



吴洪鑫, 许亚婷, 康泽泓, 杨荣蓉, 陆永跃, 金丰良, 许小霞. 红火蚁 Serpin 家族基因鉴定及其在绿僵菌侵染下的表达模式分析 [J]. 环境昆虫学报, 2022, 44 (6): 1541–1552.

红火蚁 Serpin 家族基因鉴定及其在绿僵菌侵染下的表达模式分析

吴洪鑫, 许亚婷, 康泽泓, 杨荣蓉, 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: 丝氨酸蛋白酶抑制剂 (Serine protease inhibitor, Serpin) 在昆虫 Toll 通路和 PPO 级联反应的防御机制中起着至关重要的作用。本研究利用现代生物信息学工具预测和分析了红火蚁 *Solenopsis invicta* 中 Serpin 家族的结构和功能多样性。染色体定位表明, 红火蚁基因组中 7 个 Serpin 基因家族成员不均匀的分布在 4 条染色体上。结构域分析表明, SiSerpin 蛋白具有 Serpin 基因的保守结构, 即典型的反应中心环 (Reactive central loop, RCL) 结构与 Serpin 结构域, 不同成员蛋白拥有多样化的基序。系统进化分析表明, 红火蚁 Serpin 蛋白与其他的昆虫 Serpin 蛋白有较高亲缘关系, SiSerpin7 与烟草天蛾 *Manduca sexta* 的 Serpin3a 亲缘关系最近, SiSerpin12 与黄粉虫 *Tenebrio molitor* Serpin55 亲缘关系最近, SiSerpin13 与烟草天蛾 Serpin6 亲缘关系最近, SiSerpin4 与家蚕 Serpin27 亲缘关系最近。为了进一步明确红火蚁 Serpin 家族在绿僵菌 *Metarhizium* 侵染后的表达模式, 用绿僵菌侵染不同体型的工蚁, 荧光定量 PCR (RT-qPCR) 分析表明, 红火蚁 Serpin 基因家族成员能在早期响应绿僵菌的侵染; 除 SiSerpin7 基因外, 大型和小型两种工蚁的表达模式存在较大的差异。结果表明红火蚁 Serpin 家族作为免疫调控蛋白, 能够响应绿僵菌的侵染, 且在红火蚁不同体型工蚁之间存在着不同的免疫调控模式。这些发现不仅为 Serpins 的功能分析提供了理论基础, 而且有可能有助于绿僵菌作为一种有效的生防剂的开发。

关键词: 红火蚁; 金龟子绿僵菌; 丝氨酸蛋白酶抑制剂; 免疫反应

中图分类号: Q968.1; S433; S476

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2022) 06-1541-12

Genome-wide identification of Serpin gene family in *Solenopsis invicta* and expression analysis in response to *Metarhizium anisopliae*

WU Hong-Xin, XU Ya-Ting, KANG Ze-Hong, YANG Rong-Rong, LU Yong-Yue, JIN Feng-Liang, XU Xiao-Xia* (Key Laboratory of Bio-Pesticide Creation and Application of Guangdong Province, “Belt and Road Initiative” Technology Industry and Innovation Institute for Biological Control of Agricultural Pests, Department of Entomology, College of Plant Protection, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstracts: Serpins play crucial modulatory roles in the insect defense mechanism, mainly in the Toll pathway and prophenoloxidase (PPO) cascade. In the current study, we employed modern Bioinformatics tools to predict and analyse the structural and functional diversity of Serpin family in *Solenopsis invicta*, an invasive and notoriously harmful species of ants. Computational analysis showed that Serpin family genes were evenly distributed on four chromosomes. Domain analysis revealed that *S. invicta* Serpin (SiSerpin)

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2021YFD1000500)

作者简介: 吴洪鑫, 男, 1997 年生, 广东开平人, 硕士研究生, 研究方向为农业昆虫与害虫防治; E-mail: scauwhx@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: 2022-09-11; 接受日期 Accepted: 2022-10-13

protein had the conserved structure, typical reactive central loop (RCL) and serpin domain, whereas different member proteins had diverse motifs. Phylogenetic analysis showed that the SiSerp family had a strong relationship with Serpin genes from other insect species. *SiSerp7* was most closely related to *Serp3a* of *Manduca sexta*, and *SiSerp12* was strongly related to *Serp55* of *Tenebrio molitor*. Similarly, *SiSerp13* was found to be in close homology with *Serp6* in *M. sexta* while *SiSerp4* was closely linked to *Bombyx mori Serp27*. To further understand the role of SiSerp in immune response, the *S. invicta* were infected with *Metarhizium anisopliae*, an insect pathogenic fungi. RT-qPCR results showed that the expression profiles of SiSerp family greatly varied at the initial stages of infection, an indicator of their regulatory potential during fungal stress. It was worth mentioning that the expression patterns differed in small and large worker ants. These results presented an intricate immuno-regulatory potential of the Serpin family of *S. invicta* in response to the fungal infection. We also noted the difference in immune responses amongst different sizes of the ants. These findings not only provide a theoretical basis for the functional analysis of Serpins, but could potentially assist in the development of *M. anisopliae* as an effective biocontrol agent of *S. invicta*.

Key words: *Solenopsis invicta*; *Metarhizium anisopliae*; Serpin; immune responses

丝氨酸蛋白酶 (Serine protease, SP) 是一类重要的蛋白水解酶家族, 能够参与多种生理过程 (Veillard *et al.*, 2016)。丝氨酸蛋白酶以丝氨酸为活性中心, 其催化结构域由组氨酸、丝氨酸和天冬氨酸 3 个氨基酸残基组成 (Jiang *et al.*, 2000)。在昆虫中主要参与消化、发育和先天免疫反应等重要生理过程 (Zou *et al.*, 2006)。

丝氨酸蛋白酶抑制剂 (Serine proteases inhibitor, Serpin) 是丝氨酸蛋白酶最有效的抑制因子。Serp 家族一般由 350 ~ 500 个氨基酸组成, 其 C 末端含一个约有 20 个氨基酸组成的反应中心环 (reactive central loop, RCL), 研究表明这类抑制剂为单一肽链的球状蛋白质, 并且各种 Serpins 大约有 30% 的序列同源性, 疏水区同源性高达 70% (周诗敏等, 2021)。Serpins 主要功能是抑制丝氨酸蛋白酶的活性, 通过调控丝氨酸蛋白酶级联反应, 参与昆虫的体液免疫反应 (Tong *et al.*, 2005; Veillard *et al.*, 2016)。Serpins 通过不可逆的结合丝氨酸蛋白酶, 形成非共价复合物, 调控昆虫体液免疫反应的 Toll 通路和黑化反应, 通过抑制 PPO 途径和 Toll 通路中的丝氨酸蛋白酶活性, 调控昆虫的免疫反应 (赵丽芳等, 2016)。

Serpins 作为一种免疫功能调控蛋白, 昆虫体内 Serpin 蛋白的表达可以被许多外来病原物诱导, 包括细菌、真菌等。早在 1998 年, 研究者们就在美国白蛾 *Hyphantria cunea* 中发现能够被细菌激烈诱导表达的 Serpin 蛋白 *Hdd3* (Shin *et al.*, 1998), 在随后的研究中, 发现 *Hdd3* 蛋白主要存在于血浆

中并能通过竞争性抑制酚氧化酶原 PPO 的活性从而下调昆虫的黑化反应 (Park *et al.*, 2000)。Wang 等人研究表明, 饲喂靶向 *Serp1* 的 dsRNA 可显著增加绿僵菌侵染后东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* 的死亡率, 且防治效果和 dsRNA 浓度呈剂量依赖性 (Wang *et al.*, 2022)。

红火蚁 *Solenopsis invicta* 于 2004 年首次报道入侵中国大陆 (曾玲等, 2005)。作为一种外来入侵物种, 红火蚁因其习性凶猛、繁殖力大、环境适应性强等特点, 被世界自然保护联盟 (IUCN) 列为 100 种最具有破坏力的入侵生物之一 (陆永跃等, 2015)。红火蚁多发生于路边、草地、荒芜坡地等, 与人类生活环境有一定的交集 (张睿等, 2022)。目前, 红火蚁的防治主要依赖大量的化学农药 (李旭林, 2020)。但化学杀虫剂持续大量的使用, 不仅使红火蚁抗药性水平不断提高, 出现“3R”问题, 污染人类生活环境, 而且对环境和非靶标生物产生了一定的影响。生物防治是替代化学农药使用、实现绿色植保的有效途径。微生物杀虫剂因其资源丰富、广谱高毒力、对环境友好且易制剂化等优点而在害虫的生物防治中占据重要的地位 (王露露等, 2022)。绿僵菌作为一种新型安全的杀虫剂, 已被广泛运用于农业、林业及卫生害虫的生物防治 (张礼生等, 2006)。但是目前微生物杀虫剂杀虫效率严重受到红火蚁自身免疫防御系统的制约, 极大限制微生物杀虫剂的规模化应用。尽管 2011 年完成了红火蚁全基因组序列的测定, 筛选基于红火蚁天然免疫响应微生物

杀虫剂的研究报道较少。基于此,本研究利用生物信息学的方法鉴定并分析了红火蚁 Serpin 基因家族的理化性质、进化关系、染色体定位和保守结构域,并利用 RT-qPCR 分析该基因的病原真菌诱导表达模式,以期为深入研究红火蚁 Serpin 基因的功能奠定基础,也为以 Serpin 基因为靶点开发新的红火蚁生物防治技术提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫和菌株

供试红火蚁采自广东省广州市黄埔区 (N23°11'2.04", E113°28'31.08), 将红火蚁巢从野外采集带回实验室,采用水滴法分离蚁群,并在温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相对湿度 50% 和光照 12 L: 12 D 条件下培养,使用黄粉虫 *Tenebrio molitor* 和 10% 蔗糖水饲喂。试验所用金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 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,于 25°C 恒温培养。并保存在实验室备用。

1.2 红火蚁 Serpin 基因家族的鉴定

本研究从昆虫基因组与转录组数据库 InsectBase 2.0 获取的红火蚁全基因组数据 (登录号: IBG_00711) 为研究对象 (Mei *et al.*, 2022)。基于 Pfam 蛋白家族数据库 (<https://pfam-legacy.xfam.org/>) 中的 Serpin 基因家族蛋白 (登录号: PF00079) 的隐马尔可夫模型,使用 HMMER 3.3 软件从红火蚁基因组蛋白数据中搜索获取候选的 Serpin 蛋白序列,选取其中可信度较高的 ($E\text{-value} < 1e^{-20}$) 的序列作为候选序列。将获得的候选序列,提交到 NCBI-CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/>) 数据库中分析保守结构,并人工剔除不包含完整 Serpin 结构域的蛋白序列,得到最终的红火蚁 Serpin 基因家族成员。

1.3 红火蚁 Serpin 基因家族蛋白理化性质预测

采用在线工具 ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析红火蚁 Serpin 基因家族蛋白氨基酸数量、分子量大小、等电点和不稳定系数。

1.4 红火蚁 Serpin 基因家族系统进化树构建

从 UniProt (<https://www.uniprot.org/>) 蛋白质数据库中下载果蝇 *Drosophila melanogaster*、家蚕 *Bombyx mori*、烟草天蛾 *Manduca sexta*、黄粉虫

Tenebrio molitor、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 的 Serpin 蛋白序列,利用 MEGAX 软件的 ClustalW 算法进行多序列比对,基于比对结构采用邻接法构建系统进化树,遗传距离模型采用 JTT 模型,bootstrap 设置为 1 000,其他参数默认。使用在线工具 Evolview v3 (<https://www.evolgenius.info/evolview/>) 美化进化树 (Subramanian *et al.*, 2019)。

1.5 红火蚁 Serpin 基因染色体定位和共线性分析

从 InsectBase 2.0 数据库获取红火蚁的基因结构文件,运用 TBtools 软件绘制红火蚁 Serpin 基因家族染色体定位图 (Chen *et al.*, 2020)。从 InsectBase 2.0 数据库中收集蜜蜂科的东方蜜蜂 *Apis cerana* (登录号: IBG_00079)、蚁科的斯氏林蚁 *Formica selysi* (登录号: IBG_00394) 物种的基因组信息,运用 BLASTP 软件搜索红火蚁物种内与物种间的同源基因,再使用 MCScanX 软件检索红火蚁种内与种间的共线性基因对,将位于同一条染色体上中间相隔长度小于 100 kb 的同源基因被认定为串联重复基因 (Wang *et al.*, 2012)。

1.6 红火蚁 Serpin 基因家族基因结构分析

运用实验室内部 R 脚本分析红火蚁基因结构文件,找出外显子与 CDS 区的位置与长度,最后使用 IBS 软件绘制红火蚁 Serpin 家族基因结构图 (Liu *et al.*, 2015)。

1.7 红火蚁 Serpin 基因家族的保守结构与保守基序分析

将红火蚁 Serpin 基因家族序列提交到 NCBI-CDD 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/>) 分析 Serpin 基因家族中保守的 Serpin 结构域与 RCL 环位置,并使用 Evolview v3 工具可视化。利用 MEME 软件分析红火蚁 Serpin 基因家族蛋白序列的保守基序 (motif),参数设置如下:氨基酸长度为 6 ~ 50,基序的重复数量任意,基序发现数量阈值为 10 (Bailey *et al.*, 2006)。

1.8 金龟子绿僵菌对红火蚁的侵染

挑选大型和小型两种体型的红火蚁工蚁,用红火蚁工蚁头壳宽 (head capsule width, HW) 衡量工蚁体型大小,并依此区分工蚁类型, (小型工蚁: $HW \leq 0.595 \text{ mm}$; 大型工蚁: $HW > 1.000 \text{ mm}$) (Porter and Tschinkel, 1985)。采用浸渍法接种。

将红火蚁放入 1×10^7 孢子/mL 孢子悬浮液中浸泡 3~5 s, 之后取出并放置在湿润滤纸上, 一起移入内有 10% 蔗糖水的离心管的干净注塑杯内, 杯子内壁刷上滑石粉防止逃逸。采用来源于 3 个不同巢穴的红火蚁工蚁作为 3 个生物学重复, 每个重复处理 200 头。在气温 25℃、相对湿度为 85% 的培养箱中培养, 处理后在 0、6、24、48 和 72 h 时取样, 每个样品随机取整虫 10 头。

1.9 RNA 的提取与 cDNA 的合成

收集绿僵菌侵染的红火蚁整虫虫体, 利用 Trizol 法提取以上样品的总 RNA, 样品通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性, 并使用美国赛默飞公司 NanoDrop One 型微量紫外分光光度计, 对 RNA 样品进行纯度与污染分析, OD_{260}/OD_{280} 值在 1.8~2.0 之间的 RNA 样品即为无蛋白污染的合格样品。合格的 RNA 样品利用 EZBioscience 公司的 Color Reverse Transcription Kit (with gDNA Remover) 反转录试剂盒反转录成 cDNA 第一链, 置于 -20℃ 保存。

1.10 荧光定量 PCR 检测红火蚁 Serpin 基因家族表达模式

使用 Primer 6 软件设计根据红火蚁 Serpin 基因家族 CDS 序列设计荧光定量引物 (表 1), 引物由擎科 (广州) 生物公司合成, 并运用在线工具 Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) 检测引物特异性。荧光定量 PCR 反应使用 Takara 公司 TB Green Premix Ex Taq II 试剂盒进行。反应体系为 TB Green Premix Ex Taq II 12.5 μ L、cDNA 模板 1.0 μ L、上下游引物各 1.0 μ L、无酶水补足至 25 μ L, 反应程序为: 95℃ 变性 30 s, 95℃ 5 s、60℃ 30 s 条件下进行 40 个循环, 每一个体系设置 3 个技术重复。*RPL18* 基因作为内参基因, 0 h 样本设为对照组, 根据 C_t 值采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因的相对表达水平。

1.11 数据统计与分析

实验数据的分析、处理采用软件 IBM SPSS Statistic 25 和 GraphPad Prism 8。计算平均值和标准误, 采用单因素方差分析检测红火蚁 Serpin 基因在不同时间点表达量是否存在统计学差异, 在进行方差分析前计算数据是否符合正态分布且方差齐性, 单因素方差分析后的多重比较采用 LSD 检验, 采用 t 检验检测两种体型红火蚁的 Serpin 基因在相同时间点表达量是否存在统计学差异, 差异显著性水平均为 $P < 0.05$ 。

表 1 实验所用的引物

Table 1 Primers used in the experiment

基因名称	引物名称	序列 (5'-3')
Gene name	Primer name	Primer sequences (5'-3')
<i>SiSerp4</i>	SiSerp4F	GCCGGTTATGAGCCTAGCAT
	SiSerp4R	GCTCGAGACGATCCAGAGTG
<i>SiSerp7</i>	SiSerp7F	GTTCCACGCCAATCATCCATTCT
	SiSerp7R	CCAGTAGTTCAGACGCACTC
<i>SiSerp12</i>	SiSerp12F	AGCAGAAGGAGACGGCAGAG
	SiSerp12R	AGCACTTCGTTGGCGTACAG
<i>SiSerp13-1</i>	SiSerp13-1F	CTGGAGCCGAAAGGTAATGTCT
	SiSerp13-1R	CGTCCGCAGGAATGTAGAGG
<i>SiSerp13-2</i>	SiSerp13-2F	ATCCCGAGAGAGGAAGGAAGTT
	SiSerp13-2R	TTGCCGTCTAATTCACCATTCG
<i>SiSerp13-3</i>	SiSerp13-3F	GTTGAGGAACCTACGCCACTTG
	SiSerp13-3R	TCGCCGTTGCTATGACACTATT
<i>SiSerp13-4</i>	SiSerp13-4F	GTATCGAGGTCACGGAAGAAGG
	SiSerp13-4R	AGGTAGACGAACGGATGATTGG
<i>RPL18</i>	RPL18F	TTTACGGCTCCTCGTCAAGC
	RPL18FR	ACGCAATTCTCCCTTCCAGG

2 结果与分析

2.1 红火蚁 Serpin 基因家族的鉴定与分析

通过 HMMER 软件, 基于 pfam 数据库 Serpin 基因家族蛋白的隐马尔科夫模型, 从红火蚁全基因组中检索到 8 个候选 Serpin 基因家族成员, 将序列提交至 NCBI-CDD 数据库中, 人工去除不包含完整 Serpin 结构域的蛋白序列, 最终鉴定得到 7 个红火蚁 Serpin 基因。根据基因在染色体中的定位将其分别命名为 *SiSerp4*、*SiSerp7*、*SiSerp12*、*SiSerp13-1*、*SiSerp13-2*、*SiSerp13-3* 和 *SiSerp13-4* (表 2), 对这些基因的基因长度、CDS 长度、氨基酸序列长度、分子量、等电点、不稳定系数等进行预测与分析。结果表明, 红火蚁 Serpin 家族基因基因大小介于 4 330~11 124 bp 之间, CDS 序列长度介于 1 113~5 370 bp 之间, 编码的最长转录本蛋白最短含有 370 aa, 最长含有 1 789 aa; 分子量大小范围为 43.46~193.58 kDa; 等电点范围为 5.13~9.25, *SiSerp4*、*SiSerp7*、

SiSerp13-1 和 SiSerp13-4 为酸性蛋白, SiSerp12、SiSerp13-2 和 SiSerp13-3 为碱性蛋白; 除 SiSerp13-1 为稳定蛋白外, 其他 Serpin 蛋白不稳定系数大于 40, 为不稳定蛋白。红火蚁 Serpin 基因家族蛋白理化性质具有多样性, 这暗示红火蚁 Serpin 基因家族蛋白功能的多样性。

表 2 红火蚁 Serpin 基因家族成员序列特征
Table 2 Sequence characteristics of the Serpin family members in *Solenopsis invicta*

基因名称 Gene name	基因 ID Gene ID	基因长度 (bp) Gene length	CDS 长度 (bp) CDS length	氨基酸 (aa) Amino acid	分子量 (kDa) Molecular weight	等电点 Isoelectric point	不稳定系数 Instability index
<i>SiSerp4</i>	LOC105200371	8 853	5 370	1 789	193. 58	6. 81	44. 93
<i>SiSerp7</i>	LOC105203897	11 124	2 520	839	94. 09	6. 11	43. 01
<i>SiSerp12</i>	LOC105199370	10 239	2 487	828	92. 09	9. 25	47. 17
<i>SiSerp13-1</i>	LOC105199563	4 896	1 173	390	44. 57	5. 13	32. 78
<i>SiSerp13-2</i>	LOC105193420	4 498	1 113	370	43. 46	9. 10	42. 33
<i>SiSerp13-3</i>	LOC105199561	4 330	1 245	414	47. 95	7. 51	48. 21
<i>SiSerp13-4</i>	LOC105199560	6 400	1 344	447	50. 18	5. 85	42. 06

2.2 红火蚁 Serpin 基因家族系统进化分析

为了明确红火蚁 Serpin 基因家族各个成员蛋白的进化关系, 使用 MEGAX 软件, 对来源自红火蚁、果蝇、家蚕、烟草天蛾、黄粉虫、冈比亚按蚊 6 个全变态昆虫的 Serpin 蛋白进行系统发育分析, 构建系统进化树 (图 1)。根据系统进化树分支, 可将 71 条蛋白序列分为 4 个亚群 (Group1 ~ 4), 红火蚁的 7 个 Serpin 蛋白分布于其中的 3 个亚群当中, 其中 Group1 最多, 包括 *SiSerp13-1*、*SiSerp13-2*、*SiSerp13-3*、*SiSerp13-4* 和 *SiSerp4*, *SiSerp12* 属于 Group2, *SiSerp7* 属于 Group4, 不同的亚群可能行使着不同的生物学功能。

2.3 红火蚁 Serpin 家族基因的染色体定位和基因共线性分析

基于红火蚁基因结构注释文件, 使用 TBtools 软件绘制红火蚁 Serpin 基因家族成员在染色体上的分布图 (图 2), 7 个 Serpin 基因分布在 4 条染色体上, 其中 13 号染色体上分布有 4 个 Serpin 基因, *SiSerp13-1*、*SiSerp13-2*、*SiSerp13-3* 和 *SiSerp13-4* 4 个基因紧密相连分布在 13 号染色体上, 4 号、7 号、12 号染色体各分布有一个 Serpin 基因。串联重复 (Tandem duplication) 和片段重复 (Segmental duplication) 是基因家族扩张的两种主要方式, 是基因组进化过程中的重要最动力, 本研究运用 McscanX 软件分析了红火蚁 Serpin 基因的串联重复和片段重复事件, 红火蚁 Serpin 基因家族中没有鉴定出片段重复事件, 但鉴定出

一组串联重复事件, 这说明串联重复事件是红火蚁 Serpin 基因家族成员数量扩增的主要方式。此外, 为了探究红火蚁 Serpin 基因在物种间的共线性关系, 选取与红火蚁同为蚁科的斯氏林蚁和蜜蜂科的东方蜜蜂, 运用 MCscanX 软件进行物种间的共线性分析、TBtools 可视化, 结果如图 3 所示。红火蚁与其同科的斯氏林蚁具有 4 对共线性基因, 涵括了分布在红火蚁 4 条染色体上的 Serpin 基因家族成员, 分别为 *SiSerp4*、*SiSerp7*、*SiSerp12* 和 *SiSerp13-1*, 而在红火蚁中只找到 2 个与东方蜜蜂有共线性关系的基因, 分别是 *SiSerp12* 和 *SiSerp13-1*, 这表明 *SiSerp12* 和 *SiSerp13-1* 两个基因在蜜蜂科与蚁科共同祖先分化前就已存在, 进化上较为保守。

2.4 红火蚁 Serpin 家族基因基因结构

根据红火蚁基因组基因结构注释文件, 确定其最长转录本内含子和外显子的组成, 绘制红火蚁 Serpin 基因结构图 (图 4), 由图可知, 红火蚁 Serpin 基因均含有内含子, *SiSerp7* 基因结构较为复杂, 具有 15 个外显子, 系统发育树中同在 Group1 的 *SiSerp4*、*SiSerp13-1*、*SiSerp13-2*、*SiSerp13-3* 和 *SiSerp13-4* 的基因结构相对简单, 由 4 ~ 5 个外显子组成。*SiSerp7*、*SiSerp12* 和 *SiSerp13-1* 3 个基因基因定位在染色体的正链上, 而 *SiSerp13-2*、*SiSerp13-3* 和 *SiSerp13-4* 4 个基因则定位于染色体的负链上。

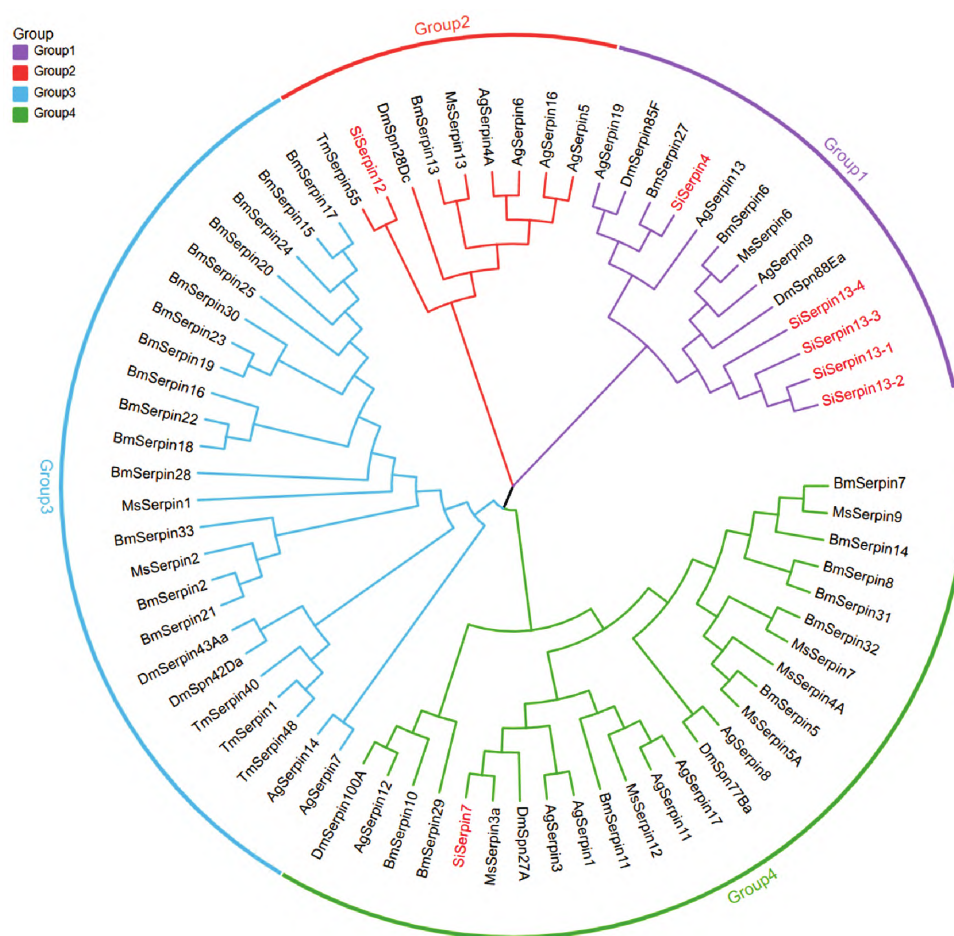


图1 红火蚁、果蝇、家蚕、烟草天蛾、黄粉虫、冈比亚按蚊 Serpin 蛋白系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic analysis of Serpin gene family from *Solenopsis invicta*, *Drosophila melanogaster*, *Bombyx mori*, *Manduca sexta*, *Tenebrio molitor*, *Anopheles gambiae*

注: Si, 红火蚁; Dm, 果蝇; Bm, 家蚕; Dm, 烟草天蛾; Tm, 黄粉虫; Ag, 冈比亚按蚊。Note: Si, *Solenopsis invicta*; Dm, *Drosophila melanogaster*; Bm, *Bombyx mori*; Dm, *Manduca sexta*; Tm, *Tenebrio molitor*; Ag, *Anopheles gambiae*.

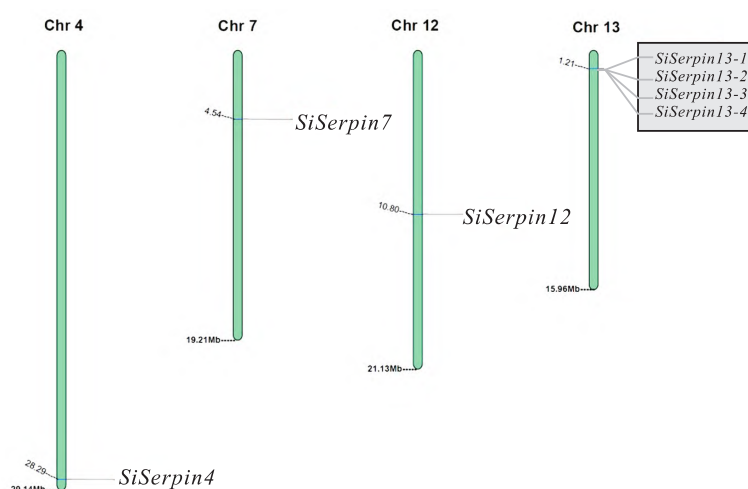


图2 红火蚁 Serpin 基因家族各成员的染色体定位图

Fig. 2 Chromosome mapping of members of Serpin gene family in *Solenopsis invicta*

注: 蓝色方框中为串联重复基因。Note: Tandem duplication genes in blue box.

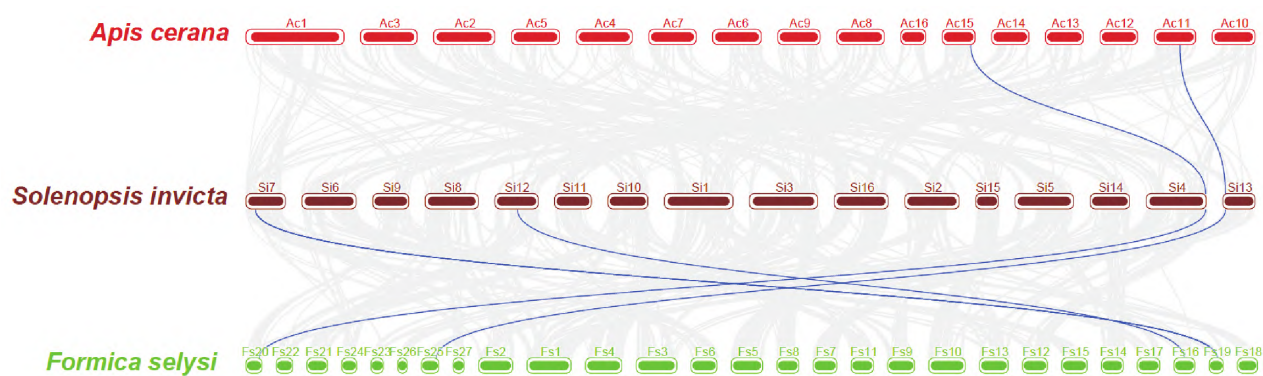


图3 红火蚁、斯氏林蚁、东方蜜蜂的 Serpin 基因家族共线性分析

Fig. 3 Collinearity analysis of Serpin gene families in *Solenopsis invicta*, *Formica selysi* and *Apis cerana*

2.5 红火蚁 Serpin 家族基因保守结构域与 Motif 分析

典型的 Serpin 蛋白结构上带有明显外伸的反应中心环 RCL，RCL 环是 Sepins 蛋白的活性区域，在结合与改变靶标蛋白的构象过程中起着重要的作用。对红火蚁 Serpin 基因家族成员蛋白做保守结构域分析（图 5），发现所有的 Serpin 蛋白都至少包含一个 RCL 环，其中 SiSerpin7 蛋白含有两个 RCL 环和两个 Serpin 结构域，而 SiSerpin12 蛋白的 Serpin 结构域分为两部分，推测这两个蛋白功能上

存在特异性。motif 一般认为它是拥有生物学功能的保守序列，可能包含特异性的结合位点，或者是涉及某一个特定生物学过程的有共性的序列区段。在 7 个红火蚁 Serpin 蛋白中搜索 motif，在所有的 10 个 motif 中，motif2、motif3、motif5 和 motif6 在所有的红火蚁 Serpin 蛋白中存在的，这表明 4 个保守的 motif 可能是 Serpin 蛋白发挥功能所必需的。此外，不同的 Serpin 蛋白拥有多样化的 motif 组成，这些多样化的 motif 暗示了红火蚁 Serpin 蛋白功能上的多样性。

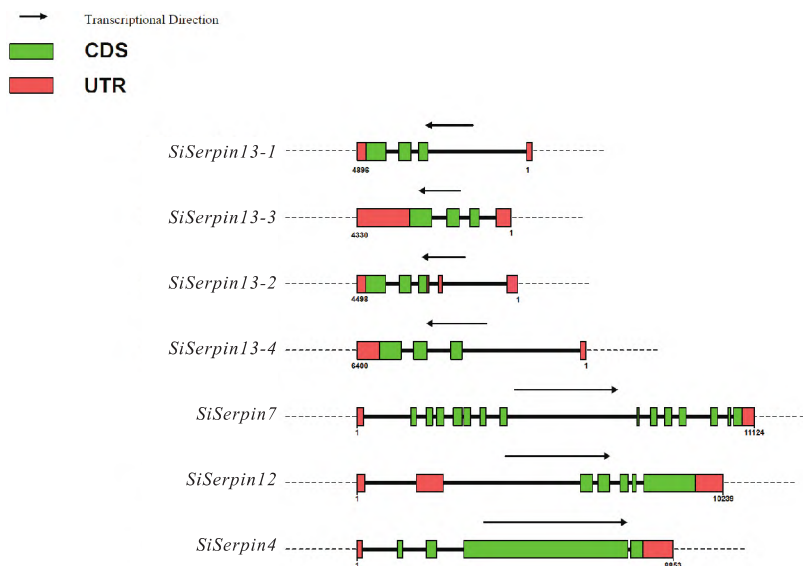


图4 红火蚁 Serpin 基因家族基因结构

Fig. 4 Serpin gene family gene structure of *Solenopsis invicta*

注：图中箭头表示转录方向，箭头向左表示基因在染色体负链上，箭头向右代表染色体在正链上。Note: Arrows in the figure indicated the transcriptional direction, arrows to the left indicated that the gene was on the reverse strand of chromosome, and arrows to the right indicated that the gene was on the forward strand of chromosome.

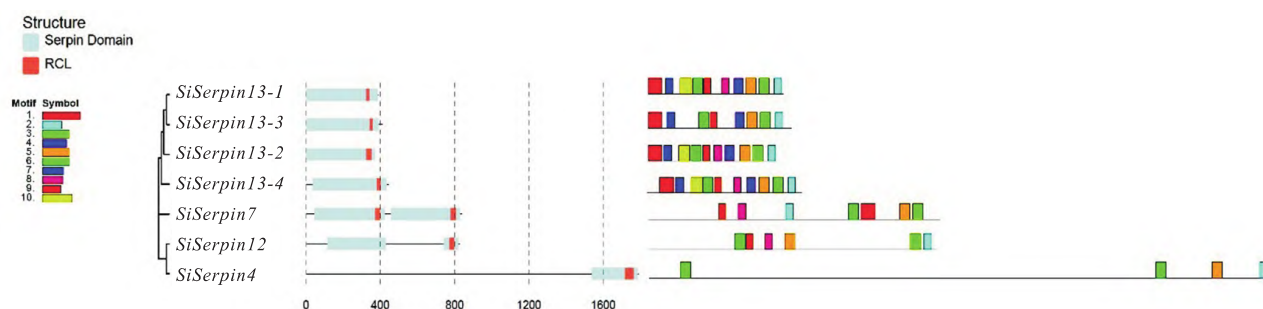


图5 红火蚁 Serpin 家族基因的保守结构域和保守基序分析

Fig. 5 Serpin gene family conserved domains and protein motif of *Solenopsis invicta*

2.6 红火蚁 Serpin 基因家族表达模式分析

为了研究 Serpin 基因家族在红火蚁受绿僵菌侵染后的表达模式。以绿僵菌处理红火蚁两种体型的工蚁（大型工蚁和小型工蚁），在处理 0、6、24、48 和 72 h 收集样品。RT-qPCR 检测两种体型的工蚁在绿僵菌下的诱导表达模式（图 6）。结果表明，红火蚁 Serpin 家族基因可以响应绿僵菌的侵染，且在不同体型的工蚁中有着不同表达模式（图 6-A ~ F）。在绿僵菌侵染 6 h 后，除 *SiSerp7*，其他的 Serpin 基因的表达在大、小两种体型的红火蚁中均存在显著差异，且 *SiSerp4*、*SiSerp12*、*SiSerp13-1*、*SiSerp13-2*、*SiSerp13-3* 和 *SiSerp13-4* 在小型工蚁中的表达显著高于大型工蚁（图 6-A、C、D、E、F、G）。在大型工蚁中，*SiSerp4*、*SiSerp7*、*SiSerp12*、*SiSerp13-1*、*SiSerp13-2* 和 *SiSerp13-3* 基因在 48 h 时能被绿僵菌诱导表达，其中 *SiSerp12* 对绿僵菌的诱导最为敏感，在 24 h 后每个时间点的表达量均为对照组的 3 倍以上。在小型工蚁中，在 6 h 时绿僵菌会显著诱导 *SiSerp4*、*SiSerp13-1*、*SiSerp13-2*、*SiSerp13-3* 和 *Serp13-4* 的表达，其中 *SiSerp13-2*、*SiSerp13-3* 和 *Serp13-4* 在 6 h 时达到诱导上调高峰（图 6-E、F、G）。在两种体型的红火蚁中，只有 *SiSerp7* 表达模式相似，大型工蚁 Serpin 至少在 24 h 后才会被绿僵菌诱导表达，小型工蚁 Serpin 最早在 6 h 后就能被绿僵菌诱导表达。绿僵菌侵染 72 h 后，*SiSerp4*、*SiSerp12*、*SiSerp13-1*、*SiSerp13-2* 和 *SiSerp13-3* 在小型工蚁中的表达显著高于大型工蚁。相比于大型工蚁，小型工蚁的 Serpin 基因对绿僵菌的诱导更为敏感。

3 结论与讨论

Serpins 是一类结构保守而功能多样的蛋白酶抑制剂超家族，存在于植物、动物、细菌及微生物等几乎所有的生命形式中（Irving *et al.*, 2000）。近年来，随着组学和生物信息学技术的快速发展，大量的 Serpin 基因被成功检测和鉴定。目前，已经有超过 1500 种 Serpins 被鉴定出来（Irving *et al.*, 2000; Law *et al.*, 2006），如人类 *Homo sapiens* 中有 36 个（Law *et al.*, 2006）、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中有 13 个（Law *et al.*, 2006）、拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 中有 29 个（Law *et al.*, 2006）、秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 中有 9 个（Law *et al.*, 2006）、家蚕 *Bombyx mori* 中有 34 个（Zou *et al.*, 2009）、小菜蛾 *Plutella xylostella* 中有 28 个（Shakeel *et al.*, 2019）、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 中有 22 个（Xiong *et al.*, 2015）。本研究从红火蚁中鉴定出 7 个 Serpin 基因家族成员，分别为 *SiSerp4*、*SiSerp7*、*SiSerp12*、*SiSerp13-1*、*SiSerp13-2*、*SiSerp13-3* 和 *SiSerp13-4*。红火蚁 Serpin 家族相对于其他昆虫较少，这可能与红火蚁 Serpin 基因家族的扩张只依靠串联重复事件有关。红火蚁 7 个基因家族成员所编码的蛋白质在序列长度、等电点和分子量等方面均存在差异，这也符合 Serpin 基因家族功能上高度分化的特点。在所有的红火蚁 Serpin 基因家族蛋白中，都预测到 RCL 环的存在，RCL 环是 Serpins 蛋白的活性区域，在结合与改变靶标蛋白的构象过程中起着重要的作用（周诗敏等，2021）。其中 *SiSerp7* 含有两个 Serpin domain，黄粉虫中也存在这种同时含有两个 Serpin domains 的 Serpin 蛋白 *SPN93*，黄粉虫 *SPN93* 的两

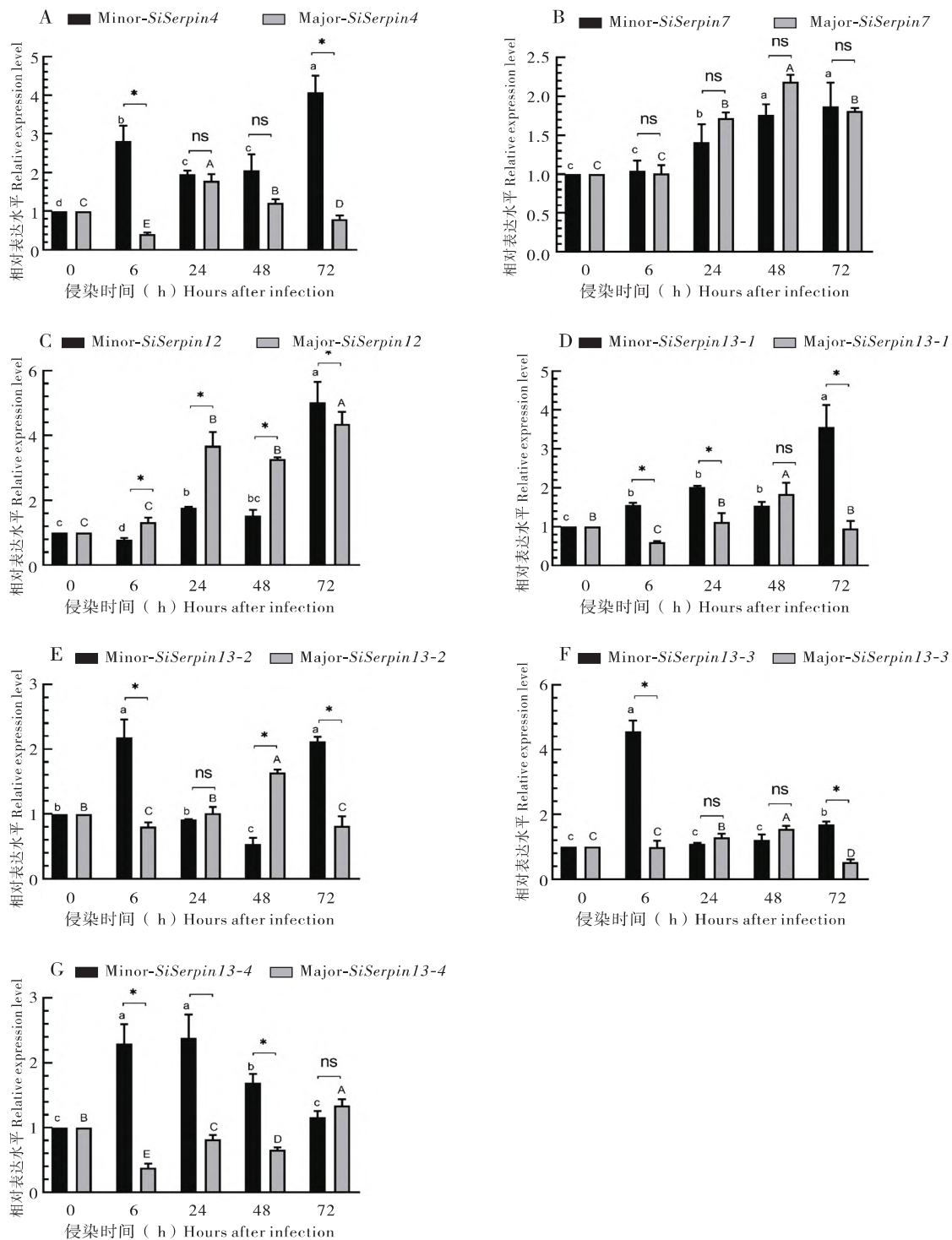


图6 绿僵菌侵染后红火蚁工蚁 Toll 受体家族的表达模式 RT-qPCR 分析

Fig. 6 RT-qPCR analysis mRNA level of Serpin gene family in adult worker ant of *Solenopsis invicta*

注: 红火蚁工蚁 Serpin 基因家族表达模式分析; Minor 代表小型工蚁, Major 代表大型工蚁; 图中数值为平均值 $\pm$ 标准误 ($n=3$), 柱上不同大写字母表示大型工蚁中不同时间点间基因相对表达量差异显著, 不同小写字母表示表示小型工蚁中不同时间点间基因相对表达量差异显著 ($P<0.05$, 单因素方差分析 LSD 检验), 星号 (*) 表示同一时间点大型工蚁和小型工蚁基因相对表达量差异显著; ns 表示无统计学差异 ($P<0.05$, t 检验)。Note: Analysis of Serpin gene family expression pattern in worker ant of *S. invicta*; Minor represented small workers, Major represented large workers; Values in the figure were Mean $\pm$ SE ($n=3$). Different capital letters on the column indicated significant differences in the relative gene expression levels of large worker ants at different time points, different lowercase letters indicated significant differences in the relative gene expression levels of small worker ants at different time points ($P<0.05$, one way ANOVA, LSD test), asterisk (*) indicated significant difference in relative gene expression between large and small worker ants at the same time point; ns indicated no statistical difference ($P<0.05$, t-test).

个 Serpin domains 可以分别作用于 Toll 通路上两个的蛋白, 推测 *SiSerp7* 的两个结构域也有着不同的靶蛋白 (Jiang *et al.*, 2011)。基因结构分析显示, 红火蚁所有的 Serpin 基因家族成员均含有内含子, 同处于 Group1 亚群的 5 个基因的基因结构较为简单, 而分别位于 Group2 和 Group4 的两个家族成员基因结构较为复杂, 导致这种基因结构差异可能在进化过程中发生中外显子和内含子的缺失或插入等变异, 而这种基因结构的差异性在进化过程中发挥了重要的作用 (Xu *et al.*, 2012)。

通过构建系统进化树, 可对未知蛋白的功能进行预测。本研究对红火蚁、果蝇、家蚕、烟草天蛾、黄粉虫、冈比亚按蚊中的 71 条 Serpin 基因家族蛋白序列, 采用邻接法构建红火蚁 Serpin 系统进化树, 结果显示 *SiSerp7* 与烟草天蛾的 *Serp3a* 亲缘关系最近, 而烟草天蛾 *Serp3a* 蛋白被证明负调控 PPO 途径, 高效调控其黑化反应 (Zhu *et al.*, 2003); *SiSerp12* 与黄粉虫 *Serp55* 亲缘关系最近, 而黄粉虫 *Serp55* 可以结合 Toll 通路上的丝氨酸蛋白酶 SAE (Spatzle-processing enzyme-activating enzyme) 从而负调控 Toll 信号通路且可同时抑制了 PPO 的切割激活 (Jiang *et al.*, 2009); 而与 *SiSerp13-1*、*SiSerp13-2*、*SiSerp13-3*、*SiSerp13-4* 4 个基因分在同一支的烟草天蛾 *Serp6* 可以抑制 PPO 途径中的 PAP-3 蛋白 (Zou *et al.*, 2005); *SiSerp4* 与 *BmSerp27* 分在同一支, 而 *BmSerp27* 被证明能被大肠杆菌 *Escherichia coli* 显著诱导 (Zou *et al.*, 2009)。红火蚁 Serpin 家族与其他昆虫同源性较高, 而红火蚁 Serpin 蛋白是否具有类似功能尚未见报道, 因此该方面也成为本研究后续将开展的研究内容之一。

在昆虫中, Serpin 蛋白广泛参与了免疫反应的调控, 包括重要的免疫通路 Toll 和 PPO 途径调控的黑化反应。Toll 通路主要被革兰氏阳性菌和真菌激活, 诱导抗菌肽等一系列免疫活性物质杀死病原体 (Valanne *et al.*, 2011), PPO 途径激活的黑化反应, 则起到了到隔离并杀死病原体的重要作用, 且 Toll 通路与 PPO 途径之间存在一定的联系 (An *et al.*, 2009)。Serpin 蛋白在昆虫的免疫调控存在以下几种功能: (1) Serpins 通过抑制 PPO 途径中的丝氨酸蛋白酶级联反应来调节昆虫先天免疫中抗菌肽的产生, 如烟草天蛾 *Serp1J* 抑制的血淋巴蛋白酶 8 (Hemolymph proteinase 8, HP8) 对 *proSpatle* 的激活, 调控 Toll 通路, 影响抗菌肽的表

达 (An *et al.*, 2011)。(2) Serpins 通过抑制 PPO 途径中丝氨酸蛋白酶级联反应来调节昆虫血淋巴的黑化作用, 如黑腹果蝇的 *Serp27A* 可以抑制酚氧化酶激活酶 PPAE 的活性, 从而负调控黑化反应 (Nappi *et al.*, 2005)。(3) 作为急性期蛋白, 在昆虫受到病原物侵染或损伤时急速上调, 如冈比亚按蚊在受到寄生虫侵染时, 中肠上皮细胞会大量表达 SRPN10 蛋白 (Danielli *et al.*, 2005)。尽管正常情况下 Serpin 基因在昆虫血淋巴中的表达水平并不高, 但当受到免疫刺激时都表现出基因表达水平明显上调的特征。烟草天蛾 *Serp2*、*Serp3* 和 *Serp6* 在幼虫血淋巴中表达量较低, 但在受到病原菌刺激后在血淋巴中高表达 (Zhu *et al.*, 2003; Zou *et al.*, 2005)。柞蚕丝氨酸蛋白酶抑制剂 6 基因 *Apserpin-6* 在经柞蚕肠球菌、白僵菌以及柞蚕核型多角体病毒处理后, 其 mRNA 水平与对照相比明显升高, 暗示 *Apserpin-6* 可能参与柞蚕对病原菌的免疫应激反应 (曾军等, 2017)。昆虫先天性免疫在病原信号的刺激下会迅速启动, 诱导免疫相关基因的表达, 调节机体免疫, 减少由病原菌侵染引起的一系列危害, 进而维护宿主机体内环境的平衡。本研究中, 红火蚁 Serpin 基因家族在绿僵菌侵染后转录水平也出现差异表达 (图 6)。RT-qPCR 结果发现红火蚁 Serpin 基因家族 *SiSerp4*、*SiSerp7*、*SiSerp12*、*SiSerp13-1*、*SiSerp13-2* 和 *SiSerp13-4* 都能响应绿僵菌的侵染, 且两种体型的工蚁相应程度不一致。在大型工蚁中, *SiSerp4*、*SiSerp13-1*、*SiSerp13-2* 和 *SiSerp13-4* 在绿僵菌侵染早期表达受到抑制 (图 6-A、D、E、G), 大型工蚁 Serpin 至少在 24 h 时才会被绿僵菌诱导上调表达, 除了 *SiSerp13-2*, 其他基因表达量在绿僵菌侵染后总体呈现上升趋势 (图 6-A ~ F)。在小型工蚁中, 绿僵菌会显著诱导 *SiSerp4*、*SiSerp13-1*、*SiSerp13-2*、*SiSerp13-3* 和 *SiSerp13-4* 的转录, 且 *SiSerp13-2*、*SiSerp13-3* 和 *Serp13-4* 在诱导 6 h 后达到表达高峰期 (图 6-E ~ G), *SiSerp4*、*SiSerp7* 和 *SiSerp12*, *SiSerp13-1* 在诱导 72 h 后达到表达高峰期 (图 6-A ~ D)。大型工蚁检测出在绿僵菌侵染早期检测到下调表达的基因在小型工蚁中则检测到激烈的上调表达。大型工蚁中 Serpin 基因表达侵染前期不变或下调而后期的升高的表达模式很可能揭示了它们作为一类免疫负调控蛋白, 在早期下调表达以增强免疫反应, 而后期表达上升以保护昆虫

机体不受过强的免疫反应伤害的作用。这种相反的早期诱导表达模式暗示红火蚁两种体型的工蚁在应对病原物入侵时有着不同的免疫调控模式。

目前,昆虫基因组中包括红火蚁发现的绝大多数 Serpin 基因尚未被鉴定,即使鉴定功能的昆虫 Serpin 蛋白仍是孤儿蛋白 (Orphans),尚未明确与其互作的靶蛋白。目前,对 Serpin 蛋白的研究仍存在着许多的困难,运用传统的生物化学方法难以鉴定非模式昆虫中 Serpin 蛋白及其靶蛋白。不过随着测序技术的快速发展,未来可以运用蛋白质组学技术研究红火蚁 Serpin 蛋白及其靶蛋白,以期构建完整的 Serpin 蛋白互作网络,对 Serpin 蛋白功能进一步探讨。基于此,本研究首次对红火蚁 Serpin 基因家族进行鉴定和响应绿僵菌侵染的表达模式验证。为进一步研究红火蚁与绿僵菌的互作奠定基础,也为利用病原生物对红火蚁进行生物防治奠定理论基础,从而为新型杀虫生物制剂的研发以及杀虫靶标发掘提供材料。

参考文献 (References)

- An C, Ishibashi J, Ragan EJ, *et al.* Functions of *Manduca sexta* hemolymph proteinases HP6 and HP8 in two innate immune pathways [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284 (29): 19716–19726.
- An C, Ragan EJ, Kanost MR. Serpin-4 splicing isoform J inhibits the proSpätzle-activating proteinase HP8 to regulate expression of antimicrobial hemolymph proteins in *Manduca sexta* [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2011, 35 (1): 135–141.
- Bailey TL, Williams N, Misleh C, *et al.* MEME: Discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs [J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34 (suppl_2): W369–W373.
- 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.
- Danielli A, Barillas-Mury C, Kumar S, *et al.* Overexpression and altered nucleocytoplasmic distribution of *Anopheles ovalbumin*-like SRPN10 serpins in *Plasmodium*-infected midgut cells [J]. *Cellular Microbiology*, 2005, 7 (2): 181–190.
- Irving JA, Pike RN, Lesk AM, *et al.* Phylogeny of the serpin superfamily: Implications of patterns of amino acid conservation for structure and function [J]. *Genome Research*, 2000, 10 (12): 1845–1864.
- Jiang H, Kanost MR. The clip-domain family of serine proteinases in arthropods [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2000, 30 (2): 95–105.
- Jiang R, Kim EH, Gong JH, *et al.* Three pairs of protease-serpin complexes cooperatively regulate the insect innate immune responses [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284 (51): 35652–35658.
- Jiang R, Zhang B, Kurokawa K, *et al.* 93-kDa twin-domain serine protease inhibitor (Serpin) has a regulatory function on the beetle Toll proteolytic signaling cascade [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286 (40): 35087–35095.
- Law RHP, Zhang Q, McGowan S, *et al.* An overview of the Serpin superfamily [J]. *Genome Biology*, 2006, 7 (5): 1–11.
- Li XL. Risk and countermeasures of red imported fire ant epidemic in Wuxuan County [J]. *South China Agriculture*, 2020, 14 (24): 15–16. [李旭林. 武宣县农区红火蚁疫情扩散风险及应对措施探讨 [J]. 南方农业, 2020, 14 (24): 15–16]
- Liu W, Xie Y, Ma J, *et al.* IBS: An illustrator for the presentation and visualization of biological sequences [J]. *Bioinformatics*, 2015, 31 (20): 3359–3361.
- 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, 29 (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, 29 (2): 1–6]
- Mei Y, Jing D, Tang S, *et al.* InsectBase 2.0: A comprehensive gene resource for insects [J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50 (D1): D1040–D1045.
- Nappi AJ, Frey F, Carton Y. *Drosophila* serpin 27A is a likely target for immune suppression of the blood cell-mediated melanotic encapsulation response [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2005, 51 (2): 197–205.
- Park DS, Shin SW, Hong SD, *et al.* Immunological detection of serpin in the fall webworm, *Hyphantria cunea* and its inhibitory activity on the prophenoloxidase system [J]. *Molecules and Cells*, 2000, 10 (2): 186–192.
- Porter SD, Tschinkel WR. Fire ant polymorphism: The ergonomics of brood production [J]. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 1985, 16 (4): 323–336.
- Shakeel M, Xu X, De Mandal S, *et al.* Role of serine protease inhibitors in insect-host-pathogen interactions [J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2019, 102 (3): e21556.
- Shin SW, Park SS, Park DS, *et al.* Isolation and characterization of immune-related genes from the fall webworm, *Hyphantria cunea*, using PCR-based differential display and subtractive cloning [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1998, 28 (11): 827–837.
- Subramanian B, Gao S, Lercher MJ, *et al.* Evolview v3: A webserver for visualization, annotation, and management of phylogenetic trees [J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47 (W1): W270–W275.
- Tong Y, Kanost MR. *Manduca sexta* Serpin-4 and Serpin-5 inhibit the prophenol oxidase activation pathway: cDNA cloning, protein expression, and characterization [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280 (15): 14923–14931.
- Valanne S, Wang JH, Rämet M. The *Drosophila* toll signaling pathway [J]. *The Journal of Immunology*, 2011, 186 (2): 649–656.
- Veillard F, Troxler L, Reichhart JM. *Drosophila melanogaster* clip-

- domain serine proteases: Structure, function and regulation [J]. *Biochimie*, 2016, 122: 255–269.
- Wang J, Li H, Cheng Y, *et al.* Feeding dsSerp1 enhanced *Metarhizium anisopliae* insecticidal efficiency against *Locusta migratoria manilensis* [J]. *Agriculture*, 2022, 12 (4): 538.
- Wang LL, Wang H, Xiong Y, *et al.* Advances in the control of crop pests by using entomopathogenic fungi [J]. *Journal of Tropical Biology*, 2022, 13 (3): 309–314. [王露露, 王辉, 熊焰, 等. 虫生真菌防治农作物害虫的研究进展 [J]. 热带生物学报, 2022, 13 (3): 309–314]
- Wang Y, Tang H, DeBarry JD, *et al.* MCSanX: A toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity [J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40 (7): e49–e49.
- Xiong GH, Xing LS, Lin Z, *et al.* High throughput profiling of the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* immunotranscriptome during the fungal and bacterial infections [J]. *BMC Genomics*, 2015, 16 (1): 1–21.
- Xu G, Guo C, Shan H, *et al.* Divergence of duplicate genes in exon-intron structure [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109 (4): 1187–1192.
- Zeng J, Wang GB, Wang DY, *et al.* Cloning and functional analysis of Serine protease inhibitor 6 encoding gene (ApSerp1–6) from *Antheraea pernyi* [J]. *Science of Sericulture*, 2017, 43 (5): 764–772. [曾军, 王国宝, 王德意, 等. 柞蚕丝氨酸蛋白酶抑制剂6基因 ApSerp1–6 的克隆及功能分析 [J]. 蚕业科学, 2017, 43 (5): 764–772]
- Zeng L, Lu YY, He XF, *et al.* Identification of red imported fire ant *Solenopsis invicta* to invade China's mainland and infestation in Wuchuan, Guangdong [J]. *Chinese Bulletin of Entomology*, 2005, 42 (2): 144–148. [曾玲, 陆永跃, 何晓芳, 等. 入侵中国大陆的红火蚁的鉴定及发生为害调查 [J]. 昆虫知识, 2005, 42 (2): 144–148]
- Zhang LS, Zhang ZH, Gao S, *et al.* Application and development of *Metarhizium* biological pesticide [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2006, S1: 141–146. [张礼生, 张泽华, 高松, 等. 绿僵菌生物农药的研制与应用 [J]. 中国生物防治, 2006, S1: 141–146]
- Zhang R, Bi TT, Liu N, *et al.* Evaluation on field control effects of 4 pesticides against *Solenopsis invicta* Buren [J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2022, 10: 65–67, 72. [张睿, 毕婷婷, 刘娜, 等. 4种药剂防治红火蚁田间效果评价 [J]. 现代农业科技, 2022, 10: 65–67, 72]
- Zhao LF, Tao ML, Pan GQ. Advances in serine protease inhibitors (Serp1) superfamily [J]. *Science of Sericulture*, 2016, 42 (3): 532–540. [赵丽芳, 陶美林, 潘国庆. 丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族的研究进展 [J]. 蚕业科学, 2016, 42 (3): 532–540]
- Zhou SM, Gu QJ, Huang JH, *et al.* Advances in research on serine protease inhibitors (Serp1s) and their role in regulating insect immune systems [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2021, 58 (2): 245–255. [周诗敏, 谷启娟, 黄健华, 等. 丝氨酸蛋白酶抑制剂 Serp1s 对昆虫免疫调控作用的研究进展 [J]. 应用昆虫学报, 2021, 58 (2): 245–255]
- Zhu Y, Wang Y, Gorman MJ, *et al.* *Manduca sexta* Serpin-3 regulates prophenoloxidase activation in response to infection by inhibiting prophenoloxidase-activating proteinases [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278 (47): 46556–46564.
- Zou Z, Jiang H. *Manduca sexta* serpin-6 regulates immune serine proteinases PAP-3 and HP8: cDNA cloning, protein expression, inhibition kinetics, and function elucidation [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280 (14): 14341–14348.
- Zou Z, Lopez DL, Kanost MR, *et al.* Comparative analysis of serine protease-related genes in the honey bee genome: Possible involvement in embryonic development and innate immunity [J]. *Insect Molecular Biology*, 2006, 15 (5): 603–614.
- Zou Z, Picheng Z, Weng H, *et al.* A comparative analysis of serpin genes in the silkworm genome [J]. *Genomics*, 2009, 93 (4): 367–375.