

赵旭东,韩芷琪,耿薏舒,胡天义,李文萱,郝德君.美国白蛾丝素蛋白基因的鉴定、时空表达及取食不同寄主植物后的表达响应 [J]. 环境昆虫学报,2021,43 (6):1348-1358.

美国白蛾丝素蛋白基因的鉴定、时空表达及 取食不同寄主植物后的表达响应

赵旭东^{1,2},韩芷琪^{1,2},耿薏舒^{1,2},胡天义^{1,2},李文萱^{1,2},郝德君^{1,2}* (1. 南京林业大学南方现代林业协同创新中心,南京 210037; 2. 南京林业大学林学院,南京 210037)

摘要:美国白蛾 Hyphantria cunea Drury 被列为我国林业检疫性害虫,其1~4 龄幼虫具有吐丝结网幕的习性。为探究丝素蛋白基因的表达特性,本研究利用 PCR 技术克隆了美国白蛾的 HcP25 (Genbank 登录号:OL625670)、 HcFib-H (Genbank 登录号:OL625672)、HcFib-L (Genbank 登录号:OL625671)3条丝素蛋白基因,并进行生物 信息学分析;利用 RT-qPCR 技术检测美国白蛾3条丝素蛋白基因的表达特性。结果表明:3条丝素蛋白基因序列 比对均与车前灯蛾 Arctia plantaginis 丝素蛋白一致性最高,系统进化分析显示丝素蛋白 HeP25、HcFib-H、HeFib-L 在鳞翅目不同科之间在出现较大的分化。RT-qPCR 试验结果显示 HcP25、HcFib-H、HeFib-L3基因相对表达量与网 幕产生高峰期(1龄、2龄)相一致。3种丝素蛋白均在丝腺中特异性高水平表达,在头部及脂肪体中有少量表 达。美国白蛾幼虫取食不同寄主植物后,3种丝素蛋白基因呈现不同的表达规律;取食杨树 Populus L.处理组中 HcP25与HcFib-H基因相对表达量极显著高于取食其它寄主处理,而取食山樱花 Cerasus serrulata var. lannesiana 和 日本晚樱 Cerasus serrulata 处理组中 HcFib-L 基因表达量最高。研究结果为进一步探究丝素蛋白介导的美国白蛾对 不同寄主的适应机制及其扩散机制奠定基础,也为开发美国白蛾防治新方法提供了潜在的基因靶标。 关键词:美国白蛾;寄主植物;丝素蛋白;时空表达特性

中图分类号: Q965; S433 文献标识码: A 文章编号: 1674-0858 (2021) 06-1348-11

Cloning and spatio-temporal expression of fibroinsand its expression in response to feeding on different host in *Hyphantria cunea* (Lepidoptera: Arctiidae)

ZHAO Xu-Dong^{1,2}, HAN Zhi-Qi^{1,2}, GENG Yi-Shu^{1,2}, HU Tian-Yi^{1,2}, LI Wen-Xuan^{1,2}, HAO De-Jun^{1,2*} (1. Co-Innovation Center for the Sustainable Forestry in Southern China, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 2. College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China) **Abstract**: *Hyphantria cunea* Drury is listed as quarantine pests in China, and its 1st ~ 4th larva aggregate by creating silk webs on tree branches, where the larvae feed and live as they growing. To explore the expression characteristics of silk fibroin genes. In this study, three silk fibroin genes were cloned from *H. cunea* by PCR and the results of sequence alignment showed that the silk fibroin genes of *H. cunea* had the highest consistency with those of *Arctia plantaginis*. Phylogenetic analysis showed that *HcP25*, *HcFib-H* and *HcFib-L* differentiated greatly among different families of Lepidoptera. RT-qPCR results indicated that the expression of *HcP25*, *HcFib-H* and *HcFib-L* in different developmental stages showed dynamic change

基金项目: 江苏省林业科技创新与推广项目 (LYKJ [2020] 17); 江苏省研究生培养创新工程 (KYCX18_ 0957)

作者简介:赵旭东,博士研究生,研究方向为森林保护学, E-mail: 1148413687@qq.com

^{*} 通讯作者 Author for correspondence:郝德君,博士,教授,研究方向为森林保护学,E-mail: dejunhao@163.com 收稿日期 Received: 2021-08-16;接受日期 Accepted: 2021-10-07

and the expression level of HcP25, HcFib-H and HcFib-L was significantly related to the stage of silkproducing (1st and 2nd instars). RT-qPCR results in different tissues showed that HcP25, HcFib-H and HcFib-L were mainly expressed in silk glands and a small amount in head and fat body. Moreover, after feeding on different hosts, the expression trends of HcP25, HcFib-H and HcFib-L were different and the relative expression of HcP25 and HcFib-H genes of H. *cunea* larvae fed on *Populus* L. was significantly higher than that of other host populations, while the relative expression of HcFib-L fed on *Cerasus serrulata* var. *lannesiana* and *Cerasus serrulata* was significantly higher than that of other hosts. The results of this study laid a foundation for in-depth study of web-mediated adaptation and diffusion mechanism of H. *cunea* to different hosts, and provided potential genetic targets for the development of new control methods of H. *cunea*.

Keywords: Hyphantria cunea; host plants; fibroins; temporal and spatial expression patterns

大多数鳞翅目幼虫依靠唇腺分泌纤维蛋白 (统称为丝),用于躲避天敌、抵御外界不良环境 以及营造化蛹场所 (Robert, 2002; Chinnaswamy et al., 2012)。丝素作为丝的主要成分,约占 75%~80%,是由丝素重链 (Fibroin Heavy Chain, fib-H链)、丝素轻链 (Fibroin Light Chain, fib-L 链)和 P25 三种蛋白组成(Rouhova et al., 2021)。 丝素重链与丝素轻链通过二硫键形成 H-L 复合体, fib-H和fib-L之间的二硫键位点被鉴定为fib-H的 羧基末端的第20位残基(Cys-20)以及 fib-L 羟基 末端第 172 位残基 (Cys-172), 这类 H-L 复合体 对于丝蛋白在细胞内运输及有效分泌必不可少 (Tanaka et al., 1999a)。同时, P25 蛋白通过非共 价键疏水作用与 H-L 复合体结合, 以维系丝素蛋 白分子复合体的三维构造(Yonemura et al., 2009; Matthew et al., 2011)。已有研究表明,家蚕 Bombyx mori一个基本的丝素单位由 6 个 fib-H、 6个 fib-L 和 1 个 P25 分子组装成 (Takei et al., 1987; Song et al., 2002; Matthew et al., 2011; Tsubota et al., 2016)。但并非所有鳞翅目幼虫丝素 蛋白均由这三种蛋白构成,如天蚕 Antheraea yamamai Guerin-Meneville、柞蚕 Antheraea pernyi 等 大蚕蛾科柞蚕属昆虫的丝纤维则缺少 fib-L 和 P25 组分,是由丝素重链二聚体组成(Hwang et al., 2001; Tanaka and Mizuno, 2001; Naoyuki et al., 2009); 毛翅目幼虫的丝纤维主要由 fib-H 和 fib-L 构成, 缺少 P25 (Yonemura et al., 2006)。

不同的鳞翅目幼虫由于其生物学习性的差异, 幼虫吐丝发挥不同的作用,同时伴随丝素蛋白基 因特异的表达模式。家蚕 Bmfib-H、Bmfib-L 和 BmP25 的表达量均随着幼虫的生长发育而呈现上 升趋势,老熟幼虫时表达量达到峰值(赵晓明, 2017)。同样地,在米蛾 Corcyra cephalonica 中,随 着幼虫龄期的增加,丝腺组织分泌丝的能力逐渐 增强,Ccfib-H、Ccfib-L和CcP25的表达量也随之 升高,在末龄幼虫时达到峰值,在预蛹阶段又显 著下降(Chaitanya and Dutta-Gupta, 2010; Chaitanya et al., 2013)。稻纵卷叶螟Cnaphalocrocis medinalis 通过用丝包裹稻叶形成网幕,幼虫在网 幕中取食水稻上表皮和叶片组织,其丝素蛋白的 表达量也与产生网幕的时期呈现正相关(Su et al., 2016)。

美国白蛾 Hyphantria cunea Drury 是国际性检疫 害虫,具有适应性强,繁殖量大,寄主种类多, 传播途径广,危害严重等特点(杨忠岐等, 2007), 自1979年在辽宁省丹东市首次发现以来, 目前已经扩散至13个省(区、市)608个县级行 政区(国家林业和草原局2021年第7号公告)。 对森林、园林、果树业造成巨大的经济损失,对 国土生态安全构成严重威胁 (Tang et al., 2021; 卢修亮等, 2021)。研究发现, 美国白蛾幼虫具有 吐丝结网的习性,一旦卵孵化后即可分泌丝蛋白 形成丝状网幕,1~4龄幼虫在网幕内取食寄主植 物 (Wu et al., 2019; 王光宇等, 2020), 网幕也为 其提供适宜的生长温度以及躲避天敌的攻击 (Rehnberg, 2002)。关于美国白蛾丝素蛋白的表达 特性研究还未见报道。本研究通过克隆三条美国 白蛾丝素蛋白,利用荧光定量 PCR 技术探究丝素 蛋白基因在美国白蛾不同发育阶段和不同组织的 表达特性, 以期明确丝素蛋白表达特性与幼虫产 丝时期的关系。同时,分别选择美洲黑杨 Populus deltoides、日本晚樱 Cerasus serrulata var. lannesiana、 山樱花 Cerasus serrulata、喜树 Camptotheca Acuminata 和落羽杉 Taxodium distichum 等5种植物,研究美 国白蛾取食不同寄主植物后丝素蛋白基因的表达 特性,为解析网幕介导的美国白蛾对不同寄主的

适应性和扩散机制奠定基础,也为未来防治美国 白蛾提供潜在的基因靶标。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

美国白蛾 2 龄幼虫于 2020 年 5 月采自江苏省 淮安市淮安区杨树上(33.52°N,119.16°E)。将 幼虫带回室内参照曹利军等(2014)方法进行人 工饲养,人工气候培养箱温度设置为 26℃ ±1℃, 相对湿度 65% ±5%,光周期 16 L:8 D。待成虫羽 化后,提供新鲜的杨树叶片供其产卵。取室内繁 殖的第 2 代幼虫用于试验。

1.2 美国白蛾幼虫总 RNA 的分离与 cDNA 模板 的合成

取 10 头生长发育一致的美国白蛾 3 龄幼虫用 液氮速冻后置于研钵中,研磨成粉末状,再用提 取试剂盒(上海生工技术公司)提取总 RNA。利 用紫外分光光度计及 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 浓度及质量,选择电泳图谱良好且 OD₂₆₀/OD₂₈₀值 在 1.8~2.0之间的 mRNA 样品合成 cDNA 模板。 cDNA 模板用 HiScript II Q Select RT SuperMix (南 京诺唯赞生物技术公司)两步法合成,第一步: 4× gDNA Wider Mix 4 μ L, Oligo (dT) 1 μ L, RNA 1 μ L, ddH₂ O 10 μ L, 42℃ 2 min; 第二步: 将 4 μL 5 × HiScript II Select qRT SuperMix II 加入混 合液, 85℃ 5 s, 50℃ 15 min, -20℃保存或直接 用于 PCR 反应。

1.3 美国白蛾丝素蛋白基因的克隆

美国白蛾3条丝素蛋白基因 HcP25、HcFib-H、 HcFib-L的 cDNA 序列由美国白蛾幼虫转录组(由 本实验室构建,未发表数据)筛选获得,利用 Prime Premier 5.0 软件设计引物 (表 1),送至上 海生工生物公司合成。以美国白蛾 3 龄幼虫 RNA 合成的 cDNA 为模板,利用 ApexHF FS PCR Master Mix (艾科瑞生物,中国) 聚合酶进行 PCR 扩增, 扩增体系为: ApexHF FS PCR Master Mix 25 μL、 上下游引物各 1 μL、cDNA 模板 2 μL, ddH₂O 21 µL; 扩增条件为: 98℃ 10 s、50℃ 15 s、72℃ 30 s, 循环 30 次; 72℃ 5 min 延伸, 扩增后用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。将 PCR 产物经琼脂糖 凝胶电泳后切胶纯化, 克隆于 pCE2 载体 (南京诺 唯赞生物技术公司),导入大肠杆菌 Escherichia coli Trans1-T1 (南京诺唯赞生物技术公司) 之后在含 有氨苄抗性的 LB 琼脂板上 37℃过夜培养,挑取阳 性克隆于 LB 液体培养基中 37℃ 200 r/min 孵育 2h,再进行菌液 PCR 鉴定。将验证正确的重组质 粒送至上海生工生物有限公司进行测序。利用分 子生物学软件 DNAMAN 8.0 比对测序序列与美国 白蛾 cDNA 文库中的丝素蛋白序列相似性。

表 1 本实验所用引物 Table 1 The primers used in this study

基因 Genes	引物 Primer (5′-3′)	用途 Purpose
P25-F	F: ATGCTTCTGAAAGGTCTGTT	支政の・
P25-R	R: TTTAGGCATTGGACAGCCGT	兄座 Cloning
qP25-F	F: CTGGCAGAGCGGTATTTTGC	实时定量 PCR
qP25-R	R: CTCGCTGAACACAGGTCCAT	Real-time quantitative PCR
FIB-L-F	F: TGTGTAAACATATCAATATCTGAACATTTTTGT	
FIB-L-R	R: TTAGTAGTTAGCTGCAGAGATAAGGG	見座 Cloning
qFLB-L-F	F: TCGCACAACTGGCTCTCAAT	实时定量 PCR
qFLB-L-R	R: CTCTTGGAAGAGGCCTGGTG	Real-time quantitative PCR
FIB-H-F	F: ATGAGGGGAATAACCATCGTGA	
FIB-H-R	R: CACTCTGTCCTCCACGGATA	兒隆 Cloning
qFIB-H-F	F: TGCCACCGCTAACTTCAACA	实时定量 PCR
qFIB-H-R	R: CCTTGTCGTACCAGGCTTGT	Real-time quantitative PCR
qRPS26-F	F: CAGGGACATCAACGAAGCCT	实时定量 PCR
qRPS26-R	R: GGTGCTCTTGGGTGGAGTAC	Real-time quantitative PCR

1.4 美国白蛾不同发育阶段和不同组织 RNA 的 提取以及 cDNA 模板合成

美国白蛾不同虫龄幼虫和蛹的 cDNA 模板的合成:选取 200 ~ 300 粒卵、20 ~ 30 头 1 龄、2 龄幼虫; 5 ~ 10 头 3 龄、4 龄幼虫; 3 ~ 5 头 5 龄、6 龄幼虫、蛹各 3 ~ 10 头为一个生物学处理, 3 次重复。RNA 提取及 cDNA 合成方式参考 1.2。

美国白蛾不同组织 cDNA 模板的合成:选取 2 日龄 3 龄幼虫 10~15 头,在生理盐水中解剖, 获得头、中肠、血淋巴、马氏管、脂肪体、表皮、 丝腺、足等组织,置于 RNA later 中短时保存,通 过离心法将 RNA later 去除。RNA 提取及 cDNA 合 成方式参考 1.2。

1.5 不同寄主植物处理

将初羽化的雌雄成虫置于 10 cm × 10 cm × 10 cm 的饲养盒中,提供30%蜂蜜水补充营养,让 其自由交配,第 2 天收集卵块。将收集的卵卡分 别放入盛有 5 种新鲜寄主的的饲养盒(13.5 cm × 8.0 cm × 0.5 cm)中,待幼虫孵化,每隔 1 d 清理 1 次虫粪便并更换食料。由于美国白蛾幼虫在 1 ~ 4 龄时形成网幕,因此选择取食 5 种寄主植物的 3 龄幼虫为供试昆虫进行丝素蛋白的表达特性分 析。取 10 ~ 15 头蜕皮后 1 d 的 3 龄幼虫为一个处 理,5 次重复。RNA 提取及 cDNA 合成方式参 考1.2。

1.6 荧光定量 PCR 引物的合成与扩增效率的 检测

依据 cDNA 文库所得到的基因序列设计引物 (退火温度均在 50°C~60°C之间),以美国白蛾核 糖体基因 Ribosomal Protein S26 (*RPS26*)为内参基 因(实验室前期筛选,数据未发表),引物设计运 用 Primer 5.0软件,由上海生工生物公司合成,引 物序列见表 1。取美国白蛾 3 龄幼虫的 cDNA 模 板,稀释浓度为 500、50、5、0.5 和 0.05 ng/µL。 分别利用上述引物进行扩增,每个浓度重复 5 次。 利用公式 E = 10⁻¹/Slope (E为扩增效率,Slope 为 5 个浓度平均 Ct 值所构成直线的斜率值)计算 引物的扩增效率,比较待测丝素蛋白基因与内参 基因 *RPS26* 扩增效率的数值,确定本研究所用的 荧光定量 PCR 引物是否达到要求。

1.7 实时荧光定量 PCR

依据克隆获得的丝素蛋白基因序列设计实时

荧光定量 PCR 引物。引物设计采用 Primer 5.0 软件由上海生工生物公司合成,引物序列见表1。实时荧光定量 PCR 在 Applied Biosystem 7500 System (美国)上进行。反应体系:UltraSYBR mix (with R) 12.5 μ L,上下游引物各 0.5 μ L, cDNA 模板 2 μ L, ddH₂O 9.5 μ L。扩增条件:95℃ 预变性 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 34 s, 40 个循环;每个样品 设置3 个生物学重复,每个生物学重复设置3 个技术重复,采用2^{-ΔΔCt}法计算丝素蛋白基因的相对表 达量 (Livak *et al.*, 2001)。

1.8 美国白蛾丝素蛋白基因序列分析以及进化树 分析

通过在线软件(http://web.expasy.org/ compute_pi/)分析美国白蛾丝素蛋白核苷酸序列 的物理性状。已知鳞翅目昆虫的丝素蛋白基因氨 基酸序列相似性搜索使用 BLAST(http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)工具利用 NCBI 的 CD search (www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/ cdd/cdd.shtml)预测蛋白的保守功能域;ClustalX 软件进行氨基酸多重序列完全比对;利用 MEGA 9.0软件包中的邻位相连法(Neighbor-Joining)构 建进化树并经1000次 Bootstrap 自举重复检验。

1.9 数据处理与分析

美国白蛾不同发育阶段、不同组织以及取食不同寄主的丝素蛋白相对表达量变化采用 2^{-ΔΔCt}法 计算。利用 IBM SPSS Statistics 20 软件进行数据处理, Origin 2018 绘制图表。采用单因素分析法中的 Duncan 氏多重检验法对美国白蛾丝素蛋白基因相对表达量进行差异显著性分析,差异显著水平 为 P < 0.05。

2 结果与分析

2.1 美国白蛾丝素蛋白基因的鉴定

基于美国白蛾幼虫的转录组数据,通过基因 克隆鉴定了3条美国白蛾丝素蛋白基因。其中 HcP25具有完整的ORF,编码221个氨基酸, HcFib-L、HcFib-H为部分片段。HcP25预测分子量 为25.6 kDa,理论等电点预测为7.45。信号肽预 测结果表明,HcP25 N端均具有17个氨基酸组成 的信号肽序列(图1),且有典型的丝素蛋白P25 蛋白保守结构域。

1	ATG	CTT	CTG	AAA	GGT	CTG	TTA	ATT	TTG	TTG	GGG	GCA	CAT	TAT	TGC	TAC	GCA	GAT	TTA	ТСТ
	М	L	L	К	G	L	L	I	L	L	G	Α	Н	Y	С	Y	Α	D	L	S
61	AAT	ATT	ATA	CGA	CCT	TGC	AAA	СТА	AAT	CAT	TAC	AAA	TGT	ATT	GGA	GAA	AAT	ТТА	GCA	GCG
	N	I	Ι	R	Р	С	К	L	Ν	Н	Y	K	С	I	G	Е	Ν	L	А	А
121	AAT	TCG	TAC	TGC	AAA	GTC	AAG	GAG	AAC	GGC	TTC	CTG	CCC	TCC	AAA	TAC	GTA	CAG	GAG	TCC
	Ν	S	Y	С	K	V	Κ	Е	Ν	G	F	L	Р	S	K	Y	V	Q	Е	S
181	TTC	CAC	TAC	GAC	ACG	CCA	TAC	TTC	AAC	GCG	TCG	TAT	ATC	GAT	CAT	AAC	TTG	ATT	ATC	AGA
	F	Н	Y	D	Т	Р	Y	F	Ν	А	S	Y	I	D	Н	Ν	L	I	I	R
241	AAT	CAG	GAT	AAG	TGC	TAT	GTT	TCG	GAC	TTT	TTC	GTC	AAT	ACA	CGG	ACT	GGC	AGA	GCG	GTA
	Ν	Q	D	K	С	Y	V	S	D	F	F	V	Ν	Т	R	Т	G	R	А	V
301	TTT	TGC	ATG	GAC	TGT	CCT	AAC	CTG	GAC	TTT	GAA	TCG	GAC	CGC	ACC	ATG	ATC	CAG	CAC	AGA
	F	С	М	D	С	Р	N	L	D	F	Е	S	D	R	Т	М	I	Q	Н	R
361	ACT	TGT	CAA	GAA	GAC	AGT	TAT	TAT	GAA	TAC	CAC	TTT	AGG	GGC	GTT	TAT	CCT	ATG	ATT	CGC
	Т	С	Q	Е	D	S	Y	Y	Е	Y	Н	F	R	G	V	Y	Р	М	1	R
421	ATA	ACA	ATC	AAC	TTG	CCG	AGC	GCA	ACC	CAC	ATG	GAC	CTG	TGT	TCA	GCG	AGC	ATC	TTC	ACC
	Ι	Т	Ι	Ν	L	Р	S	А	Т	Н	М	D	L	С	S	Α	S	Ι	F	Т
481	GAC	GTG	TCT	GAG	CTG	CCC	AAA	TTG	CAC	ATA	AAC	CCT	AAA	AAT	AAA	CCA	ACA	GCT	AAT	TAC
	D	V	S	Е	L	Р	K	L	Н	1	Ν	Р	K	Ν	K	Р	Т	А	N	Y
541	CTG	TCC	AAG	GAC	TTC	AGT	CAC	CTT	TAT	ATA	TAT	GAA	CGA	GAG	AAC	GGC	CAC	GCC	AGG	GGA
	L	S	K	D	F	S	Н	L	Y	1	Y	Е	R	Е	Ν	G	Н	А	R	G
601	CCC	GGC	CTC	GCC	TAC	AAG	TTC	ATA	GAC	TCG	CTC	ATC	TGT	GAC	TAC	GGC	TGT	CCA	ATG	CCT
	Р	G	L	А	Y	K	F	Ι	D	S	L	Ι	С	D	Y	G	С	Р	М	Р
661	AAA	TAA																		
	V	*																		

图 1 美国白蛾丝素蛋白 HcP25 基因核苷酸序列以及其推导出来的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *HcP25* from *Hyphantria cunea*

注: 红色下划线为推导的信号肽区域, 灰色阴影部分为 P25 蛋白超家族结构域。Note: The predicted signal peptide sequence was underlined. The gray shaded part was the fibroin P25 super family domain.

表 2	3 条丝素蛋白的 BLASTX 最佳匹配
Table 2	BLASTX best hit of three Fibroin genes

基因名称 Gene name		BLASTX 最佳匹配 BLASTX best hit							
	む 増大度(bp) Amplification length	物种和蛋白名称 Species and protein name	GenBank 登录号 GeBank accession number	期望值 E-value	一致性(%) Identity				
HcP25	666	车前灯蛾 Arctia plantaginis P25	CAB3237372. 1	1e-118	77.3				
HcFib-H	406	车前灯蛾 Arctia plantaginis Fib-H	CAB3248753. 1	6e-46	80.4				
HcFib-L	510	车前灯蛾 Arctia plantaginis Fib-L	CAB3225488. 1	3e-43	81.5				

2.2 美国白蛾与其他昆虫丝素蛋白基因氨基酸序 列的进化树分析

NCBI BLAST 比对结果显示, 丝素蛋白主要在 鳞翅目昆虫中特异性表达。MEGA 9.0 邻接法 (Neighbor Joining methods) 对包括美国白蛾 HcP25、HcFib-H、HcFib-L在内的不同科鳞翅目昆 虫的丝素蛋白基因核苷酸序列分别进行系统发育 进化树的构建。结果显示 (图 2): 美国白蛾 HcP25、HcFib-H、HcFib-L均与车前灯蛾同源性最 高,同属于一个分支。P25、Fib-H、Fib-L在鳞翅 目不同科之间在出现较大的分化;分化的原因可 能是由于取食习性以及生物学习性的差异导致。 P25 以及 Fib-L 在美国白蛾所属的灯蛾科中与夜蛾 科的进化关系较为接近,而在丝素蛋白 Fib-H 中灯 蛾科与凤蝶科进化关系更为接近。

2.2 美国白蛾丝素蛋白基因在幼虫不同发育阶段 的表达

引物合成后,RT-qPCR 检测结果显示无引物 二聚体,亦无非特异性扩增。丝素蛋白基因 *HcP25、HcFib-H、HcFib-L* 引物扩增效率分别为 106.03%、94.90%、108.14%;内参基因 *RPS26* 的引物扩增效率为104.15 (表3)。确定本研究所 用的荧光定量 PCR 引物均达到实验要求。



图 2 鳞翅目昆虫丝素蛋白进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of lepidopteran Fibroins

注:A表示鳞翅目昆虫 P25 基因进化树;B表示鳞翅目昆虫 Fib-L进化树;BC表示鳞翅目昆虫 Fib-H进化树。不同颜色 区域代表鳞翅目不同科; Note: A represents phylogenetic tree of lepidopteran P25s; B represents phylogenetic tree of lepidopteran Fib-Ls; C represents phylogenetic tree of lepidopteran Fib-Hs. Different color regions represent different families of Lepidoptera. 物 种名以及 P25s 登录号: 菜粉蝶 Pieris rapae; Prp25 (XP 022115373.1); 白粉蝶 Pieris macdunnoughi; PmP25 (CAF4741365.); 菊黄花粉蝶 Zerene cesonia; ZcP25 (XP 038217613.1); 条纹小粉蝶 Leptidea sinapis; LsP25 (VVD01372.1); 黑脉金斑蝶 Danaus plexippus plexippus; DpP25 (XP 032525475.1); 金凤蝶 Papilio machaon; PmaP25 (XP 014362623.1); 赤松毛虫 Dendrolimus spectabilis; DsP25 (BAB39502.1); 桑野蚕 Bombyx mandarina; BmP25 (BAB39500.1); 米蛾 Corcyra cephalonica; CceP25 (ACX50393.1); 蜡螟 Galleria mellonella; GmP25 (XP 026750282.1); 海波斯莫科马属尖蛾 Hyposmocoma kahamanoa; HkP25 (XP 026325402.1); 棉褐环野螟 Haritalodes derogata; HdP25 (ARE31005.1); 亚洲玉米螟 Ostrinia furnacalis; OfP25 (XP 028174026.1); 粉纹夜蛾 Trichoplusia ni; TniP25 (XP 026736911.1); 车前灯蛾 Arctia plantaginis; ApP25 (CAB3237372.1); 美国白蛾 Hyphantria cunea; HcP25; 棉铃虫 Helicoverpa armigera; HaP25 (XP 021180832.1); 斜纹夜蛾 Spodoptera litura; SIP25 (XP 022817133.1); 草地贪夜蛾 Spodoptera frugiperda; SfP25 (XP 035455615.1); 幕衣蛾 Tineola bisselliella; TbP25 (QRN45216.1); 稠李巢蛾 Yponomeuta evonymella; YeP25 (BAE97692.1); 小菜蛾 Plutella xylostella; PxP25 (QQP17683.1)。物种名以及 Fib-Ls 登录号: 蜡螟 Galleria mellonella; GmFibL (XP 026751556.1); 米蛾 Corcyra cephalonica; CcFibL (ACX50392.1); 脐橙螟蛾 Amyelois transitella; AtFibL (XP 013191394.1); 亚洲玉米螟 Ostrinia furnacalis; OfFibL (XP 028170825.1); 棉褐环野螟 Haritalodes derogata; HdFibL (AFS32690.1); 玉带凤蝶 Papilio polytes; PpFibL (XP 013148799.1); 柑橘凤蝶 Papilio xuthus; PxFibL (NP 001299492.1); 特美红蛱蝶 Vanessa tameamea; VtFibL (XP 026488043.1); 黑脉金斑蝶 Danaus plexippus; DpFibL (OWR43595.1); 菊黄花粉蝶 Zerene cesonia; ZcFibL (XP 038218698.1); 白粉蝶 Pieris macdunnoughi; PmFibL (CAF4952403.1); 菜粉蝶 Pieris rapae; PrFibL (XP 022120941.1); 袋衣蛾 Tineola bisselliella; TbFibL (QRN45215.1); 烟草天蛾 Manduca sexta; MsFibL (XP 037303618.1); 家蚕 Bombyx mori; BmFibL (AAL83649.1); 粉纹夜蛾 Trichoplusia ni; TnFibL (XP 026736676.1); 车前灯蛾 Arctia plantaginis; ApFibL (CAB3225488.1); 美国白蛾 Hyphantria cunea; HcFibL; 棉铃虫 Helicoverpa armigera; HaFibL (XP 021187436.1); 斜纹夜蛾 Spodoptera litura; SIFibL (XP 022823583.1); 草地贪夜蛾 Spodoptera frugiperda; SfFibL (XP 035443377.1);物种名以及 Fib-H 登录号:车前灯蛾 Arctia plantaginis; ApFib-H (CAB3248753.1); 美国白蛾 Hyphantria cunea; HcFib-H; 玉带凤蝶 Papilio polytes; PpFib-H (XP 013147704.1); 柑橘凤蝶 Papilio xuthus; PxFib-H (KPJ01470.1); 棉褐环野螟 Haritalodes derogata; HdFib-H (ANA52002.1); 桑野蚕 Bombyx mandarina; BmFib-H (CAA27612.1); 家蚕 Bombyx mori; BmFib-H (NP 001106733.1); 棉铃虫 Helicoverpa armigera; HaFib-H (PZC72456.1); 斜纹夜蛾 Spodoptera litura; SIFib-H (XP 022817907.1); 草地贪夜蛾 Spodoptera frugiperda; SfFib-H (XP 035449581.1)

表 3 候选基因 qRT-PCR 引物的扩增效率及线性相关系数 Table 3 Amplification efficiency and R² of qRT-PCR primers for candidate genes

	P	8	
基因 Genes	扩增效率(%) Amplification efficiency	线性决定系数 R ² Correlation coefficient	斜率 Slope
RPS26	104. 15	0. 998	-3.22
HcFib-H	94.90	0. 998	-3.44
HcP25	106.03	0. 999	-3.17
HcFib-L	108. 14	0. 999	-3.14

RT-qPCR 结果显示美国白蛾丝素蛋白 HcP25、 HcFib-H、HcFib-L 相对表达量在美国白蛾幼虫不同 发育阶段存在明显差异。HcP25 与 HcFib-H 具有相 似的表达特点, HcP25 与 HcFib-H 在初孵幼虫以及 2 龄时相对表达量显著高于其它龄期(P<0.05); 在 2 龄后随着龄期增长呈下降趋势,4 龄之后 HcP25 与 HcFib-H 表达量显著下降,在蛹期时相对 表达量最低(图 3-A,C)。HcFib-L 在 2 龄幼虫体 内表达量达到峰值,显著高于其它龄期(P < 0.001),之后同样随着龄期增长显著下降,且在 蛹期时相对表达量最低,显著低于卵期与幼虫期 (P<0.05,图3-B)。



图 3 美国白蛾丝素蛋白基因 *HcP25*(A)、*HcFib-L*(B)、*HcFib-H*(C) 在不同发育阶段的表达特性 Fig. 3 Expression profiles of *HcP25*(A), *HcFib-L*(B), *HcFib-H*(C) in different developmental stages of *Hyphantria cunea* 注: L1~L6: 分别表示 1 龄至 6 龄美国白蛾幼虫。数据为平均数 ±标准误, 柱上不同小写字母表示差异显著 P < 0.05, Duncan 氏多重比较。下图同。Note: L1~L6 1st~6th instar larva, respectively. Data in the figure were mean ± SE, and different small letters above bars indicated significant difference (*P* < 0.05, Duncan's multiple comparison). The same below.

2.3 美国白蛾丝素蛋白基因在幼虫不同组织的表达分析

美国白蛾 HcP25、HcFib-H 和 HcFib-L 基因在 3 龄幼虫的不同组织中具有不同的表达模式。RTqPCR 结果表明 3 条丝素蛋白基因均在丝腺组织中 表达量 最高,且极显著高于其它组织(P < 0.001);其中 HcFib-H 在脂肪体、头中特异性地高 表达,且在脂肪体中相对表达量高于头部(P < 0.05),显著高于其他组织(P < 0.05)。HcP25、 HcFib-L 除了在丝腺组织中特异性表达之外,在表 皮、脂肪体、头中也有表达,且在这3个组织之 间差异不显著(P > 0.05)(见图4)。



图 4 美国白蛾丝素蛋白基因 *HcP25*(A)、*HcFib-L*(B)、*HcFib-H*(C) 在幼虫不同组织的表达特性 Fig. 4 Expression profiles of *HcP25*(A), *HcFib-L*(B), *HcFib-H*(C) in different tissues of the 3th instar larvae of *Hyphantria cunea*

2.4 美国白蛾丝素蛋白基因在取食不同寄主植物 后的表达谱分析

取食不同寄主植物后美国白蛾3龄幼虫丝素 蛋白基因的转录水平存在显著差异。取食杨树的 美国白蛾幼虫的 HcP25和 HcFib-H基因相对表达量 种群极显著高于其它寄主的种群(P<0.001,图 5-A,B),取食喜树的美国白蛾也相对较高。 HcP25和 HcFib-H基因表达量高低依次为杨树种群 > 喜树种群 > 山樱花种群 > 日本晚樱种群、落羽 杉种群。HcFib-L 表达特性与 HcP25 和 HcFib-H 不 同,取食山樱花与日本晚樱幼虫的 HcFib-L 相对表 达量显著高于其它种群 (P < 0.05),取食杨树幼 虫的 HcFib-L 表达相对较低且与取食落羽杉、喜树 的无显著性差异 (P > 0.05);取食落羽杉幼虫的 HcP25、HcFib-H 和 HcFib-L 表达量均低于取食其它 寄主植物 (图 5-C)。



不同寄主植物 Different host plants

图 5 美国白蛾幼虫取食不同寄主植物后丝素蛋白基因 HcP25(A)、HcFib-L(B)、HcFib-H(C)的表达特性 Fig. 5 Relative expression levels of HcP25(A), HcFib-L(B), HcFib-H(C) in the 3th instar larvae of Hyphantria cunea after feeding on different host plants

3 结论与讨论

丝是一种从螨类、蜘蛛等节肢动物外胚层腺 体中分泌形成的聚合纤维, 而节肢动物产丝能力 是由多个昆虫谱系中进化而来的(Gatesy et al., 2001; 王孟卿和彩万志, 2004; Addis et al., 2014)。 吐丝现象在膜翅目、长翅目、管蚤目、双翅目、 毛翅目和鳞翅目等昆虫的幼虫中均有发生 (Matthew et al., 2012; Yan et al., 2021)。 丝的主 要作用吐丝结成网幕保护幼虫躲避天敌或者是化 蛹时制作茧室以及一些肉食性昆虫利用丝收集食 物或用作捕获猎物的"陷阱"(John et al., 2001)。 产丝能力、丝的功能以及性能在不同的昆虫种类 中有很大的不同。美国白蛾幼虫聚集在寄主植物 叶片以及树枝上通过分泌丝纤维形成网幕, 幼虫 通常白天群聚在网幕中,夜晚扩张网幕并将植物 叶片包裹起来供其取食 (Rehnberg, 2002; Chen et al., 2020)。网幕为美国白蛾幼虫提供适宜的生 长温度以及躲避天敌的攻击。此外, 网幕还可以

调节热量,减缓网内的空气流动,从而促进幼虫的发育(Rehnberg, 2002; Takuya *et al.*, 2016)。

丝素蛋白是研究节肢动物适应性进化的理想 材料,因为它们独立地出现在许多节肢动物的谱 系中。通常情况下, 丝主要由甘氨酸、丙氨酸和 丝氨酸等非必需氨基酸组成。拥有特殊功能的丝 蛋白往往具有特定的属性,这些属性在很长一段 时间的进化过程中一直保持不变 (Gosline et al., 1999)。这些保守的蛋白质特征可以从单一半胱氨 酸残基的均匀定位,到更复杂的特征,如序列同 源性高的长片段区域。对于蜘蛛丝来说,研究这 些蛋白保守的特征有助于确定重要的丝蛋白序列 元件和分子进化模式 (John et al., 2001)。本研究 中筛选出美国白蛾幼虫3条丝素蛋白基因即 HcP25、HcFib-H、HcFib-L,核苷酸序列比对分析, 发现3条丝素蛋白基因均与车前灯蛾同源性最高, 可能是由于两种昆虫均隶属于灯蛾科,具有同源 的系统进化关系。P25、Fib-H、Fib-L 在鳞翅目不 同科之间在出现较大的分化; P25 以及 Fib-L 在美 国白蛾所属的灯蛾科中与夜蛾科的进化关系较为

接近,而在 Fib-H 中灯蛾科与凤蝶科进化关系更为 接近。可能是由于不同科的鳞翅目幼虫的网幕行 使不同的功能,以及生物学习性的差异导致丝素 蛋白功能上的分化 (Robert., 2002)。如在谷蛾总 科和螟蛾总科中,幼虫通常藏匿于用丝构成的纺 丝管中,在纺丝管中取食,还可以躲避天敌;而 一些尺蛾科和夜蛾科的老熟幼虫吐丝帮助它们从 树冠上下落到地面上化蛹 (Frantisek and Michal, 2004; Tsubota *et al.*, 2020)。

同样, 丝在在鳞翅目幼虫不同的发育时期行 使不同的功能。如一些斑蛾科、卷叶蛾科以及毒 蛾科昆虫的初孵幼虫利用丝线借助风的作用扩大 分布范围,蚕蛾科昆虫在老熟幼虫化蛹时吐丝作 茧以保护蛹 (Inoue et al., 2000)。本研究中, 美 国白蛾丝素蛋白 HcP25、HcFib-H、HcFib-L 相对表 达量在美国白蛾幼虫不同发育阶段处于动态的变 化过程。HcP25 与 HcFib-L 在初孵幼虫及2 龄时相 对表达量显著高于其它龄期, HcFib-L 在 2 龄幼虫 时表达量达到峰值,之后随着龄期增长呈现下降 趋势, 表明丝素蛋白的表达量与美国白蛾的产丝 量密切相关。美国白蛾在其幼虫孵化后立即大量 吐丝结网幕,而这一阶段 HcP25、HcFib-H、HcFib-L 相对表达量较高。美国白蛾幼虫4龄后开始分散 取食,不群居结成网幕 (Wu et al., 2019),因而 HcP25、HcFib-H、HcFib-L 相对表达量较低,而蛹 期几乎不形成网幕,相对表达量最低。在对丝素 蛋白在不同组织表达水平研究中, 丝素蛋白基因 HcP25、HcFib-L和HcFib-H均在丝腺组织中特异性 表达,说明3条基因参与丝腺组织中丝纤维的合 成。美国白蛾幼虫的丝腺是一对特异化程度非常 高的器官,由下唇腺特化而成,主要功能是合成 和分泌丝蛋白, 而头部器官是幼虫分泌丝的主要 场所 (Wu et al., 2019; Chen et al., 2020), 3 条 基因在美国白蛾头部均有分布和表达说明丝素蛋 白在可能头部参与丝的分泌。

植物作为重要的生态因子和食物资源,直接 影响昆虫的地理分布与扩散。美国白蛾为多食性 食叶害虫,具有特定的食物结构和适应性。本研 究中,取食不同寄主植物的美国白蛾3龄幼虫丝 素蛋白呈现不同的表达水平。已有研究表明家蚕 幼虫血淋巴中贮藏的蛋白积累是由寄主植物直接 诱导的(Nagata and Kobayashi, 1990),丝素蛋白

的表达水平因取食不同的桑叶品种而有所差异 (Micheal and Subramanyam, 2014)。诱导丝素蛋白 高表达的桑树品种的叶片含有较高的蛋白质和碳 水化合物,直接有助于家蚕幼虫产生更多的丝素 (Ruth et al., 2019)。在这些寄主富含较多的微量 营养素、氨基酸和碳水化合物、以及促进丝腺生 长成熟和血淋巴分泌的促生酶(Chinnaswamy et al., 2012; Ruth et al., 2020)。本研究发现取食 杨树的美国白蛾幼虫 HcP25 与 HcFib-H 基因相对表 达量种群极显著高于其它寄主种群,可能是由于 杨树叶片中蛋白质、碳水化合物的丰度高于其它 寄主,从而诱导 HcP25 与 HcFib-H 基因的高表达, 继而使其在杨树上产生更多的网幕,造成危害。 HcFib-L 与 HcP25、HcFib-H 表达模式呈现不同的表 达特性,取食山樱花和日本晚樱幼虫的 HcFib-L 表 达量显著升高,可能是由于美国白蛾网幕形成过 程中不同类型的丝素蛋白行使不同的功能。在家 蚕的研究中,幼虫取食不同品种桑叶后,5龄家蚕 幼虫的 Fib-L 与 Fib-H 同样呈现了不同的表达模式 (Ruth et al., 2020)。在不同鳞翅目昆虫中 Fib-H 具有同源性,其氨基酸序列重复区具有多样性, 同时氨基酸组成、基本序列重复单元的复杂性以 及这些重复单元的排列决定了丝纤维的特性 (Frantisek and Michal, 2004; Takuya et al., 2020). 而 Fib-L 和 P25 主要是参与丝基本单元的构成以及 Fib-H的分泌,与 Fib-H 在丝形成的过程中发挥不 同的作用 (Frantisek and Michal, 2004)。下一步将 测定不同寄主的营养物质,以及美国白蛾在不同 寄主植物上网幕发生量,明确寄主植物营养物质、 美国白蛾在不同寄主上的发生量以及与形成网幕 大小的关系。

美国白蛾是一种多食性的入侵害虫,以幼虫 取食寄主植物叶片造成危害,其幼虫吐丝合成丝 状物形成网幕对寄主植物造成危害。本研究在克 隆出美国白蛾三条丝素蛋白的基础上,探究了其 时空表达特性以及美国白蛾幼虫取食不同寄主植 物后的表达谱,为进一步研究深网幕介导的美国 白蛾对不同寄主的适应机制、寄主介导的扩散机 制奠定基础。

参考文献 (References)

Addis TK, Suresh KR, Jacques MK. Structure, composition, and properties of silk from the african wild silkmoth, *Anaphe panda*

(Boisduval) (Lepidoptera: Thaumetopoeidae) [J]. International Journal of Insect Science, 2014, 6: 465-485.

- Cao LJ, Yang F, Tang SY, *et al.* Development of an artificial diet for three lepidopteran insects [J]. *Chinese Bulletin of Entomology*, 2014, 51 (5): 1376-1386. [曹利军,杨帆,唐思莹,等.适合三种鳞翅目昆虫的一种人工饲料配方 [J].应用昆虫学报, 2014, 51 (5): 1376-1386.]
- Chaitanya RK, Aparna DG. Light chain fibroin and P25 genes of Corcyra cephalonica: Molecular cloning, characterization, tissue – specific expression, synchronous developmental and 20 – hydroxyecdysone regulation during the last instar larval development [J]. General and Comparative Endocrinology, 2010, 167 (1): 113 – 121.
- Chaitanya RK, Sridevi P, Senthilkumaran B, et al. Effect of juvenile hormone analog, methoprene on H – fibroin regulation during the last instar larval development of Corcyra cephalonica [J]. General and Comparative Endocrinology, 2013, 181: 10 – 17.
- Chen Q, Zhao H, Wen M, et al. Genome of the webworm Hyphantria cunea unveils genetic adaptations supporting its rapid invasion and spread [J]. BMC Genomics, 2020, 21 (1): 242.
- Chinnaswamy R, Lakshmi H, Kumari SS, et al. Nutrigenetic screening strains of the mulberry silkworm, Bombyx mori, for nutritional efficiency [J]. Journal of Insect Science, 2012, 12 (3): 1-18.
- Frantisek S, Michal Z. Construction of silk fiber core in Lepidoptera [J]. Biomacromolecules, 2004, 5 (3): 666 – 674.
- Gatesy J, Hayashi C, Motriuk D, et al. Extreme diversity, conservation, and convergence of spider silk fibroin sequences [J]. Science, 2001, 291 (5513): 2603 – 2605.
- Gatesy J, Hayashi C, Motriuk D, et al. Extreme diversity, conservation, and convergence of spider silk fibroin sequences [J]. Science, 2001, 291: 2603 – 2605.
- Gosline JM, Guerette PA, Ortlepp CS, et al. The mechanical design of spider silks: From fibroin sequence to mechanical function [J]. The Journal of Experimental Biology, 1999, 202 (23): 3295 – 303.
- Hwang JS, Lee JS, Goo TW, et al. Cloning of the fibroin gene from the oak silkworm, Antheraea yamamai and its complete sequence [J]. Biotechnology letters, 2001, 23: 1321 – 1326.
- Inoue S, Tanaka K, Arisaka F, et al. Silk fibroin of Bombyx mori is secreted, assembling a high molecular mass elementary unit consisting of H-chain, L-chain, and P25, with a 6: 6: 1 molar ratio [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2000, 275: 40517-40528.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta}CT$ method [J]. Methods, 2001, 25 (4): 402 408.
- Lu XL, Hang FY, Wen XY. Occurrence situation analysis and countermeasure suggestions of *Hyphantria cunea* (Drury) [J]. *Forest Pest and Disease*, 2021, 40 (1): 44-48. [卢修亮,韩凤 英,温玄烨. 美国白蛾发生形势分析与对策建议 [J]. 中国森 林病虫, 2021, 40 (1): 44-48]

- Ma Y, Luo Q, Ou Y, et al. New insights into the proteins interacting with the promoters of silkworm fibroin genes [J]. Scientific Reports, 2021, 11 (1): 15880 – 15880.
- Matthew AC, Janice SE, Cheryl YH. Comparison of fibroin cDNAs from webspinning insects: Insight into silk formation and function [J]. Zoology, 2011, 114 (4): 239-246.
- Micheal AS, Subramanyam MV. Influence of sericin in alleviating the hydrogen peroxide induced oxidative stress in silkworm *Bombyx mori*: Role of the amino acids [J]. *Invertebrate Survival Journal*, 2014, 11: 257 – 272.
- Nagata M, Kobayashi J. Effects of nutrition on storage protein concentrations in the larval hemolymph of the silkworm, Bombyx mori [J]. The Journal of Sericultural Science of Japan, 1990, 59 (6): 469-474.
- Naoyuki Y. Conservation of silk genes in Trichoptera and Lepidoptera [J]. Journal of Molecular Evolution, 2009, 68 (6): 641-653.
- Rehnberg BG. Heat retention by webs of the fall webworm Hyphantria cunea (Lepidoptera: Arctiidae): Infrared warming and forced convective cooling [J]. Journal of Thermal Biology, 2002, 27 (6): 525 - 530
- Robert F, Michal Z, František S. The silk of Lepidoptera [J]. Journal of Insect Biotechnology and Sericology. 2002, 71 (1): 1-15.
- Rouhova L, Kludkiewicz B, Sehadova H, et al. Silk of the common clothes moth, *Tineola bisselliella*, a cosmopolitan pest belonging to the basal ditrysian moth line [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2021, 130; 103527.
- Ruth L, Ghatak S, Subbarayan S, et al. Influence of micronutrients on the food consumption rate and silk production of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) reared on mulberry plants grown in a mountainous ggro-ecological condition [J]. *Frontiers in Physiology*, 2019, 10: 878.
- Ruth L, Souvik G, Sarathbabu S, et al. Fibroin gene expression and antioxidant enzymes are elevated in *Bombyx mori* when reared on preferred host plants [J]. *Biologia*, 2020, 75 (11): 2009 – 2014.
- Sabina A, Taseem A, Malik MF, et al. Comparative silk protein expression of different hybrid varieties of Bombyx mori [J]. Trends Life Science, 2012, 1: 12 - 16.
- Song F, Zhang P, Yi F, Hong X, et al. Study on fibroin heavy chain of the silkworm Bombyx mori by fluorescence in situ hybridization (FISH) [J]. Science in China Series, 2002, 45 (6): 663-668.
- Su HH, Cheng YM, Wang ZY, et al. Silk gland gene expression during larval-pupal transition in the cotton leaf roller Sylepta derogata (Lepidoptera: Pyralidae) [J]. PLoS ONE, 2015, 10 (9): 1 – 16.
- Takei F, Kikuchi Y, Kikuchi A, et al. Future evidence for importance of the subunit combination of silk fibroin in its efficient secretion from the posterior silk gland cells [J]. The Journal of Cell Biology, 1987, 105: 175 - 180.
- Takuya T, Kimiko Y, Kazuei M, et al. Gene expression analysis in the

larval silk gland of the eri silkworm Samia ricini [J]. Insect Science, 2016, 23 (6): 791-804.

- Tanaka K, Kajiyama N, Ishikura K. , et al. Determination of the site of disulfide linkage between heavy and light chains of silk fibroin produced by Bombyx mori [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1999, 1432: 92 - 103.
- Tanaka K, Mizuno S. Homologues of fibroin L chain and P25 of Bombyx mori are present in Dendrolimus spectabilis and Papilio xuthus but not detectable in Antheraea yamamai [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2001, 31 (6): 665 - 677.
- Tang X, Yuan Y, Liu X, et al. Potential range expansion and niche shift of the invasive Hyphantria cunea between native and invasive countries [J]. Ecological Entomology, 2021, 46 (4): 910-925.
- Tsubota T, Yamamoto K, Mita K, et al. Gene expression analysis in the larval silk gland of the eri silkworm Samia ricini [J]. Insect Science, 2016, 23 (6): 791-804.
- Tsubota T, Yoshioka T, Jouraku A, et al. Transcriptomic analysis of the bagworm moth silk gland reveals a number of silk genes conserved within Lepidoptera [J]. Insect Science, 2020, 28 (4): 885 – 900.
- Wang GY, Zhao XP, Wang XJ, et al. Morphological and ultrastructural characterization of the alimentary canal in larvae of Hyphantria cunea Drury [J]. Journal of Environmental Entomology, 2020, 42 (5): 1084 – 1092. [王光宇, 赵兴鹏, 王秀吉, 等. 美国白

蛾幼虫消化道形态和超微结构观察 [J].环境昆虫学报, 2020,42 (5):1084-1092]

- Wang MQ, Cai WZ. Silk and silk glands of insects [J]. Entomological Knowledge, 2004, 41 (1): 90-95. [王孟卿, 彩万志. 昆虫的 丝和丝腺 [J]. 昆虫知识, 2004, 41 (1): 90-95]
- Wu NN, Zhuang SF, Li XW, et al. Fall webworm genomes yield insights into rapid adaptation of invasive species [J]. Nature Ecology & Evolution, 2019, 3 (1): 105 - 115.
- Yang ZQ, Zhang YA. Researches on techniques for biocontrol of the fall webworm, *Hyphantria cunea*, a severe invasive insect pest to China [J]. *Chinese Bulletin of Entomology*. 2007, 44 (4): 465 471.
 [杨忠岐,张永安.重大外来入侵害虫 美国白蛾生物防治 技术研究 [J]. 昆虫知识, 2007, 44 (4): 465 471]
- Yonemura N, Mita K, Tamura T. et al. Conservation of silk genes in Trichoptera and Lepidoptera [J]. Journal of Molecular Evolution, 2009, 68 (6): 641-653.
- Yonemura N, Sehnal F. The design of silk fiber composition in moths has been conserved for more than 150 million years [J]. Journal of Molecular Evolution, 2006, 63 (1): 42 – 53.
- Zhao XM. The Effects of 20E and JH on the Expression of Silk Protein Gene in Silk Worm, Bombyx mori [D]. Suzhou: Soochow University, 2017. [赵晓明. 蜕皮激素和保幼激素对家蚕丝蛋 白基因表达的影响 [D]. 苏州: 苏州大学, 2017]