

doi: 10.3969/j.issn.1674-0858.2016.05.16

绿僵菌素 A 对家蚕 cecropin B 和 gloverin 4 基因表达的影响

胡维娜, 何广位, 李福霞, 胡琼波*

(华南农业大学农学院, 广州 510642)

摘要: 绿僵菌素 A (DA) 是由金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 产生的一种环缩羧肽类次生化合物, 具有抗昆虫免疫作用, 但是人们对其影响免疫相关基因调控的机理缺乏了解。本实验以家蚕 Bm12 细胞为材料, 采用 RNAi 技术沉默相关转录因子, 结合荧光定量 PCR (qPCR) 技术, 明确 DA 处理或沉默 TOLL 和 IMD 信号通路相关转录因子后抗菌肽 cecropin B 和 gloverin 4 基因表达的变化。实验发现, DA 能引起抗菌肽 cecropin B 基因表达上调和 gloverin 4 基因表达下调。利用特异性 siRNA 分别沉默转录因子 BmRelish1、BmRelish2、BmRel、BmFOXg1 后, 发现只有沉默转录因子 BmRelish 时, cecropin B 和 gloverin 4 基因表达才下调, 说明这两种抗菌肽的合成均通过 IMD 信号通路调控。当沉默 BmRelish1 或 BmRel 基因及 DA 处理联合作用时, cecropin B 基因显著下调, 说明在抑制 cecropin B 合成时, DA 与转录因子 BmRelish1 或者 BmRel 之间存在密切的协同效应; 同样, 在促进 gloverin 4 合成时, DA 与转录因子 BmRelish2 之间也存在着协同效应。

关键词: 绿僵菌素 A; Bm12 细胞; cecropin; gloverin

中图分类号: Q965; S476

文献标志码: A

文章编号: 1674-0858 (2016) 05-0984-06

Effect of destruxin A on expression of cecropin B and gloverin 4 genes of silkworm

HU Wei-Na, HE Guang-Wei, LI Fu-Xia, HU Qiong-Bo* (College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Destruxin A (DA), a cyclodepsipeptidic mycotoxin isolated from entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*, has anti-immunity activity against insects, but the mechanism of immune regulation is not clear yet. In the current experiment, by means fluorescence quantitative PCR (qPCR), the silkworm cell line Bm12 was used to survey the expression level of antimicrobial peptides cecropin B and gloverin 4 genes after the cells treated with DA or silence of transcription factors in TOLL and IMD signal pathways. The results indicated that the cecropin B gene was up-regulated and gloverin 4 gene was down-regulated after the DA treatment. Respectively silencing transcription factors BmRelish1, BmRelish2, BmRel, BmFOXg1 with specific siRNA, found that after only the transcription factors *BmRelish2* gene was silenced, cecropin B and gloverin 4 genes were all down-regulated. This illustrated that the two antimicrobial peptides were biosynthesized through IMD signal pathway. Furthermore, when the silence of transcription factors *BmRelish1* or *BmRel* genes and DA treatment were combined, cecropin B gene was significantly down-regulated, which suggested that there were some synergism between DA and transcription factors BmRelish1 or BmRel to inhibit the biosynthesis of cecropin B. Similarly, there were close synergistic relations between DA and transcription factors BmRelish2 to promote the biosynthesis of gloverin 4.

Key words: Destruxins A; Bm12 cell; cecropin; gloverin

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31272057)

作者简介: 胡维娜, 女, 1990 年生, 河南周口人, 硕士生, 研究方向为昆虫毒力, E-mail: hwn688094@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: hqbscau@scau.edu.cn

收稿日期 Received: 2015-11-11; 接受日期 Accepted: 2016-03-14

绿僵菌素 (destruxins) 是由金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 产生的一类环缩羧肽类次生代谢物质, 具有杀虫活性, 也是绿僵菌的关键致病因子 (Kershaw *et al.*, 1999; Pedras *et al.*, 2002)。目前已经发现 39 种绿僵菌素同系物, 其中绿僵菌素 A 和 B (DA 和 DB) 是最常见的同系物种类 (Liu and Tzeng, 2012)。研究表明, 绿僵菌素破坏昆虫的先天性免疫系统, 影响血细胞中的钙离子与氢离子平衡 (Chen *et al.*, 2014), 影响血细胞的吞噬与囊胞化功能 (Vey *et al.*, 2002), 抑制果蝇抗菌肽合成 (Pal *et al.*, 2007), 而且绿僵菌素 A 对家蚕浆血细胞与粒血细胞具有毒性 (Chen *et al.*, 2014; Fan *et al.*, 2014)。但是, 目前对绿僵菌素作用的分子机理并不清楚。

一般认为, Rel/NF- κ B 信号通路在昆虫免疫中发挥着重要作用, Toll 和 Imd 两条通路均属于 Rel/NF- κ B 信号通路。昆虫对真菌与革兰氏阳性细菌的免疫响应通过 TOLL 信号通道激活, 而革兰氏阴性细菌则是通过激活 IMD 信号通路引起免疫响应。Rel 蛋白是 Toll 通路中的下游的转录因子, 它被激活后即进入细胞核, 启动抗菌肽等靶标基因的转录, Dorsal 是 Rel 家族蛋白的重要代表, 能高效调节抗菌肽的合成 (张明明等, 2012; 初源等, 2013)。家蚕 BmRel 基因通过选择性剪切为 BmRelA 和 BmRelB 两个转录本, 分别编码 Dorsal isoform A 和 Dorsal isoform B 两种蛋白 (Tanaka *et al.*, 2008; Suetsugu *et al.*, 2013)。参与 IMD 信号转导通路的 Rel 蛋白是 Relish, 家蚕的 *Relish1* 和 *Relish2* 基因分别编码 NF- κ B p110 subunit isoform 1 和 NF- κ B p110 subunit isoform 2 两种蛋白质 (Tanaka *et al.*, 2008; Suetsugu *et al.*, 2013), 它们能调控抗菌肽基因的转录。另一个转录因子 FOXg1, 在细菌刺激后表达量会显著变化, 可能与免疫相关 (Tanaka *et al.*, 2010)。

DA 处理家蚕血细胞后, 影响 Bm_nscf3098_42 和 Bm_nscf1071_17 基因表达, 表达谱分析表明基因 Bm_nscf3098_42 编码葛佬素 4 前体 (gloverin 4 precursor), 而基因 Bm_nscf1071_17 编码家蚕抗菌肽 B 前体 (cecropin-B precursor) (Gong *et al.*, 2014)。家蚕的葛佬素 (gloverin) 是一种富含甘氨酸的抗菌肽, 具有热稳定性, 对大肠杆菌、革兰氏阳性细菌、真菌和病毒有生物活性, 家蚕有 4 种 Gloverin (Kaneko *et al.*, 2007; Kawaoka *et al.*, 2008; Yi *et al.*, 2013)。Cecropin-B 属于 cecropins

家族, 对革兰氏阳性与阴性细菌都有效, 其肽链中碱性氨基酸主要分布在 N-端, 疏水基团主要分布在其 C-端, 在许多特定位置有较保守的残基, 如 2 位的色氨酸 (Trp), 6、7 位具一对赖氨酸 (Lys), 4 位具天冬酰胺 (Asn), 6 位具精氨酸 (Arg), 不含半胱氨酸 (Cys) 和二硫桥; 但在第 8 位为苯丙氨酸 (Phe), 有别于其它的抗菌肽 (陈玉清等, 2006; 周启升等, 2011)。

因此, 本研究以家蚕 Bm12 细胞为材料, 采用 RNAi 方法分别敲除 BmRel、BmRelish1、BmRelish2、BmFOXg1 等转录因子, 考察绿僵菌素 A 对抗菌肽 gloverin 基因 Bm_nscf3098_42 和 cecropin 基因 Bm_nscf1071_17 表达的影响, 增进对绿僵菌素作用机理的认识。

1 材料与方法

1.1 细胞与培养

供试细胞系: 家蚕 *Bombyx mori* Bm12 细胞由华南农业大学动科学院曹阳教授馈赠, 采用 TNM-FH 培养基 (Hyclone 公司) 加入 10% 胎牛血清 (Gibco 公司), 在 27°C 下恒温培养传代, 每隔 2-4 d 传代 1 次, 取对数期细胞用于实验。

1.2 绿僵菌素

绿僵菌素 A (DA) 由本实验室从金龟子绿僵菌金龟子变种 *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* 菌株 MaQ10 中分离纯化 (Hu *et al.*, 2006)。取 DA 1 mg, 加入 100 μ L 二甲基亚砷 (DMSO, Sigma 公司) 溶解, 制成 10000 μ g/mL 的绿僵菌素贮备液, -80°C 保存备用。

1.3 处理方法

小干涉 RNA (siRNA) 制备: 根据目标基因的核苷酸序列, 选择 3' 端相邻的核苷酸作为候选的 siRNA 靶点, 合成用于 RNAi 的小干涉 RNA (siRNA) (上海英骏生物技术有限公司设计并合成), 包括针对转录因子 BmRel、BmRelish1、BmRelish2 和 BmFOXg1 的 siRNA (表 1)。

siRNA-lipo2000 混合液的准备: 将 lipofectimine2000 (Bio-Rad 公司) 轻轻摇匀, 然后取 2 μ L, 再用无血清 TNM-FH 培养基 200 μ L 稀释, 轻轻混合, 室温孵育 5 min; 另取 2 μ L siRNA, 用无血清 TNM-FH 培养基 200 μ L 稀释, 轻轻混合; 将孵育好的 lipofectimine 2000 与稀释好的 siRNA 轻轻混合, 室温孵育 20 min, 形成 siRNA-lipofectimine 2000 混合液供细胞转染实验。

表 1 用于沉默目标基因的小干扰 RNA (siRNA)
Table 1 Small interfering RNA (siRNA) for silencing target genes

目标基因	siRNA 序列	
<i>BmRel</i>	5'-GCAAACGAGACGAGACCUUTT-3'	3'-TTCGUUUGCUCUGCUCUGGAA-5'
<i>BmRelish1</i>	5'-GCAGUCCCGAAUCUGCAATT-3'	3'-TTCGUCAAGGGCUUAGACGUU-5'
<i>BmRelish2</i>	5'-CCCAUUGAAAUGACUUGAATT-3'	3'-TTGGGUAACUUACUGAACUU-5'
<i>BmFOXg1</i>	5'-GCUACAACGCUCUCAUCAUTT-3'	3'-TTCGAUGUUGCGAGAGUAGUA-5'

细胞转染: 取对数生长期 Bm12 细胞接种至 12 孔板 (美国 Corning Incorporated 公司), 培养 24 h 后, 将培养液吸出, 再加入无血清 TNM-FH 培养基 100 μ L, 轻轻摇匀让培养基铺满底部; 取 siRNA-lipofectimine 2000 混合液 400 μ L, 缓慢加入 12 孔板中, 非转染组则将 200 μ L 孵育好的 lipofectimine 2000 与 200 μ L 无血清 TNM-FH 培养基混匀, 缓慢加入 12 孔板中, 27 $^{\circ}$ C 下培养 4 h, 吸去上清液, 终止转染, 更换新鲜的含血清 TNM-FH 培养基继续培养 20 h; 再加入 DA 贮备液使培养液中 DA 的终浓度达到 200 μ g/mL, 非 DA 处理组则加二甲基亚砜 (DMSO, Sigma 公司) 对照使其终浓度达到 0.1%, 处理 8 h 后, 提取细胞总 RNA (RNA 提取试剂盒: Omega 公司)。RNA 的纯度与浓度采用 SimpliNano 微量分光光度计 (GE Healthcare Life Science) 进行检测。

1.4 基因表达量分析

siRNA 或 DA 处理的细胞作为实验组, 未经转染和 DA 处理的细胞作为对照, 提取总 RNA, 实验重复 3 次; qPCR 方法参照 Livak 文献 (Livak and Schmittgen, 2001), 反应液体系为反转录的 cDNA 1 μ L, 上下游引物各 1 μ L (表 2), SYBR Premix Ex TaqTM (Bioscience 公司) 10 μ L, ddH₂O 7 μ L; 反应程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 10 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 39 个循环后 95 $^{\circ}$ C 10 s, 65 $^{\circ}$ C 至 95 $^{\circ}$ C 5 s。

1.5 数据处理

qPCR 数据采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法 (Pfaffl, 2001) 进行数据分析处理, 利用家蚕 GAPDH 基因作为内参, 具体计算公式: $\Delta\Delta C_t = (C_{t_{\text{目标基因}}} - C_{t_{\text{持家基因}}})_{\text{实验组}} - (C_{t_{\text{目标基因}}} - C_{t_{\text{持家基因}}})_{\text{对照组}}$, 实验处理组中目标基因的相对表达量 (Q) 计算公式: $Q = 2^{-\Delta\Delta C_t}$, 实验结果采用 SPSS 软件 (IBM, 美国) 分析基因相对表达量。

表 2 内参基因 GAPDH (甘油醛-3-磷酸脱氢酶) 和家蚕待检测基因引物

Table 2 Primers of reference gene GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) and silkworm gene to be detected

检测基因	引物 (5'→3')
BmRelish1	F: CCTGAAAATGTCTGCCGATAA
	R: ATGCCGTCTAGTCCCGTCT
BmRelish2	F: AGCAGTTATGCGTTTCGGTTTG
	R: AATGCTGCCACCCACCTTG
BmRel	F: AATGACCCCAATCAACCTAACG
	R: CGGAATCTGAGGGCTTTGC
BmFOXg1	F: TAAGGAACAGTCCCAGAAAACG
	R: CCAGCCTTGTCTGTTTTCCCT
GAPDH	F: ATGTTTGTGTGGGTGTTA
	R: GTAGAGGCAGGAATGATT
Bm_nscsf 3098_42	F: ATTAGCGGTCAGTTCTCA
	R: AGCCCATCATCGTTTT
Bm_nscsf 1071_17	F: CCTTCGTCTTCGCTCTGG
	R: ATGCCGTCACGGATGTT

2 结果与分析

2.1 对转录因子的干扰效率

Bm12 细胞被 siRNA 转染 24 h 后, 经 qPCR 检测 BmRel、BmRelish1、BmRelish2 和 BmFOXg1 基因显著下调, 干扰效率大于 70% (图 1)。

2.2 绿僵菌素 A 与转录因子对 cecropin B 基因表达的影响

DA 处理细胞 8 h 后, 抗菌肽 cecropin B 基因 Bm_nscsf1071_17 表达量明显上调 (图 2)。沉默基因 BmRelish2 后, cecropin 基因 Bm_nscsf1071_17 显著下调; 而沉默基因 BmRelish1、BmRel 和

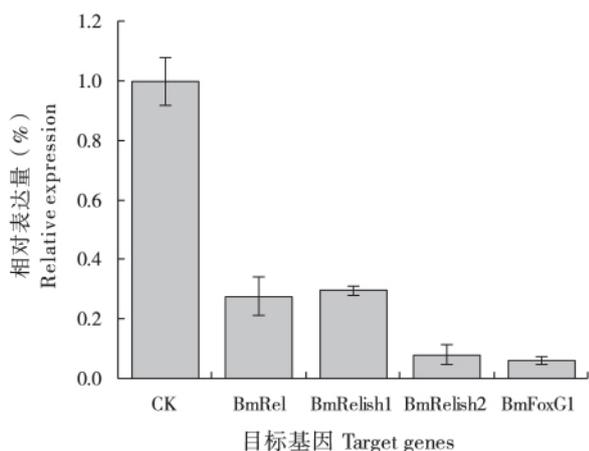


图1 siRNA 对转录因子的干扰效率

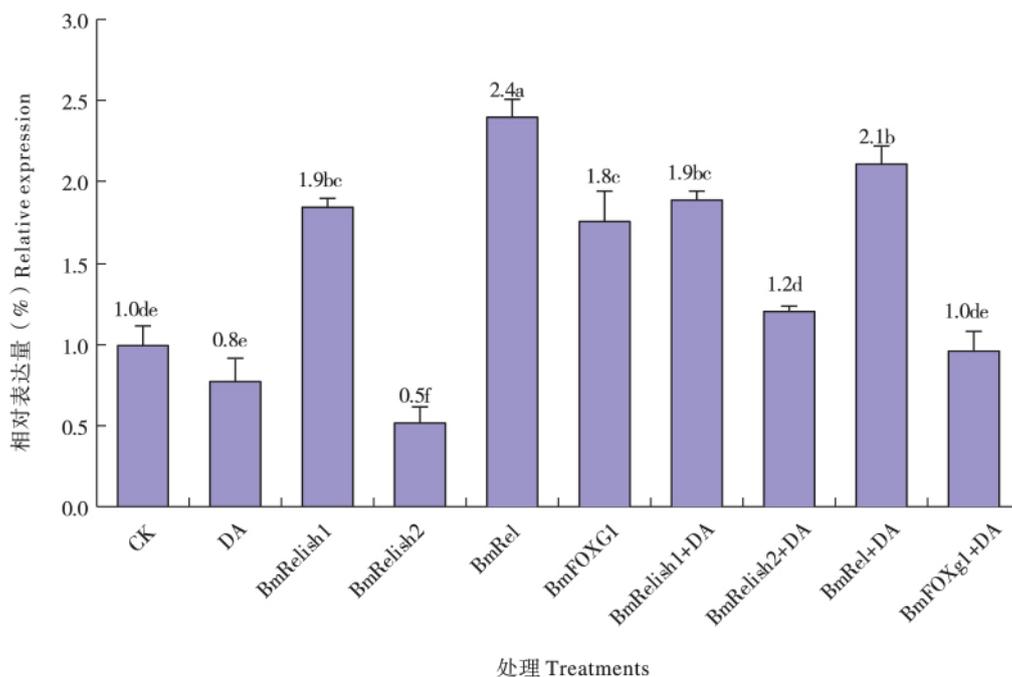
Fig. 1 siRNA to interference efficiency of transcription factors

BmFOXg1, *cecropin* 基因表达量基本不变 (图 2)。在敲除转录因子与 DA 联合处理实验中发现, 先沉默 BmRelish1 或 BmRel 基因再用 DA 处理 8 h (图 2 中 BmRelish1 + DA 和 BmRel + DA) 时, *cecropin* 基因的表达水平显著低于 BmRelish1、BmRel 或 DA 各自单独处理时的水平; 而先沉默其他基因再

用 DA 处理 (图 2 中 BmRelish2 + DA 和 BmFOXg1 + DA), *cecropin* 基因的表达水平相较于转录因子或 DA 单独处理时的水平未发生显著上调或者下调现象 (图 2)。

2.3 绿僵菌素 A 与转录因子对 *gloverin 4* 基因表达的影响

DA 处理细胞 8 h 后, *gloverin* 基因 Bm_nscf3098_42 显著下调 (图 3)。沉默基因 BmRelish2 后, *gloverin 4* 基因 Bm_nscf3098_42 显著下调, 而沉默基因 BmRelish1、BmRel 和 BmFOXg1 后, 基因显著上调 (图 3)。在敲除转录因子与 DA 联合处理实验中发现, 先沉默 BmRelish2 基因再用 DA 处理 8 h (图 3 中 BmRelish2 + DA) 时, *gloverin 4* 基因的表达水平显著上调, 显著高于 BmRelish2 或 DA 单独处理时的水平; 而先沉默其他基因再用 DA 处理 (图 3 中 BmRelish1 + DA、BmRel + DA、BmFOXg1 + DA), *gloverin* 基因的表达水平总是介于转录因子或 DA 单独处理时的水平之间 (图 3)。

图2 绿僵菌素 A 与转录因子对 *cecropin - B* 基因 Bm_nscf1071_17 的表达量的影响Fig. 2 Effect of destruxin A and transcription factors on Bm_nscf1071_17 gene expression of *cecropin B*

3 结论与讨论

实验表明, DA 处理 Bm12 细胞后, *cecropin B*

基因显著上调表达, 而 *gloverin 4* 基因显著下调表达。家蚕的 *cecropin* 的抗菌谱较广, 对革兰氏阴性细菌、阳性细菌及真菌均有活性 (孙伟等, 2009; Yang *et al.*, 2011), DA 又是虫生真菌 - 绿僵菌产

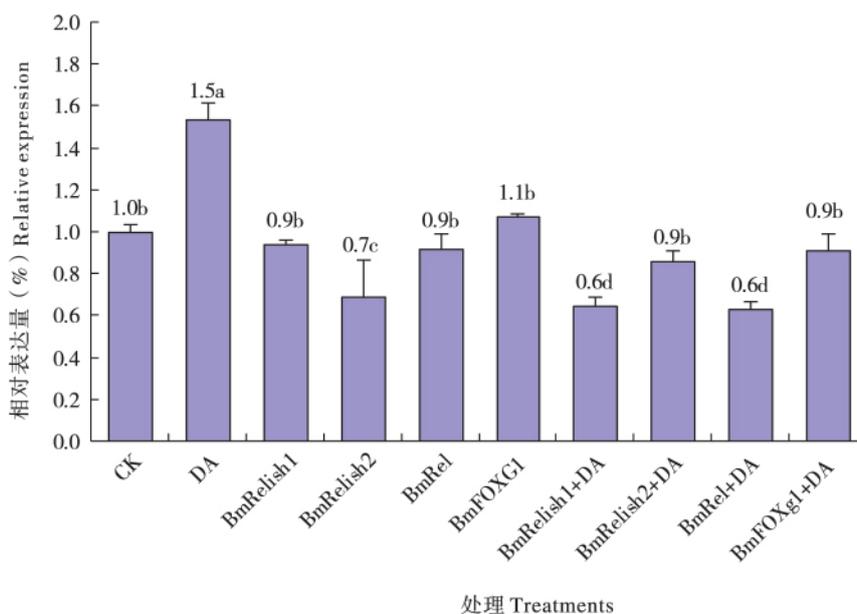


图3 绿僵菌素 A 与转录因子对抗菌肽 gloverin 基因 Bm_nscf3098_42 表达量的影响

Fig. 3 Effect of destruxin A and transcription factors on Bm_nscf3098_42 gene expression of gloverin 4

生的毒素,所以家蚕在 DA 刺激下,可能激发 cecropin B 的合成,有利于家蚕抵御虫生真菌的侵染,而 gloverin 只对革兰氏阴性细菌具有活性,因此家蚕在 DA 刺激下不会激发 gloverin 4 的合成。

沉默转录因子基因 *BmRelish2* 后, cecropin B 基因 Bm_nscf1071_17 显著下调,而沉默 *BmRelish1*、*BmRel* 和 *BmFOXg1* 转录因子基因后,该基因表达量基本不变。这一结果说明 cecropin B 的生物合成是通过 IMD 信号通路调控的,转录因子 *BmRelish2* 在发挥着关键作用,而转录因子 *BmRelish1* 为什么对 cecropin B 基因表达影响不显著,也许是因为该基因未参与供试细胞 Bm12 细胞的 IMD 信号通路,抑或是其他更复杂的原因。然而,在进一步的转录因子沉默与 DA 处理联合实验中,先沉默 *BmRelish1* 或 *BmRel* 基因再用 DA 处理(图 2 中 *BmRelish1* + DA 和 *BmRel* + DA) 时, cecropin B 基因的表达水平显著低于 *BmRelish1*、*BmRel* 或 DA 各自单独处理时的水平,这个结果暗示 DA 与转录因子 *BmRelish1* 或者 *BmRel* 之间存在强烈的直接或间接的相互作用,从而强烈抑制 cecropin B 的合成。毫无疑问,DA 与转录因子 *BmRelish1* 或者 *BmRel* 之间的关系值得进一步深入研究。

已有研究表明, gloverin 也是通过 TOLL 信号通路调控的,因为斜纹夜蛾 *Spodoptera exigua* 的 Toll 基因 *SeToll* 被沉默后, gloverin 的合成被抑制

(Park and Kim, 2012)。但是,本研究发现,转录因子 *BmRelish2* 被沉默后, gloverin 4 基因显著下调,而沉默转录因子 *BmRelish1*、*BmRel* 和 *BmFOXg1* 后,该基因又显著上调,这个结果说明 gloverin 4 的合成是通过 IMD 信号通路调控,但 TOLL 信号通路可能也发挥某些作用,可见抗菌肽合成的调控机理是相当复杂的。先沉默 *BmRelish2* 基因再用 DA 处理后, gloverin 4 基因的表达水平显著高于 *BmRelish2* 或 DA 单独处理时的水平,这个结果表明,在调控 gloverin 4 的合成时,DA 与转录因子 *BmRelish2* 之间存在强烈的直接或间接的相互作用。

总之,本实验发现,绿僵菌素 A 处理后,引起家蚕 Bm12 细胞抗菌肽 cecropin B 基因表达上调和 gloverin 4 基因表达下调,家蚕细胞在 DA 刺激后,能够启动 cecropin B 基因表达,增强其体内的抗真菌能力。沉默转录因子 *BmRelish2* 基因后, cecropin B 和 gloverin 4 基因均下调表达,说明这两种抗菌肽的合成均通过 IMD 信号通路调控。沉默 *BmRelish1* 或 *BmRel* 基因及 DA 处理联合作用时, cecropin B 基因显著下调,说明在抑制 cecropin B 的合成时,DA 与转录因子 *BmRelish1* 或者 *BmRel* 之间存在密切的协同效应。同样,在促进 gloverin 4 的合成时,DA 与转录因子 *BmRelish2* 之间也存在着协同效应。揭示 DA 与这些转录因子之间相互作用调控家蚕抗菌肽 cecropin B 和 gloverin 4 的合

成的机理, 将有助于解析绿僵菌素的作用机制及绿僵菌的致病机理, 从而有助于真菌生物防治剂的开发与应用。

致谢: 感谢华南农业大学动物科学学院曹阳教授馈赠 Bm12 细胞。

参考文献 (References)

- Chen XR, Hu QB, Yu XQ, *et al.* Effects of destruxins on free calcium and hydrogen ions in insect hemocytes [J]. *Insect Sci.*, 2014, 21 (1): 31–38.
- Chen YQ, Li BC, Wu X, *et al.* The purification and identification of the antibacterial peptides cecropin D and lysozyme from silkworm larvae, *Bombyx mori* [J]. *Journal of Nanjing Normal University (Natural Science)*, 2006, 29 (3): 103–107. [陈玉清, 李保存, 吴希, 等. 家蚕抗菌蛋白 Cecropin D 和 Lysozyme 的分离纯化及性质鉴定 [J]. 南京师大学报 (自然科学版), 2006, 29 (3): 103–107]
- Chu Y, Zhou F, Zhang MM, *et al.* Frontiers of research on the innate immune response in insects [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2013, 50 (2): 311–320. [初源, 周帆, 张明明, 等. 昆虫天然免疫反应研究前沿 [J]. 应用昆虫学报, 2013, 50 (2): 311–320]
- Fan JQ, Han PF, Chen XR, *et al.* Comparative proteomic analysis of *Bombyx mori* hemocytes treated with destruxin A [J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2014, 86 (1): 33–45.
- Gong L, Chen XR, Liu CL, *et al.* Gene expression profile of *Bombyx mori* hemocyte under the stress of destruxin A [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9 (5).
- Hu QB, Ren SX, Wu JH, *et al.* Investigation of destruxin A and B from 80 metarhizium strains in China, and the optimization of cultural conditions for the strain MaQ10 [J]. *Toxicon*, 2006, 48: 491–498.
- Kaneko Y, Furukawa S, Tanaka H, *et al.* Expression of antimicrobial peptide genes encoding enbocin and gloverin isoforms in the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2007, 71 (9): 2233–2241.
- Kawaoka S, Katsuma S, Daimon T, *et al.* Functional analysis of four gloverin-like genes in the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2008, 67 (2): 87–96.
- Kershaw MJ, Moorhouse ER, Bateman R, *et al.* The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1999, 74 (3): 213–223.
- Liu BL, Tzeng YM. Development and applications of destruxins: A review [J]. *Biotechnology Advances*, 2012, 30 (6): 1242–1254.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻DELTA² method [J]. *Methods*, 2001, 25 (4): 402–408.
- Pal S, Leger RJS, Wu LP. Fungal peptide destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282 (12): 8969–8977.
- Park JA, Kim Y. Eicosanoid biosynthesis is activated via Toll, but not Imd signal pathway in response to fungal infection [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2012, 110 (3): 382–388.
- Pedras MSC, Zaharia LI, Ward DE. The destruxins: Synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity [J]. *Phytochemistry*, 2002, 59 (6): 579–596.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29: 2002–2007.
- Suetsugu Y, Futahashi R, Kanamori H, *et al.* Large scale full-length cDNA sequencing reveals a unique genomic landscape in a lepidopteran model insect, *Bombyx mori* [J]. *G3 – Genes Genomes Genetics*, 2013, 3 (9): 1481–1492.
- Sun W, Shen YH, Xiang ZH, *et al.* Advances in antimicrobial peptide genes in the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Science of Sericulture*, 2009, 35 (1): 196–203. [孙伟, 沈以红, 向仲怀, 等. 家蚕抗菌肽基因研究进展 [J]. 蚕业科学, 2009, 35 (1): 196–203]
- Tanaka H, Ishibashi J, Fujita K, *et al.* A genome-wide analysis of genes and gene families involved in innate immunity of *Bombyx mori* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, 38 (12): 1087–1110.
- Tanaka H, Suzuki N, Nakajima Y, *et al.* Expression profiling of novel bacteria-induced genes from the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2010, 73 (3): 148–162.
- Vey A, Matha V, Dumas C. Effects of the peptide mycotoxin destruxin E on insect haemocytes and on dynamics and efficiency of the multicellular immune reaction [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2002, 80 (3): 177–187.
- Yang WY, Cheng TC, Ye MQ, *et al.* Functional divergence among silkworm antimicrobial peptide paralogs by the activities of recombinant proteins and the induced expression profiles [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6 (3).
- Yi HY, Deng XJ, Yang WY. Gloverins of the silkworm *Bombyx mori*: Structural and binding properties and activities [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 43 (7): 612–625.
- Zhang MM, Chu Y, Zhao ZW, *et al.* Progress in the mechanisms of the innate immune responses in insects [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2012, 55 (10): 1221–1229. [张明明, 初源, 赵章武, 等. 昆虫天然免疫反应分子机制研究进展 [J]. 昆虫学报, 2012, 55 (10): 1221–1229]
- Zhou QS, Yu Q, Liu QX. Progress and application prospect of transgenic silkworm [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2011, 54 (2): 197–210. [周启升, 于奇, 刘庆信. 转基因家蚕的研究进展及应用前景 [J]. 昆虫学报, 2011, 54 (2): 197–210]