基于转录组数据的意大利蝗微卫星位点分析与分子标记开发*

桑 迪[1**] 徐 叶[1] 王伟亮[2] 向 敏[1] 季 荣[1] 王 晗[1***]

（1. 中亚区域跨境有害生物联合控制国际研究中心，新疆师范大学生命科学学院，乌鲁木齐 830054；
2. 新疆玛纳斯县蝗虫鼠害预测预报防治站，玛纳斯 832200）

摘 要 **【目的】** 意大利蝗 *Calliptamus italicus* (L.)是新疆荒漠半荒漠草原重要害虫。本研究利用已获得的意大利蝗转录组数据，鉴定其微卫星位点。**【方法】** 使用 MISA 筛选 SSR 位点，利用 Primer Premier 5 设计引物，通过 PCR 扩增对引物进行验证。**【结果】** 在意大利蝗转录组数据库中，共检测出 156 500 个 SSR 位点，分布在 126 369 条 unigene 中。其中，单核苷酸重复为 60.88%，二核苷酸重复为 23.58%，三核苷酸重复和四核苷酸重复分别为 12.99%和 2.04%。单核苷酸重复主要为 A/T（44.38%），二核苷酸重复主要为 AC/GT（12.99%）和 AG/CT（8.05%）。基于筛选的 SSR 位点设计引物，随机挑选 24 对引物，对 10 个不同地理种群意大利蝗成虫 DNA 样品进行 PCR 扩增，共有 6 对引物扩增成功。**【结论】** 本研究利用转录组数据发掘意大利蝗 SSR 位点，为意大利蝗分子标记、种群遗传及功能基因等研究奠定基础。

关键词 意大利蝗；微卫星；转录组；分子标记

Analysis of microsatellite loci from *Calliptamus italicus* (Orthopera: Acrididae) based on a transcriptome dataset

SANG Di[1**] XU Ye[1] WANG Wei-Liang[2] XIANG Min[1] JI Rong[1] WANG Han[1***]

(1. International Research Center for the Collaborative Containment of Cross-Border Pests in Central Asia, College of Life Sciences, Xinjiang Normal University, Urumqi 830054, China;
2. Manasi Station of Forecast and Control on Locusts and Rodents, Manasi 832200, China)

Abstract **[Objectives]** To investigate genetic variation in *Calliptamus italicus*（L.）, an important pest of desert and semi-desert grasslands in Xinjiang. **[Methods]** Microsatellite loci were analyzed from the transcriptome dataset of *C. italicus*, and primers designed for PCR amplification. SSR loci were identified using MISA, and primers were designed using Primer 5 for experimental validation. **[Results]** In total, 156 500 SSR loci distributed in 126 369 unigenes were detected. The majority of these were mono-nucleotides (60.88%), followed by di-nucleotides (23.58%), tri-nucleotides (12.99%), and tetra-nucleotides (2.04%). The most abundant mono-nucleotide repeat motif was A/T (44.38%). The dominant motif among the di-nucleotide repeat units was AC/GT (12.99%), followed by AG/CT (8.05%). 24 primer pairs were randomly selected to validate SSR loci detected with genomic DNA from multiple individuals from 10 different geographic populations. 6 primer pairs amplified the expected products. **[Conclusion]** Based on transcriptome data, 156 500 SSR loci were identified which can provide a foundation for research on molecular markers, population genetics and functional genes of *C. italicus*.

Key words *Calliptamus italicus*; microsatellite; transcriptome; molecular marker

*资助项目 Supported projects：新疆维吾尔自治区“天山青年计划”项目（2017Q024）；新疆维吾尔自治区高校科研计划面上项目（XJEDU2017M023）；新疆特殊环境物种多样性应用与调控实验室招标课题（XJTSWZ-2018-02）；国家重点研发计划资助（2016YFE0203100）；新疆高校科研创新团队项目（XJEDU2017T007）；自治区研究生科研创新项目

**第一作者 First author，E-mail：798688908@qq.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：wanghanguoxi@sina.com

收稿日期 Received：2019-05-14；接受日期 Accepted：2019-08-05

微卫星（Microsatellite），又称简单重复序列（Simple sequence repeat，SSR），是以 1-6 bp 核苷酸为重复单位的特殊序列。SSR 作为分子标记，具有多态性高、共显性遗传、检测快速方便、特异性强及稳定性高等优点，广泛应用于动植物分类、遗传、进化及功能基因等研究领域（Renuka and Shamitha，2016；Duan *et al.*，2017a；Li *et al.*，2017；杨万云等，2017；Chen *et al.*，2018；Deng *et al.*，2018）。

随着高通量测序技术及生物信息学技术的高速发展，基因组或转录组数据为 SSR 位点的发掘提供了丰富的数据资料和便捷的筛选途径（Wachi *et al.*，2018）。目前，从基因组数据库中已筛选得到多种昆虫的 SSR 位点（王晨等，2015；王小婷等，2016；Ding *et al.*，2017；丁思敏等，2018；刘旸等，2018；Yoshitaka *et al.*，2019），而转录组数据库因其快速、经济、有效等优点，成为缺少基因组信息的非模式生物分子标记筛选的重要手段。通过转录组数据库已成功开发出枣食芽象甲 *Scythropus yasumatsui*（洪波等，2019）、水椰八角铁甲 *Octodonta nipae*（Chen *et al.*，2018）、窄足真蚋 *Simulium* (*Eusimulium*) *angustipes*（郭欢等，2018）、梨小食心虫 *Grapholita molesta*（冷春蒙等，2018）、沙棘木蠹蛾 *Eogystia hippophaecolus*（崔明明等，2017）、禾谷缢管蚜 *Rhopalosiphum padi*（Duan *et al.*，2017b）、东方粘虫 *Mythimna separate* (Walker)（李微等，2017）等多种昆虫的分子标记。张鹏飞等（2016）对沙葱萤叶甲 *Galeruca daurica* 转录组数据进行分析，筛选出 3 880 个 SSR 位点，设计 10 对引物对 DNA 进行扩增，扩增效率为 100%。罗梅等（2014）对扶桑绵粉蚧 *Phenacoccus solenopsis* 转录组进行搜索，找到 1 781 个 SSR 位点，随机挑选 10 对引物进行扩增，其中 6 对 PCR 扩增产物与预期相符。

意大利蝗 *Calliptamus italicus* (L.)是新疆荒漠半荒漠草原优势危害种类，主要分布在北疆地区及天山一带，其中伊犁州、博州中部，塔城地区的西北部，阿勒泰地区的西北部和东南部，昌吉州南部，乌鲁木齐达坂城区和乌鲁木齐县，哈密地区中部，吐鲁番地区和阿克苏地区北部为主要适生地，严重危害草原生态（李鸿昌和夏凯龄，2006）。近几年，对意大利蝗的研究主要集中在种群分布、生长发育、行为特征、生理生化、预测防控及植物互作等方面（任金龙等，2015；Hunter *et al.*，2016；Popova *et al.*，2016；Ren *et al.*，2016；王冬梅等，2016；Zhang *et al.*，2016；向敏等，2017；Giovanni *et al.*，2018；闫蒙云等，2018；Zhang *et al.*，2018），有关其分子标记的相关研究较少。本研究在已获得的意大利蝗转录组数据库基础上，对 SSR 位点进行发掘、分析及鉴定，以期为意大利蝗种群遗传及功能基因等研究奠定基础。

1　材料与方法

1.1　意大利蝗转录组数据来源

采集意大利蝗雌雄成虫，分别取卵巢和精巢组织，提取 RNA，构建 cDNA 文库，采用 Illumina 高通量测序平台（HiSeq / MiSeq）进行测序（委托北京康普森生物技术有限公司进行测序），每个样本生成超过 12.7 Gb 的高质量数据（NCBI 登录号: SRP119060），利用 Trinity 软件进行序列组装（Grabherr *et al.*，2011；Haas *et al.*，2013），共得到 718 872 条 unigenes（向敏等，2017）。

1.2　供试虫源及 DNA 提取

意大利蝗成虫采自伊宁市、伊宁县、博乐、裕民、塔城、吉木乃、玛纳斯、哈巴河、乌鲁木齐南山、巴里坤，样本采集信息见表 1。样品经液氮速冻后转移至 - 80 ℃保存，用于验证 SSR 引物。使用 Ezup 柱式动物基因组 DNA 抽提试剂盒（生工生物工程（上海）有限公司），提取整头意大利蝗成虫基因组 DNA，1%琼脂糖凝胶电泳检测后于 - 20 ℃保存备用。

1.3　SSR 鉴定

利用软件 MISA 1.0（Micro satellite identification tool）搜索 unigenes 的 SSR 位点。搜索标准：重复单元长度设为 1、2、3、4、5 和 6 bp，最小重复次数分别为 10、6、5、5、5 和 5，

表 1 意大利蝗样本来源信息
Table 1 Specimen information of *Calliptamus italicus* used in the study

序号 No.	采集地 Location	经度 Longitude	纬度 Latitude	海拔（m） Altitude	采集时间 Date	样本数 Number
1	伊宁市 Yining	81°16′	44°40′	1 030	2018.6	10
2	伊宁县 Yining country	81°33′	44°00′	1 020	2018.6	10
3	博乐 Bole	81°58′	45°60′	1 010	2018.6	10
4	裕民 Yumin	82°50′	45°38′	1 850	2018.6	10
5	塔城 Tacheng	83°60′	46°35′	470	2018.6	10
6	吉木乃 Jimunai	85°44′	47°25′	1 070	2018.6	10
7	玛纳斯 Manasi	86°15′	43°93′	1 292	2018.6	10
8	哈巴河 Habahe	86°31′	48°10′	680	2018.6	10
9	乌鲁木齐南山 Nanshan	87°39′	43°20′	1 930	2018.6	10
10	巴里坤 Balikun	93°38′	43°22′	2 030	2018.6	10

且 SSR 位点侧翼序列长度≥100 bp。

1.4 SSR 引物设计及验证

使用 Primer Premier 5 软件设计 SSR 引物，随机挑选 24 对引物（表 2），由生工生物工程（上海）有限公司进行合成。以意大利蝗 DNA 为模板进行扩增，PCR 反应体系为 25 μL，其中包含 DNA 模板 1 μL，2×Taq PCR Master Mix 12.5 μL（Takara，日本），上下游引物（10 μmol·L^{-1}）各 1 μL，ddH_2O 补足至 25 μL。PCR 反应程序（Eppendorf PCR 仪）为 94 ℃预变性 3 min；94 ℃变性 30 s，55 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 1 min，共 30 个循环；72 ℃延伸 5 min，4 ℃保存。PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳进行检测。

表 2 意大利蝗 SSR 引物信息
Table 2 Information for SSR primers of *Calliptamus italicus*

编号 No.	Unigene ID	基序和重复数 Motif and repeat number	引物序列 Primer sequence	产物大小（bp） Product size
SSR-1	636716	(TACAG)5	F: GCGGCGGAGTGTTTGCATTTTG R: TTGCTCACATCTCACCTCAGGC	181
SSR-2	286034	(AAGGGG)5	F: AGGGTCTGTCTTCAGGATCTC R: GACCTGCCTACATTGTTACACGG	284
SSR-3	343708	(TTTTC)6	F: GGTTTATGACGCTCCCACAG R: TGCTCCTTGCTCCCTATTCC	128
SSR-4	499673	(CTACAT)6	F: CCTGTCACAAGAAGGTAGCCAATG R: AGATGAACCCTCTGCCAAGC	318
SSR-5	296594	(T)10	F: CGCCCTTTCCTATCGCTATC R: GCCCGTTTGCTGCTTTCTAC	449
SSR-6	175894	(C)10	F: GGACATCGTTCTTGGTTGCC R: TGGCAGTGGTCCTCATCTTC	248
SSR-7	305376	(AG)10	F: GCCCGCCAAATTCTTCCATC R: AATCCCTCTACTCTACCGCC	435
SSR-8	578616	(TGT)10	F: GAGCGACACCTATCAACCCAG R: CGCCTCAAACCAGTTTACGG	353
SSR-9	188559	(ATTT)10	F: GCGAACAGTCTTCCGCAATG R: CGTTGTCCTTGTGGATGTGG	469*
SSR-10	507837	(AAAAG)10	F: GCCGCCTTATGATCCTACTG R: GCGTGTCCTAGGACATCATC	180*

续表 2（Table 2 continued）

编号 No.	Unigene ID	基序和重复数 Motif and repeat number	引物序列 Primer sequence	产物大小（bp） Product size
SSR-11	45749	(TAAAAA)10	F: TCTTCCGCGTCTGCTTACAC R: AATGAGACACCCAGCACTCG	192*
SSR-12	428119	(A)11	F: GCTCCAGGTTACACTTGGCGTTAG R: GGCTTAGAGGGTCTGTCACATC	181
SSR-13	305093	(GT)11	F: CGAGCAACGCAAGGAAAGAC R: CGCCGATGGCTAATGTTCAG	616*
SSR-14	305434	(CT)11	F: CGGCCCAGGCATAACTAGATCAG R: CCGCATGGGCAATTACTCAC	415*
SSR-15	685038	(CTG)11	F: TCACCTTCTGCTGTCACTGC R: CCGCCCTGGATACATTTGAC	461
SSR-16	269878	(ATG)11	F: GCCCAACGTGGATGTAAGTC R: GCGAGATCTTTCATCCCTGG	137
SSR-17	28884	(TAC)12	F: TAACTGCTGCCTGATGCCAC R: GAGACTGGGAGCATTTACCG	472
SSR-18	312449	(ATC)12	F: AGGTCAGGGACTGGGTATTG R: GGCTGTGCTCGTAGTTGATG	452*
SSR-19	298970	(C)23	F: GGAGGATGCAGAGCAGTAAG R: TAGTGTAGGGGTAGTGGAGG	320
SSR-20	291297	(GT)23	F: CACTGCCATACCCAGTTCCT R: CGGCGTCTCTCTTTCACTCT	189
SSR-21	296160	(ATT)23	F: GCTCGGAGTTGCGACCTAT R: CCGCTAATACGAAGTCCACC	188
SSR-22	451836	(TCCTT)7	F: CTTACAGCCAAGCCACCTGT R: CGGCATATAAGATGAGAAGAGAG	188
SSR-23	301124	(TA)10	F: TAGGCCATTGAAGGGTTTTG R: AGGCAGTGTTGTTGAGACAGAA	236
SSR-24	300374	(G)11	F: GGGAAAAACAAGAAAGGGGT R: TCTTGCCTGTCTTCGTTCCT	128

表示扩增成功。 indicates successful amplification.

2　结果与分析

2.1　意大利蝗转录组中 SSR 位点的分布特征

从意大利蝗 718 872 条 unigene 数据中，共筛选到 156 500 个 SSR 位点，分布在 126 369 条 unigenes 中，发生频率（含有 SSR 的 unigene 数量与总 unigene 数量之比）为 17.58%，其中 102 820 条 unigene 序列只含有 1 个 SSR 位点，23 549 条 unigene 序列含有 1 个以上 SSR 位点。SSR 的出现频率(SSR 个数与总 unigene 数量比）为 21.77%。

意大利蝗 SSR 重复基序中，单核苷酸重复所占比例最高，为 60.88%；其次为二核苷酸、三核苷酸和四核苷酸，分别占 SSR 总数的 23.58%、12.99%和 2.04%；五核苷酸和六核苷酸重复的含量较少，分别占 SSR 总数的 0.45%和 0.06%（表 3）。在单核苷酸重复中，A/T 基序为主要类型，所占比例为 44.38%，其次为 C/G 基序（16.50%）。二核苷酸重复中 AC/GT（12.99%）和 AG/CT（8.05%）基序为主要类型。三核苷酸重复中超过 1%的基序有 AAT/ATT、AAG/CTT、AGC/CTG、AAC/GTT、CCG/CGG 和 ATC/ATG，其比例分别为 2.84%、2.24%、1.63%、1.53%、1.30%和 1.13%。四核苷酸中 AAAT/ATTT 基序最多，所占比例为 0.72%（图 1）。

2.2　意大利蝗成虫 SSR 引物设计与 PCR 扩增

针对 70 560 个 unigenes 共设计出 84 672 对 SSR 引物。随机挑选并合成 24 对引物对意大利

蝗成虫 DNA 样品进行扩增。结果显示，SSR-9、SSR-10、SSR-11、SSR-13、SSR-14 及 SSR-186 对引物，可在 10 个不同地理种群样品中扩增出与预期片段大小基本一致的特异性片段（图 2）。引物 SSR-19 扩增产物大于预期产物片段；SSR-17 在 10 个不同地理种群样品扩增中均存在非特异性扩增条带；SSR-6、SSR-12、SSR-22、SSR-23 和 SSR-24 没有扩增条带；其他引物在不同地理种群之间扩增结果不一致（图 2）。

表 3　意大利蝗转录组中 SSRs 类型及数目

Table 3　Types and numbers of SSRs in *Calliptamus italicus* transcriptome

重复类型 Repeat type	重复数 Number of repeats												合计 Total	百分比 Percentage (%)
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	>15		
单核苷酸 Mononucleotide	–	–	–	–	–	20 576	11 536	8 653	6 709	5 980	5 423	36 400	95 277	60.88
二核苷酸 Dinucleotide	–	6 912	3 510	2 417	1 556	971	4 175	922	61	83	86	16 212	36 905	23.58
三核苷酸 Triucleotide	7 863	4 024	2 315	1 034	58	267	956	935	832	586	503	949	20 322	12.99
四核苷酸 Tetranucleotide	1 868	645	40	224	151	106	73	42	17	7	3	20	3 196	2.04
五核苷酸 Pentanucleotide	291	55	66	57	43	24	23	28	31	23	19	40	700	0.45
六核苷酸 Hexaucleotide	32	29	17	6	6	4	–	2	1	1	2	–	100	0.06
总计 Total	10 054	11 665	5 948	3 738	1 814	21 948	16 763	10 582	7 651	6 680	6 036	53 621	156 500	–
百分比（%） Percentage	6.42	7.45	3.80	2.39	1.16	14.02	10.71	6.76	4.89	4.27	3.86	34.26	–	–

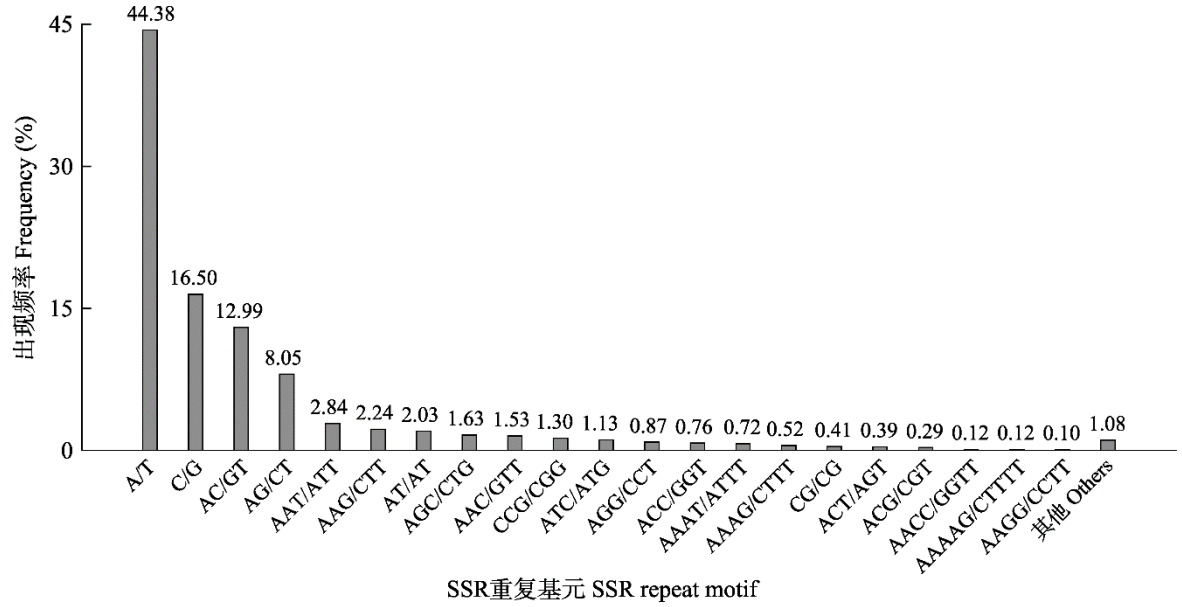

图 1　不同串联重复单元类型的 SSR 在总 SSR 中所占比例

Fig. 1　Frequency of different types of SSR motif in total SSRs

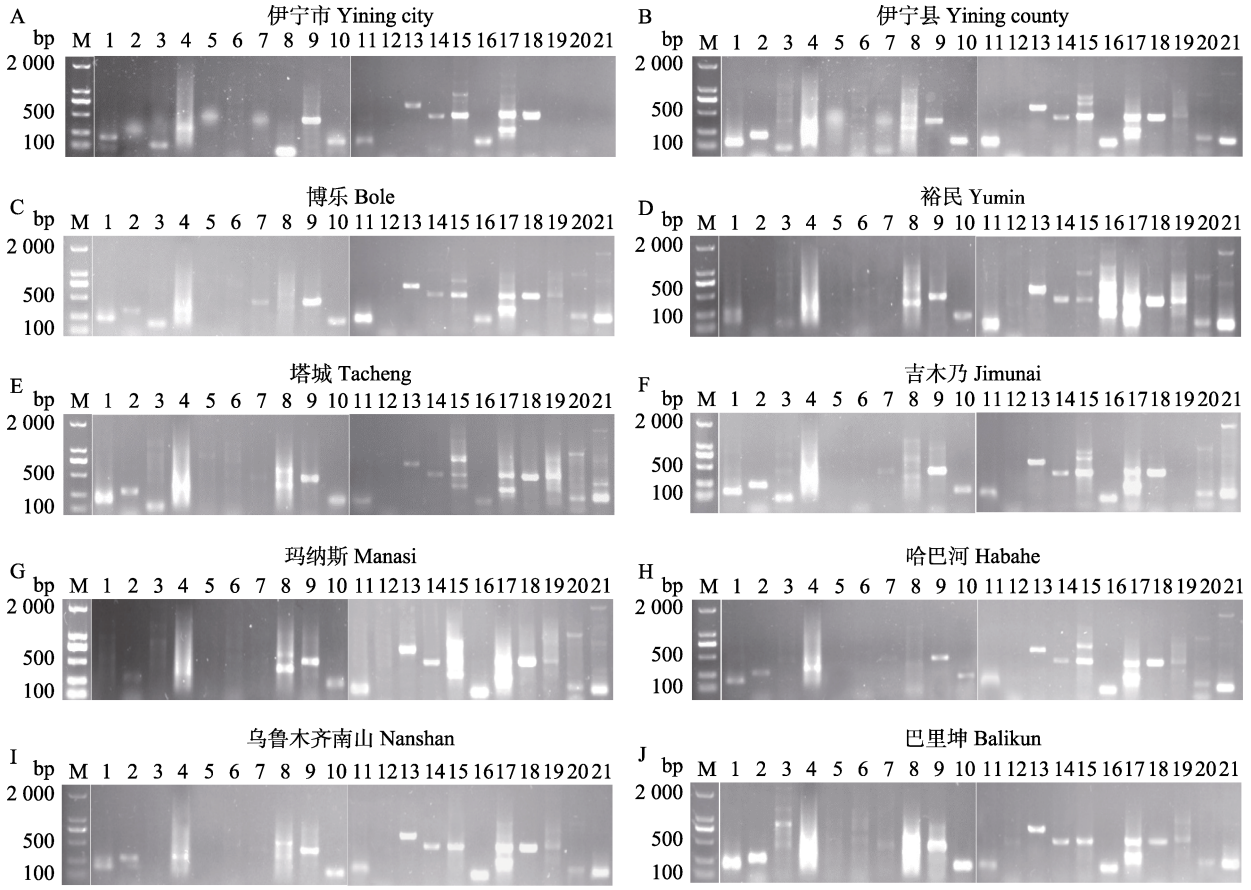

图 2　意大利蝗 SSR 位点扩增电泳图

Fig. 2　DNA amplification of SSR loci of *Calliptamus italicus*

M：DL2000 DNA marker；1-21：SSR 引物 1-21。A-J.样品分别采自伊宁市、伊宁县、博乐、裕民、塔城、吉木乃、玛纳斯、哈巴河、乌鲁木齐南山和巴里坤。

M：DL2000 DNA marker；1-21：SSR primer 1-21. A-J. Samples from Yining city, Yining county, Bole, Yumin, Tacheng, Jimunai, Manasi, Habahe, Nanshan and Balikun.

3　讨论与结论

本研究在意大利蝗转录组数据库 718 872 条 unigenes 中发掘出有效的 SSR 位点共 156 500 个，分布在 126 369 条 unigenes 中，发生频率为 17.58%，高于东方粘虫（9.85%）（李微等，2017）、沟眶象 *Eucryptorrhynchus chinensis*（9.47%）（武政梅等，2016）、扶桑绵粉蚧（5.79%）（罗梅等，2014）、沙葱萤叶甲（4.53%）（张鹏飞等，2016）和桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis*（4.00%）（魏丹丹等，2014），但低于窄足真蚋（36.05%）（郭欢等，2018）、沙棘木蠹蛾（35.14%）（崔明明等，2017）、中华蜜蜂幼虫 *Apis cerana cerana*（17.82%）（熊翠玲等，2017）。不同昆虫 SSR 发生频率存在差异，这可能与物种本身差异有关，同时，测序 RNA 质量、筛选标准及方法等不同亦是造成不同物种 SSR 发生频率差异的可能原因（Deng *et al.*，2018）。

本研究意大利蝗转录组 SSR 位点中，单核苷酸重复（60.88%）和二核苷酸重复（23.58%）为主要类型，与梨小食心虫（冷春蒙等，2018）、沙棘木蠹蛾（崔明明等，2017）结果类似。而窄足真蚋（郭欢等，2018）、孟氏隐唇瓢虫 *Cryptolaemus montrouzieri*（Li *et al.*，2017）、沙葱萤叶甲（张鹏飞等，2016）、扶桑绵粉蚧（罗梅等，2014）、桔小实蝇（魏丹丹等，2014）等昆虫，SSR 位点均以单核苷酸和三次核苷酸重复为主要类型。不同昆虫 SSR 位点核苷酸重复类

型存在一定差别，这可能与不同昆虫自身基因编码特征、转录组数据大小、SSR 位点搜索软件及参数设置等因素有关（Duan *et al.*，2017b；Deng *et al.*，2018）。

研究表明，动物 SSR 中 GC/GC 重复基序含量一般较低甚至没有（Duan *et al.*，2017b），如在中华蜜蜂幼虫（熊翠玲等，2017）、云南切梢小蠹 *Tomicus yunnanensis*（袁远等，2014）、桔小实蝇（魏丹丹等，2014）、沙葱萤叶甲（张鹏飞等，2016）中仅含有 1-3 个 GC/GC 重复基序，在褐飞虱 *Nilaparvata lugens*（刘玉娣和侯茂林，2010）中没有发现 GC/GC 重复基序。本研究中，意大利蝗 GC/GC 所占比例不高，仅为 0.52%。但在印度谷螟 *Plodia interpunctella*（唐培安等，2017）、粘虫 *Mythimna separate* (Walker)（胡艳华等，2015）、二点委夜蛾 *Athetis lepigone*（Li *et al.*，2013）等昆虫，其 GC/GC 含量较高。不同昆虫 GC/GC 重复基序含量不一致是否与特殊功能相关，还有待于进一步验证。

本研究随机挑选的 24 对引物中，6 对引物扩增片段与预期产物片段大小一致，1 对引物扩增片段大于预期产物片段长度，5 对引物扩增失败。通过转录组获得的 SSR 与相应的基因组 SSR 不同，不包含内含子序列，这些内含子可能对 PCR 扩增产生影响，造成扩增产物大于预期大小，甚至导致扩增失败（Chen *et al.*，2018）。

基于转录组数据开发的 SSR 位点，对于意大利蝗种群遗传、分子进化、功能基因等研究具有重要意义。本研究在意大利蝗转录组数据库中共检测出 156 500 个 SSR 位点，分布在 126 369 条 unigene 中，针对其中 70 560 个 unigenes 共设计出 84 672 对 SSR 引物。随机挑选 24 对引物对不同地理种群意大利蝗进行扩增，最后筛选得到 6 对能够稳定扩增的引物，有关其遗传多态性还有待于进一步研究。

参考文献 (References)

Chen ZM, Chen J, Zhang X, Hou YM, Wang GH, 2018. Development of microsatellite markers for the nipa palm hispid beetle, *Octodonta nipae* (Maulik). *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, doi. org/10.1155/2018/9139306.

Cui MM, Tao J, Zong SX, 2017. Feature analysis of simple sequence repeats in *Eogystia hippophaecolus* transcriptome. *Journal of Environmental Entomology*, 39(3): 605–610. [崔明明, 陶静, 宗世祥, 2017. 基于转录组的沙棘木蠹蛾简单重复序列特征分析. 环境昆虫学报, 39(3): 605–610.]

Deng KP, Deng RJ, Fan JX, Chen EF, 2018. Transcriptome analysis and development of simple sequence repeat (SSR) markers in *Zingiber striolatum* Diels. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 24(1): 125–134.

Ding SM, Wang SP, He K, Jiang MX, Li F, 2017. Large-scale analysis reveals that the genome features of simple sequence repeats are generally conserved at the family level in insects. *BMC Genomics*, 18(1): 848–857.

Ding SM, Wang SP, He K, Li F, Jiang MX, 2018. PCR-based identification of fruit-flies using specific SSR sequences. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 55(4): 759–765. [丁思敏, 王书平, 贺康, 李飞, 蒋明星, 2018. 基于基因组特异性 SSR 序列的实蝇 PCR 鉴定方法. 应用昆虫学报, 55(4): 759–765.]

Duan XL, Peng X, Qiao XF, Chen MH, 2017a. Life cycle and population genetics of bird cherry-oat aphids *Rhopalosiphum padi* in china: an important pest on wheat crops. *Journal of Pest Science*, 90(1): 103–116.

Duan XL, Wang K, Su S, Tian RZ, Li YT, Chen MH, 2017b. *De novo* transcriptome analysis and microsatellite marker development for population genetic study of a serious insect pest, *Rhopalosiphum padi* (L.) (Hemiptera: Aphididae). *PLoS ONE*, 12(2): e0172513.

Giovanni T, Elena D, Riccardo B, Lorenzo M, 2018. Effect of insect herbivory on plant community dynamics under contrasting water availability levels. *Journal of Ecology*, 106(5): 1819–1828.

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 H, Wang G, Zhang ST, Huang M, 2018. Development of SSR primers for *Simulium* (*Eusimulium*) *angustipes* (Diptera: Simuliidae) based on RNA-seq dataset. *Acta Entomologica Sinica*, 61(7): 815–824. [郭欢, 王刚, 张树田, 黄敏, 2018. 基于 RNA-seq 数据的窄足真蚋 SSR 分子标记开发. 昆虫学报, 61(7): 815–824.]

Haas BJ, Papanicolaou A, Yassour M, Grabherr MG, Blood PD, Bowden J, Couger MB, Eccles D, Li B, Lieber M, MacManes

MD, Ott M, Orvis J, Pochet N, Strozzi F, Weeks N, Westerman R, William T, Dewey CN, Henschel R, LeDuc RD, Friedman N, Regev A, 2013. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols*, 8(8): 1494–1512.

Hong B, Zhang F, Chen ZJ, Luo K, Zhao HY, 2019. Analysis of the genetic diversity of *Scythropus yasumatsui* (Coleoptera: Curculionidae) populations in China based on microsatellite markers. *Acta Entomologica Sinica*, 62(3): 381–390. [洪波, 张锋, 陈志杰, 罗坤, 赵惠燕, 2019. 基于微卫星标记的中国枣食芽象甲地理种群遗传多样性分析. 昆虫学报, 62(3): 381–390.]

Hu YH, Li M, Zhang HF, Li SC, Wang Q, Zhao HL, 2015. The information analysis of SSR loci in the *Mythimna separate* (Walker) transcriptome. *Journal of Shanxi Agricultural University*, 35(5): 484–489. [胡艳华, 李敏, 张虎芳, 李生才, 王青, 赵慧玲, 2015. 粘虫转录组中 SSR 位点的信息分析. 山西农业大学学报, 35(5): 484–489.]

Hunter DM, Latchininsky AV, Abashidze E, Gapparov FA, Nurzhanov AA, Medetov MZ, Tufliev NX, 2016. The efficacy of *Metarhizium acridum* against nymphs of the Italian locust, *Calliptamus italicus* (L.) (Orthoptera: Acrididae) in Uzbekistan and Georgia. *Journal of Orthoptera Research*, 25(2): 61–65.

Leng CM, Li Y, Hu D, Wu JX, Li YP, 2018. Analysis of the larval midgut transcriptome and SSR markers in *Grapholitha molesta* (Lepidoptera: Tortricidae). *Acta Entomologica Sinica*, 61(11): 1272–1283. [冷春蒙, 李引, 胡迪, 仵均祥, 李怡萍, 2018. 梨小食心虫幼虫中肠转录组及 SSR 分子标记分析. 昆虫学报, 61(11): 1272–1283.]

Li HC, Xia KL, 2006. Fauna Since. Beijing: China Science Press. 576–578. [李鸿昌, 夏凯龄, 2006. 中国动物志. 北京: 科学出版社. 576–578.]

Li HS, Liang XY, Zou SJ, Liu Y, Clercq PD, Slipinski A, Pang H, 2017. New EST-SSR markers reveal strong genetic differentiation in native and introduced populations of the mealybug destroyer *Cryptolaemus montrouzieri*. *Biological Control*, 109: 21–26.

Li LT, Zhu YB, Ma JF, Li ZY, Dong ZP, 2013. An analysis of the *Athetis lepigone* transcriptome from four developmental stages. *PLoS ONE*, 8(9): e73911.

Li W, Zhang L, Cheng YX, Luo LZ, Jiang XF, 2017. High-throughput discovery of microsatellite markers based on transcriptome sequencing in the oriental armyworm, *Mythimna separate* (Walker). *Journal of Plant Protection*, 44(3): 377–384. [李微, 张蕾, 程云霞, 罗礼智, 江幸福, 2017. 应用转录组测序高通量发掘东方粘虫 SSR 标记. 植物保护学报, 44(3): 377–384.]

Liu Y, Fu KY, Tursun, He J, Guo WC, 2018. Verification SSR primers by datamining genome SSR loci in *Leptinotarsa decemlineata*. *Journal of Environmental Entomology*, 40(3): 633–644. [刘旸, 付开赟, 吐尔逊, 何江, 郭文超, 2018. 马铃薯甲虫基因组 SSR 位点分析及引物效率的验证. 环境昆虫学报, 40(3): 633–644.]

Liu YD, Hou ML, 2010. Analysis of microsatellite information in EST resource of *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). *Acta Entomologica Sinica*, 53(3): 239–247. [刘玉娣, 侯茂林, 2010. 褐飞虱 EST 资源的微卫星信息分析. 昆虫学报, 53(3): 239–247.]

Luo M, Zhang H, Bin SY, Lin JT, 2014. High-throughput discovery of SSR genetic markers in the mealybug, *Phenacoccus solenopsis* (Hemiptera: Pseudococcidae), from its transcriptome database. *Acta Entomologica Sinica*, 57(4): 395–400. [罗梅, 张鹤, 宾淑英, 林进添, 2014. 基于转录组数据高通量发掘扶桑绵粉蚧微卫星引物. 昆虫学报, 57(4): 395–400.]

Popova EN, Semenov SM, Popov IO, 2016. Assessment of possible expansion of the climatic range of Italian locust (*Calliptamus italicus* L.) in Russia in the 21st century at simulated climate changes. *Russian Meteorology and Hydrology*, 41(3): 213–217.

Ren JL, Tu XB, Ge J, Zhao L, Zhang ZH, 2016. Influence of temperature on the development, reproduction, and life table of *Calliptamus italicus* (L.) (Orthoptera: Acridoidea). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 19(1): 203–207.

Ren JL, Zhao L, Ge J, 2015. Embryonic development of diapausing eggs in *Calliptamus italicus* (L.) (Orthoptera: Catantopidae). *Acta Entomologica Sinica*, 58(11): 1201–1212. [任金龙, 赵莉, 葛婧, 2015. 意大利蝗的胚胎发育及卵滞育发生的胚胎发育阶段. 昆虫学报, 58(11): 1201–1212.]

Renuka G, Shamitha G, 2016. Genetic variation in ecoraces of tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta* using SSR markers. *Journal of Genetics*, 95(4): 777–785.

Tang PA, Tao YX, Xue H, Yuan ML, 2017. Analysis of microsatellite loci in *Plodia interpunctella* based on transcriptome dataset. *Plant Protection*, 43(3): 43–48. [唐培安, 陶冶心, 薛昊, 袁明龙, 2017. 基于转录组数据的印度谷螟微卫星位点分析. 植物保护, 43(3): 43–48.]

Wachi N, Matsubayashi KW, Maeto K, 2018. Application of next-generation sequencing to the study of non-model insects. *Entomological Science*, 21(1): 3–11.

Wang C, Du LM, Li P, Yang MY, Li WJ, Shen YM, Zhang XY, Yue BS, 2015. Distribution patterns of microsatellites in the genome

of the German cockroach (*Blattella germanica*). *Acta Entomologica Sinica*, 58(10): 1037–1045. [王晨, 杜联明, 李鹏, 杨茗羽, 李午佼, 沈咏梅, 张修月, 岳碧松, 2015. 德国小蠊全基因组中微卫星分布规律. 昆虫学报, 58(10): 1037–1045.]

Wang DM, Li S, Zhang YJ, Roman J, Ji R, 2016. Response of the discontinuous gas exchange cycle (DGC) duration in *Calliptamus italicus* (Orthoptera: Acrididae) to high temperature stress. *Acta Entomologica Sinica*, 59(5): 516–522. [王冬梅, 李爽, 张永军, Roman JASHENKO, 季荣, 2016. 意大利蝗不连续气体交换循环(DGC)呼吸周期历时对高温胁迫的响应. 昆虫学报, 59(5): 516–522.]

Wang XT, Zhang YJ, He X, Mei T, Chen B, 2016. Identification, characteristics and distribution of microsatellites in the whole genome of *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae). *Acta Entomologica Sinica*, 59(10): 1058–1068. [王小婷, 张玉娟, 何秀, 梅婷, 陈斌, 2016. 中华按蚊全基因组微卫星的鉴定、特征及分布规律. 昆虫学报, 59(10): 1058–1068.]

Wei DD, Shi JX, Zhang XX, Chen SC, Wei D, Wang JJ, 2014. Analysis of microsatellite loci from *Bactrocera dorsalis* based on transcriptome dataset. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 25(6): 1799–1805. [魏丹丹, 石俊霞, 张夏琁, 陈世春, 魏冬, 王进军, 2014. 基于转录组数据的桔小实蝇微卫星位点信息分析. 应用生态学报, 25(6): 1799–1805.]

Wu ZM, Gao P, Wen JB, 2016. Characteristic analysis of microsatellite in *Eucryptorrhynchus chinensis* transcriptome. *Journal of Environmental Entomology*, 38(5): 979–983. [武政梅, 高朋, 温俊宝, 2016. 沟眶象转录组微卫星特征分析. 环境昆虫学报, 38(5): 979–983.]

Xiang M, Ye XF, Hu HX, Wang WL, Yu F, Xiao HW, Ji R, Wang H, 2017. Analysis of the transcriptome and gonadal development related genes of *Calliptamus italicus* (Orthopera: Acrididae). *Acta Entomologica Sinica*, 60(11): 1235–1246. [向敏, 叶小芳, 扈鸿霞, 王伟亮, 于非, 肖宏伟, 季荣, 王晗, 2017. 意大利蝗转录组及性腺发育相关基因分析. 昆虫学报, 60(11): 1235–1246.]

Xiong CL, Zhang L, Fu ZM, Wang HQ, Hou ZX, Tong XY, Li WD, ZhengYZ, Chen DF, Guo R, 2017. Large-scale development of SSR primers for *Apis cerana cerana* larvae based on its RNA-seq datasets. *Journal of Environmental Entomology*, 39(1): 68–74. [熊翠玲, 张璐, 付中民, 王鸿权, 侯志贤, 童新宇, 李汶东, 郑燕珍, 陈大福, 郭睿, 2017. 基于 RNA-seq 数据大规模开发中华蜜蜂幼虫的 SSR 分子标记. 环境昆虫学报, 39(1): 68–74.]

Yan MY, Xu Y, Wang XX, Wang H, Ji R, Ye XF, 2018. The response of respiratory metabolism in overwintering eggs of Italian locust *Calliptamus italicus* (Orthoptera: Acrididae) to seasonal changes. *Journal of Plant Protection*, 45(6): 1302–1307. [闫蒙云, 徐叶, 王香香, 王晗, 季荣, 叶小芳, 2018. 意大利蝗卵越冬期呼吸代谢对季节变化的响应. 植物保护学报, 45(6): 1302–1307.]

Yang WY, Zhen JJ, Jia BY, Chang SZ, Liu H, Li CY, Wang GW, Yang FH, 2017. SSR marker and its research progress to animal genetics and breeding. *Genomics and Applied Biology*, 36(11): 4644–4649. [杨万云, 郑军军, 贾博寅, 常树卓, 刘慧, 李春义, 王桂武, 杨福合, 2017. 微卫星分子标记及其在动物遗传育种中的研究进展. 基因组学与应用生物学, 36(11): 4644–4649.]

Yoshitaka K, Jun ABE, Rodrigo LF, Kazunori Y, 2019. Microsatellite markers developed using a next-generation sequencing technique for *Neotrogla* spp. (Psocodea: Prionoglarididae), cave dwelling insects with sex-reversed genitalia. *Entomological Science*, 22(1): 48–55.

Yuan Y, Zhang LF, Wu GX, Zhu JY, 2014. High-throughput discovery microsatellites in *Tomicus yunnanensis* (Coleoptera: Scolytinae). *Journal of Environmental Entomology*, 36(2): 166–170. [袁远, 张丽芳, 吴国星, 朱家颖, 2014. 云南切梢小蠹微卫星的高通量发掘. 环境昆虫学报, 36(2): 166–170.]

Zhang LW, Zhang PF, Zhang L, 2018. Epizootics of the entomopathogenic fungus, *Entomophaga grylli* (Entomophthorales: Entomophthoraceae), in a grasshopper population in Northwest China. *Biocontrol Science and Technology*, 28(9): 848–857.

Zhang PF, Zhou XR, Pang BP, Tan Y, Chang J, Gao LJ, 2016. High-throughput discovery of microsatellite markers in *Galeruca daurica* (Coleoptera: Chrysomelidae) from a transcriptome database. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 53(5): 1058–1064. [张鹏飞, 周晓榕, 庞保平, 谭瑶, 常静, 高利军, 2016. 基于转录组数据高通量发掘沙葱萤叶甲微卫星引物. 应用昆虫学报, 53(5): 1058–1064.]

Zhang XH, Li YL, Zhang KJ, Hou J, Ying H, 2016. Cloning and expression analysis the hexamerin subunit type (Hex2) gene from the grasshopper *Calliptamus italicus* (Orthoptera: Catantopidae). *Acta Entomologica Sinica*, 59(2): 156–163.