美国白蛾自噬基因*HcAtg8*的鉴定及其对沉默*HcV-ATPase A*的响应

王薄毓 王晓洁 韩 莹 王 海 赵 丹 王 倩 姚亚林* 陆秀君*

（河北农业大学植物保护学院，保定 071001）

摘要：为明确美国白蛾*Hyphantria cunea*调控细胞能量代谢的V型质子ATP酶催化亚基A（V-type proton ATPase catalytic subunit A，V-ATPase A）基因*HcV-ATPase A*与自噬相关基因（autophagy-related gene，Atg）*HcAtg8*的级联效应，采用PCR技术克隆*HcAtg8*基因，分析该基因的生物学信息及系统进化关系，利用原核表达系统体外表达*HcAtg8*，并进行Western blot检测，通过实时荧光定量PCR（quantitative real-time PCR，qRT-PCR）技术分析美国白蛾不同龄期及不同肠道部位中*HcAtg8*基因的表达情况，以及沉默*HcV-ATPase A*后中肠自噬相关组织的病理学变化及*HcAtg8*基因的表达情况。结果显示：克隆得到的美国白蛾自噬基因*HcAtg8*编码区为354 bp，编码117个氨基酸，HcAtg8蛋白和家蚕*Bombyx mori* BmAtg8聚在一个分支，亲缘关系较近。构建得到pMAL-c2X-*HcAtg8*重组表达质粒，体外原核表达得到大小为56.4 kD的HcAtg8蛋白，诱导8 h后表达量最高。美国白蛾*HcAtg8*基因在不同龄期和不同肠道部位均有表达，在蛹中和中肠的表达量最高。沉默*HcV-ATPase A*后，处理组自噬溶酶体数量为11.0个，显著高于对照组的3.5个，自噬溶酶体数量上调3.1倍，处理组脂滴数量为73.8个，显著高于对照组的12.5个，脂滴数量上调5.9倍；沉默*HcV-ATPase A*后溶酶体酸性环境改变，导致自噬小体及相关代谢产物积累；qRT-PCR结果显示自噬相关基因*HcAtg8*在24 h时的表达量为对照的6.1倍，在48 h时表达量最高，为对照的375.2倍；在72 h时该基因表达量降低，为对照的2.5倍，与组织切片的结果相符。表明通过沉默*HcV-ATPase A*导致了*HcAtg8*的高表达以及自噬小体和脂滴的积累，破坏了中肠细胞的稳态，导致细胞功能障碍或者死亡。

关键词：美国白蛾；自噬相关基因；基因克隆表达；沉默*HcV-ATPase A*；中肠组织变化

Identification of the autophagy gene *HcAtg8* in fall webworm *Hyphantria cunea* and its response to *HcV-ATPase A* silencing

Wang Boyu Wang Xiaojie Han Ying Wang Hai Zhao Dan Wang Qian
Yao Yalin* Lu Xiujun*

（College of Plant Protection, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, Hebei Province, China）

Abstract: To elucidate the cascade effect between the V-type proton ATPase catalytic subunit A (V-ATPase A), a key regulator of cellular energy metabolism, and the autophagy-related gene *HcAtg8* in the fall webworm *Hyphantria cunea*, the *HcAtg8* gene was cloned by PCR. The bioinformatic characteristics and phylogenetic relationships were analyzed. The HcAtg8 protein was expressed *in vitro* using a prokaryotic expression system and detected via Western blot. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

基金项目：河北省中央引导地方项目（246Z6507G），河北省现代农业产业技术体系项目（HBCT2024190208，HBCT2024130204），石家庄市驻冀高校重点研发专项（241490102A）

* 通信作者（Authors for correspondence），E-mail：luxiujun@hebau.edu.cn，yaoyalin@hebau.edu.cn

收稿日期：2025-08-15

was used to analyze the expression of *HcAtg8* in different developmental stages and tissues (foregut, midgut, and hindgut). Additionally, after silencing *HcV-ATPase A*, histopathological changes in midgut tissues related to autophagy and the expression of *HcAtg8* were examined. The results showed that the cloned coding region of *HcAtg8* was 354 bp in length, encoding 117 amino acids. Phylogenetic analysis indicated that HcAtg8 clustered closely with BmAtg8 from *Bombyx mori*, suggesting a close evolutionary relationship. A recombinant expression vector pMAL-c2X-*HcAtg8* was constructed, and a 56.4 kD HcAtg8 protein was obtained by prokaryotic expression *in vitro*, with the highest expression level observed after 8 h of induction. *HcAtg8* was expressed across all developmental stages and gut tissues, with the highest expression observed in pupae. Among gut tissues, expression was highest in the midgut. After silencing *HcV-ATPase A*, the number of autophagosomes in the treated group was 11.0, significantly higher than that in the control group (3.5), representing a 3.1-fold increase. The number of lipid droplets in the treated group was 73.8, significantly higher than that in the control group (12.5), representing a 5.9-fold increase. Silencing *HcV-ATPase A* disrupted the acidic environment of lysosomes, leading to the accumulation of autophagosomes and related metabolites. qRT-PCR results showed that the expression level of *HcAtg8* was 6.1-fold higher than that of the control at 24 h, peaked at 375.2-fold at 48 h, and subsequently decreased to 2.5-fold at 72 h, consistent with the histological observations. These results indicate that silencing *HcV-ATPase A* leads to the upregulation of *HcAtg8* expression and the accumulation of autophagosomes and lipid droplets, thereby disrupting midgut cellular homeostasis, and resulting in cellular dysfunction or death.

Key words: *Hyphantria cunea*; autophagy-related gene; gene cloning and expression; *HcV-ATPase A* silencing; midgut tissue changes

美国白蛾*Hyphantria cunea*属鳞翅目灯蛾科，是世界性检疫害虫，在中国连续多年暴发成灾且为害范围逐年扩大（Ning et al.，2022）。该害虫寄主范围广、食性杂、抗逆性强，以幼虫群集结网为害树叶并取食叶肉，残留表皮枯萎，严重时可造成整颗植株死亡（杨忠岐，2004；刘丹等，2023）。生产上防治美国白蛾多采用化学防治和生物防治相结合的方法（杨忠岐等，2018；Edosa et al.，2019）。鉴定新型靶标基因是生物防治新领域，利用靶标基因防控美国白蛾是目前研究的重点、热点和难点。目前已鉴定得到影响美国白蛾代谢的V型质子ATP酶催化亚基A（V-type protein ATPase catalytic subunit A，V-ATPase A）基因*HcV-ATPase A*、6-磷酸果糖谷氨酰胺氨基转移酶（glutamine：fructose-6-phosphate aminotransferase，GFAT）基因*HcGFAT*和蜕皮激素诱导蛋白E75基因*HcE75*，利用其开发新型核酸纳米农药将为美国白蛾防控提供新途径（Zhang et al.，2022；Zou et al.，2022；Wang et al.，2024）。

自噬是真核生物中普遍存在并高度保守的生理过程，是程序化细胞死亡的一种类型，对于维持细胞稳态和避免细胞衰老至关重要（Mizushima et al.，2008；Shelly et al.，2009；刘勇等，2024）。自噬通过形成具有双层膜的自噬体，将细胞中错误折叠的蛋白质、受损的细胞器运送到溶酶体降解后进行循环利用（Kuo et al.，2018）。自噬相关基因（autophagy-related gene，Atg）所编码的蛋白ATG参与自噬体的形成和选择性自噬的调控（Sheng & Qin，2019），其中ATG8蛋白是参与整个自噬过程的重要标志蛋白，也是自噬体膜形成的重要标志（Mizushima et al.，2011）。溶酶体腔内的酸性环境是其发挥活性的关键，腔内酸性环境主要依靠液泡型ATP酶V-ATPase维持。研究表明自噬活性影响昆虫生长发育，如自噬抑制剂作用于蜜蜂幼虫后，幼虫自噬活性受到显著抑制，进而导致蛹的死亡（陈文凤，2023）；沉默褐飞虱*Nilaparvata lugens Atg13*基因后，其存活率显著降低，组织ATP含量显著降低（吴建艮等，2022）。

V-ATPase是一种普遍存在的多亚基复合物，由可溶性V1复合物和膜相关V0复合物组成（王梦珂等，2020）。V1复合物的A亚基可以催化ATP水解（Nishi & Forgac，2002；Forgac，2007）。V-ATPase依靠ATP水解释放能量，调控蛋白质转运、受体介导内吞与pH平衡（Breton & Brown，2013）；同时可利用水解ATP产生的动力完成质子跨膜运输，是维持细胞离子平衡的核心功能酶。在拟南芥*Arabidop-*

*sis thaliana*中，V-ATPase特异性抑制剂Concanamycin A能抑制内吞转运、分泌途径以及自噬小体降解，表明V-ATPase在植物自噬过程中起着非常重要的作用（蔺姗，2019）。在人和模型动物脑内发现V-ATPase的部分亚基下调会影响溶酶体酸化功能和自噬溶酶体的降解（Gao et al.，2011；Chen et al.，2018）。抑制V-ATPase与组织蛋白酶D的活性会导致水解酶功能异常并引起自噬阻滞，进而产生神经毒性（韩解，2022）。本实验室前期研究发现，沉默美国白蛾*HcV-ATPase A*基因后，自噬小体增多（Wang et al.，2024）。基于此，本研究利用美国白蛾转录组数据筛选得到自噬相关基因*HcAtg8*，通过克隆*HcAtg8*基因的编码区分析其编码蛋白的序列结构和系统进化关系，分析*HcAtg8*基因在不同龄期和肠道中的表达水平，以及沉默*HcV-ATPase A*后中肠细胞自噬相关组织的病理学变化及*HcAtg8*基因的表达趋势，以期为明确美国白蛾*HcV-ATPase A*与自噬间的相互作用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试昆虫、蛋白：美国白蛾卵购于中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所昆虫病毒研发中心，于河北农业大学害虫生物防治实验室、昆虫病理与分子生物学实验室内人工饲养，饲养至3龄幼虫时供试，饲养条件为温度（26±1）℃、相对湿度（60±5）%、光周期16 L∶8 D。绿色荧光蛋白（green fluorescent protein，gfp）为本课题组保存并提供。

供试培养基：Luria-Bertani（LB）液体培养基成分为胰蛋白胨10 g、酵母提取物5 g、NaCl 10 g、ddH_2O定容至1 L；加入12 g琼脂即为LB固体培养基。

试剂及仪器：大肠杆菌*Escherichia coli* DH5*α*、BL21（DE3）及质粒pMAL-c2X由河北农业大学害虫生物防治实验室保存并提供；磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline，PBS）、PVDF膜、环氧树脂812、限制性内切酶*Bam*H I、*Sal* I、T4 DNA Ligase、高保真酶Primer STAR® Max DNA Polymerase、反转录试剂盒cDNA Synthesis Kit、荧光定量酶SYBR® Premix Ex *Taq* TM II，宝生物工程（大连）有限公司；异丙基-*β*-D-硫代半乳糖苷（Isopropyl *β*-*D*-1-thiogalactopyranoside，IPTG）、羊抗鼠抗体IgG-HRP、动物组织总RNA提取试剂盒，天根生化科技（北京）有限公司；通用型DNA纯化回收试剂盒、鼠抗Anti-MBP抗体、RIPA裂解液，生工生物工程（上海）股份有限公司；其他试剂均为国产分析纯。Mastercycler Gradient PCR仪，德国Eppendorf公司；DYCP-32B琼脂糖凝胶电泳系统，北京六一仪器厂；Mini protein III蛋白质电泳系统装置，美国Bio-Rad公司；HT7800透射电子显微镜，日立高新技术公司。

1.2 方法

1.2.1 美国白蛾总RNA提取及第一链cDNA的合成

分别收集美国白蛾卵、1~6龄幼虫、蛹及成虫的健康试虫，每10头（粒）为1个重复，共3次重复；同时分别收集美国白蛾3龄幼虫的前肠、中肠、后肠组织，每10头为1个重复，共3次重复，于−80 ℃保存备用。参照动物组织总RNA提取试剂盒说明书提取各发育阶段以及各肠道组织样品的RNA，参照反转录试剂盒cDNA Synthesis Kit说明书反转录获得第一链cDNA备用。

1.2.2 目的基因的鉴定、扩增和克隆测序

利用本实验室前期得到的美国白蛾转录组数据进行筛选，利用LTFViewr5u软件解析数据库序列，进一步利用NCBI上已知Atg8序列进行全长序列比对，获得*HcAtg8*基因序列，利用DNAMAN 9软件对分析所得的*HcAtg8*基因序列进行全长引物设计（表1）。以3龄幼虫cDNA为模板进行PCR扩增，25 μL PCR扩增体系：cDNA 1.0 μL、10 μmol/L上下游引物各0.5 μL、2×PrimerStar Max Mix 12.5 μL、ddH_2O 10.5 μL。扩增程序：95 ℃预变性3 min；95 ℃变性45 s，55 ℃复性45 s，72 ℃延伸90 s，35个循环；72 ℃延伸10 min。利用通用型DNA纯化回收试剂盒纯化回收PCR产物。回收产物与pMAL-c2X质粒连接，连接转化至大肠杆菌DH5*α*感受态细胞，次日挑取白色单菌落进行菌液PCR，反应程序同上，之后经0.8%琼脂糖凝胶电泳检测正确后，提取重组质粒pMAL-c2X-*HcAtg8*，使用*Bam*H I、*Sal* I进行单双酶切验证，委托生工生物工程（上海）股份有限公司测序。

1.2.3 美国白蛾*HcAtg8*基因的原核表达

将测序正确的pMAL-c2X-*HcAtg8*表达质粒转化至大肠杆菌BL21（DE3）感受态细胞，在含有氨苄西林的LB固体培养基平板上培养16 h时挑选单菌落，并进行PCR验证（Wang et al.，2024）。将重组菌接入10 mL的LB液体培养基中过夜培养，次日转接220 r/min继续振荡培养至$OD_{600\,nm}$为0.65时，加入母液浓度为1 mol/L的IPTG 6 μL，于37 ℃分别诱导2、4、6和8 h后取样1 mL，以未经IPTG诱导的菌液作为阴性对照。离心收集菌沉淀，加入1×PBS重悬沉淀，加入5×Loading Buffer混匀，煮沸10 min，以10%十二烷基硫酸钠−聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis，

SDS-PAGE）分离HcAtg8蛋白，将该蛋白转移至PVDF膜，以小鼠来源的Anti-MBP抗体为一抗，碱性磷酸酶标记的羊抗鼠抗体IgG-HRP为二抗，进行Western blot分析。对蛋白进行纯化并送至河北省生物研究所制备特异抗体。取2头美国白蛾蛹，加入RIPA裂解液后置于冰上进行充分匀浆。4 ℃、12 000 r/min离心15 min，吸取上清液即为总蛋白样品，以特异性抗体为一抗，采用Western blot检测目标蛋白的表达情况。

表1 本研究所用引物信息

Table 1 Information of primers in the study

引物名称 Primer name	引物序列（5′→3′） Primer sequence（5′→3′）	用途 Application
HcAtg8-F	GGATCCATGAAATTCCAATACAAAGAAGAACAT	DNA克隆 DNA cloning
HcAtg8 -R	GTCGACGTTAATATCCATAAACATTTTCATCAGA	
q*HcAtg8*-F	CAGAGCCGACATTACTGGT	实时荧光定量PCR qRT-PCR
q*HcAtg8*-R	AATGGTCTGCGGTAACAAC	
HcActin-F	CTACCTCACGCCATTCTC	
HcActin-R	AGCTTCTCCTTGATGTCAC	

下划线表示内切酶*Bam*H I、*Sal* I酶切位点。The restriction sites of *Bam*H I and *Sal* I are underlined.

1.2.4 *HcAtg8*的生物信息学分析

利用DNAMAN V6.0软件对*HcAtg8*基因序列的开放阅读框、编码的蛋白分子量等进行预测，利用WOLF PSORT在线软件预测其亚细胞定位，利用ExPASy Proteomics Server在线软件预测其编码蛋白的理化性质，利用SignalP 4.1 Server、NetOGlyc 4.1 Server和NetNGlyc1.0 Server等网站分别对其编码蛋白的信号肽、O-糖基化位点和N-糖基化位点等进行分析，利用SOPMA软件对其编码蛋白的二级结构进行分析。将筛选得到的序列在NCBI上进行BLAST比对分析，下载近缘物种的*Atg8*的氨基酸序列，利用MEGA 7软件采用邻接法构建系统进化树，Bootstrap设1 000次重复检验。

1.2.5 qRT-PCR检测*HcAtg8*的时空表达

利用DNAMAN软件设计*HcAtg8*及内参基因*HcActin*的实时荧光定量PCR（quantitative real-time PCR，qRT-PCR）特异性引物（表1），以1.2.1中获得的cDNA模板，参照荧光定量试剂盒说明书进行qRT-PCR，反应体系以及反应程序参考Wang et al.（2024）方法。每处理3次重复，反应结束后记录*Ct*值。以参照样品的表达量为标准参量，利用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算该基因在美国白蛾不同龄期以及肠道组织中的相对表达量，计算基因沉默效率（Wang et al.，2024）。基因沉默效率=（1−处理组靶基因相对表达量/对照组靶基因相对表达量）×100%。

1.2.6 沉默*HcV-ATPase A*对*HcAtg8*表达及自噬的影响

利用Wang et al.（2024）方法合成ds*V-ATPase A*和ds*gfp*，采用注射法沉默美国白蛾3龄幼虫*HcV-ATPase A*基因获得试虫，以注射ds*gfp*作对照，参考1.2.1方法获得沉默*HcV-ATPase A*基因0、24、48和72 h后虫体的cDNA，以cDNA为模板进行qPT-PCR测定*HcAtg8*表达水平，反应体系及反应程序同1.2.5。同时，收集沉默*HcV-ATPase A* 72 h后的美国白蛾幼虫3头，于冰上解剖分离中肠组织，经过固定液固定、脱色、包埋、切片、染色后，将样本在包埋剂中包埋2 h，使用超微切片机切成60~80 nm厚的切片，并用透射电子显微镜观察脂滴与自噬溶酶体的数量变化，每头幼虫观察3张切片，每个切片5个视野，共3个重复。

1.3 数据分析

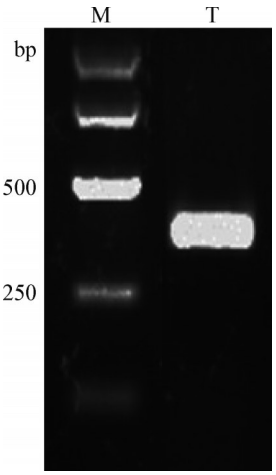
试验数据利用SPSS 20.0软件进行统计分析，采用单因素方差分析，用Tukey氏多重比较法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 *HcAtg8*的克隆及其序列分析

*HcAtg8*序列全长为354 bp（图1），编码117个氨基酸，蛋白质分子量为13.98 kD，等电点为9.21，表明该蛋白质为碱性蛋白质。经亚细胞定位分析，发现该蛋白可能定位于细胞核。通过氨基酸序列对比筛选并构建系统发育树，结果表明美国白蛾HcAtg8序列与家蚕BmAtg8亲缘关系最近（图2）。

HcAtg8蛋白化学分子式为$C_{499}H_{773}N_{149}O_{151}S_6$，总原子数为1 578个，进一步分析发现其不稳定系数为59.27，表明该蛋白为不稳定蛋白；其平均亲水系数为−0.508，表明该蛋白是亲水性蛋白；无糖基化位点，无信号肽结构，该蛋白二级结构中α螺旋占10%，β折叠占21%，无规则卷曲占69%。



M：DNA marker DL5000；T：目标条带。M：DNA marker DL5000; T: target band.

图1 美国白蛾*HcAtg8*基因PCR扩增

Fig. 1 PCR amplification of the *HcAtg8* gene in *Hyphantria cunea*

2.2 *HcAtg8*的原核表达

重组质粒pMAL-c2X-*HcAtg8*经*Bam*H I单酶切后产生大小为7 000 bp的目的条带，经*Bam*H I和*Sal* I双酶切后，产生6 646 bp的载体条带和354 bp的目的基因条带（图3-A），说明重组载体pMAL-c2X-*HcAtg8*构建成功。含有pMAL-c2X-*HcAtg8*的菌株BL21（DE3）经IPTG诱导后表达大小为56.4 kD的重组蛋白，且在8 h时蛋白表达量最高（图3-B~C）。Western blot检测目标蛋白特异性抗体与目的条带发生特异性结合，表明该蛋白在虫体中存在表达（图3-D）。

2.3 美国白蛾*HcAtg8*的时空定位

美国白蛾*HcAtg8*在各个龄期及肠道中均有表达，在蛹中表达量最高，其次是成虫，在卵及1~3龄幼虫中表达稳定，整体呈现稳定表达、急剧减少、逐步升高趋势（图4-A）；在中肠中表达量最高（图4-B，$P<0.05$）。

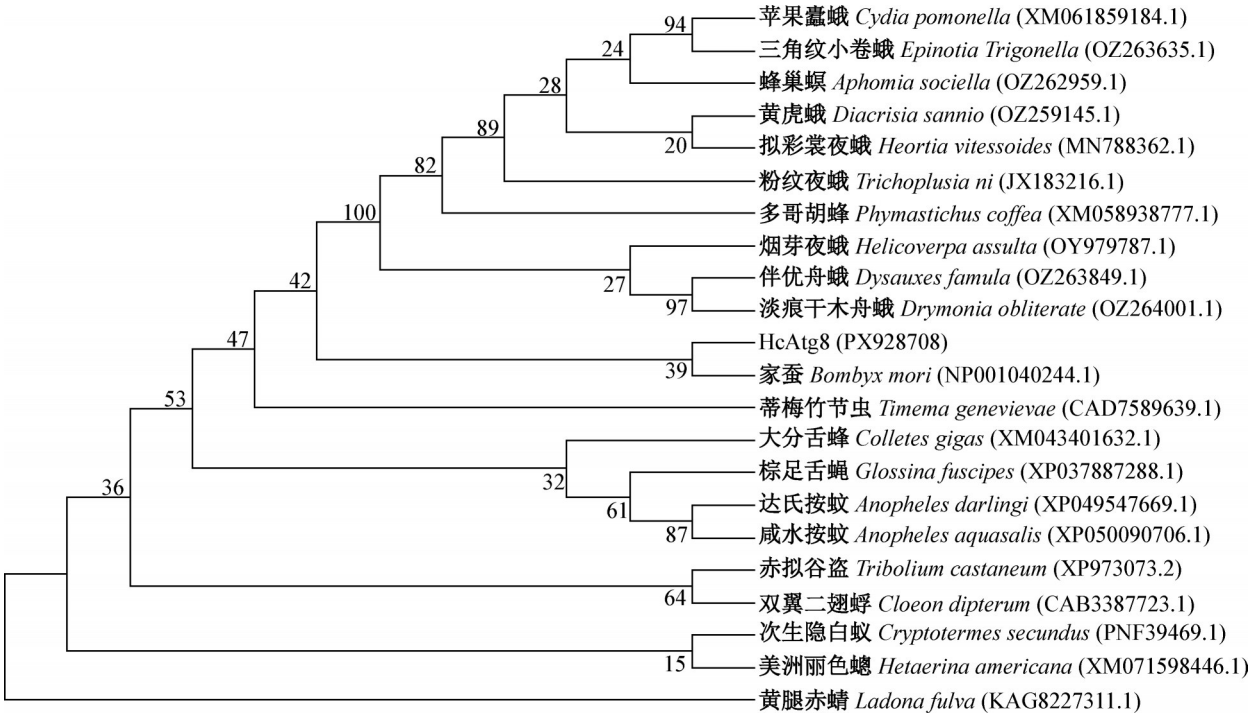


图2 基于氨基酸序列采用邻接法构建美国白蛾HcAtg8与其他昆虫Atg8的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of HcAtg8 from *Hyphantria cunea* and other insect Atg8 proteins constructed using the neighbor-joining method

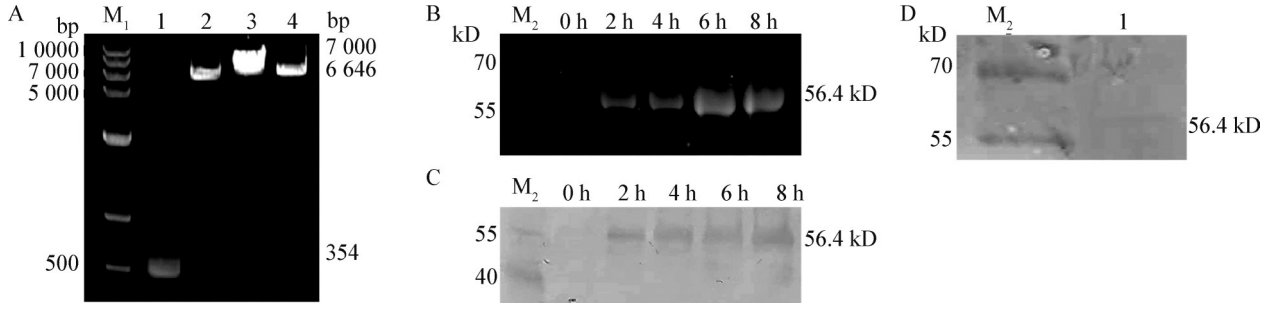
2.4 沉默*HcV-ATPase A*后对自噬的影响

2.4.1 沉默*HcV-ATPase A*后自噬超微结构组织变化

沉默*HcV-ATPase A*后处理组自噬溶酶体数量为11.0个，显著高于对照组的3.5个，自噬溶酶体上调3.1倍；处理组脂滴数量为73.8个，显著高于对照组的12.5个，脂滴上调5.9倍（$P<0.05$，图5）。

2.4.2 沉默*HcV-ATPaseA*后不同时间*HcAtg8*的表达水平

沉默*HcV-ATPase A* 72 h内美国白蛾体内*HcAtg8*基因的表达量均比对照高，且差异显著，整体呈现表达量先升高后降低的趋势，在24 h表达量为对照的6.1倍，在48 h时表达量最高，为对照的375.2倍，在72 h时该基因表达量降低，为对照的2.5倍（图6）。



A：重组表达载体pMAL-c2X-*HcAtg8*酶切验证；M_1：DL marker 15000；1：*HcAtg8*；2：pMAL-c2X；3：pMAL-c2X-*HcAtg8/Bam*H I；4：pMAL-c2X-*HcAtg8/Bam*H I & *Sal* I。B：重组表达载体pMAL-c2X-*HcAtg8*在大肠杆菌BL21（DE3）中的表达；M_2：蛋白Marker。C：重组蛋白HcAtg8的纯化；M_2：蛋白Marker。D：特异性抗体介导的蛹蛋白条带鉴定；M_2：蛋白Marker。A: Restriction enzyme digestion verification of the recombinant vector pMAL-c2X-*HcAtg8*; M_1: DL marker 15000; 1: *HcAtg8*; 2: pMAL-c2X; 3: pMAL-c2X-*HcAtg8*/*Bam*H I; 4: pMAL-c2X-*HcAtg8*/*Bam*H I & *Sal* I. B: Expression of the recombinant expression vector pMAL-c2X-*HcAtg8* in *Escherichia coli* BL21 (DE3); M: protein marker. C: Purification of recombinant HcAtg8 protein; M_2: protein marker. D: Identification of pupal protein bands using specific antibodies; M_2: protein marker.

图3 pMAL-c2X-*HcAtg8*验证及HcAtg8蛋白原核表达产物检测

Fig. 3 Verification of pMAL-c2X-*HcAtg8* and detection of prokaryotic expression products of HcAtg8 protein

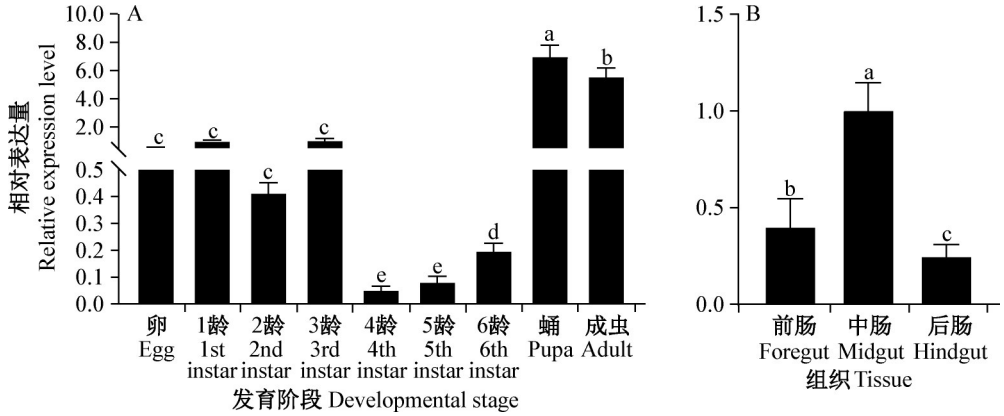


图4 *HcAtg8*在美国白蛾不同龄期及肠道组织中的相对表达量

Fig. 4 Expression levels of *HcAtg8* in different larval instars and gut tissues of *Hyphantria cunea*

图中数据为平均数±标准误。柱上不同小写字母表示经Tukey氏多重比较法检验差异显著(P<0.05). Data are mean±SE. Different lowercase letters above the bars indicate significant differences according to Tukey's multiple comparison test (P<0.05)

3 讨论

自噬是一种细胞内的防御和应激调控机制，能快速清除细胞内受损的细胞器、错误折叠的蛋白质、入侵的病原体，并将降解产物循环再利用，以此维持细胞内环境稳态并应对营养匮乏、氧化应激等不利生存条件。ATG8是自噬研究中监测自噬小体和自噬活性的重要标志物（Qiao et al.，2018）。何珊等（2023）研究发现，白纹伊蚊*Aedes albopictus* ATG8氨基酸序列同家蚕的相似性为94.2%，扩增片段为357 bp。本研究利用美国白蛾转录组数据筛选并克隆鉴定到美国白蛾*HcAtg8*基因，系统进化树发育分析结果也显示HcAtg8与家蚕的BmAtg8亲缘关系最近。

不同昆虫的Atg基因具有物种特异性，白纹伊蚊*AaAtg8*在各发育阶段均有表达，在蛹期表达量最高，这表明*AaAtg8*可能在发育中起重要作用（Qiao et al.，2018）。在本研究中，*HcAtg8*在美国白蛾所有发育阶段均有表达，在蛹中表达量最高，与Qiao et al.（2018）研究的白纹伊蚊*Atg8*在蛹期表达量最高的结果一致。在黄粉虫*Tenebrio molitor*的整个发育过程中，*TmATG8*的相对表达量在中肠中较高（Tettamanti et al.，2007）；在大蜡螟*Galleria mellonella*中，*GmATG8*在中肠、卵巢、马氏小管、脂肪体和丝腺中均检测到表达，并且发现表达量最高的组织是在幼虫中肠（Khoa & Takeda，2012）；本研究也获得类似结果，组织特异性结果显示，*HcAtg8*的表达量在美国白蛾幼虫的中肠最高。

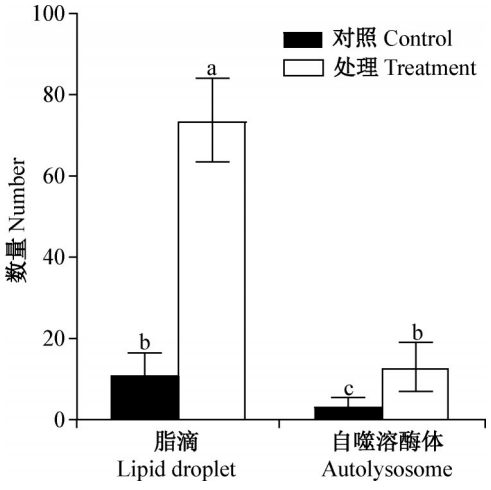


图5 沉默*HcV-ATPase A*后美国白蛾自噬相关结构变化

Fig. 5 Changes in autophagy-related structures in *Hyphantria cunea* after silencing *HcV-ATPase A*

图中数据为平均数±标准误。柱上不同小写字母表示经Tukey氏多重比较法检验差异显著（$P<0.05$）。 Data are mean±SE. Different lowercase letters above the bars indicate sig-nificant differences according to Tukey's multiple comparison test ($P<0.05$).

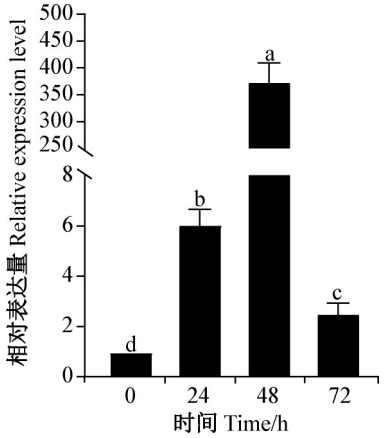


图6 沉默*HcV-ATPase A*对美国白蛾*HcAtg8*表达水平的影响

Fig. 6 Effect of ds*HcV-ATPase A* silencing on *HcAtg8* expression levels in *Hyphantria cunea*

图中数据为平均数±标准误。柱上不同小写字母表示经Tukey氏多重比较法检验差异显著（$P<0.05$）。Data are mean±SE. Different lowercase letters above the bars indicate sig-nificant differences according to Tukey's multiple comparison test ($P<0.05$).

溶酶体的质子泵V-ATP酶负责建立酶活化和货物降解所必需的内腔低pH，V-ATP酶参与溶酶体酸化、溶酶体酶活化和自噬特异性物质降解（Mauvezin & Neufeld，2012）。ATP6V0A1/a1亚基的敲低会抑制细胞的溶酶体酸化（Lee et al.，2015）。ATP6V0A1/a1亚基错义变异体可损害Neuro-2a细胞系的溶酶体酸化和自噬体积累（Aoto et al.，2021）。本研究沉默*HcV-ATPase A*后，随着溶酶体酸性环境改变，溶酶体降解自噬小体活性下降，推测可能自噬体–溶酶体降解受阻，导致自噬小体及相关代谢产物积累，影响昆虫稳态，进而发挥杀虫作用。研究结果将为进一步探究*HcV-ATPase A*与美国白蛾细胞自噬反应的相互作用机理提供支撑，也将为阐明*HcAtg8*基因的功能及作用机制奠定基础。

参 考 文 献（References）

Aoto K, Kato M, Akita T, Nakashima M, Mutoh H, Akasaka N, Tohyama J, Nomura Y, Hoshino K, Ago Y, et al. 2021. ATP6V0A1 encoding the a1-subunit of the V0 domain of vacuolar H^+-ATPases is essential for brain development in humans and mice. Nature Communications, 12: 2107

Breton S, Brown D. 2013. Regulation of luminal acidification by the V-ATPase. Physiology, 28(5): 318–329

Chen HQ, Shen F, Sherban A, Nocon A, Li Y, Wang H, Xu MJ, Rui XL, Han JY, Jiang BB, et al. 2018. DEP domain-containing mTOR-interacting protein suppresses lipogenesis and ameliorates hepatic steatosis and acute-on-chronic liver injury in alcoholic liver disease. Hepatology, 68(2): 496–514

Chen WF. 2023. Effects of *Atg2B* on pupal lipid metabolism by regulating lipophagy in fat body and midgut autophagy in *Apis mellifera ligustica*. PhD thesis. Tai'an: Shandong Agricultural University (in Chinese) [陈文凤. 2023. *Atg2B*通过调控脂肪体脂噬和中肠自噬影响意大利蜜蜂蛹期脂代谢的研究. 博士学位论文. 泰安: 山东农业大学]

Edosa TT, Jo YH, Keshavarz M, Anh YS, Noh MY, Han YS. 2019. Current status of the management of fall webworm, *Hyphantria cunea*: towards the integrated pest management development. Journal of Applied Entomology, 143(1/2): 1–10

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

Gao DM, Inuzuka H, Tan MM, Fukushima H, Locasale JW, Liu PD, Wan LX, Zhai B, Chin YR, Shaik S, et al. 2011. mTOR drives its own activation *via* SCF (βTrCP) -dependent degradation of the mTOR inhibitor DEPTOR. Molecular Cell, 44(2): 290–303

Han J. 2022. Role and mechanism of V-ATPase-mediated lysosomal acidification abnormalities in fluoride-induced neurotoxicity. Master thesis. Shihezi: Shihezi University (in Chinese) [韩解. 2022. V-ATPase介导溶酶体酸化异常在氟致神经毒性中的作用及机制. 硕士学位论文. 石河子: 石河子大学]

He S, Xiao QQ, Shi MT, Li WY, Peng ZH, Cheng JZ, Wu JH. 2023. Preparation and application of polyclonal antibody against autophagy gene *ATG8* in *Aedes albopictus*. Journal of Pathogen Biology, 18(7): 787–792 (in Chinese) [何珊, 肖秋秋, 石梦婷, 李威仪, 彭哲慧, 程金芝, 吴家红. 2023. 白纹伊蚊自噬基因ATG8蛋白多克隆抗体的制备及应用. 中国病原生物学杂志, 18(7):

787–792]

Khoa DB, Takeda M. 2012. Expression of autophagy 8 (Atg8) and its role in the midgut and other organs of the greater wax moth, *Galleria mellonella*, during metamorphic remodelling and under starvation. Insect Molecular Biology, 21(5): 473–487

Kuo CJ, Hansen M, Troemel E. 2018. Autophagy and innate immunity: insights from invertebrate model organisms. Autophagy, 14(2): 233–242

Lee JH, McBrayer MK, Wolfe DM, Haslett LJ, Kumar A, Sato Y, Lie PPY, Mohan P, Coffey EE, Kompella U, et al. 2015. Presenilin 1 maintains lysosomal Ca^{2+} homeostasis *via* TRPML1 by regulating vATPase-mediated lysosome acidification. Cell Reports, 12(9): 1430–1444

Lin S. 2019. Mechanism exploration of V-ATPase subunit C involved in autophagy in *Arabidopsis thaliana*. Master thesis. Lanzhou: Lanzhou University (in Chinese) [蔺姗. 2019. 拟南芥V-ATPase亚基C参与自噬的机制探究. 硕士学位论文. 兰州: 兰州大学]

Liu D, Deng JD, Xu WK, Gu TZ, Mang DZ, Zhang LW. 2023. Ultrastructure of sensilla on the antennae of fall webworm *Hyphantria cunea* (Lepidoptera: Arctiidae). Journal of Plant Protection, 50(2): 507–518 (in Chinese) [刘丹, 邓竣丹, 许维康, 顾天滋, 忙定泽, 张龙娃. 2023. 美国白蛾触角感器的超微结构. 植物保护学报, 50(2): 507–518]

Liu N, Lian S, Zhou SY, Wang CX, Ren WC, Li BH. 2022. Involvement of the autophagy-related gene *BdATG8* in development and pathogenicity in *Botryosphaeria dothidea*. Journal of Integrative Agriculture, 21(8): 2319–2328

Liu Y, Zhang YY, Fu YP, Xie JT, Jiang DH, Cheng JS. 2024. Functional analysis of autophagy-related genes *SsATG8* and *SsATG5* in pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. Journal of Plant Protection, 51(2): 302–313 (in Chinese) [刘勇, 张宇宇, 付艳苹, 谢甲涛, 姜道宏, 程家森. 2024. 核盘菌自噬相关基因*Ss4TG5*和*SsATG8*的功能分析. 植物保护学报, 51(2): 302–313]

Mauvezin C, Neufeld TP. 2015. Bafilomycin A1 disrupts autophagic flux by inhibiting both V-ATPase-dependent acidification and Ca-P60A/SERCA-dependent autophagosome-lysosome fusion. Autophagy, 11(8): 1437–1438

Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. Nature, 451(7182): 1069–1075

Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. 2011. The role of Atg proteins in autophagosome formation. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 27: 107–132

Ning J, Lu PF, Fan JT, Ren LL, Zhao LL. 2022. American fall webworm in China: a new case of global biological invasions. The Innovation, 3(1): 100201

Nishi T, Forgac M. 2002. The vacuolar (H^+)-ATPases: nature's most versatile proton pumps. Nature Reviews. Molecular Cell Biology, 3(2): 94–103

Qiao JL, Zhang DD, Wang Y, Li XM, Wang SY, Liu QZ. 2018. Identification of AaAtg8 as a marker of autophagy and a functional autophagy-related protein in *Aedes albopictus*. PeerJ, 6: e5988

Shelly S, Lukinova N, Bambina S, Berman A, Cherry S. 2009. Autophagy is an essential component of *Drosophila* immunity against vesicular stomatitis virus. Immunity, 30(4): 588–598

Sheng R, Qin ZH. 2019. History and current status of autophagy research. Advances in Experimental Medicine and Biology, 1206: 3–37

Tettamanti G, Grimaldi A, Pennacchio F, de Eguileor M. 2007. Lepidopteran larval midgut during prepupal instar: digestion or self-digestion? Autophagy, 3(6): 630–631

Wang MK, Zhao T, Zhou L, Du PQ, Liu XY, Guo XR. 2020. Cloning and relative expression level of vacuolar-type proton ATPase G subunit gene in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera*. Journal of Plant Protection, 47(1): 205–206 (in Chinese) [王梦珂, 赵特, 周琳, 杜鹏强, 刘向阳, 郭线茹. 2020. 棉铃虫V-ATP酶G亚基基因克隆及相对表达量分析. 植物保护学报, 47(1): 205–206]

Wang XJ, Zhao D, Wang Q, Liu YN, Lu XJ, Guo W. 2024. Identification and functional analysis of *V-ATPaseA* and *C* genes in *Hyphantria cunea*. Insects, 15(7): 515

Wu JG, Jiao QQ, Yu FF, Zheng YY, Chen TT, Hao PY, Yu XP. 2022. Expression and functional analysis of the autophagy-related gene *NlATG13* in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). Acta Entomologica Sinica, 65(8): 967–976 (in Chinese) [吴建艮, 矫启启, 俞飞飞, 郑园园, 陈桐桐, 郝培应, 俞晓平. 2022. 褐飞虱自噬相关基因*NlATG13*的表达与功能分析. 昆虫学报, 65(8): 967–976]

Yang ZQ. 2004. Advance in bio-control researches of the important forestInsect pests with natural enemies in China. Chinese Journal of Biological Control, 20(4): 221-227 (in Chinese) [杨忠岐. 2004. 利用天敌昆虫控制我国重大林木害虫研究进展. 中国生物防治, 20(4): 221-227]

Yang ZQ, Wang XY, Zhang YN, Zhang YL. 2018. Research advances of Chinese major forest pests by integrated management based on biological control. Chinese Journal of Biological Control, 34(2): 163–183 (in Chinese) [杨忠岐, 王小艺, 张翌楠, 张彦龙. 2018. 以生物防治为主的综合控制我国重大林木病虫害研究进展. 中国生物防治学报, 34(2): 163–183]

Zhang BH, Yao B, Li XP, Jing TZ, Zhang SY, Zou H, Zhang GC, Zou CS. 2022. *E74* knockdown represses larval development and chitin synthesis in *Hyphantria cunea*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 187: 105216

Zou H, Zhang BW, Zou CS, Ma WH, Zhang SY, Wang Z, Bi B, Li SY, Gao JH, Zhang CX, et al. 2022. Knockdown of *GFAT* disrupts chitin synthesis in *Hyphantria cunea* larvae. Pesticide Biochemistry and Physiology, 188: 105245

（责任编辑：王 璇）