



泽兰实蝇雌雄成虫转录组及差异分析*

高平** 李丽芳 兰明先 李梦月 廖贤斌 吴国星 高熹***

(云南农业大学植物保护学院, 昆明 650201)

摘要 【目的】泽兰实蝇 *Procecidochares utilis* Stone 是入侵杂草紫茎泽兰 *Eupatorium adenophorum* Spreng 的重要的专食性天敌, 已成为控制紫茎泽兰的重要因子。本研究旨在获得泽兰实蝇转录组, 并深入研究泽兰实蝇雌雄成虫差异表达基因。【方法】利用 Illumina 高通量测序技术对泽兰实蝇雌雄成虫进行转录组测序和生物信息分析。【结果】总共获得 29 147 条 unigenes, 平均长度为 457 bp, 同时将所得序列注释到七大数据库进行比对, 共获得 19 384 条 unigenes 注释结果。分析发现 11 331 条差异表达基因; 与雄成虫相比, 雌成虫有 2 640 条 unigenes 表达量上调, 8 691 条 unigenes 表达量下调。【结论】本研究获得了泽兰实蝇转录组, 为今后泽兰实蝇性别相关研究提供了序列支持。

关键词 泽兰实蝇; 转录组; 差异表达基因

Transcriptome and differential analysis of adult male and female *Procecidochares utilis* Stone

GAO Ping** LI Li-Fang LAN Ming-Xian LI Meng-Yue
LIAO Xian-Bin WU Guo-Xing GAO Xi***

(College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract 【Objectives】*Procecidochares utilis* Stone is an important monophagous herbivore of the invasive weed *Eupatorium adenophorum* Spreng, and has become an important biological control of this pest plant. The purpose of this study was to obtain the *P. utilis* transcriptome, and investigate the molecular mechanism underlying differences between adult males and females of this species. 【Methods】Illumina high-throughput sequencing technology was used to obtain transcriptome sequencing and conduct biological information analysis of *P. utilis*. 【Results】A total of 29 147 unigenes with an average length of 457 bp were obtained. Gene sequences were annotated using seven databases, resulting in the identification of 19 384 unigenes. There were 11 331 differentially expressed genes; compared to adult males, adult females had 2 640 up-regulated, and 8 691 down-regulated, unigenes. 【Conclusion】The transcriptome of *P. utilis* was obtained, which provides sequence data to support future research on the sexes of this species.

Key words *Procecidochares utilis* Stone; transcriptome; differentially expressed gene

泽兰实蝇 *Procecidochares utilis* Stone 属双翅目 Diptera 实蝇科 Tephritidae, 是目前入侵杂草紫茎泽兰 *Eupatorium adenophorum* Spreng 的专一性寄生天敌 (陈旭东和何大愚, 1990; Rahman and Agarwal, 1990)。紫茎泽兰是一种

旺盛的多年生恶性杂草, 由于其生长快速和繁殖率高而难以根除 (Sang *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2012)。紫茎泽兰的传播不仅给农业、林业和畜牧业造成严重的经济损失, 而且还破坏本土物种的栖息地环境 (孙劲等, 2003; Lu *et al.*, 2006)。

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金项目 (31860521, 32060640)

**第一作者 First author, E-mail: gaoping65432@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: chonchon@163.com

收稿日期 Received: 2019-12-17; 接受日期 Accepted: 2020-05-25

由于紫茎泽兰造成众多危害,寻找能防治紫茎泽兰的方法显得尤为重要。在国内外已广泛利用泽兰实蝇削弱紫茎泽兰的长势且效果明显(Rahman and Agarwal, 1990)。

泽兰实蝇雌成虫将卵产在紫茎泽兰的芽、茎尖和叶脉上,卵孵化时,幼虫钻入紫茎泽兰的嫩茎中觅食并刺激形成虫瘿,从而减少植株养分运输(Li *et al.*, 2006; 郭俊等, 2008; Wan *et al.*, 2010)。此外,泽兰实蝇寄生产生的虫瘿可以阻碍紫茎泽兰的生长和结籽,削弱紫茎泽兰的长势,导致泽兰实蝇很高的死亡率(Bennett and Vanstaden, 1986; 张智英等, 1988; 刘文耀等, 1991; Buccellato *et al.*, 2012)。因此,关于泽兰实蝇的研究受到广泛重视,目前主要集中在引种、生态学特性、生物学特性和对紫茎泽兰的控制等方面(Rahman and Agarwal, 1990; Fowler *et al.*, 2000; 李爱芳等, 2006; 王吉秀等, 2013; 兰明先等, 2017; 柳青, 2017; 姜丽娜等, 2019)。

近年来,高通量测序技术已成为昆虫学研究的最重要手段之一(吕红娟, 2012; 岳桂东等, 2012; Jin *et al.*, 2016),通过转录组测序揭示昆虫的形态、生理和发育等对环境适应、进化的遗传机制(张麒麟和袁明龙, 2013; 顾欣悦等, 2018)。高通量测序的方法也引入到泽兰实蝇的转录组研究,例如利用泽兰实蝇幼虫的转录组数据阐明其克服寄主植物有毒次生化化合物的机制(Li *et al.*, 2018)。转录组研究还表明,泽兰实蝇雌雄成虫的生殖系统和寿命存在差异(马沙等, 2012a, 2012b; 高熹等, 2013)。本研究利用Illumina测序技术对泽兰实蝇的雌雄成虫进行转录组测序,拼接和组装后,对基因进行功能注释和分类。同时对泽兰实蝇雌成虫、雄成虫的差异表达基因进行了分析,为探究泽兰实蝇雌雄成虫差异的相关分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

泽兰实蝇在云南农业大学校内养殖棚内采集。采集大棚内带有虫瘿的紫茎泽兰枝条,带回实验室放入养虫笼中,待泽兰实蝇成虫羽化后,

收集其作为供试虫源。

1.2 总 RNA 提取与质检

取 10 头泽兰实蝇雌成虫和雄成虫分别放入 1.5 mL 离心管中,加入 200 μ L Trizol 试剂使细胞释放 RNA 并保证 RNA 的完整性,充分研磨后加入 800 μ L Trizol 试剂。然后进行离心、除杂、弃上清液,最终得到的白色的沉淀即为 RNA。加适量 RNase Free H₂O 溶解沉淀,取 1 μ L 已溶解的 RNA 用超微量紫外分光光度计(NanoDrop 2000)测定浓度。利用琼脂糖凝胶电泳分析 RNA 降解程度,在凝胶成像仪(GenoSens 1880)中观察 RNA 条带。把检测合格的样品委托华大基因生物信息科技有限公司进行高通量测序。

1.3 cDNA 文库构建与测序

在获得高质量的 mRNA 后,用反转录酶 Oligo(dT)引导合成 cDNA 第 1 链,cDNA 第 2 链的合成需要先通过 RNaseH 处理除去 RNA 链,然后用大肠杆菌 DNA 聚合酶连接。在 cDNA 第 1 链和第 2 链合成后,加入合成接头,将双链 DNA 克隆到载体中,分析 cDNA 插入片段,扩增 cDNA 文库。最后检验合格的 cDNA 文库在 Illumina HiSeq 测序平台上进行测序。

1.4 转录组拼接和功能基因注释

Trinity 是针对无参考基因组 RNA-Seq 数据构建的转录本工具(Grabherr *et al.*, 2011)。利用 Trinity 进行组装,主要包括以下步骤:(1)将 RNA-seq 数据组装成单个转录本,通常是主要转录亚型的全长转录本;(2)将上一步得到 contig 进行聚类,对于每个聚类构建完整的德布罗意图(de Bruijn graph)。每个转录本表示的是给定基因或者一组有着共同序列的基因的全部转录组成,然后根据图中不相交的点对全部短读数据进行拆分;(3)处理各个图(Graph),追踪每个图中的短读和配对短读的路径,最后报告可变剪切亚型的全长转录本,并且区分出旁系同源基因的转录本。数据组装完成之后,使用 BLAST 软件在 7 大数据库中进行比对,获得基因的注释信息。

1.5 CDS 预测与 SSR 分析

基因的编码区(Coding DNA sequence, CDS)是指 DNA 或 RNA 中由外显子组成, 编码蛋白质的部分。将基因与 NR 蛋白库、Swissprot 蛋白库进行比对, 从比对的结果中提取转录本的开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF) 信息。基于拼接得到的泽兰实蝇 unigenes 序列, 使用 MISA 软件进行 SSR 分析。

2 结果与分析

2.1 转录组序列分析和组装

泽兰实蝇转录组的测序产量见表 1。通过对

泽兰实蝇雌成虫和雄成虫进行转录组测序, 得到的原始 reads 雌成虫为 39 150 698 条, 雄成虫为 42 277 032 条。原始数据过滤之后, 分别得到泽兰实蝇雌成虫和雄成虫的 clean reads 为 36 800 864 条和 38 308 428 条。2 个样本 Q20 比例都不小于 20%, 雌成虫和雄成虫的 GC 含量分别为 30.45%和 29.24%。

利用 Trinity 软件组装之后, 雌成虫样品获得 68 467 条 Contig, 雄成虫样品获得 44 166 条 Contig, 其平均长度分别为 227 bp 和 232 bp。Contig 进一步拼接得到 29 147 条 unigenes, 总长度为 13 312 286 bp, 平均长度为 457 bp, N50 为 503 bp。unigenes 的长度分布情况见图 1。

表 1 泽兰实蝇转录组测序产量统计
Table 1 Statistics of transcriptome assembly for *Procecidochares utilis*

样本 Samples	原始读数 Total raw reads	高质量读数 Total clean reads	总核酸数 (nt) Total clean nucleotides (nt)	Q20 比例 (%) Q20 percentage	N 比例 (%) N percentage	GC 比例 (%) GC percentage
雌虫 Female	39 150 698	36 800 864	3 312 077 760	98.36	0	30.45
雄虫 Male	42 277 032	38 308 428	3 447 758 520	98.36	0	29.24

表 2 泽兰实蝇转录组测序数据的组装质量统计
Table 2 Assembly quality statistics of the transcriptome sequencing of *Procecidochares utilis*

项目 Item	样本 Sample	总数 Total number	总长度 (nt) Total length (nt)	平均长度 (nt) Mean length (nt)	N50 值 N50 value	总序列 Total consensus sequences	独特集群 Distinct clusters	不同单例 Distinct singletons
重叠群 Contig	雌虫 Female	68 467	15 558 079	227	277	—	—	—
	雄虫 Male	44 166	10 262 573	232	282	—	—	—
基因 Unigene	总数 All	29 147	13 312 286	457	503	29 147	3 497	25 650

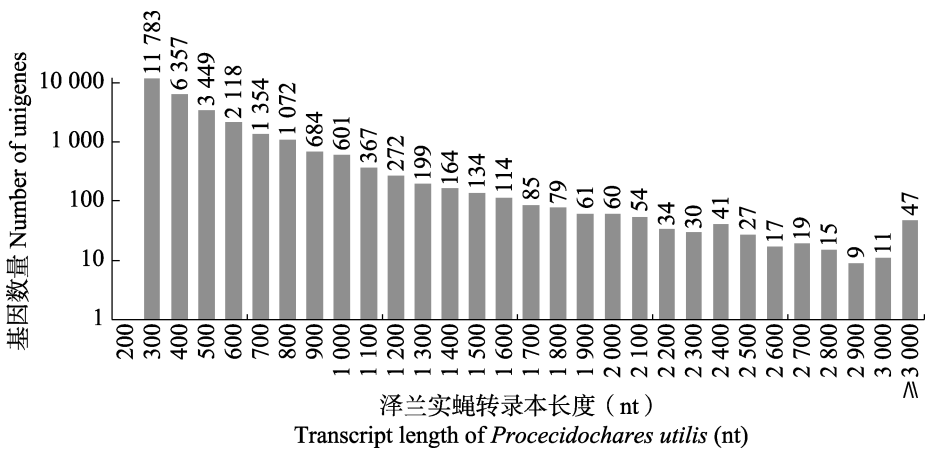


图 1 泽兰实蝇的 unigenes 长度分布统计
Fig. 1 Length distribution of unigenes of *Procecidochares utilis*

2.2 unigenes 的功能注释

表 3 显示了 unigenes 与 7 大数据库比对得到的注释信息。组装获得的 unigenes 所有数据库中都被注释到的有 19 384 条, 注释率为 66.50%。其中, NR 注释的 unigenes 最多(16 947, 58.14%), 之后依次是 NT (12 172, 41.76%)、GO (11 237, 38.55%)、SwissProt (10 946, 37.55%)、KO (9 752, 33.46%); 在 KOG 数据库中注释的最少, 为 4 689

条, 占 16.09%。泽兰实蝇转录组测序拼接的 unigenes 与 *Trypanosoma brucei gambiense* 的 unigenes 相似性较高, 达到了 11.80%; 其次与 *Drosophila virilis*、*Drosophila willistoni*、*Drosophila melanogaster*、*Drosophila mojavensis*、*Drosophila ananassae* 等基因序列对比的相似度分别为 9.70%、9.70%、8.90%、8.20% 和 6.20%; 另外与其它物种同源的基因占 39.50% (图 2)。

表 3 泽兰实蝇功能注释结果统计
Table 3 Statistics of the functional annotation of *Procecidochares utilis*

数据库 Databases	基因数量 Number of annotated unigenes	注释比例 (%) Percentage of annotated unigenes
NR 数据库注释 Annotated in NR database	16 947	58.14
NT 数据库注释 Annotated in NT database	12 172	41.76
KO 数据库注释 Annotated in KO database	9 752	33.46
SwissProt 数据库注释 Annotated in SwissProt database	10 946	37.55
GO 数据库注释 Annotated in GO database	11 237	38.55
COG 数据库注释 Annotated in COG database	4 689	16.09
所有数据库均有注释 Annotated in all databases	19 384	66.50
基因 Unigenes	29 147	100.00

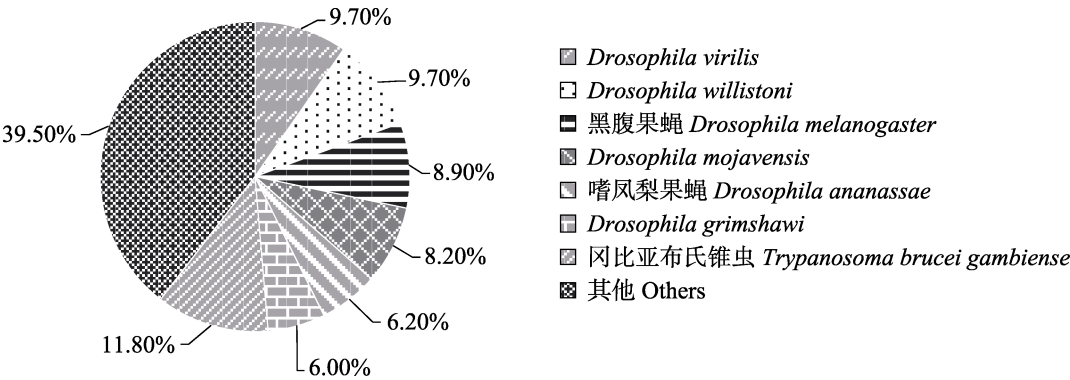


图 2 NR 数据库中注释的泽兰实蝇 unigenes
Fig. 2 Annotated unigenes of *Procecidochares utilis* in NR database

2.3 unigenes 的功能分类

泽兰实蝇雌雄成虫共有 11 237 (38.55%) 条 unigenes 注释到 GO 功能数据库中 (图 3)。其中注释到生物学过程 (Biological process) 的 unigenes 有 58 065 条, 其中细胞过程 (Cellular

process, 8 092 条)、单一生物过程 (Single-organism process, 6 494 条) 的数量最多, (Cell killing, 3 条) 的数量最少; 注释到细胞组分 (Cellular component) 的 unigenes 有 32 203 条, 其中细胞 (Cell, 6 741 条)、细胞部分 (Cell part, 6 741 条) 的数量最多, 病毒体部分 (Virion part,

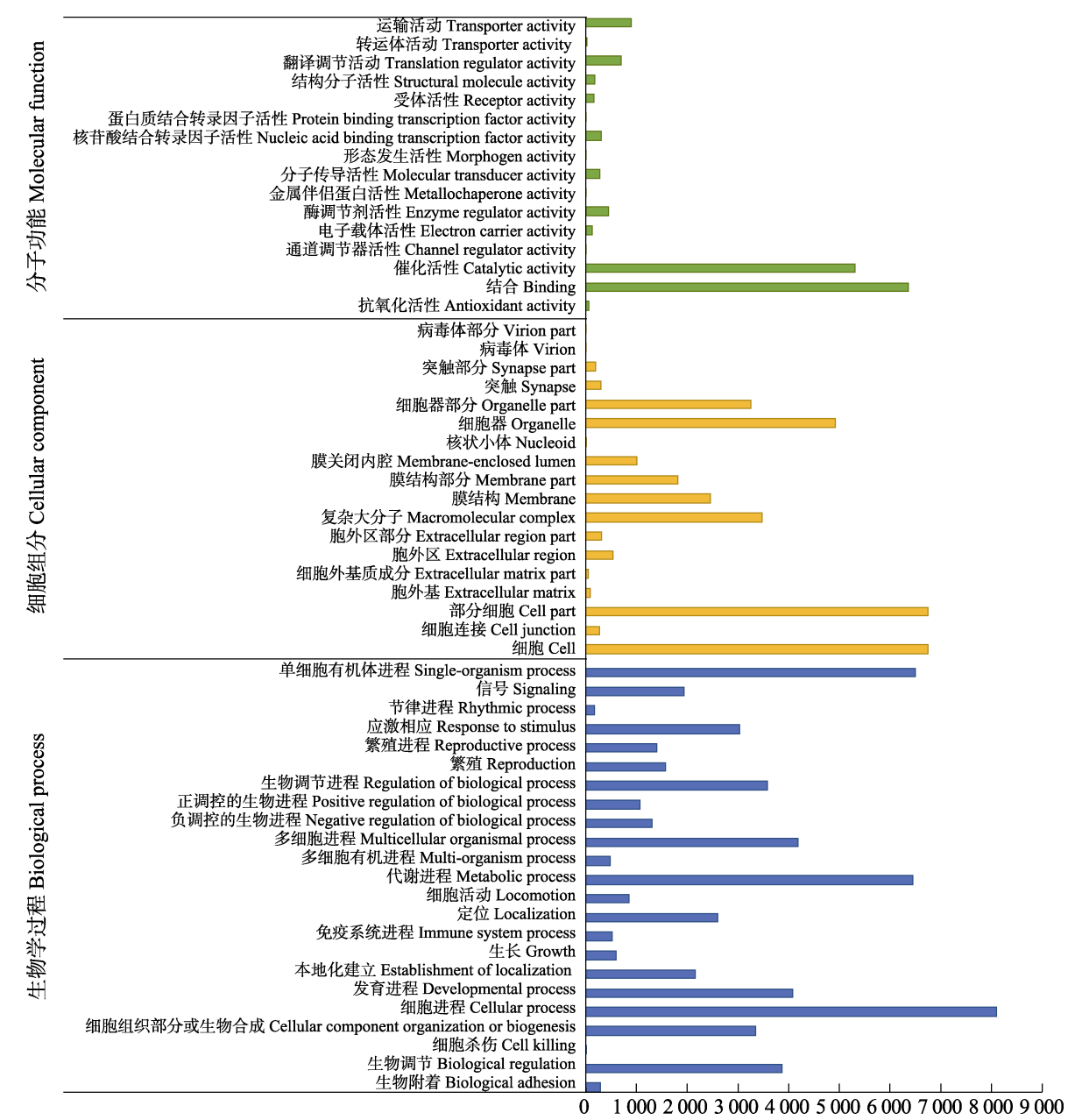


图 3 泽兰实蝇 unigenes 的 GO 分类

Fig. 3 GO categories of unigenes of *Procecidochares utilis*

4 条) 的数量最少; 注释到分子功能 (Molecular function) 的 unigenes 有 14 829 条, 在分子功能中注释到结合活性 (Binding, 6 355 条)、催化活性 (Catalytic activity, 5 303 条) 的基因最多, 营养库活性 (Nutrient reservoir activity, 5 条) 的数量最少。

经过 COG 数据库功能预测和分类, 最终有 4 689 条 unigenes 成功注释到 COG 数据库的 25 个分类中 (图 4)。其中注释到只有一般功能

(General function prediction only, R) 的 unigenes 数量最多, 为 1 283 条; 其次是参与翻译、核糖体结构和生物合成 (Translation, ribosomal structure and biogenesis, J) 的 1 018 条, 转录 (Transcription, K) 的 699 条, 参与翻译后修饰、蛋白质转换、分子伴侣 (Posttranslational modification, Protein turnover, Chaperones, O) 的 698 条; 其余的都低于 600 条, 最少的是真核生物胞外结构 (Extracellular structures, W) 的 4 条。

2.4 CDS 预测与 SSR 分析

将泽兰实蝇 unigenes 与 Nr 和 Swiss-prot 蛋白数据库进行 blast 比对, 获得了 17 113 条 CDS 序列片段, 再将比对不上的 unigenes 利用 ESTscan 分析获得 2 257 条 CDS 序列片段。在所

有得到的 19 370 条 CDS 片段中, 长度位于 200-400 nt 区间的最多, 有 11 079 条; 其次是 400-600 nt (3 152 条) 及 0-200 nt (2 909 条), 其余长度区间的 CDS 都不足 2 000 条 (图 5)。利用 MISA 软件搜索到微卫星 (Simple sequence

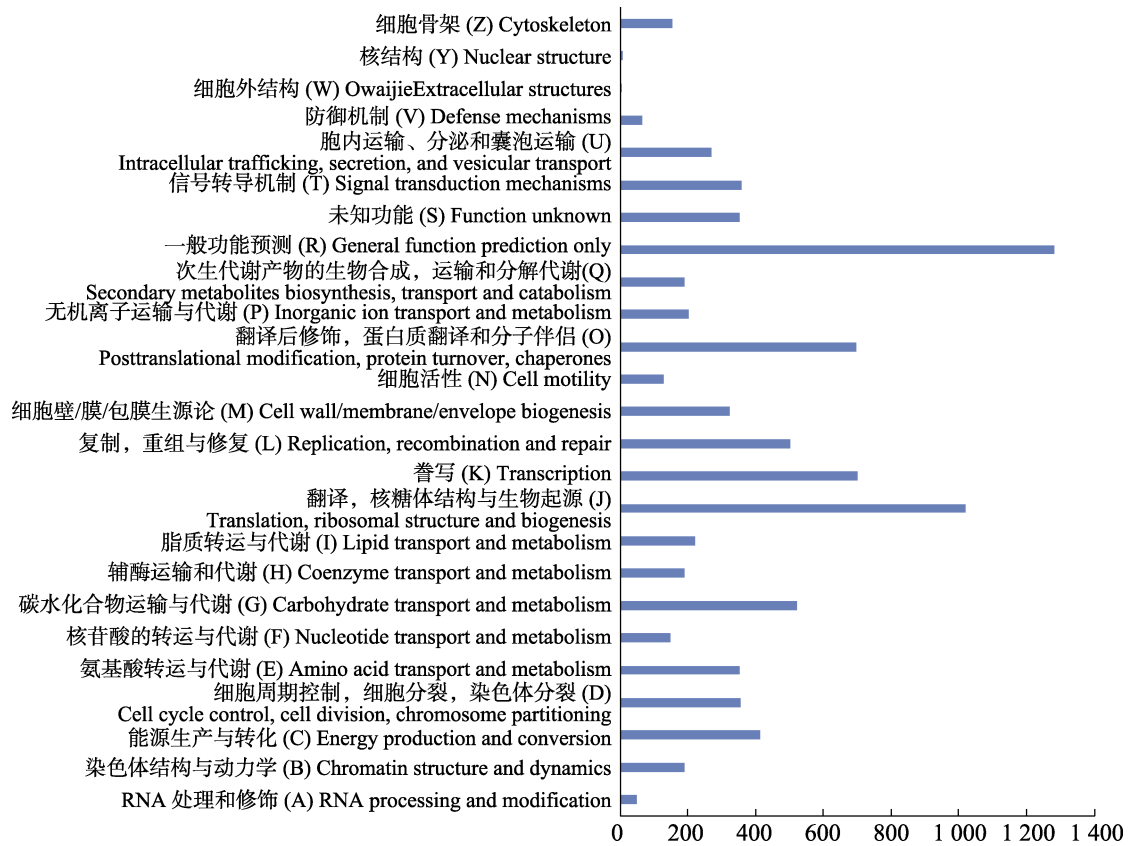


图 4 泽兰实蝇 unigenes 的 COG 分类

Fig. 4 COG categories of unigenes of *Procecidiochares utilis*

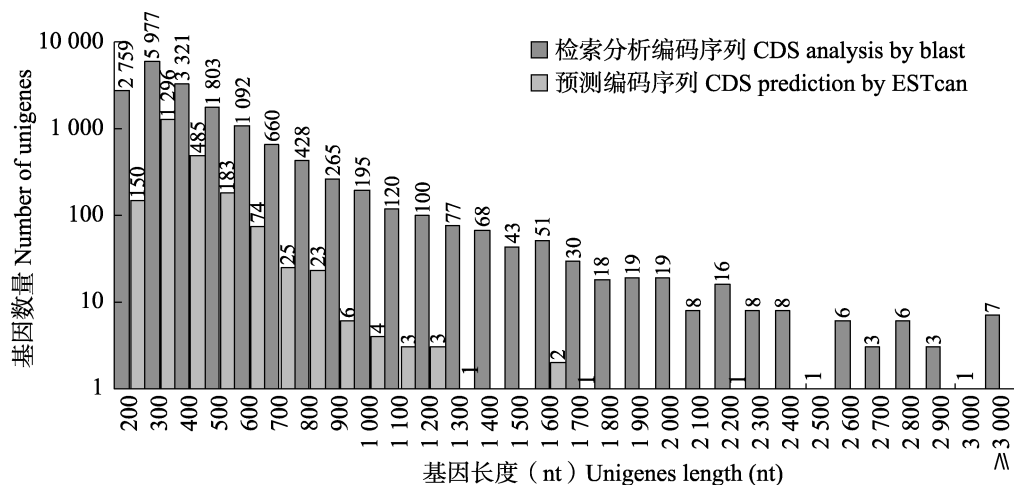


图 5 基因编码序列 (CDS) 长度分布

Fig. 5 Gene coding DNA sequence (CDS) length distribution

repeats, SSRs) 标记 5 483 个, 其中单碱基微卫星 (2 850 个, 占 51.98%) 最多; 其次是三碱基型 (1 587 个, 29.94%); 五碱基型 (60 个, 占 1.09%) 和六碱基型 (52 个, 占 0.94%) 最少 (表 4)。

表 4 泽兰实蝇SSR 分析统计结果
Table 4 Statistical results of SSR analysis of *Procecidochares utilis*

项目 Items	数量 Numbers
序列总数 Total number of sequences examined	29 147
序列总长度 Total size of examined sequences (bp)	13 312 286
识别的 SSR 总数 Total number of identified SSRs	5 483
SSR 序列数 Number of SSR containing sequences	4 365
包含 1 个以上 SSR 的序列数 Number of sequences containing more than 1 SSR	870
化合物形成中存在的 SSR 数 Number of SSRs present in compound formation	337
单体 Monomers	2 850
二聚体 Dimers	769
三聚体 Trimers	1 587
四聚体 Quadmers	165
五聚体 Pentamers	60
六聚体 Hexamers	52

2.5 差异表达基因的筛选

本研究发现泽兰实蝇的 29 147 个 unigenes 中有 11 331 个 unigenes 在雌成虫与雄成虫中的表达水平不同。泽兰实蝇雌成虫与雄成虫相比有 2 640 个表达水平上调的 unigenes, 8 691 个表达水平下调的 unigenes。利用所得数据, 以雌成虫的 FPKM 为横坐标, 雄成虫的 FPKM 为纵坐标做散点图。图 6 中红色区域表示的是上调的基因, 绿色区域代表下调的基因, 蓝色区域代表雌成虫与雄成虫中表达水平没有差异的基因, 共有 17 816 个。

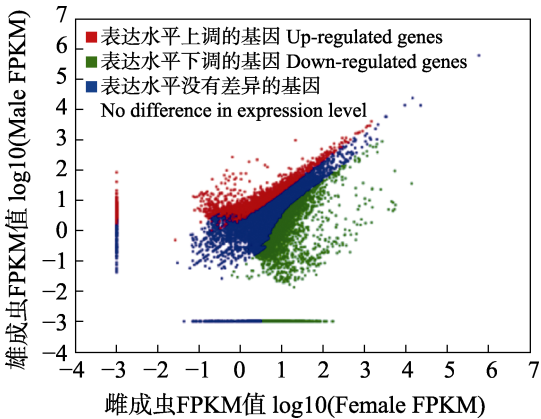


图 6 泽兰实蝇 unigene 的表达水平分析
Fig. 6 Analysis of *Procecidochares utilis* unigenes expression level

2.6 差异表达基因 GO 富集分析

本研究中共 38 848 个差异表达基因注释到 GO 功能分类中。20 461 个基因注释到生物学过程, 12 408 个基因注释到细胞组分, 5 979 个基因参与分子功能 (图 7)。GO 富集分析共获得 8 条差异显著基因: 差异基因在生物学过程中富集在细胞过程 (Cellular process, 3 126 条)、代谢过程 (Metabolic process, 2 595 条)、单有机体过程 (Single-organism process, 2 340 条); 在细胞组分中富集在细胞 (Cell, 2 667 条)、细胞部分 (Cell part, 2 667 条)、细胞器 (Organelle, 2 003 条); 在分子功能中富集在结合活性 (Binding, 2 625 条) 和催化活性 (Catalytic activity, 2 151 条)。

2.7 差异 unigenes 的代谢通路分析

KEGG 代谢通路分析共得到 3 980 个差异表达基因, 这些差异表达基因参与 250 个不同的代谢或信号通路, 在这些通路中表达发生上调或下调。其中 632 个基因参与多种物质的代谢途径 (Metabolic pathways), 216 个基因参与亨廷顿氏病 (Hunting's disease), 168 个基因参与 RNA 运输过程 (RNA transport), 161 个基因参与核糖体形成 (Ribosome), 135 个基因参与嘌呤代谢 (Purine metabolism), 133 个基因参与氧化磷酸化 (Oxidative phosphorylation), 125 个基因参与细胞周期 (Cell cycle), 99 个基因参与真核生物

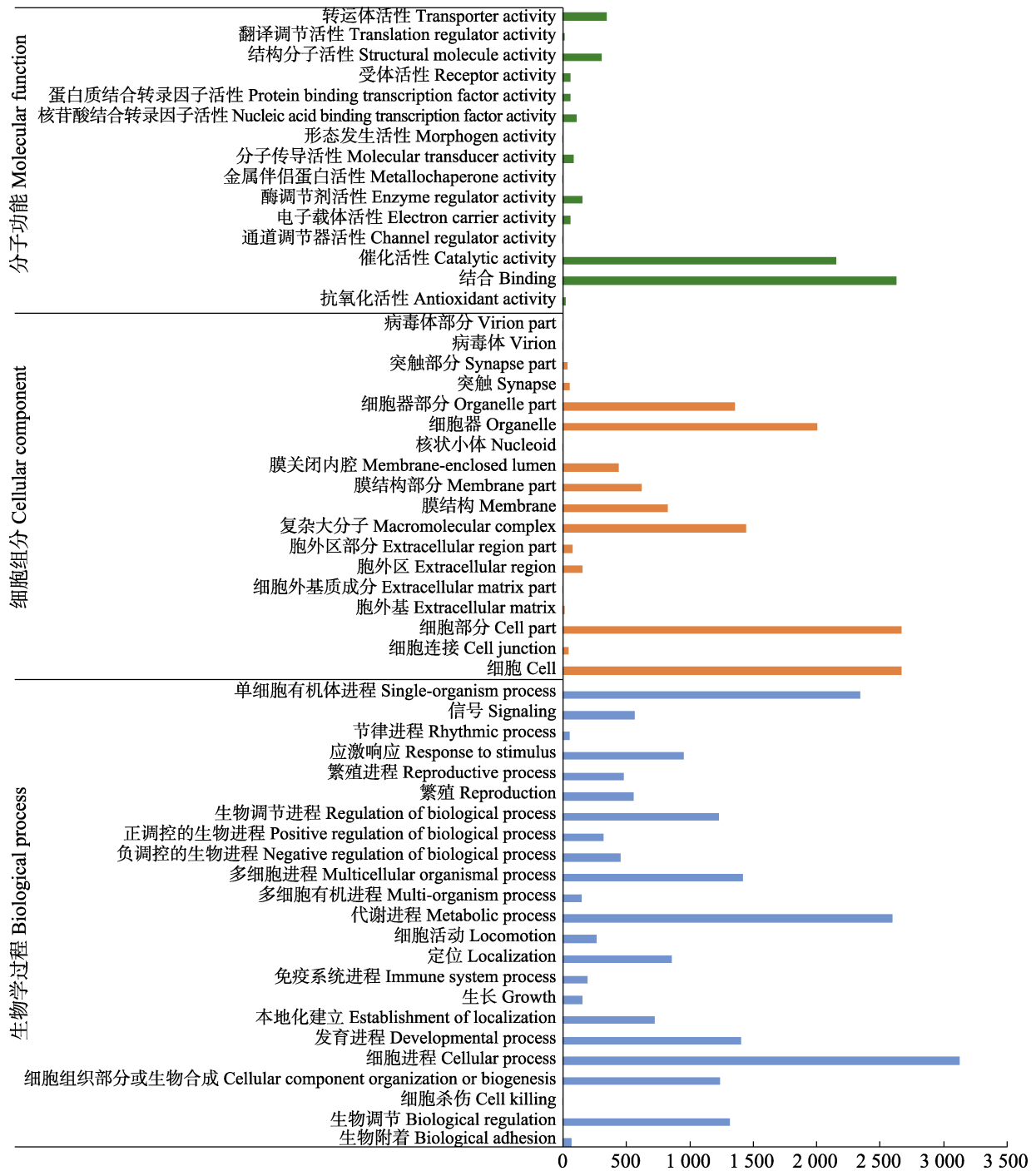


图 7 泽兰实蝇差异表达基因的 GO 分类

Fig. 7 GO categories of *Procecidochares utilis* DEGs

中的核糖体生物形成 (Ribosome biogenesis in eukaryotes)。

3 讨论

泽兰实蝇是专门寄生紫茎泽兰的昆虫,因此在控制这种杂草中起着重要作用 (王文琪等,

2006)。有许多学者研究了泽兰实蝇的生物学和生态学特性 (陈升碧和关德盛, 1994), 但是目前针对泽兰实蝇基因方面的研究较少。本研究利用 Illumina 测序技术对泽兰实蝇进行转录组测序和差异分析, 揭示了转录组的整体表达模式。通过序列的预处理、Trinity 拼接、转录本功能注释

等步骤,得到了转录组信息。数量巨大的泽兰实蝇基因数据及其功能注释信息为进一步的分子研究提供了宝贵的资源。

近年来随着高通量转录组测序技术的发展,众多的昆虫完成了转录组文库的构建,如烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Wang *et al.*, 2010)、亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* (Zhang *et al.*, 2016)、荔枝蒂蛀虫 *Conopomorpha sinensis* (孟翔等, 2016)、扶桑绵粉蚧 *Phenacoccus solenopsis* (胡俊杰等, 2017)、椰子织蛾 *Opisina areosella* (徐志文等, 2018)、云斑天牛 *Batocera horsfieldi* 成虫触角(胡佳萌等, 2019)等。昆虫基因数据的大量积累对害虫控制具有重要的推动作用,有助于研究出新的害虫控制技术,开辟出资源昆虫利用的新领域(张赞等, 2012)。本研究共获得了 29 147 条 unigenes,平均长度为 457 bp,N50 长度为 503 bp。N50 值越大就表示得到的长片段越多,且不小于 800 bp 就说明组装得到的序列完整性较好(贾新平等, 2014)。所有试验样本高质量的数据(Q20)均高于 98%,且有研究表明,序列长度是影响注释的重要因素(Chen *et al.*, 2014)。从获得基因的数量、平均长度和 N50 长度等方面均显示本次泽兰实蝇转录组的拼接效果良好。

从数据库注释上看,共计有 19 384 条 unigenes 被 Nr、Nt、Pfam、Swiss-prot、GO、KOG、KEGG 数据库成功注释,占 unigenes 总数的 60.50%。然而,由于 unigenes 整体长度较短、昆虫基因信息仍相对缺乏等原因(Qi *et al.*, 2016),仍有 9 763 条 unigenes 没有获得注释信息,这些基因的鉴定和功能分析还有待进一步的研究。虽然泽兰实蝇在 7 个数据库上均得到注释,对了解其基因功能有重要的帮助,但从数量上看,各类数据库中可注释的基因占比较少,在 16.09%-58.14%之间,说明国际公共数据库中收录的泽兰实蝇数据较少(齐润姿等, 2016)。GO 和 KEGG 注释结果为挖掘研究泽兰实蝇的基因功能提供了方便,但还需依据得到的功能分类或通路结果进行进一步的试验验证才能真正揭示相关基因的生理功能。

从遗传标记来看,本研究挖掘出大量的单核

苷酸多态性及微卫星位点信息,它们是分子标记筛选的理想工具(Weeks *et al.*, 2001)。目前,已经有很多研究者通过转录组数据库发掘分子标记(Li *et al.*, 2016),解决了传统开发分子标记的方法耗时较长、成本较高的问题。本研究将为泽兰实蝇后续的分子鉴定、多态性检测和种群遗传结构的研究奠定坚实基础。

通过泽兰实蝇雌成虫和雄成虫的差异表达分析,发现泽兰实蝇的 29 147 个 unigenes 中有 11 331 个 unigenes 在雌成虫与雄成虫中的表达水平不同。数据统计发现有 2 640 个表达水平上调的 unigenes,8 691 个表达水平下调的 unigenes。GO 富集分析中,差异基因主要富集在细胞过程,代谢过程,细胞,细胞部分和结合活性。KEGG 代谢通路分析 3 980 个差异表达基因参与 250 个不同的代谢或信号通路。

参考文献 (References)

- Bennett PH, Vanstaden J, 1986. Gall formation in crofton weed, *Eupatorium adenophorum* Spreng (syn. *Ageratina adenophora*) by the *Eupatorium* gall fly *Procecidochares utilis* Stone (Diptera: Trypetidae). *Australia Journal of Botany*, 34(4): 473–480.
- Buccellato L, Byrne MJ, Witkowski ETF, 2012. Interactions between a stem gall fly and a leaf-spot pathogen in the biological control of *Ageratina adenophora*. *Biological Control*, 61(3): 222–229.
- Chen SB, Guan DS, 1994. Biological character observation and biological control of *Procecidochares utilis* Stone. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 7(4): 98–102. [陈升碧, 关德盛, 1994. 泽兰实蝇生物学特性观察及生物防治. 西南农业学报, 7(4): 98–102.]
- Chen XD, He DY, 1990. Study on the strategy of biological control of *Eupatorium adenophorum* by using *Procecidochares utilis*. *Journal of Applied Ecology*, 1(4): 315–321. [陈旭东, 何大愚, 1990. 利用泽兰实蝇控制紫茎泽兰的生防策略研究. 应用生态学报, 1(4): 315–321.]
- Chen EH, Wei DD, Shen GM, Yuan GR, Bai PP, Wang JJ, 2014. De novo characterization of the *Dialeurodes citri* transcriptome: Mining genes involved in stress resistance and simple sequence repeats (SSRs) discovery. *Insect Molecular Biology*, 23(1): 52–66.
- Fowler SV, Syrett P, Hill RL, 2000. Success and safety in the biological control of environmental weeds in New Zealand.

- Austral Ecology*, 25(5): 553–562.
- Gao X, Ma S, Wang JR, Ye M, Li ZY, Wu GX, 2013. Structure and development of internal reproductive organs in *Procecidochares utilis* Stone (Diptera: Tephritidae). *Journal of Biosafety*, 22(1): 61–65. [高熹, 马沙, 汪金蓉, 叶敏, 李正跃, 吴国星, 2013. 泽兰实蝇内生生殖器官的结构及其发育状况. 生物安全学报, 22(1): 61–65.]
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng Q, Chen Z, Mauceli E, Hacohen N, Gnirke A, Rhind N, di Palma F, Birren BW, Nusbaum C, Lindblad-Toh K, Friedman N, Regev A, 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, 29(7): 644–652.
- Guo J, Lü F, Yan NS, Chen B, Li ZY, Sun YX, 2008. Reproductive behavior of crofton weed gall fly. *Journal of Jilin Agricultural University*, 30(1): 4–7. [郭俊, 吕芳, 严乃胜, 陈斌, 李正跃, 孙跃先, 2008. 泽兰实蝇生殖行为的研究. 吉林农业大学学报, 30(1): 4–7.]
- Gu XY, Liu LJ, Su Y, Zhao Y, Guo SK, Li ZH, 2018. A review of transcriptome sequencing in Tephritidae. *Journal of Plant Protection*, 45(3): 399–408. [顾欣悦, 柳丽君, 粟耘, 赵岩, 郭韶堃, 李志红, 2018. 实蝇科昆虫转录组研究进展. 植物保护学报, 45(3): 399–408.]
- Hu JJ, Meng X, Zhou JB, Yang LX, Liu RH, Li RZ, 2017. Transcriptome analysis of the cotton mealybug, *Phenacoccus solenopsis* (Hemiptera: Pseudococcidae). *Acta Entomologica Sinica*, 60(1): 9–17. [胡俊杰, 孟翔, 周佳滨, 杨陆兴, 刘善海, 李润钊, 2017. 扶桑绵粉蚧转录组分析. 昆虫学报, 60(1): 9–17.]
- Hu JM, Xu DP, Zhuo ZH, Yang W, Yang Y, Zheng YR, 2019. Analysis of antennal transcriptome and olfaction-related genes of adult *Batocera horsfieldi* (Hope). *Chinese Journal of Applied Entomology*, 56(5): 1037–1047. [胡佳萌, 徐丹萍, 卓志航, 杨伟, 杨桦, 郑奕然, 2019. 云斑天牛成虫触角转录组及嗅觉相关基因分析. 应用昆虫学报, 56(5): 1037–1047.]
- Jiang LN, Mu L, Sun A, Yue Y, Liu MR, Gui FR, 2019. Effects of parasitism of eupatorium gall fly *Procecidochares utilis* on the growth and host defense of *Ageratina adenophora*. *Journal of Plant Protection*, 46(1): 56–62. [姜丽娜, 木霖, 孙昂, 岳英, 刘梦然, 桂富荣, 2019. 泽兰实蝇寄生对紫茎泽兰生长和防御能力的影响. 植物保护学报, 46(1): 56–62.]
- Jia XP, Ye XQ, Liang LJ, Deng YM, Sun XB, She JM, 2014. Transcriptomic study of *Paspalum vaginatum* based on high-throughput sequencing. *Acta Prataculurae Sinica*, 23(6): 242–252. [贾新平, 叶晓青, 梁丽建, 邓衍明, 孙晓波, 余建明, 2014. 基于高通量测序的海滨雀稗转录组学研究. 草业学报, 23(6): 242–252.]
- Jin YL, Cong B, Wang LY, Gao YG, Zhang HY, Dong H, Lin ZW, 2016. Differential gene expression analysis of the *Epacromius coerulipes* (Orthoptera: Acrididae) transcriptome. *Insect Science*, 16(1): 42.
- Lan MX, Ma S, Zhang M, Hao KQ, Lu WF, Wu GX, Gao X, 2017. *Procecidochares utilis* Stone: A review. *Journal of Southern Agriculture*, 48(3): 459–464. [兰明先, 马沙, 张某某, 郝凯强, 鲁武锋, 吴国星, 高熹, 2017. 泽兰实蝇研究进展. 南方农业学报, 48(3): 459–464.]
- Li AF, Gao XM, Dang WG, Huang RX, Deng ZP, Tang HC, 2006. Parasitism of *Procecidochares utilis* and its effect on growth and reproduction of *Eupatorium adenophorum*. *Journal of Plant Ecology*, 30(3): 496–503. [李爱芳, 高贤明, 党伟光, 黄荣祥, 邓祖平, 唐和春, 2006. 泽兰实蝇寄生状况及其对紫茎泽兰生长与生殖的影响. 植物生态学报, 30(3): 496–503.]
- Li CY, Chiang TY, Chiang YC, Hsu HM, Ge XJ, Huang CC, Chen CT, Hung KH, 2016. Cross-species, amplifiable EST-SSR markers for amentotaxus species obtained by next-generation sequencing. *Molecules*, 21(1): 67–76.
- Li LF, Lan MX, Lu WF, Li ZB, Xia T, Zhu JY, Ye M, Gao X, Wu GX, 2018. De novo transcriptomic analysis of the alimentary tract of the tephritid gall fly, *Procecidochares utilis*. *PLoS ONE*, 13(8): e0201679.
- Liu Q, 2017. Effects of *Procecidochares utilis* on parasitism, height and reproductive performance of *Eupatorium adenophorum*. *Guizhou Agricultural Sciences*, 45(8): 34–37. [柳青, 2017. 泽兰实蝇对紫茎泽兰寄生及株高与繁殖性能的影响. 贵州农业科学, 45(8): 34–37.]
- Liu WY, Liu LH, He AJ, 1991. The effect of *Procecidochares utilis* on growth and development, distribution of biomass of *Eupatorium adenophorum*. *Acta Ecologica Sinica*, 11(3): 291–293. [刘文耀, 刘伦辉, 和爱军, 1991. 泽兰实蝇对紫茎泽兰生长发育及生物量分配影响的研究. 生态学报, 11(3): 291–293.]
- Lu P, Sang WG, Ma KP, 2006. Effects of environmental factors on germination and emergence of crofton weed (*Eupatorium adenophorum*). *Weed Science*, 54(3): 452–457.
- Lü HJ, 2012. Transcriptome compare between adult and nymph of *Oxya chinensis* and the construction of their transcript map. Master dissertation. Xian: Shaanxi Normal University. [吕红娟, 2012. 中华稻蝗若虫和成虫转录组的比较研究及线粒体转录组作图. 硕士学位论文. 西安: 陕西师范大学.]
- Ma S, Gao X, Zhu JY, Wu GX, Wang JR, Ye M, Xiao C, Li ZY, 2012a. Effects of temperature and supplementary nutrients on the life span of adult *Procecidochares utilis* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Biosafety*, 21(3): 74–77. [马沙, 高熹, 朱家颖, 吴国

- 星, 汪金蓉, 叶敏, 肖春, 李正跃, 2012a. 温度及补充营养物质对泽兰实蝇寿命的影响. *生物安全学报*, 21(3): 74–77.]
- Ma S, Wu GX, Zhu JY, Wang JR, Gao X, Ye M, Xiao C, Li ZY, 2012b. Effects of supplying hydromel and mating behavior on life-span of *Procecidochares utilis* adults. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 24(2): 83–85. [马沙, 吴国星, 朱家颖, 汪金蓉, 高熹, 叶敏, 肖春, 李正跃, 2012b. 补充蜂蜜水及交配行为对泽兰实蝇成虫寿命的影响. *江西农业学报*, 24(2): 87–89.]
- Meng X, Hu JJ, Liu H, Ou YGC, Guo MF, 2016. Analysis of the transcriptome and olfaction-related genes of *Conopomorpha sinensis* Bradley (Lepidoptera: Gracilariidae). *Acta Entomologica Sinica*, 59(8): 823–830. [孟翔, 胡俊杰, 刘慧, 欧阳革成, 郭明昉, 2016. 荔枝蒂蛀虫转录组及嗅觉相关基因分析. *昆虫学报*, 59(8): 82–830.]
- Qi LX, Fang Q, Zhao L, Xia H, Zhou YX, Xiao JH, Li K, Ye GY, 2016. De novo assembly and developmental transcriptome analysis of the small white butterfly *Pieris rapae*. *PLoS ONE*, 11(7): 1–18.
- Qi RZ, Gao XM, Wei DD, 2016. Transcriptome analysis of *Periplaneta fuliginosa* Serville. *Chinese Frontier Health Quarantine*, 39(5): 319–323. [齐润姿, 高雪萌, 魏丹丹, 2016. 基于高通量测序的黑胸大蠊转录组分析. *中国国境卫生检疫杂志*, 39(5): 319–323.]
- Rahman O, Agarwal ML, 1990. Biological control of crofton weed (*Eupatorium adenophorum* Sprengel) by a fruit fly *Procecidochares utilis* Stone in eastern Himalayas. *Indian Journal of Weed Science*, 22(1/2): 98–101.
- Sang WG, Zhu L, Axmacher JC, 2012. Invasion pattern of *Eupatorium adenophorum* Spreng in southern China. *Biological Invasions*, 12(6): 1721–1730.
- Sun J, Wang HL, Wang DH, Xu B, 2003. Overview of *Eupatorium adenophorum* Spreng control. *Yunnan Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, (4): 11–13. [孙劲, 王海龙, 王甸洪, 徐彪, 2003. 紫茎泽兰防治概述. *云南畜牧兽医*, (4): 11–13.]
- Wan F, Liu W, Guo J, Qiang S, Li B, Wang J, Yang G, Niu H, Gui F, Huang W, Jiang Z, Wang W, 2010. Invasive mechanism and control strategy of *Ageratina adenophora* (Sprengel). *Science China Life Sciences*, 53(11): 1291–1298.
- Wang JX, Gao X, Ma S, Wu GX, 2013. Bioconcentration effects of Cd, Pb and Zn in soil-*Eupatorium adenophorum* Spreng-*Procecidochares utilis* Stone system. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 21(7): 877–882. [王吉秀, 高熹, 马沙, 吴国星, 2013. Cd、Pb 和 Zn 在土壤-紫茎泽兰-泽兰实蝇系统中的生物富集效应研究. *中国生态农业学报*, 21(7): 877–882.]
- Wang WQ, Wang JJ, Zhao ZM, 2006. Effects of parasitizing on the sexual reproduction of *Eupatorium adenophorum* Sprengel by *Procecidochares utilis* Stone at different microhabitats. *Acta Phytophylacica Sinica*, 33(4): 391–395. [王文琪, 王进军, 赵志模, 2006. 不同微生境中泽兰实蝇寄生对紫茎泽兰有性繁殖的影响. *植物保护学报*, 33(4): 391–395.]
- Wang XW, Luan JB, Li JM, Bao YY, Zhang CX, Liu SS, 2010. De novo characterization of a whitefly transcriptome and analysis of its gene expression during development. *BMC Genomics*, 24(11): 400.
- Weeks AR, Marec F, Breeuwer JA, 2001. A mite species that consists entirely of haploid females. *Science*, 292(5526): 2479–2482.
- Xu ZW, Ren XM, Wang J, Zhang ZQ, Liu NY, Yan W, Zhu JY, 2018. Transcriptome analysis of *Opisina arenosella*. *Journal of Southwest Forestry University*, 38(5): 44–51. [徐志文, 任雪敏, 王俊, 张枝全, 刘乃勇, 阎伟, 朱家颖, 2018. 椰子织蛾转录组分析. *西南林业大学学报*, 38(5): 44–51.]
- Yue GD, Gao Q, Luo LH, Wang JY, Xu JH, Yin Y, 2012. Application of high-throughput sequencing technology in animal and plant research. *Scientia Sinica Vitae*, 42(2): 107–124. [岳桂东, 高强, 罗龙海, 王军一, 许姣卉, 尹烨, 2012. 高通量测序技术在动植物研究领域中的应用. *中国科学: 生命科学*, 42(2): 107–124.]
- Zhang QL, Yuan ML, 2013. Progress in insect transcriptomics based on the next-generation sequencing technique. *Acta Entomologica Sinica*, 56(12): 1489–1508. [张麒麟, 袁明龙, 2013. 基于新一代测序技术的昆虫转录组学研究进展. *昆虫学报*, 56(12): 1489–1508.]
- Zhang T, He K, Wang Z, 2016. Transcriptome comparison analysis of *Ostrinia furnacalis* in four developmental stages. *Scientific Reports*, 6(1): 1–9.
- Zhang Z, Liu JD, Huang SQ, Li F, 2012. Application of bioinformatics in entomology. *Chinese Journal of Entomology*, 49(1): 1–11. [张赞, 刘金定, 黄水清, 李飞, 2012. 生物信息学在昆虫学研究中的应用. *应用昆虫学报*, 49(1): 1–11.]
- Zhang ZY, Wei Y, He DY, 1988. Biology of a gall fly, *Procecidochares utilis* and its impact on crofton weed, *Eupatorium adenophorum*. *Chinese Journal of Biological Control*, 4(1): 10–13. [张智英, 魏艺, 何大愚, 1988. 泽兰实蝇生物学特性的初步研究. *生物防治通报*, 4(1): 10–13.]
- Zhao YJ, Yang XJ, Xi XQ, Gao XM, Sun SC, 2012. Phenotypic plasticity in the invasion of crofton weed (*Eupatorium adenophorum*) in China. *Weed Science*, 60(3): 431–439.