丙酮酸羧化酶在棉蚜生长发育及蜜露形成中的作用

海芙蓉[1] 解津刚[1] 孔文亭[1] 王建明[1] 胡得琴[1] 刘 宁[2*] 刘小宁[1*]

（1. 新疆大学生命科学与技术学院，新疆生物资源基因工程重点实验室，乌鲁木齐 830017；
2. 新疆维吾尔自治区农业科学院农作物品种资源研究所，乌鲁木齐 830091）

摘要：为探究棉蚜*Aphis gossypii*丙酮酸羧化酶（pyruvate carboxylase，PYC）基因*AgPYC*在棉蚜生长发育及蜜露形成中的作用，对棉蚜*AgPYC*基因进行生物信息学分析，体外合成干扰片段ds*AgPYC*，通过干扰试验测定沉默*AgPYC*基因对棉蚜体内及其蜜露中总糖含量、生长发育及种群生命表参数的影响。结果显示：棉蚜*AgPYC*基因序列具有PYC的典型结构特征，PYC蛋白主要位于线粒体内。棉蚜AgPYC蛋白的氨基酸序列与雪松长足大蚜*Cinara cedri*体内PYC蛋白的氨基酸序列的亲缘关系最近。在3个ds*AgPYC*浓度中，浓度750 ng/μL ds*AgPYC*的沉默效果最好。喷洒750 ng/μL ds*AgPYC*后72 h，棉蚜体内*AgPYC*基因的相对表达量较喷洒ds*GFP*降低了44.5%，棉蚜体内及其蜜露中总糖含量分别较喷洒ddH_2O降低了16.2%和18.1%。喷洒750 ng/μL ds*AgPYC*后棉蚜体型明显小于其他两个处理，第9天的累计死亡率达47.8%，种群适合度下降至0.71。表明*AgPYC*基因可能在棉蚜糖代谢、蜜露形成及生长发育过程中起着调控作用。

关键词：棉蚜；丙酮酸羧化酶；蜜露；总糖；生长发育；生命表参数

Role of pyruvate carboxylase in the growth, development and honeydew formation of the cotton aphid *Aphis gossypii*

Hai Furong[1] Xie Jingang[1] Kong Wenting[1] Wang Jianming[1] Hu Deqin[1]
Liu Ning[2*] Liu Xiaoning[1*]

（1. Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830017, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; 2. Institute of Crop Research, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China）

Abstract: To investigate the role of the pyruvate carboxylase (PYC) gene *AgPYC* in the growth, development and honeydew production of the cotton aphid *Aphis gossypii*, bioinformatics analysis of the *AgPYC* gene was performed. The interference fragment ds*AgPYC* was synthesized *in vitro*, and RNA interference assays were conducted to evaluate the effects of *AgPYC* silencing on the total sugar content in cotton aphids and their honeydews, as well as on aphid growth, developmental and population life table parameters. The results showed that the *AgPYC* gene sequence possessed typical structural features of PYC, and the predicted PYC protein was primarily localized in mitochondria. Phylogenetic analysis revealed that the amino acid sequence of the AgPYC protein was most closely related to that of PYC protein *Cinara cedri*. Among the three tested ds*AgPYC* concentrations, 750 ng/μL ds*AgPYC* exhibited the highest silencing efficiency. At 72 h after spraying with 750 ng/μL ds*AgPYC*, the relative expression level *AgPYC* in cotton aphids decreased by 44.5% compared with that after ds*GFP* treatment, and the total sugar contents in cotton aphids and their honeydews decreased by 16.2% and 18.1%,

基金项目：新疆维吾尔自治区自然基金重点项目（2022D01D07）

* 通信作者（Authors for correspondence），E-mail：liuxn0103@sina.com，1477538879@qq.com

收稿日期：2025-10-25

respectively, compared with those after ddH_2O treatment. After spraying with 750 ng/μL ds*AgPYC*, the body size of cotton aphids was markedly smaller than that in the other treatments, the cumulative mortality reached 47.8% on day 9, accompanied by a notable decline in the population fitness index (0.71). These findings indicate that the *AgPYC* gene may play an important regulatory role in sugar metabolism, honeydew formation, and growth and development in cotton aphids.

Key words: *Aphis gossypii*; pyruvate carboxylase; honeydew; total sugar; growth and development; life table parameter

棉蚜*Aphis gossypii*，又称瓜蚜，隶属半翅目蚜科，是农业生产上最主要的害虫之一（马康生等，2021）。棉蚜刺吸棉花汁液后，棉花叶片卷缩，畸形生长，导致幼苗萎蔫，甚至枯死。此外，在取食过程中棉蚜还会分泌大量蜜露（取食总量的70%以上），严重影响棉花的光合作用（姚永生，2017）。蜜露主要由蔗糖、葡萄糖和果糖组成（杨益众等，2005），不仅会污染棉花纤维，还会诱发霉菌寄生，严重影响棉花的产量和品质。蜜露的合成与分泌主要依靠棉蚜糖代谢途径的转化与重新分配（Blanchard et al.，2022），因此，明确棉蚜糖代谢途径及关键酶的作用对于棉蚜的防控至关重要。

生物机体通过糖代谢途径将葡萄糖等糖类物质在细胞内转化为三磷酸腺苷（adenosine triphosphate，ATP）、氨基酸、脂质和核苷酸等前体以维持正常的生命活动（Judge & Dodd，2020）。丙酮酸羧化酶（pyruvate carboxylase，PYC）作为糖代谢途径中的关键限速酶，位于糖酵解与三羧酸循环过程（tricarboxylic acid cycle，TCA）的枢纽位置，通过催化丙酮酸转化为草酰乙酸，并汇入TCA循环，参与能量代谢过程，同时介导机体维持能量代谢稳态。近年来，PYC因在糖异生、脂质合成、谷胱甘肽合成及氧化应激应答中的关键作用，被证实与糖尿病、肿瘤等多种疾病密切相关（Fu et al.，2021；Selen et al.，2022）。尽管目前针对昆虫PYC的直接研究较少，但作为连接糖酵解与TCA循环的关键节点，其在昆虫生命活动中的重要作用已被揭示（Kiesel et al.，2021）。PYC通过调控昆虫体内丙酮酸向草酰乙酸的转化，并与磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶（phosphoenolpyruvate carboxykinase，PEPCK）协同作用共同参与糖异生及糖原代谢调控（Martins da Silva et al.，2023）。例如，*PYC-1*缺失可显著改变秀丽隐杆线虫*Caenorhabditis elegans*线粒体呼吸、运动能力和寿命，说明其对线粒体功能和个体生理有基础性作用（Giaquinta et al.，2026）。当糖分缺少时烟草天蛾*Manduca sexta*幼虫中碳流会经PYC进入TCA循环并参与糖异生，当高糖时，PYC与丙酮酸脱氢酶之间的碳流分配趋于平衡（Thompson，2000）。美国白蛾*Hyphantria cunea*体内蜕皮激素20-羟基蜕皮酮（20-hydroxyecdysone，20E）可显著抑制脂肪体内PYC及其他糖异生限速酶的活性和转录水平，从而负向调控糖异生并重塑脂质代谢（Zhang SY et al.，2023）。作为糖代谢途径中的关键酶，PYC如何参与棉蚜体内糖的转化与利用，如何进一步影响其生长速率、存活及繁殖等生命活动尚不清楚。

本课题组前期研究发现，与取食非转基因棉花的棉蚜相比，取食表达ds*AgCYP6CY3*转基因棉花的棉蚜不仅发育历期延长，生长受阻，而且糖代谢通路被显著抑制，且体内*AgPYC*基因的相对表达量显著降低（魏原杰等，2017；Kong et al.，2025）。因此，为探究棉蚜*AgPYC*基因对棉蚜糖代谢以及生长发育的影响，本研究首先对棉蚜*AgPYC*基因进行生物信息学分析，体外合成干扰片段ds*AgPYC*，利用ds*AgPYC*进行干扰试验，明确沉默*AgPYC*基因对棉蚜体内及其蜜露中总糖含量、生长发育及种群生命表参数的影响，以期为棉蚜的有效治理提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试虫源和植物：2010年自新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市新市区安宁渠镇棉田采集棉蚜成蚜，带回实验室，于温度（25±1）℃、相对湿度50%~60%、光周期14 L∶10 D的条件下用3叶期新棉1号饲养，不接触任何杀虫剂，选择初孵若蚜供试。新棉1号种子，由新疆农业科学院经济作物研究所提供，种子催芽后，种植于上口直径15 cm、下口直径9 cm、高10 cm的花盆中，每盆1株，待长至3叶期供试。

试剂及仪器：DNA marker，宝日医生物技术（北京）有限公司；T7 RiboMAX™ Express RNAi System，美国Invitrogen公司；总糖含量检测试剂盒，北京索莱宝科技有限公司；EasyPure® PCR Purification Kit、PerfectStart Green qPCR SuperMix Kit、TransScript®

One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix和TransZol™ UP Plus RNA Kit，北京全式金生物技术有限公司；其他试剂均为国产分析纯。Nano Drop-1000紫外分光光度计和C1000™ Thermal Cycler PCR仪，美国赛默飞世尔科技有限公司；Gel Doc 2000凝胶成像仪，美国Bio-Rad公司；DYY-6D凝胶电泳仪，北京六一生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 棉蚜*AgPYC*基因的生物信息学分析

从NCBI GenBank数据库下载棉蚜*AgPYC*基因的氨基酸序列（GenBank登录号为XP_027849471.2），利用BioEdit 7.2.1软件对棉蚜*AgPYC*基因编码的氨基酸序列的保守区域进行分析；采用PSORT II Prediction软件（http://psort.hgc.jp/form2.html）预测其亚细胞定位；在NCBI数据库（https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi）中对棉蚜*AgPYC*基因进行BLAST同源性比对，下载同源性较高的其他昆虫*PYC*基因的氨基酸序列，利用MEGA 7.0软件，基于邻近法构建系统发育树（Geourjon & Deléage，1995），采用Bootstrap法对进化树分支置信度进行1 000次检测。

1.2.2 dsRNA的体外合成及鉴定

采用干扰位点预测网站（https://rnaidesigner.thermofisher. com/rnaiexpress/sort. do）设计棉蚜*AgPYC*基因干扰片段ds*AgPYC*的引物ds*AgPYC*-F/ds*AgPYC*-R和ds*GFP*片段的引物ds*GFP*-F/ds*GFP*-R（表1）。所有引物均委托生工生物工程（上海）股份有限公司合成。采用TransZol™ UP Plus RNA Kit提取100头棉蚜初孵若蚜总RNA，用紫外分光光度计和1%琼脂糖凝胶电泳检测总RNA的浓度及质量，检测合格后按照TransScript® One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix说明书反转录合成cDNA。以合成的cDNA为模板进行PCR扩增。20 μL PCR反应体系：cDNA 0.5 μL、Ex *Taq*酶0.2 μL、10×PCR Buffer 2 μL、上下游引物各0.5 μL，dNTP 2 μL，ddH_2O 14.3 μL。扩增程序：95 ℃预变性5 min；95 ℃变性30 s，60 ℃退火30 s，72 ℃延伸30 s，34个循环；72 ℃终延伸10 min。采用1%琼脂糖凝胶电泳对干扰片段的质量进行检测，利用EasyPure® PCR Purification Kit纯化回收检测合格的扩增产物，采用紫外分光光度计检测其纯度与浓度，置于−80 ℃冰箱中保存，备用。以回收产物为模板，按照T7 RiboMAX™ Express RNAi System体外合成ds*AgPYC*和ds*GFP*。采用紫外分光光度计检测dsRNA浓度和纯度，采用1%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性，取质量较好的置于−80 ℃冰箱中保存，备用。

表1 本研究所用的引物序列

Table 1 Primer sequences in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5′−3′) Primer sequence (5′−3′)
ds*AgPYC*-F	TAATACGACTCACTATAGGGATGAGGGTGGTTCGGAAAATGG
ds*AgPYC*-R	TAATACGACTCACTATAGGGTTCGCCGCTCCTGAATACTT
ds*GFP*-F	TAATACGACTCACTATAGGGACAGTGCTTCAGCCGCTAC
ds*GFP*-R	TAATACGACTCACTATAGGGAGTTCACCTTGATGCCGTTC
AgPYC qPCR-F	CTGATGTAGTTGATGTTGCTGTTG
AgPYC qPCR-R	TTTCCTGATTTCATTGTTGTTGTA
18S rRNA-F	CCGGAAAGATTGACAGATTGAG
18S rRNA-R	CAGGACAGAGTCTCGTTCGTTATC

下划线为T7启动子序列。Underlined is T7 promoter sequence.

1.2.3 不同浓度ds*AgPYC*干扰效果的测定

取1.2.2合成的ds*AgPYC*溶液，用无RNase/DNase水将其浓度分别稀释为250、500和750 ng/μL。选取生长状态一致的3叶期棉花植株，每株接120头棉蚜初孵若蚜（1个重复），分别喷洒3种浓度的ds*AgPYC*溶液，每株喷施200 μL，以喷洒等量ds*GFP*和无菌水作为阴性对照和空白对照，每个处理3个生物学重复，每个重复100头若蚜。分别于喷洒后36、48、72和96 h收集试虫，液氮速冻后于−80 ℃保存。棉蚜RNA提取及cDNA合成同1.2.2。采用NCBI数据库中Primer-BLAST软件在线设计实时荧光定量PCR（real-time quantitative PCR，qPCR）引物*AgPYC* qPCR-F/*AgPYC* qPCR-R（表1）。以合成的cDNA为模板，以棉蚜*18S rRNA*作为内参基因进行qPCR检测。20 μL qPCR反应体系：2×Real-StarFast SYBR qPCR MixPCR 10 μL、上下游引物各0.5 μL、cDNA模板1 μL、ddH_2O 8 μL。扩增程序：95 ℃预变性60 s；95 ℃变性15 s，69 ℃退火30 s，72 ℃延伸30 s，40个循环。每个试验2次技术重复。采用$2^{-\triangle\triangle CT}$法计算*AgPYC*基因的相对表达量（Livak & Schmittgen，2001）。选择干扰效果较好的ds*AgPYC*浓度进行后续试验。

1.2.4 沉默*AgPYC*对棉蚜及其蜜露中总糖含量的影响

选取生长状态一致的3叶期棉花植株，每株接入120头棉蚜初孵若蚜（1个重复），选取1.2.3干扰

效果较好的ds*AgPYC*溶液，将其均匀喷洒至接有试虫的棉花植株上，以喷施等量ds*GFP*和无菌水分别作为阴性对照和空白对照。72 h后每株随机收取100头健康活跃试虫（1个重复），每个处理3个重复。同时，为进一步分析蜜露中总糖含量变化，接虫36 h时于棉花植株下放置parafilm膜，持续收集处理72 h内滴落的蜜露，每个处理3个重复。将收集的棉蚜和棉蚜蜜露样品分别于95 ℃水中水浴10 min。冷却后于4 000 *g*下离心10 min，吸取上清液按照总糖含量检测试剂盒说明书测定波长540 nm处的吸光度，根据浓度–吸光度标准曲线计算总糖含量。

1.2.5　沉默*AgPYC*基因对棉蚜生长发育的影响

选取生长状态一致的3叶期棉花植株，每株接入30头棉蚜初孵若蚜（1个重复），选取1.2.3干扰效果较好的ds*AgPYC*溶液，将其均匀喷洒至接有试虫的棉花植株上，每株150 μg，以喷施等量ds*GFP*和无菌水处理分别作为阴性对照和空白对照，每个处理3个重复，每天观察试虫死亡数量并记录，直至试虫全部死亡，计算累计死亡率。

1.2.6　沉默*AgPYC*基因对棉蚜种群生命表参数的影响

选取生长状态一致的3叶期棉花，每株接入30头棉蚜初孵若蚜（1个重复），选取1.2.3干扰效果较好的ds*AgPYC*溶液，将其均匀至接有试虫的棉花植株上，每株150 μg，以喷施等量ds*GFP*和无菌水处理分别作为阴性对照和空白对照，每个处理3个重复，每天观察试虫，记录试虫的蜕皮时间、次数、龄期及各龄期若虫的发育历期和存活率，并清理蜕皮。采用TWOSEX-MSChart软件，利用Bootstrap技术计算棉蚜种群净增殖率、平均世代周期、内禀增长率、周限增长率、种群加倍时间和适合度等生命表参数，重复100 000次。

1.3　数据分析

采用SPSS 20.0软件对试验数据进行统计分析。应用paired bootstrap test对生命表参数进行差异显著性检验，对其他数据应用单因素方差分析，并采取Tukey检验法进行差异显著性检验。

2　结果与分析

2.1　棉蚜*AgPYC*基因序列及亚细胞地位分析

棉蚜*AgPYC*基因序列与雪松长足大蚜*Cinara cedri*、柑橘木虱*Diaphorina citri*、烟粉虱*Bemisia tabaci*和糖槭盔蚧*Parthenolecanium corni*的*PYC*基因序列一致，具有PYC的典型结构特征，即包含两个Mg-ATP结合位点、1个生物素结合位点、1个丙酮酸结合位点和1个二价金属离子结合位点（图1）。棉蚜PYC蛋白主要位于线粒体内。

2.2　棉蚜AgPYC蛋白的系统进化分析

棉蚜AgPYC蛋白的氨基酸序列（GenBank登录号为XP_027849471.2）与雪松长足大蚜PYC蛋白的氨基酸序列（GenBank登录号为VVC43536.1）的亲缘关系最近；而糖槭盔蚧、柑橘木虱、烟粉虱等其他半翅目物种则各自形成独立的亚分支（图2）。

2.3　ds*AgPYC*片段的合成及鉴定

通过体外扩增获得570 bp的ds*AgPYC*片段基因序列（图3-A）。经1%琼脂糖凝胶电泳检测后，合成的ds*GFP*和ds*AgPYC*的条带单一完整（图3-B），可用于后续试验。

2.4　不同浓度ds*AgPYC*的干扰效果

喷洒250 ng/μL ds*AgPYC*后36、48、72和96 h，棉蚜体内*AgPYC*的相对表达量与喷洒ds*GFP*无显著差异（图4-A）。喷洒500 ng/μL ds*AgPYC*后36 h和48 h，棉蚜体内*AgPYC*的相对表达量与喷洒ds*GFP*无显著差异；其他处理时间棉蚜体内*AgPYC*相对表达量均显著低于喷洒ds*GFP*（$P<0.05$，图4-B）。喷洒750 ng/μL ds*AgPYC*后36 h，棉蚜体内*AgPYC*的相对表达量与喷洒ds*GFP*无显著差异；其他处理时间棉蚜体内*AgPYC*的相对表达量均显著低于喷洒ds*GFP*（$P<0.05$），且喷洒后72 h，棉蚜体内*AgPYC*的相对表达量最低，较喷施ds*GFP*降低了44.5%（图4-C）。表明喷洒750 ng/μL ds*AgPYC*的干扰效果最好，后续试验采用750 ng/μL浓度进行ds*AgPYC*处理。

2.5　沉默*AgPYC*对棉蚜及其蜜露中总糖含量的影响

喷洒750 ng/μL ds*AgPYC*后72 h，棉蚜体内总糖含量为6.5 μg/g，分别较喷洒ds*GFP*和喷洒H_2O显著降低了19.7%和16.2%（$P<0.05$，图5-A）；喷洒750 ng/μL ds*AgPYC*后72 h，棉蚜蜜露中总糖含量为5.8 μg/g，分别较喷洒ds*GFP*和喷洒H_2O显著降低了12.5%和18.1%（$P<0.05$，图5-B），表明沉默*AgPYC*基因导致棉蚜体内及其蜜露中总糖含量下降。

2.6　沉默*AgPYC*对棉蚜生长发育的影响

喷洒ds*AgPYC*后72 h，棉蚜体型明显小于其他两个处理（图6）。喷洒ds*AgPYC*后3~9 d，棉蚜的累计死亡率均显著大于其他两个处理（$P<0.05$），且在第9天累计死亡率达47.8%；而ds*AgPYC*处理11~21 d时，棉蚜的累计死亡率与其他两个处理均差异不显著（图7）。表明干扰棉蚜*AgPYC*基因可抑制棉蚜生长发育，增加棉蚜的死亡率。



AgPYC、CcPYC、DcPYC、BtPYC和PcPYC：棉蚜、雪松长足大蚜、柑橘木虱、烟粉虱和糖槭盔蚧的*PYC*基因的氨基酸序列。红色方框：Mg-ATP结合位点；黄色方框：丙酮酸结合位点；绿色方框：二价金属离子结合位点；蓝色方框：生物素结合位点。AgPYC, CcPYC, DcPYC, BtPYC and PcPYC represent the amino acid sequences of PYC proteins from *Aphis gossypii*, *Cinara cedri*, *Diaphorina citri*, *Bemisia tabaci* and *Parthenolecanium corni*, respectively. Red boxes indicate Mg-ATP binding sites; yellow boxes indicate pyruvate binding sites; green boxes indicate divalent metal ion binding sites; blue boxes indicate biotin binding sites.

图1 棉蚜*AgPYC*基因的氨基酸序列比对分析

Fig. 1 Amino acid sequences alignment analysis of *AgPYC* in *Aphis gossypii*

2.7 沉默*AgPYC*对棉蚜种群生命表参数的影响

ds*AgPYC*处理后，棉蚜种群的净增殖率、内禀增长率、周限增长率和平均世代周期分别为14.72、0.32 d^{-1}、1.39 d^{-1}和8.24 d，前三者均显著低于其他两个处理（$P<0.05$）；ds*AgPYC*处理后，棉蚜种群加倍时间为2.12 d，较其他两个处理显著延长（$P<0.05$），而棉蚜种群的适合度降为0.71，较ds*GFP*处理的种群适合度下降（表2）。表明沉默棉蚜*AgPYC*基因可降低棉蚜种群的适合度。

3 讨论

本研究通过对棉蚜*AgPYC*基因序列进行分析发现，*AgPYC*基因编码1 196个氨基酸残基。棉蚜AgPYC的氨基酸序列具有PYC的典型结构特征，包含两个Mg-ATP结合位点、1个生物素结合位点、1个丙酮酸结合位点和1个二价金属离子结合位点（Jitrapakdee et al.，2002），这些保守区域是催化活性的关键组成部分，表明AgPYC在丙酮酸羧化反应过程中可能发挥着重要作用（Valle，2017）。棉蚜*AgPYC*基因序列与雪松长足大蚜、糖槭盔蚧、柑橘木虱和烟粉虱*PYC*基因序列几乎完全相同，表明棉蚜*AgPYC*基因序列功能性位点区域在进化上非常保守。此外，本研究通过系统发育分析显示，棉蚜AgPYC蛋白与雪松长足大蚜PYC蛋白的同源性最高，表明该基因在进化上较保守，推测AgPYC可能在棉蚜糖异生及TCA循环途径中起重要作用。

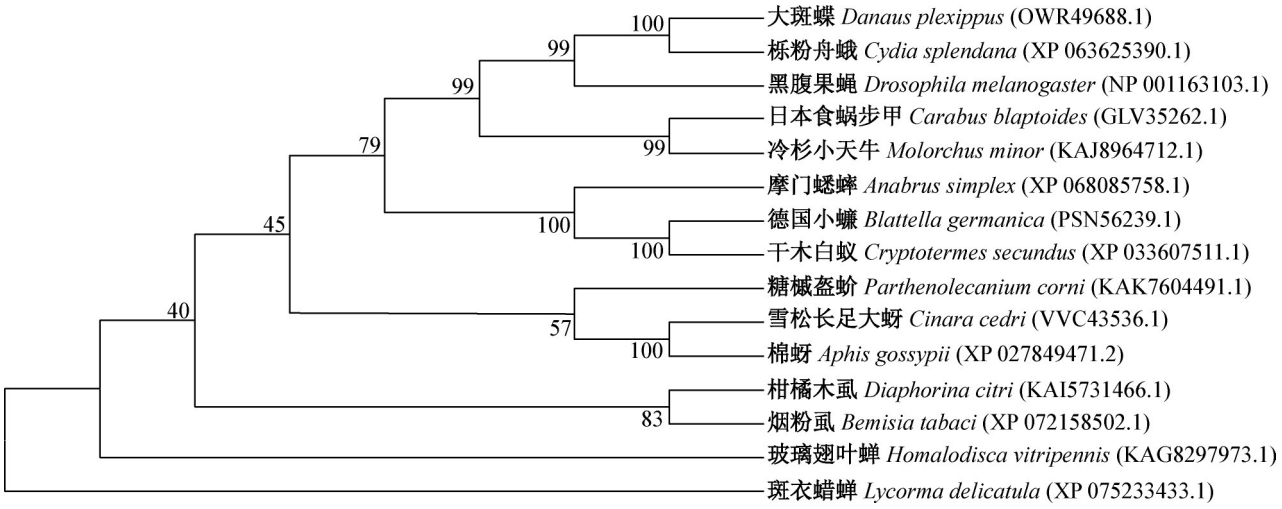
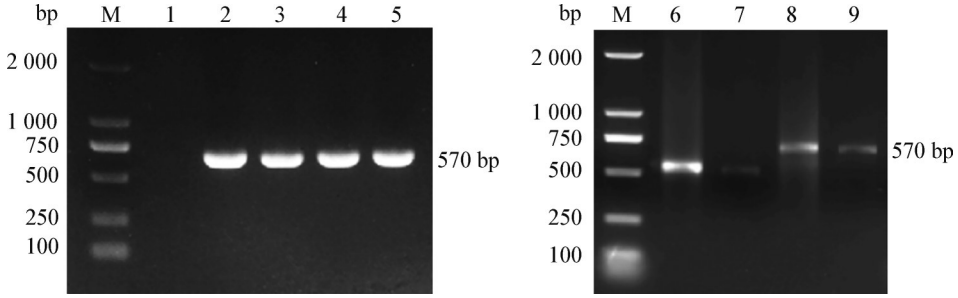


图2　基于氨基酸序列采用邻近法构建棉蚜AgPYC蛋白及其他物种PYC蛋白的系统进化树

Fig. 2　Phylogenetic tree of the AgPYC protein from *Aphis gossypii* and PYC proteins from other insect species constructed using the neighbor-joining method based on amino acid sequences



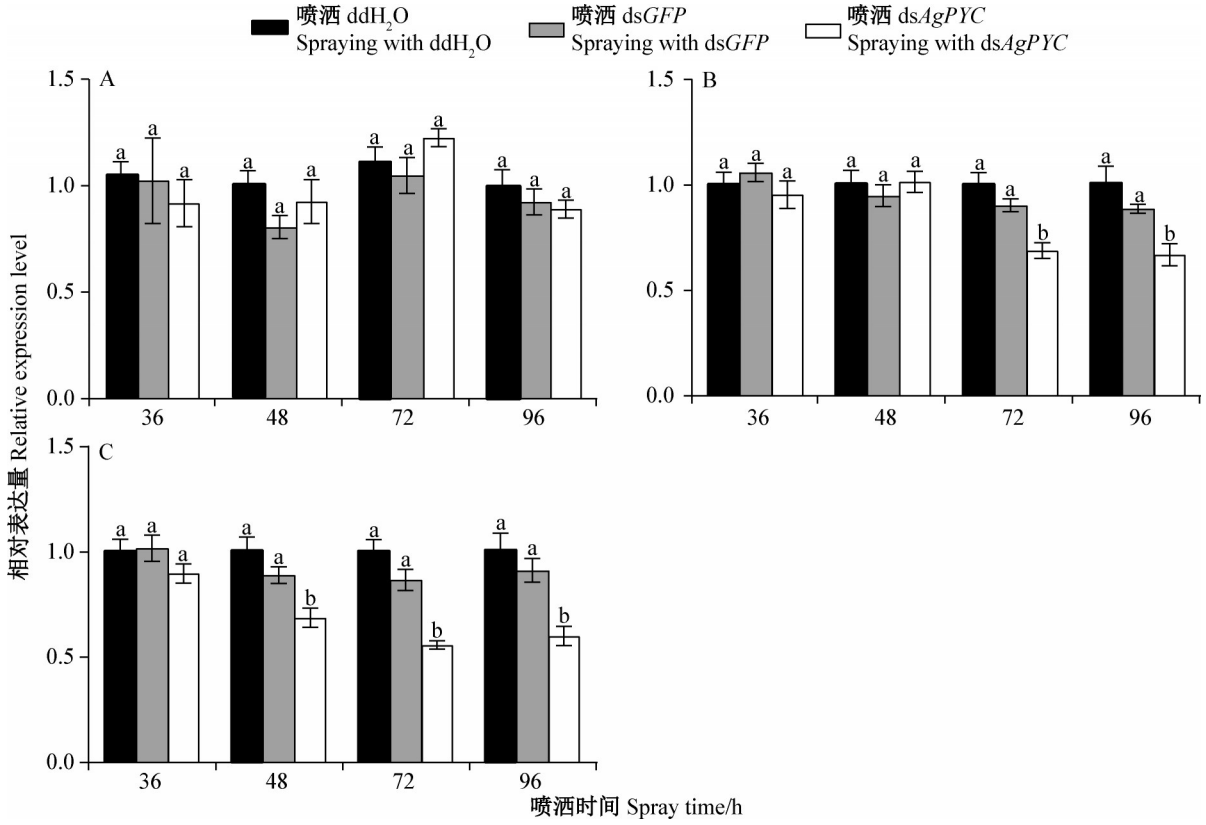
M：2 000 bp DNA marker；1：阴性对照；2~5：ds*AgPYC*片段扩增；6和7：核酸酶消化前后的ds*GFP*；8和9：核酸酶消化前后的ds*AgPYC*。M: 2000 bp DNA marker; 1: negative control; 2−5: amplification of ds*AgPYC* fragments; 6−7: ds*GFP* before and after nuclease digestion; 8−9: ds*AgPYC* before and after nuclease digestion.

图3　干扰片段ds*AgPYC*的扩增（A）和体外合成（B）

Fig. 3　Amplification (A) and *in vitro* synthesis (B) of the interfering fragments ds*AgPYC*

RNAi干扰（RNA interference RNAi）技术因其作用精准、环境友好等特点，已成为绿色防控害虫的策略之一（Zhu & Palli，2020）。而该技术的关键在于dsRNA在昆虫体内是否稳定、是否能被有效吸收并触发靶标基因的沉默（Darlington et al.，2022）。Wang et al.（2019）研究表明dsRNA长度既影响细胞摄取，也会使宿主小干扰RNA（small interfering RNA，siRNA）产生多样性，从而改变RNAi效率。本研究选取长度570 bp的*AgPYC*片段合成ds*AgPYC*，其能对棉蚜*AgPYC*基因进行有效沉默，表明所设计的ds*AgPYC*片段长度较合理。在赤拟粉甲*Tribolium castaneum*中长度为21 bp的siRNA和长度为31 bp的dsRNA几乎不起作用，而当dsRNA的长度为60~69 bp时，RNAi开始有效，且480~520 bp长片段的干扰效果和持续时间均优于短片段（Miller et al.，2012）。在马铃薯叶甲*Leptinotarsa decemlineata*中，不同长度乙酰胆碱酯酶1（acetylcholinesterase 1，ACE1）基因片段所合成的dsRNA均能有效沉默*ACE1*基因，但其中长度670 bp dsRNA的沉默效率最高，分别与长度为222 bp和870 bp的dsRNA的沉默效率相当（Julian-Chávez et al.，2024）。此外，递送方式决定了dsRNA在环境中的稳定性以及在害虫体内的吸收和分布，从而影响对靶标基因的干扰效率及对目标害虫的防效（Yu et al.，2013）。例如，Zhang LJ et al.（2023）构建了ds*CP6CY3*转基因棉花株系，取食该转基因棉花48 h时，棉蚜体内*CYP6CY3*的相对表达水平较对照显著下降47.3%；利用ds*GSTT2*连续饲喂72 h后，豆蚜*Aphis craccivora*体内谷胱甘肽*S*-转移酶T2（glutathione *S*-transferase T2，GSTT2）基因

的沉默效率可达43.8%(薛超等,2025);本研究发现750 ng/μL ds*AgPYC*处理72 h后,棉蚜体内*AgPYC*基因表达水平较对照显著降低44.5%。因此,合理设计dsRNA长度并选择适宜的递送方式可实现对棉蚜*AgPYC*基因的沉默,从而为基于RNAi的棉蚜防控技术提供参考数据。未来研究可进一步优化dsRNA递送载体与稳定性,推动该技术向田间应用的转化。



A~C:ds*AgPYC*浓度分别为250、500和750 ng/μL。A–C: ds*AgPYC* concentrations of 250, 500, and 750 ng/μL, respectively.

图4 喷施不同浓度ds*AgPYC*后棉蚜体内*AgPYC*基因的相对表达量

Fig. 4 Relative expression levels of the *AgPYC* gene in *Aphis gossypii* after spraying with different concentrations of ds*AgPYC*

图中数据为平均数±标准误。不同小写字母表示同时间不同处理之间经Tukey检测法检验差异显著(P<0.05)。Data are mean±SE. Different lowercase letters indicate significant differences among treatments at the same time point according to Tukey's test (P<0.05).

昆虫通过糖代谢途径调节葡萄糖、海藻糖和糖原平衡,进而控制几丁质合成、蜕皮、变态和翅发育。其中,PYC是丙酮酸进入TCA循环和糖异生的关键补充途径酶,其活性变化会直接影响碳流向及总糖含量。Thompson & Borchard(1996)利用同位素示踪发现烟草天蛾中海藻糖的生成明显依赖丙酮酸羧化途径;当食物缺糖时,PYC介导的丙酮酸羧化成为合成葡萄糖/海藻糖的主要来源。Cedden et al.(2025)研究显示当PYC活性增加时,其通过促进糖异生和为糖类合成提供碳骨架来维持或提高总糖含量,而当PYC活性被抑制时,其进入糖异生和相关合成途径的碳流减少,导致组织或个体总糖含量下降。本研究结果显示沉默*AgPYC*后棉蚜体内及其蜜露的总糖含量分别较喷洒ddH_2O降低了16.2%和18.1%,与已有研究结果一致。此外,Ge et al.(2019)采用RNAi技术介导糖代谢途径中己糖激酶-1(hexokinase-1-like,Hex-1)活性降低后,严重破坏了褐飞虱*Nilaparvata lugens*雌成虫体内海藻糖和葡萄糖的稳态,最终影响雌成虫的繁殖力。采用RNAi技术敲低麦红吸浆虫*Sitodiplosis mosellana*体内第1类胞质型磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase,PEPCK)基因的第2个亚型*SmPEPCK1-2*后,麦红吸浆虫化蛹时间显著延长,表明*PEPCK*对幼虫向蛹阶段的转变进程有调节作用(Huang et al.,2026)。然而关于PEPCK上游的PYC在昆虫生长发育中的研究较少。吴艳丽(2013)研究

结果显示敲除黑腹果蝇*Drosophila melanogaster*中*PYC*的同源基因会导致其幼虫在发育晚期死亡。本研究结果显示喷洒ds*AgPYC*后，棉蚜体型缩小，第9天累计死亡率达到47.8%，适合度降至0.71，表明*AgPYC*缺失会严重影响棉蚜的能量储备与生理机能，最终影响其种群增长潜力。

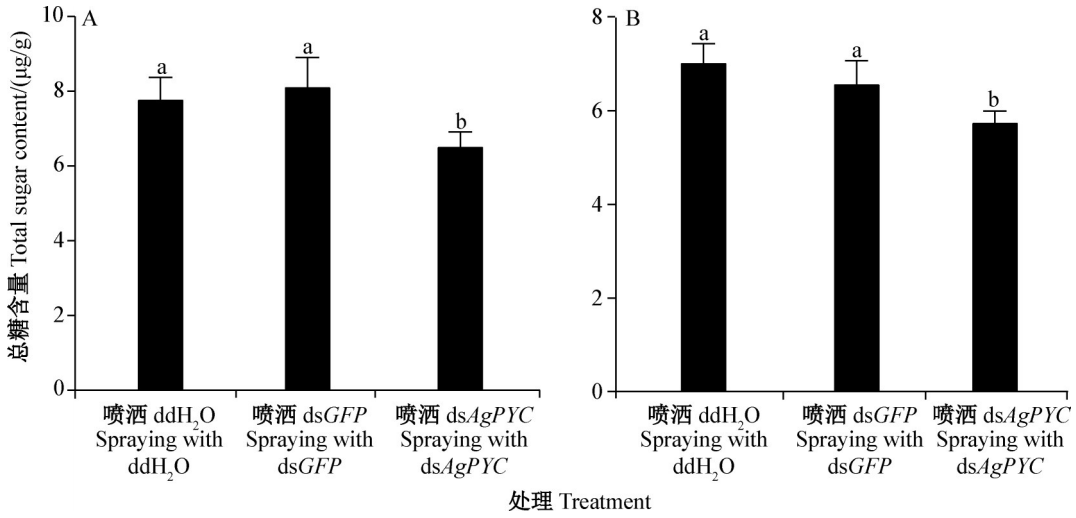


图5 沉默*AgPYC*基因对棉蚜体内（A）及其蜜露（B）中总糖含量的影响

Fig. 5 Effects of silencing the *AgPYC* gene on total sugar contents in *Aphis gossypii* (A) and its honeydew (B)

图中数据为平均数±标准误。不同小写字母表示不同处理经Tukey检测法检验差异显著（$P<0.05$）。Data are mean±SE. Different lowercase letters indicate significant differences among treatments according to Tukey's test ($P<0.05$).

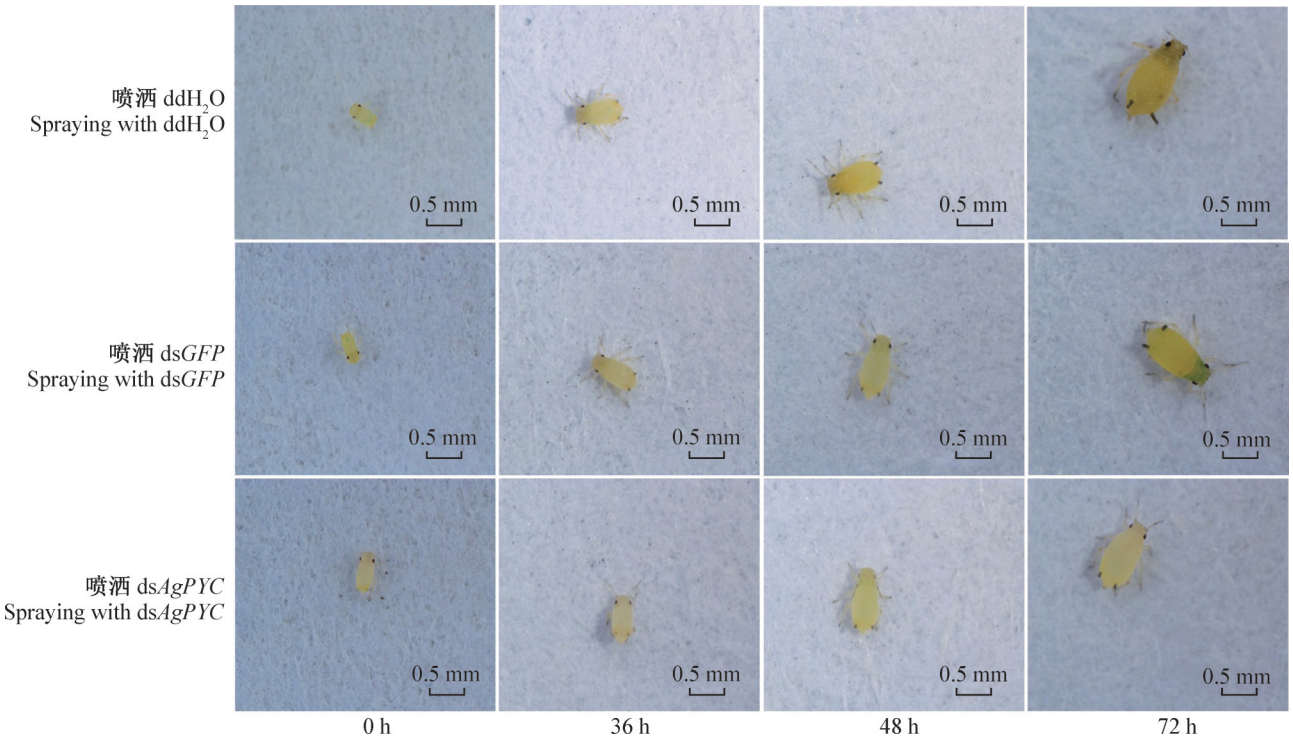


图6 不同处理后棉蚜表型

Fig. 6 Phenotypic changes in *Aphis gossypii* after different treatments

综上所述，本研究通过RNAi介导*AgPYC*基因沉默，证实了*AgPYC*在棉蚜能量代谢与生长发育过程中的核心调控作用，可作为潜在的RNAi高效靶标基因。后续可通过纳米颗粒包裹ds*AgPYC*进行喷洒来进一步提高沉默效果。此外，关于*AgPYC*参与棉蚜能量代谢及生长发育的具体机制还不明确，

后续可通过转录组与代谢组联合分析以及相关功能验证试验予以阐明。

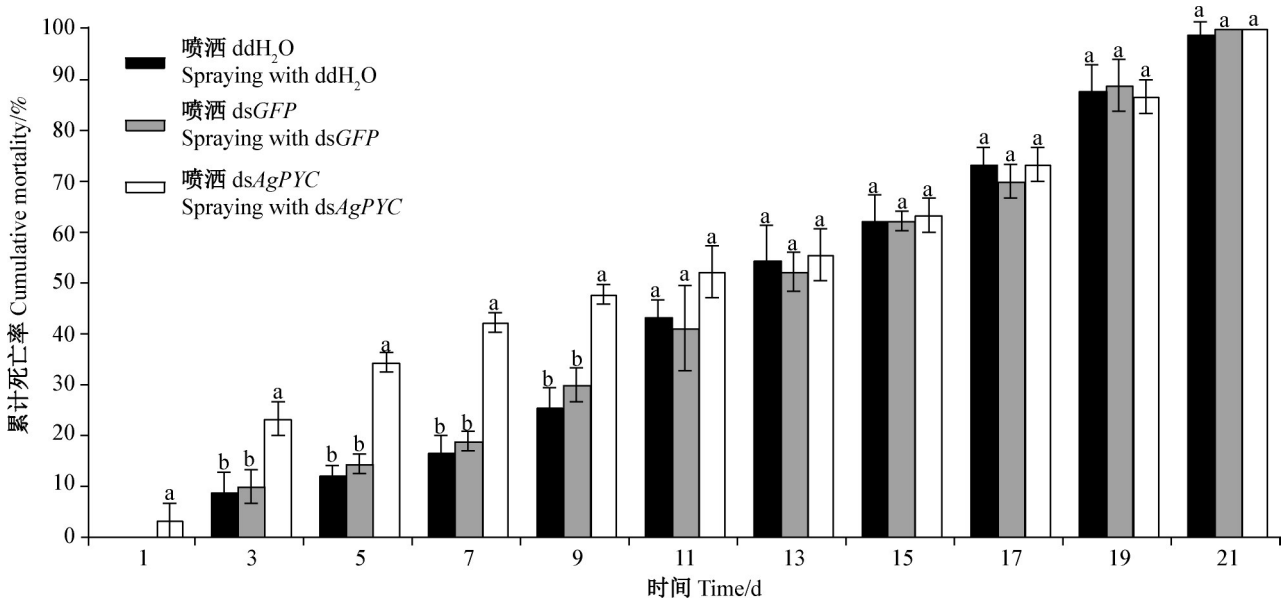


图7 不同处理后棉蚜的累计死亡率

Fig. 7 Cumulative mortality of *Aphis gossypii* after different treatments

图中数据为平均数±标准误。不同小写字母表示同时间不同处理之间经Tukey检测法检验差异显著(P<0.05)。Data are mean±SE. Different lowercase letters indicate significant differences among treatments at the same time point according to Tukey's test (P<0.05).

表2 不同处理后棉蚜种群的生命表参数

Table 2 Life table parameters of *Aphis gossypii* populations after different treatments

处理 Treatment	净增殖率 Net reproductive rate	内禀增长率 Intrinsic rate of increase/d^{-1}	周限增长率 Finite rate of increase/d^{-1}	平均世代周期 Mean generation time/d	种群加倍时间 Population doubling time/d	适合度 Fitness
ddH_2O	20.66±0.93 a	0.37±0.01 a	1.44±0.01 a	8.28±0.17 a	1.90±0.06 b	–
ds*GFP*	19.36±1.37 a	0.37±0.01 a	1.43±0.01 a	8.23±0.05 a	1.93±0.06 b	0.95
ds*AgPYC*	14.72±0.29 b	0.32±0.01 b	1.39±0.01 b	8.24±0.12 a	2.12±0.04 a	0.71

表中数据为平均数±标准误。同列不同小写字母表示经paired bootstrap test检验差异显著(P<0.05)。Data are mean±SE. Different lowercase letters within the same column indicate significant differences according to paired bootstrap test (P<0.05).

参 考 文 献（References）

Blanchard S, Verheggen F, Van De Vreken I, Richel A, Detrain C. 2022. Combined elevation of temperature and CO_2 impacts the production and sugar composition of aphid honeydew. Journal of Chemical Ecology, 48(9/10): 772−781

Cedden D, Güney G, Rostás M, Bucher G. 2025. Optimizing dsRNA sequences for RNAi in pest control and research with the dsRIP web platform. BMC Biology, 23: 114

Darlington M, Reinders JD, Sethi A, Lu AL, Ramaseshadri P, Fischer JR, Boeckman CJ, Petrick JS, Roper JM, Narva KE, et al. 2022. RNAi for western corn rootworm management: lessons learned, challenges, and future directions. Insects, 13(1): 57

Fu A, van Rooyen L, Evans L, Armstrong N, Avizonis D, Kin T, Bird GH, Reddy A, Chouchani ET, Liesa-Roig M, et al. 2021. Glucose metabolism and pyruvate carboxylase enhance glutathione synthesis and restrict oxidative stress in pancreatic islets. Cell Reports, 37(8): 110037

Ge LQ, Gu HT, Li X, Zheng S, Zhou Z, Miao H, Wu JC. 2019. Silencing of triazophos-induced hexokinase-1-like reduces fecundity in *Nilaparvata lugens* (Stål) (Hemiptera: Delphacidae). Pesticide Biochemistry and Physiology, 153: 176−184

Geourjon C, Deléage G. 1995. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. Bioinformatics, 11(6): 681−684

Giaquinta R, Andric A, Scheppach M, Weiss AKH. 2026. Synergistic roles of *FAHD-1* and *PYC-1* in mitochondrial function, behavior, and longevity in *C. elegans*. Advanced Biology, 10: e0041

Huang QT, Nie YX, Liu XB, Ma Q, Tang WQ, Cheng WN. 2026. Characterization and expression of two cytoplasmic phosphoenolpyruvate carboxykinase genes associated with larval diapause and temperature stress in the wheat blossom midge, *Sitodiplosis mosellana*. Biology, 15(2): 147

Jitrapakdee S, Nezic MG, Ian Cassady A, Khew-Goodall Y, Wallace

JC. 2002. Molecular cloning and domain structure of chicken pyruvate carboxylase. Biochemical and Biophysical Research Communications, 295(2): 387−393

Judge A, Dodd MS. 2020. Metabolism. Essays in Biochemistry, 64(4): 607−647

Julian-Chávez B, Siqueiros-Cendón TS, Torres-Castillo JA, Sinagawa-García SR, Abraham-Juárez MJ, González-Barriga CD, Rascón-Cruz Q, Siañez-Estrada LI, Arévalo-Gallegos S, Espinoza-Sánchez EA. 2024. Silencing *ACE1* gene with dsRNA of different lengths impairs larval development in *Leptinotarsa decemlineata*. Insects, 15(12): 1000

Kiesel VA, Sheeley MP, Coleman MF, Cotul EK, Donkin SS, Hursting SD, Wendt MK, Teegarden D. 2021. Pyruvate carboxylase and cancer progression. Cancer & Metabolism, 9: 20

Kong WT, Li TT, Li Y, Zhang LJ, Xie JG, Liu XN. 2025. Transgenic cotton expressing ds*AgCYP6CY3* significantly delays the growth and development of *Aphis gossypii* by inhibiting its glycolysis and TCA cycle. International Journal of Molecular Sciences, 26(1): 264

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

Ma KS, Wang JH, Xie XP, Gao XW. 2021. Status and management strategies of neonicotinoid insecticide resistance in *Aphis gossypii* Glover. Journal of Plant Protection, 48(5): 947−957 (in Chinese) [马康生, 王静慧, 解晓平, 高希武. 2021. 棉蚜对新烟碱类杀虫剂的抗性现状及其治理策略. 植物保护学报, 48(5): 947−957]

Martins da Silva R, de Oliveira Daumas Filho CR, Calixto C, Nascimento da Silva J, Lopes C, da Silva Vaz I Jr., Logullo C. 2023. PEPCK and glucose metabolism homeostasis in arthropods. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 160: 103986

Miller SC, Miyata K, Brown SJ, Tomoyasu Y. 2012. Dissecting systemic RNA interference in the red flour beetle *Tribolium castaneum*: parameters affecting the efficiency of RNAi. PLoS ONE, 7(10): e47431

Selen ES, Rodriguez S, Cavagnini KS, Kim HB, Na CH, Wolfgang MJ. 2022. Requirement of hepatic pyruvate carboxylase during fasting, high fat, and ketogenic diet. Journal of Biological Chemistry, 298(12): 102648

Thompson SN. 2000. Pyruvate cycling and implications for regulation of gluconeogenesis in the insect, *Manduca sexta* L. Biochemical and Biophysical Research Communications, 274(3): 787−793

Thompson SN, Borchard DB. 1996. An *in vivo* ^{13}C NMR study on the effect of dietary sugar on pyruvate cycling during glucogenesis from (2-13C) pyruvate in *Manduca sexta* L. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 26(10): 1047−1054

Valle M. 2017. “Pyruvate carboxylase, structure and function”//Harris JR, Marles-Wright J. Macromolecular protein complexes: structure and function. Cham: Springer International Publishing, pp. 291−322

Wang K, Peng Y, Fu W, Shen Z, Han Z. 2019. Key factors determining variations in RNA interference efficacy mediated by different double-stranded RNA lengths in *Tribolium castaneum*. Insect Molecular Biology, 28(2): 235−245

Wei YJ, Wang YM, Huang LN, Liu N, Zhao J, Ai XY, Liu XN. 2017. Cloning, prokaryotic expression and preparation of the polyclonal antibody against *CYP6CY3* from *Aphis gossypii*. Scientia Agricultura Sinica, 50(7): 1351−1360 (in Chinese) [魏原杰, 王亚美, 黄丽娜, 刘宁, 赵洁, 艾新宇, 刘小宁. 2017. 棉蚜P450 *CYP6CY3*的克隆、原核表达及多克隆抗体的制备. 中国农业科学, 50(7): 1351−1360]

Wu YL. 2013. The effects of pyruvate carboxylase deficiency in *Drosophila melanogaster* development and a preliminary study of its molecular mechanisms. Master thesis. Xiamen: Xiamen University (in Chinese) [吴艳丽. 2013. 丙酮酸羧化酶缺陷对果蝇发育的影响及其分子机制的初步探讨. 硕士学位论文. 厦门: 厦门大学]

Xue C, Duan AL, Wang AY, Yang YX. 2025. The role of GSTs in the detoxification metabolism of *Aphis craccivora* to afidopyropen. Biotechnology Bulletin, 41(12): 304−312 (in Chinese) [薛超, 段爱玲, 王爱玉, 杨媛雪. 2025. GSTs在花生蚜对双丙环虫酯解毒代谢中的作用. 生物技术通报, 41(12): 304−312]

Yang YZ, Lu YH, Xue WJ, Yu YS, Li XH, Wang F, Yang HY, Liu Y. 2005. Effects of change in the content of sugars and free amino acids in transgenic cotton cultivars on the secretion amount and major nutritive components of honeydew of *Aphis gossypii* Glover. Acta Entomologica Sinica, 48(4): 491−497 (in Chinese) [杨益众, 陆宴辉, 薛文杰, 余月书, 李晓慧, 王峰, 杨海燕, 刘洋. 2005. 转基因棉花中糖类和游离氨基酸含量的变化对棉蚜泌蜜量及蜜露主要成分的影响. 昆虫学报, 48(4): 491−497]

Yao YS. 2017. Interspecific pattern change of *Aphis gossypii* and *Acyrthosiphon gossypii* and its’ influencing factors in southern Xinjiang cotton-growing region. PhD thesis. Beijing: China Agricultural University (in Chinese) [姚永生. 2017. 新疆南部棉区棉蚜与棉长管蚜种间关系的格局变化及影响因素分析. 博士学位论文. 北京: 中国农业大学]

Yu N, Christiaens O, Liu JS, Niu JZ, Cappelle K, Caccia S, Huvenne H, Smagghe G. 2013. Delivery of dsRNA for RNAi in insects: an overview and future directions. Insect Science, 20(1): 4−14

Zhang LJ, Wei YJ, Wei LY, Liu XN, Liu N. 2023. Effects of transgenic cotton lines expressing ds*AgCYP6CY3-P1* on the growth and detoxification ability of *Aphis gossypii* Glover. Pest Management Science, 79(1): 481−488

Zhang SY, Gao H, Askar A, Li XP, Zhang GC, Jing TZ, Zou H, Guan H, Zhao YH, Zou CS. 2023. Steroid hormone 20-hydroxyecdysone disturbs fat body lipid metabolism and negatively regulates gluconeogenesis in *Hyphantria cunea* larvae. Insect Science, 30(3): 771−788

Zhu KY, Palli SR. 2020. Mechanisms, applications, and challenges of insect RNA interference. Annual Review of Entomology, 65: 293−311

（责任编辑：张俊芳）