

中华稻蝗 *Knickkopf* (*Knk*) 基因分子特性和生物学功能

于荣荣¹, 张育平¹, 马恩波², 张建珍^{2*}

(1. 太原师范学院, 晋中 030619; 2. 山西大学, 太原 030006)

摘要 基于中华稻蝗转录组数据库, 采用生物信息学方法搜索获得 1 条 *OcKnk* 基因全长 cDNA 序列, 采用 qRT-PCR 检测其组织部位表达特性和其在表皮发育过程中表达情况, 明确其分子特性, 采用 RNAi 技术结合表型观察, 研究其对中华稻蝗蜕皮和生长发育的影响, 以明确其生物学功能。组织部位表达结果显示其在中华稻蝗体壁、前肠和脂肪体表达最高, 发育表达结果显示其在表皮不同发育日龄均有表达, 且在蜕皮前期和后期表达显著高于其他日龄。生物学功能研究表明, 注射 dsRNA 后, 多数虫体难以成功蜕去旧表皮, 导致死亡, 少部分可蜕至下一龄期, 但活动力较低, 行动缓慢, 最终死亡。研究结果表明 *OcKnk* 参与昆虫生长发育和蜕皮过程, 可作为重要靶标基因, 为下一步害虫防治提供理论基础。

关键词 中华稻蝗; *Knickkopf*; 分子特性; 生物学功能

中图分类号: S 433.2 文献标识码: A DOI: 10.16688/j.zwbh.2019648

Molecular characteristics and biological function of *Knickkopf* (*Knk*) gene in *Oxya chinensis*

YU Rongrong¹, ZHANG Yuping¹, MA Enbo², ZHANG Jianzhen^{2*}

(1. Taiyuan Normal University, Jinzhong 030619, China; 2. Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract The full-length cDNA of *OcKnk* gene was obtained based on the transcriptome database of *Oxya chinensis*. To determine the molecular characteristics of *OcKnk*, the expressions of *OcKnk* in different tissues and during different developmental stage (day) of cuticle were detected by qRT-PCR. The biological functions of *OcKnk* affecting molting and development were investigated by RNAi technology combined with phenotype observation. Tissue expression results indicated that there was a highest expression in the integument, foregut and fat body; developmental expression pattern showed that it was expressed in the cuticle during different developmental days of age, with a significantly higher expression during proecdysis and post-ecdysis. The biological function assay showed that most locusts was unable to escape from the old cuticle successfully, finally leading to death and failing to reach the next instar. During the process, they moved slowly with low activity and eventually went to death. The results indicated that *OcKnk* may be involved in insect growth and molting, which can be used as an important target gene and provide a theoretical basis for further pest control.

Key words *Oxya chinensis*; *Knickkopf*; molecular characteristics; biological function

中华稻蝗 *Oxya chinensis* 隶属于直翅目 Orthoptera 斑腿蝗科 Catantopidae 稻蝗属 *Oxya*, 广泛分布于我国水稻种植区, 是稻田土蝗的优势种^[1-3], 喜食水稻幼嫩组织, 造成叶片缺刻受损、白穗和稻粒缺失, 严重影响农作物产量^[4-5]。目前化学药剂仍是防治稻蝗的主要手段^[6-7], 长期施用化学药剂, 使稻

蝗产生一定程度的抗药性^[8-9]。昆虫生长发育伴随周期性旧表皮脱落和新表皮形成, 几丁质是昆虫表皮的重要组成部分^[10-11], 几丁质片层结构以恒定角度螺旋排列形成致密而富有弹性的表皮结构^[12-15]。几丁质排列过程中, *Knickkopf* (*Knk*) 发挥着关键作用^[16]。因此, 通过 RNA 干扰 (RNAi) 技术筛选获得

收稿日期: 2019-11-26

修订日期: 2020-02-01

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金(31801749); 山西省教育厅高等学校科技创新项目(2019L0796)

* 通信作者 E-mail: zjz@sxu.edu.cn

几丁质排列关键靶基因将为中华稻蝗防治提供重要理论基础。

目前对于 *Knk* 功能的研究主要集中于黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 和赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 中,果蝇 *DmKnk* 对于胚胎气管直径的维持、长度的保持和结构的完整性发挥重要作用,此外,*DmKnk* 通过对表皮几丁质进行组装,进而影响胚胎形态^[16]。通过点突变结合遗传学试验筛选,发现 *DmKnk* 的 DOMON 功能域 4 个关键氨基酸对于几丁质组装具有作用^[17]。同时,*DmKnk* 对于成虫翅形状和翅表面结构的维持具有重要作用^[18]。赤拟谷盗中,*TcKnk* 对胚后发育时期虫体生长发育起着关键作用,当 *TcKnk* 表达量下降后,不同发育阶段(幼虫-蛹和蛹-成虫)虫体均出现难以蜕去旧表皮,蜕皮致死的表型,进一步通过透射电镜观察,发现注射 *dsTcKnk* 后,鞘翅表皮致密排列的几丁质片层结构消失,同时气管形态结构发生改变^[19]。此外,*TcKnk* 对胚胎发育起着关键作用,将 *dsTcKnk* 注射进入雌虫体内,发现其所产卵的孵化率显著降低,几丁质含量下降,同时浆膜表皮几丁质片层结构消失,部分已孵化幼虫在蜕至下一龄期前死亡^[20-21]。此外,*TcKnk* 负责保护幼虫新合成的表皮,防止其被几丁质酶降解^[22]。已在意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 中鉴定出 *AmKnk*,但对其功能未做进一步阐述^[23]。

目前国内外对于 *Knk* 生物学功能系统性研究多集中于全变态昆虫中,研究表明,其在昆虫蜕皮和生长发育过程中起着关键作用;而目前对于渐变态昆虫中 *Knk* 生物学功能研究较少。由于全变态昆虫和渐变态昆虫变态发育过程存在明显差异,为明确其在渐变态昆虫中是否也具有同样功能,本文以典型渐变态昆虫(中华稻蝗)为研究对象,基于中华稻蝗转录组数据库,搜索获得 *OcKnk* 全长 cDNA 序列,进一步对其分子特性和生物学功能进行研究,以探究 *Knk* 在不同昆虫中生物学功能是否保守。

本研究搜索获得 *OcKnk* 全长 cDNA 序列,并对其分子特性和生物学功能进行研究,明确 *OcKnk* 在昆虫生长发育和蜕皮过程中发挥关键作用,筛选获得靶基因将为害虫防治提供重要理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

中华稻蝗虫卵采集于山西省太原市晋源区稻田

中,将其置于恒定温度(30 ± 2)℃,恒定湿度 60%,光周期 L//D=14 h//10 h 的人工气候培养箱中进行孵育,待其孵化为 1 龄若虫时,将其收集于纱网笼中,置于人工气候箱中饲喂,待其生长至 5 龄若虫时收集并开展试验。

1.2 试验试剂

RNAiso™ Plus 用于总 RNA 提取, M-MLV Reverse transcriptase, dNTP Mixture, RNAase Inhibitor(TaKaRa, 日本); Oligo-(dT)18 引物(上海生工, 中国)用于 cDNA 第一链合成; SYBR Green 用于 qRT-PCR 检测(TOYOBO, 日本); $2 \times Taq$ PCR Master Mix(天根, 中国)和 T7 RiboMAX™ Express RNAi System(Promega, 美国)用于双链 RNA(dsRNA)合成。

1.3 *OcKnk* 序列鉴定和功能域分析

基于中华稻蝗转录组数据库,采用生物信息学方法搜索获得 *OcKnk* 全长 cDNA 序列。通过 Ex-PaSy translate tool(<http://web.expasy.org/>)对其开放阅读框进行预测,并将其翻译为对应氨基酸,同时采用 computer PI/Mw tool(http://web.expasy.org/compute_pi/)对其分子量(MW)和等电点(pI)进行预测,使用 SignalP-5.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)在线软件对其信号肽进行预测;采用 big-PI Predictor 在线软件(http://mendel.imp.ac.at/gpi/cgi-bin/gpi_pred.cgi)预测 GPI-锚定位点,采用 NCBI 的 BLASTp(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>)对其功能域进行预测。

1.4 *OcKnk* 聚类分析

基于 NCBI 的 BLASTp(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>)工具,搜索获得不同昆虫 *Knk* 同源序列,并将其下载保存于文本中,使用 ClustalX 对同源序列进行比对,进一步将比对结果输入 MEGA 5.0 软件中,采用邻接法(neighbor-joining)构建系统进化树,并通过 Bootstrap 重复 1 000 次对其进行检验。

1.5 *OcKnk* 引物设计

基于 *OcKnk* 全长 cDNA 序列,使用 Primer Premier 5.0 软件设计 qRT-PCR 表达引物和双链扩增引物,并将其送于上海英骏公司进行引物合成(表 1)。

表 1 文中所用引物列表¹⁾
Table 1 Primers used in this study

基因 Gene	用途 Application	引物序列(5'-3') Primer sequence	产物/bp Product
<i>βactin</i>	基因表达	F: CTTTCTTCGTCCTCGCATAAATACAC R: TGGCGAACTTCTCGATGATGA	156
<i>OcKnk</i>		F: TACAGCTGGTCCTTTGTGTATTGG R: TGTTAGGGTGGGTGTAACATATGGTAG	194
<i>GFP</i>	dsRNA 合成	F: taatacgactcactatagggGTGGAGAGGGTGAAGG R: taatacgactcactatagggGGGCAGATTGTGTGGAC	571
<i>OcKnk</i>		F: taatacgactcactatagggAACATTACTGCCAAGTCTCC R: taatacgactcactatagggGGAACCTAAGTAGCCATTGA	497

1) 小写字母为 T7 启动子序列, *βactin* 为基因表达内参基因, *GFP* 为 dsRNA 注射对照基因。
Lowercase letters indicate T7 promoter sequence; *βactin* is a reference gene for gene expression, and *GFP* is the control gene for dsRNA injection.

1.6 *OcKnk* 基因表达特性

1.6.1 不同组织部位和发育日龄模板制备

收集 30 头 5 龄 6 d 若虫用于不同组织部位模板制备,具体过程为使用锋利解剖刀在显微镜下将不同组织部位(体壁、前肠、中肠、后肠、胃盲囊、马氏管、脂肪体)快速解剖下来,冻存于液氮中,依据 RNAiso™ Plus 说明书,将解剖下来的组织进行总 RNA 提取,使用琼脂糖凝胶和 NanoDrop 对其完整性和浓度进行检测,选取 1 μg 总 RNA 用于第一链 cDNA 合成。

将不同日龄的 5 龄若虫表皮解剖下来,用于制备不同日龄模板,用镊子挑去表皮上气管和脂肪体,根据 RNAiso™ Plus 说明书提取总 RNA 并将其反转录为第一链 cDNA。

1.6.2 qRT-PCR 检测

将合成的第一链 cDNA 稀释 20 倍作为模板,同时将 *OcKnk* 表达引物稀释至 10 μmol/L 用于 qRT-PCR 检测,参照 SYBR Green 说明书,配制反应体系,其中 SYBR Green 10 μL,模板 2 μL,无菌去离子水 6.4 μL,上下游表达引物各 0.8 μL。将配制好的反应体系放于 ABI 7300 real time PCR 反应仪中进行扩增,反应程序为:95℃ 30 s;随后 95℃ 5 s, 60℃ 31 s 40 个循环,熔解曲线为 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 95℃ 15 s。 *βactin* 为内参基因,设置 3 个生物学重复和 2 个技术重复,采用 SPSS 16.0 软件 ANOVA 进行数据分析,并采用 SigmaPlot 12.0 软件绘制柱形图,柱上不同字母代表不同处理之间存在显著差异。

1.7 *OcKnk* 生物学功能研究

1.7.1 dsRNA 合成所需模板制备

将包含 T7 启动子 (taatacgactcactataggg) 的

dsRNA 合成引物稀释至 10 μmol/L,将表皮 cDNA 稀释 20 倍作为模板,进行 PCR 扩增,扩增体系为: 2× *Taq* PCR Master Mix 12.5 μL,无菌去离子水 9.5 μL, cDNA 2 μL,上下游引物各 0.5 μL。采用琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,明确目的条带,将目的条带切割下来,并依照胶回收试剂盒说明书对目的条带进行回收,检测目的条带的大小和浓度,将回收产物定量至 0.25 μg/μL,吸取 8 μL 回收产物用于 dsRNA 合成,依照 T7 RiboMAX™ Express RNAi System 试剂盒说明书合成 dsRNA,将合成的 dsRNA 定量至 2 μg/μL。

1.7.2 dsRNA 沉默效率检测

收集 18 头 5 龄 2 d 若虫,平均分为 2 组,采用微量注射器分别将 3 μL ds*GFP* 和 ds*OcKnk* 注射进入不同组若虫体腔内,待 24 h 后,收集虫体,冻存于 -80℃ 冰箱,进一步提取总 RNA 并将其反转录为第一链 cDNA,采用 qRT-PCR 检测 *OcKnk* 在对照组和处理组中的表达情况,采用 SigmaPlot 12.0 绘制柱形图,使用 *t* 测验分析 *OcKnk* 在对照组和处理组中表达差异。

1.7.3 飞蝗表型观察

选取 40 头 5 龄 2 d 若虫,平均分为 2 组,分别将 6 μg ds*GFP* 和 ds*OcKnk* 注射进入 5 龄 2 d 若虫中,置于人工气候培养箱中,对其生长发育进行连续观察和记录,直至蜕皮至下一龄期。

2 结果

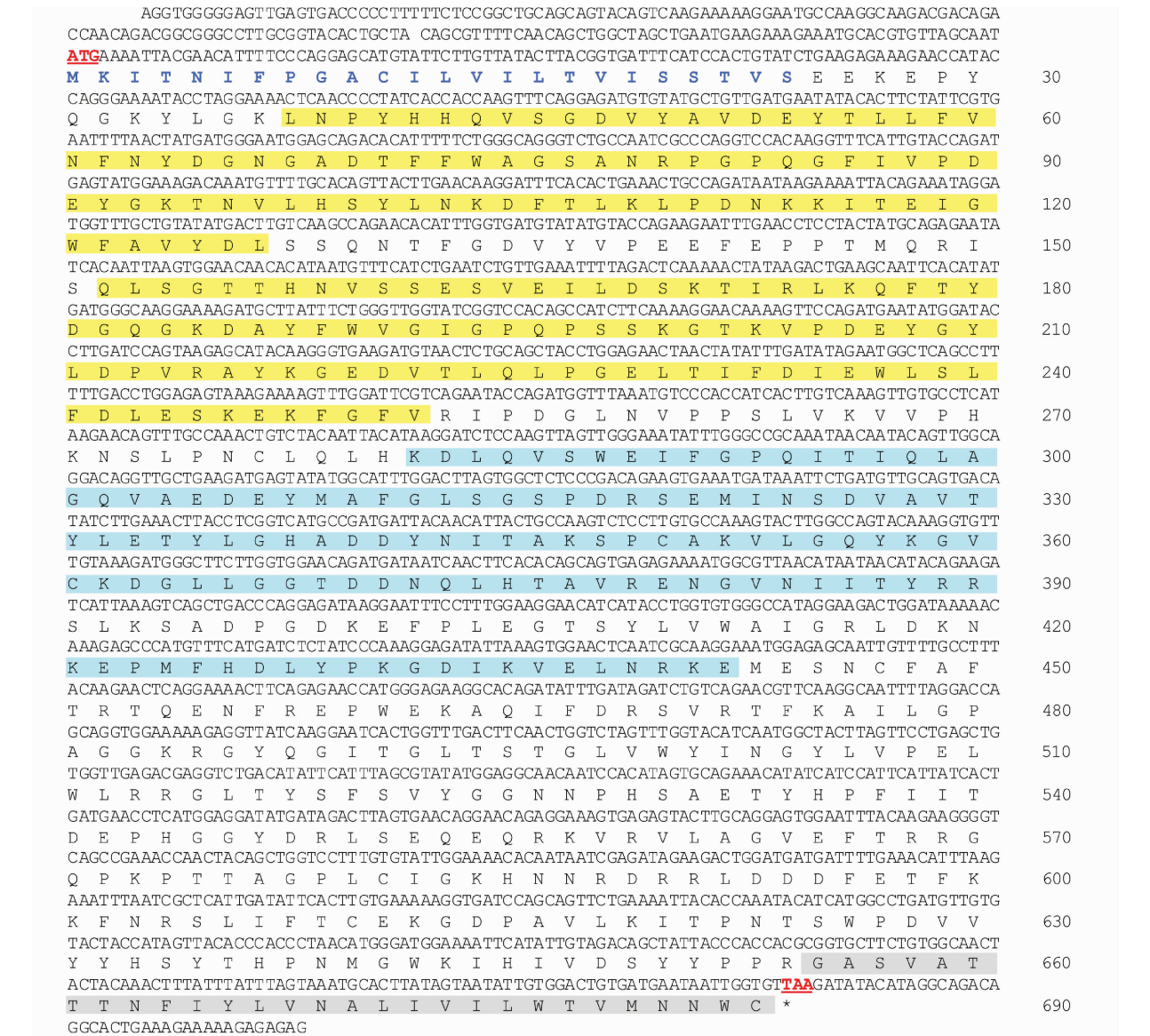
2.1 *OcKnk* 全长 cDNA 鉴定

基于中华稻蝗转录组数据库,搜索获得 1 条

OcKnk 序列(图 1),其全长 cDNA 核苷酸长度为 2 265 bp,由 5'-UTR 区、开放阅读框和 3'-UTR 区组成。其中 5'-UTR 和 3'-UTR 分别为 172 bp 和 41 bp,开放阅读框为 2 052 bp,编码 684 个氨基酸,分子量为 77 kD,等电点为 5.8。功能域预测结果显示其包含信号肽(1—24 aa)、两个串联的 DM13 功

能域(37—136 aa 和 152—252 aa)、1 个多巴胺类似功能域(DOMON)(282—414 aa)和 C 端的 GPI 锚定位点(655—683 aa)。

不同昆虫 *Knk* 氨基酸序列系统进化分析结果显示(图 2),不同昆虫 *Knk* 聚为一支,说明不同昆虫 *Knk* 序列具有较高同源性,故将其命名为 *OcKnk*。



红色核苷酸为起始密码子和终止密码子。蓝色氨基酸为信号肽,黄色阴影为DM13功能域,蓝色阴影为多巴胺类似功能域(DOMON),灰色阴影为GPI锚定位点
Red nucleotides indicate the start codon and stop codon; blue amino acids are signal peptide; yellow shade indicates the DM13 domain; blue shade indicates the DOMON domain, and gray shade indicates the GPI anchor site

图 1 中华稻蝗 *OcKnk* 功能域分析
Fig. 1 Functional domain analysis of *OcKnk* in *Qxya chinensis*

2.2 *OcKnk* 表达特性

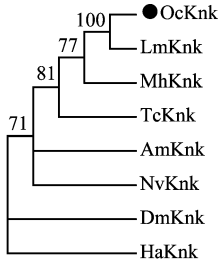
采用 qRT-PCR 检测 *OcKnk* 组织部位和表皮不同天数表达特性(图 3),*OcKnk* 在不同组织部位表

达结果表明(图 3a):*OcKnk* 在体壁和前肠中表达最高,暗示其在表皮中发挥重要作用,将 5 龄不同日龄若虫体壁解剖下来,进一步检测其在不同日龄体壁

表达(图 3b),结果表明其在 5 龄不同日龄均有表达,且其在 5 龄若虫蜕皮前、后期表达量显著提高,暗示其参与昆虫蜕皮过程。

2.3 OcKnk 生物学功能

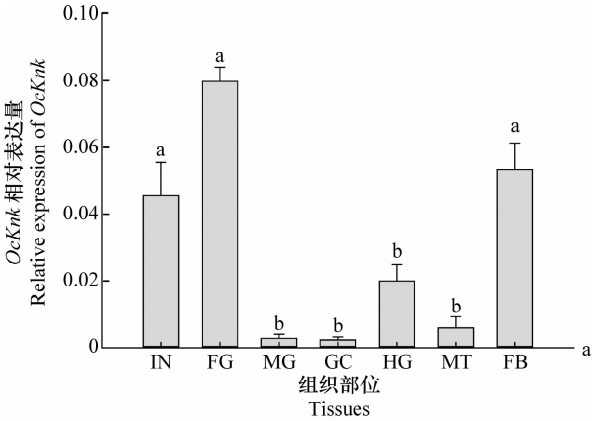
将合成的 dsGFP 和 dsOcKnk 分别注射进入稻蝗体内,24 h 后检测其在对照组和处理组的表达情况(图 4a),结果显示注射 dsOcKnk 后,与对照相比, OcKnk 表达量显著降低, dsOcKnk 沉默效率为 98.5%。表型观察结果显示(图 4b),注射 dsOcKnk 后,85%虫体在蜕皮时脊线开裂,难以蜕去旧表皮,最终导致死亡,5%虫体可蜕去旧表皮,但虫体崩裂,组织暴露,最终死亡,10%虫体蜕至成虫,但活动力不强,行动缓慢,蜕皮后 48 h 内死亡。表明 OcKnk 在中华稻蝗蜕皮过程中发挥关键作用。



黑色实心圆为稻蝗OcKnk。Lm: 飞蝗KR537807; Mh: 桑粉蚧ABN12040; Tc: 赤拟谷盗AEM60136; Am: 意大利蜜蜂XP394084; Nv: 丽蝇蛹集金小峰XP001606352; Dm: 果蝇NP649981; Ha: 棉铃虫PZC70707 Black solid circle indicates OcKnk of *Oxya chinensis*. Lm: *Locusta migratoria* KR537807; Mh: *Macronellacoccus hirsutus* ABN12040; Tc: *Tribolium castaneum* AEM60136; Am: *Apis mellifera* XP394084; Nv: *Nasonia vitripennis* XP001606352; Dm: *Drosophila melanogaste* NP649981; Ha: *Helicoverpa armigera* PZC70707

图 2 不同昆虫种类 Knk 聚类分析

Fig. 2 Cluster analysis of Knks from different insects



IN: 体壁; FG: 前肠; MG: 中肠; GC: 胃盲囊; HG: 后肠; MT: 马氏管; FB: 脂肪体; N: 龄期; D: 日龄。不同字母代表样本间存在显著差异 ($P<0.05$)
IN: Integument; FG: Foregut; MG: Midgut; GC: Gastric caeca; HG: Hindgut; MT: Malpighian tubules; FB: Fat body; N: Nymph instar; D: Day-old. Different letters indicate significant difference between samples ($P<0.05$)

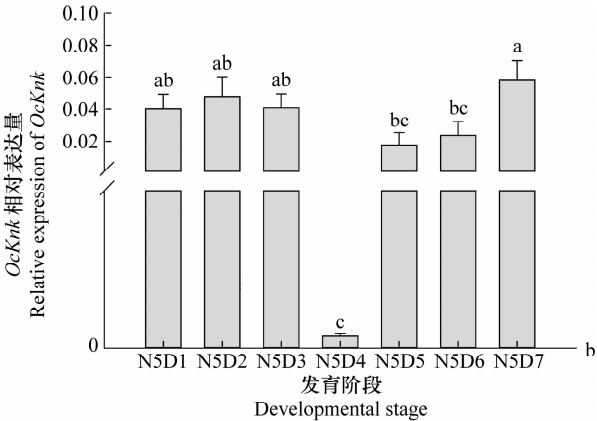
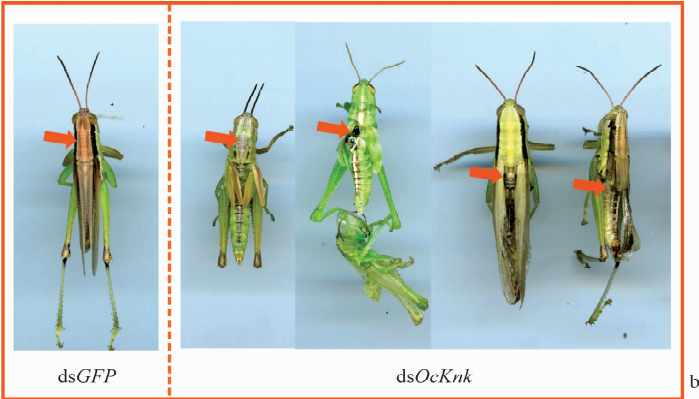
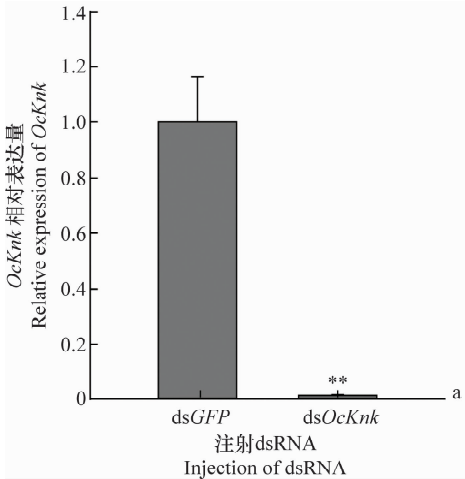


图 3 OcKnk 在中华稻蝗 5 龄若虫中的表达模式

Fig. 3 Expression pattern of OcKnk in 5th instar nymph of *Oxya chinensis*



**代表样品间存在极显著差异, 橙色箭头所示为旧表皮开裂位置
** represents extremely significantly different between samples; orange arrows indicate the split location of old cuticle

图 4 中华稻蝗 dsOcKnk 沉默效率和表型观察

Fig. 4 Silence efficiency of dsOcKnk and phenotype observation of *Oxya chinensis*

3 讨论

昆虫表皮是防止体内水分蒸发和隔绝病原体侵害的重要结构,对昆虫的生长发育具有重要意义^[24-25]。昆虫表皮坚硬而富有弹性^[26],由几丁质和蛋白质交联组装而成。其形成过程为几丁质纤维丝通过氢键聚合为几丁质微纤维,几丁质微纤维进一步与蛋白交联形成水平的几丁质片层结构,多个几丁质片层结构以中心垂直轴为中心,以恒定的角度螺旋排列组装形成致密的表皮结构^[12-15]。*Knk* 为参与几丁质组装的关键蛋白^[16]。目前已在多个昆虫中鉴定出 *Knk* 蛋白^[22-23, 25, 27]。赤拟谷盗中鉴定出 3 个 *Knk* 蛋白,分别被命名为 *TcKnk*、*TcKnk2* 和 *TcKnk3*,且不同蛋白的功能域具有多样性,*TcKnk* 含有信号肽,2 个串联的 DM13 功能域,多巴胺单加氧酶 N 端结构域和 C 端的 GPI-锚定位点。而 *TcKnk2* 不含信号肽和 GPI-锚定位点,含有跨膜区。*TcKnk3* 包含多个剪切子,不同剪切子因 C 端是否含有 GPI-锚定位点而导致其功能域存在差异^[19]。文献报道 DM13 功能域参与氧化还原反应中电子转移,DOMON 是结合几丁质的重要区域,是几丁质排列关键功能域^[28-29]。本文采用生物信息学方法,将搜索获得的 1 条 *OcKnk* 全长 cDNA 序列翻译成相应的氨基酸,并对其功能域进行分析,结果表明其含有信号肽,2 个串联的 DM13 功能域,多巴胺单加氧酶 N 端结构域(DOMON)和 C 端的 GPI-锚定位点。故推测其可能为 *OcKnk* 基因。进一步将其与其他昆虫同源 *Knk* 序列比对并构建系统进化树,结果表明,其与其他昆虫 *Knk* 以较高的置信度聚为一支,故将其命名为 *OcKnk*。登录号为 MN603495。

昆虫 *Knk* 在组织部位和发育阶段的表达具有多样性,果蝇中,*DmKnk* 特异性表达于 13 期胚胎气管和 15 期胚胎咽、后肠和表皮中^[16],*DmKnk* 在幼虫、蛹和成虫期均有表达,且其在蛹化前后特定时间内表达量显著高于卵期和幼虫期^[18]。赤拟谷盗中,*TcKnk* 特异性表达于幼虫表皮和后肠以及卵期浆膜中,且其在整个胚后发育阶段(幼虫、蛹和成虫期)均有表达^[19]。本文中 *OcKnk* 表达于体壁、前肠和脂肪体中,同其他昆虫一样,体壁和前肠均来源于外

胚层,均含有几丁质^[12],表明 *Knk* 在富含几丁质的组织中发挥作用,而其在脂肪体中表达量较高,可能由于脂肪体和气管密布于昆虫表皮上,解剖时由于部分气管的粘连,导致 *OcKnk* 在脂肪体中表达量较高。此外,目前研究多集中于不同发育阶段 *Knk* 表达,而对其在特定组织部位同一发育龄期动态变化情况研究较少,本文通过对不同组织部位检测发现其在体壁中表达量较高;为了研究其对蜕皮的影响,将不同日龄的 5 龄若虫体壁解剖下来,探究 *Knk* 的动态表达情况,结果表明 *OcKnk* 在不同日龄的 5 龄若虫中均有表达,且其在蜕皮前后表达量较高,暗示其参与昆虫蜕皮过程。

目前对于 *Knk* 功能研究多集中于全变态昆虫中。果蝇中的 *DmKnk* 在多个组织部位中发挥功能。*DmKnk* 参与胚胎气管直径的调节和形态结构的维持。*DmKnk* 突变体中,气管横截面由圆形变得不规则,气管长度过度延伸,缠绕在一起,导致形态结构发生变化。同时突变体胚胎膨大,且头部表皮结构畸形并呈现黑色^[16]。*DmKnk* 参与翅形成和形态结构的维持。采用 RNAi 沉默 *DmKnk* 表达后,蛹羽化为成虫时,出现翅折叠不能伸展,翅卡在蛹中,出现断翅或残翅,甚至虫体死亡等多种表型^[18]。赤拟谷盗注射 dsRNA 后,不同发育阶段(幼虫-蛹-成虫)均出现蜕皮困难,虫体死亡的表型^[22]。RNAi 是功能基因检测常用方法^[30],本文将 *OcKnk* 特异性 dsRNA 注射进入虫体中对中华稻蝗功能基因进行研究,为了确保试验可行性,首先对 *dsOcKnk* 沉默效率进行检测,结果表明沉默效率高达 98.5%,为进一步表型观察顺利进行提供保障。表型观察结果显示 *dsOcKnk* 可使中华稻蝗出现蜕皮致死的表型。同时翅出现一定程度残缺,而该表型与果蝇翅残缺表型相一致^[18]。说明 *OcKnk* 对于翅形态结构维持具有一定作用。但其是否影响几丁质排列,仍需进一步研究。本试验结果明确了 *OcKnk* 参与中华稻蝗生长发育和蜕皮的生物学功能,筛选获得的 *OcKnk* 将为中华稻蝗防治提供重要理论基础。

参考文献

- [1] 杨国国. 基于机器视觉的中华稻蝗早期蝗蛹的识别和检测研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2017.
- [2] 朱恩林, 李玉川. 北方农区土蝗化学防治技术[J]. 中国植保导

- 刊, 1993(2): 13-14.
- [3] 冯祥和, 张爱萍. 中华稻蝗的危害与防治[J]. 农业科技通讯, 1989(12): 26.
 - [4] 李书琴, 赵书文, 王晋瑜. 中华稻蝗的发生与防治[J]. 植物医生, 2013, 26(5): 4-5.
 - [5] 李艳君. 中华稻蝗在辽宁中部地区的发生及防治[J]. 垦殖与稻作, 2003(4): 29-30.
 - [6] 史树森. 大豆害虫综合防控理论与技术[M]. 长春: 吉林出版社, 2013: 199-204.
 - [7] 孙富余, 于凤泉. 辽宁省水稻主要虫害发生与防治对策[J]. 新农业, 2017(8): 39-40.
 - [8] YANG Meiling, ZHANG Jianzhen, ZHU Kunyan, et al. Increased activity and reduced sensitivity of acetylcholinesterase associated with malathion resistance in a field population of the oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2008, 91(1): 32-38.
 - [9] 萧玉涛, 吴超, 吴孔明. 中国农业害虫防治科技 70 年的成就与展望[J]. 应用昆虫学报, 2019, 56(6): 1115-1124.
 - [10] 唐斌, 张露, 熊旭萍, 等. 海藻糖代谢及其调控昆虫几丁质合成研究进展[J]. 中国农业科学, 2018, 51(4): 697-707.
 - [11] MINKE R, BLACKWELL J. The structure of α -chitin [J]. Journal of Molecular Biology, 1978, 120(2): 167-181.
 - [12] CHAPMAN R F. The insects structure and function [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2013: 475.
 - [13] NEVILLE A C. Biology of the arthropod cuticle [M]. Springer Berlin Heidelberg, 1974.
 - [14] BOULIGAND Y. On a twisted fibrillar arrangement common to several biologic structures [J]. Comptes Rendus Des Séances De LacadémieDes Sciences Série D Sciences Naturelles, 1965, 261(22): 4864-4867.
 - [15] 刘晓健, 刘卫敏, 赵小明, 等. 昆虫表皮发育研究进展及展望[J]. 应用昆虫学报, 2019, 56(4): 625-638.
 - [16] MOUSSIAN B, TANG E, TONNING A, et al. *Drosophila* Knickkopf and retroactive are needed for epithelial tube growth and cuticle differentiation through their specific requirement for chitin filament organization [J]. Development, 2006, 133(1): 163-171.
 - [17] SHAIK K S, WANG Yiwen, ARAVIND L, et al. The Knickkopf domon domain is essential for cuticle differentiation in *Drosophila melanogaster* [J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2014, 86(2): 100-106.
 - [18] LI Kaixia, ZHANG Xubo, ZUO Ying, et al. Timed Knickkopf function is essential for wing cuticle formation in *Drosophila melanogaster* [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2017, 89: 1-10.
 - [19] CHAUDHARI S S, MOUSSIAN B, SPECHT C A, et al. Functional specialization among members of Knickkopf family of proteins in insect cuticle organization [J/OL]. PLoS Genetics, 2014, 10(8): e1004537. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004537.
 - [20] JACOBS C G C, BRAAK N, LAMERS G E M, et al. Elucidation of the serosal cuticle machinery in the beetle *Tribolium* by RNA sequencing and functional analysis of *Knickkopf1*, *Retroactive* and *Laccase2* [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2015, 60: 7-12.
 - [21] CHAUDHARI S S, NOH M Y, MOUSSIAN B, et al. Knickkopf and retroactive proteins are required for formation of laminar serosal procuticle during embryonic development of *Tribolium castaneum* [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2015, 60: 1-6.
 - [22] CHAUDHARI S S, ARAKANE Y, SPECHT C A. Knickkopf protein protects and organizes chitin in the newly synthesized insect exoskeleton [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011, 108(41): 17028-17033.
 - [23] WANG Yiwen, ODEMER R, ROSENKRANZ P, et al. Putative orthologues of genetically identified *Drosophila melanogaster* chitin producing and organising genes in *Apis mellifera* [J]. Apidologie, 2014, 45(6): 733-747.
 - [24] DELON I, PAYRE F. Evolution of larval morphology in flies: get in shape with shavenbaby [J]. Trends in Genetics, 2004, 20(7): 305-313.
 - [25] MOUSSIAN B, SCHWARZ H, BARTOSZEWSKI S, et al. Involvement of chitin in exoskeleton morphogenesis in *Drosophila melanogaster* [J]. Journal of Morphology, 2005, 264(1): 117-130.
 - [26] MOUSSIAN B. Recent advances in understanding mechanisms of insect cuticle differentiation [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2010, 40(5): 363-375.
 - [27] JURGENS G, WIESCHAUS E, NUSSLEIN-VOLHARD C, et al. Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster* [J]. Roux Archives of Developmental Biology, 1984, 193(5): 283-295.
 - [28] ARAVIND L, DOMON; an ancient extracellular domain in dopamine beta-monooxygenase and other proteins [J]. Trends in Biochemical Sciences, 2001, 26(9): 524-526.
 - [29] IYER L M, ANANTHARAMAN V, ARAVIND L. The DOMON domains are involved in heme and sugar recognition [J]. Bioinformatics, 2007, 23(20): 2660-2664.
 - [30] 张涛, 鄧军锐, 叶茂. RNAi 在昆虫基因功能研究中的应用进展[J]. 山地农业生物学报, 2018, 37(6): 63-69.

(责任编辑: 田 喆)