小地老虎 *AiJHAMT2* 基因的分子特征及其生物学功能分析*

贾书静[1**] 邢嘉琪[1**] 余佳敏[1, 2] 江连强[3] 邓 全[3]
马 鹏[3] 刘东阳[3***] 张宇星[1] 李茂业[1] 刘 苏[1***]

（1. 安徽农业大学植物保护学院，农产品质量与生物安全教育部重点实验室，合肥 230036；2. 中国烟草总公司四川省公司，四川省烟草科学研究所，成都 610041；3. 四川省烟草公司凉山州公司，西昌 615000）

摘 要 **【目的】** 鉴定小地老虎 *Agrotis ipsilon* 保幼激素酸甲基转移酶（Juvenile hormone acid *O*-methyltransferase）*AiJHAMT2* 基因，解析其序列特征，并明确其生物学功能。**【方法】** 利用同源检索技术从小地老虎转录组中鉴定 *AiJHAMT2* 的 cDNA 序列，使用生物信息学软件分析其序列特征，通过 RNA 干扰技术沉默 *AiJHAMT2*，分析小地老虎幼虫保幼激素滴度、存活率、体长、体重、化蛹率和羽化率的变化。**【结果】** *AiJHAMT2* 的开放阅读框为 855 bp，其编码的蛋白质具有昆虫 JHAMT 的典型特征，包括 S-腺苷甲硫氨酸结合域以及 11 个能够与底物发生互作的氨基酸残基。*AiJHAMT2* 基因位于小地老虎 12 号染色体，在基因组上的长度为 5 673 bp，包含 4 个外显子和 3 个内含子。系统进化分析结果表明 AiJHAMT2 与东方粘虫 *Mythimna separata* MsJHAMT2 进化关系最近。向小地老虎 3 龄幼虫注射靶向 *AiJHAMT2* 的双链 RNA 能够有效沉默该基因，注射后 24 和 48 h 时，*AiJHAMT2* 表达水平与对照组相比分别显著下降了 74.0%（P=0.026）和 76.6%（P=0.008），而 *AiJHAMT1* 表达水平在注射后 48 h 时显著上升至对照组的 2.21 倍（P=0.009）。沉默 *AiJHAMT2* 后，幼虫保幼激素滴度显著下降了 46.4%（P=0.020），幼虫存活率、体长、体重和化蛹率分别显著降低了 28.1%（P<0.001）、31.7%（P=0.007）、36.3%（P=0.002）和 35.2%（P<0.001），但沉默 *AiJHAMT2* 未对小地老虎羽化率产生显著影响（P=0.252）。**【结论】** 沉默 *AiJHAMT2* 显著降低小地老虎幼虫存活率并阻碍其生长和化蛹，表明该基因具有作为 RNA 干扰靶标用于小地老虎防治的潜力。

关键词 小地老虎；保幼激素酸甲基转移酶；序列分析；基因沉默；生长发育

Molecular characterization and biological function of the *Agrotis ipsilon AiJHAMT2* gene

JIA Shu-Jing[1**] XING Jia-Qi[1**] YU Jia-Min[1, 2] JIANG Lian-Qiang[3] DENG Quan[3]
MA Peng[3] LIU Dong-Yang[3***] ZHANG Yu-Xing[1] LI Mao-Ye[1] LIU Su[1***]

(1. Key Laboratory of Agri-products Quality and Biosafety, Ministry of Education, School of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 2. Sichuan Tobacco Science Institute, Sichuan Branch of China National Tobacco Corporation, Chengdu 610041, China; 3. Liangshan Branch of Sichuan Tobacco Corporation, Xichang 615000, China)

Abstract **[Aim]** To identify the *AiJHAMT2* gene in *Agrotis ipsilon*, analyze its sequence characteristics and clarify of its biological functions. **[Methods]** The cDNA sequence of *AiJHAMT2* was identified from the *A. ipsilon* transcriptome using a homology search method. The sequence characteristics of *AiJHAMT2* were analyzed using bioinformatic software. *AiJHAMT2* was silenced with RNA interference technology and subsequent changes in juvenile hormone (JH) titer, larval survival rate, body length, body weight, and pupation, and emergence rates, were assessed. **[Results]** *AiJHAMT2* contained an open

*资助项目 Supported projects：国家自然科学基金（32572808）；中国烟草总公司四川省公司科技项目（SCYC202410，SCYC202519，SCYC202112）；安徽农业大学“优才计划”学生发展支持项目（202521）；安徽省大学生创新创业训练计划（S202510364134）

**共同第一作者 Co-first authors，E-mail：1550730113@qq.com；3226747633@qq.com

***共同通讯作者 Co-corresponding authors，E-mail：wwwldy@163.com；suliu@ahau.edu.cn

收稿日期 Received：2025-07-08；接受日期 Accepted：2025-11-20

reading frame of 855 bp. The protein encoded by *AiJHAMT2* possessed features typical of other insect JHAMTs, including a S-adenosyl methionine-binding motif and 11 conserved substrate-interacting residues. The *AiJHAMT2* gene was localized on chromosome 12, and its genomic sequence spans 5 673 bp, comprising four exons and three introns. Phylogenetic analysis revealed that AiJHAMT2 is most closely related to *Mythimna separata* MsJHAMT2. Injection with double-stranded RNA (dsRNA) targeting *AiJHAMT2* effectively silenced the gene in 3rd instar larvae. Expression of *AiJHAMT2* significantly decreased by 74.0% (P=0.026) and 76.6% (P=0.008), respectively, 24 and 48 h post-injection compared to the control group, whereas expression of *AiJHAMT1* significantly increased by 2.21-fold compared to the control group 48 h post-injection (P=0.009). Silencing *AiJHAMT2* significant reduced the JH titer of larvae by 46.4% (P=0.020). This also significantly reduced larval survival rate, body length, body weight, and pupation rate by 28.1% (P<0.001), 31.7% (P=0.007), 36.3% (P=0.002), and 35.2% (P<0.001), respectively. However, silencing *AiJHAMT2* had no significant effect on the emergence rate (P=0.252). **[Conclusion]** Silencing *AiJHAMT2* significantly reduced larval survival rate and impaired larval growth and pupation, demonstrating that this gene is a potential RNAi target for controlling *A. ipsilon*.

Key words *Agrotis ipsilon*; JHAMT; sequence analysis; gene silencing; growth and development

保幼激素（Juvenile hormone，JH）是昆虫一种重要的倍半萜类激素，该激素由昆虫咽侧体合成并释放到血淋巴中，与其他激素共同调控昆虫的生长发育（何倩毓等，2017；Li *et al.*，2019b）。昆虫保幼激素的生物合成包含多个步骤，其中最重要的一步是保幼激素酸甲基转移酶（Juvenile hormone acid *O*-methyltransferase，JHAMT）催化保幼激素酸的甲基化（Smykal and Dolezel，2023）。因此，JHAMT 在保幼激素合成及昆虫生长发育中发挥关键作用。首个昆虫的 JHAMT 发现于家蚕 *Bombyx mori*，体外实验证明该蛋白能够将 S-腺苷甲硫氨酸（S-adenosyl methionine，SAM）的甲基转移到保幼激素酸的羧基上，从而合成具有活性的保幼激素（Shinoda and Itoyama，2003）。此后，从黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 和赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 等昆虫中陆续鉴定了 *JHAMT* 基因，并证明了 *JHAMT* 参与昆虫生长、发育和生殖等重要生理过程（Minakuchi *et al.*，2008；Niwa *et al.*，2008；Ekert *et al.*，2014）。昆虫间的 *JHAMT* 基因数量存在显著差异（Smykal and Dolezel，2023），如黑腹果蝇基因组中只有 1 个 *JHAMT*，而赤拟谷盗和家蚕分别有 3 和 6 个 *JHAMT*（Minakuchi *et al.*，2008；Niwa *et al.*，2008；Guo *et al.*，2021）。在赤拟谷盗中的研究发现，只有 TcJHAMT3 能够特异性催化保幼激素酸的甲基化，而 TcJHAMT1 和 TcJHAMT2 均无此功能，表明不同 *JHAMT* 基因在功能上存在分化（Minakuchi *et al.*，2008）。

鉴于 *JHAMT* 对于昆虫极为重要，加之脊椎动物中不存在其同源基因，*JHAMT* 被认为是有效的靶标分子，可用于开发基于 RNA 干扰（RNA interference，RNAi）的害虫防治技术（Lu and Shen，2024）。例如，Fu 等（2016）通过饲喂双链 RNA（Double-stranded RNA，dsRNA）沉默马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 的 *JHAMT* 后，幼虫生长发育受阻，化蛹率和成虫羽化率显著降低，雌成虫产卵量也显著减少。Guo 等（2018）在此基础上构建了转基因马铃薯植株，使之表达靶向马铃薯甲虫 *JHAMT* 的 dsRNA，大田试验结果证明马铃薯甲虫取食这些植株后，其种群数量持续下降。还有学者将靶向棉铃虫 *Helicoverpa armigera JHAMT* 的 dsRNA 与纳米载体结合并喷洒到作物叶片上，棉铃虫幼虫取食后大量死亡，并且这种 dsRNA 纳米载体复合物对非靶标昆虫没有明显影响（Kolge *et al.*，2021）。

小地老虎 *Agrotis ipsilon*（鳞翅目，夜蛾科）是世界性分布的重要农业害虫（Liu *et al.*，2015）。在我国，小地老虎幼虫能够为害多种粮食和经济作物，如玉米、小麦、棉花、烟草和多种蔬菜等，严重影响作物产量和品质（陈建明等，2004）。长期以来，防治小地老虎主要依赖化学杀虫剂（Liu *et al.*，2023）。然而，长期使用此类药剂已经导致部分地区的小地老虎对药剂的敏感性明显降低（于伟丽等，2012；武海斌等，2013）。

更为严重的是，滥用化学杀虫剂会杀伤天敌和非靶标生物，还会污染农田环境，不利于我国农业高质量可持续发展和生态文明建设。因此，亟需开发针对小地老虎的环境友好型治理措施。针对小地老虎关键基因的 RNAi 已有一些报道，如沉默液泡膜质子转运 ATP 酶（Vacuolar-type H^+-ATPase）基因抑制小地老虎幼虫生长发育（Li *et al.*，2019），沉默几丁质酶（Chitinase）基因使小地老虎幼虫蜕皮和化蛹受阻（Li *et al.*，2022），表明 RNAi 在小地老虎无公害治理中具有良好的应用前景。

在前期研究中，我们鉴定了小地老虎 *JHAMT1* 基因，发现沉默该基因会导致小地老虎幼虫死亡率显著增加，化蛹率显著降低（Zhang *et al.*，2025）。本研究鉴定了小地老虎第 2 个 *JHAMT* 基因（命名为 *AiJHAMT2*），对该基因的分子特征进行分析，重点探究沉默该基因对小地老虎生长发育的影响，以期明确 *AiJHAMT2* 的生物学功能。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

小地老虎幼虫采集自四川省凉山彝族自治州盐源县烟田，在人工气候室中经 10 代以上继代饲养。幼虫饲喂人工饲料（Zhou *et al.*，2021），成虫供给 10%（v/v）蜂蜜水溶液，整个饲养过程中，小地老虎未接触任何杀虫剂和 dsRNA。饲养条件为：温度（26±1）℃，相对湿度 65%±2%，光周期 14 L∶10 D。

1.2 RNA 提取和第 1 链 cDNA 合成

使用 RNAiso Plus 试剂（货号：9108，宝日医，北京）提取小地老虎总 RNA，并使用 Hifair Ⅲ 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR（货号：11141ES60，翌圣生物，上海）将总 RNA 反转录为第 1 链 cDNA。各项试验均依据产品说明书进行操作。

1.3 *AiJHAMT2* 鉴定、克隆与序列分析

以家蚕 BmJHAMT1 的氨基酸序列（Shinoda and Itoyama，2003）作为查询模板，使用 BioEdit 软件中的 TBLASTN 程序，从小地老虎转录组（Jin *et al.*，2023）中检索 *AiJHAMT2* 的 cDNA 序列，使用 ORF finder 程序（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/）预测其开放阅读框（Open reading frame，ORF）。根据检索结果设计引物（表 1），以小地老虎第 1 链 cDNA 为模板，对 *AiJHAMT2* 的 ORF 进行 PCR 扩增。产物与 pMD-18T 载体（货号：6011，宝日医，北京）连接后，转化大肠杆菌 Trans5α 感受态细胞（货号：CD201，全式金，北京），送通用生物（安徽）股份有限公司测序。利用 ExPASy 程序（http://web.expasy.org/compute_pi/）计算 *AiJHAMT2* 编码蛋白质的理论分子量和等电点，使用 SignalP 程序（https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/）和 TMHMM 程序（https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/）分别预测分泌信号肽和跨膜区。通过 Clustal Omega 程序（https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo）完成多序列比对。*AiJHAMT2* 和 *AiJHAMT1* 的基因组定位和外显子/内含子结构分析由 Splign 程序（https://www.st-va.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/splign/splign.cgi）完成。使用 MEGA11 软件，基于邻接法（Neighbor-joining method）构建进化树，各分支置信度经过 1 000 次 Bootstrap 重复检验。

1.4 dsRNA 合成与注射

因 *AiJHAMT2* 与此前鉴定的 *AiJHAMT1*（Zhang *et al.*，2025）为同源基因（核苷酸序列一致性 60.5%），为防止 dsRNA 脱靶，先将 *AiJHAMT2* 与 *AiJHAMT1* 的 cDNA 序列进行联配分析，再根据 Chen 等（2021）报道的脱靶阈值选择低于该阈值的区域（连续匹配的碱基数少于 15 bp）设计 dsRNA。在引物上引入 T7 启动子序列（表 1），对小地老虎第 1 链 cDNA 进行扩增，得到 283 bp 的 *AiJHAMT2* 片段。同样，对 pEGFP-N1 载体（货号：6085-1，Clontech，美国）进行扩增，获得 440 bp 的绿色荧光蛋白（Green fluorescent protein，GFP）基因片段。2

表 1　本研究使用的引物
Table 1　Primers used in this study

引物 Primer	序列（5′-3′） Sequence (5′-3′)	产物长度（bp） Product size (bp)	扩增效率（%） Amplification efficiency (%)	目的 Purpose
AiJHAMT2-F	ATGAATAACGCCGTGTTGT	855	/	ORF 克隆 ORF cloning
AiJHAMT2-R	TCAGTCTTGCTTGTTGAG			
AiJHAMT2-ds-F	TAATACGACTCACTATAGGGGAACCAGAAAAAGTTGTTG	283	/	dsRNA 合成 dsRNA synthesis
AiJHAMT2-ds-R	TAATACGACTCACTATAGGGCTGGCTTCCTGGCGTATA			
GFP-ds-F	TAATACGACTCACTATAGGGGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCAC	440	/	
GFP-ds-R	TAATACGACTCACTATAGGGTTGTATAGTTCATCCATGCCA			
AiJHAMT1-q-F	ATGGCAGCGTGACCGTC	212	92	定量 PCR qPCR
AiJHAMT1-q-R	CCAATGTAAAGCGTAAAAAGAG			
AiJHAMT2-q-F	CGTCACTAACATGCTGAAG	149	93	
AiJHAMT2-q-R	CAGGAACATCTCCCTCGATG			
RPS3-q-F	AAGTCCATGAAGTTCGTA	103	92	
RPS3-q-R	GTACTCCTTGTCTTAGCA			
β-actin-q-F	GATGTTGACATTCGTAAG	131	96	
β-actin-q-R	ATCTTGATCTTCATTGTG			

下划线为 T7 RNA 聚合酶启动子序列。
The underlined sequence indicates T7 RNA polymerase promoter.

个片段经凝胶电泳分离后，使用 AxyPrep 凝胶回收试剂盒（货号：AP-GX-50，康宁生命科学，吴江）进行回收，以此为模板，利用 MEGAscript T7 体外转录试剂盒（货号：AM1333，Thermo Scientific，美国）合成 ds*AiJHAMT2* 和 ds*GFP*，再用无 RNase 的水将两者均稀释至 2 μg·μL^{-1}。选取体型大小一致的小地老虎 3 龄第 2 天幼虫，使用 Nanoject Ⅱ型注射仪（Drummond Scientific，美国）进行 dsRNA 注射，每头幼虫注射 0.5 μL（1 μg）ds*AiJHAMT2* 或 ds*GFP*。注射后，将幼虫转移至 6 孔板中（提前放置人工饲料），每孔 1 头幼虫。注射后 24 和 48 h 时（48 h 时幼虫均进入 4 龄），从处理组（注射 ds*AiJHAMT2*）和对照组（注射 ds*GFP*）随机选取幼虫，检测 *AiJHAMT2* 基因的表达水平（步骤见 1.5 节），并检测注射后 48 h 时幼虫 *AiJHAMT1* 的表达水平以及保幼激素滴度（见 1.6 节）。

1.5　*AiJHAMT2* 表达水平检测

使用 1.2 节的方法提取小地老虎幼虫总 RNA，并反转录为第 1 链 cDNA。所用引物见表 1，以小地老虎肌动蛋白（*β-actin*）和核糖体蛋白 S3 基因（*Ribosomal protein S3*，*RpS3*）为内参（杨浩岚等，2024）。反应总体积为 20 μL，包含 Hieff qPCR SYBR Green Master Mix（货号：11201ES08，翌圣生物，上海）10 μL，上游和下游引物各 0.4 μL，第 1 链 cDNA 模板 1 μL（20 ng），其余由超纯水补足至 8.2 μL。将配制的反应液分装于 96 孔板中，置于 CFX96 型实时荧光定量 PCR 仪（Bio-Rad，美国）中进行扩增，热循环程序为：95 ℃ 30 s，1 个循环；95 ℃ 5 s，60 ℃ 30 s，40 个循环。反应结束后，以 60 ℃到 95 ℃的升温梯度进行熔解曲线分析，以评估引物的特异性。为检测潜在的样品污染，每个 96 孔板均包括无模板的对照以及无核酸酶的对照。试验设置 3 次生物学重复，每个重复包含 15 头幼虫，使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析相对表达量。

1.6　保幼激素滴度检测

将小地老虎幼虫置于 1 mmol·L^{-1} 磷酸盐缓

冲液（Phosphate-buffered saline，PBS，pH=7.4）中，在冰上充分匀浆，匀浆液在 4 ℃下经过 12 000 r/min 离心后，将上清液转移到新的离心管中，使用昆虫保幼激素Ⅲ酶联免疫分析试剂盒（货号：LB4799B，力博瑞生物，武汉）检测上清液中的保幼激素Ⅲ滴度。该试剂盒利用偶联了辣根过氧化物酶的抗体捕获保幼激素Ⅲ，再通过四甲基联苯胺显色光度法检测辣根过氧化物酶的活性，最终得到保幼激素III滴度。反应液吸光值的读取在 Multiskan GO 型酶标仪（Thermo Scientific，美国）上进行，试验设置 3 次生物学重复，每个重复包含 15 头幼虫。

1.7 生物测定

注射 ds*AiJHAMT2* 和 ds*GFP* 后，将幼虫转移至 6 孔板中，每孔 1 头，每 24 h 更换 1 次新鲜的人工饲料。每天记录 1 次幼虫存活数（用昆虫针轻刺虫体 3 次，完全不动者视为死亡），计算存活率。注射后第 9 天，使用直尺记录幼虫的体长，使用 ME203E 型分析天平（梅特勒托利多，瑞士）测量幼虫体重，同时观察其表型变化。存活的幼虫化蛹后，统计蛹的数量及羽化的成虫数量，计算化蛹率和羽化率。实验设置 3 次生物学重复，每个重复包含 48 头幼虫。计算公式如下：

存活率=（存活幼虫数/初始幼虫数）×100%，

化蛹率=（蛹数/第 9 天存活的幼虫数）×100%，

羽化率=（羽化成虫数/蛹数）×100%。

1.8 数据分析

使用 WPS Office 2019 版软件计算幼虫存活率、化蛹率和羽化率，使用 DPS v19.05 版软件进行统计分析，两组样本间的差异显著性通过学生氏 *t* 检验进行比较，多组样本之间的差异显著性通过单因素方差分析（One-way ANOVA）和 Tukey's HSD 法进行评估。

2 结果与分析

2.1 *AiJHAMT2* 序列分析

通过转录组检索、基因克隆和测序验证，获得了 *AiJHAMT2* 的 cDNA 序列（GenBank 登录号：PQ063874）。该序列包含 855 bp 的 ORF，编码由 284 个氨基酸残基组成的蛋白质。AiJHAMT2 蛋白的理论分子量和等电点分别为 33.4 kD 和 5.9。经软件预测，AiJHAMT2 蛋白不含分泌信号肽与跨膜区，推测其定位于胞质。多序列联配结果显示，AiJHAMT2 具有昆虫 JHAMT 的典型特征，包括由 8 个氨基酸构成的 SAM 结合结构域以及 11 个能够与底物发生互作的氨基酸残基（图 1）。

通过分析小地老虎基因组，发现 *AiJHAMT2* 在基因组上的长度为 5 673 bp，并且 *AiJHAMT2* 和先前鉴定的 *AiJHAMT1* 共同位于 12 号染色体上，两者在基因组中相距 8 081 bp（图 2：A）。2 个基因均由 4 个外显子和 3 个内含子组成（图 2：B），内含子的插入位置边界均符合"GT-AG"规则（结果未显示）。此外，*AiJHAMT1* 和 *AiJHAMT2* 均具有保守的内含子插入位点，第 1 个和第 3 个内含子插入在编码同一个氨基酸的密码子内部，而第 2 个内含子插入在编码两个氨基酸的密码子之间（图 2：C）。基于 31 种昆虫的 45 个 JHAMT 蛋白序列构建了系统发育树，结果表明，来自同一目昆虫的 JHAMT 聚在同一进化分支上，AiJHAMT2 位于鳞翅目分支，且与东方粘虫 *Mythimna separata* MsJHAMT2 亲缘关系最近（图 3）。

2.2 *AiJHAMT2* 沉默效果分析

向小地老虎幼虫注射 ds*AiJHAMT2*，通过实时荧光定量 PCR 分析靶标基因沉默情况。结果显示，注射后 24 和 48 h 时，与对照组（注射 ds*GFP*）相比，小地老虎幼虫 *AiJHAMT2* 的表达水平下降了 74.0%和 76.6%，均显著低于对照组的表达水平（24 h：t=3.42，P=0.026；48 h：t=4.88，P=0.008），表明 *AiJHAMT2* 被成功沉默（图 4：A）。注射 ds*AiJHAMT2* 后 48 h 时，*AiJHAMT1* 表达水平显著上升至对照组的 2.21 倍（t=4.69，P=0.009）（图 4：B）。注射 ds*AiJHAMT2* 后 48 h 时，小地老虎幼虫保幼激素III滴度显著降低了 46.4%（t=3.75，P=0.020）（图 4：C）。

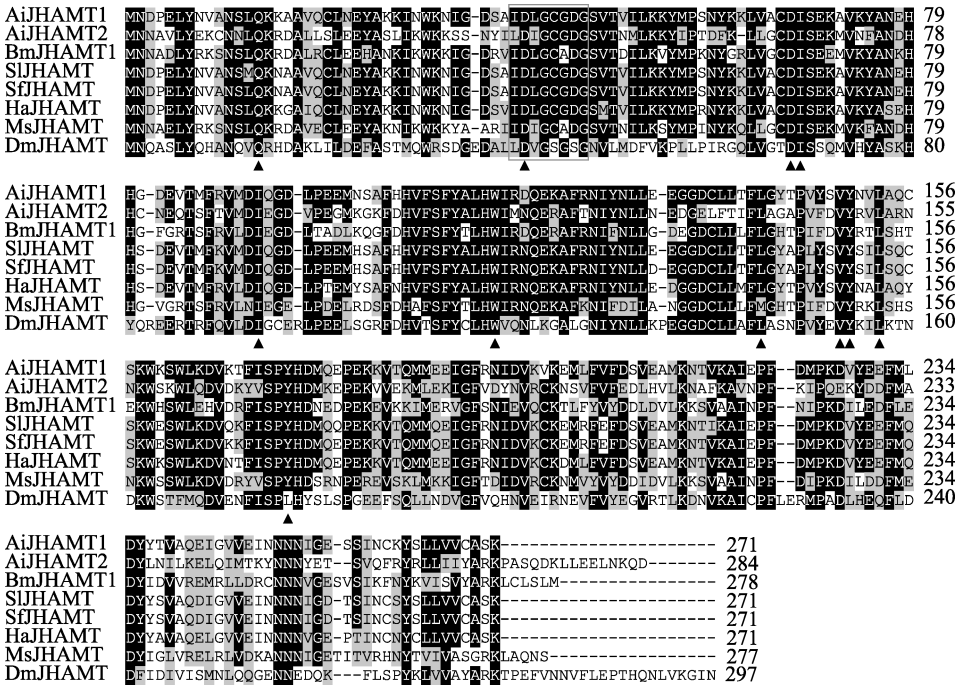


图 1　小地老虎 AiJHAMT2 与其他昆虫 JHAMTs 序列联配

Fig. 1　Sequence alignment of *Agrotis ipsilon* AiJHAMT2 with JHAMTs from other insect species

S-腺苷甲硫氨酸结合域以灰色方框表示，与底物互作的 11 个氨基酸残基以三角形表示。Ai：小地老虎（AiJHAMT1，PQ063873；AiJHAMT2，PQ063874），Bm：家蚕（AB113578），Sl：斜纹夜蛾（XM_022959200），Sf：草地贪夜蛾（XM_035578501），Ha：棉铃虫（XM_021326702），Ms：东方粘虫（MW365993），Dm：黑腹果蝇（NM_135949）。

The S-adenosyl methionine (SAM)-binding motif is indicated by grey box. Eleven amino-acid residues involved in interacting with substrates are indicated by triangles. Ai: *Agrotis ipsilon* (AiJHAMT1, PQ063873; AiJHAMT2, PQ063874), Bm: *Bombyx mori* (AB113578), Sl: *Spodoptera litura* (XM_022959200), Sf: *Spodoptera frugiperda* (XM_035578501), Ha: *Helicoverpa armigera* (XM_021326702), Ms: *Mythimna separata* (MW365993), Dm: *Drosophila melanogaster* (NM_135949).

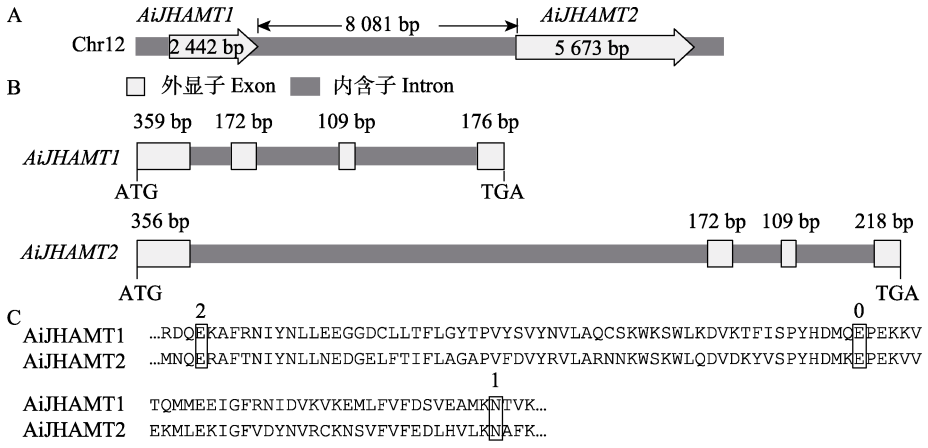


图 2　*AiJHAMT1* 和 *AiJHAMT2* 在基因组上的位置与外显子/内含子结构

Fig. 2　Genomic location and exon/intron structure of *AiJHAMT1* and *AiJHAMT2*

A. *AiJHAMT1* 和 *AiJHAMT2* 在基因组上的位置；B. *AiJHAMT1* 和 *AiJHAMT2* 的外显子/内含子结构，灰色方块上的数字为内含子长度；C. *AiJHAMT1* 和 *AiJHAMT2* 的内含子插入位点，黑色方框上的数字表示内含子的相位（0 表示密码子未被内含子分隔开，1 和 2 分别表示密码子的第 1 位和第 2 位核苷酸被内含子分隔开）。

A. Genomic location of *AiJHAMT1* and *AiJHAMT2*; B. Exon/intron structure of *AiJHAMT1* and *AiJHAMT2*, numbers above grey squares indicate intron size; C. Intron insertion sites of *AiJHAMT1* and *AiJHAMT2*, numbers above black boxes indicate the phase of each intron insertion site (introns that do not split codons are indicated by 0; interruption after the first and second nucleotides are indicated by 1 and 2, respectively).

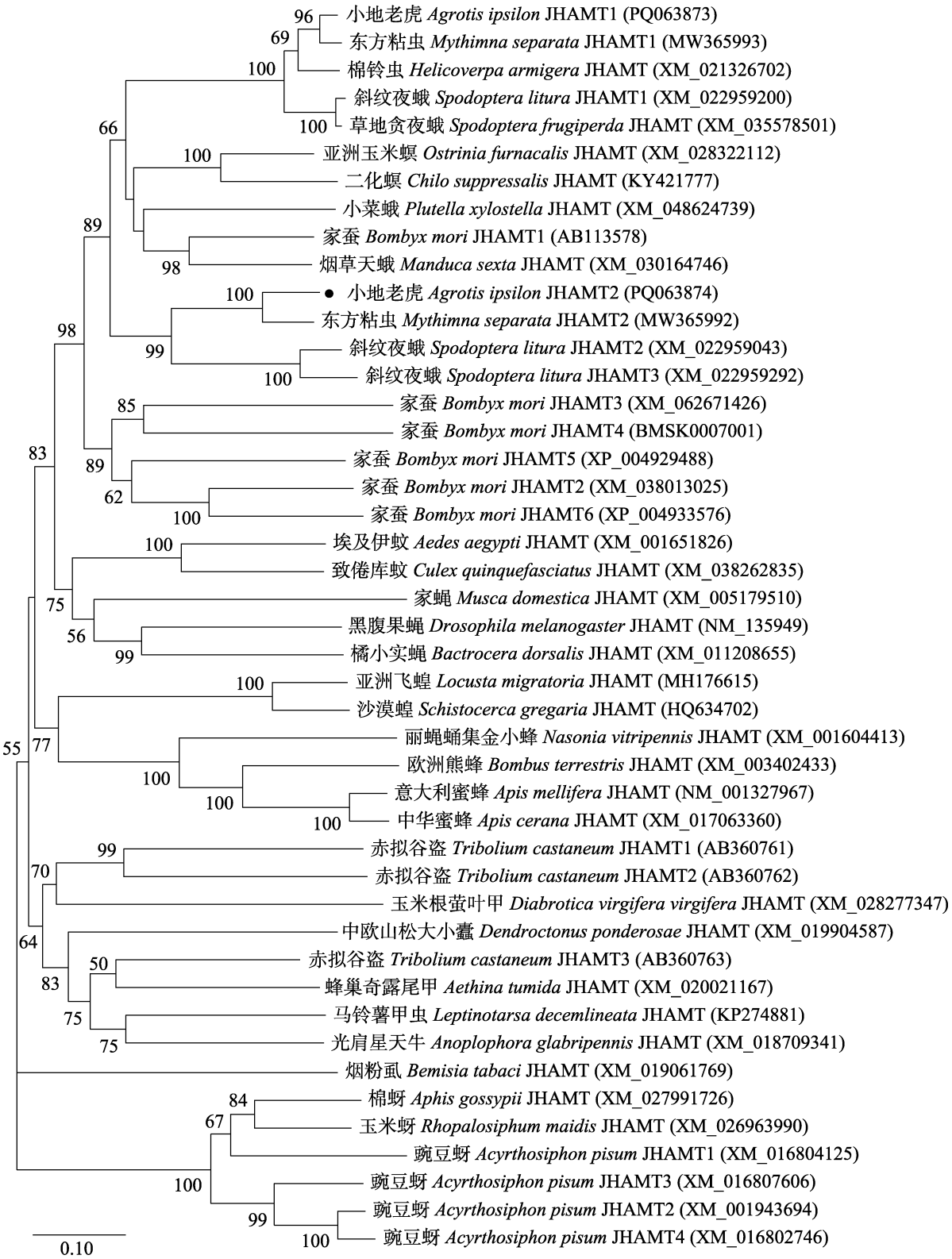


图 3 基于 31 种昆虫的 45 个 JHAMT 蛋白质序列构建的系统进化树

Fig. 3 Construction of phylogenetic tree based on 45 JHAMT protein sequences from 31 insect species

小地老虎 AiJHAMT2 以黑色圆形标注，括号中为 GenBank 登录号。

The *Agrotis ipsilon* AiJHAMT2 is indicated with a black circle.
GenBank accession numbers are shown in parentheses.

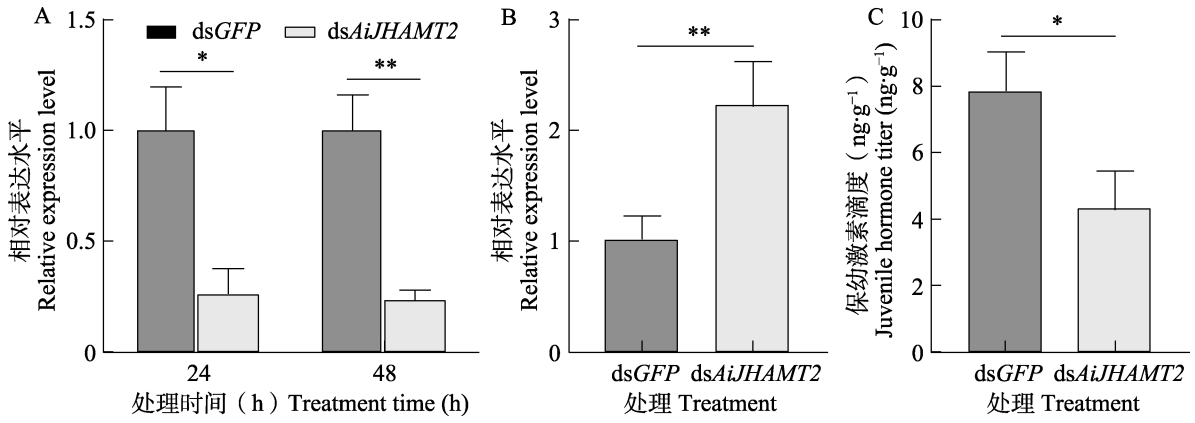


图 4　沉默 *AiJHAMT2* 及其对小地老虎 *AiJHAMT1* 表达水平与保幼激素滴度的影响

Fig. 4　Silencing of *AiJHAMT2* and the effect on *AiJHAMT1* expression level and juvenile hormone titer in *Agrotis ipsilon* larvae

A. 注射 ds*AiJHAMT2* 和 ds*GFP* 后 24 和 48 h 时，小地老虎幼虫 *AiJHAMT2* 的相对表达水平；B. 注射 ds*AiJHAMT2* 和 ds*GFP* 后 48 h 时，幼虫 *AiJHAMT1* 的相对表达水平；C：注射 ds*AiJHAMT2* 和 ds*GFP* 后 48 h 时，幼虫的保幼激素滴度。图中数据为平均值±标准误，星号表示经 Student 氏 *t* 检验两组间差异显著（**P*<0.05，***P*<0.01，****P*<0.001）。图 5 和图 6 同。

A. The relative expression level of *AiJHAMT2* in *A. ipsilon* larvae at 24 and 48 h after injection with ds*AiJHAMT2* 和 ds*GFP*; B. The relative expression level of *AiJHAMT1* in *A. ipsilon* larvae at 48 h after injection with ds*AiJHAMT2* and ds*GFP*; C. The juvenile hormone titer in larvae at 48 h after ds*AiJHAMT2* and ds*GFP* injection. Data in the figure are mean±SE. The asterisks indicate significant difference between two groups by Student's *t*-test (**P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001). The same for Fig. 5 and Fig. 6.

2.3　沉默 *AiJHAMT2* 对小地老虎幼虫存活率、体长和体重的影响

注射 ds*AiJHAMT2* 后 1-5 d，小地老虎幼虫的存活率与对照组（注射 ds*GFP*）差异不显著（*P*>0.05）（图 5：A）。注射 ds*AiJHAMT2* 后第 6 天，幼虫存活率下降至 82.6%，而对照组的存活率为 97.9%，两者存在显著性差异（*t*=5.50，*P*=0.005）（图 5：A）。此后，注射 ds*AiJHAMT2* 的幼虫的存活率持续降低，至第 9 天时存活率已下降至 65.9%，与对照组的存活率（91.7%）相比下降了 28.1%，两者差异显著（*t*=11.70，*P*<0.001）（图 5：A）。注射 ds*AiJHAMT2* 后死亡的幼虫具有相似的表型，如体型变小、体色变黑（图 5：B）。注射 ds*AiJHAMT2* 后虽有部分幼虫存活，但其体长和体重显著低于对照组，其体长减少了 31.7%（*t*=5.06，*P*=0.007）（图 5：C），体重降低了 36.3%（*t*=8.24，*P*=0.002）（图 5：D）。

2.4　沉默 *AiJHAMT2* 对小地老虎化蛹率和羽化率的影响

进一步分析了沉默 *AiJHAMT2* 对小地老虎化蛹率和羽化率的影响。结果表明，注射 ds*AiJHAMT2* 幼虫的化蛹率为 57.9%，相较于对照组显著降低了 35.2%（*t*=10.24，*P*<0.001）（图 6：A）。在不能正常化蛹的幼虫中，有 47.1%的个体出现“幼虫-蛹中间型”，进而死亡（图 6：B）。沉默 *AiJHAMT2* 对小地老虎羽化率没有显著影响（*t*=1.34，*P*=0.252）（图 6：C）。

3　结论与讨论

本课题组在前期研究中，鉴定了小地老虎 *AiJHAMT1*，并证明了该基因在小地老虎生长发育中具有重要作用（Zhang *et al.*，2025）。进一步研究发现，小地老虎基因组中共有 2 个 *JHAMT* 基因（*AiJHAMT1* 和 *AiJHAMT2*）。因此，本研究旨在分析 *AiJHAMT2* 的分子特征并探讨该基因

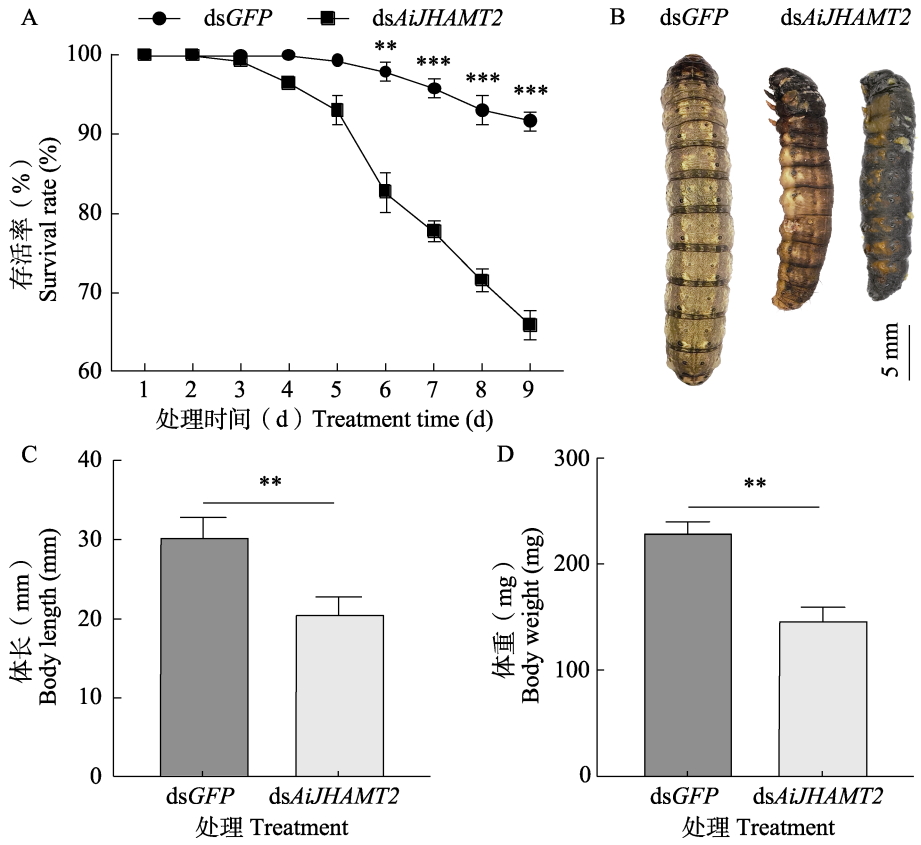


图 5　沉默 *AiJHAMT2* 对小地老虎幼虫存活和生长的影响

Fig. 5　Effects of *AiJHAMT2* silencing on the survival and growth of *Agrotis ipsilon* larvae

A. 注射 ds*AiJHAMT2* 和 ds*GFP* 后小地老虎幼虫的存活率；B. 注射 ds*AiJHAMT2* 和 ds*GFP* 后幼虫的表型；C. 注射后第 9 天存活幼虫的体长；D：注射后第 9 天存活幼虫的体重。

A. Survival rates of *A. ipsilon* larvae after injection with ds*AiJHAMT*2 and ds*GFP*; B. The phenotypes of larvae after ds*AiJHAMT*2 and ds*GFP* injections; C. The body length of surviving larvae on day 9 after injection; D. The body weight of surviving larvae on day 9 after injection.

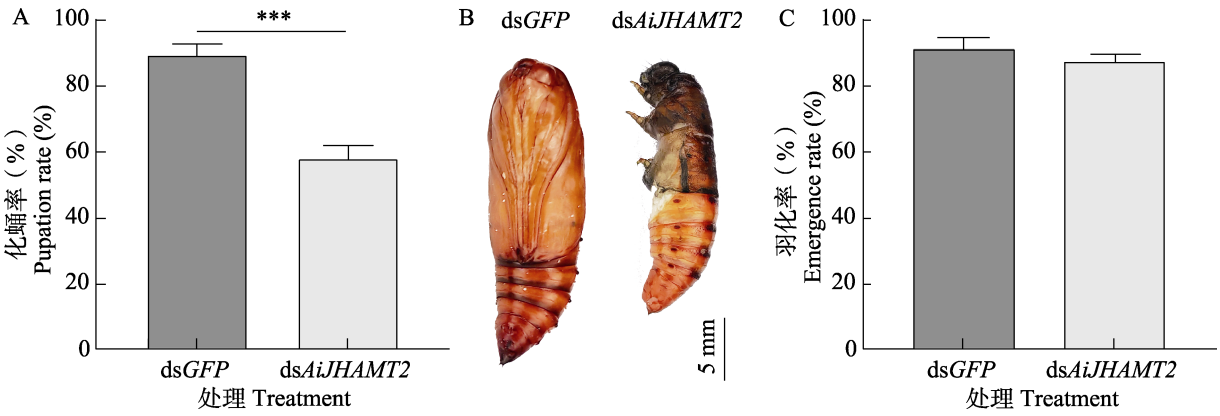


图 6　沉默 *AiJHAMT2* 对小地老虎化蛹和羽化的影响

Fig. 6　Effects of *AiJHAMT2* silencing on the pupation and emergence of *Agrotis ipsilon*

A. 注射 ds*AiJHAMT2* 和 ds*GFP* 后小地老虎的化蛹率；B. 注射 ds*AiJHAMT2* 和 ds*GFP* 后小地老虎的蛹表型；C. 注射 ds*AiJHAMT2* 和 ds*GFP* 后小地老虎的羽化率。

A. The pupation rates of *A. ipsilon* after ds*AiJHAMT*2 and ds*GFP* injections; B. The pupal phenotypes of *A. ipsilon* after ds*AiJHAMT*2 and ds*GFP* injections; C. The emergence rates of *A. ipsilon* after ds*AiJHAMT*2 and ds*GFP* injections.

的生物学功能，为开发以该基因为靶标的小地老虎新型防治技术提供理论基础。与 *AiJHAMT1* 类似，*AiJHAMT2* 编码的蛋白质同样具有昆虫 JHAMT 的典型特征，包括保守的 SAM 结合域以及 11 个与底物互作的氨基酸残基。研究表明，如果这些氨基酸残基发生突变，将会显著降低 JHAMT 与 SAM 和底物的亲和力，并导致 JHAMT 催化效率大幅度下降(Guo *et al.*, 2021)。此外，本研究还发现 *AiJHAMT1* 和 *AiJHAMT2* 在 12 号染色体上邻近，且均具有保守的外显子和内含子插入位点，推测这 2 个基因可能源自共同的祖先基因，在进化中通过基因加倍事件而形成。

为了明确 *AiJHAMT2* 的生物学功能，通过注射 dsRNA 的方法将其成功沉默。沉默 *AiJHAMT2* 后，小地老虎幼虫保幼激素Ⅲ滴度显著下降，表明 *AiJHAMT2* 参与保幼激素Ⅲ的合成。此外发现，沉默 *AiJHAMT2* 后 48 h 时，*AiJHAMT1* 的表达水平显著上升。鉴于 *AiJHAMT1* 同样参与小地老虎保幼激素合成（Zhang *et al.*，2025），其上调可能是对由 *AiJHAMT2* 沉默引起的保幼激素滴度下降的一种补偿。这表明，*AiJHAMT2* 与 *AiJHAMT1* 在一定程度上存在功能冗余。

保幼激素Ⅲ是昆虫最常见的保幼激素形式（Li *et al.*，2019；Yi *et al.*, 2023），其通过细胞膜上的 2 个受体酪氨酸激酶（Receptor tyrosine kinases）CAD96CA 和 FGFR1 传递信号，在昆虫生长、蜕皮、变态和生殖等生理过程中发挥重要调控作用（Li *et al.*，2025）。本研究中发现，沉默 *AiJHAMT2* 导致小地老虎幼虫生长受到抑制，死亡率显著上升。这可能是由于幼虫保幼激素合成受阻，进而影响了其他重要的生理过程。在黑腹果蝇中，缺少保幼激素会扰乱胰岛素信号途径，使果蝇幼虫生长延缓(Mirth *et al.*, 2014)；在家蚕中，敲除 *JHAMT1* 导致幼虫体型显著减小，而且这些家蚕在幼虫阶段就会全部死亡（Daimon *et al.*, 2015）。在棉铃虫、马铃薯甲虫、桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 和亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 中，沉默 *JHAMT* 均会抑制幼虫生长发育，并显著降低幼虫存活率（Fu *et al.*，2016；Kolge *et al.*，2021；Zhou *et al.*，2022；刘叶等，2025）。本研究中还观察到，沉默 *AiJHAMT2* 导致小地老虎幼虫化蛹率显著降低。昆虫的变态发育由保幼激素和蜕皮激素协同调控，前者启动昆虫的蜕皮和变态，后者则使幼虫每次蜕皮后继续保持幼虫形态（刘素宁等，2019）。因此，当 *AiJHAMT2* 被沉默后，保幼激素和蜕皮激素的平衡可能会被打破，从而阻碍小地老虎的化蛹过程。虽然沉默 *AiJHAMT2* 对小地老虎成虫羽化率没有显著影响，但在其他昆虫如黑腹果蝇中，敲除 *JHAMT* 会抑制成虫精子和卵巢发育，进而影响其生殖（Wen *et al.*，2015；Barton *et al.*，2024）。在后续研究中，将深入探讨沉默 *AiJHAMT2* 是否会对小地老虎成虫的生殖产生影响。

虽然本研究通过注射 dsRNA 成功实现了对 *AiJHAMT2* 的沉默，但该方法仍存在沉默效率有限、注射操作不适合于田间实际应用等不足。近年来，基于纳米颗粒的 dsRNA 递送技术已成为害虫防治领域一项极具前景的新策略（李名珊等，2025）。该技术可使 dsRNA 经由害虫取食过程进入体内，有效保护 dsRNA 免受害虫消化道内核酸酶的降解，显著提升其稳定性与递送效率（刘洋洋等，2025）。此前，一种可高效负载 dsRNA 的星型阳离子聚合物纳米颗粒已被开发，并在小地老虎中成功应用，显著提高了靶标基因的沉默效率（Li *et al.*，2019a）。后续将借鉴这一成功经验，开发或优化纳米递送系统，探索其在小地老虎 *AiJHAMT2* 沉默中的应用效果。

综上所述，本研究明确了 *AiJHAMT2* 的序列特征，探明了沉默 *AiJHAMT2* 导致小地老虎保幼激素滴度下降、生长发育受阻、存活率显著降低，表明 *AiJHAMT2* 是有效的 RNAi 防治靶标。后续将研发适合于田间应用的 ds*AiJHAMT2* 纳米载体递送系统，以提高沉默效率，为小地老虎的可持续治理提供新途径。

参考文献 (References)

Barton LJ, Sanny J, Packard Dawson E, Nouzova M, Noriega FG, Stadtfeld M, Lehmann R, 2024. Juvenile hormones direct

primordial germ cell migration to the embryonic gonad. *Current Biology*, 34(3): 505–518.

Chen J, Peng Y, Zhang H, Wang K, Zhao C, Zhu G, Palli SR, Han Z, 2021. Off-target effects of RNAi correlate with the mismatch rate between dsRNA and non-target mRNA. *RNA Biology*, 18(11): 1747–1759.

Chen JM, Yu XP, Chen LZ, Lu ZX, Zheng XS, Xu HX, Zhang JF, 2004. Occurrence, damage of the soil dwelling pests and its management strategy in China. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 16(6): 389–394. [陈建明, 俞晓平, 陈列忠, 吕仲贤, 郑许松, 徐红星, 张珏锋, 2004. 我国地下害虫的发生为害和治理策略. 浙江农业学报, 16(6): 389–394.]

Daimon T, Uchibori M, Nakao H, Sezutsu H, Shinoda T, 2015. Knockout silkworms reveal a dispensable role for juvenile hormones in holometabolous life cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(31): E4226–E4235.

Ekert EV, Powell CA, Shatters RG, Borovsky D, 2014. Control of larval and egg development in *Aedes aegypti* with RNA interference against juvenile hormone acid methyl transferase. *Journal of Insect Physiology*, 70: 143–150.

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.

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.

Guo W, Bai C, Wang Z, Wang P, Fan Q, Mi X, Wang L, He J, Pang J, Luo X, Fu W, Tian Y, Si H, Zhang G, Wu J, 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.

He QY, Zhang YX, Pei ZH, Li MX, Zhang X, 2017. Molecular mechanisms of juvenile hormone in insect metamorphosis. *Acta Entomologica Sinica*, 60(5): 594–603. [何倩毓, 张原熙, 裴泽华, 李美鑫, 张旭, 2017. 保幼激素对昆虫变态发育调控的分子机制. 昆虫学报, 60(5): 594–603.]

Jin MH, Liu B, Zheng WG, Liu CH, Liu ZX, He Y, Li XK, Wu C, Wang P, Liu KY, Wu SG, Liu HW, Chakrabarty S, Yuan HB, Wilson K, Wu KM, Fan W, Xiao YT, 2023. Chromosome-level genome of black cutworm provides novel insights into polyphagy and seasonal migration in insects. *BMC Biology*, 21(1): 2.

Kolge H, Kadam K, Galande S, Lanjekar V, Ghormade V, 2021. New frontiers in pest control: Chitosan nanoparticles-shielded dsRNA as an effective topical RNAi spray for gram podborer biocontrol. *ACS Applied Bio Materials*, 4(6): 5145–5157.

Li DQ, Zhang JQ, Yang Y, Liu J, Lu JJ, Ren MF, Abbas M, Zhu KY, Zhang JZ, 2022. Identification and RNAi-based functional analysis of chitinase family genes in *Agrotis ipsilon*. *Pest Management Science*, 78(10): 4278–4287.

Li JH, Qian J, Xu YY, Yan S, Shen J, Yin MZ, 2019a. A facile-synthesized star polycation constructed as a highly efficient gene vector in pest management. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7(6): 6316–6322.

Li K, Jia QQ, Li S, 2019b. Juvenile hormone signaling-a mini review. *Insect Science*, 26(4): 600–606.

Li MS, Dong M, Du XG, Shen J, Yan S, 2025. Recent advances and future trends in nanocarriers for RNA delivery. *Plant Protection*, 51(5): 168–177. [李名珊, 董民, 杜相革, 沈杰, 闫硕, 2025. RNA 递送纳米载体的研究进展与发展趋势. 植物保护, 51(5): 168–177.]

Li YX, Kang XL, Li YL, Wang XP, Yan Q, Wang JX, Zhao XF, 2025. Receptor tyrosine kinases CAD96CA and FGFR1 function as the cell membrane receptors of insect juvenile hormone. *eLife*, 13: RP97189.

Liu PP, Zhang JX, Shen HF, Yang QY, Pu XM, Sun DY, Ge BY, Lin BR, 2023. Efficacy of transplant insecticides against black cutworm *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae) in tobacco. *Crop Protection*, 171: 106283.

Liu SN, Ren CH, Li S, 2019. Progress in research on hormonal and nutritional regulation in insect metamorphosis. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 56(4): 639–651. [刘素宁, 任充华, 李胜, 2019. 昆虫变态发育的激素和营养调控研究进展与展望. 应用昆虫学报, 56(4): 639–651.]

Liu YQ, Fu XW, Feng HQ, Liu ZF, Wu KM, 2015. Trans-regional migration of *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae) in North-East Asia. *Annals of the Entomological Society of America*, 108(4): 519–527.

Liu Y, Tian X, Cao SY, Ma HY, 2025. Identification and function of the juvenile hormone acid O-methyltransferase gene *OfJHAMT* in *Ostrinia furnacalis* during diapause. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 62(3): 754–763. [刘叶, 田迅, 曹胜雁, 马红悦, 2025. 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. 应用昆虫学报, 62(3):

754–763.]

Liu YY, Wang H, Luo JQ, Li HT, Zhang JZ, Chai L, Zhang JQ, 2025. Application prospects of RNA interference technology based on natural nanopolymers in pest management. *Acta Entomologica Sinica*, 68(6): 862–876. [刘洋洋, 汪浩, 罗佳琪, 理豪天, 张建珍, 柴林, 张建琴, 2025. 基于天然纳米聚合物的 RNA 干扰技术在害虫防治中的应用前景. 昆虫学报, 68(6): 862–876.]

Lu J, Shen J, 2024. Target genes for RNAi in pest control: A comprehensive overview. *Entomologia Generalis*, 44(1): 95–114.

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. *FEBS Journal*, 275(11): 2919–2931.

Mirth CK, Tang HY, Makohon-Moore SC, Salhadar S, Gokhale RH, Warner RD, Koyama T, Riddiford LM, Shingleton AW, 2014. Juvenile hormone regulates body size and perturbs insulin signaling in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(19): 7018–7023.

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.

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.

Smykal V, Dolezel D, 2023. Evolution of proteins involved in the final steps of juvenile hormone synthesis. *Journal of Insect Physiology*, 145: 104487.

Wen D, Rivera-Perez C, Abdou M, Jia QQ, He QY, Liu X, Zyaan O, Xu JJ, Bendena WG, Tobe SS, Noriega FG, Palli SR, Wang J, Li S, 2015. Methyl farnesoate plays a dual role in regulating *Drosophila metamorphosis*. *PLoS Genetics*, 11(3): e1005038.

Wu HB, Fan K, Zhang KP, Gong QT, Sun RH, 2013. Biological activity of 13 insecticides to eggs and larva of *Agrotis ipsilon* Rottemberg. *Journal of Environmental Entomology*, 35(3): 409–414. [武海斌, 范昆, 张坤鹏, 宫庆涛, 孙瑞红, 2013. 13 种杀虫剂对小地老虎卵和幼虫的生物活性. 环境昆虫学报, 35(3): 409–414.]

Yang HL, Zhao L, Cao F, Jiang LQ, Liu S, Li MY, Li SG, 2024. Molecular characterization of thioredoxin peroxidase (AiTPX1) from *Agrotis ipsilon* and its response to insecticide stress. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 61(2): 258–270. [杨浩岚, 赵乐, 曹付, 江连强, 刘苏, 李茂业, 李世广, 2024. 小地老虎硫氧还蛋白过氧化物酶 AiTPX1 的分子特征及其对杀虫剂胁迫的响应. 应用昆虫学报, 61(2): 258–270.]

Yi GQ, Ba RK, Luo J, Zou LX, Huang MF, Li YX, Li HH, Li XS, 2023. Simultaneous detection and distribution of five juvenile hormones in 58 insect species and the absolute configuration in 32 insect species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(20): 7878–7890.

Yu WL, Du JH, Hu YP, Shen RP, Mu W, 2012. Toxicity of six insecticides to black cutworm *Agrotis ipsilon* (Rottemberg) and safety evaluation to oil organisms. *Journal of Plant Protection*, 39(3): 277–282. [于伟丽, 杜军辉, 胡延萍, 申瑞平, 慕卫, 2012. 六种杀虫剂对小地老虎的毒力及对土壤生物安全性评价. 植物保护学报, 39(3): 277–282.]

Zhang J, Yu JM, Shi XX, Liu DY, Deng Q, Peng JN, Li MY, Liu S, 2025. Knockdown of the juvenile hormone acid O-methyltransferase gene impairs development of *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 28(2): 102410.

Zhou DS, Teng T, Liu JH, Long JM, 2021. Cross-habituation to deterrents correlates with desensitisation of the corresponding deterrent neuron in the larva of the black cutworm, *Agrotis ipsilon*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 169(11): 1039–1048.

Zhou QH, Zhang Q, Yang RL, Yuan GR, Wang JJ, Dou W, 2022. RNAi-mediated knockdown of juvenile hormone acid O-methyltransferase disrupts larval development in the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 188: 105285.