



糯淑梅, 王政全, 吴春, 杨安锦, 刘乃勇. 管纹艳虎天牛糖苷水解酶基因家族的鉴定和表达谱分析 [J]. 环境昆虫学报, 2022, 44 (4): 921–934.

管纹艳虎天牛糖苷水解酶基因家族的 鉴定和表达谱分析

糯淑梅, 王政全, 吴春, 杨安锦, 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: 昆虫糖苷水解酶 (Glycoside hydrolase, GH) 在寄主植物糖类化合物的水解过程中扮演着重要作用, 但是在管纹艳虎天牛 *Rhaphuma horsfieldi* 中尚未有 GH 基因的报道。基于测序的转录组数据, 本研究从管纹艳虎天牛中鉴定到 7 个 RhorGHs 家族: GH1、GH9、GH13、GH16、GH28、GH31 和 GH45, 分别具有 23、1、4、2、10、12 和 4 个基因, 其中 23 个基因具有全长序列。在进化分析中, 管纹艳虎天牛不同 GH 家族的成员主要以物种特异的形式聚类, 尤其是 GH1 和 GH28 家族。三级结构分析显示, RhorGH28 家族的蛋白主要由 β 折叠组成, 不同蛋白间具有高度保守的结构和与糖类化合物互作的关键氨基酸位点, 包括质子供体、催化亲核残基和底物结合位点。在表达谱分析中, 大部分 RhorGHs 基因主要在雌雄虫腹部特异或高表达, 暗示其可能在与消化有关的肠道中表达。研究结果明确了管纹艳虎天牛 GH 家族及其数量, 以及各家族的序列特征和进化关系, 可为该天牛的寄主植物适应性机制研究提供借鉴。

关键词: 管纹艳虎天牛; 糖苷水解酶; 进化分析; 同源建模; 表达谱

中图分类号: Q963; S433

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2022) 04-0921-14

Identification and expression profile analysis of glycoside hydrolase gene families in *Rhaphuma horsfieldi*

NUO Shu-Mei, WANG Zheng-Quan, WU Chun, YANG An-Jin, LIU Nai-Yong* (Key Laboratory of Forest Disaster Warning and Control of Yunnan Province, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China)

Abstract: Glycoside hydrolase (GH) in insects is of particular importance for the hydrolysis of carbohydrate polymers, but little is known about this gene family in *Rhaphuma horsfieldi*. Based on the transcriptome of *R. horsfieldi*, totally seven gene families of RhorGHs were identified, representing GH1, GH9, GH13, GH16, GH28, GH31 and GH45 with 23, 1, 4, 2, 10, 12 and 4 relatives, respectively. Among them, 23 genes were predicted to have complete open reading frames. Phylogenetic analysis indicated that RhorGHs of each gene family clustered together in species-specific expansions, especially for GH1 and GH28 families. Tertiary structural analysis revealed that RhorGH28 proteins were mainly composed of β -sheets, and had highly conserved structure and key amino acids interacting with carbohydrates, such as the proton donors, catalytic nucleophiles and substrate binding residues. In the

基金项目: 云南省教育厅科学研究基金项目 (2019Y0141, 2020Y398); 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: 糯淑梅, 女, 1996 年生, 云南省怒江人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫化学生态, E-mail: 2952529483@qq.com

* 通讯作者 Author for correspondence: 刘乃勇, 男, 博士, 副教授, 研究方向为昆虫化学生态及其分子生物学, E-mail: Naiyong_2013@163.com

收稿日期 Received: 2021-05-16; 接受日期 Accepted: 2021-12-16

expression profiling analyses , most of *RhorGHs* were specifically or highly expressed in female or male abdomens , suggesting their presence in guts involving digestive functions. Taken together , this study has identified *RhorGH* gene families , as well as their numbers , sequence characteristics and phylogenetic relationships in *R. horsfieldi* , and facilitates further studies on adaptive mechanisms of this beetle to host plants.

Key words: *Rhaphuma horsfieldi*; glycoside hydrolase; phylogenetic analysis; homology modeling; expression profile

管纹艳虎天牛 *Rhaphuma horsfieldi* 是一种杂食性的蛀干害虫, 其寄主包括豆科、樟科和胡桃科植物, 不同寄主植物可能促使其体内植物细胞壁降解相关的酶在数量、表达水平、基因结构等方面呈现多样化, 如糖苷水解酶 (Glycoside hydrolase, GH; EC 3.2.1) 基因家族 (云南省林业厅等, 1987; 尹宁娜等, 2019)。GH 是一大类广泛存在于动物、植物、细菌、真菌、线虫等生物体内催化糖苷键水解的酶, 负责裂解糖分子与生物分子之间的糖苷键, 其催化水解过程不需要任何辅酶或辅因子的参与。在植食性天牛昆虫体内, GH 主要将纤维素、纤维二糖等多糖水解为可供昆虫消化吸收的低聚糖或单糖 (Watanabe and Tokuda, 2010; Pauchet *et al.*, 2010; Fischer *et al.*, 2013)。因此, GH 基因对于取食木本植物的天牛科昆虫的生长发育尤为重要。

根据序列相似性和基因功能, 昆虫 GH 基因超家族可划分为多个家族 (如 GH1、GH9、GH28、GH45 等), 同一物种不同 GH 家族基因间相似性较低, 而不同物种同一 GH 家族的同源基因间相似性较高 (Bourne and Henrissat, 2001; Palomares-Rius *et al.*, 2014)。在桑天牛 *Apriona germari* 和桑树黄星天牛 *Psacotha hilaris* 中, 同源的 GH5 基因具有 89% 的氨基酸一致性 (Wei *et al.*, 2006)。在鞘翅目昆虫中, 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* (Willis *et al.*, 2011)、光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis* (Mckenna *et al.*, 2016)、叶甲 *Gastrophysa viridula* (Busch *et al.*, 2018)、白蜡窄吉丁 *Agrilus planipennis* (登录号: XP_025831030.1)、萤火虫 *Photinus pyralis* (Fallon *et al.*, 2018) 和椰子犀角金龟 *Oryctes rhinoceros* (Matan *et al.*, 2019) 的 GH9 基因具有 60% 的氨基酸一致性。然而, 光肩星天牛的 *AglaGH9* 基因与所有 *AglaGH1s* 基因均具有较低的氨基酸一致性 (<15%) (Mckenna *et al.*, 2016)。由于鞘翅目不

同昆虫间 GH 家族数量存在差异, 因此导致了它们的基因数量变化较大。从玉米根萤叶甲 *Diabrotica virgifera virgifera* 卵、初孵幼虫和 3 龄幼虫中肠的转录组中鉴定到 8 个 GH 家族的 78 个基因 (Eyun *et al.*, 2014); 在大足象 *Cyrtotrachelus buqueti* 中, 从不同发育阶段的转录组中鉴定到 55 个 GH 家族的 309 个基因 (Luo *et al.*, 2018); 基于基因组数据, 从赤拟谷盗 (*Tribolium* Genome Sequencing Consortium, 2008)、中欧山松大小蠹 *Dendroctonus ponderosae* (Keeling *et al.*, 2013)、光肩星天牛 (Mckenna *et al.*, 2016) 和红棕象甲 *Rhynchophorus ferrugineus* (Hazzouri *et al.*, 2020) 中分别鉴定到 27 个 (5 个 GH 家族)、70 个 (7 个 GH 家族)、86 个 (6 个 GH 家族) 和 224 个 (19 个 GH 家族) GH 基因。因此, 鞘翅目不同昆虫间 GH 基因在家族大小和数量上均存在不同程度的差异, 推测其可能与不同昆虫的寄主范围有关。

昆虫 GH 基因主要在与糖类物质消化吸收有关的肠道中表达, 此外在不同发育阶段的组织中也有表达。桑天牛的 *AgerGH5*、*GH45-1* 和 *GH45-2* 基因均在中肠中特异表达 (Lee *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2006); 类似地, 光肩星天牛中肠中也存在大量的 GH 基因 (Scully *et al.*, 2013); 长须罗蛉 *Lutzomyia longipalpis* 的 GH 基因在幼虫、蛹、成虫或成虫头部等组织中均有不同程度的表达 (Moraes *et al.*, 2014)。昆虫 GH 基因超家族下的家族成员数量众多, 不同家族的基因功能也有所不同。在光肩星天牛中, GH1 和 GH5 家族的酶主要具有纤维素酶活性; 而 GH28、GH45 和 GH48 家族的酶则主要具有多聚半乳糖醛酸酶活性 (Mckenna *et al.*, 2016)。类似的关于 GH 降解糖类物质的研究在日本桑天牛 *Apriona japonica* (Pauchet *et al.*, 2014)、云斑天牛 *Batocera horsfieldi* (Xia *et al.*, 2013; Mei *et al.*, 2015)、叶甲 *G. viridula* (Busch *et al.*, 2018)、赤拟谷盗

(Willis *et al.*, 2011) 等鞘翅目昆虫中也有报道。

管纹艳虎天牛是一种取食木本植物的蛀干害虫, 其体内存在大量 GH 家族基因, 但是至今尚未有该家族基因的相关报道。因此, 本研究基于测序的转录组数据, 采用转录组学、生物信息学、蛋白同源建模等方法研究管纹艳虎天牛的 GH 基因。研究结果可为后续管纹艳虎天牛 GH 基因的功能研究奠定基础, 同时为该天牛寄主取食及适应机制的研究提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

管纹艳虎天牛收集自寄主植物三台核桃 *Juglans sigillata* 受害木段。首先, 野外采集受害核桃木段 (云南省楚雄州大姚县三台乡: N26°00′01.6″, E101°04′04.7″) 至室内进行饲养, 树干两端用凡士林和封口膜进行保湿, 饲养条件: 25 ± 3℃, 相对湿度 50% ± 10%, 光周期 12 L: 12 D; 其次, 待天牛成虫羽化后根据腹部形态特征区分雌雄虫 (尹宁娜等, 2019), 分开饲养, 并提供 10% 的蜂蜜水、核桃枝干和树叶; 最后, 分别收集 3 ~ 5 d 的雌雄虫触角、跗节、不含触角和跗节的残体用于转录组测序, 每个组织收集两套生物学模板和进行两次重复测序 (Zhao *et al.*, 2020a)。

1.2 实验方法

1.2.1 基因的鉴定

为了尽可能鉴定管纹艳虎天牛的 GH 基因, 选取光肩星天牛、赤拟谷盗、中欧山松大小蠹、马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 等具有基因组的鞘翅目昆虫 GH 蛋白序列 (Tribolium Genome Sequencing Consortium, 2008; Pauchet *et al.*, 2010; Keeling *et al.*, 2013; McKenna *et al.*, 2016; Busch *et al.*, 2019), 构建 GH 蛋白序列本地数据库。根据测序的管纹艳虎天牛转录组数据 (Zhao *et al.*, 2020a), 将其导入 Geneious 10.1.3 软件 (<https://www.geneious.com/>) 中。以构建的 GH 蛋白序列本地库为靶标, 采用 TBLASTN 同源搜索的方法搜索经 Trinity v2.5.1 软件组装的转录组 (Trinity.fasta) (Grabherr *et al.*, 2011) (搜索参数: BLOSUM62 矩阵, E 值设定为 1e-5, 每条序列最大搜索比对数为 20), 鉴定 *RhorGHs* 基因。采用

相同的方法搜索经 Corset v1.05 软件聚类处理后有注释信息的转录组 (Unigene.fasta) (Davidson and Oshlack, 2014)。以鉴定的 *RhorGHs* 蛋白为靶标序列, 分别搜索 Trinity.fasta 和 Unigene.fasta 两个数据库, 鉴定种间一致性较低但种内一致性较高的 *RhorGHs* 基因; 最后, 在 NCBI NR 蛋白序列数据库 (National Center for Biotechnology Information Non-redundant protein sequence database) 中进行 BLASTP 比对, 完成亚家族划分和保守域确定。

1.2.2 序列及进化分析

为了确定 *RhorGHs* 基因是否是全长序列, 根据以下两个标准进行判断: (1) NCBI BLAST 比对结果, 即与其他昆虫中具有全长序列的 GH 进行长度比较; (2) 昆虫不同 GH 家族基因的序列特征, 包括糖基化位点、信号肽和保守域。不同 GH 家族基因的氨基酸序列比对采用 ClustalW 软件进行, 比对完成后分析不同 GH 间的氨基酸一致性 (Larkin *et al.*, 2007)。序列编辑采用 Jalview v2.8 软件进行 (Waterhouse, 2009)。分子量 (Molecular weight, Mw) 和等电点 (Isoelectric point, pI) 预测利用在线工具 Compute pI/Mw (https://web.expasy.org/compute_pi/) 完成。采用 SignalP 4.1 Server 预测 GH 的信号肽序列 (Petersen *et al.*, 2011)。N-糖基化位点 (N-glycosylation predicted sites, NPS) 利用 NetNGlyc 1.0 Server 在线软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/netnglyc/>) 预测。

在进化分析中, 主要选取鞘翅目昆虫、细菌和真菌的 GH 序列, 其中 GH9 家族也选取了其他 5 个目 12 种昆虫的蛋白序列: 半翅目的桃蚜 *Myzus persicae*、豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum*、大豆蚜 *Aphis glycines*、雪松长足大蚜 *Cinara cedri* 和褐飞虱 *Nilaparvata lugens*; 蜚蠊目的达尔文澳白蚁 *Mastotermes darwiniensis*、内华达古白蚁 *Zootermopsis nevadensis*、北美散白蚁 *Reticulitermes flavipes* 和美洲大蠊 *Periplaneta americana*; 螳螂目的薄翅螳螂 *Mantis religiosa*; 竹节虫目的竹节虫 *Timema cristinae*; 膜翅目的大蜜蜂 *Apis dorsata*。利用 MAFFT v7.450 软件进行蛋白序列比对 (Katoh and Standley, 2013)。采用 PhyML 3.0 软件中的最大似然法 (Maximum-likelihood method) 构建进化树 (Guindon *et al.*, 2010)。采用 FigTree v1.4.4 软件

对进化树进行编辑和可视化分析 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>)。

1.2.3 基因的表达谱研究

为了明确 *RhorGHs* 基因在不同组织的表达情况, 根据测序获得的 FPKM (fragments per kilobase of transcript per million mapped reads) 值构建它们的表达谱。先采用 Bowtie 2 软件将 Clean reads 比对到 Unigene 转录组 (Langmead and Salzberg, 2012); 利用 RSEM 软件统计比对到基因上的 Reads 数 (Dewey and Li, 2011), 并用 FPKM 值方法进行标准化处理, 计算每个基因在不同组织的表达水平 (Trapnell *et al.*, 2010); 然后用 *RhorGHs* 基因搜索 Unigene. fasta 数据库, 找到其对应的基因编号; 最后, 根据基因编号找到其在不同组织的 FPKM 值, 利用两次重复的平均值绘制表达谱热图。

1.2.4 RhorGH28 蛋白的同源建模

选取管纹艳虎天牛 *RhorGH28* 家族中具有全长序列的 5 个 *RhorGH28s* 基因 (*RhorGH28-1*、*GH28-2*、*GH28-3*、*GH28-4* 和 *GH28-5*), 在 NCBI PDB 蛋白晶体结构数据库 (NCBI Protein Data Bank protein database) 中进行 BLASTP 比对, 比对结果发现 5 个 *RhorGH28s* 均与黑曲霉 *Aspergillus niger* 的多聚半乳糖醛酸内切酶 (Endo-polygalacturonase, AnigPGA-II) 具有最高氨基酸一致性; 根据序列比对结果截取与 AnigPGA-II 对应长度的 *RhorGHs* 的 C 端区域; 以 AnigPGA-II 蛋白的晶体结构 (PDB ID: 1CZF) 为模板 (Van *et al.*, 2016), 采用 MODELLER 9v7 软件分别构建 5 个 *RhorGH28s* 蛋白的三级结构 (Sali and Blundell, 1993)。三级结构的编辑和可视化分析采用 PyMOL 软件进行 (<https://pymol.org/>)。

2 结果与分析

2.1 管纹艳虎天牛 *RhorGHs* 基因的鉴定

基于已测序的转录组数据 (Zhao *et al.*, 2020a), 从管纹艳虎天牛中鉴定到 7 个 *GH* 基因家族: *GH1*、*GH9*、*GH13*、*GH16*、*GH28*、*GH31* 和 *GH45*, 共 56 个基因; 除 *RhorGH1-13* 基因仅存在于 Trinity 转录组外, 其余 55 个基因在 Trinity 和 Unigene 数据库中均检测到。其中, *GH1* 包含 23 个基因, 有 8 个基因 (*RhorGH1-1* ~ *GH1-8*) 具有全

长序列, 编码 484 ~ 505 个氨基酸; 除 *RhorGH1-2* 接近中性外, 其余 7 个均偏酸性; 分子量在 55.02 ~ 58.62 kDa 之间; 8 个 *RhorGH1s* 蛋白间糖基化位点在数量和位置上均存在一定差异, 其中 *RhorGH1-4*、*GH1-5* 和 *GH1-6* 均有 5 个糖基化位点, 而 *RhorGH1-1* 只有 1 个。其余 15 个基因 (*RhorGH1-9* ~ *GH1-23*) 为片段, 编码 216 ~ 505 个氨基酸 (表 1)。

在 *GH9* 家族中, 只有 1 个基因 (*RhorGH9*), 为片段, 编码 437 个氨基酸。在 *GH13* 家族中, 4 个基因均为片段, 编码 235 ~ 366 个氨基酸。在 *GH16* 家族中, 2 个基因 (*RhorGH16-1* 和 *GH16-2*) 均为片段。在 *GH28* 家族中, 鉴定到 10 个基因, 其中 *RhorGH28-1* ~ *GH28-5* 基因具有全长序列, 编码 364 ~ 369 个氨基酸; 除 *RhorGH28-3* 和 *GH28-4* 偏碱性外, 其余 3 个均接近中性; 糖基化位点数量相对较少 (1 ~ 3 个), 但是其位置相对保守。*RhorGH28-6* ~ *GH28-10* 等 5 个基因为片段, 编码 182 ~ 373 个氨基酸 (表 1)。

在 *GH31* 家族中, 鉴定到 12 个基因, 其中 *RhorGH31-1* ~ *GH31-6* 基因是全长序列, 编码 632 ~ 1 020 个氨基酸; 分子量在 72.23 ~ 116.02 kDa 之间; *RhorGH31-4* 糖基化位点最多, 有 16 个, 其余 5 个基因均有 6 个糖基化位点, 但位置变化较大。*RhorGH31-7* ~ *GH31-12* 等 6 个基因为片段, 编码 282 ~ 725 个氨基酸。在 *GH45* 家族中, *RhorGH45-1* ~ *GH45-4* 基因都是全长序列, 编码 234 ~ 240 个氨基酸; 除 *RhorGH45-3* 偏碱性外, 其余 3 个均偏酸性; 4 个 *RhorGH45s* 均只有 1 个糖基化位点 (表 1)。

2.2 RhorGH1 家族基因的序列及进化特征

选取 *GH1* 家族中具有全长序列的 8 个 *RhorGH1s* 进行序列比对和分析。结果表明, 所有 *RhorGH1s* 在 N 端均具有信号肽序列, 长度为 17 ~ 23 个氨基酸。不同蛋白间氨基酸一致性变化范围较大 (38.31% ~ 73.49%), 平均一致性为 47.19%, 其中 *RhorGH1-7* 与 *GH1-8* 一致性最高 (73.49%), 而 *RhorGH1-6* 与 *GH1-8* 一致性最低 (38.31%)。在功能区域内所有 *RhorGH1s* 具有高度保守的氨基酸残基, 如质子供体 (E/Q: 谷氨酸和谷氨酰胺) 和催化亲核残基 (E) (图 1)。

表 1 管纹艳虎天牛全长 *RhorGHs* 基因的信息
Table 1 Information for full-length *RhorGH* genes of *Rhaphuma horsfieldi*

基因 Gene	开放阅读框 (AA) ORF	等电点/分子量 (kDa) pI/MW	N-糖基化位点 NPS
糖苷水解酶家族 1 Glycoside hydrolase 1 (GH1) family			
<i>GH1-1</i>	500	5.62/57.39	411
<i>GH1-2</i>	485	6.48/55.95	42, 253, 299, 461
<i>GH1-3</i>	505	4.73/58.62	29, 260, 408, 476
<i>GH1-4</i>	498	4.76/57.15	28, 51, 300, 347, 408
<i>GH1-5</i>	496	5.26/57.44	27, 323, 354, 407, 470
<i>GH1-6</i>	484	4.69/55.02	115, 242, 303, 423, 454
<i>GH1-7</i>	495	4.79/56.39	49, 297, 409, 434
<i>GH1-8</i>	499	4.97/56.90	348, 369, 413
糖苷水解酶家族 28 Glycoside hydrolase 28 (GH28) family			
<i>GH28-1</i>	367	6.74/38.92	23, 243
<i>GH28-2</i>	367	6.40/38.95	23, 243
<i>GH28-3</i>	369	8.45/38.76	23, 243
<i>GH28-4</i>	367	9.04/38.26	23, 243, 343
<i>GH28-5</i>	364	6.93/38.76	22
糖苷水解酶家族 31 Glycoside hydrolase 31 (GH31) family			
<i>GH31-1</i>	861	4.96/97.90	365, 375, 513, 713, 758, 810
<i>GH31-2</i>	632	4.52/72.36	19, 99, 194, 295, 338, 543
<i>GH31-3</i>	642	4.61/72.76	69, 205, 291, 297, 342, 637
<i>GH31-4</i>	845	5.19/96.31	25, 41, 69, 115, 126, 220, 355, 365, 403, 440, 476, 503, 692, 705, 750, 795
<i>GH31-5</i>	1020	5.91/116.02	222, 290, 312, 388, 467, 738
<i>GH31-6</i>	633	5.47/72.23	50, 97, 293, 342, 544, 607
糖苷水解酶家族 45 Glycoside hydrolase 45 (GH45) family			
<i>GH45-1</i>	237	4.82/24.36	96
<i>GH45-2</i>	234	4.40/25.11	65
<i>GH45-3</i>	236	8.18/24.73	95
<i>GH45-4</i>	240	4.39/25.93	102

注：AA，氨基酸；ORF，开放阅读框；pI，等电点；MW，分子量；NPS，N-糖基化位点。Note: AA，amino acid；ORF，Open reading frame；pI，Isoelectric point；MW，Molecular weight；NPS，N-glycosylation predicted sites.

选取 4 种鞘翅目昆虫（光肩星天牛、中欧山松大小蠹、赤拟谷盗和管纹艳虎天牛）、3 种细菌（解糖热解纤维素菌 *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*、热纤梭菌 *Hungateiclostridium thermocellum* 和热解糖热厌氧杆菌 *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*）和

4 种真菌（黑曲霉、尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum*、灰腐质霉 *Humicola grisea* 和长柄木霉 *Trichoderma longibrachiatum*）GH1 家族的 119 个蛋白构建进化树。结果表明，鞘翅目昆虫的 GH1 具有物种或科特异聚类的特点，其中 3 个分支仅包含天牛科昆虫光肩星天牛和管纹艳虎天牛的 GH1，

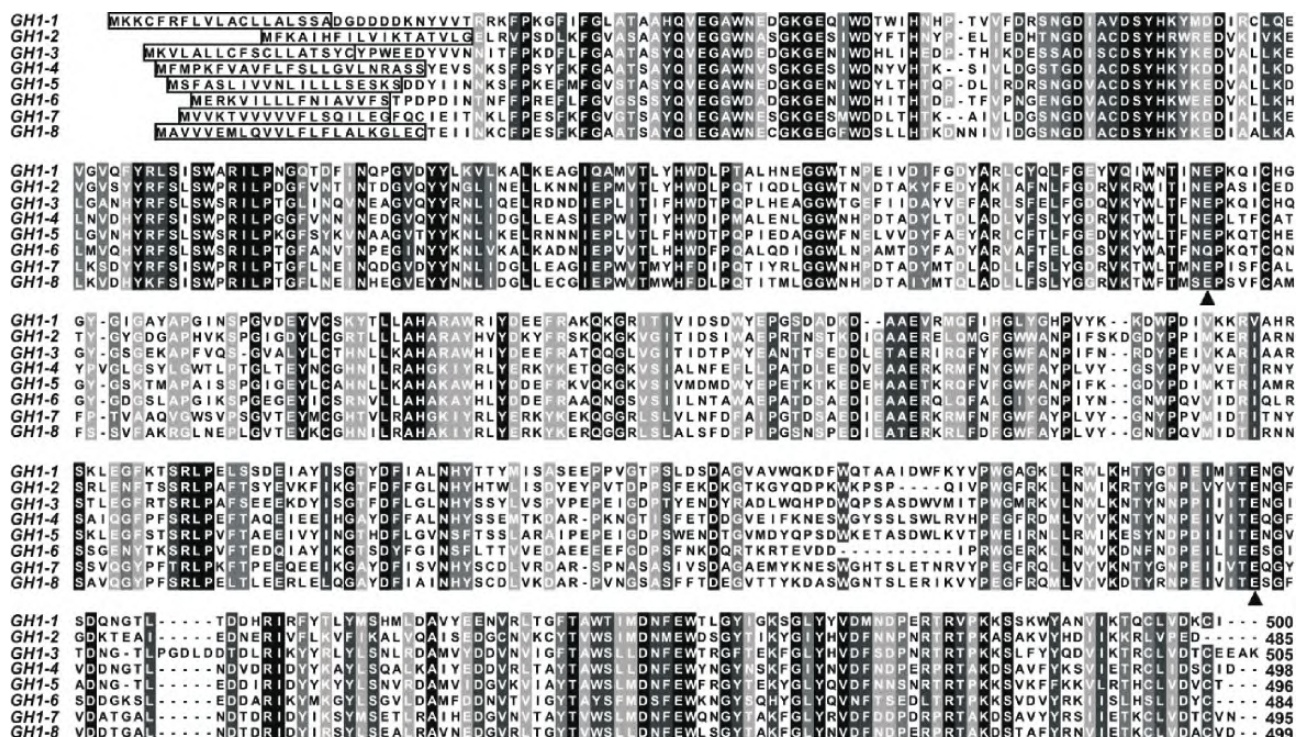


图1 管纹艳虎天牛 RhorGH1s 蛋白的氨基酸序列比对

Fig. 1 Alignment of amino acid sequences of RhorGH1 proteins in *Rhabduma horsfieldi*

注: N 端黑色方框内的氨基酸为信号肽序列。黑色三角形标示的是质子供体 (E/Q) 和催化亲核残基 (E)。Note: Signal peptide sequences at N-termini were boxed in black. Putative residues for the proton donors (E/Q) and catalytic nucleophiles (E) were marked in black triangles, respectively.

而且管纹艳虎天牛具有 2 个种特异的扩增 (RhorGH1-4/GH1-4/GH1-7 ~ GH1-10/GH1-16 和 RhorGH1-6/GH1-11 ~ GH1-15)。此外, 3 个分支呈种特异的聚类, 包括 2 个中欧山松大小蠹和 1 个赤拟谷盗的 GH1 分支; 1 个混合分支与细菌和真菌的亲缘关系较近, 其中管纹艳虎天牛在该分支中仅有 RhorGH1-2 (图 2)。

2.3 RhorGH9/GH13/GH16 家族基因的序列及进化特征

在 GH9、GH13 和 GH16 蛋白的进化分析中, 3 个家族的成员各自聚类到不同的分支中。其中, 管纹艳虎天牛的 RhorGH9 与其他昆虫的 GH9 具有较高的支持率 (>0.70) 和中等的氨基酸一致性 (平均值为 58.19%); 4 个 RhorGH13s 聚类到鞘翅目昆虫的 1 个小分支; 2 个 RhorGH16s 聚类到鞘翅目昆虫的 GH16 家族, 在该分支中的 GH16 主要以物种特异的形式聚成不同的小分支 (图 3)。

2.4 RhorGH28 家族基因的序列及进化特征

在昆虫 GH28 家族的进化分析中, 考虑到鞘翅目每个物种具有较少数量的 GH28 基因, 选取了更

多鞘翅目昆虫的蛋白构建进化树。结果表明, 鞘翅目昆虫的 GH28 家族主要以种特异的形式聚类, 其中管纹艳虎天牛的 GH28 被分散到 3 个分支中 (RhorGH28-10、RhorGH28-6/GH28-9 和 RhorGH28-1 ~ GH28-5/GH28-7 ~ GH28-8), 第 3 个分支呈现物种特异的扩增; 其他种特异的聚类还包括光肩星天牛 (1 个分支)、四纹豆象 *Chrysomela tremula* (1 个分支)、中欧山松大小蠹和米象 *Enterococcus saccharolyticus* (2 个分支)。此外, 叶甲科昆虫的 GH28 具有 2 个大的聚类分支, 其中管纹艳虎天牛有 2 个分支分别与它们具有较近的亲缘关系 (图 4)。

以黑曲霉 AnigPGA-II 的晶体结构为模板, 采用同源建模的方法构建了 RhorGH28 家族中 RhorGH28-1、GH28-2、GH28-3、GH28-4 和 GH28-5 等 5 个蛋白的三级结构。根据黑曲霉 AnigPGA-II 晶体结构的氨基酸序列, 选取 5 个 RhorGH28s 蛋白 C 端相应区域的氨基酸 (346 ~ 350 个) 进行序列比对。结果表明, 5 个蛋白相互间具有高的氨基酸一致性 (57.14% ~ 74.43%), 但它们与 AnigPGA-II

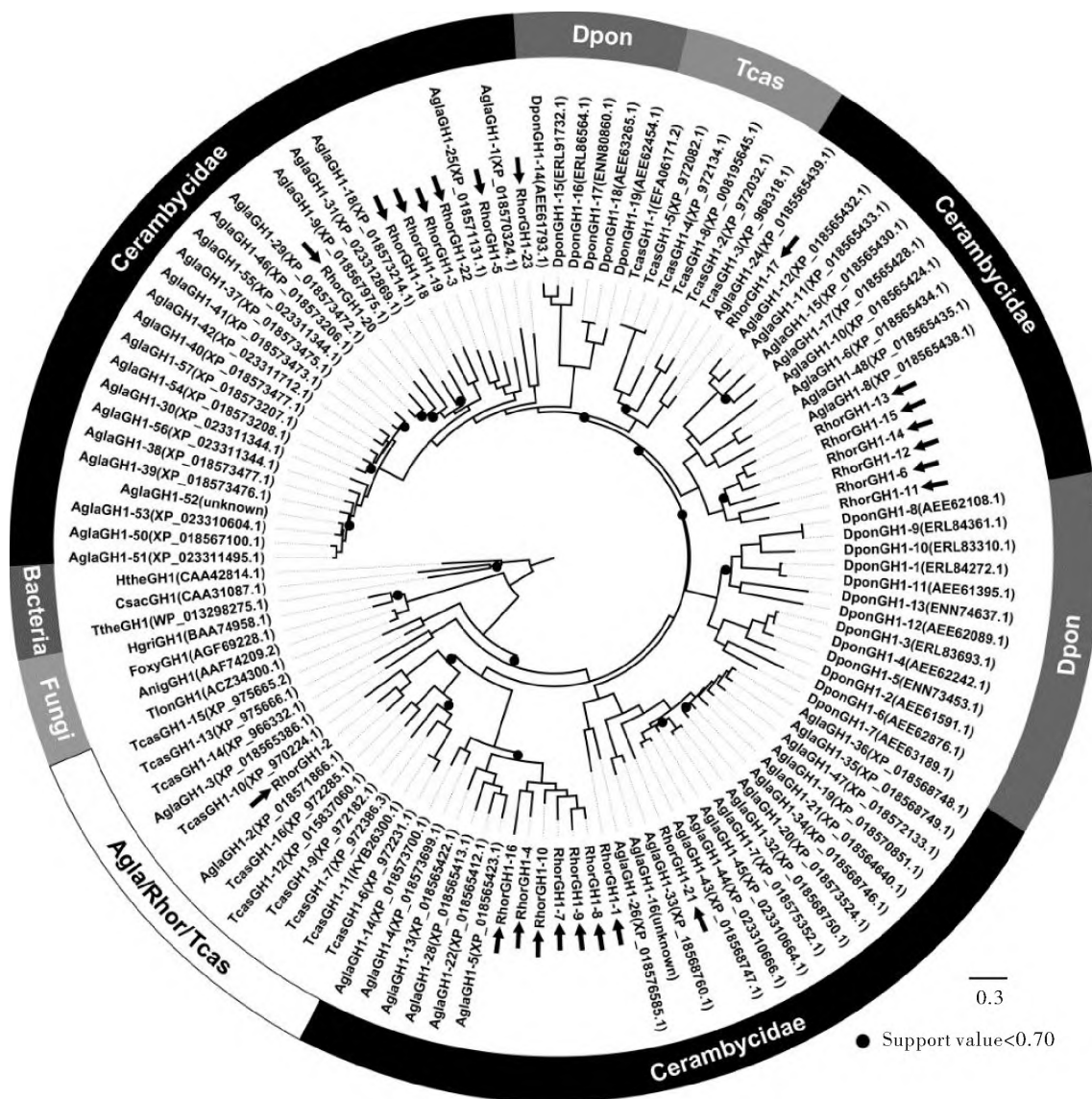


图2 鞘翅目、细菌和真菌 GH1 蛋白的进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of GH1 proteins in Coleoptera, bacteria and fungi

注: 管纹艳虎天牛的 RhroGH1s 蛋白用黑色箭头标示。用细菌的 GH1 作为进化树的根。Agl, 光肩星天牛; Dpon, 中欧山松大小蠹; Rhor, 管纹艳虎天牛; Tcas, 赤拟谷盗; Csac, 解糖热解纤维素菌; Hthe, 热纤梭菌; Tthe, 热解糖热厌氧杆菌; Anig, 黑曲霉; Foxy, 尖孢镰刀菌; Hgri, 灰腐质菌; Tlon, 长柄木霉。Note: RhroGH1 proteins from *Rhaphuma horsfieldi* were indicated with black arrows. GH1 members of bacteria were used to root the tree. Agla, *Anoplophora glabripennis*; Dpon, *Dendroctonus ponderosae*; Rhor, *Rhaphuma horsfieldi*; Tcas, *Tribolium castaneum*; Csac, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*; Hthe, *Hungateiclostridium thermocellum*; Tthe, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*; Anig, *Aspergillus niger*; Foxy, *Fusarium oxysporum*; Hgri, *Humicola grisea*; Tlon, *Trichoderma longibrachiatum*.

均只具有中等的一致性 (39.66% ~ 43.35%) (图 5-A)。

同源建模结果表明, 5 个 RhorGH28s 的三级结构主要由 β 折叠组成, 每个蛋白包括 28 个折叠片、1 个 α 螺旋、N 端和 C 端, 其中三级结构主要

由 4 对二硫键和 1 对可能的二硫键稳定。所有 RhorGH28s 的大部分 β 折叠间一致性较低, 但质子供体和催化亲核残基则高度保守。在第一个亲核残基中, 除 RhorGH28-5 是天冬酰胺 (N) 外, 其余 5 个均为天冬氨酸 (D); 所有 6 个蛋白的第

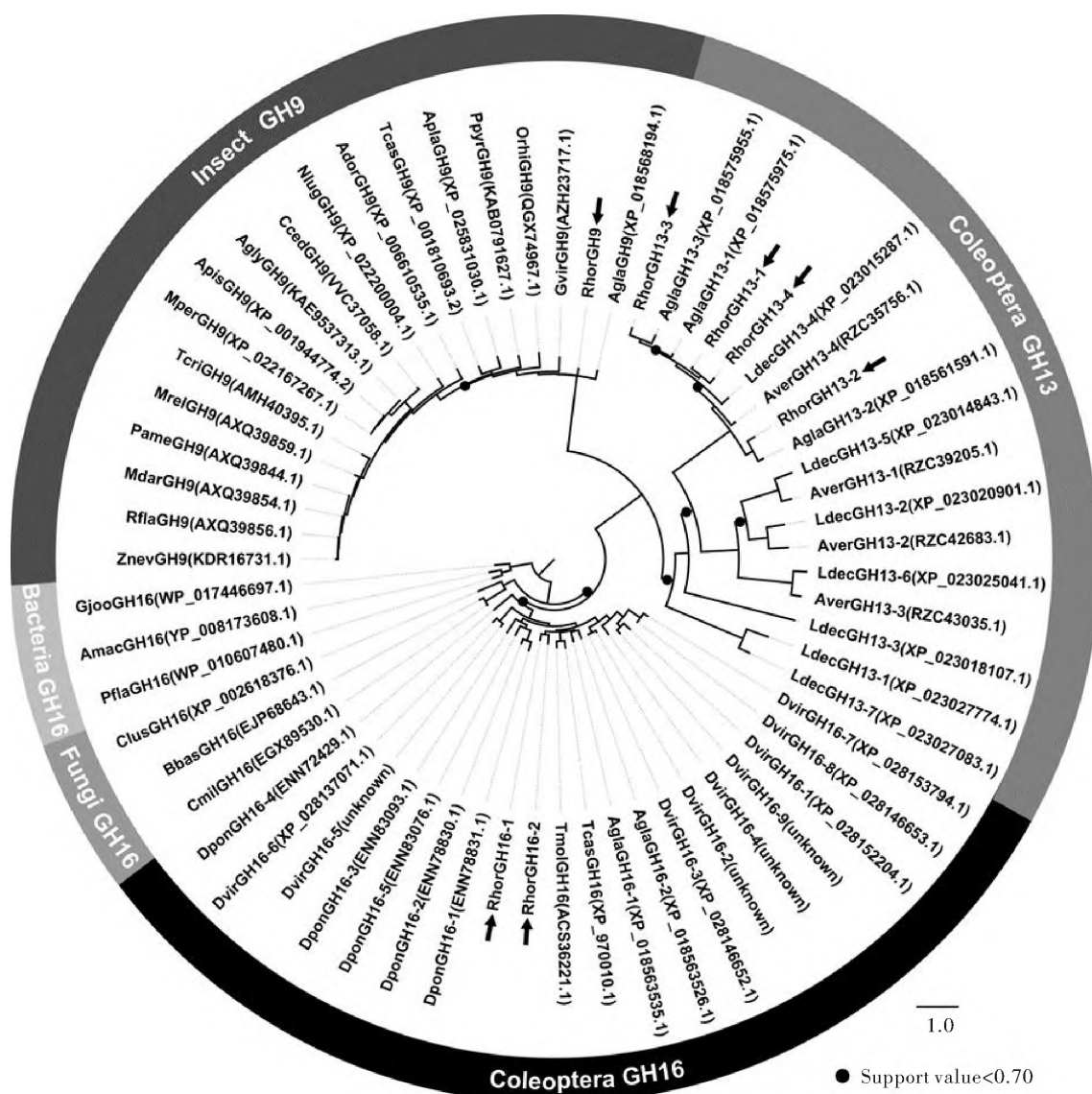


图3 昆虫、细菌和真菌 GH9、GH13 和 GH16 蛋白的进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of GH9, GH13 and GH16 proteins in insects, bacteria and fungi

注: 管纹艳虎天牛的 RhroGH9、GH13 和 GH16 蛋白用黑色箭头标示。用细菌的 GH16 作为进化树的根。Ador, 大蜜蜂; Agly, 大豆蚜; Apla, 白蜡吉丁; Apis, 豌豆蚜; Aver, 沙漠铁包甲虫; Cced, 雪松长足大蚜; Dvir, 玉米根萤叶甲; Gvir, 叶甲; Ldec, 马铃薯甲虫; Mdar, 达尔文澳白蚁; Mper, 桃蚜; Mrel, 薄翅螳螂; Nlug, 褐飞虱; Orhi, 椰子犀角金龟; Pame, 美洲大蠊; Ppyr, 萤火虫; Rfla, 北美散白蚁; Tcri, 竹节虫; Tmol, 黄粉虫; Znev, 内华达古白蚁; Amac, 麦氏交替单胞菌; Gjoo, 单胞菌; Pfla, 金黄色假交替单胞菌; Bbas, 球孢白僵菌; Cmil, 蛹虫草菌; 其余物种缩写见图 2。Note: RhroGH9, GH13 and GH16 proteins from *Rhaphuma horsfieldi* were indicated with black arrows, respectively. GH16 members of bacteria were used to root the tree. Ador, *Apis dorsata*; Agly, *Aphis glycines*; Apla, *Agrilus planipennis*; Apis, *Acyrtosiphon pisum*; Aver, *Asbolus verrucosus*; Cced, *Cinara cedri*; Dvir, *Diabrotica virgifera virgifera*; Gvir, *Gastrophysa viridula*; Ldec, *Leptinotarsa decemlineata*; Mdar, *Mastotermes darwiniensis*; Mper, *Myzus persicae*; Mrel, *Mantis religiosa*; Nlug, *Nilaparvata lugens*; Orhi, *Oryctes rhinoceros*; Pame, *Periplaneta americana*; Ppyr, *Photinus pyralis*; Rfla, *Reticulitermes flavipes*; Tcri, *Timema cristinae*; Tmol, *Tenebrio molitor*; Znev, *Zootermopsis nevadensis*; Amac, *Alteromonas macleodii*; Gjoo, *Gayadomonas joobiniege*; Pfla, *Pseudoalteromonas flavipulchra*; Bbas, *Beauveria bassiana*; Cmil, *Cordyceps militaris*. The abbreviation of other species was listed in Fig. 2.

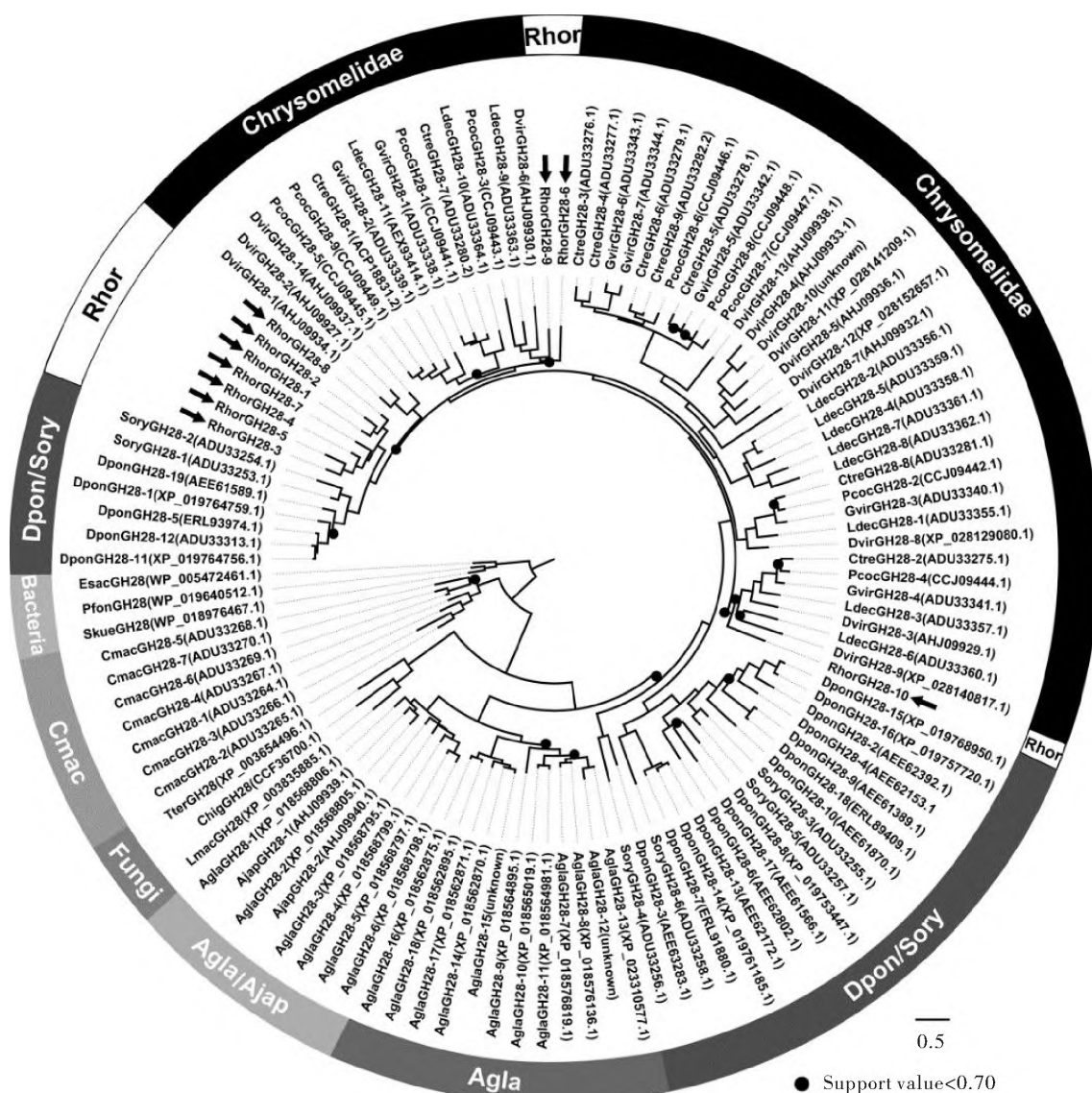


图4 鞘翅目、细菌和真菌 GH28 蛋白的进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of GH28 proteins in Coleoptera, bacteria and fungi

注: 管纹艳虎天牛的 RhorGH28 蛋白用黑色箭头标示。用细菌的 GH28 作为进化树的根。Cmac, 四纹豆象; Ctre, 山杨叶甲; Pcoc, 辣根猿叶虫; Sory, 米象; Esac, 解糖肠球菌; Pfon, 细菌; Skue, 细菌; Chig, 菜炭疽菌; Lmac, 油菜茎基溃疡病菌; Tter, 太瑞斯梭孢壳霉; 其余物种缩写见图 2 和图 3。
 Note: RhorGH28 proteins from *Rhaphuma horsfieldi* were indicated with black arrows. GH28 members of bacteria were used to root the tree. Cmac, *Callosobruchus maculatus*; Ctre, *Chrysomela tremula*; Pcoc, *Phaedon cochleariae*; Sory, *Sitophilus oryzae*; Esac, *Enterococcus saccharolyticus*; Pfon, *Paenibacillus fonticola*; Skue, *Saccharibacillus kuertensis*; Chig, *Colletotrichum higginsianum*; Lmac, *Leptosphaeria maculans*; Tter, *Thielavia terrestris*. The abbreviation of other species was listed in Fig. 2 and Fig. 3.

二个亲核残基均为天冬氨酸 (D); 此外, 它们也具有相同的质子供体氨基酸 (D)。除以上 3 个关键氨基酸位点外, 在 RhorGH28s 和 AnigPGA-II 中还具有高度保守的底物结合位点, 如 N159、组氨酸 (H204、H205)、精氨酸 (R240)、赖氨酸 (K242) 和酪氨酸 (Y276) (图 5-B)。

2.5 RhorGHs 基因的组织表达特征

除 *RhorGH1-13* 基因在 Unigene 数据库中未检测到外, 研究了 7 个 GH 家族共 55 个基因在雌雄虫触角、跗节和残体的表达情况。结果表明, 在 RhorGH1 家族中, *RhorGH1-1*、*GH1-3* 和 *GH1-20* 基因在所有组织中均呈现高表达的特点, 其余基因



图5 管纹艳虎天牛 5 个 RhorGH28s 蛋白的三级结构

Fig. 5 Three-dimensional (3D) structures of five RhorGH28 proteins from *Rhaphuma horsfieldi*

注: (A) 管纹艳虎天牛 5 个 RhorGH28s 与黑曲霉 AnigPGA-II 的氨基酸序列比对。根据黑曲霉 AnigPGA-II 的晶体结构, 质子供体 (D182)、催化亲核残基 (D161 和 D183) 和参与底物结合的关键氨基酸 (N159、H204、H205、R240、K242 和 Y276) 被标示。参与二硫键形成的 8 个半胱氨酸用数字标示; 此外, 第 5 对可能的二硫键用虚线标示。 (B) 管纹艳虎天牛 5 个 RhorGH28 的三级结构。在图 5-A 中的关键氨基酸和 4 对二硫键在三级结构上被标示。Nt, N 端; Ct, C 端。Note: (A) Alignment of five RhorGH28s and AnigPGA-II amino acid sequences. Based on the crystal structure of AnigPGA-II, the residues for the proton donor (D182), catalytic nucleophile (D161 and D183) and substrate binding (N159, H204, H205, R240, K242 and Y276) were shown, respectively. Eight cysteines involving the formation of disulfide bridges were numbered 1 to 4. The fifth putative disulfide bridge was indicated with a dashed line. (B) 3D models of five RhorGH28s. In Fig. 5-A, key amino acids and four disulfide bridges were labeled on their respective 3D structures, respectively. Nt, N-termini; Ct, C-termini.

主要在残体中特异或高表达。在 *RhorGH13* 家族中, *RhorGH13-2* 和 *GH13-3* 两个基因在 6 个组织具有广泛且高表达的特征, 而 *RhorGH13-4* 基因在所有组织中的表达量均较低。 *RhorGH9* 基因在所有组织中均具有高表达。 *RhorGH16-1* 基因在 6 个组织中均具有较高表达, 尤其是在雌雄虫触角和跗节。大部分 *RhorGH28s* 基因主要在两性残体中特异或高

表达, 包括 *RhorGH28-1* ~ *GH28-7* 和 *GH28-9* 基因。在 *RhorGH31* 家族中, 除 *RhorGH31-1* 基因外, 其余基因在测试的至少两个组织中有表达。 *RhorGH45-1* 基因在所有组织中均具有较高表达, *RhorGH45-3* 和 *GH45-4* 基因在雌雄虫残体中高表达 (图 6)。

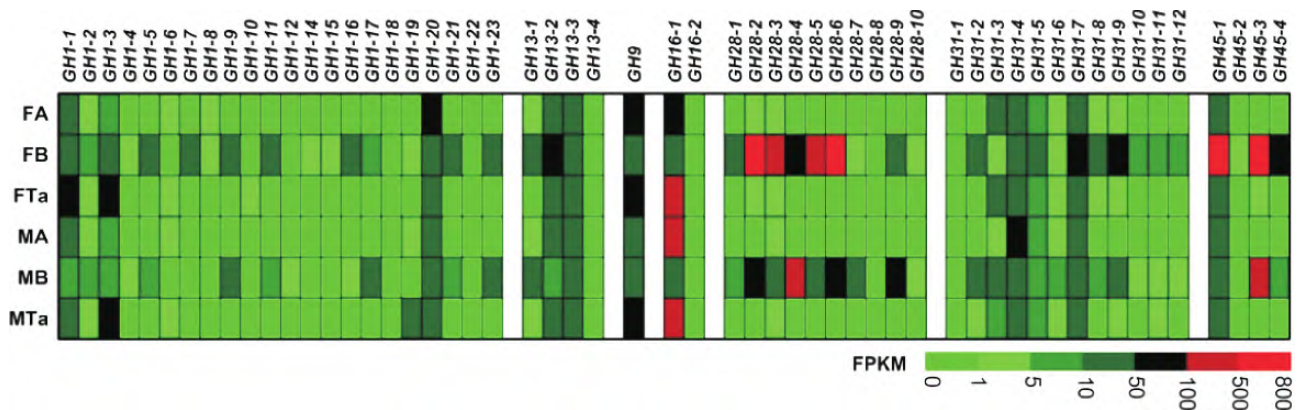


图 6 管纹艳虎天牛 *RhorGHs* 基因在雌雄虫不同组织的表达谱

Fig. 6 Expression profile of *RhorGHs* in different tissues of both sexes from *Rhaphuma horsfieldi*

注: 不同颜色表示两次重复的 FPKM 平均值。FA, 雌虫触角; MA, 雄虫触角; FTa, 雌虫跗节; MTa, 雄虫跗节; FB, 不含触角和跗节的雌虫身体; MB, 不含触角和跗节的雄虫身体。Note: Different colors represented an average FPKM value of two replicates. FA, Female antennae; MA, Male antennae; FTa, Female tarsi; MTa, Male tarsi; FB, Female bodies without antennae and tarsi; MB, Male bodies without antennae and tarsi.

3 结论与讨论

管纹艳虎天牛是一种杂食性的蛀干害虫, 先前报道的寄主植物仅有豆科的香须树 *Albizia odoratissima* 和樟科的木姜子属 *Litsea* (云南省林业厅等, 1987)。2014 年, Wickham 等采用天牛性信息素 (2- β -己二醇 2, 3-Hexanediol 和 (2R*, 3R*)-2- β -辛二醇 (2R*, 3R*)-2- β -Octanediol) 作为诱芯, 在云南林间诱捕到大量的管纹艳虎天牛, 暗示其寄主植物很可能具有多样性 (Wickham *et al.*, 2014)。2017 年, 本课题组从三台核桃受害木段中首次发现管纹艳虎天牛, 进一步增加了其取食寄主植物的范围。作为一种以幼虫蛀食树木为生的害虫, 不同的寄主植物可能促使昆虫与其体内参与植物细胞壁降解相关的酶呈现协同进化。关于该种天牛已有其形态特征、主要化感组织感器种类、基因家族 (化感基因和解毒代谢酶) 等的报道 (尹宁娜等, 2019; 王政全等, 2020; Zhao *et al.*, 2020a; Zhao *et al.*, 2020b; 李根层等,

2021), 但缺乏植物细胞壁降解酶基因家族 (如 GH) 的相关研究。昆虫 GH 基因是其体内一类庞大的水解酶家族, 可将植物中的糖类化合物转化为昆虫消化和吸收的低聚糖或单糖, 在植食性昆虫的取食和寄主适应性进化中起着重要作用 (Pauchet *et al.*, 2010; Watanabe and Tokuda, 2010; Fischer *et al.*, 2013)。因此, 本研究基于发表的转录组 (Zhao *et al.*, 2020a), 鉴定和研究了管纹艳虎天牛中参与植物细胞壁降解的重要酶: GH。研究结果有助于了解管纹艳虎天牛寄主植物范围与 GH 家族的相关性, 为其寄主偏好性和适应性机制研究奠定基础。

与同科的光肩星天牛 (6 个 GH 家族: 86 个基因) 相比, 管纹艳虎天牛具有 7 个 GH 家族共 56 个基因; 通过分析发现两种天牛仅有 4 个 GH 家族相同 (GH1、GH9、GH28 和 GH45), 基因数量的差异主要存在于 GH1 (管纹艳虎天牛: 23 个; 光肩星天牛: 57 个) 和 GH28 (管纹艳虎天牛: 10 个; 光肩星天牛: 18 个) 家族; 此外, 管纹艳虎天牛还具有 GH13、GH16 和 GH31 家族, 而光

肩星天牛还包括 GH5 和 GH48 家族 (McKenna *et al.*, 2016)。与鞘翅目其他科的昆虫相比, 管纹艳虎天牛 GH 基因的数量多于赤拟谷盗 (5 个 GH 家族: 27 个) (Tribolium Genome Sequencing Consortium, 2008), 但是明显少于大足象 (55 个 GH 家族: 309 个) (Luo *et al.*, 2018) 和红棕象甲 (19 个 GH 家族: 224 个) (Hazzouri *et al.*, 2020)。鞘翅目不同昆虫间 GH 基因数量差异的主要原因可能有: 一是基因鉴定的数据库不同, 部分物种 (管纹艳虎天牛和大足象) 是从转录组中鉴定, 而部分物种 (光肩星天牛、赤拟谷盗和红棕象甲) 则是从基因组中鉴定; 二是转录组测序组织差异和测序深度不同, 虽然都来源于转录组数据, 但是由于测序深度和组织的不同使得管纹艳虎天牛的 GH 基因数量少于其他昆虫; 三是基因组测序和组装质量存在差异, 导致 GH 基因未能全部得到鉴定; 四是取食寄主植物的差异性, 由于 GH 基因的功能主要与糖类化合物的水解有关, 不同寄主植物因糖类物质或糖的浓度不同而导致昆虫 GH 家族基因的收缩或扩张。

在序列比对分析中, RhorGH1 和 GH28 家族的蛋白在关键氨基酸位点处 (如质子供体、催化亲核残基以及底物结合位点) 高度保守, 暗示它们对糖类物质的水解具有高度的底物特异性和保守性, 尤其是 5 个具有较高相似性的 RhorGH28s (RhorGH28-1 ~ GH28-5)。在进化分析中, RhorGH1 (RhorGH1-6/GH11 ~ 15 和 RhorGH1-4/GH1-7 ~ GH1-10/GH1-16) 和 GH28 (RhorGH28-1 ~ GH28-5/GH28-7 ~ GH28-8) 家族的部分成员以物种特异的形式聚类成小分支, 且具有较高的支持率 (> 0.70), 这种物种特异的扩增暗示它们可能起源于基因的复制。据此推测其他物种 GH1 和 GH28 聚类分支中的成员也通过基因的复制产生, 即它们位于同一条染色体上。在 GH1 家族中, 主要验证了与管纹艳虎天牛两个聚类分支进化关系较近的光肩星天牛 *AglaGH1s* 和赤拟谷盗 *TcasGH1s*, 与预期结果一致, 光肩星天牛的两个聚类分支 *AglaGH1-6/GH1-8/GH1-10 ~ GH1-12/GH1-15/GH1-17/GH1-48* 和 *AglaGH1-5/GH1-13/GH1-22/GH1-28* 基因均位于 Scaffold 278 上 (McKenna *et al.*, 2016); 赤拟谷盗的 *TcasGH1-6/GH1-7/GH1-9/GH1-11/GH1-12/GH1-16* 基因在染色体 LG7 上 (Tribolium Genome Sequencing Consortium, 2008)。在 GH28 家族中, 光肩星天牛的 *AglaGH28-7 ~*

GH28-13 基因位于 5 条 Scaffold 上, 而 *AglaGH28-14 ~ GH28-18* 基因位于同一条 Scaffold 206 上 (McKenna *et al.*, 2016)。因此, 分析认为管纹艳虎天牛的两个 *RhorGH1s* 聚类分支可能分别位于两条染色体上, 且通过基因的复制产生; 而 *RhorGH28s* 聚类分支的成员是否位于同一条染色体上仍有待进一步研究。

昆虫 GH 家族的基因主要在与糖类物质消化和吸收有关的肠道中表达, 并呈现肠道特异或高表达的特点 (Watanabe and Tokuda, 2010)。在天牛科昆虫桑天牛 (*AgerGH5*、*GH45-1* 和 *GH45-2*) (Lee *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2006)、光肩星天牛 (Scully *et al.*, 2013)、桑树黄星天牛 (*PhilGH5*) (Sugimura *et al.*, 2003)、日本桑天牛 (*AjapGH5* 和 *GH45* 家族基因) (Pauchet *et al.*, 2014)、大足象 (*Cqbgln5* 和 *Cqbgln7*) (Luo *et al.*, 2018)、辣根猿叶虫 *Phaedon cochleariae* (*PcocGH11*、*GH28* 和 *GH45* 家族基因) (Kirsch *et al.*, 2012)、玉米根萤叶甲 (*DvirENGaseI*) (Valencia *et al.*, 2013)、金眼竹节虫 *Peruphasma schultei* (Matan *et al.*, 2014) 和豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* (*ApisAPSI*) (Price *et al.*, 2007) 中, GH 基因均具有中肠特异或高表达的特点。本研究中管纹艳虎天牛的大部分 *RhorGHs* 基因在残体中特异或高表达, 鉴于先前 GH 的表达特征和消化水解功能, 暗示 *RhorGHs* 基因很可能主要在管纹艳虎天牛的肠道中表达, 即 *RhorGHs* 基因主要参与植物中糖类物质的水解。此外, 昆虫 GH 基因在丝腺、卵、蛹、头部等组织中也有表达, 说明该家族基因可能还参与到昆虫其他生理过程 (Scharf *et al.*, 2010; Eyun *et al.*, 2014; Moraes *et al.*, 2014; Luo *et al.*, 2018)。在管纹艳虎天牛中, 部分 *RhorGHs* 基因在化感器官 (触角和跗节) 中有表达, 说明它们可能具有嗅觉或味觉功能。

参考文献 (References)

- Bourne Y, Henrissat B. Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: Families and functional modules [J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2001, 11 (5): 593–600.
- Busch A, Danchin EGJ, Pauchet Y. Functional diversification of horizontally acquired glycoside hydrolase family 45 (GH45) proteins in Phytophaga beetles [J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2019, 19 (1): 100.
- Busch A, Kunert G, Wielsch N, *et al.* Cellulose degradation in *Gastrophysa viridula* (Coleoptera: Chrysomelidae): Functional

- characterization of two CAZymes belonging to glycoside hydrolase family 45 reveals a novel enzymatic activity [J]. *Insect Molecular Biology*, 2018, 27 (5): 633–650.
- Davidson NM, Oshlack A. Corset: Enabling differential gene expression analysis for *de novo* assembled transcriptomes [J]. *Genome Biology*, 2014, 15 (7): 410.
- Dewey CN, Li B. RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome [J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12 (1): 323–323.
- Eyun SI, Wang H, Pauchet Y, *et al.* Molecular evolution of glycoside hydrolase genes in the western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*) [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9 (4): e94052.
- Fallon TR, Lower SE, Chang CH, *et al.* Firefly genomes illuminate parallel origins of bioluminescence in beetles [J]. *Elife*, 2018, 7: e36495.
- Fischer R, Ostafe R, Twyman RM. Cellulases from insects [J]. *Advances in Biochemical Engineering-Biotechnology*, 2013, 136: 51–64.
- 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]
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, *et al.* Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome [J]. *Nature Biotechnology*, 2011, 29 (7): 644–652.
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, *et al.* New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0 [J]. *Systematic Biology*, 2010, 59 (3): 307–321.
- Hazzouri KM, Sudalaimuthasari N, Kundu B, *et al.* The genome of pest *Rhynchophorus ferrugineus* reveals gene families important at the plant-beetle interface [J]. *Communications Biology*, 2020, 3 (1): 323.
- 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.
- Keeling C, Yuen M, Liao N, *et al.* Draft genome of the mountain pine beetle, *Dendroctonus ponderosae* Hopkins, a major forest pest [J]. *Genome Biology*, 2013, 14 (3): R27.
- Kirsch R, Wielsch N, Vogel H, *et al.* Combining proteomics and transcriptome sequencing to identify active plant-cell-wall-degrading enzymes in a leaf beetle [J]. *BMC Genomics*, 2012, 13 (1): 587.
- Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 [J]. *Nature Methods*, 2012, 9 (4): 357–359.
- Larkin M, Blackshields G, Brown N, *et al.* Clustal W and Clustal X version 2.0 [J]. *Bioinformatics*, 2007, 23 (21): 2947–2948.
- Lee SJ, Kim SR, Yoon HJ, *et al.* cDNA cloning, expression, and enzymatic activity of a cellulase from the mulberry longicorn beetle, *Apriona germari* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 139 (1): 107–116.
- Lee SJ, Lee KS, Kim SR, *et al.* A novel cellulase gene from the mulberry longicorn beetle, *Apriona germari*: Gene structure, expression, and enzymatic activity [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 140 (4): 551–560.
- Li GC, Zhao YJ, Zhao N, *et al.* Identification and characterization of cuticular protein gene families of *Rhaphuma horsfieldi* based on transcriptomics [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2021, 43 (1): 1–14. [李根层, 赵昱杰, 赵宁, 等. 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]
- Luo C, Li Y, Liao H, *et al.* *De novo* transcriptome assembly of the bamboo snout beetle *Cyrtotrachelus buqueti* reveals ability to degrade lignocellulose of bamboo feedstock [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11 (1): 292.
- Matan S, Cameron J, Joel A, *et al.* Differential expression of endogenous plant cell wall degrading enzyme genes in the stick insect (Phasmatodea) midgut [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15 (1): 917.
- Matan S, Lin SS, Liu LY. Transcriptome and microbiome of coconut rhinoceros beetle (*Oryctes rhinoceros*) larvae [J]. *BMC Genomics*, 2019, 20 (1): 957.
- 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): 1–18.
- Mei HZ, Xia DG, Zhao QL, *et al.* Molecular cloning, expression, purification and characterization of a novel cellulase gene (Bh-EGaseI) in the beetle *Batocera horsfieldi* [J]. *Gene*, 2015: 45–51.
- Moraes CdaS, Diaz-Albiter HM, Faria MdoV, *et al.* Expression pattern of glycoside hydrolase genes in *Lutzomyia longipalpis* reveals key enzymes involved in larval digestion [J]. *Frontiers in Physiology*, 2014, 5 (5): 276.
- Palomares-Rius JE, Hirooka Y, Tsai IJ, *et al.* Distribution and evolution of glycoside hydrolase family 45 cellulases in nematodes and fungi [J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2014, 14 (1): 1–12.
- Pauchet Y, Kirsch R, Giraud S, *et al.* Identification and characterization of plant cell wall degrading enzymes from three glycoside hydrolase families in the cerambycid beetle *Apriona japonica* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, 49 (49): 1–13.
- Pauchet Y, Wilkinson P, Chauhan R, *et al.* Diversity of beetle genes encoding novel plant cell wall degrading enzymes [J]. *PLoS ONE*, 2010, 5 (12): e15635.
- Petersen TN, Brunak S, Heijne GV, *et al.* SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions [J]. *Nature Methods*, 2011, 8 (10): 785–786.
- Price D, Karley AJ, Ashford DA, *et al.* Molecular characterisation of a candidate gut sucrase in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 37 (4):

- 307–317.
- Sali A, Blundell TL. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1993, 234 (3): 779–815.
- Scharf ME, Kovaleva ES, Jadhao S, *et al.* Functional and translational analyses of a beta-glucosidase gene (glycosyl hydrolase family 1) isolated from the gut of the lower termite *Reticulitermes flavipes* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 40 (8): 611–620.
- Scully ED, Hoover K, Carlson JE, *et al.* Midgut transcriptome profiling of *Anoplophora glabripennis*, a lignocellulose degrading cerambycid beetle [J]. *BMC Genomics*, 2013, 14 (1): 850.
- Sugimura M, Watanabe H, Lo N, *et al.* Purification, characterization, cDNA cloning and nucleotide sequencing of a cellulase from the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacotha hilaris* [J]. *European Journal of Biochemistry*, 2003, 270 (16): 3455–3460.
- Tribolium Genome Sequencing Consortium. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum* [J]. *Nature*, 2008, 452 (7190): 949–955.
- 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.
- Valencia A, Alves AP, Siegfried BD. Molecular cloning and functional characterization of an endogenous endoglucanase belonging to GHF45 from the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* [J]. *Gene*, 2013, 513 (2): 260–267.
- Van YS, Benen JA, KH Schröter, *et al.* 1.68–Å crystal structure of endopolygalacturonase II from *Aspergillus niger* and identification of active site residues by site-directed mutagenesis [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, 274 (43): 30474–30480.
- Wang ZQ, Yin NN, Zhao N, *et al.* Identification and expression characterization of UDP-glucosyltransferase genes in *Rhaphuma horsfieldi* [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2020, 57 (4): 898–910. [王政全, 尹宁娜, 赵宁, 等. 管纹艳虎天牛 UDP-葡萄糖基转移酶基因的鉴定及表达特征分析 [J]. 应用昆虫学报, 2020, 57 (4): 898–910]
- Watanabe H, Tokuda G. Cellulolytic system in insect [J]. *Annual Review of Entomology*, 2010, 55 (1): 609–632.
- Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, *et al.* Jalview version 2-A multiple sequence alignment editor and analysis workbench [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25 (9): 1189–1191.
- Wei YD, Lee KS, Zhong ZG, *et al.* Molecular cloning, expression, and enzymatic activity of a novel endogenous cellulase from the mulberry longicorn beetle, *Apriona germari* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2006, 145 (2): 220–229.
- Wickham JD, Harrison RD, Lu W, *et al.* Generic lures attract cerambycid beetles in a tropical montane rain forest in southern China [J]. *Journal of Economic Entomology*, 2014, 107 (1): 259–267.
- Willis JD, Oppert B, Oppert C, *et al.* Identification, cloning, and expression of a GHF9 cellulase from *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2011, 57 (2): 300–306.
- Xia DG, Wei Y, Zhang G, *et al.* cDNA cloning, expression, and enzymatic activity of a novel endogenous cellulase from the beetle *Batocera horsfieldi* [J]. *Gene*, 2013, 514 (1): 62–68.
- 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 (自然科学版), 2019, 39 (3): 132–140]
- Zhao YJ, Li GC, Zhu JY, *et al.* Genome-based analysis reveals a novel SNMP group of the Coleoptera and chemosensory receptors in *Rhaphuma horsfieldi* [J]. *Genomics*, 2020a, 112 (4): 2713–2728.
- Zhao YJ, Wang ZQ, Zhu JY, *et al.* Identification and characterization of detoxification genes in two cerambycid beetles, *Rhaphuma horsfieldi* and *Xylotrechus quadripes* (Coleoptera: Cerambycidae: Clytini) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2020b, 243–244: 110431.
- Zhou JP. Preliminary Study on Cellulases and Hemicellulases from Symbiotic Bacteria Harbored in the Gut of *Batocera horsfieldi* Larvae [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences Doctoral Thesis, 2010. [周峻沛. 云斑天牛胃肠道内共生细菌来源的纤维素酶和半纤维素酶的初步研究 [D]. 北京: 中国农业科学院博士论文, 2010]