



一种新的昆虫热诱导型 HSP70 基因的克隆与表达分析*

秦 晶** 张小香 高 鹏 陆明星 杜予州***

(扬州大学园艺与植物保护学院&应用昆虫研究所, 扬州 225009)

摘 要 【目的】西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* (Pergande) 是一种重要的外来有害生物, 已在我国多个省份发现危害, 且有向南北两端继续扩张的趋势。HSP70 是热激蛋白家族中最重要的一类成员, 在昆虫温度耐受性中发挥重要的作用。本研究旨在明确不同性别的西花蓟马成虫在受到高低温胁迫时其 HSP70 家族的表达差异, 进一步探讨西花蓟马对环境适应的分子机理, 为其防控提供理论依据。【方法】首先, 应用 RT-PCR 及 RACE 技术从西花蓟马中克隆得到 HSP70 基因; 其次, 对该基因组进行验证, 得到基因组序列, 并分析内含子的位置及大小; 最后, 通过实时定量 PCR 技术分析得到的西花蓟马 HSP70 的表达模式。【结果】本研究克隆得到的西花蓟马 HSP70 基因命名为 *Fohsp703* (GenBank 登录号: KY914546), 该基因全长 2 106 bp, 开放阅读框 2 040 bp, 编码 679 个氨基酸, 推测分子量为 73.6 ku。FoHSP703 的氨基酸序列中含有 3 个 HSP70 家族签名序列, 说明它是热激蛋白家族成员; 但是, FoHSP703 的蛋白序列以 APAA 结尾, 而且多序列比对与系统发育分析均表明, FoHSP703 不同于现在已鉴定出的其它昆虫的 HSP70。基因组结构分析发现, *Fohsp703* 不含有内含子, 在高低温胁迫下能够被诱导并且显著表达, 而且雌虫的表达量高于雄虫, 分别在 37℃ 和 -12℃ 达到最大值。【结论】本研究的西花蓟马 HSP70 (*FoHSP703*) 是一种新的昆虫热诱导型 HSP70, 在西花蓟马温度耐受性中起着重要的作用。

关键词 西花蓟马, HSP70, 克隆, 表达模式, 荧光定量 PCR

Cloning and expression profile of a novel, thermal, inducible HSP70 gene in insects

QIN Jing** ZHANG Xiao-Xiang GAO Peng LU Ming-Xing DU Yu-Zhou***

(School of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

Abstract [Objectives] In recent years, the Western flower thrip, *Frankliniella occidentalis* (Pergande), has been found in several Chinese provinces and the range of this pest appears to be expanding in China. Heat shock protein 70 (HSP70) is one of the most important members of the heat shock protein family and plays a very important role in thermotolerance in insects. The aim of this study was to clarify differences in the expression of HSP70 in adult male and female *F. occidentalis* that were subject to temperature stress, both to further explore the molecular mechanism by which this species responds to temperature stress, and to provide a theoretical basis for the control of this pest. [Methods] The Western flower thrip HSP70 gene was cloned using RT-PCR and RACE. The genomic sequence was then determined by genomic validation, and the position and size of the intron were analyzed by cDNA sequence analysis. Finally, Real-time PCR was used to analyze the expression patterns of HSP70. [Results] The HSP70 gene obtained was named *Fohsp703* (GenBank accession number: KY914546) which had a complete cDNA sequence of 2 106 bp in length, an open reading frame (ORF) of 2 040 bp and encoded 679 amino acids with a predicted

*资助项目 Supported projects: 大学生科技创新基金项目 (X20160637); 公益性行业 (农业) 科研专项 (201103026)

**第一作者 First author, E-mail: m18252715696@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: yzdu@yzu.edu.cn

收稿日期 Received: 2017-03-10, 接受日期 Accepted: 2017-05-12

molecular weight of 73.6 ku. Its amino acid sequence contains three HSP70 family signature sequences, indicating that HSP70 is a member of the heat shock protein family. However, unlike the HSP70 genes of other species, the *Fohsp703* protein sequence ends with APAA, and phylogenetic analysis also suggests that *Fohsp703* differs from the HSP70 genes of other insects. Analysis of its genomic structure revealed that *Fohsp703* does not contain introns. The expression of *Fohsp703* was significantly elevated by heat and cold stress. Expression was higher in adult females than in males, peaking at 37°C and -12°C, respectively. **[Conclusion]** The Western flower thrip HSP703 gene is a novel member of the insect HSP70 family and plays an important role in resistance to extreme temperatures.

Key words western flower thrips, HSP70, cloning, expression pattern, real-time quantitative PCR

热激蛋白 (Heat shock proteins, HSPs) 又称热休克蛋白, 广泛存在于各种生物中, 是一类进化上高度保守、在各类生物中具有较高同源性的特殊蛋白质, 而且在机体受到刺激后能迅速合成, 使生物体适应不良环境 (Lindquist, 1986; Sørensen *et al.*, 2003; Zhao and Jones, 2012; 孙猛等, 2014)。此外, HSPs 还伴随有多种生物学功能, 可促进变性蛋白质重新折叠, 故又称分子伴侣 (Hartl, 1996)。目前, 按照同源性与分子量可将热激蛋白分为 HSP100、HSP90、HSP70、HSP60 和小分子 HSPs (分子量 12~43 ku) 家族, 其中 HSP70 是热激蛋白中最重要的成员之一 (Glick, 1995; Kim *et al.*, 1998)。HSP70 家族在结构上相似, 皆含有 1 个约 44 ku 的 N-端保守 ATP 结合结构域、1 个约 18 ku 的多肽结合结构域和 1 个 10 ku 的 C-端不保守区域 (Feige and Polla, 1994)。在细胞质中, HSP70 在前体蛋白组装形成多分子复合体前起稳定作用, 而且将这些前体蛋白转移至线粒体和内质网过程中也具有重要作用; 在器官中, 蛋白折叠和组装前, HSP70 则可维持新转运蛋白的非折叠状态, 还能促进不溶性多聚物和重新折叠的多肽的溶解 (Marshall *et al.*, 1990)。此外, HSP70 在不利环境中也发挥着重要的作用 (Gkouvitsas *et al.*, 2009; Sørensen, 2010; Zhang and Denlinger, 2010)。根据 HSP70 的表达模式不同, 可分为 3 类: 第一类属组成型 (HSC70), 在各个细胞内均可表达, 不受外界胁迫刺激也能大量表达; 第二类为诱导型, 在正常细胞中少量表达, 却会受胁迫刺激大量诱导表达; 第三类是兼有诱导型和组成型特征的中间型 (Constitutive and inducible), 既能在细胞中普遍表达, 也可在受胁迫刺激下被显著诱导表达 (Callahan *et al.*, 2002; Boutet *et al.*, 2003; Zhao and Jones,

2012)。

西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* (Pergande) 又名苜蓿蓟马, 属缨翅目 (Thysanoptera), 蓟马科 (Thripidae)、花蓟马属 *Frankliniella*。该虫是一类危害蔬菜、花卉等植物的全球性入侵害虫, 我国 1997 年将其列入进境植物检疫潜在危险性病、虫、杂草名录。西花蓟马原产于北美洲, 20 世纪 70 年代随着进出口贸易的日益频繁而在欧洲、亚洲、美洲、非洲和大洋洲等多个国家和地区之间传播 (Kirk and Terry, 2003; 戴霖等, 2005)。西花蓟马自 2000 年在我国昆明首次发现, 2003 年在北京保护地的辣椒和黄瓜上被发现严重危害以来, 该虫已在我国多个省区被发现危害, 且有向南北两端继续扩张的趋势 (蒋小龙等, 2001; 张友军等, 2003; 吴青君等, 2007; 袁成明等, 2008; 杨华等, 2010; 吕要斌等, 2011)。西花蓟马不仅直接取食危害植株, 还能传播病毒, 造成植物病害 (Jones *et al.*, 2005; 陆亮等, 2009; 孟祥钦等, 2010)。此外, 温度对西花蓟马的生长发育会产生很大影响 (Katayama, 1997; 李景柱等, 2007; 刘丽辉等, 2008)。在抗冻方面西花蓟马属不耐结冰型, 且具有快速冷驯化现象 (McDonald *et al.*, 1998; 李鸿波等, 2011a); 相反, 西花蓟马不耐高温, 高温甚至影响其雌雄比例 (Li *et al.*, 2011; 张治军等, 2012; 李鸿波等, 2011b)。有关西花蓟马热激蛋白以及对高低温胁迫的适应性研究已有一些报道 (Li and Du, 2013; 史亮等, 2013; Wang *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2016; Qin *et al.*, 2017)。本研究利用分子克隆技术获得了一种新的西花蓟马 HSP70 蛋白基因全长, 并分析其序列特征及在温度处理下雌雄虫的表达情况, 探讨这种新的 HSP70 在西花蓟马应对高低温胁迫的响应, 为深入研究西花蓟马温度耐受性机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫与温度处理

西花蓟马于 2008 年 9 月取自浙江省农业科学院,是用四季豆豆荚在室内进行多代饲养后建立的实验种群。室内饲养是在 QHX-300BS- 型智能人工气候箱中进行,温度为 $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$,湿度为 70%~80%,光暗比为 16:8。

将 24 h 内羽化的西花蓟马成虫(雌雄)各取 120 头,分别于恒温水浴槽中进行 33、35、37、39、41 $^\circ\text{C}$ 高温处理 1 h;以及 -14、-12、-10、-8、-6 $^\circ\text{C}$ 低温处理 1 h。处理结束后将样品置于人工气候箱内恢复 1 h,以气候箱内未经温度处理的西花蓟马雌雄成虫作为对照组。将所有处理的样品及对照样品在液氮中冷冻 5 min,然后储存在 -70 $^\circ\text{C}$ 超低温冰箱备用。每个温度梯度,设置 4 个重复。

1.2 总 RNA 提取与 cDNA 第一链的合成

取高低温处理后的西花蓟马,按照 Promega 生物技术有限公司 SV Total RNA 分离纯化试剂盒说明书步骤提取西花蓟马总 RNA。用 1%琼脂糖凝胶电泳(DYY-12 电泳仪)和微量分光光度计(Eppendorf BioPhotometer plus, Eppendorf)检测总 RNA 的纯度和浓度。以总 RNA 为模板, Oligo(dT)₁₈ 为引物,利用 M-MLV Reverse Transcriptase 催化 cDNA 第一链的合成。

1.3 HSP70 基因全长的克隆

从转录组中获得西花蓟马的部分片段,设计引物(表 1)并以 cDNA 第一链为模板对该片段进行扩增。PCR 扩增体系为:12.5 μL 2xTaq master Mix (Dye Plus), 1 μL cDNA 模板、上下游引物各 1 μL , 再加 ddH₂O 至 25 μL 。在 PCR 仪(S-100, Bio-Rad)上采用 touchdown PCR 扩增中间片段,扩增条件为:94 $^\circ\text{C}$ 预变性 3 min, 94 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s, 64 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 30 s, 每一个循环降低退火温度 1 $^\circ\text{C}$, 共 19 个循环,然后 94 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s, 44 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 1 min, 30 个循环,最后 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。反应结束后用 1%的琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物,参照 Axyprep DNA 凝胶回收试剂盒(Axygen)说明书步骤回收 Touchdown PCR 产物,回收产物与 pGEM-T Easy Vector 载体连接,转化 DH5 α 大肠杆

菌,阳性克隆送上海生工测序。

根据已获得的 1 个 *hsp70* 片段,结合 RACE 引物设计的相关要求,设计 5'和 3'特异性引物(表 1)进行西花蓟马 *hsp70* 的 5'/3'段序列的扩增,引物由上海生工合成。参照 SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit 说明书合成 5'和 3' cDNA 第一条链,cDNA 产物保存于 -20 $^\circ\text{C}$ 待用。5'和 3'片段扩增体系为:12.5 μL 2xTaq master Mix (Dye Plus), 1 μL 5'或 3'cDNA 模板, 1 μL 引物 5'或 3'引物(10 mmol/L), 2.5 μL UPM(10 $\times$), 8 μL RNase-free dH₂O。反应参数为:94 $^\circ\text{C}$ 5 min; 94 $^\circ\text{C}$ 30 s, 68~69 $^\circ\text{C}$ 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 2 min, 35 个循环;然后 72 $^\circ\text{C}$ 下 10 min, 最后 4 $^\circ\text{C}$ 保存。其产物检测、回收、连接、转化、测序均参照中间片段扩增方法。利用 ContigExpress 软件将 5'端, 3'端序列以及中间序列进行拼接,获得西花蓟马 HSP70 基因全长序列。为了进一步验证 HSP70 基因全长序列的准确性,利用西花蓟马 5' cDNA 模板进行全长序列扩增验证(表 1)。

1.4 HSP70 基因序列分析

通过在线软件 Translate tool (<http://web.expasy.org/translate/>)对 HSP70 氨基酸进行翻译,分析序列组成、相对分子质量及等电点等理化性质。利用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf/>)查找基因完整的开放阅读框(Opening reading frame, ORF)。使用 ExPASy 分子生物学序列分析工具推导氨基酸序列(Gasteiger *et al.*, 2003),并在线软件 Scanprosite (<http://www.expasy.org/tools/scanprosite/>)搜索西花蓟马 HSP70 基因编码蛋白的特征基序(Motif)。最后同源性搜索在 NCBI 中的 Blast 进行,并采用 MEGA7.0 分别采用邻接法,最小进化法,最大似然法和最大简约法四种方法构建昆虫 HSP70 系统进化树。

1.5 HSP70 基因组验证

参照 AxyPrep 说明书步骤提取西花蓟马成虫的基因组 DNA。将其样品置于 -20 $^\circ\text{C}$ 保存备用。根据已获得的西花蓟马热激蛋白基因全长 cDNA 序列,设计跨越开放阅读框的引物(表 1)用于扩增 *hsp70* 的基因组序列。PCR 产物检测、回收、连接、转化、测序参照中间片段扩增方法。将测序结果放在 GenBank 中进行 Blast 同源序列检索,予以确认后

表 1 研究中使用的引物
Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequences	产物长度 (bp) Amplicon size	用途 Purpose
<i>hsp70</i> DP-F <i>hsp70</i> DP-R	TGGTATTGTAAAGGCTACTGACG CATACCGACAGCATCCTTCATAA	1 254	中间片段扩增 Intermediate fragment amplification
<i>hsp70</i> RACE-5' <i>hsp70</i> RACE-3'	CTTGATAAGCAGCACCATAGGCAAC CAGAGCAGGCTGAGTGACGAGGAAA	563 1 519	5'RACE 3'RACE
<i>hsp70</i> cDNA-F <i>hsp70</i> cDNA-R	AGCAATTGGTATCGACTTAGGTA ATTATCTTTTAGGCGGCTGGTGC	2 022	cDNA 全长验证 Verification of full-length cDNA
<i>hsp70</i> DNA-F <i>hsp70</i> DNA-R	AGCAATTGGTATCGACTTAGGTA ATTATCTTTTAGGCGGCTGGTGC	2 022	基因组验证 Verification of genome
<i>hsp70</i> RT-F <i>hsp70</i> RT-R	GCTAAGGAACACGAGAGGATTG' TGTGACATACCGACAGCATCC	362	实时定量 Real-time quantitative PCR
18S-F 18S-R	AACACGGGAAACCTCACCA CAGACAAATCGCTCCACCAA	116	实时定量内参基因 Reference gene in qRT-PCR
<i>GAPDH</i> -F <i>GAPDH</i> -R	AAGGGTGCTCAGGTTGTTGCT CGACCGTGGGTGGAGTCATAT	89	

西花蓟马 HSP70 基因组序列与 cDNA 序列全长进行比对, 并分析内含子分布情况。

1.6 HSP70 蛋白质结构分析

使用 Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html>), 以与西花蓟马热激蛋白 70 最相似的蛋白质模型为模板, 预测西花蓟马热激蛋白 70 结构模型。使用 Chimera 软件调整三维结构和原子排列。

1.7 西花蓟马 HSP70 实时定量分析

1.7.1 实时定量 cDNA 的合成与引物设计 参照 PrimeScript RT reagent Kit Perfect Real Time 试剂盒 (Bio-Rad)说明书步骤合成实时定量 cDNA 第一条链。根据已获得西花蓟马 HSP70 基因全长序列, 利用 Primer 5.0 软件设计特异引物, 并以 18S 作为低温内参基因和 GAPDH 作为高温内参基因 (Zheng *et al.* , 2014) , 引物信息见表 1。

1.7.2 实时定量分析 采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 Real-time PCR 扩增反应。PCR 反应体系为 20 : SYBR® Premix Ex TaqTM (2×) 10 μL , 10 μmol/L 的上下游引物各 1 μL , cDNA 模板 2 μL , 灭菌超纯水 6 μL。用两步法进行 PCR ,在 CFX-96 System PCR 仪上进行, 反应参数为 :95℃预变性 3 min ,95℃变性 15 s ,56.3℃ 30 s ,共计 40 个循环。反应结束后, 通过熔解曲线来判定 Real-time PCR 反应的特异性。

1.8 数据统计与分析

实验数据用均数±标准误表示, 各处理的表达水平通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行相对定量分析, 然后利用 Duncan's 多重比较法进行差异显著性分析。所有数据由 SPSS16.0 软件分析处理, 显著性水平取 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 西花蓟马 HSP703 序列特征分析

以西花蓟马 cDNA 为模板, 用中间片段引物进行 PCR 扩增得到 257 bp 的特异性条带, 经回收、克隆、测序。将测序结果进行 Blast 比对发现与昆虫的 HSP70 基因 (*hsp70*) 序列具有较高的相似度, 表明该片段为西花蓟马 HSP70 基因 (*hsp70*) 中间片断。进一步使用 RACE 技术扩增得到西花蓟马 *hsp70* 的 5'端序列(563 bp)和 3'端序列(1 519 bp)。利用 DNAMAN 拼接这 3 个片段可得到 2 106 bp 的西花蓟马 *hsp70* 全长, cDNA 序列全长验证表明所获得的 *hsp70* 序列正确可靠, 故命名为 *Fohsp703* (GenBank 登录号 : KY914546)。

ORF Finder 分析显示, *Fohsp703* 包含 9 bp 的 5'非编码区 (5' untranslated region , 5'UTR)、2 040 bp 的 ORF 和 57 bp 的 3'非编码区 (3' untranslated region , 3'UTR) , 3'UTR 末端具有典型的 ploy-A

结构。利用在线软件 ProtParam 分析发现, *Fohsp703* 共编码 679 个氨基酸, 氨基酸的理论分子量为 73.6 ku, 全长的分子式为 $C_{3243}H_{5213}N_{877}O_{1032}S_{20}$, 等电点为 5.36。氨基酸组成方面, 丙氨酸 (Ala) 含量最高, 占总数的 9.6%, 其次为谷氨酸 (Glu), 占 7.8%。带负电荷残基 (Asp+Glu) 总数为 87 个, 正电荷残基 (Arg+Lys) 总数为 74 个。N 段氨基酸为蛋氨酸 (Met, M) 为稳定型氨基酸, 蛋白质半衰期为 30 h, 不稳定性指数为 36.40 (40 以下为稳定蛋白), 脂肪指数为 88.79, 亲水性指数为 -0.222 (不亲水)。利用在线软件 Prositescan 分析发现, 本研究所克隆得到的 *Fohsp703* 推导的蛋白质氨基酸序列具有 3 个 HSP70 家族签名序列: IDLGTTFS (第 14-21 位 aa)、VFDLGGGTFDVSVL (第 228-241 位 aa) 和 VLLVGSSRIKIRA (第 397-411 位 aa) (图 1)。但是, HSP703 C 端最末端不是典型的 EEVD (Glu-Glu-Val-Asp), 说明该蛋白不存在于细胞质中, 不同于已知西花蓟马的其它 HSP70 蛋白, 是西花蓟马 HSP70 家族中的一种新的热激蛋白。

2.2 西花蓟马 HSP703 结构预测

以人类的 HSP70 结构为模板 (PDB ID: c5e84B), 预测了 *FoHSP703* 的三维结构 (图 2)。*FoHSP703* 与人类的 HSP70 在结构上具有较低的同源性, 仅为 43%。结构分析表明, *FoHSP703* 具有 HSP70 家族典型的结构区域, 即一个氨基段的核苷酸结合区域 (NBD) (6-446 aa) 和羧基段的底物结合域 (SBD) (459-672 aa) (图 2)。

2.3 西花蓟马 HSP703 的基因组结构

根据 *Fohsp703* cDNA 序列设计一对引物直接扩增 *Fohsp703* 的基因组, 获得了 1 个 2 022 bp 的序列, 即 *Fohsp703* 的基因组 (登录号: KY986660)。对比其 cDNA 序列发现, *Fohsp703* 中无内含子, 由此推测该热激蛋白为诱导型。相比之下, 西花蓟马已知的 *Fohsp701* (登录号分别为 KC148536) 和 *Fohsp702* (KC430097) 具有内含子, 分别为 4 个和 7 个; 而其它物种, 如丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis* 和家蚕 *Bombyx mori* 的 *hsp70* (*Nvhsp70*: AAZX1007931.1 和 *Bmhsp70*: AADK1000639.1) 也有内含子, 分别为 3 个和 2 个。这表明同一物种以及不同物种间的 HSP70 基因内含子的数目存在很大

的变化 (图 3)。

2.4 西花蓟马 HSP70 序列及系统发育分析

Blast 表明, 本研究克隆的 *FoHSP703* 与同种已知的 *FoHSP70* 以及其它昆虫 HSP70 的氨基酸序列相似性在 44% 左右 (图 4), 较低的相似性说明本研究中的 *FoHSP703* 可能是一种新的昆虫热激蛋白 70 家族成员。此外, 从 Genbank 中下载 24 种昆虫的 HSP70 的氨基酸序列, 结合本研究中新获得的西花蓟马 HSP703 的氨基酸序列, 利用 MEGA7.0 软件采用邻接法、最小进化法、最大简约法和最大似然法构建这些昆虫的 HSP70 的系统发育树, 几种方法均显示了一致的系统进化关系 (图 5)。系统发育分析表明, 西花蓟马的 3 种 HSP70 (*FoHSP701*, *FoHSP702*, *FoHSP703*) 分别处在 3 个不同的分支上, 其中已知的 *FoHSP701* 与不同种昆虫的 HSP70 聚集在系统进化树的顶端; *FoHSP702* 与点蜂缘蝽 *Riptortus pedestris* 的 HSP70 的亲缘关系最近, 处于系统进化树的中间分支; 本研究的 *FoHSP703* 独立成为一个分支, 没有其它昆虫的 HSP70 与之近源, 这进一步说明本研究的 *FoHsp703* 是昆虫热激蛋白家族 70 中的新成员。

2.5 *Fohsp703* 在不同温度下的表达差异分析

经 qRT-PCR 分析, 目的基因及各内参基因的熔解曲线均为单峰, 扩增产物单一, 扩增效率在 93.5%~107.3% 之间, 标准曲线的 R^2 值于 0.980, 达到进行实时定量研究的基本要求。

在高温胁迫条件下, 西花蓟马在 37℃ 暴露 1 h, 其雌成虫的 *Fohsp703* 的 mRNA 表达量显著提高, 其值为对照的 2.78 倍; 而雄虫暴露在 35℃ 时, *Fohsp703* 的 mRNA 表达量显著下降, 与对照相比其值下降了 14.29 倍, 暴露于 37 后, 表达量又有所上升 (图 6:A)。统计分析表明, 暴露温度、性别及暴露温度×性别的交互作用对西花蓟马 *Fohsp703* 的 mRNA 表达具有显著影响 (温度: $F = 9.562$, $df = 5$, $P < 0.001$; 性别: $F = 10.118$, $df = 1$, $P = 0.003$; 暴露温度×性别: $F = 4.019$, $df = 5$, $P = 0.007$)。

在低温胁迫条件下, 西花蓟马在 -12℃ 暴露 1 h, 其雌成虫和雄成虫的 *Fohsp703* 的 mRNA 表达量明显提高, 其值分别为各自对照的 4.14 倍和 2.76 倍 (图 6:B)。统计分析表明, 暴露温度和性别对

1 ACATGGGGAATGTCAGAGGAGAAATTAACACTTCTAAAGCAATTGGTATCGACTTAGGT
1 M S E E K L N T S K A I G I D L G
61 ACAACTTTTCTGTGTGCAGGATACATAAGCGGGAAGATTGAGATTATCAGCAATGGG
18 T T F S C V A G Y I S G K I E I I S N G
121 GAAGGAGATAGAACAACCATCTGCAGTTATTTTGATGAGAACATAACGTGGTTGTT
38 E G D R T T P S A V Y F D E N N N V V V
181 GGAACAGCAGCCAAGAGCATGTTTGGATCTGATCCAAGTTCTGTGGTTTTTGATGCCAAG
58 G T A A K S M F G S D P S S V V F D A K
241 AGGATGATTGGACGTGGGTTTGATGAGCCAAAGATTCAAAGCTCGATAAAGGGATGCCA
78 R M I G R G F D E P K I Q S S I K G W P
301 TTTGAGTTGTAAGGTATAATCACCAGACCAAGAAGGAGGAGTGTAAAGTCCCTGAG
98 F E V V R Y N H Q T K K E E S A K V P E
361 GGAACCAAGGCCTATGACAATATAGCTATCAAGATCTCGAAGAATGGGAAGACCAGCTAC
118 G T K A Y D N I A I K I S K N G K T S Y
421 TATGCTCCTATTGAGATAAGTGCCAGGGTCTGACATATCTAAGAAGGCAGCAGAAGCA
138 Y A P I E I S A R V L T Y L K K A A E A
481 AGGCTTGAACCACTGTTGATGCAGCCGTTGTGACTGTTCCAGCATATTTCCGAGGAGCCA
158 R L G T T V D A A V V T V P A Y F E E P
541 CAGAAAGAGAGGACCAAGGCAGCAGCTATTATGCAGGGTTAATCCAGAGAAGGTCCGA
178 Q K E R T K A A A I I A G F N P E K V R
601 CTGCTTGCAGAGCCCACTGCAGCTGCTATGGCATATGGTCATATCCAGACCCAAAGCAAT
198 L L A E P T A A A M A Y G H I Q T Q S N
661 GCAAATCTCTCTGCAAAGGAGGATGTGCTTGTCTTTGATCTTGGAGGTGGTACCTTTGAT
218 A N L S A K E D V L V F D L G G G T F D
721 GTATCTGTTCTGGACTTTGAGTTCAACGGAGCAGCAGGGTCTCTTGGTATTGTAAAGGCT
238 V S V L D F E F N G A A G S L G I V K A
781 ACTGACGGAACACCTTCCTGGGTGGCCAAGACTTTGACAATCTTCTATCAACTACTGT
258 T D G N T F L G G Q D F D N L L I N Y C
841 ATCTCCGAGTTCCTGAAGAAGAACCCTTCGATTAAGGAGTCTGATATTAAGGAGAGTGCT
278 I S E F L K K N P S I K E S D I K E S A
901 ATGCTCAGGCTTAGAGCAGAATGTACAAGGGTGAAGGCTATCTTAGTTCACGACAAAC
298 M L R L R A E C T R V K A I L S S T T N
961 AGCGCCATCTATGTTCCATGCTTCCACATGACGGAGGATCTGAATGTCCAGATTACACGT
318 S A I Y V P C F H M T E D L N V Q I T R
1021 ACAAGGTCGAGTACTCTGTGATGCTCTTTCAAGACATGTATGGAGAGAGTTAAGGGA
338 T R F E L L C D A L F K T C M E R V K G
1081 TGTCTCCTGCTTTCCGTTGGTGCACAGGCGTCCAATACTCTGCAGATGGAACAAGCTC
358 C L L L S V G A P G V Q Y S A D G N K L
1141 CTCCTGAATGCAAGTCTCGAGAAGACTTTGAACGAGGTCAAGAACAAGATCAGCAAGGTT
378 L L N A S L E K T L N E V K N K I S K V
1201 CTTCTTGTGGTGAAGCTCCAGAATTCCAAAGATTAGGGCTATGCTCTCAGAGTACTTC
398 L L V G G S S R I P K I R A M L S E Y F
1261 GGAGCACAGAAGGTTATTGAGCCAGTCAATGCCGATGAGGCTGTTGCCTATGGTGTGCT
418 G A Q K V I E P V N A D E A V A Y G A A
1321 TATCAGGCTGCAACTATCTACTCCGATGTTGTCTCTGCAGGCTCAGGACTTCTTCTATT
438 Y Q A A T I Y S D V V S A G S G L L L I
1381 GATTGTATCCCACTCGATCTTCCATCGAAACAGCAGGAGGTGTTGCAACTGTATTGATT
458 D C I P L D L S I E T A G G V A T V L I
1441 GAGAAGAATAGCAGCATTCTATCAAGAAGACGGAGACATTACGACCTATGAGGACAAC
478 E K N S S I P I K K T E T F T T Y E D N
1501 CAGACCGCAGTCAGATCAATGTCTATGAGGAAACAGGGCACTCTGCAAGGAGAATAAC
498 Q T A V T I N V Y E G N R A L C K E N N
1561 AAGATCGGAAGCTCAACTTGGATGGGATTATCCCTGCTCCTCGTGGTGTCCAAAGATC

```

518      K I G S F N L D G I I P A P R G V P K I
1621    GAGGTTACCTTCGATGTCGACCACAACGGTGTCTTACAATCACAGCAGAAGACAAACAG
538      E V T F D V D H N G V L T I T A E D K Q
1681    ACGAACAAGAGCGCCAATCTTACTGTCTTAACACCCAGAGCAGGCTGAGTGACGAGGAA
558      T N K S A N L T V S N T Q S R L S D E E
1741    ATCAAGAGGATGACGGAATCCGCTAAGGAACACGAGAGGATTGACAATGAGATCAAGGAG
578      I K R M T E S A K E H E R I D N E I K E
1801    AAGGTTGGAAGAAGAATGGCTTTGAACAGACTCTTCACTCTGTCAAGAGCGCCATCAAC
598      K V G K K N G F E Q T L H S V K S A I N
1861    CAGGCAAATGTTCTCAGGAGCAGAAGGATCCTATCCTCAGCCAAGTCCAGGAGCATGAG
618      Q A N V P Q E Q K D P I L S Q V Q E H E
1921    CAATGGCTTGACAGATCAACGGTGTGACTTTGAGGTTGAAGAGCTTGACTCTAGACTG
638      Q W L A Q I N G V D F E V E E L D S R L
1981    AACACTCTACAGCAGCTTATGAAGGATGCTGTCGGTATGTCACAGGGAGGAGCAGCACCA
658      N T L Q Q L M K D A V G M S Q G G A A P
2041    GCCGCCTAAAAGATAATTAATAATTATCTCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
691      A A *
2101    AAAAAA

```

图 1 西花蓟马 HSP703 基因 cDNA 序列及其编码氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of HSP703 gene from *Frankliniella occidentalis*

方框里的氨基酸序列表示 3 个 HSP70 家族签名序列。Three signature sequences of HSP70 family are boxed.

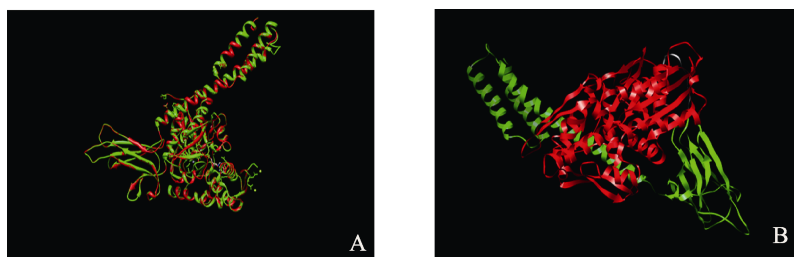


图 2 西花蓟马 HSP703 的结构分析

Fig. 2 Structure analyses of HSP703 of *Frankliniella occidentalis*

A. 以人类 HSP70 (PDB ID: c5e84B) (绿色) 为模板, 用 Phyre2 预测西花蓟马 HSP703 的结构模型 (红色);

B. 西花蓟马 HSP703 的结构分为 NBD (红色) 和 SBD (绿色)。

A. Homology modeling of HSP703 of *F. occidentalis* (red) with human HSP70 (PDB ID: c5e84B) (green) as template using Phyre2 software; B. Three-dimensional structure of HSP703 of *F. occidentalis* includes NBD (red) and SBD (green).

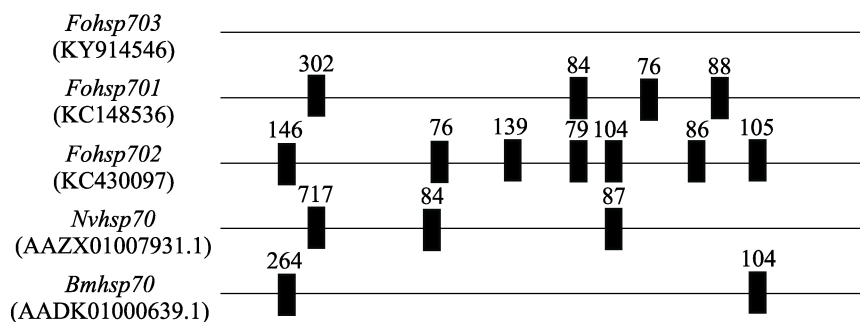


图 3 西花蓟马 HSP70 与其另外两个已知 HSP70 以及其它物种相应的 HSP70 的基因组结构比较

Fig. 3 Comparison of genomic structure of *Fohsp70* from *Frankliniella occidentalis* with homologous genes in same and other insect species

直线代表 *hsp70* 的 cDNA 序列, 黑色的方框代表内含子插入的位置, 方框上的数字代表内含子的大小, 并用 bp 表示。

Horizontal lines represent the cDNA sequences of *hsp70*, black-shaded rectangles indicate intron positions, and the numbers above the rectangles indicate intron length (in bp).

<i>FoHSP703</i>	MSEEEKINTSKAIGIDIGTTFSCVAGYISCKEITISNGRGDRITTSAYVFCENNNVVGTAAKSMFGSDSSVVFDAKRMTCGRFEEFKIQ	90
<i>FoHSP70</i>	MPAVGIDIGTTFSCVGVWCCCKVEITANDCGNRITTSYVAFTETE..RIIGDAAKNCTAMNPCKITVFLAKRIICGRFEEFKIQ	81
<i>NIHSP70</i>	...NAAKAPAVGIDIGTTFSCVGVWCCCKVEITANDCGNRITTSYVAFTETE..RIIGDAAKNCVAMNPNTIIFLAKRIICGRFEEFKIQ	85
<i>LsHSP70</i>	...MVKCCPAIGIDIGTTFSCVGVWCCCKVEITANDCGNRITTSYVAFTETE..RIIGDAAKSCVAMNPNTIIFLAKRIICGRFEEFKIQ	85
<i>DaHSP70</i>	MVAIGIDIGTTFSCVGVWCCCKVEITANDCGNRITTSYVAFTETE..RIIGDAAKNCVAMNPNTIIFLAKRIICGRFEEFKIQ	81
<i>FoHSP703</i>	SSITKWPFFVVRYNHCTKKEESAKVPEEGTKAYCNIAIKISKNGKTSYVAFTETISARVITYIKKAAEFARICTTVDAVVTVFAYFEEFOKE	180
<i>FoHSP70</i>	ATIKWPFFSVISCSCKPK.....ICVTFKGRKVFSPFISSMVI TKMKETAFAYIGSTVRDAVVTVFAYFENCSORO	153
<i>NIHSP70</i>	SMKWPFFVVSICGCKPK.....ICVAYKGENKTFEPFVSSMVI TKMKETAFAYIGSTVINAVITVPEAYFENCSORO	157
<i>LsHSP70</i>	DMKWPFFVWCHGCKPK.....IRVEYKGECKTFEPFINSMVI TKMKETSETYI GNKVKDAVITVPEAYFENCSORO	157
<i>DaHSP70</i>	ELMKWPFFVINDCGCKPK.....ISVEFKGECKTFEPFISSMVI TKMKETAFAYIGSTVRDAVVTVFAYFENCSORO	153
<i>FoHSP703</i>	RTKAAAITACENPEKVRLLAEPTAAAMAYGHICTCSNANISAKETDVLVFDLGGGTFLVSVILDEEFNGAAGSISGVKATIDNTILGGCFD	270
<i>FoHSP70</i>	ATKLCAGVTAGIN...VMRIINFEPTAAATAYG.....LDKNIKGERNVILFDLGGGTFLVSVILDE...EGSIFEVKSTAGDTILGGCFD	232
<i>NIHSP70</i>	ATKLCAGTISGIN...VIRIINFEPTAAATAYG.....LDKKGHGERNVILFDLGGGTFLVSVILDE...EGSIFEVKSTAGDTILGGCFD	235
<i>LsHSP70</i>	ATKLCAGATAGIN...VIRIINFEPTAAATAYG.....LDKNIKGERNVILFDLGGGTFLVSVILDE...EGSIFOVKSTAGDTILGGCFD	236
<i>DaHSP70</i>	ATKLCAGATAGIN...VIRIINFEPTAAATAYG.....LDKNIKGERNVILFDLGGGTFLVSVILDE...EGSIFEVKSTAGDTILGGCFD	232
<i>FoHSP703</i>	NLLINVCISFFIKKNPSTIKESLTKFSAVIRIIRAFCTRVKATISSTINSAITYVPCFHMVFDINVCITTRIRFELICLATFKTCMFRVKGCLL	360
<i>FoHSP70</i>	SRLVNHIAEEFKRKVK...KCVTSNFRALRRLRTAABRAKRIISSTFANTETILALYEGIDFYTKVSRARFEELCALIFRATILFEVE....	316
<i>NIHSP70</i>	NRMVNHFVCEFKRKHK...KCLTSNFRALRRLRTACBRARKIISSTCASIEILSLYEGIDFYTSITRFRFEELCALIFRSTIMEFEVE....	319
<i>LsHSP70</i>	NRIVKHFAEFCKRKVK...KCLTGNVRALRRLRTACBRARKIISSTFASIEILALHGVDFYAKTIRARFEFECMCMFRSTIAPFVE....	320
<i>DaHSP70</i>	NRLVNHIAEEFKRKVK...KCLRSNFRALRRLRTAABRAKRIISSTFATIEILALYEGVDFYTKVSRARFEELCALIFRNTILFEVE....	316
<i>FoHSP703</i>	ISVGAFGCVCYSADGNKILINASIFKTIINEVKNKISKVILVGGSSRIPIKTRAMISFYEGACKVIFEVNADFAVAYGAAYCAATTSYVSV	450
<i>FoHSP70</i>	RAICDAKMSK.....SDTHELVIVGGSTRIPKVCNLI CNFECCKSLNLSINDEFAVAYGAAVCAAILSGDCSEA	385
<i>NIHSP70</i>	KSTRDAKMDK.....SOTHELVIVGGSTRIPKVCNLI CDFENGKEINKSINDEFAVAYGAAVCAAILHGDCKSFE	388
<i>LsHSP70</i>	RAICDAKLDK.....GATHELVIVGGSTRIPKCKMI CDFECCKALNLSINDEFAVAYGAAVCAAILSGDTSSA	389
<i>DaHSP70</i>	KATINDAKMDK.....NCTHELVIVGGSTRIPKVCNLI CQFECCKSLNLSINDEFAVAYGAATCAAILSGDKSSA	385
<i>FoHSP703</i>	CGSLIILIDCEPIDLSIETACGVATVITKNSSTIEKKTFETITVFCNCTAVTINNVYEGNRALCKENNKISFNIDGIIIEAFRCVPEKTEVT	540
<i>FoHSP70</i>	ICCVLIIVDVAPISLIGIETACGVMTIKIERNSRIFQKCTCTESTYADNCPAVIIOVFEGGERAMIKDNNLIGTFEITIGTEPAFRGVPEKTEVT	475
<i>NIHSP70</i>	VCCILILIDVTPISLIGIETACGVMTIKIRNTITITKCTCTETITVYDNCQGVIIIOVFEGGERAMIKDNNLIGKFEITIGTEPAFRGVPEKTEVT	478
<i>LsHSP70</i>	ICCVLIIVDVAPISLIGIETACGVMTIKIVERNSRIFQKCCCTETITVYDNCQGVIIIOVFEGGERAMIKDNNLIGTFEITIGTEPAFRGVPEKTEVT	479
<i>DaHSP70</i>	ICCVLIIVDVAPISLIGIETACGVMTIKIERNSRIFQKSKTFETITVYADNCPAVIIOVFEGGERAMIKDNNLIGTFEITIGTEPAFRGVPEKTEVT	475
<i>FoHSP703</i>	FTVDNNGVITITAEKCTINKSANITVSNICSRISLEETIKRVTESAKEHERIDNFIKEKVGKKNGEFTIHSVKSATINCAN...VPCFCOK	626
<i>FoHSP70</i>	FDIDANGILNVAAKETSIGRSCNITIKNDKGRISADEIRNVDEBZERYKABDDCCDRVAAARNCLEGYVFSIKCAILEAG...DKLFECDK	563
<i>NIHSP70</i>	FDIDANGIITNVIAIFKSTIGKENKITITNDKGRISKEDIRNVNDAEKYKABDEKCKCVIAAKNALFSYCFNMSTILEEKLKDKISESDK	568
<i>LsHSP70</i>	FDIDANGIITNVSAKLSSTGKSKFITITNDKGRISKEDIRMTKRAKYKABDECKIRERVAARNCLFSYAFSVKCAARETAG...AKLSAARK	567
<i>DaHSP70</i>	FDIDANGILNVNAKEMSIGNVKNIVIKNDKGRISCAEIDRVNDAEYADEDEKYRCRIARNCLEITYVEGVKCTVQCAG...DKIFKSDK	563
<i>FoHSP703</i>	CFITISCVCFHFOWIACINCVCFEVEFELSRINNTCCIMKCAVGMSCGGAFAA.....	679
<i>FoHSP70</i>	TRAREECFATIRFLCSN...TIADKEEYEHRLKELCKKVCCEVMVRLHSGGPGASCFCAPCGCGCCAG.....RHNGPTVEEVD	638
<i>NIHSP70</i>	TATILKCNFVITRWICAN...CIAEKHFFEHKCKEITAI CNPITTKI YCSGGCAPGGMFFPGGFPCAGGAAPCAGAAFGSGAGPTTFEVD	654
<i>LsHSP70</i>	KCVCKKCAATTAWEGN...TCAEKDFYEKTKETCKEFCSPIMTKMHGAGN.....AKGPTVEEVD	625
<i>DaHSP70</i>	DRIMEKCSSETINWLCNN...TTAEKEBYCYKLEETIKICQPIIMTRHQCANGGAGFCQPGSNCSQAGGFGS.....GSYSCTVEEVD	643

图 4 西花蓟马 HSP703 与其同种及其它 3 种昆虫氨基酸序列的多重比较

Fig. 4 Amino acid sequence alignments of *FoHSP703* with other insects

Frankliniella occidentalis (*FoHSP703*: KY914546; *FoHSP70*: AFX84617.1), *Nilaparvata lugens* (*NIHSP70*: AFJ20626.1), *Laodelphax striatella* (*LsHSP70*: AMD09927.1), *Delia antiqua* (*DaHSP70*: AAY28732.1).

西花蓟马 *Fohsp703* 的 mRNA 表达具有显著影响 温度: $F = 13.241$, $df = 6$, $P < 0.001$; 性别: $F = 14.175$, $df = 1$, $P = 0.001$), 但暴露温度×性别的交互作用对其 mRNA 表达没有显著影响 (暴露温度×性别: $F = 1.103$, $df = 4$, $P = 0.375$)。

实验结果表明, 西花蓟马的 *Fohsp703* 能被高低温诱导, 说明 *FoHSP703* 为诱导型。此外, 在高低温胁迫下, 雌成虫的 *Fohsp703* 的 mRNA 表达量高于雄成虫。

3 讨论

西花蓟马是世界性蔬菜、花卉等园艺植物上的重要害虫。因个体小, 为害状隐蔽, 生殖方式多样, 繁殖速度快, 且易产生抗药性等特点, 导致其数量大, 传播快, 为害重。西花蓟马既可通过产卵、取食等方式直接影响蔬菜花卉的产量和质量, 又能传播多种植物病毒对果蔬等造成危害。据适生性分析预测, 我国大部分地区适宜西花蓟马的发生危害,

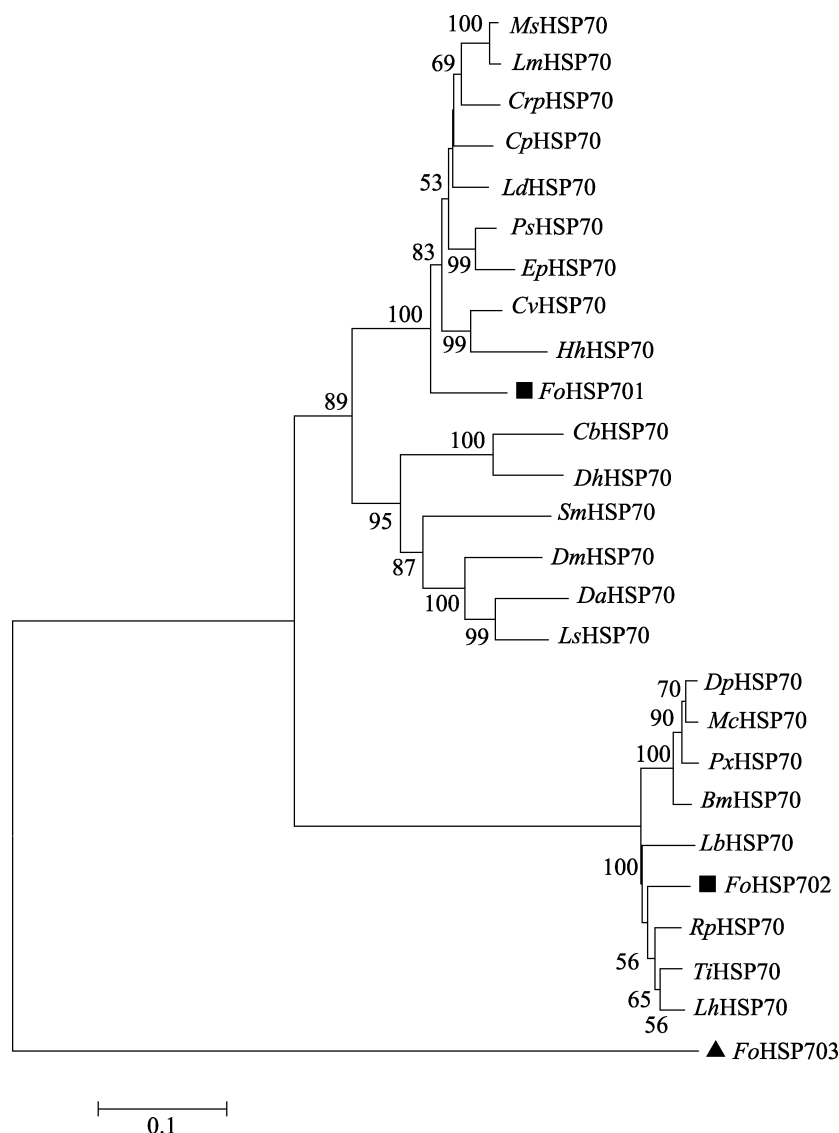


图 5 基于邻接法的昆虫 HSP70 家族基因的系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of FoHSP70 and other insect species based on Neighbor-Joining method

三角标记的为本研究中西花蓟马的热激蛋白 70, 黑色方块标记的是已有的西花蓟马的热激蛋白 70, HSP70 序列来源及 GenBank 登录号如下: The FoHSP70 in our study is marked with a black triangle, and FoHSP70s in other studies are marked with black boxes. Origin of HSP70 proteins and their GenBank accession numbers: 西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* (AGE15504.1, AGI37646.1, KY914546), 血黑蝗 *Melanoplus sanguinipes* (ALX00040.1), 东亚飞蝗 *Locusta migratoria* (AAP57537.3), 点刻隐尾蠊 *Cryptocercus punctulatus* (AFK49798.1), 叶色草蛉 *Chrysopa phyllochroma* (AHY95944.1), 斑衣蜡蝉 *Lycorma delicatula* (AFP54307.1), 扶桑绵粉蚧 *Phenacoccus solenopsis* (AIL52740.1), 白蜡蚧 *Ericerus pela* (AGE92596.1), 菜蛾盘绒茧蜂 *Cotesia vestalis* (AGF34718.1), 麦蛾茧蜂 *Habrobracon hebetor* (AFM45299.1), 天猿叶甲 *Colaphellus bowringi* (AHF52926.1), 花绒寄甲 *Dastarcus helophoroides* (ANA11230.1), 麦红吸浆虫 *Sitodiplosis mosellana* (AIS72815.1), 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (NP_731651.1), 葱地种蝇 *Delia antiqua* (AAY28732.1), 美洲斑潜蝇 *Liriomyza sativae* (AAW32099.2), 君主斑蝶 *Danaus plexippus* (EHJ73638.1), 庆网蛱蝶 *Melitaea cinxia* (AGR84226.1), 小菜蛾 *Plutella xylostella* (XP_011549238.1), 家蚕 *Bombyx mori* (ACL36370.1), 嗜卷书虱 *Liposcelis bostrychophila* (AKP54257.1), 点蜂缘蝽 *Riptortus pedestris* (BAN20624.1), 侵扰椎猎蝽 *Triatoma infestans* (JAS01476.1), 豆荚草盲蝽 *Lygus hesperus* (JAQ04155.1). 各分支上的数字为自引导值 (1 000 次重复, 仅显示>50 的值). Numbers on the branches are the bootstrap values obtained from 1 000 replicates (only bootstrap values >50 are shown).

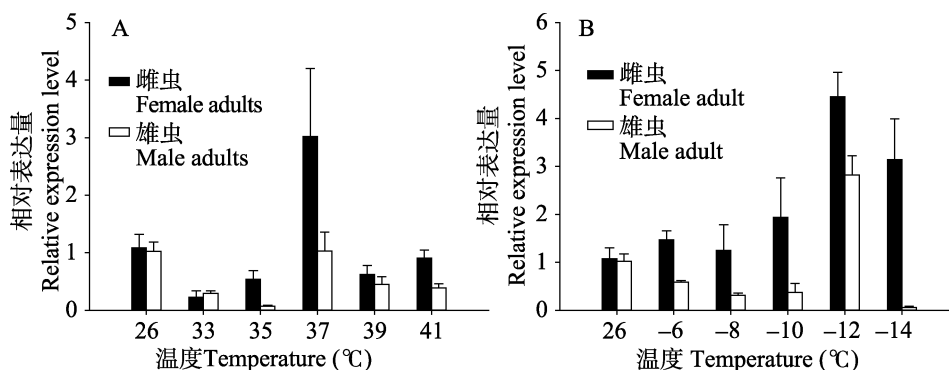


图 6 在不同温度处理下西花蓟马 *Fohsp703* 的 mRNA 相对表达量

Fig. 6 Relative mRNA expression levels of *Fohsp703* in adults of *Frankliniella occidentalis* under various temperature stress

A. 高温胁迫下的 mRNA 相对表达量; B. 低温胁迫下的 mRNA 相对表达量。

A. Relative mRNA expression levels under high temperature stress; B. Relative mRNA expression levels under low temperature stress.

而且是一种高风险的外来入侵害虫(戴霖等, 2004; 杜予州等, 2005; 周卫川等, 2006), 且部分地区的西花蓟马正在取代一些本地蓟马, 逐渐成为许多重要蔬菜作物上的优势种(吕要斌等, 2011)。此外, 在全球变暖的趋势下, 极端温度发生频次和强度也在增加, 这些气候变化也会影响到昆虫的生长发育和发生危害。越来越多的研究表明, 热激蛋白 70 在昆虫抵御不良温度过程中起着重要作用(Huang and Kang, 2007; Udaka *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2016)。不同昆虫体内具有多条热激蛋白 70 家族成员, 并且不同类型的 HSP70 成员的基序具有特异性, 不同的多肽序列表明位于不同的亚细胞, 例如 C-末端基序为 EEVD, 说明 HSP70 成员定位于细胞质内; C-末端基序为 KDEL, 表明该 HSP70 定位于内质网内。本研究所得的西花蓟马 HSP70 蛋白(*FoHSP703*)以 APAA 结尾, 而其他昆虫 HSP70 家族成员都是以 EEVD 和 KDEL 结尾, 不同于已发现昆虫的 HSP70 家族成员; 同时, 在西花蓟马体内发现的另外 3 种 HSP70 家族成员都以 EEVD 和 KDEL 结尾(Wang *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2016)。并且, 多序列比对与系统发育树结果也表明, *FoHSP703* 是一种新的热激蛋白 70 家族成员。

基因组结构分析表明, 本研究获得的 *FoHSP703* 不含有内含子, 同时它能够显著被高低温诱导表达, 并在 -12°C 达到最大值, 从而推断 *FoHSP703* 为西花蓟马体内的热诱导型 HSP70。此外, 在高低温胁迫下, 西花蓟马雌虫的成活率要高

于雄虫(李鸿波等, 2011a), 这与本研究的 *Fohsp703* 表达模式相一致。在不同的温度胁迫下, 西花蓟马雌虫的 *Fohsp703* 表达量明显要高于雄成虫。但是, 尽管 *Fohsp703* 的表达量受到温度的诱导, 但是最高的表达量仅为对照的 4.14 倍, 这说明西花蓟马体内可能还存在其它对温度反应敏感的热激蛋白 70 家族成员。因此, 本研究鉴定出的 *FoHSP703* 的功能还需进一步研究。总之, 通过深入开展西花蓟马体内热激蛋白 70 家族的研究, 对我们全面了解该虫温度耐受性的分子机制及该虫的分布扩散具有重要意义, 也为科学防控该虫提供理论依据。

参考文献 (References)

- Boutet I, Tanguy A, Rousseau S, Moraga D, 2003. Molecular identification and expression of heat shock cognate 70 (*hsc70*) and heat shock protein 70 (*hsp70*) genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Cell Stress & Chaperones*, 8(1): 76–85.
- Callahan MK, Chaillot D, Jacquin C, Clark PR, Ménoret A, 2002. Differential acquisition of antigenic peptides by Hsp70 and Hsc70 under oxidative conditions. *Journal of Biological Chemistry*, 277(37): 33604–33609.
- Dai L, Du YZ, Zhang LW, Zhou FC, Gong WR, Ju RT, 2004. A preliminary study on the suitable establishment areas of the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande) in China. *Plant Protection*, 30(6): 48–51. [戴霖, 杜予州, 张刘伟, 周福才, 龚伟荣, 鞠瑞亭, 2004. 西花蓟马在中国的适生性分布研究初报. 植物保护, 30(6): 48–51.]
- Dai L, Du YZ, Ju RT, Gu J, 2005. Status of diffusion for the western flower thrip. *Entomological Journal of East China*, 14(2): 173–178. [戴霖, 杜予州, 鞠瑞亭, 顾杰, 2005. 危险性害虫西花蓟马的传播现状. 华东昆虫学报, 14(2): 173–178.]

- Du YZ, Dai L, Ju RT, Gu J, Diao CY, Gong WR, 2005. Risk analysis of alien invasive western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande), in China. *Scientia Agricultura Sinica*, 38(11): 2360–2364. [杜予州, 戴霖, 鞠瑞亭, 顾杰, 刁春友, 龚伟荣, 2005. 入侵害虫西花蓟马在中国的风险性初步分析. 中国农业科学, 38(11): 2360–2364.]
- Feige U, Polla BS, 1994. Heat shock proteins: the hsp70 family. *Experientia*, 50(11/12): 979–986.
- Glick BS, 1995. Can Hsp70 proteins act as force-generating motors? *Cell*, 80(1): 11–14.
- Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, D Appel R, Bairoch A, 2003. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research*, 31(13): 3784–3788.
- Gkouvitsas T, Kontogiannatos D, Kourti A, 2009. Cognate Hsp70 gene is induced during deep larval diapause in the moth *Sesamia nonagrioides*. *Insect Molecular Biology*, 18(2): 253–264.
- Hartl FU, 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 381(6 583): 571–580.
- Huang LH, Kang L, 2007. Cloning and interspecific altered expression of heat shock protein genes in two leafminer species in response to thermal stress. *Insect Molecular Biology*, 16 (4): 491–500.
- Jiang XL, Bai S, Xiao S, Yang B, 2001. Service for the China Kunming international flower festival check. *Plant Quarantine*, 15(2): 115–117. [蒋小龙, 白松, 肖枢, 杨碧, 2001. 为中国昆明国际花卉节把关服务. 植物检疫, 15(2): 115–117.]
- Jones T, Scott Dupree C, Harris R, Shipp L, Harris B, 2005. The efficacy of spinosad against the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, and its impact on associated biological control agents on greenhouse cucumbers in southern Ontario. *Pest Management Science*, 61(2): 179–185.
- Katayama H, 1997. Effect of temperature on development and oviposition of western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Japanese Journal of Applied Entomology & Zoology*, 41(4): 225–231.
- Kim KK, Kim R, Kim SH, 1998. Crystal structure of a small heat-shock protein. *Nature*, 394(6693): 595–599.
- Kirk WDJ, Terry LI, 2003. The spread of the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Agricultural and Forest Entomology*, 5(4): 301–310.
- Li HB, Shi L, Wang JJ, Du YZ, 2011a. Impact of temperature hardening on thermal tolerance and reproduction in *Frankliniella occidentalis*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(3): 530–535. [李鸿波, 史亮, 王建军, 杜予州, 2011a. 温度锻炼对西花蓟马温度耐受性及繁殖的影响. 应用昆虫学报, 48(3): 530–535.]
- Li HB, Shi L, Wang JJ, Du YZ, 2011b. Rapid cold hardening of Western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, and its ecological cost. *Acta Ecologica Sinica*, 31(23): 7196–7202. [李鸿波, 史亮, 王建军, 杜予州, 2011b. 西花蓟马的快速冷驯化及其生态学代价. 生态学报, 31(23): 7196–7202.]
- Li HB, Shi L, Lu MX, Wang JJ, Du YZ, 2011. Thermal tolerance of *Frankliniella occidentalis*: Effects of temperature, exposure time, and gender. *Journal of Thermal Biology*, 36(7): 437–442.
- Li HB, Du YZ, 2013. Molecular cloning and characterization of an Hsp90/70 organizing protein gene from *Frankliniella occidentalis* (Insecta: Thysanoptera, Thripidae). *Gene*, 520(2): 148–155.
- Li JZ, Zhi JR, Yuan CM, Wang HD, 2007. The effect of temperature on the development of *Frankliniella occidentalis*. *Guizhou Agricultural Sciences*, 35(5): 13–14. [李景柱, 邹军锐, 袁成明, 王和东, 2007. 温度对西花蓟马生长发育的影响. 贵州农业科学, 35(5): 13–14.]
- Lindquist S, 1986. The heat-shock response. *Annual Review of Biochemistry*, 55: 1151–1191.
- Liu LH, Zhang F, Wu ZQ, 2008. Effect of temperatures on the development and survival rate of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Acta Ecologica Sinica*, 28(10): 4891–4895. [刘丽辉, 张帆, 吴珍泉, 2008. 温度对西花蓟马 (*Frankliniella occidentalis*) 生长发育和存活率的影响. 生态学报, 28(10): 4891–4895.]
- Lu L, Du YZ, Li HB, Wang JJ, 2009. Advances in the virus disease transmitted by the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Plant Protection*, 35(2): 7–10. [陆亮, 杜予州, 李鸿波, 王建军, 2009. 西花蓟马传播病毒病的研究进展. 植物保护, 35(2): 7–10.]
- Lu MX, Li HB, Zheng YT, Shi L, Du YZ, 2016. Identification, genomic organization and expression profiles of four heat shock protein genes in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Journal of Thermal Biology*, 57: 110–118.
- Lv YB, Zhang ZJ, Wu QJ, Du YZ, Zhang HR, Yu Y, Wang ED, Wang MH, Wang MQ, Tong XL, Lv LH, Tan XQ, Fu WD, 2011. Research progress of the monitoring, forecast and sustainable management of invasive alien pest *Frankliniella occidentalis* in China. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(3): 488–496. [吕要斌, 张志军, 吴青君, 杜予州, 张宏瑞, 于毅, 王恩东, 王鸣华, 王满困, 童晓立, 吕利华, 谭新球, 付卫东, 2011. 外来入侵西花蓟马防控技术研究 with 示范. 应用昆虫学报, 48(3): 488–496.]
- McDonald JR, Bale JS, Walters KFA, 1998. Effect of temperature on development of the Western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *European Journal of Entomology*, 95(2): 301–306.
- Meng XQ, Min L, Wan FH, Zhou ZS, Wang WK, Zhang GF, 2010. SCAR marker for rapid identification of the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae). *Acta Entomologica Sinica*, 53(3): 323–330. [孟祥钦, 闵亮, 万方浩, 周忠实, 王文凯, 张桂芬, 2010. 西花蓟马的 SCAR 分子检测技术. 昆虫学报, 53(3): 323–330.]
- Qin J, Lu MX, Zheng YT, Du YZ, 2017. Molecular cloning, characterization and functional analysis of catalase in *Frankliniella occidentalis*. *Annals of the Entomological Society of America*, 110(2): 212–220.
- Shi L, Li HB, Jin XZ, Wang JJ, Du YZ, 2013. Effect of low temperature stress on antioxidant activity of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Chinese Journal of Applied*

- Entomology*, 50(4): 1062–1067. [史亮, 李鸿波, 金学柱, 王建军, 杜予州, 2013. 低温胁迫对西花蓟马抗氧化酶活性的影响. *应用昆虫学报*, 50(4): 1062–1067.]
- Sørensen JG, 2010. Application of heat shock protein expression for detecting natural adaptation and exposure to stress in natural populations. *Current Zoology*, 56(6): 703–713.
- Sørensen JG, Kristensen TN, Loeschcke V, 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters*, 6(11): 1025–1037.
- Sun M, Lu MX, Tang XT, Du YZ, 2014. Molecular cloning and sequence analysis of the HSP83 gene in *Sesamia inferens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae). *Chinese Journal of Applied Entomology*, 51(5): 1246–1254. [孙猛, 陆明星, 汤小天, 杜予州, 2014. 大螟热激蛋白 83 基因克隆及序列分析. *应用昆虫学报*, 51(5): 1246–1254.]
- Udaka H, Ueda C, Goto SG, 2010. Survival rate and expression of Heat-shock protein 70 and Frost genes after temperature stress in *Drosophila melanogaster* lines that are selected for recovery time from temperature coma. *Journal of Insect Physiology*, 56(12): 1889–1894.
- Wang HH, Reitz SR, Wang LX, Wang SY, Li X, Lei ZR, 2014. The mRNA expression profiles of five heat shock protein genes from *Frankliniella occidentalis* at different stages and their responses to temperatures and insecticides. *Journal of Integrative Agriculture*, 13(10): 2196–2210.
- Wu QJ, Xu BY, Zhang ZJ, Zhang YJ, Zhu GR, 2007. Investigation on species and distribution of plant thrips in Beijing, Zhejiang and Yunnan. *China Plant Protection*, 27(1): 32–34. [吴青君, 徐宝云, 张治军, 张友军, 朱国仁, 2007. 京、浙、滇地区植物蓟马种类及其分布调查. *中国植保导刊*, 27(1): 32–34.]
- Yang H, Cui YY, Zhang S, Sun XJ, 2011. The occurrence and damage of the exotic invasive pest: western flower thrip (*Frankliniella occidentalis*). *Xinjiang Agricultural Sciences*, 47(11): 2252–2253. [杨华, 崔元珩, 张升, 孙晓军, 2011. 外来入侵害虫——西花蓟马在新疆的发生为害. *新疆农业科学*, 47(11): 2252–2253.]
- Yuan CM, Zhi JR, Li JZ, Zhang Y, 2008. Investigation on the species of thrips in fields of vegetable in Guizhou Province. *China Plant Protection*, 28(7): 8–10. [袁成明, 鄧军锐, 李景柱, 张勇, 2008. 贵州省蔬菜蓟马种类调查研究. *中国植保导刊*, 28(7): 8–10.]
- Zhao L, Jones WA, 2012. Expression of heat shock protein genes in insect stress responses. *Invertebrate Survival Journal*, 9: 93–101.
- Zhang Q, Denlinger DL, 2010. 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. *Journal of Insect Physiology*, 56(2): 138–150.
- Zhang YJ, Wu QJ, Xu BY, Zhu GR, 2003. Dangerous invasive alien species-western flower thrips in Beijing. *Plant Protection*, 29(4): 58–59. [张友军, 吴青君, 徐宝云, 朱国仁, 2003. 危险性外来入侵生物——西花蓟马在北京发生危害. *植物保护*, 29(4): 58–59.]
- Zhang ZJ, Zhang YJ, Xu BY, Zhu GR, Wu QJ, 2012. Effects of temperature on development, reproduction and population growth of the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *Acta Entomologica Sinica*, 55(10): 1168–1177. [张治军, 张友军, 徐宝云, 朱国仁, 吴青君, 2012. 温度对西花蓟马生长发育、繁殖和种群增长的影响. *昆虫学报*, 55(10): 1168–1177.]
- Zheng YT, Li HB, Lu MX, Du YZ, 2014. Evaluation and validation of reference genes for qrt-pcr normalization in *Frankliniella occidentalis* (thysanoptera: thripidae). *PLoS ONE*, 9(10): e111369.
- Zhou WC, Lin YW, Weng RQ, Wu YF, Wang NW, 2006. Geographical distribution and annual generation algebra prediction of *Frankliniella occidentalis* in China. *Chinese Bulletin of Entomology*, 43(6): 798–801. [周卫川, 林阳武, 翁瑞泉, 吴宇芬, 王念武, 2006. 西花蓟马在中国的地理分布和年发生代数预测. *昆虫知识*, 43(6): 798–801.]