

DOI:10.12171/j.1000-1522.20230313

# 白细胞激肽及其受体对美国白蛾取食和生长发育的影响

莫建洲<sup>1</sup> 唐颖<sup>2</sup> 李昊峰<sup>1</sup> 曹传旺<sup>1,3</sup> 孙丽丽<sup>1</sup>

(1. 东北林业大学林学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 鸡东县农业技术推广中心, 黑龙江 鸡东 158200;  
3. 东北林业大学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)

**摘要:**【目的】探究神经肽 LK 及其受体对美国白蛾生长发育的影响。【方法】构建美国白蛾基因 *LK/LKR* dsRNA 合成的体外原核表达系统, 并饲喂美国白蛾幼虫表达 dsRNA 的菌液, 统计其取食量、体重和发育历期。对美国白蛾 4 龄幼虫注射 LK1 和 LK2 短肽, 检测 72 h 后中肠和脂肪体组织中消化酶活性及海藻糖、糖原和葡萄糖含量, 并用 RT-qPCR 技术检测相关基因的相对表达量。【结果】细菌介导的原核表达系统可有效沉默 *LK* 和 *LKR* 基因, 影响美国白蛾 4 龄幼虫 48 h 内取食量, 但不显著 ( $P > 0.05$ ), 并导致体重累计增长率显著提高 ( $P < 0.05$ ) (除 L4440-HcLKR 处理组幼虫外), 发育历期延迟。注射 LKs 短肽的美国白蛾 4 龄幼虫取食量和体重累计增长率显著降低, 24 h 粪便含水量显著升高, 但幼虫体内含水量无显著变化; 进一步研究显示 72 h 中肠的  $\alpha$ -淀粉酶以及脂肪体中的脂肪酶、 $\alpha$ -淀粉酶、胰蛋白酶活性显著增强; 中肠的糖原含量显著减少, 而脂肪体中的糖原、海藻糖含量显著升高, 葡萄糖含量显著降低; 中肠和脂肪体中的脂肪酶基因 *LIP* (除脂肪体的 LK1 组) 和  $\alpha$ -淀粉酶基因 (*amy-1* 和 *amy-2*) 表达量显著升高; 中肠海藻糖酶基因 (*Tre1* 和 *Tre2*) 与海藻糖转运蛋白基因 *Tret1* 表达量显著升高; 脂肪体 *Tre1* (除 LK2 组) 和 *Tre2* 基因表达量显著下降, *Tret1* 基因 (LK2 组) 表达量显著升高。【结论】本研究明确了白细胞激肽参与调节美国白蛾取食、能量代谢和生长发育过程, 为研发绿色杀虫剂防控美国白蛾提供理论依据。

**关键词:** Leucokinin; RNAi; 美国白蛾; 消化酶; 神经肽

中图分类号: S763.42 文献标志码: A 文章编号: 1000-1522(2025)03-0095-12

引文格式: 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 Jianzhou, Tang Ying, Li Haofeng, 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.

## Effects of leucokinin neuropeptide and its receptor on feeding and growth of *Hyphantria cunea*

Mo Jianzhou<sup>1</sup> Tang Ying<sup>2</sup> Li Haofeng<sup>1</sup> Cao Chuanwang<sup>1,3</sup> Sun Lili<sup>1</sup>

(1. College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China;

2. Jidong County Agricultural Technology Extension Center, Jidong 158299, Heilongjiang, China;

3. Key Laboratory of Sustainable Forest Ecosystem Management of Ministry of Education, Harbin 150040, Heilongjiang, China)

**Abstract:** [Objective] This paper investigates the effects of leucokinin (LK) neuropeptide and its receptor on growth of *Hyphantria cunea*. [Method] An in vitro prokaryotic expression system was developed for synthesis of *LK/LKR* dsRNA. The 4th instar larvae of *Hyphantria cunea* were fed with dsRNA-expressing bacteria. The food intake, body mass and developmental duration were measured and recorded. Subsequently, the 4th instar larvae of *Hyphantria cunea* were injected with short LK1 and LK2 peptide.

收稿日期: 2023-11-08 修回日期: 2024-05-10

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32171791), 黑龙江省优秀青年基金项目(YQ2021C007)。

第一作者: 莫建洲。主要研究方向: 森林保护。Email: 1612918106@qq.com 地址: 150040 黑龙江省哈尔滨市香坊区和兴路 26 号东北林业大学林学院。

责任作者: 孙丽丽, 副教授。主要研究方向: 昆虫生理生化与分子毒理。Email: sunlili@nefu.edu.cn 地址: 同上。

本刊网址: <http://j.bjfu.edu.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

Digestive enzyme activities, trehalose, glycogen, and glucose content in the midgut and fat body were detected after 72 h. And the relative expression level of related genes was detected using RT-qPCR technology. [Result] Bacteria-mediated RNAi effectively silenced *LK* and *LKR* genes. It affected the food intake of the 4th instar larvae of *Hyphantria cunea* within 48 h, but it was not significant ( $P > 0.05$ ). It led to a significant increase in relative growth rate within 48 h, and a delay in developmental duration. It led to an increase in feeding amount ( $P > 0.05$ ) and a significant increase in relative accumulation growth rate within 48 h, and delayed the development time. After injection of LKs short peptide, the feeding amount and relative accumulation growth rate of 4th instar larvae of *Hyphantria cunea* were significantly reduced, and the water content of feces was significantly increased at 24 h after injection, but the water content of larvae was not significantly different. Further studies showed the activities of  $\alpha$ -amylase in the midgut, and lipase,  $\alpha$ -amylase, trypsin, trehalase in the fat body were significantly enhanced at 72 h after injection. The content of glycogen in the midgut decreased significantly. The content of glycogen and trehalose in the fat body increased significantly, while the content of glucose was significantly reduced. The expression level of *LIP* genes (excluding LK1 group in the fat body), and *amy-1* and *amy-2* genes significantly increased in the midgut and fat body. The expression level of *Tre1*, *Tre2* and *Tret1* genes increased significantly in the midgut. The expression level of *Tre1* (excluding LK2 group) and *Tre2* decreased, while the expression level of *Tret1* (LK2 group) significantly increased in the fat body. [Conclusion] This study reveals that LK is involved in regulating feeding, energy metabolism and growth in *Hyphantria cunea*, providing a theoretical basis for the development of green insecticides to control *Hyphantria cunea*.

**Key words:** Leucokinin; RNAi; *Hyphantria cunea*; digestive enzyme; neuropeptide

美国白蛾 (*Hyphantria cunea*) 属鳞翅目 (Lepidoptera), 目夜蛾科 (Erebidae), 是一种原产于北美的世界性检疫害虫<sup>[1]</sup>。它具有食性杂、繁殖能力强、适应范围广、传播速度快、防治难度极大等特点, 对农林业生产造成了严重损失<sup>[2-3]</sup>。化学农药防治美国白蛾见效快、经济效益高, 但存在污染环境、杀伤天敌、易产生抗药性等缺点, 长期使用带来的“抗性 resistance、再增猖獗 resurgence、残留 residue (3R)”问题不容忽视<sup>[4]</sup>。

昆虫神经肽是一类重要的化学信使, 具有分子量小和活性高等特点, 能以微摩尔级的量影响昆虫的诸多生理过程<sup>[5]</sup>。因此, 以扰乱神经肽信号通路为基础, 研发害虫控制剂, 可为绿色防控害虫提供新途径。白细胞激肽 (leucokinin, LK) 是一种多功能神经肽, LK 及其受体 (leucokinin receptor, LKR) 已在东亚飞蝗 (*Locusta migratoria*)<sup>[6]</sup>、美洲棉铃虫 (*Helicoverpa zea*)<sup>[7]</sup>、黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*)<sup>[8]</sup>、埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*)<sup>[9]</sup>、长红锥蝽 (*Rhodnius prolixus*)<sup>[10]</sup> 和美国白蛾<sup>[11]</sup> 等多种昆虫中被鉴定和发现。昆虫白细胞激肽通过与其配对的 G 蛋白偶联受体结合, 调节昆虫肌肉和唾液腺收缩<sup>[10,12-13]</sup>、发育<sup>[14]</sup>、取食和味觉敏感性<sup>[15-16]</sup>、睡眠<sup>[17]</sup> 以及水分稳态<sup>[11]</sup> 等诸多重要的生理和行为。在黑腹果蝇中, LKR 被 LKs 激活, 导致环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 水平增加, 进而刺激马氏管产生尿液<sup>[8]</sup>。

Helicokinin 利尿激肽以剂量依赖性的方式促进烟芽夜蛾 (*Heliothis virescens*) 离体马氏管的液体分泌。向血淋巴注射 Helicokinin I, 6 d 内死亡率增加 43%<sup>[18]</sup>。此外, Hirono 等<sup>[19]</sup> 发现 LK/LKR 信号通路可影响黑腹果蝇饥饿状态下对热刺激的痛觉性行为反应; Zandawala 等<sup>[20]</sup> 研究发现 LKs 信号通路受损会影响多种生理过程, 包括耐饥饿与干燥调节、水稳态、进食、运动活动和代谢率, 且 LKs 与胰岛素信号相互作用影响应激耐受性和新陈代谢; Yurgel 等<sup>[21]</sup> 研究发现 LKs 在果蝇睡眠和进食状态的整合中起着关键作用, 表达 LK 的一对神经元 (LHLK) 在饥饿时期变得活跃, 并调节胰岛素生成细胞 (insulin-producing cells, IPCs) 的功能, 这些细胞是睡眠和进食的关键调节器, 而抑制 IPCs 中的 LKR 也会扰乱睡眠的代谢调节。

Sun 等<sup>[11]</sup> 研究发现, 沉默美国白蛾 *HcLK* 和 *HcLKR* 基因可以促进幼虫摄食, 并增加幼虫对干燥和饥饿胁迫的抵抗力。然而, 通过显微注射 dsRNA 到昆虫体内的方式, 在实际应用中对 dsRNA 的需求量很大, 难以大面积应用。因此, 本研究以 L4440 质粒为载体, 利用大肠杆菌 HT115 (DE3) 表达美国白蛾白细胞激肽及其受体 dsRNA 的体系。研究分别通过饲喂表达 dsRNA 的细菌和注射 LKs 短肽, 探究激肽对美国白蛾生理功能的影响, 为开发基于扰乱美国白蛾激肽调节机制的绿色杀虫剂奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试昆虫

美国白蛾卵块和人工饲料购买自中国林业科学研究院森林生态环境与自然保护研究所。卵用 10% 甲醛熏蒸表面消毒后, 置于  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$  和光周期为 16 L:8 D 的恒温培养箱中孵化和饲养, 孵化幼虫用新鲜人工饲料饲养。

### 1.2 RNA 的提取、cDNA 合成和实时荧光定量 RT-qPCR

采用 RNeasy Mini 动物组织 RNA 提取试剂盒 (Qiagen) 提取美国白蛾组织的总 RNA, 使用 TaKaRa 的反转录试剂盒 (PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA) 合成第一链 cDNA, 合成后的 cDNA 稀释 10 倍后于  $-20^\circ\text{C}$  保存。RT-qPCR 使用 SYBR Green Realtime PCR Master mix 试剂盒 (Toyobo) 检测相关基因的表达水平。具体反应体系如下: cDNA 2  $\mu\text{L}$ ,  $2 \times$  SYBR premix Ex Taq 酶 10  $\mu\text{L}$ , Primer mix (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu\text{L}$ , 反应总体积 20  $\mu\text{L}$ 。反应条件为:  $94^\circ\text{C}$  预变性 30 s,  $94^\circ\text{C}$  变性 12 s,  $58^\circ\text{C}$  退火 45 s,  $72^\circ\text{C}$  延伸 45 s,  $81^\circ\text{C}$  读板 1 s, 45 个循环, 每个样品 3 次重复。以美国白蛾 *EF1 $\alpha$*  和 *RPL13* 为内参引物。引物序列见表 1, 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

### 1.3 基因扩增

利用软件 Primer 3.0 分别设计扩增美国白蛾 *HcLK* (511 bp)、*HcLKR* (586 bp) 和 *GFP* (522 bp) 基因干扰片段的引物, 并在每对引物的 5' 端分别加上

*Sac* I 和 *Hind* III 两个限制性酶切位点以及保护碱基。引物序列详见表 1。以美国白蛾的 pMD18-T-*LK*、pMD18-T-*LKR* 和 pMD18-T-*GFP* 质粒为模板, 使用 TaKaRa 公司的  $2 \times$  Taq PCR Mix 对 *HcLK*、*HcLKR* 和 *GFP* 基因的干扰片段进行 PCR 扩增。反应程序为  $94^\circ\text{C}$  预变性 3 min,  $94^\circ\text{C}$  30 s,  $58^\circ\text{C}$  30 s,  $72^\circ\text{C}$  30 s, 35 个循环,  $72^\circ\text{C}$  延伸 5 min,  $4^\circ\text{C}$  保存。使用胶回收试剂盒 (Omega E.Z.N.A. Gel Extraction Kit) 对 PCR 产物纯化。

### 1.4 目的基因干扰载体构建

使用 *Sac* I 和 *Hind* III 限制性内切酶对 *HcLK*、*HcLKR*、*GFP* 基因片段和 L4440 质粒在  $37^\circ\text{C}$  酶切 3 h。酶切产物通过琼脂糖凝胶电泳检测后利用 T4 DNA 连接酶  $16^\circ\text{C}$  连接过夜。将连接产物转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞后, 涂布于含有 100  $\mu\text{g/mL}$  氨苄青霉素的 LB 固体培养基上,  $37^\circ\text{C}$  过夜培养 16 h 左右, 挑取单菌落于 LB 液体培养基 (100  $\mu\text{g/mL}$  氨苄青霉素) 中培养。对菌液 PCR 验证并提取质粒测序验证, 将测序正确的重组质粒命名为 L4440-*HcLK*、L4440-*HcLKR* 和 L4440-*GFP*。

### 1.5 目的基因 dsRNA 的诱导表达

将重组质粒 L4440-*HcLK*、L4440-*HcLKR* 和 L4440-*GFP* 转化到大肠杆菌 HT115 (DE3) 感受态细胞中, 涂布于 LB 固体培养基上, 挑取单菌落接种在含 12.5  $\mu\text{g/mL}$  四环素和 100  $\mu\text{g/mL}$  氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,  $37^\circ\text{C}$ , 200 转/分摇床培养至  $\text{OD}_{600} = 0.4 \sim 0.6$ , 加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG 诱导 5 h。将未添加 IPTG 的细菌培养物置于相同条

表 1 本文所使用的引物序列

Tab. 1 Primer sequences used in this study

基因	正向引物序列 (5'—3')	反向引物序列 (5'—3')	用途
<i>GFP-L4440</i>	ATCGgagctcAGTTGAACGGATCCATCTTCA	CCCaagcttAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTG	dsRNA 合成
<i>HcLK-L4440</i>	ATCGgagctcCGAAGCCTGTGTTATTTTATTGTGT	CCCaagcttAGTGCCTTCAGCCCTTG	
<i>HcLKR-L4440</i>	ATCGgagctcTAGCTGGATCTAGTTCATCTTCCA	CCCaagcttATGGACACCAGTACAGCAAATAC	
<i>LK</i>	ATGTTGCACCAATGGCTCATCATC	CATCGTCGCGTTGGTAAAACCTG	RT-qPCR
<i>LKR</i>	TATTCCTCCCGCGATATATTGAAAG	ACAATTCAGTACTCTCTCATCG	
<i>RPL13</i>	GTTAGCTACACAGCTCCGTGG	GCAGCAGTTGGGGCTTTAGT	
<i>EF-1<math>\alpha</math></i>	ATGAAATCTCTGTGACCGGGG	GCGGTGGTATCGACAAACGT	
<i><math>\alpha</math>-amy1</i>	ATGTTCCGTTTCATCTCT	AGGTATCACCTCCAATGA	
<i><math>\alpha</math>-amy2</i>	ATGTTTCGTTTCATCTGT	TGGTGGGAACGTTATCAG	
<i>Tre1</i>	ATGGTGTCTTTTCTACAGTAAAG	GTAATTGATCGAAGTCTGCTAGAG	
<i>Tre2</i>	CCTGGTGGTATTGGCTTCTC	CAATCTCTGGCTGATGAAGG	
<i>Tret1</i>	GCAACAGGATTCATCTGTTATTG	ACCTTTCCAGCCAATATTGC	
<i>LIP</i>	ATGTTGCGACAACCTGTTGT	CGTACCCATCGGAAGTAATAAC	

注: 小写字母序列为酶切位点序列, 下划线字母为保护碱基。

件下孵育,作为对照。收集上述菌液,采用酚氯仿法<sup>[22]</sup>提取细菌总 RNA,1%琼脂糖凝胶电泳确认为 dsRNA。将确认表达 dsRNA 的细菌培养物 5 000 rpm 离心 5 min 后去上清,随后用 ddH<sub>2</sub>O 重悬,洗去多余 LB 培养基,再次离心去上清,最后按每 50 mL 细菌培养物用 800 μL ddH<sub>2</sub>O 重悬。菌液和饲料按 100 μL:1 g 的比例混合饲喂美国白蛾 4 龄幼虫<sup>[23-24]</sup>,每组处理 10 头,每个处理 3 个重复。每天更换含 dsRNA 新鲜人工饲料,饲养直至化蛹。每 24 h 观察记录幼虫存活和蜕皮情况,以此统计美国白蛾幼虫发育历期。每 24 h 使用电子分析天平统计美国白蛾幼虫取食前后饲料和幼虫的质量。

$$m = m_1 - m_2$$

式中: $m$  为取食量(g); $m_1$  为取食前饲料质量(g); $m_2$  为取食后饲料质量(g)。

$$W = (w_2 - w_1) / w_1 \times 100\%$$

式中: $W$  为体重累计增长率(%); $w_1$  为取食前幼虫体重(g); $w_2$  为取食后幼虫体重(g)。

### 1.6 多肽合成与注射

根据已获得的美国白蛾 LKs 成熟肽序列<sup>[11]</sup>,由南京金斯瑞公司合成白细胞激肽序列 LK1(YFSPWGamide)和 LK2(VRFSPWGamide)。两种白细胞激肽短肽均用磷酸缓冲液(PBS)稀释至质量浓度 2 μg/μL,并置于-20 °C 冰箱保存备用。利用微量进样器将 2 μg 的 LK1 或 LK2 溶液注射到健康且大小一致的美国白蛾 4 龄幼虫体内,对照组注射等量的 PBS 溶液,每组处理 10 头幼虫,重复 3 次。注射后,幼虫在室温下恢复 2 h,随后置于恒温培养箱中饲养。每 24 h 记录幼虫的取食量、体重、粪便质量和发育历期。将试验结束后的幼虫及其粪便在 80 °C 下脱水 12~16 h,105 °C 烘干至恒质量。幼虫和粪便含水量按如下公式计算

$$C = (w_f - w_d) / w_f \times 100\%$$

式中: $C$  为含水量(%); $w_f$  为鲜质量(g); $w_d$  为干质量(g)。

### 1.7 酶活性和糖含量测定

注射 LKs 短肽或 PBS 缓冲液 72 h 后,选取发育一致且活泼的美国白蛾幼虫,解剖取脂肪体和中肠组织,分别置于离心管中,每个组织样品制备 4 份。第 1 份样品加入 200 μL PBS 缓冲液,充分研磨后再加入 800 μL PBS,以 4 °C、1 000 × g 离心 20 min,取 350 μL 上清,再以 4 °C、20 800 × g 超速离心 1 h。剩余上清液用于蛋白质、海藻糖和糖原含量测定。超速离心的上清液用于可溶性海藻糖酶(trehalase1, Tre1)活性测定,沉淀用 300 μL PBS 缓

冲液重悬后测定膜结合性海藻糖酶(trehalase2, Tre2)活性。具体步骤参照 Zhang 等<sup>[25]</sup>的方法。第 2 份样品按质量(g):体积(mL) = 1:4 的比例加入 4 倍体积 PBS,制备 20% 的组织匀浆。在常温条件下充分研磨,2 500 rpm 离心 10 min,取上清液用于脂肪酶(lipases, LPS)活性测定。第 3 份样品加入 9 倍体积 PBS,在冰浴条件下充分研磨,2 500 rpm 离心 10 min,取上清液用于 α-淀粉酶(Alpha-amylases, AMS)活性测定。第 4 份样品加入 9 倍体积的匀浆介质,冰浴条件下充分研磨,2 500 rpm 离心 10 min,取上清液用于胰蛋白酶(trypsin, Try)活性测定。各酶活性测定方法和计算公式参照脂肪酶试剂盒(南京建成, A054-1-1)、胰蛋白酶试剂盒(南京建成, I015-1-1)、α-淀粉酶试剂盒(南京建成, C016-1-1)说明书。各上清液和沉淀中的蛋白质和葡萄糖含量根据葡萄糖(GO)检测试剂盒(Sigma, GAGO20)和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天, P0012)说明书进行测定。以上酶活性和糖含量的测定,每个处理 3 个重复。

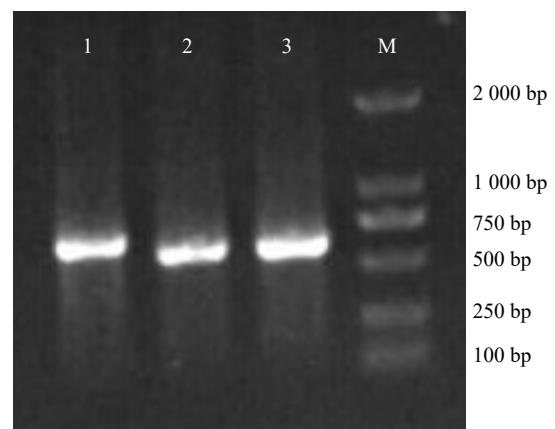
### 1.8 数据统计与分析

运用 IBM SPSS Statistics 24.0 软件的单因素方差分析(one-way ANOVA)进行显著性差异分析( $P < 0.05$ )。使用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 方法计算基因的相对表达量<sup>[26]</sup>,使用 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 目的基因扩增及重组载体的构建

采用含 Sac I 和 Hind III 酶切位点的引物 PCR 扩增获得美国白蛾 HcLK、HcLKR 和 GFP 干扰片段,将克隆的片段亚克隆至 pMD18-T 载体上,转化后挑取阳性菌落 PCR 检测的结果与预期片段大小相符(图 1),其测序结果显示序列正确。



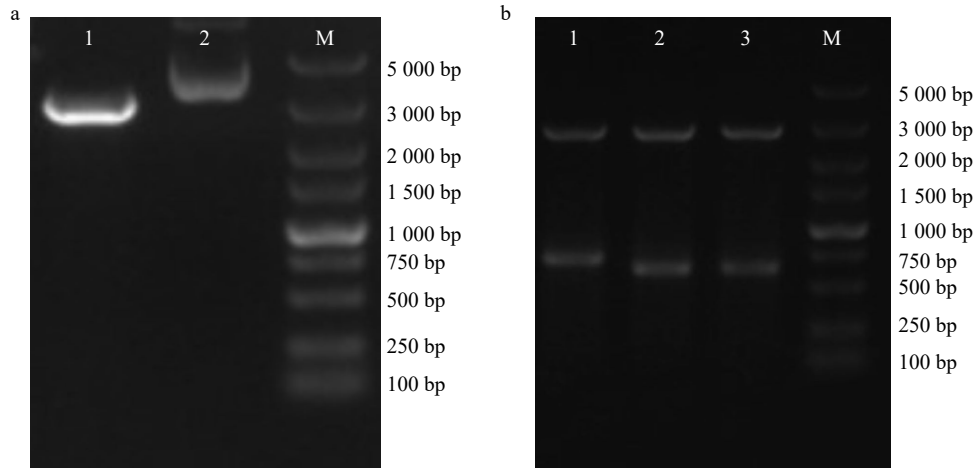
M. DL 2 000 Marker; 1. HcLKR 基因干扰片段; 2. HcLK 基因干扰片段; 3. GFP 干扰片段

图 1 PCR 扩增干扰片段验证

Fig. 1 Verification of PCR amplification interference fragment

利用限制性内切酶 *Sac* I 和 *Hind* III 对 L4440-*HcLK*、L4440-*HcLKR*、L4440-*GFP* 以及 L4440 质粒进行双酶切。L4440-*HcLKR*、L4440-*HcLK* 和 L4440-*GFP* 重组质粒经双酶切后得到载体约 2 700 bp, 目

的基因约 600、500 和 500 bp 的条带(图 2), 其结果与目的片段及线性 L4440 质粒片段大小一致, 表明 *HcLK*、*HcLKR* 与 *GFP* 基因的 dsRNA 表达载体构建成功。



M. DL 5 000 Marker; a. L4440 载体双酶切: 1. L4440 质粒酶切产物, 2. L4440 载体质粒; b. 重组质粒酶切: 1. L4440-*HcLKR* 重组质粒酶切产物, 2. L4440-*HcLK* 重组质粒酶切产物, 3. L4440-*GFP* 重组质粒酶切产物

图 2 L4440 载体和重组质粒双酶切验证

Fig. 2 Double enzyme digestion validation of L4440 vector and recombinant plasmid

## 2.2 dsRNA 表达载体的诱导及沉默效率检测

原核表达载体 L4440-*HcLK*、L4440-*HcLKR* 和 L4440-*GFP* 转化大肠杆菌 HT115(DE3)感受态细胞中, 经 IPTG 诱导, 提取细菌总 RNA, 琼脂糖凝胶电泳检测显示诱导出目的 dsRNAs 条带大小正确(图 3), 说明 dsRNA 片段在细菌中成功表达。

与饲喂 L4440-*GFP* 对照组相比, 美国白蛾幼虫 L4440-*HcLK* 饲喂组的 *LK* 基因相对表达量显著降低, 48 h 和 72 h 的沉默效率分别为 62.81% 和 88.15% (图 4a)。在 48 h 时 L4440-*HcLKR* 处理组 *LKR* 表达量稍有升高, 为对照组的 1.18 倍( $P > 0.05$ ), 而 72 h

时, *LKR* 基因的沉默效率为 41.34%(图 4b)。结果表明: 饲喂含有表达 *HcLK* 和 *HcLKR* dsRNA 菌液饲料可成功诱导美国白蛾幼虫产生 RNAi 效应。

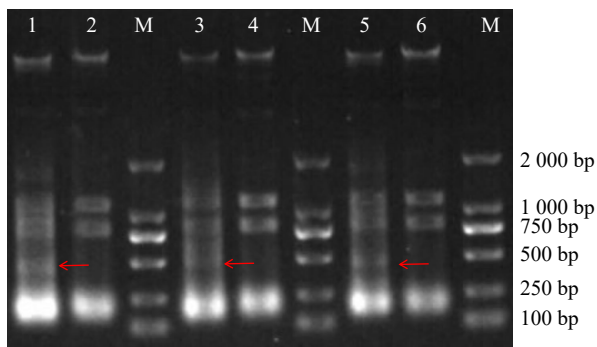
## 2.3 饲喂 dsRNA 菌液对美国白蛾取食和发育历期的影响

与 L4440-*GFP* 对照组相比, 48 h 时 L4440-*HcLK* 和 L4440-*HcLKR* 处理组的美国白蛾 4 龄幼虫的取食量分别增加了 12.99% 和 14.22%, 但无显著差异(图 5a); L4440-*HcLK* 处理组的幼虫体重累计增长率显著增加了 29.68% ( $P < 0.05$ ), 而 L4440-*HcLKR* 处理组的体重累计增长率与对照相比无显著差异(图 5b)。

饲喂 L4440-*HcLK* 和 L4440-*HcLKR* 菌液后美国白蛾幼虫 4 龄至蛹期的发育时间均延长, 从对照组的 15.24 d 分别延长至 15.64 和 16.00 d。对照组、L4440-*HcLK* 和 L4440-*HcLKR* 处理组幼虫 4 龄发育时间分别为 3.40、3.37 和 3.57 d, 5 龄发育时间分别为 4.64、4.80 和 4.82 d, 6 龄发育时间分别为 7.20、7.47 和 7.61 d, 各龄期发育时间均有所延迟(图 6)。

## 2.4 LK 短肽对美国白蛾取食和发育历期的影响

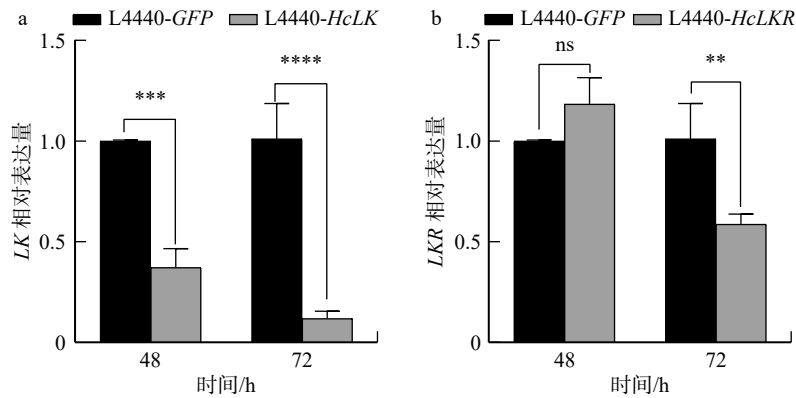
与对照组(注射 PBS)相比, 注射 LKs 短肽(LK1 和 LK2)的美国白蛾 4 龄幼虫, 48 h 时取食量依次显著降低了 15.15% 和 16.20%(图 7a), 体重累计增长率分别显著降低了 39.01% 和 32.86%(图 7b)。LKs 短肽注射 48 h 后美国白蛾幼虫体内含水量无显著变化(图 7c); 而注射短肽 LK2 24 h 后粪便的含水量显



M. DL2000 Marker; 1. IPTG 诱导 L4440-*HcLKR* 细菌表达的 dsRNA; 2. 未经 IPTG 诱导 L4440-*HcLKR* 细菌表达的 dsRNA; 3. IPTG 诱导 L4440-*HcLK* 细菌表达的 dsRNA; 4. 未经 IPTG 诱导 L4440-*HcLK* 细菌表达的 dsRNA; 5. IPTG 诱导 L4440-*GFP* 细菌表达的 dsRNA; 6. 未经 IPTG 诱导 L4440-*GFP* 细菌表达的 dsRNA

图 3 细菌中的诱导表达 dsRNA 的鉴定

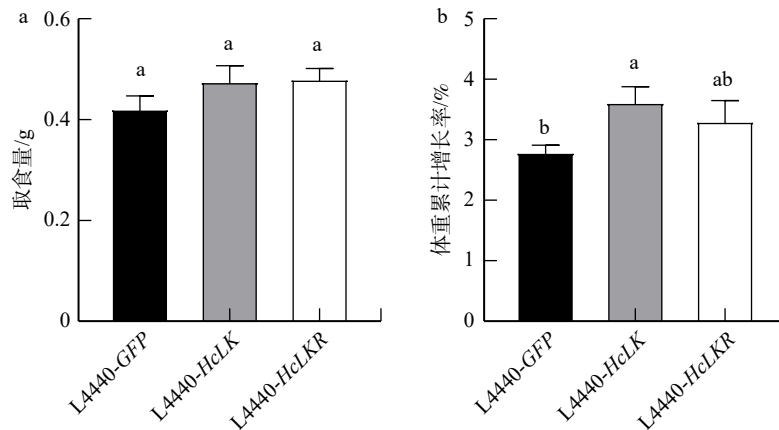
Fig. 3 Identification of induced expression of dsRNA in bacteria



数据为平均值  $\pm$  标准误差; 柱上星号表示与对照组比较差异显著 (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ ) 独立样本  $T$  检验。ns 表示差异不显著。下同。

图4 饲喂 L4440-HcLK 和 L4440-HcLKR 菌液后美国白蛾 4 龄幼虫 LK 和 LKR 基因表达量

Fig. 4 LK and LKR gene expression in the 4th instar larvae of *H. cunea* by feeding L4440-HcLK and L4440-HcLKR bacterial solution



用 Duncan 方法分析差异显著性, 不同小写字母表示不同处理组间差异显著 ( $P < 0.05$ )。下同。

图5 饲喂 L4440-HcLK 和 L4440-HcLKR 菌液对美国白蛾 4 龄幼虫取食和体重的影响

Fig. 5 Effects of feeding L4440-HcLK and L4440-HcLKR bacterial solution on feeding and weight of the 4th instar larvae of *H. cunea*

著升高, 为对照组的 1.29 倍, 但 48 h 的粪便含水量无显著差异(图 7d)。

注射 LK1 和 LK2 短肽的美国白蛾幼虫在 4 龄和 5 龄较对照组(CK)延迟了 1 d 开始蜕皮。CK 组幼虫 4 龄发育时间为 3.90 d, 而 LK1 和 LK2 组 4 龄发育时间均为 4.19 d; CK、LK1 和 LK2 组 5 龄发育时间分别为 4.85、4.71 和 4.19 d, 6 龄发育时间分别为 7.80、7.68 和 8.84 d。从 4 龄发育至蛹, LK1 组的发育时间从 CK 组的 16.54 d 减少至 16.06 d, 减少了 0.48 d, LK2 组发育时间为 17.56 d, 延长了 1.02 d (图 8)。结果表明, 注射 LKs 短肽会影响美国白蛾幼虫的发育时间。

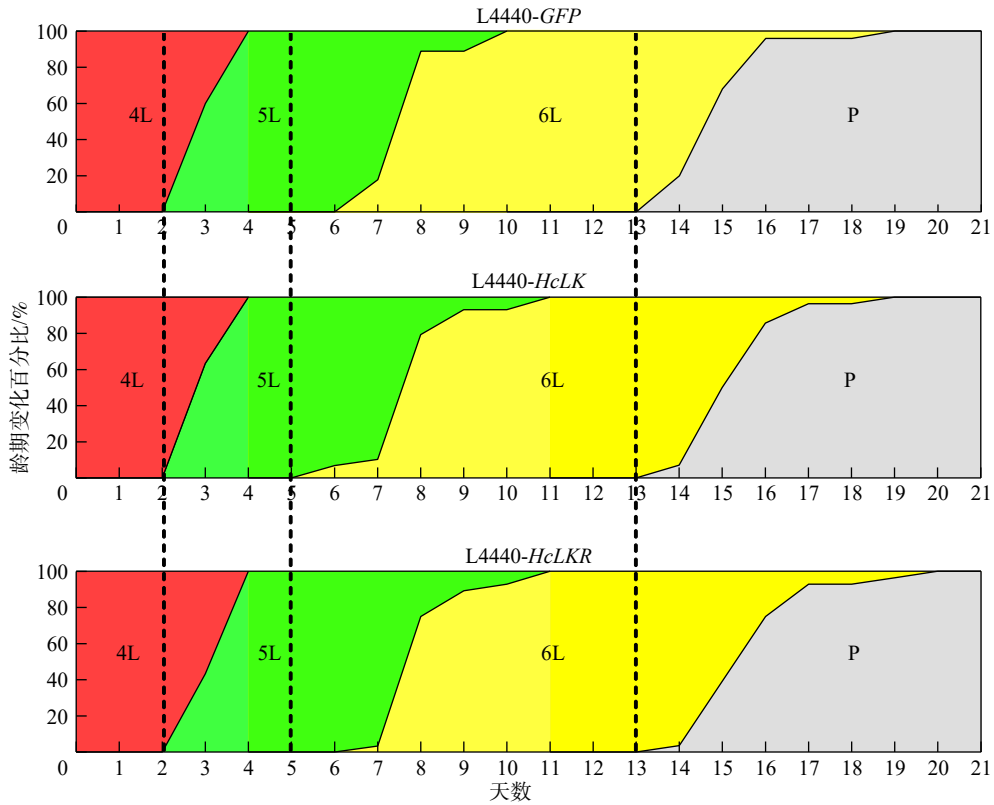
## 2.5 LK 短肽注射对消化酶活性的影响

与对照组相比, 注射 LKs 短肽对美国白蛾幼虫中肠组织和脂肪体(注射短肽 LK2)中的脂肪酶和胰蛋白酶活力均无显著影响 ( $P > 0.05$ )。注射短肽 LK1 的美国白蛾幼虫脂肪体中脂肪酶和胰蛋白酶活性显著升高, 分别为对照组的 2.34 倍和 2.01 倍(图 9a、

b)。中肠和脂肪体中  $\alpha$ -淀粉酶活性在注射 LKs 短肽后均显著升高, 与对照组相比依次增加了 2.22 倍、2.30 倍、2.84 倍和 2.66 倍(图 9c)。注射短肽 LK1 抑制了美国白蛾幼虫中肠中可溶性海藻糖酶活性, 酶活性较对照组显著降低了 48.28%, 脂肪体中可溶性海藻糖酶活性被激活, 较对照组显著增加了 72.47%; 而注射 LK2 短肽的中肠和脂肪体的可溶性海藻糖酶活性均无显著变化(图 9d)。与对照组相比, 注射短肽 LK1 和 LK2 的中肠膜结合型海藻糖酶活性被激活, 分别显著提高了 59.93% 和 37.02%; 注射 LK2 短肽对脂肪体的膜结合型海藻糖酶活性无显著影响, 而注射 LK1 短肽导致脂肪体中的膜结合型海藻糖酶活性显著增加, 为对照的 2.37 倍(图 9e)。

## 2.6 LK 短肽对消化酶基因表达的影响

上述研究结果表明 LKs 短肽可显著提高部分消化酶的活性, 为此进一步使用 RT-qPCR 技术检测了中肠和脂肪体中消化酶关键基因的表达水平。结果



L 为龄期, P 为蛹期。下同。

图 6 饲喂 L4440-HcLK 和 L4440-HcLKR 菌液对美国白蛾发育历期的影响

Fig. 6 Effects of feeding L4440-HcLK and L4440-HcLKR bacterial solution on development duration of *H. cunea*

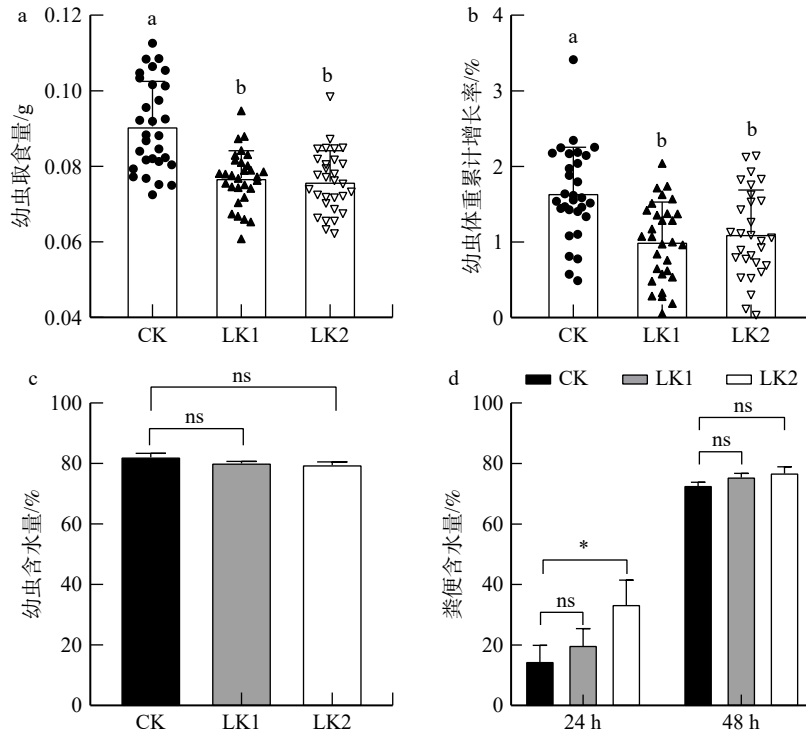


图 7 注射 LKs 短肽对美国白蛾 4 龄幼虫取食、体重和含水率的影响

Fig. 7 Effects of microinjection of LKs short peptide on feeding, weight and water content of the 4th instar larvae of *H. cunea*

表明: 与对照组相比, 注射短肽 LK1 和 LK2 的美国白蛾中肠脂肪酶基因 *LIP* 表达量依次显著增加了 1.09 倍和 2.42 倍; 注射 LK2 短肽的美国白蛾脂肪

体 *LIP* 基因表达量显著升高了 20.86 倍, 而 LK1 短肽处理组无显著变化(图 10 a)。注射短肽 LK1 后美国白蛾中肠  $\alpha$ -淀粉酶 *amy-1* 基因表达量无显著变

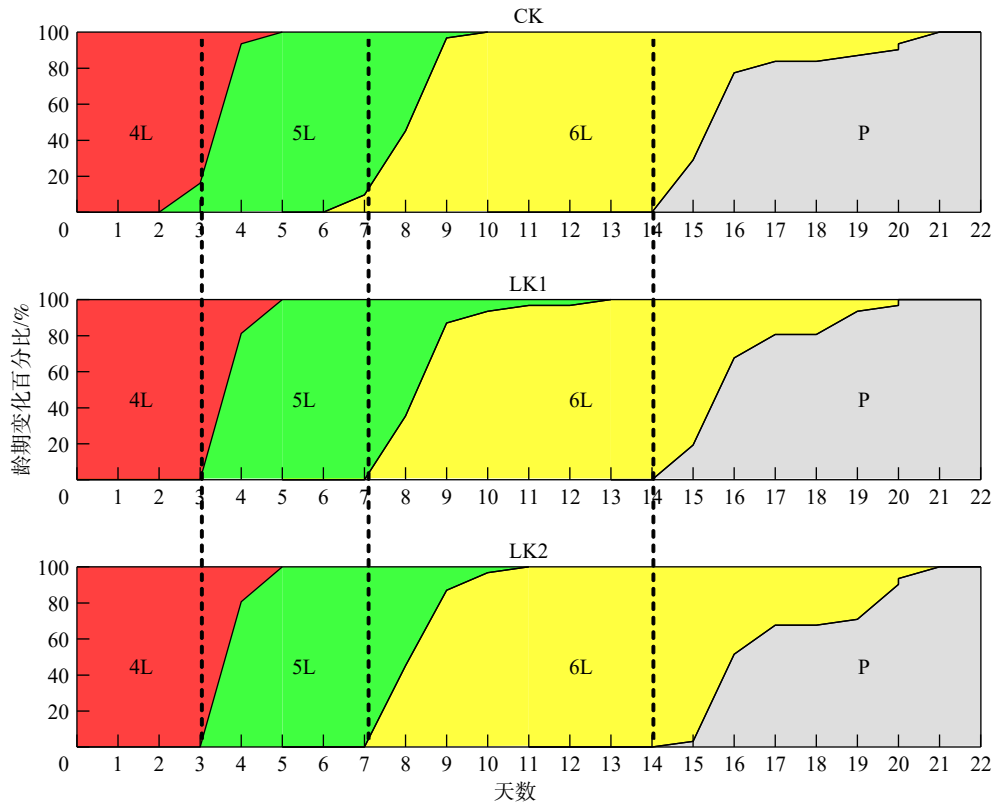


图8 注射 LKs 短肽对美国白蛾发育历期的影响

Fig. 8 Effects of microinjection of LKs short peptide on development duration of *H. cunea*

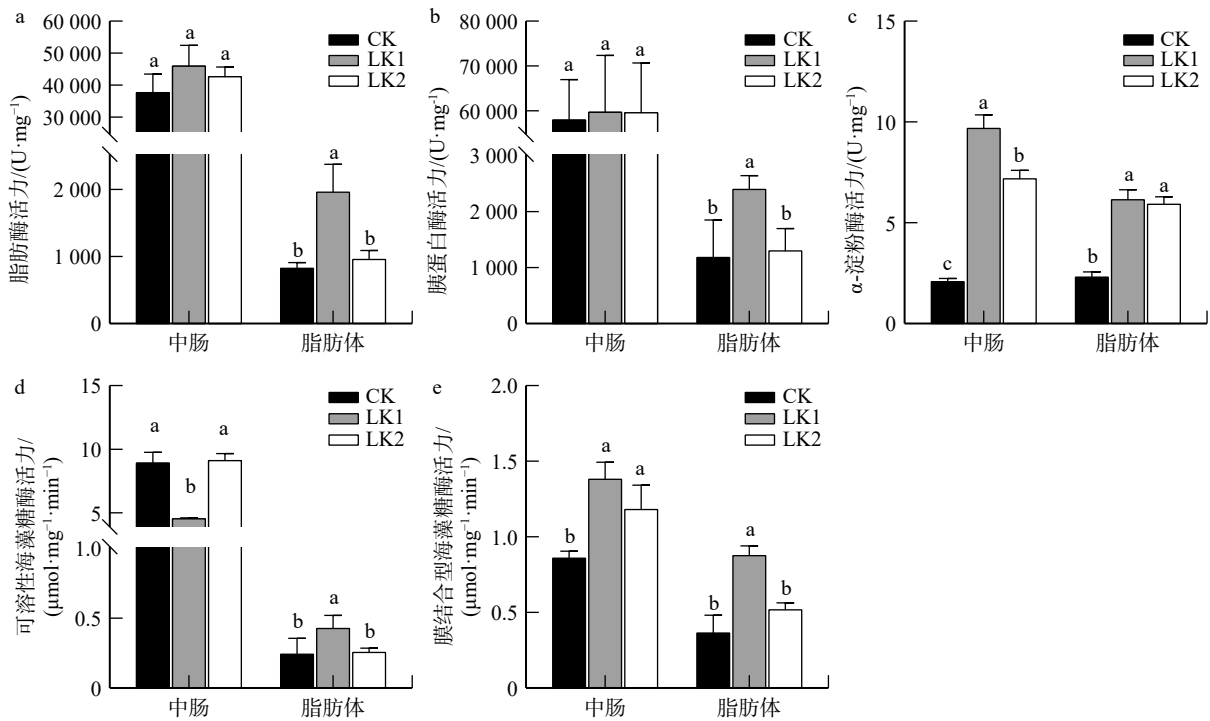


图9 注射 LKs 短肽对美国白蛾中肠和脂肪体消化酶活力的影响

Fig. 9 Effects of microinjection of LKs short peptide on digestive enzyme activity in midgut and fat body of *H. cunea*

化, 而 LK2 注射组的中肠 *amy-1* 基因表达量显著升高, 为对照组的 1.92 倍。与对照组相比, 两个处理组脂肪体中的 *amy-1* 基因表达量均上调表达, 依次显著增加了 6.13 倍和 6.47 倍(图 10b); 而 *amy-2* 基因

表达量在中肠和脂肪体中均显著提高, 分别为对照组的 13.62 倍、7.31 倍、7.03 倍和 4.79 倍(图 10c)。

### 2.7 LK 短肽对糖代谢的调节作用

与对照组相比, 注射 LKs 短肽对美国白蛾中肠

的海藻糖和葡萄糖含量无显著影响(图 11a、c), 但中肠糖原含量显著降低, 分别减少了 46.59% 和 58.06% ( $P < 0.05$ )(图 11b)。注射 LK1 短肽的幼虫脂肪体的海藻糖含量增加, 为对照组的 7.34 倍 ( $P < 0.05$ ), 而注射 LK2 短肽的脂肪体中海藻糖含量无显著性变化 ( $P > 0.05$ )(图 11a); 注射 LK1 和 LK2 短肽导致脂肪体中糖原含量升高, 分别增加了 4.32 倍和 2.37 倍 ( $P < 0.05$ )(图 11b), 但葡萄糖含量显著降低, 依次减少了 5.06% 和 12.66%(图 11c)。

注射短肽 LKs 后美国白蛾幼虫中肠的糖代谢

相关基因表达量均显著增加, 其中可溶性海藻糖酶基因 *Tre1* 表达量与对照组相比分别显著增加了 2.10 倍和 1.01 倍, 膜结合型海藻糖酶基因 *Tre2* 表达量依次显著增加了 0.65 倍和 2.28 倍, 海藻糖转运蛋白(trehalose transporter1, *Tret1*)基因 *Tret1* 表达量分别显著增加了 2.31 倍和 0.87 倍(图 12)。短肽 LK1 注射抑制了 *Tre1* 基因表达, 显著降低了 79.08%, 但短肽 LK2 注射后无显著影响(图 12a); 短肽 LK1 和 LK2 抑制了 *Tre2* 基因表达, 依次降低了 58.03% 和 44.17% ( $P < 0.05$ )(图 12b); 短肽 LK2 诱导了 *Tret1*

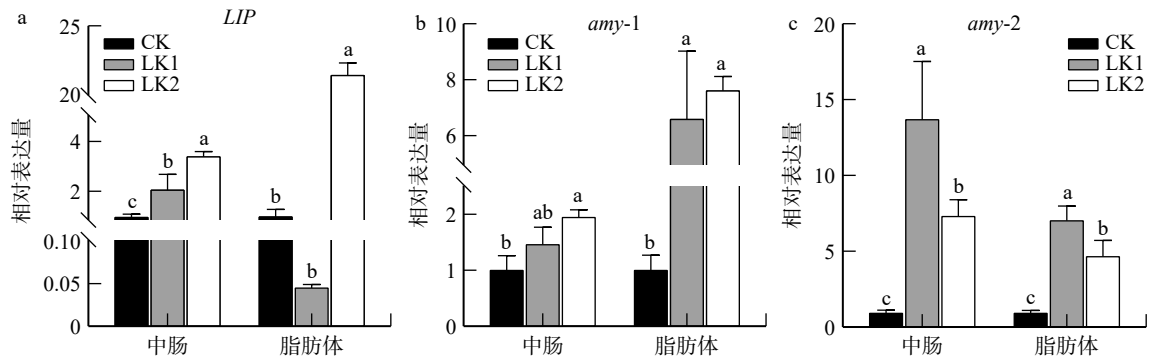


图 10 注射 LKs 短肽对美国白蛾中肠和脂肪体消化酶相关基因相对表达量的影响

Fig. 10 Effects of microinjection of LKs short peptide on relative expression levels of digestive enzyme related genes in midgut and fat body of *H. cunea*

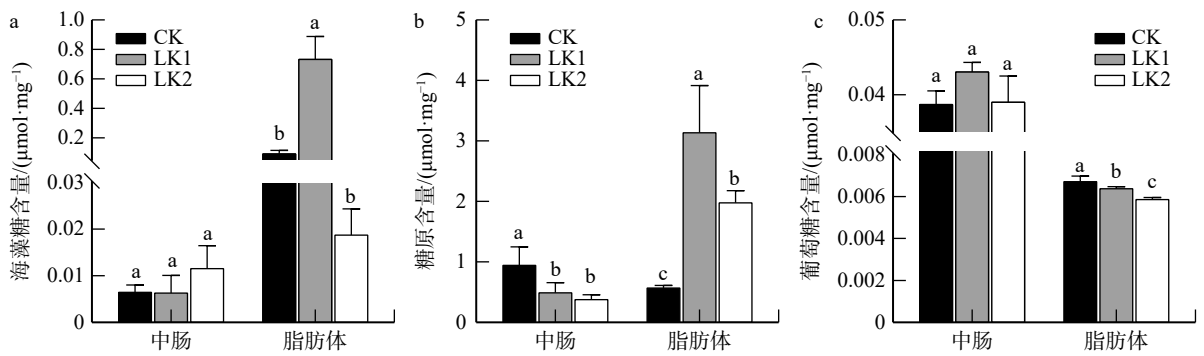


图 11 注射 LKs 短肽对美国白蛾中肠和脂肪体中海藻糖、糖原和葡萄糖含量的影响

Fig. 11 Effects of microinjection of LKs short peptide on trehalose, glycogen and glucose content in midgut and fat body of *H. cunea*

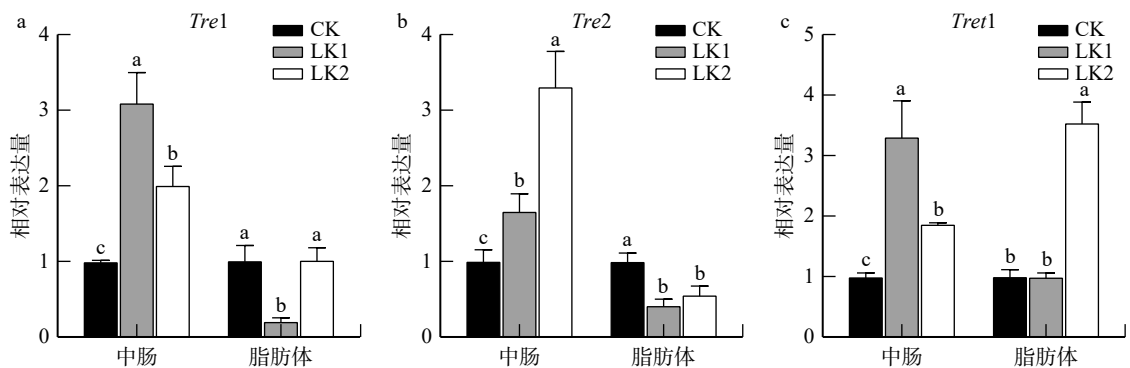


图 12 注射 LKs 短肽对美国白蛾中肠和脂肪体海藻糖代谢相关基因相对表达量的影响

Fig. 12 Effects of microinjection of LKs short peptide on relative expression levels of genes related to trehalose metabolism in midgut and fat body of *H. cunea*

基因表达,表达量为对照组的 3.53 倍( $P < 0.05$ ),但注射 LK1 短肽对 *Tret1* 表达量无显著影响(图 12c)。

### 3 讨 论

白细胞激肽信号系统对昆虫多种生理和行为有着重要影响,尤其在调控取食和能量代谢方面<sup>[11,14]</sup>。深入了解白细胞激肽对美国白蛾幼虫取食和生长发育的影响,可为其新型防治策略提供理论依据。本研究通过 RNAi 和注射 LK 短肽证实了激肽参与调控美国白蛾幼虫取食、能量代谢和生长发育。本研究成功构建了通过工程细菌表达美国白蛾白细胞激肽和受体 dsRNA 的原核表达系统,并有效沉默了 4 龄幼虫 *LK* 和 *LKR* 基因,这导致了美国白蛾幼虫取食量增加、体重累计增长率显著增加和幼虫发育历期延迟。进一步对幼虫注射 LK 短肽,发现取食量和体重累计增长率显著降低,且影响幼虫各龄期的发育时间。已有研究表明激肽能显著抑制美洲棉铃虫幼虫体重增长,并延长化蛹时间<sup>[14]</sup>; *LK* 和 *LKR* 基因突变会导致果蝇取食量增加和进食频率减少<sup>[15]</sup>。课题组前期研究显示抑制美国白蛾 *LK* 和 *LKR* 基因表达幼虫体内含水量增加,说明美国白蛾保水能力增强<sup>[11]</sup>。而在本研究中,体外注射 LKs 短肽 24 h 美国白蛾幼虫粪便含水量略微升高,仅注射 LK2 短肽显著高于对照组( $P < 0.05$ );注射短肽 48 h 处理组粪便含水量和幼虫含水量与对照组无显著差异,说明白细胞激肽调控水稳态存在时间效应,注射初期可促进美国白蛾体内水分排出,随处理时间延长美国白蛾幼虫体内水分代谢已达到平衡,该研究加深了昆虫 LK 信号系统调节水稳态功能的认识。

在昆虫中,取食过程中的神经肽可调节消化酶的活性,消化酶对取食过程中的食物消化和养分吸收起着重要的作用<sup>[27-28]</sup>。昆虫中肠组织是消化食物和吸收营养物质的主要场所;脂肪体是昆虫生命代谢活动的重要器官,主要功能是储存营养和代谢废物,进行物质合成、转化等中间代谢<sup>[29]</sup>。本研究发现,注射 LKs 短肽导致美国白蛾中肠的  $\alpha$ -淀粉酶以及脂肪体中的脂肪酶、胰蛋白酶、 $\alpha$ -淀粉酶活性显著升高。与此相对应的是,中肠和脂肪体脂肪酶基因 *LIP*(除脂肪体的 LK1 组)以及  $\alpha$ -淀粉酶基因 *amy-1* 和 *amy-2* 的相对表达量显著上调。这表明,激肽作为取食调控的重要因子,通过调节消化酶活性,提高了美国白蛾的消化能力。

葡萄糖、糖原和海藻糖是维持昆虫生命活动的重要能量物质。海藻糖酶(*Tre1* 和 *Tre2*)是把海藻糖水解成葡萄糖的重要水解酶<sup>[30-31]</sup>。海藻糖转运蛋白(*Tret*)可协助转移脂肪体内的海藻糖到血淋巴中,从

而被其他组织吸收,并且还能协助其他组织中的海藻糖释放至血淋巴中,以满足昆虫的生理需求<sup>[32-33]</sup>。有研究表明,*NITret1* 转运蛋白参与褐飞虱(*Nilaparvata lugens*)海藻糖的特异性转运,沉默褐飞虱 *NITret1* 基因显著抑制了糖原含量和海藻糖含量<sup>[34]</sup>。本研究发现,白细胞激肽影响了中肠和脂肪体中葡萄糖、糖原和海藻糖的能量代谢,并且在两种组织中的功能有所差异。短肽 LK1 显著抑制了美国白蛾脂肪体海藻糖酶基因 *Tre1* 和 *Tre2* 的表达,进而降低了可溶性海藻糖酶活性。尽管膜结合型海藻糖酶活性显著提高,但最终减少了海藻糖消耗,导致海藻糖含量升高。短肽 LK2 提高了脂肪体海藻糖转运蛋白 *Tret1* 基因表达量,降低了 *Tre2* 表达量,但对海藻糖酶活力和海藻糖含量无显著影响。短肽 LK1 和 LK2 均降低了脂肪体葡萄糖含量,同时提高了糖原含量,推测激肽可促进脂肪体内葡萄糖转化为糖原。注射 LK1 和 LK2 短肽后,中肠海藻糖酶基因 *Tre1* 和 *Tre2* 的表达量增加,提高了膜结合型海藻糖酶活力,降低了可溶性海藻糖酶活力(LK1 组)。尽管中肠海藻糖含量无显著变化,但糖原含量显著减少,这可能是中肠糖原向海藻糖转化的结果。胰岛素样肽(*insulin-like peptide, ILP*)是昆虫体内新陈代谢、生长发育和寿命的重要调节剂<sup>[35]</sup>。注射 dsRNA 干扰激肽信号影响了美国白蛾 *ILPs* 基因的表达,并提高了幼虫在干燥和饥饿胁迫下的存活率<sup>[11]</sup>。研究表明,昆虫体内海藻糖水平与抵抗逆境的能力密切相关<sup>[36]</sup>。本研究结果表明,白细胞激肽通过调控美国白蛾 *Tret1*、*Tre1* 和 *Tre2* 基因的表达,影响葡萄糖、糖原和海藻糖的水平,从而维持体内能量代谢平衡,以保证其生长发育的需求。

美国白蛾作为取食量大和危害猖獗的入侵害虫,对其取食行为的调节机制所知甚少。本研究明确了激肽可通过调控美国白蛾体内消化酶活性和能量代谢过程来影响美国白蛾的取食和生长发育,未来可针对美国白蛾激肽信号通路设计特异杀虫剂用于其防治。

### 参 考 文 献

- [1] 杨明琪. 不同气候情景下美国白蛾在我国的适生区预测 [D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2013.  
Yang M Q. Prediction of fall webworm's potential suitable geographic distribution in different weather conditions in China [D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry, 2013.
- [2] 闫家河, 刘芹, 王文亮, 等. 美国白蛾发生与防治研究综述 [J]. 山东林业科技, 2015, 45(2): 93-106.  
Yan J H, Liu Q, Wang W L, et al. Review on the occurrence and

- control of *Hyphantria cunea* (Drury)[J]. Journal of Shandong Forestry Science and Technology, 2015, 45(2): 93–106.
- [3] 贾红梅, 张宏杰, 张旭. 美国白蛾发生危害特点及综合防控措施[J]. 果树资源学报, 2022, 3(2): 60–62.
- Jia H M, Zhang H J, Zhang X. Occurrence characteristic and comprehensive countermeasure of *Hyphantria cunea*[J]. Journal of Fruit Resources, 2022, 3(2): 60–62.
- [4] 郭小强, 韩明利. 美国白蛾发生危害与防治技术研究进展[J]. 现代园艺, 2020, 43(21): 61–63.
- Guo X Q, Han M L. Research progress on the occurrence and control technology of *Hyphantria cunea*[J]. Contemporary Horticulture, 2020, 43(21): 61–63.
- [5] 汪梅子, 金小宇, 周源琳, 等. 昆虫神经肽抑咽侧素及其类似物的研究进展[J]. 农药学报, 2019, 21(3): 255–272.
- Wang M Z, Jin X Y, Zhou Y L, et al. Research progress of insect neuropeptide allatostatins and their analogues[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2019, 21(3): 255–272.
- [6] Schoofs L, Holman G M, Proost P, et al. Locustakinin, a novel myotropic peptide from *Locusta migratoria*, isolation, primary structure and synthesis[J]. Regulatory Peptides, 1992, 37(1): 49–57.
- [7] Blackburn M B, Wagner R M, Shabanowitz J, et al. The isolation and identification of three diuretic kinins from the abdominal ventral nerve cord of adult *Helicoverpa zea*[J]. Journal of Insect Physiology, 1995, 41(8): 723–730.
- [8] Terhzaz S, O'Connell F C, Pollock V P, et al. Isolation and characterization of a leucokinin-like peptide of *Drosophila melanogaster*[J]. Journal of Experimental Biology, 1999, 202: 3667–3676.
- [9] Pietrantonio P V, Gibson G E, Strey A A, et al. Characterization of a leucokinin binding protein in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Malpighian tubule[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2000, 30(12): 1147–1159.
- [10] Orchard I, Brugge V T. Contractions associated with the salivary glands of the blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus*: evidence for both a neural and neurohormonal coordination[J]. Peptides, 2002, 23(4): 693–700.
- [11] Sun L L, Ma H T, Gao Y, et al. Functional identification and characterization of leucokinin and its receptor in the fall webworm[J]. Frontiers in Physiology, 2021, 12: 741362.
- [12] Holman G M, Cook B J, Nachman R J. Isolation, primary structure and synthesis of two neuropeptides from *Leucophaea maderae*: members of a new family of cephalotropins[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C Comparative Pharmacology, 1986, 84C: 205–211.
- [13] Cook B J, Holman G M, Wagner R M, et al. Pharmacological actions of a new class of neuropeptides, the leucokinins I-IV, on the visceral muscles of *Leucophaea maderae*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology, 1989, 93(2): 257–262.
- [14] Nachman R J, Coast G M, Douat C, et al. A C-terminal aldehyde insect kinin analog enhances inhibition of weight gain and induces significant mortality in *Helicoverpa zea* larvae[J]. Peptides, 2003, 24(10): 1615–1621.
- [15] Bader A, Elena A, Paul N, et al. The leucokinin pathway and its neurons regulate meal size in *Drosophila*[J]. Current Biology, 2010, 20(11): 969–978.
- [16] Kwon H, Ali A M, Smith R C, et al. Leucokinin mimetic elicits aversive behavior in mosquito *Aedes aegypti* (L.) and inhibits the sugar taste neuron[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(25): 6880–6885.
- [17] Cavey M, Collins B, Bertet C, et al. Circadian rhythms in neuronal activity propagate through output circuits[J]. Nature Neuroscience, 2016, 19(4): 587–595.
- [18] Seinsche A, Dyker H, Lösel P, et al. Effect of heliocokinins and ACE inhibitors on water balance and development of *Heliothis virescens* larvae[J]. Journal of Insect Physiology, 2000, 46(11): 1423–1431.
- [19] Hirono O, Takaomi S. Leucokinin signaling regulates hunger-driven reduction of behavioral responses to noxious heat in *Drosophila*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2018, 499(2): 221–226.
- [20] Zandawala M, Yurgel M E, Texada M J, et al. Modulation of *Drosophila* post-feeding physiology and behavior by the neuropeptide leucokinin[J]. PLoS Genetics, 2018, 14(11): e1007767.
- [21] Yurgel M E, Kakad P, Zandawala M, et al. A single pair of leucokinin neurons are modulated by feeding state and regulate sleep–metabolism interactions[J]. PLoS Biology, 2019, 17(2): e2006409.
- [22] 常瑞, 王俊, 付开赞, 等. 4种原核表达双链RNA的dsRNA提取方法效果评价[J]. 新疆农业科学, 2021, 58(4): 700–711.
- Chang R, Wang J, Fu K Y, et al. Comparative study on the effect of 4 kind of dsRNA extraction methods from prokaryotic expression double-stranded RNA[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2021, 58(4): 700–711.
- [23] 王越, 张苏芳, 徐瑶, 等. 美国白蛾几丁质酶细菌表达的RNA干扰载体构建及其介导的RNA干扰[J]. 林业科学研究, 2019, 32(2): 1–8.
- Wang Y, Zhang S F, Xu Y, et al. Construction of the expression vector and RNAi mediated by bacteria expressed dsRNA of *Chitinase* gene from *Hyphantria cunea*[J]. Forest Research, 2019, 32(2): 1–8.
- [24] Zhang X, Fan Z, Zhang R, et al. Bacteria-mediated RNAi for managing fall webworm, *Hyphantria cunea*: screening target

- genes and analyzing lethal effect[J]. *Pest Management Science*, 2023, 79(4): 1566–1577.
- [25] Zhang L, Qiu L Y, Yang H L, et al. Study on the effect of wing bud chitin metabolism and its developmental network genes in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, by knockdown of *TER* gene[J]. *Frontiers in Physiology*, 2017, 8: 750.
- [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] Terra W R. Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective[J]. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 1988, 21(4): 675–734.
- [28] Guo D, Zhang S, Zhang Y J, et al. Sulfakinin inhibits activity of digestive enzymes in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*[J]. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 2020, 23(4): 1073–1082.
- [29] 吴秋雁. 昆虫脂肪体的代谢作用 [J]. *昆虫知识*, 1981(2): 92–95.  
Wu Q Y. Metabolism of fat body in insect[J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 1981(2): 92–95.
- [30] Becker A, Schlöder P, Steele J E, et al. The regulation of trehalose metabolism in insects[J]. *Experientia*, 1996, 52(5): 433–439.
- [31] Shukla E, Thorat L J, Nath B B, et al. Insect trehalase: physiological significance and potential applications[J]. *Glycobiology*, 2015, 25(4): 357–367.
- [32] Thompson S N. Trehalose—the insect “blood” sugar[J]. *Journal of Insect Physiology*, 2003, 31: 205–283.
- [33] Leyria J, El-Mawed H, Orchard I, et al. Regulation of a trehalose-specific facilitated transporter (TRET) by insulin and adipokinetic hormone in *Rhodnius prolixus*, a vector of chagas disease[J]. *Frontiers in Physiology*, 2021, 12: 624165.
- [34] 罗雨嘉, 邱玲玉, 刘永康, 等. 褐飞虱两个糖转运蛋白的功能分析及调控海藻糖代谢的影响 [J]. *环境昆虫学报*, 2022, 44(4): 935–945.  
Luo Y J, Qiu L Y, Liu Y K, et al. Functional analysis of two sugar transporters of the brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) and their effects on regulating trehalose metabolism[J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2022, 44(4): 935–945.
- [35] Nssel D R, Broeck J V. Insulin/IGF signaling in *Drosophila* and other insects: factors that regulate production, release and post-release action of the insulin-like peptides[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2016, 73(2): 271–290.
- [36] Benoit J B, Lopez-Martinez G, Elnitsky M A, et al. Dehydration-induced cross tolerance of *Belgica antarctica* larvae to cold and heat is facilitated by trehalose accumulation[J]. *Comparative Biochemistry & Physiology Part A*, 2009, 152(4): 518–523.

(责任编辑 范娟  
责任编辑 骆有庆)