

黏虫丝氨酸蛋白酶抑制剂基因的克隆 及抗球孢白僵菌功能分析



张春雨 杨洪佳 胡育硕 王艺晓 樊东*

(东北农业大学植物保护学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 为探究丝氨酸蛋白酶抑制剂 (serine protease inhibitor, Serpin) 基因在黏虫 *Mythimna separata* 生长发育及免疫防御等过程中发挥的作用, 在黏虫转录组中获得 *Serpin* 基因的 cDNA 序列, 采用实时荧光定量 PCR 技术分析 *Serpin* 在黏虫不同发育阶段和不同组织中的表达水平, 并通过 RNA 干扰技术分析 *Serpin* 在黏虫抗球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 过程中发挥的作用。结果显示, 获得 2 个黏虫 *Serpin* 基因, 命名为 *MsSerp*-4 和 *Mserpin*-5, 其 cDNA 全长序列分别为 1 938 bp 和 2 618 bp, 开放阅读框分别为 1 188 bp 和 1 197 bp, 分别编码 395 个和 398 个氨基酸, GenBank 登录号分别为 MZ577062 和 MZ577063。2 个基因在黏虫不同龄期 and 不同组织内均有表达, 在成虫期的相对表达量最高, 在 1 龄幼虫期的相对表达量最低; 在中肠中的相对表达量最高, 在唾腺中的相对表达量最低。RNA 干扰 6 h 时对 *MsSerp*-4 和 *Mserpin*-5 表达的抑制效果最好, 抑制率分别为 52.57% 和 49.15%; *MsSerp*-4 和 *Mserpin*-5 的表达被抑制后, 黏虫对球孢白僵菌更敏感, 校正死亡率分别提高了 31.47% 和 14.62%。表明黏虫 2 个 *MsSerp* 均参与了被球孢白僵菌侵染后的免疫反应, 可为后续黏虫的生物防治提供新靶标。

关键词: 丝氨酸蛋白酶抑制剂; 黏虫; 球孢白僵菌; RNA 干扰; 免疫反应

Cloning of the serine protease inhibitor from oriental armyworm *Mythimna separata* and analysis of its anti-*Beauveria bassiana* function

Zhang Chunyu Yang Hongjia Hu Yushuo Wang Yixiao Fan Dong*

(College of Plant Protection, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang Province, China)

Abstract: To investigate the function of serine protease inhibitor (Serpin) in the growth, development, and immune defense of *M. separata*, the cDNA sequences of *MsSerp*-4 and *Mserpin*-5 were cloned from oriental armyworm *Mythimna separata*, and real-time quantitative PCR (qRT-PCR) was used to determine the expression levels of *MsSerp* in various tissues and developmental stages. The RNA interference approach was employed to examine the function of *MsSerp* in the anti-*B. bassiana* process. *MsSerp*-4 and *Mserpin*-5 (GenBank accession numbers: MZ577062 and MZ577063) had sequence lengths of 1 938 bp and 2 618 bp, respectively, and open reading frames of 1 188 bp and 1 197 bp, encoding 395 and 398 amino acids, respectively. Both *MsSerp* were expressed in different tissues and developmental stages. The first-instar larvae exhibited the lowest expression, while the adult stage showed the highest. Expression levels were the lowest in the salivary glands and highest in the midgut. The greatest inhibition of *MsSerp* was achieved by RNA interference for six hours, resulting in 52.57% and 49.15% inhibition, respectively. Following *MsSerp* inhibition, *M. separata* became more

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-04), 国家重点研发计划 (2018YFD0201000)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: dnfd@163.com

收稿日期: 2022-11-29

susceptible to *B. bassiana*, resulting in a 31.47% and 14.62% increase in corrected mortality, respectively. These findings suggest the involvement of two *MsSerpins* in the immunological response to *B. bassiana* infection, offering a new insight into the biological regulation of *M. separata*.

Key words: serine protease inhibitor (Serp); *Mythimna separata*; *Beauveria bassiana*; RNA interference; immunoreaction

昆虫体内含有大量的丝氨酸蛋白酶和丝氨酸蛋白酶抑制剂 (serine protease inhibitor, Serpin), 二者均参与发育和防御等多种过程 (Broehan et al., 2010; Vilcinskas, 2010; Butt et al., 2016)。丝氨酸蛋白酶是昆虫免疫原途径的主要组成部分, 该途径受数量多且种类丰富的 Serpin 调节 (Butt et al., 2016)。Serpin 具有保守的三维结构, 具有 3 个 β -折叠、8~9 个 α -螺旋和 1 个反应中心环 (reactive center loop, RCL), 在抑制过程中, Serpin 被位于 RCL 中特定键处的攻击性蛋白酶切割, 这会将连接的酶拖到抑制剂的另一边, 并扭曲酶催化中心 (Chen et al., 2021)。Serpin 广泛存在于生物体内, 在血液淋巴凝固、多酚氧化酶激活和抗菌合成等多种生化途径中发挥着关键作用 (Gu et al., 2021), 如烟草原天蛾 *Manduca sexta* 的 Serpin-12 下调使酚氧化酶原被激活 (Yang et al., 2018)。此外, Serpin 还通过直接抑制真菌和细菌的蛋白水解酶来调节凝血和激活细胞因子的信号过程 (Kanost, 1999), Li et al. (2012; 2015) 研究发现蛋白酶抑制剂 BmSPI38 和 BmSPI39 可以通过抑制球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 分泌的角质层降解酶来防止真菌菌丝渗入家蚕 *Bombyx mori* 表皮。

球孢白僵菌是一种防治多种害虫的有效生物杀虫剂, 可替代化学农药进行害虫防治 (Saranraj & Jayaprakash, 2017)。昆虫病原真菌通过穿透昆虫的角质层, 利用机械压力和酶降解相结合的方式入侵昆虫 (Xiong et al., 2013)。白僵菌可直接穿透表皮感染寄主, 但昆虫依靠先天免疫系统来阻止其入侵 (Lemaitre & Hoffmann, 2007)。Li et al. (2015) 研究发现 BmSPI38 和 BmSPI39 对芽胞杆菌 *Bacillus* 的产酶和分生孢子萌发都有很强的抑制作用, 还能抑制由家蚕病原真菌产生的蛋白水解酶引起的有害黑化。Butt et al. (2016) 研究发现昆虫对真菌感染的敏感性取决于昆虫的发育阶段, 快蜕皮的昆虫特别容易受到感染, 因为新的角质层还没有完全硬化, 因此在昆虫即将蜕皮时进行侵染的效果更好。因此, 研究真菌诱导的免疫反应对高效真菌杀虫剂的研发和害虫综合治理能力的提升具有重要的实践意义 (Zibace et al., 2011; Namara et al., 2018)。

黏虫 *Mythimna separata* 属于鳞翅目夜蛾科, 主要为害禾谷类作物, 具有暴食性、强繁殖力、无自残性、无休眠和滞育等特点。当前对黏虫丝氨酸蛋白酶-Serpin 在真菌侵染中的作用鲜有报道, 为深入揭示其在病原真菌侵染黏虫过程中的作用, 本研究拟克隆黏虫 *Serpin* 基因的 cDNA 序列, 并通过比较 RNA 干扰其表达前后黏虫对球孢白僵菌的抗性, 明确 Serpin 在昆虫病原真菌侵染黏虫中的作用, 以期利用 Serpin 对黏虫进行生物防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试黏虫和植物: 黏虫采集自东北农业大学向阳实验基地玉米试验田, 经诱虫灯诱集成虫, 于室内培育 3 代以后进行试验。成虫群体饲养在 40 cm×40 cm×40 cm 网罩养虫笼中, 喂食 5% 蜂蜜水, 笼中挂置褶皱塑料绳供其产卵。幼虫于长 19 cm×宽 12.5 cm×高 7.5 cm 的养虫盒中群体饲养, 盖子上开有透气孔, 置于温度 (26±2) °C、相对湿度 (70±5)%、光周期 14 L:10 D 的人工气候箱中用新鲜玉米叶片饲喂。玉米品种为东农 264, 东北农业大学农学院自培品种, 置于温度 (26±2) °C、相对湿度 (70±5)% 的人工气候箱中培养至 3 叶期, 取健康叶片供试。

马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (potato dextrose agar, PDA): 马铃薯 200 g、葡萄糖 30 g、琼脂 20 g, 加蒸馏水定容至 1 000 mL。

供试菌株: 球孢白僵菌由东北农业大学农学院农业昆虫与害虫防治专业于洪春老师课题组提供, 在 PDA 培养基上活化 1~2 代后接种于新鲜 PDA 培养基上, 置于 25 °C、光周期 14 L:10 D 的恒温箱中培养 15 d, 待菌株充分产孢后于 4 °C 保存, 备用。

试剂和仪器: RNA 保存液、TRIzol® Reagent, 美国 Invitrogen 公司; ReverTra Ace qPCR RT Kit、Thunderbrd Sybr qPCR Mix, 东洋纺 (上海) 生物科技有限公司; SYBR Primer Script RT-PCR Kit Mix, 日本 ToYoBo 公司; D2500-02 Gel Extraction Kit, 美国 Omega Biotek 公司; 其余试剂均为国产分析纯。BIC-250 人工气候箱, 海博迅医疗生物仪器有限公

司;Universal16R 低温冷冻离心机,美国 Hettich 公司;A24812 SimpliAmp™ PCR 仪,美国 Thermo Fisher 公司;Alpha Imager HP 凝胶成像系统,美国 Protein Simple 公司;DYY-6C 电泳仪,北京市六一仪器厂;P-330 超微量分光光度计,德国 Implen 公司。

1.2 方法

1.2.1 黏虫 *Serpin* 基因的克隆及序列分析

分别收集黏虫卵(30粒)、1~3龄幼虫(各12头)、4~6龄幼虫(各3头)、预蛹(3头)、蛹(3头)和成虫(不分雌雄,随机3头),委托安诺优达基因科技有限公司进行转录组测序。在转录组数据库中筛选出黏虫 *Serpin* 基因,在 NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 上进行同源性比对后,利用 Primer Premier 5.0 软件设计全长序列引物 *MsSerpin*-Full-F/*MsSerpin*-Full-R(表1)进行 PCR 扩增。引物均由睿博兴科生物工程技术公司合成。分别选取黏虫1日龄的卵(30粒)、1~3龄幼虫(各12头)、4~6龄幼虫(各3头)、预蛹(3头)、蛹(3头)和成虫(3头),每组3个生物学重复。利用 TRIzol 法提取各样品的总 RNA,

每 100 mg 组织加入 1 mL TRIzol® Reagent 进行提取。分别取 2 μg 各组织的总 RNA,利用 ReverTra Ace qPCR RT Kit 按照说明书进行反转录合成 cDNA 第一链,于 -20 ℃ 保存备用。25 μL 反应体系:10×Easy Taq Buffer 2.5 μL、cDNA 模板 0.5 μL、10 μmol/L 上下游引物各 1 μL、High Pure dNTPs 2.5 μL、Easy Taq DNA 聚合酶 0.5 μL、ddH₂O 17 μL。反应条件:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,50 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 4 min,共 35 个循环;最后 72 ℃ 保存 10 min。将产物进行胶回收后,委托安诺优达基因科技有限公司测序,对克隆得到的黏虫 *Serpin* 基因序列与原始转录组数据库中获得的基因序列进行准确性校正。经查得到 2 条包含完整开放阅读框(open reading frame, ORF)序列的 *Serpin* 基因 cDNA 序列,在 NCBI 上进行登录并命名。利用 SMART 在线网站 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 预测其编码氨基酸序列的结构域;在 NCBI 网站搜索相关昆虫的 *Serpin* 氨基酸序列,利用 MEGA 5.1 软件以邻接法构建系统进化树,1 000 次重复验证。

表1 本研究所用引物信息

Table 1 Primer information in this study

引物 Primer code	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	退火温度 Annealing temperature/℃	预期片段大小 Expected fragment size/bp	用途 Purpose
<i>MsSerpin</i> -4-Full-F	ATGAAGTTTAAATAAAATAAATT	50	1 938	克隆 Cloning
<i>MsSerpin</i> -4-Full-R	AATTTATTTATTTAAACTTCAT			
<i>MsSerpin</i> -5-Full-F	CTATCCCTCTACCGAACGTCTC		2 618	
<i>MsSerpin</i> -5-Full-R	GAGACGTTTCGGTAGAGGGATAG			
<i>MsSerpin</i> -4-qPCR-F	CGTCGACATCGTCTTGTAAATCT	57	1 188	实时荧光 定量 PCR qRT-PCR
<i>MsSerpin</i> -4-qPCR-R	TGATTGTGATCCTGCCTTATCC			
<i>MsSerpin</i> -5-qPCR-F	CCTGGCGAGTAAGTCACAAA		1 197	
<i>MsSerpin</i> -5-qPCR-R	TGATATCCTGAACCGTGGAATG			
<i>β-actin</i> -qPCR-F	CCAACGGCATCCACGAGACCA		1 472	RNA 干扰 RNA inter- ference
<i>β-actin</i> -qPCR-R	TCGGCGATACCAGGGTACAT			
<i>siMsSerpin</i> -4-F	GGAUAUAUGGCGCGGAGAUUTT			
<i>siMsSerpin</i> -4-R	AUCUCCGCGCCAUAUUUCCTT			
<i>siMsSerpin</i> -5-F	GCUCUAUAUGUGACAUCUUTT			
<i>siMsSerpin</i> -5-R	AAGAUGUCACAUAUAGAGCTT			
<i>siNegative control</i> -F	UUCUCCGAACGAGUCACGUTT			
<i>siNegative control</i> -R	ACGUGACACGUUCGGAGAATT			

1.2.2 黏虫 *Serpin* 基因表达模式的分析

分别选取黏虫1日龄的卵(30粒)、1~3龄幼虫(各12头)、4~6龄幼虫(各3头)、预蛹(3头)、蛹(3头)和成虫(3头)作为不同发育阶段样品;提取黏虫初孵4龄幼虫的唾腺、前肠、中肠、后肠、马氏管、脂肪体和体壁作为不同组织样品,每个组织取15头;每个处理3个生物学重复。利用 TRIzol 法提取各样品的总 RNA,每 100 mg 组织中加入 1 mL TRIzol Re-

agent 进行提取。分别取 2 μg 总 RNA,利用 ReverTra Ace qPCR RT Kit 按照说明书进行反转录合成 cDNA 第一链,于 -20 ℃ 保存备用。

根据 1.2.1 克隆的黏虫 *Serpin* 基因 cDNA 序列和内参基因 *β-actin* 设计 qRT-PCR 引物 *MsSerpin*-qPCR-F/*MsSerpin*-qPCR-R 和 *β-actin*-qPCR-F/*β-actin*-qPCR-R(表1),以黏虫不同发育阶段样品和不同组织样品的 cDNA 作为模板进行实时荧光定量 PCR

(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)检测。20 μL 反应体系:SYBR qPCR Mix 10 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物各 0.6 μL 、cDNA 模板 2 μL 、 ddH_2O 6.8 μL 。反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,57 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,共 40 个循环。3 次技术重复。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算目的基因的相对表达量(Levashina et al., 1999)。

1.2.3 黏虫 *Serpin* 基因对球孢白僵菌诱导的响应检测

将球孢白僵菌分生孢子从 PDA 培养基上洗下后,用含 0.1% 吐温 80 的无菌水配制成孢子悬浮液母液,并分别稀释至浓度为 1×10^{10} 、 1×10^9 、 1×10^8 、 1×10^7 和 1×10^6 个/mL,各取 50 mL 备用,以含 0.1% 吐温 80 的无菌水作空白对照,采用喷雾法(王定锋等, 2012)处理大小一致的健康黏虫 3 龄幼虫,喷雾至养虫盒底部滤纸湿润而无液滴流动为止。连续观察 7 d,统计幼虫死亡情况,用 DPS 7.05 软件计算半致死浓度 LC_{50} 。将球孢白僵菌孢子悬浮液母液用 0.1% 吐温 80 稀释至 LC_{50} ,选择重量基本一致的健康 3 龄幼虫进行喷雾处理,方法同上,以含 0.1% 吐温 80 的无菌水处理作为对照。分别于处理 12、24、48 和 72 h 后各取 3 头黏虫,在液氮中快速冷冻并于 -80°C 保存备用,采用 qRT-PCR 方法检测黏虫体内 *Serpin* 的相对表达量,分析其对球孢白僵菌诱导的响应,检测方法同 1.2.2。每个处理 3 次技术重复。

1.2.4 RNA 干扰后黏虫 *Serpin* 基因表达量的检测

基于 1.2.1 获得的黏虫 *Serpin* 序列,委托上海吉玛制药技术有限公司合成相应的小片段干扰核糖核酸(small interfering RNA, siRNA),以与靶基因无同源性且在黏虫体内没有生物学效应的基因序列的 siRNA 作为阴性对照(negative control, NC)(表 1),均稀释至 20 $\mu\text{mol/L}$ 备用。选取大小一致的健康 3 龄幼虫,分别取 siRNA 各 2 μL ,用微量注射器从虫体腹部侧面的 2~3 节处缓慢匀速注入,然后放入 $(26 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中用新鲜玉米叶片饲养,分别于 3、6、12、24 和 48 h 后收集试虫,处理组与对照组每个时间点均收集 3 头幼虫并解剖获得 1.2.2 筛选出的 2 种高表达组织,于液氮中速冻后,采用 qRT-PCR 方法检测 RNA 干扰不同时间点靶基因的表达量,分析干扰效率,检测方法同 1.2.2。每个处理 3 次重复。

1.2.5 RNA 干扰后球孢白僵菌的杀虫活性测定

以 1.2.3 制备的 LC_{50} 球孢白僵菌孢子悬浮液,采用 1.2.3 方法处理黏虫 3 龄幼虫,以含 0.1% 吐温 80 的水溶液处理为对照,分别于处理 24、48 和 72 h 后进行 RNA 干扰,方法同 1.2.4,每个处理 6 次重复,每

个重复 15 头,分别于 RNA 干扰后 12、24、48 和 96 h 统计并记录幼虫的死亡情况,计算校正死亡率,校正死亡率=(处理组虫口死亡率-对照组虫口死亡率)/(1-对照组虫口死亡率) $\times 100\%$ 。

1.2.6 沉默 *Serpin* 对黏虫生长发育及产卵的影响测定

取大小一致健康的黏虫 3 龄幼虫,采用 1.2.3 方法进行 LC_{50} 球孢白僵菌处理后放入 $(26 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中用新鲜玉米叶片进行饲养,采用 1.2.4 方法进行 RNA 干扰,分别于干扰 12、24、48 和 96 h 观察并统计化蛹、羽化和产量情况,计算幼虫化蛹率、蛹羽化率和单雌产卵量,同时称量化蛹第 2 天的蛹重。每个处理 3 次重复,每个重复 50 头。

1.3 数据分析

利用 SAS 9.0 软件对试验数据进行统计分析,各处理下不同时间点基因的相对表达量采用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验,校正死亡率以及 RNA 干扰后对黏虫生长发育相关参数采用 t 检验法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 黏虫 *Serpin* 基因的序列分析和系统进化树构建

本试验通过对黏虫转录组数据库进行搜索、NCBI 比对、保守结构域查找及序列验证,得到 2 条包含完整 ORF 序列的 *Serpin* 基因 cDNA 序列。序列验证后,在 NCBI 上进行登录并命名为 *MsSerpin-4* 和 *MsSerpin-5*,登录号分别为 MZ577062 和 MZ577063。利用在线软件 ProtParam 对其编码氨基酸的理化性质进行分析,结果表明, *MsSerpin-4* 和 *MsSerpin-5* 基因的 cDNA 序列长度分别为 1 938 bp 和 2 618 bp, ORF 分别为 1 188 bp 和 1 197 bp,分别编码 395 个和 398 个氨基酸,在第 29~392 个和第 32~395 个氨基酸之间存在 *Serpin* 超家族结构域。

系统发育树显示,黏虫 *MsSerpin-4* (MZ577062) 先与夜蛾科昆虫如草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* (XP_035454813) 和斜纹夜蛾 *S. litura* (XP_022837569) 的同源序列聚在一起,亲缘关系最近;再与粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 的同源序列 (XP_026736072) 聚在一起,说明亲缘关系较近;而与野蚕 *Bombyx mandarina* (ALD62506) 和家蚕 (NP_001037205) 的亲缘关系较远(图 1)。黏虫 *MsSerpin-5* (MZ577063) 先与粉纹夜蛾的同源序列 (XP_026736073) 聚在一起,显示两者亲缘关系最近;再与斜纹夜蛾的同源序列 (XP_022837600) 聚在一起,然后与棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (XP_021182965) 和美洲棉铃虫 *H. zea* (XP_

047036835)的同源序列聚在一起,说明亲缘关系较近;而与螟蛾科昆虫和粉蝶科昆虫亲缘关系较远(图1)。

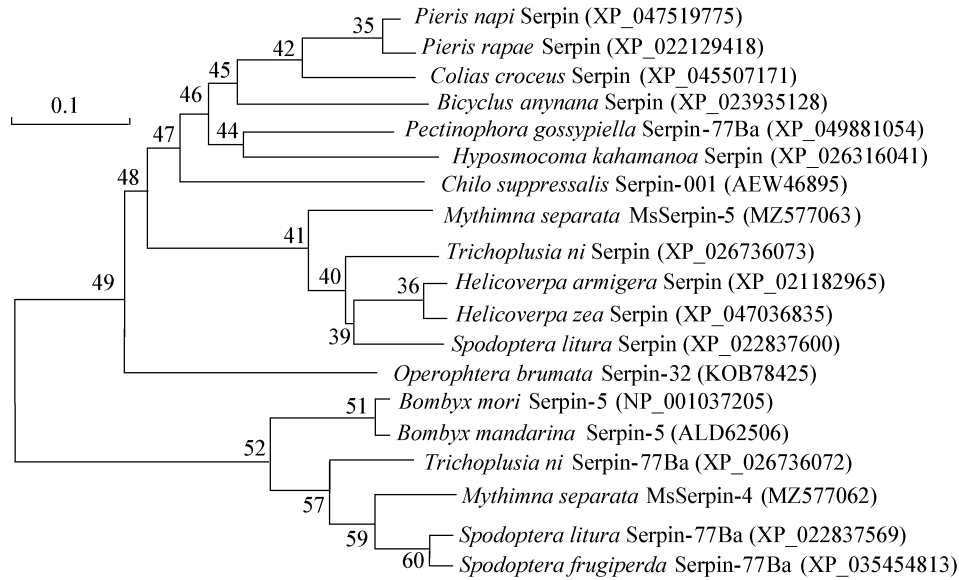


图1 基于Serpin序列采用邻接法构建黏虫与其他昆虫的系统进化树

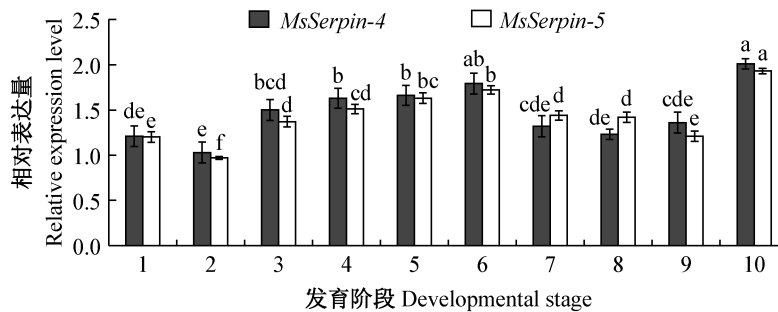
Fig. 1 Phylogenetic tree of *Mythemna separata* and other insects based on Serpin sequences by neighbor-joining method

2.2 黏虫 *MsSerp* 基因的时空表达模式

2.2.1 在不同发育阶段的表达模式

MsSerp-4 和 *MsSerp*-5 基因在黏虫不同发育阶段均有表达,且均在成虫期的相对表达量最高,在1龄期的相对表达量最低,前者分别是后者的1.95倍和1.98倍,而且在其他发育阶段的表达趋势也基本一致。*MsSerp*-4 基因在2、3、4和5龄幼虫期的相对表达量较高,均显著高于在1龄期的相对表达量,

但三者间差异不显著;在其他发育阶段期的相对表达量均较低,且无显著差异(图2)。*MsSerp*-5 基因在4龄和5龄幼虫期的相对表达量较高,两者差异不显著;在2、3、6龄幼虫期和预蛹期的相对表达量较低,差异也不显著;在卵期和蛹期的相对表达量很低,两者差异不显著;总体上看,该基因在其他发育阶段的相对表达量均显著高于1龄期相对表达量(图2)。



1: 卵; 2~7: 分别为1日龄的1龄、2龄、3龄、4龄、5龄、6龄幼虫; 8: 1日龄预蛹; 9: 1日龄蛹; 10: 1日龄成虫。1: Egg; 2~7: one-day-old 1st, 2nd, 3rd, 4th, 5th and 6th instar larvae, respectively; 8: one-day-old pre-pupa; 9: one-day-old pupa; 10: one-day-old adult.

图2 *MsSerp* 基因在黏虫不同发育阶段的表达模式

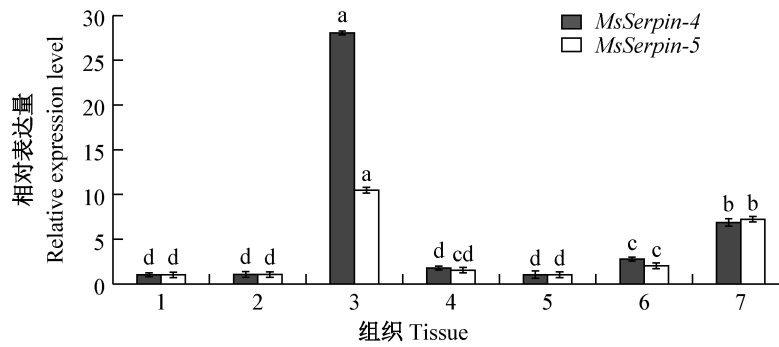
Fig. 2 *MsSerp* expression pattern at different developmental stages of *Mythemna separata*

图中数据为平均数±标准误。同色柱上不同小写字母表示不同处理间经Duncan氏新复极差法检验差异显著($P<0.05$)。Data are mean±SE. Different lowercase letters on the same color bars indicate significant difference among different treatments by Duncan's new multiple range test ($P<0.05$).

2.2.2 不同组织中的表达模式

MsSerp-4 和 *MsSerp*-5 在黏虫不同组织中均有表达,其中,在中肠中的相对表达量均最高,显著高于在其他组织中的相对表达量,分别是唾腺中相对

表达量的27.85倍和10.40倍;在体壁中的相对表达量次高,也显著高于在其他组织中的相对表达量;在前肠、后肠和马氏管中的相对表达量较低,且三者间无显著差异;在唾腺中的相对表达量均最低(图3)。



1: 唾腺; 2: 前肠; 3: 中肠; 4: 后肠; 5: 马氏管; 6: 脂肪体; 7: 体壁。1: Salivary gland; 2: foregut; 3: midgut; 4: hindgut; 5: Malpighian tubule; 6: fat body; 7: integument.

图3 *MsSerpins* 在黏虫不同组织中的表达模式

Fig. 3 *MsSerpins* expression pattern in different tissues of *Mythimna separata*

图中数据为平均数±标准误。同色柱上不同小写字母表示不同处理间经Duncan氏新复极差法检验差异显著($P<0.05$)。Data are mean±SE. Different lowercase letters on the same color bars indicate significant difference among different treatments by Duncan's new multiple range test ($P<0.05$).

2.3 *MsSerpins* 基因的生物学功能

2.3.1 球孢白僵菌侵染对 *MsSerpins* 表达的影响

5种不同浓度球孢白僵菌侵染黏虫7 d后,拟合得到 LC_{50} 为 3.11×10^8 个/mL,95%置信区间为 $1.10 \times 10^8 \sim 8.79 \times 10^8$ 个/mL,毒力方程为 $y=2.15+0.38x$,相关系数为0.967。

经 LC_{50} 球孢白僵菌侵染12、24、48和72 h后,黏虫中2个*MsSerpins*基因的相对表达量均呈现先升高后降低的趋势,侵染24、48和72 h时较对照显著升高($P<0.05$),*MsSerpins-4*和*MsSerpins-5*基因的相对表达量在侵染48 h时分别为对照的7.56倍和5.88倍(图4)。

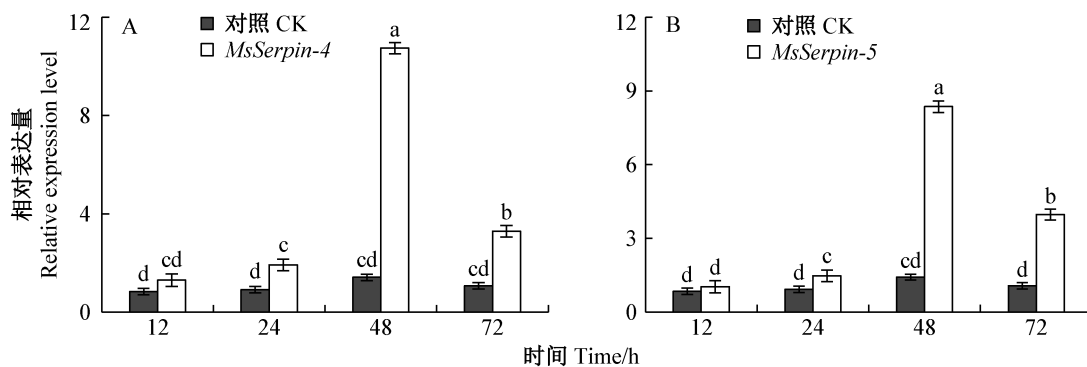


图4 球孢白僵菌侵染不同时间后 *MsSerpins* 基因的相对表达量

Fig. 4 Relative expression levels of *MsSerpins* after *Beauveria bassiana* infection

图中数据为平均数±标准误。柱上不同小写字母表示经Duncan氏新复极差法检验差异显著($P<0.05$)。Data are mean±SE. Different lowercase letters on the bars indicate significant difference by Duncan's new multiple range test ($P<0.05$).

2.3.2 *MsSerpins* 的RNA干扰效果

RNA干扰后,*MsSerpins*基因被成功沉默,其中*MsSerpins-4*的相对表达量在干扰3、6、12和24 h时均较对照显著降低($P<0.05$),分别降低了49.80%、52.57%、42.88%和39.66%,在干扰48 h时该基因的相对表达量与对照差异不显著(图5-A);*MsSerpins-5*的相对表达量在干扰6 h时下降幅度最大,达49.15%,且在干扰3、6和12 h时均较对照显著降低($P<0.05$),而在干扰24 h和48 h时其相对表达量与对照差异不显著(图5-B),表明RNA干扰效果减弱。

2.3.3 球孢白僵菌侵染后 *MsSerpins* 的沉默表达

球孢白僵菌侵染24、48和72 h时分别进行RNA干扰处理,干扰3、6、12、24和48 h后检测*MsSerpins*的相对表达量。结果表明,在侵染24 h时进行RNA干扰,干扰3、6和12 h时,*MsSerpins-4*基因在中肠、体壁和虫体中的相对表达量均被显著抑制;干扰24 h时,该基因在体壁和虫体中的相对表达量被显著抑制(图6-A)。在侵染48 h时进行RNA干扰,干扰3 h和6 h时,*MsSerpins-4*基因在中肠、体壁和虫体中的相对表达量均被显著抑制;干扰12 h时,该基因体壁

和虫体中的相对表达量被显著抑制;干扰24 h时仅其在体壁中的相对表达量被显著抑制(图6-B)。在侵染72 h时进行RNA干扰,干扰3 h时 *MsSerp-4*

基因在体壁和虫体中的相对表达量被显著抑制;干扰6、12和24 h时,该基因在中肠、体壁和虫体中的相对表达量均被显著抑制(图6-C)。

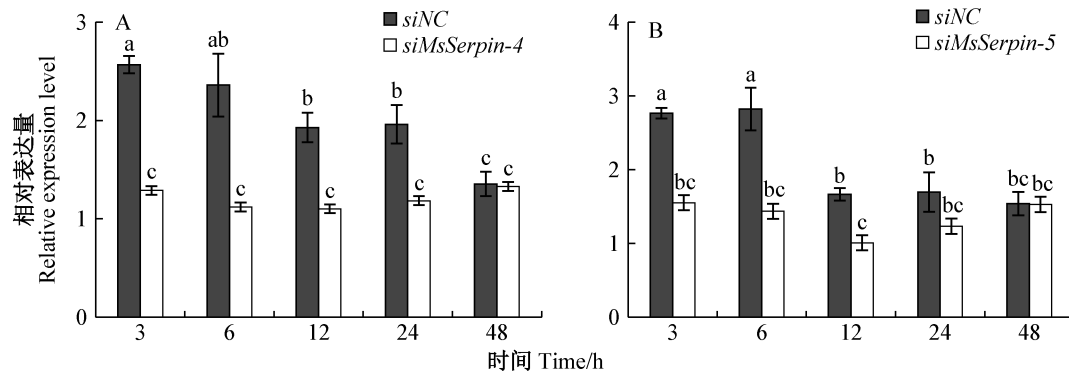
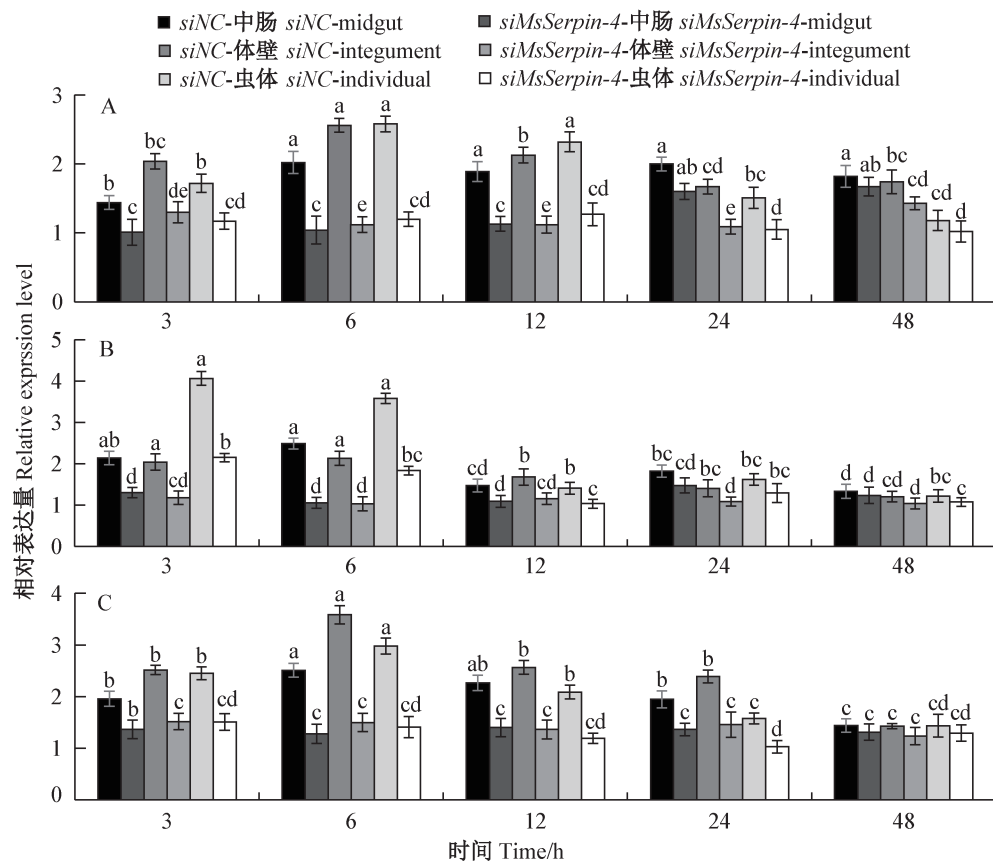


图5 RNA干扰处理对黏虫 *MsSerp* 基因相对表达量的影响

Fig. 5 Relative expression levels of *MsSerp* following RNA interference treatments in *Mythemna separata*

图中数据为平均数±标准误。柱上不同小写字母表示经Duncan氏新复极差法检验差异显著 ($P < 0.05$)。Data are mean±SE. Different lowercase letters on the bars indicate significant difference by Duncan's new multiple range test ($P < 0.05$).



A、B和C分别为在球孢白僵菌侵染24、48和72 h后对 *MsSerp-4* 进行RNA干扰处理。A、B和C are RNA interference treatments on *MsSerp-4* after 24, 48, and 72 h of infection with *Beauveria bassiana*, respectively.

图6 不同RNA干扰处理后黏虫中 *MsSerp-4* 基因的相对表达量

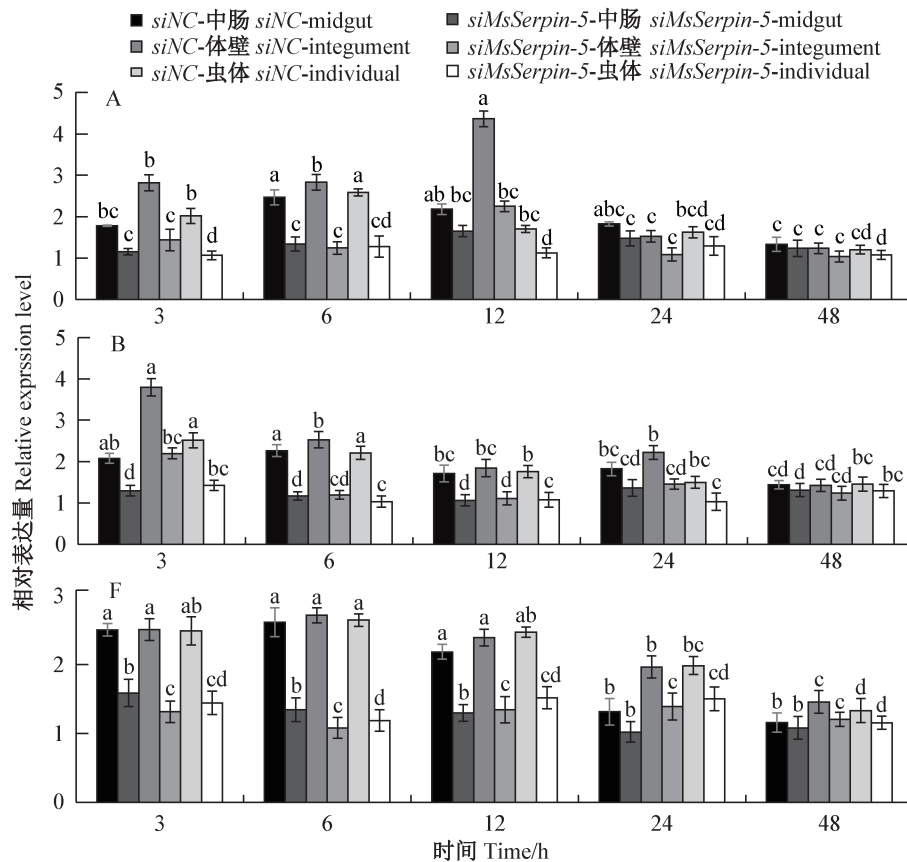
Fig. 6 Relative expression levels of *MsSerp-4* in *Mythemna separata* after different RNA interference treatments

图中数据为平均数±标准误。不同小写字母表示同种组织不同处理间经Duncan氏新复极差法检验差异显著 ($P < 0.05$)。Data are mean±SE. Different lowercase letters on the bars indicate significant difference among different treatments for the same tissue by Duncan's new multiple range test ($P < 0.05$).

在侵染 24 h 时进行 RNA 干扰, 干扰 3 h 时, *MsSerp-5* 基因在体壁和虫体中的相对表达量被显著抑制; 干扰 6 h 时, 该基因在中肠、体壁和虫体中的相对表达量均被显著抑制; 干扰 12 h 时, 其在体壁和虫体中的相对表达量均被显著抑制(图 7-A)。在侵染 48 h 时进行 RNA 干扰, 干扰 3、6 和 12 h 时 *MsSerp-5* 基因在中肠、体壁和虫体中的相对表达量均被显著抑制; 干扰 24 h 时, 该基因在体壁中的相对表达量被

显著抑制(图 7-B)。在侵染 72 h 时进行 RNA 干扰, 干扰 3、6 和 12 h 时, *MsSerp-5* 基因在中肠、体壁和虫体中的相对表达量均被显著抑制; 干扰 24 h 时, 该基因仅在体壁中的相对表达量被显著抑制(图 7-C)。

无论是 *MsSerp-4* 基因还是 *MsSerp-5* 基因, 在进行 RNA 干扰 48 h 时, 其相对表达量与各自对照之间均无显著差异(图 6~7)。



A、B 和 C 分别为在球孢白僵菌侵染 24、48 和 72 h 后对 *MsSerp-5* 进行 RNA 干扰处理。A, B and C are RNA interference treatments on *MsSerp-5* after 24, 48, and 72 h of infection with *Beauveria bassiana*, respectively.

图 7 不同 RNA 干扰处理后黏虫中 *MsSerp-5* 基因的相对表达量

Fig. 7 Relative expression levels of *MsSerp-5* in *Mythimna separata* after different RNA interference treatments

图中数据为平均数±标准误。不同小写字母表示同种组织不同处理间经 Duncan 氏新复极差法检验差异显著 ($P < 0.05$)。Data are mean±SE. Different lowercase letters on the bars indicate significant difference among different treatments for the same tissue by Duncan's new multiple range test ($P < 0.05$).

2.3.4 球孢白僵菌侵染 48 h 后黏虫的生命参数

对经球孢白僵菌侵染 48 h 后的黏虫进行 *MsSerp-5* 基因的 RNA 干扰, 结果表明, 干扰 24、48 和 96 h 后, 黏虫的校正死亡率均显著高于对照 ($P < 0.05$), 其中干扰 *MsSerp-4* 和 *MsSerp-5* 基因 96 h 后, 黏虫的校正死亡率较对照分别显著提高了 31.47% 和 14.62% (表 2)。同时, RNA 干扰处理后的 3 龄幼虫出现了取食少、动作慢和生长速率减慢的情况, 与对

照相比, 最终导致黏虫幼虫化蛹率显著降低, 蛹重减轻, 羽化率显著降低, 单雌产卵量减少(表 2)。

3 讨论

Serp 在昆虫免疫中发挥着重要作用 (Gan et al., 2001), 主要通过形成共价复合体不可逆灭活丝氨酸蛋白酶来调节其活性 (Tripathi & Sowdhamini, 2008)。目前, 在不同昆虫中鉴定到多个 *Serp* 基

因,因不同的序列以及不同的排列方式产生了不同的抑制选择性(Brandt et al., 2004; Hegedus et al., 2008; Zheng et al., 2009)。Serpín不仅可以抑制昆虫的消化与营养摄取,导致一些必需氨基酸缺乏,使昆虫的代谢紊乱,影响昆虫正常的生长发育(李莉莉

等, 2016), 还可在丝氨酸蛋白酶级联反应过程中抑制丝氨酸蛋白酶的活性, 在昆虫的天然免疫中发挥着重要的调控作用(李贝贝等, 2020)。本研究从黏虫中获得2个具Serpín结构域的Serpín基因的cDNA序列, 命名为*MsSerpín-4*和*MsSerpín-5*。

表2 经球孢白僵菌侵染48 h进行RNA干扰处理后黏虫的校正死亡率及生长发育参数

Table 2 Corrected mortalities and growth and development parameters of *Mythimna separata* after RNA interference treatment with *Beauveria bassiana* for 48 h

处理 Treatment	校正死亡率Corrected mortality/%				化蛹率 Pupation rate/%	蛹重 Pupal weight/g	羽化率 Emergence rate/%	单雌产卵量 No. of eggs per female
	12 h	24 h	48 h	96 h				
<i>siNC</i>	6.17±0.32	22.99±1.02	46.58±0.41	53.71±1.20	43.58±0.23	0.19±0.01	42.12±0.23	918.81±15.81
<i>siMsSerpín-4</i>	8.45±0.26*	35.54±0.79*	66.56±0.80*	70.61±0.83*	28.27±0.07*	0.17±0.01*	26.20±0.25*	781.14±16.85*
<i>siMsSerpín-5</i>	7.19±0.48	33.05±0.86*	57.36±0.99*	61.56±0.63*	36.39±0.11*	0.18±0.01	34.98±0.16*	872.48±11.00

表中数据为平均数±标准误。*表示处理和对照之间经*t*检验法检验差异显著($P<0.05$)。Data are mean±SE. * indicates significant difference between treatment and the control by *t* test ($P<0.05$).

本研究结果表明, *MsSerpín-4*和*MsSerpín-5*在黏虫不同发育阶段和不同组织内均有表达, 且均在成虫期的相对表达量最高, 在1龄幼虫期的相对表达量最低, 这与张彩虹等(2021)和邬伟等(2022)研究结论相似。张彩虹等(2021)研究发现棉铃虫中*Serpín-b*在成虫期的相对表达量最高; 邬伟等(2022)研究结果显示褐飞虱*Nilaparvata lugens*中*NlsERP2*在雄成虫体内的相对表达量最高。*Serpín*基因的数量和种类都很丰富, 在不同表达时期有不同作用, 暗示它们在不同昆虫不同龄期的生理功能可能存在差异。*MsSerpín-4*和*MsSerpín-5*基因在黏虫中肠和体壁中的相对表达量远高于其他组织。昆虫肠道中定殖着大量微生物, 昆虫通过取食等生理活动亦可在肠道中引入潜在病原微生物。黏虫中肠中这2个基因高表达, 极可能在中肠免疫防御过程中发挥着重要作用。而本试验中黏虫在球孢白僵菌诱导条件下, *MsSerpín*在体壁中发挥的抑制作用比在中肠内更明显。在黏虫幼虫期进行球孢白僵菌侵染, 测得 LC_{50} 为 3.11×10^8 个/mL, *MsSerpín*基因表达受到球孢白僵菌侵染正调控, *MsSerpín*基因的相对表达量显著上调, 说明*MsSerpín*基因可能通过调节体内蛋白酶的活性来参与黏虫抵制外来病原菌的侵入。本研究结果表明, 在接种球孢白僵菌后48 h时2个*MsSerpín*基因的相对表达量最高, 随后降低, 这可能与球孢白僵菌侵入黏虫体内需要时间有关。球孢白僵菌侵入黏虫体内并成功长出分生孢子, 此时黏虫体内*MsSerpín*做出应答, 开始免疫反应, 在48 h表达

量达到最高, 然后在自身免疫系统作用下, 球孢白僵菌的侵染效果减弱, *MsSerpín*基因表达量开始降低。有研究表明, *Serpín*的防御特性是基于抑制微生物释放的昆虫肠道蛋白酶, 导致其生长和发育所需氨基酸的可获得性降低, 进而影响昆虫的生长发育, 导致繁殖力降低, 死亡率增加(Herwade et al., 2022)。如舞毒蛾*Lymantria dispar*受白僵菌侵染后*Sp1*和*Sp6*均明显下调(Bai et al., 2022); 家蚕体内*BmsERP28*受白僵菌侵染后表达水平大幅上涨, 说明该基因与家蚕先天免疫有关(Gao et al., 2018); 亚洲玉米螟*Ostrinia furnacalis*受真菌侵染后*Serpín-3*明显上调表达, 表明该基因在调节亚洲玉米螟幼虫的原苯氧合酶激活和抗菌肽生产方面发挥着重要作用(Chu et al., 2015)。*Serpín*不仅可以调节黏虫内源性丝氨酸蛋白酶, 也可调控外源性丝氨酸蛋白酶(Wang et al., 2009)。小菜蛾*Plutella xylostella*中*CvT-serpin15*在细菌攻击后上调表达, 提高了感染细菌后的存活率(Gu et al., 2021); 鞘翅目和膜翅目昆虫的*Serpín*表现出抗菌活性, 表明它们可能直接与病原体产生效应作用(Zhao et al., 2014)。这些研究结果均说明*Serpín*参与了昆虫的免疫反应。

本研究通过RNA干扰技术抑制*MsSerpín*基因来抑制*Serpín*参与的免疫系统反应, 提高真菌对黏虫的杀虫效果, qRT-PCR检测结果表明*MsSerpín*表达量明显降低。通过调整干扰*MsSerpín*时间去匹配球孢白僵菌诱导反应时间, 使*MsSerpín*基因受球孢白僵菌影响最明显的时间与基因沉默效率最高的

时间相统一,使其杀虫效果达到最高,研究结果也表明在球孢白僵菌侵染 48 h 后进行 *MsSerp* 基因 RNA 干扰处理,此时真菌已侵入黏虫体内,再进行 RNA 干扰也不会影响真菌蛋白酶侵入黏虫体内的过程,且抑制了黏虫的自身免疫系统,此时杀虫效果最佳,而且这种抑制作用主要发生在黏虫体壁。Kanost(1999)研究表明 *Serp* 可直接抑制真菌的蛋白水解酶,推测抑制黏虫 *MsSerp* 后也使球孢白僵菌的蛋白水解酶发挥出更大的作用。另外,干扰 *MsSerp* 基因后,球孢白僵菌对黏虫的致死效果提升,但其发育历期没有显著变化,推测由于 *Serp* 参与的反应复杂,其代谢受多种酶共同调控,且黏虫体内含有多个 *Serp* 基因,本试验对 1 个基因进行干扰后虽然使其对免疫系统产生一定程度的影响,但并未完全逆转其幼虫对病原菌的免疫作用。此外, *MsSerp* 沉默提高了黏虫对球孢白僵菌诱导的敏感性,球孢白僵菌侵染 48 h 后分别沉默黏虫 *MsSerp*-4 和 *MsSerp*-5 基因,黏虫化蛹率降低,蛹重减轻,羽化率降低,产卵量较少,推测 *MsSerp* 也可能在成虫生长发育过程中发挥了重要的调控作用,这需要进一步研究验证。本研究测定分析了球孢白僵菌处理对黏虫 *MsSerp* 基因表达水平的影响,发现 *MsSerp* 能够作为负调控因子控制病原真菌对黏虫侵染引起的免疫反应。

参 考 文 献 (References)

- Bai JY, Cao JY, Zhang YE, Xu Z, Li L, Liang LW, Ma XQ, Han RH, Ma W, Xu LT, et al. 2022. Comparative analysis of the immune system and expression profiling of *Lymantria dispar* infected by *Beauveria bassiana*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 187: 105212
- Brandt KS, Silver GM, Becher AM, Gaines PJ, Maddux JD, Jarvis EE, Wisniewski N. 2004. Isolation, characterization, and recombinant expression of multiple serpins from the cat flea, *Ctenocephalides felis*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 55(4): 200–214
- Brochan G, Arakane Y, Beeman RW, Kramer KJ, Muthukrishnan S, Merzendorfer H. 2010. Chymotrypsin-like peptidases from *Tribolium castaneum*: a role in molting revealed by RNA interference. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40(3): 274–283
- Butt TM, Coates CJ, Dubovskiy IM, Ratcliffe NA. 2016. Entomopathogenic fungi: new insights into host-pathogen interactions. *Advances in Genetics*, 94: 307–364
- Chen JN, Fang GQ, Pang L, Sheng YF, Zhang QC, Zhou YN, Zhou SC, Lu YQ, Liu ZG, Zhang YX, et al. 2021. Neofunctionalization of an ancient domain allows parasites to avoid intraspecific competition by manipulating host behaviour. *Nature Communications*, 12: 5489
- Chu Y, Zhou F, Liu Y, Hong F, Wang GR, An CJ. 2015. *Ostrinia furnacalis* serpin-3 regulates melanization cascade by inhibiting a prophenoloxidase-activating protease. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 61: 53–61
- Gan H, Wang Y, Jiang HB, Mita K, Kanost MR. 2001. A bacteria-induced, intracellular serpin in granular hemocytes of *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31(9): 887–898
- Gao QP, Yang LL, Dai JJ, Yuan GZ, Wang L, Qian C, Zhu BJ, Liu CL, Wei GQ. 2018. Characterization and functional analysis of serpin-28 gene from silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 159: 18–27
- Gu QJ, Wu ZW, Zhou YN, Wang ZZ, Huang JH, Shi M, Chen XX. 2021. A serpin (CvT-serpin15) of teratocytes contributes to microbial-resistance in *Plutella xylostella* during *Cotesia vestalis* parasitism. *Pest Management Science*, 77(10): 4730–4740
- Hegedus DD, Erlandson M, Baldwin D, Hou XW, Chamankhah M. 2008. Differential expansion and evolution of the exon family encoding the serpin-1 reactive centre loop has resulted in divergent serpin repertoires among the Lepidoptera. *Gene*, 418(1/2): 15–21
- Herwade AP, Barale SS, Sonawane KD, Pawar PK. 2022. *In vivo* developmental studies of *Helicoverpa armigera* and *in silico* molecular interactions with trypsin reveal the bio-insecticidal potential of trypsin inhibitor (SSTI) isolated from *Solanum surattense*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 223: 335–345
- Kanost MR. 1999. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. *Developmental & Comparative Immunology*, 23(4/5): 291–301
- Lemaître B, Hoffmann J. 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology*, 25: 697–743
- Levashina EA, Langley E, Green C, Gubb D, Ashburner M, Hoffmann JA, Reichhart JM. 1999. Constitutive activation of toll-mediated antifungal defense in serpin-deficient *Drosophila*. *Science*, 285(5435): 1917–1919
- Li BB, Tian Y, Du GL, Yue FZ, Nong XQ, Liu TH, Zhang ZH, Wang GJ. 2020. Effect of serine protease inhibitor Serpin1 from *Locusta migratoria* on the infection of *Metarhizium anisopliae*. *Chinese Journal of Biological Control*, 36(5): 729–736 (in Chinese) [李贝贝, 田野, 杜桂林, 岳方正, 农向群, 刘廷辉, 张泽华, 王广君. 2020. 丝氨酸蛋白酶抑制剂 Serpin1 对绿僵菌侵染飞蝗的影响. *中国生物防治学报*, 36(5): 729–736]
- Li LL, Zhou XQ, Zhao KJ, Lei L, Fan D. 2016. cDNA cloning and prokaryotic expression of a serine protease from *Heliothis virescens*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 53(4): 706–715 (in Chinese) [李莉莉, 周晓群, 赵奎军, 雷蕾, 樊东. 2016. 苜蓿夜蛾丝氨酸蛋白酶基因 cDNA 序列的克隆与原核表达研究. *应用昆虫学报*, 53(4): 706–715]
- Li YS, Zhao P, Liu HW, Guo XM, He HW, Zhu R, Xiang ZH, Xia QY. 2015. TIL-type protease inhibitors may be used as targeted resistance factors to enhance silkworm defenses against invasive

- fungi. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 57: 11–19
- Li YS, Zhao P, Liu SP, Dong ZM, Chen JP, Xiang ZH, Xia QY. 2012. A novel protease inhibitor in *Bombyx mori* is involved in defense against *Beauveria bassiana*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42(10): 766–775
- Namara LM, Griffin CT, Fitzpatrick D, Kavanagh K, Carolan JC. 2018. The effect of entomopathogenic fungal culture filtrate on the immune response and haemolymph proteome of the large pine weevil, *Hylobius abietis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 101: 1–13
- Saranraj P, Jayaprakash A. 2017. Agrobeneficial entomopathogenic fungi-*Beauveria bassiana*: a review. *Indo-Asian Journal of Multidisciplinary Research*, 3(2): 1051–1087
- Tripathi LP, Sowdhamini R. 2008. Genome-wide survey of prokaryotic serine proteases: analysis of distribution and domain architectures of five serine protease families in prokaryotes. *BMC Genomics*, 9(1): 1–28
- Vilcinskis A. 2010. Coevolution between pathogen-derived proteinases and proteinase inhibitors of host insects. *Virulence*, 1(3): 206–214
- Wang DF, Zeng MS, Li HL, Wang QS, Wu GY. 2012. Effect of inoculation method on toxicity of *Beauveria bassiana* against 5th instar larvae of *Homona coffearia*. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 27(10): 1097–1101 (in Chinese) [王定锋, 曾明森, 李慧玲, 王庆森, 吴光远. 2012. 染毒方式对球孢白僵菌侵染茶卷叶蛾毒力的影响. *福建农业学报*, 27(10): 1097–1101]
- Wang ZH, Zhao XF, Wang JX. 2009. Characterization, kinetics, and possible function of Kazal-type proteinase inhibitors of Chinese white shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 26(6): 885–897
- Wu W, Xu HL, Wang ZL, Yu XP. 2022. Cloning and function analysis of a serine protease inhibitor gene *Nlserpin2* in *Nilaparvata lugens*. *Scientia Agricultura Sinica*, 55(12): 2338–2346 (in Chinese) [郭伟, 徐慧丽, 王正亮, 俞晓平. 2022. 褐飞虱丝氨酸蛋白酶抑制剂基因 *Nlserpin2* 的克隆及其功能分析. *中国农业科学*, 55(12): 2338–2346]
- Xiong Q, Xie YP, Zhu Y, Xue JL, Li J, Fan RJ. 2013. Morphological and ultrastructural characterization of *Carposina sasakii* larvae (Lepidoptera: Carposinidae) infected by *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales: Clavicipitaceae). *Micron*, 44: 303–311
- Yang F, Wang Y, Sumathipala N, Cao XL, Kanost MR, Jiang HB. 2018. *Manduca sexta* serpin-12 controls the prophenoloxidase activation system in larval hemolymph. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 99: 27–36
- Zhang CH, Zaw LN, Ei TS, Liang GM. 2021. Cloning and expression analysis of four serine protease inhibitor genes in cotton bollworm *Helicoverpa armigera*. *Journal of Plant Protection*, 48(5): 980–988 (in Chinese) [张彩虹, Zaw LN, Ei TS, 梁革梅. 2021. 棉铃虫四个丝氨酸蛋白酶抑制剂基因的克隆与表达分析. *植物保护学报*, 48(5): 980–988]
- Zhao YR, Xu YH, Jiang HS, Xu S, Zhao XF, Wang JX. 2014. Antibacterial activity of serine protease inhibitor 1 from Kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Developmental & Comparative Immunology*, 44(2): 261–269
- Zheng YP, He WY, Béliveau C, Nisole A, Stewart D, Zheng SC, Doucet D, Cusson M, Feng QL. 2009. Cloning, expression and characterization of four *serpin-1* cDNA variants from the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 154(2): 165–173
- Zibae A, Bandani AR, Talaei-Hassanlouei R, Malagoli D. 2011. Cellular immune reactions of the sunn pest, *Eurygaster integriceps*, to the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* and its secondary metabolites. *Journal of Insect Science*, 11(1): 138

(责任编辑:李美娟)