研究论文

褐飞虱 26S 蛋白酶体非 ATPase 调节亚基 4 基因 *NlPSMD4* 作为防治靶点的潜力研究*

施书棋** 杨江涛 沈博昱 郝培应*** 俞晓平***

（中国计量大学生命科学学院，浙江省生物计量及检验检疫技术重点实验室，杭州 310018）

摘 要 **【目的】** 褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 是对水稻极具破坏性的农业害虫。泛素-蛋白酶体系统（Ubiquitin proteasome system，UPS）参与昆虫多种生理过程。本研究旨在探究 UPS 的核心组分 26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 4（*NlPSMD4*）在褐飞虱生长发育与生殖中的功能，并评估其作为 RNA 干扰（RNA interference，RNAi）防控靶点的潜力。**【方法】** 利用 qRT-PCR 技术解析 *NlPSMD4* 的时空表达特征；通过显微注射 dsRNA 对若虫和成虫分别进行 *NlPSMD4* 基因的 RNA 干扰，系统测定其致死效应、产卵量及卵孵化率；检测 *NlPSMD4* 基因 RNA 干扰后卵黄原蛋白（*Vg*）、保幼激素酸甲基转移酶（*JHAMT*）以及蜕皮激素受体（*EcR*）相关基因的表达量变化，以揭示其作用机制。**【结果】** *NlPSMD4* 在褐飞虱各发育阶段及组织中均有表达，其中卵期第 2 天及卵巢组织丰度最高。RNAi 结果表明，干扰 *NlPSMD4* 会导致褐飞虱严重死亡：ds*NlPSMD4* 注射处理后第 11 天若虫存活率仅为 3.33%，雄虫与雌虫存活率分别骤降至 4.00%（10 d）和 4.17%（14 d）。生殖力测定显示，雌雄双性别干扰组（ds*NlPSMD4*♀×ds*NlPSMD4*♂）总产卵量降至 62 粒，孵化率降至 25.65%；雄虫单性别干扰亦显著抑制孵化率（41.93%，$P < 0.05$）。产卵量与孵化率相关的基因表达水平检测发现，*NlPSMD4* 基因的 RNA 干扰破坏了激素与生殖信号稳态：*JHAMT* 基因在雌成虫中的表达显著上调（$P < 0.000\ 1$）；*EcR* 基因在雄虫中显著上调（$P < 0.000\ 1$）；雌虫 *Vg* 基因表达量激增约 15 倍（20.07），但产卵量和孵化率没有增加，反而降低。**【结论】** 本研究证实 *NlPSMD4* 在褐飞虱生存及生殖方面发挥重要作用，其表达量下降会引发严重的致死与致不育效应。因此，*NlPSMD4* 有望成为基于 RNA 干扰的褐飞虱防控新的靶标。

关键词 褐飞虱；*PSMD4*；26S 蛋白酶体；RNA 干扰；害虫防治

Potential for targeting the 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit four gene *NlPSMD4* for the control of *Nilaparvata lugens*

SHI Shu-Qi** YANG Jiang-Tao SHEN Bo-Yu HAO Pei-Ying*** YU Xiao-Ping***

(Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biometrology and Inspection & Quarantine, College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China)

Abstract **[Aim]** To investigate the function of the 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4 (NlPSMD4), a core component of the UPS, in the growth, development and reproduction of *Nilaparvata lugens*, and evaluate its potential as a target for RNA interference (RNAi)-based control. **[Methods]** The spatiotemporal expression profiles of the *NlPSMD4* gene were characterized using qRT-PCR. Gene silencing was performed by microinjecting dsRNA into nymphs and adults. Following RNAi treatment, mortality, fecundity, and egg hatching rates were systematically measured. Furthermore, the mRNA expression levels of vitellogenin (*Vg*), juvenile hormone acid methyltransferase (*JHAMT*) and ecdysone receptor (*EcR*)

*资助项目 Supported project：浙江省自然科学基金重大项目（LD25C140001）

**第一作者 First author，E-mail：18358736796@163.com

***共同通讯作者 Co-corresponding authors，E-mail：haopeiy@163.com；yuxiaoping19630306@163.com

收稿日期 Received：2026-02-05；接受日期 Accepted：2026-05-07

genes, were analyzed to elucidate the underlying molecular mechanisms. **[Results]** *NlPSMD4* was expressed in all developmental stages and tissues, with the highest abundance observed in 2-day-old eggs and ovarian tissues. RNAi experiments demonstrated that silencing *NlPSMD4* caused severe mortality; nymph survival dropped to 3.33% by day 11 post-treatment, and the survival rate of males and females declined to 4.00% and 4.17%, respectively, on days 10 and 14. RNAi treatment of both sexes (ds*NlPSMD4*♀ × ds*NlPSMD4*♂) caused the number of eggs to decrease to 62 per female, and the hatching rate to decrease to 25.65%. RNAi treatment of males only (ds*GFP*♀ × ds*NlPSMD4*♂) also significantly reduced the hatching rate of eggs to 41.93%. Gene expression analysis indicates that RNAi treatment disrupts hormonal and reproductive signaling homeostasis. mRNA expression of the *JHAMT* gene was significantly up-regulated in female adults, whereas that of the *EcR* gene was significantly up-regulated in males. Although the mRNA expression of the *Vg* gene in females surged 15-fold (20.07), the fecundity and hatching rates of eggs did not increase, but rather declined. **[Conclusion]** This study confirms that the *NlPSMD4* gene plays a critical role in the survival and reproduction of the BPH. Loss of *NlPSMD4* function results in significant lethality and sterility. Therefore, the *NlPSMD4* gene is a promising target for the RNAi-based management of BPH.

Key words *Nilaparvata lugens*; *PSMD4*; 26S proteasome; RNA interference; pest control

褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 属半翅目飞虱科，是亚洲地区最具破坏性的水稻害虫之一（林志坚等，2026），其通过直接刺吸水稻韧皮部汁液和产卵刺伤植株组织，引起水稻枯黄、倒伏，这种毁灭性的症状被称为“虱烧”（Hopperburn）。褐飞虱不仅直接影响水稻生长发育，还能传播水稻黑条矮缩病、南方水稻黑条矮缩病等多种病毒病，每年造成巨大的粮食产量损失（Dono and Iamba，2021；Xu *et al.*，2022）。现阶段，褐飞虱的防治主要依赖化学农药，但长期过量使用化学农药已导致褐飞虱对多种农药产生抗药性，并带来生态隐患（Fahad *et al.*，2015）。鉴于此，挖掘兼具高效性与环境安全性的新型防控靶点，对于实现褐飞虱的绿色可持续治理具有重要意义。

泛素-蛋白酶体系统（Ubiquitin-proteasome system，UPS）是真核生物细胞内蛋白质降解的主要途径，负责调控细胞周期、信号转导和基因转录等核心生命过程（Michael and Aaron，2002）。泛素-蛋白酶体系统是维持蛋白质稳态的关键，其功能紊乱会引发多种细胞适应性反应（Rai *et al.*，2025）。26S 蛋白酶体系统是真核生物体内蛋白质质量控制和代谢调控的核心系统，由 2 种亚复合物组成，即 20 核心颗粒（CP）和 19S 调节颗粒（RP），其中 19S 调节颗粒由 ATP 酶调节亚基（AAA+ ATPase regulatory subunits，Rpts）和非 ATP 酶调节亚基（Non-ATPase regulatory subunits，Rpn）两大类亚基组成（Lyupina *et al.*，2016；Arkinson *et al.*，2025），在组装过程中还需要分子伴侣（19S RP assembly chaperones，Racs）参与（Murata *et al.*，2009）。19S 调节颗粒赋予与泛素化蛋白结合的特异性，并具有去泛素化和 ATP 依赖的蛋白质去折叠功能（Lasker *et al.*，2012）。Rpn 亚基作为 19S 调节颗粒的重要组成部分，参与识别泛素化修饰的底物、打开底物构象并将其转运至 20S 核心颗粒中进行降解，对 26S 蛋白酶体的功能实现具有不可替代的作用（Bard *et al.*，2018）。*PSMD4*（在酵母中称为 *Rpn10*）是 19S 调节颗粒基底部分的一个非 ATP 酶亚基，其主要功能是作为泛素受体，识别并结合被泛素标记的底物蛋白，将其导入蛋白酶体进行降解。在昆虫中，26S 蛋白酶体的研究相对有限。已有研究表明，日本甲虫 *Popillia japonica* 的 26S 蛋白酶体 *RPN6* 基因 RNA 干扰后会提高该虫的死亡率（Lucetti *et al.*，2025）；26S 蛋白酶体调节亚基 *RPN6* 基因 RNA 干扰导致葡萄金黄化植原体叶蝉传播媒介死亡和雌性不育（Canuto *et al.*，2025）。我们在研究褐飞虱取食行为过程中，发现褐飞虱向水稻分泌的唾液中含有 PSMD4 蛋白，但其在褐飞虱中的功能及其作为 RNAi 靶标的潜力尚不清楚。本研究旨在克隆褐飞虱 *PSMD4* 基因，明确其时空表达模式，并通过 RNAi 技术评估其在害虫生存和生殖中的功能，为开发基于 UPS 系统的害虫防治策略提供理论依据，为褐飞虱的绿色防控提供新思路和靶点资源。

1　材料与方法

1.1　供试虫源及饲养方法

供试虫源来源于以水稻品种秀水 134（浙江勿忘农种业股份有限公司）持续饲养至少 30 代的褐飞虱种群。褐飞虱和水稻培养的条件为：温度（26 ± 2）℃，相对湿度 70% ± 5%，光周期 16L：8D。短翅型褐飞虱的繁殖力普遍高于长翅型（Diptaningsari *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019），本研究如无特殊说明，供试的昆虫均选用短翅型褐飞虱。

1.2　供试试剂和仪器

柱式 RNA 抽提试剂盒 MiniBEST Universal RNA Extraction Kit（9767，TaKaRa，Japan）、HiFiScript gDNA Removal cDNA Synthesis Kit（CW2582M，康为世纪，江苏，中国）、SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒（B515103，Sangon Biotech，中国）、聚合酶链式反应 PCR 酶 LA Taq®（TaKaRa，Japan）、TB Green® Fast qPCR Mix 试剂盒（TaKaRa，Japan）、SYBR Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒（Accurate Biology，中国）、MEGAscript^{TM}T7 Kit（Thermo Fisher Scientific，USA）、DNA Marker（DL2000，TaKaRa，Japan）、YeaRed 核酸染料（YEASEN，中国）、琼脂糖凝胶粉（TransGen Biotech，中国）、DNA Ligation Kit 试剂盒（Ver.2，TaKaRa，Japan）、T-Vector pMD^{TM}19 载体（3271，TaKaRa，Japan）、氨苄青霉素钠（Solarbio，中国）、LB 培养基（Sangon Biotech，中国）。

实验仪器：组织破碎仪（Tiss-Basic12，上海净信实业发展有限公司，中国）、冷冻离心机（5804R，Eppendorf，Germany）、PCR 仪（T100 梯度 PCR 仪，BIO-RAD，USA）、CFX384TM Real-Time System（BIO-RAD，USA）、NanoDrop ND-2000 微量分光光度计（Thermo Fisher Scientific，USA）、体视显微镜（SZ61，Olympus，Japan）、微量注射仪（FemtoJet 4i，Eppendorf，Germany）、体视显微镜（SMZ18，Nikon，Japan）、超净台（SW-CJ-1FD，浙江沪净净化设备有限公司，中国）、高速离心机（5425R，Eppendorf，Germany）、人工气候箱（MGC-350HP，上海一恒科学仪器有限公司，中国）。

1.3　实验方法

1.3.1　引物设计与合成　通过激光切割褐飞虱口针获得唾液蛋白收集液（Hayashi and Chino 1990；Turgeon and Oparka，2010），并经蛋白质谱解析，获得肽段对应的褐飞虱 PSMD4 蛋白序列信息，根据该蛋白序列信息，在 NCBI 网站通过 blastX 比对，获得一条褐飞虱 *PSMD4* 基因（*NlPSMD4*）的 mRNA 序列（登录号：XM_039427088.1），利用 Primer Premier 5.0 软件设计 qRT-PCR 引物和 dsRNA 合成引物（表 1）。引物由杭州有康生物科技有限公司合成，用于 RNA 干扰片段合成的引物 5′端加上 T7 promotor 序列：5′-TAATACGACTCACTATAGGGAGA-3′。荧光定量 PCR 内参基因选用褐飞虱 *RPS11* 基因（GenBank 登录号：XM_022332657.2）（Yuan *et al.*，2014）。

1.3.2　总 RNA 提取与 cDNA 合成　在秀水 134 水稻上，吸取健康成虫用于总 RNA 提取。总 RNA 提取按照 TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit 试剂盒（9767，Takara，Japan）操作步骤进行。提取的 RNA 样品浓度和纯度用 NanoDrop ND-2000 微量分光光度计（Thermo Fisher Scientific，USA）测定，并使用凝胶电泳验证其完整性，放置于 - 80 ℃保存。提取总 RNA 后，参照 HiFiScript gDNA Removal cDNA Synthesis Kit（CW2582M，康为世纪，江苏，中国）试剂盒操作步骤，将总 RNA 模板反转录合成 cDNA，用 NanoDrop ND-2000 微量分光光度计测定 cDNA 浓度，将检测合格后的 cDNA 保存在 - 20 ℃备用。褐飞虱 *NlPSMD4* 的基因全长克隆使用混合龄期的褐飞虱 cDNA 为模板。

1.3.3　褐飞虱 *NlPSMD4* 基因全长 cDNA 的克隆与生物信息学分析　根据 1.3.1 节获得的 *NlPSMD4* 的全长 cDNA 序列信息，利用 Primer Premier 5 软件设计 1 对特异性扩增引物（表 1），覆盖 *NlPSMD4* 基因的完整编码区。以合成的褐飞虱 cDNA 为模板，进行 *NlPSMD4* 全长 CDS（Coding DNA sequence，CDS）扩增验证。使用 50 μL PCR

表 1 基因克隆、荧光定量 PCR 和合成 dsRNA 的引物

Table 1 Primers used in gene cloning, real-time PCR and dsRNA synthesis

用途 Purpose	引物名称 Primer name	引物序列（5′-3′）Primer sequence (5′-3′)
cDNA 克隆 cDNA cloning	*NlPSMD4*-F	CTTAATCACATCCAACCATGGTTCG
	NlPSMD4-R	ACCACAGCTAATCTACTTCTTGTCG
荧光定量 PCR Real-time PCR	*NlPSMD4*-qF	CCAAGTTGCATAAGGTTCAGGC
	NlPSMD4-qR	CCTCGATGGGACTTCCAACA
	NlRPS11-qF	CCGATCGTGTGGCGTTGAAGGG
	NlRPS11-qR	ATGGCCGACATTCTTCCAGGTCC
	NlVg-qF	CACTGCCCGTGCTGTGCTCTA
	NlVg-qR	TGACTTCCTTGCTTTGCTCCC
	NlJHAMT-qF	GCAATGTCACTGCTCTCCTC
	NlJHAMT-qR	AGCATGTTCCACCATATTCG
	NlEcR-qF	GCTGTGAAGCGAAAGGA
	NlEcR-qR	ATTCCACGCTGAAGTCG
合成 dsRNA dsRNA synthesis	ds*NlPSMD4*-F	TAATACGACTCACTATAGGGAGA AGGCAAATGGCAACATTAATCTGCT
	ds*NlPSMD4*-R	TAATACGACTCACTATAGGGAGA TAGCTTCTTGTTCTTGTCTTTGACGC
	ds*GFP*-F	TAATACGACTCACTATAGGGAGA ACGTAAACGGCCACAAGTTC
	ds*GFP*-R	TAATACGACTCACTATAGGGAGA TGTTCTGCTGGTAGTGGTCG

体系：PCR master mix 25 μL，ddH_2O 19 μL，模板 2 μL，正反向引物各 2 μL（10 μmol/L）。使用梯度 PCR 进行反应，反应程序为 95 ℃，3 min；95 ℃，30 s；60 ℃，30 s；72 ℃，90 s，34 个循环，4 ℃保存。PCR 产物经过 1%琼脂糖凝胶电泳检测，使用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒（生工生物，中国）按照说明书进行目的片段的回收。将回收片段连接至 T-Vector pMD^{TM}19 载体（3271，TaKaRa，Japan）进行 12 ℃过夜连接。连接产物转化到 100 μL JM109 感受态中再加入 800 μL 液体 LB 培养基 37 ℃摇床培养 1 h，离心去上清 700 μL，剩余菌液吹打混匀后涂布在含有 1% Amp 的 LB 固体培养基上，倒置于 37 ℃培养 12 h。挑选 12 个阳性菌落加入配有 1% Amp 的 1 mL LB 液体培养基中，摇床振荡培养至浑浊，经菌落 PCR 验证后送至杭州有康生物科技有限公司测序。

通过 PCR 扩增获得 *NlPSMD4* 基因的全长编码序列（CDS），并利用生物信息学软件进行同源性比对和系统发育树构建：运用 MEGA11.0 软件进行氨基酸序列比对与系统发育树构建（邻接法，1 000 次 Bootstrap 重复），运用 ExPASy ProtParam 分析蛋白理化性质，运用 SMART 软件预测功能结构域，运用 SignalP 6.0 预测信号肽。

1.3.4 褐飞虱 *NlPSMD4* 基因表达规律分析 收集的褐飞虱样本包括不同的组织和发育阶段。发育阶段样本包括：卵，1-7 日龄，每个重复约 50 粒卵；若虫，每个样本包含 60 头 1-5 龄的若虫；成虫，每个样本包含 15 头羽化后 1、3、5 和 7 d 的雌性成虫或 15 头雄性成虫。成虫日龄选择依据：褐飞虱羽化后 1 日龄为初羽化未成熟期，3 日龄进入性成熟初期，5 日龄达到繁殖高峰期，7 日龄为繁殖稳定期，该日龄梯度覆盖了成虫从羽化到繁殖的关键生理阶段（Yuan *et al.*，2014）。组织表达样本：选取健康雌雄成虫，在冰浴中麻醉 1-2 min 后，转移至预冷的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液（PBS，pH 7.2）中，在体视显微镜（SZX7，奥林巴斯公司）下进行解剖（王渭霞等，2022），通过解剖针固定虫体后沿腹部中线轻划体壁，依次分离头、胸及经无菌 PBS 漂洗 2-3 次去除血淋

巴的中肠，再小心剥离脂肪体、雌虫卵巢或雄虫精巢，剩余组织即为表皮（含体壁及附属结构），所有组织样品均迅速放入液氮中冷冻以避免 RNA 降解。每组 3 个生物学重复。所有样品收集后迅速放入液氮中冷冻，随后置于 - 80 ℃冰箱中保存备用。按照 1.3.2 节提取样本总 RNA 并反转录成 cDNA，用 ddH_2O 稀释 4 倍，同时设置 5 个浓度梯度。用稀释的 cDNA 作为模板对褐飞虱的 *NlPSMD4* 基因以 *NlRPS-11*（GenBank 登录号：XM_022332657.2）作为内参基因进行最适条件和特异性进行摸索。qRT-PCR 反应体系为 10 μL：TB Green® Premix Ex Taq™ Ⅱ 5 μL，上游引物（10 μmol/L）0.2 μL，下游引物（10 μmol/L）0.2 μL，cDNA 模板 1 μL，ddH_2O 3.6 μL。反应程序：95 ℃预变性 45 s，95 ℃变性 5 s，57 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 30 s，40 个循环；熔解曲线分析：95 ℃，15 s；60 ℃，1 min；95 ℃，15 s。每个样品设置 3 个技术重复，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对表达量（Ionascu *et al.*, 2024），用 SPSS 26.0 统计学软件包进行 Student *t* 检验，$P<0.05$ 为差异显著。

1.3.5　dsRNA 的合成与鉴定　以含有 T7 启动子序列的引物扩增 *NlPSMD4* 的特异性片段（约 510 bp）和绿色荧光蛋白基因 *GFP*（GenBank：MF169984.1）。使用 MEGAscript^{TM}T7 Kit（Thermo Fisher Scientific, Amercia）合成 dsRNA。合成的 dsRNA 经 1%琼脂糖凝胶电泳验证完整性，通过 NanoDrop ND-2000 微量分光光度计检测浓度，置于 - 80 ℃冰箱中保存备用。以绿色荧光蛋白基因 495 碱基对双链 RNA 片段（ds*GFP*）作为阴性对照。

1.3.6　褐飞虱 RNAi 以及干扰效率测定　选取健康的 3 龄若虫、羽化 24 h 的雌虫和雄虫进行显微注射，处理组注射 ds*NlPSMD4*，对照组注射 ds*GFP*，dsRNA 注射浓度为 5 000 ng/μL 每头褐飞虱体内注射 50 nL。注射后将褐飞虱放在秀水 134 水稻苗上，置于人工气候箱（MGC-1500BP，上海捷呈实验仪器有限公司）内饲养，饲养条件同 1.1 节。每个处理设置 3 个生物学重复，每个重复 30 头虫。分别在注射 dsRNA 后 1、3 和 5 d，从每个处理组中随机选取 5 头褐飞虱，提取总 RNA 并反转录合成 cDNA。采用 qRT-PCR 技术检测 *NlPSMD4* 基因的相对表达量，方法同 1.3.4 节，计算干扰效率。

1.3.7　干扰后褐飞虱生物学测定　从注射 dsRNA 后开始，每天定时观察并记录 ds*NlPSMD4* 处理组和 ds*GFP* 对照组褐飞虱的死亡情况，连续观察 7 d，计算每天的存活率（存活率=存活虫数/总虫数×100%）。将注射 dsRNA 后羽化 12 h 以内的雌虫和雄虫进行配对，配对情况如下：ds*GFP*♀× ds*GFP*♂，ds*NlPSMD4*♀× ds*NlPSMD4*♂，ds*NlPSMD4*♀× ds*GFP*♂，ds*GFP*♀× ds*NlPSMD4*♂。每个配对为 15 组重复，将配对的褐飞虱置于含有新鲜 4-5 叶期水稻幼苗的玻璃管（直径=28 mm，高度=116 mm）中，每 2 d 转移到新苗一次，直至雌虫死亡。每组配对的褐飞虱新孵化若虫每 5 d 记录一次，若连续 3 d 无新若虫孵化后，停止计数，并在体视显微镜下解剖所有水稻幼苗，记录未孵化卵数，计算总产卵量和孵化率。

1.4　数据分析

实验数据采用 SPSS 26.0 软件和 GraphPad 10.0（GraphPad Prism，America）进行统计分析。两组间比较采用独立样本 *t* 检验，多组间比较采用单因素方差分析（One-way ANOVA），后续 Tukey 多重比较检验。数据以平均值±标准误（Mean ± SE）表示，$P<0.05$ 为差异显著，$P<0.01$ 为差异极显著。

2　结果与分析

2.1　褐飞虱 *NlPSMD4* 基因及其编码蛋白的序列分析

褐飞虱 *NlPSMD4* 的 mRNA 全长 1 841 bp，开放阅读框（Open reading frame, ORF）为 1 440 bp，编码 479 个氨基酸。将 NlPSMD4 蛋白的氨基酸序列输入在线蛋白理化性质分析网站 ProtParam tool 在线网站（http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/）预测蛋白质的理化性质，结果表明 NlPSMD4 蛋白分子式为 $C_{2189}H_{3572}N_{626}O_{739}S_{28}$，氨基酸数目为 479 个，相对分子质量分别为

51.38 kD，理论等电点 pI 为 4.81，不稳定系数为 46.25，大于 40.00，提示该蛋白为不稳定蛋白。利用 ProtScale 在线网站（https://web.expasy.org/protscale/）预测网站分析蛋白的亲疏水性，NlPSMD4 蛋白的 GRAVY 值为 - 0.355，这说明该蛋白为亲水性蛋白。使用 SignalP-6.0 在线网站（https://services.healthtech.dtu.dk）预测 NlPSMD4 蛋白的信号肽，发现该蛋白的信号肽（Sec/SPI）、脂蛋白信号肽（Sec/SPII）、TAT 信号肽（Tat/SPI）、TAT 脂蛋白信号肽（Tat/SPII）和肽类信号肽（Sec/SPIII）的值均为 0，因此初步判断 NlPSMD4 蛋白为非分泌蛋白。通过蛋白质结构构建网站（http://swissmodel.expasy.org/）对 NlPSMD4 蛋白的三维结构进行预测分析，表明蛋白的三维空间结构拥有 14 个 α 螺旋、6 个 β 折叠（图 1，图 2）。使用 SMART 网站（https://smart.embl.de/）预测功能结构域，结果显示 NlPSMD4 存在 VWA 结构域，长度约为 200 个氨基酸，是该蛋白的核心功能域之一；3 个高度单一的 UIM 结构域为参与泛素结合的保守元件（图 3）。

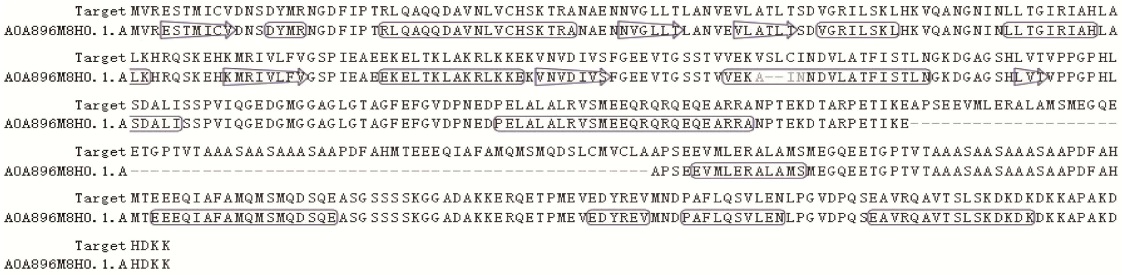

图 1　褐飞虱 NlPSMD4 蛋白氨基酸序列及推导的 α 螺旋和 β 折叠所在位点

Fig. 1　The amino acid sequence of the NlPSMD4 protein in *Nilaparvata lugens* and the sites of the deduced α-helices and β-sheetslocated

α 螺旋用方框框出，β 折叠用箭头框出。

The sequences of α-helix are enclosed in boxes, and the sequences of β-sheet are enclosed in arrows.

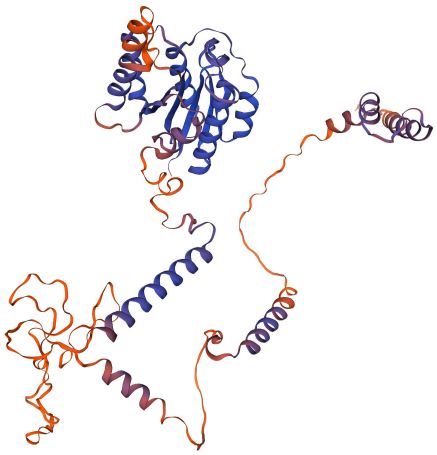

图 2　褐飞虱 NlPSMD4 蛋白推导的三维结构模型

Fig. 2　Three-dimensional structural model deduced from the NlPSMD4 protein of *Nilaparvata lugens*

为了研究褐飞虱与其他物种的 PSMD4 蛋白之间的同源关系，构建了其氨基酸序列的系统发育树。系统发育树分析显示，NlPSMD4 蛋白与灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 的 PSMD4 蛋白亲缘关系最近，氨基酸序列一致性为 83.02%，而 NlPSMD4 蛋白与同翅目中的斑衣蜡蝉 *Lycorma delicatula* 的亲缘关系也比较近，其氨基酸序列一致性为 78.38%（图 4）。

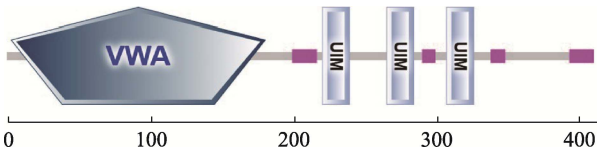

图 3　NlPSMD4 蛋白结构域预测

Fig. 3　Domain of NlPSMD4 protein

使用 SMART 网站预测功能结构域，NlPSMD4 存在 VWA 结构域，是该蛋白的核心功能域之一；3 个高度单一的 UIM 结构域为参与泛素结合的保守元件。

The functional domain is predicted through the SMART website. NlPSMD4 has a VWA domain, which is one of the core functional domains of this protein; three highly uniform UIM domains are conserved elements involved in ubiquitin binding.

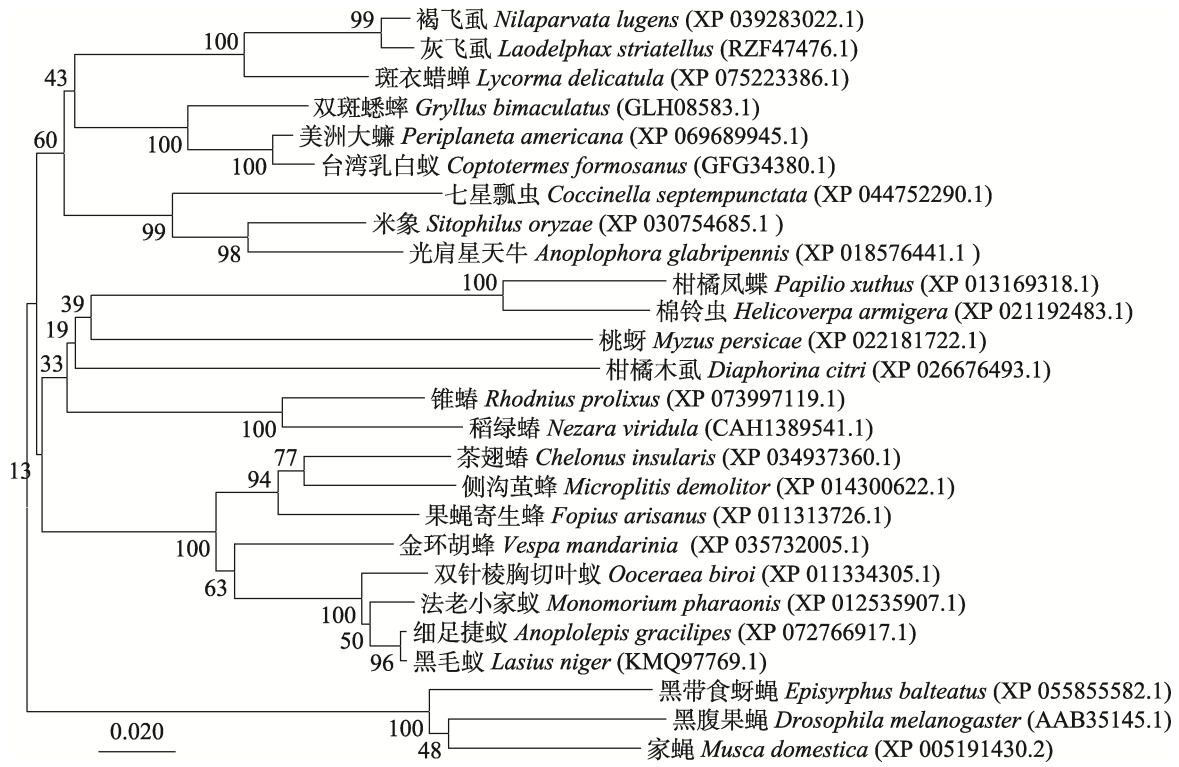

图 4　基于氨基酸序列构建的褐飞虱及其他昆虫 *NlPSMD4* 的进化树（邻接法）

Fig. 4　Phylogenetic tree of *NlPSMD4* from *Nilaparvata lugens* and other insects based on amino acid sequences (neighbor-joining method)

该树使用 MEGA 11.0 软件构建（邻接法，*n*=100 次 Bootstrap 重复）。每个节点上显示的是大于 50%的 Bootstrap 值。
The phylogenetic tree is constructed using MEGA 11.0 software with the neighbor-joining (NJ) method and 1 000 bootstrap replicates. Bootstrap values >50% are indicated at each node.

2.2　褐飞虱 *NlPSMD4* 基因表达规律分析

用 cDNA 作为模板对褐飞虱的 *NlPSMD4* 基因以及内参 *NlRPS-11* 基因 qRT-PCR 引物扩增的最适条件和特异性进行摸索。结果表明 *NlPSMD4* 基因在 57 ℃时的特异性最好且扩增效率均满足相对定量法 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 测定基因表达量的要求，即符合 R^2 大于 0.99，EFF%值在 90%-110%之间的标准，可以作为 *NlPSMD4* 基因的 RT-qPCR 引物（图 5：A-D）。

qRT-PCR 结果显示，*NlPSMD4* 基因在褐飞虱整个发育阶段均有表达，但表达量存在显著差异（图 6：A）。其中，卵期第 2 天表达量最高（3.47），显著高于成虫期（$P<0.05$）；雄成虫的表达量略高于雌成虫，但变化幅度不大。若虫期，5 龄若虫的表达量（1.95）显著高于 1-4 龄若虫（$P<0.05$）；成虫期阶段，羽化后第 7 天的雌虫中表达量最低（0.29）。在褐飞虱雌成虫不同组织中，*NlPSMD4* 基因的表达量存在明显的组织特异性。其中，卵巢组织中的表达量最高（1.61），显著高于其他组织（$P<0.05$）；头部和胸部的表达量次之，分别为 1.43 和 1.51；脂肪体中的表达量最低，为 0.09（图 6：B）。

2.3　RNAi 干扰效率检测结果

将合成好的 ds*NlPSMD4* 注射进 5 龄若虫、雌成虫和雄成虫中，分别取注射 dsRNA 后 1、3 和 5 d 的存活褐飞虱，每组 3 个重复，每个重复取 3 头褐飞虱。qRT-PCR 结果显示，与对照组（ds*GFP* 组）相比，处理组 ds*NlPMSD4* 褐飞虱在注射 dsRNA 后第 1 天、第 3 天和第 5 天后 *NlPSMD4* 基因表达量均显著下调（$P<0.001$、$P<0.000\ 1$、$P<0.001$）（图 7：A-C）。在若虫中，注射后第 3 天的干扰效率最高，达到 93.09%（图 7：A），表明本研究设计的 dsRNA 能够有效沉默褐飞虱 *NlPSMD4* 基因的表达。

NlPSMD4 基因在干扰羽化 24 h 雌虫后第 1、3、5 天的表达水平相比于 ds*GFP* 降低了 52.18%、69.27%、93.20%（图 7：B）；同样，在羽化 24 h 雄虫中的 RNA 干扰在第 1、3、5 天的表达水平相比于 ds*GFP* 也显著降低，分别为 78.51%、27.97%、86.38%（$P < 0.000\ 1$、$P < 0.01$、$P < 0.000\ 1$）（图 7：C）。因此，*NlPSMD4* 的 RNA 干扰可以有效地抑制靶基因的表达且效果持续时间较长。

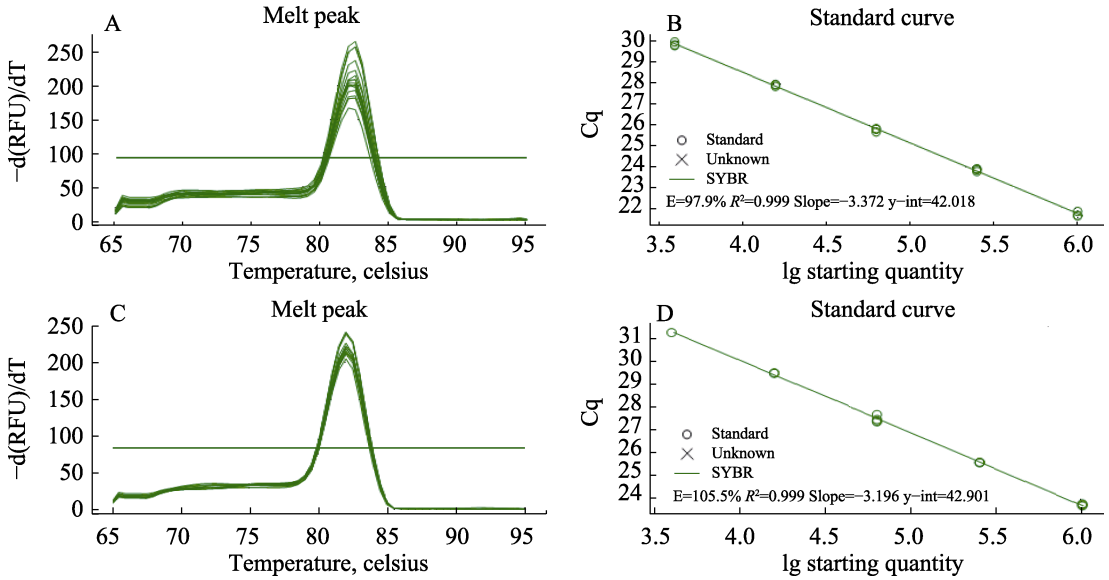

图 5　褐飞虱 *NlRPS11* 和 *NlPSMD4* 的荧光定量 PCR 标准曲线和溶解曲线

Fig. 5　Standard curves and dissolution curves of *NlRPS11* and *NlPSMD4* in *Nilaparvata lugens* for RT-qPCR

A. *NlRPS11* 标准曲线和熔解曲线；B. *NlRPS11* 熔解曲线；C. *NlPSMD4* 标准曲线；D. *NlPSMD4* 熔解曲线。Melt peak：熔解峰；Temperature，celsius （℃）：温度（℃）；－d（RFU）/dT：负荧光-温度变化速率；Standard curve：标准曲线；lg (starting quantity)：起始模板量。

A. Standard curve and melting curve of *NlRPS11*; B. Melting curve of *NlRPS11*; C. Standard curve of *NlPSMD4*; D. Melting curve of *NlPSMD4*.

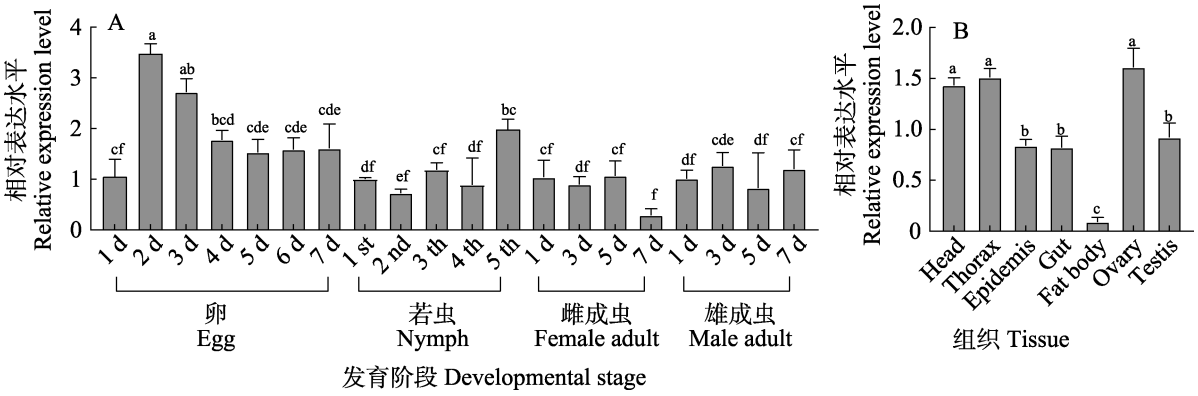

图 6　褐飞虱 *NlPSMD4* 基因在不同发育阶段和组织的表达量

Fig. 6　Expression levels of the *NlPSMD4* gene of *Nilaparvata lugens* in different developmental stages and tissues

A. *NlPSMD4* 在 1-7 d 卵、1-5 龄若虫、羽化后 1、3、5、7 d 雌虫和雄虫中的相对表达量；B. *NlPSMD4* 在不同组织或部位的相对表达量。Head：头部；Thorax：胸部；Epidemis：表皮；Gut：肠道；Fat body：脂肪体；Ovary：卵巢；Testis：精巢。图中数据为平均值±标准误，n=3，柱上标有不同小写字母表示差异显著（$P < 0.05$，单因素方差分析和 Tukey 检验）。图 9 同。

A. Relative expression levels of *NlPSMD4* in 1–7-day-old eggs, 1st to 5th instar nymphs, and female and male adults at 1, 3, 5 and 7 days post-emergence; B. Relative expression levels of *NlPSMD4* in different tissues. Data are presented as mean ± SE, n = 3. Different lowercase letters above bars indicate significant difference at $P < 0.05$ according to one-way ANOVA followed by Tukey test. The same for Fig. 9.

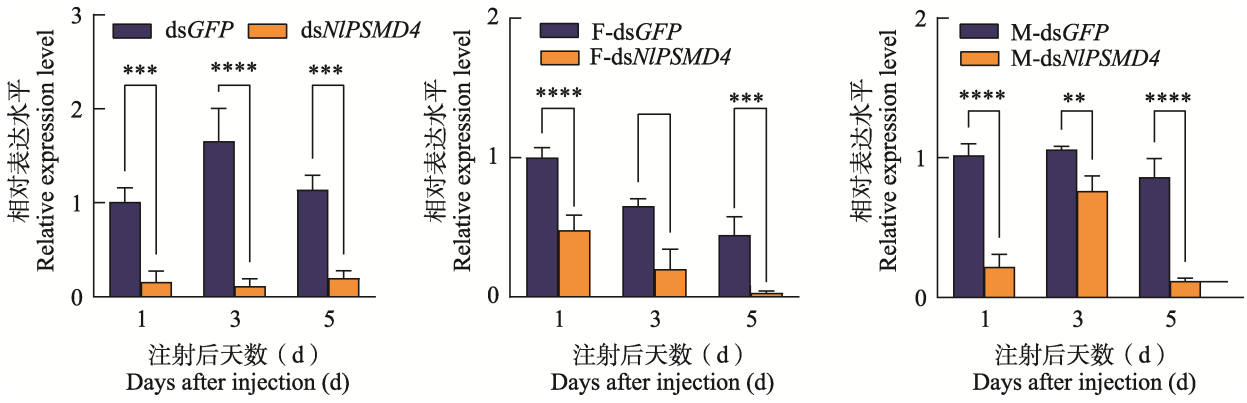

图 7　ds*NlPSMD4* 注射后对褐飞虱 3 龄若虫、羽化 24 h 雌虫与雄虫的 RNA 干扰效率

Fig. 7　RNAi efficiency in 3rd-instar nymphs, 24 h post-emergence female and male adults of *Nilaparvata lugens* after ds*NlPSMD4* injection

A. ds*NlPSMD4* 注射后对褐飞虱 3 龄若虫的 RNA 干扰效率；B. ds*NlPSMD4* 注射后对褐飞虱雌成虫的 RNA 干扰效率；C. ds*NlPSMD4* 注射后对褐飞虱雄成虫的 RNA 干扰效率。以 ds*GFP* 为对照，以 *RPS11* 为内参基因。图中数据为平均值±标准误，*n*=3。星号代表同一时间点处理组和对照组差异显著（** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$，**** $P < 0.000\ 1$，Student *t* 检验）。图 8 和图 10 同。

A. RNA interference efficiency in 3rd-instar nymphs of *N. lugens* after ds*NlPSMD4* injection; B. RNA interference efficiency in female adults of *N. lugens* after ds*NlPSMD4* injection; C. RNA interference efficiency in male adults of *N. lugens* after ds*NlPSMD4* injection. ds*GFP* is used as the control and *RPS11* is used as the reference gene. Data in the figures are mean ± SE, *n* = 3. Asterisks indicate significant difference between the treatment group and the control group (injected with ds*GFP*) at the same time point (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.000\ 1$, Student *t*-test). The same for Fig. 8 and Fig. 10.

2.4　干扰后褐飞虱生物学指标变化

2.4.1　*NlPSMD4* 干扰对褐飞虱存活率变化的影响　为了探究 *NlPSMD4* 基因在褐飞虱生存中的功能，分别向若虫、羽化 24 h 雌成虫和羽化 24 h 雄成虫中注射 ds*NlPSMD4*，并以注射 ds*GFP* 的个体作为对照组。结果显示，若虫在实验初期（第 0-2 天），处理组与对照组的存活率差异尚不明显（$P < 0.05$）；然而从第 3 天开始，ds*NlPSMD4* 处理组的若虫死亡率急剧上升；注射后的第 11 天，对照组（ds*GFP*）若虫的平均存活率仍保持在 61.11%，而 ds*NlPSMD4* 处理组的存活率已降至 3.33%，与对照组相比，*NlPSMD4* 基因 RNA 干扰导致的相对死亡率为 94.55%（图 8：A）。因此，注射 ds*NlPSMD4* 对褐飞虱若虫的存活产生了极显著的负面影响，*NlPSMD* 的 RNA 干扰导致褐飞虱若虫无法正常发育存活。

在雌成虫中，ds*NlPSMD4* 处理组的存活率也随时间呈持续下降趋势。至注射后第 14 天，对照组 ds*GFP* 的平均存活率为 50.83%，而处理组 ds*NlPSMD4* 的存活率仅为 4.17%，与对照组 ds*GFP* 相比该基因的 RNA 干扰在褐飞虱雌虫中造成的相对死亡率高达 91.80%（图 8：B）。雄成虫对 *NlPSMD4* 的 RNA 干扰同样敏感，干扰后第 10 天时，对照组 ds*GFP* 保持了较高的存活水平（62.67%），而处理组 ds*NlPSMD4* 的存活率已降至 4.00%。与对照组 ds*GFP* 相比，处理组表现出 93.62%的致死效应（图 8：C）。综合上述结果，ds*NlPSMD4* 处理组在干扰褐飞虱若虫、雌成虫和雄成虫后存活率均显著低于 ds*GFP* 对照组，表明 *NlPSMD4* 基因对于褐飞虱的生存至关重要。

2.4.2　*NlPSMD4* 干扰对褐飞虱产卵量及孵化率的影响　为了明确 *NlPSMD4* 在褐飞虱生殖过程中的作用，设置了 4 组不同的交配组合，并统计了各组的雌虫产卵量及卵孵化率。结果显示，*NlPSMD4* 的干扰导致褐飞虱产卵量急剧下降，ds*NlPSMD4*♀×ds*NlPSMD4*♂雌雄双干扰处理组总产卵量为 62 粒，较对照组 ds*GFP*♀×ds*GFP*♂下降 63.70%，表明 *NlPSMD4* 的 RNA 干扰显著降低产卵量。有趣的是，雄虫单干扰组 ds*GFP*♀×ds*NlPSMD4*♂的产卵量也显著降低，仅为 68 粒（$P < 0.05$），甚至低于雌虫单干扰组

ds*NlPSMD4*♀×ds*GFP*♂（99 粒）（图 9：A）。在卵孵化率方面，*NlPSMD4* 同样表现出关键作用，双干扰组 ds*NlPSMD4*♀×ds*NlPSMD4*♂ 孵化率为 25.65%，显著低于对照组 ds*GFP*♀×ds*GFP*♂的孵化率（75.30%，$P < 0.05$）；雄虫干扰组 ds*NlPSMD4*♂×ds*GFP*♀的孵化率为 41.93%，略低于仅雌虫干扰组 ds*NlPSMD4*♀×ds*GFP*♂（45.47%）（图 9：B）。尽管雌性处理组产卵量有所下降，但其产下的卵仍有较高的孵化潜能，相较于雌虫单干扰，雄虫单干扰及雌雄双干扰均会进一步降低卵孵化率，其中雌雄双干扰对孵化的抑制效应最为突出。上述结果表明，*NlPSMD4* 基因的 RNA 干扰不仅会导致雌虫产卵量减少，还会严重阻碍卵的孵化，表明 *NlPSMD4* 基因在褐飞虱繁殖过程发挥重要作用。

2.5 *NlPSMD4* 干扰对褐飞虱中的 *Vg*、*JHAMT* 和 *EcR* 基因 mRNA 表达水平的影响

在昆虫的生长发育与生殖调控网络中，卵黄原蛋白（Vitellogenin，Vg）、保幼激素酸甲基转移酶（Juvenile hormone acid methyltransferase，JHAMT）以及蜕皮激素受体（Ecdysone receptor，EcR）扮演着至关重要的角色。为了进一步探究 *NlPSMD4* 基因 RNA 干扰导致褐飞虱生殖力下降和发育受阻的分子机制，通过 qRT-PCR 技术检测了生殖与激素信号通路中上述 *Vg*、*JHAMT* 和 *EcR* 这 3 个标志性基因的表达水平。结果显示，与对照组 ds*GFP*（表达量 1.34）相比，ds*NlPSMD4* 处理组雌虫体内的 *Vg* 表达水平发生极显著上调（20.07，$P < 0.000\ 1$），上调幅度约为 15 倍（图 10：A）。这种 *Vg* mRNA 水平异常激增与该处理组极低的生殖力形成了鲜明对比。

此外，*NlPSMD4* 的 RNA 干扰还导致了 *JHAMT* 和 *EcR* 表达模式的变化。qRT-PCR 结果表明，*JHAMT* 的表达量在 ds*NlPSMD4* 处理的雌虫中显著上调，处理组（表达量 2.92，$P < 0.000\ 1$），较对照组（表达量 0.64）上调了 356.25%（图 10：B）。干扰 *NlPSMD4* 后，*EcR* 在雄成虫的表达量显著上调，ds*NlPSMD4* 处理组（表达量 4.79，$P < 0.000\ 1$）相比对照组（表达量 1.00）的 *EcR* mRNA 水平上调了 379%（图 10：C）。上述结果表明，*NlPSMD4* 的 RNA 干扰导致了褐飞虱体内激素信号网络调控的异常变化。

3 结论与讨论

本研究发现，*NlPSMD4* 在褐飞虱各发育阶段及组织中均广泛表达，且在卵巢和卵期表达量较高。对 *NlPSMD4* 基因进行 RNA 干扰可以有效地抑制靶基因的表达且效果持续时间较长，进而导致褐飞虱若虫和成虫出现极高的死亡率，并显著降低了褐飞虱的生殖能力。类似的研究在其他农业害虫中也得到了验证，例如 Lucetti 等

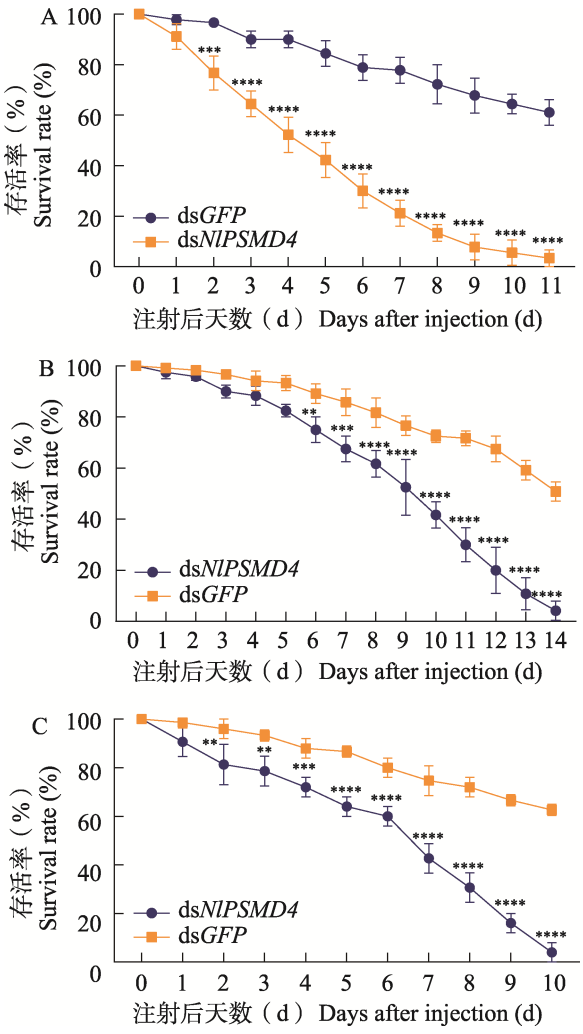

图 8 RNAi 抑制 *PSMD4* 对褐飞虱 3 龄若虫（A）、羽化 24 h 雌虫（B）和雄虫（C）存活率的影响

Fig. 8 Effects of RNAi-mediated knockdown of *NlPSMD4* on survival rates of 3rd-instar nymphs (A), 24 h post-emergence female adults (B) and male adults (C) of *Nilaparvata lugens*

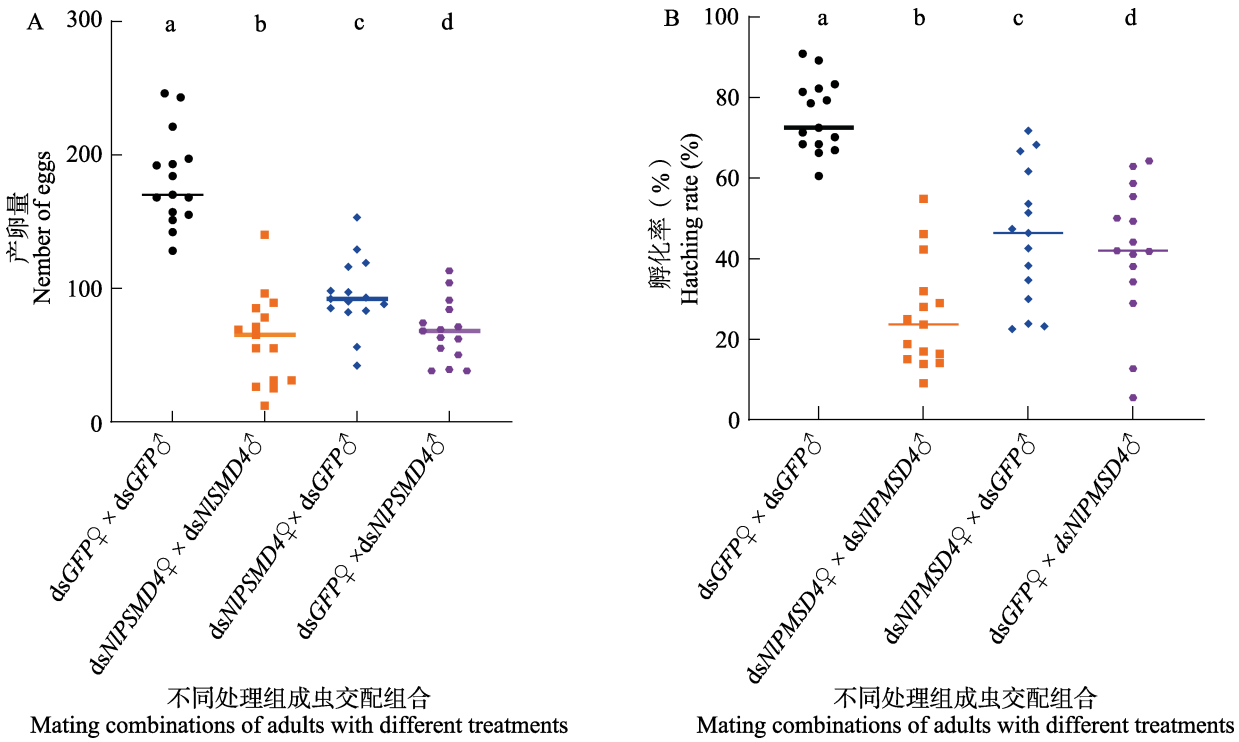

图 9　*NlPSMD4* 基因 RNA 干扰对褐飞虱总产卵量（A）及孵化率（B）的影响

Fig. 9　The effect of RNAi against *NlPSMD4* on the number of eggs (A) and hatching rate (B) of *Nilaparvata lugens*

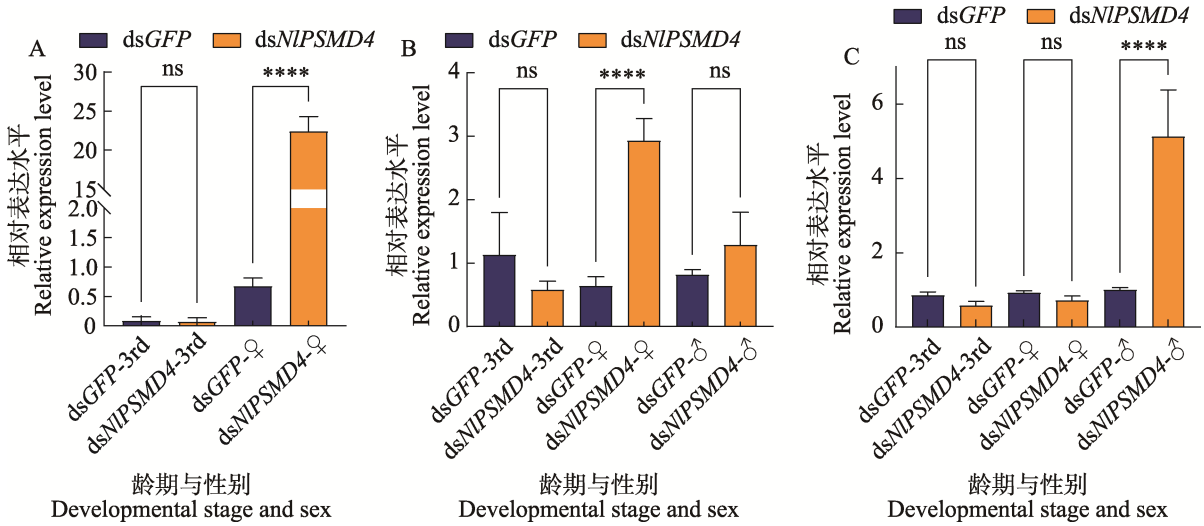

图 10　*NlPSMD4* 干扰对褐飞虱 *Vg*（A）、*JHAMT*（B）和 *EcR*（C）基因 mRNA 表达水平的影响

Fig. 10　Effects of RNAi against *NlPSMD4* on the mRNA expression levels of *Vg* (A), *JHAMT* (B) and *EcR* (C) genes in *Nilaparvata lugens*

图中数据为平均值±标准误，n=3。ns 代表同一时间点处理组和对照组（注射 ds*GFP*）差异不显著（$P > 0.05$，Student t 检验）。

Data in the figures are mean ± SE, n=3. ns indicates no significant difference between the treatment group and the ds*GFP*-injected control group at the same time point ($P > 0.05$, Student's t-test).

（2025）在多食性害虫日本金龟子 *Popillia japonica* 中发现，26S 蛋白酶体调节亚基基因（*RPN6*）的 RNA 干扰会导致成虫和幼虫显著死亡。Canuto 等（2025）在葡萄叶蝉 *Scaphoideus titanus* 中的

研究也表明，干扰蛋白酶体亚基不仅导致高死亡率，还引发了卵巢形态的严重病变。这些结果均表明，*PSMD4* 在维持昆虫基本生命活动中发挥重要作用，破坏该基因将导致不同程度的致死效应。

Vg 通常被认为是昆虫卵发育的主要营养来源，在脂肪体中合成并运输至卵巢。然而，近年研究表明 *Vg* 还兼具免疫防御、非生物胁迫、抗氧化应激及延寿等多种非生殖功能，是评估昆虫生殖健康与生理状态的关键指标（Lian *et al.*，2022；Kodrík *et al.*，2023；Lei *et al.*，2025）。JHAMT 是保幼激素（Juvenile hormone，JH）生物合成途径中的最后一步限速酶，它能将 JH 酸或 JH 的非活性前体转化为活性 JH，从而精确调控昆虫的变态发育与生殖成熟，干扰其表达往往会导致变态受阻或生殖障碍（Sheng *et al.*，2008；Guo *et al.*，2021）。蜕皮激素受体（*EcR*）是一种昆虫核受体，它会被蜕皮激素 20-羟基蜕皮酮激活（Horoiwa *et al.*，2019）。*EcR* 不仅控制昆虫的蜕皮与变态，还广泛参与成虫生殖过程中的卵子发生与排卵调控，已被证实是 RNAi 防治害虫的理想靶标之一（Yu *et al.*，2014）。因此，探究这些关键基因在靶标基因干扰后的响应变化，有助于深入解析 RNAi 对褐飞虱生存、发育和生殖的影响。在雌性生殖方面，沉默 *NlPSMD4* 可显著降低褐飞虱的产卵量和卵孵化率。值得注意的是，干扰 *NlPSMD4* 后，雌虫体内 *Vg* 的 mRNA 水平反而异常上调。这种“高转录、低生殖”的矛盾现象，其机制可从两个层面加以理解：上游激素信号稳态失衡与下游蛋白降解转运障碍。在激素层面，Lv 等（2025）在褐飞虱中发现蛋白酶体亚基缺失会抑制 *Vg* 基因和三酰甘油脂酶（Triacylglycerol lipase，TGL）基因的转录，减少 20-羟基蜕皮酮（20E）的合成，进而导致卵巢滤泡细胞发育异常；而在鞘翅目中已证实 20E-EcR/USP 复合体是 *Vg* 转录的核心正向调控因子（Zhang *et al.*，2023），其自身的泛素化降解亦依赖 UPS，*NlPSMD4* 表达量降低可能使 EcR/USP 复合体“逃逸”正常的负反馈降解（Stoiber *et al.*，2016），致使下游 *Vg* 转录信号被异常持续激活。在蛋白层面，蛋白酶体功能缺陷会阻断氨基酸的循环再利用，引发内质网应激（ER stress）和氨基酸稳态失衡（Suraweera *et al.*，2012），这种代谢压力可能通过 mTOR 或未折叠蛋白反应（Unfolded protein response，UPR）错误触发代偿性机制，迫使脂肪体上调 *Vg* 转录以应对细胞感知的“合成前体短缺”或翻译压力（Lu *et al.*，2016）。因此，*Vg* 转录上调并非生殖功能的真实反映，而是在激素信号异常与胞内蛋白降解受阻双重因素驱动下的一种病理代偿现象，由此造成转录水平升高与功能蛋白积累不足并存的复杂表型，最终导致产卵量与孵化率下降。

此外，本研究还发现干扰 *NlPSMD4* 显著扰乱了 *JHAMT* 和 *EcR* 通路的基因表达。若虫期 *JHAMT* 和 *EcR* 表达显著下调，而在雌成虫中 *JHAMT* 表达上调。Shinoda 和 Itoyama（2023）的研究表明，JHAMT 是 JH 合成的关键酶，其表达水平直接影响昆虫的变态与生殖。激素信号的紊乱可能进一步影响卵巢发育，这与 Lv 等（2025）在褐飞虱中发现蛋白酶体亚基缺失导致卵巢滤泡细胞发育异常的结果相似。与其它昆虫中同类靶标基因的研究相比，本研究的发现既呈现共性规律，也凸显出褐飞虱的特异性。共性方面，PSMD4/RPN 这一类 UPS 调节亚基基因在不同昆虫物种中普遍具有维持生存和生殖的核心功能：在日本金龟子中，*RPN6* 的 RNA 干扰导致成虫和幼虫显著死亡（Lucetti *et al.*，2025）；在葡萄叶蝉中，*RPN6* 的 RNA 干扰不仅降低存活率，还引发雌虫卵巢形态严重病变及繁殖力下降（Canuto *et al.*，2025）。相比之下，本研究的独特之处在于揭示了 *NlPSMD4* 对雄性和雌性生殖功能的双重影响，尤其是仅干扰雄虫即导致后代表型出现胚胎致死效应的现象——这一表型在日本金龟子和葡萄叶蝉的研究中并未被明确阐述。此外，褐飞虱作为半翅目刺吸式口器昆虫，其 RNAi 效率通常低于鞘翅目，而本研究中 *NlPSMD4* 干扰后超过 95%的致死率表明该基因对 RNAi 的响应极为灵敏，这为在半翅目水稻害虫中开发 RNAi 防治策略提供了重要启示。

本研究的另一个重要发现是 *NlPSMD4* 对雄

性生殖能力的显著影响。仅干扰雄虫的 *NlPSMD4* 表达，并在其与健康雌虫交配后，后代卵的孵化率显著降低至 41.93%。这表明 *NlPSMD4* 可能在精子发生或受精过程中扮演关键角色。Xiong 等（2022）指出，UPS 在精子发生过程中负责清除多余的细胞质蛋白并重塑精子结构，泛素化修饰对组蛋白-鱼精蛋白转换至关重要。Sutovsky（2011）的研究进一步证实，精子携带的蛋白酶体在受精过程中参与降解卵子透明带蛋白，是受精成功的必要条件。褐飞虱雄虫 *NlPSMD4* 的 RNA 干扰可能导致精子质量下降、活力受损或受精能力缺陷，进而引起胚胎致死效应。RNA 干扰是一种天然的基因表达调控机制，与内源基因同源的双链 RNA 既可以在作物植株中产生，也可以通过外源合成后施用于作物，它们能有效触发昆虫体内的基因沉默，从而减轻害虫造成的损害（Ortolá and Daròs，2024）。RNAi 具有生态友好性，且具备特异性靶向这一内在优势，因此，探索基于分子靶标的新型害虫防治策略，特别是利用 RNA 干扰等生物技术手段，已成为当前农业害虫可持续治理的研究热点（Choudry *et al.*，2024）。RNAi 产品被评估为比化学农药更具选择性且对环境更安全，这是因为它们在土壤中的移动性有限、在自然环境中的持久性较低，并且通过干扰序列的选择可以避免或减少对益虫的毒性（Bachman *et al.*，2016；Taning *et al.*，2021）。开发基于 RNAi 方法的关键步骤是选择合适且有效的靶基因（Canuto *et al.*，2025）。泛素-蛋白酶体系统 UPS 是真核生物体内负责蛋白质降解和维持细胞稳态的核心机制，其功能的完整性对昆虫的生长发育及生殖过程至关重要。本研究通过 RNA 干扰技术，系统证明了 26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 4 基因 *NlPSMD4* 在调控褐飞虱生存及生殖中的关键作用，揭示了其作为新型高效 RNAi 害虫防治靶点的潜力。

褐飞虱及其近缘种中 ATPase 家族基因的功能研究已日趋系统。褐飞虱 ATP 合酶 b 亚基基因 *ATPSb* 在 1-2 龄若虫期高丰度表达，RNAi 抑制其表达可完全阻滞若虫羽化进程，表明 *ATPSb* 是调控褐飞虱生长发育的关键功能基因（冯娅琳等，2018）。液泡型 H^+-ATPase（V-ATPase）d 亚基基因 *NlVHA-d* 兼具生长发育调控与农药响应功能（朱友理等，2013）。在白背飞虱 *Sogatata furcifera* 中，通过 RNAi 和纳米递送系统筛选发现 V-ATPase 的 F、a2 和 c2 亚基具备害虫防控靶标潜力；靶向沉默上述亚基可显著抑制 V-ATPase 活性，并降低白背飞虱蜜露排泄量（Ma *et al.*，2024）。上述结果一致表明，ATP 合酶与 V-ATPase 不仅是飞虱科昆虫能量代谢的核心执行者，更是 RNAi 介导的害虫防治极具潜力的分子靶点。在近缘种灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 中，ATPase 兼具病毒介导传播与胁迫下能量代谢调控功能；带毒灰飞虱唾液腺 *LsATP* 表达显著升高，基因沉默后传毒能力下降，说明其在水稻条纹病毒唾液腺屏障转运中发挥重要作用（江华，2017）。上述研究进一步拓展了对飞虱科昆虫 ATPase 家族基因功能的认知，该家族成员不仅是昆虫基础生命活动的核心能量供给载体，还可通过表达调控与代谢网络重构，在生长发育调控、化学胁迫响应、病原传播等关键生理过程中发挥核心作用，同时凸显了其作为 RNAi 介导害虫防控靶标的应用潜力。

综上所述，本研究结果表明，*NlPSMD4* 是维持褐飞虱生存和生殖功能的关键基因。利用 RNAi 技术靶向干扰该基因，能够同时实现褐飞虱各发育阶段尤其是若虫高致死和成虫繁殖能力降低。在应用方面，基于 *NlPSMD4* 的 RNAi 防治策略可从两个方向推进。其一，开发外源 dsRNA 制剂。目前已有针对蛋白酶体亚基的 dsRNA 农药进入商业化阶段，靶向 *PSMB5* 的 dsRNA 制剂已在美国完成监管登记并用于马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 的田间防控（Graser *et al.*，2025），这充分证明了蛋白酶体亚基作为 RNAi 农药靶标的可行性和应用潜力。对于褐飞虱这类刺吸式害虫，dsRNA 的稳定化递送是制约田间应用的关键瓶颈，纳米载体递送系统已在白背飞虱中被证实可显著提高 dsRNA 的稳定性和 RNA 干扰效率（Ma *et al.*，2024），未来可借鉴该策略开发以 *NlPSMD4* 为靶标的纳米包载 dsRNA 喷施制剂。其二，培育表达

NlPSMD4 dsRNA 的转基因水稻。已有研究证实，利用RNAi技术通过培育转基因水稻防治褐飞虱在技术路径上具有可行性，表达靶标基因dsRNA的转基因水稻可使取食褐飞虱体内靶标基因转录水平显著降低（谢坤等，2025）。将 *NlPSMD4* 的特异性 dsRNA 表达元件转入水稻，使褐飞虱取食韧皮部汁液时持续摄入 dsRNA 以触发基因沉默，可实现抗虫性与环境安全性的统一。值得关注的是，在开发基于 *PSMD*4 的 RNAi 防治手段时，必须充分考虑褐飞虱作为迁飞性害虫的特殊性，其种群遗传多样性高、世代重叠严重，靶标基因的保守性与特异性之间的平衡需要通过更大规模的种群序列分析和环境安全性评价加以验证（Távora *et al.*, 2022）。此外，将 *NlPSMD4* 靶向策略与其他飞虱科害虫高效RNAi靶标进行组合，有望在更广泛的飞虱类水稻害虫中实现协同增效的可持续防控。

参考文献 (References)

Arkinson C, Dong KC, Gee CL, Martin A, 2025. Mechanisms and regulation of substrate degradation by the 26S proteasome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 26(2): 104–122.

Bachman PM, Huizinga KM, Jensen PD, Mueller G, Tan JG, Uffman JP, Levine SL, 2016. Ecological risk assessment for DvSnf7 RNA: A plant-incorporated protectant with targeted activity against western corn rootworm. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 81: 77–88.

Bard JAM, Goodall EA, Greene ER, Jonsson E, Dong KC, Martin A, 2018. Structure and function of the 26S proteasome. *Annual Review of Biochemistry*, 87: 697–724.

Canuto F, Taliano E, Marzachì C, Bosco D, Galetto L, 2025. RNAi-mediated silencing of a regulatory subunit of the 26S proteasome induces mortality and female sterility in leafhopper vectors of grapevine Flavescence dorée phytoplasmas. *Journal of Pest Science*, 98(6): 2625–2634.

Choudry MW, Nawaz P, Jahan N, Riaz R, Ahmed B, Raza MH, Fayyaz Z, Malik K, Afzal S, 2024. RNA based gene silencing modalities to control insect and fungal plant pests: Challenges and future prospects. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 130: 102186.

Diptaningsari D, Trisyono YA, Purwantoro A, Wijonarko A, 2019. Inheritance and realized heritability of resistance to imidacloprid in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae), from Indonesia. *Journal of Economic Entomology*, 112(4): 1831–1837.

Dono D, Iamba K, 2021. A review on brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål), a major pest of rice in Asia and Pacific. *Journal of Research in Crop Science*, 6(4): 7–19.

Fahad S, Nie L, Hussain S, Khan F, Khan FA, Saud S, Muhammad H, Li L, Liu X, Tabassum A, Wu C, Xiong D, Cui K, Huang J, 2015. Rice pest management and biological control. *Sustainable Agriculture Reviews*, 16: 85–106.

Feng YL, Hao PY, Yu FF, Lu CF, Zhu JJ, Yu XP, 2018. Cloning and functional analysis of ATP synthase b subunit gene *ATPSb* in *Nilaparvata lugens*. *Acta Entomologica Sinica*, 61(5): 519–526. [冯娅琳, 郝培应, 俞飞飞, 陆潮峰, 朱家骏, 俞晓平, 2018. 褐飞虱ATP合酶 b亚基基因*ATPSb*的克隆与功能分析. 昆虫学报, 61(5): 519–526.]

Graser L, Gordon ERL, Jamison M, Talton W, Chen Y, Knorr E, Windfelder A, Narva K, Vilcinskas A, 2025. Targeting the proteasome subunit PSMB5 by RNA interference induces proteasome dysfunction and mortality in the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*). *Scientific Reports*, 15: 41183.

Guo P, Zhang Y, Zhang L, Xu H, Zhang H, Wang Z, Jiang Y, Molloy D, Zhao P, Xia Q, 2021. Structural basis for juvenile hormone biosynthesis by the juvenile hormone acid methyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 297(5): 101234.

Hayashi H, Chino M, 1990. Chemical composition of phloem sap from the uppermost internode of the rice plant. *Plant and Cell Physiology*, 31(2): 247–251.

Horoiwa S, Yokoi T, Masumoto S, Minami S, Ishizuka C, Kishikawa H, Ozaki S, Kitsuda S, Nakagawa Y, Miyagawa H, 2019. Structure-based virtual screening for insect ecdysone receptor ligands using MM/PBSA. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 27(6): 1065–1075.

Ionascu A, Ecovoiu AA, Chifiriuc MC, Ratiu AC, 2024. qDATA-an R application implementing a practical framework for analyzing quantitative real-time PCR data. *BioTechniques*, 76(12): 559–573.

Jiang H, 2017. Functional study of differentially expressed proteins in salivary glands of viruliferous *Laodelphax striatellus* during vector virus transmission. Master dissertation. Yangzhou: Yangzhou University. [江华, 2017. 带毒灰飞虱唾液腺差异表达蛋白在介体传毒中的功能研究. 硕士学位论文. 扬州: 扬州大学.]

Kodrík D, Čapková Frydrychová R, Hlávková D, Skoková Habuštová O, Štěrbová H, 2023. Unusual functions of insect vitellogenins: Minireview. *Physiological Research*, 73(5): 475–487.

Lasker K, Förster F, Bohn S, Walzthoeni T, Villa E, Unverdorben P, Beck F, Aebersold R, Sali A, Baumeister W, 2012. Molecular architecture of the 26S proteasome holo complex determined by an integrative approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(5): 1380–1387.

Lei L, Song H, Liu Z, Zhang G, Wang Y, Xu B, 2025. Functional elucidation of vitellogenin receptor activity in *Apis mellifera* in response to abiotic stress. *Insects*, 16(7): 650.

Lian YY, Peng SH, Yang XF, Jia JJ, Li JJ, Wang AQ, Yang SY, Zheng RJ, Zhou SH, 2022. The vitellogenin receptor gene is involved in lifespan regulation of *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett) after short-term high-temperature treatment. *Frontiers in Physiology*, 13: 870243.

Lin ZJ, Lin CB, Tang JX, Deng ZQ, Huang XB, Su RL, 2026. Resistance mechanism of rice carrying pyramided *Bph14* and *Bph15* genes to brown planthopper. *China Rice*, 32(1): 102–106. [林志坚, 林成豹, 唐江霞, 邓则勤, 黄显波, 苏荣理, 2026. 聚合 *Bph14*、*Bph15* 基因水稻对褐飞虱的抗性研究. 中国稻米, 32(1): 102–106.]

Lu K, Chen X, Liu WT, Zhou Q, 2016. TOR pathway-mediated juvenile hormone synthesis regulates nutrient-dependent female reproduction in *Nilaparvata lugens* (Stål). *International Journal of Molecular Sciences*, 17(4): 438.

Lucetti G, Abbà S, Pesavento G, Fanelli E, De Luca F, Battagini E, Cazzaniga S, Ballottari M, Frizzon D, Mori N, Galetto L, 2025. RNAi-mediated gene silencing of a 26S proteasome subunit increases mortality of the Japanese beetle *Popillia japonica*. *Pest Management Science*, 82(1): 1066–1078.

Lv X, Tu JY, Liu Q, Wu ZQ, Lin C, Zhou T, Yu XP, Xu YP, 2025. Proteasome subunits regulate reproduction in *Nilaparvata lugens* and the transovarial transmission of its yeast-like symbionts. *Insects*, 16(9): 895.

Lyupina YV, Zatsepina OG, Serebryakova MV, Erokhov PA, Abaturova SB, Kravchuk OI, Orlova OV, Beljelarskaya SN, Lavrov AI, Sokolova OS, Mikhailov VS, 2016. Proteomics of the 26S proteasome in *Spodoptera frugiperda* cells infected with the nucleopolyhedrovirus, AcMNPV. *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 1864(6): 738–746.

Ma YF, Zhao YQ, Zhou YY, Feng HY, Gong LL, Zhang MQ, Hull JJ, Dewer Y, Roy A, Smagghe G, He M, He P, 2024. Nanoparticle-delivered RNAi-based pesticide target screening for the rice pest white-backed planthopper and risk assessment for a natural predator. *Science of the Total Environment*, 926: 171286.

Michael HG, Aaron C, 2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: Destruction for the sake of construction. *Journal of Physiological Reviews*, 82(2): 373–428.

Murata S, Yashiroda H, Tanaka K, 2009. Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(2): 104–115.

Ortolá B, Daròs JA, 2024. RNA interference in insects: From a natural mechanism of gene expression regulation to a biotechnological crop protection promise. *Biology*, 13(3): 137.

Rai M, Hunt LC, Demontis F, 2025. Stress responses induced by perturbation of the ubiquitin-proteasome system. *Trends in Biochemical Sciences*, 50(3): 175–178.

Sheng ZT, Ma L, Cao MX, Jiang RJ, Li S, 2008. Juvenile hormone acid methyl transferase is a key regulatory enzyme for juvenile hormone synthesis in the Eri silkworm, *Samia cynthica ricini*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 69(3): 143–154.

Shinoda T, Itoyama K, 2003. Juvenile hormone acid methyltransferase: A key regulatory enzyme for insect metamorphosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(21): 11986–11991.

Stoiber M, Celniker S, Cherbas L, Brown B, Cherbas P, 2016. Diverse hormone response networks in 41 independent *Drosophila* cell lines. *Genes Genomes Genetics*, 6(3): 683–694.

Sutovsky P, 2011. Sperm proteasome and fertilization. *Reproduction*, 142(1): 1–14.

Suraweera A, Münch C, Hanssum A, Bertolotti A, 2012. Failure of amino acid homeostasis causes cell death following proteasome inhibition. *Molecular Cell*, 48(2): 242–253.

Taning CNT, Gui SH, De Schutter K, Jahani M, Castellanos NL, Christiaens O, Smagghe G, 2021. A sequence complementarity-based approach for evaluating off-target transcript knockdown in *Bombus terrestris*, following ingestion of pest-specific dsRNA. *Journal of Pest Science*, 94(2): 487–503.

Távora FTK, Diniz FAS, Rêgo-Machado CM, Freitas NC, Arraes FBM, Andrade EC, Furtado LL, Osiro KO, Sousa NL, Cardoso TB, Henning LMM, Molinari PAO, Feingold SE, Hunter WB, Grossi de Sá MF, Kobayashi AK, Nepomuceno AL, Santiago TR, Molinari HBC, 2022. CRISPR/Cas- and topical RNAi-based technologies for crop management and improvement: Reviewing the risk assessment and challenges towards a more sustainable agriculture. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10:

913728.

Turgeon R, Oparka K, 2010. The secret phloem of pumpkins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(30): 13201–13202.

Wang WX, He JC, Wei Q, Lai FX, Wan PJ, Fu Q, 2022. Tissue dissection of the brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) and male tissue-specific expression analysis of the *NlEF7* gene. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 59(5): 1009–1019. [王渭霞, 何佳春, 魏琪, 赖凤香, 万品俊, 傅强, 2022. 褐飞虱组织解剖及 *NlEF7* 基因的雄虫组织特异性表达研究. 应用昆虫学报, 59(5): 1009–1019.]

Xiong Y, Yu C, Zhang QT, 2022. Ubiquitin-proteasome system-regulated protein degradation in spermatogenesis. *Cells*, 11(6): 1058.

Xu WY, Fang XD, Cao Q, Gao Q, Gao DM, Qiao JH, Zang Y, Xie L, Ding ZH, Yang YZ, Wang Y, Wang XB, 2022. A cytorhabdovirus-based expression vector in *Nilaparvata lugens*, *Laodelphax striatellus*, and *Sogatella furcifera*. *Journal of Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 140: 103703.

Xie K, Ding HF, Li NN, Jia SP, Bai J, Cong YZ, Li GX, Yao FY, Yang YY, 2025. RNA interference silencing of sugar transporter gene 4 in the brown planthopper (*Nilaparvata lugens*). *Shandong Agricultural Sciences*, 57(1): 22–29. [谢坤, 丁汉凤, 李娜娜, 贾素平, 白静, 丛韫喆, 李广贤, 姚方印, 杨永义, 2025. RNA 干扰沉默褐飞虱糖转运蛋白基因 4 的研究. 山东农业科学, 57(1): 22–29.]

Yu R, Xu XP, Liang YK, Tian HG, Pan ZQ, Jin SH, Wang N, Zhang WQ, 2014. The insect ecdysone receptor is a good potential target for RNAi-based pest control. *International Journal of Biological Sciences*, 10(10): 1171–1180.

Yuan M, Lu YH, Zhu X, Wan H, Shakeel M, Zhan S, Jin BR, Li JH, 2014. Selection and evaluation of potential reference genes for gene expression analysis in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae) using reverse-transcription quantitative PCR. *PLoS ONE*, 9(1): e86503.

Zhang CX, Brisson JA, Xu HJ, 2019. Molecular mechanisms of wing polymorphism in insects. *Annual Review of Entomology*, 64: 297–314.

Zhang XQ, Jin L, Li GQ, 2023. RNAi-mediated functional analysis reveals the regulation of oocyte vitellogenesis by ecdysone signaling in two coleoptera species. *Biology*, 12(10): 1284.

Zhu YL, Wang J, Xie ZJ, Liu YP, Wang JJ, 2013. Cloning and mRNA expression analysis of V-ATPase d subunit gene in *Nilaparvata lugens*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 50(3): 666–674. [朱友理, 王剑, 谢志娟, 刘亚萍, 王建军, 2013. 褐飞虱 V-ATPase d 亚基基因的克隆与 mRNA 表达分析. 应用昆虫学报, 50(3): 666–674.]