

粘虫 *hsc70* 克隆及其密度胁迫下的表达模式*

李鸿波** 戴长庚 张昌容 何永福***

(贵州省农业科学院植物保护研究所, 贵阳 550006)

摘要 【目的】昆虫种群密度的升高往往成为一种胁迫因子。粘虫在低密度下形成散居型,而在高密度下则形成群居型。本研究通过比较 *hsc70* 在两型粘虫中的表达模式,究旨在探索 *hsc70* 在粘虫 *Mythimna separata* 响应密度胁迫中的作用。【方法】采用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆粘虫 *hsc70* cDNA 全长序列,利用生物信息学软件分析该基因及其编码蛋白质的序列特性;运用实时荧光定量 PCR 技术(qRT-PCR)分析该基因在两型粘虫不同发育阶段(卵、1-6 龄幼虫、蛹和成虫)、5 龄幼虫不同组织(头、表皮、前肠、中肠、后肠和马氏管)以及群居和分离处理后 mRNA 表达量的变化。【结果】克隆得到的 *HSC70* 基因命名为 *Mshsc70*(GenBank 登录号:MH669276),全长 cDNA 长 2 184 bp,开放阅读框为 1 965 bp,编码 653 个氨基酸。序列分析发现 MsHSC70 具有 HSP70 家族典型的结构域,即 IDLGTTYS (11-18 aa),IFDLGGGTFDVSLL (198-211 aa)和 IVLVGGSTRIPKVQQ (341-355 aa)。序列比对结果显示,MsHSC70 与斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*,棉铃虫 *Helicoverpa armigera*,大螟 *Sesamia inferens*、甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* HSC70 的相似性高达 99%;基于 HSC70 的系统发育分析显示,粘虫与夜蛾科(Noctuidae)昆虫的亲缘关系最近。*Mshsc70* 在两型粘虫的各个发育阶段均表达,*hsc70* 的表达量在 1 龄和 5 龄中的表达量较散居型显著上调,而在 2-3 龄中的表达量显著下调。除表皮和前肠外,群居型粘虫的其他组织中 *hsc70* 的表达量显著高于散居型。散居型粘虫经群聚饲养 36 h 后,*hsc70* 显著上调表达,表达量是对照的 3.17 倍,而群居型粘虫经分离饲养 36 h 后,*hsc70* 的表达量与对照无显著差异。【结论】粘虫的种群密度是决定粘虫 *hsc70* 表达的一个重要因子。

关键词 粘虫, *Mshsc70*, 种群密度, 实时荧光定量 PCR

Cloning of *hsc70* and its expression in response to crowding in the oriental armyworm, *Mythimna separata* (Lepidoptera: Noctuidae)

LI Hong-Bo** DAI Chang-Geng ZHANG Chang-Rong HE Yong-Fu***

(Institute of Plant Protection, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550006, China)

Abstract [Objectives] High population density causes stress to insect populations. *Mythimna separata* has solitary and gregarious phases that occur at low and high population densities, respectively. This study aims to explore the role of *hsc70* under crowding stress by comparing the expression profiles of *hsc70* in the two phases of the *M. separata*. [Methods] The complete cDNA sequence of *hsc70* was cloned by RT-PCR and RACE. Bioinformatics programs were used to analyze the sequence characteristics of the gene and its amino acid sequences. The expression levels of *hsc70* in different developmental stages (egg, 1st-6th instar larva, pupa and adult) and tissues of 5th instar larvae (head, epidermis, fore-gut, mid-gut, hindgut and Malpighian tubules) from different phases (solitary and gregarious) were detected by Quantitative Real-time PCR(qRT-PCR). [Results] The complete cDNA of *hsc70* obtained from *M. separata* (named as *Mshsc70*) was 2 184 bp in length (GenBank accession no.: MH669276), including a 1 965 bp opening reading frame (ORF) encoding 653 amino acids. Sequence analysis

*资助项目 Supported projects: 公益性(农业)科研专项(201403031); 贵州省自然科学基金(黔科合 J 字[2014]2121); 国家自然科学基金(31601633); 贵州省农科院博士启动项目(201301); 企业服务行动计划(黔 2015-4012)

**第一作者 First author, E-mail: gzlhb2017@126.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: heyongfu08@163.com

收稿日期 Received: 2018-08-25, 接受日期 Accepted: 2018-09-21

indicates that MsHSC70 has typical motifs of the HSP70 family, including IDLGTTYS (11-18 aa), IFDLGGGTFDVSLL (198-211 aa) and IVLVGGGSTRIPKVQQ (341-355 aa). Phylogenetic analysis indicates that HSC70s from Noctuid moths could be assigned to one well-supported cluster. *Mshsc70* was expressed in all developmental stages of both phases, its expression in 1st and 5th instar larvae of gregarious individuals was significantly up-regulated compared to solitary individuals, whereas its expression in 2nd and 3rd instar larvae was obviously down-regulated. The differential expression of *hsc70* in different tissues was higher in gregarious than in solitary individuals, except in the epidermis and foregut. *hsc70* transcripts were significantly up-regulated (3.17 times of that the control) in solitary *M. separata* larvae after these were kept in crowded conditions for 36 h, but transcript abundance did not change in gregarious larvae that were kept isolated for 36 h. [Conclusion] Population density may be an important factor determining *hsc70* expression in *M. separata*

Key words *Mythimna separata*, *Mshsc70*, population density, quantitative real-time PCR

热激蛋白 (Heat shock proteins, HSPs) 又称热休克蛋白, 是生物体受多种胁迫因子刺激后新合成的一类遗传上高度保守的蛋白质, 广泛存在于真核和原核生物中 (Kregel, 2002; 王海鸿和雷仲仁, 2005)。其主要生物学功能是作为分子伴侣参与各种生理代谢途径 (Gething and Sambrook, 1992), 增强生物体的抗逆性 (Clegg *et al.*, 1998) 和调控细胞骨架动力学 (王海鸿和雷仲仁, 2005)。按照其分子量 HSPs 可以划分为 5 个家族, 包括 HSP110, HSP90, HSP70, HSP60 和小分子 HSPs (Denlinger *et al.*, 2001)。其中, HSP70 家族最保守, 家族成员最多, 同时也是研究最为深入的一个家族。根据其在生物体内的表达特性, HSP70 家族又分为两类, 即诱导型 HSP70 和组成型 HSP70 (HSC70)。HSP70 受到外界胁迫刺激后会迅速上调表达, 当胁迫条件消除后其表达水平又迅速下调到正常水平; HSC70 在生物体内都表达, 不能被外界胁迫刺激大量诱导表达。最近的一些研究发现一些生物体内的 HSC70 也能被诱导表达 (韩岚岚等, 2014; 徐凯等, 2017), 因而又把这一类 HSP70 称为中间型 (Søensen, 2010)。此外, 区分 HSC70 和 HSP70 的另一个标准则是 HSP70 对应的基因组不含内含子, 而 HSC70 则含有 1 到多个内含子 (Castillo-Davis *et al.*, 2002; Qin *et al.*, 2003)。

粘虫 *Mythimna separata* 是一种典型的迁飞性害虫, 近年来在我国北方玉米上经常暴发, 对我国玉米安全生产造成了严重的威胁 (张云慧等, 2012; 姜玉英, 2014)。该害虫的典型特征是根据幼虫种群密度而发生型变, 即在高密度下

形成群居型, 而在低密度下形成散居型。两型粘虫在体色、形态、生长发育、抗病性等 (罗礼智等, 1993; Wilson *et al.*, 2001; 白毓昕, 2010) 方面具有明显差异, 这为我们研究种群密度是否作为一种胁迫因子影响生物的生理过程提供了一个理想的模型。尽管 HSPs 作为一种胁迫响应蛋白有大量的报道, 但这些研究主要集中在 HSPs 对生物生长发育的调控和对非生物胁迫因子的响应方面, 而对 HSPs 在生物胁迫因子如种群密度响应的相关研究还比较少 (Wang *et al.*, 2007)。为此, 本研究从粘虫中克隆了一个 HSC70 基因 (*hsc70*), 分析了其在两型粘虫不同发育时期, 不同组织和不同种群密度诱导处理后其 mRNA 的表达模式。通过该项研究试图回答: 1) *hsc70* 是否在两型粘虫中的表达水平存在差异; 2) 如有表达差异, 发生在两型粘虫的那些发育时期和组织 (器官), 差异有多大; 3) 这些差异在粘虫成灾过程中有何生态学意义。

1 材料与方法

1.1 供试虫源及试剂

供试虫源: 实验中所用粘虫于 2014 年采自贵州省黔西县素朴镇 (27°01'39.72"N, 106°20'2.92"E), 带回室内后在光周期为 16L:8D、温度为 24-25、湿度为 70%-80% 的条件下饲养将同一时间孵化的 40 头 1 龄幼虫集中饲养在 1 050 mL 塑料盒中, 定期检查幼虫数, 发现有死亡情况就立即补充, 以保持密度的持续性, 经过连续 3 代以上的饲养而获得群居型粘虫; 同时,

将同一时间孵化的 1 龄幼虫单头饲养于 250 mL 的塑料养虫盒中, 经过连续 3 代以上的饲养而获得散居型粘虫。两型粘虫具体饲养方法为: 1 龄幼虫孵化后, 利用新鲜的玉米叶饲养于上述条件下, 定期更换叶片, 幼虫老熟取食停止后, 提供湿度为 10%-20% 的抽纸供其化蛹。羽化成虫进行配对后置于养虫笼内, 提供折叠的 A4 纸供其产卵, 同时提供 10%-20% (w/v) 蜂蜜水补充营养。

供试试剂: 总 RNA 提取试剂盒 (型号: Z3100) 和 PGEM-Teasy 载体购自 Promega 公司; 胶回收试剂盒购自 Omega 公司; RACE 试剂盒、*Taq* 酶, DL2000 marker 和 DH5 α 均购自 TaKaRa 公司; cDNA 第一链反转录试剂盒购自 Thermo fisher 公司, 荧光定量试剂盒购自 Bio-RAD 公司。所有引物由上海生物工程有限公司合成。

1.2 样品的处理和收集

两型粘虫不同发育阶段样品包括卵、1-6 龄幼虫、蛹和成虫。其中卵约为 100 粒, 1 龄幼虫 20 头; 2 龄幼虫为 10 头, 3-6 龄幼虫、蛹和成虫各 3 头作为一个重复; 粘虫不同组织样品取自 5 龄幼虫, 包括头部、表皮、前肠、中肠、后肠和马氏管。从 3 头 5 龄幼虫解剖而得的各组织作为一个重复。

一个重复。

群聚处理: 将 40 头散居型 5 龄幼虫集中饲养于 1 050 mL 的塑料养虫盒内 36 h, 以同时期单头饲养的散居型粘虫为对照。

分离处理: 将 40 头群居型 5 龄幼虫单头饲养于 250 mL 的塑料养虫盒 36 h, 以同时期群体饲养的群居型粘虫为对照。

以上样品收集完成后用液氮速冻, 存于 -80 °C 下用于总 RNA 的提取。每处理重复 3 次。

1.3 总 RNA 提取及 cDNA 第 1 链合成

总 RNA 的提取按照 SV Total RNA isolation Kit 提供的方法进行。利用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 采用核算蛋白测定仪检测 RNA 的浓度和纯度, 存于 -80 °C 备用。cDNA 第 1 链的合成采用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 进行。以 1 μ g 的总 RNA 为模板, 利用反转录酶和 oligo dT 引物合成第 1 链, 存于 -20 °C 下备用。

1.4 粘虫 *hsc70* 中间片段的克隆

根据已报道的粘虫近缘种 *hsc70* 保守区域设计一对简并引物 (表 1), 以 1.3 节中反转录 cDNA

表 1 实验中所用的引物
Table 1 Primers used in the experiments

| 引物 Primers | 方向 Direction | 引物序列 (5'-3') Primer sequences | 产物大小 (bp) Product size | 退火温度 (°C) Annealing temperature | 引物用途 Usage of primers |
|-----------------|-----------------|----------------------------------|---------------------------|------------------------------------|--|
| <i>DP-hsc70</i> | F | GGTACCATCTCBGGCYTGAA | 1 048 | | 中间片段扩增 Amplification of the intermediate fragment |
| | R | CCYTTGTCGTTGGTRATGG | | | |
| <i>hsc70-5</i> | R | CTTGGTGGGGATGGTGGTGTTC | 1 376 | 68 | 5'末端扩增 5' RACE |
| <i>hsc70-3</i> | F | CCATCAACCCCGACGAGGCTGTA | 992 | 68 | 3'末端扩增 3' RACE |
| <i>hsc70-SP</i> | F | GTCAACGACTGAGATAGTT | 2 063 | | 全长验证 Full-length verification |
| | R | GTACTGTAGTTGAATACTGC | | | |
| <i>hsc70</i> | F | ACGGTTCAGCGTACTTCAAT | 79 | 54.3 | 实时荧光定量 PCR Real-time PCR |
| | R | GGAGAACGTTCAAGCCAGAGA | | | |
| <i>actin</i> | F | AACTTCCCACGGTCAAGTCAT | 168 | 60 | |
| | R | TGTTGGCGTACAAGTCCTTACG | | | |
| <i>tub</i> | F | CGGTAATGCCTGCTGGGAA | 118 | 54.3 | |
| | R | CTCGCTGAAGAAGGTGTTGAA | | | |

为模板,采用 *rTaq* 酶进行 RT-PCR 扩增,反应体系:10×*ExTaq* Buffer 2.5 μL, dNTPs(2.5 mmol/L) 2 μL, 上下游引物(10 mmol/L)各 1 μL, *Taq* 酶 0.125 μL, ddH₂O 17.375 μL。PCR 参数:94 3 min, 94 30 s, 65-45 30 s(每个循环降温 1), 72 30 s, 共 19 个循环;之后 94 30 s, 45 30 s, 72 1 min, 共 25 个循环;最后在 72 下延伸 10 min。PCR 产物采用 1.5%的琼脂糖凝胶进行电泳,而后对目标产物进行回收纯化。将回收产物连接至 pGEM-T easy 载体上进行 TA 克隆,转化到感受态细胞中。然后进行经蓝白斑筛选,挑取白斑扩大培养,经菌液 PCR 鉴定为阳性后,送上海生物工程股份有限公司测序。

1.5 粘虫 *hsc70* 末端序列的 RACE 扩增

根据获得的 *hsc70* 中间片段信息,设计特异性引物 *hsc70-5* 和 *hsc70-3*(表 1),以 SMARTER RACE 5'/3' Kit 合成的 cDNA 为模板,分别进行 5'和 3'扩增。PCR 参数:94 3 min;94 30 s, 68 30 s, 72 3 min, 共 35 个循环;最后 72 下延伸 10 min。PCR 产物回收纯化后,按照上述 1.4 节的方法进行克隆测序。

1.6 粘虫 *hsc70* 的表达谱分析

不同处理样品的总 RNA 提取按照 1.3 节中的方法进行,并采用 iScriptcDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) 进行 RNA 的反转录,于 -20 下保存备用。实时荧光定量 PCR 的体系:SsoAdvanced™ Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) 10 μL, 上下游引物各 1 μL(表 1),模板 cDNA 1 μL, ddH₂O 7 μL。PCR 反应参数:95 预变性 3 min;95 变性 15 s,退火温度下 30 s,共 35 个循环;反应结束后,制作溶解曲线判定引物的特异性。反应中以 ddH₂O 作为阴性对照,以 *Actin* 分别作为不同发育阶段,以 *TUB* 作为不同组织和密度胁迫处理的内参基因对数据进行校正(Li *et al.*, 2018)(表 1)。每个处理包含 3 个生物学重复,每个生物学重复包含 3 个技术重复。

1.7 数据分析

利用 Contig express 软件对获得的 *hsc70* 片

段进行拼接,以获得全长 cDNA 序列。采用 ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)鉴定粘虫 *hsc70* 的开放阅读框;采用 ExPASy (<http://www.expasy.org/>) 鉴定等电点和蛋白质分子量及蛋白结构域;采用 Mega5.0,基于邻接法构建 *hsc70* 的进化树,各分支重复检验次数均为 1 000 次。

采用 $2^{-\Delta\Delta t}$ 法计算粘虫 *hsc70* mRNA 的表达量,之后采用 One-Way ANOVA 进行不同处理间的差异显著性分析,并采用 HSD 法进行多重比较分析。所有统计过程在 DPS 软件(Tang and Zhang, 2013)中完成。

2 结果与分析

2.1 粘虫 *hsc70* 的克隆与序列分析

将测序获得的 1 048 bp 基因片段在 NCBI 中进行 Blast 分析,结果显示该基因为 *HSC70* 家族基因。根据该基因序列,分别在 5'和 3'端设计 1 条特异性引物(表 1),以粘虫的 5'和 3' cDNA 为模板,经 RT-PCR 扩增后分别获得了约 1 376 bp 和 992 bp 的条带。经测序后与中间片段进行拼接,获得了粘虫 *HSC70* 基因的全长 cDNA 序列,并命名为 *Mshsc70*(图 1)。该基因 cDNA 全长 2 184 bp(GenBank 登录号:MH669276),包含一个 104 bp 的 5'-UTR,一个 117 bp 的 3'-UTR 和一个 1 962 bp 开放阅读框。该开放阅读框编码 653 个氨基酸,编码蛋白的分子量为 71.48 ku,等电点为 5.28。采用 Prosite scan 分析发现,MsHSC70 具有 HSP70 家族典型的结构域,即 IDLGTTYS(11-18 aa),IFDLGGGTFDVSLL(198-211 aa)和 IVLVGGSTRIPKVQQ(341-355 aa)。同时还发现一个 ATP-GDA 结合位点 AEAYLGKT(132-139 aa)和一个非细胞器结构域 RARFEEL(300-306 aa)。此外,在该氨基酸序列 N-端发现一个 GGKP(99-102 aa)的四肽序列,可判定该蛋白属于组成型 HSC70 家族;在 C-端也发现了 HSP70 保守的结构域 EEVD,说明 *Mshsc70* 定位于细胞质内。

```

1 ATGGGGATTTTTTCGTGAAACGAAGCCGTCAATCGCGCACCTTTGCTGAGTTACTCTACGAGTTAAGTCAACGACTGAGATAGTTATACA
91 TAAAAATATTAATAAATGGCAGCAAAAAGCACCCGCTGTAGGTATTGATTTGGGTACCACCTACTCATGCGTGGGAGTATTCCAGCATGGCA
1 M A A K A P A V G I D L G T T Y S C V G V F Q H G
181 AGGTGGAGATCATCGCCAACGACCAGGGCAACAGGACCACGCCCTCATATGTCGCCTTCCCGACACAGAGCGTCTCATCGGAGATGCCG
26 K V E I I A N D Q G N R T T P S Y V A F T D T E R L I G D A
271 CCAAGAACCAGGTGGCGATGAACCCTAACACACAATTTTCATGCCAAACGCTCATCGGACGCAAATTCGAAGATGCCACCGTACAAG
56 A K N Q V A M N P N N T I F D A K R L I G R K F E D A T V Q
361 CCGACATGAAGCACTGGCCCTTCGAGGTAGTCAGTGACGGTGGCAAACCAAGATCAAGGTCTCATAAAGGAGAAGACAAAACCTTCT
86 A D M K H W P F E V V S D G G K P K I K V S Y K G E D K T F
451 TCCCTGAGGAAGTTAGTCTATGGTGTACAAAAATGAAGGAAACGGCCGAGGCTACCTCGGCAAAACGGTGCAGAATGCAGTTATTA
116 F P E E V S S M V L T K M K E T A E A Y L G K T V Q N A V I
541 CGGTTCCAGCGTACTTCAATGACTCACAGAGCAAGCCACAAAAGATGCGGGTACCATCTCTGGCTTGAACGTTCTCCGTATCATCAATG
146 T V P A Y F N D S Q R Q A T K D A G T I S G L N V L R I I N
631 AACCGACTGCTGCTGCGATTGCGTACGGCCTTGACAAGAAGGGGAGTGAGAACGTAACGTTTTGATTTTCGATCTCGGCGCGGTACCT
176 E P T A A A I A Y G L D K K G S G E R N V L I F D L G G G T
721 TCGACGTGCCATCTGACCATCGAGGATGGTATCTTCAAGTAAAGTCCACCGTGGTACACGCATTGGGAGGAGAGGACTTCGACA
206 F D V S I L T I E D G I F E V K S T A G D T H L G G E D F D
811 ACCGAATGGTGAACCACTTTGTGACGAGTTAAGAGGAAGTACAAGAAGGACCTCGCCACCAACAAGAGGGCCCTTCGACGATTGCGCA
236 N R M V N H F V Q E F K R K Y K K D L A T N K R A L R R L R
901 CGGCTTGCAGAAAGGGCGAAGAGAACTCTCTCTCGTCCACCCAGGCTAGCATTGAAATCGACTCTCTGTTGAGGGTATCGACTCTACA
266 T A C E R A K R T L S S S T Q A S I E I D S L F E G I D F Y
991 CATCCATCACTAGGCTCGTTTCGAGGAGCTGAACGCTGACCTGTTACAGATCCACCATGGAGCCCGTGGAGAAGTCCCTTCGTGACCGGA
296 T S I T R A R F E E L N A D L F R S T M E P V E K S L R D A
1081 AGATGGACAAGTCTCAAATCCAGCATCGTACTGTAGGTGGTTCCACTCGTATCCCCAAAGTGCAGAAGCTCCTCAAGACTTCTTCA
326 K M D K S Q I H D I V L V G G S T R I P K V Q K L L Q D F F
1171 ACGGCAAGGAGCTTAACAAATCCATCAACCCCGACGAGGCTGTAGCTTACGGTGGCGCGTCCAGGCCGCATCTTGCATGGCGACAAGT
356 N G K E L N K S I N P D E A V A Y G A A V Q A A I L H G D K
1261 CTGAGGAGTCCAGGATCTGCTGCTGCTCGACGTCACCCACTGTCTCTCGGTATTGAAACCGTGGCGGTGTCATGACCACCCCTCATCA
386 S E E V Q D L L L L D V T P L S L G I E T A G G V M T T L I
1351 AGCGAACACCACATCCCCACCAAGCAGACCCAGACGTTACCCACATACTCGGACAACCAGCCTGGAGTACTCATCCAGGTGTTCCAGG
416 K R N T T I P T K Q T Q T F T T Y S D N Q P G V L I Q V F E
1441 GCGAGCGCGCATGACCAAGGATAACAATCTACTCGAAAGTTCGAGCTTACCGGTATCCCTCCCGCGCCCGTGGCGTCCCCAGATCG
446 G E R A M T K D N N L L G K F E L T G I P P A P R G V P Q I
1531 AAGTCACTTCGATATCGACGCTAACGGCATTCTCAACGTGTCTGCCGTCGAGAAGTCGACCAACAAGGAGAACAAGATCACCATCACCA
476 E V T F D I D A N G I L N V S A V E K S T N K E N K I T I T
1621 ACGACAAGGGCGCTTTTCCAAGGAGGATCGAGCGCATGGTCAACGAGGCGGAGAAATACAGGACTGAAGACGAGAAGCAGAAGGAGA
506 N D K G R L S K E E I E R M V N E A E K Y R T E D E K Q K E
1711 CCATCCAGGTAAGAACGCCCTGGAGTCTTACTGCTTCAACATGAAGTCCACCATGGAGGACGAGAAGCTCAAGGACAAGATCTCAGACT
536 T I Q A K N A L E S Y C F N M K S T M E D E K L K D K I S D
1801 CTGACAAGCAGATCATCTGGACAAGTGCAACGACCATCAAAATGGCTGGATTCCAATCAGTGGCTGACAAGGAAGAATACGAGCCCA
566 S D K Q I I L D K C N D T I K W L D S N Q L A D K E E Y E P
1891 AGCAGAAGGAACTGGAAGGCATTTGCAACCCGATCATCAACAGATGACCAGGAGCAGGAGCATGCCCGTGGTATGCCCCGAGGCA
596 K Q K E L E G I C N P I I T K M Y Q G A G G M P G G M P G G
1981 TGCCCGGCTTCCCCGGCGCGCTCCCGCGCGCGCGCGCAGCCCCGGTGGCGGTGCCGACCTACCATCGAGGAGGTGACTAAACAT
626 M P G F P G G A P G A G G A A P G G G A G P T I E E V D ★
2071 TCCAACAGATTACAGCAAGCTTTTACCTACTTTGATATTGCAGTATTCAACTACAGTACAGTGTCTCCAATAAATAATTGAAACAAAAA
2161 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2184

```

图 1 粘虫 *Mshsc70* 的核苷酸及推导的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Mshsc70* in *Mythimna separata*

图中 HSP70 家族典型标签基序 IDLGGTYS (11-18 aa), IFDLGGGTFDVSLL (198-211 aa), IVLVGGSTRIPKVQQ (341-355 aa) 和 EEVD(650-653 aa)用黄色标记。ATP-GDA 结合位点 AEAYLGKT (132-139 aa) 和非细胞器结构域 RARFEEL (300-306 aa) 用长方形方框标出。

The typical features of the HSP70 family, including IDLGGTYS (11-18 aa), IFDLGGGTFDVSLL (198-211 aa), IVLVGGSTRIPKVQQ (341-355 aa) and EEVD(650-653 aa) are marked by yellow. A putative ATP-GDA binding site AEAYLGKK(P) (132-139 aa) and a non-organelle consensus motif RARFEEL (300-306 aa) are indicated by black rectangles.

2.2 MsHSC70 序列比对和进化分析

将粘虫的 HSC70 与其他鳞翅目的 HSC70 进行比对分析发现鳞翅目昆虫 HSC70 十分保守。其中与斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*，棉铃虫 *Helicoverpa armigera*，大螟 *Sesamia inferens*、甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* HSC70 的相似性高达 99%。为研究粘虫与其他物种之间的进化关

系，基于 HSC70 的氨基酸序列构建了鳞翅目昆虫的系统进化树。结果发现粘虫与夜蛾科昆虫聚在一起，其中与甘蓝夜蛾亲缘关系最近，其次为斜纹夜蛾、甜菜夜蛾和草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda*，这与基于形态学的亲缘关系结果基本一致，说明本研究克隆的 MsHSC70 属于 HSC70 家族的一员(图 2)。

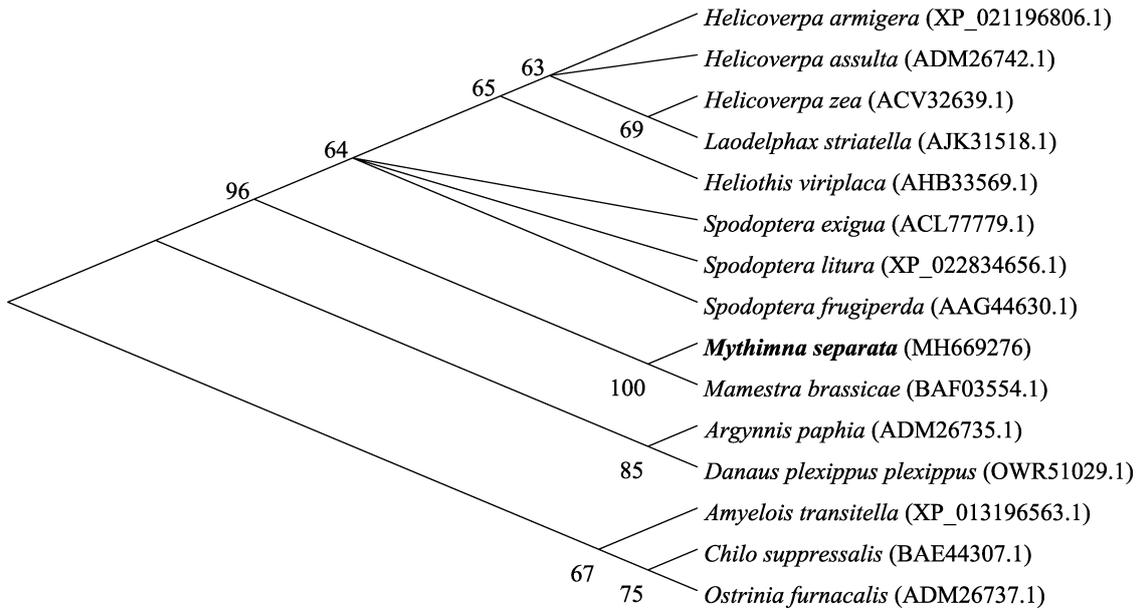


图 2 基于 HSC70 氨基酸序列构建的粘虫与其他昆虫的进化树 (邻接法)
 Fig. 2 Phylogenetic tree based on amino acid sequences of HSC70 from *Mythimna separata* and other insect species (Neighbor-Joining method)

图中进化树节点数字代表自展 1 000 次重复检验百分比值，且图中只显示大于 50% 的自展检验百分比。

The test of phylogeny is carried out using a bootstrap analysis of 1 000 replications, and only the bootstrap value above 50% are shown on each node of the tree.

2.3 Mshsc70 在密度胁迫下的表达谱分析

由图 3 (A) 可知，*Mshsc70* 在两型粘虫各发育阶段均有表达，其中 *Mshsc70* 在群居型 2 龄幼虫的表达水平最高，而在散居型 3 龄幼虫中表达最高。*t*-test 分析发现，群居型 2 龄，5 龄粘虫的 *Mshsc70* 表达量显著高于散居型 (1 龄： $t=18.21, P=0.0001$ ；5 龄： $t=3.28, P=0.038$)，表达量分别是散居型粘虫的 6.08 倍和 2.07 倍，散居型 2 龄和 3 龄粘虫体内的 *hsc70* 显著高于群居型 (2 龄： $t=18.21, P=0.001$ ；3 龄： $t=5.84, P=0.004$)，表达量分别是群居型的 3.25 倍和 1.82 倍，而两性粘虫卵、4 龄、6 龄、蛹和成虫体内 *Mshsc70*

的表达量无显著差异。不同组织的表达谱分析结果表明：*Mshsc70* 在两型粘虫在各组织均表达，其中 *Mshsc70* 在群居型粘虫的头部、中肠、后肠和马氏管中的表达量显著高于散居型 (头部： $t=5.75, P=0.004$ ；中肠： $t=3.05, P=0.038$ ；后肠： $t=5.02, P=0.007$ ；马氏管： $t=11.76, P=0.0003$)，其表达量分别是散居型的 3.76 倍，1.65 倍，2.19 倍和 2.48 倍，而 *Mshsc70* 在表皮和前肠中的表达量无显著差异 (表皮： $t=1.86, P=0.138$ ；前肠： $t=1.06, P=0.364$) (图 3：B)。

群聚和分离实验结果表明：散居型粘虫经群聚饲养 36 h 后 *Mshsc70* 显著上调表达，其表达

量是对照的 3.17 倍 ($t=5.71$, $P=0.005$)。然而, 群居型粘虫分离饲养 36 h 后, 其表达水平与对照无显著差异($t=0.14$, $P=0.894$) (图 4)。

3 讨论

本研究克隆得到了粘虫 *hsc70* 的全长 cDNA

序列。序列分析发现 *Mshsc70* 包含 3 个 HSP70 家族典型的标签序列 (IDLGTTYS (11-18 aa), IFDLGGGTFDVSL (198-211 aa) 和 IVLVGG-STRIPKVQQ (341-355 aa)) 和 1 个 C-端的 EEVD 4 肽序列, 说明 *Mshsc70* 属于细胞质 *hsp70* 家族。此外, *Mshsc70* 的 N-端具有一个 GGKP 4 肽结

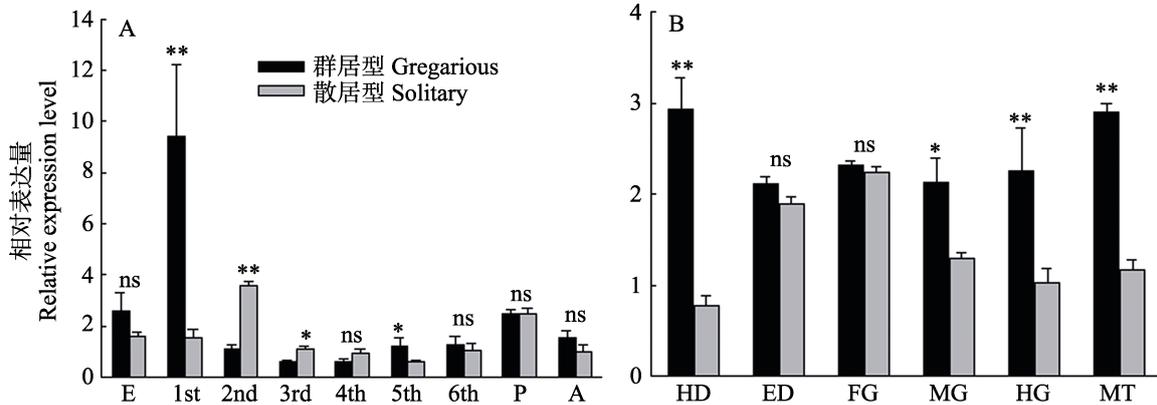


图 3 *Mshsc70* 在两型粘虫不同发育阶段 (A) 和 5 龄幼虫组织 (B) 中的相对表达量
Fig. 3 Relative expression levels of *Mshsc70* in different developmental stages (A) and tissues of the 5th instar larva (B) of two phases of *Mythimna separata*

E: 卵 Egg; 1st-6th: 分别为 1-6 龄幼虫 1st-6th instar larva, respectively; P: 蛹 Pupa; A: 成虫 Adult; HD: 头 Head; ED: 表皮 Epidemics; FG: 前肠 Foregut; MG: 中肠 Midgut; HG: 后肠 Hindgut; MT: 马氏管 Malpighian tubules. 柱上标有*表示经 *t*-test 法检验两处理间差异显著 ($P \leq 0.05$), **表示经 *t*-test 法检验两处理间差异极显著 ($P \leq 0.01$), ns 表示差异不显著。下图同。

Histograms with * indicate significant difference between two phases by *t*-test ($P \leq 0.05$) while with ** indicates extremely significant difference between two phases by *t*-test ($P \leq 0.01$), and ns indicate no significant difference between two phases. The same below.

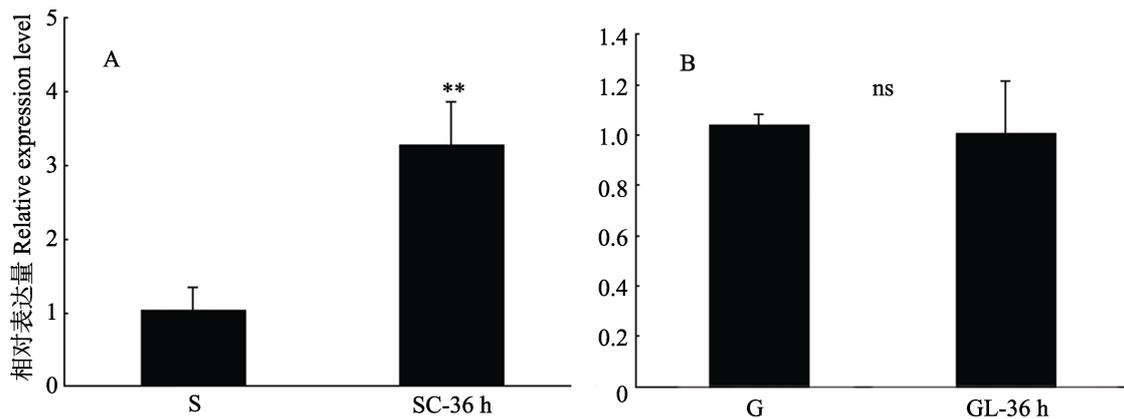


图 4 5 龄幼虫群聚或分离处理 36 h 后 *Mshsc70* 的表达量
Fig. 4 Relative expression levels of *Mshsc70* after being crowded or isolated 36 h

S: 散居型 Solitary; G: 群居型 Gregarious; SC-36 h: 散居型群居饲养 36 h Solitary individuals are crowded for 36 h; GI-36 h: 群居型分离饲养 36 h Gregarious individuals are isolated for 36 h.

A. 散居型 5 龄幼虫群聚 36 h 后 *Mshsc70* 的表达量; B. 表示群居型 5 龄幼虫分离 36 h 后 *Mshsc70* 的表达量。

A. *Mshsc70* expression of solitary *M. separata* larvae subjected to crowding for 36 h;
B. *Mshsc70* expression of gregarious *M. separata* larvae subjected to isolation for 36 h.

构,说明 *Mshsc70* 属于组成型 *hsp70* (Wu *et al.*, 2001)。序列比对发现 MsHSC70 与斜纹夜蛾,棉铃虫,大螟、甘蓝夜蛾 HSC70 的相似性高达 99%,且系统发育分析发现粘虫与夜蛾科昆虫的亲缘关系最近,这些结果进一步证明本研究克隆的 MsHSC70 属于 HSC70 家族的一员。

HSPs 的功能是调控生物的发育,并在胁迫响应中发挥作用。本研究发现,*Mshsc70* 在两型粘虫的整个发育时期都表达,表明该基因在调控粘虫生长发育中具有重要作用。同时,*Mshsc70* 在两型粘虫的卵,1-4 龄的表达模式并未表现出一致的趋势,甚至在散居型 2-3 龄中 *Mshsc70* 的表达水平显著高于群居型。可能是由于在相对较大的空间下,卵和低龄幼虫期由于个体小而降低了个体之间相互接触的机会 (Collett *et al.*, 1998),从而导致种群密度胁迫的压力减少,最终对 *Mshsc70* 的表达的影响可以忽略。随着发育的进行,*Mshsc70* 在群居型 5-6 龄粘虫种的表达水平都有高于散居型粘虫的趋势(尽管 *hsc70* 在两型粘虫 6 龄中的表达水平无显著差异),可能是由于随粘虫的生长发育对能量的需求增加,加剧了高龄粘虫个体之间对食物和空间的竞争,导致在群居型粘虫中产生了更多的胁迫压力 (Pener, 1991),从而诱导 *Mshsc70* 的上调表达。*Mshsc70* 两型粘虫 5 龄幼虫不同组织中的表达模式也验证了这一推测。然而,我们发现 *Mshsc70* 在两型蛹和成虫中的表达水平无显著差异,这可能是由于粘虫化蛹和羽化后个体减小,由种群密度胁迫造成的压力降低所致。

已有的研究表明,延长群聚和分离的时间可改变 HSPs 基因的表达 (Feder and Hofmann, 1999; Wang *et al.*, 2007)。本研究发现,散居型粘虫经群聚饲养 36 h 后,*Mshsc70* 的表达水平显著上调,这与飞蝗的研究结果相一致 (Wang *et al.*, 2007)。最近有研究发现,散居型飞蝗经过多代群体饲养后,其体色、形态特征和 *hsp*s 的表达水平都接近群居型型飞蝗 (Chen *et al.*, 2015),说明在适宜条件下存在散居型飞蝗可以向群居型飞蝗转变的可能。然而,这种现象是否存在粘虫中,诱导条件如何还需进一步研究。此

外,我们发现群居型粘虫经分离饲养 36 h 后,*hsc70* 表达水平较对照并未有显著改变,可能是由于诱导的时间过短或 *Mshsc70* 并不参与这一生理过程导致。

密度依赖的形多型是一种普遍现象,已在直翅目和鳞翅目昆虫中发现 (Wilson and Reeson, 1998; Wilson *et al.*, 2002)。此类昆虫的群居型和散居型除了在体色、形态、生长发育方面存在显著差异外,还存在密度依赖的抗病性现象,即高密度(群居型)条件下饲养的昆虫抵御病原微生物、天敌的能力明显强于低密度(散居型)饲养的个体;对其分子调控机制的研究发现免疫功能增强是昆虫抗病性提高的一个主要原因 (Wilson *et al.*, 2001, 2002; Wang *et al.*, 2013)。除抗病性外,最近的研究还发现随饲养种群密度的增加,昆虫在高温下存活率也得到显著提高;进一步的研究发现其体内的 *hsp*s 也显著上调表达 (Sørensen and Loeschcke, 2001; Henry *et al.*, 2018),表明 *hsp*s 的上调表达与抗逆性增强相关。近年来,在开展粘虫危害调查时发现田间所有大发生灾种群均出现了不同程度的黑化,进一步调查发现这些黑化黏虫的天敌寄生率和病原物侵染率明显下降,且一些常用的真菌、细菌和病毒等生物制剂对其防治效果均不理想,导致近年来其在生产上危害程度加重 (江幸福等, 2014)。我们推测包括 *hsc70* 在内的 *hsp*s 的上调可能是粘虫聚集成灾的一个主要机制。因此,粘虫的治理策略应当以监测预警为主,加强对粘虫低龄幼虫的防治,避免因粘虫群聚导致抗逆性增强,从而影响防治效果。

参考文献 (References)

- Bai YY, 2010. Effects of larval density on growth, development and defense capabilities of oriental armyworm, *Mythimna separata*. Master's dissertation. Wuhan: Huazhong Agricultural University. [白毓昕, 2010. 幼虫密度对粘虫生长发育和防御能力的影响. 硕士学位论文. 武汉: 华中农业大学.]
- Castillo-Davis CI, Mekhedov SL, Hartl DL, Koonin EV, Kondrashov FA, 2002. Selection for short introns in highly expressed genes. *Nature Genetics*, 31(4): 415-418.
- Chen B, Li S, Ren Q, Tong X, Zhang X, Kang L, 2015. Paternal epigenetic effects of population density on locust phase-related

- characteristics associated with heat-shock protein expression. *Molecular Ecology*, 24(4): 851–862.
- Clegg NJ, Honda BM, Whitehead IP, Grigliatti TA, Wakimoto B, Brock HW, Lloyd VK, Sinclair DA, 1998. Suppressors of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster* affect expression of the heterochromatic gene light in the absence of a chromosome rearrangement. *Genome*, 41(4): 495–503.
- Collett M, Despland E, Simpson SJ, Krakauer D, 1998. Spatial scales of desert locust gregarization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(22): 13052–13055.
- Denlinger DL, Rinehart JP, Yocumb GD, 2001. Stress Proteins: A Role in Insect Diapause? Insect Timing: Circadian Rhythmicity to Seasonality. Amsterdam: Elsevier. 155–171.
- 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.
- Gething MJ, Sambrook J, 1992. Protein folding in the cell. *Nature*, 355 (6355): 33–45.
- Han LL, Zhu MH, Dong TY, Zhao KJ, Qu ZC, Lv Y, Han XX, 2014. Effects of heat shock and imidacloprid on the expressions of *hsp70* and *hsc70* mRNA in the *Aphis glycines* (Hemiptera: Aphididae). *Acta Entomologica Sinica*, 57(4): 387–394. [韩岚岚, 朱明贺, 董天宇, 赵奎军, 曲忠诚, 吕洋, 韩晓旭, 2014. 热应激和吡虫啉对大豆蚜 *hsp70* 和 *hsc70* 基因 mRNA 表达的影响. 昆虫学报, 57(4): 387–394.]
- Henry Y, Renault D, Colinet H, 2018. Hormesis-like effect of mild larval crowding on thermotolerance in *Drosophila* flies. *Journal of Experimental Biology*, 221(Pt 2): jeb. 169342.
- Jiang XF, Zhang L, Chen YX, Luo LZ, 2014. Novel features, occurrence trends and economic impact of the oriental armyworm, *Mythimna separata* (Walker) in China. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 51(6): 1444–1449. [江幸福, 张蕾, 程云霞, 罗礼智, 2014. 我国粘虫发生危害新特点及趋势分析. 应用昆虫学报, 51(6): 1444–1449.]
- Jiang YY, Li CG, Zeng J, Liu J, 2014. Population dynamics of the armyworm in China: A review of the past 60 years' research. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 51(4): 890–898. [姜玉英, 李春广, 曾娟, 刘杰, 2014. 我国粘虫发生概况: 60 年回顾. 应用昆虫学报, 51(4): 890–898.]
- Kregel KC, 2002. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *Journal of Applied Physiology*, 192(5): 2177–2186.
- Li HB, Dai CG, Zhang CR, He YF, Ran HY, Chen SH, 2018. Screening potential reference genes for quantitative real-time PCR analysis in the oriental armyworm, *Mythimna separata*. *PLoS ONE*, 13(4): e0195096.
- Luo LZ, Li GB, Hu Y, 1993. Effects of larval density on development and phase change of the oriental armyworm, *Mythimna separata*. *Agricultural Science*, 1: 239–244 [罗礼智, 李光博, 胡毅, 1995. 粘虫幼虫密度对其生长发育及变型的影响. 农业科学集刊, 1: 239–244.]
- Pener M, 1991. Locust phase polymorphism and its endocrine relations. *Advance of Insect Physiology*, 23: 1–79.
- Qin W, Tyshenko MG, Wu BS, Walker VK, Robertson RM, 2003. Cloning and characterization of a member of the Hsp70 gene family from *Locusta migratoria*, a highly thermotolerant insect. *Cell Stress Chaperones*, 8(2): 144–152.
- Soensen 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.
- Sorensen JG, Loeschke V, 2001. Larval crowding in *Drosophila melanogaster* induces Hsp70 expression, and leads to increased adult longevity and adult thermal stress resistance. *Journal of Insect Physiology*, 47(11): 1301–1307.
- Tang QY, Zhang CX, 2013. Data Processing System (DPS) software with experimental design, statistical analysis and data mining developed for use in entomological research. *Insect Science*, 20(2): 254–260.
- Wang HH, Lei ZR, 2005. Current developments of heat shock proteins in insect. *Scientia Agricultura Sinica*, 38(10): 2023–2034. [王海鸿, 雷仲仁, 2005. 昆虫热休克蛋白的研究进展. 中国农业科学, 38(10): 2023–2034.]
- Wang HS, Wang XH, Zhou CS, Huang LH, Zhang SF, Guo W, Kang L, 2007. cDNA cloning of heat shock proteins and their expression in the two phases of the migratory locust. *Insect Molecular Biology*, 16(2): 207–219.
- Wang Y, Yang P, Cui F, Kang L, 2013. Altered immunity in crowded locust reduced fungal (*Metarhizium anisopliae*) pathogenesis. *PLoS Pathogens*, 9(1): e1003102.
- Wilson K, Reeson AF, 1998. Density-dependent prophylaxis: evidence from Lepidoptera-baculovirus interactions? *Ecological Entomology*, 23(1): 100–101.
- Wilson K, Thomas MB, Blanford S, Doggett M, Simpson SJ, Moore SL, 2002. Coping with crowds: density-dependent disease resistance in desert locusts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(8): 5471–5475.
- Wilson K, Cotter SC, Reeson AF, Pell JK, 2001. Melanism and disease resistance in insects. *Ecology Letters*, 4(6): 637–649.
- Wu SJ, Liu FH, Hu SM, Wang C, 2001. Different combinations of the heat-shock cognate protein 70 (*hsc70*) C-terminal functional groups are utilized to interact with distinct tetratricopeptide repeat containing proteins. *Biochemical Journal*, 359(Pt2): 419–426.
- Xu K, Niu QS, Liu YL, Chen DH, Yang S, Zhao HT, Jiang YS, 2017. Expression characteristics of HSC70-4 gene in *Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Environmental Entomology*, 39 (1): 55–61. [徐凯, 牛庆生, 刘玉玲, 陈东海, 杨爽, 赵慧婷, 姜玉锁, 2017. 中华蜜蜂 HSC70-4 基因表达特性的研究. 环境昆虫学报, 39(1): 55–61.]
- Zhang YH, Zhang Z, Jiang YY, Zeng J, Gao YB, Cheng DF, 2012. Preliminary analysis of the outbreak of the third-generation army worm *Mythimna separata* in China in 2012. *Plant Protection*, 38(5): 1–8. [张云慧, 张智, 姜玉英, 曾娟, 高月波, 程登发, 2012. 2012 年三代黏虫大发生原因初步分析. 植物保护, 38(5): 1–8.]