

亚洲玉米螟保幼激素酸甲基转移酶基因 *OfJHAMT* 的鉴定及在滞育中的功能*

刘 叶** 田 迅 曹胜雁 马红悦***

(内蒙古民族大学, 生命科学与食品学院, 通辽 028000)

摘 要 【目的】保幼激素酸甲基转移酶 (Juvenile hormone acid O-methyltransferase, JHAMT) 是参与昆虫保幼激素合成的关键限速酶。本研究旨在鉴定和表达亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* JHAMT 基因, 揭示其在亚洲玉米螟幼虫滞育中的作用。【方法】基于本实验室前期组装的亚洲玉米螟转录组数据 (NCBI 登录号: PRJNA1030200), 采用 RT-PCR 技术克隆鉴定 JHAMT 基因并进行生物信息学分析, 通过实时荧光定量 PCR (qPCR) 技术分析其在亚洲玉米螟幼虫不同滞育状态的表达水平, 利用 dsRNA 注射法干扰滞育幼虫的 JHAMT 基因, 探究该基因在亚洲玉米螟滞育过程中的功能。【结果】亚洲玉米螟 *OfJHAMT* 基因开放阅读框长度为 948 bp, 编码 315 个氨基酸, 预测蛋白质分子量为 36.40kD, 等电点 pI 为 7.64。同源序列比对和系统发育分析表明, 亚洲玉米螟 *OfJHAMT* 与欧洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis* 的 *OnJHAMT* 亲缘关系最近, 其氨基酸序列一致性为 96.51%。*OfJHAMT* 基因在亚洲玉米螟的不同滞育阶段均有表达, 其中滞育期的相对表达量最低, 解除滞育后表达量升高。RNAi 实验结果表明, 注射 ds*OfJHAMT* 48 h 后 *OfJHAMT* 基因表达量下调 86.35%。沉默 *OfJHAMT* 基因后第 9 天, 亚洲玉米螟的存活率降至 56.67%, 与对照组 ds*GFP* 相比, 滞育率下降了 81.67%, 且试验组幼虫不同程度出现外表皮变黑, 组织软化及皱缩等致死表型, 存活个体多生长为畸形蛹, 无法正常发育成成虫。【结论】本研究成功鉴定了亚洲玉米螟 *OfJHAMT* 基因, 其在不同滞育状态下的表达模式呈现显著性差异表达, *OfJHAMT* 表达被降低后影响幼虫生长发育且滞育率显著低于对照组, 表明 *OfJHAMT* 基因在亚洲玉米螟滞育过程中起着重要作用。

关键词 亚洲玉米螟; 保幼激素酸甲基转移酶; 序列分析; RNA 干扰; 滞育

Identification and function of the juvenile hormone acid O-methyltransferase gene *OfJHAMT* in *Ostrinia furnacalis* during diapause

LIU Ye** TIAN Xun CAO Sheng-Yan MA Hong-Yue***

(College of Life Sciences and Food Engineering, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028000, China)

Abstract [Aim] To identify the *Ostrinia furnacalis* juvenile hormone acid O-methyltransferase (*OfJHAMT*) gene, and to investigate its role in diapause in this species. [Methods] Based on *O. furnacalis* transcriptome data previously obtained by our lab (NCBI accession number : PRJNA1030200), the *OfJHAMT* gene was cloned and identified with RT-PCR and analyzed using bioinformatics. The expression of the *OfJHAMT* gene in different diapause stages of *O. furnacalis* larvae was analyzed using real-time fluorescent quantitative PCR (qPCR), and its function during the diapause process was investigated using RNA interference (RNAi; injecting dsRNA into diapausing larvae). [Results] The open reading frame (ORF) of the *OfJHAMT* gene is 948 bp long, encodes 315 amino acids, and has a predicted protein molecular weight of 36.40 kD and an isoelectric

*资助项目 Supported projects: 内蒙古自治区自然科学基金 (2024QN03011); 内蒙古自治区本级事业单位引进人才科研项目 (RCQD202304); 2023 年度自治区直属高校基本科研业务费项目 (GXKY23Z025); 内蒙古民族大学博士科研启动基金 (BS676); 内蒙古自治区研究生科研创新项目 (KC2024069S)

**第一作者 First author, E-mail: ly18247554729@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: plmmhy1111@163.com

收稿日期 Received: 2024-12-11; 接受日期 Accepted: 2025-03-19

point (pI) of 7.64. Homologous sequence alignment and phylogenetic analysis indicate that *OfJHAMT* is most closely related to the *OnJHAMT* gene of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*, with which it has an amino acid sequence identity of 96.51%. The *OfJHAMT* gene was expressed in all diapause stages, with the lowest relative expression during the diapause period. Expression levels increased after diapause ended. The RNAi experiment indicated that expression of *OfJHAMT* was downregulated by 86.35% 48 h after the injection of dsRNA. The survival rate of larvae dropped to 56.67% by the 9th day after injection, and, compared to the dsGFP control group, the diapause rate of the treatment group was 81.67% lower. In addition, larvae treated with dsRNA exhibited different degrees of cuticle darkening, tissue softening, and wrinkling, phenotypes that were often lethal, with surviving individuals mostly being deformed pupae that were unable to develop normally into adults.

[Conclusion] The *OfJHAMT* gene appears to play an important role in the diapause process of *O. furnacalis* larvae.

Key words *Ostrinia furnacalis*; juvenile hormone acid O-methyltransferase; sequence analysis; RNA interference; diapause

亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 属鳞翅目 Lepidoptera 螟蛾科 Pyralidae, 是我国玉米作物的重要害虫, 被增列为国家一类农作物害虫。该害虫分布广泛, 主要以幼虫对玉米植株的地上部分造成严重危害, 导致产量下降和品质降低(魏杰, 2013)。目前, 亚洲玉米螟的防治主要依赖化学防治, 但存在环境污染和害虫抗药性等问题(李琳红等, 2024)。通过松毛虫赤眼蜂 *Trichogramma dendrolimi* 田间放蜂方法可有效防治亚洲玉米螟, 但受玉米螟预测预报、赤眼蜂品种、释放方法等限制, 导致其防治效果差异较大(杜文梅等, 2023)。因此, 寻找并研发针对亚洲玉米螟的新类型控制剂至关重要。1998 年在秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 中首次描述了双链 RNA 的遗传干扰功能, 并将其命名为 RNA 干扰(Fire *et al.*, 1998)。RNA 干扰(RNAi)技术作为一种调控基因表达水平的方式, 已经成为基因功能研究的关键工具。RNA 生物农药通过干扰或抑制目标生物特定基因的转录和表达, 从而影响其生命活动已展现出巨大的开发和应用潜力, 被认为是一种新型的绿色生物农药(Nwokeoji *et al.*, 2022)。

滞育是昆虫为躲避不利环境条件, 保持个体存活, 维持种群延续而引起的生长发育停止的状态(Denlinger, 2008)。昆虫在感知环境信号(光周期、温度及湿度等)后, 通过改变虫体内激素水平诱导滞育的发生。保幼激素、蜕皮激素和滞育激素是调控昆虫滞育过程中的重要内源性因子(Verma, 2007)。在我国东北地区, 亚洲玉米螟以老熟幼虫进入滞育, 属于兼性滞育昆虫。

研究发现低温-短日照诱导幼虫滞育的发生, 高温-长日照下幼虫能够正常生长发育(刘宁等, 2005)。

保幼激素(Juvenile hormone, JH)是昆虫咽侧体产生并释放的一类倍半萜类化合物(Gilbert *et al.*, 2000), 在调节昆虫生长发育、变态繁殖和滞育等生理过程中起着重要作用(Truman, 2019; Jindra *et al.*, 2021)。保幼激素酸甲基转移酶(Juvenile hormone acid O-methyltransferase, JHAMT)作为 JH 生物合成的限速酶, 其活性直接决定了 JH 的生物合成速率和水平(Zhang *et al.*, 2022)。在果蝇 *Drosophila melanogaster* 中过表达 *JHAMT* 基因可显著减少滞育果蝇的数量(Shinoda and Itoyama, 2003; Noriega, 2014), 而在咽侧体中特异性降低 *JHAMT* 的表达, 可增加滞育果蝇的数量(Ojima *et al.*, 2018)。目前, 已经在多种昆虫中成功克隆鉴定了 *JHAMT* 基因, 包括家蚕 *Bombyx mori* (Shinoda and Itoyama, 2003)、果蝇(Niwa *et al.*, 2008)、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* (Minakuchi *et al.*, 2008)和西方蜜蜂 *Apis mellifera* (Li *et al.*, 2013)等。*JHAMT* 基因的沉默可显著影响昆虫的变态率和死亡率(Minakuchi *et al.*, 2008)。敲除 *JHAMT* 可导致虫体内 JH 滴度下降, 表现出 JH 缺失的各种表型特征。利用 RNAi 技术沉默烟草天蛾 *Manduca sexta* 的 *JHAMT* 基因, 导致 JH 的生物合成速率降低了 82% (Yin *et al.*, 2020)。Guo 等(2018)研究发现当马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 幼虫食用含有 ds*JHAMT* 的植物叶片时, 虫体内 *JHAMT* 基因表达水平显著下调,

成虫的产卵量降低。在华山松大小蠹 *Dendroctonus armandi* 中, 沉默成虫 *JHAMT* 基因可抑制华山松大小蠹诱剂的生物合成, 增加蛹的死亡率和羽化形态异常率, 证实了 *JHAMT* 是华山松大小蠹 JH 合成通路的关键调控酶 (Sun *et al.*, 2022)。

本研究基于前期组装的亚洲玉米螟幼虫滞育转录组测序数据 (NCBI 登录号: PRJNA1030200), 克隆鉴定亚洲玉米螟 *JHAMT* 基因, 明确其不同滞育状态的表达模式, 采用 RNAi 技术揭示该基因在幼虫滞育过程中的生物学功能, 以期评估 *JHAMT* 基因作为亚洲玉米螟防治靶标的潜力, 为开发亚洲玉米螟绿色防治新技术提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试昆虫: 本研究中的亚洲玉米螟种群由中国农业科学院植物保护研究所提供, 采用由麦胚、酵母、卡拉胶、魔芋粉、山梨酸、维生素 C、玉米油、亚油酸配置的人工饲料饲喂, 于 2023 年 6 月在内蒙古民族大学生命科学与食品学院生物科学实验室建立稳定种群。正常生长发育的亚洲玉米螟饲养条件为: 温度 (27 ± 1) °C, 光周期 16 L : 8 D, 相对湿度 $80\%\pm 10\%$ 。滞育诱导下的亚洲玉米螟饲养条件: (20 ± 1) °C, 光周期 12 L : 12 D, 相对湿度 $80\%\pm 10\%$ 。5 龄幼虫连续 7 d 以上未进行取食和活动, 则判定为进入滞育状态。将滞育的 5 龄幼虫置于 4 °C 冰箱中 15 d, 然后转移到 [27 ± 1] °C, 光周期 16 L : 8 D, 相对湿度 $80\%\pm 10\%$ 智能型人工气候箱中, 继续饲养后收集解除滞育的试验样本。

试剂及仪器: Freezol Reagent 总 RNA 提取试剂盒、HiScript[®] III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) 反转录试剂盒、Green Tag Mix, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; T7 RiboMAX[™] Express RNAi System 试剂盒、pGEM-T Easy 连接载体、T4 连接酶, Eastep[®] Gel and PCR Cleanup Kit 试剂盒、美国 Promega 公司; MonAmp[™] SYBR Green qPCR Mix 试剂盒, 莫纳 (苏州) 生物科技有限公司; pMD19-T 载体, 日本 TaKaRa

公司; 大肠杆菌感受态细胞 *Escherichia coli* DH5 α , 天根生化科技 (北京) 有限公司; GeneJET Plasmid Miniprep Kit 试剂盒, 美国赛默飞世尔科技有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。RTOP 智能型人工气候箱, 浙江托普仪器有限公司; TGem Ultra 微量分光光度计, 天根生化科技 (北京) 有限公司; ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪, 美国 Thermo Scientific 公司; My - cycle Thermal Cycle PCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司; 微量进样器, 上海高鸽工贸有限公司。

1.2 方法

1.2.1 亚洲玉米螟 *JHAMT* 基因的克隆 取亚洲玉米螟 5 龄幼虫, 按照 Freezol Reagent 试剂盒说明书提取总 RNA, 使用分光光度计和 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的浓度及完整性。根据 HiScript[®] III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) 反转录试剂盒说明书合成第一链 cDNA。基于本实验室组装的亚洲玉米螟幼虫转录组测序数据 (GeneBank 登录号: PRJNA1030200), 利用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物 *OfJHAMT*-F (5'-ACATGAACAACGCCGAAGTCTACCA-3'), *OfJHAMT*-R (5'-AGTCACATTTGCTCCCGTACACCAC-3'), 扩增候选 *OfJHAMT* 基因的编码序列。所有引物均委托生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。25 μ L RT-PCR 反应体系: cDNA 模板 1 μ L、Green Tag Mix 12.5 μ L、上/下游引物各 1 μ L、ddH₂O 9.5 μ L。RT-PCR 反应程序: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 15 s, 65 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 40 个循环; 72 °C 延伸 10 min。扩增产物使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 将目标条带切胶回收纯化后连接至 pMD19-T 载体上, 将连接产物转化到大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 中, 经过蓝白斑筛选及 PCR 鉴定, 选取阳性克隆菌液委托北京六合华大基因科技有限公司进行测序。使用 DNAMAN 6.0 软件对测序序列与转录组序列进行比对验证。

1.2.2 亚洲玉米螟 *JHAMT* 基因生物信息学分析

利用 ExPASy 在线软件 (<http://www.expasy.org/tools/prot-param.html>) 计算亚洲玉米螟 *JHAMT*

基因编码蛋白质的分子量及等电点; 用 DNAMAN 6.0 软件对亚洲玉米螟 *JHAMT* 基因编码的氨基酸序列与其它昆虫的氨基酸序列进行同源比对。从 NCBI 下载相似度高的不同昆虫 *JHAMT* 氨基酸序列进行系统进化树分析, 利用 MEGA X 软件以邻接法构建系统发育树, Bootstrap 值设为 1 000。

1.2.3 不同滞育状态亚洲玉米螟 *JHAMT* 基因的表达 为明确 *JHAMT* 基因在亚洲玉米螟不同滞育状态的表达模式, 分别收集非滞育, 滞育和解除滞育 3 种状态的 5 龄亚洲玉米螟幼虫各 3 头, 设置 3 个生物学重复。所取样品立即用液氮速冻, 于 -80 °C 冰箱中保存备用。按照 1.2.1 方法提取总 RNA 并合成 cDNA。采用 qPCR 技术分析不同滞育状态亚洲玉米螟 *JHAMT* 基因的表达水平。以亚洲玉米螟 β -actin 为内参基因, 引物为 β -actin-F(5'-CCGTCCTCCTGACCGAGGCTC-3'), β -actin-R(5'-GGTGTGGGAGACACCATCTCCG-3')。利用在线软件 Primer 3 In-put 设计 *JHAMT* 基因 qPCR 引物 *qOfJHAMT*-F(5'-CATGAGTCACAGGAGCCAGA-3'), *qOfJHAMT*-R(5'-ACACGTCTTTTGGCATAGGG-3')。20 μ L qPCR 反应体系: cDNA 模板 2 μ L、上/下游引物各 0.4 μ L、MonAmpTM SYBR Green qPCR Mix 10 μ L, ddH₂O 7.6 μ L。qPCR 反应程序: 95 °C 预变性 10 min, 1 个循环, 95 °C 退火 15 s, 60 °C 延伸 1 min, 40 个循环。溶解曲线: 95 °C 变性 15 s, 65 °C 退火 15 s, 95 °C 延伸 15 s。每个处理设 4 次技术重复。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法 (Livak and Schmittgen, 2001) 计算相对表达量。

1.2.4 亚洲玉米螟 *JHAMT* 基因 RNAi 效应及表型观察 根据 1.2.1 鉴定获得的亚洲玉米螟 *JHAMT* 基因的开放阅读框序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计用于扩增 *OfJHAMT* 基因干扰片段引物 ds*OfJHAMT*-F 和 ds*OfJHAMT*-R 序列, 以绿色荧光蛋白 (Green fluorescent protein, GFP) 基因为对照, 分别在上/下游引物的 5'端加 T7 启动子序列, 合成 dsRNA 片段的引物 ds*OfJHAMT*-F (5'-TAATACGACTCACTATAGGGATCACAAGGACGAGCGGACT-3'), ds*OfJHAMT*-R(5'-TAATACGACTCACTATAGGGGGGTTCACTGCCTG-

AACTG-3'), ds*GFP*-F(5'-TAATACGACTCACTATAGGGGACTTTTTCAAGAGTGCCATGC-3'), ds*GFP*-R(5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGGACCATGTGGTCTCTCTTTTC-3')。以 5 龄亚洲玉米螟幼虫的 cDNA 为模版, 扩增 dsRNA 片段, PCR 扩增体系及程序同 1.2.1。将 PCR 产物回收纯化并连接到 pGEM[®]-T Easy 载体, 进行转化、阳性克隆、测序验证。将含有 T7 启动子序列的目的基因和 *GFP* 片段为模板, 按照 T7 RiboMAXTM Express RNAi System 试剂盒说明书合成 ds*OfJHAMT* 和 ds*GFP*, 将合成的 dsRNA 稀释至 1 000 ng/ μ L 备用。选取发育大小一致的 5 龄亚洲玉米螟滞育幼虫 80 头, 分别显微注射 ds*OfJHAMT* (处理组, 注射 40 头) 和 ds*GFP* (对照组, 注射 40 头), 每头幼虫腹部注射体积为 1 μ L。注射 48 h 后, 每个处理收集幼虫各 3 头, 使用 qPCR 检测 RNA 干扰效率, qPCR 反应体系及程序同 1.2.3。同时, 逐日观察并记录幼虫的滞育、存活及表型的变化 (设置 3 个生物学重复, 每个生物学重复 10 头幼虫), 以明确 *JHAMT* 基因在亚洲玉米螟幼虫滞育及存活中的作用。

1.3 数据分析

采用 SPSS 20.0 软件对数据进行统计分析, 应用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验。使用 GraphPad Prism 9.5.1 软件作图。

2 结果与分析

2.1 亚洲玉米螟 *JHAMT* 基因的鉴定与序列分析

基于亚洲玉米螟幼虫转录组数据筛选注释为 *JHAMT* 的基因序列, 通过 RT-PCR 技术克隆了亚洲玉米螟 *JHAMT* 基因的开放阅读框 (Open-reading frame, ORF), 命名为 *OfJHAMT* (GenBank 登录号: PQ628091), ORF 全长为 948 bp, 编码 315 个氨基酸, 相对分子质量为 36.40 kD, 等电点为 7.64。

2.2 亚洲玉米螟 *OfJHAMT* 序列比对与系统进化分析

将亚洲玉米螟 *OfJHAMT* 的氨基酸序列与其

它昆虫 JHAMT 的氨基酸序列进行同源比对, 结果显示亚洲玉米螟 OfJHAMT 的氨基酸序列与欧洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis* OnJHAMT 的一致性最高, 为 96.51%, 与金凤蝶 *Papilio machaon* PmJHAMT、二化螟 *Chilo suppressalis* CsJHAMT、优红蛱蝶 *Vanessa atalanta* VaJHAMT、夏威夷红蛱蝶 *Vanessa tameamea* VtJHAMT、小红蛱蝶 *Vanessa cardui* VcJHAMT、小蜡螟 *Achroia grisella* AgJHAMT、大蜡螟 *Galleria mellonella* GmJHAMT、

帝王斑蝶 *Danaus plexippus* DpJHAMT、烟草天蛾 *Manduca sexta* MsJHAMT 的一致性分别为 79.57%、61.90%、54.57%、54.50%、54.26%、53.97%、53.97%、52.05% 和 47.54% (图 1)。

系统发育分析结果显示, 亚洲玉米螟 OfJHAMT 与同为螟蛾科野螟属的欧洲玉米螟 JHAMT 亲缘关系最近, 首先聚类为一分支, 置信度为 100%, 然后与二化螟聚类在一大分支, 在一定程度上反映其亲缘关系 (图 2)。

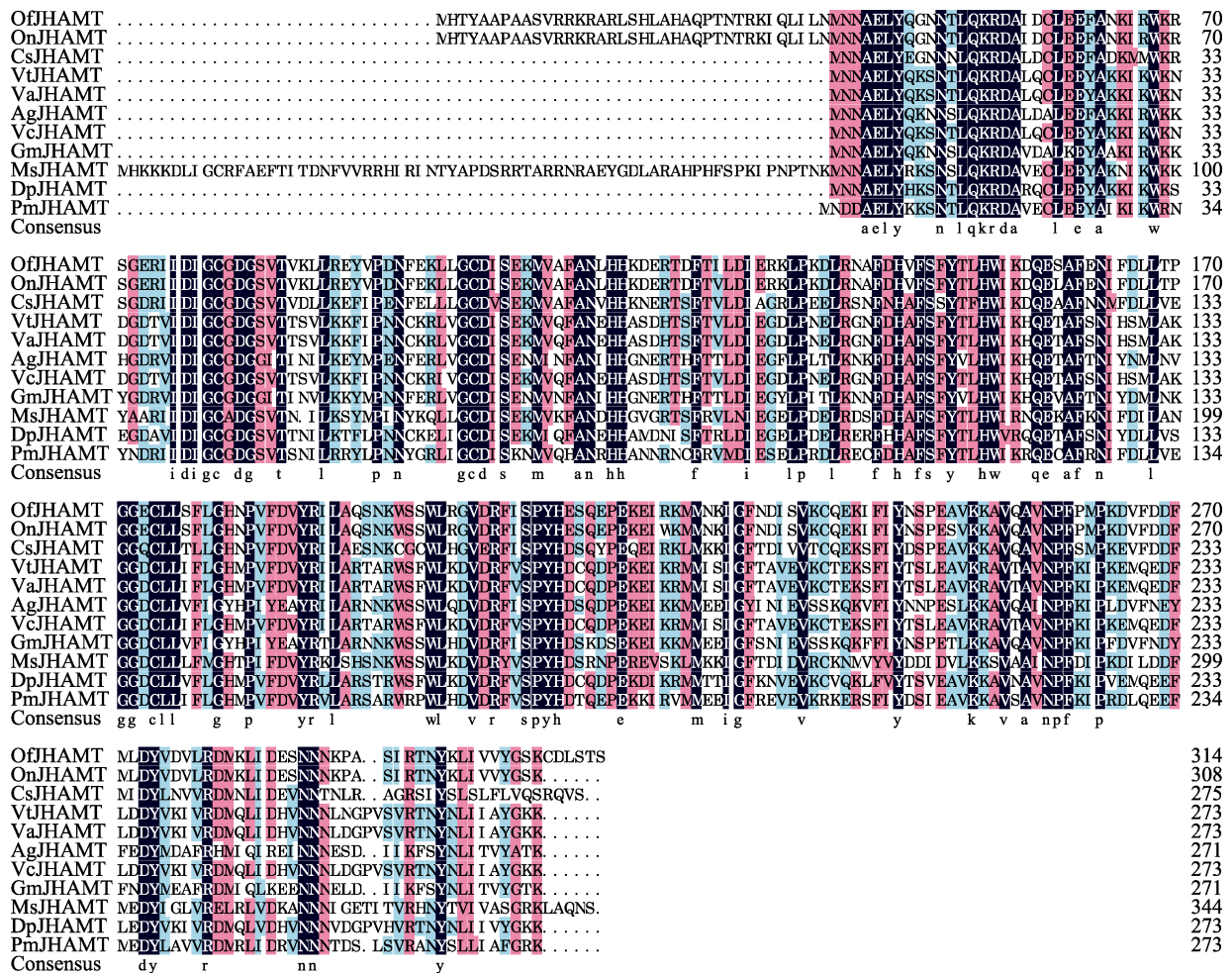


图 1 亚洲玉米螟 OfJHAMT 与其他昆虫 JHAMT 氨基酸序列比对

Fig. 1 Amino acid sequence alignment of *Ostrinia furnacalis* OfJHAMT and other insect JHAMT

Of: 亚洲玉米螟 *O. furnacalis*; On: 欧洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis*; Cs: 二化螟 *Chilo suppressalis*; Vt: 夏威夷红蛱蝶 *Vanessa tameamea*; Va: 优红蛱蝶 *Vanessa atalanta*; Ag: 小蜡螟 *Achroia grisella*; Vc: 小红蛱蝶 *Vanessa cardui*; Gm: 大蜡螟 *Galleria mellonella*; Ms: 烟草天蛾 *Manduca sexta*; Dp: 帝王斑蝶 *Danaus plexippus*; Pm: 金凤蝶 *Papilio machaon*; Consensus: 共有序列。黑色区域: 相似度为 100%; 粉色区域: 75% ≤ 相似度 < 100%; 蓝色区域: 50% ≤ 相似度 < 75%。

Consensus: Consensus sequences; Black area: 100% similarity; Pink area: 75% ≤ similarity < 100%;

Blue area: 50% ≤ similarity < 75%.

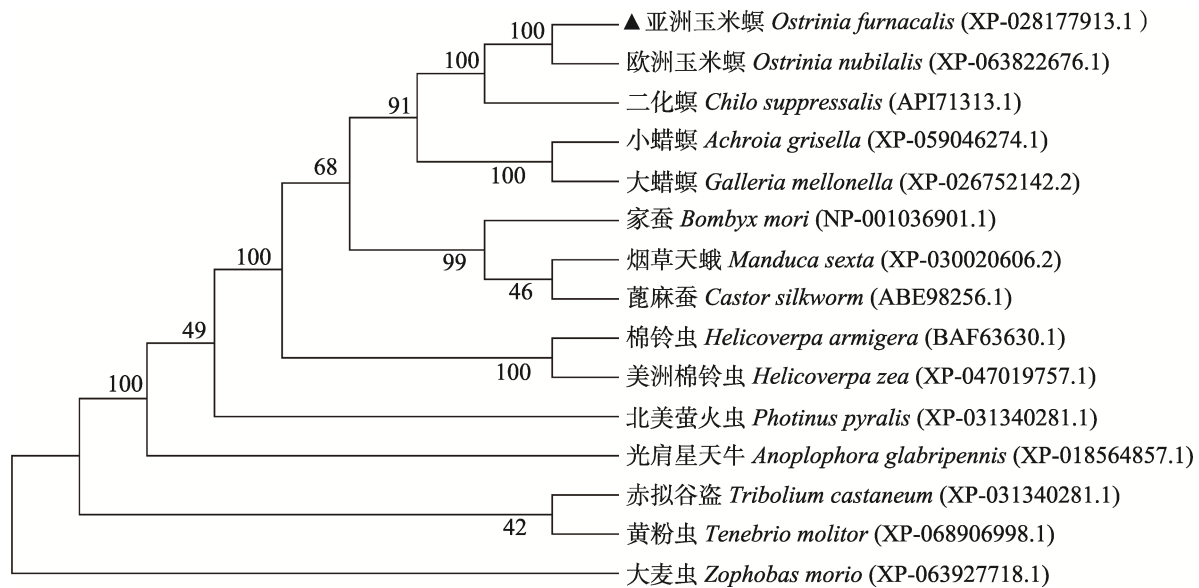
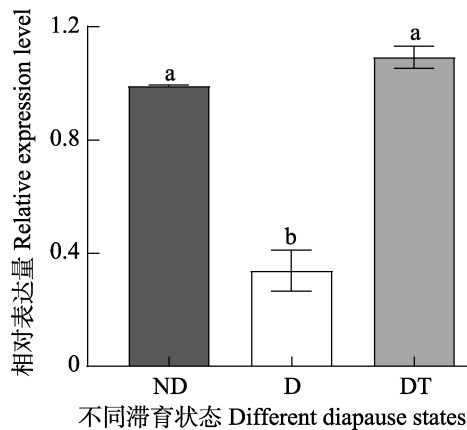


图 2 亚洲玉米螟与其它昆虫 JHAMT 的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree analysis of JHAMT from *Ostrinia furnacalis* and other insect species

2.3 *OfJHAMT* 基因在亚洲玉米螟不同滞育状态下的表达模式

OfJHAMT 基因在亚洲玉米螟的不同滞育状态下均有表达(图 3), 且存在显著差异($P<0.05$)。

图 3 不同滞育状态亚洲玉米螟 *JHAMT* 基因的相对表达量Fig. 3 The relative expression level of the *JHAMT* gene in different diapause states of *Ostrinia furnacalis*

ND: 非滞育; D: 滞育期; DT: 滞育解除。图中数值为平均值 $\pm$ 标准误, 柱上不同小写字母表示差异显著($P<0.05$, Duncan 氏新复极差法检验)。下同。

ND: Non-diapause; D: Diapause; DT: Diapause termination. Data in the figure are mean $\pm$ SE, and different letters above bars indicate significant difference ($P<0.05$, Duncan's multiple range test). The same below.

以非滞育亚洲玉米螟幼虫 *JHAMT* 基因的表达量为对照, 滞育期 *JHAMT* 的相对表达量显著下调($P<0.05$), 下降了 66.18%; 解除滞育后, 相对表达量上升至最高值, 约为非滞育幼虫的 1.09 倍。

2.4 干扰 *OfJHAMT* 对亚洲玉米螟滞育和基因表达的影响

亚洲玉米螟 5 龄滞育幼虫经显微注射 dsRNA 48 h 后, *OfJHAMT* 基因的相对表达量与注射 dsGFP 对照组相比存在极显著差异($P<0.01$), 其相对表达量下调了 86.35% (图 4)。注射 ds*OfJHAMT* 的试验组滞育幼虫表型变化为外表皮颜色变黑, 组织软化、皱缩(图 5: A); 而注射 dsGFP 的对照组幼虫仍保持滞育状态, 体表为正常白色, 生长状况良好(图 5: B)。同时, 注射 ds*OfJHAMT* 试验组滞育幼虫, 多数能够解除滞育, 但不能正常生长发育, 最终化为畸形蛹而死亡(图 6: A-E)。

保幼激素酸甲基转移酶基因对亚洲玉米螟滞育幼虫有显著的影响, 注射 ds*OfJHAMT* 3 d 后, 亚洲玉米螟处理组的滞育率明显低于注射 dsGFP 对照组($P<0.05$), 滞育率下降至 86.67%, 有 13.33% 的幼虫解除滞育, 在注射 ds*OfJHAMT* 第 7 天, 81.67% 的幼虫解除滞育($P<0.001$) (图 7: A)。注射 ds*OfJHAMT* 后第 2 天开始死亡,

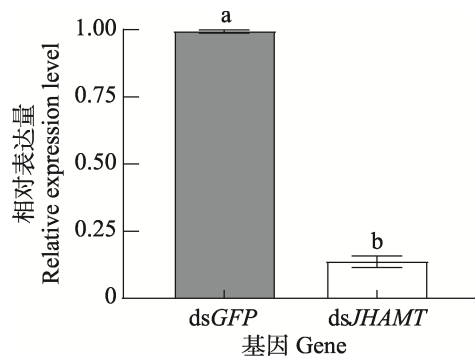


图 4 注射 dsRNA 48 h 后亚洲玉米螟 *OfJHAMT* 基因的相对表达量

Fig. 4 The relative expression level of the *OfJHAMT* gene in *Ostrinia furnacalis* at 48 h after dsRNA injection

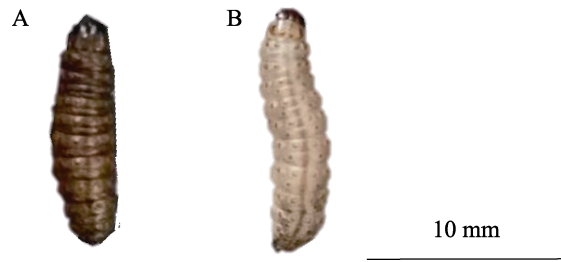


图 5 注射 ds*OfJHAMT* (A) 和 ds*GFP* (B) 后 48 h 亚洲玉米螟 5 龄幼虫表型变化

Fig. 5 The phenotypic changes of 5th instar larvae of *Ostrinia furnacalis* at 48 h after injection of ds*OfJHAMT* (A) and ds*GFP* (B)

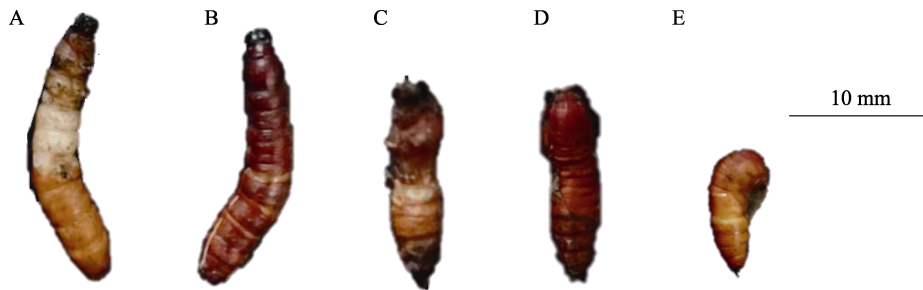


图 6 注射 ds*OfJHAMT* 后亚洲玉米螟 5 龄滞育幼虫解除滞育异常化蛹的表型

Fig. 6 The phenotypic changes in 5th instar diapausing larvae of *Ostrinia furnacalis* that failed to diapause after the injection of ds*OfJHAMT*, leading to the abnormal pupation

图 A-E 为亚洲玉米螟 5 龄幼虫解除滞育后畸形蛹的形态特征。

Figs. A-E show the morphological characteristics of deformed pupae of 5th instar larvae of *O. furnacalis* after diapause termination.

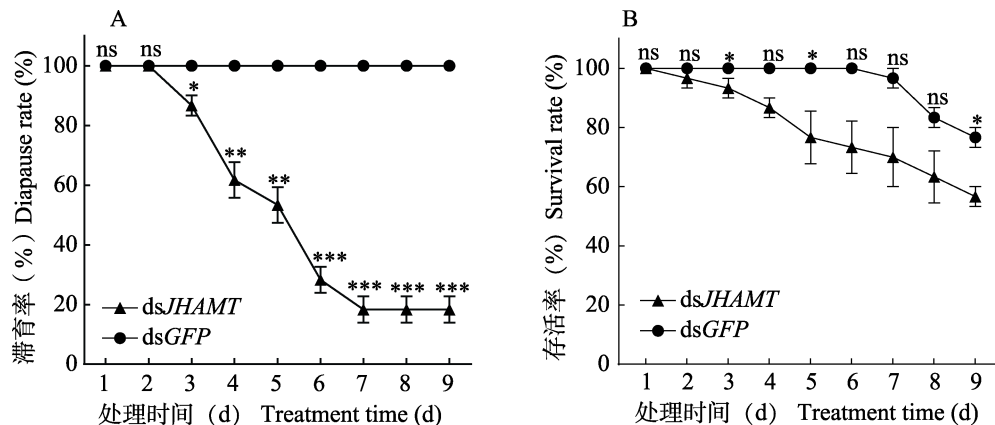


图 7 注射 dsRNA 后亚洲玉米螟幼虫滞育率 (A) 和存活率 (B)

Fig. 7 The diapause rate (A) and survival rate (B) of *Ostrinia furnacalis* larvae after dsRNA injection

图中数据为平均值±标准误; 图中符号表示经 *t* 检验两组间差异显著

(* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; $^{ns} P > 0.05$)。

The data in the figure are mean±SE. The symbol in the figure indicates significant difference between the two groups by *t*-test (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; $^{ns} P > 0.05$).

第 9 天后存活率为 56.67%，这与注射 *dsGFP* 的对照组相比，死亡率增加 20.00%，致死效果明显 ($P < 0.05$) (图 7: B)。

3 讨论

在昆虫的生长发育、变态和繁殖过程中，JH 发挥着至关重要的作用。JHAMT 作为合成 JH 通路的最后一步限速酶，其在昆虫生理活动中的作用至关重要。胜振涛 (2007) 在蓖麻蚕 *Castor silkworm* 中成功克隆了 *JHAMT* 基因，发现 *JHAMT* 与咽侧体合成 JH 能力存在明显的相关性，证实了 JHAMT 是 JH 合成途径上游信号的关键调控酶。Yang 等 (2021) 分析了 *JHAMT* 基因在家蚕中的表达模式，进一步揭示了其在变态发育中的关键调控作用，这对于理解昆虫变态发育的分子机制具有重要意义。在亚洲玉米螟中，我们成功克隆鉴定了 *JHAMT* 基因，并发现其氨基酸序列在不同物种中具有较高的一致性，表明 JHAMT 在进化过程中高度保守，也暗示保幼激素调控机制的功能保守。系统发育分析发现亚洲玉米螟 *JHAMT* 与其他昆虫中的 *JHAMT* 序列同源性较高，与欧洲玉米螟的亲缘关系最近，其次与二化螟聚类到同一大分支，显示出较高的系统发育置信度。

昆虫滞育是一种应对外界不利环境条件而引起的生长发育停滞的生理状态，涉及复杂的分子调控机制 (姜春艳等, 2021)。*JHAMT* 基因在亚洲玉米螟滞育过程中的表达特征表明 *JHAMT* 基因的表达与滞育进程密切关联，可能在滞育过程中发挥重要的调控作用。在九香虫 *Aspongopus chinensis* 的研究中发现，调节 JH 的合成及降解的 *JHAMT* 和 *JHEH* 的表达水平直接影响滞育状态的维持或解除 (周汶桢, 2021)。Tian 等 (2021) 的研究发现，在大猿叶甲 *Colaphellus bowringi* 中，*JHAMT* 基因在长日照诱导的滞育雌性中的表达显著下调。本文研究结果表明，*JHAMT* 基因在亚洲玉米螟 5 龄幼虫滞育期间表达水平较低，推测这可能是因为滞育期间生长发育受阻，导致咽侧体合成保幼激素 (Juvenile hormone, JH) 的能力下降，同时 JH 合成途径的关键调控

酶 JHAMT 的表达水平也相应下调；而在解除滞育后，JHAMT 表达量回升，可能是为了提升虫体内 JH 滴度，为后续的化蛹及羽化等发育过程做准备。

RNAi 技术可以特异性的敲低靶基因的表达水平，被广泛应用于害虫基因功能的研究。利用 RNAi 技术沉默九香虫 *AcJHAMT* 基因可降低九香虫体内 JH 浓度，延缓生殖发育，降低脂肪消耗，并显著延迟了平均交配发生时间，证明其在调控九香虫滞育中起重要作用 (Zhou *et al.*, 2022)。在马铃薯甲虫中，干扰 4 龄幼虫 *LdJHAMT* 表达可导致幼虫死亡率增加，幼虫历期缩短和化蛹率降低 (Fu *et al.*, 2016)。敲除棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 幼虫 *JHAMT* 基因会导致其变态期出现幼虫-蛹的中间体而影响羽化 (Prakash *et al.*, 2017)。本研究中，利用 RNAi 技术抑制亚洲玉米螟滞育幼虫 *OfJHAMT* 的表达可导致其幼虫发育异常。注射 *dsOfJHAMT* 后，*JHAMT* 基因相对表达量显著下调，说明通过注射 *dsOfJHAMT* 能够在亚洲玉米螟虫体内引起强烈的 RNAi 效应。干扰 *OfJHAMT* 的表达，亚洲玉米螟幼虫滞育率明显降低，50% 以上的幼虫能够解除滞育，表明 *OfJHAMT* 的降低会影响亚洲玉米螟 5 龄幼虫滞育状态，使其在滞育的环境条件下依然可以继续发育，但具体的调控功能还需进一步研究。丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis* 的滞育是由母体 *JHAMT* 决定的，*JHAMT* 的 RNAi 干扰降低了血淋巴 JH 的浓度，并诱导丽蝇蛹集金小蜂即使在长日照的情况下也能产生滞育后代 (Mukai *et al.*, 2022)。基于亚洲玉米螟幼虫存活率和致死表型分析，发现 *JHAMT* 对亚洲玉米螟幼虫的致死效率虽然缓慢但致死效应显著，且其与亚洲玉米螟 5 龄幼虫滞育以及解除滞育后的形态建成密切相关。利用 RNAi 技术敲除赤拟谷盗 *T. castaneum* 幼虫 *TcJHAMT1*、*TcJHAMT2* 和 *TcJHAMT3*，发现 *TcJHAMT1* 和 *TcJHAMT2* 的敲除对其幼虫发育没有显著影响，而沉默 *TcJHAMT3* 可导致早熟幼虫提前化蛹 (Minakuchi *et al.*, 2008)，这与我们的研究结果一致。本研究利用多种分子生物学技术在亚洲玉米螟幼虫体内克隆鉴定了 *JHAMT* 基

因, 通过 RNAi 技术进一步证实了 *JHMT* 基因在亚洲玉米螟幼虫滞育过程中的功能, 研究结果可为后续基于 *JHMT* 作为亚洲玉米螟绿色防控的潜在 RNAi 靶标基因奠定基础。接下来, 我们将进一步研究保幼激素通路其他基因在亚洲玉米螟幼虫滞育中的功能, 以便更全面的揭示该虫滞育的分子机制, 为其绿色防控技术提供理论基础。

参考文献 (References)

- Denlinger DL, 2008. Why study diapause. *Entomological Research*, 38: 1–9.
- Du WM, Pang JY, Wang L, Zhang JJ, Ruan CC, 2023. The impact of field release methods of *Trichogramma ostrinae* on the control effect of *Ostrinia furnacalis*. *Chinese Journal of Biological Control*, 39(6): 1275–1281. [杜文梅, 庞佳瑶, 王琳, 张俊杰, 阮长春, 2023. 松毛虫赤眼蜂田间放蜂方法对亚洲玉米螟防治效果的影响. 中国生物防治学报, 39(6): 1275–1281.]
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC, 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669): 806–811.
- Fu KY, Li Q, Zhou LT, Meng QW, Lü FG, Guo WC, Li GQ, 2016. Knockdown of juvenile hormone acid methyl transferase severely affects the performance of *Leptinotarsa decemlineata* (Say) larvae and adults. *Pest Management Science*, 72(6): 1231–1241.
- Gilbert LI, Rybczynski R, Song Q, Mizoguchi A, Morreale R, Smith WA, Matubayashi H, Shionoya M, Nagata S, Kataoka H, 2000. Dynamic regulation of prothoracic gland ecdysteroidogenesis: *Manduca sexta* recombinant prothoracicotropic hormone and brain extracts have identical effects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30(11): 1079–1089.
- Guo WC, Bai C, Wang ZA, Wang P, Fan Q, Mi XX, Wang L, He J, Pang JH, Luo XL, Fu WD, Tian YC, Si HJ, Zhang GL, Wu JH, 2018. Double-stranded RNAs high-efficiently protect transgenic potato from *Leptinotarsa decemlineata* by disrupting juvenile hormone biosynthesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(45): 11990–11999.
- Jiang CY, Wu Q, Yang NW, Huang C, Liu WX, Qian WQ, Wan FH, 2021. Molecular regulatory mechanisms of diapause induction in insects. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 58(1): 1–13. [姜春艳, 武强, 杨念婉, 黄聪, 刘万学, 钱万强, 万方浩, 2021. 昆虫滞育诱导的分子调控机制. 应用昆虫学报, 58(1): 1–13.]
- Jindra M, McKinstry WJ, Nebl T, Bittova L, Ren B, Shaw J, Phan T, Lu L, Low JKK, MacKay JP, Sparrow LG, Lovrecek GO, Hill RJ, 2021. Purification of an insect juvenile hormone receptor complex enables insights into its post-translational phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 297(6): 101387.
- Li LH, Wang HB, Liang P, 2024. Research progress of RNA pesticides. *Journal of Pesticide Science*, 23(4): 13–21. [李琳红, 王海宝, 梁沛, 2024. RNA 杀虫剂研究进展. 现代农药, 23(4): 13–21.]
- Li N, Wen LP, Wang ZY, 2005. The Photoperiod and Temperature Effects on the Diapause Induction of Different Geographical Populations of the Asian Corn Borer. Beijing: China Agricultural Science and Technology Publishing House. 245–258. [刘宁, 文丽萍, 王振营, 2005. 光周期和温度对亚洲玉米螟不同地理种群的滞育诱导作用. 北京: 中国农业科学技术出版社. 245–258.]
- Li WF, Huang ZY, Liu F, Li ZG, Yan LM, Zhang SW, Chen SL, Zhong BX, Su SK, 2013. Molecular cloning and characterization of juvenile hormone acid methyltransferase in the honey bee, *Apis mellifera*, and its differential expression during caste differentiation. *PLoS ONE*, 8(7): e68544.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Minakuchi C, Namiki T, Yoshiyama M, Shinoda T, 2008. RNAi-mediated knockdown of juvenile hormone acid O-methyltransferase gene causes precocious metamorphosis in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *The FEBS Journal*, 275(11): 2919–2931.
- Mukai A, Mano G, Des Marteaux L, Shinada T, Goto SG, 2022. Juvenile hormone as a causal factor for maternal regulation of diapause in a wasp. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 144: 103758.
- Niwa R, Niimi T, Honda N, Yoshiyama M, Itoyama K, Kataoka H, Shinoda T, 2008. Juvenile hormone acid O-methyltransferase in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(7): 714–720.
- Noriega FG, 2014. Juvenile hormone biosynthesis in insects: What is new, what do we know, and what questions remain? *International Scholarly Research Notices*, 2014: 967361.
- Nwokeoji AO, Nwokeoji EA, Chou T, Togola A, 2022. A novel sustainable platform for scaled manufacturing of double-stranded RNA biopesticides. *Bioresources and Bioprocessing*, 9(1): 107.
- Ojima N, Hara Y, Ito H, Yamamoto D, 2018. Genetic dissection of stress-induced reproductive arrest in *Drosophila melanogaster* females. *PLoS Genetics*, 14(6): e1007434.
- Prakash M N, Maligeppagol M, Asokan R, Krishna V, Sharath

- Chandra G, Prasad Babu K, Latha J, Krishna Kumar NK, Ellango R, 2017. Transgenic tomato expressing dsRNA of juvenile hormone acid O-methyl transferase gene of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) affects larval growth and its development. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 20(2): 559–567.
- Sheng ZT, 2007. Molecular and enzymatic mechanisms of the pharate-adult CA reactivation in *Samia cynthia ricini*. Doctor dissertation. Shanghai: University of Chinese Academy of Sciences (Shanghai Institutes for Biological Sciences). [胜振涛, 2007. 蓖麻蚕预成虫咽侧体复活的分子和酶学机理研究. 博士学位论文. 上海: 中国科学院研究生院(上海生命科学研究院).]
- 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.
- Sun YY, Fu DY, Liu B, Wang LJ, Chen H, 2022. Functional characterization of allatostatin C (PISCF/AST) and juvenile hormone acid O-methyltransferase in *Dendroctonus armandi*. *International Journal Molecular Sciences*, 23(5): 2749.
- Tian Z, Guo S, Li JX, Zhu F, Liu W, Wang XP, 2021. Juvenile hormone biosynthetic genes are critical for regulating reproductive diapause in the cabbage beetle. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 139: 103654.
- Truman JW, 2019. The evolution of insect metamorphosis. *Current Biology*, 29(23): R1252–R1268.
- Verma KK, 2007. Polyphenism in insects and the juvenile hormone. *Journal of Biosciences*, 32(2): 415–420.
- Wei J, 2013. Asian corn borer control techniques in northern Anhui region. *Agricultural Technology Services*, 30(4): 352–353. [魏杰, 2013. 皖北地区亚洲玉米螟防治技术. 农技服务, 30(4): 352–353.]
- Yang ZM, Wu Y, Li FF, Zhou ZJ, Yu N, Liu ZW, 2021. Genomic identification and functional analysis of JHAMTs in the pond wolf spider, *Pardosa pseudoannulata*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21): 11721.
- Yin Y, Qiu YW, Huang J, Tobe SS, Chen SS, Kai ZP, 2020. Enzymes in the juvenile hormone biosynthetic pathway can be potential targets for pest control. *Pest Management Science*, 76(3): 1071–1077.
- Zhang L, Xu HY, Zhang YS, Zhang H, Wang Z, Guo PC, Zhao P, 2022. Structural characterization and functional analysis of juvenile hormone acid methyltransferase JHAMT3 from the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 151: 103863.
- Zhou WZ, Wu YF, Yin ZY, Guo JJ, Li HY, 2022. Juvenile hormone is an important factor in regulating *Aspongopus chinensis* Dallas diapause. *Frontiers in Physiology*, 13: 873580.
- Zhou WZ, 2021. Effects of JHEH and JHAMT expression changes on the diapause of *Aspongopus chinensis* Dallas. Marster dissertation. Guiyang: Guizhou University. [周汶桢, 2021. JHEH 和 JHAMT 表达变化对九香虫滞育影响. 硕士毕业论文. 贵阳: 贵州大学.]