



彭震, 李品, 魏纪珍. 干扰钙调磷酸酶可导致棉铃虫死亡并引发显著的适合度代价 [J]. 环境昆虫学报, 2026, 48 (2): 374–381. PENG Zhen, LI Pin, WEI Ji-Zhen. Interfering with calcineurin induces mortality and imposes substantial fitness costs in *Helicoverpa armigera* [J]. Journal of Environmental Entomology, 2026, 48 (2): 374–381.

干扰钙调磷酸酶可导致棉铃虫死亡并引发显著的 适合度代价

彭震¹, 李品², 魏纪珍^{2*}

(1. 上海市农业技术推广服务中心, 上海 201103; 2. 河南农业大学植物保护学院, 郑州 450046)

摘要: 【目的】钙调磷酸酶 (Calcineurin, CaN) 属于去磷酸化酶 PP2B 家族 (Protein phosphatase 2B family), 依赖于 Ca²⁺ 信号的丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶, 它在多种生物体的生理生化通路中具有广泛的调节作用。【方法】为探究 CaN 基因在棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 中是否可作为 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 农药研发的关键靶标基因, 本研究对 4 龄幼虫进行 CaN 基因干扰, 并系统分析了其致死率、体重变化、化蛹率、羽化率及其他相关生命参数的响应。【结果】结果表明, 注射 CaN dsRNA 可以有效的降低 CaN 基因的表达, 并对应降低了 CaN 蛋白的酶活性。成功干扰 CaN 后, 会导致棉铃虫 4 龄幼虫约 60.81% 的死亡, 同时成活幼虫的体重自注射 CaN dsRNA 后 24 h 开始显著降低、从 4 龄幼虫至化蛹阶段以及蛹期至羽化阶段的发育时间均显著延长、化蛹率和羽化率亦显著下降, 最终的羽化率仅为 3.75%。【结论】综上所述, CaN 是棉铃虫生长发育的重要基因, 可以作为 RNAi 的一个重要靶标来进行棉铃虫的防治。

关键词: 钙调磷酸酶; 棉铃虫; RNAi; 死亡率; 生长发育

中图分类号: Q968.1; Q963

文献标识码: A

文章编号: 1674–0858 (2026) 02–0374–08

Interfering with calcineurin induces mortality and imposes substantial fitness costs in *Helicoverpa armigera*

PENG Zhen¹, LI Pin², WEI Ji-Zhen^{2*} (1. Shanghai Agricultural Technology Extension and Service Center, Shanghai 201103, China; 2. College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046, China)

Abstract: 【Aim】 Calcineurin (CaN), a Ca²⁺-dependent serine/threonine protein phosphatase belonging to the protein phosphatase 2B (PP2B) family, plays diverse regulatory roles in various physiological and biochemical pathways in vivo. 【Methods】 To investigate its potential as a key target gene for RNA interference (RNAi)-based pesticide development, this study conducted CaN RNAi on 4th instar *Helicoverpa armigera* and statistically analyzed their mortality, body weight, pupation rate, eclosion rate and other life indicators. 【Results】 The results showed that injection of CaN dsRNA significantly reduced both CaN gene expression and the enzymatic activity of CaN protein. Following knocking down CaN expression, about 60.81% mortality was observed among the fourth-instar larvae. Moreover, the body weight of surviving larvae showed a significant reduction starting 24 h after CaN dsRNA administration. The developmental durations from 4th instar larva to pupa and from pupa to adult eclosion were significantly prolonged. Both pupation and eclosion rates were markedly decreased, with the final eclosion rate dropping

基金项目: 国家自然科学基金 (32172401); 河南省高校科技创新人才项目 (24HASTIT051); 中原青年拔尖人才项目

作者简介: 彭震, 男, 高级农艺师, 研究方向为植物保护, E-mail: 1975861023@qq.com

*通讯作者 Author of correspondence: 魏纪珍, 女, 博士, 副教授, 研究方向为农业昆虫与害虫防治, E-mail: weijizhen1986@163.com

收稿日期 Received: 2025–08–05; 修回日期 Revision received: 2025–12–24; 接受日期 Accepted: 2025–12–24

to only 3.75%. **[Conclusion]** These findings demonstrate that *CaN* is essential for the growth and development of *H. armigera* and highlight its potential as a promising RNAi target for pest control strategies.

Key words: Calcineurin; *Helicoverpa armigera*; RNAi; mortality; growth and development

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 是我国及全球各地区的重要农业害虫，其广泛的分布范围、多食性、强大的繁殖力和抗药性等特点使之成为农业生产中的一大严重威胁。长期以来对棉铃虫的化学防治，使其已对拟除虫菊酯类、有机磷类等多种化学杀虫剂产生高水平抗性（徐劲松，2025），甚至对苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* (Bt) 杀虫蛋白的耐受性也逐渐增强（Hu *et al.*, 2025）。当前，RNAi 生物农药以其特有的技术优势成为更好地控制棉铃虫及有效地进行棉铃虫抗药性治理的重要手段，然而 RNAi 生物农药的应用前提需要深入地挖掘棉铃虫的功能基因。

钙调磷酸酶（Calcineurin, CaN）属于去磷酸化酶 PP2B 家族（Protein phosphatase 2B family），依赖于 Ca^{2+} 信号的丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶。在大多数的哺乳动物中，CaN 作为重要的信号分子广泛分布在各种组织中，在各种生理生化通路中发挥多种多样的功能（Liu *et al.*, 1991; Furman and Norris, 2014; Saraf *et al.*, 2018）。研究报道 CaN 主要在脑中表达，在 Ca^{2+} 平衡、突触可塑性、信号受体和转录调控中发挥重要作用，是神经调控和神经紊乱的重要作用分子（Saraf *et al.*, 2018）。CaN 还在内皮细胞上分布，调节过敏反应（Ballesteros-Martinez *et al.*, 2017）。其次，CaN 在淋巴细胞和巨噬细胞中表达，参与到机体的先天免疫（Bueno *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2007）。

在昆虫中，关于 CaN 的研究主要在模式昆虫果蝇 *Drosophila melanogaster* 中开展。在果蝇中，CaN 在肌丝形成和肌钙蛋白 I 型转变中发挥重要作用，故 CaN 影响昆虫飞行肌的发育（Gajewski *et al.*, 2006）。同时，CaN 还参与果蝇的昼夜节律（Kweon *et al.*, 2018），轴突运输（Shaw *et al.*, 2013），线粒体功能（Shaw *et al.*, 2013），嗅觉气味学习和长期记忆（Chang *et al.*, 2003），求偶行为（Ejima *et al.*, 2004; Sakai and Aigaki, 2010）和雌虫的生殖活动（Ejima *et al.*, 2004; Horner *et al.*, 2006; Takeo *et al.*, 2010）。此外，果蝇的 CaN 在免疫反应中起到重要作用，当果蝇幼虫取食革兰氏阴性菌时，CaN 活性增强（Li and Dijkers,

2015）。CaN 活性增强，促进 *relish* 产生，*relish* 是免疫缺陷通路（Immune deficiency pathway）中的重要转录因子，调控抗菌肽的表达（Dijkers and O'Farrell, 2007; Li and Dijkers, 2015）。除了果蝇，CaN 在其它昆虫中的研究非常有限。仅有的研究报道，在家蚕 *Bombyx mori* 成虫中，CaN 分布在信息素合成细胞的细胞质中，调节性信息素的合成（Yoshiga *et al.*, 2002）。再有对棉铃虫成虫中 CaN 的研究表明，CaN 通过去磷酸化激活乙酰辅酶 a 羧化酶（acetyl CoA carboxylase）调节性信息素合成和雌虫的交配行为（Du *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2018）。

棉铃虫幼虫阶段是主要的取食和危害阶段。本团队前期对 *CaN* 在幼虫中的功能进行了初步的研究发现，*CaN* 在幼虫中各龄期和组织中广泛分布，与转录因子 *relish* 结合，调控下游抗菌肽 *cecropin D*, *attacin* 和 *gloverin* 的表达参与到昆虫对革兰氏阴性菌的免疫中（Wei *et al.*, 2019）。同时利用 CaN 特异性抑制剂 CsA 处理棉铃虫，会导致昆虫死亡，引起适合度代价，以及体色变浅等（Wei *et al.*, 2022）。进一步的研究发现抑制棉铃虫幼虫 CaN 去磷酸化活性，还能显著增强 Bt 杀虫蛋白的杀虫效果（Wei *et al.*, 2021a; 2021b）。但是 *CaN* 在棉铃虫中能否作为 RNAi 农药研发中的关键靶标基因，目前仍缺乏系统研究。因此本研究在前期的研究基础上，通过干扰的方法，探究 CaN 在棉铃虫幼虫生长发育中的功能。

1 材料与方 法

1.1 材料

供试昆虫为棉铃虫敏感品系（JY），购自河南省济源白云实业有限公司。实验室中采用人工饲料进行饲养（梁革梅等，1999），饲养环境条件为温度 $(26 \pm 1) ^\circ\text{C}$ 、相对湿度 $(60 \pm 10) \%$ 、光周期 16 L : 8 D。

试剂与仪器：RNA 提取、HiScript[®] III RT SuperMix for qPCR (+gDNAwiper) 反转录、双链合

成 T7 RNAi Transcription Kit 及质粒 DNA 小量提取试剂盒均购自南京诺维赞生物科技股份有限公司；大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 购自北京擎科生物科技股份有限公司；氨苄青霉素和 20 \times PBS 缓冲液购自北京索莱宝科技有限公司；BCA 总蛋白定量测定和钙调磷酸酶 (CaN) 试剂盒购自南京建成生物工程有限公司；增强绿色荧光蛋白 EGFP 的序列参照 Wei *et al.* (2021) 的方法设计合成；其余化学试剂均为国产分析纯。主要仪器包括 NANODROP 1000 全波长微量分光光度计 (赛默飞世尔科技)、DYY-3C 电泳仪 (北京六一仪器厂)、荧光定量 PCR 仪 (ABI) 及酶标仪 (伯腾仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 样品制备和 cDNA 合成

选取大小和龄期基本一致的 4 龄 1 d 棉铃虫，预先置于冰上以降低其活动度。分别在 0 h 和 36 h 注射 12 μ g dsCaN、dsEGFP 或 DEPC 水，并在 24 h、48 h 和 72 h 取其中肠组织，每组分别取 10 头棉铃虫中肠组织，设置 3 个生物学重复，用于比较不同时间点注射 dsCaN 后 CaN 基因的表达变化及酶活性测定。每组分别取 20 头棉铃虫，设置 4 个生物学重复，用于比较注射 dsCaN 对棉铃虫生长发育指标的影响。

采用 RNA 提取试剂盒分别提取各处理组样品的总 RNA，依据 HiScript[®] III RT SuperMix for qPCR

(+gDNA wiper) 反转录试剂盒说明书合成 cDNA 模板，作为后续 qPCR 分析的模板，并检测 CaN 基因的转录水平变化。

1.2.2 载体构建

以棉铃虫 cDNA 为模板，使用 CaN-F/R 特异性引物 (见表 1) 扩增 CaN 基因的编码区 (CDS)，该区域对应蛋白中的氨基酸序列 (登录号: KR185962.1)。试验所用引物均由北京擎科生物科技股份有限公司合成。PCR 反应体系为 50 μ L，包含 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 1 μ L、cDNA 模板 1 μ L、dNTPs 1 μ L、上下游引物各 2 μ L、2 \times Phanta Max Buffer 25 μ L 以及 ddH₂O 18 μ L。PCR 扩增程序为：95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min；随后进行 38 个循环，每个循环包括 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s、55 $^{\circ}$ C 退火 30 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s，最后在 72 $^{\circ}$ C 保温 10 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后，纯化并连接至克隆载体。将构建好的连接产物通过热激法转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中，并利用氨苄青霉素进行抗性筛选。对筛选获得的阳性克隆进行菌液 PCR 验证，验证条件与上述 PCR 一致。再次通过 1% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物。选取验证阳性的菌落，在含有氨苄青霉素的 LB 液体培养基中于 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 条件下过夜培养，随后提取质粒 DNA，并送至北京擎科生物科技股份有限公司进行测序，以确认插入片段的准确性。

表 1 本研究引物列表

Table 1 List of primers in this study

引物名称 Primer name	序列 Sequence (5'-3')
CaN-CDS-F	ATGTCCGGGAGCAATGATAAAG
CaN-CDS-R	CGAATGTGCGTTGCTGTTTACAT
CaN-T7-F	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAGGAAGGTGTATGATGCATGTAT</u>
CaN-T7-R	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAGCATCCATGAAGTTGGGCAGCCA</u>
EGFP-T7-F	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAGACCTGAAGTTCATCTGCACCAC</u>
EGFP-T7-R	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAGACTCCAGCAGGACCATGTGATC</u>
qCaN-F	ATGAATGCCGACATTTGACA
qCaN-R	CCAAATGCAGGTGGTTCTTT
β -actin-F	CCTGGTATTGCTGACCGTATGC
β -actin-R	CTGTTGGAAGGTGGAGAGGGAA
EF-1 α -F	GCCTGGTACCATTGTCTGCTCT
EF-1 α -R	GTAACCACGACGCAACTCCT

注：下划线的序列为 T7 启动子序列。Note: The underlined sequences were T7 promoter sequence.

1.2.3 dsRNA的合成

首先设计并合成针对 *CaN* 基因和对照组 *EGFP* 基因的特异性引物 *CaN*-T7-F/R 和 *EGFP*-T7-F/R (见表1), 引物中包含 T7 聚合酶识别位点。以克隆载体 ZT4-*CaN* 质粒及 *EGFP* 质粒为模板, 采用上述带有 T7 位点的引物进行 PCR 扩增, 获得长度分别为 530 bp (*CaN*) 和 538 bp (*EGFP*) 的双链 DNA 模板。PCR 扩增体系与 1.2.2 节所述一致, 反应程序为: 95°C 预变性 5 min; 随后进入循环阶段, 包括 95°C 变性 30 s、55°C 退火 30 s、72°C 延伸 30 s, 共进行 38 个循环。扩增完成后, 对产物进行酚-氯仿抽提处理, 并通过凝胶电泳检测, 确保获得单一清晰的目的条带后继续后续试验。依据 T7 RNAi Transcription Kit 试剂盒的操作说明, 分别体外转录合成 *CaN* 和 *EGFP* 的双链 RNA (dsRNA), 最终溶解于 DEPC 水中, 并使用分光光度计测定其浓度, 用于后续试验。

1.2.4 实时荧光定量 PCR (Quantitative Real-time PCR, RT-qPCR)

采用 q*CaN*-F/R 特异性引物 (见表1) 对 *CaN* 基因干扰后的表达水平进行定量检测。同时, 选取 *EF-1 α* (登录号: U20129.1) 和 β -*actin* (登录号: HM629442.1) 作为内参基因, 并依据其序列设计相应的内参引物 β -*actin*-F/R 和 *EF-1 α* -F/R (见表1)。qPCR 反应体系为 10 μ L, 包含 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (2 \times) 5 μ L、上下游引物各 0.4 μ L、cDNA 模板 1 μ L 以及 ddH₂O 3.2 μ L。扩增程序如下: 95°C 预变性 2 min; 随后进入 38 个循环, 每个循环包括 95°C 变性 15 s、55°C 退火 15 s、68°C 延伸 20 s。试验设置 3 个生物学重复, 每组生物学重复下设 3 个技术重复, 以平均循环数结合扩增效率评估各基因的表达水平。最终采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法对试验数据进行分析处理 (Liu *et al.*, 2015)。

1.2.5 CaN 酶活性的测定

用 500 μ L 提前灭菌且预冷的 1 \times PBS 将 1.2.1 样品吸打混匀, 将其研磨成匀浆, 3500 rpm, 4°C 离心 10 min, 取 300 μ L 上清。根据 BCA 试剂盒将 100 μ L 上清中的蛋白浓度进行测量, 根据 *CaN* 试剂盒的说明书, 使用 Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Reader 全波长微孔板扫描测定反应后的 OD 值, 参考对应的蛋白浓度, 计算酶的活力。

1.3 数据统计分析

幼虫死亡率 (%) = 死亡个体数/幼虫总数 \times 100, 校正死亡率 (%) = (处理组死亡率 - 对照组死亡率) / (1 - 对照组死亡率) \times 100。统计棉铃虫从 4 龄幼虫到化蛹经历的时间, 即为幼虫的发育历期。统计从化蛹第一天到羽化为成虫经历的时间, 即为蛹的发育历期。统计棉铃虫同一处理组得到的活蛹数目, 和样本数 20 头的比值, 即为 1 个生物学重复的化蛹率; 统一处理组内 3 个生物学重复化蛹率的平均值即为该处理组的化蛹率。将成功化蛹的棉铃虫虫蛹称重即为蛹重。各处理组幼虫成功化蛹后, 观察统计各处理组羽化成虫数目, 和样本数 20 头的比值即为羽化率。

本研究中所有试验数据均采用 DPS 9.01 软件进行统计分析, 涉及多组间比较时, 统一使用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 并结合 LSD 模型进行多重比较。该方法适用于 *CaN* 双链 RNA 干扰效率及 *CaN* 酶活性测定、校正死亡率、7 日体重、4 龄幼虫的发育历期以及化蛹率、蛹重、蛹历期和羽化率等相关试验数据处理。图表绘制则通过 GraphPad Prism 8.0.2 软件完成。

2 结果与分析

2.1 *CaN* dsRNA 干扰效率及对 *CaN* 蛋白酶活性的影响

为探究 *CaN* 基因在棉铃虫幼虫生长发育中的功能, 本研究开展了 *CaN* 基因 RNA 干扰试验。RT-qPCR 结果表明, 在注射 ds*CaN* 后的不同时间点, 与 DEPC 水处理组和 ds*EGFP* 处理组相比, 24 h 时即可观察到对棉铃虫 *CaN* 基因表达的显著干扰作用 ($P < 0.0001$, $n = 30$), 在 48 h 和 72 h 时, 干扰效果依然显著 ($P < 0.0001$, $n = 30$)。相比与 ds*EGFP* 处理组, *CaN* 基因表达水平在 3 个时间点分别由降低了 82.31%、64.63% 和 41.78%。此外, 我们还评估了 *CaN* 基因沉默对 *CaN* 蛋白酶活性的影响 (图 1-a、b、c)。通过在不同时间点检测 *CaN* 蛋白酶活性发现, 与 DEPC 水对照组及 ds*EGFP* 对照组相比, 注射 ds*CaN* 后 24 h 就显著降低了棉铃虫体内 *CaN* 蛋白酶的活性 ($P < 0.0001$, $n = 30$), 且该抑制效应在 48 h ($P < 0.0001$, $n = 30$) 和 72 h ($P < 0.0001$, $n = 30$) 仍持续存在 (图 1-d、e、f)。

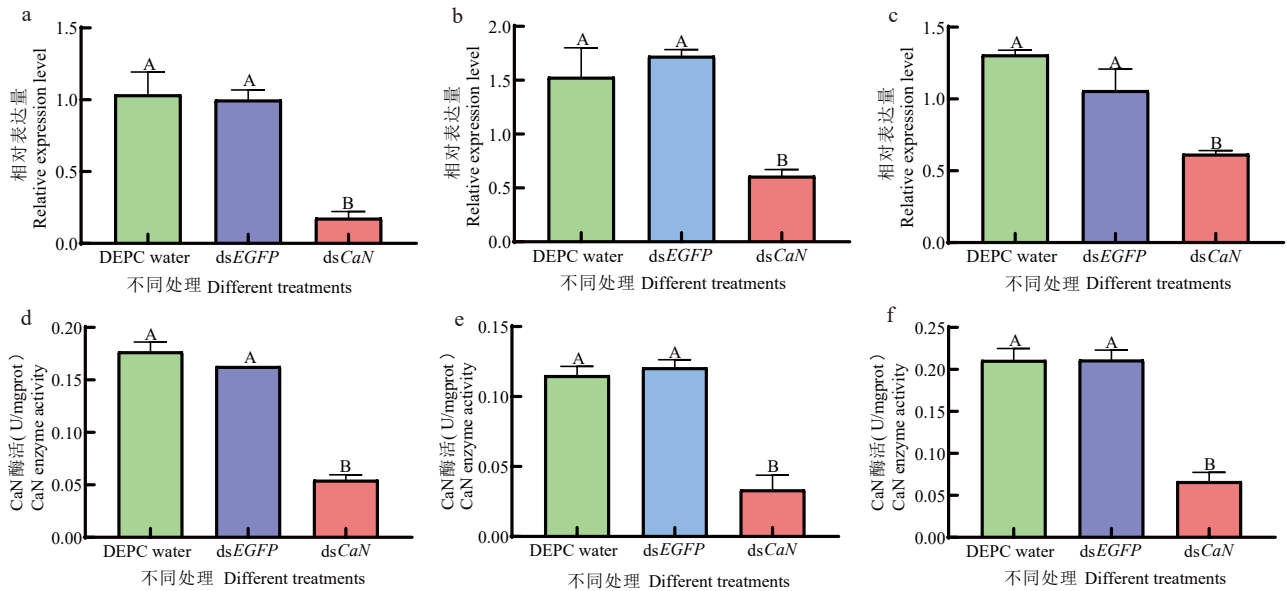


图1 棉铃虫 *CaN* 的干扰效率及对 *CaN* 蛋白酶活性的影响

Fig. 1 Interference efficiency of *CaN* gene and the effect on *CaN* enzyme activity in *Helicoverpa armigera*

注: a, 注射 *dsCaN* 24 h 后对 *CaN* 表达量的影响; b, 注射 *dsCaN* 48 h 后对 *CaN* 表达量的影响; c, 注射 *dsCaN* 72 h 后对 *CaN* 表达量的影响; d, 注射 *dsCaN* 24 h 后对 *CaN* 酶活性的影响; e, 注射 *dsCaN* 48 h 后对 *CaN* 酶活性的影响; f, 注射 *dsCaN* 72 h 后对 *CaN* 酶活性的影响。不同大写字母表示 $P < 0.01$ 水平显著。Note: a, Effect of *dsCaN* injection on the expression level of *CaN* after 24 h; b, Effect of *dsCaN* injection on the expression level of *CaN* after 48 h; c, Effect of *dsCaN* injection on the expression level of *CaN* after 72 h; d, Effect of *dsCaN* injection on *CaN* enzyme activity after 24 h; e, Effect of *dsCaN* injection on *CaN* enzyme activity after 48 h; f, Effect of *dsCaN* injection on *CaN* enzyme activity after 72 h. Different capital letters indicated significant differences at the $P < 0.01$ level.

2.2 干扰 *CaN* 对棉铃虫幼虫死亡率的影响

试验结果表明, 干扰 *CaN* 基因后, 与 DEPC 水处理组和 *dsEGFP* 对照组相比, 棉铃虫幼虫的校正死亡率显著上升。与 *dsEGFP* 对照组相比, *dsCaN* 处理组的幼虫的校正死亡率分别提高了 44.60% 和 43.24% ($P < 0.0001$, 图 2, $n = 80$)。

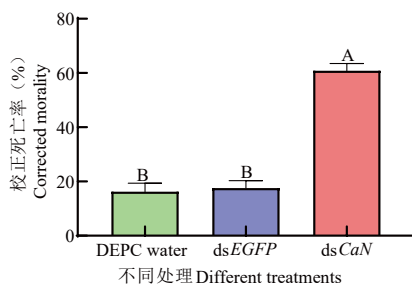


图2 干扰 *CaN* 后对棉铃虫幼虫校正死亡率

Fig. 2 Corrected larval mortality of *Helicoverpa armigera* after *CaN* interference

注: 不同大写字母表示 $P < 0.01$ 水平显著。下同。

Note: Different capital letters indicated significant differences at the $P < 0.01$ level. Same below.

2.3 干扰 *CaN* 对棉铃虫各时间点体重的影响

统计幼虫经过 DEPC 水、*dsEGFP* 及 *dsCaN* 处理后, 分别在 0、24、48、72、96、120、144、168 h 时的体重。结果表明, 与 DEPC 水及 *dsEGFP* 处理相比, *dsCaN* 处理棉铃虫体重自 24 h 起极显著地降低 ($P_{24h} < 0.0001$ 、 $P_{48h} < 0.0001$ 、 $P_{72h} < 0.0001$ 、 $P_{96h} < 0.0001$ 、 $P_{120h} < 0.0001$ 、 $P_{144h} < 0.0001$ 及 $P_{168h} < 0.001$, 图 3, $n = 80$)。

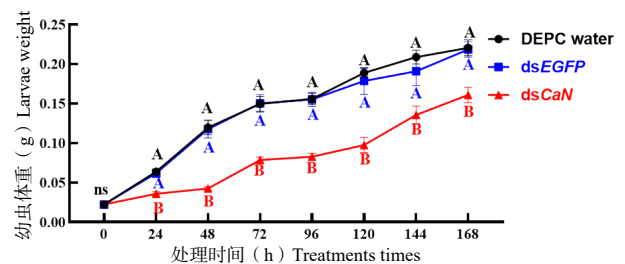


图3 干扰 *CaN* 后各时间点棉铃虫幼虫体重

Fig. 3 Larval weight of *Helicoverpa armigera* at different time point after *CaN* interference

注: ns, 无显著性差异。Note: ns, no significant difference.

2.4 干扰 *CaN* 对棉铃虫发育历期的影响

将各处理下棉铃虫幼虫持续使用人工饲料饲养, 直至幼虫化蛹, 统计4龄幼虫到化蛹第一天的时间, 即为幼虫的发育历期。干扰 *CaN* 会显著延长棉铃虫幼虫4龄至蛹期的发育历期 ($P < 0.0001$, $n = 80$) (图4)。

2.5 干扰 *CaN* 对棉铃虫蛹期的影响

为了继续探究干扰棉铃虫幼虫 *CaN* 后对蛹期产生的影响, 继续观察了昆虫的生长发育情况。通过统计蛹期的指标发现, 干扰 *CaN* 后显著降低化蛹率 ($P < 0.0001$, 图5-a, $n = 80$), 并显著的减少了蛹重 ($P < 0.0001$, 图5-b, $n = 80$), 显著延长蛹历期 ($P < 0.0001$, 图5-c, $n = 80$), 也明

显降低羽化率 ($P < 0.0001$, 图5-d, $n = 80$), 结果表明幼虫期干扰 *CaN* 对棉铃虫蛹期的生长发育也具有抑制作用。

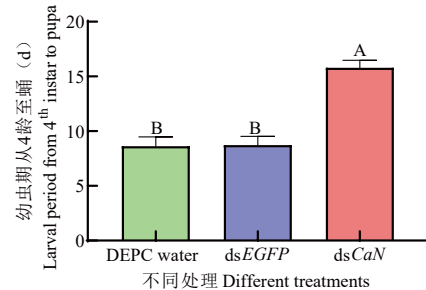


图4 干扰 *CaN* 后棉铃虫幼虫历期

Fig. 4 Larval period of *Helicoverpa armigera* after *CaN* interference

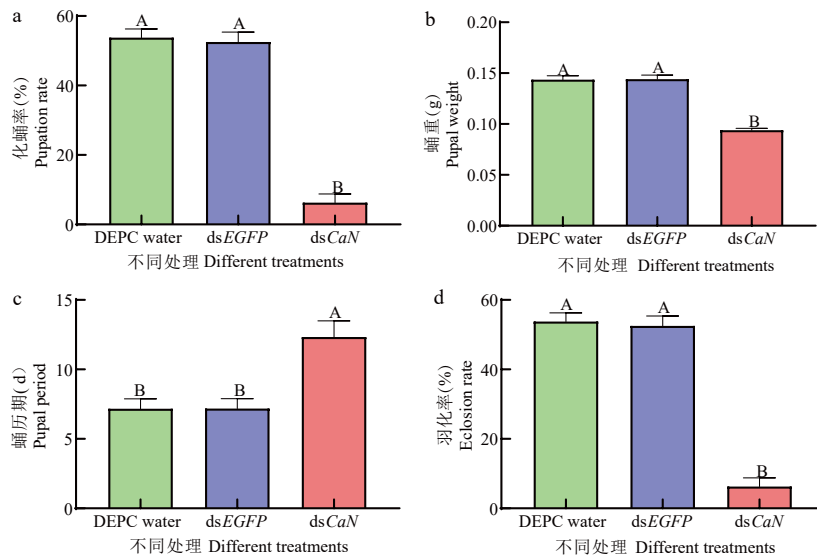


图5 干扰 *CaN* 对棉铃虫的化蛹率 (a)、蛹重 (b)、蛹历期 (c) 及羽化率 (d) 的影响

Fig. 5 Impacts of *CaN* interference on the pupation rate (a), pupal weight (b), pupal period (c) and eclosion rate (d) of *Helicoverpa armigera*

3 结论与讨论

鉴于 *CaN* 在昆虫中广泛的功能, 本研究通过对4龄期棉铃虫进行 *CaN* dsRNA 干扰, 以探究其作为关键靶标进行棉铃虫防治的潜能。结果发现注射 *CaN* dsRNA 可以有效地降低 *CaN* 基因的表达, 并对应降低了 *CaN* 蛋白的酶活性 (图1)。通过干扰 *CaN* 降低棉铃虫 *CaN* 的酶活性导致幼虫死亡 (图2)、体重降低 (图3, 图5-b)、发育历期延缓 (图4, 图5-c)、化蛹率 (图5-a) 和羽化率降低 (图5-d)。这与前期用 *CaN* 的抑制剂 FK506 抑制

CaN 蛋白的酶活性, 发现可以导致棉铃虫死亡、体重降低、发育历期延长、化蛹率和羽化率的降低的结果一致, 分析其原因可能抑制了 *CaN* 调控的免疫通路, 使下游免疫基因 *cecropin D*, *attacin* 和 *gloverin* 的表达量降低导致的 (Wei et al., 2019)。同时, 棉铃虫在4龄开始进入暴食期, 从体重的降低可以推测干扰后的取食量显著降低, 这说明即使高龄期干扰也能有效的降低棉铃虫的为害。同时通过对4龄期棉铃虫进行 *CaN* 干扰, 棉铃虫最终的羽化率仅为3.75%, 这一方面说明 *CaN* 蛋白是棉铃虫幼虫一个重要的功能基因。此外, 仅为3.75%

羽化的棉铃虫，可能也会因为 CaN 酶活性的降低而导致昆虫交配失败而最终无法产生后代。因为 CaN 还在昆虫的求偶行为 (Ejima *et al.*, 2004; Sakai and Aigaki, 2010) 和雌虫的生殖活动 (Yoshiga *et al.*, 2002; Ejima *et al.*, 2004; Horner *et al.*, 2006; Takeo *et al.*, 2010) 起到重要作用。对棉铃虫成虫中 CaN 的研究表明，CaN 通过去磷酸化激活乙酰辅酶 A 羧化酶，从而调节性信息素的生物合成和雌虫的交配行为 (Du *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2018)。鉴于 CaN 在幼虫及成虫中的重要作用，研究人员推测 CaN 可以作为棉铃虫 RNAi 防治的一个重要靶标。

CaN 是一种独特且复杂的钙离子/钙调蛋白介导的酶，由催化亚基 A (CaNA) 和调节亚基 B (CaNB) 组成，本研究发现干扰 CaN 后会引发棉铃虫体重降低、发育历期、化蛹率和羽化率的降低 (图 3, 图 4, 图 5)。据报道通过 RNAi 沉默褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 的 CaN 亚基 *NICNA*、*NICNB1* 和 *NICNB1* 基因，也可显著降低褐飞虱的存活率、雌性体重、羽化率和繁殖力，且在若虫中，*NICNB1* RNAi 后 20-羟基蜕皮激素 (20E) 含量明显降低，干扰后显示褐飞虱激素和能量代谢受损 (Wang *et al.*, 2022)。CaN 在昆虫中同源性很高 (Wei *et al.*, 2019)，推测 CaN 在棉铃虫中也可能参与激素调节和能量代谢。前期的研究也发现棉铃虫幼虫中 CaN 在各龄期和组织中广泛分布 (Wei *et al.*, 2019)，因此 CaN 更多功能有待后续进一步的挖掘。

综上结果及之前的研究结果，可以证实 CaN 不管在幼虫还是成虫中均具有重要的作用。以 CaN 为棉铃虫 RNAi 靶标，具备害虫防治的功能。但是 RNAi 在鳞翅目昆虫中具有干扰效果不稳定及易被降解的现象 (Guan *et al.*, 2018, 2019; Han *et al.*, 2025)，本研究仅通过注射的方式 (避免肠道的降解作用) 验证了 CaN 的效果，后续 CaN RNAi 的应用可能还要通过一些特殊手段来实现，例如利用纳米材料为介质完成 dsRNA 片段的传递等。

参考文献 (References)

- Ballesteros-Martinez C, Mendez-Barbero N, Montalvo-Yuste A, *et al.* Endothelial regulator of calcineurin 1 promotes barrier integrity and modulates histamine-induced barrier dysfunction in anaphylaxis [J]. *Frontiers in Immunology*, 2017, 8: 1323.
- Bueno OF, Brandt EB, Rothenberg ME, *et al.* Defective T cell development and function in calcineurin A-deficient mice [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99: 9398-9403.
- Chang KT, Shi YJ, Min KT. The *Drosophila* homolog of Down's syndrome critical region 1 gene regulates learning: implications for mental retardation [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100: 15794-15799.
- Dijkers PF, O' Farrell, PH. *Drosophila* calcineurin promotes induction of innate immune responses [J]. *Current Biology*, 2007, 17: 2087-2093.
- Du MF, Liu XG, Ma N, *et al.* Calcineurin-mediated dephosphorylation of acetyl-coA carboxylase is required for pheromone biosynthesis activating neuropeptide (PBAN)-induced sex pheromone biosynthesis in *Helicoverpa armigera* [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2017, 16(12): 2138-2152.
- Ejima A, Tsuda M, Takeo S, *et al.* Expression level of *sarah*, a homolog of DSCR1, is critical for ovulation and female courtship behavior in *Drosophila melanogaster* [J]. *Genetics*, 2004, 168: 2077-2087.
- Furman JL, Norris CM. Calcineurin and glial signaling: neuroinflammation and beyond [J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2014, 11: 158.
- Gajewski KM, Wang JB, Schulz RA. Calcineurin function is required for myofilament formation and troponin I isoform transition in *Drosophila* indirect flight muscle [J]. *Developmental Biology*, 2006, 289: 17-29.
- Guan RB, Chen QY, Li HC, *et al.* Knockout of the *HaREase* gene improves the stability of dsRNA and increases the sensitivity of *Helicoverpa armigera* to *Bacillus thuringiensis* toxin [J]. *Frontiers in Physiology*, 2019, 10: 1368.
- Guan RB, Li HC, Fan YJ, *et al.* A nuclease specific to lepidopteran insects suppresses RNAi [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2018, 293(16): 6011-6021.
- Han XY, Li HC, Xu SB, *et al.* *Bacillus* secretes nucleases to degrade dsRNA, thereby reducing host's susceptibility to RNAi [J]. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 2025, 11(1): 127.
- Horner VL, Czank A, Jang JK, *et al.* The *Drosophila* calcipressin *sarah* is required for several aspects of egg activation [J]. *Current Biology*, 2006, 16: 1441-1446.
- Hu DQ, Wang DM, Pan HS, *et al.* Molecular mechanisms underlying resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in lepidopteran pests: an updated research perspective [J]. *Agronomy*, 2025, 15(1): 155.
- Kang YJ, Kusler B, Otsuka M, *et al.* Calcineurin negatively regulates TLR-mediated activation pathways [J]. *Journal of Immunology*, 2007, 179: 4598-4607.
- Kweon SH, Lee J, Lim C, *et al.* High-amplitude circadian rhythms in *Drosophila* driven by calcineurin-mediated post-translational control of *sarah* [J]. *Genetics*, 2018, 209: 815-828.
- Li YX, Dijkers PF. Specific calcineurin isoforms are involved in
- Ballesteros-Martinez C, Mendez-Barbero N, Montalvo-Yuste A, *et al.* Endothelial regulator of calcineurin 1 promotes barrier integrity and modulates histamine-induced barrier dysfunction in

- Drosophila* toll immune signaling [J]. *The Journal of Immunology*, 2015, 194: 168–176.
- Liang GM, Tang WJ, Guo YY. Improvement of artificial rearing technology of cotton bollworm [J]. *Plant Protection*, 1999, 2: 16–18. [梁革梅, 谭维嘉, 郭予元. 人工饲养棉铃虫技术的改进 [J]. 植物保护, 1999, 2: 16–18]
- Liu J, Farmer JD Jr, Lane WS, *et al.* Calcineurin is a common target of cyclophilin–cyclosporin A and FKBP–FK506 complexes [J]. *Cell*, 1991, 66 (4): 807–815.
- Liu SS, Wang M, Li XC. Overexpression of tyrosine hydroxylase and dopa decarboxylase associated with pupal melanization in *Spodoptera exigua* [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 11273.
- Sakai T, Aigaki TJ. The *Drosophila* calcineurin regulator, *Sarah*, is involved in male courtship [J]. *Neuroreport*, 2010, 21: 985–988.
- Saraf J, Bhattacharya P, Kalia K, *et al.* A friend or foe: calcineurin across the gamut of neurological disorders [J]. *ACS Central Science*, 2018, 4: 805–819.
- Shaw JL, Chang KT, Lu B. Nebula/DSCR1 upregulation delays neurodegeneration and protects against APP–Induced axonal transport defects by restoring calcineurin and GSK–3 β signaling [J]. *PLoS Genetics*, 2013, 9: e1003792.
- Takeo S, Hawley RS, Aigaki T. Calcineurin and its regulation by *Sra/RCaV* is required for completion of meiosis in *Drosophila* [J]. *Developmental Biology*, 2010, 344 (2): 957–967.
- Wang WX, Zhu TH, Wan PJ, *et al.* Cloning and functional analysis of calcineurin subunits A and B in development and fecundity of *Nilaparvata lugens* (Stål) [J]. *Rice Science*, 2022, 29 (2): 143–154.
- Wei JZ, Li LH, Yao SY, *et al.* Calcineurin–modulated antimicrobial peptide expression is required for the development of *Helicoverpa armigera* [J]. *Frontiers in Physiology*, 2019, 10: 1312.
- Wei JZ, Liu SK, Wang K, *et al.* Cyclosporin A acts as a novel insecticide against Cry1Ac–susceptible and –resistant *Helicoverpa armigera* [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2022, 188: 5283.
- Wei JZ, Yang S, Zhou S, *et al.* Suppressing calcineurin activity increases the toxicity of Cry2Ab to *Helicoverpa armigera* [J]. *Pest Management Science*, 2021a, 77: 2142–2150.
- Wei JZ, Yao X, Yang S, *et al.* Suppression of calcineurin enhances the toxicity of Cry1Ac to *Helicoverpa armigera* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021b, 12: 634619.
- Xu JS. Current status of pesticide product registration for *Helicoverpa armigera* control in China [J]. *Agricultural Engineering*, 2025, 15(4): 75–80. [徐劲松. 我国防治棉铃虫农药产品登记现状 [J]. 农业工程, 2025, 15 (4): 75–80]
- Yoshiga T, Yokoyama N, Imai N, *et al.* cDNA cloning of calcineurin heterosubunits from the pheromone gland of the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 32: 477–486.
- Zhao WL, Li LH, Zhang Y, *et al.* Calcineurin is required for male sex pheromone biosynthesis and female acceptance [J]. *Insect Molecular Biology*, 2018, 27: 373–382.