研究论文

RNA 干涉 *P-Hsp70* 基因表达对不同温度下方斑瓢虫成虫寿命及繁殖力的影响*

杨 晴[1, 2**] 陆宴辉[1, 3***]

（1. 中国农业科学院植物保护研究所植物病虫害综合治理全国重点实验室，北京 100193；
2. 沧州职业技术学院，沧州 061001；3. 中国农业科学院西部农业研究中心，昌吉 831100）

摘 要 **【目的】** 本研究旨在明确热激蛋白 *P-Hsp70* 基因表达对不同温度下方斑瓢虫 *Propylaea quatuordecimpunctata* 成虫寿命和繁殖力的影响。**【方法】** 采用显微注射递送 dsRNA 的方法对方斑瓢虫成虫的 *P-Hsp70* 基因进行干涉，利用 qRT-PCR 检测方法计算 *P-Hsp70* 基因的干扰效率，同时观察 *P-Hsp70* 基因被干扰后方斑瓢虫成虫暴露在不同温度（32、35 和 38 ℃）下的存活和繁殖情况。**【结果】** 显微注射递送 dsRNA 的方法可有效抑制方斑瓢虫成虫 *P-Hsp70* 基因的表达。显微注射 ds-*P-Hsp70* 处理组方斑瓢虫成虫在各个温度下的存活率、寿命和繁殖力均显著低于未注射 dsRNA 的对照组。在 32、35 和 38 ℃下，显微注射 dsRNA 24 h 后方斑瓢虫成虫存活率较对照组分别降低了 15.5%、16.7%和 56.8%，成虫平均寿命分别缩短 40.6%、51.2%和 65.8%。在 32 和 35 ℃下，显微注射 dsRNA 成虫繁殖力分别降低了 37.5%和 100.0%；在 38 ℃时，无论注射 dsRNA 与否，成虫均未能产卵。**【结论】** 热激蛋白 *P-Hsp70* 基因在方斑瓢虫成虫抵御高温胁迫过程中具有非常重要的作用。

关键词 方斑瓢虫；热激蛋白；*P-Hsp70*；RNAi；耐高温

RNAi-mediated mediating of *P-Hsp70* gene expression affects *Propylaea quatuordecimpunctata* longevity and fecundity under different temperatures

YANG Qing[1, 2**] LU Yan-Hui[1, 3***]

(1. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. Cangzhou Technical College, Cangzhou 061001, China; 3. Western Agricultural Research Center, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changji 831100, China)

Abstract **[Aim]** This study aims to investigate the effects of heat shock protein P-Hsp70 gene expression on the longevity and fecundity of adult 14-spotted ladybugs, *Propylaea quatuordecimpunctata,* under different temperatures. **[Methods]** Microinjection delivery of dsRNA was used to interfere with the *P-Hsp70* gene of adult *P. quatuordecimpunctata*. qRT-PCR was used to calculate the interference efficiency of the *P-Hsp70* gene. The adults were then exposed to different temperatures (32, 35, and 38 ℃) to determine the effect of temperature on their survival and reproduction following *P-Hsp70* gene interference. **[Results]** Our results demonstrate that microinjection delivery of dsRNA can effectively inhibit the expression of the *P-Hsp70* gene in adult *P. quatuordecimpunctata*. The survival rate, longevity, and fecundity of adult *P. quatuordecimpunctata* treated with microinjection ds-*P-Hsp70* were significantly lower than the control group (without injection of dsRNA) under all temperatures. At 32, 35, and 38 ℃, the survival rate of adults decreased by 15.5%, 16.7%, and

*资助项目 Supported projects：国家重点研发计划项目（2022YFD1400300）；国家棉花产业技术体系（CARS-15-19）

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

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：luyanhui@caas.cn

收稿日期 Received：2023-05-12；接受日期 Accepted：2023-12-26

56.8%, respectively. Additionally, the average adult longevity was reduced by 40.6%, 51.2%, and 65.8%, respectively. At 32 and 35 ℃, the fecundity of adults decreased by 37.5% and 100.0%, respectively. At 38 ℃, the adults failed to lay eggs with or without dsRNA. **[Conclusion]** Our findings indicate that the heat shock protein *P-Hsp70* gene plays a crucial role in high temperature stress resistance in adult *P. quatuordecimpunctata*.

Key words *Propylaea quatuordecimpunctata*; heat shock protein; *P-Hsp70*; RNAi; thermotolerance

20 世纪 90 年代以来，新疆逐步发展成为我国棉花种植的主产区（陆宴辉，2021）。国家统计局公布数据显示，2022 年新疆棉花种植面积达 249.7 万 hm^2，产量为 539.1 万吨，分别占全国棉花总面积和总产量的 83.2%和 90.2%。棉蚜 *Aphis gossypii*（Glover）是世界性重大农作物害虫，主要通过刺吸取食、分泌蜜露等途径危害棉花，在我国各棉区均有发生（Wu and Guo，2005；姜玉英等，2021）。在生产实践中，对棉蚜的防控以化学防治为主，往往忽视了瓢虫等天敌昆虫的生物防治能力（于汉龙等，2014；娄善伟等，2015），导致棉蚜再猖獗问题严重。2016-2020 年，新疆棉蚜年均发生面积为 45.66 万 hm^2，年均损失高达 12.13 万吨（芦屹等，2022）。

在新疆，方斑瓢虫 *Propylaea quatuordecimpunctata* Linnaeus（鞘翅目：瓢虫科）是棉田主要天敌种类之一，对棉蚜等害虫有较好的控制效果。新疆属于典型的温带大陆性干旱气候，在棉花生长季节环境温度偏高，而高温耐受性的强弱决定了昆虫在高温下的存活机率（García-Robledo *et al.*，2016）。已有研究显示，在室内恒温条件下，随着温度升高（17 到 30 ℃），方斑瓢虫幼虫期和成虫期寿命缩短，繁殖力呈“先升高后降低”趋势，在 25 ℃时繁殖力最高（Papanikolaou *et al.*，2013，2014）。田间调查发现，方斑瓢虫主要分布在温度较低的新疆北疆棉田，因此前期系统研究了方斑瓢虫对高温胁迫的适应性。研究结果发现，方斑瓢虫对 32、35 和 38 ℃的适应性不同，随着温度升高，表现为存活率下降、寿命缩短、繁殖力降低、抗氧化能力降低和基因的表达量改变等（Yang *et al.*，2022a，2022b）。同时还发现，在不同高温处理的方斑瓢虫中热激蛋白家族基因的表达显著升高。

当生物体（昆虫）遭受高温胁迫时，体内会诱导产生大量热激蛋白（HSPs），避免生物体内蛋白质和多肽变质（Nollen and Morimota，2002；King and MacRae，2015）。有研究表明，昆虫的耐热性强弱与其体内热激蛋白的表达量成正比（Bourg *et al.*，2001; Murphy *et al.*，2003；张永强等，2004）。Dahlgaard 等（1998）研究报道，热激蛋白 *Hsp70* 基因的表达与黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* Meigen 的耐热性呈正相关，*Hsp70* 基因的表达量越高其成虫的耐热性越强；被称为最耐热的陆地动物之一撒哈拉沙漠蚁 *Cataglyphis bombycina* Roger 和 *Cataglyphis bicolor* Fabricius 在 45 ℃时依然可以合成热激蛋白，而生活在气候比较温和地区的蚂蚁 *Formica polyctena* Foerster 最高在 39 ℃时合成（Gehring and Wehner，1995）；当桃蚜 *Myzus persicae* (Sulzer)的 *MpHsp70a* 基因被敲除后，对 40 ℃高温的敏感性显著增高（Chen *et al.*，2022）。已有研究认为，热激蛋白家族基因的高表达可提高昆虫对外界环境温度适应性，前期研究同样发现，随着处理温度的升高（32 到 38 ℃）方斑瓢虫体内诱导型热激蛋白 *P-Hsp70* 基因表达量显著升高。然而，该基因是否提高了方斑瓢虫抗高温能力以及是否介导对高温环境下的耐受性尚不清楚。

本研究将前期筛选的方斑瓢虫抗热相关基因 *P-Hsp70*，利用 RNA 干扰（RNAi）技术进行功能验证。观察和探讨经 RNAi 后的方斑瓢虫在不同温度（32、35 和 38 ℃）条件下的存活和繁殖情况，以阐明该基因在方斑瓢虫耐高温中的作用。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

方斑瓢虫于 2019 年 7 月在新疆石河子大学

实验棉田（44.32° N，85.92° E）内采集。依照任顺祥等（2009）对瓢虫形态特征的描述进行种类鉴定。采集前，确定采样地棉田未喷施任何药剂。将采集到的方斑瓢虫带回中国农业科学院廊坊科研中试基地，在人工气候箱[（32±1）℃、RH70%±5%、16L∶8D]内继代饲养，每天提供充足活体棉蚜作为食物。

1.2　方斑瓢虫总 RNA 提取及 cDNA 和 dsRNA 合成

采用 *TransZol* Up Plus RNA Kit 试剂盒提取方斑瓢虫总 RNA，全过程均在低温条件下进行，所有离心管和枪头均选用 RNase-free，避免 RNA 降解。待检测其浓度和纯度合格后，根据 FastKing gDNA Dispelling RT Supermix 反转录试剂盒合成 cDNA 第一条链，于 - 80 ℃保存备用。

将筛选到的方斑瓢虫基因 *P-Hsp70* 和对照基因 *GFP* 分别进行体外 dsRNA 合成。通过线上 Primer3Plus（http://www.primer3plus.com）设计引物。根据 T7 RiboMAX™ Express RNAi System 试剂盒要求，每个基因设计 2 对引物：一对在 F 引物 5′端加酶切位点，在 R 引物 5′端添加 T7 启动子；另一对反向添加。用于后续实验中分别合成目的基因的正反义链，引物信息见表 1。

表 1　引物信息

Table 1　Primer information

引物 Primers	引物序列（5′-3′） Primer sequences	用途 Purpose
ds-*P-Hsp70*	F: CTCCACCTGCGGTCTCAATT	RNAi
	R: CAGGGGTACATTGGAGCCAG	
ds-*P-GFP*	F: TGGTCCCAATTCTCGTGGAAC	
	R: CTTGAAGTTGACCTTGATGCC	
q-*P-Hsp70*	F: CTGCGGTCTCAATTCCCAGT	qPCR
	R: AACCCAGACGAAGCAGTAGC	
q-*P-GFP*	F: AGCCAACATTACCACTGA	
	R: GTATCCACGACGCAATTC	

1.3　dsRNA 干扰处理及干扰效率验证

选取新羽化的方斑瓢虫成虫（日龄<12 h）进行 RNAi 实验。将纯化的 dsRNA 上样于显微注射仪中，注射仪控制注射体积。用显微注射仪向试虫腹部注射目的基因 dsRNA（ds-GFP 和 ds-目的基因），每头瓢虫注射 1.536 μg dsRNA。将注射的试虫进行相应温度胁迫（32、35 和 38 ℃）处理，饲喂充足的棉蚜。以注射 ds-*P-GFP* 基因为阴性对照，不注射 dsRNA 为空白对照。在注射 24、48 和 72 h 后分别收集 2 头瓢虫作为一个样本，每个样本 3 次重复。将收集到的瓢虫快速置于液氮中的离心管中，保存于 - 80 ℃冰箱。

RNA 提取和 cDNA 合成参照 1.2。对未注射 dsRNA 的试虫、注射 ds-*P-GFP* 基因的试虫和注射目的基因 dsRNA 的试虫等通过 qRT-PCR 技术检测目的基因的表达量。方斑瓢虫内参基因 *EF1α* 用于均一化分析。引物信息见表 1。

1.4　RNA 干扰后方斑瓢虫存活率与繁殖力评价

将未注射 dsRNA 的试虫、注射 ds-*P-GFP* 基因的试虫和注射目的基因 dsRNA 的试虫在相应温度（32、35 和 38 ℃）培养箱中进行饲养，每天提供充足的棉蚜作为食物。每 20 头瓢虫为一组，每个处理进行 3 次重复。每 24 h 记录瓢虫的存活和产卵量直到全部死亡，验证 RNAi 前后方斑瓢虫存活率、寿命和繁殖力等参数的变化。

1.5　数据分析

采用单因素方差分析（One-way ANOVA）对实验数据进行分析。Student's *t* 检验 用于确定同一温度下不同处理间的表达差异（$P < 0.05$），对数秩检验 Kaplan-Meier 用于分析生存曲线。所有统计分析均使用 Excel 2010 和 SPSS 25.0 软件进行，图片由 OriginPro 9.0 和 SigmaPlot 12.5 等软件制作生成。

2　结果与分析

2.1　dsRNA 干扰效率

通过显微注射将 dsRNA 递送至方斑瓢虫成虫腹部，然后在不同温度（32、35 和 38 ℃）下进行处理，利用 qRT-PCR 技术测定热激蛋白 *P-Hsp70* 基因在干扰后 24、48 和 72 h 的表达量，计算可得出干扰效率。研究结果显示，方斑瓢虫

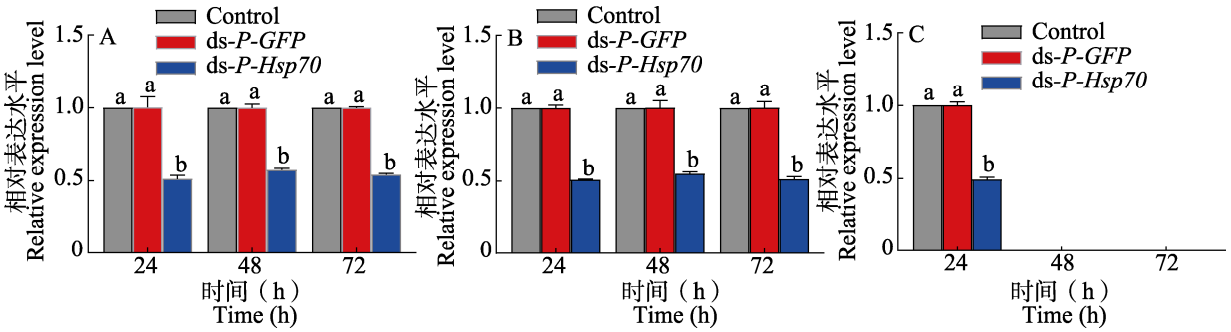


图 1　方斑瓢虫成虫基因 *P-Hsp70* 的干扰效率

Fig. 1　The gene silence effects of *P-Hsp70* in *Propylaea quatuordecimpunctata* adults

A. 32 ℃处理下成虫基因 *P-Hsp70* 的干扰效率；B. 35 ℃处理下成虫基因 *P-Hsp70* 的干扰效率；C. 38 ℃处理下成虫基因 *P-Hsp70* 的干扰效率。

A. The gene silence effects of *P-Hsp70* in the adults under 32 ℃; B. The gene silence effects of *P-Hsp70* in the adults under 35 ℃; C. The gene silence effects of *P-Hsp70* in the adults under 38 ℃。

对照：未注射 dsRNA，下图同。数据为平均值±SE，不同字母表示在 0.05 水平上差异显著（Tukey 检验）。图 3 同。

Control: Non-injection dsRNA, the same below. Data are mean ±SE. Different letters above the bars indicate statistically significant difference across temperatures within a species (Tukey's posthoc test; $P < 0.05$). The same for Fig. 3.

P-Hsp70 基因在 72 h 内被成功干扰，表达量与对照组（未注射 dsRNA）相比显著降低，且 24 h 时表达量最低（$P < 0.001$，图 1：A-C）。在高温（38 ℃）胁迫下，当 *P-Hsp70* 基因被干扰后方斑瓢虫在 48 h 内全部死亡，干扰后 24 h 的表达量降低了 50.9%（24 h：$t = 40.21$，$P = 0.001$，图 1：C）。

2.2　RNA 干扰对方斑瓢虫成虫存活和繁殖的影响

明确了注射 dsRNA 介导的 RNAi 技术可成功干扰方斑瓢虫的 *P-Hsp70* 基因表达，本研究继续观察方斑瓢虫成虫 *P-Hsp70* 基因被干扰后在不同实验温度（32、35 和 38 ℃）下的存活率。结果显示，方斑瓢虫 *P-Hsp70* 基因被干扰后，与对照组（未注射 dsRNA）相比，方斑瓢虫成虫存活率随着处理时间的延长均逐渐降低（$P < 0.001$，图 2：A-C），这说明 *P-Hsp70* 基因在方斑瓢虫抗高温过程中具有非常重要的作用。当 *P-Hsp70* 基因被干扰 24 h 后，所有实验温度下方斑瓢虫成虫的存活率均显著降低，存活率分别下降 15.5%、16.7%和 56.8%（32 ℃：$t = 7.07$, $P =$

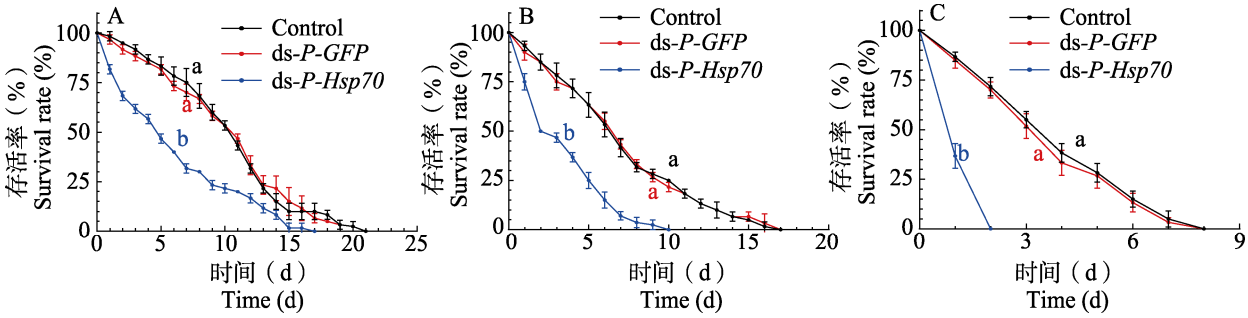


图 2　方斑瓢虫成虫 *P-Hsp70* 基因被干扰后在不同温度下的存活率

Fig. 2　Adult survival rate of *Propylaea quatuordecimpunctata* under different temperatures after the *P-Hsp70* gene was silenced

A. 32 ℃处理下存活率；B. 35 ℃处理下存活率；C. 38 ℃处理下存活率。

A. Survival rate under 32 ℃; B. Survival rate under 35 ℃; C. Survival rate under 38 ℃.

折线上不同字母代表相应颜色曲线与对照组差异显著（$P < 0.05$，log-rank）。

Different letters indicates that the corresponding color curve is different from control ($P < 0.05$, log-rank).

0.002; 35 ℃: $t = 5.50$, $P = 0.005$; 38 ℃: $t = 10.61$, $P < 0.001$)。

当方斑瓢虫成虫 *P-Hsp70* 基因被干扰后，与对照组（未注射 dsRNA）相比，在所有实验温度下平均寿命显著缩短(图 3:A),分别缩短 40.6%、51.2%、65.8%(32 ℃: $t = 14.97$, $P < 0.001$; 35 ℃: $t = 21.07$, $P < 0.001$; 38 ℃: $t = 14.19$, $P < 0.001$)。

同时，本研究还观察了 *P-Hsp70* 基因被干扰后方斑瓢虫成虫在所有实验温度（32、35 和 38 ℃）下的繁殖力。结果如图 3（B）所示，当 *P-Hsp70* 基因被干扰后，方斑瓢虫成虫的产卵量与对照组（未注射 dsRNA）相比也显著降低(38 ℃除外: *P-Hsp70* 基因干扰前后都未能产卵), 2 个不同温度（32 和 35 ℃）处理条件下的产卵量分别降低 37.5%和 100.0%（32 ℃: $t = 17.13$, $P < 0.001$; 35 ℃: $t = 29.96$, $P < 0.001$)。

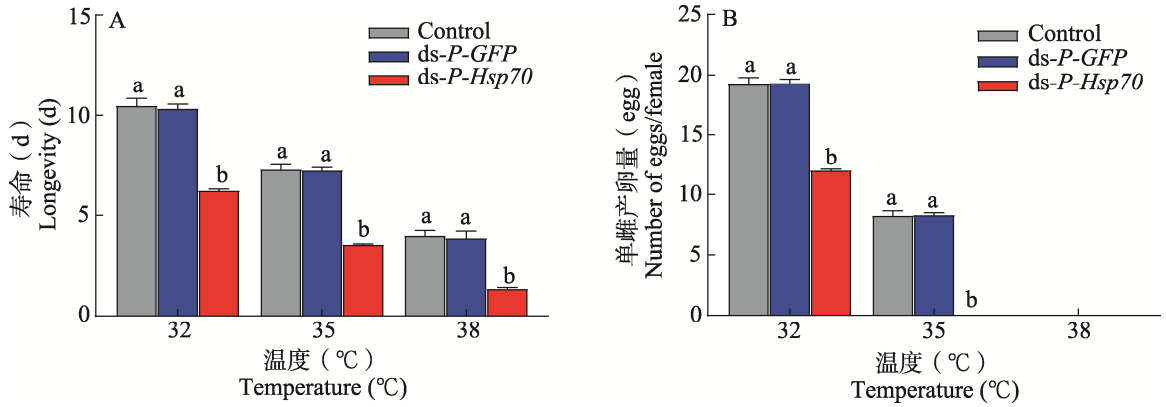


图 3　方斑瓢虫成虫 *P-Hsp70* 基因被干扰后的平均寿命（A）和繁殖力（B）

Fig. 3　Adult average longevity (A) and fecundity (B) of *Propylaea quatuordecimpunctata* under different temperatures after the *P-Hsp70* gene was silenced

3　讨论

近 20 年来，RNAi 技术被广泛应用于昆虫功能基因的验证研究（Kennerdell and Carthew，1998；Li *et al.*，2013；林妙金等，2021)。普遍认为，细胞对 dsRNA 的摄取效率是限制 RNAi 过程的重要因素，只要 dsRNA 进入细胞内，RNAi 通常都会发生（Yu *et al.*，2013)。在多种 dsRNA 的递送方式中，直接注射 dsRNA 的递送方式是最有效的方式之一（Fire *et al.*，1998)。本研究中采用 RNAi 技术对热激蛋白 *P-Hsp70* 基因进行功能验证，显微注射 dsRNA 后该基因表达量显著降低，干扰效率为 49.1%-57.5%，这说明本研究中选用直接注射 dsRNA 的递送方式可显著抑制目的基因。同样直接注射 dsRNA 可有效抑制斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* Fabricius 幼虫中氨肽酶基因 *slapn* 的表达，但饲喂 dsRNA 却不能实现 RNAi（Rajagopal *et al.*，2002)。然而，注射 dsRNA 的递送方式同样不能适用于所有昆虫，例如，体型较小的昆虫更适合选择机械损伤较小的饲喂或浸泡 dsRNA 的递送方式（Chen *et al.*，2010)。因此，在进行 RNAi 研究时还需综合考虑，选用合适、有效的递送方式。

存活曲线可显示种群的生存率随时间如何变化，方斑瓢虫热激蛋白 *P-Hsp70* 基因被干扰后，在所有实验温度下其存活率的下降趋势显著高于对照组，随着时间推移降低趋势更显著，这表明热激蛋白 *P-Hsp70* 基因在方斑瓢虫抗高温过程中具有一定的保护作用。同样，前期研究中也发现了热激蛋白 70 家族基因在不同昆虫耐高温过程有类似的作用。例如，莲草直胸跳甲 *Agasicles hygrophila*（Selman and Vogt）的 *Hsp70* 基因被干扰后，高温处理下（36 和 39 ℃）存活率显著低于对照（未进行 RNAi)，并随温度升高差异更显著(Jin *et al.*, 2020); 棉蚜 *Aphis gossypii* Glover 热激蛋白 70 家族基因 *ApHsp70A1-1* 和 *ApHsp68* 被抑制后，成虫的存活和繁殖均显著低于对照组（Liu *et al.*，2023)。本研究发现，热

激蛋白 *P-Hsp70* 基因在方斑瓢虫抗高温过程中有一定保护作用，随着温度升高保护作用更显著。

同时发现，在所有实验温度下，当热激蛋白 *P-Hsp70* 基因被干扰后，方斑瓢虫成虫寿命和繁殖力也显著下降。因此推断，热激蛋白 *P-Hsp70* 基因可保护方斑瓢虫，降低高温危害。先前的一些报道已经证实，热激蛋白可调控昆虫的寿命。例如，短暂、低水平的诱导黑腹果蝇体内 *Hsp70* 基因的表达量，就可使其寿命延长（Tatar *et al.*，1997）。同时，也有研究表明热激蛋白的合成是一个消耗能量的过程，在帮助昆虫获取高温耐受性的同时也会对虫体产生不利影响，过量表达可能会影响昆虫的生长发育和繁殖能力（Koehn and Bayne，1989；Hoffmann，1995；Sejerkilde *et al.*，2003；Morrow *et al.*，2006）。在 32 和 35 ℃温度锻炼下，美洲斑潜蝇 *Liriomyza sativae* Blanchard 的 *hsp70* 和 *hsp20* 基因表达量显著升高，虫体耐热性提高，但成虫的取食和繁殖能力显著降低（Huang *et al.*，2007）。在前期的研究结果中发现，高温（38 ℃）虽然提高了方斑瓢虫 *P-Hsp70* 基因的表达量，但成虫存活率和繁殖率大幅度降低，瓢虫对高温的适应性和热激蛋白基因诱导之间的权衡关系还有待进一步研究（Yang *et al*., 2022a, 2022b）。

本研究证实，热激蛋白 *P-Hsp70* 基因在方斑瓢虫抗高温过程中具有重要作用，但昆虫的抗高温过程十分复杂，还需更深入的探索。前期研究结果显示，除了热激蛋白 *P-Hsp70* 基因之外，还有热激蛋白家族其他基因（*P-shsp*）、大量的细胞色素 P450 基因以及一些抗氧化相关基因的表达量和表达模式随温度升高发生变化（Yang *et al.*，2022a）。这些基因同样在一些昆虫的抗高温过程中具有重要作用（杨航等，2019；Durak *et al.*，2021；Shen *et al.*，2021），但它们在方斑瓢虫的抗高温过程中是否有意义，还需要进一步证实。

参考文献 (References)

Bourg EL, Valenti P, Lucchetta P, Payre F, 2001. Effects of mild heat shocks at young age on aging and longevity in *Drosophila melanogaster*. *Biogerontology*, 2(3): 155–164.

Chen J, Zhang D, Yao Q, Zhang J, Dong X, Tian H, Chen J, Zhang W, 2010. Feeding-based RNA interference of a trehalose phosphate synthase gene in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Molecular Biology*, 19(6): 777–786.

Chen N, Tan JY, Wang Y, Qi MH, Peng JN, Chen DX, Liu S, Li MY, 2022. A heat shock protein 70 protects the green peach aphid (*Myzus persicae*) against high-temperature stress. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 25(4): 101992.

Dahlgaard J, Loeschcke V, Michalak P, Justesen J, 1998. Induced thermotolerance and associated expression of the heat-shock protein Hsp70 in adult *Drosophila melanogaster*. *Functional Ecology*, 12(5): 786–793.

Durak R, Dampc J, Kula-Maximenko M, Mołoń M, Durak T, 2021. Changes in antioxidative, oxidoreductive and detoxification enzymes during development of aphids and temperature increase. *Antioxidants*, 10 (8): 1181.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC, 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669): 806–811.

García-Robledo C, Kuprewicz EK, Staines CL, Erwin TL, Kress WJ, 2016. Limited tolerance by insects to high temperatures across tropical elevational gradients and the implications of global warming for extinction. *PNAS*, 113(3): 680–685.

Gehring WJ, Wehner R, 1995. Heat shock protein synthesis and thermotolerance in *Cataglyphis*, an ant from the Sahara desert. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(7): 2994–2998.

Hoffmann AA, 1995. Acclimation: Increasing survival at a cost. *Trends in Ecology and Evolution*, 10(1): 1–2.

Huang LH, Chen B, Kang L, 2007. Impact of mild temperature hardening on thermotolerance, fecundity, and Hsp gene expression in *Liriomyza huidobrensis*. *Journal of Insect Physiology*, 53(12): 1199–1205.

Jiang YY, Liu J, Zeng J, Xia B, Lu YH, 2021. Monitoring and forecast of cotton pests in China: A review over the past 70 years. *Journal of Plant Protection*, 48(5): 940–946. [姜玉英, 刘杰, 曾娟, 夏冰, 陆宴辉, 2021. 中国棉花害虫测报：70 年回顾. 植物保护学报, 48(5): 940–946.]

Jin JS, Zhao MT, Wang Y, Zhou ZS, Wan FH, Guo JY, 2020. Induced thermotolerance and expression of three key Hsp genes (*Hsp70*, *Hsp21*, and *sHsp21*) and their roles in the high temperature tolerance of *Agasicles hygrophila*. *Frontiers in Physiology*, 10: 1593.

Kennerdell JR, Carthew RW, 1998. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell*, 95(7): 1017–1026.

King AM, MacRae TH, 2015. Insect heat shock proteins during stress and diapause. *Annual Review of Entomology*, 60: 59–75

Koehn RK, Bayne BL, 1989. Towards a physiological and genetical understanding of the energetics of the stress response. *Biological Journal of the Linnean Society*, 37(1/2): 157–171.

Li J, Wang XP, Wang MQ, Ma WH, Hua HX, 2013. Advances in the use of the RNA interference technique in *Hemiptera*. *Insect Science*, 20(1): 31–39.

Lin MJ, Guo MJ, Pan G, He SQ, Wu JH, Qiu BL, Pan HP, 2021. RNAi mediated silencing of *HvIAP1* affects survival and development of the 28-spotted ladybird, *Henosepilachna vigintioctopunctata*. *Journal of Environmental Entomology*, 43(3): 552–558. [林妙金, 郭木娟, 潘广, 何诗淇, 吴建辉, 邱宝利, 潘慧鹏, 2021. RNAi 介导的 *HvIAP1* 基因沉默对茄二十八星瓢虫存活和发育的影响. 环境昆虫学报, 43(3): 552–558.]

Liu JP, Liu Y, Li Q, Lu YH, 2023. Heat shock protein 70 and Cathepsin B genes are involved in the thermal tolerance of *Aphis gossypii*. *Pest Management Science*, 79(6): 2075–2086.

Lou SW, Wang DG, Zhang PZ, Lu XY, Bian Y, Zhang XD, Ma TF, Zhang HJ, 2015. The study of *Baeillus subtilis* with water application to control of cotton verticillium wilt. *China Cotton*, 42(7): 25–28. [娄善伟, 王大光, 张鹏忠, 鹿秀云, 边洋, 张晓东, 马腾飞, 张怀军, 2015. 枯草芽孢杆菌随水滴施防治棉花黄萎病的应用研究. 中国棉花, 42(7): 25–28.]

Lu Y, Li J, Wei XZ, Wang HQ, Wang PL, 2022. A technical regulation for integrated control of cotton aphids in Xinjiang. *China Cotton*, 49(1): 38–41. [芦屹, 李晶, 魏新政, 王惠卿, 王佩玲, 2022. 新疆棉花蚜虫综合防治技术规程. 中国棉花, 49(1): 38–41.]

Lu YH, 2021. Ever-evolving advances in the researches of cotton insect pest management in China. *Journal of Plant Protection*, 48(5): 937–939. [陆宴辉, 2021. 与时俱进的中国棉花害虫治理研究. 植物保护学报, 48(5): 937–939.]

Morrow G, Heikkila JJ, Tanguay RM, 2006. Differences in the chaperone-like activities of the four main small heat shock proteins of *Drosophila melanogaster*. *Cell Stress Chaperones*, 11(1): 51–60.

Murphy CT, Mccarroll SA, Bargmann CI, Fraser A, Kamath RS, Ahringer J, Li H, Kenyon C, 2003. Genes that act downstream of DA–16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 424(6946): 277–283.

Nollen EA, Morimoto RI, 2002. Chaperoning signaling pathways: Molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. *Journal of Cell Science*, 115(14): 2809–2816.

Papanikolaou NE, Milonas PG, Kontodimas DC, Demiris N, Matsinos YG, 2013. Temperature-dependent development, survival, longevity, and fecundity of *Propylea quatuordecimpunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Annals Entomological Society America*, 106(2): 228–234.

Papanikolaou NE, Milonas PG, Kontodimas DC, Demiris N, Matsinos YG, 2014. Life table analysis of *Propylea quatuordecimpunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) at constant temperatures. *Annals Entomological Society America*, 107(1): 158–162.

Rajagopal R, Sivakumar S, Agrawal N, Malhotra P, Bhatnagar RK, 2002. Silencing of midgut aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 277(49): 46849–46851.

Ren SX, Wang XM, Pang H, Peng ZQ, Zeng T, 2009. Colored Pictorial Handbook of Ladybird Beetles in China. Beijing: Science Press. 228–229. [任顺祥, 王兴民, 庞虹, 彭正强, 曾涛, 2009. 中国瓢虫原色图鉴. 北京: 科学出版社. 228–229.]

Sejerkilde M, Sorensen JG, Loeschcke V, 2003. Effects of cold- and heat hardening on thermal resistance in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 49(8): 719–726.

Shen XN, Liu WX, Wan FH, Lv ZC, Guo JY, 2021. The role of Cytochrome P450 4C1 and Carbonic anhydrase 3 in response to temperature stress in *Bemisia tabaci*. *Insects*, 12(12): 1071.

Tatar M, Khazaeli AA, Curtsinger JW, 1997. Chaperoning extended life. *Nature*, 390(6655): 30.

Wu KM, Guo YY, 2005. The evolution of cotton pest management practices in China. *Annual Review of Entomology*, 50: 31–52.

Yang H, Wang XY, Pei HY, Fan D, 2019. Cloning a peroxidase cDNA sequence from the priental armyworm, *Mythimna separata* Walker and its induction to different temperature stress. *Chinese Journal of Biological Control*, 35(1): 44–52. [杨航, 王晓云, 裴海英, 樊东, 2019. 粘虫过氧化物酶 *MsPOD* 基因的克隆及不同温度胁迫的诱导效应. 中国生物防治学报, 35(1): 44–52.]

Yang Q, Liu JP, Lu YH, 2022a. Transcriptome analysis of *Propylaea quatuordecimpunctata* L. (Coleoptera: Coccinellidae) under high temperature stress. *Agriculture*, 12(8): 1088.

Yang Q, Liu JP, Wyckhuys KAG, Yang TZ, Lu YH, 2022b. Impact of heat stress on the predatory ladybugs *Hippodamia variegata* and *Propylaea quatuordecimpunctata*. *Insects*, 13(3): 306.

Yu HL, Men XY, Ye BH, Yu Y, Zhang AS, Li LL, Zhou XH, Zhang SC, Zhuang QY, 2014. Effects of suppression of natural enemies on cotton aphids. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 51(1): 99–106. [于汉龙, 门兴元, 叶保华, 于毅, 张安盛, 李丽莉, 周仙红, 张思聪, 庄乾营, 2014. 自然天敌对苗蚜和伏蚜控制作用的定量分析. 应用昆虫学报, 51(1): 99–106.]

Yu N, Christiaens O, Liu JS, Niu JZ, Cappelle K, Caccia S, Huvenne H, Smagghe G, 2013. Delivery of dsRNA for RNAi in insects: An overview and future directions. *Insect Science*, 20(1): 4–14.

Zhang YQ, Wang JJ, Ding W, Zhao ZM, 2004. Heat shock proteins in insects. *Chinese Bulletin of Entomology*, 41(1): 16–19. [张永强, 王进军, 丁伟, 赵志模, 2004. 昆虫热休克蛋白的研究概况. 昆虫知识, 41(1): 16–19.]