



三叶斑潜蝇地理种群间的耐热性及 *Hsp64.9* 表达研究*

常亚文^{1**} 仲 玲¹ 闫玉卿¹ 赵婧雅¹ 龚伟荣^{1,2***} 杜予州^{1,3***}

(1. 扬州大学植物保护学院暨应用昆虫研究所, 扬州 225009; 2. 江苏省植物保护植物检疫站, 南京 210036; 3. 教育部农业与农产品安全国际合作联合实验室, 扬州 225009)

摘 要 【目的】明确三叶斑潜蝇 *Liriomyza trifolii* 不同地理种群的高温耐受性和重要热激蛋白基因 *Hsp64.9* 的表达模式, 探究三叶斑潜蝇地理种群间温度适应性差异的机制。【方法】以三叶斑潜蝇海南和江苏种群为研究对象, 分别测定其成虫和蛹在不同高温条件 (41–46 °C, 温度梯度 1 °C) 胁迫 1 h 和同一温度不同胁迫时长处理 (39、42 和 45 °C, 处理时长 0.25、0.5、1、2 和 4 h) 下的存活率和羽化率, 并比较基因 *Hsp64.9* 的表达差异。【结果】江苏和海南种群成虫的存活率分别在 42 和 43 °C 开始显著降低 (江苏种群: $F_{6,14}=296.459$, $P<0.001$; 海南种群: $F_{6,14}=255.810$, $P<0.001$), 且不同温度条件下, 海南种群成虫的存活率显著高于江苏种群 ($P<0.05$)。在 39 °C 胁迫时长短于 4 h 及 42 和 45 °C 胁迫时长短于 1 h 处理下, 2 个种群成虫的存活率无显著差异 ($P>0.05$), 随着胁迫时长的延长, 海南种群成虫存活率显著高于江苏种群 ($P<0.05$), 除了存活率为 0 的 45 °C 下 2 和 4 h 处理。海南种群蛹的羽化率在 42、44 和 46 °C 显著高于江苏种群 (42 °C: $t=-4.234$, $P=0.013$; 44 °C: $t=-5.567$, $P=0.005$; 46 °C: $t=-4.000$, $P=0.016$)。同一温度不同胁迫时长处理下, 除了 42 °C 胁迫时长 1 h 外 ($t=-4.243$, $P=0.013$), 2 个种群蛹的羽化率均没有显著差异 ($P>0.05$)。海南种群成虫和蛹在不同温度及同一高温不同胁迫时长处理下, 除了成虫 44 °C 处理 1 h ($t=-0.475$, $P=0.659$) 和蛹 45 °C 处理 0.5 h ($t=2.723$, $P=0.053$) 外, 基因 *Hsp64.9* 的相对表达量均显著高于江苏种群。【结论】三叶斑潜蝇不同地理种群间的耐热性存在显著差异, *Hsp64.9* 的差异表达可能是海南种群耐热性高于江苏种群的原因。

关键词 三叶斑潜蝇; 地理种群; 高温处理; 耐热性; *Hsp64.9*

Differences in thermal tolerance and the expression of *Hsp64.9* between geographical populations of *Liriomyza trifolii*

CHANG Ya-Wen^{1**} ZHONG Ling¹ YAN Yu-Qing¹ ZHAO Jing-Ya¹
GONG Wei-Rong^{1,2***} DU Yu-Zhou^{1,3***}

(1. College of Plant Protection & Institute of Applied Entomology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

2. Plant Protection and Quarantine Station of Jiangsu Province, Nanjing 210036, China; 3. Joint Laboratory of International

Cooperation in Agriculture and Agricultural Products Safety, Ministry of Education, Yangzhou 225009, China)

Abstract [Aim] To investigate differences in the high temperature tolerance and expression of the heat shock protein gene *Hsp64.9* between different geographical populations of *Liriomyza trifolii*, and investigate the mechanism of temperature adaptation in this species. [Methods] Adults and pupae from the Hainan and Jiangsu populations of *L. trifolii* were exposed to different high temperatures for different periods. Differences in heat tolerance between these geographical populations were

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金青年项目 (32202275); 国家重点研发计划项目 (2022YFC2601100); 江苏现代农业产业技术体系建设项目 (JATS [2023] 315)

**第一作者 First author, E-mail: changyawen@yzu.edu.cn

***共同通讯作者 Co-corresponding authors, E-mail: yzdu@yzu.edu.cn; 627351585@qq.com

收稿日期 Received: 2024-06-28; 接受日期 Accepted: 2024-08-06

then assessed by comparing adult survival rates and pupal emergence rates. The expression of *Hsp64.9* in adults and pupae from each population were also measured and compared. **[Results]** The survival rate of both the Jiangsu and Hainan populations began to decrease significantly at 42 and 43 °C (Jiangsu population: $F_{6,14}=296.459$, $P<0.001$; Hainan population: $F_{6,14}=255.810$, $P<0.001$), respectively, but the survival rate of the Hainan population was significantly higher than that of the Jiangsu population ($P<0.05$). There was no significant difference in survival rate between the two populations following exposure to 39 °C for less than 4 h, or exposure to 42 or 45 °C for less than 1 h ($P>0.05$). The survival rate of adults from the Hainan population was significantly higher than that of those from the Jiangsu population following longer durations of exposure to high temperatures ($P<0.05$). The emergence rate of the Hainan population was also significantly higher than that of Jiangsu population after exposure to 42, 44 and 46 °C for 1 h (42 °C: $t=-4.234$, $P=0.013$; 44 °C: $t=-5.567$, $P=0.005$; 46 °C: $t=-4.000$, $P=0.016$), but duration of exposure to high temperature had no significant effect on the emergence rate of pupae from these populations ($P>0.05$). The expression of *Hsp64.9* in adults and pupae from the Hainan population was significantly higher than that of those from the Jiangsu population under all treatment combinations ($P<0.05$). **[Conclusion]** The Hainan population of *L. trifolii* is significantly more tolerant to high temperatures than the Jiangsu population, an adaptation that, at least in part, could be due to greater expression of the *Hsp64.9* gene.

Key words *Liriomyza trifolii*; geographical population; high temperature; heat tolerance; *Hsp64.9*

三叶斑潜蝇 *Liriomyza trifolii* 是一种危害严重的世界性园艺蔬菜害虫 (Spencer, 1973), 也是我国重要的外来入侵物种 (Wan and Yang, 2016)。近年来, 随着设施农业的发展, 斑潜蝇类害虫危害日趋严重。基于生态学和分子生物学的研究表明, 三叶斑潜蝇在已入侵我国并造成严重危害的 3 种斑潜蝇 (三叶斑潜蝇、美洲斑潜蝇 *L. sativae* 和南美斑潜蝇 *L. huidobrensis*) 中, 温度耐受性和竞争能力最强 (Wang *et al.*, 2014; Chang *et al.*, 2017a, 2020; Zhang *et al.*, 2022)。目前, 三叶斑潜蝇在我国的入侵区域不断扩大, 其分布的北界已达河北省 (Chen *et al.*, 2019), 并具有在全国范围内暴发成灾的潜力 (雷仲仁等, 2007; Gao *et al.*, 2017; 常亚文等, 2021)。自 2005 年在广东省中山市首次发现以来 (汪兴鉴等, 2006), 已有 19 年的入侵记录。研究表明, 三叶斑潜蝇的南北地理种群已出现一定程度的分化, 包括地理种群间的温度适应性变化 (Chen *et al.*, 2019; 张起恺等, 2021)。这种地理种群间的温度适应性差异可能导致入侵能力改变, 扩大该虫的分布和危害范围。

环境温度是影响昆虫生命活动的重要因素, 对温度胁迫的适应能力是决定种群在特定生态环境下生存和延续的重要条件 (Taylor, 1981; Sinclair *et al.*, 2015)。在温度胁迫条件下, 昆虫通常会产生不同的生物学行为和生理生化反应,

其中热激蛋白 (Heat shock protein, Hsp) 的温度诱导表达研究最多, 该蛋白质被认为与昆虫的温度耐受性密切相关 (Feder and Hofmann, 1999; Sørensen *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2009; 陆明星等, 2015; Xie *et al.*, 2020)。但是, 有关昆虫温度适应性的研究, 特别是在不同地理种群间, 多局限于生态学试验和有关生理生化指标的测定 (吕仲贤等, 2000; Guerra *et al.*, 2004; Chen and Kang, 2005; Wang and Kang, 2005; Zhou *et al.*, 2011), 基于分子机制的地理种群温度适应性差异研究相对较少 (Wang and Kang, 2005; Tian *et al.*, 2022)。尽管有关斑潜蝇地理种群温度适应性的生态学研究 (Chen and Kang, 2005; 张起恺等, 2021) 和热激蛋白在斑潜蝇温度胁迫响应中的作用已有报道 (Huang and Kang, 2007; Kang *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2017a), 但热激蛋白在斑潜蝇地理种群间温度适应性分化中的作用尚不明确。

全球气候变化对生态多样性产生了严重影响, 也影响到自然界中物种的扩散分布 (Hoffmann, 2010; Kellermann *et al.*, 2012)。物种的温度适应能力是决定其分布范围的关键因素。本研究以海南和江苏两地三叶斑潜蝇地理种群为对象, 比较其高温耐受性和基因 *Hsp64.9* 的表达差异, 对于揭示基于温度影响下三叶斑潜蝇的扩散分布规律具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

三叶斑潜蝇海南和江苏种群分别采自海南海口 (20.01° N, 110.28° E) 和江苏扬州 (32.39° N, 119.42° E), 采集时间均为 2022 年 6 月。成虫羽化后通过光学显微镜鉴定无误后置于养虫笼 (50 cm × 50 cm × 50 cm) 中, 使用新鲜菜豆 *Phaseolus vulgaris* 饲养, 饲养条件为温度 (25±1) °C, 相对湿度 70%±5%, 光照时间 16 L : 8 D。本研究以 1 日龄蛹和 1 日龄成虫为试验对象。

1.2 不同高温和同一高温不同胁迫时长处理下存活率测定

不同高温设置为 41-46 °C, 温度梯度为 1 °C, 胁迫时长 1 h。同一高温不同胁迫时长处理, 温度分别为 39、42 和 45 °C, 胁迫时长分别为 0.25、0.5、1、2 和 4 h。对照组为常温处理。

成虫: 将成虫用 CO₂ 气体眩晕后, 放于 1.5 mL 离心管中, 置于玻璃管 (3 cm × 20 cm) 内, 玻璃管上方用医用棉花封口, 随后将玻璃管置于高低温水浴锅中。处理结束后, 将离心管置于显微镜下观察, 三叶斑潜蝇死亡判定标准为腿部部分或全部完全弯曲收于腹前且离心管轻轻晃动后成虫无任何反应。存活成虫放于 1.5 mL 灭菌离心管中使用液氮速冻, 置于 -80 °C 冰箱备用。每个温度处理 3 个生物学重复, 每个重复 10 头成虫。

蛹: 每个温度 6 个生物学重复, 每个重复 15 头蛹。其中 3 个重复的样品在高温胁迫结束

后迅速置于液氮速冻, 并置于 -80 °C 冰箱备用。其余 3 个重复样品在三叶斑潜蝇饲养条件下放置 15 d 进行观察, 死亡判断标准为蛹发黑皱缩, 无明显缺口或成虫未完全脱离蛹壳羽化失败。

1.3 HSP64.9 的基因克隆和序列分析

从三叶斑潜蝇不同地理种群的高温胁迫转录组中筛选获得 1 条 *Hsp64.9* 全长序列, 并设计跨越其开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 全长的特异性引物进行验证 (Chang *et al.*, 2024) (表 1)。按照 RNA-easy™ isolation Reagent 总 RNA 分离纯化试剂盒 (南京诺唯赞生物科技股份有限公司) 的方法提取 RNA, 按照 RevertAid First Strand cDNA Synthesis 试剂盒 (赛默飞世尔科技公司) 普通反转录的说明书进行 cDNA 合成, 保存于 -20 °C 备用。PCR 扩增体系为 25 μL, 包含 2×Max Buffer 12.5 μL、dNTP Mix 1 μL、ddH₂O 9 μL、Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 0.5 μL、10 μmol·L⁻¹ 上游和下游引物各 1 μL 及模板 cDNA 1 μL。PCR 扩增采用 Touch-down 程序: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 68 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min 30 s, 每次循环降低退火温度 1 °C, 直到 45 °C 共 23 个循环; 然后 94 °C 变性 30 s, 45 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min 30 s, 循环 23 次, 72 °C 延伸 10 min。反应结束后, 取 5 μL PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。使用 Axyprep DNA 凝胶回收试剂盒 (AxyGEN 生物技术有限公司) 进行纯化回收 DNA, 进行连接测序。采用 pGEM®-T Easy Vector System I 试剂盒 (Promega 生物技术有限公司) 将

表 1 引物信息
Table 1 Primer information

用途 Purpose	基因名称 Gene name	引物类型 Primer type	引物序列 (5'-3') Primer sequence
基因克隆 Gene cloning qPCR	<i>Hsp64.9</i>	上游引物 Forward primer	TGGGTAAACTGTAAACAAACGCC
		下游引物 Reverse primer	GACTGCTTTCTTGTCCAAACCAT
		上游引物 Forward primer	GACCAAAATGAAGGAAACCGC
		下游引物 Reverse primer	CGCAACACATTGAGACCAGCA
内参基因 Reference gene	<i>Actin</i>	上游引物 Forward primer	TTGTATTGGACTCTGGTGACGG
		下游引物 Reverse primer	GATAGCGTGAGGCAAAGCATAA

DNA 转化到 DH5 α 感受态细胞中,在含有氨苄卡那霉素 (AMP) 的 LB 固体培养基上培养,并通过挑菌和摇菌法,经 PCR 检测确认为阳性后,送至上海生物生化工程公司进行双向测序。

Hsp64.9 基因的氨基酸序列翻译、序列组成、相对分子质量和等电点等理化性质通过在线网站 Translate tool (<http://web.expasy.org/translate/>) 完成,利用在线网站 Scanprosite (<http://www.expasy.org/tools/scanprosite>) 搜索编码蛋白的特征序列 (Motif) (Duvaud *et al.*, 2021)。使用 DNAMAN 9.0 软件进行序列可视化和多序列比对。使用 NCBI Conserved Domains 在线工具搜索基因编码蛋白的保守结构域。利用 NCBI 中的 Blast 进行同源性搜索,采用 MEGA 7.0 (Kumar *et al.*, 2016) 基于邻接法构建系统发育树。

1.4 *Hsp64.9* 实时定量 PCR 表达模式分析

将处理好的样品进行 RNA 提取,成虫和蛹各 3 个生物学重复,方法同 1.3 节。针对成虫和蛹 *Hsp64.9* 基因在不同高温及同一温度不同胁迫时长处理下的表达模式进行实时定量 PCR 分析 (Quantitative real-time PCR, qPCR),模板 cDNA 合成采用 HiScript[®] III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) 实时定量反转录试剂盒 (南京诺唯赞生物科技股份有限公司) 的方法进行,采用 SYBR Green 1 嵌合荧光法进行 qPCR 扩增反应,引物见表 1,反应体系如下: 10 μ L 2 $\times$ ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix, 上游和下游引物 (10 μ mol $\cdot$ L⁻¹) 各 1 μ L, 2 μ L cDNA 模板和 6 μ L ddH₂O。qPCR 程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 40 个循环,反应结束后读取 Ct 值。选用 *Actin* 作为内参基因 (Chang *et al.*, 2017b), 并使用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 方法进行基因表达分析 (Livak and Schmittgen, 2001)。

1.5 数据分析

所有数据采用 SPSS 16.0 进行统计分析,使用 *t* 检验和 One-way ANOVA 比较 2 个地理种群间的存活率、羽化率和基因相对表达量差异,运用广义线性模型 (GLM) 分析不同因子间的差异显著性,当 $P < 0.05$ 时认为具有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 不同高温条件下三叶斑潜蝇两个地理种群的耐热性比较

不同温度对江苏 ($F_{6,14}=296.459$, $P < 0.001$) 和海南种群 ($F_{6,14}=255.810$, $P < 0.001$) 成虫的存活率均有显著影响。2 个种群成虫的存活率均随温度升高而下降,在 42 $^{\circ}$ C 时,江苏种群的存活率 (82.22%) 显著低于对照组 (100%); 海南种群的存活率 (75.56%) 在 43 $^{\circ}$ C 条件下显著低于对照组 (100%)。极端高温 46 $^{\circ}$ C 时,江苏种群的存活率仅为 2.22%,海南种群为 15.56%。不同温度条件下,海南种群的存活率均显著高于江苏种群 (41 $^{\circ}$ C: $t = -4.000$, $P = 0.016$; 42 $^{\circ}$ C: $t = -2.828$, $P = 0.047$; 43 $^{\circ}$ C: $t = -6.500$, $P = 0.003$; 44 $^{\circ}$ C: $t = -4.950$, $P = 0.008$; 45 $^{\circ}$ C: $t = -5.000$, $P = 0.007$; 46 $^{\circ}$ C: $t = -4.243$, $P = 0.013$) (图 1: A)。地理种群和高温的双因子交互作用对三叶斑潜蝇成虫耐热性具有显著影响 (表 2)。

高温处理对 2 个地理种群蛹的羽化率有显著影响 (江苏种群: $F_{6,14}=122.576$, $P < 0.001$; 海南种群: $F_{6,14}=63.581$, $P < 0.001$)。42 $^{\circ}$ C 时,江苏种群蛹的羽化率 (62.22%) 与对照组 (93.33%) 相比显著下降。随着温度升高,江苏种群蛹的存活降低,且在 46 $^{\circ}$ C 时无成虫羽化; 海南种群蛹的羽化率随温度上升而下降,41 $^{\circ}$ C 时,其存活率 (78.33%) 显著低于对照组 (95.56%),但在 46 $^{\circ}$ C 时仍有 8.89% 的蛹可以成功羽化。在 42、44 和 46 $^{\circ}$ C 条件下,海南种群蛹的羽化率显著高于江苏种群 (42 $^{\circ}$ C: $t = -4.234$, $P = 0.013$; 44 $^{\circ}$ C: $t = -5.567$, $P = 0.005$; 46 $^{\circ}$ C: $t = -4.000$, $P = 0.016$), 43 和 45 $^{\circ}$ C 时,海南种群与江苏种群之间无显著差异 (43 $^{\circ}$ C: $t = -1.549$, $P = 0.196$; 45 $^{\circ}$ C: $t = -2.500$, $P = 0.067$) (图 1: B)。地理种群和高温的双因子交互作用对三叶斑潜蝇蛹的耐热性影响不显著 (表 2)。

2.2 同一温度不同胁迫时长下三叶斑潜蝇两个地理种群的耐热性比较

39 $^{\circ}$ C 胁迫 0.25-2 h, 江苏和海南种群的成虫存活率均无显著变化; 胁迫 4 h 时, 2 个种群的

存活率显著下降 (江苏种群: $F_{5,12}=21.969$, $P<0.001$; 海南种群: $F_{5,12}=4.323$, $P=0.018$), 且海南种群存活率 (80.00%) 显著高于江苏种群 (37.78%) ($t=-7.181$, $P=0.002$) (图 2: A)。

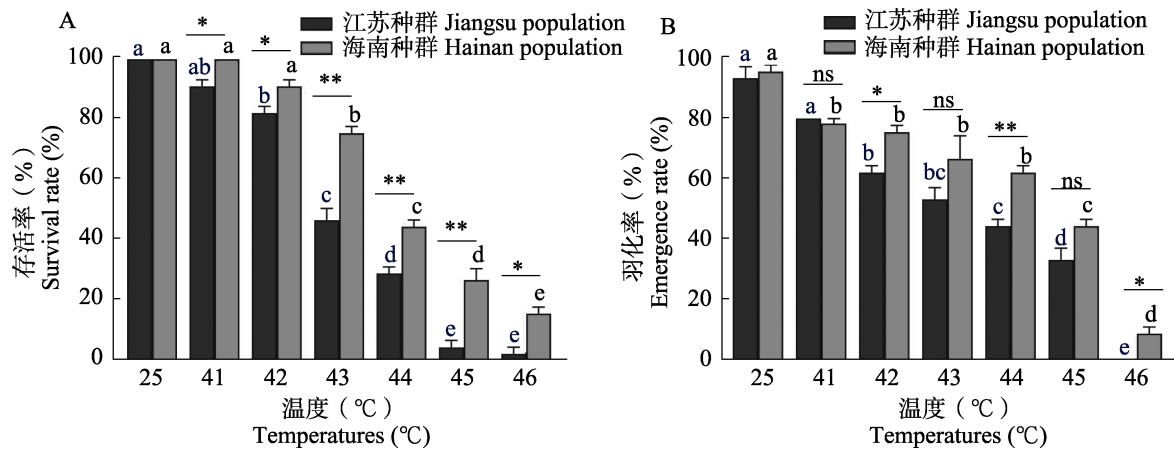


图 1 不同高温条件下三叶斑潜蝇两个地理种群的耐热性

Fig. 1 Heat tolerance of two geographic populations of *Liriomyza trifolii* under different high temperatures

A. 成虫; B. 蛹。柱上标有不同小写字母代表显著差异 ($P<0.05$, Tukey's HSD 检验); ns 表示没有显著性差异 ($P>0.05$, 独立样本 t 检验); 星号表示不同处理间差异显著 (* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$, 独立样本 t 检验)。下图同。
A. Adults; B. Pupae. Histograms with different lowercase letters represent significant difference ($P<0.05$, Tukey's HSD test), ns means no significant difference ($P>0.05$, independent sample t -test), asterisk above bars indicates significant difference between the two groups (* $P<0.05$, ** $P<0.001$, independent sample t -test). The same below.

表 2 地理种群和高温对三叶斑潜蝇耐热性影响的双因子方差分析

Table 2 Two-way ANOVA for the effects of geographic populations and high temperatures on the heat tolerance of *Liriomyza trifolii*

虫态 Developmental stages	因子 Factors	自由度 Degree of freedom	<i>F</i>	<i>P</i>
成虫 Adult	地理种群 Geographic populations	1	129.067	<0.001
	高温 High temperatures	6	546.486	<0.001
	地理种群×高温 Geographic populations × High temperatures	6	8.511	<0.001
蛹 Pupa	地理种群 Geographic populations	1	29.954	<0.001
	高温 High temperatures	6	170.301	<0.001
	地理种群×高温 Geographic populations × High temperatures	6	2.301	0.062

42 °C 时, 2 个种群的成虫存活率均随胁迫时长的增加而下降, 且在胁迫时长为 2 和 4 h 时, 与对照组相比显著降低 (江苏种群: $F_{5,12}=94.545$, $P<0.001$; 海南种群: $F_{5,12}=58.086$, $P<0.001$); 胁迫时长为 1、2 和 4 h 时, 海南种群的存活率显著高于江苏种群 (1 h: $t=-2.828$, $P=0.047$; 2 h: $t=-7.071$, $P=0.002$; 4 h: $t=-116.263$, $P<0.001$) (图 2: B)。

45 °C 时, 不同胁迫时长对 2 个种群的成虫存活率有显著影响 (江苏种群: $F_{5,12}=250.577$, $P<0.001$; 海南种群: $F_{5,12}=145.970$, $P<0.001$)。胁迫时长为 1 h 时, 海南种群的存活率 (26.67%) 显著高于江苏种群 (4.44%) (1 h: $t=-5.000$, $P=0.007$)。胁迫时长为 2 和 4 h 时, 2 个种群的成虫不能存活 (图 2: C)。

在多因子方差分析中, 地理种群、高温和胁

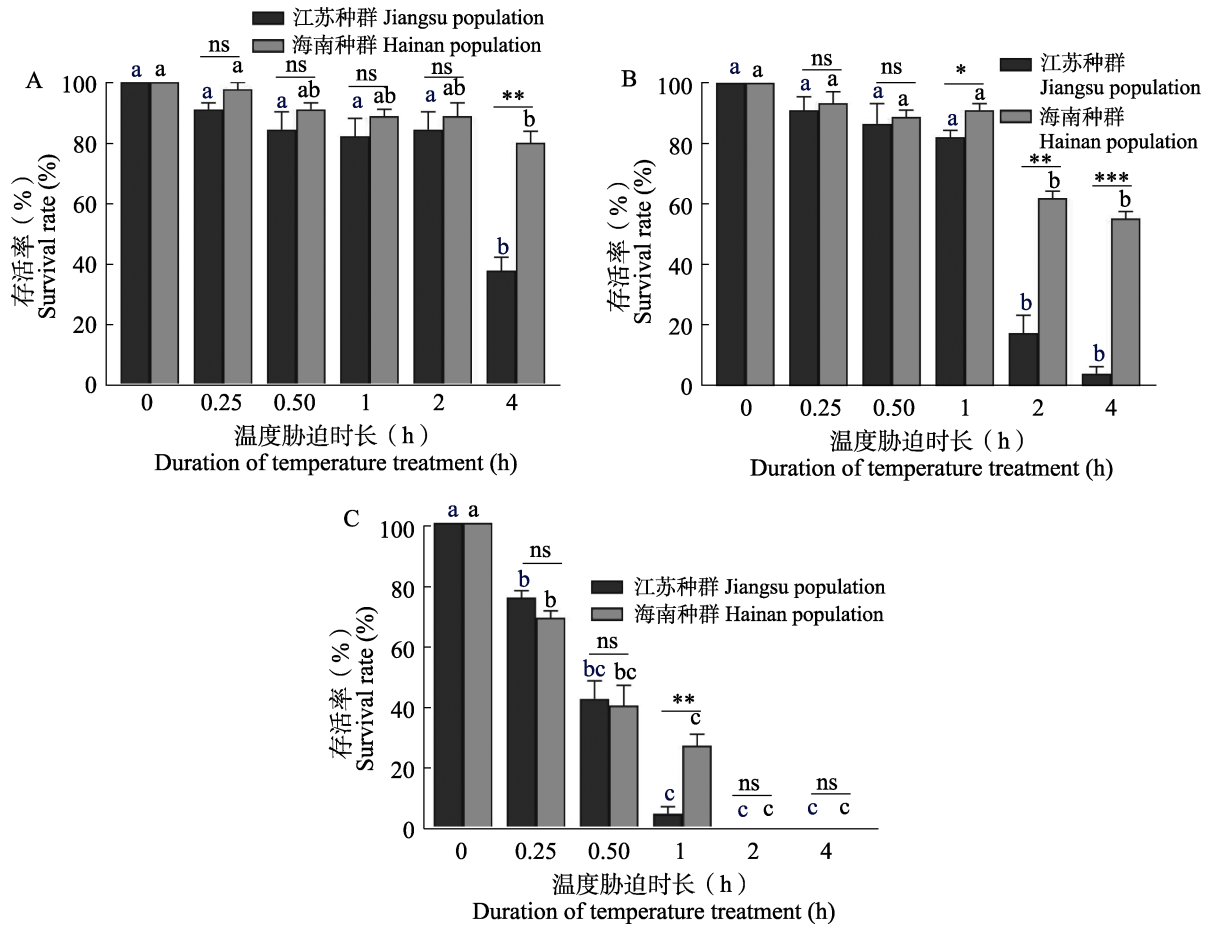


图2 三叶斑潜蝇两个地理种群成虫高温不同时间的存活率
Fig. 2 Survival rates of two geographic populations of *Liriomyza trifolii* adults under different duration of high temperature treatments

A. 39 °C; B. 42 °C; C. 45 °C.

胁迫时长三因子间两两交互, 以及三者的交互作用对三叶斑潜蝇成虫的耐热性均有显著影响 (表3)。

39 °C胁迫 0.25-1 h, 江苏和海南种群蛹的羽化率无显著变化。与对照组 (100%) 相比, 海南种群在胁迫 2 h (75.56%) 时羽化率显著下降 ($F_{5,12}=6.827$, $P=0.003$); 江苏种群在胁迫 4 h (66.67%) 时, 蛹的羽化率相比对照组 (100%) 显著降低 ($F_{5,12}=5.100$, $P=0.01$)。在不同胁迫时长处理下, 2 个种群蛹的羽化率没有显著差异 (0.25 h: $t=0.707$, $P=0.519$; 0.5 h: $t=1.512$, $P=0.205$; 1 h: $t=-2.000$, $P=0.116$; 2 h: $t=0.000$, $P=1.000$; 4 h: $t=-1.225$, $P=0.288$) (图3: A)。

42 °C胁迫下, 2 个地理种群蛹的羽化率均有显著变化。其中, 江苏种群在胁迫时长为 1

(62.22%) 和 4 h (62.22%) 时相比对照组 (100%) 显著下降 ($F_{5,12}=9.6$, $P=0.001$); 海南种群在胁迫时长超过 0.5 h 后 (1 h: 75.56%; 2 h: 77.78%; 4 h: 68.89%) 与对照组 (100%) 相比显著下降 ($F_{5,12}=6.176$, $P=0.005$)。除胁迫时长为 1 h 外 ($t=-4.243$, $P=0.013$), 2 个地理种群蛹的羽化率均无显著差异 (0.25 h: $t=-1.225$, $P=0.288$; 0.5 h: $t=-0.316$, $P=0.768$; 2 h: $t=-0.302$, $P=0.778$; 4 h: $t=-2.121$, $P=0.101$) (图3: B)。

45 °C不同胁迫时长处理对 2 个地理种群蛹的羽化率有显著影响 (江苏种群: $F_{5,12}=142.180$, $P<0.001$; 海南种群: $F_{5,12}=115.831$, $P<0.001$), 但 2 个种群之间没有显著差异 (0.25 h: $t=-1.000$, $P=0.374$; 0.5 h: $t=0.500$, $P=0.643$; 1 h: $t=-2.500$,

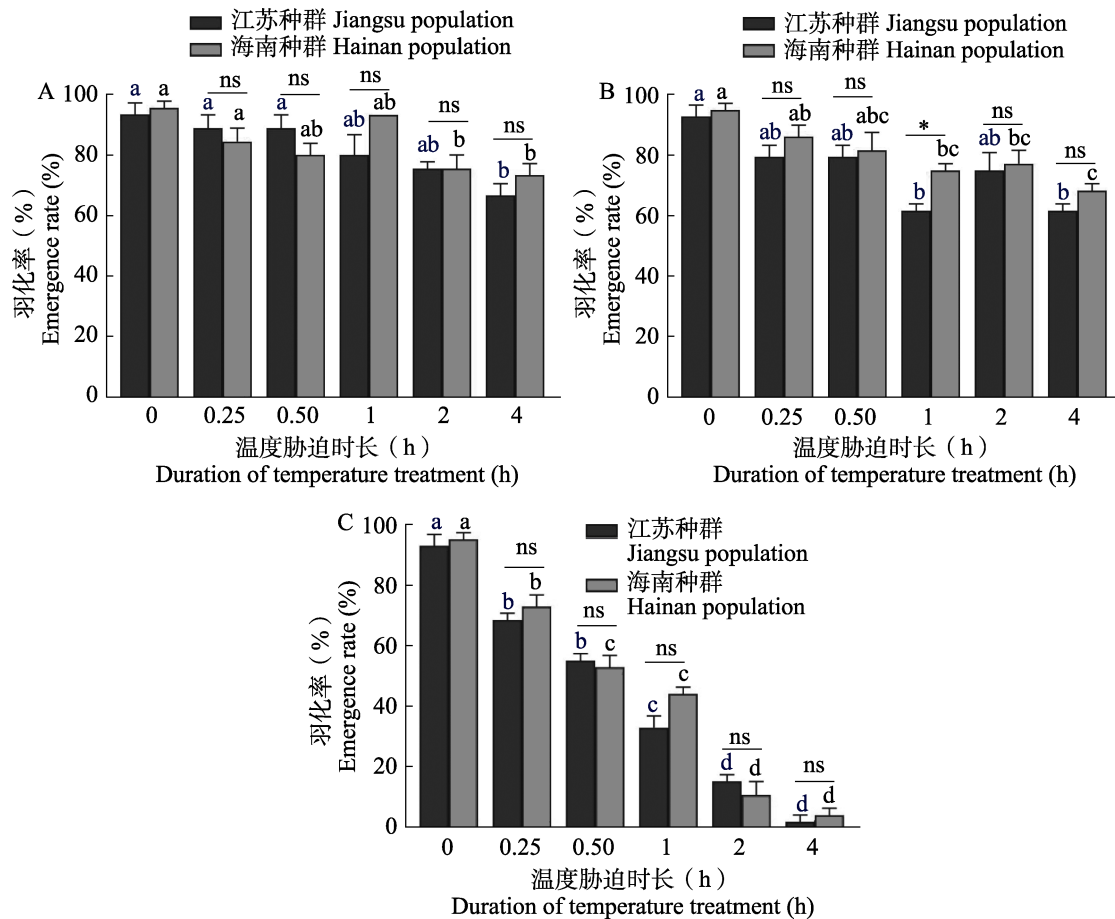


图3 三叶斑潜蝇两个地理种群蛹高温不同时长羽化率

Fig. 3 Emergence rates of two geographic populations of *Liriomyza trifolii* pupae under different duration of high temperature treatments

A. 39 °C; B. 42 °C; C. 45 °C.

$P=0.067$; 2h: $t=0.894$; $P=0.422$; 4h: $t=-0.707$; $P=0.519$) (图3: C)。

在多因子方差分析中,除地理种群和高温以及地理种群、高温与不同胁迫时长的交互作用对三叶斑潜蝇蛹的羽化率影响不显著,其它因子的交互作用均有显著影响(表3)。

2.3 三叶斑潜蝇 Hsp64.9 的序列特征和系统发育分析

本研究获得的 Hsp 基因命名为 Hsp64.9, GenBank 登录号为 PP391283。Hsp64.9 的 ORF 全长为 1 776 bp, 共编码 591 个氨基酸。利用 ExPASy 分子生物学序列分析工具预测蛋白产物的理论分子量为 64.9 kD, 理论等电点为 5.40。在 Hsp64.9 的氨基酸序列的 C 末端发现保守的

EEVD 基序。在氨基酸序列比对中发现, Hsp64.9 与三叶斑潜蝇中的其它 Hsp70 和近缘双翅目物种的相似度可达 91.46% (图4: A)。从 NCBI 中下载不同昆虫的 Hsp70s 氨基酸序列构建系统发育树, 结果表明, Hsp64.9 同三叶斑潜蝇的 Hsc70 和 Hsp701 聚在同一分支(图4: B)。

2.4 三叶斑潜蝇 Hsp64.9 在不同高温下的表达模式比较

不同高温胁迫下, 2 个地理种群三叶斑潜蝇成虫 Hsp64.9 基因均显著表达(江苏种群: $F_{6,14}=7.149$, $P<0.001$; 海南种群: $F_{6,14}=44.957$, $P<0.001$), 但表达模式和表达量存在差异(图5: A)。其中, 江苏种群 Hsp64.9 的表达量随着温度升高而降低, 在 41 °C 时达到最高, 为对照组的

表 3 高温不同时长下三叶斑潜蝇两个地理种群间耐热性的方差分析
Table 3 Variance analysis of heat tolerance between two geographic populations of *Liriomyz trifolii* under different duration of high temperature treatments

虫态 Developmental stages	因子 Factors	自由度 Degree of freedom	<i>F</i>	<i>P</i>
成虫 Adult	地理种群 Geographic population	1	78.400	<0.001
	不同高温 High temperatures	2	581.211	<0.001
	不同时长 Different duration	5	339.191	<0.001
	地理种群×不同高温 Geographic population×High temperatures	2	15.433	<0.001
	地理种群×不同时长 Geographic population×Different duration	5	18.267	<0.001
	不同高温×不同时长 High temperatures×Different duration	10	54.678	<0.001
	地理种群×不同高温×不同时长 Geographic population×High temperatures×Different duration	10	8.820	<0.001
蛹 Pupa	地理种群 Geographic population	1	6.443	<0.013
	不同高温 High temperatures	2	367.268	<0.001
	不同时长 Different duration	5	137.016	<0.001
	地理种群×不同高温 Geographic population×High temperatures	2	1.062	0.351
	地理种群×不同时长 Geographic population×Different duration	5	3.326	0.009
	不同高温×不同时长 High temperatures×Different duration	10	35.487	<0.001
	地理种群×不同高温×不同时长 Geographic population×High temperatures×Different duration	10	0.431	0.927

3.81 倍;海南种群的表达量随着温度升高先下降后增加。除 44 ℃处理 ($t = -0.475$, $P=0.659$), 海南种群 *Hsp64.9* 的表达量显著高于江苏种群 (41 ℃: $t = -4.307$, $P=0.013$; 42 ℃: $t = -4.000$, $P=0.016$; 43 ℃: $t = -5.467$, $P<0.001$; 45 ℃: $t = -7.830$, $P<0.001$; 46 ℃: $t = -10.290$, $P<0.001$)。

2 个地理种群蛹的 *Hsp64.9* 基因表达模式相近, 表达量均随温度升高先下降后增加 (图 5: B)。其中, 江苏种群在 42 ℃时表达量最高, 为对照组的 3.17 倍;海南种群在 45 ℃时表达量最高, 为对照组的 15.83 倍(江苏种群: $F_{6,14}=12.512$, $P<0.001$; 海南种群: $F_{6,14}=37.651$, $P<0.001$)。不同温度处理下, 海南种群 *Hsp64.9* 基因的表达量显著高于江苏种群 (41 ℃: $t = -6.077$, $P=0.004$;

42 ℃: $t = -8.495$, $P<0.001$; 43 ℃: $t = -14.733$, $P<0.001$; 44 ℃: $t = -5.907$, $P=0.004$; 45 ℃: $t = -5.136$, $P=0.007$; 46 ℃: $t = -4.858$, $P=0.008$)。

在双因子方差分析中, 地理种群和高温的交互作用对三叶斑潜蝇成虫和蛹 *Hsp64.9* 基因的表达量有显著影响 (表 4)。

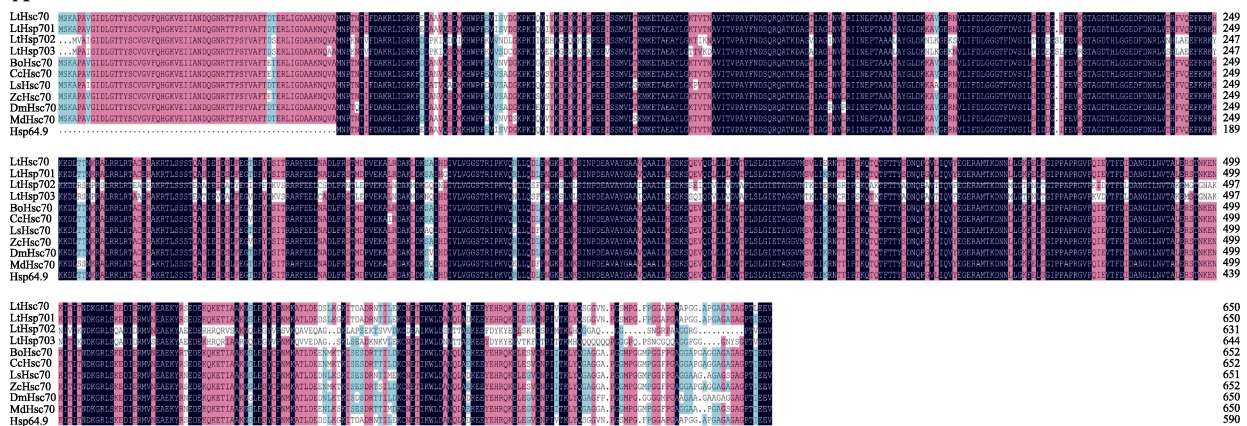
2.5 三叶斑潜蝇 *Hsp64.9* 在同一温度不同胁迫时长下的表达模式比较

2 个地理种群成虫的 *Hsp64.9* 基因在同一温度不同胁迫时长下表现出不同的表达模式(图 6: A-C)。其中, 温度为 39 ℃时, 海南种群的表达量随胁迫时间增加先上升后下降, 并在 1 h 时达到最高;江苏种群随着处理温度的升高而升高并

在 4 h 时达到最高 (海南种群: $F_{5,12}=47.146$, $P<0.001$; 江苏种群: $F_{5,12}=12.506$, $P<0.001$)。42 °C 时, 2 个种群的表达量均随处理温度的升高而表现出先上升后下降的趋势。海南种群在胁迫时长 0.5 h 处理下的表达量最高; 江苏种群在胁迫 1 h 时达到最高 (海南种群: $F_{5,12}=34.024$, $P<0.001$; 江苏种群: $F_{5,12}=4.663$, $P=0.013$)。45 °C 时, 江苏种群的表达量在不同胁迫时长处理下均不上调表达; 而海南种群与对照组相比显著上调表达 (海南种群: $F_{5,12}=18.983$, $P<0.001$; 江苏种群: $F_{5,12}=2.837$, $P=0.064$)。39、42 和 45 °C

时, 海南种群 *Hsp64.9* 基因的表达量在不同胁迫时长处理下显著高于江苏种群 (39 °C: 0.25 h: $t=-4.871$, $P=0.008$; 0.5 h: $t=-4.661$, $P=0.01$; 1 h: $t=-10.069$, $P<0.001$; 2 h: $t=-5.885$, $P=0.004$; 4 h: $t=-3.310$, $P=0.03$; 42 °C: 0.25 h: $t=-7.993$, $P<0.001$; 0.5 h: $t=-6.878$, $P=0.002$; 1 h: $t=-3.375$, $P=0.02$; 2 h: $t=-7.481$, $P=0.002$; 4 h: $t=-8.364$, $P<0.001$; 45 °C: 0.25 h: $t=-8.364$, $P<0.001$; 0.5 h: $t=-8.092$, $P<0.001$; 1 h: $t=-9.383$, $P<0.001$; 2 h: $t=-8.744$, $P<0.001$; 4 h: $t=-9.673$, $P<0.001$)。

A



B

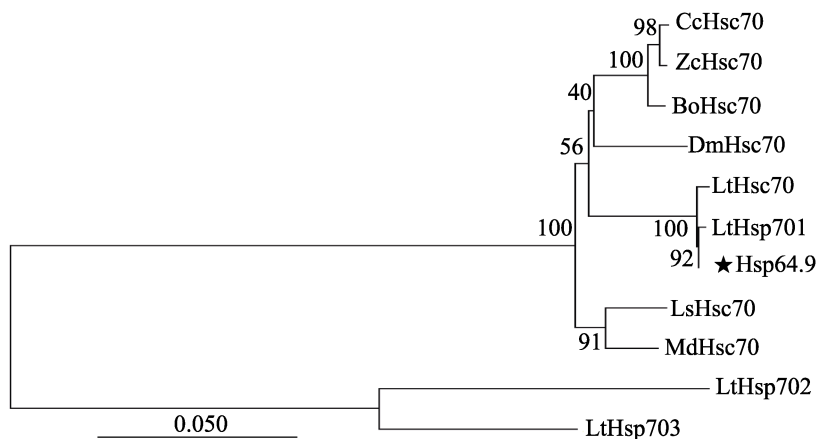


图 4 *Hsp64.9* 的氨基酸序列的多重比较 (A) 和系统发育树 (B)

Fig. 4 Multiple comparisons of amino acid sequences (A) and phylogenetic tree (B) of *Hsp64.9*

LtHsp701: 三叶斑潜蝇热激蛋白 701; LtHsp702: 三叶斑潜蝇热激蛋白 702; LtHsp703: 三叶斑潜蝇热激蛋白 703; LtHsc70: 三叶斑潜蝇热激同源蛋白 70; MdHsc70: 家蝇热激同源蛋白 70; DmHsc70: 黑腹果蝇热激同源蛋白 70; ZcHsc70: 瓜实蝇热激同源蛋白 70; LsHsc70: 丝光绿蝇热激同源蛋白 70; CcHsc70: 地中海实蝇热激同源蛋白 70; BoHsc70: 柑橘大实蝇热激同源蛋白 70。星号代表三叶斑潜蝇热激蛋白 64.9。

LtHsp701: *Liriomyza trifolii* heat shock protein 701; LtHsp702: *Liriomyza trifolii* heat shock protein 702; LtHsp703: *Liriomyza trifolii* heat shock protein 703; LtHsc70: *Liriomyza trifolii* heat shock cognate 70; MdHsc70: *Musca domestica* heat shock cognate 70; DmHsc70: *Drosophila melanogaster* heat shock cognate 70; ZcHsc70: *Zeugodacus cucurbitae* heat shock cognate 70; LsHsc70: *Lucilia sericata* heat shock cognate 70; CcHsc70: *Ceratitis capitata* heat shock cognate 70; BoHsc70: *Bactrocera oleae* heat shock cognate 70. The asterisk represents *Liriomyza trifolii* heat shock protein 64.9.

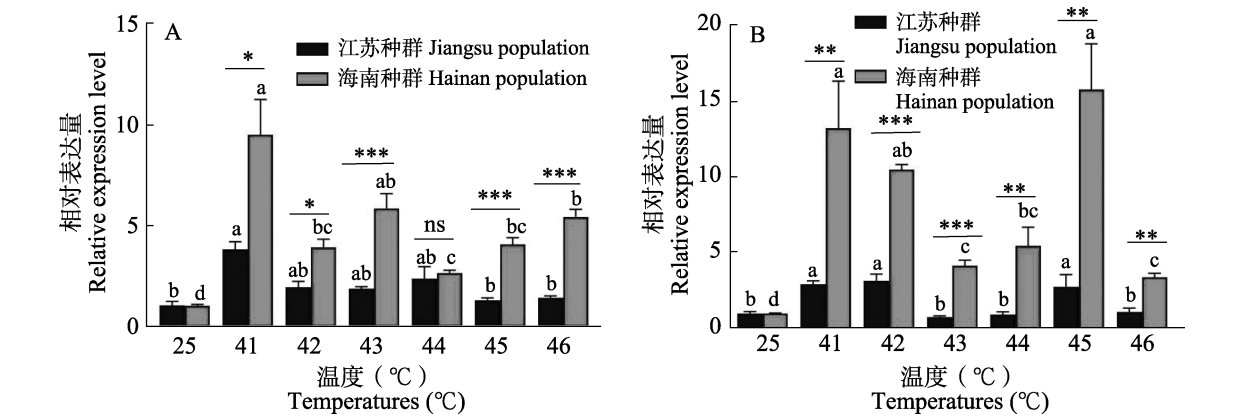


图 5 不同高温胁迫下 *Hsp64.9* 在两个地理种群中的表达模式
Fig. 5 Expression patterns of *Hsp64.9* in two geographic population under different high temperature treatments

A. 成虫; B. 蛹。A. Adult; B. Pupa.

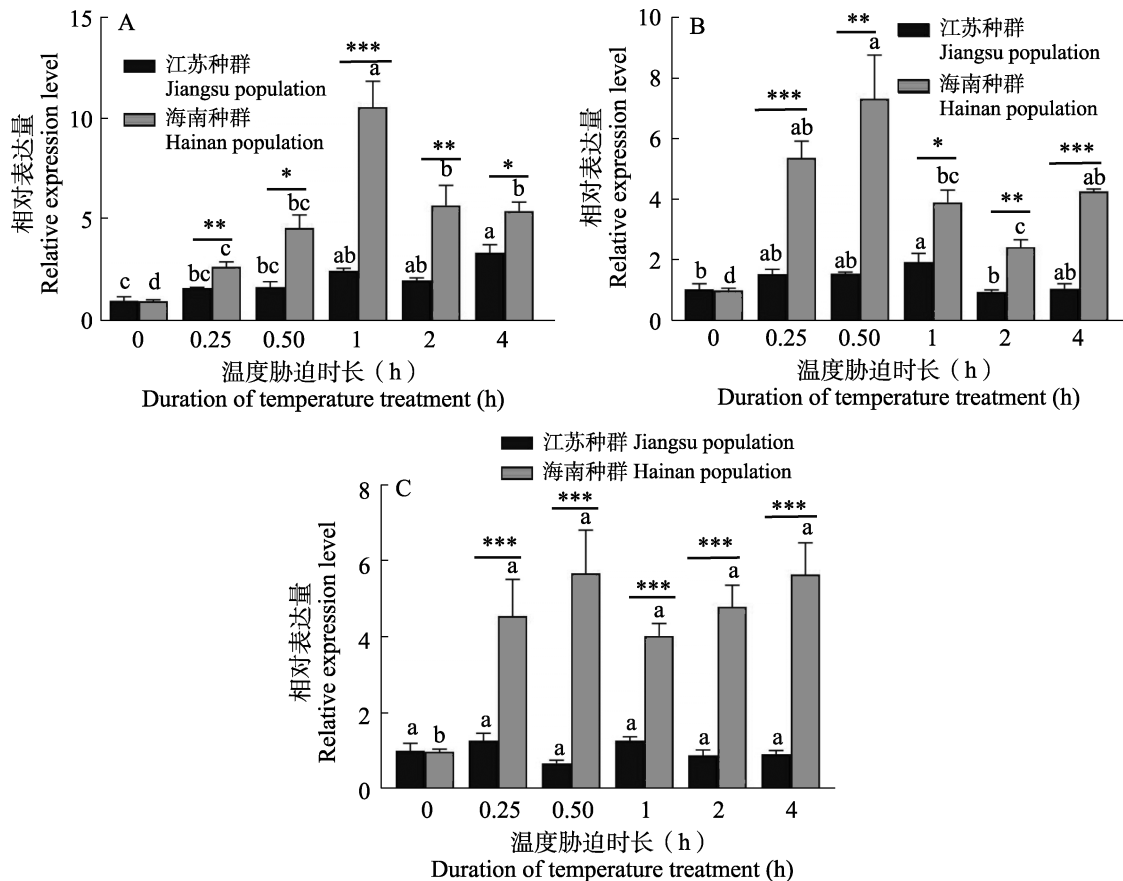
表 4 不同高温处理下三叶斑潜蝇两个地理种群间 *Hsp64.9* 表达模式的方差分析
Table 4 Variance analysis of expression patterns of *Hsp64.9* between two geographic populations of *Liriomyz trifolii* under different high temperature treatments

虫态 Developmental stages	因子 Factors	自由度 Degree of freedom	F	P
成虫 Adult	地理种群 Geographic population	1	73.690	<0.001
	不同高温 High temperatures	6	17.556	<0.001
	地理种群×不同高温 Geographic population×High temperatures	6	6.402	<0.001
蛹 Pupa	地理种群 Geographic population	1	76.538	<0.001
	不同高温 High temperatures	6	13.647	<0.001
	地理种群×不同高温 Geographic population×High temperatures	6	6.867	<0.001

2 个地理种群蛹的 *Hsp64.9* 基因在同一温度不同胁迫时长处理下的表达模式有所差异(图 7: A-C)。其中, 39 °C 时, 海南和江苏种群的表达量随胁迫时长增加先上升后下降, 并在 1 h 时达到最高(海南种群: $F_{5,12}=100.255$, $P<0.001$; 江苏种群: $F_{5,12}=37.440$, $P<0.001$)。42 °C 时, 海南种群的表达量随处理温度的升高而升高; 江苏种群随胁迫时长增加先上升后下降(海南种群: $F_{5,12}=134.880$, $P<0.001$; 江苏种群: $F_{5,12}=20.749$, $P<0.001$)。45 °C 时, 海南和江苏种群的表达量随胁迫时长的增加先上升后下降, 海南种群在胁迫时长为 1 h 时的表达量显著高于 0.5 h 和 2 h (海南种群: $F_{5,12}=32.473$, $P<0.001$; 江苏种群: $F_{5,12}=$

4.421, $P=0.019$)。除 45 °C 胁迫 0.5 h (0.5 h: $t=-2.723$, $P=0.053$), 海南种群 *Hsp64.9* 基因的表达量均显著高于江苏种群(39 °C: 0.25 h: $t=-13.244$, $P<0.001$; 0.5 h: $t=-8.716$, $P<0.001$; 1 h: $t=-17.351$, $P<0.001$; 2 h: $t=-6.324$, $P=0.003$; 4 h: $t=-14.866$, $P<0.001$; 42 °C: 0.25 h: $t=-15.354$, $P<0.001$; 0.5 h: $t=-12.760$, $P<0.001$; 1 h: $t=-8.945$, $P<0.001$; 2 h: $t=-9.116$, $P<0.001$; 4 h: $t=-16.672$, $P<0.001$; 45 °C: 0.25 h: $t=-5.402$, $P=0.006$; 1 h: $t=-5.136$, $P=0.007$; 2 h: $t=-3.629$, $P=0.022$; 4 h: $t=-7.229$, $P=0.002$)。

在多因子方差分析中, 地理种群、高温和胁

图6 *Hsp64.9* 在两个地理种群成虫不同高温时长下的表达模式Fig. 6 Expression patterns of *Hsp64.9* in two geographic populations of *Liriomyz trifolii* adults under different duration of high temperature treatments

A. 39 °C; B. 42 °C; C. 45 °C.

迫时长三因子间两两交互, 以及三者交互作用对三叶斑潜蝇成虫和蛹 *Hsp64.9* 基因的表达量有显著影响 (表 5)。

3 讨论

昆虫作为一种变温动物, 对环境温度变化表现敏感。基于对温度胁迫的响应, 昆虫往往表现出对温度的耐受性, 且这种耐受能力与其他因素一起决定了昆虫的地理分布和扩散区域范围 (Bale *et al.*, 2002; Chen and Kang, 2002; Sørensen *et al.*, 2003)。研究表明, 经过一定时间的环境温度适应, 同一物种的不同地理种群对温度适应能力会发生相应变化。例如: 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 非洲热带种群的高温耐受性显著高于北欧种群 (Guerra *et al.*, 2004); 我国广西南宁和云南景洪褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 种群的高

温耐受性较浙江杭州种群强 (吕仲贤等, 2000); 东亚飞蝗 *Locusta migratoria* 温带种群比热带种群的耐寒性更强 (Wang and Kang, 2005); 我国豚草天敌昆虫广聚萤叶甲 *Ophraella communa* 的耐寒性随纬度梯度的变化而变化, 纬度偏北种群耐寒性高于纬度偏南种群 (Zhou *et al.*, 2011)。此外, 室内模拟不同自然环境温度的驯化研究表明, 昆虫通常具有较强的高低温适应可塑性 (Gu *et al.*, 2019; Iqbal *et al.*, 2021)。因此, 在全球气候变化的大背景下, 昆虫温度适应性改变可能会导致其扩散分布范围变化, 对重要农业害虫尤其是入侵害虫的监测预警和防控带来挑战。

本研究中, 三叶斑潜蝇江苏种群成虫在 42 °C 时存活率显著降低, 海南种群在 43 °C 时显著下降, 且在 41-46 °C 温度范围内, 海南种群的成虫存活率显著高于江苏种群。海南种群成虫

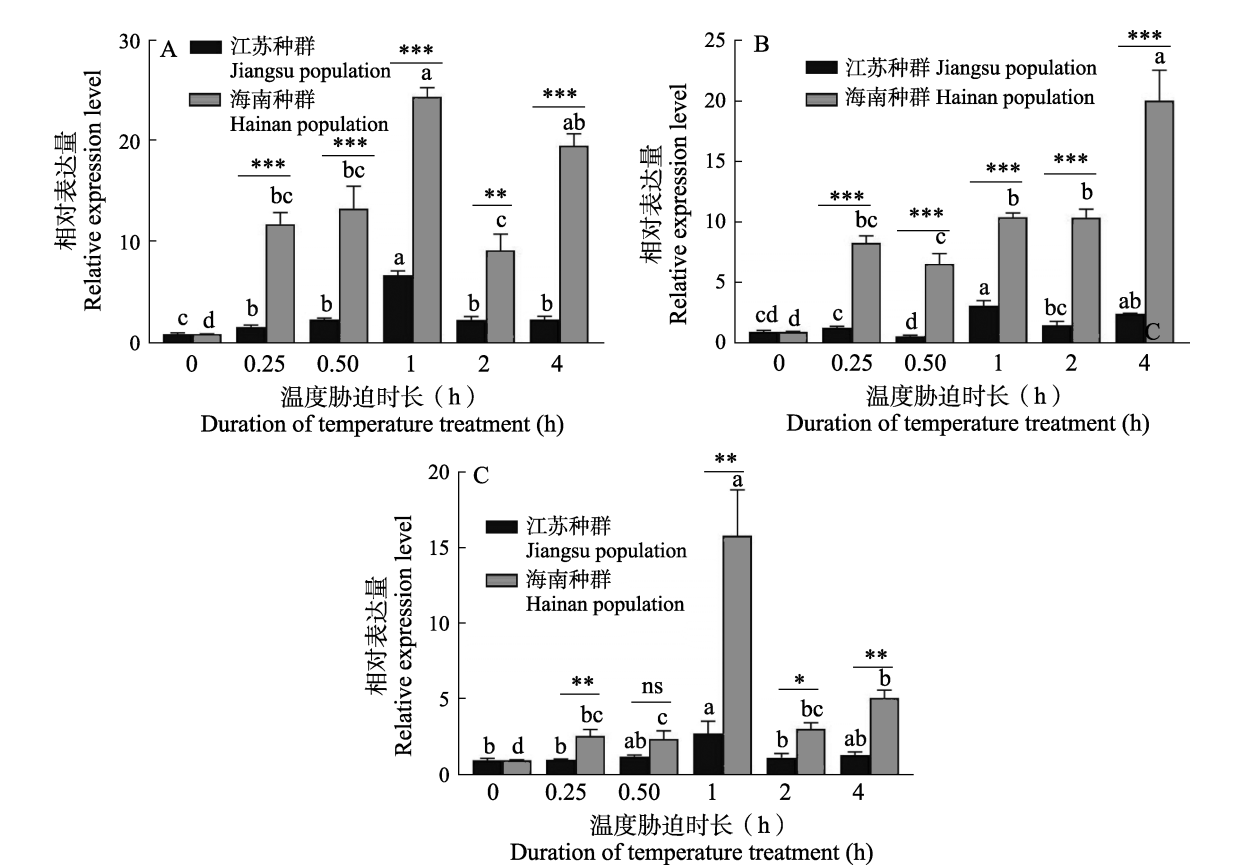


图 7 *Hsp64.9* 在两个地理种群蛹不同高温时长下的表达模式

Fig. 7 Expression patterns of *Hsp64.9* in two geographic populations of *Liriomyz trifolii* pupae under different duration of high temperature treatments

A. 39 °C; B. 42 °C; C. 45 °C.

表 5 高温不同时长下三叶斑潜蝇两个地理种群间 <i>Hsp64.9</i> 表达模式的方差分析				
Table 5 Variance analysis of expression patterns of <i>Hsp64.9</i> between two geographic populations of <i>Liriomyz trifolii</i> under different duration of high temperature treatments				
虫态 Developmental stages	因子 Factors	自由度 Degree of freedom	<i>F</i>	<i>P</i>
成虫 Adult	地理种群 Geographic population	1	289.787	<0.001
	不同高温 High temperatures	2	10.748	<0.001
	不同时长 Different duration	5	24.635	<0.001
	地理种群×不同高温	2	0.879	0.420
	Geographic population×High temperatures			
	地理种群×不同时长	5	14.585	<0.001
	Geographic population×Different duration			
	不同高温×不同时长	10	8.953	<0.001
	High temperatures×Different duration			
蛹 Pupa	地理种群×不同高温×不同时长	10	6.741	<0.001
	Geographic population×High temperatures×Different duration			
	地理种群 Geographic population	1	562.989	<0.001
	不同高温 High temperatures	2	83.255	<0.001
	不同时长 Different duration	5	82.038	<0.001

续表 5 (Table 5 continued)

虫态 Developmental stages	因子 Factors	自由度 Degree of freedom	<i>F</i>	<i>P</i>
蛹 Pupa	地理种群×不同高温 Geographic population×High temperatures	2	43.149	<0.001
	地理种群×不同时长 Geographic population×Different duration	5	41.721	<0.001
	不同高温×不同时长 High temperatures×Different duration	10	13.195	<0.001
	地理种群×不同高温×不同时长 Geographic population×High temperatures×Different duration	10	8.541	<0.001

在 39 °C 胁迫 4 h、42 °C 胁迫 2 h 和 42 °C 胁迫 4 h 时的存活率显著高于江苏种群。这表明海南种群成虫的极端耐受高温和高温耐受时长均显著高于江苏种群。42、44 和 46 °C 时，三叶斑潜蝇海南种群蛹的存活率显著高于江苏种群。对蛹进行 39、42 和 45 °C 不同胁迫时长处理，总的来说海南种群蛹的存活率高于江苏种群，但两者之间无显著差异。我国美洲斑潜蝇南方种群的耐寒性随纬度增加而增加 (Chen and Kang, 2005)，三叶斑潜蝇不同地理种群的耐寒性也有类似现象，湖北和安徽种群的耐寒性强于海南种群 (张起恺等, 2021)。

热激蛋白是生物体应对高温或其它环境胁迫时所产生的一类特定的应急蛋白，在抵御胁迫过程中主要作为分子伴侣，维持蛋白质的正常折叠，协助蛋白质跨膜运输和阻止蛋白质前体积聚，进而使生物体免受或减轻伤害 (Lindquist, 1986; Feder and Hofmann, 1999; Sørensen *et al.*, 2003)。目前，关于昆虫在高低温胁迫下分子机制的研究大多集中于 *Hsps* 基因的表达 (Feder and Hofmann, 1999; Kang *et al.*, 2009; 陆明星等, 2015; Xie *et al.*, 2020)，针对不同地理种群温度适应性分化与 *Hsps* 相关的研究报道较少。例如，海南东亚飞蝗自然种群与辽宁种群相比，高温耐受性更强且低温耐受性更弱。高温胁迫增加了辽宁种群 *Hsp90* 基因的表达，但在海南种群中该基因的表达不显著，相反低温胁迫显著提高了海南种群中 *Hsp90* 的表达，而在辽宁种群中表达不显著 (Wang and Kang, 2005)。赵梅婷 (2017) 比较了莲草直胸跳甲 *Agasicles hygrophila* 2 个地理

种群在周期性高温胁迫下连续多代的生态学特征，并对莲草直胸跳甲进行了转录组测序，发现 *Hsps* 是 2 个地理种群差异表达较高的基因家族。因此，不同地理种群昆虫温度适应性分化，与昆虫体内 *Hsps* 基因表达的可塑性进化有关。此外，有关斑潜蝇 (包括三叶斑潜蝇) *Hsps* 相关的研究多集中在近缘种间的比较和不同温度胁迫下的基因表达模式 (Huang and Kang, 2007; Kang *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2017a; Chang *et al.*, 2019a; 2019b)，针对不同地理种群间 *Hsps* 和温度适应性分子机制的研究较少。

本研究通过前期不同地理种群高温胁迫下转录组数据分析筛选获得 *Hsp64.9* 基因 (Chang *et al.*, 2024)，通过序列预测发现 *Hsp64.9* 具有 *Hsp70* 典型的 EEVD 序列，表明该基因存在于细胞质中并起到 ATP 酶 (ATPase) 活性作用 (Michels *et al.*, 1999)。江苏和海南三叶斑潜蝇地理种群的 *Hsp64.9* 均可被高温显著诱导且在种群间存在一定表达模式的差异。海南种群成虫和蛹的 *Hsp64.9* 基因在不同温度和不同胁迫时长下的相对表达量显著高于江苏种群。研究表明，*Hsp70s* 在三叶斑潜蝇耐热性中发挥着重要作用，是其占据种间竞争优势地位的关键因素 (Chang *et al.*, 2019a)。因此，海南种群 *Hsp64.9* 的高表达可能导致其在高温胁迫下的存活率显著高于江苏种群。同样，Bai 等 (2021) 在比对烟粉虱 *Bemisia tabaci* MEAM1 和 MED 隐种的耐热性时发现，具有较高 *HSP70s* 表达的 MEAM1 隐种在不同高温处理下的存活率高于 MED 隐种。这些结果表明，温度耐受性较高的物种或昆虫在高温

胁迫下可通过维持较高水平的 *Hsp70* 表达来增强温度耐受能力。

本研究通过对三叶斑潜蝇 2 个地理种群间温度适应性分化研究,发现不同地理种群间的耐热性存在显著差异,成虫和蛹不同高温和高温不同时长处理下的存活率、羽化率和 *Hsp64.9* 基因的表达模式结果,均表明海南种群的耐热性高于江苏种群。研究结果对揭示昆虫温度适应能力在地理种群分化中的作用具有重要的科学意义,同时也为研究入侵物种的危害分布规律及研发监测防控技术提供了新的视角。

参考文献 (References)

- Bai J, Wang YC, Liu YC, Chang YW, Liu XN, Gong WR, Du YZ, 2021. Isolation of two new genes encoding heat shock protein 70 in *Bemisia tabaci* and analysis during thermal stress. *International Journal of Biological Macromolecules*, 193(Pt A): 933–940.
- Bale JS, Masters GJ, Hodkinson ID, Awmack C, Bezemer TM, Brown VK, Butterfield J, Buse AL, Coulson JC, Farrar J, Good JEG, Harrington R, Hartley S, Jones TH, Lindroth RL, Press MC, Symmioudis I, Watt AD, Whittaker JB, 2002. Herbivory in global climate change research: Direct effects of rising temperature on insect herbivores. *Global Change Biology*, 8(1): 1–16.
- Chang YW, Chen JY, Lu MX, Gao Y, Tian ZH, Gong WR, Dong CS, Du YZ, 2017a. Cloning and expression of genes encoding heat shock proteins in *Liriomyza trifolii* and comparison with two congener leafminer species. *PLoS ONE*, 12(7): e0181355.
- Chang YW, Chen JY, Lu MX, Gao Y, Tian ZH, Gong WR, Zhu W, Du YZ, 2017b. Selection and validation of reference genes for quantitative real-time PCR analysis under different experimental conditions in the leafminer *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae). *PLoS ONE*, 12(7): e0181862.
- Chang YW, Wang YC, Gong WR, Du YZ, 2021. Research progress in the molecular mechanism of interspecific competition and substitution of leaf miner flies *Liriomyza* species under the influence of temperature. *Journal of Plant Protection*, 48(6): 1199–1207. [常亚文, 王禹程, 龚伟荣, 杜予州, 2021. 温度影响下斑潜蝇种间竞争取代的分子机制研究进展. 植物保护学报, 48(6): 1199–1207.]
- Chang YW, Yan YQ, Hu J, Du YZ, 2024. Characterization of genes encoding heat shock proteins reveals a differential response to temperature in two geographic populations of *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics & Proteomics*, 49: 101156.
- Chang YW, Zhang XX, Chen JY, Lu MX, Gong WR, Du YZ, 2019a. Characterization of three heat shock protein 70 genes from *Liriomyza trifolii* and expression during thermal stress and insect development. *Bulletin of Entomological Research*, 109(2): 150–159.
- Chang YW, Zhang XX, Lu MX, Du YZ, Zhu-Salzman K, 2019b. Molecular cloning and characterization of small heat shock protein genes in the invasive leaf miner fly, *Liriomyza trifolii*. *Genes*, 10(10): 775.
- Chang YW, Wang YC, Zhang XX, Iqbal J, Lu MX, Gong HX, Du YZ, 2020. Comparative transcriptome analysis of three invasive leafminer flies provides insights into interspecific competition. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165(Pt B): 1664–1674.
- Chen B, Kang L, 2002. Cold hardiness and supercooling capacity in the pea leafminer *Liriomyza huidobrensis*. *Cryo Letters*, 23(3): 173–182.
- Chen B, Kang L, 2005. Can greenhouses eliminate the development of cold resistance of the leafminers? *Oecologia*, 144(2): 187–195.
- Chen JY, Chang YW, Tang XT, Zheng SZ, Du YZ, 2019. Population genetics of *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) and comparison with four *Liriomyza* species in China based on *COI*, *EF-1a* and microsatellites loci. *Scientific Reports*, 9(1): 17856.
- Duvaud S, Gabella C, Lisacek F, Stockinger H, Ioannidis V, Durinx C, 2021. Expasy, the swiss bioinformatics resource portal, as designed by its users. *Nucleic Acids Research*, 49(W1): W216–W227.
- Feder ME, Hofmann GE, 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology*, 61: 243–282.
- Gao YL, Reitz S, Xing ZL, Ferguson S, Lei ZR, 2017. A decade of leafminer invasion in China: Lessons learned. *Pest Management Science*, 73(9): 1775–1779.
- Gu XY, Zhao Y, Su Y, Wu JJ, Wang ZY, Hu JT, Liu LJ, Zhao ZH, Hoffmann AA, Chen B, Li ZH, 2019. A transcriptional and functional analysis of heat hardening in two invasive fruit fly species, *Bactrocera dorsalis* and *Bactrocera correcta*. *Evolutionary Applications*, 12(6): 1147–1163.
- Guerra D, Loeschcke V, Cavicchi S, 2004. Chromosomal and cytoplasmic analysis of heat shock resistance in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Hereditas*, 132(2): 143–149.
- Hoffmann AA, 2010. Physiological climatic limits in *Drosophila*: Patterns and implications. *The Journal of Experimental Biology*, 213(6): 870–880.
- 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.
- Iqbal J, Zhang XX, Chang YW, Du YZ, 2021. Differential response of leafminer flies *Liriomyza trifolii* (Burgess) and *Liriomyza sativae* (Blanchard) to rapid cold hardening. *Insects*, 12(11): 1041.
- Kang L, Chen B, Wei JN, Liu TX, 2009. Roles of thermal adaptation and chemical ecology in *Liriomyza* distribution and control. *Annual Review of Entomology*, 54: 127–145.
- Kellermann V, Overgaard J, Hoffmann AA, Fløjgaard C, Svenning JC, Loeschcke V, 2012. Upper thermal limits of *Drosophila* are linked to species distributions and strongly constrained phylogenetically. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(40): 16228–16233.
- Lei ZR, Yao JM, Zhu CJ, Wang HH, 2007. Prediction of suitable areas for *Liriomyza trifolii* (Burgess) in China. *Plant Protection*, 33(5): 100–103. [雷仲仁, 姚君明, 朱灿健, 王海鸿, 2007. 三叶斑潜蝇在中国的适生区预测. 植物保护, 33(5): 100–103.]
- Lindquist S, 1986. The heat-shock response. *Annual Review of Biochemistry*, 55: 1151–1191.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻[Delta Delta C(T)] method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Lu MX, Xu J, Du YZ, 2015. Progress in research on insect small heat shock proteins. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 52(6): 1326–1332. [陆明星, 徐静, 杜予州, 2015. 昆虫小分子量热激蛋白的研究进展. 应用昆虫学报, 52(6): 1326–1332.]
- Lü ZX, Yu XP, Chen JM, Zheng XS, Tang J, 2000. Tolerance of various geographic populations of brown planthopper to adverse environmental stresses. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 11(5): 745–748. [吕仲贤, 俞晓平, 陈建明, 郑许松, 唐健, 2000. 不同地理种群褐飞虱的抗逆性. 应用生态学报, 11(5): 745–748.]
- Michels AA, Kanon B, Bensaude O, Kampinga HH, 1999. Heat shock protein (Hsp) 40 mutants inhibit Hsp70 in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, 274(51): 36757–36763.
- Sinclair BJ, Coello Alvarado LE, Ferguson LV, 2015. An invitation to measure insect cold tolerance: Methods, approaches, and workflow. *Journal of Thermal Biology*, 53: 180–197.
- Sørensen JG, Kristensen TN, Loeschcke V, 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters*, 6(11): 1025–1037.
- Spencer KA, 1973. Agromyzidae (Diptera) of Economic Importance. London: Pitman Press. 219–225.
- Taylor F, 1981. Ecology and evolution of physiological time in insects. *The American Naturalist*, 117(1): 1–23.
- Tian ZQ, Chen GM, Zhang Y, Ma C, Tian ZY, Gao XY, Chen HS, Guo JY, Zhou ZS, 2022. Rapid evolution of *Ophraella communa* cold tolerance in new low-temperature environments. *Journal of Pest Science*, 95(3): 1233–1244.
- Wan FH, Yang NW, 2016. Invasion and management of agricultural alien insects in China. *Annual Review of Entomology*, 61: 77–98.
- Wang HH, Reitz SR, Xiang JC, Smagghe G, Lei ZR, 2014. Does temperature-mediated reproductive success drive the direction of species displacement in two invasive species of leafminer fly? *PLoS ONE*, 9(6): e98761.
- Wang XH, Kang L, 2005. Differences in egg thermotolerance between tropical and temperate populations of the migratory locust *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acridiidae). *Journal of Insect Physiology*, 51(11): 1277–1285.
- Wang XJ, Huang DC, Li HM, Xue DY, Zhang RZ, Chen XL, 2006. Invasion and identification of *Liriomyza trifolii* and its potential distribution areas in China. *Chinese Bulletin of Entomology*, 43(4): 540–545. [汪兴鉴, 黄顶成, 李红梅, 薛大勇, 张润志, 陈小琳, 2006. 三叶草斑潜蝇的入侵、鉴定及在中国适生区分析. 昆虫知识, 43(4): 540–545.]
- Xie J, Peng GF, Hu XX, Gu SS, Bi JX, Wei LT, Tang J, Song XW, Feng F, Li B, 2020. Functional analysis of a novel orthologous small heat shock protein (shsp) hsp21.8a and seven species-specific shsps in *Tribolium castaneum*. *Genomics*, 112(6): 4474–4485.
- Zhang QK, Wu SY, Wang HH, Xing ZL, Lei ZR, 2022. Overwintering, cold tolerance and supercooling capacity comparison between *Liriomyza sativae* and *L. trifolii*, two invasive leafminers in China. *Journal of Pest Science*, 95(2): 881–888.
- Zhang QK, Xing ZL, Wu SY, Xu RR, Lei ZR, 2021. Response of *Liriomyza trifolii* to cold acclimation and differences of cold tolerance among different populations. *Scientia Agricultura Sinica*, 54(13): 2781–2788. [张起恺, 邢振龙, 吴圣勇, 徐瑞瑞, 雷仲仁, 2021. 三叶斑潜蝇对冷驯化的响应及不同种群耐寒性差异. 中国农业科学, 54(13): 2781–2788.]
- Zhao MT, 2017. Phenotypic ecological performance and transcriptome analyses of the two geographic populations of *Agasicles hygrophila* in response to heat stresses. Doctor dissertation. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. [赵梅婷, 2017. 不同地理种群莲草直胸跳甲响应高温的生态学表现及转录组分析. 博士学位论文. 北京: 中国农业科学院.]
- Zhou ZS, Guo JY, Michaud JP, Li M, Wan FH, 2011. Variation in cold hardiness among geographic populations of the ragweed beetle, *Ophraella communa* LeSage (Coleoptera: Chrysomelidae), a biological control agent of *Ambrosia artemisiifolia* L. (Asterales: Asteraceae), in China. *Biological Invasions*, 13(3): 659–667.