

温度和毒死蜱对灰飞虱雌成虫热激蛋白 70 和 90 基因的诱导表达特性研究*

王利华** 单 丹 姚 静 方继朝***

(江苏省农业科学院植物保护研究所, 南京 210014)

摘 要 【目的】为了明确灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 对温度和杀虫剂等环境胁迫因子的适应性进化机制, 本文研究了高温和毒死蜱对该害虫热激蛋白 70 和 90 基因的诱导表达特性。【方法】利用生物测定法研究了灰飞虱的热激存活率和对毒死蜱的敏感性, 采用实时荧光定量 PCR 技术测定了不同诱导温度、LC₂₅ 剂量的毒死蜱诱导不同时间以及不同品系的 *Lhsp70-1*、*Lhsp70-2*、*Lhsp90-1* 和 *Lhsp90-2* 4 个基因表达量的变化。【结果】在 27 和 31 条件下, 耐高温品系对毒死蜱的敏感性比对照品系分别降低 1.39 倍和 1.95 倍, 42 热激后毒死蜱抗性品系的存活率比敏感品系高 23.58%。经过 30、34、38 和 42 热激 1 h 后, 灰飞虱雌成虫 *Lhsp70-2*、*Lhsp90-1* 和 *Lhsp90-2* 的表达量分别上升 1.4~2.5、1.7~3.3 和 1.1~2.0 倍, *Lhsp70-1* 表达量下降 1.0~1.7 倍; LC₂₅ 剂量的毒死蜱处理 0.5、8 和 12 h 后, 以上 4 个基因的表达量变化不显著或呈下降趋势。然而毒死蜱长期筛选后 *Lhsp70-2*、*Lhsp90-1* 和 *Lhsp90-2* 表达量分别上升 2.32、1.53 和 2.28 倍, 高温长期筛选后 *Lhsp90-1* 表达量上升 1.58 倍。【结论】*Lhsp90-1* 表达量增加很可能是灰飞虱对高温和毒死蜱产生交互适应性的重要原因。

关键词 灰飞虱, 高温, 毒死蜱, *Lhsp90-1*, 表达特性, 适应性

Induced expression of the heat shock protein 70 and 90 genes by exposure to high temperature and chlorpyrifos in female of *Laodelphax striatellus*

WANG Li-Hua** SHAN Dan YAO Jing FANG Ji-Chao***

(Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract [Objectives] To explore the mechanisms used by *Laodelphax striatellus* to cope with environmental stress; specifically, the expression patterns of the heat shock protein 70 and 90 genes induced by exposure to high temperature and chlorpyrifos. [Methods] A bioassay was performed to test the sensitivity of female *L. striatellus* to chlorpyrifos and heat, and real-time quantitative PCR used to analyze the expression levels of the *Lhsp70-1*, *Lhsp70-2*, *Lhsp90-1* and *Lhsp90-2* genes in thermo-tolerant and chlorpyrifos-resistant *L. striatellus* strains. Changes in the expression of these genes were measured after exposure to 1 hour at 10-42 or LC₂₅ dose of chlorpyrifos for 0.5-12 hours. [Results] The sensitivity of the thermo-tolerant strain to chlorpyrifos at 27 and 31 was 1.39 and 1.95 times, respectively, less than that of the control strain. Survival of the chlorpyrifos-resistant strain increased by 23.58% after exposure to 42. After 1 hour at either 30, 34, 38 or 42, the expression of the *Lhsp70-2*, *Lhsp90-1* and *Lhsp90-2* genes increased by 1.4-2.5, 1.7-3.3 and 1.1-2.0 times, respectively, and the expression of the *Lhsp70-1* gene decreased 1.0-1.7 times. The expression of the above four heat shock protein genes either did not change much, or tended to decrease, following exposure to an LC₂₅ dose of chlorpyrifos for 0.5, 8 and 24 h. However, the expression of the *Lhsp70-2*, *Lhsp90-1* and *Lhsp90-2* genes increased by 2.32, 1.53 and 2.28 times, respectively

* 资助项目 Supported projects: 江苏省自然科学基金 (BK20130711); 国家自然科学基金 (31301660); 江苏省农业科学院基本科研业务专项 (6003)

**第一作者 First author, E-mail: wlhyang@sohu.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: fangjc126@126.com

收稿日期 Received: 2015-06-23, 接受日期 Accepted: 2015-06-30

following long-term selection for chlorpyrifos resistance, and *Lhsp90-1* expression increased by 1.58 times after long-term selection for tolerance to sub-lethal high temperatures. [Conclusion] These results suggested that the increased expression of *Lhsp90-1* may promote the tolerance of *L. striatellus* to both high temperatures and chlorpyrifos.

Key words *Laodelphax striatellus*, high temperature, chlorpyrifos, *Lhsp90-1*, expression patterns, tolerance

热激蛋白是一类在生物受到高温等逆境刺激后大量表达的蛋白质,在生物中广泛存在,可协助其他大分子蛋白质折叠、组装,阻止蛋白质亚基的异常聚集,在生物正常生命活动和胁迫应激中起重要作用(Feder, 1999; Tkáčová and Angelovičová, 2012)。根据分子量的大小,热激蛋白可分为 HSP110、HSP100、HSP90、HSP70、HSP60 和小分子热激蛋白。热激蛋白 70(HSP70)是研究最早、最广泛也是最保守的热激蛋白,在昆虫高温适应性和热应激中发挥重要作用。高温适应能力更强的果蝇,其热激蛋白 70 基因具有更高的表达量或者更快的诱导速度(Evgen'ev et al., 2014)。三叶草斑潜蝇 *Liriomyza trifolii* 成虫 *Lthsp70-1* 表达量在 31~33 范围内随温度升高而上升(郑丹等, 2010)。B 型烟粉虱 *Bemisia tabaci* 成虫热激蛋白 70 基因的表达量也随着温度的升高而增加,在 41℃ 时达到最高峰(崔旭红等, 2007)。热激蛋白 90(HSP90)在昆虫耐热性中也发挥重要作用。果蝇热激蛋白 90 基因表达量与其耐热性正相关(Boher et al., 2012; Chen and Wagner, 2012);小菜蛾 *Plutella xylostella* 和甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 在高温热激后,其热激蛋白 90 基因表达量显著上升(Sonoda et al., 2006; 翟会芳等, 2010)。

杀虫剂胁迫对热激蛋白 70 和 90 基因的表达也有一定的诱导作用。果蝇 *Drosophila melanogaster* 和烟粉虱 *Bemisia tabaci* 在毒死蜱胁迫下,其热激蛋白 70 基因表达量不同程度的增加(Gupta et al., 2007; 郭雅洁等, 2013);西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* Fo-HSP70 和 Fo-HSP90 在亚致死剂量阿维菌素的诱导下,其表达量显著上升(Wang et al., 2014);但是柑橘木虱 *Citrus psyllid* 热激蛋白 70 和 90 基因不受低剂量吡虫啉诱导(Marutani-Hert et al., 2010)。

灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 是我国重要水

稻害虫之一,在 20 世纪末至本世纪初的十几年的时间内连年大发生,严重危害水稻生产,其种群数量随四季温度变化在春秋两季出现高峰期而冬夏季出现低峰期(张爱民和刘向东, 2010)。灰飞虱的防治主要依靠化学防治,但是由于杀虫剂自身特点或者高剂量、频繁地使用,抗药性的产生几乎是不可避免的后果。毒死蜱是防治灰飞虱的重要杀虫剂之一,在我国浙江、江苏、安徽等地均已发现灰飞虱对其产生了抗性(王利华等, 2008; 彭永强等, 2009)。为了探索灰飞虱对温度和杀虫剂等环境胁迫因子适应性进化的共性,本文研究了灰飞虱热激蛋白 70 和 90 基因的诱导表达特性,讨论了热激蛋白基因表达量改变在高温和毒死蜱交互适应中的作用。

1 材料与方法

1.1 试虫品系

YN: 对照品系,采用武运粳 7 号在 (27±1)℃ 培养箱中饲养 5 年以上,期间未接触任何杀虫剂。

HR: 灰飞虱耐高温品系,以 YN 品系为背景,采用亚致死高温连续筛选 10 代后获得,饲养于 (31±1)℃ 培养箱。

CPFR: 毒死蜱抗性品系,以 YN 品系为背景,采用 70%致死浓度连续筛选后获得,抗性倍数达到 100 倍以上,饲养于 (27±1)℃ 培养箱。

1.2 毒死蜱敏感性测定

采用浸苗法测定试虫对毒死蜱的敏感性。首先配制 48 mg/L 毒死蜱溶液,然后逐倍稀释,直至 1.5 mg/L,以清水为对照。将 7 日龄稻苗在各浓度药液中浸 10 s,晾干后接入 1 日龄雌成虫(本文试验均采用该龄期试虫),10 头/重复,每个浓度 3 个重复,48 h 后观察存活虫数,采用 PoloPlus 软件计算 LC₅₀。

1.3 热激存活率测定

热激存活率实验参考冯宏组等(2008)的方法。试验时将试虫置于 42℃ 水浴锅中,热激 30 min 后取出,常温恢复 1 h,然后观察试虫存活数,并计算存活率。

1.4 灰飞虱热激蛋白 70(*Lhsp70*)和 90(*Lhsp90*)基因的诱导表达

1.4.1 试虫处理 温度诱导 *Lhsp70* 和 *Lhsp90* 基因的表达特性研究参考张青等(2014)的方法,收集雌成虫,分别采用 10、16、22、26、30、34、38、42℃ 处理 1 h,常温恢复 1 h。另外采用 38℃ 分别处理 0.5、1、2、4、6、8、12 h,研究 *Lhsp70* 和 *Lhsp90* 基因的表达量与胁迫时间的关系。

研究毒死蜱诱导 *Lhsp70* 和 *Lhsp90* 基因的表达特性时,采用 LC₂₅ 剂量的毒死蜱处理敏感雌成虫 0.5、8、12 h,然后收集试虫,以清水处理为对照。

收集对照、耐高温和毒死蜱抗性 3 个品系雌成虫,用于高温或毒死蜱长期筛选对灰飞虱 *Lhsp70* 和 *Lhsp90* 基因表达的影响试验。

所有处理设 3 重复,6 头/重复。所有试虫收集后,液氮速冻,存于 -80℃ 超低温冰箱,然后提取总 RNA,用于实时荧光定量 PCR 分析。

1.4.2 总 RNA 提取 总 RNA 的提取采用 Promega 公司的 SV Total RNA Isolation System。取冻存于 -80℃ 超低温冰箱的样品,根据试剂盒说明书提取总 RNA,然后使用 1% 琼脂糖凝胶电泳和微量分光光度计(ependorf BioPhotometer Plus)检测 RNA 的完整性、纯度与浓度,-80℃ 超低温冰箱保存备用。

1.4.3 cDNA 第一链的合成 cDNA 第一链的合成采用 TaKaRa 的 PrimeScript[®] RT reagent Kit Perfect Real Time。参照试剂盒说明书,以 500 ng 总 RNA 为模板,分别加入 2 μL 5×PrimeScript[®] Buffer、0.5 μL PrimeScript[®] RT Enzyme Mix I、0.5 μL Oligo dT Primer(50 μmol/L)、0.5 μL Random 6 mers(100 μmol/L),以无 RNAase 水补至 10 μL,然后 37℃ 30 min、80℃ 15 s。稀释 20 倍后,于

-20℃ 贮存,用于实时荧光定量 PCR。

1.4.4 实时荧光定量 PCR 采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行实时荧光定量 PCR(qPCR)分析,以 ADP-ribosylation factor-like protein(Accession number: JF728807.1)为内参。反应体系共 20 μL,包括 10 μL SYBR[®] Premix Ex Taq[™]、1 μL cDNA、0.4 μL ROX Reference Dye(50×)和 0.4 μL 10 μmol/L 上游和下游引物(引物序列见表 1)。反应分为 3 步,第一步 95℃ 预变性 30 s,第二步 95℃ 5 s,60℃ 31 s,共 40 个循环,第 3 步为熔解曲线,95℃ 15 s,60℃ 1 min。相对表达量的计算采用 2^{-ΔΔCT} 法(Livak and Schmittgen,2001),试验结果数据分析采用 Excel 软件,在 0.05 显著水平上进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 亚致死高温长期筛选对毒死蜱敏感性的影响

亚致死高温长期筛选后灰飞虱对毒死蜱的敏感性下降,在 27℃ 和 31℃ 条件下,耐高温品系对毒死蜱的敏感性比对照品系分别低 1.39 倍和 1.95 倍。而且耐高温品系和敏感品系对毒死蜱的敏感性受温度影响,31℃ 时毒死蜱对两品系的毒力分别为 10.70 mg/L 和 5.50 mg/L,而 27℃ 时分别为 21.37 mg/L 和 15.34 mg/L(表 2)。

2.2 毒死蜱抗性对高温耐受性的影响

灰飞虱对温度的耐受性受毒死蜱抗性的影响。在 42℃ 高温热激后,敏感品系雌成虫存活率为 28.23%,毒死蜱抗性品系雌成虫存活率为 51.81%,比敏感品系提高了 23.58%(图 1)。

2.3 温度对 *Lhsp70* 和 *Lhsp90* 基因的诱导表达

2.3.1 不同温度处理 1 h 后 *Lhsp70* 和 *Lhsp90* 基因的表达量变化 不同温度胁迫 1 h 对灰飞虱 *Lhsp70* 和 *Lhsp90* 基因的表达量有明显的影响。在 4 个基因中,*Lhsp90-1* 受高温诱导表达量变化最大,而 *Lhsp90-2* 在低温胁迫后其表达量变化最大。*Lhsp70-1* 在 10~16℃ 低温和 30~42℃ 高温胁迫后其表达量下降 1.8~1.0 倍;*Lhsp70-2* 表

表 1 qPCR 引物碱基序列
Table 1 Primers sequences for qPCR

基因 Gene	引物 Primer	引物碱基序列 (5 ' -3 ') Nucleotide sequences of primers (5 ' -3 ')
<i>Lhsp70-1</i>	Lhsp70-1F	TCGTGTGTTGGAGTGTGGCA
	Lhsp70-1R	GTTTTTCGGGTTTCATGGCTA
<i>Lhsp70-2</i>	Lhsp70-2F	GATGCCAAGATTGACAAGAGC
	Lhsp70-2R	ATAGAATAGCAGCCTGGACGG
<i>Lhsp90-1</i>	Lhsp90-1F	TATCCCATCAAGCTGCTCG
	Lhsp90-1R	CTTTGGTGTTTTGTCTGTC
<i>Lhsp90-2</i>	Lhsp90-2F	CGGTTTCTACTCCGCTTACCT
	Lhsp90-2R	ACCTCCTTGATTTTGCTCTCG
内参 Reference gene	ARFF	TTGGACAGTATCAAGACCCATC
	ARFR	GCAGCAATGTCATCAATAAGC

表 2 毒死蜱在 27℃和 31℃条件下对耐高温和对照灰飞虱雌成虫的毒力
Table 2 The toxicity of chlorpyrifos to female of thermo-tolerant and control *Laodelphax striatellus* at 27℃ and 31℃

温度 Temperature	品系 Strain	斜率 ± 标准误 Slope ± SE	致死中浓度 (95% 置信限) LC ₅₀ (95% CL)	抗性倍数 Resistance ratio
27	YN	1.91±0.31	15.34 (5.99-28.19)	1.39
	HR	3.08±0.45	21.37 (11.89-33.81)	
31	YN	1.48±0.36	5.50 (1.67-9.14)	1.95
	HR	1.66±0.33	10.70 (6.17-15.17)	

抗性倍数=HR 致死中浓度/YN 致死中浓度。
Resistance ratio= LC₅₀ of HR/ LC₅₀ of YN.

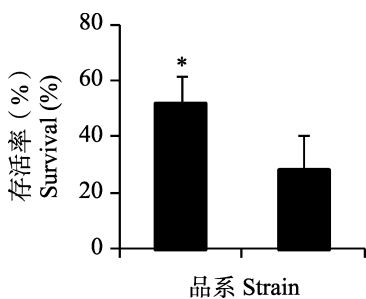


图 1 毒死蜱抗性和敏感品系雌成虫在 42℃热激后的存活率

Fig. 1 The survival ratio of chlorpyrifos resistant and susceptible female after 42℃ treatment
柱上标有*表明差异显著 ($P<0.05$)。下图同。
Histograms with * indicate significantly different at 0.05 level. The same below.

达量在 10 低温胁迫后下降约 1.7 倍,在 30~42 高温胁迫后,上升 1.4~2.5 倍; *Lhsp90-1* 在低温胁迫后表达量变化不显著,但在 30~42 高温胁迫后其表达量上升 1.7~3.3 倍; *Lhsp90-2* 在 10~16 低温胁迫后表达量下降 4.5~2.6 倍, 30~42 高温胁迫后其表达量上升 1.1~2.0 倍 (图 2)。

2.3.2 38℃处理不同时间后 *Lhsp70* 和 *Lhsp90* 基因的表达量变化 *Lhsp70-1*、*Lhsp70-2*、*Lhsp90-1* 和 *Lhsp90-2* 4 个基因在 38 热激 0.5~12 h 后的表达量变化明显不同,结果见图 3。 *Lhsp70-1* 表达量除热激 1 h 显著下降外,其余变化不显著; *Lhsp70-2* 表达量在热激 2 h 后由上升转为下降,而且处理时间越长,下降越明显; *Lhsp90-1* 在热

激 1 h 时表达量到达最高峰, 然后逐渐回落, 但在 12 h 后仍高于对照; *Lhsp90-2* 在热激 0.5 h 后表达量上升并维持在该水平, 直至 4 h 后其表达量才开始回落, 而且在 4 h 后随处理时间的延长, 下降越明显。

2.4 毒死蜱对 *Lhsp70* 和 *Lhsp90* 基因的诱导表达

亚致死剂量毒死蜱影响灰飞虱 *Lhsp70* 和 *Lhsp90* 基因的表达。在 LC_{25} 剂量处理 0.5 h 后, 除 *Lhsp70-2* 表达量显著下降外, 其余 3 个基因

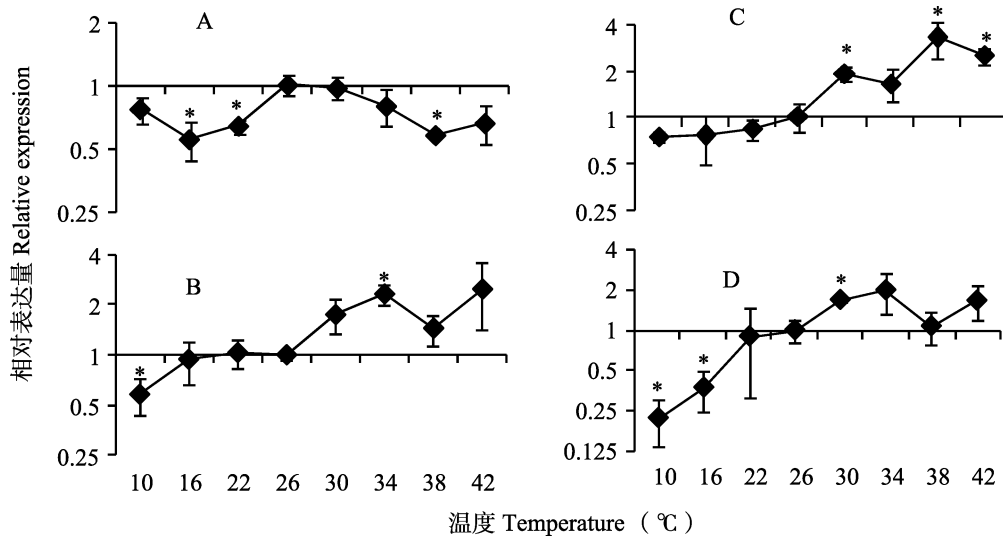


图 2 不同温度胁迫 1 h 后灰飞虱雌成虫 *Lhsp70* 和 *Lhsp90* 基因的相对表达量

Fig. 2 The relative expression of *Lhsp70* and *Lhsp90* genes after different temperature treatment for 1 hour in female of *Laodelphax striatellus*

A. *Lhsp70-1*; B. *Lhsp70-2*; C. *Lhsp90-1*; D. *Lhsp90-2*. 图 3, 图 4 同。

A. *Lhsp70-1*; B. *Lhsp70-2*; C. *Lhsp90-1*; D. *Lhsp90-2*. The same with Fig. 3 and Fig. 4.

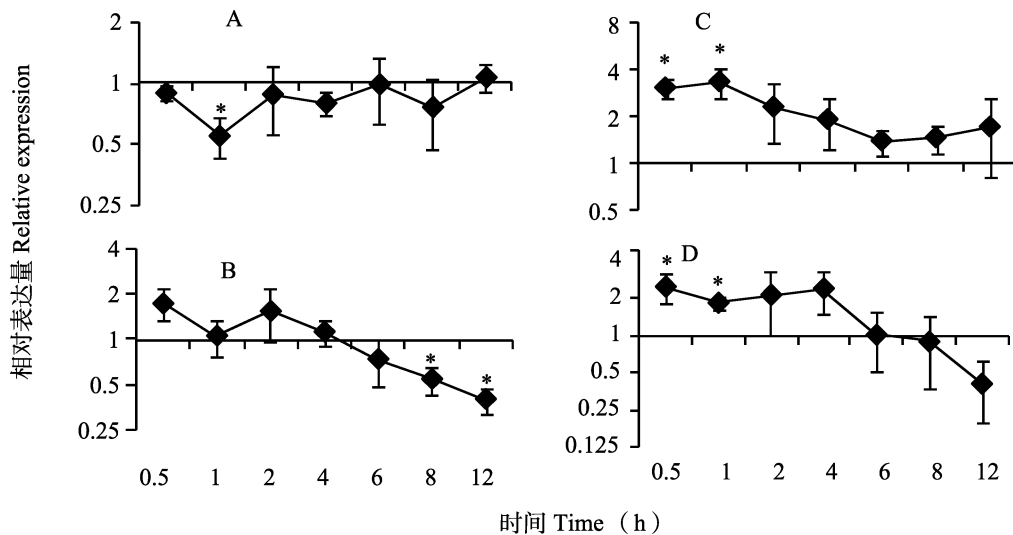


图 3 38°C 处理不同时间后灰飞虱雌成虫 *Lhsp70* 和 *Lhsp90* 基因的相对表达量

Fig. 3 The relative expression of *Lhsp70* and *Lhsp90* genes at 38°C for different time in female of *Laodelphax striatellus*

Lhsp70-1、*Lhsp90-1* 和 *Lhsp90-2* 表达量变化不显著。8 h 后, *Lhsp70-2* 和 *Lhsp90-2* 的表达量显著下降, *Lhsp70-1* 和 *Lhsp90-1* 表达量虽有下降趋势, 但是与对照相比差异不显著 (图 4)。

2.5 高温和毒死蜱长期筛选对 *Lhsp70* 和 *Lhsp90* 基因表达量的影响

高温和毒死蜱长期筛选对灰飞虱雌成虫

Lhsp70 和 *Lhsp90* 基因表达量的影响见图 5。亚致死高温长期筛选后, 除 *Lhsp90-1* 表达量上升 1.58 倍左右外, 其余 3 个基因 *Lhsp70-1*、*Lhsp70-2* 和 *Lhsp90-2* 的表达量显著下降, 尤其是 *Lhsp70-2* 表达量下降 5 倍以上; 毒死蜱长期筛选后, 其 *Lhsp70-2*、*Lhsp90-1* 和 *Lhsp90-2* 表达量分别上升约 2.32、1.53、2.28 倍, *Lhsp70-1* 表达量无显著变化。

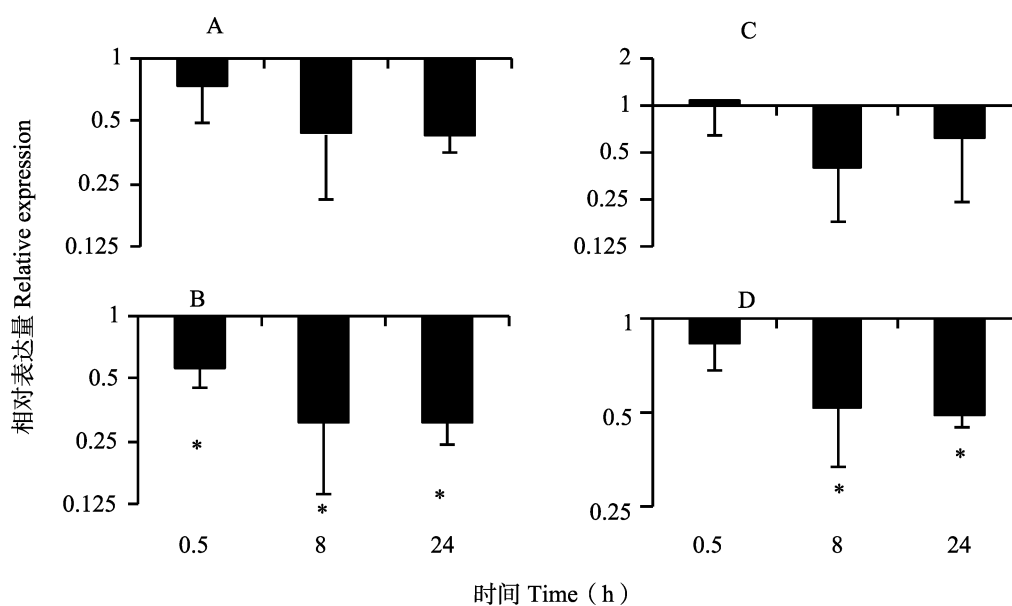


图 4 LC_{25} 剂量毒死蜱处理不同时间后灰飞虱雌成虫 *Lhsp70* 和 *Lhsp90* 基因的相对表达量
Fig. 4 The relative expression of *Lhsp70* and *Lhsp90* genes by exposing LC_{25} of chlorpyrifos for different time in female of *Laodelphax striatellus*

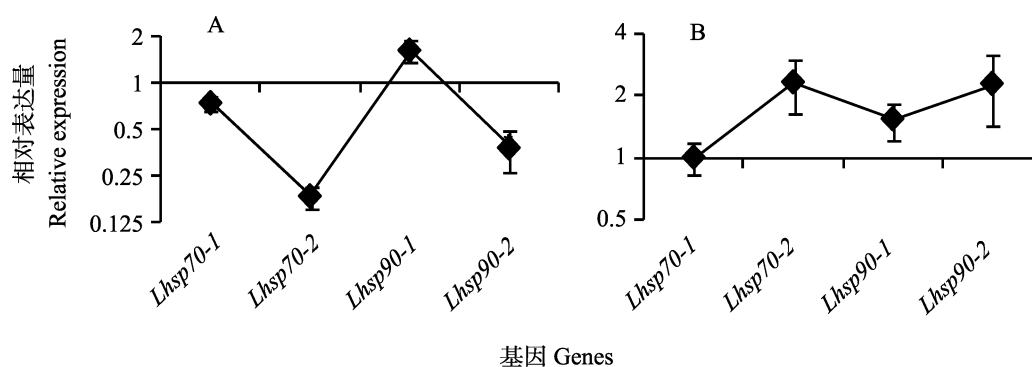


图 5 耐高温品系和毒死蜱抗性品系雌成虫 *Lhsp70* 和 *Lhsp90* 基因的相对表达量
Fig. 5 The relative expression of *Lhsp70* and *Lhsp90* genes in thermo-tolerant and chlorpyrifos resistant female of *Laodelphax striatellus*

A. 耐高温品系; B. 毒死蜱抗性品系。
A. Thermo-tolerant strain; B. Chlorpyrifos resistant strain.

3 讨论

温度和杀虫剂是影响害虫种群发展的两个重要因素,而且这两个因素间常相互作用。害虫对杀虫剂的敏感性常受温度的影响,如高温下小菜蛾 *Plutella xylostella* 对甲胺磷的敏感性提高 (Liu *et al.*, 2008)。灰飞虱对毒死蜱的敏感性也受温度的影响,高温下其敏感性增加。但亚致死高温长期筛选后,灰飞虱在获得高温抗逆性的同时,对毒死蜱的敏感性下降,这将极有可能在长时间尺度上影响害虫的化学防治,增加杀虫剂的使用剂量。因为全球气温正处于上升时期,这种以温度升高为特征的气候变暖将影响昆虫分布、生长发育、繁殖以及基因组成 (陈瑜和马春森, 2010),如耐热性高的果蝇其热激蛋白 70 的合成量也高 (Evgen'ev *et al.*, 2014)。而热激蛋白的过量表达可减少杀虫剂对昆虫靶器官的伤害 (Gupta *et al.*, 2007),从而降低其对杀虫剂的敏感性。

杀虫剂对害虫的温度耐受性也有一定的影响,疟蚊 *Aoophes stephensi* 和埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 在亚致死浓度残杀威处理后,对高温的抗逆性增加 (Patil, 1996);朱砂叶螨 *Tetranychus cinnabarinus* 在阿维菌素长期筛选获得抗性后对高温的抗逆性更强 (何林等, 2008)。灰飞虱与朱砂叶螨相似,在对毒死蜱产生抗性后,对高温的抗逆性增强,这将有助于提高灰飞虱越夏后的存活率,从而促进其田间抗药性的发展。

灰飞虱对温度胁迫的响应与热激蛋白 70 和 90 的表达有关。昆虫在面临温度胁迫时,常通过生理生化或行为反应机制维持热平衡 (Chidawanyika and Terblanche, 2011)。在胁迫条件下,热激蛋白等分子伴侣稳定变性蛋白质或重新折叠已变性的蛋白,保持蛋白质的天然构象或者协助其降解,从而减少其细胞毒性聚集 (Feder, 1999)。热激蛋白 70 和 90 与昆虫耐热性有关 (Boher *et al.*, 2012; Evgen'ev *et al.*, 2014),其表达常受温度诱导 (Sonoda *et al.*, 2006; 崔旭红等, 2007; 翟会芳等, 2010; 郑丹

等, 2010)。因为灰飞虱 *Lhsp70-2* 在短暂的高温胁迫后其表达量上升,但长期亚致死高温筛选后其表达量显著下降,所以该基因可能与高温短暂胁迫应激有关。*Lhsp70-1* 在短期或长期高温处理后其表达量均表现出下降的趋势,所以在高温胁迫应激保护中的作用可能不大。与此不同的是,热激蛋白 90 在灰飞虱长短期高温胁迫应激中可能都发挥重要作用,尤其是 *Lhsp90-1* 在短时高温胁迫后表达量显著上升,虽然在 4 h 后开始回落,但是 12 h 后仍高于对照,而且长期亚致死高温筛选后该基因表达量也显著上升。

灰飞虱热激蛋白的表达也受毒死蜱胁迫的影响。杀虫剂进入昆虫体内后除了与其主要作用靶标结合发挥毒性外,还诱导氧自由基的产生 (Banerjee *et al.*, 2001),导致氧化胁迫 (Lushchak, 2011),引起机体其他组织的损伤,如毒死蜱诱导黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 细胞凋亡和 DNA 损伤 (Gupta *et al.*, 2010)。而热激蛋白过量表达可协助受损细胞的清除或修复,从而保护细胞免受伤害,如黑腹果蝇、烟粉虱、西花蓟马等在亚致死剂量杀虫剂处理后,其热激蛋白的表达量有不同程度的增加 (Gupta *et al.*, 2007; 郭雅洁等, 2013; Wang *et al.*, 2014)。灰飞虱 *Lhsp70* 和 *Lhsp90* 基因的表达受毒死蜱处理时间的影响,在短时间处理后其表达量变化不显著或呈下降趋势,但是在长期筛选后 *Lhsp70-2* 和 *Lhsp90-1* 表达量显著上升。这与绿盲蝽 *Apolygus lucorum* 和朱砂叶螨 *Tetranychus cinnabarinus* 相似,绿盲蝽毒死蜱抗性个体 *AIHSP90* 表达量更高 (Sun *et al.*, 2014),朱砂叶螨阿维菌素抗性品系 *TcHSP90* 也拥有更高的表达量 (Feng *et al.*, 2010)。

灰飞虱对高温和毒死蜱的交互适应性可能与某些热激蛋白的过量表达有关。Zhang 等 (2012) 认为热激蛋白的产生可能是生物对多种胁迫如高温、紫外线、化学农药等反应的共响应因子。大量的研究证实抗性试虫因其热激蛋白、抗氧化酶等表达量上升或者活性增加从而对高温的耐受性增强 (冯宏祖等, 2008; Feng *et al.*,

2010; Sun *et al.*, 2014)。毒死蜱抗性灰飞虱 *Lhsp70-2* 和 *Lhsp90-1* 等热激蛋白基因过量表达可能是其对高温抗逆性增强的原因,但是在耐高温品系中仅有 *Lhsp90-1* 表达量呈上升趋势,因此 *Lhsp90-1* 的过量表达可能是灰飞虱对高温和毒死蜱产生交互适应的重要原因,而 *Lhsp70-2* 可能只对某一胁迫因子或者其它功能负责。

综上所述,温度或毒死蜱胁迫影响灰飞虱 *Lhsp70* 和 *Lhsp90* 基因的表达,而且短期胁迫和长期胁迫对热激蛋白表达量的影响不同。*Lhsp90-1* 过量表达可能在灰飞虱温度和毒死蜱交互适应性中起重要作用。但是除热激蛋白 70 和 90 外,其它抗逆性相关因子如热激蛋白 60、小分子热激蛋白、抗氧化酶、海藻糖等也可能参与温度或杀虫剂胁迫应激 (Benoit *et al.*, 2009; 李志明等, 2010; Wu *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2014), 因此这些因素是否在灰飞虱高温和毒死蜱的交互适应性中发挥作用尚不能确定,需进一步研究。

参考文献 (References)

- Banerjee BD, Seth V, Ahmed RS, 2001. Pesticides induced oxidative stress: perspectives and trends. *Reviews on Environmental Health*, 16(1): 1–40.
- Benoit JB, Lopez-Martinez G, Elnitsky MA, Lee RE, Denlinger DL, 2009. Dehydration-induced cross tolerance of *Belgica antarctica* larvae to cold and heat is facilitated by trehalose accumulation. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology*, 152(4): 518–523.
- Boher F, Trefault N, Piulachs MD, Bellés X, Godoy-Herrera R, Bozinovic F, 2012. Biogeographic origin and thermal acclimation interact to determine survival and hsp90 expression in *Drosophila* species submitted to thermal stress. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 162(4): 391–396.
- Chen B, Wagner A, 2012. Hsp90 is important for fecundity, longevity, and buffering of cryptic deleterious variation in wild fly populations. *BMC Evolutionary Biology*, 12: 25.
- Chen Y, Ma CS, 2010. Effect of global warming on insect: a literature review. *Acta Ecologica Sinica*, 30(8): 2159–2172. [陈瑜, 马春森, 2010. 气候变暖对昆虫影响研究进展. 生态学报, 30(8): 2159–2172.]
- Chidawanyika F, Terblanche JS, 2011. Rapid thermal responses and thermal tolerance in adult codling moth *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Insect Physiology*, 57(1): 108–117.
- Cui XH, Xie M, Wang FH, 2007. Changes in expression level of heat shock protein 70 gene in *Bemisia tabaci* B-biotype (Homoptera: Aleyrodidae) under high temperature stress. *Acta Entomologica Sinica*, 50(11): 1087–1091. [崔旭红, 谢明, 万方浩, 2007. 高温胁迫下 B 型烟粉虱热激蛋白基因 hsp70 表达量的变化. 昆虫学报, 50(11): 1087–1091.]
- Evgen'ev MB, Garbuz D, Zatsepina O, 2014. Heat Shock Proteins and Whole Body Adaptation to Extreme Environments. Berlin: Springer Science+Business Media Dordrecht. 59–61.
- Feder ME, 1999. Organismal, ecological, and evolutionary aspects of heat-shock proteins and the stress response: established conclusions and unresolved issues. *American Zoologist*, 39(6): 857–864.
- Feng H, Wang L, Liu Y, He L, Li M, Lu W, Xue C, 2010. Molecular characterization and expression of a heat shock protein gene (HSP90) from the carmine spider mite, *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval). *Journal of Insect Science*, 10(1): 112.
- Feng HZ, Liu YH, He L, Lu XE, Yang DX, 2008. Effects of abamectin and temperature stresses on free radicals and protective enzyme activities in *Tetranychus cinnabarinus*. *Acta Phytophylacica Sinica*, 35(6): 530–536. [冯宏祖, 刘映红, 何林, 陆蕊娥, 杨大兴, 2008. 阿维菌素和温度胁迫对朱砂叶螨自由基及保护酶活性的影响. 植物保护学报, 35(6): 530–536.]
- Guo YJ, Liang P, Gao XW, 2013. Induced expression of hsp70 mRNA by nitenpyram, chlorpyrifos and beta-cypermethrin in *Bemisia tabaci* Mediterranean (Hemiptera: Aleyrodidae). *Acta Entomologica Sinica*, 56(1): 29–38. [郭雅洁, 梁沛, 高希武, 2013. 烯啶虫胺毒死蜱和高效氯氟菊酯对烟粉虱地中海隐种 hsp70mRNA 的诱导表达. 昆虫学报, 56(1): 29–38.]
- Gupta SC, Mishra M, Sharma A, Balaji TGR D, Kumar R, Mishra RK, Chowdhuri DK, 2010. Chlorpyrifos induces apoptosis and DNA damage in *Drosophila* through generation of reactive oxygen species. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(6): 1415–1423.
- Gupta SC, Siddique HR, Mathur N, Mishra RK, Saxena DK, Chowdhuri DK, 2007. Adverse effect of organophosphate compounds, dichlorvos and chlorpyrifos in the reproductive tissues of transgenic *Drosophila melanogaster*: 70kDa heat shock protein as a marker of cellular damage. *Toxicology*, 238(1): 1–14.
- He L, Xue CH, Zhao ZM, Wang JJ, 2008. Relative fitness of *Tetranychus cinnabarinus* resistant strains at different

- temperatures. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 19 (11): 2449–2454. [何林, 薛传华, 赵志模, 王进军, 2008. 朱砂叶螨抗性品系不同温度下的相对适合度. 应用生态学报, 19 (11): 2449–2454.]
- Li Z, Chen Q, Jin Q, Tang C, Wen H, Peng Z, 2010. Effect of high temperature on the protective enzymes of *Tetrastichus brontispae*. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 31(6): 994–998. [李志明, 陈青, 金启安, 唐超, 温海波, 彭正强, 2010. 高温对椰心叶甲啮小蜂保护酶系活性的影响. 热带作物学报, 31(6): 994–998.]
- Liu F, Miyata T, Wu ZJ, Li CW, Wu G, Zhao SX, Xie LH, 2008. Effects of temperature on fitness costs, insecticide susceptibility and heat shock protein in insecticide-resistant and -susceptible *Plutella xylostella*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 91(1): 45–52.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Lushchak VI, 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 101(1): 13–30.
- Marutani-Hert M, Hunter WB, Hall DG, 2010. Gene response to stress in the Asian *Citrus psyllid* (Hemiptera: psyllidae). *Florida Entomologist*, 93(4): 519–525.
- Patil NS, 1996. Adaptive larval thermotolerance and induced cross-tolerance to propoxur insecticide in mosquitoes *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*. *Medical and Veterinary Entomology*, 10(3): 277–282.
- Peng YQ, Gao CF, Ma CY, Mao YX, Shen JL, 2009. Risk Assessment and genetic analysis of fipronil resistance and insecticide susceptibility in the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus* (Homoptera: Delphacidae). *Chinese Journal of Rice Science*, 23(6): 645–652. [彭永强, 高聪芬, 马崇勇, 毛玉霞, 沈晋良, 2009. 灰飞虱对氟虫腈抗性风险评估、遗传分析及杀虫剂敏感性研究. 中国水稻科学, 23(6): 645–652.]
- Sonoda S, Ashfaq M, Tsumuk H, 2006. Cloning and nucleotide sequencing of three heat shock protein genes (hsp90, hsc70, and hsp19.5) from the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) and their expression in relation to developmental stage and temperature. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 62(2): 80–90.
- Sun Y, Sheng Y, Bai L, Zhang Y, Xiao Y, Xiao L, Tan Y, Shen Y, 2014. Characterizing heat shock protein 90 gene of *Apolygus lucorum* (Meyer-Dür) and its expression in response to different temperature and pesticide stresses. *Cell Stress and Chaperones*, 19(5): 725–739.
- Tkáčová J, Angelovičová M, 2012. Heat shock proteins (HSPs): a review. *Animal Science and Biotechnologies*, 45 (1): 349–353.
- Wang H, Reitz SR, Wang L, Wang S, Li X, Lei Z, 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.
- Wang LH, Fang JC, Liu BS, 2008. Relative toxicity of insecticides to *Laodelphax striatellus* (Fallén) (Homoptera: Delphacidae) and the resistance of field populations from different areas of East China. *Acta Entomologica Sinica*, 51(9): 930–937. [王利华, 方继朝, 刘宝生, 2008. 几类杀虫剂对灰飞虱的相对毒力及田间种群的抗药性现状. 昆虫学报, 51(9): 930–937.]
- Wu H, Zhang R, Liu J, Guo Y, Ma E, 2011. Effects of malathion and chlorpyrifos on acetylcholinesterase and antioxidant defense system in *Oxya chinensis* (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae). *Chemosphere*, 83(4): 599–604.
- Zhai HF, Jiang XF, Luo LZ, 2010. Cloning and expression of HSP90 cDNA in larvae of the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) under high temperature stress. *Acta Entomologica Sinica*, 53(1): 20–28. [翟会芳, 江幸福, 罗礼智, 2010. 甜菜夜蛾 HSP90 基因克隆及高温胁迫下其表达量的变化. 昆虫学报, 53(1): 20–28.]
- Zhang AM, Liu XD, 2010. Population characteristics of *Laodelphax striatellus* and the relationship with temperature. *Chinese Bulletin of Entomology*, 47(2): 326–330. [张爱民, 刘向东, 2010. 灰飞虱的种群特性及其与温度的关系. 昆虫知识, 47(2): 326–330.]
- Zhang G, Fang X, Guo X, 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature*, 490(7418): 49–54.
- Zhang Q, Lu MX, Zhu SD, 2014. Cloning, sequence analysis and expression profiling of heat shock protein 90 gene in the small brown plant hopper, *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae). *Acta Entomologica Sinica*, 57(7): 777–786. [张青, 陆明星, 祝树德, 2014. 灰飞虱热激蛋白 Hsp90 基因的克隆序列分析与表达模式. 昆虫学报, 57(7): 777–786.]
- Zhen S, Cui XH, Li HL, Cai C, Gao YS, Shang HW, 2010. Cloning of heat shock protein gene, hsp70, in *Liriomyza trifolii* and its expression under temperature stress. *Acta Phytomorphologica Sinica*, 37(2): 159–164. [郑丹, 崔旭红, 李红亮, 蔡冲, 高永生, 商晗武, 2010. 三叶草斑潜蝇 hsp70 的克隆及其表达量在高低温胁迫下的变化. 植物保护学报, 37(2): 159–164.]