



许亚婷, 杨荣蓉, 吴洪鑫, 陆永跃, 金丰良, 许小霞. 红火蚁 Toll 受体家族免疫响应绿僵菌表达模式的研究 [J]. 环境昆虫学报, 2022, 44 (6): 1528–1540.

## 红火蚁 Toll 受体家族免疫响应绿僵菌表达模式的研究

许亚婷, 杨荣蓉, 吴洪鑫, 陆永跃, 金丰良, 许小霞\*

(华南农业大学植物保护学院昆虫学系, 广东省生物农药创制与应用重点实验室,  
“一带一路”农业有害生物绿色防控科技产业创新院, 广州 510642)

**摘要:** 为探究红火蚁 *Solenopsis invicta* Buren Toll 受体家族基因如何免疫响应绿僵菌 *Metarhizium* 的侵染。本研究采用浸渍法测定了不同浓度下绿僵菌对红火蚁大中小 3 种不同大小工蚁的致病力, 并用显微镜观察了绿僵菌侵染后红火蚁 3 种工蚁的表型变化。利用生物信息学筛选 Toll 受体基因, 并对 Toll 受体家族基因的理化性质、结构域、染色体位置、系统进化进行分析鉴定。运用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测了红火蚁大中小型工蚁中 Toll 受体家族的发育历期和绿僵菌侵染后的表达模式。结果表明, 绿僵菌在 96 h 对红火蚁大中小型工蚁的致死中浓度 ( $LC_{50}$ ) 分别为  $5.8 \times 10^7$  孢子/mL、 $3.1 \times 10^7$  孢子/mL、 $1.5 \times 10^7$  孢子/mL; 绿僵菌侵染红火蚁第 3 天, 显微镜下观察到红火蚁体壁细小的菌丝, 虫体僵硬, 寄主死亡后菌丝迅速蔓延并逐渐长成橄榄绿色分生孢子; RT-qPCR 结果表明 Toll 受体基因在红火蚁不同发育阶段中的 mRNA 表达水平存在显著差异, 且 Toll 受体基因在雌性生殖蚁表达水平显著高于雄性生殖蚁; RT-qPCR 结果表明红火蚁大中小型工蚁 Toll 受体免疫响应绿僵菌不一样。在大型工蚁中, 绿僵菌侵染后, Toll 受体家族基因能显著上调表达, 6 h 是一个诱导高峰期, *Toll2-1* 和 *LRR* 转录水平最高, 响应绿僵菌最强; 在中型工蚁中, 绿僵菌不能刺激 *Toll2-2* 基因的表达, 却能强烈诱导 *Toll1*, *Toll2-1*, *Toll6*, *Toll7* 和 *LRR* 基因的上调表达, *Toll1* 和 *Toll2-1* 响应绿僵菌最强。在小型工蚁中, 绿僵菌能显著诱导 Toll 受体家族基因基因的上调表达, 在 24 h 时, *LRR* 基因表达量最高, 相比于对照, *LRR* 基因表达提高 25 倍, *LRR* 在 6 h 和 24 h 响应绿僵菌最强。以上研究表明 Toll 受体可以免疫响应入侵的绿僵菌, 且不同的 Toll 对绿僵菌可能具有不同的响应机制。本研究为进一步阐明 Toll 受体的功能奠定基础, 为进一步利用绿僵菌控制红火蚁提供技术指导。

**关键词:** 红火蚁; Toll; 绿僵菌; 表达模式

中图分类号: Q968.1; S433; S476

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2022) 06-1528-13

### Study on expression pattern of Toll receptor family of *Solenopsis invicta* Buren in response to *Metarhizium anisopliae*

XU Ya-Ting, YANG Rong-Rong, WU Hong-Xin, LU Yong-Yue, JIN Feng-Liang, XU Xiao-Xia\*  
(Key Laboratory of Bio-Pesticide Creation and Application of Guangdong Province, Department of Entomology, College of Plant Protection, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** To investigate the immune response of Toll receptor family gene of *Solenopsis invicta* to *Metarhizium anisopliae* infection. In this study, the impregnation method was used to determine the

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2021YFD1000500)

作者简介: 许亚婷, 女, 1997 年生, 江西吉安人, 硕士研究生, 研究方向为农业昆虫与害虫防治, E-mail: xuyt1101@stu.scau.edu.cn

\* 通讯作者 Author for correspondence: 许小霞, 女, 博士, 副教授, 研究方向为生物防治, E-mail: xuxiaoxia111@scau.edu.cn

收稿日期 Received: 2022-09-08; 接受日期 Accepted: 2022-10-15

pathogenicity of *M. anisopliae* infection three different grades of worker *S. invicta*, and the phenotypic changes of *S. invicta* after *M. anisopliae* infection were photographed with the microscope. Based on the genome of *S. invicta*, the Toll receptor gene family sequence were screened by bioinformatics analysis, the physical and the chemical properties, structural domain, chromosomal location and phylogenetic evolution of the Toll receptor family gene were analyzed. Real time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to analyze the expression patterns of the Toll receptor family of developmental stage in major, medium and minor-sized worker ants and the induced expression patterns of the Toll receptor family in ants infected by *M. anisopliae*. The results showed that the lethal medium concentration ( $LC_{50}$ ) at 96 h of *M. anisopliae* in major, medium and minor-sized worker ants.  $LC_{50}$  were  $5.8 \times 10^7$  spores /mL,  $3.1 \times 10^7$  spores /mL and  $1.5 \times 10^7$  spores /mL, respectively. On the third day of *M. anisopliae* infection, small mycelia could be observed on the body of *S. invicta*. The mycelia spread rapidly and gradually grew into olive green conidia after the death of the host. The results of RT-qPCR indicated that the mRNA level of Toll receptor gene was significantly different in developmental stages of *S. invicta*, especially, the expression level of Toll receptor family in female were much higher than in male *S. invicta*. The RT-qPCR results also showed that the immune response of Toll receptors to *M. anisopliae* was different. In major-sized worker ants, the expression level of Toll receptor family genes were significantly upregulated after *M. anisopliae* infection, and the induction peak was 6 h. The transcription levels of *Toll2-1* and *LRR* were the highest, and the response to *M. anisopliae* was the strongest. In medium-sized worker ants, *M. anisopliae* could not stimulate the expression of *Toll2-2* gene, but could strongly induce the up-regulated expression of *Toll1*, *Toll2-1*, *Toll6*, *Toll7* and *LRR* genes, and *Toll1* and *Toll2-1* were the most responsive to *M. anisopliae*. In the minor-sized worker ants, *M. anisopliae* could significantly induce the up-regulated expression of Toll receptor family genes. The *LRR* gene was the highest expression level with 25 times higher than the control at 24 h post infection. The *LRR* was the most responsive to *M. anisopliae* at 6 h and 24 h. These studies indicated that Toll receptors could be immune to invading *M. anisopliae*, and different Toll might have different mechanism response against *M. anisopliae*. This study laid the foundation for further elucidate the function of Toll receptor and provided technical guidance for further control of *S. invicta* by *M. anisopliae*.

**Key words:** *S. invicta*; *M. anisopliae*; Toll; expression patterns

红火蚁 *Solenopsis invicta* Buren 属于膜翅目蚁科, 原分布于南美洲巴拉那河流域, 2003 年侵入我国台湾桃园与嘉义地区, 2004 年传入中国广东省吴川市。红火蚁具有强大的侵略性、攻击性、适应性、繁殖快、竞争力强、食性杂的特点。红火蚁对人体健康、公共安全、农林业生产和生态环境均具有严重的危害性, 是世界公认的最具危险的外来入侵物种之一。红火蚁在我国基本上是多蚁后种群, 广东省光温条件特别适合其繁殖, 且红火蚁在我国尚无天敌, 能快速形成高密度种群 (刘晓燕等, 2006; 陆永跃等, 2015; Xu et al., 2022)。因此, 如何预防红火蚁入侵和有效控制其种群成为亟需解决的科学问题。

化学防治在一定程度上控制了红火蚁的种群数量, 但会造成环境污染、对生态位重叠的本地

蚂蚁造成伤害, 易伤害非靶标生物, 破坏生态平衡 (Williams et al., 1998; 2004)。金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 是一种被广泛使用的昆虫病原真菌, 能感染包括鳞翅目、膜翅目、双翅目、鞘翅目在内的 200 多种农业害虫 (康奎等, 2022)。该菌致病力强, 效果好, 对人、畜、作物等无毒害作用, 是当前世界上研究和应用最多的虫生真菌之一, 利用绿僵菌对害虫进行微生物防治具有广阔的前景 (王磊等, 2018)。

生物农药是未来农药发展的趋势, 昆虫的免疫防御反应极大地延缓了目前使用的微生物杀虫剂的杀虫效率, 成为推广普及的限制因素之一。因此, 研究昆虫免疫应答机制, 找到昆虫先天性免疫应答过程中的关键因子并以此为靶标, 筛选对这个关键因子有抑制、阻断等功能的基因, 对

于高效杀虫生物的筛选、改良和设计具有十分重要的应用价值。先天免疫应答是害虫抵御病原微生物侵染的重要防御体系,是昆虫生存和繁衍的前提与保障(张若男, 2019)。Toll 通路是与先天免疫有关的主要信号通路之一,在响应真菌和革兰氏阳性细菌侵染的免疫防御中具有重要作用(Wang *et al.*, 2015),而 Toll 受体作为 I-型跨膜受体,是 Toll 通路中重要的因子,果蝇 Toll 最初发现控制早期胚胎的建立,后面发现在先天免疫中发挥重要的作用(Nüsslein-Volhard *et al.*, 1980, Armant *et al.*, 2002)。Toll 受体可以识别寄生虫、细菌和病毒等病原体,其家族在低等生物及脊椎动物中都极为保守。在昆虫中, Toll 受体不仅可以作为跨膜受体与活化的神经生长因子同源物 Spätzle 配体结合,激活胞内 Toll 信号通路,调控抗菌肽的表达(Nie *et al.*, 2018)。而且昆虫 Toll 受体还能直接作为模式识别受体(Pattern recognition proteins, PRR)与特定的病原相关分子模式(Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)结合,发挥免疫学功能(Lemaitre *et al.*, 1996)。由于物种多样性、生存环境的多态性,昆虫的免疫功能也会发生物种分化,具备种属的特异性。Nüsslein-Volhard 等研究发现在敲除果蝇 Toll 后会导致全身长满霉菌死亡(Nüsslein-Volhard *et al.*, 1980)。Zhang 等研究发现烟粉虱 *Bemisia tabaci* Toll 基因通过 RNAi 敲低,在受到真菌毒素 destruxin A 攻击后,死亡率增加(Zhang *et al.*, 2017)。Wang 等研究发现凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei* 中 Toll 基因,通过 RNAi 敲低后也显著增加凡纳滨对虾的死亡率,且降低了凡纳滨对虾对细菌清除率(Wang *et al.*, 2010)。以上研究表明 Toll 在昆虫的免疫方面发挥了重要的作用。因此从昆虫 Toll 受体发挥免疫功能作用方式探究其诱导的免疫防御反应对于阐明昆虫 Toll 受体功能及其介导的免疫防御机制具有重要意义。基于此,本研究根据红火蚁基因组序列([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/genome/GCF\\_016802725.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/genome/GCF_016802725.1)),利用生物信息学,筛选获得红火蚁 6 个 Toll 受体基因序列,对其氨基酸数量、分子量大小和等电点分析,构建系统发育树; RT-qPCR 验证了 Toll 受体的发育表达模式及绿僵菌诱导表达模式;开展红火蚁免疫防御绿僵菌的研究,并以此基因为靶点,研发新型、安全高效的生物杀虫剂对于提高生物防治效率具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株和昆虫

金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 菌株 MaqS1902 由华南农业大学广东省生物农药创制与应用重点实验室胡琼波教授提供。接种在 PDA 斜面培养基上,置于 25℃,相对湿度为 70% 的培养箱培养。红火蚁采集于广州市。在野外将蚁巢挖回,采用水滴法进行分离获得蚁群,然后将分离后的蚁群饲养于 48 cm × 36 cm × 17.5 cm 的养虫盒内,养虫盒上内壁需均匀刷上滑石粉以防红火蚁逃逸,并且在养虫盒内放置用石膏搭建的人工蚁巢,置于 25 ± 1℃、RH 80% ± 5%,光照 12 L:12 D 条件下的实验室,使用黄粉虫、水试管和 10% 蔗糖水饲喂。

### 1.2 孢子悬浮液配制及致病力测定

金龟子绿僵菌在 PDA 培养基培养 10 d,将萌发率达到 90% 的绿僵菌孢子。用孢子萌发液(4.0% 蔗糖,1.0% 蛋白胨,0.02% Tween-80)洗脱孢子,使用水平摇床摇 10 h。用血球计数板计数,将菌株配制成  $1.0 \times 10^8$ 、 $1.0 \times 10^7$ 、 $1.0 \times 10^6$ 、 $1.0 \times 10^5$  和  $1.0 \times 10^4$  孢子/mL 悬浮液。采用浸渍法接种,将健康红火蚁工蚁放入孢子悬浮液中浸泡 3 ~ 5 s,取出工蚁并放置在湿润滤纸上,一起移入含有 10% 蔗糖水的离心管内的干净注塑杯内,杯子内壁刷上滑石粉,置于 25℃、相对湿度 85% 培养箱中,使用孢子萌发液处理作为对照。每天观察并记录死亡的工蚁数量,同时将死虫及时挑出,放到铺有湿滤纸的培养皿(φ9 cm)中 25℃ 恒温箱里保湿培养,确定死亡原因,观察死虫上的子实体生长情况,连续观察统计 10 d。统计不同组别每个时间点死亡率,然后将死亡率数据转化为生存分析的数据模式,并用 SPSS 的 Kaplan-Meier 来分析,每个浓度 1 个处理,每个处理 3 个重复,每个重复 50 头试虫。

### 1.3 Toll 受体家族的生物信息学分析

从 InsectBase 2.0 (<http://v2.insect-genome.com/>) 蛋白质数据库中下载黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、家蚕 *Bombyx mori*、埃及伊蚊 *Aedes aegypti*、黄粉虫 *Tenebrio molitor*、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 和赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 的 Toll 受体序列(Yang *et al.*, 2021),利用 MEGA 11 软件 ClustalW 算法进行多序列比对,基于比对结构采用

邻近法构建系统进化树进行聚类分析, 遗传距离模型采用 JTT 模型, bootstrap 设置为 1 000, 使用在线工具 Evolview v3 ( <https://www.evolgenius.info/evolview/> ) 美化进化树 ( Subramanian *et al.* , 2019) 。从 InsectBase 2.0 数据库下载红火蚁 gff3 格式的基因结构文件, 使用 TBtools 软件绘制红火蚁 Toll 受体家族染色体定位图 ( Chen *et al.* , 2020) , 使其分布可视化。采用在线工具 ExPASy ( <http://web.expasy.org/protparam/> ) 分析红火蚁 Toll 受体家族蛋白氨基酸数量、分子量大小和等电点。

1.4 Toll 受体的发育历期的表达模式

选取同一批次的红火蚁, 分别收集卵、幼虫 ( 1 ~ 4 龄) 、蛹、雌性生殖蚁、雄性生殖蚁、大中小型工蚁 8 个样品; 用研磨器研磨后用 Trizol 法提取总 RNA, 按照反转录试剂盒 Color Reverse Transcription Kit ( with gDNA Remover) 说明书操作, 取 1.0 μg 总 RNA 作为模板, 合成 cDNA 第一链。基于红火蚁 Toll 受体基因序列设计引物 *Toll1* ,

*Toll2-1* , *Toll2-2* , *Toll6* , *Toll7* , *LRR* , 以红火蚁 *RPL18* 为内参基因 ( Souza *et al.* , 2017) , 引物序列见表 1。引物的合成交由广州擎科生物技术有限公司, 合成后用 ddH<sub>2</sub>O 进行稀释, 稀释至 10 μM, 稀释后的引物放入 - 20℃ 保存备用。总 RNA 的提取, cDNA 的合成参照试剂盒进行, RT-qPCR 反应体系 ( 25 μL) : 5 × cDNA 模板 2 μL, 上下游引物 ( 10 μM) 各 1 μL, TB Green Premix Ex Taq II 12.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 8.5 μL。反应条件: 94℃ 30 s; 94℃ 15 s, 60℃ 20 s, 72℃ 30 s, 40 次循环。用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法进行数据分析处理 ( Arocho *et al.* , 2006) , 利用红火蚁 *RPL18* 基因作为内参, ΔΔCt = ( Ct 目标基因 - Ct 持家基因) 实验组 - ( Ct 目标基因 - Ct 持家基因) 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<sup>-ΔΔCt</sup>。每个样品设置 3 次重复实验, 每个实验进行 3 次生物学重复。设置 3 次生物学重复, 每个生物学重复来自 30 头虫。

表 1 实验所用的引物  
Table 1 Primers used in the experiment

| 基因登陆号<br>Gene number           | 引物名称<br>Primer name                  | 序列 ( 5' - 3' )<br>Primer sequences ( 5' - 3' ) | 产物长度 ( bp)<br>Product length |
|--------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------|
| <i>Toll1</i><br>LOC105194815   | <i>Toll1</i> F<br><i>Toll1</i> R     | GCCATTCAAGCTGTGCCTTC<br>CCATCCTTCCCCAGATGCTC   | 143                          |
| <i>Toll2-1</i><br>LOC105200898 | <i>Toll2-1</i> F<br><i>Toll2-1</i> R | TCCCTCGTACAAACTGTGCC<br>CTTCTGTCCCTCAGCACCTG   | 186                          |
| <i>Toll2-2</i><br>LOC105200880 | <i>Toll2-2</i> F<br><i>Toll2-2</i> R | AAGTGCTACGACTGGACAGC<br>TCGCGGCAGTACATCTTCTC   | 187                          |
| <i>Toll6</i><br>LOC105200897   | <i>Toll6</i> F<br><i>Toll6</i> R     | ATTACGGATCTCGGTGTCGC<br>AGAATGTCTGCGGCTCTACG   | 160                          |
| <i>Toll7</i><br>LOC105197864   | <i>Toll7</i> F<br><i>Toll7</i> R     | TAGCGGTGCGAACTGGAACAC<br>CACAAATTAGCACGCGTCGAG | 140                          |
| <i>LRR</i><br>LOC105197592     | <i>LRR</i> F<br><i>LRR</i> F         | CACACAGGGAGCTCAAGGAG<br>TGCGGCTCTACAAAGGACAG   | 164                          |
| <i>RPL18</i><br>LOC105198518   | <i>RPL18</i> F<br><i>RPL18</i> R     | TTTACGGCTCCTCGTCAAGC<br>ACGCAATTCTCCCTTCCAGG   | 165                          |

1.5 Toll 受体的绿僵菌诱导表达模式

配制 PDA 固体培养基, 将绿僵菌 *M. anisopliae* 接种在 PDA 平板上, 置于 25℃、湿度为

70% 的培养箱中进行培养, 培养至产生大量孢子后用孢子萌发液洗脱孢子, 用灭过菌的纱布过滤除去其中的杂质得到孢子悬浮液, 利用血球计数

板计算孢子母液浓度,在用孢子萌发液稀释至孢子终浓度为  $1.0 \times 10^7$  孢子/mL。

选取同一批次发育良好的成虫红火蚁 600 头作为实验材料。利用体壁浸渍法将红火蚁完全浸泡在孢子悬浮液中 3~5 s,用滤纸吸去多余液体后正常饲养,在 0、6、24、48、72 h 取样,每个样品取整虫 30 头,对照组用孢子萌发液做相同处理。总 RNA 的提取, cDNA 的合成, RT-qPCR 的操作参照前面方法进行,用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法进行数据分析处理,利用红火蚁 *RPL18* 基因作为内参,每个样品设置 3 次重复实验,每个实验进行 3 次生物学重复。

### 1.6 数据统计与分析

实验数据的分析、处理采用软件 SPSS (IBM SPSS Statistic 25) 和 Sigma plot 8.01。计算平均值和标准误差,采用一维方差分析 (One-Way ANOVA) 中的最小显著差法 (LSD) 分析,多重比较采用 Duncan 氏检验法,差异显著性水平为  $P < 0.05$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 绿僵菌菌株对红火蚁三种工蚁的致病力

3 种工蚁死亡率随着绿僵菌浓度和处理时间增加而增加。用  $1.0 \times 10^8$  孢子/mL 处理大型工蚁后,大型工蚁死亡率第 2 天开始迅速上升,第 4 天工蚁存活率为 46.7%,处理后第 10 天,红火蚁存活率达到 16.0%。将  $1.0 \times 10^7$ 、 $1.0 \times 10^6$ 、 $1.0 \times 10^5$  和  $1.0 \times 10^4$  孢子/mL 绿僵菌处理 10 d 后,红火蚁工蚁存活率分别为 43.3%、65.1%、95.2% 和 96.5% (图 1-A)。用  $1.0 \times 10^8$  孢子/mL 处理中型工蚁后,中型工蚁死亡率第 3 天开始迅速上升,第 4 天时,中型工蚁存活率为 43.2% 左右,处理后第 10 天存活率为 12.2%。在  $1.0 \times 10^7$ 、 $1.0 \times 10^6$ 、 $1.0 \times 10^5$  和  $1.0 \times 10^4$  孢子/mL 处理红火蚁中型工蚁 10 d 后,存活率分别为 34.2%、45.3%、63.1% 和 92.5% (图 1-B)。用  $1.0 \times 10^8$  孢子/mL 处理小型工蚁后,小型工蚁死亡率第 2 天开始迅速上升,第 3 天时,小型工蚁存活率为 34.2%,处理后第 10 天存活率为 9.39%。将  $1.0 \times 10^7$ 、 $1.0 \times 10^6$ 、 $1.0 \times 10^5$  和  $1.0 \times 10^4$  孢子/mL 处理 10 d 红火蚁小型工蚁后,存活率分别为 35.5%、72.3%、89.8% 和 89.8% (图 1-C)。统计结果表明,4 d 绿僵菌对红火蚁大中小型工蚁的致死中浓度 ( $LC_{50}$ ) 分别

为  $5.8 \times 10^7$ 、 $3.1 \times 10^7$  和  $1.5 \times 10^7$  孢子/mL。10 d,绿僵菌对大中小型工蚁的致死中浓度 ( $LC_{50}$ ) 分别为  $4.0 \times 10^6$ 、 $8.4 \times 10^5$ 、 $3.8 \times 10^6$  孢子/mL,结果表明不同品级工蚁对同一株绿僵菌的敏感性不一样 (图 1)。便于实验操作,后续实验绿僵菌侵染红火蚁实验浓度为  $1.0 \times 10^7$  孢子/mL。

### 2.2 绿僵菌侵染过程的形态变化

采用浸渍法,将健康红火蚁工蚁放入绿僵菌孢子悬浮液 ( $1.0 \times 10^7$  孢子/mL) 中浸泡 3~5 s,置于恒温保湿培养箱培养 8 d,每天用显微镜拍摄 3 种工蚁的表型 (图 2)。绿僵菌孢子接触虫体附着在虫体表面,穿透体壁,逐渐侵入寄主。为逃避红火蚁免疫系统的防御,便以菌丝形式生长,菌丝在寄主体内大量繁殖,侵入寄主的所有器官,当寄主体内免疫无法防御时,绿僵菌在体内便会迅速生长。在侵染第 1 天和第 2 天显微镜下红火蚁体壁无明显变化,活动减弱,身体弓曲;在侵染第 3 天时可在红火蚁体壁观察到细小的菌丝,虫体僵硬,寄主死亡,虫体僵化;死亡 1 d (感染第 4 天),在体壁快速生长,且沿体壁蔓延,蔓延过程中若遇到合适的侵入部位,如口部、节间、气门,会继续向体壁穿透,菌丝在寄主体内大量繁殖。随着侵染的时间,菌丝蔓延寄主的所有器官,菌丝也逐渐形成橄榄绿色的分生孢子,产孢增加,在死亡 5 d 后 (感染第 8 天) 菌丝基本长成橄榄绿色分生孢子 (图 2)。

### 2.3 Toll 受体基因的序列分析

采用在线工具 ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析红火蚁 Toll 受体基因家族蛋白氨基酸数量、分子量大小、等电点、跨膜区和信号肽 (表 2)。进一步对 Toll 受体进行了结构域、染色体定位和系统进化树的构建 (图 3)。结构域预测显示 *Toll1*, *Toll2-1*, *Toll2-2*, *Toll6*, *Toll7* 都具有完整的结构, *LRR* 序列缺乏跨膜区和胞内区;且 Toll 受体含有不同的个数 LRR (图 3-A)。将 Toll 受体基因序列与 NCBI 数据库中其他昆虫物 Toll 序列进行比对,鳞翅目昆虫家蚕、棉铃虫,鞘翅目昆虫中的赤拟谷盗和黄粉虫以及双翅目中的埃及伊蚊和黑腹果蝇,并对相似性较高的序列进行比对分析,通过 N-J 法构建进化树。通过系统发育进化分析发现,红火蚁 *Toll1* 与果蝇和埃及伊蚊 *Toll1* 亲缘关系较近, *Toll7* 与黄粉虫和赤拟谷盗 *Toll7* 同源性较高,红火蚁 *Toll6* 与赤拟谷盗 *Toll6* 同源性较高, *LRR* 与黄粉虫的 *Toll8* 同源性高

(图 3-B)。暗示红火蚁不同的 Toll 蛋白功能与它们有相似的功能。利用染色体定位方法对红火蚁 Toll 受体定位, 结果表明 *Toll1* 和 *LRR* 在 1 号染色体上, *Toll7* 在 10 号染色体上, *Toll2-1*, *Toll2-2* 和 *Toll* 在 8 号染色体上 (图 3-C)。

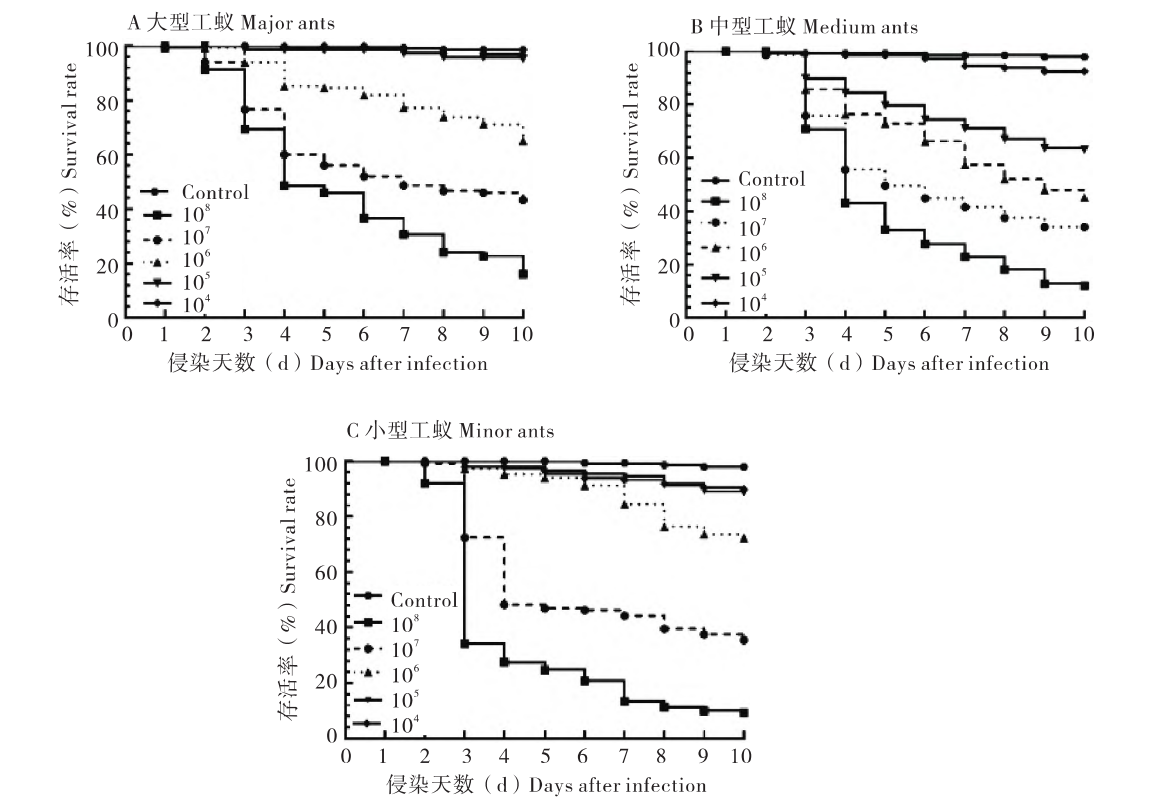


图 1 金龟子绿僵菌对红火蚁 3 种工蚁的致病力

Fig. 1 Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* strain MaqS1902 against *Solenopsis invicta* three types workers  
注: A, 大型工蚁生存曲线; B, 中型工蚁生存曲线; C, 小型工蚁生存曲线。Note: A, Survival curve of major ants; B, Survival curve of medium ants; C, Survival curve of minor ants.

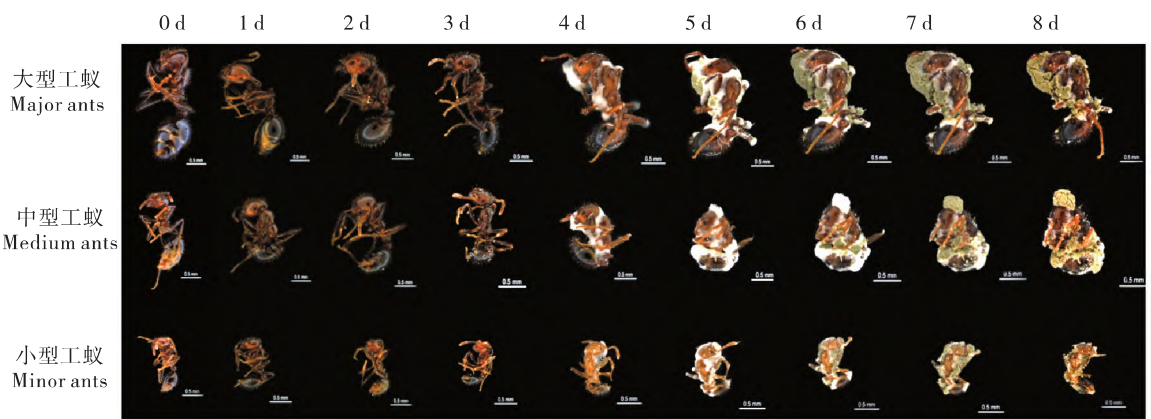


图 2 绿僵菌感染红火蚁 3 种工蚁的显微观察

Fig. 2 Microscopic observation of infection process of *Metarhizium anisopliae* strain MaqS1902 on *Solenopsis invicta* three types workers

表 2 红火蚁 Toll 受体基因的生物信息学分析

Table 2 Bioinformatics analysis of different Toll receptors genes in *Solenopsis invicta*

| 描述 Description                          | <i>Toll1</i> | <i>Toll2-1</i> | <i>Toll2-2</i> | <i>Toll6</i>  | <i>Toll7</i>  |
|-----------------------------------------|--------------|----------------|----------------|---------------|---------------|
| 基因库 GenBank                             | LOC105194815 | LOC105200898   | LOC105200880   | LOC105200897  | LOC105197864  |
| 基因全长 (bp)<br>Full-length gene           | 12 611       | 9 598          | 6 706          | 60 787        | 12 969        |
| 染色体定位<br>Chromosome location            | 1            | 8              | 8              | 8             | 10            |
| 编码区 (bp) Coding sequence                | 3 231        | 3 732          | 3 990          | 3 687         | 4 344         |
| 氨基酸 (aa) Amino acid                     | 1 076        | 1 243          | 1 329          | 1 228         | 1 447         |
| 蛋白分子量 (kDa)<br>Protein molecular weight | 124. 43      | 141. 74        | 149. 34        | 137. 62       | 161. 16       |
| 等电点 Isoelectric point                   | 6. 24        | 5. 80          | 6. 08          | 6. 24         | 6. 24         |
| 跨膜区 (aa)<br>Transmembrane domains       | 788 ~ 810    | 1 018 ~ 1 040  | 997 ~ 1 019    | 1 014 ~ 1 036 | 1 041 ~ 1 063 |
| 信号肽 (aa) Signal peptides                | 20           | 20             | 31             | 36            | 0             |

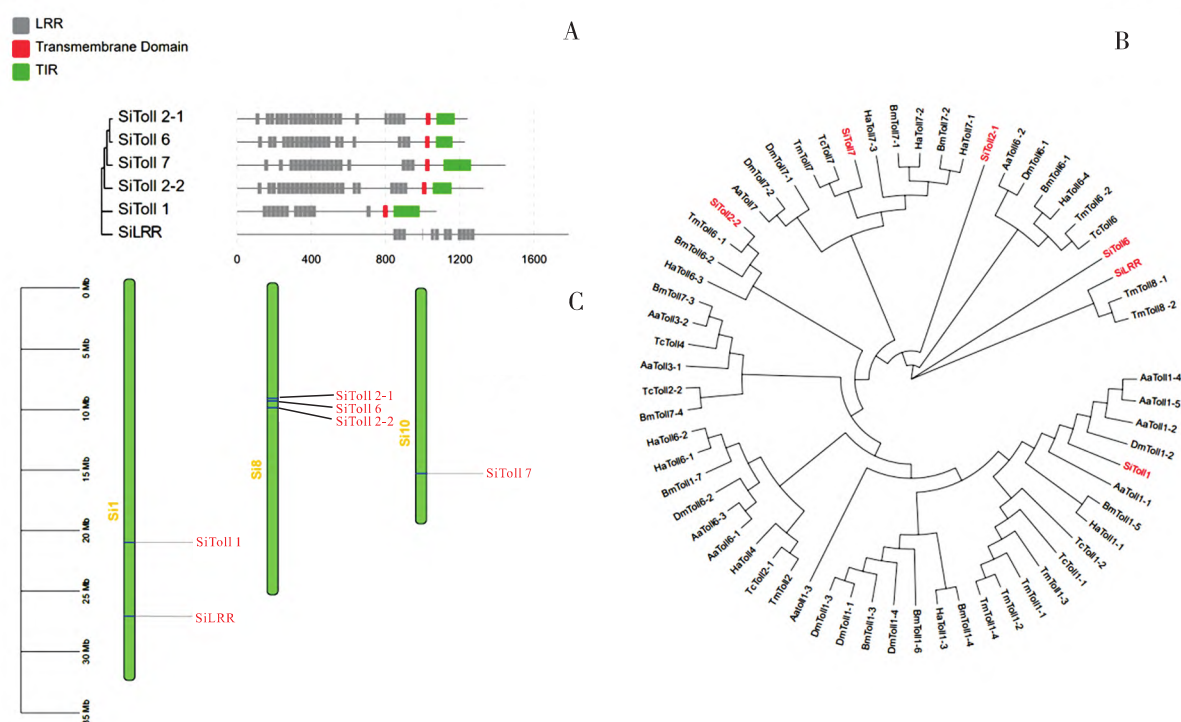


图 3 Toll 受体的生物信息学分析

Fig. 3 Bioinformatics analysis of Toll receptors

注: A, Toll 样受体的结构域, LRR 是指亮氨酸重复区, 红色部分代表跨膜区, 绿色部分代表 TIR, 为 Toll/白介素-1 受体 (IL-1R) 同源区; B, 基于氨基酸序列构建的红火蚁及其他物种 Toll 基因的系统发育树; C, 染色体定位分析。Note: A, The domain architecture of *S. invicta* Toll receptors. LRR indicated leucine rich repeat, transmembrane domain were indicated by red lines, TIR was for the Toll/interleukin-1 receptor (IL-1R) homologous region, which were indicated by green lines; B, Phylogenetic tree of Toll from *S. invicta* and other species based on amino acid sequence; C, Chromosome localization analysis.

## 2.4 红火蚁 Toll 受体的表达水平检测

利用 RT-qPCR 对红火蚁的发育历期 (卵、幼虫、蛹、雌性生殖蚁、雄性生殖蚁、大型工蚁、中型工蚁、小型工蚁) Toll 受体基因进行 mRNA 表达水平检测。Toll 受体基因在红火蚁发育历期中的表达水平不一致, Toll 受体家族在蛹期处于高表达 (图 4); *Toll1*, *Toll6*, *Toll7* 和 *LRR* 在大型工蚁和小型工蚁中表达量显著上调, 且在 *Toll6* 和 *Toll7* 中小型工蚁与大型工蚁之间也达到差异显著水平 ( $P < 0.05$ )。 *Toll1*, *Toll2-2*, *Toll6*, *Toll7* 和 *LRR* 基因在雄性生殖蚁和雌性生殖蚁中的表达达到差异显著水平, 雌性生殖蚁表达水平显著高于雄性生殖蚁, 除了 *LRR* 基因 ( $P < 0.05$ )。说明 Toll 受体在红火蚁成虫期的表达还与性别相关。具体的功能需要进一步的检测。

## 2.5 绿僵菌诱导 Toll 基因家族的表达模式

RT-qPCR 检测了 Toll 基因家族在红火蚁受绿僵菌侵染后的表达模式。红火蚁大中小型工蚁 Toll

受体免疫响应僵菌不一样。在大型工蚁中, 绿僵菌能显著诱导 *Toll1*, *Toll2-1*, *Toll2-2*, *Toll6*, *Toll7* 和 *LRR* 基因的上调表达, 6 h 是一个诱导高峰期, 可以强烈刺激基因的转录 (图 5); 在中型工蚁中, 绿僵菌能显著诱导 *Toll1*, *Toll2-1*, *Toll6*, *Toll7* 和 *LRR* 基因的上调表达, 6 h 对 *Toll2-1* 的诱导效果最显著, 与对照相比, 提高了 5 倍。 *Toll2-2* 基因对绿僵菌的刺激不敏感。在小型工蚁中, 绿僵菌能显著诱导 *Toll1*, *Toll2-1*, *Toll2-2*, *Toll6*, *Toll7* 和 *LRR* 基因的表达, 绿僵菌对小型工蚁的 *LRR* 基因诱导最敏感, 在 6 h 和 24 h 时, 相比于对照, *LRR* 基因表达提高 25 倍 (图 5)。RT-qPCR 检测结果表明 Toll 基因家族能被绿僵菌诱导表达, 且在不同工蚁中的激活机制不同, 说明 Toll 受体家族在不同工蚁中所起的作用不同, 真菌通过模式识别受体 Toll 识别病原相关分子模式 (PAMP) 来激活先天免疫通路 Toll 信号通路来保护红火蚁。

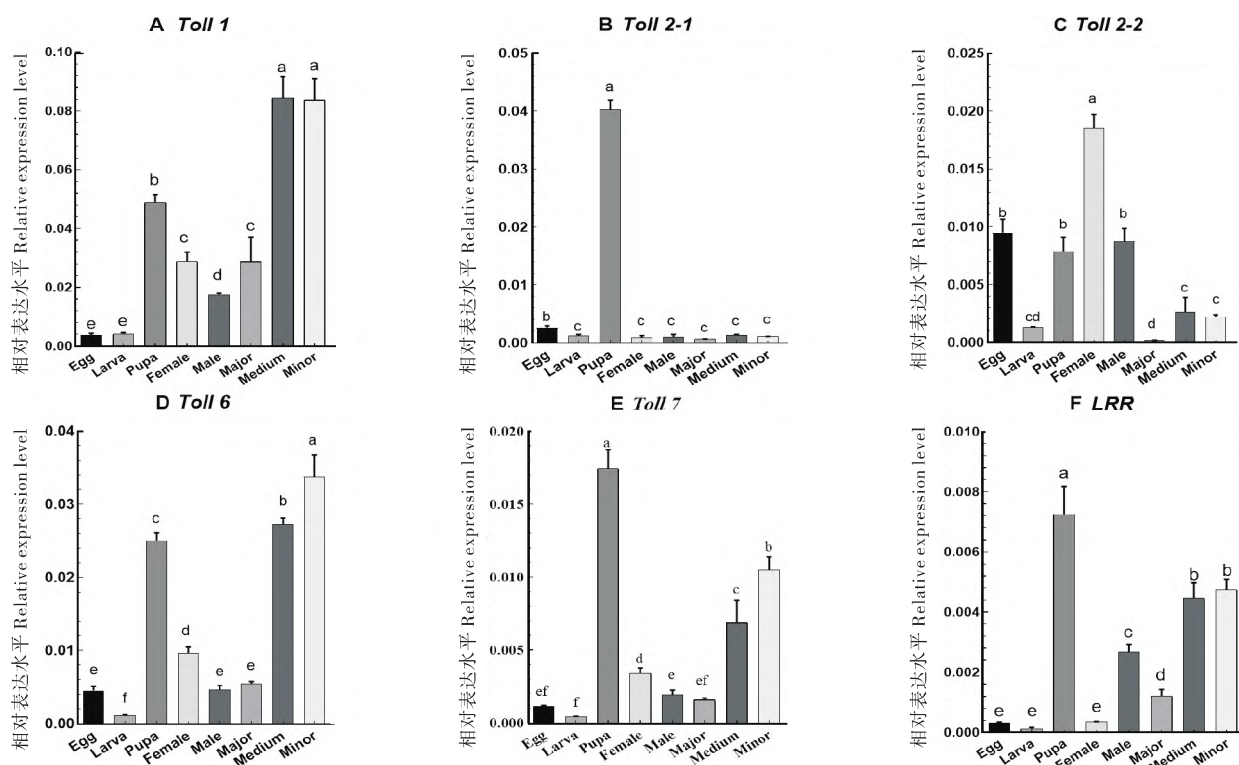
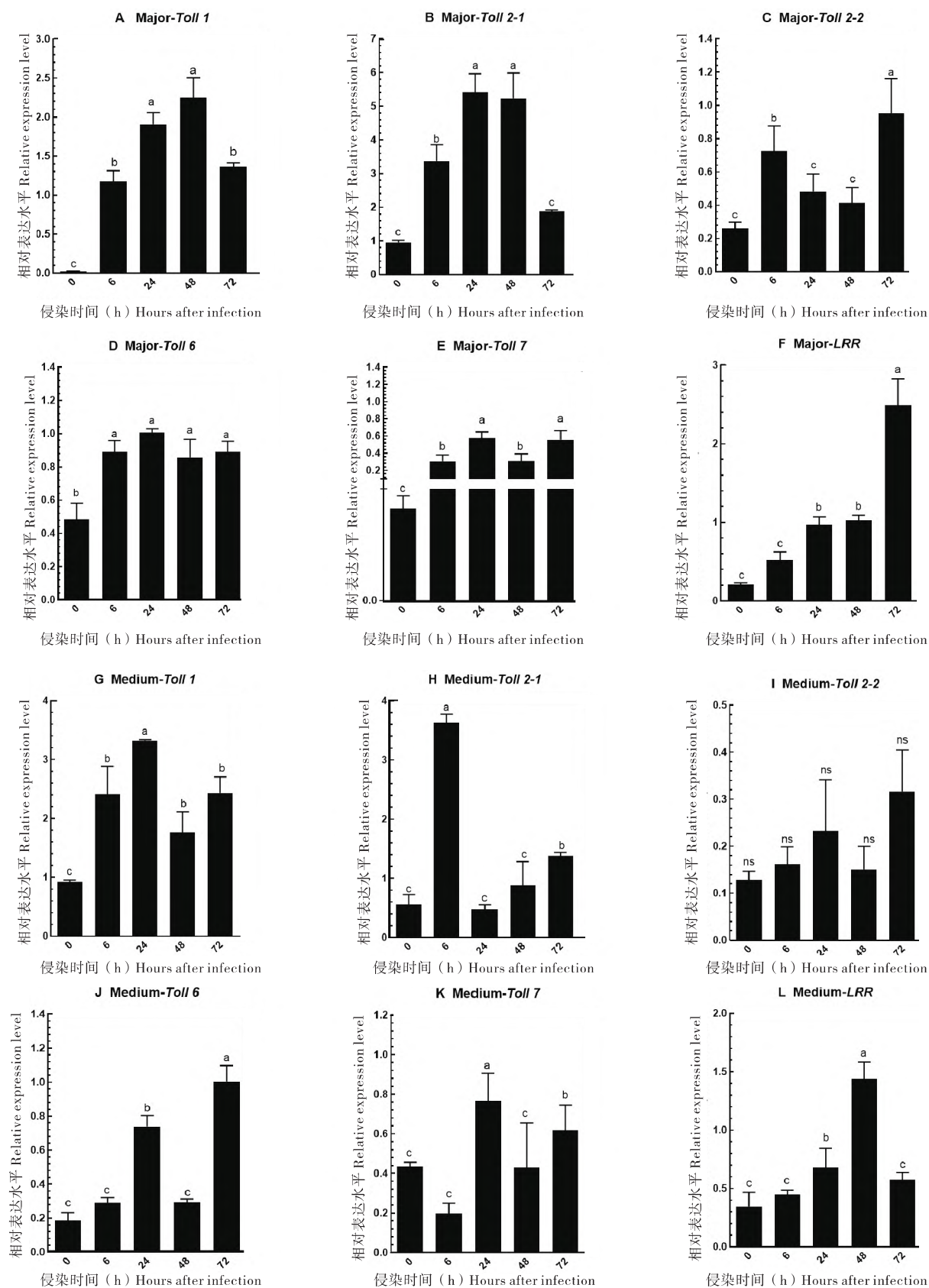


图 4 红火蚁发育历期 Toll 受体的表达量

Fig. 4 Expression level of Toll receptors at developmental stages of *Solenopsis invicta*

注: A ~ F, 红火蚁在各发育历期 Toll 受体的表达量。图中数值为平均值  $\pm$  标准误 ( $n = 3$ ); 柱上不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ , 单因素方差分析, Duncan 氏新复极差检验法)。Note: A ~ F, The expression level of Toll receptors at developmental stages of *S. invicta*. Data in the figure were mean  $\pm$  SE ( $n = 3$ ). Different small letters above bars indicated significant difference ( $P < 0.05$ , one-way ANOVA, Duncan's new multiple range test).



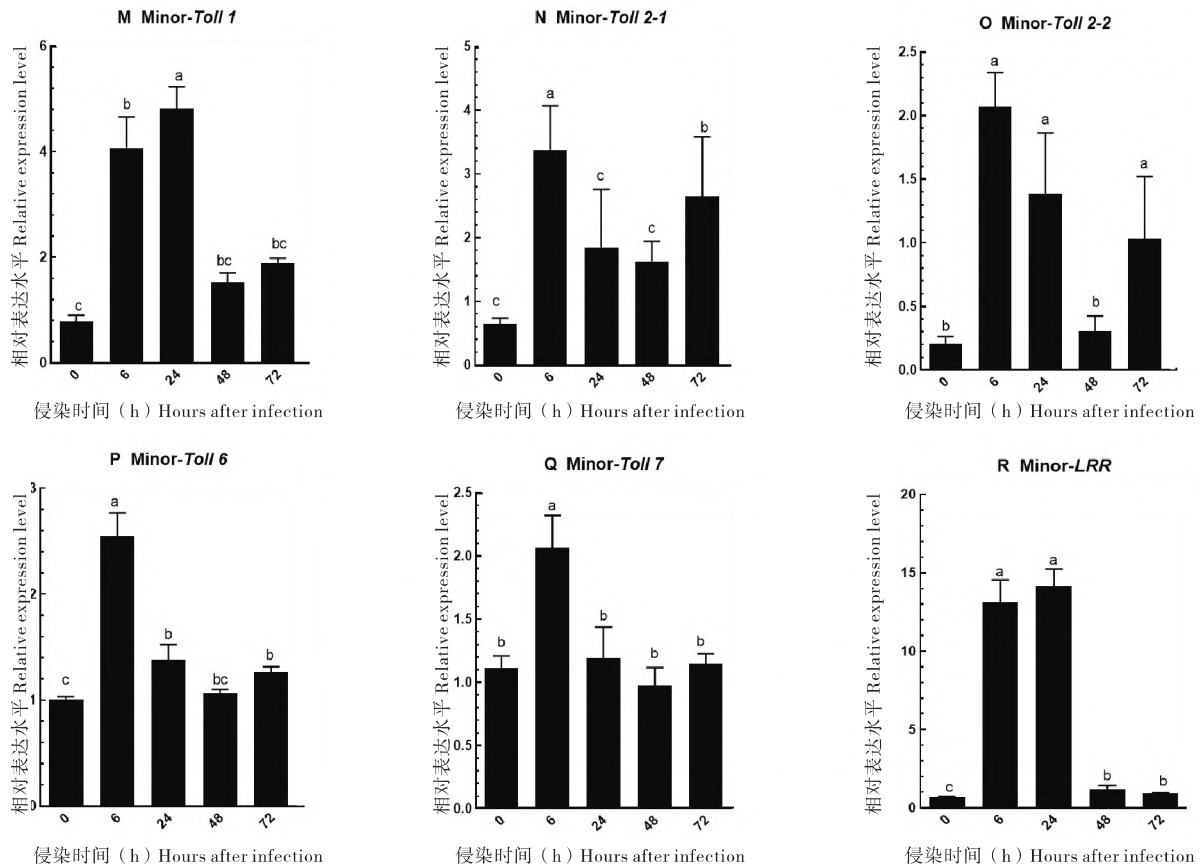


图5 绿僵菌侵染后红火蚁工蚁 Toll 受体家族的表达模式 RT-qPCR 分析

Fig. 5 RT-qPCR analysis mRNA level of Toll receptors in adult worker ant of *Solenopsis invicta*

注: A ~ F, 大型工蚁 Toll 受体家族表达模式分析; G ~ L, 中型工蚁 Toll 受体家族表达模式分析; M ~ R, 小型工蚁 Toll 受体家族表达模式; 分析图中数值为平均值  $\pm$  标准误 ( $n = 3$ ), 柱上不同字母表示基因表达差异显著 ( $P < 0.05$ , 方差分析中的 LSD 和 Duncan 检验)。Note: A ~ F, The expression patterns of Toll receptors in major ants of *S. invicta*; G ~ L, The expression patterns of Toll receptors in medium ants of *S. invicta*; M ~ R, The expression patterns of Toll receptors in minor ants of *S. invicta*; Each bar presents the mean  $\pm$  SE ( $n = 3$ ), and different letters above each bar indicated a significant difference ( $P < 0.05$ , LSD and Duncan in ANOVA).

### 3 结论与讨论

昆虫具有和哺乳动物类似的先天性免疫防御体系, 分为体液免疫和细胞免疫, 可抵御细菌、真菌、病毒和微孢子虫等病原的侵染 (Shmueli *et al.*, 2018)。真菌侵入害虫体内后, 首先面临的是寄主免疫系统的抵抗 (Ouedraogo *et al.*, 2003)。昆虫依赖于高效率的天然免疫系统, 会对昆虫病原菌作出强烈的免疫反应甚至可能将其消灭 (Söderhäll *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2021)。“非己”识别是因为模式识别蛋白 (Pattern recognition proteins, PRPs) 对病原相关分子模式 (Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 的高效识别。PAMP 是指微生物表面保守的, 而在宿主中又不存

在的病原相关分子模式, 如  $G^-$  的脂多糖 (LPS)、 $G^+$  的肽聚糖 (PGN)、脂磷壁酸 (TLA) 以及真菌的甘露聚糖 (manana) (Hughes, 2012)。

Toll 受体是昆虫重要的病原体识别受体之一。典型 Toll 受体包含有保守而相似的结构, 而且 Toll 受体在昆虫体内的分布因物种、受体亚型、时期及所处环境条件的不同而有所差异。目前在果蝇、家蚕、赤拟谷盗、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*、蜜蜂 *Apis mellifera*、小菜蛾 *Plutella xylostella*、豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* 等昆虫中分别报道了有 9、14、9、11、5、9 和 7 个 Toll 基因, 这些 Toll 受体对激活宿主昆虫的先天性免疫应答起着十分重要的作用 (Maxton-Kuchenmeister *et al.*, 1999; Imamura *et al.*, 2002; Luna *et al.*, 2002; Gerardo *et al.*, 2010; Xia *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2021;

Dong *et al.*, 2022)。基于红火蚁基因组分析和鉴定,本研究也获得了红火蚁 6 个 Toll 受体基因(图 3),但获得红火蚁 Toll 受体基因的数量远远少于家蚕(14 个)和冈比亚按蚊(11 个),与果蝇(9)和豌豆蚜(7)差别不大,多于蜜蜂(5 个)。Toll 受体基因数量可能与红火蚁所处环境条件的不同而有所差异。结构域分析发现 Toll 受体包含胞内区,跨膜区和胞外区,这属于 Toll 受体结构,与果蝇等报道的一致。染色体定位分析表明 *Toll1* 和 *LRR* 在 1 号染色体上, *Toll7* 在 10 号染色体上, *Toll2-1*, *Toll2-2* 和 *Toll6* 在 8 号染色体上(图 3-B)。Toll 受体所处染色体位置不一样,激活途径可能也不一样。系统发育分析表明红火蚁 *Toll1* 与果蝇和埃及伊蚊 *Toll1* 亲缘关系较近, *Toll7* 与黄粉虫和赤拟谷盗 *Toll7* 同源性较高,红火蚁 *Toll6* 与赤拟谷盗 *Toll6* 同源性较高, *LRR* 与黄粉虫的 *Toll8* 同源性高。暗示红火蚁 6 个 Toll 受体所起的作用不一样,不同的 Toll 受体蛋白功能与这些不同来源昆虫 Toll 受体蛋白的功能相近。

在昆虫中,对 PAMPs 的识别是由 Toll 受体介导的, Toll 受体作为昆虫先天免疫系统中的关键步骤—免疫识别中的关键受体而具有十分重要的意义。目前,对昆虫 Toll 受体的功能研究正在向全面、系统的趋势发展。研究报道果蝇中鉴定了 9 个 Toll 受体,分别命名为 DmToll, DmToll-2 ~ DmToll-9,这 9 个 Toll 受体的功能被详细的阐述,其功能很不相同(Nüsslein-Volhard *et al.*, 1980; Hashimoto *et al.*, 1988; Rosetto *et al.*, 1995; McIlroy *et al.*, 2013; Ballard *et al.*, 2014; Ward *et al.*, 2015; Shmueli *et al.*, 2018)。本研究中,利用 RT-qPCR 对筛选到的红火蚁 6 个 Toll 受体进行发育历期的 mRNA 水平检测(图 4)。研究表明 Toll 受体家族在红火蚁整个生命周期都有表达,但是 Toll 受体家族表达量会随着红火蚁的发育,各个基因表达水平出现转录差异,说明 Toll 受体家族基因与红火蚁的发育密切关系,并抵御病原物的入侵。*Toll1* 基因中型和小型工蚁里高表达, *Toll2-1*, *Toll7* 和 *LRR* 在蛹期高表达, *Toll2-2* 在雌性生殖蚁中高表达, *Toll6* 中小型工蚁中高表达。除了 *Toll2-1* 之外, Toll 基因在雄性生殖蚁和雌性生殖蚁中的表达达到差异显著水平,且 Toll 家族在蛹期也出现高表达水平(图 4)。探讨其原因可能红火蚁蛹期不能移动,四周被病原物包围,红火蚁通过提高其体内 Toll 受体基因表达水平来应对病原物的入侵。本研究结果与余静(2017)年

研究了小菜蛾凝集素 *PxCTL5* 结果相似,只是小菜蛾 *PxCTL5* 基因的高表达在成虫期。小菜蛾 *PxCTL5* 基因在小菜蛾的整个发育历期都有表达,但其转录水平存在着明显差异。*PxCTL5* 在成虫时期的表达量是 3 龄幼虫时期的 35 倍。*PxCTL5* 是小菜蛾生长发育中的必需基因,与小菜蛾变态发育有着密切的联系(余静等, 2017)。本研究结果也与张燕结果相类似,张燕利用 Semi-qRT-PCR 研究发现唾液蛋白家族在蚜虫整个生命周期都有表达,没有发育阶段特异性(张燕等, 2011)。

本研究结果表明 4 d 绿僵菌对红火蚁大、中、小型工蚁的致死中浓度 ( $LC_{50}$ ) 分别为  $5.8 \times 10^7$ 、 $3.1 \times 10^7$ 、 $1.5 \times 10^7$  孢子/mL。10 d, 绿僵菌对大、中、小型工蚁的致死中浓度 ( $LC_{50}$ ) 分别为  $4.0 \times 10^6$ 、 $8.4 \times 10^5$ 、 $3.8 \times 10^6$  孢子/mL。生存曲线表明,高浓度时绿僵菌处理小型工蚁 3 ~ 4 d,死亡率较高,但低浓度时死亡率要比大、中型工蚁低(图 1)。这结果与许齐爱和王磊结果类似,但本研究效果高于他们的菌株。许齐爱等人研究了黄绿绿僵菌 SM076 菌株对大型和小型工蚁红火蚁的致病力。SM076 处理大型和小型工蚁 14 d 的  $LC_{50}$  分别为  $9.29 \times 10^4$  和  $1.02 \times 10^6$  孢子/mL。随着黄绿绿僵菌孢子悬浮液浓度的增加,红火蚁的死亡率不断升高,致病时间缩短,致死中时间降低(许齐爱等, 2013)。王磊等人研究了 M09、CQMa128 和 CQMa117 3 株金龟子绿僵菌对红火蚁的致病力。结果表明在  $1.0 \times 10^8$  孢子/mL 浓度下 3 株菌株处理后 10 d 红火蚁的工蚁累计死亡率分别为 73.3%、14.6% 和 55.5%; M09 菌株对工蚁的  $LC_{50}$  为  $3.50 \times 10^6$  孢子/mL(王磊等, 2018)。本研究中菌株与上述研究差异的原因可能是不同菌株对红火蚁的致病力不同所致。

真菌和革兰氏阳性菌能够激活 Toll 信号通路从而诱导下游抗菌肽的产生,激活昆虫先天免疫反应,保护昆虫免受侵染(Rutschmann *et al.*, 2002)。本研究中,当绿僵菌侵染红火蚁大中小工蚁 3 种品级后, RT-qPCR 检测显示不同品级的工蚁,且在诱导后不同时间, Toll 受体家族免疫应答不一致(图 5)。在大型工蚁中,绿僵菌能显著诱导 Toll 受体家族的上调表达,6 h 是一个诱导高峰期,可以强烈刺激 *Toll1*, *Toll2-1*, *Toll2-2*, *Toll6*, *Toll7* 和 *LRR* 基因的转录(图 5-A ~ F);在中型工蚁中,绿僵菌能显著诱导红火蚁 *Toll1*, *Toll2-1*, *Toll6*, *Toll7* 和 *LRR* 基因的上调表达,6 h 对 *Toll2-1* 的诱导效果最显著,与对照相比,提高了 5 倍。

而 *Toll2-2* 基因却对绿僵菌的刺激不敏感 (图 5-G ~ L)。在小型工蚁中, 绿僵菌能显著诱导 *Toll1*, *Toll2-1*, *Toll2-2*, *Toll6*, *Toll7* 和 *LRR* 基因的表达, 绿僵菌对小型工蚁的 *LRR* 基因诱导最敏感, 在 6 h 和 24 h 时, 相对于对照, *LRR* 基因表达提高 25 倍 (图 5-M ~ R)。说明红火蚁 Toll 家族基因各自免疫响应绿僵菌的侵染, 且不同的 Toll 对不同品级的工蚁响应程度不一样, 绿僵菌侵染后表达模式存在显著差异 (图 5), 这与哺乳动物 TLR 和果蝇 Toll-7 受体蛋白识别功能相似 (Takeda *et al.*, 2004, Nakamoto *et al.*, 2012)。本研究结果也与其他昆虫研究结果类似。Lin 等人研究表明家蚕幼虫感染白僵菌 *Beauveria*, 不同的 Toll 受体在家蚕受到白僵菌感染后的表达模式也存在显著差异。*Bm Toll3-2*、*Bm Toll6*、*Bm Toll7-1* 和 *Bm Toll9* 基因在不同的注射时间显著上调, 而 *Bm Toll10-2* 与 *Bm Toll10-3* 基因则出现下调现象 (Lin *et al.*, 2018)。张静 (2021) 研究了飞蝗 *Locusta migratoria* TLR (LmTLR) 对病原微生物侵染的响应模式。结果表明, 在注射大肠杆菌 6 h 时 LmTLR 的表达量与对照相较还没有显著差异, 这说明在注射初期还没有引起 Toll 信号通路上游基因对 LmTLR 的调控; 在注射病原物 24 h 后, LmTLR 的表达量降低; 在注射绿僵菌 12 h 后 LmTLR 的表达量显著增加, 24 h 显著性差异消失, 这也暗示了病原物诱导了 LmTLR (张静, 2021)。欧阳莉娜 (2016) 同样采用体壁侵染的方法, 分别将玫瑰色棒束孢、白僵菌、绿僵菌的孢子悬浮液  $10^7$  孢子/mL 侵染健康小菜蛾 3 龄幼虫后, 利用 RT-qPCR 检测了小菜蛾表皮、脂肪体、血细胞的表达模式。结果表明同一种真菌处理后的同一种组织中 *Toll2*、*Toll5*、*Toll11* 基因的表达量存在差异。作为 Toll 通路内部组分的 3 种 Toll 基因在受到真菌侵染时表达量在不同时间可能会出现抑制和诱导两种反应, 进一步表明调控小菜蛾体内信号通路的因子复杂性 (欧阳莉娜, 2016)。Shields 研究表明果蝇的 *Toll-9* 不是先天免疫所必需的, 但是与 *Toll-1* 相互作用, 可以相互作用激活 NF- $\kappa$ B 转录因子背侧核易位的细胞内的 *Toll-1* 途径 (Shields *et al.*, 2022)。以上说明红火蚁不同的品级通过提高其体内不同亚型的 Toll 基因表达水平来应对病原物的入侵, 具体的 Toll 功能将进一步展开研究。

### 参考文献 (References)

Armant MA, Fenton MJ. Toll-like receptors: A family of pattern-

- recognition receptors in mammals [J]. *Genome Biology*, 2002, 3 (8): 1-6.
- Arocho A, Chen B, Ladanyi M, *et al.* Validation of the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  calculation as an alternate method of data analysis for quantitative PCR of BCR-ABL P210 transcripts [J]. *Diagnostic Molecular Pathology*, 2006: 15.
- Ballard SL, Miller DL, Ganetzky B. Retrograde neurotrophin signaling through Tollo regulates synaptic growth in *Drosophila* [J]. *Journal of Cell Biology*, 2014, 204 (7): 1157-1172.
- Chen C, Chen H, Zhang Y, *et al.* TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. *Molecular Plant*, 2020, 13 (8): 1194-1202.
- Dong ZX, Tang QH, Li WL, *et al.* Honeybee (*Apis mellifera*) resistance to deltamethrin exposure by modulating the gut microbiota and improving immunity [J]. *Environmental Pollution*, 2022, 314: 120340.
- Gerardo NM, Altincicek B, Anselme C, *et al.* Immunity and other defenses in pea aphids, *acyrthosiphon pisum* [J]. *Genome Biology*, 2010, 11 (2): 1-17.
- Hughes AL. Evolution of the  $\beta$ GRP/GNBP/ $\beta$ -1, 3-glucanase family of insects [J]. *Immunogenetics*, 2012, 64 (7): 549-558.
- Imamura M, Yamakawa M. Molecular cloning and expression of a Toll receptor gene homologue from the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 2002, 1576 (3): 246-254.
- Kang K, Cai YJ, Gong J, *et al.* Effects of *Metarhizium anisopliae* on the fecundity of *Nilaparvata lugens* [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2022, 38 (1): 180. [康奎, 蔡允俊, 龚俊, 等. 金龟子绿僵菌对褐飞虱繁殖力的影响 [J]. 中国生物防治学报, 2022, 38 (1): 180]
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, *et al.* The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults [J]. *Cell*, 1996, 86 (6): 973-983.
- Lin J, Xia X, Yu XQ, *et al.* Gene expression profiling provides insights into the immune mechanism of *Plutella xylostella* midgut to microbial infection [J]. *Gene*, 2018: 21-30.
- Liu XX, Lu LH, Feng X, *et al.* Advance in biological control of red imported fire ant, *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae) [J]. *Guangdong Academy of Agricultural Sciences*, 2006, 5: 18-23. [刘晓燕, 吕利华, 冯夏, 等. 红火蚁生物防治研究进展 [J]. 广东农业科学, 2006, 5: 18-23]
- Luna C, Wang X, Huang Y, *et al.* Characterization of four Toll related genes during development and immune responses in *Anopheles gambiae* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 32 (9): 1171-1179.
- Lu YY, Zeng L. 10 years after red imported fire ant found to invade China: History, current situation and trend of its infestation [J]. *Plant Quarantine*, 2015, 2: 1-6. [陆永跃, 曾玲. 发现红火蚁入侵中国 10 年: 发生历史, 现状与趋势 [J]. 植物检疫, 2015, 2: 1-6]
- Maxton-Küchenmeister J, Handel K, Schmidt-Ott U, *et al.* Toll homolog expression in the beetle *tribolium* suggests a different mode of dorsoventral patterning than in *Drosophila* embryos [J]. *Mechanisms of Development*, 1999, 83 (1-2): 107-114.
- McIlroy G, Foldi I, Aurikko J, *et al.* Toll-6 and Toll-7 function as

- neurotrophin receptors in the *Drosophila melanogaster* CNS [J]. *Nature Neuroscience*, 2013, 16 (9): 1248 – 1256.
- Nakamoto M, Moy R, Jie X, *et al.* Virus recognition by Toll-7 activates antiviral autophagy in *Drosophila* [J]. *Immunity*, 2012, 36 (4): 658 – 667.
- Nie L, Cai SY, Shao JZ, *et al.* Toll-like receptors, associated biological roles, and signaling networks in non-mammals [J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 1523.
- Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila* [J]. *Nature*, 1980, 287 (5785): 795 – 801.
- Ouedraogo RM, Cusson M, Goettel MS, *et al.* Inhibition of fungal growth in thermoregulating locusts, *Locusta migratoria*, infected by the fungus *Metarhizium anisopliae* var *acridum* [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2003, 82 (2): 103 – 109.
- Ouyang LN. DGE Analysis of Dynamical Mechanism on Immunity of *Plutella xylostella* against Entomopathogenic Fungi and Functional Study on Toll Familie [D]. Guangzhou: South China Agricultural University Master Thesis, 2016. [欧阳莉娜. 小菜蛾免疫虫生真菌侵染动力学的 DGE 分析及其 Toll 基因功能研究 [D]. 广州: 华南农业大学硕士论文, 2016]
- Rutschmann S, Kilinc A, Ferrandon D. Cutting Edge: The Toll pathway is required for resistance to gram – positive bacterial infections in *Drosophila* ~1 [J]. *The Journal of Immunology: Official Journal of the American Association of Immunologists*, 2002, 168 (4): 168.
- Söderhäll K, Cerenius L. Role of the prophenoloxidase – activating system in invertebrate immunity [J]. *Current Opinion in Immunology*, 1998, 10 (1): 23 – 28.
- Souza DHF, Moreira AC. Validation of reference genes in leaf – cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* in different developmental stages and tissues [J]. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 2017, 2 (2): 743.
- Shields A, Amcheslavsky A, Brown E, *et al.* Toll-9 interacts with Toll-1 to mediate a feedback loop during apoptosis-induced proliferation in *Drosophila* [J]. *Cell Reports*, 2022, 39 (7): 110817.
- Shmueli A, Shalit T, Okun E, *et al.* The toll pathway in the central nervous system of flies and mammals [J]. *NeuroMolecular Medicine*, 2018, 20 (4): 419 – 436.
- Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways [J]. *Seminars in Immunology*, 2004, 1: 16.
- Wang L, Xu YJ, Li ZL, *et al.* Pathogenicity of three strains of *Metarhizium anisopliae* ( Metchnikoff) to red imported fire ant *Solenopsis invicta* Buren [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2018, 40 (4): 820 – 824. [王磊, 许益鏖, 李梓琳, 等. 三株金龟子绿僵菌对红火蚁的致病力测定 [J]. 环境昆虫学报, 2018, 40 (4): 820 – 824]
- Wang HC, Tseng CW, Lin HY, *et al.* RNAi knock-down of the *Litopenaeus vannamei* Toll gene (LvToll) significantly increases mortality and reduces bacterial clearance after challenge with *Vibrio harveyi* [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2010, 34 (1): 49 – 58.
- Wang Z, Chen YH, Dai YJ, *et al.* A novel vertebrates Toll-like receptor counterpart regulating the anti-microbial peptides expression in the freshwater crayfish, *Procambarus clarkii* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 43 (1): 219 – 229.
- Ward A, Hong W, Favaloro V, *et al.* Toll receptors instruct axon and dendrite targeting and participate in synaptic partner matching in a *Drosophila* olfactory circuit [J]. *Neuron*, 2015, 85 (5): 1013 – 1028.
- Williams DF, Knue GJ, Becnel JJ. Discovery of *Thelohania solenopsae* from the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*, in the United States [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1998, 71 (2): 175 – 176.
- Williams DF, DeShazo RD. Biological control of fire ants: An update on new techniques [J]. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 2004, 93 (1): 15 – 22.
- Xia X, Yu L, Xue M, *et al.* Genome-wide characterization and expression profiling of immune genes in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5 (1): 1 – 13.
- Xu QA, Li JY, Ren SX. Selection of *Metarhizium flavoviride* isolates to control the red imported fire ant *Solenopsis invicta* [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2013, 29 (3): 384 – 388. [许齐爱, 李佳颖, 任顺祥. 红火蚁高致病力黄绿绿僵菌菌株的筛选 [J]. 中国生物防治学报, 2013, 29 (3): 384 – 388]
- Xu Y, Vargo EL, Tsuji K, *et al.* Exotic ants of the Asia – pacific: Invasion, national response, and ongoing needs [J]. *Annual Review of Entomology*, 2022, 67 (1): 27 – 42.
- Yang M, Dong J, Shen YT, *et al.* InsectBase 2.0: A comprehensive gene resource for insects [J]. *Nucleic Acids Research*, 2021.
- Yu J, Xu XX, Gao YF, *et al.* Molecular cloning of the C – type lectin gene PxCTL5 and its mRNA level changes under bacterial stimulation in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2017, 60 (8): 876 – 890. [余静, 许小霞, 高延富, 等. 小菜蛾 C 型凝集素基因 PxCTL5 的克隆及其在细菌刺激下的转录水平变化 [J]. 昆虫学报, 2017, 60 (8): 876 – 890]
- Zhang C, Yan S, Shen B, *et al.* RNAi knock – down of the *Bemisia tabaci* Toll gene (BtToll) increases mortality after challenge with destruxin A [J]. *Molecular Immunology*, 2017, 88: 164 – 173.
- Zhang J. Research on the Function and Application of Toll – like Receptor of *Locusta Migrat* [D]. Taiyuan: Shanxi University Master Thesis, 2021. [张静. 飞蝗 Toll 样受体的功能及其应用研究 [D]. 太原: 山西大学硕士论文, 2021]
- Zhang R, Li X, Zhang J, *et al.* Toll9 from *Bombyx mori* functions as a pattern recognition receptor that shares features with Toll – like receptor 4 from mammals [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2021, 118 (19): e2103021118.
- Zhang RN. Study on BmMLs and BmToll9 Immune Response Induced by LPS Insilkworm [D]. Guangzhou: South China Agricultural University Master Thesis, 2016. [张若男. 家蚕 BmToll9 和 BmMLs 响应 LPS 引发的免疫反应 [D]. 广州: 华南农业大学硕士论文, 2016]
- Zhang Y, Wu GX, Guo K, *et al.* Cloning and expression profiling of a saliva protein family at different developmental stages in *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2011, 54 (12): 1445 – 1451. [张燕, 吴国星, 郭昆, 等. 豌豆蚜唾液蛋白家族的克隆及在不同发育阶段的表达 [J]. 昆虫学报, 2011, 54 (12): 1445 – 1451]