

张 青, 陆明星, 祝树德. 灰飞虱 2 种热激蛋白基因 *Hsp70* 的克隆、分析[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(6): 1257-1264.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2015.06.010

灰飞虱 2 种热激蛋白基因 *Hsp70* 的克隆、分析

张 青^{1,2}, 陆明星¹, 祝树德¹

(1.扬州大学园艺与植物保护学院, 江苏 扬州 225009; 2.苏州市农业科学院, 江苏 苏州 215155)

摘要: 灰飞虱 [*Laodelphax striatellus* (Fallén)] 是一种分布广, 对环境有很强适应性的重要水稻害虫。热激蛋白 70 (Hsp70) 家族是与生物体环境适应最为密切的一类蛋白质。本研究通过 RT-PCR 与 RACE 技术克隆灰飞虱 *Hsp70* 基因, 利用生物信息方法分析了该热激蛋白的特征, 采用实时荧光定量 PCR 技术研究该基因在不同生长发育阶段和不同温度条件下表达变化规律。结果显示: 克隆了 *Hsp70* 基因的 2 种 cDNA 全长序列, 分别命名为 *LsHsc70* (GenBank 登录号为 KF660252) 和 *LsHsp70* (GenBank 登录号为 KF660251)。*LsHsc70* 全长为 2 399 bp, 编码 657 个氨基酸, 编码的蛋白质等电点为 5.3, 分子量为 73 000; *LsHsp70* 全长为 2 468 bp, 编码 690 个氨基酸, 编码的蛋白质等电点为 5.8, 分子量为 74 900。*LsHsc70* 和 *LsHsp70* 的氨基酸序列中均含有 Hsp70 蛋白质家族的 3 个签名序列及 1 个 ATP-GTP 结合位点。系统进化关系分析结果表明它们与多种昆虫的 Hsp70 氨基酸序列有较高的同源性。不同发育阶段的灰飞虱体内 *LsHsc70* 和 *LsHsp70* 呈现出不同的表达模式, *LsHsc70* 在雄性成虫阶段表达量达到最大值, 而 *LsHsp70* 的最高表达量在 1 龄若虫阶段。不同性别的灰飞虱成虫体内 *LsHsc70* 表达量有显著差异, 而 *LsHsp70* 没有显著差异。高温和低温胁迫都可以诱导灰飞虱体内 *LsHsc70* 和 *LsHsp70* 的表达, 在 -4 ℃ 和 -9 ℃ 的低温胁迫下, *LsHsc70* 和 *LsHsp70* 分别达最大的表达量。在 40 ℃, *LsHsc70* 和 *LsHsp70* 表达水平均在处理后 0.5 h 时最高。而在 -4 ℃, *LsHsc70* 和 *LsHsp70* 的表达水平均在处理后 1 h 时达到最大值。结果表明灰飞虱可以通过调节体内的 *LsHsc70* 和 *LsHsp70* 表达, 来应对不良的环境温度。

关键词: 灰飞虱; 热激蛋白 70; 发育; 温度; 实时定量 PCR

中图分类号: S435.112+.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)06-1257-08

Cloning, sequence analysis and expression profiling of two heat shock protein 70 genes in small brown plant hopper, *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae)

ZHANG Qing^{1,2}, LU Ming-xing¹, ZHU Shu-de¹

(1. School of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 2. Suzhou Academy of Agricultural Sciences, Suzhou 215155, China)

Abstract: The small brown planthopper *Laodelphax striatellus* (Fallén), an important rice pest insect, feeds on rice and causes the decrease of yield and quality. The small brown planthopper is widely distributed and adapts to various environments. Heat shock protein 70 subfamily is considered as the protein related mostly to environmental adaption of organism. In this study, two full-length cDNA encoding Hsp70, *LsHsc70* (GenBank accession no. KF660252) and *LsHsp70* (GenBank accession no. KF660251), were cloned. The complete cDNA of *LsHsc70* was 2 399 bp in length, encoding a protein of 657 amino acids, with the theoretical isoelectric point of 5.3 and molecular weight of

收稿日期: 2015-09-08

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2011BAD16B03); 苏州市科技支撑计划项目 (SNG201204)

作者简介: 张 青 (1969-), 男, 江苏高邮人, 博士, 副研究员, 研究方向为农业昆虫与害虫治理。(Tel) 0512-66700877; (E-mail) zhangqingsz@163.com

通讯作者: 祝树德, (E-mail) sdzhu@yzu.edu.cn

73 000. The complete cDNA of *LsHsp70* was 2 468 bp in length, encoding a protein of 690 amino acids, with the theoretical isoelectric point of 5.8 and molecular weight of 74 900. The amino acid sequence of *LsHsc70* and *LsHsp70* both contained three signature sequences of Hsp70 family and a ATP-GTP binding site. The phylogenetic tree demonstrated that *LsHsc70* and *LsHsp70* shared high homology with Hsp70 amino acid sequence from other insect species. Real-time PCR analyses revealed that the expression level of *LsHsc70* differed from *LsHsp70* in different developmental stages; *LsHsc70* reached the highest level in the male adult of *L. striatellus*, while *LsHsp70* expression level peaked in the first instar nymphs. *LsHsc70* showed significant differences between male and female adults, but *LsHsp70* did not. The *LsHsc70* and *LsHsp70* expressions of *L. striatellus* could be induced by both heat and coldness stress. The highest *LsHsc70* and *LsHsp70* levels were observed at -4°C and -9°C , respectively. At 40°C , *LsHsc70* and *LsHsp70* levels reached the peaks 0.5 h after treatment. It was indicated that *L. striatellus* could regulate the levels of *LsHsc70* and *LsHsp70* to adapt to adverse temperatures.

Key words: *Laodelphax striatellus*; heat shock protein 70; development; temperature; real-time quantitative PCR

灰飞虱 [*Laodelphax striatellus* (Fallén)] 属半翅目飞虱科, 是水稻等粮食作物的重要害虫, 既能直接刺吸危害, 又能通过传播水稻条纹叶枯病毒 (Rice stripe virus, RSV) 等引起间接危害, 造成严重的产量损失^[1-4]。热激蛋白 (Heat shock proteins, Hsp) 作为细胞的重要组成成分几乎在所有的生物体都存在, Hsps 有的还受到多种胁迫的诱导, 如高温、低温、干燥、缺氧、杀虫剂、重金属、饥饿等^[5]。Hsp 的主要功能是参与蛋白质合成、折叠、装配及转运等生命活动^[6]。根据同源性与分子量大小, 昆虫热激蛋白一般分为 Hsp90、Hsp70、Hsp60、Hsp40 和小分子量热激蛋白 (sHsp)^[7-8]。其中 Hsp70 家族是最保守, 也是研究最为广泛的家族^[9]。热激蛋白 Hsp70 包含了胁迫诱导型和细胞组成型 (Heat shock cognate, Hsc70) 二种类型^[10]。Hsp70 主要结构包括氨基端的大小约为 45 000 的 ATP 结合域和羧基端的大约为 25 000 的结合结构域^[11]。尽管在蛋白质结构上具有许多共同的特征, 但是它们的表达模式完全不同。大量的研究表明: 热激蛋白 Hsp70 在生物体的生理功能、各种抗性、环境监测中具有重要的作用^[12-14]。温度是决定昆虫种群分布和丰度的最重要因子之一^[15-16]。在自然条件下, 昆虫经常要面对不利的温度, 但是由于其个体较小, 调节自身温度的能力较差, 因而在长期的进化过程中, 昆虫形成了多种补充的方法应对不利温度, 如昆虫可通过调节热激蛋白 Hsp70 的表达来维持其体内各种蛋白质的平衡以抵抗不良温度^[11, 17-18]。灰飞虱具有较强的耐高温、抗低温能力, 它能在我国长江中下游水稻主产区以 3~5 龄若虫越冬越夏^[19-22]。研究结果表明, 灰飞虱 4~5 龄若虫的过冷却点均在 -10°C 以下, 表现出较强的抗寒力^[22]。在 $18\sim 30^{\circ}\text{C}$ 下卵的

发育速率直线加快, 且高温不能抑制灰飞虱卵的发育^[23]。目前灰飞虱对不良温度适应的分子机制仍然不清楚。本研究从热激蛋白角度出发, 探索了灰飞虱对温度胁迫响应的分子机制。为进一步科学合理地制定该虫的综合防治策略提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

扬州大学园艺与植物保护学院昆虫实验室内饲养的不携带条纹叶枯病毒的灰飞虱种群, 用武育梗 7 号稻苗饲养 10 代以上。饲养条件为 $(26\pm 1)^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 70%, 光周期 16 L/8 D。

1.2 灰飞虱 *Hsp70* 基因的克隆

灰飞虱总 RNA 提取, *Hsp70* 基因中间片段克隆, *Hsp70* 基因 RACE 扩增, *Hsp70* 基因序列拼接与分析, *Hsp70* 结构分析等方法参照张青等对灰飞虱 *HSP90* 基因的克隆与分析方法^[23], 并略有改动。根据已有半翅目昆虫 *Hsp70* 基因序列, 设计了 2 对简并引物, 分别为 *LsHsp70F*₁、*LsHsp70R*₁ 和 *LsHsc70F*₁、*LsHsc70R*₁ (表 1)。

1.3 不同发育阶段及不同温度胁迫下灰飞虱 *Hsp70* 基因表达差异分析

1.3.1 cDNA 第一链的合成 参照张青等研究 *HSP90* 的相关方法^[23]。

1.3.2 引物设计与合成 根据灰飞虱 *Hsp70* 基因全长设计用于荧光实时定量 PCR 的引物, 并根据已扩增的灰飞虱 β -actin 部分序列设计内参基因引物 (表 1), 由上海英俊生物技术有限公司合成引物。

1.3.3 实时定量分析 运用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 Real-time PCR 分析, 详细方法参照 *HSP90* 的分析方法^[24], 并略有改动。其中退火温度 (T_m)

分别为 *Hsp70*: 58.5 °C, *Hsc70*: 60.8 °C, β -*actin*: 58.5 °C。

2 结果与分析

2.1 灰飞虱 *Hsc70* 和 *Hsp70* 基因全长扩增与序列分析

以灰飞虱的 cDNA 为模板,采用简并引物 LsHsc70F1、LsHsc70R1 和 LsHsp70F1、LsHsp70R1 进行 PCR 扩增,分别获得约 1 000 bp 和 400 bp 的特异性条带。扩增产物回收、克隆、测序后,经 Blast 比对,发现该核苷酸序列分别与其他昆虫的 *Hsc70* 和 *Hsp70* 核苷酸序列具有高度相似性,推测其为灰飞虱 *Hsc70* 和 *Hsp70* 的中间片段,长度分别为 1 047 bp 和 421 bp。根据这 2 个片段分别设计扩增灰飞虱 *Hsc70* 和 *Hsp70* 基因 cDNA 全长的 3' 和 5' 引物,并进行 RACE 扩增。根据 *Hsc70* 的中间序列,分别扩增得到 980 bp 3' 端序列和 1 823 bp 的 5' 端序列。经 DNAMAN 拼接获得一个 2 399 bp 的灰飞虱 *Hsc70* 基因 cDNA 序列全长,命名为 *LsHsc70* (GenBank 登录号:KF660252)。其 3' UTR 末端具有典型的 ploy A 结构,在 ploy A 上游 12 bp 处具有 1 个多聚腺苷酸结构 AATAAA。它的开放阅读框 (ORF) 长 1 974 bp,编码 657 个氨基酸,编码的蛋白质分子量 73 000,等电点 5.3。LsHsc70 蛋白质具有 Hsp70 蛋白质家族特征签名序列:IDLGTTYS (第 34~41 位残基)、VFDLGGGTFDVSLL (第 222~235 位残基)、LV-LVGGSTRIPKVQQ (第 359~373 位残基)。除此之外,在 157~164 位残基处有 1 个 ATP~GTP 结合位点;C-末端 (第 654~657 位残基) 具有 4 个保守的氨基酸 KDEL,表明 LsHsc70 是内质网型热激蛋白家族成员 (图 1A)。根据 *Hsp70* 的中间序列,分别扩增得到 1 805 bp 3' 端序列和 1 485 bp 的 5' 端序列。经 DNAMAN 拼接获得 1 个 2 468 bp 的灰飞虱 *Hsp70* 基因 cDNA 序列全长,命名为 *LsHsp70* (GenBank 登录号:KF660251)。其 3' UTR 末端具有典型的 ploy A 结构,但在 ploy A 上游未发现 AATAAA 结构。它的开放阅读框 (ORF) 长 2 073 bp,编码 690 个氨基酸,编码的蛋白质分子量 74 900,等电点 5.8。LsHsp70 具有 Hsp70 蛋白质家族特征签名序列:IDLGTTNS (第 62~69 位残基)、VYDLGGGTFDISIL (第 247~260 位残基)、VILVGGMTRMPKVQS (第 388~402 位残基)。除此之外,在 183~190 位残基处有 1 个

ATP-GTP 结合位点 (图 1B)。

表 1 本研究所使用引物

Table 1 Primer sequences used in this study

引物名称	引物序列 (5'→3')	引物用途
LsHsc70F ₁	GCTGAYGCBGCTA- ARAAYCA	中间片段扩增
LsHsc70R ₁	ATACCCATRGCTNARAG- GRITKAC	
LsHsp70F ₁	CARGMHGACATGAAG- CACTGGCC	中间片段扩增
LsHsp70R ₁	ATGGARACATCRAAN- GTRCCDC	
Lshsc70RACE3'	TCAAAGGTGCCACCGC- CCAGAT	3'RACE
Lshsc70RACE5'	CGCTCTGTACTGTAG- CATCGGACCAT	5'RACE
Lshsp70RACE3'	ATTCAACGACTCA- CAACGACAGG	3'RACE
Lshsp70RACE5'	CCTGTCGTT- GCGAGTCGTTGAAGT	5'RACE
qLshsc70F1	GCCAAAAATCAGCT- CACCACA	Real-time PCR 检 测目的基因
qLshsc70R1	TTTCCAAGCACCATAG- CAGAAAC	
qLshsp70F1	CGACTCTATCTCG- GCACCTCA	Real-time PCR 检 测目的基因
qLshsp70R1	AATTGTGCCGCATC- CTTTGT	
β -actinF1	GTCTCACACACAGTC- CCCATCTATG	Real-time PCR 检 测内参基因
β -actinR1	TCGGTCAAGTCACGAC- CAGC	

2.2 LsHsc70 和 LsHsp70 蛋白质结构分析

以人类 *Homo sapiens* Hsp70 蛋白质 (PDB ID: c3d2fc) 为模型,使用 Phyre 预测灰飞虱 Hsc70 和 Hsp70 蛋白质结构模型,它们与人类 Hsp70 蛋白质的相似性分别为 27% 和 25%。尽管它们之间的相似性不高,但它们结构之间的比对都是基于 600 个以上的氨基酸残基。结构模型显示灰飞虱 LsHsc70 和 LsHsp70 蛋白质都具有热激蛋白质家族 70 的结构特征 (图 2)。

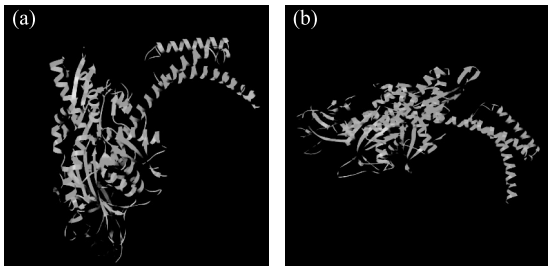
2.3 LsHsc70 和 LsHsp70 系统分析

序列相似性分析结果显示:灰飞虱 LsHsc70 和 LsHsp70 都与内华达古白蚁 *Zootermopsis nevadensis* Hsc70 (KDR08641) 的氨基酸序列的一致性最高,分别达 91% 和 84%。以不同生物体的 Hsc70 和 Hsp70

粗斜体阴影部分表示热激蛋白 70 家族特征序列;单划线部分表示 ATP~GTP 结合位点;双划线部分表示多聚腺苷酸信号序列(AATAAA)。

图1 灰飞虱 *LsHsc70* (A) 和 *LsHsp70* (B) 基因的碱基序列和编码的氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *LsHsc70* (A) and *LsHsp70* (B) genes from *Laodelphax striatellus*



A:以人类 *Homo sapiens* *Hsp70* (蓝绿色)为模板,用 *Phyre2* 预测灰飞虱 *Hsc70* 的结构模型(绿色);B:以人类 *Homo sapiens* *Hsp70* (蓝绿色)为模板,用 *Phyre2* 预测灰飞虱 *Hsp70* 的结构模型(绿色)。

图 2 灰飞虱 *Hsc70* (A) 和 *Hsp70* (B) 的结构预测

Fig.2 Structure of *Hsc70* (A) and *Hsp70* (B) from *L. striatellus*

为外群,对 21 种昆虫的 *Hsc70* 和 *Hsp70* 氨基酸序列进行完全比对,基于 Meg5.0 采用邻接法构建的系统发育树表明灰飞虱 *Hsc70* 与西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* *Hsc70* (AGI36553) 单独聚为一支;但灰飞虱 *Hsp70* 与赤拟谷盗 *Tribolium cast-*

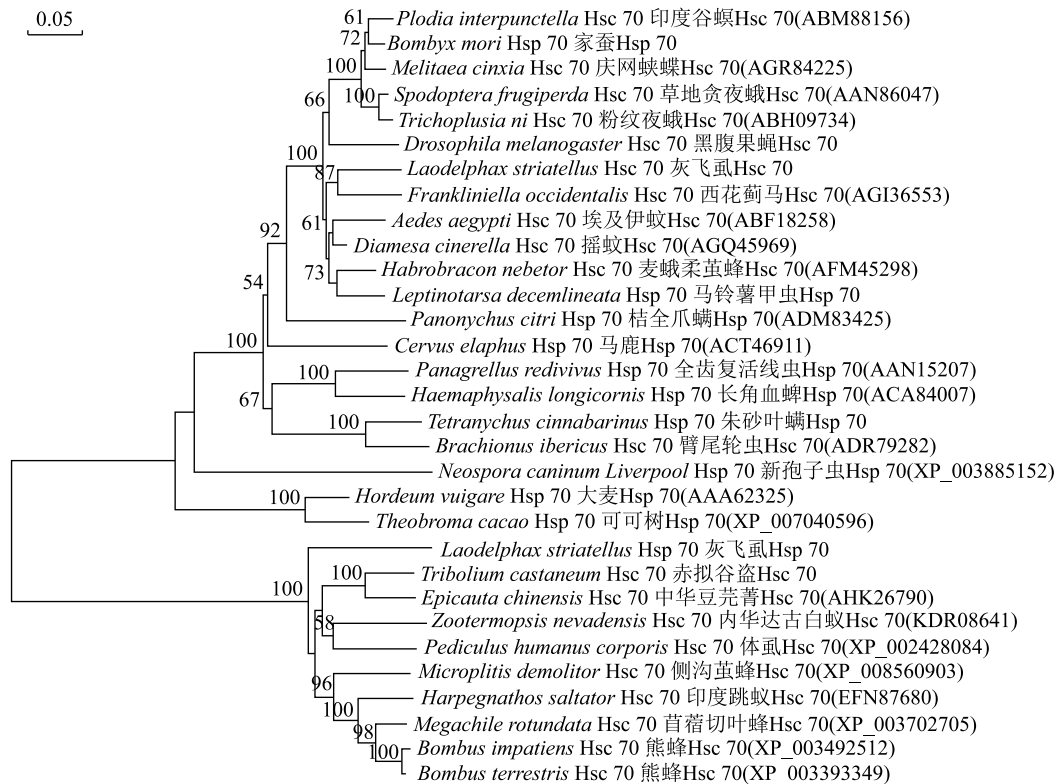
aneum *Hsc70* (XP_975386) 聚为一支。所有的鳞翅目昆虫 *Hsc70* 和 *Hsp70* 都聚集在一起。同时,热激蛋白质 70 所构建的系统发育树也反应了这些生物体的系统关系(图 3)。

2.4 不同发育阶段灰飞虱体内 *LsHsc70* 和 *LsHsp70* 的表达变化

LsHsc70 和 *LsHsp70* 在不同发育阶段的灰飞虱体内呈现出不同的表达模式。随着灰飞虱龄期不断的增加,*LsHsc70* 的表达量逐渐增多,在雄成虫时达到最大值,并显著高于雌成虫 ($F_{6,14} = 7.509, P < 0.001$)。1 龄若虫体内 *LsHsp70* 基因表达量最高,显著高于其他龄期 ($F_{6,14} = 3.377, P = 0.028$)。但是,*LsHsp70* 基因表达量在雌雄成虫之间无显著差异(图 4)。

2.5 不同温度胁迫下灰飞虱 4 龄若虫体内 *LsHsc70* 和 *LsHsp70* 的表达

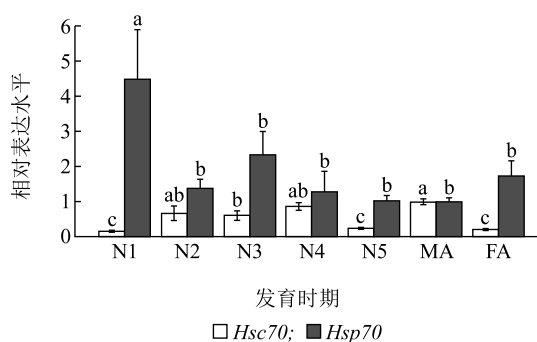
高温和低温都可以诱导灰飞虱体内 *LsHsc70* 和 *LsHsp70* 的表达,但是,低温对这 2 种热激蛋白的诱



各分支上的数字为自引导值(1 000 次重复)(仅显示>50 的值)。

图 3 用邻接法构建的灰飞虱 *Hsc70* 和 *Hsp70* 与其他昆虫 *Hsc70* 和 *Hsp70* 的系统进化树

Fig.3 Neighbour-joining phylogenetic tree of the *Hsc70* and *Hsp70* proteins from *L. striatellus* and other insects



N1:1 龄若虫;N2:2 龄若虫;N3:3 龄若虫;N4:4 龄若虫;N5:5 龄若虫。MA:雄成虫;FA:雌成虫。不同小写字母表示差异达 0.05 显著水平。

图 4 不同发育阶段的灰飞虱 *LsHsc70* 和 *LsHsp70* mRNA 的相对表达水平

Fig.4 Relative expression levels of *LsHsc70* and *LsHsp70* mRNA in different developmental stages of *L. striatellus*

导作用要强于高温。例如,在低温条件下,*LsHsc70* 和 *LsHsp70* 分别在 -4°C 和 -9°C 达到最大值,分别是 26°C 时表达量的 10.06 和 13.70 倍。在高温条件下,*LsHsc70* 和 *LsHsp70* 的表达量与 26°C 时相比增加,分别在 42°C 和 38°C 达到最大值,分别是 26°C 时的 4.97 和 3.20 倍(图 5)。

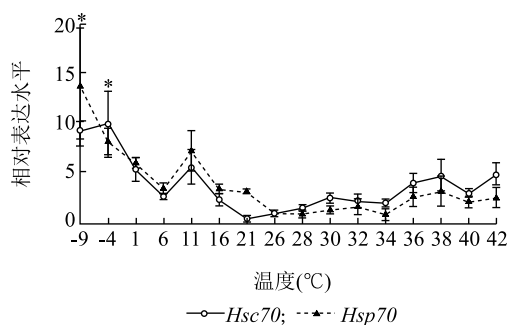


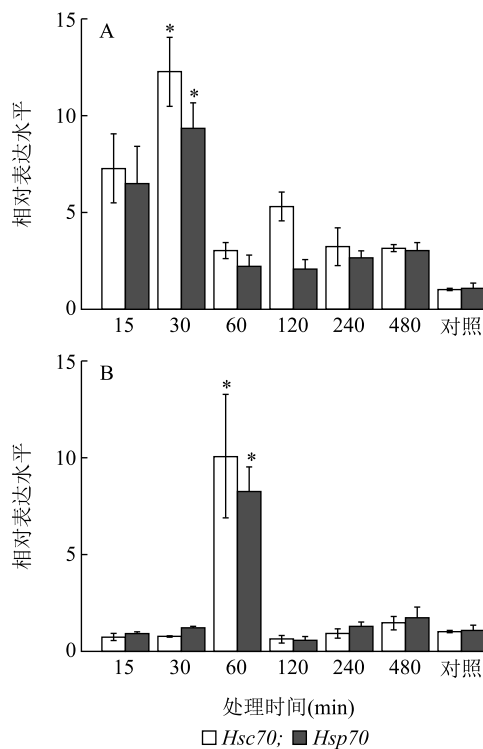
图 5 不同温度处理 1 h 后灰飞虱 4 龄若虫 *LsHsc70* 和 *LsHsp70* mRNA 的相对表达水平

Fig.5 Relative expression levels of *LsHsc70* and *LsHsp70* mRNA in the 4th instar nymphs of *L. striatellus* exposed to different temperatures for 1 h

2.6 不同持续时间高、低温胁迫下灰飞虱 4 龄若虫体内 *LsHsc70* 和 *LsHsp70* 的表达变化

灰飞虱 4 龄若虫在 40°C 条件下,经过不同持续时间处理后发现 *LsHsc70* 和 *LsHsp70* 的表达趋势一致。分别在处理后 0.5 h 时达到最大值,分别是对照的 12.29 和 9.35 倍,并且均显著高于其他处理 ($P < 0.001$)。在 -4°C 下不同持续时间处理后,*LsH-*

sc70 和 *LsHsp70* 的表达模式与 40°C 条件下不同。*LsHsc70* 和 *LsHsp70* 的表达量均在处理后 1 h 时达到最大值,分别是对照的 10.06 和 8.22 倍,且它们均显著高于处理后 0.25 h 时的表达量 ($P < 0.001$) (图 6)。



星号表示处理间差异达 0.05 显著水平;对照为 26°C ,处理 1 h。

图 6 40°C (A) 和 -4°C (B) 下处理不同时间灰飞虱 4 龄若虫 *LsHsc70* 和 *LsHsp70* mRNA 的相对表达水平

Fig.6 Relative expression levels of *LsHsc70* and *LsHsp70* mRNA in the 4th instar nymphs of *L. striatellus* exposed to 40°C (A) and -4°C (B) for different time

3 讨论

本研究通过 RACE 法克隆得到灰飞虱体内 2 种 *Hsp70* 家族基因 *LsHsc70* 和 *LsHsp70*。氨基酸序列分析结果表明 2 个基因均具有 *Hsp70* 家族 3 个签名序列和 1 个 ATP ~ GTP 结合位点^[25]。*LsHsc70* 在 3' UTR 端的 poly(A) 上方有加尾信号“AATAAA”,但 *LsHsp70* 不具有加尾信号。同源性比较显示不同生物体 *Hsp70* 家族基因具有较高的保守性。但是,通过 Blast 比对发现半翅目同翅亚目昆虫的 *Hsp70* 基因序列之间的相似性较低。例如, *LsHsc70* 和 *LsHsp70* 都与内华达古白蚁 *Z. nevadensis* *Hsc70* 最为

相似;褐飞虱 *Nilaparvata lugens* *Hsp70* 与苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* *Hsp70* 同源性最高。由于 *Hsp70* 属于多基因家族,推测可能与这类昆虫中存在亲源关系较近的 *Hsp70* 未被鉴定有关。

已有研究发现热激蛋白质 70 在调控昆虫生长发育方面起到重要的作用^[26-28]。随着灰飞虱的生长发育,*LsHsc70* 表达量逐渐增多,在雄成虫时达到最大值,类似的现象也在小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 和斜纹夜蛾 (*Spodoptera litura*) 中发现^[29-30]。同时,雄虫体内的 *LsHsc70* 显著高于雌成虫。*LsHsc70* 可能还参与昆虫的生殖调控,其在灰飞虱中的这类作用机制仍需进一步研究。但是,*LsHsp70* 在 1 龄若虫体内的表达量最高,类似的现象也在水稻二化螟 (*Chilo suppressalis*) 中被发现^[31]。在灰飞虱整个发育过程中,*LsHsp70* 表达量相对稳定。

Hsp70 是与生物体温度耐受性最为相关的一类蛋白质,一些研究结果已经证实了他们在昆虫抵抗冷热胁迫中起到重要的作用^[31-35]。高温和低温都可以诱导灰飞虱体内 *LsHsc70* 和 *LsHsp70* 的表达,但是,低温对这 2 种热激蛋白的诱导作用要强于高温。但是,Kim 等人研究发现低温不可以诱导 *L. striatellus* 体内的另外二种热激蛋白质 70 基因的表达^[36]。低温对大螟 (*Sesamia inferens*) 的 *Sihsc70* 的诱导不显著^[37]。低温可以诱导黑腹果蝇 (*D. melanogaster* *Hsp70Aa*),但是不能诱导 *Hsc70-I*^[38]。这说明不同昆虫的不同 *Hsp70* 作用不尽相同。灰飞虱以 3~5 龄若虫越冬越夏,热激蛋白 70 的调控有助于其渡过不良环境温度。温和的温度也可以诱导灰飞虱 *LsHsc70* 和 *LsHsp70* 表达。较低温度的锻炼同样也引起了南美斑潜蝇 (*Liriomyza huidobrensis*) *Hsp70* 的增加^[39]。*LsHsc70* 和 *LsHsp70* 在 42 °C 和 38 °C 的表达量分别是 26 °C 的 4.97 和 3.20 倍。王海鸿等研究结果表明高温可以诱导在烟粉虱 (*Bemisia tabaci* B biotype) 和温室白粉虱 (*Trialeurodes vaporariorum*) *Hsp70* 的表达^[40]。高低温处理不同时间均能诱导 *LsHsc70* 和 *LsHsp70* 表达,这与美洲棉铃虫 (*Helicoverpa zea*) 体内的 *Hsp70* 表达模式相似^[41]。在 40 °C 条件下,灰飞虱 4 龄若虫体内的 *LsHsc70* 和 *LsHsp70* 的表达量都在 0.5 h 时达到最大值。然而,在 -4 °C 下 *LsHsc70* 和 *LsHsp70* 的表达量均在处理后 1 h 时达到最大值。这表明热激蛋白 70 对高温和低温有不同的响应时间。因此,我们初步推断调节

LsHsc70 和 *LsHsp70* 的表达是灰飞虱渡过不良环境温度的重要生理手段。

为了探讨灰飞虱对不良环境的适应机制,本研究成功克隆了其 *Hsc70* 和 *Hsp70* 基因全长序列,分析了不同发育阶段 *LsHsc70* 和 *LsHsp70* 的表达变化规律,检测了冷热条件下 *LsHsc70* 和 *LsHsp70* 的表达水平,初步阐明了 *Hsp70* 与灰飞虱温度适应能力有着密切的联系。本研究仅仅是从基因水平研究了灰飞虱的 *Hsp70*,有必要从蛋白质水平研究其功能。同时,我们也发现灰飞虱体内还有其他热激蛋白质 70 家族基因,为了进一步深入探讨它的环境适应机制,有必要结合其他热激蛋白 70 进行进一步研究。

参考文献:

- [1] 蒲茂华. 苏南灰稻虱 (*Delphacodes striatella* Fallén) 的初步研究 [J]. 昆虫学报, 1963, 12(2): 117-136.
- [2] 阮义理, 蒋文烈, 林瑞芬. 稻病毒病介体昆虫灰稻虱的研究 [J]. 昆虫学报, 1981, 24(3): 283-290.
- [3] 程兆邦, 杨荣明, 周益军, 等. 江苏稻区水稻条纹叶枯病发生新规律 [J]. 江苏农业科学, 2002(1): 39-41.
- [4] 陆虎华, 孙权星, 彭长俊, 等. 不同播期对玉米粗缩病发生及鲜穗产量的影响 [J]. 江苏农业科学, 2013, 41(9): 75-76.
- [5] NOVER L, SCHARF K D. Heat stress proteins and transcription factors [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 1997, 53(1): 80-103.
- [6] FEDER M E, HOFMANN G E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology [J]. Annual Review of Physiology, 1999, 61(1): 243-282.
- [7] DENLINGER D L, RINEHART J P, YOCUM G D. Stress proteins: a role in insect diapause? — Insect timing: Circadian rhythmicity to seasonality [M]. Amsterdam: Elsevier, 2001.
- [8] SØRENSEN J G, KRISTENSEN T N, LOESCHCKE V. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins [J]. Ecology Letter, 2003, 6(11): 1025-1037.
- [9] BOORSTEIN W R, ZIEGELHOFFER T, CRAIG E A. Molecular evolution of the *Hsp70* multigene family [J]. Journal of Molecular Evolution, 1994, 38(1): 1-17.
- [10] GKOUVITSAST, KONTOGIANNATOS D, KOURTI A. Cognate *Hsp70* gene is induced during deep larval diapause in the moth *Sesamia nonagrioides* [J]. Insect Molecular Biology, 2009, 18(2): 253-264.
- [11] HUNG J J, CHENG T J, CHANG M D, et al. Involvement of heat shock elements and basal transcription elements in the differential induction of the 70-kDa heat shock protein and its cognate by cadmium chloride in 9 L rat brain tumor cells [J]. Journal of Cellular Biochemistry, 1998, 71(1): 21-35.
- [12] KREGEL K C. Heat shock proteins: modifying factors in physiologi-

- cal stress responses and acquired thermotolerance [J]. Journal of Applied Physiology, 2002, 92(5): 2177-2186.
- [13] MAHROOF R, ZHU K Y, NEVEN L, et al. Expression patterns of three heat shock protein 70 genes among developmental stages of the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 2005, 141(2): 247-256.
- [14] CLARK M S, PECK L S. Triggers of the HSP70 stress response: environmental responses and laboratory manipulation in an Antarctic marine invertebrate (*Nacella concinna*) [J]. Cell Stress and Chaperones, 2009, 14(6): 649-660.
- [15] BALE J S, MASTERS G J, HODKINSON I D, et al. Herbivory in global climate change research: direct effects of rising temperature on insect herbivores [J]. Global Change Biology, 2002, 8(1): 1-16.
- [16] HOFFMANN A A, CHOWN S L, CLUSELLA-TRULLAS S. Upper thermal limits in terrestrial ectotherms: how constrained are they? [J]. Functional Ecology, 2012, 27(4): 934-949.
- [17] 崔亚东, 陆明星, 杜予州. 二化螟热休克蛋白 70 基因的克隆及胁迫下的表达分析 [J]. 昆虫学报, 2010, 53(8): 841-848.
- [18] BALE J S, HAYWARD S A L. Insect overwintering in a changing climate [J]. Journal of Experimental Biology, 2010, 213(6): 980-994.
- [19] 李济宸, 李桂珍, 高立起, 等. 灰飞虱发生规律的研究 [J]. 北京农业科学, 1998, 16(6): 24-27.
- [20] 孙兴全, 吴静菊, 吴爱忠, 等. 灰飞虱生物学特性研究 [J]. 上海农学院学报, 2000, 18(2): 150-154.
- [21] 刘向东, 翟保平, 刘慈明. 灰飞虱种群暴发成灾原因剖析 [J]. 昆虫知识, 2006, 43(2): 141-146.
- [22] 刘向东, 翟保平, 胡自强. 高温及水稻类型对灰飞虱种群的影响 [J]. 昆虫知识, 2007, 44(3): 348-352.
- [23] 张爱民, 刘向东, 翟保平, 等. 温度对灰飞虱生物学特性的影响 [J]. 昆虫学报, 2008, 51(6): 640-645.
- [24] 张青, 陆明星, 祝树德. 灰飞虱热激蛋白基因 *Hsp90* 的克隆、分析与表达模式研究 [J]. 昆虫学报, 2014, 57(7): 777-786.
- [25] KELLEY L A, STERNBERG M J E. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server [J]. Nature Protocols, 2009, 4(3): 363-371.
- [26] PETTERSEN E F, GODDARD T D, HUANG C C, et al. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis [J]. Journal of Computational Chemistry, 2004, 25(13): 1605-1612.
- [27] RAVAUX J, TOULLEC J Y, LEGER N. First hsp70 from two hydrothermal vent shrimps, *Mirocaris fortunata* and *Rimicaris exoculata*: Characterization and sequence analysis [J]. Gene, 2007, 386(1-2): 162-172.
- [28] SHARMA S, ROHILLA M S, TIWARI P K. Developmental and hyperthermia-induced expression of the heat shock proteins HSP60 and HSP70 in tissues of the housefly *Musca domestica*: an *in vitro* study [J]. Genetics and Molecular Biology, 2007, 30(1): 159-168.
- [29] SHU Y H, DU Y, WANG J W. Molecular characterization and expression patterns of *Spodoptera litura* heat shock protein 70/90, and their response to zinc stress [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A, 2011, 158(1): 102-110.
- [30] SONODA S, ASHFAQ M, TSUMUKI H. Cloning and nucleotide sequencing of three heat shock protein genes (*hsp90*, *hsc70*, and *hsp19.5*) from the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) and their expression in relation to developmental stage and temperature [J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2006, 62(2): 80-90.
- [31] LU M X, LIU Z X, CUI Y D, et al. Expression patterns of three heat shock proteins in *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae) [J]. Annals of the Entomological Society of America, 2014, 107(3): 667-673.
- [32] RINEHART J P, LI A Q, YOCUM G D, et al. Up-regulation of heat shock proteins is essential for cold survival during insect diapause [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(27): 11130-11137.
- [33] YI S X, MOORE C W, LEE R E. Rapid cold-hardening protects *Drosophila melanogaster* from cold-induced apoptosis [J]. Apoptosis, 2007, 12(7): 1183-1193.
- [34] KOŠTÁL V, TOLLAROVÁ-BOROVANSKÁ M. The 70 kDa heat shock protein assists during the repair of chilling injury in the insect, *Pyrrhocoris apterus* [J]. Plos One, 2009, 4(2): e4546.
- [35] XU P J, XIAO J H, LIU L, et al. Molecular cloning and characterization of four heat shock protein genes from *Macrocentrus cingulum* (Hymenoptera: Braconidae) [J]. Molecular Biology Reports, 2010, 37(5): 2265-2272.
- [36] KIM D H, LEE S C, KWAK D Y, et al. Cloning of heat shock protein genes from the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, and the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus*, and their expression in relation to thermal stress [J]. Insect Science, 2008, 15(5): 415-422.
- [37] 孙猛, 陆明星, 汤小天, 等. 大螟 *HSC70* 基因克隆及表达模式分析 [J]. 昆虫学报, 2014, 57(7): 787-797.
- [38] COLINET H, LEE S F, HOFFMANN A. Temporal expression of heat shock genes during cold stress and recovery from chill coma in adult *Drosophila melanogaster* [J]. FEBS Journal, 2010, 277: 174-185.
- [39] HUANG L H, CHEN B, KANG L. Impact of mild temperature hardening on thermotolerance, fecundity, and Hsp gene expression in *Liriomyza huidobrensis* [J]. Journal of Insect Physiology, 2007, 277(12): 1199-1205.
- [40] 王海鸿, 雷仲仁. 两种入侵粉虱热激基因 *Hsp70* 的克隆及温度胁迫下的种间差异表达. 生态学杂志, 2010, 29(4): 693-701.
- [41] ZHANG Q R, DENLINGER D L. Molecular characterization of heat shock protein 90, 70 and 70 cognate cDNAs and their expression patterns during thermal stress and pupal diapause in the corn earworm [J]. Journal of Insect Physiology, 2010, 56(2): 138-150.

(责任编辑: 袁伟)