

棉铃虫 *HaIIM5AC* 基因通过维持围食膜结构性完整抵御核型多角体病毒侵染*

祝琳^{1, 2**} 高艺升¹ 刘小侠^{1***}

(1. 中国农业大学植物保护学院昆虫学系, 北京 100193; 2. 山东省农业科学院植物保护研究所, 济南 250100)

摘要 【目的】明确棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 感染棉铃虫核型多角体病毒 *H. armigera* nucleopolyhedrovirus (HearNPV) 后显著上调表达的肠粘蛋白基因 *HaIIM5AC* 在抵御病毒侵染过程中的功能。【方法】基于本实验室前期测定的健康及感病棉铃虫幼虫转录组数据, 筛选出 HearNPV 感染后棉铃虫幼虫中显著上调表达的 *HaIIM* 基因, 通过实时荧光定量 PCR (qPCR) 技术分析其在健康和感病 24、48、72 和 96 h 幼虫中肠的表达水平, 利用 dsRNA 注射法干扰感病幼虫的 *HaIIM5AC* 基因, 统计感病幼虫的死亡速率并利用 qPCR 技术检测病毒量, 利用石蜡切片和苏木素伊红染色观察围食膜形态, 探究该基因在抵御 HearNPV 病毒侵染过程中的功能。【结果】比较健康和感病棉铃虫幼虫肠道转录组差异基因, 筛选出感病后 24 及 48 h 表达量均显著上调 ($P < 0.001$) 的肠粘蛋白 *HaIIM5AC* 基因。qPCR 结果表明, 与健康幼虫相比, 感病幼虫中肠 *HaIIM5AC* 表达量在所有时间点均显著上调 (24 hpi: $P < 0.001$; 48 hpi: $P < 0.001$; 72 hpi: $P < 0.01$; 96 hpi: $P < 0.001$)。RNAi 实验结果表明, 注射 ds*HaIIM5AC* 24 和 48 h 后, *HaIIM5AC* 的表达量分别下调 54.72% 和 43.48%。在幼虫中沉默 *HaIIM5AC* 后, 感病幼虫的死亡速率显著加快 ($P < 0.05$), 病毒复制量显著增多 ($P < 0.001$), 中肠围食膜结构明显破损。【结论】*HaIIM5AC* 基因通过维持围食膜完整性来抵御 HearNPV 的侵染, 其在棉铃虫抗病毒感染的物理免疫方面发挥重要作用。

关键词 棉铃虫; 核型多角体病毒; 肠粘蛋白; 围食膜; RNA 干扰

The role of the *HaIIM5AC* gene in resistance to nucleopolyhedrovirus infection in *Helicoverpa armigera*

ZHU Lin^{1, 2**} GAO Yi-Sheng¹ LIU Xiao-Xia^{1***}

(1. Department of Entomology, College of Plant Protection, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

2. Institute of Plant Protection, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China)

Abstract 【Aim】To elucidate the function of the insect intestinal mucin gene *HaIIM5AC* in *Helicoverpa armigera* (the cotton bollworm) during infection by the *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus (HearNPV). 【Methods】Significantly up-regulated *HaIIM* genes post-HearNPV infection were identified based on previously generated transcriptome data from healthy and HearNPV-infected *H. armigera* larvae. The expression level of *HaIIM5AC* in the midgut of healthy and infected larvae (24, 48, 72, 96 h post-infection [hpi]) was analyzed using quantitative real-time PCR (qPCR). RNA interference (RNAi) via dsRNA injection was employed to knock down *HaIIM5AC* expression in infected larvae. Mortality rates of infected larvae were recorded, and viral load was quantified using qPCR to investigate the role of *HaIIM5AC* in defense against HearNPV infection. In addition, paraffin sectioning and hematoxylin-eosin (HE) staining were used to observe peritrophic membrane (PM) morphology. 【Results】Comparative transcriptome analysis of healthy and infected larval midguts found that the *HaIIM5AC* gene had been significantly up-regulated 24 and 48 hpi ($P < 0.001$). Compared to healthy larvae, *HaIIM5AC* expression was significantly up-regulated in the midgut of infected larvae at all time points (24 hpi: $P < 0.001$; 48 hpi: $P <$

*资助项目 Supported project: 北京市自然科学基金 (6232020)

**第一作者 First author, E-mail: 18801066135@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: liuxiaoxia611@cau.edu.cn

收稿日期 Received: 2025-08-12; 接受日期 Accepted: 2025-10-13

0.001; 72 hpi: $P < 0.01$; 96 hpi: $P < 0.001$). RNAi results showed that *HaIIM5AC* expression was reduced by 54.72% and 43.48% 24 and 48 hours after the injection of ds*HaIIM5AC*, respectively. Silencing *HaIIM5AC* resulted in significantly accelerated mortality rates in infected larvae ($P < 0.05$), significantly increased viral replication levels ($P < 0.001$), and obvious structural damage to the PM. **[Conclusion]** The *HaIIM5AC* gene defends against HearNPV infection by maintaining the integrity of the PM, playing a crucial role in the immune response of *H. armigera* to HearNPV infection.

Key words *Helicoverpa armigera*; nucleopolyhedrovirus; insect intestinal *HaIIM*; peritrophic membrane; RNA interference

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 属鳞翅目 Lepidoptera 夜蛾科 Noctuidae, 是一种世界性分布的重大农业害虫 (Wu *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2012; 吴益东等, 2021)。尽管转 Bt 抗虫棉的大面积推广有效控制了棉田棉铃虫的暴发, 但由于棉铃虫寄主范围广且繁殖力强, 近年来在玉米、花生、蔬菜及果树等多种作物上频繁发生 (陆宴辉, 2021; 李耀发等, 2024)。因此, 研发绿色高效的防控手段迫在眉睫。

棉铃虫核型多角体病毒 (*Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus, HearNPV) 是一种专一性感染棉铃虫的杆状病毒, 属双链 DNA 病毒 (秦启联等, 2008; Lefkowitz *et al.*, 2018)。其感染过程起始于病毒包涵体 (Occlusion body, OB) 经口摄入后, 在棉铃虫强碱性的中肠中溶解, 释放出包涵体衍生病毒粒子 (Occlusion-derived virus, ODV)。随后, ODV 突破名为围食膜 (Peritrophic membrane, PM) 的细胞外基质, 才能成功感染中肠上皮细胞 (Wang and Granados, 2000; Bao *et al.*, 2013), 进而扩散至整个虫体, 引发系统性感染, 最终导致虫体液化死亡并释放新病毒粒子 (Blissard and Theilmann, 2018)。HearNPV 对人畜及环境安全, 是极具潜力的生物杀虫剂 (Xu *et al.*, 2014; Haase *et al.*, 2015)。然而, 其实际应用受限于宿主范围窄、致病力有限、潜伏期长及致死速度慢等瓶颈。因此, 深入解析 HearNPV 与宿主的互作机制, 特别是病毒如何突破宿主防御屏障, 对提升其杀虫效率至关重要。

昆虫中肠不仅是营养消化与吸收的主要场所, 也是抵御经口入侵病原的首道防线 (Engel and Moran, 2013)。由中肠细胞分泌形成的 PM 是一层长管状、结构均匀的非细胞薄膜, 作为昆

虫特有的物理屏障, 可分隔肠腔内容物与中肠壁 (相静波等, 2004)。PM 的主要成分为几丁质、蛋白质和多糖 (Peters, 1992), 其致密连续的结构能有效保护肠壁细胞免受机械损伤和病原直接侵染, 显著延缓病原入侵速率 (Dinglasan *et al.*, 2009; Erlandson *et al.*, 2019; Hegedus *et al.*, 2019)。当病原经口进入昆虫肠道后, 首先需要攻击围食膜以利于进一步侵染, 如 BmNPV 病毒感染后的家蚕围食膜结构变松散, 且出现较大孔洞 (刘博, 2012), 而后病原侵染中肠上皮细胞, 进一步触发昆虫的先天免疫反应 (McNeil *et al.*, 2010; Kong *et al.*, 2018)。

昆虫肠粘蛋白 (Insect intestinal *HaIIM*, IIM) 是构成 PM 的核心功能蛋白组分。IIM 具有高度 O-联糖基化的粘蛋白结构域, 可与几丁质紧密结合维持 PM 稳定性, 其糖基化修饰还赋予其优异的抗蛋白酶水解能力 (张晓刚, 2013), 在润滑肠道、保护上皮细胞及抵御病原入侵中发挥核心作用。已有诸多研究支持 IIM 在昆虫免疫防御中的功能。例如, 重金属诱导处理埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 后, 中肠 IIM 表达量显著增加 (Rayms-Keller *et al.*, 2000); 冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 成虫降解血红素的过程中体内会产生一种有毒的亚铁血红素, 其 IIM 与之结合并最终随围食膜代谢排出 (Devenport *et al.*, 2006); 干扰家蚕 *Bombyx mori* 的 *BmIIM2* 基因后, 家蚕对 BmNPV 的抵抗能力显著降低 (夏丹丹, 2015)。尽管 IIM 在维持 PM 结构完整性及抵御病原侵染的作用已被证实, 但其在棉铃虫抵抗专一性病原 HearNPV 感染中的具体功能机制尚不明确。

本研究聚焦棉铃虫 IIM 基因在 HearNPV 感染过程中的功能, 基于健康与感病棉铃虫幼虫肠道转录组数据 (Tian *et al.*, 2023), 筛选出病毒

感染后显著上调表达的 *HaIIM5AC* 基因。利用 RNAi 沉默 *HaIIM5AC* 基因, 比较处理组与对照组幼虫 PM 的结构完整性、感染 HearNPV 后的死亡率变化及病毒复制量水平, 旨在阐明 *HaIIM5AC* 是否通过维持 PM 结构稳定性参与抗病毒免疫防御。本研究将揭示棉铃虫 *HaIIM5AC* 基因在抗 HearNPV 感染中的分子机制, 为深入理解病毒-宿主互作提供新见解, 并为开发靶向昆虫肠道屏障、增强 HearNPV 杀虫效能的策略提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

本研究所用的棉铃虫长期饲养于中国农业大学害虫综合治理实验室, 并且定期从野外采集与之交配保持种群活力。棉铃虫饲养于人工气候箱 (PRX-350C, 宁波赛福实验仪器有限公司, 中国) 中, 温度 (26 ± 1) °C, 相对湿度 $75\% \pm 10\%$, 光周期 14 L : 10 D。初孵幼虫以 3-5 头为一组放于塑料盒中以人工饲料喂养 (Liu *et al.*, 2022); 3-4 龄幼虫时期转为单独饲养直至化蛹, 随后将蛹置于长方形培育盒中培育至成虫羽化。成虫羽化后, 采用 10% 蜂蜜水喂养并使雌雄成虫交配, 培育盒上覆纱布供雌虫产卵。产卵后每日收集卵布置于塑封袋内, 放入人工气候箱中待其孵化。

1.2 棉铃虫感染病毒操作方法

病毒材料: 采用 5×10^9 OBs/mL 的 HearNPV 原液 (河南济源白云实业有限公司, 中国), 加入 ddH₂O 将病毒原液稀释至 2×10^7 OBs/mL。为直观观察棉铃虫是否取食到病毒, 在病毒稀释液中与对照液中均加入 0.2% 的食用绿色染料 (MedChemExpress, 中国)。

染毒方法: 选取 3 龄末期头壳开裂、体型一致的棉铃虫幼虫, 单头放入塑料盒中饥饿处理过夜。次日, 选取已蜕皮至 4 龄初的幼虫进行接毒处理, 感病组饲喂 2.5 μ L 上述 HearNPV 病毒稀释液, 健康对照组则饲喂等体积的含染料

ddH₂O。待幼虫完全取食液滴后, 补充正常人工饲料继续饲养。

1.3 转录组数据分析与 *HaIIM* 基因筛选

本研究利用实验室前期已构建的转录组数据库 (NCBI 登录号: PRJNA856772), 该数据包含健康与 HearNPV 感染后 24 及 48 h 的棉铃虫中肠组织样本 (各处理 3 个生物学重复) (Tian *et al.*, 2023)。基于 FPKM 值, 采用 DESeq2 软件进行差异表达分析, 筛选 $P\text{-adjust} < 0.05$ 且表达量变化倍数 (Fold change) > 1.5 的 *HaIIM* 基因并进行聚类分析。

1.4 棉铃虫中肠 *HaIIM5AC* 表达分析

1.4.1 中肠 RNA 提取 在 PBS 缓冲液 (pH = 7.4) 中解剖 HearNPV 感染后 24、48、72 和 96 h 的健康及感病棉铃虫幼虫中肠, 每个处理时间点解剖 15 头幼虫中肠, 并进行 3 组生物学重复。所取样品立即用液氮速冻, 于 -80 °C 冰箱中保存备用。按照 Trizol Reagent 试剂盒 (Takara, 日本) 说明书进行总 RNA 提取, 使用超微量紫外分光光度计 (Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific, 美国) 和 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的浓度及完整性。

1.4.2 实时荧光定量 PCR 利用 PrimeScript RT reagent kit with gDNA eraser 试剂盒 (Takara) 将总 RNA 反转录为 cDNA。根据转录组序列, 采用 Primer Premier 5.00 软件完成 qPCR 引物的设计, 内参基因选择已报道的 *Ribosomal Protein L32* (*RPL32*) 基因 (Zhang *et al.*, 2018), 所有引物委托擎科生物科技有限公司 (中国) 合成。qPCR 反应使用 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒 (Takara), 在荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad CFX Connect TM Real-Time PCR System, 德国) 上进行。qPCR 反应体系为 cDNA 1 μ L、SYBR Premix Ex Taq 10 μ L、正反向引物各 0.5 μ L、ddH₂O 8 μ L。反应程序为 95 °C 下 30 s; 95 °C 下 5 s、60 °C 下 30 s (共 39 个循环); 65-95 °C 记录熔解曲线。使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法对目的基因的相对表达量进行计算 (Livak and Schmittgen, 2001)。

1.5 *HaIIM5AC* 功能研究

1.5.1 *HaIIM5AC* 的 RNAi 处理 根据 *HaIIM5AC* 基因的开放阅读框序列, 利用 Primer Premier 5.00 软件设计用于扩增 *dsHaIIM5AC* 片段的引物, 以增强绿色荧光蛋白(Enhanced green fluorescent protein, EGFP)基因为对照(表1)。按照 MEGAscript™ T7 Transcription Kit 试剂盒(Thermo Fisher Scientific, 美国)说明书合成 *dsHaIIM5AC* 和 *dsEGFP*, 并将合成的 dsRNA 稀释至 5 000 ng/μL 备用。取健康或感病 24 h 后的棉铃虫 4 龄幼虫, 用毛细注射器从棉铃虫的第 2 腹足处注射 2 μL *dsHaIIM5AC* (实验组) 或 *dsEGFP* (对照组)。注射 24 及 48 h 后, 每个处理各收集 15 头幼虫并解剖中肠组织, 使用 qPCR 检测 RNAi 效率, qPCR 反应体系及程序同 1.4.2 节, 共进行 3 次生物学重复。

1.5.2 死亡速率统计 按照 1.5.1 节的方法向感病 24 h 的 4 龄幼虫注射 *dsHaIIM5AC* 和 *dsEGFP*, 每头棉铃虫单独饲养, 每个处理组至少包含 50 头幼虫, 每隔 12 h 统计一次棉铃虫幼虫的死亡数量, 直至所有幼虫死亡或化蛹。

1.5.3 病毒复制量检测 对感病幼虫进行 *HaIIM5AC* 的 RNAi 处理后, 于注射后 24 及 48 h 收集 4 龄棉铃虫的中肠组织(每个时间点 15 头幼虫, 3 次生物学重复)。以病毒的多角体蛋白(Polyhedrin, poly)作为检测病毒复制量的基因

(表1), 使用 qPCR 检测 *poly* 基因的相对表达量, qPCR 反应体系及程序同 1.4.2 节。

1.5.4 肠道组织石蜡切片及苏木素伊红(HE)染色 取注射 *dsHaIIM5AC* 和 *dsEGFP* 48 h 的健康和感病 4 龄幼虫, 以 4% 多聚甲醛浸泡 72 h 固定虫体。随后将各处理棉铃虫利用梯度乙醇(70%-100%)逐级脱水, 每级 1 h。利用二甲苯进行透明处理, 再经 60 °C 石蜡渗透后对组织进行石蜡包埋。利用切片机将包埋了组织的石蜡块进行切片, 切片厚度约为 5 μm, 将切片置于 40 °C 水浴展平并贴附于防脱载玻片, 后将玻片利用二甲苯进行脱蜡和梯度乙醇水化(100%-70%)处理。按照 H&E 染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司, 中国)说明书进行染色, 在显微镜(CX31-32C02, 奥林巴斯, 日本)下观察并采集图像。

1.6 数据分析

使用 SPSS 22.0 进行数据分析(平均值±标准误), 通过两独立样本均值检验(Independent two-sample *t*-test)比较两组处理的差异显著性(**P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001), 采用对数秩检验(Log-rank/Mantel-cox test)比较生存曲线的差异显著性(**P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001)。使用 Graphpad 9.5.1 软件进行绘图。

表 1 本研究使用的引物信息
Table 1 Summary of primers used in this study

名称 Name	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	用途 Purpose
<i>HaIIM5AC</i> -F	GACACCTTACCAAGCCGACA	qPCR
<i>HaIIM5AC</i> -R	GTTGGTATGGCCGACCTCAA	qPCR
<i>RPL32</i> -F	CATCAATCGGATCGCTATG	qPCR
<i>RPL32</i> -R	CCATTGGGTAGCATGTGAC	qPCR
<i>poly</i> -F	CAAACCGAACCGTTGTTACC	qPCR
<i>poly</i> -R	TGCAAGTTCATAACGGGAC	qPCR
<i>dsHaIIM5AC</i> -F	TAATACGACTCACTATAGGGAGAAGCGCATCCTCGTCTGAAAA	RNAi
<i>dsHaIIM5AC</i> -R	TAATACGACTCACTATAGGGAGAAGCGGGATTGTGGTCGAAAT	RNAi
<i>dsEGFP</i> -F	TAATACGACTCACTATAGGGAGACACAAGTTCAGCGTGTCCG	RNAi
<i>dsEGFP</i> -R	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTTACCTTGATGCCGTTC	RNAi

2 结果与分析

2.1 响应 HearNPV 感染的 *HaIIM* 基因筛选

转录组分析结果表明, HearNPV 病毒感染 24 及 48 h 后, 共有 7 个 *HaIIM* 基因表达量出现显著性变化 ($P < 0.05$), 其中 5 个基因在感病后表达量显著上调 ($P < 0.05$), 2 个基因在感病后表达量显著下调 ($P < 0.05$)。在上调表达的基因中, *HaIIM5AC* 基因在感染后 24 和 48 h 的表达上调幅度最为显著, 分别上调了 1.23 和 4.30 倍 (图 1: A)。qPCR 结果表明, 与健康幼虫相比, *HaIIM5AC* 在感病幼虫中肠的表达量在 24 (2.89 倍) ($P < 0.001$)、48 (2.98 倍) ($P < 0.001$)、72 (2.61 倍) ($P < 0.01$) 和 96 h (3.09 倍) ($P < 0.001$) 均出现显著上调 (图 1: B), 说明 *HaIIM5AC* 响应 HearNPV 感染, 可能参与病毒感染过程。

2.2 *HaIIM5AC* 对感病幼虫死亡速率及病毒复制量的影响

感病棉铃虫经 *dsHaIIM5AC* 注射后 24 及 48 h, *HaIIM5AC* 的表达量分别下调 54.72% 和

43.48% (图 2: A)。死亡速率统计结果表明, 与对照组相比, *dsHaIIM5AC* 处理后感病幼虫死亡率显著加快 ($P < 0.05$), 其半数致死时间 (LT_{50}) 由 6.5 d 缩短为 6.0 d, 死亡风险是对照组的 1.78 倍 (图 2: B)。病毒 *poly* 表达量检测结果表明, 相较于对照组, 注射 *dsHaIIM5AC* 的感病幼虫中肠 *poly* 的表达量在 24 (3.05 倍) ($P < 0.001$) 和 48 h (1.48 倍) ($P < 0.001$) 均出现显著上调 (图 2: C)。

2.3 *HaIIM5AC* 对 PM 完整性的影响

为明确 *HaIIM5AC* 对棉铃虫 PM 完整性的影响, 分别对健康和感病的棉铃虫幼虫进行了 *dsEGFP* 和 *dsHaIIM5AC* 处理, 随后对棉铃虫进行石蜡切片和 HE 染色。结果表明, 健康棉铃虫 PM 结构完整、连续且清晰, 与中肠细胞之间存在明显的外围食空间 (Ectoperitrophic space, es) (图 3: A); 而经 *dsHaIIM5AC* 处理的健康棉铃虫 PM 出现局部破损、结构松散, 且 es 区域面积缩小 (图 3: B), 证明 *HaIIM5AC* 具有维持 PM 完整性的功能。感病棉铃虫 PM 出现损伤,

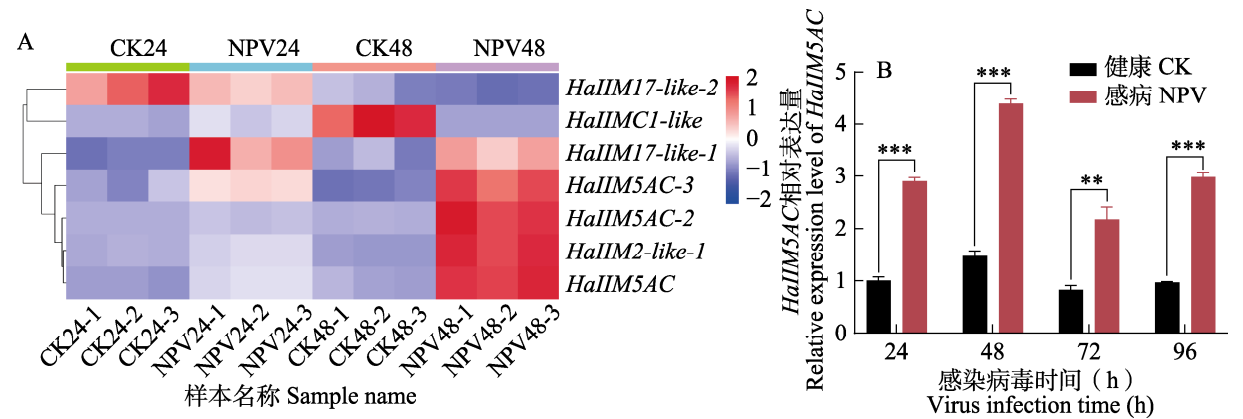


图 1 响应 HearNPV 感染的 *HaIIM* 基因筛选
Fig. 1 Screening of *HaIIM* genes in response to HearNPV infection

A. 健康 (CK) 及感病 (NPV) 24 及 48 h 棉铃虫中肠转录组测序结果中差异表达的 *HaIIM* 基因表达量热图;
B. 感染 HearNPV 不同时间后 *HaIIM5AC* 在健康及染毒棉铃虫中肠的相对表达量。
A. Heatmap of differentially expressed *HaIIM* gene expression levels in the transcriptome sequencing results of healthy (CK) and infected (NPV) *H. armigera* larvae midgut at 24 and 48 h; B. The relative expression level of *HaIIM5AC* in the midgut of healthy and infected *H. armigera* larvae at different time periods of infection with HearNPV.
CK24: 健康 24 h; NPV24: 感病 24 h; CK48: 健康 48 h; NPV48: 感病 48 h; 图中数据为平均值±标准误, 图中星号表示经 *t* 检验两组间差异显著 (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$)。
CK24: Healthy at 24 h; NPV24: Infected at 24 h; CK48: Healthy at 48 h; NPV48: Infected at 48 h; Data in the figure are presented as mean±SE. The asterisks in the figure indicate significant difference between the two groups by *t*-test (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

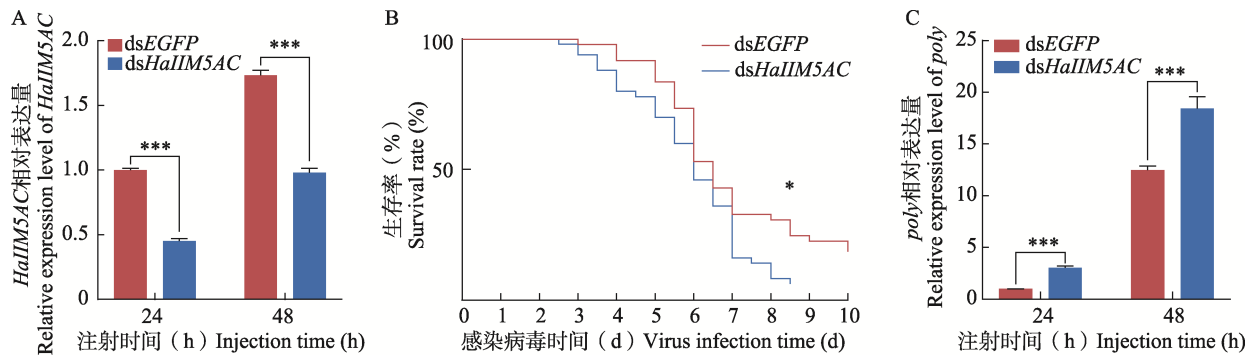


图 2 *HaIIM5AC* 干扰对棉铃虫感病幼虫死亡速率及病毒量的影响

Fig. 2 The effect of *HaIIM5AC* interference on the mortality rate and viral load of infected *Helicoverpa armigera* larvae

A. dsEGFP 和 dsHaIIM5AC 处理 24 及 48 h 的感病幼虫中 *HaIIM5AC* 的相对表达量; B. dsEGFP 和 dsHaIIM5AC 处理的感病幼虫生存率; C. dsEGFP 和 dsHaIIM5AC 处理 24 及 48 h 的感病幼虫中 *poly* 的相对表达量。

A. Relative expression level of *HaIIM5AC* in infected larvae treated with dsEGFP and dsHaIIM5AC for 24 and 48 h; B. Survival rates of infected larvae treated with dsEGFP and dsHaIIM5AC; C. Relative expression level of *poly* in infected larvae treated with dsEGFP and dsHaIIM5AC for 24 and 48 h.

图中数据为平均值±标准误, 图 A 和图 C 中星号表示经 *t* 检验两组间差异显著 (** $P < 0.001$),

图 B 中星号表示经对数秩检验两条生存曲线间差异显著 (* $P < 0.05$)。

Data in the figure are presented as mean±SE. The asterisks in Fig. A and Fig. C indicate significant difference between the two groups after *t*-test (** $P < 0.001$), while the asterisks in Fig. B indicate significant difference between the two survival curves after Log-rank/Mantel-cox test (* $P < 0.05$).

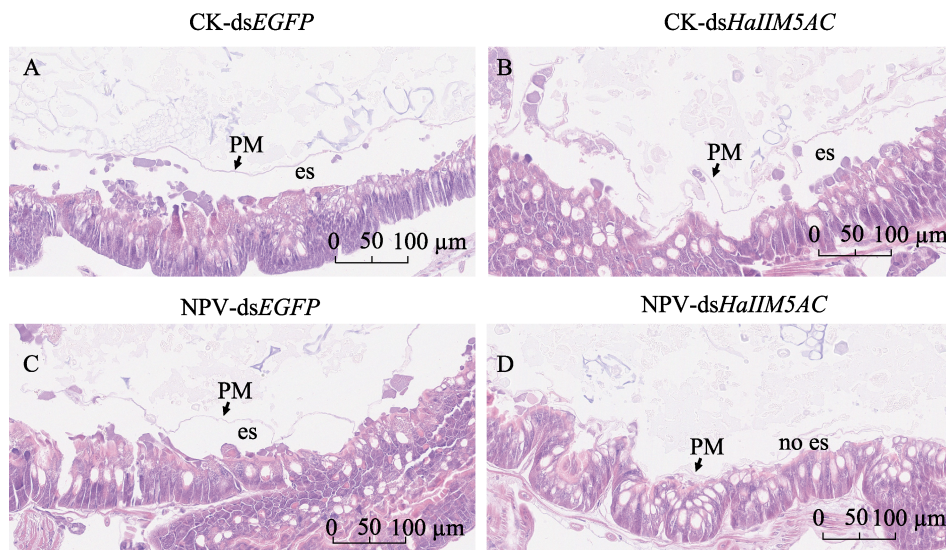


图 3 *HaIIM5AC* 对棉铃虫幼虫围食膜 (Peritrophic membrane, PM) 完整性的影响

Fig. 3 The effect of *HaIIM5AC* on the integrity of the peritrophic membrane (PM) in *Helicoverpa armigera* larvae

A. 经 dsEGFP 处理的健康棉铃虫 (CK) 幼虫横切面苏木素伊红 (Hematoxylin-eosin, HE) 染色照片; B. 经 dsHaIIM5AC 处理的健康棉铃虫幼虫横切面 HE 染色照片; C. 经 dsEGFP 处理的感病棉铃虫 (NPV) 幼虫横切面 HE 染色照片; D. 经 dsHaIIM5AC 处理的感病棉铃虫幼虫横切面 HE 染色照片。

A. Cross-sectional hematoxylin-eosin (HE) staining image of healthy *H. armigera* (CK) larvae treated with dsEGFP; B. Cross-sectional HE staining image of healthy *H. armigera* larva treated with dsHaIIM5AC; C. Cross-sectional HE staining image of infected *H. armigera* (NPV) larva treated with dsEGFP; D. Cross-sectional HE staining image of infected *H. armigera* larva treated with dsHaIIM5AC.

箭头指示 PM; PM: Peritrophic membrane, 围食膜; es: Ectoperitrophic space, 外围食空间; no es: No ectoperitrophic space, 无外围食空间。Arrowheads indicate the PM; PM: Peritrophic membrane; es: Ectoperitrophic space; no es: No ectoperitrophic space.

表现为结构不连续, 部分围食膜与中肠细胞紧密贴合, *es* 区域面积变小(图 3: C), 证明 *HearNPV* 感染破坏围食膜完整性; 经 *dsHaIIM5AC* 处理的感病棉铃虫 *PM* 损伤最严重, 出现大面积断裂, *es* 区域几乎消失(图 3: D), 证明在 *HearNPV* 感染过程中, *HaIIM5AC* 通过维持围食膜完整性来抵御病毒侵袭。

3 结论与讨论

杆状病毒作为环境友好型生物杀虫剂, 其应用仍受限于杀虫速度慢、对高龄幼虫毒力有限等瓶颈 (Moscardi, 1999; Sun *et al.*, 2002)。解决这些问题的关键在于深入理解病毒-宿主互作机制, 特别是病毒突破中肠物理屏障的初始环节。本研究系统揭示了棉铃虫 *HaIIM5AC* 基因通过维持围食膜 (*PM*) 结构完整性在抵御 *HearNPV* 感染中的关键作用, 为杆状病毒-昆虫互作机制提供了新的理论依据。

本研究通过转录组分析和 qPCR 验证, 发现 *HearNPV* 感染可特异性并持续地诱导 *HaIIM5AC* 表达上调, 在感染早期 (24-48 h) 即出现极显著上调, 且在感染后期 (72-96 h) 仍维持较高表达水平。这种持续性的表达模式表明, *HaIIM5AC* 的上调不是简单的应激反应, 而是棉铃虫针对病毒入侵的一种主动防御策略。本研究结果与家蚕感染 *BmNPV* 后围食膜蛋白编码基因表达上调的报道 (夏丹丹, 2015) 以及昆虫在病原压力下强化 *PM* 屏障的普遍策略相呼应 (Hegedus *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2019)。

通过 RNAi 技术获得的实验证据表明, 干扰 *HaIIM5AC* 基因表达可导致围食膜结构完整性破坏、病毒复制加速和宿主死亡加快, 这些结果有力地证明了 *HaIIM5AC* 基因在棉铃虫抵抗 *HearNPV* 感染过程中发挥着不可或缺的保护作用。这一研究结果与在粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 中观察到的因 *IIM* 降解导致的 *PM* 渗透性变化和结构破损的现象高度相似 (Peng *et al.*, 1999), 与在家蚕-*BmNPV* 体系中发现的干扰 *BmIIM2* 降低家蚕抗病毒能力 (夏丹丹, 2015) 以及在小菜蛾 *Plutella xylostella* 中发现的抑制 *HaIIM-like* 基

因降低小菜蛾生存率的结果具有一致性 (Chen *et al.*, 2021)。这些研究共同表明, *IIM* 家族蛋白在维持 *PM* 结构完整性和抵御各类病原入侵中发挥着普遍作用。值得注意的是, 即使在健康幼虫中沉默 *HaIIM5AC* 也会导致围食膜结构损伤, 表明该基因在维持围食膜基础结构中的作用不依赖于病毒感染, 这一发现深化了对昆虫肠粘蛋白功能的认识。

基于本研究的发现, *HaIIM5AC* 及其蛋白产物可作为极具潜力的害虫防控新靶标。与传统广谱杀虫剂不同, 针对 *HaIIM5AC* 设计的 RNA 农药或小分子抑制剂可实现种特异性控制, 显著降低对环境和非靶标生物的影响。同时, 筛选能够特异性干扰 *IIM* 功能的小分子化合物作为病毒增效剂, 与 *HearNPV* 配合使用, 有望突破现有病毒杀虫剂对棉铃虫高龄幼虫效果不佳的技术瓶颈。这些应用方向与传统化学防治相比具有显著的环境友好性, 与现有生物防治手段相比则具有更高的靶向性和效率。

综上所述, 本研究系统阐明了棉铃虫 *HaIIM5AC* 基因通过维持围食膜结构完整性抵御 *HearNPV* 感染的分子机制, 发现 *HearNPV* 病毒感染诱导 *HaIIM5AC* 基因显著上调, 而 *HaIIM5AC* 基因的沉默导致 *PM* 破损、病毒复制量增多, 宿主死亡速率加快, 证明受 *HearNPV* 感染的棉铃虫通过上调 *HaIIM5AC* 基因表达, 从而合成更多 *IIM* 维持 *PM* 结构完整性, 构成抵御 *HearNPV* 经口入侵的关键物理屏障。这些发现为理解病毒-昆虫互作提供了新的理论视角, 也为开发基于宿主因子靶向的新型害虫防控策略奠定了坚实基础。未来的研究应致力于解析其上下游调控网络, 评估其田间应用潜力, 从而为农业害虫的绿色可持续治理提供新的解决方案。

参考文献 (References)

- Bao YY, Chen LB, Wu WJ, Zhao D, Wang Y, Qin X, Zhang CX, 2013. Direct interactions between bidensovirus *BmDNV-Z* proteins and midgut proteins from the virus target *Bombyx mori*. *FEBS Journal*, 280(3): 939–949.

- Blissard GW, Theilmann DA, 2018. Baculovirus entry and egress from insect cells. *Annual Review of Virology*, 5(1): 113–139.
- Chen C, Chen HY, Huang SJ, Jiang TS, Wang CH, Tao Z, He C, Tang QF, Li PJ, 2021. Volatile DMNT directly protects plants against *Plutella xylostella* by disrupting the peritrophic matrix barrier in insect midgut. *eLife*, 10: e63938.
- Devenport M, Alvarenga PH, Shao L, Fujioka H, Bianconi ML, Oliveira PL, Jacobs-Lorena M, 2006. Identification of the *Aedes aegypti* peritrophic matrix protein AeIMUCI as a heme-binding protein. *Biochemistry*, 45(31): 9540–9549.
- Dinglasan RR, Devenport M, Florens L, Johnson JR, McHugh CA, Donnelly-Doman M, Carucci DJ, Yates JR, Jacobs-Lorena M, 2009. The *Anopheles gambiae* adult midgut peritrophic matrix proteome. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39(2): 125–134.
- Engel P, Moran NA, 2013. The gut microbiota of insects-diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5): 699–735.
- Erlandson MA, Toprak U, Hegedus DD, 2019. Role of the peritrophic matrix in insect-pathogen interactions. *Journal of Insect Physiology*, 117: 103894.
- Haase S, Sciocco-Cap A, Romanowski V, 2015. Baculovirus insecticides in Latin America: Historical overview, current status and future perspectives. *Viruses*, 7(5): 2230–2267.
- Hegedus DD, Toprak U, Erlandson M, 2019. Peritrophic matrix formation. *Journal of Insect Physiology*, 117: 103898.
- Kong M, Zuo H, Zhu FF, Hu ZY, Chen L, Yang YH, Lv P, Yao Q, Chen KP, 2018. The interaction between baculoviruses and their insect hosts. *Developmental and Comparative Immunology*, 83: 114–123.
- Lefkowitz EJ, Dempsey DM, Hendrickson RC, Orton RJ, Siddell SG, Smith DB, 2018. Virus taxonomy: The database of the international committee on taxonomy of viruses (ICTV). *Nucleic Acids Research*, 46(D1): D708–D717.
- Li YF, An JJ, Dou YN, Zhang SQ, Dang ZH, Li MY, Yuan WL, Guo JL, Gao ZL, 2024. Population distribution of *Helicoverpa armigera* in different geographical regions of Hebei Province. *Journal of Hebei Agricultural Sciences*, 28(1): 60–65. [李耀发, 安静杰, 窦亚楠, 张尚卿, 党志红, 李明远, 袁文龙, 郭江龙, 高占林, 2024. 河北省不同地理区域的棉铃虫种群分布. 河北农业科学, 28(1): 60–65.]
- Liu B, 2012. BmNPV infection causes peritrophic membrane variety in *Bombyx mori* larvae. Master dissertation. Chongqing: Southwest University. [刘博, 2012. BmNPV 感染对家蚕幼虫中肠围食膜的影响. 硕士学位论文. 重庆: 西南大学.]
- Liu XJ, Cooper AMW, Zhang JZ, Zhu KY, 2019. Biosynthesis, modifications and degradation of chitin in the formation and turnover of peritrophic matrix in insects. *Journal of Insect Physiology*, 114: 109–115.
- Liu XM, Tian ZQ, Cai LM, Shen ZJ, Michaud JP, Zhu L, Yan S, Ros VID, Hoover K, Li Z, Zhang SD, Liu XX, 2022. Baculoviruses hijack the visual perception of their caterpillar hosts to induce climbing behaviour thus promoting virus dispersal. *Molecular Ecology*, 31(9): 2752–2765.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Lu YH, 2021. Ever-evolving advances in the researches of cotton insect pest management in China. *Journal of Plant Protection*, 48(5): 937–939. [陆宴辉, 2021. 与时俱进的中国棉花害虫治理研究. 植物保护学报, 48(5): 937–939.]
- Lu YH, Wu KM, Jiang YY, Guo YY, Desneux N, 2012. Widespread adoption of Bt cotton and insecticide decrease promotes biocontrol services. *Nature*, 487(7407): 362–365.
- McNeil J, Cox-Foster D, Slavicek J, Hoover K, 2010. Contributions of immune responses to developmental resistance in *Lymantria dispar* challenged with baculovirus. *Journal of Insect Physiology*, 56(9): 1167–1177.
- Moscardi F, 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annual Review of Virology*, 44: 257–289.
- Peng JX, Zhong J, Granados RR, 1999. A baculovirus enhancer alters the permeability of a mucosal midgut peritrophic matrix from lepidopteran larvae. *Journal of Insect Physiology*, 45(2): 159–166.
- Peters W, 1992. Peritrophic Membranes. Heidelberg: Springer Berlin. 31–118.
- Qin QL, Cheng QQ, Zheng JF, Chen XZ, Zhang ST, Li X, Miao L, Zhang H, 2008. Production and application of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus bio-pesticides trademarked Keyun on large scale. *Biotechnology Bulletin*, 24(S1): 467–470. [秦启联, 程清泉, 郑建峰, 陈新中, 张松涛, 李瑄, 苗麟, 张寰, 2008. 科云牌棉铃虫核型多角体病毒生物农药的规模化生产和应用. 生物技术通报, 24(S1): 467–470.]
- Rayms-Keller A, McGaw M, Oray C, Carlson JO, Beaty BJ, 2000. Molecular cloning and characterization of a metal responsive

- Aedes aegypti* intestinal mucin cDNA. *Insect Molecular Biology*, 9(4): 419–426.
- Sun XL, Chen XW, Zhang ZX, Wang HL, Bianchi FJJA, Peng HY, Vlak JM, Hu ZH, 2002. Bollworm responses to release of genetically modified *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedroviruses in cotton. *Journal of Invertebrate Pathology*, 81(2): 63–69.
- Tian ZQ, Zhu L, Michaud JP, Zha M, Cheng J, Shen ZJ, Liu XM, Liu XX, 2023. Metabolic reprogramming of *Helicoverpa armigera* larvae by HearNPV facilitates viral replication and host immune suppression. *Molecular Ecology*, 32(5): 1169–1182.
- Wang P, Granados RR, 2000. Calcofluor disrupts the midgut defense system in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30(2): 135–143.
- Wu KM, Lu YH, Feng HQ, Jiang YY, Zhao JZ, 2008. Suppression of cotton bollworm in multiple crops in China in areas with Bt toxin-containing cotton. *Science*, 321(5896): 1676–1678.
- Wu YD, Guan F, Shen HW, Yang YH, 2021. Research progress in the resistance status and molecular resistance mechanisms of the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* to Bt protein Cry1Ac in China. *Journal of Plant Protection*, 48(5): 958–963. [吴益东, 管放, 沈慧雯, 杨亦桦, 2021. 我国棉铃虫对 Bt 蛋白 Cry1Ac 抗性现状及分子机制研究进展. 植物保护学报, 48(5): 958–963.]
- Xia DD, 2015. Characterization of IIM genes in the silkworm, *Bombyx mori*. Master dissertation. Chongqing: Southwest University. [夏丹丹, 2015. 家蚕肠粘蛋白基因的鉴定及功能分析. 硕士学位论文. 重庆: 西南大学.]
- Xiang JB, Liu HX, Wu WJ, 2004. Progress in research on peritrophic membrane of insect. *Entomological Knowledge*, 41(2): 116–122. [相静波, 刘惠霞, 吴文君, 2004. 昆虫围食膜的研究进展. 昆虫知识, 41(2): 116–122.]
- Xu PJ, Liu YQ, Graham RI, Wilson K, Wu KM, 2014. Densovirus is a mutualistic symbiont of a global crop pest (*Helicoverpa armigera*) and protects against a baculovirus and Bt biopesticide. *PLoS Pathogens*, 10(10): e1004490.
- Zhang SD, An SH, Hoover K, Li Z, Li XR, Liu XM, Shen ZJ, Fang HB, Ros VID, Zhang QW, Liu XX, 2018. Host miRNAs are involved in hormonal regulation of HaSNPV-triggered climbing behaviour in *Helicoverpa armigera*. *Molecular Ecology*, 27(2): 459–475.
- Zhang XG, 2013. Biochemical characterization of insect intestinal mucin HaIIM72 from *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). Master dissertation. Baoding: Agriculture University of Hebei. [张晓刚, 2013. 棉铃虫围食膜肠粘蛋白 HaIIM72 生化特性分析. 硕士学位论文. 保定: 河北农业大学.]