

瓜实蝇热激蛋白 *Hsp90* 基因克隆及表达分析*

姜建军** 黄立飞 黎柳锋 陈红松 王凤英** 杨 朗***

(广西壮族自治区农业科学院植物保护研究所, 广西作物病虫害生物学重点实验室, 南宁 530007)

摘 要 【目的】热激蛋白基因 *Hsps* 在生物体抗逆性过程中具有重要的作用, 本文旨在通过阐释瓜实蝇 *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) 热激蛋白基因 *Hsp90* 在其对环境温度适应性及抗药性过程中的功能作用, 为瓜实蝇综合治理提供理论基础。【方法】采用 RACE-PCR 技术克隆瓜实蝇的 *Hsp90* 基因 cDNA 序列, 利用生物信息学工具分析序列特征, 并通过实时定量 PCR 技术分析高温胁迫、阿维菌素诱导和抗性敏感品系中该基因的表达情况。【结果】克隆获得的瓜实蝇 *Hsp90* 基因 cDNA 全长 2 654 bp, 命名为 *Bc-Hsp90*, GenBank 登录号为 KP864677, 含 2 145 bp 的开放阅读框, 编码 715 个氨基酸蛋白, 具有 HSP90 蛋白家族共有模式和 1 个基序标签, C-末端具有 MEEVD 基序, 属于胞质型热激蛋白。系统发育分析显示, *Bc-Hsp90* 基因高度保守。不同高温 (32–40 °C) 胁迫处理 1 h 和 2 h 后, 瓜实蝇成虫体内 *Bc-Hsp90* 的相对表达量均显著高于对照组 (26 °C), 并在 38 °C 和 40 °C 表达量最高; 阿维菌素长期筛选的 RS 品系, *Bc-Hsp90* 表达量是对照 SS 品系的 2.13 倍, 但 RS 品系以 LC₉₀ 剂量诱导后, *Bc-Hsp90* 表达量显著下调, 随着恢复时间延长其表达量逐渐升高, 96 h 后恢复到对照水平。【结论】推测 *Bc-Hsp90* 在瓜实蝇耐热性和抗阿维菌素过程中可能起着重要作用。

关键词 瓜实蝇; 高温胁迫; 抗药性; *Hsp90*; 表达

Cloning and expression of the *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) heat shock protein 90 gene

JIANG Jian-Jun** HUANG Li-Fei LI Liu-Feng CHEN Hong-Song
WANG Feng-Ying*** YANG Lang***

(Guangxi Key Laboratory of Biology for Crop Diseases and Insect Pests, Plant Protection Research Institute,
Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China)

Abstract [Objectives] To investigate the function of the heat shock protein *Hsp90* gene of *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) (*Bc-Hsp90*) under different temperatures and pesticide stress in order to improve control of this pest. [Methods] The cDNA full-length fragment of the *Bc-Hsp90* was cloned using the RACE-PCR method. Bioinformatics tools were used to analyze the sequence characteristics, and real-time quantitative PCR was used to detect the expression levels of the gene under heat stress, and after exposure to the pesticide abamectin, in abamectin-resistant and susceptible strains. [Results] The complete sequence of 2 654 bp was obtained (Accession number: KP864677) and was found to contain a 2 145 bp open reading frame (ORF) encoding 715 amino acids. Family signatures of the HSP90 protein and the cytoplasm of the *Hsp90* gene C-terminal region MEEVD motif were detected. Phylogenetic analysis indicates that *Bc-Hsp90* is highly conserved. Real-time quantitative PCR results showed that 1 h and 2 h of heat stress (32–40 °C) up-regulated the expression of *Bc-Hsp90*. Expression peaked at 38 °C and 40 °C and expression in an abamectin resistant strain (RS) was 2.13 times higher than in a sensitive strain (SS). The expression of the *Bc-Hsp90* gene was down-regulated after exposure to an LC₉₀ dose of abamectin and returned to normal levels after 96 h. [Conclusion] The expression level of *Bc-Hsp90* could play an important role in heat resistance and

*资助项目 Supported projects: 广西自然科学基金 (2018GXNSFAA138068; 2015GXNSFBA139072); 广西科技重大专项 (AA17204041); 广西作物病虫害生物学重点实验室项目 (2016-ST-4)

**第一作者 First author, E-mail: jiangjianjun8008@126.com

***共同通讯作者 Co-corresponding authors, E-mail: wfy58260396@163.com; yang2001lang@163.com

收稿日期 Received: 2019-04-02; 接受日期 Accepted: 2019-04-26

pesticide tolerance in *B. cucurbitae*.

Key words *Bactrocera cucurbitae*; heat stress; resistance; *Hsp90*; gene expression

热激蛋白 (Heat shock protein, HSP), 又称热休克蛋白, 是一类生物体抵御极端温度、干旱、杀虫剂、饥饿和病菌感染等不利因素诱导合成的抗逆性相关蛋白, 其功能主要充当分子伴侣阻止蛋白质错误折叠, 通过降解变性蛋白和运送蛋白质到不同的细胞室从而保证正常的生理代谢活动 (Parsell and Lindquist, 1993; Sørensen *et al.*, 2010)。正常情况下, HSP 主要充当分子伴侣功能, 表达量较少, 但当细胞受到不利环境刺激时, HSP 就会被诱导增加表达量, 从而帮助生物体免受伤害。自果蝇体内首次发现 *Hsp* 基因以来 (Ritossa, 1962; Tissières *et al.*, 1974), 人类几乎在所有的生物体内均发现了有 *Hsp* 基因的存在 (Morimoto *et al.*, 1997), 并根据分子量大小和功能, 把 HSP 分为 6 个家族: 大分子 HSP 家族 (100-104 ku)、HSP90 家族 (82-90 ku)、HSP70 家族 (68-78 ku)、HSP60 家族 (58-65 ku)、HSP40 家族和小分子 sHSP 家族 (12-34 ku) (王秋香等, 2008; Li *et al.*, 2009)。

HSP90 是热激蛋白家族重要的成员之一, 在昆虫发育、环境极端温度适应性和抗药性等方面发挥着重要的作用。如在禾谷缢管蚜 *Rhopalosiphum padi* (李玉婷等, 2017)、玉米黄呆蓟马 *Anaphothrips obscurus* (Guo and Feng, 2018)、黏虫 *Mythimna separata* (杨静等, 2017)、玉米象 *Sitophilus zeamais* (Tungjitwitayakul *et al.*, 2015)、柑橘全爪螨 *Panonychus citri* (杨丽红等, 2016)、灰飞虱 *Laodelphax striatellus* (张青等, 2014) 和中红侧沟茧蜂 *Microplitis mediator* (张敏等, 2009) 等昆虫体内不同组织和发育阶段 *Hsp90* 基因表达量存在显著差异, 同时温度胁迫处理能明显诱导其表达。毒死蜱长期筛选的灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 品系其体内 *Hsp90-1* 和 *Hsp90-2* 表达量比对照敏感品系分别上升了 1.53 倍和 2.28 倍 (王利华等, 2015)。阿维菌素亚致死剂量 2 mg/mL 处理后, 西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* *Hsp90* 基因显著上调表达, 而高剂量 10 mg/mL 处理并不能诱导其 *Hsp90* 表达 (Wang *et al.*, 2014)。三氯杀螨醇和甲氰菊

酯胁迫处理咖啡小爪螨 *Oligonychus coffeae* 能诱导其体内 HSP90 蛋白显著上调表达 (Roy *et al.*, 2016)。

瓜实蝇 *Bactrocera cucurbitae* Coquillett 属双翅目实蝇科, 是果蔬上的一种重要入侵害虫 (Matthew and Jang, 2010; 任志超等, 2013), 主要以成虫产卵到作物花、果、茎中, 孵化后的幼虫取食造成作物组织腐烂和落果, 其寄主超过 80 多种作物, 包括甜瓜、西葫芦、黄瓜、豇豆、番茄和西瓜等 (Dhillon *et al.*, 2005; Ansari *et al.*, 2012; Dupuis *et al.*, 2018)。在我国主要分布于广东、广西、福建、海南、江苏、四川、云南、贵州、香港和台湾等省区 (孔令斌等, 2008)。从地理分布上看, 瓜实蝇主要在亚热带地区, 这可能与其耐热性相关。目前, 瓜实蝇的防治主要以化学防治为主, 杀虫剂的频繁施用, 瓜实蝇不可避免的产生了抗药性。田间监测表明瓜实蝇已经对阿维菌素、多杀菌素、敌百虫和高效氯氰菊酯等农药产生了不同程度的抗药性 (Vontas *et al.*, 2011; Hsu *et al.*, 2012; 谷世伟等, 2015)。在一些昆虫中已经证实热激蛋白的表达水平同其耐热性和抗药性有着直接的关系 (Tian *et al.*, 2015; Roy *et al.*, 2016), 但瓜实蝇热适应性和抗药性是否与其热激蛋白基因调控相关及其作用机制尚不清楚, 因此, 本研究利用 RACE-PCR 技术克隆获得瓜实蝇 *Hsp90* 基因全长 cDNA 序列, 分析其序列特征以及不同高温和药剂处理后的表达情况, 为探讨 *Hsp90* 基因在瓜实蝇对环境温度和杀虫剂等因子适应性方面可能的作用机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试虫源: 试验用瓜实蝇于 2012 采自南宁市郊区, 带回实验室标准化人工连续饲养建立种群, 即为敏感 (Susceptible strain, SS) 品系。饲养条件: 温度 (26 ± 1) °C, 湿度 75% ± 5%, 光周期

14 L : 10 D。用南瓜果实(市售)接卵和饲养幼虫,成虫采用酵母与蔗糖混合物饲养。瓜实蝇抗阿维菌素品系(Resistant strain, RS),以室内未接触任何农药饲养的 SS 品系为母本,采用饲毒法选育。

试剂:总 RNA 提取试剂 TRizol 美国 Invitrogen 公司;SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit, 美国 Clontech 公司;第一链 cDNA 合成试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser、荧光定量 PCR 试剂 SYBR® Premix Ex Taq™ II、TA 克隆试剂盒、感受态细胞 DH5 α 、DNA Taq 聚合酶和 DNA Marker 等, TaKaRa (大连)公司;其余试剂均为国产分析纯。96%阿维菌素(Abamectin)原药, 山东威瑞信化学检测技术有限公司。

仪器:PowerCycler PCR 仪,德国 Analytik Jena AG 公司;DYCP-6D 琼脂糖水平电泳仪,北京六一仪器厂;Firereader 紫外凝胶成像系统,英国 Uvitec 公司;SW-CJ-2D 型超净工作台,苏州净化设备有限公司;GT100 震动球磨仪,北京格瑞德曼公司;Nano-Drop1000C 超微量分光光度计,美国 Thermo 公司;CFX Connect 实时荧光定量 PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司;LRH-550-GSI 人工气候箱,韶关市泰宏医疗器械公司。

1.2 方法

1.2.1 瓜实蝇总 RNA 提取与 cDNA 合成 取羽化 4-5 d 的瓜实蝇成虫 8 头(SS 品系,雌雄各 4 头),采用 Trizol 试剂提取瓜实蝇总 RNA,1%琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 完整性,微量紫外分光光度计检测其质量和浓度。取 RNA 总量 1 μ g 用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒合成第一链 cDNA。所有操作均按照试剂说明进行。

1.2.2 瓜实蝇 *Hsp90* 基因全长扩增 根据 GenBank 数据库中瓜实蝇相近物种 *Hsp90* 氨基酸保守序列,采用 primer premier 5.0 软件设计合成 PCR 扩增简并引物 BC-*Hsp90*-F/R :TTYGGNGTNG GNTTYTA/AYTCNARYTGNCCTC。以 1.2.1 中合成的 cDNA 为模板,利用简并引物扩增 Bc-*Hsp90* 部分片段。扩增体系 50.0 μ L, 包含 10 $\times$ PCR Buffer 5.0 μ L (含 Mg²⁺)、dNTP (各 2.5 mmol) 4.0 μ L、上下游引物(10 μ mol·L⁻¹)各 4.0 μ L、cDNA 5.0 μ L、Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.5 μ L、加灭菌水至

50.0 μ L。反应条件:95 变性 30 s, 54 退火 30 s, 72 延伸 1 min, 35 个循环, 然后 72 延伸 5 min。扩增产物 2%琼脂糖凝胶电泳检测并纯化回收, 纯化的片段连接到克隆载体 pMD-20-T, 然后转化到感受态细胞 DH5 α , 转化后的重组细胞涂在含 Amp/IPTG/X-gal 的 LB 固体培养基上, 37 培养 12 h, 挑取白色菌斑在含 Amp 的 LB 液体培养基中 37 摇菌培养, 菌液送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

根据扩增获得的 BC-*Hsp90* 基因部分片段, 设计合成 5'-和 3'-RACE 全长扩增的引物 BC-*Hsp90*-GSP1/-GSP2 :CAATAAGAGTCAAAGTTCC AGCAGT/GCTCATTCTTAATAAGACTGCTGG。以 1.2.1 提取的总 RNA 为模板, 利用 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 分别扩增瓜实蝇 *Hsp90* 基因 5'-和 3'-全长序列, 操作按照试剂说明书进行。5'-和 3'-RACE-PCR 产物纯化、克隆、转化及测序同上述。

1.2.3 瓜实蝇 *Hsp90* 序列信息与系统发育分析 采用 Mega 7.0.26 软件对 BC-*Hsp90* 序列。5'-和 3'-进行拼接获得其全长, 利用在线 BLAST 工具和 ORF Finder 工具分别进行序列相似性分析和寻找全长 cDNA 开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF);ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>) 工具进行蛋白序列理化参数分析;SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测蛋白端信号肽;ScanProsite(<https://prosite.expasy.org/>) 进行蛋白基序分析;从 NCBI 数据库中下载昆虫纲 6 个目 46 种昆虫的 *Hsp90* 基因氨基酸全长序列, 利用 Mega 7.0.26 软件采用邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建系统发育树, 参数设置中以 Bootstrap 值检验置信度, 重复 1 000 次。

1.2.4 热胁迫和阿维菌素诱导后瓜实蝇 *Hsp90* 基因表达分析 热胁迫处理:取羽化 4-5 d 的成虫 10 头(雌雄各 5 头)置于 50 mL 离心管中, 用纱布封口, 置于光照培养箱中, 32、34、36、38、40 分别处理 1 h 和 2 h, 以 26 处理为对照。胁迫处理后, 26 恢复 1 h, 立即提取总 RNA 并合成第一链 cDNA。维菌素诱导处理:羽化 4-5 d 的成虫 500-600 头, 放置于 20 cm $\times$ 20 cm $\times$ 20 cm 的养虫笼中, 饥饿 24 h, 然后以含阿维菌素 (2.12 mg/L) 的 5%蜂蜜水 (含 0.5% 吐温-80) 饲喂 12 h, 接

下来正常饲养, 分别于药剂处理后 24、48、72、96 h 取活成虫 8 头(雌雄各 4 头)提取总 RNA, 以配制阿维菌素工作液的丙酮代替药剂处理为对照, 所有样品处理后立即提取总 RNA 并合成第一链 cDNA。热胁迫和药剂诱导处理均为 RS 种群(阿维菌素抗性 $LC_{90} = 2.12 \text{ mg/L}$)。所有处理均设 3 个生物学重复。

根据克隆获得的 *BC-Hsp90* 全长序列, 利用 Primer-BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 在线工具设计实时荧光定量 PCR 引物 *BC-Hsp90-F₁/R₂*: ACAACCTGGGTACCATGCG/CGG CAAACAAGTAAGCAGAGTA。选择稳定表达的内参基因进行校正和标准化是利用 RT-qPCR 方法准确定量不同处理间目标基因表达水平的必要前期基础, 本研究中对热胁迫、阿维菌素诱导及 RS 和 SS 品系中瓜实蝇内参基因进行了筛选, 引物和筛选步骤参照王凤英等(2018)的方法。热胁迫最合适的内参基因为 *RPS13* 和 *RpL32*, 阿维菌素药剂诱导处理及不同品系中为 *RpS13+TBP*。热胁迫和阿维菌素诱导 *BC-Hsp90* 荧光定量 PCR 分析以本步骤中合成的 cDNA 为模板, 定量 PCR 反应体系为 20 μL , 包括 SYBR® Premix Ex Taq™ II($2\times$) 10 μL 、上下游引物($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 各 0.75 μL 、cDNA 模板 1 μL 、灭菌水 7.5 μL , 反应程序按照试剂说明书进行。阿维菌素长期筛选后瓜实蝇 *BC-Hsp90* 基因表达分析, 分别以羽化 4-5 d 的 RS 和 SS 品系 cDNA 为模板(3 个生物学重复, 每个重复雄、雌各 4 头)。定量 PCR 每个样品均设 3 个重复孔。

1.3 数据统计与分析

定量 PCR 数据利用 Bio-Rad CFX Maestro 1.1 软件进行相对表达量分析($2^{-\Delta\Delta CT}$ 法)和 SPSS 19.0.0 软件进行差异显著分析。

2 结果与分析

2.1 瓜实蝇 *BC-hsp90* 基因全序列的扩增

采用简并引物 *BC-hsp90-F/R* 扩增瓜实蝇 *Hsp90* 基因部分片段, 目的片段经克隆测序后, 获得 208 bp 核苷酸片段, BLAST 比对显示该片段与昆虫 *Hsp90* 基因片段高度相似, 最高相似性为 93%

(GenBank 登录号 JN168997), 表明所获得的片段属于瓜实蝇 *Hsp90* 基因。根据获得的部分片段序列, 经过进一步 RACE-PCR 扩增获得 2 654 bp 瓜实蝇 *Hsp90* 基因全长 cDNA 序列, 命名为 *BC-Hsp90* (登录号 KP864677)。*BC-Hsp90* 全长 cDNA 序列与同属双翅目实蝇科的桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* (JN168997.1)、番石榴实蝇 *Bactrocera correcta* (KF444950.1) 和橄榄实蝇 *Bactrocera oleae* (FN392227.1) 等有较高的同源性 92%。开放阅读框为 2 148 bp, 编码 715 个氨基酸 5'-和 3'-端非编码区分别为 138 bp 和 368 bp, 3'-末端具 poly-A 结构和多聚腺苷酸加尾信号 AATAAA。

2.2 瓜实蝇 *BC-hsp90* 基因编码蛋白的生物学信息

瓜实蝇 *BC-hsp90* 基因编码的蛋白序列分子质量为 81.74 ku, 理论等电点 5.00, 负电荷的氨基酸残基(Asp + Glu) 137 个, 正电荷的氨基酸残基(Arg + Lys) 103 个, 分子式为 $\text{C}_{3615}\text{H}_{5756}\text{N}_{950}\text{O}_{1153}\text{S}_{24}$, N-端氨基酸为蛋氨酸(M, Met)推测的半衰期为 30 h (Mammalian reticulocytes, in vitro), 不稳定性系数 36.33, 总平均亲水性 -0.635, 不具有信号肽序列。ScanProsite 分析显示该蛋白具有 HSP90 蛋白家族共有模式: Y-x-[NQHD]-[KHR]-[DE]-[IVA]-F-[LM]-R-[ED] 和 1 个家族标签序列 YsNKEIFLRE (位于第 26-35 位), 胞质型热激蛋白基序标签 MEEVD 位于 C-末端第 711-715 位(图 1)。

2.3 *BC-hsp90* 序列的系统发育分析

本研究获得的瓜实蝇 *Hsp90* 氨基酸序列与其它昆虫 *Hsp90* 氨基酸序列构建的 NJ 系统发育树(图 2), 结果显示, 鳞翅目、鞘翅目、双翅目、膜翅目和直翅目分别单独聚为一支。半翅目形成 2 个亲缘关系较近的平行分支, 其中温室白粉虱 *Trialeurodes vaporariorum*、烟粉虱 *Bemisia tabaci* biotype 和褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 聚为一支, 绿盲蝽 *Apolygus lucorum*、桃蚜 *Myzus persicae*、东亚小花蝽 *Orius sauteri* 等聚为一支。本研究获得的瓜实蝇 *Hsp90* 氨基酸序列很好的聚在双翅目分支, 并与同属双翅目实蝇科果实蝇属的桔小实蝇关系最近。系统发育结果表明 *Hsp90* 具有较高的同源保守型, 能很好地反映出昆虫间的物种进化关系。

```

1   ATGGGGAGTTGAATTGGAAAAATACGCTTGAAAAATTTTGC GCGGAGCAATTTATAAAAGTGT TTTTGCAAGTGA
76  CTCTATATAATTTTACTGAAAGAACTAATTTATACTAAGTTAATATATATAAAATAAAACAAGATGCCAGAAGAA
1   M P E E
151 GTGGAAACCTTCGCTTTCCAAGCTGAGATTGCTCAGCTTATGTCGTTGATCATCAACACATTCTACTCGAACAAA
5   V E T F A F Q A E I A Q L M S L I I N T F Y S N K
226 GAAATTTTCCTTCGCGAGTTGATCTCCACGCATCTGATGCTTTGGATAAAAATCCGCTATGAGTCATTGACTGAC
30  E I F L R E L I S N A S D A L D K I R Y E S L T D
301 CCCACCAAGTTGGACAGTGGCAAGGAGCTGTACATCAAGCTCATTCCCTAATAAGACTGCTGGAACCTTTGACCCTT
55  P T K L D S G K E L Y I K L I P N K T A G T L T L
376 ATTGATACCGGTATTGGTATGACCAAA TCGGATTTGGTTAAACAACCTGGGTACCATTGCCAAGTCTGGTACAAAG
80  I D T G I G M T K S D L V N N L G T I A K S G T K
451 GCATTCATGGAACCTTTTGCAAGCTGGTCCGATATTTCTATGATTGGTCAATTTGGTGTGTTGTTCTACTCTGCT
105  A F M E A L Q A G A D I S M I G Q F G V G F Y S A
526 TACTTGTGTTGCGATAAGGTAAGTGTACATCAAGCATAACGATGATGAGCAATACATTTGGGAGTCTCTCAGCC
130  Y L F A D K V T V T S K H N D D E Q Y I W E S S A
601 GGTGGCTCCTTCACTGTCAATCTGTCAATACGAACCTTTGGGAGCTGGTACCAAGATTGTTACTATACATCAAG
155  G G S F T V K S D N T E P L G R G T K I V L Y I K
676 GAAGACCAAACCTGAATATTTGGAAGAAAGCAAATCAAGGAAATTGTGAACAAACACTCGCAATTCATTGGTTAT
180  E D Q T E Y L E E S K I K E I V N K H S Q F I G Y
751 CCAATTGAAGTTATTGGTTGAAAGGACGCGATCAAGAAGTGAGCGATGAGGCTGAAGTGACAGAAAGAT
205  P I K L L V E K E R D Q E V S D D E A E D D K K D
826 GAAGAGAAGAAAGATATGGACACAGATGAGCCAAAGATTGAAGATGTTGGTGAAGATGAAGATGCCGACAAAGAT
230  E E K K D M D T D E P K I E D V G E D E D A D K D
901 AAGGACGAAGAAGAAAGACTGTAAAGGTAAATACACCGAAGATGAAGAATTGAACAAACCAAGCCCAT
255  K D K K K K K T V K V K Y T E D E E L N K T K P I
976 TGGACCCGCAACCCCGATGATATTTACAAGAAGAGTATGGCGAGTTCTACAAATCCCTTACCAATGATTGGGAG
280  W T R N P D D I S Q E E Y G E F Y K S L T N D W E
1051 GATCATTTAGCCGTTAAGCACTTCTCTGTTGAAGGTCAATTGGAGTTCCGTGCTTTCATCCCACGTCGT
305  D H L A V K H F S V E G Q L E F R A L L F I P R R
1126 ACCCCCTTCGATTTGTTTGAACCAAAAGAAACGCAACAACATTAAATTGTACGTCGACGAGTTTTCATCATG
330  T P F D L F E N Q K K R N N I K L Y V R R V F I M
1201 GACAAATGCGAAGAACTCATTCCTGAGTATTGAATTTCAATCAAGGCTGTTGTCGACTGGAAGATTACCTTTG
355  D N C E E L I P E Y L N F I K G V V D S E D L P L
1276 AACATCTCTCGTGAATATGTTGCAACAGAACAAAGTATTGAAAGTTATTCGCAAAAATTTGGTAAAGAAACCATG
380  N I S R E M L Q Q N K V L K V I R K N L V K K T M
1351 GAATTGATCGAAGAGCTTACCGAAGCAAAAGAGTTGTACAAGAAATCTACGATCAGTTTGCCAAGAAATTTGAAA
405  E L I E E L T E D K E L Y K K F Y D Q F A K N L K
1426 TTGGGTGTGCACGAAGACAGCAACAACCGCGCTAAACTTGC CGACTTCTTGC GTTACCACACCTCAGCTTCTGGT
430  L G V H E D S N N R A K L A D F L R Y H T S A S G
1501 GATGATGCTGCTTCTTGTCCGATTACGTTTCAAGTATGAAGAGCAACGACATCTACTTCACTCAGTGT
455  D D A A S L D Y V S R M K S N Q K H I Y F I T G
1576 GAGTCGAAGGAACAAGTAAGCAACTCTGCCTTCGTAGAACGTGTTAAGGCCCGTGGATTGTAAGTAATCTACATG
480  E S K E Q V S N S A F V E R V K A R G F E V I Y M
1651 ACTGAACCCATGATGAATACGTCATCCAACCTTGAAGGAATATAAGGGCAACAATGACCTCTGTGAACCAAG
505  T E P I D E Y V I Q H L K E Y K G K Q L T S V T K
1726 GAAGGTTTGGAGTTGCCTGAAGATGAAGCTGAGAAGAAGAAGCGCGAGGAAGACAAGGCCAATTTCGAAAACCTG
530  E G L E L P E D E A E K K K R E E D K A K F E N L
1801 TGCAAAATGATGAAGTCAATTTTGGACAACAAGTGAAGAGTTGTTGTATCAAAAGATTTGTTGAGTCAACCA
555  C K L M K S I L D N K V E K V V V S N R L V E S P
1876 TGTTGTATTGTAACATCTCAATTCGGTTGGT CAGCCAACATGGAGCGTATTATGAAGGCACAAGCTCTACGTGAT
580  C C I V T S Q F G W S A N M E R I M K A Q A L R D
1951 ACTTCACTATGGGCTTACATGGCCGGAAGAAACATTTGGAAATCAATCCCGAACCCCAATCATCGAAACCTTG
605  T S T M G Y M A G K K H L E I N P E H P I I E T L
2026 CGCCAAAAGGCTGAGGCTGACAAGAACGATAAGGCTGTAAAGGACTTGTGCATTTTGTTCGAGACTGCTTTG
630  R Q K A E A D K N D K A V K D L C I L L F E T A L
2101 TTGCTTCTGTTTCTCATTGGACAGCCCTCAAGTGACGCTTCCCGCATTTACCGTATGATCAAGCTTGGTCTT
655  L S S G F S L D S P Q V H A S S R I Y R M I K L G L
2176 GGCATTGACGAAGAAGAGCCAAATGGCGACTGAAGATACTCAAGCGGTGGTGATGCTCCTCATTGGTTGATGAC
680  G I D E E E P M A T E D T Q S G G D A P P L V D D
2251 ACCGAGGATGCTTCAACATGGAAGAAGTCGATTAACTACCTAAATTTGACCCAAATTTTGAGTGC GAATTT CG
705  T E D A S H M E E V D
2326 CTAGTTCTACGTTATAAGTTTATTTTATTTTACAGAAATTTTG TATTCGACTTAGCAAACATCTTTAAATCTAAAC
2401 TTAATAGCTTACTATTTATGTTCAATTAATGAGTATCAAAATATGATTTTTTGTGTCGCGT TTTAAGCGGCC TAA
2476 TCCTATCGGAAGATAGGAACCTTCGTTTCCAAATCGATGTATGAGTGTGAGAATCTATATAGGAATAAATATTTA
2551 AATGAACCTTAATGTATGTCA TGATTCTTTA TTAACAGTAAGAAAT TAAAAATAAACTAATTGTTTATCAAACTC
2626 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 瓜实蝇 *Hsp90* 基因核苷酸序列及其推导的氨基酸序列Fig. 1 Nucleotide sequences of *Hsp90* from *Bactrocera cucurbitae* and their predicted amino sequences

方框为 *Hsp90* 基因家族序列标签，下划线为细胞质型热激蛋白氨基酸特征。

The sequences in box: Signature sequences for *Hsp90* gene family. The underline:

The cytoplasm of *Hsp90* gene C-terminal region.

2.4 BC-hsp90 基因表达分析

不同温度胁迫、阿维菌素药剂诱导及 RS 和 SS 品系中, 利用 qRT-PCR 筛选瓜实蝇成虫体内最稳定表达的内参基因组合。温度胁迫后: *RpS13*+*RpL32* 为最合适的内参基因, *RpS13*+*TBP* 为阿维菌素药剂诱导处理及 RS 和 SS 品系中最合适的内参基因。实时荧光定量分析不同高温胁迫后 BC-hsp90 基因的表达结果显示, 不同高温和时间胁迫后,

BC-Hsp90 表达量均显著高于对照 26 处理, 并且随着温度升高和时间延长, BC-Hsp90 表达呈上升趋势, 40 处理 1 h 和 2 h 的表达量均为最高, 分别为对照的 6.84 倍和 7.79 倍(图 3 :A)。除了 32 处理, 各相同高温处理 2 h 的 BC-Hsp90 表达量均高于处理 1 h 的相对表达量, 并且在 34、36、38 温度处理 1 h 和 2 h 两个处理组间差异显著。阿维菌素 LC₉₀ 浓度处理瓜实蝇 RS 品系后, 药剂诱导

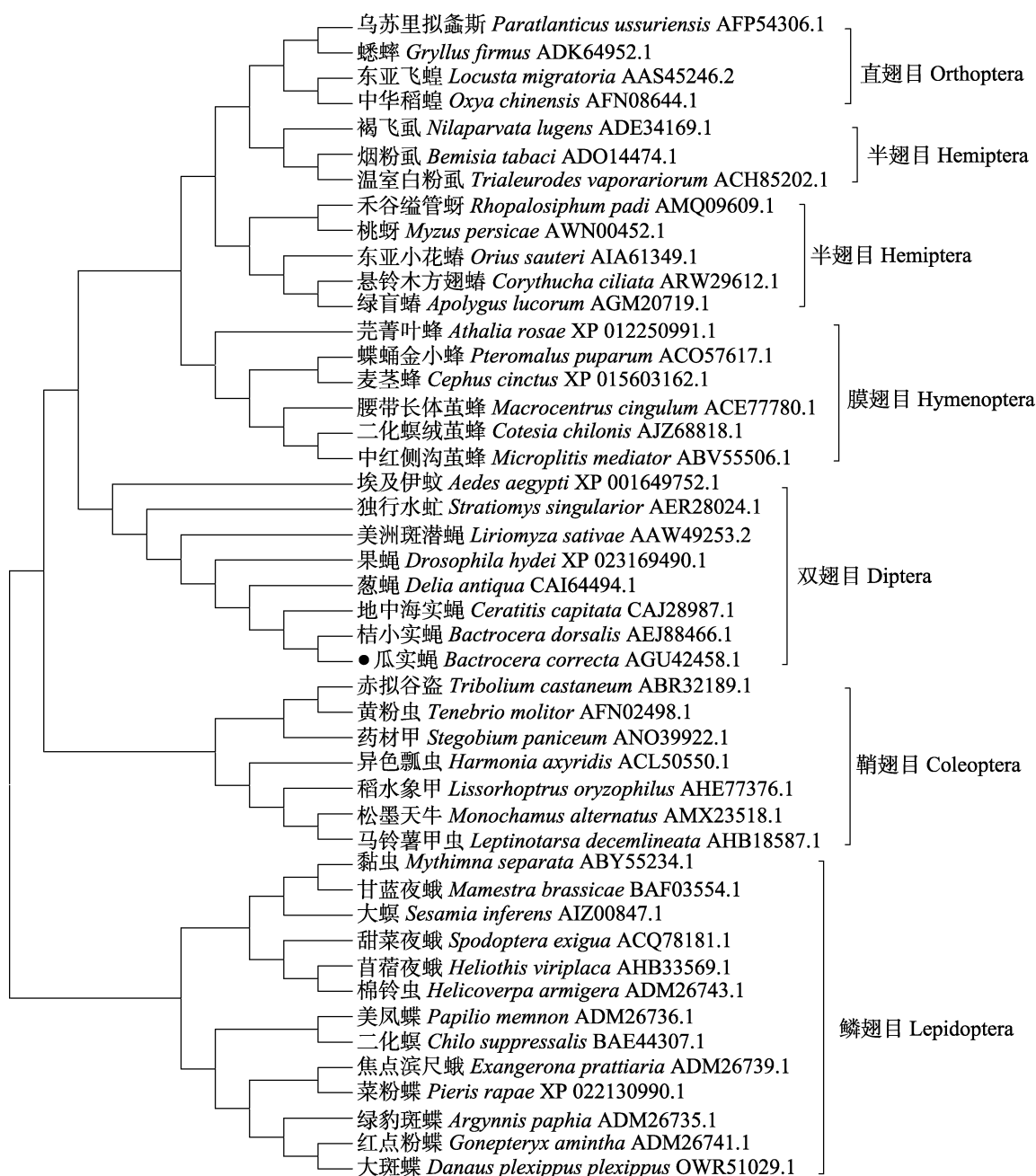


图 2 昆虫 Hsp90 氨基酸序列系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of insect Hsp90 amino acid sequences

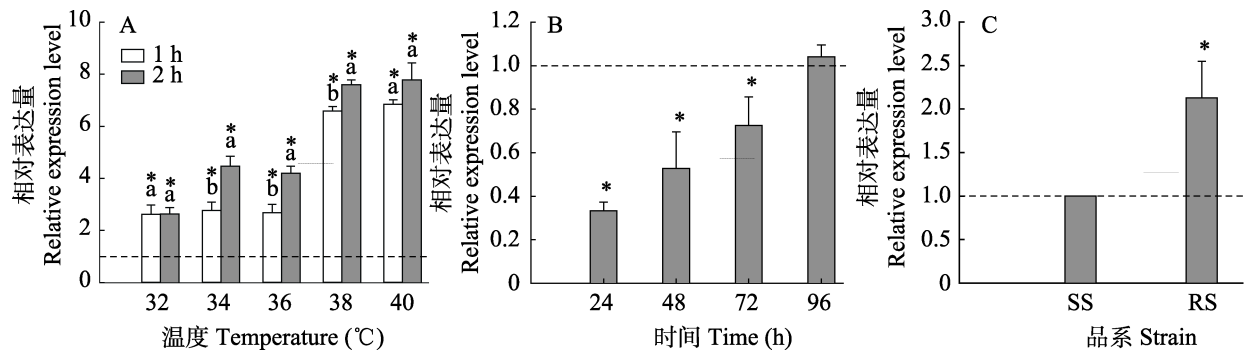


图3 不同高温和阿维菌素处理后瓜实蝇 *BC-Hsp90* 的相对表达量
Fig.3 Relative expression levels of *BC-Hsp90* in *Bactrocera cucurbitae* after exposure to different high temperature stress and abamectin stress

图中数据为平均值 ± 标准差；柱上标有星号表示该处理组与对照组差异显著 ($P < 0.05$, t -检验)；柱上标有不同小写字母表示相同高温不同时间处理后基因表达量存在显著性差异 ($P < 0.05$, t -检验)；Y=1.0 的虚线表示对照组相对表达量。A. 不同高温和时间处理后 *BC-hsp90* 基因相对表达量；B. 阿维菌素 LC_{90} 浓度诱导后 *BC-hsp90* 基因相对表达量；C. 阿维菌素长期筛选后的 RS 品系 *BC-hsp90* 基因相对 SS 品系表达量。

Data are mean ± SE. Histograms with the asterisk indicate significant difference between the treatment and control ($P < 0.05$, t -test), while with different letters indicate significant difference among different treatment time for 2 h and 1 h, respectively ($P < 0.05$, t -test), the dotted lines of Y=1.0 indicates the expression levels of *BC-Hsp90* in the control group.

- A. Relative expression levels of *BC-Hsp90* after exposure to different temperature stress for different time;
B. Relative expression levels of *BC-Hsp90* after exposure to LC_{90} of abamectin for different time;
C. Relative expression levels of *BC-Hsp90* in SS and RS.

24、48、72 h, *BC-Hsp90* 相对表达量明显下调表达, 分别为对照的 33.27%、52.81%和 72.52%, 诱导后 96 h 后恢复到对照水平 (图 3 : B); 未经阿维菌素处理的瓜实蝇 RS 品系 *BC-Hsp90* 表达量相对 SS 品系上升 2.13 倍 (图 3 : C)。

3 讨论

在生物体适应不利环境过程中, 其体内热激蛋白 HSP90 扮演着重要的作用, 为了研究瓜实蝇耐热性和抗药性机制, 本研究利用 RACE-PCR 技术成功克隆了瓜实蝇全长 *Hsp90* cDNA 序列, 氨基酸序列特征分析表明 *BC-Hsp90* 具有典型的家族序列标签和共有模式基序, C-末端为真核生物细胞质型基序 MEVVD, 说明其属于胞质型 HSP90 热激蛋白家族。已有的研究表明, 昆虫物种间 *Hsp90* 基因氨基酸序列高度保守 (Sun *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2018), 可以作为物种系统进化分析的参考基因进行分析 (Rutherford and Lindquist, 1998; Theodoraki and Mintzas, 2006)。本研究中, 瓜实蝇 *Hsp90* 氨基酸序列与其它昆虫高度相似 ($\geq 81\%$), 最高达 98% (桔小实蝇 AEJ88466.1)。 *BC-Hsp90* 氨基酸序

列与其它 6 目 45 种昆虫的 *Hsp90* 基因氨基酸序列系统进化关系显示, 大部分分类关系较为近缘的物种均聚在了一起, 虽然半翅目形成 2 个亲缘关系较近的平行分支, 但在以往分类学观点中, *B. tabaci* 和 *T. vaporariorum* 和 *N. lugens* 原属于独立的同翅目 (Homoptera), 后来经过分类学家的修订同翅目归入半翅目 (Hemiptera), 基于 *Hsp90* 氨基酸序列聚类树结果来看, 半翅目聚为两个较近平行分支的亲缘进化关系, 比较符合传统的分类学观点。上述结果验证了昆虫 *Hsp90* 具有很高的保守性和选择进化性 (Sun *et al.*, 2014)。

昆虫体内 *Hsp90* 基因过度表达有助于其对温度的耐受性, 本研究结果显示 32-40 °C 高温胁迫瓜实蝇 1 h 和 2 h, 其体内 *Hsp90* 表达量均显著高于对照, 且随着胁迫温度升高和时间延长而增加, 这表明本研究获得的 *BC-Hsp90* 基因属于诱导型热激蛋白, 可能在瓜实蝇热耐受性过程中具有重要意义, 此种现象在其它昆虫种类也有类似发现, 如苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* (申建茹等, 2011)、梨小食心虫 *Grapholita molesta* (Chen *et al.*, 2014) 等体内 *Hsp90* mRNA 的相对表达量在高温胁迫下随

温度的升高而显著增高,且与温度胁迫程度呈正相关。研究显示,昆虫对杀虫剂的耐受性与热激蛋白基因介导的热适应性存在相互关系,如在朱砂叶螨 *Tetranychus cinnabarinus* 抗阿维菌素(冯宏祖等, 2010)、灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 抗毒死蜱(王利华等, 2015)、咖啡小爪螨 *Oligonychus coffeae* 抗三氯杀螨醇、甲氰菊酯和乙硫磷(Roy *et al.*, 2016)、烟粉虱 *Bemisia tabaci* 地中海隐种抗烯啶虫胺、毒死蜱和高效氯氟菊酯 3 种药剂(郭雅洁等, 2013)、柑橘全爪螨 *panonychus citri* 抗阿维菌素(Tian *et al.*, 2015)等研究中均表明高温胁迫能诱导昆虫对杀虫剂的抗性,同样昆虫对杀虫剂的抗药性也能诱导其对高温的耐性,而这些结果均与昆虫体内 *Hsp* 基因的表达有关。杀虫剂和高温胁迫等不利环境胁迫均能对虫体组织和细胞造成损伤,而热激蛋白作为分子伴侣,通过降解变性蛋白和运送蛋白质到不同的细胞室从而保护有机体免受不利环境胁迫伤害,这可能是热激蛋白介导的昆虫抗药性和热耐受性存在相互影响关系的原因。

在本研究中,阿维菌素长期筛选后的瓜实蝇 RS 品系 *BC-hsp90* 基因相对 SS 品系表达量上调了 2.13 倍,这与在灰飞虱和朱砂叶螨等昆虫中的研究结果相一致(冯宏祖等, 2010;王利华等, 2015),药剂长期筛选的抗性品系中 *Hsp90* 基因的表达要高于敏感品系。然而,利用阿维菌素 LC_{90} 剂量诱导处理瓜实蝇后,其体内 *BC-Hsp90* 表达量呈现明显的下调表达,直到处理 96 h 后其表达量恢复到对照水平。在对西花蓟马研究中,阿维菌素亚致死剂量(2 mg/L)处理西花蓟马 24 h 和 48 h 后,其体内 *Fo-Hsp90* 基因能显著上调表达,但 10 mg/L 剂量处理并不能诱导 *Fo-Hsp90* 基因上调或下调表达(Wang *et al.*, 2014)。阿维菌素不同浓度处理后朱砂叶螨和柑橘全爪螨体内 *Hsp90* 基因均显著上调表达。但毒死蜱亚致死剂量 LC_{25} 浓度处理灰飞虱后短时间内其体内 *Hsp90* 基因表达量变化不显著或呈下降趋势。本研究中, LC_{90} 剂量(2.12 mg/L)处理后瓜实蝇 *BC-Hsp90* 下调的原因推测可能是阿维菌素 LC_{90} 剂量对瓜实蝇组织和细胞损伤过大,其体内仅调节转录维持生命特征的基因能正常或上调表达,其它非必要基因下调表达或维持原状(如 *BC-Hsp90*),以节省能量维持生命,也可能

是不同药剂在不同种类昆虫中对其 *Hsp90* 基因表达影响不同所致,但具体的原因还需要进一步深入研究。

参考文献 (References)

- Ansari MS, Hasan F, Ahmad N, 2012. Threats to fruit and vegetable crops: fruit flies (Tephritidae) - ecology, behaviour, and management. *Journal of Crop Science & Biotechnology*, 15(3): 169–188.
- Chen H, Xu X, Li Y, Wu J, 2014. Characterization of heat shock protein 90, 70 and their transcriptional expression patterns on high temperature in adult of *Grapholita molesta* (Busck). *Insect Science*, 21(4): 439–448.
- Dhillon MK, Singh R, Naresh JS, Sharma HC, 2005. The melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae*: A review of its biology and management. *Journal of Insect Science*, 5(1). Doi: 10.1093/jis/5.1.40.
- Dupuis JR, Sim SB, Jose MS, Leblanc L, Hoassain MA, Rubinoff D, Geib SM, 2018. Population genomics and comparisons of selective signatures in two invasions of melon fly, *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae). *Biological Invasions*, 20(5): 1211–1228.
- Feng HZ, Liu YH, He L, Li M, Lu RE, 2010. Cross tolerance of carmine spider mite, *Tetranychus cinnabarinus*, to abamectin and high temperature. *Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci.)*, 36(2): 159–167. [冯宏祖, 刘映红, 何林, 李明, 陆蕊娥, 2010. 朱砂叶螨对阿维菌素及高温的交互耐性. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 36(2): 159–167.]
- Gu SW, Zeng L, Liang GW, 2015. Monitoring for insecticide resistance of melon fly populations in the field of Southern China. *Journal of South China Agricultural University*, 36(4): 76–80. [谷世伟, 曾玲, 梁广文, 2015. 华南地区瓜实蝇田间种群的抗药性监测. 华南农业大学学报, 36(4): 76–80.]
- Guo XJ, Feng JN, 2018. Comparisons of expression levels of heat shock proteins (*hsp70* and *hsp90*) from *Anaphothrips obscurus* (Thysanoptera: Thripidae) in polymorphic adults exposed to different heat shock treatments. *Journal of Insect Science*, 18(3). Doi: 10.1093/jisesa/iey059.
- 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 *hsp70* mRNA 的诱导表达. 昆虫学报, 56(1): 29–38.]
- Hsu JC, Haymer DS, Chou MY, Feng HT, Chen HH, Huang YB,

- Mau RFL, 2012. Monitoring resistance to spinosad in the melon fly (*Bactrocera cucurbitae*) in Hawaii and Taiwan. *The Scientific World Journal*, 2012: Article ID 750576. 8.
- Kong LB, Lin W, Li ZH, Wan FH, Wang ZL, Huang GS, 2008. A predication of potential geographic distribution of melon fruit fly based on CLIMEX and DIVA-GIS. *Journal of Plant Protection*, 35(2):148–154. [孔令斌, 林伟, 李志红, 万方浩, 王之岭, 黄冠胜, 2008. 基于 CLIMEX 和 DIVA-GIS 的瓜实蝇潜在地理分布预测. *植物保护学报*, 35(2):148–154.]
- Li J, Qian X, Sha B, 2009. Heat shock protein 40: structural studies and their functional implications. *Protein & Peptide Letters*, 16(6): 606–612.
- Li YT, Zhao Q, Fang B, Chen MH, 2017. Molecular cloning and expression analysis of the *Hsp90* gene in the bird cherry-oat aphid, *Rhopalosiphum padi*. *Journal of Plant Protection*, 44(1): 16–23. [李玉婷, 赵奇, 房冰, 陈茂华, 2017. 禾谷缢管蚜热激蛋白 *Hsp90* 基因的克隆和表达分析. *植物保护学报*, 44(1): 16–23.]
- Matthew SS, Jang EB, 2010. Cucumber volatile blend attractive to female melon fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett). *Journal of Chemical Ecology*, 36(7): 699–708.
- Morimoto RI, Kline MP, Bimston DN, Cotto JJ, 1997. The heat-shock response: regulation and function of heat-shock proteins and molecular chaperones. *Essays in Biochemistry*, 32: 17–29.
- Parsell DA, Lindquist S, 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance-degradation and reaction of damageproteins. *Annual Review of Genetics*, 27: 437–496.
- Ren ZC, Wu WJ, Li Mh, Fu YG, 2013. Screening of attraction formula for male *Bactrocera cucurbitae* in laboratory and field. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 34(4): 743–746. [任志超, 吴伟坚, 李梅辉, 符悦冠, 2013. 瓜实蝇雄虫引诱剂配方的筛选. *热带作物学报*, 34(4): 743–746.]
- Ritossa F, 1962. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 18(12): 571–573.
- Roy S, Prasad A, Handique G, Barua A, 2016. First report on heat shock protein expression in red spider mites (*Oligonychus coffeae*) in response to pesticide exposure. *Invertebrate Survival Journal*, 13: 350–354.
- Rutherford SL, Lindquist S, 1998. *Hsp90* as a capacitor for morphological evolution. *Nature*, 396(6709): 336–342.
- Shen JR, Li MF, Chen NZ, Wang JJ, Wan FH, 2011. Cloning and analysis of the expression characteristics under heat stress of *Hsp90* gene in the codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Acta Entomologica Sinica*, 54(11): 1236–1248. [申建茹, 李明福, 陈乃中, 王进军, 万方浩, 2011. 苹果蠹蛾热激蛋白 *Hsp90* 基因的克隆及热胁迫下的表达分析. *昆虫学报*, 54(11): 1236–1248.]
- Sørensen JG, Kristensen TN, Loeschcke V, 2010. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters*, 6(11): 1025–1037.
- 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.
- Theodoraki MA, Mintzas AC, 2006. cDNA cloning, heat shock regulation and developmental expression of the *hsp83* gene in the Mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata*. *Insect Molecular Biology*, 15(6): 839–852.
- Tian H, Yu S, Liu B, Yang J, Li X, Yue J, Chen F, Ding L, Liu H, Li H, 2015. Molecular cloning of heat shock protein gene *HSP90* and effects of abamectin and double-stranded RNA on its expression in *Panonychus citri* (Trombidiformes: Tetranychidae). *Florida Entomologist*, 98(1): 37–43.
- Tissièrès A, Mitchell HK, Tracy UM, 1974. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *Journal of Molecular Biology*, 84(3): 389–398.
- Tungjitwitayakul J, Tatun N, Vajarasathira B, Sakurai S, 2015. Expression of heat shock protein genes in different developmental stages and after temperature stress in the maize weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Economic Entomology*, 108(3): 1313–1323.
- Vontas J, Hernández-Crespo P, Margaritopoulos JT, Ortego F, Feng HT, Mathiopoulos KD, Hsu JC, 2011. Insecticide resistance in Tephritid flies. *Pesticide Biochemistry & Physiology*, 100(3): 199–205.
- Wang FY, Yang L, Li LF, Liao SC, Liao RZ, 2018. Selection of reference genes in the *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) under temperature stress by RT-qPCR. *Journal of Environmental Entomology*, 40(5): 1097–1105. [王凤英, 杨朗, 黎柳锋, 廖世纯, 廖仁昭, 姜建军, 2018. 不同温度胁迫下瓜实蝇 RT-qPCR 内参基因筛选. *环境昆虫学报*, 40(5): 1097–1105.]
- 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.
- Wang LD, Shan D, Yao J, Fang JC, 2015. Induced expression of the heat shock protein 70 and 90 genes by exposure to high temperature and chlorpyrifosin female of *Lanodelphax striatellus*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 52(4): 828–836. [王利华, 单丹, 姚静, 方继朝, 2015. 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. 应用昆虫学报, 52(4): 828–836.]
- Wang QX, Li ZY, Xie Y, Cao H, 2008. Research progress of heat shock proteins in *Drosophila*. *Chinese Bulletin of Entomology*, 45(5): 698–702. [王秋香, 李宗芸, 谢艳, 曹慧, 2008. 果蝇热激蛋白的研究进展. 昆虫知识, 45(5): 698–702.]
- Wu YK, Zou C, Fu DM, Zhang WN, Xiao HJ, 2018. Molecular characterization of three *Hsp90* from *Pieris* and expression patterns in response to cold and thermal stress in summer and winter diapause of *Pieris melete*. *Insect Science*, 25(2): 273–283.
- Yang J, Nasir AB, Fan D, 2017. cDNA Cloning and induction of heat shock protein *Hsp90* from *Mythimna separata*. *Chinese Journal of Biological Control*, 33(5): 623–630. [杨静, Baloch Nasir Ali, 樊东, 2017. 黏虫热休克蛋白 *Hsp90* 基因的克隆及不同温度对其诱导反应. 中国生物防治学报, 33(5): 623–630.]
- Yang LH, Dou W, Jiang HB, Niu JZ, Ding TB, Wang JJ, 2016. Cloning and expression profiling of heat shock protein gene *PcHsp90* in the citrus red mite, *Panonychus citri* (Acari: Tetranychidae). *Acta Entomologica Sinica*, 59(4): 411–420. [杨丽红, 豆威, 蒋红波, 牛金志, 丁天波, 王进军, 2016. 柑橘全爪螨热激蛋白基因 *PcHsp90* 的克隆及表达模式分析. 昆虫学报, 59(4): 411–420.]
- Zhang M, Li JC, Liu XX, Zhang QW, Zhao ZW, 2009. The relationship between the heat shock protein 90 and the development of *Microplitis mediator*. *Acta Entomologica Sinica*, 46(2): 284–289. [张敏, 李建成, 刘小侠, 张青文, 赵章武, 2009. 热激蛋白 90 与中红侧沟茧蜂的发育关系. 昆虫知识, 46(2): 284–289.]
- 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.]