

网络出版时间:2018-03-09 17:09

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2018.07.013

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20180309.1708.026.html>

# PrGV 多角体膜蛋白(PEP)的分析

黄海剑<sup>2</sup>, 张宝琴<sup>1,2</sup>

(1 海南大学 热带农林学院, 海南 海口 570228; 2 浙江大学 昆虫科学研究所, 浙江 杭州 310058)

**【摘要】**【目的】对菜粉蝶颗粒体病毒(*Pieris rapae* Granulovirus, PrGV)多角体膜蛋白(polyhedron envelope protein, PEP)进行研究, 为揭示 PEP 的功能及其在病毒生命过程中的作用提供参考。【方法】以 PrGV PEP 为对象, 通过序列分析、原核表达、抗体制备、Western blotting、胶体金免疫定位、实时荧光定量 PCR 等方法初步确认该基因定位和表达时相。【结果】PrGV PEP 与其他鳞翅目昆虫颗粒体病毒的 PEP 同源性达到 50% 左右, 但未在核型多角体病毒(Nucleo polyhedro virus, NPV)中发现同源序列。定量 PCR 分析表明, 菜青虫感染 PrGV 后 24 h 可检测到 PEP 的存在, 随后该基因的表达水平逐渐升高, 并在 72 h 达到峰值。通过 Western blotting 可以在感染 PrGV 的菜青虫体内检测到大小分别为 23 ku 和 15 ku 的清晰条带, 说明制备的多克隆抗体具有较好的特异性。免疫金标记将 PEP 定位于椭圆型的颗粒体, 证明 PEP 是 GV 包涵体的重要组成部分。【结论】PrGV PEP 在颗粒体病毒中较为保守, 可能是 PrGV 晚期表达的重要基因, 参与病毒侵染后期颗粒体结构的形成。

**【关键词】** 菜粉蝶颗粒体病毒; 颗粒体; 晚期基因; 多角体膜蛋白

**【中图分类号】** Q78

**【文献标志码】** A

**【文章编号】** 1671-9387(2018)07-0095-07

## Analysis of polyhedron envelope protein of *Pieris rapae* Granulovirus

HUANG Haijian<sup>2</sup>, ZHANG Baoqin<sup>1,2</sup>

(1 Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China;

2 Institute of Insect Sciences, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058, China)

**Abstract:** 【Objective】This study aimed to investigate the potential roles of polyhedron envelope protein (PEP) in *Pieris rapae* Granulovirus (PrGV). 【Method】The recombinant GST-fused PrGV PEP was expressed in *Escherichia coli* and polyclonal antibody against PEP of PrGV was prepared by immunizing a New Zealand rabbit. The location and expression pattern of PrGV PEP were determined using Western blotting, immunoelectron microscopy, and quantitative real-time PCR. 【Result】PEP of PrGV showed high homology (about 50%) with PEPs of other Lepidoptera GV, but had no homologous sequence with nucleopolyhedro virus (NPV). Quantitative real-time PCR showed that the expression of PrGV PEP was detectable 24 h after viral infection and peaked at 72 h after gradually increase. Western blotting analysis verified the specificity of polyclonal antibody against PrGV PEP, with protein bands at 23 ku and 15 ku. The PEP was located in elliptic type particles and was an important component of inclusion body in GV. 【Conclusion】The PEP of PrGV was conserved among GVs and participated in the formation of granular structure at the late stage of viral infection.

**Key words:** *Pieris rapae* Granulovirus; granular; late gene; PEP

〔收稿日期〕 2017-04-26

〔基金项目〕 海南省自然科学基金项目(314045)

〔作者简介〕 黄海剑(1989—), 男, 浙江台州人, 博士, 主要从事昆虫分子生物学研究。E-mail: huanghaijian@zju.edu.cn

〔通信作者〕 张宝琴(1976—), 女, 福建福州人, 副教授, 硕士生导师, 主要从事昆虫与资源开发研究。E-mail: 147823102@qq.com

杆状病毒(baculovirus)是一类含有囊膜结构的双链环状 DNA 病毒,是目前发现最早、研究最多的昆虫病毒,在害虫生物防治中发挥着重要的作用<sup>[1]</sup>。杆状病毒根据其包涵体形态可分为核型多角体病毒(Nucleopolyhedrovirus,NPV)和颗粒体病毒(Granulovirus,GV),其中 GV 病毒的包涵体呈椭圆形的颗粒状,常常只包埋单个病毒粒子,可以在环境中长期稳定存在<sup>[2]</sup>。近年来,随着杆状病毒基因组测序的完成,越来越多的研究者从分子水平揭示了病毒编码蛋白的功能,为病毒的合理利用提供了理论指导。

菜粉蝶颗粒体病毒(*Pieris rapae* Granulovirus,PrGV)属于杆状病毒科颗粒体病毒属,是一类特异侵染菜粉蝶的 GV 病毒,其宿主菜粉蝶(*Pieris rapae*)属鳞翅目,幼虫称菜青虫,严重危害甘蓝、萝卜、花菜等十字花科作物,影响蔬菜的产量和品质<sup>[3]</sup>。PrGV 基因组大小为 108 592 bp,预测编码框为 120 个,占整个基因组的 91%<sup>[4]</sup>。蛋白同源性比对发现,有 33 个 PrGV 基因只存在于 GV 基因组,但在 NPV 基因组并不存在,这其中包括 1 个编码多角体膜蛋白(polyhedron envelope protein,PEP)的 ORF20<sup>[5]</sup>。有研究表明,PEP 是颗粒体囊膜蛋白成分之一,可能参与颗粒体的形成<sup>[6-7]</sup>。然而,关于该蛋白在病毒侵染、组装、扩散等生命过程中的作用尚不清楚。

本研究对 PrGV PEP 进行原核表达,并制备了该蛋白的多克隆抗体,通过表达时相分析、免疫标记、细胞定位等手段对 PrGV PEP 进行深入研究,旨在为进一步了解 PrGV 的生物学特性奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菜青虫饲养 试验用菜青虫和甘蓝植株采自浙江大学紫金港校区,并在人工气候环境下饲养,饲养温度控制在(26±0.5)℃,相对湿度控制在(50±5)%,光周期(白天/黑夜)为 16 h/8 h。

1.1.2 PrGV 病毒 PrGV 纯病毒由浙江大学昆虫科学研究所分子昆虫研究室提供。取新鲜的甘蓝叶片,裁成 1 mm×2 mm 的碎片,将含有 PrGV 病毒的溶液稀释 100 倍,用毛笔均匀涂抹于叶片表面,置容积为 1 cm<sup>3</sup> 的玻璃培养皿内自然晾干;然后放入刚蜕皮并饥饿 3 h 的 2 龄菜青虫幼虫。放入 1 h 后,将完全取食完叶片的幼虫,即感染 PrGV 幼虫,放入新鲜(不含病毒)的甘蓝叶片上继续饲养。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取与定量 PCR 分别挑取感染 PrGV 后第 0,3,6,12,18,24,36,48,72 和 96 h 的菜青虫若虫,利用 RNAiso plus(TaKaRa,Dalian,China)提取 RNA;随后,按照 ReverTra Ace qPCR RTMaster 试剂盒(ToYoBo,Osaka,Japan)说明书,将 mRNA 反转录成 cDNA;定量 PCR 按照 SYBR Green 试剂盒(Bio-Rad,Hercules,CA,USA)说明书配置反应体系,并利用 CFX Connect Real-Time System(Bio-Rad)实时检测荧光信号。定量 PCR 反应程序如下:95℃预变性 3 min;95℃变性 10 s,60℃退火延伸 30 s,共循环 40 次。以 *P. rapae* 18S rRNA 作为内参,利用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 法进行试验结果计算<sup>[8]</sup>。共进行 3 个生物重复,每个生物重复包含 3 个技术重复,定量引物设计详见表 1。

1.2.2 PEP 原核表达 根据 PrGV PEP 编码蛋白的 CDs 序列,设计 1 对含有 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点的 PrGV PEP-sense 和 PrGV PEP-antisense 引物(表 1),利用 PCR 扩增目的片段并与 PMD-19T(TaKaRa)连接;测序正确后分别用 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切 PEP-PMD-19T,与经同样双酶切的 pGEX-4T-2 表达载体(Pharmacia,Piscataway,NJ,USA)相连接,获得 PEP-pGEX-4T-2 重组质粒,转化 *E. coli* BL21;挑取单菌落接种到含有氨苄青霉素的 LB 培养基中;加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L,37℃下诱导表达 6 h;最后,通过 SDS-PAGE 将诱导表达得到的菌液进行分离,确定目的蛋白的表达情况。

表 1 定量 PCR 和原核表达引物及其序列

Table 1 Primers and sequences used in prokaryotic expression and quantitative real-time PCR

| 引物功能 Primer function                 | 引物 Primer                          | 序列(5'→3') Sequence (5'→3') |
|--------------------------------------|------------------------------------|----------------------------|
| 定量 PCR<br>Quantitative real-time PCR | PrGV PEP-sense                     | TCCTCTAATTCCGGTAACTACAT    |
|                                      | PrGV PEP-antisense                 | TCTTACATCGTAAATGGCTTC      |
|                                      | <i>P. rapae</i> 18S rRNA-sense     | AGAAACGGCTACCACATCCA       |
|                                      | <i>P. rapae</i> 18S rRNA-antisense | GCACCAGACTTGCCCTCCA        |
|                                      |                                    |                            |
| 原核表达<br>Prokaryotic expression       | PrGV PEP-sense                     | GGATCCATGACCTCTATACCGGCAG  |
|                                      | PrGV PEP-antisense                 | CTCGAGTTAATTGGTAATTTCTTG   |

Fig. 1 Nucleotide and amino acid sequence analysis of PrGV *PEP*

根据基因组测序结果(图 1),获得编码框总长为 615 bp 的 *PEP* 基因序列,该基因位于 PrGV 基因组 13 806—14 420 nt,共编码 304 个氨基酸,预测分子量大小为 23 ku,等电点为 7.942。SMART 预测结果表明,该基因包含 1 个 PEP 保守结构域,位于第 16—121 个氨基酸。

利用 BLAST 软件搜索 PEP 的同源序列,发现 PrGV PEP 与鳞翅目昆虫的 GV PEP 有较高的同源性,氨基酸序列相似性约为 50%。然而,PrGV PEP 与其他核型多角体病毒(NPV)的基因组序列并无同源性,可能是 GV 所特有的。进化树分析结果(图

2)表明,侵染昆虫 GV 的 PEP 可分为 2 组:木薯天蛾颗粒体病毒 *EeGV*、稻纵卷叶螟颗粒体病毒 *CmGV*、马铃薯麦蛾颗粒体病毒 *PoGV*、菜粉蝶颗粒体病毒 *PrGV*、小菜蛾颗粒体病毒 *PxGV*、地老虎颗粒体病毒 *AsGV*、分月扇舟蛾颗粒体病毒 *CaGV* 等为一组;斜纹夜蛾颗粒体病毒 *SlGV*、草地贪夜蛾颗粒体病毒 *SfGV*、一点粘虫颗粒体病毒 *MuGV*、一星粘虫颗粒体病毒 *PuGV*、棉铃虫颗粒体病毒 *HaGV* 等为另一组。其中,PrGV PEP 与 *PxGV* PEP 的亲缘关系最近,该结果从侧面反映了 GV 与宿主之间的演化关系。

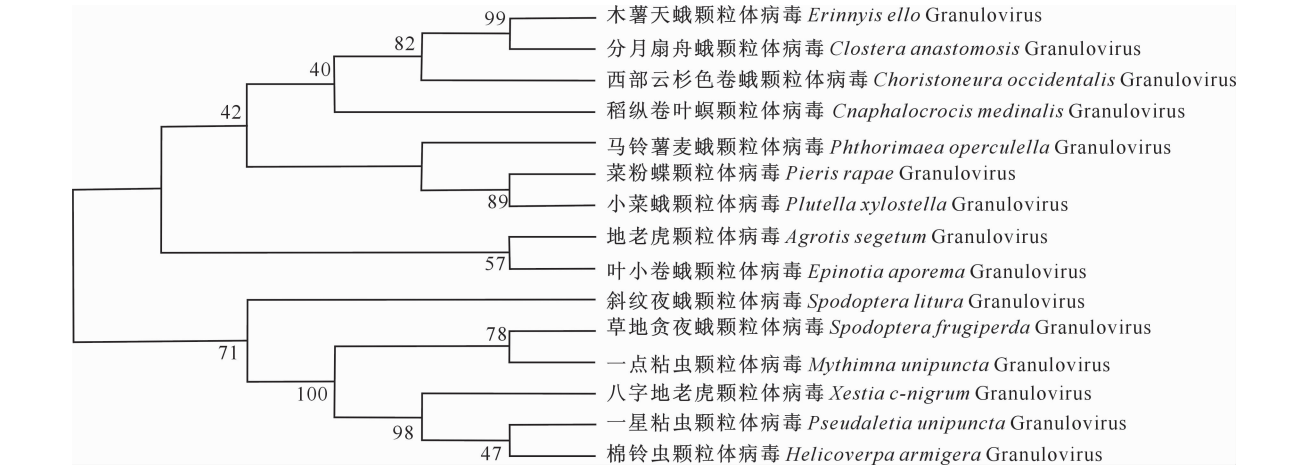


图 2 基于邻接法构建的 PEP 蛋白种系发生树

Fig. 2 Phylogenetic analysis of PEP using Neighbor-joining method

2.2 PEP 的表达时相分析

利用定量 PCR 方法实时监测 *PEP* 基因的增长动态,结果(图 3)表明,菜青虫在感毒后 0~18 h 检测不到 *PEP* 的表达。随着感染时间的推移,感毒菜青虫体内的 *PEP* 含量逐渐升高,在感染 72 h 时达到峰值,随后开始下降,感染后 96 h 的表达量下降到与 36 h 近似水平。

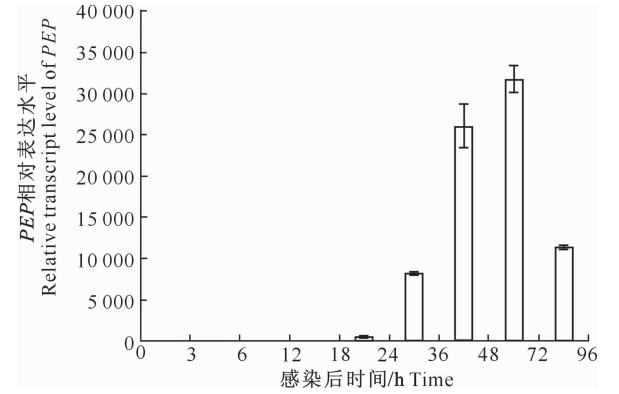


图 3 PrGV 感染后 PEP 基因表达水平

Fig. 3 Expression of PrGV PEP after PrGV

2.3 PEP 的原核表达

将 PrGV PEP 构建到 pGEX-4T-2 载体,并导入 *E. coli* BL21 进行原核表达。SDS-PAGE 分析结果(图 4)表明,导入 pGEX-4T-2 的空载体能够诱导表达出 26 ku 的条带,而未加 IPTG 诱导的 *E. coli* BL21 无法表达外源蛋白。PrGV PEP 能在 *E. coli* 中诱导表达,其与 GST 的融合蛋白分子量大小为 49 ku,与预测的蛋白分子量相近。与 *E. coli* BL21 自身的蛋白相比较,PrGV PEP 融合蛋白的表达量较高,可以进行蛋白回收。

2.4 PEP 的 Western blotting 检测

将回收的 PrGV PEP-GST 蛋白免疫健康的新西兰大耳白兔,最终获得 PrGV PEP 多克隆抗体。为检测这些抗体的特异性,用 Western blotting 方法杂交 PrGV 提取物中的目的蛋白。结果(图 5)表明,在 23 ku 和 15 ku 附近均有特异性条带,并且 2 条条带亮度相近。

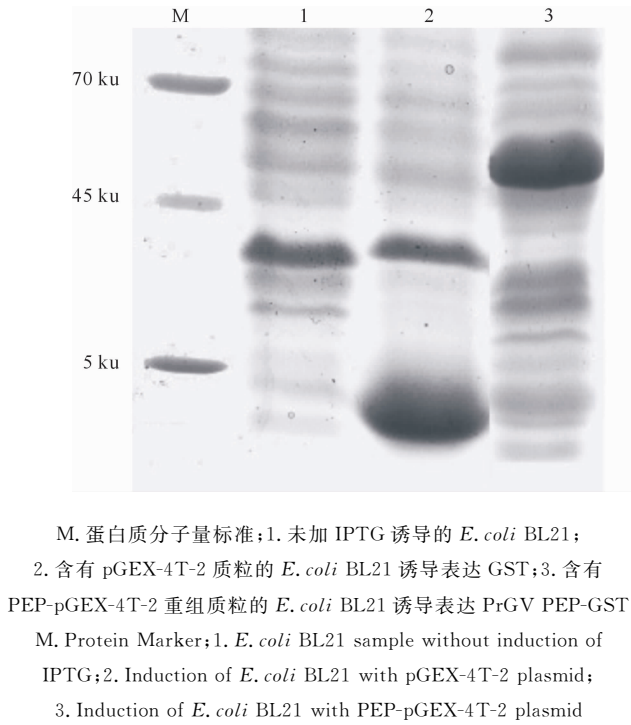


图 4 PrGV PEP-GST 融合表达分析

Fig. 4 Expression of PrGV PEP-GST in *E. coli* BL21

2. 5 PEP 的免疫金标记分析

为探究 PrGV PEP 在病毒颗粒体上的具体位

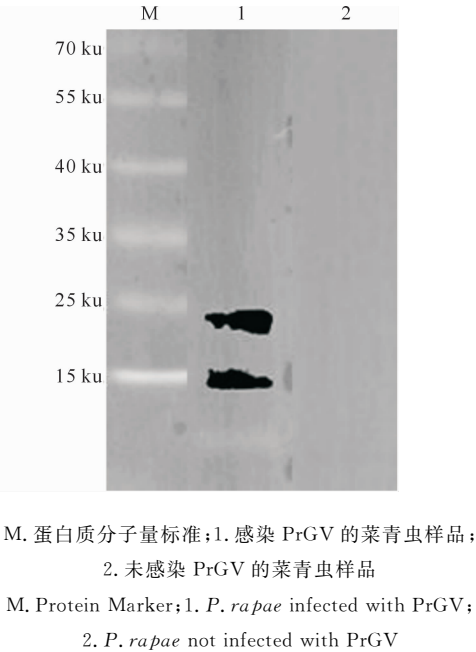
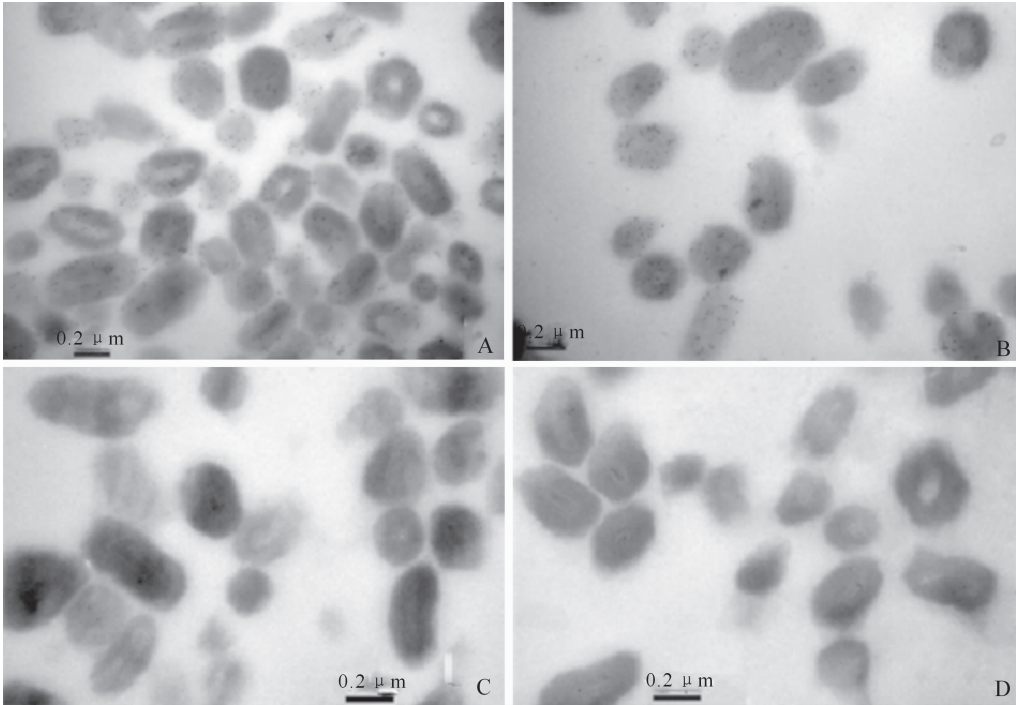


图 5 PrGV PEP 多克隆抗体的特异性检测

Fig. 5 Detection of PrGV PEP by Western blotting

置,用胶体金标记的方法对该蛋白进行定位分析,结果见图 6。



A、B. PrGV PEP 多克隆抗体为一抗标记 PrGV 包涵体;C. 清水为一抗标记 PrGV 包涵体;D. 兔阴性血清为一抗标记 PrGV 包涵体  
Immunolabelling using anti-PrGV PEP serum (A,B),water (C),and preimmune serum (D) as primary antibodies, respectively

图 6 基于免疫金标记的 PrGV PEP 蛋白定位分析

Fig. 6 Localization of PrGV PEP using immunogold labeling

电镜结果显示:PrGV PEP 抗体能够特异地与颗粒体结合,10 nm 的金颗粒遍布整个病毒粒子,而无病毒粒子的地方则未见金颗粒存在(图 6-A,B)。平均每个颗粒体上有 20~40 个金颗粒,说明 PrGV PEP 在病毒上的含量较高。相比之下,以清水或以兔阴性血清为一抗的对照组未观察到标记的金颗粒(图 6-C,D),说明该抗体具有非常高的特异性。

### 3 讨 论

本研究利用制备的 PEP 多克隆抗体,在感染 PrGV 的菜青虫体内成功检测到目的蛋白;通过免疫金标记,将 PEP 定位到包涵体上,发现该蛋白在颗粒体上含量很高,分布较为均匀,说明 PEP 是 GV 包涵体的重要组分;菜青虫感染 PrGV 后,其体内 PEP 基因表达水平逐渐上升,并在感染 72 h 时达到峰值。杆状病毒包含双相生活循环,即在侵染初期产生出芽型病毒(budded virus,BV),引起宿主整体感染,而在侵染后期产生多角体衍生病毒(occlusion-derived virus,ODV)释放到周围环境<sup>[9]</sup>。PEP 基因在侵染后期表达量较高,说明该基因很可能是 PrGV 后期表达的重要基因。

迄今为止,对杆状病毒的研究主要集中在 NPV 上<sup>[10-15]</sup>,而对 GV 的研究相对较少,且多集中在对病毒株的报道<sup>[16-21]</sup>。其中关于 PrGV 的研究报道涉及基因组<sup>[5]</sup>和个别功能基因<sup>[22-23]</sup>,但对于 PEP 基因尚未见报道。本研究对 GV 特有基因 PEP 的进化关系、表达模式、细胞定位等进行具体分析,为深入研究该基因功能及 PrGV 的功能基因组学奠定了基础。PEP 是杆状病毒的重要组成部分,广泛存在于 NPV 和 GV 中<sup>[16,18-21]</sup>。PEP 主要分布于电子致密的膜上,包裹病毒的蛋白基质<sup>[24]</sup>。王利群等<sup>[25]</sup>通过对不同 NPV 多角体膜蛋白的分析发现,这些序列之间的同源性远低于多角体蛋白。本研究发现,PrGV 与其他昆虫 GV PEP 氨基酸序列的相似性只有 50%左右,说明不同 GV 的 PEP 也存在一定差异,这可能与 GV 的宿主特异性相关。而 PrGV 的 PEP 与 NPV 则无同源性,这可能是病毒长期进化过程中形成的<sup>[18-21]</sup>。

利用 PrGV PEP 的多克隆抗体,在 PrGV 提取物中分别检测到 23 ku 和 15 ku 2 条特异性条带,类似的现象也在 ODV-E18、ODV-EC27 等基因中观察到<sup>[5]</sup>。杆状病毒表达系统能够进行蛋白切割、甲基化、糖基化等翻译后加工过程,如甜菜夜蛾多角体病毒 SeMNPV 的外壳融合蛋白,在成熟过程中可产生

76 ku 的原始蛋白和 60 ku 的切割产物<sup>[26-27]</sup>。PrGV PEP 预测分子量大小为 23 ku,猜测 15 ku 的条带可能是成熟蛋白被切割后的产物。

随着很多病毒新株系被报道及一些基因功能被逐步解析明确<sup>[28-29]</sup>,杆状病毒不仅非常成功地应用于生物防治<sup>[30-31]</sup>,也为人们深入了解这些微生物与宿主的相互影响提供了可能<sup>[32]</sup>,而 PrGV PEP 的独特性有可能为解释 GV 一类微生物的奥秘提供了重要线索。

### [参考文献]

- [1] Bonning B C, Hammock B D. Development of recombinant baculoviruses for insect control [J]. Annual Review of Entomology, 1996, 41(1): 191-210.
- [2] Boucias D G, Pendland J C. Baculoviruses in principles of insect pathology [M]. Norwell: Kluwer Academic Publishers, 1998: 111-146.
- [3] Yin J L. Occurrence law of cabbage butterfly in China and its identification and prevention [J]. Plant Diseases and Pests, 2010, 1(2): 21-25, 62.
- [4] Zhang B Q, Cheng R L, Wang X F, et al. The genome of *Pieris rapae* granulovirus [J]. Journal of Virology, 2012, 86(17): 9544.
- [5] 王晓峰. 菜粉蝶颗粒体病毒基因组和 ODV 蛋白组研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2011.  
Wang X F. Genome and ODV proteome from *Pieris rapae* Granulovim [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2011.
- [6] Escasa S R, Lauzon H A, Mathur A C, et al. Sequence analysis of the *Choristoneura occidentalis* granulovirus genome [J]. Journal of General Virology, 2006, 87(7): 1917-1933.
- [7] Harrison R L, Popham H J. Genomic sequence analysis of a granulovirus isolated from the old world bollworm, *Helicoverpa armigera* [J]. Virus Genes, 2008, 36(3): 565-581.
- [8] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>( $\Delta\Delta C_T$ ) method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [9] 朱士茂, 李 慧. 杆状病毒包埋型病毒粒子研究进展 [J]. 病毒学报, 2016, 32(1): 93-100.  
Zhu S M, Li H. Research advances in *Baculovirus occlusion-derived virions* [J]. Chinese Journal of Virology, 2016, 32(1): 93-100.
- [10] Martemyanov V V, Podgwaite J D, Belousova I A, et al. A comparison of the adaptations of strains of *Lymantria dispar* multiple nucleopolyhedrovirus to hosts from spatially isolated populations [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2017, 146: 41-46.
- [11] Ferrelli M L, Taibo C, Fichetti P, et al. Characterization of a new *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus variant causing epizootic on a previously unreported host, *Helicoverpa gelotopoeon* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. Journal of Inverte-

- brate Pathology, 2016, 138: 89-93.
- [12] Biedma M E, Salvador R, Ferrelli M L, et al. Effect of the interaction between *Anticarsia gemmatilis* multiple nucleopolyhedrovirus and *Epinotia aporema* granulovirus, on *A. gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae [J]. Biological Control, 2015, 91: 17-21.
- [13] Gupta R K, Gani M, Kaul V, et al. Field evaluation of *Lymantria obfuscata* multiple nucleopolyhedrovirus for the management of Indian gypsy moth in Jammu & Kashmir, India [J]. Crop Protection, 2016, 80: 149-158.
- [14] Harrison R L, Rowley D L, Keena M A. Geographic isolates of *Lymantria dispar* multiple nucleopolyhedrovirus: genome sequence analysis and pathogenicity against European and Asian gypsy moth strains [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2016, 137: 10-22.
- [15] Liu J, Zhu L, Zhang S, et al. The *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ac110 gene encodes a new per os infectivity factor [J]. Virus Research, 2016, 221: 30-37.
- [16] Lange M, Jehle J A. The genome of the *Cryptophlebia leucotreta* granulovirus [J]. Virology, 2003, 317(2): 220-236.
- [17] Pfannenstiel R S, Szymanski M, Lacey L A, et al. Discovery of a granulovirus of *Pandemis pyrusana* (Lepidoptera: Tortricidae), a leafroller pest of apples in Washington [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2004, 86(3): 124-127.
- [18] Zhang X X, Liang Z P, Peng H Y, et al. Characterization and partial genome sequence analysis of *Clostera anachoreta* granulovirus [J]. Virus Research, 2005, 113(1): 36-43.
- [19] Hilton S, Winstanley D. Biological characterization of an English granulovirus from the summer fruit tortrix moth, *Adoxophyes orana* [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2008, 97(3): 298-305.
- [20] Jukes M D, Knox C M, Hill M P, et al. The isolation and genetic characterisation of a South African strain of *Phthorimaea operculella* granulovirus, PhopGV-SA [J]. Virus Research, 2014, 183: 85-88.
- [21] Wormleaton S, Kuzio J, Winstanley D. The complete sequence of the *Adoxophyes orana* granulovirus genome [J]. Virology, 2003, 311(2): 350-365.
- [22] Oh S, Kim D H, Patnaik B B, et al. Molecular and immunohistochemical characterization of granulin gene encoded in *Pieris rapae* granulovirus genome [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2013, 113(1): 7-17.
- [23] Meng X, Gong C, Xue R, et al. Cloning and sequence analysis of lef-3 gene from *Pieris rapae* Granulo virus [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2009, 12: 41.
- [24] Lent J W M V, Groenen J Y M, Klinge R E C, et al. Localization of the 34 kDa polyhedron envelope protein in *Spodoptera frugiperda* cells infected with *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus [J]. Archives of Virology, 1990, 111(1): 103-114.
- [25] 王利群, 沈卫德, 李 兵. 柞蚕 NPV 多角体膜蛋白类似基因的克隆和序列分析 [J]. 蚕业科学, 2006, 32(4): 502-506.
- Wang L Q, Shen W D, Li B. Cloning and sequence analysis of the *Antheraea pernyi* nucleopolyhedrovirus polyhedral envelope protein gene [J]. Science of Sericulture, 2006, 32(4): 502-506.
- [26] Westenberg M, Wang H, Ijkel W F, et al. Furin is involved in baculovirus envelope fusion protein activation [J]. Journal of Virology, 2002, 76(1): 178-184.
- [27] Xu H J, Yang Z N, Zhao J F, et al. *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus ORF56 encodes an occlusion-derived virus protein and is not essential for budded virus production [J]. Journal of General Virology, 2008, 89: 1212-1219.
- [28] Williams T, Bergoin M, Monique M. Diversity of large DNA viruses of invertebrates [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2016, 147: 4-22.
- [29] Katsuma S. Phosphatase activity of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus PTP is dispensable for enhanced locomotory activity in *B. mori* larvae [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2015, 132: 228-232.
- [30] Lacey L A, Frutos R, Kaya H K, et al. Insect pathogens as biological control agents: do they have a future [J]. Biological Control, 2001, 21(3): 230-248.
- [31] Xu H X, Yang Y J, Lu Y H, et al. Sustainable management of rice insect pests by non-chemical-insecticide technologies in China [J]. Rice Science, 2017, 24(2): 61-72.
- [32] Wu K, Yang B, Huang W, et al. Gut immunity in *Lepidopteran insects* [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2016, 64: 65-74.