

棉铃虫 *JNKs* 基因的克隆及表达分析

于思琪¹, 汤金荣¹, 张彩虹¹, EI THINZAR SOE¹, 梁革梅^{1,2,*}

(1. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193;

2. 中国农业科学院西部农业研究中心, 昌吉 831100)

摘要 c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)是 MAPK 家族(mitogen-activated protein kinases, 丝裂原活化蛋白激酶)的重要成员,具有参与昆虫抗逆反应等多种功能。为明确 JNK 在棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 中的表达特性及其对 Bt 杀虫蛋白的应激与免疫反应,本研究通过 PCR 克隆得到 2 个棉铃虫 JNK 基因 *HaJNK1* 和 *HaJNK2*;生物信息学分析结果显示;*HaJNK1* 和 *HaJNK2* 基因开放阅读框分别为 1 191、1 143 bp,分别编码 397、381 个氨基酸。系统进化树分析结果表明棉铃虫 *HaJNK1* 与黏虫 *Mythimna separata* 聚为一支,亲缘关系较近,*HaJNK2* 与家蚕 *Bombyx mori* 聚为一支,同源性较高。利用实时荧光定量 PCR 技术分析 *HaJNK1* 与 *HaJNK2* 在棉铃虫不同发育时期、不同组织中的表达量,发现 *HaJNK1* 与 *HaJNK2* 在卵中表达量最高,其次是雌成虫;*HaJNK1* 在性腺中表达量最高,其次是唾液腺;*HaJNK2* 在头部表达量最高,其次是性腺。取食 Cry1Ac 的 4 龄棉铃虫幼虫的中肠组织中,*HaJNK1* 与 *HaJNK2* 的表达量均显著升高。推测 *HaJNKs* 基因可能参与棉铃虫抵御 Bt 杀虫蛋白伤害的应激和抗逆反应。

关键词 棉铃虫; Cry1Ac 蛋白; JNK 基因; 表达水平

中图分类号: S 435.622.3 文献标识码: A DOI: 10.16688/j.zwbh.2022607

Cloning and expression analysis of *JNKs* gene in cotton bollworm *Helicoverpa armigera*

YU Siqi¹, TANG Jinrong¹, ZHANG Caihong¹, EI THINZAR SOE¹, LIANG Gemei^{1,2,*}

(1. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. West Agricultural Research Center, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changji 831100, China)

Abstract c-Jun N-terminal kinase (JNK) is an important member of the MAPK family (mitogen-activated protein kinases), which has various functions such as participating in insect anti-stress response. In order to clarify the expression characteristics of *HaJNK* and its role in defense against Bt insecticidal protein in cotton bollworm *Helicoverpa armigera*, we cloned two *HaJNK* gene coding sequences *HaJNK1* and *HaJNK2* by PCR amplification. Bioinformatics analysis showed that the open reading frames of *HaJNK1* and *HaJNK2* genes were 1 191 bp and 1 143 bp, encoding 397 and 381 amino acids, respectively. Phylogenetic tree analysis showed that *HaJNK1* of *H. armigera* had high homology with that of *Mythimna separata* and *HaJNK2* of *H. armigera* is clustered with that of *Bombyx mori*. Quantitative real-time PCR was used to analyze the expression levels of *HaJNK1* and *HaJNK2* in different developmental stages and tissues. It was found that the expression levels of *HaJNK1* and *HaJNK2* were the highest in the stage of egg, following by female adults. The highest expression of *HaJNK1* was observed in gonads followed by salivary glands, and the highest expression of *HaJNK2* was in head followed by gonads. For the fourth instar larvae, after cotton bollworm fed on Cry1Ac, the expression levels of *HaJNK1* and *HaJNK2* in midgut were significantly increased. It was speculated that the *HaJNKs* of *H. armigera* might be involved in emergency response and antistress response against Bt insecticidal protein.

Key words *Helicoverpa armigera*; Cry1Ac protein; JNK genes; expression level

收稿日期: 2022-09-30 修订日期: 2022-10-14

基金项目: 国家棉花产业技术体系(CARS-15-20)

* 通信作者 E-mail: gmliang@ippcaas.cn

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)高度保守,在细胞增殖、分化和迁移等过程中发挥着重要作用,还参与细胞对环境的应激适应、炎症反应、抗逆性等多种重要的生理过程^[1]。MAPK通过4级磷酸化级联反应给邻近的蛋白质传递信号^[2],主要有4条信号通路,分别为:c-Jun氨基末端激酶途径(c-Jun N-terminal kinase, JNK)、蛋白激酶 P38 途径(protein kinase 38, P38)、细胞外信号调节蛋白激酶途径(extracellular signal-regulated protein kinase, ERK)和 ERK5/BMK1 (big MAP kinase 1)途径^[3]。JNK 信号通路是 MAPK 中的重要通路之一,已有文献报道昆虫 JNK 在响应杀虫剂、低温、外来病原微生物、紫外辐射的应激反应中发挥着重要作用,如:低温可以诱导激活西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* 体内 JNK、P38 信号通路,引起应激反应^[4];烟粉虱 *Bemisia tabaci* 的 JNK 基因在响应细菌、真菌的胁迫时发挥着重要作用^[5];白纹伊蚊 *Aedes albopictus* 的 JNK 基因响应热灭活细菌胁迫,且在 30 min 时表达量达到最大^[6];当棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 受到紫外辐射时,其 JNK 信号通路被激活并发生一系列的应激反应^[7]。而且 JNK 信号通路还参与昆虫的发育和免疫反应等,如 JNK 在果蝇 *Drosophila* 的形态发育和免疫反应过程中发挥作用^[8];白纹伊蚊幼虫的 JNK 基因被干扰后 48 h 死亡率会显著增加^[9]。

Bt 是目前世界上产量最大、应用最广的生物杀虫剂。由于 Bt 杀虫蛋白具有杀虫效果好、安全、高效等优点^[10-13],Bt 杀虫基因已广泛用于抗虫转基因作物的研制^[14],但是靶标害虫对其也存在一系列的应激与免疫反应,甚至有些靶标害虫产生了抗性^[1,15-21]。因此,明确 Bt 蛋白杀虫机制和昆虫对杀虫蛋白产生应激反应的作用机制对延长 Bt 产品的使用寿命具有重要意义。研究表明,小菜蛾 *Plutella xylostella* 中肠 Bt 杀虫蛋白受体位于抗性基因座内的 MAPK 途径调控,与敏感品系相比,Bt Cry1Ac 抗性品系中 MAP4K4 基因显著上调,并反式调控多个抗性基因差异表达^[22-25]。

JNK 途径可由多种生物因子或非生物因子激活,昆虫取食 Bt 杀虫蛋白后其免疫系统会产生一系列的应激、免疫反应^[26-27]。因此,我们推测 JNKs 可能参与棉铃虫抵御 Bt 杀虫蛋白伤害及对其产生

抗性的过程。本研究克隆得到两条棉铃虫 JNK 基因序列,分别命名为 *HaJNK1*、*HaJNK2*,通过荧光定量 PCR 分析了 *HaJNKs* 的时空表达谱,并比较了棉铃虫取食 Cry1Ac 蛋白后对 *HaJNKs* 表达量的影响,以期为进一步揭示棉铃虫 *HaJNKs* 基因在抵御 Bt 杀虫蛋白及对其产生抗性机制中的作用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试昆虫:棉铃虫 96S 敏感品系,1996 年采自河南省新乡市棉田,在实验室人工饲养至今,未接触任何 Bt 杀虫蛋白或杀虫剂。幼虫用人工饲料饲养,成虫饲喂 10% 的糖水^[28]。饲养温度为 (27±2)℃,光周期为 L//D=14 h//10 h,相对湿度为 (75±10)%。

供试杀虫蛋白:Cry1Ac 蛋白,购自北京诺思特生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 样品收集

不同组织:选取 2 日龄的 5 龄棉铃虫 90 头,每 30 头作为 1 个重复,共 3 个重复。幼虫置于冰上解剖并分别截取以下 10 种组织:头、表皮、唾液腺、脂肪体、前肠、中肠、后肠、马氏管、血淋巴、性腺,取样后在 0.7% NaCl 溶液中清洗,滤纸吸干,然后立刻置于 1.5 mL 离心管中,放入液氮或 -80℃ 保存。

不同发育时期:收集不同发育时期的棉铃虫,卵 400 粒、1 龄幼虫 100 头、2 龄幼虫 50 头、3 龄幼虫 20 头、4 龄和 5 龄幼虫各 10 头、雌蛹、雄蛹、雌成虫、雄成虫各 10 头为 1 次重复,每个时期设 3 次重复。取样后立刻置于液氮或 -80℃ 保存。

1.2.2 RNA 提取与 cDNA 合成

按照说明书用 TRIzol 试剂提取总 RNA,并在 NanoDrop 1000(Thermo Fisher)紫外分光光度计检测总 RNA 的浓度和质量,确保 A_{260}/A_{280} 、 A_{260}/A_{230} 均在 1.8~2.2 范围内,之后用琼脂糖凝胶电泳检测质量。按照 HiScript III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)试剂盒说明书合成 cDNA 第一链(南京诺唯赞生物科技股份有限公司),并置于 -20℃ 保存(用于定量的样品取 1 μg RNA 用于反

转录)。

1.2.3 *HaJNK* 基因的克隆

根据 NCBI 数据库的棉铃虫 *HaJNK* 序列,利用 primer3 plus 设计 PCR 特异性引物(表 1),以 4 龄幼虫中肠 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,体系如下:2 × Phanta Max Master Mix 25 μ L,上、下游引物各 2 μ L,cDNA 模板 2 μ L,超纯水 19 μ L。反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,60 $^{\circ}$ C 退火 15 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 30 s,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。2%琼脂糖凝胶电泳检测,使用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒回收目的条带并纯化,而后将纯化产物连接到 *pEASY-Blunt Simple*(全式金北京生物技术有限公司)克隆载体上,并转化至 Trans1-T1 感受态细胞中,待细胞复苏后,取 200 μ L 涂在含有氨苄抗生素的培养基上,37 $^{\circ}$ C 过夜培养,之后挑取单克隆,菌液 PCR 验证后挑取阳性菌液送至深圳华大基因有限公司进行测序。

1.2.4 序列分析以及进化树的构建

利用 DNAMAN 软件对测序结果进行拼接并比对,利用 NCBI 中 ORF finder 预测开放阅读框,并翻译成氨基酸序列。利用 ExPaSy(http://web.expasy.org/compute_pi)预测 *HaJNK* 蛋白的分子量和等电点, Sig-nalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/Sig-nalP/>)预测 *HaJNK* 的信号肽,NCBI CDD(Conserved Domain Database)预测 *HaJNK* 的保守结构域,利用 SWISS MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>)预测蛋白的三级结构。利用 NCBI-Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)在线搜索得到棉铃虫 *HaJNK* 的同源蛋白,使用 MEGA 7.0 软件邻接法(neighbor-joining,NJ)构建系统发育树。

在线搜索得到棉铃虫 *HaJNK* 的同源蛋白,使用 MEGA 7.0 软件邻接法(neighbor-joining,NJ)构建系统发育树。

1.2.5 RT-qPCR 分析 *HaJNK* 的时空表达

基于 *HaJNK* 基因序列,用 Primer5 设计 RT-qPCR 特异性引物,内参基因为 *RPS15*(基因序列号:AY818611.1)与 *18S*(基因序列号:AB620126.1),合成并进行引物扩增效率检测(表 1)。模板为棉铃虫不同发育时期、不同组织的 cDNA,利用 ABI QuantStudio 6(Thermo Fisher)高产率实时荧光定量 PCR 仪扩增。反应总体积 20 μ L:2×*Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix* 10 μ L,上、下游引物各 0.4 μ L,超纯水为 7.2 μ L,cDNA 模板 2 μ L。反应条件参照 *Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix* 试剂盒的说明书:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s;95 $^{\circ}$ C 变性 10 s,60 $^{\circ}$ C 退火/延伸 20 s,40 个循环;采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析 *HaJNK* 基因的相对表达量^[29]。

1.2.6 取食 *Cry1Ac* 对 *HaJNKs* 基因表达量的影响

用 20、40、80 ng/ μ L *Cry1Ac* 分别处理 4 龄棉铃虫,分别在 0、3、6、12、24、48 h 时取样,每次取 10 头为 1 个重复,每个时间段 3 个生物学重复。进行荧光定量 PCR 检测 *HaJNKs* 基因的变化。

1.3 数据分析

利用 SPSS Statistics 26 软件对试验数据进行分析。采用单因素方差分析(One-way ANOVA)分析不同发育时期、组织的表达量之间以及 *Cry1Ac* 处理前后 *HaJNK* 表达量的差异显著性。

表 1 本研究所用引物

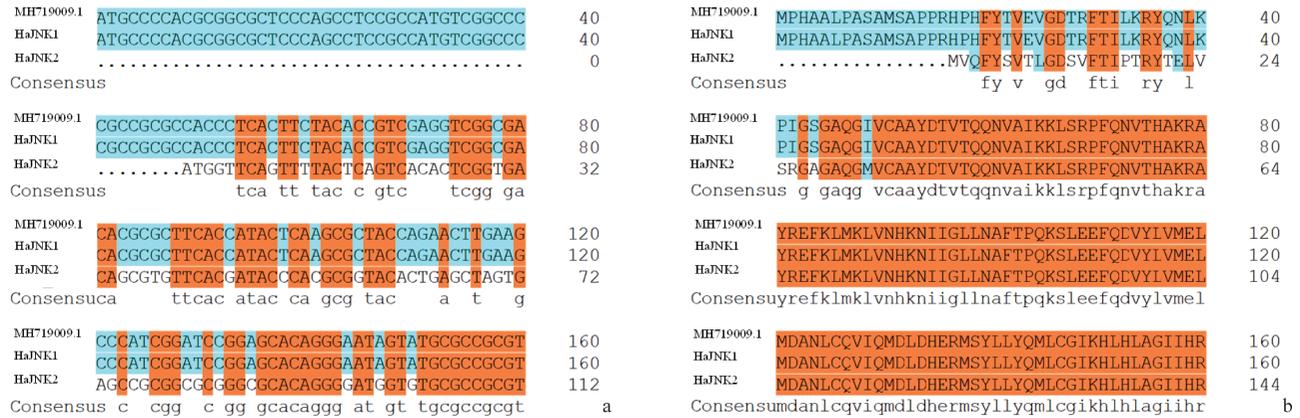
Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence	引物用途 Primer application	扩增效率/% Amplification efficiency	扩增片段大小/bp Expected size
c- <i>HaJNK</i> -F	AAAAGTAGGGGTGGTTCGATGCCCC	基因克隆	—	1 191
c- <i>HaJNK</i> -R	TGCTGTTGCCTATGTGGTGAGGGCGGG			
q- <i>HaJNK1</i> -F	CGCCACCCTCACTTCTACAC	实时荧光定量 PCR	99.04	83
q- <i>HaJNK1</i> -R	CCGATGGGCTTCAAGTTCTG			
q- <i>HaJNK2</i> -F	CCTGAAGCCGTCCAACAT		109.10	164
q- <i>HaJNK2</i> -R	CGTTCTCCGTGTATCCCAT			
<i>RPS15</i> -F	CTGAGGTCGATGAAACTCTC		91.45	107
<i>RPS15</i> -R	CTCCATGAGTTGCTCATTG			
<i>18S</i> -F	GCATCTTTCAAATGTCTGC		90.80	230
<i>18S</i> -R	TACTCATTCGGATTACGAG			

2 结果与分析

2.1 *HaJNK* 基因克隆和生物信息学分析

经克隆及多次重复测序得到两条 *HaJNK* 序列,分别命名为 *HaJNK1*、*HaJNK2*,其开放阅读框分别为 1 191 bp 和 1 143 bp,分别编码 396、380 个

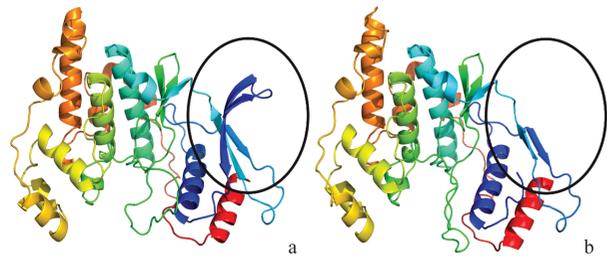


a: DNA序列; b: 氨基酸序列。蓝色表示序列不同部分,橘色表示序列相同部分

a: DNA sequence; b: Amino acid sequence. The blue represents different parts of the sequence, Orange represents the same part of the sequence

图 1 棉铃虫 *HaJNKs* 的部分 DNA 序列与氨基酸序列

Fig. 1 Partial DNA sequence and amino acid sequence of *HaJNKs* in *Helicoverpa armigera*



a: *HaJNK1* 蛋白三维结构; b: *HaJNK2* 蛋白三维结构。图中圆圈内两个大的发夹结构为 *HaJNK1* 特有
a: The predicted 3D structures of *HaJNK1* protein; b: The predicted 3D structures of *HaJNK2* protein. The circle in the figure shows the unique two big hairpin structures of *HaJNK1*

图 2 预测的棉铃虫 *HaJNKs* 蛋白三维结构

Fig. 2 Predicted 3D structures of *HaJNKs* protein in *Helicoverpa armigera*

2.2 *HaJNK* 进化树分析

序列对比结果显示,棉铃虫的 *HaJNK* 与鳞翅目昆虫的同源性都较高,其中 *HaJNK1* 与黏虫聚为一支,亲缘关系较近, *HaJNK2* 与家蚕聚为一支,它们的亲缘关系较近(图 3)。

2.3 *HaJNK* 的时空表达谱

2 个 *HaJNK* 基因在棉铃虫的各个发育阶段都有表达,不同发育阶段的表达量存在显著差异 (*HaJNK1*: $F = 47.81, P = 0.001$; *HaJNK2*: $F =$

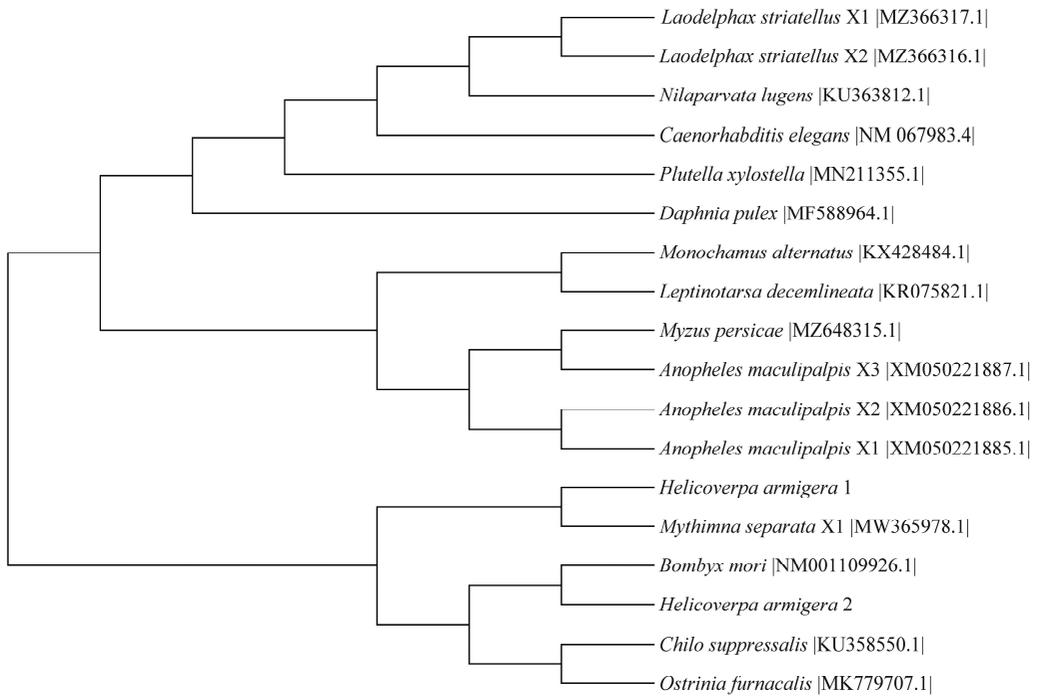
氨基酸。部分序列对比如图 1 所示。预测 *HaJNK1* 和 *HaJNK2* 的蛋白分子量分别为 45.07 kD 和 43.32 kD,等电点为 6.49、6.06。 *HaJNK1* 与 *HaJNK2* 均存在于细胞质中,无信号肽。 *HaJNK1* 与 *HaJNK2* 蛋白的三维结构存在差异, *HaJNK1* 在起始位置多两个发夹结构(图 2)。

38.34, $P = 0.001$)。 *HaJNK1* 和 *HaJNK2* 均在卵期表达量最高,其次 *HaJNK1* 在雌成虫、2 龄幼虫中表达量较高, *HaJNK2* 表达量较高的是雌成虫和 1 龄幼虫(图 4)。

2 个 *HaJNK* 基因在棉铃虫的不同组织中均有表达,不同组织中的表达量存在显著差异 (*HaJNK1*: $F = 31.39, P = 0.001$; *HaJNK2*: $F = 20.88, P = 0.001$)。其中 *HaJNK1* 在性腺中表达量最高,其次是唾液腺,头和表皮中也有较高的表达量; *HaJNK2* 在头部表达量最高,显著高于其他组织(图 5)。

2.4 取食 *Cry1Ac* 后 *HaJNKs* 表达量变化

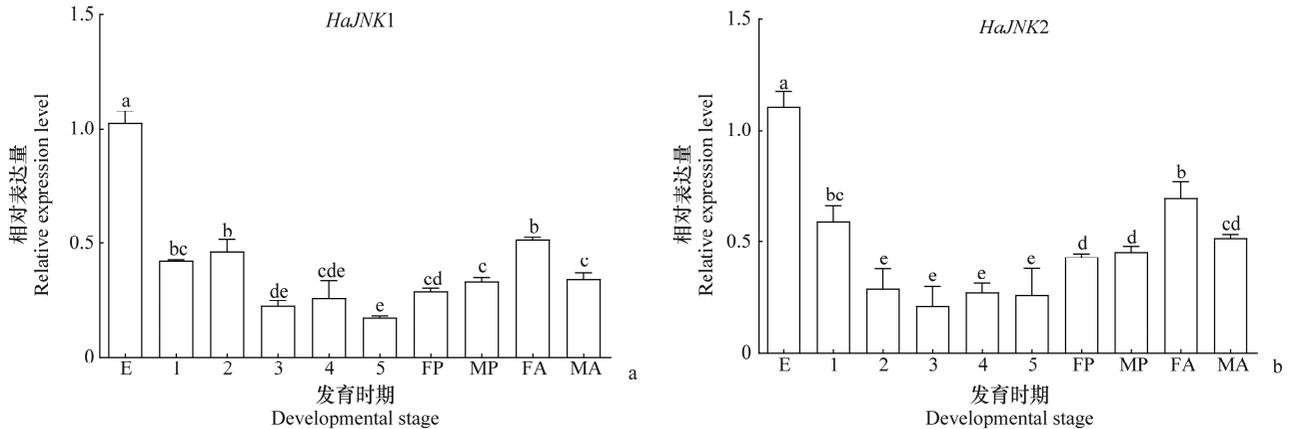
取食相同浓度 *Cry1Ac* 不同时间的棉铃虫中 *HaJNKs* 的表达量存在显著差异, P 值均小于 0.05。随着时间的变化 *HaJNK1* 和 *HaJNK2* 的表达量都呈现先升高后降低的趋势(图 6)。 *HaJNK1* 和 *HaJNK2* 的表达量分别在 20 ng/ μ L 的 *Cry1Ac* 处理 6 h、40 ng/ μ L 的 *Cry1Ac* 处理 12 h 和 80 ng/ μ L 的 *Cry1Ac* 处理 12 h 后达到最高; *HaJNK1* 和 *HaJNK2* 均在 80 ng/ μ L *Cry1Ac* 处理 12 h 时表达量达到最高。



Bombyx mori: 家蚕; *Myzus persicae*: 桃蚜; *Daphnia pulex*: 桃蛀螟; *Nilaparvata lugens*: 褐飞虱; *Chilo suppressalis*: 二化螟; *Plutella xylostella*: 小菜蛾; *Monochamus alternatus*: 松墨天牛; *Ostrinia furnacalis*: 亚洲玉米螟; *Leptinotarsa decemlineata*: 马铃薯甲虫; *Caenorhabditis elegans*: 秀丽隐杆线虫; *Mythimna separata* X1: 黏虫X1; *Laodelphax striatellus* X1: 灰飞虱X1; *Laodelphax striatellus* X2: 灰飞虱X2; *Anopheles maculipalpis* X1: 意大利按蚊X1; *Anopheles maculipalpis* X2: 意大利按蚊X2; *Anopheles maculipalpis* X3: 意大利按蚊X3

图 3 基于 *HaJNK* 氨基酸序列采用邻接法构建棉铃虫和相关昆虫的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of *Helicoverpa armigera* and other insects based on *HaJNK* amino acid sequence constructed by neighbour-joining method

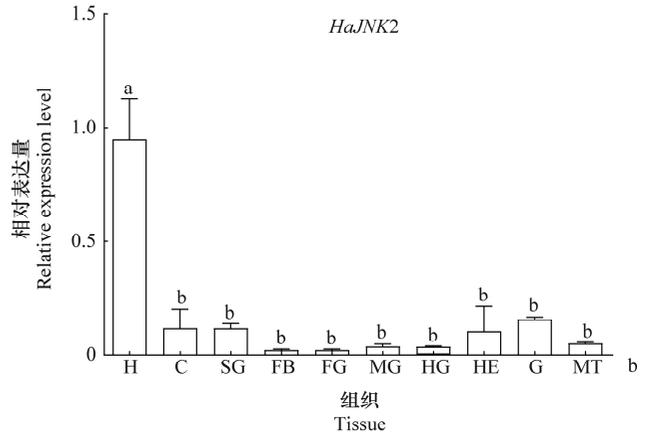
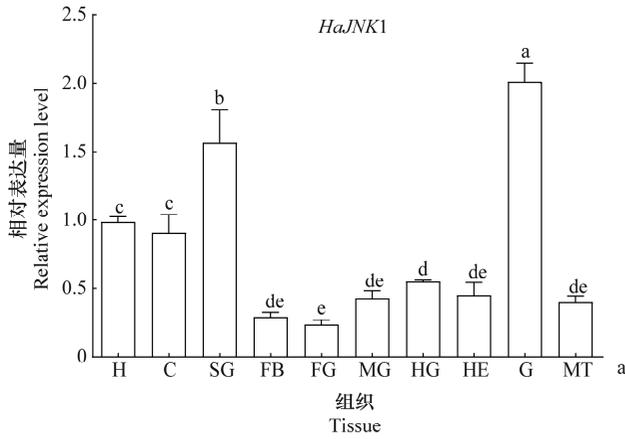


E: 卵; 1~5: 1~5龄幼虫; FP: 雌蛹; MP: 雄蛹; FA: 雌成虫; MA: 雄成虫。图中数据为平均值±标准误。不同小写字母表示经 Tukey 法检验在0.05 水平差异显著。下同

E: Egg; 1~5: 1st-instar to 5th-instar larvae; FP: Female pupa; MP: Male pupa; FA: Female adult; MA: Male adult. Data are mean±SE. Different lowercase letters indicate significant difference at 0.05 level by Tukey test. The same applies below

图 4 *HaJNK* 基因在棉铃虫不同发育时期的表达量

Fig. 4 Expression level of *HaJNK* genes in different developmental stages of *Helicoverpa armigera*



H: 头; C: 表皮; SG: 唾液腺; FB: 脂肪体; FG: 前肠; MG: 中肠; HG: 后肠; HE: 血淋巴; G: 性腺; MT: 马氏管
 H: Head; C: Epidermis; SG: Salivary gland; FB: Fat body; FG: Foregut; MG: Midgut; HG: Hindgut; HE: Hemolymph; G: Gonad; MT: Malpighian tube

图5 *HaJNK* 基因在棉铃虫不同组织的表达量

Fig. 5 Expression level of *HaJNK* genes in different tissues of *Helicoverpa armigera*

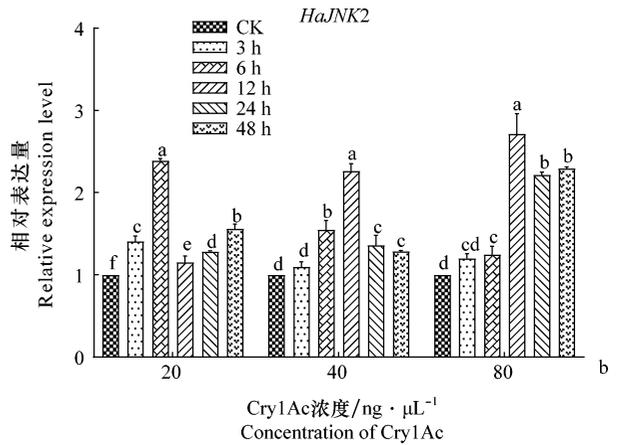
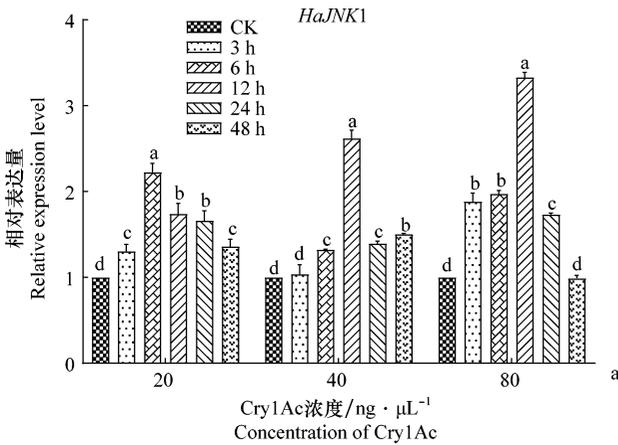


图6 不同浓度 Cry1Ac 胁迫处理后棉铃虫 *HaJNKs* 表达量的变化

Fig. 6 Changes of *HaJNKs* expression level in *Helicoverpa armigera* treated by different concentrations of Cry1Ac

3 结论与讨论

MAPK 信号通路在调节生物生长、发育、繁殖过程中起到至关重要的作用,也是免疫反应中的关键因子,JNK 作为其中一种重要通路发挥的作用不可小觑^[6]。已有报道表明 JNK 在昆虫抵御低温、紫外、外来病原微生物胁迫过程中起到了重要作用。本文利用 1 对引物克隆棉铃虫的 *HaJNK* 基因,通过大量样本测序发现,除了已经被鉴定过的 *HaJNK1* 之外,还发现 *HaJNK2* 基因,同时两个 *HaJNK* 基因还存在不同的剪切本。经过序列比对,发现棉铃虫 *HaJNK2* 与 *HaJNK1* 序列一致性达 98.77%,Query Cover 为 92.00%。经生物信息学分析发现两个 *HaJNK* 在起始位置相差 16 个氨

基酸(图 1b),蛋白三维结构预测发现,这 16 个氨基酸编码的蛋白质折叠成为 2 个发夹结构(图 2a)。由于前人研究发现激酶的磷酸化会受到发夹结构的影响,而磷酸化水平会直接影响蛋白质功能^[30]。因此,我们推测这可能造成 *HaJNK1* 和 *HaJNK2* 在棉铃虫体内发挥不同的功能。

进化树分析结果表明,棉铃虫 *HaJNK1* 与二化螟、家蚕进化为同一支,再与棉铃虫 *HaJNK2* 聚为一支,它们在亲缘关系上较近。因此,可能与其他鳞翅目昆虫的 *JNK* 基因存在类似的功能,参与抵御外来病原微生物等的应激及免疫反应。时空表达谱分析表明 *HaJNKs* 在棉铃虫不同组织、不同龄期均有表达,说明 *HaJNK* 存在于棉铃虫的整个生命过程中,可能参与生物体的生长、发育、繁殖

等过程。随着棉铃虫的生长发育 *HaJNKs* 的表达量呈现出先高后低的趋势, *HaJNKs* 在卵期高表达, 显著高于其他发育时期, *HaJNK1* 在性腺中表达量最高, 其次是唾液腺, *HaJNK2* 在头部表达量最高, 其次是性腺。报道显示, 果蝇卵期 *JNK* 高表达可能是因为 *JNK* 通路参与卵的形成, 并在卵泡细胞和其他上皮细胞的形态发生过程中起到重要作用^[31]; 棉铃虫头部 *HaJNK* 表达量高可能是由于复眼视网膜细胞是昆虫感受外界光刺激的主要场所, *HaJNK* 将外界光刺激的胞外信号转导至胞内, 因此含有复眼的头部 *HaJNK* 高表达^[7]。我们推测 *HaJNK* 基因在棉铃虫各发育时期、组织中发挥着重要的功能, 除参与卵形成、感受光刺激等功能外, 还可能参与性别分化^[32], 且两种 *HaJNK* 基因在不同的组织中发挥的功能有所不同。

棉铃虫受到 *Cry1Ac* 胁迫诱导后 *HaJNKs* 的表达量呈现出先升高后降低的趋势。低浓度 (20 ng/ μ L) *Cry1Ac* 处理 6 h 后, *HaJNK1* 和 *HaJNK2* 表达量达到最高, 分别为对照组棉铃虫的 2.23 倍、2.39 倍; 高浓度 (40 ng/ μ L, 80 ng/ μ L) *Cry1Ac* 处理 12 h 后, *HaJNK1* 和 *HaJNK2* 表达量达到最高, 其中 80 ng/ μ L 处理分别为对照组棉铃虫的 3.32 倍、2.71 倍。这与其他昆虫中的报道类似, 经过 *Cry* 蛋白处理后亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 的 *MAPKs* 基因有明显的上调现象^[33], 推测受到 *Cry* 蛋白的胁迫后引起了 *MAPK* 通路的免疫反应。烟粉虱被病原菌侵染后 *JNK* 的 mRNA 水平与蛋白磷酸化水平显著升高, 说明 *JNK* 信号通路在烟粉虱抵抗病原菌侵染过程中起到重要作用^[5]; *JNK* 信号通路被果蝇免疫反应中的 *LSP* 所激活, 参与果蝇的免疫反应^[8]。而且, 棉铃虫取食 *Cry1Ac* 后 *HaJNK* 表达量的升高, 也可能激活 *MAPK* 通路, 通过反式调控棉铃虫中肠上相关 *Bt* 受体蛋白基因的表达, 降低受体蛋白与 *Bt* 蛋白的结合, 从而减少对棉铃虫的为害^[34-35]。关于 *HaJNK* 在 *Cry1Ac* 对棉铃虫的毒力过程中的作用, 后续我们将进一步探索研究。

参考文献

[1] CARGNELLO M, ROUX P P. Activation and function of the

MAPKs and their substrates, the *MAPK*-activated protein kinases [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2011, 75(1): 50-83.

- [2] ARTHUR J S C, LEY S C. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity [J]. *Nature Reviews: Immunology*, 2013, 13(9): 679-692.
- [3] RURONG J I, GEREAU R W, MALCANGIO M. *MAP* kinase and pain [J]. *Brain Research Reviews*, 2009, 60(1): 135-148.
- [4] 赵倩倩, 张桃, 王小奇, 等. 西花蓟马被球孢白僵菌侵染后 β *GRP*s 基因的鉴定及表达分析 [J]. *中国生物防治学报*, 2017, 33(2): 206-212.
- [5] WANG Lanlan, HUANG Huang, ZHANG Changrong. Cloning and functional characterization of *c-Jun* NH₂-terminal kinase from the Mediterranean species of the whitefly *Bemisia tabaci* complex [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14(7): 13433-13446.
- [6] MIZUTANI T, KOBAYASHI M, ESHITA Y, et al. Characterization of *JNK*-like protein derived from a mosquito cell line, C6/36 [J]. *Insect Molecular Biology*, 2003, 12(1): 61-66.
- [7] 刘小飞, 孟建玉, 赵晓超. 棉铃虫 *c-Jun* 氨基末端激酶基因的克隆、表达谱及对 UV-A 胁迫的响应 [J]. *昆虫学报*, 2019, 62(4): 407-417.
- [8] SLUSS H K, HAN Z Q, BARRETT T. A *JNK* signal transduction pathway that mediates morphogenesis and an immune response in *Drosophila* [J]. *Gene and Development*, 1996, 10(21): 2745-2758.
- [9] NAGANO Y K, ESHITA Y K, FUKUSHIII S. Inhibitory effects of *JNK* on *Aedes albopictus* early larval development [J]. *Urban Pest Management*, 2012, 2(1): 7-13.
- [10] MENDELSON M, KOUGH J, VAITUZIS, et al. Are *Bt* crops safe? [J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(9): 1003-1009.
- [11] SANAHUJA G, BANAKAR R, TWYMAN R M, et al. *Bacillus thuringiensis*: A century of research, development and commercial applications [J]. *Plant Biotechnology*, 2011, 9(3): 283-300.
- [12] COMAS C, LUMBIERRES B, PONS X, et al. No effects of *Bacillus thuringiensis* maize on nontarget organisms in the field in southern Europe: A meta-analysis of 26 arthropod taxa [J]. *Transgenic Research*, 2014, 23(1): 135-143.
- [13] NICOLIA A, MANZO A, VERONESI F, et al. An overview of the last 10 years of genetically engineered crop safety research [J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2014, 34(1): 77-88.
- [14] BRAVO A, LIKITVIVATANAVONG S, GILL S S, et al. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, 41(7):

423 - 431.

- [15] 王月琴, 何康来, 王振营. 靶标害虫对 Bt 玉米的抗性发展和治理策略[J]. 应用昆虫学报, 2019, 56(1): 12 - 23.
- [16] 焦晓国, 崔旭红, 张国安. Bt 水稻对田间非靶标害虫种群动态的影响[J]. 应用昆虫学报, 2006, 43(6): 774 - 777.
- [17] 杨晓伟, 李云河, 韩兰芝. “高剂量/庇护所”策略在 Bt 玉米靶标害虫抗性治理中的应用及成效[J]. 植物保护, 2022, 48(4): 59 - 67.
- [18] 刘磊磊, 徐培文, 刘凯于, 等. 受体介导的鳞翅目昆虫对 Bt 毒素抗性机制进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(5): 1809 - 1823.
- [19] ZHANG Haonan, YIN Wei, ZHAO Jing, et al. Early warning of cotton bollworm resistance associated with intensive planting of Bt cotton in China [J/OL]. PLoS ONE, 2011, 6(8): e22874. DOI: 10.1371/journal.pone.0022874.
- [20] ZHANG Haonan, TIAN Wen, ZHAO Jing, et al. Diverse genetic basis of field-evolved resistance to Bt cotton in cotton bollworm from China [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(26): 10275 - 10280.
- [21] LIN Jing, ZHANG Haonan, LU Yanhui, et al. Large-scale test of the natural refuge strategy for delaying insect resistance to transgenic Bt crops [J]. Nature Biotechnology, 2015, 33(2): 169 - 174.
- [22] GUO Zhaojiang, KANG Shi, CHEN Defeng, et al. MAPK signaling pathway alters expression of midgut ALP and ABCC genes and causes resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in diamondback moth [J/OL]. PLoS Genetics, 2015, 11(4): e1005124. DOI: 10.1371/journal.pgen.1005124.
- [23] GUO Zhaojiang, KANG Shi, ZHU Xun, et al. The midgut cadherin-like gene is not associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in *Plutella xylostella* (L.) [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2015, 126: 21 - 30.
- [24] GUO Zhaojiang, KANG Shi, ZHU Xun, et al. Down regulation of a novel ABC transporter gene (*Pxwhite*) is associated with Cry1Ac resistance in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2015, 59: 30 - 40.
- [25] GUO Zhaojiang, KANG Shi, SUN Dan, et al. MAPK-dependent hormonal signaling plasticity contributes to overcoming *Bacillus thuringiensis* toxin action in an insect host [J/OL]. Nature Communications, 2020, 11(1): 3003. DOI: 10.1038/s41467-020-16608-8.
- [26] FORCADA C, ALCACER E, GARCERA M D, et al. Differences in the midgut proteolytic activity of two *Heliothis virescens* strains, one susceptible and one resistant to *Bacillus thuringiensis* toxins [J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2010, 31(3): 257 - 272.
- [27] 俞元春, 冷春龙, 舒洪岚, 等. 转基因抗虫棉对土壤养分和酶活性的影响[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2011, 35(5): 21 - 24.
- [28] 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, 25(2): 16 - 18.
- [29] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402 - 408.
- [30] 谭诗平, 张宁, 胡志毅, 等. GIT1 发夹结构对成骨细胞内局部黏附激酶的磷酸化和分布的影响[J]. 江苏医药, 2011, 37(15): 1745 - 1747.
- [31] SUZANNE M, PERRIMON N, NOSELLI S. The *Drosophila* JNK pathway controls the morphogenesis of the egg dorsal appendages and micropyle [J]. Developmental Biology, 2001, 237(2): 282 - 294.
- [32] XIAO Yamei, CHEN Lili, LIU Jiao, et al. Contrast expression patterns of *JNK1* during sex reversal of the rice-field eel [J]. Journal of Experimental Zoology part B- Molecular and Developmental Evolution, 2010, 314(3): 242 - 256.
- [33] FENG Congjing, ZHAO Ya, CHEN Kangkang, et al. Clip domain prophenoloxidase activating protease is required for *Ostrinia furnacalis* Guenée to defend against bacterial infection [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2018, 87: 204 - 215.
- [34] WEI Jizhen, YANG Shuo, CHEN Lin. Transcriptomic responses to different Cry1Ac selection stresses in *Helicoverpa armigera* [J/OL]. Frontiers in Physiology, 2018, 9: 1653. DOI: 10.3389/fphys.2018.01653.
- [35] XIAO Yutao, WU Kongming. Recent progress on the interaction between insects and *Bacillus thuringiensis* crops [J/OL]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2019, 374(1767): 20180316. DOI: 10.1098/rstb.2018.0316.

(责任编辑: 杨明丽)