅能够防御病原体的攻击和不利环境的伤害,而且在昆虫发育过程中对于体型塑造、水分保持和维持正常的活动能力等起着重要作用 (Delon and Payre, 2004)。昆虫表皮的主要成分是表皮蛋白 (cuticular proteins, CPs) 和几丁质。其中, CP 是昆虫体内一种重要的结构蛋白,其种类和数量因种间或同种不同发育阶段而存在差异。因此, CP 种类和数量的变化是昆虫表皮结构及其机械性能的重要影响因素 (Andersen *et al.*, 1995; Fire *et al.*, 1998)。1982 年, Snyder 等首次报道了黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的 5 个 CP 基因 (*DmelCP1-5*) (Snyder *et al.*, 1982); 随后, Ioannidou 等 (2014) 从黑腹果蝇基因组中共鉴定到 228 个 CP 基因 (Ioannidou *et al.*, 2014)。随着家蚕 *Bombyx mori*、埃及伊蚊 *Aedes aegypti*、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*、意大利蜜蜂 *Apis mellifera*、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 等昆虫完成基因组测序,已有大量的 CP 基因得到鉴定,为 CP 基因家族的进化及功能研究提供了重要资源,但是在不同物种间其数量差异较大 (66 ~ 305 个) (Futahashi *et al.*, 2008; Willis, 2010; Ioannidou *et al.*, 2014)。截至目前 (2020 年 1 月),在 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 数据库中收录的有详细描述昆虫 CP 序列已达数千条。

基于保守的氨基酸基序,昆虫的 CP 蛋白可以划分为 CP-RR (含有 Rebers & Riddiford 保守基序)、CPF (含一段高度保守的长为 44 个氨基酸的区域)、CPFL (CPF Like)、Tweedle (含有 4 个保守的区域)、CPAP1 (有 1 个 ChtBD2 几丁质结合域)、CPAP3 (有 3 个 ChtBD2 几丁质结合域)、CPG (有许多短的甘氨酸重复序列)、CPLC (一类

含有低复杂序列的蛋白,包括 CPLCA、CPLCG、CPLCP 和 CPLCW 家族) 和 Apidermin 等 12 个家族 (He *et al.*, 2007; Togawa *et al.*, 2007; Willis *et al.*, 2010)。1988 年,Rebers 和 Riddiford 通过对 7 条 CP 氨基酸序列的比对分析,鉴定到 CP-RR 家族的保守基序为 G-X(8) -G-X(6) -Y-X-A-X-E-X-G-Y-X(7) -P-X(2) -P (X 表示氨基酸,括号内的数字为该处 X 的数目) (Rebers and Riddiford, 1988)。随后,有学者根据 R&R 保守基序的差异,将 CP-RR 分为 CP-RR1 (主要存在柔软表皮层)、CP-RR2 (主要存在于坚硬表皮层) 和 CP-RR3 (目前对其研究不多,可能参与蜕皮后新表皮的形成) 3 个家族 (Soares *et al.*, 2007; 刘清明等, 2010)。

昆虫 CP 蛋白的种类较多,每类 CP 基因的功能可能因其所在位置及发育阶段的不同而存在差异 (梁九波, 2012)。Guan 等 (2006) 在研究黑腹果蝇的体形时发现, *Tweedle D1* 基因缺失会导致果蝇幼虫与蛹变短 (Guan *et al.*, 2006)。马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 通过调节表皮蛋白基因 *LdecGRP1*、*LdecGRP2* 和 *LdecGRP3* 的表达来增加自身对外界环境的适应能力 (Zhang *et al.*, 2008)。Dittmer 等 (2012) 通过蛋白质组学和转录组学的方法,发现赤拟谷盗鞘翅中存在大量 CP-RR2 基因,而 CP-RR1 基因则集中于柔软后翅中,表明 CP 基因的类型对表皮物理性质有重要影响 (Dittmer *et al.*, 2012)。赤拟谷盗的 *TcasCPAP1* 基因的缺失会导致其表皮发育不全并脱落; 而 *TcasCPAP3-A1* 和 *TcasCPAP3-A2* 基因的缺失则会影响其鞘翅的发育 (Jasrapuria *et al.*, 2012)。Arakane 等 (2012) 将赤拟谷盗的 *TcasCP18* 和 *TcasCP27* 基因沉默后,发现成虫鞘翅产生皱褶、弯曲、多孔等症状,从而导致成虫在羽化后因鞘

翅过短而不能完整包裹虫体,进而导致成虫失水死亡,且异形的鞘翅弹性显著降低,表明这两个 CP 基因对于维持赤拟谷盗鞘翅的形态和机械性能是不可缺少的 (Arakane *et al.*, 2012)。此外,赤拟谷盗 CP-RR1 家族的 *TcasCPR4* 基因在其表皮层孔道的形成中具有重要作用 (Noh *et al.*, 2015)。综上所述,昆虫 CP 基因在其生长发育、体型塑造、表皮和翅的形成等生理过程中具有重要作用。

管纹艳虎天牛 *Rhaphuma horsfieldi* 隶属鞘翅目 Coleoptera 天牛科 Cerambycidae 虎天牛族 Clytini 艳虎天牛属 *Rhaphuma*, 主要为害香须树、木姜子属、合欢属以及三台核桃等树木。在国内主要分布于云南、四川、贵州望漠等地 (云南省林业厅等, 1987), 在印度、缅甸、越南、老挝等国家也有关于该天牛的相关报道 (张俊香, 2005)。课题组前期调查发现, 该天牛是云南三台核桃上新发现的一种重要蛀干害虫, 每年 5–7 月, 成虫开始羽化, 随后完成交配、并咬食树干后, 在刻槽内产卵, 孵化后的幼虫钻蛀到树干木质部进行取食和为害 (尹宁娜等, 2019)。由于管纹艳虎天牛的幼虫生活在树干内, 不易防治; 此外, 成虫具有坚硬的外表皮, 进一步加大了防治的难度。目前, 管纹艳虎天牛表皮相关蛋白的研究仍属空白, 如何能够有效地抑制天牛昆虫表皮的形成, 从而采用化学防治等方法将其杀死, 是昆虫生理生化领域的研究热点。本文基于测序的转录组数据, 采用生物信息学方法在鉴定管纹艳虎天牛 CP 基因的基础上, 进一步研究了 CP 基因家族的序列及结构特征、与鞘翅目其他昆虫 CP 基因的进化关系以及组织表达特征。研究结果不仅可以为后续管纹艳虎天牛 CP 基因的功能研究奠定基础, 还可为该种天牛的防治提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 研究对象

管纹艳虎天牛采自云南省楚雄州大姚县三台乡 (N26°00′01.6″, E101°04′04.7″), 海拔 1 999 m。2016 年 7 月中旬, 通过野外采集带有天牛产卵刻痕的受害核桃木段于室内饲养, 并保持受害核桃木段水分, 待 2017 年成虫羽化后收集备用。

分别收集管纹艳虎天牛雌雄成虫触角、跗节及身体其他组织 (不含触角和跗节), 每个组织收集两套生物学模板, 用于转录组测序。

1.2 研究方法

1.2.1 基因的鉴定及比较

收集光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis* (McKenna *et al.*, 2016)、马铃薯甲虫 (Schoville *et al.*, 2018) 和赤拟谷盗 (Ioannidou *et al.*, 2014) 的 CP 蛋白序列, 用于管纹艳虎天牛 CP 基因的鉴定; 然后, 将管纹艳虎天牛转录组导入 BioEdit 软件中, 采用 tBlastn 同源搜索的方法鉴定管纹艳虎天牛中候选的 CP 基因; 最后, 采用 Primer Premier 5 软件将已鉴定的基因翻译成氨基酸序列, 在 NCBI Nr 数据库中进行比对, 每个 RhorCPs 仅选择比对到光肩星天牛的 AglaCPs。

根据已发表的文献, 收集鞘翅目、双翅目、膜翅目和鳞翅目等其他昆虫的 CP 基因, 分析和比较不同目及同目不同种间 CP 基因的数量差异。

1.2.2 序列及进化分析

采用 NCBI Open Reading Frame Finder 预测 RhorCPs 基因的开放阅读框 (ORF) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)。采用 ClustalW 软件进行序列比对 (Larkin *et al.*, 2007)。采用 WebLogo 在线软件绘制 CP-RR1 和 CP-RR2 家族的结构域 Logo 图 (Crook *et al.*, 2004), 并标记保守基序。采用 SignalP 4.1 预测信号肽 (Petersen *et al.*, 2011)。利用 CutProtFam-Pred 对鉴定的 RhorCPs 基因进行不同家族的划分 (Ioannidou *et al.*, 2014)。在结构域分析中, 仅选取具有全长的 RhorCPs, 采用 SMART 鉴定 RhorCPs 的结构域 (Letunic and Bork, 2018), 并绘制序列结构域示意图。

选取管纹艳虎天牛和光肩星天牛的 CP 序列, 首先利用 MAFFT v7.388 进行序列比对 (Katoh and Standley, 2013); 然后, 采用 FastTree v2.1.5 软件中的 SH-like 1000 support 方法构建 CP 的进化树 (Price *et al.*, 2010)。进化树的编辑和可视化采用 FigTree v1.4.4 软件进行 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>)。

1.2.3 基因的表达水平研究

采用 Bowtie 软件将测序获得的 reads 比对到 unigenes 数据库, 然后利用 RSEM 对基因的表达量进行计算, 最后采用 FPKM (expected number of Fragments Per Kilobase of transcript sequence per Millions base pairs sequenced, 即每百万 fragments 中来自某一基因每千碱基长度的 fragments 数目) 值比较不同 CP 基因在同一样本或同一 CP 基因在

不同样本间的表达量 (Trapnell *et al.*, 2010)。根据转录组测序获得的 FPKM 值及基因对应的编号, 找到每个基因在不同组织的 FPKM 值, 然后取两次重复的 FPKM 平均值研究 *CP* 基因在不同组织的表达情况。

2 结果与分析

2.1 管纹艳虎天牛 *CP* 基因的鉴定

基于管纹艳虎天牛的转录组数据, 采用 Blast 同源搜索的方法一共鉴定到 108 个 *CP* 基因, 包括 7 个家族成员 (表 1): 41 个 *CP-RR1*、30 个 *CP-RR2*、8 个 *CPAP1*、7 个 *CPAP3*、3 个 *CPCFC*、14 个 *CPU* 和 5 个 *TWDL*。在 *CP-RR1* 基因家族中, 16 个基因具有全长序列, 编码 105 ~ 239 个氨基酸; 剩余 25 个基因为片段, 编码 88 ~ 410 个氨基酸。在 *CP-RR2* 基因家族中, 13 个基因具有全长序列, 编码 113 ~ 340 个氨基酸; 剩余基因为片段,

编码 88 ~ 252 个氨基酸。在 *CPAP1* 基因家族中, *CPAP1.4* 和 *CPAP1.7* 具有全长 ORF, 分别编码 172 和 129 个氨基酸。在 *CPAP3* 家族中, *CPAP3.2* 和 *CPAP3.6* 是全长序列, 分别编码 238 和 255 个氨基酸。在 *CPCFC* 家族中, *CPCFC2* 和 *CPCFC3* 是全长序列, 分别编码 214 和 186 个氨基酸。在 *CPU* 家族中, 4 个基因 (*CPU2*、*CPU10*、*CPU13* 和 *CPU14*) 具有全长序列, 编码 177 ~ 1 093 个氨基酸。在 *TWDL* 家族中, 所有 5 个基因均为片段, 其中最长的 *TWDL1*, 编码 465 个氨基酸; 最短的是 *TWDL3*, 编码 153 个氨基酸 (表 1)。NCBI Blast 比对结果表明, 在具有全长序列的 *CP* 基因中, RhorCPAP3.2 与 AglaCPAP3.4 (GenBank 登录号: XP_018569398.1) 一致性最高, 为 92%; RhorCP-RR1.10 与 AglaCP-RR1.28 (GenBank 登录号: XP_018568269.1) 的氨基酸一致性最低, 仅为 38% (表 1)。

表 1 管纹艳虎天牛 *CP* 基因的信息

Table 1 Information for cuticular protein genes in *Rhaphuma horsfieldi*

基因 Gene	开放阅读框 ORF (AA)	全长 FL	与光肩星天牛 <i>CP</i> 比对结果 (登录号/基因)		E 值 E value	一致性 (%) Identity
Cuticular Proteins with a Rebers and Riddiford motif (<i>CP-RR1</i>)						
<i>CP-RR1. 1</i>	88	No	XP_018575118. 1	AglaCP-RR1. 44	4e-33	67
<i>CP-RR1. 2</i>	132	Yes	XP_018580237. 1	AglaCP-RR1. 22	4e-44	69
<i>CP-RR1. 3</i>	108	Yes	XP_018562931. 1	AglaCP-RR1. 24	8e-40	63
<i>CP-RR1. 4</i>	128	Yes	XP_018574441. 1	AglaCP-RR1. 45	5e-50	63
<i>CP-RR1. 5</i>	117	Yes	XP_018576797. 1	AglaCP-RR1. 50	7e-61	78
<i>CP-RR1. 6</i>	136	Yes	XP_018570532. 1	AglaCP-RR1. 29	4e-40	60
<i>CP-RR1. 7</i>	187	No	XP_018580264. 1	AglaCP-RR1. 19	2e-26	50
<i>CP-RR1. 8</i>	129	No	XP_018579264. 1	AglaCP-RR1. 4	9e-35	66
<i>CP-RR1. 9</i>	153	No	XP_018575117. 1	AglaCP-RR1. 43	5e-33	46
<i>CP-RR1. 10</i>	155	Yes	XP_018568269. 1	AglaCP-RR1. 28	1e-17	38
<i>CP-RR1. 11</i>	206	No	XP_018574348. 1	AglaCP-RR1. 28	2e-60	49
<i>CP-RR1. 12</i>	163	Yes	XP_018568269. 1	AglaCP-RR1. 28	2e-14	39
<i>CP-RR1. 13</i>	102	No	XP_018568269. 1	AglaCP-RR1. 28	3e-16	40
<i>CP-RR1. 14</i>	159	No	XP_018578131. 1	AglaCP-RR1. 57	1e-90	82
<i>CP-RR1. 15</i>	143	Yes	XP_018574964. 1	AglaCP-RR1. 40	6e-75	79
<i>CP-RR1. 16</i>	191	No	XP_018564026. 1	AglaCP-RR1. 5	2e-56	88
<i>CP-RR1. 17</i>	111	No	XP_018576798. 1	AglaCP-RR1. 51	1e-39	69

续表 1 Continued table 1

基因 Gene	开放阅读框 ORF (AA)	全长 FL	与光肩星天牛 <i>CP</i> 比对结果 (登录号/基因) Blast hit to <i>Anoplophora glabripennis</i> (GenBank No. /Gene)		E 值 E value	一致性 (%) Identity
<i>CP-RR1. 18</i>	203	No	XP_018574345. 1	AglaCP-RR1. 38	2e-61	73
<i>CP-RR1. 19</i>	258	No	XP_018578419. 1	AglaCP-RR1. 55	8e-85	65
<i>CP-RR1. 20</i>	137	Yes	XP_018575897. 1	AglaCP-RR1. 49	2e-82	85
<i>CP-RR1. 21</i>	92	No	XP_018577186. 1	AglaCP-RR1. 54	5e-41	74
<i>CP-RR1. 22</i>	117	No	XP_018562156. 1	AglaCP-RR1. 27	7e-34	55
<i>CP-RR1. 23</i>	234	No	XP_018574347. 1	AglaCP-RR1. 39	4e-98	74
<i>CP-RR1. 24</i>	410	No	XP_018577235. 2	AglaCP-RR1. 47	0. 0	74
<i>CP-RR1. 25</i>	108	Yes	XP_018562931. 1	AglaCP-RR1. 24	5e-45	69
<i>CP-RR1. 26</i>	180	Yes	XP_018580259. 1	AglaCP-RR1. 11	4e-44	59
<i>CP-RR1. 27</i>	133	Yes	XP_018580236. 2	AglaCP-RR1. 16	6e-22	51
<i>CP-RR1. 28</i>	95	No	XP_018580256. 1	AglaCP-RR1. 59	5e-40	71
<i>CP-RR1. 29</i>	317	No	XP_018563931. 1	AglaCP-RR1. 10	1e-88	60
<i>CP-RR1. 30</i>	134	No	XP_018568269. 1	AglaCP-RR1. 28	1e-20	38
<i>CP-RR1. 31</i>	168	Yes	XP_018574122. 1	AglaCP-RR1. 36	8e-81	78
<i>CP-RR1. 32</i>	221	No	XP_018564024. 1	AglaCP-RR1. 8	2e-63	83
<i>CP-RR1. 33</i>	239	Yes	XP_018579201. 1	AglaCP-RR1. 3	e-80	68
<i>CP-RR1. 34</i>	169	Yes	XP_018580260. 1	AglaCP-RR1. 17	4e-46	57
<i>CP-RR1. 35</i>	204	No	XP_018577372. 1	AglaCP-RR1. 56	7e-47	87
<i>CP-RR1. 36</i>	105	Yes	XP_018574074. 1	AglaCP-RR1. 37	9e-34	55
<i>CP-RR1. 37</i>	110	No	XP_018577186. 1	AglaCP-RR1. 54	7e-50	74
<i>CP-RR1. 38</i>	198	No	XP_018562156. 1	AglaCP-RR1. 27	1e-14	41
<i>CP-RR1. 39</i>	109	No	XP_018575898. 1	AglaCP-RR1. 48	8e-52	72
<i>CP-RR1. 40</i>	149	No	XP_018564030. 1	AglaCP-RR1. 6	4e-43	86
<i>CP-RR1. 41</i>	154	No	XP_018580261. 1	AglaCP-RR1. 20	4e-45	59
Cuticular Proteins with a Rebers and Riddiford motif (<i>CP-RR2</i>)						
<i>CP-RR2. 1</i>	155	No	XP_018566856. 1	AglaCP-RR2. 9	1e-33	48
<i>CP-RR2. 2</i>	126	Yes	XP_018571774. 1	AglaCP-RR2. 59	2e-22	64
<i>CP-RR2. 3</i>	152	Yes	XP_018566221. 1	AglaCP-RR2. 45	4e-37	62
<i>CP-RR2. 4</i>	252	No	XP_018561133. 1	AglaCP-RR2. 2	2e-25	63
<i>CP-RR2. 5</i>	122	Yes	XP_018566220. 1	AglaCP-RR2. 44	9e-44	80
<i>CP-RR2. 6</i>	186	Yes	XP_018572515. 1	AglaCP-RR2. 62	4e-80	74
<i>CP-RR2. 7</i>	113	Yes	XP_018561136. 1	AglaCP-RR (LOC108903441)	8e-45	68
<i>CP-RR2. 8</i>	112	No	XP_018572821. 1	AglaCP-RR2. 64	2e-55	80
<i>CP-RR2. 9</i>	205	Yes	XP_023313029. 1	AglaCP-RR2. 23	4e-75	77
<i>CP-RR2. 10</i>	229	No	XP_018563463. 1	AglaCP-RR2. 38	1e-91	75

续表 1 Continued table 1

基因 Gene	开放阅读框 ORF (AA)	全长 FL	与光肩星天牛 <i>CP</i> 比对结果 (登录号/基因) Blast hit to <i>Anoplophora glabripennis</i> (GenBank No. /Gene)		E 值 E value	一致性 (%) Identity
<i>CP-RR2. 11</i>	165	No	XP_018561035. 1	AglaC2P-RR2. 15	1e-47	70
<i>CP-RR2. 12</i>	146	Yes	XP_018561020. 1	AglaCP-RR2. 27	8e-59	67
<i>CP-RR2. 13</i>	198	No	XP_018577010. 1	AglaCP-RR2. 66	1e-60	80
<i>CP-RR2. 14</i>	250	Yes	XP_023313168. 1	AglaCP-RR2. 51	3e-58	46
<i>CP-RR2. 15</i>	162	No	XP_018571773. 1	AglaCP-RR2. 60	4e-57	76
<i>CP-RR2. 16</i>	232	No	XP_023312999. 1	AglaCP-RR2. 35	5e-49	61
<i>CP-RR2. 17</i>	155	No	XP_018566243. 1	AglaCP-RR2. 39	2e-61	67
<i>CP-RR2. 18</i>	88	No	XP_018561038. 1	AglaCP-RR2. 17	9e-34	66
<i>CP-RR2. 19</i>	150	No	XP_018561033. 1	AglaCP-RR2. 16	4e-67	73
<i>CP-RR2. 20</i>	166	No	XP_023309914. 1	AglaCP-RR2. 10	4e-50	79
<i>CP-RR2. 21</i>	340	Yes	XP_018566263. 1	AglaCP-RR2. 42	4e-28	54
<i>CP-RR2. 22</i>	106	No	XP_018566845. 1	AglaCP-RR2. 12	2e-33	44
<i>CP-RR2. 23</i>	183	Yes	XP_023313033. 1	AglaCP-RR2. 28	2e-56	57
<i>CP-RR2. 24</i>	208	No	XP_023309915. 1	AglaCP-RR2. 24	3e-38	51
<i>CP-RR2. 25</i>	196	Yes	XP_023310031. 1	AglaCP-RR2. 6	9e-57	50
<i>CP-RR2. 26</i>	174	No	XP_018562897. 1	AglaCP-RR2. 53	7e-52	62
<i>CP-RR2. 27</i>	173	No	XP_018561020. 1	AglaCP-RR2. 27	3e-62	69
<i>CP-RR2. 28</i>	155	No	XP_023310028. 1	AglaCP-RR2. 5	7e-33	57
<i>CP-RR2. 29</i>	200	Yes	XP_018567125. 1	AglaCP-RR2. 52	5e-69	67
<i>CP-RR2. 30</i>	205	Yes	XP_018566219. 1	AglaCP-RR2. 41	2e-19	61
Cuticular Proteins Analogous to Peritrophins (<i>CPAP</i>)						
<i>CPAP1. 1</i>	598	No	XP_018578797. 1	AglaCPAP1. 1	0. 0	59
<i>CPAP1. 2</i>	944	No	XP_023311614. 1	AglaCPAP1. 3	2e-145	53
<i>CPAP1. 3</i>	564	No	XP_023311614. 1	AglaCPAP1. 3	0. 0	62
<i>CPAP1. 4</i>	172	Yes	XP_018570675. 1	AglaCPAP (LOC108910540)	3e-94	78
<i>CPAP1. 5</i>	106	No	XP_018567545. 1	AglaCPAP1. 2	7e-52	92
<i>CPAP1. 6</i>	688	No	XP_018571448. 1	AglaCPAP1. 6	0. 0	47
<i>CPAP1. 7</i>	129	Yes	XP_018570674. 1	AglaCPAP1. 7	5e-72	80
<i>CPAP1. 8</i>	406	No	XP_018564602. 1	AglaCPAP1. 4	7e-82	47
<i>CPAP3. 1</i>	227	No	XP_018569399. 1	AglaCPAP3. 5	2e-149	88
<i>CPAP3. 2</i>	238	Yes	XP_018569398. 1	AglaCPAP3. 4	1e-160	92
<i>CPAP3. 3</i>	150	No	XP_018571556. 1	AglaCPAP37	8e-97	95
<i>CPAP3. 4</i>	181	No	XP_018570214. 1	AglaCPAP3. 6	4e-97	77
<i>CPAP3. 5</i>	167	No	XP_018569407. 1	AglaCPAP3. 2	9e-107	88
<i>CPAP3. 6</i>	255	Yes	XP_018579209. 1	AglaCPAP3. 1	8e-157	86
<i>CPAP3. 7</i>	172	No	XP_018569404. 1	AglaCPAP3. 3	6e-105	85

续表 1 Continued table 1

基因 Gene	开放阅读框 ORF (AA)	全长 FL	与光肩星天牛 <i>CP</i> 比对结果 (登录号/基因) Blast hit to <i>Anoplophora glabripennis</i> (GenBank No. /Gene)		E 值 E value	一致性 (%) Identity
Cuticular Proteins with 2 or 3 C-α (5) -C repeats (<i>CPCFC</i>)						
<i>CPCFC1</i>	109	No	XP_018574004. 1	AglaCPCFC1	1e-47	82
<i>CPCFC2</i>	214	Yes	XP_023311323. 1	AglaCPCFC3	4e-69	72
<i>CPCFC3</i>	186	Yes	XP_018573996. 2	AglaCPCFC4	7e-70	72
Cuticular Protein Unclassified (<i>CPU</i>)						
<i>CPU1</i>	251	No	XP_018565075. 1	AglaCPU5	1e-56	64
<i>CPU2</i>	412	Yes	XP_018568600. 1	AglaCPU7	6e-124	77
<i>CPU3</i>	271	No	XP_018577635. 1	AglaCPU15	3e-96	62
<i>CPU4</i>	422	No	XP_018574644. 1	AglaCPU12	4e-155	60
<i>CPU5</i>	350	No	XP_018575098. 1	AglaCPU11	2e-112	47
<i>CPU6</i>	171	No	XP_018572158. 1	AglaCPU10	1e-77	73
<i>CPU7</i>	200	No	XP_018567240. 1	AglaCPU4	7e-48	65
<i>CPU8</i>	285	No	XP_018577023. 1	AglaCPU13	9e-69	77
<i>CPU9</i>	348	No	XP_018575098. 1	AglaCPU11	3e-31	38
<i>CPU10</i>	177	Yes	XP_018571732. 1	AglaCPU14	7e-58	85
<i>CPU11</i>	222	No	XP_018571433. 1	AglaCP-RR2. 65	4e-34	50
<i>CPU12</i>	208	No	XP_018565075. 1	AglaCPU5	7e-73	70
<i>CPU13</i>	221	Yes	XP_018571433. 1	AglaCP-RR2. 65	5e-14	32
<i>CPU14</i>	1093	Yes	XP_018564695. 1	AglaCPU2	0. 0	52
Tweedle (<i>TWDL</i>)						
<i>TWDL1</i>	465	No	XP_018570155. 1	AglaTWDL5	9e-116	51
<i>TWDL2</i>	268	No	XP_018564608. 1	AglaTWDL7	2e-26	61
<i>TWDL3</i>	153	No	XP_023312955. 1	AglaTWDL6	6e-61	91
<i>TWDL4</i>	310	No	XP_018564608. 1	AglaTWDL7	1e-54	95
<i>TWDL5</i>	255	No	XP_018564608. 1	AglaTWDL7	8e-45	81

注：ORF，开放阅读框；FL，全长。Note: ORF, open reading frame; FL, full-length.

2.2 不同昆虫间 CP 基因的数量比较

为了比较管纹艳虎天牛与其他昆虫 CP 基因的数量差异，从已发表文章中收集了鞘翅目、双翅目、膜翅目、鳞翅目、半翅目和直翅目等 12 种昆虫的 CP 基因。相比于其他昆虫，管纹艳虎天牛的 CP 基因数量多于直翅目的东亚飞蝗 *Locusta migratoria*、膜翅目的意大利蜜蜂和丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis* (表 2)。与同目其他昆虫相比，管纹艳虎天牛的 CP-RR1 家族的基因数量仅多

于赤拟谷盗；CP-RR2 家族的基因少于其他 3 个物种；CPU 家族的基因数量多于光肩星天牛，但是少于马铃薯甲虫和赤拟谷盗；在管纹艳虎天牛中未鉴定到 CPF 家族的基因；所有鞘翅目昆虫均不含 *CPLCW* 基因；其他 CP 家族在鞘翅目不同种间基因数量相近。与非鞘翅目昆虫相比，管纹艳虎天牛的 CP-RR2 和 CPAP1 均少于双翅目、鳞翅目和半翅目昆虫；CP-RR1 仅少于双翅目和鳞翅目昆虫 (表 2)。

表 2 不同目昆虫间 CP 基因的数量比较
Table 2 Comparison of cuticle protein gene numbers across insect orders

昆虫纲 Insecta	物种 Species	家族 Family											总数 Total number	参考文献 Reference
		RR1	RR2	CPAP1	CPAP3	CPCFC	CPF	CPLCA	CPLCG	CPLCW	TWDL	CPU		
鞘翅目 Coleoptera	管纹艳虎天牛 <i>Rhaphuma horsfieldi</i>	41	30	8	7	3	0	0	0	0	5	14	108	本研究
	光肩星天牛 <i>Anoplophora glabripennis</i>	59	66	7	7	4	3	0	0	0	7	13	166	McKenna <i>et al.</i> , 2016
	马铃薯甲虫 <i>Leptinotarsa decemlineata</i>	44	63	8	7	2	5	0	1	0	8	25	163	Schoville <i>et al.</i> , 2018
	赤拟谷盗 <i>Tribolium castaneum</i>	34	55	13	7	2	5	1	1	0	3	21	142	Ioannidou <i>et al.</i> , 2014
双翅目 Diptera	埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>	66	150	14	9	1	3	3	18	7	6	28	305	Corrman and Willis, 2008
	冈比亚按蚊 <i>Anopheles gambiae</i>	43	103	13	10	1	4	3	25	10	12	21	245	Corrman <i>et al.</i> , 2008
	黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	61	42	29	10	1	5	13	4	0	29	34	228	Karouzou <i>et al.</i> , 2007
	意大利蜜蜂 <i>Apis mellifera</i>	13	15	15	7	0	4	0	0	0	2	10	66	Ioannidou <i>et al.</i> , 2014
膜翅目 Hymenoptera	丽蝇蛹集金小蜂 <i>Nasonia vitripennis</i>	19	32	16	6	0	5	0	0	0	2	18	98	Ioannidou <i>et al.</i> , 2014
	家蚕 <i>Bombyx mori</i>	47	78	13	6	1	1	2	0	0	4	19	171	Futahashi <i>et al.</i> , 2008
鳞翅目 Lepidoptera	君主斑蝶 <i>Danaus plexippus</i>	47	57	16	10	1	1	1	1	0	5	18	157	Ioannidou <i>et al.</i> , 2014
半翅目 Hemiptera	褐飞虱 <i>Nilaparvata lugens</i>	36	57	17	8	0	3	0	0	0	3	0	124	Pan <i>et al.</i> , 2018
	东亚飞蝗 <i>Locusta migratoria</i>	25	18	2	7	0	9	0	0	0	2	0	63	Zhao <i>et al.</i> , 2017

2.3 管纹艳虎天牛 CP 基因家族的结构域分析

结构域分析结果表明, 所有检测的 RhorCPs 均具有信号肽序列; 在 CP-RR1 和 CP-RR2 中, 所有 CP-RRs 均具有保守的 Chitin_bind_4 结构域, 仅 CP-RR2. 21 含有盘管区; 此外, RhorCPs 在低复杂区的有无、数量及位置上也存在差异 (图 1)。与其他昆虫 CPAP1 类似, CPAP1. 4 和 CPAP1. 7 包含 1 个信号肽和 1 个 ChtBD2 结构域; CPAP3. 2 和 CPAP3. 6 则包含 1 个信号肽和 3 个 ChtBD2 结构域; 两个 RhorCPCFCs 间差异较大, 共有结构域为信号肽和 CPCFC 结构域, 此外 CPCFC2 还包含

1 个 SCOP 结构域, 而 CPCFC3 包含两个低复杂区; 在 4 个 RhorCPUs 家族成员中, 仅 CPU13 具有 Chitin_bind_4 结构域, 其余成员均不含保守的结构域 (图 1)。

2.4 管纹艳虎天牛 CP 家族的保守基序分析

利用 WebLogo 在线工具对 CP 家族结构域的氨基酸保守基序进行了分析。结果表明, CP-RR1 和 CP-RR2 家族的保守基序分别为 G-X(8)-G-X(6)-Y-X-A-X-E-X-G-F(图 2-A) 和 G-X-Y-X(5)-D-G-X(6)-Y-X-A-X(4)-G-F(X 表示保守的氨基酸; 数字表示氨基酸数量) (图 2-B)。

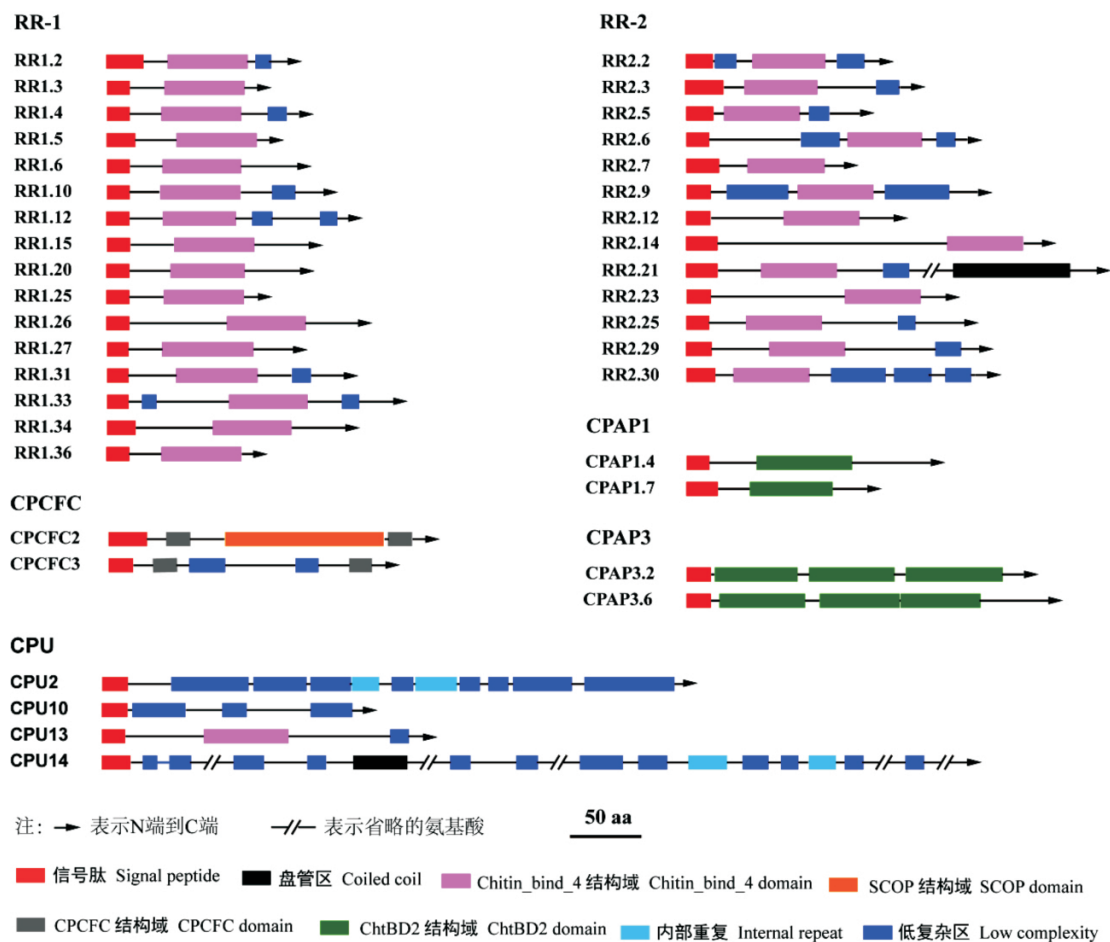


图 1 管纹艳虎天牛 CP 序列结构域特征

Fig. 1 Characteristics of cuticular protein domains of *Rhaphuma horsfieldi*

2.5 管纹艳虎天牛 CP 基因的进化分析

利用 FastTree 软件, 构建了管纹艳虎天牛与光肩星天牛共 293 个 CP 基因的系统进化树。结果表明, 两种天牛的 CP 可划分为 8 个家族 (图 3): CPR-RR1、CPR-RR2、CPAP1、CPAP3、CPCFC、CPF、TWDL 和 CPU。除 CPF 家族外, RhorCPs 在

其余 7 个家族中均有分布, 两种天牛大部分的 CP 均为同源基因, 且与光肩星天牛的 *AglaCPs* 具有较高的氨基酸一致性。此外, CPAP1 和 CPU 家族聚类到好几个分支; CPAP3 家族分散到两个分支; CP-RR1 和 CP-RR2 家族聚类相对集中; CPCFC、CPF 和 TWDL 家族仅聚类到一个大的分支 (图 3)。

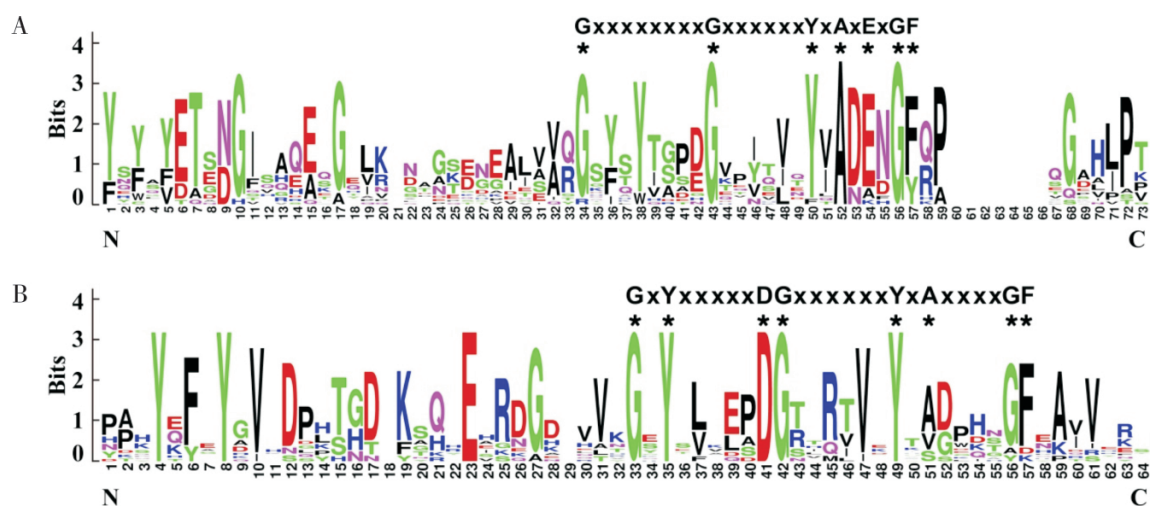


图2 管纹艳虎天牛 CP-RR1 (A) 和 CP-RR2 (B) 保守基序的 WebLogo 分析

Fig. 2 WebLogo analysis of conserved motifs of CP-RR1 (A) and CP-RR2 (B) families from *Rhaphuma horsfieldi*

注: * 表示保守的氨基酸残基; CP-RR1 和 CP-RR2 保守基序模式在序列上方出示。Note: * represented conserved amino acid residues. Conserved motifs of CP-RR1 and CP-RR2 were presented on the top of sequences, respectively.

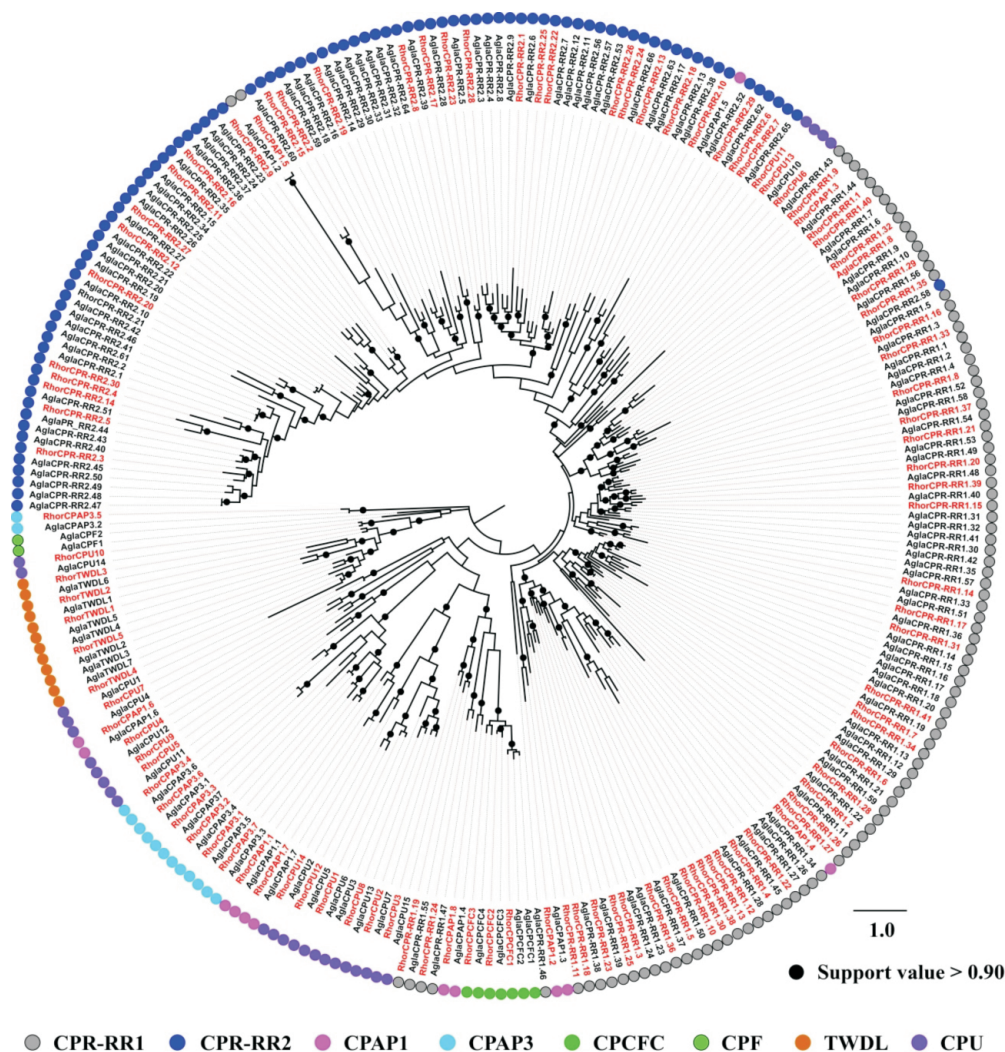


图3 管纹艳虎天牛和光肩星天牛 CP 的进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of cuticle proteins from *Rhaphuma horsfieldi* (Rhor) and *Anoplophora glabripennis* (Agl)

2.6 管纹艳虎天牛 *CP* 基因的表达谱分析

基于转录组测序获得的 FPKM 值, 研究了 *RhorCPs* 基因在不同组织的表达谱。结果表明, 大部分 *CP-RR1* 基因在检测的组织中表达量均较低 (图 4-A)。然而, *CP-RR1.14* 和 *CP-RR1.20* 在所有组织中均有较高表达; 部分基因呈现组织特异或高表达的特点, 如 *CP-RR1.1* 和 *CP-RR1.7* 在雄

虫身体 (不含触角和附节) 中特异表达, *CP-RR1.11* 在雌虫身体 (不含触角和附节) 中特异表达, *CP-RR1.29* 和 *CP-RR1.35* 在雌虫触角特异表达, *CP-RR1.16* 和 *CP-RR1.40* 在雌虫触角高表达, *CP-RR1.12* 在雌虫附节高表达, *CP-RR1.19* 在雌雄虫附节高表达, *CP-RR1.24* 在雌雄虫触角和附节均有较高表达 (图 4-A)。

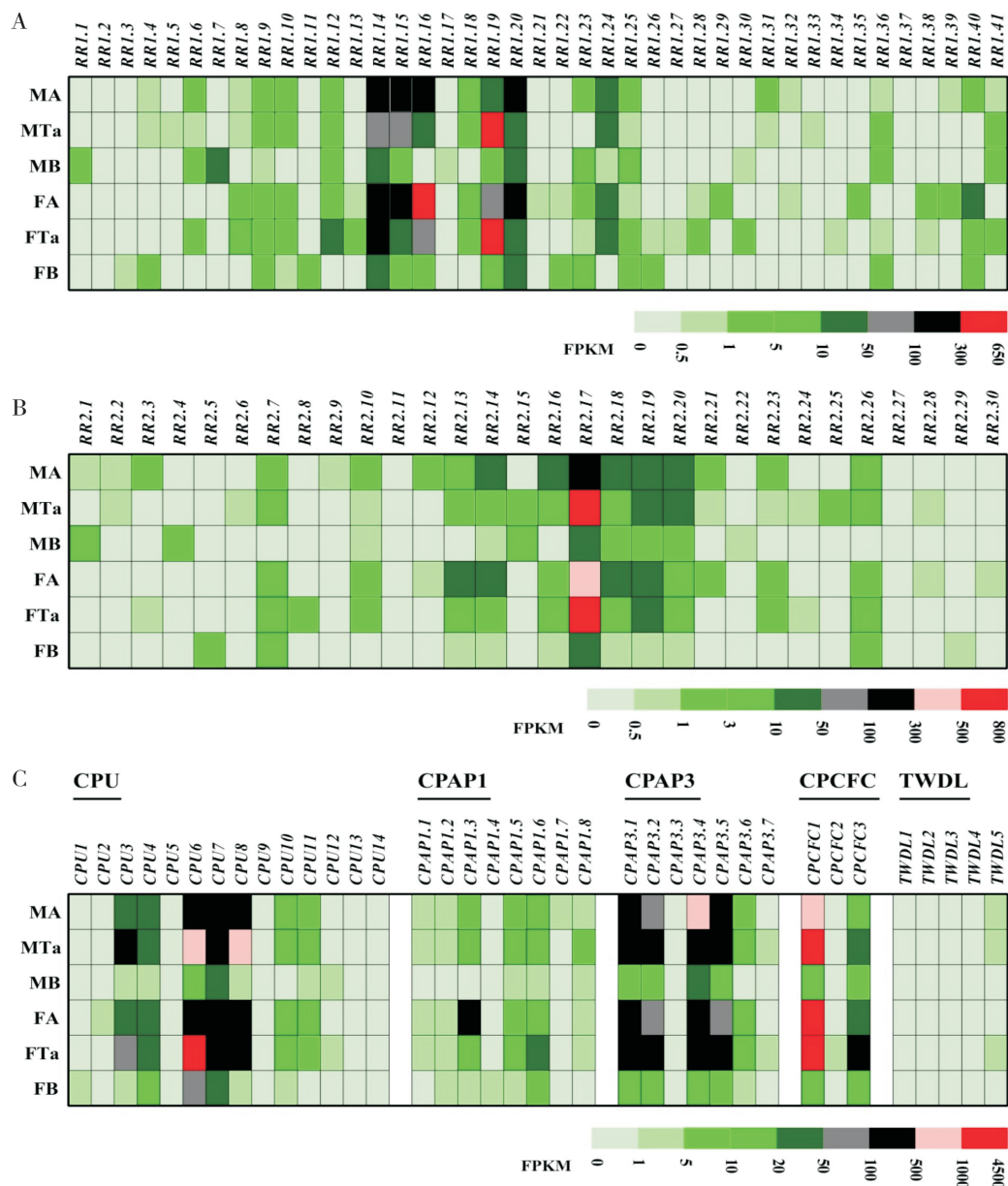


图 4 管纹艳虎天牛 *CP* 基因在雌雄成虫不同组织的表达谱

Fig. 4 Expression profile of cuticle protein genes in different tissues of *Rhaphuma horsfieldi*

注: A, *RhorCP-RR1* 基因的组织表达谱; B, *RhorCP-RR2* 基因的组织表达谱; C, 其他家族 *RhorCPs* 基因的表达谱。基因的表达水平用两次重复的 FPKM 平均值表示。MA, 雄虫触角; MTa, 雄虫附节; MB, 不含触角和附节的雄虫身体; FA, 雌虫触角; FTa, 雌虫附节; FB, 不含触角和附节的雌虫身体。Note: A, Expression profiles of *RhorCP-RR1* genes; B, Expression profiles of *RhorCP-RR2* genes; C, Expression profiles of other *RhorCP* genes. Gene expression levels were shown by mean FPKM values with two replicates. MA, male antennae; MTa, male tarsi; MB, male bodies without antennae and tarsi; FA, female antennae; FTa, female tarsi; FB, female bodies without antennae and tarsi.

与 *CP-RR1* 类似, 大部分 *CP-RR2* 基因在检测的所有组织中也仅有微弱表达 (图 4-B)。然而, *CP-RR2.17* 在所有检测的组织中均有较高表达, 且呈现雌雄虫跗节高表达的特点; *CP-RR2.14* 和 *CP-RR2.18* 在雌雄虫触角中高表达; *CP-RR2.13*、*CP-RR2.16*、*CP-RR2.18*、*CP-RR2.19* 和 *CP-RR2.20* 在雌雄虫触角和跗节中高表达, 且 *CP-RR2.13* 呈现雌虫触角偏好表达的特点, *CP-RR2.16* 呈现雄虫触角偏好表达的特点, *CP-RR2.20* 呈现雄虫触角和跗节偏好表达的特点 (图 4-B)。

在 *CPU* 基因家族中, *CPU6* 和 *CPU7* 在所有组织中具有较高表达, 且 *CPU6* 呈现雌虫跗节高表达的特点; *CPU5*、*CPU9*、*CPU13* 和 *CPU14* 在所有组织中表达量均较低; *CPU3* 和 *CPU8* 在雌雄虫触角和跗节高表达, 且呈现雄虫跗节高表达的特点。在两个 *CPAP* 家族中, 所有 *CPAP1* 基因在测序的大部分组织中表达量均较低, 其中 *CPAP1.3* 在雌虫触角高表达; *CPAP3.1*、*CPAP3.2* 和 *CPAP3.5* 在雌雄虫触角和跗节中高表达, *CPAP3.4* 在所有组织中均有较高表达, *CPAP3.3* 在所有组织中仅有微弱表达。在剩余的两个家族中, *CPCFC1* 在雌雄虫触角和跗节中高表达; *CPCFC2* 在所有检测的组织中表达量较低; *CPCFC3* 在雌虫跗节中高表达。5 个 *TWDL* 基因在所有组织中仅有微弱表达 (图 4-C)。

3 结论与讨论

昆虫的表皮是昆虫体壁皮细胞分泌物形成的一种高度有序的层状结构, 是昆虫抵御外界不良环境的第一道防线 (Andersen *et al.*, 1995; Vincent and Wegst, 2004)。昆虫表皮的主要成分是几丁质和蛋白质, 因此表皮蛋白是昆虫极为重要的结构蛋白, 在昆虫生存和繁衍中必不可少 (梁九波, 2012)。本研究基于测序的转录组数据, 从管纹艳虎天牛中共鉴定到 108 个 *CP* 基因, 其中 *CP-RR1* 占有所有基因的 37.96%、*CP-RR2* 占 27.78%、*CPAP1* 占 7.41%、*CPAP3* 占 6.48%、*CPCFC* 占 2.78%、*CUP* 占 12.96% 和 *TWDL* 占 4.63%, 该比例与黑腹果蝇 *CP* 基因在不同家族中的比例类似, 但是不同于其他物种的 *CP* 基因家族, 在其他物种中多为 *CP-RR2* 所占比例最高, 其次为 *CP-RR1* (Ioannidou *et al.*, 2014)。

光肩星天牛是天牛科昆虫中具有基因组、且

已完成 *CP* 基因家族注释的物种 (McKenna *et al.*, 2016), 在基因鉴定、序列比对和进化分析中, 选取光肩星天牛 *CP* 基因家族作为参考序列更有利于分析管纹艳虎天牛的 *CP* 基因家族。其中, 在管纹艳虎天牛中仅有 39 个 *CP* 基因 (39/108, 36.11%) 具有全长序列, 可能与测序组织及 *CP* 基因的发育表达特征有关, 因为昆虫的 *CP* 基因主要在幼虫蜕皮、化蛹阶段、羽化阶段、成虫表皮等组织和发育阶段有较高表达 (Liang *et al.*, 2010; Chu *et al.*, 2013; Dittmer *et al.*, 2015; 付丹影等, 2016), 而本研究并未对幼虫、蛹及表皮等组织进行测序; 同时, 这也可能是管纹艳虎天牛转录组中获得较少 *CP* 基因的原因之一。在基因数量的比较中, 除膜翅目与直翅目外, 管纹艳虎天牛 *CP* 基因的数量均少于鞘翅目等其他昆虫 (Ioannidou *et al.*, 2014), 而其他物种的 *CP* 基因均来源于基因组, 表明管纹艳虎天牛可能仍有部分 *CP* 基因未得到鉴定。从 *CP* 基因不同家族的分析结果来看, 除双翅目昆虫 (Ioannidou *et al.*, 2014) 外, 其他昆虫均不含有 *CPLCW* 基因; 此外, 天牛科、膜翅目、半翅目和直翅目等昆虫还缺失 *CPLCA* 和 *CPLCG* 基因, 暗示昆虫在进化过程中很可能因外界环境 (如生境) 的影响而导致 *CP* 基因家族的收缩或扩张 (付丹影等, 2016)。

昆虫 *CP-RR* 家族保守基序的起始通常为 G-X (8)-G-X (6)-Y, 通常不会因物种及 *CP-RR* 数量的增加而发生改变 (Willis *et al.*, 2010; 付丹影等, 2016)。在管纹艳虎天牛中, *RR1* 和 *RR2* 家族均具有 1 个保守的 Chitin_bind_4 结构域, 其中 *RR1* 家族完全符合经典的 R&R 基序 G-X (8)-G-X (6)-Y, 而 *RR2* 家族保守基序为 G-X-Y-X (5)-D-G-X (6)-Y, 与 R&R 保守基序相比出现了保守的酪氨酸 (tyrosine, Y) 与天冬氨酸 (aspartic acid, D)。Hamodrakas 等 (2002) 研究发现, 芳香族氨基酸残基 (主要为酪氨酸 Y 与苯丙氨酸 P) 会形成一个疏水平面, 以阻止几丁质的堆叠 (Hamodrakas *et al.*, 2002)。因此, 管纹艳虎天牛 *CP-RR2* 家族结构域中的保守氨基酸残基 Y 很可能有利于加强蛋白质与几丁质的结合。类似的结果在葱蝇 *Delia antiqua* 的 *CP-RR2* 家族中也有发现 (付丹影等, 2016)。基于光肩星天牛和管纹艳虎天牛的进化树, 发现两个物种间 *CP* 具有较高的氨基酸一致性, 说明天牛科昆虫 *CP* 间具有相对高的保守性, 在功能上主要参与表皮的形成和发育。此外, 在

CP-RR1 和 CP-RR2 家族中, 光肩星天牛部分 CP 基因呈物种聚类分布模式 (McKenna *et al.*, 2016), 但在管纹艳虎天牛中仅 RR1 中具有一个聚类分支 (RhorCP-RR1. 10/12/13/30/38), 鉴于 *AglacPs* 基因是从基因组中鉴定, 而 *RhorCPs* 基则是从转录组中获得, 表明管纹艳虎天牛的这一 CP 聚类分支可能是物种特异的分支。

昆虫 CP 基因主要在幼虫、蛹和成虫的表皮组织中表达, 但在其他组织中也有发现。中华蜜蜂 *Apis cerana* 的 *AcerCP24* 基因在蛹后期的表皮、肌肉、脑和中肠中均有表达, 且呈现中肠高表达的特点 (Chu *et al.*, 2013)。在黑腹果蝇中, *DmelTWDLs* 基因在表皮、前肠、气管和胚胎等组织中高表达 (Guan *et al.*, 2006)。家蚕的 *BmorCP4* 基因在腹部表皮组织中表达, *BmorCP9* 基因在胸部表皮中表达 (Ali *et al.*, 2012); 而 *BmorTWDLs* 基因则主要在表皮和翅原基表达 (Futahashi *et al.*, 2008)。此外, 赤拟谷盗的 *TcasCPAP1* 和 *TcasCPAP3* 基因参与到发育、蜕皮、表皮形成、产卵等生理过程 (Jasrapuria *et al.*, 2012)。与其他昆虫 CP 基因的表达特征类似, 管纹艳虎天牛 *RhorCPs* 基因的表达谱也具有多样性, 即 *RhorCPs* 基因在雌雄虫触角、跗节、身体等一至多个组织有表达, 暗示它们很可能具有多种功能。值得注意的是, 部分 *RhorCPs* 基因 (*RhorCP-RR1. 16*、*CP-RR1. 19*、*CP-RR2. 17*、*CPAP3. 4*、*CPU6*、*CPCFC1* 等) 在触角或跗节中特异或高表达, 推测这些基因可能具有嗅觉或味觉方面的功能。

参考文献 (References)

- Ali MS, Iwanaga M, Kawasaki H. Ecdysone - responsive transcription factors determine the expression region of target cuticular protein genes in the epidermis of *Bombyx mori* [J]. *Development Genes & Evolution*, 2012, 222 (2): 89 - 97.
- Andersen SO, Hojrup P, Roepstorff P. Insect cuticular proteins [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1995, 25 (2): 153 - 176.
- Arakane Y, Lomakin J, Gehrke SH, *et al.* Formation of rigid, non-flight forewings (elytra) of a beetle requires two major cuticular proteins [J]. *PLoS Genetics*, 2012, 8 (4): e1002682.
- Chu XQ, Lu WJ, Zhang YY, *et al.* Cloning, expression patterns, and preliminary characterization of AccCPR24, a novel RR1 type cuticle protein gene from *Apis cerana cerana* [J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2013, 84 (3): 130 - 144.
- Cornman RS, Togawa T, Dunn WA, *et al.* Annotation and analysis of a large cuticular protein family with the R&R Consensus in *Anopheles gambiae* [J]. *BMC Genomics*, 2008, 9 (1): 22.
- Cornman RS, Willis JH. Extensive gene amplification and concerted evolution within the CPR family of cuticular proteins in mosquitoes [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, 38 (6): 661 - 676.
- Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, *et al.* WebLogo: A sequence logo generator [J]. *Genome Research*, 2004, 14 (6): 1188 - 1190.
- Delon I, Payre F. Evolution of larval morphology in flies: Get in shape with shavenbaby [J]. *Trends in Genetics*, 2004, 20 (7): 305 - 313.
- Dittmer NT, Hiromasa Y, Tomich JM, *et al.* Proteomic and transcriptomic analyses of rigid and membranous cuticles and epidermis from the elytra and hindwings of the red flour beetle, *Tribolium castaneum* [J]. *Journal of Proteome Research*, 2012, 11 (1): 269 - 278.
- Dittmer NT, Tetreau G, Cao X, *et al.* Annotation and expression analysis of cuticular proteins from the tobacco hornworm, *Manduca sexta* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2015, 62: 100 - 113.
- FireA, Xu SQ, Montgomery MK, *et al.* Potent and specific genetic interference by double - stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391 (2): 806 - 811.
- Forestry Department of Yunnan Province, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences. Yunnan Forest Insects [M]. Kunming: Yunnan Science and Technology Press, 1987. [云南省林业厅, 中国科学院动物研究所. 云南森林昆虫 [M]. 昆明: 云南科技出版社, 1987]
- Fu DY, Si FL, Chen B, *et al.* Transcriptome-guided identification of the cuticular protein gene family of *Delia antiqua* (Diptera: Anthomyiidae) and expression analysis under non-and winter-diapause conditions [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2016, 59 (2): 172 - 184. [付丹影, 司凤玲, 陈斌, 等. 基于转录组的葱蝇表皮蛋白基因家族的鉴定及在非滞育和冬滞育条件下的表达分析 [J]. 昆虫学报, 2016, 59 (2): 172 - 184]
- Futahashi R, Okamoto S, Kawasaki H, *et al.* Genome-wide identification of cuticular protein genes in the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, 38 (12): 1138 - 1146.
- Guan X, Middlebrooks BW, Alexander S, *et al.* Mutation of tweedled, a member of an unconventional cuticle protein family, alters body shape in *Drosophila* [J]. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103 (45): 16794 - 16799.
- Hamodrakas SJ, Willis JH, Ikonomidou VA. A structural model of the chitin - binding domain of cuticle proteins [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 32 (11): 1577 - 1583.
- He N, Botelho JM, McNall RJ, *et al.* Proteomic analysis of cast cuticles from *Anopheles gambiae* by tandem mass spectrometry [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 37 (2): 135 - 146.
- Ioannidis ZS, Theodoropoulou MC, Papandreou NC, *et al.* CutProtFam - Pred: Detection and classification of putative structural cuticular

- proteins from sequence alone, based on profile Hidden Markov Models [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, 52: 51–59.
- Jasrapuria S, Specht CA, Kramer KJ, et al. Gene families of cuticular proteins analogous to peritrophins (CPAPs) in *Tribolium castaneum* have diverse functions [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7 (11): e49844.
- Karouzou MV, Spyropoulos Y, Iconomidou VA, et al. *Drosophila* cuticular proteins with the R&R Consensus: Annotation and classification with a new tool for discriminating RR-1 and RR-2 sequences [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 37 (8): 754–760.
- Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30 (4): 772–780.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0 [J]. *Bioinformatics*, 2007, 23 (21): 2947–2948.
- Letunic I, Bork P. 20 years of the SMART protein domain annotation resource [J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46 (D1): D493–496.
- Liang JB, Zhang L, Xiang ZH, et al. Expression profile of cuticular genes of silkworm, *Bombyx mori* [J]. *BMC Genomics*, 2010, 11 (1): 173.
- Liang JB. Expression Profile of Cuticular Protein Genes and Function Study of Cuticular Protein BmorCPT1 in Silkworm, *Bombyx mori* [D]. Chongqing: Southwest University, 2012. [梁九波. 家蚕表皮蛋白基因的表达谱分析及表皮蛋白 BmorCPT1 的功能研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2012]
- McKenna DD, Scully ED, Pauchet Y, et al. Genome of the Asian longhorned beetle (*Anoplophora glabripennis*), a globally significant invasive species, reveals key functional and evolutionary innovations at the beetle–plant interface [J]. *Genome Biology*, 2016, 17 (1): 227.
- Moussian B, Schwarz H, Bartoszewski S, et al. Involvement of chitin in exoskeleton morphogenesis in *Drosophila melanogaster* [J]. *Journal of Morphology*, 2005, 264 (1): 117–130.
- Noh MY, Muthukrishnan S, Kramer KJ, et al. *Tribolium castaneum* RR-1 cuticular protein TcCPR4 is required for formation of pore canals in rigid cuticle [J]. *PLoS Genetics*, 2015, 11 (2): e1004963.
- Pan PL, Ye YX, Lou YH, et al. A comparative omics analysis and functional survey of cuticular proteins in the brown planthopper [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115 (20): 5175–5180.
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, et al. SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions [J]. *Nature Methods*, 2011, 8 (10): 785–786.
- Price MN, Dehal PS, Arkin AP. FastTree 2-approximately maximum-likelihood trees for large alignments [J]. *PLoS ONE*, 2010, 5 (5): e9490.
- Rebers JE, Riddiford LM. Structure and expression of a *Manduca sexta* larval cuticle gene homologous to *Drosophila* cuticle genes [J]. *Molecular Biology*, 1988, 203 (2): 411–423.
- Schoville SD, Chen YH, Andersson MN, et al. A model species for agricultural pest genomics: The genome of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8 (1): 1931.
- Snyder MP, Kimbrell D, Hunkapiller M, et al. A transposable element that splits the promoter region inactivates a *Drosophila* cuticle protein gene [J]. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1982, 79 (23): 7430–7434.
- Sudhir K, Glen S, Koichiro T. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33 (7): 1870–1874.
- Togawa T, Augustine Dunn W, Emmons AC, et al. CPF and CPFL, two related gene families encoding cuticular proteins of *Anopheles gambiae* and other insects [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 37 (7): 675–688.
- Trapnell C, Williams BA, Pertea G, et al. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation [J]. *Nature Biotechnology*, 2010, 28 (5): 511–515.
- Vincent JF, Wegst UG. Design and mechanical properties of insect cuticle [J]. *Arthropod Structure & Development*, 2004, 33 (8): 187–199.
- Willis JH. Structural cuticular proteins from arthropods: Annotation, nomenclature, and sequence characteristics in the genomics era [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 40 (3): 189–204.
- Xu W, Luo LL, Wu HJ, et al. Cloning and expression profiling of a cuticular protein gene in *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2014, 57 (5): 515–521. [许雯, 罗淋淋, 吴华俊, 等. 松墨天牛表皮蛋白基因的克隆及表达分析 [J]. 昆虫学报, 2014, 57 (5): 515–521]
- Yin NN, Zhao N, Liu NY. Morphological characteristics of *Rhaphuma horsfieldi* and ultrastructure of its antennae and tarsi [J]. *Journal of Southwest Forestry University (Natural Science)*, 2019, 39 (3): 132–140. [尹宁娜, 赵宁, 刘乃勇. 管纹艳虎天牛形态特征与触角及附节的超微结构 [J]. 西南林业大学学报 (自然科学), 2019, 39 (3): 132–140]
- Zhang J, Goyer C, Pelletier Y. Environmental stresses induce the expression of putative glycine-rich insect cuticular protein genes in adult *Leptinotarsa decemlineata* (Say) [J]. *Insect Molecular Biology*, 2008, 17 (3): 209–216.
- Zhang JX. Faunal Analysis and Phylogenetic Study of Clytini in China [D]. Chongqing: Southwest Agricultural University, 2005. [张俊香. 中国虎天牛族区系分析与系统发育研究 [D]. 重庆: 西南农业大学, 2005]
- Zhao XM, Gou X, Qin ZY, et al. Identification and expression of cuticular protein genes based on *Locusta migratoria* transcriptome [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 45462.