韭菜迟眼蕈蚊热休克蛋白 *BoHsp70* 的克隆及热胁迫下的表达分析*

程佳旭[1, 2**] 付步礼[1, 2] 李传仁[1] 张友军[2***]

（1. 长江大学农学院，荆州 434025；2. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所，北京 100081）

摘 要 【**目的**】本研究旨在克隆韭菜眼蕈蚊 *Bradysia odoriphaga* 热休克蛋白 *Hsp70* 基因，并对其进行序列和表达模式分析，以及探讨该基因在韭菜迟眼蕈蚊生长发育及响应温度胁迫方面的作用。【**方法**】选择韭菜迟眼蕈蚊温度转录组中高温下表达上调的 *Hsp70* 序列，设计其基因引物扩增序列，构建 qRT-PCR 检测体系分析该虫在短时高温热激（30、32、34 和 36 ℃；1、2、4、6、8、10 和 12 h）和高温热激后不同恢复时间（25 ℃；1 h、2 h）下的 *Hsp70* 表达谱。【**结果**】获得韭菜迟眼蕈蚊 *Hsp70* 基因 cDNA 全长序列并命名为 *BoHsp70*（GeneBank 登录号：MW250640），包含 1 971 bp 的开放阅读框，编码 656 个氨基酸，具有真核生物 *Hsp70* 基因家族的 3 个保守序列，同时在 C-末端具有 *KDEL* 序列，推测其属于内质网型热休克蛋白。BLAST 分析和氨基酸序列系统发育分析结果显示，韭菜迟眼蕈蚊与双翅目蝇类昆虫 *Hsp70* 聚类为一个分支。*BoHsp70* 在韭菜迟眼蕈蚊体内不同发育阶段中都有表达，雄成虫体内的表达量高于雌成虫，且在雌雄成虫头部表达量的差异显著。高温胁迫可诱导 *BoHsp70* 表达，并在诱导 1-2 h 内达到最高水平。在 30、32 和 34 ℃热激条件下随热激时间的增加，*BoHsp70* 表达量呈下降趋势，而在 36 ℃热激下，*BoHsp70* 表达水平不变。韭菜迟眼蕈蚊在解除高温热激后，*BoHsp70* 表达水平随着恢复时间的增长而下降。【**结论**】韭菜迟眼蕈蚊可以通过调节体内 *Hsp70* 的表达来应对不良的环境温度。

关键词 韭菜迟眼蕈蚊；高温胁迫；热休克蛋白 *Hsp70*；昆虫耐热性

Cloning the *Bradysia odoriphaga* heat shock protein 70 gene and analysis of its expression under heat stress

CHENG Jia-Xu[1, 2**] FU Bu-Li[1, 2] LI Chuan-Ren[1] ZHANG You-Jun[2***]

(1. College of Agriculture, Yangtze University, Jingzhou 434025, China; 2. Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract **[Objectives]** To clone the *Bradysia odoriphaga* heat shock protein *Hsp70* gene, analyze its gene sequence and mRNA expression profiles, and investigate its function in development and the thermal stress response. **[Methods]** PCR primers were designed to amplify a full-length fragment of the *Hsp70* gene based on the nucleotide sequence of *B. odoriphaga* obtained from transcriptome data. A real-time, fluorescence, quantitative detection system was established to detect *Hsp70* expression in *B. odoriphaga* during exposure to high temperatures for different periods (30, 32, 34 and 36 ℃; 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h) and after different recovery periods at 25 ℃ (1 h, 2 h). **[Results]** The full-length *B. odoriphaga Hsp70* gene was obtained and named *BoHsp70* (GenBank accession number: MW250640). This gene contained a 1 971 bp open reading frame (ORF) and encoded 656 amino acids. Its amino acid sequence contains three *Hsp70* family conserved sequences and a *KDEL* motif in the C-terminal region, indicating that *Hsp70* is a member of the endoplasmic reticulum family of heat shock proteins.

*资助项目 Supported projects：国家重点研发计划（2017YFD0200600；2017YFD0201600；2017YFD0200603）；现代农业产业技术体系专项（CARS-24-C-02）；蔬菜有害生物控制与优质栽培北京市重点实验室和中国农业科学院科技创新工程（AAS-ASTIP-IVFCAAS）

**第一作者 First author，E-mail：chengjx8023@163.com

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

收稿日期 Received：2020-11-17；接受日期 Accepted：2021-03-22

BLAST analysis of amino acid sequences indicates that *BoHsp70* is very similar to the *Hsp70* genes of Dipteran insects, and it clustered on the same branch as Dipteran *Hsp70* genes on a phylogenetic tree. *BoHsp70* was expressed in different developmental stages of *B. odoriphaga*. Expression was higher in male adults than in females and was significantly different in the heads of male and female adults. Exposure to a high temperature induced expression of *BoHsp70* which peaked after 1-2 h. *BoHsp70* expression decreased with the duration of exposure at 30, 32 and 34 ℃, but remained constant over time at 36 ℃. After heat shock treatment, *BoHsp70* expression decreased with the duration of recovery time at 25 ℃. **[Conclusion]** Collectively, these findings indicate that *B. odoriphaga* can regulate *BoHsp70* expression in response to high temperature stress.

Key words　*Bradysia odoriphaga*; heat stress; heat shock protein 70 (Hsp70); insect heat tolerance

温度是影响昆虫生命活动的重要非生物因子（Umina *et al.*，2005；Broufas *et al.*，2009；Forster *et al.*，2011）。昆虫在自然条件中的长期进化下发展出了一系列的策略来避免环境的变化（如气候变化、温室效应、极端天气等）所造成的伤害（Sonna *et al.*，2002；Sørensen *et al.*，2003）。其中，热休克蛋白（Heat shock proteins，Hsps）是生物体内广泛存在的一类能够抵抗高温和干旱等不良环境的应激蛋白（Gething，1999；Agashe and Harlt，2000），包括 *Hsp100*、*Hsp90*、*Hsp70*、*Hsp60*、*Hsp40* 和 small *Hsp*（*sHsp*）6 个家族（Ritossa，1962）。众多研究表明，*Hsp70* 作为昆虫热休克蛋白家族中重要且保守的成员，具强烈的温度敏感性（郝春凤等，2016），其在多种昆虫应对高温不利条件下避免伤害而发挥重要作用（郑丹等，2010；Lü and Wan，2011）。

韭菜迟眼蕈蚊 *Bradysia odoriphaga* 是我国重要的地下害虫，其幼虫俗称韭蛆（杨集昆和张学敏，1985）。韭蛆取食 7 科 30 多种植物根茎，对韭菜尤为喜爱（冯惠琴和郑方强，1987）。研究发现，我国北京、山东、湖北等多地的韭蛆种群在春秋两季高发，夏冬两季少有发生（史彩华等，2016；谢超等，2016；孔海龙等，2017；李朝霞等，2019），暗示着季节温度变化影响韭蛆种群动态，特别是夏季高温不利于其种群发生。此外，中国农业科学院蔬菜花卉研究所张友军团队发现高温对韭菜迟眼蕈蚊的发育、存活与繁殖等重要生物学指标有显著的负面影响（Cheng *et al.*，2017），基于此研发了“日晒高温覆膜法”防治韭蛆绿色防控新技术（Shi *et al.*，2018）。因此，上述研究说明高温对韭蛆的生命活动具有重要影响，但是至今对于该虫应对高温热激的内在响应特征与耐热适应性机制却知之甚少。

综上，鉴于 *Hsp70* 在昆虫应对高温胁迫下发挥着重要作用，前期韭菜迟眼蕈蚊温度胁迫转录组研究中得到的结果表明韭蛆热休克蛋白在不同温度胁迫下差异表达，其中 *Hsp70* 在 40 ℃下表达上调，在 4 ℃下表达下调（Cheng *et al.*，2020）。基于转录组数据，本研究克隆获得韭蛆 *Hsp70* cDNA 的全长序列，采用 qRT-PCR 方法分析不同高温胁迫和常温恢复下韭蛆 *Hsp70* 在 mRNA 水平上表达量的变化，以期了解韭菜迟眼蕈蚊在其抵抗高温胁迫中的分子机制，为深入研究该虫的温度耐受性机制奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料

供试虫源：采用 Cheng 等（2020）方法用韭菜进行韭菜迟眼蕈蚊的室内继代饲养至 20 代并用于后续试验。

主要试剂：采用李世香等（2019）所用 RNA 提取试剂、反转录试剂、载体和感受态和荧光定量试剂为 FastFire qPCR PreMix (SYBR Green)（TIANGEN，中国）。

1.2　不同龄期、不同体段、不同温度及时间热激处理后韭菜迟眼蕈蚊样本的收集

不同龄期韭菜迟眼蕈蚊样品的收集：收集 1 日龄卵、2 日龄卵、3 日龄卵各 300 粒；1 龄幼虫 100 头；2 龄幼虫 50 头；3 龄幼虫 30 头；4 龄幼虫 10 头；1-5 日龄蛹各 10 头；雌成虫和雄

成虫各 10 头。

韭菜迟眼蕈蚊成虫的不同体段样品收集：在显微镜下解剖虫体，分别收集雌虫、雄虫的头部、胸部和腹部 3 个体段。

不同温度与时间热激后的样品收集：挑取长势一致的韭菜迟眼蕈蚊 4 龄幼虫 30 头置于底部有琼脂（浓度为 2.5%）的培养皿中，并将培养皿置于不同温度的人工气候箱中进行热激。分别在 30、32、34 和 36 ℃下热激 1、2、4、6、8、10 和 12 h。热激后，收集上述共 28 组实验组中存活的幼虫各 5 头，并将热激后的幼虫转入 25 ℃人工气候箱中进行室温（25 ℃）恢复 1 h 和 2 h。待恢复后，收集共 56 组实验组中的幼虫各 5 头，并以 25 ℃饲养的幼虫作为对照组。

按照上述不同的取样方式，每个处理样品收集 3 管作为 3 次生物学重复，收集后存放于 - 80 ℃，用于 RNA 提取、反转录操作以及 qRT-PCR 检测。

1.3 韭菜迟眼蕈蚊 *Hsp70* 基因的克隆及序列分析

参照 Cheng 等（2020）方法，采用 Trizol（Trizol Reagent，北京生化科技有限公司）方法对韭菜迟眼蕈蚊进行 RNA 抽提。经 Nanodrop 2100（Thermo Fisher，美国）检测后，取 1 μg 总 RNA 作为模板，按照反转录试剂盒说明书合成 cDNA 第一链，并保存于 - 20 ℃备用。

依据转录组数据，经 NCBI 网站序列比对鉴定后获得韭菜迟眼蕈蚊 *Hsp70* 核苷酸序列。利用 Primer 5.0 软件设计引物（表 1），引物由北京擎科生物技术有限公司合成，以上述合成的 cDNA 为模板进行常规 PCR，对该基因的序列进行验证。20 μL 常规 PCR 反应体系：2 × Taq PCR MasterMix Ⅱ 10 μL、引物 *BoHsp70* F/R（表 1）各 1 μL、模板 cDNA 1 μL、ddH_2O 7 μL。反应条件：94 ℃预变性 5 min；94 ℃变性 45 s，60 ℃退火 1 min，72 ℃延伸 3 min，共 35 个循环；72 ℃延伸 10 min；4 ℃保存。PCR 产物经回收、连接转化、摇菌后送到北京擎科生物技术有限公司测序。测序结果用 DNAMAN 软件和原序列比对验证。

将测序所得序列在 NCBI 中用 BLAST（http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi）工具进行核酸序列的同源性分析，利用在线软件 ORF Finder（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.Html）查找序列的开放阅读框并预测其编码的氨基酸序列。运用在线工具 ExPASy（http://web.expasy.org/compute_pi/）预测蛋白的分子量、等电点等理化性质。

表 1 本试验所用引物

Table1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列（5′-3′） Primer sequence（5′-3′）	引物长度（bp） Primer length	扩增片段长度（bp） Product size	目的 Purpose
BoHsp70 F	GACGACGGTTTGTTCATCAGT	21	2 398	扩增全长
BoHsp70 R	CTGCCGAGTGTGTCTTCTTG	20		Amplification of full-length
BoHsp70 qF	AGAACTCGAAGCCACACGTT	20	113	qPCR
BoHsp70 qR	GTAAGCCTCTGCGGTTTCCT	20		
RPS15 qF	ATCGTGGCGTCGATTTGGAT	20	164	qPCR
RPS15 qR	CTCATTTGGTGGGGCTTCCT	20		
RPL28 qF	CGTGCCCGACATTTTCATCA	20	180	qPCR
RPL28 qR	GACCAAGCCACTGTAACGGA	20		

1.4 韭菜迟眼蕈蚊 *Hsp70* 基因的系统进化分析

利用 NCBI 将韭菜迟眼蕈蚊 *Hsp70* 基因推导出来的氨基酸序列进行同源检索比对，选取意蜂 *Apis mellifera*（登录号：NP_001153524.1）、美洲东部熊蜂 *Bombus impatiens*（登录号：XP_003490896.1）、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*（登录号：XP_015838368.1）、马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata*（登录号：XP_023015278.1）、家蚕 *Bombyx mori*（登录号：NP_001036837.1）、黑脉金斑蝶 *Danaus plexippus plexippus*（登录号：

OWR50998.1）、埃及伊蚊 *Aedes aegypti*（登录号：XP_021707218.1）、达氏按蚊 *Anopheles darlingi*（登录号：ETN60336.1）、致倦库蚊 *Culex quinquefascia*（登录号：XP_001845218.1）、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*（登录号：NP_727563.1）、地中海实蝇 *Ceratitis capitata*（登录号：XP_004535077.1）、家蝇 *Musca domestica*（登录号：XP_005184291.1）12 种昆虫的 *Hsp70* 氨基酸序列，使用 DNAMAN 8.0 软件对以上 13 种昆虫 *Hsp70* 的氨基酸序列进行多重序列比对。利用 Mega 6.0 软件以邻接（Neighbor-Joining，NJ）法构建系统进化树，序列中的缺失采用 partial deletion（95%）删除，选用 Poisson 模型计算两两序列间的遗传距离，并对生成树的各分支进行 1 000 次重复抽样检测其置信度。

1.5　韭菜迟眼蕈蚊 *Hsp70* 基因的荧光定量 PCR

以 *BoHsp70* qF/*BoHsp70* qR（表 1）为特异性引物，韭菜迟眼蕈蚊 *RPS15* 和 *RPL28* 为内参基因（Shi *et al.*，2016），利用荧光定量试剂进行 qRT-PCR 来检测韭菜迟眼蕈蚊 *Hsp70* 基因在各发育龄期、雌雄成虫各体段样品以及不同温度与时间热应激下的相对表达量。20 μL 的 qPCR 反应体系为 2 × FastFire qPCR PreMix 10 μL、上下游引物各 0.6 μL、cDNA 模板 1 μL、50 × ROX Reference Dye 0.4 μL、RNase-Free ddH_2O 7.4 μL。反应条件为 95 ℃预变性 1 min；95 ℃变性 5 s，60 ℃退火/延伸 15 s，共 40 个循环。每个生物学重复设置 3 次技术重复。荧光定量结果根据目的基因和内参基因的 CT 值，采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行数据分析。样品结果组间差异采用 SPSS 19.0 软件中的 ANOVA 法进行单因素方差分析，用 Turkey 法进行差异性显著性检验，并采用 GraphPad Prism 8 软件对结果进行作图。

2　结果与分析

2.1　韭菜迟眼蕈蚊 *BoHsp70* 基因的克隆

分别以 *BoHsp70* F/R 为引物、韭菜迟眼蕈蚊 4 龄幼虫 cDNA 为模板，扩增 *Hsp70* 基因，目的片段经回收、连接转化后菌液测序，得到 *Hsp70* 基因核苷酸序列并命名为 *BoHsp70*（GenBank 登录号：MW250640）。序列分析结果显示，*BoHsp70* 基因开放阅读框为 1 971 bp，编码 656 个氨基酸（图 1）。预测分子量为 72.6 ku，理论等电点为 5.09。*BoHsp70* 基因氨基酸序列包含 3 个 *Hsp70* 家族氨基酸多肽链高度保守序列以及内质网 *Hsp70* 的特征序列，因此可被认定为热休克蛋白 70 家族基因。

2.2　韭菜迟眼蕈蚊 *BoHsp70* 的系统进化分析

氨基酸多序列比对结果表明韭菜迟眼蕈蚊 *BoHsp70* 的氨基酸序列和其他 12 种昆虫 *Hsp70* 氨基酸序列的一致性很高，约为 87.25%-91.01%，其中与双翅目果蝇的序列一致性最高，为 91.01%（图 2）。系统进化树分析结果表明，韭菜迟眼蕈 *BoHsp70* 与双翅目蝇类昆虫进化关系最近，分属同支（图 3）。

2.3　*BoHsp70* 在韭菜迟眼蕈蚊中的表达模式

荧光定量 PCR 结果分析表明，*BoHsp70* 在韭菜迟眼蕈蚊生长发育的各个时期均有表达，且在不同发育阶段呈现出不同的表达模式。*BoHsp70* 在卵期和蛹期的表达量随着发育日龄的增加而增加，在幼虫期中以 1 龄幼虫的表达量为最高，在成虫期中雄成虫的表达量高于雌成虫（图 4：A）。*BoHsp70* 在韭菜迟眼蕈蚊成虫的不同体段中都有表达，在雌成虫头部、胸部、腹部体段中表达差异不显著（P>0.05），而在雄成虫头部、胸部、腹部体段中表达差异显著（P<0.05），在头部中表达量最高，是腹部的 5.75 倍（图 4：B）。

2.4　高温热激后韭菜迟眼蕈蚊 *BoHsp70* 基因的表达分析

韭菜迟眼蕈蚊 *BoHsp70* 的相对表达量在 30、32、34 和 36 ℃下热激 1 h 或 2 h 即可达到峰值，并且峰值随着热激温度的升高而增加并趋于稳定，分别是对照组（25 ℃）的 5、24、21 和 24 倍。在不同热激温度处理下，*BoHsp70* 的相对表达量变化很大，在 30 ℃热激下，*BoHsp70* 的相对表达量随着热激时间的增加而缓慢减少并最终为对照组的 3 倍；在 32 ℃和 34 ℃热激下，

图 1 韭菜迟眼蕈蚊 *BoHsp70* 基因核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *BoHsp70* in *Bradysia odoriphaga*

ATG 为起始密码子；*表示终止密码子 TAA；起始密码子和终止密码子均用黑色粗体标出；用灰色标出 *Hsp70* 保守序列；下划线标出内质网 *Hsp70* 特征序列。

ATG is the start codon; An asterisk indicates the stop codon TAA; The start and stop codons are marked in bold black; *Hsp70* conversed sequence is outlined in gray; Endoplasmic reticulum *HSP70* characteristic sequence is underlined.

BoHsp70 的相对表达量随着热激时间的增加而迅速减少并最终为对照组的 8 倍和 9 倍；在 36 ℃热激下，*BoHsp70* 的相对表达量随着热激时间的增加而稳定在对照组的 20 倍（图 5）。

韭菜迟眼蕈蚊在不同热激温度及时间处理下并经室温恢复后的 qRT-PCR 结果表明，*BoHsp70* 的相对表达量在室温恢复后有所降低。在 30 ℃热激 1-12 h 并经室温恢复 2 h 后，*BoHsp70* 的相对表达量基本与对照组无显著性差异（P>0.05）；在 32 ℃和 34 ℃热激 1-12 h 后，随着室温恢复时间的增加，*BoHsp70* 的相对表达量显著降低（P<0.05）；在 36 ℃热激 1-12 h 后，随着室温恢复时间的增加，*BoHsp70* 的相对表达量降低并显著高于对照（P<0.05）（图 6）。

3 讨论

本研究克隆获得了韭菜迟眼蕈蚊 *Hsp70* 基因的 cDNA 全长，命名为 *BoHsp70*（GenBank 登录号：MW250640）。该基因的开放阅读框为 1 971 bp，编码 656 个氨基酸，且具有真核生物 *Hsp70* 基因的 3 个氨基酸多肽链高度保守序列，同时在 C-末端具有 *KDEL* 序列，推断韭菜迟眼蕈蚊 *BoHsp70* 属于内质网型热休克蛋白基因。氨基酸多序列比对结果表明韭菜迟眼蕈蚊 *BoHsp70* 与其它 12 种昆虫的相似性在 87%以上，且与双翅目果蝇科果蝇相似性高达 91.01%，证实 *Hsp70* 基因的高度保守。在形态学上，韭菜迟眼蕈蚊幼虫看起来类似于蝇类幼虫，成虫看起来类似于蚊类成虫。然而，对于其与双翅目昆虫的进化关系研究比较少见。在本研究中的氨基酸序列系统进化聚类分析结果表明，韭菜迟眼蕈蚊与蝇类昆虫中的地中海实蝇 *Ceratitis capitata*、家蝇 *Musca domestica*、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 聚集在一支，然而蚊类昆虫达氏按蚊 *Anopheles darlingi*、埃及伊蚊 *Aedes aegypti*、致倦库蚊 *Culex*

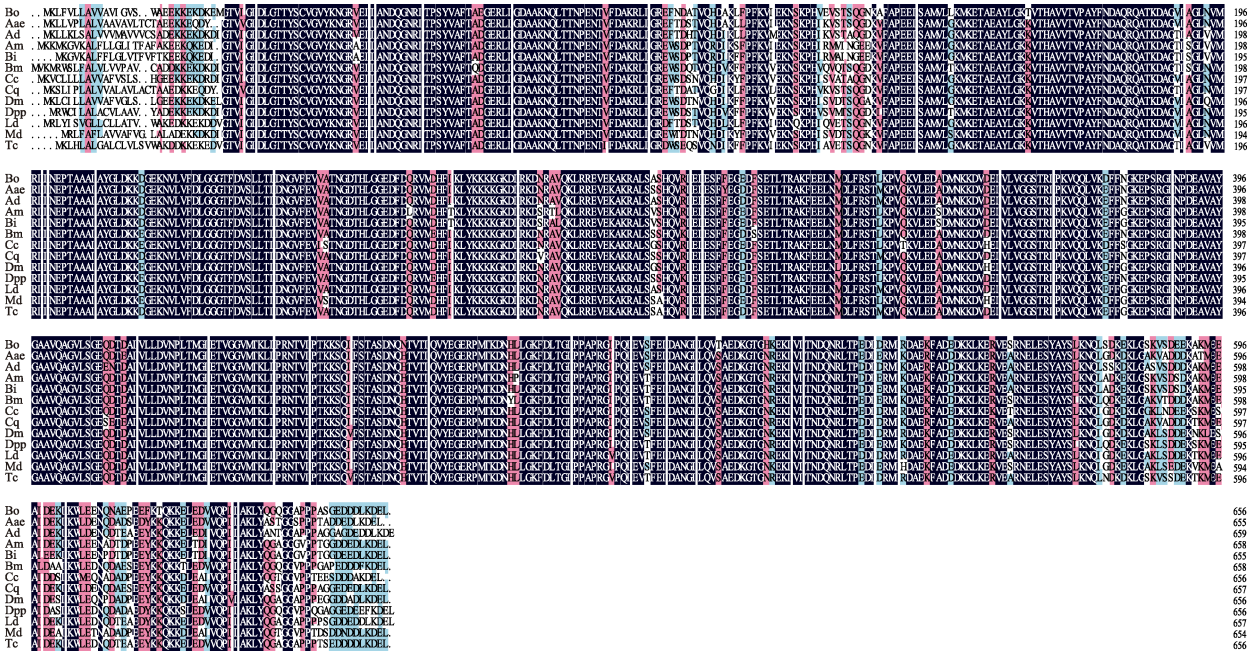

图 2　韭菜迟眼蕈蚊与其他 12 种昆虫的 *Hsp70* 氨基酸序列比对

Fig. 2　Sequence alignment of *Hsp70* amino acids of *Bradysia odoriphaga* and other 12 insects

黑色代表 100%的序列一致性，红色代表 75%的序列一致性，蓝色代表小于或等于 50%的序列一致性，虚线表示此位氨基酸在对齐比较中不存在。Aae：埃及伊蚊；Ad：达氏按蚊；Am：意蜂；Bi：美洲东部熊蜂；Bm：家蚕；Bo：韭菜迟眼蕈蚊；Cc：地中海实蝇；Cq：致倦库蚊；Dm：黑腹果蝇；Dpp：黑脉金斑蝶；Ld：马铃薯甲虫； Md：家蝇；Tc：赤拟谷盗。

Black represents 100% identity; Red represents 75% identity and blue represents ≤50% identity; The dotted line represents that the amino acid does not exist in alignment comparison. Aae: *Aedes aegypi*; Ad: *Anopheles darlingi*; Am: *Apis mellifera*; Bi: *Bombus impatiens*; Bm: *Bombyx mori*; Bo: *Bradysia odoriphaga*; Cc: *Ceratitis capitata*; Cq: *Culex quinquefascia*; Dm: *Drosophila melanogaster*; Dpp: *Danaus plexippus plexippus*; Ld: *Leptinotarsa decemlineata*; Md: *Musca domestica*; Tc: *Tribolium castaneum*.

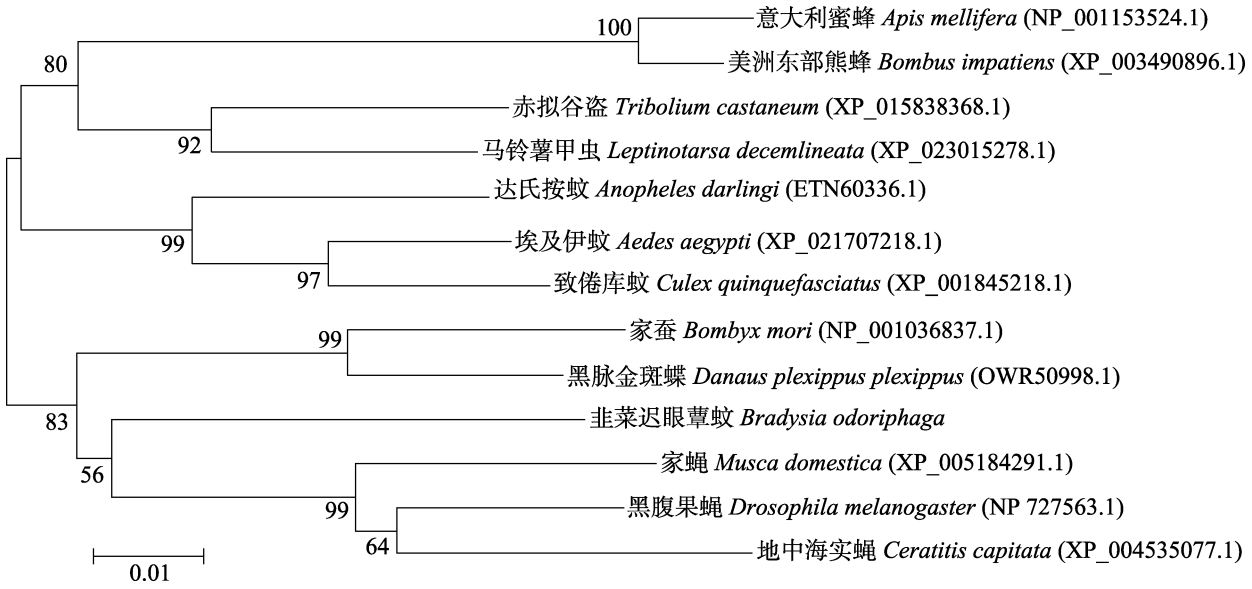

图 3　基于邻接法构建的韭菜迟眼蕈蚊与其他 12 种昆虫 *Hsp70* 氨基酸的系统发育树

Fig. 3　Phylogenetic tree of *Hsp70* amino acids between *Bradysia odoriphaga* and other 12 insects based on Neighbor-Joining method

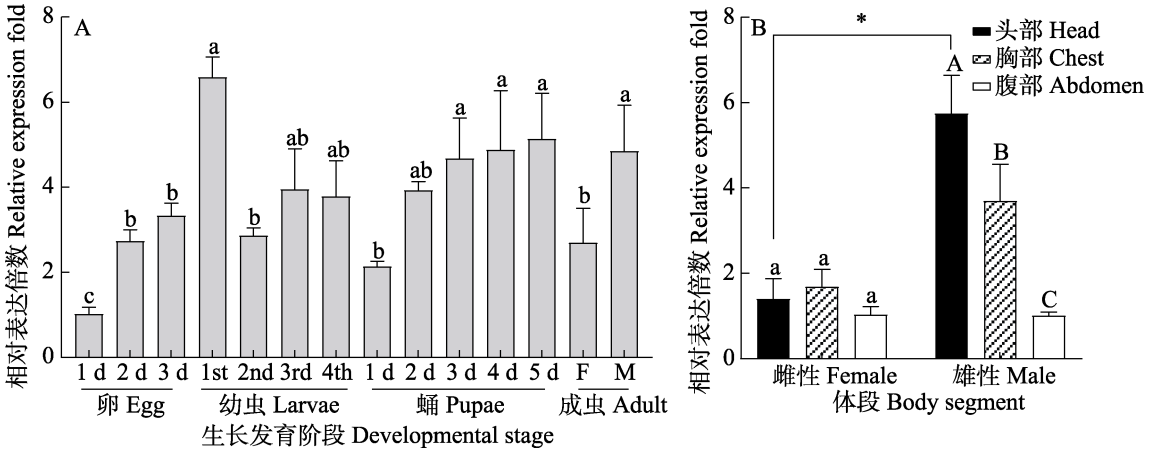

图 4 *BoHsp70* 在韭菜迟眼蕈蚊中的表达模式

Fig. 4 Expression pattern of *BoHsp70* in *Bradysia odoriphaga*

数据为平均数±标准误差。柱上标有不同大、小写字母表示经 Turkey 新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。*表示经 Turkey 新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异极显著。1 d：1 日龄；2 d：2 日龄；3 d：3 日龄；4 d：4 日龄；5 d：5 日龄；1st：1 龄；2nd：2 龄；3rd：3 龄；4th：4 龄；F：雌；M：雄；Egg：卵；Larvae：幼虫；Pupae：蛹；Adult：成虫。Head：成虫头部；Chest：成虫胸部；Abdomen：成虫腹部。

Data are mean ± SE. Histograms with different letters indicate significant difference at the 0.05 level by Turkey's new multiple range test. * indicates extremely significant difference at the 0.05 level by Turkey's new multiple range test. 1 d: 1st day old; 2 d: 2nd day old; 3 d: 3rd day old; 4 d: 4th day old; 5 d: 5th day old; 1st: 1st instar; 2nd: 2nd instar; 3rd: 3rd instar; 4th: 4th instar; F: Female; M: Male. Head: Adult head; Chest: Adult chest; Abdomen: Adult abdomen.

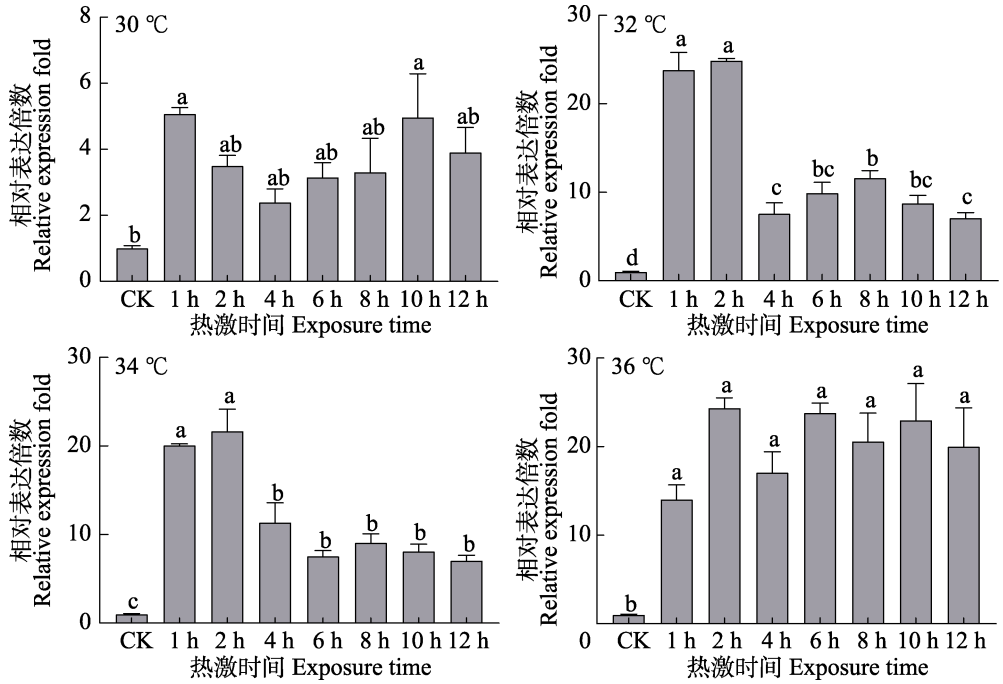

图 5 不同温度和时间处理下韭菜迟眼蕈蚊 *BoHsp70* 的表达分析

Fig. 5 Expression analysis of *BoHsp70* in *Bradysia odoriophaga* under different heat shock temperature and time

数据为平均数±标准误差，柱上标有不同字母表示经 Turkey 新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。CK 表示在 25 ℃条件下 *BoHsp70* 的表达情况。下图同。

Data are mean ± SE. Histograms with different small letters indicate significant difference at the 0.05 level by Turkey's new multiple range test. CK indicates the expression of *BoHsp70* at 25 ℃. The same below.

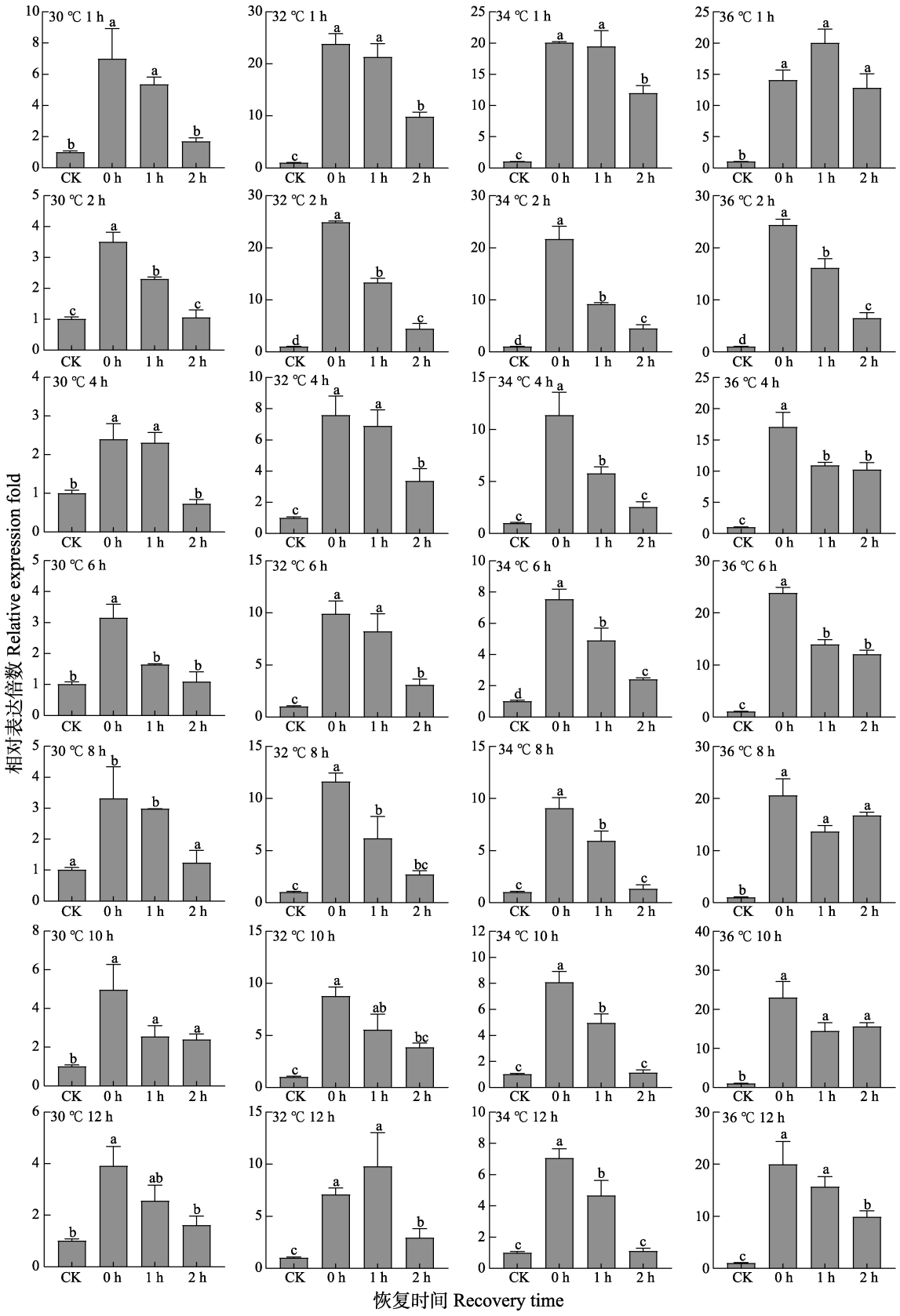

图 6　不同温度和时间处理后不同恢复时间韭菜迟眼蕈蚊 *BoHsp70* 的表达分析

Fig. 6　Expression analysis of *BoHsp70* in *Bradysia odoriophaga* at different recovery times after different heat shock temperature and time

quinquefasciatus 则另聚类为一支。*Hsp70* 基因在蝇类昆虫与蚊类昆虫聚类在不同分支的情况在瓜实蝇 *Bactrocera cucurbitae Hsp70* 的研究中也同样存在（姜建军等，2015）。这种结果表明韭菜迟眼蕈 *BoHsp70* 与蝇类昆虫亲缘关系更近，推测其 *Hsp70* 功能的分化早于其形态学上的进化。

已有研究表明 *Hsp70* 基因参与调控昆虫的生长发育（Pettersen *et al.*，2004；Ravaux *et al.*，2007；Sharma *et al.*，2007）。不同昆虫种内的 *Hsp70* 基因表达量在各发育阶段的变化并不一致且具有物种特异性，例如 *Hsp70* 基因在灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 的 1 龄若虫阶段表达量最高（张青等，2015），而沙葱萤叶甲 *Galeruca daurica* 的 *Hsp70* 基因在卵期的表达量最高（谭瑶等，2017）。全变态昆虫发育阶段转换的波动体现在相关基因表达量的变化（Gala *et al.*，2013）。在本研究中，*BoHsp70* 的表达量在韭菜迟眼蕈蚊的不同生长发育阶段中有变化且在 1 龄幼虫中最高，Lu 等（2014）在二化螟 *Chilo suppressalis* 幼虫中也发现了类似的现象并推测 *CsHsp70* 在 1 龄幼虫期的高表达是由于其面临外界环境压力而引发的应激状态。而 *BoHsp70* 的表达量在韭菜迟眼蕈蚊卵期与蛹期中随着发育的成熟而逐渐增加，表明了韭菜迟眼蕈蚊 *BoHsp70* 基因参与到卵期与蛹期的发育过程。*Hsp70* 基因的表达在昆虫不同性别中存在差异，*Hsp70* 在梨小食心虫 *Grapholitha molesta* 雌成虫中的表达量高于其在雄成虫中的表达量，表明了 *GmHsp70* 的诱导表达在雌性中比在雄性中更加敏感（Chen *et al.*，2013），而 *Hsp70* 在灰飞虱 *L. striatellus* 雄成虫中的表达量高于其在雌成虫中的表达量，表明了 *LsHsp70* 参与了灰飞虱的生殖调控（张青等，2015）。在本研究中，*BoHsp70* 在雄成虫中的表达量高于雌成虫，对此，我们认为 *BoHsp70* 可能参与了韭菜迟眼蕈蚊的生殖调控，然而有关韭蛆性别研究的报道目前较少，*BoHsp70* 在韭菜迟眼蕈蚊不同性别中的作用机制仍需进一步研究。*BoHsp70* 在韭菜迟眼蕈蚊雌、雄成虫不同体段中的表达结果表明在胸部以及腹部的表达无差异，而在头部表达差异显著。同样的结果在苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* 中有过报道（Yang *et al.*，2016）。因此，*BoHsp70* 在韭菜迟眼蕈蚊成虫头部的转录水平暗示着这个基因与神经系统处理功能可能相关，但其作用机制仍需进一步研究。

Hsp70 基因参与昆虫的热应激反应从而帮助变形蛋白质恢复正确构象（Deane and Woo，2005）。当昆虫受到高温胁迫时，其体内的 *Hsp70* 蛋白含量会增加几十倍甚至几百倍（马文静和马纪，2012）。黄粉虫 *Tenebrio molitor* 在 42 ℃热激 1 h 后，其体内 *Hsp70* 的表达量上升了 26.9 倍（黄琼等，2013）。温室白粉虱 *Trialeurodes vaporariorum* 的 *Hsp70* 基因在 36 ℃诱导下表达上升了近 400 倍（王海鸥和雷仲仁，2010）。本研究发现，韭菜迟眼蕈蚊 *BoHsp70* 的表达量在 30、32、34、36 ℃热激处理 1-2 h 时达到最大值，分别是对照（25 ℃）的 5、24、21 和 24 倍。然而，随着热激时间的增长，*BoHsp70* 的响应强度和方式对不同热激温度有较大的差异。*MpHsp70* 在不同的高温胁迫中表现出不同的响应强度在小胸鳖甲 *Microdera punctipennis* 中有也过报道（马文静和马纪，2012）。*BoHsp70* 的表达在 30、32、34 ℃热激下随热激时间的增加显著降低，而在 36 ℃热激下持续在高水平。这说明 *BoHsp70* 表达量在不同热激强度与时长下的动态变化与韭菜迟眼蕈蚊抵抗高温和热适应性密切相关。有研究指出，当昆虫在高温环境下，*Hsp70* 的初始表达导致 *Hsp70* 蛋白的大量累积来保护昆虫免受热胁迫，但当昆虫适应高温环境后，*Hsp70* 的长期转录似乎是不必要的（Lu *et al.*，2017）。李俊杰等研究（2004）也说明当昆虫处于过高的应激强度，或持续过长的应激时间，昆虫体内的热休克蛋白对细胞的保护作用“失效”而导致机体死亡。

有研究表明，当昆虫解除热激后，热休克蛋白表达将降低以确保昆虫适应常温环境变化（季璐等，2015）。本研究也发现，韭菜迟眼蕈蚊 *BoHsp70* 的表达水平在 30、32、34 ℃热激下经室温恢复 2 h 后可降低至室温水平，说明对韭菜迟眼蕈蚊解除热激后，*BoHsp70* 表达量降低也是

该虫重新适应常温环境的应激反应。另外，本研究发现在 36 ℃热激下，韭菜迟眼蕈蚊需更长时间才能将体内 *BoHsp70* 表达量降低至室温水平，这可能与该虫为适应高温而产生了适合度代价相关（Hoffmann，1995；Silbermann and Tatar，2000），从而使得 *BoHsp70* 恢复正常需要更多时间。

综上所述，本研究成功克隆了韭菜迟眼蕈蚊 *BoHsp70* 基因 cDNA 序列，明确了该虫响应热激下 *Hsp70* 表达规律，研究结果初步阐明了 *Hsp70* 与韭菜迟眼蕈蚊温度适应性密切相关，为进一步深入探讨该虫的温度耐受性机制提供了理论依据。

参考文献 (References)

Agashe VR, Hartl FU, 2000. Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 11(1): 15–25.

Broufas GD, Pappas ML, Koveos DS, 2009. Effect of relative humidity on longevity, ovarian maturation, and egg production in the olive fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 102(1): 70–75.

Chen H, Xu XL, Li YP, Wu JX, 2013. 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.

Cheng JX, Su Q, Jiao XG, Shi CH, Yang YT, Han HL, Xie W, Guo ZJ, Wu QJ, Xu BY, Wang SL, Zhang YJ, 2017. Effects of heat shock on the *Bradysia odoriphaga* (Diptera: Sciaridae). *Journal of Economic Entomology*, 110(4): 1630–1638.

Cheng JX, Su Q, Xia JX, Yang ZZ, Shi CH, Wang SL, Wu QJ, Li CR, Zhang YJ, 2020. Comparative transcriptome analysis of differentially expressed genes in *Bradysia odoriphaga* Yang et Zhang (Diptera: Sciaridae) at different acute stress temperatures. *Genomics*, 112(5): 3739–3750.

Deane EE, Woo NYS, 2005. Cloning and characterization of the hsp70 multigene family from silver sea bream: Modulated gene expression between warm and cold temperature acclimation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 330(3): 776–783.

Feng HQ, Zheng FQ, 1987. Studies of the occurrence and control of *Bradysia odoriphaga* Yang et Zhang. *Journal of Shandong Agricultural University*, 18(1): 71–80. [冯惠琴，郑方强，1987. 韭蛆发生规律及其防治研究. 山东农业大学学报, 18(1): 71–80.]

Forster JA, Hirst G, Woodward G, 2011. Growth and development rates have different thermal responses. *The American Naturalist*, 178(5): 668–678.

Gala A, Fang Y，Woltedji D, Zhang L, Han B, Feng M, Li J, 2013. Changes of proteome and phosphoproteome trigger embryo-larva transition of honeybee worker (*Apis mellifera ligustica*). *Journal of Proteomics*, 78(1): 428–446.

Gething MJ, 1999. Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 10(5): 465–472.

Hao CF, Wang HP, Zhang ZQ, Chang Y, Li ML, 2016. Characterization and expression analysis of *Hsp70* gene in *Dastarcus helophoroides*. *Journal of Northeast Forestry University*, 44(7): 108–124. [郝春凤, 王化鹏, 张正青, 常勇, 李孟楼, 2016. 花绒寄甲 *Hsp70* 基因的特征与表达. 东北林业大学学报, 44(7): 108–124.]

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

Huang Q, Hu J, Sun L, Wang Q, 2013. Cloning, sequence analysis and expression profiling of a heat shock protein 70 gene in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Acta Entomologica Sinica*, 56(5): 475–485. [黄琼, 胡杰, 孙灵, 王勤, 2013. 黄粉虫热休克蛋白 70 基因的克隆、序列分析与表达. 昆虫学报, 56(5): 475–485.]

Ji L, Cui XH, Zhu M, 2015. Effects of brief heat shock on the survival and *hsp70* expression of brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stål). *Journal of Plant Protection*, 42(4): 619–625. [季璐, 崔旭红, 朱敏, 2015. 短时高温胁迫对褐飞虱存活及其热激蛋白基因 *hsp70* 表达的影响. 植物保护学报, 42(4): 619–625.]

Jiang JJ, Wang FY, Huang LF, Chen HS, Li L, Yang L, 2015. Cloning and sequence analysis of heat shock protein 70 gene (*hsp70*) from *Bactrocera cucurbitae* Coquillett. *Journal of Southern Agriculture*, 46(5): 800–805. [姜建军, 王凤英, 黄立飞, 陈红松, 李磊, 杨朗, 2015. 瓜实蝇热激蛋白基因 *hsp70* 的克隆及序列分析. 南方农业学报, 46(5): 800–805.]

Kong HL, Wang C, Zheng MY, Mao N, Zhu SD, Zhang YJ, 2017. Overwintering habits and population dynamics of Chinese chive gnat *Bradysia odoriphaga* Yang et Zhang in Yangzhou city. *Journal of Plant Protection*, 44(4): 576–581. [孔海龙, 王成, 郑敏圆, 毛念, 祝树德, 张友军, 2017. 扬州市韭菜迟眼蕈蚊越冬习性及种群年动态变化规律. 植物保护学报, 44(4): 576–581.]

Li JJ, Sang RZ, Tian SJ, Feng ZH, 2004. The application of heat shock protein (*Hsp70*) in animal stress. *Ecology of Domestic Animal*, 25(3): 44–46. [李俊杰, 桑润滋, 田树军, 冯志华, 2004. 热激蛋白在动物应激中的应用. 家畜生态, 25(3): 44–46.]

Li SX, Peng ZK, Li CR, Shi CH, Wang SL, Xie W, Xu BY, Zhang YJ, 2019. Identification and expression of the calcium-binding protein in MED *Bemisia tabaci* (Gennadius). *Chinese Journal of Applied Entomology*, 56(2): 245–252. [李世香, 彭争科, 李传仁, 史彩华, 王少丽, 谢文, 徐宝云, 张友军, 2019. MED 烟粉虱钙结合蛋白的鉴定及表达分析. 应用昆虫学报, 56(2): 245–252.]

Li ZX, Xu NF, Song JP, Sun SN, Zhou Y, Wang ZB, Fu ZQ, 2019. Occurrence regularity and green control technology of *Bradysia odoriphaga* in Shandong province. *Agricultural Science and*

Technology Communication, 6: 315–317. [李朝霞, 许念芳, 宋计平, 孙胜楠, 周颖, 王振宝, 付在秋, 2019. 山东省韭菜迟眼蕈蚊发生规律及绿色防控技术. 农业科技通讯, 6: 315–317.]

Lu MX, Liu ZX, Cui YD, Du YZ, 2014. Expression patterns of three heat shock protein in *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 107(3): 667–673.

Lu K, Chen X, Liu WT, Zhang ZC, Wang Y, You KK, Li Y, Zhang RB, Zhou Q, 2017. Characterization of heat shock protein 70 transcript from *Nilaparvata Lugens* (Stål): Its response to temperature and insecticide stresses. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 142: 102–110.

Lü ZC, Wan FH, 2011. Using double-stranded RNA to explore the role of heat shock protein genes in heat tolerance in *Bemisia tabaci* (Gennadius). *The Journal of Experimental Biology*, 214(5): 764–769.

Ma WJ, Ma J, 2012. Cloning and sequence analysis of a heat shock protein gene (*Mphsp70*) from *Microdera punctipennis* and its expression in relation to high temperatures. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(2): 439–447. [马文静, 马纪, 2012. 小胸鳖甲热激蛋白基因（*Mphsp70*）的克隆、序列分析及温度对其表达的影响. 应用昆虫学报, 49(2): 439–447.]

Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE, 2004. UCSF Chimera-a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13): 1605–1612.

Ravaux J, Toullec JY, Leger N, 2007. First *Hsp70* from two hydrothermal vent shrimps, *Mirocaris fortunate* and *Rimicaris exoculata*: Characterization and sequence analysis. *Gene*, 386(1/2): 162–172.

Ritossa FM, 1962. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *drosophila*. *Experientia*, 18(12): 571–573.

Sharma S, Rohilla MS, Tiwari PK, 2007. Developmental and hyperthermia-induced expression of the heat shock proteins *HSP60* and *HSP70* in tissues of the housefly *Musca domestica*: An in vitro study. *Genetics and Molecular Biology*, 30(1): 159–168.

Shi CH, Hu JR, Wei QW, Yang YT, Cheng JX, Han HL, Wu QJ, Wang SL, Xu BY, Su Q, Li CR, Zhang YJ, 2018. Control of *Bradysia odoriphaga* (Diptera: Sciaridae) by soil solarization. *Crop Protection*, 114: 76–82.

Shi CH, Yang FS, Zhu X, Du E, Yang YT, Wang SL, Wu QJ, Zhang YJ, 2016. Evaluation of housekeeping genes for quantitative Real-time PCR analysis of *Bradysia odoriphaga* (Diptera: Sciaridae). *International Journal of Molecular Science*, 17(7): 1034.

Shi CH, Yang YT, Han HL, Cheng JX, Wu QJ, Xu BY, Zhang YJ, 2016. Population dynamics and summer and winter habitats of *Bradysia odoriphaga* in the Beijing area. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 53(6): 1174–1183. [史彩华, 杨玉婷, 韩昊霖, 程佳旭, 吴青君, 徐宝云, 张友军, 2016. 北京地区韭菜迟眼蕈蚊种群动态及越夏越冬场所调查研究. 应用昆虫学报, 53(6): 1174–1183.]

Silbermann R, Tatar M, 2000. Reproductive costs of heat shock protein in transgenic *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 54(6): 2038–2045.

Sonna LA, Fujita J, Gaffin SL, Lilly CM, 2002. Invited review: Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. *Journal of Applied Physiology*, 92(4): 1725–1742.

Sørensen JG, Kristensen TN, Loeschcke V, 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters*, 6(11): 1025–1037.

Tan Y, Zhang Y, Huo ZJ, Zhou XR, Shan YM, Pang BP, 2017. Molecular cloning and expression profiling of the heat shock protein gene *GdHsp70* in *Galeruca daurica* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Acta Entomologica Sinica*, 60(8): 865–875. [谭瑶, 张玉, 霍志家, 周晓榕, 单艳敏, 庞保平, 2017. 沙葱萤叶甲热激蛋白基因 *GdHsp70* 的克隆与表达模式分析. 昆虫学报, 60(8): 865–875.]

Umina PA, Weeks AR, Kearney MR, McKechine SW, Hoffmann AA, 2005. A rapid shift in a classic clinal pattern in *Drosophila* reflecting climate change. *Science*, 308(5722): 691–693.

Wang HO, Lei ZR, 2010. Cloning and inter-specific altered expression of heat shock gene *Hsp70* in two invasive whiteflies in response to thermal stress. *Chinese Journal of Ecology*, 29(4): 693–701. [王海鸥, 雷仲仁, 2010. 两种入侵粉虱热激基因 Hsp70 的克隆及温度胁迫下的种间差异表达. 生态学杂志, 29(4): 693–701.]

Xie C, He M, Li CR, 2016. Occurrence characteristics of *Bradysia odoriohaga* in Jianghan Plain Area. *Journal of Environmental Entomology*, 38(3): 535–540. [谢超, 贺敏, 李传仁, 2016. 江汉平原地区韭菜迟眼蕈蚊的发生特点. 环境昆虫学报, 38(3): 535–540.]

Yang JK, Zhang XM, 1985. Notes on the fragrant onion gnats with descriptions of two new species of *Bradysia* (Sciaridae: Diptera). *Acta Agriculture Universitatis Pekinensis*, 11(2): 153–156. [杨集昆, 张学敏, 1985. 韭菜蛆的鉴定迟眼蕈蚊属二新种（双翅目：眼蕈蚊科）. 北京农业大学学报, 11(2): 153–156.]

Yang XQ, Zhang YL, Wang XQ, Dong H, Gao P, Jia LY, 2016. Characterization of multiple heat shock protein transcripts from *Cydia pomonella*: Their response to extreme temperature and insecticide exposure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(21): 4288–4298.

Zhang Q, Lu MX, Zhu SD, 2015. Cloning, sequence analysis and expression profiling of two heat shock protein 70 genes in small brown plant hopper, *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae). *Jiangsu Journal of Agriculture Science*, 31(6): 1257–1264. [张青, 陆明星, 祝树德, 2015. 灰飞虱 2 种热激蛋白基因 *Hsp70* 的克隆、分析. 江苏农业学报, 31(6): 1257–1264.]

Zheng D, Cui XH, Li HL, Cai C, Gao YS, Shang HW, 2010. Cloning of heat shock protein gene, *Hsp70*, in *Liriamyza trifolii* and its expression under temperature stress. *Journal of Plant Protection*, 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.]