北京林业大学学报
JOURNAL OF BEIJING FORESTRY UNIVERSITY

舞毒蛾*V-ATPaseA*基因dsRNA原核表达及其对生长发育的影响

刘艳涛 王晓琪 张新华 孙丽丽 曹传旺

Prokaryotic-expressed *V-ATPaseA* dsRNA and its effects on growth and development in *Lymantria dispar*

Liu Yantao, Wang Xiaoqi, Zhang Xinhua, Sun Lili, Cao Chuanwang

引用本文:
刘艳涛, 王晓琪, 张新华, 孙丽丽, 曹传旺. 舞毒蛾*V-ATPaseA*基因dsRNA原核表达及其对生长发育的影响[J]. 北京林业大学学报, 2025, 47(9):99-109. doi: 10.12171/j.1000-1522.20240325
Liu Yantao, Wang Xiaoqi, Zhang Xinhua, Sun Lili, Cao Chuanwang. Prokaryotic-expressed *V-ATPaseA* dsRNA and its effects on growth and development in *Lymantria dispar*[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2025, 47(9):99-109. doi: 10.12171/j.1000-1522.20240325

在线阅读 View online: https://doi.org/10.12171/j.1000-1522.20240325

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

两种丛枝菌根真菌定殖青山杨后对舞毒蛾的抗性研究

Effects of arbuscular mycorrhizal fungal colonization on *Populus pseudo-cathayana* × *P. deltoides* resistance to *Lymantria dispar* larvae

北京林业大学学报, 2024, 46(3): 53-59. https://doi.org/10.12171/j.1000-1522.20220144

松材线虫VAPs蛋白的原核表达、多抗制备及表达模式分析

Prokaryotic expression, polyclonal antibody preparation and expression pattern analysis of venom-allergen proteins from *Bursaphelenchus xylophilus*

北京林业大学学报, 2021, 43(9): 38-50. https://doi.org/10.12171/j.1000-1522.20210202

蜡样芽孢杆菌NJSZ-13中蛋白酶ATP-α与ClpX的杀线虫活性研究

Prokaryotic expression of nematicidal proteases ATP-α and ClpX from *Bacillus cereus* NJSZ-13

北京林业大学学报, 2024, 46(4): 84-90. https://doi.org/10.12171/j.1000-1522.20220231

舞毒蛾*LdOR2*基因克隆及对CO_2胁迫下的行为反应

Cloning of *LdOR2* gene in *Lymantria dispar* and its behavioral response to CO_2 stress

北京林业大学学报, 2021, 43(9): 101-110. https://doi.org/10.12171/j.1000-1522.20210184

渗灌水肥耦合对同心圆枣生长发育的影响

Effects of water and nitrogen coulping on growth and development of *Zizphus jujuba* 'Tongxinyuanzao' under infiltration irrigation

北京林业大学学报, 2022, 44(2): 22-29. https://doi.org/10.12171/j.1000-1522.20200179

基于MaxEnt模型对舞毒蛾全球适生区的预测及分析

Prediction and analysis of the global suitability of *Lymantria dispar* based on MaxEnt

北京林业大学学报, 2021, 43(9): 59-69. https://doi.org/10.12171/j.1000-1522.20200416

DOI:10.12171/j.1000−1522.20240325

舞毒蛾 *V-ATPaseA* 基因 dsRNA 原核表达及其对生长发育的影响

刘艳涛[1]　王晓琪[1]　张新华[2]　孙丽丽[1]　曹传旺[1]
（1. 东北林业大学林学院，森林生态系统可持续经营教育部重点实验室，黑龙江 哈尔滨 150040；
2. 大悟县林业局森林病虫防疫检疫站，湖北 大悟 432800）

摘要:【目的】探究舞毒蛾液泡型 H^+-ATP 酶 *V-ATPaseA* 基因对蜕皮、生殖和生长发育等生理活动的影响，评估其作为舞毒蛾 RNA 干扰（RNAi）绿色防控靶标的潜力，为鳞翅目害虫新型生物农药开发提供参考。**【方法】**首先，克隆舞毒蛾 *V-ATPaseA* 基因开放阅读框（ORF）序列，利用 qRT-PCR 分析舞毒蛾不同发育时期及组织中 *V-ATPaseA* 基因的表达特征。随后，构建 *LdV-ATPaseA* 基因原核表达载体，并转化至 HT115（DE3）菌株，经 IPTG 诱导后制备表达 dsRNA 的菌液，连续饲喂舞毒蛾 2 龄和 3 龄幼虫。试验统计取食量、体重、体重累计增长率、死亡率、化蛹率、蛹质量、产卵量和发育历期等指标。**【结果】**结果显示，*LdV-ATPaseA* 基因在舞毒蛾整个生命周期中持续表达，且表达水平呈组织特异性，其中精巢表达量最高（为对照脂肪体的 30.80 倍），其次为卵巢（12.82 倍）和表皮（9.66 倍）。对舞毒蛾 2 龄和 3 龄幼虫连续饲喂添加表达 ds*LdV-ATPaseA* 菌液的人工饲料均可显著沉默靶标基因，导致 3 龄～5 龄幼虫取食量、体重、体重累计增长率显著降低，幼虫累计死亡率显著增加，雌蛹质量显著降低；此外，对舞毒蛾 2 龄幼虫连续饲喂添加表达 ds*LdV-ATPaseA* 菌液的人工饲料可导致 2 龄～6 龄幼虫及蛹期发育历期显著延长，化蛹率显著降低，蛹期畸形率显著升高，雌成虫产卵量显著降低。**【结论】***V-ATPaseA* 基因显著干扰舞毒蛾蜕皮、生殖及生长发育，表现为取食减少、生长受阻、死亡率升高、发育延迟、蛹畸形增加及繁殖力下降。因此，*LdV-ATPaseA* 基因可作为 RNAi 介导绿色防控的理想靶点，本研究为鳞翅目害虫生物农药的研发提供了新的理论依据。

关键词：液泡型 H^+ -ATP 酶；RNA 干扰；原核表达；舞毒蛾；生长发育
中图分类号：S763.42　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1000−1522(2025)09−0099−11
引文格式：刘艳涛，王晓琪，张新华，等. 舞毒蛾 *V-ATPaseA* 基因 dsRNA 原核表达及其对生长发育的影响［J］. 北京林业大学学报，2025，47(9)：99−109. Liu Yantao, Wang Xiaoqi, Zhang Xinhua, et al. Prokaryotic-expressed *V-ATPaseA* dsRNA and its effects on growth and development in *Lymantria dispar*［J］. Journal of Beijing Forestry University, 2025, 47(9): 99−109.

Prokaryotic-expressed *V-ATPaseA* dsRNA and its effects on growth and development in *Lymantria dispar*

Liu Yantao[1]　Wang Xiaoqi[1]　Zhang Xinhua[2]　Sun Lili[1]　Cao Chuanwang[1]
(1. College of Forestry, Key Laboratory of Sustainable Forest Ecosystem Management of Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China;
2. Forest Pest Control and Quarantine Station, Dawu County Forestry Bureau, Dawu 432800, Hubei, China)

Abstract:［**Objective**］The objective of this study was to thoroughly investigate how the *LdV-ATPaseA* gene affects various physiological activities of *Lymantria dispar*, including molting, reproduction, growth, and development. Furthermore, we evaluated its potential as a green control target for *Lymantria dispar* RNA interference (RNAi) and provide reference for the development of new biopesticides for *L. dispar*. ［**Method**］The ORF sequence of *V-ATPase* was successfully cloned, and quantitative reverse transcription

收稿日期: 2024−09−30　**修回日期:** 2025−01−07
基金项目: 国家自然科学基金项目（32071772），国家重点研发计划（2018YFC1200400）。
第一作者: 刘艳涛。主要研究方向：昆虫生理生化与分子毒理学。Email: 980232137@qq.com　地址：150040 黑龙江省哈尔滨市香坊区和兴路 26 号。
责任作者: 曹传旺，教授。主要研究方向：昆虫生理生化与分子毒理学。Email: chuanwangcao@nefu.edu.cn　地址：同上。
本刊网址: http://j.bjfu.edu.cn; http://journal.bjfu.edu.cn

PCR (qRT-PCR) was used to measure gene expression levels across various developmental stages and tissues in *L. dispar*. Additionally, an in vitro prokaryotic expression system was developed to produce dsRNA targeting the *LdV-ATPaseA* gene, continuous feeding of 2nd and 3rd instar larvae of *L. dispar*. Subsequently, we conducted experimental statistics on indicators such as food intake, body mass, cumulative mass gain rate, mortality rate, pupation rate, pupal mass, egg production, and developmental duration. [**Result**] The *LdV-ATPaseA* gene showed consistent expression levels across all developmental phases of *L. dispar*, with distinct tissue specific expression levels. The highest expression level was detected in the tests, with 30.80-fold of that in the control fat body. This was followed by ovary and epidermis, with 12.82-fold and 9.66-fold of that in the fat body, respectively. The recombinant expression of *LdV-ATPaseA* vector was successfully constructed to generate dsRNA which specifically induces *V-ATPaseA* gene silencing. Moreover, the dsRNA ingested by 2nd and 3rd instar *L. dispar* resulted in decreased food intake, reduced larval mass, decreased larval growth rate, decreased pupal mass of females and increased mortality. Additionally, the dsRNA ingested by 2nd instar *L. dispar* resulted larval and pupal life span was significantly longer, increased the pupal malformation rate, and reduced the pupation and egg production in female adults. [**Conclusion**] The *LdV-ATPaseA* plays a crucial role in the molting, reproduction, growth, and development of *L. dispar*. These findings highlight its potential as an RNAi-based green control target and offer valuable insights for developing biopesticides against Lepidoptera pests.

Key words: vacuolar-type proton ATPase; RNA inference; prokaryotic expression; *Lymantria dispar*; growth and development

液泡型 H^+-ATP 酶(vacuolar-type proton ATPase，V-ATPase)是由胞质侧 V1 催化结构域和膜嵌入的 V0 质子通道结构域组成的多亚基复合体，在真核胞腔内转运阳离子完成酸化过程中发挥重要作用[1]。V-ATPase 利用 ATP 水解释放的能量，驱动肠腔中 H^+ 与 K^+ 之间的运输，维持胞内 pH 稳态，驱动物质主动运输[2]。在昆虫体内，V-ATPase 作为上皮组织的关键功能蛋白，主要分布于马氏管、中肠及唾液腺等组织的细胞膜系统。该酶通过建立跨膜质子梯度，参与维持血淋巴与管腔之间的离子平衡，确保代谢废物的有效排泄，同时维持肠道碱性微环境，为营养物质的跨膜转运提供必需条件[3−4]。V-ATPase 调控的 pH 稳态对中肠蛋白酶活性的维持具有决定性作用，进而影响昆虫的生长发育[5]。例如，Guo 等[6]在柑橘木虱(*Diaphorina citri*)中发现，沉默 *V-ATPaseE* 基因导致柑橘木虱体重下降、死亡率显著升高，并诱导其中肠细胞凋亡。当 V-ATPase 的功能受到抑制，中肠 pH 不能维持在适宜范围，消化酶活性下降，影响食物消化，进而引起取食量和体重显著下降。Bebas 等[7]在海灰翅夜蛾(*Spodoptera littoralis*)中发现，注射 V-ATPase 特异性抑制剂巴弗洛霉素(Bafilomycin)能够阻止输精管管腔 pH 下降，破坏精子释放节律，显著降低精子数量和质量，表明 V-ATPase 能够调控输精管上皮管腔酸化进而影响其生殖能力。当 V-ATPase 功能受到抑制时，生殖细胞中离子调控发生紊乱，导致生殖细胞正常成熟及受精等过程受到阻碍，进而影响昆虫种群繁衍。

V-ATPaseA 作为 V-ATPase 家族成员，通过对胞间阳离子转运进行精准调控，在昆虫生长发育、生殖调控等生理过程中发挥关键作用，其在美国白蛾(*Hyphantria cunea*)[8]、黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)[9]和家蚕(*Bombyx mori*)[10]等昆虫中均已鉴定，但在舞毒蛾(*Lymantria dispar*)中尚未见报道。舞毒蛾是世界性食叶害虫[11]，隶属于鳞翅目(Lepidoptera)毒蛾科(Lymantriidae)，取食植物叶片、果实以及芽茎，危害蔷薇科(Rosaceae)、杨柳科(Salicaceae)和松科(Pinaceae)等 500 多种植物，在我国东北、华北、华中和西北地区均有分布，生命力和抗逆能力极强[12]，对森林生态系统造成巨大危害[13−14]。目前防治舞毒蛾主要依赖乐果类或菊酯类等广谱性化学农药，其见效快、效率高，但长期使用易产生生态环境污染、天敌种群受害及抗药性增强等问题[15−17]。RNA 干扰(RNAi)作为一种高效、特异的基因沉默技术，在害虫绿色防控中具有广阔应用前景。细菌诱导表达作为基因工程四大表达系统(细菌、酵母、杆状病毒和哺乳动物细胞表达系统)之一[18]，能够高效合成靶向 dsRNA，通过昆虫摄食实现体内 RNAi 效应，已成功应用于多种害虫防治研究[19−21]。因此，现阶段研究重点集中在运用分子生物学技术精准确定调控昆虫生长发育、生殖及行为等关键生理过程的分子靶标，并利用 RNAi 分子防控技术，干扰昆虫体内关键基因的功能，进而影响昆虫的生长

发育进程、降低其繁殖能力或者改变其行为模式，为害虫防控提供一种高效且特异性强的新策略[22−24]。基于此，本文通过构建舞毒蛾 *LdV-ATPaseA* 基因的原核表达载体，并通过饲喂表达 dsRNA 的工程细菌，系统分析其对舞毒蛾幼虫生长发育和繁殖能力的影响。本研究不仅有助于深入理解舞毒蛾生长发育的内在分子机制，也为后续探索基于该基因的害虫防治策略提供重要理论依据。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

舞毒蛾卵块及人工饲料购自中国林业科学研究院森林生态环境与自然保护研究所。将纱布包裹的卵块置于 10% 甲醛溶液消毒 1 h，随后用自来水冲洗 10 min，自然晾干。将处理后的卵块放入人工气候培养箱中，培养条件为温度（25 ± 1）℃、光周期 14 L∶10 D、相对湿度（70 ± 5）%。幼虫使用新鲜人工饲料饲养。

1.2　基因克隆与分析

使用 RNeasy Mini 动物组织 RNA 提取试剂盒（Qiagen 公司）分别提取舞毒蛾各龄期及不同组织的总 RNA。使用 PrimeScript™ RT reagent Kit（Takara）合成 cDNA，反应体系配制如下：取 2.0 μL 5 × PrimeScript 缓冲液，加入 0.5 μL PrimeScript RT 酶混合物 I，0.5 μL Oligo d（T）引物（50 μmol/L），0.5 μL 随机六聚体引物（100 μmol/L）以及 0.5 μg 总 RNA，最后用无 RNase 水将终体积调至 10 μL。反应条件为：42 ℃ 孵育 60 min，85 ℃ 加热 5 s 终止反应。所得 cDNA 置于−20 ℃ 保存备用。以稀释 10 倍的 cDNA 为模板，使用 Primer 3.0 软件设计引物用于 RT-PCR 克隆。反应体系为：2 × Fine Taq PCR Super Mix（+ dye）5 μL，上下游引物（10 μmol/L）各 0.5 μL，cDNA 2 μL，ddH_2O 2 μL，引物序列见表 1。反应程序为：94 ℃ 3 min；94 ℃ 30 s、58 ℃ 30 s、72 ℃ 30 s，共 35 次循环；72 ℃ 5 min；4 ℃ 保存。1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物，回收目的条带后使用胶回收试剂盒（Omega）纯化。纯化产物与 pMD18-T 载体（Takara）连接，连接体系如下：pMD18-T 载体 1 μL，纯化产物 2 μL，Solution I 缓冲液 5 μL，ddH_2O 补足至 10 μL；16 ℃ 连接过夜。随后将连接产物与 DH5α 感受态按 1∶10 的比例进行转化，并将产物涂布于含氨苄青霉素的 LB 平板并筛选阳性克隆进行测序（生工生物），最终获得 *LdV-ATPaseA* 基因序列。

获取开放阅读框使用 ORF founder（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf.html），蛋白特性使用 ProtParam（http://au.expasy.org/tools/protparam.html）预测，信号肽使用 SignlP 5.0 Server（https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/）预测，同源性分析使用 Blast（http://www.ncbi. nlm.nih.gov/BLAST/），跨膜结构域使用 TMHMM 2.0 Server（http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/），多重序列比对使用 Clustalx（1.83）软件，系统发育树使用 MEGA（5.1）软件邻接法，1 000 次重复验证稳定性[14,25]。

1.3　实时荧光定量 qRT-PCR

使用 *EF*1*α* 和 *Actin* 作为内参基因进行实时荧光定量 qRT-PCR，引物序列见表 1。反应体系包括：2 × SYBR premix Ex Taq 酶 10 μL，上下游引物（10 μmol/L）各 1 μL，cDNA 2 μL，ddH_2O 6 μL。反应程序为：94 ℃ 30 s，94 ℃ 12 s，58 ℃ 45 s，72 ℃ 40 s，81 ℃ 1 s，共 45 次循环。每个样品设置 3 次重复。基因表达量使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行计算分析[26]。

1.4　dsRNA 原核表达

采用 MEGAscript RNAi Kit（Ambion）制备 *LdV-ATPaseA* 基因 dsRNA。经琼脂糖凝胶电泳验证其质量后，调整质量浓度至 1 μg/μL，−80 ℃ 保存。使用 Primer 3.0 程序设计引物，在引物 5'端分别引入保护碱基序列（atcgGAGCTC/cccAAGCTT）及 SacI/Hind III 酶识别位点；同步制备 GFP 基因片段作为空白对照。PCR 扩增产物经凝胶纯化试剂盒（Omega）分离纯化后，与 L4440 载体在 37 ℃ 条件下进行双酶切反应 3.5 h。酶切产物经电泳鉴定后，采用 T4 连接酶在 16 ℃ 条件下连接 12 h。将重组质粒转入 DH5α 感受态细胞，筛选阳性克隆并通过 PCR 验证。经测序确认（生工生物）无误后，扩大培养并提取重组质

表 1　引物序列

Tab. 1　Primer sequences

名称	上游引物序列（5′—3′）	下游引物序列（5′—3′）	长度/bp	用途
LdV-ATPaseA	CTTGTGATAAGTTGCTATCCTCCG	ATGCGCCAATGATGGACG	1 851	全长克隆
LdV-ATPaseA	GGGGAGGAGAATGAGGACAA	CTCTCCGACCAGCTCATTGT	129	实时荧光定量qRT-PCR
Actin	AGAAGCACTTGCGGTGGACAAT	ACCTGTACGCCAACACTGTCAT	232	
*EF*1*α*	TTTGCCTTCCTTGCGCTCAACA	TGTAAAGCAGCTGATCGTGGGT	252	
ds*LdV-ATPaseA*	atcgGAGCTCGTCCATCATGAAGCGAACAG	cccAAGCTTGAACTCTGGGTAGTTCTTGTC	508	dsRNA合成

粒，命名为 L4440-*LdV-ATPaseA*。

将 L4440-*LdV-ATPaseA* 重组菌株与 L4440-*GFP* 菌株分别转化至 RNaseIII 缺陷型 HT115 感受态细胞中，接种于 LB 液体培养基（含 100 μg/mL Amp 和 12.5 μg/mL Tet），于 37 ℃、200 r/min 条件下振荡培养 12 h。取适量菌液以 1∶500 比例接种至新鲜含相同抗生素的 LB 培养基，继续培养至对数中期（OD_{600} 为 0.6～0.8）。随后，加入 IPTG 至终浓度 0.1 mmol/L 进行诱导表达，在 37 ℃、200 r/min 条件下培养 4 h。菌液经 5 000 g 离心 15 min（室温）收集菌体，去除上清后加入 1 mL 无菌 ddH_2O 重悬沉淀，再以 5 000 g 离心 5 min（4 ℃）沉淀；重复洗涤一次。最终以 800 μL 无菌 ddH_2O 重悬菌体，4 ℃ 保存备用。

1.5 dsRNA 基因沉默效率检测

选取生理状态一致的 2 龄第 1 天和 3 龄第 1 天健康舞毒蛾幼虫，饥饿处理 12 h 后，将含有 dsRNA 的 HT115 工程菌悬液按 100 μL/g 饲料的比例均匀涂布于人工饲料表面。每个处理组 30 头幼虫，设 3 个生物学重复。幼虫个体置于智能光照培养箱中培养，条件为（25 ± 1）℃、相对湿度（70 ± 5）% 及光周期 14 L∶10 D。每日更换新鲜处理的饲料，以确保 dsRNA 有效干扰。对饲喂 dsRNA 后 24、48 和 72 h 的舞毒蛾 2 龄和 3 龄分别进行取样并使用液氮冷冻，每组样品 3 头舞毒蛾幼虫，3 个生物学重复，保存于 −80 ℃ 备用。提取各组样品总 RNA 并反转录合成 cDNA，实时荧光定量 qRT-PCR 检测沉默效率。

1.6 基因沉默对舞毒蛾生长发育指标影响

对饲喂 ds*LdV-ATPaseA* 和阴性对照 ds*GFP* 的舞毒蛾进行取食量、体重、体重累计增长率、幼虫死亡率、化蛹率、蛹期畸形率、蛹质量及成虫产卵量的测定，每个处理组 30 头幼虫，设立 3 个生物学重复，饲喂方法同上。每隔 24 h 记录幼虫体重变化，并采用称重法测定取食量（取食前饲料质量减去取食后残余质量），分别统计 3 龄、4 龄和 5 龄幼虫、雌雄蛹的体重增长及人工饲料消耗量，并统计幼虫死亡总数和化蛹总数；待幼虫化蛹后，统计蛹畸形数并测定蛹期第 3 d 的雌雄蛹质量。各指标计算公式如下：体重累计增长率 =（取食后体重 − 初始体重）/初始体重 × 100%，死亡率 = 死亡个体数/总个体数 × 100%，化蛹率 = 化蛹个体数/个体总数 × 100%，畸形率 = 蛹畸形数/总蛹数 × 100%，单雌产卵量 = 总产卵数/雌成虫总数。

1.7 数据统计与分析

采用 Opticon Monitor3 软件处理 qRT-PCR 试验数据，通过 Excel 2021 计算目的基因的相对表达量；运用 SPSS 25.0（IBM）中 Duncan 多重比较法和独立样本 *T* 检验进行差异显著性分析。使用 Graphpad Prism 9.5.0 软件进行数据可视化处理。

2 结果与分析

2.1 *LdV-ATPaseA* 基因特性分析

舞毒蛾 *LdV-ATPaseA* 基因的开放阅读框长 1 851 bp，编码 616 个氨基酸，蛋白分子量为 68.04 kDa，理论等电点为 5.24。生物信息学分析表明该蛋白具有碱性特征，未检测到信号肽序列和跨膜结构域。保守结构域分析确认其属于 V-ATPase 家族 V1 结构域的 A 亚基成员。系统进化分析显示，18 种昆虫的 V-ATPaseA 蛋白可分为两个主要进化分支，其中舞毒蛾 V-ATPaseA 蛋白与小地老虎（*Agrotis ipsilon*）、甜菜夜蛾（*Spodoptera exigua*）、夏威夷红蛱蝶（*Vanessa tameamea*）、庆网蛱蝶（*Melitaea cinxia*）及棉铃虫（*Helicoverpa armigera*）的对应蛋白聚类于同一进化分支，且与小地老虎的亲缘关系最近（图 1）。

2.2 *LdV-ATPaseA* 基因各发育阶段和组织表达模式分析

通过 qRT-PCR 检测了 *LdV-ATPaseA* 基因舞毒蛾不同发育阶段及组织中的表达模式（图 2）。结果表明，该基因在各发育阶段均有表达，其中雌蛹期表达水平最高，为卵期（对照）的 1.81 倍；其次是 2 龄幼虫，为对照的 1.51 倍；而 4 龄幼虫的表达量最低，仅为对照的 0.47 倍（图 2A）。组织表达分析表明，*LdV-ATPaseA* 基因在舞毒蛾所有检测组织中均有表达（图 2B）。其中，精巢和卵巢表达量最高，分别为脂肪体（对照）的 30.80 倍和 12.82 倍（$P < 0.05$）；其次为表皮，为对照的 9.66 倍；马氏管中表达量最低（0.79 倍），与对照相比无显著差异（$P > 0.05$）。

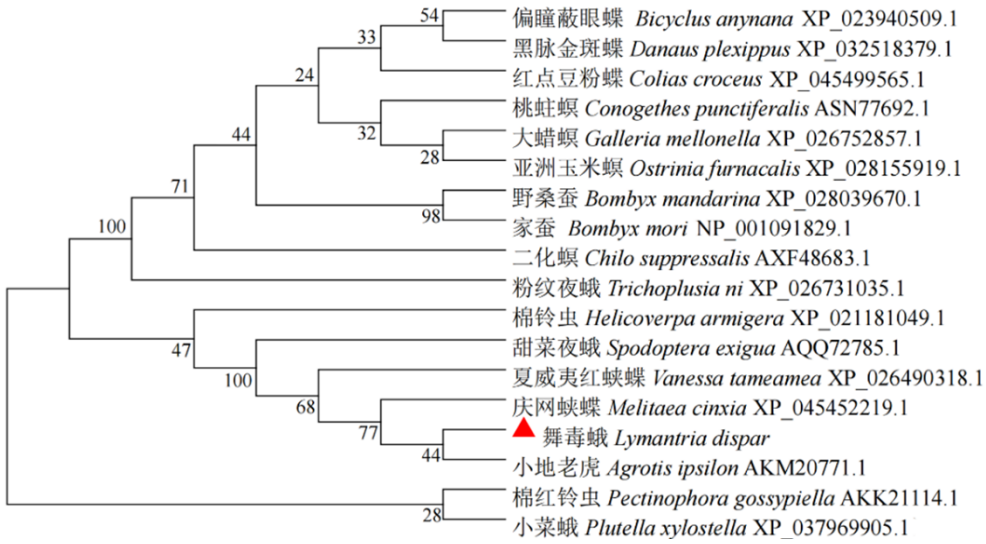
2.3 dsRNA 原核表达及沉默效率检测

IPTG 诱导表达 dsRNA 使用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测（图 3），与对照组相比，在 500～750 bp 处出现条带，结果表明经 IPTG 诱导后 dsRNA 在细菌中成功表达。

利用 qRT-PCR 检测舞毒蛾 2 龄和 3 龄幼虫饲喂 ds*LdV-ATPaseA* 后的沉默效率（图 4）。以 ds*GFP* 为对照，2 龄幼虫基因沉默 24、48 和 72 h 表达量显著降低，沉默效率分别为 96.24%、96.43%、98.35%；3 龄幼虫基因沉默 24、48 和 72 h 表达量显著降低，沉默效率分别为 63.97%、39.71% 和 60.82%。结果表明舞毒蛾 2 龄、3 龄幼虫饲喂 ds*LdV-ATPaseA* 能够显著降低靶标基因 mRNA 表达水平。

2.4 基因沉默对幼虫取食的影响

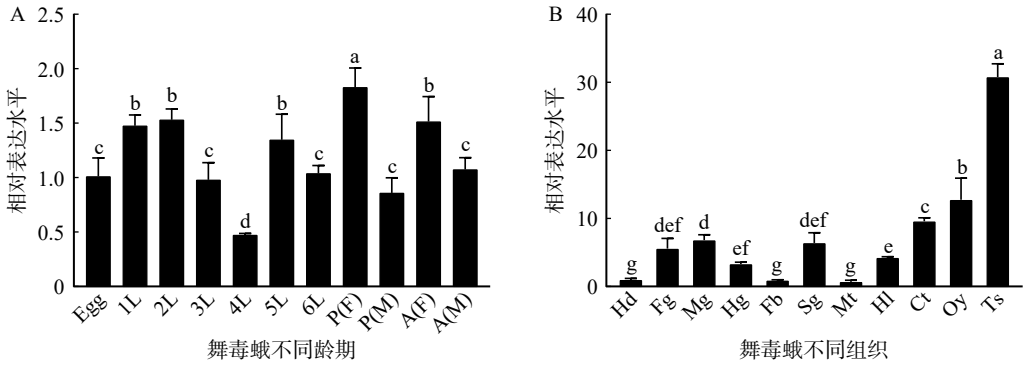
饲喂 ds*LdV-ATPaseA* 导致舞毒蛾沉默基因使幼虫取食量出现显著变化（图 5）。与对照组 ds*GFP* 相比，自 2 龄幼虫开始饲喂时，3 龄幼虫取食量显著减



节点数字指该分支中两部分的进化距离。

图 1　18 种鳞翅目昆虫 V-ATPaseA 蛋白系统进化树

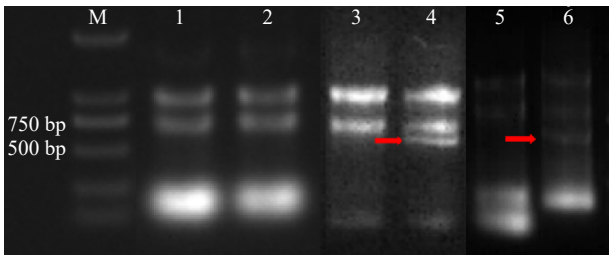
Fig. 1　Phylogenetic tree of V-ATPaseA proteins in 18 Lepidoptera insect species



Egg. 卵；1L～6L. 1 龄～6 龄幼虫；P(F). 雌蛹；P(M). 雄蛹；A(F). 雌成虫；A(M). 雄成虫；Hd. 头；Fg. 前肠；Mg. 中肠；Hg. 后肠；Fb. 脂肪体；Sg. 丝腺；Mt. 马氏管；Hl. 血淋巴；Ct. 表皮；Oy. 卵巢；Ts. 精巢。使用 Duncan 分析差异显著性，不同小写字母表示差异显著（$P < 0.05$）。

图 2　舞毒蛾 *V-ATPaseA* 发育阶段和组织表达特异性分析

Fig. 2　Analysis of expression specificity of *V-ATPaseA* in developmental stages and tissues of *L. dispar*



M.Marker DL2000；1. L4440 转空载体 RNA（未诱导）；2. L4440 转空载体 RNA（IPTG 诱导）；3. 细菌表达的 ds*GFP*（未诱导）；4. 细菌表达的 ds*GFP*（IPTG 诱导）；5. 细菌表达的 ds*LdV-ATPaseA*（未诱导）；6. 细菌表达的 ds*LdV-ATPaseA*（IPTG 诱导）。

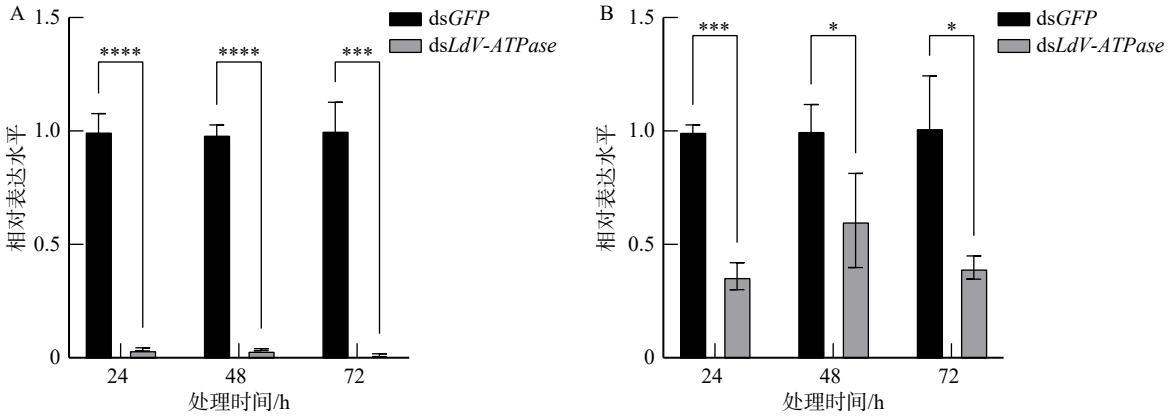
图 3　细菌诱导表达 dsRNA 检测

Fig. 3　Detection of induced dsRNA expression in bacteria

少 48.73%，4 龄雌幼虫和雄幼虫取食量分别显著减少 14.87% 和 22.47%；5 龄雌幼虫和雄幼虫取食量分别显著减少 55.34% 和 15.44%（图 5A）。自 3 龄幼虫开始饲喂时，3 龄幼虫取食量显著减少 60.87%，4 龄雌幼虫和雄幼虫取食量分别显著减少了 33.47% 和 34.24%，5 龄雌幼虫和雄幼虫取食量分别显著减少 16.51% 和 15.21%（图 5B）。

2.5　基因沉默对幼虫体重的影响

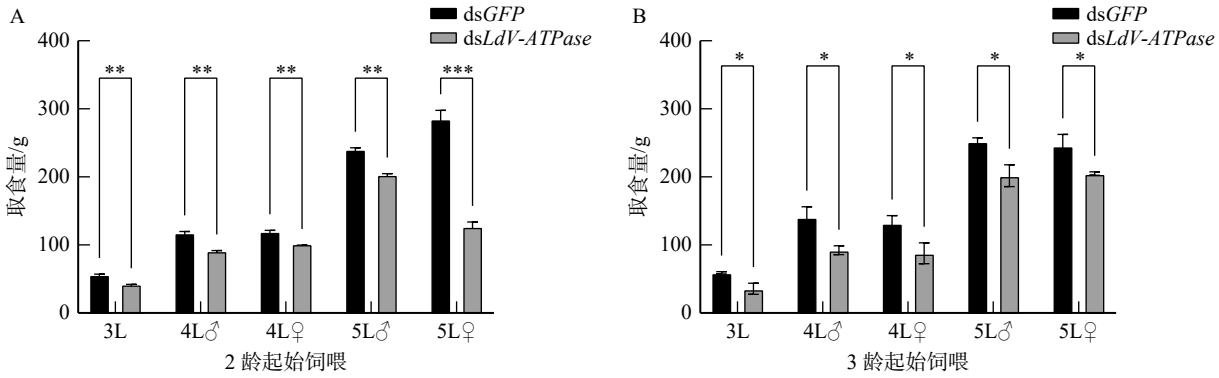
饲喂 ds*LdV-ATPaseA* 导致的舞毒蛾基因沉默使幼虫体重出现显著变化（图 6）。与对照组 ds*GFP* 相比，自 2 龄起饲喂时，3 龄幼虫的体重显著降低 24.32%，体重累计增长率显著减少 78.58%；4 龄雌幼虫和雄幼虫的体重分别显著降低 17.36% 和 35.90%，体重累计增长率分别显著减少 55.30% 和 117.19%；5 龄雌幼虫和雄幼虫体重分别显著降低 26.48% 和 22.81%，体重累计增长率分别显著减少 27.69% 和 58.69%（图 6A、C）。自 3 龄开始饲喂时，3 龄幼虫体重显著降低 39.64%，体重累计增长率显著减少 69.27%；4 龄雌幼虫和雄幼虫体重显著降低 13.16% 和 45.47%，体重累计增长率分别显著减少 117.19% 和 53.25%；5 龄雌幼虫和雄幼虫体重显著降低 20.71% 和 17.74%，体重累计增长率分别显著



A. 舞毒蛾 2 龄幼虫饲喂 ds*LdV-ATPaseA* 沉默效率检测；B. 舞毒蛾 3 龄幼虫饲喂 ds*LdV-ATPaseA* 沉默效率检测。星号表示与对照组比较差异显著(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.000\ 1$)。下同。

图 4 舞毒蛾 2 龄和 3 龄幼虫 ds*LdV-ATPaseA* 沉默效率检测

Fig. 4 Detection of ds*LdV-ATPaseA* silencing efficiency in 2nd and 3rd instar *L. dispar* larvae



♂表示雄虫，♀表示雌虫。下同。

图 5 *LdV-ATPaseA* 基因沉默对舞毒蛾 3～5 龄幼虫取食量影响

Fig. 5 Effects of *LdV-ATPaseA* gene silencing on food intake of 3rd to 5th instar *L. dispar* larvae

减少 41.22% 和 38.27%(图 6B、D)。

2.6 基因沉默对舞毒蛾化蛹率、蛹期畸形率和蛹质量影响

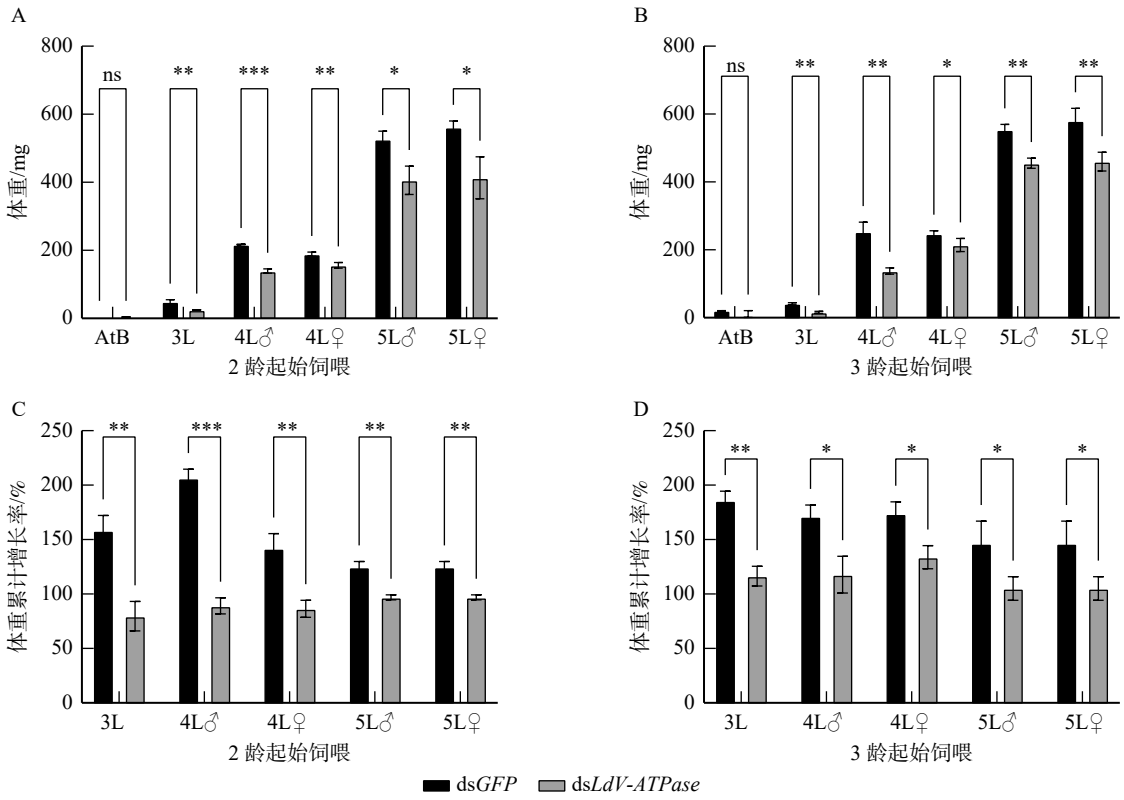
饲喂 ds*LdV-ATPaseA* 导致的舞毒蛾基因沉默使幼虫化蛹失败(图 7A)。以饲喂 ds*GFP* 为对照，饲喂 ds*LdV-ATPaseA* 导致舞毒蛾 6 龄末期出现蜕皮异常(仅头部有蜕皮迹象，其余部位无法蜕皮)；2 龄起饲喂 ds*LdV-ATPaseA* 的舞毒蛾化蛹率为 74.28%，显著低于对照组(91.92%)；3 龄起饲喂 ds*LdV-ATPaseA* 的舞毒蛾化蛹率比对照组降低 6.95%，但差异不显著(图 7B)。2 龄幼虫起饲喂 ds*LdV-ATPaseA* 的舞毒蛾雌蛹质量(1.37 ± 0.27)g，相比对照组(1.54 ± 0.28)g 显著降低 11.06%；3 龄起饲喂 ds*LdV-ATPaseA* 的舞毒蛾雌蛹质量为(1.00 g ± 0.35)g，相比对照组(1.33 ± 0.40)g 降低 24.58%；但相比于对照组，2 龄和 3 龄起饲喂 ds*LdV-ATPaseA* 的舞毒蛾雄蛹质量均无显著性差异(图 7C)。2 龄起饲喂 ds*LdV-ATPaseA* 的舞毒蛾蛹畸形率相比于对照组显著升高(5.20%)；3 龄起饲喂 ds*LdV-ATPaseA* 的舞毒蛾畸形率高于对照组 1.23%，但差异不显著(图 7D)，结果表明 *LdV-ATPaseA* 显著影响舞毒蛾的蜕皮、化蛹率、蛹期畸形率和雌蛹质量。

2.7 基因沉默对舞毒蛾幼虫累计死亡率及成虫产卵量影响

饲喂 ds*LdV-ATPaseA* 导致的舞毒蛾基因沉默使幼虫累计死亡率显著上升(图 8A)。以饲喂 ds*GFP* 为对照组，2 龄和 3 龄起饲喂舞毒蛾 ds*LdV-ATPaseA* 的幼虫累计死亡率显著增加 28.89% 和 36.67%，结果表明饲喂 ds*LdV-ATPaseA* 显著增加舞毒蛾幼虫累计死亡率。饲喂 ds*LdV-ATPaseA* 导致的舞毒蛾基因沉默，使雌成虫产卵量显著下降(图 8B)。以饲喂 ds*GFP* 为对照组，2 龄起饲喂 ds*LdV-ATPaseA* 的舞毒蛾雌雄沉默体成虫交配产卵数为 308 粒，相比于对照组显著降低 30.17%；3 龄起饲喂 ds*LdV-ATPaseA* 的舞毒蛾雌雄沉默体成虫交配产卵数为 267 粒，相比于对照显著降低 42.80%。结果表明，ds*LdV-ATPaseA* 显著降低舞毒蛾雌成虫产卵量。

2.8 基因沉默对发育历期的影响

沉默 *LdV-ATPaseA* 基因影响舞毒蛾幼虫期和蛹期发育历期(表 2)。2 龄起饲喂 ds*LdV-ATPaseA* 的



AtB 表示饲喂起始体重。ns 表示差异不显著($P > 0.05$)。下同。

图 6　*LdV-ATPaseA* 基因沉默对舞毒蛾 3 龄～5 龄幼虫体重和体重增长率的影响

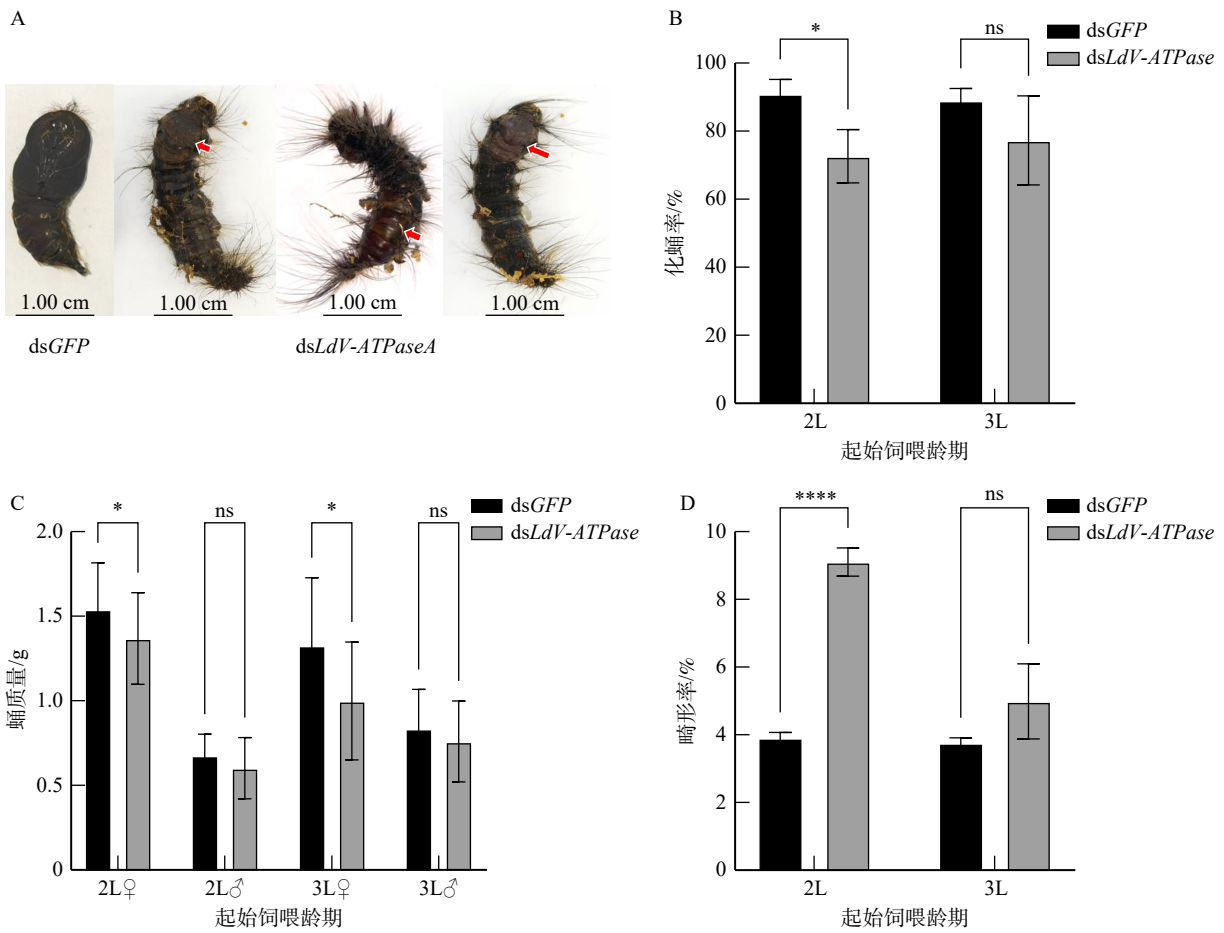
Fig. 6　Effects of *LdV-ATPaseA* gene silencing on body mass and body mass growth rate of 3rd to 5th instar *L. dispar* larvae

舞毒蛾 6 龄幼虫阶段持续时间为(8.11 ± 0.09)d，较对照组(6.30 ± 0.24)d 显著延长；2 龄至 6 龄的整个幼虫期，饲喂 ds*LdV-ATPaseA* 的舞毒蛾完成发育需要(29.96 ± 0.64)d，显著长于对照组的(27.63 ± 0.30)d；蛹期发育时间由对照组的(14.03 ± 0.03)d 显著延长至(15.11 ± 0.10)d(表 2)；3 龄起始饲喂 ds*LdV-ATPaseA* 的舞毒蛾 3 龄幼虫发育历期(4.61 ± 0.07)d、5 龄幼虫发育历期(6.22 ± 0.09)d 及蛹期发育历期(14.49 ± 0.51)d 相比于对照组((4.52 ± 0.10)d；(6.18 ± 0.07)d；(13.90 ± 0.09)d)均延长，但差异均不显著(表 2)。结果表明，2 龄起始饲喂 ds*LdV-ATPaseA* 基因显著延长舞毒蛾发育历期；3 龄起始饲喂 ds*LdV-ATPase* 延长舞毒蛾发育历期，但差异不显著。

3　结论与讨论

V-ATPaseA 作为一种关键膜蛋白复合物，在昆虫的生理活动中扮演着不可或缺的角色[2–4]。在细胞内环境的维持上，能够主动运输阳离子(如氢离子)，调节细胞内的酸碱度，使胞内生化反应能在适宜的 pH 环境下进行[27]。对于昆虫的消化系统而言，V-ATPaseA 在中肠上皮细胞中发挥作用，通过转运阳离子营造合适的离子梯度，从而促进营养物质的吸收过程。V-ATPaseA 所营造的离子环境，能更高效地摄取食物中糖、氨基酸等营养成分，保障自身的生长发育及能量供应[28]。在昆虫的生殖系统中，V-ATPaseA 参与生殖细胞发育过程中的离子调控，保证生殖细胞正常成熟及受精等过程顺利进行，对于昆虫种群繁衍有重要意义。V-ATPaseA 凭借其对胞间阳离子的转运能力，在昆虫的众多生理系统和生命活动环节中发挥多种关键功能，是昆虫能够正常生长发育及繁衍的重要保障之一[29]。

为了明确 *LdV-ATPaseA* 基因是否参与调控舞毒蛾生长发育、蜕皮以及生殖功能，本文深入研究了该基因功能，检测了舞毒蛾 *LdV-ATPaseA* 基因时空表达谱，构建了 dsRNA 原核表达载体 L4440-*LdV-ATPaseA*，转化至大肠杆菌 HT115 菌株，以 IPTG 诱导表达出相应的 dsRNA 并对舞毒蛾幼虫进行饲喂。实时荧光定量结果表明，舞毒蛾的 2 龄幼虫、雌蛹以及雌成虫阶段，*LdV-ATPaseA* 基因表达水平显著高于其他阶段，呈现出阶段特异性表达，这一研究成果与棉铃虫中相关研究结论类似，在表达特异性上呈现一定的相似性[30]；不同组织中，*LdV-ATPaseA* 在精巢的表达量最高，其次是表皮，推测影响舞毒蛾蜕皮和生殖功能。昆虫生长发育过程中，V-ATPaseA 在精巢中持续表达发挥作用，通过调控胞间阳离子转运，维持细胞内外适宜离子环境，使生精细胞能有序地进行分化、增殖，发育成熟，保障雄性昆虫的生殖能力；卵巢发育同样依赖 V-ATPaseA 营造的离子调



A. 蛹期畸形表型；B. 不同龄期起始饲喂 dsRNA 的化蛹率；C. 不同龄期起始饲喂 dsRNA 的雌雄蛹质量（2L♀. 舞毒蛾 2 龄幼虫期起始饲喂 dsRNA 的雌蛹，2L♂. 舞毒蛾 2 龄幼虫期起始饲喂 dsRNA 的雄蛹，3L♀. 舞毒蛾 3 龄幼虫期起始饲喂 dsRNA 的雌蛹，3L♂. 舞毒蛾 3 龄幼虫期起始饲喂 dsRNA 的雄蛹）；D. 不同龄期起始饲喂 dsRNA 的蛹期畸形率。

图 7 *LdV-ATPaseA* 基因沉默对舞毒蛾化蛹率、蛹期畸形率和蛹质量的影响

Fig. 7 Effects of *LdV-ATPaseA* gene silencing on pupation rate, pupal deformity rate and pupal mass of *L. dispar*

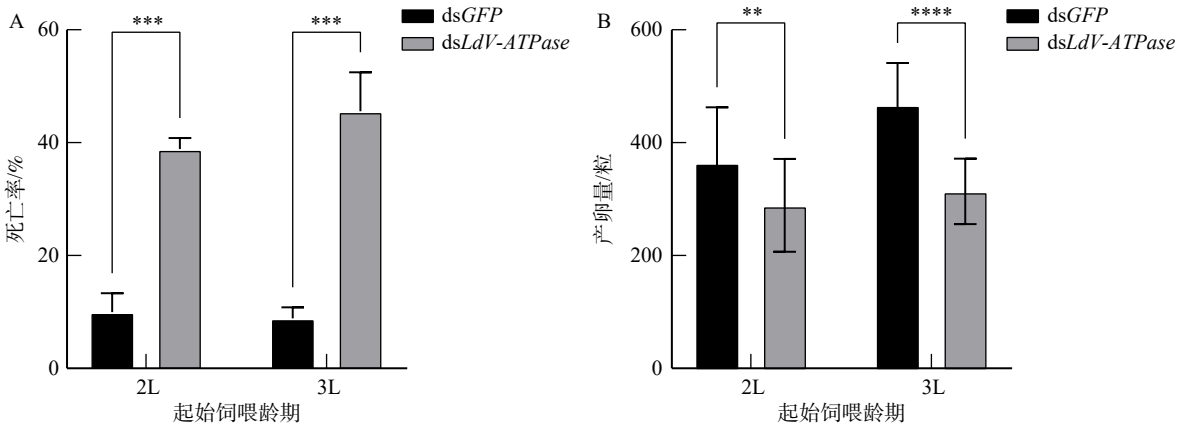


图 8 *LdV-ATPaseA* 基因沉默对舞毒蛾幼虫死亡率和成虫产卵量的影响

Fig. 8 Effects of *LdV-ATPaseA* gene silencing on larval mortality and adult fecundity of *L. dispar*

控环境，能够保证卵巢细胞间的物质交换、信号传导等活动正常进行，使得卵泡能够正常发育，最终产生具有受精能力的成熟卵子，实现雌性昆虫的繁殖功能[31−32]。在 ds*LdV-ATPaseA* 饲喂实验中，我们发现舞毒蛾沉默体成虫交配产卵量显著下降，表明 *LdV-ATPaseA* 基因显著影响舞毒蛾的生殖功能，这与 Basnet 等[33]在温带臭虫（*Cimex lectularius*）中的研究结果类似，Yao 等[34]在玉米蜡蝉（*Peregrinus maidis*）中沉默 *V-ATPaseB* 或 *V-ATPaseD* 基因也同样导致雌成虫产卵量显著下降。*LdV-ATPaseA* 基因沉默，生殖细胞内环境失衡，胞内关键的生理生化反应无法正常开展，导致生殖细胞质量变差，导致出现诸如精子活力

表 2　舞毒蛾 *LdV-ATPaseA* 基因沉默对其发育历期的影响

Tab. 2　Effects of *LdV-ATPaseA* gene silencing on developmental duration of *L. dispar*

起始饲喂龄期	dsRNA	发育历期/d						
		2龄	3龄	4龄	5龄	6龄	2龄(3龄)～6龄	蛹期
2龄	ds*GFP*	4.64 ± 0.07a (n = 90)	4.59 ± 0.20a (n = 90)	5.02 ± 0.78a (n = 90)	7.13 ± 0.04a (n = 87)	6.30 ± 0.24b (n = 81)	27.63 ± 0.30b (n = 90)	14.03 ± 0.03b (n = 71)
	ds*LdV-ATPaseA*	4.66 ± 0.17a (n = 90)	4.68 ± 0.19a (n = 87)	5.19 ± 0.13a (n = 75)	7.19 ± 0.07a (n = 67)	8.11 ± 0.09a (n = 55)	29.96 ± 0.64a (n = 90)	15.11 ± 0.10a (n = 49)
	ds*GFP* vs. ds*LdV-ATPaseA*	t = −0.106 P = 0.921	t = 0.562 P = 0.604	t = 1.901 P = 0.130	t = 1.443 P = 0.222	t = 11.910 P = 0.002	t = 5.662 P = 0.005	t = 18.370 P = 0.002
3龄	ds*GFP*		4.52 ± 0.10a (n = 90)	4.80 ± 0.18a (n = 90)	6.18 ± 0.07a (n = 85)	6.18 ± 0.23a (n = 82)	21.74 ± 0.49a (n = 90)	13.90 ± 0.09a (n = 70)
	ds*LdV-ATPaseA*		4.61 ± 0.07a (n = 90)	4.78 ± 0.14a (n = 77)	6.22 ± 0.09a (n = 68)	6.09 ± 0.06a (n = 49)	21.49 ± 0.59a (n = 90)	14.49 ± 0.51a (n = 38)
	ds*GFP* vs. ds*LdV-ATPaseA*		t = −1.239 P = 0.291	t = 0.152 P = 0.887	t = −0.461 P = 0.670	t = 0.607 P = 0.599	t = 0.565 P = 0.603	t = −1.129 P = 0.357

注: 表中数据以平均值 ± 标准差呈现, 独立样本T检验检测差异显著性, 不同小写字母代表不同处理组间具有显著差异(P < 0.05)。

不足、卵子受精能力下降等情况, 可能是影响交配后的产卵量降低的主要原因。

鉴于 *LdV-ATPaseA* 基因在表皮中的较高表达量, 推测其可能通过调控胞间阳离子转运, 影响表皮细胞的生理状态, 进而参与到蜕皮过程中。在昆虫蜕皮时, 旧表皮被降解, 新表皮快速合成并硬化, 这一过程涉及诸多依赖离子的生化反应, 如参与几丁质合成相关酶活性调节便与离子浓度密切相关[35−36]。V-ATPaseA 营造的适宜离子环境能保证几丁质合成酶等关键酶处于最佳活性状态, 促使新表皮几丁质正常合成, 确保蜕皮过程顺利进行[35−36]。本研究, 我们发现饲喂 ds*LdV-ATPaseA* 导致舞毒蛾 6 龄末龄幼虫出现蜕皮缺陷, 并造成蛹期畸形, 这与 Sato 等[37]在黑胸大蠊(*Periplaneta fuliginosa*)以及 Pannicke[38]等在东方粘虫(*Mythimna separata*)的研究结果相似。同时, V-ATPaseA 参与细胞内的能量代谢过程, 其正常功能对于维持细胞内 ATP 的充足供应十分关键[39]。对舞毒蛾幼虫饲喂 ds*LdV-ATPaseA* 后, 该基因表达被显著抑制, 导致 ATP 合成效率降低, 昆虫蜕皮以及蛹期的发育需要消耗大量能量, 能量供应不足可能导致蜕皮缺陷, 蛹期也可能因缺乏能量而无法正常完成形态构建, 造成畸形[40]。此外, 蜕皮激素调控昆虫的蜕皮过程, 而昆虫的生长、体重增加以及后续继续取食等活动都和蜕皮周期紧密相关[40]。V-ATPase 参与到细胞内环境塑造等过程中, 会协同蜕皮激素发挥作用, 帮助调节蜕皮过程中细胞的生理变化, 保障蜕皮后昆虫能正常取食、快速恢复并进一步增加体重, *V-ATPaseA* 沉默后, 可能导致昆虫蜕皮异常、取食受抑制以及体重增长停滞等情况[41]。

中肠是昆虫消化食物的主要场所, V-ATPaseA 在中肠细胞中通常分布在顶膜等部位, 通过水解 ATP 将阳离子泵入中肠腔, 使其内部环境酸化[42]。对植食性昆虫而言, 合适的酸性环境有助于激活中肠内各类消化酶, 使食物中的营养成分易分解成可吸收的小分子, 进而提高消化效率, 促进昆虫摄取更多食物, 影响其体重增长[43]。本文研究发现, 对舞毒蛾低龄幼虫饲喂 ds*LdV-ATPaseA* 后发现其取食量显著降低、体重及体重增长率显著下降, 幼虫累计死亡率显著上升和幼虫总发育历期显著延长的现象, 表明 *LdV-ATPaseA* 影响舞毒蛾的生长发育。当 V-ATPaseA 的功能受到抑制, 中肠 pH 不能维持在适宜范围, 消化酶活性下降, 影响食物消化, 可能是引起取食量和体重显著下降的原因。同时, *V-ATPaseA* 沉默后, 质子转运功能异常还会引起细胞内离子平衡失调, 如钾离子、钙离子等的浓度发生改变, 这些离子在细胞的能量代谢过程中发挥重要功能[35]。钙离子是许多细胞信号通路的关键调节因子, 离子平衡失调会干扰细胞的正常代谢信号传导, 进而影响细胞的能量产生和利用效率, 使昆虫整体能量代谢紊乱, 无法维持生命活动而死亡[44−45]; Guo 等[46]在茄二十八星瓢虫(*Henosepilachna vigintioctopunctatai*)的研究中发现, 沉默其 *V-ATPaseA* 基因后幼虫死亡率显著升高, 同时摄食减少且发育减缓, 这与我们的研究结果类似。在 ds*LdV-ATPaseA* 饲喂实验中, 舞毒蛾雌蛹质量显著下降, 但雄蛹质量无显著差异, 这可能是雌性相对于雄性对能量代谢和离子平衡的变化更加依赖, 雌性需要更多的能量用于卵巢发育和卵母细胞的生长和成熟, 而雄性所需相对较少, 在能量供应受干扰的情况下, 会优先将有限的能量分配给生殖系统, 从而导致其他生理功能(如蛹体正常生长和维持体重)所需的能量减少, 使雌蛹质量显著下降[47]。

这些结果表明 *LdV-ATPaseA* 基因在调控舞毒蛾蜕皮、生殖和生长发育中发挥重要作用，*LdV-ATPaseA* 在舞毒蛾幼虫的多个生理层面发挥着关键作用，从营养摄取、代谢利用，到生理功能维持以及发育调控等环节均有涉及。研究结果不仅有助于我们深入理解舞毒蛾生长发育的内在分子机制，也为后续探索基于该基因的害虫防治策略提供了重要理论依据，为舞毒蛾绿色防控提供新的分子靶标，并为鳞翅目害虫生物农药开发提供新的理论依据和参考。未来研究可深入挖掘 *LdV-ATPaseA* 与其他关键基因的互作网络，为开发多靶标协同作用的 RNAi 产品提供理论支撑，同时可进一步探索纳米颗粒载体和微胶囊等新型递送技术，提高 RNAi 在复杂林间环境中的稳定性，推动基于 RNA 干扰的舞毒蛾绿色防控技术从实验室走向林间，实现森林害虫治理的绿色化与可持续化发展。

参 考 文 献

[1] Forgac M. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2007, 8(11): 917−929.

[2] 王梦珂, 赵特, 周琳, 等. 棉铃虫 V-ATP 酶 G 亚基基因克隆及相对表达量分析 [J]. 植物保护学报, 2020, 47(1): 205−206.
Wang M K, Zhao T, Zhou L, et al. Cloning and relative expression level of vacuolar-type proton ATPase G subunit gene in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera*[J]. Journal of Plant Protection, 2020, 47(1): 205−206.

[3] 邱琪琪, 付晓政, 王梦珂, 等. 草地贪夜蛾 *V-ATPase* 亚基 *A*、*B*、*C* 和 *D* 基因的克隆与分析 [J]. 应用昆虫学报, 2022, 59(3): 499−511.
Qiu Q Q, Fu X Z, Wang M K, et al. Cloning and expression of *Spodoptera frugiperda V-ATPase* subunit *A*, *B*, *C* and *D* genes[J]. Chinese Journal of Applied Entomology, 2022, 59(3): 499−511.

[4] 钟丰, 王亚楠, 谢丙堂, 等. 棉铃虫 V-ATP 酶亚基 A 基因克隆及表达谱分析 [J]. 植物保护学报, 2016, 43(5): 705−712.
Zhong F, Wang Y N, Xie B T, et al. Cloning and expression analysis of V-ATPase subunit *A* gene in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Hübner)[J]. Journal of Plant Protection, 2016, 43(5): 705−712.

[5] Ajamhassani M, Zibaee A, Sendi J J, et al. Proteolytic activity in the midgut of the mrimson speckled moth *Utethesia pulchella* L. (Lepidoptera: Arctiidae)[J]. Journal of Plant Protection Research, 2012, 52(3): 368−373.

[6] Guo C F, Qiu J H, Hu Y W, et al. Silencing of *V-ATPase-E* gene causes midgut apoptosis of *Diaphorina citri* and affects its acquisition of Huanglongbing pathogen[J]. Insect Science, 2022, 30(4): 1022−1034.

[7] Bebas P, Cymborowski B, Giebultowicz J M. Circadian rhythm of acidification in insect vas deferens regulated by rhythmic expression of vacuolar H(+)-ATPase[J]. The Journal of Experimental Biology, 2002, 205(1): 37−44.

[8] Wang X, Zhao D, Wang Q, et al. Identification and functional analysis of *V-ATPase A* and *C* genes in *Hyphantria cunea*[J]. Insects, 2024, 15(7): 515.

[9] Chen R P, Liu C Y, Shao H L, et al. Adenylate kinase 2 (*AK2*) promotes cell proliferation in insect development[J]. BMC Molecular Biology, 2012, 13: 31.

[10] Eystathioy T, Swevers L, Iatrou K. The orphan nuclear receptor *BmHR3A* of *Bombyx mori*: hormonal control, ovarian expression and functional properties[J]. Mechanisms of Development, 2001, 103(1−2): 107−115.

[11] Fernandes J T, Shuter J B, McMeans C B. Do invasive terrestrial invertebrates subsidize north-temperate fish populations? The case of the spongy moth (*Lymantria dispar*)[J]. Food Webs, 2024, 40: e00357.

[12] Hoover K, Grove M J. Specificity of developmental resistance in gypsy moth (*Lymantria dispar*) to two DNA-insect viruses[J]. Virologica Sinica, 2009, 24(5): 493−500.

[13] Enayatiaa R, Anson H, Hemingway J. Insect glutathione transferases and insecticide resistance[J]. Insect Molecular Biology, 2005, 14(1): 3−8.

[14] Andrea C M, Luca A, Helen E, et al. Divergent behavioural responses of gypsy moth (*Lymantria dispar*) caterpillars from three different subspecies to potential host trees[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 8953.

[15] 党英侨, 殷晶晶, 陈传佳, 等. 转舞毒蛾 *LdCYP6AN15v1* 基因果蝇品系对氯虫苯甲酰胺胁迫响应 [J]. 林业科学, 2017, 53(6): 94−104.
Dang Y Q, Yin J J, Chen C J, et al. Responses of transformant *Drosophila* expressing *LdCYP6AN15v1* gene to chlorantraniliprole stress[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2017, 53(6): 94−104.

[16] 刘鹏, 孙丽丽, 张琪慧, 等. 舞毒蛾小分子热激蛋白基因分析及对甲萘威胁迫的响应 [J]. 北京林业大学学报, 2017, 39(1): 78−84.
Liu P, Sun L L, Zang Q H, et al. Analysis of *smHsp* genes in *Lymantria dispar* and its response to carbaryl stress[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2017, 39(1): 78−84.

[17] 张承志, 范程程, 孙丽丽, 等. 美国白蛾 RyR 对氯虫苯甲酰胺胁迫响应及分子对接分析 [J]. 北京林业大学学报, 2024, 46(10): 90−99.
Zhang C Z, Fan C C, Sun L L, et al. Stress response and molecular docking analysis of ryanodine receptor (RyR) in *Hyphantria cunea* to chlorantraniliprole[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2024, 46(10): 90−99.

[18] 唐琦, 邱立鹏, 李东, 等. 杆状病毒表达载体的应用现状 [J]. 微生物学通报, 2018, 45(2): 442−450.
Tang Q, Qiu L P, Li D, et al. Current application status of baculovirus expression vector system[J]. Microbiology China, 2018, 45(2): 442−450.

[19] Dorner S, Lum L, Kim M, et al. A genomewide screen for components of the RNAi pathway in *Drosophila* cultured cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(32): 11880−11885.

[20] 周心怡, 闫丽琼, 吕云彤, 等. 舞毒蛾取食诱导小黑杨苯丙烷代谢酶活性及其相关基因的表达 [J]. 林业科学, 2021, 57(3): 108−116.
Zhou X Y, Yan L Q, Lü Y T, et al. Activities and gene expressions of phenylpropane metabolic enzymes in *Populus simonii* × *P. nigra* by herbivore induction of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae)[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2021, 57(3): 108−116.

[21] Xu Q Q, Shang F, Feng Y S, et al. Design the fusion double-strand RNAs to control two global sap-sucking pests[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2024, 205: 106114.

[22] 吴元旺, 谢佳铭, 丛培娟, 等. 舞毒蛾 Methuselah-like 分子模拟及靶向小分子抑制剂研究 [J]. 林业科学研究, 2024, 37(4): 12−23.
Wu Y W, Xie J M, Cong P J, et al. Research on molecular simulation of *Lymantria dispa*r methuselah-like and targeting small molecular inhibitors[J]. Forest Research, 2024, 37(4): 12−23.

[23] Rakesh V, Singh A, Ghosh A. Suppression of *Thrips palmi* population by spray-on application of dsRNA targeting *V-ATPase-B*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 280: 135576.

[24] 莫建洲, 唐颖, 李昊峰, 等. 白细胞激肽及其受体对美国白蛾取食和生长发育的影响 [J]. 北京林业大学学报, 2025, 47(3): 95−106.
Mo J Z, Tang Y, Li H F, et al. Effects of leucokinin neuropeptide and its receptor on feeding and growth of *Hyphantria cunea*[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2025, 47(3): 95−106.

[25] 王建国, 王建军, 曹传旺, 等. 舞毒蛾 *LdOR2* 基因克隆及对 CO_2 胁迫下的行为反应 [J]. 北京林业大学学报, 2021, 43(9): 101−110.
Wang J G, Wang J J, Cao C W, et al. Cloning of *LdOR*2 gene in *Lymantria dispar* and its behavioral response to CO_2 stresses[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2021, 43(9): 101−110.

[26] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402−408.

[27] Collins M P, Forgac M. Regulation and function of *V-ATPases* in physiology and disease[J]. Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes, 2020, 1862(12): 183341.

[28] O'Donnell, M. The *V-ATPase* in insect epithelia[J]. The Journal of Experimental Biology, 2017, 220(18): 3201−3203.

[29] Qi W, Xu H Z, Wang P J, et al. Knockdown of the chromatin remodeling *ATPase* gene *Brahma* impairs the reproductive potential of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2022, 184: 105106.

[30] 陈嘉洁, 王梦珂, 付晓政, 等. 棉铃虫 V-ATP 酶 E 亚基基因克隆及表达分析 [J]. 河南农业大学学报, 2020, 54(3): 422−429.
Chen J J, Wang M K, Fu X Z, et al. Cloning and expression analysis of V- ATPase subunit *E* gene in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Hübner)[J]. Journal of Henan Agricultural University, 2020, 54(3): 422−429.

[31] Liu X J, Liang X Y, Guo J, et al. *V-ATPase* subunit a is required for survival and midgut development of *Locusta migratoria*[J]. Insect Molecular Biology, 2021, 31(1): 60−72.

[32] Krüger J, Bohrmann J. Bioelectric patterning during oogenesis: stage-specific distribution of membrane potentials, intracellular pH and ion-transport mechanisms in *Drosophila* ovarian follicles[J]. BMC Developmental Biology, 2015, 15: 1.

[33] Basnet S, Kamble S T. RNAi-mediated knockdown of *V-ATPase* subunits affects survival and reproduction of bed bugs (Hemiptera: Cimicidae)[J]. Journal of Medical Entomology, 2018, 55(3): 540−546.

[34] Yao J X, Rotenberg D, Afsharifar A, et al. Development of RNAi methods for *Peregrinus maidis*, the corn planthopper[J]. Plos One, 2013, 8(8): e70243.

[35] Xie J J, Zhang L G, Yang K X, et al. Enhanced chitinase production by *Bacillus paralicheniformis* GXMU-J23.1: optimization, genomic insights, and chitin degradation mechanism[J]. Bioresource Technology, 2024, 418: 131911.

[36] Li F, Chen W, Ai Y, et al. Design and synthesis of novel indole-derived N-methylcarbamoylguanidinyl chitinase inhibitors with significantly improved insecticidal activity[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(39): 21410−21418.

[37] Sato K, Miyata K, Ozawa S, et al. Systemic RNAi of *V-ATPase* subunit *B* causes molting defect and developmental abnormalities in *Periplaneta fuliginosa*[J]. Insect Science, 2019, 26(4): 721−731.

[38] Pannicke U, Honig M, Hess I, et al. Reticular dysgenesis (aleukocytosis) is caused by mutations in the gene encoding mitochondrial adenylate kinase 2[J]. Nature Genetics, 2009, 41(1): 101−105.

[39] Jefferies K C, Cipriano D J, Forgac M. Function, structure and regulation of the vacuolar (H+)-ATPases[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2008, 476(1): 33−42.

[40] Wang X P, Sun S P, Li Y X, et al. 20-hydroxyecdysone reprograms amino acid metabolism to support the metamorphic development of *Helicoverpa armigera*[J]. Cell Reports, 2023, 42(6): 112644.

[41] Li Z, Wang L, Yi T C, et al. The nuclear receptor gene E75 plays a key role in regulating the molting process of the spider mite, *Tetranychus urticae*[J]. Experimental and Applied Acarology, 2023, 92(1): 1−11.

[42] Allman E, Johnson D, Nehrke K, et al. Loss of the apical *V-ATPase a*-subunit VHA-6 prevents acidification of the intestinal lumen during a rhythmic behavior in *C. elegans*[J]. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2009, 297(5): C1071−C1081.

[43] Overend G, Luo Y, Henderson L, et al. Molecular mechanism and functional significance of acid generation in the drosophila midgut[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 27242.

[44] Danese A, Leo S, Rimessi A, et al. Cell death as a result of calcium signaling modulation: a cancer-centric prospective[J]. Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research, 2021, 1868(8): 119061.

[45] Bidaud-Meynard A, Nicolle O, Heck M, et al. A V0-ATPase-dependent apical trafficking pathway maintains the polarity of the intestinal absorptive membrane[J]. Development, 2019, 146(11): dev174508.

[46] Guo W, Guo M, Yang C, et al. RNA interference-mediated silencing of *V-ATPase* subunits *A* and *E* affect survival and development of the 28-spotted ladybeetle, *Henosepilachna vigintioctopunctata*[J]. Insect Science, 2021, 28(6): 1664−1676.

[47] Zhao L Q, Wang W. Effects of autumn warming on energy consumption of diapausing fall webworm (Lepidoptera: Arctiidae) Pupae[J]. Journal of Insect Science, 2021, 21(2): 8.

（责任编辑　范　娟
责任编委　骆有庆）