

陈 龙,常小丽,胡建军,等. 春尺蠖 2 个小热激蛋白编码基因的克隆及其在不同时空和温度胁迫下的表达情况[J]. 江苏农业学报, 2026, 42(4): 691-700.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2026.04.005

春尺蠖 2 个小热激蛋白编码基因的克隆及其在不同时空和温度胁迫下的表达情况

陈 龙^{1,2}, 常小丽³, 胡建军⁴, 王克秀⁴, 程明军⁵, 越慧芳⁶, 白 艳⁷, 崔阔澍⁸

(1.河套学院农学系,内蒙古 巴彦淖尔 015000; 2.河套地区绿色农产品安全生产与预警控制实验室,内蒙古 巴彦淖尔 015000; 3.四川农业大学,四川 成都 611130; 4.四川省农业科学院作物研究所<四川省种质资源中心>,四川 成都 610066; 5.四川省草业技术推广中心,四川 成都 610041; 6.伊金霍洛旗园林绿化中心,内蒙古 伊金霍洛旗 017200; 7.内蒙古自治区林业科学研究院,内蒙古 呼和浩特 010010; 8.四川省农业技术推广总站,四川 成都 610041)

摘要: 本研究旨在克隆春尺蠖(*Apocheima cinerarius*)中 2 个小热激蛋白编码基因(*sHSP*),分析其不同发育阶段、不同组织、不同温度胁迫下的表达模式,以期明确小热激蛋白在春尺蠖应答温度胁迫过程中的作用。基于春尺蠖蛹的转录组数据,筛选并克隆春尺蠖的 2 个 *sHSP* 基因,对其进行系统发育分析、结构域分析等生物信息学分析。用实时荧光定量 PCR (qPCR) 技术检测 *sHSP* 基因在春尺蠖不同发育阶段(卵、幼虫、蛹及成虫)及不同组织(头部、胸部、腹部、足部及翅膀)中的时空表达特征,并进一步分析其 4 龄幼虫在不同温度(-5 °C、0 °C、5 °C、25 °C 和 30 °C)胁迫下的表达模式。克隆获取 2 个 *sHSP* 基因后,分别将其命名为 *AcinHSP20.4*、*AcinsHSP*(GenBank 登录号分别为 PV053122 和 PV053123),编码序列(CDS)全长分别为 543 bp、758 bp,分别编码 180 个、252 个氨基酸,相对分子量分别为 20 470、27 758,理论等电点分别为 6.98、4.60。基因表达结果显示,*AcinHSP20.4* 基因在春尺蠖卵至 5 龄幼虫阶段的相对表达量较低,在滞育解除蛹期的相对表达量最高;*AcinsHSP* 基因的相对表达量在春尺蠖卵至 5 龄幼虫阶段处于较低水平,在雌虫中的相对表达量达到最大值。*AcinHSP20.4* 基因的相对表达量在雌虫胸部最高,*AcinsHSP* 基因的相对表达量则在雄虫头部最高。随着温度的升高,*AcinHSP20.4* 基因的相对表达量整体表现为先升高后降低的趋势,在 25 °C 达到最大值,在 30 °C 时下降并且与 25 °C 的相对表达量间表现出显著差异($P < 0.05$);*AcinsHSP* 基因的相对表达量总体呈上升趋势,在 0~30 °C 范围内无显著差异,在 -5 °C 与 30 °C 之间差异显著($P < 0.05$)。由研究结果可以看出,*sHSP* 基因在春尺蠖生长发育、滞育及响应温度胁迫的过程中具有重要作用,研究结果为进一步探究春尺蠖生长发育机制、滞育机制及对温度胁迫的适应性机制奠定了一定的理论基础。

关键词: 春尺蠖; 小分子热激蛋白; 滞育; 逆境胁迫; 表达谱

中图分类号: S888.72⁺1 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2026)04-0691-10

Cloning, temporal-spatial expression, and temperature stress response of two small heat shock protein genes in *Apocheima cinerarius* (Lepidoptera: Geometridae)

CHEN Long^{1,2}, CHANG Xiaoli³, HU Jianjun⁴, WANG Kexiu⁴, CHENG Mingjun⁵, YUE Huifang⁶,

BAI Yan⁷, CUI Kuoshu⁸

收稿日期: 2025-05-26

基金项目: 内蒙古自然科学基金项目(2021BS03028); 四川省中央“三区”科技人才支持计划项目; 四川省饲草创新团队项目(sccxtid-2024-16)

作者简介: 陈 龙(1988-), 男, 陕西汉中, 博士, 副教授, 主要从事昆虫生态与分子生物学研究。(E-mail) 15774711140@163.com

通讯作者: 崔阔澍, (E-mail) cuikuoshu@126.com

(1. Agriculture Department, Hetao College, Bayannur 015000, China; 2. Hetao Area Green Agricultural Product Safety Production and Early Warning Control Laboratory, Bayannur 015000, China; 3. Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; 4. Crop Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences (Sichuan Province Germplasm Resource Center), Chengdu 610066, China; 5. Sichuan Grassland Technology Research and Promotion Center, Chengdu 610041, China; 6. Yijin Horo Banner Landscape and Greening Center, Yijin Horo

Banner 017200, China; 7.Inner Mongolia Academy of Forestry Sciences, Hohhot 010010, China; 8.Sichuan Agricultural Technology Extension Station, Chengdu 610041, China)

Abstract: This study aimed to clone two small heat-shock protein genes (*sHSPs*) from *Apocheima cinerarius* and to analyse their expression patterns across different developmental stages, tissues and temperature stresses, so as to clarify the role of *sHSPs* in the response of *A. cinerarius* to temperature stress. Based on the pupal transcriptome of *A. cinerarius*, two *sHSP* genes were screened and cloned, and subjected to phylogenetic and domain-related bioinformatic analyses. Quantitative real-time PCR (qPCR) was used to examine the spatiotemporal expression characteristics of the two *sHSP* genes in different developmental stages (egg, larva, pupa and adult) and tissues (head, thorax, abdomen, legs and wings) of *A. cinerarius*, and to analyse their expression profiles in 4th-instar larvae exposed to temperatures of $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. The two cloned *sHSP* genes were designated *AcinHSP20.4* and *AcinsHSP* (GenBank accession numbers PV053122 and PV053123, respectively); their coding sequences (CDS) were 543 bp and 758 bp in length, encoding 180 and 252 amino acids with predicted molecular masses of 20 470 and 27 758 and theoretical isoelectric points of 6.98 and 4.60, respectively. Expression analysis revealed that *AcinHSP20.4* transcript levels were low from the egg to the 5th-instar larval stage and peaked in diapause-terminated pupae, whereas *AcinsHSP* transcript levels remained low from the egg to the 5th-instar larval stage and reached their maximum in female adults. The relative expression level of *AcinHSP20.4* was the highest in the thorax of female adults, while that of *AcinsHSP* was the highest in the head of male adults. As temperature increased, the relative expression of *AcinHSP20.4* first increased and then decreased, peaking at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ and decreasing significantly at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($P<0.05$). The relative expression of *AcinsHSP* showed an overall upward trend, with no significant difference within the temperature range of $0\text{--}30\text{ }^{\circ}\text{C}$, but a significant difference was observed between $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($P<0.05$). These results indicate that *sHSP* genes play important roles in the growth, development, diapause and temperature-stress response of *A. cinerarius*, and provide a theoretical basis for further investigation into the mechanisms underlying its development, diapause and adaptation to temperature stress.

Key words: *Apocheima cinerarius*; small heat shock protein; diapause; adverse stress; expression profile

春尺蠖(*Apocheima cinerarius*)是鳞翅目尺蛾科的重要食叶害虫,广泛分布于中亚及中国北方等地区,对柠条、杨柳科、榆科等经济树种造成了严重危害^[1-2]。春尺蠖幼虫的食量在3龄后剧增,并具有扩散习性,可吃光叶片,仅留叶柄^[3]。春尺蠖4龄幼虫在生长发育中常面临温度与饥饿的双重胁迫,但是目前关于其在恶劣环境中的生存机制尚不明确^[4]。热休克蛋白(Heat shock protein, HSP)是细胞应对环境胁迫的关键分子伴侣,其中的小分子热激蛋白(Small heat shock protein, sHSP)在蛋白质折叠、稳定及降解中发挥着重要作用,并通过防止蛋白质聚集、促进蛋白质复性来维持细胞功能^[5-6]。在昆虫中,sHSP参与胁迫信号的传递,并在高温、低温、干旱、滞育及饥饿等逆境中起到关键作用^[7-9]。因此,研究*sHSP*基因在春尺蠖4龄幼虫应对温度胁迫中的作用,不仅有助于揭示春尺蠖4龄幼虫适应机制,还可为制定相应的防治策略提供理论依据。

sHSP作为热激蛋白家族中相对分子量最小且多样性最丰富的成员,在昆虫响应非生物胁迫的过程中具有双重调控功能,它们不仅可以通过维持蛋白质稳

态发挥分子伴侣作用,还能在不同胁迫条件下特异性激活细胞保护机制。*sHSP*的温度响应功能呈现出显著的双向性。在高温胁迫方面,当棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)暴露于 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境后,*sHSPs* 22.0基因的相对表达量于1 h内达到峰值^[10]。在 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理1~2 h后,野桑蚕(*Bombyx mandarina*)*BmmHSP19.9*基因的相对表达量在5龄幼虫所有组织中均呈持续上调的趋势^[8]。通过低温适应研究,揭示了物种的特异性响应模式,例如,经低温储藏后,异色瓢虫(*Harmonia axyridis*)中*sHSP*的相对表达量显著提高^[11],而野桑蚕5龄幼虫在 $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 胁迫下,*BmmHSP19.9*基因仍保持高表达水平^[8]。由同源基因的双温域响应特性可以看出,*sHSP*可能具有温度调控的广谱性。除了对温度的应激反应外,*sHSP*在发育调控领域也表现出新的功能。对滞育黑纹粉蝶(*Pieris melete*)的研究发现,与非滞育蛹相比,夏季滞育(SD)、冬季滞育(WD)黑纹粉蝶蛹中*PmHSP19.5*、*PmHSP20.0*的相对表达量保持在较高水平^[12]。

虽然春尺蠖是一种重要的害虫,但是目前关于其对环境胁迫的适应机制尚不完全清楚。*sHSP*在

昆虫应对逆境胁迫的过程中发挥了重要作用,但是目前关于春尺蠖 *sHSP* 基因的研究较少。本研究拟基于春尺蠖蛹转录组数据,筛选并克隆 2 个 *sHSP* 基因,旨在明确小热激蛋白在春尺蠖应答温度胁迫过程中的作用,从而为深入探究春尺蠖的蛹滞育及温度胁迫适应机制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

春尺蠖雌/雄成虫于 2023 年春季采自内蒙古巴彦淖尔市乌拉特前旗天然柠条草场(108°45'23.63"E,40°46'4.19"N),带回实验室后将其置于上海智城人工气候箱(型号:ZXQP-R1900)中培养,设定恒温(22±1)℃、光/暗周期 18 h/6 h、相对湿度 55%~59%。成对饲喂柠条锦鸡儿叶片,待其产卵后,置于相同条件下培养。待幼虫孵化后,继续饲喂柠条锦鸡儿叶片,直至化蛹。

1.2 样品处理与采集

为了测定春尺蠖 *sHSP* 基因的表达特性,分别收集不同发育阶段、不同组织及 4 龄幼虫在不同温度胁迫下的样本。收集、处理方法如下:(1)在不同发育阶段,收集卵、幼虫(1~5 龄)(采集时间为蜕皮后 2 d)、蛹(滞育蛹、非滞育蛹)及成虫;(2)在雌/雄成虫的不同组织样本收集方面,收集雌/雄成虫头部(包括触角)、胸部、腹部、足,收集雄虫翅膀;(3)在滞育解除蛹处理方面,在化蛹后 45 d,于 4~6℃低温处理 60 d;(4)在 4 龄幼虫的不同温度胁迫处理方面,在-5℃、0℃、5℃、25℃、30℃共 5 个温度下各处理 1 h。

每个处理设置 3 个生物学重复,每个生物学重复包括如下组分:30 个卵,30 头一龄幼虫,20 头二龄幼虫,5 头三龄幼虫,各 3 头四龄幼虫、五龄幼虫、蛹及雌雄成虫,30 个成虫头部(含触角),5 个胸部,

5 个腹部。此外,各种类型的足(如前足、中足和后足)共取 50 个,并取 20 个雄虫翅膀样本。处理后用液氮速冻,置于超低温冰箱(-80℃)中保存待用。

1.3 RNA 提取及 cDNA 合成

取方法 1.2 所述春尺蠖处理样本,置于高温灭菌陶瓷研钵中,迅速加入液氮并充分研磨至粉末状。用 TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction 试剂盒进行总 RNA 的提取。选取符合质量标准的 RNA 样本,按照 TaKaRa PrimeScript™ RT Reagent 试剂盒说明书进行逆转录操作,将所得 cDNA 保存于-80℃超低温冰箱中备用。

1.4 春尺蠖 *sHSP* 基因的克隆

基于实验室前期所测春尺蠖蛹的转录组数据,从差异基因数据库中筛选出 *HSP20.4*、*sHSP* 基因,经 BLASTP 验证后,选取具有完整编码序列(CDS)区的基因,分别命名为 *AcinHSP20.4*、*AcinsHSP*(GenBank 登录号分别为 PV053122、PV053123)。依据序列基因信息,在基因编码蛋白质区外侧设计特异性扩增引物,并用该引物通过 PCR 扩增目标基因。PCR 反应体系如下:1.0 μL 模板 DNA,各 1.0 μL 正向引物、反向引物,12.5 μL PCR Mix,用无酶水补足总体积至 25.0 μL。在反应过程中,设定退火温度为 56℃、66℃,其余反应温度及程序参照文献[13]的方法。扩增完成后,用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离目标 DNA 片段,并用 DNA 凝胶回收试剂盒进行回收。经遗传转化筛选出阳性克隆后,进行质粒 DNA 的抽提,随后送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序分析,以确认目标基因的准确性。

1.5 春尺蠖 *sHSP* 基因的生物信息学分析

借助特定在线工具(具体网址见表 1),对春尺蠖 *sHSP* 基因进行生物信息学分析,具体包括蛋白质编码区、理化性质、N 端信号肽、跨膜区、磷酸化位点及糖基化位点分析。

表 1 *sHSP* 基因的生物信息学的预测内容、工具名称及网址链接

Table 1 The prediction content of *sHSP* bioinformatics, the name and website link of the tool

预测内容	预测工具名称及网址链接
蛋白质编码区预测	NCBI ORF Finder, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/
蛋白质理化性质分析	ExPASy-ProtParam, http://web.expasy.org/protparam/
N 端信号肽预测	SignalP 5.0, https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/
蛋白质跨膜区预测	TMHMM, https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/
磷酸化位点预测	NetPhos 3.1 Server, https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/
糖基化位点预测	DictyOGlyc 1.1, https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?DictyOGlyc-1.1

NCBI:美国国家生物技术信息中心。

1.6 春尺蠖 *sHSP* 基因的序列比对及系统进化分析

从美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 网站下载春尺蠖及其他目昆物种的 *sHSP* 编码的蛋白质氨基酸序列,用 DNAMAN 6.0 对氨基酸序列进行多序列比对。用 MEGA 6.0 构建系统发育树,用邻接法 (Neighbor-joining method) 进行拓扑结构推测,选择 *p*-距离 (*p*-distance) 模型进行遗传差异计算。为了验证系统发育关系的可靠性,通过自举检验 (Bootstrap analysis) 进行 1 000 次重复抽样以评估分支支持率。

1.7 春尺蠖 *sHSP* 基因的表达

为了探究春尺蠖 *sHSP* 基因在不同发育阶段、不同组织及 4 龄幼虫在温度胁迫下的表达模式,本研究采用 qPCR 技术进行检测,所用引物信息见表 2。以 *Actin* 基因为内参,反应体系总体积为 20.0 μ L,包含 2.0 μ L cDNA 模板、0.4 μ L 正向引物、0.4 μ L 反向引物、10.0 μ L GoTaq[®] qPCR Master Mix,用无核酸酶水补足体积至 20.0 μ L。qPCR 反应程序严格参照 GoTaq[®] qPCR Master Mix 试剂说明书。

表 2 春尺蠖 *sHSP* 基因试验所用引物信息

Table 2 Primer information for *sHSP* genes of *Apocheima cinerarius* in the experiment

引物名称	引物序列 (5'→3')	引物用途
<i>AcinHSP20.4-F</i>	AAGTTAATCCACCTTCTGAAGAAC	克隆
<i>AcinHSP20.4-R</i>	TATACCTGATTACTCTGAACTGAACA	克隆
<i>AcinsHSP-F</i>	TGAAACGTGCAATCATGTTCACAAC	克隆
<i>AcinsHSP-R</i>	TATTCACCACACGCCTCCACCATTA	克隆
<i>AcinHSP20.4-F</i>	TGGACCTATGCTAAGCCGAG	qRT-PCR
<i>AcinHSP20.4-R</i>	TGTGAACTGCCGAGAGATGT	qRT-PCR
<i>AcinsHSP-F</i>	GATGAGATCGTCCCACCCAT	qRT-PCR
<i>AcinsHSP-R</i>	GTCTCCCTTCACCTTGACCT	qRT-PCR
<i>Actin-F</i>	CGACATCCGTAAGGACCTGT	qRT-PCR
<i>Actin-R</i>	TTCGAGATCCACATCTGCTG	qRT-PCR

qRT-PCR: 实时荧光定量逆转录 PCR。

1.8 数据统计与分析

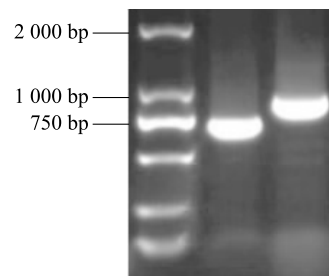
本研究用 SPSS 27.0 软件进行单因素方差分析 (One-way ANOVA),并用图基显著性差异检验 (Tukey's HSD) 多重比较检验方法评估春尺蠖 *sHSP* 基因在不同发育阶段、不同组织及不同温度胁迫条件下的表达差异,用最小显著差数 *t* 检验 (LSD-

t) 检验评估同一组织内 *sHSP* 基因在雌/雄成虫中的差异表达情况。数据可视化用 GraphPad Prism 9.5 软件进行分析,结果以均值 \pm 标准差形式呈现,统计显著性水平设定为 0.05。

2 结果与分析

2.1 春尺蠖 *sHSP* 基因的克隆

基于春尺蠖转录组数据,针对 *sHSP* 基因的蛋白质编码序列 (CDS) 设计引物,开展扩增试验。通过特异性引物 *AcinHSP20.4-F/R*、*AcinsHSP-F/R* 分别进行 PCR 扩增,获得预期长度为 739 bp、907 bp 的产物。1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测结果显示,在 750 bp、1 000 bp 标记位置观察到特异性条带 (图 1)。对特异性条带进行测序分析发现,测序结果与转录组序列一致。



M: DL2000 DNA Marker; 1: *AcinHSP20.4* 基因的 PCR 扩增产物; 2: *AcinsHSP* 基因的 PCR 扩增产物。

图 1 春尺蠖 *AcinHSP20.4*、*AcinsHSP* 基因全长编码序列 (CDS) 的克隆结果

Fig.1 Cloning of the full-length coding sequences (CDS) of *AcinHSP20.4* and *AcinsHSP* genes in *Apocheima cinerarius*

2.2 春尺蠖 *sHSP* 基因的生物信息学分析

春尺蠖 *AcinHSP20.4*、*AcinsHSP* 基因的 CDS 全长分别为 543 bp、758 bp,分别编码 180 个、252 个氨基酸,预测分子式分别为 $C_{909}H_{1445}N_{257}O_{273}S_4$ 、 $C_{1223}H_{1913}N_{303}O_{375}S_4$,相对分子量分别为 20 470、27 758,理论等电点分别为 6.98、4.60,半衰期均为 30 h,脂肪指数分别为 78.56、85.44。正电荷氨基酸残基 [精氨酸 (Arg) + 赖氨酸 (Lys)] 总电荷分别为 29、24,负电荷氨基酸残基 [天冬氨酸 (Asp) + 谷氨酸 (Glu)] 总电荷分别为 29、41。*AcinHSP20.4* 的亲水性系数为 -0.629,不稳定系数为 41.93,说明该基因编码的蛋白质属于亲水性不稳定蛋白质;*AcinsHSP* 的亲水性系数为 -0.242,不稳定系数为 41.08,说明

该基因编码的蛋白质属于两性不稳定蛋白质。

信号肽检测结果显示, *AcinHSP20.4* 中未发现信号肽, *AcinsHSP* 则在第 1~20 个氨基酸之间有 1 条信号肽, 未发现跨膜结构。 *AcinHSP20.4*、*AcinsHSP* 基因分别在第 62~157 位、第 76~157 位之间包含 *sHSP* 基因家族的 α -结晶蛋白体保守结构域(图 2)。

磷酸位点检测结果显示, *AcinHSP20.4* 蛋白中有 9 个丝氨酸、4 个苏氨酸和 2 个酪氨酸磷酸化候选位点; *AcinsHSP* 蛋白中有 13 个丝氨酸、16 个苏氨酸磷酸化候选位点, 未检测到酪氨酸磷酸化候选位点。糖基化位点检测结果显示, *AcinHSP20.4* 中无糖基化位点, 而 *AcinsHSP* 中有 1 个糖基化位点。

```

A      ATGTCCTCTCTGCGTATTTATTGACGACTTCCGCCGCCGCCGCCCTTATGGACCAGCATTTGGCCTAGCTCTCACACTGACGAC
1      M S L L P Y L F D D F R R P R R L M D Q H F G L A L T P D D
      TTCCTAACAAATCGTCTGGACTATGCTAAGCCGAGAATACTACGCCCGTGGGCCATCTAGCCGCCGTGAAAGACGTCGGTTCA
31     F L T I A A G P M L S R E Y Y R P W R H L A A A V K D V G S
      AGCATCAAGGCAGATAAAGACAAGTTCCAAGTGAATTTGGATGTCACAGCATTTTGGCCGGAAGAGATCAGCGTGAAGACGGCAGATGGG
61     S I K A D K D K F Q V N L D V Q H F A P E E I S V K T A D G
      TATATCGTAGTTGAAGGAAACACGAGGAAAAGAAGGATGAGCAGGGTACATCTCTCGGCAGTTCACAGAAAGTATGCACTGCCGAA
91     Y I V V E G K H E E K K D E H G Y I S R Q F T R R Y A L P E
      GGCTGCATGCGGAGACAGTTGAGTACGTCTGCTTCTGACGGAGTCTCTCCATCAGGCCCGGAGAAAGTTCCTGAAGCCATCAAG
121    G C T A E T V E S R L S S D G V L S I T A P R K V P E A I K
      GGGGAGCGCAAGTTCCCATTTGCTCAGACCCGACCCGTACGCAAGGAGATTAAGACCAAGAGCGAAATCAAAGAGAACGAAGTGAAGAAT
151    G E R K V P I A Q T G P V R K E I K D Q S E I K E N E V K N
      TAA
181   *

B      ATGTTCAACACGCGCTGCCTCGCAATTTCTGCCTTGTGGCCGCCGCGACTTCTACCGGCGCAAGAAAAACCTATACCCCAACCCATC
1      M F T T R C L A I L A L V A A A T S L P A Q E K P I P Q P I
      ACAACGATAACAAGAGATGAGATCGTCCACCCATGCCAGGACCATGGTCAACGTTCCCTTCTCGGAGACATCACAAAATTTTGTCT
31     T T I T R D E I V P P M P G P W F N V P F F G D I T K I F A
      CCGCTCTGAAAATTTGTTCCCGAGCTTCGAGGATCTCGGCCGAGAATAATCGCCGACGATATAAGTTCCAAGTATCGTCCAAGTTAAGG
61     P L W K L F P S F E D L G P R I I A D D D K F Q V I V Q V K
      ACTACAAGAAGTCTGACTTGAAGGTCAAGGTGAAGGAGACTTTATTTTCGTGCAAGGCTCGCACGAAGCCAAGTGCAGGACGACCCAG
91     D Y K K S D L K V K V K G D F I F V Q G S H E A K L Q D D H
      ATCTGTTGCGGACCCAGTTCTCCATACGTACACTCTCCCGGCAACTCCAGCGCGGACAGCGTACAGCCGATCTGACTACCGCGGCT
121    D L F A S Q F F H T Y T L P A N S S A D S V T A D L T T D G
      TCCTGATCATCAACGCACCCATCAGCGGACCCGTCGACCGATCAAAGGAAACCGACCGGGAAGTTCATCATGTCGACCGGATCTCCCT
151    F L I I N A P I S G P V D R S K E T D R E V P I M S T G S P
      ACAAGAAAGATGAAACGCCAAAGGTAGTAACATCAGAAGTAGCACCAGAAGTGGTAACACCAGAAGTAGTAACACCAGAAGTAGTAGTGG
181   Y K K D E T P K V V T S E V A P E V V T P E V V T P E V V V
      GGAACCGGCAGCATCTTGAAGAAGACCGAAAAGAACCGACGACGATCTTCCGAAAAGAAAGATCGACGAAAAGGATAACGTGA
211   G E P A A S L E E D R K E P T T I L P E K E E S T E K D N V
      TCCCAACGAAACGAAATAAACGAAGTTTCGCCCTAA
241   I P H G N E I N E V S P *
  
```

下划线对应部分为起始密码子(ATG)、终止密码子(TAA);阴影部分为 *sHSP* 基因家族的 α -结晶蛋白体保守结构域。*表示终止密码子。左边数据表示这一行第一个氨基酸字母的顺序。

图 2 春尺蠖 *AcinHSP20.4* (A)、*AcinsHSP* (B) 基因的核苷酸序列及其编码的蛋白质氨基酸序列

Fig.2 Nucleotide sequences of *AcinHSP20.4* (A) and *AcinsHSP* (B) in *Apocheima cinerarius*, and amino acid sequences of their encoded proteins

2.3 春尺蠖 *sHSP* 基因编码蛋白质的氨基酸序列一致性比对及系统进化关系分析

对春尺蠖 *AcinsHSP* 基因编码的蛋白质氨基酸序列与其他鳞翅目昆虫对应的序列进行一致性比对分析,结果(图 3)显示,春尺蠖 *AcinsHSP20.4* 基因在

编码的蛋白质氨基酸序列上与家蚕(*Bombyx mori*) HSP20.4 的序列一致性最高,为 85.16%,其次为与黏虫(*Mythimna separata*) HSP20.8 的序列一致性,为 80.54%,与草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*) HSP20.4 的一致性为 80.33%,而与冬尺蠖(*Operoph-*

tera brumata) sHSP、二化螟 (*Chilo suppressalis*) HSP23.9 和斜纹夜蛾 (*Spodoptera litura*) sHSP 的一致性较低,分别为 15.19%、21.82% 和 23.08%;春尺蠖 *AcinsHSP* 基因编码的蛋白质氨基酸序列与冬尺蠖 sHSP 序列的一致性最高,达到 51.24%,与二化螟的 HSP23.9、斜纹夜蛾的 sHSP 的序列一致性较高,分别为 47.56%、48.81%,但与家蚕、黏虫和草地贪夜蛾相关序列的一致性较低,分别为 17.00%、

18.18%、20.16%。综合分析结果表明,春尺蠖 *AcinHSP20.4* 基因在氨基酸序列上表现出较高的保守性,暗示其在进化过程中可能受到较强的纯化选择压力,以维持其功能;春尺蠖较低的 *AcinsHSP* 一致性,则反映了物种间在基因结构上的进化分化。上述结果提示,不同鳞翅目昆虫的 sHSP 基因在进化和功能上存在复杂关系,可能与它们的生态适应性和进化历史密切相关。

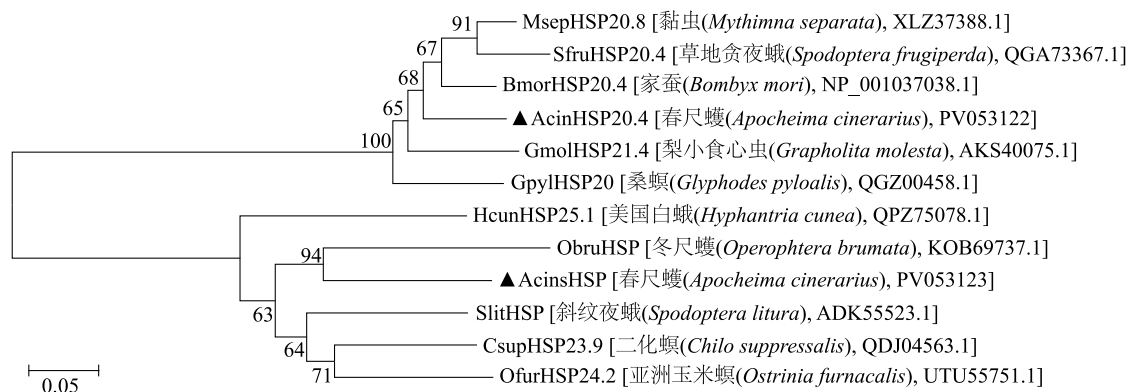
BmorHSP20.4MSI I FYFFDFDFGSRPRRI I.DOHFGI AI TPECFI I SVAAGFI I NRYFYRWRHI AAAARDVGSSTKVKDKFCVNI DV	77
MsepHSP20.8MSI I FYFFDFDFGYORPRRI I.DOHFGI AI TPECFI I STAAGFI I TRFYRWRHI AAAAKDVGSSTKAGDKFCVNI DV	77
SfruHSP20.4MSI I FYFFDFDFGFORPRRI I.DOHFGI AI TPECFI I SVAAGFI I TRFYRWRHI AAAVKDVGSSTKTEGDKFCVNI DV	77
ObrusHSP	MFSLSLIATFAL IATAVAL PASEKPIPKPIITTTSDLEI LVMFAFWFSVYFGLIT .KIFAPLWKFFPSFDDICPRINTEGNKFCVIVPV	89
CsupHSP23.9	MF SARVLTFAVVL IATAVAL PASECKPAVPRVTTITDACLVDLA .FWFSFYEFG . . . NLFAPLWKLFPTIADICPRITADDDKFCVIVGV	84
SlitsHSP	MFSPRLI A VCAVLATAVAEVVTDGVPVR . . ITTITEEDFEN . . . FWLGFEMFG . . . NLFAPLWKLFPTFADICPRITADDDKFCVIVNV	81
AcinHSP20.4MSL I FYLFDLDFR . . RPRRLMDOHFGI AI TPECFI I TAAGFMI SREYRWRHLAAAVKDVGSSTKACKDKFCVNI DV	75
AcinHSP	MFTRICLAILALVA AATSLFAQEKPIPCPIITTTTRDEIVFEMFGFENVEFFGLIT .KIFAPLWKLFPSFDDICPRITADDDKFCVIVGV	89
BmorHSP20.4	CHF AFFF I SVKTA DGFIVVVGKFFPRKDEH . GYISROFVRRVAT FEGAAFFIVESRI SSGCVITTTAAR . . KVPFLAVKCFRKYVFTACTGP	164
MsepHSP20.8	CHF AFFF I SVKTA DGFIVVVGKFFPRKDEH . GFISROFVRRVAT FEGAAFFIVESRI SSGCVITTTAAR . . KVPFLAVKCFRKYVFTACTGP	164
SfruHSP20.4	CHF AFDL I SVKTA DGFIVVVEAKFFPRKDDH . GFISROFVRRVAT FEGTEFFIVESRI SSGCVITTTAAR . . KVPFLAVKCFRKYVFTACTGP	164
ObrusHSP	KEYSKDLIKVVKKCLIFVCGLYEAKHADR . DVFASQFHTYITL FANSSGTVTAELTSDGYLVVNAFTTSDVRSKETTDRVPTVETGV	178
CsupHSP23.9	KLYKKDLIKVVKKGLFIFVCGSEPAKCCDR . DIFASQFHTYITL FANSSAAVTAELTSDGFLIVSAFTGGAAESTETDREVEITETGA	173
SlitsHSP	KLYKRLIKVVKKGLFIFVCGSEPAKCCDR . DVFASQFHTYITL FANSSSTVTAELTSDGFLIVTAFTVGTGAVDRAKLVDRVVEIVETEK	170
AcinHSP20.4	CHF AFFF I SVKTA DGFIVVVGKFFPRKDEH . GYISROFVRRVAT FEGCTAETVESRI SSGCVITTTAAR . . KVPFLAVKCFRKYVFTACTGP	162
AcinHSP	KLYKSLIKVVKKGLFIFVCGSEPAKLCDDHDLFASQFHTYITL FANSSADSVTADLITDGGFLINAFISGFPVDRSKETTDRVVEIVETGS	179
BmorHSP20.4	VRKFTKLCSEFANEKEK	181
MsepHSP20.8	VRKFTKLCSENCNGTEKKKEK	185
SfruHSP20.4	VRKFTKLCSENCNGTEKKKEK	183
ObrusHSP	FFKKEETASTAEFKLPEIPEKLPETPEKLPVPEKLPVPEKLPVPEKLPVPEKLPVPEKLPVPEKLPVPEKLPVPEKLPVPEKLPVPEKLPV	268
CsupHSP23.9	FYLKEESTITTVV ILESENCKESTTOSEREVIEKLVNIPHGNEIFV	220
SlitsHSP	FYIEKVKETITPLFAA . TVTDDERKEPITPAEKEDVIEKLVNIPHGNEIPL	221
AcinHSP20.4	VRKFTKLCSEPTKFNFKVN	180
AcinHSP	FYKKEETFKVVI SEVAPEVVTPEVVTPEVVVGEPAASLEEDRKEPTIILFKEESTEKDNVIPHGNEINEVSP	252
BmorHSP20.4	181
MsepHSP20.8	185
SfruHSP20.4	183
ObrusHSP	NVTPHCNFTCTT	281
CsupHSP23.9	220
SlitsHSP	221
AcinHSP20.4	180
AcinHSP	252

AcinsHSP:春尺蠖 (*Apocheima cinerarius*) sHSP (GenBank 登录号:PV053122); AcinHSP20.4:春尺蠖 (*Apocheima cinerarius*) HSP20.4 (GenBank 登录号:PV053122); BmorHSP20.4:家蚕 (*Bombyx mori*) HSP20.4 (GenBank 登录号:NP_001037038.1); MsepHSP20.8:黏虫 (*Mythimna separata*) HSP20.8 (GenBank 登录号:XIZ37388.1); SfruHSP20.4:草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) HSP20.4 (GenBank 登录号:QGA73367.1); ObrusHSP:冬尺蠖 (*Operophtera brumata*) sHSP (KOB69737.1); CsupHSP23.9:二化螟 (*Chilo suppressalis*) HSP23.9 (GenBank 登录号:QDJ04563.1); SlitsHSP:斜纹夜蛾 (*Spodoptera litura*) sHSP (GenBank 登录号:ADK55523.1)。

图 3 春尺蠖及其他昆虫小热休克蛋白 (sHSP) 的多重氨基酸序列比对结果
 Fig.3 Multiple amino acid sequence alignment of small heat-shock proteins (sHSPs) from *Apocheima cinerarius* and other insects

在 NCBI 网站搜索已经上传的其他目昆虫的 sHSP 基因编码的蛋白质氨基酸序列与春尺蠖 *AcinHSP20.4*、*AcinsHSP* 基因编码的蛋白质氨基酸序列信息,构建系统进化树。结果(图 4)显示,春尺蠖小热激蛋白 *AcinsHSP* 与同属尺蛾科冬尺蠖的 sHSP 聚为一支,表明两者在进化上具有较近的亲缘关系,这可能与其相似的生物学特性及环境适应策略有关。此外,春尺蠖的 *AcinHSP20.4* 与

家蚕的 HSP20.4、草地贪夜蛾的 HSP20.4 及黏虫的 HSP20.8 聚为一类,进一步揭示了 sHSP 在不同昆虫物种间的功能保守性。这种聚类关系不仅反映了 sHSP 在进化过程中的高度保守性,也暗示了其在昆虫应对环境胁迫(如温度变化和饥饿)中的重要作用。此外,上述结果为进一步研究 sHSP 的功能分化及其在昆虫的温度适应性方面的分子机制提供了重要线索。



春尺蠖 sHSP 蛋白用三角标记。

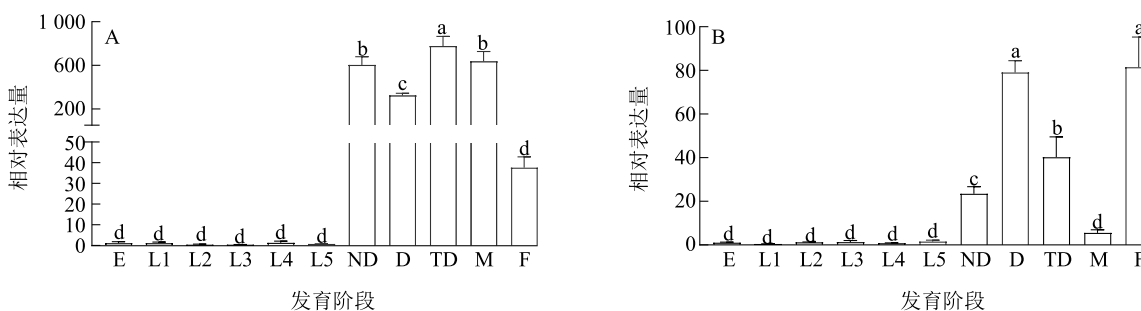
图 4 基于春尺蠖及其他昆虫小热激蛋白基因 (sHSP) 编码的蛋白质氨基酸序列的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree based on amino acid sequences of proteins encoded by small heat-shock protein genes (sHSPs) from *Apocheima cinerarium* and other insects

2.4 春尺蠖 sHSP 在不同发育阶段的表达情况

从图 5 可以看出, *AcinHSP20.4* 的相对表达量在春尺蠖卵至 5 龄幼虫阶段均处于较低水平; 进入蛹期后, *AcinHSP20.4* 的相对表达量上升; 在非滞育蛹至雌虫阶段, *AcinHSP20.4* 的相对表达量均处于较高水平; 在滞育解除蛹期, *AcinHSP20.4* 的相对表达量最高。 *AcinsHSP* 的相对表达量在春尺蠖卵至 5 龄幼

虫阶段均处于较低水平; 在蛹期和雌虫中, *AcinsHSP* 的相对表达量显著高于卵至 5 龄幼虫; 在雌虫、滞育蛹中, *AcinsHSP* 的相对表达量较大, 并且与其余发育阶段的相对表达量间差异显著 ($P < 0.05$); 在非滞育蛹、滞育蛹与滞育解除蛹阶段, *AcinsHSP* 的相对表达量处于较高水平, 且与除雌虫外的其他阶段的相对表达量差异显著 ($P < 0.05$)。



E: 卵; L1~L5: 1~5 龄幼虫; ND: 非滞育蛹; D: 滞育蛹; TD: 滞育解除蛹; M: 雄虫; F: 雌虫。

图 5 春尺蠖 *AcinHSP20.4* (A)、*AcinsHSP* (B) 基因在不同发育阶段的表达情况

Fig.5 Expression levels of *AcinHSP20.4* (A) and *AcinsHSP* (B) genes at different developmental stages of *Apocheima cinerarium*

2.5 春尺蠖 sHSP 基因在不同组织中的表达情况

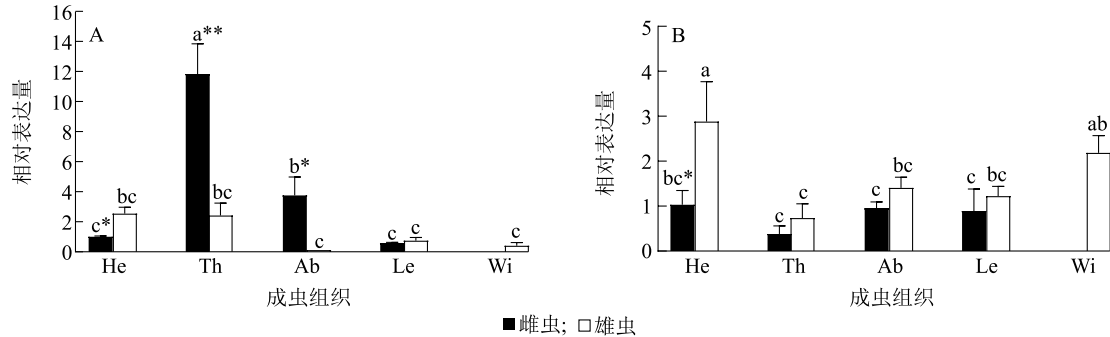
由图 6 可以看出, *AcinHSP20.4* 在春尺蠖雌虫胸部的相对表达量最高, 并且与其他组织中的相对表达量有显著差异 ($P < 0.05$); *AcinsHSP* 在春尺蠖雄虫头部的相对表达量最高, 并且与除雄虫翅膀外的其他组织中的相对表达量有显著差异 ($P < 0.05$); *AcinHSP20.4*、*AcinsHSP* 在雌虫、雄虫足中的相对表达量无显著差异 ($P > 0.05$)。

2.6 不同温度胁迫下春尺蠖 sHSP 基因在 4 龄幼虫中的表达情况

由图 7 可以看出, 随着温度升高, *AcinHSP20.4* 基因的相对表达量整体表现为先升高后降低的趋势。在 $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理下, *AcinHSP20.4* 基因的相对表达量较低, 且二者间无显著差异; 在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理下, *AcinHSP20.4* 基因相对表达量达到最大值; 在 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理下, *AcinHSP20.4* 基因的相对表达量下降, 并且

与 25 °C 处理下的相对表达量有显著差异 ($P < 0.05$)。随着温度的升高, *AcinsHSP* 基因的相对表达量整体呈逐渐上升的趋势, 在 0~25 °C 温度处理

下, *AcinsHSP* 基因的相对表达量无显著差异, 而在 -5 °C 与 30 °C 处理下, *AcinsHSP* 基因的相对表达量差异显著 ($P < 0.05$)。



He:头部;Th:胸部;Ab:腹部;Le:足部;Wi:翅膀。不同小写字母表示不同组织间基因相对表达量差异显著 ($P < 0.05$); *、** 分别表示经 t 检验后 2 个不同性别基因的转录水平在 0.05、0.01 水平具有显著差异。

图 6 春尺蠖 *AcinHSP20.4* (A)、*AcinsHSP* (B) 基因在不同组织中的表达情况

Fig.6 Expression levels of *AcinHSP20.4* (A) and *AcinsHSP* (B) in different tissues of *Apocheima cinerarius*

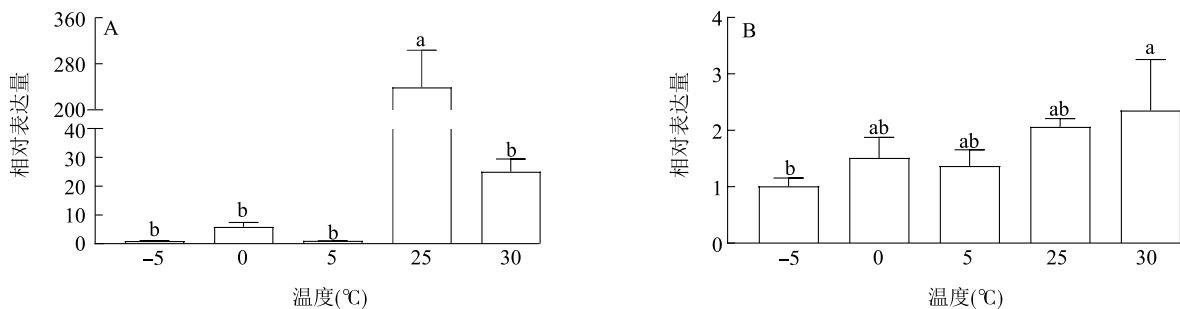


图 7 春尺蠖 *AcinHSP20.4* (A)、*AcinsHSP* (B) 基因在不同温度胁迫下的表达情况

Fig.7 Expression of *AcinHSP20.4* (A) and *AcinsHSP* (B) genes in *Apocheima cinerarius* under different temperature stresses

3 讨论

小分子热激蛋白 (sHSP) 是一类相对分子量为 15 000~50 000 的应激调控蛋白^[14], 其核心特征在于其 α -结晶蛋白结构域(蛋白质家族数据库中该结构域的官方编号为 PF00011)的保守性, 该结构域通过 β -折叠三明治构象维持着分子伴侣功能^[15]。本研究基于春尺蠖转录组数据, 通过逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 克隆获得 *AcinHSP20.4* (开放阅读框长度为 543 bp)、*AcinsHSP* (开放阅读框长度为 758 bp) 的完整编码序列, 分别编码 180 个、252 个氨基酸。借助 ExPASy ProtParam 工具, 预测春尺蠖 *AcinHSP20.4* 和 *AcinsHSP* 的相对分子量分别为 20 470 (等电点为 6.98) 和 27 758 (等电点为 4.60), 该差异符合 sHSP 基因家族的多态性特征^[16]。保守结构域分析结果显示, *AcinHSP20.4* 和 *AcinsHSP* 2

个蛋白质均包含完整的 α -结晶蛋白结构域。结合蛋白质相对分子量及进化关系初步分析得出, 本研究获得的 sHSP 基因基本上符合 sHSP 基因家族的结构特征。

研究发现, sHSP 的种类繁多, 功能上也表现出一定差异。本研究对 2 个 sHSP 基因在春尺蠖卵至成虫发育阶段的表达模式进行分析发现, *AcinsHSP*、*AcinHSP20.4* 在春尺蠖不同发育阶段的表达模式表现出一定差异。*AcinsHSP* 在春尺蠖卵至 5 龄幼虫阶段的相对表达量较低, 而在春尺蠖蛹期、成虫期的相对表达量显著升高, 在春尺蠖雌虫中的相对表达量达到峰值, 并且与除滞育蛹外其他发育阶段相对表达量之间差异显著 ($P < 0.05$)。类似的, *AcinHSP20.4* 在春尺蠖卵至 5 龄幼虫阶段的相对表达量也较低, 但在进入蛹期后逐渐上升, 并在滞育解除蛹期达到最大值。2 个小热激蛋白的表达水平在春尺蠖卵至

5 龄幼虫阶段均较低,这与美国白蛾 (*Hyphantria cunea*) 中 *HcHSP18.9*、*HcHSP21.4* 的表达特点^[17] 一致,说明春尺蠖在卵与整个幼虫阶段对 *sHSP* 基因的依赖性较低。在沙葱萤叶甲中, *GdHSP10a* 的相对表达量在幼虫阶段较低,但在卵期却显著高于幼虫期,沙葱萤叶甲的越冬卵具有很强的抗寒能力^[18-19],可能与 *GdHSP10a* 在卵期的高水平表达相关。

在已有的与滞育相关的基因研究中,热激蛋白的编码基因被认为与滞育的关系最密切^[20]。本研究发现,春尺蠖 *AcinHSP20.4* 基因在滞育蛹期的相对表达量显著低于非滞育蛹期、滞育解除蛹期 ($P < 0.05$),该结果与蛀茎夜蛾 (*Sesamia nonagrioides*) 相关研究中 *HSP20.8* 在滞育期的相对表达量较低、滞育终止后相对表达量显著升高的研究结果^[21] 一致。在小麦吸浆虫 (*Sitodiplosis mosellana*) *SmHSP21.9* 的研究中也发现了类似结果^[22]。可能由于春尺蠖滞育蛹期能量代谢较低,产生的腺嘌呤核苷三磷酸 (ATP) 显著减少,此时不依赖于 ATP 的 *sHSP* 蛋白在滞育过程中大量积累。但是,春尺蠖 *AcinsHSP* 基因在滞育蛹期的相对表达量却高于非滞育蛹期、滞育解除期,这一结果与松墨天牛 (*Monochamus alternatus*) 小热激蛋白 *sHSP21.2* 基因的研究结果^[23] 一致,可能与该基因参与春尺蠖滞育蛹期间抵御外界高温的活动有关。此外, *AcinHSP20.4*、*AcinsHSP* 基因分别在雄虫和雌虫中特异性表达,这种性别差异性表达可能与 *AcinsHSP*、*AcinHSP20.4* 分别参与雌/雄成虫的生殖过程有关^[24]。

小热激蛋白的组织特异性表达通常与其功能密切相关,在不同组织中可能发挥着不同作用^[8]。从组织特异性表达的分析结果可以看出, *AcinsHSP*、*AcinHSP20.4* 在春尺蠖的不同组织中表现出明显的表达差异。 *AcinsHSP* 在雄虫头部的相对表达量最高,且与除雄虫翅膀外的其他组织中的相对表达量差异显著 ($P < 0.05$),推测 *sHSP* 基因可能参与雄虫头部调控脑神经分泌细胞的生理活动,从而影响精子的发生和成熟过程,对春尺蠖的生殖能力产生影响^[25]。而 *AcinHSP20.4* 在雌虫胸部的相对表达量最高,可能是由于雌虫胸部存在与生殖相关的组织, *sHSP* 可能参与调控相关细胞的生理活动,影响卵子的发生和成熟过程,从而对春尺蠖的生殖能力产生影响^[26]。例如,在对家蚕 *sHSP* 基因的研究中发现,该基因通过调控卵黄蛋白等生殖细胞蛋白的折叠与

转运过程,确保这些蛋白质准确输送至卵母细胞,这种精确的蛋白质递送机制不仅为胚胎发育提供了必需的营养基质,还直接关系到成虫的产卵效能与卵粒品质^[27]。

表达热激蛋白是昆虫应对极端温度胁迫而采取的一种重要手段^[28-29]。从温度胁迫表达结果可以看出, *AcinHSP20.4*、*AcinsHSP* 在温度胁迫下的表达模式存在显著差异。随着温度升高, *AcinHSP20.4* 的相对表达量整体呈现先升高后降低的趋势,在 25 °C 时达到峰值,在 30 °C 时显著下降 ($P < 0.05$),沙葱萤叶甲 *GdHSP10a* 的表达模式与春尺蠖相同,但其在 30 °C 时的相对表达量达到最大值^[19],可能由于春尺蠖 4 龄幼虫的生长所处时间为 4 月中下旬的春季,而沙葱萤叶甲的生长所处时间为夏季,因此春尺蠖 4 龄幼虫的耐受温度低于沙葱萤叶甲成虫。相比之下,随温度升高, *AcinsHSP* 的相对表达量逐渐上升,在 0~30 °C 范围内无显著差异,但在 -5 °C 和 30 °C 之间差异显著 ($P < 0.05$),表明该基因受到的温度诱导表达没有 *AcinHSP20.4* 敏感。上述结果表明, *AcinHSP20.4* 和 *AcinsHSP* 在春尺蠖应对温度胁迫中可能具有不同的功能分工。

4 结论

本研究成功克隆了春尺蠖的 2 个 *sHSP*,并对其在不同发育阶段、不同组织及 4 龄幼虫在温度胁迫下的表达进行了深入分析。研究表明, *AcinsHSP* 在春尺蠖生长发育、蛹滞育、对温度胁迫的响应中扮演着重要角色。这些发现揭示了 *sHSP* 在春尺蠖生长发育、蛹滞育及温度胁迫中的潜在作用,为其分子机制研究奠定了基础。本研究的不足之处在于:(1) 未通过 RNA 干扰验证 *sHSP* 基因的功能;(2) 未检测其他应激因子(如低温、病原感染)的调控效应;(3) 蛋白质翻译水平的变化尚未与 mRNA 表达进行关联分析。后续将进一步对上述不足进行研究,从而全面深入地揭示 *sHSP* 基因响应春尺蠖生长发育、蛹滞育及温度胁迫中的分子机制。

参考文献:

- [1] 黄晓曦,刘占国. 春尺蠖生物学特性及综合防治的研究[J]. 中国农业信息,2013(17):98.
- [2] 庞竟公,何稳稳,曹玉,等. 重要林木害虫春尺蠖研究进展[J]. 农业科学,2018,8(5):461-467.
- [3] 卿薇,阿地力沙塔尔,闫文兵. 春尺蠖生物学特性研究[J].

- 应用昆虫学报,2016,53(1):174-184.
- [4] 陈龙,董飞龙,王建,等.春尺蠖可溶性海藻糖酶 *AcinTreIA* 和 *AcinTreIA-like* 基因的克隆及饥饿胁迫下表达谱[J].江苏农业科学,2023,51(2):58-66.
- [5] 栗振义,龙瑞才,张铁军,等.植物热激蛋白研究进展[J].生物技术通报,2016,32(2):7-13.
- [6] 徐彤,王英琪,李渊,等.小分子热激蛋白在植物应对高温胁迫中的作用[J].江苏农业学报,2024,40(7):1343-1350.
- [7] KING A M, MACRAE T H. Insect heat shock proteins during stress and diapause[J]. Annual Review of Entomology,2015,60:59-75.
- [8] 丁佳奇,蒋青萍,陈恩熙,等.野桑蚕小分子热激蛋白基因 *Bm-mHSP19.9* 的克隆与表达分析[J].蚕业科学,2023,49(6):481-489.
- [9] 邵云飞,张今,王莹莹,等.小地老虎 *AiHSP19.3* 基因鉴定及其对高温和杀虫剂胁迫的响应[J].植物保护,2024,50(3):80-87.
- [10] 杨朔,刘少凯,赵少轩,等.棉铃虫小分子热激蛋白 *sHSP22.0* 基因的克隆及表达谱分析[J].植物保护,2021,47(3):61-69.
- [11] WANG H J, SHI Z K, SHEN Q D, et al. Molecular cloning and induced expression of six small heat shock proteins mediating cold-hardiness in *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) [J]. Frontiers in Physiology,2017,8:60.
- [12] MIANO F N, JIANG T, ZHANG J, et al. Identification and up-regulation of three small heat shock proteins in summer and winter diapause in response to temperature stress in *Pieris melete* [J]. International Journal of Biological Macromolecules,2022,209(A):1144-1154.
- [13] 陈龙,朱圣杰,崔阔澍,等.春尺蠖热激蛋白 *AcinHSP70* 基因的克隆、分子特性与表达分析[J].西南农业学报,2024,37(1):128-136.
- [14] 王瑞娟,高瑞娜,张婷,等.外源物质诱导家蚕小分子热激蛋白基因 *HSP19.9* 的组织表达活性分析[J].蚕业科学,2010,36(5):780-784.
- [15] VIERLING E. The roles of heat shock proteins in plants [J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology,1991,42:579-620.
- [16] BUBLIY O A, LOESCHCKE V. Variation of life-history and morphometrical traits in *Drosophila buzzatii* and *Drosophila simulans* collected along an altitudinal gradient from a Canary island [J]. Biological Journal of the Linnean Society,2004,84(1):119-136.
- [17] ZHAO S Y, LIU Y K, LI H, et al. Spatiotemporal patterns of five small heat shock protein genes in *Hyphantria cunea* in response to thermal stress [J]. International Journal of Molecular Sciences,2023,24(20):15176.
- [18] 高靖淳,周晓榕,庞保平,等.低温对沙葱萤叶甲越冬卵存活和发育的影响[J].昆虫学报,2015,58(8):881-886.
- [19] 陈龙,谭瑶,周晓榕,等.沙葱萤叶甲热激蛋白基因 *GdH-sp10a* 的克隆、分子特征与表达分析[J].植物保护学报,2019,46(2):417-424.
- [20] 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.
- [21] GKOUVITSAS T, KONTOGIANNATOS D, KOURTI A. Differential expression of two small HSPs during diapause in the corn stalk borer *Sesamia nonagrioides* (Lef.) [J]. Journal of Insect Physiology,2008,54(12):1503-1510.
- [22] 古丽旦,刘洋,李方向,等.小麦吸浆虫小热激蛋白基因 *HSP21.9* 的克隆及在滞育过程与温度胁迫下的表达特性[J].中国农业科学,2023,56(1):79-89.
- [23] 李慧,何玄玉,陶蓉,等.松墨天牛小热激蛋白基因的克隆、表达谱及对温度胁迫的响应[J].昆虫学报,2018,61(7):749-760.
- [24] LU Y H, YUAN M, GAO X W, et al. Identification and validation of reference genes for gene expression analysis using quantitative PCR in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. PLoS ONE,2013,8(7):e68059.
- [25] 张旺和,徐进,李伟,等.热激蛋白在昆虫生殖中的功能及作用机制[J].生物安全学报,2023,32(2):109-117.
- [26] 刘雅婷,谢文,张友军.昆虫性别决定机制研究进展[J].昆虫学报,2015,58(4):437-444.
- [27] 刘彬斌,柴春利,王先燕,等.家蚕 *HSP24.3* 基因的克隆及功能研究[J].中国农业科学,2008,41(12):4201-4208.
- [28] HOFFMANN A A, SØRENSEN J G, LOESCHCKE V. Adaptation of *Drosophila* to temperature extremes: bringing together quantitative and molecular approaches [J]. Journal of Thermal Biology,2003,28(3):175-216.
- [29] SØRENSEN J G, KRISTENSEN T N, LOESCHCKE V. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins [J]. Ecology Letters,2003,6(11):1025-1037.

(责任编辑:徐艳)