

棉铃虫表皮蛋白基因 *CP22* 和 *CP14* 的表达特征及其对甲氧虫酰肼的响应



张万娜 刘香亚 赖 乾 肖海军*

(江西农业大学昆虫研究所, 南昌 330045)

摘要: 为揭示棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 表皮蛋白 (cuticular protein, CP) 基因在其生长发育及应对药剂胁迫中的作用, 克隆棉铃虫 2 个 CP 基因 *CP22* 和 *CP14*, 利用实时荧光定量 PCR 技术分析其不同发育阶段和不同组织中的相对表达量, 并于显微镜下观察甲氧虫酰肼亚致死剂量处理后棉铃虫 3 龄幼虫的表皮形态, 并用实时荧光定量 PCR 技术测定药后 *CP22* 和 *CP14* 基因的相对表达量。结果显示, *CP22* 和 *CP14* 的开放阅读框全长分别为 570 bp 和 393 bp, 分别编码 189 个和 130 个氨基酸; *CP22* 和 *CP14* 都具有 1 个几丁质结合域, 属于 CPR 家族 RR-1 亚类; *CP22* 和 *CP14* 基因均在棉铃虫 5 龄幼虫表皮中表达水平高; 这 2 个基因在棉铃虫幼虫期的表达水平高于在卵期、蛹期和成虫期的表达水平, 且在 4 龄幼虫体内表达量最高, 在蜕皮后随着日龄的增加表达量逐渐降低; 甲氧虫酰肼处理后棉铃虫 3 龄幼虫表皮黑化、皱缩, 发生蜕皮异常, 显微观察显示其内外表皮分离, 真皮细胞解体; 甲氧虫酰肼处理后 24 h 和 48 h, 棉铃虫 *CP22* 和 *CP14* 基因的相对表达量显著上调。表明棉铃虫 *CP22* 和 *CP14* 基因参与棉铃虫幼虫蜕皮, 并且响应甲氧虫酰肼胁迫, 可作为防治棉铃虫的潜在靶标基因。

关键词: 棉铃虫; 表皮蛋白; 基因表达; 甲氧虫酰肼; 响应; 显微观察

Expression analysis of cuticular protein genes *CP22* and *CP14* in cotton bollworm *Helicoverpa armigera* and their response to the sublethal dose of methoxyfenozide

Zhang Wanna Liu Xiangya Lai Qian Xiao Haijun*

(Institute of Entomology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, Jiangxi Province, China)

Abstract: To explore the function of insect cuticular proteins in development and response to insecticides, two cuticular proteins genes, namely *CP22* and *CP14*, were identified from cotton bollworm *Helicoverpa armigera*. The expression patterns of *CP22* and *CP14* were measured in different tissues and developmental stages by real-time quantitative PCR (qPCR). Then the sublethal effects of methoxyfenozide (MF) on larval cuticle were observed after hematoxylin and eosin (HE) staining, and the relative expressions of *CP22* and *CP14* were detected by qPCR. The results showed that *CP22* contained an open reading frame (ORF) of 570 bp, encoding 189 amino acids, while *CP14* contained an ORF of 393 bp, encoding 130 amino acids. The functional domain analysis showed that both *CP22* and *CP14* contained a chitin binding domain, which belonged to RR-1 subclass of the CPR family. qPCR revealed that these two genes were highly expressed in larval cuticle during larval stage, and their expression reached the highest level in the 4th-instar larvae and then decreased after molting. Phenotype observation revealed that the larval cuticle became wrinkled and darkened after treated with sublethal dose of MF, resulting

基金项目: 国家自然科学基金(32060642), 国家重点研发计划(2017YFD0201900), 江西省教育厅科技计划项目(GJJ190246)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: hjxiao@jxau.edu.cn

收稿日期: 2020-12-21

in abnormal molting. HE staining showed the separation of exocuticle and endocuticle, as well as the decomposition of epidermis. Besides, the relative expressions of *CP22* and *CPI4* were significantly up-regulated at 24 h to 48 h after MF treatment. Our results therefore demonstrated that *CP22* and *CPI4* participated in larvae ecdysis, responded to the disturbance of MF treatment, and could serve as potential targets for controlling *H. armigera*.

Key words: *Helicoverpa armigera*; cuticular protein; gene expression; methoxyfenozide; response; microscope observation

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 是我国重要的农业害虫,随着国家种植结构的战略性调整,Bt棉对棉铃虫的区域控制能力削弱,棉铃虫的主要为害对象日趋多样化,局部暴发成灾的可能性显著增加(陆宴辉等,2018),开发新的防控技术迫在眉睫。昆虫表皮覆盖整个虫体表面,不仅保护虫体内部结构,维持正常生理活动,而且防止昆虫体内水分蒸发及抵御外界不良条件等(Moussian,2010)。昆虫表皮是由昆虫上皮细胞合成和分泌的一种细胞外物质,主要是由表皮蛋白(cuticular protein,CP)和几丁质组成。昆虫表皮蛋白是结构蛋白,通过化学结合方式与几丁质形成糖蛋白,经过鞣化后形成昆虫坚硬的体壁。深入研究昆虫表皮蛋白有助于阐明昆虫发育机理,可为新型农药的开发提供靶点。

随着基因组测序技术的快速发展,越来越多的昆虫表皮蛋白被鉴定,根据已鉴定的表皮蛋白氨基酸序列特征,昆虫的表皮蛋白可分为CPR、CPT、CPF、CPG、CPFL五个大家族(梁欣等,2014)。昆虫表皮蛋白基因约占昆虫预测总基因数的1%~2%(刘晓健等,2019),在昆虫生长发育等生理过程中发挥着重要作用。如*CPI2*与*CP23*这2种表皮蛋白基因参与了柞蚕 *Antheraea pernyi* 蛹皮、幼虫及成虫表皮的构建(马月月等,2018);干扰赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 体内的*CPR27*和*CPR18*基因,其内表皮片层结构和纵行孔道的形成收到影响(Arakane et al.,2012);干扰飞蝗 *Locusta migratoria* 成虫节间膜表皮蛋白的表达会导致其表皮层变薄,卵囊个数及卵粒数显著减少(贾盼等,2019)。昆虫通过上调其表皮蛋白的表达、稳固自身的表皮结构来抵御外界的低温胁迫(付丹影等,2016;单艳敏等,2019);此外Cui et al.(2017)和Balabanidou et al.(2018)研究结果发现昆虫表皮与昆虫抗药性的产生密切相关,如在抗吡虫啉的2个田间马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 品系中,部分表皮蛋白基因表达水平显著上调,当干扰上调最高的表皮蛋白基因,马铃薯甲虫对杀虫剂的敏感性显著增加(Clements et al.,

2016)。目前已有20多种昆虫的表皮蛋白被陆续鉴定出来,如Pan et al.(2018)以褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 为研究对象,利用多组学分析及RNA干扰相结合的方法系统研究了32种表皮蛋白在其胚胎、若虫和成虫发育中的功能,而关于棉铃虫表皮蛋白的研究相对较少(刘晓健等,2019;Volovych et al.,2020)。

甲氧虫酰肼属于酰肼类的杀虫剂,是一种昆虫蜕皮激素(20-hydroxyecdysone,20E)的拮抗剂,能与虫体内源的20E竞争结合蜕皮激素受体,干扰20E通路下游基因的正常表达,导致幼虫无法蜕皮,该杀虫剂对鳞翅目害虫有较高的杀虫活性(Smagghe et al.,2003)。本课题组前期研究发现经甲氧虫酰肼处理后棉铃虫幼虫蜕皮异常(Zhang et al.,2021),Ali et al.(2013)研究结果也表明表皮蛋白基因由蜕皮激素信号转录因子激活表达,并响应20E的诱导,而甲氧虫酰肼如何影响棉铃虫幼虫蜕皮过程中皮层溶离及旧表皮脱落尚不明确,另外其对表皮蛋白基因表达的影响也尚不明确。因此,本研究以棉铃虫幼虫表皮高表达的表皮蛋白基因*CP22*和*CPI4*为研究对象,分析其组织分布和龄期表达特征及其对甲氧虫酰肼的响应,以期为棉铃虫表皮蛋白的生理功能确定及以表皮蛋白为靶标的新型农药设计提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试虫源:棉铃虫为本实验室于温度(27±2)℃、相对湿度(70±5)%,光周期为14 L:10 D室内用人工饲料长期饲养的种群,待化蛹后,将雌、雄蛹分别放入长40 cm、宽26 cm、高21 cm的养虫笼内饲养,待其羽化,成虫羽化后用10%蜂蜜水饲喂。人工饲料配方和饲养方法参照梁革梅等(1999)。

农药、试剂及仪器:98%甲氧虫酰肼(methoxyfenozide)原药,由中国农业科学院植物保护研究所刘永强副研究员赠送。曲拉通X-100(聚乙二醇对异辛基苯基醚),索莱宝公司;RNA提取试剂,美国

Invitrogen 生命技术公司; Gel Extraction Kit 凝胶回收试剂盒, 美国 Axygen 公司; PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂和 SYBR® Premix EX Taq™, 宝生物工程(大连)有限公司; 2×Taq PCR Master Mix, 天根生化科技(北京)有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。Nanodrop 2000 超微量分光光度计, 美国赛默飞世尔科技公司; DYCP-32B 琼脂糖凝胶电泳, 北京六一生物科技有限公司; Veriti 梯度 PCR 仪, 美国 ABI 公司; CFX96 荧光定量 PCR 仪, 美国伯乐公司; BX51 型显微镜, 日本 Olympus; BA-T-50 熔蜡箱: 北京奔奥新技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 棉铃虫 *CP22* 和 *CP14* 基因的克隆与序列分析

基于课题组前期棉铃虫转录组数据库获得表皮蛋白基因序列, 结合棉铃虫基因组数据库(棉铃虫基因组的资源号 PRJNA388211), 获得其全长开放阅读框(open reading frames, ORF)序列, 利用 Premier 5.0 软件设计 *CP22F* (5'-CAAAATGAAATTCGCA-GTGG-3')/*CP22R* (5'-TCGTTTGTATTCGGTATTC-AGC-3') 和 *CP14F* (5'-ATGAAATACTTCATCTTAG-CC-3')/*CP14R* (5'-TTACAATTTCTTCTCGACGT-3') 引物, 所有引物均委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。采用 TRIzol 法提取单头棉铃虫 5 龄幼虫的总 RNA, 并使用分光光度计和琼脂糖凝胶电泳进行 RNA 纯度及完整性检测。取 1 μg 总 RNA 为模板按照 PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒说明书合成 cDNA, 以合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增验证 ORF 的存在, 25 μL PCR 反应体系: cDNA 模板 1 μL、10 μmol/L 上下游引物各 1 μL、PCR Master Mix 12.5 μL、ddH₂O 9.5 μL。PCR 扩增条件: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 2 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 5 min。克隆验证后对基因结构进行分析。利用 ExPASy 网站 translate tool (<https://web.expasy.org/translate/>) 对 *CP22* 和 *CP14* 基因的 ORF 序列进行翻译, 采用 SignalP 4.1 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>) 预测信号肽, 利用 SMART 软件 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 进行结构域分析, 通过在线 WebLogo 工具 (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) 对表皮蛋白在各物种间的保守基序进行分析。

1.2.2 *CP22* 和 *CP14* 序列比对及系统发育树的构建

根据翻译得到的氨基酸序列, 运用 NCBI 的 BLAST 工具搜索棉铃虫以及其他昆虫的 CP 同源序

列并进行比对, 使用 MEGA 6.0 软件采用邻接法构建系统发育树, 1 000 次重复。

1.2.3 棉铃虫各发育阶段 *CP22* 和 *CP14* 基因定量分析

分别取新鲜棉铃虫卵 200 粒, 孵化第 1 天的 1 龄幼虫 80 头, 蜕皮第 1 天的 2 龄幼虫 50 头, 蜕皮后 1 d 的 3、4、5、6 龄的幼虫各 10 头, 预蛹期的蛹 10 头, 化蛹后 4 d 的蛹 10 头, 羽化 2 d 的雌、雄成虫各 10 头, 经液氮冷冻后于 -80℃ 冰箱保存。每个样品 4 个生物学重复。总 RNA 提取和 cDNA 合成方法同 1.2.1, 将合成的 cDNA 稀释 5 倍作为实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, qPCR) 的模板。以 q-*CP22F* (5'-GCAGCTACGCTTACTTCTACG-3')/q-*CP22R* (5'-CTGGTATCCGTTCTCGTCAG-3') 和 q-*CP14F* (5'-GTATCCGTTCTCGTTGGCTA-3')/q-*CP14R* (5'-GTATCCGTTCTCGTTGGCTA-3') 为目的基因引物、以棉铃虫 β -actin 内参基因的 β -actin-F (5'-GCGACATCAAGGAGAAGCTG-3')/ β -actin-R (5'-CGTCGCACTTCATGATGGAG-3') 为引物、以预蛹期的基因表达量为对照, 利用 qPCR 检测 *CP22* 和 *CP14* 在棉铃虫不同发育阶段的相对表达量。20 μL 反应体系: cDNA 模板 2 μL、10 μmol/L 上下游引物各 0.8 μL、qPCR Master Mix 10 μL、ddH₂O 7.4 μL。采用两步法 PCR 程序进行反应, 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 15 s, 60℃ 退火 1 min, 40 个循环; 95℃ 15 s, 60℃ 15 s, 95℃ 15 s。对 qPCR 结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行分析 (Livak & Schmittgen, 2001)。

1.2.4 棉铃虫各组织中 *CP22* 和 *CP14* 基因的定量分析

取棉铃虫 5 龄幼虫置于冰上解剖, 分别收集表皮、血淋巴、头、中肠和脂肪体组织, 经液氮冷冻后于 -80℃ 冰箱保存。每次解剖 12 头试虫, 即 1 个生物学重复, 重复 4 次。样品总 RNA 提取、cDNA 合成、qPCR 检测及相对表达量分析同 1.2.3, 以中肠的基因表达量为对照进行相对表达量计算。

1.2.5 甲氧虫酰肼处理对棉铃虫表皮的影响

根据 Zhang et al. (2021) 确定甲氧虫酰肼对棉铃虫的亚致死剂量 LC₂₅ 为 7.75 μg/mL。取 62 μL 浓度为 10 mg/mL 的甲氧虫酰肼母液加入到 10 mL 0.1% 曲拉通水溶液中配制浓度为 62 μg/mL 的溶液, 再用 0.1% 曲拉通水溶液按照 2× 梯度稀释成浓度为 31、15.5 和 7.75 μg/mL 的溶液, 备用。将人工饲料切成 1 cm³ 方块, 置于浓度为 7.75 μg/mL 的甲氧虫酰肼药液中浸渍 3 s, 常温晾干后放入 24 孔板中, 孔板长 127 mm、宽 85 mm、高 22.5 mm, 孔直径为 15.6 mm, 每个孔放 1 块饲料。选取大小一致的刚蜕皮的棉铃

虫3龄幼虫接入到24孔板内,每孔接1头,以0.1%曲拉通水溶液作为空白对照,每个处理4次重复,每个重复24头幼虫。分别在处理24、48和72 h后,每个处理随机选取3头幼虫,观察其形态,并解剖获取其表皮。将表皮用4%多聚甲醛常温固定48 h,用70%~100%的梯度酒精逐级脱水,将组织块置于二甲苯与酒精等体积混合液内1 h,再置于纯二甲苯溶液内1 h,使二甲苯替换出组织块中的酒精,随后将已透明的组织块置于已溶化的石蜡中,放入熔蜡箱保温。待石蜡完全浸入组织块后进行包埋,待石蜡块变硬后,修整组织块并在切片机上切成厚度为8 μm 的石蜡切片。用苏木精伊红染色,经过梯度脱水、透明、中性树胶封片后,于显微镜下观察其表皮结构,具体方法参照雷佳瑶等(2010)方法。同时每个处理随机选取3头幼虫,在冰上解剖获取其表皮,迅速冻存于液氮中,进行总RNA提取、cDNA模板合成、qPCR检测及相对表达量分析,方法同1.2.3。每个处理重复4次。

1.3 数据分析

利用SPSS 17.0软件对试验数据进行统计分析,对照和药剂处理的基因表达量应用Student's *t*法进行差异显著性检验,不同发育阶段和不同组织间基因表达量均采用最小显著差数(LSD)法进行差异显

著性检验。

2 结果与分析

2.1 棉铃虫CP22和CP14基因的序列分析

通过搜索、扩增和DNA测序,获得棉铃虫2个表皮蛋白的全长cDNA序列。棉铃虫CP22基因(GenBank登录号为MV145542)的ORF全长为570 bp,编码189个氨基酸,在N末端包含1个信号肽,剪切位点位于16和17残基处,无跨膜结构。棉铃虫CP14基因(GenBank登录号为MW250379)的ORF全长393 bp,编码130个氨基酸,在N末端包含1个信号肽,剪切位点位于16和17残基处,无跨膜结构。蛋白质结构域分析表明,棉铃虫CP22与CP14都具有典型的CPR蛋白质家族功能结构域,即氨基酸序列中具有几丁质结合域ChtBD4。棉铃虫CP22和CP14的几丁质结合域分别包含68个氨基酸(99~156位)(图1-A)和56个氨基酸(38~93位)(图1-B)。此外,棉铃虫CP22和CP14都具有CPR蛋白质家族典型保守的氨基酸序列G-x(8)-G-x(6)-Y-x-A-x(3)-GY-x(7)-P-x(2)-P, x表示氨基酸,数字表示氨基酸的数目,其中棉铃虫CP22的氨基酸序列为GS-FSWTSPEGEPIAISYVADENGYQPSGNAIPTAP,棉铃虫CP14的氨基酸序列为GANSYKSPEGQVISL-TYVANENGYQPQGDHLPTTP。



下划线: 信号肽; 方框: 几丁质结合域 Cht BD4; 虚线: CPR 保守区; *: 终止密码子。The underlined sequences: signal peptides; the boxed sequences: chitin binding domains; the dotted lines: CPR consensus sequences; *: stop codon.

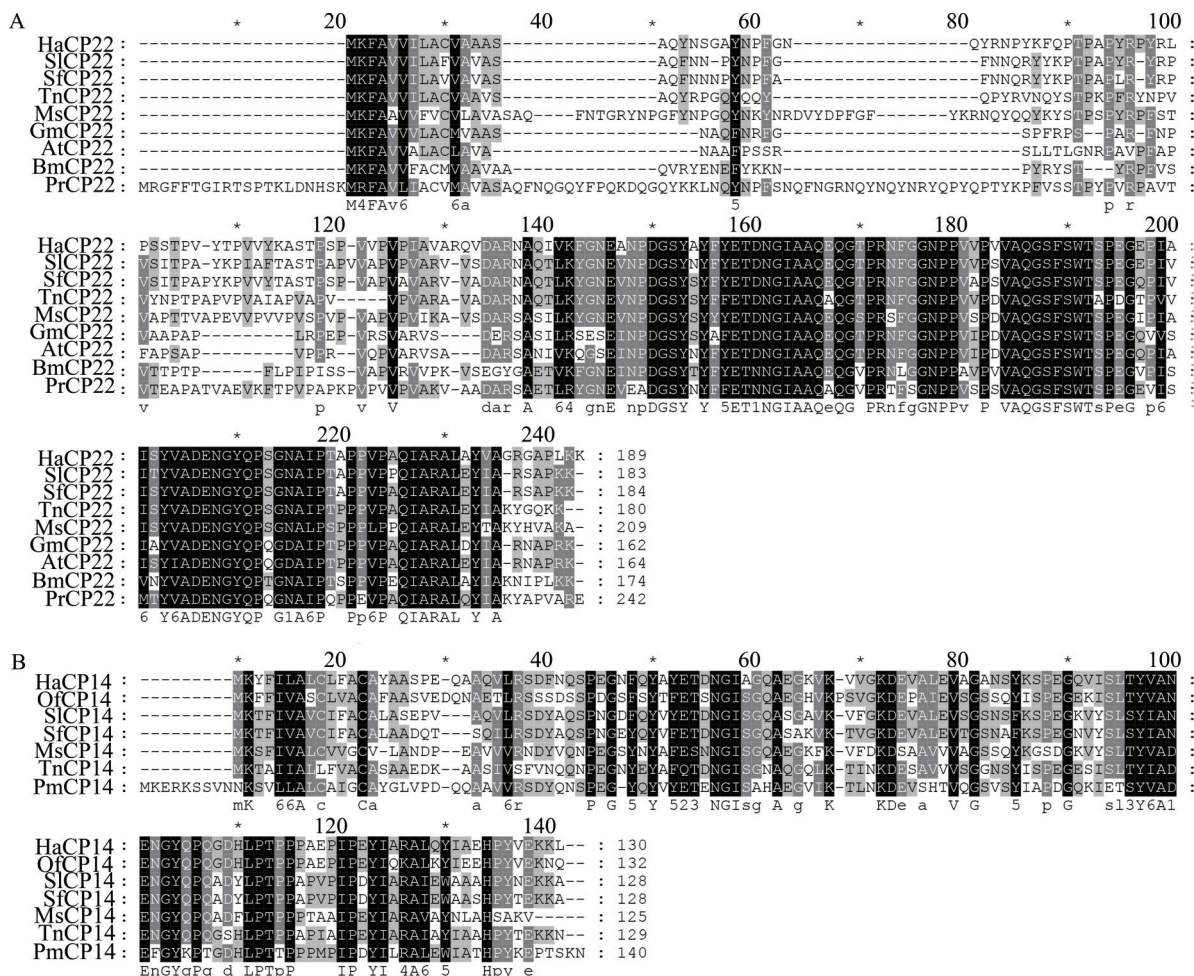
图1 棉铃虫CP22(A)和CP14(B)基因的氨基酸序列

Fig. 1 Amino acid sequences of CP22 (A) and CP14 (B) from *Helicoverpa armigera*

2.2 棉铃虫表皮蛋白CP22和CP14同源序列比对

BLAST 比对结果显示,棉铃虫与搜索到的其他昆虫的表皮蛋白氨基酸序列的差异主要在N端(图2),其中棉铃虫 CP22 氨基酸序列(GenBank 登录号为 MV145542)与斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 及草地贪夜蛾 *S. frugiperda* CP22 氨基酸序列(GenBank 登录号分别为 XP_022816174.1 和 XP_035459276.1)的相似度高达 80.26%,与粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni*、烟

草天蛾、家蚕 *Bombyx mori*、大蜡螟 *Galleria mellonella* 和脐橙螟 *Amyelois transitella* 等鳞翅目其他昆虫 CP22 氨基酸序列(GenBank 登录号分别为 XP_026729283.1、XP_030035553.1、NP_001036828.1、XP_026750979.1 和 XP_013186221.1)的相似度介于 60.85%~68.34%之间,与菜粉蝶 *Pieris rapae* CP22 氨基酸序列(GenBank 登录号为 XP_022122759.1)的相似度为 48.63%(图 2-A)。



黑色背景: 完全一致; 灰色背景: 不完全一致。HaCP22、SiCP22、SfCP22、TnCP22、MsCP22、GmCP22、AtCP22、BmCP22 和 PrCP22 分别为棉铃虫、斜纹夜蛾、草地贪夜蛾、粉纹夜蛾、烟草天蛾、大蜡螟、脐橙螟、家蚕和菜粉蝶的表皮蛋白 CP22。HaCP14、OfCP14、SiCP14、SfCP14、MsCP14、TnCP14 和 PmCP14 分别为棉铃虫、亚洲玉米螟、斜纹夜蛾、草地贪夜蛾、烟草天蛾、粉纹夜蛾和金凤蝶的表皮蛋白 CP14。Black background: complete conformity; gray background: partial conformity. HaCP22, SiCP22, SfCP22, TnCP22, MsCP22, GmCP22, AtCP22, BmCP22 and PrCP22 represent cuticular proteins CP22 from *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera litura*, *S. frugiperda*, *Trichoplusia ni*, *Manduca sexta*, *Galleria mellonella*, *Amyelois transitella*, *Bombyx mori* and *Pieris rapae*, respectively. HaCP14, OfCP14, SiCP14, SfCP14, MsCP14, TnCP14 and PmCP14 represent cuticular proteins CP14 from *H. armigera*, *Ostrinia furnacalis*, *S. litura*, *S. frugiperda*, *M. sexta*, *T. ni* and *Papilio machaon*, respectively.

图2 棉铃虫 CP22(A)和 CP14(B)氨基酸序列与其他昆虫表皮蛋白氨基酸序列的同源比对

Fig. 2 Alignment of the deduced amino acid sequences of CP22 (A) and CP14 (B) from *Helicoverpa armigera* with the homologs of cuticular proteins from other insects

棉铃虫 CP14 氨基酸序列(GenBank 登录号为 MW250379)与亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* CP14

氨基酸序列(GenBank 登录号为 XP_028168598.1)的相似度为 53.45%,与斜纹夜蛾 CP14 氨基酸序列(GenBank 登录号为 XP_022814231.1)的相似度为 52.30%,与草地贪夜蛾 CP14 氨基酸序列(GenBank 登录号为 XP_035440438.1)的相似度为 49.43%,与粉纹夜蛾、烟草天蛾 *Manduca sexta* 及金凤蝶 *Papilio machaon* CP14 氨基酸序列(GenBank 登录号分别为 XP_026734679.1、AAA29319.1 和 KPJ13958.1)的相似度介于 40.93%~41.68% 之间(图 2-B)。

2.3 棉铃虫 CP22 和 CP14 的系统发育树

鳞翅目昆虫的 CP22 亚家族位于一个小分支上, CP14 亚家族位于另一个小分支上,但都与非鳞翅目昆虫遗传距离较远,说明昆虫表皮蛋白进化较保守(图 3)。棉铃虫的 CP22 与斜纹夜蛾和草地贪夜蛾同源基因遗传距离最近,而棉铃虫的 CP14 与亚洲玉米螟遗传距离最近,其次与斜纹夜蛾和草地贪夜蛾的遗传距离较近,与氨基酸的相似度结果一致(图 3)。

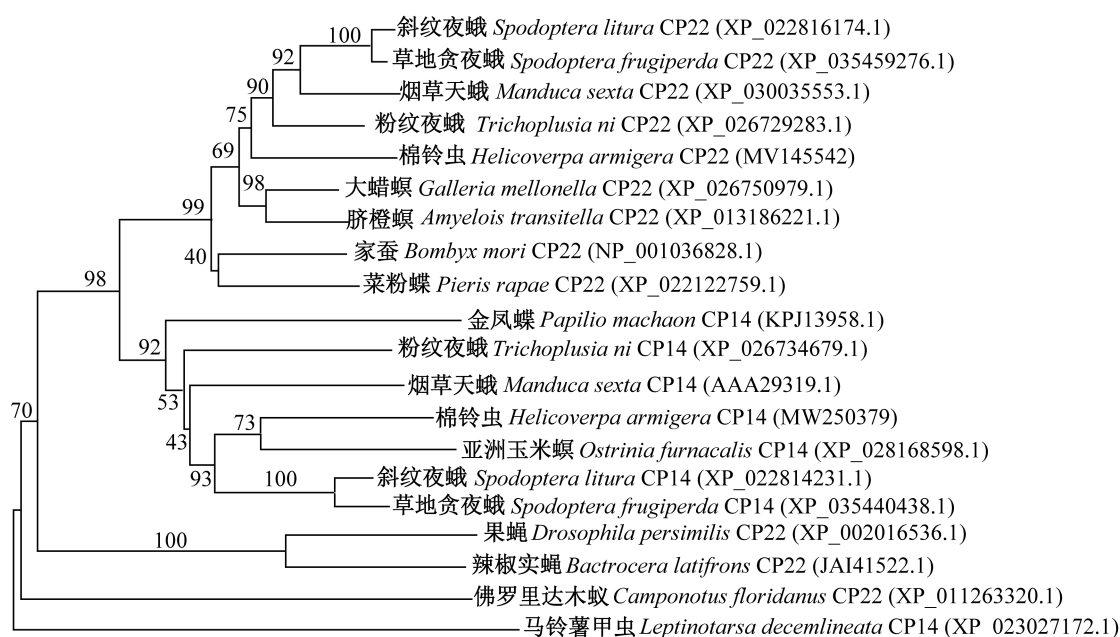


图 3 采用邻接法构建棉铃虫和其他昆虫表皮蛋白氨基酸序列的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of cuticular proteins from *Helicoverpa armigera* and other insect species by using neighbor-joining method based on amino acid sequences

2.4 棉铃虫 CP22 和 CP14 基因的表达模式

2.4.1 在棉铃虫不同发育时期中的表达

CP22 和 CP14 基因在棉铃虫所有发育阶段均有表达,其中在卵期、预蛹期、蛹期及成虫期的相对表达量均较低,且成虫期不同性别之间无显著差异;在幼虫期,随龄期的增加其相对表达量逐渐升高,在 4 龄期达到高峰,CP22 和 CP14 基因的表达量分别为 2 930.56 和 133.16,显著高于其他发育阶段($P < 0.05$),5 龄期开始下降,在预蛹期相对表达量达到最低,分别为 1.82 和 1.77,且幼虫期 CP22 基因的相对表达量较 CP14 高(图 4)。

CP22 和 CP14 基因均是在棉铃虫 4 龄幼虫蜕皮后高表达,然后相对表达量逐渐降低,其中蜕皮后第 1 天 CP22 基因的相对表达量分别为第 2 天和第 3 天的 2.84 倍和 8.25 倍,显著高于蜕皮后第 2 天和第 3 天的相对表达量($P < 0.05$,图 5-A);蜕皮后第 1 天 CP14

基因的相对表达量分别为第 2 天和第 3 天的 1.98 倍和 10.84 倍,显著高于蜕皮后第 2 天和第 3 天的相对表达量($P < 0.05$,图 5-B)。

2.4.2 在棉铃虫 5 龄幼虫不同组织中的表达

CP22 基因主要在棉铃虫 5 龄幼虫的表皮中表达水平高,为 2.96×10^6 ,是中肠组织表达量的 2.38×10^6 倍,显著高于其他组织($P < 0.05$),在脂肪体中的相对表达量次之,为 8 806.96,约为表皮表达量的 1/30,在血淋巴和头部中相对表达量较低,在中肠中的相对表达量最低,为 1.24,显著低于其他组织($P < 0.05$,图 6-A)。CP14 基因在棉铃虫 5 龄幼虫表皮中相对表达量最高,为 28 692.80,是中肠组织表达量的 18 690.67 倍,显著高于其他组织($P < 0.05$),在头部的相对表达量次之,为 121.05,约为表皮表达量的 1/24,在血淋巴和脂肪体中的相对表达量相对较低,在中肠中的相对表达量最低,为 1.54(图 6-B)。

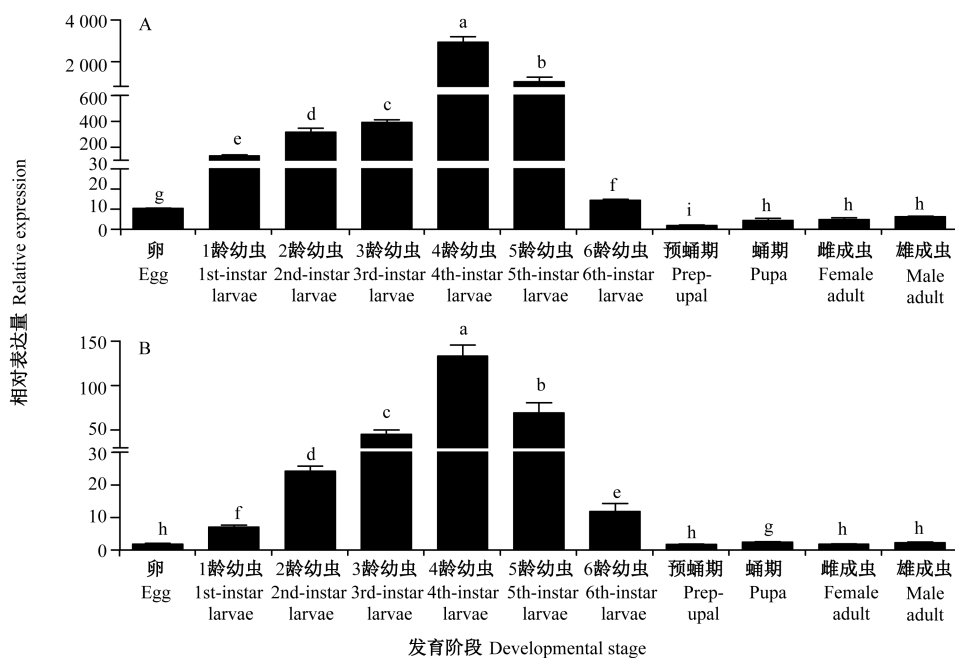


图4 棉铃虫不同发育阶段中 *CP22*(A)和 *CP14*(B)基因的相对表达量

Fig. 4 Relative expressions of *CP22* (A) and *CP14* (B) genes in *Helicoverpa armigera* at different developmental stages

图中数据为平均数±标准误。不同小写字母表示经LSD法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data in the figure are mean±SE. Different lowercase letters indicate significant difference at $P<0.05$ level by LSD.

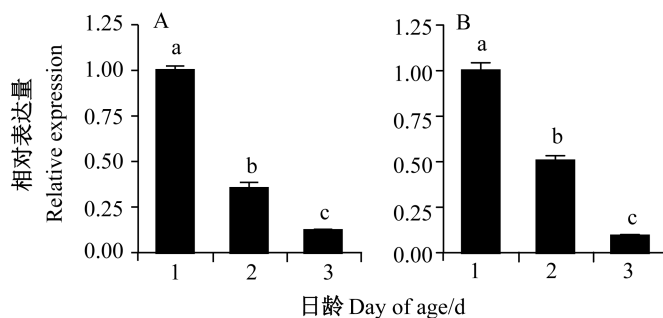


图5 棉铃虫不同日龄4龄幼虫体内 *CP22*(A)和 *CP14*(B)基因的相对表达量

Fig. 5 Relative expressions of *CP22* (A) and *CP14* (B) genes in the 4th instar larvae of *Helicoverpa armigera* at different day-ages

图中数据为平均数±标准误。不同小写字母表示经LSD法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data in the figure are mean±SE. Different lowercase letters indicate significant difference at $P<0.05$ level by LSD.

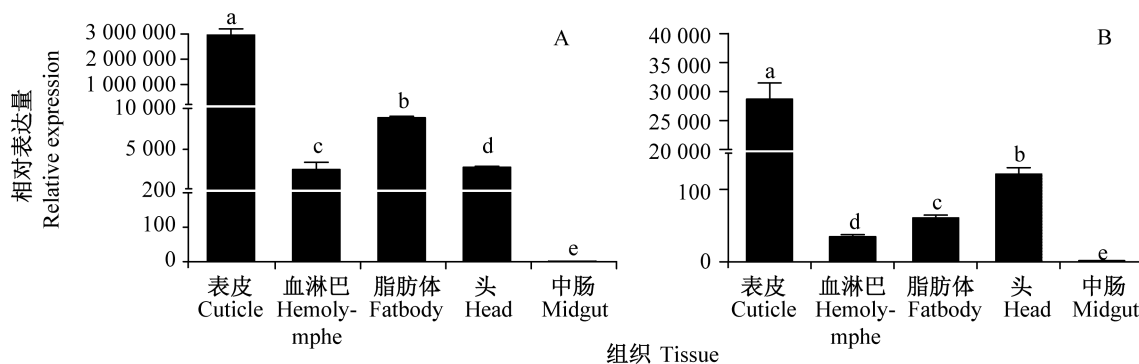


图6 棉铃虫5龄幼虫不同组织中 *CP22*(A)和 *CP14*(B)基因的相对表达量

Fig. 6 Relative expressions of *CP22* (A) and *CP14* (B) in different tissues of the 5th instar larvae of *Helicoverpa armigera*

图中数据为平均数±标准误。柱上不同小写字母表示经LSD法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data in the figure are mean±SE. Different lowercase letters on the bars indicate significant difference at $P<0.05$ level by LSD.

2.5 甲氧虫酰肼亚致死剂量对棉铃虫表皮的影响

2.5.1 对棉铃虫形态和表皮结构的影响

甲氧虫酰肼亚致死剂量处理后,棉铃虫3龄幼虫表皮出现明显黑化、皱缩的现象,而对照表皮结构

正常(图7)。经显微结构观察,棉铃虫3龄幼虫表皮和真皮细胞出现分离,随着时间延长真皮细胞逐渐解体(图8),表明甲氧虫酰肼亚致死剂量干扰了蜕皮过程中内表皮的形成。

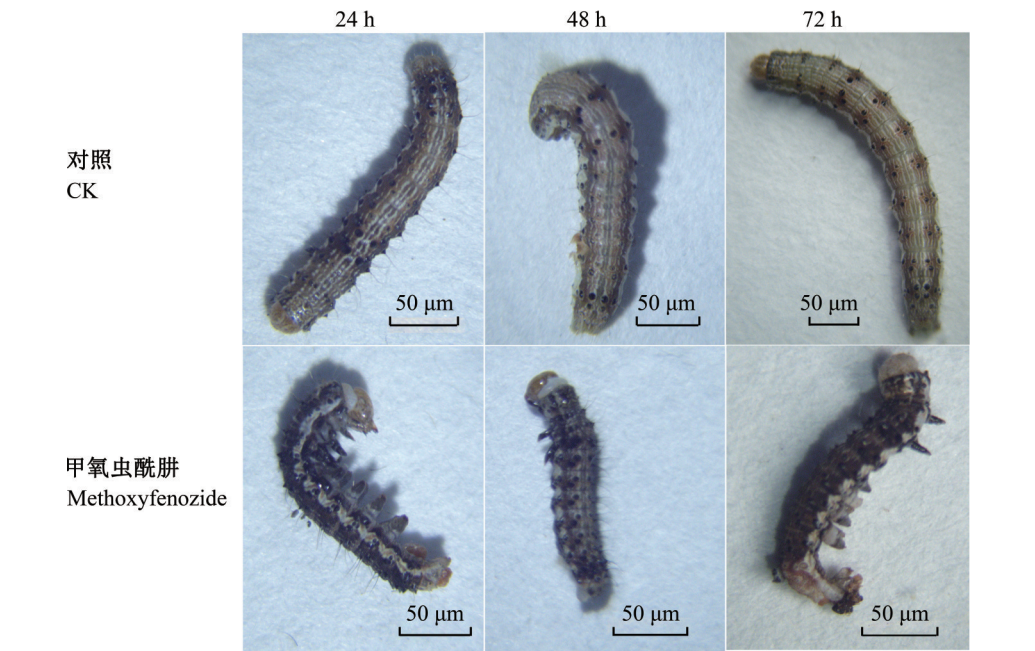
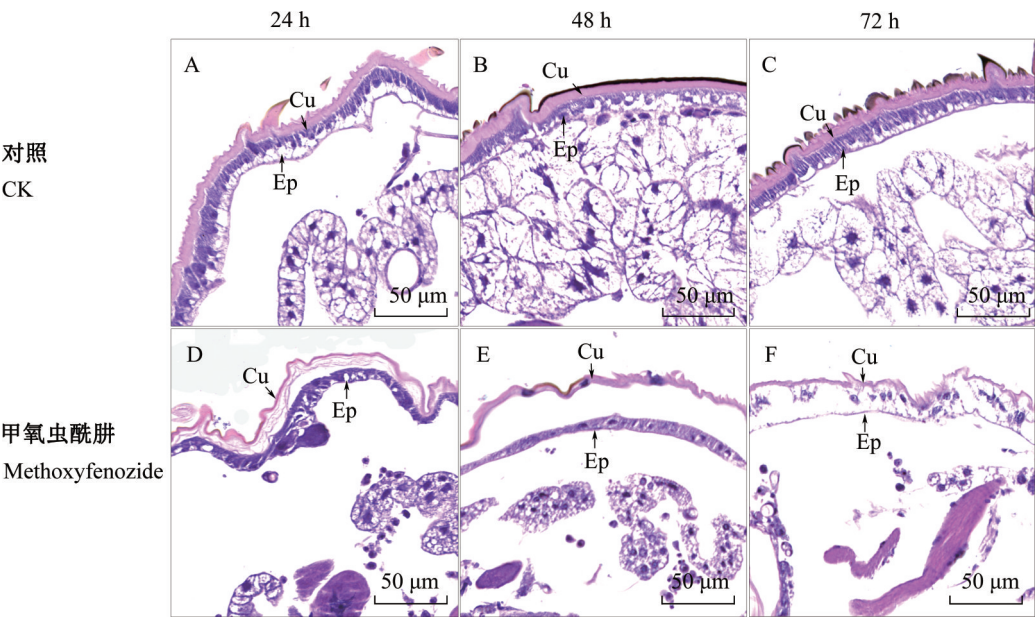


图7 甲氧虫酰肼亚致死剂量处理不同时间后棉铃虫3龄幼虫的形态

Fig. 7 Phenotypes of *Helicoverpa armigera* 3rd instar larvae after exposure to sublethal dose of methoxyfenozide for different durations



Cu: 表皮; Ep: 真皮细胞。Cu: Cuticle; Ep: epidermis.

图8 甲氧虫酰肼亚致死剂量处理不同时间后棉铃虫3龄幼虫的表皮结构

Fig. 8 Cuticles in the 3rd instar larvae of *Helicoverpa armigera* treated with sublethal dose of methoxyfenozide for different durations

2.5.2 对CP22和CPI4基因表达的影响

甲氧虫酰肼亚致死剂量处理24 h后,棉铃虫

CP22基因的相对表达量为对照的7.06倍,极显著高于对照($P<0.01$),CPI4基因的相对表达量为对照的

1.22 倍,与对照差异不显著;处理 48 h 后,棉铃虫 *CP22* 基因的相对表达量为对照的 1.08 倍,显著高于对照 ($P<0.05$), *CPI4* 基因的相对表达量为对照的

2.79 倍,极显著高于对照 ($P<0.01$);处理 72 h 后,棉铃虫 *CP22* 和 *CPI4* 基因的相对表达量均极显著低于对照 ($P<0.01$,图 9)。

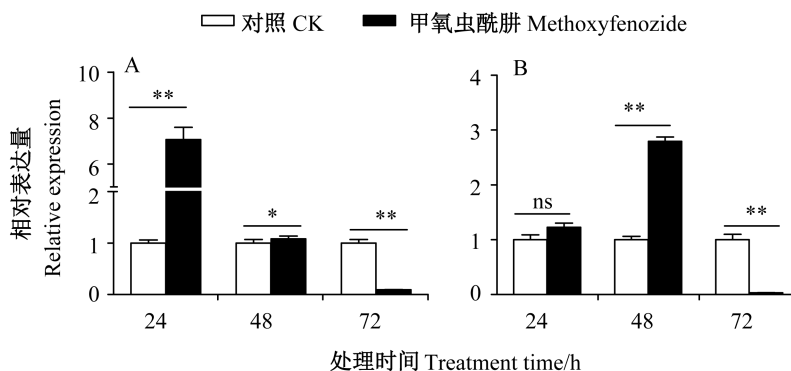


图 9 甲氧虫酰肼亚致死剂量处理不同时间后棉铃虫 3 龄幼虫体内 *CP22*(A)和 *CPI4*(B)基因的相对表达量

Fig. 9 Relative expressions of *CP22* (A) and *CPI4* (B) in the 3rd instar larvae of *Helicoverpa armigera* treated with sublethal dose of methoxyfenozide for different durations

图中数据为平均数±标准误。*、**分别表示经 Student's *t* 法检验在 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 水平差异显著; ns: 差异不显著。Data in the figure are mean±SE. *, ** indicate significant difference at $P<0.05$ and $P<0.01$ levels by Student's *t* test; ns: no significant difference.

3 讨论

本研究结果发现,棉铃虫 *CP22* 和 *CPI4* 基因在棉铃虫幼虫表皮中表达水平高, *CP* 基因在斜纹夜蛾表皮组织中也表达水平较高(赵鹏等, 2020)。推测表皮蛋白主要参与昆虫体壁的形成,这也与鳞翅目昆虫幼虫表皮内主要是表皮蛋白的 RR-1 亚类的报道一致(Cornman et al., 2008)。不同的基因其功能有所差异,如灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 表皮蛋白基因 *CPRI* 主要在血淋巴中表达,后续研究证明该基因参与传播植物病毒(Liu et al., 2015)。表皮蛋白基因 *CPF3*、*CPLCG3* 和 *CPLCG4* 在冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 成虫生殖器和附腺内表达水平高,推测其与成虫生殖系统发育密切相关(Vannini et al., 2014)。本研究结果发现 *CP22* 和 *CPI4* 这 2 个基因在棉铃虫幼虫各个龄期均有表达,但在蛹期与成虫期表达量较低,表明其为幼虫表皮蛋白,与褐飞虱 *CP* 基因的表达模式相似(马艳等, 2013); *CP22* 和 *CPI4* 这 2 个表皮蛋白基因在棉铃虫 4 龄幼虫中相对表达量最高,其表达与表皮形成时间相一致,推测棉铃虫在 4 龄进入暴食期,体型迅速增大,需要大量表皮蛋白的合成和沉积;在东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* 各个龄期的内表皮形成时期,其表皮蛋白呈现周期性的高表达(贾盼等, 2019),上述研究说明表皮蛋白在昆虫表皮结构形成中具有重要作用。

昆虫在变态发育过程中,表皮的结构和组成都经历剧烈的变化,而昆虫表皮蛋白作为表皮的重要组成部分,其基因也受到昆虫激素的调控。如 Okamoto et al. (2008) 研究结果表明 *CP* 基因表达受蜕皮激素脉冲的调控,家蚕中特定 *CP* 基因表达与蜕皮激素滴度呈负相关; Zhang et al. (2021) 研究结果表明,甲氧虫酰肼亚致死剂量能抑制棉铃虫蜕皮,降低蜕皮激素滴度。本研究结果发现经甲氧虫酰肼处理后棉铃虫幼虫表皮皱缩黑化,表皮层明显变薄,内外皮层分离,真皮细胞解体,表明甲氧虫酰肼通过阻碍表皮形成来达到杀虫效果。经灭蝇胺处理后烟草天蛾同样出现幼虫畸形、活动障碍的现象,究其原因可能是药剂处理后表皮蛋白合成受阻(Dittmer et al., 2015)。

在昆虫生长发育过程中,20E 周期性的上升和下降会诱导一系列核受体转录因子的激活和转录,继而启动靶标组织蜕皮相关基因表达,而甲氧虫酰肼作为昆虫蜕皮激素拮抗剂,通过干扰 20E 通路基因表达影响其正常蜕皮(Zhang et al., 2021)。本研究进一步发现,甲氧虫酰肼处理 24 h 后棉铃虫 *CP22* 基因的相对表达量显著上升,同样处理 48 h 后 *CPI4* 基因的相对表达量也显著上升。推测甲氧虫酰肼处理后激活了调控 *CP* 基因上游的相关转录因子,从而诱导 *CP* 基因高表达,而表皮蛋白作为昆虫表皮的主要组分,其含量变化或成分缺失都会引起表

皮结构异常,因此干扰了蜕皮过程中旧表皮的溶解和新表皮的形成。此外,本研究发现棉铃虫 *CP22* 和 *CP14* 基因对甲氧虫酰肼的响应时间有差异,可能与 *CP22* 和 *CP14* 基因在表皮形成过程中发挥作用的大小有关,*CP22* 基因的相对表达量高于 *CP14* 基因,推测在表皮形成过程中 *CP22* 基因发挥着更关键的作用,但有待进一步验证。转录因子通过调控表皮蛋白表达在昆虫生长发育及抗逆性过程中发挥着重要作用,如 Zhang et al. (2021) 研究发现甲氧虫酰肼亚致死剂量抑制棉铃虫核受体型转录因子 FTZ-F1 的表达;Murata et al. (1996) 研究也发现在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 变态期 *CP* 基因 EDG84A 受 FTZ-F1 的转录调控;Mello et al. (2019) 研究发现干扰 FTZ-F1 基因能显著抑制意蜂 *Apis mellifera* *CP* 基因的表达;Xu et al. (2020) 研究发现淡色库蚊 *Culex pipiens* 转录因子 FTZ-F1 调控表皮蛋白 CPLCG5 的表达,进而增加其对拟除虫菊酯的抗性,但转录因子 FTZ-F1 是否调控表皮蛋白的转录进而影响幼虫蜕皮还需进一步研究。

参 考 文 献 (References)

- Ali MS, Iwanaga M, Kawasaki H. 2013. Ecdysone-responsive transcriptional regulation determines the temporal expression of cuticular protein genes in wing discs of *Bombyx mori*. *Gene*, 512 (2): 337–347
- Arakane Y, Lomakin J, Gehrke SH, Hiromasa Y, Tomich JM, Muthukrishnan S, Beeman RW, Kramer KJ, Kanost MR. 2012. Formation of rigid, non-flight forewings (elytra) of a beetle requires two major cuticular proteins. *PLoS Genetics*, 8(4): e1002682
- Balabanidou V, Grigoraki L, Vontas J. 2018. Insect cuticle: a critical determinant of insecticide resistance. *Current Opinion in Insect Science*, 27: 68–74
- Clements J, Schoville S, Peterson N, Lan Q, Groves RL. 2016. Characterizing molecular mechanisms of imidacloprid resistance in select populations of *Leptinotarsa decemlineata* in the central sands region of Wisconsin. *PLoS ONE*, 11(1): e0147844
- Cornman RS, Togawa T, Dunn WA, He NJ, Emmons AC, Willis JH. 2008. Annotation and analysis of a large cuticular protein family with the R&R consensus in *Anopheles gambiae*. *BMC Genomics*, 9: 22
- Cui L, Yuan HZ, Yang DB, Rui CH, Mu W. 2017. The mechanism by which dodecyl dimethyl benzyl ammonium chloride increased the toxicity of chlorpyrifos to *Spodoptera exigua*. *Frontiers in Pharmacology*, 8: 475
- Dittmer NT, Tetreau G, Cao XL, Jiang HB, Wang P, Kanost MR. 2015. Annotation and expression analysis of cuticular proteins from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 62: 100–113
- Fu DY, Si FL, Chen B, Xu YL, Hao YJ. 2016. Transcriptome-guided identification of the cuticular protein gene family of *Delia antiqua* (Diptera: Anthomyiidae) and expression analysis under non- and winter-diapause conditions. *Acta Entomologica Sinica*, 59 (2): 172–184 (in Chinese) [付丹影, 司凤玲, 陈斌, 徐燕玲, 郝友进. 2016. 基于转录组的葱蝇表皮蛋白基因家族的鉴定及在非滞育和冬滞育条件下的表达分析. *昆虫学报*, 59(2): 172–184]
- Jia P, Zhang J, Yang Y, Liu WM, Zhang JZ, Zhao XM. 2019. Expression and function analysis of endocuticle structural glycoprotein gene *LmAbd-2* in *Locusta migratoria*. *Scientia Agricultura Sinica*, 52(4): 651–660 (in Chinese) [贾盼, 张晶, 杨洋, 刘卫敏, 张建珍, 赵小明. 2019. 飞蝗内表皮结构糖蛋白基因 *LmAbd-2* 的表达与功能分析. *中国农业科学*, 52(4): 651–660]
- Lei JY, Xu Y, Gu HY. 2010. Serial paraffin section and hematoxylin-eosin staining of the amphioxus. *Anatomy Research*, 32(5): 396–398 (in Chinese) [雷佳瑶, 徐晔, 顾怀宇. 2010. 文昌鱼石蜡连续切片的制作和苏木精-伊红染色. *解剖学研究*, 32(5): 396–398]
- Liang GM, Tan WJ, Guo YY. 1999. An improvement in the technique of artificial rearing cotton bollworm. *Plant Protection*, 25(2): 15–17 (in Chinese) [梁革梅, 谭维嘉, 郭予元. 1999. 人工饲养棉铃虫技术的改进. *植物保护*, 25(2): 15–17]
- Liang X, Chen B, Qiao L. 2014. Research progress in insect cuticular protein genes. *Acta Entomologica Sinica*, 57(9): 1084–1093 (in Chinese) [梁欣, 陈斌, 乔梁. 2014. 昆虫表皮蛋白基因研究进展. *昆虫学报*, 57(9): 1084–1093]
- Liu WW, Gray S, Huo Y, Li L, Wei TY, Wang XF. 2015. Proteomic analysis of interaction between a plant virus and its vector insect reveals new functions of hemipteran cuticular protein. *Molecular & Cellular Proteomics*, 14(8): 2229–2242
- Liu XJ, Liu WM, Zhao XM, Zhang JZ, Ma EB. 2019. Progress in the study of insect cuticle development and prospects for future research. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 56(4): 625–638 (in Chinese) [刘晓健, 刘卫敏, 赵小明, 张建珍, 马恩波. 2019. 昆虫表皮发育研究进展及展望. *应用昆虫学报*, 56(4): 625–638]
- 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
- Lu YH, Jiang YY, Liu J, Zeng J, Yang XM, Wu KM. 2018. Adjustment of cropping structure increases the risk of cotton bollworm outbreaks in China. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 55(1): 19–24 (in Chinese) [陆宴辉, 姜玉英, 刘杰, 曾娟, 杨现明, 吴孔明. 2018. 种植业结构调整增加棉铃虫的灾变风险. *应用昆虫学报*, 55(1): 19–24]
- Ma Y, Hao PY, Lu CF, Yu XP. 2013. Molecular cloning and function analysis of cuticular protein gene *NIICP* in the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). *Acta Entomologica Sinica*, 56(11): 1244–1251 (in Chinese) [马艳, 郝培应, 陆潮峰, 俞晓平. 2013. 褐飞虱表皮蛋白基因 *NIICP* 的克隆及功能研究. *昆虫学报*, 56(11): 1244–1251]
- Ma YY, Liu W, Wang Y, Wang DY, Lei P, Ru YT, Jiang YR, Yang RS,

- Qin L. 2018. Expression profiling and functional analysis of RR-1 cuticular protein genes *ApCP12* and *ApCP23* in *Antheraea pernyi* (Lepidoptera: Saturniidae). *Acta Entomologica Sinica*, 61(2): 188–199 (in Chinese) [马月月, 刘微, 王勇, 王德意, 雷飘, 汝玉涛, 姜义仁, 杨瑞生, 秦利. 2018. 柞蚕 RR-1 亚族表皮蛋白基因 *ApCP12* 与 *ApCP23* 的表达特征与功能分析. 昆虫学报, 61(2): 188–199]
- Mello TRP, Aleixo AC, Pinheiro DG, Nunes FMF, Cristino AS, Bitondi MMG, Barchuk AR, Simões ZLP. 2019. Hormonal control and target genes of ftz-fl expression in the honeybee *Apis mellifera*: a positive loop linking juvenile hormone, ftz-fl, and vitellogenin. *Insect Molecular Biology*, 28(1): 145–159
- Moussian B. 2010. Recent advances in understanding mechanisms of insect cuticle differentiation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40(5): 363–375
- Murata T, Kageyama Y, Hirose S, Ueda H. 1996. Regulation of the EDG84A gene by FTZ-F1 during metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Biology*, 16(11): 6509–6515
- Okamoto S, Futahashi R, Kojima T, Mita K, Fujiwara H. 2008. Catalogue of epidermal genes: genes expressed in the epidermis during larval molt of the silkworm *Bombyx mori*. *BMC Genomics*, 9: 396
- Pan PL, Ye YX, Lou YH, Lu JB, Cheng C, Shen Y, Moussian B, Zhang CX. 2018. A comprehensive omics analysis and functional survey of cuticular proteins in the brown planthopper. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(20): 5175–5180
- Shan YM, Zhang ZR, Zhou XR, Wu YG, Pang BP. 2019. Molecular cloning of a cuticular protein gene *GdAbd* from *Galeruca daurica* (Coleoptera: Chrysomelidae) and its response to temperature stress. *Journal of Plant Protection*, 46(3): 514–521 (in Chinese) [单艳敏, 张卓然, 周晓榕, 乌英嘎, 庞保平. 2019. 沙葱萤叶甲表皮蛋白基因 *GdAbd* 的克隆及对温度胁迫的响应. 植物保护学报, 46(3): 514–521]
- Smagghe G, Pineda S, Carton B, Estal PD, Budia F, Viñuela E. 2003. Toxicity and kinetics of methoxyfenozide in greenhouse-selected *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Management Science*, 59(11): 1203–1209
- Vannini L, Reed TW, Willis JH. 2014. Temporal and spatial expression of cuticular proteins of *Anopheles gambiae* implicated in insecticide resistance or differentiation of M/S incipient species. *Parasites & Vectors*, 7: 24
- Volovych O, Lin Z, Du J, Jiang H, Zou Z. 2020. Identification and temporal expression profiles of cuticular proteins in the endoparasitoid wasp, *Microplitis mediator*. *Insect Science*, 27(5): 998–1018
- Xu Y, Yang XS, Sun XH, Li XX, Liu ZH, Yin Q, Ma L, Zhou D, Sun Y, Shen B, et al. 2020. Transcription factor FTZ-F1 regulates mosquito cuticular protein CPLCG5 conferring resistance to pyrethroids in *Culex pipiens pallens*. *Parasites & Vectors*, 13(1): 514
- Zhang WN, Ma L, Liu XY, Peng YC, Liang GM, Xiao HJ. 2021. Dissecting the roles of FTZ-F1 in larval molting and pupation, and the sublethal effects of methoxyfenozide on *Helicoverpa armigera*. *Pest Management Science*, 77(3): 1328–1338
- Zhao P, Zhang S, Zhao CC, Hu FM, Cui JJ, Li SQ. 2020. Cloning and expression profiling of cuticular protein genes of *Spodoptera litura*. *Cotton Science*, 32(4): 292–304 (in Chinese) [赵鹏, 张帅, 赵晨晨, 胡方梅, 崔金杰, 李绍勤. 2020. 斜纹夜蛾表皮蛋白基因克隆及表达谱分析. 棉花学报, 32(4): 292–304]

(责任编辑:张俊芳)