



研究论文

稻纵卷叶螟几丁质合成酶及合成通路 相关酶基因的鉴定及表达分析*

余海中^{1**} 黄克慧^{1**} 汪婉玲² 刘明辉³
杨鑫¹ 张彦³ 徐家萍^{1***}

(1. 安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230036; 2. 安徽省农科院水稻研究所, 合肥 230031;
3. 安徽省农科院蚕桑研究所, 合肥 230031)

摘要 【目的】稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) 是水稻上的四大害虫之一, 危害较为严重, 近年来以几丁质合成和代谢过程作为害虫防治的靶标研究已成为热点。为阐明几丁质合成酶及合成通路上关键酶的作用, 本研究开展了对稻纵卷叶螟几丁质合成酶及合成相关通路上关键酶的克隆及时空表达分析。【方法】本研究基于稻纵卷叶螟转录组, 结合 PCR 及 RACE 技术, 克隆了几丁质合成酶代谢通路上的 4 条基因的 cDNA 全长; 利用生物信息学软件对序列进行结构预测、序列比对和进化分析; 采用实时定量 PCR 技术研究了 4 条基因在不同虫态和幼虫的不同组织中的表达情况。【结果】获得了 2 条几丁质合成酶序列及 2 条合成通路上的基因序列, 包括几丁质合成酶 A (Chitin synthase A, CHSA), 几丁质合成酶 B (Chitin synthase B, CHSB), N-乙酰葡萄糖胺磷酸变位酶 (Phosphoacetylglucosamine mutase, PGM 和 UDP-N-乙酰葡萄糖焦磷酸化酶 (UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase, UAP), 并分别命名为 *CmCHSA*、*CmCHSB*、*CmPGM* 和 *CmUAP*; 序列分析显示 *CmCHSA* 序列全长 4 868 bp, 编码 1 564 个氨基酸。*CmCHSB* 序列全长 4 651 bp, 编码 1 525 个氨基酸。*CmPGM* 全长 1 934 bp, 编码 548 个氨基酸。*CmUAP* 序列全长 1 837 bp, 编码 487 个氨基酸。实时定量研究表明, *CmUAP* 和 *CmPGM* 在血淋巴中表达量最高, *CmCHSA* 在头部和表皮中表达量较高, 而 *CmCHSB* 在中肠中表达量最高。【结论】本研究得到了稻纵卷叶螟几丁质合成路径的 4 个关键酶基因 cDNA 全长, 它们在稻纵卷叶螟的不同组织和虫态中呈现了差异显著的时空表达, 本文为进一步探究稻纵卷叶螟的几丁质合成酶的生理功能和几丁质的合成代谢途径奠定了基础。
关键词 稻纵卷叶螟, *CmCHSA*, *CmCHSB*, *CmUAP*, *CmPGM*, 鉴定, 几丁质合成, 生物信息学分析

Identification and expression analysis of chitin synthase and related enzymes in the chitin biosynthetic pathway genes of *Cnaphalocrocis medinalis*

YU Hai-Zhong^{1**} HUANG Ke-Hui^{1**} WANG Wan-Ling² LIU Ming-Hui³
YANG Xin¹ ZHANG Yan³ XU Jia-Ping^{1***}

(1. School of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036; 2. Rice Research Institute, Anhui Agricultural Sciences, Hefei 230031; 3. Sericultural Research Institute, Hefei 230031)

Abstract 【Objectives】The rice leaf folder, *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée), is one of four rice pest insects that cause serious crop damage. In recent years, chitin synthesis and metabolism has become a focus of pest control research. Cloning and

* 资助项目 Supported projects: 国家 863 计划 (2011AA100306); 国家自然科学基金项目 (31472148); 安徽省国际科技合作项目 (1403062018)

**共同第一作者 Co-first authors, E-mail: yuhaizhong1988@163.com; hkh1122hkh@163.com

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

收稿日期 Received: 2015-01-28, 接受日期 Accepted: 2015-05-11

spatio-temporal expression of two chitin synthases, and other two key enzymes in the chitin biosynthetic pathway encoding genes in *C. medinalis*, were conducted to reveal the function of these genes. [Methods] Based on transcriptome data, we used the PCR and RACE techniques to clone the full length cDNA sequences of 4 key enzymes in the chitin biosynthetic pathway. Prediction of the structure, sequence alignment and phylogenetic analysis of the products of these 4 genes were performed using different bioinformatics software. The relative expression levels of the 4 genes in different developmental stages and larval tissues of *C. medinalis* were determined with quantitative Real-time PCR. [Results] Two full-length cDNA sequences encoding chitin synthase, and two full-length cDNA sequences encoding other two key enzymes related to the chitin biosynthetic pathway, were obtained. These were; *Chitin Synthase A (CHSA)*, *Chitin Synthase B (CHSB)*, *Phosphoacetylglucosamine Mutase (PGM)* and *UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase (UAP)* (hereafter *CmCHSA*, *CmCHSB*, *CmPGM* and *CmUAP*, respectively). Sequence analysis shows that the full length of the *CmCHSA* gene is 4 868 bp, which encodes a polypeptide of 1 564 amino acids, the full length of the *CmCHSB* gene is 4 651 bp, which encodes a polypeptide of 1 525 amino acids, the full length of *CmPGM* gene is 1 934 bp, which encodes a polypeptide of 548 amino acids, and the full length of *CmUAP* gene is 1 837 bp, which encodes a polypeptide of 487 amino acids. The results of RT-qPCR indicate that *CmUAP* and *CmPGM* had higher expression in hemolymph, whereas *CmCHSA* was more highly expressed in the head and integument than the midgut and *CmCHSB* was more highly expressed in the midgut than in other tissues. [Conclusion] Four key chitin biosynthetic pathway genes were cloned in *C. medinalis*. These have significantly different spatio-temporal expression patterns in different developmental and tissues. This work lays a foundation for future research on the function of CmCHS and the chitin biosynthetic pathway.

Key words *Cnaphalocrocis medinalis*, *CmCHSA*, *CmCHSB*, *CmUAP*, *CmPGM*, identify, bioinformatics analysis, chitin biosynthesis

稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenee) 是水稻上的一种重要害虫, 广泛分布在亚洲的主要水稻产区 (Zhang *et al.*, 1980; Chen, 1985)。自 20 世纪 90 年代以来, 该虫在我国多次暴发成灾, 给我国的水稻生产造成严重危害 (Zhai and Cheng, 2006)。目前, 稻纵卷叶螟的防治主要依赖化学农药, 然而大量、长期使用杀虫剂不但对人类健康有潜在危害, 而且造成环境污染。研究绿色新型农药已成当务之急。

几丁质是一种自然界广泛存在的直链多糖 (Spindler *et al.*, 1990), 广泛存在于真菌隔片、细胞壁以及甲壳动物和节肢动物角质层和围食膜基质中 (Merzendorfer and Zimoch, 2003)。在昆虫中, 几丁质是重要的结构组成成分, 一般以三种形式构成几丁质微丝, 包括 α -几丁质、 β -几丁质和 γ -几丁质 (Merzendorfer, 2006), 它们存在于昆虫表皮、中肠、围食膜和气管上皮中。在昆虫的外骨骼中, 以强度最高的 α -几丁质为主要的结构成分, 起到支撑作用, 其含量最多可以占干重的 40%, 虽然随着生理周期其含量会有所波动 (Kramer *et al.*, 1995)。而在围食膜中, 具有一定柔性的 β -几丁质和 γ -几丁质为其中几

丁质的主要构成成分。围食膜中的几丁质可以保护昆虫免受微生物侵染、物理应力损伤和化学侵蚀 (Tellam *et al.*, 2000)。由于几丁质在昆虫生长发育过程起着关键性的作用, 同时并不存在于高等动植物体内, 因此人们把几丁质代谢中必需的关键酶作为潜在的绿色农药靶标进行研究。

几丁质在体内的合成是一个非常复杂的过程, 从海藻糖到几丁质的合成途径中, 至少有 8 种酶参与 (Candy and Kilby, 1962; Jaworski, 1963; Merzendorfer and Zimoch, 2003), 其中最重要的酶是在最后一步把 UDP-N-acetylglucosamine 催化成为几丁质的几丁质合成酶 (CHS) (Cohen *et al.*, 2001), 而 UDP-N-acetylglucosamine 是由 Phosphoacetylglucosamine mutase (PGM) 和 UDP-N-acetyl-glucosamine pyrophosphorylase (UAP) 相继催化 N-acetyl-glucosamine-6-phosphate 和 N-acetyl-glucosamine-1-phosphate 而来 (Peneff *et al.*, 2001)。因此在几丁质合成的路径中, CHS、UAP 和 PGM 都是非常关键的酶。

几丁质合成酶 (CHS) 属于糖基转移酶家族成员, 是一个分子量超过 170 kDa 的含有多个跨

膜螺旋结构的蛋白, 整合于细胞膜结构中。自 2000 年从铜绿蝇 *Lucilia cuprina* 中第一个得到几丁质合成酶的基因序列以来 (Tellam *et al.*, 2000), 目前已经有烟草天蛾 *Manduca sexta*、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*、草地夜蛾 *Spodoptera frugiperda*、云杉卷叶蛾 *Choristoneura fumiferana*、亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 以及小菜蛾 *Plutella xylostella* 等数十种昆虫的几丁质合成酶相继被克隆并被登录在 GenBank 上 (Lu *et al.*, 2008)。几丁质合成酶基因根据序列分析结果可以分为两类: *CHSA* 和 *CHSB*, 它们分别负责编码不同的几丁质合成酶 (Merzendorfer, 2006)。*CHSA* 和 *CHSB* 的同源性较高而且具有一些共同的基本属性, 比如它们都有 16~17 个跨膜结构域, 都含有“DXD”EDR”CATMWHXT”和“QRRRW”等特征基序, 这些特征基序有和二价阳离子结合、催化, 以及与底物结合等功能 (Merzendorfer, 2006)。然而它们在昆虫生长发育中的作用不同。*CHSA* 参与昆虫的多个生理过程, 在不同的发育时期和不同的组织中都存在。在果蝇 *Drosophila metamorphosis* 中, *DmCHSA* 对于胚胎发育过程中形成气管及头部骨骼起着极其重要的作用 (Macauley *et al.*, 2005)。*DmCHSA* 在幼虫蜕皮和成蛹过程中表达量很高 (Gagou *et al.*, 2002)。在烟草天蛾 *Manduca sexta* 中, *MsCHSA* 主要在幼虫蜕皮期和蛹中期表达 (Zhu *et al.*, 2002)。通过免疫印记、原位杂交以及 RT-PCR 证明, 烟草天蛾中的 *MsCHSA* 主要在表皮、腺体和气管中表达 (Zimoch and Merzendorfer, 2002)。在甜菜夜蛾中 *Spodoptera exigua*, 通过免疫组化和 RT-PCR 研究同样证明 *SeCHSA* 主要在蜕皮过程的表皮中进行表达 (Chen *et al.*, 2007)。相比 *CHSA*, *CHSB* 参与的昆虫生理过程较为单一, 只在进食期的中肠中表达, 果蝇的 *DmCHSB* 主要在进食期表达 (Gagou *et al.*, 2002)。在赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 中, *TcCHSB* 主要在进食期和成虫中表达 (Arakane *et al.*, 2004)。对于甜菜夜蛾 (Chen *et al.*, 2008), 草地夜蛾 (Bolognesi *et al.*, 2005) 中 *CHSB* 的研究同样表明其主要在中肠中发挥作用。

UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase (UAP) 作为几丁质合成路径上的关键酶, 近年来也逐渐开始被研究, 许多昆虫已经通过基因组测序得到 UAP 的基因序列, 如黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、埃及伊蚊 *Aedes aegypti*、家蚕 *Bombyx mori*、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 等 (Arakane *et al.*, 2011)。*UAP* 基因具有 17 个保守的氨基酸的底物结合位点 (Liu *et al.*, 2013) 对赤拟谷盗 *TcUAP* 基因进行 RNA 干扰 (RNAi), 发现赤拟谷盗由于几丁质合成不足而死亡 (Arakane *et al.*, 2011)。同样的结论也出现在对果蝇突变体的研究中, 果蝇 *DmUAP* 基因突变体存在许多缺陷, 主要是角质层和气管形态的缺陷, 导致缺陷的原因主要是几丁质含量的减少 (Araujo *et al.*, 2005; Schimmelpfeng *et al.*, 2006)。

Phosphoacetylglucosamine Mutase (PGM) 同样是几丁质合成路径上的关键酶, 在几丁质的合成途径中催化产生 UAP 的底物 N-acetyl-glucosamine-6-phosphate, 果蝇的 PGM 突变体被发现蛋白质 O-糖基化受到阻断, 不能正常形成几丁质合成酶的底物 UDP-GlcNAc (Mariappa *et al.*, 2013)。

本研究通过转录组测序结合 PCR 及 RACE 技术, 首次获得了两个稻纵卷叶螟几丁质合成酶基因, 并同时获得了稻纵卷叶螟几丁质合成路径上两个关键基因 *CmUAP* 和 *CmPGM*, 并通过实时荧光定量 PCR 的方法分析了 4 个基因在不同组织和虫态中的表达情况, 为进一步研究昆虫的几丁质合成路径中各种基因的功能奠定了基础, 同时也对开发绿色新型生物杀虫剂提供了新的思路。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫及组织收集

稻纵卷叶螟采集自安徽省农科院水稻所试验田, 分别取 4 龄幼虫头部、脂肪体、中肠、表皮、血液等组织, 并用液氮迅速冷冻, 置于 -80℃ 保藏待用。

1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

以 Trizol 试剂 (Invitrogen) 提取 1.1 节中收集的稻纵卷叶螟不同组织的总 RNA, 详细操作参照 Trizol 试剂说明书进行。100 mg 组织液氮研磨后加入 1 mL Trizol, 提取的总 RNA 质量和浓度通过琼脂糖凝胶电泳检测。将总 RNA 使用 PrimeScriptTM 1st Strand cDNA synthesis Kit 反转录试剂盒 (TaKaRa) 处理, 并按照该试剂盒说明书完成 cDNA 第一链的合成, 以此作为 PCR 模板。

1.3 引物设计

在实验前期, 本课题组对稻纵卷叶螟进行了转录组测序, 根据转录组数据库中得到的序列片段进行拼接得到 *CmCHSB* 与 *CmPGM* 的基因序列全长, 并对转录组中缺失 3' 端的 *CmUAP* 基因序列设计 RACE 引物, 对两端完整缺失而部分中间序列片段的 *CmCHSA* 设计 PCR 引物, 得到 *CmUAP* 与 *CmCHSA* 基因全长。然后根据得到的 4 个基因序列全长, 设计特异引物用于荧光定量 RT-qPCR, 选择稻纵卷叶螟 β -actin (*Cm β -actin*, Genbank 登录号: JN029806.1) 作为内参基因, 实验中的引物全部使用 Primer Premier 5 软件设

计, 委托上海生工生物工程股份有限公司合成。引物序列见表 1。

1.4 基因全长 cDNA 克隆

CmCHSA 缺失基因片段的补齐采用 PCR 扩增的方式。在无菌 PCR 管中加入依次加入 2.5 μ L 10 $\times$ Taq Buffer, 2 μ L dNTPs, 1 μ L cDNA 模板, 上下游引物各 1 μ L, 0.25 μ L Taq 酶, 用 ddH₂O 补齐至 25 μ L。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 98 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 反应 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

RACE: 根据转录组得到的 *CmUAP* 基因片段, 设计 3' 端的 RACE 引物, 使用的 RACE 试剂盒为 SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech)。通过该说明书合成 cDNA 第一链。3'RACE 反应参照 RACE 试剂盒说明书进行。用 UAP-RACE 3'-F1 为引物进行第一轮扩增, 反应参数为: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 70 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C 3 min, 68 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 25 个循环; 然后以此扩增产物为模板, 以 UAP-RACE 3'-F2 引物, 以 94 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 25 个循环的扩增程序完成半巢式 PCR 扩增。

表 1 本研究中所用引物
Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 (5'—3') Primer sequences	引物用途 Use of primers
CHSA-F1	CGCCTTACATCGCTTACC	<i>CmCHSA</i> cDNA 克隆 <i>CmCHSA</i> cDNA cloning
CHSA-R1	ACBARACCRATNGGYTCC	
CHSA-F2	GCCAACATTATGGACTTGCT	
CHSA-R2	CGCTTCTTCTGCCTCTTTC	
CHSA-F3	GCTTTCCTCAATCAATCTG	
CHSA-R3	TATTTTCGGCAAGGTCCTC	
UAP-RACE3'-F1	GGTGGAATACTCTGAATTGACCAACGAGG	RACE
UAP-RACE3'-F2	TCGCAACCCTGACGGCAGACTAACA	
Actin-F1	GTTACTCATTACCAACACCGCTG	内参引物 Internal primers
Actin-R1	GGATACCGCAAGATTCCATACCCA	
PGM-RTF	TCTACCGTATGGGACTATTGG	<i>CmPGM</i> RT-qPCR
PGM-RTR	CGGGGGCTTGTGTATCTTGT	
UAP-RTF	GTCGGGCTGAAGGAAATCTCGG	<i>CmUAP</i> RT-qPCR
UAP-RTR	TGCGGTTGGTGCTTTAGTGTGC	
CHSA-RTF	TCTTGAAGTCTATTCTGCGTCTG	<i>CmCHSA</i> RT-qPCR
CHSA-RTR	CCTCGTCGCTGTGGTCTG	
CHSB-RTF	TATGCCTCCTCTACTTGGTCTG	<i>CmCHSB</i> RT-qPCR
CHSB-RTR	CATCGCCTTCTTTGCCTCT	

1.5 序列分析

以 DNAMAN7.0 软件分析各目的基因 cDNA 序列的开放阅读框及氨基酸序列; 序列同源性搜索使用 BLAST 工具 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>); 采用 DNAMAN 软件对目的基因和其他昆虫同源序列进行多重序列比对, 利用 ProtPar 软件 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测蛋白的理论分子量和等电点等; 以 TMHMM 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 对蛋白的跨膜区进行分析, 以 MEGA5.2 的邻近法构建进化树。利用 NetNGlyc1.0 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 分析信号肽和糖基化位点, 保守结构域也通过 NCBI BLSAT 查找分析。

1.6 基因的时空表达分析

取 4 龄稻纵卷叶螟幼虫的头、中肠、血液、脂肪体、表皮和全虫及全虫成虫, 分别提取 RNA, 头、中肠、脂肪体和表皮组织及全虫的提取方法同 1.2, 血液通过 Trizol 方法提取, 血液与 Trizol 比例为 1:1。

以 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒 (TaKaRa) 消除基因组 DNA 反转录一步进行, 得到 RT-qPCR 模板。利用实时荧光定量 RT-qPCR 检测 4 条目的基因在幼虫不同组织及成虫体内的表达情况, 选择 *Cm β -actin* 为内参基因, 使用荧光定量试剂盒 (SYBR Primix Ex Taq, TaKaRa)。反应体系为 SYBR 10 μ L, ROX 0.4 μ L, 上游引物 1.0 μ L, 下游引物 1.0 μ L, cDNA 模板 1.0 μ L, 用 ddH₂O 补齐至 20 μ L。反应条件为: 50℃ 预热 2 min; 95℃ 预变性 10 min; 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 40 个循环。实验用 3 次独立样品重复 3 次。反应均在 ABI Prism 7500 Fast Detection System (Applied Biosystems) 实时定量 PCR 仪上完成。

以 4 条基因分别在最低表达组织的中的表达量为标准参量, 利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量法计算 4 条基因在稻纵卷叶螟不同虫态和不同组织中的表达量差异 (Livak and Schmittgen, 2001), 表达量的差异显著性比较采用 SPSS 软件 (SPSS

v17.0) 进行分析。

2 结果与分析

2.1 *CmCHSA*、*CmCHSB*、*CmPGM* 和 *CmUAP* 全长 cDNA 的获得

本研究通过转录组技术获得了 *CmCHSB* 和 *CmPGM* 的全长及 *CmCHSA* 和 *CmUAP* 基因的部分片段。其中 *CmCHSA* 基因 5' 和 3' 端完整, 缺失中间部分基因片段。*CmUAP* 基因 5' 完整, 3' 端缺失。经过 PCR 和 RACE 反应扩增及对所得片段进行拼接后, 获得 *CmCHSA*、*CmCHSB*、*CmUAP* 和 *CmPGM* 4 条基因的全长序列。本研究得到的 *CmCHSA*、*CmCHSB*、*CmPGM* 和 *CmUAP* 4 条基因的 cDNA 全长分别为 4 868、4 651、1 934 和 1 837 bp, 分别编码 1 564、1 525、548 和 487 个氨基酸, 登录号分别为 AJG44538.1、AJG44539.1、AJG44541.1 和 AJG44540.1。

2.2 序列分析

将获得的 4 条基因序列使用 ProtPar 软件进行分析, *CmCHSA*、*CmCHSB*、*CmPGM* 和 *CmUAP* 的蛋白分子量分别为 178、175、60 和 54 ku; 等电点分别为 6.38、5.93、5.77 和 5.90; 4 条氨基酸序列经 NetNGlyc 1.0 Server 预测均不含有信号肽; 经 TMHMM 2.0 蛋白跨膜结构域预测软件分析, *CmPGM* 和 *CmUAP* 不含跨膜结构, 而 *CmCHSA* 和 *CmCHSB* 是跨膜蛋白。

将获得的 4 条基因的氨基酸序列在 NCBI 上进行同源性比对, BLAST 结果表明, *CmCHSA* 与亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* CHSA (GenBank 登录号: ACB13821.1)、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* CHSA (GenBank 登录号: AAZ03545.1)、甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* CHSA (GenBank 登录号: ABX56676.2) 的相似性分别达到了 95%、91% 和 91%; *CmCHSB* 与亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* CHSB (GenBank 登录号: ABX46067.1)、烟草天蛾 *Manduca sexta* CHSB (GenBank 登录号: AAX20091.1)、棉铃虫 *Helicoverpa zea* CHSB (GenBank 登录号: ADX66427.1) 的相似性分别达到了 78%、73%

和 73% ; CmPGM 与家蚕 *Bombyx mori* PGM (GenBank 登录号 : XP_004933071.1) 黑脉金斑蝶 *Danaus plexippus* PGM (GenBank 登录号 : EHJ68938.1) 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* PGM (GenBank 登录号 : NP_648588.1) 的相似性达到了 86%、83%和 60% ; CmUAP 与甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* UAP (GenBank 登录号 : ACN29686.1) 家蚕 *Bombyx mori* UAP (GenBank 登录号 : XP_004922282.1) 黑脉金斑蝶 *Danaus*

plexippus UAP (GenBank 登录号 : EHJ70626.1) 的相似性分别达到了 83%、80%和 80%。将得到的 4 条氨基酸序列与已在 GenBank 中登录的其他昆虫相关基因的氨基酸序列进行系统发育分析 , 如图 1 所示。

预测分析 CmCHSA 有 16 个跨膜结构域 , N 末端位于细胞膜内 (图 2) , CmCHSB 有 17 个跨膜结构域 , N 末端位于细胞膜内 (图 3) , CmCHSA 有 7 个 N-糖基化位点 , CmCHSB 有 5 个 N-糖基

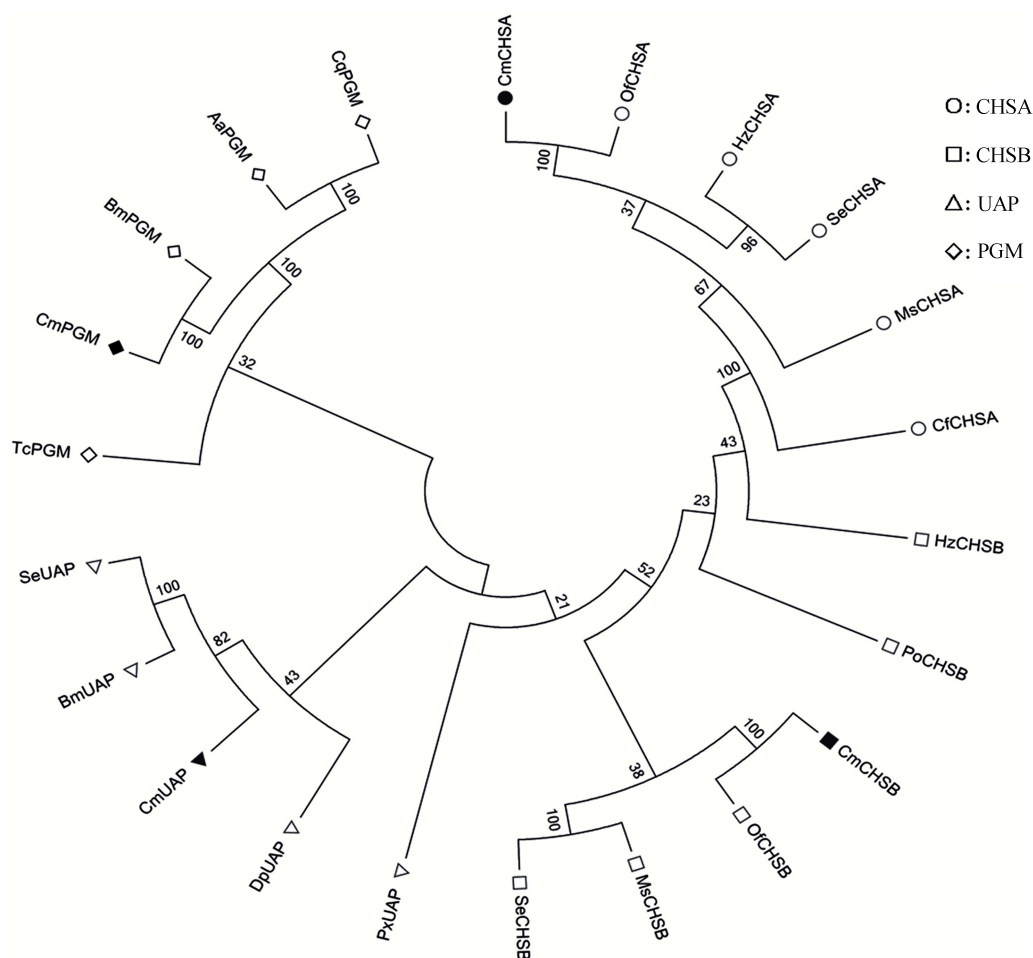


图 1 稻纵卷叶螟与其他昆虫 CHS、PGM 和 UAP 氨基酸序列的系统发育树分析

Fig. 1 Phylogenetic tree of amino acid sequences of CHS, PGM and UAP in *Cnaphalocrocis medinalis* and other insects

氨基酸序列来源及 GenBank 登录号如下 The origin of amino acid sequences and their accession number are as follow: Aa: *Aedes aegypti* (AaPGM: XP_001661733.1); Bm: *Bombyx mori* (BmUAP: XP_004922282.1, BmPGM: XP_004933071.1); Cm: *Cnaphalocrocis medinalis* (CmCHSA: AJG44538.1, CmCHSB: AJG44539.1, CmUAP: AJG44541.1, CmPGM: AJG44540.1); Cf: *Choristoneura fumiferana* (CfCHSA: ACD84882.1); Cq: *Culex quinquefasciatus* (CqPGM: XP_001861542.1); Dp: *Danaus plexippus* (DpUAP: EHJ70626.1); Hz: *Helicoverpa zea* (HzCHSA: ADX66429.1, HzCHSB: ADX66427.1); Ms: *Manduca sexta* (MsCHSA: AAL38051.2, MsCHSB: AAX20091.1); Of: *Ostrinia furnacalis* (OfCHSA: ACB13821.1, OfCHSB: ABX46067.1); Po: *Phthorimaea operculella* (PoCHSB: AIJ50381.1); Px: *Papilio xuthus* (PxUAP: BAM18256.1); Se: *Spodoptera exigua* (SeCHSA: AAZ03545.1, SeCHSB: ABI96087.1, SeUAP: ACN29686.1); Tc: *Tribolium castaneum* (TcPGM: EFA09778.1).

```

1      MAASGGKRREEASDNSDELTPLANEYGGSQRTVQETKGWDFREFPPKQDSVSMETQK
61     WLECTVRMLKVLAYLVTFIVVLGSGVIAKGTVLFMTSQLRKDRRLAYCNRNLGRDKQFVV
121    SLPDEERVAMWAILAAFAIPEIGTLIRSVRICFFKSSKRPSFTQFVVVFIAESLHTIGM
181    ALLFFVILPELDVVKGAMITNCLCVVPAILGLLSRNSRDNRKRVKIVDMAAIVAQVTGF
241    IVWPLSEDKPVLWLIPVASLCISLGWENYVTRQSPIGVIKSLGRKLDELNSSRYIYRF
301    MSIWKVLLFLMCILFCIWMGDGDEPSMFFQMYNTGFGPHNIVVEEVQVTLGGTIIPLVANV
361    TLTPGDSVEVAAVFKSAYYVMLIQIFAAYFCYIFGKFACKILIQGFSYAFPINLIIPLVVN
421    FLIAACGLRNGDTCFFHGTVPDYLFFESPVPVFTLSDFITRQMAWVWLLWLLSQTWITIHI
481    WTPKAERLASTEKLFIPIYNGLLIDQSMALNRKRDDQKDVKTEDLAEIEKEKGDEYYET
541    ISVHTDNTGTTPKTVKSSDQITRIYACATMWHETKDEMMEFLKSLRLDEDDQARRVAQK
601    YLRVVDPDYEFETHIFLDDAFEIADHSDEDSQVNRFFVKLLVDTIDEAASEVHOTNIRIR
661    PSKKYPAPYGGRLTWVLPKTKMICHLKDKAKIRHRKRWSQVMYMYLLGHRMLPLSV
721    DRKEVMAENTYLLTLDGDDIDFQPHAVRLLIDLMKKKNLGAACGRIHPVSGPMVYQMF
781    EYAIGHWLQKATEHMGCVLCSGPCFSLFRGKALMDDSVMKYTLRSDEARHYVOYDQGE
841    DRWLCTLLLRQGYRVEYSAASDAYTHCPEGFSEFYNQRRRWVPSTIANIMDLLMDYKHTI
901    KINDNISTPYIAYQMLMGGTILGPGTIFLMLVGAFAAFRIDNWTSEFYNLYPIAIFML
961    VCFTMKSEIQLLVAQILSTAYAMIMMAVIGTALQLGEDGIGSPSAIFLIALSSSFFIAA
1021   CLHPQEFWCIVPGIYYLLSIPSMYLLILYSIINLNNVTWGTREVQTKKTKKEIEEEKKE
1081   AEEAKKKAKQKSLGLQGVNSNEDEGSLEFSFAGLFKCMFCTHPKGNEEKVQLLHIAST
1141   LEKLEKKMEVVERTVDPHGMSRGRKLSVGHGSGTNGDHLDALAEGPENDSGSDSETDTLS
1201   TSPRERRDDLINPYWIEDPELKKGEVDLSPSEIQFWRDLLEKYLPIDENKEEKARIAAG
1261   DLIELRNKSVFAFVMFNALFILIVFLLQLNKDQLHVDWPLGIKTNITYIETGEVLISKE
1321   YLQLEPITGLVFVFFALILVIQFTAMLFHFRFGTLSHILASTELNWFCTKKSEDLSDQALL
1381   DKNAIAIVKDLQKLNGLDDDDYDNDSSGSGPHNVGRKRTIHNLEKARQKRNIGTLDVAFKK
1441   RFFNMNANDGPGTPVLNRKMTLRRETTLKALETRNSVMAERRKSQMOTLGANNEYGVGTGM
1501   LNNNLGVVPRHRTSTANISVKDVFAEPNGGQVNRGYETSLGDDDEDNNSMRLQPRQNQVSF
1561   QRYQ

```

图 2 CmCHSA 氨基酸序列

Fig. 2 The amino acid sequence of CmCHSA

预测的跨膜区用阴影标出, 预测的 7 个 N-糖基化位点用下划线标出, 预测的催化结构域用波浪线标出。

The putative transmembrane regions are shaded, the seven potential N-glycosylation sites are underlined, the amino acid sequence of the putative catalytic domain is wavy lined.

```

1      MASTLNKSLDDSDSEITPLYDDFDEPDQRTAQETKGWNLFREIPVKKDSGSMVSTAW
61     IDTSVKIMKLVAIVIFIAVLGSAVISKGTLLFITSQKLDKDRQITHCNKALALDLQFITV
121    HDLHERLSWLAAWII FSVPEFGSFLRSVRICFFKTAKKPTNFEFLVAFVETCQVSGIA
181    LLLLFILPELDVVKGAMLMNAVCVPAVLNVLMRDRTHPNYHWMVLVDILAVSAQATAFV
241    VWPLLDGKLVLCIPVATVLISLGWENFVGPVEKHSSGIAVAINEFRNSLRSKRYTTSR
301    TLSIWKIILFLAFIMASLHMQGDNPLSFFSLVGEAFNDRYKVEIQITLRDIYSGLYDY
361    KMTGEGIPGIPVAWASSLWVALIQVVAAYFCFI SAKLACRILIONFSFTFALS LGVPVTV
421    NILILLCGYRNADPCAFYRVIPDYLFFNI PSVYLLKDYVGREMAWIWVLLSQAWVCVH
481    AWLPRCERLASSDKLFSKPLYNGTLVDQCLLMNRKDEDIVDIQIEDKEDADDVSNSMD
541    KGTDIRPSDHTTRIYICATMWHETKEEMMEFLKSIFRLDEDDQARRVAQKYWGIVDPDY
601    ELEAHIFMDDAFEVSDHSAEDSQVNRFFVKCLVDTIDEAASEVHLTNIRLRPPKYPPTYG
661    GKLVLWILPGKNKMICHLKDKSKIRHRKRWSQVMYMYFLGHRMLDPLSVDRKEVIAENT
721    YLLALDGDIDFKPCAVTLLIDLMKKKNLGAACGRIHPVSGSGFMSWYQMF EYAIGHWLQK
781    ATEHMGCVLCSGPCFSLFRGKALMDDNVMKYTLTSNEARHYVOYDQGEDRWLCTLLQ
841    RGYRVEYSAASDAYTHCPEFDEFYQRRRWVPSTMANIFDILLADSKRTISVNDNISTLY
901    IMYQMLMAGTILGPGTIFLMMIGAMNAITGMSQMQUALFCNLVPITIFIIVCMTCCKSETQ
961    LYLANIITCAYAMVMLVIGIVLQIAEDGWLAPSSIIFTIATFGSFFLTAAMHPQEIICL
1021   LYLVVYYITIPSMYMLLIVYSLCNLNNVSWGTREVAQKKTAKEMEMEKKAEKAEKAMEK
1081   QSFMRWFGNNKTDEESGSMEMSVAGLFKCMCCTNPKDHKEDLHLLQIASSMEKIEKKLDS
1141   LGATSETQENPPRRRSTVMRGNSLAMLPEYQDSEASTDIPREERDDLINPFWIEDPNLQ
1201   KGEVDLTLTAETEFWKDLIDAYLRPIDENKEEQERIKTDLKNLRDTPVFAFVMLNALFVL
1261   VIFLLQLNQDQLHFRWPFQKVAIEYDSEQNLIETERYLMLEPIGSVFLIFFGMVMIVQ
1321   FTAMIFHFRFGTLIHLLSTVQLNWFYTKRPGVSNELAHLEKNAIEIAKDLQRLNVDDLQQA
1381   GAGDEPVTRRKTTLNHLERARDTKLNNNTLDANFKRRLMSPSEI I KRLSTLGGNHAMRRA
1441   TLRALQTRRESVLAERRSQLQARDSTSEYLYEPPRASTAAGERTGRRATGAYVNKGYE
1501   PAFDSDDEDTPMRNRNVRFMQPNF

```

图 3 CmCHSB 氨基酸序列

Fig. 3 The amino acid sequence of CmCHSB

预测的跨膜区用阴影标出, 预测的 5 个 N-糖基化位点用下划线标出, 预测催化区域用波浪线标出。

The putative transmembrane regions are shaded, the five potential N-glycosylation sites are underlined, the amino acid sequence of the putative catalytic domains is wavy lined.

化位点。几丁质合成酶的结构域可以分为 3 部分, 即有 9~10 个跨膜结构的 N 端, 有 7 个跨膜结构的 C 端和中间保守催化区。对 CmCHSA 和 CmCHSB 的氨基酸序列进行比对, 发现它们的相似性较高, 达到了 55.36%, 并且都保持着糖基转移酶两家族的 4 个特征基序 (DXD、EDR、QRRRW 和 CATMWHXT, X 指代任意氨基酸) (图 6), 符合昆虫 CHS 特征, 说明推导的氨基酸序列正确。

CmPGM 氨基酸序列经预测有 18 个氨基酸的活性位点, 2 个 N-糖基化位点 (图 4), 拥有 PGM 的特征基序 (DGD XDR、TGV、EXNXGH 和 SGT, X 指代任意氨基酸) (图 7)。CmUAP 氨基酸序列经预测有 17 个氨基酸的底物结合位点, 1 个 N-糖基化位点 (图 5), 拥有 UAP 的特征基序 (GGXXTXXGXXXPK, X 指代任意氨基酸)

(图 8)。分别符合昆虫中 PGM 及 UAP 的特征。

2.3 目的基因在不同组织和不同发育时期的表达分析

利用荧光定量 RT-qPCR 的方法, 分别检测了稻纵卷叶螟在 4 龄幼虫期的头、中肠、血淋巴、脂肪体和表皮 5 个组织以及幼虫和成虫两个时期中 CmCHSA、CmCHSB、CmPGM 和 CmUAP 4 条基因的表达量 (图 9)。由图 9 (A) 和 (B) 可以看出, 同属于几丁质合成酶基因的 CmCHSA 和 CmCHSB 的表达具有明显的组织特异性。CmCHSA 主要在表皮和头部表达且表达量远高于中肠及血淋巴, CmCHSA 在表皮的表达量是中肠中的 174 倍左右。而 CmCHSB 主要在中肠中表达, 表达量明显高于其他组织, CmCHSB 中肠中的表达量是表皮的 5 倍左右。

```

1      MPPSSLRVVYAFAREMHPKTSDFVFIQYGTAGFRTKANLLEHVVMGLLAVIRSRVKNGR
61     TIGMMITASHNLEPDNGVKLVDPDGEMLEQSWEEIATRLANVSDNDLESTTEQVIKQVNA
121    DMSLKASVFIGMDTRYTSPRLAAAAANGVIALKGTPKEFGIVTTPMLHFCVCKRNDNTYG
181    TPTTEGGYEEKIVGAFAKNIRDKLPVYGDNNTLYVDGANGVGGKKLNIIRKSLDGELDLNL
241    YNLGGNGGKLNLCGADFVKVSQTPPVGVEHAPFORVASLDGDRIVVYYLDDKEKMHLL
301    LDGDRIATLLASYVTELLRASEASGLRLGLVQTAYANGASTRYITEELKVPVSCVKTGVIK
361    HLHHAALAYDVGYYFANGHGTVVYSKAAKNAISKIAQEGEPEQRKAAQLLQNFIDMTNE
421    TVGDAISDLFLVETVLRARGHGVRQWMEAYTDLPCRQLKVTVQDRNAISTTDAERRCTAP
481    EGLQSKIDELVAAYTSGRAFVRPESGTEDVVRVYSEADTQEAADKLAAEVAQAVFDLAGGV
541    GERPALPA
  
```

图 4 CmPGM 氨基酸序列

Fig. 4 The amino acid sequence of CmPGM

2 个糖基化位点用下划线标出, 保守结构域用波浪线标出, 18 个活性位点用方框标出。

The two potential N-glycosylation sites are lined, the amino acid sequence of the putative conserved domains is wavy lined, the 18 active sites are boxed.

```

1      MSYEKLERELLAPHGQEQLIKFWPDLTDSERQELTKEILKLDLSEVNEIFRRANETTKVIL
61     EKLDDDLKPIPOAHYESVPSLTNEKIQEYESVGLKEISDGKVGVLILAGGQATRLGFGHP
121    KGMYNVGLPSKKTLEFQIQAERIVRIQMAAAKYGKEGKITWYIMTSEHTKAPTADFFKDH
181    SYFGLNEDDIVFFEGRGPCFDFEGKILLDEKHKLASAPDGNGLYRALKSQGVLTDIAR
241    RGVEHLHAHSDNIIKIVADPVFIGYCKSKNADCAAKVVQKSAPSEAVGVVCRVNGHYKV
301    VEXSELTNEAAERRNPDGRLTFSAGNICNHYSSEFLSKICDFETKKAHIAKKKIPYVD
361    DSGVRQKPTPEPNGIKMEKFIQDVFEFAENFICLEVARDVEFSALKNADSVKKDCPSTARE
421    DLLRLHRKYIREAGGEIADDVDVEISPLLSYGGEGLENIVNGDVFTISPFHLKSEMEAEET
481    NGLNGNH
  
```

图 5 CmUAP 氨基酸序列

Fig. 5 The amino acid sequence of CmUAP

1 个糖基化位点用下划线标出, 保守结构域用波浪线标出, 17 个底物结合位点用方框标出。

The potential N-glycosylation sites is lined, the amino acid sequence of the putative conserved domains is wavy lined, the 17 substrate binding sites are boxed.

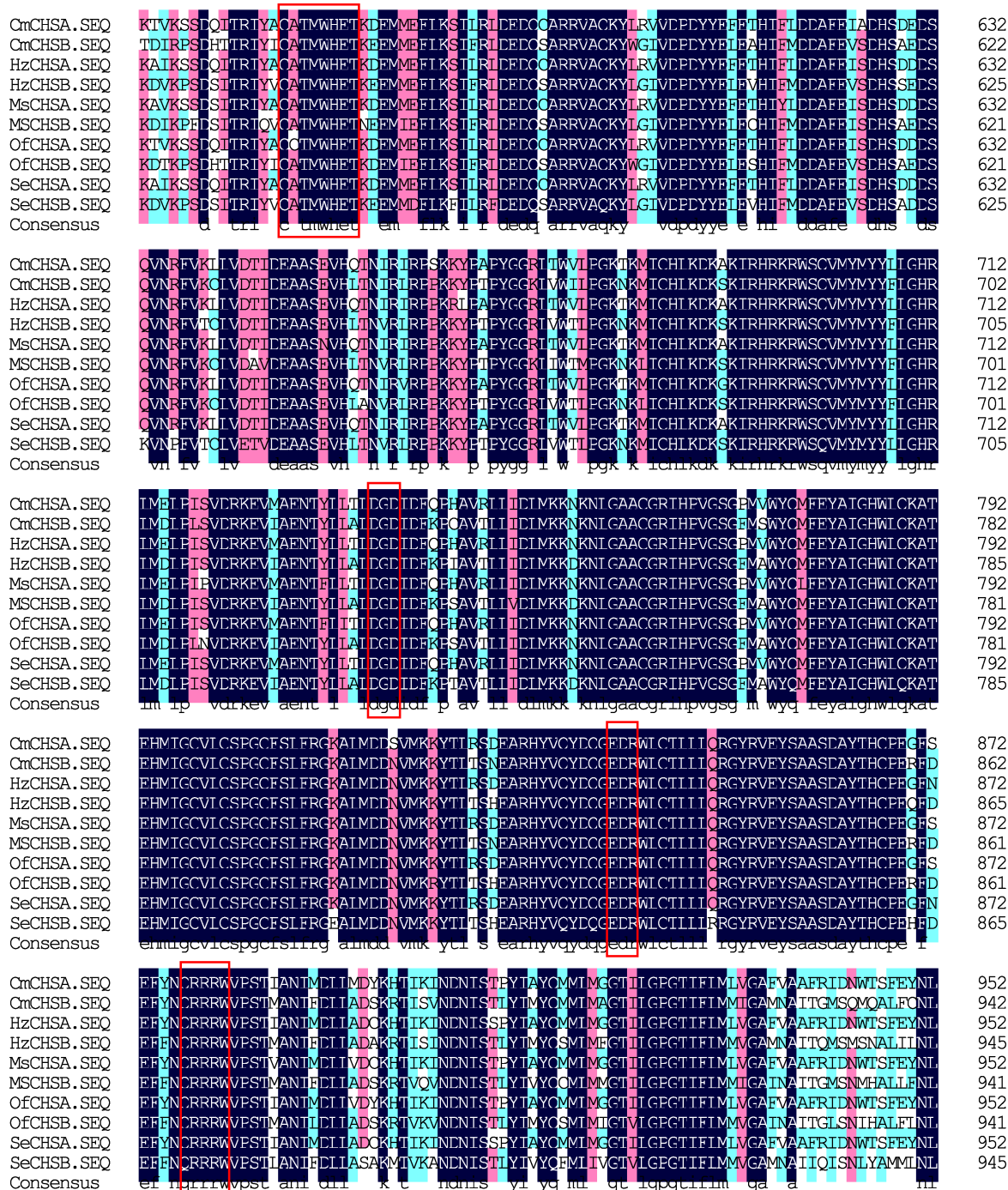


图 6 昆虫 CHS 的催化中心序列比对

Fig. 6 The alignment of the catalytic center of insect CHS

深蓝色表示 100%同源, 粉色表示 80%~90%同源, 浅蓝色表示 50%~70%同源, 白色表示 50%以下同源。

红框标出为保守基序。

Amino acids with 100% identify are in dark blue background and this with 80%~90% identify in pink background and these with 50%~70% identify in light blue background and with below 50% in white background. Conserved motifs are in red box.

CHS 来源及 GenBank 登录号分别如下 The origin of CHS and their accession number are as follow:

HZCHSA, *Helicoverpa zea*, ADX66429.1; HZCHSB, *Helicoverpa zea*, ADX66427.1; MSCHSA, *Manduca sexta*, AAL38051.2; MSCHSB, *Manduca sexta*, AAX20091.1; OFCHSA, *Ostrinia furnacalis*, ACB13821.1; OFCHSB, *Ostrinia furnacalis* ABX46067.1; SECHSA, *Spodoptera exigua*, AAZ03545.1; SECHSB, *Spodoptera exigua*, ABI96087.1.

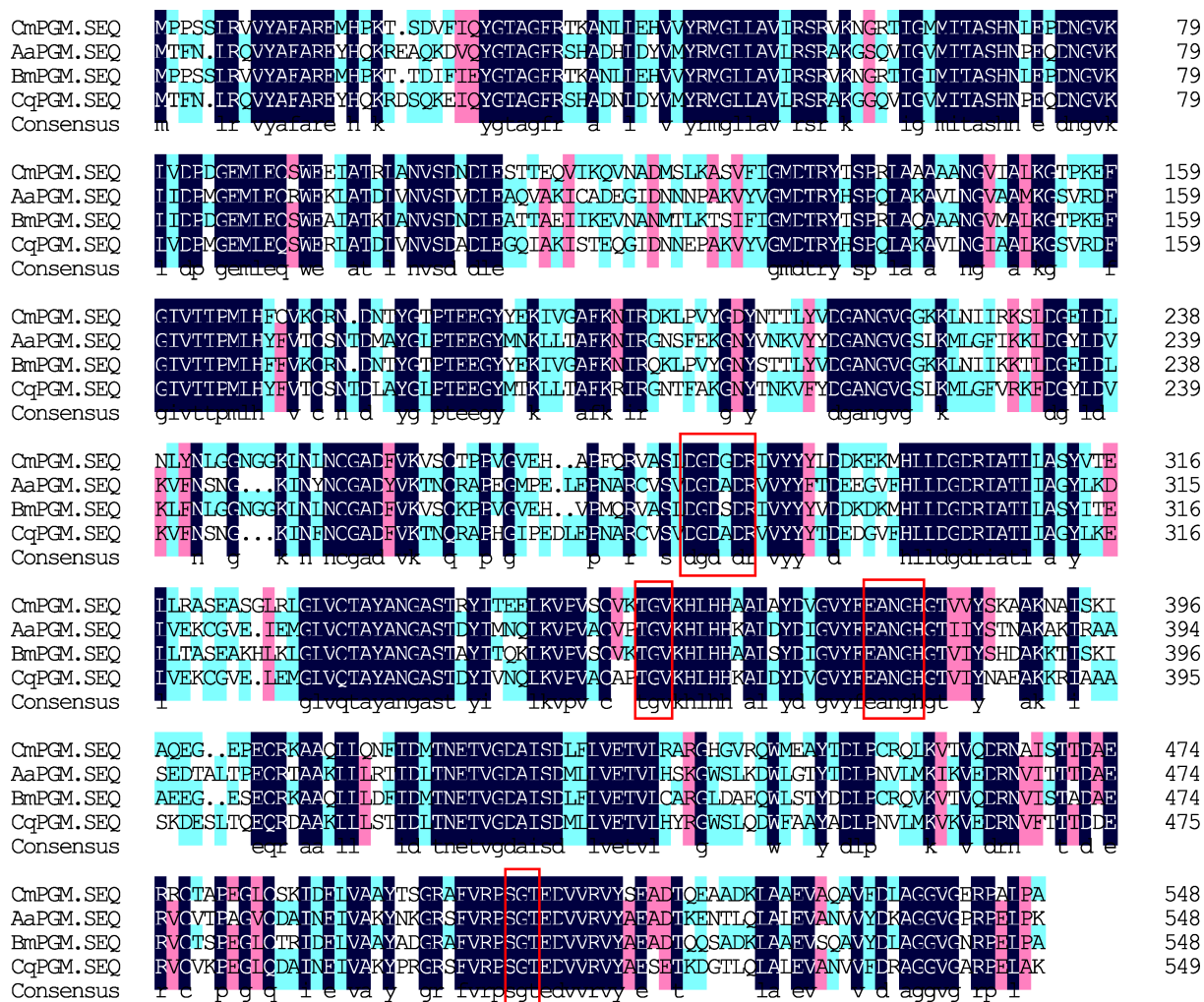


图7 昆虫 PGM 的催化中心序列比对

Fig. 7 The alignment of the catalytic center of insect PGM

深蓝色表示 100%同源, 粉色表示 75%同源, 浅蓝色表示 50%同源, 白色表示 50%以下同源。红框标出为保守基序。Amino acids with 100% identify are in dark blue background and this with 75% identify in pink background and these with 50% identify in light blue and with below 50% in white background. Conserved motifs are in red box.

PGM 来源及 GenBank 登录号分别如下 The origin of PGM and their accession number are as follow:

AaPGM, *Aedes aegypti*, XP_001661733.1; BmPGM, *Bombyx mori*, XP_004933071.1; CqPGM, *Culex quinquefasciatus*, XP_001861542.1.

由图 9 (C) 和 (D) 可以看出, *CmPGM* 和 *CmUAP* 基因在血淋巴中表达量都远高于其他组织, 而在表皮中表达量都较低。其中血淋巴中 *CmPGM* 的表达量是表皮的表达量的 25 倍, *CmUAP* 的表达量是表皮中的 14 倍; 同时我们发现, 成虫的 4 条基因的表达量都高于幼虫。

3 讨论

几丁质合成是昆虫非常重要的生理过程, 研

究几丁质合成的途径可为开发绿色新型生物杀虫剂提供新的思路。在几丁质合成的生理过程的研究中, 一些研究已经证明了 CHS、UAP 和 PGM 在其他昆虫体内的重要作用。本研究首次获得了稻纵卷叶螟的两条几丁质合成酶, 一条 UDP-N-乙酰葡萄糖焦磷酸化酶和一条 N-乙酰葡萄糖磷酸变位酶的 cDNA 全长并进行了表达分析。

CHSA 和 CHSB 是几丁质合成途径中最关键的酶, 在甜菜夜蛾中, 使用 dsRNA 对 *CHSA*

进行干扰, 会使得幼虫不能进行幼虫-幼虫、幼虫-蛹的变态发育 (Wang *et al.*, 2000), 影响气管的发育 (Chen *et al.*, 2008)。在赤拟谷盗中, 对于 *TcCHSB* 的干扰则能够使幼虫饥饿致死 (Arakane *et al.*, 2005)。在氨基酸序列的比对分析中, 我们发现 CHSA 相比 CHSB, 保守性更高 (与亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 比对, CmCHSA 与 OfCHSA 氨基酸相似性达到 95%, 而 CmCHSB 与 OfCHSB 相似性为 78%)。从进化角度分析, 说明几丁质合成酶 A 的保守性高于几丁质合成酶 B。从功能上考虑, 产生这种现象的原因可能是与两种几丁质合成酶的作用有关, 几丁质合成酶 A 主要是合成表皮部分的几丁质, 不同昆虫表皮内的几丁质成分相差不大, 而几丁质合成酶 B 主要用于合成中肠部分的几丁质, 并且主要在进食期表达 (Arakane *et al.*,

2004), 考虑到不同昆虫之间食物谱并不相同, 围食膜的几丁质成分差异可能会大于表皮几丁质之间的差异。这可能是造成几丁质合成酶 B 的保守性低于几丁质合成酶 A 的原因。

由基因的时空表达分析结果可以看出, *CmCHSA* 在头部和表皮中的表达量最高, 在中肠表达量较低。相反, *CmCHSB* 在中肠中的表达量最高, 在表皮中表达量较低。这种表达特性与其他昆虫中 CHS 的特性相同, 如家蚕 (Zhuo *et al.*, 2014)、赤拟谷盗 (Zhang *et al.*, 2010, Liu *et al.*, 2012)、甜菜夜蛾 (Chen *et al.*, 2007, 2008) 等, 都能明显发现 CHSA 主要在表皮中表达而 CHSB 主要在中肠中表达, 可以推测 CmCHSA 主要合成组成表皮和头壳的 α -几丁质, 而 CmCHSB 主要合成组成围食膜的 β -几丁质和 γ -几丁质。

几丁质合成酶固然是几丁质合成过程中的



图 8 昆虫 UAP 的催化中心序列比对

Fig. 8 The alignment of the catalytic center of insect UAP

深蓝色表示 100%同源, 粉色表示 75%同源, 浅蓝色表示 50%同源, 白色表示 50%以下同源。红框标出为保守基序。 Amino acids with 100% identify are in dark blue background and this with 75% identify in pink background and these with 50% identify in light blue background and with below 50% in white background. Conserved motif is in red box.

UAP 来源及 GenBank 登录号分别如下 The origin of UAP and their accession number are as follow:

AaUAP, *Aedes aegypti*, XP_001659746.1; BmUAP, *Bombyx mori*, XP_004922282.1; SeUAP, *Spodoptera exigua*, ACN29686.1.

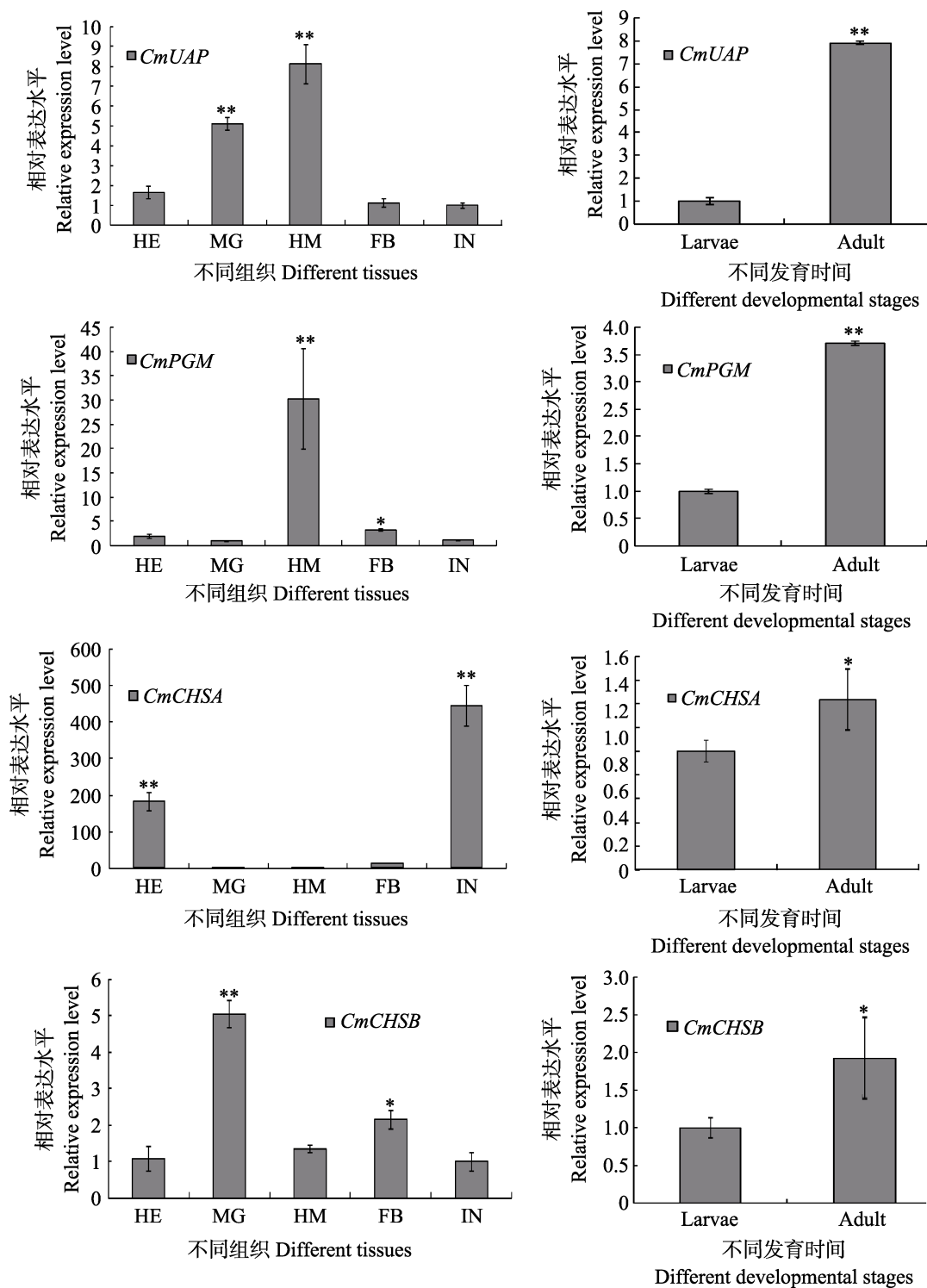


图9 目的基因在不同的组织及不同发育时期中的相对表达水平

Fig.9 Relative expression levels of target genes in different tissues and different developmental stages

*代表差异显著 ($P < 0.05$, t -test), **代表差异极显著 ($P < 0.01$, t -test)。* indicates significant difference between different tissues and different developmental stages ($P < 0.05$, t -test), ** indicates extremely significant difference between different tissues and different developmental stages ($P < 0.01$, t -test).

HE: 头; MG: 中肠; HM: 血淋巴; FB: 脂肪体; IN: 表皮; Larvae: 幼虫; Adult: 成虫。

HE: Head; MG: Midgut; HM: Hemolymph; FB: Fatbody; IN: Integument.

关键酶,几丁质合成路径上其他的酶应该也对几丁质的合成有着重要作用,在合成路径中通过催化反应为几丁质合成酶提供底物的 UAP 和 PGM 已经开始受到关注,在东亚飞蝗 *Locusta migratoria* 中,对 *LmUAP* 基因进行干扰,发现中肠和表皮中的几丁质合成都受到阻碍 (Liu *et al.*, 2013);而在对果蝇 *Drosophila metamorphosis* PGM 缺陷突变体的研究中,发现突变体中几丁质合成酶的底物 UDP-GlcNAc 的合成受到严重影响,比正常果蝇 UDP-GlcNAc 的合成量少 80% (Mariappa *et al.*, 2013)。

由基因的时空表达分析结果同时可以看出,4 条基因的在成虫期的表达量都高于幼虫。研究表明,几丁质合成途径的基因严格的受到保幼激素和蜕皮激素的共同调控 (Tellam *et al.*, 2000),而我们捕获的幼虫都处于 4 龄期中间,各种几丁质合成通路蛋白表达都处于较低状态,使得与蜕皮相关因素联系紧密且主要在体液中表达的 *CmUAP*, *CmPGM* 在成虫与幼虫间的表达量差距较大。而与蜕皮相关因素影响较小的 *CmCHSB*,成虫和幼虫的表达量差距较小。该基因受激素调控的特点有待在完善稻纵卷叶螟的人工培养技术后进一步研究。

近几年,对昆虫几丁质合成的研究使得几丁质合成酶逐渐成为研究热点。基于这个目的,我们获得并研究了两条几丁质合成酶及合成途径上的两种酶的 cDNA 序列,并且从 mRNA 水平上检测了不同组织和不同虫态中 4 条基因的表达情况。然而对稻纵卷叶螟几丁质合成通路的这 4 条基因的具体功能还有待进一步深入研究。

参考文献 (References)

- Ampasala DR, Zheng SC, Zhang DY, Ladd T, Doucet D, Krell PJ, Feng QL, 2011. An epidermis-specific chitin synthase cDNA in *Choristoneura fumiferana*: cloning, characterization, developmental and hormonal-regulated expression. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 76(2): 83–96.
- Arakane Y, Hogenkamp DG, Zhu YC, Kramer KJ, Specht CA, Beeman RW, Kanost MR, Muthukrishnan S, 2004. Characterization of two chitin synthase genes of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, and alternate exon usage in one of the genes during development. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34(3): 291–304.
- Arakane Y, Muthukrishnan S, Kramer KJ, Specht CA, Tomoyasu Y, Lorenzen MD, Kanost M, Beeman RW, 2005. The *Tribolium* chitin synthase genes *TcCHS 1* and *TcCHS2* are specialized for synthesis of epidermal cuticle and midgut peritrophic matrix. *Insect Mol. Biol.*, 14(5): 453–463.
- Arakane Y, Baguion MC, Jasrapuria S, Chaudhari S, Doyungan A, Kramer KJ, Muthukrishnan S, Beeman RW, 2011. Both UDP N-acetylglucosamine pyrophosphorylases of *Tribolium castaneum* are critical for molting, survival and fecundity. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 41(1): 42–50.
- Araujo SJ, Aslam H, Tear G, Casanova J, 2005. Mummy/cystic encodes an enzyme required for chitin and glycan synthesis, involved in trachea, embryonic cuticle and CNS development: analysis of its role in *Drosophila* tracheal morphogenesis. *Dev. Biol.*, 288(1): 179–193.
- Bolognesi R, Arakane Y, Muthukrishnan S, Kramer KJ, Terra WR, Ferreira C, 2005. Sequences of cDNAs and expression of genes encoding chitin synthase and chitinase in the midgut of *Spodoptera frugiperda*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35(11): 1249–1259.
- Candy DJ, Kilby BA, 1962. Studies on chitin synthesis in the desert locust. *J. Exp. Biol.*, 39: 129–140.
- Chen YN, 1985. A review of foreign *Cnaphalocrocis medinalis* research. *Entomological Knowledge*, (6): 287–289. [陈永年, 1985. 国外稻纵卷叶螟研究概述. 昆虫知识, (6): 287–289.]
- Chen X, Tian H, Zou L, Tang B, Hu J, Zhang W, 2008. Disruption of *Spodoptera exigua* larval development by silencing chitin synthase gene A with RNA interference. *Bull. Entomol. Res.*, 98(6): 613–619.
- Chen X, Yang X, Senthil KN, Tang B, Sun X, Qiu X, Hu J, Zhang W, 2007. The class A chitin synthase gene of *Spodoptera exigua*: molecular cloning and expression patterns. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 37(5): 409–417.
- Cohen E, 2001. Chitin synthesis and inhibition: A revisit. *Pest Manag. Sci.*, 57(10): 946–950.
- Mariappa D, Sauert K, Mariño K, Turnock D, Webster R, van Aalten DMF, Ferguson MAJ, Müller HA, 2011. Protein O-GlcNAcylation is required for fibroblast growth factor signaling in *Drosophila*. *Sci. Signal.*, doi:10.1126/scisignal.2002335.
- Gagou ME, Kapsetaki M, Turberg A, Kafetzopoulos D, 2002. Stage-specific expression of the chitin synthase *DmeChSA* and *DmeChSB* genes during the onset of *Drosophila metamorphosis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32(2): 141–146.

- Jaworski E, Wang L, Margo G, 1963. Synthesis of chitin in cell free extracts of *Prodenia eridania*. *Nature*, 198: 790.
- Kramer KJ, Hopkins TL, Schaefer J, 1995. Applications of solids NMR to the analysis of insect sclerotized structures. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 25(10): 1067–1080.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Liu XJ, Li F, Li DQ, Ma EB, Zhang WQ, Zhu KY, Zhang JZ, 2013. Molecular and functional analysis of UDP-N-Acetylglucosamine pyrophosphorylases from the migratory locust, *Locusta migratoria*. *PLoS ONE*, 8(8): e71970.
- Liu XJ, Zhang HH, Li S, Zhu KY, Ma EB, Zhang J, 2012. Characterization of a midgut-specific chitin synthase gene (LmCHS2) responsible for biosynthesis of chitin of peritrophic matrix in *Locusta migratoria*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 42(12): 902–910.
- Lu JL, Lin C, Yang XL, Zheng XQ, Liang YR, 2008. Characteristics prediction of insect chitin synthase. *Journal of Zhejiang University*, 34(5): 491–501. [陆建良, 林晨, 杨晓丽, 郑新强, 梁月荣, 2008. 昆虫几丁质合成酶特性预测. 浙江大学学报, 34(5): 491–501.]
- Macauley MS, Whitworth GE, Debowski AW, Chin D, Vocadlo DJ, 2005. O-GlcNAcase uses substrate-assisted catalysis: kinetic analysis and development of highly selective mechanism-inspired inhibitors. *J. Biol. Chem.*, 280(27): 25313–25322.
- Merzendorfer H, 2006. Insect chitin synthases: a review. *J. Comp. Physiol. B*, 176(1): 1–15.
- Merzendorfer H, Zimoch L, 2003. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J. Exp. Biol.*, 206(24): 4393–4412.
- Peneff C, Ferrari P, Charrier V, Taburet Y, Monnier C, Zamboni V, Winter J, Harnois M, Fassy F, Bourne Y, 2001. Crystal structures of two human pyrophosphorylase isoforms in complexes with UDPGlc(Gal)NAc: Role of the alternatively spliced insert in the enzyme oligomeric assembly and active site architecture. *EMBO J.*, 20(22): 6191–6202.
- Schimmelpfeng K, Strunk M, Stork T, Klambt C, 2006. Mummy encodes an UDP-N-acetylglucosamine-diphosphorylase and is required during *Drosophila* dorsal closure and nervous system development. *Mech. Dev.*, 123(6): 487–499.
- Spindler KD, Spindler-Barth M, Londershausen M, 1990. Chitin metabolism: a target for drugs against parasites. *Parasitol. Res.*, 76(4): 283–288.
- Tellam RL, Vuocolo T, Johnson SE, Jarmey J, Pearson RD, 2000. Insect chitin synthase cDNA sequence, gene organization and expression. *Eur. J. Biochem.*, 267(19): 6025–6043.
- Wang ZY, Lu X, He KL, Zhou DR, 2000. Review of history, present situation and prospect of the asian maize borer research in China. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 31(5): 402–412. [王振营, 鲁新, 何康来, 周大荣, 2000. 我国研究亚洲玉米螟历史、现状与展望. 沈阳农业大学学报, 31(5): 402–412]
- Zhai BP, Cheng JA, 2006. A summary of symposium for migratory pests-rice in 2006. *Chinese Bulletin of Entomology*, 43(4): 585–588. [翟保平, 程家安, 2006. 2006年水稻两迁害虫研讨会纪要. 昆虫知识, 43(4): 585–588.]
- Zhang JZ, Liu XJ, Zhang JQ, Li DQ, Sun Y, Guo Y, Ma E, Zhu KY, 2010. Silencing of two alternative splicing-derived mRNA variants of chitin synthase 1 gene by RNAi is lethal to the oriental migrator locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 40(11): 824–833.
- Zhang XX, Geng JG, Zhou WJ, 1981. Research on the laws of the journey of *Cnaphalocrocis medinalis* in China. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 3(3): 43–54. [张孝羲, 耿济国, 周威君, 1981. 我国稻纵卷叶螟迁飞规律的研究. 南京农学院学报, 3(3): 43–54.]
- Zhang XX, Lu ZQ, Geng JG, Li GZ, Chen XL, Wu XW, 1980. Study on *C. medinalis* migration pathway. *Acta Entomologica Sinica*, 23(2): 130–139. [张孝羲, 陆自强, 耿济国, 李国柱, 陈学礼, 吴学文, 1980. 稻纵卷叶螟迁飞途径的研究. 昆虫学报, 23(2): 130–139.]
- Zhu YC, Specht CA, Dittmer NT, Muthukrishnan S, Kanost MR, Kramer KJ, 2002. Sequence of a cDNA and expression of the gene encoding a putative epidermal chitin synthase of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32(11): 1497–1506.
- Zimoch L, Merzendorfer H, 2002. Immunolocalization of chitin synthase in the tobacco hornworm. *Cell Tissue Res.*, 308(2): 287–297.
- Zhuo WW, Chu F, Kong LF, Tao H, SimaYH, Xu SQ, 2014. Chitin synthase B: a midgut-specific gene induced by insect hormones and involved in food intake in *Bombyx mori* larvae. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 85(1): 36–47.